

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07457

研究課題名(和文) 培養細胞固定化センサチップを用いたSPRセンサによる細胞毒性評価法の開発

研究課題名(英文) Evaluation of cytotoxicity by Surface Plasmon Resonance (SPR) sensor using cell-immobilized sensor chip

研究代表者

小林 弘司 (KOBAYASHI, Hiroshi)

福岡女子大学・国際文理学部・准教授

研究者番号：00610255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞固定化センサチップを用いたSurface Plasmon Resonance (SPR) センサによる細胞毒性の評価法の開発を試みた。その結果、1) センサチップ金膜上に細胞を固定化する方法を構築し、また、2) 細胞のベロ毒素(高分子)に対する応答がSPRシグナル変化として測定できること、3) 細胞の過酸化水素(低分子)に対する応答がSPRシグナル変化として測定できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, we tried to develop a method for evaluating cytotoxicity by Surface Plasmon Resonance (SPR) sensor using cell-immobilized sensor chip. As a result, 1) a method of immobilizing cells on the sensor chip gold film was constructed, 2) the response of the cell to the verotoxin (macromolecule) can be measured as a SPR signal change, 3) the cell hydrogen peroxide (Low molecular weight) can be measured as SPR signal change.

研究分野：食品衛生学

キーワード：細胞固定化センサ 毒性評価 SPR

1. 研究開始当初の背景

食品危害物質の検出や化学物質の毒性試験には、培養細胞を用いたアッセイが広く用いられている。例えば、*Bacillus cereus* が産生する毒素セレウリドの検出には HEp-2 細胞空胞化試験が、ペロ毒素産生大腸菌の検出には Vero 細胞を用いた壊死性試験が用いられている。また、医療機器等の細胞毒性試験には、「医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方について」(平成 24 年 3 月 1 日、薬食機発 0301 第 20 号)に基づき、V79 細胞を用いたコロニー形成試験および L929 細胞を用いた細胞増殖抑制試験が実施されている。さらに、食品添加物等の毒性試験にも培養細胞を用いた試験が多く実施されている。しかし、動物細胞を用いた毒性試験は、結果が得られるまで数日から一週間程度の期間が必要であり、また、細胞の形態変化を見極めるには熟練を要する。このため、迅速で簡便な細菌毒素検出法や毒性試験法の開発が求められており、細胞損傷により細胞外に放出されたアデニル酸キナーゼや乳酸脱水素酵素など各種酵素活性を測定する迅速検出キットが市販されている。しかし、近年、リアルタイムかつ生体内での反応を反映するような検出法の開発が求められている。SPR 法は、ガラスに金薄膜を蒸着させたセンサチップの金薄膜近傍 (300 nm 程度まで) で生じる質量変化を光の屈折率変化として検出する方法で、抗原抗体反応のリアルタイムモニタリングが可能であり、医薬品開発領域を中心に利用されている。

2. 研究の目的

本研究は Surface Plasmon Resonance (SPR) センサによる細胞毒性の評価法を開発することを目的とする。従来の培養細胞を用いた毒素検出や毒性評価では、細胞の形態変化や死滅を観察する必要があるため、結果が得られるまで数日を要するが、SPR センサでは細胞とアナライトの反応をリアルタイムに測定することが可能であるため、迅速に結果が得られると期待される。また、培養細胞を固定化したセンサチップでは、細胞内で起こるアナライトとの反応を細胞質の屈折率の変化として捉えるため、細胞の形態変化で評価していた従来法では得られなかった、細胞とアナライトとの相互作用を新たに発見することが可能となり、細胞毒性の新たな評価法として活用されると期待される。

3. 研究の方法

SPR センサは、パーソナル SPR センサ RANA (九州計測器株式会社) のプロトタイプを使用した。また、SPR センサチップも九州計測器より購入した。

本研究では、1) センサチップ金膜上への細胞の固定化方法の確立し、2) センサチップ金膜上に固定化した細胞の試験対象物質

に対する応答を特異的な SPR シグナルとして検出できるか明らかにした。

センサチップ上への細胞固定化および SPR 測定条件の最適化

センサチップ上にペロ細胞 (JCRB0111) が 6.2×10^4 cells/mL となるように播種し、センサチップ金膜上でセミコンフルエントになるまで 10%FBS 添加 DMEM または KBM (無血清) 培地で培養した。このセンサチップについて、細胞の固定化確認および SPR シグナル測定の最適化を行った。

ペロ細胞のペロ毒素をモデルとするレセプターを介した細胞応答の SPR 測定

センサチップ金膜上にペロ細胞を 6.2×10^4 cells/mL となるように播種し、セミコンフルエントになるまで培養して細胞を固定化した。新鮮な培地に交換したのち、病原大腸菌 O157 (VT-1, VT-2 産生) の定常培養液から抽出したペロ毒素を添加した後 CO₂ インキュベーター静置し、1 時間後に SPR シグナルを測定した。陰性コントロールとしては、V79 あるいは L929 細胞を固定化したセンサチップを用いて、SPR シグナルの特異性を検討した。

過酸化水素による細胞応答の SPR 測定

センサチップ金膜上にペロ細胞が 6.2×10^4 cells/mL となるように播種し、セミコンフルエントになるまで培養し、センサチップに細胞を固定化した。新鮮な培地に交換した後、0.01% となるように過酸化水素を添加し、細胞の応答を経時的に測定した。

4. 研究成果

センサチップ上への細胞固定化および SPR 測定条件の最適化

センサチップ金膜上でペロ細胞を培養することで、細胞をセンサチップに良好に固定化することができた。また、金膜をポリリジンコーティングすることにより、培養後の SPR シグナルは増加した (図 1) が、コーティングがなくても十分量が固定化された。培養に用いる培地は、ペロ細胞の培養に一般的に用いられる 10%FBS 添加 DMEM 培地の他に、血清成分の金膜への付着によるノイズシグナルが懸念されたため無血清培地である KBM 培地を用いて検討を行ったが、血清成分によるシグナルは

確認されず、また固定化された細胞数も 10% FBS 添加 DMEM 培地の方が多かったため、センサチップ金膜上に細胞を固

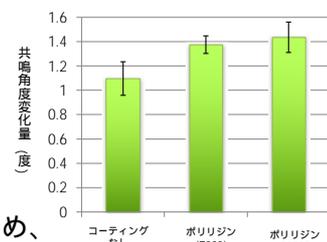


図1 ペロ細胞固定化後のSPRシグナル変化

定化する時には、センサチップには特別な処理を施さず、10%FBS 添加 DMEM 培地を用いて 48 時間培養することとした。また、SPR 測定時には培地を取り除き、PBS に置換することで SPR シグナルは安定した。このため、以後の操作は、この条件を用いた。

ペロ細胞のペロ毒素をモデルとするレセプターを介した細胞応答の SPR 測定

図 2 に、センサチップ上に固定化したペロ細胞に種々の濃度のペロ毒素を添加し、1 時間毎に SPR シグナルを測定した結果を示す。

病原大腸菌 0157 (VT-1, VT-2 産生株) の定常期培養液から抽出したペロ毒素を添加すると原液、2 倍希釈、および 5 倍希釈までは、毒素無添加およびオートクレーブに比べて、シグナルは優位に上昇した。このため、このシグナル上昇は、ペロ毒素がペロ細胞のレセプターに結合しただけでなく、結合後に細胞内に取り込まれ、それによって生じた細胞質の密度変化によって引き起こされたと考えられた。また、同じ濃度のペロ毒素を 6 ウェルプレートで培養したペロ細胞に添加した場合は、4 時間目までは顕微鏡観察による細胞の形態変化は確認できなかったため、本法により細胞の形態変化以前に生じる細胞質内の変化を推定できることが示された。

また、シグナルの特異性を検証するために、L929 細胞または V79 細胞を固定化したセンサチップを用いて同様の実験を行なった。その

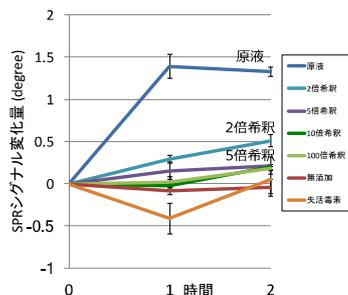


図 2. ペロ細胞のペロ毒素に対する応答の SPR シグナル

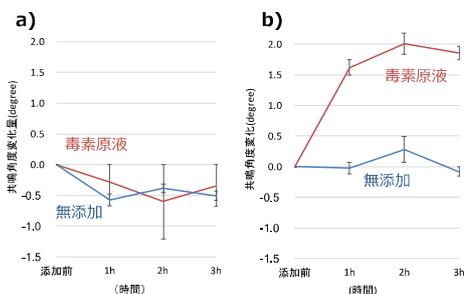


図 3. ペロ細胞以外にペロ毒素の反応による SPR シグナル
a) V79 細胞、b) L929 細胞

結果、V79 細胞固定化センサチップではペロ毒素を添加してもシグナルは優位に上昇しなかったが、L929 細胞固定化センサチップはペロ毒素添加によりシグナルが優位に上昇した。ペロ毒素は、まず、細胞表面層の gb4 レセプターを介して細胞内に取り込まれることが知られているため、V79, L929 およびペロ細胞の gb4 合成酵素の発現量を比較したところ、V79 細胞の gb4 合成酵素の量は、ペロ

細胞および L929 細胞と比較して 1/100 以下であった。また、顕微鏡観察により L929 細胞はペロ毒素添加によって、24 時間後には死滅したため、L929 細胞固定化センサチップにペロ毒素添加後 1 時間目に上昇したシグナルは、ペロ毒素が細胞質内に取り込まれたことによる細胞質の密度変化を示していると考えられた。

過酸化水素による細胞応答の SPR 測定

図 3 に、センサチップ上に固定化したペロ細胞に 0.01% 過酸化水素を添加した時の経時的な SPR シグナルの変化を示す。過酸化水素添加後 1 時間目から無添加と比べ有意にシグナルが増加した。0.01% の過酸化水素は文献によって毒性の有無が異なる値であるが、添加後に細胞内で酸化ストレス誘導性の変化が起こり、これによって生じた細胞質の密度変化により SPR シグナルが上昇したと考えられた。

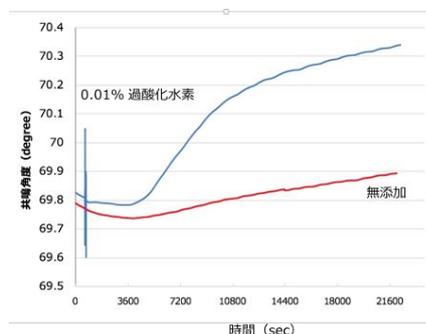


図 4. ペロ細胞の 0.01% 過酸化水素に対する応答

今後は、種々の濃度の過酸化水素に対する応答、異なる細胞を用いての応答について検討をすすめる。

以上、細胞固定化センサチップを用いて、細胞の標的物質に対する応答によって生じた細胞質密度変化を SPR シグナルとして捉え、細胞毒性を評価する手法の開発を試みた結果、レセプターを介した応答だけでなく低分子化合物に対する細胞の応答も SPR シグナルとして測定できることを明らかとした。今後も様々な物質についてのデータを蓄積することにより、簡易迅速な細胞毒性評価法を確立していく予定である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

小林 弘司、中原 萌、緒方 千晶、皆川 奈緒、山内 良子、石川 洋哉 (2017) Evaluation of cytotoxicity by Surface Plasmon Resonance (SPR) sensor

using cell-immobilized sensor chip 日本
農芸化学会 2018 年度大会(名古屋・名城大
学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弘司 (KOBAYASHI Hiroshi)

福岡女子大学・国際文理学部・准教授

研究者番号： 00610255