

ガン遺伝子導入による組換えタンパク質高発現動物 細胞株の育種

照屋, 輝一郎
九州大学農学研究科遺伝子資源工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3099889>

出版情報 : 九州大学, 1994, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

第4章 SR α プロモーター制御下でhIL-6を生産する各種組換え細胞のhIL-6生産性の増強

第1節 緒言

ラット、マウス、あるいはハムスターなどの齧歯類の胎児細胞は、動物細胞の増殖や細胞分裂を研究するモデルとしてよく利用されている。これらの動物では年齢や遺伝的系統のはっきりとした動物を数多く利用できることから再現性のよい結果が得られる。また胎児細胞は加齢した動物の細胞よりも容易に*in vitro*で培養できる利点を持っている。

マウス胎児細胞を従来の10%血清添加培地で初代および継代培養すると、Balb/c、SwissおよびNIH系の細胞(3T3, 3T6, 3T12)やC3H10T1/2細胞株など、広くガン研究や増殖制御の研究などに使用されている細胞株を得ることができる。しかし、これらの細胞は例外なしに様々な染色体異常を持った4倍体近くの異常な核型を示し、しばしば自然発ガンを起こす。一般に、正常な哺乳動物細胞には細胞レベルでの寿命があり、無限には分裂できないと考えられている(Hayflick and Moorhead, 1961; Hayflick, 1965)。血清添加培地で培養したマウスの初代細胞は正常な2倍体細胞であるが、継代を続けるうちに急速に増殖能を失い、クライシスまたは老化を受ける。その後、遺伝的に変化した細胞が増殖してきて永久増殖能を獲得した細胞を得ることができる。クライシスに入るまでの分裂回数、クライシスの顕著さ、クライシスの後現れる永久増殖能の性質は培養条件に大きく依存する(Loo *et al.*, 1989)。これに対し、増殖因子としてインスリン、トランスフェリン、上皮細胞成長因子(EGF)、セレニウム、ヒト高密度リポタンパク質(HDL)を添加した無血清培地でマウス胎児細胞を培養して得られる細胞株は全く異なる性質を持っている。この無血清マウス胎児細胞(Serum Free Mouse Embryo cell, SFME細胞)はクライシスを示さず、200継代にわたって染色体的に全く異常のない2倍体細胞として継代できる(Loo *et al.*, 1987)。

SFME細胞は正常細胞であるため、細胞が本来持っているプロトオン

コジーンが正常に制御されていて、外来性の導入ガン遺伝子の影響が現れやすいと考えられた。またSFME細胞は染色体的に非常に安定であるため、染色体に組込まれた外来性遺伝子を欠落することなく娘細胞へと受け渡し、安定した形質発現を維持するものと考えられた。このような観点から、恒常的な有用生理活性タンパク質の高生産性細胞株を作成する際のよいモデル系として利用できると考えられた。

また現在、有用生理活性タンパク質の生産に使用されているハムスター由来のBHK-21細胞に関しても生産性の増強は必要な課題であると考えられた。そこで本章においては、恒久的な発現の際のOAPシステムの利用について検討するために、構築したエフェクタープラスミドとSR α プロモーターにより制御されhIL-6を発現するレポータープラスミドをBHK-21細胞およびSFME細胞に導入し、組換えタンパク質の生産性にどのような影響を与えるかを検討した。

第2節 実験材料および方法

第1項 細胞培養および遺伝子導入

BHK-21およびBHK6-1細胞は10% FBSを含むDMEM中で37°C、5% CO₂/95% 空気の条件下で培養した。また動物細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム共沈法により行った(第3章参照)。

SFME細胞は10 μ g/mlフィブロネクチンでコーティングした培養器を使用し、インスリン(10 μ g/ml)、トランスフェリン、EGFおよびHDLを添加したDF培地(DMEM:F12=1:1の混合培地)中で37°C、5% CO₂/95%空気の条件下で培養した(Shirahata *et al.*, 1990)。遺伝子導入はリン酸カルシウム共沈法を使用した。ガン遺伝子発現プラスミド導入の際には0.6 mg/mlのG418(Colebère-Garapin *et al.*, 1981)含有培地で、pSR α -IL-6とpSV2-*gpt*遺伝子の共導入時には2.5 mg/mlミコフェノール酸(Mulligan and Berg, 1981)含有培地で選択を行った。それぞれの選択は単一クローンからなるコロニーが得られるまで3週間程度行った。形質転換クローンはペニシリンカッ

ブをクローニング環として使用し、トリプシン処理により分離した。遺伝子導入実験の概略についてはFigure 4-1に示した。

第2項 hIL-6の定量および細胞数の測定

組換え細胞から分泌されたhIL-6の定量はELISA法により行った(第3章)。また96穴プレート中の細胞数の測定は、生細胞のテトラゾリウム塩の開裂能を指標とした細胞数測定法であるMTT法により行った(Mosmann, 1983; Denizot and Lang, 1986)。MTT法の手順を以下に示す。96穴プレートの各穴(100 μ l培地)中にMTT試薬(MTT 5 mg/ml PBS) 10 μ lを加え6時間インキュベートした(37°C、5% CO₂/95%空気条件下)。インキュベート後、150 μ lの0.04N HCl/2-プロパノール150 μ lを各穴に添加し、超音波ミキサーを用いてMTTフォルマザンを溶解した。そしてマイクロプレート用分光光度計により主波長570 nm、副波長620 nmの吸光度を測定し、標準細胞数を基に検量線を作製し各穴中の細胞数を算出した。

第3項 細胞からのmRNA調製

mRNAの抽出は磁気により回収の可能なオリゴ(dT) 25-ダイナビーズ(DYNAL, Norwayより購入)を用いたmRNA抽出法で行った(Jakobsen, *et al.*, 1990; Hultman *et al.*, 1990)。試料としてSFME/*fos*、SFME/*myb*、SFME/*myc*、SFME/*rus*、BHK-21/*myb*、そしてBHK6-1/*myb*細胞を使用した。10⁷個程度に増殖するまで培養した細胞をトリプシン処理で分散して集め、冷PBS(4°C)で3回洗浄した後、1 mlのPBSに懸濁して1.5 mlマイクロチューブへ移し氷上に置いた。4°Cで5分間遠心(3,000 rpm)後、上清を捨て1 mlのLysis/Binding Buffer(100 mM Tris-HCl, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 5 mM DTT, pH 8.0)を加えて懸濁後、テフロンホモジナイザーに移し、2 mlのLysis/Binding Bufferと消泡剤として100 μ lのイソアミルアルコールを加え、氷上で2分間、手動でホモジネートした。細胞のライセートをマイクロチューブへ分注し、4°Cで5分間遠心(15,000rpm)した後、上清を予め

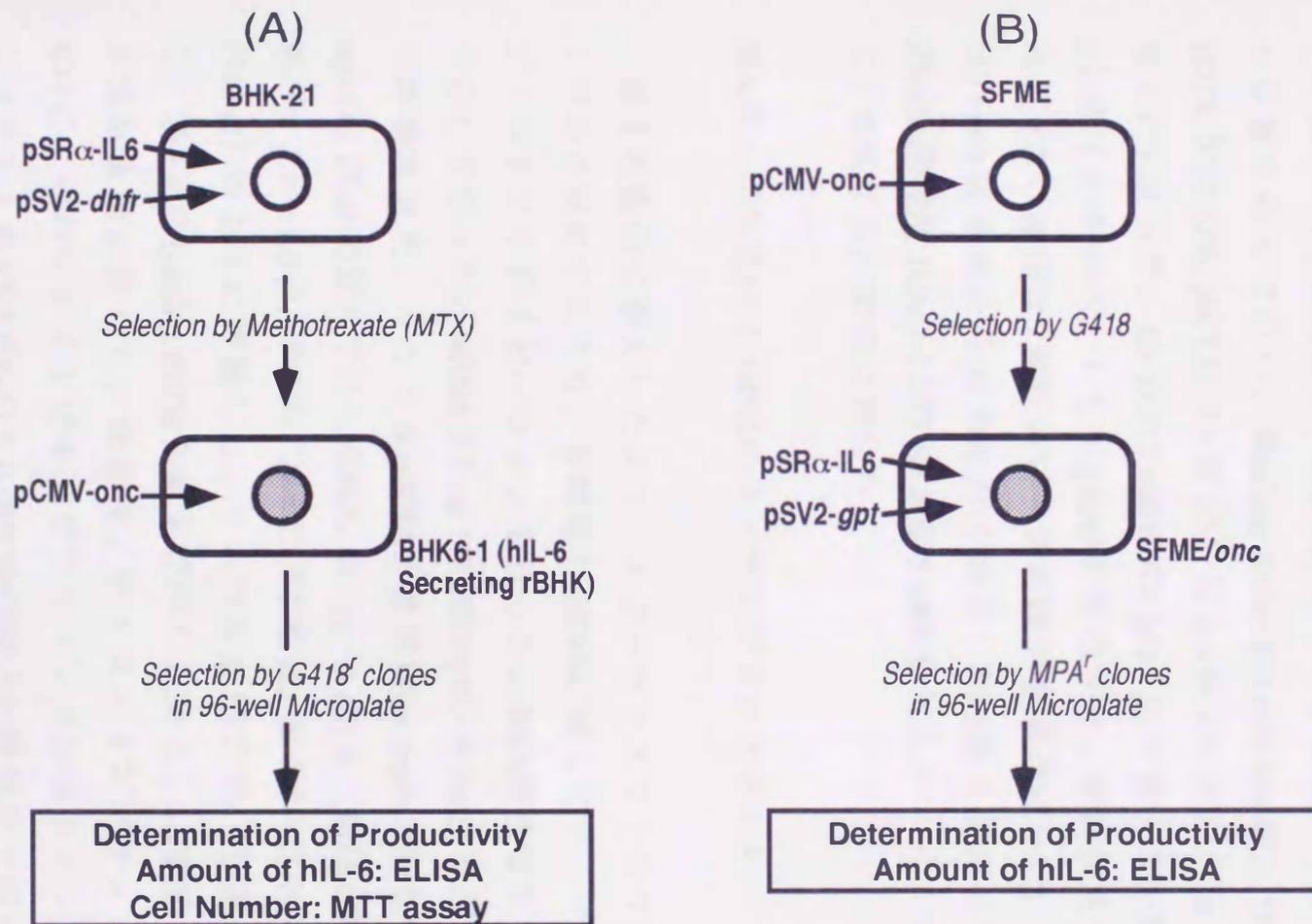


Figure 4-1. BHK細胞への遺伝子導入実験(A)とSFME細胞への遺伝子導入実験(B)の概略

Lysis/Binding Bufferで洗浄したオリゴ (dT) 25-ダイナビーズ (0.5mg/チューブ) を分注しておいたマイクロチューブに各500 μ lずつ、計6本にライセートを分注した。ときどきチューブ内をピペッティングにより攪拌し、氷上で5分間放置し、mRNAをビーズに結合させた。上清とビーズの分離を磁石で行い、Washing Buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.3% SDS, pH 7.5) で5回 (2回目と4回目の洗いの前にはチューブを変えた) 洗った。60 μ lの2 mM EDTA (pH 7.5) でビーズを懸濁し、65°Cで2分間インキュベートしてmRNAを溶出させ、溶液が熱いうちに上清を回収 (この操作は2回行いビーズの除去を完全にした) した。溶出液の260 nmの吸光度を分光光度計で測定しRNA量を算出した。RNA溶液にRNasin (終濃度 1U/ μ l) とDTT (終濃度 5 mM) を加えディープフリーザー (-80°C) で保存し、実験に供した。

第4項 ガン遺伝子mRNAのノーザンブロッティング

宿主細胞内に導入したエフェクタープラスミドのガン遺伝子転写のレベルを検討するため、各細胞のmRNAに関してノーザンブロッティング・ハイブリダイゼーションを行った。RNA変性電気泳動は以下のように行った。mRNA 2.5 μ g (SFME/*myb*のみ3 μ g) を遠心濃縮器を用いて乾燥させた。サンプルmRNAと標準DNA (*myb*: *Xba*I消化*myb*断片、*fos*、*myc*および*ras*: 市販のプロープDNA、0.1 pg~1 ng) を [RNA (DNA) 2.25 μ l、5 \times 泳動バッファー1.0 μ l、ホルムアルデヒド 1.75 μ l、脱イオン化ホルムアミド 5.0 μ l/合計10 μ l] のように調製した。サンプルを55°Cで15分間インキュベートし、各1 μ lのLoading Bufferを加え攪拌した後に、1.2% 変性アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、ナイロンメンブラン (Amersham Hybond N+) にオーバーナイトでキャピラリー・ブロッティングを行った。メンブラン上のRNA (DNA) を0.05N NaOHの5分間処理で固定し、その後2 \times SSC中でメンブランを1分間振とうして洗い風乾した。

第5項 ^{32}P 標識DNAプローブを用いたハイブリダイゼーション

プローブの調製にはマルチプライムDNAラベリングキット (Amersham) を使用した。プローブ用のDNA (*myb*: *Xba*I消化*myb*断片、*fos*、*myc*および*ras*: 市販のプローブDNA) 25 ng/3 μl を95-100°Cで2分間処理し、氷上で反応液を調製した (DNA溶液 3 μl (25 ng)、反応バッファー 10 μl 、プライマー 5 μl 、蒸留水 25 μl 、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP ($\sim 3,000$ Ci/mmol) 5 μl 、DNAポリメラーゼ (Klenow fragment) 2 μl /計50 μl)。反応は37°Cで1時間行った。

ハイブリダイゼーション溶液 3 ml (Amershamのハイブリダイゼーションタブレット1錠/50%脱イオン化ホルムアミド/蒸留水) をメンブランを入れたハイブリバック中に加え、プレハイブリダイゼーション (42°C、1時間) を行った。中の溶液を捨てた後、プローブ溶液 16 μl を加えたハイブリダイゼーション溶液 3 ml を加えハイブリダイゼーション (42°C、オーバーナイト) を行った。メンブランを取り出し、Table 4-1に示した条件で洗いオートラジオグラフィーを行った。

Table 4-1. ハイブリダイゼーション後の洗いの条件

2 \times SSC/0.1% SDS (室温、5分間)

2 \times SSC/0.1% SDS (室温、5分間)

0.1 \times SSC/0.2% NaPPi (65°C、30分間)

20 \times SSC: 3.0 M NaCl, 0.3 M $\text{Na}_3\text{Citrate}$ (pH 7.0)

NaPPi: ピロリン酸ナトリウム

第3節 結果

第1項 BHK細胞におけるガン遺伝子導入によるhIL-6生産性の増強

まず宿主となるBHK-21細胞へ、リン酸カルシウム共沈法によりレポータープラスミドとpSV2-*dhfr*を共導入し、50nMメトトレキセート (MTX, SIGMA, St. Louis, MOより購入) 含有培地中で形質転換細胞の選択を行い、

安定にhIL-6を生産する株、BHK6-1細胞を樹立した。

引続きこの細胞に、一連のエフェクタープラスミドを導入した。今度は、プラスミド自身が持つ*neo*耐性遺伝子を指標にG418 (1 mg/ml)で形質転換細胞の選択を行なった。

形質転換細胞の選択に引続き、細胞のhIL-6の生産性を調べた。その際、hIL-6の定量はELISAにより行い、細胞数の測定はMTT法により行ない、単位細胞数当りのhIL-6生産量を産出した (Figure 4-2)。様々なガン遺伝子を単独、あるいは組合せて、導入した場合のBHK6-1細胞のhIL-6生産性について調べた結果、*fos*、*myb*そして*myc*に生産性の高いクローンが見られ、特に*myb*において高い生産性を示すクローンが多く出現した。一方ガン遺伝子を組合せることによる相乗効果は特に見られなかった。また得られたクローンは継代を続けていくと生産性の低下が見られた (Figure 4-3)。

第2項 SFME細胞におけるガン遺伝子導入によるhIL-6生産性活性化

各種ガン遺伝子を導入したSFME細胞と対照のSFME細胞に対してpSR α -IL-6を導入し、クローニング後の単一クローンの培養上清中に分泌されたhIL-6の量をELISA法により測定した (Figure 4-4)。図中の1つのプロットは96穴プレートの1穴中に分泌されたhIL-6濃度を示している。対照のSFME細胞の生産量は平均8 ng/mlであったのに対し、各種ガン遺伝子を導入したSFME細胞においては高い生産量を示したクローンが現れた。その生産量比は*myc*を導入した細胞の場合17倍、*myb*を導入した場合18倍、*ras*を導入した場合15倍の生産量比を示した。一方、*fos*を導入した場合は高い生産量比を示すクローンは現れなかった。

また、*ras*と*myc*、*myb*、*fos*のどれか1つを組合せて導入した細胞では*ras+myc*との組合せで最も高い生産量比を示したクローンが得られたが、*ras*または*myc*の組合せによる生産量比の増強は見られず、単独に導入した場合と同様の生産量比を示した。また*ras+myb*、*ras+fos*の組合せの場合も増強効果は見られなかった。

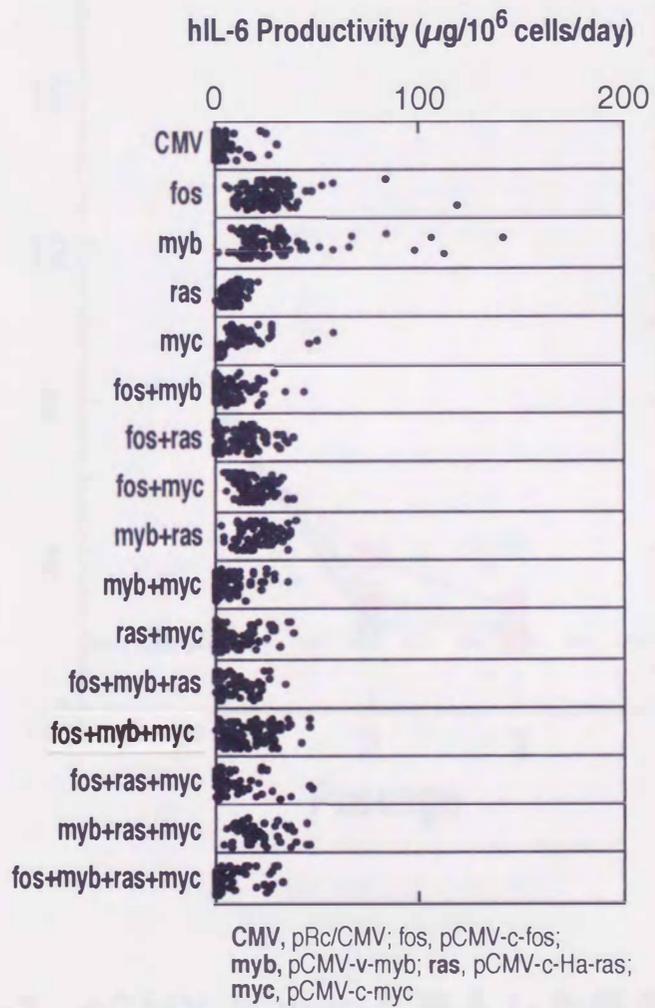


Figure 4-2. BHK6-1細胞への各種ガン遺伝子発現
 プラスミド導入によるhIL-6生産性の増強

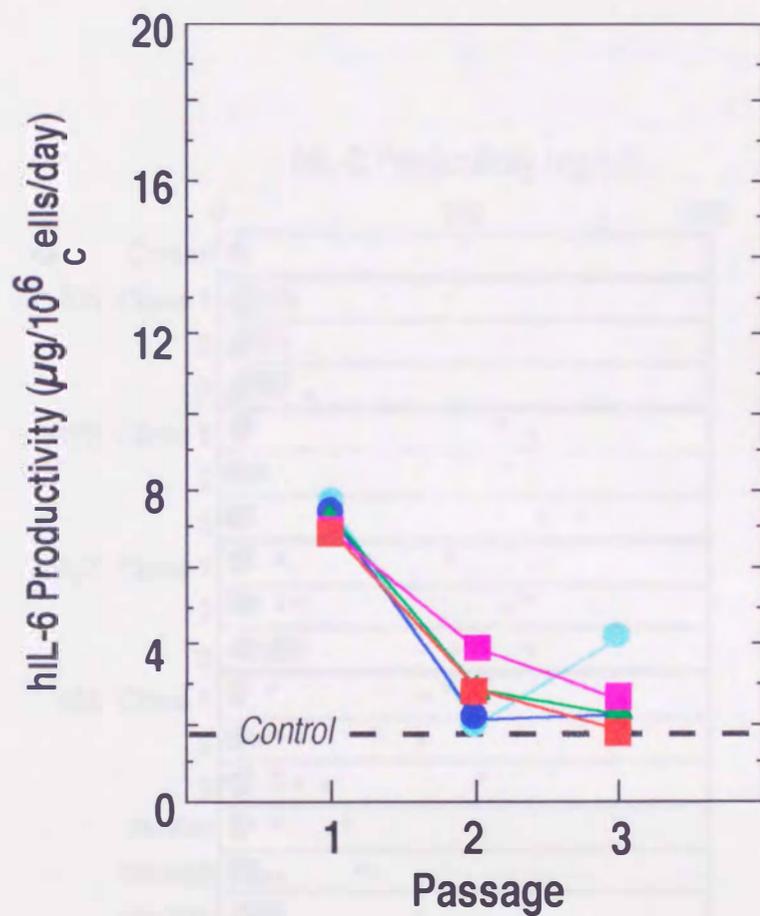


Figure 4-3. pCMV-v-mybを導入した高生産性クローンの継代によるhIL-6生産性の減少

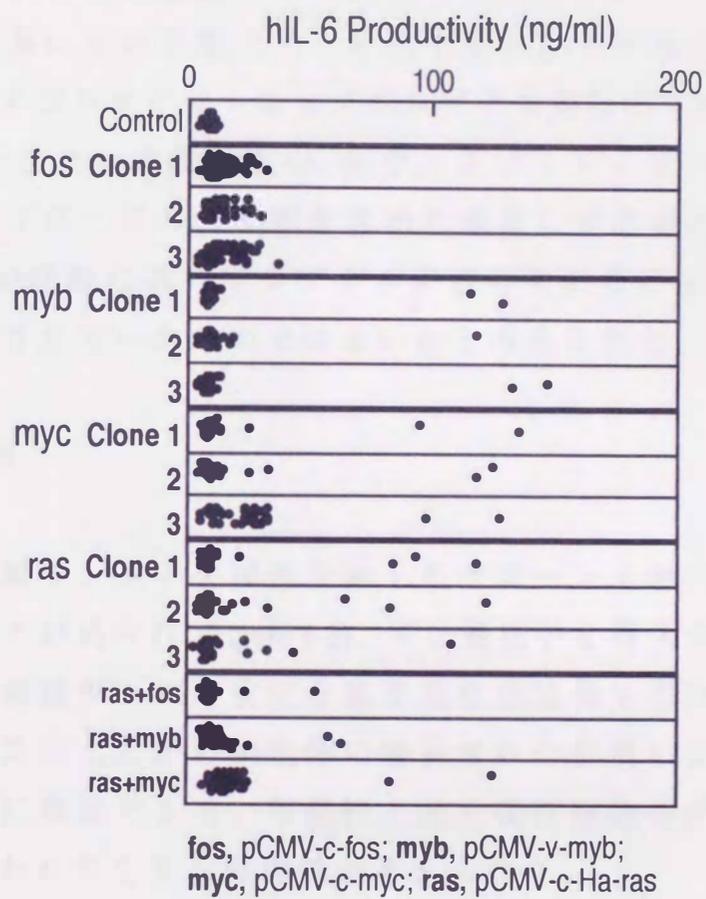


Figure 4-4. SFME細胞への各種ガン遺伝子発現
プラスミド導入によるhIL-6生産性の増強

第3項 組換え細胞におけるガン遺伝子のmRNAのノーザンブロッティング・ハイブリダイゼーション

ノーザンブロッティング・ハイブリダイゼーションの結果をFigure 4-5に示した。この結果より、各ガン遺伝子産物の大幅な転写レベルの上昇は見られず、各細胞当りの組込まれたエフェクタープラスミドのコピー数は多いもので数コピー程度であることが考えられた。一方、予想外のハイブリダイゼーションのシグナルが検出されたものもあり、hn RNAを含まない成熟 mRNAのみでハイブリダイゼーションを行う必要性、またプローブの再検討を含めた見直しが必要と考えられた。またBHK6-1/*myb*細胞においてシグナルが認められなかったのは、*v-myb*の発現が抑制されていたためではないかと考えられた。

第4節 考察

本章の実験で、高い生産性を示したクローンも継代していくうちに生産性の低下が見られ (Figure 4-3)、ガン遺伝子を導入する以前に近いレベルまで生産性が下がり安定な高生産性細胞株を樹立することはできなかった。このことから染色体に組込まれた位置によってはガン遺伝子が効果的に機能できない可能性と高生産性細胞株がスクリーニングの過程で失われてしまう可能性が考えられた。

この結果を受け、より多いコピー数のエフェクタープラスミドを宿主細胞に維持させる必要、そしてより活性の強いエフェクタープラスミドを使用する必要性が示唆された。そこで、染色体に組込まれることなく染色体外で高コピー数を長期間維持できるBPVベクターに*myb*遺伝子を挿入したエフェクタープラスミドを構築することにした (第2章参照)。また、遺伝子導入の後に高生産性細胞を早い時期にスクリーニングする目的で、細胞膜上の分泌中のhIL-6を蛍光抗体を用いて検出しFACSを用いて高生産性細胞を早い時期に細胞分取しスクリーニングすることを第5章では検討した。



Figure 4-5. 各種ガン遺伝子発現プラスミド導入SFME細胞およびBHK細胞のノーザンブロットィング・ハイブリダイゼーションの結果

(1) lane 1, SFME mRNA 2.5 μ g; lane 2, SFME/*fos* mRNA 2.5 μ g; lane 3, *fos* Probe DNA 1 pg; lane 4, *fos* Probe DNA 10 pg; lane 5, *fos* Probe DNA 100 pg; lane 6, *fos* Probe DNA 1000 pg. (2) lane 1, SFME mRNA 3 μ g; lane 2, SFME/*myb* mRNA 3 μ g; lane 3, v-*myb* fragment, 0.01 pg; lane 4, v-*myb* fragment, 0.1 pg; lane 5, v-*myb* fragment, 1 pg; lane 6, v-*myb* fragment, 10 pg; lane 7, v-*myb* fragment, 100 pg; lane 8, v-*myb* fragment, 1000 pg. (3) lane 1, SFME mRNA 2.5 μ g; lane 2, SFME/*myc* mRNA 2.5 μ g; lane 3, *myc* Probe DNA 1 pg; lane 4, *myc* Probe DNA 10 pg; lane 5, *myc* Probe DNA 100 pg; lane 6, *myc* Probe DNA 1000 pg. (4) lane 1, SFME mRNA 2.5 μ g; lane 2, SFME/*ras* mRNA 2.5 μ g; lane 3, *ras* Probe DNA 1 pg; lane 4, *ras* Probe DNA 10 pg; lane 5, *ras* Probe DNA 100 pg; lane 6, *ras* Probe DNA 1000 pg. (5) lane 1, BHK-21 mRNA 2.5 μ g; lane 2, BHK-21/*myb* mRNA 2.5 μ g; lane 3, BHK6-1 mRNA 2.5 μ g; lane 4, BHK6-1/*myb* mRNA 2.5 μ g; lane 5, v-*myb* fragment 1 pg; lane 6, v-*myb* fragment 10 pg; lane 7, v-*myb* fragment 100 pg; lane 8, v-*myb* fragment 1000 pg.

第5節 小括

本章ではOAPシステムの有効性を検討するため、構築したガン遺伝子発現プラスミドとpSR α -IL-6をBHK-21細胞またはSFME細胞に導入し、組換えタンパク質の生産性にどのような影響を与えるかを検討した。

1. BHK細胞では*fos*、*myb*そして*myc*に生産性の高いクローンが見られ、特に*myb*において高い生産性を示すクローンが多く出現した。しかし、ガン遺伝子を組合せることによる相乗効果は見られなかった。また、得られたBHK細胞のクローンでは継代を続けていくと生産性の低下が見られた。
2. 各種ガン遺伝子を導入したSFME細胞においては高い生産量を示したクローンが現れた。その生産量比は*myc*で17倍、*myb*で18倍、*ras*で15倍の生産量比を示した。しかし、*fos*では高い生産量比を示すクローンは出現しなかった。また、ガン遺伝子を組合せることによる相乗効果は見られなかった。
3. ノーザンブロッティング・ハイブリダイゼーションの結果より、各ガン遺伝子産物の大幅な転写レベルの上昇は見られず、各細胞当りの組込まれたエフェクタープラスミドのコピー数は多いもので数コピー程度であると考えられた。

第5章 ガン遺伝子導入BHK6-1細胞のフローサイトメトリー分析と蛍光活性化細胞選択装置による高生産細胞の分離の試み

第1節 緒言

フローサイトメトリー (Flow Cytometry, FCM) は細胞を浮遊状態とし、流体系の中を高速で通過させる途中に光学的に得られた情報を電気信号として検出し、個々の細胞の生物学的特徴を毎秒10,000個の早さで解析することが可能である。解析可能なパラメーターとしては細胞の大きさ、形態、DNA量、RNA量、表面形質、染色体など多岐にわたる。

蛍光活性化細胞選択装置 (Fluorescence activated cell sorter, FACS) はFCMを応用して開発されたものであり、HerzenbergらはFACSとモノクローナル抗体を用いて細胞亜集団の分類、特にTリンパ球の機能を解析するFACSの利用を発表した (Herzenberg *et al.*, 1976)。細胞の表面抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を利用した技術が広く用いられるようになるにつれて、様々な分野でFACSが応用されるようになってきた。FACSによる細胞解析が広く利用されている例として、医療分野で利用されているリンパ球分化抗原に対するモノクローナル抗体を用いた各種免疫疾患の診断や、種々のガン細胞のDNA含量解析による細胞診などがある。また細胞工学分野への応用としてハイブリドーマ等の培養細胞の機能解析、さらには有用物質高生産株の分取手段として利用されている。このため従来は種々の細胞の平均的な反応を検出せざるを得なかった場合から、特定の状態の細胞に着目して、解析、あるいは細胞分取を行うことが可能となった。

本章では遺伝子導入後早い時期に高生産性細胞のスクリーニングを行うため、細胞工学の分野で大きな力を発揮しているFACSを用いることを検討した。hIL-6を産生するBHK6-1細胞には産生されたhIL-6が存在しており、その量は細胞のhIL-6生産性を反映しているものと考えられた。そこで細胞上hIL-6に蛍光標識抗体を用いて細胞の蛍光標識を行い、FACSを用いてFCM分析および細胞分取を行った。

第2節 実験材料および方法

第1項 細胞培養および使用した試薬

BHK6-1細胞は10% FBSを含むDMEM中で培養した。培養は37℃、5% CO₂/95%空気の条件下で行った。また動物細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム共沈法により行った。

フェノールレッド不含有のERDF培地は極東製薬より購入した。マウスモノクローナル抗hIL-6抗体はGenzymeより購入した。R-フィコエリスリン (PE) 標識ヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体はTAGOより購入した。

第2項 hIL-6分泌細胞の蛍光標識

薬剤選択終了後、形質転換細胞をPBSで洗浄した後に0.02% EDTA-PBSで細胞を分散し、フェノールレッド不含有のERDF培地 (ERDF・PR) を用いて細胞 (10⁶個程度) をマイクロチューブに集めた (ここでERDF・PRを使用するのはフェノールレッドがFCMにおいて自家蛍光の原因となるためである)、加えて、操作はすべて4℃で行った (Kawahara *et al.*, 1991)。ERDF・PRで1回洗浄後、抗hIL-6抗体溶液 (20 μl抗体溶液+40 μl 10% FBS/ERDF・PR) 60 μlで細胞を懸濁し、30分間抗体を反応させた。ERDF・PRで2回洗浄後、PE標識抗マウスIgG溶液 (20 μl抗体溶液+40 μl 10% FBS/ERDF・PR) 60 μlで細胞を懸濁し、30分間抗体を反応させた。ERDF・PRで1回洗浄後、2 mlのERDF・PRに細胞を懸濁し、FACS用のサンプルカップに移し、FCM解析、または細胞分取に供した (Figure 5-1)。

第3項 FCM分析と細胞分取

FACSの操作関係はマニュアルに従い行った。解析においてはFACSに

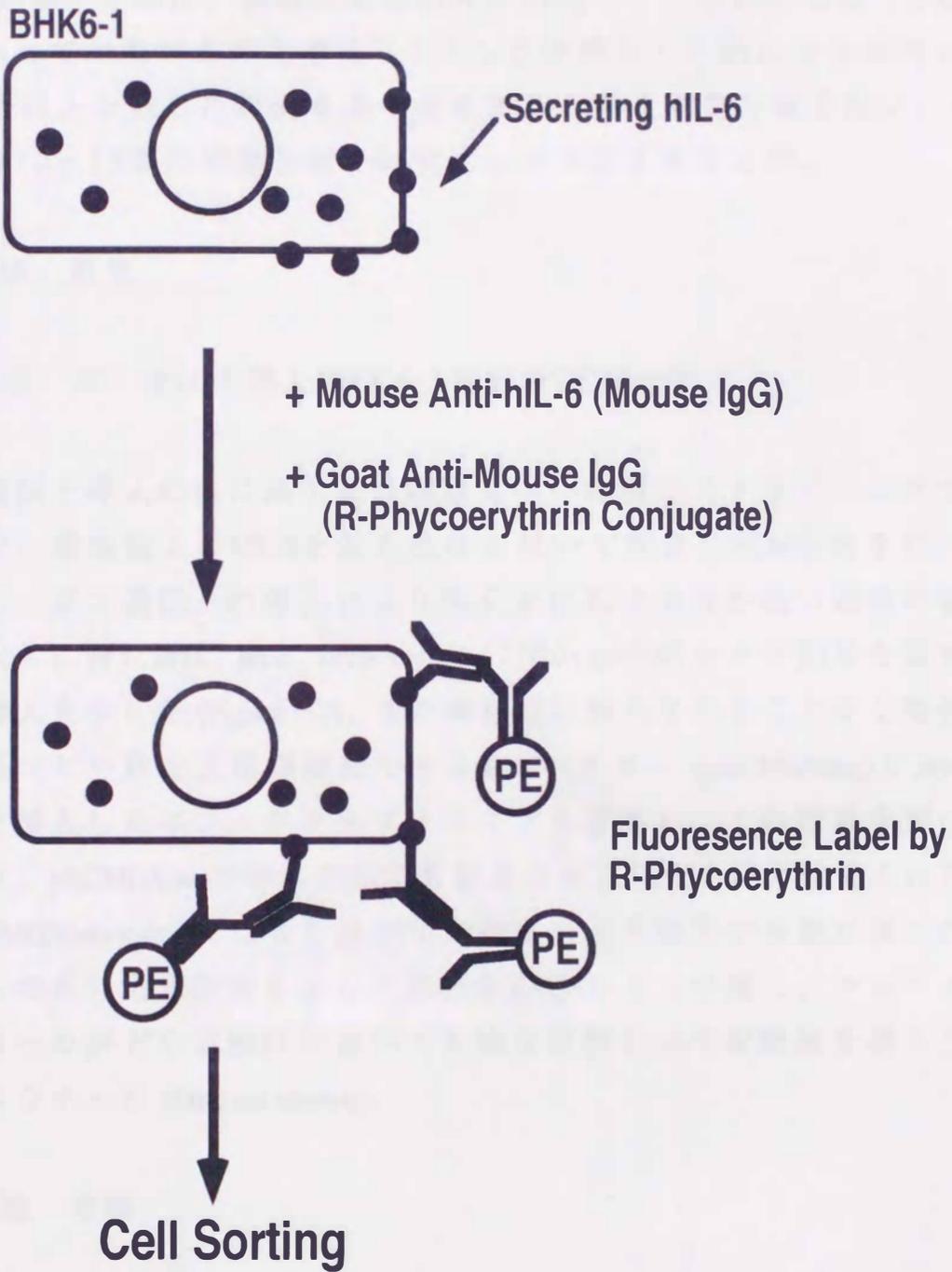


Figure 5-1. FCMを用いたhIL-6高生産性細胞のスクリーニング法

より得られるパラメーターのうち前方散乱光 (LS)、90° 散乱光 (90LS) の両者を、死細胞や2個以上が凝集した細胞を測定から除くために使用した。そして細胞を標識するのに用いたPEの蛍光 (励起488 nm、蛍光575 nm) を基に、細胞の蛍光強度を測定し、大多数の細胞 (生産性が変わっていないものと考えられた) を対照とした際に蛍光強度にして4.5倍以上を示した細胞を高生産性細胞と考え細胞分取を行い、1穴あたり10~15個の細胞密度で96穴プレートにまきこんだ。

第3節 結果

第1項 ガン遺伝子導入BHK6-1細胞のFCM分析

遺伝子導入の後に高生産性細胞を早い時期にスクリーニングする目的で、細胞膜上のhIL-6を蛍光抗体を用いて標識しFCM分析を行ったところ、ガン遺伝子の導入により明らかに蛍光強度が強い細胞の割合が増大し、特に*myb*、*myc*、*myb+myc*および*fos+ras*の組合せが顕著な蛍光強度の増大を示した (Figure 5-2)。また染色体に組込まれることなく染色体外で高コピー数を長期間維持できるBPVベクター (pBCMGSneo) に*myb*遺伝子を挿入したエフェクタープラスミドを構築し、この効果を調べたところ、pBCMGSneoの導入のみでも顕著な蛍光強度の増大が見られたが、pBCMGSneo-v-*myb*ではより高い蛍光強度を示す細胞が多数出現した。これらの高い蛍光強度を示した細胞をFACSにより分離し、クローニングを行ったがどの試験区においても高生産性を示す細胞株を得ることはできなかった (Data not shown)。

第4節 考察

FCM分析において、ガン遺伝子の導入により明らかに蛍光強度が強い細胞 (ここでは高hIL-6生産性と考えられる細胞) の割合が増大し、特に*myb*、*myc*、*myb+myc*および*fos+ras*の組合せが顕著な効果を示した。

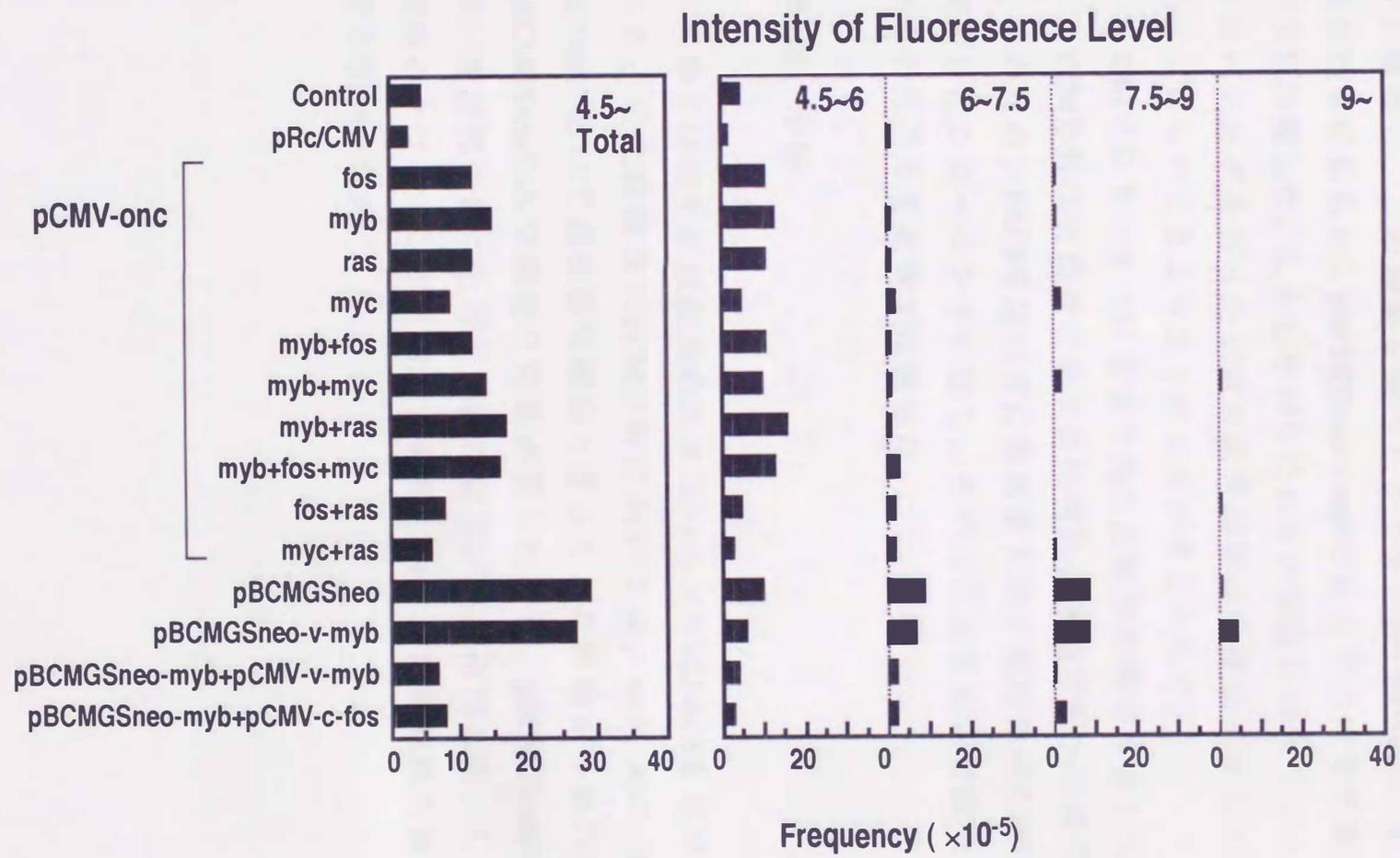


Figure 5-2. 高PE標識細胞の出現頻度

また染色体に組込まれることなくエピソームの形で長期間高コピー数を維持できるpBCMGSneoに*myb*遺伝子を挿入したエフェクタープラスミドを構築し、この効果を調べたところ、pBCMGSneoの導入のみでも顕著な効果が見られ、pBCMGSneo-v-*myb*ではより高い蛍光強度を示す細胞が多数出現した。しかしながらこれらの細胞を96穴プレートを使用し、クローニングを行ったが高生産性細胞株を樹立することはできなかった。これらのことより以下のことが考えられた。

1. SR α プロモーターは安定な高生産性細胞樹立に適していない。
2. FCM分析は有効だが高生産性細胞は細胞分取への耐性が低い。

そのため、FACSを用いずに薬剤選択後の細胞集団を96穴プレートを使用したクローニングに供し、その後に高生産性細胞のスクリーニングを行うことを次章では試みた。

第5節 小括

本章では高生産性細胞のスクリーニングにFACSを使用することを試みた。蛍光標識後のFCM分析においては、*myb*、*myc*、*myb+myc*および*fos+ms*において高生産性細胞と考えられた細胞が多数出現した。またpBCMGSneoのみで顕著な効果が見られたが、pBCMGSneo-v-*myb*ではより高い生産性を持つと考えられた細胞が多数出現した。しかしこれらの細胞のクローニングを行った結果、高生産性細胞株を樹立することはできなかった。

第6章 高生産性各種ガン遺伝子導入組換えBHK細胞の限界希釈法による樹立

第1節 緒言

前章までの方法により、*v-myb*を導入後、BHK6-1細胞とSFME細胞の生産性について調べた結果、BHK細胞に*myb*を導入した場合に高い生産性を示すクローンが出現した。しかし第4章Figure 4-3に示したように出現した高生産性細胞を継代していくと生産性の急速な低下が見られ、安定な高生産性細胞株を樹立することはできなかった。これらのことから、導入した遺伝子が宿主細胞の染色体に組込まれる位置によっては、ガン遺伝子が効果的に発現されないという可能性、ならびに96穴プレートによる選択では単一のクローン由来のみでなく、多種の形質転換細胞クローンがミックス状態で得られるために高生産性細胞株がスクリーニングの過程で失われる可能性が考えられた。そこで前章に引き続きBPVベクターの使用と、遺伝子を導入した細胞を初期段階で単一クローンとするためのクローニングを行い、その後スクリーニングを行うことで高生産性株の樹立を試みた。

第2節 実験材料および方法

第1項 細胞培養および遺伝子導入

BHK6-1細胞は10% FBSを含むDMEM中で培養した。培養は37℃、5% CO₂/95%空気の条件下で行った。また動物細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム共沈法およびトランスフェクタム法により行った(第3章、第4章参照)。

第2項 限界希釈法によるスクリーニング

遺伝子導入の後、90 mmの培養器中でG418選択を行い、その後96穴プレートを用いた限界希釈法によりクローニングを行った。検鏡により単一のクローン由来のものと見られる穴から培養上清を採取し、ELISA(第3章参照)によりhIL-6量を測定し、総hIL-6量の高いクローンを選択し、1次スクリーニングとした。1次スクリーニングで得られたクローンに関してELISAにより培養上清中のhIL-6を、MTT法(第4章参照)により、各クローンの生細胞数の測定を行い、両者の値より細胞数あたりのhIL-6生産性を算出した。

第3節 結果

第1項 *myb*発現プラスミドの導入が組換えBHK細胞のhIL-6生産性に及ぼす影響

pCMV-v-*myb*あるいはpBCMSGneo-v-*myb*プラスミドを導入した後のBHK6-1細胞をG418処理の後、限界希釈法により単一のクローンとして、スクリーニングを行った結果、hIL-6生産量が25 ng/mlを越えたものに関して各々のクローンのhIL-6生産効率を第4章と同様な方法で算出した(Figure 6-1)。このようにpCMV-v-*myb*に関しては840クローン中1クローンが5.4倍、pBCMSGneo-v-*myb*に関しては400クローン中1クローンが4.4倍の相対生産性を示した。

第2項 *c-fos*、*c-myc*および*c-Ha-ras*発現プラスミドの導入による組換えBHK細胞のhIL-6生産性の変化

pCMV-c-*fos*、*c-myc*および*c-Ha-ras*を導入した後のBHK6-1細胞をG418処理の後、限界希釈法により単一のクローンとして、スクリーニングを行った。またhIL-6生産量が高かったクローンに関してはhIL-6生産効率を第4

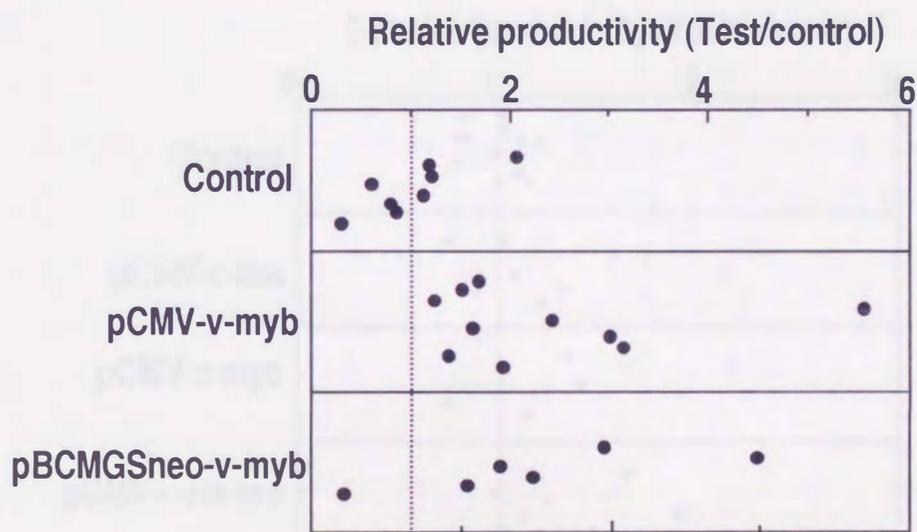


Figure 6-1. *myb*導入BHK6-1細胞の限界希釈法による高生産細胞のスクリーニングの結果

章と同様な方法で算出した (Figure 6-2)。このように *fos*、*myc* および *ras* 発現プラスミドの導入による組換え BHK 細胞の hIL-6 生産性増強は 2 倍程度のものであった。

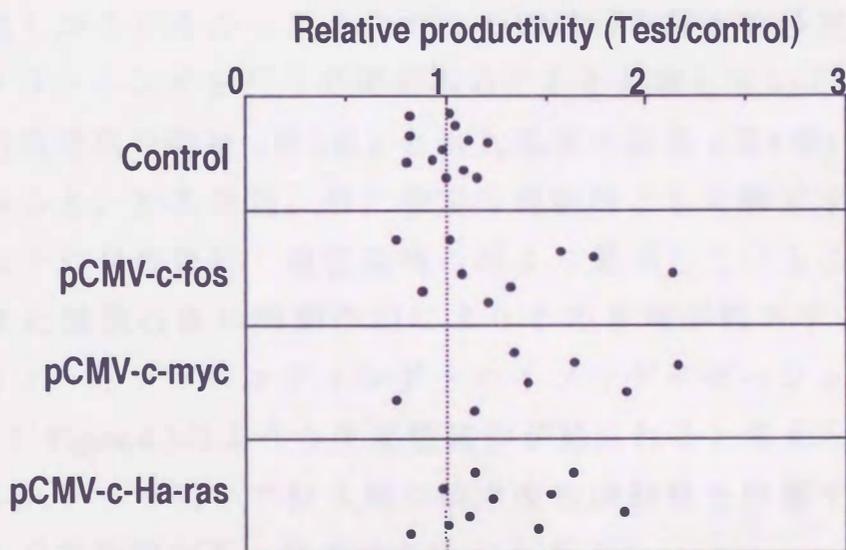


Figure 6-2. *fos*、*myc* および *ras* 導入 BHK6-1 細胞の限界希釈法による高生産細胞のスクリーニングの結果

第4節 考察

本章では遺伝子導入後の薬剤選択終了後、直ちに96穴プレートを使用し、得られた形質転換細胞のクローニングおよびスクリーニングを行った。その結果、単一クローン由来の数百程度のクローンを調べることができた。その結果、pCMV-v-mybやpBCMGSneo-v-mybにより、4~5倍程度生産性の増強されたクローンを得ることができた。しかしながら、他の*fos*、*myc*、そして*ras*の導入においては高いもので約2倍程度の生産性増強しか生じなかった。このことは数百を超える多数のクローンからスクリーニングを行う必要があることを示唆している。

また一過性発現の結果(第3章)と恒久発現の結果(第4章)を併せて考慮してみると、恒久発現、特に安定な細胞株として樹立する際に各種ガン遺伝子の発現量は一過性発現の時より低下していることが考えられる。また細胞自体の抑制作用によりその発現が低下する(第4章BHK細胞のノーザンブロットイング・ハイブリダイゼーションの結果参照)ためにFigure 4-3のような生産性減少が見られると考えられた。つまりOAPシステムを用いて恒久的な高生産性細胞株を作製するためにはガン遺伝子の発現が不十分ではないかと考えた。

これらのことより、次章(第7章)ではより多数のクローンのhIL-6生産性を調べるためのスクリーニング法の開発を行った。また第9章では導入したガン遺伝子の発現レベルを上昇させることを目的とした遺伝子増幅法の併用を検討した。

第5節 小括

本章では遺伝子導入細胞の薬剤選択終了後、ただちに96穴プレートで限界希釈法を用いてクローニングを行い、得られるクローンに関してスクリーニングを行ったところ、以下のような結果が得られた。

1. *myb*遺伝子導入により、4~5倍程度まで生産性が増強されたクローンを得ることができた。

第7章 Secretary Cell Immunoscreening Assay (SCISA) 法の開発

第1節 緒言

近年、多数の有用生理活性タンパク質の遺伝子がクローニングされ、動物細胞を用いての大量生産が行われてきている (Griffiths, 1990)。その組換えタンパク質の大量生産において、安定な高生産性細胞株の樹立が不可欠である。現在、遺伝子増幅法 (Schimke, 1984; Kaufman *et al.*, 1986; Hayward *et al.*, 1986) が組換え動物細胞の生産性を実用的レベルまで上げるのに使用されているが、選択薬剤の段階的增加により遺伝子のコピー数を増加させるためには多くの時間と労力を要する。中でも高生産性細胞のスクリーニングに多くの労力を要しているのが現状である。

典型的なスクリーニング法では、薬剤耐性を指標にクローンを1個ずつ拾い、その後組換えタンパク質生産性の検定を行ってきた。その場合、限界希釈法によりクローニングを行い、生産性をチェックするという方法は非常に時間と手間を必要とする。

一方、大量のコロニーを取り扱うことのできる方法として、コロニーレプリカアッセイ法が確立されている (Esko *et al.*, 1978 & 1982; Raetz *et al.*, 1982)。しかしながら、この方法は分泌タンパク質のスクリーニングには適切ではない。またサイトカイン分泌細胞の検出のために開発された Enzyme-linked Immunospot 法 (Taguchi *et al.*, 1990; Kawamura *et al.*, 1992) は分泌タンパクの検出には使用できるがクローニングには不適當である。

近年、化学発光を利用した高感度 ECL 検出法が開発され、ウェスタンブロッティングでタンパク質の超微量検出が可能となった (Thorpe and Kricka, 1986; Seigel and Notter, 1992)。本章で開発した Secretary Cell Immunoscreening Assay (SCISA) 法はニトロセルロース膜に吸着させた固相抗体に分泌タンパク質をトラップさせ、高感度 ECL 法と免疫ブロッティング法を組合せることにより 100 pg 以下の分泌タンパク質の検出を可能とした。

第2節 実験材料および方法

第1項 細胞培養および遺伝子導入

BHK-21細胞は5%のFBSを含むDMEM中で37℃、5% CO₂/95%空気の条件下で培養した。BHK-21細胞にリン酸カルシウム共沈法を用いてpSR α -IL-6およびpSV2-*dhfr*プラスミドを共導入することで、hIL-6を生産するBHK細胞を作製し、50nM MTXを含む培地中で形質転換細胞の選択を行った。

第2項 標準hIL-6のプロットイング

ニトロセルロース膜 (Amersham Hybond C) をヤギ抗hIL-6抗体 (R&D Systems) 溶液中で37℃、1時間インキュベートし固相抗体を吸着させ、ブロックエース (大日本製薬) 中で37℃、1時間インキュベートしブロッキングを行った。1% BSA/PBS中にhIL-6を1pg~1000 pg/ μ lとなるように調製した標準溶液を1 μ lずつスポットし、37℃、1時間インキュベートし、固相抗体と反応させた。0.05% Tween 20/PBS (TPBS) で膜を洗った後、ビオチン化マウス抗hIL-6抗体 (Genzyme) を含む1% BSA/PBS中で37℃、1時間インキュベートした。TPBSで膜を洗った後、HRP (西洋ワサビヘルオキシダーゼ) 標識ストレプトアビジン (Amersham) もしくはアビジン・ビオチン化HRP複合体 (ABC) (Vector Laboratory, Burlingame, CA) を含む0.1% Tween 20/PBS中で37℃、1時間インキュベートした。TPBSで膜をよく洗った後、4-クロロ-1-ナフトール (4CN, 和光純薬)、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB, 同仁化学)、そしてEnhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham) を使用してhIL-6の検出を行った。

第3項 組換えBHK細胞の生産するhIL-6の検出

SCISA法の手順をFigure 7-1に示した。培養器中の培養上清を除去し、

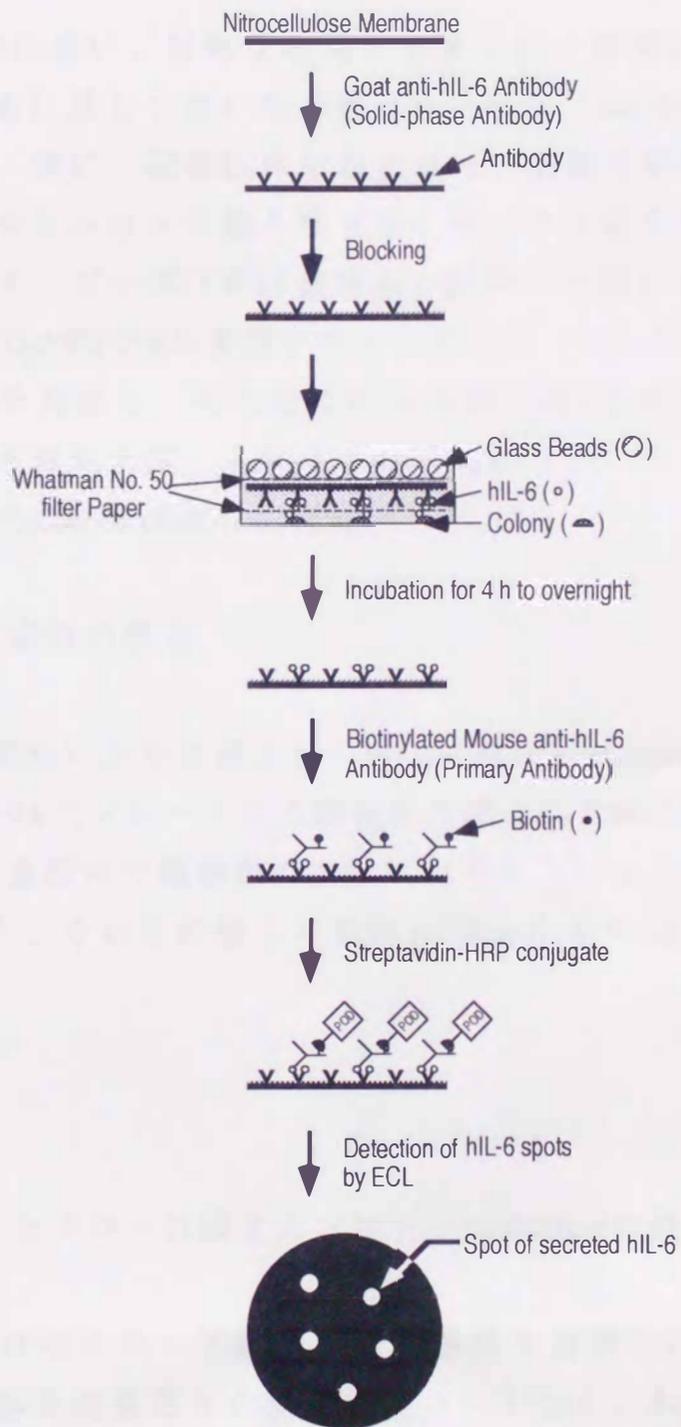


Figure 7-1. Secretory Cell Immunoscreening Assay (SCISA) 法の概略

PBSで2回静かに洗い、新鮮な培地に交換した。最初に細胞培養培地 (5% FBS/DMEM) に浸しておいたろ紙 (ワットマンNo.50) を細胞の上に静かに乗せた。次に、固相抗体を吸着させ、細胞培養培地でブロッキングしたニトロセルロース膜に乗せた。そしてろ紙を乗せ、最後に直径4 mmのガラス・ビーズ (井内盛栄堂) を単一の層となるように重層し、37°C、5% CO₂/95%空気の条件下でインキュベートした。インキュベート終了後に膜を回収し、その後は抗体処理とECLを使用してhIL-6の検出を行った。ろ紙およびニトロセルロース膜はオートクレーブ滅菌、ガラス・ビーズは乾熱滅菌した後使用した。

第4項 hIL-6生産性の測定

組換えBHK細胞により生産されたhIL-6の量はELISA法により測定した (第3章)。また96穴プレート中の細胞数の測定にはMTT法 (第4章) を使用し、35 mm培養器中の細胞数の測定にはセルカウンター (東亜医用機器) を使用した。それらの値より細胞10⁶個あたりのhIL-6生産性を算出した。

第3節 結果

第1項 ニトロセルロース膜上にプロットしたhIL-6の検出

最初にニトロセルロース膜での検出感度を試験した。様々な量のhIL-6を固相抗体を吸着させた膜上にプロットした。Figure 7-2に示したようにECLは明らかに100 pgのhIL-6のスポットを検出できた。しかしながら通常ウェスタン・ブロッティングで使用される4CNおよびDABではこの濃度のhIL-6を検出するためには感度が不足していた。これらの結果はECLのみがSCISA法で要求される検出感度を持つことを示していた。

次に固相抗体、一次抗体、そしてHRP-ストレプトアビジン濃度の検討を行った。固相抗体なしでは10 ng/スポットのhIL-6でさえ検出できな

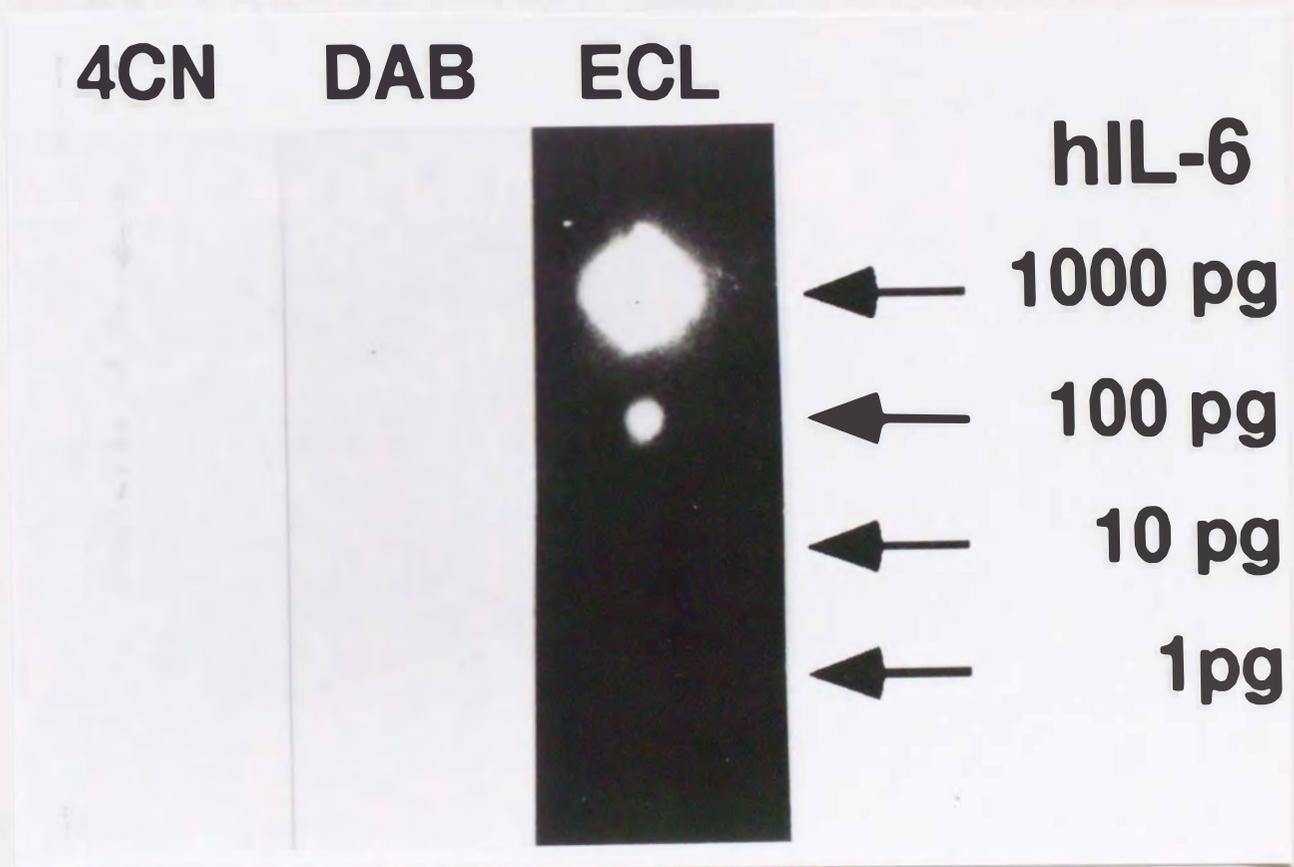


Figure 7-2. SCISA法のHRP検出試薬とhIL-6の検出感度

かった。また5 $\mu\text{g/ml}$ の固相抗体が100 pg/スポットのhIL-6を検出するために必要であった (Figure 7-3)。0.5 $\mu\text{g/ml}$ のHRP-ストレプトアビジンにはバックグラウンドの発光が増大しており、高感度検出法として知られているABCでの検出感度の上昇は見られなかった (Figure 7-4)。これらの結果より固相抗体5 $\mu\text{g/ml}$ 、一次抗体0.13 $\mu\text{g/ml}$ 、そしてHRP-ストレプトアビジン0.25 $\mu\text{g/ml}$ を至適濃度として以後使用した。また3種類のニトロセルロース膜 (Amersham Hybond-C、Hybond-ECLおよびSchlicher & Schuell BA85) において検出感度の差異は見られず、PVDF膜 (Millipore) を使用した場合にわずかな検出感度の上昇が見られた (Data not shown)。

第2項 組換え細胞から分泌されたhIL-6の検出

膜上のhIL-6のスポット (Figure 7-5A) とギムザ染色した培養器上のコロニー (Figure 7-5B) は位置および大きさがよく対応していた。またろ紙をコロニーと膜の間にはさむことは、膜に細胞が接着することによる脱落を防ぐ効果が見られた。長時間のインキュベートはコロニーの脱落を加速する傾向が見られた、これはおそらく細胞が増殖し、分裂した後、ろ紙に接着するためと考えられた。またhIL-6遺伝子を導入していないBHK細胞ではECLのスポットは検出されなかった (Data not shown)。

コロニーの大きさは可能な限り小さい方が均一な発光スポットを与えた。これはスクリーニングの期間を短縮するため、また高生産性細胞株の選択において好ましい結果であった。

第3項 高生産性細胞のスクリーニング

形質転換したBHK細胞を20枚の96穴プレートに0.5個/穴の密度でまきこみ、限界希釈法による高生産性株のスクリーニングを行った。ELISA法で培養上清中のhIL-6量を測定し、416クローンから23クローンを選択した。それらのクローンのhIL-6生産性を算出したところ最高0.42 $\mu\text{g}/10^6$ 細胞/日の生産性を示す細胞株が得られた (Table 7-1)。

Concentration of Solid-phase Antibody

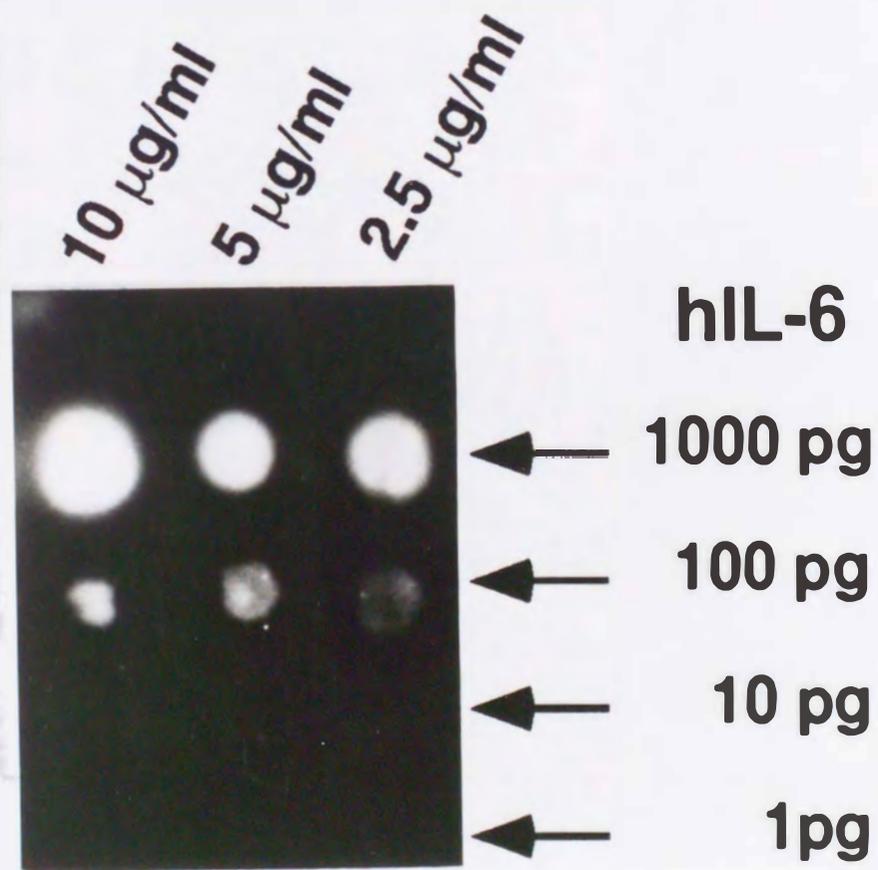


Figure 7-3. SCISA法の固相抗体濃度とhIL-6の検出

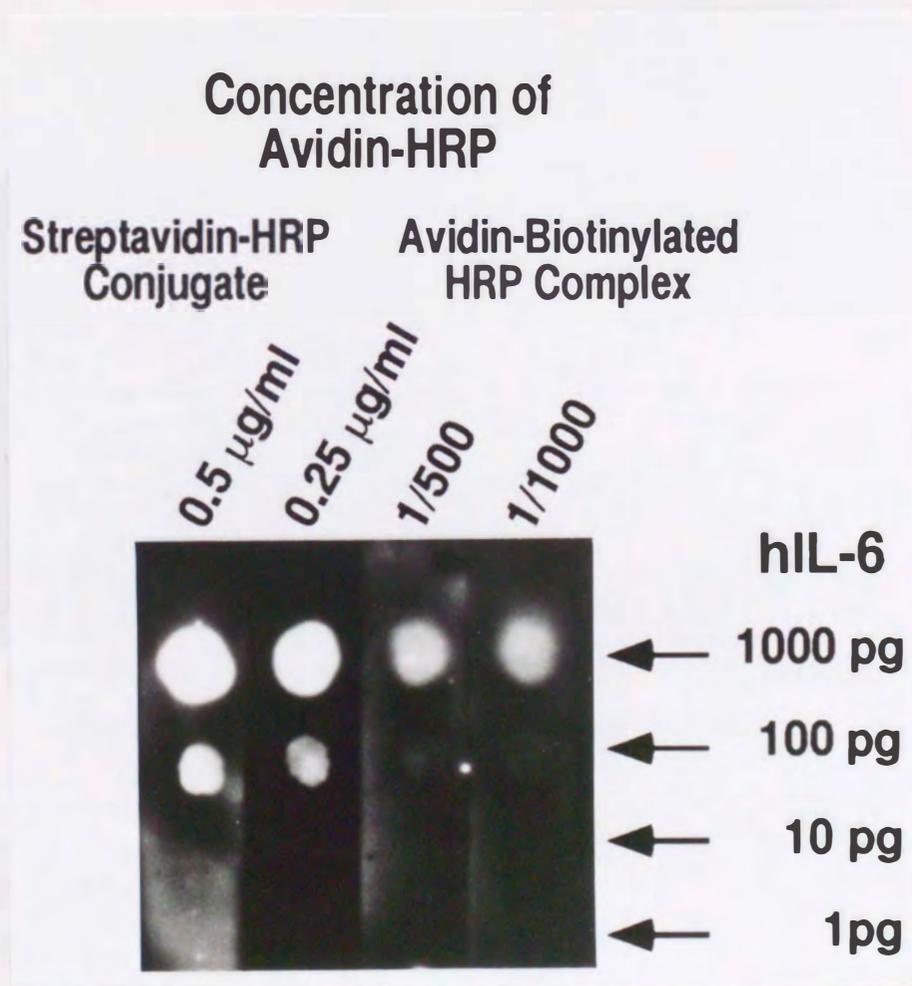


Figure 7-4. SCISA法のHRP-ストレプトアビジンおよびABCの濃度とhIL-6の検出

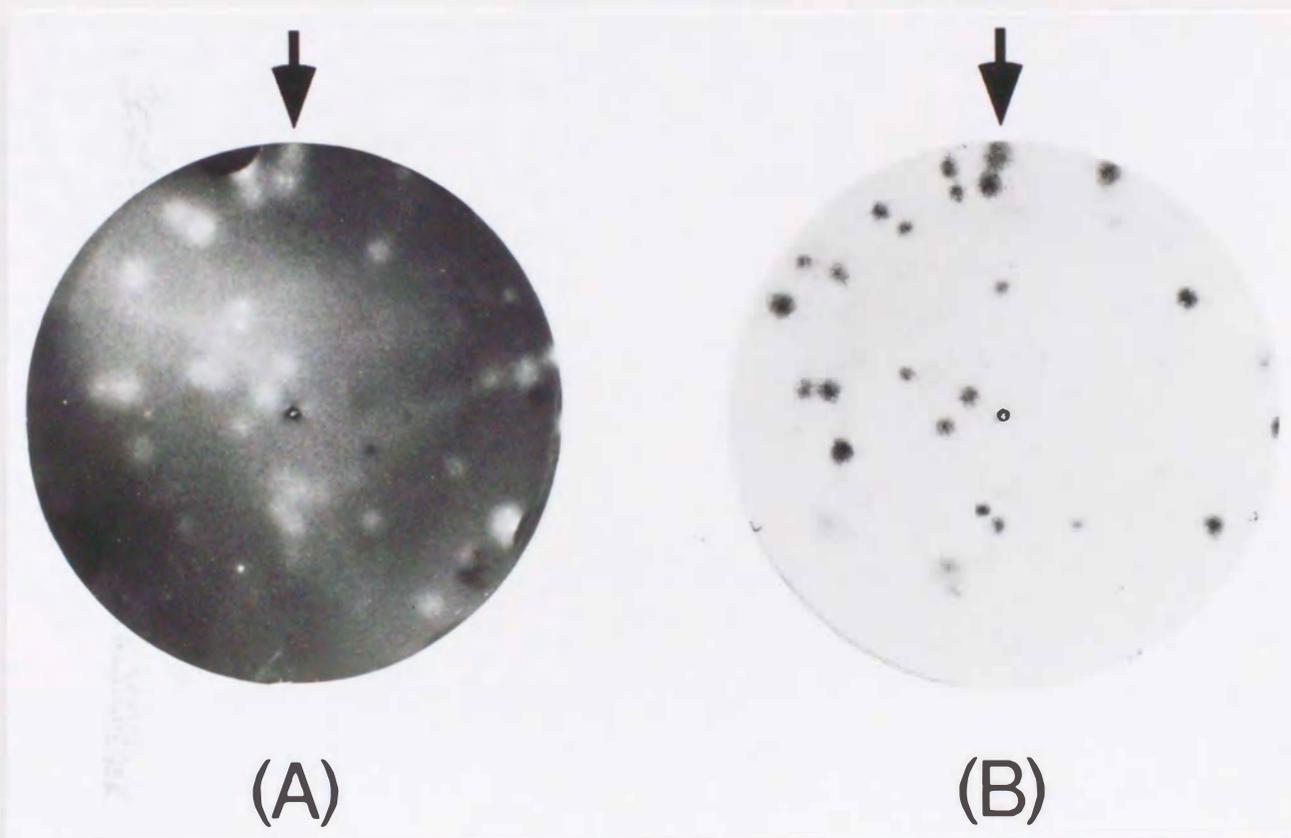


Figure 7-5. SCISA法による分泌hIL-6検出(A)と組換えBHK細胞コロニーのギムザ染色(B)

Table 7-1. 96穴プレートを用いた限界希釈法による高hIL-6生産性クローンのスクリーニング

Clone Number	Absorbance at 405 nm	Productivity (hIL-6 $\mu\text{g}/10^6$ cells/day)	
		1st. Assay (96-well microplate)	2nd. Assay (96-well microplate)
Control		0.03	0.03
1	0.358	0.36	0.35
2	0.330	0.31	0.30
3	0.301	0.12	
4	0.226	0.27	
5	0.317	0.24	
6	0.367	0.52	0.37
7	0.478	0.52	0.42
8	0.355	0.06	
9	0.192	0.16	
10	0.230	0.09	
11	0.322	0.60	0.24
12	0.324	0.16	
13	0.182	0.07	
14	0.339	0.23	
15	0.247	0.20	
16	0.247	0.31	0.20
17	0.252	0.16	
18	0.197	0.12	
19	0.184	0.08	
20	0.180	0.07	
21	0.288	0.25	
22	0.273	0.09	
23	0.186	0.08	

また 2×10^3 細胞/90mm培養器3枚と 1×10^4 細胞/90mm培養器1枚、合計4枚の90mm培養器からSCISA法によりスクリーニングを行った。より強い発光スポットを示した12個のコロニーを選択し、それらのクローンの

hIL-6生産性を算出したところ (Table 7-2)、最高 $0.57 \mu\text{g}/10^6$ 細胞/日の生産性を示すクローンが得られた。この結果は限界希釈法で得られた結果と対応していた。

Table 7-2. SCISA法による高hIL-6
生産性クローンのスクリーニング

Clone Number	Productivity (hIL-6 $\mu\text{g}/10^6$ cells/day)	
	1st. Assay (96-well microplate)	2nd. Assay (35 mm dish)
Control	0.03	0.03
1	0.24	0.23
2	0.37	
3	0.34	0.35
4	0.24	
5	0.44	0.57
6	0.21	
7	0.33	0.26
8	0.36	0.27
9	0.23	
10	0.27	
11	0.40	0.40
12	0.27	

第4節 考察

SCISA法はELISA法を応用したものである。検出したいタンパク質を直接特異抗体で捕捉することおよびECLの高感度の両者が100個以下の組換えBHK細胞から分泌されるhIL-6の検出を可能とした。SCISA法は高生産性細胞の迅速スクリーニングに最適であった。限界希釈法およびSCISA法の両方で組換えBHK細胞のスクリーニングを行ったところSCISA法は、より効率的なスクリーニングが行えた。20枚の96穴プレー

トから得られるわずか数百のクローンをストックする限界希釈法に対し、SCISA法では最大10,000クローンを1枚の90 mm培養器からスクリーニングできた。これはSCISA法が非常に小さいコロニーの検出を可能としているからである。ただしSCISA法はその性格上、高生産性のコロニーだけでなく低生産性の大きなクローンからも強い発光シグナルを与えることが予測される。そのため選択したコロニーの顕微鏡でのチェックおよび生産性測定による評価が必要とされる。しかしSCISA法では数倍程度以上に高い生産性を示すクローンを容易にスクリーニングすることができた。

限界希釈法とSCISA法の特徴をTable 7-3に示した。SCISA法を行った後コロニーの単離のみが多少厄介であるが、他の操作は非常に容易なものであった。またSCISA法は高感度で分泌タンパク質を検出し、その位置を特定できるため、薬剤マーカーなしの直接スクリーニングにも応用できると考えられる。

Table 7-3. 96穴プレートを用いた限界希釈法とSCISA法の比較

項目	限界希釈法	SCISA法
スクリーニングの規模	30~50クローン /96穴プレート	$10^2 \sim 10^4$ クローン /90 mm培養器
クローン集団からの高生産性クローンの選択	△	○
高生産性クローンの単離	○	△
細胞種の制限	なし	現在のところ 接着細胞のみ

第5節 小括

ニトロセルロース膜と特異抗体を利用した、より迅速かつ簡便な高生産性細胞株のスクリーニング法、Secretory Cell Immunoscreening Assay (SCISA)法を開発した。本法はニトロセルロース膜上に目的とする分泌タンパク質に対する抗体を固相抗体として吸着させ、培養器中に形成させた接着動物細胞のコロニー上に膜を乗せて、細胞が生産している組換えタンパク質をトラップさせた後、イムノブロッティングの方法により検出を行うものである。動物細胞に生産させる組換えタンパク質としてhIL-6を使用し、その検出には高感度ECL検出法を使用した。SCISA法では100 pg以下のhIL-6が検出可能であった。また組換えBHK細胞のコロニーが分泌するhIL-6を直接検出でき、多数の形質転換細胞のクローンの中から生産性の高い細胞を迅速かつ容易に選択することができた。

第8章 MTTに替わる新規細胞数測定用化合物の検討

第1節 緒言

細胞制御工学の分野を含めて細胞を使用する研究分野において、細胞数の測定という作業は単純なものではあるが研究において重要な位置を占める。細胞密度が 10^3 個/ml程度で数mlの検体が準備できる場合にはセルカウンターが威力を発揮する。しかしこのセルカウンターは構造上、細胞と同等の大きさの粒子数を計測するものであり、細胞の生死に関わらず、あるいは液中の気泡もカウントするという欠点がある。また生細胞率を算出するためには、生細胞の色素排除能を利用したトリパンブルー染色法などを行う必要がある。またセルカウンターは96穴プレートの1穴中の細胞数を測定するといった極少量の細胞測定にも不適である。

96穴プレートなどの非常に少量の細胞の生細胞数を測定するための方法としてMTT法 (Mosmann, 1983; Denizot and Lang, 1986) やニュートラルレッド法 (Klostergaard, 1985) が開発され使用されている。MTTは第3章で前述したように淡黄色のMTT [3-(3,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] が生細胞のミトコンドリア内の呼吸酵素により開裂され、暗青色のフォルマザンを生成する (Figure 8-1上段)。死細胞ではこの反応は起こらない。生成したフォルマザンを0.04 N 塩酸/2-プロパノール溶液を用いて細胞より抽出し、570 nmの波長の吸光度を測定するものである。この吸光度は生細胞数と相関するため生細胞数測定に利用されている。またニュートラルレッド (3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine HCl) は生細胞に取り込まれ、細胞のリソソーム中に蓄積される。このニュートラルレッド取り込み量は生細胞数に比例することから生細胞数の高感度測定法として用いられている。

本研究では使用している細胞の接着性がやや弱くニュートラルレッド法の使用に不適当なため、96穴プレート中の細胞数の測定にはMTT法を用いてきた。しかしながら上述したようにMTTフォルマザンは塩

酸/2-プロパノール溶液を用いて抽出を行わなければならない、この操作が測定の大きな手間となっている。

近年、水溶性のフォルマザンを生成するテトラゾリウム塩、WST-1が開発された (Ishiyama *et al.*, 1993)。WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] は電子供与体である1-Methoxy PMSの共存下で黄色のフォルマザンを生成する (Figure 8-1下段)。このフォルマザンは難水溶性のMTTフォルマザンと異なり水溶性のため、MTT法のような抽出操作を必要としない。また alamar Blue という吸光度測定や蛍光測定に使用できる細胞数測定試薬も開発された。本章では、従来のMTT法にかわる微量細胞数測定法の検討を行った。

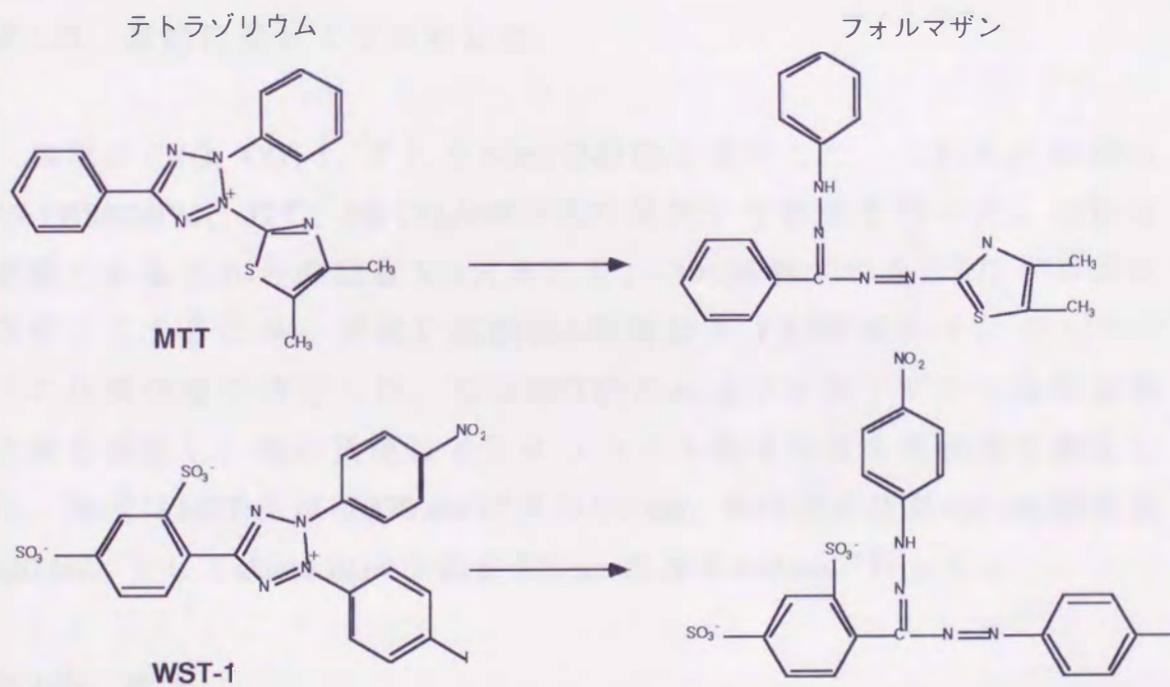


Figure 8-1. MTTおよびWST-1のテトラゾリウムとフォルマザンの構造

第2節 実験材料および方法

第1項 各化合物の吸光スペクトル分析

MTTは同仁化学より購入した。WST-1および1-Methoxy PMSは同仁化学より入手した。alar BlueはBIOSOURCEより購入した。MTTは5 mg/ml PBS溶液を、WST-1はWST-1 65 mgと1-Methoxy PMS 7 mgを1mlのPBSに溶かした溶液を保存溶液とした。alar Blueは保存溶液の形で入手した。また、全試薬とも使用に際しては1/10量を培地に添加して使用した。それぞれの試薬を用いた実験手順をFigure 8-2に示した。吸光度のスペクトル測定はBECKMAN DU-64分光光度計を使用し、測定波長400~700 nm、スキャン750 nm/minで行った。

第2項 細胞培養および細胞試験

細胞はCHO、COS-1、そしてNIH3T3細胞を使用した。これらの細胞は5% FBS/DMEM、37°C、5% CO₂/95%空気の条件下で培養を行った。対数増殖期にあるこれらの細胞を1穴あたり1~3×10⁵個ずつから1/2ずつ段階希釈してまきこみ、試薬を添加後4時間および27時間のインキュベーションの後吸光度を測定した。なおMTT法のみはフォルマザンの抽出後吸光度を測定し、他の試薬はインキュベーション後そのまま吸光度を測定した。測定はMTT:主波長570 nm/副波長630 nm、WST-1:主波長450 nm/副波長620 nm、そしてalar Blue:主波長570 nm/副波長620 nmで行った。

第3節 結果

第1項 各化合物の吸光スペクトル

まず各試薬を生細胞と4時間インキュベートした。細胞なしで同時インキュベートしたものをブランクとして用いた。PBSで1/10に希

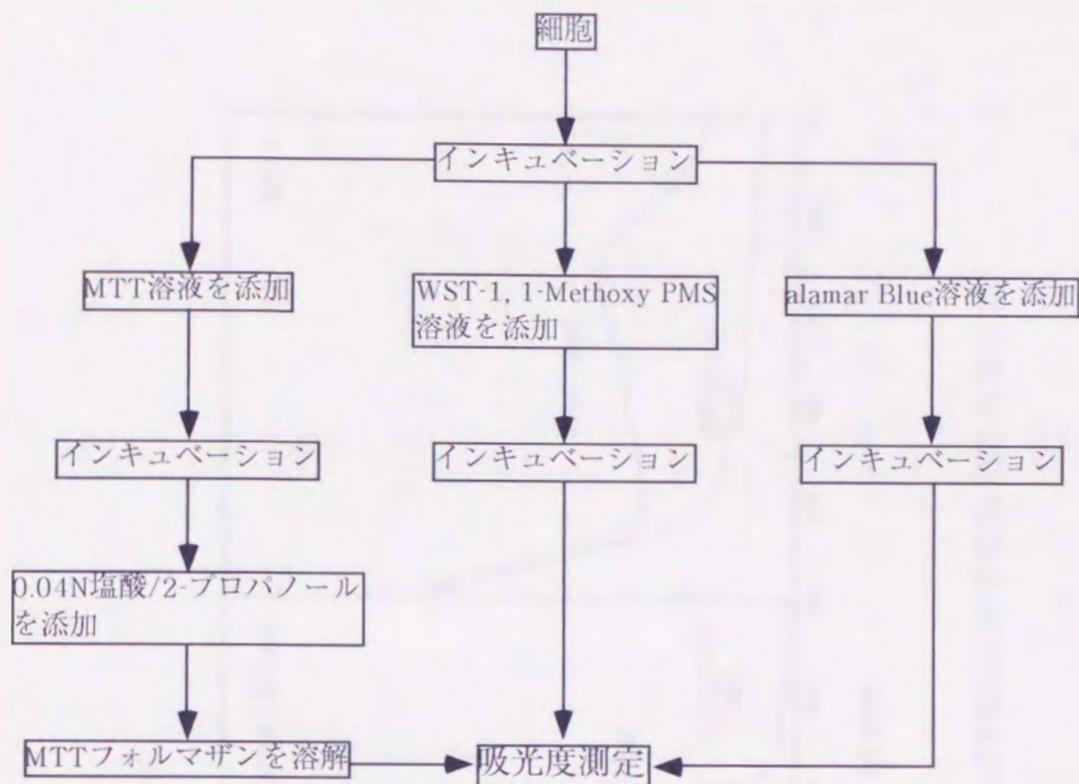


Figure 8-2. MTT、WST-1、およびAlamar Blueのアッセイ手順

釈後、各試薬のPBSに対する吸光スペクトルの測定を行った (Figure 8-3)。従来使用していたMTTはブランク自体が黄色に着色しておりそれが400 nm付近の吸光度として現れている。Alamar Blueはブランクの青色からテストの赤色への変化が吸光極大値のシフトとして現れている。一方、WST-1はブランクにはほとんど吸光値がなく、450 nm付近に吸光極大を持つ単一のピークとして発色が示される。続けてこれらを試験/ブランクで吸光スペクトルを測定した (Figure 8-4左図)。その結果、WST-1のみが吸光極大と参照として使う波長の差が明確に現れた。また通常動物細胞培養で使用する培地には5 mg/literのフェノールレッドがpH指示薬として添加されている。フェノールレッドは550 nm付近に吸光値のピークを持つ (Figure 8-4右図)。しかしながら、他の構成物由来の420 nm付近の吸光値のピークを含め、生細胞数測定の影響にはならないと考えられた。

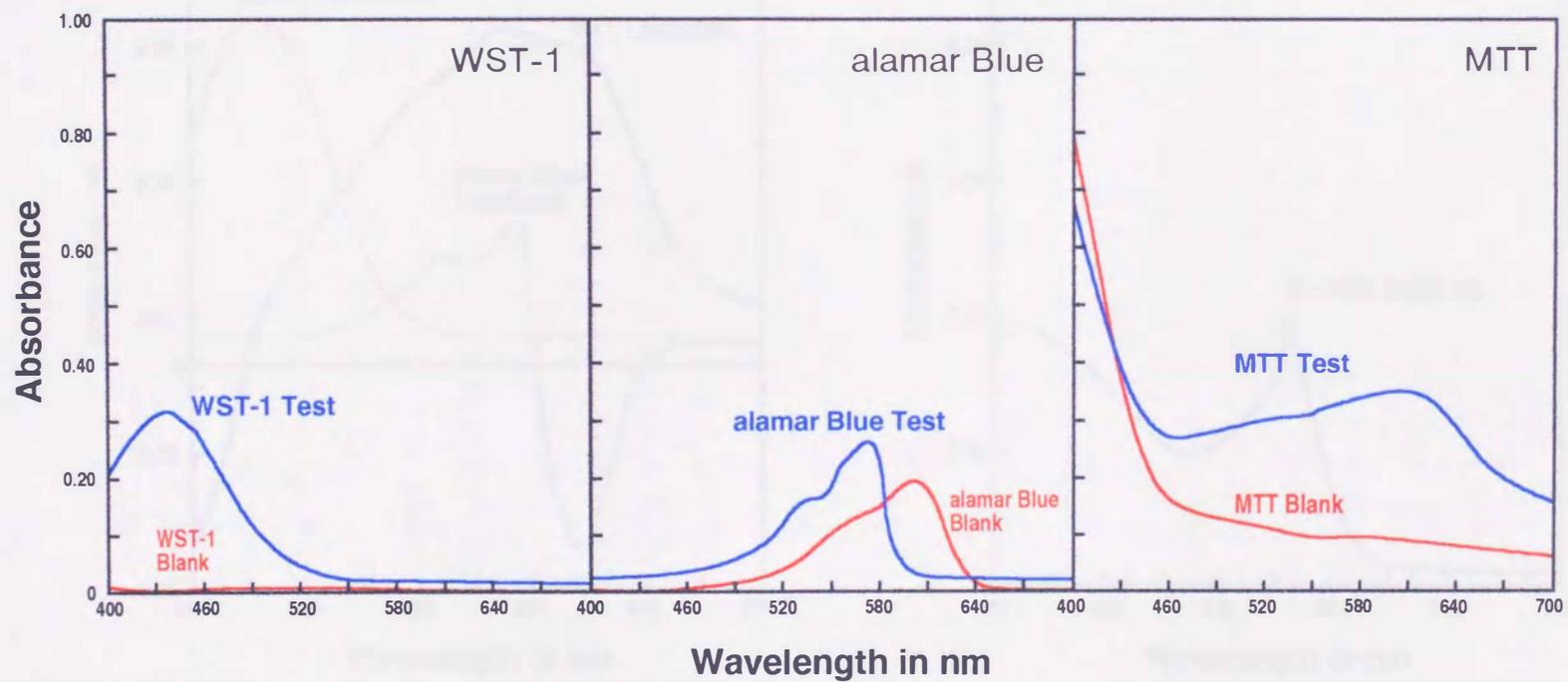


Figure 8-3. MTT、WST-1およびalamar BlueのPBSに対する吸光スペクトル

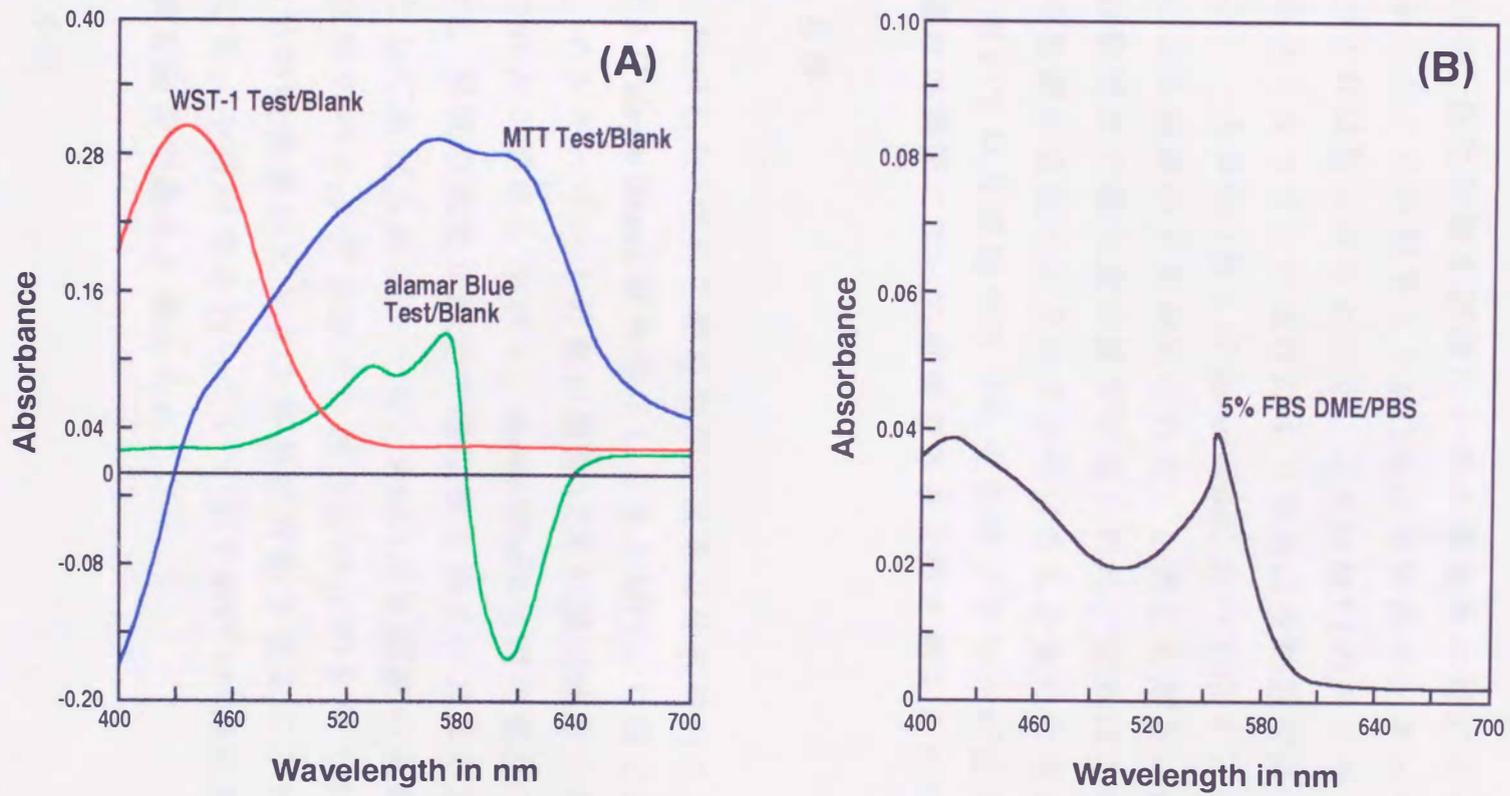


Figure 8-4. MTT、WST-1およびalamar BlueのTest/Blankの吸光スペクトル(A)と5%FBS添加培地のPBSに対する吸光スペクトル(B)

第2項 細胞数測定試験の結果

Figure 8-5に各化合物を使用した際の細胞数に対応する各化合物の吸光度を示した。この結果よりMTT法は長時間インキュベートしても測定感度の上昇は見られなかった。これはMTTのテトラゾリウムおよび生成するフォルマザンの毒性により急速に生細胞が減少するためと考えられた。一方WST-1およびalar Blueにおいてはインキュベーション時間の延長による感度の上昇が見られた。しかしながら、alar Blueにおいては高細胞密度で吸光度の減少が見られた。これはこの試薬の発色が青→赤の色調の変化で示されるために生じるものと考えられた。またWST-1においては高細胞密度では発色のプラトーが見られたが、これは試薬濃度の調節によって解消できるものと考えられた。

第4節 考察

本章で検討した3種の生細胞数測定試薬の比較検討を行ったところ、WST-1およびalar Blueは従来使用してきたMTTより測定が行い易いことに加え、インキュベーション時間の調節により測定感度の向上が可能なことが示された。しかしながら、alar Blueは色調の変化で細胞数に対応するため、単純な吸光度測定で細胞数を示すのには不向きであることが欠点としてあげられる。一方、WST-1は反応前の試薬自体の吸光値が培地自体のバックグラウンドと同じレベルのものであり、細胞数とWST-1由来の吸光値のピークを容易に対応させることができた。以上のことより、今後研究を行っていく上でWST-1が細胞数測定用の試薬として最も適切であると考えられた。

第5節 小括

本章ではMTT法にかわる細胞数測定試薬の検討を行った。その結果、WST-1およびalar Blueは測定操作の簡略化が可能で、しかもMTTより高

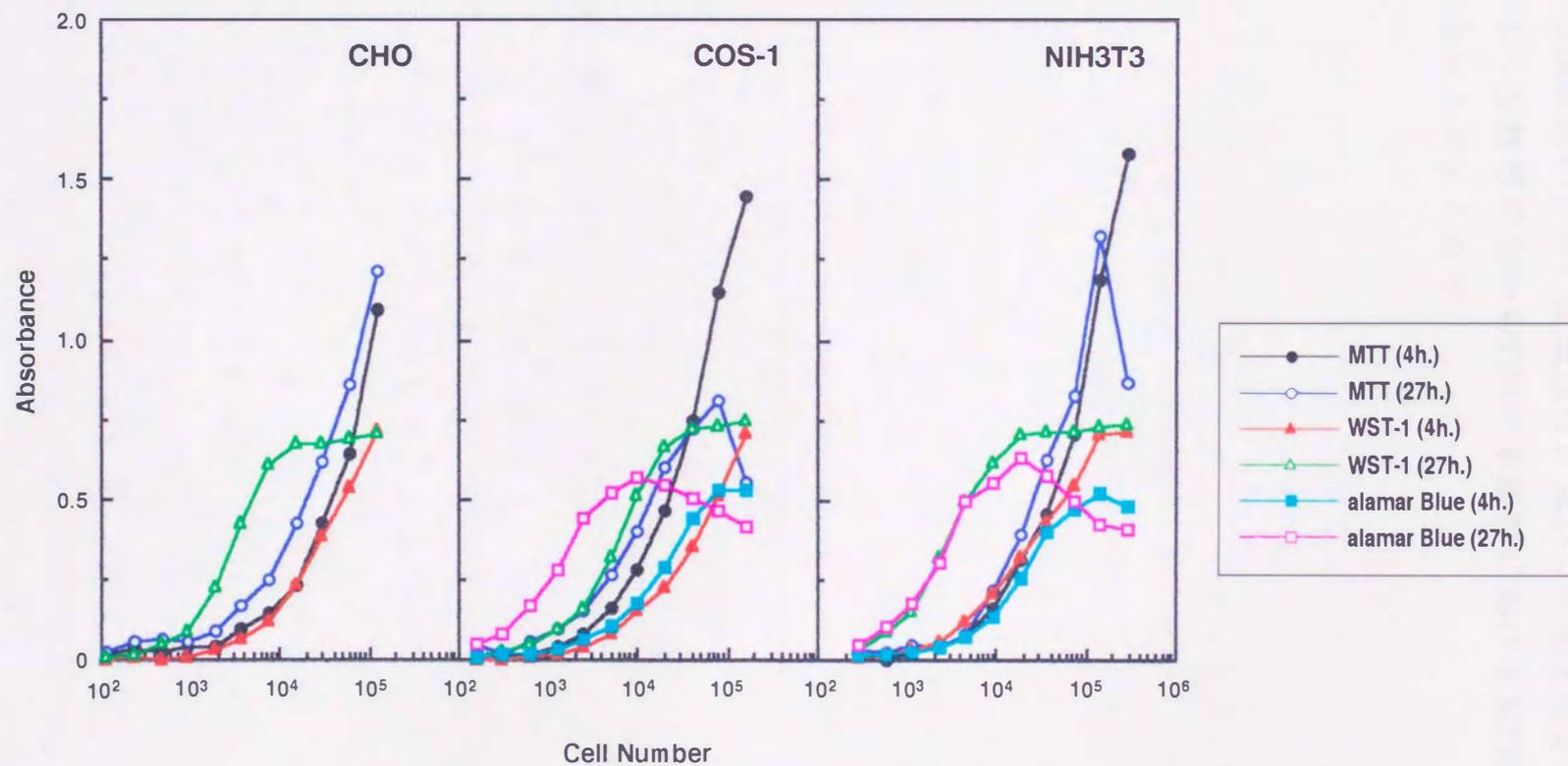


Figure 8-5. CHO、COS-1およびNIH3T3の細胞数とMTT、WST-1
およびalamar Blueの吸光度の関係

感度の測定を行うことが可能であった。しかしながら、alar Blueの発色は色調変化のために高発色時に見かけの吸光度が減少する。よって、そのような性質のないWST-1が本研究におけるMTTの代替試薬として適当であると考えられた。