

日本財団補助金による

1997年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1998年 3月 1日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 神山宣彦 
所属機関名 労働省産業医学総合研究所
職名 部長 年齢 52 才
所在地 〒214-8585 川崎市幸区長尾6-21-1
電話 044-865-6111 内線 2340

1. 研究課題

JFM繊維状標準試料を用いたアスベスト代替
繊維の細胞毒性と物性との比較研究

2. 研究期間 自 1997年 4月 1日 ~ 至 1998年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 神山宣彦 (52才)
所属機関 労働省産医研 職名 部長

中国側研究者氏名 劉世傑 (84才)
所属機関 北京医科大学公共卫生学院 職名 名誉院長

JFM繊維状標準試料を用いたアスベスト代替繊維の 細胞毒性と物性との比較研究

日本側研究代表者 神山宣彦

中国側研究代表者 劉 世傑

1. はじめに

アスベスト曝露によって肺線維症、肺ガン、中皮腫等が引き起こされることが判明し、先進国ではアスベスト使用は厳しく管理・制限されている。しかし、発展途上国では、アスベストは依然として重要な工業材料・資源として採掘、加工及び製品生産が盛んに行なわれている。アスベスト関連疾患の予防の面から現在可能な対策としては、(1) 作業環境のアスベスト濃度の減少、(2) 使用可能な代替物質の開発、(3) アスベストの毒性軽減のための繊維表面性状の改質方法の研究、などがある。これらの点を日中両国の関係で見てみると(1)については、日本や欧米の環境測定や管理の方法が良く知られており、今後は中国側の経済事情が環境改善の成否の多くを占めるであろう。(3)については、中国で種々の研究が進んでいる。まだ決め手になるような改質方法は完成していないようだが、今後も中国独自に進められるものと見られる。(2)については、最近、特に日本で多種多様な人造鉱物繊維 (Man made mineral fibers ; MMMF) がアスベスト代替繊維として製造されている。また、中国ではアスベスト代替繊維として人造鉱物繊維とは別に豊富な鉱物資源産出国として、アスベスト以外の種々の天然鉱物繊維を大量に採掘・生産・輸出しており、日本にもかなり輸出している。

日本も含めて欧米先進国では、製造物責任という観点からの法律整備がなされ、こうした人造鉱物繊維についても予め使用に先立つ有害性調査が重要視されている。アスベストに限らず繊維状物質の生体影響は、一般に細くて長い繊維サイズと体内耐久性が重要な因子と見られていることから、アスベスト代替繊維についても十分な生体影響研究の実施が必要である。しかし、それらの生体影響についてはまだ不明なものが多い。この状況は日中ともにまだその研究の端緒についたばかりで同様である。

本研究は、最近日本で新たに調整・準備された11種類のMMMFやウィスカークラス、有機繊維などから成るJFM標準試料とその他、アスベスト代替繊維試料として数種の天然鉱物繊維について、生化学および遺伝毒性的手法による *in vitro* の細胞毒性と繊維状物質の様々な物性とを比較検討して、個々の繊維状試料の毒性評価とともに毒性発現機序の解明にも迫ろうとするものである。

2. 研究の概要

本研究に用いた繊維状試料の調整とキャラクター化を日本側が行った。日本側の産医研では、過去にアスベストを始めとして種々の繊維状鉱物を調整し、それらの一部についてラットを用いた発癌試験と染色体異常試験などの *in vitro* 試験を行ってきたが、現在それらの試験を行える研究者はいない。今回は、中国側グループによって既に発癌性試験成績のある試料も含めてJFM試料について次のような細胞毒性試験や変異原性試験を行った。中国側の行った試験は、[I] 種々の細胞との反応性試験：1) 溶血性、2) 細胞膜透過性への影響、3) 細胞膜流動性への影響、4) アルカリ性染色剤の吸着、5) 細胞内Ca濃度に対する影響、6) 細胞内グルタチオン(GSH)濃度に対する影響、[II] 遺伝的損傷影響：1) A549細胞DNA鎖の断裂、2) HEL細胞染色体異常、[III] 表面改質の試み：くえん酸アルミニウムの溶血性抑制作用 などである。

3. 試料と方法

研究試料は、11種類のJFM標準繊維状試料を中心に、アスベスト、天然鉱物繊維、などである

(表1)。毒性評価のための細胞には、人の赤血球、モルモットの肺胞マクロファージ、人の血中リンパ球などを用いた。JFM標準繊維状試料についてのキャラクタリゼーション(物性解析)は、既にX線回折、熱分析、蛍光X線分析、サイズ分布測定、などが行われており、今回は、高分解能電子顕微鏡による繊維横断面観察を主に行った。

Table 1. List of JFM standard fibrous samples.

Sample name	Name of Fiber/whisker
GW1	Glass wool (Glass fiber)
RW1	Rock wool
MG1	Micro glass fiber
RF1	Refractory fiber (Ceramic fiber)
RF2	Refractory fiber (Ceramic fiber)
RF3	Refractory fiber (Mullite fiber)
PT1	Potassium titanate whisker
SC1	Silicon carbide whisker
TO1	Titanium oxide whisker (Rutile whisker)
WO1	Wollastonite (from China)
AR1	Aramid fiber

4. 結果

[I] 被検試料の物性解析と表面構造の観察

1) 被検試料のキャラクタリゼーション

JFM標準繊維状試料11種類の主な物性をまとめて表2に示した。繊維サイズについても、表2に示した。

Table 2. Some characteristics of JFM standard fibrous samples.

Sample name	Crystallinity	σ	ϵ	Width		Length		SR
				(g; μm)	SD(g)	(g; μm)	SD(g)	
GW1	Non-crystalline	2.6	-	0.88	3.10	20.0	2.58	-
RW1	"	2.7	-	1.80	2.32	16.5	2.51	-
MG1	"	2.6	-	0.24	2.35	3.0	2.22	-
RF1	"	2.7	-	0.77	2.53	12.0	2.36	-
RF2	"	2.7	-	1.10	2.00	11.0	1.96	-
RF3	Crystalline	2.7	-	2.40	1.37	11.0	1.75	-
PT1	Crystalline	3.5	-	0.35	1.51	6.0	2.04	+++
SC1	Crystalline	3.2	+	0.30	1.51	6.4	2.45	
TO1	Crystalline	4.3	-	0.14	1.53	2.1	2.00	++
WO1	Crystalline	3.0	-	1.00	1.72	10.5	2.03	+++
AR1	Crystalline	1.4		nm	nm	nm	nm	

s: specific gravity, e: surface charge, -: negative, +: positive, g: geometric mean, SD: standard deviation, nm: could not be measured, SR: surface roughness

2) 高分解能電子顕微鏡によるJFM試料の繊維横断面観察

赤血球の溶血性、マクロファージによる食食など、いずれも細胞膜と繊維表面の接触という局面が存在する。表面原子のパッキングが密なほど、すなわち原子オーダーでスムーズな表面を持つ粒子ほどある種の細胞毒性が低いという結果も報告されている。そういった観点から、実際の表面構造を直接原子オーダーで観察しその同一物質の詳細な細胞毒性試験との比較検討を行うことは、表面形状と毒性との関連製を探る上で大きな期待が持てる。表面構造の原子オーダー観察のための試料は、繊維を樹脂に包埋し、ウルトラマイクロトームにより繊維横断面が電頭支持膜に並んだ超薄切片試料を作製した。観察は最新の高分解能電子顕微鏡により行った。

繊維を電頭支持膜に分散させて観察する通常の方法では、繊維の軸方向に沿った表面構造が見える。一般にどの繊維の表面も平滑である。一方、繊維の軸方向から繊維を見た場合、繊維横断面に現れた繊維表面が見える。この方向の繊維表面はその種類によって平滑（スムーズ）なものから凹凸（ジグザグ）の激しいものまでいろいろであった。そのジグザグ度（roughness）を定量的に表現するのは難しい問題である。そこで、ジグザグ度（roughness）を下記のような4段階に分けて表現した。

- +++ : 凹凸がかなり激しい
- ++ : 中くらい
- +: 少し凹凸がある
- : 原子レベルで全く平滑

結果を同じく表2に示した。幾つかの表面形態の様子を図1に示した。

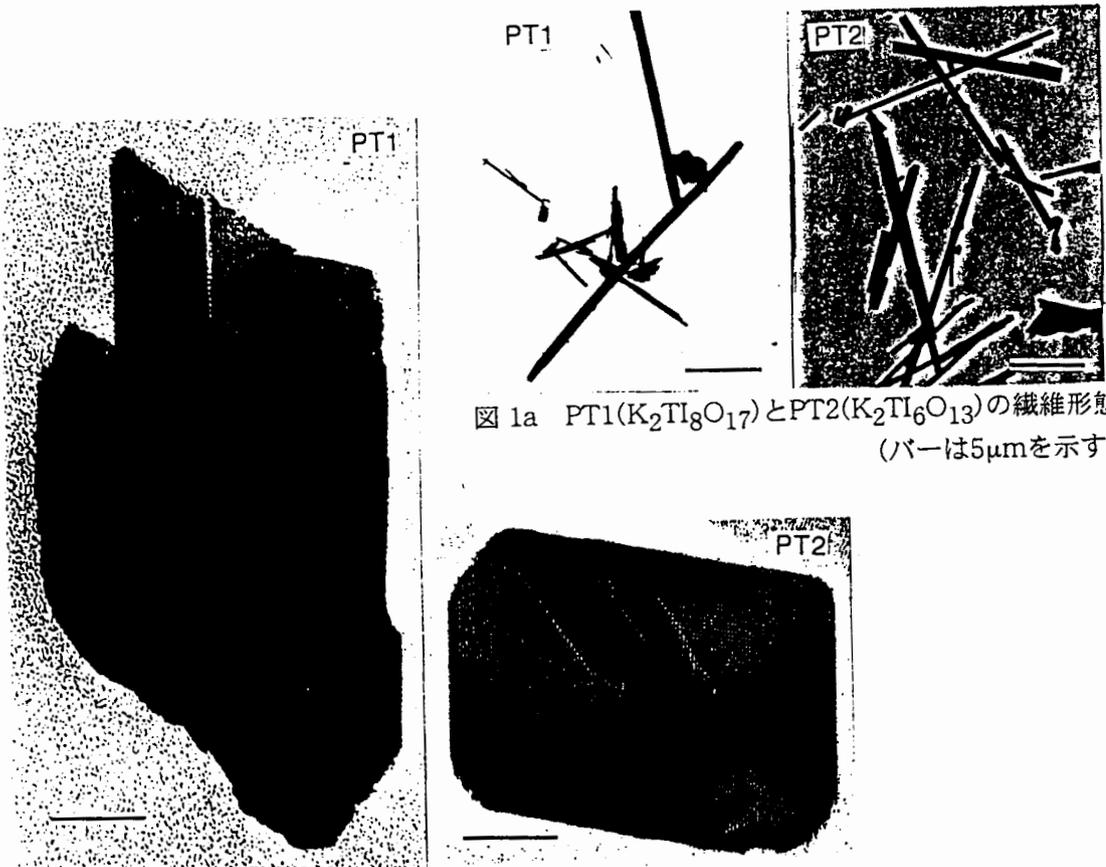


図1a PT1($K_2Ti_8O_{17}$)とPT2($K_2Ti_6O_{13}$)の繊維形態
(バーは5 μm を示す)

図1b PT1($K_2Ti_8O_{17}$)とPT2($K_2Ti_6O_{13}$)の繊維断面の形態
(バーは20nmを示す)

[II] 種々の細胞に対する傷害性試験

1) JFM試料の溶血性

200 $\mu\text{g/ml}$ のWO1懸濁液と3%赤血球懸濁液を0、5、30、60分間作用させた。その結果、WO1の溶血性は時間の延長とともに強くなり(表3)、異なる量を加えて60分間作用させると表4のように量-反応関係が得られた。500 $\mu\text{g/ml}$ のJFM各試料と赤血球を60分間させた場合には、表5に示すように対照群クリソタイル(UICC Chrysotile B)に明らかに溶血性がある他、TO1、WO1、GW1、MG1なども弱い溶血性を示した。

Table 3 Hemolytic effect of 200 $\mu\text{g/ml}$ WO1

in time course (n=3)	
Incubation time (min)	Hemolytic rate(%)
0	0.87
5	0.65
30	2.09
60	2.04

Table 5 Hemolytic effects of JFM fibers (n=3)

JFM samples	Hemolytic rate(%)
UICC B	52.54
WO1	4.76
PT1	3.17
TO1	1.37
GW1	1.06
MG1	1.06
SC1	0.74
RF2	0.53
RW1	0.32
RF3	0.21
RF1	0.21

Table 4 Hemolytic effect of different dose of WO1(n=3)

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Hemolytic rate(%)
0	0.00
50	0.95
250	3.17
500	4.76

2) JFM試料の細胞膜透過性に対する影響

(1) 赤血球からの K^+ の漏出

WO1とTO1の引き起こした赤血球 K^+ の漏出は、量-反応関係が認められた(表6)。しかも、500 $\mu\text{g/ml}$ のWO1とTO1の引き起こした赤血球 K^+ の漏出は、明らかにUICC Bより多かった。AR1とRF1も赤血球 K^+ の漏出が認められたが、対照群UICC Chrysotile Bより顕著に低かった。

Tab.6 Release of K^+ from erythrocytes induced by JFM fibers($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$, n=3)

tested materials	concentration of K^+ in supernatant
TO1	227.4 \pm 8.2*#
WO1	208.0 \pm 8.7*#
UICC chrysotile B	185.8 \pm 16.8
AR1	173.8 \pm 16.8*#
RF1	159.6 \pm 11.6*#
MG1	149.6 \pm 5.8#
PT1	146.4 \pm 10.0#
SC1	138.4 \pm 5.2#
RF3	137.2 \pm 2.8#
RW1	135.2 \pm 3.6#
GW1	131.6 \pm 4.8#
RF2	131.0 \pm 8.2#
control group	128.3 \pm 6.4

vs control group, *: $p < 0.05$

vs UICC chrysotile B, #: $p < 0.05$

(2) 肺胞マクロファージ (AM) よりのK⁺の漏出

WO1とTO1の引き起こしたAMからのK⁺漏出は、赤血球と同様に明らかに量-反応関係が認められた(表7)。200μg/mlを用いた場合、全てのJFMにAMからのK⁺漏出が認められたが、その中でTO1の起こしたAMからのK⁺漏出は対照群UICC Chrysotile Bより更に顕著であった。

Tab.7 Release of K⁺ from AM induced by JFM fibers(μg/ml, x±s, n=3)

tested materials	K ⁺ in supernatant
TO1	141.25±3.73**
AR1	128.70±5.03*
WO1	128.55±7.03*
UICC Chrysotile B	127.40±5.84*
PT1	121.90±5.03*
RW1	120.90±1.68*
GW1	120.35±3.99*
SC1	116.50±3.07**
RF2	114.55±3.92**
RF3	114.10±7.01*
RF1	97.40±7.85*
MG1	94.30±5.06*
control group	60.65±17.88

*: vs control group, p<0.05

#: vs UICC chrysotile B, p<0.05

(3) AMからのLDH (乳酸脱水素酵素) の漏出

TO1の引き起こしたAMからのLDH漏出は、時間-反応と量-反応関係が共に認められた(表8、9)。200μg/mlのJFM試料をAMと60分間作用させると、RF1、MG1、GW1を除くその他のJFM全部にAMからのLDH漏出が見られた。そのうちAR1とPT1の値は対照群UICC Chrysotile Bにほぼ等しかった(表10)。

Tab.8 Release of LDH from AM induced by TO1

time(minutes)	LDH(U/100ml)
0	307.01±33.83
15	519.29±75.40*
30	445.81±38.00*
60	796.30±68.81*
120	913.91±55.61*

vs control group *: p<0.05 (x±s, n=3)

Tab.9 Release of LDH from AM induced by TO1

dose(μg/ml)	LDH(U/100ml)
0	511.81±6.80
50	573.04±28.05*
100	620.67±90.52*
200	824.78±40.63*

vs control group *: p<0.05 (x±s, n=3)

Tab.10 Release of LDH from AM induced by JFM fibers

tested materials	LDH(U/100ml)
AR1	1488.16±118.11*
UICC chrysotile B	1433.98±82.56*
PT1	1256.83±154.35*
TO1	824.78±40.63**
SC1	819.68±22.48**
WO1	627.47±13.03**
RW1	627.47±30.17**
RF2	627.47±48.90**
RF3	586.65±48.94**
RF1	569.64±36.00#
control group	511.81±6.80
MG1	501.60±83.52#
GW1	487.99±257.35#

*: vs control group, p<0.05

(x±s, n=3)

#: vs UICC chrysotile B, p<0.05

3) 細胞膜流動性に対する影響

200 μ g/mlのPT1, MG1, TO1, WO1とUICC Chrysotile BをそれぞれAMと1時間作用させ細胞膜流動性の指標として蛍光偏光性を測定したところ、そのうちWO1だけ顕著にAMの流動性を低下させた(表11)。

Tab.11 Effect of JFM fibers on membrane of AM($\bar{x}\pm s$, n=3)

tested materials	P
control group	0.080 \pm 0.019
PT1	0.087 \pm 0.003
UICC chrysotile B	0.108 \pm 0.018
MG1	0.113 \pm 0.020
TO1	0.102 \pm 0.015
WO1	0.114 \pm 0.014*

*: vs control group, $p<0.05$

4) アルカリ性染料の吸着

10 μ g/mlのメチレンブルーを用いて500 μ g/mlのJFM試料と混合して30分後、AR1, MG1とRF1のメチレンブルー吸着量は顕著に増加して、そのうちAR1のメチレンブルー吸着量は大体対照群UICC Chrysotile Bと等しかった(表12)。

Tab.12 Adsorption of methylene blue on JFM(μ g/ml $\bar{x}\pm s$, n=3)

tested materials	methylene blue in supernatant
UICC chrysotile B	1.99 \pm 0.23**
AR1	2.09 \pm 0.46**
MG1	6.41 \pm 0.22**##
RF1	7.97 \pm 0.23**##
RF2	8.12 \pm 0.38##
RW1	8.24 \pm 0.83##
RF3	8.29 \pm 0.75##
WO1	8.52 \pm 1.04##
control group	8.97 \pm 0.45
TO1	8.97 \pm 0.54##
PT1	9.07 \pm 0.77##
SC1	9.17 \pm 0.96##

*: vs control group, $p<0.05$ **: $p<0.01$

##: vs UICC chrysotile B, $p<0.01$

5) 細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度に対する影響

JFM試料200 μ g/mlとAMを1時間作用させた。JFM試料の内、GW1を除いたすべてがAM細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度を明らかに増加させた(表13)。ただし、対照群UICC Chrysotile Bと比較すると遥かに低かった。WO1は正常対照と統計上差異はないにも拘わらず、AM細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加は、尚量-反応関係が認められた(表14)。

Tab.13 Increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by JFM fibers($x \pm s$, n=4)

tested materials	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)
UICC chrysotile B	1563.4±264.9**
SC1	640.1±103.3**#
TO1	425.7±26.5**#
PT1	418.5±36.2**#
MG1	380.9±28.0**#
RF3	363.8±43.9**#
RF2	347.1±30.1**#
RF1	340.0±24.1**#
RW1	329.4±23.7*#
WO1	329.3±55.3#
GW1	259.1±28.8#
control group	256.3±33.1

*: vs control group, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

#: vs control group, $p < 0.01$

Tab.14 Increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by WO1 in AM($x \pm s$, n=4)

dose(μ g/ml)	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)
0	256.3±33.1
50	260.1±54.5
100	293.9±53.2
200	329.3±55.3
400	360.0±8.2*

*: vs control group, $p < 0.05$

6) AM細胞内グルタチオン(GSH)濃度に対する影響

JFM試料200 μ g/mlとAMを2時間作用させた。PT1, TO1, SC1, WO1, MG1, RF2などは、細胞内グルタチオン(GSH)濃度を明らかに減少させた。そのうち、PT1とTO1は対照群UICC Chrysotile Bと大体類似していた(表15)。

Tab.15 Depletion of GSH in AM induced by JFM fibers($x \pm s$, n=4)

tested materials	GSH(μ g/ 10^6 cells)
PT1	0.188±0.007**
UICC chrysotile B	0.198±0.017**
TO1	0.221±0.016**
SC1	0.261±0.020**#
WO1	0.280±0.017**#
MG1	0.340±0.011**#
RF2	0.430±0.012*#
RF3	0.448±0.013#
GW1	0.452±0.013#
RF1	0.455±0.021#
RW1	0.488±0.021#
control group	0.488±0.033

*: vs control group, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

#: vs UICC chrysotile B, $p < 0.05$

[III] 遺伝的損傷影響

1) JFM試料のA549細胞DNA鎖の断裂

JFM試料200 μ g/mlとA549細胞を1時間作用させた。試料全てにDNA鎖の断裂発生が見られた(表16)。そのうちPT1が対照群UICC Chrysotile Bと大体類似の値を示した。

Tab.16 DNA strand breaks induced by JFM fibers(x \pm s, n=30)

tested materials	tail/total length
UICC chrysotile B	0.606 \pm 0.143*
PT1	0.554 \pm 0.144*
SC1	0.500 \pm 0.133*#
MG1	0.475 \pm 0.155*#
TO1	0.461 \pm 0.117*#
WO1	0.458 \pm 0.152*#
RF3	0.441 \pm 0.121*#
RF2	0.404 \pm 0.127*#
RF1	0.330 \pm 0.091*#
GW1	0.322 \pm 0.135*#
RW1	0.255 \pm 0.110*#
control group	0.127 \pm 0.122

*: vs control group, p<0.01

#: vs UICC chrysotile B, p<0.01

2) HEL細胞染色体異常

2.5 μ g/mlのJFM試料をHuman Embryo Lung Cell (HEL細胞)に24時間作用させた後、細胞染色体異常を測定した。大多数のJFM試料は染色体異常を現した。そのうちSC1の起こした染色体異常率は明らかに対照群UICC Chrysotile Bより高かった(表17)。染色体異常のタイプは単体型の異常であった。

Tab.17 Chromosome aberration induced by JFM fibers in HEL cells(n=100)

tested fibers	aberration cells(%)	aberration type (%)						total aberration rate(%)
		ace	csb	f	ctb	cte	pp	
SC1	6	2		2	1	2	1	8
UICC B	6	2		2	2			6
RF2	5			1	2	1	1	5
WO1	4		1	1	2			4
MG1	3				1	3		4
RF3	3			2	2			4
PT1	3		1		2			3
TO1	3					2	1	3
GW1	2			1	1			2
RF1	2			1	1			2
RW1	1				1			1
control	1				1			1

Note ace: acentric fragment, csb: chromosome breaks, f: fragment, ctb: chromatid breaks, cte: chromatid exchanges, pp: polyploid

[IV] 表面改質の試み：くえん酸アルミニウムの溶血性抑制作用

500 μ g/mlのWO1, TO1と対照群UICC Bを200及び500 μ g/mlのくえん酸アルミニウム (CitAl) を1時間混合した後、細胞に作用させた。その結果、処理後のWO1と対照群UICC Bの起した溶血性は、未処理の試料の溶血性に比べて明らかに減少していた。TO1, WO1及び対照群UICC Chrysotile Bの起したK⁺の漏出も明らかに少なくなった。

5. 結 論

以上の実験結果より、ほとんどのJFM試料の毒性は対照試料のクリソタイル (UICC Chrysotile B) よりも低いといえる。しかし、JFM試料は各影響指標によってその作用程度と順番は同じでなく指標ごとに多様であった。

- 1) 繊維試料の表面電荷を現すゼータ電位は、クリソタイルのみプラスで他はマイナスである。溶血性はクリソタイル (UICC Chrysotile B) がプラス52.54%で他はいずれもその1/10以下の数%以下であった。表面電荷がプラスのものが高い溶血性を示すと考えられる。
- 2) 細胞膜傷害性の指標としての赤血球、AMからのK⁺漏出は、対照試料のクリソタイル (UICC Chrysotile B) より強いとか同等レベルのものとして、赤血球とAMのいずれに於てもTO1, WO1, AR1が挙げられる。同じくAMからのLDH (乳酸脱水素酵素) の漏出は、AR1とPT1がクリソタイルと同レベルの値を示し、TO1とSC1が比較的高かった。これらの繊維と細胞との接触に於て細胞膜の傷害が発生すると考えられる。
- 3) 繊維試料とAMとの作用の影響を、細胞内[Ca²⁺]_i濃度とAM細胞内グルタチオン(GSH)濃度を指標として評価した。その結果、前者は対照試料のクリソタイルに比べいずれも低かったが、後者はPT1とTO1が対照試料のクリソタイルと同等レベルにまで低下したことが確認された。
- 4) 遺伝的損傷影響を(1)A549細胞DNA鎖の断裂と(2)HEL細胞染色体異常を指標として見た場合、対照試料のクリソタイルより強いとか同等レベルのものとして、(1)ではPT1がほぼ同レベルでSC1, MG1, TO1, WO1などが比較的高かった。(2)については、SC1がクリソタイルより強い異常の発生値を示した。

今後、これらの成果を踏まえて期待されることは、(1) 個々の繊維状物質の線維化能や遺伝毒性などがアスベストと比較して評価される、(2) 繊維状物質表面の微細構造と細胞毒性との関連性が評価される、(3) 毒性評価のための簡便なスクリーニング法の確立のための基礎データとして用いられる、などである。

関係論文の発表予定 (含む既発表)

- 1) Kohyama, N. et al. : Preparation and characteristics of some fibrous minerals for biological experiments, Ninth International Conference for Occupational Respiratory Diseases, Kyoto, 1997.10.10/15
- 2) Wang, Q., Wu, W and Shi, J: Effects of JFM on membrane and genetic materials in cells, 日本繊維状物質研究協議会研究交流会、東京、1998.3.7
- 3) 神山宣彦、栗盛静江、篠原也寸志：2種のチタン酸カリウムウイスカの表面形態の直接観察、日本産業衛生学会、盛岡、1998.4.22 (発表予定)
- 4) Wang, Q., Wu, W, Shi, J and Kohyama, N: Biological effects of man-made mineral fibers and some whiskers on membrane and genetic materials in cells, Ind. Health, (preparation)