

研究解説

培養細胞を用いる簡便・迅速なバイオアッセイに関する 研究の現状と課題

The current status and related issues of studies on rapid and easy bioassay using cultured cell

庄 司 良*・酒 井 康 行*・迫 田 章 義*・鈴 木 基 之**

Ryo SHOJI, Yasuyuki SAKAI, Akiyoshi SAKODA and Motoyuki SUZUKI

水環境の深刻化に伴い、バイオアッセイが注目されている。しかし、従来のバイオアッセイは評価に数日間を要するため、毒性変動の大きな河川水などの毒性評価には、より迅速・簡便なバイオアッセイの開発が望まれている。本報では、迅速・簡便なバイオアッセイに関する既往の研究と現状を整理するとともに、今後の課題について考察した。

1. はじめに

バイオアッセイとは、生体の応答を利用して薬物などの毒性を評価する方法の総称である。評価のために用いられる生物は、その評価の目的に応じて様々なものが利用される⁶⁾。Fig. 1 にバイオアッセイの様々な用途と、必要な条件(感度, 迅速性, 簡便性)を示す。もともと医薬学, 生理学的な用途に用いられてきたバイオアッセイは高感度な評価が必要になるため, 評価の迅速性や簡便性はほとんど考慮されていなかった。しかし今日の水環境は多種多様な化学物質による様々な汚染が問題となっており⁵⁾, こうした汚染の場合, 従来の機器分析による個別物質の濃度による水質基準では物質間相互作用による複合毒性の発現可能性等によって対応が難しくなっている。そこでこうした汚染に対して総括的にその毒性を評価できるバイオアッセイが着目され, 水質評価に応用されつつある¹⁾²⁾³⁾。Fig. 1 において, 環境関連用途としてまとめた各種用途に用いられるバイオアッセイは評価の迅速性や簡便性が考慮された方法もある。特に浄水またはその原水の危険性を論じる場合, 重要となるのは人体影響評価すなわちヒト健康リスクを評価すること⁴⁾であろう。これには究極的には人体実験が最も信頼性のある評価につながるだろう。しかし実際にはこれは不可能であり, 他の生物個体またはこれに代替するものとしてヒトあるいは他の哺乳類由来の培養細胞を用いているのが現状である。この培養は哺乳類細胞を用

いるバイオアッセイの中では, あらゆる臓器由来の細胞で共通する一般細胞毒性の評価が最も信頼性の高い評価となるが, 評価に数日間を要するものが一般的であり⁵⁾, その簡便・迅速性は必ずしも十分ではない。

一方, 本邦では主たる水道原水として河川水を用いているが, 最近の河川水の毒性評価に関する研究の結果, その毒性は短時間(2~6時間程度)で大きく変動することが明らかになっている⁵⁾。最も毒性が強くなる時間帯の河川水では, 人体影響⁶⁾が分かっている幾つかの参照化合物と比較するとヒト血中致死濃度³⁵⁾の1/10程度と無視し得ないことがわかる。実際にはこうした河川水に存在する化学物質がヒト体内に摂取され血中濃度に反映されるまでには, 吸収, 代謝, 排泄などの各過程を経るため単純に比較することは不可能であり, このことが培養細胞を用いるバイオアッセイの現時点での限界を示しているが, こうした河川水を水道原水として安全に運用するためには, この毒性変動に追従できるような迅速性を持ち, 且つ河川の現場で評価できるような簡便性を併せ持つバイオアッセイ, Fig. 1 においては環境水管理に位置するバイオアッセイの開発が必要になっているといえる⁷⁾。

本稿では, 現状の哺乳類細胞を用いるバイオアッセイについて概観し, 迅速性, 簡便性の観点から評価を行うことで, 迅速・簡便毒性評価手法としての可能性を検討した。更に筆者らの研究成果を踏まえて展望し, 今後の研究の方向性について議論する。

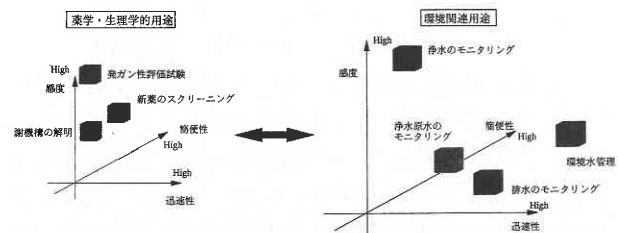


Fig. 1 バイオアッセイの様々な用途と必要な条件

*東京大学生産技術研究所 第4部

**国際連合大学

2. 迅速なバイオアッセイ

主として水環境の分野では、上水や排水の自動計測システムとして、極めて応答の迅速なバイオアッセイが提案され、実用化されているものもある⁵⁶⁾。中でも硝化菌⁸⁾や鉄酸化細菌⁹⁾の呼吸活性を検知するセンサーは極めて迅速に有害物質の毒性を評価できるものであり、すでに多くの化学物質でその反応性が確認されている。ただしいずれの方法も特に環境水の評価に適用する場合、感度の改善が今後の課題となろう。またヌカエビ¹⁰⁾やミジンコ¹¹⁾や魚個体¹²⁾の運動活性を評価する方法も迅速性に優れている。且つこれらの方法はテレビカメラを用いた画像解析によって、ある程度定量的な評価が可能になっている。同じく魚個体を用いたバイオアッセイとしては他に「えらぶた」の運動を観測するシステムも提案されている¹³⁾。しかしこれらの方法はいずれも測定の実用性の面で多少の問題を残しているが、これらの方法は運転が容易であり、もともと自動計測を念頭においているため、一旦現場にこれら装置が導入されれば、極めて簡便な連続的な評価が可能であると言える。

また、バイオセンサーとしての酵素センサー¹⁴⁾²⁰⁾等は非常に迅速に且つ安定性よく環境汚染物質の濃度を測定するものがいくつかある¹⁵⁾。これらのセンサーは生物学的応答を用いているわけではないので、得られたデータは毒性と直接結びつかないが、高感度に濃度を定量できるため、対象物質の毒性が明らかにされていけば、非常に有用であると考えられる。生物学的な応答に基づくバイオセンサーとしては感度が悪いが動物細胞を用いるセンサー¹⁷⁾¹⁸⁾もあり、感度の良いセンサーでは微生物センサー¹⁶⁾やDNA組み込みセンサー¹⁹⁾²¹⁾、DNA配列センサー¹⁹⁾などが開発されている。しかし環境管理に適用する場合、対象物質によって検出系が異なるため³⁶⁾、総合的に毒性を評価するといった目的には不適切であり、主として混入している汚染物質がある程度明確な排水などのモニタリングに、こうしたバイオセンサーも今後適用できるものと推察される。

装置のような定点自動観測評価だけではなく、一時的にある試料水の毒性を評価するキット試験法も提案されている。急性毒性を評価するマイクロトックス⁶⁹⁾や遺伝毒性を検出するミュータトックス⁷⁰⁾などがその代表的な存在であり、すでに市販されている。これらの方法は極めて簡便・迅速であり、前者は欧米で毒性試験の標準にもなっている。用量作用関係を検討できるような定量性を兼ね備えれば、より一層水環境管理に有効な方法となる。

ただしこれらの方法は、生態影響を評価するといった目的の場合には、非常に合理的な方法と言える²⁴⁾が、前章で述べたようなヒト健康影響評価に適用するためには、種差の問題のために困難であり、実際ヒトに対する致死濃度

との直接的な比較を行った場合、こうした生態学的なバイオアッセイよりは乳類細胞特にヒト細胞を用いたバイオアッセイによる一般細胞毒性評価の方が相関性が高いことも報告されている²²⁾²³⁾。従ってヒトまたはほ乳類由来の細胞を用いた迅速なバイオアッセイの開発が望まれる。

3. 細胞の応答と迅速な評価

一方、培養細胞を用いた迅速バイオアッセイの研究も幾つか進められており、特にバイオセンサーとして検討されている幾つかの方法は、非常に有望と考えられるものもある。軽部ら¹⁷⁾は動物細胞の酵素活性と呼吸活性に着目したバイオセンサーを開発した。Owickiらは細胞の代謝による培地中のpHの微小変化を測定するセンサーを開発した⁵¹⁾。しかしながらこれらの方法は環境計測に適用するためには感度の面で不十分であると考えられる。また電極上に細胞を付着させたものを用意して、細胞の運動を電極の電気抵抗を測定することで評価する方法¹⁸⁾も提案されている。同じ原理で神経細胞²⁶⁾⁵⁷⁾や運動の活発な肺の細胞を用いた研究例もある。これらの方法はかなり鋭敏な評価が比較的短時間で可能である⁵⁸⁾が、測定の実用性に乏しく、環境水毒性評価へ応用することは困難である。しかしこれらバイオセンサーは細胞の応答を電気信号として出力している点で、迅速な応答が期待でき、既に様々な応用が検討されている。また、画像解析による細胞の運動²⁸⁾や細胞体面積、繊維の測定は、評価が短時間に行える点で優れており、幾つか毒性評価手法として提案されている³¹⁾。実際に神経細胞の神経繊維の伸展を指標とした迅速なバイオアッセイの開発を試みもある⁶⁶⁾⁷³⁾。しかしこれらの方法の感度は環境濃度の測定には必ずしも十分ではない。

ある程度の感度を持ちつつ再現性に優れた迅速な評価を細胞で行うためには、細胞における毒性発現のエンドポイントの選択が重要になる。Fig. 2に毒性発現機序と様々なエンドポイントについて、時系列にまとめたものを示す。図に示す通り、毒性は細胞死にいたるまでには様々な細胞機能に障害をきたす²⁹⁾。最も一般的な細胞毒性試験としては、細胞生存率試験⁷⁾があげられるが、細胞死に近いエンドポイントであるコロニー形成能⁶⁸⁾、細胞増殖能²⁾やタンパク質分泌能⁶⁰⁾の評価は一般細胞毒性評価に近く⁶⁷⁾、ヒト健康影響評価に適用する観点から考えると、細胞生存率試験と同様に確実な評価結果が期待できる。本研究でもかつてラット初代培養肝細胞のアルブミン分泌能を指標として、肝細胞の長期毒性を評価し、この方法の有効性と限界について検討した³⁰⁾⁶⁰⁾。一方、細胞膜に毒物が吸着することで、最初に毒物に接触する細胞膜の損傷や細胞膜タンパク質の変性や破壊を蛍光偏光度⁴³⁾あるいは膜電位⁴²⁾で見る評価は、迅速な応答が期待できる。また毒物の曝露による生体防御反応の結果として、誘導される各種タンパ

ク質 (フェリチン⁴⁸⁾, シクロヘキシミド⁴⁵⁾, メタロチオネイン^{40) 44)}, ヒートショックタンパク⁴¹⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾, その他³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾の分泌を見る方法も, 迅速な応答が期待できる⁴⁹⁾. また, 細胞質タンパク量を定量することで細胞数を定量する方法³⁴⁾や, 膜タンパク質の変性や破壊については細胞膜上の膜タンパク質に着目し, 毒物の暴露による変性をCDスペクトルをとることで評価する方法も迅速な応答が期待できる. しかしこれらのタンパク質を定量する方法⁵⁰⁾は, 曝露時間は短縮できても測定に時間がかかる上, 操作が煩雑となり, 総合的にみると簡便・迅速な毒性評価手法の原理とはなり得ない.

それぞれのエンドポイントの中で最も迅速な評価が期待できる細胞膜及び膜タンパク質に着目した研究例を紹介していくと, 膜障害性を見るバイオアッセイのなかで最も基本的且つ一般的に用いられているのが, Trypan Blue 染色法である. この色素は細胞の物質透過膜の破壊によって, 細胞内に入り込み青色に染色する. 染色された細胞と全細胞数を血球計算版で計数することによって, 生存率を評価できる. しかしこの Trypan Blue という染色物質は分子量が大きいため, 相当の損傷が細胞膜に生じていないと染色されないため, その毒性評価は感度の悪くなる. 実際, 死細胞数を少なく見積もる場合もある. 同じ染色法でも Crystal violet を用いる方法もある³³⁾. この色素は比較的分子量が小さいために, 細胞の生死を問わず染色を行う. 従ってこの方法による細胞毒性のエンドポイントは, 細胞膜上に存在する細胞接着タンパク質の変性である. このエンドポイントは短時間で発現するものではないために, 評価時間を短くとると極めて感度の悪い評価になる. これらの染色法は細胞内外の濃度差による細胞にとって受動的な染色である. 染色法としては他に Neutral Red 法がある²⁷⁾が, これは細胞内小器官のリポソームを染色するものであり, 生体外異物を除去するという細胞の能動的な機能に基づい

ている点で, 先に挙げた二つの染色法よりも一般細胞毒性に近いエンドポイントを評価していると言えよう⁵⁴⁾. また細胞膜の物質透過膜の損傷を見る LDH assay は, 毒性評価に良く用いられる⁶⁴⁾. これらの方法は通常生細胞数を計測するという目的のために開発され, 使用されてきたものである. 同じく細胞数を計測する方法としては, 他にも様々な方法がある²⁵⁾. ミトコンドリアにおけるテトラゾリウム塩の還元をみる MTT 法⁷¹⁾を初めとして, AP (Acid Phosphatase) 法⁶²⁾, CVDE (Crystal Violet) 法⁵³⁾, NR 法²⁷⁾などがある. Martin はこれら比色アッセイを反応時間や定量範囲, 感度などの指標で評価しており³²⁾, この4種類の中では AP 法に軍配が挙がっている. しかし評価する細胞や目的等で使い分ける必要があるだろう. また筆者らも LDL (Low density lipoprotein)⁶³⁾の取り込み活性に着目した迅速毒性評価手法を開発しており⁵⁷⁾, 細胞にとって必須の栄養である LDL の能動的な取り込みを評価する方法である. この一つのエンドポイントは LDL receptor の破壊・変性・失活である.

以上の様々な評価法で得られる感度とそれを得るのに必要な評価時間でまとめたものを Fig. 3 に示す. 感度の指標としては各評価系で得られた ED₅₀ 値 (mM) を用いた. 参照物質として As₂O₃ を用いたが, この物質は比較的一般的な細胞毒性しか発現しない⁵⁵⁾. 図中直線で示したように高い検出感度を得るためには長い評価時間が必要になるといった一般的な傾向が見られる. また既に迅速毒性評価手法として確立されている方法と単純に比較すると, これら培養細胞を用いるバイオアッセイは, 迅速性という点では見劣りする. 先に述べた河川水の毒性変動に追従でき, かつ最低でもヒトに対する急性毒性を評価するという目標を定めた場合, 細胞を用いる簡便・迅速なバイオアッセイは Fig. 3 の横軸の曝露時間を6時間以内, ED₅₀ を Table 1 に示したヒト急性毒性値が知られている参照化合物 (As₂O₃)

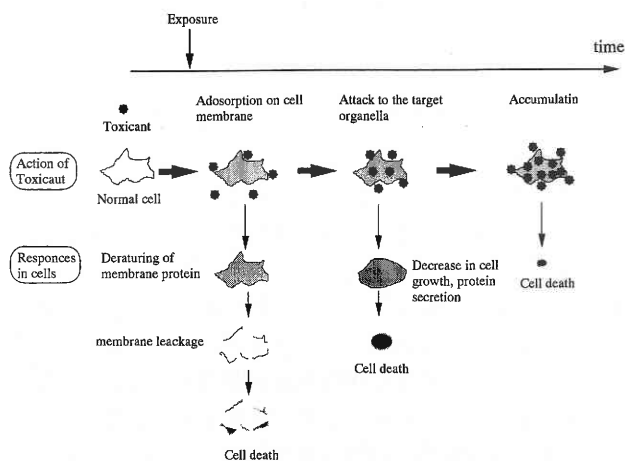


Fig. 2 Mechanism of toxic action and the endpoint

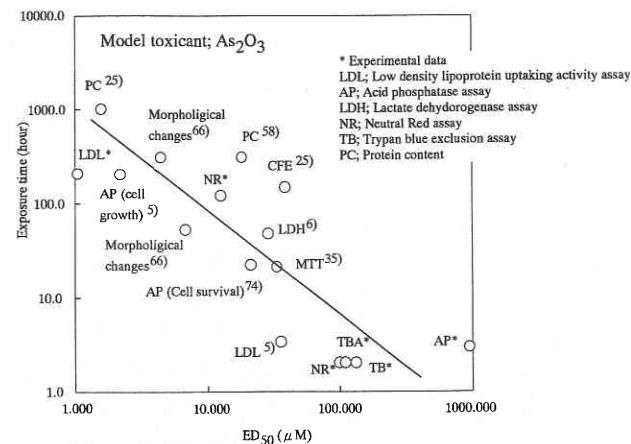


Fig. 3 Comparison between ED₅₀ and Exposure time of As₂O₃

Table 1 Comparison between human lethal concentration and effective dose obtained from LDL uptaking activity assay and cell survival test for 48 hours

Substance	Human LD (blood, $\mu\text{mol/L}$)	ED ₅₀ (μM) LDL uptaking activity assay	ED ₅₀ (μM) Cell survival test
Ethylene glycol	33000		
Phenol	1013	70	
Malathion	722		
Dichlorophenoxyacetic acid	180	1	100
Potassium cyanide	43.8		3000
Paraquat	5.75	2	
Arsenic trioxide	54	2.4	51
Copper (II) sulphate	312	60	800
Mercuric chloride	6.48	90	200

のヒト致死血中濃度から鑑みて 0.054 mM 以下の条件をみたす必要が最低限あると考えられる。ただしこれらの参照物質で環境水の毒性を代表させるのには議論の余地があり、ヒト急性毒性濃度と細胞に曝露される濃度を直接比較することはできない。

4. 簡便なバイオアッセイ

動物細胞を用いるバイオアッセイが水環境の現場で、簡便に運用されるためには幾つかの障害がある。なかでもクリーンルームやインキュベーター等の特殊な設備や細胞培養技術を必要とすることは、水環境の現場で運用するためには大きな障害となろう。簡便化の最終的な目標としては大きく 2 通りのアプローチが考えられる。一つは自動計測システムの開発で、もう一つはバックテストのような毒性評価キットの開発である。

前者では前述した硝化菌⁸⁾や鉄酸化細菌⁹⁾の呼吸活性を検知するセンサーやミジンコ¹¹⁾や魚個体¹²⁾の運動活性を評価する方法などが代表的な例であり、これらの方法はリアルタイムに毒性を評価し、得られたデータの転送から解析まで自動的に行うことが可能になっている。しかしかつて動物細胞を使ったバイオアッセイでこうした自動計測の研究例はない。ヒトリスク評価を指向するような動物細胞を用いるバイオアッセイが水環境の現場で、簡便に運用されるためには幾つかの障害がある。なかでもクリーンルームやインキュベーター等の特殊な設備や細胞培養技術を必要とすることは、水環境の現場で運用するためには大きな障害となろう。また培養動物細胞を用いる場合、ヒトに急性毒性を及ぼし得るような濃度を曝露すると、細胞に不可逆的な損傷を与える可能性があり、その毒性検出媒体は使い捨てにならざるを得ない。そこでその毒性検出媒体となる生物試料を凍結、乾燥、固定化などによって大量に準備し、現場に供給することで間欠的な自動毒性評価システムを指向することになる。しかし動物細胞に凍結乾燥の方法の適用はかなり難しい。筆者らは従来から研究されてき

た細胞の凍結保存技術を応用し、96 well-plate に細胞を接着進展させ、そのまま凍結保存することで、プレートでの簡便化を試み、自動毒性計測システムの開発を指向した。だが、長期間に渡る細胞の安定性や生存率などに問題があった⁶⁵⁾。また凍結・解凍による細胞膜への損傷の結果、親水性物質の毒性を高く見積もってしまうという問題もあった⁶⁵⁾。しかし河川水等の環境水の毒性評価に応用したところ、通常の細胞による評価とほとんど同様の出力が期待でき、定点自動細胞毒性評価システムの骨格として、有望な方法であると考えられる。

一方、毒性評価キットとして開発された方法としては、前述のマイクロトックス⁶⁹⁾ミュータトックス⁷⁰⁾など幾つかキット化されており、凍結乾燥が可能な菌体等を用いて、大幅に簡便化された方法も存在する。しかし、前述のように動物細胞は凍結乾燥は不可能であるために、現状のところ動物細胞を用いた毒性評価キットは開発されていない。我々はマイクロキャリアを細胞の固定化担体とし、これをフィルターチップに充填することで、被検水のマイクロピペットによる溶液の導入・排出のみで毒性評価する方法を開発し、動物細胞を用いる簡便毒性評価キットの開発を試みている⁵²⁾。LDL の取り込み活性評価手法に基づくこの方法は、高密度に細胞を充填することで測定迅速化の見通しを得ている。Fig. 3 にこの方法による毒性評価の結果を示した。単一化学物質の毒性評価では、従来 4 時間の評価で得られる感度を 2 時間で得られる程度であったが、河川水の毒性評価に応用したところ、48 時間曝露の細胞生存率試験による毒性評価結果と比較して、遜色ない感度で毒性を評価できることを確かめている⁵²⁾。自動計測システムとは異なるアプローチとなるが、pH 試験紙で pH を計測するような手軽さを追求したものであり、キット試験法としてはヒト培養細胞を用いる点で他に例のない毒性試験システムといえよう。キット化には他に、調整から使用までの保存の問題や測定の安定性、再現性に改善の余地があるものの、環境水の 1 次スクリーニングなどの目的には、有効な方法と考えられる。

5. 水環境管理のためのバイオアッセイとは

水環境管理に利用するバイオアッセイが具備する条件としては、Fig. 1 に示した感度、迅速性、簡便性等様々な条件が要求されるが、水質事故や排水管理などで問題となる急性毒性を対象とする場合、環境濃度を評価できるような高感度性は必要ではなく、むしろ最低限ヒトまたは生態系に対する急性毒性を発現する濃度を評価できれば感度は十分である。発ガン性等の慢性毒性が問題となる上水の管理には別の Fig. 1 の左の図に示すような薬学・生理学の分野で用いられる長期毒性評価方法が望まれるが、このようなバイオアッセイを水環境管理に応用するためには、冒頭で

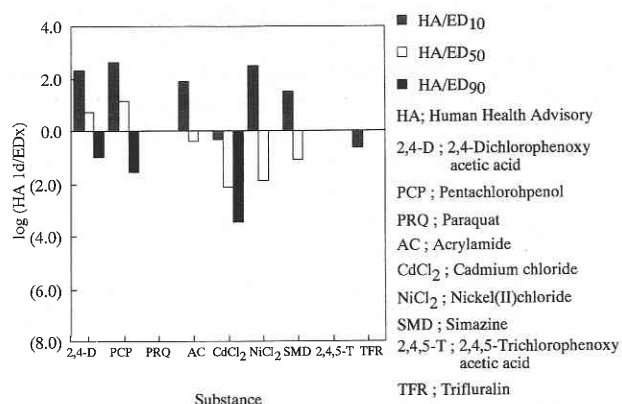


Fig. 4 Comparison between EDx and HA (1 d, child)

述べたようにあまりにも現状では障害が大きすぎる。個別物質の濃度を指標とする環境基準に基づいた水環境管理体系の破綻から、生体の応答を利用してその総括的な毒性を評価するバイオアッセイが着目されつつあるといっても、現状で用いられるのは操作が極めて簡便な一部の方法しかなく、動物細胞を用いるバイオアッセイの必要性が声高に訴えられていても、その煩雑な操作を簡便化しない限り、永久に水環境管理に用いられていくことはないだろう。US EPA (米国環境保護庁) が提示する HA (Human Health Advisory) ではヒトの1日間、10日間、長期間 (7年間)、生涯の各期間で影響を及ぼす可能性が示唆される様々な化学物質の規制濃度を安全係数を乗じて、決定している。この各規制値のうち急性毒性が問題となる1日間 (子供) の濃度、慢性毒性が問題となる長期間の濃度とバイオアッセイによる毒性評価で評価できる濃度を比較した図を Fig. 4 に示す。バイオアッセイの例として我々が迅速毒性評価手法として開発した低密度リポタンパク質の取込み活性阻害評価法での評価結果を用いたが、これによるとほぼ急性毒性をヒトに及ぼしうる濃度に相当する毒性を48時間で評価することは、現状のバイオアッセイで十分に可能であると結論できる。したがって現状の比較的感度の良いまたは迅速な応答が期待できるバイオアッセイ手法、前述の Fig. 1 においては環境関連用途の各バイオアッセイを大幅に簡便化することで、水環境管理に有効に利用できるものと考えられる。

6. 結 言

培養動物細胞を用いる簡便・迅速なバイオアッセイの開発という視点から、既往の方法について概観し、それらの感度と評価時間を比較し、簡便・迅速バイオアッセイに具備すべき条件を検討した。ついで幾つか我々の試みについて紹介し、それらの限界と改良すべき問題点を整理した。加えて水環境管理における簡便・迅速バイオアッセイ手法

の必要性を提示し、その満たすべき条件について考察した。

(11年11月1日受理)

7. 参 考 文 献

- 鈴木基之, 酒井康行, 工学からみたバイオアッセイの有効性, アニテックス, 7, 27-31 (1995).
- 酒井康行, 迫田章義, 鈴木基之, 動物細胞を用いた環境水の生体影響評価の試み, 生産研究, 47, 216-219 (1995).
- 内海英雄, 安藤正典, 土屋悦輝, 細胞毒性試験による水質評価, 用水と廃水, 35, 5-12 (1993).
- 市川和洋, 鄭然孫, 内海英雄, 個体毒性の検証に基づく in vitro 簡易毒性評価系の確立, 水環境学会誌, 20, 701-704 (1997).
- 鈴木基之, 庄司良, 酒井康行, 迫田章義, 低密度リポタンパク質の取込みを指標とした迅速簡便な細胞毒性評価手法, 水環境学会誌, 20, 746-751 (1997).
- Wang, X., Sasaki, T., Matsudo, T., Saijo-Kurita, K. and Ohno, T., Correlation of in vitro toxicities of MEIC chemicals determined by lactate dehydrogenase release assay with in vivo toxicities to animals and humans, AATEX, 2, 115-126 (1993).
- Shoji, R., Sakai, Y., Sakoda, A. and Suzuki, M., Rapid bioassay of toxicity in environmental water by LDL-uptaking activity of human cells, Water Science and Technology, 38, 271-278 (1998).
- 田中良春, 田口和之, 大戸時善雄, 星川寛, 佐々木弘, 三森裕司, 齊藤芳雄, 鹿志村修, バイオセンサを用いた急性毒性物質の連続自動監視装置の開発, EICA, 1, 250-253 (1996).
- 日本水道協会 (1993) 上水試験方法解説.
- 宮代明, 馬場研二, 原直樹, 早稲田邦夫, 矢萩捷夫, 水質危機管理のための高感度バイオアッセイシステムの研究, EICA, 1, 246-249 (1996).
- Peterson, S. M. and Stauber, J. L., New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity, Bulletin Environmental Contaminants and Toxicology, 56, 750-757 (1996).
- 馬場研二, 矢萩捷夫, 水質異常検知を目的とする魚類行動の画像監視, 水質汚濁研究, 11, 114-122 (1988).
- Morgan, W. S. G., ASTM STP, 607, 38 (1977).
- Glab, S., Koncki, R. and Holona, I., Kinetic model of pH-base potentiometric enzymic sensors, Analyst, 117, 1671-1679 (1992).
- Vadgama, P. and Crump, P. W., Biosensors: Recent Trends, A Review, Analyst, 117, 1657-1670 (1992).
- 松本邦男, バイオセンサによる発酵プロセス計測技術の最近の進歩, バイオサイエンスとインダストリー, 53, 773-776 (1995).
- Karube, M., Hiramoto, K., Kawarai, M. and Sode, K., Biosensors for toxic compounds using immobilized animal cell membrane, Membrane, 14, 311-318 (1989).
- Giaever, I. and Keese, C. R., A morphological biosensor for mammalian cells, Nature, 366, 591-592 (1993).
- 軽部征夫, バイオセンサ材料, 工業材料, 41, 28-34 (1993).
- 末永智一, 西沢松彦, 内田勇, 化学工業, 10, 801-804 (1993).

- 21) 前田瑞夫, DNA バイオセンサ, 化学と工業, 50, 992-994 (1997).
- 22) Clemedson, C. et al., MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part I methodology of 68 in vitro toxicity assay used to test the first 30 reference chemicals, *ATLA*, 24, 251-272 (1996).
- 23) Clemedson C et al., MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part II. In Vitro Results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *ATLA*: 273-311 (1996).
- 24) Lilius, H., Isomaa, B. and Holmström, T., A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow trout hepatocytes and *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicology*, 30, 47-60 (1994).
- 25) Ekwall, B., Gomez-Lechon, M. J., Hellberg, S., Bondesson, I., Castell, J. V., Jover, R., Hogberg, J., Ponsoda, X., Romert, L., Stenberg, K. and Walum, E., Preliminary results from the scandinavian multicentre evaluation in vitro cytotoxicity (MEIC), *Toxicology in vitro*, 4, 688-691 (1990).
- 26) Chicoine, M. R. and Silbergeld, D. L., Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro, *Journal of Neurosurgery*, 82, 615-622 (1995).
- 27) Borenfreund, E. and Puerner, J. A., A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90), *Journal of Tissue Culture Methods*, 9, 7-9 (1985).
- 28) Tillmann, U., Pollet, D. and Miltenburger, H. G., Cytotoxicity detected by image analysis: a new method for the quantification of survival, mortality, recovery and growth of mammalian cell culture, *Toxicology in vitro*, 4, 717-719 (1990).
- 29) Belman, S., Casto, B., Flessel, P., Lane, P. B., Loeb, L., Rossman, T., Sirover, A. M., Vainio, H., Whiting, R. and Zakour, R., In vitro models and methods for bioassay and studies of cellular mechanisms, *Environmental Health Perspectives*, 40, 35-42 (1981).
- 30) Suzuki, M., Ichikawa, K., Sakoda, A. and Sakai, Y., Long-term culture of primary rat hepatocytes with high albumin secretion using membrane-supported collagen sandwich, *Cytotoxicity*, 11, 213-218 (1993).
- 31) Weiss, M. T. and Sawyer, T. W., Cytotoxicity of the MEIC chemicals in primary neuron cultures, *Toxicology in vitro*, 7, 653-667 (1993).
- 32) Martin, A. and Clynes, M., Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays, *Cytotechnology*, 11, 49-58 (1993).
- 33) 国本学, 安原昭夫, 相馬悠子, 中杉修身, 哺乳類動物細胞培養系を用いた水環境試料の毒性評価, *水環境学会誌*, 19, 855-860 (1996).
- 34) Diericks, P. J. and Ekwall, B., Long-term cytotoxicity testing of the first twenty MEIC chemicals by the determination of the protein content in human embryonic lung cells, *ATLA*, 20, 285-289 (1992).
- 35) Jover, R., Ponsoda, X., Castell, J. V. and Lechon-Gomez, M. J., Acute cytotoxicity of ten chemicals in human and rat cultured hepatocytes and in cell lines: correlation between in vitro data and human lethal concentrations, *Toxicology in vitro*, 8, 47-54 (1994).
- 36) 久保いずみ, 微生物センサーによる環境物質の計測, *化学工業*, 10, 816-821 (1993).
- 37) Kumar, S., Vinci, J. M., Pytel, B. A. and Baglioni, C., Expression of messenger RNAs for complement inhibitors in human tissues and tumors, *Cancer Research*, 53, 348-353 (1993).
- 38) Safrit, J. T. and Bonavida, B., Sensitivity of resistant human tumor cell lines to tumor necrosis factor and adriamycin used in combination: correlation between down-regulation of tumor necrosis factor-messenger RNA induction and overcoming resistance, *Cancer Research*, 52, 6630-6637 (1992).
- 39) Klefstrom, J., Koskinen, P. J., Saksela, E., Jaatterla, M., Brabo, R. and Alitalo, K., A sub-set of immediate early mRNAs induced by tumor necrosis factor- α during cellular cytotoxic and non-cytotoxic responses, *International Journal of Cancer*, 55, 655-659 (1993).
- 40) Robson, T., Grindley, H., Hall, A., Vormoor, J. and Lohrer, H., Increased DNA-repair capacity and the modulation of 2 proteins in and metallothionein overexpressing Chinese hamster cell line, *Mutation Research*, 314, 143-157 (1994).
- 41) Fujita, F., Iwahashi, H., Kodama, O. and Komatsu, Y., Induction of heat-shock proteins and accumulation of trehalose by TPN in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216, 1041-1047 (1995).
- 42) Binggeli, R., Weinstein, R. C. and Stevenson, D., Calcium ion and the membrane potential of tumor cells, *Cancer Biochemistry and Biophysics*, 14, 201-210 (1994).
- 43) Neelson, D. G., Sorensen, E. M. B. and Acosta, D., A fluorescence polarization procedure for the evaluation of the effects of cadmium and calcium on plasma membrane fluidity, *Journal of Tissue Culture Methods*, 9, 11-17 (1984).
- 44) Kershaw, W. C., Iga, T. and Klaassen, C. D., Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: possible role of hepatic metallothionein induction, 106, 448-455 (1990).
- 45) Borrelli, M. J., Stafford, D. M., Rausch, C. M., Ofenstein, J. P., Cosenza, S. C. and Soprano, K. J., Cycloheximide protection against actinomycin D cytotoxicity, *Journal of Cellular Physiology*, 153, 507-517 (1992).
- 46) Matsuo, K., Kohno, K., Sato, S., Ushiumi, T., Tanimura, H., Yamada, Y. and Kuwano, M., Enhanced expression of the DNA topoisomerase II gene in response to heat shock stress in human epidermoid cancer KB cells, *Cancer Research*, 53, 1085-1090 (1993).
- 47) Lee, Y. J., Hou, Z., Cho, J. M. and Corry, P. M., Comparison between tumour necrosis factor response and heat shock response in L 929 cells: cellular and molecular aspects, *Journal of Thermo Biology*, 17, 241-249 (1992).
- 48) Moirand, R., Lescoat, G., Hubert, N., Dezier, J. F., Pasdeloup, N. and Brissot, P., Alcohol induction of ferritin expression in a human hepatoblastoma cell line (hep g2), *Clinical and Experimental Research*, 14, 847-852 (1990).
- 49) Maio, A. D., Beck, S. C. and Buchman, T. G., Heat shock gene expression and development of translational thermotolerance in human hepatoblastoma cells, *Circulatory Shock*, 40, 177-186 (1993).
- 50) Mitani, K., Fujita, H., Fukuda, Y., Kappas, A. and Sassa, S., The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of haem oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells, *Biochemical Journal*, 290, 819-825 (1993).
- 51) Owicki, J. C., Parce, J. W., Kercso, K. M., Sigal, G. B., Muir, V. C., Venter, J. C., Fraser, C. M. and McConnell, H. M., Continuous mon-

- itoring of receptor-mediated changes in the metabolic rates of living cells, *Proceeding of National Academy of Science USA.*, 87, 4007-4011 (1990).
- 52) Shoji, R., Sakai, Y., Sakoda, A. and Suzuki, M., Development of a rapid and sensitive bioassay device using human cells immobilized in macroporous microcarriers for the on-site evaluation of environmental waters, *Applied Microbiology and Biotechnology*, submitted (1999).
- 53) 庄司良, 大村佳子, 酒井康行, 迫田章義, 内海英雄, 鈴木基之, 環境水及び化学物質の複合毒性に関する定量的評価の試み, *生産研究*, 51, 571-574 (1999).
- 54) Alberic, G. T., Quantitative correlation of neutral red dye uptake with cell number in human cancer cell cultures, *Biology International Reports*, 11, 373-379 (1987).
- 55) Barrachina, A. C., Carbonell, F. B. and Beneyto, J. M., Effect of sodium arsenite on arsenic accumulation and distribution in leaves and fruit of *Vitis vinifera*, *Journal of Plant Nutrition*, 20, 379-387 (1997).
- 56) Builema, Jr. A. L., Niederlehner, B. R. and Cairns, Jr. J., Biological monitoring, part IV - toxicity testing, *Water Research*, 16, 239-265 (1982).
- 57) Chicoine, R. M. and Silbergeld, L., D., Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro, *Journal of Neurosurg*, 82, 615-622 (1995).
- 58) Dierickx, J. P., Cytotoxicity testing of 114 compounds by the determination of the protein content in Hep G 2 cell culture, *Toxic. in Vitro*, 3, 189-193 (1989).
- 59) Ebersole, R. C., Foss, R. P. and Ward, M. D., Piezoelectric cell growth sensor, *Biotechnology*, 9, 450-454 (1991).
- 60) Ichikawa, K., Sakai, Y., Sakoda, A. and Suzuki, M., Long-term cytotoxicity of various pesticides evaluated by albumin selection of primary cultured rat hepatocytes, *Biotechnology and Techniques*, 10, 99-102 (1996).
- 61) John Hopkins Center for Alternative to Animal Testing, Cell culture systems and in vitro toxicity testing, *Cytotechnology*, 8, 129-176 (1992).
- 62) Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ and Feder J., Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay, *Analytical Biochemistry*, 152, 136-140 (1986).
- 63) Stopeck, A. T., Nicholson, A. C. Manicini, F. P. and Hajjar, D. P., Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in Hep G 2 cells, *Journal Biological Chemistry*, 268, 17489-17494 (1993).
- 64) Wang, X and Ohno, T., Typing of MEIC chemicals according to their toxicokinetics modes of action by lactate dehydrogenase-release assay, *In Vitro Toxicology*, 8, 55-63 (1995).
- 65) Shoji, R., Sakai, Y., Sakoda, A. and Suzuki, M., Preservation of microplate-attached human hepatoma cells and their use in cytotoxicity test, *Cytotoxicity*, in press (2000).
- 66) 鈴木基之, 三島裕, 酒井康行, 迫田章義, 神経細胞の形態変化を指標とした環境汚染物質の毒性評価, *生産研究*, 48, 147-150 (1996).
- 67) Witte, I., Jacobi, H. and Juhl-Strauss, U., Suitability of different cytotoxicity assays for screening combination effects of environmental chemicals in human fibroblasts, *Toxicology. Letters.*, 87, 39-45 (1996).
- 68) 内海英雄ら, 細胞毒性試験による有害化学物質汚染の評価, *水環境学会誌*, 15, 655-661 (1992).
- 69) Brenner, A., Evaluation of activated carbon adsorption capacity by a toxicity bioassay, *Water Research*, 27, 1577-1583 (1993).
- 70) Xu H., Genotoxicity studies on sediments using a modified SOS chromotest, *Toxicity Assessment*, 2, 79-87 (1987).
- 71) Al-Rubeal, M., Use of the MTT assay for the study of hybridoma cells in homogeneous and heterogeneous cultures, *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses*, 1, 143-155 (1989).
- 72) Shoji, R., Sakoda, A., Sakai, Y., Utsumi, H. and Suzuki, M., Formulating bioassay data of chemicals and environmental water, *IAWQ 7 th-Asia Pacific regional conference*, Taipei, Taiwan (1999).
- 73) Sakoda, A., Mishima, Y., Sakai, Y. and Suzuki, M., Neurotoxicity evaluation by morphological changes in PC-12 cells, *5 th World Congress of chemical engineering*, San Diego (1996).
- 74) 鈴木基之, 庄司良, 酒井康行, 迫田章義, ヒト細胞の代謝活性に着目した環境汚染物質の迅速毒性評価ヒト細胞の代謝活性に着目した環境汚染物質の迅速毒性評価, *生産研究*, 49, 162-165 (1997).