ホルムアルデヒドとグルタルアル デヒドによる培養L細胞の形態変化

九州歯科大学歯科薬物学講座 (主任: 吉村泰治教授)

黒 木 賀代子・大 住 伴 子

昭和60年8月24日受付

Morphological Observations of Cultured L Cells Exposed to Formaldehyde or Glutaraldehyde

Kayoko Kuroki and Tomoko Ohsumi

Department of Dental Pharmacology (Chief: Prof. Taiji Yoshimura)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Formaldehyde and glutaraldehyde were examined for their cytotoxic effect on L cell tissue culture system. In the first study the trypsinized and replanted cells were grown to monolayers on the dish bases, and then they were exposed to each drug, which was diluted into the culture medium in the concentrations of 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1, 10 mg/ml . At the end of 2-hour cell-drug contact the cells were observed by phase contrast microscopy, and then fixed for microscopical examination with Giemsa stain. Death, deterioration or any observable changes of the cells in relation to control cells were noted as toxic responses. Both drugs caused slight changes at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Formaldehyde and glutaraldehyde caused serious cell damage indicating noticeable rounding, constriction and deterioration of cytoplasm at the concentration of 1 mg/ml and 10 mg/ml respectively. Bleb formation was found only with formaldehyde at the concentrations of 1 and 10 mg/ml . In the second study the medium containing a desired concentration of the drug was mixed with the cell suspension so that final concentration became 2.5, 5.0, 10, 20 or 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kept in contact with the drug the cells were incubated for 24 and 48 hours, after which time they were examined microscopically in their abilities of establishing monolayers. Trypsinized cells showed less tolerance of drug effects, and were completely inhibited from clinging to the dish bases and establishing monolayers by formaldehyde at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The cells were markedly restrained from their growth but viable cells were not diminished when they were exposed to 2.5 or 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of formaldehyde and to 10, 20 or 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of glutaraldehyde. From the above it was confirmed that cytotoxicity of glutaraldehyde was considerably less potent than that of formaldehyde, although the both were extremely toxic to the tissue culture cells.

Key words : *Cytotoxicity/monolayer/formalin/aldehydes*

緒 言

ホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの細胞毒性を比較するために、前報¹⁾では **HeLa** 細胞に対して、濃度 1, 100, 10000 $\mu\text{g/ml}$ で、24, 48時間作用させた場合について、薬物濃度と細胞形態の変化との関係を調べた。その結果、両薬物とも 1 $\mu\text{g/ml}$ ではほとんど影響を示さず、100 $\mu\text{g/ml}$ では全細胞が崩壊した像を呈し、これによって細胞毒性の強弱を判定するには至らなかった。

そこで今回は実験濃度系列をさらに細分するとともに、前回行なった増殖抑制実験に加えて付着阻止実験を行なうことにより両薬物の作用を詳細に比較検討した。なお、今回は互いに密着して敷石状に増殖する上皮性の **HeLa** 細胞に代えて、線維芽性で運動性が強く個別に生育し、また、培養液中血清添加量を少なくしても良好な増殖を示すなどの点²⁾で、薬物作用の観察にはより好都合と思われる **L** 細胞を使用した。

実 験 方 法

1. 供試細胞および培養液

実験に供した **L** 細胞は九州大学医学部ウィルス学教室より分与され、**Eagle** 最少培地 (**Nissui MEM-1**, 日水製薬) に仔牛血清 (和光純薬) 3% を加えた培養液を用いて約 2 年間継代培養を行ってきたものである。

2. 被験薬物

ホルマリン：**JIS** 特級，ホルムアルデヒド含有量 37.5%，半井化学

グルタルアルデヒド溶液：電顕用特製試薬，グルタルアルデヒド含有量 70%，半井化学

3. 増殖抑制実験

継代培養 3 日目の単層にトリプシン・EDTA 溶液を用い既報の方法³⁾でトリプシン処理を施して細胞浮遊液 (細胞数： 5×10^4 個/ml) を作成し、その 2 ml をプラスチック製培養皿 (35 $\times$ 10 mm, **Falcon** 社) に分注した。37°C で 48 時間培養した後、皿中の培養液を捨て薬物含有培養液 (血清無添加) 2 ml を加えて培養を再開した。その 2 時間後に位相差顕微鏡 (倍率 200) を用いて細胞の形態変化を調べ、続いてこれをメタノールで固定し、ギムザ染色標本を作成して鏡検 (倍率 200) した。

培養液中の薬物濃度は、ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドとしての含有量が 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ および 1, 10 mg/ml の 4 段階となるようにした。なお、対照として薬物を加えない培養液 (血清無添加) を用いて

同様の操作を行なった。

4. 付着阻止実験

前実験と同様の操作で作成した細胞浮遊液 (血清無添加) を小試験管に 1 ml 宛分注後、これに実験濃度の 2 倍の薬物を含む培養液 1 ml (血清無添加) を注加し、試験管ミキサーで 5 秒間攪拌後培養皿 (上記と同一規格) に移して培養を開始した。

実験濃度は培養皿中の最終濃度が、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドとしてそれぞれ、2.5, 5.0, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ の 5 段階になるようにした。そのためにはホルマリンとグルタルアルデヒド溶液を先ず、滅菌 PBS で希釈してホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドとしてそれぞれ 10 mg/ml を含有する溶液を作り、これをさらに培養液 (血清無添加) 中に所定の濃度となるように希釈した。

培養開始後 24, 48 時間後に器底に付着し生育している細胞を位相差顕微鏡 (倍率 200) を用いて観察した。対照として薬物を含まない培養液 (血清無添加) で同様の操作を行なった。

実 験 結 果

1. 増殖抑制実験

対照では、細胞は紡錘形ないし多角形を呈し、細胞質突起を長く伸展し、核は円形ないし楕円形で 1～3 個の仁が明瞭に識別された (写真 1 中下)。そのギムザ染色標本でも核は明瞭で比較的大きく、濃紫色の仁が認められた (写真 2 中下)。

ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド 10 $\mu\text{g/ml}$ ～10 mg/ml を 2 時間作用させた場合には次のような形態変化が観察された。

a) ホルムアルデヒド

10 $\mu\text{g/ml}$ では胞体部が僅かに収縮した細胞が認められたが、多くの細胞は対照と変わらなかった。

100 $\mu\text{g/ml}$ では細胞質が萎縮し、突起の先端部や起部に小胞状あるいは顆粒状の突起物を生じた。ほとんどの細胞が球状化傾向を示し、核がやや不明瞭になった (写真 1 左上)。ギムザ染色標本では胞状物は濃染し、核、仁は比較的明瞭に識別された (写真 2 左上)。

1 mg/ml では胞体部の球状化はさらに顕著になり、完全に球状化した細胞が現われたが、細胞質突起は長いまま残存するものが多かった。細胞の周囲に小さな水泡状のもの (以下 **bleb** と表記) を生じた (写真 1 左中)。ギムザ染色標本では、球状化傾向を示す細胞の核内部は不明瞭となった。多角形を呈する細胞では細胞質

と核は明瞭に識別され、濃紫色の核膜の内部は淡紅色を帯び多数の濃紫色顆粒が認められ、また、細胞質には核を取り囲むように隣接配列した不染色性の空胞状のもの（以下小空胞と表記）が多数生じ、細胞質は網目状を呈した（写真2 左中）。

10mg/ml では細胞質突起の短縮はほとんど見られず、胞体部の球状化も軽度であったが、細胞周囲には大小多数の bleb を生じた。細胞質には顆粒や稀に空胞状の白いものが見られた。核と仁はやや不明瞭になった（写真1 左下）。ギムザ染色標本では、bleb はほとんど消失したが、核は濃染して凝縮したようになり、内部構造は不明となった（写真2 左下）。

b) グルタルアルデヒド

10μg/ml では対照とほとんど同じ像を示したが、細胞質突起のやや短縮したものが現われた。

100μg/ml では、細胞質突起の短縮した細胞が多くなり、核膜や仁、細胞質内の小空胞などが極めて明瞭となった（写真1 右上、写真2 右上）。

1mg/ml の場合は細胞質突起が短縮あるいは消失し、多くの細胞は輪郭が単純化し、ついに球状を呈するものも現われた（写真1 右中）。ギムザ染色標本では、100μg/ml の場合よりも仁の識別が困難になった（写真2 右中）。

10mg/ml でも細胞質突起の短縮が起こったが、胞体部の球状化は1mg/ml の場合よりも軽度であった。多角形の細胞は短縮した細胞質突起の先端や胞体部に小胞状物を生じたが、核は明瞭であった。紡錘形の細胞は球状化傾向を示し、内部構造は不明瞭であった（写真1 右下）。ギムザ染色標本は1mg/ml の場合とほとんど同様な像を示した（写真2 右下）。

2. 付着阻止実験

対照では、24時間後に培養器底面への細胞の付着および生育状態は極めて良好で、浮遊細胞は極く少数であった。引続き48時間後まで培養を続けると細胞数は2～3倍に増加し、個々の細胞は小型化したが、なおも旺盛な分裂、増殖を行なっている様子であった（写真3）。

細胞浮遊液にホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドを、それぞれ所定の濃度になるように加えて培養を開始し、その24時間後および48時間後に細胞の生育状態を観察すると、薬物とその濃度により次のような差異が現われた。

a) ホルムアルデヒド（写真3）

2.5μg/ml では24時間後に浮遊状態のまま付着しない細胞が対照よりもやや多かった。しかし、付着した細胞

は対照とほとんど同様な像を示し、その後良好な増殖を示した。

5.0μg/ml では付着し生存可能と思われる細胞が極めて少なくなった。正常な形態を示すものはほとんど認められなくなり、球状あるいはそれに近い細胞が多く、紡錘形や多角形の細胞も突起を伸展するに至っていない状態であった。多くの細胞は表面に顆粒状突起物、細胞質には空胞状の白いものを生じるなどの変化を伴った。48時間後になっても細胞数はほとんど増加せず、大多数の細胞は崩壊過程にあり、生存細胞は24時間後より減少したように見えた。しかし多角形の細胞の中には、少数ではあるが突起を伸ばしたのも認められた。

10, 20μg/ml では全ての細胞は死滅崩壊した像を示した。細胞は凝縮、小球化し、次第に分解し断片と化した。20μg/ml の場合は24時間後に全細胞に bleb を生じたが、48時間後には bleb はほとんど全て消失していた。

b) グルタルアルデヒド（写真4）

2.5, 5.0, 10μg/ml の場合、細胞形態はほぼ正常に近いが、細胞表面に顆粒状や小胞状の突起物を生じた細胞がかなり多く認められた。しかし、24時間後の付着状況もその後の増殖も、2.5, 5.0μg/ml では対照にかなり近い状態を示した。また、10μg/ml では24時間後の付着細胞は対照よりも明らかに少なかったが、その後の細胞増加は順調であった。

20μg/ml では、24時間後に付着し生存可能であると思われる細胞が対照の半分以下に減少した。その生育は強く抑制されたようで、細胞質突起は伸展せず、細胞表面に顆粒状突起物を生じた。しかし48時間後になると付着した細胞のほとんどが正常な形態を示すようになり、細胞数もかなり増加した。

40μg/ml では崩壊状態で浮遊する細胞がさらに多くなり細胞の付着は強く阻止され、付着細胞の生育も抑制された。48時間後には、細胞質突起を伸展し、ほぼ正常に近い形態を示す細胞がかなり多数認められるようになったが、中には細胞表面に顆粒状突起物を生じたものもあった。

考 察

前報¹⁾に述べたように単層形成後の培養 HeLa 細胞に対してホルムアルデヒドもグルタルアルデヒドも1μg/ml では、48時間作用させた場合でもほとんど影響を与えなかった。また、100μg/ml, 24時間適用例では、両薬物とも全細胞の完全な崩壊をもたらした。今回はL

formaldehyde 100 μ g/ml

glutaraldehyde 100 μ g/ml

formaldehyde 1 mg/ml

glutaraldehyde 1 mg/ml

formaldehyde 10 mg/ml

glutaraldehyde 10 mg/ml

Control

Photo. 1 Phase contrast micrographs of L cell monolayers exposed to formaldehyde or glutaraldehyde for 2 hours

formaldehyde 100 µg/ml

glutaraldehyde 100 µg/ml

formaldehyde 1 mg/ml

glutaraldehyde 1 mg/ml

formaldehyde 10 mg/ml

glutaraldehyde 10 mg/ml

Control

Photo. 2 Micrographs of L cell monolayers exposed to formaldehyde or glutaraldehyde for 2 hours and fixed to be stained with Giemsa solution

Photo. 3 Phase contrast micrographs of L cells trypsinized and exposed to formaldehyde for 24 and 48 hours

Photo. 4   Phase contrast micrographs of L cells trypsinized and exposed to glutaraldehyde for 24 and 48 hours

細胞を用いて実験濃度を $10\mu\text{g/ml}$ 以上とし、作用時間を 2 時間に限定して両者の影響を比較した。

まず、 $10\mu\text{g/ml}$ の場合、ホルムアルデヒドでは胞体部の収縮、グルタールアルデヒドでは細胞質突起の短縮を起こしたが、いずれの影響も軽度であった。

しかし、 $100\mu\text{g/ml}$ ではグルタールアルデヒドの影響が比較的軽度であったのに対して、同濃度のホルムアルデヒドに細胞は強く反応し変形した。さらに 1mg/ml になるとホルムアルデヒドでは細胞質が網目状となり既に生命を失い、崩壊過程にあると思われる細胞が多く現われたが、グルタールアルデヒドでは細胞質突起の短縮、細胞形態の単純化などが認められたに留まり、この時点ではほとんどの細胞が生存するものと思われた。ホルムアルデヒドの 1mg/ml にほぼ匹敵するような変化がグルタールアルデヒドで観察されたのは 10mg/ml であった。

このように両薬物の 10 倍希釈系列で単層培養細胞の形態に及ぼす影響を比較した結果、ホルムアルデヒドの方が 10 倍強力であることが判明した。

続いて、両薬物の細胞形態に対する影響をさらに詳細に比較するために、10 倍希釈系列よりもさらに細分した実験濃度で、トリプシン・EDTA 溶液を用いて単層から解離した細胞に対する付着阻止作用を観察した。

この実験成績では、単層形成後の細胞を用いた前実験よりも低濃度で両薬物の影響が現われたが、解離細胞はトリプシンによる糖蛋白質の分解および EDTA による 2 価陽イオンの喪失により細胞と器壁との結合に関与する細胞膜の機能が一時的に失われた状態であり、単層形成後の細胞に比べると薬物感受性は当然高いものと考えられる^{4,5)}。

至適条件で解離された細胞は、ほとんど支障なく増殖可能であるが、強い障害を受けた場合は、再び培養器の底面に付着し、細胞質を伸展して各細胞に特異的な形態を示すことが出来なくなり、細胞分裂を行なって増殖することも不可能となる。今回、敢えて解離状態の細胞を使用したのは、位相差顕微鏡下では、薬物により単層形成後の細胞に惹起される形態変化よりも、解離細胞に現われる付着阻止や生育の抑制を検出することの方が容易であり、したがって薬物濃度の僅かな変化に伴う細胞の変化を観察することも可能であると考えたためであった。

その結果を総括すると次のとおりであった。グルタールアルデヒド $2.5, 5.0\mu\text{g/ml}$ では 24 時間後の付着状況もその後の増殖も良好で対照にかなり近かった。これら

に比較してホルムアルデヒド $2.5\mu\text{g/ml}$ はやや強い付着阻止作用を示し、それはグルタールアルデヒド $10\mu\text{g/ml}$ とほぼ同程度であった。また、ホルムアルデヒド $5.0\mu\text{g/ml}$ はグルタールアルデヒド $20\mu\text{g/ml}$ よりもやや強い影響を示し、 $40\mu\text{g/ml}$ よりやや弱いようであった。ホルムアルデヒドは $10\mu\text{g/ml}$ で生存細胞が認められなくなったが、グルタールアルデヒドでは $40\mu\text{g/ml}$ でも生存可能と思われる細胞が認められ、それらは増殖も可能であると思われる像を示した。ただし、細胞の生死や増殖抑制の程度を明確に知るには、今回のような顕微鏡所見以外のものについて、さらに検討しなければならない。

以上のように、様々な濃度でホルムアルデヒドとグルタールアルデヒドの細胞形態に与える影響を観察すると、確かに両薬物とも著しく強い細胞障害作用を示すが、前者に比すれば明らかに後者の毒性は低いと言える。今回行った 2 種類の実験結果を総合すると、グルタールアルデヒドの細胞毒性はホルムアルデヒドの $1/5 \sim 1/10$ 程度ではないかと考えられる。したがって、最近、ホルムアルデヒド製剤に代えて組織固定作用の強力なグルタールアルデヒド製剤を歯内療法に応用することが検討されているが^{6,7)}、それは組織傷害作用の減弱という観点からも確かに意義があることと思われる。

結 論

ホルムアルデヒドとグルタールアルデヒドを種々の条件で培養 L 細胞に作用させた場合の位相差顕微鏡所見から次の事が明らかとなり、細胞毒性はホルムアルデヒドの方が強いことを確認した。

1. ホルムアルデヒドを単層形成後の細胞に 2 時間作用させた場合、 $10\mu\text{g/ml}$ では胞体部の軽度の収縮、 $100\mu\text{g/ml}$ では顆粒状突起物の形成、 1mg/ml では著しい球状化と bleb 形成ならびに細胞質の変性が認められた。 10mg/ml では細胞の輪郭はほとんど変わらずに、多数の bleb を生じた。
2. グルタールアルデヒドを単層形成後の細胞に 2 時間作用させた場合、 $10\mu\text{g/ml}$ では細胞質突起の軽度の短縮、 $100\mu\text{g/ml}$ では細胞質突起の顕著な短縮ないし消失、 1mg/ml では細胞輪郭の単純化ないし球状化が認められた。 10mg/ml では細胞の形態変化はむしろ少なかったが、細胞質の変性は著しかった。
3. ホルムアルデヒドを細胞浮遊液に加えて培養した場合、 $2.5\mu\text{g/ml}$ では細胞の付着および生育に対する阻止作用は軽度であるが、 $5.0\mu\text{g/ml}$ では細胞の付着を強く阻止し増殖に対する抑制作用も顕著となった。 $10\mu\text{g/ml}$

では付着細胞が認められなかった。

4. グルタルアルデヒドを細胞浮遊液に加えて培養した場合, 2.5, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ では影響は極めて軽微であった。10 $\mu\text{g/ml}$ で軽度の付着阻止作用が現われ, それは

ホルムアルデヒド 2.5 $\mu\text{g/ml}$ と同程度であった。20, 40 $\mu\text{g/ml}$ では付着細胞数は著しく減少し, ホルムアルデヒド 5.0 $\mu\text{g/ml}$ と大差ない状態となった。

引 用 文 献

- 1) Kuroki, K. and Ohsumi, T. : Study on cytotoxicity of formaldehyde and glutaraldehyde by phase contrast microscopy. *J. Kyushu Dent. Soc.* 39 : 91—98, 1985.
- 2) 黒田行昭 : 動物組織培養法. 共立出版. 東京, 1974, 69—71.
- 3) 黒木賀代子・大住伴子 : 培養L細胞に対するクレゾールとホルマリンの増殖抑制作用. 九州歯会誌 39 : 481—491, 1985.
- 4) 黒田行昭 : 動物組織培養法. 共立出版. 東京, 1974, 98—102.
- 5) 大場義樹 : 微生物としての動物細胞. 共立出版. 東京, 1977, 5—7.
- 6) E.J. 's-Gravenmade : Some biochemical consideration of fixation in endodontics. *J. Endodontics* 1 : 233—237, 1975.
- 7) 猪野和子・浜田芳隆・斉藤 峻・神山紀久男 : グルタルアルデヒドの歯髓切断法への応用に関する研究. 第22回日本小児歯科学会総会予稿集 : 79, 1985.