

ジクロフェナクナトリウムによる細胞障害の作用機序

高橋 信夫¹⁾²⁾, 宮越 稔¹⁾, 高 直美¹⁾, 栗原 孝行¹⁾, 藤川孝三郎¹⁾¹⁾金沢医科大学総合医学研究所, ²⁾金沢医科大学眼科学教室

要 約

プロスタグランジン生合成阻害薬ジクロフェナクナトリウム(DFNa)の細胞障害性を Chang 培養ヒト結膜上皮細胞を使って調べた。DFNa には細胞増殖抑制があり, この作用は用量依存性であった。0.1%DFNa 1 分間接触 12 時間後には細胞の増殖は停止したが, 24 時間以降は増殖を開始した。0.1%液 1 分間接触 24 時間後の電子顕微鏡検査では, 細胞の障害像はみられなかった。0.1%DFNa 1 分間接触の細胞周期に与える影響を flow cytometer を用いて検討した。得られた DNA ヒストグラムでは, 接触 12 時間後に G₁ ピークの幅がやや広くなり, M 期細胞の数が増え, DNA 量の低い死細胞が G₁ ピークの左側にみられた。接触 24 時間後には死細胞はさらに多くなり, S 期細胞は増加したが, M 期細胞は次第に減少し, 48 時間にはほとんどみられなくなった。(日眼会誌 97:145-149, 1993)

キーワード: Chang ヒト結膜上皮細胞, ジクロフェナクナトリウム, flow cytometer, 細胞周期, DNA ヒストグラム

Cytotoxic Effects of Diclofenac Sodium

Nobuo Takahashi¹⁾²⁾, Minoru Miyakoshi¹⁾, Naomi Taka¹⁾Takayuki Kurihara¹⁾ and Kohzaburo Fujikawa¹⁾¹⁾Medical Research Institute, ²⁾Department of Ophthalmology, Kanazawa Medical University

Abstract

The authors studied the cytotoxic effect of diclofenac sodium, a prostaglandin synthetic inhibitor, on Chang's cultured human conjunctival cells. Diclofenac sodium inhibited cell growth dose-dependently. Although cell growth was interrupted 12 hrs later by one minute of exposure to a 0.1% solution of diclofenac sodium, the cells began to grow again 24 hrs later. Twenty-four hours later, a one-minute exposure to a 0.1% solution of diclofenac sodium revealed no cytotoxic effects electron microscopically. The effect on the cell cycle of exposure to 0.1% diclofenac sodium was studied using a flow cytometer. Twelve hours after exposure to diclofenac sodium, DNA histograms showed a broader G₁ peak, and increase in mitotic phase cells and dead cells with a low DNA content on the left of the G₁ peak. 24 hrs later, the number of dead cells and DNA synthetic phase cells increased and mitotic cells gradually decreased, almost disappearing within 48 hrs. (J Jpn Ophthalmol Soc 97:145-149, 1993)

Key words: Chang human conjunctival cell, Diclofenac sodium, Flow cytometer, Cell cycle, DNA histogram

別刷請求先: 920-02 石川県河北郡内灘町大学 1-1 金沢医科大学総合医学研究所 高橋 信夫

(平成4年4月30日受付, 平成4年7月29日改訂受理)

Reprint requests to: Nobuo Takahashi, M.D. Medical Research Institute, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada-machi, Kahoku-gun, Ishikawa 920-02, Japan

(Received April 30, 1992 and accepted in revised form July 29, 1992)

I 緒 言

ジクロフェナクナトリウム (DFNa) はフェニル酢酸系非ステロイド性抗炎症剤¹⁾, その作用はプロスタグランジン合成阻害であることから点眼薬として開発され²⁾, 白内障手術, 眼内レンズ移植術に使用されている。水溶液で使いやすく, 抗炎症作用も強力であるが, 近年, 角膜上皮障害の発生が報告されるようになった^{3,4)}。本稿においては, DFNa 純末の細胞障害性の有無とその程度, 作用機序解明のため, また, 今回の方法が薬剤障害実験として妥当な方法であるか否かを知るため, 培養細胞を用いて以下の実験を行った。この種の実験に使用する細胞はヒト由来であること, 入手しやすく追試が可能なこと, 再現性に富むことなどの条件がそろっていなければならない。ヒト由来の角膜上皮細胞はいまだ市販されず, 常に同一条件の細胞を入手することは難しい。角膜上皮障害を広く眼球表面に対する障害と捉え, 今回の実験には前記の条件を満たしたヒト結膜上皮細胞を用いることとした。

II 材料と方法

使用細胞は Chang ヒト結膜上皮細胞で, 10% 仔牛血清, カナマイシン, ペニシリンを含有する Dulbecco's minimum essential medium 中に 37°C, 5% CO₂ incubator 内で, 10⁵/ml の密度で培養した。

1. 薬剤処理後の濃度依存毒性の検討

1) 長時間接触

直径 6 cm のプラスチック培養皿内で対数増殖中の細胞を 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 300 µg/ml の濃度の DFNa 純末を含む培地で 24 時間培養した。細胞をトリプシンにて分離, コールターカウンターで数を算定した。

2) 短時間接触

前記と同様の条件で培養した細胞に, 燐酸緩衝液 (PBS) で溶解した 1,000 µg/ml (0.1%) および 2,000 µg/ml (0.2%) DFNa 純末液を 1 分あるいは 2 分間接触させ, ただちに PBS で洗浄後, 培地に置換して 24 時間後にトリプシン消化, コールターカウンターで細胞数を数えた。

2. 薬剤処理後の細胞再増殖

前記と同一の条件で対数増殖中の細胞に, 0.1% DFNa 液を 1 分間接触させ, 12 時間, 24 時間, 36 時間および 48 時間後の細胞数を算定し, 対照と比較した。

3. 薬剤処理後の電子顕微鏡所見

Lab. Tek チェンバー (Nunc) 内で対数増殖中の細胞に 0.1% DFNa 液を 1 分間接触させ, ただちに PBS で洗浄後, 培地に置換して 24 時間後に電子顕微鏡の試料を作成した。

電子顕微鏡試料作成法

細胞を 2.5% グルタルアルデヒドで 1 時間前固定し, 0.15 モル PBS で 1 時間, さらに 1% オスミウム酸で 1 時間後固定した。エタノール系列で脱水し, 水溶性エポキシ樹脂であるクエトール 651 に包埋し, 0.08 µm の厚さに切片を作り, ホルムバール膜を張ったメッシュにのせ観察した。なお, ウラン, 鉛による二重染色を行った。

4. Flow cytometer による DNA ヒストグラムの検討

DFNa が細胞周期に与える影響を調べるため, DNA ヒストグラムを記録した。0.1% DFNa で 1 分間処理した後, PBS で洗浄, 培地に置換し, 12, 24, 48 時間後に細胞をトリプシン処理し, 単離した。20% エタノールで 30 分固定し, 0.25% RNA 分解酵素で 37°C 1 時間処理, 0.05% propidium iodide で細胞核 DNA を染色し, flow cytometer 用の試料とした。

個々の細胞の蛍光は Ortho 社製サイトフルオログラム 50 H で測定した。488 nm のアルゴンレーザー光で励起された細胞から発する propidium iodide の赤色発光は, 2 色性ミラーおよびロングパスフィルターで分光, 光電子増倍管で検出した。ヒストグラムは DS-1 データ解析装置から出力されたものである。実験に用いた試料は同一日に同一条件で検討した。

III 結 果

1. 薬剤処理後の濃度依存毒性

1) 長時間接触

対照に比べ, 10 µg/ml では 21%, 50 µg/ml では 37%, 100 µg/ml では 51%, 300 µg/ml では 69% と用量依存性に細胞増殖抑制が観察された (図 1)。

2) 短時間接触

図 2 にみるように, 1 分間接触と 2 分間接触とではほとんど差がなく, 0.1% で約 30%, 0.2% で 50%, 0.3% では 90% の死細胞がみられた。

2. 薬剤処理後の細胞増殖能

処理 12 時間後には処理前とほぼ同数の細胞数で, 増殖が全くみられないが, 24 時間後には増殖を開始しており, 48 時間後まで対照のおよそ 60% であった (図 3)。

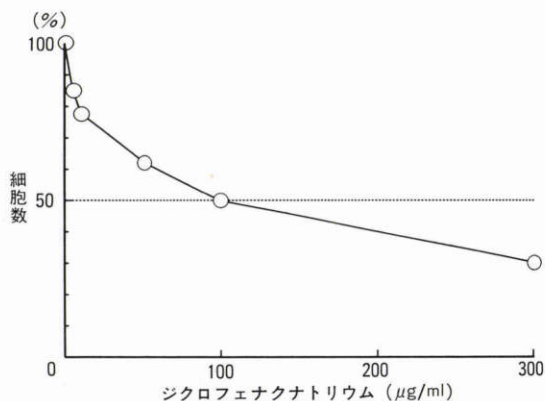


図 1 ジクロフェナクナトリウム長時間接触による細胞障害。

24 時間接触により，細胞数は用量依存性に減少する。

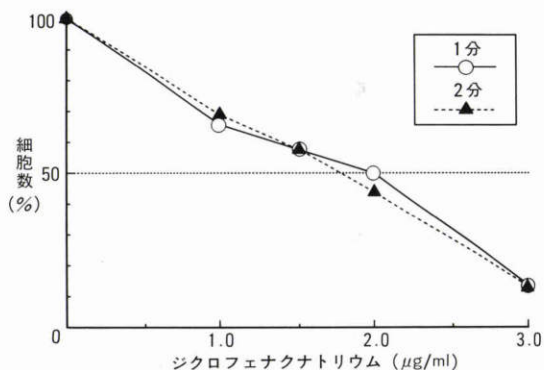


図 2 ジクロフェナクナトリウム短時間接触による細胞障害。

1 または 2 分間接触により，細胞数は用量依存性に減少するが，1 分と 2 分間とは差はない。ジクロフェナクナトリウムの濃度は図 1 の場合と大きく異なる。

3. 電子顕微鏡所見

薬剤処理をしなかった正常細胞を図 4 に示した。細胞表面には microvilli があり，細胞質はかなり均質で空胞が認められる。核は比較的大きく，小器官はほとんど発達しておらず，細胞全体が単純な構造となっている。DFNa 処理後の細胞を図 5 に示したが，正常細胞とほとんど差がなく，形態的には細胞障害はみられなかった。

4. DNA ヒストグラムの経時的所見

図 6 に実験結果を示した。正常細胞の DNA ヒストグラムを対照とした。対照ヒストグラムの左の背の高

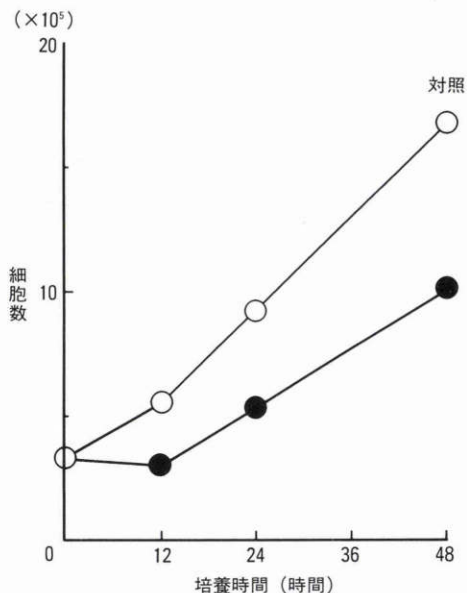


図 3 0.1%ジクロフェナクナトリウムに 1 分間接触させた場合の細胞増殖曲線。

接触後 12 時間までは細胞増殖はみられない。その後は順調に増殖しているが対照の 60%程度である。

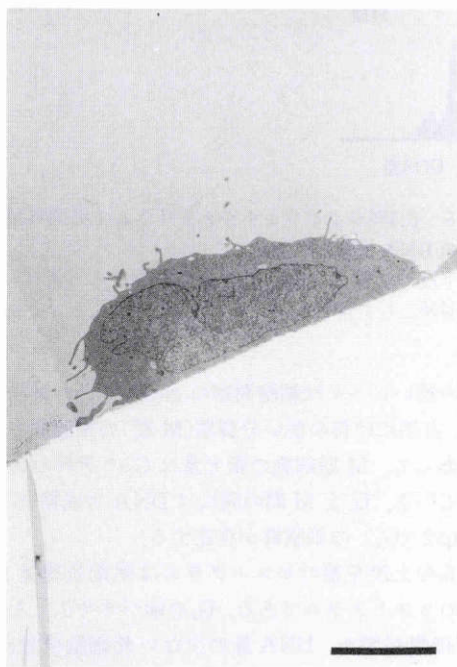


図 4 Chang ヒト結膜上皮細胞の正常電顕像。

図の上方は樹脂に包埋されている。下方の水平な部分は細胞がガラス面に付着していた部分である。バーは 5 μm, ×3,100

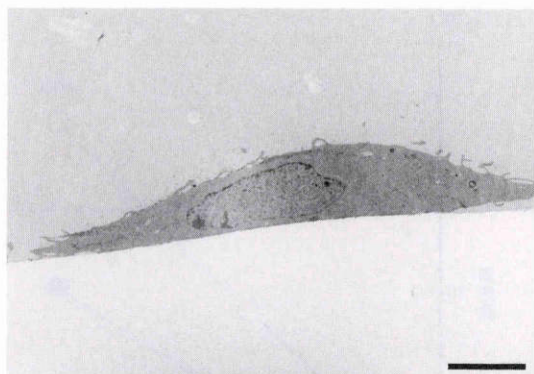


図5 0.1%ジクロフェナクナトリウム1分間接触24時間後の電顕像。
正常細胞と異なるところはない。バーは5 μ m。
 $\times 3,100$

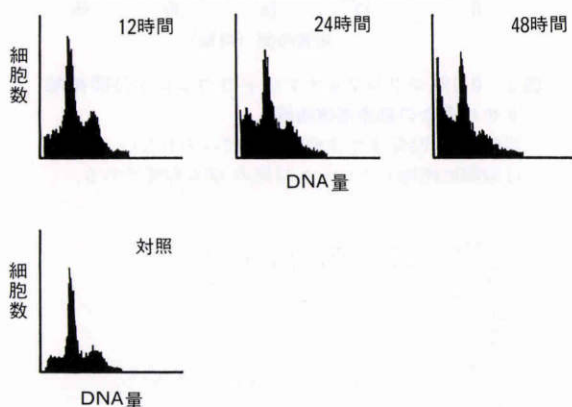


図6 0.1%ジクロフェナクナトリウム1分間接触後のDNAヒストグラム。
下段に培養24時間目の正常細胞のヒストグラムを対照として示した。

い幅の狭いピークは細胞周期の gap 1 (G_1) の細胞群であり、右端には背の低い分裂期 (M 期) の細胞群のピークがあって、M 期細胞の蛍光量は G_1 のその 2 倍になっている。 G_1 と M 期の間には DNA 合成期 (S 期) と gap 2 (G_2) の細胞群が存在する。

図6の上段左端のヒストグラムは薬剤処理後12時間目のヒストグラムである。 G_1 の幅がやや広くなり、M 期細胞が増え、DNA 量の少ない死細胞成分が G_1 ピークの左側に小量認められた。24時間目には死細胞はさらに多くなり、S 期細胞が増えるとともに M 期細胞は次第に減少した。48時間目には死細胞がさらに増える一方で、M 期細胞はますます減少し、ほとんどみ

られなくなった。

IV 考 按

DFNa で細胞処理した場合、低濃度液の長時間接触であれ、高濃度液の短時間接触であれ、細胞増殖を抑制することは実験結果から明らかである。0.1%DFNa 1 分間接触後、細胞の再増殖は12時間までは見られず、その後は順調に増殖するものの、48時間に至っても正常対照の60%程度であった。一方、電子顕微鏡的には明らかな細胞障害所見は見られなかった。これらの事実と DNA ヒストグラムの結果から、どのようなことが考えられるであろうか。

DFNa の役割はプロスタグランジンの生合成を阻害することである。すなわち、アラキドン酸から種々のプロスタグランジンが作られる最初の段階で、プロスタグランジン生合成酵素である脂肪酸シクロオキシゲナーゼを抑制すると考えられている⁵⁾。プロスタグランジンの前駆体である不飽和脂肪酸は細胞膜の磷脂質の成分として存在するから、細胞は必要とする量のプロスタグランジンを生成しては消費しているはずである。プロスタグランジン生合成阻害薬を投与すると、細胞周期にかかわらず、プロスタグランジン生合成はある時間阻害されるであろう。しかし、すでに作られたプロスタグランジンを使いつつ、細胞周期は先へ進み、分裂時には細胞数が2倍に増えるので、使用し得るプロスタグランジン量はさらに不足すると考えられる。このために DNA ヒストグラムの M 期の延長が起るものと考えられ、これはすなわち、薬剤処理12時間後のヒストグラムに相当する。その後 M 期細胞はどうか分裂しても、死細胞となるものも多くなり、プロスタグランジンを必要とする細胞が G_1 から S 期にかけて多くとどまることになり、この姿が処理後24時間目のヒストグラムとして説明できる。48時間後にも同様の傾向があるが、図3にみられるように、細胞増殖抑制されながらも実数は増えているので、DFNa 処理によって完全に死滅する訳ではない。しかし、形態的に異常がみられない時期に、すでに細胞増殖は抑制され、DNA ヒストグラムに影響があらわれており、臨床使用時にみられる DFNa の上皮障害の原因の一翼を担っているものと考えられる。

DFNa の細胞障害性に関する *in vitro* 実験は著者らの知る限り、西ら⁶⁾の報告があるのみである。20 μ g/ml 以上の濃度で培養水晶体上皮の増殖抑制がみられたとしており、今回の実験のうち、長時間接触の結果

と一部似通った結果であった。西らの実験では増殖と形態の変化を中心に観察しており、もとより著者らの実験とはその目的、方法、材料など多くの点で異なっているが、DFNa の上皮細胞障害性については一致している。

今回の著者らの実験では、flow cytometer を用いた細胞周期解析によって、DFNa の細胞障害性についての新知見を得ることができた。本法による実験はまだその緒についたばかりであるが⁷⁾、薬剤毒性研究の有力な手段の1つであることを今回もまた証明し得た。

DFNa の臨床使用の前に、安全性試験として動物に点眼し、組織学的に検査したり⁸⁾、Draize 変法で評価したり⁹⁾しているが、いずれも障害性を実証し得ず、薬剤安全性試験法としては不十分であることがわかっている。DFNa は臨床使用後に副作用が判明した薬剤の1つであるが、このような事態を避けるために、培養細胞による薬剤毒性試験法を早期に確立し、広く活用すべきであろう。

文 献

- 1) Ku EC, Wasvary JM, Cash WD: Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase. *Biochem Pharmacol* 24: 641-643, 1975.
- 2) 阿形光治, 阿部 亨, 今 正嗣, 田中 稔, 木村泰朗, 中島 章: 非ステロイド性抗炎症剤ジクロフェナクナトリウム点眼液の基礎的検討. *日眼会誌* 87: 19-28, 1983.
- 3) 小川昭彦, 田中 稔, 中島 章: ジクロフェナクナトリウム点眼液の安全性試験および外眼部炎症疾患に対する有効性について. *薬理と治療* 14: 2961-2998, 1986.
- 4) 北大路浩史, 中井義秀, 北大路勢津子: 白内障術前後の抗炎症剤ジクロフェナク点眼. *臨眼* 45: 171-174, 1991.
- 5) 郷 保正: 眼におけるプロスタグランジンの代謝と作用. *眼紀* 40: 2589-2606, 1989.
- 6) 西 佳代, 西 興史: 人眼水晶体上皮細胞の組織培養. その2. 水晶体上皮細胞の増殖, 化生に対するジクロフェナクナトリウムの抑制効果. *日眼会誌* 95: 581-590, 1991.
- 7) 高橋信夫, 藤川孝三郎, 宮越 稔, 寺岡弘平, 谷内喜美子: 塩化ベンザルコニウムの細胞周期に与える影響—flow cytometer による解析—. *日眼会誌* 96: 823-827, 1992.
- 8) 馬詰良比古, 我喜屋重光, 徳田久弥, 田村 正: ジクロフェナク Na 0.1% 点眼液の家兎角膜, 虹彩の創傷治癒に及ぼす影響. *眼紀* 35: 1403-1412, 1984.
- 9) 釣谷昌敏, 阿形光治, 樋口史郎, 阿部 亨, 水野由美子, 内藤 聡, 他: 非ステロイド性抗炎症剤 Diclofenac sodium 水溶性点眼液の点眼毒性試験—家兎による眼粘膜刺激試験および亜急性毒性試験—. *薬理と治療* 14: 93-116, 1986.