

培養細胞を用いた化学物質の毒性評価(3)

— マスノスケ胚由来CHSE-214細胞に対する11種類の化学物質の毒性 —

森 真朗 若林 明子

要 旨

マスノスケ胚由来CHSE-214細胞に対して11種類の化学物質を曝露し、ニュートラルレッド法で細胞毒性を評価した。試験した11種類の化学物質のNR50値は次のとおりであった。

エタノール-738mM、アニリン-33.7mM、フェノール-11.8mM、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム-0.084mM、塩化ベンゼトニウム-0.013mM、ドデシル硫酸ナトリウム-0.064mM、フェニトロチオン-0.572mM、ダイアジノン-1.120mM、チオベンカルブ-0.174mM、キャプタン-0.026mM、酢酸-7.4mM

水に難溶性の化学物質はジメチルホスホキシド(DMSO)またはタウロデオキシコール酸添加DMSOに溶解して用いた。細胞の生存に影響を及ぼさないDMSOの濃度は2%(v/v)、タウロデオキシコール酸添加DMSOの濃度は0.5%であった。

本研究で得られた結果を既報の魚類由来細胞を用いて行われた試験結果及び魚類個体を用いて行われた毒性試験のLC50値と比較したところ、良い相関が認められた。

キーワード：魚類、培養細胞、細胞毒性、ニュートラルレッド、化学物質

Cells in Culture for the Evaluation of the Toxicity of Chemicals(3) — Cytotoxicity of Several Chemicals toward CHSE-214 Cells derived from Chinook Salmon Embryo —

Masaaki Mori and Meiko Wakabayashi

Summary

CHSE-214 cells, an established fish cell line derived from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) embryo, were exposed to 11 chemicals. Cytotoxicities were assayed by the neutral red (NR) technique. NR50 values for 11 chemicals are as follows:

ethanol-738 mM, aniline-33.7mM, phenol-11.8mM, sodium linear-dodecylbenzene-sulfonate-0.084mM, benzethonium chloride-0.013mM, sodium dodecyl sulfate-0.064mM, fenitrothion-0.572mM, diazinon-1.120 mM, benthocarb-0.174mM, captan-0.026mM and acetic acid-7.4mM.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) or DMSO added with taurodeoxycholic acid was used as the vehicle to dissolve the chemicals which were scarcely dissolved in water. The concentration of no observable effect on the cell viability was 2%(v/v) for DMSO and 0.5%(v/v) for DMSO added with taurodeoxycholic acid. Comparisons of neutral red cytotoxicity (24h NR50 values) in CHSE-214 cells were made with previously

obtained data on fish cells in culture and with in vivo 96h LC50 values. A good correlation was observed between NR50 values and 96h LC50 values.

Keywords : fish, cultured cell, cytotoxicity, neutral red, chemicals

1 はじめに

著者らは、前報¹⁾において、5種類の魚類由来細胞に対する4種類の金属類の毒性をニュートラルレッド法²⁾を用いて評価することを試みた。魚類培養細胞を用いたin vitro毒性試験方法を化学物質の魚毒性を知るための簡便なスクリーニング手法として確立していくには、さらに多種類の化学物質について、種々のin vitro試験間及びin vitro試験とin vivo試験間で毒性値を比較検討する必要がある。そこで、本研究では、金属類以外の11種類の化学物質を対象に、前報¹⁾とほぼ同じ方法で魚類由来細胞を用いたニュートラルレッド法による毒性試験を行った。その結果得られた毒性値を、これまでに魚類培養細胞を用いて行われた試験結果及びin vivo試験で得られた結果と比較検討し、考察を加えた。

2 材料及び方法

(1) 化学物質

以下の化学物質を試験に用いた。

アルコール類

エタノール

アニリン類

アニリン

フェノール類

フェノール

界面活性剤

直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム

塩化ベンゼトニウム

ドデシル硫酸ナトリウム

農薬類

ダイアジノン

キャプタン

チオベンカルブ

フェニトロチオン

酢酸類

酢酸

これらの化学物質はすべて和光純薬工業株式会社（大阪）製である。農薬は残留農薬試験用標準品を用いた。

(2) 魚類由来細胞

CHSE-214細胞（マスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* 胚から樹立された上皮性の株化細胞）を用いた。細胞の維持、継代は前報¹⁾と同様の方法で行った。

(3) ニュートラルレッド法による毒性評価

(ア) 培地及び試薬類

a MEM(-)HEPES HEPES (GIBCO BRL、アメリカ) 20mMを加えた牛胎児血清を含まないイーグルMEM 培地（日水製薬株式会社、東京）。

b MEM-5-HEPES HEPES 20mMを加えた牛胎児血清 (GIBCO BRL、アメリカ) 5% (v/v) を含むイーグルMEM培地。

c MEM-10-HEPES HEPES 20mMを加えた牛胎児血清10% (v/v) を含むイーグルMEM培地。

d ニュートラルレッド(NR)溶液 ニュートラルレッド (SIGMA、アメリカ) をMEM-5-HEPESで希釈し140 μ g/ml溶液を作製する。マグネチックスターラーで充分攪拌したのち、1夜20 $^{\circ}$ Cに静置する。翌日、2,500 rpmで10分間遠沈し、上清を0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過して用いた。

e 細胞固定液 1% (w/v) CaCl₂を含む1% (v/v) ホルマリン液。

f NR抽出液 1% (v/v) 酢酸を含む50% (v/v) エタノール液。

(イ) 操作手順

a 96穴マイクロプレートへのCHSE-214細胞の播種 MEM-10-HEPESで所定の細胞数の細胞浮遊液を調製し、前報¹⁾にしたがい細胞をマイクロプレートの各ウェルに植え込んだ。播種細胞数は3 \times 10⁴個/ウェルとした。

b 検体作製 水溶性の化学物質は超純水に、水に難溶性のものはDMSO(ジメチルスルホキシド、和光純薬工業株式会社、大阪、生化学用)あるいはタウロデオキシコール酸(SIGMA、アメリカ) 20mg/mlを含むDMSOに溶解し、MEM(-)HEPESで所定濃度に希釈して用いた。

c 検体処理 前報¹⁾と同様に行った。

d ニュートラルレッド処理と吸光度の測定 前報¹⁾と同様に行った。

e 測定結果の処理 各化学物質の細胞毒性度は前報¹⁾と同様にNR50値で示した。

(4) 溶解補助剤の影響

本研究では、水に難溶性の化学物質はDMSOあるいはタウロデオキシコール酸20mg/mlを含むDMSOに溶解した。そこで、これら溶解補助剤のCHSE-214細胞に対する毒性をニュートラルレッド法で評価した。すなわち、96穴マイクロプレートに3×10⁴個/ウェルの密度でCHSE-214細胞を播種し、24時間培養後、ウェル内の培養液を捨て、DMSOあるいはタウロデオキシコール酸20mg/mlを含むDMSOのそれぞれを最終濃度が0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10% (いずれもv/v) になるようにMEM(-)HEPES 培地に溶解した培養液 (100 μl/ウェル) に置換した。24時間曝露したのち、ニュートラルレッド法により細胞生存率を求めた。なお、1濃度につき5つのウェルを使用し、試験は3回行った。

3 結果及び考察

(1) 溶解補助剤の影響

本研究で用いた農薬類の中には水に難溶性のものがいくつか含まれている。それらの物質はまずDMSOに溶解し、その後MEM(-)HEPESに溶かしたが、なかにはMEM(-)HEPESに溶かすと再び培地表面に油滴状に散在するものがあつた。国本ら³⁾は、ヒト由来細胞培養系を用いた水環境試料中の有機塩素化合物の毒性評価において、水に難溶性の有機塩素化合物の溶解補助剤としてタウロデオキシコール酸20mg/mlを含むDMSOを用いた。そこで、本研究では国本ら³⁾のこの手法を参考にし、そうした物質に対しては、弱い界面活性剤であるタウロデオキシコール酸を含むDMSOに溶かして用いた。そこでまず、これら溶解補助剤のCHSE-214細胞に対する影響をニュートラルレッド法により調べた。図1及び図2にその結果を示した。

図1及び図2から、DMSOは単独では3% (v/v) 程度培地に加えた時、初めてCHSE-214細胞に対して有意な毒性が認められたが、20mg/mlのタウロデオキシコール酸がDMSOに加わると、2% (v/v) 程度培地に加えただけで細胞生存率は30%以下に低下し、DMSO単独の時より毒性が強くなった。

この予備実験の結果から、本研究においては、培地に加える溶解補助剤の量は0.5% (v/v) 以下とした。

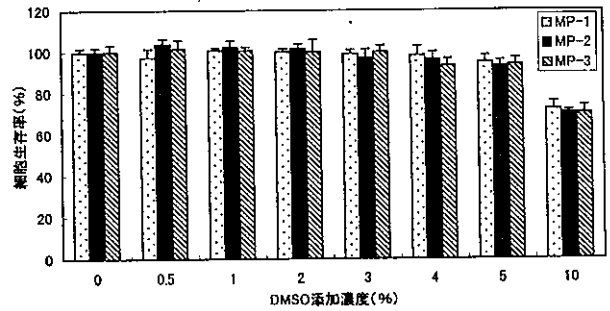


図1 DMSOのCHSE-214細胞に対する影響

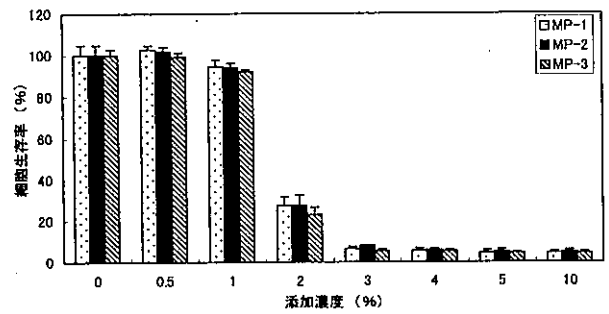


図2 タウロデオキシコール酸20mg/ml 加DMSOのCHSE-214細胞に対する影響

辻ら⁴⁾は抗HIV活性物質のスクリーニング研究において、試料中の有機性化合物の溶解性を増すために入っている有機溶媒の測定系に及ぼす影響を調べるため、DMSOのヒトリンパ球系樹立細胞株であるMT-4細胞、Molt-4細胞、HIV持続感染系のMolt-4/HTLV-III B細胞に対する毒性を検討した。そして、DMSO濃度は最終濃度1% (v/v) 以上になると用いた細胞すべてに毒性を示すこと、0.5% (v/v) 以下では影響はみられないことを明らかにした。辻らの研究と本研究とを比較すると、哺乳類由来細胞の方が低濃度でDMSOの影響を受ける (感受性が高い) と思われるが、前報¹⁾で述べたように、培養細胞に対する化学物質の毒性は曝露温度により異なる。哺乳類由来細胞の通常の曝露温度は37℃、本研究の魚類由来のCHSE-214細胞の曝露温度は20℃という条件を考えると、DMSOに対する感受性の比較、特に培養温度の異なる哺乳類由来と魚類由来の培養細胞間の比較は慎重に行われなくてはならない。

(2) 11種類の化学物質のCHSE-214細胞に対する細胞毒性

表1に、試験に供した11種類の化学物質のCHSE-214細胞に対する毒性値 (NR50値¹⁾) を一括して示した。表1には今回得られたNR50値とともに、これまでに魚

類由来細胞を用いて行われた毒性試験の結果も一部比較のため記載した。また、表2には、表1で示した毒性試験の供試細胞及び試験条件等を一括して示した。今回用いた化学物質のNR50値の最大値はエタノールの738mM、最小値は塩化ベンゼトニウムの0.013mMであった。試験した化学物質の中で、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、塩化ベンゼトニウム、ドデシル硫酸ナトリウム、チオベンカルブについては、魚類由来細胞を用いた細胞毒性試験はこれまでに行われていない。一方、フェノールは割合多く試験されている。そこで、フェノールの結果を見ると、細胞付着をエンドポイントとしたEC50値・41.7mMを別にすれば、NR50値、CV50値は6.9-11.8mMでほぼ近い範囲に入っている。エタノール、アニリン、フェニトロチオン、ダイアジノン、キャプタン、酢酸といった物質についても、他の試験結果と比較した場合、物質により感受性に高低はあるものの、その違いは10倍程度であった。

次に、in vivo 試験で得られた結果と本研究結果を比較する。CHSE-214細胞の由来魚種のマスノスケ（キングサーモン）については毒性試験データが極めて少な

いため、ここではデータベースAquireで検索し、急性毒性試験の96時間LC50値がよく整っている温水性淡水魚ファットヘッドミノーと比較した。ファットヘッドミノーについては、今回供試した11種類の化学物質のうち、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、チオベンカルブを除く9種類の化学物質の96時間LC50値のデータがデータベースAquireにあった。図3に、本研究のNR50値とファットヘッドミノーの96時間LC50値の関係を9種類の化学物質について示した。図3で明らかのように、NR50値とLC50値は良い相関関係にあり、相関係数は0.87であった。また、今回試験した11種類の化学物質の中で、in vivo試験のデータがあるものについてみると、エタノールが最も毒性が低く、キャプタンが最も毒性が高いという現象はin vivo、in vitro両試験に共通であった。

今回の試験では11種類の化学物質についてin vitro毒性試験を実施したが、in vitro試験とin vivo試験を比較するにはさらに工夫が必要であり、かつ、供試化学物質の絶対数が不足している。化学物質は生物に対する作用様式によりいくつかの型に分けられる¹³⁾。魚類毒性試験

表1 化学物質のCHSE-214細胞に対する細胞毒性及び魚類培養細胞を用いた他の研究結果との比較

化学物質	(分子量)	NR50*0	EC50*1	NR50*2	NR50*3	NR50*4	NR50*5	NR50*6	NR50*7	CV50*8
エタノール**	(46.07)	738				880			880	254
アニリン**	(93.13)	33.7	29.4							
フェノール**	(94.11)	11.8	41.7	6.9	6.93	7.8	7.9		7.8	10.4
直鎖ドデシルベンゼン										
スルホン酸ナトリウム**	(348.48)	0.084								
塩化ベンゼトニウム**	(448.09)	0.013								
ドデシル硫酸ナトリウム**	(288.38)	0.064								
フェニトロチオン*c	(277.24)	0.572						0.048		
ダイアジノン*b	(304.35)	1.120						0.11		
チオベンカルブ*c	(257.78)	0.174								
キャプタン*b	(300.59)	0.026						0.022		
酢酸**	(60.05)	7.4				49			49	

** : 超純水

*b : DMSO (ジメチルスルホキシド)

*c : タウロデオキシコール酸加 DMSO

*0 : 本研究

*1 : Bolsら⁵⁾

*2 : Babichら⁶⁾

*3 : Babichら⁷⁾

*4 : Dierickxら⁸⁾

*5 : Saitoら⁹⁾

*6 : Saitoら¹⁰⁾

*7 : Brandaoら¹¹⁾

*8 : Segnerら¹²⁾

表2 魚類培養細胞を用いた研究の供試細胞及び実験条件

文 献	細胞名	由来魚種	由来組織	エンドポイント	暴露時間	暴露温度	培地
*0 本研究	CHSE-214	マスノサ	胚	NR ^{*a}	24 h	20°C	EMEM ^{*d}
*1 Bolsら ⁵⁾	RTG-2	ニジマス	生殖腺	EC ^{*b}	24 h	室温	L-15 ^{*e}
*2 Babichら ⁶⁾	BF-2	ブルーギルサソフィッシュ	筋肉	NR	24 h	26°C	DMEM ^{*f}
*3 Babichら ⁷⁾	FHM	ファットヘッドミノ	筋肉	NR	24 h	34°C	
	BF-2	ブルーギルサソフィッシュ	筋肉	NR	24 h	26°C	DMEM
*4 Dierickxら ⁸⁾	FHM	ファットヘッドミノ	筋肉	NR	2 h	34°C	DMEM
*5 Saito ら ⁹⁾	GFS	キンギョ	鱗	NR	24 h	27°C	L-15
*6 Saito ら ¹⁰⁾	GFS	キンギョ	鱗	NR	24 h	25°C	L-15
*7 Brandao ら ¹¹⁾	FHM	ファットヘッドミノ	筋肉	NR	24 h	34°C	DMEM
*8 Segnerら ¹²⁾	R1	ニジマス	肝臓	CV ^{*c}	24 h	18°C	M199 ^{*g}

*a:NR, ニュートラルレッド

*d:EMEM, イーグル MEM 培地

*g:M199, M199培地

*b:EC, 細胞付着

*e:L-15, ラボビッツ L-15 培地

*c:CV, クリスタルバイオレット

*f:DMEM, ダルベッコ MEM培地

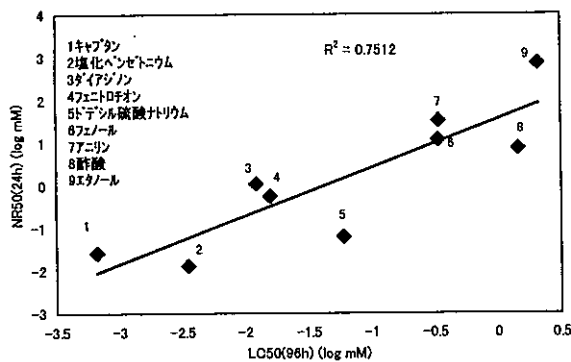


図3 24hNR50値とファットヘッドミノ96hLC50値との関係

の代替法として魚類由来培養細胞を用いる毒性試験を考えた場合、作用様式の異なる化学物質に魚類由来培養細胞がどのような反応を示すかを知ることは重要である。今後、より多くの化学物質について、作用様式の型を考慮に入れたin vitro毒性試験を行っていく必要があるが、魚類由来細胞は哺乳類由来細胞に比べると増殖速度が著しく遅く、試験に必要な細胞数の確保に支障をきたす場合がある。この点については、将来、浮遊培養可能で常時マイクロプレートに播種可能な新しいタイプの魚類由来細胞の利用を考えていく必要がある。

今後は、新しいタイプの魚類由来細胞を利用し、簡便・迅速に多くの化学物質の細胞毒性を評価し、in vivo試験の結果やQSAR（構造相関活性）式で得られる結果等と比較検討し、魚類由来培養細胞を用いたin vitro毒性試験を魚類毒性試験に移る前のスクリーニング手法としてどの程度利用していいのかを明らかにしていくことが重要である。

4 まとめ

魚類由来CHSE-214細胞に対する11種類の化学物質の毒性をニュートラルレッド法により評価した。その結果、この手法が多種類の化学物質の毒性評価に使用できることが明らかになった。水に難溶性の化学物質の細胞毒性評価のために、溶解補助剤としてDMSOあるいはタウロデオキシコール酸加DMSOを用いた。溶解補助剤の細胞毒性試験から、溶解補助剤の培地への添加濃度は0.5%以下が適当と考えられた。得られた結果を魚類培養細胞を用いてこれまでに行われた試験結果及び魚類個体を用いて行われた毒性試験結果と比較検討した。9種類の化学物質について、ファットヘッドミノを用いて得られた96時間LC50値と本研究で得られたNR50値との

関係を調べたところ、良い相関が認められた。

謝 辞

本研究に用いたCHSE-214細胞は、東京水産大学 福田穎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) 森 真朗, 若林 明子: 培養細胞を用いた化学物質の毒性評価-2 数種類の魚類培養細胞に対する金属類の毒性及び毒性に及ぼす曝露温度の影響, 東京都環境科学研究所年報 1997, p.134-142 (1997) .
- 2) Borenfreund E. and J.A.Puerner: Toxicity determination in vitro by morphological alternations and neutral red absorption, Toxicological Letters, 24, p119-124 (1985) .
- 3) 国本 学ら: ヒト由来細胞培養系を用いた水環境試料中の有機塩素化合物の毒性評価、水環境学会誌、20 (11) 、 p.752-756 (1997)
- 4) 辻恵美子ら: 抗IHN活性物質のスクリーニング、神奈川県衛生研究所研究報告、27、 p.34-38 (1997) .
- 5) Bols N., et al.: The use of fish cells cultures as an indication of contaminant toxicity to fish, Aquatic Toxicology, 6, p.147-155 (1985) .
- 6) Babich H. and E. Borenfreund: Fathead minnow FHM cells for use in in vitro cytotoxicity assays of aquatic pollutants, Ecotoxicology and Environmental safety, 14, p.78-87 (1987) .
- 7) Babich H. and E. Borenfreund: In Vitro cytotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish (BF-2) cells, Environmental Research, 42, p. 229-237 (1987) .
- 8) Dierickx P.J. and Ingrid E. Van De Vyver: Correlation of the Neutral Red uptake inhibition assay of cultured fathead minnow fish cells with fish lethality tests, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 46, p.649-653 (1991) .
- 9) Saito H., et al.: In vitro cytotoxicity of chlorophenols to goldfish GF-scale (GFS) cells and quantitative structure-activity relationships, Environmental Toxicology and Chemistry, 10, p. 235-241 (1991) .
- 10) Saito H., et al.: In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-Scale (GFS) cells, Chemosphere, 23 (4) , p.525-537 (1991) .
- 11) Brandao Joao C., et al.: Correlation between the in vitro cytotoxicity to cultured fathead minnow fish cells and fish lethality data for 50 chemicals, Chemosphere, 25 (4) , p.553-562 (1992) .
- 12) Segner H. and D. Lenz: Cytotoxicity assays with the rainbow trout cell line, Toxic. in vitro, 7 (4) , p.537-540 (1993) .
- 13) 若林 明子: 化学物質の毒性発現の作用様式 (mode of action) -魚類を例にして-、環境管理、34 (3) 、 p.46-53 (1998) .