総 説

動物培養細胞を用いた食品機能と食品安全性の検定

清水 誠*・初谷泰夫*・岡田智行*

Evaluation of food functions and safety by using animal cell culture systems

Makoto SHIMIZU*, Yasuo HATSUGAI* and Tomoyuki OKADA*

* Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

1. はじめに

食品の生理機能や安全性を評価するための方法としては動物実験が広く用いられている。しかし、食品成分の生理機能や安全性を多種類のサンプル中に検索する場合や、その作用機構を細胞・分子レベルで解析するためには *in vitro* 系での実験が不可欠となる。幸い、この 20 年ほどの間に動物細胞の培養技術は急速に発展し、また様々な細胞株が入手可能になった。いくつかの欠点や限界は存在するものの、動物細胞培養系は手軽な検定系として今後ますますその重要性を増していくものと考えられる。本稿では、食品成分の「生理機能評価」と「安全性・毒性評価」における動物細胞培養系の有用性について考えて行きたい。

2. 生理機能評価と細胞培養系

食品の生理機能検定への動物細胞培養の利用については、昨年の本誌 6 月号に篠原による優れた総説があり¹⁾、最近用いられるようになった多くの食品機能検定系について具体的な例を挙げて説明が為されている(表 1)。これらの検定系は手法的にそれほど難しくないものも多く、大学・研究機関のみならず企業における機能性食品素材探索の手段としても広く用いられるようになっている。特に、様々な培養細胞株の樹立と初代培養技術の発展によって多様な細胞が使用できるようになり、実験の幅は

ますます拡大している。動物細胞の培養法や株化細胞の特性の詳細については最近の成書²⁾³⁾も参照していただきたいが、様々な新しい培養手法が次々に考案され、食品機能の解析に用いられるようになってきている。本稿ではその例として、特に 3 次元的な細胞培養系や、複数の細胞を同じチャンバー内で培養する共培養(複合培養)系を用いた機能解析法を中心にいくつか紹介する。

(1) ガン細胞の浸潤の評価系

ガン細胞の増殖やアポトーシスを観察する系、あるいはプロモーション活性を測定する系⁴⁾など、細胞レベルでの発ガンやガンの増殖を観察する手法は抗ガン活性を持つ食品成分の検索に有用であることは知られている。しかし、ガンを恐ろしい病気としている大きな理由の一つであるガン細胞の浸潤(転移)を抑制する食品成分の検索に関する研究はあまりなかった。YAGASAKI ら⁵⁾は、AKEDO ら⁶⁾の考案したガン細胞浸潤能測定系を用いて、ガン細胞浸潤抑制機能を持つ食品成分に関する研究を展開している。本実験系では、まずラット腸間膜から初代培養した中皮細胞を培養ディッシュ中に培養して細胞層を形成させ、その上からラット腹水肝ガン細胞 AH109A を重層して一定時間培養する。その後、中皮細胞層の下に潜り込んでいる AH109A 細胞の数を測定することによって浸潤能を評価しようというものである。この実験系に各種の食品を添加することによって、お茶類、コーヒー、ある種の野菜抽出物などの食品中にガン細胞浸潤

* 東京大学大学院農学生命科学研究科(〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

表 1 動物細胞を用いた食品機能検定系の例

食 品 機 能	細胞 (株化細胞の例)	指 標
細胞増殖	リンパ球系細胞	細胞数, 細胞周期
ガン細胞壊死	乳ガン細胞, 肝ガン細胞など	アポトーシスなど
細胞分化誘導	ヒト白血病細胞 (HL-60)	単球などへの分化
発ガンプロモーション抑制	ヒト B リンパ球 (Raji 細胞)	EBvirus 早期抗原
単球・マクロファージ活性化	単球・マクロファージ系細胞	食作用など
T 細胞活性化	T 細胞	チミジン取り込み
B 細胞活性化	B 細胞ハイブリドーマ	抗体産生量
インターフェロン産生増強	繊維芽細胞	IFN 産生量
メラニン産生調節	黒色肉腫細胞 (B16)	メラニン色素形成
抗アレルギー	マスト細胞 (MC/9)	ヒスタミン放出
脂肪細胞分化誘導	脂肪前駆細胞 (3T3L1)	形態, マーカー酵素
腸管吸収性	腸管上皮由来細胞 (Caco-2)	単層透過性など

篠原¹⁾の総説より任意に抜粋。

を抑制するものが見出され, さらにその有効成分としてクロロゲン酸⁷⁾, クルクミン⁸⁾などに抑制効果があることが示された。また, これらの食品成分をラットに経口摂取させ, 摂取後の血清を試料として上記の *in vitro* 浸潤能測定を行った結果, このような食品を摂取したラットの血清でもガン細胞の浸潤を抑制することも見出された。一方, 山本ら⁹⁾は, 透過性膜上に単層培養した内皮細胞株 HUVEC-C の上側に繊維肉腫細胞株 HT-1080 を加え, 下層に浸潤してくるガン細胞数を測定する系を用いて, カテキンの浸潤抑制作用を見出している。このように 2 つの異なる細胞を共培養することにより, ガン細胞の浸潤を制御し得る食品成分を定量的に評価できることが示唆された。

(2) 血管新生の評価系

ガンの増殖に重要な役割を担っている現象に血管新生がある。血管新生が始まるとともにガンは臨床的に悪性になるという事実から, その機構と阻害の方法を探る研究が進められてきた¹⁰⁾。これまでに内在性の調節因子を始めとする様々な抑制因子が見出されているが, 食品成分や食品関連因子による血管新生の抑制についての情報は少ない。血管新生を評価する系は *in vivo*, *in vitro* 系を含めていくつかあるが, KANAYASU ら¹¹⁾ は血管内皮細胞を用いた *in vitro* の系で, エイコサペンタエン酸 (EPA) のような高度不飽和脂肪酸が血管新生に及ぼす影響を調べている。この実験系は, コラーゲンゲルの上に血管内皮細胞をまき, さらにコラーゲンゲルを重層した後, インキュベートして血管内皮細胞がゲル内で形成するチューブ様構造を定量化する方法である。これに

よって, EPA のような食品成分にも血管新生を抑制する効果があることが見出された。血管内皮細胞は今では様々な株が市販されており, 上記の実験法はより身近なものとして利用できるようになっている。

(3) 食品成分の腸管吸収の評価系

食品因子の生体への作用を考える場合に重要なファクターとなるのが腸管における吸収性である。食品成分の吸収性を調べる場合には, それを動物に経口摂取させた後, 門脈血などを採って濃度を測定するといった方法がしばしば用いられる。しかし, 腸管吸収の機構を分子レベルで解析するのに上記の方法は不向きである。腸管上皮細胞の単層培養系を用いた実験系は, このような目的に適している¹²⁾。特にヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 は, 透過性膜上で培養すると細胞間のタイトジャンクションの発達した単層を形成し, 小腸上皮細胞に存在するような様々な酵素, トランスポーター, レセプターなどを発現する (図 1) ので¹³⁾¹⁴⁾, 小腸における物質の吸収を評価するモデル系として薬学分野では以前から使われてきた。薬物 (特に疎水性のもの) の透過性については, この実験系がヒトでの吸収試験¹⁵⁾ あるいはラットの腸管における透過実験¹⁶⁾ と良い相関を示すことが報告されている。この系が, 最近食品成分の吸収評価系としても用いられるようになった。例えば, TERAO ら¹⁷⁾¹⁸⁾ はケルセチンについて, また MURAKAMI ら¹⁹⁾²⁰⁾ は抗ガン活性を持つフラボノイドであるオーラブテンやノビレチンについて, その腸管吸収と腸管上皮細胞における動態について詳細な検討を行っている。

(4) 腸管上皮層を介した食品の生理機能の予測

図 1 ヒト腸管上皮由来細胞 Caco-2 を用いた培養系 (透過性等の試験系) と Caco-2 細胞が示す主な特性

食品因子自身を透過させるだけでなく、腸管上皮細胞層は食品成分が持つある種のシグナルを粘膜側(管腔側)で受容し、その刺激に応答して内因性因子(例えばホルモンやサイトカイン類)を基底膜側(血液側)に分泌する能力を持つと考えられる。内因性因子は腸管上皮下の他の細胞群の機能を変化させることが期待されるので、腸管上皮細胞の食品シグナル変換作用は食品の生理機能を考える上で重要である。我々は、このような腸管上皮層を介した食品の生理機能調節作用の一部を、複合培養系を用いて検出できるのではないかと考え、検討を開始している。例えば、Caco-2 細胞層の下側チャンバーにヒト単球系細胞 THP-1 を培養すると、THP-1 の食能が亢進する²¹⁾。これは Caco-2 から何らかの因子が分泌されて THP-1 細胞を活性化したためと考えられるが、食品成分中に Caco-2 からのこの因子の産生を促進するようなものがあれば、その食品成分は上皮下のマクロファージ系細胞の活性化機能を持った食品因子(自分自身はマクロファージ系細胞の活性化能を持たないにもかかわらず)ということになるであろう。同様に、Caco-2 細胞層の下側チャンバーに神経系細胞 PC12 を培養した系では、Caco-2 が分泌する神経増殖因子 (NGF) の作用によって PC12 が神経突起を伸ばし、ニューロン様細胞に分化することが見出された²²⁾ (図 2)。このような実験系を用いれば、腸管上皮細胞を刺激して上皮下の神経組織の増殖や機能分化を制御する食品因子の検索ができるかもしれない。

In vitro 系の細胞と生体の中の細胞ではその機能がかなり異なることが予想されるが、複数の細胞を組み合わせ、細胞間の相互作用を利用することにより、単一の細胞培養系では見られなかった機能が見られるようになる可能性があり、このような複合培養系は今後ますます増えていくものと推測される。

3. 毒性試験と細胞培養系

近年、環境中の有害物質(ダイオキシン、内分泌攪乱物質、金属類、そして多くの自然毒など)、強力な食中毒細菌 (O157 とその毒素など)、新規な病原体 (例えばプリオン) による食品の汚染が社会的な問題となっている。このような有害物質の存在をいかに迅速に感度良く検出できるか、またそれらをどのようにして食品から除去するか、経口的に侵入してくるそれら物質の脅威からいかにして身を守るかといった点が、技術開発の重要な標的として注目されている。有害物質には多様なものが存在するのでその検出は容易ではないが、細胞培養技術は毒性試験の有力な手段として活用されている。

(1) 細胞毒性の従来の試験法

細胞は、生体に比べてより鋭敏に有害物質の影響を受ける場合が多い。動物実験と違って、代謝の過程で生じる毒性物質などを評価するのは困難であるという欠点があるが、ある食品成分が細胞にとって有害か有害でないかを知ることは大切である。これまでに最も良く用いられている方法は、細胞の代謝活性を、代謝に関わる酵素

図 2 腸管細胞 Caco-2 と神経系細胞 PC12 の複合培養系 (A) と複合培養をすることによって PC12 に起こる変化 (B)

活性（ミトコンドリアの酵素など）を指標に測定する方法である。MTT assay と呼ばれる方法は古くから知られているが、最近では Alamar Blue assay のようなより簡便な系に置き換わりつつある。また、YAMASHOJI と ISSHIKI⁽²³⁾ は生細胞がメナジオン存在下で放出する過酸化水素を測定する新規な実験経を開発し、これによって迅速に細胞毒性を検出できることを示した。

一方、毒性物質によって細胞膜の透過性が亢進すると、細胞内の酵素（例えば乳酸脱水素酵素：LDH）が細胞外に漏出してくる。この漏出 LDH 活性を指標に細胞毒性を評価する方法や、死細胞では細胞外から侵入したトリパンブルーなどの色素が排除されないことを利用して、死細胞数を測定する方法も古くから用いられている。

(2) 細胞層の電気抵抗を指標とする毒性試験法⁽²⁴⁾

我々は、前述の Caco-2 細胞層を用いた実験の過程で、細胞にある種の有害成分が作用すると、細胞間の物質透過性を制御しているタイトジャンクションが開き、細胞層の電気抵抗（Trans epithelial electrical resistance: TEER または TER）が急激に低下することを見出した。そこで、この実験系が物質の毒性評価系として使用できないか検討したところ、細胞膜損傷性の毒性物質の添加

によって TER が急激に低下すること、その感度は従来の LDH 法よりもずっと高く、かつ短時間で検出ができることがわかった⁽²⁵⁾。そこで様々な有害物質を用いて検討をした結果、本試験法は、タンパク質合成を阻害するような毒物の検出には不向きであるものの、細胞骨格を変化させる成分や細胞膜に小孔を形成する成分などかなり広範囲の毒性物質に対応できることも分かった⁽²⁶⁾（表 2）。食品中の有害物質の 1 次スクリーニング系としては、このような測定系も有用であろう。また、本実験系は腸管細胞層を用いているので、腸管において炎症を引き起こす物質の検出などにも応用が可能と考えられる。

(3) 培養細胞を用いたダイオキシン類の検出

ダイオキシンの検出法開発については社会的な要請が大きい。現在、ダイオキシン測定には公定法として日本工業規格（JIS）で定められている高分解能ガスクロマトグラフ質量分析（HRGC-HRMS）が用いられている。この測定法では超微量のダイオキシンを測定することができるが、その反面、1) 高価な分析機器や熟練した技術が必要のために限られた機関でしか行えない、2) 分離・精製などの前処理に時間がかかるため素早い分析ができないといった問題が挙げられている。そこで免疫化学的

表 2 Caco-2 細胞層の経上皮電気抵抗 (TER) に及ぼす各種毒性物質の影響

毒 性 物 質	TER の低下
細胞膜損傷	
塩化ベンザルコニウム	++
サポニン	++
ディスコダーミン A	++
フラムトキシソ	++
アクチンフィラメントの脱重合	
ミカロライド B	++
アクチン重合阻害	
サイトカラシン D	++
タンパク質合成阻害	
オンナミド A	-
ペロ毒素 1 & 2	-
タンパク質ホスファターゼ 1 & 2A 阻害	
カリキュリン A	+++
オカダ酸	++
エネルギー代謝阻害	
アジ化ナトリウム	+

TER は試料添加後 90 分たった時の値で評価した。
 +++ : TER 低下率 80%以上, ++ : 80-40%,
 + : 40-20%, - : 20%以下 (変化なし)

測定法²⁷⁾が開発され、測定キットが市販されるようになった。この方法は、抗ダイオキシン抗体に対する抗原 (ダイオキシン) と酵素標識抗原との競合的免疫反応を利用して、未反応の酵素標識抗原量を測定することにより試料中のダイオキシン量を算出する。コストを公定法での検査費用の 1/10 程度に抑えることができる

え、時間を大幅に短縮することが可能である。ただし、公定法ほどではないが前処理は必要であり、また検出感度が劣るため精密な検査には向かないということは認識しておかなければならない。

しかし上記二通りの方法は、200 種類以上にものぼるダイオキシン類のうち、最も毒性の強い 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) を主な分析対象としており、ダイオキシン類の毒性を総合的に評価することはできない。公定法では分離・精製によりある程度の種類には対応できるが、手間がかかる。そこで現在研究が進められているのが、バイオアッセイを用いた分析手法である。ダイオキシン類は細胞内に入るとレセプター (AhR) と結合して核に移行し、ダイオキシン応答配列 (XRE) に結合することによって解毒酵素等の発現を誘導する。そこで XRE 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子などを連結したプラスミドを培養細胞に導入することにより、ダイオキシン類に反応して酵素活性の上昇が誘導されるような細胞株の作出が可能になると考えられる (図 3)。このような実験系は、多くの種類が混在するダイオキシン類の毒性を総合的に評価できる系として有用と考えられる。

こうした研究は国内外のいくつかのグループで行われている。我々も上記のような XRE 配列を組み込んだプラスミド (pGL3-XRE) を作製するとともに、カリフォルニア大学の TUKEY 博士から供与されたダイオキシン応答性のプラスミド (pSVOL-CYP1A1N)²⁸⁾ をヒト肝臓由来細胞 HepG2 に導入して、それぞれ一過的に発現させてダイオキシンに対する応答性を観察した。その結果、10 nM TCDD で 24 時間処理するとコントロール区と比べ pGL3-XRE では 6 倍程度、pSVOL-CYP1A1N では 30 倍以上の酵素活性が得られた (図 4)。ANDERSON

図 3 ダイオキシン検出のためのレポーターアッセイの概要

ルシフェラーゼ (Luc) の上流にダイオキシン類応答配列 (XRE) を含むように構築したプラスミドを腸管細胞や肝細胞に導入して、ダイオキシン (TCDD) の添加による酵素活性の誘導を観察する。

図4 XRE配列を含む2つのプラスミド, pGL3-XRE および pSVOL-CYP1A1Nを導入した HepG2細胞の TCDD に対する応答性細胞を 10 nM TCDD で 24 時間処理した時の酵素活性の上昇を示した。

ら²⁹⁾や MURK ら³⁰⁾も同様の手法を用いて海岸堆積物や水中のダイオキシン類測定を行っており、この手法の有用性が認められつつある。利点としては1) 操作が比較的簡便でしかも安価である、2) 前処理がほとんど必要なく公定法より大幅に時間を短縮できる、3) ダイオキシン類個々の化合物を測定することなく総毒性量を計測できるということが挙げられている。しかし、現段階では検出感度に限界があり定量性に欠けることは免疫化学測定法と同様である。つい最近になって、このようなレポーターアッセイを用いたダイオキシン測定技術が実用化され³¹⁾、国内での提供が開始された。今後は公定法や免疫測定法と並んで、バイオアッセイを用いたこのようなダイオキシン測定技術が広範囲で迅速な検査として一般化してくるものと推定される。

4. 最後 に

本稿で述べてきたように、動物細胞培養法は食品機能や安全性の研究にとって無くてはならない技術となっている。しかも、複合的な培養系の構築や、特定の遺伝子を導入して高発現させた細胞、あるいはある遺伝子の発現を抑制したノックアウト細胞のようなものを作成する細胞工学的技術が進展することによって、より効率的な評価系を設計することも可能になってきた。この分野の今後の発展に関心を持って見守っていきたい。

文 献

- 1) 篠原和毅：食科工，47，399 (2000)。
- 2) 食品機能研究法，篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一編著（光琳，東京）(2000)。
- 3) 動物細胞工学ハンドブック，日本動物細胞工学会編（朝倉書店，東京）(2000)。
- 4) 小清水弘一：化学と生物，29，598 (1991)。
- 5) 矢ヶ崎一三：栄食誌，53，123 (2000)。
- 6) AKEDO, H., SHINKAI, K., MUKAI, M., MORI, Y., TATEISHI, R., TANAKA, K., YAMAYOTO, R. and MORISHITA, T.: *Cancer Res.*, 46, 2416 (1986)。
- 7) YAGASAKI, K., MIURA, Y., OKAUCHI, R. and FURUSE, T.: *Cytotechnology*, 33, 229 (2000)。
- 8) KOZUKI, Y., MIURA, Y. and YAGASAKI, K.: *Cytotechnology*, 35, 57 (2001)。
- 9) 山本万里：食科工，47，567 (2000)。
- 10) 佐藤靖史：化学と生物，37，306 (1999)。
- 11) KANAYASU, T., MORITA, I., NAKAO-HAYASHI, J., ASUWA, N., FUJISAWA, C., ISHI, T., ITO, H. and MUROTA, S.: *Lipids*, 26, 271 (1991)。
- 12) 清水 誠：バイオサイエンスとインダストリー，55，952 (1997)。
- 13) PINTO, M., ROBINE-LEON, S., APPAY, M.D., KEDINGER, M., TRIADOU, N., DUSSAULX, E., LACROIX, B., SIMON-ASSMAN, P., HAFFEN, K., FOGH, J. and ZWEIBAUM, A.: *Biol. Cell.*, 47, 323 (1983)。
- 14) HIDALGO, I.J., RAUB, T.J. and BORCHARDT, R.T.: *Gastroenterology*, 96, 736 (1997)。
- 15) ARTURSSON, P. and KARLSSON, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 880 (1991)。
- 16) KIM, D.-C., BURTON, P.S. and BORCHARDT, R.T.: *Pharm. Res.*, 10, 1710 (1993)。
- 17) IKENO, A., HASHIMOTO, K., SHIMIZU, M., TERAU, J., KUMAZAWA, S. and NAKAYAMA, T.: *Food Sci. Technol. Res.*, 5, 90 (1999)。
- 18) MUROTA, K., SHIMIZU, S., CHUJO, H., MOON, J.H. and TERAU, J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 384, 391 (2000)。
- 19) MURAKAMI, A., WADA, K., UEDA, N., SASAKI, K., HAGA, M., KUKI, W., TAKAHASHI, Y., YONEI, H., KOSHIMIZU, K. and OHIGASHI, H.: *Nutr. Cancer Intern. J.*, 36, 199 (2000)。
- 20) MURAKAMI, A., KUWAHARA, S., TAKAHASHI, Y., ITO, C., FURUKAWA, H., JU-ICHI, M., KOSHIMIZU, K. and OHIGASHI, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 194 (2001)。
- 21) KANZATO, H., MANABE, M. and SHIMIZU, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 449 (2001)。
- 22) SATSU, H., YOKOYAMA, T., OGAWA, N., FUJIWARA-HATANO, Y. and SHIMIZU, M.: *Cytotechnology*, 35, 73 (2001)。
- 23) YAMASHOJI, S. and ISSHIKI, K.: *Cytotechnology*,

- 311, 45 (1999).
- 24) 清水 誠, 岡田智行 : 食衛誌, **40**, 259 (1999).
- 25) NARAI, A., ARAI, S. and SHIMIZU, M. : *Toxicol. in Vitro*, **11**, 347 (1997).
- 26) OKADA, T., NARAI, A., MATSUNAGA, S., FUSEYANI, N. and SHIMIZU, M. : *Toxicol. in Vitro*, **14**, 219 (2000).
- 27) 牛山正志 : ぶんせき, **10**, 736 (1998).
- 28) POSTLIND, H., VU, T.P., TUKEY, R.H., and QUATTROCHI, L.C. : *Toxicol. and Appl. Pharm.*, **118**, 255 (1993).
- 29) ANDERSON, J.W., JONES, J.M., HAMEEDI, J. and TUKEY, R.H. : *Marine Environ. Res.*, **48**, 407 (1999).
- 30) MURK, A.J., LEGLER, J., DENISON, M.S., GIESY, J.P., VAN de GUCHTE, C. and BROUWER, A. : *Fund. and Appl. Toxicol.*, **33**, 149 (1996).
- 31) 村田弘司 : 環境研究, **119**, 75 (2000).

(平成 13 年 4 月 27 日受理)