

塩化ベンザルコニウムによる温熱耐性の誘導

岡山大学医学部放射線医学教室 (主任: 平木祥夫教授)

黒田 昌宏, 浅海 淳一, 西川 光治, 田中 聖了
高 献書, 山本 道法, 卷幡 栄一, 平木 祥夫

岡山大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科

川 崎 祥 二

(平成4年10月14日受稿)

Key words: 温熱療法, 温熱耐性, 塩化ベンザルコニウム

緒 言

In vitro において細胞を加温処理し, その後一定時間37℃にて培養すると, 細胞は温熱耐性を獲得し, その後の2回目加温では初回加温時と比較して細胞の生存率が高くなる. この二分割加温において, 2回の加温処理の間を0℃に保ったり¹⁾, 重水培地^{2,3)} や蛋白合成阻害剤 cycloheximide⁴⁾ を使用して, 2回の加温処理の間の代謝をとめると, 温熱耐性の誘導が抑制される. このことは温熱耐性の形成に, 温熱障害に対する細胞の代謝過程が関わっていることを示唆している. 一方, 温熱のみでなくエタノールやリドカインなども温熱耐性を誘導し, 同時に熱ショック蛋白質を細胞内に誘導する⁵⁻⁷⁾. 温熱, エタノール, リドカインに共通する作用部位のひとつは細胞膜であり, 細胞膜障害が温熱耐性誘導と関連している可能性がある. 今回, 細胞膜の特にリン脂質と作用して膜を障害する界面活性剤⁸⁾ である塩化ベンザルコニウムが温熱耐性を誘導しうるかどうかを, NIH 3 T 3 細胞を用いて *in vitro* で調べ, 細胞膜障害と温熱耐性誘導との関連性を検討した.

材 料 と 方 法

1. 細胞および培養法

実験にはマウス線維芽細胞由来の NIH 3 T 3 細胞を用いた. 培養液として Dulbecco's

modified Eagle medium (日水製薬) に10%非働化仔牛血清(ハイクローン社), 100 μ g/ml streptomycin (明治製薬) および100 units/ml penicillin (明治製薬) を加えた. 10⁵個の細胞を含んだ5 mlの培養液を25cm² screw-topped polystyrene culture flask (ベクトンディキンソン社) に入れ, CO₂ incubator (三洋電機) にて95%air + 5%CO₂, 37℃の条件下で培養を行った. 播種後48時間では指数増殖状態の細胞が flask の底に一層に並んでおり, この状態で実験を開始した. 実験前に37℃, 5 mlの新しい培養液に交換した.

2. 温 熱 処 理

温熱処理は45℃に設定した恒温槽 (タイテック社) に flask をつけて行った. 温度は $\pm 0.05^\circ\text{C}$ の誤差で維持した.

3. 薬 剤

塩化ベンザルコニウム (日本製薬) を, 血清を含まない Dulbecco's modified Eagle medium にて希釈し, 0.001, 0.002, 0.008, 0.01および0.02%の濃度とした.

4. 細胞の生存率の判定

細胞の生存率はコロニー形成法にて判定した. 各処理後に, flask 内の細胞を trypsin (ディフコ社) にて単一細胞に分離した. それを各3枚の60 \times 15mmシャーレ (ベクトンディキンソン社) に10², 10³, 10⁴個ずつ各5 mlの培養液に加えてうえこんだ. その後11日間 incubator の中で培養した. その後10%ホルムアルデヒド液にて固

定、10%ギムザ染色液にて染色した。細胞の生存率は、3枚のシャーレにて50個以上の細胞からなるコロニーの平均数を出し、無処理細胞でのコロニー平均数で除してもとめた。

5. 処理方法

1) 37℃での塩化ベンザルコニウムの細胞毒性

(1) 濃度と細胞毒性

5 mlの0, 0.001, 0.002, 0.008, 0.01および0.02%塩化ベンザルコニウムに入れ換え、incubatorの中で20分間接触させた。その後細胞を新しい培養液で2回洗滌し、細胞の生存率を判定した。

(2) 接触時間と細胞毒性

5 mlの0.002%塩化ベンザルコニウムに入れ換え、incubatorの中で0, 10, 20, 30, 40および50分間接触させた。その後細胞を新しい培養液で2回洗滌し、細胞の生存率を判定した。

2) 塩化ベンザルコニウム接触後の温熱耐性の出現

5 mlの0.002%塩化ベンザルコニウムに入れ換え、incubatorの中で20分間接触させた。細胞を新しい培養液で2回洗滌したのち、37℃、5 mlの新しい培養液に入れ換え、incubatorの中で0, 3, 6, 9, 12, 15, 21および24時間培養した。各時間の培養後、37℃、5 mlの新しい培養液に入れ換え、45℃で30分間の加温を行った。加温後、加温処理をしない細胞を対照として生存率を判定した。

3) 塩化ベンザルコニウムとの接触時間と温熱耐性の程度

5 mlの0.002%塩化ベンザルコニウムに入れ換え、incubatorの中で10, 15および20分間接触させた。また対照として血清を含まない5 mlの培養液に入れ換え、incubatorの中で20分間接触させた。細胞を新しい培養液で2回洗滌したのち、37℃、5 mlの新しい培養液に入れ換え、incubatorの中で15時間培養した。培養後、37℃、5 mlの新しい培養液に入れ換え、45℃で0, 15, 30, 45, 60, 90分間の加温を行った。加温後、細胞の生存率を判定した。

結 果

1. 塩化ベンザルコニウムの細胞毒性

1) 濃度と細胞毒性

37℃での塩化ベンザルコニウムの細胞毒性は、その濃度の上昇とともに増加した(図1)。0.002%塩化ベンザルコニウムと20分間の接触により細胞の生存率は無処理の細胞と比較して50%に減少した。

2) 接触時間と細胞毒性

37℃での塩化ベンザルコニウムの細胞毒性はその接触時間の延長とともに増加した(図2)。

2. 塩化ベンザルコニウム処理後の温熱耐性の誘導

0.002%塩化ベンザルコニウムの20分間処理後の培養中に、15時間目をピークとする温熱耐性の形成がみられ、以後徐々に消失した(図3)。

3. 塩化ベンザルコニウム処理時間と温熱耐性の大きさの関連

0.002%塩化ベンザルコニウムでの処理時間が長いほど、誘導される温熱耐性は大きくなった(図4)。0.002%塩化ベンザルコニウム20分間

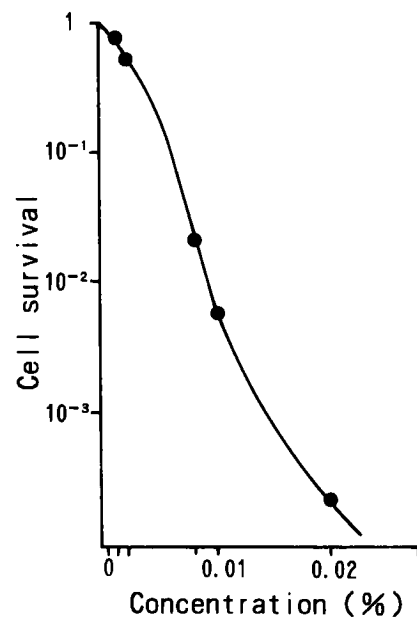


図1 塩化ベンザルコニウム濃度と細胞毒性
横軸に示した各濃度の塩化ベンザルコニウムで細胞を20分間処理した。

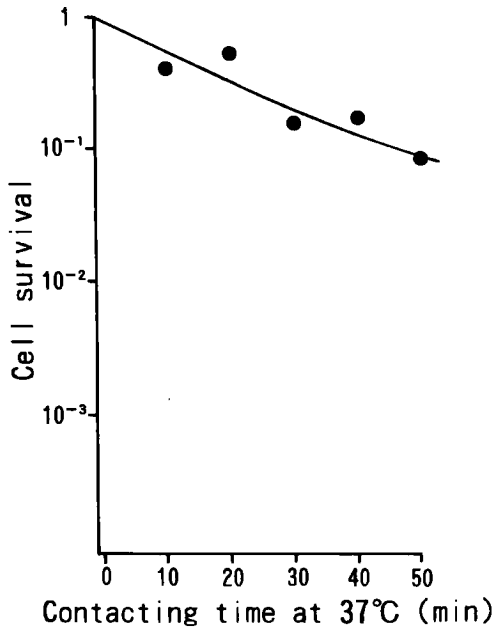


図2 塩化ベンザルコニウム接触時間と細胞毒性
横軸に示した各時間、細胞を0.002%塩化ベンザルコニウムで処理した。

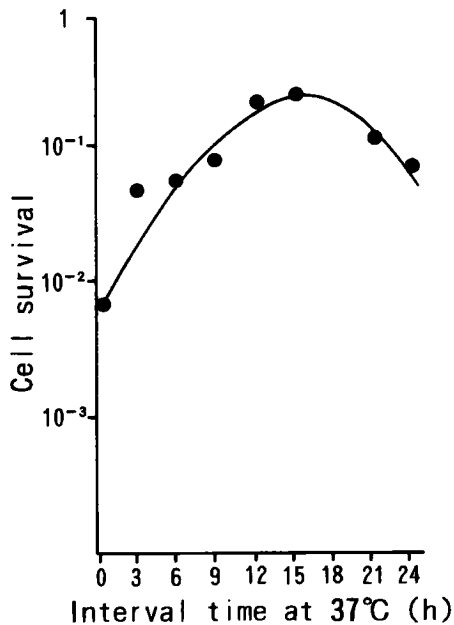


図3 塩化ベンザルコニウム処理後の温熱耐性
横軸は0.002%塩化ベンザルコニウム20分間処理後の培養時間、縦軸は45°C 30分間の加温に対する細胞の生存率を示す。

処理群での D_0 値は11.5分であり、対照群での D_0 値3分と比較して、 D_0 比で3.8倍の温熱耐性が出現した。

考 察

温熱耐性誘導の機序は未だ解明されていないが、温熱のみならずエタノール、リドカインなども温熱耐性を誘導する⁵⁻⁷⁾。温熱およびこれらの薬剤に共通する作用部位のひとつは細胞膜である。エタノール⁷⁾ および温熱⁹⁾ は細胞膜に作用し、細胞に障害を与える。これらの細胞膜障害に対する代謝過程が温熱耐性発現に関与している可能性がある。我々は細胞膜障害と温熱耐性誘導との関連性を調べるために塩化ベンザルコニウムを用いた。塩化ベンザルコニウムは陽

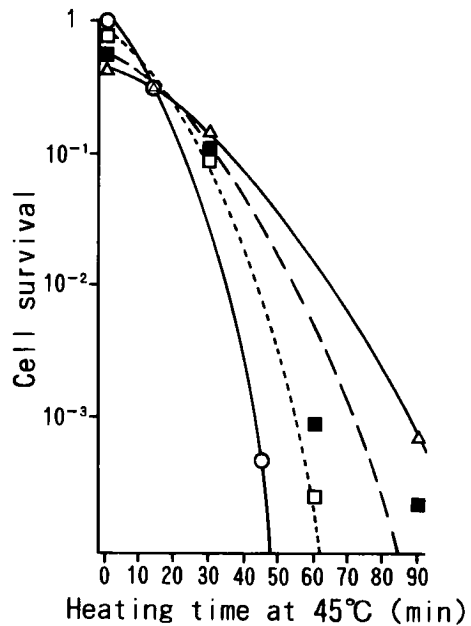


図4 塩化ベンザルコニウム処理時間と温熱耐性の大きさ
横軸は0.002%塩化ベンザルコニウム処理後に15時間培養した後の45°C加温時間を示す。
○：対照群
□：0.002%塩化ベンザルコニウム10分間処理群
■：0.002%塩化ベンザルコニウム15分間処理群
△：0.002%塩化ベンザルコニウム20分間処理群

性石鹼であり、臨床で用いられる消毒薬の一つである⁹⁾。また眼科用点眼液の防腐剤としても使われており、*in vitro* でのヒト結膜上皮細胞に対する細胞毒性が報告されている^{10,11)}。塩化ベンザルコニウムは細胞膜の脂質 2 重層のリン脂質に作用⁹⁾し、細胞の生存率を低下させる¹⁰⁻¹³⁾。向井、高橋は走査電子顕微鏡での観察を通して、塩化ベンザルコニウムが細胞形態を変化させ、細胞膜の microvilli や filopodia の数の減少および完全消失をひきおこし、長時間の接触では細胞膜に多数の micro-holes の形成や細胞膜の穿孔がおこると報告している^{10,11)}。この所見は塩化ベンザルコニウムが細胞膜に作用することを示している。今回の実験により、塩化ベンザルコニウムによる細胞障害と温熱耐性誘導との間の関連性が示唆された。NIH 3 T 3 細胞において温熱により誘導される温熱耐性¹⁴⁾と比較すると、塩化ベンザルコニウムが誘導する温熱耐性はより小さい。この理由としては、細胞刺激の大きさの違いが、温熱耐性誘導の大きさの違いと関連しているかもしれない。即ち、約90%の細胞を致死させる程度の強い初回温熱刺激¹⁴⁾は、強い温熱耐性を誘導しうるが、50%の細胞を致死させる程度の塩化ベンザルコニウム細胞刺激では温熱耐性の誘導が小さくなるのかもしれない。別の理由として、塩化ベンザルコニウムの細胞膜以外に対する作用が考えられる。梶野らは V79 細胞にて塩化ベンザルコニウムが DNA, RNA, タンパク質合成を抑制すると報告している¹³⁾。この作用が温熱耐性を獲得した細胞のコロニー形成能の低下、しいては生存率の低下と関連している可能性がある。

温熱耐性を誘導する薬剤の中には、熱ショック

蛋白質を誘導するもの^{6,9)}と誘導しないもの¹⁵⁾がある。塩化ベンザルコニウムが熱ショック蛋白質を誘導するか否かは今後の課題としたい。

結 論

NIH 3 T 3 細胞における塩化ベンザルコニウムの温熱耐性誘導能について調べ、以下の結果を得た。

1. 塩化ベンザルコニウムの濃度上昇、接触時間延長とともに細胞毒性が増加した。0.002%塩化ベンザルコニウムの20分間処理にて細胞の生存率は無処理細胞と比較して50%に減少した。

2. 0.002%塩化ベンザルコニウムの20分間処理後の培養中に温熱耐性が誘導され、処理後15時間目に最大となり、以後徐々に消失した。処理後15時間目の45°C加温にて、対照群と比較して D₀比で3.8倍の温熱耐性が出現した。

3. 0.002%塩化ベンザルコニウムにて誘導される温熱耐性の大きさは、その処理時間が長くなるにしたがって大きくなった。

以上の結果より塩化ベンザルコニウム処理による細胞膜障害と温熱耐性誘導との間に関連性が示唆された。

本論文の要旨は日本ハイパーサーミア学会第7回大会(1990年、岡山)にて報告した。この研究の一部は、文部省がん特別研究(I)(加納班)(63010052, 01010026, 02151022)、および文部省科学研究費(03857136)の援助によった。終わりに臨み、実験遂行にあたり終始快く協力して下さいました当教室の赤木悦子、斉藤昌子両氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Gerner EW and Schneider MJ: Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* (1975) **256**, 500-502.
- 2) Fisher GA, Li GC and Hahn GM: Modification of the thermal response by D₂O. I. Cell survival and the temperature shift. *Radiat Res* (1982) **92**, 530-540.
- 3) Li GC, Fisher GA and Hahn GM: Modification of the thermal response by D₂O. II. Thermotolerance and the specific inhibition of development. *Radiat Res* (1982) **92**, 541-551.
- 4) Henle KJ and Leeper DB: Modification of the heat response and thermotolerance by cycloheximide,

- hydroxyurea and lucanthon in CHO cells. *Radiat Res* (1982) **90**, 339—349.
- 5) Li GC and Werb Z : Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 3218—3222.
 - 6) Hahn GM and Li GC : Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiat Res* (1982) **92**, 452—457.
 - 7) Hahn GM, Shiu EC, West B, Goldstein L and Li GC : Mechanistic implications of the induction of thermotolerance in Chinese hamster cells by organic solvents. *Cancer Res* (1985) **45**, 4138—4143.
 - 8) 勝田信夫 : 界面活性剤特に陽性石鹼 ; 現代の薬理学, 田中 潔編, 金原出版, 東京 (1979) pp 433—435.
 - 9) Lepock JR : Involvement of membranes in cellular responses to hyperthermia. *Radiat Res* (1982) **92**, 433—438.
 - 10) 向井佳子, 高橋信夫 : 副腎皮質ホルモン点眼剤の培養結膜細胞に対する影響. *眼紀* (1986) **37**, 339—342.
 - 11) 高橋信夫, 向井佳子 : 点眼剤用防腐剤塩化ベンザルコニウムの細胞毒性とその作用機序. *日本の眼科* (1987) **58**, 945—950.
 - 12) 今安正樹, 杉浦栄一, 岩田修造 : コンタクトレンズ用材の生体適合性に関する研究. *日コレ誌* (1984) **26**, 84—88.
 - 13) 梶野 尚 : 培養V79細胞に対する塩化ベンザルコニウムの作用について. *歯学* (1987) **75**, 63—74.
 - 14) Kuroda M, Kawasaki S and Hiraki Y : Cepharanthin reduces thermotolerance by enhancing thermosensitivity in NIH 3 T 3 cells. *Acta Med Okayama* (1992) **46**, 147—155.
 - 15) Boon-niermeijer EK, Souren JEM and Wijk RV : Thermotolerance induced by 2,4-dinitrophenol. *Int J Hyperthermia* (1987) **3**, 133—141.

**Thermotolerance induction by benzalkonium chloride
in NIH3T3 cells**

Masahiro KURODA, Shoji KAWASAKI¹⁾, Junichi ASAUMI

Koji NISHIKAWA, Seiryō TANAKA, Xian Shu GAO

Michinori YAMAMOTO, Eiichi MAKIHATA and Yoshio HIRAKI

Department of Radiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

¹⁾Department of Radiation Technology,

School of Health Sciences,

Okayama University,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Hiraki)

The ability of benzalkonium chloride to induce thermotolerance was examined in NIH3T3 cells. Benzalkonium chloride enhanced cytotoxicity as its concentration and administration period increased. The cell survival decreased to 50% of that in the non-treated group by 20min of treatment in 0.002% benzalkonium chloride. Thermotolerance developed during the culture after 20min of treatment with 0.002% benzalkonium chloride. Thermotolerance reached its peak at 15h after treatment and decreased subsequently. At 15h after treatment, the Do value at 45°C heating, a parameter of thermotolerance was 3.8-fold higher than that of the non-treated group. The thermotolerance induced by 0.002% benzalkonium chloride increased as its treatment period was prolonged. These findings suggested a relationship between thermotolerance induction and the cell membrane damage by benzalkonium chloride.