

【特集】

## アスベスト代替物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

Micronucleus Test of Asbestos Substitutes in Chinese Hamster Lung V79-4 Cells

藤田 博、大橋則雄、小縣昭夫  
東京都健康安全研究センター

Hiroshi FUJITA, Norio OHASHI, Akio OGATA  
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

**要旨**：アスベスト代替物の変異原性について 3 種類のアスベストを対照としてチャイニーズハムスター肺由来細胞である V79-4 を用いた小核試験により検討した。試験は天然鉱物繊維のアタパルジャイト(2 品目)、ワラストナイト(3 品目)及び人工鉱物繊維であるチタン酸カリウムウイスキーについて実施した。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 $\mu$ g/mL、ワラストナイト 1 品目では 50 $\mu$ g/mL 以上の濃度で有意な小核誘発が見られたがアスベストよりは弱い小核誘発性であると考えられた。チタン酸カリウムウイスキーは、10 $\mu$ g/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、アタパルジャイト、ワラストナイト、人工鉱物繊維

**Abstract**: Chinese hamster lung V79-4 cells are sensitive to the micronucleus inducibility of asbestos. Attapulgitite (2 samples) and wollastonite (3 samples), natural mineral fibers, and potassium titanate whisker, a man-made mineral fiber, are all used as asbestos substitutes and thus were tested for their inducibility of micronucleated cells in V79-4 cells. The micronucleated cells significantly increased by 100 $\mu$ g/mL of one of the attapulgitites, 50 $\mu$ g/mL or more of one of the wollastonites, and 10 $\mu$ g/mL or more of potassium titanate whisker. The micronucleated cells significantly increased also by 10 $\mu$ g/mL or more of asbestos. These results indicate that attapulgitites and wollastonites may possess an ability to induce micronuclei weaker than that of asbestos and potassium titanate whisker possesses such an ability similarly to that of asbestos.

**Keywords** : Asbestos, Asbestos Substitutes, Attapulgitite, Wollastonite, Man-Made Mineral Fiber, MMMF, Mutagenicity, MN

**社会的背景：** アスベストは、その発がん性が極めて強いこと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。そのアスベスト代替物（以下、代替物と略す）としては、アスベスト以外の天然鉱物繊維であるセピオライト、アタパルジャイト、ワラストナイトなどが建築ボードや摩擦材として利用されてきた。また人工鉱物繊維としてはグラスウール、ロックウールがプラスチック強化材や建築用断熱材に多用されているが、近年ウイスキー（単結晶繊維）の開発が盛んに行われチタン酸カリウムウイスキーなどがブレーキなどの摩擦材や耐熱塗料に利用されている（神山宣彦, 2004; 環境庁大気保全局企画課監修, 1989）。しかしながら、代替物の生体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（WHO, 2005）。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。

## 1. 緒言

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 (Lu et al, 1994) 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考えたところにある。以下は、代替物の中で天然鉱物繊維のアタパルジャイト (2 品目)、ワラストナイト (3 品目) 及び人工鉱物繊維であるチタン酸カリウムウイスカーについて 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。

## 2. 実験方法

### 2-1. 試料

アタパルジャイトは、製品 A (直径 2 $\mu$ m、長さ 3 $\mu$ m) と製品 B (直径 3 $\mu$ m、長さ 5 $\mu$ m) の 2 品目。ワラストナイトは、製品 C (直径 7 $\mu$ m、長さ 35 $\mu$ m)、製品 D (直径 3 $\mu$ m、長さ 9 $\mu$ m) 及び製品 E (直径 5 $\mu$ m、長さ 65 $\mu$ m) の 3 品目を用いた。チタン酸カリウムウイスカーは、日本繊維状物質研究協議会の JFM 標準繊維状試料 (Adachi et al, 2001) (直径 0.35 $\mu$ m、長さ 6.0 $\mu$ m (Kohyama et al, 1997)) で単位重量あたりの繊維数は (Yamato et al, 1998)、 $5.9 \times 10^5/\mu$ 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。

### 2-2. 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 (Ishiyama et al, 1997) を利用した Cell Counting Kit-8 (和光純薬) を用いた。

### 2-3. 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。

### 2-4. 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  $4 \times 10^5$  /well ( $2.22 \times 10^5$  /mL を 1.8mL) に播種し、37 °C、CO<sub>2</sub> 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 0.2mL を添加し、48 時間の培養後、標本作製した。細胞は、0.5mL のトリプシン溶液 (GIBCO 0.1 % トリプシン、1.06mM EDTA·4Na) で細胞の分離を行い、培地 2mL 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  $\mu$ L をスライドガラスに塗沫してから冷風乾燥した。細胞はメタノール固

定 30 秒、ギムザ染色 10 分を行い水洗後、乾燥させた後封入した。

細胞数の計数は、培地の細胞懸濁液 10 $\mu$ L を 90 $\mu$ L の培地を入れた 96well プレート (FALCON) に加えた後、Cell Counting KIT-8 付属の溶液を 10  $\mu$ L 添加し、3 時間後に 450 nm で吸光度を測定し求めた。

小核及び多核細胞は、2,000 細胞あたりの出現数を求め、 $\chi^2$ -検定により有意性の検討を行った。

### 3. 結果

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ルの 3 種類とも 10 $\mu$ g/mL から小核の有意な増加が見られ、100 $\mu$ 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製品 B の 100 $\mu$ 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、製品 E で 50 $\mu$ 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。さらにチタン酸カリウムウイスキーでは 10 $\mu$ g/mL 以上の濃度で小核を有する細胞が有意に増加した。10 $\mu$ g/mL での増加はコントロールの約 6 倍、50 $\mu$ g/mL では約 15 倍及び 100 $\mu$ g/mL では約 18 倍であった。

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 $\mu$ g/mL で検討した細胞の約 3-6 %、100 $\mu$ 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製品 A、製品 C 及び製品 D を含む 6 品目全ての 50 または 100 $\mu$ 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 $\mu$ 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

クリソタイルであり、続いてアタパルジャイト>クロシドライト $\approx$ アモサイト>チタン酸カリウムウイスキー>ワラストナイトの順であった。

### 4. 考察

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、クリソタイルの小核誘発性も報告 (Lu et al, 1994) 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、クリソタイル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、クリソタイルが最も高く、発がん性についてクロシドライト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ルでは、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、クリソタイルが最も強く、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

表1. アスベスト代替物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

試料名	用量( $\mu\text{g/mL}$ )	小核細胞数 <sup>1)</sup>	多核細胞数 <sup>1)</sup>	増殖率(%)
天然鉱物繊維				
アタパルジャイト				
製品 A	0	6	17	100
	10	6	18	84
	50	9	46 <sup>***2)</sup>	61
	100	7	71 <sup>***</sup>	53
製品 B	0	6	17	100
	10	6	12	90
	50	11	33 <sup>*</sup>	70
	100	17 <sup>*</sup>	50 <sup>***</sup>	53
ワラストナイト				
製品 C	0	7	28	100
	10	9	41	92
	50	8	30	94
	100	10	69 <sup>***</sup>	89
製品 D	0	7	28	100
	10	7	31	92
	50	7	30	85
	100	9	51 <sup>**</sup>	82
製品 E	0	5	11	100
	10	7	29 <sup>**</sup>	101
	50	19 <sup>**</sup>	58 <sup>***</sup>	92
	100	22 <sup>**</sup>	82 <sup>***</sup>	91
人工鉱物繊維				
チタン酸カリウムウイスカー				
	0	4	11	100
	10	26 <sup>***</sup>	222 <sup>***</sup>	98
	50	60 <sup>***</sup>	356 <sup>***</sup>	87
	100	74 <sup>***</sup>	496 <sup>***</sup>	79
アスベスト				
アモサイト				
	0	5	11	100
	10	20 <sup>**</sup>	117 <sup>***</sup>	101
	50	35 <sup>***</sup>	323 <sup>***</sup>	50
	100	83 <sup>***</sup>	485 <sup>***</sup>	61
クロソドライト				
	0	7	15	100
	10	19 <sup>*</sup>	67 <sup>***</sup>	80
	50	41 <sup>***</sup>	249 <sup>***</sup>	71
	100	72 <sup>***</sup>	363 <sup>***</sup>	63
クリソタイル				
	0	5	11	100
	10	20 <sup>**</sup>	103 <sup>***</sup>	78
	50	103 <sup>***</sup>	306 <sup>***</sup>	36
	100	183 <sup>***</sup>	409 <sup>***</sup>	34

1) : 2000細胞あたりの出現数

2) :  $\chi^2$ -検定による有意確率 \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001

もできる。

代替物では、アタパルジャイトの製品 B 及びワラストナイトの製品 E 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 $\mu$ 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。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。

多核細胞の増加についてはいくつかの報告があり (Lu et al,1994; Cassey, 1983)、多核細胞化は繊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、繊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 (WHO, 2005, 1997) 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 (WHO, 2005)。

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 $\mu$ m 以上の長い繊維において、ヒトに対する高い有害性があり、短い繊維の有害性が低いとしている (WHO, 2005)。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繊維の陰性報告が判断の基盤となっている (WHO, 2005)。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 (Aslam et al, 1993)、今回の小核試験でも一品目ながら繊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繊維での *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。

チタン酸カリウムウイスカーがアスベストと同程度の小核誘発性を有していることが明らかとなったが、安達ら (Adachi et al, 2001) 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高い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のある程度推定できるものと考えられる。チタン酸カリウムウイスカーは、代替物として物性的に優れているようだが、アスベストに比べて弱いかもしれないが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。

今回は、代替物の中でもある程度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。

**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及びチタン酸カリウムウィ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。

本報文は、東京都健康安全研究センター研究報告第 57 号 (2007) に掲載された論文の内容に一部加筆・修正したものである。

**参考資料：**

- 1) Adachi, S., Kawamura, K., Takemoto, K. (2001): A trial on the quantitative risk assessment of man-made mineral fibers by the rat intraperitoneal administration assay using the JFM standard fibrous samples. *Industrial Health*, **39**, 168-174.
- 2) Aslam, M., Rahman, Q. (1993): Cytotoxic and genotoxic effects of calcium silicates on human lymphocytes in vitro. *Mutation Res*, **300**, 45-48.
- 3) Casey, G. (1983): Sister-chromatid exchange and cell kinetics in CHO-K1 cells, human fibroblasts and lymphoblastoid cells exposed in vitro to asbestos and glass fibre. *Mutation Res*, **116**, 369-377.
- 4) Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. (1997): A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, **44**, 1299-1301.
- 5) Kohyama, N., Tanaka, I., Tomita, M., Kudo, M., Shinohara, Y. (1997): Preparation and characteristics of standard reference samples of fibrous minerals for biological experiments. *Industrial Health*, **35**, 415-432.
- 6) Lu, J., Keane, M.J., Ong, T., Wallace, W.E. (1994): In vitro genotoxicity studies of chrysotile asbestos fibers dispersed in simulated pulmonary surfactant. *Mutation Res*, **320**, 253-259.
- 7) Yamato, H., Morimoto, Y., Tsuda, T., Ohgami, A., Kohyama, N., Tanaka, I. (1998): Fiber numbers per unit weight of JFM standard reference samples determined with a scanning electron microscope. Japan Fibrous Material. *Industrial Health*, **36**, 384-387.
- 8) WHO (1997): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **Vol.68**, Silica, 245 and 283.
- 9) WHO (2005): WHO Workshop Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos Substitutes, IARC, Lyon.
- 10) 神山宣彦 (2004) :石綿製品の使用禁止と石綿代替繊維の現状, 安全衛生コンサルタント, **24**, 42-46.
- 11) 環境庁大気保全局企画課監修 (1989): アスベスト代替品のすべて, 日本環境衛生センター, 川崎.