

# 多摩川河川水の 細胞毒性・遺伝毒性の調査

1996年

内海英雄

九州大学薬学部教授

# 目 次

はじめに .....	1
1. 多摩川河川水の毒性評価試験 .....	1
1・1 実験方法 .....	1
1・2 結果及び考察 .....	2
2. 河川水中有害物質の毒性機序の解析 .....	3
2・1 実験方法 .....	4
2・2 結果及び考察 .....	4
ま と め .....	5
関 連 文 献 .....	6

## 研究組織

代表研究者	内 海 英 雄 (九州大学薬学部 教授)
共同研究者	市 川 和 洋 (九州大学薬学部 助手)
	鄭 然 孫 (九州大学薬学部 大学院生)
	鈴 木 基 之 (東京大学生産技術研究所 教授)
	酒 井 康 行 (東京大学生産技術研究所 助手)

## はじめに

「水」は我々の生活と密着した関係にあり、外観的アメニティーに加えて水質の安全性の維持・向上が常に求められてきた。環境中に存在する膨大な物質種の中で、安全性評価がなされているものは一部に過ぎない。また、生物学的代謝、物理・化学的な変換等により毒性を示す物質もあり、様々な変換を受け環境中での最終的な存在形態が必ずしも特定できない。したがって、水環境においてはこれら微量有害化学物質に対してもBOD、CODあるいは大腸菌群のような何らかの総合的評価手法が必要となっている。

生物応答による評価（バイオアッセイ）は、さまざまな物質群の影響全体を評価することが可能であるため総合評価手法として有用と考えられる。水環境においてもエームス試験による変異原性試験が行われるようになってきた。しかし、一方で化学物質の毒性は、代謝活性等の違いのため試験に用いる動物種により大きく異なることが知られている。そこで、ヒトへの健康影響を指向する場合にはよりヒトに近い毒物感受性を持つ動物種あるいは生物系を用いた評価法が有用となる。そのひとつとしてより高等生物由来の細胞（例えば、哺乳動物細胞）を用いることが挙げられる。ヒトへの健康影響を指向する場合には、哺乳動物由来細胞を用いる毒性試験はバクテリア等による評価と比較し、明らかに信頼性およびヒトへの近似性が高く、水環境への適用が期待される。

そこで、本研究では医薬品の評価に用いられている哺乳動物由来培養細胞を用いた小核形成試験による遺伝毒性試験、及びコロニー形成阻害試験による細胞毒性試験を多摩川の河川水試料に適用した。また、従来から行われてきたエームス試験による変異原性試験と比較することで、ヒトへの影響評価を指向した水環境における哺乳類動物細胞による毒性評価の有用性を明らかにすることを目的とした。

## 1. 多摩川河川水の毒性評価試験

### 1.1 実験方法

遺伝毒性、細胞毒性試験には哺乳動物由来細胞株chinese hamster lung (CHL)を用

いた。細胞毒性についてはコロニー形成阻害試験により、また遺伝毒性については*in vitro*小核試験およびAmes Salmonella test (TA-98)によって検討した。図1に両試験法の特長をまとめた。コロニー形成阻害試験は、ATP合成・蛋白合成・遺伝子の複製等のすべての細胞機能の結果として現されるため、そのいずれの段階における損傷に対しても阻害を確認することができる。すなわち、正常にコロニーが形成される場合は細胞機能が総合的に正常に維持されている事に相当し、水環境中に存在する物質群の毒性発現部位・機構が多岐にわたることを考慮すると、広範囲の適用が可能な評価方法の一つと考えられた。また、遺伝毒性・変異原性を評価する手法は数多くあり、Ames testsの様なバクテリアを用いる試験の他に哺乳動物細胞を用いたDNA鎖切断や遺伝子突然変異試験、染色体異常試験がある。しかし、染色体異常試験は結果の判定に経験を要することなどの問題点があるのに対し、小核試験は染色体異常に由来する小核を計測するもので簡便に行うことができる。また、個体を用いる小核試験と異なり、*in vitro*小核試験は簡便且つ再現性が高いことが知られている。

試料原水は、東京都の水道水源である多摩川の数地点（図2）で河川水を10～20リットル採水した。浮遊物質を除去後、CP-800カラムにより溶存物質を回収した。カラム吸着物質はメタノールで脱離させて回収した（図3）。この抽出濃縮した試料について各試験法により調査し、結果を比較した。

また、コロニー形成阻害試験・*in vitro*小核試験の特性を明らかにするため、既知有害化学物質に対しても両試験を行った。用いた化学物質は塩素化有機物質を中心として選択した（表1）。

## 1.2 結果及び考察

上流の羽村堰では小核試験とコロニー形成阻害試験共に低い値が得られ、遺伝毒性・細胞毒性ともに低いことが示唆された（図4）。また支流の新井橋及び下流の丸子橋では、用量依存的に遺伝毒性が認められ、これらの地点では遺伝毒性物質が含まれていることが示唆された。日野橋では用量依存的に細胞毒性の増加が認められた。しかし、細

胞毒性及び遺伝毒性には有為な相関性は認められなかった。in vitro小核試験とAmes試験の比較では、類似の傾向を示す地点も見られたが必ずしも両手法に相関性は認められなかった（図5）。

図6に陽性対照物質として用いたMitomycin C量に換算した多摩川各地点の遺伝毒性をまとめた。上流の羽村堰では遺伝毒性はほとんど認められなかった。一方、支流の新井橋では最も高い値が得られ、また日野橋及び丸子橋でも高い値が得られたことから、多摩川の河川水中には遺伝毒性物質が含まれていることが示唆された。最も汚染度が高いといわれる関戸橋においては、通常水質評価に用いられている化学的評価指標では高い値を示しているにも関わらず（図1）、遺伝毒性は低い値が得られたことは興味深い。これらの結果は、評価系やエンドポイントの違い等により応答する化学物質種や感受性が異なる可能性を示唆しており、複数の評価方法により毒性評価を行う必要性を示している。

また、表1に示した化学物質からそれぞれ遺伝毒性・細胞毒性が検知され、この評価手法は有害物質の毒性評価に有用であることが示唆された（図2）。得られた毒性の強さは表1の個体を用いた場合の毒性値とは相関しないが、個体では吸収や組織への分布等があるが培養細胞の場合には直接作用することがその一因と考えられる。

## 2 河川水中有害物質の毒性機序の解析

近年環境水中の有害汚染物質の毒性発現にラジカル反応が関与していることが明らかとなってきた。また、ラジカル反応は生体においては炎症、発癌等のような現代病に深く関わっており、フリーラジカルの代謝には生体内レドックス反応が関係し、生体の恒常性維持、病態発現に大きな役割を果たしていると考えられている。

そこで、水環境中に存在する数種の塩素化フェノール類をモデル化合物とし、哺乳動物由来細胞を用いたin vitro小核試験による遺伝毒性評価を行った。その毒性発現にラジカル反応が関与しているか否かを検討し、水中有害物質の毒性発現機序の解析手法の

確立を目的とした。

## 2.1 実験方法

細胞系は、ヒト子宮頸部癌細胞（HeLa細胞）を用いた。またHeLa細胞を親株として用い、薬物耐性遺伝子導入株、カタラーゼ遺伝子、SOD遺伝子などの抗酸化系酵素導入株を用いた。また、外因性抗酸化剤（ラジカル消去剤）として、ジメチルチオ尿素、マンニトール、グルタチオン、SOD等を用いた。塩素化フェノール類は最終濃度が1mMになるように添加し、S9mix添加により代謝活性化を行った。1時間培養した後、培地交換により塩素化フェノールを取り除き、更に24時間培養し小核試験を行った（図7）。

## 2.2 結果及び考察

添加した塩素化フェノール類は細胞外でS9 mixによる代謝を受け、代謝物及び副産物を生じ遺伝毒性を発現する経路が考えられる（図8）。その遺伝毒性に活性酸素等が関与している場合、外因性の抗酸化剤の添加により遺伝毒性が抑制される。また、塩素化フェノール類は脂溶性が高く容易に細胞内に移行するため、他の経路として細胞内に移行した塩素化フェノールが直接作用する経路、及び細胞内で代謝を受けて、その代謝産物及び副産物により遺伝毒性を発現することが考えられた。この場合も、活性酸素等が遺伝毒性に関与している場合には、抗酸化酵素遺伝子導入株では遺伝毒性が抑制されることが考えられた。

2,4,6-trichlorophenolによるHeLa細胞（親株）での小核形成はS9mix添加により3倍程度増大し、この増大はマンニトール、グルタチオン、カタラーゼにより有意に抑制された（図9）。またカタラーゼ遺伝子導入株及びカタラーゼ/SOD遺伝子導入株で有意に小核形成が抑制され、その抑制効果はカタラーゼ阻害剤の3-aminotriazole添加により失われた（図10）。また、2,6-dichlorophenolにおいてはジメチルチオ尿素、マンニトール、グルタチオン、カタラーゼにより小核形成が抑制された。また、カタラーゼ遺伝子導入株及びカタラーゼ/SOD遺伝子導入株で有意に小核形成が抑制され（図11）、

その抑制効果はカタラーゼ阻害剤の3-aminotriazole添加により失われた(図12)。2,4,6-trichlorophenol及び2,6-dichlorophenolでは、抗酸化剤による小核形成の抑制には類似の傾向が認められたが、抗酸化剤の種類は若干異なっていた。

細胞膜を通過しないヒドロキシルラジカルの消去剤のマニトール等により小核形成が抑制されたことは現時点では説明が付かないが、以上の結果から塩素化フェノール類の遺伝毒性発現には、その直接作用よりも代謝過程で生成する $O_2^-$ や $H_2O_2$ が関与している可能性が示唆された(図13)。また、抗酸化剤・抗酸化系酵素の作用は塩素化フェノール間で異なったことから、その置換位置によって毒性発現機序が異なることが示唆された。

今回用いたモデル化合物は環境水中に含まれる可能性があり、その遺伝毒性にラジカル反応が関与していることが示唆された。従って、水質評価においてもラジカル反応への関与を定量的に評価することが今後益々重要になっていくものと考えられ、本手法が河川水の安全性評価に有効な評価手法となる可能性が示唆された。

## まとめ

本研究では、哺乳動物由来培養細胞を用いた小核形成試験による遺伝毒性試験、及びコロニー形成阻害試験による細胞毒性試験を多摩川の河川水試料に適用し、遺伝毒性・細胞毒性物質が含まれていることを明らかにした。また、塩素化フェノール類をモデル毒物として、その毒性発現機序を抗酸化酵素遺伝子導入細胞株を用いて解析し、塩素化フェノール類の遺伝毒性に代謝過程で生じる活性酸素種が関与していることを明らかにした。

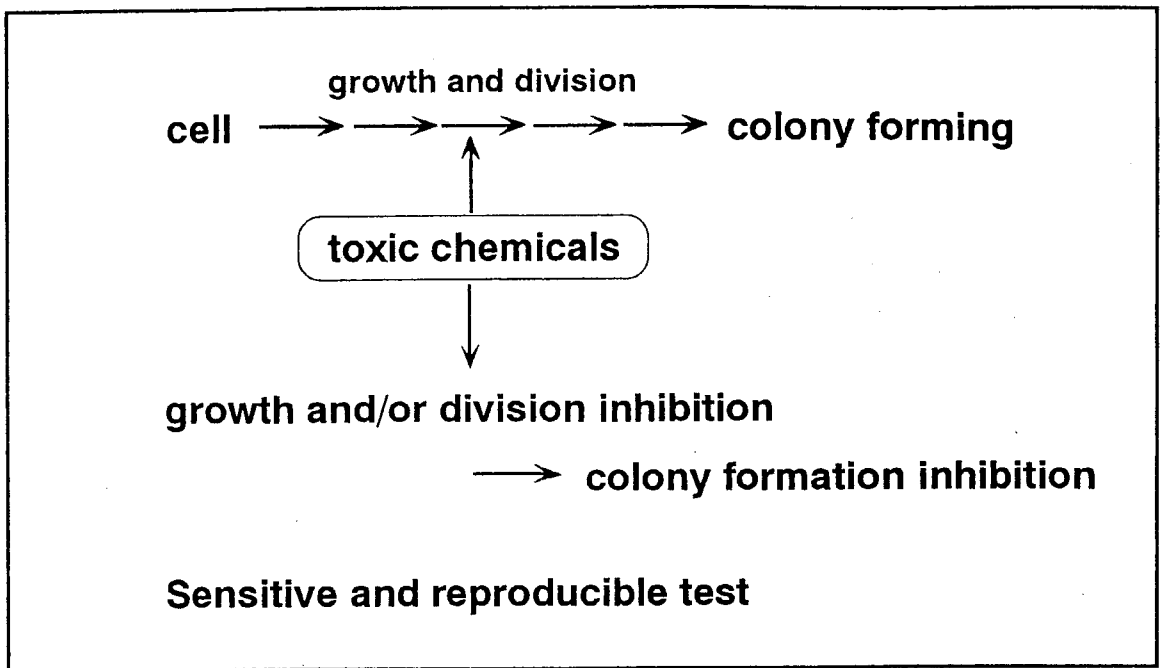
動物培養細胞を用いる手法は、簡便且つ機序の解析が可能な点で極めて有用であるが、同時にin vivoとは様々な点で異なるために適用の限界がある。また、化学物質の毒性発現機序も多種にわたるため、各バイオアッセイ法の適用可能範囲を正しく認識したうえで、複数の評価系を組み合わせた形での利用が重要になると考えられる。

## 関連文献

- 1) Micronucleus in vitro assay to micropollutants in river water, Youn-Son Chung, Kazuhiro Ichikawa and Hideo Utsumi, Proc. 5th I.A.W.Q. Asian Regional Conference on Water Quality and Pollution Control, Manila, Philippines(1995)
- 2) Hideo Utsumi, Masafumi Hakoda, Satoko Shimbara, Hiroaki Nagaoka, and Akira Hamada: Active Oxygen Species Generated during Chlorination and Ozonation; Water Sci. Tech., **30**(9), 91-99 (1994)
- 3) Hideo Utsumi, Koji Kiyoshige, et al.: Comparative Studies on Cytotoxicity of Micropollutants in Water. -Principle of Cytotoxicity Matrix-, Environ. Toxicol. Water Quality, **9**, 333-339 (1994)
- 4) 市川和洋, 内海英雄: 細胞毒性試験による水環境の評価: アニテックス, **7**(1): 5-8, 研成社, 1995
- 5) 市川和洋, 内海英雄: 培養細胞を用いた水質評価法: ファルマシア, **31**(3): 284-286, 日本薬学会, 1995
- 6) 平成7年度科学研究費補助金(総合研究A)研究成果報告書  
「新水処理技術群の総合的評価手法に関する研究」  
(研究代表者: 大垣眞一郎、分担研究者: 内海英雄)



a) colony Formation Inhibition Test



b) *in vitro* micronucleus test

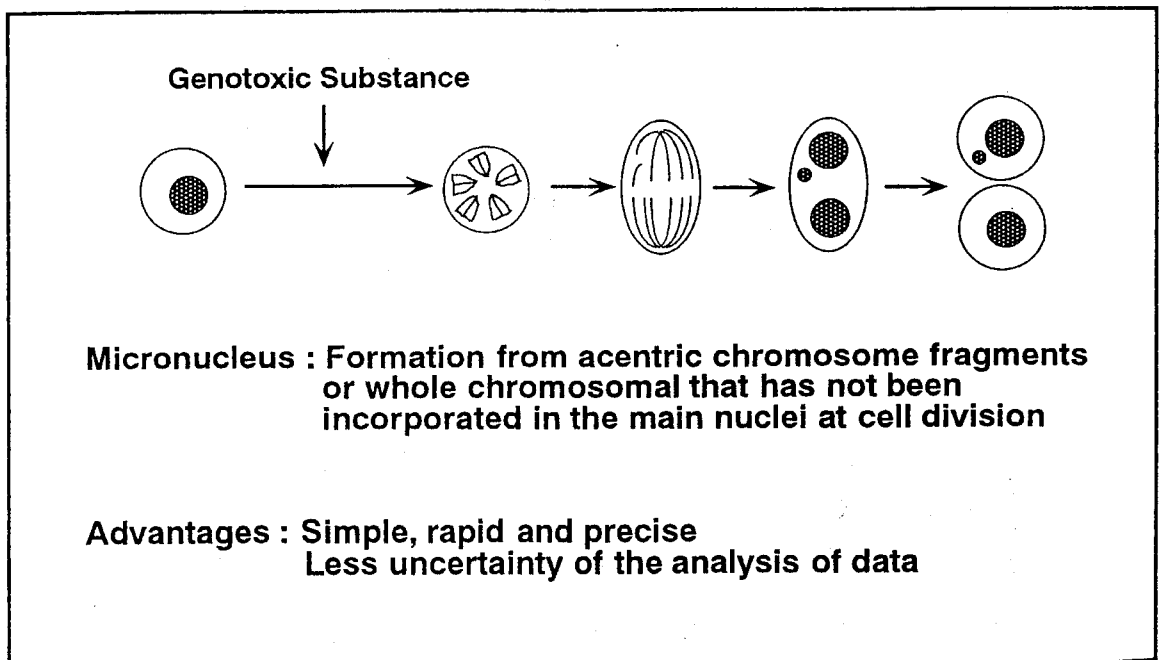


Fig.1 Characteris of Bioassays used in this study

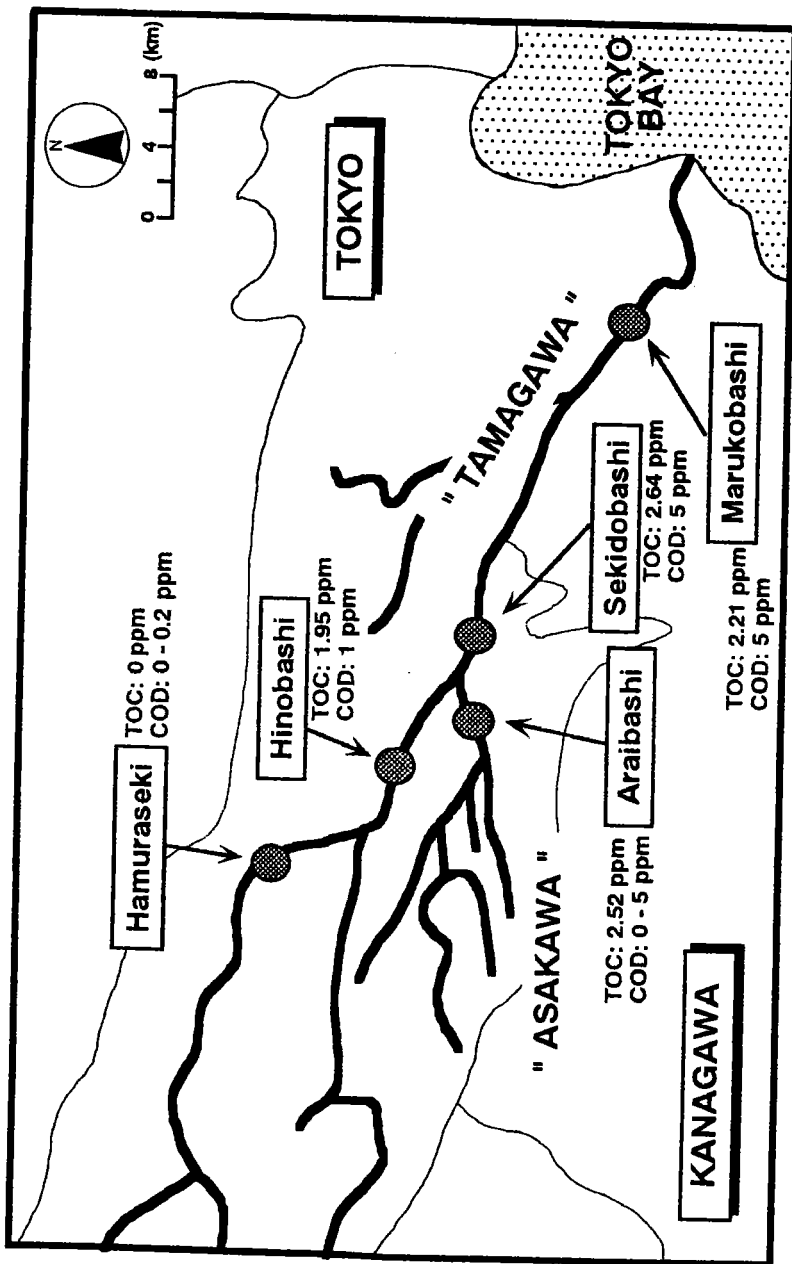
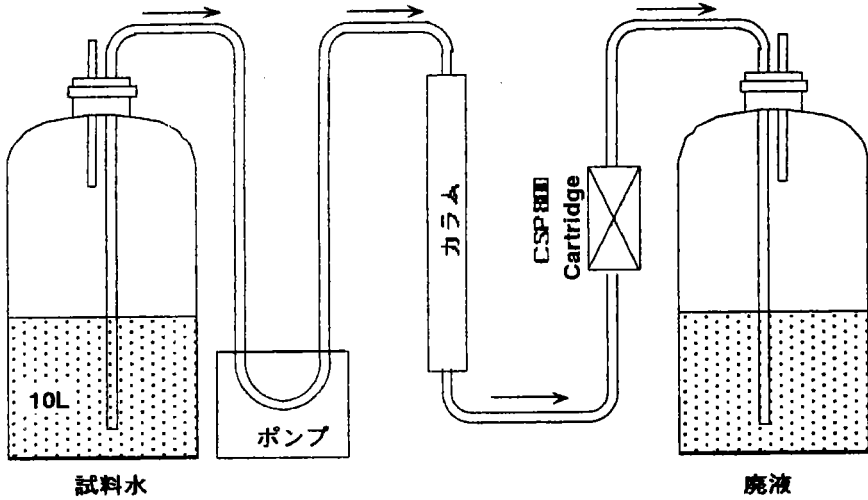


Fig.2 Map of sampling stations in Tamagawa

## 濃縮プロセス



## 脱離操作

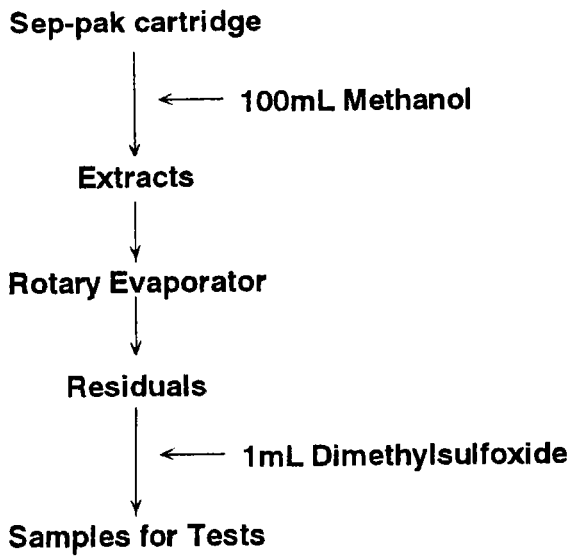
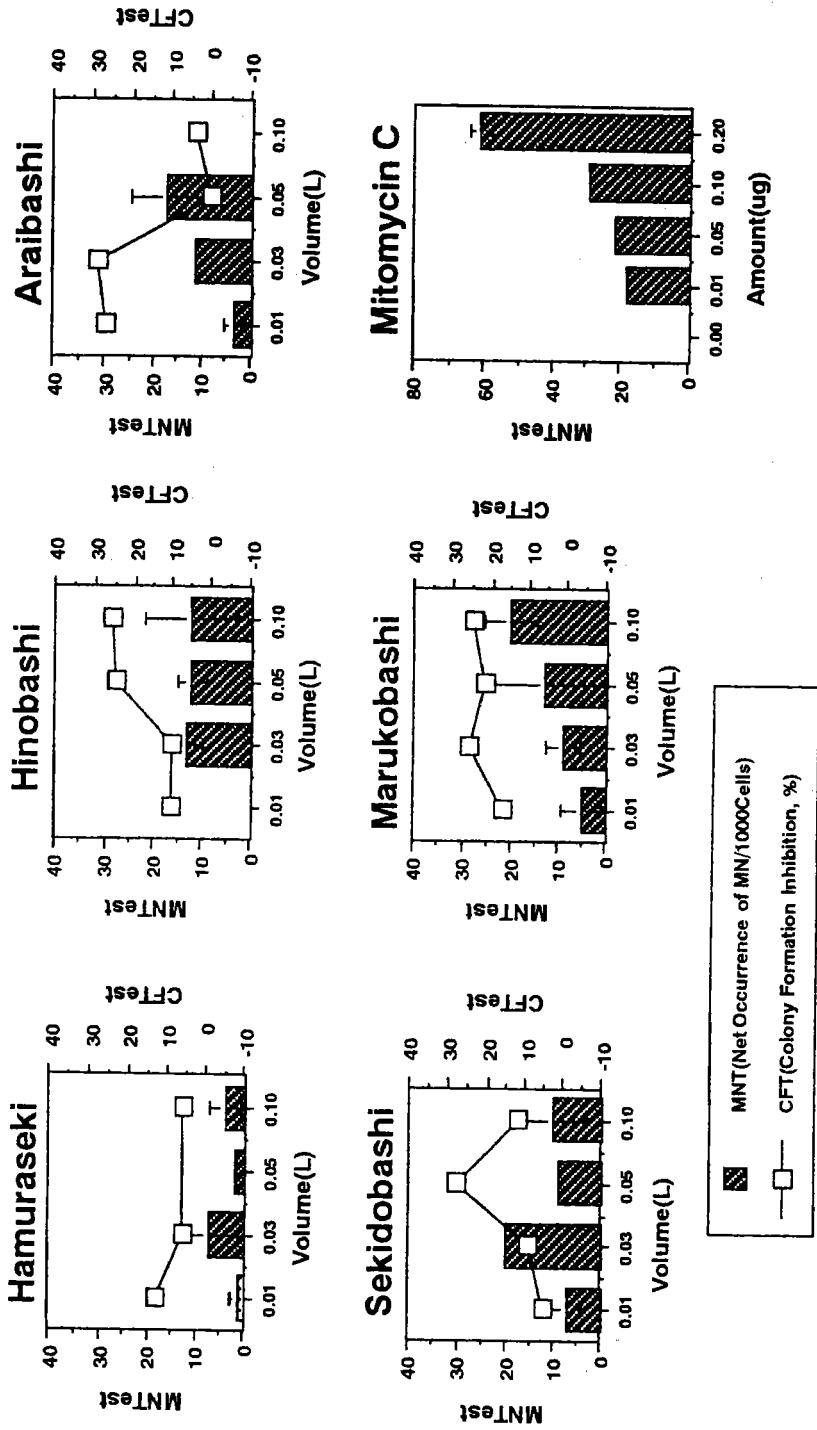
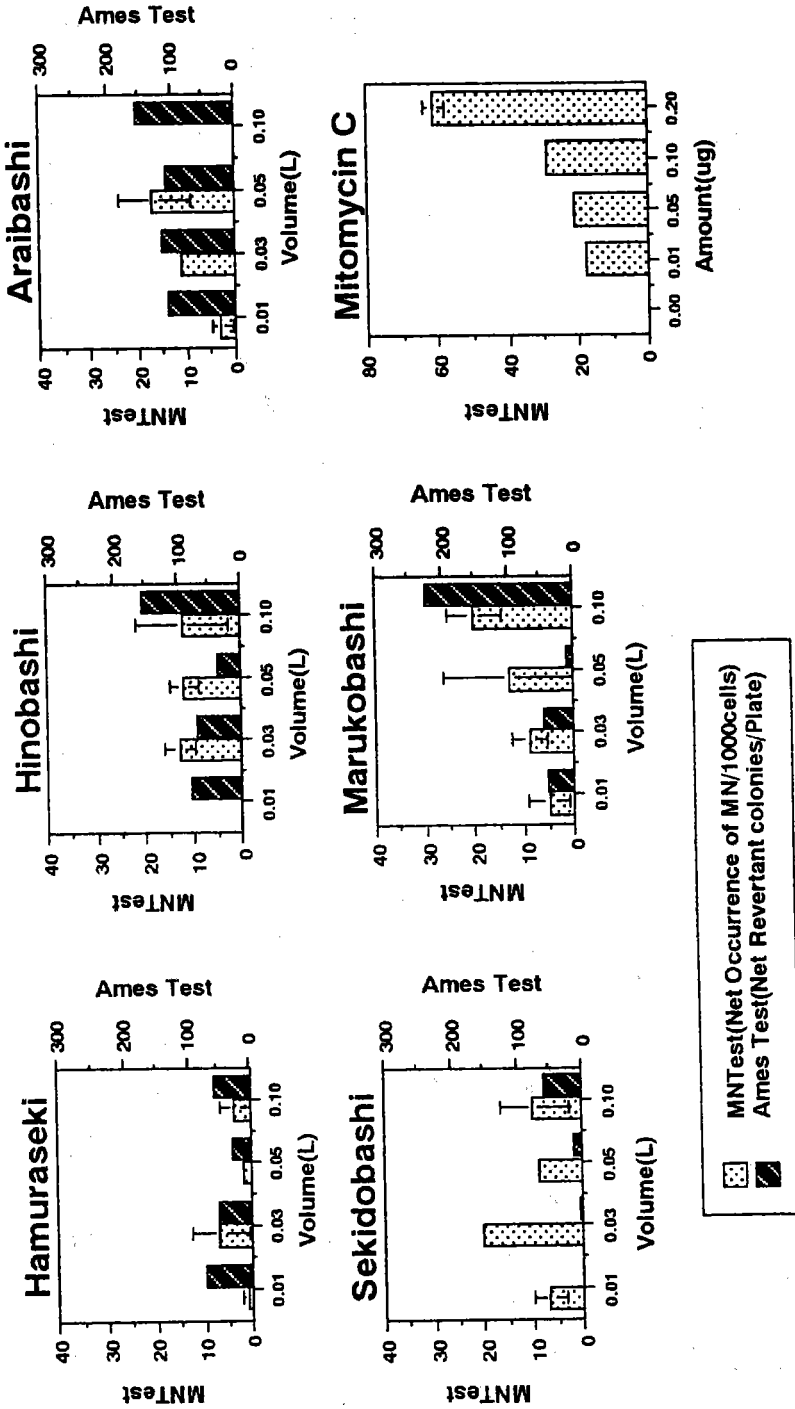


Fig.3 水中有機物の回収操作



**Fig.4 Comparison of MNT and CFT for Water Samples**



**Fig.5 Comparison of MNTtest and Ames Test for Water Samples**

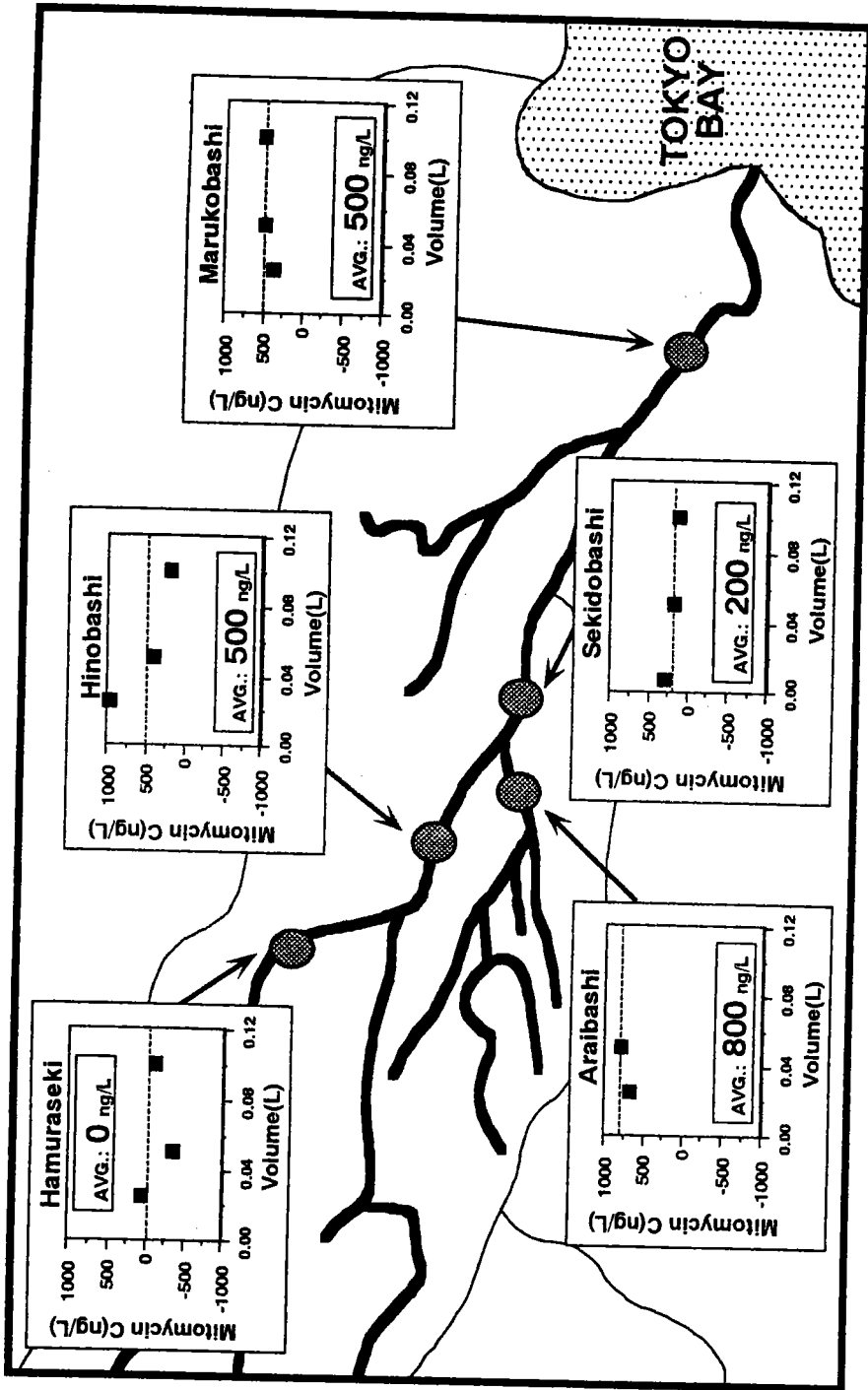


Fig.6 Genotoxicity of water samples from Tamagawa

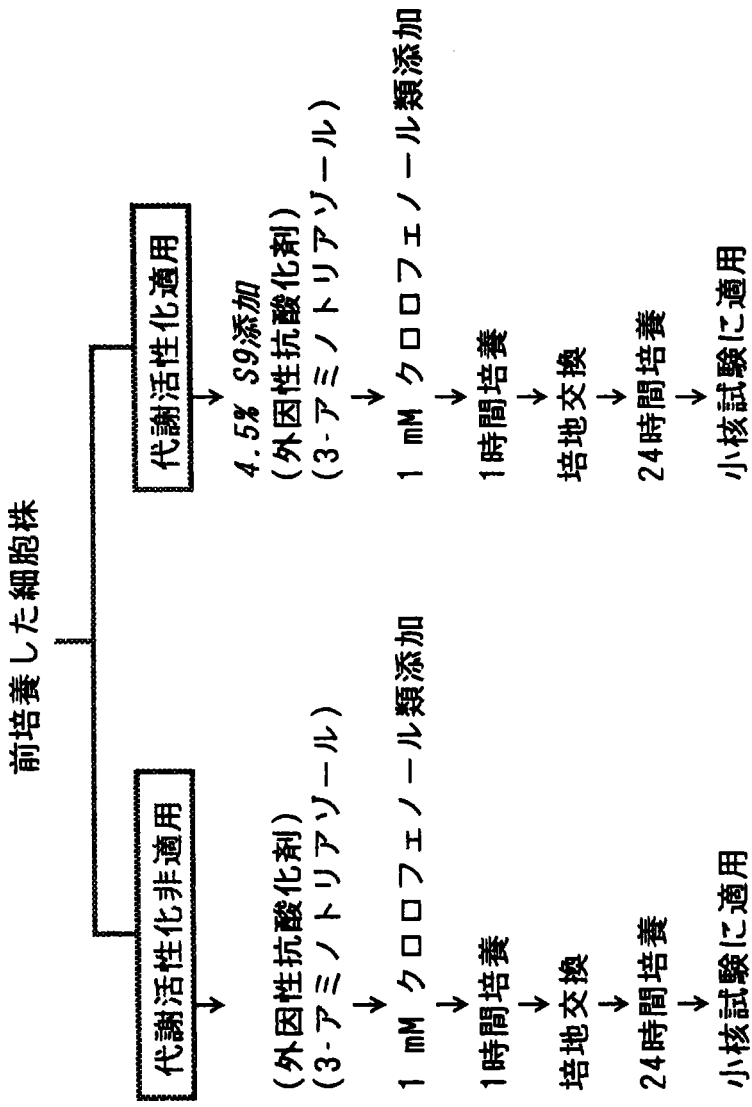
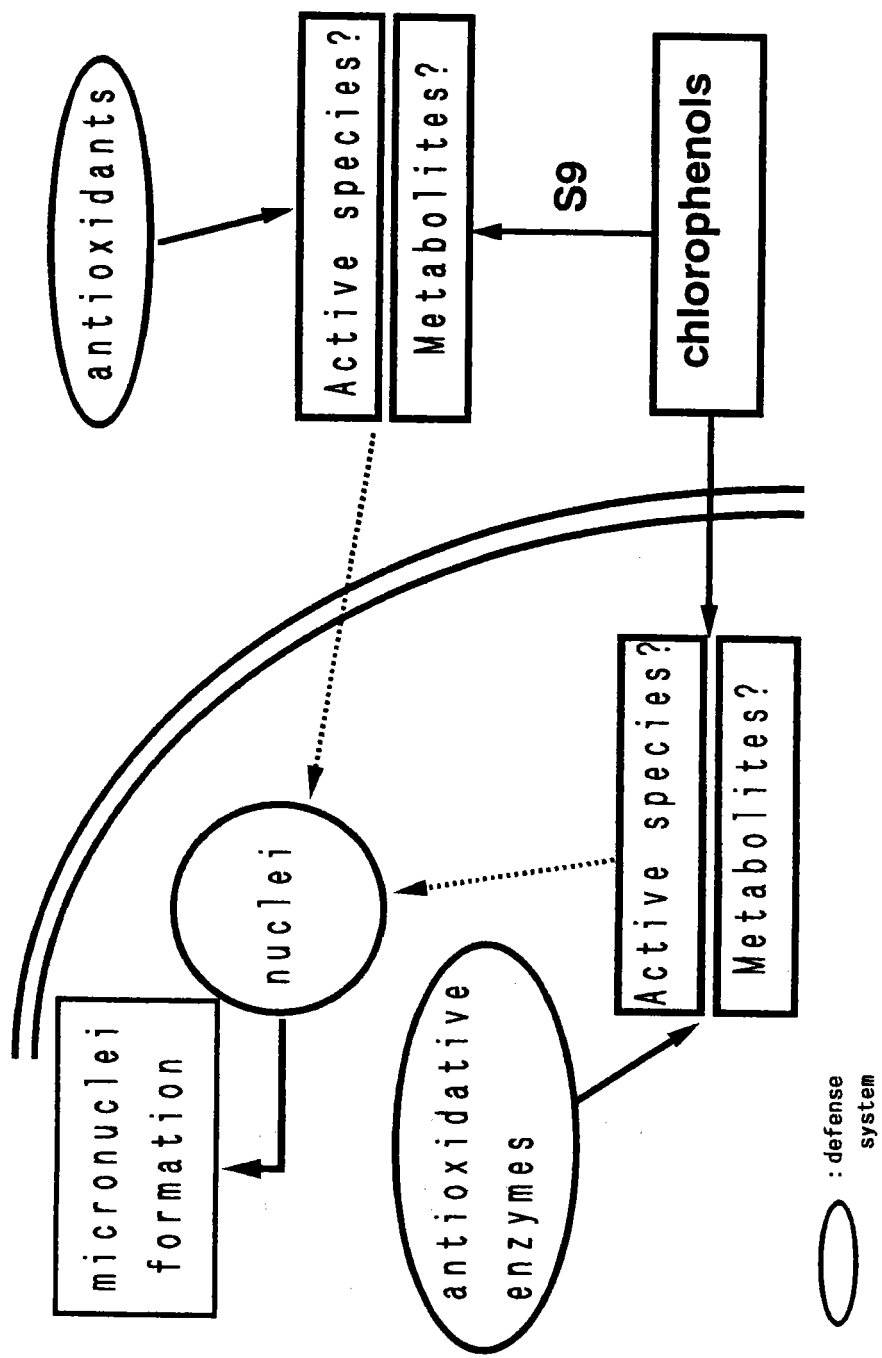
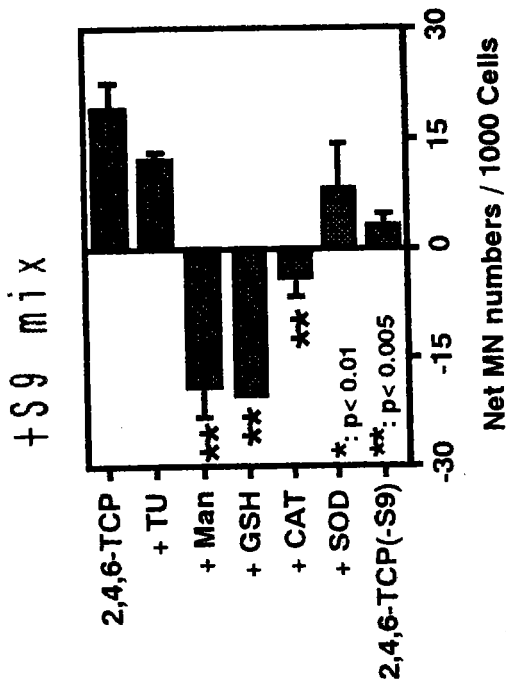


Fig.7 実験方法



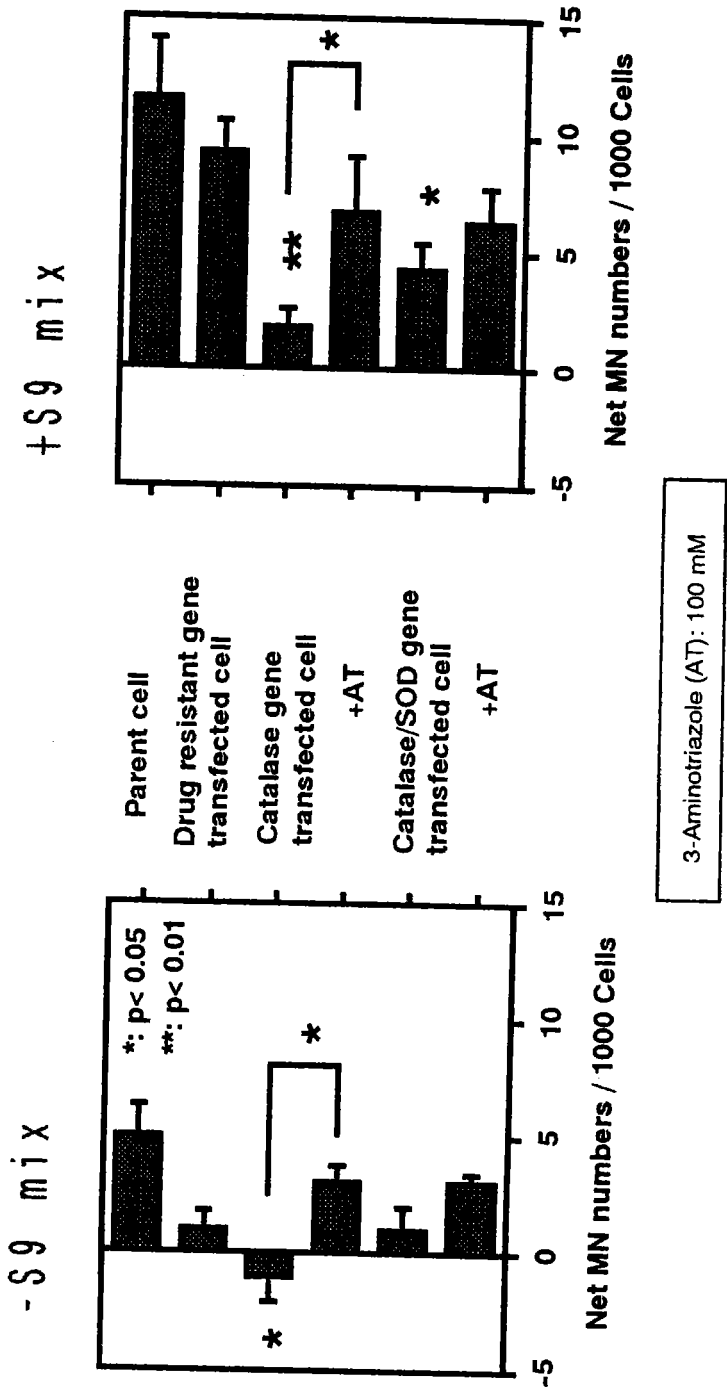
**Fig.8 Scheme of micronucleus formation by chlorophenols**



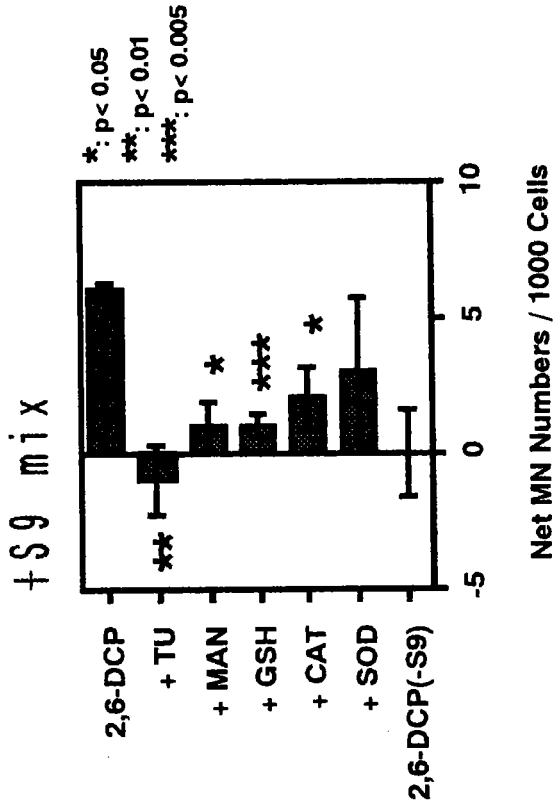


Thiourea (TU), Mannitol (Man), GSH: 100 mM  
Catalase (CAT,) and SOD: 20 U/mL

**Fig.9 Effect of antioxidants on micronuclei formation by 2,4,6-TCP**

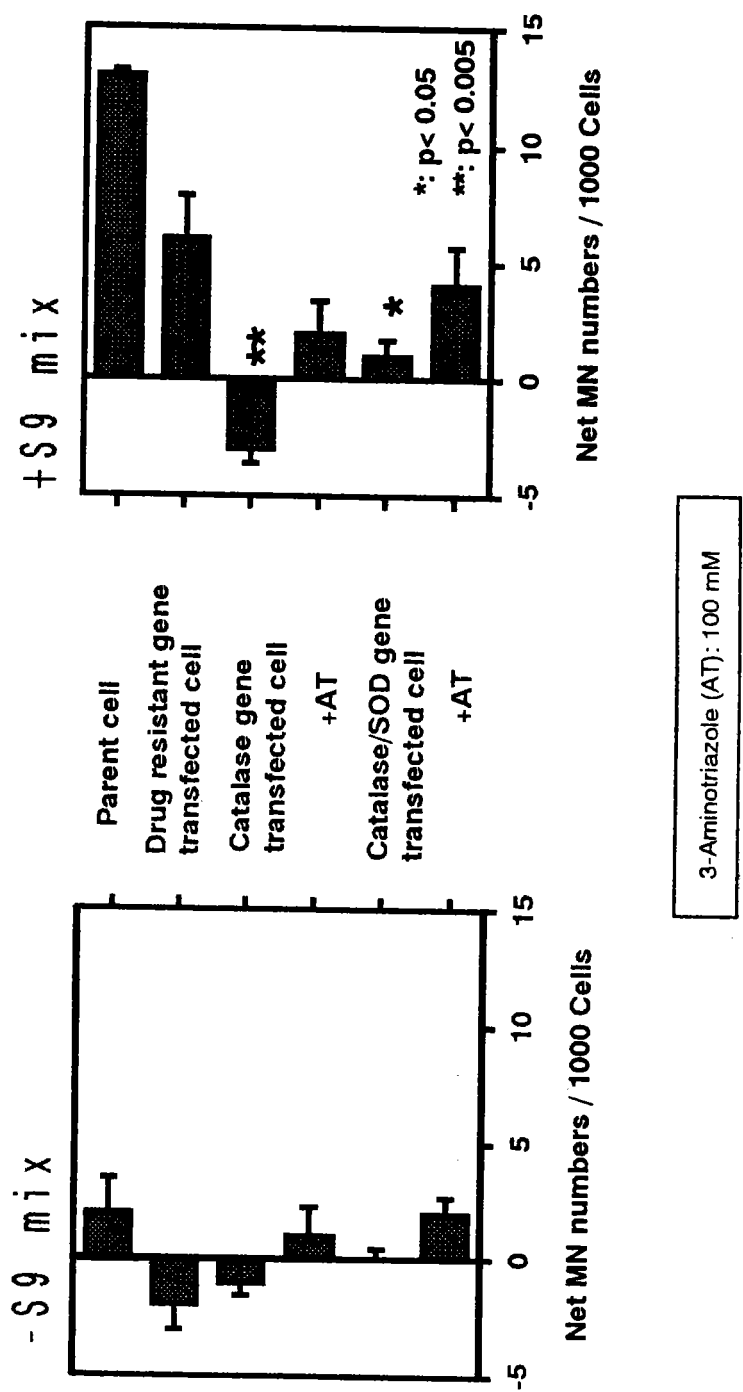


**Fig.10 Micronuclei formation in HeLa cells by 2,4,6-TCP**



Thiourea (TU), Mannitol (Man), GSH: 100 mM  
Catalase (CAT) and SOD: 20 U/mL

**Fig. 11 Effect of antioxidants on micronuclei formation by 2,6-DCP**



**Fig.12 Micronuclei formation in HeLa cells by 2,6-DCP**



Table 1 用いた化学物質の構造と毒性値

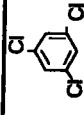
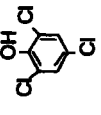
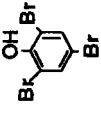
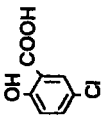
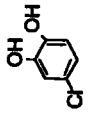
Chemicals	Structures	LD50 (mg/kg)	Chemicals	Structures	LD50 (mg/kg)
1,3,5-Trichloro-benzene		800 (rat, oral)	1,3-Dichloro-2-Propanol	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{Cl} \quad \text{OH} \quad \text{Cl} \end{array}$	110 (rat, oral)
2,4,6-Trichloro-phenol		820 (rat, oral) 454(mouse, oral)	2-Chloro-propionic Acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{Cl} \end{array}$	500 (rat, oral)
2,4,6-Tribromo-phenol		2 (rat, oral)	5-Chloro-salicylic Acid		250 (rat, oral)
4-Chloro-resorcinol		369 (rat, oral)	Trichloro-acetic Acid	$\begin{array}{c} \text{Cl} \\   \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{Cl} \end{array}$	400(rat, oral)
3-Chloro-1-Propanol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{Cl} \end{array}$		Carbon Tetrachloride	$\begin{array}{c} \text{Cl} \\   \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{Cl} \\   \\ \text{Cl} \end{array}$	5630-9770 (rat, oral) 12800 (mouse,oral)

Table 2 Geno- and Cytotoxicity of chemicals

Chemicals	Genotoxicity (MNTest)	Cytotoxicity (CFTest)	Chemicals	Genotoxicity (MNTest)	Cytotoxicity (CFTest)
1,3,5-Trichloro-benzene	83	++	1,3-Dichloro-2-Propanol	46	—
2,4,6-Trichloro-phenol	47	+	2-Chloro-Propionic Acid	76	±
2,4,6-Tribromo-phenol	83	++	5-Chlorosalicylic Acid	32	No data
4-Chloro-resorcinol	7	±	Trichloroacetic Acid	0	No data
3-Chloro-1-Propanol	39	No data	Carbon Tetrachloride	0	—

++ : severe, + : strong, ± : weak, — : non-toxic

The numbers indicate genotoxic activity of chemicals which is normalized as the amounts of mitomycin C (ng/mM).

---

「た まがわ か せんすい さいぼうどくせい い でんどくせい ちようき  
多摩川河川水の細胞毒性・遺伝毒性の調査」

(研究助成・A類 NO. 178)

著 者 う つ み ひで お  
内 海 英 雄

発行日 1997年3月31日

発 行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団  
〒150 渋谷区渋谷1-16-14  
(渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03)3400-9142

FAX (03)3400-9141

---