

チタン酸カリウムウイスキーのチャー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, 大橋則雄, 小縣昭夫

チタン酸カリウムウイスキー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*, 大橋 則雄*, 小縣 昭夫**

アスベスト代替物質で人工鉱物繊維であるチタン酸カリウムウイスキーの小核試験には、チャイニーズハムスター肺由来細胞 V79-4を用いた。チタン酸カリウムウイスキーは、10 µg/mL以上の濃度で小核細胞が有意に増加した。アスベストでは10 µg/mL以上の濃度で小核細胞が有意に増加することからチタン酸カリウムウイスキーのV79-4細胞に対する小核誘発性は、アスベストと同程度であると考えられた。

キーワード: アスベスト, アスベスト代替物, 人工鉱物繊維, 変異原性

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、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腫などがんの発生には細胞増殖制御などに関与する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てきた。

代替物として利用されているチタン酸カリウムウイスキー(単結晶繊維)は、耐薬品、耐熱性、耐摩耗性に優れていると評価されており自動車のブレーキ用材料として使われる。一方耐熱塗料やフィルターなどにも利用する技術が開発されている³⁾。本研究はチタン酸カリウムウイスキーが変異原性を有するかどうかを明らかにするためにチャイニーズハムスター肺由来細胞V79-4を用いた小核試験を実施したところ、小核細胞の誘発が見られたので報告する。

実験方法

1. 試料及び試薬

1) 試料: チタン酸カリウムウイスキーは、日本繊維状物質研究協議会のJFM標準繊維状試料⁴⁾を安達氏より分与を受け用いた。チタン酸カリウムウイスキーの平均サイズは⁵⁾、長さ6.0 µm、直径0.35 µmであり、単位重量あたりの繊維数は⁶⁾、 $5.9 \times 10^5/\mu\text{g}$ と報告されている。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。

2) 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⁷⁾ 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 $4 \times 10^5/\text{well}$ ($2.22 \times 10^5/\text{mL}$ を1.8 mL)に播種し、37°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、標本を作製した。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た。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。

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付属のテトラゾリウム塩溶液を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求めた。

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

チタン酸カリウムウイスキーおよびアスベストのチャイニーズハムスター肺由来細胞であるV79-4を用いた小核試験の結果をTable 1に示した。チタン酸カリウムウイスキーでは10 µg/mL以上の濃度で小核を有する細胞が有意に増加した。10 µg/mLでの増加はコントロールの約6倍、50 µg/mLでは約15倍

* 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

** 東京都健康安全研究センター環境保健部

Table 1. Micronucleus Test of Potassium Titanate Whisker and Asbestos

	Dose($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MN ¹⁾	PN ¹⁾	Growth(%)
Potassium Titanate whisker	0	4	11	100
	10	26 ***	222 ***	98
	50	60 ***	356 ***	87
	100	74 ***	496 ***	79
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) : The number of cells per 2000 cells.

MN: Micronucleated cells, PN: Polynucleated cells.

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

及び100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では約18倍であった。陽性対照の3種類のアスベストの小核試験ではそれぞれ10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で小核細胞が有意に増加し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では約3-4倍であり、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では約16-33倍であった。また、チタン酸カリウムウイスカーの試験において10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で多核細胞も有意に増加した。この多核細胞の増加は、陽性対照のアスベスト3種類の場合とほぼ同様の傾向を示した。チタン酸カリウムウイスカーのV79-4細胞の増殖に対する影響は100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で約20%の抑制であり、陽性対照のアスベスト3種類に比べてやや弱かった。

チタン酸カリウムウイスカーのチャイニーズハムスター肺由来細胞であるV79-4を用いた小核試験の結果では、小核細胞、多核細胞の出現が見られた。今回の試験に用いたV79細胞は、アスベストの小核誘発性を検出できることをLuら⁸⁾が報告している。

チタン酸カリウムウイスカーのV79-4細胞に対する小核誘発性は、アスベストに比較してほぼ同程度であり、特にクロシドライト及びアモサイトの出現傾向に類似していた。これはチタン酸カリウムウイスカーがアスベストと同程度の変異原性を有している可能性があることを示している。安達ら⁴⁾は、ラットを用いた投与実験においてチタン酸カリウムウイスカーがアスベストのクリソタイルに比べて約1/4程度の中皮種誘発性を有していると報告している。in vivoの試験結果がヒトへの健康被

害の可能性を推定するのに有効とされるが、本研究でチタン酸カリウムウイスカーの小核誘発性が検出できたことから、in vitroの試験においても代替物の危険性をある程度推定できるものと考えられる。したがって時間的、経済的負担を考えるならば、今後新たに開発されてくるかもしれない代替物の発がん性の可能性について培養細胞を用いた小核試験などの変異原性試験で推定することは、有用であると考えられる。

チタン酸カリウムウイスカーは、代替物として物的に優れているようだが、アスベストに比べて弱いながら健康被害を及ぼす可能性が示されてきたことから、その安全性についてさらに詳細に評価することが望まれる。

まとめ

チャイニーズハムスター肺由来細胞のV79-4は、アスベストの小核誘発性を検出できる。アスベスト代替物の人工鉱物繊維であるチタン酸カリウムウイスカーは、V79-4細胞に小核及び多核細胞を誘発した。小核及び多核細胞は、チタン酸カリウムウイスカーの10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で有意に増加した。アスベストでも、同様の濃度で小核及び多核細胞を有意に増加させた。このことから、チタン酸カリウムウイスカーの小核誘発性は、アスベストと同程度と考えられた。

謝辞 本研究で用いた試料のチタン酸カリウムウイスカーを分与頂いた相模女子大学教授 安達修一氏に深謝いたします。

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) 環境庁大気保全局企画課監修: アスベスト代替品のすべて, 113-117, 1989, 日本環境衛生センター, 川崎.
- 4) Adachi, S., Kawamura, K., and Takemoto, K. : *Industrial Health*, **39**, 168-174, 2001.
- 5) Kohyama, N., Tanaka, I., Tomita, M., et al. : *Industrial Health*, **35**, 415-432, 1997.
- 6) Yamato, H., Morimoto, Y., Tsuda, T., et al. : *Industrial Health*, **36**, 384-387, 1998.
- 7) Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., et al. : *Talanta*, **44**, 1299-1301, 1997.
- 8) Lu, J., Keane, M.J., Ong, T and Wallace, W.E.: *Mutation Res*, **320**, 253-259, 1994.

Micronucleus Test of Potassium Titanate Whisker in Chinese Hamster Lung V79-4 Cells

Hiroshi FUJITA*, Norio OHASHI*, and Akio OGATA*

Chinese hamster lung V79-4 cells are sensitive to the micronucleus inducibility of asbestos. The potassium titanate whisker, a synthetic mineral fiber used as an asbestos substitute, induced micronucleation and polynucleation in V79-4 cells. The number of micronucleated and polynucleated cells increased significantly after treatment with 10 µg/mL or more of potassium titanate whisker. Micronucleated and polynucleated cells also increased significantly after treatment with similar doses of asbestos. These results indicate that potassium titanate whisker possesses an ability to induce micronuclei similar to that of asbestos.

Keywords: asbestos, asbestos substitutes, man-made mineral fiber, MMMF, mutagenicity

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan