

魚類由来浮遊培養細胞を用いた化学物質の毒性評価 (2)

森 真朗 若林 明子

要 旨

魚類由来浮遊培養細胞であるCHSE-sp細胞を用いて、11種類の化学物質の毒性を調べた。11種類の化学物質の毒性順は、魚類由来単層培養細胞のCHSE-214細胞を用いた場合とほとんど同じで、感受性はほぼ等しかった。それらの化学物質のCHSE-sp細胞とCHSE-214細胞に対するNR50値の相関係数は0.98で、良い相関関係が認められた。CHSE-sp細胞を用いた毒性値と魚体を用いた毒性値との相関を調べたところ、相関係数はファットヘッドミノーでは0.83、ニジマスでは0.78で、比較的良い相関関係が認められた。家庭で最も多量に使用される化学物質の一つである界面活性剤のいくつかについて、最新の魚類由来浮遊培養細胞であるFHM-sp細胞に対する毒性を調べた。培養細胞を用いる試験は、今後、スクリーニング試験として有用であると考えられる。そのため、魚体を用いる毒性試験との相関について、種々の側面から検討していく必要がある。

キーワード: 化学物質、培養細胞、細胞毒性、魚類、NR50、界面活性剤

1 はじめに

著者らは前報¹⁾において、魚類由来としては初めての浮遊培養細胞であるマスノスケ (キングサーモン) (*Oncorhynchus tshawytscha*) 由来のCHSE-sp細胞を用いて、ラウリル硫酸ナトリウムとアニリンの細胞毒性を調べた。本報ではそれらに加え、更に9種類の化学物質のCHSE-sp細胞に対する毒性について試験すると共に、単層培養細胞であるCHSE-214細胞及び魚体を用いた毒性試験との相関について検討する。また、北アメリカ大陸産の温水性淡水魚ファットヘッドミノー由来の浮遊培養細胞であるFHM-sp細胞を用いた界面活性剤の毒性試験についても若干の検討を行ったので報告する。

2 方法

(1) CHSE-sp細胞に対する11種類の化学物質の毒性

ア 化学物質

次の11種類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、MEP (フェニト

ロチオン))、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。

イ CHSE-sp細胞

サケ科魚類のマスノスケ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て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²⁾。

ウ 細胞毒性評価方法

前報¹⁾と同様、96穴マイクロプレートを用いて、ニュートラルレッド法³⁾により、曝露後生残した細胞によるニュートラルレッド色素の取り込みが対照に比べ50%になる化学物質の濃度 (NR50) を求めた。曝露温度は20℃で行った。

(2) CHSE-214細胞を用いた毒性試験との相関

前々報⁴⁾で得られたCHSE-214細胞に対する11種類の化学物質のNR50と今回得られたCHSE-sp細胞に対するNR50との相関係数を表計算ソフト 'Excel' を用いて算出し相関を調べた。

(3) 魚体を用いた毒性試験との相関

アメリカ合衆国環境庁データベースで調べたニジマス及びファットヘッドミノーに対する96時間LC50と今回得られたCHSE-sp細胞に対するNR50との相関を

調べた。

(4) FHM-sp細胞に対する3種類の界面活性剤の毒性

ア 界面活性剤

陰イオン界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、陽イオン界面活性剤の塩化ベンゼトニウムの3種類を用いた。これらの界面活性剤はすべて和光純薬工業株式会社（大阪）製である。

イ FHM-sp細胞

北アメリカ大陸産の温水性淡水魚ファットヘッドミノー (*Pimephales promela*) 由来のFHM細胞を基に選抜淘汰を繰り返して得られた浮遊培養細胞である。

ウ 細胞毒性評価方法

前報¹⁾と同様、96穴マイクロプレートを用いて、ニュートラルレッド法により実施した。曝露温度は30℃で行った。

3 結果及び考察

(1) CHSE-sp細胞に対する11種類の化学物質の毒性

CHSE-sp細胞に対する11種類の化学物質のNR50を表1に示した。11種類の化学物質の中で、NR50が最も小さかったのは塩化ベンゼトニウム (0.007mM) で、最も大きかったのはエタノールであった (832mM)。NR50の小さい順、すなわち毒性の強い順に11種類の化学物質を並べると、塩化ベンゼトニウム>ドデシル硫酸ナトリウム>キャプタン>直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム>ベンチオカルブ>MEP>ダイアジノン>酢酸>フェノール>アニリン>エタノールであった。

既報⁴⁾で報告した、今回と同じ11種類の化学物質の単層培養細胞CHSE-214細胞に対するNR50と比較すると、毒性順はほとんど同じであった。

表1 CHSE-sp細胞に対する11種類の化学物質のNR50

化学物質	分子量	NR50, mM
		CHSE-sp細胞
1 エタノール	46.07	832
2 アニリン	93.13	40.8
3 フェノール	94.11	14.2
4 塩化ベンゼトニウム	448.09	0.007
5 ドデシル硫酸ナトリウム	288.38	0.03
6 直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	348.48	0.085
7 MEP	277.24	0.116
8 ダイアジノン	304.35	1.48
9 キャプタン	300.59	0.038
10 ベンチオカルブ	257.78	0.095
11 酢酸	60.05	6.4

(2) CHSE-214細胞を用いた毒性試験との相関

11種類の化学物質の浮遊培養細胞CHSE-sp細胞と単層

培養細胞CHSE-214細胞に対するNR50の相関係数を表2に示した。両細胞に対するNR50の相関係数は0.98で、非常に良い相関関係が認められた。試験操作の点では、単層培養細胞より浮遊培養細胞の方がマイクロプレートを用いる毒性試験には適していることから⁵⁾、今後検討する化学物質の種類を増やし、両タイプの細胞に対する毒性の相関性を明らかにし、魚類由来浮遊培養細胞を用いた毒性試験法の確立を図っていく必要がある。

表2 11種類の化学物質のCHSE-sp細胞とCHSE-214細胞に対するNR50の相関係数

	CHSE-214細胞
CHSE-sp細胞	0.98

(3) 魚体を用いた毒性試験との相関

アメリカ環境庁のデータベースである「AQUIRE」から、今回用いた11種類の化学物質のうち、ファットヘッドミノーについては9種類 (エタノール、アニリン、フェノール、塩化ベンゼトニウム、ドデシル硫酸ナトリウム、MEP、ダイアジノン、キャプタン、酢酸)、ニジマスについては6種類 (エタノール、アニリン、フェノール、ドデシル硫酸ナトリウム、MEP、ダイアジノン) の化学物質について96時間LC50を求めた。今回得られた9種類の化学物質のNR50とファットヘッドミノー96時間LC50の間の相関係数及び6種類の化学物質のNR50とニジマス96時間LC50の間の相関係数を表3に示した。相関係数はそれぞれ0.83及び0.78であり、比較的良好な相関関係が認められた。

単層培養細胞CHSE-214細胞に対する化学物質のNR50とファットヘッドミノー96時間LC50及びニジマス96時間LC50の相関関係を調べた結果でも、相関係数はそれぞれ0.86及び0.83で、比較的良好な相関関係が認められている⁵⁾。

表3 CHSE-sp細胞のNR50とファットヘッドミノー及びニジマスLC50との相関係数

	ファットヘッドミノー 96hLC50	ニジマス96hLC50
CHSE-sp細胞24hNR50	0.83 ^{*1}	0.78 ^{*2}
CHSE-214細胞24hNR50	0.86 ^{*1}	0.83 ^{*2}

*1 9種類(エタノール、アニリン、フェノール、塩化ベンゼトニウム、ドデシル硫酸ナトリウム、MEP、ダイアジノン、キャプタン、酢酸)の化学物質のファットヘッドミノーに対する96hLC50との相関

*2 6種類(エタノール、アニリン、フェノール、ドデシル硫酸ナトリウム、MEP、ダイアジノン)の化学物質のニジマスに対する96hLC50との相関

(4) FHM-sp細胞に対する3種類の界面活性剤の毒性

ドデシル硫酸ナトリウム、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム及び塩化ベンゼトニウムのFHM-sp

細胞に対するNR50を表4に示した。NR50の小さい順に並べると、塩化ベンゼトニウム (0.007mM)、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (0.013mM)、ドデシル硫酸ナトリウム (0.036mM) の順であった。

界面活性剤は陰イオン、陽イオン、非イオン、両性イオン界面活性剤に大別することが出来る。ドデシル硫酸ナトリウムや直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムは陰イオン界面活性剤に、塩化ベンゼトニウムは陽イオン界面活性剤に分類される。今回の結果では、陽イオン界面活性剤が細胞に対して毒性が強かった。界面活性剤と助剤とからなる合成洗剤は家庭で最も多量に使用される化学物質の一つである。そのためわが国では、化学物質が水生生物に及ぼす影響に関する研究が不十分な中でも数少ない例外として、水中の汚染濃度や水生生物への毒性についてのデータが最も早くから、豊富に集められてきている⁶⁾。界面活性剤は、種類によって魚類に対する毒性に差のあることが知られている⁷⁾。培養細胞に対する毒性が、上記に大別した界面活性剤の間でどのように異なり、それが魚体に対する毒性試験結果とどのような関係にあるかは非常に興味深い点である。

今後、更に多くの界面活性剤について培養細胞を用いた毒性試験を行ない、魚体を用いた毒性試験と比較検討していく必要がある。

魚類由来培養細胞を用いた毒性試験結果と魚体を用いた毒性試験結果の間の相関性については、いくつか報告されている^{8), 9), 10)}。しかし、それらはいずれも魚類由来培養細胞のほとんどを占める単層培養細胞を用いて行われた毒性試験である。今後は樹立されて日も浅い魚類由来浮遊培養細胞を用いた毒性試験と魚体を用いた毒性試験との相関に関する検討を界面活性剤やその他の化学物質について行う必要がある。

表4 FHM-sp細胞に対する3種類の界面活性剤のNR50

界面活性剤	分子量	NR50, mM
		FHM-sp細胞
ドデシル硫酸ナトリウム	288.38	0.036
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	348.48	0.013
塩化ベンゼトニウム	448.09	0.007

4 おわりに

FHM-sp細胞はCHSE-sp細胞に比べ増殖可能な温度範囲が広く、高温でも培養可能である。すなわち、CHSE-sp細胞は培養温度が25℃を超えると死滅するのに対し、FHM-sp細胞は30℃を超えても十分増殖すること

が出来る¹¹⁾。また、FHM細胞の由来魚種であるファットヘッドミノーは、アメリカ合衆国で水生生物に対する毒性試験に頻繁に用いられている実験魚であり、毒性試験データも豊富である。今後、培養細胞を用いる毒性試験は、魚体を用いた毒性試験との相関について、種々の側面から検討していく必要がある、培養可能な温度域の広いFHM-sp細胞の利用と豊富な毒性試験データの存在は、そうした検討を容易にするものと考えられる。

魚類由来の浮遊培養細胞は樹立されてから日も浅く、特徴を生かした利用方法の検討が種々の分野で試みられつつある。生態毒性の分野においても、莫大な種類数の化学物質とそれらの複合的影響をも考慮した簡便、迅速かつ経済的な試験方法の開発が急務となっている。魚類由来の浮遊培養細胞の利用については、そうした試験方法の一つの候補として、今後一層進展させていく必要がある。

謝 辞

本研究に用いたCHSE-sp細胞及びFHM-sp細胞は、東京水産大学助教授 羽曾部正豪博士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: 魚類由来浮遊培養細胞を用いた化学物質の毒性評価 (1), 東京都環境科学研究所年報 1999, p.83-86(1999).
- 2) M.Mori, et al.: Application of a suspension-cultured salmonid cell line CHSE-sp to cytotoxicity test, *Fisheries Sci.*, 64, p.991-992(1998).
- 3) E.Borenfreund and J.A.Puerner: Toxicity determination in vitro by morphological alternations and neutral red absorption, *Toxic.Lett.*, 24, p.119-124(1985).
- 4) 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).
- 5) M.Mori and M.Wakabayashi: Cytotoxicity evaluation of synthesized chemicals using suspension-cultured fish cells, *Fisheries Sci.*, in press.
- 6) 菊地幹夫: 界面活性剤の水環境への影響, 日本油化学会誌, 45, p.271-281(1996).

- 7) (社) 日本水環境学会編：Q & A 水環境と洗剤、
(株) ぎょうせい、東京、p.94-97(1994).
- 8) N.B.Bols,*et al.*:The use of fish cell cultures as
indication of contaminant toxicity to fish, *Aquatic Toxicol.*,
6, p.147-155(1985).
- 9) H.Saito,*et al.*:Cytotoxicity of anilines and aldehydes to
goldfish GFS cells and relationships with 1-octanol/water
partition coefficients, *Chemosphere*, 27, p.1553-
1560(1993).
- 10) H.Segner,*et al.*:Cytotoxicity of metals toward rainbow
trout R1 cell line, *Environ. Toxicol. Water Quality*, 9, 273-
279(1994).
- 11) 未発表データ.

Toxicity Evaluation of Chemicals using Suspension Cultured Fish Cells (2)

Masaaki Mori and Meiko Wakabayashi

Summary

Cytotoxicity of 11 synthesized chemicals chosen from various chemical classes was determined using a suspension-cultured fish cell line, i.e. CHSE-sp cell line. The cytotoxicity ranking of 11 chemicals based on the 24h NR50 to the CHSE-sp cells was similar to the monolayer cultured fish cell line, i.e. CHSE-214 cell line. The sensitivity of both cell lines to those chemicals was similar. A high correlation coefficient of cytotoxicity (0.98) was observed between the 24h NR50 of 11 chemicals to the CHSE-sp cells and to the CHSE-214 cells. There were also high correlations between the 24h NR50 to the CHSE-sp cells and 1) to the fathead minnow 96h LC50 ($r=0.83$), 2) to the rainbow trout 96h LC50 ($r=0.78$). The cytotoxicity of several surfactants, which have been used in domestic activity in large quantities, was determined using a new established suspension-cultured fish cell line, i.e. FHM-sp cell line. Suspension-cultured fish cell lines could be used as an effective tool of screening prior to *in vivo* testing. Therefore, the correlation between an *in vivo* assay using a whole fish body and an *in vitro* assay using suspension-cultured fish cell lines should be examined from many aspects.

Keywords: chemicals, cultured cell, cytotoxicity, fish, NR50, surfactants.