

## 培養神経細胞の形態変化を指標とした農薬類の毒性評価

Toxicity Evaluation of Pesticides by Morpholoical Changes of Cultured Neuroblastoma

鈴木基之\*・三島 浩\*・酒井康行\*・迫田章義\*\*

Motoyuki SUZUKI, Yutaka MISHIMA, Yasuyuki SAKAI and Akiyoshi SAKODA

### 1. はじめに

近年、我々の産業活動および生活様式の多様化はめざましく、それに伴って多種多様の化学物質が大量に産み出されている。その中には環境中に排出されて、地球環境汚染の原因となっているものもある。ことに、水道水などを通じて人体に直接悪影響を与える可能性のある水環境の汚染は重大な問題である。この水環境の悪化に対処するために、環境庁は平成5年に水質環境基準の改定を行った。それによると、水環境汚染の原因物質の一つとして農薬が注目されている<sup>1)</sup>。

近年、汚染された水の人体への影響を包括的に評価する手法として、培養動物細胞を用いた方法が検討され始めている<sup>2),3)</sup>。医学・薬学分野において通常広く用いられている細胞の増殖を指標とする毒性評価手法では、有為な差を

得るために一般に2～4日の負荷を必要とする。また、細胞数の検出には生化学反応を利用しているため、実際の結果を得るまでに負荷時間に加えて数時間を要する<sup>4)</sup>ため、迅速な毒性の検出ができない。刻々と汚染状況が変化する水環境の影響を正しく把握するためには、水質の汚染に対して迅速に応答を得ることのできる手法の確立が必須である。一方、水環境中に存在する物質は一般にごく低い濃度であるため、その急性毒性は低くても、長期的に暴露することで感受性の高い臓器に毒性を発現することも懸念されており、低濃度で毒性が検出できる感度の高さも必要とされる。

ラット副腎髄質由来細胞 (PC12) は、神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) を投与することで長い神経繊維を伸ばし<sup>5)</sup>、神経細胞に似た形をとることが特徴的である (図1)。このような形態変化は *in vitro* での神経細

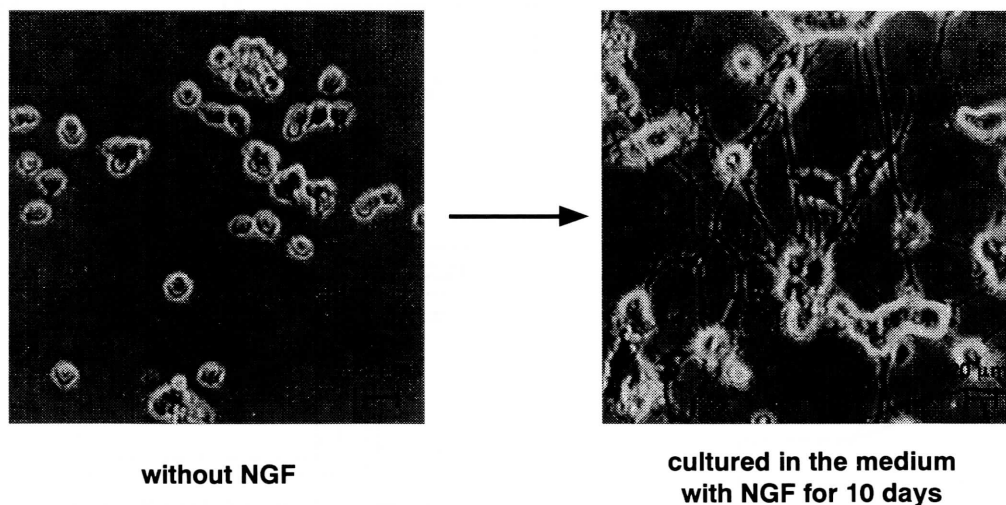


図1 PC12の神経成長因子 (NGF) 投与による神経細胞への分化

\*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

研 究 速 報 .....  
 胞の分化の指標とされており<sup>6),7)</sup>, この特異的な形態の経時変化を定量的に測定することで, 迅速な影響評価または低濃度での毒性の検出が可能となると期待される。

そこで本研究では, 神経組織に特異的な毒性を持つとされる農薬をモデル環境汚染物質として, 予め分化させた PC12 細胞に暴露した際の形態変化を, 簡便な画像取り込み・解析システムを用いて迅速かつ定量的に評価することを試み, 併せて既存の生化学反応を利用した毒性試験法 (Acid Phosphatase assay; AP assay) および他の細胞系 (ヒト肝臓ガン由来細胞 Hep G2) での結果と比較したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 培養条件

PC12 を初期密度  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で, 画像解析用として 35 mm コラーゲンコートディッシュ上に, AP assay 用として 96 穴マルチウェルプレート (0.32 cm<sup>2</sup>/well) に播種後, NGF を 50 ng/ml 含む DME 培地により, 予め 8 日間培養し神経細胞に分化させた。また神経疑似細胞 PC12 の, 神経特異毒性に対する応答の速度についての比較として, 神経系の性質を持たない細胞系である Hep G2 についても AP assay を同様に行った。その際は, 播種後約 12 時間経過させて実験に供した。

### 2.2 負荷物質について

神経毒性を有する有機リン系の農薬として dimethyl 2,2-

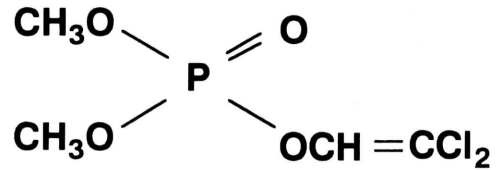


図 2 dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP) の構造式

dichlorovinyl phosphate (以下 DDVP, 図 2) を用いた<sup>8)</sup>. これを培養液中に溶解することで負荷させた。またその濃度は 100 μM, 500 μM, 1 mM, 含まない control の 4 条件で実験を行った。

### 2.3 画像解析

形態変化は図 3 の装置を用いて測定を行った。37°C・湿度 100% に保った位相差型顕微鏡のステージにサンプルを置き, 顕微鏡に取り付けられた CCD カメラを使って, コンピュータにリアルタイムで画像を取り込んだ。6 時間まで同じ位置で観察を行った。また, 解析は画像解析ソフト NIH Image (Produced by Dr. Wayne Rasband @ National Institutes of Health) を用いて計測を行った。

### 2.4 AP assay

添加した p-ニトロフェニルフォスフェイトが細胞質に存在する酸性フォスファターゼにより, 黄色の p-ニトロフェノールとなることを利用したもので, 吸光度と生細胞数が直線関係になる<sup>9)</sup>。既報に従い調製した反応基質溶液 p-ニトロフェノール/酢酸緩衝液を, 培地除去後各 well に

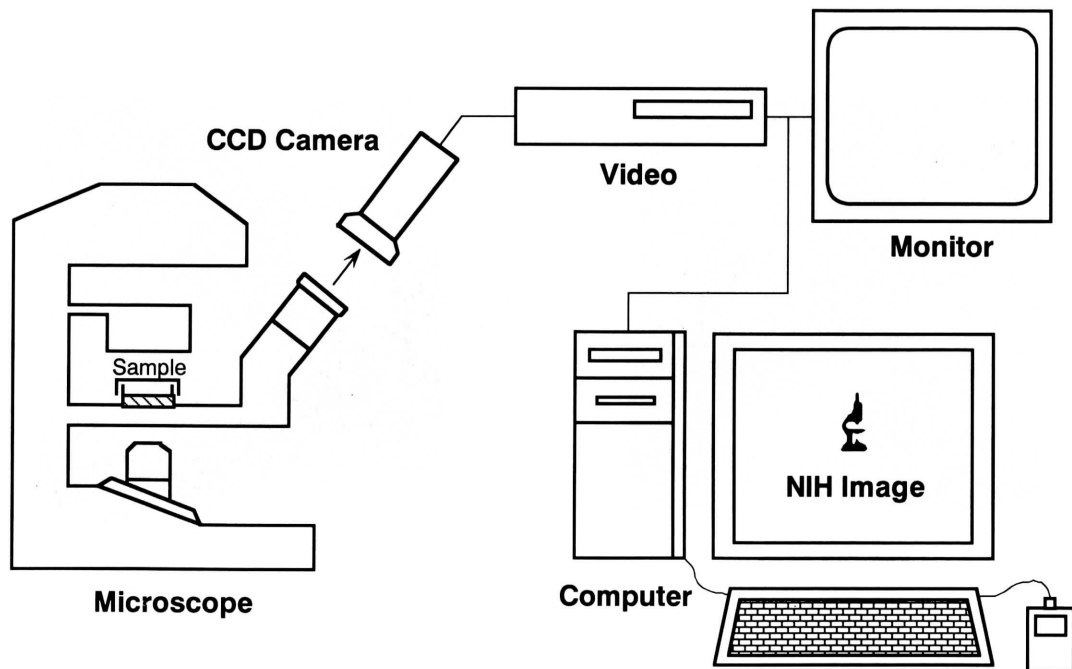


図 3 測定装置

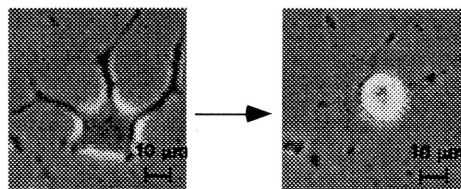


図4 DDVP 負荷による PC12 の形態変化 (1 mM)

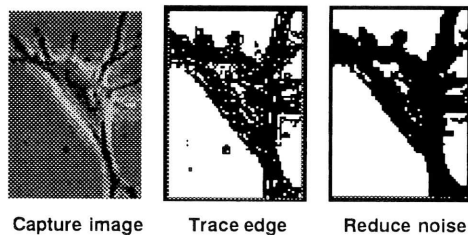


図5 細胞の面積算出過程

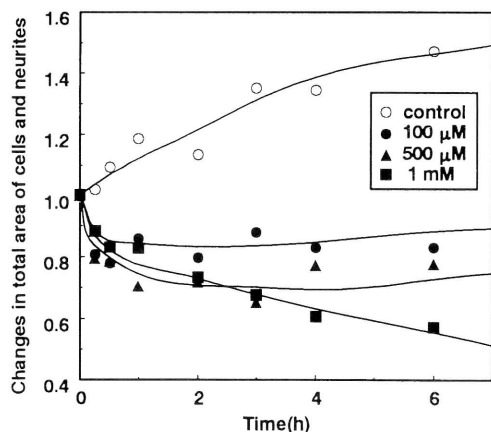


図6 神経細胞 PC12 の面積変化

100 μl 加え、37°C で 2 時間反応後、0.01 N NaOH を 100 μl 加えて発色を強め、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。データは 6 ウェルの平均値とした。

### 3. 結果と考察

図4は、1 mM の DDVP を負荷した場合の PC12 細胞の形態変化の様子である。負荷開始直後には扁平で不定形であった細胞体が、時間を経るに従って円形に収縮し、繊維が消失していくことが観察された。またその変化は、負荷時間の長さ依存するだけでなく、負荷濃度が高いほど変化が大きいことも合わせて観察された。

以上の観察結果から、この変化を定量的に測定することで毒性を評価できると考えられたので、その一例として、

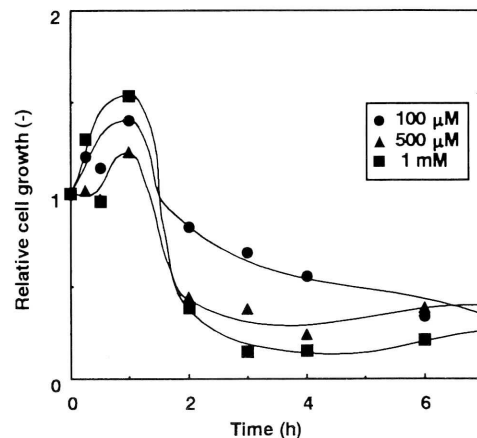


図7 神経細胞 PC12 の細胞数の変化

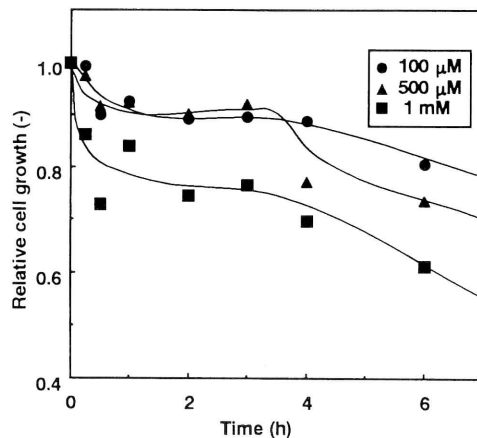


図8 非神経系細胞 HepG2 の細胞数の変化

図5のような手順で細胞体と繊維を合わせた面積を計算した。取り込んだ画像を画像解析ソフト NIH Image 上で外形線を描き (Trace Edges)、ノイズを除去し (Reduce Noise)、画像を二値化した (Threshold) のち、面積を計算させた。その経時変化を表したのが図6である。図の縦軸には細胞1個当たりの面積をとり、0時間における値に対する割合で示してある。農薬を含まない control においては繊維の伸長または細胞の進展による面積の増大がみられたが、農薬を負荷したものについては添加直後から面積が減少し始め、3時間後には濃度差による影響が観察されるようになり、それ以降は次第にその差が顕著になった。この結果より、細胞体と神経繊維の合計の面積の変化を定量的に測定することにより、毒性を評価できることが分かった。

次に形態変化との比較としての、PC12 および HepG2 の AP assay の結果はそれぞれ図7、8のようになった。どちらも DDVP に対して速やかに応答しているが、濃度

研究速報

差による影響については HepG2 が 4 時間程度の負荷を要するのに対し、PC12 は 2 時間以内で既に現れている。この結果から、神経毒性を検出するために神経組織由来細胞である PC12 を用いることの有用性が認められた。また、PC12 について形態変化と AP assay の結果を比較すると、形態変化は応答は早いですが、濃度差による影響は AP assay の方が 1 時間程度早く認められた。しかしながら、既に述べたように AP assay は測定までに 2 時間の反応時間を必要とするが、形態変化はリアルタイムで測定できるので、結果として形態変化の方が早く細胞の状態を把握することが可能であることが示された。

今回はモデル農薬として DDVP を取りあげたが、今後他種の環境汚染物質について検討を進める必要がある。一方、現在の浄水処理行程において、塩素処理・オゾン処理といった化学反応を利用したプロセスがある。化学物質の中には、オゾン処理によって分解されたために、かえって毒性が大きくなる物質が存在する。このような農薬の派生物の毒性評価に対しても応用可能であると考えている。

#### 4. 結 論

PC12 の形態変化の一指標として、細胞体と神経繊維の面積の和を取りあげ、その変化と既存の毒性評価手法、他の細胞系における結果を比較した。その結果、神経細胞の

形態変化を定量的に測定することにより、毒性を評価できることが分かった。また、DDVP を負荷物質とした場合、神経細胞の形態変化を追う本手法は、迅速な毒性評価法として有用であることが示された。

#### 謝 辞

本研究の開始に当たりアドバイスをいただいた、国立環境研究所・主任研究官の国本学博士に感謝致します。

(1996年1月8日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) 井上嘉高, 水道協会雑誌 **63**, 2-12 (1994).
- 2) 市川和洋, 内海英雄, アニテックス **7**, 5-8 (1995).
- 3) 鈴木基之, 酒井康行, アニテックス **7**, 27-31 (1995).
- 4) Martin, A. and Clynes, M., Cytotech. **11**, 49-58 (1993).
- 5) Greene, L. A. and Tischler, A. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **73**, 2424-2428 (1976).
- 6) Kunimoto, M., FEBS Lett. **357**, 217-220 (1995).
- 7) Harada, H., Morita, M. and Suketa, Y., Biochem. Biophys. Acta **1220**, 310-314 (1994).
- 8) 白須泰彦ら, 毒性試験講座 17, 地人書館, 東京; pp 81-93 (1991).
- 9) Connolly, D. T., Knight, M. B., Harakas, N. K., Witter, A. J. and Feder, J., Anal. Biochem. **152**, 136-140 (1986).