短 報

粉碎アスベストおよび長短2種グラスファイバーのマクロファージ細胞毒性

Effects of Milled Asbestos and Length Different Glass Fibers on Macrophages

石綿等のミネラルファイバーの人体影響を知る目的で *in vitro* での暴露実験が行われている¹⁻⁴⁾が、今回われわれは、工場、車のブレーキライニング等から磨耗した状態で出てくる現実の環境汚染物質としての線維性粉じんを考え⁵⁾、3種類の線維性粉じんについて、マウス腹腔マクロファージに対する影響の相違を酵素学的見地から検討したので、その成績を報告する。

実験材料および方法

実験動物は、生後8週齢の ddy 系の雌性マウスを用い、腹腔よりマクロファージ（以下 Mφ と略記）を採取した。これが培養シャーレに十分付着するよう 37°C 5% CO₂ 条件下で24時間培養し、その後、培養液 M 199 (10% FCS 含む) 中に3種類の線維性粉じんが 5, 10, 20, 30, 50 μg/ml の濃度になるように調整したもので培地を交換し、16時間培養後上澄をとり、4°C に冷却した 0.1% Triton X-100 を培養シャーレに入れ、ラバーチップにて細胞をはがした。上澄および細胞質成分中の Lactic dehydrogenase⁶⁾ (以下 LDH と略記)、β-Glucuronidase⁷⁾ (以下 β-G と略記) 活性を測定した。

暴露した粉じんは、(A)UICC Canadian Chrysotile (以下 Chrysotile と略記): 5~30 μm, 63% (光顕)、(B) UICC Amosite [以下 Amo(0) と略記]: 5~30 μm, 65% (光顕)、(C)4時間 chopping した UICC Amosite [以下 Amo(4) と略記]: 2 μm 以下, 98% (光顕)、また Glass Fiber については、code 110 (φ 1.50~2.49 μm), code 100 (φ 0.05~0.09 μm) [John Manville, Canada] を入手し disc milling により長さを 200 μm 以下になるようにし⁸⁾、吸引可能な大きさとするため hexhlet sampler⁹⁾ でさらに大きい粉じんを除いた。それぞれを (D)Glass Fiber code 110 (以下 GL と略記): 5~30 μm, 69% (光顕)、(E)Glass Fiber code 100 (以下 GS と略記): 2 μm 以下, 82% (光顕) であった。

実験成績

細胞毒性の指標として Mφ から放出される LDH およびライソゾーム酵素の一種である β-G を測定した結果を Fig. 1(A)~(E) に示す。

(A) Chrysotile では、暴露濃度 10 μg/ml から急速に

LDH, β-G とともにコントロールと比較して有意に培養上澄中への放出が増加し、また、細胞成分中からの LDH, β-G の有意な減少が認められた。

(B) Amo(0) においては、暴露濃度 30 μg/ml にて β-G の上澄中への有意な放出を示した。LDH は、暴露濃度 50 μg/ml にて上澄中への有意な放出を示した。

(C) Amo(4) の場合は、上澄中および細胞成分中とも LDH, β-G 活性には、コントロールに比して有意な変動を認められなかった。

同様に (D) GS の暴露では、LDH, β-G とともに何ら特記すべき変動を認めなかったのに対し、(E) GL では、暴露濃度 5 μg/ml 以上で β-G の有意な上澄中への放出を認め、LDH は暴露濃度 10 μg/ml から有意な上澄中への放出を示した。また、GL 暴露での細胞成分中の LDH, β-G は、暴露濃度 30 μg/ml より有意な減少を示した。

考 察

今回の実験は、3種類の線維性粉じんを用いてその種類の違いによる Mφ に対する影響を見るとともに、その線維の粉碎による長さの影響を検討したものである。

Chrysotile の場合、β-G, LDH 両酵素の上澄中への放出促進が同時に起こり始め、暴露量-反応関係も他の粉じん線維と比較して顕著に認められ強い細胞毒性を示していた。これは、Chrysotile の表面の Mg²⁺ による影響も加わりその毒性が増強されたと考えられる¹⁰⁾。

Amo(0), GL の場合には、LDH の放出に先だち β-G の放出促進が見られた。これは、Amo (4), GS の結果と考え合わせると、線維が Mφ に比べ大きすぎるため貪食しえないことも一つの誘因と考えられる。また、細胞内および上澄中の酵素の総量が低濃度暴露で増加する傾向がみられることから、細胞内での酵素産生が最初起こっているよううかがわれる。しかし、粉じん暴露濃度が多くなると酵素は減少するのみである。

Amo (4), GS の場合は、ほとんどのものが Mφ 内に貪食されているが、暴露濃度 50 μg/ml に至っても酵素の変動は見られなかった。

以上のように、粉じん自体の形態的な大きさというものが、Mφ に対する細胞毒性に関して大きな要因となりうることが示唆された。

ただし、粉碎処理を行う際に chopping おいても表面構造の変化がおこることが報告されており¹¹⁾、その点については今後の検討課題と考える。

まとめ

マウス腹腔マクロファージを *in vitro* で培養し Chrysotile, UICC Amosite および粉碎処理したもの、長短2種類の Glass Fiber を暴露し、酵素学的見地より

Fig.1. Effects of dusts on mouse peritoneal macrophages. ○—○ LDH Activities, ●—● β-Glucuronidase Activities (mean±S.E.), (A) Chrysotile, (B) Amosite (0), (C) Amosite (4), (D) Glass Fiber S, (E) Glass Fiber L; sug. $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (t -test), Significantly different from the control.

その影響を見る実験を行った。これら粉じんの $M\phi$ に対する細胞毒性は、その粉じん自体に含まれる化学的性質のみでなく、線維の長さという形態的な要因によっても大きく影響されることが認められた。また粉じん暴露後の酵素放出は、ライソゾーム酵素が LDH に先がけて起こることが認められた。

文 献

- Beck, E. G., Holt, P. F. and Manojlovic, N.: Comparison of effects on macrophage cultures of glass fiber, glass powder and chrysotile asbestos, Br. J. Ind. Med., 29: 280-286, 1972.
- Beck, E. G.: Die Auseinandersetzung von Zellen *in vitro* mit faserförmigem Staub, Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig. Reihe B, 162: 85-92, 1976.
- Tikes, F. and Beck, E. G.: Comparison of length dependent cytotoxicity of inhalable asbestos and man-made mineral fibres, Biological effects of mineral fibres, Vol. 1 (Ed. Wagner, J. C.), 475-483, 1980.
- David, M. B., Robert, T. D. and Marvin, K.: Experimental approaches for exposure to sized glass fibers, Environ. Health Perspect., 34: 47-57, 1980.
- Rohl, A. N., Langer, A. M., Klimentidis, R., Wolff, M. S. and Selikoff, I. J.: Asbestos content of dust encountered in breake maintenance and repair, Proc. R.Soc. Med., 70: 32-37, 1977.
- Henry, R. J.: Clinical chemistry, A Hoeber-Haper International Reprint, 505, 1966.
- 延 永正: β-Glucuronidase 測定法, 福岡医誌, 52: 300, 1961.
- Brown, R. C., Chamberlain, M., Davies, R., Gaffen, J. and Skidmore, J. W.: *In vitro* biological effects of glass fibers, J. Environ. Pathol. Toxicol., 2: 1369-1383, 1979.
- Wright, B. M.: A size selecting sampler for air borne dust, Br. J. Ind. Med., 11: 284-288, 1954.
- Macnab, G. and Harington, J. S.: Hemolytic activity of asbestos and other mineral dusts, Nature (London), 214: 522, 1967.
- Sprny, K. R., Stoken, W., Opiela, H. and Weiss, G.: On the problem of milling and ultrasonic treatment of asbestos and glass fibers in biological and analytical applications, Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 41: 198-203, 1980.

窪田道男*, 中谷喜彦*, 岡田 晃*, 鏡森定信**

* 金沢大学医学部公衆衛生学教室

** 富山医科薬科大学医学部保健医学教室

Michio KUBOTA,* Yoshihiko NAKATANI,* Akira OKADA* and Sadanobu KAGAMIMORI**

* Department of Public Health, Kanazawa University, School of Medicine, 13-1, Takara-machi, Kanazawa, 920 Japan

** Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

昭和56年6月8日受付

通信先: 窪田あて, Reprint requests to M. Kubota