

# 培養細胞を用いた化学物質の毒性評価— 1 —カドミウム及び銅のマスノスケ由来CHSE-214細胞に対する毒性—

森 真朗 若林 明子

## 要 旨

現在、世界中で10万種類を越える化学物質が商品化されている。それらの一部は水環境中にも流出し、水生生物に潜在的な脅威を及ぼしている。

膨大な数にのぼる化学物質の水生生物に対する毒性を評価するためには、簡便、迅速、安価かつ再現性の高い評価方法を開発する必要がある。

本研究の目的は、魚類由来細胞を用いた簡便で再現性のある *in vitro* の試験方法を確立することである。

マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) 由来のCHSE-214細胞にカドミウム及び銅を暴露し、細胞に対する毒性を調べた。毒性の評価は、ニュートラルレッド法(NR法)で行った。ニュートラルレッドの取り込み量を50%減少させるカドミウム及び銅の濃度は、それぞれ、0.09-0.10mM、0.85-0.86mMであった。

## Cells in Culture for the Evaluation of the Toxicity of Chemicals—1 —Cytotoxicity of Cadmium and Copper to CHSE-214 Cells Derived from Chinook Salmon—

Masaaki Mori and Meiko Wakabayashi

### Summary

An estimated chemicals of more than 100,000 are already in commerce in the world. Some of those chemicals enter into aquatic environments and pose a potential threat to the aquatic biota.

For the assessment of the toxicity of those vast numbers of chemicals to the aquatic biota, simple, rapid, reproducible and inexpensive assays have to be developed.

The purpose of this study is to establish a simple, reproducible, *in vitro* assay using cultured fish cells.

CHSE-214 cells derived from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) were exposed to cadmium and copper to evaluate cytotoxicity. Cytotoxicity was assayed by the neutral red (NR) technique. The concentration of cadmium and copper causing a 50% reduction in the uptake of neutral red (NR50) were 0.09-0.10mM and 0.85-0.86mM, respectively.

### 1 はじめに

社会経済活動の活発化にともない、多くの化学物質が製造・使用されてきている。ケミカル・アブストラクトサービス(化学抄録サービス、米国のデータベース)に

よれば、化学物質は現在1,300万種を越え、商品化されているのは10万種を越えているとも言われている。当然ながら、それらの一部は水環境中に流出し、水生生態系に影響を及ぼしている。水辺環境保全のためには、そうし

た化学物質の水環境中への流出を監視し、水生生態系を構成する水生生物への影響を的確に把握する必要がある。化学物質の水生生物への影響の把握、毒性スクリーニングは、一般に、ミジンコや魚類を用いる生物試験により行われ、試験方法も環境庁テストガイドライン、OECDテストガイドライン等により規定されている。

しかし、膨大な数の化学物質すべての毒性スクリーニングを上述の生物試験で行うのは、施設、経費、人員及び時間の面からいってほとんど不可能であり、従来の生物試験に代わる新たな毒性スクリーニング方法の開発が必要になっている。

近年、哺乳類に関する毒性学の分野では、各種の生物試験の代替法として、培養細胞等を用いる *in vitro* の試験方法の開発が進んでいる<sup>1)</sup>。この *in vitro* 試験法の利点は、低コスト、迅速性、多方面への適用性、再現性等にある。水環境中の化学物質の水生生物に対する毒性評価の分野においても、新たな毒性スクリーニング方法として、*in vitro* 試験法の導入を推進していかなければならない。

*In vitro* 試験法の水試料への適用例としては、細菌を用いる試験、動物の培養細胞を用いる試験、菌類を用いる試験、植物を用いる試験などが報告されている<sup>2)</sup>。

今回、著者らは、水環境中に放出される多数の化学物質に対する迅速かつ簡便な、従来の生物試験に代わる新たな毒性スクリーニング方法として、水界に生息する魚類由来の培養細胞を用いた *in vitro* 試験法の適用を検討した。

魚類由来細胞を水環境中の毒性物質の研究に用いたのは Rachlin ら<sup>3)</sup>が最初であり、以後、Kokan ら<sup>4)</sup>、Marion and Denizeau<sup>5)</sup>、Babich ら<sup>6)</sup>、Saito ら<sup>7)</sup>により研究が行われている。

水環境中の化学物質の毒性評価に魚類由来細胞を用いる利点としては、①魚類は変温動物であり、細胞も生息水温に応じた広い温度範囲にわたって培養可能である、②哺乳類由来細胞と異なり、多くの細胞が無限増殖を示す、③培養方法は哺乳類由来細胞に適用されているものほとんど同じでよく、哺乳類由来細胞で確立されている種々の毒性指標を利用できる、等の点が挙げられる<sup>8)</sup>。

本研究では、まず最初に、魚類由来培養細胞の培養方法及び凍結保存方法の検討を行った。対象にした細胞は、マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) 由来CHSE-

214細胞、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 由来RTG-2細胞、ファットヘッドミノー (*Pimephales promela*) 由来FHM細胞、ブラウンプルヘッド (*Ictalurus nebulosus*) 由来BB細胞の4種類である。さらに、魚類由来培養細胞による化学物質の毒性評価方法を確立するため、カドミウム及び銅のCHSE-214細胞に対する毒性を、Borenfreund and Puerner<sup>9)</sup>が開発したニュートラルレッド法 (NR法) を用いて検討した。この方法は、赤色素ニュートラルレッドが生細胞には活発に取り込まれ、細胞のリソゾームに蓄積されるのに対し、死細胞は、ニュートラルレッドを蓄積できないので染色されないという原理を利用したものである。

## 2 方法

### (1) 培養方法及び凍結保存方法の検討

#### ア 細胞

マスノスケ由来CHSE-214細胞、ニジマス由来RTG-2細胞、ファットヘッドミノー由来FHM細胞、ブラウンプルヘッド由来BB細胞の4種類を用いた。

#### イ 培養液

EAGLE'S MEM 培地 (日水製薬) にグルタミンを 292 mg/ℓ、NaHCO<sub>3</sub> を 1,100 mg/ℓ、牛胎児血清 (GIBCO BRL) を 10% 加えた MEM-10 培養液を用いた。

#### ウ 培養

細胞の培養は、プラスチック製ダブルシールキャップフラスコ (IWAKI) を用い、20℃で行った。

#### エ 継代

細胞分散剤として、0.1%トリプシン、0.02%EDTAを含むPBSを用いた。細胞分散剤を培養フラスコに加え、細胞が培養器底から剥離しはじめるまで作用させた後、細胞分散剤を捨て、培養液を加えトリプシンの作用を止めた。その後、ピペッティングにより細胞を十分分散させ、1/6程度の継代濃度で継代した。継代操作は1-2週間に1回の割合で行った。

#### オ 凍結保存

25cm<sup>2</sup>のダブルシールキャップフラスコ (IWAKI) で各細胞を十分繁殖させ、細胞分散後、10%となるようDMSOを加えて混合した培養液2.5mlに懸濁した。凍結保存用チューブに1mlずつ分注し、チューブラックに立て、タオルでくるみビニール袋に入れた後、-80℃の冷

凍庫に入れた。1週間後、各細胞種につき1本ずつ解凍し、細胞の生残を確認した。

(2) 化学物質の毒性評価方法の検討

ア 細胞

マスノスケ由来CHSE-214細胞を用いた。

イ 培養液

MEM-10培養液を用いた。

ウ 培養

CHSE-214細胞の培養は、ダブルシールキャップフラスコ (IWAKI) を使い、20℃で行った。

エ ニュートラルレッド試験

(ア) 試薬

a. MEM (-) 牛胎児血清を含まない培養液

b. 細胞分散剤 0.1%トリプシン、0.02%EDTAを含むPBS

c. ニュートラルレッド (NR) 溶液 ニュートラルレッド (和光純薬) を培養液で希釈し140  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液を作製する。1時間以上マグネチックスターラで攪拌した後、2,500rpm、10分間遠沈し、1夜20℃に静置する。翌日、再度2,500rpm、10分間遠沈し、上清を0.45 $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過して用いる。

d. 細胞固定液 1%CaCl<sub>2</sub>を含む1%ホルマリン液

e. NR抽出液 1%酢酸を含む50% エタノール液

f. 被験物質 塩化カドミウム CdCl<sub>2</sub>·2 $\frac{1}{2}$ H<sub>2</sub>O (和光純薬、試薬特級)、塩化第二銅 CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (和光純薬、試薬特級)

(イ)操作手順

操作手順は、渡辺<sup>10)</sup>を参考にした。

a. 細胞の植え込み 20℃で培養し、十分繁茂したCHSE-214細胞を細胞分散剤で処理し、MEM-10培養液で所定の細胞数の細胞浮遊液を調製した。96穴マイクロプレートの各ウェルに細胞浮遊液の100 $\mu\text{l}$ ずつを植え込み、プレートシーラー (三光純薬) でプレート上部をシーリングし、20℃で24時間培養した。各ウェル当たりの植え込み細胞数は3 × 10<sup>4</sup>個/ウェルとした。

b. 検体作製 被験物質を二次蒸留水 (DW<sub>2</sub>) で溶解し、MEM (-) で所定濃度に希釈した後、0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過滅菌した。96穴マイクロプレート (FALCON) を用いて段階的希釈を行い、目的とする処理濃度の2倍濃度の検体

を96穴マイクロプレートの各ウェルに150 $\mu\text{l}$  準備した。

c. 検体処理 検体作製で96穴マイクロプレートに準備した各濃度段階の被験物質の100 $\mu\text{l}$  ずつを細胞が植え込まれた96穴マイクロプレートの同じ位置のウェルに加え、シーリングし、さらに20℃で24時間培養した。

d. ニュートラルレッド処理と吸光度の測定 NR溶液の100 $\mu\text{l}$  ずつをブランクウェル以外のすべてのウェル (測定の対象ウェルは96ウェルの外周のウェル列を除く60ウェルとした。) に添加し、20℃で3時間、培養を続けた。3時間後にプレート上のすべての溶液を捨て、すべてのウェルに200  $\mu\text{l}$  の細胞固定液を加え、1分間、固定した。固定液を捨てたのち、すべてのウェルに100 $\mu\text{l}$  の色素抽出液を入れ、シーリングし、室温で20分間、色素を抽出した。その後、マイクロプレートリーダー (MPR-A4 i II、東ソー) を用いて、540nmの波長で吸光度を測定した。

e. 測定結果の処理 被験物質の細胞毒性度は、横軸に被験物質の濃度の対数を取り、縦軸に培養液のみを添加した陰性対照群における色素の取り込み量に対する処理群の細胞における色素の取り込み量の比 (細胞生存率) を示した処理濃度・生存率関係図を基に、未処理群における色素の取り込み量に対する処理群における色素の取り込み量の比が50% になる化学物質濃度 (NR50値) で示した。今回の試験では、1回の試験に3枚の96穴マイクロプレートを用い、1濃度につき6つのウェルを使用し、カドミウム及び銅についてそれぞれ2回試験を行った。

### 3 結果及び考察

#### (1) 魚類由来細胞の培養及び凍結保存結果

##### ア 魚類由来細胞の培養

CHSE-214、RTG-2、FHM、BB細胞の細胞形態を図1、2、3、4に示す。

CHSE-214、RTG-2、BB細胞は線維芽細胞であり、FHM細胞は上皮細胞である。

本研究では、培養温度20℃で、1-2週間に一度の割合で継代し、約1年間にわたり4種類の細胞を良好な状態で維持することができた。

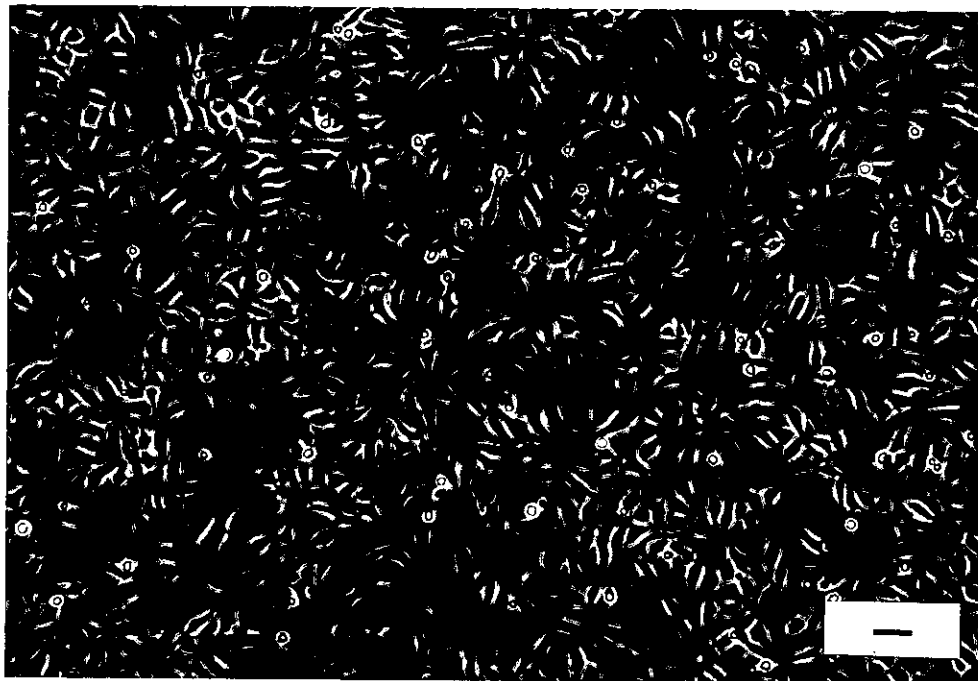


図1 マスノスケ由来CHSE-214細胞  
位相差観察 (実線: 0.05 mm)

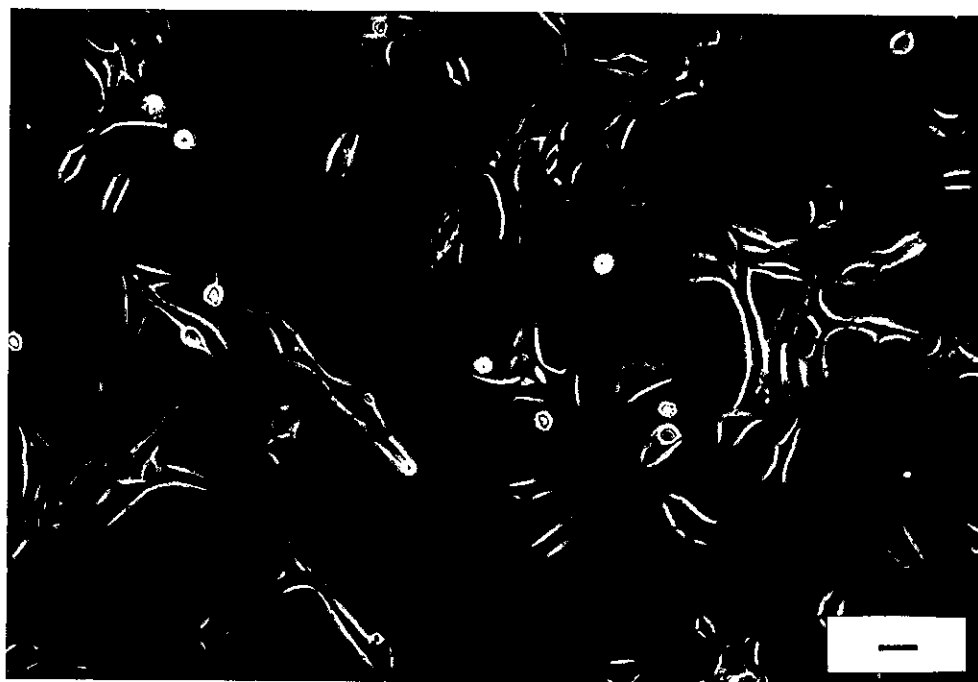


図2 ニジマス由来RTG-2細胞  
位相差観察 (実線: 0.05 mm)

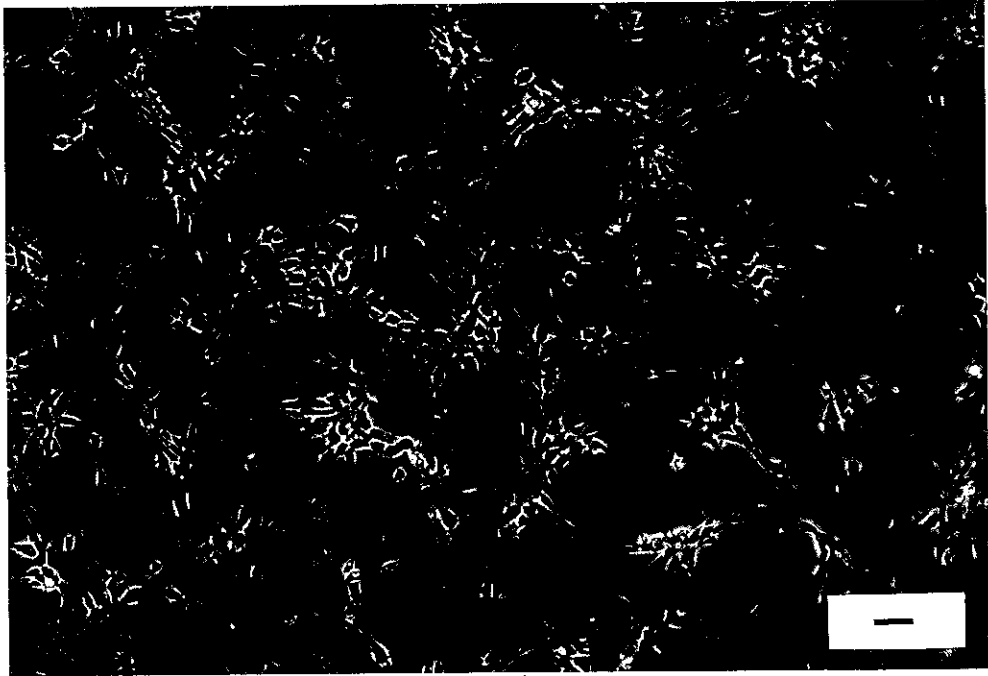


図3 ファットヘッドミノー由来FHM細胞  
位相差観察 (実線: 0.05 mm)

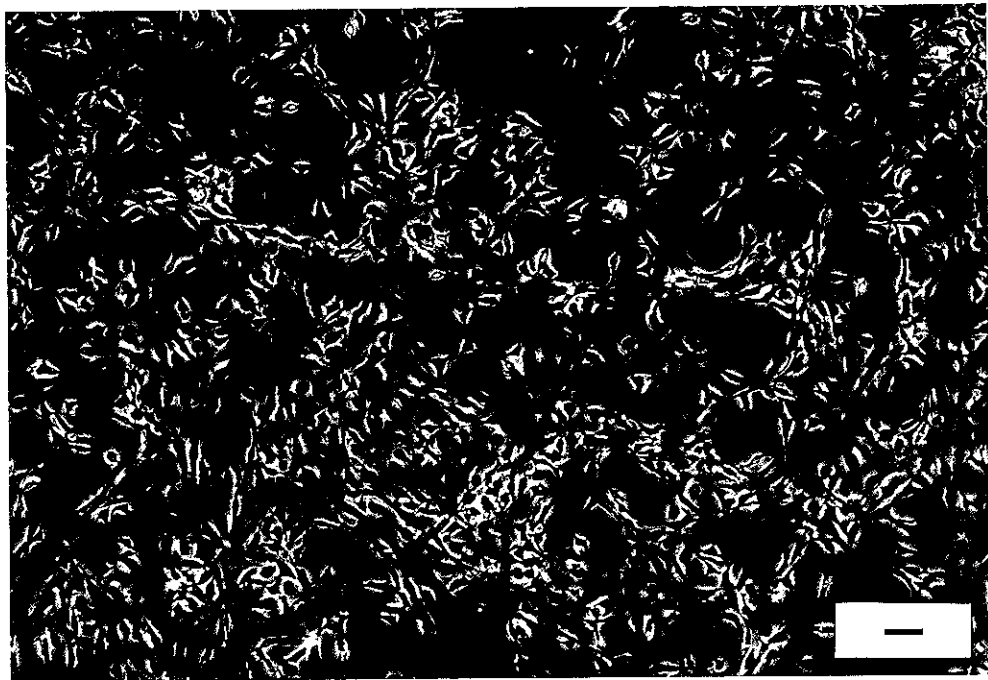


図4 ブラウンブルヘッド由来BB細胞  
位相差観察 (実線: 0.05 mm)

イ 魚類由来細胞の凍結保存

4種類の魚類由来培養細胞の-80℃の凍結保存結果を表1に示す。-80℃で凍結後、1週間経過した時点で解凍し、細胞の生存を確かめたところ、4種類の細胞すべてについて生存が確認され、25cm<sup>2</sup>のフラスコに十分に繁殖させることができた。

表1 魚類由来細胞の凍結保存結果

細胞の種類	凍結1週間後の生存 (-80℃)
CHSE-214	+
RTG-2	+
FHM	+
BB	+

(2) カドミウム及び銅のCHSE-214細胞に対する毒性  
 カドミウムのCHSE-214細胞に対する毒性を試験回数ごと、マイクロプレートごとに図5、図6に示す。また、銅の毒性を図7、図8に示す。カドミウムの第1回目の毒性試験のマイクロプレートごとのNR50値は、0.09、0.10、0.10mM、平均0.10mMであった。第2回目のそれは、0.08、0.09、0.09mM、平均0.09mMであった。銅の第1回目のNR50値は、0.87、0.81、0.84mM、平均0.85mMであり、第2回目のそれは、0.76、0.89、0.91mM、平均0.86mMであった。

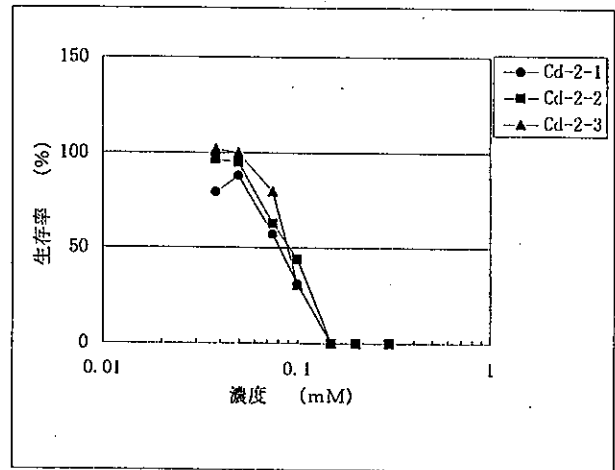


図6 CdのCHSE-214細胞に対する毒性 (第2回)

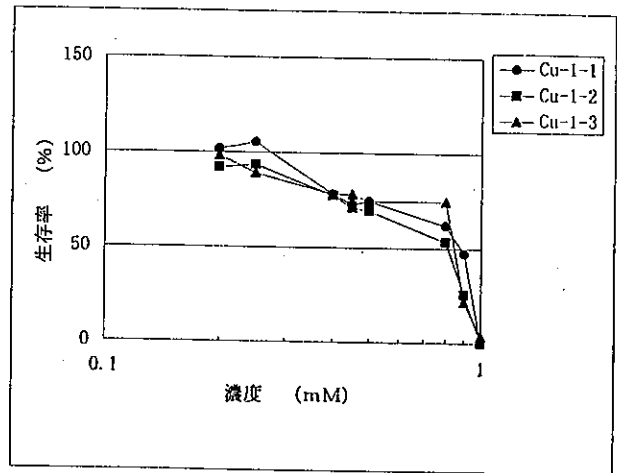


図7 CuのCHSE-214細胞に対する毒性 (第1回)

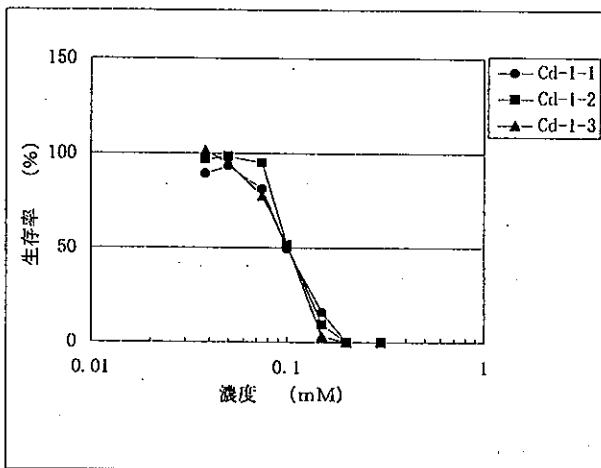


図5 CdのCHSE-214細胞に対する毒性 (第1回)

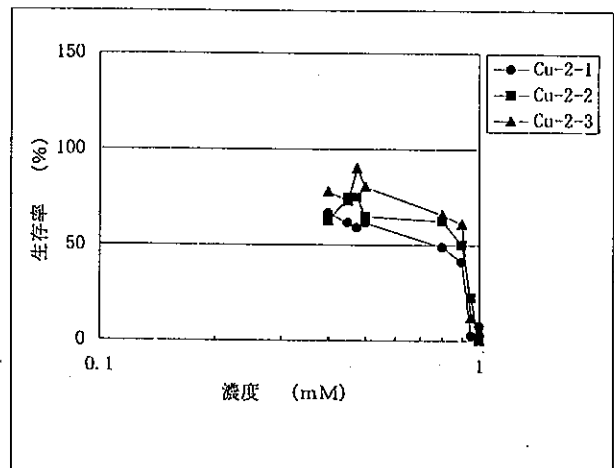


図8 CuのCHSE-214細胞に対する毒性 (第2回)

Babichら<sup>6)</sup>は、魚類培養細胞系を用いた水質汚濁物質(カドミウム、銅、亜鉛、ニッケル)の*in vitro*細胞毒性試験をブルーギルサンフィッシュ由来のBF-2細胞とニジマス由来のRTG-2細胞を用いてニュートラルレッド法で行っている。カドミウム及び銅について、Babichら<sup>6)</sup>の結果と今回の結果を比較して示すと表2のとおりである。カドミウム及び銅の毒性の強さをNR50値で比べると、三種類の細胞すべてで、[カドミウム>銅]であった。また、カドミウムのそれぞれの細胞に対するNR50値は、0.08-0.18mMでほぼ似かよっていたが、銅のそれは0.55-1.45mMと細胞の種類により感受性にやや差が認められた。

表2 カドミウム及び銅の魚類由来細胞に対する毒性

細胞の種類	NR50値 単位: mM	
	カドミウム	銅
BF-2 <sup>6)</sup>	0.08	0.55
RTG-2 <sup>6)</sup>	0.18	1.45
CHSE-214	0.10	0.85
	0.09	0.86

#### 4 おわりに

今回、CHSE-214細胞を用いて2種類の金属の毒性を試験したところ、再現性のよい結果が得られた。

一般に、魚類急性毒性試験は費用と時間がかかり、特別の飼育設備やある程度熟練した要員が必要である。もし、魚類由来細胞を用いる*in vitro*毒性試験で化学物質の魚毒性値を予測できるとすれば、水環境の生態毒性学の進歩に大きな貢献となるであろう。

これまでに樹立されている魚類由来細胞の種類数に比べ、化学物質の細胞毒性試験に用いられた細胞の種類数は少ない。また、変温動物由来細胞に特徴的な広い培養温度範囲という性質を利用した研究も少ない。今後は多種類の魚類由来培養細胞の化学物質に対する感受性及び*in vivo*と*in vitro*の毒性試験結果の比較、さらに暴露温度の違いによる魚類由来培養細胞の化学物質に対する感受性の比較、等について検討していく必要がある。

将来的には、魚類由来培養細胞を用いた環境水の評価、

あるいはバイオモニターとしての利用等についての研究展開も重要である。

#### 謝 辞

本研究に用いたCHSE-214、RTG-2、FHM、BB細胞は、東京水産大学 福田頼穂教授のご好意により分与賜ったものである。記して深謝の意を表する。

#### 引用文献

- 1) Ekwall B.: Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals New York academy of sciences*, **407**, p.64-77(1983).
- 2) 浦野紘平・金澤伸浩: 細胞などを用いた毒性試験方法と水試料への適応例, 用水と廃水, **33**, 9, p.3-16 (1991).
- 3) Rachlin J.W. and A. Perlmutter: Fish cells in culture for study of aquatic toxicants. *Water Research*, **2**, p.409-414(1968).
- 4) Kokan R.K., *et al.*: In Vitro effect of some mutagens/carcinogens on cultured fish cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **10**, p.663-671(1981).
- 5) Marion M. and F. Denizeau: Rainbow trout and human cells in culture for the evaluation of the toxicity of aquatic pollutants: A study with cadmium. *Aquatic Toxicology*, **3**, p.329-343 (1983)
- 6) Babich H., *et al.*: In Vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **11**, p.91-99(1986).
- 7) Saito H., *et al.*: In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to Goldfish GF-Scale (GFS) cells. *Chemosphere*, **23**, 4, p.525-537(1991).
- 8) 齊藤穂高・茂岡忠義: 魚類細胞による化学物質の魚毒性予測手法について, 第1回エコトキシコロジー研究会, バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集, B-10(1995).
- 9) Borenfreund E. and J.A. Puerner: Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*,

24, p.119-124(1985).

- 10) 渡辺正己：ニュートラルレッド取り込みによる毒性試験法，大野忠夫編著 動物実験代替法マニュアル 培養細胞を用いた理論と応用，p.45-50，共立出版(1994)。