ノート

化学発光法を用いた細胞毒性試験法の検討

(平成9年5月2日受理)

北村和子* 諏訪芳秀*

Application of Chemiluminescent Assay in Cytotoxicity Tests

Kazuko KITAMURA and Yoshihide SUWA

(Institute for Fundamental Research, Suntory Co., Ltd.: 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618, Japan)

This study showed that chemiluminescent (CL) assay is superior to Giemsa staining assay or MTT reduction assay in sensitivity and rapidity for detection of the cytotoxic effects of four compounds (phenobarbital sodium, theophyllin, propranolol and thioridazine). Furthermore, HepG2 cells were found to be more suitable for CL assay than intestine 407 cells, being more susceptible to the toxicity of the four compounds.

(Received May 2, 1997)

Key words: 細胞毒性試験 cytotoxicity test; 化学発光法 chemiluminescent assay; ヒト小腸上皮細胞 intestine 407; ヒト肝ガン細胞 HepG2

緒言

動物実験代替法のひとつとして、ヒト細胞を含めた各種動物細胞を用いた細胞毒性試験がある。

細胞毒性を測定する方法としては大別して2タイプがある。まず、ひとつのタイプは被験物質処理後の生細胞数を測定して細胞毒性を推定するギムザ染色法、MTT還元法¹⁾及びニュートラルレッド(NR)法²⁾に代表される方法である。これに対して被験物質処理後の細胞死を測定するLDH法^{3)~5)}に代表される方法も広く用いられている。

山庄司らが考案した、化学発光法を導入した細胞毒性試験^{6)~9)}は前者の方法に属する。すなわち、本法は生細胞のみが細胞内に取り込んだメナジオン(ビタミンK₃)を代謝し、NAD(P)Hに依存して過酸化水素を生成することに着目し、生成した過酸化水素がビス[2-(3,6,9-トリオキサデカニルオキシカルボニル)-4-ニトロフェニル]オキサレート(TDPO)とピレンによる蛍光反応を触媒・亢進することを応用したものである。この方法は他の試験法と比較して、簡便でしかも短時間で毒性を検出することが期待できる方法である。しかしなが

ら、本法は現在開発途上にあり、以下の懸案事項の克服が待たれるところである。

それらは(1)本法に適した細胞種及び被験物質処理時間の選定、(2)非特異的な化学発光の排除、(3)代謝活性化法の導入、そして(4)多くの有毒物質に関する本法による毒性データの蓄積である。

著者らはこれらの事項のうち(1)について検討するためMEIC(Multicentre Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity, organized by the Scandinavian Society of Cell Toxicology)¹⁰⁾に記載されている物質の中から4化合物[フェノバルビタールナトリウム(CAS番号57-30-7)、テオフィリン(58-55-9)、プロプラノロール(3506-09-0)、チオリダジン(130-61-0)]を選び、それらを用いて化学発光法による細胞毒性試験の優位性について、ギムザ染色法及びMTT還元法と比較検討した。これらの化合物を選択するに際しては、食品あるいは食品素材の安全性評価を想定して強い毒性を示す物質はあえて除外した。4種の化合物はいずれも医薬品としても使用され、いわゆる毒物ではない。食品の毒性を検出する目的からは比較的毒性の低い物質でも検出できる手法が望ましい。また、テオフィリンは茶類などの嗜好品にも含まれる食品成分でもある。フェノバルビタールナトリウムは、薬物代謝酵素を誘導する薬物であり今後、代謝活性

* サントリー(株)基礎研究所: 〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1

化法を導入するに当たり必要であると判断した。また、食品あるいは食品素材の安全性評価には、消化器官由来の細胞で毒性の検出感度が高い細胞を用いることも重要と考え、小腸上皮細胞 (intestine 407) あるいは肝細胞 (HepG2) を用いて、毒性検出感度を比較した。

実験方法

1. 供試細胞及び培養方法

HepG2 (Human hepatocellular carcinoma, ヒト肝ガン細胞 ATCC HB8065) は 10% 牛胎児血清 (FBS), 4 mmol/L L-グルタミン及び 1% ペニシリン G を含む Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (D-MEM) を用いて、また、intestine 407 (ヒト胎児小腸上皮細胞 ATCC CCL6) は 10%FBS 及び 4 mmol/L L-グルタミンを含む Eagle's minimum essential medium (E-MEM) を用いて培養した。いずれの細胞も、37°C における 5%CO₂ 飽和蒸気圧下で培養し、実験に供した。

2. 供試試薬

TDPO, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), フェノバルビタールナトリウムは和光純薬工業(株)製を、テオフィリン、メナジオン (ビタミン K₃)、ビレンはナカライテスク(株)製を、プロプラノロール、チオリダジンは Sigma 社製を用いた。TDPO, ビレンの溶解には高速液体クロマトグラフ用アセトニトリルを、メナジオンは特級エタノール [いずれも和光純薬工業(株)] を用いて溶解し、他の試薬は蒸留水 (NANO pure; Barnstead) に溶解した。

3. ギムザ染色法

細胞を培地中に懸濁させ、96 穴マイクロプレート (Nunc) に分注 (10³ cells/100 µL/well) した後、48 時間培養した。培養後、培地を除去し PBS で洗浄後、新しい培地を 100 µL ずつ分注し、被験物質 (フェノバルビタールナトリウム; 0, 5, 10, 20, 30 mmol/L, テオフィリン; 0, 5, 10, 20, 30 mmol/L, プロプラノロール; 0, 200, 300, 400, 500 µmol/L, チオリダジン; 0, 10, 20, 40, 50 µmol/L) を 10 µL ずつ添加した。3 時間の処理後、被験物質を除去し、新しい培地で洗浄後、培地を新たに 100 µL ずつ分注し、更に 48 時間培養した。培養後、培地を除去し、PBS で洗浄後、メタノールで 20~30 分間固定した。次に、30~60 分乾燥させ、4% ギムザ染色液で 30 分間染色した。染色液を除去し、2~3 時間風乾させ、マイクロプレートリーダー (EL 312 e 型; BIO-TEK Instruments) を用いて 540 nm にて吸光度を測定した。測定値より細胞の相対的生存率を求め、IC₅₀ 値を算出した。実験は 2 回実施し、処理濃度当たりの被験物質数は 3 サンプルとした。

4. MTT 還元法

96 穴マイクロプレート (Nunc) に細胞懸濁液 (6 × 10³ cells/100 µL/well) を播種し、培地で処理濃度に調製し

Fig. 1. Plot of chemiluminescence (CL) intensity vs. logarithm of H₂O₂ concentration

Fig. 2. Plot of cell density vs. menadion-catalyzed H₂O₂ production

Trypsinized cells were diluted with medium to obtain samples of various numbers of cells per well of a 96-well tissue culture plate. Samples of 100 µL of cell were introduced into each well. Chemiluminescent assay of H₂O₂ production was performed as described in Materials and Methods.

Closed symbols: H₂O₂ generated from HepG2; Open symbols: H₂O₂ from intestine 407.

た被験物質 (ギムザ染色法と同じ種類と処理濃度) を 100 µL 添加した。48 時間培養後、MTT の 4 mg/mL PBS 溶液を 20 µL ずつ各ウェルに分注し 37°C で 4 時間処理した。次に 1,800~2,000 rpm で 5 分間遠心分離し上清を除去した。各ウェルに 0.04 mol/L 塩酸-イソプロピルアルコール溶液を 150 µL ずつ分注し、マイクロプレート用ミキサー (MPM-1; Iwaki) で生成したフォルマザンを 5~10 分間抽出した。マイクロプレートリーダー (前記) で 540 nm における抽出液の吸光度を測定した。測定値より細胞の相対的生存率を求め IC₅₀ 値を算出した。実験は 2 回実施し、処理濃度当たりの

Fig. 3. Influence of treatment-time on the appearance of cytotoxicity

Bars show the mean IC₅₀ values in three separate experiments. Trypsinized cells were diluted with medium and introduced into 96-well tissue culture plates at 50,000 cells/well (24 hr) or 10,000 cells/well (48 hr).

The cells were incubated with test compounds for 24 hr or 48 hr. Then the cells were washed with medium and fresh medium was added. Viability was determined by CL assay.

被験物質数は3サンプルとした。

5. 化学発光法

96穴マイクロプレート (Nunc) に細胞懸濁液 (3時間処理は 6×10^3 cells, 24時間処理は 5×10^4 cells, 48時間処理は 10^4 cells/100μL/well) を播種し, 被験物質 (ギムザ染色法と同じ種類と処理濃度) を 10 μL ずつ添加した。各々の処理時間後に被験物質を除去し, 新しい培地を 100 μL ずつ分注し, 更に 48時間培養した。培養後, フェノールレッドとグルタミンを含有しない MEM 培地 (Sigma M4144) で洗浄後, 更に新しい培地を 100 μL ずつ分注した。ルミネセンサー (AB-2000; ATTO) を用いてメナジオンを用いた化学発光法により細胞の過酸化水素生成量を測定した。測定値より細胞の相対的生存率を求め IC₅₀ 値を算出した。化学発光法による過酸化水素の測定は 0.2 m mol/L メナジオン [ナカライテスク (株)] のエタノール溶液 2 μL を測定用培

地 50 μL とともに 5 分間 37℃ でインキュベートした後に, TDPO とピレンの高速液体クロマトグラフィー用アセトニトリル混合溶液 100 μL を各ウェルに分注した。その直後の 10 秒間の発光量を測定し, そのうちの最初の 5 秒間の発光量を積算した。なお, 試薬はすべて自動的に分注した。実験は 2 回実施し, 処理濃度当たりの被験物質数は 3 サンプルとした。

実験結果

1. 過酸化水素濃度と化学発光量の関係

過酸化水素濃度と化学発光量の関係を Fig. 1 に示した。試薬により調製した過酸化水素濃度 ($10^{-7} \sim 10^{-3}$ mol/L) と化学発光量の間には良好な直線性が得られた。次に, 試験に用いる 2 種の細胞 (intestine 407 及び HepG2) からメナジオン添加によって生成する過酸化水素量を測定した (Fig. 2)。その結果, intestine 407 に比べ HepG2 のほうが過酸化水素生成量が 3~4 倍程

Fig. 4. Comparison of susceptibilities of HepG2 cells and intestine 407 cells in the CL assay

Bars represent mean IC₅₀ values for three separate experiments.

Trypsinized cells were diluted with medium and introduced at 10,000 cells/well into 96-well tissue culture plates. The cells were incubated with each chemical for 3 hr. Then they were washed and incubated in fresh medium for 48 hr. Viability was determined by CL assay.

度多いことが分かった。また、測定に最適な発光量を得るためには細胞種により試験に供する細胞数を変える必要があることが分かった。(過酸化水素を約 10 μmol/L 生成するに十分な細胞数を基準とし、intestine 407 については 10⁵ cells/100 μL/well, HepG2 は 10⁴ cells/100 μL/well と設定した。)

2. 被験物質処理濃度及び時間による毒性評価

MEIC 記載の 4 種の化合物の intestine 407 及び HepG2 の両細胞に対する細胞毒性を化学発光法で評価したところ、いずれの被験物質にも濃度依存的な生物活性 (viability) 低下作用を認めた (図示せず)。被験物質処理時間 (24 時間あるいは 48 時間) の違いによる intestine 407 及び HepG2 における毒性発現の較差を示す (Fig. 3)。2 種の細胞を用いて二つの処理時間によってもたらされた 4 種の化合物の IC₅₀ 値の中での最低値は、フェノバルビタールナトリウムでは 4.63 mmol/L (HepG2 に対する 24 時間処理)、テオフィリンでは 10.85 mmol/L (intestine 407 に対する 48 時間処理)、

プロプラノロールでは 113.56 mmol/L (HepG2 に対する 48 時間処理) 及びチオリダジン 13.55 mmol/L (HepG2 に対する 48 時間処理) であった。フェノバルビタールナトリウムの HepG2 に対する IC₅₀ 値が 24 時間処理の場合に 48 時間処理に比べ 26% ほど低値を示したことを除いては、4 種の化合物とも 48 時間処理の方が毒性が強く認められた [IC₅₀ (24 hr/48 hr) 比で 1.16~3.02]。

また、いずれの化合物でも intestine 407 に対しては 48 時間処理の場合に細胞毒性は強く発現した (Fig. 3)。

3. 細胞種による検出感度の比較

次に処理時間を 3 時間に限定した場合の両細胞種の 4 種の化合物に対する感受性を比較した (Fig. 4)。Intestine 407 に比べ HepG2 の方が、毒性の検出感度が概して高い傾向が認められた。したがって、当初 intestine 407 が消化管由来の細胞であり消化管に対する毒性の検出には適していると考えられたものの、感度の点では HepG2 のほうが優れていることが明らかになった。

Fig. 5. Comparison of susceptibilities of HepG2 cells determined by Giemsa staining assay, MTT reduction assay and CL assay

Bars represent mean IC₅₀ values in 3 separate experiments.

The procedures for the three assays are described in Materials and Methods.

ND: not detected

4. 細胞毒性試験法の比較

HepG2を用いて、ギムザ染色法、MTT還元法及び化学発光法による細胞毒性試験法から得られたIC₅₀値をFig. 5に示した。それぞれの被験物質処理時間は、ギムザ染色法及び化学発光法では3時間、MTT還元法では48時間である。4種の化合物のIC₅₀値は化学発光法を用いて求められた値が、他の2法を採用した場合に比べ25~75%低いことが判明した。したがって、いずれの化合物においても化学発光法のほうが高感度に毒性を検出できることが分かった。

考 察

毒物には濃度に応じて即時的に毒性を示すものと、慢性的あるいは蓄積されて毒性を示すものがある。毒物が安定であれば、処理時間とともに毒性が強くなることは当然考えられるが、細胞に対する処理時間の長期化によって毒性を発現する傾向の強い物質は、細胞への取り込みや代謝活性化に時間を要するものもあると思われ

る。濃度に応じて毒性を示す物質は種々の細胞毒性試験法で検出可能であるが、慢性的あるいは蓄積されて毒性を示すものは困難である。今回の実験を通じ、化学発光法と2種の試験法を比較検討した結果、化学発光法は接着、浮遊細胞のいずれをも用いることができ、また、測定時間が数分で終了するため、被験物質処理時間の細かい設定が可能であった。他方、ギムザ染色法は接着細胞のみ、また、MTT還元法は接着、浮遊細胞のいずれに対しても用いることができるが、共に指標色素の取り込みに時間を要し、測定までの間の細胞の生物活性の変化を見ることができない。したがって、化学発光法の優位性としては濃度に応じて毒性を示す物質と慢性的あるいは蓄積されて毒性を示す物質の両者を対象として、まず分単位での毒性発現パターンを検討することが可能である点を挙げられる。化学発光法は、遅発性、即発性の両方の毒性を把握できる優れた方法であると言えよう。

更に、化学発光法は他の試験法に比べ試験期間も短く

(化学発光法: 1~3日, MTT法: 3日, ギムザ法: 5日) 多種の被験物質を1度に処理することができるため, 迅速な対応が可能な試験法であると言える。

本報では細胞種によって検出感度が異なることを示した。すなわち, intestine 407 に比べ HepG2 の方が毒性の検出感度が概して高い傾向が認められた。ちなみに, 山庄司ら⁹⁾により, PC-3, NIH/3T3, HuH-6KK 及び CLL64 の各細胞種の生成過酸化水素量が示されている。これによると各細胞種を用いた場合の過酸化水素生成量は, 今回の実験における intestine 407 と同程度であり, HepG2 採用時よりも低いものと見なされる。化学発光法による細胞毒性試験では, まず HepG2 の採用を考えるべきと思われる。

結 論

メナジオンの還元的代謝を利用した化学発光法による細胞毒性試験を検討した結果, 以下の結論を得た。

1. 本法は分単位での毒性発現パターンを解析することが可能である。
2. 本法の毒性検出感度はギムザ染色法や MTT 還元法よりも 3~4 倍程度優れていた。
3. 本法に用いる細胞としては, ヒト胎児小腸上皮細胞 (intestine 407) よりもヒト肝ガン細胞 (HepG2) のほうが感度の点で優れていた。

謝 辞

化学発光法の導入と検討にあたり, 貴重なご助言をいただきました神戸学院女子短大, 山庄司志朗教授に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Mosmann, N.: J. Immun. Meth. **65**, 55~63 (1983).
- 2) Borenfreud, E., Puerner, J. A.: Toxicol. Lett. **24**(1), 19~23 (1985).
- 3) Korenzeniewski, C., Callewart, D. M.: J. Immunol, Methods **64**, 313~318 (1983).
- 4) Szekers, J., Pacsa, A. S., Pejtsik, B.: *ibid.* **40**, 151~157 (1981).
- 5) Sasaki, T., Kawai, K., Ohno, T.: Toxicol. *in Vitro* **6**(5), 451~457 (1992).
- 6) Yamashoji, S., Ikeda, T., Yamashoji, K.: Anal. Biochem. **181**, 149~152 (1989).
- 7) Yamashoji, S., Ikeda, T., Yamashoji, K.: Biochem. Biophys. Acta **1,059**, 99~105 (1991).
- 8) Yamashoji, S., Ikeda, T., Yamashoji, K.: Anal. Biochem. **207**, 255~260 (1992).
- 9) 山庄司志朗, 西本普喜子: 組織培養 **20**(4), 155~159 (1994).
- 10) Ponsoda, X., Jover, R.: Toxicol. *in Vitro* **9**(6), 959~966 (1995).