

## 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

Rapid toxicity evaluation of environmental pollutants by metabolic activity of human cell line

鈴木基之\*・庄司 良\*・酒井康行\*・迫田章義\*\*

Motoyuki SUZUKI, Ryo SHOJI, Yasuyuki SAKAI and Akiyoshi SAKODA

## 1. はじめに

近年、著しい科学技術の発展により人間生活は目覚ましく快適なものとなっているが、一方で多種多様の化学物質が環境水に排出されている。これらの化学物質は複合的毒性を発現し結果として毒性が相乗的に増大することも懸念されるため<sup>1)</sup>、水道原水として安全に用いるには、環境水の総合的毒性評価指標としてのバイオアッセイの導入が求められる<sup>2)</sup>。

本研究室では、細胞増殖阻害を指標とする簡便なバイオアッセイを用いて、代表的な都市型河川である多摩川河川水の評価を行ってきた。その結果、河川水の細胞毒性の変動は一部の時間帯では人体に影響を及ぼす恐れのある強い毒性を確認できるほどに大きく、その変動の時定数も数時間程度と大変小さいことが判明した<sup>3)</sup>。水道水の安全確保のためには、浄水プロセスに要する時間内で毒性変動を把握することが必要になるが、既往の手法<sup>4)5)</sup>では少なくとも評価に数日を要するため、この変動に追従できるような迅速評価はほぼ不可能である。

そこで本研究では、環境汚染物質や実際の河川水の毒性を、数時間程度で評価できるような手法の開発を目的としている。我々はヒト肝臓ガン由来細胞 (Hep G2)<sup>6)</sup>の代謝活性に着目した。代謝物としては細胞の単位時間当たりの取り込み量が多い物質の一つ<sup>7)</sup>である LDL (Low Density Lipoprotein) を用い迅速評価を試みた。また、これらの結果を細胞増殖阻害試験による毒性評価の結果と比較した。

## 2. 実験方法

## 2.1 LDL法による迅速毒性評価

各種毒性試験に広く用いられ培養も比較的簡単な Hep

\*東京大学生産技術研究所 第4部

\*\*東京大学生産技術研究所 附属計測技術開発センター

G2 (ヒト肝臓癌由来, JCRB より供与) を24ウェルプレートに播種し, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件の下で DME (Dulbecco modified Eagle's medium) に FBS (fetal bovine serum) 10% を添加した培地で前培養した。24時間後各種毒物溶液及び河川水サンプルから調製した DME 培地 (無血清) にアクリジウム蛍光標識<sup>8)</sup> LDL を添加した培地で, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の下で培養し (LDL 結合活性阻害試験は 4°C), 毒物曝露と毒性評価を同時に行った。数時間の曝露後 1 N-NaOH で細胞を処理・融解し, 取り込まれた (結合した) LDL を蛍光強度計 (Ex = 378 nm, Em = 430 nm) により定量した。データは 4 ウェルの平均とした。誤差範囲は標準偏差で平均値の ±10% 以内であった。

## 2.2 AP法による一般細胞毒性評価

一般細胞毒性評価には 96 穴プレートに初期密度  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した Hep G2 細胞を各毒物溶液および河川水サンプルから調製した FBS 10% 添加の DME 培地で 6 日間培養後, 細胞内の加水分解酵素である Acid Phosphatase (AP) の活性評価に基づいた発色反応を吸光度で測定する AP assay<sup>9)</sup> を行った。吸光度と生細胞数が比例することを用いて細胞数を測定し, 毒性による細胞増殖阻害を評価した。データはこの場合 8 ウェルの平均とした。誤差範囲は標準偏差で平均値の ±10% 以内であった。

## 2.3 モデル毒物と河川水サンプル

これら二つの方法を用いて表 1 に示す 4 種類の環境汚染物質, および実際の環境水として 1996 年 5 月 15 日~16 日の 24 時間ごとに採取した河川水サンプルの毒性を評価した。一般的な水質指標として, TOC (総有機炭素量), EC (電気伝導度), SS (総懸濁粒子濃度) 水温, pH, 220 nm での吸光度 UV220, 260 nm での吸光度 UV260 (それぞれ有機化合物, 芳香族化合物の濃度を間接的に示す) を同時に測定した。また AP 法, LDL 法は共にブランクとして

細胞の入っていないウェルの値, コントロールとして超純水から調製した培地中での値をそれぞれ用いた. TPN については, 水への溶解度が小さいため DMSO に溶解した後負荷した. ただし培地中の DMSO の最終濃度は 0.5 vol% 以内とし, この場合のコントロールは DMSO 0.5 vol% の DME 培地を用いた.

### 3. 結果と考察

#### 3.1 LDL 法における毒性評価条件

まず, 有意な結果を得るために必要な最短の曝露時間を決定した. 図 1 に曝露時間と蛍光強度の関係を示す. モデル毒物は Paraquat を用いた. 毒性の差は暴露時間 1 時間までは現われず, 数時間経過した後に評価されていることから, 毒性は LDL の取り込み速度ではなく, 十分に時間を経た平衡取り込み量に強く発現すると考えられる. 既往の文献<sup>10)</sup>では健全な細胞の LDL 取り込み量は 4 時間で平衡になることから, 本研究では河川水の毒性を評価するために必要な感度を考慮して曝露時間を 4 時間に決定したが, 毒性の強さにより, 蛍光強度が平衡に達する時間の相違を利用して更なる迅速評価が可能であると考えられる.

次に最適な細胞播種密度を決定した. 図 2 に細胞播種密度と蛍光強度の関係を示す.  $0.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>まではほぼ直線的に蛍光強度が増大することが分かる. しかし細胞密度が小さいと誤差範囲が大きくなる傾向があるため, 結果の安定性を期してほぼ増殖飽和細胞密度に近い  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>に決定した.

また蛍光標識 LDL そのものの細胞毒性と培地中の最適 LDL 投与量を調べた. 図 3 に LDL 法と曝露時間 4 時間の AP 法による蛍光標識 LDL の評価の結果を示す. 図より LDL が培地中に 10 mg/ml まではほぼ直線的に細胞の取り込み量が増加することがわかる. しかし標識した蛍光物質 (アクリジウム) の強い細胞毒性により, 20 mg/ml を越えると細胞数が減少してしまうため, 本研究では蛍光標識 LDL 添加濃度を 10 mg/ml とした.

さらに, 更なる迅速評価のために, LDL の取り込み活性だけでなく細胞表面に存在する LDL を取り込む機能を有する LDL receptor に着目し, モデル毒物 Paraquat による receptor と LDL の結合活性阻害 (4 °C の評価) を評価し, 取り込み活性阻害評価 (37 °C の評価) との比較を行った. この結果を図 4 に示す. 図の縦軸はコントロールで規格化した値を示すものとする. 結果から結合活性よりも取り込み活性に毒性による阻害が現われていることがわかるが, 測定の簡便化と高感度化を図るため, 本研究ではこれら活性の阻害を一括して評価することにした.

表 1 本研究で用いたモデル毒物の物性, 致死濃度<sup>12), 13)</sup>, 水質基準値

物質	分子量	溶解度 (g/100g水)	ヒトの血中致死濃度 (μM)	水質基準 (μM)
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	197.84	2.05	54	0.133
SDS	288.38	易溶		0.694
Paraquat	257.18	易溶	5.75	
TPN	265.91	0.006		0.150

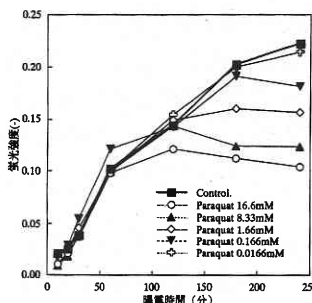


図 1 蛍光強度の時間変化

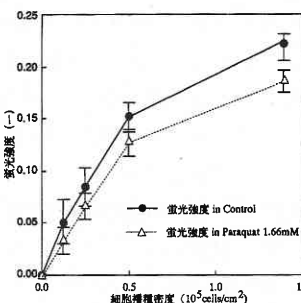


図 2 細胞数と蛍光強度の関係

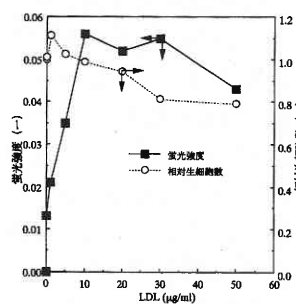


図 3 最適 LDL 量の決定

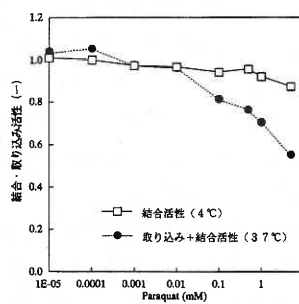


図 4 取り込み活性と結合活性の比較

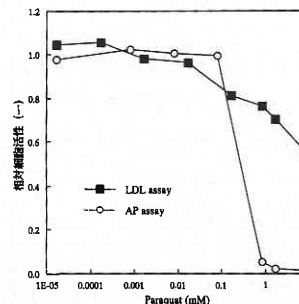
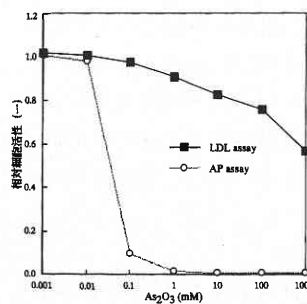
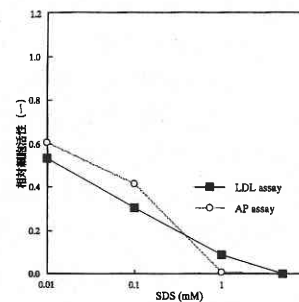
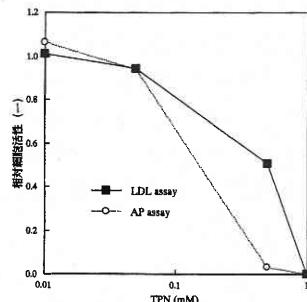


図 5 モデル毒物の容量作用曲線

研究速報  
3.2 モデル毒物の毒性評価

3.1で確立したLDL法を用いて表1に示した4種類のモデル毒物について、毒性評価を行った。まずは各毒物の容量作用曲線を図5に示す。以後図の縦軸はコントロールで規格化した値を示すものとする。図より重金属のAs<sub>2</sub>O<sub>3</sub>や農業のParaquatの場合ED<sub>50</sub>(細胞活性50%阻害濃度)で比較すると、LDL法はAP法より数桁大きい値を示しているものの、界面活性剤のSDSや農薬のTPNに対してはLDL法は遜色無い感度を示している。これは各毒物の毒性発現機序の相違によるものと考えられる。以上のことから本LDL法は急性毒性を従来法より格段に短い4時間程度で評価することができるのがわかる。

3.3 河川水の細胞毒性評価

次に実際の河川水へLDL法を応用した。まず一般的な水質指標の時間的変動(図6A, B)及びLDL法とAP法で評価した細胞毒性の時間的変動(図6C)を示す。図6CよりAP法とLDL法で評価した細胞毒性を比較すると、LDL法とAP法による結果は同じ様な細胞毒性変動を示し、LDL法はAP法に匹敵する程度に高感度の評価が可能であることがわかる。また評価時間も4時間で済むことから、LDL法はほぼ河川水の毒性変動の時定数に追従できると考えられる。また図6A, Bと比較すると一般的な水質指標とLDL法でみた細胞毒性は互いに独立した変動を示しており、細胞毒性評価に基づく水質指標は独立した新たな水質指標となる可能性を示すものと考えられる。

3.4 LDL法とAP法の比較

最後に本研究で用いたモデル毒物と河川水について、LDL法による評価結果とAP法による評価結果を比較した。図7に示す。図よりLDL法による毒性評価とAP法による毒性評価結果は物質によってかなり異なることが分かる。これは各毒物の毒性発現機序の違いによるものと考えられる。今後より多くの物質についてLDL法とAP法を比較することで、毒性評価におけるLDL法の特長と適用範囲を明らかにしていく必要があるだろう。

4. 結 論

本研究で確立したLDL法は、環境汚染物質ならびに河川水の細胞毒性を既往の方法より格段に迅速な評価が可能であることが示唆された。特に河川水の細胞毒性の時間的変動はとても大きく、その変動の時定数もわずか数時間であるがLDL法はこれに追従できる程度に迅速な評価が可能であった。

謝辞

本研究の一部は文部省科学研究費・重点領域研究、昭和シェル石油地球環境保全基金、および財団法人とうきゅう

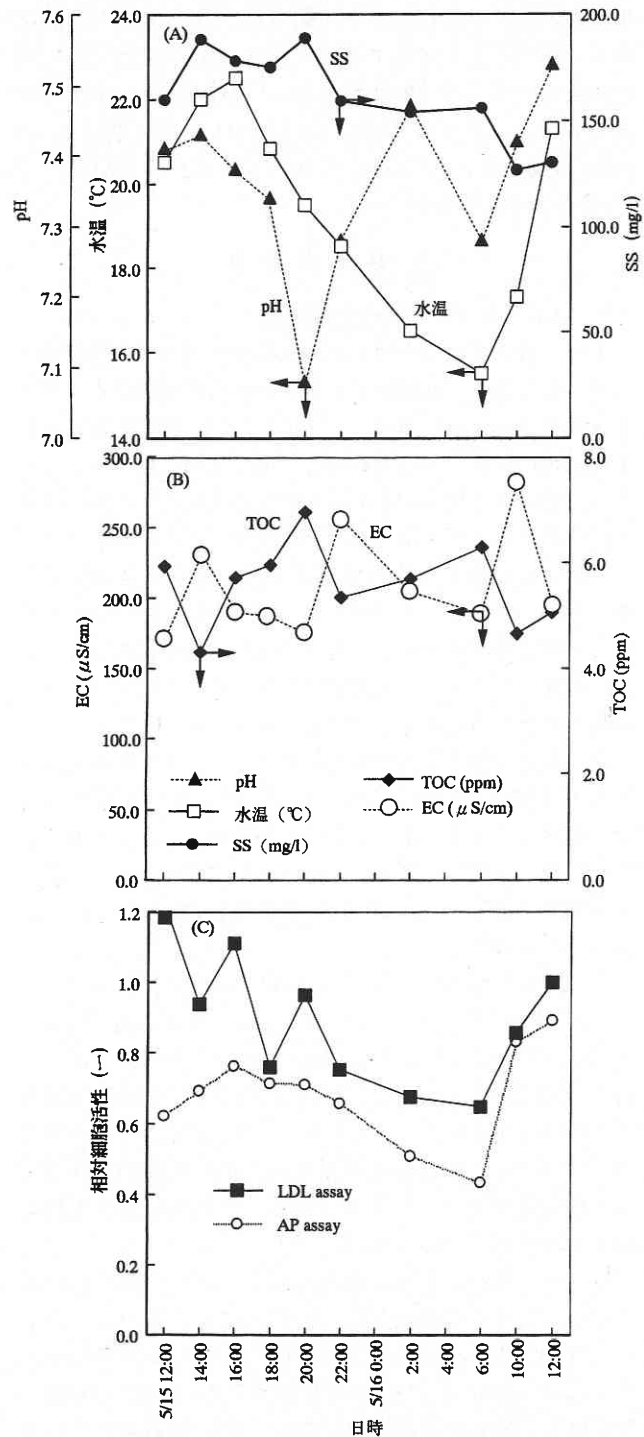


図6 河川水の水質指標と細胞毒性の時間的変動

環境浄化財団・研究助成の補助によるものである。

(1996年12月25日受理)

参 考 文 献

- 1) 鈴木基之, 酒井康行, アニテックス, **7**, 27-31 (1995).
- 2) 酒井康行ら, 生産研究, **47**, 216-219 (1995).
- 3) Suzuki, M. *et al*, Water Reseach (submitted).
- 4) Cecilia Clemenson *et al*, ATLA, **24**, 251-272 (1996).
- 5) 鈴木基之ら, 生産研究, **48**, 147-150 (1996).
- 6) Aden, D. P. *et al*, Nature, **282**, 615-616 (1979).
- 7) Robert I. *et al*, J. Biol. Chem., **266**, 18194-18199 (1991).
- 8) Weeks I. *et al*, Method in Enzymology, **133**, 366-387 (1986).
- 9) Connolly, D. T. *et al*, Anal. Biochem., **152**, 136-140 (1986).
- 10) Zouhair F. and Edna C. Y., J. of Lipid Res., **34**, 325-330 (1993).
- 11) Wang X. *et al*, AATEX, **2**, 115-156 (1993).
- 12) R. Jover. *et al*, Toxic. in Vitro, **8**, 47-54 (1994).
- 13) B. Ekwall. *et al*, Toxic. in Vitro, **4**, 688-691 (1990).

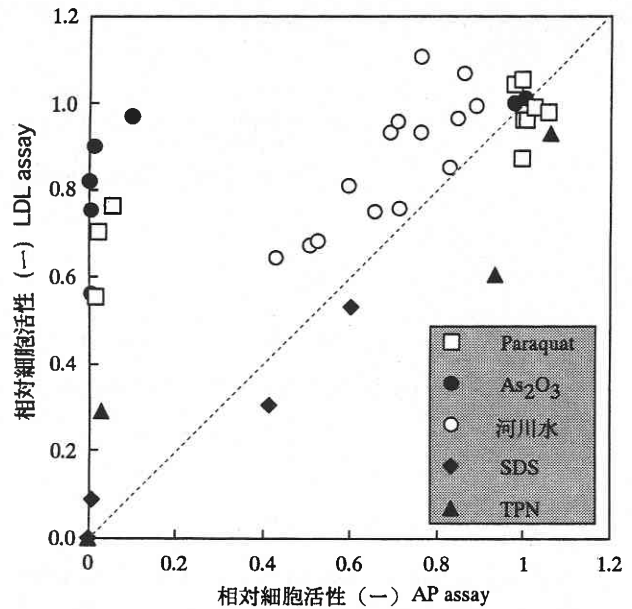


図 7 AP と LDL との比較