

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
AOP および IATA に立脚した国際的な安全性評価手法の確立
平成 28 年度分担研究報告書

Bhas42 細胞形質転換試験の protocols 整備

研究分担者 山影 康次

一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 研究開発部 部長

研究要旨

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は発がん物質の *in vitro* スクリーニング試験である。多くの研究者に利用可能な試験にするため、OECD のガイダンスドキュメントに記載されている 96 ウェルプレート法について吸光度測定による客観的判定法の確立を目指している。

今年度は、メチレンブルー（MB）染色による吸光度法に加え、形質転換巢形成過程における形質転換細胞の増殖に基づく判定基準（カットオフ値）設定を検討した。その結果、主に細胞核を染色する MB 染色による方法が、観察による判定により近似した結果となった。しかしながら、生細胞数測定試薬である WST-8 を用いて培養開始 14 日目と培養終了 21 日目の吸光度の差から細胞増殖率の測定する方法も MB 染色の結果との相関が認められた。このことから、2 つの方法を組み合わせることにより、より正確に形質転換巢を判定できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は発がん物質の *in vitro* スクリーニング試験である。多くの研究者に利用可能な試験にするため、OECD のガイダンスドキュメントに記載されている 96 ウェルプレート法について吸光度測定による客観的判定法の確立を目的としている。

これまで、主に細胞核を染色する MB を抽出し、その吸光度から形質転換巢が形成されているウェルを判定する方法を検討してきた。しかしながら、形質転換巢形成メカニズムに基づく判定法がよりよい判定法であることから、MB 染色以外の科学的根拠に基づく判定法の検討を行った。

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は、細胞の増殖期に化学物質で細胞を処理するイニシエーション試験と細胞がほぼコンフルとなった時期に処理するプロモーション試験からなるが、いずれの方法も細胞増殖が停止している接触障害状態で細胞を維持し、その状態から形質転換した細胞が増殖して形成される形質転換細胞集団（形質転換巢）を検出する試験系である。すな

わち、形質転換細胞の増殖を検出できれば、形質転換巢が形成されたウェルを検出できると考えられる。そこで、細胞毒性が無く、生細胞数を測定可能とされている WST-8 試薬を用いて形質転換細胞の増殖率を測定し、形質転換巢が形成されたウェルを判別する方法を検討した。また、その結果を、これまで実施してきた MB 染色による方法と比較し、その有効性を検討した。

B. 研究方法

96 ウェルプレートの各ウェルに Bhas 42 細胞を播種し、ガイダンスドキュメントに従ってイニシエーション試験では陽性対照物質として用いられる 3-methylcholanthrene (MCA) を、プロモーション試験では 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いて 96 ウェルプレート法による形質転換試験を実施した。培養終了後、固定した細胞を 0.2% MB 染色し、MB を 0.1 mol/L HCl 水溶液で抽出して吸光度（655 nm）を測定した。また、細胞増殖の測定については、イニシエーション試験およびプロモーション試験ともに、培養開始 14 日目（プロモーション試験の処理終了日）に WST-8 を 5 vol% 添加し、1 時間培養後に吸光度（450

nm) を測定した。その後、各ウェルの培養液または処理液を捨て、細胞を培養液で洗浄して、正常培地で 1 週間培養した。培養開始 21 日目に再度、WST-8 を 5 vol% 添加し、1 時間培養後に吸光度 (450 nm) を測定した (図 1)。吸光度測定終了後、細胞をホルマリン固定し、水洗・乾燥後、0.2% MB 染色し、MB を抽出し、吸光度 (655 nm) を測定した。水洗後、5 vol% ギムザ液 (pH6.8) で染色し、水洗・乾燥後に形質転換巣の形成された陽性ウェルをカウントした。

C. 研究結果

細胞増殖率を測定する前に、播種細胞数と WST-8 による吸光度の相関を調べた。ウェルあたりの播種細胞数を公比 2 で増やし、4 日間培養後に WST-8 試薬を 10 vol% 添加し、1 時間後に吸光度 (450 nm) を測定した。その結果、播種細胞数と吸光度はほぼ直線的相関のあることが確認された (図 2)。

次に、形質転換細胞の増殖率を WST-8 により測定し、形質転換巣が形成されたウェルを判定する方法について検討した。

イニシエーション試験における溶媒 (DMSO) 対照群の培養開始 14 日目、21 日目 (培養終了) の WST-8 の吸光度、および培養開始 21 日目の吸光度から 14 日目の吸光度を引いた吸光度、すなわち、培養終了までの 1 週間の細胞増殖率と陽性ウェルの結果を図 3 に示した。14 日目および 21 日目ともに高い吸光度を示すウェルが必ずしも陽性ウェル (図の赤い棒線、形質転換巣を形成したウェル) ではなかったが、その差をとることにより、WST-8 単独の結果よりも陽性ウェルを吸光度で区別しやすい傾向が認められた。次に、吸光度順に各ウェルを並び替えて、同一プレートの細胞増殖率の結果と MB 染色の結果を比較した (図 4)。その結果、どちらの方法でも陽性ウェルがすべて高い吸光度を示すとは限らなかった。しかしながら、観察による判定では陰性ウェルと判定されたが、ウェル側面に形質転換巣が形成されたウェル (図の白抜き赤い棒線) を陽性ウェルと判断すると、MB の吸光度が高いウェルはほぼ陽性ウェルとなり、これまでの結果と同様に MB の高い吸光

度は形質転換巣を形成していることが確認された。

同様の分析をイニシエーション試験の陽性対照物質である MCA およびプロモーション試験についても行った。MCA については、陽性ウェル数が増えたものの、MB の方がイニシエーション試験の DMSO と同様に陽性ウェル (ウェル側面の陽性ウェルを含む) の半分以上を確実に高い吸光度として検出した (図 5)。一方、プロモーション試験においては、溶媒対照である DMSO 処理群でもイニシエーション試験と同様の傾向を示したが、陽性対照物質である TPA の細胞増殖率は殆どが負の値を示し、明らかに他とは異なる結果となった。MB については、陽性ウェルの吸光度がイニシエーション試験の陽性対照物質である MCA に比べ、ばらつきが大きかったが、傾向としては他とほぼ同じであった (図 6)。

培養途中である培養開始 14 日目に WST-8 を処理した場合と処理しない場合の形質転換率を比較し、WST-8 前処理の影響を調べた (表 1)。その結果、いずれの場合もガイドスドキュメントの許容基準内の値であったが、WST-8 前処理により形質転換巣の形成された陽性ウェルの数が減少する傾向が認められた。

なお、陰性ウェルと陽性ウェルを区別するために、統計学的手法として判別分析も検討した。すなわち、MB 染色した陰性対照と陽性対照のプレートの既知データ (吸光度とその判定結果) を用いて、陰性ウェルと陽性ウェルを区別する吸光度 (カットオフ値) を統計学的に算出した。この方法は、陰性と陽性のウェルを良好に区別することが可能であったが、吸光度が実験毎にばらつくこの試験に適用することは困難であると考えられた。

D. 考察

現時点では、陰性と陽性ウェルを区別する判定基準の設定方法は、判別分析によるカットオフ値の決定など以外にも様々な方法が考えられるほか、様々な条件設定が必要であり、それらの設定の科学的根拠を求めるとは困難であり、シミュレーションにより決定する必要があると考えられる。

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は、接触阻止能を

保有する正常細胞が形質転換し、その細胞が増殖して形成した細胞集落（形質転換巣）を検出する試験である。したがって、増殖停止状態から形質転換して増殖する形質転換細胞の細胞増殖率を測定することにより、形質転換巣を検出できると考えられる。そこで、形質転換細胞が増殖を開始し、実験スケジュールに影響しない方法として、培養開始14日目の培地交換前にWST-8を添加し、その時点での生細胞率を測定し、培養終了21日目の細胞固定前に再度WST-8で生細胞率を測定することにより、7日間の細胞増殖率を測定することを試みた。

イニシエーション試験やプロモーション試験の溶媒対照群では、明らかな形質転換巣を形成したウェルでは7日間の細胞増殖率（21日目の吸光度から14日目の吸光度を差し引いた値）は高い値を示し、期待通りの結果が得られたが、全ての陽性ウェルが必ずしも高い値を示すとは限らず、陰性と陽性のウェルの区別という点ではMBの方が優れていた。また、プロモーション試験の陽性対照群（TPA処理群）では、殆どが負の細胞増殖率を示した。これは、培養開始14日目はプロモーション試験の処理最終日であることから、TPAの作用により細胞の増殖活性が高い状態で生細胞率を測定し、通常培地に交換して細胞活性が低下した7日後にさらに生細胞率を測定したためと考えられる。WST-8は、脱水素酵素により産生されるNADHの酸化還元反応を利用した発色反応であり、今回のWST-8による発色は細胞数に比例した値というよりも、TPA処理による細胞内活性の上昇を反映していると考えられる。また、形質転換誘発はラジカルスカベンジャーによって阻害されることが知られていることから、WST-8処理による形質転換率の低下傾向は、化学物質処理により発生する活性酸素などのラジカルがWST-8と反応したことによる可能性が考えられた。

WST-8前処理による細胞増殖率の測定によって、必ずしも陰性と陽性ウェルの区別はできなかったが、細胞増殖を指標とする方法の有効性やプロモーション試験における被験物質のプロモーション活性への応用も考えられる。

これまでの報告と同様に、MB染色が陰性と陽性ウェルを区別する有力な方法であるが、現時点では、それらを明確に区別できる科学的根拠がない。したがって、この試験の特徴である形質転換細胞の増殖を何らかの方法でとらえ、MB染色と組み合わせることによって、より正確に陽性ウェルを区別できる可能性があると考えられる。

E. 結論

形質転換巣のある陽性ウェルを判定するための基準値（カットオフ値）設定には、MB染色の吸光度利用に加え、この試験系の原理である形質転換細胞の増殖率を加味することで、MB染色単独よりも適切な判定法を設定できる可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

Tsujii S., Ohbayashi T., Yamakage K., Oshimura M., Tada M.: A Cytoplasmic form of Gaussia luciferase provides a highly sensitive test for cytotoxicity, PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0156202. doi: 10.1371/journal.pone.0156202. eCollection 2016.

2 学会発表

須藤鎮世、工藤季之、白菊敏之、小枝暁子、小松佳奈、関博、山影康次、山本美佳、若田明裕、松元郷六、森田健：変異原の閾値に関する共同研究：提案と予備試験結果、2016年、第45回日本環境変異原学会

H. 知的所有件の取得状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

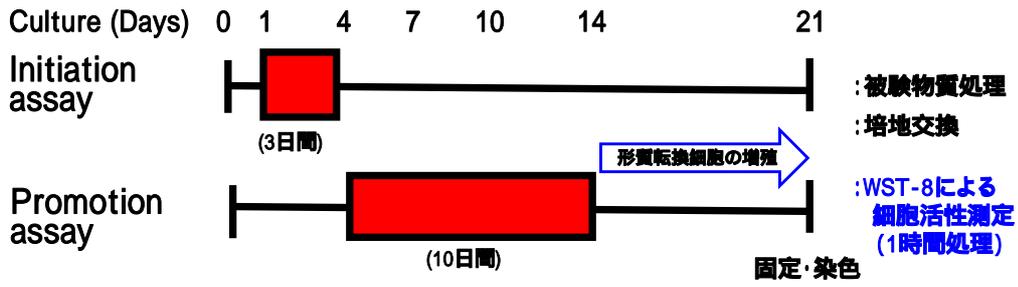
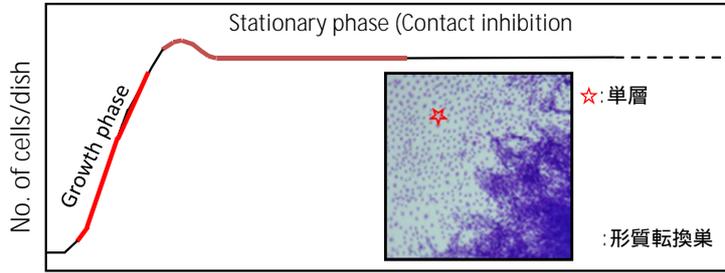


図1 Bhas 42細胞を用いる形質転換試験の細胞増殖に基づく判定法検討実験スケジュール

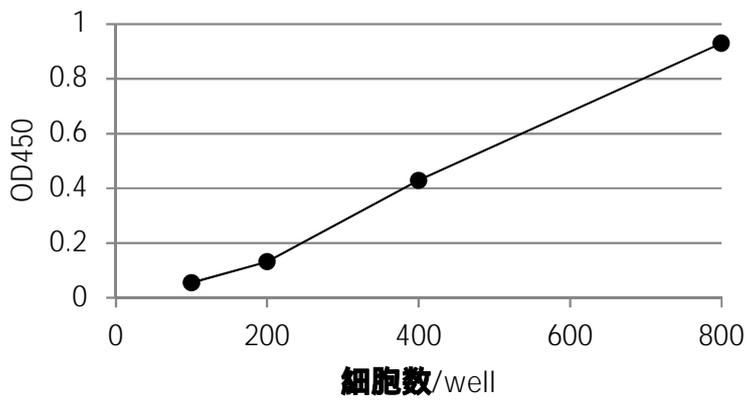


図2 Bhas 42細胞の播種細胞数とWST-8による吸光度の相関性

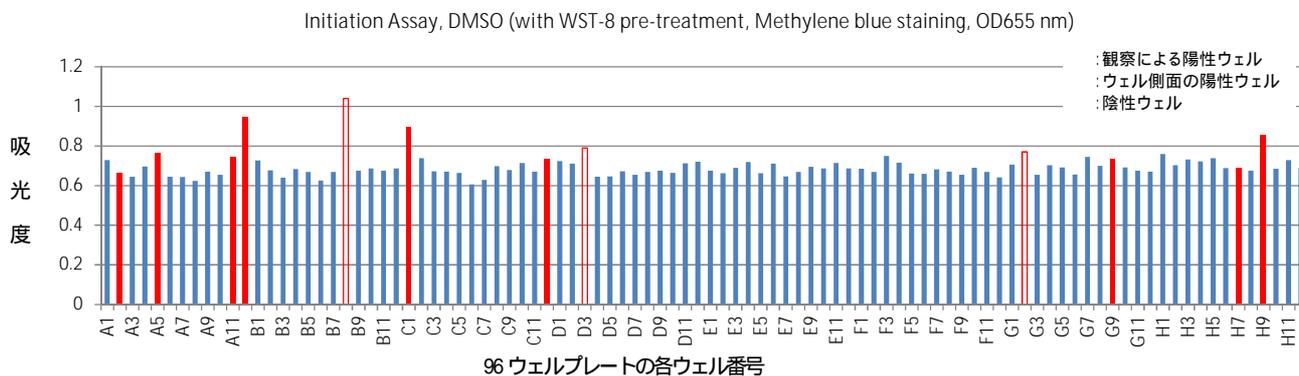
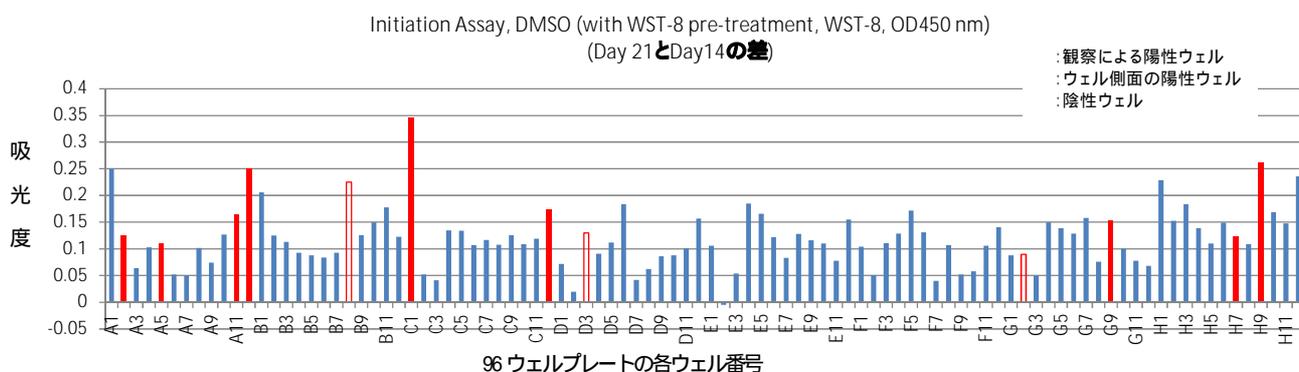
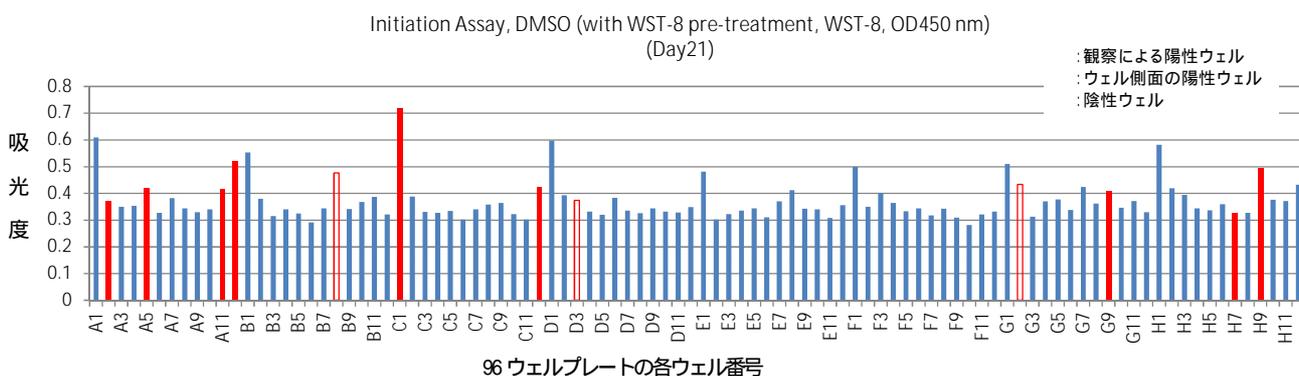
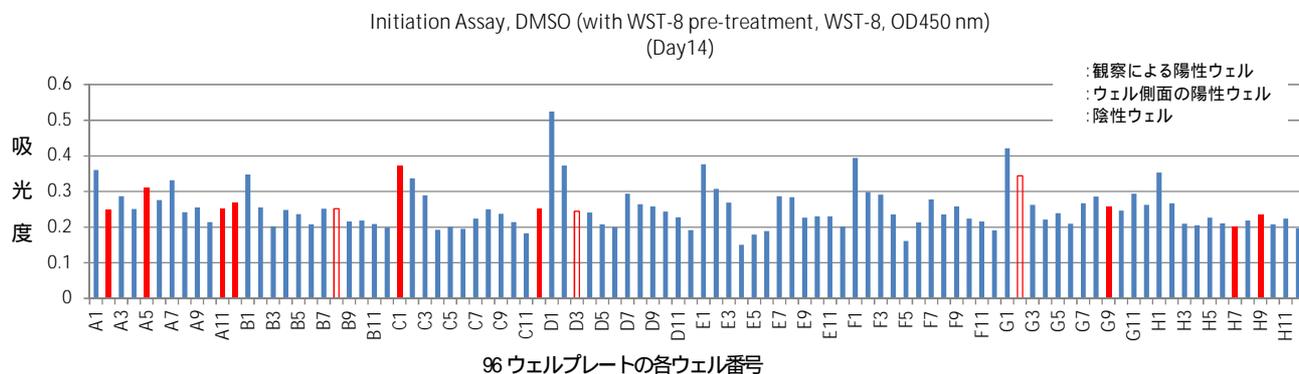


図3 DMSO対照群のイニシエーション試験における培養開始14日後および21日後のWST-8による吸光度(生細胞数)、14日~21日間の吸光度差(細胞増殖率)およびMB染色による吸光度と陽性ウェル(形質転換巢の認められたウェル)の出現パターン

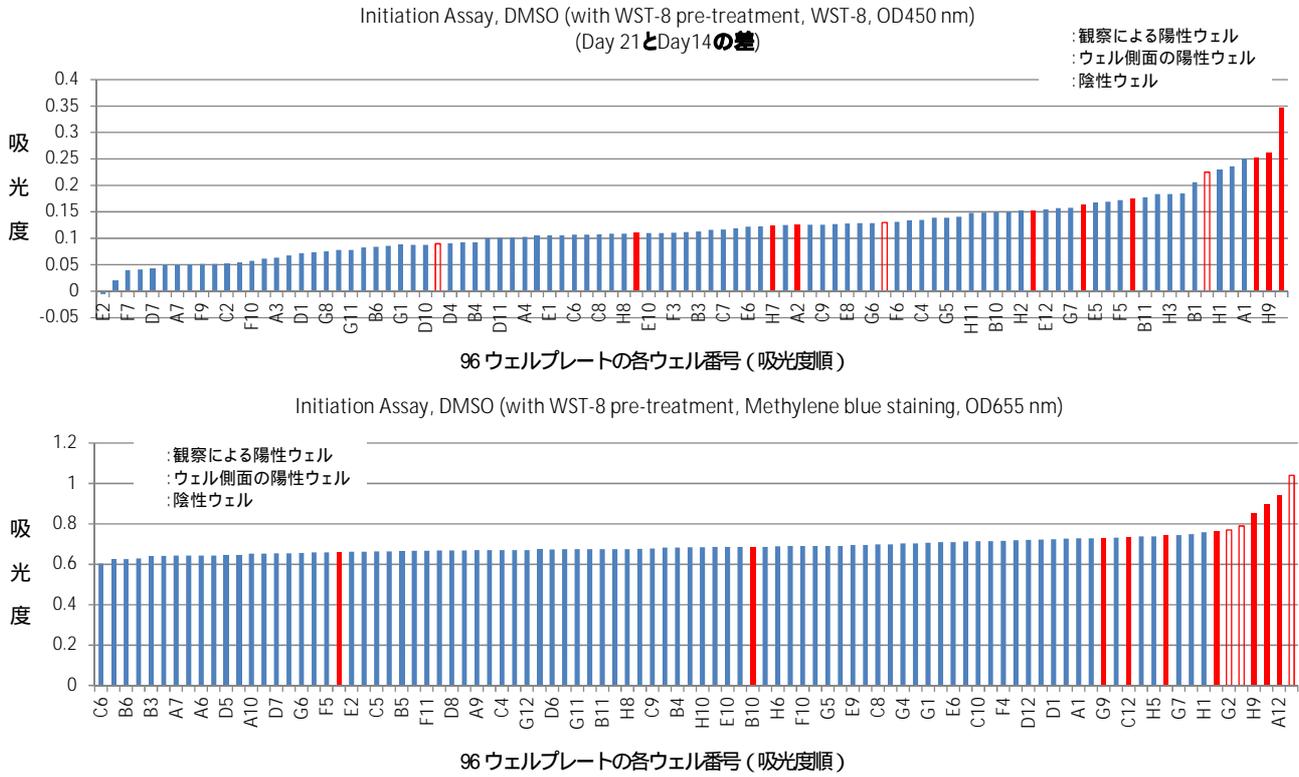


図4 各ウェルの細胞増殖率とMB染色の結果と形質転換薬の形成された陽性ウェルの出現パターン

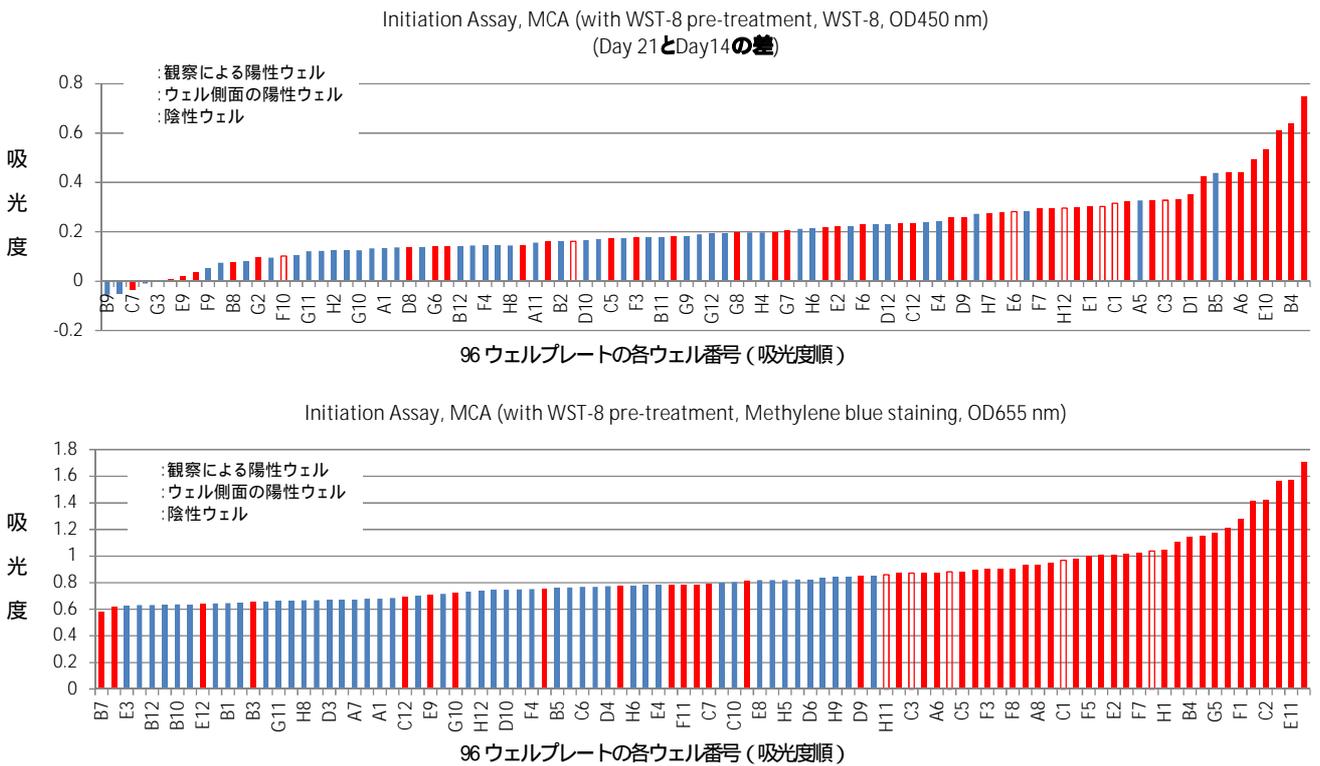


図5 MCAで処理(イニシエーション試験)した場合の細胞増殖率とMB染色の結果と陽性ウェルの出現パターン

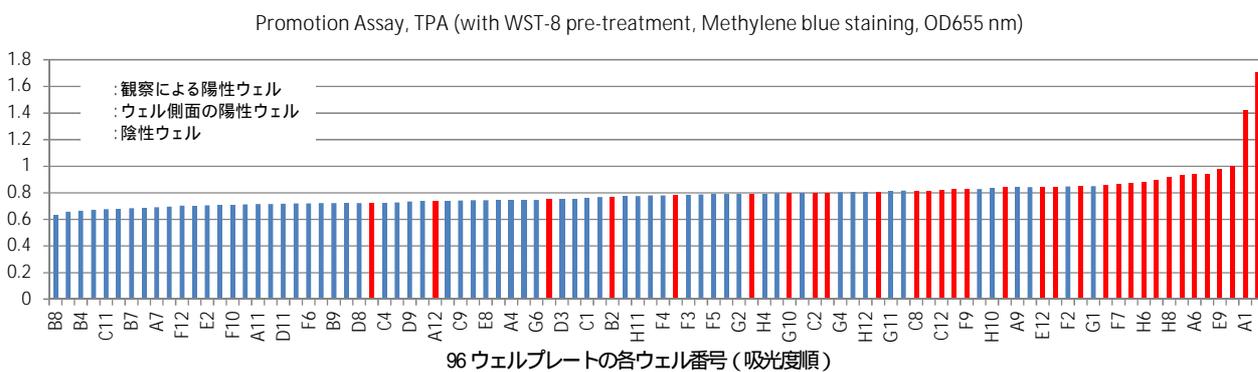
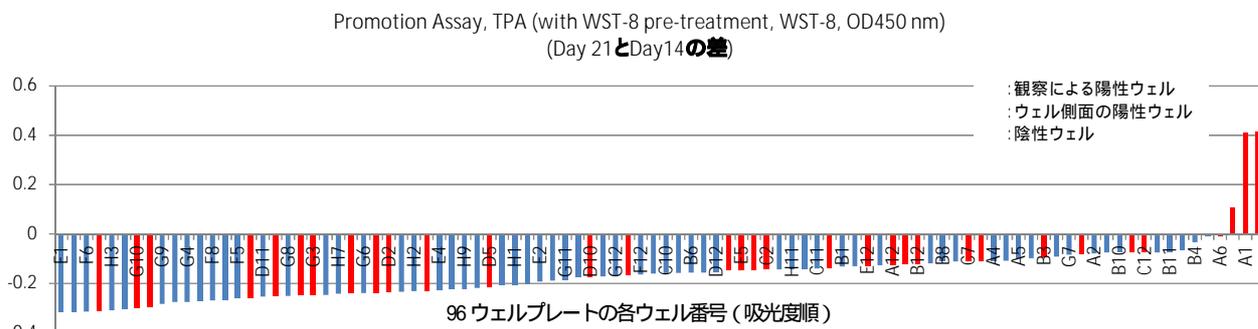
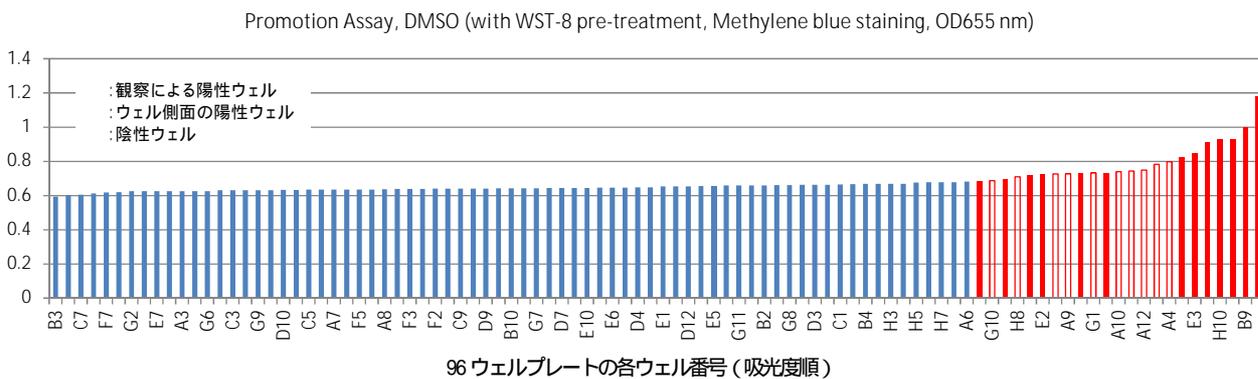
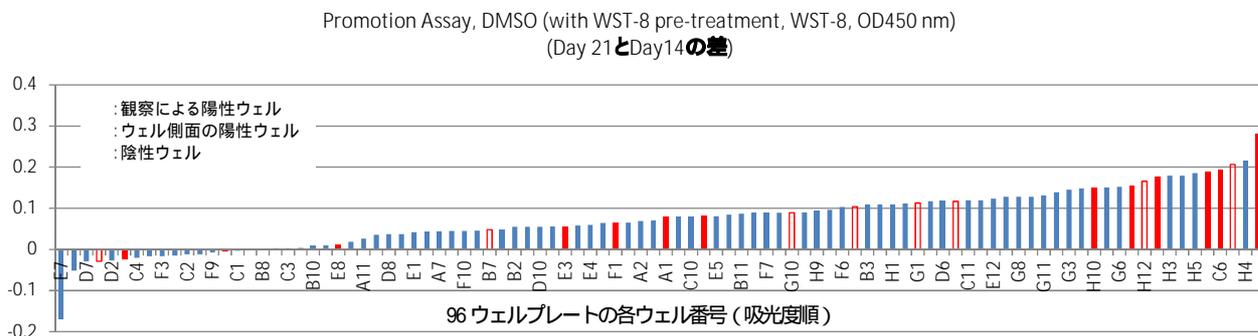


図6 プロモーション試験における細胞増殖率とMB染色の結果と陽性ウェルの出現パターン

表1 形質転換巢誘発に対する WST-8 処理の影響

処理群		陽性ウェル/カウントウェル数	
		WST-8 処理無し	WST-8 処理無し
イニシエーション試験	DMSO	11/96	9/96
	MCA	58/96	43/96
プロモーション試験	DMSO	19/96	12/96
	TPA	57/96	32/96