

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7394367号

(P7394367)

(45)発行日 令和5年12月8日(2023.12.8)

(24)登録日 令和5年11月30日(2023.11.30)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/00

C

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

Z

請求項の数 4 (全8頁)

(21)出願番号 特願2018-122876(P2018-122876)

(22)出願日 平成30年6月28日(2018.6.28)

(65)公開番号 特開2020-101(P2020-101A)

(43)公開日 令和2年1月9日(2020.1.9)

審査請求日 令和2年7月2日(2020.7.2)

審判番号 不服2022-15381(P2022-15381/J
1)

審判請求日 令和4年9月28日(2022.9.28)

早期審理対象出願

(73)特許権者 000002853

ダイキン工業株式会社

大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号

大阪梅田ツインタワーズ・サウス

(73)特許権者 504137912

国立大学法人 東京大学

東京都文京区本郷七丁目3番1号

(74)代理人 110000796

弁理士法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 友塚 育美

大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12

号 ダイキン工業株式会社内

(72)発明者 松本 博士

大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12

号 ダイキン工業株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 気体の細胞毒性評価方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

気体を細胞培養液に溶解させる気体溶解工程、

及び、細胞機能を測定する細胞評価工程をこの順に有し、

前記気体溶解工程では、前記気体の流入口及び流出口をそれぞれ少なくとも1つ有する容器に開放した細胞培養容器を設置し、直接的に前記気体を細胞に曝露することなくフローさせることを特徴とする、気体による心筋細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、脳細胞、神経細胞、膵臓細胞、脾臓細胞、血液細胞及び骨髄細胞からなる群より選択される少なくとも一種の細胞への毒性評価方法。

【請求項2】

前記気体溶解工程は、

前記細胞培養液をpH7.1～7.7、及び温度35～39 に維持して実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞は、哺乳類由来細胞である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記細胞は、心筋細胞である、請求項1～3の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

本開示は、気体の細胞毒性評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献1では、被験物質を細胞培養液中に含んだ状態で細胞培養を行い、細胞の状態を測定することにより、被験物質の毒性を評価することが提案されている。

【0003】

特許文献1に記載された評価方法は、医薬品の研究開発における候補化合物（固体又は液体）の選定に活用するものである。

【0004】

非特許文献1では、in vitroレベルでのガスの毒性評価方法が、提案されている。気体と細胞培養液との気液界面に半透膜を設け、当該半透膜上で細胞を培養する。そして、半透膜上で培養された細胞に、直接的に被験物質としてのガスを曝露し、当該ガスの細胞毒性を評価するというものである。かかる方法により、A549細胞又はCalu-3細胞へのガス毒性を評価できるとされている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】特表2003-510093号公報

【非特許文献】

【0006】

【文献】生産研究, 59巻, 2号, 2007, p89-92

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本開示の目的とするところは、細胞培養液中に存在する細胞に対しても適用可能な、つまり、気管支や肺由来の細胞以外の細胞に対しても適用可能な、気体の細胞毒性評価方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、被験物質としての気体を細胞培養液に溶解させることにより、前記気体による細胞への毒性を評価することができることを見出した。本発明者らは、かかる知見に基づきさらに研究を重ね、本開示を完成するに至った。

30

【0009】

即ち、本開示は、以下の毒性評価方法を提供する。

項1 .

気体を細胞培養液に溶解させる気体溶解工程、

及び、細胞機能を測定する細胞評価工程をこの順に有することを特徴とする、気体による細胞への毒性評価方法。

項2 .

40

前記気体溶解工程は、

前記細胞培養液をpH7.1～7.7、及び温度35～39℃に維持して実施される、項1に記載の方法。

項3 .

前記気体溶解工程は、

前記気体を前記細胞培養液の表面に接触させ、培養液中に溶解させることにより実施される、項1又は2に記載の方法。

項4 .

前記細胞は、哺乳類由来細胞である、項1～3の何れかに記載の方法。

【発明の効果】

50

【 0 0 1 0 】

本開示の毒性評価方法によれば、細胞培養液中に存在する細胞に対する気体の毒性評価を行うことができるため、これまでに評価できなかった気管支や肺由来の細胞以外の細胞に応用することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】本開示の、細胞への毒性評価方法の模式図。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

本開示の、気体による細胞への毒性評価方法は、気体を細胞培養液に溶解させる気体溶解工程、及び、細胞機能を測定する細胞評価工程をこの順に有することを特徴とする。

10

【 0 0 1 3 】

被験物としての気体は、気体であれば特に限定はない。但し、毒性評価という目的を考慮すれば、毒性評価に供される気体であることが好ましい。また、被験物としての気体は、単独種類の気体であってもよいし、複数種の気体の混合物であってもよい。

【 0 0 1 4 】

かかる気体として、具体的には、窒素酸化物や硫黄酸化物など大気汚染物質、一酸化炭素、二酸化炭素や炭化水素など排出ガス類、メタン、プロパン、ブタン、およびアセチレンなど燃料ガス類、ホルムアルデヒド、トルエン、キシレン、パラジクロロベンゼン、エチルベンゼン、およびスチレンなど製品中から放出されるガス、ハイドロフルオロカーボン（HFC）類、ハイドロクロロフルオロカーボン（HCFC）類、ハイドロフルオロオレフィン（HFO）類、ヒドロクロロフルオロオレフィン（HCFO）類、並びに、モノマーガスなど生産の過程で出るガスを例示することができる。

20

【 0 0 1 5 】

中でも、産業上の利用価値が大きいという観点から、メタン、プロパン、ブタン、およびアセチレンなど燃料ガス類、ホルムアルデヒド、トルエン、キシレン、パラジクロロベンゼン、エチルベンゼン、およびスチレンなど製品中から放出されるガス、HFC類、HCFC類、HFO類、及びHCFO類等の冷媒用ガス、並びに、モノマーガスなど生産の過程で出るガスを好適に使用可能である。

【 0 0 1 6 】

30

毒性評価に供する細胞としては、任意の培養細胞を使用することが可能である。初代培養された細胞であってもよいし、継代培養された細胞であってもよい。また、培養細胞は、細胞培養容器の底面に接着した状態であってもよいし、細胞培養液中に浮遊した状態であってもよい。もちろん、半浮遊細胞であってもよい。

【 0 0 1 7 】

毒性評価に供する細胞としては、単一種類の細胞を使用してもよいし、複数種の細胞種を使用してもよい。

【 0 0 1 8 】

毒性評価に供する細胞は、上述の通り任意の培養細胞を使用することが可能であるが、毒性評価という目的に鑑みれば、哺乳類由来細胞であることが好ましい。

40

【 0 0 1 9 】

また、毒性評価の目的に応じて、生体中の、適宜の部位由来の細胞を使用することが可能である。具体的には、心筋細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、脳細胞、神経細胞、肺細胞、消化管細胞、膵臓細胞、脾臓細胞、子宮内膜細胞、繊維芽細胞、皮膚細胞、筋細胞、血液細胞、および骨髄細胞から選択される 1 種以上を例示することができる。

【 0 0 2 0 】

細胞培養液として使用する培地の種類は、使用する細胞に応じて、適宜設定すればよい。具体的には、MEM培地、DMEM培地、BME培地、Ham's F-12培地、RPMI 1640培地などを使用することができる。

【 0 0 2 1 】

50

播種する細胞の個数及び密度、並びに細胞培養容器のサイズに関しては、毒性評価の目的や細胞の種類に応じ、適宜設定すればよい。

【 0 0 2 2 】

本開示の毒性評価方法は、気体を細胞培養液に溶解させる気体溶解工程を有する。

【 0 0 2 3 】

気体を細胞培養液に溶解させる際には、気体以外の要因により細胞の状態が影響を受けることを排除すべく、細胞培養液のpHを二酸化炭素や緩衝液等により7.1～7.7に維持することが好ましく、7.3～7.5に維持することがより好ましい。同様の理由により、細胞培養液の温度を35～39℃に維持することが好ましく、36～38℃に維持することがより好ましい。

10

【 0 0 2 4 】

細胞培養液に気体を溶解させる方法としては、適宜の方法を採用することが可能であり、特に限定はない。具体的には、気体を細胞培養液中でバブリングさせる方法、気体を細胞培養液の表面にフローさせる（換言すれば、気体を細胞培養液の表面に接触させ、培養液中に溶解させる。）方法を例示することができる。この際、細胞培養液表面に導入する気体の濃度は、0 vol%より大きく100 vol%未満の任意の濃度に設定することが可能である。細胞培養に資するための二酸化炭素濃度に関しても、特に限定はなく、0 vol%より大きく10 vol%以下の任意の濃度を設定することが可能である。

【 0 0 2 5 】

上記した中でも、細胞培養液のpH及び温度を上記した数値範囲内に安定して維持することが可能であるという理由から、気体を細胞培養液の表面にフローさせる方法が、好ましい。

20

【 0 0 2 6 】

気体を細胞培養液の表面にフローさせる具体的な態様としては、気体の流入口及び流出口をそれぞれ少なくとも1つ有する容器（インキュベーター）に開放した細胞培養容器を設置し、気体をフローさせる態様を例示することができる。

【 0 0 2 7 】

尚、容器（インキュベーター）内に気体をフローさせる際の、容器（インキュベーター）内の気圧は、90～120 kPaに維持されていることが好ましい。

【 0 0 2 8 】

気体の流入口及び流出口をそれぞれ少なくとも一つ有する容器のサイズとしては、細胞培養容器のサイズに応じて、適宜設定すればよい。また、気体をフローする際の流量としても、気体の流入口及び流出口をそれぞれ少なくとも一つ有する容器のサイズ、細胞培養容器のサイズに応じて適宜設定すればよい。

30

【 0 0 2 9 】

さらに、本開示の細胞毒性評価方法においては、気体の細胞毒性を詳細、明確、且つ正確に把握するために、気体溶解工程の後に、細胞機能を評価する細胞評価工程を設ける。

【 0 0 3 0 】

評価する細胞機能としては、細胞生存率、ミトコンドリア機能、細胞複製能、細胞内エネルギーバランス、細胞膜完全性等を例示することができる。また、細胞の種類に応じて、当該細胞特有の機能を評価することも好ましい。例えば、心筋細胞を評価する際には、その拍動の指標を評価することも好適である。

40

【 0 0 3 1 】

本明細書において細胞生存率とは、生細胞および死細胞の総数に対する生細胞数の割合と定義する。生細胞および死細胞の数は、例えば、生体染色剤を用いた色素排除試験により得ることができる。

【 0 0 3 2 】

本明細書においてミトコンドリア機能とは、ミトコンドリアにおける酸素消費速度、カルシウムイオン流動量、および膜電位の変化から示される機能と定義する。

ミトコンドリアにおける酸素消費速度の変化は、例えば、酸素感受性プローブの発光強度

50

を測定することにより得ることが出来る。カルシウムイオン流動量の変化は、例えばカルシウムイオン感受性プローブの発光強度を測定することにより得ることができる。膜電位の変化は、例えば、膜電位感受性プローブの発光強度を測定することにより得ることができる。

【0033】

本明細書において細胞内エネルギーバランスとは、ADP / ATP量比と定義する。ADP / ATP量比とは、例えば、ルシフェラーゼ反応による化学発光強度を測定することにより得ることができる。

【0034】

本明細書において細胞膜完全性とは、細胞膜損傷の程度と定義する。かかる細胞損傷の程度は、例えば、LDHなど逸脱酵素測定することにより得ることができる。

10

【0035】

以上、本開示の実施形態について説明したが、本開示はこうした例に何ら限定されるものではなく、本開示の要旨を逸脱しない範囲において種々なる形態で実施し得ることは勿論である。

【実施例】

【0036】

以下、実施例に基づき、本開示の実施形態をより具体的に説明するが、本開示がこれらに限定されるものではない。

【0037】

20

細胞毒性評価試験

ヒトiPS細胞由来心筋細胞(iCell cardiomyocytes², CDI社製)を96well half area プレートに、40,000cells/wellの密度で播種し、7~10日間、インキュベーター内で培養した。その後、上記心筋細胞にCa指示薬(EarlyTox Cardiotoxicity Kit, Molecular Devices社製)を30μL/wellずつ添加した。その後、密閉容器内に、クロロジフルオロメタン(実施例)、ジフルオロメタン(参考例)を、細胞培養液表面にそれぞれ流速50mL/minという条件でフローした。その際、細胞培養液は、pH7.4、温度37℃、インキュベーター内の気圧101.3kPaに維持されていた。フロー開始時点、及びフロー開始から10分後の時点における心筋細胞の拍動数を、共焦点定量イメージサイトメーター(CQ1、横河電機社製)により蛍光測定を行い、計測した。

30

【0038】

尚、クロロジフルオロメタンは動物実験により、心臓に影響のある気体であることが報告されている。これに対してジフルオロメタンは心臓に有意な影響を与えないことが知られていることから、陰性対照として使用した(参考例)。

【0039】

表1に示すように、ジフルオロメタンを使用した参考例(陰性対照)においてはジフルオロメタンを細胞培養溶液に溶解しても、心筋細胞の拍動数に変動は殆ど確認されなかった。心筋細胞に無害な気体を細胞培養液表面にフローするのみでは、心筋細胞に影響はなく、心筋細胞の健全な状態が保持されていることが確認された。

【0040】

40

一方で、心臓に影響を及ぼすとされるクロロジフルオロメタンを使用した実施例においては、フロー開始より10分後において、拍動数の顕著な増加が確認された(74%増)。以上から、本開示における毒性評価方法により、気体(クロロジフルオロメタン)が心筋細胞に与える毒性を評価可能であることが確認された。

【0041】

【表 1】

	実施例	参考例
曝露時間/分	平均拍動数（回/30sec）	平均拍動数（回/30sec）
0	14.5	16.1
10	25.3	16.5

10

20

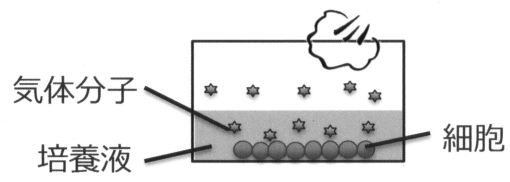
30

40

50

【図面】

【図 1】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 澤田 光平

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

合議体

審判長 福井 悟

審判官 松本 淳

審判官 田中 耕一郎

(56)参考文献 国立研究開発法人国立環境研究所[online]、大気汚染物質を細胞に直接曝露する気液界面細胞曝露装置、公開日：2013年10月31日、[検索日：2021年12月18日]、<<https://www.nies.go.jp/kanko/news/32/32-4/32-4-03.html>>

環境化学、1996、Vol. 6、No. 2、p. 217-224

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12Q1/00-3/00

Google