

Ehrlich腹水癌細胞とラット赤血球に対するセレン 化合物の細胞毒性の相違

齊藤 睦弘, 藤井 恒子, 本田 正宏, 米田 祥子,
前田 綾, 妹尾 晴美, 千熊 正彦
(大阪薬科大学*)

Differences in the cytotoxicity to Ehrlich ascites tumor cells and rat erythrocytes induced by selenium compounds

Yoshihiro SAITO, Tsuneko FUJII, Masahiro HONDA, Shoko YONEDA,
Aya MAEDA, Harumi SEO, Masahiko CHIKUMA
Osaka University of Pharmaceutical Sciences

To investigate the difference in the cytotoxicity of selenium compounds for Ehrlich ascites tumor cells (EATC) and rat erythrocytes (RBC), we have compared the time dependent appearance of cell injury induced by sodium selenite and diethyldithiocarbamate selenotrisulfide (SeT). For evaluation of cytotoxicity, viability(%) of EATC or lysed RBC(%) was determined by trypan blue exclusion or by spectrophotometry after the incubation with these compounds. The SeT had much higher cytotoxicity to both EATC and RBC than sodium selenite. However, significant RBC lysis was observed at an earlier stage for SeT than for sodium selenite when they were compared under the conditions which gave similar lysis(%) values after 5 hr incubation. In contrast to RBC, cytotoxicity of sodium selenite to EATC appeared at an earlier time than that of SeT when they were compared in doses giving similar viability after 5hr treatment. In the case of EATC, it was suggested that sodium selenite decreases some cellular functions, such as mitochondrial function, than SeT, because faster decrease of the mitochondrial membrane potential was observed for sodium selenite treatment. These results indicate that selenium compounds show different time profile of the appearance of cytotoxic activity depending not only on their chemical forms but also on cell species studied.

* 所在地：大阪府高槻市奈佐原4-20-1 (〒569-1094)

結果と考察

亜セレン酸およびDEDC-SeTは、いずれもEATCに対して細胞毒性を示し、細胞生存率は処理時間と化合物濃度の増加とともに低下した (Fig. 1)。しかし、DEDC-SeTは亜セレン酸の10分の1の濃度でも、亜セレン酸と同程度の生存率低下をおこした。

RBCに対して、亜セレン酸とDEDC-SeTは、いずれも化合物濃度および処理時間依存的な溶血活性を示したが、その活性はDEDC-SeTの方が大きかった (Fig. 2)。亜セレン酸の場合、10mMまでの濃度範囲では、1時間後の溶血はほとんど認められなかったが、2時間目以後、溶血率の上昇が観察された (Fig. 2(a))。一方、DEDC-SeTの場合は、1時間インキュベーション後でも有意な溶血が観測された (Fig. 2(b))。

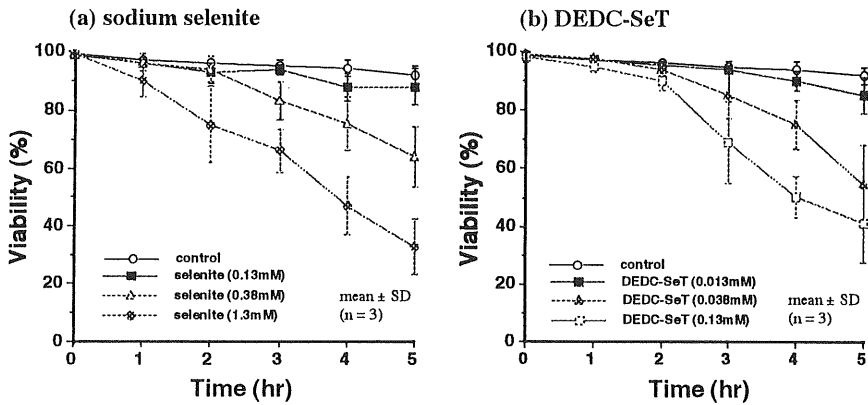


Fig. 1 Effect of selenium compounds on EATC viability

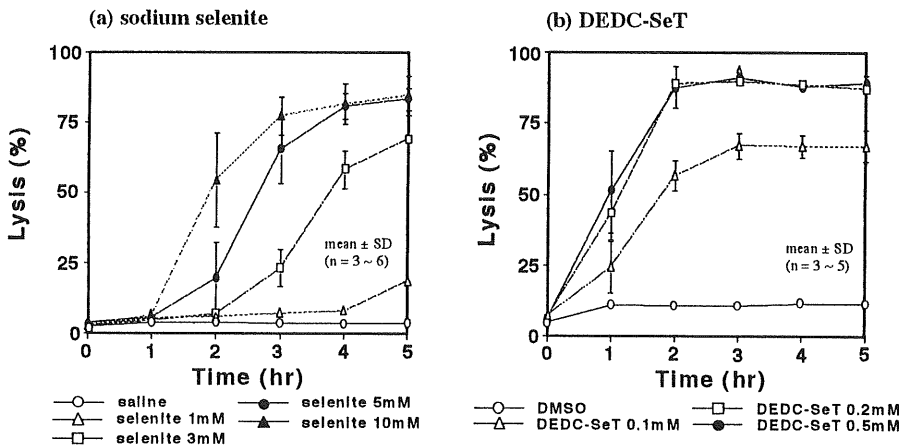


Fig. 2 Red blood cell lysis induced by selenium compounds

Fig. 1とFig. 2を用量-反応曲線の経時変化として比較したものが、各々、Fig. 3とFig. 4である。EATCに対して、0.13, 0.38, 1.3mMの亜セレン酸の毒性と0.013, 0.038, 0.13mMのDEDC-SeTの毒性は、3~5時間後では同程度であったが、1~2時間後では、1.3mM 亜セレン酸の毒性は0.13mM DEDC-SeTの毒性よりも大きく、亜セレン酸の毒性発現はDEDC-SeTよりも速やかであった (Fig. 3)。一方、RBCでは、5時間目において、0.1, 0.2, 0.5 mMのDEDC-SeTによる溶血率は各々、3, 5, 10 mMの亜セレン酸による溶血率とほぼ同程度であったが、これらの濃度での1時間目の溶血率は、亜セレン酸では極めて低いのに対し、DEDC-SeTでは20~50%にも達していた。このことから、5時間後に同程度の溶血をおこす条件下で両セレン化合物を比較するとき、EATCの場合とは異なり、亜セレン酸よりもDEDC-SeTの方が速やかに溶血を起こし始めることが示された。

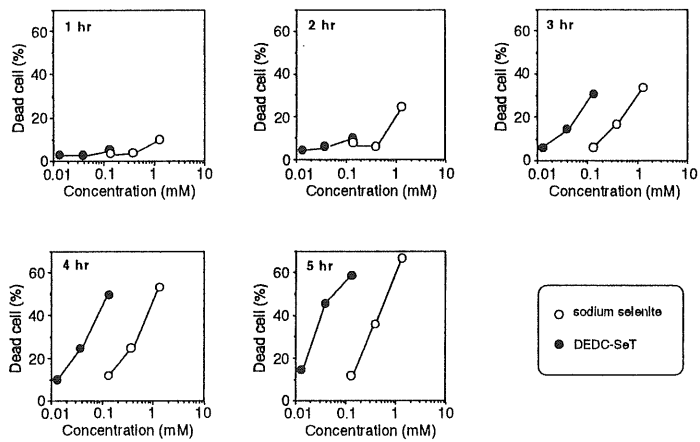


Fig. 3 Time dependency of dose-response curves for selenocompounds in EATC

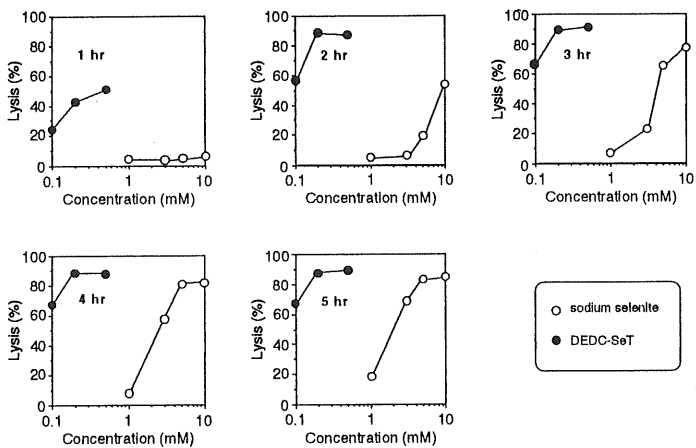


Fig. 4 Time dependency of dose-response curves for selenocompounds in red blood cell

これらの結果より、EATCおよびRBCに対する細胞毒性は、いずれもDEDIC-SeTの方が亜セレン酸ナトリウムより大きい、これらのセレン化合物の毒性発現の相対的な速さは、細胞により異なることが明らかとなった。

亜セレン酸とDEDIC-SeTのEATCに対する細胞毒性発現速度の相違について検索するため、 ^{75}Se 標識化合物を用いて両化合物の細胞への取り込みを検討した。その結果、細胞への取り込み速度や取り込まれたセレン量は、DEDIC-SeTの方が亜セレン酸よりも大きく、毒性発現速度の大小とは逆の関係であった。従って、EATCに対して早い時点から現れる亜セレン酸の細胞毒性には、速やかな細胞機能の低下が反映されているのではないかと考えられた。

そこで、細胞内器官のうち、その速やかな機能変化が細胞の生死を支配するものとしてミトコンドリアに着目し、2種のセレン化合物で処理した細胞の生存率とミトコンドリア機能の指標となるミトコンドリア膜電位をフローサイトメトリーにより測定した (Fig. 5)。コントロール細胞でも時間経過に伴って、ヨウ化プロピジウム (PI) の蛍光強度が大きく、ロダミン123 (Rh123) の蛍光強度が小さい細胞集団、つまり、ミトコンドリア膜電位が低下した死細胞集団が徐々に増加するのが観察された (Fig. 5a)。亜セレン酸 (Fig. 5b) やDEDIC-SeT (Fig. 5c) で処理した場合、そのような細胞集団の増加は、コントロールより早期から認められた。しかし、亜セレン酸処理の場合の方が、その変化が速やかであった。これらの結果より、亜セレン酸とDEDIC-SeTによりひきおこされるミトコンドリア膜電位低下速度の大小は、これらの化合物がEATCに対して示す相対的な毒性発現速度の大小と一致することが明らかとなった。細胞を死に至らしめる機能変化はミトコンドリア機能の他にもあると考えられるが、本実験結果から、少なくともミトコンドリア機能の低下は、セレン化合物のEATCに対する毒性発現速度と関連することが示唆された。

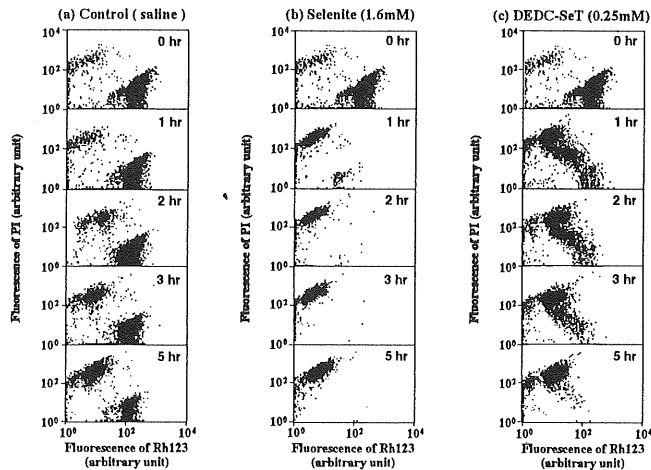


Fig. 5 Effect of selenocompounds on viability and mitochondrial membrane potential of EATC

以上、本研究により、(1) 亜セレン酸およびDEDC-SeTは、EATCとRBCに対して用量および時間依存的な細胞毒性を示し、その作用はいずれの細胞においてもDEDC-SeTの方が大きいこと、(2) 細胞毒性発現速度は、5時間後に同程度の毒性を示す用量で比較するとき、EATCでは、亜セレン酸の方がDEDC-SeTよりも大きい、RBCでは逆であること、(3) EATCに対する毒性が亜セレン酸でより速やかに現れる現象には、ミトコンドリア膜電位の低下等の細胞機能の変化が反映されうること、が明らかとなり、セレン化合物の細胞毒性発現は、セレンの化学形だけでなく、標的細胞の種類によっても大きく異なることが示された。

文 献

- 1) Poirier, K.A. and J.A. Milner (1983) J. Nutr. 113:2147-2154.
- 2) Saito, Y., M. Chikuma, A. Iwado and Y. Saito (1994) Fresenius J. Anal. Chem. 348:776-777.
- 3) Saito, Y. and M. Chikuma (1995) Naturwissenschaften 82:476-477.
- 4) 齊藤睦弘, 藤井恒子, 本田正宏, 千熊正彦 (1995) Biomed. Res. Trace Elements 6:263-264.
- 5) 米田祥子, 齊藤睦弘, 千熊正彦 (1998) Biomed. Res. Trace Elements 9:189-190.
- 6) 齊藤睦弘, 前田 綾, 妹尾晴美, 木村裕子, 千熊正彦 (1999) Biomed. Res. Trace Elements 10:207-208.