

石綿代替繊維のF344ラットへの腹腔内 および経気道肺内投与による発がんリスク評価

安達修一

Assessment of carcinogenic potency of man made mineral fibers
by intraperitoneal and intratracheal administration to female F344 rats

ADACHI Shuichi

Abstract : It has been well recognized by increasing evidences on the correlation of occupational exposure to asbestos and severe diseases that asbestos is one of the most harmful substances to human. Consequently, not only the production of man-made mineral fibers (MMMFs) but the development of new fibers is being increased. Asbestos is categorized to two types (serpentine and amphibole), by contrast, there are a number of different MMMFs with different chemical composition and different dimensions (length and diameter). Amorphous silicate fibers (fiberglass, rock wool, ceramic fiber), which is one of the major asbestos substitutes, ranges from submicron to millimeter for their use. Monocrystalline whiskers (silicon carbide, potassium titanate, and so on) have very fine structure and are used from the paper filler to the additive of plastic gear based on their suitability of chemical features. However, there is a limited knowledge on the carcinogenicity and other biological effects of these asbestos substitutes. Because of the insolubility and complicated mechanism of the pathogenicity, the short term tests for carcinogenicity and other biological effects using cultured cell system are not able to detect the feature in human after exposure. In order to estimate the risk of inhaled MMMFs, tumor and other changes were histologically examined in female F344 rats after intraperitoneal or intratracheal administration. Considerably high induction of peritoneal tumor was observed in rats administered silicon carbide whisker. Results from these experiments suggest that some type of MMMFs even if used as the asbestos substitutes possibly have the potency to induce mesothelioma and other asbestos related diseases.

Key words : asbestos, man-made mineral fiber, mesothelioma, whisker

I. はじめに

石綿（アスベスト）は、耐火性、耐熱性、耐薬品性、絶縁性などの特性を持つことから、鉄骨吹き付け材、耐火建材、断熱材をはじめ、自動車のブレーキ、家庭用の石油ストーブの芯材、魚焼き網など、最も広く使用された天然素材である。しかし、石綿の発がん性が疫学的に示唆され¹⁾、実験的にも証明される²⁾にしたがい、各国では使用の制限や輸入禁止の措置が取られるようになった。そこで石綿に替わる素材が求められるようになり、各種の人工鉱物

繊維（Man-made mineral fiber, MMMF）が石綿代替繊維として開発され、その生産量も増加している³⁾。それら石綿代替繊維には、ガラス繊維、ロックウール、セラミック繊維などの非晶質ケイ酸塩、チタン酸カリウムウイスカー、シリコンカーバイドウイスカーなどの単結晶ウイスカー、その他にメタリン酸繊維などがあり、石綿代替としてばかりでなく石綿とは異なった特性を生かした新素材として利用されているものもある。

これら人工鉱物繊維には、石綿に比べて太い形状

で吸入できないものから、石綿と同様に微細な針状の形態のものがあり、この様な微細な繊維は吸入沈着後の生体影響も石綿と類似し、発がん性を示す可能性が指摘されている⁴⁾。ところが、石綿の発がん機構は、不溶性の石綿がどの様に細胞核内のDNAと作用し発がんに至らせるかについては種々の検討^{5) - 8)}が行われているものの証明には至っていない。そして、いわゆる培養細胞を使った種々の短期発がんスクリーニング法による評価もほとんど不可能であることから、人工鉱物繊維の発がん性評価は実験動物を用いた方法によらなければならない⁹⁾。日本繊維状物質研究協議会 (JFM) では、人工鉱物繊維の生物学的影響を評価するために MMMF の標準試料を作製した¹⁰⁾。本研究では、JFM 標準試料をラットへ腹腔内投与して発がん性の定量的リスク評価を試み、さらに発がん性の示唆された MMMF をラットに経気道肺内投与し、腫瘍性変化、線維増殖性、胸膜に対する影響を病理組織学的に観察した。

II. 実験方法

1. 実験動物および飼育条件

F344/Slc ラット雌 4 週齢を 1 週間の予備飼育後、実験に使用した。飼育は、ポリカーボネート製ケージに 3 ~ 5 匹とし、飼料として CE-2 (日本クレア製) を、飲料水はろ過 (オルガノ製 PF フィルター) した水道水とともに自由摂取とした。飼育室内は、12 時間の明暗サイクルで、気温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ に維持した。

2. 人工鉱物繊維

日本繊維状物質研究協議会 (JFM) の調製した人工鉱物繊維 10 種類および標準のアスベスト試料として UICC クリソタイルを使用した。(Table 1)

3. 腹腔内投与および経気道肺内投与

腹腔内投与には人工鉱物繊維またはアスベストの 1.0mg/ml 滅菌生理食塩水懸濁液を調製し、1 匹当たり 10mg、1 群 20 匹に投与した。腹腔内腫瘍の発生を観察した結果、発生率の高かった SC と PT には 5 mg

Table 1 JFM standard reference samples

Sample name	Short description of fiber and whisker
GW	Glass wool (glass fiber sprayed by phenol resin)
RW	Rock wool (sludge wool)
MG	Micro glass fiber
RFA	Refractory fiber (ceramic fiber, amorphous)
RFB	Refractory fiber (ceramic fiber, amorphous)
RFC	Refractory fiber (mullite fiber, chrySTALLINE)
PT	Potassium titanate whisker ($\text{K}_2\text{TisO}_{17}$)
SC	Silicon carbide whisker (SiC)
TO	Titanium oxide (rutile) whisker (TiO_2)
WO	Wollastonite (natural mineral fiber from China, CaSiO_3)

Chemical composition, size distribution and other data are described in ref. 10.

投与群、腫瘍発生の認められなかった他の MMMF については 20mg 投与群を設定し同様の腹腔内投与を行った。

腹腔内投与によって腫瘍発生を認めた SC、PT、RFA、RFB について、経気道肺内投与を行った。各群 20 匹とし、エーテル麻酔下に 10mg/ml 滅菌生理食塩水懸濁液 0.1ml を、各繊維の低用量群として 1 回投与、高用量群として週 1 回ずつ 4 回投与した。

4. 腫瘍の検索および病理組織学的観察

腹腔内投与群では、血性腹水の貯留を認めた例は解剖し腫瘍の発生を確認した。投与後 2 年で生存した全例を解剖し、肉眼的および組織学的に腹腔内の腫瘍を検索した。肺内投与群は衰弱した例および投与後 2 年に生存した例を解剖し、腫瘍の検索および線維増殖などの変化を観察した。臓器、組織は 10% 中性ホルマリンにより固定、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色のほか、PAS、アザンマロリー、アルシアンブルーの各染色を施し観察した。

Ⅲ. 結果

腹腔内投与による腹膜中皮腫発生をFig.1にまとめた。SC 10mg群では、1年以内に全例に腹膜中皮腫が発生した。投与2年後の腹膜中皮腫発生率は、UICCクリソタイル10mg群85%、PT 10mg群77%、SC 5mg群70%、PT 5mg群20%、RFA 20mg群20%、RFB 20mg群10%となった。

腹膜中皮腫を発生したラットは、貧血と腹水貯留を指標として肉眼的観察によって比較的容易に見いだすことができた。貧血はF344ラットで自然発生が多い白血病でも出現するが、腹水の合併は中皮腫に特異的で、ほぼ全例が20ml以上の血性腹水を貯留していた。腹腔内全組織表面に腫瘍結節がみられ、ときに脾、脾、小腸、大腸が大網部の腫瘍によって癒合している。播種した腫瘍は、径0.5～2 mm程度の表面の平滑な球状で頸部は細く括れた形状を呈しているが、希に組織間に数cmを繋ぐ白色網状、または1 mm以下の微絨毛状の形態のものも見られた。肝

は例外なく横隔膜と腫瘍によって癒着し、投与した繊維の集簇が存在し、沈着部位であることが確認できる。腹腔以外の転移を示す例はほとんどない。組織学的には、肉腫型あるいは混合型が多く、上皮型の例は少ない。腫瘍は同一個体でも部位によって異なっている例が多い。乳頭状の腫瘍は、1層から数層の腫瘍細胞がhyaluronidase消化性コラーゲンを含む結合組織を被覆している。腫瘍細胞は、立方状で好塩基性の豊富な細胞質を有し、円形から楕円形の核を持つ。結節性の腫瘍は、多様な組織学的特徴を呈し、表面は乳頭状と同様の立方状腫瘍細胞が1層から数層被覆している。結節中心部の腫瘍は大型の核をもち、様々な大きさの空胞、不明瞭な細胞間隔の多角形細胞を有するものもみられる。mucoid物質はPAS染色陰性である。この2形態は入り交じり、大きな腫瘍塊を形成する。化骨形成を示す例が全体の6%にみられた。(Photo.1～4)

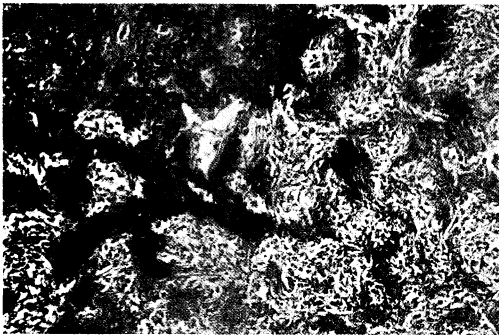


Photo.1 Peritoneal mesothelioma (SC, AB-PAS, X100)

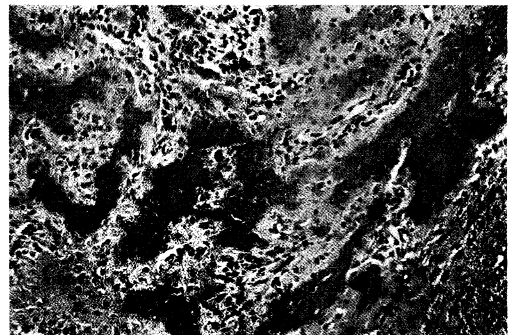


Photo.2 Peritoneal mesothelioma with osseous formation (SC, H&E, X100)

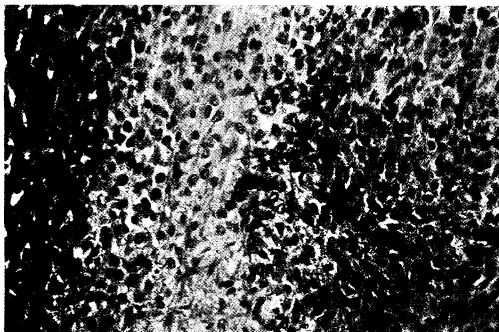


Photo.3 Peritoneal mesothelioma and PT fibers (H&E, X100)



Photo.4 Peritoneal mesothelioma with papillary structure on abdomen (UC, H&E, X100)

経気道肺内投与により、SC、PT、RFA、RFBの各投与群に腫瘍発生を認めなかった。SCおよびPT投与群では、肺組織内に沈着し、また、マクロファージに貪食され集簇した繊維を多数認め、慢性炎症を伴っている部位もある。RFAおよびRFB投与群の肺組織には繊維の沈着を確認できなかった。SC投与群では、肺実質の扁平上皮化生、腺様化生、胸膜の肥厚と線維化が認められた。PT投与群では、扁平上皮化生は認められず、腺様化生と炎症像がみられ、胸膜の肥厚が全例に見られた。(Photo.5, 6)



Photo.5 SC fibers deposition in the lung (H&E, X200)



Photo.6 PT fibers deposition in the lung parenchyma (H&E, X200)

IV. 考察

腹腔内投与により発生した腹膜中皮腫は、雄F344ラットでは約4%に自然発生し、原発部位は精巣周囲の腹膜とされているが、雌での自然発生は極めて低い¹¹⁾。投与した繊維状粉じんは、ラットの肝表面に沈着がみられ、初期の中皮腫例では肝・横隔膜間のみ腫瘍が観察されることから、ここが原発

部位と推察される。繊維状粉じんて誘発されるラット腹腔内腫瘍は、人の胸膜、腹膜中皮腫症例と異なる点が多く、組織学的には"fibrohistiocytic sarcoma", "mesenchymoma", "mesothelioblastoma"が適当ではないかとする報告があった¹²⁾。しかし、組織学的多様性は中皮腫の特性であり、ヒト中皮腫と一致しない点はあるが、雄ラットの自然発生と同様に中皮腫との判断は妥当と考えられる。この実験方法は、生体内の局在性を著しく高めた方法であるため、繊維自体のいわば潜在的発がん性を明らかにするもので、直ちに人への曝露による発がん性を示唆するとは言えない。ヒトへの外挿には、クリソタイルのリスクを基準とした相対的な評価などが適当であり、また、吸入曝露による肺内沈着の影響を評価するには、肺内投与による組織学的な知見が必要であるとの立場から本研究を行った。

人工鉱物繊維の生体影響や発がん性に関して、世界保健機関 (WHO) は1988年にEnvironment Health Criteria¹³⁾の中で評価し、さらに2002年に国際がん研究機構 (IARC) が評価を公表した¹⁴⁾。前者では、評価の対象がロックウールやガラス繊維であり、吸入曝露の可能性が低いこと、肺内沈着後に溶解することによって生物学的な影響がほとんどないと判断している。IARCでは、その後の動物実験の結果などを受けて、特別な用途のガラス繊維やセラミック繊維について、実験動物に対する発がん性の高さから「発がん性が疑われる - Group2B」と評価し、ロックウールや一般的なガラス繊維などの人工鉱物繊維は「発がん性は認められない - Group3」に分類している。

本研究でラットへの腹腔内投与により腫瘍発生を認めたシリコンカーバイドウイスキーやチタン酸カリウムウイスキーの発がん性を含む生体影響に関する報告は、ほとんどない¹⁵⁾。これら単結晶ウイスキー類は、天然鉱物であるアスベストとは異なり、各メーカーが開発し製造しており、種類、生産量も多様で、化学的な特性など詳細が明らかでないものも多い。チタン酸カリウムウイスキーの場合、その価格はアスベストの100倍以上と高価であるため用途も限られ、精密度と軽量化の必要とされるプラスチック部品への添加剤などに使われ、多量に添加する建材などへの使用例は少ない。

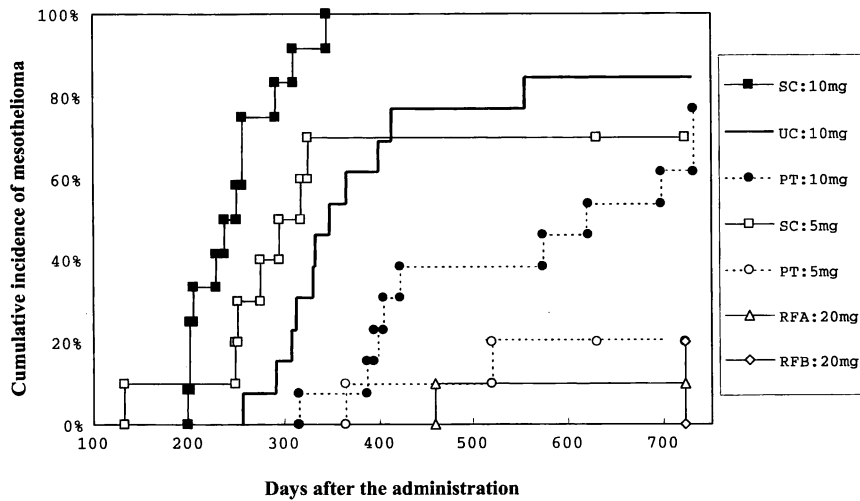


Fig.1 Cumulative mesothelioma incidence in female F344 rats after the intraperitoneal administration of JFM standard fibers

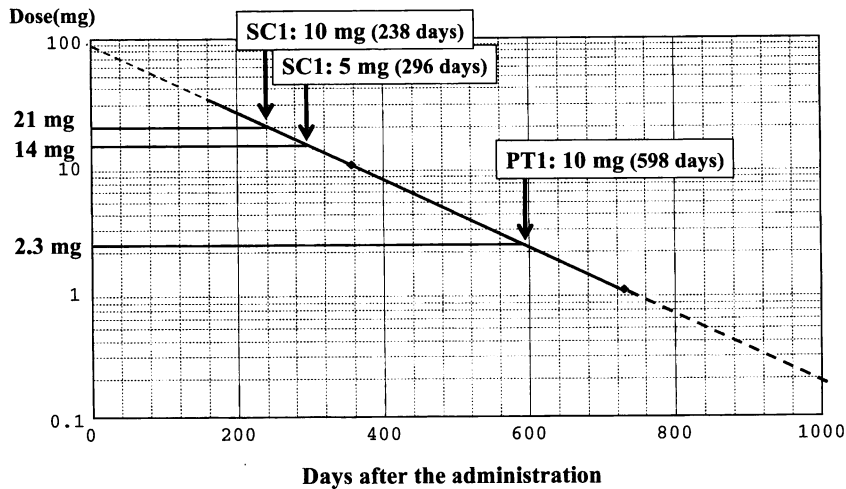


Fig.2 Relative potency of JFM standard fibers to UICC chrysotile in carcinogenicity test in F344 rats by intraperitoneal administration

しかし、単結晶ウイスキー類は、その形状が非常に微細で、繊維状物質の発がん性が繊維のサイズに依存しているとしたStanton-Pottの仮説^{16), 17)}にあてはめれば、最も危険度の高い繊維に分類される。本研究の結果、SCとPTの2種類には発がん性が示唆され、沈着した繊維状粉じんは溶解せずに、持続的に肺組織と反応して線維増殖性変化や胸膜肥厚など、アスベストと同様の生体影響を引き起こす可

能性が推察された。

そこで、UICC chrysotileを基準としてリスクの相対的な推定を行うため、UICC chrysotileの50%腹膜中皮腫の発生期間と用量の関係は、近似的に用量の対数に反比例することから、SCおよびPT投与による50%腫瘍発生期間を基に、UICC chrysotileの当量を求めた。その結果、SCの10mgはUICC chrysotile Bの21 mg相当し、SCの5 mgは同じく14 mg、PTの

10mgは同じく2.3mgに相当すると求められた。(Fig.2) これをWHOとU.S.EPAがchrysotileや石綿について算定しているリスク値から、SCの生涯曝露による1,000,000分の1リスクは、 0.5×10^{-6} (WHO)、 1.7×10^{-6} (EPA)、PTでは同じく 5.7×10^{-6} (WHO)、 17.4×10^{-6} (EPA) と算出できた。(Table 2)

人工鉱物繊維は、石綿代替繊維として急速に需要が高まっていくと予想されるが、現在のアスベスト問題と同様に、労働衛生上の作業者の健康問題にとどまらず、一般環境でのリスク要因になりうるという視点での安全性評価が必要であると考えられた。

Table 2 Estimated risk and regulatory number for JFM fibers based on their relative potency to UICC chrysotile

	Risk level*1 (WHO)	Risk level*1 (EPA)	PEL*2 (OSHA)	TLV*3 (ACGIH)
Chrysotile	1.3×10^{-6}	4×10^{-6}	0.2	0.5
SC	0.5×10^{-6}	1.7×10^{-6}	0.09	0.21
PT	5.7×10^{-6}	17.4×10^{-6}	0.9	2.2

*1 : Life time excess of one cancer death in 1,000,000 (fiber/ml)

*2 : Permissible exposure limit expressed as a time-weighted average (fiber/ml)

*3 : Threshold limit value expressed as a time-weighted average (fiber/ml)

参考文献

- 1) Doll R. Mortality in relation to smoking: Ten years observations of British doctors. *Br J Ind Med*, 1, 1399-1410, 1955.
- 2) Wagner JC, Berry G. Mesotheliomas in rats following inoculation with asbestos. *Br J Cancer*, 23, 567-581, 1969.
- 3) 竹本和夫, 安達修一. アスベスト代替物質の生体影響. *労働の科学*, 42, 27-32, 1987.
- 4) Adachi S, Takemoto K, Kimura K. Tumorigenicity of fine man-made fibers after intratracheal administrations to hamsters. *Environ Res*, 54, 52-73, 1991.
- 5) Adachi S, Takemoto K. Mesothelioma incidence in rats after asbestos exposure was significantly decreased by a surface modification of the fiber. In "Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases" Chiyotani, K. et al eds. p.714-718, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- 6) Adachi S, Yoshida S, Kawamura K, Takahashi M, Uchida H, Odagiri Y, Takemoto K. Inductions of oxidative DNA damage and mesothelioma by crocidolite, with special reference to the presence of iron inside and outside of asbestos fiber. *Carcinogenesis*, 15, 753-758, 1994.
- 7) Adachi S, Kawamura K, Takemoto K, Kimura K. Tumor incidence was not related to the thickness of visceral pleura in female Syrian hamsters intratracheally administered amphibole asbestos or manmade fibers. *Environ Res*, 58, 55-65, 1992.
- 8) Adachi S, Kawamura K, Yoshida S, Takemoto K. Oxidative damage on DNA induced by asbestos and man-made fibers in vitro. *Int Arch Occup Environ Health*, 63, 553-557, 1992.
- 9) International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol.14, Asbestos, Lyons; IARC, 1977.

- 10) Kohyama N, Tanaka I, Tomita M, Kudo M, Shinohara Y Preparation and characteristics of standard reference samples of fibrous minerals for biological experiments. *Ind Health* 35, 415-432, 1997.
- 11) Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA Jr, MacKenzie WF eds. *Pathology of Fischer Rat*. Academic Press, San Diego, 1990.
- 12) Friemann J, Varnai M, Sutter C, Hohl B, Behrens A, Althoff, GH, Schilpkoter, HW. Differential diagnosis of malignant tumours in the abdominal cavity of rats after intraperitoneal injection of crocidolite or benzo[a]pyrene. *Exp Toxicol Pathol.* 48, 13-17, 1996.
- 13) Environmental Health Criteria 77 "Man-made Mineral Fibres", World Health Organization, Geneva, 1988.
- 14) International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol.81, Man-made Vitreous Fibers, Lyons; IARC, 2002.
- 15) Adachi S, Kawamura K, Takemoto K. A Trial on the Quantitative Risk Assessment of man made mineral fibers by the rat intraperitoneal administration assay using the JFM standard fibrous samples. *Ind Health*, 39, 168-174, 2000.
- 16) Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Miller E, May M, Kent E. Carcinogenicity of fibrous glass: Pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J Natl Cancer Inst*, 58, 587-603, 1977.
- 17) Pott F, Ziem U, Reiffer FJ, Huth F, Ernst H, Mohr U. Carcinogenicity studies in fibres, metal compounds, and some other dusts in rats. *Exp Pathol*, 32, 129-152, 1987.