

ヒト正常細胞を用いた染色体異常試験法の確立に向けた ヒト正常骨髄細胞の最適培養条件の決定

佐々木克典*, 中山 亜紀*, 米田 稔*, 森澤 眞輔*

(2010年5月25日受付, 2010年12月17日受理)

Optimization of Culture Condition for Human Bone Marrow Cells Aimed at Establishing a Chromosome Aberration Test Using Human Normal Cells

Katsunori SASAKI*, Aki NAKAYAMA*, Minoru YONEDA*, Shinsuke MORISAWA*

Nowadays there is a tendency to avoid animal studies for chemical toxicity evaluation and there is a stronger need to develop a more practical framework for assessment. To realize such a framework, *in vitro* toxicity assays using human normal cells can be an effective tool because we may be able to imitate the functions of human organs in such assays. Therefore, we set the optimization of culture condition for human bone marrow cells as the purpose of this study aimed at establishing a chromosome aberration test using human normal cells. As a result, we found an optimal culture condition where bone marrow cells proliferated ideally and we successfully made chromosome samples from cultured cells. In addition, we obtained the results indicating that the culture state is an optimal one for assessing the toxicity in human bone marrow by performing MPO quantitative test and cell differentiation analysis using flow cytometric analysis. This study can help to familiarize *in vitro* toxicity assays as brief assessment tools for toxicity of chemicals.

Key words: human bone marrow cells, cell culture, chromosome aberration test

1. 序 論

人間社会には数多くの化学物質が利用されており、それら化学物質の使用にあたっては、その安全性を正當に評価して適切に管理することが必要不可欠である。現在の化学物質の毒性の詳細な評価は、主に実験動物を用いて長期的に被検物質を反復投与した結果から得られる情報に基づいて行われている¹⁾が、変異原性の有無等を簡便に評価するスクリーニング試験としては Ames 試験や染色体異常試験、コメットアッセイ等の *in vitro* 試験系が広く用いられている。また、近年の化学物質の多種多様化、国際世論の動物実験に対する批難傾向、企業単位での自社製品の安全性評価に対する社会的要請の高まりに伴う簡便な評価法への需要の増大等の背景を受けて、*in vitro* 試験系が化学物質の安全性評価に果たす役割が一層広がることが予想される。ここで、従来の *in vitro* 試験系は、そのほとんどが簡便のために動物細胞あるいは株化細胞等の不死化細胞を用いたものである。しかしながら、実際に問題とされる対象物質の毒性は、ヒトの標的臓器にお

いて正常な細胞が悪影響を受けることによって発現する。従って、*in vitro* 試験にヒト正常細胞を用いることで実験条件が実際の発症機構を再現したものに近付き、より信頼性の高い結果を得られることが期待できる。そこで本研究では、代表的な *in vitro* 毒性試験として染色体異常試験を選び、染色体異常試験にヒト正常細胞を用いる手法の最適化について検討を行う。

染色体異常については発がんをはじめとする様々な疾患との関連が報告されており、特に白血病の発症と密接な関連があるとされている。Ph¹染色体（フィラデルフィア染色体）はヒト9番染色体の長腕部と22番染色体の長腕部との間に起きた相互転座によって発生した異常染色体であり、95%以上の慢性骨髄性白血病患者に認められ²⁾、また、急性骨髄性白血病や骨髄腫などにも低頻度ながら検出されている³⁾。他にも、急性骨髄性白血病における15番染色体と17番染色体との相互転座⁴⁾、急性前骨髄球性白血病に置ける8番染色体と15番染色体との相互転座⁵⁾等、病型に特異的な染色体異常が明らかにされている。そこで本研究では、染色体異常と白血病との関連に注目し、その標的臓器

である骨髓に由来するヒト正常細胞を用いた染色体異常試験法の確立に向けて、実験条件の最適化として使用細胞であるヒト正常骨髓細胞の最適培養条件を決定することを目的とした。

ここで、染色体は細胞周期間期（S期）を経て有糸分裂（M期）中期に達することで凝集し、光学顕微鏡下で染色体標本として観察可能な形態を取るため、染色体異常試験を行うには対象細胞が良好な増殖傾向を示すことが非常に重要である。更には、発症機構の再現を目的として正常細胞を用いるため、培養後の細胞がヒト骨髓における毒性発現を評価可能な状態にあることを確認することが必要不可欠である。ここでヒト骨髓に対して確認すべき事項として、myeloperoxidase (MPO) の代謝活性と造血細胞の存在率とを挙げる。MPO は骨髓中の造血細胞に豊富に発現している分子量約 150 kDa⁶⁾ の代謝酵素であり⁷⁻¹¹⁾、ベンゼン代謝物の代謝に関わるなど血液毒性との密接な関連が報告されており¹²⁾、骨髓における化学物質に対する応答の中核を成すと考えられる。本研究では培養後の細胞の MPO 含有量を、 H_2O_2 によるベンジジンの酸化における酵素反応を用いて測定した¹³⁾。また、骨髓中には造血幹細胞が豊富に含まれており、造血作用は骨髓の代表的機能であると共に、造血細胞は骨髓における毒性の主要な標的であると考えられる。幹細胞は培養の進行に従って細胞分化を起こすため、骨髓での毒性発現を評価するには、培養後の細胞においても十分な割合で標的細胞である造血細胞が含まれていることを確認する必要がある。従って本研究では、培養後の細胞の造血機能の確認として、フローサイトメトリーによる細胞分化解析を行うことで培養後の細胞の造血細胞 CD34⁺ の含有率を測定した。フローサイトメトリーは、フローセル中に細胞を 1 個ずつ流してレーザー光を照射し、その散乱光や蛍光の強度から各細胞のサイズや構造に関する情報を得て細胞を分類・解析する手法である¹⁴⁾。本研究においては、細胞試料を CD34 antibody 及び 7-AAD (7-Aminoactinomycin) を用いて蛍光標識することで死細胞を除去して CD34⁺ 細胞を検出し、細胞分化解析試験を行った。

すなわち本研究においては、ヒト正常細胞を用いた染色体異常試験を行う上で必要不可欠な条件としてヒト正常骨髓細胞の最適培養条件を決定することを目的

とし、ヒト正常骨髓細胞を複数の培養条件に従って培養してその細胞増殖率から良好な培養条件を選択し、実際に染色体標本を作製すると共に、MPO 測定試験及びフローサイトメトリーを用いた細胞分化解析試験に基づいて培養状態を確認し、最適培養条件についての検討を行った。

2. 方 法

2.1 試薬及び細胞

ヒト正常骨髓細胞としては、Bone Marrow Mononuclear Cells (CAMBERX, NJ) 及び Bone Marrow CD34⁺ Cells (Lonza, Switzerland) を用いた。また、細胞培養用試薬としては、無血清培地 STEMPROTM-34 及び L-Glutamine は Invitrogen (CA) 社の、無血清培地 StemSpan[®] SFEM (Serum-Free Expansion Medium) 及びサイトカインカクテル StemSpan[®] CC100 は StemCell[®] Technologies (Canada) 社の、汎用培地 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) は Lonza (Switzerland) 社の、血清 FBS (Fatal Bovine Serum) は MP Biomedicals (OH) 社の、サイトカイン SCF, GM-CSF, G-CSF, IL-3 及び IL-6 は PEPROTECH (NJ) 社の製品を購入して用いた。その他の試薬は特に記載の無い限りは (株) 和光純薬製の生化学用または試薬特級を用いた。

2.2 細胞培養試験

検討した培養条件は、使用する培地、血清やサイトカイン等の増殖因子及び初期細胞密度を変えた 4 条件であり、その詳細を表 1 に示す。表 1 に示した条件の内、条件 1 は Delay らの研究¹⁵⁾ でヒト骨髓由来 CD34⁺ 細胞の培養に用いられた培養条件と同等の条件であり、条件 2 は Bone Marrow Mononuclear Cells に対して CAMBREX 社が推奨する培養条件に基づいている。また、条件 3 は Bone Marrow CD34⁺ Cells の有血清培養に関して Lonza 社が推奨する培養条件となっており、汎用培地 IMDM 及び FBS は ARAKI らの研究¹⁶⁾ でも骨髓由来 CD34⁺ 細胞の培養に用いられている。条件 4 は Bone Marrow CD34⁺ Cells の無血清培養に関して Lonza 社が推奨する培養条件であり、無血清培地 StemSpan[®] SFEM はヒト臍帯血由来 CD34⁺ 細胞を対象とした Lim らの研究¹⁷⁾ においても用いられ

表 1 本研究で用いた培養条件の詳細

培養条件	条件 1	条件 2	条件 3	条件 4
使用細胞	Bone Marrow Mononuclear Cells		Bone Marrow CD34 ⁺ Cells	
使用培地	STEMPRO-34		IMDM	StemSpan® SFEM
初期細胞密度	5.0×10 ⁵ cells/mL	5.0×10 ⁴ cells/mL	5.0×10 ⁴ cells/mL	1.7×10 ⁴ cells/mL
増殖因子	2 mM L-Glutamine	2 mM L-Glutamine	15% FBS	1% StemSpan® CC100
	100 ng/mL SCF	25 ng/mL SCF		
	25 ng/mL GM-CSF	10 ng/mL GM-CSF		
	50 ng/mL IL-3	10 ng/mL IL-3		
	10 ng/mL IL-6	10 ng/mL IL-6		
		1ng/mL G-CSF		

ている。

解凍した細胞をそれぞれの条件に従って37℃、CO₂濃度 5 %、湿度100%の条件下のインキュベータ内で6日間培養し、それぞれの培養条件での細胞数の経日変化を血球計数板を用いて測定して増殖の程度を比較した。なお、以降の各試験には、本試験によって決定した適当な培養条件に従って6日間培養した細胞を回収して用いた。

2.3 染色体標本作製試験

回収した細胞を100 mm ディッシュに10 mLの培養液と共に 5.0×10⁵cellsの細胞を播種し、更に48時間の培養を行った。培養終了の2時間前に、滅菌水で100倍に希釈したMAS (Metaphase Arresting Solution; Genial Genetic Solutions, UK) を 200 μL 添加した。培養終了後ただちに細胞を回収し、5 mLの 0.075 M 塩化カリウム溶液中で37℃、20分間のインキュベートを行うことで低張処理とした。続いて5 mLの固定液（メタノール：酢酸 = 3：1）を加えて穏やかに混合、細胞を半固定した。この細胞浮遊液を200×gで15分間遠心沈降して新しい固定液5 mLと交換する操作を3回繰り返して細胞を完全に固定した。固定後の細胞を1mL程度の固定液に再懸濁してスライドグラス上に滴下し、40℃に設定したパラフィン伸展器PSP-400（井内盛栄堂）上で乾燥させた。作製した標本をpH 6.8 PBS（Phosphate Buffer Solution）で25倍に希釈したギムザ液（Merck, Germany）で30分間染色し、光学顕微鏡Axiovert 25（Carl Zeiss, Germany）を用いて観察した。

2.4 MPO 測定試験

回収した細胞を100 mm ディッシュに細胞密度 5.0×10⁴cells/mLにて播種して24時間の前培養を行った後、細胞を回収し、PBSを用いて2度の洗浄を行った。洗浄後の細胞から2.5×10⁶cellsまたは5.0×10⁶cellsを取り、MPO lysis solution（600 mM PBS 500 μL, 30% TritonX（MP Biomedicals, OH）60 μL, 滅菌水 5.44mLを混合して事前調製）1 mL中に懸濁した。この細胞浮遊液に対して液体窒素と37℃に設定したウォーターバスとによる凍結融解サイクルを3度繰り返すことで細胞を完全に溶解した。細胞浮遊液を4℃、12000 rpmにて15分間遠心沈降し、上清を除去した。残った細胞塊にTMB reacting solution（500 mM PBS 100 μL, N,N-ジメチルホルムアミドを用いて20 mMに調整したTMBZ（同仁化学）80 μL, 滅菌水 820 μLを混合して事前調製）を90 μL添加し、37℃にて5分間インキュベートした。その後10 mM H₂O₂を10 μL加え、37℃にて4分間インキュベートすることで青色への呈色反応を行った。4分後100 μLの5M H₃PO₄を添加して溶液のpHを変化させることで呈色反応を停止させた。本操作により検出感度が向上することが知られており¹⁸⁾、溶液の吸収極大波長が650 nm から450 nmへと変化して溶液は鮮やかな黄色を呈する。

TMB 反応終了後の溶液を37℃、12000 rpmにて2分間遠心沈降し、上清の波長 450 nm における吸光度（O.D.₄₅₀）を測定した。なお、上述のプロトコールにおいて10 mM H₂O₂に代えて滅菌水を用いることでブランク試料を作製し、式（1）に従って細胞試料の正味吸光度を計算した。また、細胞試料とは別に、購入したMPO酵素（純度95%以上；ELASTIN Products,

MO)を用いて同様の操作を行うことで検量線を作成し、その検量線に基づいて細胞試料中のMPO含有量を決定した。

$$\Delta O.D._{450} = (O.D._{450})_{sample} - (O.D._{450})_{blank} \quad (1)$$

2.5 フローサイトメトリーを用いた細胞分化解析

回収した細胞をwash solution (2%のFBS (MP Biomedicals, OH)を添加したPBS)で洗浄した。洗浄後の細胞から 4.0×10^6 cellsを取り、wash solution 400 μ L中に懸濁した。この細胞浮遊液を100 μ Lずつ4本の試験管に等分し、それぞれ試験管I、II、III、IVとした。試験管Iにはネガティブコントロールとして20 μ LのPE mouse IgG1 isotype control (Becton, Dickinson and Company, NJ)を、試験管II及びIVにはそれぞれ20 μ Lのanti human CD34-PE antibody (Becton, Dickinson and Company, NJ)を添加し、4本の試験管を室温、暗所にて30分間静置した。各溶液をwash solutionで2度洗浄した後、室温、1500 rpmにて5分間遠心沈降し、上清を除去した。その後、試験管III及びIV中の細胞塊にはそれぞれ20 μ Lの7-AAD (Becton, Dickinson and Company, NJ)を加えて室温にて10分間静置した。4本の試験管それぞれに500 μ Lのwash solutionを添加し、FACS Calibur™ (Becton, Dickinson and Company, NJ)を用いて解析を行った。

ここで、CD34⁺細胞は染色操作時にCD34 antibodyを取り込むが、死細胞もまた抗体を取り込んでしまうため、CD34 antibodyのみによっては死細胞を分別除去してCD34⁺細胞を検出することはできない。そこで本試験においては、膜の形状が保てなくなった細胞に浸透しやすい核染色剤である7-AADを組み合わせ用いており、これにより生存CD34⁺細胞のみを検出可能である¹⁹⁾。なお、本試験では解析に際して1試料あたり4本の試験管を用いたが、この内CD34 antibodyと7-AADの両方を添加した試験管IVを細胞分化解析に用い、ネガティブコントロールとしてPE mouse IgG1 isotype controlを添加した試験管Iは非特異的反応による影響の判定や感度設定等の機器の初期設定に、CD34 antibodyのみを添加した試験管IIはCD34の検出感度補正に、7-AADのみを添加した試験管IIIは7-AADの検出感度補正に用いた。

3. 結 果

3.1 細胞培養試験

細胞培養試験の結果得られたそれぞれの培養条件における増殖曲線を図1に示す。なお、横軸には培養開始時点からの経過日数を、縦軸には増殖率として、測定細胞数の、初期細胞数に対する比を取った。

条件4では培養3日目時点から増殖傾向が見られ、培養6日目で約15.9倍と十分な増殖が観察された。しかしながら、他の培養条件については、条件2で培養4日目に約1.47倍の増殖率を示したものの正常な培養状態とは考えられず、条件1及び条件3に至っては全く増殖傾向が見られなかった。そこで次節の染色体標本作製試験には、初期細胞数からの増殖が見られた条件2及び条件4に従って培養した細胞試料のみを用いることとした。

3.2 染色体標本作製試験

染色体標本作製試験では、作製した染色体標本の品質を判断する指標として、展開した染色体が確認できる中期分裂細胞数を計数し、観察した総細胞数に対する比を取って100倍することで細胞100個あたりの染色体展開中期分裂細胞数を算出し、Mitotic Index (MI)とした。培養条件2及び4に対して得られたMIの値を表2に示す。なお、表2中の「良好な中期分裂細胞数」は、観察した細胞の内、良好に展開した染色体が確認できた中期分裂細胞の数を示す。条件4については十分な頻度で良好に展開したMetaphasesが得られ

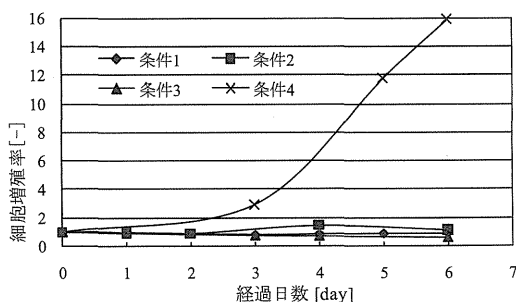


図1 細胞培養試験結果

図1は、4つの培養条件に従ってヒト正常骨髄細胞を培養した際のそれぞれの増殖曲線を示す

* 凡例の条件1-4は表1に記載の各培養条件を示す

** 横軸は培養開始時点からの経過日数を示す

*** 縦軸は測定細胞数の、初期細胞数に対する比を示す

表2 染色体標本作製試験結果

培養条件	観察細胞数	良好な中期分裂細胞数	MI
条件2	6000	12	0.20
条件4	13617	300	2.20

たが、条件2についてはMIが0.20と非常に小さく、また検出されたMetaphasesに関しても展開が不十分であり、染色体異常試験を行うに足る品質の染色体標本が得られたとは言い難い。従ってヒト正常骨髓細胞に対する最適培養条件の候補として培養条件4を選択し、以降のMPO測定試験及び細胞分化解析には条件4に従って培養した細胞試料のみを用いて培養状態の確認を行った。

3.3 MPO測定試験

MPO測定試験で作成した検量線を図2に、その1次回帰式を式(2)に示す。なお、図2の横軸は試料懸濁液中の蛋白量、縦軸はその正味吸光度である。また、図2中の4点はそれぞれの測定値を、実線はその1次回帰直線を示す。

$y = 448.68x - 0.0246 \quad (R^2 = 0.988)$ (2)

ただし、

x: 試料懸濁液中の蛋白量 [mg/mL]

y: 正味吸光度 $\Delta O.D_{.450}$ [-]

である。

この検量線及び測定した $\Delta O.D_{.450}$ に基づき、また、検量線作成に用いたMPO酵素の純度を95%、MPO

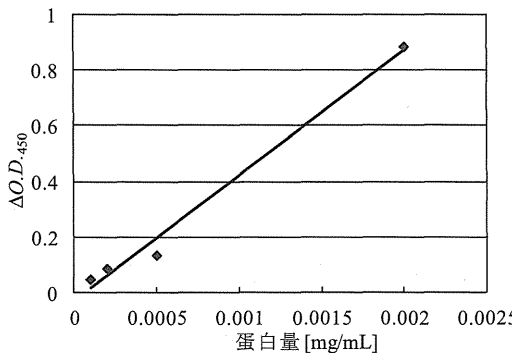


図2 作成したMPO検量線

図2は、試料懸濁液中の蛋白量と正味吸光度とを関連付ける検量線を示す
* 図中の4点は測定値を、実線はその1次回帰直線を示す
** 横軸は試料懸濁液中の蛋白量を示す
*** 縦軸は正味吸光度を示す

表3 条件4に従って培養した細胞中のMPO濃度測定結果

サンプル	$\Delta O.D_{.450}$ [-]	MPO濃度 [pmol/10 ⁶ cells]
2.5a	0.405	485.1
2.5b	1.363	1567
5.0a	1.221	703.3
5.0b	1.394	801.0
5.0c	1.416	813.4
平均値	-	873.9
標準偏差	-	409.1

の分子量を150 kDaとして単位細胞数あたりのMPO含有量を決定した。なお、本試験においては細胞数 2.5×10^6 cellsにて2試料、細胞数 5.0×10^6 cellsにて3試料の合計5試料分の測定を行った。これら5試料を順に2.5a, 2.5b, 5.0a, 5.0b, 5.0cと呼ぶこととする。5回の測定それぞれの結果とその平均値及び標準偏差を表3に示す。計算の結果、条件4に従って培養した細胞中のMPO濃度は 873.9 ± 409.1 pmol/10⁶cellsとなった。

3.4 フローサイトメトリーを用いた細胞分化解析

フローサイトメトリーにおいては、デブリや凝集細胞等の解析に不必要な粒子の情報を除去する必要がある、その操作をゲーティングと呼ぶ。そこで本試験では、前方散乱光(Forward Scatter (FSC))強度及び側方散乱光(Side Scatter (SSC))強度に基づいてゲーティングを行った。FSCは測定粒子の大きさに、SSCは測定粒子の内部構造に関連した情報を提供する¹⁴⁾。ゲーティングの結果を図3に示す。図3中に多角形で示した領域内の細胞集団を本試験での解析対象とし、他の粒子の情報は除去した。

ゲーティング後の細胞集団を対象として、CD34による蛍光強度及び7-AADによる蛍光強度に基づいて細胞分化解析を行った。解析結果を図4に示す。図4では横軸にCD34蛍光強度を、縦軸に7-AAD蛍光強度を取り、それぞれの検出感度補正結果に基づいて対象細胞集団を4領域に分類し、各領域に属する細胞数の百分率を数値で示した。図4中の右上領域はCD34陽性かつ7-AAD陽性、すなわちCD34⁺死細胞を示す領域である。同様に右下領域はCD34⁺生細胞を、左上領域はCD34⁻死細胞を、左下領域はCD34⁻生細胞を、それぞれ示す領域である。細胞分化解析の結果、条

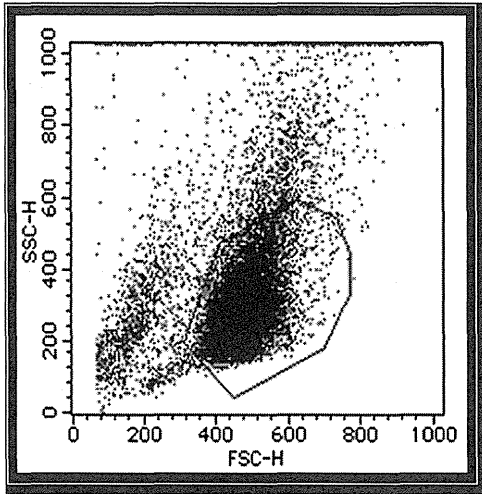


図3 ゲーティング結果

図3は、条件4に従って培養した細胞の分化解析に先立ち行ったゲーティングの結果を示す

* 横軸は粒子の大きさと関連するFSC強度を示す

** 縦軸は粒子の内部構造と関連するSSC強度を示す

*** 図中の多角形領域を分化解析の対象とし、他の粒子はデブリ等の可能性が高いとしてその情報は除外した

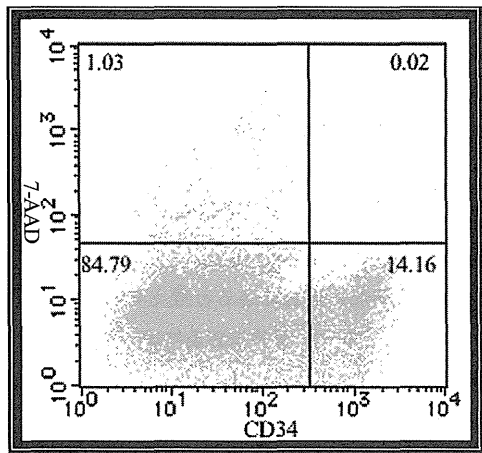


図4 細胞分化解析結果

図4は、条件4に従って培養した細胞の分化解析結果を示す

* 横軸はCD34蛍光強度を示す

** 縦軸は7-AAD蛍光強度を示す

*** 右上領域はCD34⁺死細胞を、右下領域はCD34⁺生細胞を、左上領域はCD34⁻死細胞を、左下領域はCD34⁻生細胞を、それぞれ示す領域であり、各領域内の数値は各領域に属する細胞数の、全細胞数に対する百分率である

件4に基づいて培養した細胞試料中に占めるCD34⁺細胞の割合は14.16%であった。

4. 考察と結論

本研究ではヒト正常細胞を用いた染色体異常試験を

行う上での最適培養条件を決定することを目的として、表1に示した4条件のそれぞれに従ってヒト正常骨髄細胞を培養し、その細胞増殖率から良好な培養条件を選択し、染色体標本作製試験、MPO測定試験及び細胞分化解析に基づいて培養状態を確認し、最適な培養条件について検討した。

培養条件1及び条件3については細胞培養試験において全く増殖が見られなかった。条件2に関しては培養4日目に約1.47倍とわずかな増殖傾向を示したものの、続く染色体標本作製試験において染色体異常試験に足る品質の染色体標本が得られなかった。すなわち以上の3条件に関しては、細胞分裂が正常に進行せずに細胞周期S期ではなく静止期(G₀期)へと移行して停滞し、染色体を形成するM期中期に達していないことが考えられ、実際に条件3に従って6日間培養した後の細胞を用いてフローサイトメトリーによる細胞周期解析を行ったところ、その99%以上がG₀期にあることが確認された(data not shown)。従って染色体異常試験に向けた培養条件としては不適切であると言える。

一方、培養条件4では細胞培養試験において培養3日目時点から増殖傾向が見られ、培養6日目で約15.9倍と十分な増殖が観察され、対数増殖期を有する理想的な培養状態であると考えられる。続く染色体標本試験においても十分な頻度で良好に展開したMetaphasesが得られ、正常な細胞周期を経る細胞分裂が適切に進行していることが予想された。そこで条件4を最適培養条件の候補として選択し、MPO測定試験及び細胞分化解析による培養状態の確認を行った。

MPO測定試験の結果、条件4に従って6日間培養した後の細胞中のMPO濃度の平均値は 873.9 ± 409.1 pmol/ 10^6 cellsとなった。この結果は、本研究と同一の測定法を用いて測定した、ヒト骨髄性白血病株化細胞HL-60中のMPO濃度の報告値 310.3 pmol/ 10^6 cells²⁰⁾よりも大きい値であった。ここで、MPOは骨髄系の造血細胞に発現している代謝酵素で⁷⁻¹¹⁾、特に好中球に豊富に含まれることが知られており、顆粒球の分化過程の前骨髄球の時期に活発に産生される^{21,22)}。HL-60細胞は顆粒球への分化過程にある前骨髄球であり、MPOを産生していることが明確にされている培養細胞である^{21,23)}。従って、本試験において6日間の培養

後の細胞においても MPO が HL-60 細胞を上回る濃度で測定されたことは、骨髓細胞として毒性試験に用いるに足る代謝活性を有していることを示唆していると考えられるが、表 3 に示した各試料の $O.D._{450}$ 値を見るに、試料 2.5a を除いた 4 試料では $O.D._{450}$ 測定値が図 2 に示した検量線の範囲を逸脱しており、本研究での MPO 濃度計算値には検量線の外挿に伴う誤差が含まれると考えられる。すなわち、試料 2.5a の結果からは本研究での細胞中の MPO 濃度は既存の報告における HL-60 中の MPO 濃度²⁰⁾ よりも大きいことが示唆され、代謝活性の観点から適切な培養状態であることを支持する結果であると言えるが、その他 4 試料での測定と文献値とを直接比較するのは難しく、試料の希釈調整等により検量線の範囲内での測定データを追加し、測定結果の再現性を確認することが望まれる。

細胞分化解析の結果、条件 4 に従って 6 日間培養した後の細胞中に占める CD34⁺細胞の割合は14.16%であった。ここで、ヒト骨髓中に CD34⁺細胞が占める割合としては約 1% であるとの報告²⁴⁾があり、本研究における測定値はこの報告値を大きく上回っている。従って、培養後の細胞には骨髓における毒性の標的たる造血細胞が通常のヒト骨髓よりも豊富に存在していると考えられ、骨髓における毒性を非常に敏感に評価し得る系となっていると言える。すなわち、細胞分化進行度の観点から染色体異常試験を行うに適切な培養状態であることが確認されたと言える。

本研究の成果として、ヒト正常骨髓細胞に対する最適培養条件として表 1 に示した条件 4 (増殖因子として 1% 量の StemSpan® CC100 を添加した無血清培地 StemSpan® SFEM 中における初期細胞密度 10^4 cells/mL オーダーでの培養) を見出した。本培養条件に従って 6 日間培養した後の細胞を用いて、実際に良好な品質な染色体標本が作製できることを確認した。また、培養後の細胞の代謝活性及び細胞分化進行度を測定し、両者の観点からヒト骨髓における毒性発現を評価可能な培養状態にあることを支持する結果を得た。なお、実際に本条件に基づいて培養を行ったヒト正常骨髓細胞 CD34⁺ に X 線を急照射し、32 時間の回復培養の後には本研究と同様の Giemsa 染色により染色体標本作製して行った佐々木ら²⁵⁾ による染色体異常試験の結果を図 5 に示す。ここで解析に用いられた細胞数は 1

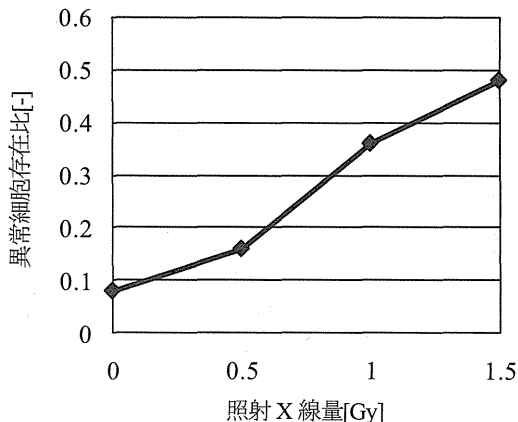


図 5 条件 4 に基づく佐々木らの染色体異常試験結果²⁵⁾

図 5 は、条件 4 に基づいて培養したヒト正常骨髓細胞 CD34⁺ に X 線を照射して行った染色体異常試験の結果である

* 横軸は照射 X 線量を示す

** 縦軸は、Gap、Break、Exchange のいずれかの異常を有する細胞数の、観察細胞総数 50 に対する比を示す

条件あたり 50 であり、照射した X 線の線量は 0Gy、0.5Gy、1.0Gy、1.5Gy の 4 段階である。また、解析対象とした染色体異常は Gap (非染色部位)、Break (切断)、Exchange (交換) の 3 種類であり、図 5 の縦軸には「異常細胞存在比」として、これら 3 種類の染色体異常のいずれかを有する細胞数の、観察細胞総数 50 に対する比を示した。図 5 を見るに、観察細胞数 50 という小規模な試験ながらも染色体異常を有する細胞が線量依存的に増加していることが見てとれ、染色体異常試験が問題なく実行できると考えられる。すなわち、本研究で決定した最適培養条件は、ヒト正常骨髓細胞を用いた染色体異常試験を行うにあたって適切なものであると言える。本研究は、*in vitro* 試験系による毒性評価が重視される昨今にあつて、実際の発症機構を再現してより信頼性の高い評価が実現できると予想される、正常細胞による *in vitro* 毒性試験の普及の一助となる点で意義深い。

謝 辞

本研究を進めるにあたって、医薬基盤研究所の平山知子先生には染色体標本作製に関して貴重なご助言をいただき、また、弘前大学医学部宮越研究室の皆さまには FACs 装置を提供していただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活安全対策室(監修), 国立医薬品食品衛生研究所(編集)(1997): 化学物質のリスクアセスメント—現状と問題点—, 薬業時報社
- 2) 佐藤裕子, 血液学ハイライト(中外医学社, 東京, 1993)
- 3) S. Propp, F. A. Lizzi, “Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia”, *Blood* 36(3), 353-360 (1970)
- 4) M. Sakurai, “Chromosome studies in hematological disorders. II. Chromosome findings in acute leukemia”, *日本血液学会雑誌* 33(1), 116-126 (1970)
- 5) 平井久丸, 白血病の分子医学, (羊土社, 東京, 1994)
- 6) W. M. Nauseef, I. Olsson, K. Arnljots, “Biosynthesis and processing of myeloperoxidase—a marker for myeloid cell differentiation, European”, *Journal of Haematology* 40(2), 97-110 (1988)
- 7) J. Taguchi, Y. Miyazaki, C. Tsutsumi, Y. Sawayama, K. Ando, H. Tsushima, T. Fukushima, T. Hata, S. Yoshida, K. Kuriyama, S. Honda, I. Jinnai, H. Mano, M. Tomonaga, “Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia”, *Leukemia Research* (30)9, 1105-1112 (2006)
- 8) B. M. Babior, “Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)”, *The New England Journal of Medicine* 298 (12), 659-668 (1978)
- 9) B. M. Babior, “Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts)”, *The New England Journal of Medicine* 298(13), 721-725 (1978)
- 10) H. P. Koeffler, J. Ranyard, M. Pertcheck, “Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation”, *Blood* 65(2), 484-491 (1985)
- 11) C. C. Winterbourn, M.C. Vissers, A. J. Kettle, “Myeloperoxidase, *Current Opinion in Hematology*”, 7 (1), 53-58 (2000)
- 12) A. Sadler, W. Subrahmanyam, D. Ross, “Oxidation of catechol by horseradish peroxidase and human leukocyte peroxidase: reactions of o-benzoquinone and o-benzosemiquinone”, *Toxicology and Applied Pharmacology* 93(1), 62-71 (1988)
- 13) A. C. Maelhy, B. Chance, “in *Methods of Biochemical Analysis*”, Glick D., ed., Interscience (1954)
- 14) ベックマン・コールター (2010): サイトメトリードットコム, <http://www.bc-cytometry.com/> (Accessed May 23rd, 2010)
- 15) J. P. Daley, B. M. Dadey, M. G. Wysocki, M. A. Caligiuri, W. C. Biddle, “Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free STEMPRO™-34 medium”, *Focus* (18)3, 62-67 (1996)
- 16) H. Araki, J. P. Chute, B. Petro, L. Halliday, R. Hoffman, N. Mahmud, “Bone marrow CD34⁺ cells expanded on human brain endothelial cells reconstitute lethally irradiated baboons in a variable manner”, *Leukemia & Lymphoma Early Online* (2010)
- 17) C. K. Lim, L. Sun, Q. Feng, P. Law, W. T. Chua, S. N. Lim, W. Y. Hwang, “Effect of anti-CD52 antibody alemtuzumab on ex-vivo culture of umbilical cord blood stem cells”, *Journal of Hematology & Oncology* 1(19), (2008)
- 18) D. G. Schattenberg, W. S. Stillman, J. J. Gruntmeir, K. M. Helm, R. D. Irons, D. Ross, “Peroxidase activity in murine and human hematopoietic progenitor cells: potential relevance to benzene-induced toxicity”, *Molecular Pharmacology* 46(2), 346-351 (1994)
- 19) 塩谷美夏, 長村登紀子, 須郷美智子, 崔硯, 高橋敦子, 平井雅子, 高橋恒夫, “凍結臍帯血中のCD34陽性細胞測定法—ProCOUNT法と7-AAD法による比較検討—”, *Japanese Journal of Transfusion Medicine* 50(4), 605-612 (2004)
- 20) Y. Noguchi, “Evaluation of oxidative DNA damage induced by benzene metabolite hydroquinone”, 京都大学大学院工学研究科修士論文 (2001)
- 21) M. Yamada, M. Mori, T. Sugimura, “Purification and characterization of small molecular weight myeloperoxidase from human promyelocytic leukemia HL-60 cells”, *Biochemistry* (20)4, 766-771 (1981)

- 22) D. F. Bainton, J. L. Ullyot, M. G. Farquhar, "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow, The Journal of Experimental Medicine", 134(4), 907-934 (1971)
- 23) 山田道之, 橋中一也, "骨髓性白血病細胞 HL-60 の細胞分化と遺伝子発現の調節", 蛋白質 核酸 酵素, 36(1), 41-53 (1991)
- 24) 三浦恭定, 血液幹細胞 (中外医学社, 東京, 1983)
- 25) 佐々木克典, 今村治世, 中山亜紀, 米田稔, 森澤真輔, "CD34⁺ 細胞の染色体異常試験に基づいたベンゼン誘発白血病のリスク評価", 日本リスク研究学会誌, 20(4), 267-277 (2010) (印刷中)