

魚類由来浮遊培養細胞を用いた化学物質の毒性評価(1)

森 真朗 若林 明子

要 旨

魚類由来としては初めての浮遊培養細胞であるCHSE-sp細胞及び単層培養細胞CHSE-214細胞に対してラウリル硫酸ナトリウムとアニリンを暴露し、ニュートラルレッド法で細胞毒性を評価した。CHSE-sp細胞に対するラウリル硫酸ナトリウム及びアニリンの20℃、24hNR50値は、0.030mM及び40.8mMであった。CHSE-214細胞に対するそれらの24hNR50値は、0.064mM及び33.7mMであった。CHSE-sp細胞の好適培養温度域をニュートラルレッド法により調べたところ、30℃、96時間培養では増殖が極端に低下することが分かった。浮遊培養細胞は毒性試験における操作性の点で単層培養細胞より優れていた。魚類培養細胞を用いた毒性試験をより迅速に行うために、浮遊培養細胞の利用は有望と考えられた。

キーワード：魚類、培養細胞、細胞毒性、ラウリル硫酸ナトリウム、アニリン

Toxicity Evaluation of Chemicals using Suspension Cultured Fish Cells (1)

Masaaki Mori and Meiko Wakabayashi

Summary

Cytotoxicity of sodium dodecyl sulfate and aniline toward CHSE-sp cells and CHSE-214 cells were evaluated by the Neutral Red Assay Method. The CHSE-sp cells are the first complete suspension cultured fish cells and the CHSE-214 cells are monolayer cultured fish cells. The 24h NR50 values of sodium dodecyl sulfate and aniline toward the CHSE-sp cells were 0.030mM and 40.8 mM, respectively. Those values of the two chemicals toward the CHSE-214 cells were 0.064 mM and 33.7 mM, respectively. The optimum growth temperature for the CHSE-sp cells was investigated using the Neutral Red assay.

During a 96 hour incubation period at 30 °C, CHSE-sp cells did not propagate. The suspension cultured fish cells showed advantages in executing of the cytotoxicity assay in comparison with the monolayer cultured fish cells. Using the suspension cultured cells, the cytotoxicity assay using fish cultured cells can be executed more quickly.

Keywords : fish, cultured cell, cytotoxicity, sodium dodecyl sulfate, aniline

1 はじめに

魚類由来培養細胞は現在までに百数十種類以上樹立されているが、そのほとんどは接着依存性であり、単層培養細胞である¹⁾。したがって、これまで化学物質の毒性評価に用いられてきた種々の魚類由来培養細胞もすべて単層培養細胞であった^{2), 3), 4), 5), 6)}。培養細胞を用いる毒性試験には、トリプシン等による細胞剥離操作の必要な単層培養細胞よりも、分散した状態で細胞の保存が可

能で、必要な時に随時マイクロプレート等に直接播種できる浮遊培養細胞の方が適していると考えられる。しかし、これまで魚類由来浮遊培養細胞を化学物質の毒性評価試験に用いた研究は皆無である。そこで本研究では、魚類由来としては初めての浮遊培養系の細胞株であるCHSE-sp細胞を毒性試験に応用する際の基礎的検討として、魚類由来浮遊培養細胞と単層培養細胞の化学物質に対する感受性を比較し、さらに魚類由来浮遊培養細胞の

増殖適温域についても調べたので報告する。

2 方法

(1) 魚類由来浮遊培養細胞と単層培養細胞の化学物質に対する感受性の比較

ア 化学物質

次の2種類の化学物質を試験に用いた。

①ドデシル硫酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社 (大阪))。

②アニリン (和光純薬工業株式会社 (大阪))。

イ 魚類由来培養細胞

①CHSE-sp細胞：マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) 胚由来の単層培養細胞CHSE-214細胞を基に選抜淘汰を繰り返し得られた魚類由来としては初めての浮遊培養細胞である。⁷⁾

② CHSE-214細胞：マスノスケ胚由来の単層培養細胞である。

ウ 化学物質の細胞毒性評価方法

CHSE-sp細胞及びCHSE-214細胞を用いた化学物質の細胞毒性評価は96穴マイクロプレートを用いて、ニュートラルレッド法⁸⁾により実施した。化学物質の細胞への暴露は20℃、24時間とした。ニュートラルレッド法による細胞毒性評価法の概略は次のとおりである。MEM-10-HEPES (10%牛胎児血清を含むHEPES緩衝イーグルMEM培地) 培養液でCHSE-sp細胞あるいはCHSE-214細胞の細胞懸濁液を調製し、96穴マイクロプレート (Becton Dickinson&Co.,NJ.,USA) の各ウェルに3×10⁴個の細胞を含む0.1mlの培養液を播種し、20℃で24時間培養した。24時間後、ウェルの底面に細胞シートが形成されたのを確認し、培養液を捨て、各化学物質を含むMEM (-) HEPES (牛胎児血清を含まないHEPES緩衝イーグルMEM培地) 培養液0.1mlに置換した。20℃で24時間暴露後、培養液を捨て、140μg/mlのニュートラルレッド (SIGMA Chemical Co.St.Louis.,MO.USA) を含むMEM-5-HEPES (5%牛胎児血清を含むHEPES緩衝イーグルMEM培地) 培養液0.1mlに置換し、20℃、3時間、生細胞にニュートラルレッドを取り込ませた。培養液を捨て、1分間、0.2ml/ウェルの固定液 (1% (v/v) ホルマリン-1% (w/v) 塩化カルシウム) で固定後、20分間、0.1ml/ウェルの色素抽出液 (1% (v/v) 酢酸-50% (v/v) エタノール) で色素を抽出した。マイクロプレ-

トリーダー (MPR-A4I II、東ソー、東京) を用い、波長540nmで各ウェルの吸光度を測定した。細胞毒性データは対照に対するパーセントとして示した。化学物質の相対的な細胞毒性はNR50値で評価した。NR50値とは、細胞によるニュートラルレッドの取り込みを50%阻害するのに必要な化学物質の濃度である。値はmMで示した。

(2) 魚類由来浮遊培養細胞の増殖適温域の検討

ア 供試細胞：CHSE-sp細胞を用いた。

イ 培養液：MEM-10-HEPESを用いた。

ウ 試験：20℃、静置浮遊状態で保存したCHSE-sp細胞をMEM-10-HEPES培養液に懸濁し、1×10⁴個の細胞を含む100μlの細胞浮遊液を96穴マイクロプレートの各ウェルに播種した。温度勾配恒温器 (TG-100-AD, (株)日本医化器械製作所) で10,15,20,25,30℃の温度区を設定し、各温度区に細胞を播種したマイクロプレートを1枚ずつ静置した。各温度で96時間培養後、(1)と同様の方法でニュートラルレッドを生細胞に取り込ませ、細胞固定、抽出後、吸光度を測定した。

3 結果及び考察

(1) 浮遊培養細胞CHSE-sp細胞と単層培養細胞CHSE-214細胞の毒性試験における操作性の比較

細胞毒性試験における操作性の点から浮遊培養細胞と単層培養細胞を比較すると、単層培養細胞の場合はアッセイプレートを準備するためにトリプシン溶液等を用いた煩雑な細胞剥離・分散作業が必要であり、毒性試験に必要な細胞数を確保するにも、かなりの数の大型培養フラスコを準備しなければならない。それに対し、浮遊培養細胞の場合は、分散細胞集団であるため、トリプシン処理等の煩雑な操作無しに、必要な時に随時、マイクロプレート等に細胞を播種することが可能であった。

我々は前報⁹⁾で、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来す場合のあることを報告し、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を毒性試験に利用していく必要のあることを述べた。今回用いたCHSE-sp細胞は、操作性の点ではそうした条件を十分に満たし、毒性試験に用いるには非常に適した細胞タイプと考えられた。

(2) 魚類由来浮遊培養細胞と単層培養細胞の化学物質に対する感受性の比較

浮遊培養細胞CHSE-sp細胞及び単層培養細胞CHSE-214細胞に対する2種類の化学物質、ドデシル硫酸ナトリウム及びアニリンの24hNR50値を表1に示した。CHSE-sp細胞に対するドデシル硫酸ナトリウム及びアニリンの24hNR50値はそれぞれ0.030mM、40.8mMであった。CHSE-214細胞に対するそれは、それぞれ0.064mM、33.7mMであった。浮遊培養細胞に対しても、単層培養細胞に対するのと同様に、ドデシル硫酸ナトリウムの毒性は強いことが分かった。今回は2物質についてのみなので簡単には言えないが、感受性の点で両細胞を比較すると、一方が特に感受性が高いとは言えないようである。アニリンに関しては、魚類培養細胞に対する毒性についてBolsらの報告¹⁰⁾があるが、ドデシル硫酸ナトリウムに

の各温度区で96時間培養し、ニュートラルレッド法で吸光度を測定した結果を図1に示した。図から明らかなように、CHSE-sp細胞の30℃、96時間培養区では、ニュートラルレッドの取り込み量は非常に低かった。最終的なニュートラルレッド抽出量と生細胞数との間には高い相関関係のあることが知られていることから⁸⁾、30℃、96時間培養で生きているCHSE-sp細胞はほとんどなくなってしまふと考えられた。15～25℃の取り込み量は大きいことから、CHSE-sp細胞を用いた毒性試験はこの15～25℃の温度帯で行うのが適当と考えられた。我々は既に、単層培養細胞CHSE-214細胞及びFHM細胞の増殖適温域の検討を行い¹¹⁾、CHSE-214細胞の増殖適温域は20～25℃、FHM細胞のそれは30℃以上と考えられ、培養細

表1 CHSE-sp細胞とCHSE-214細胞に対するドデシル硫酸ナトリウム及びアニリンの毒性

化学物質	分子量	CHSE-sp	CHSE-214
ドデシル硫酸ナトリウム	(288.38)	0.030	0.064
アニリン	(93.13)	40.8	33.7

24hNR50 単位：mM

関しては、魚類培養細胞に対する毒性についてこれまで検討されておらず、今回が初めてである。

(3) 魚類由来浮遊培養細胞の増殖適温域の検討

CHSE-sp細胞をマイクロプレートに播種し、10～30℃

胞の増殖適温域は由来魚種の生息適温域をある程度反映していることを明らかにした。今回の結果から、このことは浮遊培養細胞CHSE-sp細胞についても当てはまることが明らかになった。

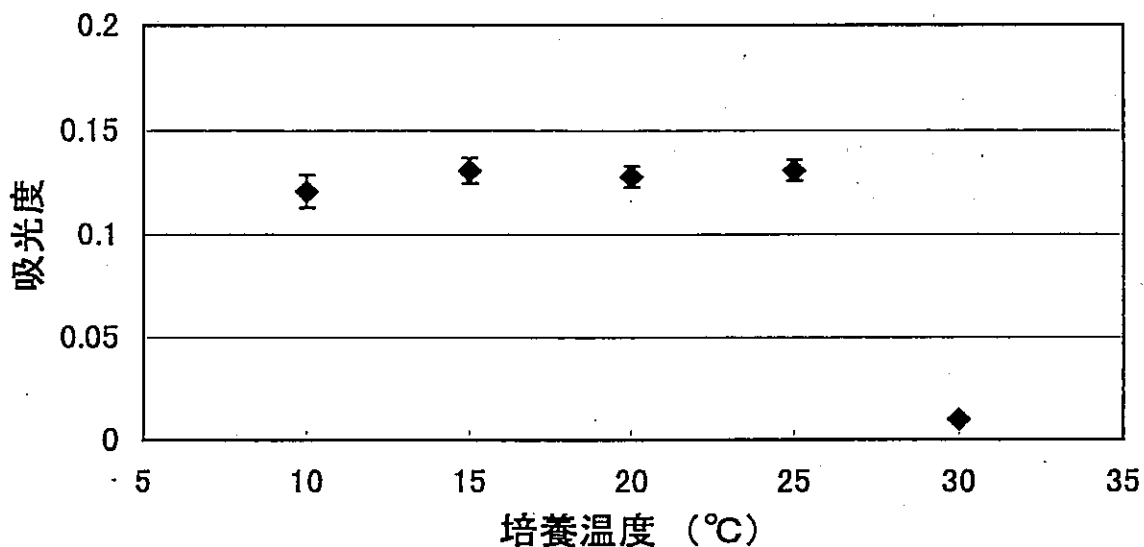


図1 CHSE-sp細胞の培養温度別増殖

4 おわりに

本研究では2種類の化学物質（ドデシル硫酸ナトリウム及びアニリン）の魚類浮遊培養細胞と単層培養細胞に対する毒性を調べた。毒性評価に当たっては、単層培養細胞と比較するため、浮遊培養細胞を用いる場合でもマイクロプレートのウェル内に単層の細胞層を形成させた後、化学物質に暴露した。しかし、魚類浮遊培養細胞の長所を生かし、より迅速に毒性試験を行うには、マイクロプレートのウェル内にあらかじめ準備した化学物質の溶液に直接細胞を播種し、影響を見るという方法が考えられる。今後は、そうした浮遊培養細胞の長所を生かした試験方法の検討を行っていく必要がある。

謝 辞

本研究に用いたCHSE-sp細胞は、東京水産大学 羽會部正豪助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) Fryer J.L. and C.N.Lannan : Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes, *Journal of Tissue Culture Methods*, **16**, p.87-94 (1994) .
- 2) Rachlin J.W. and A.Perlmutter: Fish cells in culture for study of aquatic toxicants, *Water Research*, **2**, p.409-414 (1968) .
- 3) 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) .
- 4) 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) .
- 5) 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) .
- 6) Saito H., et al. : In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to Goldfish GF-Scale (GFS) cells, *Chemosphere*, **23**(4), p.525-537 (1991) .
- 7) Karasawa H., et al. : Development of a suspension culture of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)

- embryo (CHSE-214) cells in a spinner flask, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **11**(4), p.142-144 (1991) .
- 8) Borenfreund E. and J.A.Puerner : Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters*, **24**, p.119-124 (1985) .
- 9) 森 真朗、若林明子：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、東京都環境科学研究所年報1998、p.101-106 (1998) .
- 10) 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) .
- 11) 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) .