

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590758

研究課題名(和文)アスベストの無害化処理品の生体影響における鉄・シリカ複合体の作用に関する研究

研究課題名(英文)Role of the iron-silica complex to biological effects related to detoxification products of asbestos.

研究代表者

高田 礼子(TAKATA, Ayako)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：30321897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：わが国で主に使用されたアスベストのうち、アモサイト(AM)は1000℃以上での焼成処理により酸化鉄(ヘマタイトとマグネタイト)、結晶質シリカ(クリストバライトとトリジマイト)から成る複合体が生成され、その構成比率は焼成条件により異なる。本研究では、AMの焼成無害化処理品に含まれる鉄とシリカによる酸化ストレス、炎症作用を評価するため、細胞毒性試験とラット気管内投与試験を行った。AMの1200℃以上の焼成試料の慢性呼吸器影響には、繊維形状だけでなく、結晶構造のうち結晶質シリカの関与が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Amosite (AM) is one of the principal asbestos that was used in Japan. This AM is converted to crystalline silica and iron oxides by thermal treatment at 1000 °C or more, and the proportion of these compositions are different by thermal treatment condition. We conducted cytotoxicity tests of thermal transformed AM samples and intratracheal administration tests in rats to evaluate the role of crystal structure (crystalline silica and iron oxides) in the biological effects of thermal decomposition products of AM. When the material was thermal transformed at over 1200 °C, acute respiratory effects were reduced but chronic respiratory effects were increased in spite of fiber morphology of thermally transformed AM. These results suggested that the fiber morphology and crystal structure (especially crystalline silica) influence the chronic respiratory effects induced by thermal decomposition products of AM.

研究分野：衛生学

キーワード：アスベスト 無害化 鉄 シリカ

1. 研究開始当初の背景

わが国では建築物の解体により大量に排出されるアスベスト含有廃棄物の安全で円滑な処理を推進するため、環境省によるアスベストの無害化処理認定制度が開始された。アスベストの無害化処理とは、無害化処理生成物にアスベストが検出されないように処理することである。しかし、アスベストが検出されないだけでは無害化処理生成物の安全性は担保されない。さらに、無害化処理生成物の中には工業的に再利用されるものもあり、幅広く利用されると多くのヒトがばく露される危険性があることから、無害化処理生成物の安全性に関する科学的検証が求められている。

無害化処理を行うアスベスト含有廃棄物にはクリソタイルとアモサイトの両者が含まれる可能性があることから、両者を安全な無害化処理物に転換できる処理条件を明らかにしなければならない。これまでに申請者らはもっとも大量に使用されたアスベストであるクリソタイルについては、1000℃以上の焼成処理により慢性影響や発がん性が低下することが明らかにしてきた。しかし、アモサイトの無害化処理品の生体影響に関する国際的な研究成果は乏しく、アスベストの結晶構造と繊維形状が破壊されても新たに生成された酸化鉄と結晶質シリカの複合体による有害性が懸念される。そのため、アモサイトの安全な無害化処理品の要件を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

アスベストの一つであるアモサイトは1000℃以上での焼成処理により酸化鉄（ヘマタイトとマグネタイト）、結晶質シリカ（クリストバライトとトリジマイト）から成る複合体が生成され、その構成比率は焼成条件により異なる。アモサイトの焼成無害化処理品の生体影響については、アモサイトと同様な鉄イオンによるラジカル反応を介した酸化ストレスの関与が考えられる。さらに、シリカによるマクロファージの活性酸素種の誘導とサイトカイン産生増加による炎症の関与の可能性が考えられる。

本研究では、アモサイトの焼成無害化処理品の生体影響の原因として、無害化処理品に含まれる鉄とシリカの作用を細胞毒性実験およびラット気管内投与実験により解明し、アスベスト無害化処理生成物の安全性評価に重要な基礎データの集積を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 被験試料

① 被験試料の作製

UICC アモサイト(AM)を電気炉で 1000℃、1200℃、1400℃で1時間焼成して非石綿化した試料(AM1000, AM1200, AM1400)を作製した。さらに焼成試料の形状と生体影響との関連を検討するために、AM 繊維に由来する見

かけの繊維形状が残っている AM1000, AM1200 について、粉碎機で3分間粉碎した試料(AM1000G, AM1200G)を作製した。

AM 焼成試料の結晶構造と生体影響との関連を検討するために、結晶質シリカ（クリストバライト(CB)、トリジマイト(TR)）については(社)日本作業環境測定協会標準試料を、酸化鉄（ヘマタイト(HM)、マグネタイト(MT)）については関東化学株式会社1級試薬を粉碎して、粒度をAM焼成後粉碎試料(AM1000G, AM1200G)と同程度に調製した。

② 被験試料の物性

AM とその焼成試料、焼成後粉碎試料、結晶質シリカ試料、酸化鉄試料に対して、X線回折基底標準吸収補正法による生成物含有量の定量、透過型電子顕微鏡(TEM)によるサイズ分布等の測定を行った。

X線回折分析の結果、AM1000 および AM1000G では、酸化鉄であるヘマタイトとマグネタイトが生成されていた。AM1200 および AM1200G では酸化鉄であるマグネタイトに加えて、結晶質シリカのクリストバライトの生成が認められた。AM1400 ではマグネタイト、クリストバライトに加えて、結晶質シリカのトリジマイトの生成も認められた。TEM 観察では、AM1000 と AM1200 では、AM の繊維を置換するように酸化鉄と結晶質シリカの結晶構造が成長した見かけの繊維形状が認められた。

(2) 細胞毒性試験

① マウスマクロファージ系細胞株 (J774A.1 細胞) に AM と AM 焼成試料(AM1000, AM1200, AM1400)およびその粉碎試料(AM1000G, AM1200G)、結晶質シリカ試料(CB, TR)、酸化鉄試料(HM, MT)をそれぞれ添加した。24時間ばく露終了後、5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate

(H₂DCFDA)染色による細胞内活性酸素種の定量、培養上清中の Tumor necrosis factor- α (TNF- α)濃度の ELISA 法での測定等を行った。

② ヒト肺胞上皮系細胞株(A549細胞)にAMとAM焼成試料およびその粉碎試料、結晶質シリカ試料、酸化鉄試料をそれぞれ添加した。48時間ばく露終了後、H₂DCFDA染色による細胞内活性酸素種の定量等を行った。

(3) ラット気管内一回投与試験

AM と AM 焼成試料およびその粉碎試料、結晶質シリカ試料、酸化鉄試料を生理食塩水に懸濁して、2mg/ml の用量をラットに気管内一回投与した。急性呼吸器影響については投与後30日まで、慢性呼吸器影響については投与後1.5年まで観察した。生体影響の評価は、病理組織検査、気管支肺胞洗浄液(Bronchoalveolar lavage fluid: BALF)中の炎症細胞数及びサイトカイン (Monocyte Chemotactic Protein-1; MCP-1 等)、その他の炎

症関連生化学指標（蛋白、乳酸脱水素酵素；LDH等）の測定等を実施した。

4. 研究成果

(1) 細胞毒性試験

① AM 焼成試料による細胞毒性

J774A.1細胞にAM, AM1000を24時間ばく露後、細胞内活性酸素種の生成が顕著に認められた。しかしAM1200, AM1400をばく露した細胞内活性酸素種の生成量に顕著な変化は認められなかった。さらに、粉碎処理したAM1000G, AM1200Gを24時間ばく露後の細胞内活性酸素種の誘発は認められなかった。とくにAM1000GはAM1000に比較して細胞内活性酸素種レベルの有意な低下が明確に認められた。

同様に、J774A.1細胞にAM, AM1000を24時間ばく露後、培養上清中のTNF- α 濃度の顕著な上昇が認められた。一方、AM1200, AM1400を24時間ばく露後の培養上清中のTNF- α 濃度に変化は認められなかった。さらに、粉碎処理したAM1000G, AM1200Gをばく露後の培養上清中のTNF- α 濃度に変化はなく、とくにAM1000GはAM1000に比較してTNF- α 濃度は有意に低値であった。

一方、A549細胞にAM, AM1000を48時間ばく露後、細胞内活性酸素種の生成が顕著に認められたが、粉碎処理したAM1000Gを48時間ばく露後の細胞内活性酸素種の誘発は認められなかった。

② 結晶質シリカ、酸化鉄による細胞毒性

J774A.1細胞にAM1000G, AM1200Gと同程度の粒度に調整した結晶質シリカ試料（CB, TR）、酸化鉄試料（HM, MT）を24時間ばく露後の細胞内活性酸素種レベルは有意な増加が認められず、培養上清中のTNF- α 濃度の有意な変化も認められなかった。

一方、A549細胞に結晶質シリカ試料、酸化鉄試料をばく露後の細胞内活性酸素種レベルについて検討した結果、結晶質シリカ、とくにCBを48時間ばく露後の細胞内活性酸素種の生成の増加傾向が認められた。

(2) ラット気管内投与試験

① AM 焼成試料の急性呼吸器影響

各試料2mg/mlを気管内投与後30日まで観察した結果、AM1000では、AMと同様に急性炎症反応および肉芽腫の形成が認められた。気道上皮細胞および炎症細胞において酸化的DNA損傷のバイオマーカーである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の生成はAMと同様に持続していた。一方、AM1200, AM1400では、AMおよびAM1000に比較して、急性炎症反応は軽度であったが、経時的に炎症が進展し、投与後30日目の時点で、炎症、8-OHdGの生成が持続していた。

また、AM1000Gでは粉碎処理による炎症反応の軽減が認められた。AM1200Gについても、急性炎症反応はAM, AM1000に比較し

て軽度であった。

気管内投与後のBALFの炎症細胞数および炎症関連バイオマーカー（蛋白、LDH、MCP-1）の分析結果より、AM1000はAMに比較して毒性の軽減が認められなかった。これに対して、AM1000Gでは粉碎処理による毒性の軽減が認められた。また、AM1200, AM1400では投与後30日目の時点でBALF中の炎症細胞数と炎症関連バイオマーカーの上昇が認められた。

② AM 焼成試料の慢性呼吸器影響

各試料2mg/mlを気管内投与後30日以降1.5年まで観察した結果、AM1000, AM1200では肺の肉芽腫が長期間持続し、その周囲の線維化が認められた。また、AM1400では、肺の線維化は明らかではなかったものの、慢性炎症が持続していた。さらに、AM, AM1000, AM1200, AM1400では、気道上皮細胞および炎症細胞において8-OHdGの生成が長期間持続していた。一方、AM1000Gでは慢性呼吸器影響はほぼ認められず、8-OHdGの生成も炎症の回復に伴い軽減していた。しかし、AM1200Gでは、投与後180日目以降に肺野領域の炎症と8-OHdGの生成が観察された。

気管内投与後のBALFの炎症細胞数および炎症関連バイオマーカー（蛋白、LDH、MCP-1）の分析結果より、AM1200, AM1400では投与後30日目以降、AM1200Gでは投与後180日目以降でBALF中の炎症細胞数と炎症関連バイオマーカーの上昇が認められた。

以上の結果から、1000℃焼成処理により酸化鉄が生成されたAM1000については、粉碎処理による急性および慢性呼吸器影響の軽減が認められた。しかし、1200℃焼成処理により酸化鉄に加えて結晶質シリカが生成されたAM1200については、粉碎処理による慢性呼吸器影響の軽減効果が認められなかった。さらに、1400℃焼成処理により酸化鉄に加えて結晶質シリカが生成されたAM1400においても慢性呼吸器影響が認められた。

③ 結晶質シリカ、酸化鉄の呼吸器影響

結晶質シリカ試料、酸化鉄試料2mg/mlを気管内投与後の呼吸器影響を経時的に観察した結果、結晶質シリカであるCB, TRでは、投与後30日目の時点でも炎症反応は持続しており、気道上皮および炎症細胞で8-OHdGの生成の持続も認められた。BALF中の好中球数および炎症関連バイオマーカー（蛋白、LDH、MCP-1）は投与後30日目にかけて増加する傾向が認められ、とくにCBで顕著であった。しかし、CB, TRの投与後30日目の時点での炎症反応はAM1000, AM1200, AM1400よりも軽度であった。また、CBの方がTRに比較して炎症反応がやや強い傾向にあり、一部に肉芽腫形成が認められたが、明らかな線維化は認められなかった。

酸化鉄であるHM, MTでは、投与後30日目で肺野領域の急性炎症反応が認められ、気道

上皮およびマクロファージ等の炎症細胞で8-OHdGの生成も認められた。しかし、これらの炎症反応はCB, TRよりも軽度であった。HM, MTの炎症反応は結晶質シリカと異なり経時的に回復傾向を示した。投与後30日目の時点では、肺胞領域の炎症はごく軽度であり、肺組織における8-OHdGの生成も減少していた。BALF中の好中球数および炎症関連バイオマーカーの増加傾向も認められなかった。

(3) 総括

細胞毒性試験の結果から、マクロファージ系細胞および肺胞上皮系細胞のいずれにおいても、AM焼成試料による細胞毒性は、アスベストに由来する見かけの繊維形状の残存が影響することが確認された。しかし、肺胞上皮系細胞においては、試料の繊維形状だけでなく、結晶構造として結晶質シリカが影響している可能性が考えられた。

一方、ラット気管内投与試験の結果から、AM焼成試料の急性呼吸器影響には細胞毒性試験の結果と同様に、アスベストに由来する見かけの繊維形状の残存が影響することが示唆された。しかし、AM焼成試料の慢性呼吸器影響には、繊維形状の残存だけでなく結晶構造が影響する可能性が考えられた。とくに、慢性呼吸器影響には結晶質シリカの結晶構造が影響することが示唆された。

すなわち、AMのように焼成処理により結晶質シリカが生成されるアスベストにおいては、アスベストに由来する見かけの繊維形状を破壊できる処理条件だけでは不十分であり、結晶構成成分も考慮して結晶質シリカが生成されないような焼成処理条件で無害化処理を行うことが必要であると考えられた。本研究から、AMの1000℃焼成後の粉碎処理は最適な無害化処理条件の候補の一つであることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

① 高田礼子、山内博、網中雅仁、神山宣彦。アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価：アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価に関する最近の知見。繊維状物質研究、2014；1：23-25。(査読有)

② 山内博、高田礼子、神山宣彦。アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価：アスベストの無害化処理の必要性和背景。繊維状物質研究、2014；1：20-22。(査読有)

③ 高田礼子。アスベスト含有廃棄物の無害化処理。保健の科学、2013；55：609-614。(査読無)

④ 高田礼子、網中雅仁、伊与亨、神山宣彦、山下喜世次、小西淑人、山内博。アスベスト

の無害化処理物の安全性および将来への展望。臨床環境医学、2013；22：25-35。(査読有)

〔学会発表〕(計15件)

① 高田礼子、山内博、網中雅仁、伊与亨。アスベスト焼成無害化処理物に関する安全性の検証および将来展望。第72回日本公衆衛生学会総会。2013年10月24日、アストプラザ(三重県津市)。

② 高田礼子。アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価。②アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価に関する最近の知見。第1回日本繊維状物質研究学術集会、2013年8月21日、メルパルク東京(東京都港区)。

③ 山内博。アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価。①アスベストの無害化処理の必要性和背景。第1回日本繊維状物質研究学術集会、2013年8月21日、メルパルク東京(東京都港区)。

④ 高田礼子。中皮腫の疫学と一次予防：アスベストの代替化と無害化。第102回日本病理学会総会、2013年6月6日、ロイトン札幌(北海道札幌市)。

⑤ 山内博、中野(青木)瑞穂、高田礼子、網中雅仁、山下喜世次、神山宣彦。クリソタイト、クロシドライト、アモサイトの焼成無害化処理物の細胞毒性。第86回日本産業衛生学会、2013年5月15日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)。

⑥ 網中雅仁、高田礼子、山内博、山下喜世次、神山宣彦。ラット腹腔内投与によるアモサイト焼成無害化処理物の中皮腫発がん性評価：2) 酸化的DNA損傷評価。第86回日本産業衛生学会、2013年5月15日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)。

⑦ 高田礼子、網中雅仁、山内博、山下喜世次、神山宣彦。ラット腹腔内投与によるアモサイト焼成無害化物の中皮腫発がん性評価：1) 病理組織学的検査。第86回日本産業衛生学会、2013年5月15日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)。

⑧ 網中雅仁、高田礼子、山内博。アモサイト焼成無害化処理材料のラット気管内投与後の酸化的DNA損傷からみた慢性影響。第71回日本公衆衛生学会総会。2012年10月24日、サンルート国際ホテル山口(山口県山口市)。

⑨ 高田礼子、網中雅仁、山内博。アモサイト焼成無害化処理材料のラット気管内投与による慢性呼吸器影響。第71回日本公衆衛生学会総会。2012年10月24日、サンルート国際ホテル山口(山口県山口市)。

⑩ 高田礼子. アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価の現状と将来展望. 第 19 回石綿・中皮腫研究会. 2012 年 10 月 13 日、ホテル北野プラザ六甲荘 (兵庫県神戸市).

⑪ 高田礼子. アスベストの焼成無害化処理物の安全性評価に関する最近の知見. 第 21 回日本臨床環境医学会総会. 2012 年 6 月 2 日、南魚沼市民会館 (新潟県南魚沼市).

⑫ 高田礼子、高野 (宮本) 清子、網中雅仁、江尻直美、山下喜世次、神山宣彦、山内博. ラット気管支肺胞洗浄液を用いたアモサイト焼成無害化処理材料の急性呼吸器影響評価. 第 85 回日本産業衛生学会. 2012 年 6 月 1 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

⑬ 江尻直美、戸田枝里子、高田礼子、高野清子、網中雅仁、山下喜世次、神山宣彦、山内博. アモサイト焼成無害化処理材料のラット気管内投与による酸化的 DNA 損傷評価. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 2012 年 3 月 25 日、京都大学吉田キャンパス (京都府京都市).

⑭ 高田礼子、高野 (宮本) 清子、網中雅仁、山下喜世次、神山宣彦、山内博. アモサイト焼成無害化処理材料のラット気管内投与による呼吸器影響評価. 第 59 回日本職業・災害医学会学術総会. 2011 年 11 月 12 日、六本木アカデミーヒルズ (東京都港区).

⑮ 山内博、中野 (青木) 瑞穂、網中雅仁、高田礼子、山下喜世次、神山宣彦. アモサイトの焼成無害化処理材料に対する細胞毒性. 第 52 回大気環境学会年会. 2011 年 9 月 14 日. 長崎大学 (長崎県長崎市).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 礼子 (TAKATA, Ayako)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：30321897

(2) 研究分担者

山内 博 (YAMAUCHI, Hiroshi)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：90081661

網中 雅仁 (AMINAKA, Masahito)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：30231997

(3) 連携研究者

なし