

動物細胞を用いた環境水の生体影響評価の試み

Toxicity Assessment of Environmental Water by Using Cultured Animal Cells

酒 井 康 行*・迫 田 章 義*・鈴 木 基 之*

Yasuyuki SAKAI, Akiyoshi SAKODA and Motoyuki SUZUKI

1. は じ め に

河川水や湖沼水といった環境水の一部は、所定の処理工程を経た後に水道水として人体に摂取される。これら水道原水としての環境水は、個々には低濃度ではあるがきわめて多種の化学物質によって汚染されている（不特定多様汚染）。個々の物質については、小動物での慢性毒性発現濃度の1/100程度の水質基準が定められているが、同時に多種の物質を摂取した際の影響はほとんど不明である。また、今後の化学物質数の増大を考慮すると、現行の基準指定品目種の拡大では、近い将来対応が不可能になることが予想される。そこで、水質管理手法体系の一部として、生物の活性変化というまったく新たな指標を導入することが考えられている（水環境管理のためのバイオアッセイの導入）。

水質管理に利用が予想されるいくつかのバイオアッセイのうち、哺乳類動物細胞での膜障害・増殖阻害等の一般（基底）細胞毒性（Basal Cytotoxicity）を指標としたバイオアッセイは、哺乳類細胞に共通した機構に基づく障害を検出しており、ヒトを始めとする哺乳類への毒性を対象とする場合には非常に汎用性が高いと思われる。しかもヒト急性致死毒性とある程度相関があることが示されつつある^{1)~3)}。そこで、各種リアルタイム評価が可能な手法や、広く行われている変異原性評価のための AMES 試験などとの対応を明らかにしつつ、それらと組み合わせ、水環境管理手法体系に導入する価値が高いと考えられる。

動物細胞を用いたバイオアッセイの実際の環境水評価への使用を想定すると、手法の簡便化や試料調製・負荷方法などの問題を解決することが必要である。そこで本研究では、実際の環境水を測定しながら、低倍率濃縮／哺乳類細胞負荷というバイオアッセイ手法の確立のために検討を行ったので報告する。

2. 実 験 方 法

各種毒性試験に広く使われており培養も簡単なハムスター由来細胞株 CHO-K1 またはヒト肝臓ガン由来細胞株 Hep G2 に、さまざまな環境水およびその濃縮液から培地を調製し培養、6～8 日までの増殖を測定した。この2つの細胞は、各種毒性物質に対する応答がほぼ等しいことを確かめている。結果は、差が顕著に見られる6または8日後の細胞数を相対値として示した。

環境水としては、多摩川河川水、固相抽出法による水道水濃縮物（横浜国大・高梨氏から供与）、水道水などを使用した。多摩川河川水や水道水については、必要に応じてロータリーエバポレーターにより、10倍濃縮を施した。埋立地浸出水は必要に応じて超純水（Milli-Q 水）で希釈して実験に供した。これらの試料水に90%に10倍濃縮した Ham F-12（CHO cells）または DME 培地（Hep G2 cells）を添加し、血清その他を添加して細胞に負荷した。水道水濃縮物は DMSO に溶けた状態であるため、DMSO 培地中最終濃度を0.5%とした。コントロールにも、この濃度の DMSO を添加した。

各培養日における生細胞数は、MTT（3-（4,5-dimethylthiazol-2-yl）-2,5-diphenyl tetrazolium bromide）法⁴⁾または AP（acid phosphatase）法⁵⁾によって測定した。前者は、添加した MTT が生細胞内ミトコンドリア酵素群により還元反応を受け、青色の MTT-ホルマザンとなることを利用している。また後者は、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ている。いずれも吸光度と生細胞数が直線関係となるように、原法を基本としてあらかじめ測定手法を再決定した。

MTT 法による測定の場合には、24穴マルチウェルブ

*東京大学生産技術研究所 第4部

レート ($2.0 \text{ cm}^2/\text{well}$) に, 1.0×10^4 を cells/cm^2 で細胞播種を行った. 各培養日に MTT 水溶液を負荷し4時間反応後, 酸性 iso-プロパノールで細胞を破壊し, 細胞内に蓄積された MTT-ホルマザンを抽出, その吸光度を測定した. データはすべて3ウェルの平均値とした. この場合の測定誤差は標準偏差で最大 $\pm 10\%$ 程度であった. AP法においては, 96穴マルチウェルプレートと ELISA リーダーによる簡便法を用いた. すなわち, 96穴マルチウェルプレート ($0.32 \text{ cm}^2/\text{well}$) に, 細胞を $1.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ で播種し, 各培養日に AP の基質である p-ニトロフェノール/酢酸緩衝液を添加・2時間反応後, プレートごと ELISA リーダーで吸光度を測定した. 発色を強めるため, 必要に応じて水酸化ナトリウム水溶液を添加し, pH をシフトさせた. 1 データの測定は, 6 ウェルの平均値とした. この場合の

誤差は, 標準偏差で最大 $\pm 10\%$ 以内であった.

3. 結 果

3.1 多摩川河川水の評価

1993年6月と12月, 1994年9月と12月にサンプリングを行い, 評価試験を行った結果を図1に示す. 最上流の羽村のサンプルはどの時期においてもほぼコントロールの Milli-Q 水と同じ増殖を示したが, 日野橋から丸子橋までの中下流域のサンプルには増殖阻害が見られることが多かった. しかし, 増殖阻害は単純に下流に行くにつれて強まるわけではなかった. 汚染源からの毒性物質が, 流下に伴い河川の自然浄化能によってある程度無毒化されたためであると考えられる. 季節に着目すると, 6・8月の方が9・12月に比べて汚染が強いことがわかる. どの地点でも

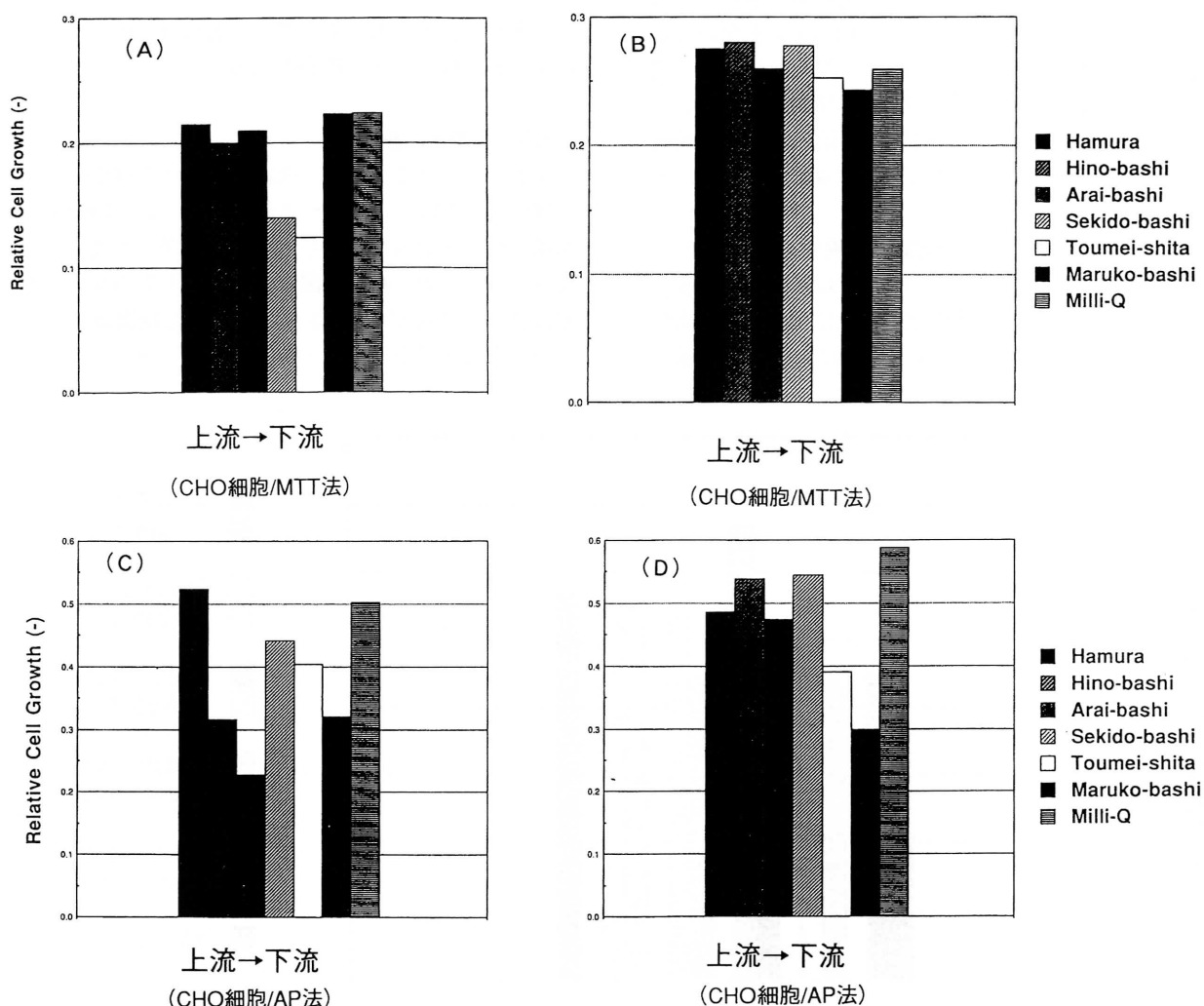


図1 多摩川河川水の細胞毒性.

(A): 1993年8月, (B): 1993年12月, (C): 1994年6月, (D): 1994年9月.

研 究 速 報

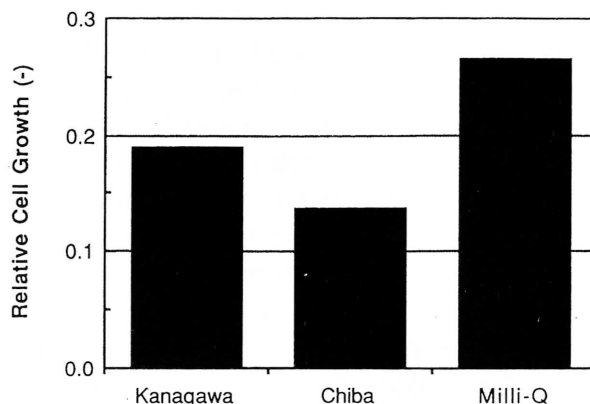
増殖阻害が見られなかった1993年12月のサンプルについては10倍濃縮を行っても増殖阻害が検出されなかった（データは示していない）。河川の自然浄化能は、冬季には夏季に比較して低下しているので、夏季の河川への毒性物質負荷は、自然浄化能に比較してかなり大きな量であると考えられ、農薬の影響が疑われる。

河川水については、それ自身の溶存化合物による培養液への浸透圧増大に及ぼす影響から、ほぼすべてのサンプル成分を濃縮する本手法では、10倍程度の濃縮が限界となる。季節を通じて本手法での評価を継続するためには、今後1倍と10倍のサンプルを同時に評価していく必要がある。

3.2 水道水固相抽出物の評価

サンプルは、水道水を Sep pack カートリッジに通水し DMSO に溶解するという、いわゆる固相抽出を行ったものである⁶⁾。コントロールとしての Mill-Q 水を含めて培地中の DMSO の最終濃度は 0.5% とした。神奈川・千葉サンプルは、それぞれ 1,000 倍・500 倍体積からの抽出物であるので、結果的にそれぞれ 5 倍・2.5 倍の水道水を細胞に接触させたことになる。この 2 サンプルについての評価結果を図 2 に示す。

神奈川・千葉サンプルの AMES 試験での変異原性は 900・9,100 net revertants/L で、それぞれほぼ全国の水道水サンプル中最大値および検出下限付近に相当する（高梨氏私信）。神奈川・千葉の両サンプル共に増殖阻害を示し



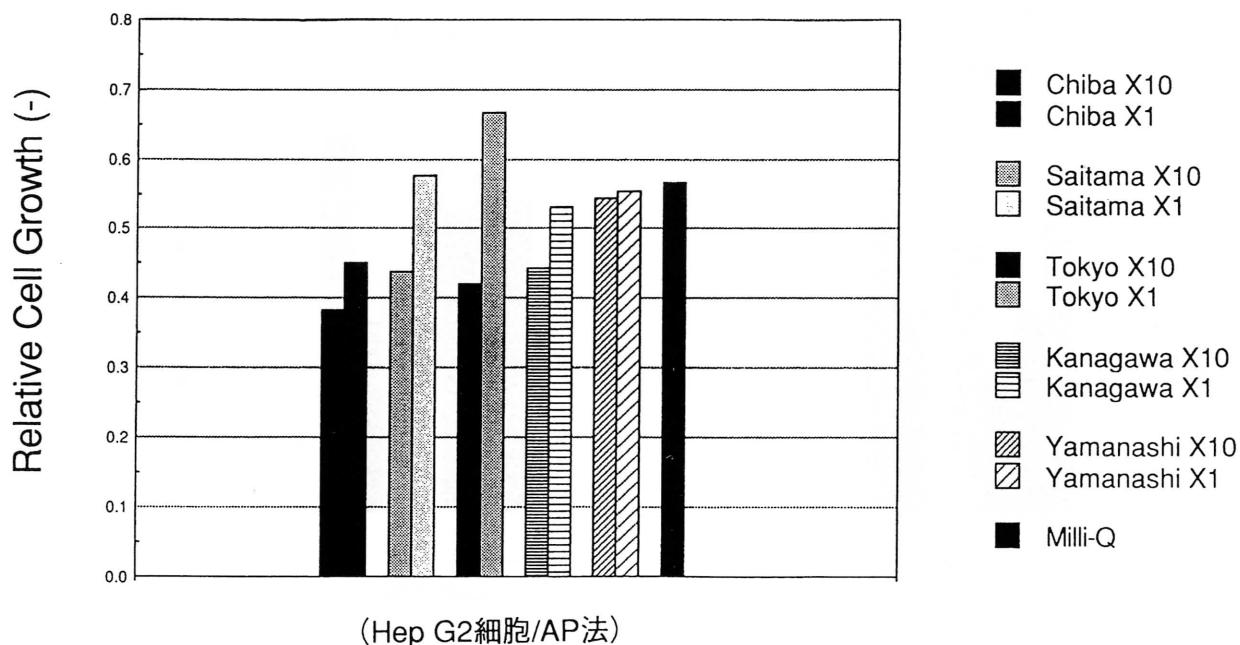
(CHO細胞/AP法)

図 2 水道水抽出物の細胞毒性.

たことから、水道水中の変異原性物質は、細胞への一般毒性を合わせ持つことが推察される。

3.3 水道水の評価

3.2 で水道水について、理論的には10倍程度の濃縮負荷で増殖阻害が起こることが予想されたため、1994年9月に関東近県の水道水を採取し、1・10倍濃縮の後、一般細胞毒性を検討した。結果を図 3 に示す。山梨のサンプルでは、濃縮倍率によらず Milli-Q 水とほぼ同じ細胞増殖がみられたが、千葉・埼玉・東京・神奈川のサンプルについては、



(Hep G2細胞/AP法)

図 3 水道水およびその濃縮物の細胞毒性.

いずれも10倍の濃縮により Mill-Q 水に比べて細胞増殖が悪化した。今回はこれ以上の濃縮倍率サンプルの評価は試みていないが、水道水由来の溶存化合物による培地の浸透圧増大はわずかであるため、本手法で100倍程度の濃縮負荷が可能である。より明確な結論のためには、今後水道水については、1倍・10倍・100倍での評価を平行して行う必要がある。

4. 考 察

各種バイオアッセイによる環境水評価における解決すべき最大の課題は、得られた結果から、合理的かつ科学的根拠に基づいて、人体での長期健康障害リスクの評価を行うことである。

ここで用いた一般細胞毒性による評価は、人体の急性致死血中濃度との直接的な比較により、ある程度の相関が存在することが確かめられつつある^{1)~3)}。

中下流河川水などの汚染の進んだ環境水サンプルについては、1倍の負荷で毒性が検出された。すなわち、毒物がそのままの濃度でヒト血液中に存在するという場合には、ヒトに対する急性致死毒性が無視できないといえる。しかしながら、人体が直接摂取する水道水などの評価で最終的に求められるのは、ほぼヒト生涯にわたる長期リスクの評価である。

ここで用いている一般細胞毒性評価法においては、亜急性相当期間に達する負荷実験が技術的な問題から限界である。この期間内に毒性を検出するためには、何らかのサンプルの濃縮が必要となる。したがって、濃縮操作が評価期間の伸長にどのように対応するのか、という点を明らかにする必要がある。たとえば、水試料を一桁濃縮してバイオアッセイに用いることが、1週間のアッセイの結果を10週間での毒性とみなすことが出来るのか、ということである。この対応が実際の環境水試料について明らかにできれば、培養系での負荷実験が可能な期間における毒性発現過程を定量的に把握・記述し、適当な仮定をおくことにより、実験の不可能なより長期間のリスク評価がある程度可能となると思われる。さらには、生体臓器の特異機能を保持した細胞を用いることにより、細胞の生死ではなくより高度な臓器機能への障害を指標とした評価も可能となろう。もちろん、現行水質指標の基礎となっている小動物の慢性毒性

発現濃度との関連は、明らかにしておく必要がある。

5. 結 論

温和な方法によって低倍率濃縮した試料水を動物細胞に添加するというバイオアッセイ手法により環境水の総合的な毒性評価が可能であることが示された。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究費・重点領域研究（人間地球系、課題番号06271223）の補助によるものである。実験を補助して下さった丸山恵美さん（東京理科大学理学部、現（株）荏原ユーザライト）、庄司良さん（東京理科大学工学部）に感謝する。水道水固相抽出物は、横浜国大・浦野研究室・高梨氏にご供与いただいた。また動物細胞の評価系によるヒトでの毒性予測に関する最新の知見は、国立環境研究所・環境保健部の国本学博士にご教示いただいた。以上、感謝申し上げます。（1994年12月8日受理）

参 考 文 献

- 1) C. Clemedson *et al.*: MEIC evaluation of acute systemic toxicity for the first 30 reference chemicals: Part I. Methodology of the 68 in vitro toxicity assays. ATLA, in press.
- 2) C. Clemedson *et al.*: Meic evaluation of acute systemic toxicity for the first 30 reference chemicals: Part II. In vitro results from 68 methods and a comparative cytotoxicity analysis. ATLA, in press.
- 3) R. Jover *et al.*: Acute cytotoxicity of ten chemicals in human and rat cultured hepatocytes and in cell lines: Correlation between in vitro data and human lethal concentrations., *Toxicol. in Vitro*, **8**, 47 (1994).
- 4) T. Mosmann: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
- 5) D. T. Connolly *et al.*: Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay, *Anal. Biochem.*, **152**, 136 (1986).
- 6) 浦野紘平ら：水道水の AMES 試験に関する研究 第1報 変異原性物質濃縮回収用の吸着剤，水環境学会誌，**17**，451 (1994)。
- 7) 鈴木基之，酒井康行：工学からみたバイオアッセイの課題，アニテックス，**7**，27 (1995)。