

ヒト由来の培養細胞を用いたカビ臭原因物質ジェオスミン および2-メチルイソボルネオールの毒性評価

北脇悠平・持田 恭

要 旨

2007年に島根県の東部にある宍道湖の湖水でカビ臭が発生した。そのときに検出したカビ臭原因物質ジェオスミン (GM) の最高濃度は、700 ng/Lであった。この濃度の細胞毒性を、ヒト由来のKB細胞を用いるコロニー形成アッセイによって評価した。併せてカビ臭原因物質として知られている2-メチルイソボルネオール(2-MIB)についても細胞毒性評価を行った。その結果、カビ臭原因物質であるGMおよび2-MIBは、10 ng/L ~ 3,000 ng/Lの濃度範囲で細胞毒性を示さなかった。このことから、宍道湖の湖水で確認された最高濃度のGM (700 ng/L) は細胞毒性を認めないことが分かった。

キーワード：ジェオスミン、2-メチルイソボルネオール、コロニー形成アッセイ、細胞毒性

1. はじめに

2007年の春(5月)、宍道湖(汽水湖79.1km²)周辺(図1)においてカビ臭が発生した。福田¹⁾は、湖水を化学分析しジェオスミン(以下GMと略す)を検出した。この時、宍道湖においてはGMを産生する藍藻類(*Phormidium*属、*Oscillatoria*属、*Anabaena*属)は確認しなかったが、GMを放出する放線菌(*Streptomyces*属)を分離同定した。

カビ臭物質としては、GMおよび2-メチルイソボルネオール(以下2-MIBと略す)が知られている。前者の化学構造をGerber²⁾は放線菌から単離したGMを用いて、trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol(分子量182)であることを示し、またMedskerら^{3,4)}は放線菌から単離した後者の化学構造を(1-R-exo)-1, 2, 7-tetra-methyl-bicyclo-(2,2,1)-heptan-2-olと決定した。

これらの化合物は、水中の放線菌⁵⁾や藍藻などの生物によって産生されることが報告されて以来^{3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17)}、今日まで数多くの報告がなされている。今回、宍道湖で発生したカビ臭の湖水における最高濃度はGM 700 ng/Lであった¹⁾。この濃度における毒性は、どの程度のもか確認するため毒性情報を調査したところ、GM および2-MIBの毒性についての報告は少なかった。これまでのGMに対する魚毒試験の報告として、モロコの稚魚を用いた京都市水道局の実験例があり、それによるとGMの急性毒性は認められなかったと述べられている¹⁸⁾。また石橋¹⁹⁾によるとGM濃度が1~0.05 mg/L濃度の環境で、アカヒレが生存していたとする報告もある。さらに間崎と青山ほか²⁰⁾によると変異原性試験(*Salmonella* Typhimurium)

において、GM 100 μg/plate以上の濃度で致死作用を示すものの、それ未満の濃度では突然変異原性を認めなかったと述べている。いずれの報告を見てもこの化合物の毒性の低さが示唆される。

化学物質の毒性評価に培養細胞が用いられたのは、農薬を対象としたGabliksら^{21,22)}の研究報告が最初であり、その後数多くの化合物の細胞毒性が評価されている。本論文において、我々はヒト由来のKB細胞を用いGMおよび2-MIBの毒性(細胞毒性)を評価したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 材料

GMおよび2-MIBは和光純薬株式会社より購入した。それぞれを、10%牛胎児血清(FBS)を含むEagle minimal essential medium(MEM)(10%FBS含有MEM培地)を用いて所定濃度(10 ng/L ~ 3,000 ng/L)に調整した。培地中の濃度をGC/MSで確認した後、細胞毒性試験に供した。

2.2 試料中のGM および2-MIBの分析

GC/MS分析は島津GC-17AとQP-500を用いた。選択イオンモニタリングカラム(30 m × 0.25 mm)は、DB-5 MSを使った。気化室温度200°C。60°C 1分保持後、1分間につき10°Cづつ250°Cまで昇温をした。検出器の温度は250°Cで行なった。

2.3 細胞培養

ヒト由来のKB細胞を用いた。細胞は、10%FBS含有MEM培地を用い、37°CのCO₂インキュベーター内で培養した²³⁾。

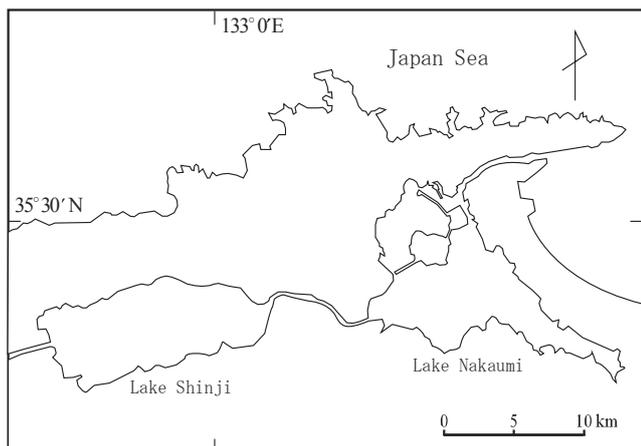


図1 カビ臭が発生した宍道湖

2.4 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、コロニー形成アッセイを用いて行った。コロニー形成アッセイには直径60mmの組織培養プラスチックシャーレを用いた。細胞はコロニー形成率の高い、ヒト由来のKB細胞²⁴⁾を実験前に3回クローニングしたものを用いた。細胞は対数増殖期にあるものを、トリプシン-EDTA混液で均一に分散後、200個/5mLの細胞浮遊液に調整し各シャーレに移植し37°CのCO₂インキュベーターで培養した。培養1日後、所定濃度のGMあるいは2-MIBを含む10%FBS含有MEM培地5mLと交換した。37°CのCO₂インキュベーター内で12日間培養後、10%ホルマリンで固定、0.1%メチレンブルーで染色した。出現したコロニー数を肉眼で数え、対照シャーレのコロニー数との比をもってコロニー形成率(%)とし、毒性を定量的に表わすこととした。50個以上の細胞からなるコロニーを1コロニーとして数えた。GMあるいは2-MIBの溶媒として用いたメチルアルコールの最終濃度は細胞毒性を示さない0.3%以下であった。

3. 結果と考察

カビ臭と一口に言われているが、2つの種類がある。1つはGMで、外国人は土臭いというが日本人にはカビ臭いと感じる。もう1つは2-MIBで、外国人はカビ臭いといい、日本人は土臭、墨汁臭という¹⁶⁾。

我々は飲料水や魚介類の中に、これらの化合物が多く含まれていると臭いが強いために不快に感じることから、まず飲食することはないと考えられる。それゆえに、石橋¹⁹⁾は、これら化合物の魚毒性試験濃度を10ng/L～1mg/Lの低濃度の範囲で行っている。そこで、我々もGMと2-MIB10ng/Lから3,000ng/Lまでの試験濃度範囲で細胞毒性試験を行った。その結果、GMおよび2-MIBのすべての供試濃度において明らか

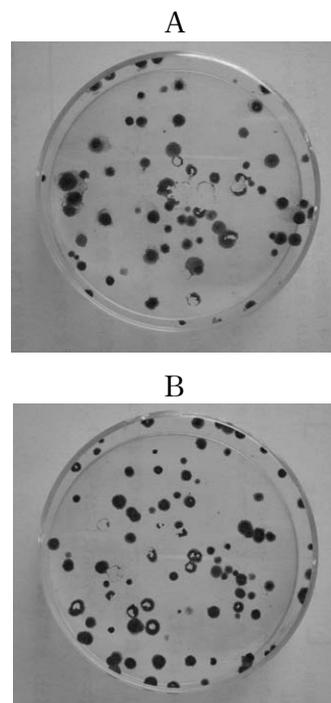


図2 KB細胞のコロニー形成に及ぼすGM (1,000 ng/L)の影響

A : GM (1,000 ng/L) 添加

B : コントロール (GM無添加)

にコロニーの形成を抑制しなかった。

図2は、GM 1,000 ng/L濃度におけるKBのコロニー形成像を示している。培地へ1,000 ng/LのGMの添加にも関わらず、培養後12日目に形成されたコロニーの数に違いがないことから、1,000 ng/L濃度であってもコロニーの形成を阻止しないことが分かった(図2A, 2B)。またGMと同じカビ臭物質である2-MIBを、培地へ1,000 ng/L添加したにも関わらず、培養後12日目に形成されたコロニーの数に違いがないことから、この濃度では細胞毒性がないことが分かった(図3A, 3B)。

これらの結果を、魚毒試験¹⁹⁾や変異原性試験^{18,19,20,25)}の報告と併せ考えると、カビ臭物質であるGMおよび2-MIBの毒性の低さが示唆された。

我々の実験結果(コロニー形成アッセイ)から宍道湖の湖水で検出されたGMの最高濃度(700 ng/L)は、培養細胞に対し毒性を認めないことが明らかになった。

カビ臭は早くから、世界各国で水道水の問題となってきたが、これまでにヒトの健康に関し問題があったとする報告例がないことから、これまでの毒性報告^{19,20,25)}と考え併せて、カビ臭物質が、ヒトの健康を害するとは思えない。しかしながら、今後、宍道湖でカビ臭発生が長期化することも考えられることから、生物濃縮、慢性毒性がないか確認する必要がある。我々が

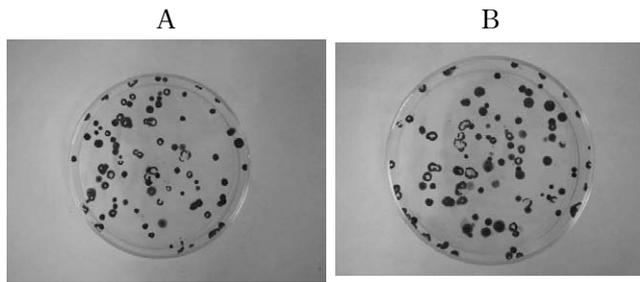


図3 KB細胞のコロニー形成に及ぼす2-MIB (1,000 ng/L) の影響

A : 2-MIB (1,000ng/L) 添加

B : コントロール(2-MIB 無添加)

この研究で得たGMおよびMIBの細胞毒性データは、今後のカビ臭物質の毒性評価に役立つであろう。

文 献

- 1) 福田俊治: 保環研だよりNo.125 (2007)
- 2) Gerber, NN.: Tetrahedron Lett 25: 2971 (1968)
- 3) Medsker, LL. et al.: Environ Sci Technol 2: 461 (1968)
- 4) Medsker, LL. et al.: Environ Sci Technol 3: 476 (1969)
- 5) Gerber, NN. et al.: Appl Microbiol 13: 935(1965)
- 6) Berglund, L. et al.: Water Sci Technol 15: 241 (1983)
- 7) Farlow, WG.: Science 2: 333 (1883)
- 8) Gerber, NN.: J Antibiotics 22: 508 (1969)
- 9) Gerber, NN.: Crit Rev Microbiol 17: 91 (1979)
- 10) 伊藤裕也ほか: 用水と廃 28: 686 (1986)
- 11) Persson, PE.: Wat Sci Tech 20: 211 (1988)
- 12) Safferman, RS. et al.: Environ Sci Technol 1: 429 (1967)
- 13) Smith, JL. et al.: Aquaculture 280: 5 (2008)
- 14) Silvey, JKG. et al.: J Am Water Works Assoc 42: 1018 (1950)
- 15) Slater, GP. et al.: Wat Sci Tech 15: 181 (1983)
- 16) 八木正一ほか: 日本薬剤師会雑誌 41: 481 (1989)
- 17) Yagi, O. et al.: Agric Biol Chem 51: 2081 (1987)
- 18) 京都市水道局臭い水対策研究会: 水道協会誌 462: 10 (1973)
- 19) 石橋良信: 水道協会雑誌 57: 30 (1988)
- 20) 間崎真典ほか: 水道協会雑誌 56: 24 (1987)
- 21) Gabliks, J. et al.: Proc Soc Exp Biol Med 120: 163 (1965a)
- 22) Gabliks, J.: Proc Soc Exp Biol Med 120: 168 (1965b)
- 23) Mochida, K. et al.: Zbl Bakt Hyg B 182: 558 (1986)
- 24) Itagaki, A. et al.: Exp Cell Res 83: 351 (1974)
- 25) Dionigi, CP. et al.: Water Res 27: 1615 (1993)

本研究は平成19年度自主研究（宍道湖沿岸に発生したカビ臭の原因とされる化合物の毒性（細胞毒性）評価）で行なった成果である。

Cytotoxicity of Geosmin and 2-Methylisoborneol Using Cultured Human Cells

Yuhei KITAWAKI and Kyo MOCHIDA

Summary

The cytotoxicity of musty odor-emitting substances, geosmin (GM) and 2-methylbornane (MIB), at a concentration of 10 ng/L~3,000ng/L was investigated using cultured human KB cells. These two compounds exhibited no cytotoxicity in the colony-formation of human KB cells assays. These results suggest that the maximum concentration (700ng/L) of GM found in the water of Lake Shinji not toxic.

Key word: geoxmin, 2-methylbornane , colony-formation assay , cytotoxicity