

動物培養細胞を用いた細胞毒性試験環境の構築

柳澤昌臣・近藤康人*・石田一成**

Establishment of a cytotoxicity test environment using animal cell culture

YANAGISAWA Masaomi, KONDO Yasuhito, ISHIDA Kazushige

動物実験は、人体への安全性を評価するために広く用いられてきた試験方法である。しかし、近年では倫理的観点から廃止に向けた運動が世界的に広がっている。今回、動物実験の代替法に使用される動物細胞の培養環境を整備し、既存の試験方法をもとに樹脂材料の細胞毒性試験を実施した。また、食の安全性評価への活用を目指して食品抽出物の安全性評価を試みたので報告する。

キーワード：動物細胞、細胞毒性試験、樹脂材料、食品

Animal testing is a method that has been widely used to evaluate safety for the human body. However, in recent years, there has been a worldwide movement to abolish it from an ethical perspective. In this study, we developed an environment for animal cell culture, which are used as an alternative to animal testing, and conducted cytotoxicity tests on resin materials based on existing test methods. We also attempted to evaluate the safety of food extracts for application in food safety assessment.

Keywords : Animal cell culture, Cytotoxicity, Resin, Food

1 まえがき

食品や工業製品に起因する健康被害は、意図せずとも時折発生してしまうため、製品の安全性を適切に評価しておくことは重要である。動物実験は、人体への安全性を確認するための手法として従来利用されてきたが、最近では動物の権利保護の観点から廃止に向けた運動が進んでいる。動物実験の代替法には、動物由来の細胞を人工的に培養した動物培養細胞による試験が挙げられる。この代替法は、動物個体にストレスをかけないことや細胞への毒性を直接確認できることが利点とされる。

そこで、本研究では動物培養細胞を用いた評価試験の立ち上げに向けて培養環境を整備するとともに、樹脂材料に対する細胞毒性試験を行うための試験環境を構築した。さらに、食品抽出物の安全性を評価する手法の検討に

ついても併せて行った。

2 方法

2.1 供試細胞の培養及び試薬

哺乳類の肺由来線維芽細胞である V79 細胞 (JCRB0603) を使用した。ウシ胎児血清を 10% 添加したイーグル最少必須培地 (以降、増殖培地) 及び底面積 75 cm² の細胞培養用フラスコ (以降、培養容器) を用いて CO₂ インキュベーターで培養 (CO₂ 濃度 5%、37°C、6 日) し、試験に供した。

細胞の洗浄には、リン酸塩緩衝液 (塩化カリウム 0.02%、リン酸二水素カリウム 0.02%、塩化ナトリウム 0.8%、無水リン酸水素二ナトリウム 1.15%) を使用した。また、培養容器底面に付着した細胞を剥がす際には、トリプシン溶液 (トリプシン 0.05%、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 0.05% を含むリン酸塩緩衝液) を使用した。

表 1 細胞毒性試験の対照材料

対照材料	概要
陽性材料 A	ジエチルジチオカルバミン酸 亜鉛を 0.1%含有するポリウ レタンフィルム
陽性材料 B	ジブチルジチオカルバミン酸 亜鉛を 0.25%含有するポリ ウレタンフィルム
陰性材料	高密度ポリエチレンフィルム

2. 2 樹脂材料成分の抽出

細胞毒性の指標として使用される 3 種類の対照材料（一般財団法人食品薬品安全センター製）を 2×15 mm 角程度に加工し、オートクレーブ滅菌した（表 1）。なお、陽性材料 A は中程度の、陽性材料 B は弱程度の細胞毒性を示し、陰性材料は細胞毒性を示さない材料である。加工した試料の片面 2.5 cm²あたり 1 ml の割合で増殖培地を加えて静置（CO₂ 濃度 5%、37℃、24 時間）し、樹脂材料の成分を抽出した。得られた抽出液を 100%試料溶液として、増殖培地で 2 倍ずつ希釈した 6 段階の試料溶液を調製した（100%、50%、25%、12.5%、6.3%、3.2%）。

2. 3 食品由来成分の抽出

界面活性作用を示す食品由来の試料として「サポニン、大豆由来」（富士フィルム和光純薬(株)製）10 mg を MilliQ 水 10 ml に添加し、よく攪拌した。オートクレーブ滅菌してから遠心分離（3,000 rpm、5 分）し、上清を 0.1%サポニン液とした。増殖培地の調製に使用する MilliQ 水を 0.1%サポニン液に一部代替することでサポニンが 0.05%含まれる増殖培地を調製した。得られた培地を 0.05%サポニン液として、増殖培地で 2 倍ずつ希釈した 6 段階の試料溶液を調製した（0.05%、0.025%、0.013%、0.0063%、0.0032%、0.0016%）。

食品試料としてジャガイモを日の当たらない保管庫（暗所）または日の当たる窓際（明所）でそれぞれ 2 か月間常温保管した。ジャガイモの皮 5 g に蒸留水 45 ml を添加して乳鉢で粉碎した後、全量をオートクレーブ滅菌してから遠心分離（3,000 rpm、5 分）した。上清を 10%ジャガイモ抽出液とした。増殖培地の調製に使用する MilliQ 水を 10%ジャガ

イモ抽出液に一部代替することでジャガイモ抽出液が含まれる増殖培地を調製した。得られた培地を 1%ジャガイモ抽出液として、増殖培地で 2 倍ずつ希釈した 6 段階の試料溶液を調製した（1%、0.5%、0.25%、0.13%、0.063%、0.032%）。

2. 4 細胞毒性試験

V79 細胞を培養した培養容器から培地を除き、リン酸塩緩衝液 4 ml を静かに加えて培養容器底面に付着している細胞層を洗浄した。トリプシン溶液を 1 ml 加えてから静置（CO₂ 濃度 5%、37℃、2 分）した後、培養容器を叩くことで底面に付着している細胞を完全に剥がした。増殖培地 10 ml を加えて十分にピペッティングしてから 50 ml 遠心管に移した。遠心分離後（1,300 rpm、10 分）に上清を捨て、新しいリン酸塩緩衝液 10 ml を添加して再度ピペッティングと遠心分離（1,300 rpm、10 分）を行った。上清を捨ててから増殖培地を添加し、適切な細胞濃度に調整したものを細胞浮遊液とした。細胞浮遊液 0.5 ml を 24 ウェルプレートの各ウェルに添加してから培養（CO₂ 濃度 5%、37℃、48 時間）することでプレート底面に細胞を接着させた。24 ウェルプレートの培地を捨て、2.2 節及び 2.3 節で調製した試料溶液、または増殖培地を 0.5 ml ずつ所定の穴に添加し、直ちに培養（CO₂ 濃度 5%、37℃、6 日間）した。24 ウェルプレートの培地を捨ててからメタノールを添加して細胞を固定した後、ギムザ希釈液で染色を行った。同じ試料溶液を添加したウェルを 3 つずつ作製し、ギムザ希釈液で染まった V79 細胞由来のコロニー数の平均値を求めた。増殖培地を添加したウェルで生じたコロニー数の平均値を 100%として、以下の式より試料溶液の相対コロニー形成率を求めた。相対コロニー形成率が 50%となる試料溶液の濃度（IC₅₀ 値）は、IC₅₀ 値を挟む 2 点の測定値から一次方程式に基づいて算出し、細胞毒性の評価に使用した。

・相対コロニー形成率 (%)

= (各濃度の試料溶液を添加したウェル中のコロニー数の平均値) × 100 / (増殖培地を添加したウェル中のコロニー数の平均値)

3 結果

3. 1 供試細胞の培養

新たに導入した V79 細胞の培養条件を検討したところ、CO₂ インキュベーターを用いた培養条件下で細胞の増殖を確認することができた。同一容器内で長期間培養した細胞は、培養容器の底面いっぱいには分裂した後、やがて増殖を止めてしまう。そのため、一部の細胞を新たな増殖培地に植え継ぐ操作（継代培養）が必要となる。所定の操作に従って継代培養を行ったところ、植え継いだ細胞の増殖が確認できたため（図 1）、当センターで培養細胞を管理することができると分かった。

細胞毒性試験では動物細胞のコロニーを数える必要があるため、事前確認として 24 ウェルプレートで V79 細胞を培養し、ギムザ染色を行った。その結果、青く染まった V79 細胞のコロニーが確認できた（図 2）。そこで、まずは樹脂材料を試料として細胞毒性試験を行うこととした。

3. 2 樹脂材料の細胞毒性試験

培養細胞を用いた評価試験の環境を整備するため、樹脂材料に対する細胞毒性試験を実施した。今回は、第十八改正日本薬局方に記載されている樹脂製医薬品容器材料のための

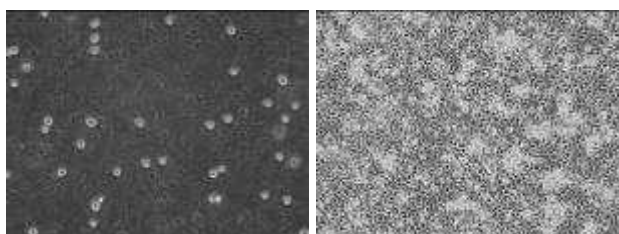


図 1 V79 細胞の倒立顕微鏡写真

（左：継代培養直後の細胞の様子、右：培養 6 日目の細胞の様子）

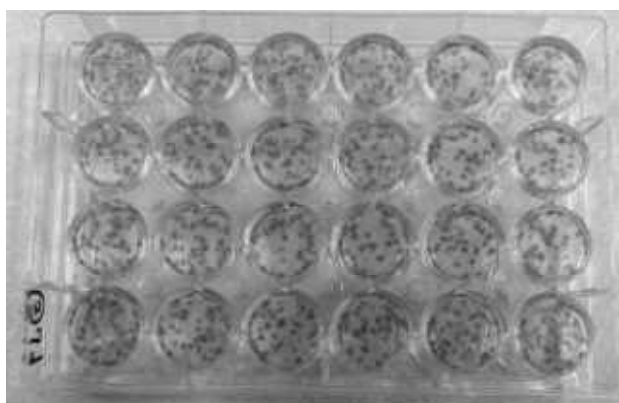


図 2 24 穴ウェルプレートの様子

（4 行×6 列に並んだウェルの中で青い点状に見えるものが V79 細胞由来のコロニー）

試験操作を参考にした¹⁾。毒性既知の材料を使用して試験を行ったところ、V79 細胞の生育を阻害する濃度が樹脂材料ごとに異なることを確認した。（図 3）。中程度の細胞毒性を示す陽性材料 A は、6.3%以上の濃度条件で V79 細胞に毒性を示したため、ウェル中にコロニーが形成されなかった。一方、3.2%の試料溶液を添加したウェルでは、コロニー様に染まった箇所が確認された。染まった箇所の大きさは、他の条件下で形成されたコロニーと比較すると小さいため、細胞の生育阻害が起こっていると考えられたが、本試験ではコロニーとみなして計数した。弱程度の細胞毒性を示す陽性材料 B は 100%試料溶液で細胞毒性を示したが、50%以下の濃度条件ではコロニーが形成されたため細胞毒性は比較的弱いことがわかった。相対コロニー形成率が 50%となる IC₅₀ 値を材料ごとに求めたところ、陽性材料 A は 4.2%、陽性材料 B は 76%となった（図 5）。陰性材料は、相対コロニー形成率が 50%を下回ることはなかった。対照材料の頒布元が測定した各材料の IC₅₀ 値は、陽性材料 A が 0.72%、陽性材料 B が 72%であった。試料の希釈濃度が今回行った試験とは異なるため単純な比較はできないが、各対照材料が示す毒

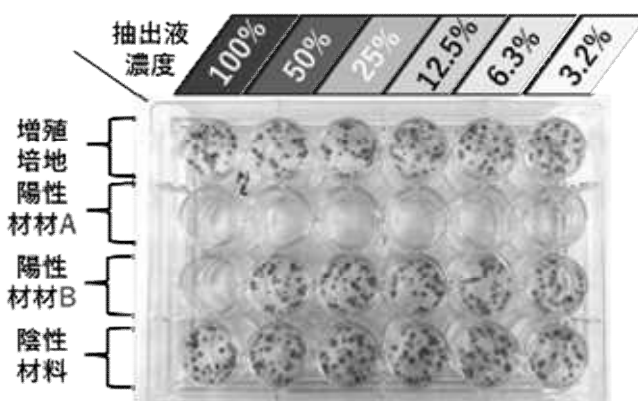


図 3 樹脂材料の細胞毒性試験結果

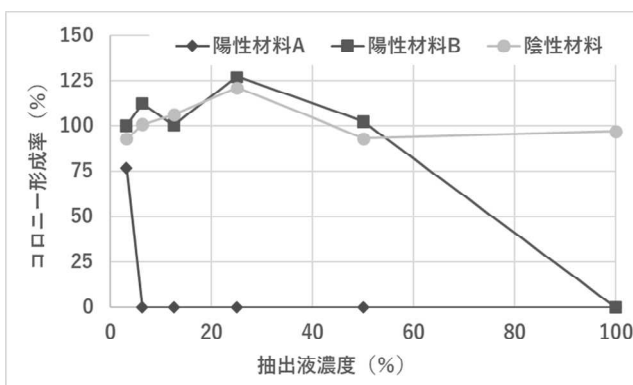


図 4 樹脂材料の相対コロニー形成率

性の程度は、同様な傾向を示していると考えられた。そのため、今回の試験では対照材料の細胞毒性を適切に評価できたと判断した。

3. 3 食品由来成分の細胞毒性試験

上述の細胞毒性試験を応用して、培養細胞による食品の安全性評価を試みた。今回は、食品試料としてジャガイモを選定した。ジャガイモは、日の当たる場所で保管することにより天然毒素であるソラニン及びチャコニンも多く生成する。そのため、不適切に保管したジャガイモは、食中毒の原因になることが報告されている。ソラニン及びチャコニンは、植物グリコシドであるサポニンの一種である。サポニンは界面活性作用により細胞膜を破壊して溶血効果を示すことが知られているため、ジャガイモに含まれる天然毒素も同様の作用により細胞毒性を示すと考えた。そこで、保管条件の異なるジャガイモの抽出液を増殖培地に添加して V79 細胞を培養した。また、サポニンの細胞毒性を確認するために市販の大豆由来サポニンに対照試料として使用した。

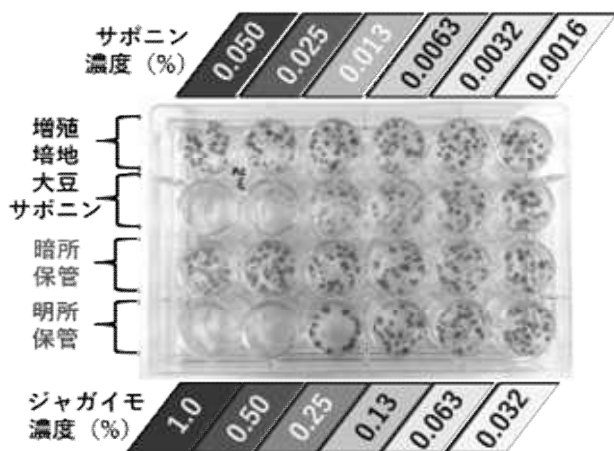


図5 食品由来成分の細胞毒性試験結果

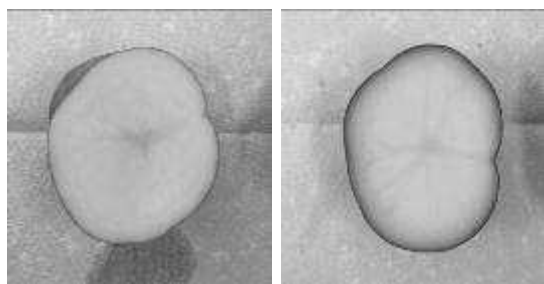


図6 保管条件の違いによるジャガイモ外観の変化

(左：暗所保管、右：明所保管)

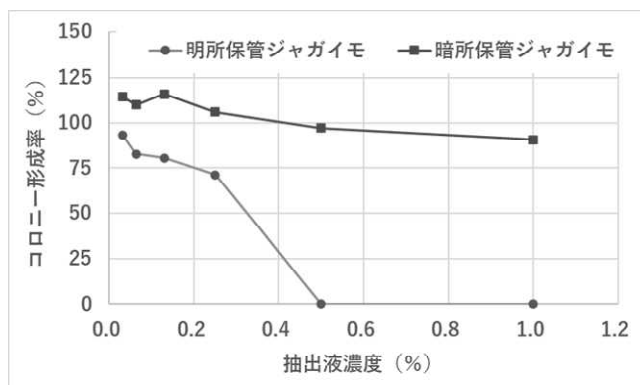


図7 食品抽出液の相対コロニー形成率

サポニン液を添加したウェルでは、コロニーの形成阻害が起こり(図5)、 IC_{50} 値は0.034%であった。そのため、大豆由来サポニンが細胞毒性試験の対照試料として有効であることを改めて確認した。

明所で保管したジャガイモは、皮周辺が緑色に変色しており、天然毒素を多く生成していると考えられた(図6)。皮の部分を粉碎した抽出液を用いて細胞毒性試験を行ったところ IC_{50} 値は0.32%となり、細胞毒性を示した(図7)。一方、暗所保管したジャガイモ抽出液は、V79細胞に対して毒性を示さなかった。このことから、ジャガイモは保管条件によって毒性成分の生成量に変化することを確認した。以上より、食品の安全性を確認する方法として細胞毒性試験が有効であると分かった。

4 まとめ

動物培養細胞のための培養環境を新たに整備し、細胞毒性試験を実施した。その結果、樹脂材料の毒性を定量的に評価することができた。また、保管条件の異なる食品の安全性を評価できるシステムを構築することができた。今後は、共同研究などに活用していきたい。

参考文献

- 1) 令和3年6月7日厚生労働省告示第220号 第十八改正日本薬局方