

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18390184

研究課題名(和文) 人造繊維状物質の安全衛生評価体系の開発

研究課題名(英文) Development of safety hygiene evaluation system of manufactured fiber material

研究代表者

相澤 好治 (AIZAWA YOSHIHARU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10124926

研究成果の概要(和文)：

石綿は、肺がん、中皮腫の原因となることが明らかになったため、現在使用が禁止されている。現在使用されている石綿代替品は、年月が浅いため安全性が明らかになっていないものが多く、安全性評価が急務となっている。本研究では、人造繊維状物質のうち、RF3種、RCF、RW2種を調査対象物質とした。試験管内試験や吸入曝露実験などで評価した結果、細胞や肺の障害性は少ないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

As for the asbestos, the use is prohibited now to cause lung cancer, the mesothelioma. The used asbestos substitutes has many things that safety does not become clear so that time is not long, and safety evaluation becomes urgent business now. In this study, we assumed RF3 class, RCF, RW2 class an investigation object material among synthetic fiber-shaped materials. As a result of having evaluated it by intratracheal instillation or inhalation exposure, as for the obstacle characteristics of a cell and lungs, few things were suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：細胞磁界測定法、肺磁界測定法、人造繊維状物質、クリソタイル、細胞毒性

## 1. 研究開始当初の背景

石綿は、肺がん、中皮腫の原因となることが明らかになったため、現在使用が禁止されている。このため石綿代替品が使用されている。しかし、代替品は使用されてから年月が浅いため安全性が明らかになっていないものが多く、安全性評価が急務となっている。人造繊維状物質の一種である RF、RCF は耐火性、耐熱性等に優れているため、産業廃棄物用高炉や工業炉に石綿代替繊維の一つとして使用されている。また、RW は石綿代替繊維の一種であり、耐熱性や耐久性等に優れているため幅広く使用されている。今回、産業界で幅広く使用されている繊維について、研究を行った。

## 2. 研究の目的

線維増殖性および発がん性が認められる石綿に替わる人造繊維状物質のうち、RF3 種、RCF、RW2 種を調査対象物質とした。

評価手法は、*in vitro* 実験で、細胞磁界測定法、LDH 逸脱酵素測定法、形態学的観察、

*in vivo* 実験で、鼻部吸入曝露後の肺磁界測定法、肺内滞留性評価、また気管内投与後、マクロファージから産生されるサイトカインの測定、肺病理学的評価で、各々の組合せによる安全衛生評価体系の開発と実証をする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス由来腹腔マクロファージ様培養細胞 RAW264.7 を用いた RF3 種の安全性の検討

試料は、RF1、RF2、RF3（日本繊維状物質研究協議会）を用いた。培養液（DMEM）で前培養した RAW264.7 細胞を回収し、計算盤で算出した後、 $25 \times 10^4$  個/ml となるよう培養液で調製した。ガラス秤量瓶に播種した細胞に、細胞磁界測定の指標となる  $Fe_3O_4$  を添加し、実験群には RF1、2、3 を各 250、500、1000  $\mu g/ml$  添加、対照群には PBS を添加した ( $n=6$ )。48 時間培養後、細胞磁界測定装置にて外部より磁化、その後 20 分間の残留磁界をフラック

スゲート磁束計にて測定した。測定後、上清を回収し、マイクロプレートリーダーで RAW264.7 細胞から培養液中への LDH 逸脱量を求めた。

群毎に、得られたデータの平均値を算出し一元配置分散分析で統計解析した。電子顕微鏡による形態学的観察では、RAW264.7 細胞に 1000  $\mu g/ml$  の試料を添加し、48 時間培養した。前処理後、走査型および透過型電子顕微鏡を用いて、核、細胞小器官、細胞膜の観察を行った。

(2) オス Wistar ラットを用いた RCF (1200°C、1500°C、ムライト) の安全性の検討

RCF は加熱温度が上昇すると非晶質のムライト、結晶質のクリストバライト（結晶性シリカ）が生じる。また、加熱温度が上昇するにつれて結晶質シリカの割合が増加する。

そこで本研究では加熱した RCF の生体影響を評価するため 1200°C および 1500°C に加熱した RCF、その生成物であるムライトを用いた。調製は、各 RCF 0.5mg を 0.3ml の生理的食塩水に懸濁した。オス Wistar ラット 7 週令に、各 RCF を 1 日 1 回 4 日連続で気管内投与した。また、対照群は生理的食塩水 0.3ml を同様に投与した ( $n=3 \sim 5$ )。

その後、気管支肺胞洗浄を行い、マクロファージを回収した。遠心分離後の上清を用いてマクロファージから産生されるサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ ) を測定した。また、遠心分離後の沈殿した細胞について、種類の分類や計数を行い各々の割合を算出した。

さらに、肺の病理組織標本を作製し病理学的影響を評価した。

(3) オス Fischer344 ラットを用いた NC 社製 RW の安全性の検討

試料は NC 社製 RW を使用した。鼻部吸入曝露実験装置を用いてオス Fischer344 ラット (6~9 週齢) に 1 日 6 時間 5 日間の連続曝露を行った ( $n=24$ )。曝露濃度は長径 (L)  $> 20 \mu m$  が 93.08 fiber/ $m^3$  であった。曝露終了 1、90、

180日後にラットを屠殺し、肺を摘出した。

灰化・ろ過捕集などの処理後、電子顕微鏡写真にて、肺内繊維サイズ(長径・短径)の計測と肺内滞留繊維数の計数を行った。

得られた結果の平均値を算出し、一元配置分散分析、Scheffe 法による多重比較の検定を行った。さらに肺内滞留繊維数の1日後群の幾何平均値を100%とした時の指数近似曲線からRWの半減期を求めた。

#### (4) オス Wistar ラットを用いた NT 社製 RW の安全性の検討

試料は NT 社製の RW を用いた。鼻部吸入曝露実験装置を用いてオス Wistar ラット(8週齢)に1日6時間、5日間連続曝露を行った(n=10)。

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>3mg を生理食塩水 0.2ml に懸濁した試料を、曝露終了1日後に気管内投与した。

曝露終了1、3、7、14、28日後、胸部全体をヘルムホルツ型コイルにより50mTで1秒間磁化し、その後40分間、胸部の残留磁界をフラックスゲート磁束計にて肺磁界測定した。非曝露のラットを対照群とし、実験群と同様の条件で測定を行った(n=12)。得られた結果について、t検定による両群間の統計学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞磁界測定では、RF 添加により緩和の遅延が認められ、対照群と比較して、RF1では500 μg/ml、1000 μg/ml、RF2では1000 μg/ml、RF3では1000 μg/mlの添加群において有意に遅延した。LDH 酵素測定においても、RF 添加による培養液中へのLDHの逸脱が認められた。対照群と比較して、RF1では500 μg/ml以上、RF2では250 μg/ml、500 μg/ml、1000 μg/ml、RF3では500 μg/ml、1000 μg/mlの各添加群において有意に逸脱した。また、細胞磁界測定およびLDH 酵素測定において、RF 添加量と細胞毒性の間には量影響関係が認められた。

形態学的観察においては、走査型電子顕微鏡では、RF1、2、3ともにRAW264.7細胞が繊維を不完全に貪食し、微絨毛が減少している像が観察された。透過型電子顕微鏡ではRF1、2、3ともに微絨毛の減少、核のクロマチンの凝

集が観察された。また、細胞質内に繊維が観察されたものの、比較的細胞小器官は保たれている様子が観察された。

今回の実験において、細胞磁界測定法による緩和の遅延より細胞機能への障害性、LDH 酵素測定法によるLDH逸脱量より細胞膜の傷害性、形態学的観察より形態学的変化から、RFによるRAW264.7細胞への細胞毒性が示唆された。緩和の遅延は、RF繊維により細胞骨格が障害されたために起こったと考えられる。また、RF1がRF2、3より毒性が強かった理由として、RF1はRF2、3に比べ、1 μg当りの繊維数が多いこと、長径が長く短径が短いことが関与していると考えられる。

(2) サイトカイン(TNF-α、TGF-β)を測定した結果、対照群およびムライト投与群に、有意差はなかった。細胞の種類の種類では、1200°Cおよび1500°C加熱処理群、ムライト投与群で1日後、3日後にわずかに好中球が増加したものの有意な増加ではなく、炎症は生じていなかった。

病理学的影響評価では1200°Cおよび1500°C加熱処理群、ムライト投与群で1日後、3日後に肺胞壁の肥厚、肺胞内にマクロファージがみられたが、これは繊維を処理する際の肺の防御反応であり、肺に異常はみられなかった。以上より、RCFが肺胞マクロファージに貪食され、肺内で繊維の溶解が生じたためと考えられる。さらに、1200°Cおよび1500°C加熱処理群、ムライト投与群ともに28日間という短期間の観察において肺の影響はなかった。

(3) ろ過処理後の検体を、繊維の判断基準に従い肺内繊維サイズを計測した結果、長径・短径ともに1日後から90、180日後にかけて有意に減少した。肺内滞留繊維数は1日後から90、180日後にかけて有意に減少した。以上より、体液による溶解、肺胞マクロファージの貪食作用後、気管・気管支の粘液線毛運動による体外への排出、肺間質からリンパ管への輸送が生じたためと考えられる。また、半減期はL>20 μmで55日、WHO繊維で74日であり、石綿の半減期と比較して短かった。

(4) 肺磁界測定を行い、磁化後 40 分間の残留磁界を経時的に観察し緩和の程度を示す緩和曲線を求めた。7 日後の測定で、実験群と対照群で有意差を認められたが、それ以外の測定日では有意差は認められなかった。また、すべての緩和曲線で緩和は迅速に認められた。磁化後 2 分間の残留磁界を対数変換して得られた直線と Y 軸との交点を B0 (磁化直後の残留磁界)、磁化中止 t 秒後の残留磁界を B とし、緩和係数 ( $\lambda$ ) を、 $B=B_0e^{-\lambda t}$  の式により求めたところ、両群間で 3、7、14、28 日後に有意差が認められた。しかし緩和係数は経時的に変化が見られた。また、曝露終了 1 日後を 100% として各測定日での B0 値をプロットし、 $Fe_3O_4$  のクリアランスを求めたところ、実験群と対照群間に有意差は認められず、両群ともに迅速な減衰がみられた。以上より、肺胞マクロファージが RW を貪食し、細胞骨格による食胞の回転が迅速に行われたことが考えられる。つまり、RW による肺障害性は低いことが示唆された。

今後は組織、白血球、尿中 8-OHdG と 8-NG の免疫組織化学的および機器分析による定量的な DNA 損傷の測定を行い、調査対象物質の毒性に関して総合的に評価する。また、上記した人造繊維状物質曝露動物について、肺、胸膜・腹膜からの悪性腫瘍の発生を経時的に病理組織診断を行い、発がん性の有無について信頼性の高い結論を作成する。また、胸水中のヒアルロン酸、血液中の腫瘍マーカー (CEA など) を測定し、中皮腫の早期診断のためのスクリーニング法を確立することが必要である。また、他の代替繊維 (シリコンカーバイトウイスキー、ガラス繊維、グラスウールなど) についての安全性についても同様に評価を進める必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1) Hosokawa M, Kudo Y, Sugiura Y, Koyama M, Ota E, Mimura K, Mogi S, Tsunoda M, Aizawa Y. Long retention of refractory ceramic fibers with high SiO<sub>2</sub> in the lungs

of rats after intratracheal administration. *Kitasato Med J* 2009; 39(1): 75-81. (査読有)

2) Kudo Y, Kotani M, Aizawa Y. Cytotoxicity study of rock wool by cell magnetometric evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009; 55(2): 151-7. (査読有)

3) Kudo Y, Aizawa Y. Behavior of rock wool in lungs after exposure by nasal inhalation in rats. *Environ Health Prev Med*. 2009; 14(4): 226-34. Epub 2009 May 26. (査読有)

4) Kudo Y, Kotani M, Tomita M, Aizawa Y. Effects of rock wool on the lungs evaluated by magnetometry and biopersistence test. *J Occup Med Toxicol* 2009; 27; 4-5. (査読有)

5) Kudo Y, Aizawa Y. Biopersistence of Rock Wool in Lungs After Short-term Inhalation in Rats. *Inhal Toxicol*. 2008 ; 20(2): 139-47. (査読有)

6) Shibata K, Kudo Y, Tsunoda M, Hosokawa M, Sakai Y, Kotani M, Aizawa Y. Magnetometric evaluation of the effects of man-made mineral fibers on the function of macrophages using the macrophage cell line RAW 264.7. *Ind Health* 2007; 45: 426-36. (査読有)

7) 佐藤勘治, 新山史朗, 工藤雄一朗, 杉浦由美子, 勝岡憲生, 相澤好治: 新しい断熱材による皮膚刺激試験. *日職災医誌* 2007; 55(5): 215-8. (査読有)

8) 工藤雄一朗, 相澤好治, 小谷 誠: ホウ酸アルミニウムウイスキーの細胞毒性および溶解性評価. *マグネティックス研究会資料* MAG-07-87: 49-56. (2007.9)

(査読無)

9) Kudo Y, Kohyama N, Sato T, Konish Y, Aizawa Y. Behavior of rock wool in rat lungs after exposure by nasal inhalation. *J Occup Health* 2006; 48: 437-45. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1) 工藤雄一朗, 茂木沙千代, 小松裕美, 小山美智代, 大田悦子, 杉浦由美子, 小谷 誠, 角田正史, 相澤好治: 肺磁界測定法を用いた

ロックウールの有害性評価. 第 57 回日本職業・災害医学会学術大会 (2009. 11. 21), 大阪.  
(日本職業・災害医学会会誌 2009; 57(臨増): 165)

2) 工藤雄一朗, 三村剣司, 日吉沙千代, 大田悦子, 小山美智代, 杉浦由美子, 角田正史, 相澤好治: 肺磁界測定法によるロックウールの安全性評価. 第 79 回日本衛生学会総会 (2009. 4. 1), 東京. (日本衛生学雑誌 2009; 64(2): 615)

3) 工藤雄一朗, 杉浦由美子, 日吉沙千代, 三村剣司, 大田悦子, 小山美智代, 角田正史, 佐藤敏彦, 相澤好治: 鼻部吸入曝露実験によるロックウールの有害性評価の検討. 第 56 回日本職業・災害医学会学術大会 (2008. 11. 7), 東京. (日本職業・災害医学会会誌 2008; 56(臨増): 116)

4) 工藤雄一朗, 細川まゆ子, 日吉沙千代, 三村剣司, 大田悦子, 小山美智代, 杉浦由美子, 角田正史, 相澤好治: 鼻部吸入曝露実験によるロックウールの肺内滞留性に関する研究. 第 55 回日本職業・災害医学会学術大会 (2007. 11. 2), 名古屋. (日本職業・災害医学会会誌 2007; 55(臨増): 249)

5) 工藤雄一朗, 三村剣司, 日吉沙千代, 大田悦子, 小山美智代, 杉浦由美子, 角田正史, 佐藤敏彦, 相澤好治: 鼻部吸入曝露実験によるロックウールの有害性評価. 第 77 回日本衛生学会総会 (2007. 3. 26), 大阪. (日本衛生学雑誌 2007; 62(2): 611)

6) 工藤雄一朗, 日吉沙千代, 三村剣司, 大田悦子, 小山美智代, 杉浦由美子, 角田正史, 佐藤敏彦, 小谷 誠, 相澤好治: 肺磁界測定法を用いたロックウールの肺障害性評価. 第 80 回日本産業衛生学会 (2007. 4. 27), 大阪.  
(産業衛生学雑誌 2007; 49(臨増): 490)

7) 工藤雄一朗, 柴田香理, 小松裕美, 杉浦由美子, 角田正史, 小谷 誠, 相澤好治: 細胞磁界測定法によるロックウールの細胞毒性評価. 第 21 回日本生体磁気学会 (2006. 6. 1), 東京. (日本生体磁気学会誌 2006; 19(1): 164-5)

8) Shibata, K., Kudo, Y., Komatsu, Y., Sugiura, Y., Inoue, Y. and Aizawa, Y. : Magnetometric evaluation for cytotoxicity of silicon carbide whisker on macrophage cell line raw 264.7. 28th International Congress on Occupational Health (2006. 6. 14), Milan. (Book of

Abstracts: 273)

[図書] (計 1 件)

1) 工藤雄一朗, 相澤好治: 細胞および肺磁界測定による化学物質の有害性評価. 非侵襲・可視化技術ハンドブックーナノ・バイオ・医療から情報システムまでー, 小川誠二, 上野照剛監修, エヌ・ディー・エス, 東京, 2007. p. 475-84.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相澤 好治 (AIZAWA YOSHIHARU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 10124926

### (2) 研究分担者

角田 正史 (TSUNODA MASASHI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 00271221

工藤 雄一朗 (KUDO YUICHIRO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 60348505

小谷 誠 (KOTANI MAKOTO)

北里大学・医学部・客員教授

研究者番号: 60057205

三木 猛生 (MIKI TAKEO)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 00327397

山内 博 (YAMAUCHI HIROSHI)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号: 90081661

(H18~19)

高田 礼子 (TAKATA AYAKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30321897

(H18~19)

### (3) 連携研究者

なし