

チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる 染色体異常試験に関する操作の検討

須井 哉, 新妻 健, 高橋俊孝, 佐々木澄志, 倉富美紀, 原 巧

Examination of test procedures for chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster cells

Hajime SUI, Takeru NITSUMA, Toshitaka TAKAHASHI,
Kiyoshi SASAKI, Miki KURATOMI, Takumi HARA

諸言

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(*in vitro* 染色体異常試験)は、染色体の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を調べる試験で、化学物質の有害性調査、医薬品や医療機器の開発段階において、遺伝毒性を評価する際の標準的のバッテリー試験の1つとして、実施が行政的に要求される。*In vitro* 染色体異常試験は、細胞播種、被験物質による細胞処理、コルセミド処理による細胞周期のM期停止、スライド標本作製、光学顕微鏡下における標本観察、という手順で行われる¹⁾。試験の説明や試験操作に関する注意点については成書²⁾も存在するが、国際的に認められた最新の標準的な試験方法はOECD TG473(2016)³⁾に記載されている。したがって、化学物質の安全性評価はOECD TG473(2016)に準拠して実施される。

弊所ではOECD TG473(2016)に準拠した試験を安定して遂行するため、2017年に行われた染色体異常試験の実験場所の変更を機に、試験のタイムスケジュールの見直しも視野に入れて従来の試験操作を見直すこととなった。特に、細胞播種から細胞処理までの日数短縮および固定から標本作製までの期間に柔軟性を持たせることを目的とし、播種細胞数および固定細胞の保管の可否について、それぞれ検討を行ったので、それら検討の結果を紹介する。

材料および方法

1. 材料

1.1 陽性対照物質

マイトマイシンC(MMC, 協和発酵キリン)を最終濃度0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (短時間処理のS9 mix非存在下)および0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (連続処理)で用いた。また、シクロホスファミド(CP, Sigma Aldrich)を最終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (短時間処理のS9 mix存在下)で用いた。

1.2 細胞と培養条件

チャイニーズ・ハムスター雌肺由来のCHL/IU細胞(入手先: JCRB細胞バンク)を使用した。培養は新生児牛血清を10 vol%添加したイーグルMEM培養液(10%NBCS/MEM)を用い、CO₂インキュベーター(37°C, 5% CO₂の加湿条件下)内で行った。

1.3 S9 mix

表1で用時調製した。

2. 実験方法

2.1 播種細胞数の検討

現在、当研究所では播種細胞数を 4×10^4 個/ $\phi 60$ mmディッシュとし、細胞処理は細胞播種から3日後に行っている。今回、細胞播種から細胞処理開始までの日数を短縮するため、播種翌日に細胞処理を開始した場合の処理細胞数および染色体異常を有する細胞数に対する影響を検討した。実験は計1~3回行った。また、実験を複数回行った播種細胞数については、各実験の測定値を用いて平均値を算出した。

30×10^4 個/mLの細胞懸濁液を調製し、播種細胞数が30, 40, 60, 90および 120×10^4 個/ディッシュ

シユとなるように細胞懸濁液をφ 60 mm ディッシュに添加した。

短時間処理(6時間処理および18時間の回復時間)のS9 mix非存在下および存在下, ならびに連続処理(24時間処理)の計3処理条件(2ディッシュ/条件)のそれぞれに無処理群を設定した。各ディッシュには最低でも合計液量が3 mLとなるように培地を加えた(表2)。

播種翌日(約19~20時間後), 0.05%トリプシン溶液で細胞を剥離し, コールターカウンターで細胞数を測定し, 処理開始時(day 1)における細胞数を算出した。すべての処理条件について, 処理開始22時間後にコルセミドを添加(最終濃度: 0.1 μg/mL)し, 2時間培養を行った。処理開始24時間後(day 2), 0.05%トリプシン溶液で細胞を剥離し, コールターカウンターで細胞数を測定し, 細胞数を算出した。

上記実験の結果に基づいて播種細胞数を 30×10^4 個/ディッシュとし, 計3処理条件のそれぞれに陰性対照群(無処理)および陽性対照群を設定し, 播種翌日に細胞処理を開始した。陽性対照群においては, 各陽性対照物質溶液(短時間処理のS9 mix非存在下および連続処理: MMC, 短時間処理のS9 mix存在下: CP)を添加後, 細胞処理を開始した。

すべての処理条件について, 処理開始24時間後, 0.05%トリプシン溶液で細胞を剥離し, 細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液の一部を0.075

mol/Lの塩化カリウム水溶液を用いて低張処理し, カルノア液[メタノール:氷酢酸=3:1(v/v)]で固定した後, スライドガラスへ滴下した。スライドガラスは自然乾燥し, 70%メタノールに浸した後, 3%ギムザ液を用いて染色した(スライド標本の作製)。スライド標本はコード化し, 「化学物質による染色体異常アトラス(JEMS・MMS分科会編)」⁴⁾による分類法に基づき構造異常を有する細胞(300細胞/群)および倍数性細胞(600細胞/群)を分析した。

構造異常を有する細胞数および倍数性細胞数については, 陰性対照群と陽性対照群との間でフィッシャーの正確確率検定($p < 0.01$, 片側)を行った。

2.2 固定細胞の保管の検討

播種細胞数を 4×10^4 個/ディッシュとし, 計3処理条件のそれぞれに陰性対照群(無処理)および陽性対照群を設定し, 播種から3日後に細胞処理を開始した。

すべての処理条件について, 処理開始24時間後, 播種細胞数の検討と同様の操作を行い, カルノア固定までの操作を行った。カルノア固定した細胞懸濁液の一部を用いて, 固定当日(固定0日目)にスライド標本を作製した。カルノア固定した残余細胞懸濁液は冷蔵した後, 固定7, 14, 24および28日目に播種細胞数の検討と同様の操作を行い, スライド標本を作製した。スライド標本をコード化した後, 構造異常

表1 S9 mixの組成

成分	混合比	最終濃度
S9 ^{*1}	3	5 vol%
HEPES	2	0.67 mmol/L
MgCl ₂	1	0.83 mmol/L
B液 ^{*2}		
・G-6-P	1	0.83 mmol/L
・β-NADP ⁺	1	0.67 mmol/L
・KCl	1	5.5 mmol/L
・精製水	1	-

*1: フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄のSprague-Dawley系ラット(7週齢)の肝臓から調製(家田貿易)。超低温槽(-80℃)内に保管し, 製造後6か月以内に使用。

*2: 超低温槽(-80℃)に保管し, 調製後6か月以内に使用。

表2 各処理条件におけるディッシュあたりの処理液量

播種細胞数 ($\times 10^4$ 個/ディッシュ)	細胞懸濁液量+添加培地量(mL)		
	1回目	2回目	3回目
30	1+2	1+2	1+2
40	1.3+1.7	NT	NT
60	2+1	2+1	NT
90	3+0	3+0	NT
120	NT	4+0	4+0

NT: Not Tested

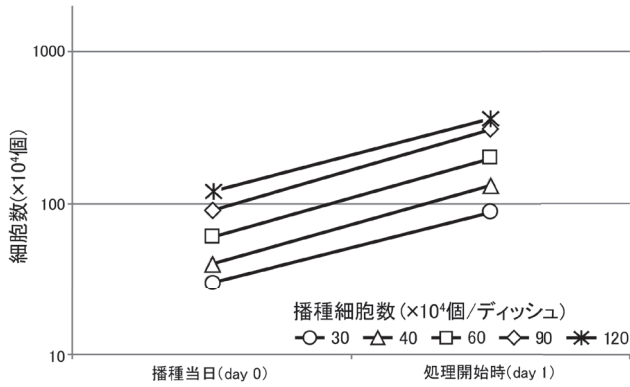


図1 各播種細胞数の増殖曲線

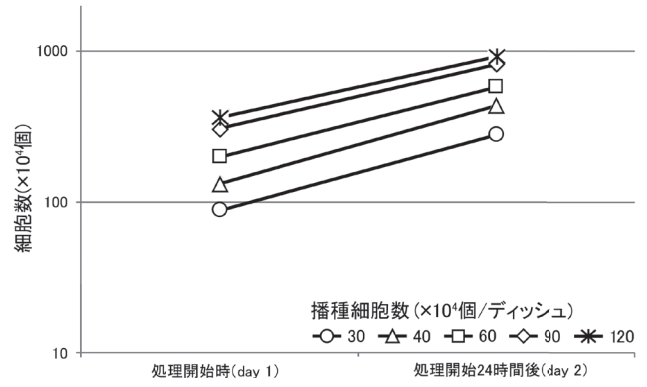


図2 各播種細胞数の増殖曲線

短時間処理のS9 mix 非存在下

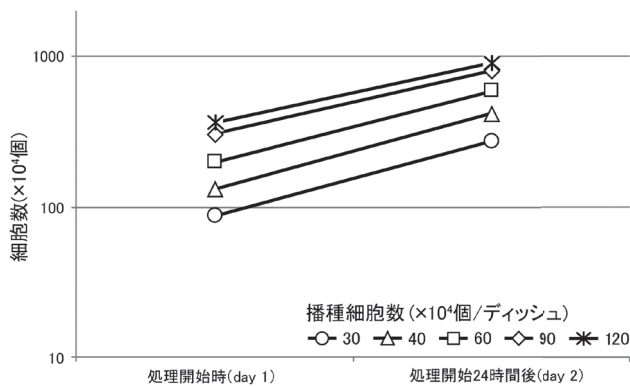


図3 各播種細胞数の増殖曲線

短時間処理のS9 mix 存在下

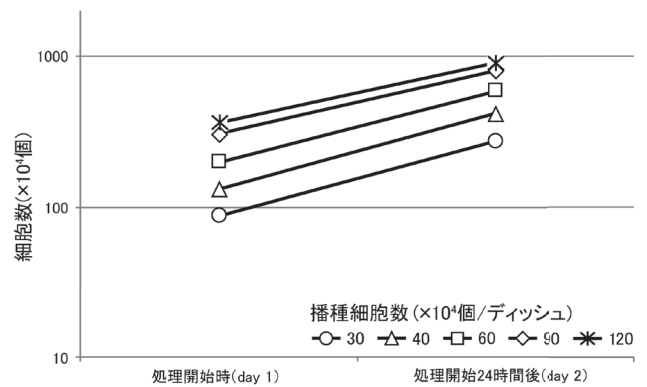


図4 各播種細胞数の増殖曲線

連続処理

を有する細胞(300細胞)および倍数性細胞(600細胞)を分析した。

構造異常を有する細胞数および倍数性細胞数については、陰性対照群と陽性対照群との間でフィッシャーの正確確率検定(p<0.01, 片側)を行った。

結果および考察

播種細胞数の検討

各播種細胞数(30, 40, 60, 90および120×10⁴個/ディッシュ)の播種後1日目(処理開始時)における細胞数は、播種当日と比べて、それぞれ2.9, 3.3, 3.3, 3.4および3.0倍に増加し、それら増加は同程度であった(図1)。また、各播種細胞数(30, 40, 60, 90および120×10⁴個/ディッシュ)の播種後2日目(処理開始24時間後)における細胞数は、播種後1日目(処理開始時)と比べて、それぞ

れ3.1~3.2倍, 3.0~3.3倍, 2.8~3.0倍, 2.2~2.7倍および2.2~2.5倍に増加し、それら増加の程度は30×10⁴個/ディッシュでは同程度であったが、それ以外では播種細胞数の増加に伴って低下した(図2~4)。これらの結果については、播種細胞数の増加に伴ってディッシュあたりの細胞密度は高くなるため、播種細胞数の多い方が、より早い時期にサブコンフルエント状態に達したことが関与していると考えられた。

OECD TG473では、処理開始後、正常細胞周期の1.5倍に相当する時間に標本作製を行うことが要求されている。そのため、各播種細胞数(30, 40, 60, 90および120×10⁴個/ディッシュ)について、処理開始から播種後2日目(処理開始24時間後)までの期間における細胞集団倍加をOECD TG473に記載の計算式[log(処理後の細胞数÷処理開始時の細胞数)]÷log 2に従って算出した。

表3 播種翌日処理(播種細胞数 30×10^4 個/ディッシュ)における染色体分析結果

処理条件	実験	処理群 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	構造異常を 有する細胞数 (/300細胞)	倍数性細胞数 (/600細胞)
短時間処理 (S9 mix 非存在下)	1回目	陰性対照	5	0
		MMC(0.1)	131*	1
	2回目	陰性対照	5	1
		MMC(0.1)	143*	0
	3回目	陰性対照	6	0
		MMC(0.1)	129*	0
短時間処理 (S9 mix 存在下)	1回目	陰性対照	5	0
		CP(10)	150*	1
	2回目	陰性対照	6	1
		CP(10)	156*	0
	3回目	陰性対照	6	1
		CP(10)	98*	0
連続処理 (S9 mix 非存在下)	1回目	陰性対照	6	0
		MMC(0.05)	113*	0
	2回目	陰性対照	1	0
		MMC(0.05)	119*	2
	3回目	陰性対照	2	1
		MMC(0.05)	132*	0

MMC: マイトマイシンC, CP: シクロホスファミド, *: $p < 0.01$ (片側, フィッシャーの正確確率検定)

その結果, 各播種細胞数における細胞集団倍加は, それぞれ1.6~1.7, 1.6~1.7, 1.5~1.6, 1.2~1.4 および1.2~1.3であった。したがって, 播種細胞数(30, 40および 60×10^4 個/ディッシュ)については, 同程度の細胞集団倍加でありOECD TG473の要求事項を満たした。また, 播種細胞数(30×10^4 個/ディッシュ)については, すべての処理条件で, 播種後1日目(処理開始時)から播種後2日目(処理開始24時間後)の期間における細胞数増加の程度の減少が認められなかったことから, 30×10^4 個/ディッシュが, 使用した血清ロットにおける最適な播種細胞数と判断した。

上記の結果を踏まえて, 播種細胞数 30×10^4 個/ディッシュについては, すべての処理条件の陰性対照群および陽性対照群についてスライド標本作製し, 染色体分析を行った。その結果, すべての処理条件の陽性対照群において, 構造異常を有する細胞数の有意な増加が認められた(表3)。また, すべての処理条件の陰性対照群および陽性対照群において, 構造異常を有する細胞数および倍数性細胞数は, 全て当研究所における背景データ

の変動範囲(平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差)内であった。

以上の結果から, 播種細胞数を 30×10^4 個/ディッシュに変更することにより, 播種の翌日に処理を開始することが可能であると結論した。

固定細胞の保管の検討

染色体分析の結果, 各処理条件の陰性対照群および陽性対照群における構造異常を有する細胞数および倍数性細胞数は, 固定後の保管日数に関わらず同程度であった(表4および5)。また, 各保管日数において, 陰性対照群および陽性対照群の構造異常を有する細胞数および倍数性細胞数は, すべて当研究所における背景データの変動範囲(平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差)内であった。したがって, 固定後の細胞懸濁液は, 冷蔵で28日間, 保管可能であることが明らかとなった。

今回の検討結果から, 適切な播種細胞数を用いた播種翌日の処理開始, 固定細胞の保管が試験結果に影響を与えないことが明らかとなり, 試験のタイムスケジュールをより柔軟に調整することが可能となった。信頼性の高いデータをより早く提

表4 固定細胞の保管の検討における染色体分析結果(構造異常)

処理条件	処理群 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	構造異常を有する細胞数(/50細胞)				
		0日目 (固定日)	固定 7日目	固定 14日目	固定 24日目	固定 28日目
短時間処理 (S9 mix 非存在下)	陰性対照	1	0	0	0	1
	MMC (0.1)	22	23	24	24	25
短時間処理 (S9 mix 存在下)	陰性対照	1	1	1	0	0
	CP (10)	18	18	21	19	20
連続処理 (S9 mix 非存在下)	陰性対照	0	0	0	0	1
	MMC (0.05)	25	26	25	23	27

MMC: マイトマイシンC, CP: シクロホスファミド

表5 固定細胞の保管の検討における染色体分析結果(倍数性)

処理条件	処理群 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	倍数性細胞数(/100細胞)				
		0日目 (固定日)	固定 7日目	固定 14日目	固定 24日目	固定 28日目
短時間処理 (S9 mix 非存在下)	陰性対照	0	0	0	0	0
	MMC (0.1)	0	0	0	0	0
短時間処理 (S9 mix 存在下)	陰性対照	0	0	0	0	0
	CP (10)	0	1	0	0	0
連続処理 (S9 mix 非存在下)	陰性対照	0	0	0	0	0
	MMC (0.05)	0	0	0	0	0

MMC: マイトマイシンC, CP: シクロホスファミド

供できるよう、今後も、さらなる試験条件の検討を重ねる必要がある。

文献

1) Galloway SM, Sofuni T, Shelby MD, Thilagar A, Kumaroo V, Kaur P, Gulati D, Putman DL, Murli H, Marshall R, Tanaka N, Anderson B, Zeiger E, Ishidate M. Jr.: Multilaboratory comparison of in vitro tests for chromosome aberrations in CHO and CHL cells tested under the same protocols. *Environ. Mol. Mutagen.* 1997; 29: 189-207

2) 祖父尼俊雄 編:「染色体異常試験:メカニズムから試験法,国際的標準化法まで」東京:サイエンティスト社,2005

3) OECD: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 473, Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2016

4) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」東京:朝倉書店,1988