

45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology

2814

「A Short-term in vitro Assay for Anti-tumor Promoters Using Human Lymphoblastoid Cells Latently Infected Epstein-Barr Viru」

Epstein-Barrウイルス潜伏感染ヒト由来リンパ芽球様細胞を用いた抗発がんプロモーターのin vitro短期検出系

Harukuni Tokuda and Hoyoku Nishino (Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine)
Akira Iida (Formerly, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University), others

The idea neoplastic development consists of at least two qualitatively different stages has gained general acceptance. The second, promotion stage has been suggested to be more critical in the development of human cancer than that of the first, initiation stage. Most tumor promoters do not bind DNA and are negative in Ames mutagenicity assay, Whereas initiating carcinogenesis usually meet one or both these criteria. Recently, TPA only those other phorbol esters with tumor promoting activity and fatty acid, n-butyric acid have been found to induced the viral cyclin latently infected Epstein-Barr virus (EBV) genome carrying cells. We have suggested that a system consisting of EBV nonproducer Raji cells and each concentration of anti-tumor promoters, chemopreventive agents might be useful as a practical screening method of certain type of chemopreventive agents, anti-tumor promoters in our eatable and herbal plants. Interestingly, EBV-early antigen (EBV-EA) activation induced by TPA, can be diminished by the additional of chemopreventive agents, Brazilian herbal medicine, food colorants and vitamins to adequate culture medium. In this studies, we tried to arrange for the useful method of screening and detection of chemopreventive agents.

■日本語訳

発がんが質的に異なる2種類以上の段階を経て起こるという説は、一般的に知られている事である。ヒトでの発がんにおいては、第二段階のプロモーションが第一段階のイニシエーションより重要な役割を果たすことが示唆されている。ほとんどの発がんプロモーターはDNAに結合せず、エイムス試験(変異原性試験)陰性である。一方、発がんイニシエーターはこれらの基準の一方または両方を満たすのが通例である。最近、Epstein-Barrウイルス(EBV)が潜伏感染し同ウイルスのゲノムが組み込まれた細胞に、ホルボールエステルの中で最も強力な発がんプロモーター活性を有するTPAと脂肪酸であるn-酪酸を添加すると、ウイルスによる発現が誘導され、がん化に進むことが確認された。我々は、EBVを産生しないRaji細胞、各濃度の抗発がんプロモーターおよびがん予防剤添加による検出系が、食用および薬用植物に含まれるある種のがん予防剤および抗発がんプロモーターの実際的なスクリーニング法として有用であると考えている。興味深いことに、TPAにより誘導されるEBV-早期抗原(EBV-EA)活性化は、がん予防剤であるブラジル産薬用植物、食品着色剤およびビタミン類を適切な培養液に添加すると減少する。このことから、本研究では、がん予防剤のスクリーニングおよび検出に有用な方法の確立を試みた。

45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology

2817

「Screening Method of Short Term in vitro Assay For Nitric Oxide Scavenger Reagents」

in vitro短期検出法を用いた一酸化窒素スカベンジャー試薬のスクリーニング

Harukuni Tokuda (Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine), others

The important physiological roles of nitric oxide(NO) suggest that donation of NO may be useful for the treatment of several states, and bioactivity of NO was indistinguishable from that of endothelium derived relaxing factor. Some pharmacological NO donors, that they may serve as natural storage and transport forms for bioregulatory NO and currently in use for the biological generation of NO. Other important feature of NO is a mutagenic compounds that can cause mutations in bacteria as well as chromosomal aberrations in rat primary lung cells and it is best known as a toxic reactive free radicals. NO is emerging as an important mediator of cytotoxicity and/or mutagenicity. In order to develop a possible in vitro screening model of scavenger against NO, we begin to explore the potential role of treatment scavenging of malignant NO production. Chang liver cells (human derived) from in DMEM were cultured for 3 days before treatment. NOR1 (NO donor, (+)-(E)-methyl-2-[(E)-hydroxyimin]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide) was added into culture dish and incubated for 1 h under CO2 incubator as control. For screening assay, test samples to culture dish were observed under light-microscopy (x 100) without stained. All observed cells count for more than 250. The inhibitory ratio was then calculated for arrangement of data. Anti-oxidative reagents tested showed moderate inhibitory effects on NOR1 activation. In present paper, we designed a short-term in vitro assay for detecting NO scavengers, and test is simple to perform, reproducible and should be applicable for mass-screening of useful substances in our environment.

■日本語訳

一酸化窒素(NO)は生理的に重要な役割を果たすことから、NOの作用はいくつかの病態の治療に有用であるものと考えられ、この作用は、内皮由来弛緩因子の生理活性とは区別できないものと思われる。いくつかのNO供与薬は本来、NOの生体内調節に外來から輸送体として役割を果たすと考えられ、現在ではNOの生体内産生として使用されている。NOのその他の重要な特徴として、変異原物質として細菌に突然変異を誘発するほか、ラット初代培養肺細胞に染色体異常を誘発することが挙げられ、このことからNOは毒性フリーラジカルとしてよく知られている。そのことからNOは細胞毒性や変異原性の重要なメディエーターとして認識されつつある。そこで、NOスカベンジャーのin vitroスクリーニングモデルを構築するため、我々は、有害なNO産生をスカベンジする簡便な方法を検討し始めている。

(ヒト由来) Chang肝細胞を用いて試験処理前に3日間、DMEM中で培養した。

NOR1 (NO発生剤、(+)-(E)-methyl-2-[(E)-hydroxyimin]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide)を培養皿に添加後、CO2インキュベーター内で1時間インキュベートし、対照とした。スクリーニングを実施する際には、被験試料を培養皿に添加し、染色せず光顕下(100倍)で観察し、すべての培養皿に関して250個以上の細胞を観察し、そのデータとして、NOによる変化に対する阻害率を算出した。試験に供した抗酸化試薬は、NOR1活性化に対し中等度の阻害作用を示した。我々は今回、NOスカベンジャー検出を目的とする、簡単に再現性の高いin vitro短期検出系をデザインした。この検出系は、環境中に存在する有用物質の広範囲なスクリーニングに応用すべきである。