

魚類培養細胞スフェロイドの基礎特性評価と それを用いた水質評価試験への応用

所属： 熊本高等専門学校

助成対象者： 本田 晴香

共同研究者： なし

概要

水質評価試験のひとつに「全排水毒性（WET）試験」があるが、生物個体を取り扱う WET 試験は、飼育や評価が煩雑である。そこで申請者は、より簡便な水質評価試験の確立を目指し、魚類培養細胞を用いた手法を発想した。

本研究では、魚類培養細胞のスフェロイド化により生体に近い応答性を獲得し、また、ボール型の形状を活かした画像解析による水質評価を試みた。

魚類培養細胞は、アガロースゲル基板上でスフェロイドを形成した。また、ベンゾピレンの暴露によりスフェロイドの形状が崩壊し、円形度の低下が見られた。さらなる条件の検討が必要であるが、魚類由来培養細胞スフェロイドを用いることで、水質評価試験へ応用できる可能性が示唆された。

abstract

A total wastewater toxicity (WET) test is one of the bioassays of the water quality test. The WET test needs a complicated operation to breed and measure the proliferation of test animals. Therefore, it is needs to that establish a simple water quality test method using derived-fish culture cells.

In this study, the applicant tried spheroid formation to obtain responsiveness close to that of a living cell in vivo and evaluate water quality using shape changes of spheroids.

Fish-derived cells formed spheroids on the agarose gel substrate. Besides, spheroids lose their balled shape and circularity after exposure to benzo[a]pyrene. These results suggested that the cultured cell spheroids derived-fish cells could be applied to the water quality test.

研究内容

[背景・目的]

環境省は、排水評価試験の一手段として「全排水毒性（WET）試験」の導入を検討している。WET 試験は、工場や事業所からの排水中でミジンコなどの生存や成長を評価し、排水全体が水生生物に与える影響を試験する手法である。しかし現状の WET 試験は、サイズの揃った生物個体を必要数準備し、手作業で個体数をカウントするなど煩雑な操作を伴う。

そこで申請者は、排水や環境水の簡便な生物応答試験には、「培養細胞」が適していると考えた。培養細胞を用いる利点として、様々な生物由来の細胞を細胞バンクから入手できる、市販の試薬キットで生存率を評価できる点などが挙げられる。

一方で培養細胞は、本来の細胞が持っている三次元的な立体構造を失い、化学物質への応答性や機能性を完全に反映できない。より長期間、生体内の細胞に近い特性を得る培養法に、個々の細胞が三次元的に集合した「スフェロイド培養」がある。スフェロイド培養の対象は哺乳類細胞が主であったが、近年、淡水魚由来細胞株をスフェロイド化すると、従来の単層培養法よりも CYP1A の遺伝子発現レベルが高まることが示され、スフェロイド培養は魚類培養細胞に対しても有効な培養方法のひとつと言える^[1]。

また、スフェロイドは生体内の細胞に近い特性を持つことが期待できると共に、ボール状をしており、その形状特徴を捉えやすい。スフェロイドに有毒物質を含む排水を暴露した場合、サイズの縮小、崩壊など、水質を反映した顕著な形状変化が表れると考えた。これらの形状変化を「画像解析」で測定し、簡便に毒性の有無を評価できると発想した。

そこで本研究では、具体的に以下 2 つの検討を行い、従来の WET 試験よりも簡便な水質評価試験の確立を大きな目的とした。

- (1) PLHC-1 細胞スフェロイドのスフェロイドサイズ依存的な基礎特性評価
- (2) PLHC-1 細胞スフェロイドの画像解析を用いた水質評価試験の検討

[結果]

(1) PLHC-1 細胞スフェロイドのスフェロイドサイズ依存的な基礎特性評価

本実験では、薬剤スクリーニング等で汎用される肝細胞（薬物代謝活性を持つ）を対象とし、カダヤシ由来の肝ガン細胞である PLHC-1 細胞を用いた。

PLHC-1 細胞スフェロイドの形成は、直径、深さ共に $500\mu\text{m}$ の微細なウェル構造 (microwell) を 400 個有するアガロースゲルを用いた。内部に壊死層が発生しないスフェロイドのサイズを決定するため、初期細胞播種密度を変えて、サイズの異なるスフェロイドを形成させた。今回は、500、および 2000 cells/microwell となるように細胞を播種し、スフェロイドの形成を試みた。Total protein、DNA 量測定、imageJ を用いた画像解析によるスフェロイドのサイズ測定、生死染色を行い、スフェロイドの特性を評価した。

PLHC-1 細胞は、一般的な細胞培養用ディッシュ上では接着、伸展して単層を形成した (Fig.1 (a), (b))。一方、アガロースゲル上では細胞の基板への接着が阻害され、細胞同士が集合、凝集してスフェロイドを形成した (Fig.1 (c), (d))。

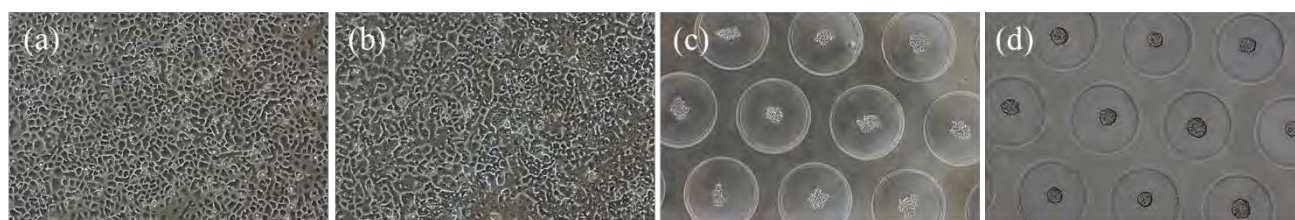


Fig.1 Morphology of PLHC-1 cells on tissue culture dish (a, b) and agarose gel (c, d) at 1 day (a, c) and 7 days (b, d) of culture.

Total protein、DNA 量の測定結果より、形成されたスフェロイドの増殖性は、初期播種密度によらず単層培養よりも低くなった。しかし Calcein/PI による生死染色の結果、2000 cells/microwell ではスフェロイド内部に死細胞のエリアが観察された。スフェロイド内部で細胞が過密に凝集することにより、酸素、栄養素等の供給が十分に行われなかったものと考えられる。以上の結果より、PLHC-1 細胞スフェロイド形成の最適初期播種密度を、500cells/microwell とした。

アルブミン分泌活性と CYP 活性は、いくつかの測定キットや手法を検討したが、検出感度が低かった。測定した範囲内では、初期播種密度の違いによる、アルブミン分泌活性や CYP 活性の大きな差は見られなかった。Nishikawa らによると、ヒト由来肝細胞株 (HepG2 細胞) のスフェロイドでは、スフェロイドのサイズが小さい方が、アルブミン分泌活性が高くなるという報告もあり^[2]、今後、測定キットの見直しも含め、検出感度を上げるなどの工夫が必要であると考えている。

(2) PLHC-1 細胞スフェロイドの画像解析を用いた水質評価試験の検討

本研究で提案する「PLHC-1 細胞スフェロイド+画像解析」は、排水暴露後のスフェロイドの直径・円形度・粒子数などの形状特徴を画像解析ソフトで測定し、生体への影響を評価しようというものである。実験(1)より、内部に壊死層が発生しない 500cells/microwell の播種密度で以下の実験を行った。

モデル化合物として、水環境中に放出され問題となっている多環芳香族炭化水素 (PAHs) であるナフタレン、フェナントレン、アントラセン、ピレン、およびベンゾ[a]ピレン培養培地に溶解し、スフェロイドへの曝露実験を行った。まず、これらの PAHs を、単層培養にて単独で曝露したところ、ベンゾ[a]ピレン (B[a]P) のみで顕著な細胞増殖阻害が見られた。そこで、B[a]P をモデル化合物としてスフェロイドに曝露し、スフェロイドの増殖性や形状変化を評価した。

PLHC-1 細胞は、培養経過に伴うサイズ変化は小さいものの、そのスフェロイド形状（ボール型）を 2 週間程度維持することが可能であった。そこで、培養 1 日目、および 7 日目に B[a]P を曝露し、14 日間（当初の計画の倍の日数）にわたる培養を行い、スフェロイドの形状特徴を ImageJ で測定した。14

日後、スフェロイドの形状は崩壊していた (Fig.2(a), (b))。スフェロイドの崩壊に伴い、面積は増加したが、円形度が低下した (Fig.2(c), (d))。1 日目に B[a]P を曝露したことで、B[a]P が細胞間の接着を阻害して細胞同士が広がったままとなり、スフェロイド面積の増大・円形度の低下が見られたと考えられる。

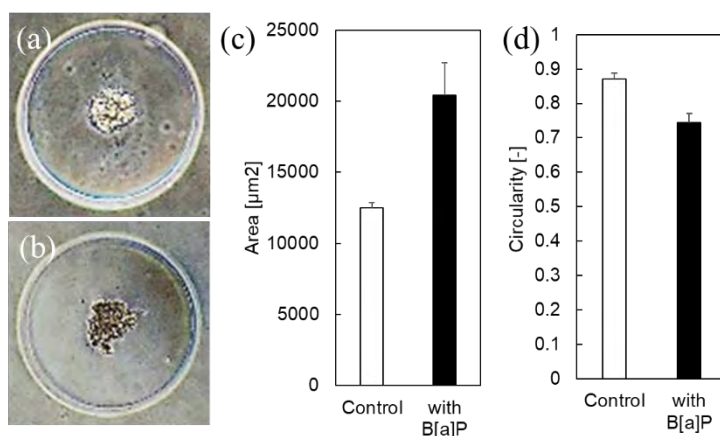


Fig.2 Morphology of PLHC-1 cell spheroid without B[a]P (a) and with B[a]P (b) at 14 days of culture. Area (C) and circularity (d) of spheroids at 14 days of culture.

また、14 日後の B[a]P 曝露後の Total protein 量は、単層培養ではコントロールの約 10 分の 1 にまで細胞数が大幅に減少した。一方、スフェロイド培養ではコントロールの半分程度の細胞数となった。ヒト由来細胞株の単層培養とスフェロイド培養では化学物質によって誘導される CYP の遺伝子発現パターンが異なることが指摘されている^[3]。培養方法の違いによる遺伝子発現パターンの差が、今回の B[a]P に対する応答性の違いに関わっている可能性があり、今後詳細に調べる必要があると考えている。

[今後]

本研究成果により、PLHC-1 細胞のスフェロイド化に成功した。また、汚染物質の有無を、スフェロイドの崩壊に伴う面積の増大、円形度の低下といった形状特徴によって評価できる可能性を示した。一方、14 日培養から 1 ヶ月培養を試みたが上手くいかなかった。1 ヶ月間にわたって細胞の特性を維持するには、スフェロイド化のみならず、さらなる工夫が必要であると考えている。今後は、細胞外マトリクス成分の添加や異種細胞との共培養を考慮した魚類由来培養の高機能化・長期維持を目指したい。

引用文献

- [1] April L. Rodd *et al.*, A 3D fish liver model for aquatic toxicology: Morphological changes and Cypla induction in PLHC-1 microtissues after repeated benzo(a)pyrene exposures, *Aquatic Toxicology*, 186, 134-144 (2017)
- [2] Tomoko Nishikawa *et al.*, Optimization of Albumin Secretion and Metabolic Activity of Cytochrome P450 1A1 of Human Hepatoblastoma HepG2 Cells in Multicellular Spheroids by Controlling Spheroid Size, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 3, 334-338 (2017)
- [3] Jun Terashima *et al.*, The regulation mechanism of AhR activated by benzo[a]pyrene for CYP expression are different between 2D and 3D culture of human lung cancer cells, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33, 4, 211-214 (2018)

本助成に関わる成果物

[論文発表] ・ [口頭発表] なし

[ポスター発表]

1. 本田晴香, 上田珠莉, 魚類由来 PLHC-1 細胞のスフェロイド化の試みと細胞特性評価, 日本動物実験代替法学会第 32 回大会, 産業技術総合研究所 (2019 年 11 月 20 日)
2. 上田珠莉, 本田晴香, 細胞培養技術の習得と環境汚染物質の評価, 2019 年度高専女子フォーラム in 九州・沖縄, 九州大学 (2019 年 9 月 7 日)

[その他]

1. 微細加工技術を用いた動物細胞の培養基板の開発, 本田晴香, 熊本高専 地域協働プロジェクトセンター報, Vol.1, p. 31