

## 第 36 回麻布環境科学研究会 一般学術講演 6

## 蛍光タンパク質発現培養細胞を新しい変異原性試験法における安定した測定結果を得るための検討

○望月 雄斗<sup>1</sup>, 中島 ひかり<sup>2</sup>, 松崎 祐希<sup>3</sup>, 山本 聖峻<sup>4</sup>,  
塚本 篤士<sup>5</sup>, 伊藤 彰英<sup>6</sup>, 猪股 智夫<sup>5</sup>, 久松 伸<sup>6</sup>

<sup>1</sup>ボゾリサーチセンター, <sup>2</sup>CAC クロア, <sup>3</sup>WDB エウレカ, <sup>4</sup>ジーエルサイエンス

<sup>5</sup>麻布大学 獣医学部, <sup>6</sup>麻布大学 生命・環境科学部

### 【背景と目的】

化学物質の中には DNA 中の塩基を置換、挿入あるいは欠失させるなど遺伝子に変異を及ぼす物質もある。また塩基が酸化やメチル化などの修飾を受けたり、遺伝子のチミンとシトシンが連続する配列上で二量体のピリミジンダイマーを形成して遺伝子の正常な転写を阻害する物質もある。これらの物質によって正常な遺伝子の転写や翻訳に影響が生じると、がんの発生を引き起こす場合もある。従って、新しく開発される化学物質等の変異原性を調べることは、重要である。

これらの化学物質に対する変異原性の評価には、微生物を用いる簡便な方法からマウスなどのほ乳動物を用いる方法など様々な試験法が利用されている。微生物を用いる方法は操作が簡便であることが利点となっているが、微生物はヒトに比べ代謝系に大きな違いがあることから、必ずしもその試験結果をヒトに外挿できないことが危惧される。一方、マウスなどのほ乳動物を用いる既存の方法では、操作が煩雑で判定に熟練した技術が必要などの欠点がある。そこで本研究は、動物の培養細胞を用い、且つ容易に評価ができるよう緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を利用した新しい変異原性試験方法を開発した。本法は、細胞に化学物質を暴露し、セルアナライザーで細胞毎の蛍光強度を測定するのみの操作であるため、操作が容易でヒトに対する直接的な毒性の評価が可能であると考えられる。

しかし、セルアナライザーを用いる測定では、1 つ

の試料に対し約 3 分の測定時間が必要となる。使用したセルアナライザーには一度に 40 検体の試料をセットできるため、検体数が多い場合には、長時間セルアナライザー内に試料が放置されることになる。従って、同じ処理をした試料を多検体セルアナライザーにセットした場合、測定されるまでの時間、即ち放置時間の違いによって、得られる値が変動する可能性がある。そこで、安定した測定結果を得るために測定条件の検討を行った。

### 【材料と方法】

本研究では、動物の細胞内で GFP 遺伝子の翻訳ができるプラスミド pAcGFP1-N1 (Clontech) を利用した。このプラスミドの GFP 遺伝子の開始コドン直下に、DNA 損傷を検出するための標的配列として、遺伝子のアンチセンス鎖にチミン及びシトシンのみで構成された 18 のアミノ酸分 (54 塩基) の配列を含む DNA 断片 (TDTS) を挿入して改変した GFP 遺伝子を構築した。得られたプラスミド pMC-TG をヒト腎細胞由来 Flp-In T-REx 293 細胞 (Life Technologies ; 293 細胞) にリボフェクション法を用いて導入・クローニングを行い、緑色蛍光を発する細胞株 (T-GFP293 細胞) を作出した。作出した T-GFP293 細胞を以下の実験に用いた。

### 実験 1. セルアナライザー測定時の放置時間による細胞の形態に与える影響

T-GFP293 細胞は、24 ウェルプレートに対して 7.5

× 10<sup>4</sup> cells/well ずつ播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で3日間培養を行った。3日間培養後、培地をすべて取り除きトリプシン処理を行った後、PBSで再懸濁させ、41メッシュのフィルターに通した後、セルアナライザー (EC800, Sony) の測定に用いた。その後、40分間隔で細胞のサイズ (FS) 及び細胞内構造の複雑さ (SS) からサイトグラムの変化を調べた。

#### 実験2. 細胞の固定及び蛍光強度の変化

細胞の経時的形態変化を抑えるために、実験1で再懸濁を使用したPBSにformaldehydeを添加し、セルアナライザーの測定に用いた。formaldehydeの終濃度は、0, 0.2, 1, 2及び20%とした。その後、サイトグラム及びGFPの蛍光強度の変化を調べた。

#### 【結果と考察】

実験1では試料を直ちに測定した場合、細胞のFS及びSSの値が一定の範囲内にあり、明確な細胞集団として認識することができたが、時間経過に従いその細胞集団が不明瞭になることを示した。今回使用した細胞は付着性細胞であり時間が経つにつれ細胞の形状が

変化しやすく、結果的にFS及びSSの値が変化し細胞集団が不明瞭になったと考えられる。これは放置時間の影響を受けて測定結果がバラついてしまい、変異原性の評価が困難となる可能性が示唆される。

実験2では、formaldehyde濃度0%と比較してどのformaldehyde濃度でも最大放置時間である200minの間は一定の細胞数の割合を示した。更に、formaldehyde濃度0%の試料でセルアナライザー内の放置時間が0minの時に得られる細胞数が50%となる領域に対して、各放置時間の細胞数の割合をformaldehyde濃度毎に算出すると、formaldehyde濃度0.2%が最も50%の値を維持していた。また、formaldehyde濃度が濃くなるとGFPの蛍光強度が低下した。このことから、細胞の経時的形態変化を抑えるためにformaldehydeでの固定は有効であること示した。しかし、formaldehyde濃度が濃くなるとGFPの蛍光強度が低下したことから、formaldehyde濃度は低濃度である必要がある。今後の暴露実験において安定した測定結果を得るためのformaldehyde濃度は0.2%が最適だと考えられる。