

平成23年度
環境研究総合推進費補助金研究事業
研究報告書

アモサイトの無害化処理生成物の安全性
に関する研究 (K2303)

平成24年4月

(代表研究者) 北里大学

聖マリアンナ医科大学

株式会社ノゾワ技術研究所

山内 博

高田礼子

網中雅仁

山下喜世次

補助事業名 平成 23 年度環境研究総合推進費補助金研究事業
所 管 環境省
国庫補助金 45,213,000 円
研究課題名 アモサイトの無害化処理生成物の安全性に関する研究
研究期間 平成 23 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日
代表研究者名 山内 博（北里大学）
共同研究者名 高田礼子（聖マリアンナ医科大学）
網中雅仁（聖マリアンナ医科大学）
山下喜世次（(株)ノザワ技術研究所）

目 次

I	研究報告概要	1
II	アモサイト、アモサイト焼成物、結晶質シリカ、酸化鉄の細胞毒性試験	7
(1)	アモサイトとアモサイト焼成物	7
	実験方法	7
	結果と考察	8
	細胞内活性酸素種	8
	培養上清中 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)濃度	9
(2)	結晶質シリカと酸化鉄	10
	実験方法	10
	結果と考察	11
	細胞内活性酸素種	11
	培養上清中 TNF- α 濃度	13
	小括	14
2.	ラット気管内一回投与によるアモサイト、アモサイト焼成物、結晶質シリカ、酸化鉄の急性と慢性影響	15
(1)	急性影響	15
	実験方法	15
	結果と考察	20
	病理組織学的検索	20
	気管支肺胞洗浄液 Bronchoalveolar lavage fluid(BALF)の細胞分画	43
	BALF 中たんぱく濃度	48
	BALF 中 Lactate dehydrogenase (LDH)濃度	50

BALF 中サイトカイン濃度	52
血清中サイトカイン濃度	58
血清中酸化ストレス度と抗酸化力	60
血清中 N-ERC/mesothelin 濃度	64
尿中 <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG)濃度	66
急性影響 (BALF 中 Monocyte chemotactic protein-1(MCP-1)濃度等) の量反応関係	68
小括	72
(2) 慢性影響	73
実験方法	73
結果と考察	77
病理組織学的検索	77
BALF の細胞分画	85
BALF 中たんぱく濃度	88
BALF 中 LDH 濃度	89
BALF 中サイトカイン濃度	90
血清中サイトカイン濃度	93
血清中酸化ストレス度と抗酸化力	95
血清中 N-ERC/mesothelin 濃度	97
尿中 NAG 濃度	98
尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)濃度	99
小括	101
3. ラット腹腔内投与による発がん性試験	102
実験方法	102

結果と考察	104
死亡率および中皮腫発生率	104
病理組織学的検索	106
血清中酸化ストレス度と抗酸化力	112
血清中サイトカイン濃度	114
血清中 N-ERC/mesothelin 濃度	115
尿中 NAG 濃度	116
小括	117
III 研究業績	118

I 研究報告概要

アモサイトの無害化処理生成物の安全性に関する研究 (K2303)

代表研究者 山内 博 (北里大学)

共同研究者 高田礼子、網中雅仁 (聖マリアンナ医科大学)

山下喜世次 ((株)ノザワ技術研究所)

研究目的

アスベスト含有廃棄物の無害化処理において非飛散性アスベストにはクリソタイルのほかにアモサイトが含まれる可能性がある。ラットを用いた気管内投与試験において、クリソタイルと異なり、アモサイト焼成無害化処理物には毒性の軽減が認められない結果が得られている。さらに、アモサイトは焼成処理により、結晶質シリカであるクリストバライトとトリジマイト及び酸化鉄であるヘマタイトとマグネタイトなどに変換され、アスベストと異なる新たな有害性が懸念される。アスベスト含有廃棄物の無害化処理を推進する上で、とくに中皮腫などの発がん性に関する明確な結論、そして、急性と慢性ばく露からの呼吸器影響および全身臓器への影響も検討する必要がある。

本研究は、アモサイト焼成処理物の安全性を科学的に検証することを目的に *in vitro* と *in vivo* 試験を連携し、発がん性の有無、そして結晶質シリカと酸化鉄を加味して生体影響を総合的に評価した。

研究方法

1. 被験試料

UICC アモサイト(AM)を表-1 の条件で 1000°C、1200°C、1400°C で焼成して非石綿化した試料(AM1000、AM1200、AM1400)を作製した。さらに焼成物の形状と生体影響との関連を検討するために、見かけの繊維形状が残っている AM1000、AM1200 について、表-1 の条件で焼成後に粉砕した試料(AM1000G、AM1200G)を作製した。

AM 焼成物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、トリジマイト) 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、マグネタイト) については関東化学株式会社 一級試薬を粉砕して、粒度を AM 焼成後粉砕物(AM1000G、AM1200G)と同程度に調製した。

AM とその焼成物、焼成物に粉砕処理を加えたもの、そして、結晶質シリカと酸化鉄の調製試料に対して、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、Brunauer-Emmett-Teller (BET)法による比表面積、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。

AM と AM 焼成物、焼成後粉砕物における生成物（結晶質シリカと酸化鉄）の含有量を表-1、粒子サイズと比表面積の測定結果を表-2 に示した。また、結晶質シリカと酸化鉄の調製試料についての粒子サイズと比表面積の測定結果は表-3 に示した。

表-1 アモサイト焼成物の焼成条件および加熱後生成物

試料	加熱温度 (°C) ¹⁾	加熱後 粉砕有無 ²⁾	加熱後の生成物と含有量(%) ³⁾					
			Amosite	Quartz	Cristobalite	Tridymite	Hematite	Magnetite
AM(原試料)	—	—	+	tr	—	—	—	—
AM1000	1000	なし	—	1.6	0	0	22	<10
AM1000G	1000	あり	—	2.3	0	0	19	<10
AM1200	1200	なし	—	0	21	0	0	38
AM1200G	1200	あり	—	0	18	0	0	35
AM1400	1400	なし	—	0	7	14	0	22

- 1) AM 焼成物の作製は、AM を白金ルツボに入れ、電気炉（51524 型、光洋リントバーク）にて加熱し、加熱後は室温まで自然放冷を行った。
- 2) AM 焼成物の粉砕処理は、粉砕機（VIBRATING SAMPLE MILL TI-10、平工製作所）にて 3 分間粉砕した。
- 3) 生成物の含有量は、X 線回折基底標準吸収補正法により定量した。なお、Hematite と Magnetite が混在する AM1000、AM1000G は Magnetite の定量が困難なため、回折強度から推測した。
生成物：+；検出、tr；微量の検出、—；不検出。

表-2 アモサイト焼成物の粒子サイズおよび比表面積の測定結果

試料	長さ(μm)	幅(μm)	総粒子数 (10 ⁶ /mg) ²⁾	繊維数(10 ⁶ /mg) (アスペクト比>=3)	比表面積 (m ² /g) ³⁾
	幾何平均(標準偏差)	幾何平均(標準偏差)			
AM	4.3(3.3) ¹⁾	0.31(1.9) ¹⁾	203 ¹⁾	189 ¹⁾	5.9
AM1000	1.6(2.7)	0.24(2.1)	316	267	3.8
AM1000G	0.33(2.4)	0.21(2.1)	3,111	242	7.7
AM1200	2.2(3.5)	0.60(2.2)	48.8	31.2	1.2
AM1200G	0.18(2.2)	0.13(2.1)	7,019	165	7.7
AM1400	0.49(2.5)	0.33(2.4)	231	11.1	0.5

- 1) Kohyama et al. Am J Ind Med. 1996; 30: 515-528 の測定結果を用いた。
- 2) 総粒子数は、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 の比重を比重瓶で実測し、それぞれ、3.21、3.30、3.25、3.34、3.19 として算出した。
- 3) 比表面積は、BET 法により BELSORP-mini（日本ベル）を用いて測定した。

表-3 結晶質シリカ、酸化鉄の粒子サイズおよび比表面積の測定結果

試料	長さ(μm)	幅(μm)	総粒子数 (10 ⁶ /mg) ³⁾	比表面積 (m ² /g) ⁴⁾
	幾何平均(標準偏差)	幾何平均(標準偏差)		
クリスタライト ¹⁾	0.18(2.3)	0.14(2.2)	23,357	8.0
トリジマイト ¹⁾	0.33(2.7)	0.26(2.5)	608	5.6
ヘマタイト ²⁾	0.13(1.9)	0.11(1.8)	52,431	1.4
マグネタイト ²⁾	0.27(1.9)	0.21(1.9)	10,683	0.5

- 1) クリスタライト、トリジマイトは、(社) 日本作業環境測定協会 標準試料を用いて調製した。
- 2) ヘマタイト、マグネタイトは、関東化学株式会社 一級試薬を用いて調製した。
- 3) 総粒子数は、クリスタライト、トリジマイト、ヘマタイト、マグネタイトの比重をそれぞれ、文献値より、2.33、2.30、5.27、5.20 として算出した。
- 4) 比表面積は、BET 法により BELSORP-mini（日本ベル）を用いて測定した。

2. 細胞毒性試験

マウス・マクロファージ細胞株(J774A.1 細胞)に AM と AM 焼成物およびその粉砕物、結晶質シリカ、酸化鉄をそれぞれ添加し、24 時間後の細胞生存率、5-(and 6) Carboxy-2', 7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H₂DCFDA)染色による細胞内活性酸素種の測定、培養上清中の Tumor necrosis factor- α (TNF- α)濃度を ELISA 法にて測定した。

3. ラット気管内一回投与試験

AMとAM焼成物およびその粉砕物、結晶質シリカ、酸化鉄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。投与後30日目まで病理組織検査、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)、血清の酸化ストレスマーカ一等の測定を実施した。さらにAMとAM焼成物およびその粉砕物の投与群については、慢性影響を評価するため、投与後1.5年まで観察した。

4. ラット腹腔内一回投与による発がん性試験

AMとAM焼成物およびその粉砕物を10mg/2mlの用量を一回投与量として、2年間の経過観察中における中皮腫発生について病理組織検査を行った。さらに、血清中の中皮腫関連マーカー(N-ERC/mesothelin)等の経時的変化も評価した。

結果と考察

1. 細胞毒性試験

(1) 細胞内活性酸素種

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の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、粉砕処理したAM1000G、AM1200Gにおいても24時間ばく露後の細胞内活性酸素種の生成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。一方、結晶質シリカ(クリストバライト、トリジマイト)、酸化鉄(ヘマタイト、マグネタイト)については、J774A.1細胞に24時間ばく露後の細胞内活性酸素種レベルの有意な増加は認められなかった。

(2) TNF- α 濃度

じん肺やがんにも関連し、炎症の初期反応で重要なサイトカインであるTNF- α を指標として細胞毒性を評価した。J774A.1細胞にAMと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、粉砕処理したAM1000G、AM1200Gにおける培養上清中の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、結晶質シリカ（クリストバライト、トリジマイト）、酸化鉄（ヘマタイト、マグネタイト）については、24 時間ばく露後の培養上清中の TNF- α 濃度に有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、細胞への毒性は、試料の結晶構造よりも、アスベストに由来する見かけの繊維形状の残存が大きく影響する可能性が示唆された。

2. 気管内投与試験

(1) 急性影響

①病理組織検査

AM1000 では、投与後 30 日目まで肺胞道～肺胞にかけて肉芽腫が認められ、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 群と同様に持続していた。一方、AM1000G では粉碎処理による炎症反応の軽減が認められた。しかし、AM1200、AM1400 では、経時的に炎症が進展し、投与後 30 日目の時点でも炎症、8-OHdG の生成が持続していた。

結晶質シリカであるクリストバライト、トリジマイトでは、投与後 3 日目で肺胞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 の生成が認められた。クリストバライト、トリジマイトともに、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。しかし、クリストバライト、トリジマイトの投与後 30 日目の時点での炎症反応は AM1000 や AM1200、AM1400 よりも軽度であった。また、クリストバライトの方がトリジマイト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。

酸化鉄であるヘマタイト、マグネタイトでは、投与後 3 日目で肺胞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 の生成が認められた。これらの炎症反応はクリストバライト、トリジマイトよりもやや軽度であった。ヘマタイト、マグネタイト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。

表-1 に示す通り、AM 焼成物のうち最も呼吸器影響が軽減されていた AM1000G では、酸化鉄のみで、クリストバライト、トリジマイトが生成されていないのに対し、経時的に炎症が進展した AM1400 では酸化鉄に加えて結晶質シリカも生成されていた。すなわち、AM 焼成物の結晶構成成分のうち、結晶質シリカの方が酸化鉄よりも呼吸器影響に関与している可能性が示唆された。

②気管支肺胞洗浄液 (BALF) 分析

気管内投与後の BALF の好中球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。AM1200、AM1400 では投与後 30 日目の時点で BALF 中の好中球数および炎症関連バイオマーカーの上昇が認められ、細胞毒性試験だけでは予測できない生体影響が動物実験で示唆された。

結晶質シリカであるクリストバライト、トリジマイトでは、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）が投与後 30 日目にかけて増加する傾向が認められ、とくにクリストバライトで顕著であった。しかし、酸化鉄であるヘマタイト、マグネタイトでは 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は認められなかった。

以上の結果から、AM 焼成物の急性影響には細胞毒性試験の結果と同様に、焼成物の繊維形状（アスベスト由来の見かけの繊維形状の残存）が影響することが示唆された。さらに、投与後 30 日目の結果から慢性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。

(2) 慢性影響

気管内投与後 1.5 年まで観察した結果、AM1000、AM1200 では肺泡道～肺胞にかけて肉芽腫が長期間持続し、その周囲で線維化が認められたが、AM に比較して線維化の程度は軽度であった。一方、AM1400 では、肺の炎症が持続していたが、線維化は明らかではなかった。これに対して、AM1000G では慢性呼吸器影響はほぼ認められず、肺の線維化は認められなかった。以上の結果から、AM1000G による呼吸器毒性が最も軽減されていることが明らかとなった。また AM 焼成物の慢性呼吸器影響には、繊維形状（アスベスト由来の見かけの繊維形状の残存）および結晶構造が影響することが示唆された。

AM 焼成物(AM1000、AM1200、AM1400)およびその粉碎物(AM1000G)では、気管内投与後 1.5 年までの観察の結果、肺腫瘍の発生は認められず、腫瘍発生リスクの明らかな増加は認められなかった。

3. 腹腔内投与による発がん性試験

AM の中皮腫発生率は 56%であったのに対し、AM1000 では腹膜の線維化は認められたが、中皮腫発生率は 4%とわずかであり、AM に比較して中皮腫発生率は有意に低かった。これに対して、AM1000G では腹膜の線維化も認められず、中皮腫発生も認められなかった。腹腔内投与後の血清中の N-ERC/mesothelin 濃度の経時的変化は、中皮腫発生リスクを反映していた。中皮腫が高率に発生した AM では血清中 N-ERC/mesothelin 濃度が観察期間を通じて高値を示し、中皮腫発生の 1～3 ヶ月前から上昇傾向を認めた。一方、中皮腫発生が認められなかった AM1000G では血清中 N-ERC/mesothelin 濃度は投与後初期に一過性に軽度の上昇を認めたが、AM に比較して低値が持続した。しかし、投与後 540 日目以降、AM1000 および AM1000G において腎障害を発生した個体で血清中 N-ERC 濃度の上昇が認められ、血清中 N-ERC/mesothelin の評価には腎障害による影響を考慮する必要があることが示された。

結論

アモサイト(AM)の焼成物の慢性影響および発がん性を評価するため、ラットへの気管内投与と腹腔内投与試験を実施した。AM 焼成物の生体影響は、形状に加えて結晶構造（結晶質シリカ、酸化鉄）を考慮した *in vitro* 試験も加味して評価を行った。

気管内投与試験の結果、AM の 1000°C、1200°C 焼成物(AM1000、AM1200)では肺の肉芽腫と線維化が認められ、1400°C 焼成物(AM1400)では肺の炎症が持続していた。一方、AM1000 の粉碎物(AM1000G)では慢性呼吸器影響はほぼ認められなかった。AM 焼成物の慢性呼吸器影響は、繊維形状および結晶構造が影響する結果を得た。

腹腔内投与による発がん試験の結果、AM では高率に中皮腫が発生した。AM1000 では腹膜の線維化は認められたが、中皮腫の発生率は AM に比較して低率であった。一方、AM1000G では中皮腫発生は認められなかった。

本研究から、AM1000G に発がん性は認められなかった。慢性影響は AM に比べて AM1000G が最も軽減されていた。アモサイトの無害化は、1000°C 焼成後に粉碎処理により達成されることを明らかにした。

英語概要

- ・ 研究課題名 = 「Evaluation of biological effects of thermal transformed amosite」
- ・ 研究代表者名及び所属 = Hiroshi Yamauchi (Kitasato University)
- ・ 共同研究者 = Ayako Takata, Masahito Aminaka (St. Marianna University School of Medicine), Kiyotsugu Yamashita (Nozawa Corporation)

・ 要旨 = In order to examine the chronic effects and carcinogenicity of thermally transformed amosite (AM), we conducted intratracheal and intraperitoneal administration tests in rats. Biological effects of thermally transformed AM were examined based on the forms and crystal structure (crystalline silica and iron oxides).

In the intratracheal administration tests, pulmonary granuloma and fibrosis developed in thermally transformed AM at 1,000 °C and 1,200 °C (AM1000, AM1200), and persistent pulmonary inflammation developed with AM1400. On the other hand, there was little, if any, chronic respiratory effect induced by ground AM1000 (AM1000G). These results indicate that the fiber morphology and crystal structure influence the chronic respiratory effects produced by thermally transformed AM.

In tests of carcinogenicity by intraperitoneal administration, mesothelioma occurred at high rates in AM. Peritoneal fibrosis developed in AM1000, while mesothelioma occurred at lower rates compared with AM. There was no incidence of mesothelioma with administration of AM1000G.

In this study, carcinogenicity of AM1000G was not observed and AM1000G showed the least chronic effects compared to AM, indicating that detoxification of AM was achieved by grinding after thermal transformation at 1,000°C.

- ・ キーワード = amosite, carcinogenicity, lung injury, crystalline silica, iron oxide mineral

II アモサイト、アモサイト焼成物、結晶質シリカ、酸化鉄の細胞毒性試験

(1) アモサイトとアモサイト焼成物

実験方法

1) 細胞

マウス・マクロファージ細胞株 (J774A.1) は ECACC (Cat. No. EC91051511) より購入し、10%牛胎児血清 (Lot.No. 68313101, MOREGATE, Australia & New Zealand) を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地 (Sigma-aldrich) を用いて継代培養した。

2) AM 焼成物および粉碎物の調整

精密天秤にて秤量した試料はオートクレーブ滅菌後、乾燥機で十分に乾燥させた。次に、添加直前に超音波洗浄器にて 10 分間十分に分散させ、通常の継代培養に用いている培地に懸濁させながら添加した。

3) 細胞内活性酸素種の測定

J774A.1 細胞はラブテックチェンバースライドに 5×10^4 cells/well で播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 24 時間培養した。その後、細胞に AM, AM1000, AM1000G, AM1200, AM1200G, AM1400 を各々 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、24 時間培養した。さらにばく露終了後、細胞は PBS で 2 回洗浄し、 H_2DCFDA とヘキスト 33342 を含むを含む DMEM (血清含まず) に置換し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 1 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄後、位相差および蛍光顕微鏡下で観察し、ランダムに数箇所を写真撮影した。位相差顕微鏡写真から一視野内の細胞数を求めた。WinRoof を用いて H_2DCFDA の蛍光量 (輝度) を求め、活性酸素発生量とした。活性酸素発生量は各写真の細胞数および輝度を合計し、輝度を細胞数で除すことにより一細胞あたりの平均輝度を活性酸素発生量とした。

4) 培養上清中 $\text{TNF-}\alpha$ 濃度の測定

J774A.1 細胞を 9×10^3 cells/well となるように播種した。24 時間培養後、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように AM, AM1000, AM1000G, AM1200, AM1200G, AM1400 を添加した。さらに 24 時間培養し、フィルター濾過したものを -80°C で保存した。培養上清中の $\text{TNF-}\alpha$ 濃度は ELISA kit Mouse $\text{TNF-}\alpha$ (invitrogen) を用いて測定した。測定は 450nm の吸光度をプレートリーダーにて行い、解析ソフト WorkOut2.5 で検量線を求め、その検量線から培地上清中の $\text{TNF-}\alpha$ 濃度を求めた。

5) 統計処理

測定値の統計解析は、SPSS ver.18J を用い、各群間の差について一元配置分散分析および Tukey の検定を行った。

結果と考察

1) 細胞内活性酸素種

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 24 時間ばく露したときに生成される細胞内活性酸素種量について、蛍光試薬(H₂DCFDA)による染色を行い測定した結果を図 1-1 に示した。

AM および AM1000 における細胞内活性酸素種の生成量は対照群に比較して約 10 倍の高値であった($p < 0.001$)。なお、細胞内活性酸素種の生成量が共に上昇した AM と AM1000 において、両者間に統計学的な有意差は認められなかった。これに対して、AM1200 および AM1400 ばく露後の細胞内活性酸素種の生成量は対照群に比較して有意差は認められず、さらに、AM に比較して有意に低値であった($p < 0.001$)。他方、粉砕物の AM1000G や AM1200G では、ばく露後の細胞内活性酸素種の生成量も対照群に比較して変化がなく、また、AM に比較しても有意な低下が示された($p < 0.001$)。

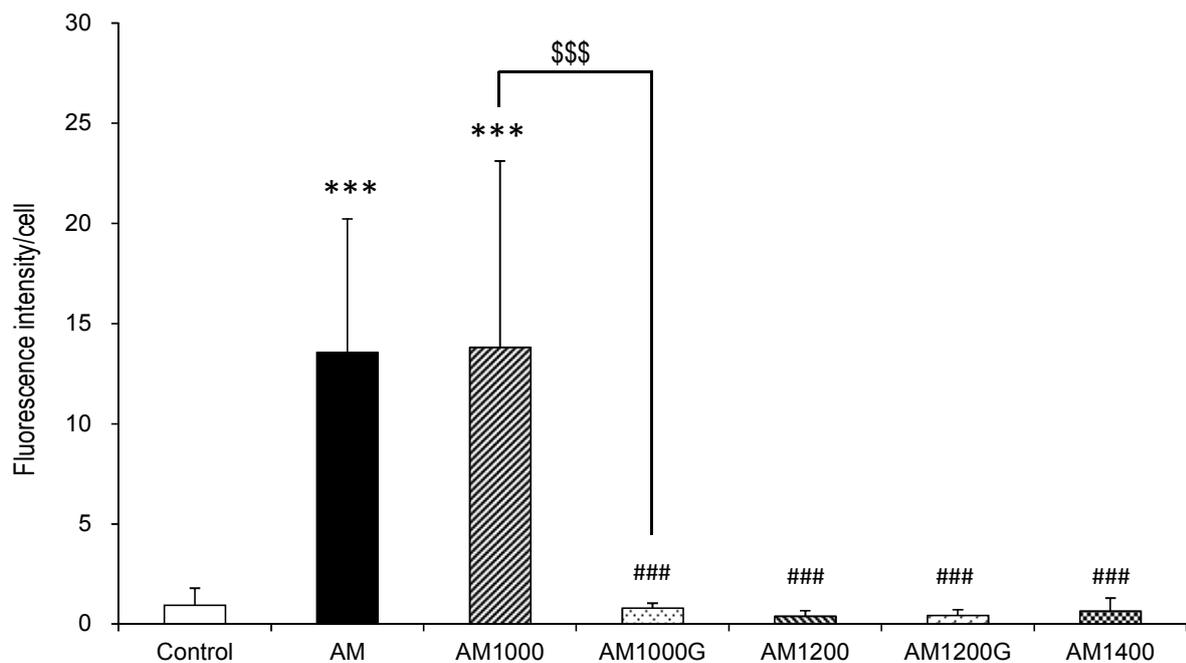


図 1-1 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 100 μ g/ml 添加 24 時間後の H₂DCFDA 染色による細胞内活性酸素種の比較

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000：\$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

2) 培養上清中 Tumor necrosis factor α (TNF- α)濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 50 μ g/ml を 24 時間ばく露したときの培養上清中の TNF- α 濃度を図 1-2 に示した。

AM と AM1000 の TNF- α 濃度は対照群に比較して、それぞれ約 2 倍と約 3.5 倍の高値に上昇した (AM, $p < 0.01$; AM1000, $p < 0.001$)。これに対して、AM1200 と AM1400 の TNF- α 濃度は、対照群に比較して変化は認められなかった。次に、焼成物の粉碎処理の効果について、AM1000G と AM1200G では、対照群に比較して TNF- α 濃度に変化は認められなかった。関連して、AM1000G の TNF- α 濃度は AM1000 に比較して有意に低値であった($p < 0.001$)。

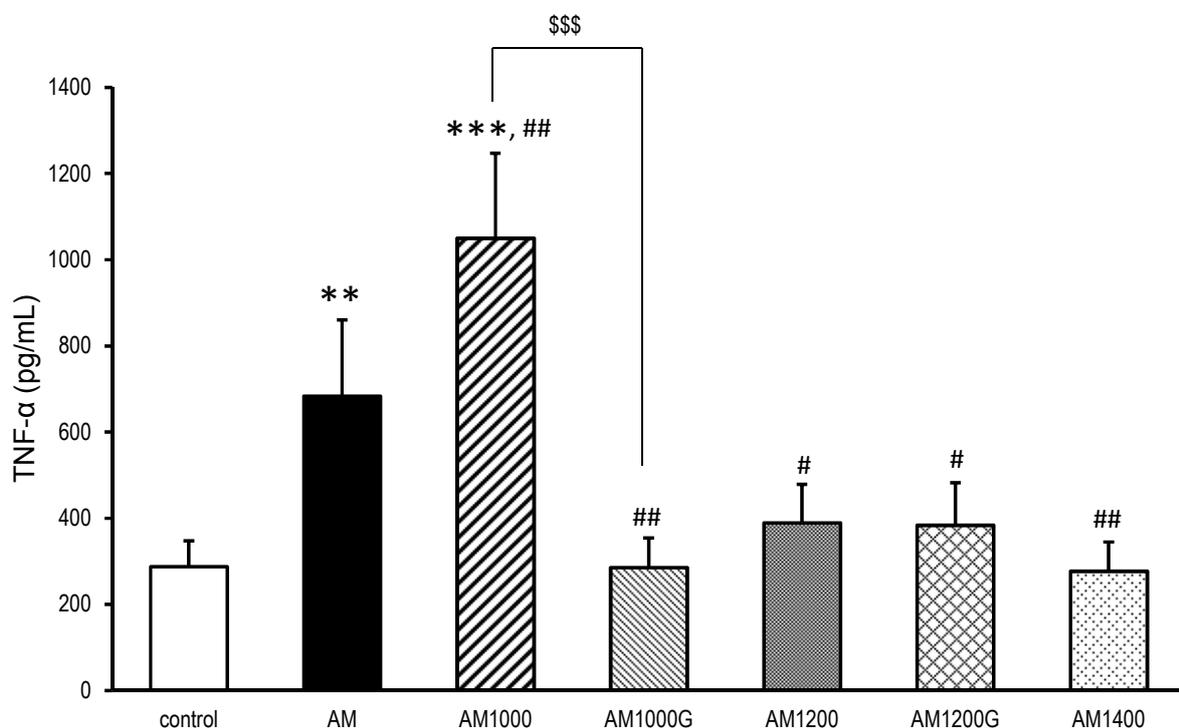


図 1-2 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 50 μ g/ml 添加 24 時間後における培養上清中の TNF- α 濃度の比較

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000 : \$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

(2) 結晶質シリカと酸化鉄

実験方法

1) 細胞

マウス・マクロファージ細胞株 (J774A.1) は ECACC (Cat. No. EC91051511) を用い、10% 牛胎児血清 (Lot.No. 68313101, MOREGATE, Australia & New Zealand) を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地 (Sigma-aldrich) にて継代培養した。

2) 結晶質シリカおよび酸化鉄の調整

精密天秤にて秤量したクリストバライト (CB)、トリジマイト (TR)、ヘマタイト (HM)、マグネタイト (MT) 試料はオートクレーブ滅菌後、乾燥機で十分に乾燥させた。次に、試料は、添加直前に超音波洗浄器にて 10 分間十分に分散させ、通常の継代培養に用いている培地に懸濁させながら添加した。

3) 細胞内活性酸素種の測定

J774A.1 細胞はラブテックチェンバースライドに 5×10^4 cells/well で播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 24 時間培養した。その後、細胞に CB、TR、HM、MT 試料を各々 $100 \mu\text{g/mL}$ となるように添加し、24 時間培養した。さらにばく露終了後、細胞は PBS で 2 回洗浄し、 H_2DCFDA とヘキスト 33342 を含むを含む DMEM (血清含まず) に置換し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 1 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄後、位相差および蛍光顕微鏡下で観察し、ランダムに数箇所を写真撮影した。位相差顕微鏡写真から一視野内の細胞数を求めた。WinRoof を用いて H_2DCFDA の蛍光量 (輝度) を求め活性酸素発生量とした。活性酸素発生量は各写真の細胞数および輝度を合計し、輝度を細胞数で除すことにより一細胞あたりの平均輝度を活性酸素発生量とした。

4) 培養上清中 $\text{TNF-}\alpha$ 濃度の測定

J774A.1 細胞を 9×10^3 cells/well となるように播種した。24 時間培養後、 $50 \mu\text{g/mL}$ となるように CB、TR、HM、MT 試料を添加した。さらに 24 時間培養し、フィルター濾過したものを 80°C で保存した。培養上清中の $\text{TNF-}\alpha$ は ELISA kit Mouse $\text{TNF-}\alpha$ (invitrogen) を用いて測定した。測定は 450nm の吸光度をプレートリーダーにて行い、解析ソフト WorkOut2.5 で検量線を求め、その検量線から培地上清中の $\text{TNF-}\alpha$ 濃度を求めた。

5) 統計処理

測定値の統計解析は、SPSS ver.18J を用い、各群間の差について一元配置分散分析および Tukey の検定を行った。

結果と考察

1) 細胞内活性酸素種

J774A.1 細胞に CB、TR、HM、MT をそれぞれ 24 時間ばく露したときに生成される細胞内活性酸素種について、蛍光試薬(H₂DCFDA)による染色の結果を図 1-3 に示した。さらに、細胞内活性酸素種量の測定結果を図 1-4 に示した。

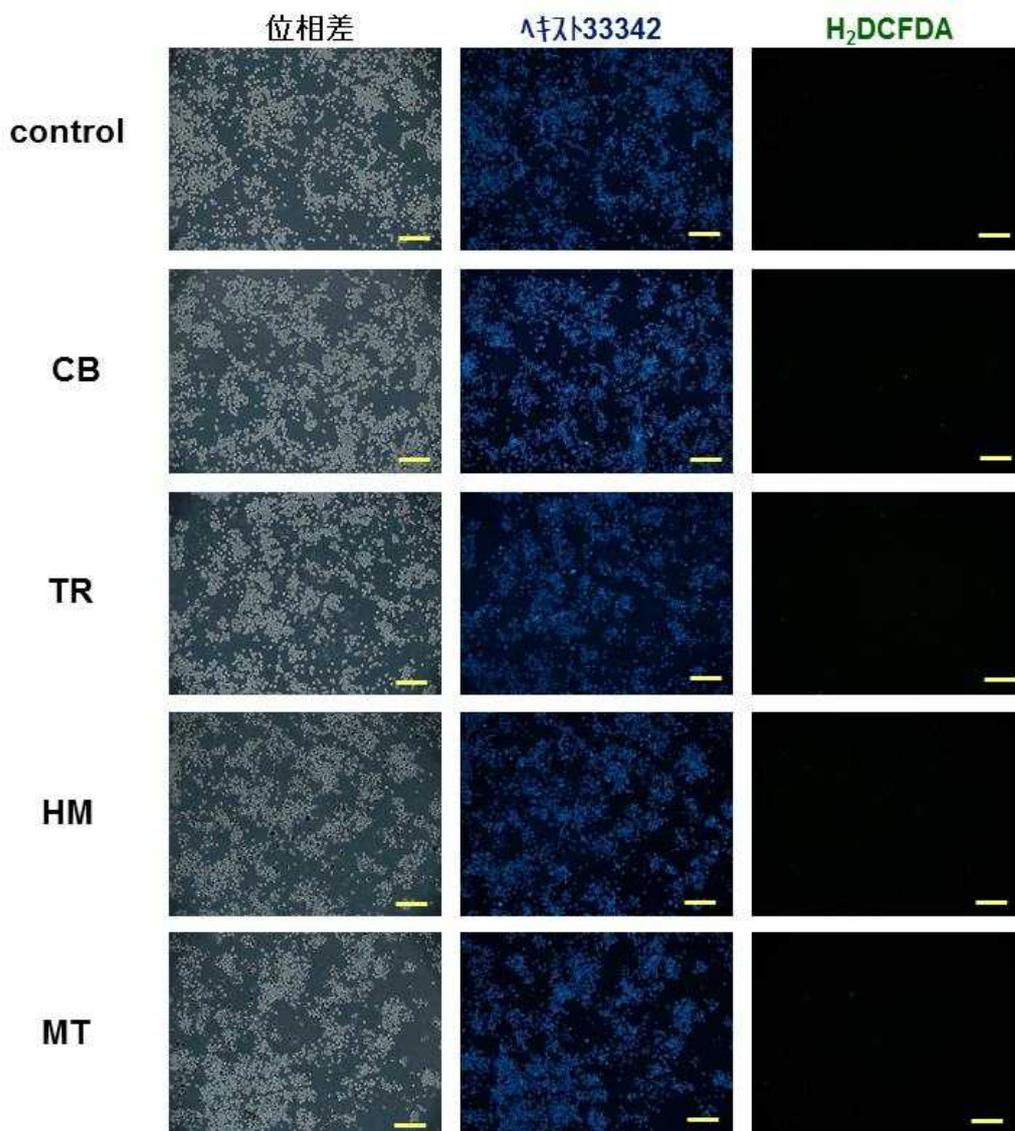


図 1-3 CB、TR、HM、MT をそれぞれ 100 μ g/ml 添加 24 時間後の H₂DCFDA 染色による細胞内活性酸素種の誘導について

Bar (—) = 100 μ m

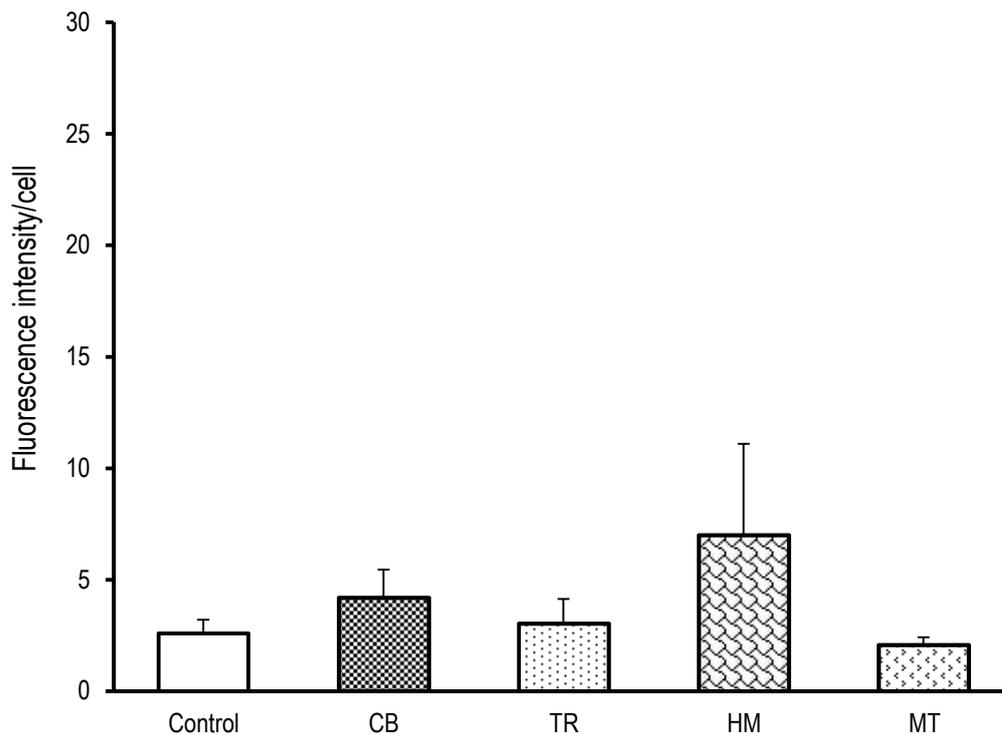


図 1-4 CB、TR、HM、MT をそれぞれ 100 μ g/ml 添加 24 時間後の H₂DCFDA 染色による細胞内活性酸素種の比較

結晶質シリカ (CB、TR) と酸化鉄 (HM、MT) をそれぞれ J774A.1 細胞に添加し 24 時間培養後における細胞内活性酸素種の誘導について観察した結果、明確な増加は認められなかった。一方、前述の通り、AM と AM1000 を 24 時間ばく露後、細胞内活性酸素種の生成量の明確な上昇が認められた。しかし AM1200 と AM1400 をばく露した細胞内の活性酸素種の生成量に明確な変化は認められず、すなわち、結晶質シリカと酸化鉄の結果は、AM1200 や AM1400 に類似することが明らかになった。

なお、結晶質シリカと酸化鉄では共通して細胞内活性酸素種の顕著な誘導は観察されなかったが、この分野の評価は重要であることから、今後、観察時間や投与量を加味した検証が必要であると考えられる。

2) 培養上清中 TNF- α 濃度

じん肺やがんにも関連し、炎症の初期反応で重要なサイトカインである TNF- α を指標として細胞毒性を評価した。

J774A.1 細胞に CB、TR、HM、MT 試料をそれぞれ 50 μ g/ml を添加し、24 時間ばく露後における培養上清中の TNF- α 濃度を図 1-5 に示した。

結晶質シリカ (CB、TR) および酸化鉄 (HM、MT) のいずれにおいても、対照群に比較して TNF- α 濃度に有意な変化は認められなかった。

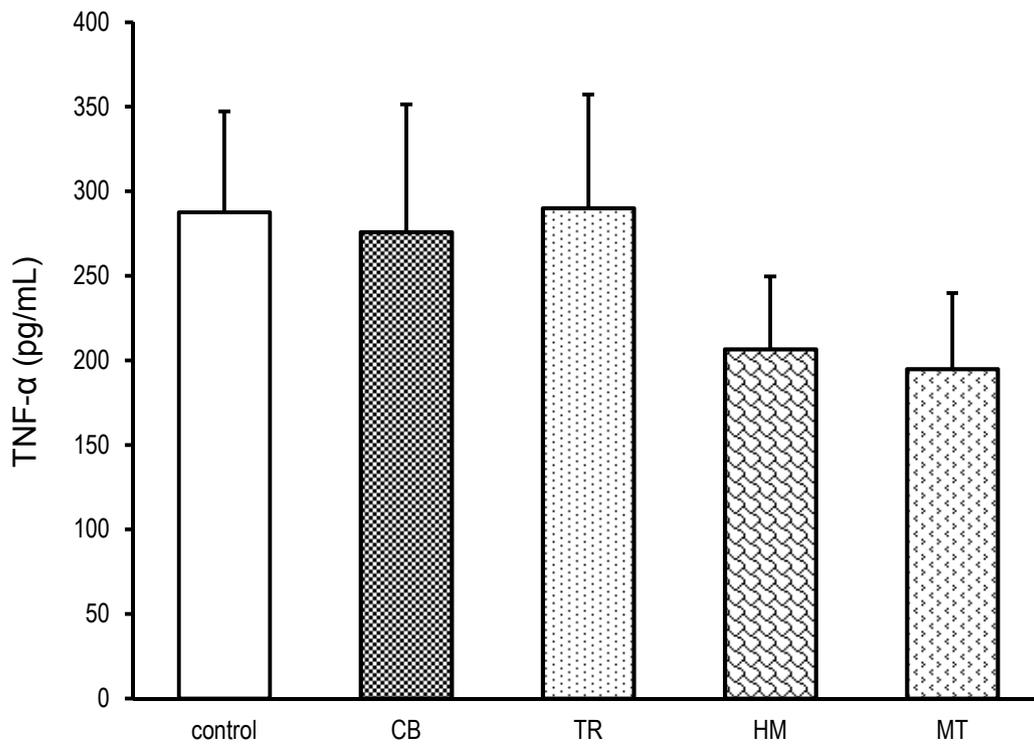


図 1-5 CB、TR、HM、MT をそれぞれ 50 μ g/ml 添加 24 時間後の培養上清中の TNF- α 濃度

小括

J774A.1 細胞に AM と AM1000 を 24 時間ばく露後、細胞内活性酸素種の生成が顕著に上昇を認められたが、AM1200 や AM1400 は細胞内の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 と AM1200G においても 24 時間ばく露後の細胞内活性酸素種の生成に変化を認めなかった。とくに、粉碎処理の効果において重要な AM1000G は、AM1000 に比較して細胞内活性酸素種の生成において有意な低下を明確に確認できた。

この研究において、結晶質シリカ (CB、TR)、酸化鉄 (HM、MT) については、J774A.1 細胞に 24 時間ばく露後における細胞内活性酸素種の生成量の有意な上昇を認めなかった。すなわち、この結果は、AM1200 や AM1400 等の組成に関連することから、細胞内の活性酸素種の生成に関する傾向が類似することを明らかにした。

じん肺や発がん性にも関連するため、炎症の初期反応で重要なサイトカインである TNF- α を指標として細胞毒性を評価した。J774A.1 細胞に AM と 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 における培養上清中の 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、結晶質シリカ (CB、TR)、酸化鉄 (HM、MT) については、24 時間ばく露後の培養上清中の TNF- α 濃度に有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、細胞への毒性は、試料の結晶構造よりも、アスベストに由来する見かけの繊維形状の残存が大きく影響する可能性が示唆された。

2. ラット気管内一回投与によるアモサイト、アモサイト焼成物、結晶質シリカ、酸化鉄の急性と慢性影響

(1) 急性影響

実験方法

1) 実験動物

Wistar 系雄ラット (Crj:WI、日本チャールスリバー) を使用した。動物はステンレス製金網ケージに 5 匹ずつ収容し、浄水器ろ過水道水、放射線滅菌飼料 (CE-2、日本クレア) を自由摂取させた。なお、酸化ストレス関連のマーカーの測定を実施したラットは、採血および採尿日の 3 日前から放射線滅菌高タンパク飼料 (Egg white diet; Dyets No.110952, Dyets Inc.) にて飼育した。

動物実験は北里大学医療衛生学部の動物飼育施設で実施した。飼育環境はセミバリア施設で 12hr/12hr 明暗、 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $55 \pm 5\% \text{RH}$ である。実験は北里大学の動物飼育管理委員会の規則及び承認のもとに実施された。

2) 被験試料の懸濁液調整

被験試料(AM、AM1000、AM1200、AM1400、AM1000G、AM1200G、CB、TR、HM、MT) は、投与前日に秤量した後、オートクレーブで 121°C 、20 分間滅菌、 37°C の乾燥器内で保存した。動物投与直前に試料を所定容量になるように生理食塩水に懸濁させ、超音波洗浄器で 10 分間分散処理を行った。

3) 気管内投与

ラット (10 週齢) に AM、AM1000、AM1200、AM1400、AM1000G、AM1200G をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与した。また AM 焼成物の結晶構造と生体影響との関連を検討するために、CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与した。対照群には、同様に生理食塩水 1ml を一回気管内投与した。さらに、生体影響の量反応関係を検討するため、AM、AM1000、AM1000G、AM1400 を被験試料として、ラット 1 匹あたり 0.1 と 0.5mg/ml をそれぞれ一回気管内投与し、 0.1 、 0.5 、 2mg/ml による評価を行った。

気管内投与は、ハロセン麻酔下 (ハロセン濃度 3.5% 、空気容量 4L/min) で、実体顕微鏡を用い咽喉頭部を観察しつつ気管ゾンデを気管支分岐部直上まで挿入し、一回の吸気時に被験試料の懸濁液を気管内に注入した。

動物の観察期間と屠殺日は、AM、AM1000、AM1200、AM1400、AM1000G、AM1200G の 2mg 投与群は 3、7、30 日目、CB、TR、HM、MT の 2mg 投与群は 3、7、30 日目、さらに、AM、AM1000、AM1000G、AM1400 の 0.1 と 0.5mg 投与群は 3、7、30 日目とした。

動物は一回気管内投与後 3、7、30 日目にソムノペンチルの腹腔内投与による深麻酔下で解

剖を行った。腹大静脈から採血後、肺および主要臓器を摘出した。酸化ストレス等の生化学検査を行う組織検体は、液体窒素で凍結後、 -80°C で保存した。また病理組織学的検索を行う組織検体は、4%パラホルムアルデヒド液で固定した。

解剖時に採取した血液（約4ml）は、チューブに入れ遮光し、室温で30分静置し、その後遠心分離を行った。血清は下記の分析に供するまで、 -80°C で凍結保存した。なお、採尿は、検査日前日にメタボリックケージ（Tecniplast）に個別に一晩収容し、遮光した採尿チューブで採尿し、 -80°C で凍結保存した。

4) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取

動物は一回気管内投与後3、7、30日目にソムノペンチルの腹腔内投与による深麻酔下で腹大静脈から採血後、腹大静脈を切断放血死させ、左肺気管支分岐部を結紮した。その後、気管にカテーテルを挿入し、右肺のみ生理食塩水5ml~8mlで2回洗浄してBALFを回収し液量を計測した。BALFの一部を下記の細胞分画検査に用い、残りは遠心後の上清を下記の分析に供するまで -80°C にて凍結保存した。

5) 病理組織学的検索

肺および主要臓器を4%パラホルムアルデヒド液に 4°C で一晩浸漬固定し、翌日から室温に戻して再固定した。病理標本は定法に従ってパラフィン包埋後、厚さ $3\mu\text{m}$ 以下に薄切しヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。さらに、肺の線維化を判定するためのMasson's trichrome等の特殊染色を行った。

6) 8-OHdG および iNOS の免疫組織染色

肺の酸化ストレスおよび窒化ストレスを評価するために、上記のパラフィン切片について、抗8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)モノクローナル抗体または抗inducible nitric oxide synthase (iNOS)ポリクローナル抗体を用い、Linked streptavidin-biotin (LSAB)法を用いて免疫組織染色を行った。

パラフィン切片は脱パラフィン後、オートクレーブを用いて 120°C で10分間の抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシターゼを不活化し、phosphate-buffered saline（以下、PBS）にて洗浄した。その後、スキムミルクで非特異反応ブロックを行い、再度PBSにて洗浄した。

一次抗体として、以下の抗体を使用した。8-OHdGに関しては、抗8-OHdGモノクローナル抗体MOG-020P（日本老化制御研究所）を希釈倍率1:100でスライドに添加後、 4°C で一晩のインキュベーションをした。iNOSに関しては、抗iNOSポリクローナル抗体ab15323(abcam)を希釈倍率1:100でスライドに添加後、 4°C で1時間のインキュベーションを行った。

PBSにて洗浄後、Biotin標識二次抗体（DAKO Japan）を添加し、室温でインキュベーションした。PBSにて洗浄後、StreptAB complex/HRP（DAKO Japan）にて処理した。さらに、PBSにて洗浄後、diaminobenzidine (DAB: DAKO Japan)で発色させた。核染色はMeyer's hematoxylinで行った。

7) BALF 中の細胞数、たんぱく濃度、LDH 濃度、サイトカイン濃度の測定

7-1) BALF 中の細胞分画

BALF の浮遊細胞数は自動血球計数装置 (Sysmex F-800、東亜医用電子) により計測した。細胞分画は、サイトスピン (Cytospin3、Shandon) を用いて標本を作製後、May-Grünwald-Giemsa 染色を行い、顕微鏡下で細胞を分別計数し、細胞分画 (%) を求めた。サイトスピン標本上で肺胞マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球に分別計数して求めた細胞分画 (%) に、自動血球計数装置で得られた総細胞数を乗じて各種炎症細胞数 (cells/ μ l) を計算した。

7-2) BALF 中のたんぱく濃度の測定

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) を用いて、BCA 法により肺胞洗浄液中のたんぱく濃度を測定した。標準物質として添付の Bovine serum albumin (BSA) を用いた。

7-3) BALF 中の LDH 濃度の測定

肺上皮の細胞傷害の程度を測定するため、Lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity detection Kit (Takara Bio) を用いて、肺胞洗浄液中の LDH 濃度を測定した。標準物質として、ブタ心臓由来 LDH (オリエンタル酵母) を用いた。

7-4) BALF 中のサイトカイン濃度の測定

BD OptEIA™ Set Rat IL-6、MCP-1 (BD Biosciences) および Rat TNF- α ELISA Kit (Thermo Scientific) を用いて BALF のサイトカイン濃度を測定した。BALF は、IL-6、TNF- α 測定時には希釈せず、MCP-1 測定時にその濃度に応じて Assay Diluent (BD Biosciences) により 1~200 倍に希釈した。

8) 血清中の生化学分析

8-1) 血清中サイトカイン濃度の測定

BD OptEIA™ Set Rat IL-6 および BD OptEIA™ Set Rat MCP-1 (BD Biosciences) を用いて血清中のサイトカイン濃度を測定した。測定に使用した血清は Assay Diluent (BD Biosciences) により希釈し、その倍率は、IL-6 測定時には 10 倍、MCP-1 測定時には 100 倍とした。

8-2) 血清中酸化ストレス度と抗酸化力の測定

気管内投与実験において、FRAS4 (DIACRON) を用いて、生体内の活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレス度 (derivative of reactive oxygen metabolites; d-ROMs) と抗酸化力 (biological antioxidant potential; BAP) を測定した。測定には、血清を用いた。

d-ROMs は、活性酸素やフリーラジカルにより生じる血中ヒドロペルオキシド濃度をクロモゲン試薬のラジカル陽イオンへの変化として測定した。10 μ l の血清を酢酸緩衝液と混合し

た後クロモゲン試薬入りのキュベットへ移し 505nm の吸光度で測定した。

BAP は、血中の抗酸化物質が三価鉄イオン塩とチオシアン酸塩の化合物を還元し、脱色する反応を測定した。着色した反応液に 10 μ l の血清を混合し、505nm の吸光度の経時的な変化を測定した。

8-3) 血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の測定

血清中 N-ERC/mesothelin 濃度は、6 μ l の血清を EIA buffer (1% BSA, 0.05% Tween20 in PBS) で 40 倍に希釈した後に、Rat N-ERC/mesothelin assay kit (Immuno-Biological Laboratories) を用いて測定した。

9) 尿中 NAG 濃度の測定

尿の測定項目は、クレアチニンおよび近位尿細管障害のマーカーである N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ (N-acetyl- β -D-Glucosaminidase ;NAG) の 2 項目である。尿中クレアチニン濃度はラボアッセイ クレアチニン (和光純薬) を用いて Jaffe 法で行った。NAG 濃度は NAG テスト (シオノギ製薬) を用いて、一定時間に分解される合成基質 (sodio-*m*-Cresolsulfonphthaleinylyl N-Acetyl- β -D-Glucosaminide) の生成物をマイクロプレートリーダー ARVO X4 (Perkin Elmer) にて測定した。NAG 濃度は尿中クレアチニン濃度で補正した。

10) 尿中 8-OHdG 濃度の測定

尿は遠心分離(10,000rpm \times 10min)し、上清を超純水で 4 倍希釈したのち、クロマトディスク (孔径 0.45 μ m) でろ過した。尿中 8-OHdG 濃度は、高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器(HPLC-ECD)装置を用いて測定した。本分析法では、2 台の HPLC を連結した。第一 HPLC は以下の通りである : pump (LC-10ADSP; 島津製作所), guard colomun (Inertsil ODS-3, 5 μ m, 4 x 10 mm, GL サイエンス), main column (TSK precolumn SW, 4.6 x 35mm, 東ソー)。UV Detector (UV 620; GL サイエンス)。分析条件は、流量 0.3ml/min、カラム温度 35 $^{\circ}$ C とした。第二 HPLC は以下の通りである : pump (PU 610; GL サイエンス), guard colomun (MG カートリッジ, 3 μ m, 4 x 20 mm, 資生堂), main column (CAPCELL PAK C18 MG S5, 資生堂)、ECD Detector (ED703 Pulse; GL サイエンス)。移動相にリン酸-8%メタノール緩衝液を使用した。8-OHdG は ECD により検出した。尿中 8-OHdG 濃度は尿中クレアチニン濃度により補正した。

11) 肺組織中の MCP-1 mRNA 発現量の測定

肺約 0.1g から RiboPureTM Kit (Life Technologies) を用いて抽出した RNA を基に High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies) を使って cDNA を合成した。Real-time PCR は TaqMan Gene Expression Assays(Life Technologies) を用いて StepOnePlus (Life Technologies) にて行った。各反応液は 20 μ l とし、18S rRNA を内在性コントロールとして比較 C_T法により MCP-1 の mRNA 発現量を測定した。

12) 統計処理

測定値の統計解析は、SPSS ver.18J を用い、各群間の差について一元配置分散分析および Tukey の検定もしくは Dunnett の検定などによって行った。

結果と考察

1) 病理組織学的検索

①肺の肉眼的所見

対照群の気管内投与後 3、7、30 日目の肺の肉眼的写真を図 2-1～図 2-3 に示した。

結晶質シリカについて、CB 群の投与後 3、7、30 日目の肺の肉眼的写真を図 2-4～2-6、TR 群の投与後 3、7、30 日目の肺の肉眼的写真を図 2-7～2-9 に示した。また酸化鉄について、HM 群の 3、7、30 日目の肺の肉眼的写真を図 2-10～2-12、MT 群の 3、7、30 日目の肺の肉眼的写真を図 2-13～2-15 に示した。

対照群

全観察期間を通じて、肺の表面はほぼ平滑で、赤色斑、白色斑等は認められず、ほぼ正常な外観を示していた。気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

CB 群

投与後 3 日目に肺の一部に点状出血斑や赤色斑が観察された。これらの変化は投与後 7 日目以降に回復傾向を示したが、投与後 30 日目まで赤色斑の残存が認められた。なお、投与後 30 日目まで気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

TR 群

投与後 3 日目に肺の一部に点状出血斑や赤色斑が観察された。これらの変化は投与後 7 日目以降に回復傾向を示したが、投与後 30 日目まで赤色斑の残存が認められた。なお、投与後 30 日目まで気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

HM 群

投与後 3 日目に肺の一部に赤色斑が観察された。これらの変化は投与後 7 日目以降回復傾向を示した。なお、投与後 30 日目まで気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

MT 群

黒色の投与粒子の肺内への沈着により肺全体の色調が黒ずんで観察された。投与後 3 日目に肺の一部に赤色斑が観察された。これらの変化は投与後 7 日目以降回復傾向を示した。なお、投与後 30 日目まで気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

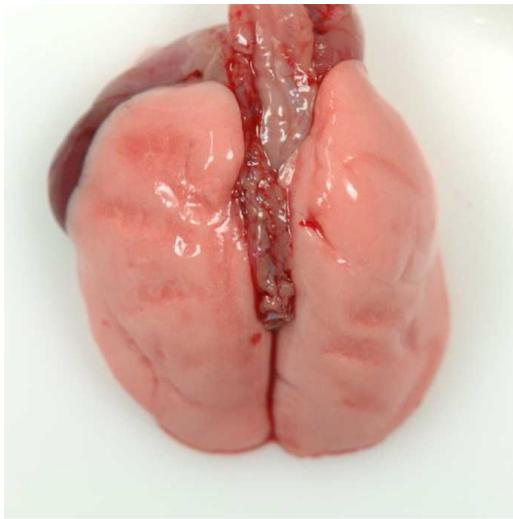


図 2-1 対照群、投与後 3 日目
(平成 21 年度報告書図 2-21 再掲)

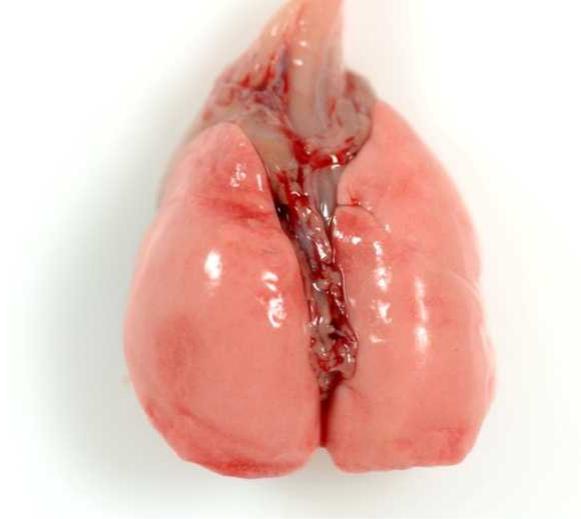


図 2-2 対照群、投与後 7 日目

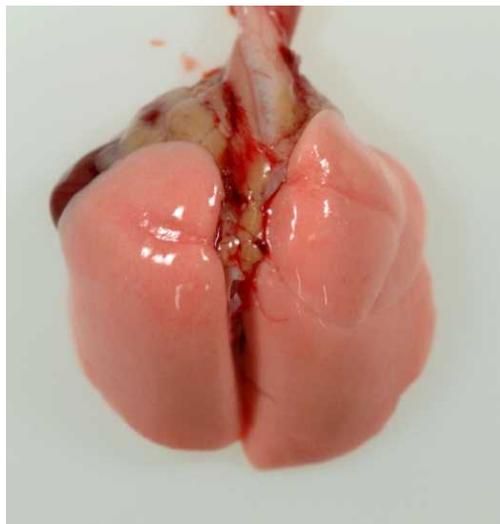


図 2-3 対照群、投与後 30 日目

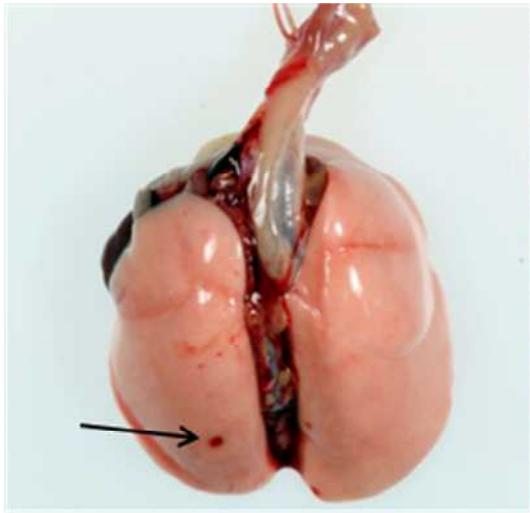


図 2-4 CB 群、投与後 3 日目
点状出血斑（矢印）を認めた。

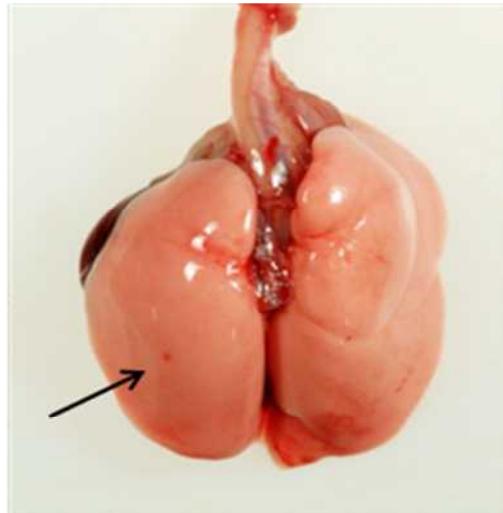


図 2-5 CB 群、投与後 7 日目
淡赤色斑（矢印）を認めた。

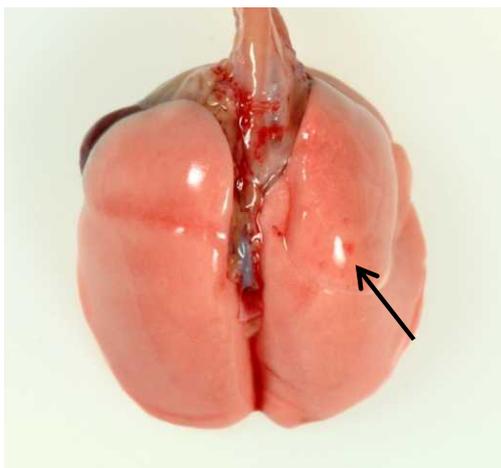


図 2-6 CB 群、投与後 30 日目
赤色斑（矢印）が認められた。

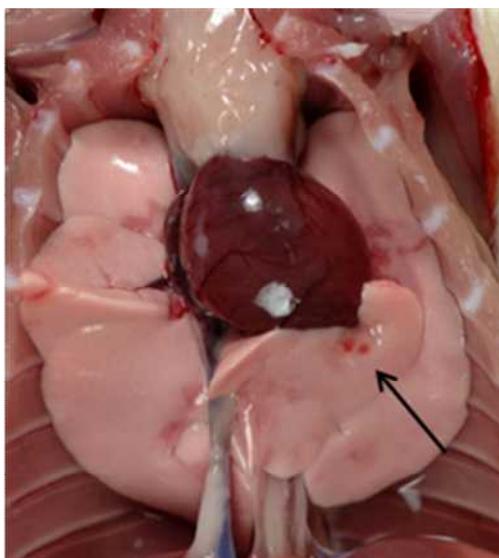


図 2-7 TR 群、投与後 3 日目
点状出血斑（矢印）や赤色斑が認められた。

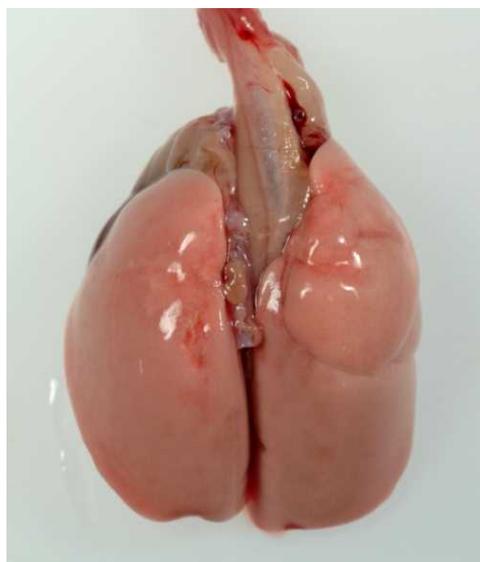


図 2-8 TR 群、投与後 7 日目

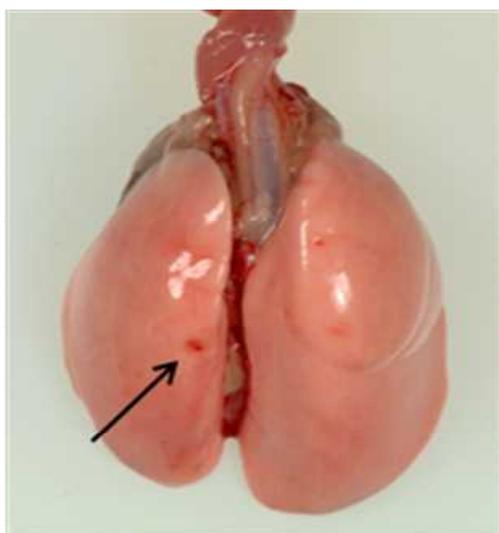


図 2-9 TR 群、投与後 30 日目
赤色斑（矢印）が認められた。

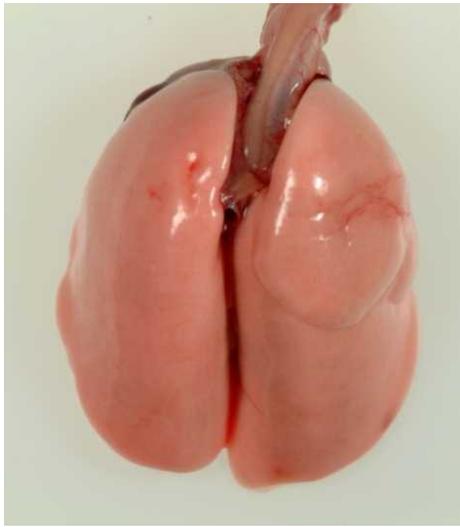


図 2-10 HM 群、投与後 3 日目



図 2-11 HM 群、投与後 7 日目

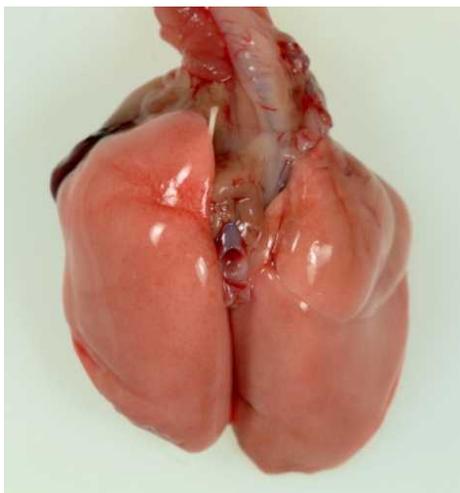


図 2-12 HM 群、投与後 30 日目

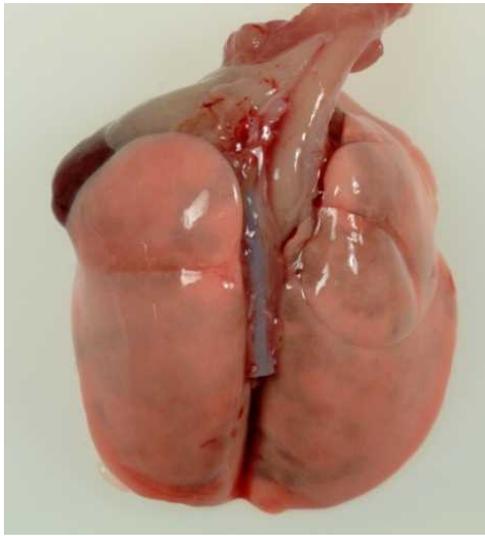


図 2-13 MT 群、投与後 3 日目

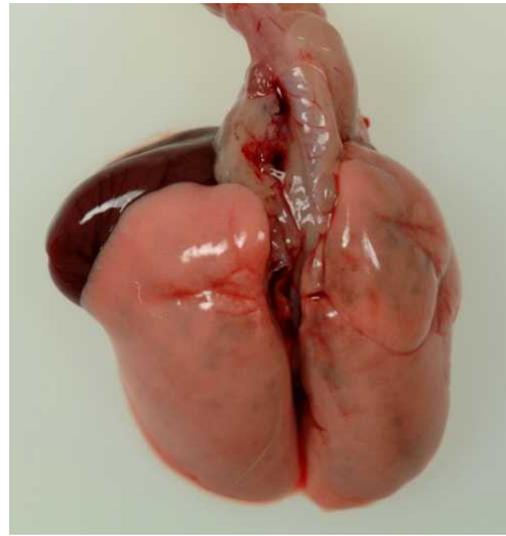


図 2-14 MT 群、投与後 7 日目

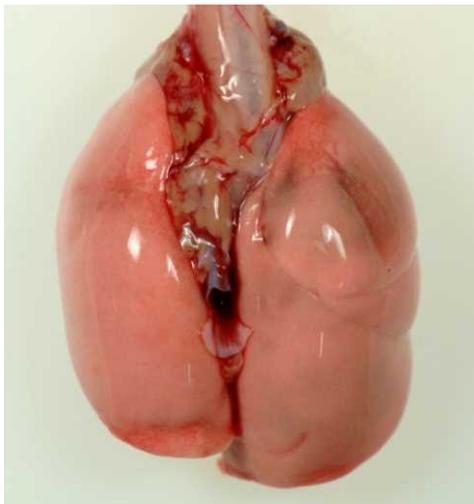


図 2-15 MT 群、投与後 30 日目

②病理組織学的所見

対照群の生理食塩水気管内投与後 7、30 日目の肺病理組織像を図 2-16-A, B に示した。結晶質シリカである CB および TR 群の気管内投与後 3、7、30 日目の肺病理組織像については、それぞれ、図 2-17-A～C および図 2-20-A～C に示した。酸化鉄シリカである HM および MT 群の気管内投与後 3、7、30 日目の肺病理組織像については、それぞれ、図 2-23-A～C、図 2-26-A～C に示した。

対照群：投与後 180 日目まで著変は認められなかった（図 2-16-A, B）。

CB 群：投与後 3 日目で細気管支、肺胞道から末梢の肺胞領域まで急性炎症反応が認められた（図 2-17-A）。炎症反応は投与後 30 日目まで持続して観察された（図 2-17-B, C）。また肺胞道および肺胞領域の一部で肉芽腫が認められた（図 2-17-D）。なお、投与後 30 日目の時点では明らかな線維化は認められなかった。

TR 群：CB 群と同様に、投与後 3 日目で細気管支、肺胞道から末梢の肺胞領域まで急性炎症反応が認められた（図 2-20-A）。投与後 7 日目以降も炎症反応は観察されたが、CB 群に比較して軽度であった（図 2-20-B, C）。なお、投与後 30 日目の時点では明らかな線維化は認められなかった。

HM 群：投与後 3 日目で肺胞領域の急性炎症反応が認められたが、結晶質シリカである CB および TR 群よりも炎症反応の程度は軽度であった（図 2-23-A）。投与後 7 日目においても炎症反応は観察されたが（図 2-23-B）、その後、回復傾向を示し、投与後 30 日目では炎症反応はごく軽度しか認められなかった（図 2-23-C）。なお、投与後 30 日目の時点では明らかな線維化は認められなかった。

MT 群：HM 群と同様に、投与後 3 日目で肺胞領域の急性炎症反応が認められたが、結晶質シリカである CB および TR 群よりも炎症反応の程度は軽度であった（図 2-26-A）。投与後 7 日目以降、炎症反応は回復傾向を示し、投与後 30 日目では炎症反応はごく軽度しか認められなかった（図 2-26-B, C）。なお、投与後 30 日目の時点では明らかな線維化は認められなかった。

③肺組織における 8-OHdG の局在

結晶質シリカと酸化鉄について、気管内投与後の肺組織における酸化的 DNA 損傷の経時的変化を酸化的 DNA 損傷のバイオマーカーである 8-OHdG の免疫組織染色により比較して評価した。

対照群：気道上皮（気管支上皮と肺胞上皮）および炎症細胞において 8-OHdG は陽性ではなかった（図 2-16-C）。

CB 群：投与後 3 日目以降、炎症反応に伴って気道上皮細胞およびマクロファージ、好中球等の炎症細胞で 8-OHdG の生成が顕著に認められた（図 2-18-A、B）。投与後 30 日目においても気道上皮および炎症細胞における 8-OHdG の生成が持続しており、肉芽腫内の細胞においても 8-OHdG の生成が認められた（図 2-18-C）。

TR 群：CB 群と同様に、投与後 3 日目以降、炎症反応に伴って気道上皮およびマクロファージ、好中球等の炎症細胞で 8-OHdG の生成が顕著に認められた（図 2-21-A）。投与後 30 日目まで気道上皮および炎症細胞における 8-OHdG の生成が持続していた（図 2-21-B、C）。

HM 群：投与後 3 日目および 7 日目で、炎症反応に伴って気道上皮およびマクロファージ、好中球等の炎症細胞で 8-OHdG の生成が認められた（図 2-24-A、B）。しかし、結晶質シリカ（CB と TR）と異なり、投与後 30 日目では炎症反応の回復に伴い、8-OHdG 陽性細胞が減少していた（図 2-24-C）。

MT 群：投与後 3 日目で炎症反応に伴って気道上皮およびマクロファージ、好中球等の炎症細胞で 8-OHdG の生成が認められた（図 2-27-A）。しかし、結晶質シリカ（CB と TR）と異なり、投与後 7 日目以降、炎症反応の回復に伴い、8-OHdG の生成も回復傾向を示した（図 2-27-B、C）。

④肺組織における iNOS の局在

結晶質シリカと酸化鉄について、気管内投与後の肺組織におけるニトロ化ストレスについて、iNOS の免疫組織染色により比較して評価した。

対照群： iNOS の発現は、細気管支上皮の細胞質に軽度みられた。一方、好中球では発現が認められたが、肺胞マクロファージでの発現はほとんどみられなかった（図 2-16-D）。

CB 群：投与後 3 日目以降、炎症反応に伴い動員されたマクロファージや好中球で iNOS の発現が認められた（図 2-19-A、B）。投与後 30 日目においてもマクロファージにおける iNOS の発現は持続しており、肉芽腫内の単球-マクロファージ系細胞においても iNOS の発現が認められた（図 2-19-C）。

TR 群：CB 群と同様に、投与後 3 日目以降、マクロファージや好中球で iNOS の発現が認められた（図 2-22-A、B）。投与後 30 日目においてもマクロファージにおける iNOS の発現は持続していた（図 2-22-C）。

HM 群：投与後 3 日目以降、マクロファージや好中球で iNOS の発現が認められた（図 2-25-A、B）。しかし、炎症反応の回復に伴い、投与後 30 日目の時点では iNOS 陽性細胞は減少していた（図 2-25-C）。

MT 群：HM 群と同様に、投与後 3 日目以降、マクロファージや好中球で iNOS の発現が認められた（図 2-28-A、B）。しかし、炎症反応の回復に伴い、投与後 30 日目の時点では iNOS 陽性細胞は減少していた（図 2-28-C）。

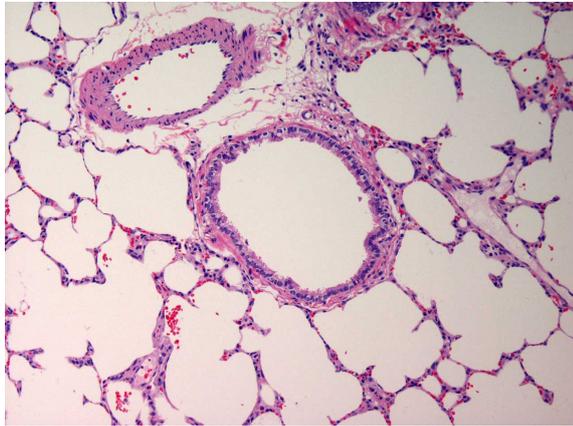


図 2-16-A 对照群、投与後 7 日目、
肺、HE 染色
(平成 21 年度報告書 図 2-33-A 再掲)

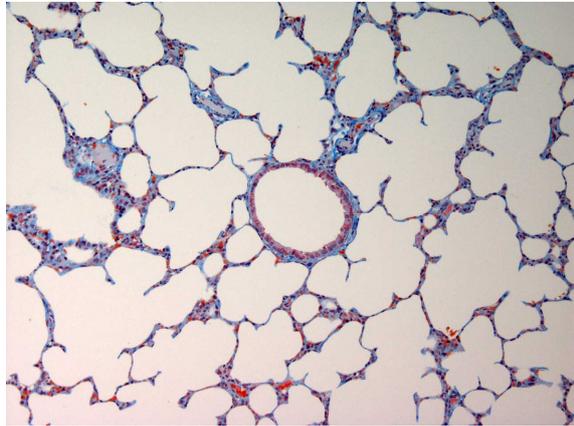


図 2-16-B 对照群、投与後 30 日目、
肺、Masson's trichrome 染色
(平成 21 年度報告書 図 2-33-B 再掲)

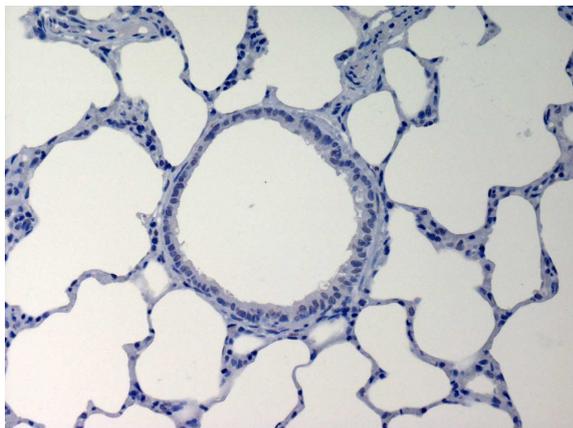


図 2-16-C 对照群、投与後 30 日目、
肺、8-OHdG 染色
(平成 21 年度報告書 図 2-33-C 再掲)

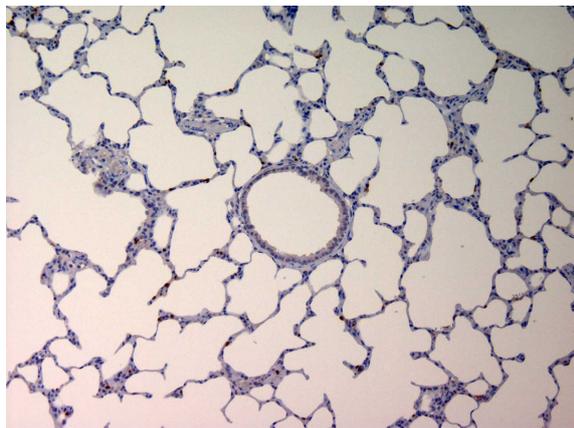


図 2-16-D 对照群、投与後 30 日目、
肺、iNOS 染色
(平成 21 年度報告書 図 2-33-D 再掲)

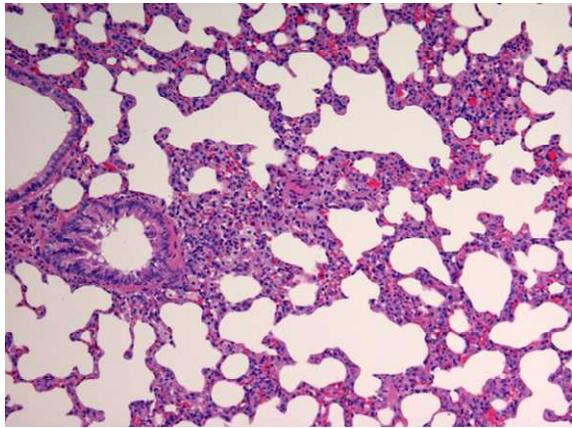


図 2-17-A CB 群、投与後 3 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域に広がる炎症が認められた。

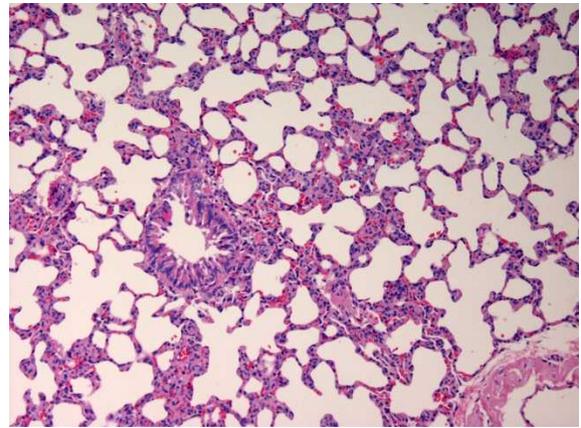


図 2-17-B CB 群、投与後 7 日目、
肺、HE 染色
炎症反応が持続していた。

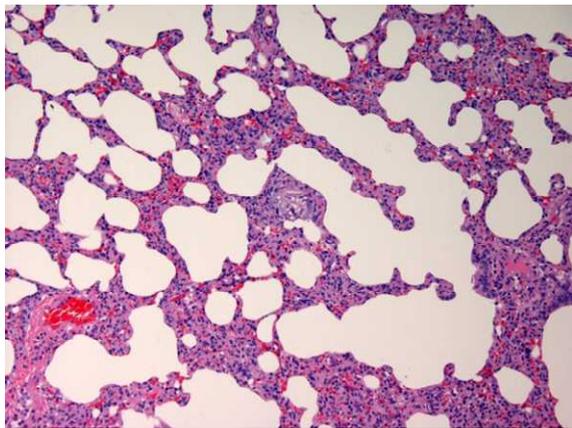


図 2-17-C CB 群、投与後 30 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域の炎症が持続していた。

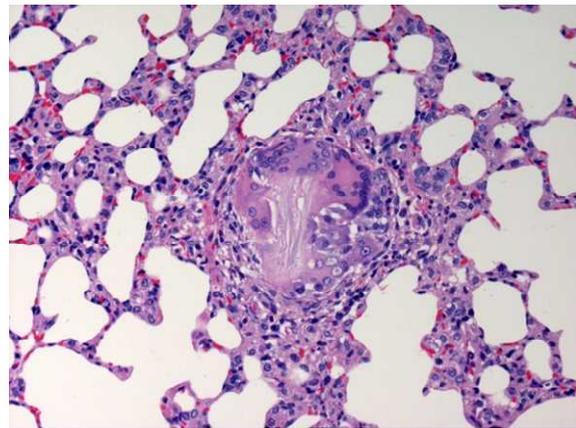


図 2-17-D CB 群、投与後 30 日目、
肺、HE 染色
肉芽腫の形成が認められた。

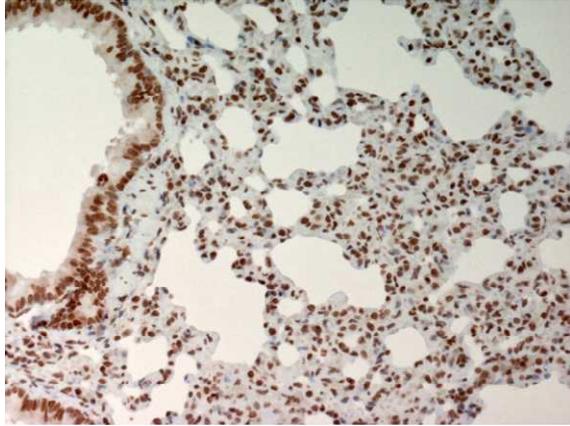


図 2-18-A CB 群、投与後 3 日目、
肺、8-OHdG 染色
細気管支上皮および炎症細胞で 8-OHdG の
生成（細胞の核が褐色）が認められた。

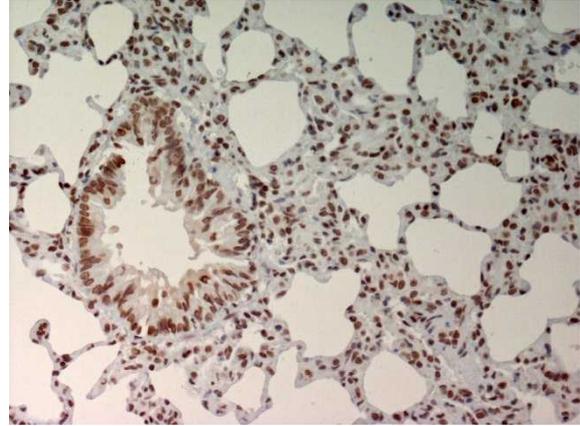


図 2-18-B CB 群、投与後 7 日目、
肺、8-OHdG 染色
8-OHdG の生成が持続していた。

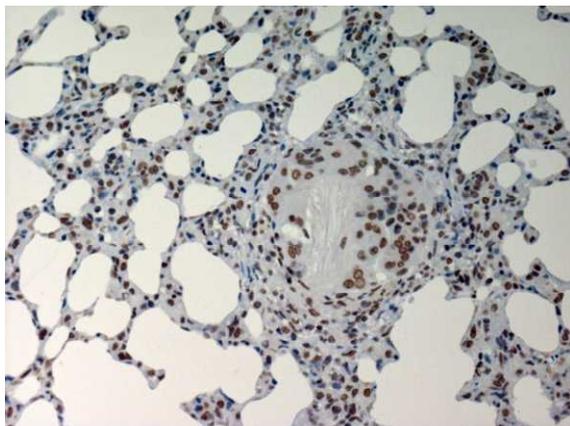


図 2-18-C CB 群、投与後 30 日目、
肺、8-OHdG 染色
肉芽腫内の細胞で 8-OHdG の生成が認められた。

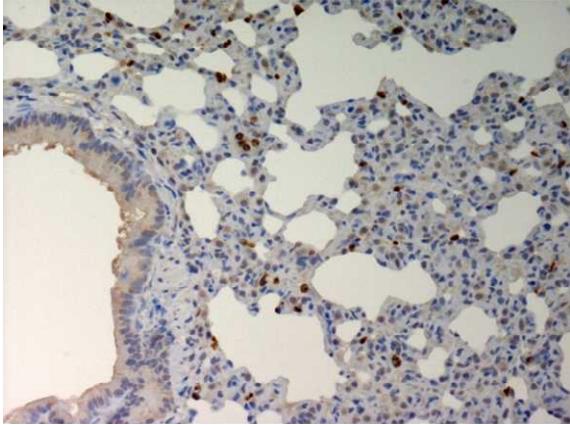


図 2-19-A CB 群、投与後 3 日目、
肺、iNOS 染色
マクロファージなどの炎症細胞の細胞質に
iNOS の発現（褐色）が認められた。

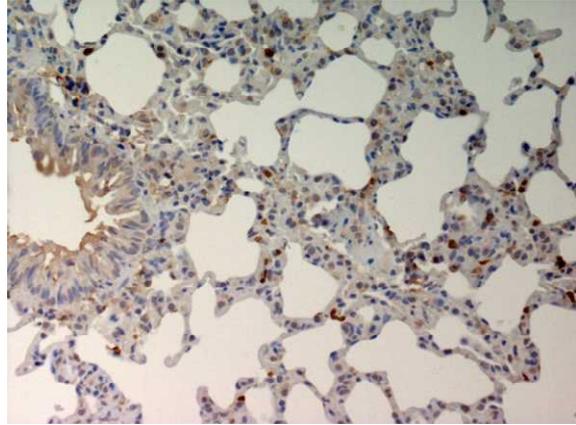


図 2-19-B CB 群、投与後 7 日目、
肺、iNOS 染色

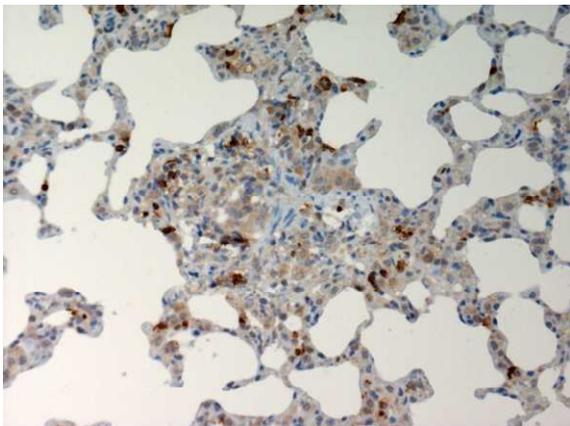


図 2-19-C CB 群、投与後 30 日目、
肺、iNOS 染色
肉芽腫内の炎症細胞の細胞質に iNOS の
発現が認められた。

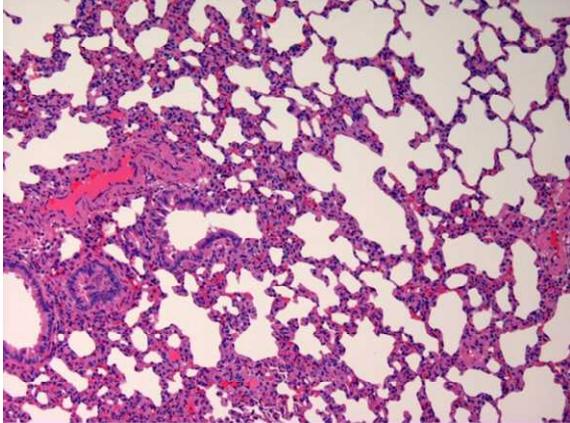


図 2-20-A TR 群、投与後 3 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域に広がる炎症反応が観察された。

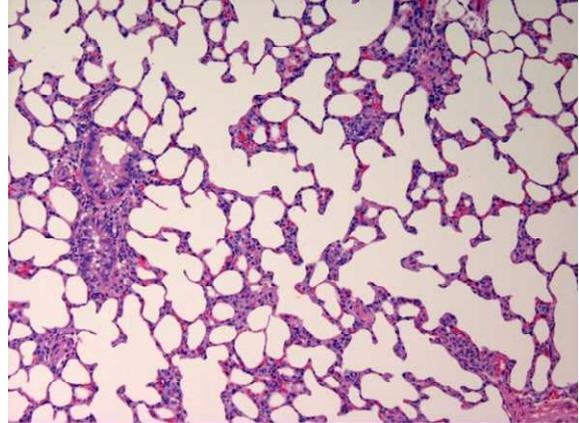


図 2-20-B TR 群、投与後 7 日目、
肺、HE 染色

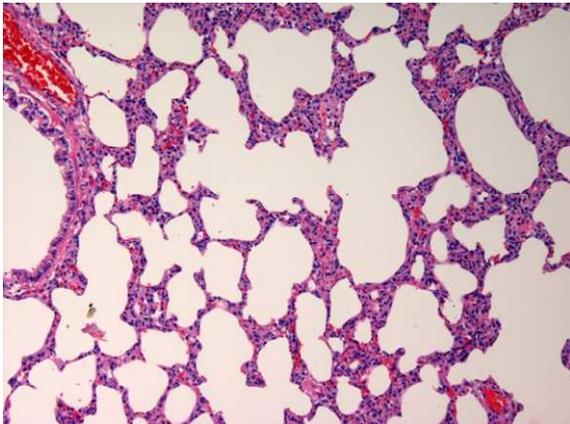


図 2-20-C TR 群、投与後 30 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域の炎症反応が持続していた。

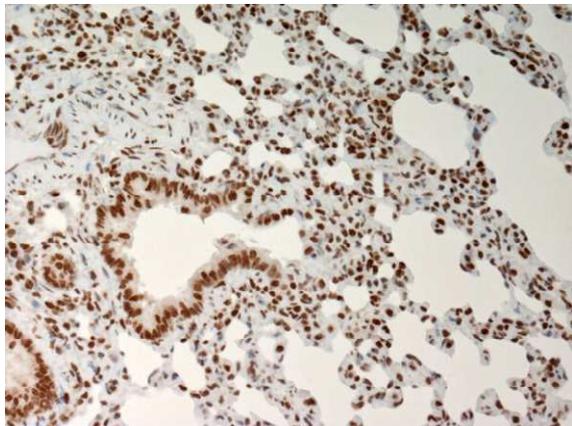


図 2-21-A TR 群、投与後 3 日目、
肺、8-OHdG 染色
細気管支上皮および炎症細胞で 8-OHdG の
生成（細胞の核が褐色）が認められた。

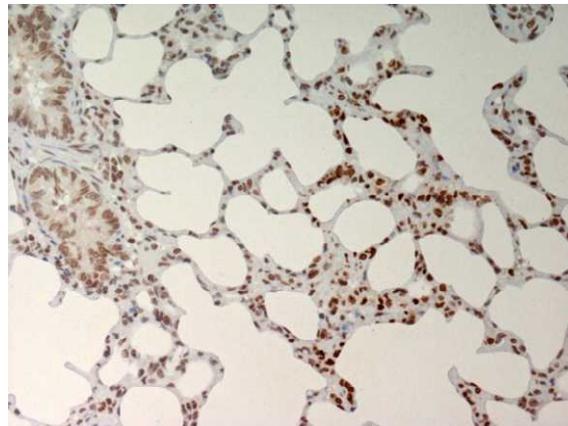


図 2-21-B TR 群、投与後 7 日目、
肺、8-OHdG 染色
8-OHdG の生成が持続していた。

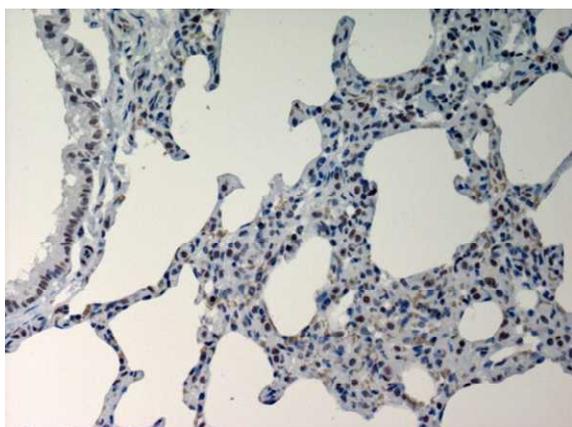


図 2-21-C TR 群、投与後 30 日目、
肺、8-OHdG 染色
8-OHdG の生成が持続していた。

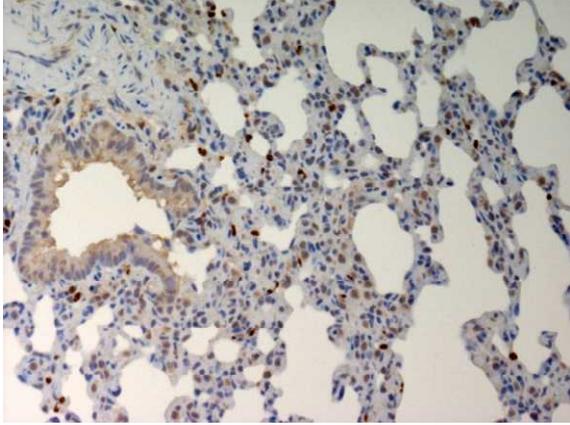


図 2-22-A TR 群、投与後 3 日目、
肺、iNOS 染色
炎症細胞でも iNOS の発現が認められた。

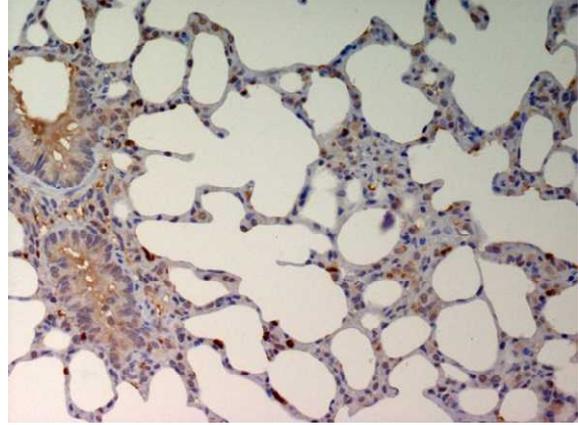


図 2-22-B TR 群、投与後 7 日目、
肺、iNOS 染色

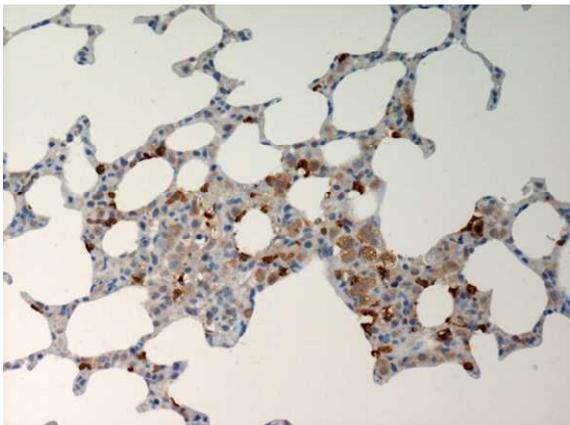


図 2-22-C TR 群、投与後 30 日目、
肺、iNOS 染色
肺胞領域のマクロファージを中心とした
炎症細胞で iNOS の発現が認められた。

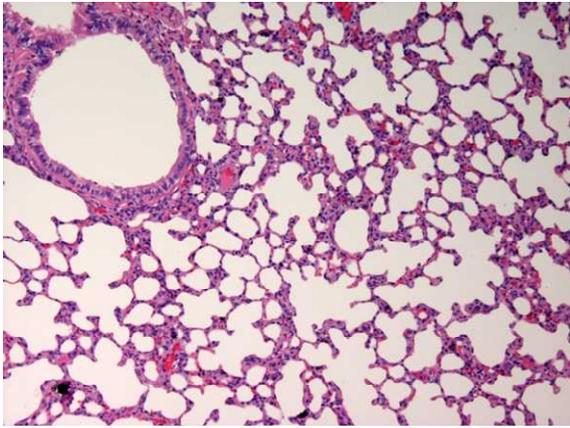


図 2-23-A HM 群、投与後 3 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域に軽度の炎症反応が観察された。

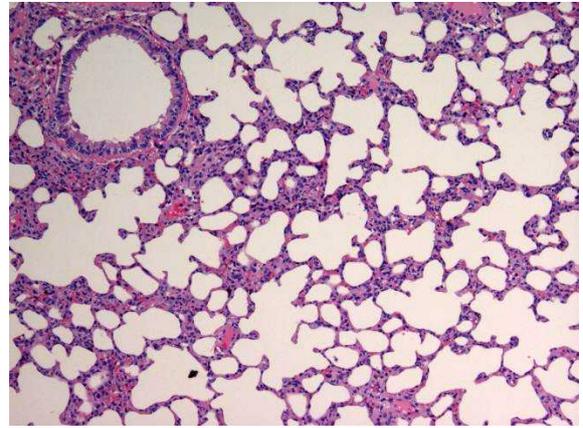


図 2-23-B HM 群、投与後 7 日目、
肺、HE 染色

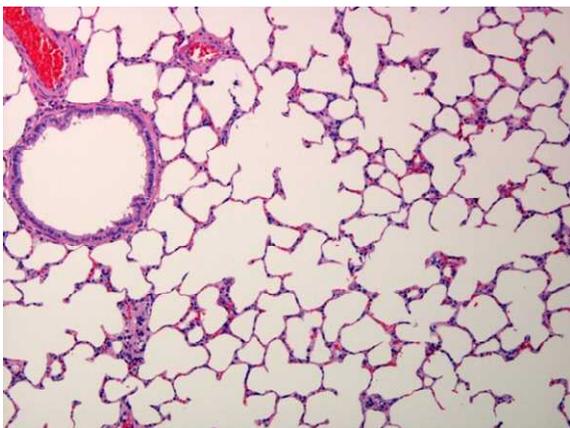


図 2-23-C HM 群、投与後 30 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域の炎症は回復していた。

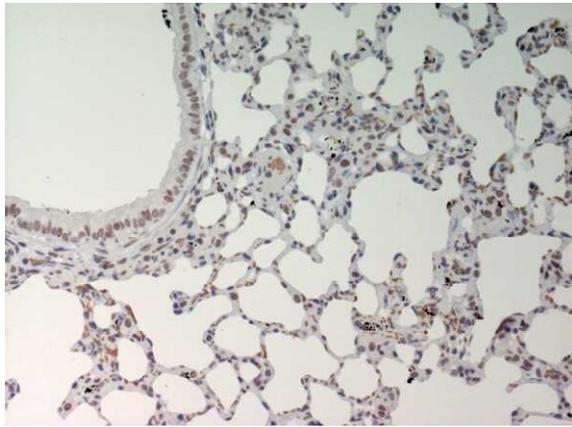


図 2-24-A HM 群、投与後 3 日目、
肺、8-OHdG 染色
気道上皮および炎症細胞で 8-OHdG の生成が
認められた。

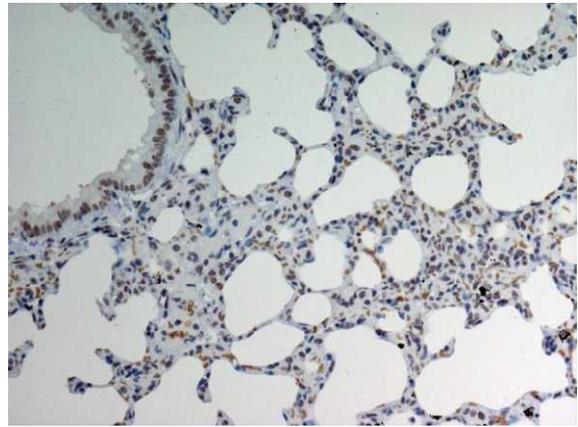


図 2-24-B HM 群、投与後 7 日目、
肺、8-OHdG 染色

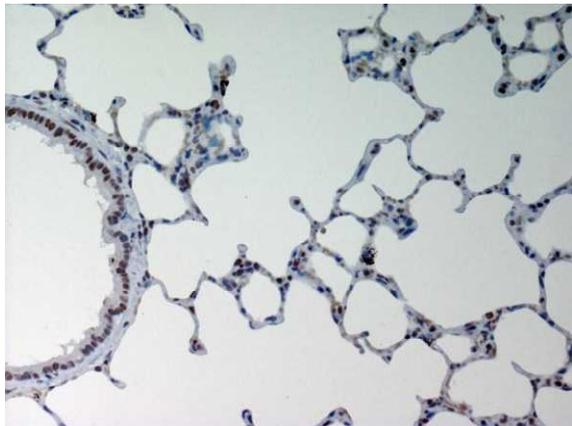


図 2-24-C HM 群、投与後 30 日目、
肺、8-OHdG 染色
8-OHdG の生成は軽減していた。

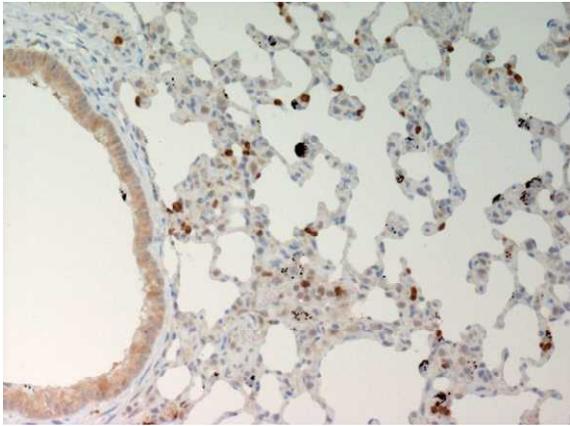


図 2-25-A HM 群、投与後 3 日目、
肺、iNOS 染色
炎症細胞においても iNOS の発現を認めた。

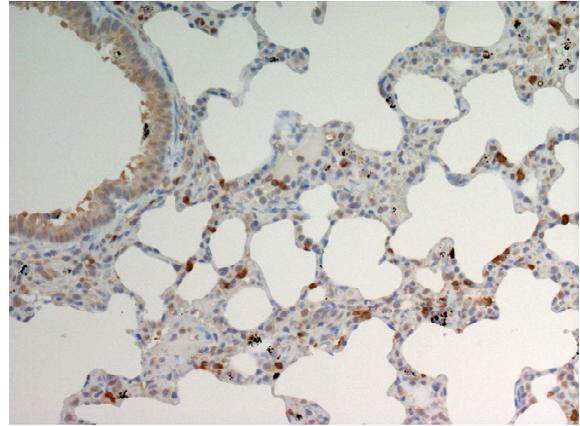


図 2-25-B HM 群、投与後 7 日目、
肺、iNOS 染色

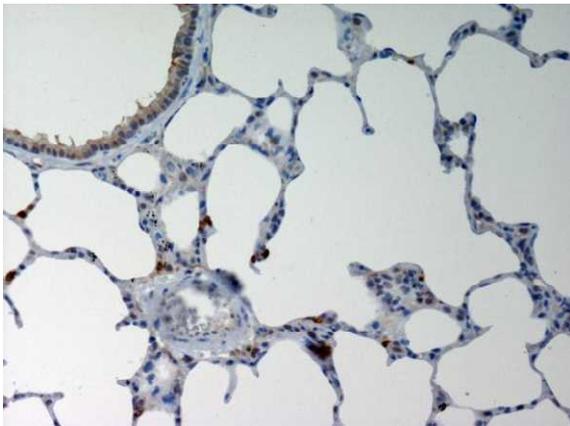


図 2-25-C HM 群、投与後 30 日目、
肺、iNOS 染色
肺胞領域の iNOS 陽性細胞は減少していた。

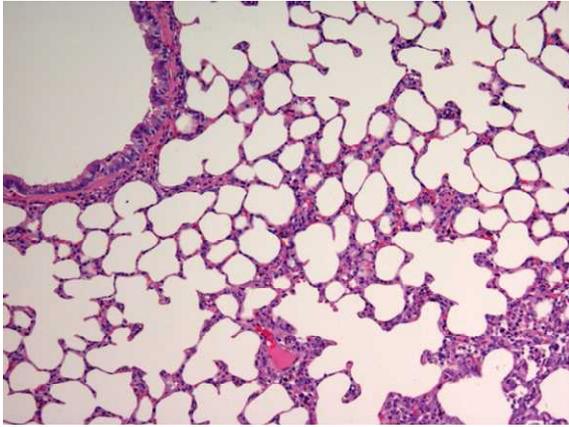


図 2-26-A MT 群、投与後 3 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域での炎症が観察された。

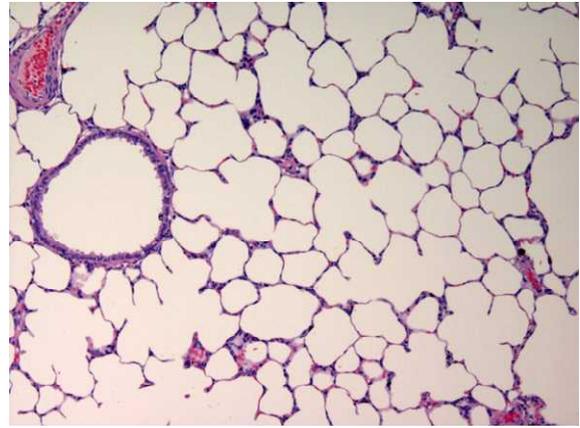


図 2-26-B MT 群、投与後 7 日目、
肺、HE 染色

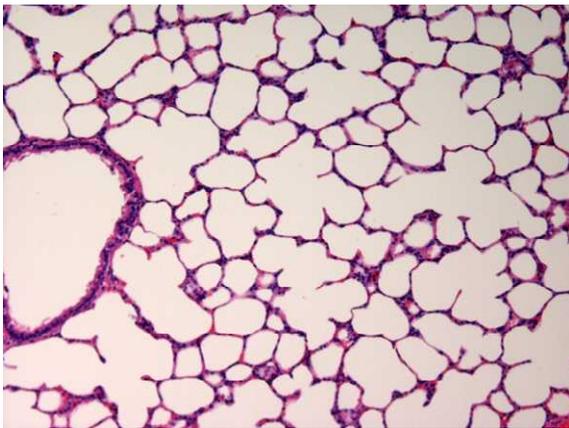


図 2-26-C MT 群、投与後 30 日目、
肺、HE 染色
肺胞領域の炎症は回復していた。

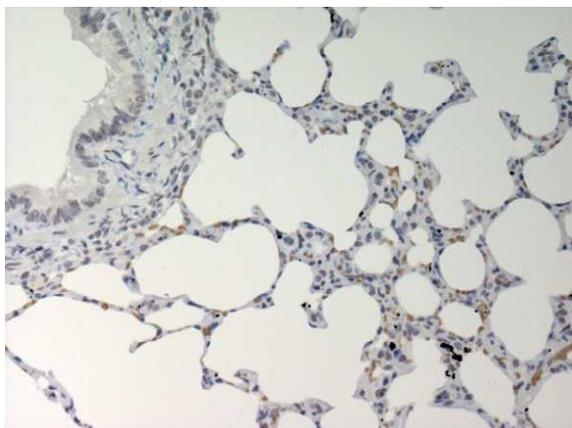


図 2-27-A MT 群、投与後 3 日目、
肺、8-OHdG 染色
炎症細胞で 8-OHdG の生成が軽度認められた。

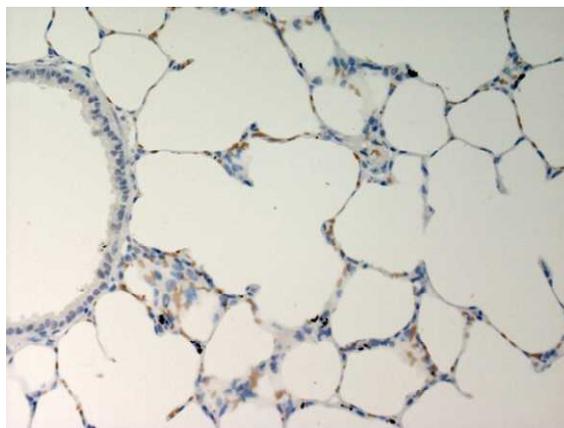


図 2-27-B MT 群、投与後 7 日目、
肺、8-OHdG 染色

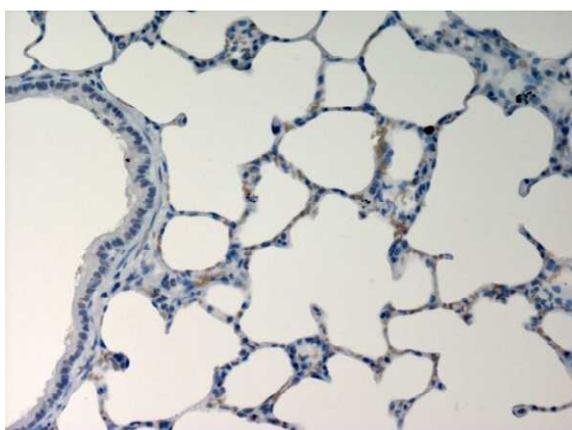


図 2-27-C MT 群、投与後 30 日目、
肺、8-OHdG 染色
8-OHdG の生成は軽減していた。

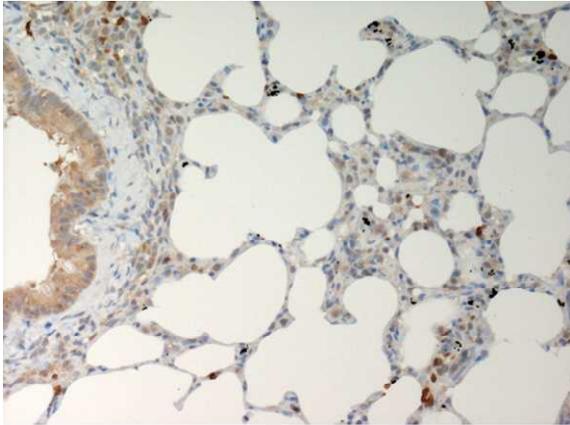


図 2-28-A MT 群、投与後 3 日目、
肺、iNOS 染色
炎症細胞でも iNOS の発現が認められた。

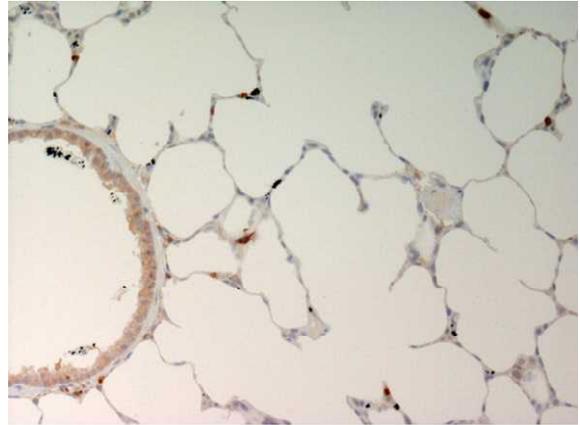


図 2-28-B MT 群、投与後 7 日目、
肺、iNOS 染色

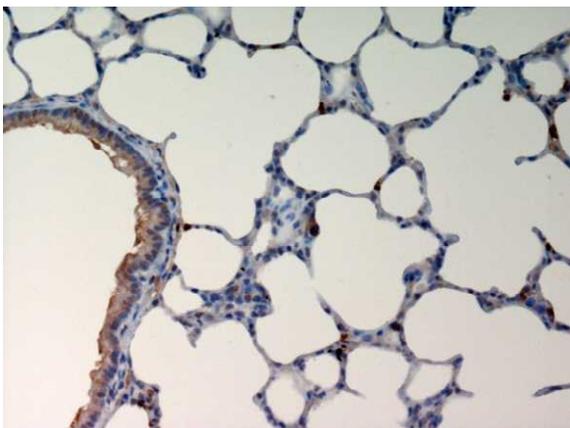


図 2-28-C MT 群、投与後 30 日目、
肺、iNOS 染色
肺胞領域の iNOS 陽性細胞は減少していた。

病理組織学的検索から得られた結果について：

結晶質シリカ(CB と TR)では、投与後 3 日目で肺胞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 の生成が認められた。CB と TR ともに、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。しかし、CB と 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(HM と MT)では、投与後 3 日目で肺胞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 の生成が認められた。これらの炎症反応は CB と TR よりもやや軽度であった。HM と 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。

平成 21 年および 22 年度報告書に示すとおり、AM 焼成物のうち最も呼吸器影響が軽減されていた AM1000G の結晶構造は酸化鉄(HM と MT)のみで結晶質シリカ(CB と TR)が生成されていないのに対し、経時的に炎症が進展した AM1400 では酸化鉄に加えて CB と TR も生成されていた。すなわち、AM 焼成物の結晶構成成分のうち、結晶質シリカの方が酸化鉄よりも呼吸器影響に関与している可能性が示唆された。

2) 気管支肺胞洗浄液 Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) の細胞分画

①BALF 中炎症細胞数の変化

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および結晶質シリカ (CB と TR) と酸化鉄 (HM と MT) について、それぞれを 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの BALF 中の細胞分画について図 2-29~32 に示した。

投与後 3、7、30 日目の急性期間、炎症細胞数の変化は AM 及び AM 焼成物に比較して結晶質シリカと酸化鉄の方が共通してやや軽減されている傾向が示された (図 2-29)。このうち、好中球数の特異的に変化が AM 焼成物の一部で観察された。

投与後 3 日目では AM と AM1000、AM1400 が対照群に比較して好中球数が約 30-50 倍に上昇し、特に、AM1000 で顕著な変化を示した ($p < 0.001$)。これに対して、AM1000 を軽度粉砕した AM1000G では、炎症反応の指標である好中球数の増加は認められなかった (図 2-30)。なお、結晶質シリカは酸化鉄に比較して好中球数がやや上昇する傾向が認められた (図 2-30)。

好中球数は投与後の時間の経過に従い減少傾向を示したが、AM1400 のみが顕著な上昇を示し、対投与後 7 日目で対照群に比較して約 100 倍の高値であった ($p < 0.001$)。しかし、この時期の AM と AM1000 に顕著な変動は見られなかった (図 2-31)。さらに、投与後 30 日目では、AM1400 の好中球数はより顕著に上昇し、また、結晶質シリカ (CB と TR) も対照群に比較して約 50、25 倍の高値を示した ($p < 0.001$, $p < 0.05$) (図 2-32)。しかし、酸化鉄 (HM と MT) にこの傾向は認められなかった。投与後 30 日目において、AM1000 の好中球数はやや上昇傾向にあったが、その粉砕物の AM1000G に変化は認められなかった (図 2-32)。

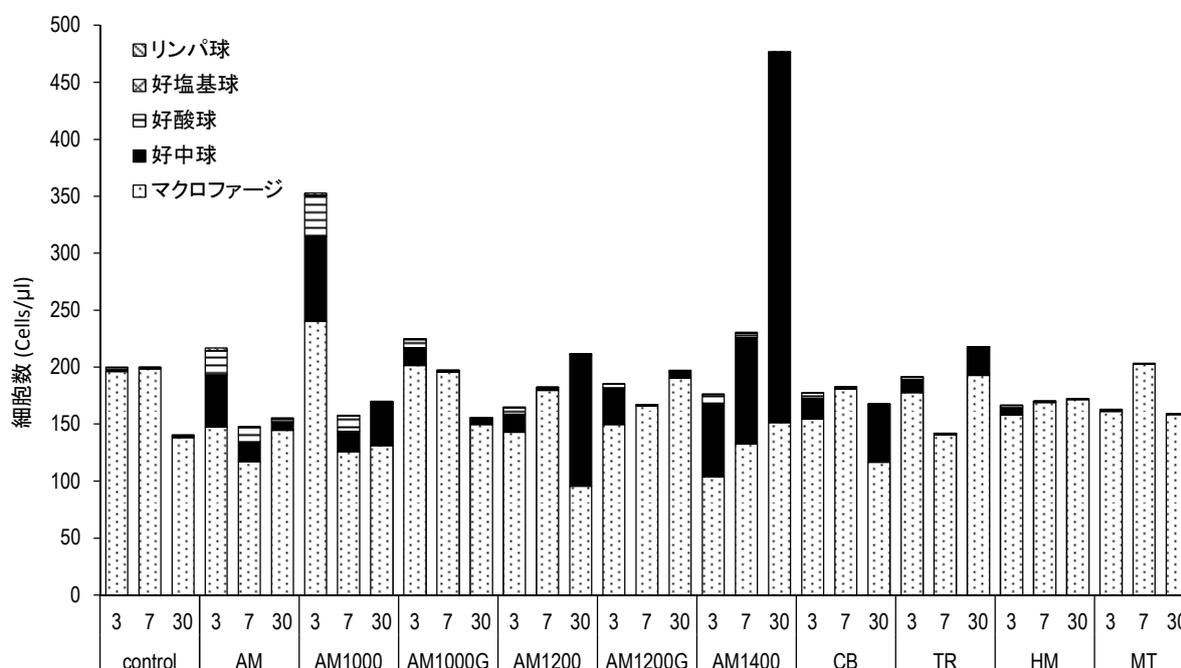


図 2-29 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中炎症細胞数の経時的変化

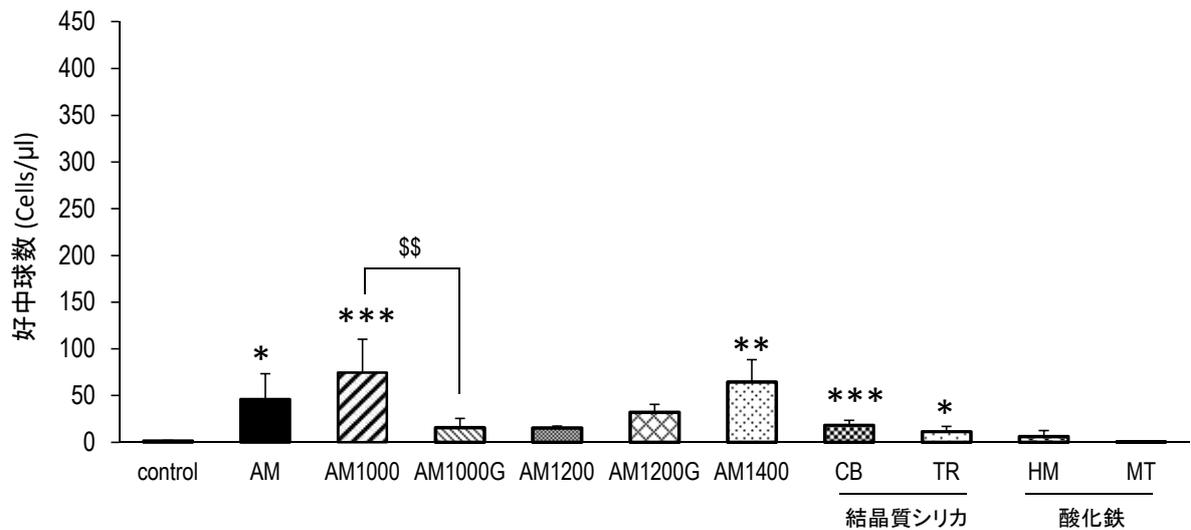


図 2-30 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中好中球数 (投与後 3 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000 : \$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

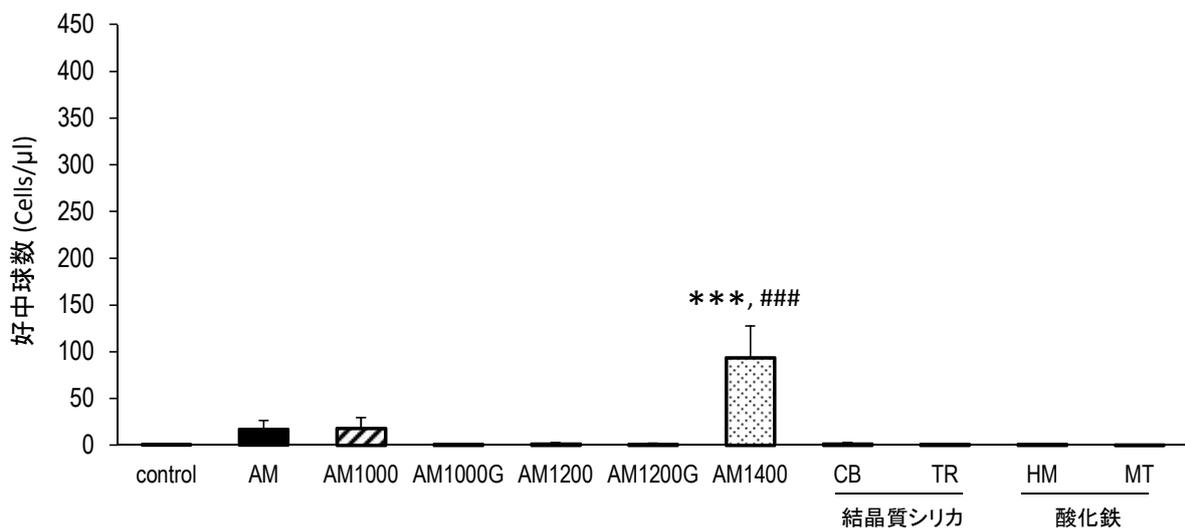


図 2-31 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中好中球数 (投与後 7 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

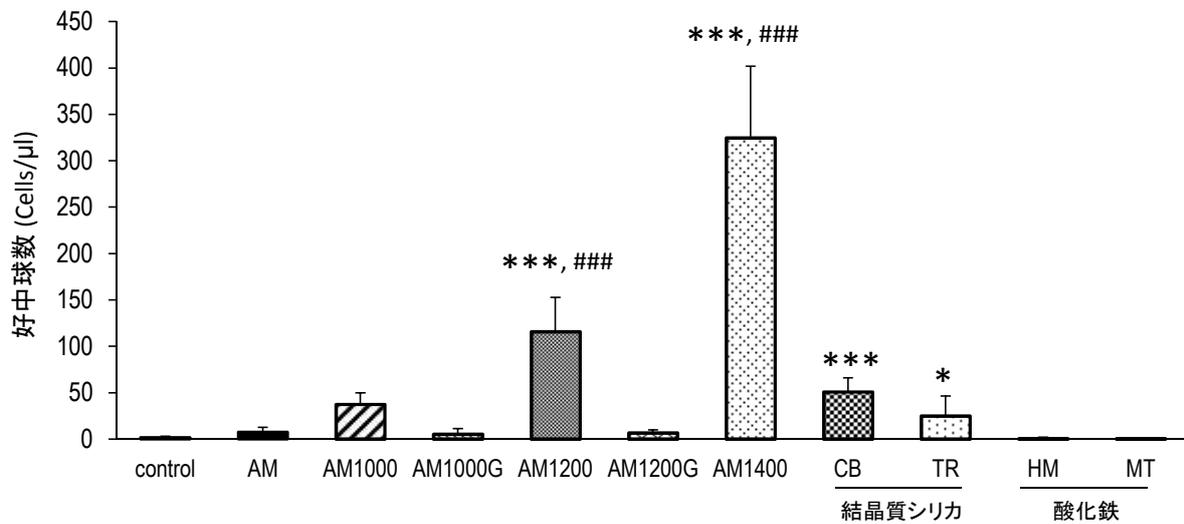


図 2-32 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中好中球数 (投与後 30 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

②BALF 細胞像

CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 投与後 3、7、30 日目における、BALF 中に観察される細胞像を図 2-33~35 に示した。

対照群の BALF 中には全観察期間を通して肺胞マクロファージが主に観察された。

投与後 3 日目(図 2-33)、7 日目(図 2-34)では、結晶質シリカおよび酸化鉄試料においても対照群と同様に肺胞マクロファージが主に観察された。

投与後 30 日目では結晶質シリカである CB と TR において、好中球が観察された(図 2-35)。なお、TR に比較して CB がより多くの好中球の出現を観察した(図 2-35)。一方、酸化鉄である HM と MT においては対照群と同様に肺胞マクロファージが主に観察され、明確な好中球の出現は観察されなかった(図 2-35)。すなわち、結晶質シリカは酸化鉄に比較して、炎症反応が起こりやすい傾向を明らかにした。

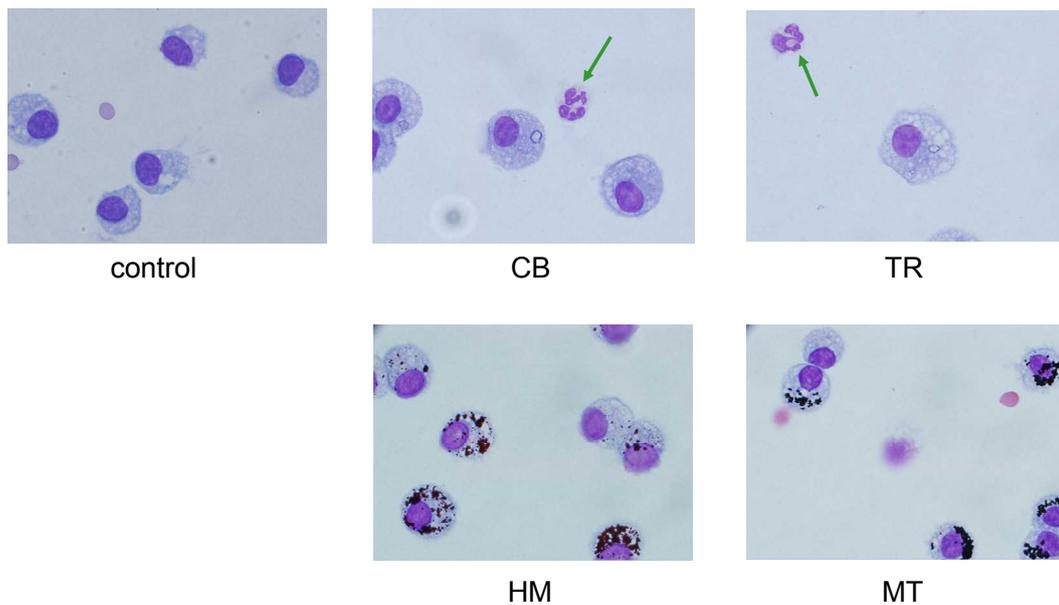


図 2-33 CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg ラット気管内一回投与後 3 日目の BALF 中の細胞像

矢印 (→) は好中球を示す。

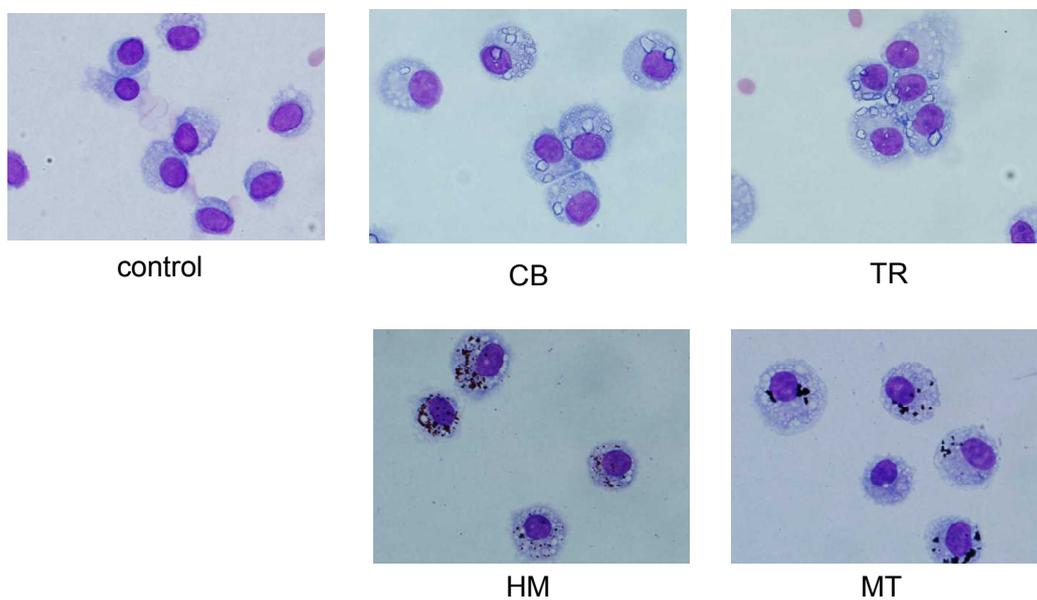


図 2-34 CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg ラット気管内一回投与後 7 日目の BALF 中の細胞像

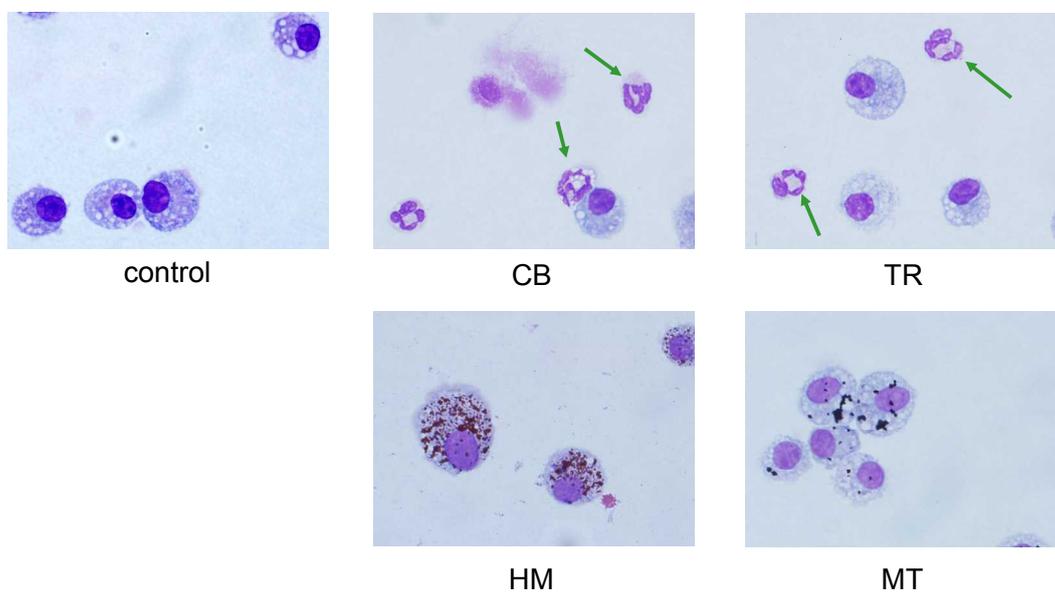


図 2-35 CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg ラット気管内一回投与後 30 日目の BALF 中の細胞像

矢印 (→) は好中球を示す。

3) BALF 中たんぱく濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの BALF 中たんぱく濃度について図 2-36～38 に示した。

投与後 3 日目では、AM 及び AM 焼成物のタンパク濃度は AM1000G、AM1200G 以外、対照群に比較して 2-3 倍の有意な上昇が観察された ($p < 0.01, 0.001$) (図 2-36)。また、結晶質シリカと酸化鉄試料においては、CB が対照群に比較して僅かな上昇のみで、たんぱく濃度に顕著な変化は観察されなかった(図 2-36)。

その後、相対的に漸減傾向を示したが、投与後 7 日目の結果は、ほぼ 3 日目の濃度とパターンが類似していた。結晶質シリカ及び酸化鉄も同様であった (図 2-37)。

他方、投与後 30 日目では投与後 7 日目の結果にほぼ類似していたが、これに対して、AM1400 のみが対照群に比較して約 2 倍の値である傾向を示した ($p < 0.001$)。

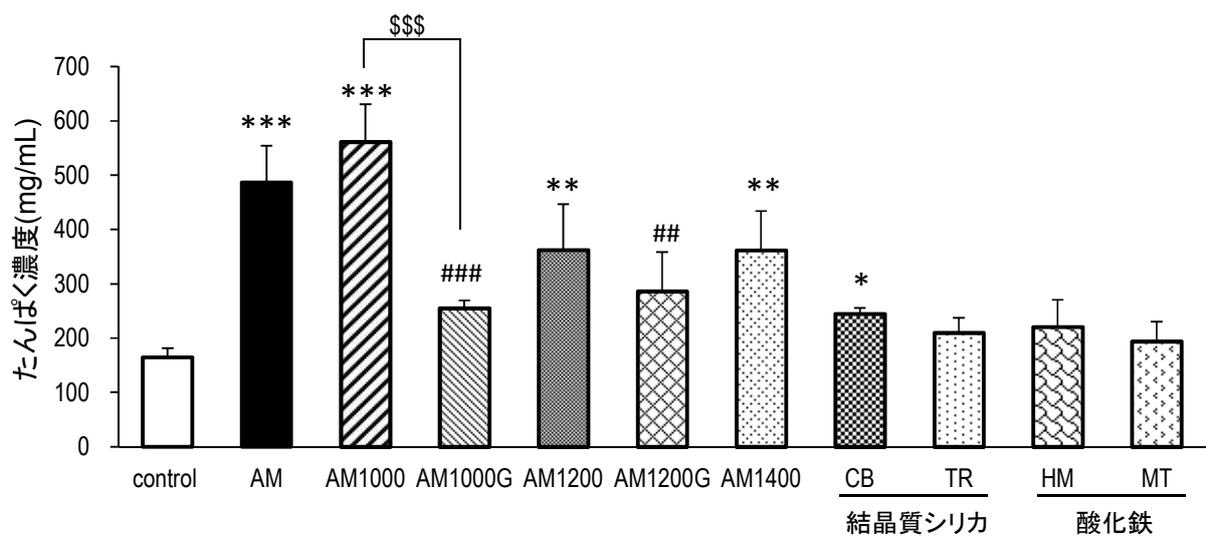


図 2-36 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中たんぱく濃度 (投与後 3 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000 : \$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

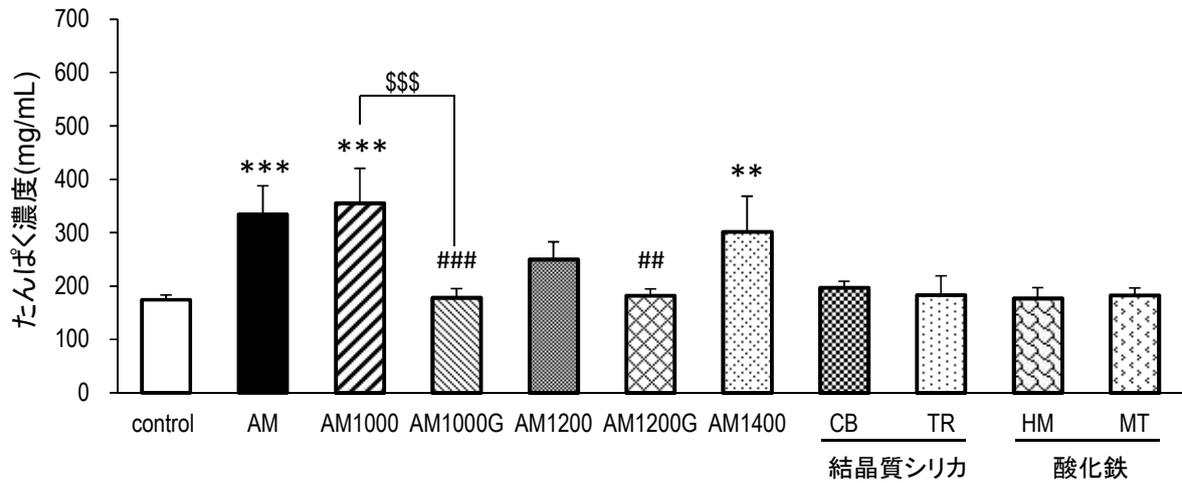


図 2-37 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中たんぱく濃度 (投与後 7 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000 : \$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

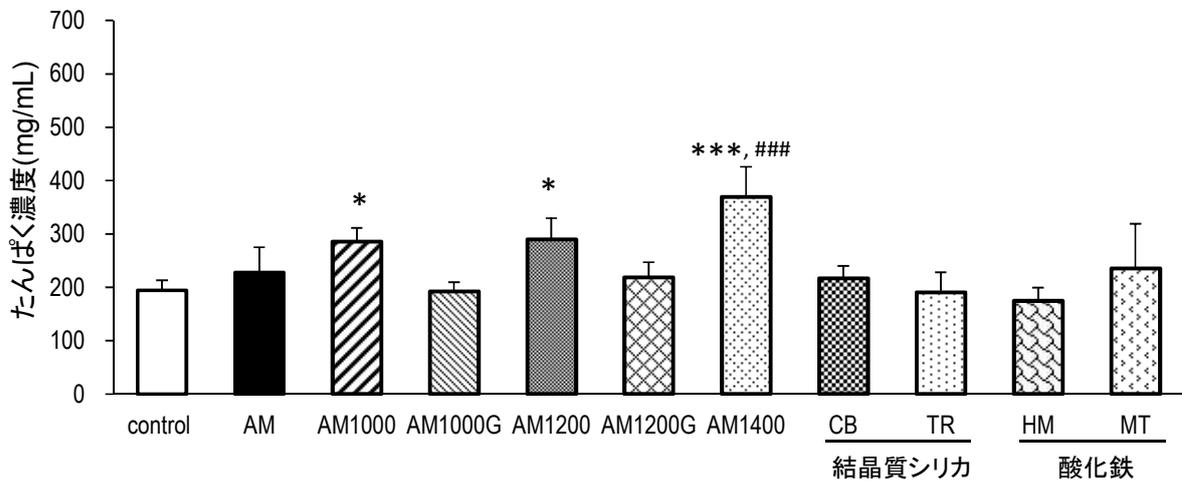


図 2-38 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中たんぱく濃度 (投与後 30 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

4) BALF 中 Lactate dehydrogenase (LDH) 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの BALF 中 LDH 濃度について図 2-39～41 に示した。

BALF 中 LDH 濃度は、投与後 3 日目において AM と AM1000 が対照群に対して約 7 倍の上昇傾向を示した ($p < 0.001$) (図 2-39)。なお、他の AM 焼成物では僅かな上昇傾向を示した。

投与後 7 日目では 3 日目で顕著に上昇していた AM と AM1000 の LDH 濃度は対照群とほぼ同レベルまで減少を示した (図 2-40)。なお、AM1400 の LDH 濃度は統計学的な有意差はないが上昇傾向を示した (図 2-40)。

投与後 30 日目の結果は 7 日目に類似しており、さらに、AM1200 の LDH 濃度が有意に上昇していた ($p < 0.05$) (図 2-41)。

一方、結晶質シリカおよび酸化鉄群では、投与後の LDH 濃度は対照群に比較して変化は示されなかった(図 2-39～41)。

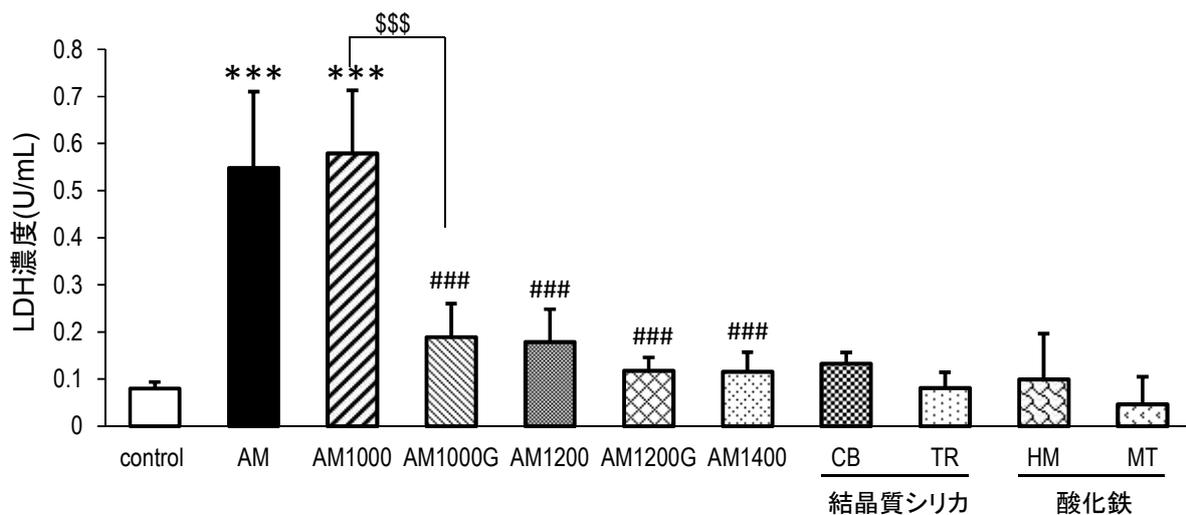


図 2-39 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 LDH 濃度 (投与後 3 日目)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000：\$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

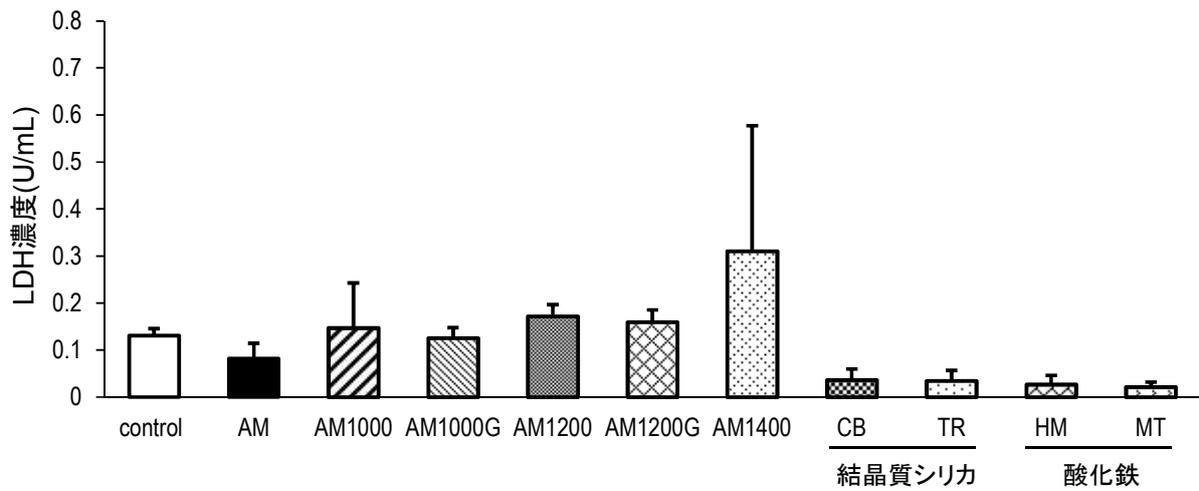


図 2-40 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 LDH 濃度 (投与後 7 日目)

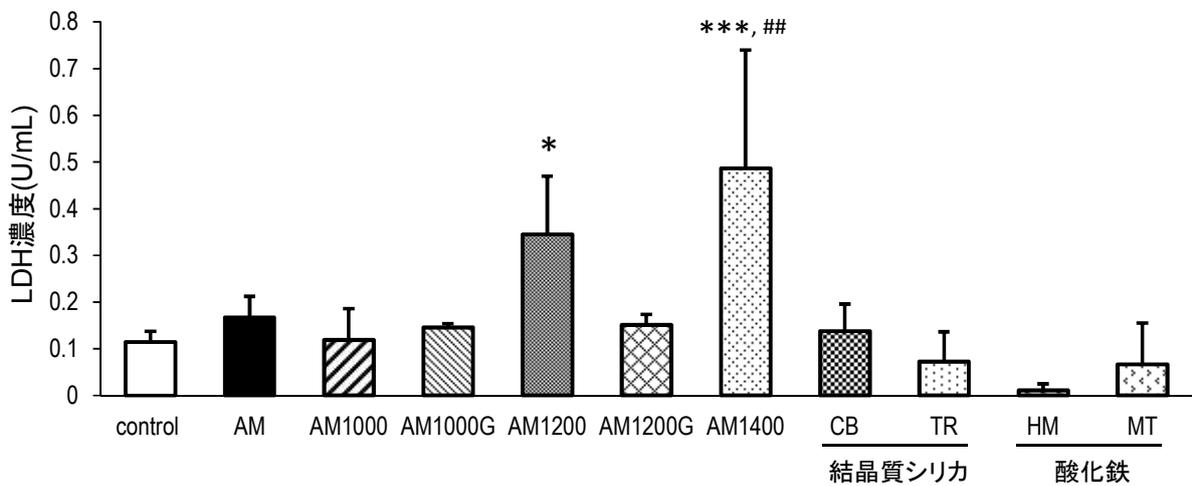


図 2-41 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 LDH 濃度 (投与後 30 日目)

対照群との比較: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

5) BALF 中サイトカイン濃度

①BALF 中 MCP-1 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの BALF 中 MCP-1 濃度について図 2-42～44 に示した。

投与後 3 日目では AM と AM1000、AM1400 における MCP-1 濃度は、対照群に比較してそれぞれ約 120、200、70 倍に上昇した傾向が示された ($p < 0.01, 0.001$)。なお、AM1000 の MCP-1 濃度は顕著に上昇したが、AM1000G に変化は認められなかった (図 2-42)。

投与後 7 日目では 3 日目で増加していた AM と AM1000 の MCP-1 濃度は急速に、対照群とほぼ同レベルまで減少した (図 2-43)。なお、AM1400 の MCP-1 濃度は持続していた。

投与後 30 日目の AM は、ほぼ対照群の値であったが、これに対して、AM1000 と AM1200、AM1400 の MCP-1 濃度が顕著に再度上昇の傾向を示した (図 2-44)。特に AM1200 と AM1400 は対照群に比較して約 200 倍に上昇した(図 2-44)。

一方、結晶質シリカおよび酸化鉄試料において、対照群に比較して MCP-1 濃度に有意な変化は認められなかった(図 2-42～44)。

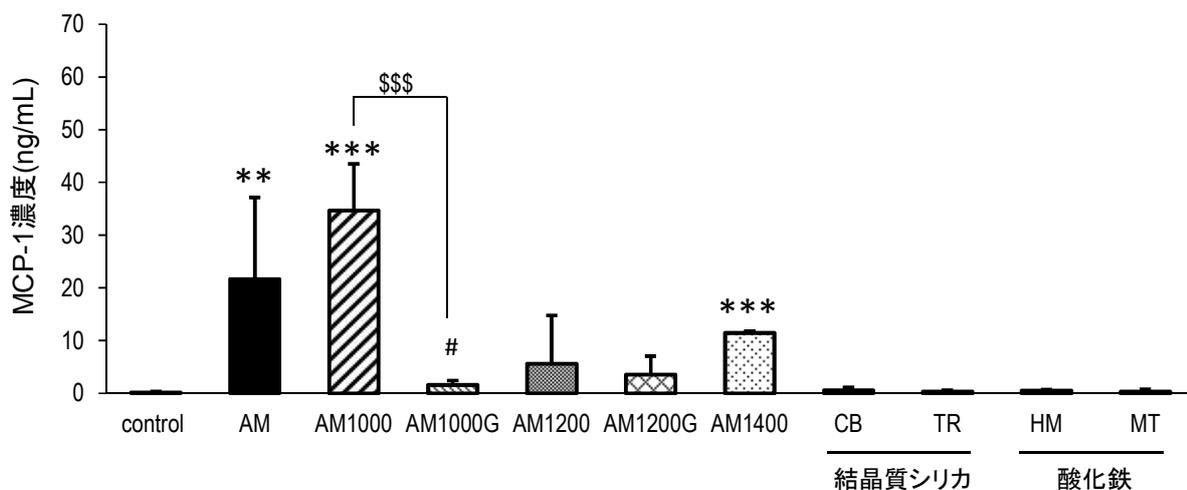


図 2-42 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 MCP-1 濃度 (投与後 3 日目)

対照群との比較: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000: \$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

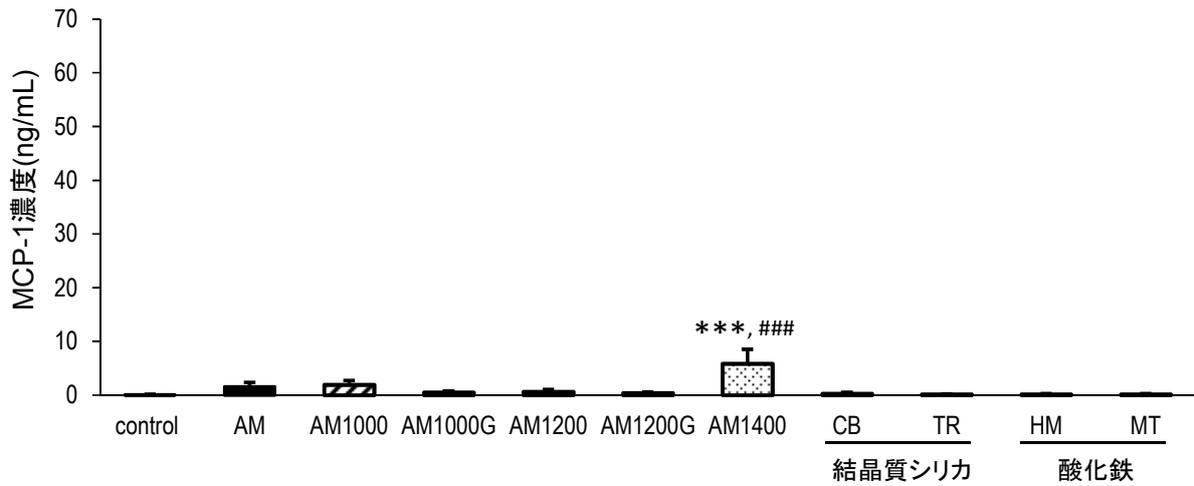


図 2-43 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 MCP-1 濃度 (投与後 7 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$
 AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

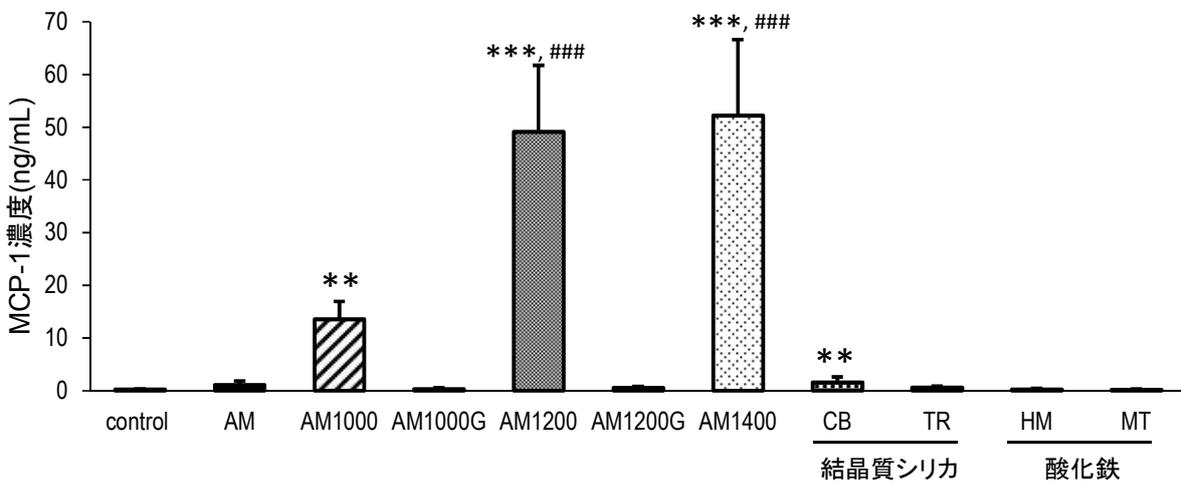


図 2-44 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 MCP-1 濃度 (投与後 30 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$
 AM 群との比較 : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

②BALF 中 TNF- α 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの BALF 中 TNF- α 濃度について図 2-45~47 に示した。

投与後 3 日目では AM と AM1000 の TNF- α 濃度は対照群に比較して約 7-8 倍に上昇する傾向が示された ($p < 0.01, 0.001$) (図 2-45)。なお、他の AM 焼成物では TNF- α 濃度に変化は示されなかった。

投与後 7 日目と 30 日目では AM 及び AM 焼成物においては焼成温度や粉碎処理の有無に関わらず、TNF- α 濃度は対照群との差異は認められなかった(図 2-46、47)。

一方、結晶質シリカおよび酸化鉄試料において、対照群に比較して TNF- α 濃度に有意な変化は認められなかった(図 2-45~47)。

すなわち、BALF 中の TNF- α 濃度は投与後初期における生体影響を評価するため用いることが可能であるように思われた。

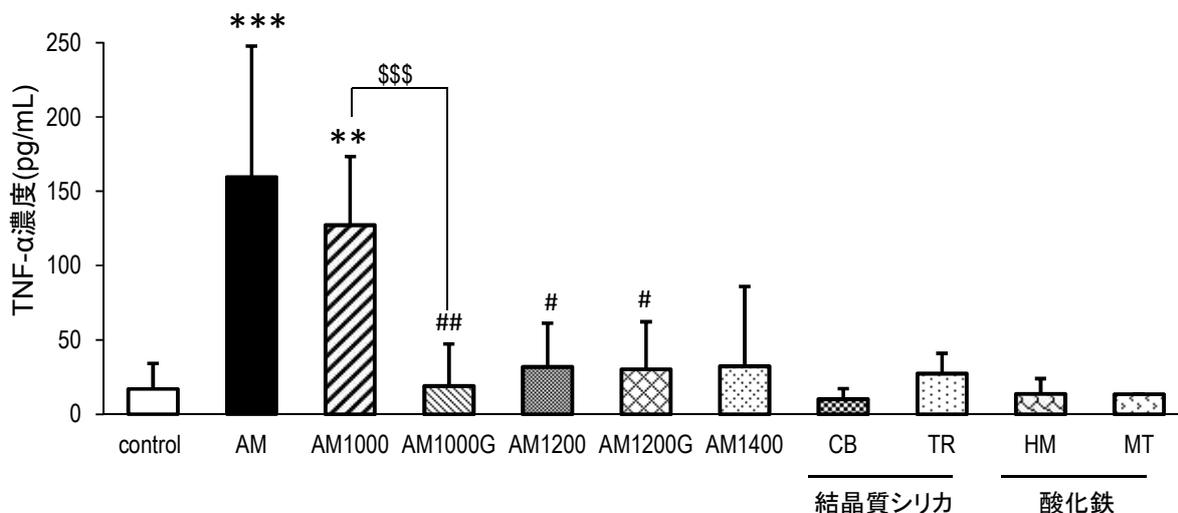


図 2-45 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 TNF- α 濃度 (投与後 3 日目)

対照群との比較: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000: \$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

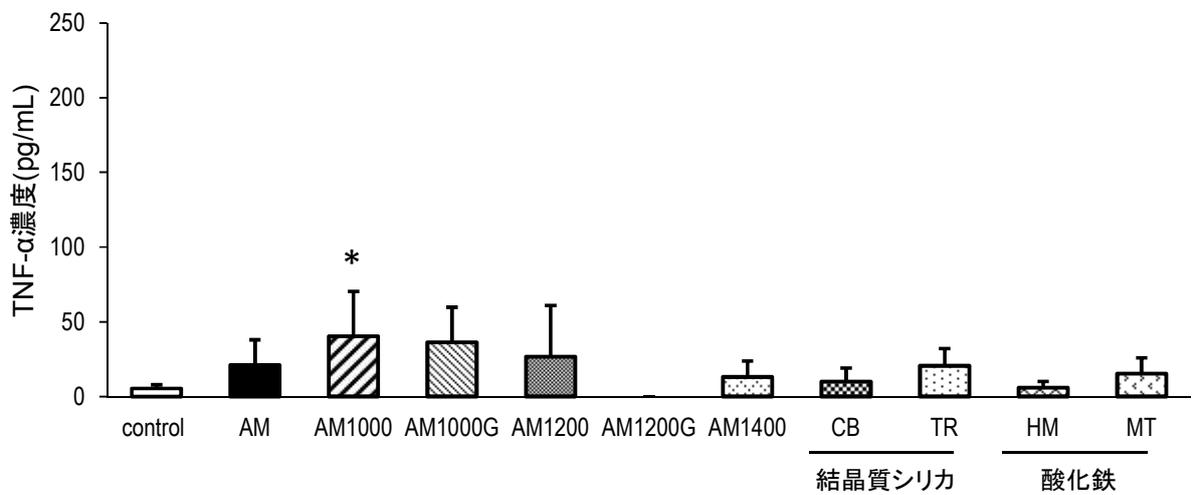


図 2-46 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 TNF- α 濃度 (投与後 7 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

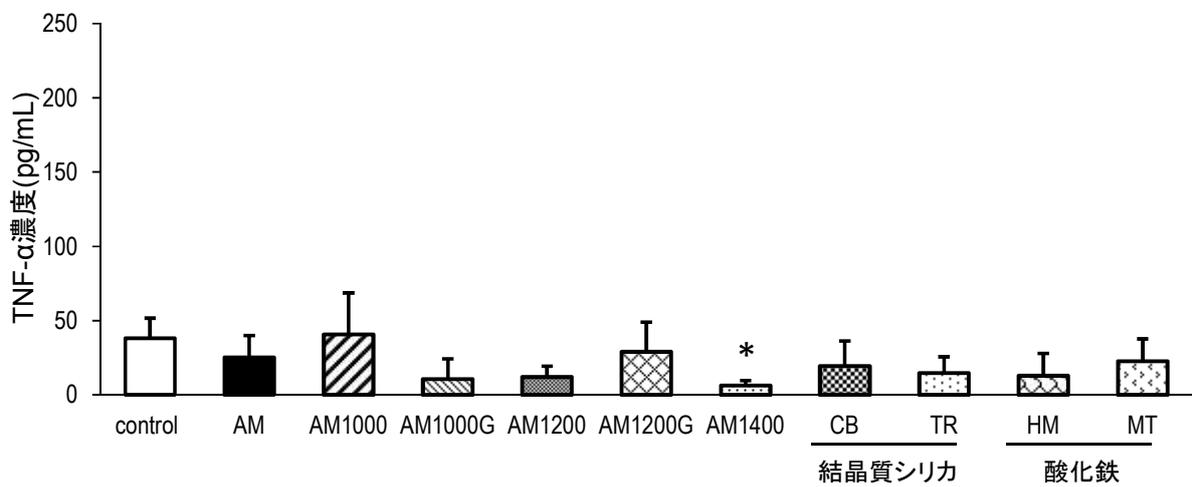


図 2-47 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 TNF- α 濃度 (投与後 30 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

③BALF 中 IL-6 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの BALF 中 IL-6 濃度について図 2-48～50 に示した。

投与後 3 日目から 30 日目を通して IL-6 濃度を測定したが、全ての値は対照群に比較して有意な変化が認められなかった。

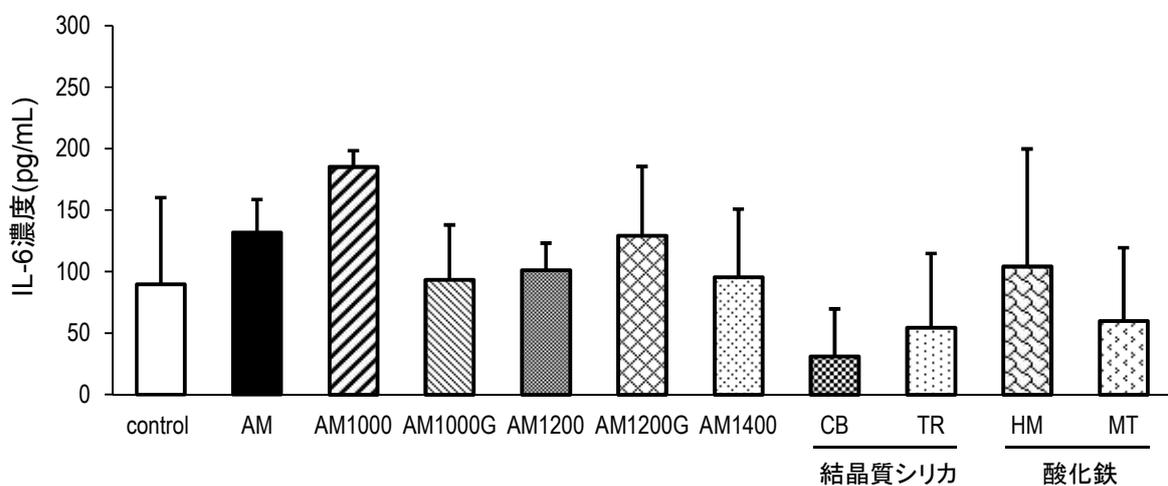


図 2-48 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 IL-6 濃度 (投与後 3 日目)

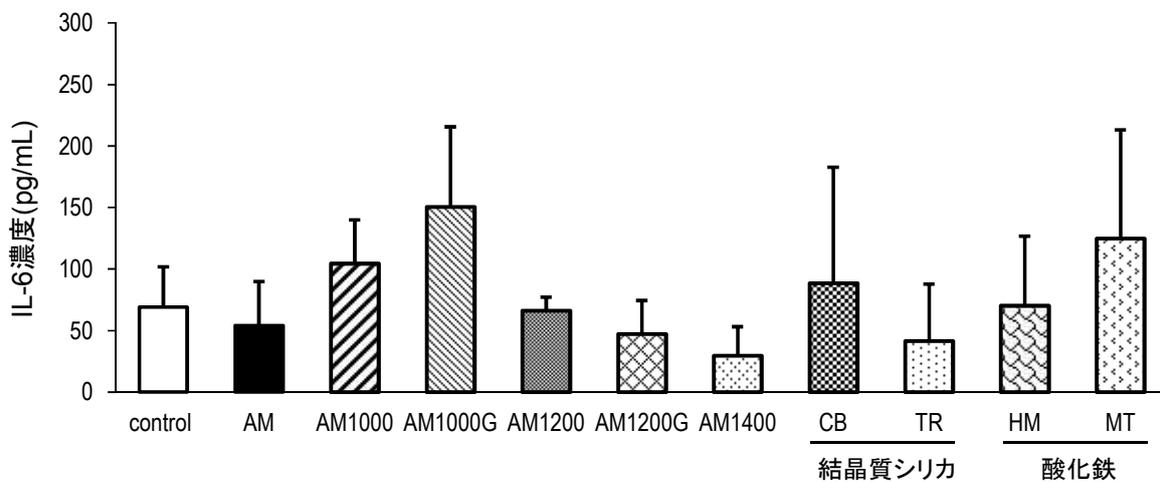


図 2-49 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 IL-6 濃度 (投与後 7 日目)

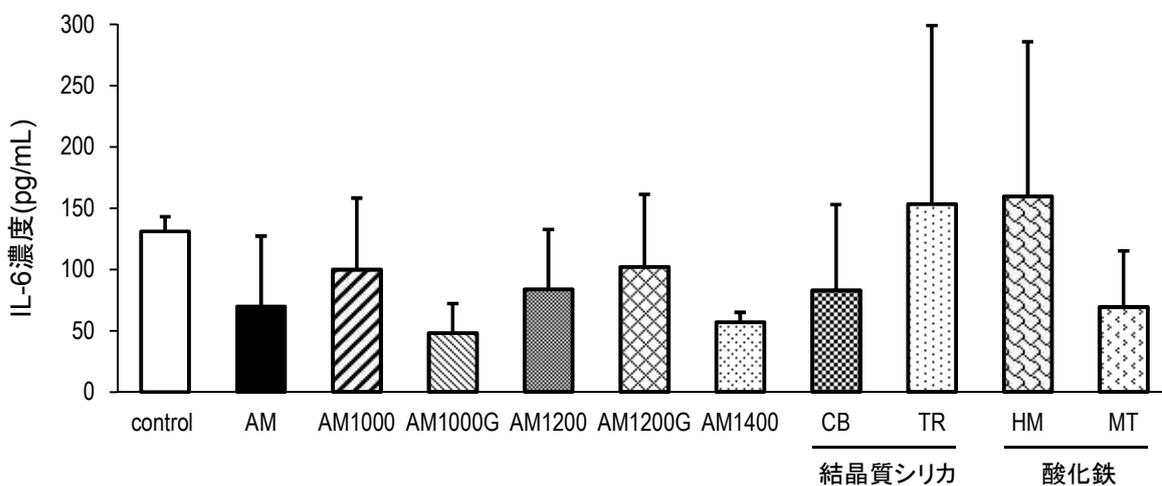


図 2-50 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の BALF 中 IL-6 濃度 (投与後 30 日目)

6) 血清中サイトカイン濃度

①血清中 MCP-1 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの血清中 MCP-1 濃度について図 2-51~53 に示した。

投与後 3~30 日目の全期間を通して対照群に比較して大きな差は見られず、焼成温度や粉碎処理がもたらす生体への効果を反映させるような結果は得られなかった。結晶質シリカ及び酸化鉄試料でも全期間を通して対照群と比較して特異的な変化は認められず、構成物質が生体にもたらす影響を評価するに至らなかった。

BALF 中 MCP-1 濃度は被験試料間において差が明らかに見られる鋭敏なバイオマーカーであるのに対して、血清中 MCP-1 濃度はバイオマーカーとして有効性は低いことが考えられた。

なお、血清中 IL-6 は BALF 中 IL-6 濃度と同様に投与後 3 日目から 30 日目を通して測定を行ったが、全試料、全期間で対照群に比較して有意な増加や減少は観察されなかった。

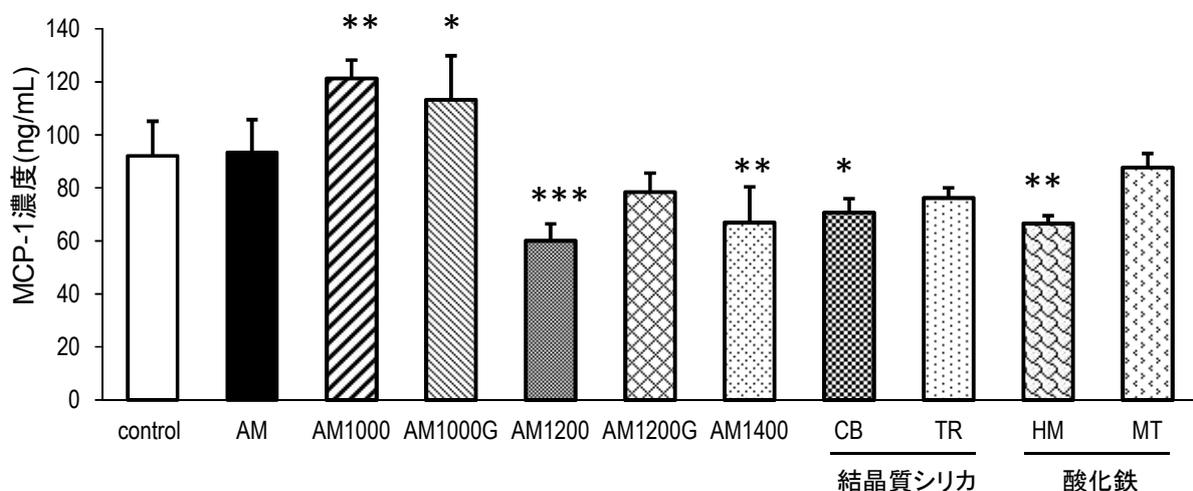


図 2-51 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 MCP-1 濃度 (投与後 3 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

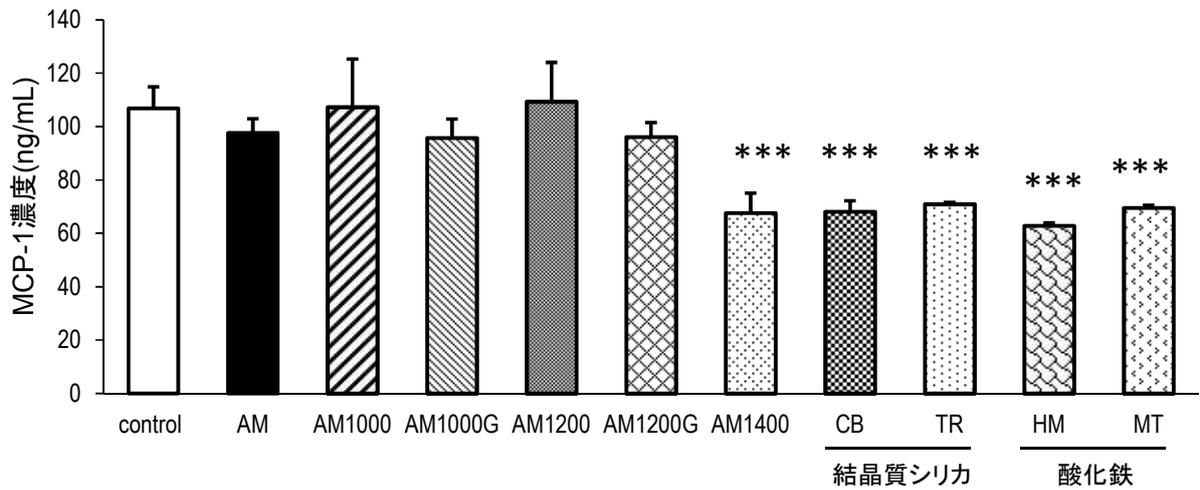


図 2-52 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 MCP-1 濃度 (投与後 7 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

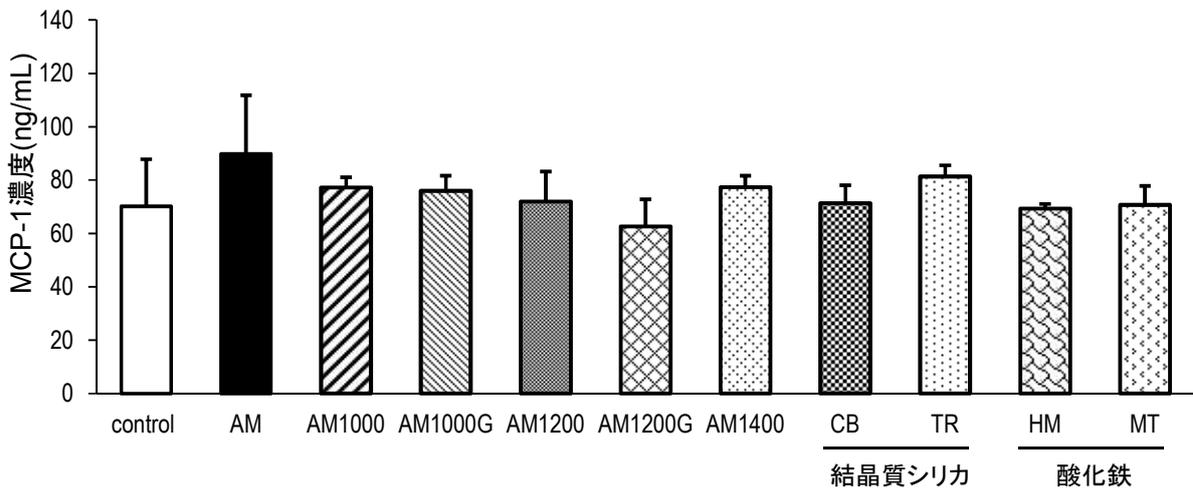


図 2-53 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 MCP-1 濃度 (投与後 30 日目)

7) 血清中酸化ストレス度と抗酸化力

①酸化ストレス度 (d-ROMs)

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの血清中 d-ROMs 値について図 2-54~56 に示した。

投与後 3~30 日目の間で AM と AM 焼成物、結晶質シリカおよび酸化鉄試料で対照群との差異は認められなかった。血清中 d-ROMs 値は焼成温度や粉碎処理がもたらす生体への効果や構成物質が生体にもたらす影響を評価する指標としては有効なものではないことが考えられた。

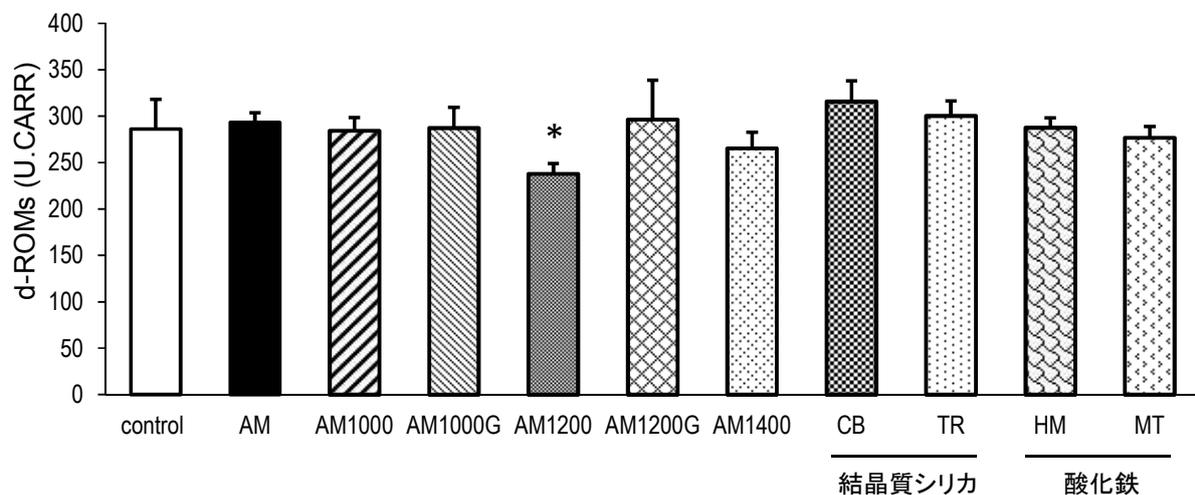


図 2-54 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 d-ROMs 値 (投与後 3 日目)

対照群との比較: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

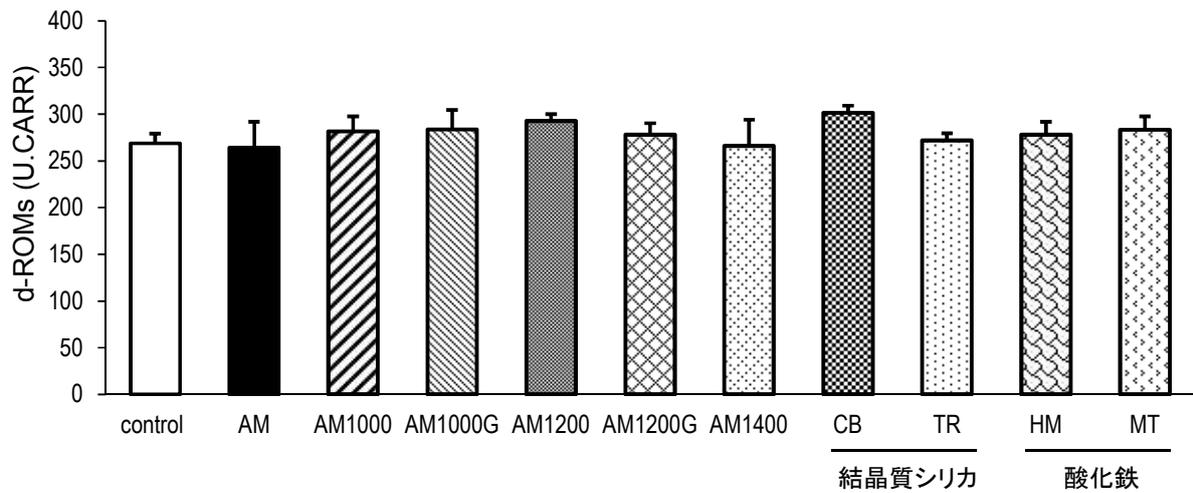


図 2-55 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 d-ROMs 値 (投与後 7 日目)

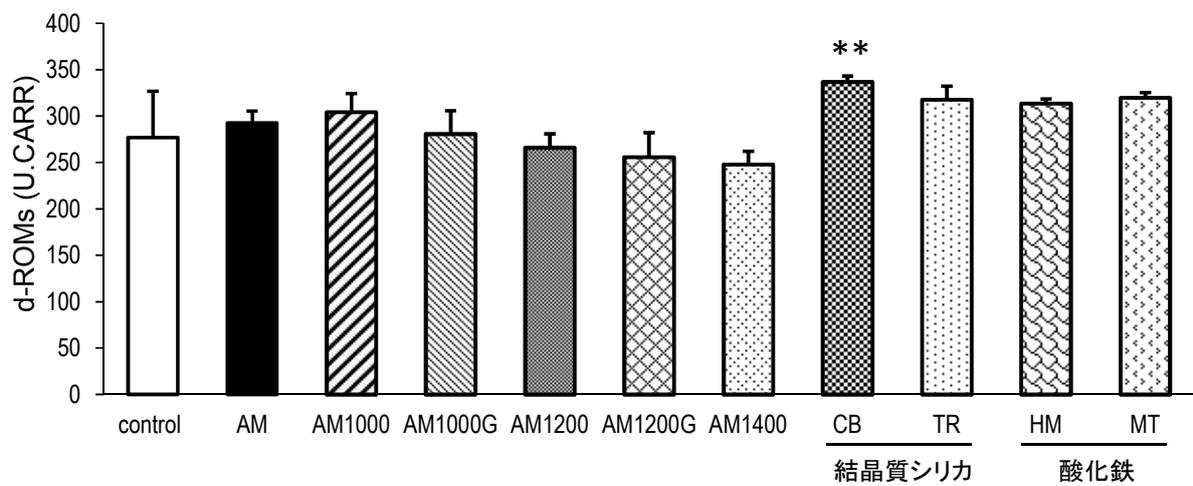


図 2-56 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 d-ROMs 値 (投与後 30 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

②抗酸化力 (BAP)

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの血清中 BAP 値について図 2-57～59 に示した。

投与後 3 日目では AM1000G で対照群に対して有意に BAP 値の上昇が観察された(図 2-57)。また結晶質シリカ及び酸化鉄試料では MT で対照群に比べて BAP 値の有意な上昇が観察されたが、他の試料では観察されなかった(図 2-57)。

投与後 7 日目では AM と AM 焼成物、結晶質シリカ及び酸化鉄試料において対照群に比べて BAP 値の有意な上昇は観察されなかった(図 2-58)。

投与後 30 日目では AM1000G の BAP 値が増加した (図 2-59)。AM および他の AM 焼成物では対照群に対して BAP 値に差異がみられなかった (図 2-59)。また結晶質シリカおよび酸化鉄試料においても対照群に対して BAP 値の有意な上昇は観察されなかった(図 2-59)。

血清中 BAP 値も血清中 d-ROMs 値と同様に、焼成温度や粉碎処理、構成物質が生体にもたらす影響を評価する指標としては有効性が低いと考えられた。

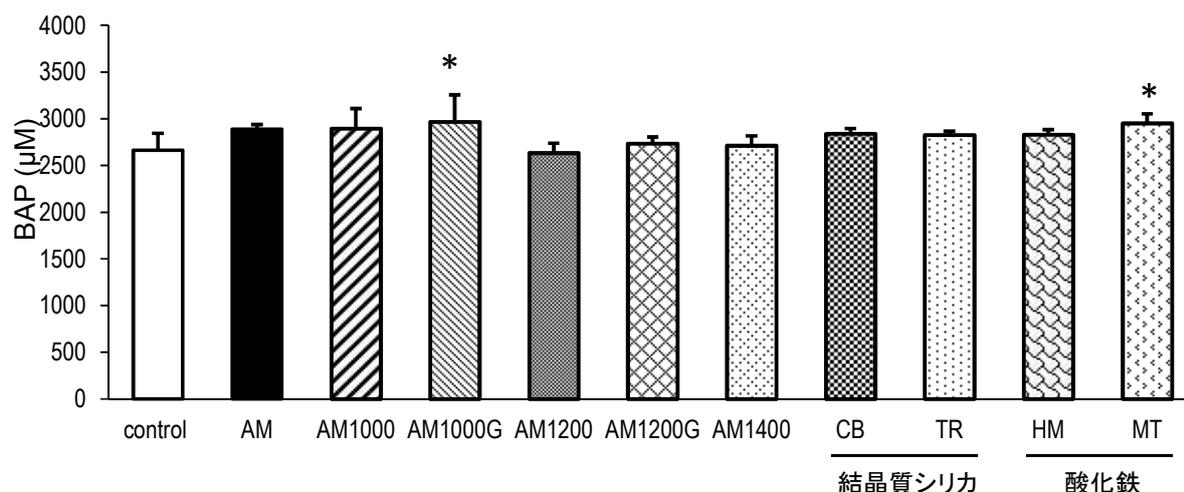


図 2-57 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 BAP 値 (投与後 3 日目) 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

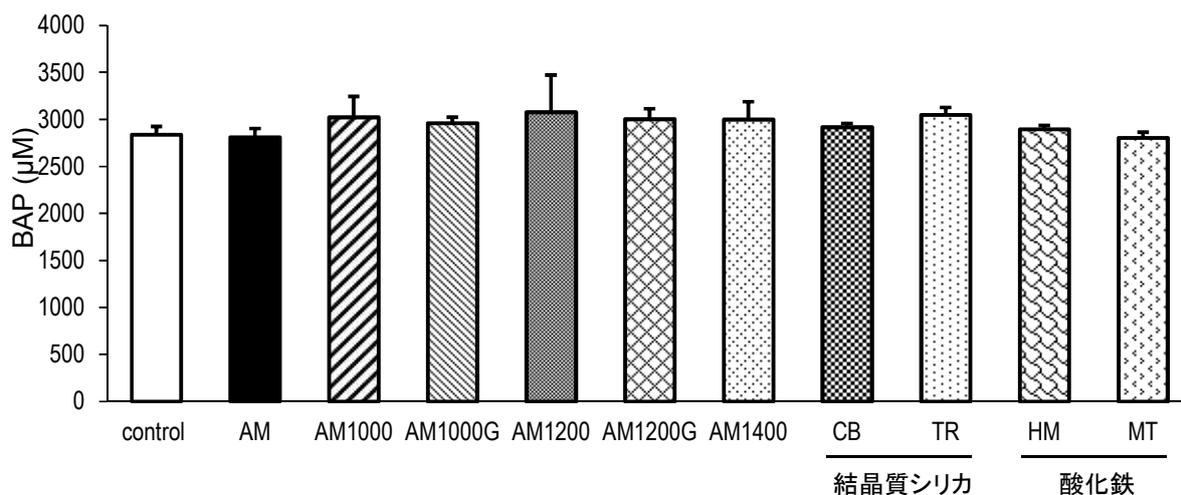


図 2-58 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 BAP 値 (投与後 7 日目)

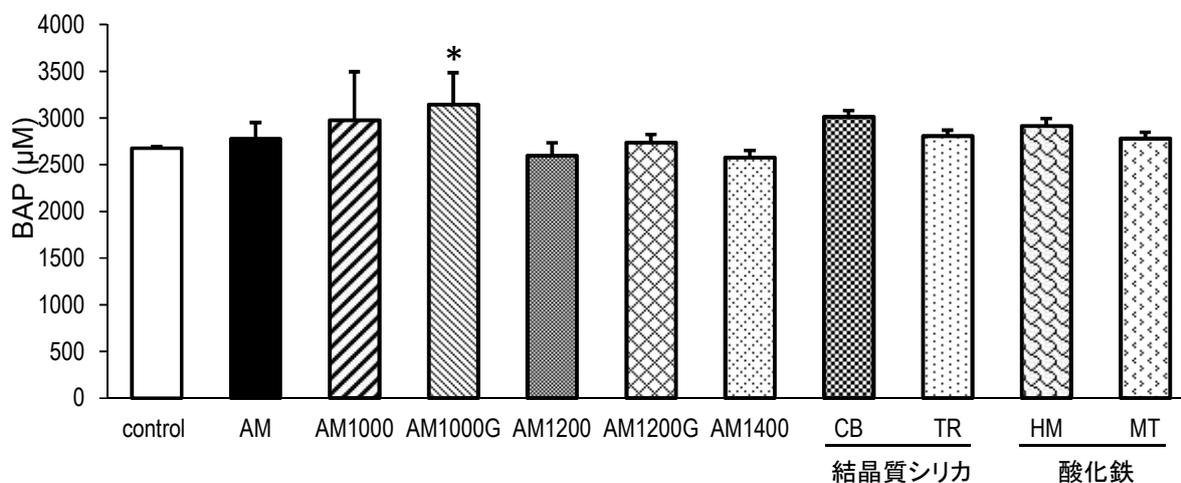


図 2-59 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 BAP 値 (投与後 30 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

8) 血清中 N-ERC/mesothelin 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの血清中 N-ERC/mesothelin 濃度について図 2-60～62 に示した。

投与後 3～30 日目の全期間を通して対照群との間に大きな差は見られず、焼成温度や粉碎処理がもたらす生体への効果を反映させるような結果は得られなかった。結晶質シリカ及び酸化鉄試料では全期間を通して対照群に比べてやや高い濃度を示したものの、構成物質が生体にもたらす影響を評価するに至るほどの大きな変動は観察されなかった。

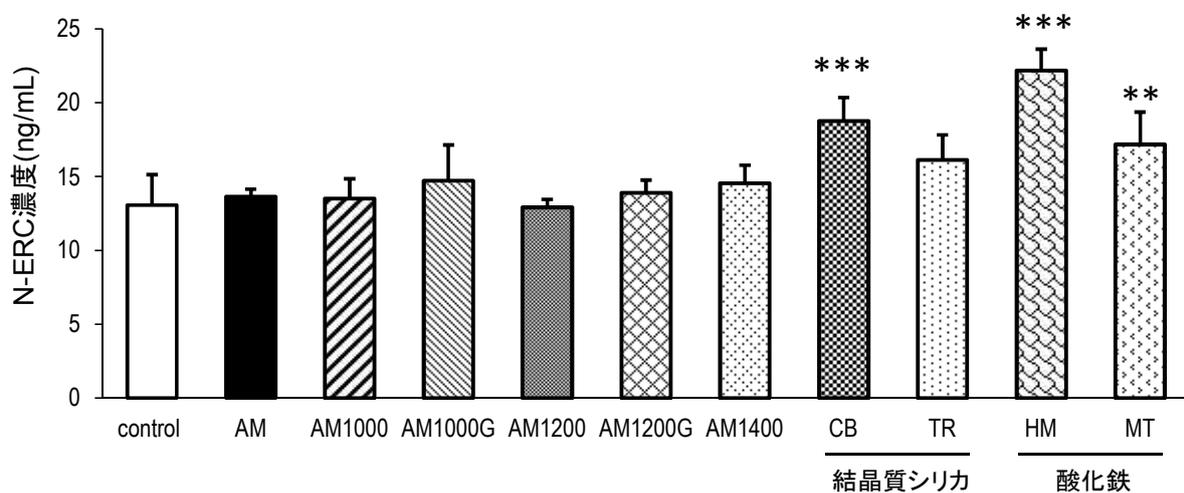


図 2-60 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 N-ERC/mesothelin 濃度 (投与後 3 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

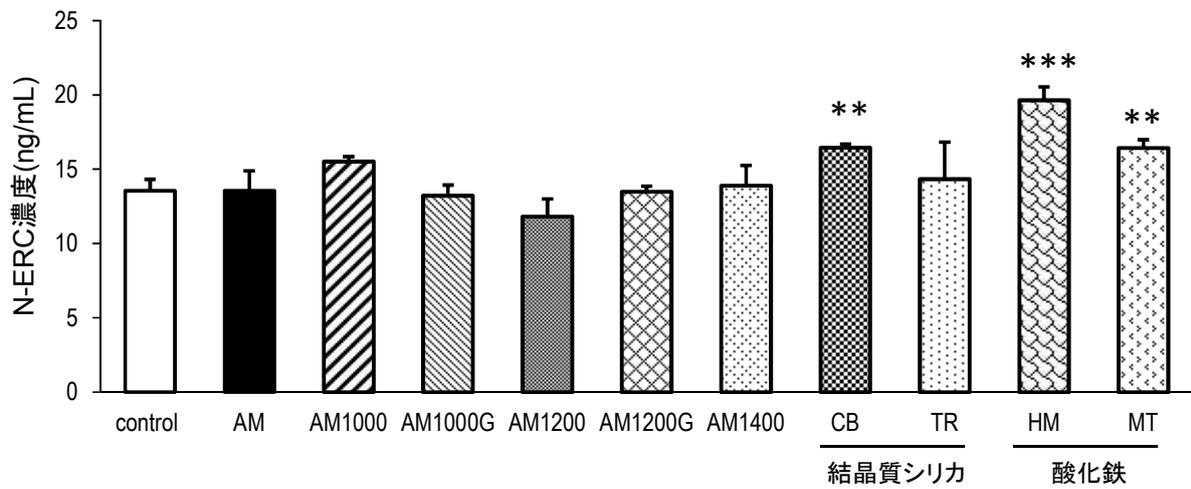


図 2-61 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 N-ERC/mesothelin 濃度 (投与後 7 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

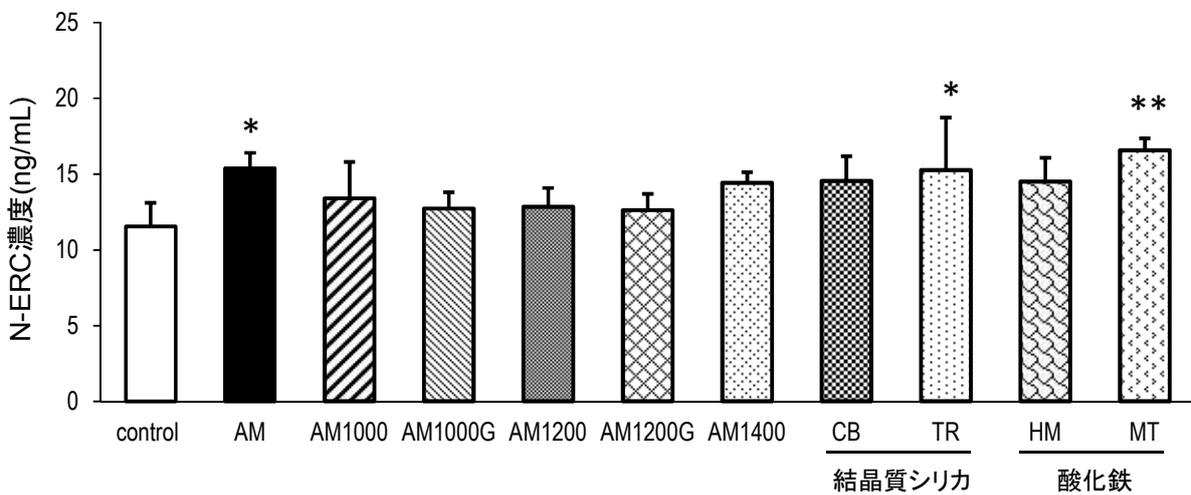


図 2-62 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の血清中 N-ERC/mesothelin 濃度 (投与後 30 日目)
 対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

9) 尿中 *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ 2mg 一回気管内投与後 3、7、30 日目までの尿中 NAG 濃度について図 2-63~65 に示した。

投与後 3 日目で AM1400 が対照群に比べて高い値を示した (図 2-63) が、その後は対照群との間に有意差は見られなかった (図 2-64~65)。AM と他の焼成物においても全期間を通して対照群との間に差異は認められなかった。結晶質シリカおよび酸化鉄試料においても投与後 3 日目で CB が高い値を示したが、その後は対照群との間に差異が見られなかった。

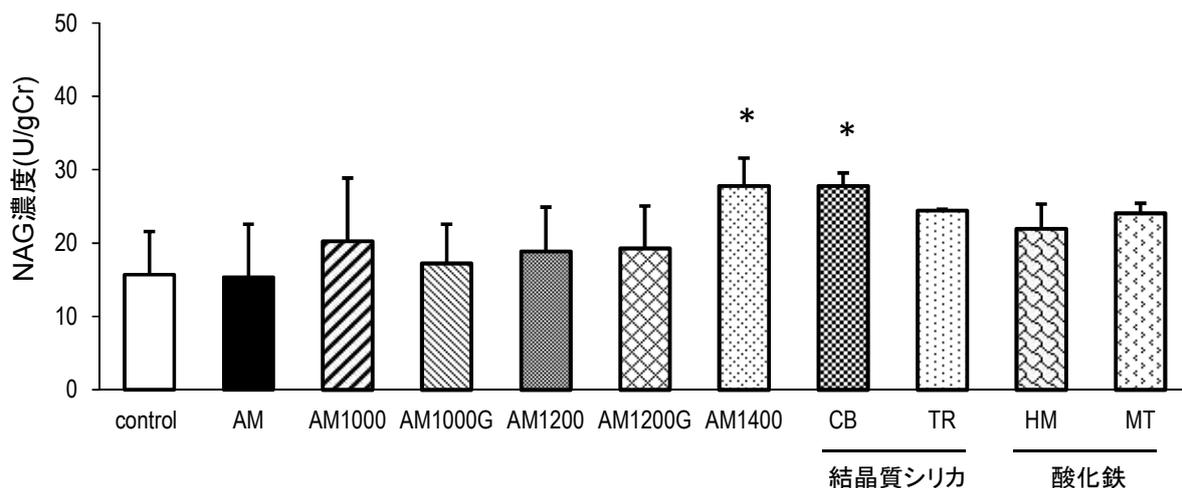


図 2-63 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の尿中 NAG 濃度 (投与後 3 日目)

対照群との比較 : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

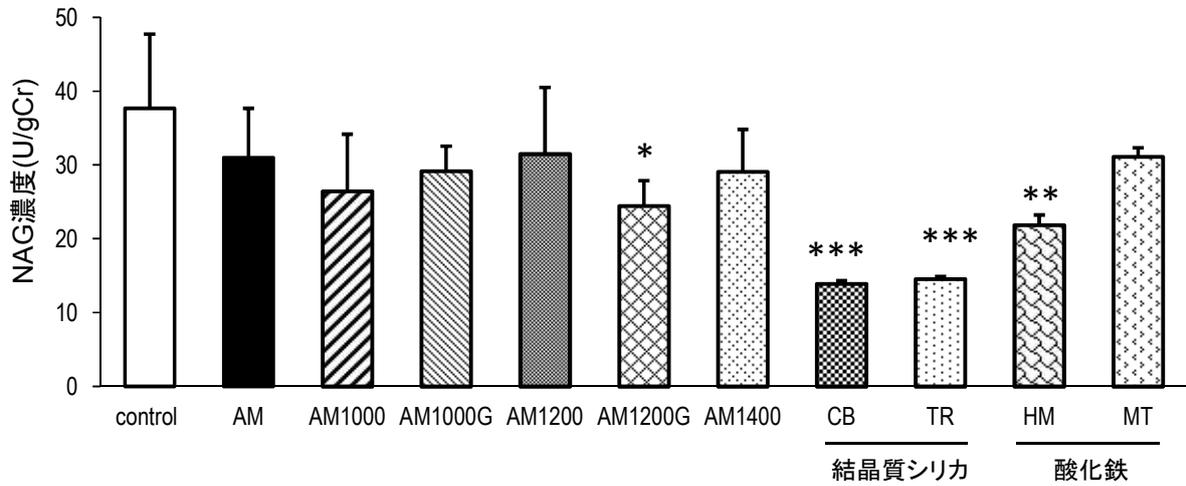


図 2-64 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の尿中 NAG 濃度（投与後 7 日目）
 対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

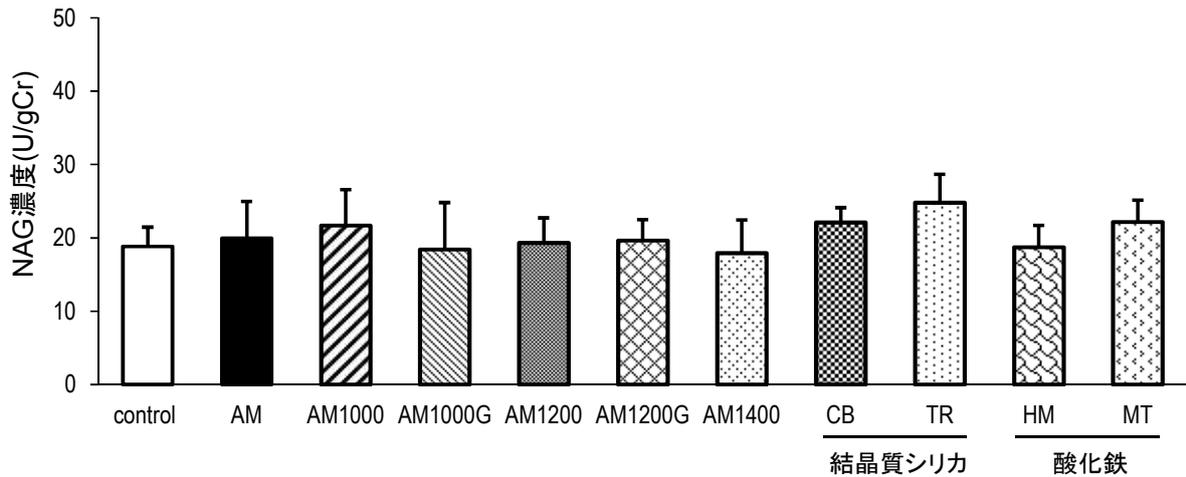


図 2-65 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 および CB、TR、HM、MT をそれぞれ一回気管内投与後の尿中 NAG 濃度（投与後 30 日目）

10) 急性影響 (BALF 中 Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 濃度等) の量反応関係

①BALF 中 MCP-1 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ 0.1mg、0.5mg、2mg、一回気管内投与後の BALF 中 MCP-1 濃度の変化を図 2-66~68 に示した。

BALF 中 MCP-1 濃度は、0.1mg と 0.5mg 投与群において 3、7、30 日目の観察期間で対照群に比較して変化が生じないことを確認した。

これに対して、AM および AM1000 の 2mg 投与群では、投与後 3 日目の BALF 中 MCP-1 濃度は対照群に比較して 100 倍以上に増加した (AM, $p < 0.01$; AM1000, $p < 0.001$) (図 2-66)。これら 2 つの試料群の BALF 中 MCP-1 濃度は投与後 3 日目をピークに減少する傾向を示した。しかし、AM1000 の 2mg 投与群では、投与後 30 日目の BALF 中 MCP-1 濃度は高値を示した ($p < 0.001$)。一方、粉碎処理した AM1000G では、2mg 投与群でのみ投与後 7 日目まで BALF 中 MCP-1 濃度が上昇したが ($p < 0.01$)、AM と AM1000 に比較して軽度の変化であった (図 2-67)。AM1400 では、2mg 投与群でのみ BALF 中 MCP-1 濃度が高値を示した。投与後 30 日目に最高値を示し、この値は AM と AM1000 に比較しても高値であり特徴的であった ($p < 0.001$) (図 2-68)。

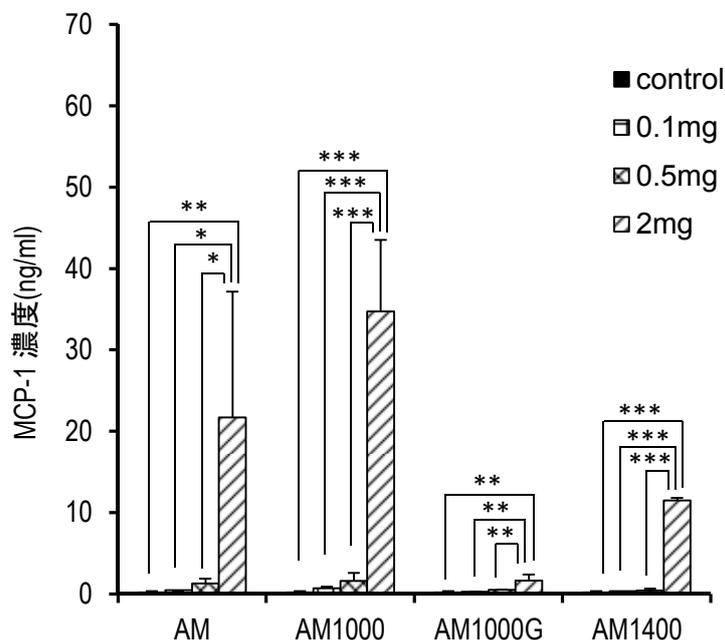


図 2-66 AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ一回気管内投与後 3 日目における BALF 中 MCP-1 濃度

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

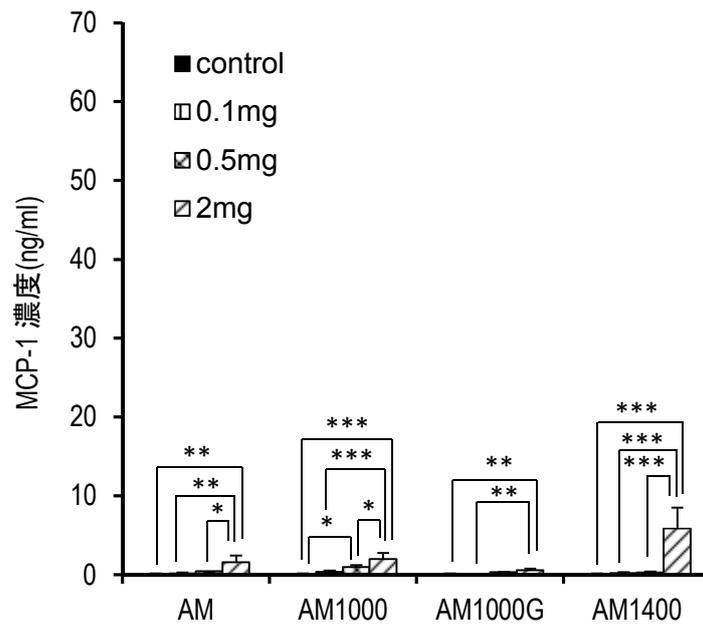


図 2-67 AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ一回気管内投与後 7 日目における BALF 中 MCP-1 濃度

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

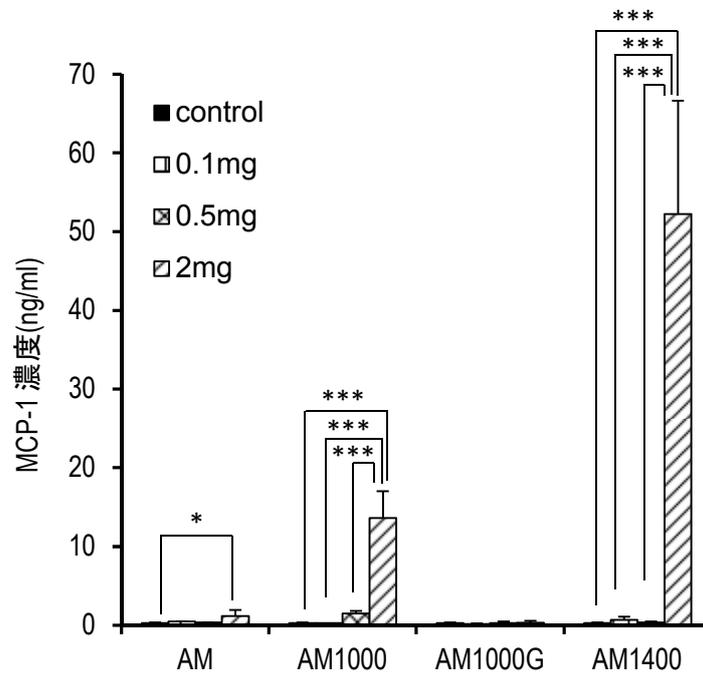


図 2-68 AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ一回気管内投与後 30 日目における BALF 中 MCP-1 濃度

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

②肺組織中 MCP-1 mRNA 発現量

AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ 0.1mg、0.5mg、2mg、一回気管内投与後の BALF 中 MCP-1 mRNA 発現量の変化を図 2-69～71 に示した。

肺組織における MCP-1 の mRNA の発現レベルの経時的変化は、BALF 中の MCP-1 濃度の変化と同様なパターンを示した。

MCP-1 mRNA 発現量は、0.1mg と 0.5mg 投与群において 3、7、30 日目の観察期間で対照群に比較して統計学的な有意差がある変化が生じないことを確認した。なお、AM1000 の 0.5mg 投与群では、投与後 3 日目と 30 日目の値においてやや上昇する傾向を示した。

これに対して、AM および AM1000 の 2mg 投与群では投与後 3 日目に MCP-1 の mRNA 発現量が対照群の 15 倍以上と顕著な増加を認めた($p < 0.001$)。これら 2 つの試料群の MCP-1 の mRNA 発現量は投与後 7 日目には減少し、対照群に比べて発現量の増加は認められなかったが、AM、AM1000 の 2mg 投与群では、投与後 30 日目の MCP-1 の mRNA 発現量が高値を示し、AM1000 の 2mg 投与群では対照群の 10 倍以上に増加していた($p < 0.001$)。しかし、AM1000G では、顕著な変化は認められなかった。AM1400 では、MCP-1 の mRNA 発現量は経時的に増加傾向を示し、投与後 30 日目では、対照群に比較して約 18 倍に増加し、AM に比較して高値を示した。

すなわち、この検査法は極めて鋭敏であるが、AM1000G での影響の生じないことを確認した。

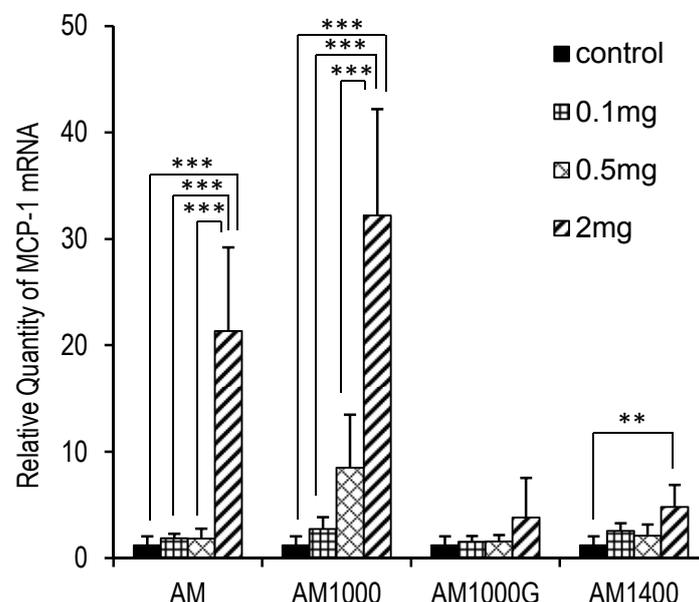


図 2-69 AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ一回気管内投与後 3 日目における肺組織中 MCP-1 mRNA 発現量

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

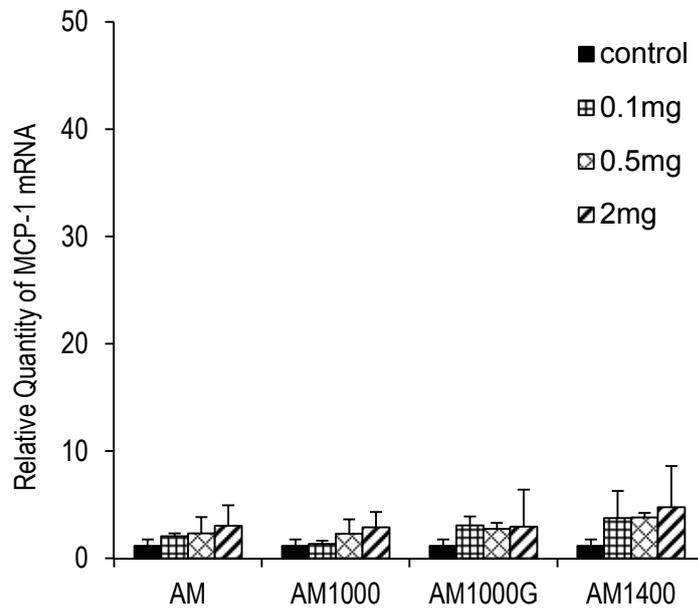


図 2-70 AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ一回気管内投与後 7 日目における肺組織中 MCP-1 mRNA 発現量

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

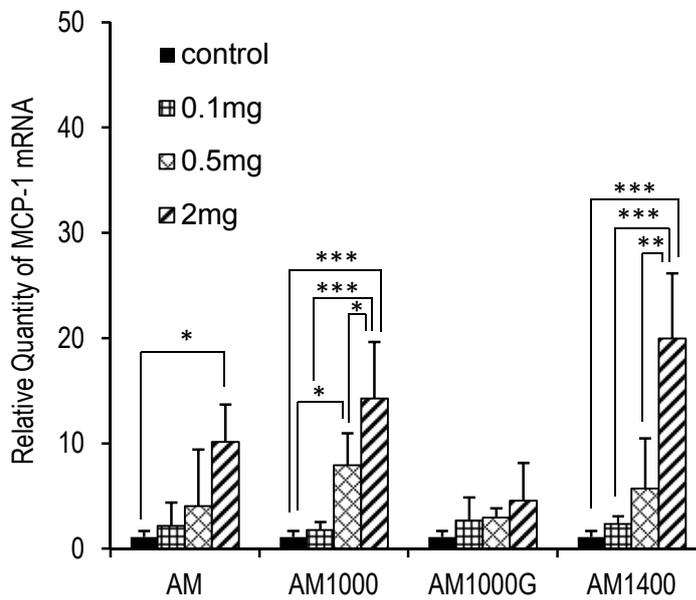


図 2-71 AM、AM1000、AM1000G、AM1400 をそれぞれ一回気管内投与後 30 日目における肺組織中 MCP-1 mRNA 発現量

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

小括

AM と AM 焼成物、その構成物質である結晶質シリカや酸化鉄試料を気管内投与したラットから、気管支肺胞洗浄液 (BALF) と血清、尿を採取し生体影響を評価した。

BALF を用いた細胞分画から、AM と AM1000 は投与後 3 日目、対照群と比較して顕著な炎症細胞が確認され、その後、時間の経過にしたがい回復傾向を示した。一方、AM1200 と AM1400 にのみ、投与後 30 日目において顕著な好中球の増加が観察された。

関連研究として、AM、AM1000 の構成物質が酸化鉄であるのに対して、AM1200 および AM1400 の構成物質は結晶質シリカや酸化鉄も生成されていることから、結晶質シリカ (CB と TR) と酸化鉄 (HM と MT) の影響について検討を試みた。酸化鉄である HM や MT では、観察期間中において炎症細胞の出現は認められなかったが、これに対して、CB や TR では AM や AM1000 などと比較すると軽微であったが投与後 30 日目において炎症細胞の出現が観察された。この結果において AM1200 と AM1400 に炎症細胞が出現された原因の一つは、結晶質シリカであることを示唆するものと考えられた。

BALF を用いてたんぱく濃度や LDH 濃度、サイトカイン等について測定した結果、BALF 中のたんぱく濃度と LDH 濃度、MCP-1 濃度はそれぞれ細胞分画の結果を非常に良く反映しており、バイオマーカーとして有効であると思われた。肺組織中 MCP-1mRNA 発現量を指標として、AM、AM1000、AM1000G、AM1400 を被験試料について、量-反応関係 (0.1mg, 0.5mg, 2mg) を検討した結果、この鋭敏な検査法を用いたことにより、0.1mg と 0.5mg は無影響であるが、2mg 投与群では被験試料の違いによる差異が認められ、AM1000G のみが影響の生じないことを確認できた。なお、TNF- α に関しては投与初期にはバイオマーカーとして有効性が示唆された。一方、IL-6 は対照群と差異が認められず、鋭敏なバイオマーカーではないと思われた。

本研究では、BALF、血清、尿等の生体試料を用いて、細胞分画、サイトカイン、酸化ストレス、抗酸化力、N-ERC/mesothelin、8-OHdG 等を比較した結果、評価対象の指標としては BALF の優位性が示唆された。

すなわち、ラットの BALF を用いて、AM と AM 焼成物、結晶質シリカ、酸化鉄について生体影響を評価した結果、AM1000G のみが種々の検査において無影響であることを明らかにした。

(2) 慢性影響

実験方法

1) 実験動物

Wistar 系雄ラット (Crj:WI、日本チャールスリバー) を使用した。動物はステンレス製金網ケージに 5 匹ずつ収容し、浄水器ろ過水道水、放射線滅菌飼料 (CE-2、日本クレア) を自由摂取させた。なお、酸化ストレス関連のマーカーの測定を実施したラットは、採血および採尿日の 3 日前から放射線滅菌高タンパク飼料 (Egg white diet; Dyets No.110952, Dyets Inc.) にて飼育した。

動物実験は北里大学医療衛生学部の動物飼育施設で実施した。飼育環境はセミバリア施設で 12hr/12hr 明暗、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 5\% \text{RH}$ である。実験は北里大学の動物飼育管理委員会の規則及び承認のもとに実施された。

2) 被験試料の懸濁液調整

被験試料(AM、AM1000、AM1000G、AM1200、1200G、AM1400)は、投与前日に秤量した後、オートクレーブで 121°C 、20 分間滅菌、 37°C の乾燥器内で保存した。動物投与直前に試料を所定容量になるように生理食塩水に懸濁させ、超音波洗浄器で 10 分間分散処理を行った。

3) 気管内投与

ラット (10 週齢) に AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与した。対照群には、同様に生理食塩水 1ml を一回気管内投与した。

気管内投与は、ハロセン麻酔下 (ハロセン濃度 3.5% 、空気容量 4L/min) で、実体顕微鏡を用い咽喉頭部を観察しつつ気管ゾンを気管支分岐部直上まで挿入し、一回の吸気時に被験試料の懸濁液を気管内に注入した。

AM1200G を除く各群とも投与後 540 日目まで経過観察を行った。またすべての群において投与後 90 日目および 180 日目に病理組織学的検索および気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取を行った。動物をソムノペンチルの腹腔内投与による深麻酔下で解剖を行った。腹大静脈から採血後、肺および主要臓器を摘出した。酸化ストレス等の生化学検査を行う組織検体は、液体窒素で凍結後、 -80°C で保存した。また病理組織学的検索を行う組織検体は、 4% パラホルムアルデヒド液で固定した。

解剖時に採取した血液 (約 4ml) は、チューブに入れ遮光し、室温で 30 分静置し、その後遠心分離を行った。血清は下記の分析に供するまで、 -80°C で凍結保存した。なお、採尿は、検査日前日にメタボリックケージ (Tecniplast) に個別に一晩収容し、遮光した採尿チューブで採尿し、 -80°C で凍結保存した。

4) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取

投与後 90、180、540 日目に動物をソムノペンチルの腹腔内投与による深麻酔下で、腹大静脈から採血後、腹大静脈を切断放血死させ、左肺気管支分岐部を結紮した。その後、気管にカテーテルを挿入し、右肺のみ生理食塩水 5ml~8ml で 2 回洗浄して BALF を回収し液量を計測した。BALF の一部を下記の細胞分画検査に用い、残りは遠心後の上清を下記の分析に供するまで -80°C にて凍結保存した。

5) 病理組織学的検索

投与後 540 日目までの経過観察期間中に死亡した動物も含めて、すべての動物に病理組織学的検索を実施した。肺および主要臓器を 4%パラホルムアルデヒド液に 4°C で一晚浸漬固定し、翌日から室温に戻して再固定した。病理標本は定法に従ってパラフィン包埋後、厚さ 3 μ m 以下に薄切しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。さらに、肺の線維化を判定するための Masson's trichrome 等の特殊染色を行った。

6) BALF 中の細胞数、たんぱく濃度、LDH 濃度、サイトカイン濃度の測定

6-1) BALF 中の細胞分画

BALF の浮遊細胞数は自動血球計数装置 (Sysmex F-800, 東亜医用電子) により計測した。細胞分画は、サイトスピン (Cytospin3, Shandon) を用いて標本を作製後、May-Grünwald-Giemsa 染色を行い、顕微鏡下で細胞を分別計数し、細胞分画 (%) を求めた。サイトスピン標本上で肺胞マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球に分別計数して求めた細胞分画 (%) に、自動血球計数装置で得られた総細胞数を乗じて各種炎症細胞数 (cells/ μ l) を計算した。

6-2) BALF 中のたんぱく濃度の測定

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) を用いて、BCA 法により肺胞洗浄液中のたんぱく濃度を測定した。標準物質として添付の BSA を用いた。

6-3) BALF 中の LDH 濃度の測定

肺上皮の細胞傷害の程度を測定するため、LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara Bio) を用いて、肺胞洗浄液中の LDH 濃度を測定した。標準物質として、ブタ心臓由来 LDH (オリエンタル酵母) を用いた。

6-4) BALF 中のサイトカイン濃度の測定

BD OptEIA™ Set Rat IL-6、MCP-1 (BD Biosciences) および Rat TNF- α ELISA Kit (Thermo Scientific) を用いて BALF のサイトカイン濃度を測定した。BALF は、IL-6、TNF- α 測定時には希釈せず、MCP-1 測定時には、その濃度に応じて Assay Diluent (BD Biosciences) により 1~200 倍に希釈した。

7) 血清中の生化学分析

7-1) 血清中サイトカイン濃度の測定

BD OptEIA™ Set Rat IL-6 および BD OptEIA™ Set Rat MCP-1 (BD Biosciences) を用いて血清のサイトカイン濃度を測定した。測定に使用した血清は Assay Diluent (BD Biosciences) により希釈し、その倍率は、IL-6 測定時には 10 倍、MCP-1 測定時には 100 倍とした。

7-2) 血清中酸化ストレス度と抗酸化力の測定

気管内投与実験において、FRAS4 (DIACRON) を用いて、生体内の活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレス度 d-ROMs と抗酸化力 BAP を測定した。測定には、血清を用いた。

d-ROMs は、活性酸素やフリーラジカルにより生じる血中ヒドロペルオキシド濃度をクロモゲン試薬のラジカル陽イオンへの変化として測定する。10 μ l の血清を酢酸緩衝液と混合した後クロモゲン試薬入りのキュベットへ移し 505nm の吸光度で測定した。

BAP は、血中の抗酸化物質が三価鉄イオン塩とチオシアン酸塩の化合物を還元し、脱色する反応を測定する。着色した反応液に 10 μ l の血清を混合し、505nm の吸光度の経時的な変化を測定した。

7-3) 血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の測定

血清中 N-ERC/mesothelin 濃度は、6 μ l の血清を EIA buffer (1% BSA, 0.05% Tween20 in PBS) で 40 倍に希釈した後に、Rat N-ERC/mesothelin assay kit (Immuno-Biological Laboratories) を用いて測定した。

8) 尿検査

尿の測定項目は、クレアチニンおよび近位尿細管障害マーカーの NAG である。尿中クレアチニン濃度はラボアッセイ クレアチニン (和光純薬) を用いて Jaffe 法で行った。NAG 濃度は NAG テスト (シオノギ製薬) を用いて、一定時間に分解される合成基質 (sodio-*m*-cresolsulfonphthaleinyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide) の生成物をマイクロプレートリーダー ARVO X4 (Perkin Elmer) にて測定した。NAG 濃度は尿中クレアチニン濃度で補正した。

9) 尿中 8-OHdG 濃度の測定

尿は遠心分離(10,000rpm \times 10min)し、上清を超純水で 4 倍希釈したのち、クロマトディスク (孔径 0.45 μ m) でろ過した。尿中 8-OHdG 濃度は、高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器(HPLC-ECD)装置を用いて測定した。本分析法では、2 台の HPLC を連結した。第一 HPLC は以下の通りである：pump (LC-10ADSP; 島津製作所), guard colomun (Inertsil ODS-3, 5 μ m, 4 x 10 mm, GL サイエンス), main column (TSK precolumn SW, 4.6 x 35mm, 東ソー)。UV detector (UV 620; GL サイエンス)。分析条件は、流量 0.3ml/min、カラム温度 35 $^{\circ}$ Cとした。第二 HPLC は以下の通りである：pump (PU 610; GL サイエンス), guard colomun (MG カートリッジ, 3 μ m, 4 x 20 mm, 資生堂), main column (CAPCELL PAK C18 MG S5, 資生堂)、ECD detector

(ED703 Pulse; GL サイエンス)。移動相にリン酸-8%メタノール緩衝液を使用した。8-OHdG は ECD により検出した。尿中 8-OHdG 濃度は尿中クレアチニン濃度により補正した。

10) 統計処理

測定値の統計解析は、SPSS ver.18J を用い、各群間の差について一元配置分散分析および Tukey の検定を行った。

結果と考察

1) 病理組織学的検索

①肺の肉眼的所見

対照群の気管内投与後 540 日目の肺の肉眼的写真を図 2-72 に示した。

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1400 群の投与後 540 日目の肺の肉眼的写真を図 2-73～2-77 に示した。

対照群

肺の表面はほぼ平滑で、赤色斑、白色斑等は認められず、ほぼ正常な外観を示していた。気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

AM 群

投与後 180 日目の時点で肺の一部に観察された白色斑は、投与後 540 日目においても残存していた。さらに、肺の一部に赤色斑が散在して認められた (図 2-73)。また気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

AM1000 群

投与後 180 日目の時点で肺の一部に暗赤色斑が観察されていた。投与後 540 日目においても赤色斑が散在して認められた (図 2-74)。また気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

AM1000G 群

投与後 180 日目の時点では投与後初期に認められた点状出血斑は回復していた。投与後 540 日目まで観察した結果、肺に赤色斑や白色斑は認められなかった (図 2-75)。また気管支リンパ節の腫大は認められなかった。

AM1200 群

投与後 180 日目の時点で肺の一部に観察された白色斑は、投与後 540 日目においても残存していた。さらに、肺の一部に赤色斑が散在して認められた (図 2-76)。また気管支リンパ節の腫大が一部で認められた。

AM1400 群

投与後 180 日目の時点で肺の一部に観察された白色斑は、投与後 540 日目においても残存していた。さらに、肺の一部に赤色斑が散在して認められた (図 2-77)。また気管支リンパ節の腫大が一部で認められた。



図 2-72 対照群、投与後 540 日目

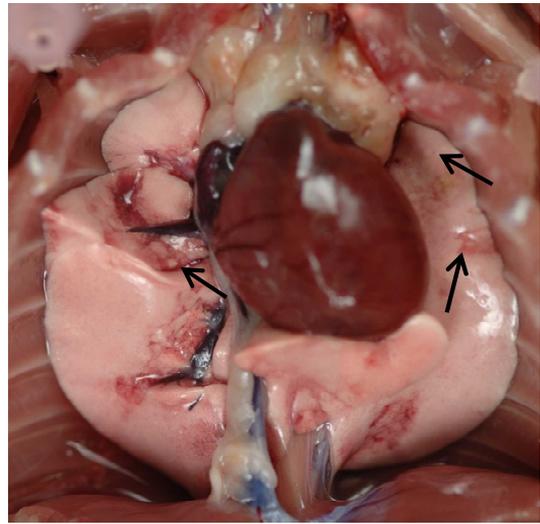


図 2-73 AM 群、投与後 540 日目
赤色斑と白色斑（矢印）が散在して認められた。

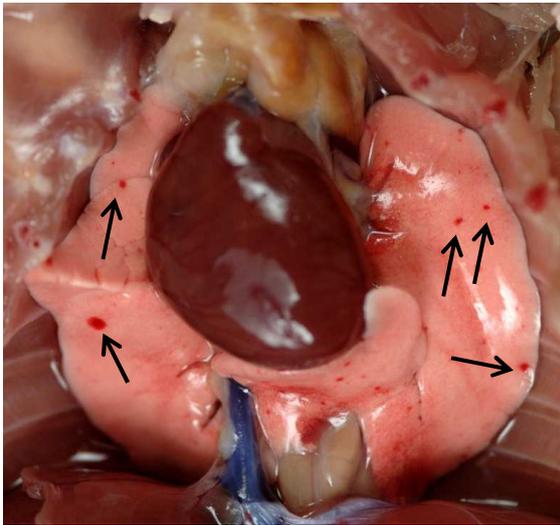


図 2-74 AM1000 群、投与後 540 日目
点状の赤色斑（矢印）が散在して認められた。

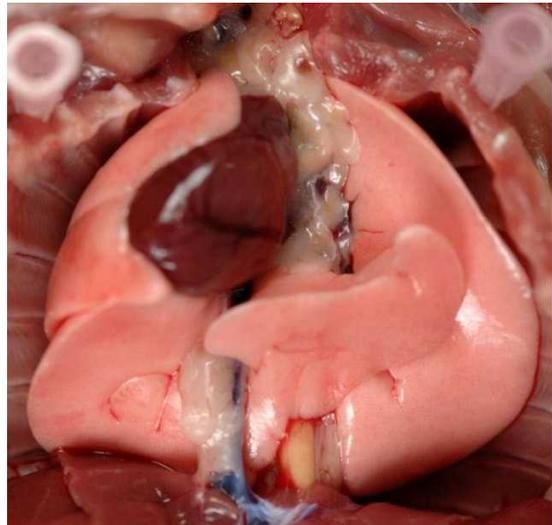


図 2-75 AM1000G 群、投与後 540 日目

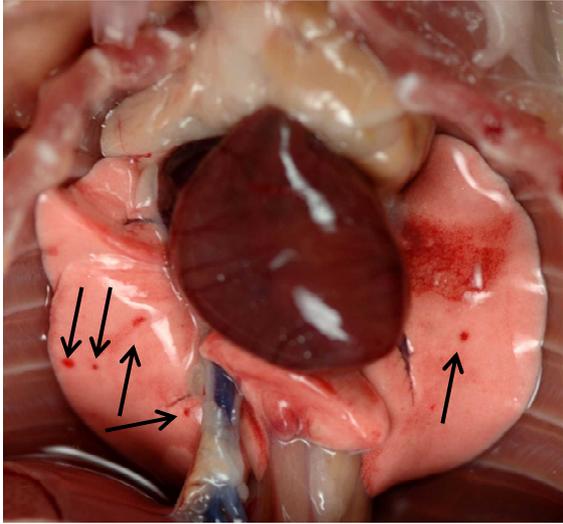


図 2-76 AM1200 群、投与後 540 日目
赤色斑（矢印）や白色斑が観察された。

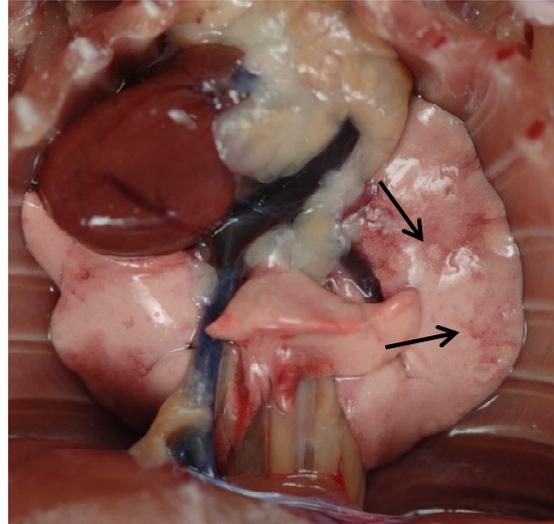


図 2-77 AM1400 群、投与後 540 日目
赤色斑や白色斑（矢印）が観察された。

②病理組織学的所見

対照群の生理食塩水気管内投与後 540 日目の肺病理組織像を図 2-78 に示した。

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1400 群の投与後 540 日目の肺病理組織像を図 2-79～2-83 に示した。

対照群

投与後 540 日目の時点で肺の線維化等の変化は認められなかった（図 2-78-A、B）。

AM 群

投与後 540 日目においても投与後 180 日目と同様に肺泡道、肺泡領域で局所的に慢性炎症が持続し（図 2-79-A）、肺泡道および肺泡壁の線維化の進展が認められた（図 2-79-B）。

AM1000 群

投与後 540 日目においても、投与後 180 日目と同様に肺泡道～肺泡領域にかけて局所的に慢性炎症が持続しており、肉芽腫も観察された（図 2-80-A）。さらに、肺泡道～肺泡領域において肉芽腫の周囲で線維化が観察されたが、AM 群よりは線維化の程度は軽度であった（図 2-80-B）。

AM1000G 群

投与後 180 日目の時点で炎症反応は回復していた。投与後 540 日目においても肺のごく一部で投与粒子を貪食したマクロファージを主体とする小肉芽腫の残存が認められただけであった。AM1000G 群では、AM1000 群と異なり、肺の線維化は明らかではなかった（図 2-81-A、B）。

AM1200 群

投与後 540 日目においても投与後 180 日目と同様に肺泡道～肺泡領域にかけて局所的に慢性炎症が持続しており、肉芽腫も観察された（図 2-82-A）。さらに、肺泡道～肺泡領域において肉芽腫の周囲で線維化が観察されたが、AM 群よりは線維化の程度は軽度であった（図 2-82-B）。

AM1400 群

投与後 540 日目においても投与後 180 日目と同様に肺泡での炎症が持続していた（図 2-83-A）。しかし、AM1000 群や AM1200 群のような肉芽腫やその周囲の線維化所見は観察されなかった（図 2-83-B）。

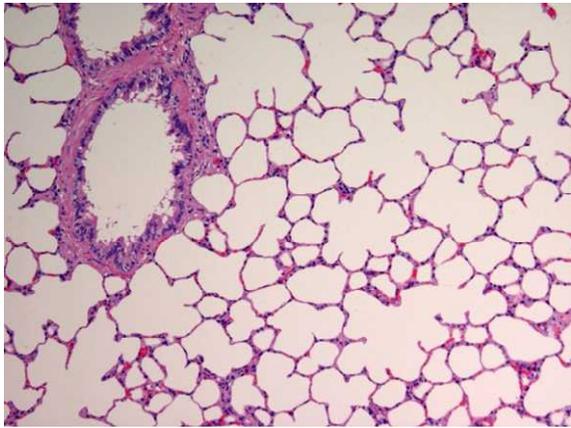


図 2-78-A 対照群、投与後 540 日目、
肺、HE 染色

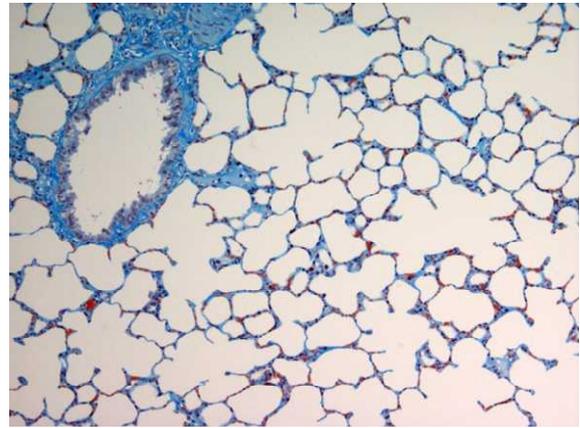


図 2-78-B 対照群、投与後 540 日目、
肺、Masson's trichrome 染色

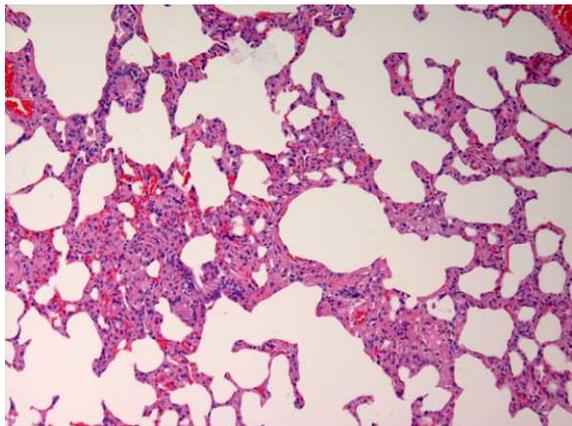


図 2-79-A AM 群、投与後 540 日目、
肺、HE 染色

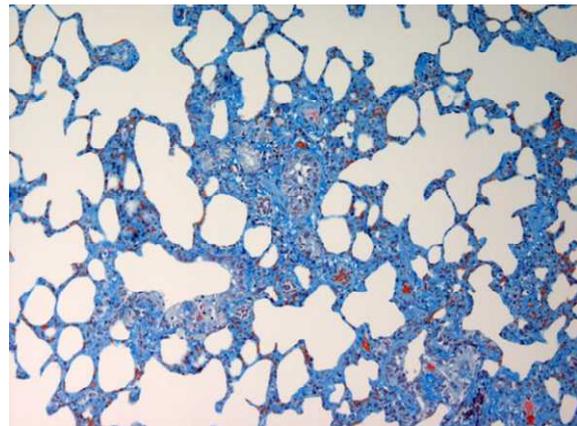


図 2-79-B AM 群、投与後 540 日目、
肺、Masson's trichrome 染色
線維化が認められた。

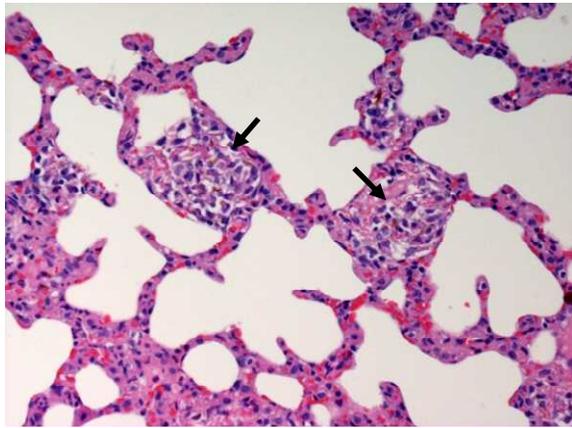


図 2-80-A AM1000 群、投与後 540 日目
肺、HE 染色
矢印は肉芽腫を示す。

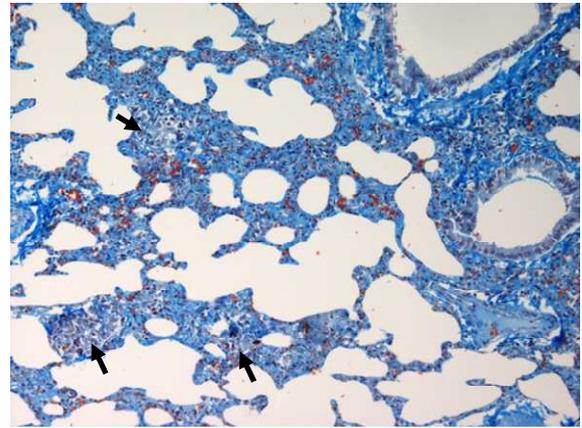


図 2-80-B AM1000 群、投与後 540 日目
肺、Masson's trichrome 染色
肉芽腫 (矢印) とその周囲の線維化が認められた。

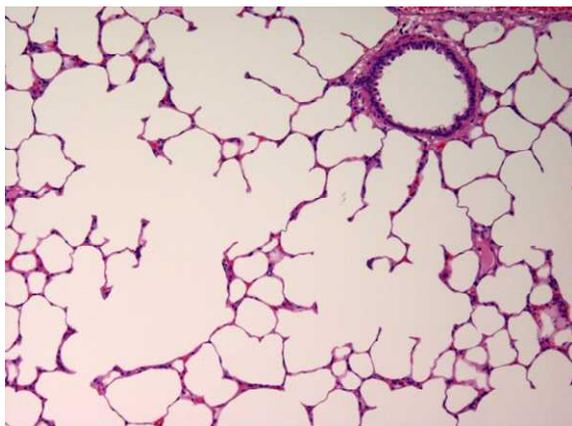


図 2-81-A AM1000G 群、投与後 540 日目
肺、HE 染色

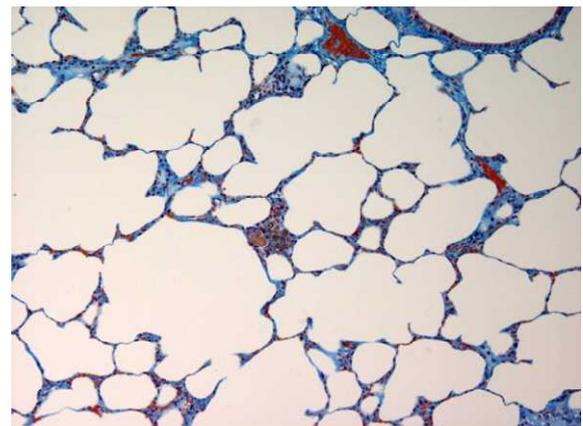


図 2-81-B AM1000G 群、投与後 540 日目
肺、Masson's trichrome 染色
ごく一部に投与粒子の沈着が認められた。

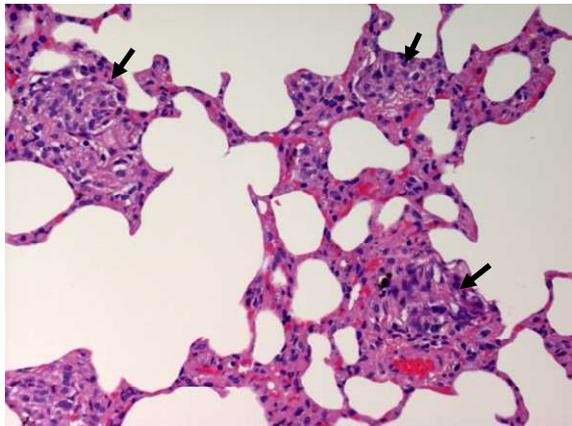


図 2-82-A AM1200 群、投与後 540 日目
肺、HE 染色
矢印は肉芽腫を示す。

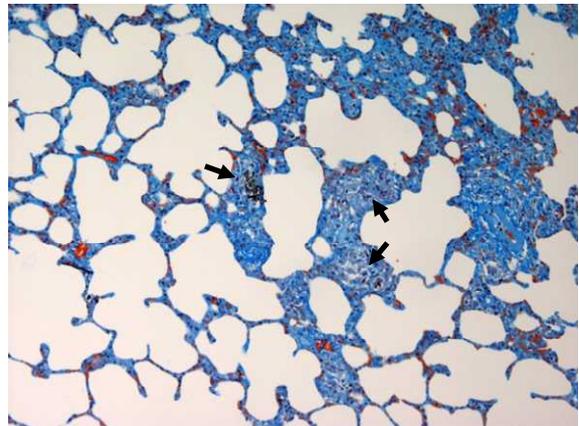


図 2-82-B AM1200 群、投与後 540 日目
肺、Masson's trichrome 染色
肉芽腫（矢印）の周囲で線維化が認められた。

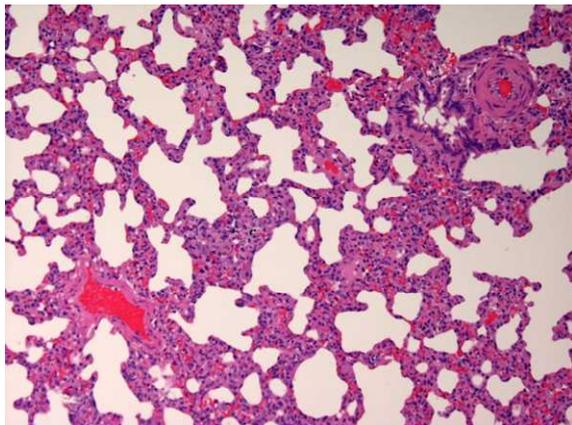


図 2-83-A AM1400 群、投与後 540 日目
肺、HE 染色

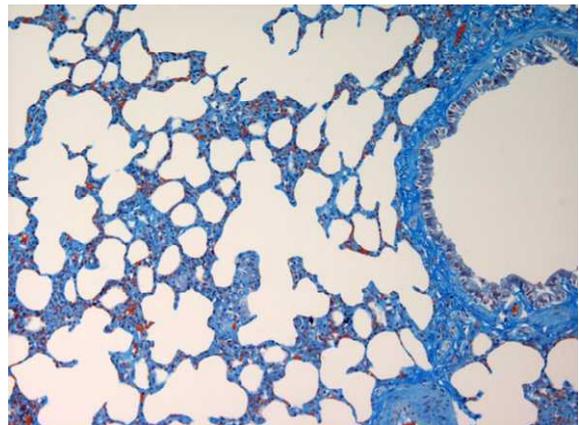


図 2-83-B AM1400 群、投与後 540 日目
肺、Masson's trichrome 染色

③18ヶ月観察群の腫瘍発生率

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1400をそれぞれ2mg/mlを一回気管内投与後18ヶ月観察した肺腫瘍および中皮腫発生率を表2-1に示した。

AM焼成物(AM1000、AM1200、AM1400)およびその粉碎物(AM1000G)では、肺腫瘍の発生は認められず、腫瘍発生リスクの明らかな増加は認められなかった。

表2-1 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1400の気管内投与後のラット肺腫瘍発生率
(投与後18ヶ月まで)

試料	投与量	肺腺腫発生率(%)	肺癌発生率(%)	中皮腫発生率(%)	肺の線維化
AM	2mg	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	+
AM1000	2mg	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	+
AM1000G	2mg	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	—
AM1200	2mg	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	+
AM1400	2mg	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	—
生理食塩水	—	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	—

2) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞分画

①BALF 中炎症細胞数の変化

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中に存在する炎症細胞数の変化を図 2-84、85 に示した。

投与初期に炎症が見られた AM、AM1000 では、投与後、観察日数の経過に伴い炎症の回復傾向が見られ、投与後 540 日目では対照群の好中球数と有意差は認められなかった。また投与初期から AM や AM1000 に比べて好中球の出現が軽微であった焼成粉砕物である AM1000G は、全期間を通じて炎症反応は軽微なものであり、投与後 540 日目では対照群と有意差も示されなかった (図 2-85)。

一方、AM1200 と AM1400 は、投与初期には AM と AM1000 に比較して好中球数が少ない傾向を示したが、投与後 30 日目から急激に好中球数が増加し、投与後 540 日目でも好中球数の増加が持続していた (図 2-85)。

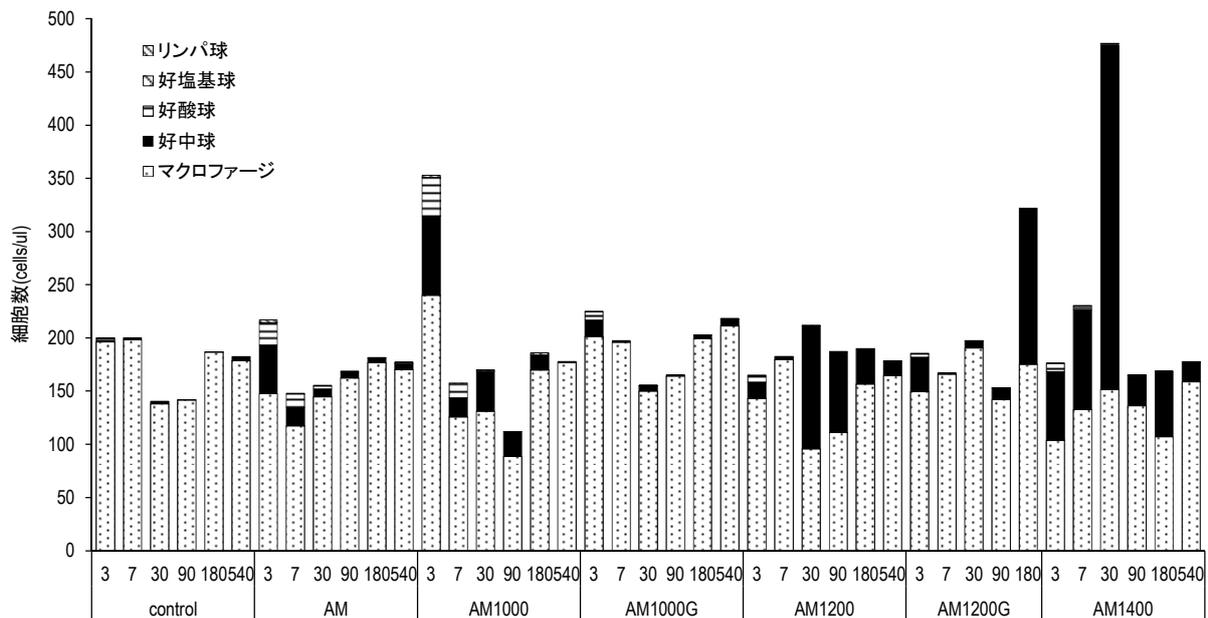


図 2-84 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中炎症細胞数の経時的変化 (AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

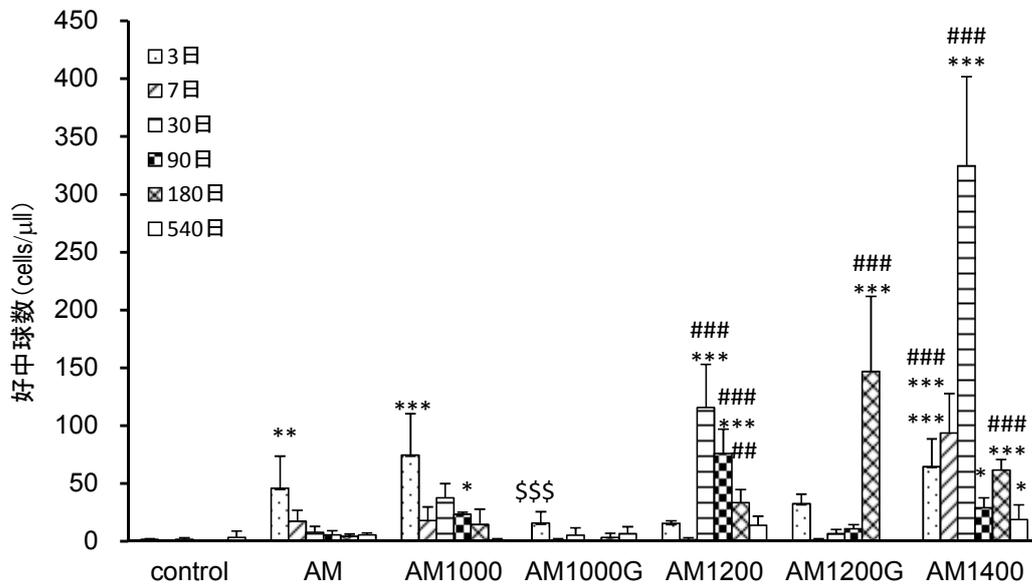


図 2-85 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中好中球数の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000：\$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

②BALF 細胞像

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目の BALF 中に回収される細胞像を図 2-86 に示した。

対照群の BALF 中には全観察期間を通して肺胞マクロファージが主に観察された。投与初期に炎症が観察された AM、AM1000 では観察日数の経過に伴い回復傾向を示し、投与後 540 日目では対照群同様に肺胞マクロファージが主に観察された。また AM1000G は全期間を通して好中球の増加は軽微なものであり投与後 540 日目では対照群と同様に主に肺胞マクロファージが観察された。

一方、投与初期は AM や AM1000 に比べて好中球の出現が少なかった AM1200、AM1400 は投与後 30 日目で急激に好中球が増加し、その後観察日数の経過と共に回復傾向を示すものの 540 日目では対照群に比べて好中球の残存が認められ、炎症が長期間持続していたことが示唆された。

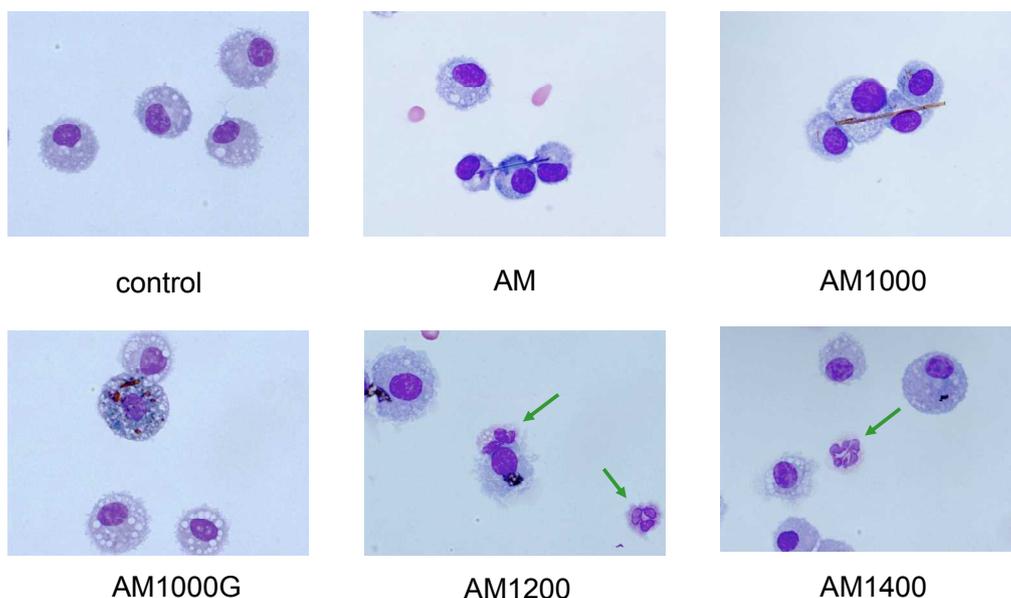


図 2-86 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目の BALF 中に回収される細胞像
矢印 (→) は好中球を示す。

3) BALF 中たんばく濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中たんばく濃度の経時的变化を図 2-87 に示した。

投与後 3 日目では、AM1000G 以外、AM と AM 焼成物については対照群に比較して有意にたんばく濃度の上昇が観察され、特に、AM、AM1000 は顕著であった($p < 0.01, 0.001$)。その後、AM と AM 焼成物のたんばく濃度は時間の経過と共に減少する傾向が見られ、投与後 180 日目以降では対照群との間に有意差は示されなかった。

すなわち、BALF 中たんばく濃度は、有害性のある AM と AM 焼成物に対して、投与初期の生体影響を評価できる指標であった。本研究において、AM1000G は BALF 中たんばく濃度に変化がなく、有害性の低い物質であることを明らかにした。

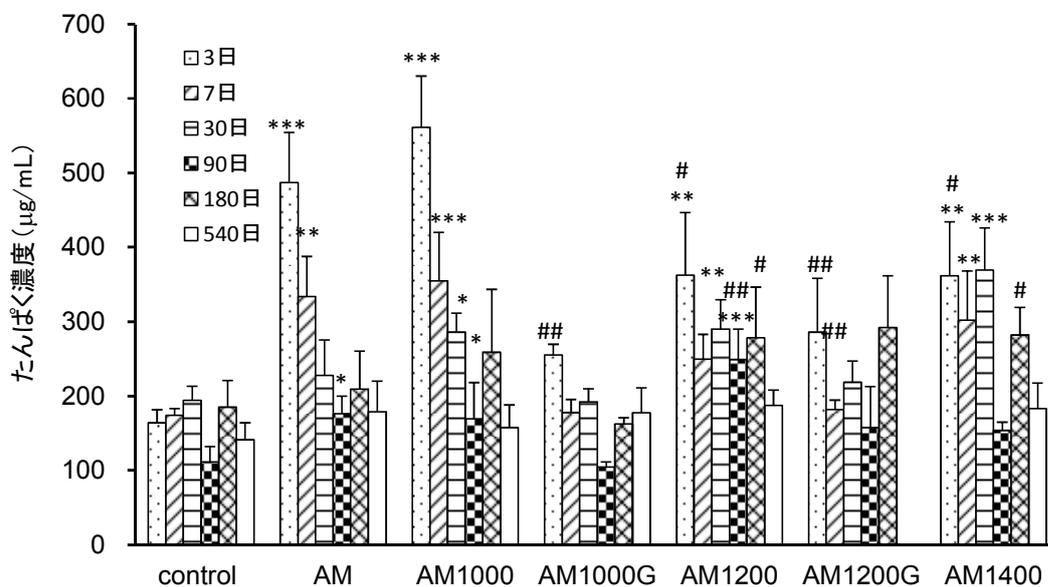


図 2-87 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中たんばく濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

4) BALF 中 LDH 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 LDH 濃度の経時的変化を図 2-88 に示した。

BALF 中 LDH 濃度は、投与後 3 日目の AM と AM1000 は対照群に比較して顕著な上昇傾向を示し ($p < 0.001$)、この上昇は一過的なもので投与後 7 日目からは対照群とほぼ同じレベルにまで回復した

一方、AM1200 と AM1400 では投与後 30 日目と 90 日目に LDH 濃度が上昇し、その後回復傾向が示された。AM、AM1000 の構成物質が酸化鉄であるのに対し、AM1200、AM1400 の構成物質は酸化鉄に加え結晶質シリカも生成されていることから、この挙動の違いは構成物質の相違であることが示唆された。

すなわち、BALF 中 LDH 濃度は、有害性のある AM とその焼成物に対して、投与初期の生体影響を評価できる指標であった。本研究において、AM1000G は BALF 中 LDH 濃度に変化がなく、有害性の低い物質であることを明らかにした。

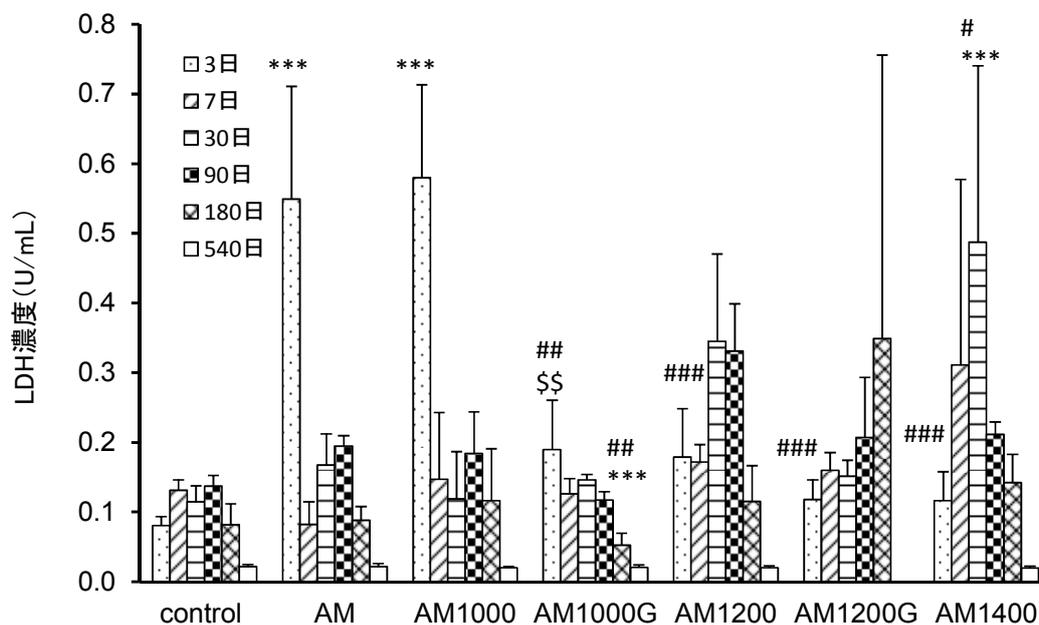


図 2-88 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 LDH 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ###, $p < 0.01$; ####, $p < 0.001$

AM vs. AM1000：\$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

5) BALF 中サイトカイン濃度

①BALF 中 MCP-1 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 MCP-1 濃度の経時的変化を図 2-89 に示した。

投与後 3 日目で AM と AM1000 は対照群に比較して有意に MCP-1 濃度の上昇が観察された ($p < 0.05, 0.001$)。AM と AM1000 の MCP-1 濃度は投与後 7 日目以降で急速に減少する傾向が示された。

これに対して、AM1200 と AM1400 は投与後 3 日目と 7 日目の変化は僅かであったが、30 日目以降の上昇傾向は特異的な傾向が示された。しかし、投与後 540 日目の値は共通して対照群の値に対して差異は認められなかった。

BALF 中 MCP-1 濃度の検査において、AM1000G は一貫して変化は明確に認められず、有害性の低さを示唆していた。

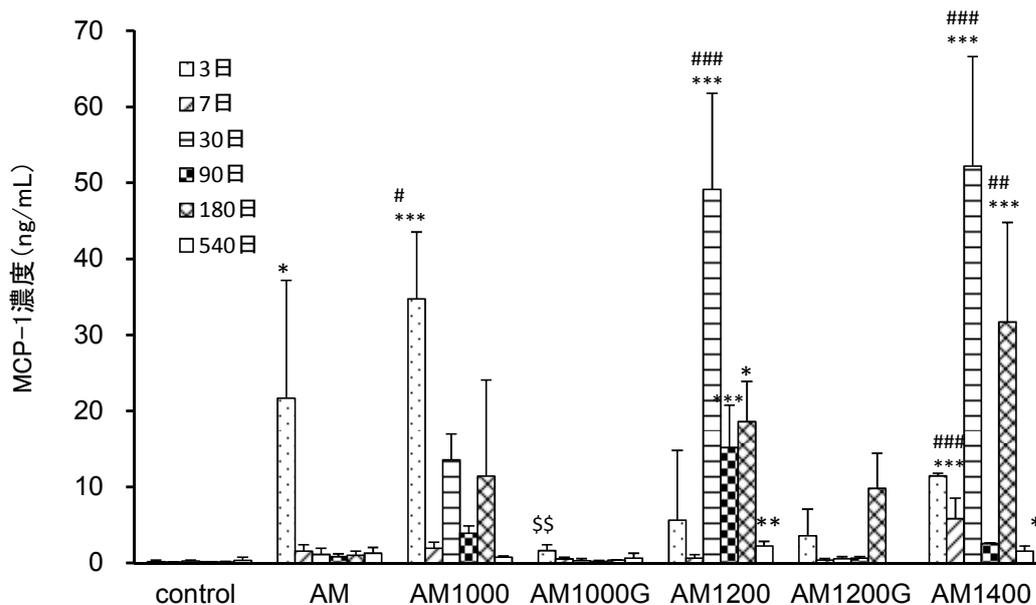


図 2-89 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 MCP-1 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000：\$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

②BALF 中 TNF- α 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 TNF- α 濃度の経時的変化を図 2-90 に示した。

投与後 3 日目で AM と AM1000 は対照群に比較して有意に TNF- α 濃度の上昇が観察された (AM, $p < 0.05$; AM1000, $p < 0.01$)。そして、AM と AM1000 の TNF- α 濃度は投与後 7 日目以降で急速に減少する傾向が示された。

一方、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 における BALF 中 TNF- α 濃度の経時的変化は顕著な動態はなく、AM1000G も同様であった。

この研究から、BALF 中の TNF- α 濃度は、有害性物質ばく露において、初期の影響評価を可能とするものと判断された。

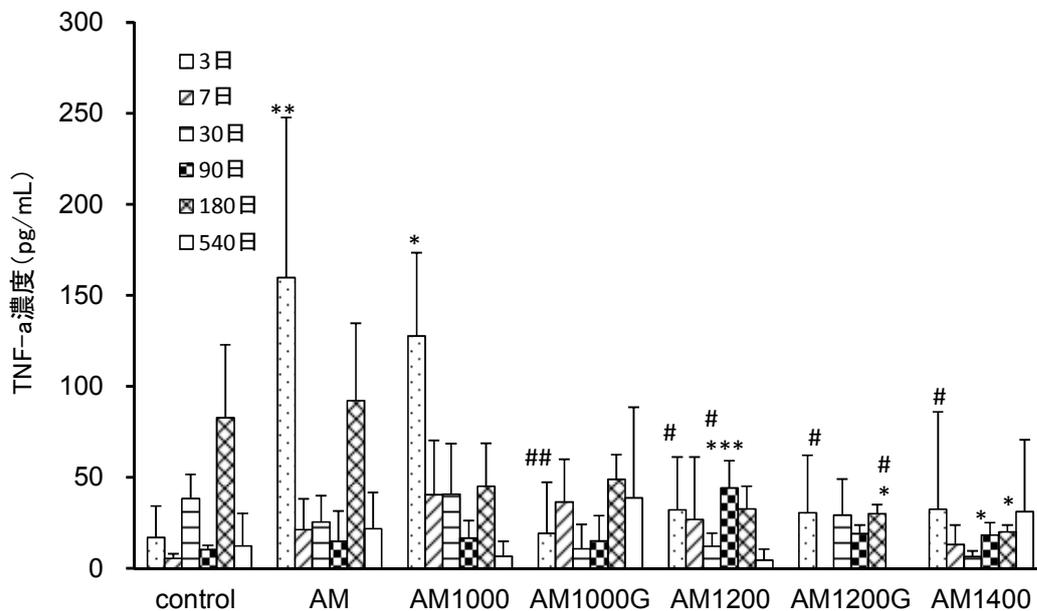


図 2-90 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 TNF- α 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

③BALF 中 IL-6 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 IL-6 濃度の経時的変化を図 2-91 に示した。

BALF 中 IL-6 濃度の測定では、同様のサイトカインである MCP-1 と比較して特徴的な経過を観察や評価することはなかった。

対照群および AM、AM 焼成物ではほぼ同じ挙動を示し、なお、投与後 540 日目を経過すると AM、AM1000、AM1400 においては、対照群に比較してやや上昇している程度の結果であった。

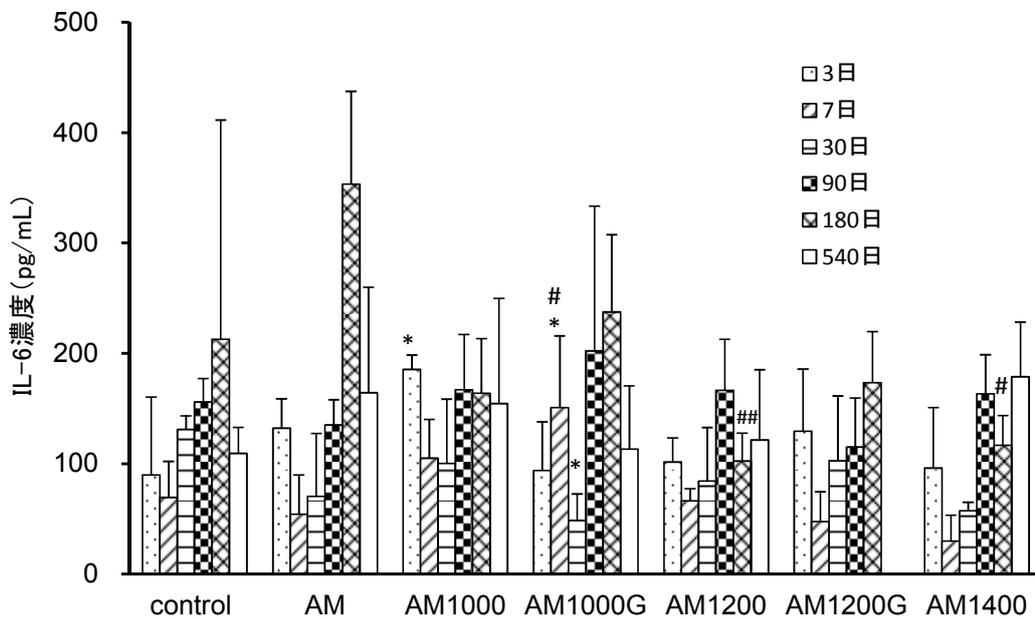


図 2-91 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの BALF 中 IL-6 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$

AM 群との比較：#、 $p < 0.05$ ；##、 $p < 0.01$ ；###、 $p < 0.001$

6) 血清中サイトカイン濃度

①血清中 MCP-1 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 MCP-1 濃度の経時的変化を図 2-92 に示した。

AM と AM 焼成物において、投与後 180 日目までの経時的な血清中 MCP-1 濃度を観察した結果、被験試料においては対照群とほぼ同一な傾向を示した。なお、AM1400 では投与後 540 日目の濃度がやや上昇している結果であった。

BALF 中 MCP-1 濃度の測定は、被験試料間の差異を鋭敏に評価することが可能であったが、血清中 MCP-1 濃度は BALF 中 MCP-1 濃度に比較して有効性は低いものと考えられた。

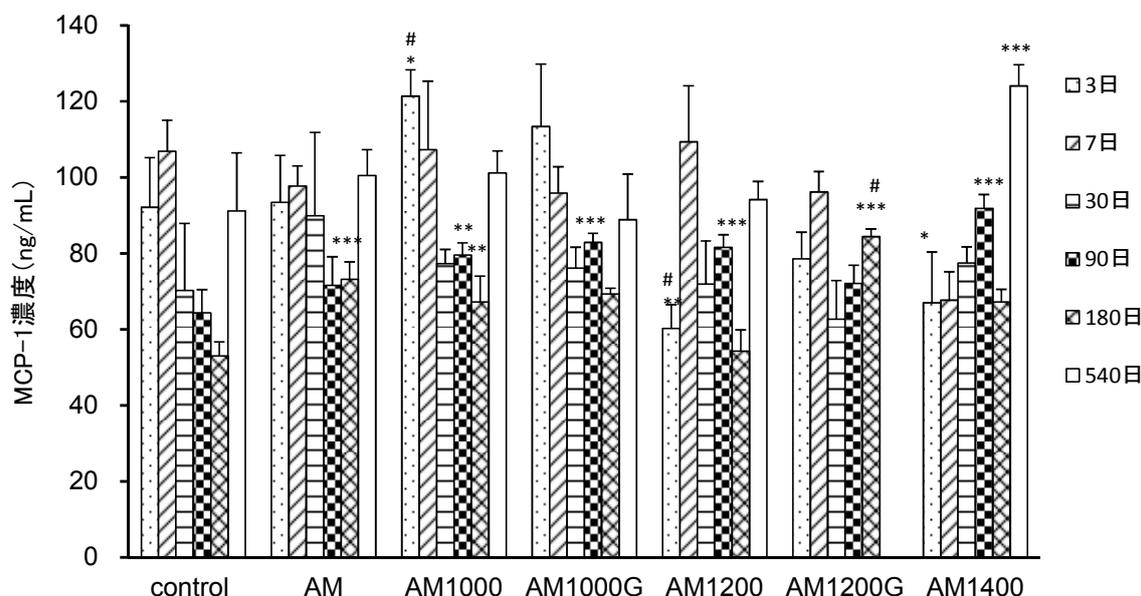


図 2-92 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 MCP-1 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

②血清中 IL-6 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 IL-6 濃度の経時的変化を図 2-93 に示した。

血清中 IL-6 濃度は、対照群を含めて全ての被験試料群において、投与後 30 日目まで高値を示した。しかし、90 日目以降の値は急速に低下して、投与後 540 日目の値は共通して、この検査で最も低い値となり、その原因は不明であった。この検査法においては、被験試料群における生体影響の比較は困難と考えた。

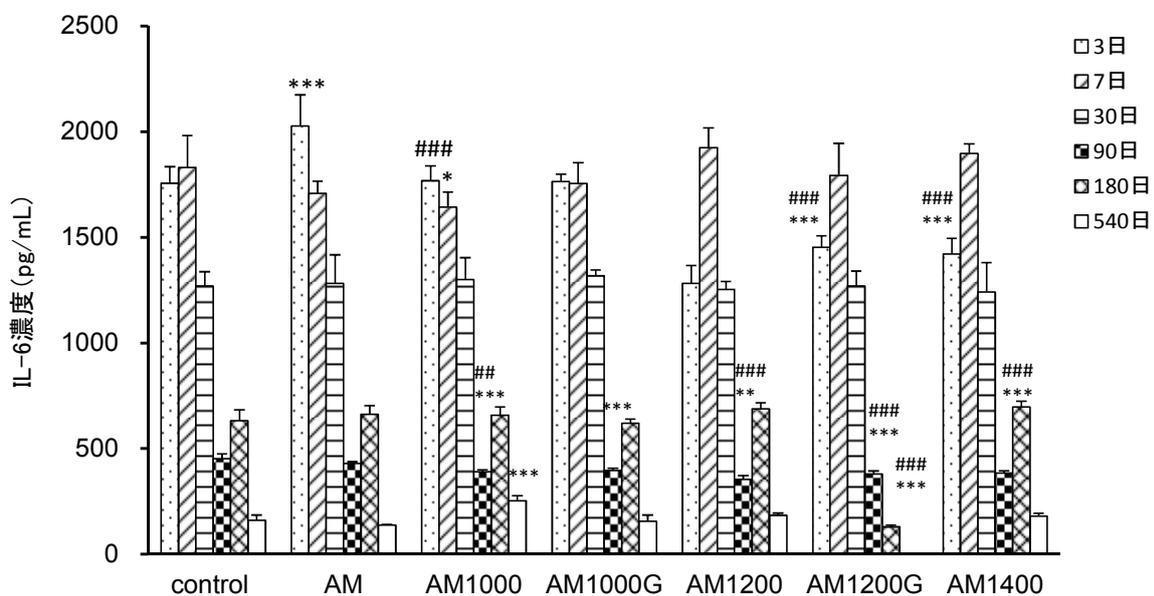


図 2-93 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 IL-6 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

7) 血清中酸化ストレス度と抗酸化力

①酸化ストレス度 (d-ROMs)

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 d-ROMs 値の経時的変化を図 2-94 に示した。

対照群、AM および AM1000G 以外の焼成物で投与後 180 日目から血清中 d-ROMs 値が上昇傾向を示した。血清中 d-ROMs 値は全身状態を反映する値であることが考えられ、投与後 540 日目を経過すると加齢など他の交絡因子の影響も関与していると思われる。そのため 540 日目の酸化ストレスの上昇傾向は、単純に被験試料だけの影響であると言及するには至らないと思われる。また投与後 540 日目の間、群間での差は見られず、焼成温度や粉碎処理がもたらす生体への効果を反映させるような結果は得られなかった。

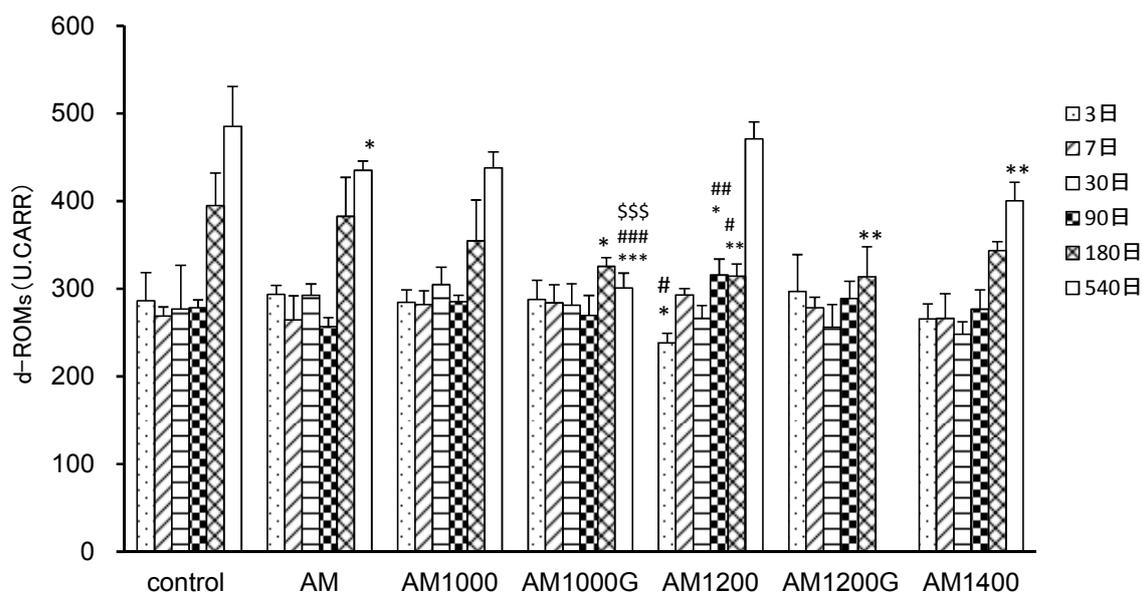


図 2-94 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 d-ROMs 値の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000 : \$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

②抗酸化力 (BAP)

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 BAP 値の経時的変化を図 2-95 に示した。

対照群および AM と AM 焼成物では、投与後 180 日目まではほぼ一定の値を示していたが、540 日目になると漸減する傾向があるように思われた。血清中 d-ROMs 値同様、BAP 値も全身状態を反映する値であることが考えられ、投与後 540 日目を経過すると加齢など他の交絡因子の影響も関与していると思われた。そのため 540 日目で BAP 値が減少したのは、d-ROMs 値の上昇からの生体防御の一貫と推測した。

本試験結果においては、被験試料群間の比較、焼成温度や粉碎処理がもたらす生体影響を明確に評価する手法としては課題があると考えた。

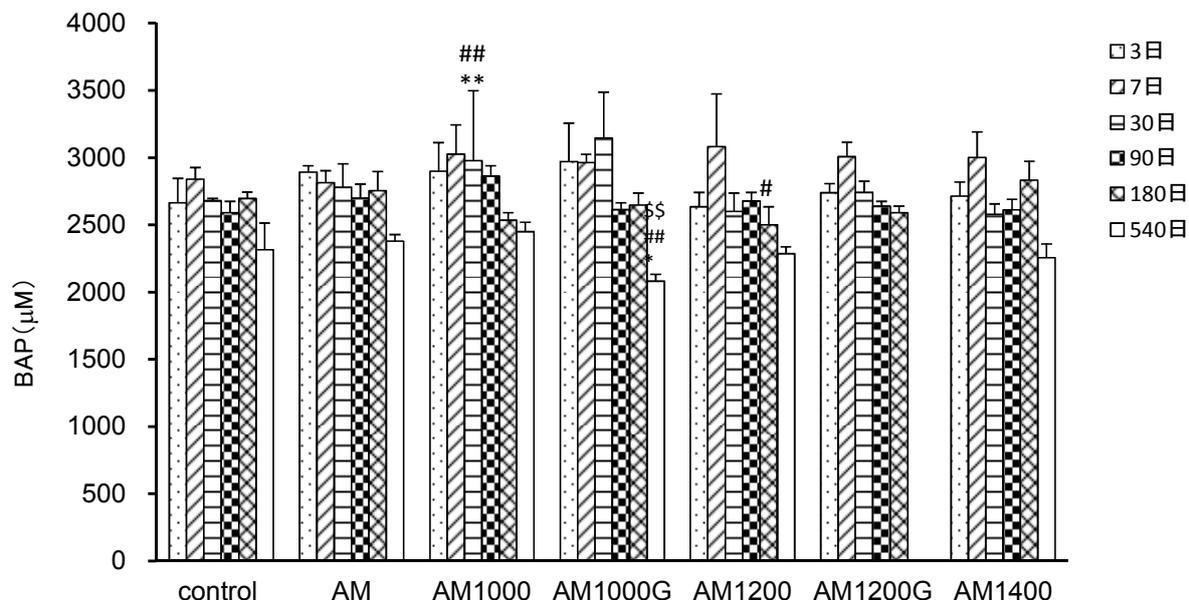


図 2-95 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 BAP 値の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000：\$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

8) 血清中 N-ERC/mesothelin 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の経時的变化を図 2-96 に示した。

投与後 3～540 日目の全期間を通して対照群と間に大きな差は見られず、焼成温度や粉碎処理がもたらす生体への効果を反映させるような結果は得られなかった。また投与後 540 日目で対照群、AM および AM 焼成物において N-ERC/mesothelin 濃度が増加する傾向を示した。N-ERC/mesothelin 濃度は全身状態を反映する値であることが考えられ、投与後 540 日目を経過すると加齢など他の影響も関与していると思われる。そのため 540 日目で N-ERC/mesothelin 濃度が増加したのは、被験試料より動物の加齢から生じた影響と推測する。

本検査法は、クリソタイルとその焼成物に対する生体影響、特に、中皮腫発生の初期影響を正確に評価されたことから、この分野の新たな研究課題と考えている。

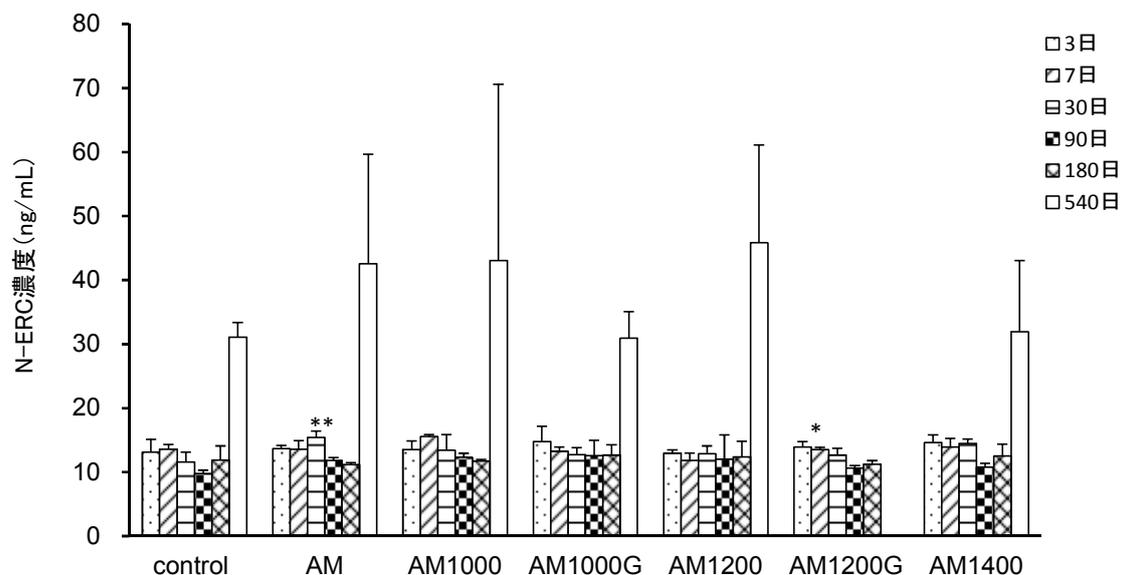


図 2-96 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

9) 尿中 NAG 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの尿中 NAG 濃度の経時的変化を図 2-97 に示した。

尿中 NAG 濃度は対照群と AM、AM 焼成物に共通して、投与直後の 3 日目は上昇し、その後は急速に減少する傾向を示した。

他方、対照群と AM、AM 焼成物に共通して 180 と 540 日目の値は共通して上昇する結果が示され、なお、被験試料群における明確な差異は認められなかった。

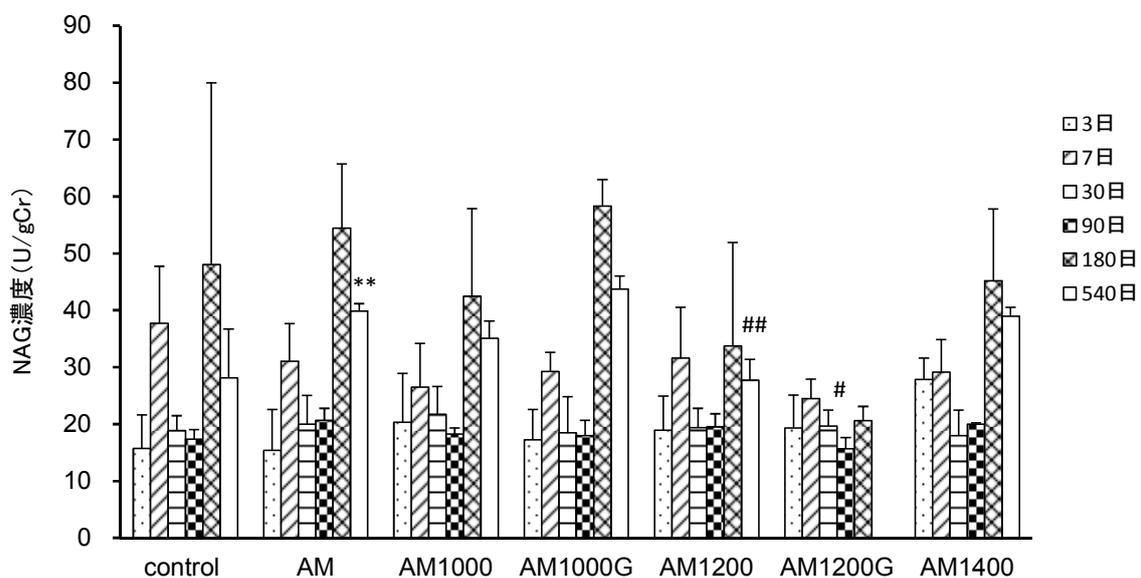


図 2-97 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 540 日目までの尿中 NAG 濃度の変化

(AM1200G 群の投与後 540 日目は結果が欠損し、研究中である)

対照群との比較：* , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$; *** , $p < 0.001$

AM 群との比較：# , $p < 0.05$; ## , $p < 0.01$; ### , $p < 0.001$

10) 尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 濃度

AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G、AM1400 をそれぞれ 2mg/ml を一回気管内投与後 180 日目までの尿中 8-OHdG 濃度の経時的变化を図 2-98、99 に示した。

焼成温度による比較

AM と AM1000 においては、投与後の尿中 8-OHdG 濃度が対照群に比較して顕著な上昇傾向を認め、この現象は AM1200 と AM1400 に比較しても有意な差異であった。

AM1000 の尿中 8-OHdG 濃度は、AM と同様に投与後 3 日目に対照群に比較して 3 倍近い上昇が認められた ($p < 0.001$)。投与後 7 日目には尿中 8-OHdG 濃度は低下したが、30 日目以降に再び上昇した。投与後 180 日目においても、AM1000 の尿中 8-OHdG 濃度は対照群の約 3 倍の濃度を示しており ($p < 0.01$)、AM に比較して酸化的 DNA 損傷の明らかな軽減が認められなかった。また AM1200、AM1400 では、投与後 3 日目の尿中 8-OHdG 濃度が上昇傾向を示したが、AM、AM1000 に比較して軽度であった。しかし、投与後 30 日目以降尿中 8-OHdG 濃度の経時的な上昇傾向が認められた。

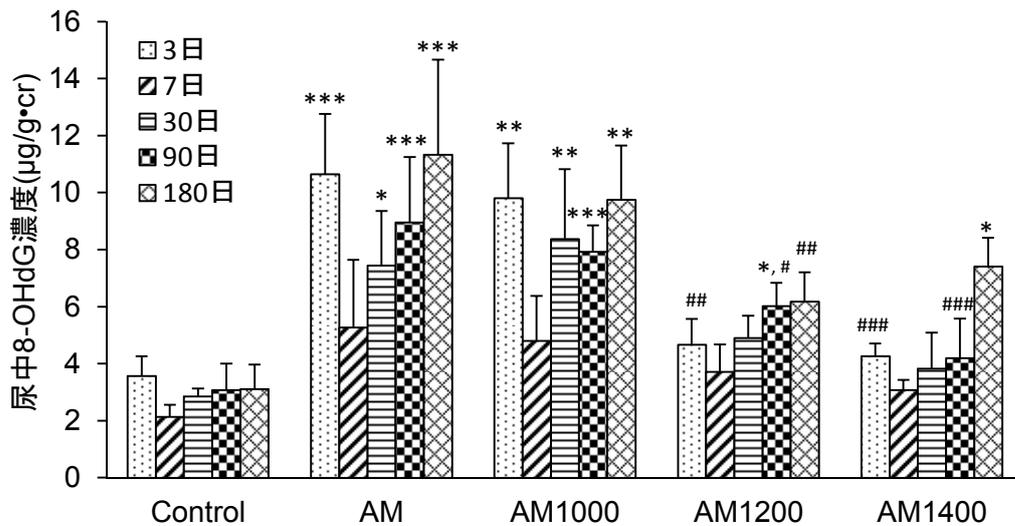


図 2-98 AM、AM1000、AM1200、AM1400 一回気管内投与後の尿中 8-OHdG 濃度の変化
対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

粉碎の有無による比較

AM1000G の尿中 8-OHdG 濃度は、投与後 3 日目に軽度の上昇を認めるが一過性であり、対照群に比較して有意な上昇は認められなかった。とくに投与後 30 日目以降の AM1000G の尿中 8-OHdG 濃度は AM および AM1000 に比較して有意に低く、粉碎処理による酸化的 DNA 損傷の明らかな軽減が認められた。一方 AM1200G の尿中 8-OHdG 濃度は投与後 3 日目では AM1200 よりもやや低値であった。しかし、投与後 30 日目以降尿中 8-OHdG 濃度は対照群に比較して 2 倍以上の増加を示し、AM1200 と比較して粉碎処理による酸化的 DNA 損傷の明らかな軽減は認められなかった。

すなわち、焼成物の粉碎処理による酸化的ストレスの軽減が有意に認められたのは AM1000 のみであった。

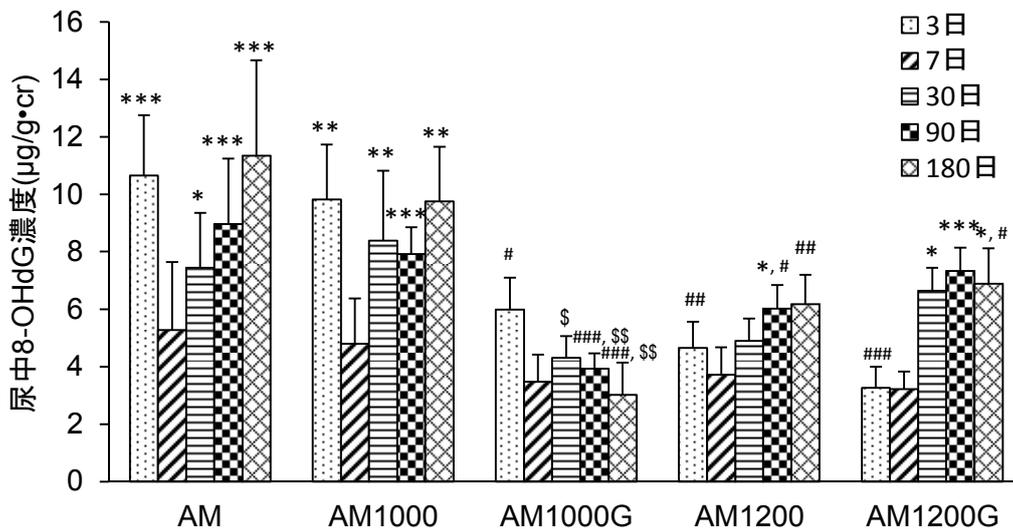


図 2-99 AM、AM1000、AM1000G、AM1200、AM1200G 一回気管内投与後の尿中 8-OHdG 濃度の変化

対照群との比較：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM 群との比較：#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

AM vs. AM1000：\$, $p < 0.05$; \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$

小括

気管内一回投与後 540 日目まで観察した結果、AM1000、AM1200 では肺泡道～肺胞にかけて肉芽腫が長期間持続し、その周囲で線維化が認められたが、AM に比較して線維化の程度は軽度であった。一方、AM1400 では、肺の炎症が持続していたが、線維化は明らかではなかった。これに対して、AM1000G では慢性呼吸器影響はほぼ認められず、肺の線維化は認められなかった。以上の結果から、AM1000G による呼吸器毒性が最も軽減されていることが明らかとなった。また AM 焼成物の慢性呼吸器影響には、繊維形状（アスベスト由来の見かけの繊維形状の残存）および結晶構造が影響することが示唆された。

AM 焼成物(AM1000、AM1200、AM1400)およびその粉碎物(AM1000G)では、気管内投与後 540 日目までの観察の結果、肺腫瘍の発生は認められず、腫瘍発生リスクの明らかな増加は認められなかった。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞分画による炎症細胞数の変化および細胞像の観察から投与初期にはどの試料を投与した群でも炎症反応が観察され、これは投与に伴う初期炎症であると考えられた。そのうち AM および AM1000 は特に強い炎症反応を示した。AM および AM1000 は繊維長の長い粒子を含んでいることが影響していると考えられた。同じ温度で焼成し粉碎処理を施した AM1000G では AM1000 で認められたような顕著な炎症反応が観察されなかったことから、初期炎症反応には繊維状物質のサイズや形状が関与していることが示唆された。

一方、AM1200 および AM1400 は投与後 30 日目に急激に炎症細胞が出現され、投与後 540 日目が経過しても炎症細胞の残存が観察された。AM1200 および AM1400 は焼成により酸化鉄だけでなく結晶質シリカが生成してくることが確認されている。また全観察期間を通して炎症反応が軽微である AM1000G には酸化鉄のみしか生成しないことから、長期的な炎症反応（慢性影響）には結晶質シリカが関与している可能性が示唆された。

本研究から、繊維状物質の急性と慢性影響には物質のサイズや形状だけでなく結晶構成成分など複雑な要因が関与しており、生体影響を正しく検証する際には多角的な研究の必要性が求められるのではないかと考えた。

3. ラット腹腔内投与による発がん性試験

実験方法

1) 実験動物

Wistar 系雄ラット (Crj:WI、日本チャールスリバー) を使用した。動物はステンレス製金網ケージに 5 匹ずつ収容し、浄水器ろ過水道水、放射線滅菌飼料 (CE-2、日本クレア) を自由摂取させた。なお、酸化ストレス関連のマーカーの測定を実施したラットは、採血および採尿日の 3 日前から放射線滅菌高タンパク飼料 (Egg white diet; Dyets No.110952, Dyets Inc.) にて飼育した。

動物実験は北里大学医療衛生学部の動物飼育施設で実施した。飼育環境はセミバリア施設で 12hr/12hr 明暗、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 5\% \text{RH}$ である。実験は北里大学の動物飼育管理委員会の規則及び承認のもとに実施された。

2) 被験試料の懸濁液調整

被験試料 (AM、AM1000、AM1000G) は、投与前日に秤量した後、オートクレーブで 121°C 、20 分間滅菌、 37°C の乾燥器内で保存した。動物投与直前に試料を所定容量になるように生理食塩水に懸濁させ、超音波洗浄器で 10 分間分散処理を行った。

3) 腹腔内投与

ラット (10 週齢) に AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ $10\text{mg}/2\text{ml}$ 一回腹腔内投与した。AM、AM1000 以外の被験試料は非繊維形状の粒子が多いため、投与量はすべて繊維数ではなく、重量濃度で統一した。予備試験による急性毒性をもとに投与量を設定した。投与匹数は各群 25 匹である。対照群には生理食塩水を 2ml 注入した。

採血はラット尾静脈からツベルクリン用シリンジを用いて採血した。ラットを採血用保定器内で保定しラットの尾静脈から無麻酔下で $0.5 \sim 0.7\text{ml}$ 採血し採血チューブに入れ遮光ボックス内で室温、30 分静置した後、卓上遠心分離器 (フナコシ) で血清分離し -80°C で凍結保存した。

採尿は、前日にメタボリックケージ (Tecniplast) に個別に一晩収容し、遮光した採尿チューブで採尿し -80°C で凍結保存した。採血および採尿に用いたラット匹数は各群 5 匹である。

4) 病理組織学的検索

瀕死動物および死亡動物を含め、すべての動物を解剖し、病理組織学的検索を実施した。腫瘍および胸腔、腹腔内の全臓器、横隔膜、腹膜を採取し、10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。定法によりパラフィン包埋した後、 $3\mu\text{m}$ 以下に薄切し、HE 染色、必要に応じて特殊染色を行った。

5) 血清中酸化ストレス度と抗酸化力の測定

気管内投与試験と同様に、発がん試験（腹腔内投与）においても、FRAS4（DIACRON）を使用し、血清を用いて生体内の活性酸素・フリーラジカルによる d-ROMs 値と抗酸化力を示す BAP 値を測定した。d-ROMs と BAP の測定法は、気管内投与実験と同様に実施した。

6) 血清中 MCP-1 濃度の測定

血清中 MCP-1 濃度は、気管内投与試験と同様に BD OptEIA™ Set Rat MCP-1（BD Biosciences）を用いて測定した。

7) 血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の測定

血清中 N-ERC/mesothelin 濃度は、気管内投与試験と同様に Rat N-ERC/mesothelin assay kit（Immuno-Biological Laboratories）を用いて測定した。

8) 尿検査

尿の測定項目は、クレアチニンおよび近位尿細管障害のマーカーである N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（N-acetyl-β-D-glucosaminidase : NAG）の 2 項目である。それぞれの測定方法は気管内投与試験と同様に行った。NAG 濃度は尿中クレアチニン濃度で補正した。

9) 統計処理

測定値の統計解析は、SPSS ver.18J を用い、各群間の差について、tukey の検定を行った。

生存分析は腹腔内投与後 720 日目までの動物の生存データをもとに、死亡、中皮腫による死亡のそれぞれについて、Kaplan-Meier 法で生存曲線を作成した。

結果と考察

1) 死亡率および中皮腫発生率

AM と AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後 720 日目までの中皮腫発生率の結果を表 3-1 に示した。また、各群のすべての死亡についての生存曲線を図 3-1 に、中皮腫による死亡についての生存曲線を図 3-2 に示した。

AM の中皮腫発生率は 56% であり、AM1000、AM1000G に比較して有意に高値であった ($p < 0.001$)。中皮腫死亡の初発は投与後 358 日目であり、中皮腫の 50% 生存期間は 664 日であった。

一方、AM1000 では、腹膜の線維化所見は認められたが、中皮腫発生率は 4% とわずかであり、AM に比較して有意に低値であった ($p < 0.001$)。これに対して、AM1000G では腹膜の線維化も認められず、さらに、中皮腫の発生も認められなかった。

表 3-1 ラットへの AM と AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の中皮腫発生率 (投与後 2 年まで)

試料	投与量	WHO 繊維数 $\times 10^9$ ※1	中皮腫 発生率(%) ※2	中皮腫 50% 生存期間
AM	10mg	0.75	14/25 (56%) ***	664 日 (95%CI:617-711)
AM1000	10mg	0.44	1/25 (4%)	—
AM1000G	10mg	0	0/25 (0%)	—

※1 WHO 繊維：繊維長 $\geq 5\mu\text{m}$ 、繊維幅 $< 3\mu\text{m}$ 、アスペクト比 ≥ 3 、なお、AM1000 については、見かけ上の繊維を指す。

※2 AM vs. AM1000, AM1000G: ***, $p < 0.001$

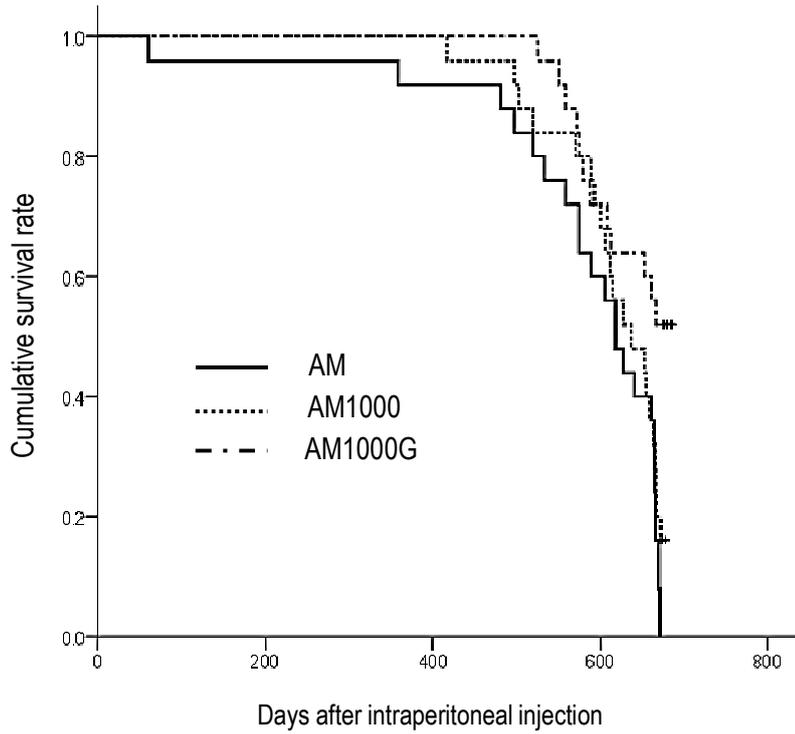


図 3-1 ラットへの AM と AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の生存曲線 (全死因)

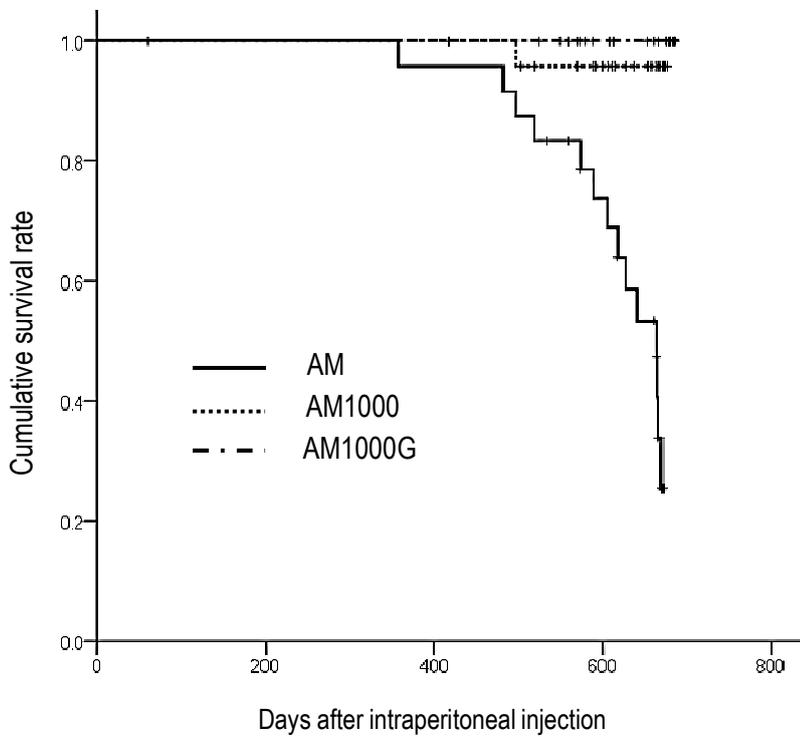


図 3-2 ラットへの AM と AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の生存曲線 (中皮腫死亡)

2) 病理組織学的検索

①肉眼的所見

対照群の腹腔内の肉眼的所見を図 3-3 に示した。また AM、AM1000、AM1000G を腹腔内投与後の代表的な肉眼的所見をそれぞれ図 3-4-A, B、図 3-5、図 3-6 に示した。

対照群

腹膜の線維化、癒着等は認められず、中皮腫の発生も認められなかった (図 3-3)。

AM 群

投与試料が肝臓、脾臓の被膜、腸管漿膜、横隔膜、大網、腸間膜、腹壁などの腹膜組織に沈着しており、腹膜組織の線維性肥厚が認められた。さらに腹膜中皮腫の発生例では、血性腹水の貯留が認められることが多く、中皮腫の結節性腫瘤が肝臓、横隔膜、大網、腸管漿膜、腸間膜、腹壁などの腹膜組織に多数存在し、腹腔内臓器の癒着が認められた (図 3-4-A, B)。

AM1000 群

投与試料が肝臓の被膜、腸管漿膜、横隔膜、大網、腸間膜、腹壁などの腹膜組織に集積して沈着しており、肝臓の被膜等で腹膜組織の線維性肥厚や腹腔内臓器の癒着が局所的に認められた (図 3-5)。しかし、AM 群と比較して中皮腫の発生は 1 個体しか認められなかった。

AM1000G 群

投与試料が大網や腸間膜等集積して沈着しているのが観察された。しかし、AM1000 群と比較して腹膜の線維化や腹腔内臓器の癒着はほとんど認められなかった (図 3-6)。さらに、中皮腫の発生は認められなかった。

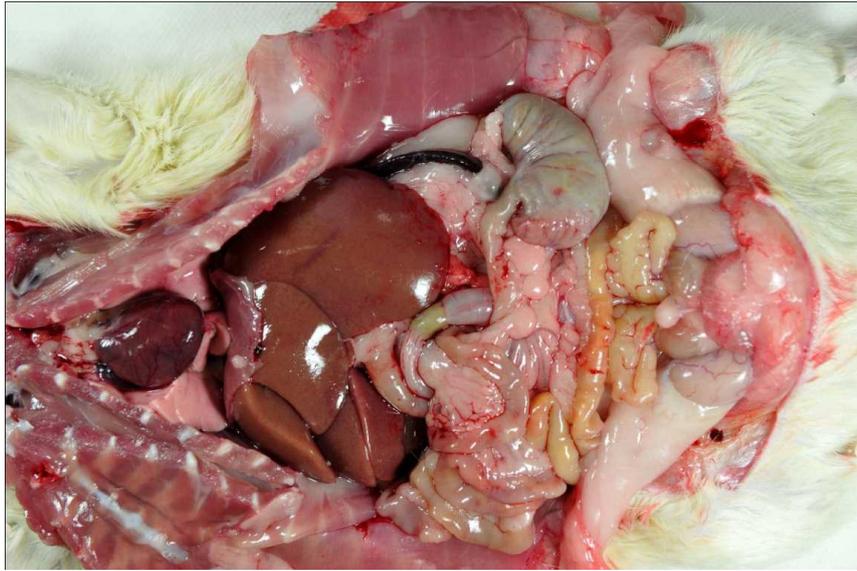


図 3-3 対照群：腹膜の線維化や中皮腫の発生を認めない。

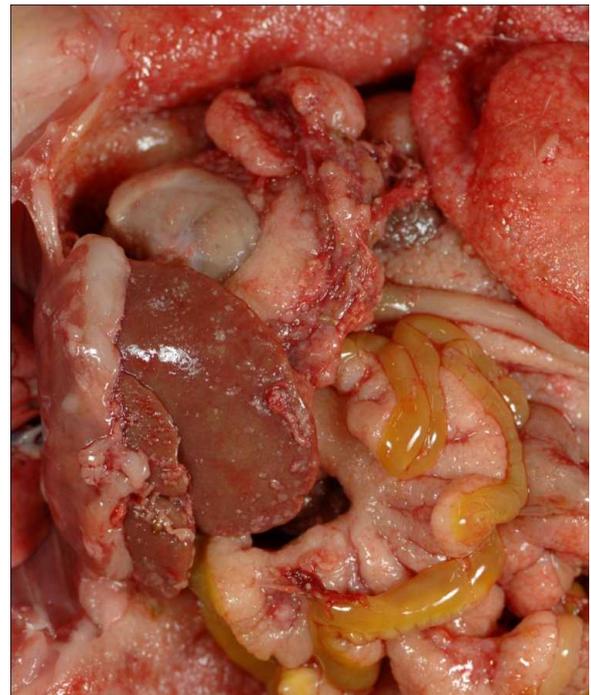
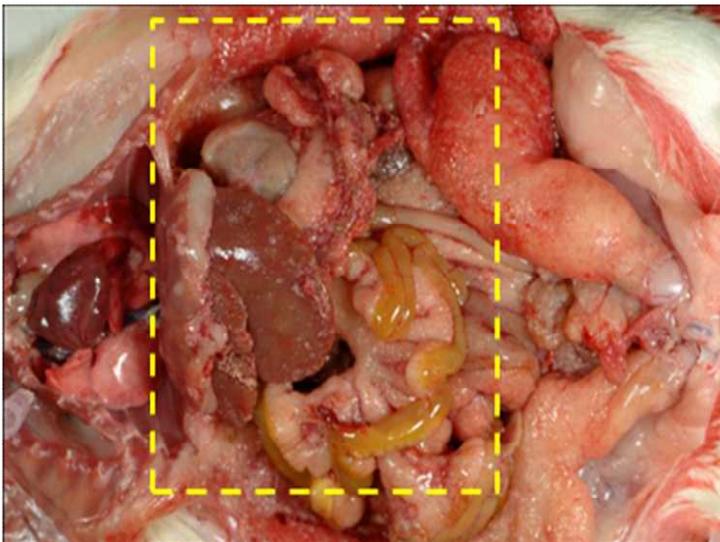


図 3-4-A AM 群に発生した腹膜中皮腫の肉眼的所見

中皮腫の微小腫瘍が肝臓、大網、腸管漿膜、壁側腹膜に多数認められ、血性腹水が 150ml 貯留していた。右写真には左写真の四角部分の拡大写真を示す。

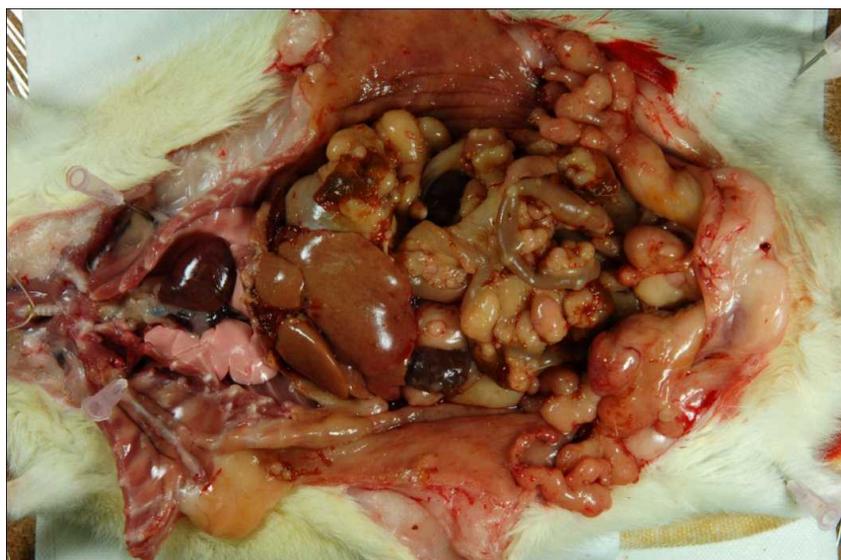


図 3-4-B AM 群に発生した腹膜中皮腫の肉眼的所見

大網、腸間膜に中皮腫の結節性腫瘤が多数認められ、腹腔内臓器の癒着が認められた。約 100ml の血性腹水の貯留も認められた。

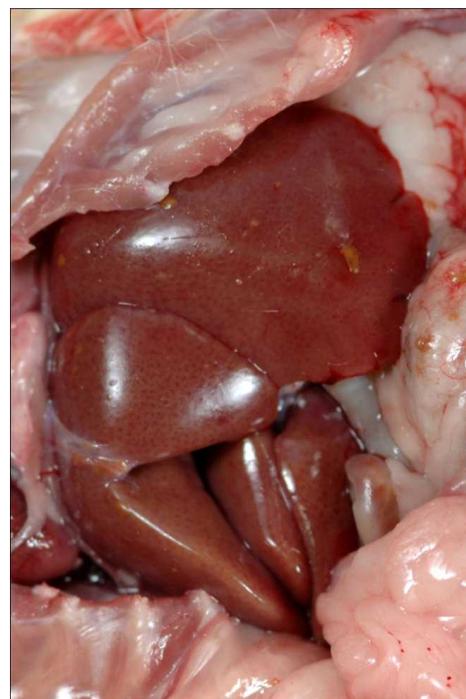
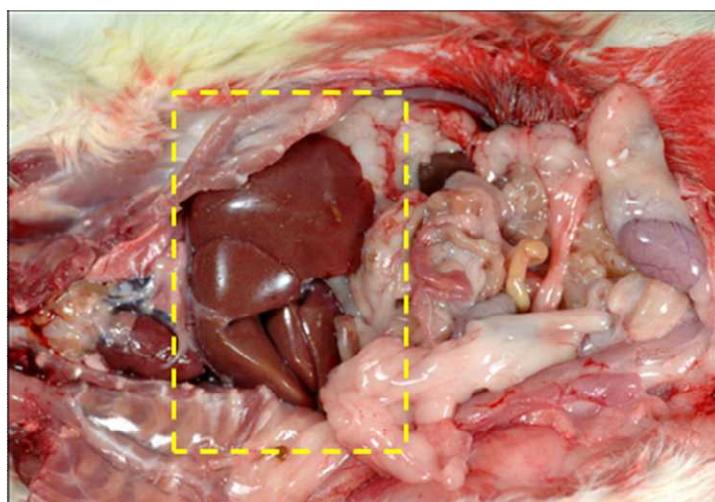


図 3-5 AM1000 群の解剖時の肉眼的所見

肝臓の被膜や腸間膜に褐色の試料の沈着が認められた。肝臓の被膜などの腹膜組織は線維性に肥厚し、横隔膜や腸管との癒着が認められた。しかし中皮腫の発生は認められず、血性腹水の貯留も認められなかった。右写真には左写真の四角部分の拡大写真を示す。

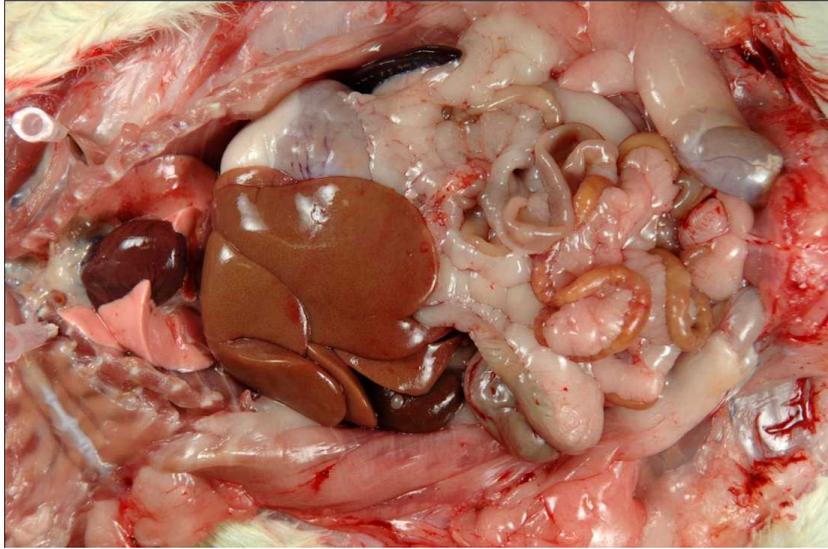


図 3-6 AM1000G 群の解剖時の肉眼的所見

大網に褐色の投与試料の沈着が認められた。しかし、AM1000 群に比較して腹膜の線維化や腹腔内臓器の癒着はほとんど認められず、中皮腫の発生は認められなかった。

②病理組織学的所見

対照群の腹腔内の肉眼的所見を図 3-7 に示した。また AM、AM1000、AM1000G を一回腹腔内投与後の動物の解剖時の腹膜組織の病理組織像を図 3-8～10 に示した。

対照群

腹膜組織の中皮細胞の過形成、線維化の所見は認められなかった (図 3-7)。

AM 群

横隔膜、肝臓被膜、大網、腸間膜、腸管漿膜などの腹膜組織に投与粒子の沈着と肉芽腫性病変が形成されており、肉芽腫性病変を中心として腹膜組織の線維化が認められた (図 3-8-A)。さらに中皮の過形成性病変や中皮腫が認められた。腹膜中皮腫は腹腔内に結節性に増殖していた (図 3-8-B)。中皮腫の組織型は、上皮型と肉腫型がほぼ同程度認められた。上皮型中皮腫では漿膜面で腫瘍細胞が乳頭状に増殖する像も観察された。

AM1000 群

肝臓の被膜、腸管漿膜、横隔膜、大網、腸間膜、腹壁などの腹膜組織に投与試料の沈着と肉芽腫性病変の形成が認められた (図 3-9)。さらに、肉芽腫性病変を中心として腹膜組織の線維化が認められた。しかし、多くの症例で中皮の過形成性変化は認められなかった。

AM1000G 群

大網、腸間膜などの腹膜組織に投与粒子の沈着が観察された。投与粒子の沈着部位では肉芽腫性病変が認められたが、AM1000 に比較して線維化は弱かった (図 3-10)。また中皮腫の過形成性変化は認められなかった。

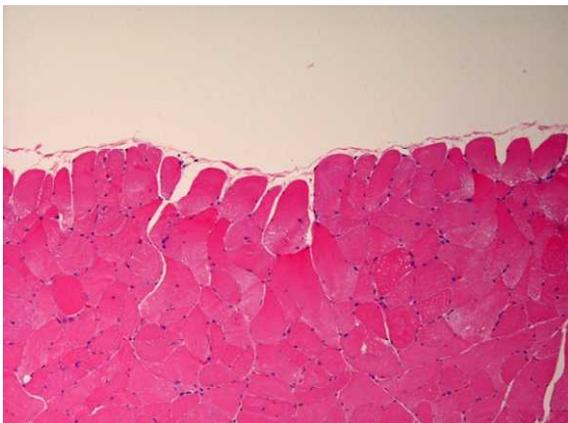


図 3-7 対照群、横隔膜、HE 染色

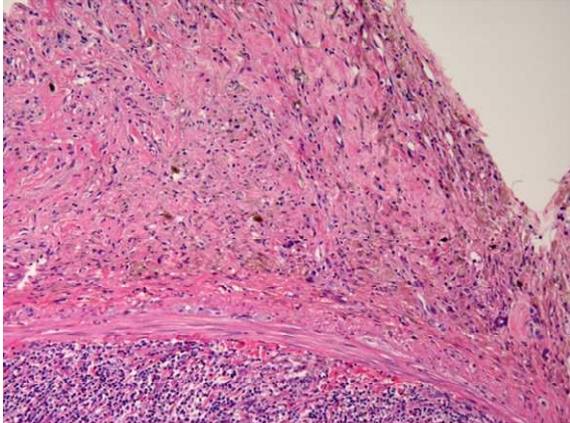


図 3-8-A AM 群、腹膜組織、HE 染色
肉芽腫及び線維化が認められた。

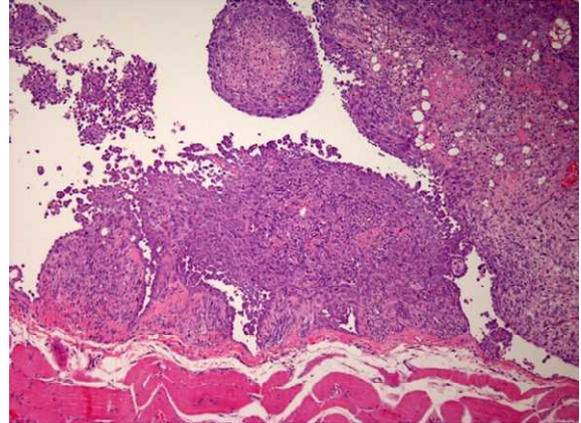


図 3-8-B AM 群、横隔膜、HE 染色
腹腔内に結節性、一部乳頭状に増殖する
中皮腫が認められた。

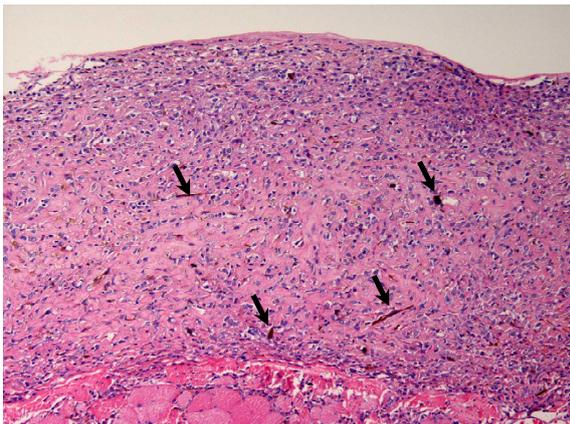


図 3-9 AM1000 群、横隔膜、HE 染色
肉芽腫性病変と線維化が認められた。
矢印は投与粒子を示す。

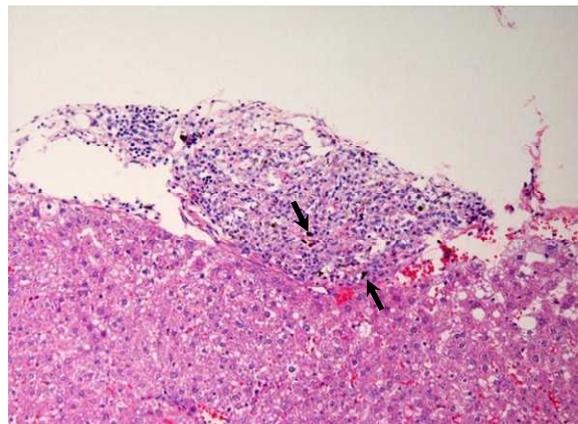


図 3-10 AM1000G 群、肝臓、HE 染色
被膜のごく一部に肉芽腫性病変が認め
られた。矢印は投与粒子を示す。

3) 血清中酸化ストレス度と抗酸化力

① 酸化ストレス度 (d-ROMs)

ラットへの AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後 600 日目までの血清中 d-ROMs 値の経時的変化を図 3-11 に示した。AM、AM1000、AM1000G 共に腹腔内投与直後は、一過性の上昇傾向を示したが、その後は減少し、10 日目以後はやや上昇する傾向を示した。3 物質の酸化ストレス度は、AM>AM1000>AM1000G の順であり、360 日目頃までは各群共に経時的に上昇しており、ほとんどの時点において AM1000G は AM よりも有意に減弱したことから、粉碎処理による酸化ストレスの低減が示唆された。

一方、360 日目以降は他の群と比べて AM1000 が低い傾向を示したが、全体的に同一群の経時的な変化が大きく、また、各群の標準偏差 (SD) も大きく変化した。この現象は、投与物質から発生する酸化的ストレスに、加齢による影響が加味されたものと推測された。

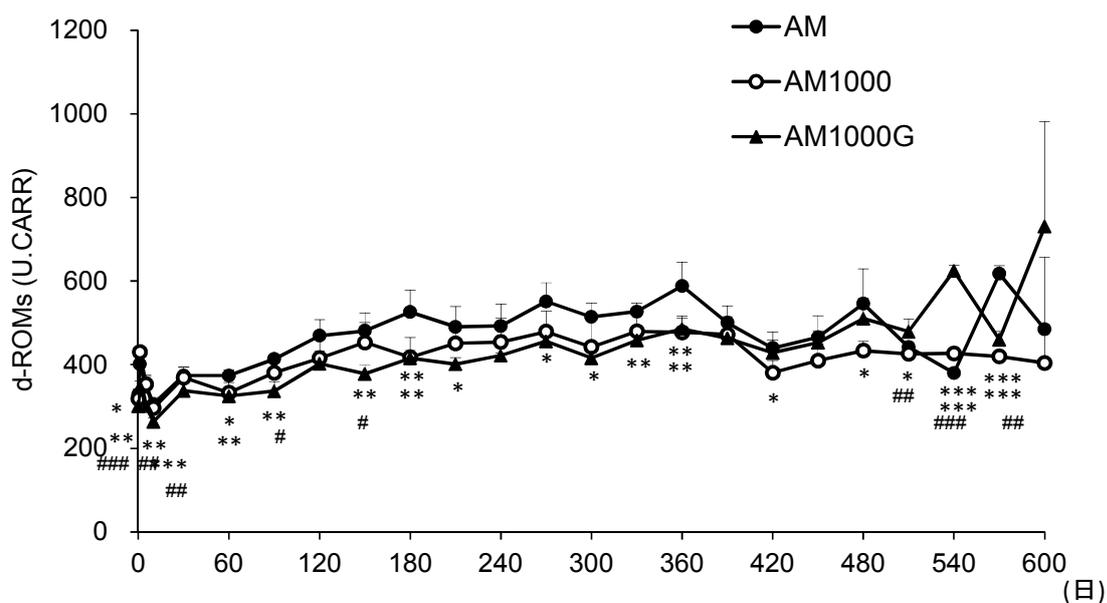


図 3-11 AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の血清中 d-ROMs 値の変化
 AM vs. AM1000, AM1000G : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$
 AM1000 vs. AM1000G : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

②抗酸化力 (BAP)

ラットへの AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後 600 日目までの血清中 BAP 値の経時的変化を図 3-12 に示した。AM、AM1000、AM1000G 共に腹腔内投与直後は、一過性の低下の傾向を見たが、5 日目以後に顕著な変化は観察されていない。各群を比較しても特異性はないが、360 日目以降から各群共に緩やかに減少傾向を示していた。

一方、540 日目以降の AM1000 では AM1000G に比較して、抗酸化力の低下傾向が認められ、生体影響への負荷が増加していくことが示唆された。さらに、AM よりも AM1000 がより生体影響への負荷が増加していくことも示唆された。

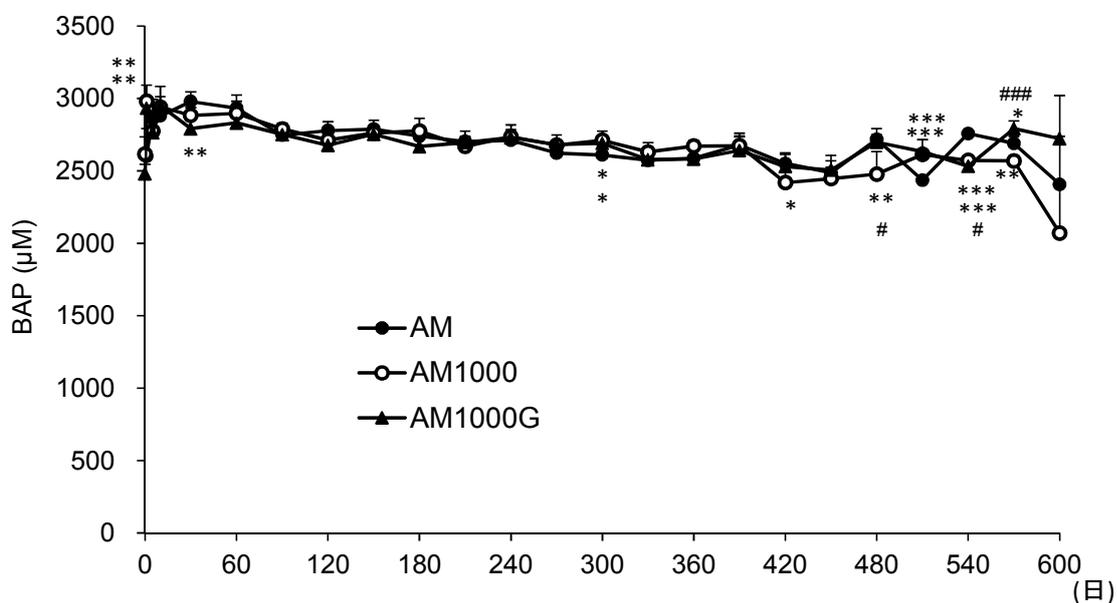


図 3-12 AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の血清中 BAP 値の変化

AM vs. AM1000, AM1000G : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM1000 vs. AM1000G : #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.01$; ####, $p < 0.001$

4) 血清中サイトカイン濃度 (MCP-1 濃度)

ラットへの AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後 600 日目までの血清中 MCP-1 濃度の経時的変化を図 3-13 に示した。AM と AM1000 の血清中 MCP-1 濃度から、投与後初期の炎症反応を鋭敏に捉えている結果を得た。その後、投与後 30 日目から 360 日目にかけては経時的な変化は見られなかった。AM1000G は AM と AM1000 に比較して僅かな変化であった。血清中 MCP-1 濃度の測定の意義の一つとして、有害因子ばく露後における初期の影響評価に有益と考えられた。

一方、360 日目以降では、AM と AM1000 の血清中 MCP-1 濃度が徐々に上昇する傾向が示された。なお、AM1000G もその傾向が示されたが、AM と AM1000 の値より常に低い結果であった。

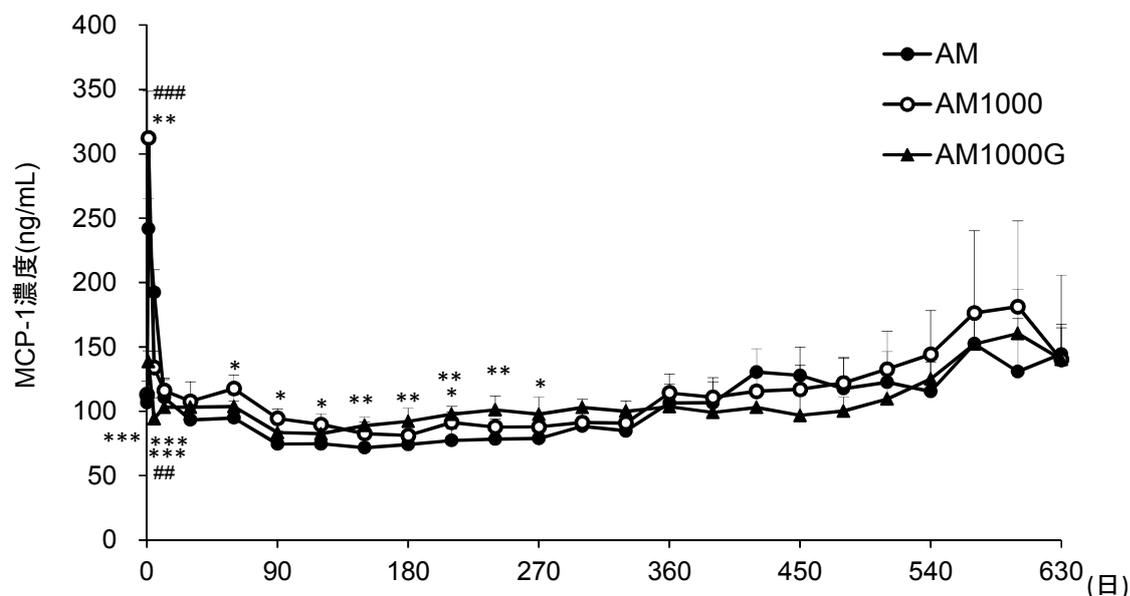


図 3-13 AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の血清中 MCP-1 濃度の変化
 AM vs. AM1000, AM1000G : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$
 AM1000 vs. AM1000G : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

5) 血清中 N-ERC/mesothelin 濃度

ラットへの AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後 600 日目までの血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の経時的变化を図 3-14 に示した。投与後 450 日目までの観察期間において各群共に投与後の一過性の上昇以外は低い値を示したが、AM1000 と AM1000G は、AM と比較して有意に減少していた。また、AM1000G は AM1000 と比較しても有意に減少していた。その後、660 日目まで経時的に上昇し、各群の差は広がる傾向にあった。

血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の結果から、AM、AM1000 と AM1000G では、生体影響の作用が大きく相違する結果が明確に示された。このような背景から、時間の経過からの各物質における中皮腫発生への予測と判断に重要な知見と考えられた。

中皮腫発生率と血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の関係を解析すると、中皮腫発生と強く関係することが明らかとなった。

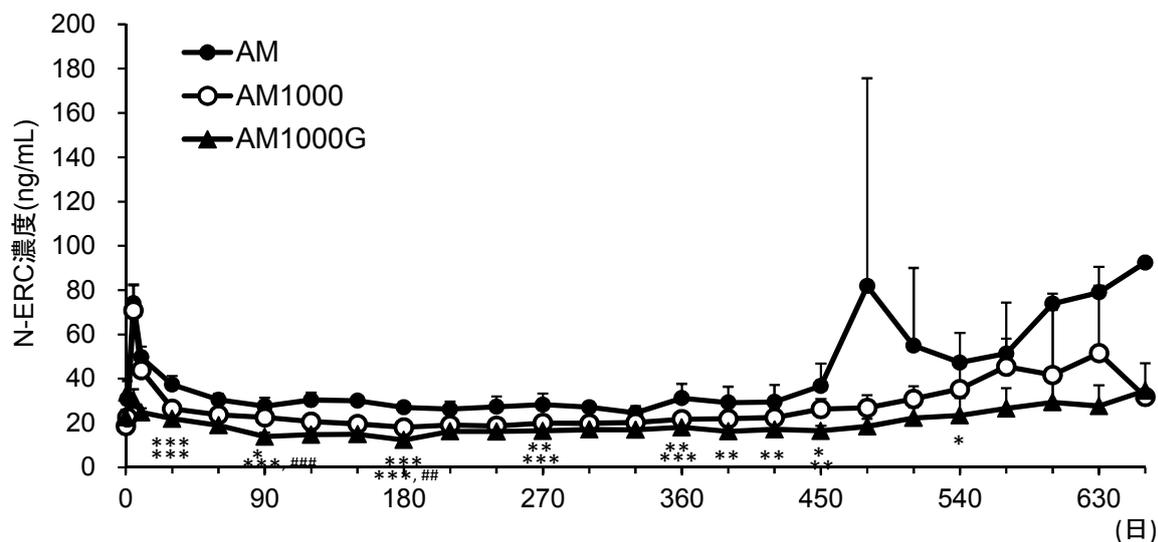


図 3-14 AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の血清中 N-ERC/mesothelin 濃度の変化

AM vs. AM1000, AM1000G : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

AM1000 vs. AM1000G : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

6) 尿中 NAG 濃度

ラットへの AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ 630 日目までの尿中 NAG 濃度の経時的変化を図 3-15 に示した。各群共に経時的に値が上昇していた。3 物質投与後の尿中 NAG 濃度は、360 日目までは AM>AM1000>AM1000G の順であり、特に、AM と AM1000 がそれぞれ AM1000G に比較して、高値の傾向であった。なお、360 日目以降は AM と AM1000 が逆転し、AM1000 の上昇傾向がみられた。しかし、AM1000 の粉碎物である AM1000G は、投与後 540 日目までは統計学的な有意差を示す低値の傾向であった。観察期間の末期は、動物個体の生理的な影響も加味された尿中 NAG 濃度の変動が観察された。

これまで、腎臓がアスベストの標的臓器となることは知られていない。しかし、AM 焼成物の構成成分であるシリカに関しては腎炎を引き起こすことが報告されており、この分野の研究の補充が重要であると推察した。

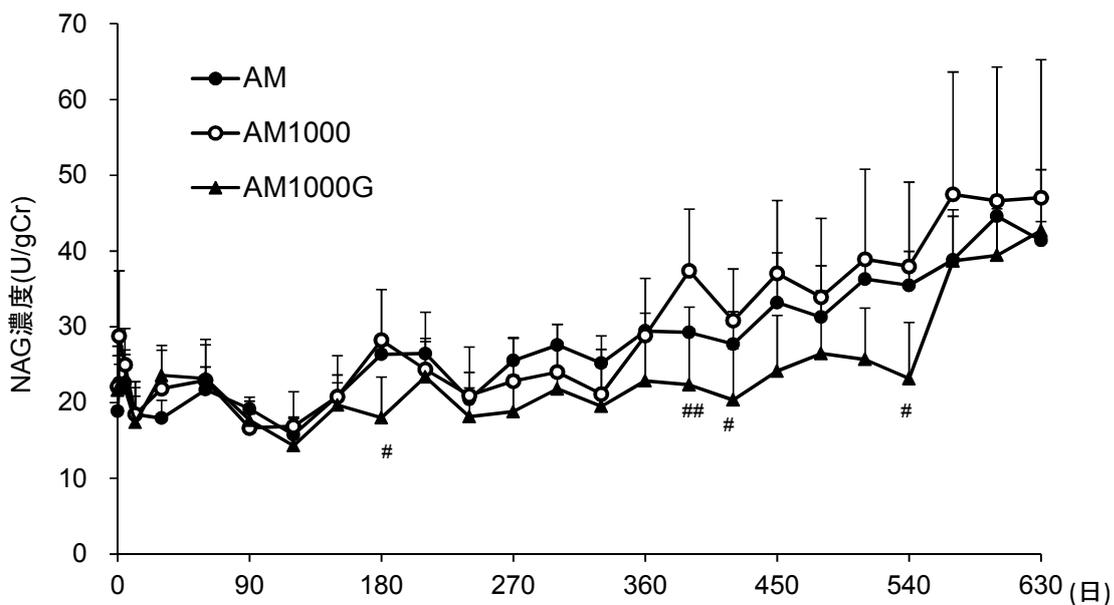


図 3-15 AM、AM1000、AM1000G をそれぞれ一回腹腔内投与後の尿中 NAG 濃度の変化
 AM1000 vs. AM1000G : #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$

小括

AMの中皮腫発生率は56%であったのに対し、AM1000では腹膜の線維化は認められたが、中皮腫発生率は4%とわずかであり、AMに比較して中皮腫発生率は有意に低かった。これに対して、AM1000Gでは腹膜の線維化も認められず、中皮腫発生も認められなかった。

腹腔内投与後の血清中のN-ERC/mesothelin濃度の経時的変化は、中皮腫発生リスクを反映していた。中皮腫が高率に発生したAMでは血清中N-ERC/mesothelin濃度が観察期間を通じて高値を示し、中皮腫発生の1~3ヶ月前から上昇傾向を認めた。一方、中皮腫発生が認められなかったAM1000Gでは血清中N-ERC/mesothelin濃度は投与後初期に一過性に軽度の上昇を認めたが、AMに比較して低値が持続した。しかし、投与後540日目以降、AM1000およびAM1000Gにおいて腎障害を発生した個体で血清中N-ERC/mesothelin濃度の上昇が認められ、血清中N-ERC/mesothelinの評価には腎障害による影響を考慮する必要があることが示唆された。

一方、血清中MCP-1濃度の測定の意義の一つとして、有害因子ばく露後における初期の影響評価に有益であることも明らかとなった。なお、従来、アスベスト関連物質からの呼吸器への急性と慢性影響そして中皮腫等について強い生体影響が懸念されてきたが、他の臓器への影響は少ないと考えられた。尿中NAG濃度の変動の結果から、この研究分野において標的臓器の評価を拡大する必要性を感じた。

Ⅲ 研究業績

論文

1) 戸田枝里子, 高田礼子, 網中雅仁, 戸谷忠雄, 山下喜世次, 神山宣彦, 山内 博. ラット気管内一回投与によるクリソタイルとアモサイトとその焼成品の酸化ストレスに関する研究, 臨床環境医学, 20, 131-140, 2011.

学会発表

- 1) 戸田枝里子, 江尻直美, 高野 (宮本) 清子, 高田礼子, 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材料のラット腹腔内投与による酸化ストレス評価. 第 84 回日本産業衛生学会, 2011 年 5 月, 東京
- 2) 高田礼子, 戸谷忠雄, 山内博, 戸田枝里子, 網中雅仁, 山下喜世次, 神山宣彦. クリソタイル焼成無害化処理材料のラット腹腔内投与による中皮腫発がん性評価. 第 52 回大気環境学会年会, 2011 年 9 月, 長崎
- 3) 戸田枝里子, 高田礼子, 網中雅仁, 戸谷忠雄, 山下喜世次, 神山宣彦, 山内博. クリソタイルとアモサイトの焼成無害化材料のラット気管内投与による酸化ストレスの比較. 第 52 回大気環境学会年会, 2011 年 9 月, 長崎
- 4) 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, 長崎
- 5) 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, 東京
- 6) 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, 京都

知的所有権の取得状況

なし