

循環型社会形成推進科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

- ・ 研究課題名・研究番号＝アスベスト廃棄物の無害化処理品の生体影響評価に関する研究
- ・ 研究番号＝K1919, K2056, K2159
- ・ 国庫補助金精算所要額（円）＝142,872,000（複数年度の総計）
- ・ 研究期間（西暦）＝2007-2009
- ・ 代表研究者名＝神山宣彦（東洋大学）
- ・ 共同研究者名＝戸谷忠雄（独立行政法人労働安全衛生総合研究所）、高田礼子、網中雅仁（聖マリアンナ医科大学）、山内 博（北里大学）、山下喜世次（(株)ノゾワ技術研究所）

・ 研究目的＝

アスベスト含有建材中のクリソタイルの無害化・再資源化処理技術として、焼成による転換技術が注目されている。しかし、クリソタイル無害化処理生成物の生体影響に関しては、十分な科学的根拠が得られていない。そこで、焼成によりフォーステライト化したクリソタイル無害化処理材料について、動物実験により経気道ばく露による体内動態分析、全身主要臓器の病理組織学的検索を行い、呼吸器影響及びその他の臓器に対する生体影響について明らかにする。また、アスベストによる発がん過程の初期に惹起される酸化的 DNA 損傷などのバイオマーカーの分析を行い、陽性対照のクリソタイルと比較して発がん性を総合的に評価する。さらに、無害化処理方法により無害化処理生成物の生体影響が異なるかを明らかにする。以上のことから、クリソタイル無害化処理生成物の廃棄及び再利用の際の安全性を科学的に検証する。

・ 研究方法＝

クリソタイル(CH)と角閃石アスベストを表1の条件で焼成して非石綿化した試料、およびCH焼成物(FO-1500)をビーズミルで9時間粉碎してナノサイズまで微細化した試料(FO-1500N)を生体影響評価試料とした。作製した試料について、アスベスト分析(JISA1481)、X線回折分析、透過電子顕微鏡(TEM)による形態観察とサイズ分布測定などのキャラクタリゼーションを行った。

生体影響評価では、まずCH焼成試料および角閃石アスベスト焼成試料のラット気管内投与実験を行い、急性影響を病理組織検査、血清中の酸化ストレス、組織および尿中の酸化的DNA損傷等のマーカーの動態をもとに比較した。次にCH焼成試料による慢性影響について、ラット気管内投与後2年間の経過観察を行い、病理組織検査等によりCHと比較して評価した。さらにCH焼成試料のラット腹腔内投与後2年間の経過観察中の中皮腫発生について病理組織検査を行い、血清、尿中の中皮腫関連マーカー等の動態もCHと比較して評価した。

表 1 生体影響評価試料の焼成条件

試料記号	アスベストの種類	昇温速度 (°C/min)	焼成温度 (°C)	保持時間 (hr)
FO-660	クリソタイル AX*	10	660	2
FO-800	〃	〃	800	1.5
FO-1000	〃	〃	1000	3
FO-1500	〃	〃	1500	1
AM1100	アモサイト (UICC)	〃	1100	1
CR925	クロシドライト (UICC)	〃	925	2

*カナダ Cassiar Mining Corp.産

・結果と考察＝

1. 試料の物性

X線回折分析で、CHの660°CでCHの消失、800°Cでフォーステライトの生成、1000°C、1500°Cでフォーステライト以外にエンスタタイトの生成が確認された(図1)。アモサイト1100°C焼成(AM1100)で酸化鉄鉱物(ヘマタイト、マグネタイト)の生成が認められた(図2)。TEMで、FO-1000の“見かけ”の繊維にフォーステライトの微粒子形成、AM1100の“見かけ”の繊維中にヘマタイト、マグネタイトの微粒子形成が観察された(図3,4)。これら焼成試料のTEMによる粒子サイズ分布測定結果を表2に示した。またFO-1500Nは、TEM観察から平均30nm程度の超微粒子が0.1µm程の凝集体となっている様子が伺えた(図5,6,表3)。

2. 生体影響評価

1) 気管内投与実験

①急性影響

FO-1000群では、肺組織で急性炎症反応、酸化DNA損傷のバイオマーカーである8-OHdGの生成を認めたが、CH群に比べて軽度で一過性の変化であり、投与後180日目ではCH群で観察されたような線維化は認められなかった(図7)。一方AM1100群では、急性炎症反応はAM群に比べて軽度であったが、8-OHdG濃度は経時的に増加し、30日目以降も肉芽腫は進展し、180日目では線維化も認められた(図8)。すなわち、AM焼成試料はCH焼成試料と異なり毒性の軽減が認められなかったことから、今後慎重な生体影響評価が必要である。

②慢性影響

FO-1000、FO-1500群では、気管内投与後2年間の観察の結果、CH群と異なり肺の線維化は認められず、腫瘍発生リスクの明らかな増加も認められなかった(図9,表4)。

2) 腹腔内投与発がん実験

CH群の中皮腫発生率は91%であったのに対し、CH焼成試料群では中皮腫発生率の有意な上昇は認められなかった(表5,図10,図11)。短繊維CH(Y-H)群の1年間での中皮腫発生率は60%であったが、FO-1500Nでは中皮腫発生を認めなかった(表6)。腹腔内投与後の尿中8-OHdGおよび血清N-ERC/mesothelinの経時的変化は中皮腫発生リスクを反映していた(図12,13)。

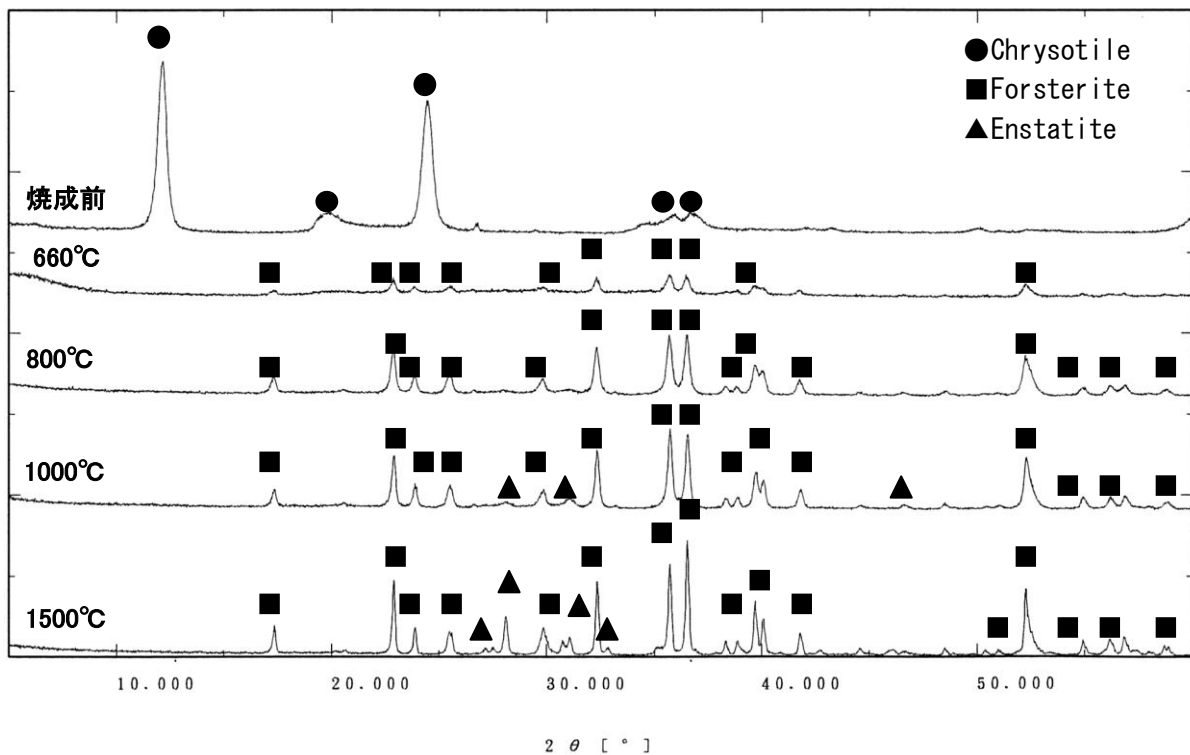


図1 CH および CH 焼成品の X線回折図

CH の 660°C、800°C 焼成によりクリソタイルは消失し、フォーステライトが生成した。1000°C、1500°C の焼成では、エンスタタイトも認められた。なお、1500°C の焼成でも非晶質（ガラス質）化しなかった。また、660~1500°C までの加熱温度の上昇につれて、フォーステライトとエンスタタイトが増加した。

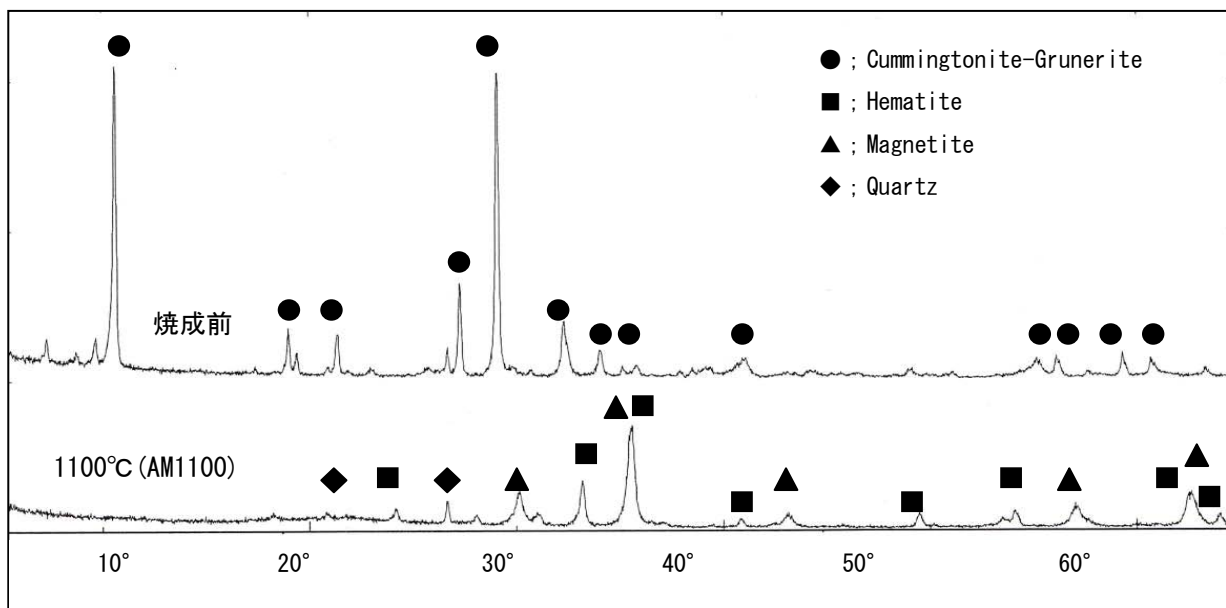


図2 アモサイト焼成前後の X線回折図

AM1100 には、ヘマタイト（褐鉄鉱； Fe_2O_3 ）、マグネタイト（磁鉄鉱； Fe_3O_4 ）の生成が認められた。微量の石英（ SiO_2 ）は原試料に混在していたものである。

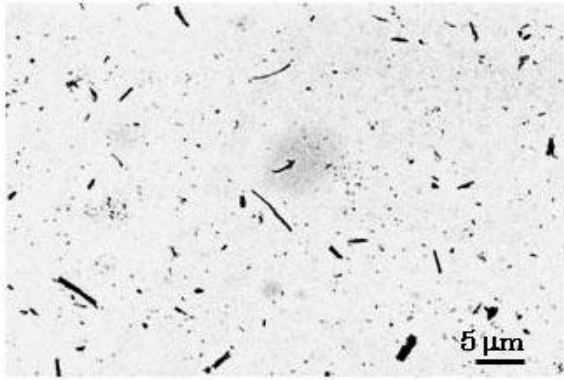


図3-A FO-1000の透過電顕写真(低倍率)

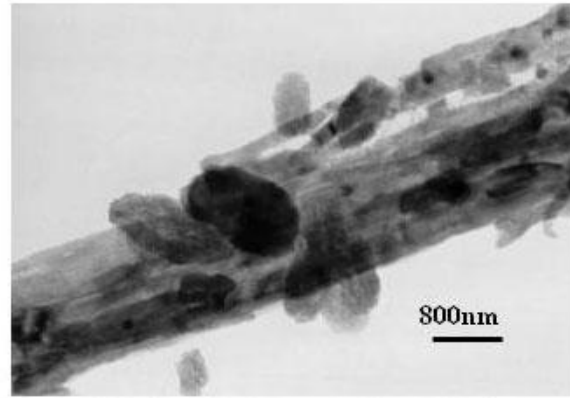


図3-B FO-1000の透過電顕写真(高倍率)

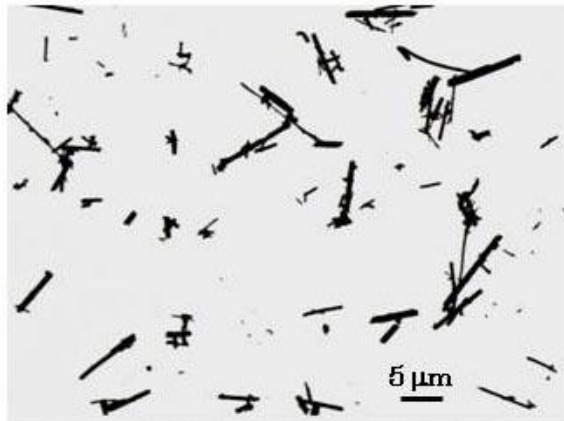


図4-A AM1100の透過電顕写真(低倍率)

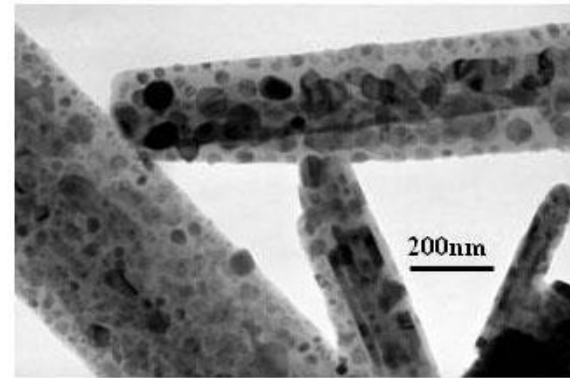


図4-B AM1100の透過電顕写真(高倍率)

フォーステライトの微粒子が形成された FO-1000 の繊維は、微粒子が繊維から飛び出していたり結晶軸方向が不揃いであったりして、いかにも脆弱な様子が推定できる。一方、ヘマタイトとマグネタイトの微粒子が形成された AM1100 の繊維は、FO-1000 より繊維外形が比較的スムーズに見える。

表2 アスベスト焼成品の繊維サイズ計測結果

試料	計数(個)	長さ(μm)		幅(μm)	
		幾何平均	標準偏差	幾何平均	標準偏差
CH (陽性対照)	300	2.2	2.9	0.14	1.6
アスペクト比 3 以上	291(97%)	2.3	2.9	0.14	1.6
FO-800	376	0.26	2.3	0.14	1.6
アスペクト比 3 以上	92 (24%)	0.70	2.4	0.14	1.6
FO-1000	315	0.31	2.3	0.18	1.7
アスペクト比 3 以上	58 (18%)	0.91	2.2	0.19	1.7
FO-1500	214	0.31	2.1	0.23	2.0
アスペクト比 3 以上	10 (4.7%)	—	—	—	—
AM*		4.3	3.3	0.31	1.9
AM1100	321	1.3	3.3	0.28	1.9
アスペクト比 3 以上	241(75%)	2.0	2.5	0.29	1.9

*Kohyama N et al.(1996)より引用

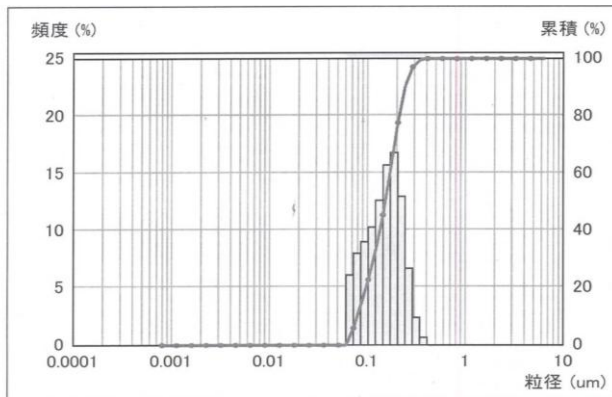


図5 FO-1500N粒度分布

FO-1500Nの平均粒径は153nm、100nm以下の粒子は約23%であった。

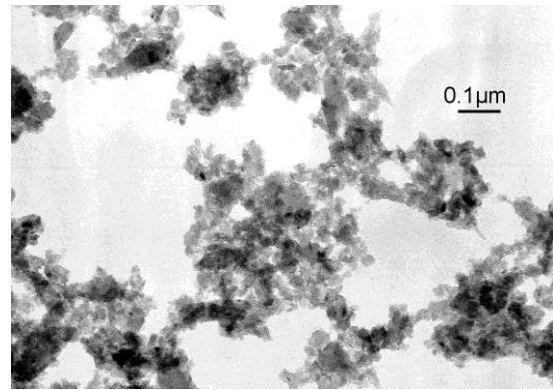


図6 FO-1500Nの透過電顕写真

20~50nm程度の超微粒子が0.1μm程の凝集体となっている。

表3 クリソタイル焼成ナノ粒子の繊維サイズ計測結果

試料	計数(個)	長さ(nm)		幅(nm)	
		幾何平均	標準偏差	幾何平均	標準偏差
Y-H (陽性対照)	426	182.41	2.06	40.26	1.32
	325(75%)	234.81	1.89	40.29	1.32
FO-1500N		28.3	1.12	—	—

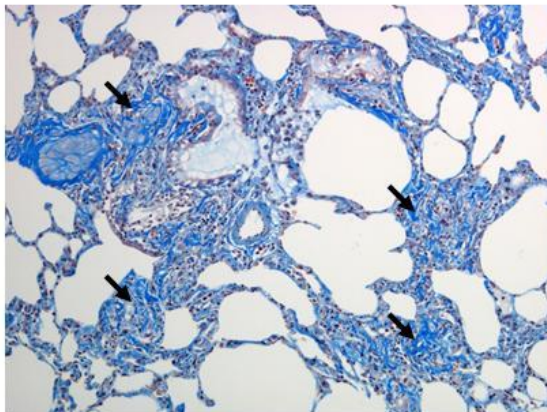


図7-A CH群:投与180日後、肺、Masson's trichrome染色。慢性炎症が局所で持続し、30日後以降に線維化(矢印)の進展が認められた。

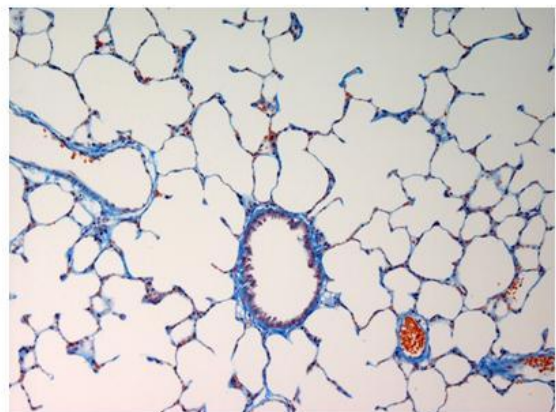


図7-B FO-1000群:投与180日後、肺、Masson's trichrome染色。投与後初期に認められた炎症は回復し、線維化も認められなかった。

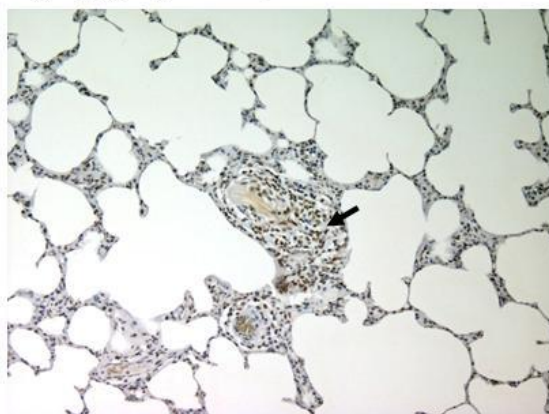


図7-C CH群:投与180日後、肺、8-OHdG免疫染色。炎症細胞および上皮細胞にて8-OHdGの生成が持続していた。矢印は肉芽腫を示す。

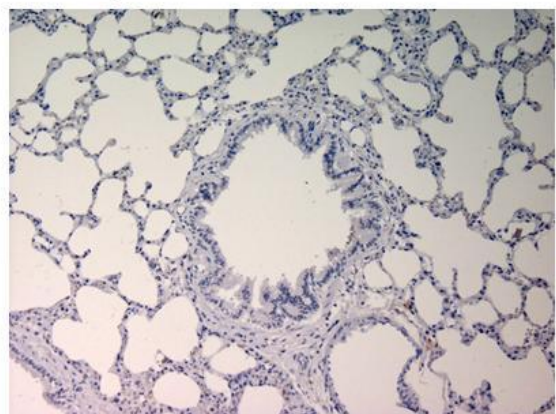


図7-D FO-1000群:投与180日後、肺、8-OHdG免疫染色。投与後初期に認められた8-OHdGの生成は回復した。

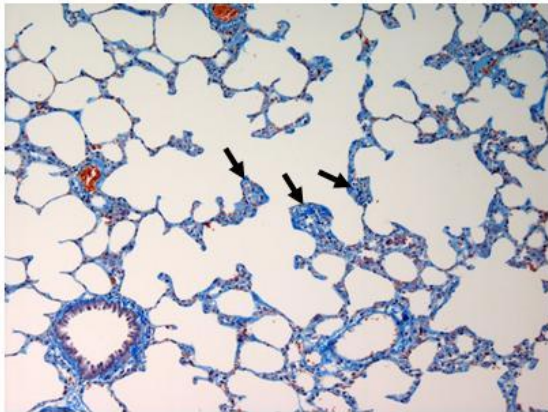


図8-A AM群:投与180日後、肺、Masson's trichrome染色。慢性炎症が局所で持続し、30日後以降に線維化(矢印)の進展が認められた。

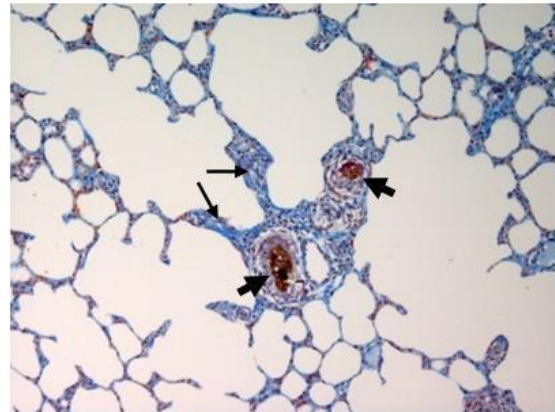


図8-B AM1100群:投与180日後、肺、Masson's trichrome染色。30日後以降も肉芽腫(太矢印)が進展し、さらに局所で線維化(矢印)が認められた。

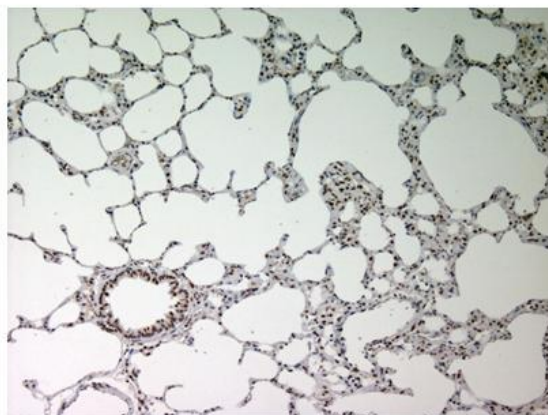


図8-C AM群:投与180日後、肺、8-OHdG免疫染色。炎症細胞および上皮細胞にて8-OHdGの生成が持続していた。

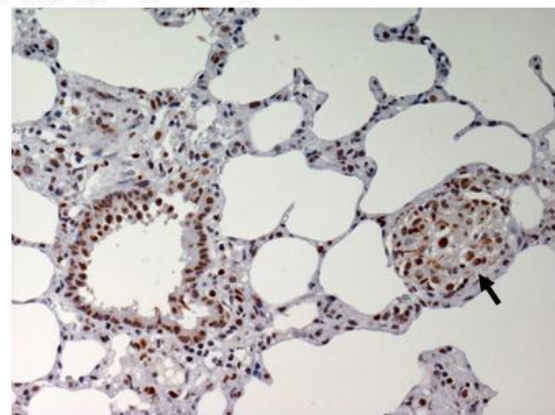


図8-D AM1100群:投与180日後、肺、8-OHdG免疫染色。炎症細胞および上皮細胞にて8-OHdG陽性が持続していた。矢印は肉芽腫を示す。

表4 CHおよび焼成品の気管内投与後のラット肺腫瘍発生率(投与後24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
CH	2mg	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	+
FO-1000	2mg	0/10 (10%)	0/10 (10%)	0/10 (0%)	—
FO-1500	2mg	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	—
生理食塩水	—	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	—

表5 CHおよび焼成品の腹腔内投与後のラット中皮腫発生率(投与後24ヶ月まで)

試料	投与量	WHO 繊維数 $\times 10^9$ ※1	中皮腫 発生率(%)	中皮腫 50%生存期間
CH	10mg	2.29	31/34 (91.2%) ※2	441 (95%CI:378-504)
FO-800	10mg	0.32	1/35 (2.9%)	—
FO-1000	10mg	0.35	0/35 (0%)	—
FO-1500	10mg	0	1/35 (2.9%)	—
生理食塩水	—	—	0/35 (0%)	—

※1 FO-800, FO-1000 については、見かけ上の繊維を指す。

※2 χ^2 検定 他のすべての群に対して $p < 0.001$

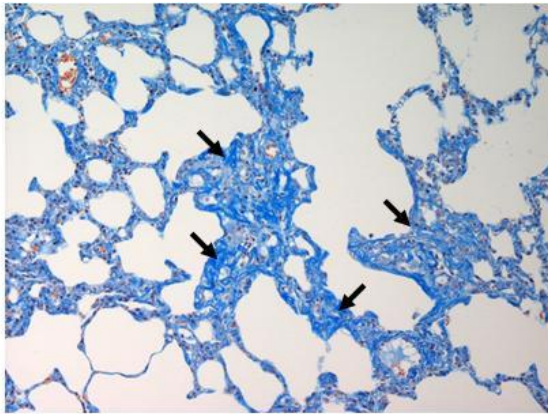


図9-A CH群:投与2年後、肺、Masson's trichrome染色。投与2年後まで肺の線維化(矢印)の進展が認められた。

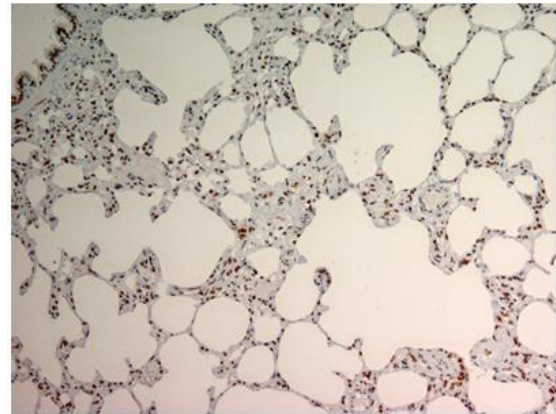


図9-B CH群:投与2年後、肺、8-OHdG免疫染色。炎症細胞および上皮細胞の核において8-OHdGの生成(褐色)が持続していた。

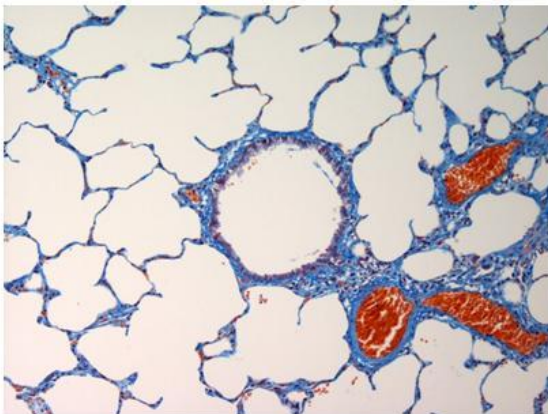


図9-C FO-1000群:投与2年後、肺、Masson's trichrome染色。投与2年後においてもCH群のような明らかな線維化は認められなかった。

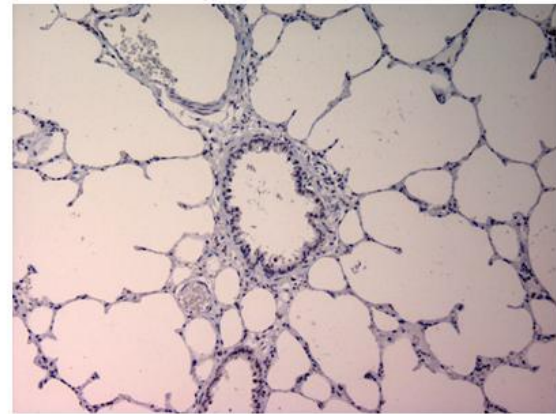


図9-D FO-1000群:投与2年後、肺、8-OHdG免疫染色。CH群に比較して8-OHdGの生成は軽度であった。

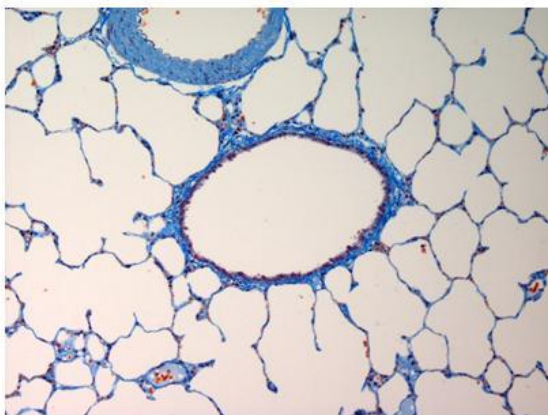


図9-E FO-1500群:投与2年後、肺、Masson's trichrome染色。投与2年後までCH群のような明らかな線維化は認められなかった。

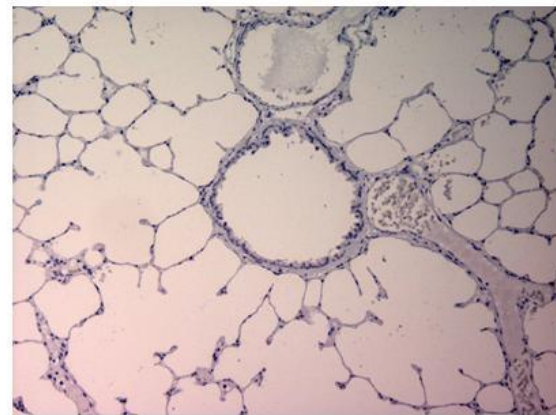


図9-F FO-1500群:投与2年後、肺、8-OHdG免疫染色。CH群に比較して8-OHdGの生成は軽度であった。

表 6 Y-H および FO-1500N の腹腔内投与後のラット中皮腫発生率 (投与後 12 ヶ月まで)

試料	投与量	中皮腫 発生率(%)	中皮腫 50%生存期間
Y-H	10mg	6/10 (60%) ※1	358 (95%CI: 316-359)
FO-1500N	10mg	0/10 (0%)	—
蒸留水	10mg	0/10 (0%)	—

※1 χ^2 検定 他のすべての群に対して $p < 0.05$

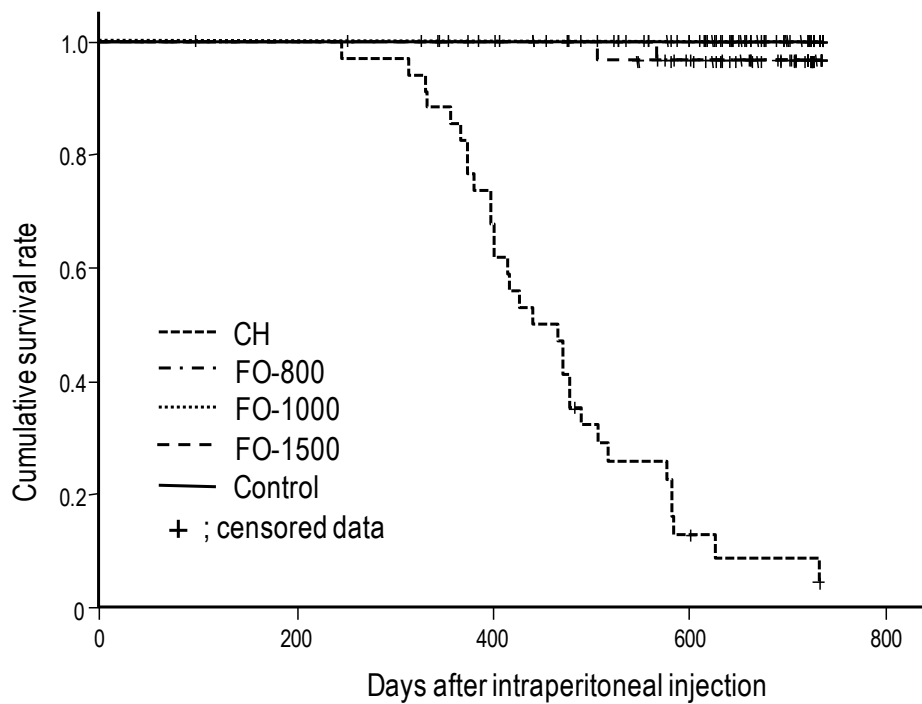


図 10 CH および CH 焼成試料の腹腔内投与後のラット生存率曲線 (中皮腫死亡)

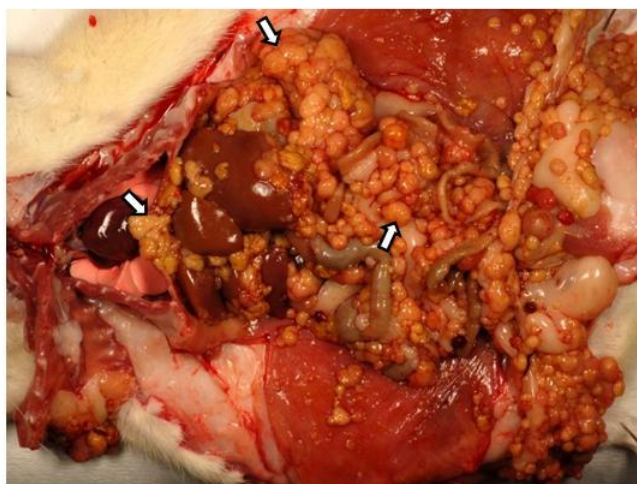


図11-A CH群: 腹膜中皮腫の肉眼所見
腹膜表面に多数の結節状の腫瘤形成(矢印)が認められ、血性腹水が貯留していた。

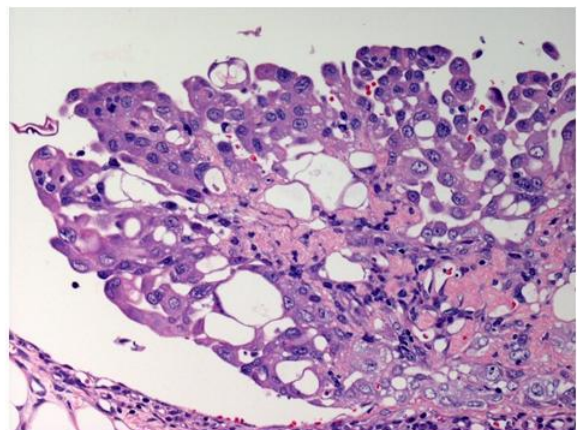


図11-B CH群: 上皮型中皮腫(HE染色).
腸間膜漿膜面に粘液産生を伴う上皮型中皮腫の増生が認められた。

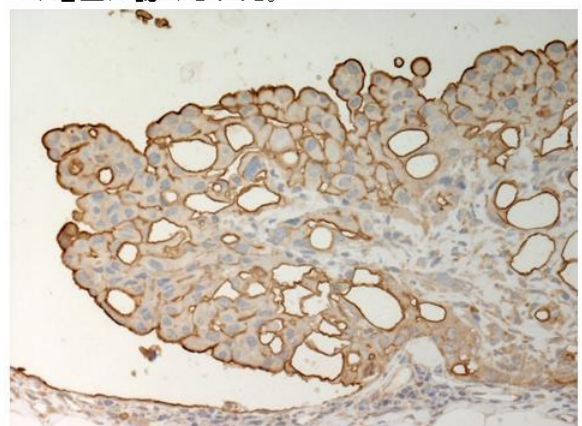


図11-C CH群: 上皮型中皮腫(C-ERC染色).
中皮腫細胞の細胞膜でC-ERCの発現が認められた。

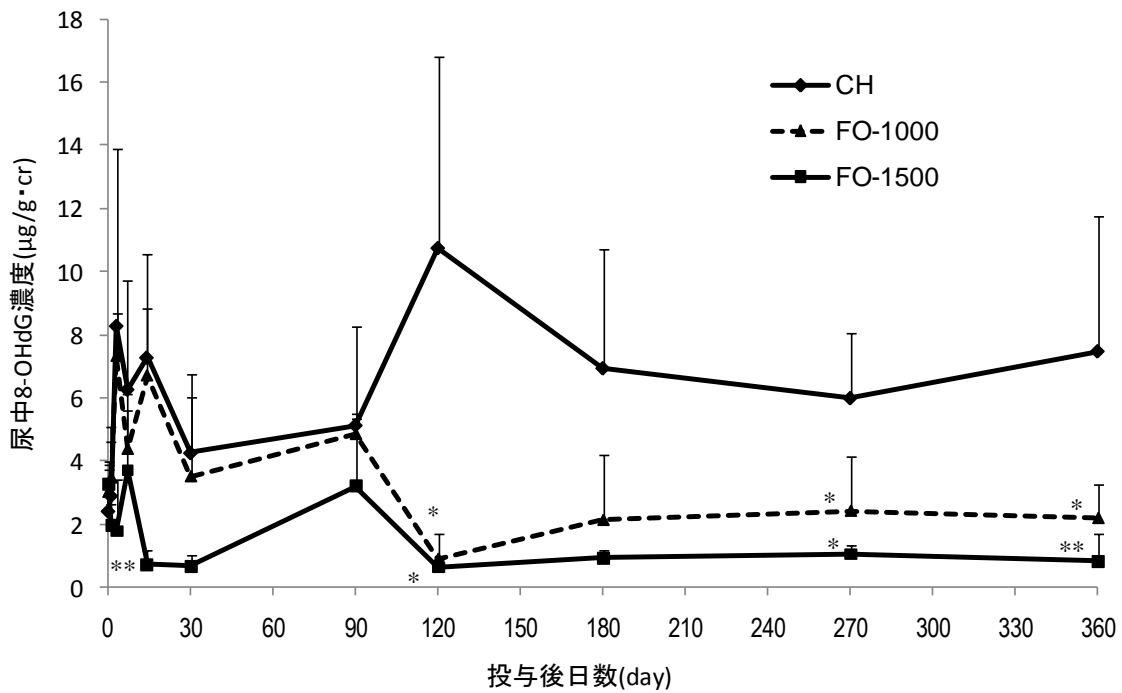


図 12 CH、FO-1000、FO-1500 の腹腔内一回投与後の尿中 8-OHdG 濃度の経時的変化
CH vs. FO-1000, FO-1500; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

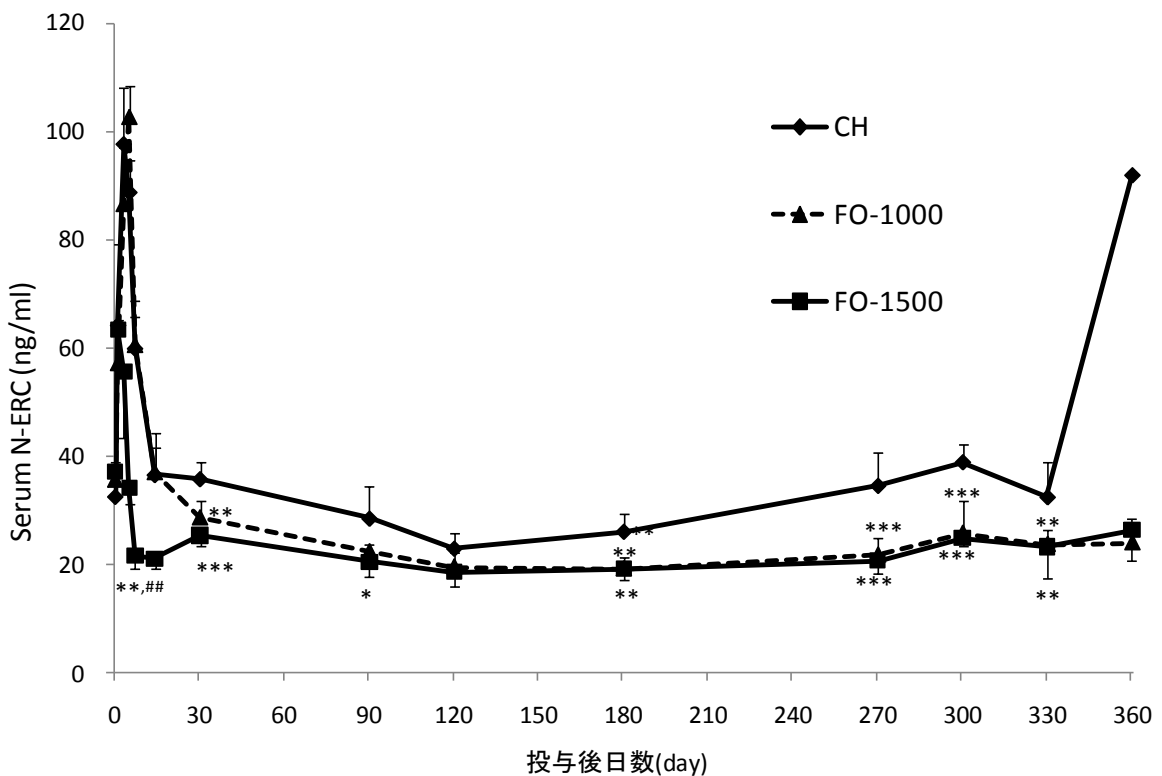


図 13 CH、FO-1000、FO-1500 の腹腔内一回投与後の血清 N-ERC/mesothelin 濃度の経時的変化

CH vs. FO-1000, FO-1500; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

FO-1000 vs. FO-1500; #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$, ###, $p < 0.001$

・結論＝

CH 焼成試料の生体影響を評価するため、ラット気管内投与および腹腔内投与実験を実施した。CH の焼成により FO-800、FO-1000、FO-1500 ではフォーステライト微粒子が形成されていた。FO-1000、FO-1500 では気管内投与後 2 年まで明らかな肺の線維化及び腫瘍発生率の増加を認めず、酸化 DNA 損傷についても一過性であり CH に比べて軽減されていた。

さらに、感度の高い腹腔内投与発がん実験にて、CH および短繊維 CH(Y-H)と異なり、FO-800、FO-1000、FO-1500、FO-1500N の中皮腫発生率の有意な上昇は認められなかった。血清 N-ERC/mesothelin 測定は、中皮腫関連バイオマーカーとして有効であった。一方、AM1100 の肺傷害、酸化 DNA 損傷は AM に比べて軽減されず、AM 焼成試料の慢性影響、発がん性に関する高度な精査の必要性を明らかとした。

本研究から、各種フォーステライトの慢性影響及び発がん性は CH に比べて明らかに軽減していた。しかし、一過性の呼吸器影響が認められたことから、CH 焼成物質のばく露防止対策は必要であると考えられた。

英語概要

- ・研究課題名＝「Evaluation of biological effects of thermal transformed asbestos」
- ・研究代表者名及び所属＝Norihiko Kohyama (Toyo University)
- ・共同研究者＝Tadao Toya (National Institute of Occupational Safety and Health, Japan), Ayako Takata, Masahito Aminaka (St. Marianna University School of Medicine), Hiroshi Yamauchi (Kitasato University), Kiyotsugu Yamashita (Nozawa Corporation)
- ・要旨 (200 語以内)＝ We evaluated the biological effects of the thermal transformed chrysotile, mainly composed of forsterite (FO), by intratracheal and intraperitoneal administration to rats. Compared to the chrysotile (CH) group by intratracheal administration to rats, the FO groups heated at 1000°C and 1500°C (FO-1000: apparently fibrous form, and FO-1500: fine particles) showed less lung injuries apparently and no progressive fibrosing lesions and tumorigenesis until two years. In the CH intraperitoneal administrated group, although the mesothelioma developed in the high rate, but no significant increase in the incidence of mesothelioma was observed in any of the FO groups (FO-800, 1000, 1500 and 1500N). This finding is a useful information for waste dispersal problem of asbestos materials. The significant correlation was also observed between serum N-ERC/mesothelin concentrations and lung 8-OHdG concentrations for both groups. The serum N-ERC/mesothelin concentrations would be used as a biomarker for understanding inflammatory effects on respiratory organs, especially during the early phase of exposure to either CH or forsterite in workers. Conclusively, the thermal transformed chrysotile (mainly FO-1000) is safer material and would become a safe resource.
- ・キーワード (5 語以内)＝ chrysotile, forsterite, oxidative DNA damage, lung injury, carcinogenicity