

ヒト細胞および水生生物を用いた 河川水中のナノ粒子成分の影響評価試験

對馬育夫・眞野浩行・小川文章

1. はじめに

近年、河川や湖沼等の水環境中から様々な人的由来の微量汚染物質が検出されており、これらによる健康・生態リスクの把握および制御技術の開発が求められている。特に、ナノテクノロジーの目覚ましい技術発展に伴い、ナノ粒子成分による環境汚染が危惧されてきている。ナノ粒子は $0.1\mu\text{m}$ の粒径を持つ成分全般を指し、炭素等の有機系とシリカや金・銀などの無機系に分類されるが、医療やエレクトロニクス分野、環境エネルギー分野において盛んに利用されており、製造工場や下水処理場から流出していることが過去の研究により報告されている。また、水環境中に放出されるナノ粒子は生態影響が極めて高いことが懸念されており、注意を要する成分とされる。

既往の研究では、実験室で特定のナノ粒子を単体で添加し調査するものが多いが、実環境下では、ナノ粒子は有機物の総称であるNOM (Natural Organic Matter: 天然有機物) と結合することで、安定化しており、そのNOMの特性や挙動にはまだよくわかっていない部分が多い。

このため、本報では、利根川を対象として、濃縮した河川水をヒト細胞や水生生物に短期間曝露させることで、その応答から、河川水の影響性を評価した。なお、本試験では、一般的にヒトへの毒性評価に用いられるヒト肝癌由来細胞株であるHepG2細胞および全排水毒性試験で推奨される藻類・ミジンコ・魚類(ゼブラフィッシュ)を用いて、影響評価を行った。

2. 実験方法

2.1 採水地点

図-1に示す4箇所のサンプリングポイント(St.1(最上流部)、St.2(上流部)、St.3(中流部)、St.4(下流部))を示す。採水は平成26年8月3~4日に行い、各サンプリングポイントにお

いて、約200Lの河川水を採取した。

2.2 濃縮・分画

St.1~4から各200L採水した後に、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターにより懸濁質を除去したサンプルを、逆浸透膜により30倍以上に濃縮した。濃縮したサンプルは、DOC (Dissolved Organic Carbon: 溶解性有機炭素) を揃えるよう適宜希釈し、ヒト細胞および水生生物を用いた影響評価試験に供した。また、河川水は吸引ろ過装置を用いて、孔径が大きい順に $0.22\mu\text{m}$ 、200kDa (ダルトン: 統一原子質量単位)、50kDaの膜でろ過し、NOMの大きさに応じて分画した。各膜によりろ過し分画したサンプルは、ヒト細胞を用いた影響評価試験に供した。



図-1 サンプリングポイント

2.3 ヒト細胞を用いた影響評価試験

本実験にはヒト肝癌由来細胞株(HepG2) (図-2)を用いた。細胞は、MEM (Minimum Essential Medium Eagle) 培地(10%FBS (Fetal bovine serum)、0.1mM NEAA (Non-Essential Amino Acids Solution)、0.03%L-グルタミン、0.2%炭酸水素ナトリウム添加)を用い、飽和水蒸気、CO₂ 5%、37°C条件下で培養した。ろ過試料と10倍濃縮MEM培地を体積比9:1の割合で混合し、pHを7.2~7.5に調整した。48時間暴露後、トリパンブルー染色により生細胞を計数した (N=3)。

2.4 水生生物を用いた影響評価試験

本研究では、水生生物として、ムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*, NIES-35株) (図-3)、オオミジンコ (*Daphnia magna*) (図-4)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) (図-4) を用いた。St.2の濃縮サンプルを適宜希釈し、DOCが異なる実験系を複数作成した。ムレミカヅキモを用いた藻類生長阻害試験では、試験水に72時間曝露させ、生長速度を調査した。試験区ごとに5連実施した。オオミジンコを用いた遊泳阻害試験では、試験水50mLの入った50mLガラスビーカーに24時間以内に産まれた5匹を入れた後に、48時間暴露し、正常遊泳個体数を24時間ごとに調査した。試験区ごとに4連実施した。ゼブラフィッシュを用いた魚類胚仔魚試験では、試験水50mLの入った50mLガラスビーカーに胚15個を入れた後に、8日間曝露させ、孵化率、生存率を調査した。試験区ごとに3連実施した。

3. 結果と考察

3.1 ヒト細胞を用いた影響評価

図-5に濃縮河川水試料の細胞影響試験結果を示す。超純水を用いた対象系 (DOC濃度 0.0mg/L) の細胞生存率を100とし、各濃縮河川水を曝露させたときの細胞生存率を示す。DOCが約12mg/L以下の場合では、細胞生存率の増加が確認された。特に、St.4では細胞生存率の増加が著しく、DOCが約25 mg/Lのときをピークに減少が確認された。例えば、DOCが約40mg/Lの場合を比較すると、St.1の細胞生存率が10%以下であるのに対し、St.2およびSt.3が約50%と同程度、St.4では依然100%以上で、細胞生存率の低下は見られなかった。したがって、本試験の結果から、各河川水のヒト細胞への影響を評価すると、最上流部 (St.1) で最も細胞生存率が低く、流下に伴って細胞生存率が増加することが観察された。一方、下流部 (St.4) においては、細胞生存率が高いことから、一見、ヒト細胞への影響は小さく、むしろ細胞に好影響を及ぼす反応のように見える。しかしながら、この反応は、低濃度の有害物質を曝露させたときに観察される典型的な反応であり、St.4の河川水にもHepG2に何らかの悪影響を与える物質が含まれていた可能性があることを示唆している¹⁾。本試験に用いた河川水試料の水質

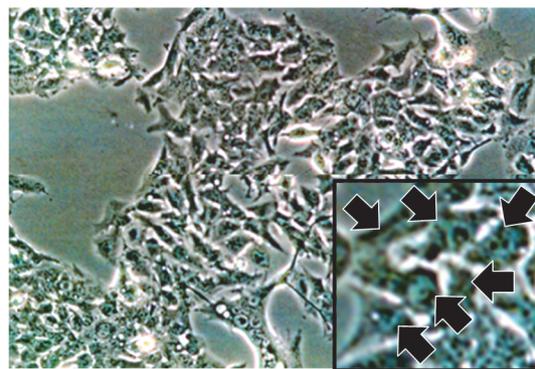


図-2 ヒト肝ガン由来細胞株HepG2 (図中の矢印は細胞を示す)



図-3 ムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*, NIES-35株)



図-4 オオミジンコ (*Daphnia magna*) (左) およびゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) (右)

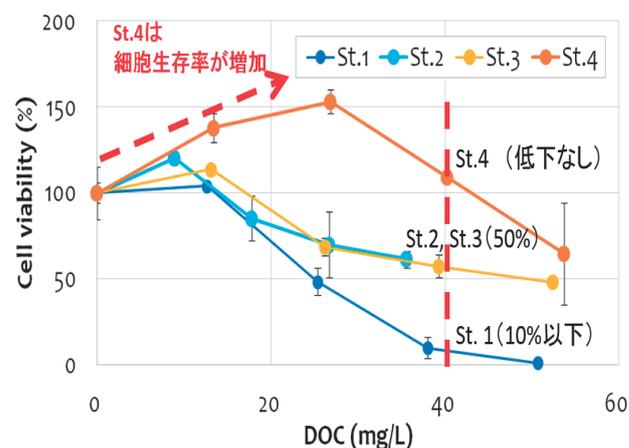


図-5 濃縮河川水試料の細胞影響試験結果

分析結果を図-6に示す。St.1のDOCを除き、DOCおよび窒素類は下流になるほど濃度が高くなった。ICP (Inductively Coupled Plasma : 誘導結合プラズマ) による元素一斉分析の結果、Fe、MnはSt.1のみで検出され、自然由来の成分と推察されたがヒト細胞生存率に影響を与えるような特徴的な成分は検出されなかった。

今回の試験で、都市活動の最も少ない最上流部 (St.1) の河川水において、最も細胞生存率が低くなった原因については不明であるが、本試験では夏季の1回の採水によるもので、今度継続して採水し、影響試験を行った場合には必ずしも同様の結果を繰り返すとは限らないことから、より詳細な水質分析を行う必要があると考えられた。

3.2 水生生物を用いた影響評価

ムレミカヅキモを用いた影響評価試験の結果を図-7に示す。その結果、濃縮倍率が10倍以上の処理区では、対照区と比べて有意な生長速度の低下が確認された。オオミジンコを用いた影響評価試験では、濃縮倍率が20倍までの範囲で、遊泳異常は観察されなかった (図-8)。ゼブラフィッシュを用いた影響評価試験でも、試験区間で生存率、孵化率に大きな差はみられなかった (図-9、図-10)。

3.3 分画試験

図-11に濃縮河川水試料を段階的にろ過した際の細胞影響率の変化を示す。0.22 μ m膜のろ液におけるヒト細胞死滅率 (1-細胞生存率) を1とし、それに対する200kDa膜および50kDa膜のろ液における細胞死滅率を相対影響値 (以下「影響値」という。) として表す。St.1およびSt.4における

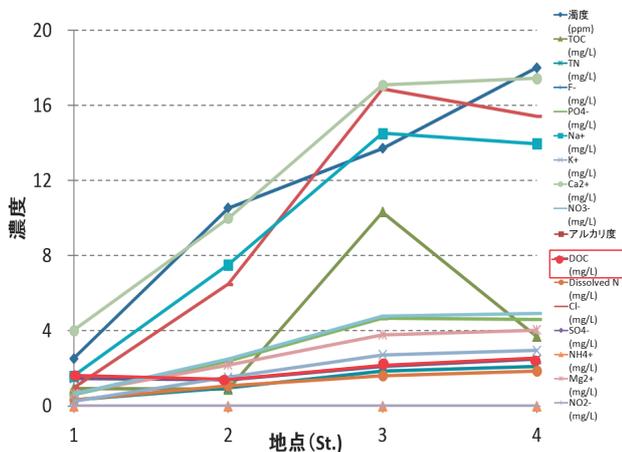


図-6 河川水試料の水質分析結果

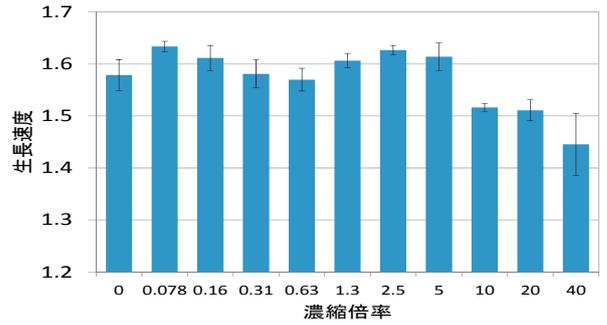


図-7 ムレミカヅキモを用いた影響試験

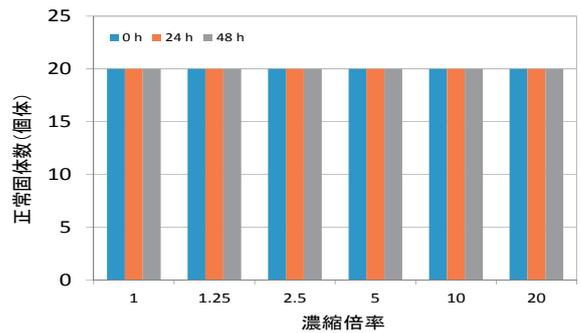


図-8 オオミジンコを用いた影響試験

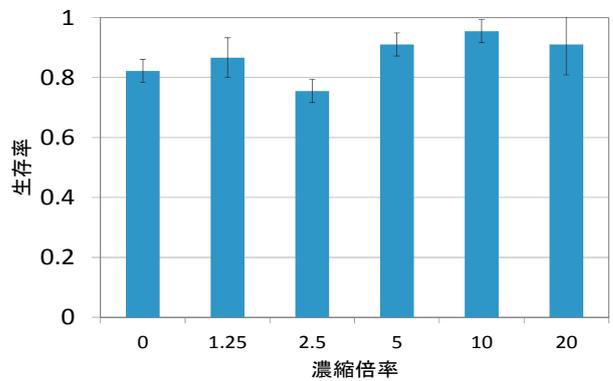


図-9 ゼブラフィッシュを用いた影響試験 (生存率)

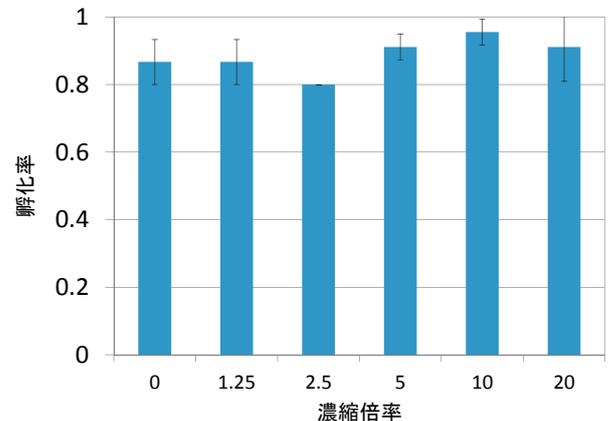


図-10 ゼブラフィッシュを用いた影響試験 (孵化率)

影響値は、200kDa膜によるろ過で20%以上低下し、50kDa膜のろ過後には当初の約50%以下となっていた。200kDa膜ろ過、50kDa膜ろ過における影響値は、St.1ではそれぞれ0.65、0.30であったのに対し、St.4では0.78、0.51であった。したがって、St.1およびSt.4では200kDa-0.22 μ m、50kDa-200kDaのそれぞれの画分に細胞増殖を阻害する成分が存在していたことが示唆された。一方、St.2およびSt.3では、200kDa膜ろ過で顕著な影響値の変化は確認されなかった。さらに、St.2では50kDa膜ろ過後に影響値が30%増加し、1.30となった。これは、50kDa膜ろ過によって、何らかの形で細胞毒性の原因物質をマスクしていた成分（ある種のタンパク質やNOMなど）が取り除かれた可能性が考えられる。今後、より詳細な成分分析を行う必要がある。

4. まとめ

本研究では、水環境中に存在するナノ物質の挙動、影響を把握するため、利根川河川水を濃縮し、ヒト細胞を用いた影響評価試験および水生生物を用いた影響評価試験を実施した。その結果、濃縮した河川水をヒト細胞に曝露した場合、サンプリング箇所の違いにより、細胞生存率に大きな差が観察され、細胞増殖を阻害する成分が含まれていたことが示唆された。また、オオミジンコやゼブ

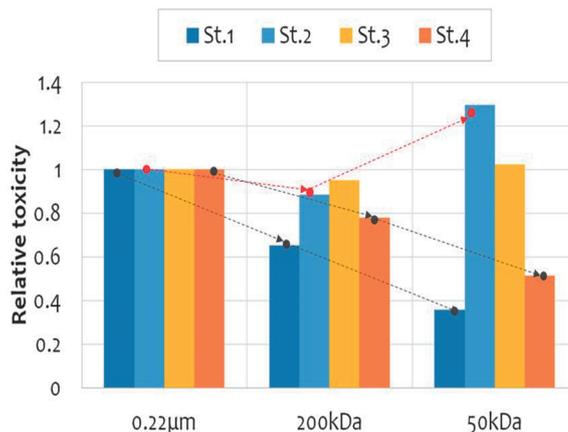


図-11 段階的ろ過水におけるヒト細胞生存率の変化

ラフィッシュを用いた影響評価試験では、高濃度濃縮水でも影響は確認されなかった。さらに、ヒト細胞の細胞生存率に影響があった最上流部 (St.1) および下流部 (St.4) からの濃縮河川水においては、200kDa-0.22 μ mおよび50-200kDaの画分に細胞増殖を阻害する成分が存在していることが示唆された。今後は、ヒト細胞や水生生物に影響を与える成分の特定を行う予定である。

参考文献

- 1) Kawata, K., Osawa, M., and Okabe, S.: In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells, Environmental Science and Technology, Vol.43 No.15 pp.6046-6051, 2009

對馬育夫



土木研究所水環境研究グループ
水質チーム 主任研究員、博士
(工学)
Dr. Ikuro TSUSHIMA

眞野浩行



研究当時 土木研究所水環境研究グループ水質チーム研究員、
現 産業技術総合研究所安全化学研究部門 主任研究員、博士
(理学)
Dr. Hiroyuki MANO

小川文章



土木研究所水環境研究グループ
水質チーム 上席研究員
Fumiaki OGAWA