

原 著

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

戸田 枝里子¹⁾ 高田 礼子²⁾ 網中 雅仁²⁾
 戸谷 忠雄³⁾ 山下 喜世次⁴⁾ 神山 宣彦⁵⁾
 山内 博¹⁾

- 1) 北里大学大学院医療系研究科環境医科学群労働衛生学
- 2) 聖マリアンナ医科大学予防医学
- 3) (独)労働安全衛生総合研究所 (現所属：日本バイオアッセイ研究センター)
- 4) (株)ノザワマイケミカル事業部
- 5) 東洋大学大学院経済学研究科

The comparison of oxidative stress of thermal decomposition products of chrysotile and amosite by single intratracheal instillation in rats

Eriko Toda¹⁾ Ayako Takata²⁾ Masahito Aminaka²⁾ Tadao Toya³⁾
 Kiyotsugu Yamashita⁴⁾ Norihiko Kohyama⁵⁾ Hiroshi Yamauchi¹⁾

- 1) Kitasato University Graduate School of Medical Sciences
- 2) Department of Preventive Medicine, St. Marianna University School of Medicine
- 3) National Institute of Occupational Safety and Health, Japan (Current affiliation: Japan Bioassay Research Center)
- 4) Nozawa Corporation
- 5) Toyo University Graduate School of Economics

要約

アスベストの無害化処理生成物の安全性に関する科学的検証が求められている。ラットにクリソタイル(CH)とアモサイト(AM)とそれぞれの焼成処理試料(CHの1,000°C焼成物(FO-1000)とAMの1,100°Cの焼成物)を一回気管内投与し、酸化的DNA損傷の経時的変化を尿中8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

受付：平成24年1月13日 採用：平成24年1月25日

別刷請求宛先：山内 博

〒252-0373 相模原市南区北里1-15-1 北里大学医療衛生学部 公衆衛生学

Received: January 13, 2012 Accepted: January 25, 2012

Reprint Requests to Hiroshi Yamauchi, Department of Public Health, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

(8-OHdG)、さらに、肺の病理組織学的検索および8-OHdGの免疫組織染色等による評価を360日目まで実施した。CH, AM, AM1100群では、ラットに2mgを気管内一回投与後、投与初期および投与後180日以後、尿中8-OHdG濃度の上昇傾向があり、この時期の肺組織の8-OHdGの免疫組織染色でも共通の結果を認めた。これに対して、FO-1000群の検査結果は軽微な変化のみであった。本研究から、CH及びAMとそれらの焼成無害化処理材料の生体影響を比較した結果、CHは焼成処理によりフォーステライト化することで生体影響の軽減が認められたのに対し、AMは1,100°Cの焼成処理条件では毒性が軽減されることがなく、さらに、最適な処理条件の解明の必要性を明らかにした。

(臨床環境20:131~140, 2011)

《キーワード》クリソタイル、アモサイト、無害化、酸化ストレス、8-OHdG

Abstract

Chrysotile (CH) and amosite (AM), the most common form of asbestos, is rendered less toxic by heating it at 1,000 and 1,100°C and converting it to forsterite (FO-1000) and AM1100 (mainly iron oxides), respectively. However, further safety tests are needed to evaluate the human health risk of these materials. We compared the ability of FO-1000 and CH, and AM1100 and AM to cause oxidative DNA damage and lung injury. In this study, a single 2mg dose of CH, FO-1000, AM and AM1100 was intratracheally administered to rats. Within 360 days after the administrations, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels were checked in the urine. In the CH, AM and AM1100 group, inflammatory responses persisted in the lung, leading to fibrosis. Increased 8-OHdG levels were observed in the lungs up to 180 days after treatment. Immunostaining experiments revealed high levels of 8-OHdG in the bronchioles and alveolar epithelium, and in inflammatory cells and granulomas. Compared to the CH group, acute lung inflammation observed in the FO-1000 was less apparent and exhibited no progressive fibrosing lesions, and FO-1000 had little alteration in the urinary 8-OHdG levels. We conclude that CH, AM and AM1100 induces oxidative stress and lung injury that progresses over time, resulting in long-term toxic effects. These results indicate that heating to 1,100°C is not sufficient to detoxify AM. In contrast, this result confirmed that FO-1000 was more efficient in detoxification than in CH.

(Jpn. J. Clin. Ecol. 20:131~140, 2011)

《Key words》chrysotile, amosite, decomposition of asbestos, oxidative stress, 8-OHdG

I. 緒言

アスベストばく露により、石綿肺、肺がん、中皮腫および良性胸膜疾患が引き起こされることが知られている。日本では、2006年にアスベストの使用は全面禁止されたが、今後、すでにアスベストを使用した建物の老朽化による解体作業に伴い、アスベスト含有建材の大量廃棄が予想される。そこで、アスベスト含有廃棄物の安全で迅速な処理を促進するために、環境省による石綿含有廃棄物の無害化処理認定制度が開始された。しかし、アスベストの無害化処理において、アスベストが検出されないだけでは無害化処理生成物の安全性

は担保されないことから、無害化処理生成物の安全性に関する科学的検証が求められている。

もっとも大量に使用されたアスベストであるクリソタイル (CH; $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$) は約700~800°Cで加熱するとフォーステライト (Mg_2SiO_4) へ変換される。さらに1,000°C~1,200°Cではフォーステライトの一部がエンスタタイト ($MgSiO_3$) に変化する^{1~3)}。これまでのラットの *in vivo* 研究において、CHを1,000°Cで焼成処理後のフォーステライトによる肺の急性炎症と酸化的DNA損傷はCHに比較して軽減され、線維化には至らなかったことが報告されている⁴⁾。さらに、ラット

への胸腔内注入⁵⁾もしくは腹腔内注入⁶⁾において、CHの焼成処理試料の発がん性はCHに比べて低下したことが報告されている。

他方、アスベスト含有建材には、CH以外にアモサイト (AM; $\text{Fe}^{2+}_7[\text{Si}_8\text{O}_{22}](\text{OH})_2$) も使用されてきたことから、アスベスト含有建材の廃棄物処理の過程でCHとAMを同時に処理する可能性がある。AMの加熱処理により生成される物質はCHと異なっている。AMは約500°Cから1,000°Cまでの温度で脱水素、脱水酸、Fe(II)の酸化が生じる^{3,7)}。その結果、AMからヘマタイト (Fe_2O_3) とマグネタイト ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) といった酸化鉄や結晶質シリカが生成される^{3,7,8)}。しかし、AMを高温で焼成処理した試料の生体影響に関する研究は十分に実施されていない状況にある。*in vitro*試験では、AMを1,073K(約800°C)で加熱した試料のフリーラジカル生成およびDNA損傷がAMに比較して低下することが報告されている⁹⁾。しかし、AMの焼成処理試料の培養細胞を用いた*in vitro*試験さらには*in vivo*における研究はほとんど行われていない。そのため、アスベスト含有廃棄物の無害化処理を推進する上でこれらの物質の安全性に関する研究が必要である。

アスベスト関連疾患の発症機序に活性酸素種や活性窒素種は重要な役割を果たしていることが推測されている^{10,11)}。これまでに、アスベストばく露が酸化的DNA損傷を引き起こす機序は十分に明らかにされていないが、アスベスト繊維の鉄を介した直接的なヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成による機序とマクロファージ、好中球などの炎症細胞での活性酸素種や活性窒素種の生成による間接的な機序が示唆されている。酸化的DNA損傷のバイオマーカーの一つである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)^{12~15)}については、アスベストばく露労働者において、白血球中DNAの8-OHdG濃度^{16~18)}や尿中8-OHdG濃度^{19,20)}の有意な上昇が確認されている。

本研究では、CHとAMとその焼成処理試料の経気道ばく露による酸化的DNA損傷の経時的变化を尿中8-OHdGを指標として評価を行った。

ラットにCHとAMとそれぞれの焼成処理試料を一回気管内投与した。同時に気管内投与後の肺の病理組織学的検索および8-OHdGの免疫組織染色等を行い、CHおよびAMの焼成処理試料の肺における酸化的DNA損傷についてもCHおよびAMと比較して評価した。

II. 材料と方法

1. 試料

クリソタイル (CH) とその1,000°C焼成処理材料 (FO-1000) (図1(a), (b)) : CHはカナダ Cassiar Mining Corp. 産の grade AX から繊維長250 μm 未満のCHを分級して用いた²¹⁾。CH試料には2.3%の Fe_2O_3 、1.7%の Al_2O_3 が含まれていた。FO-1000は、CHを電気炉で1,000°Cにて3時間の加熱を行い作製した²¹⁾。X線回折分析から、CHの残存は認められなかったが、フォーステライトと少量のエンスタタイトが含まれていた。また、CHとほぼ同様に2.1%の Fe_2O_3 、1.6%の Al_2O_3 が含まれていた。透過型電子顕微鏡 (LEM-2000; トプコン、東京) (以下、TEM) によりサイズ分布とアスペクト比3以上の繊維と非繊維状粒子数を計測した結果、FO-1000では、CHの長繊維が破壊され、非繊維状粒子の割合が増加していた (表1)。自動比表面積測定装置 (BELSORP-mini, 日本ベル、大阪) により Brunauer-Emmett-Teller (BET) 法による比表面積を測定した結果、FO-1000ではCHに比べて比表面積が大幅に減少していた。

アモサイト (AM) とその1,100°C焼成処理材料 (AM1100) (図1(c), (d)) : AMは International Union Against Cancer (IARC) 標準試料を用いた。AM試料は99%のAMと微量の石英 (SiO_2) を含んでいた⁷⁾。AM1100は、AMが完全に消失する加熱条件としてAMを電気炉内で1,100°Cで1時間加熱し作製した。X線回折分析から、AM1100はヘマタイト (Fe_2O_3) およびマグネタイト ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) を含んでいた。さらにAM1100は、AM試料と同程度の微量の石英を含んでいた。TEMによるサイズ計測の結果、AM1100ではAMに比較して長繊維の割合

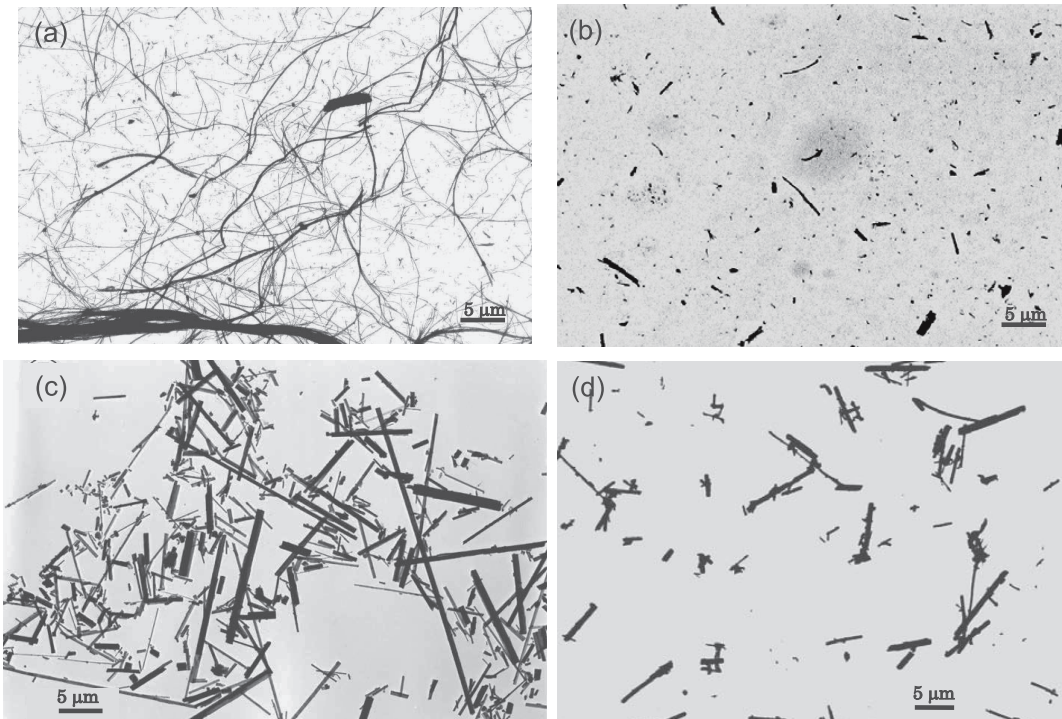


図1 被験試料のTEM所見

- (a) CH ; カナダ Cassiar Mining Corp. 産クリソタイル。
 (b) FO-1000 ; CH を1,000°Cで3時間加熱し作製した。
 (c) AM ; アモサイト UICC 標準試料。
 (d) AM-1100 ; AM を1,100°Cで1時間加熱し作製した。

表1 CH、FO-1000、AM、AM1100 試料の繊維サイズと比表面積

試料	繊維数 ($\times 10^6$ /mg)				幾何平均長 (μm)	幾何平均幅 (μm)	比表面積 (m^2/g)
	総繊維	繊維長 (μm)					
		< 5	5-20	≥ 20			
CH	912 (97%) ^a	683 (73%) ^a	207 (22%) ^a	22 (2.3%) ^a	2.3 \pm 2.9 ^b	0.14 \pm 1.6 ^b	16.5
FO-1000	1021 (18%) ^a	986 (18%) ^a	35.2 (0.6%) ^a	0 (0%) ^a	0.91 \pm 2.2 ^b	0.19 \pm 1.7 ^b	9.7
AM	189 (93%) ^a	114 (56%) ^a	57 (28%) ^a	19 (9.3%) ^a	4.3 \pm 3.3 ^b	0.31 \pm 1.9 ^b	5.9
AM1100	180 (75%) ^a	150 (63%) ^a	28.4 (12%) ^a	1.5 (0.6%) ^a	2.0 \pm 2.5 ^b	0.29 \pm 1.9 ^b	4.3

CH および FO-1000 試料の繊維サイズは Takata et al.²¹⁾の結果より引用。

AMの幾何平均長と幅は Kohyama et al.⁷⁾の結果より引用。Kohyama et al.⁷⁾の結果から繊維長別の繊維数を計算した。CH、FO-1000、AM、AM1100試料の総粒子数は、それぞれ $940 \times 10^6/\text{mg}$ 、 $5546 \times 10^6/\text{mg}$ 、 $202 \times 10^6/\text{mg}$ 、 $240 \times 10^6/\text{mg}$ であった。

^a 括弧内の数字は総粒子数のうちの繊維数の割合 (%) を示す。 ^b 幾何平均 \pm 幾何標準偏差。

は減少していたが、長さ5 μm 以上の繊維状粒子が多く観察された(表1)。AM1100の比表面積はAMに比較して減少したが、FO-1000のような顕著な減少ではなかった(表1)。

2. 気管内投与実験

動物はWistar系雄ラット(Crlj: WI; 日本チャールスリバー、神奈川)を使用した。ラットは、バリア施設内で12hr/12hr 明暗、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 55 ± 5

%RH の環境下で、浄水器ろ過水道水、放射線滅菌飼料 (Egg white diet; Dyets Inc., USA) を自由摂取させて飼育した。なお、Egg white diet は、蛋白源として卵白を使用し、8-OH-Guanine および8-OHdG の含有率が低い飼料である²²⁾。動物実験は労働安全衛生総合研究所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。

気管内投与実験は Takata et al.^{4,21)} と同様な方法で実施した。被験試料 (CH, FO-1000, AM, AM1100) は、オートクレーブで121°C、20分間滅菌後、生理食塩水に懸濁させ、超音波洗浄器で10分間分散処理を行い調整した。Wistar 系雄ラット10週齢に各試料 (CH, FO-1000, AM, AM1100) の生理食塩水懸濁液 2 mg/ml をハロセン麻酔下で気管内に一回投与した。投与前および投与後1、3、7、14、30、180、360日目に、各群5匹ずつの動物を代謝ケージにて飼育し、尿を遮光条件下で採取し、分析に供するまで-80°Cにて凍結保存した。採尿後、ラットは pentobarbital sodium の腹腔内投与による深麻酔下で解剖を行い、病理組織学的検索を行う組織検体を4% paraformaldehyde 液で固定した。

3. 尿中8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 濃度の測定

尿は遠心分離 (10,000rpm×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 μm) でろ過した。尿中8-OHdG 濃度は、Kasai²³⁾ の方法に基づき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、京都), guard column (Inertsil ODS-3, 5 μm, 4 x 10mm, GLサイエンス、東京), main column (TSK pre-column SW, 4.6 x 35mm, 東ソー、東京), and UV detector (UV 620; GL Science Inc, Tokyo, Japan)。分析条件は、流量0.3ml/min、カラム温度35°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、東京), guard column (MGカートリッジ, 3 μm, 4 x 20mm, 資生堂、東京), main column (CAPCELL

PAK C18 MG S5, 資生堂、東京), and ECD detector (ED703 Pulse; GLサイエンス、東京)。分析条件は、流量 0.7ml/min、カラム温度 45°Cとした。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。尿中クレアチニン濃度は LabAssay™ creatinine (和光純薬、大阪) を用いて測定した。尿中8-OHdG濃度は尿中クレアチニン濃度により補正した。

4. 病理組織学的検索および8-OHdGの免疫組織染色

肺組織を4%paraformaldehyde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 μm以下に薄切し Hematoxylin-Eosin (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。8-OHdGの免疫組織染色に際しては、病理組織学的検索を実施した同じ個体の肺組織のパラフィンブロックを用いた。免疫組織染色は Takata et al.^{4,21)} と同様の方法で実施した。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分による抗原賦活化を行った。内因性 peroxidase を不活化し、Phosphate-buffered saline (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し、再度PBSにて洗浄した。1次抗体として、抗8-OHdGモノクローナル抗体 (日本老化制御研究所: MOG-020) を使用した。抗8-OHdG抗体 (希釈倍率1:100) をスライドに添加後、4°Cで一晩のインキュベーションをした。PBSにて洗浄後、biotin 標識二次抗体 (DAKO, Denmark) を添加し、室温でインキュベーションした。再度洗浄後、StreptAB complex/HRP (DAKO, Denmark) にて処理した。再洗浄後、3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride で発色させた。核染色は Meyer's hematoxylin で行った。

統計処理

尿中8-OHdG濃度は平均値±標準偏差 (SD) で示した。測定値の統計解析は、SPSS 15.0-Jを用いた。各群における投与後の尿中8-OHdG濃

度と投与前の濃度との比較は、一元配置の分散分析を行い、その後の群間比較は Tukey の検定を行った。また、各採尿日における群間の比較は student's t 検定を行った。すべての検定で有意水準は 5 % 未満とした。

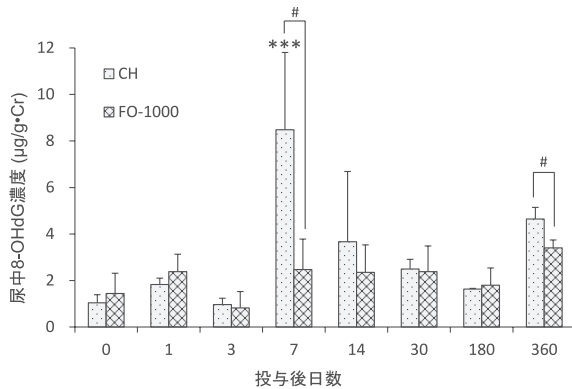


図2 CH および FO-1000の気管内一回投与後における尿中8-OHdG濃度の経時的変化

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (投与前の値との比較). # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ (CH vs. FO-1000)

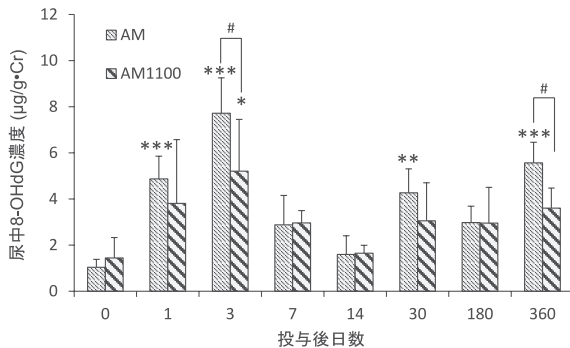


図3 AM および AM-1100の気管内一回投与後における尿中8-OHdG濃度の経時的変化

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (投与前の値との比較). # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ (AM vs. AM-1100)

III. 結果

1. 尿中8-OHdG濃度

ラットへの CH 投与群及び FO-1000 投与群の一回気管内投与後360日目までの尿中8-OHdG濃度の経時的変化をグラフに示した (図2)。CH 投与群における尿中8-OHdG濃度は、投与後7日目に投与前の5倍以上と最高値を示した ($p < 0.001$)。その後、尿中8-OHdG濃度は緩やかに減少する傾向が示された。しかし、投与後360日目に再び上昇する傾向が示された。これに対して、FO-1000投与群では、投与後1日目から180日目まで大きく上昇することはなかったが、投与後360日目に若干の上昇を示したが、有意な上昇ではなかった。

一方、AM 投与群及び AM1100投与群の一回気管内投与後360日目までの尿中8-OHdG濃度の経時的変化をグラフに示した (図3)。AM 投与群における尿中8-OHdG濃度は、投与後1日目と3日目に有意に上昇し ($p < 0.001$)、投与後3日目に最高値を示した。その後、尿中8-OHdGは減少傾向を示した。しかし、投与後30日目に尿中8-OHdG濃度は再び上昇し、投与後360日目においても投与前に比較して有意な高値を示した ($p < 0.001$)。また AM1100投与群においても、尿中8-OHdG濃度は AM 群より低い傾向にあるが、AM 群と同様な変動パターンが認められた。投与後3日目に尿中8-OHdG濃度が投与前に比較して有意に上昇した ($p < 0.05$)。その後、減少傾向を示したが、投与後360日目においても投与前に比較すると高値の傾向が示された。

2. 肺の病理組織学検索

CH 投与群では、投与後1日目で細気管支、肺胞道、肺胞領域に炎症反応が顕著に認められた。とくに、投与後3日目以降、肉芽腫が細気管支や肺胞道に顕著に認められた (図4 (a))。投与後14日目以降、急性炎症反応は次第に回復していくが、30日目以降は線維化が進行した。投与後360日目では局所的に慢性炎症が持続しており、細気管支周囲、肺胞道から肺胞にかけて線維化の進展が認められた (図4 (b))。これに対して、FO-1000投与群では、急性炎症反応は CH 群に比べて軽度で

一過性であった。肉芽腫の形成が認められたが、CH 投与群に比べて小型で数も少なかった(図5(a))。これらの急性炎症反応は投与後14日目以降次第に回復し、肉芽腫の数も減少していった。投与後360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5(b))。

一方、AM 投与群では、投与後1日目以後、細気管支、肺胞道、肺胞領域に炎症反応が顕著に認められ、投与後3日目以降、肉芽腫が細気管支、肺胞道、肺胞で認められた(図6(a))。投与後30日目以降も局所的に慢性炎症が持続し、肉芽腫も認められていた。さらに、30日目以後に線維化も認められるようになり、投与後360日目では肺胞道から肺胞にかけて線維化の進展が認められた(図6(b))。また、AM1100群では、急性炎症反応は細気管支、肺胞道、肺胞領域に認められたが、AM群よりやや軽度であった。また、投与後3日目以降、肉芽腫の形成も認められた(図7(a))。肉芽腫の数は経時的に増加していった。投与後360日目では肉芽腫から周囲の肺胞にかけて線維化の進展が認められた(図7(b))。

3. 肺組織中8-OHdGの局在

CH 投与群では、投与後1日目以降、マクロファージ、好中球などの炎症細胞、細気管支・肺胞上皮細胞の核で8-OHdGが陽性となった(図4(c))。投与後30日目以降は、肉芽腫病変部とその周囲の気道上皮細胞と炎症細胞を中心に8-OHdGの発現が観察され、投与後360日目でも同様に8-OHdGの発現が持続していた(図4(d))。FO-1000投与群では、投与後初期に気道上皮細胞と炎症細胞で8-OHdGの発現が認められた(図5(c))。しかし、8-OHdGの発現は、軽度であり、投与後14日目以後は炎症の回復に伴い、8-OHdGの発現は減少していった。投与後360日目では、肺組織における8-OHdGの発現はほとんど認められなかった(図5(d))。

一方、AM 投与群では、投与後1日目以後、炎症反応に伴って、マクロファージ、好中球などの炎症細胞および細気管支・肺胞上皮において8-OHdGの発現が認められた(図6(c))。投与後30日目以降も炎症細胞および気道上皮における

8-OHdGの発現は持続して認められた。投与後360日目でも炎症細胞および気道上皮細胞における8-OHdGの強い発現が観察された(図6(d))。AM1100投与群では、投与後1日目以降に炎症反応および肉芽腫形成に伴って、炎症細胞と気道上皮細胞で8-OHdGの発現が認められた(図7(c))。投与後30日目以後も肉芽腫内の細胞およびその周囲の気道上皮において8-OHdGの発現は持続し、投与後360日目でも8-OHdGの発現が認められた(図7(d))。

IV. 考察

アスベスト含有廃棄物の処理では、CHと同時にAMも無害化することが求められる。この研究の目的は、CHとAMをそれぞれの条件で加熱処理し、生成された無害化処理生成物の経気道ばく露による生体影響を評価することで、廃棄及び再利用時の際の安全性を科学的に検証するものである。この目的のために、呼吸器影響の簡便なスクリーニング法であるラット気管内一回投与により、CH投与群とCHを1,000℃で焼成したFO-1000投与群、AM投与群とAMを1,100℃で焼成したAM1100投与群について、アスベスト関連疾患の発症に関与すると考えられる酸化的DNA損傷のバイオマーカーである8-OHdGを指標として比較し評価した。

まず、FO-1000による肺の急性炎症と酸化的DNA損傷はCHに比較して軽減されていた。さらに、肺における炎症反応および酸化的DNA損傷は一過性であり、投与後360日目においても線維化には至らなかった。本研究の結果はこれまでの報告⁴⁾と矛盾しない結果であった。次に、AM1100をラットへ一回気管内投与後の急性期の呼吸器影響および酸化的DNA損傷は、投与後3日目の時点でAMに比較して軽度であった。しかし、投与後3日目以降、肉芽腫は経時的に進展していった。投与後360日においてもAM1100群では肉芽腫とその周囲の線維化が認められ、長期間にわたり酸化的DNA損傷が持続していた。これまで、AMの焼成処理試料については、CHの焼成処理試料に比較して、*in vivo*研究における安全性の

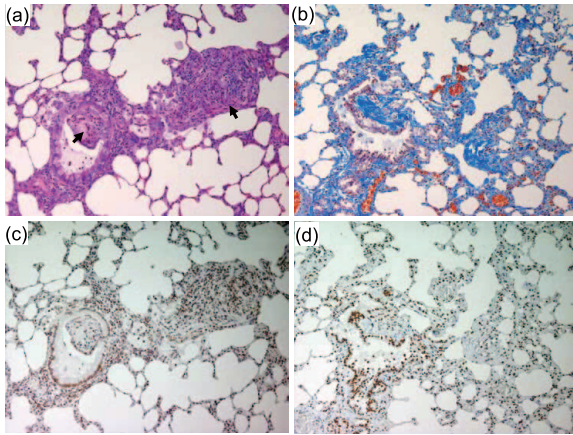


図4 CH投与群の肺病理組織像

- (a) CH群、投与後7日目、HE染色。細気管支および肺胞の急性炎症が認められ、細気管支および肺胞道に肉芽腫(矢印)が形成されていた。
- (b) CH群、投与後360日目、Masson's trichrome染色。細気管支および肺胞道から周囲の肺胞領域に拡大する線維化が認められた。
- (c) CH群、投与後7日目、8-OHdG免疫染色。炎症細胞(好中球、好酸球、マクロファージ)や細気管支および肺胞上皮細胞の核で8-OHdGが陽性であった。
- (d) CH群、投与後360日目、8-OHdG免疫染色。細気管支および肺胞上皮細胞や間質の炎症細胞の核で8-OHdGが陽性であった。

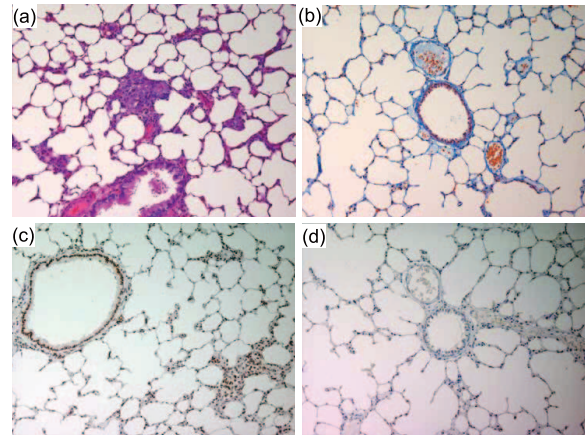


図5 FO-1000投与群の肺病理組織像

- (a) FO-1000群、投与後7日目、HE染色。細気管支周囲や肺胞で急性炎症が認められたが、CH群に比較して軽度であった。
- (b) FO-1000群、投与後360日目、Masson's trichrome染色。炎症は回復し、線維化および腫瘍性変化は観察されなかった。
- (c) FO-1000群、投与後7日目、8-OHdG免疫染色。炎症細胞や気道上皮細胞の核で8-OHdGが陽性であった。
- (d) FO-1000群、投与後360日目、8-OHdG免疫染色。気道上皮の核で8-OHdGの生成はごく軽度であった。

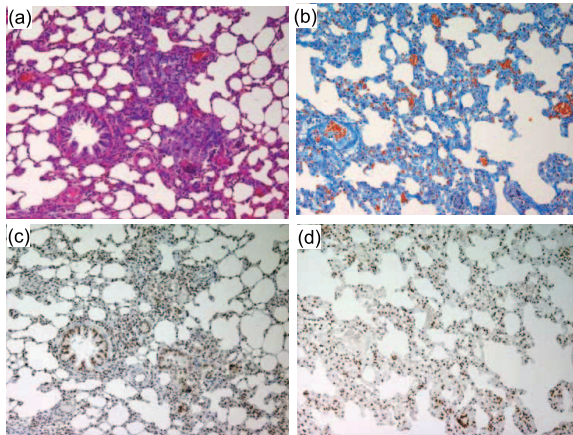


図6 AM投与群の肺病理組織像

- (a) AM群、投与後7日目、HE染色。細気管支および肺胞の急性炎症が認められ、細気管支および肺胞道に肉芽腫(矢印)が形成されていた。
- (b) AM群、投与後360日目、Masson's trichrome染色。肺胞道、肺胞において線維化が明らかに認められた。
- (c) AM群、投与後7日目、8-OHdG免疫染色。炎症細胞や細気管支および肺胞上皮細胞の核で8-OHdGが陽性であった。
- (d) AM群、投与後360日目、8-OHdG免疫染色。気道上皮細胞や間質の炎症細胞の核で8-OHdGが陽性であった。

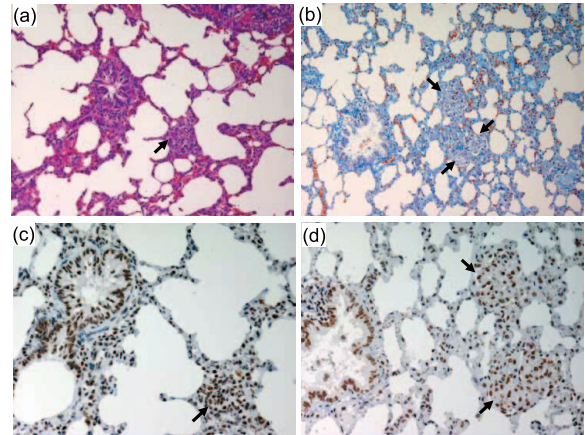


図7 AM1100投与群の肺病理組織像

- (a) AM1100群、投与後7日目、HE染色。細気管支周囲と肺胞壁の炎症細胞浸潤はAMに比べて軽度であった。しかし、肺胞道、肺胞において肉芽腫(矢印)が観察された。
- (b) AM1100群、投与後360日目、Masson's trichrome染色。肉芽腫(矢印)が認められ、その周囲の肺胞壁で線維化が生じていた。
- (c) AM1100群、投与後7日目、8-OHdG免疫染色。炎症細胞や細気管支および肺胞上皮細胞の核で8-OHdGが陽性であった。
- (d) AM1100群、投与後360日目、8-OHdG免疫染色。気道上皮細胞の核で8-OHdGが陽性であった。さらに肉芽腫内の炎症細胞の核でも8-OHdGの陽性であった。

検証が不十分である。本研究から、AMの焼成処理試料はCHの焼成処理試料と異なり、慢性影響が懸念された。

酸化了的DNA損傷のバイオマーカーの一つである8-OHdGについては、アスベストばく露労働者において、白血球中DNAの8-OHdG濃度^{16~18)}や尿中8-OHdG濃度^{19,20)}の有意な上昇が確認されている。実験動物では、多層カーボンナノチューブをばく露後の肺の急性炎症反応期にマウスで尿中8-OHdGレベルが増加したことが報告されている²⁴⁾。本研究では、CH、FO-1000、AM、AM1100群の尿中8-OHdG濃度の経時的な変動は、肺組織における炎症反応や酸化了的DNA損傷などの病変推移とよく一致していた。尿中8-OHdGレベルはアスベストの無害化処理材料の生体影響評価においても有用であることが示唆された。

アスベスト関連疾患の発症における活性酸素種および活性窒素種の生成機序は複雑である。アスベスト繊維の鉄を介した直接的なヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)の生成による機序とマクロファージ、好中球などの炎症細胞での活性酸素種や活性窒素種の生成による間接的な機序の関与が示唆されている^{11,12)}。この間接的な機序においては、マクロファージによる貪食作用の障害が関わるため、繊維状粒子のサイズが生体影響に関わる可能性がある。本研究に用いたFO-1000は、CHに比較して1,000°Cでの焼成により長繊維は大幅に減少しており(表1)、肺での炎症反応や酸化了的DNA損傷が軽減されたことが考えられた。

一方、これまでの研究から、AMによる肺の炎症と線維化にも、鉄を介したフリーラジカル生成が関与すると考えられている²³⁾。本研究で用いたAM1100はヘマタイトとマグネタイトといった酸化鉄を主成分としていることから、AM1100による酸化了的DNA損傷および炎症においてもAMと同様なメカニズムが関与している可能性も考えられた。さらに、本研究で用いたAM1100はAMに比較して長さ5 μm 以上の繊維数は減少しているものの繊維状粒子の数はAMに比較してあまり減少していなかった(表1)。そのため、マクロファージの貪食の障害による酸化スト

レスも生じていたことが示唆される。このことは、酸化了的DNA損傷マーカーである8-OHdGの免疫染色結果からも裏付けられた。

本研究から、CH及びAMとそれらの焼成無害化処理材料の生体影響を比較した結果、CHは焼成処理によりフォーステライト化することで生体影響の軽減が認められたのに対し、AMは焼成処理条件によっては非石綿化しても生体影響が軽減されない可能性が危惧された。一方、本研究ではCH及びAMとその焼成加熱物に対して、酸化了的ストレスを比較した結果、CHに比較してAM及びAM1100のやや作用が強い傾向があり、この領域に関するヒトでの疫学調査はないが、この動物実験の結果は参考になると考える。今後、AMの無害化処理方法に際してはさらなる科学的な根拠に基づく、最適な手法や条件について、詳細な検討が必要であると考え得る。

謝辞

本研究は環境省循環型社会形成推進科学研究費補助金(K1919、K2056、K2159)によって実施された。

文献

- 1) Koshi K, Hayashi H, Sakabe H: Biological and mineralogical studies on serpentine minerals in heat treated state. *Ind Health* 7: 66-85, 1969
- 2) de Souza Santos H, Yada K: Thermal transformation of chrysotile studied by high resolution electron microscopy. *Clays and Clay Minerals* 27: 161-174, 1979
- 3) Hodgson AA: Chemistry and physics of asbestos. Michaels L, Chissick SS (eds): *Asbestos: properties, applications and hazards*. John Wiley & Sons, New York, vol.1, 1979, 67-114
- 4) Takata A, Yamauchi H, Toya T, et al.: Forsterite exposure causes less oxidative DNA damage and lung injury than chrysotile exposure in rats. *Inhal Toxicol* 21: 739-746, 2009
- 5) Le Bouffant L, Bruyère S, Daniel H, et al.: Influence d'un traitement thermique des fibres de chrysotile sur leur comportement dans le poumon. *Pollution Atmosphérique* 97: 44-49, 1983 (in French)
- 6) Bolton RE, Davis JMG, Donaldson K, et al.: Variations in the carcinogenicity of mineral fibres.

- Ann OccupHyg 26: 569-582, 1982
- 7) Kohyama N, Shinohara Y, Suzuki Y: Mineral phases and some reexamined characteristics of the International Union Against Cancer standard asbestos samples. *Am J Ind Med* 30: 515-528, 1996
 - 8) Jeyaratnam M, West NG: A study of heat-degraded chrysotile, amosite, and crocidolite by X-ray diffraction. *Ann OccupHyg* 38: 137-148, 1994
 - 9) Otero Areán C, Barceló F, Fenoglio I, et al.: Free radical activity of natural and heat treated amphibole asbestos. *J Inorg Biochem* 83: 211-216, 2001
 - 10) Kamp DW, Weitzman SA: The molecular basis of asbestos induced lung injury. *Thorax* 54: 638-652, 1999
 - 11) Shukula A, Gulumian M, Hei TK, et al.: Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med* 34: 1117-1129, 2003
 - 12) Kasai H, Nishimura S: Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res* 12: 2137-2145, 1984
 - 13) Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, et al.: Formation of 8-hydroxydeoxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7: 1849-1851, 1986
 - 14) Yamauchi H, Aminaka M, Yoshida K, et al.: Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 291-296, 2004
 - 15) Kimura S, Yamauchi H, Hibino Y, et al.: Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanine in healthy Japanese people. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98: 496-502, 2006
 - 16) Takahashi K, Pan G, Kasai H, et al.: Relationship between asbestos exposure and 8-hydroxydeoxyguanosine levels in leukocytic DNA of workers at a Chinese asbestos-material plant. *Int J Occup Environ Health* 3: 111-119, 1997
 - 17) Marczynski B, Rozynek P, Kraus T, Schlösset St, Raithe HJ, Baur X: Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA of white blood cells from workers highly exposed to asbestos in Germany. *Mutat Res* 468: 195-202, 2000
 - 18) Amati M, Tomasetti M, Mariotti L, et al.: Assessment of biomarkers in asbestos-exposed workers as indicators of cancer risk. *Mutat Res* 655: 52-58, 2008
 - 19) Tagesson C, Chabiuk D, Axelson O, et al.: Increased urinary excretion of the oxidative DNA adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine, as a possible early indicator of occupational cancer hazards in the asbestos, rubber, and azo-dye industries. *Pol J Occup Med Environ Health* 6: 357-368, 1993
 - 20) Yoshida R, Ogawa Y, Shioji I, et al.: Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine and biopyrins levels among construction workers with asbestos exposure history. *Ind Health* 39: 186-188, 2001
 - 21) Takata A, Yamauchi H, Toya T, et al.: Effectiveness of serum megakaryocyte potentiating factor in evaluating the effects of chrysotile and its heated products on respiratory organs. *Toxicol Appl Pharmacol* 252: 123-129, 2011
 - 22) Kawai K, Li Y -S, Kasai H: Accurate measurement of 8-OH-dG and 8-OH-Gua in mouse DNA, urine and serum: Effects of x-ray irradiation. *Genes Environ* 29: 107-114, 2007
 - 23) Kasai H: A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system. *J Radiat Res* 44: 185-89, 2003
 - 24) Han SG, Andrews R, Gairola CG: Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. *Inhal Toxicol* 22: 340-7, 2010
 - 25) Kamp DW, Israbian VA, Yeldandi AV, Panos RJ, Graceffa P, Weitzman SA: Phytic acid, an iron chelator, attenuates pulmonary inflammation and fibrosis in rats after intratracheal instillation of asbestos. *Toxicol Pathol* 23, 689-95, 1995