

アタパルジャイト及びワラストナイトのチャイニーズハムスター肺由来 V79-4 細胞
を用いた小核試験

藤田 博, 小縣 昭夫, 上原 眞一

Micronucleus Test of Attapulgite and Wollastonite in Chinese Hamster Lung V79-4 Cells

Hiroshi FUJITA, Akio OGATA and Shin-ichi UEHARA

アタパルジャイト及びワラストナイトのチャイニーズハムスター肺由来V79-4細胞を用いた小核試験

藤田 博*, 小縣 昭夫*, 上原 眞一*

Micronucleus Test of Attapulgite and Wollastonite in Chinese Hamster Lung V79-4 Cells

Hiroshi FUJITA *, Akio OGATA * and Shin-ichi UEHARA *

Keywords : アスベスト asbestos, アスベスト代替物 asbestos substitutes, アタジェル attagel, ナイグロス NYGLOS, ナイアド NYAD

はじめに

アスベストは、その危険性が指摘され使用の規制がされてきたため、現在ほとんど使用できない。そこで、アスベストに変わる種々の材料が代替物として使用されるようになってきた¹⁾。しかしながら、アスベスト代替物（以下、代替物と略す）の生態影響についての情報はまだ不十分であり、現在、WHO では代替物の生体影響情報の収集を行い、代替物の安全性を評価しようとしている²⁾。今後も新しい材料が利用されるようになる可能性もあることから、これらの代替物の生体影響を明らかにしておく必要がある。

アスベスト暴露により誘発される中皮種などのがんの発生には細胞増殖制御や種々の遺伝子に対する影響が原因となることから、代替物の変異原性を調べることは、それらの発がんリスク評価に資する情報を提供することになる。そこで本研究は、代替物を対象に変異原性試験のひとつである培養細胞を用いた小核試験を実施した。

アスベストの遺伝毒性の評価には様々な培養細胞が用いられているが、今回はチャイニーズハムスター肺由来細胞である V79 を用いた。V79 を選択した理由は、クリソタイルによって小核が誘発されることが Lu ら³⁾ によって報告されていることから、この細胞を用いることにより代替物の遺伝毒性をアスベストと比較して評価することができると考えたところにある。以下は、代替物の中で天然鉱物由来のアタパルジャイト（2 品目）及びワラストナイト（3 品目）について V79 の 1 クローンである V79-4 細胞を用いた小核試験を実施した結果を報告する。

実験方法

1. 試料及び試薬

試料 : アタパルジャイトは attagel 40 (直径2 μm , 長さ3 μm , 東新化成株) と attagel 350 (直径3 μm , 長さ5 μm , 米国フロリダ社) の2品目。ワラストナイトは NYAD 400 (直径7 μm , 長さ35 μm , NYCO Minerals社, 巴工業

株), NYAD 1250 (直径3 μm , 長さ9 μm , NYCO Minerals社, 巴工業株) と NYGLOS 5 (直径5 μm , 長さ65 μm , NYCO Minerals社, 巴工業株) の 3 品目を用いた。陽性対照としてはアスベストであるクロシドライト (UICC crocidolite), アモサイト (UICC amosite) 及びクリソタイル (UICC chrysotile A) を用いた。試料は、純水に懸濁し、オートクレーブ滅菌を行った。

試薬 : 細胞培養の培地は、Earle's MEM (GIBCO) にウシ胎仔血清 (GIBCO) を 10 % の濃度で添加したものをを用いた。細胞標本の染色には、固定にメタノール (和光純薬), 染色にギムザ染色液 (和光純薬) を用いた。増殖した細胞数の計数には、テトラゾリウム塩 (WST-8) の還元による発色を利用した⁴⁾ Cell Counting Kit-8 (和光純薬) を用いた。

2. 培養細胞

チャイニーズハムスター肺由来細胞である V79 としては、その 1 クローンである V79-4 を ATCC より購入して用いた。

3. 小核試験

継代 4 日目の細胞を直径 35 mm の小型シャーレ (Nunc) または同直径の 6 well プレート (Linbro) に 4×10^5 /well (2.22×10^5 /mL を 1.8 mL) に播種し、37 $^{\circ}\text{C}$, CO₂ 5 % の条件で 24 時間培養した。これに培地で希釈した試料溶液 0.2 mL を添加し、48 時間の培養後、標本作製した。細胞は、0.5 mL のトリプシン溶液 (GIBCO 0.1 % トリプシン, 1.06 mM EDTA·4Na) で細胞の分離を行い、培地 2 mL を加えて細胞溶液とした。一部は細胞数の計数に用い、残りの細胞液は 750 rpm 5 分の遠心を行い、上澄みの大部分を除去して少量の培地で細胞懸濁液を作成した。細胞懸濁液 5 μL をスライドガラスに塗抹し、冷風乾燥した後、メタノール固定 30 秒、ギムザ染色 10 分を行い水洗後、乾燥させた後で封入した。

* 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

表 1. アスベスト代替物の小核試験

	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	小核細胞 ¹⁾	多核細胞 ¹⁾	増殖率(%)
Attapulgate				
Attagel 40	0	6	17	100
	10	6	18	84
	50	9	46***	61
	100	7	71***	53
Attagel 350	0	6	17	100
	10	6	12	90
	50	11	33*	70
	100	17*	50***	53
Wollastonite				
NYGLOS 5	0	5	11	100
	10	7	29**	101
	50	19**	58***	92
	100	22**	82***	91
NYAD 400	0	7	28	100
	10	9	41	92
	50	8	30	94
	100	10	69***	89
NYAD 1250	0	7	28	100
	10	7	31	92
	50	7	30	85
	100	9	51**	82
Asbestos				
Amosite	0	5	11	100
	10	20**	117***	101
	50	35***	323***	50
	100	83***	485***	61
Crocidolite	0	7	15	100
	10	19*	67***	80
	50	41***	249***	71
	100	72***	363***	63
Chrysotile	0	5	11	100
	10	20**	103***	78
	50	103***	306***	36
	100	183***	409***	34

1) : 2000細胞あたりの出現数

* : χ^2 -検定 $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

細胞数の計数は、培地の細胞懸濁液 10 μL を 90 μL の培地を入れた 96 well プレート (FALCON) に加えた後、Cell Counting KIT-8 付属の溶液を 10 μL 添加し、3 時間後に 450 nm で吸光度を測定することにより行った。

小核及び多核細胞は、2000細胞あたりの出現数を求め、 χ^2 -検定により有意性の検討を行った。

結果及び考察

小核試験の結果を表 1 に示す。陽性対照のアスベストでは、クロシドライト、アモサイト及びクリソタイトの 3 種類とも 10 $\mu\text{g/mL}$ から小核の有意な増加が見られ、100 $\mu\text{g/mL}$

にてコントロール群の 10-40 倍にのぼる小核細胞の出現を見た。代替物では、アタパルジャイトの attagel 350 の 100 $\mu\text{g/mL}$ で小核細胞の有意な増加が見られ、コントロール群の約 3 倍に達した。ワラストナイトでは、NYGLOS 5 で 50 $\mu\text{g/mL}$ から有意な増加が見られ、コントロール群の 4 倍以上に至った。

今回の試験では、同型の核を 2 個以上含む多核細胞がコントロール群でも見られたが、使用した全てのアスベスト及び代替物の投与により増加した。アスベストでは、10 $\mu\text{g/mL}$ で検討した細胞の約 3-6 %、100 $\mu\text{g/mL}$ でその数が約 18-24 % と高率となった。代替物では、小核が有意に増加しなかった attagel 40, NYAD 400 及び NYAD 1250 を含む 5 品目の 50 または 100 $\mu\text{g/mL}$ で多核細胞の有意な増加が見られた。

細胞増殖率については、いずれの化合物でも用量相関性を示す増殖の抑制が見られた。その程度は 100 $\mu\text{g/mL}$ でコントロール群の 30-90 % と様々であったが、増殖抑制効果が最も強かったのがクリソタイトであり、続いてアタパルジャイト > クロシドライト \approx アモサイト > ワラストナイトの順であった。

本研究においては代替物の遺伝毒性を評価するためにチャイニーズハムスターの肺由来細胞である V79-4 細胞を用いたが、V79 は変異原性試験に古くから使われてきた細胞であり、多くの物質の変異原性データが蓄積されている。さらに、クリソタイトの小核誘発性も報告³⁾ されていることからこの細胞を用いることには、代替物の遺伝毒性を様々な情報と比較することができる利点がある。今回の試験で代替物の結果と比較するために陽性対照として用いたアスベストは、クリソタイトに加えてアモサイト及びクロシドライトであり、小核試験の結果は、いずれも高い頻度で小核細胞が誘発された。ただし、小核細胞の誘発数は、クリソタイトが最も高く、発がん性についてクロシドライがもっと最も強いとされてきたことを小核細胞数だけでは説明できないことが明らかであった。しかし、小核を有する細胞の形態を比較すると、データとして示していないが、クロシドライト及びアモサイトでは、小核を有する細胞の一細胞内の小核数が 2 個以上であり、細胞そのものも大型の多核細胞が多くなっていた。これに対してクリソタイトでは、一細胞に小核が 1 個の細胞が大部分であり、小核細胞数だけではなく細胞の変化も含めると、クロシドライト及びアモサイトの遺伝毒性が強いと判断することもできる。また、細胞の増殖阻害作用は、クリソタイトが最も高く、突然変異が影響を及ぼすには細胞が変異を持ちながら生存していることが条件であることから、大きな変異を持ちながらも生存する細胞が多いクロシドライトやアモサイトの方が発がん性が高いと考えることもできる。

代替物では、アタパルジャイトの attagel 350 及びワラストナイトの NYGLOS 5 で小核細胞数が有意に増加した。しかし、この増加数は 3 種類のアスベストに比べて高濃度処理においてもかなり少なく、アスベストが 10 $\mu\text{g/mL}$

から有意であることと比較すると、アスベストの 1/5 から 1/10 の比較的弱い作用であると考えられる。

多核細胞の増加についてはいくつかの報告があり^{3, 5)}、多核細胞化は線維性の物質を取り込んだ細胞の分裂の過程が阻害される結果と考えられている。今回の試験でも、アスベストでは高い割合で増加し、代替物ではアスベストに比べると少ないが多核細胞数の増加が確認された。また、小核細胞が増加しなかった代替物でも増加する傾向が見られることから、多核細胞となる機構と小核ができる機構が異なることも予想され、線維性の鉱物が示す複雑な毒性が伺われた。

代替物の変異原性及び発がん性に関する情報は、WHO がまとめた報告^{2, 6)}があり、アタパルジャイト及びワラストナイトについても危険度の評価が掲載されている²⁾。

アタパルジャイトでは、ラットを用いた暴露実験の結果より、5 μm 以上の長い線維において、ヒトに対する高い有害性があり、短い線維の有害性が低いとしている²⁾。今回の試験では、一品目ながら代替物の変異原性を見いだしたことから、様々な製品の有害性を変異原性試験で簡便に評価できる可能性があると考えられる。

ワラストナイトでは、ヒトに対する有害性が低いと報告されているが、ラットを用いた発がん実験で短い線維の陰性報告が判断の基盤となっている²⁾。しかし、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常及び姉妹染色分体交換試験の結果は陽性であり⁷⁾、今回の小核試験でも一品目ながら線維長が長い製品が陽性であったことも考慮すると、アタパルジャイトのように長い線維での *in vivo* の暴露試験による評価が必要ではないかと考えられる。

今回は、代替物の中でもリスク評価が定まってきた物質での試験なので、変異原性試験結果が寄与するものが少ないかもしれない。しかし、本研究は、全く情報が無い新しい代替物に対して、まず変異原性試験で発がん性のある程度予測できる可能性を示し、今後、多くの代替物での小核試験を実施して行くことの意義を提示したものであ

る。さらに、今回の試験では、小核試験の細胞液の一部を分取し、細胞数の測定を行った。これにより小核誘発性と細胞毒性（細胞増殖率）を同時に評価することが出来るようになったことで、化合物の毒性の評価がしやすくなったと考えられる。

ま と め

本研究は、アスベスト代替物の変異原性を 3 種類のアスベストを対照に、チャイニーズハムスター肺由来細胞である V79-4 を用い小核試験により検討した。試験は天然鉱物由来のアタパルジャイト 2 品目及びワラストナイト 3 品目について実施した。その結果、アタパルジャイト 1 品目ではアスベストより高濃度の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ワラストナイト 1 品目では 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で有意な小核誘発が見られた。

謝辞 本研究を実施するにあたり、アスベスト代替物試料を分与頂いた各社に感謝します。

文 献

- 1) 神山宣彦: 安全衛生コンサルタント, **24**, 42-46, 2004.
- 2) WHO : *WHO Workshop Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos Substitutes*, 2005, IARC, Lyon.
- 3) Lu, J., Keane, M.J., Ong, T and Wallace, W.E.: *Mutation Res*, **320**, 253-259, 1994.
- 4) Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., *et al.* : *Talanta*, **44**, 1299-1301, 1997.
- 5) Cassey, G.: *Mutation Res*, **116**, 369-377, 1983.
- 6) WHO : *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol.68, *Silica*, 245 and 283, 1997.
- 7) Aslam, M., and Rahman, Q.: *Mutation Res*, **300**, 45-48, 1993.