

# 多摩川流域における細胞毒性変動の調査、解析

2000年

酒井 康行

東京大学生産技術研究所講師

# 目 次

第1章 高密度ヒト細胞固定化とその利用	
1-1. はじめに	1
1-2. 実験・解析方法	2
1-2-1. 化学物質	2
1-2-2. 細胞培養	3
1-2-3. チップの作成と使用法	3
1-3. 結果と考察	3
1-3-1. マイクロキャリアーの選択	3
1-3-2. 初期播種密度の最適化	5
1-3-3. チップ内での細胞培養	6
1-3-4. 高密度細胞による曝露時間短縮と毒性評価感度の改善	7
1-3-5. 用量作用曲線	8
1-4. 結 論	11
第1章の総括	12
第2章 環境水水質評価への応用	
2-1. はじめに	14
2-2. 実験・解析方法	15
2-2-1. 採水場所と日時	15
2-2-2. 採 水	15
2-2-3. 分析方法	16
2-3. 結果と考察	17
2-3-1. 河川水の水質評価における迅速・簡便バイオアッセイの比較	17
2-3-2. 細胞毒性の時間的変動	19
2-4. 結 論	21
第2章の総括	21
参 考 文 献	22

---

研究組織	代表研究者	酒 井 康 行	東京大学生産技術研究所 講 師
	共同研究者	迫 田 章 義	東京大学生産技術研究所 助教授
	”	庄 司 良	東京大学大学院工学研究科 学 生

---

# 第1章 高密度ヒト細胞固定化とその利用

## 1-1. はじめに

本研究ではより簡単なパックテストのような手軽さを兼ね備えたバイオアッセイのキット試験法を開発することを試みた。本節で検討しているキットはLDL取込み活性阻害に基づくものであり、2-6時間程度を時定数として変動を示す河川水の水質変動に追従できる評価が可能である。しかし、バイオアッセイを広く水環境の現場で運用されるためには、大幅な簡便化が必要となる。

一方、ヒト細胞等の動物細胞は細胞毒性によって不可逆的な損傷をうけることもあるため繰り返し使用することは困難であり、又無菌条件下で培養する必要がある。環境水のon-siteでの評価については、こうした特殊な設備は望めない。すなわち、本研究の目的のためにはヒト細胞を使った使い捨て（ディスポーザブル）のバイオアッセイセンサーを開発する必要があると言える。

そのようなセンサーにおいては、細胞の取扱いを簡便にするために、細胞を何らかの固定化媒体を用いて高密度に固定する必要がある。例えば、フィルターチップはマイクロキャリアーに固定化した細胞を充填することができ、マイクロピペットを使用することによって、試料水の導入・排出する操作だけで評価が可能になる。またLDL assayの高感度化のためには高密度の細胞培養が必要になる。これはLDLの取込み量は蛍光強度で定量されるが、その蛍光測定の検出限界によって評価の感度が規定されるためである。また細胞数1個当たりの取込み量はほぼ一定のため（Stopec *et al.*, 1993）、LDL取込み量と細胞数は比例する。従って評価の感度と細胞密度の関係を明らかにしておく必要がある。

本研究においては、高密度に細胞を固定したマイクロキャリアーをチップに充填し、そこにマイクロピペットを用いて試料水を数回、導入、排出する操作を行うことで約2時間で河川水の細胞毒性を評価することが可能なバイオアッセイセンサーの開発と、それを用いて31種類の化学物質を評価し、一般細胞毒性評価である細胞生存率試験との結果を比較した。

## 1-2. 実験・解析方法

### 1-2-1. 化学物質

Table 1 にモデル環境汚染物質として使用した化学物質を示す。河川水等の環境中で検出報告例が多い農薬（8, 9, 22, 25, 26, 28, 30）、変異原性物質（2, 3, 19, 20）、重金属（15, 18, 24, 27）、内分泌攪乱化学物質（4, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 21, 31）等を用いた。

Table 1 本研究で用いた化学物質

No.	Substance	Cas number	Molecular weight
1	Acetaldehyde	75-07-0	44
2	2-Aminoanthracene	613-13-8	193
3	Benzo(a)pyrene	50-32-8	250
4	Bis-phenol-A	80-05-7	228
5	Catechol	120-80-9	110
6	2-Chloro-1,1,2-trifluoroethyl ethyl ether	310-71-4	163
7	Di-2-ethylhexyl phthalate	117-81-7	391
8	2,5-Dichlorophenol	583-78-8	163
9	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	94-75-7	221
10	Diethylstilbestrol	56-53-1	267
11	$\beta$ -Estradiol-17-acetone	1743-60-8	270
12	17- $\alpha$ -Ethinylestradiol	57-63-6	313
13	Formaldehyde	50-00-0	30
14	Glyoxal	4405-13-4	58
15	Lead nitrate	10099-74-8	331
16	Menadione	58-27-5	172
17	3-Methylcholanthrene	56-49-5	267
18	Methylmercury Chloride	115-09-3	252
19	1-Nitropyrene	5522-43-0	247
20	4-Nitroquinoline-N-oxide	56-57-5	200
21	p-Nonylphenol	104-40-5	220
22	Pentachlorophenol	87-86-5	266
23	Phenol	7784-46-5	192
24	Sodium arsenite	108-95-2	94
25	Thiobencarb	28249-77-6	258
26	Thiuram	137-26-8	240
27	Tributyltin chloride	1461-22-9	325
28	2,4,5-Trichlorophenol	95-95-4	198
29	Trp-P-2	72254-58-1	256
30	Paraquat	1910-42-5	257
31	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	288

## 1-2-2. 細胞培養

本研究では2種類のコーラーゲン製マイクロキャリアー (A: pore size=20-40  $\mu\text{m}$ , B; pore size=10-20  $\mu\text{m}$ , Percell Biolytica AB Cultispher-GL, Lund, Sweden)とセルロース製マイクロキャリアー (C; pore size=100  $\mu\text{m}$ ; Asahikasei Microcarrier, Asahi Chemical, Osaka, Japan) を検討した。1.0 $\times 10^6$  cells/ml以上の高密度培養にはロータリーシェーカー (TAITEC R-II mini, TAITEC, Tsukuba, Japan)を用いて巡回培養した。60mm-dish (MS-1160R, Sumilon, Tokyo, Japan)を用いて1.0g/Lのマイクロキャリアーに対して、5 $\times 10^6$  cells/mlの細胞密度で培地体積が5 mlになるように培養した。70rpm で継続的に巡回培養すると、9日後マイクロキャリアー上で細胞がコンフルエントになった。生細胞数はAP assayによって定量し、またLDL取り込み量 (pg) はLDL assayによって定量したがFig. 2, Fig. 4, Fig. 5では同時に測定した生細胞数で除した値で示した。

## 1-2-3. チップの作成と使用法

8.2 $\times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の面密度で細胞が接着したマイクロキャリアーをフィルターチップ (Promega GL, Promega, Tokyo, Japan)に充填した。このフィルターチップは中央部に疎水性膜 (テフロン製) を有する。チップの模式図をFig. 1に示す。このチップは使い捨てであるため測定の現場における無菌操作の必要はない。

1.0 $\times 10^7$  cells/mlの細胞密度でチップに充填し、全培地体積を100  $\mu\text{L}$ とした。その後、細胞はチップ内で室温、大気下で24時間培養した。その後、培地は化学物質または試料水を含んだ培地に交換し、2時間後LDL取り込み活性を測定した。その後細胞を3回PBSで洗浄し、1 N-NaOHで取り込まれたLDLを溶出させた後に蛍光強度を測定した。

## 1-3. 結果と考察

### 1-3-1. マイクロキャリアーの選択

Fig. 2にマイクロキャリアーに固定した細胞をディッシュ内で巡回培養した場合の細胞増殖に関し、3種類のマイクロキャリアーについて比較した図を示す。細胞の初期播種密度は5.0 $\times 10^4$  cells/mlとした。3種類のマイクロキャリアーの中では、大孔径の

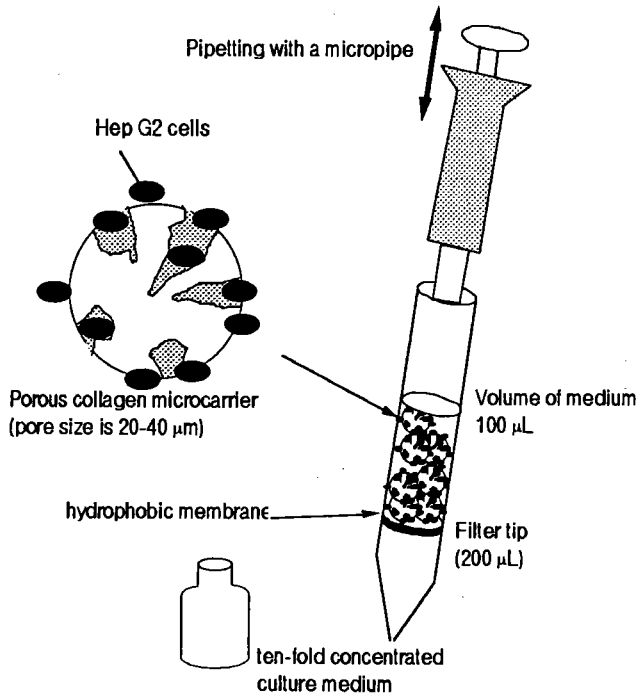


Fig. 1 迅速・簡便バイオアッセイチップの模式図

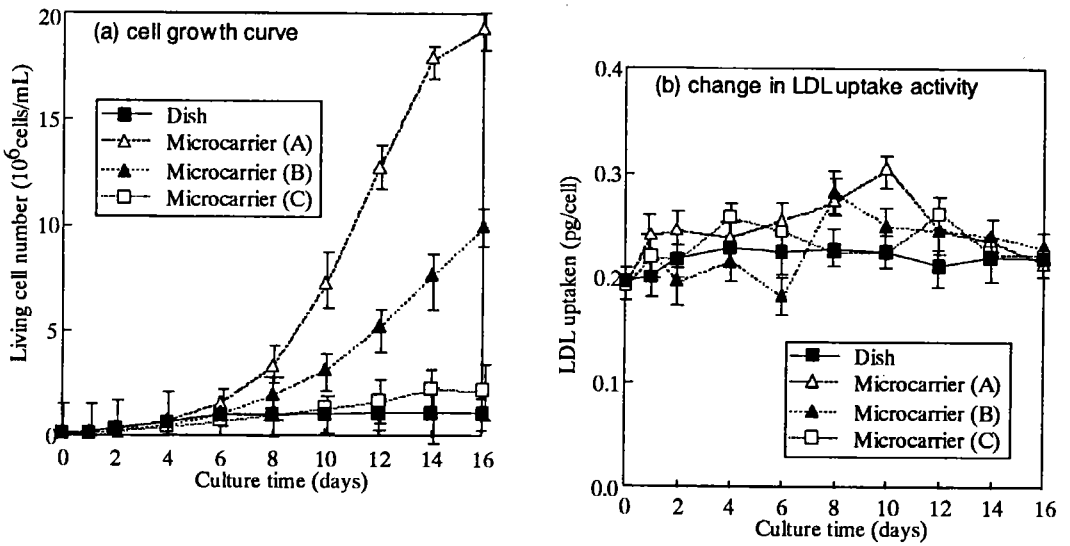


Fig. 2 様々なマイクロキャリアにおける生細胞数とLDL取込み活性の変化

コラーゲンマイクロキャリアー上で最も良い細胞増殖が見られ、16日後の生細胞数は  $1.91 \times 10^7$  cells/ml に達した。一方、単位生細胞数当たりのLDL取込み活性は、生細胞数に依存せず一定であった。以上のことから本研究では孔径が  $20-40 \mu\text{m}$  のコラーゲン性マイクロキャリアーを用いることにした。

### 1-3-2. 初期播種密度の最適化

ディッシュによる旋回培養開始から8時間後のマイクロキャリアーへの付着細胞数と初期細胞播種密度の関係を調べた(Fig. 3)。図より、初期細胞播種密度  $2.0 \times 10^5$  cells/ml まではほぼ100%の細胞がマイクロキャリアーに付着したものの、それ以上の初期細胞播種密度では付着細胞数の向上が見られず、この培養系においては初期の付着細胞数は  $4.0 \times 10^5$  cells/ml が上限であることが明らかになった。従って、本研究では  $5.0 \times 10^5$  cells/ml を標準の初期細胞播種密度と決定したが、この場合7割程度の細胞しか付着しないことになる。これはHep G2の低付着性が理由の一つとして考えられる (Alen et al., 1979)。本研究では無限に増殖する癌細胞であるHep G2細胞を用いたため低付着率は大きな欠点とは成らないが、初代培養肝細胞やヒト正常細胞を用いる場合、初期細胞播種密度は低く抑える必要がある。

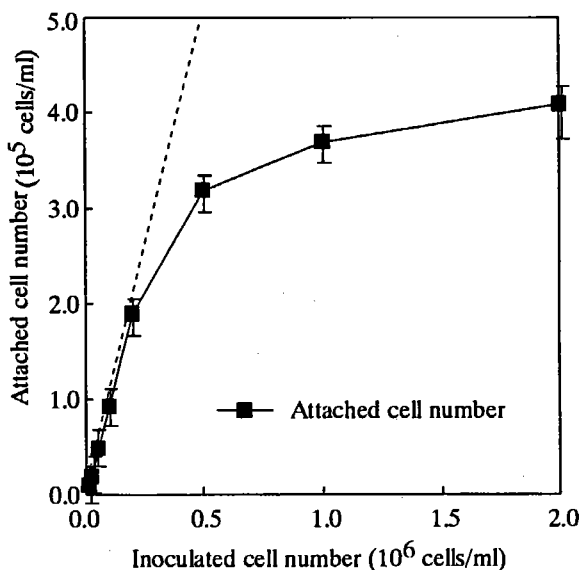


Fig. 3 コラーゲンマイクロキャリアーを使用した場合の初期播種細胞数と付着細胞数の関係

### 1-3-3. チップ内での細胞培養

マイクロキャリアーに付着させた細胞を充填したチップ内での長期間の生細胞数とLDL取込み活性の変化を検討した (Fig. 4)。肝細胞は一般的に大量の酸素の供給を必要とする (Rotem *et al.*, 1994)。高密度の細胞を培養する場合、十分な酸素を供給する必要があるため、本研究では旋回培養を用いた。96-wellplateやチップ等の小体積の中ではディッシュによる旋回培養での細胞増殖曲線 (Fig. 2) よりも、細胞増殖は特に高細胞密度の培養で明らかに低くなっている (Fig. 4)。これはチップ内での細胞への酸素の供給が細胞増殖には不十分であるためであると考えられる。一方、LDL取込み活性は実験誤差の範囲内の変動 ( $\pm 15\%$ ) であり、検討した培養時間 144 時間では一定であった。(LDL uptaken (pg/cell) = 0.21-0.28)。追加実験によってLDL取込み活性はチップ内でも1ヶ月間は安定に維持できることがわかった。(LDL uptaken (pg/cell) > 0.2)。また、チップ内での細胞のLDL取込み活性 (Fig. 4) はディッシュ内での細胞のLDL取込み活性 (Fig. 2) と比較して劣ることはなかった。従って、チップに高密度に充填した細胞を用いて少なくとも6日間LDL取込み活性阻害を指標として毒性評価を行うことは可能である。

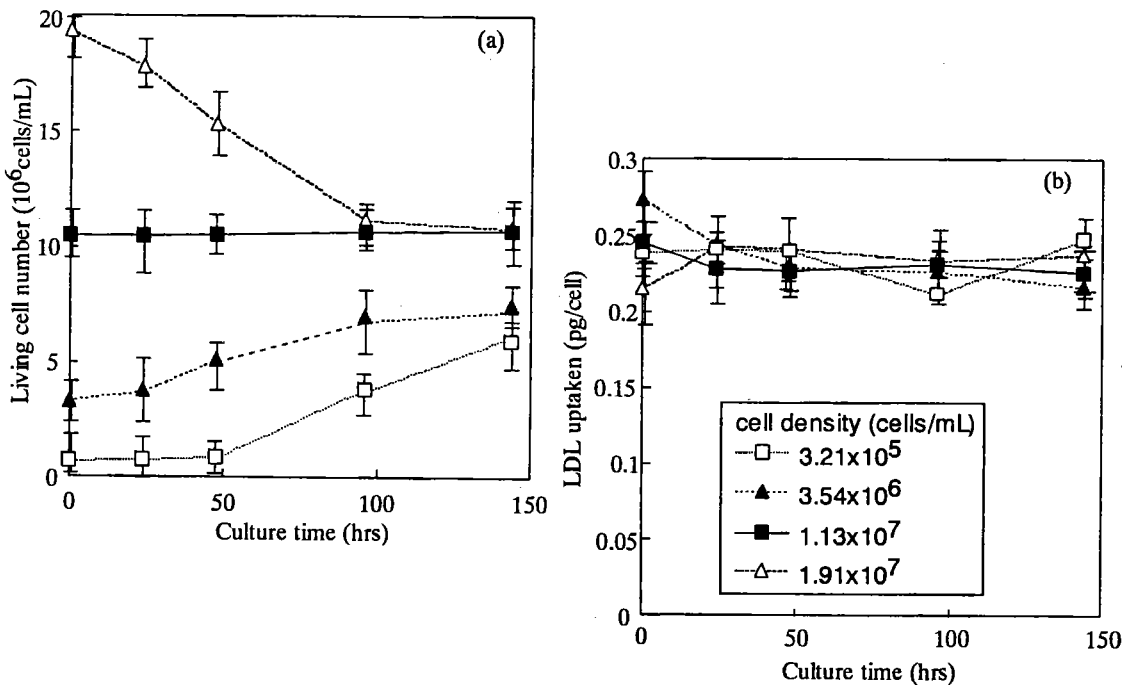


Fig. 4 チップ内における生細胞数とLDL取込み活性の変化



1-3-4. 高密度細胞による曝露時間短縮と毒性評価感度の改善

Fig. 2やFig. 4で示したように細胞に取り込まれた単位細胞当たりのLDLの量は生細胞数や細胞の状態（増殖期、安定期、死滅期）によらず、一定である。故に、1チップまたは1ウエル（96-wellplate）当たりのLDL取込みの絶対量は生細胞数に比例する。従ってチップまたはウエル内に高密度に細胞を培養することで、単位体積当たりのLDL取込み絶対量を大きくすることが可能であり、LDL取込み量の測定指標である蛍光強度が短時間でより大きくなる。96-wellplateを用いてマイクロキャリアー上で様々な細胞密度で培養し、プレート上で評価を行うことで細胞密度と評価感度（コントロール培地と化学物質添加培地間での活性の差）について検討した結果をFig. 5に示す。モデル化学物質はパラコートを使用した。またチップ内での検討を行った結果もFig. 5に示して比較する。ウエルまたはチップ内での単位培地体積当たりの細胞密度は $1.27 \times 10^7$  cells/mlとした。曝露時間の間では細胞死は起こらなかった。細胞数当たりのLDL取込み活性はパラコート濃度の上昇に応じて減少した。2mM以上のパラコートを曝露した場合、LDL取込み量は2時間以内に飽和し、2時間後にコントロールとのLDL取込み量の差は有意にもなった。一方、96-wellplateとチップに差はほとんど見られなかった。このことからチップは96-wellplateによるバイオアッセイを代替す

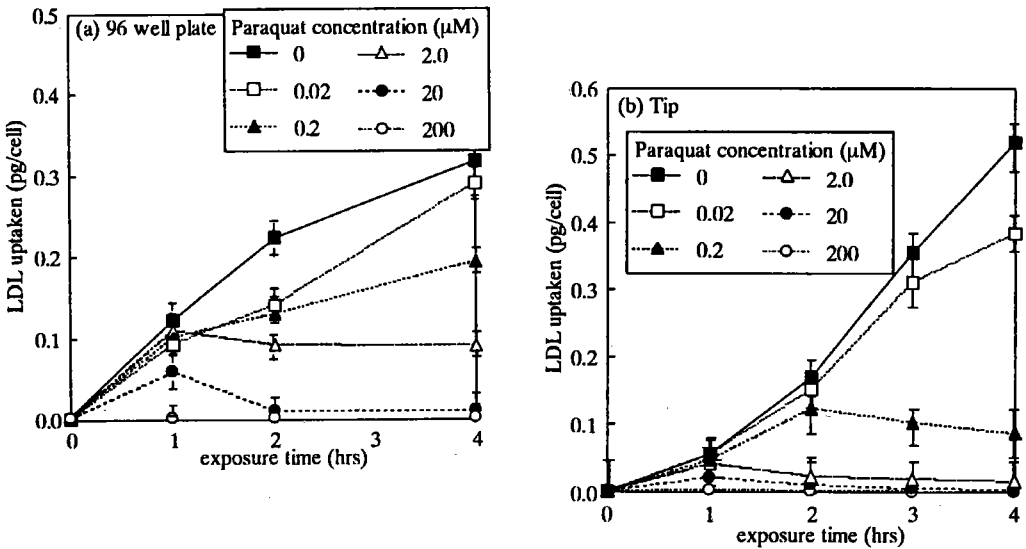


Fig. 5 チップとプレート内でのマイクロキャリアーに固定化した細胞によるパラコートを曝露した場合のLDL取込み活性の時間変化

ることが可能であると結論できる。一方、通常のLDL assayにおける単位培地体積当りの細胞密度 ( $1.0 \times 10^5$  cells/ml) では、1.66mMのパラコートを経験した場合のLDL取込み活性の違いは2時間の曝露では見られない。これらの結果を総合すると、ウェルまたはチップ内で細胞密度  $1.27 \times 10^7$  cells/ml で培養した細胞は、通常のLDL assayにおける細胞密度 ( $1.0 \times 10^5$  cells/ml) の細胞と比較して、低濃度の化学物質の毒性に対する感度が良いということになる。従って、ここで高感度な評価が可能であることを確認した。 $1.27 \times 10^7$  cells/ml 以上の細胞密度 ( $1.5 \times 10^7$  cells/ml) を以後のチップによる簡便バイオアッセイの標準細胞密度とした。

細胞毒性評価と生細胞数の関係に関してはこれまでも報告例があり、mer-lux bio assayにおいては1個細胞が持つ ml-抗体の結合サイトは一定であることから、ml-抗体との結合活性を持つ化学物質を曝露した場合、細胞数と細胞毒性評価の感度は比例すると報告されている。(Rasmussen *et al.*, 1997)。LDL assayにおいても細胞密度を高密度にすることで、急性毒性によるLDL取込み活性の差はより大きくなる。ただし、このことはすべてのバイオアッセイ系について共通して言えることではなく、評価するエンドポイントによる。

### 1-3-5. 用量作用曲線

Table 1 に示した化学物質のうち6種類の化学物質について、Fig. 6 に曝露時間48時間の細胞生存率試験とLDL取込み活性試験、4時間のLDL取込み活性試験及び本節で検討した2時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイによって評価して得られる用量作用曲線を示す。細胞密度に関しては高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイによる評価以外は  $3.2 \times 10^5$  cells/ml の細胞密度による評価結果である。また、要領作用曲線から得られたED<sub>50</sub>の比較した図をFig. 7 に示す。大半の化学物質については、4時間のLDL取込み活性阻害試験と高密度固定化細胞を用いる簡便な毒性評価チップによる評価で得られた感度は同程度であった (Fig. 7 (b))。このことから、高密度に細胞を充填した毒性評価チップは一般的な細胞密度 ( $3.2 \times 10^5$  cells/ml) によるLDL取込み活性阻害試験の標準の曝露時間4時間を2時間短縮することが可能と言える。一方、いくつかの化学物質に関しては2時間の高密度固定化細胞を用いる簡便な毒性評価チップによる評価は48時間の細胞生存率試験よりも感度が悪いこともあり (Fig. 7 (a))、特にトリブチル錫とニトロキノリン-N-オキシドではその差が有意であった。しかし

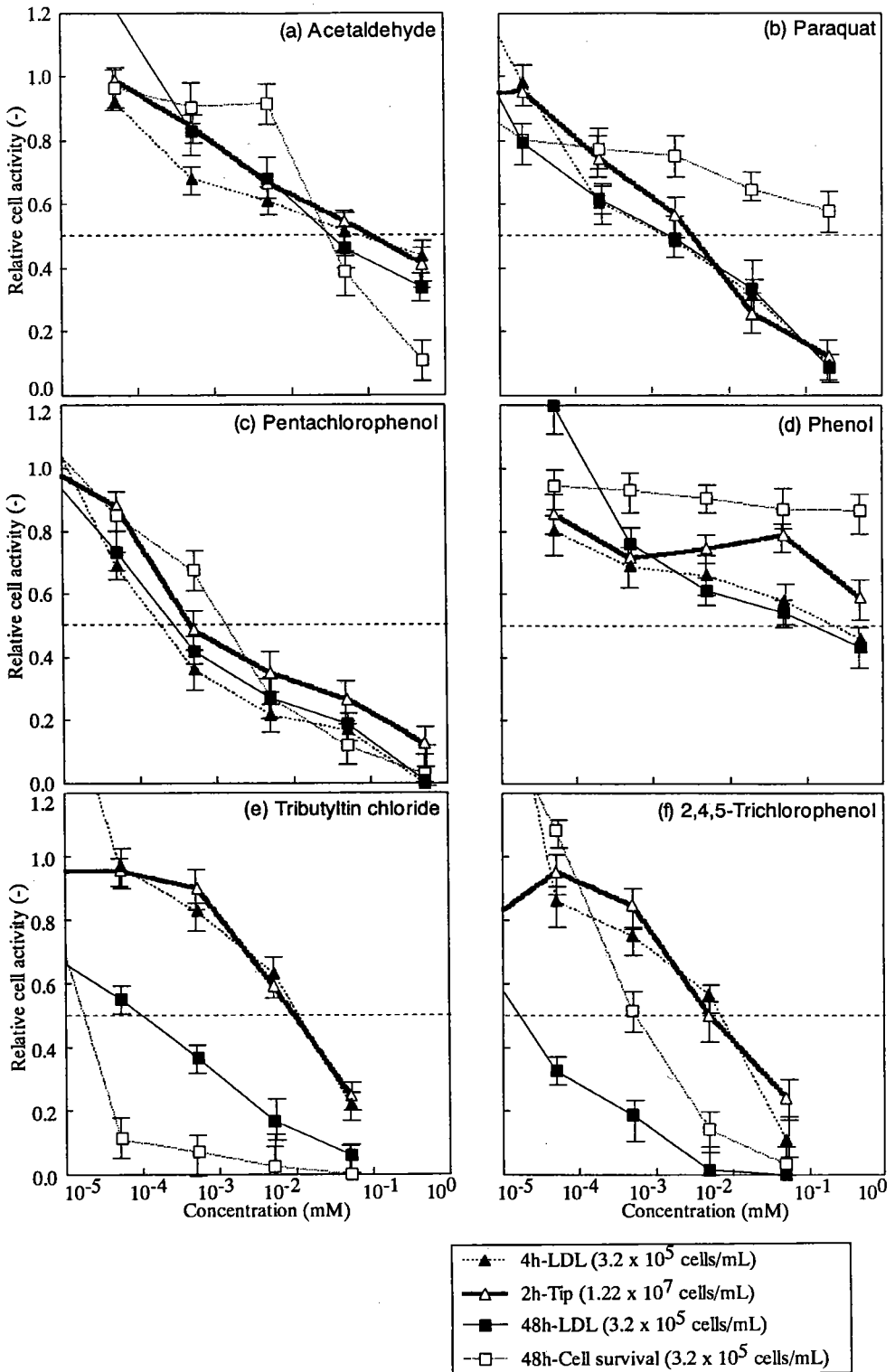
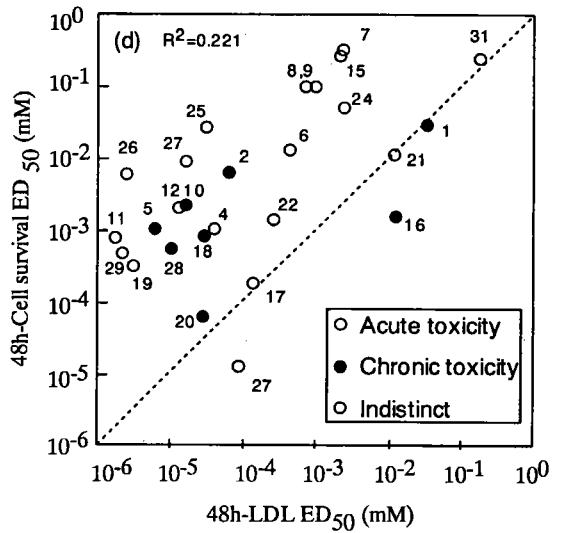
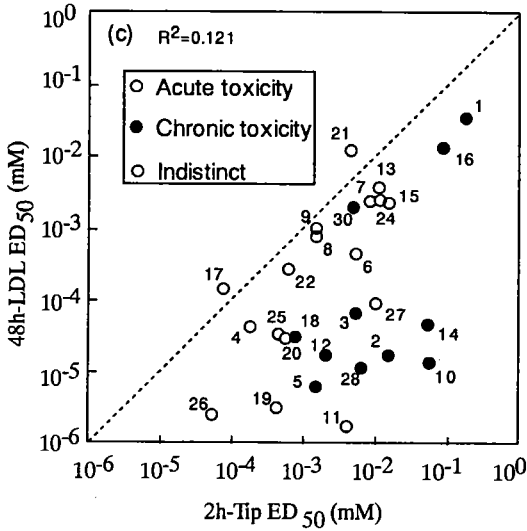
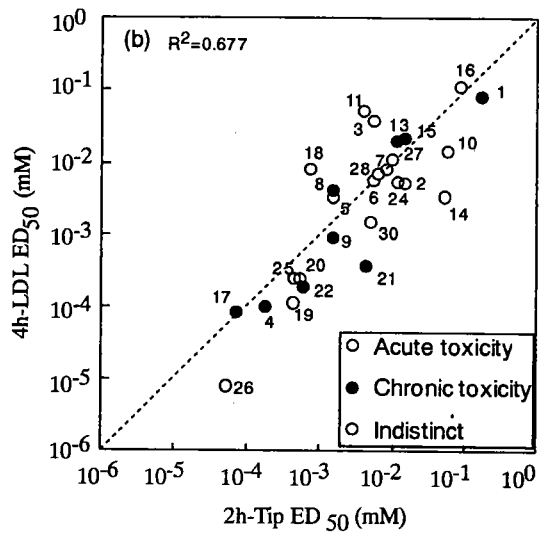
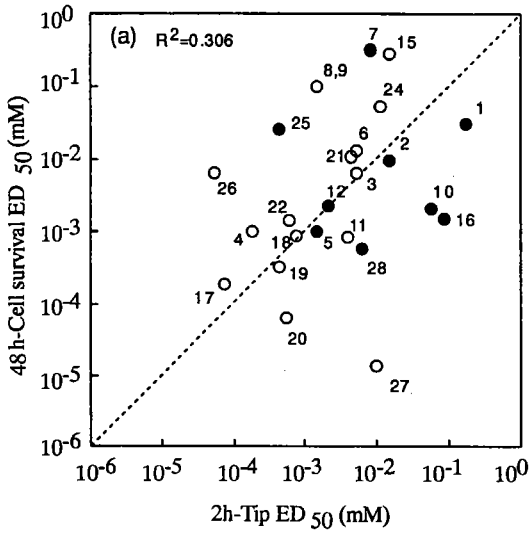


Fig. 6 チップ内における様々な細胞密度でマイクロキャリアーに固定した細胞による6種類の化学物質の用量作用曲線



- (a) 48h-cell survival vs. 2h-tip.
- (b) 4h-LDL vs. 2h-tip.
- (c) 48h-LDL vs. 2h-tip.
- (d) 48-hr cell survival vs. 48-hr LDL

Fig. 7 簡便バイオアッセイチップと他の評価法で得られたED<sub>50</sub>の比較

他の化学物質に関しては、細胞毒性が急性毒性か慢性毒性に関係なく、曝露時間 2 時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイでは 48 時間の細胞生存率試験による  $ED_{50}$  と比較してほぼ同等または 1 桁程度大きい  $ED_{50}$  を検出した。一方、曝露時間 2 時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイによる評価は曝露時間が極端に短いため慢性毒性を持つほとんどの化学物質で曝露時間 48 時間の LDL 取込み活性阻害試験の方が感度は良く、 $ED_{50}$  で 1 - 4 桁低かった。一方、曝露時間 48 時間の LDL 取込み活性阻害試験と同じ曝露時間 48 時間の細胞生存率試験では LDL 取込み活性阻害試験の方が感度が良かった (Fig. 7 (d))。

しかし、この 2 時間でのチップによる評価は他のバイオアッセイと比較して、化学物質によって結果に差があることを検討する必要がある。親水性の物質では 48 時間の細胞生存率試験の細胞毒性評価結果と比較して、チップの急性毒性評価の感度は同程度であった。これら化学物質は細胞膜を浸透することは難しく (Seibert *et al.*, 1989)、そのために LDL レセプターを含む細胞膜タンパク質に主として攻撃し、このような毒性発現過程は初期の段階で起こるためである。一方、トリブチル錫やメナジオンについては 48 時間曝露の細胞生存率試験と 2 時間のチップによる急性毒性評価で感度の差は大きかった。この理由はこれらの化学物質は亜急性または慢性毒性を持つためである (Ema *et al.*, 1997)。

しかし、Fig. 7 (b) に見られるように、本節で検討した細胞の高密度固定化によって、迅速バイオアッセイの曝露時間 4 時間を 2 時間に短縮することが可能となった。これはチップ内の様な微小空間内での酸素供給量の不足による、細胞の毒性に対する感受性の向上が、高感度化の大きな理由と考えられるが Fig. 4 に見られるように、細胞の LDL 取込みの機能は維持しており、LDL 取込み活性阻害評価を本チップで行う場合には問題にならないといえる。

#### 1-4. 結 論

- (1) マイクロキャリアーを用いて高密度 ( $1.0 \times 10^7$  cells/ml) に細胞をチップに充填することで、LDL assay の曝露時間を 2 時間に短縮した迅速・簡便なバイオアッセイのための細胞毒性評価チップを開発した。

- (2) 高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイでのLDL取込み活性は、充填した単位当たりの細胞数に依らず、チップ内でも1ヵ月間一定の値を示した。(LDL uptaken = 0.2(pg/cell))
- (3) ED<sub>50</sub>を感度の指標として、48時間曝露の細胞生存率試験と比較した場合、曝露時間2時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイは同等の感度で、化学物質の急性毒性を評価できることが明らかとなった。
- (4) 本節で開発した被験水の導入・排出の操作だけで細胞毒性を評価でき、水道原水等のヒトに対する危険性を未然に評価するセンサーとして、水環境管理に有効に用いることができると考えられる。

## 第1章の総括

細胞培養には培養設備と無菌操作が必然的に必要となる。従って、細胞を用いるバイオアッセイを簡便化するためには、まず細胞の固定化が必要になり、且つその細胞は使い捨てのものにならざるを得ない。そこで、本研究では細胞をマイクロキャリアー上で高密度に培養し、チップ内に充填することで固定化している。これにより、チップを用いて環境試料水を導入・排出するだけの操作で毒性を評価することが可能になった。

しかし、細胞培養用のプレートを用いる一般的な培養の状態(培養温度=37°C、細胞密度=1.0-5.0×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>)と比較すると、本章で開発した簡便毒性評価のための細胞培養は細胞密度の点でかなり異なっている。結果としてこれらの簡便バイオアッセイによる評価の結果は、化学物質の物性や毒性発現の機序によっては、一般的な培養下での細胞を用いる毒性評価の結果と異なることがあった。毒性評価する化学物質にもよるが、高密度充填細胞(毒性評価チップ)は酸素供給不足による細胞の活性の低下、それに伴う細胞毒性に対する感受性の向上によって、こうした細胞を用いる毒性評価の感度は正常な細胞を用いる毒性評価の感度に比べて高く、同じ曝露時間ではED<sub>50</sub>で3桁程度低い値を得られることもあった。この感度の上昇は、複雑なメカニズムに基づく生物化学反応である毒性の評価ではなく、まずは「人体にとって無視はできない影響を持つ」性質(有害性)を検出

することができる方法としては、大きな利点と言える。

高密度固定化細胞を利用した簡便細胞の毒性評価法はヒト細胞をマイクロキャリアーに固定し、高密度にフィルターチップに充填した使い捨ての毒性評価チップを中核とするものであり、毒性評価を行う水環境の現場には他に蛍光強度計とマイクロピペットが必要になる。チップの開発によって水環境の現場で、迅速・完全に環境水の毒性を評価することが可能になり、ヒト健康リスクの高い環境水の危険性を未然に評価するスクリーニング法として有望である。

## 第 2 章 環境水水質評価への応用

### 2-1. はじめに

河川水の水質評価にバイオアッセイを利用した方法は幾つかあるが、これらの測定はほとんどの場合、評価に煩雑な操作を必要とするばかりで無く、評価の感度を補うための河川水の濃縮に時間と手間がかかるため、河川水の細胞毒性の24時間や1週間の経時変動を調査した論文はほとんど無く、流域変動や季節変動を調査している論文が見られる程度である (Van *et al.*, 1980 ; Bhattacharya, 1996)。一方、バイオセンサーの分野で幾つか迅速な測定が期待できる水環境管理に有望な方法があるが、この方法は環境水の水質を評価する場合、感度不十分のため環境水の1000倍程度の濃縮が必要となり、総合的には迅速・簡便な評価は望めない。

河川水の濃縮に最も回収率の良い方法を用いたとしても、濃縮の段階で一部の物質は消失してしまうため、河川水本来の有害性（毒性）を評価することは不可能である。バイオアッセイは、ヒト健康リスクを間接的に評価し個別物質の基準濃度の代わりに用いることが期待される水質評価法であるため、濃縮等の操作はバイオアッセイの目的には合致しない。それ故、評価の前処理で内容物が変化することを防ぐこと、つまり濃縮を行わずに水質を評価する方法の開発が必要である。従って、河川水を水道原水として安全に運用するために濃縮することなく毒性評価できる感度を有する方法を用いて毒性変動を継続的に調査することが必要になる。

本節では環境水試料の例として代表的な都市河川である多摩川の河川水について、その細胞毒性を第1章で述べている。「迅速・簡便バイオアッセイ」と肝障害性評価法である48時間曝露のLDL取込み活性阻害を指標とする評価法、一般細胞毒性評価法である細胞増殖阻害又は細胞生存率を指標とする評価法で試料水の濃縮を行わずに検知・計測し、環境水の水質指標の一つに本研究で開発した「迅速・簡便バイオアッセイ」によって得られる指標を加えることの可能性と妥当性を検証した。



## 2-2. 実験・解析方法

### 2-2-1. 採水場所と日時

環境水の例とした多摩川は山梨県の笠取山に源を発する全長123kmの1級河川で、そのうち都内を98.7kmにわたって流れる人間活動の影響を大きく受けている代表的な都市河川である。特に羽村堰では平常時に全水量の96%を水道原水として採水しているため、それより下流の汚染は上流より深刻なものとなっている。中・下流部は神奈川県と東京都の県境付近を流れ、東京湾に流れている。昭和40年代の汚染が進んだ時代には、主として合成洗剤の無処理家庭雑排水、および流域に多く存在する工場からの工業排水が主な汚染原因であった（東京にサケを呼ぶ会、1988）。当時の工場排水からの重金属類は底質中（鈴木ら、1975）に依然として存在し、現在でも微量ながら問題になっている（栃木ら、1996）。最近では中・上流に点在するゴルフ場から排出される毒性の強い除草剤が多摩川に流出していることが懸念されており、多摩川河川水の変異原性物質（Houk 1992）や細胞毒性物質（Utsumi *et al.*, 1992 ; Utsumi *et al.*, 1993）の存在も報告されている。しかし多摩川を含め河川水の細胞毒性の変動を詳細に研究した例はほとんどない（Kiyoshige, 1992）。Fig. 8に多摩川の流域図と主たる試料水採水地点に設定した中流（日野橋、新井橋、関戸橋付近）の略図を示す。Fig. 8に示した流量、流程、流下時間は平成10年度の平均値である（建設省京浜土木事務所）。関戸橋の1.8km上流に程久保川の流入（ $0.5\text{m}^3/\text{s}$ ）、日野橋から関戸橋までの区間では清化園し尿処理場（ $0.00063\text{m}^3/\text{s}$ ）と北多摩2号（ $0.407\text{m}^3/\text{s}$ ）、国立排水（ $1.574\text{m}^3/\text{s}$ ）の2箇所の下水処理場、新井橋から関戸橋までの区間では日野し尿場（ $0.0005\text{m}^3/\text{s}$ ）の排水の流入があり、また、流域には飲食品工場、機械工場、横田基地などの独立した多数の排水源（合計で $1\text{m}^3/\text{s}$ 程度）から様々な排水が流入する。また神奈川県北部を流れる同様に汚染の進んだ鶴見川河川水も試料水とした。

### 2-2-2. 採水

採水はなるべく河川中央部の流れの大きい表層より水深約30cmに500ml瓶を沈め3回共洗いをして、瓶に空気が入らないように、採水した。同時に水深と水温、天候を測定した。試料水は採水後直ちにクーラーボックスにいれ、曝露開始まで約4℃に保った。

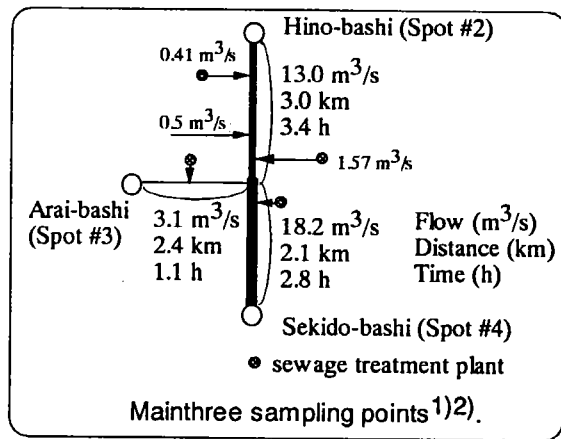
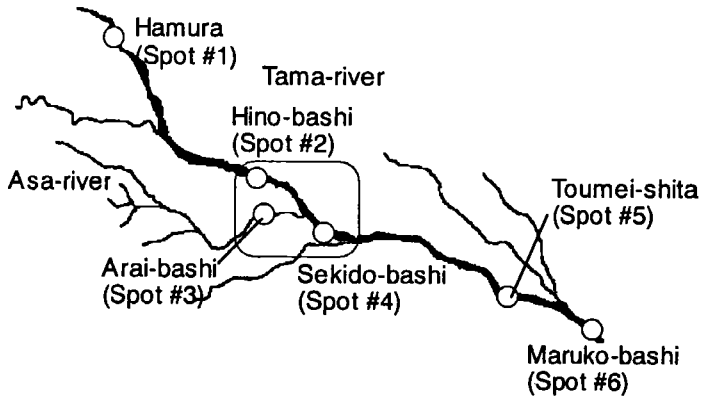


Fig. 8 多摩川流域の概念図と採取地点の位置関係

- 1) 市川 新 (1986)
- 2) 建設省京浜土木事務所

### 2-2-3. 分析方法

採水後24時間以内に $1\ \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、SS (Suspended Solid) 含有量を測定した。pH、全有機炭素濃度 (TOC; Total Organic Carbon)、電気伝導度 (EC; Electric Conductivity)、紫外線吸光 (波長は $220\text{nm}$ ;  $E_{220}$ および $260\text{nm}$ ;  $E_{260}$ ) を測定した。

培地調整の前に、試料水を $0.22\ \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (Advantec DISMIC-25cd, TOYO Co.) で濾過滅菌した。培養における通常濃度の10倍のDME 培地と試料水を 9 : 1

の割合で混合し、培地を調整した。1 N-NaOH, 1 N-HClを用いて、pHを約7.0にそろえた。また試料水の浸透圧は培地の浸透圧（清重ら、1992）に比べてはるかに小さいので、試料水間の浸透圧の違いによる細胞毒性の差は無視できる。他、試料水の化学物質以外に細胞毒性に影響を与え得る物性として、溶存酸素濃度や水温があるがいずれも培地の調整の段階で試料間の差は無視できるようになる。

細胞毒性の評価結果は独立した2回の実験の平均値と誤差範囲を標準偏差で表示した。

## 2-3. 結果と考察

### 2-3-1. 河川水の水質評価における迅速・簡便バイオアッセイの比較

鶴見川河口水についてFig. 9に曝露時間2時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイと曝露時間48時間の細胞生存率試験及び曝露時間4, 48時間のLDL assayでの評価を比較した結果を示す。曝露時間2時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイは、曝露時間4時間のLDL assayとほとんど同様の細胞毒性変動を示す

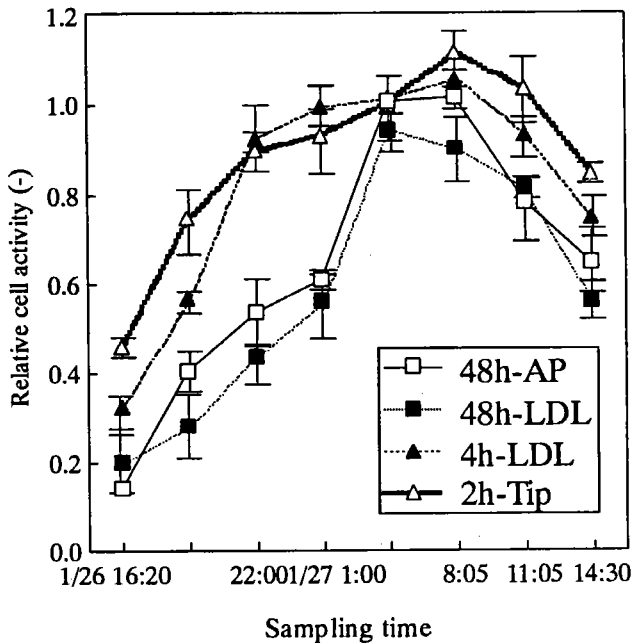


Fig. 9 本研究で開発した迅速・簡便バイオアッセイによる河川水細胞毒性の時間変化の評価

曲線となった。これは曝露時間 2 時間の毒性評価チップと曝露時間 4 時間の LDL assay で全く同じ評価原理を用いており、曝露時間も近いためである。また、相対細胞活性で感度を比較すると暴露時間 2 時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイは、同じ評価原理を持つ 48 時間の LDL assay に劣るものの、48 時間曝露の評価で有意な細胞毒性を検出した試料水に対しては、コントロールに対して有意な活性の低下を検出しており、急性毒性評価を行えることが分かった。以上のことからこの高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイ河川水または化学物質の毒性を 2 時間で評価できると結論付けられる。

本河川試料水について 48 時間曝露の細胞生存率試験と曝露時間 4 時間の LDL assay 及び曝露時間 2 時間の高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイによって得られる相対細胞活性を比較した図を Fig. 10 に示す。化学物質の急性毒性評価による用量作用曲線で得られる  $ED_{50}$  値を比較した Fig. 7 と比較すると、全体のプロットは中央の斜線付近に集合した。Fig. 7 は  $ED_{50}$  を用い、Fig. 10 は相対細胞活性の絶対値を用いて両方の評価系の感度を比較しているため単純に化学物質と河川試料水の評価結果を比較すること

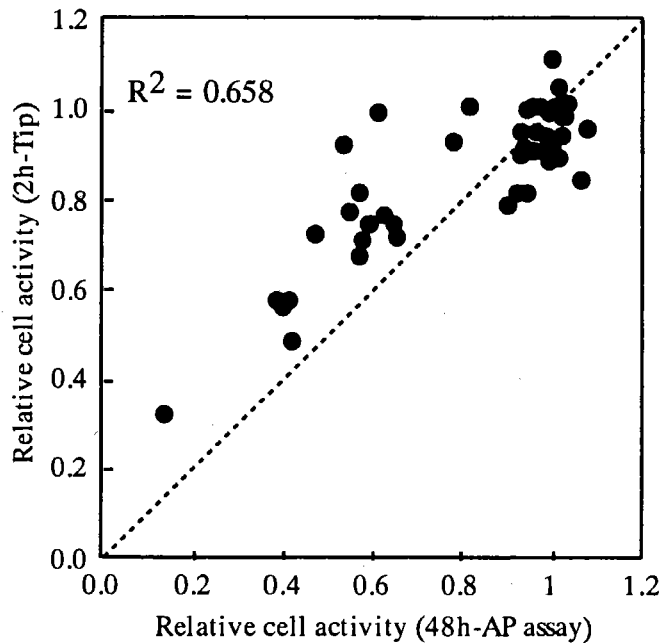


Fig. 10 河川水の細胞毒性評価において、4h-LDL, 2h-tip assayと 48h-AP assay で得られた相対細胞活性の比較

は出来ないが、本研究で開発した迅速・簡便毒性評価法は化学物質の細胞毒性評価では、化学物質の持つ毒性発現機序によっては評価結果にかなりの差が見られることがあるものの、河川試料水の細胞毒性評価では細胞生存率試験と同等の感度で評価できるといえる。また、河川水の用量作用曲線の検討によって4h-LDLと48h-APまたは2h-Tipと48h-APで得られたED<sub>50</sub>を比較した結果、総溶存有機炭素濃度(DOC)の2桁の範囲で両方の評価系から得られるED<sub>50</sub>に直線性が確認された。化学分室の評価結果による比較では6桁の範囲で検討しているが、河川水の細胞毒性変動の範囲を考慮すると現実的な変動範囲での相関性は確保できていると考えられる。

Fig. 9から48時間曝露の細胞生存率試験で評価した河川試料水の細胞毒性は非常に短時間の間で大きな変化を示しており、その時間変化に追従出来るようなバイオアッセイが必要にもなり、迅速・簡便バイオアッセイの必要性を再確認できる。ただし本項の各バイオアッセイで評価した毒性はあくまでも急性毒性である。長期毒性、慢性毒性も急性毒性と同様に河川水中では時間的な変動が見られると考えられるものの、それを短時間で評価する必要はない。細胞にも人体にも毒性の発現に長い時間が必要となるからである。こうした長期毒性、慢性毒性も短時間で簡便に評価できることが望ましくはあるが、以上のように長期間での慢性的なヒト健康リスクが懸念されるという理由から迅速評価の必要性が生じるわけでは全く無い。以上より、本研究で開発した各迅速・簡便バイオアッセイは急性毒性を評価の対象とするといずれの方法も十分な感度で河川水の水質の評価が可能であると結論できる。

### 2-3-2. 細胞毒性の時間的変動

Fig. 8に示した関戸橋及び上流の3地点において同一時刻に採水した試料水の評価し、各地点で検出された細胞毒性の変化をFig. 11に比較した。試料水採水の時間間隔が2時間と長い為、正確な細胞毒性の変動と下流の変動への影響の検討はし得ない。これには流量、流下時間、支流や排水の流入を考慮して検証する必要がある。しかし相対細胞活性は短時間で大きな変動がみられた。最も強い細胞毒性を示した試料水では顕微鏡観察でも細胞体面積の縮小、培養プレート表面からの細胞の剥離が観察された。この試料水の細胞毒性を5種類の化学物質のヒト血中致死濃度と比較した(Table 2)。三酸化二ヒ素を例にとると、この河川水の細胞毒性は三酸化二ヒ素の用量作用曲線から、0.0079mM溶液に相当する。これは三酸化二ヒ素のヒト血中致死濃度0.054(mM in blood)(Wang et

al., 1993) と比較して 1 桁程度の差しかない。このように多摩川河川水の細胞毒性は無視できないほど強く、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、細胞毒性をいち早く検出して危険性を検知出来るような迅速・簡便バイオアッセイが有効になる。

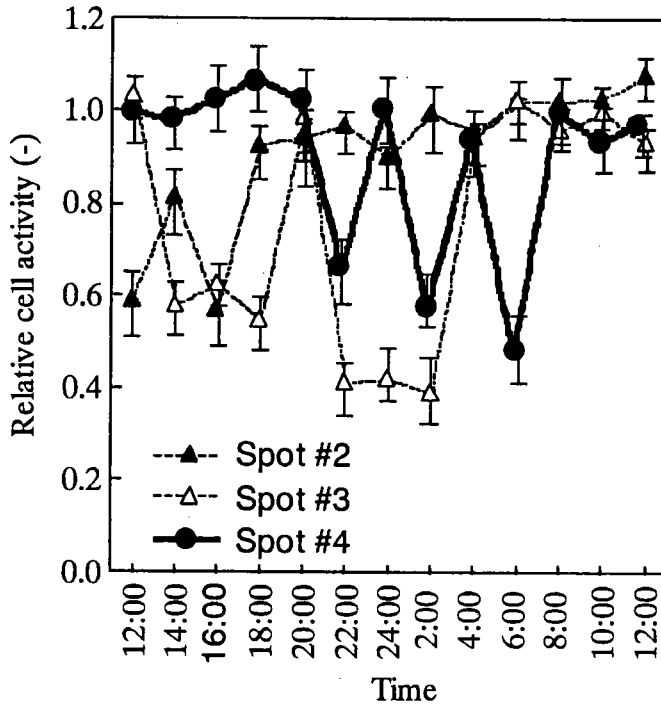


Fig. 11 多摩川試料水の水の 3 箇所同時経時的採取による細胞毒性評価による相対細胞活性の時間的変動

Table 2 河川試料水の細胞毒性に相当する化学物質の濃度とヒト急性致死血中濃度

Chemicals	Molecular weight	Water Quality Standard (mM)	Concentration equivalent to river water cytotoxicity (mM)	Human LD <sup>20</sup> (blood, mM)
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	198		0.0079	0.054
Paraquat	257		0.59	0.167
HgCl <sub>2</sub>	272	0.0024 (Hg)	0.12	0.107
CuSO <sub>4</sub>	160	15.7 (Cu)	0.052	6.817
Phenol	78	0.064 (As Phenol)	0.99	1.487

## 2-4. 結 論

- (1) 開発した高密度固定化細胞を用いる簡便なバイオアッセイによる曝露時間 2 時間の急性毒性評価でも、4 時間の LDL assay と同程度の感度で河川水の急性毒性を評価した。
- (2) 河川水の水質の変動が非常に短時間で大きく、最も大きな変化が見られた場合、2 時間で相対細胞活性が約 0.5 変化した。
- (3) 一部の時間帯の河川水の細胞毒性は、同じ細胞毒性に相当する参照化学物質の濃度を用量作用曲線から求めて比較した場合、ヒト急性致死濃度と 1 桁程度の差しか無く、人体健康に影響を及ぼし得る程強い毒性を持つといえる。バイオアッセイによる環境管理の方法論の確立が望まれる。

## 第 2 章の総括

本研究では開発した迅速・簡便バイオアッセイを河川水の水質評価に応用し、実際の環境水に対する適用性を確認することを主たる目的としたが、いずれの方法とも煩雑な操作が必要となる濃縮操作の必要は無く、細胞生存率試験で得られる感度と同等またはそれ以上の感度で評価できることが明らかとなった。また、河川水の毒性は短時間で大きな変動を示すことが明らかとなり、迅速・簡便なバイオアッセイの必要性を再確認した。特に非常に強い毒性が検出された河川水については、ヒトに対する急性毒性を発現する可能性があることが確認され、水環境管理における有害化学物質の適切な管理が必要になっているといえる。

## 参考文献

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB(1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, *Nature*, 282, 615-616.
- Bhattacharya, S.(1996) The genesis, status and future of environmental toxicity, *Indian Journal of Experimental Biology*, 34, 491-495.
- Houk, V.S.(1992)The genotoxicity of industrial wastes and effluents, *Mutation Research*, 277, 91-138.
- Rotem, A., Toner, M., Bhatia, S., Foy, B.D., Tomplins, R.G.and Yarmush, M.L.(1994) Oxygen is a factor determining in vitro tissue assembly ; effect on attachment and spreading of hepatocytes, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 654-660.
- Rotem, A., Toner, M., Tomplins, R.G.and Yarmush, M.L.(1992) Oxygen uptake rates in cultured rat hepatocyte, *Biotechnol.Bioeng.*, 40, 1286-1291.
- Seibert, H., Kolossa, M.and Wassermann, O.(1989) Bovine spermatozoa as an in vitro model for studies on the cytotoxicity of chemicals:effect of chlorophenols, *Cell Biology and Toxicology*, 5, 315-330.
- Stopeck, A.T.,Nicholson, A.C.,Mancini, F.P.and Hajjar, D.P.(1993) Cytokine regulation of low-density lipoprotein receptor gene transcription in Hep G2 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 17489-17494.
- Van,Kreijl, C.,Kool, F.H.J., Vrjes, M.D.Van Kranen, H.J.and Greef, E.D.(1980) Mutagenic activity in the rivers Rhine and Meuse in the Netherlands, *Science and Total Environment*,15, 137-147.
- Wang,X and Ohno, T.(1995) Typing of MEIC chemicals according to their toxicokinetics modes of action by lactate dehydrogenase-release assay, *in Vitro Toxicology*, 8, 55-63.
- Wang, X., Sakaki, T., Matsudo, T., Saijio-Kurita, K.and Ohno, T.(1993) Correlation of in vitro toxicity of MEIC chemicals determined by lactate-dehydrogenase release assay with in vivo toxicities to animals and humans, *A A T E X*, 2, 115-126.



市川 新 (1997) 多摩川—そのエコバランス。

内海英雄 (1996) 水環境の安全性評価のためのバイオアッセイの今後、水環境学会誌、19、758-763。

内海英雄、安藤正典、土屋悦輝 (1993) 細胞毒性試験による水質評価、用水と廃水、35、5-12

内海英雄、濱田 昭、大野泰雄 (1992) 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。

清重康二、内海英雄、新原智子、濱田 昭 (1992) L-929 細胞のコロニー形成試験を用いた水中微量汚染物質の毒性評価、水環境学会誌、15、748-755。

鈴木基之、山田敏雅、宮崎敏郎、河添邦太郎、河川における汚染物質の拡散の研究—多摩川底質中のカドミウムの蓄積を主に—、生産研究、27、108-112 (1975)。

東京にサケを呼ぶ会レポートより

栃本 博ら (1996) 水道水源水域河川の微量元素汚染指標に関する研究—ある工場排水流入による影響—、水環境学会誌、19、826-834。

---

「たまがわりゅういき多摩川流域におけるさいぼうどくせいへんどう細胞毒性変動のちょうさ調査、かいせき解析」

(研究助成・学術研究 VOL. 29—No.208)

著者 さか い やす ゆき 酒井康行  
発行日 2001年3月31日  
発行 財団法人 とうきゅうとうきゅう環境浄化財団  
〒150-0002  
渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)  
TEL (03)3400-9142  
FAX (03)3400-9141

---