

13

次亜塩素酸の培養細胞に対する毒性評価を目的としたアッセイ条件の検討

但馬智之 (京都大学大学院), 小林憲太郎 (東レ株式会社)

大河内由美子, 伊藤禎彦 (京都大学大学院)

Determination of assay conditions to evaluate toxicity to human keratinocytes caused by chlorine disinfectant

Satoshi TAJIMA (Graduate School of Kyoto Univ.), Kentaro KOBAYASHI (TORAY Industries Inc.)

Yumiko OHKOUCHI, Sadahiko ITOH (Graduate School of Kyoto Univ.)

1. はじめに

次亜塩素酸は上水道において最終消毒剤として広く用いられている。消毒剤としての塩素には、低コスト、利用しやすい、殺菌および消毒効果、残留性などの利点があるとともに、有害な消毒副生成物の生成やカルキ臭による快適性の低下といった欠点が挙げられている¹⁾。特に、トリハロメタンに代表される消毒副生成物には発がん性が指摘されているが、水系感染症による健康リスクの増加抑制を目的として、今日に至るまで塩素消毒が続けられている。

塩素系消毒剤への曝露としては従来、消毒された水道水や食品が主な曝露源であったが、1960年代から公共プールやそれに準ずる施設の普及に伴い、経口から吸入、経皮へと曝露経路が拡大してきた。塩素の曝露影響に関する知見のほとんどは経口曝露を想定しており、発がんなどの重篤な健康影響は報告されていない。しかし、生殖毒性や気管支喘息、皮膚炎を誘発するなどといった報告がある^{2,3)}ことや、昨今の健康志向の強まりからも、今後、より安全な水道水の供給を行っていくうえで、こういったエンドポイントが軽微とはいえ健康な状態からの乖離を引き起こす物質に対する社会の要請はますます高まっていくと考えられる。一方、既往研究^{3,4)}では低濃度の次亜塩素酸曝露によるアッセイが行われておらず、水道水中濃度を想定したアッセイ条件を確立する必要があるため、本研究では次亜塩素酸の経皮曝露による毒性評価を想定し、ケラチノサイトへの低濃度次亜塩素酸曝露条件および評価方法に関する検討を行った。

2. 実験方法

2.1 細胞の培養および継代

本研究では細胞として、正常ヒト成人乳房表皮角化細胞(クラボウ)を用いた。培養液には、無血清表皮角化細胞基礎培地 EpiLife™ (Cascade) に、増殖添加剤 (EDGS, Cascade) を添加したものをを用いた。細胞は液体窒素凍結状態で購入し、2次培養を経た後回収し、TCプロテクター(大日本住友製薬)を用いて 5.0×10^5 cells/mL になるように懸濁し、長期間保存の場合は液体窒素凍結保存し、短期間の場合は -80°C で凍結保存した。アッセイには継代数4のものを用いた。

2.2 細胞の播種

フラスコ内でコンフルエント状態になった細胞をトリプシン溶液を用いて回収し、培養液で細胞を目的濃度となるよう再懸濁した。この細胞懸濁液を96ウェルマイクロプレートに $100\ \mu\text{L}$ ずつ播種し、 24 ± 3 時間、 37°C 、 CO_2 濃度5%で前培養した。Tatnallら⁴⁾、Matsumotoら³⁾の既往研究を参考にして、本研究ではウェル内が80%コンフルエントになる細胞数、 1.0×10^4 cells/well (96ウェルマイクロプレート) となるように細胞を播種した。本研究では、これに加えて 3.0×10^4 cells/well の条件についても検討を加えた。

2.3 曝露方法

曝露する次亜塩素酸溶液は、次亜塩素酸ナトリウム原液(和光純薬)をPBS(-)で希釈した。DPD-FAS法⁵⁾により遊離塩素濃度を測定した後に、PBS(-)で目的とする塩素濃度まで希釈した。

培養液を除去後、ウォーターバスで 37°C に温めた PBS(-) で細胞を2回洗浄し、次亜塩素酸溶液を $100\ \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加え、 37°C 、 CO_2 濃度5%のインキュベーター内で曝露試験を行った。曝露濃度は、0(対照試料)、0.5、1、2.5、5、7.5、10、12、15、20 mgCl_2/L と設定した。

2.4 次亜塩素酸曝露条件の検討

検討した曝露条件を表1にまとめて示す。曝露日数3日の場合は、表1に示す時間・回数による曝露を1日1回、3日間連続で行った。ここで、Tatnallら⁴⁾、Matsumotoら³⁾の既往研究では、次亜塩素酸曝露後24時間の再培養時間を経てMTT法により細胞数測定を行っているが、一方で再培養の間にもダメージを受けた

細胞が回復・再増殖する可能性があることから、次亜塩素酸曝露による生細胞数の変化を正確に評価するためには再培養時間は短い方がよいと考えられる。そこで、本研究では再培養時間を30分、120分、240分と設定して検討を行った。

2.5 生細胞数および細胞内タンパク質量の測定方法

細胞数指標としては、生細胞数とタンパク質量を使用した。生細胞数の測定には、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いた。試薬 10 μ L を添加後、37°C で2時間インキュベートし、波長 450 nm (対照波長 650 nm) における吸光度から生細胞数を求めた。一方、タンパク質は細胞を構成する成分であり、細胞の乾燥重量の大部分を示す。また、細胞が有する生存機能のほとんどを担っているため、タンパク質量も生細胞数の一指標としてよく用いられている。細胞内タンパク質量の測定にはプロテインアッセイ (BIO-RAD) を用いた。曝露後、培養液を除去した細胞に対して 10 mM HCl を 40 μ L 加え、回収した細胞懸濁液を凍結融解することにより、細胞内タンパク質を抽出した。抽出液を適宜希釈後プロテインアッセイ試薬と混合して波長 595 nm の吸光度を測定し、ウシ血清アルブミン溶液であらかじめ作成した検量線からタンパク質濃度を求めた。

表 1 次亜塩素酸曝露時間

細胞播種数 (cells/well)	曝露日数 (日)	曝露時間 (分)	曝露回数 (回/日)	再培養時間 (分)
1.0×10^4	1	30	1	30
		120		120
				240
	3	30	1	30
		120		120
				240
3.0×10^4	1	15	1	30
		30		
		120		
	3	15x2	2	
		15		
		30		

3. 実験結果と考察

3.1 曝露時間と再培養時間の検討

1.0×10^4 cells/well の細胞播種数で、次亜塩素酸曝露時間を変化させた場合の生細胞数の変化を図1に示す。塩素濃度が高くなるにつれ細胞数が減少した。ここでは1日曝露の結果のみを示したが、3日曝露においても同様の結果が得られた。この結果より、塩素濃度 0 mgCl₂/L の条件においても PBS(-) に細胞が曝露されることにより、播種した細胞数に対して大幅に細胞数が減少することが確認された。生細胞数を正確に測定するためには、 1.0×10^4 cells/well 程度の細胞数が必要となるため、このような状況では次亜塩素酸曝露の影響による生細胞数の変化を正確に評価することが困難と考えられる。次亜塩素酸曝露後の再培養時間を30分間から240分間に延長しても、生細胞数の減少を抑制する効果は確認されなかった (データ示さず) ため、以降の検討では、再培養時間は30分間に固定した。

3.2 細胞播種数の検討

細胞播種数を 3.0×10^4 cells/well へと増大させた場合の、次亜塩素酸曝露による生細胞数の変化 (1日曝露) を図2に示す。細胞播種数を 3.0×10^4 cells/well とすることで、1日30分間の曝露の場合、塩素濃度 0 mgCl₂/L における細胞数を 80% コンフルエントである 1.0×10^4 cells/well に近づけることができた。しかし、1日120分間の曝露では塩素濃度 0 mgCl₂/L においてさえ、細胞数がおよそ 0.2×10^4 cells/well まで減少した。また、曝露時間30分間と120分間を比較すると、生細胞数の変化は全ての曝露濃度域で同様の傾向を示した。これはすなわち、次亜塩素酸曝露による生細胞数変化は、曝露初期 (30分以内) においてのみ起こったことを意味すると考えられる。Puller らの報告では、Hank's 平衡塩溶液で希釈した次亜塩素酸を内皮細胞に曝露した際、1分以内に次亜塩素酸の半分は消費されること、また続く15分間で残り半分も消費されるとされている⁶⁾。よって、曝露時間を短縮することにより、次亜塩素酸曝露による影響を明確にすることができると考えられる。また、3日連続曝露については対照試料においてさえほとんどの細胞が死んでしまったため、以降の条件検討では1日曝露のみとした。

3.3 曝露時間の検討

3.2の結果を踏まえて、次亜塩素酸曝露時間を15～30分間に短縮した。また、15分間×2回の連続曝露も同時に検討した。塩素曝露時間および回数が細胞生存率に与える影響を図3に示す。

15分間、30分間の次亜塩素酸曝露(単回)では細胞数の減少幅は小さく、またほぼ同じ傾向を示していることから、前述と同様、30分間の曝露では次亜塩素酸が曝露後15分以内に消費されてしまった可能性が高い。この推察は、15分間×2回と30分間×1回の曝露条件を比較した際に、前者の条件でより顕著な生細胞数減少が観察されたことから裏付けられる。よって、塩素曝露時間として15分間×2回を選定した。

以上より、決定した曝露条件は次の通りである。

- 1) 細胞播種数 3.0×10^4 cells/well (96 ウェルマイクロプレートの場合)
- 2) 曝露時間 15分×2回
- 3) 再培養時間 30分間

3.4 細胞生存率の評価指標としての生細胞数と細胞内タンパク質量の比較

3.3までで決定した条件を用いて次亜塩素酸曝露実験を行い、生細胞数およびタンパク質量の変化を図4で比較した。生細胞数、タンパク質量のいずれを指標とした場合にも、10 mgCl₂/L以上の濃度で生存率減少がはっきり確認された。両測定法を比較すると、生細胞数測定では反応後の培養液を直接測定に用いたのに

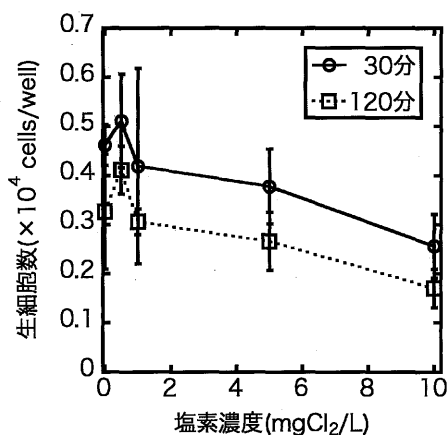


図1 曝露時間が生細胞数の変化に及ぼす影響

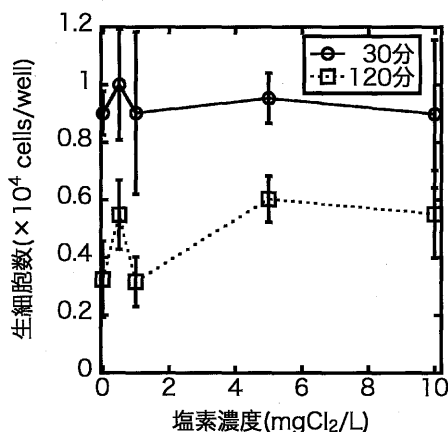


図2 細胞播種数の増大が生細胞数の変化に及ぼす影響

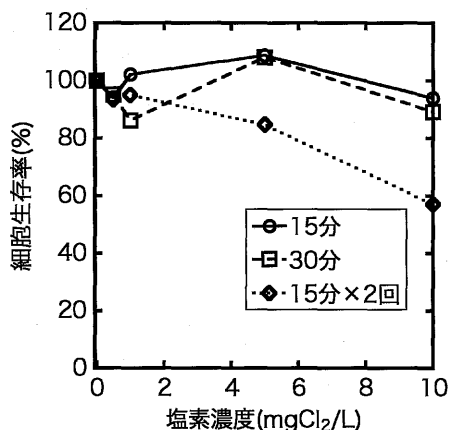


図3 曝露時間・回数が細胞生存率に与える影響

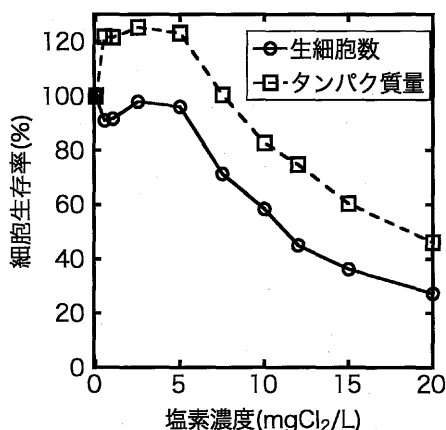


図4 生細胞数とタンパク質量をそれぞれ指標とした場合の次亜塩素酸曝露による細胞生存率の変化

対して、タンパク質量測定では細胞抽出液を40～60倍に希釈して測定を行った。言い換えれば、タンパク質量測定のほうがわずかな変化をより鋭敏に捉えることができると考えられる。従って、本研究では細胞内タンパク質を指標として細胞生存率評価を行うことが妥当と判断した。

本研究で得られた結果に基づくと、水道水中の次亜塩素酸濃度では生細胞の生存率には影響しないと考えられる。一方、実際の塩素消毒剤の利用実態を考えると、プールの腰洗い層では次亜塩素酸濃度が50～100 mgCl₂/Lと高濃度であり、このような高濃度の次亜塩素酸曝露では細胞数の低下の可能性がある。ただし、表皮表面は角質層で覆われているケースが多いため、角質層の透過性増大²⁾の観点を含めて検討する必要があるだろう。また、次亜塩素酸の表皮細胞への影響を各種バイオマーカーを用いて評価した既往研究によると、次亜塩素酸の酸化作用によるグルタチオン類の酸化やプロテインスルフヒドリルの減少、プロテインカルボニルの増加が報告されている⁷⁾。さらに、炎症マーカーであるNF- κ B、TNF- α の増大も一部の研究で報告されている⁸⁾ため、次亜塩素酸の低濃度曝露による抗酸化物質の減少や炎症誘発の可能性について、今後検討を加える必要がある。

4. 本研究の結論

本研究では次亜塩素酸の経皮曝露を想定した毒性評価を目的として、ケラチノサイトへの次亜塩素酸曝露による毒性評価のためのアッセイ条件の検討を行った。得られた主要な知見を以下に示す。

アッセイ条件として、細胞播種数 3.0×10^4 cells/well (96 ウェルマイクロプレート)、曝露時間 15 分×2 回、次亜塩素酸曝露後の再培養時間は 30 分間と決定した。また、生細胞数、タンパク質量のいずれを指標とした場合にも、10 mgCl₂/L 以上の濃度で生存率減少がはっきり確認されたが、感度の違いから、細胞数評価にはタンパク質量を用いることが妥当であると判断した。

以上の細胞生存率試験結果から、プールの腰洗い層のような高濃度の塩素曝露が想定される状況では、直接接触すれば短時間曝露でも表皮細胞が死滅する可能性がある。また、次亜塩素酸の低濃度曝露によりグルタチオン類の酸化や TNF- α 等の増大が報告されているため、次亜塩素酸による酸化ストレスや炎症誘発の可能性について、検討を加える必要がある。

参考文献

- 1) 金子光美：水の消毒，日本環境整備教育センター，1997.
- 2) Bernard, A.: Chlorination products: Emerging links with allergic diseases, *Curr. Med. Chem.*, Vol.14, No.16, pp.1771-1782, 2007.
- 3) Matsumono, Y., Mori, H., Hayakawa, A., Ohashi, M.: Influence of free residual chlorine on cultured human epidermal keratinocytes from normal skin and hypertrophic scars, *J. Derm. Sci.*, Vol.10, No.1, pp.1-7, 1995.
- 4) Tatnall, F. M., Leigh, I. M. and Gibson, J. R.: Assay of antiseptic agents in cell culture: Conditions affecting cytotoxicity, *J. Hosp. Infect.*, Vol.17, No.4, pp.287-296, 1991.
- 5) APHA, AWWA and WEF: Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., 1998.
- 6) Puller, J. M., Winterbourn, C. C., Vissers, M. C.: Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid, *Am. J. Physiol.*, Vol.277, pp.1505-1512, 1999.
- 7) Schlaufstatter, I. U., Browne, K., Harris, A., Hyslop, P. A., Jackson, J. H., Quehenberger, O. and Cochrane, C. G.: Mechanisms of hypochlorite injury of target cells, *J. Clin. Invest.*, Vol.85, No.2, pp.554-562, 1990.
- 8) Schoonbroodt, S., Legrand-Poels, S., Best-Belpomme, M. and Pitte, J.: Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid, *Biochem. J.*, Vol.321, No.3, pp.777-785, 1997.

キーワード：ケラチノサイト、次亜塩素酸曝露、細胞毒性

Key Words：keratinocyte, chlorine exposure, cytotoxicity