原著

リンパ球系細胞 (*in vitro*) の機能に対する
ミネラル・ファイバーの影響

アスベストとグラス・ファイバーの比較

中 谷 喜 彦*

BIOLOGICAL EFFECTS OF MINERAL FIBERS ON
LYMPHOCYTES *IN VITRO*

Comparative Studies of Asbestos and Glass Fibers

Yoshihiko NAKATANI*

The biological effects of asbestos and glass fibers on lymphocytes *in vitro* were investigated. Blastoid transformation and β_2 microglobulin production of human peripheral blood lymphocytes (PBL) induced by phytohemagglutinin were inhibited by Canadian chrysotile B (Standard sample of the Union Internationale Contre le Cancer; UICC standard sample) but it was not the case for crocidolite (UICC standard sample) and small and large glass fibers (John Manville, Canada). Cytotoxic activities of natural killer and killer cells of PBL were investigated using K562 cells and Chang liver cells as target cells respectively. Chrysotile inhibited the both activities but crocidolite and two kind of glass fibers not. In regard to release of lactic dehydrogenase and β -glucuronidase from mouse peritoneal macrophages exposed to mineral fibers, chrysotile showed more effective reaction compared to crocidolite and amosite (UICC standard sample), on the other hand large glass fiber showed the similar reaction to chrysotile but small glass fiber and milled amosite did not induce any more enzymatic release than the control. In addition to chemical compositions of mineral fibers, the morphological characteristics were also discussed in relation to their biological effects.

I. 緒 言

ミネラル・ファイバーは熱や音響の絶縁体あるいは繊維やプラスチックの補強剤として汎用されている。しかし、近年、代表的なミネラル・ファイバーであるアスベストの暴露集団において肺ガン、胸膜や腹膜の中皮腫などの悪性新生物が対照に比較して多発することより、発ガン機序との関連でこのミネラル・ファイバーが注目されている^{1~4)}。

アスベストの人体への影響は一般にこの粉じんの吸入

による細気管支炎を主体とするじん肺 (asbestosis) で始まり、この時期には細胞性免疫の抑制、液性免疫の亢進という特徴ある免疫系の異常が出現する^{5~7)}。一方、悪性新生物は、この asbestosis を経て粉じん暴露後 20~40 年たって発生すると報告されている⁸⁾。本研究ではアスベストによる悪性新生物の発生に実際先行し、また一般に発ガン機序と深く関連するとされている免疫系の異常について、リンパ球系細胞に対する *in vitro* でのアスベストの暴露実験により検討した。

グラス・ファイバーは、アスベストの人体への影響が明らかになるにともない、その代替品として使用量が増加してきているミネラル・ファイバーである。幸い疫学的には、この粉じんの暴露集団でのじん肺や悪性新生物の発生について、対照と比較して差異があったとの報告はまだない^{9,10)}。本研究ではグラス・ファイバーについ

* 金沢大学医学部公衆衛生学教室

昭和57年9月24日受付

* Department of Public Health, School of Medicine,
Kanazawa University

Received for publication, September 24, 1982

でもリンパ球系細胞の機能に対する影響を検討し、アスベストのそれと比較した。

II. 実験材料および方法

1. 末梢血リンパ球の分離

健康な医学部男子学生から得られた末梢血にヘパリン(日本薬局方, ヘパリンナトリウム注射液; 腸粘膜)を25単位/mlの割合で加えた。これを血清を含まない重曹緩衝 RPMI 1640 培養液(日本製薬)で4倍に希釈し、末梢血リンパ球(PBL)の分離を lymphocyte separation medium (Bionetics) を使用し、Böyum¹¹⁾の方法に準じて実施した。分離した PBL を重曹緩衝 RPMI 1640 培養液で3回洗浄したあと、2mmのL-グルタミン、100単位/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを含む重曹緩衝 RPMI 1640 培養液に 2×10^6 /ml の割合で浮遊した。

2. 腹腔マクロファージの採取

生後8週齢の ddY 系の雌マウスの腹腔内にリン酸緩衝食液(PBS)を注入し洗浄する方法でマクロファージ(Mφ)を採取した。不活化した牛胎児血清(FCS; 以下記載のない時は不活化したものをいう)を10%含む重曹緩衝 M 199 培養液(日本製薬)に Mφ を浮遊した。ついでこれを1mlに 1.25×10^5 個の Mφ を含む細胞浮遊液に調整し、この2mlを小プラスチック・シャーレ(直径5cm)に播き、37°C, 5% CO₂ の気相にて培養し付着細胞層を得た。

3. ミネラル・ファイバー懸濁液の調整

ガラス・ファイバーとしては code 100 (公称寸法: 直径 0.05~0.09 μm) および code 110 (公称寸法: 直径 1.50~2.49 μm) を John Manville, Canada から入手し、disc milling により長さ 200 μm 以下になるようにし¹²⁾、さらに吸引可能な大きさとするために hexhlet sampler¹³⁾ で大きい粉じんを除いた。このようにして得られたガラス・ファイバー(MRC Pneumoconiosis Unit より分与)の電子顕微鏡で計測した直径および長さの分布の詳細はすでに報告されているが¹²⁾、ここにその概略を示す。まず長さについてみると、code 100 では 10 μm 未満のものが 95.4% とほとんどを占め、10 μm 以上 20 μm 未満が 2.7% であった。一方 code 110 では 10 μm 未満のものが 46.7%, 10 μm 以上 20 μm 未満が 30.6% であり、20 μm 以上 30 μm 未満が 12.8% あった。ついで直径についてみると、code 100 では 0.6 μm 未満のものが 95.6% とほとんどを占め、0.6 μm 以上 1.0 μm 未満が 4.4% であった。一方 code 110 では 0.6 μm 未満のものが 49.4%, 0.6 μm 以上

1.0 μm 未満が 25.3%, 1.0 μm 以上 3.1 μm 未満が 25.4% であった。本研究では code 100 より作成され、長さも直径もより小さいほうの粉じんを GFs, code 110 より作成され長さも直径もより大きいほうの粉じんを GFL と称した。

アスベストとしては、Union Internationale Contre le Cancer (UICC) の標準サンプルである Canadian chrysotile B (クライソタイル; 光学顕微鏡による1,000個のファイバーの大きさの分布、直径 2 μm 未満・長さ 20~60 μm が 60%, 長さの最大値 300 μm), crocidolite (クロソドライト; 直径 3 μm 未満・長さ 5~30 μm が 90%, 長さの最大値 100 μm) および amosite (アモサイト; 直径 3 μm 未満・長さ 5~30 μm が 85%, 長さの最大値 90 μm) を使用した。なおアモサイトについてはこのほかに4時間 chopping 処理されたサンプル(MRC Pneumoconiosis Unit より分与; 直径 3 μm 未満・長さ 10 μm 未満が 90%) も使用したので、それぞれアモサイト(0), アモサイト(4)として区別した。

これらのミネラル・ファイバーをオートクレープにて滅菌したあと PBS にて懸濁液とし、ピペッティングを繰り返す、さらにソニケーターで30秒処理した。最終暴露濃度の10倍にあらかじめ調整されたミネラル・ファイバーの懸濁液が各培養実験系に、その暴露に際して加えられた。

4. Phytohaemagglutinin (PHA) による PBL の芽球化反応

7人の供血者の血液を使用して、PHA による PBL の芽球化反応に対するミネラル・ファイバーの影響を検討した。芽球化反応の程度は ³H-thymidine 取り込みを指標とした DNA 合成により表示した¹⁴⁾。3日間培養実験の場合には、PBL (2×10^6 /ml) を浮遊した前述の L-グルタミンおよび抗生物質を含む重曹緩衝 RPMI 1640 培養液 1.55 ml に 0.2 ml の不活化しない FCS と同じく 0.2 ml の各濃度のミネラル・ファイバー懸濁液(10倍濃度調整)を加え、最後に 50 μl の PHA 添加 PBS 溶液(PHA 濃度 40 μg/ml)により総量を 2 ml とした。これらを triplicate にして、37°C, 5%CO₂ 気相で培養した。培養2日目の終りに ³H-thymidine (methyl-³H-thymidine 6.7 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston Mass.) の重曹緩衝 RPMI 1640 溶液(100 μCi/ml)を 20 μl 加え、培養3日目の終りに該当チューブの細胞を multiple cell harvester (Labo Science Co. Ltd.) により生理的食塩水で洗浄しながら濾紙上に回収した。

6日間培養の実験では、PHA 溶液を培養4日目の始

めに, ^3H -thymidine 溶液を5日目の終りに加える以外はすべて3日間培養の場合と同じであった。

リンパ球培養チューブにおけるミネラル・ファイバーの最終濃度はそれぞれ 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。対照としてはミネラル・ファイバー懸濁液のかわりに PBS 溶液を使用した。

培養期間中の PBL の viability の検討は PHA を加えない以外は, すべて同じ条件でミネラル・ファイバーとともに培養された細胞を Fluorochromatic staining 法¹⁵⁾により観察しておこなった。落射式蛍光顕微鏡 (U-420 K フィルター, Nikon) 下にて, グリーンに輝くものの全細胞数に対する割合 (%) にて viability を表示した。

PBL の ^3H -thymidine の取り込み量は, 十分に乾燥した multiple cell harvester の濾紙を 0.6% の Butyl-PBD を含むトルエン 2 ml とともに液体シンチレーション・カウンター (Aloka, LSC 671) により測定した。 ^3H -thymidine 取り込み量の検討は, 液体シンチレーション・カウンターによるカウント数を log 変換したものでおこなった。

5. PHA による PBL の β_2 -microglobulin (β_2 -m) 産生刺激

6人の供血者の血液を使用して, PHA による PBL の β_2 -m 産生量に対するミネラル・ファイバーの影響を検討した。 ^3H -thymidine 以外は PHA による芽球化反応の場合と全く同様にして, PBL とミネラル・ファイバーおよび PHA をリンパ球培養チューブにて, 37°C, 5% CO_2 気相にて3日間培養したあと, 該当チューブを回収し, 遠心 (1,000 g, 10 分) して, β_2 -m の測定まで上清を -20°C で凍結保存した。上清中の β_2 -m の測定は, ラジオイムノアッセイ法による Phadebas β_2 -micro Test キット¹⁶⁾ (Pharmacia Diagnostics, Upsala) を使用しておこなった。

6. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)

K細胞による細胞傷害活性の測定は, MacLennan ら¹⁷⁾の方法に準じておこなった。まず 10% FCS を含む Eagle-MEM 培養液 (日水製薬) で培養した Chang 肝細胞の分裂直後でまだシャーレ底に付着しないものを回収した。ついでその 5×10^6 個を 100 μCi の ^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, 1 mCi/ml, 第1ラジオアイソトープ研究所) を含む前述の MEM 培養液 1 ml に浮遊し, 37°C, 5% CO_2 気相にて 30 分ごとに軽く振とうしながら2時間培養した。MEM 培養液で3回洗浄後, この細胞を 10^{-4} 倍希釈した抗 Chang 肝細胞家兎抗体 (MacLennan, I.C.M.

博士より分与) で 37°C, 30 分処理したものを ADCC の標的細胞とした。標的細胞 1×10^4 個と PBL 2×10^5 個 (エフェクター細胞) を 10% FCS を含む Eagle-MEM 培養液 1.8 ml に浮遊し, これに各濃度の 0.2 ml ミネラル・ファイバー懸濁液を加え, 37°C, 5% CO_2 気相で 12 時間培養した。なお, 抗 Chang 肝細胞家兎抗体で処理していない標的細胞をエフェクター細胞とともに同様に培養したものを対照とした。培養後, チューブを 1,000 g で 10 分間遠心し上清 1 ml を別のチューブに取り, 細胞沈渣の入ったチューブとともにガンマ・カウンターで ^{51}Cr を測定し, K細胞による細胞傷害活性を ^{51}Cr の解離の程度を示す specific cytotoxicity¹⁷⁾, すなわち (抗体依存性解離 - 抗体非依存性解離) $\div$ (最大解離 - 抗体非依存性解離) $\times 100$ により表示した。ADCC の培養実験は7人の供血者の PBL をエフェクター細胞とし, ミネラル・ファイバーを含まない PBS 溶液のみの場合, およびミネラル・ファイバーの最終濃度が 1, 3, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合のいずれもが triplicate でおこなわれた。

7. Natural killer cell activity (NK 細胞活性)

NK 細胞による細胞傷害活性の測定は押味¹⁸⁾の方法に準じておこなった。10% FCS と 5×10^{-5} mol の 2-mercaptoethanol を含む RPMI 1640 培養液で継代維持した K 562 細胞 (押味和夫博士より分与) を標的細胞とした。K 562 細胞を Chang 肝細胞の場合と同じく ^{51}Cr でラベルし, この細胞の 1×10^4 個, PBL の 2×10^5 個 (エフェクター細胞) およびミネラル・ファイバーを含む全量 2 ml の 10% FCS RPMI 1640 培養液を ADCC の場合と同様に作成し, 37°C, 5% CO_2 気相で 10 時間培養した。培養後, 回収したチューブを ADCC の場合と同様に遠心し, 上清 1 ml と残り沈渣部分をそれぞれガンマカウンターで ^{51}Cr の量を測定して%特異的 ^{51}Cr 解離値¹⁸⁾, すなわち {(実験解離 - 自然解離) $\div$ (最大解離 - 自然解離)} $\times 100$ を算出した。NK 細胞活性の測定は GFs と GFL では6人, クロシドライトとクライソタイルでは9人についておこない, 各ミネラル・ファイバーの最終濃度はそれぞれ 3, 5 および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

8. 腹腔マクロファージおよび上清中の細胞酵素の測定

小プラスチック・シャーレに 37°C, 5% CO_2 気相で 24 時間培養した M ϕ の細胞層に, 最終濃度 5, 10, 20, 30 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の条件でミネラル・ファイバーを 16 時間暴露したあとの M ϕ および上清中の Lactic dehydrogenase (LDH) と β -Glucuronidase (β -G) を測定

Table 1. Effects of mineral fibers on ^3H -thymidine incorporation in PBL treated with PHA and the control (3 days culture) ($\text{M} \pm \text{SE}$).

Kind of mineral fibers and the PHA treatment			Concentration of mineral fibers ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
			0	100	200	400
Glass fiber (small)	PHA (+)	7	4.47 ± 0.12	4.61 ± 0.13	4.51 ± 0.13	4.46 ± 1.2
	PHA (-)	7	3.02 ± 0.15	3.16 ± 0.13	3.05 ± 0.14	3.13 ± 1.3
Glass fiber (large)	PHA (+)	7	4.47 ± 0.12	4.54 ± 0.13	4.30 ± 0.12	4.52 ± 0.14
	PHA (-)	7	3.02 ± 0.15	3.07 ± 0.16	3.11 ± 0.16	3.09 ± 0.17
Crocidolite	PHA (+)	7	4.47 ± 0.12	4.46 ± 0.12	4.37 ± 0.13	4.30 ± 0.13
	PHA (-)	7	3.02 ± 0.15	3.01 ± 0.14	2.92 ± 0.17	2.95 ± 0.17
Chrysotile	PHA (+)	7	4.47 ± 0.12	4.50 ± 0.11	4.29 ± 0.11	4.14 ± 0.14
	PHA (-)	7	3.02 ± 0.15	2.94 ± 0.16	2.96 ± 0.21	3.12 ± 0.14

PHA(+): culture with PHA, PHA(-): culture without PHA.

Results are expressed as log-transformation of CPM.

した。細胞内の酵素の測定は上清の回収後、 4°C に冷却した 0.1% Triton X-100 水溶液 2ml を培養シャーレに加えて、ラバーチップにて細胞をはがし破壊したものについておこなった。LDH の測定は Henry¹⁹⁾ の方法によって、 β -G の測定は延²⁰⁾の方法によっておこなった。

III. 成績

1. PHA による PBL の芽球化反応に対する影響

ミネラル・ファイバーと PBL を 3 日間培養した場合の結果を Table 1 に示した。PBL 単独で培養した場合の培養 3 日目の細胞の viability は、PHA 無添加のチューブで平均 88.6% (標準誤差 4.2), PHA 添加のチューブで平均 89.5% (標準誤差 5.0) であり、両群に差異はみられなかった。本研究で検討した各濃度のミネラル・ファイバーと PBL を培養した際には、細胞の viability は PHA を添加した場合も、添加しなかった場合も、PBL 単独の場合と比較して差異はみられなかった。

各ミネラル・ファイバーの最終濃度 100, 200 および 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での PBL の ^3H -thymidine の取り込みでは、PHA を加えないで PBL 単独で培養した場合と比べて差異はなかった。PHA を加えた場合には、GFs, GFL およびクロソライトではいずれの濃度においても同じように ^3H -thymidine の取り込みは増加し、ミネラル・ファイバーを加えずに PBL 単独で PHA と培養した際の ^3H -thymidine の取り込みと差異はみられなかった。一方、クライソタイルでは 200 および 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Fig.1. Ratio of ^3H -thymidine incorporation in PBL exposed to chrysotile with PHA to the control (3 days culture). Changes in the ratios were statistically significant (Friedman two-way analysis of variance by ranks; $p < 0.01$).

の最終濃度で ^3H -thymidine の取り込み量の平均値は PBL 単独で PHA と培養した場合に比較して、統計的に有意とはいえなかったものの減少していた。クライソタイルの濃度ごとに PHA を添加しなかった場合と、添加した場合の ^3H -thymidine の取り込み量の比を Fig.1 に示した。この比の減少傾向はフリードマンの検定²¹⁾で統計的に有意であり、クライソタイルではその濃度の上

Table 2. Effects of mineral fibers on ^3H -thymidine incorporation in PBL treated with PHA and the control (6 days culture) ($M \pm \text{SE}$).

Kind of mineral fibers and the PHA treatment	Number of experiments	Concentration of mineral fibers ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	100	200	400
Glass fiber (small) PHA (+)	7	4.04 $\pm$ 0.18	4.05 $\pm$ 0.18	4.10 $\pm$ 0.20	4.01 $\pm$ 0.19
	7	2.88 $\pm$ 0.17	2.90 $\pm$ 0.16	2.87 $\pm$ 0.16	2.86 $\pm$ 0.17
Glass fiber (large) PHA (+)	7	4.04 $\pm$ 0.18	4.10 $\pm$ 0.18	4.06 $\pm$ 0.15	4.05 $\pm$ 0.20
	7	2.88 $\pm$ 0.17	2.84 $\pm$ 0.17	2.84 $\pm$ 0.18	2.85 $\pm$ 0.17
Crocidolite PHA (+)	7	4.04 $\pm$ 0.18	4.08 $\pm$ 0.18	3.91 $\pm$ 0.19	3.84 $\pm$ 0.17
	7	2.88 $\pm$ 0.17	2.80 $\pm$ 0.18	2.84 $\pm$ 0.18	2.85 $\pm$ 0.17
Chrysotile PHA (+)	7	4.04 $\pm$ 0.18	3.80 $\pm$ 0.29	3.29* $\pm$ 0.25	2.82** $\pm$ 0.18
	7	2.88 $\pm$ 0.17	2.86 $\pm$ 0.18	2.82 $\pm$ 0.15	2.82 $\pm$ 0.16

PHA (+) : culture with PHA, PHA (-) : culture without PHA.

Results are expressed as log-transformation of CPM.

* Significantly lower compared with the non-chrysotile culture with PHA (one-way analysis of variance, $0.01 < p < 0.05$), ** ditto $p < 0.01$.

昇とともに PBL の PHA による芽球化反応が抑制される傾向のあることがわかった。

ミネラル・ファイバーと PBL を 6 日間培養した場合の結果を Table 2 に示した。PBL 単独で培養した場合の培養 6 日目の細胞の viability は PHA 無添加のチューブで平均 82.4% (標準誤差 5.5), PHA 添加のチューブで平均 84.0% (標準誤差 6.2) であり, 両群に差異はみられなかった。また各濃度のミネラル・ファイバーと PBL を培養した際にも, 細胞の viability は PHA 添加の有無にかかわらず PBL 単独の場合に比較して差異はみられなかった。

各ミネラル・ファイバーの最終濃度 100, 200 および 400 $\mu\text{g/ml}$ での PBL の ^3H -thymidine の取り込みでは, PHA を加えないで PBL 単独で培養した場合と差異はみられなかった。PHA を加えた場合には GFs, GFL およびクロンドライトでは, いずれの濃度においても同じように ^3H -thymidine の取り込みは増加し, ミネラル・ファイバーを加えずに PBL 単独で PHA と培養した際の ^3H -thymidine の取り込みと差異はみられなかった。一方, クライソタイルではその濃度の上昇とともに ^3H -thymidine 取り込み量の平均は減少し, 最終濃度 200 および 400 $\mu\text{g/ml}$ では PBL 単独で PHA と培養した場合に比較して, その平均値は統計的に有意に小さかった。クライソタイルの濃度ごとに PHA を添加しなかった場合とそれを添加した場合の ^3H -thymidine の取り込み量の比を Fig.2 に示した。この比の減少傾向も

Fig.2. Ratio of ^3H -thymidine incorporation in PBL exposed to chrysotile with PHA to the control (6 days culture). Changes in the ratios were statistically significant (Friedman two-way analysis of variance by ranks; $p < 0.01$).

フリードマンの検定で統計的に有意であり, クライソタイルにおいてはその濃度の上昇とともに PBL の PHA による芽球化反応が抑制され, その傾向は 3 日間培養の場合よりさらに明瞭になった。

2. PHA による PBL の $\beta_2\text{-m}$ 産生刺激に対する影響

PHA とともに培養された PBL の $\beta_2\text{-m}$ 産生に対する各ミネラル・ファイバーの影響を検討した。GFs,

Table 3. ADCC specific cytotoxicity (%) influence by mineral fibers (M±SE).

Kind of mineral fibers	Number of experiments	Concentration of mineral fibers (μg/ml)			
		0	1	3	5
Glass fiber (small)	7	51.4± 3.8	52.1± 4.0	53.1± 4.7	54.7± 4.8
Glass fiber (large)	7	51.4± 3.8	53.0± 3.8	53.5± 3.6	52.5± 3.2
Crocidolite	7	51.4± 3.8	51.0± 2.8	50.7± 2.6	49.5± 5.4
Chrysotile	7	51.4± 3.8	50.5± 3.0	46.0± 2.1	41.1*± 2.2

* Significantly lower compared with the control (0 μg/ml), *t*-test : 0.01 < *p* < 0.05.

Fig. 3. Effects of chrysotile on β_2 -microglobulin formation induced by PHA in cultured PBL. —: culture with PHA, ...: culture without PHA. * Significantly higher compared with the culture without PHA at the identical concentration of chrysotile (0.01 < *p* < 0.05), ** ditto (*p* < 0.01).

GF_L およびクロソドライトでは、その最終濃度が 100, 200, 400 μg/ml と上昇しても、上清中の β_2 -m 濃度は PBL と PHA のみで培養した場合 (β_2 -m の平均濃度 144.4 μg/l, 標準誤差 6.6) と比較して、差異はみられなかった。また、これらミネラル・ファイバーと PBL を PHA 無添加で培養した場合でも、その上清中の β_2 -m の濃度は PBL 単独で培養した場合 (平均 49.0 μg/l, 標準誤差 8.1) と比較して、差異はみられなかった。

しかし、クライソタイルは PHA による PBL の β_2 -m 産生刺激に影響を与えた。Fig. 3 に示したごとく、PHA とともに培養した PBL の上清中の β_2 -m 濃度は、クライソタイルの濃度の上昇にともない減少し、クライソタイルの濃度が 400 μg/ml では、PHA を加えないで PBL 単独でクライソタイルを培養した場合と差異がみ

られなくなった。また、PHA を加えないで、PBL 単独で培養した場合には、今回検討した濃度のクライソタイルは、リンパ球の β_2 -m 産生に影響を与えることはなかった。

3. K 細胞活性に対する影響

リンパ球培養チューブに標的細胞溶液とエフェクター細胞溶液を加え、培養 30 分後にミネラル・ファイバーの懸濁液を追加した場合の結果を Table 3 に示した。GF_S, GF_L およびクロソドライトの 1, 3 および 5 μg/ml の濃度では、specific cytotoxicity は、ミネラル・ファイバーのかわりに PBS を加えて同様に実験した場合と比較して差異はみられなかった。しかし、クライソタイルの濃度が 5 μg/ml ではそれを加えなかった場合と比較して、specific cytotoxicity は統計的に有意に小さかった。

一方、培養チューブにあらかじめ標的細胞溶液とミネラル・ファイバー懸濁液を加え、30 分間培養の後に、エフェクター細胞溶液を追加した場合の specific cytotoxicity はミネラル・ファイバーの代わりに PBS を加えて同様に検討した場合 (平均値 62.5%, 標準誤差 4.1) と比較して、GF_S, GF_L およびクロソドライトでは差異はみられなかった。しかし、このようにエフェクター細胞を最後に加えた場合、クライソタイルによる K 細胞活性に対する影響はさらに大きくなり、その濃度が 3 および 5 μg/ml では前述のミネラル・ファイバーの場合に比較して、specific cytotoxicity は統計的に有意に小さかった (Fig. 4)。なお、標的細胞溶液とミネラル・ファイバー懸濁液を 30 分間培養後、1,000 g, 10 分間遠心し、その後攪拌、再浮遊したものに、エフェクター細胞溶液を加えた場合の K 細胞活性に対するミネラル・ファイバーの影響の検討もおこなった。GF_S, GF_L およびクロソドライトについては、その specific cytotoxicity はこれらのミネラル・ファイバーを加えない場合 (平均値 59.9

Table 4. NK cell activity (% specific ^{51}Cr -release) influenced by mineral fibers ($M \pm SE$).

Kind of mineral fibers	Number of experiments	Concentration of mineral fibers ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	3	5	10
Glass fiber (small)	6	42.0 $\pm$ 5.6	44.2 $\pm$ 5.8	42.5 $\pm$ 5.3	42.1 $\pm$ 5.9
Glass fiber (large)	6	42.0 $\pm$ 5.6	43.8 $\pm$ 5.4	44.5 $\pm$ 5.7	43.5 $\pm$ 6.0
Crocidolite	9	40.4 $\pm$ 4.8	46.1 $\pm$ 5.6	46.4 $\pm$ 4.6	39.9 $\pm$ 4.6
Chrysotile	9	40.4 $\pm$ 4.8	42.6 $\pm$ 4.5	39.3 $\pm$ 4.2	30.5 $\pm$ 5.2

Fig. 4. ADCC specific cytotoxicity in relation to addition of chrysotile and effector cells. Exp. I: effector cells were added before chrysotile, Exp. II: chrysotile was added before effector cells, Exp. III: chrysotile was spun down before addition of effector cells. 1) Significantly lower compared with Exp. I at the identical concentration of chrysotile. * $0.01 < p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 2) Significantly lower compared with Exp. II at the identical concentration of chrysotile. * $0.01 < p < 0.05$.

%, 標準誤差 4.6) と比較して差異はみられなかった。クライソタイルでは, specific cytotoxicity はさらに小さくなり, とくに $3 \mu\text{g/ml}$ の濃度では標的細胞溶液とクライソタイル懸濁液の入った培養チューブを遠心せずにエフェクター細胞溶液を加えた場合に比較して, 統計的に有意に小さかった (Fig. 4)。

4. NK 細胞活性に対する影響

NK 細胞活性に対する各ミネラル・ファイバーの影響を標的細胞の%特異的 ^{51}Cr 解離値¹⁸⁾で Table 4 に示した。GFs, GFL およびクロシドライトでは, それらの濃度が 3, 5, $10 \mu\text{g/ml}$ と上昇しても%特異的 ^{51}Cr 解

Fig. 5. Effects of chrysotile on the activity of NK cells cultured. Changes of % specific ^{51}Cr -release with the concentration of chrysotile were statistically significant (Friedman two-way analysis of variance by ranks; $p < 0.01$).

離値はミネラル・ファイバーを加えずに培養した場合に比較して, 差異を示さなかった。一方, クライソタイルでは, その濃度の上昇にともない%特異的 ^{51}Cr 解離値の平均値は順次減少したが, クライソタイルの濃度を $10 \mu\text{g/ml}$ としてもそれを加えなかった場合に比較して, %特異的 ^{51}Cr 解離値の平均値は有意に小さいとはいえなかった。しかしながら, このクライソタイルによるNK細胞活性に対する影響を各実験ごとに示した Fig. 5 について, フリードマンの検定により順位の2元配置法の分析をおこなったところ, クライソタイルはその濃度の上昇にともないNK細胞活性を抑制する傾向のあることがわかった。なお, 標的細胞とクライソタイルとをあらかじめ培養しておき, その後に遠心するなどの処理をおこなっても, その抑制の程度が有意に増加することはない。

5. Mφ の酵素放出に対する影響

シャーレに付着した Mφ に各ミネラル・ファイバー

Fig. 6(1)-(6). Effects of mineral fibers on mouse peritoneal macrophages. ○ : LDH activity, ● : β -glucuronidase activity ($M \pm SE$) the mean obtained from values of 6 tests. * Significantly different from the control ($0.01 < p < 0.05$), ** ditto ($p < 0.01$).

を暴露した場合の LDH および β -G の細胞内と上清中における濃度を Fig. 6 に示した. GFs (Fig. 6-1) では, その濃度が 50 μ g/ml になっても細胞内および上清中の LDH, β -G の濃度は, ミネラル・ファイバーを加えなかった場合と比較して差異は示さなかった. GFL (Fig. 6-2) では, その濃度が 5 μ g/ml 以上になると β -G の上清中への放出が, またその濃度が 10 μ g/ml 以上になると LDH の上清中への放出が, それぞれミネラル・ファイバーを加えない場合に比較して統計的に有意に増加した. 一方, 細胞内の LDH および β -G では, その濃度が 30 μ g/ml 以上になると統計的に有意な減少がみられた. クロンドライト (Fig. 6-3) ではその濃度が 30 μ g/ml 以上になると β -G の上清への放出が, さらにその濃度が 50 μ g/ml になると LDH の上清中への放出が, ミネラル・ファイバーを加えない場合に比較して統計的に有意に増加した. 一方, 細胞内の β -G はその濃度が 30 μ g/ml 以上で, また細胞内の LDH はその濃度が 50 μ g/ml で統計的に有意に減少した. クライソタイル (Fig. 6-4) では, その濃度が 10 μ g/ml から, LDH, β -G とともに上清中への放出がミネラル・ファイバーを加えない場合に比較して統計的に有意に増加し, 細胞内の LDH と β -G の濃度は統計的に有意に減少した. アモサイト (4), (Fig. 6-5) では, その濃度が 50 μ g/ml になっても LDH, β -G とともに上清中および細胞内の濃度は, ミネラル・ファイバーを加えなかった場合と比較して差異を示さなかった. アモサイト (0), (Fig. 6-6) では, その濃度が 30 μ g/ml 以上になると β -G の上清中への放出が, またその濃度が 50 μ g/ml になると LDH の上清中への放出が, それぞれミネラル・ファイバーを加えない場合に比較して統計的に有意に増加した. 一方, 細胞内の LDH および β -G では, その濃度が 50 μ g/ml で統計的に有意な減少がみられた.

IV. 考 察

アスベストの暴露者では, 末梢血リンパ球の機能に種類の異常が観察されており, PHA によるその芽球化反応についても, 低下することが報告されている²²⁻²⁴⁾. しかしながら, これらの報告は asbestosis や中皮腫に罹患している集団でのものであり, 観察された芽球化反応の低下がアスベストによる一次的なものであるのか, あるいはまた asbestosis や中皮腫などによる二次的なものであるのかについては疑問が残るところである. 本研究では, クライソタイルの暴露が PBL の芽球化反応を直接低下させることを観察したが, クロンドライトやグラス・ファイバーではそのようなことはみられなかった.

同じアスベストでもクライソタイルとクロンドライトで, PHA による PBL の芽球化反応に対する影響が異なる理由として, まずクライソタイルに含まれる Mg による細胞毒性²⁵⁾が考えられる. しかし, アスベスト暴露による PBL の viability にはクライソタイルとクロンドライトの場合で差異がなかったこと, あるいは PHA を添加しない際の PBL の ³H-thymidine のとりこみについてもこの2種のアスベストで差異がなかったことなどは, PBL の芽球化反応に対するクライソタイルの抑制がその含有する Mg の細胞毒性によるものであることを積極的に支持するものとはいえない. 一方, アスベストを懸濁液にした際にはニッケルやクロムなどが溶出²⁶⁾し, クライソタイルの場合はそれがより多いことからこのような共存する金属の影響も考えられる. しかし, ニッケルなど微量の金属はかえってリンパ球の芽球化反応を亢進すること²⁷⁾, また懸濁液にした際に溶出する程度のニッケルの濃度では発ガン実験の動物にはとくに影響のみられないこと²⁸⁾などから, クライソタイルと共存する金属が PHA によるリンパ球の芽球化反応を低下させる可能性を積極的に支持することはできない. ところでファイバーの形態などの物理的特性が細胞膜との相互作用を介して細胞機能に影響を与える可能性は, 本研究での K 細胞とクライソタイル混合液の遠心処理による K 細胞活性のより一層の抑制という成績からも示唆されるところである. 本研究で使用したミネラル・ファイバーの光学顕微鏡所見では, クロンドライトおよび2種のグラス・ファイバーは針状であるのに対して, クライソタイルは長さもより大きいものが多いうえにカールしており, 形態のうできわだった相違を呈している. したがって, ミネラル・ファイバーの PBL の芽球化反応への影響の相違の理由として, このような形態の差異についても考慮をばらう必要がある. 今回の成績のみからはファイバーの化学組成と物理的特性のいずれがより重要であるとは断言できないが, *in vitro* においては PHA による PBL の芽球化反応に対するクライソタイルとクロンドライトの影響は異なるので, 今後は暴露したアスベストの種類を明確にしたうえで, ヒト集団におけるこれらの異常について検討することが必要である.

ところで, PHA はリンパ球のなかでも T 細胞を主に刺激するマイトジェン²⁹⁾なので, 前述の PHA による PBL の芽球化反応では, T 細胞が刺激された状態を観察したということになる. この T 細胞はまた β_2 -m を産生し, これは PHA により亢進されることがわかっている³⁰⁾. そこで PHA による T 細胞の β_2 -m 産生に対する影響を検討したところ, PHA による PBL の芽球化反

応の場合と同じく、クライソタイルのみが影響を与えることがわかった。したがって PHA による PBL の芽球化反応と β_2 -m 産生に対するミネラル・ファイバーの影響の検討では、一致してクライソタイルが PHA による T 細胞の刺激に抑制的に作用することが明らかとなった。

ADCC は腫瘍免疫や感染免疫に関与していると考えられているリンパ球系細胞の機能であり^{31,32)}, Chang 肝細胞を標的細胞とした場合にはヒト末梢血リンパ球, 培養腫瘍細胞, 線維芽細胞, HeLa 細胞およびメラノーマ細胞の場合と同様に, リンパ球のみが K 細胞として作用する^{17,33)}。アスベストとグラス・ファイバーについてこの K 細胞機能に対する影響を検討したところ, クライソタイルのみがその機能を抑制することがわかった。この抑制作用は, 標的細胞とクライソタイルを培養あるいは両者を遠心した後に K 細胞を加えることにより一層著しくなったことより, Kagamimori ら³⁴⁾も指摘するごとくクライソタイルによる標的細胞と K 細胞の接近の障害によるものと考えられる。しかし, 他の 3 種のミネラル・ファイバーでも同じように標的細胞を処理したにもかかわらず K 細胞に対するクライソタイルのような抑制作用はみられなかった。その理由としては, 標的細胞と各ミネラル・ファイバーとの吸着性の相違, 各ミネラル・ファイバーの形態や化学成分, 共存する金属などが考えられるが, 本研究ではそれを明らかにすることはできなかった。

アスベスト暴露歴を有する中皮腫患者の末梢血リンパ球の細胞傷害作用の低下³⁵⁾あるいは肺野に石棉暴露と関連する異常陰影を有する集団では ADCC の著しく低下しているものがある (Dr. Wagner, M.M.F. 私信) などの事実, 生体内におけるアスベストによる K 細胞の機能障害が存在することを示唆している。しかし, 全身性エリテマトーデスやリウマチ性関節炎などの自己免疫性疾患でも K 細胞の機能障害が報告されており³⁶⁾, アスベスト暴露者では自己免疫性疾患と類似した免疫系の異常が認められることから^{37,38)}, これらによる間接的な K 細胞機能への作用である可能性も否定できない。

ヒト末梢血中の NK 細胞も生体内でのウイルス感染や腫瘍発生に対して防御作用を有するリンパ球と考えられている^{39,40)}。K 細胞が標的細胞の抗体を介して始めてその作用を発揮するのに対して, NK 細胞はそれらを必要とせず, 抗原やマイトジェンの刺激なしに細胞傷害作用を発揮することができる点に特徴がある。この NK 細胞の細胞傷害活性に対するミネラル・ファイバーの影響を検討したところ, K 細胞の場合と同じく, クライソタイルのみがその活性を抑制した。しかし, K 細胞の場合と違い, 標的細胞とクライソタイルをあらかじめ培養

したり遠心するなどの処理をおこなっても, その抑制の程度は変わらなかった。これは, K 細胞の場合は肝細胞, NK 細胞の場合は造血系細胞と, 使用した標的細胞の違いによるものと考えられる。*in vitro* の結果と同じく, クライソタイルの暴露が主である asbestosis の患者でも NK 細胞の細胞傷害活性の低下が観察されており (窪田道男氏私信), K 細胞の結果と合わせてクライソタイルはこれらリンパ球の細胞傷害活性を共通に抑制するものと考えられる。遺伝性の疾患である Chediak-東病では K 細胞および NK 細胞の細胞傷害活性が同時に低下し⁴¹⁾, また正常者の集団でも両者の細胞の活性には相関がみられること (著者ら, 未発表) から, これらの細胞はミネラル・ファイバーにより同じように影響を受けるものと推測される。

M ϕ からの LDH および β -G 放出に対するミネラル・ファイバーの影響を検討したところ, アスベストでは, クロンドライトやアモサイトのアンフィボーレよりクライソタイルが, グラス・ファイバーでは, GFs より GFL が, それぞれ M ϕ に対する影響が大であった。ミネラル・ファイバーの暴露による M ϕ からの細胞質およびライソゾーム酵素の放出については *in vivo* あるいは *in vitro* での検討がなされており⁴²⁻⁴⁴⁾, 完全に貪食されない大きさのファイバーの数が多くなるほどこれらの酵素の放出が強くなりことから, ファイバーの化学成分よりも形態がこの酵素放出にとってより重要であるとして一般に考えられている⁴²⁻⁴⁴⁾。本研究での, GFL と GFs における差異あるいはアモサイトを粉碎した場合に粉碎以前のアモサイトでみられた M ϕ からの酵素の放出がみられなくなったことなども, ミネラル・ファイバーの大きさが重要であることを支持する結果であった。著者らはこのほかにカーボン粒子とカーボン・ファイバーの比較においても前者では酵素の放出がみられないのに対して後者ではそれがみられることを確認している (未発表)。ところで粉碎処理により, ミネラル・ファイバーの大きさ, 表面構造あるいは破壊されやすさ (脆弱性) などに変化が生ずる可能性もあるので, 物理的な処理を施した場合にはこれらのことも考慮する必要がある⁴⁵⁾。体内における長期間にわたる影響では, ミネラル・ファイバーの脆弱性は重要な要因である。というのは脆弱性大のものは, 体内で速やかに破壊され排泄されるために発ガン性も低いと推測されている⁴⁶⁾からである。

以上, *in vitro* でのミネラル・ファイバーのリンパ球系細胞に対する影響を検討したが, アスベストに関する疫学的研究や動物実験は, むしろクライソタイルよりクロンドライトのほうが発ガン性の強いことを示唆してい

る^{47,48)}。また、グラス・ファイバーではその暴露実験により中皮腫の発生することも報告されている^{49,50)}。in vitro と in vivo におけるこれらの結果の相違が生ずる理由を究明することは、ミネラル・ファイバーの人体への影響の解明と予防につながるものと考ええる。

V. 結 論

リンパ球系細胞の機能に対するアスベストおよびグラス・ファイバーの影響を in vitro で検討し、以下の成績を得た。

1) PHA による PBL の芽球化反応は、クライソタイルにより抑制されたが、クロシドライトや、大・小2種のグラス・ファイバーでは影響はみられなかった。

2) PHA による PBL の β_2 -m 産生刺激はクライソタイルにより抑制されたが、クロシドライトや大・小2種のグラス・ファイバーでは影響はみられなかった。

3) K細胞の細胞傷害活性はクライソタイルにより抑制され、それはクライソタイルによる標的細胞とK細胞の接近の妨害によると推測された。クロシドライトや大・小2種のグラス・ファイバーでは影響がみられなかった。

4) NK 細胞の細胞傷害活性はクライソタイルにより抑制されたが、クロシドライトや大・小2種のグラス・ファイバーでは影響はみられなかった。

5) Mφ からの LDH および β -G の放出は、クロシドライトやアモサイトよりクライソタイルで著しかったが、アモサイトを粉砕すると、この放出はみられなくなった。一方、グラス・ファイバーでは直径・長さともに大きいファイバーでMφからの酵素放出が増加したが、直径・長さともに小さいファイバーでは影響がみられなかった。

以上より、リンパ球系細胞の機能に対する影響では、ミネラル・ファイバーのカールの有無あるいは直径や長さなどの形態的な特性も重要であることを指摘した。

本研究の一部は第53回、54回および55回産業衛生学会で報告した。

稿を終るに臨み、終始御指導、御校閲をいただいた恩師岡田晃教授ならびに鏡森定信助教授(富山医科薬科大学)に深謝の意を表します。また御協力いただいた窪田道男先生(金沢大学医学部)をはじめ関係者各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Selikoff, I.J., Churg, J. and Hammond, E.C.: Asbestos exposure and neoplasia, JAMA, 188: 22-32, 1964.
- 2) Wagner, J.C., Gilson, J.C., Berry, G. and Timbrell, V.: Epidemiology of asbestos cancers, Br.

- Med. Bull., 27: 71-76, 1971.
- 3) Wagner, J.C., Sleggs, C.A. and Marchand, P.: Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province, Br. J. Ind. Med., 17: 260-271, 1960.
- 4) 姜 健栄, 瀬良好澄, 横山邦彦: 石綿肺に合併した胸膜中皮腫の1例, 日本胸部疾患雑誌, 12: 458-464, 1974.
- 5) Tuner-Warwick, M. and Parks, W.R.: Circulating rheumatoid and antinuclear factors in asbestos workers, Br. Med. J., III: 492-495, 1970.
- 6) Lange, A., Smolik, R., Zatoński, W. and Szymanska, J.: Autoantibodies and serum immunoglobulin levels in asbestos workers, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 32: 313-321, 1974.
- 7) 姜 健栄, 瀬良好澄, 大河内寿一, 山村雄一: 石綿肺における免疫異常, 日本胸部疾患学会誌, 12: 515-521, 1974.
- 8) Bohlig, H. and Otto, H.: Asbest und Mesotheliom, Fakten, Fragen, Umweltproblem, 44-50, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
- 9) Gross, P., Tuma, J. and de Treville, R.T.P.: Lungs of workers exposed to fiberglass—A study of their pathologic changes and their dust content, Arch. Environ. Health, 23: 67-76, 1971.
- 10) Hill, J.W., Whitehead, W.S., Cameron, J.D. and HeDgecock, G.A.: Glass fibers—Absence of pulmonary hazard in production workers, Br. J. Ind. Med., 30: 174-179, 1973.
- 11) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and sedimentation at 1g, Scand. J. Clin. Invest., 21 (Suppl. 97): 77-89, 1968.
- 12) Brown, R.C., Chamberlain, M., Danies, R., Caffin, J. and Skidmore, J.W.: In vitro biological effects of glass fibers, J. Environ. Pathol. Toxicol., 2: 1369-1383, 1979.
- 13) Wright, B.M.: A size selecting sampler for air borne dust, Br. J. Ind. Med., 11: 284-288, 1954.
- 14) Haslam, P.L., Lukoszek, A., Merchaut, J.A. and Turner-Warwick, M.: Lymphocyte responses to phytohaemagglutinin in patients with asbestosis and pleural mesothelioma, Clin. Exp. Immunol., 31: 178-188, 1978.
- 15) Parazzi, E., Secchi, G.C. and Dernis, B.: Studies on (in vitro) cytotoxicity of asbestos dusts, Med. Lavoro, 59: 561-576, 1968.
- 16) Pharmacia Diagnostics: Phadebas β_2 -microtest, 1-5, Pharmacia A.B., Upsala, 1976.
- 17) MacLennan, I.C.M., Campbell, A.C. and Gale, D.G.: Quantitation of K cells, in: In vitro Methods in Cell-mediated and Tumor Immunity (Bloom, B.R. and David, J.R., Eds.), 511-522, Academic Press, New York, San Francisco and London, 1976.
- 18) 押味和夫: NK 細胞活性の検査, 臨床病理, 45: 299-309, 1981.
- 19) Henry, R.J.: Clinical chemistry, A Hoeber-Haper International Reprint, 505, 1966.
- 20) 延 永正: β -Glucuronidase に関する研究, 福岡医誌, 52: 300-341, 1961.
- 21) 肥田野直, 瀬谷正敏, 大川信明: 心理教育統計学. 98-

- 99, 培風館, 東京, 1970.
- 22) Kang, K.-Y., Sera, Y. and Okochi, T.: T lymphocytes in asbestosis, *N. Eng. J. Med.*, 291: 735-736, 1974.
 - 23) Kagan, E., Solomon, A., Cochrane, J.C., Beissner, E.I., Gluckman, J., Rocks, P.H. and Webster, I.: Immunological studies of patients with asbestosis. I. Studies of cell-mediated immunity, *Clin. Exp. Immunol.*, 23: 261-267, 1977.
 - 24) Haslam, P.L., Lukoszek, A., Merchant, J.A. and Turner-Warwick, M.: Lymphocyte responses to phytohaemagglutinin in patients with asbestosis and pleural mesothelioma, *Clin. Exp. Immunol.*, 31: 178-188, 1978.
 - 25) Morgan, A., Davies, P., Wagner, J.C., Berry, G., and Holmes, A.: The biological effects of magnesium-leached chrysotile asbestos, *Br. J. Exp. Pathol.*, 58: 465-473, 1977.
 - 26) Gralley, L.J.: Characterization and solubility of metals associated with asbestos fibers, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 29: 569-573, 1968.
 - 27) Pappas, A., Orfanos, C.E. and Bertram, R.: Non-specific lymphocyte transformation *in vitro* by nickel acetate, *J. Invest. Dermatol.*, 55: 198-200, 1970.
 - 28) Stanton, M.F. and Wrench, C.: Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass, *J. Natl. Cancer Inst.*, 48: 797-821, 1972.
 - 29) Stobo, J.D., Rossenthal, A.S. and Paul, W.E.: Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. 1. Responsiveness to and surface binding of concanavalin A and phytohemagglutinin, *J. Immunol.*, 108: 1-17, 1972.
 - 30) Kin, K., Kasahara, T., Itoh, Y., Sakurabayashi, I., Kawai, T. and Morita, M.: β_2 -microglobulin production by highly purified human T and B lymphocytes in cell culture stimulated with various mitogens, *Immunology*, 36: 47-54, 1979.
 - 31) Perlmann, P. and Holm, G.: Cytotoxic effects of lymphoid cells *in vitro*, *Adv. Immunol.*, 11: 117-125, 1969.
 - 32) Rouse, B.T., Wardley, R.C. and Babiuk, L.A.: The role of antibody dependent cytotoxicity in recovery from herpes virus infections, *Cell. Immunol.*, 22: 182-186, 1976.
 - 33) 荏原忠夫: ADCC の臨床免疫学意義とその応用—感染・炎症・免疫, 6: 265-274, 1976.
 - 34) Kagamimori, S., Scott, M.R., Brown, D.G., Edwards, R.E. and Wager, M.M.F.: Effects of chrysotile asbestos on mononuclear cells *in vitro*, *Br. J. Exp. Pathol.*, 61: 55-60, 1980.
 - 35) Embleton, M.J., Wagner, J.C., Wagner, M.M.F., Jones, J.S.P., Sheers, G., Oldham, P.P. and Baldwin, R.W.: Assessment of cell-mediated immunity to malignant mesothelioma by microtoxicity tests, *Int. J. Cancer*, 17: 597-601, 1976.
 - 36) Schneider, J., Becker, M.J., Sopoulos, H.M., Fye, K., Blockman, M., Epstein, W.V. and Talal, N.: Reduction antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in selected autoimmune diseases, *J. Clin. Invest.*, 58: 173-179, 1976.
 - 37) Kagan, E., Solomon, A., Cochrane, J.C., Kuba, P., Rocks, P.H. and Webster, I.: Immunological studies of patients with asbestosis. II. Studies of circulating lymphoid cell number and humoral immunity, *Clin. Exp. Immunol.*, 28: 268-275, 1977.
 - 38) Lange, A.: An epidemiological survey of immunological abnormalities in asbestos workers. 1. Nonorgan and organ-specific autoantibodies, *Environ. Res.*, 22: 162-175, 1980.
 - 39) Santoli, D. and Koprowski, H.: Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus-infected cells, *Immunol. Rev.*, 44: 125-163, 1979.
 - 40) Kiessling, R. and Haller, O.: Natural killer cells in the mouse: an alternative immune surveillance mechanism? *Contem. Top. Immunobiol.*, 8: 171-201, 1978.
 - 41) Roder, J.C., Haliotis, T., Klein, M., Korec, S., Jett, J.R., Ortaldo, J., Heberman, R.B., Katz, P. and Fanci, A.: A new immunodeficiency disorder in human involving NK cells, *Nature*, 284: 553-555, 1980.
 - 42) Bruch, J.: Response of cell cultures to asbestos fibers, *Environ. Health Persp.*, 9: 253-254, 1974.
 - 43) Beck, E.G.: Interaction between fibrous dust and cells *in vitro*, *Annales d'Anatomie Pathologique*, Paris, 12: 227-236, 1976.
 - 44) David, M.B., Robert, T.D. and Marvin, K.: Experimental approaches for exposure to sized glass fibers, *Environ. Health Persp.*, 34: 47-57, 1980.
 - 45) Sprny, K.R., Stöber, 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.
 - 46) Light, W.G. and Wei, E.T.: Surface charge and hemolytic activity of asbestos, *Environ. Res.*, 13: 135-145, 1977.
 - 47) Lemen, R.A., Dement, J.M. and Wagoner, J.K.: Epidemiology of asbestos-related diseases, *Environ. Health Persp.*, 34: 1-11, 1980.
 - 48) Reeves, A.L., Puro, H.E. and Smith, R.G.: Inhalation carcinogenesis from various forms of asbestos, *Environ. Res.*, 8: 178-202, 1974.
 - 49) Stanton, M.F. and Wrench, C.: Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fiber glass, *J. Natl. Cancer Inst.*, 48: 797-822, 1972.
 - 50) Wagner, J.C., Berry, G. and Skidmore, J.W.: Studies of the carcinogenic effect of fibre glass of different diameters following intrapleural inoculation in experimental animals, in: NIOSH Symposium on Occupational Exposure to fibrous Glass, 193-197, U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1976.

著者への連絡先: 中谷喜彦, 〒 920 金沢市宝町 13-1 金沢大学医学部公衆衛生学教室 Reprint requests to Department of Public Health, Kanazawa University School of Medicine, 13-1, Takara-machi, Kanazawa, 920 Japan (Y. Nakatani)