

厚生労働科学研究費補助金

労働安全衛生総合研究事業

**職業性呼吸器疾患の予防及び
健康管理に関する研究**

平成17～18年度 総合研究報告書

主任研究者 相澤好治

平成19(2007)年3月

目 次

総括総合研究報告書

- 職業性呼吸器疾患の予防及び健康管理に関する研究…………… 1
相 澤 好 治

総合研究報告書

1. 鼻部吸入曝露実験によるロックウールの肺障害性評価…………… 9
工 藤 雄一朗
2. 肺磁界測定の検討……………57
中 館 俊 夫
3. 胸膜プラークのモデルフィルム of 検討……………85
森 永 謙 二
4. エックス線写真条件—DR の検討……………99
村 田 喜代史
5. じん肺有所見者の肺機能の評価に関する研究……………123
阿 部 直

厚生労働科学研究費補助金
労働安全衛生総合研究事業

**職業性呼吸器疾患の予防及び
健康管理に関する研究**

平成 17～18 年度総合研究報告書
総括総合研究報告書
主任研究者 相澤好治

職業性呼吸器疾患の予防及び健康管理に関する研究

主任研究者 相澤 好治 北里大学医学部衛生学公衆衛生学

研究要旨

科学技術の進歩により産業界では、多くの新規物質が生産されている。これらの物質の安全性を評価するために細胞、動物、ヒトの各レベルで吸入性物質の安全性評価法を開発し、新たな画像診断機器、肺機能評価基準値を用いてじん肺健康診断手法を適切に実行・評価する方法を検討した。

吸入性物質の安全性評価法では、ラットを使用し石綿代替繊維の一種であるロックウール（以下 RW）の安全性を検討するため、2種類の RW を用いラットに対して鼻部吸入曝露実験を行った。肺磁界測定法、肺内滞留性、肺の病理学的評価により RW の肺障害性を評価した。1年目は、NT社製 RW を用い、RW の肺内滞留性について検討した。その結果、RW は石綿に比べ肺内滞留性が低いことが示唆された。また、肺障害性の新しい評価法として肺磁界測定装置を開発し、ラットを用いて予備実験を行い、実用化できることがわかった。2年目は、前年度とは異なる NC 社製の RW を使用しラットに対して鼻部吸入曝露実験を行い、肺磁界測定法、肺内滞留性（肺内繊維数と繊維サイズ（長径、短径）の推移）、肺の病理学的評価により RW の肺障害性を評価した。その結果、肺磁界測定法では、コントロール群と RW 曝露群の間で緩和、四三酸化鉄のクリアランスに差はなかった。また、肺内滞留試験では、半減期は石綿（クロシドライト）に比べ短かった。また、肺の病理組織学的変化では、28日後までの時点で、肺の線維化や肺癌や胸膜中皮腫はみられなかった。以上の結果から、2年間で試験した2種類の日本製ロックウールは、石綿に比べ、半減期が短く病理組織学的に変化がなかったことから、石綿に比べ安全であることが示唆された。

また、中館俊夫分担研究者はヒトレベルで吸入性物質の安全性評価法として、特に粉じん作業による健康障害の予防のために、肺磁界測定法（Magnetopneumography）を開発した。その後、実際に粉じん作業員に対し、本法を用いて測定を行った。本法を用いれば磁性粉じんの滞磁性を利用して肺内に沈着している粉じん量を推定することが可能である。そこで、その有用性を文献的に検討するとともに、装置を小型化し、可搬性を高めることで、粉じん作業の現場で容易に測定ができるような簡便な装置の開発と測定手技の検討を試みた。その結果、肺磁界測定法が、磁性粉じん取り扱い作業の曝露評価および健康リスク評価に有用であることを確認するとともに、今回開発した可搬型肺磁界測定装置が従来の設置型装置とほぼ同等な感度、精度を有することを確認した。本装置は、作業の現場での測定が可能であり、溶接作業等における健康診断／スクリーニング、労働衛生教育、胸

部異常所見の精密検査に利用できるものと考えられる。

森永謙二分担研究者による胸膜プラークのモデルフィルムの検討では、胸部間接及び直接撮影のフィルムの中から典型的な石灰化及び非石灰化胸膜プラーク陰影を呈する症例と、類似陰影を呈する症例を収集し、一部の症例については読影トライアルを実施した。このうち心膜石灰化肥厚像の1例は、読影結果では石綿によるものか、結核等の他の原因によるものかの鑑別が難しかった。また肥満による両側非石灰化肥厚像については半数前後がプラーク様陰影としていた。横隔膜部の石灰化プラークは特異的な所見を呈するので、何例かの典型的症例を経験すれば、比較的容易に診断が可能である。陳旧性肺結核による胸膜石灰化所見を収集したが、これらを今後供覧すれば、その後に石灰化胸膜プラークと鑑別することは比較的容易に行えると思われる。しかし、側胸部の非石灰化プラークは正常の胸壁を構成する軟部組織である前鋸筋と外斜胸壁筋が重複して生じる陰影、胸膜外脂肪組織との鑑別は困難な場合がしばしばあるので、そのような事例についてはCT写真との組み合わせで提示することにより、より理解し易い教材になるものと思われる。

エックス線写真条件では、じん肺健康診断に使用される胸部エックス線写真において、新しく臨床に利用されるようになったデジタル・ラジオグラフィー（DR）を用いる場合に、どのような条件で撮像および表示をするべきかについて、村田喜代史分担研究者は従来のフィルム法と比較して検討し、試案を作成した。じん肺健康診断におけるデジタル画像の応用については、今回の検討において、適切な撮像表示条件が守られれば、DRによるじん肺エックス線分類の判定は、フィルムによる判定とほとんど変わらないことが明らかとなった。メーカー間の相違については、メーカーの協力を得て、メーカーごとに適切表示条件をどのように設定するのか、十分な検討を要請した。その結果、平成18年度では、各メーカーのDR写真において、撮像表示においてポイントとなるパラメータを設定することができた。

じん肺法の「著しい呼吸機能障害の基準」は、少数の外国人のデータから得られた古い予測式をもとに作られた基準であるので、1993年に、日本胸部疾患学会（現在は日本呼吸器学会と改称）の基準値が発表されて以来、日本人のデータ、しかも多数例に基づく予測式を用いた基準に改定すべきである、と多くの専門家が発言してきた。しかしながら、現実の壁は厚く、これまで、「著しい呼吸機能障害の基準」は改訂されずに今日に至った。そこで、阿部直分担研究者は理想的な全面的改訂基準を作成するよりも、現時点で改訂できる箇所のみ、できるだけ早く改訂する方針で、現実的な改訂を実施することを考えた。その場合、BaldwinらのVCの基準値の予測式を使用しているために、身長、年齢、性別などによって申請者に生じている不公平を除く目的で、①2001年日本呼吸器学会VCの予測式に基づく基準値に改訂する。また、②1秒率に代えて、2001年日本呼吸器学会の1秒量の予測式に基づく%FEV₁による基準値に変更する。さらに、改訂がスムーズに行われるように、③認定者数に大きな変更がなく、じん肺の総補償額に変更がないようにすること、が考えられる。以上の考え方に従うと、①%VCは「Baldwinらの予測式の60%未満」に代

えて、「2001年日本呼吸器学会のVCの予測値の56.6%未満」、②「1秒率がハンドブックの基準値未満」に代えて、「Gaenslerの1秒率が70%未満、かつ、1秒量が予測値の34.7%未満」に改訂することが妥当と考えられる。

<分担研究者>

中館 俊夫 昭和大学医学部衛生学
森永 謙二 (独) 労働安全衛生研究所
産業医学総合研究所
環境計測管理研究グループ
村田喜代史 滋賀医科大学放射線医学
阿部 直 北里大学医学部
医学教育研究部門

<研究協力者>

工藤雄一朗 北里大学医学部
衛生学公衆衛生学
小谷 誠 東京電機大学
審良 正則 国立病院機構
近畿中央胸部疾患センター
高田 礼子 聖マリアンナ医科大学
予防医学教室
三浦溥太郎 横須賀市立うわまち病院
石原 俊晴 (独) 労働者健康福祉機構
福島労災病院呼吸器科
大鷹 邦夫 (独) 労働者健康福祉機構
福島労災病院放射線科
岸本 卓巳 (独) 労働者健康福祉機構
岡山労災病院
木村 清延 (独) 労働者健康福祉機構
岩見沢労災病院
五藤 雅博 中央じん肺診査医
高橋 雅士 国立大学法人
滋賀医科大学医学部
横場 正典 北里大学医学部呼吸器内科
黒澤 一 東北大学大学院
医学系研究科
近藤 哲理 東海大学医学部
内科系呼吸器内科
益田 典幸 北里大学医学部
呼吸器内科
宇佐美郁治 旭労災病院

A. 研究目的

科学技術の進歩により産業界では、多くの新規物質が生産されている。職業性呼吸器疾患には、じん肺など古くから対策が講じられている疾患の他に原因物質、作業関連性が明らかになっていないものが数多くある。本研究の目的は

1. これらの物質の安全性を評価するために細胞、動物、ヒトの各レベルで吸入性物質の安全性評価法を開発することである。
2. じん肺については、じん肺法等に基づき健康診断が実施されているが、近年の医療技術の進歩に伴い、新たな画像診断機器、肺機能評価基準値が導入されている。じん肺の病像を把握し、適切な健康診断を実施するためにこれらの機器を用いたじん肺健康診断手法を適切に実行・評価する方法を検討し、じん肺健康診断の具体的実施方法を定めた「じん肺審査ハンドブック」の改訂を考慮する。

B. 研究方法

本研究の具体的方法は下記の如くである。

1. 動物、ヒトの各レベルで吸入性物質の安全性評価法
 - 1) 鼻部吸入曝露実験によるロックスウールの肺内滞留性に関する研究および肺磁界測定法による障害性評価の検討(動物レベル)
 - 2) 肺磁界測定の検討(ヒトレベル)

2. 胸膜プラークのモデルフィルムを検討
3. 新たな画像診断機器、肺機能評価基準値を用いたじん肺健康診断手法

C. 結果

1. 動物、ヒトの各レベルで吸入性物質の安全性評価法

1) 鼻部吸入曝露実験によるロックウールの肺障害性評価

工藤雄一郎研究協力者は、ラットを使用し石綿代替繊維の一種であるロックウール（以下 RW）の安全性を検討するため、ラットに対して鼻部吸入曝露実験を行い、肺磁界測定法、肺内滞留性、肺の病理学的評価により RW の肺障害性を評価した。

1年目は、NT社製 RW を使い、ラットに対して短期間の鼻部吸入曝露実験を行った。その後、繊維の肺内動態を長径別繊維数の変動と、長径・短径のサイズ変化の両面から観察し RW の肺内滞留性について検討した。また、肺磁界測定装置を独自に開発した。

肺内滞留性実験は雄 Fischer344 ラットを1回の実験につき12匹用い合計2回実験した（合計24匹）。曝露濃度（標準偏差）は目標曝露濃度 100fiber/cm²（長径>20μm）で1日6時間、5日連続曝露した。曝露後終了直後、1週間後、2週間後、4週間後に1回の実験につき3匹ずつ解剖し、肺を摘出し、肺内繊維数および肺内繊維サイズ（長径・短径）を走査型電子顕微鏡を用いて計測した。肺内繊維数は曝露終了直後に比べて4週間後で減少し、特に長径>20μmで顕著に減少した。また、半減期は長径>20μmで28日であった。先行研究では、石綿の長径>

20μmの半減期は986日であった。肺内繊維サイズは、曝露終了直後に比べて4週間後で減少した。以上の結果から、RW は石綿に比べ肺内滞留性が低いことが示唆された。また、肺障害性の新しい評価法として肺磁界測定装置を開発し、ラットを用いて予備実験を行い、実用化できることがわかった。

2年目は、前年度とは異なる NC 社製の RW を使用しラットに対して鼻部吸入曝露実験を行い、肺磁界測定法、肺内滞留性（肺内繊維数と繊維サイズ（長径、短径）の推移）、肺の病理学的評価により RW の肺障害性を評価した。

肺磁界測定法では、鼻部曝露装置を用いてオス Fischer344 ラット（6~10週令）6匹を目標曝露濃度 100fiber/cm²（長径>20μm）で1日6時間、5日連続曝露した。コントロール群6匹はRWを曝露させず、肺磁界測定法のみ行った。曝露終了1日後に磁界測定の指標として、四三酸化鉄 3mg を生理食塩水 0.2ml に入れ、ラットに気管内投与した。陰性対照群6匹には四三酸化鉄のみ投与した。その後50mTで1秒間外部磁化を行った。磁化後、ラットから発生する残留磁界を40分間計測した。残留磁界値はパソコン上に出力した。肺磁界測定は、RW 曝露群および陰性対照群ともに曝露終了1日後、3日後、2週間後、4週間後、2ヶ月後、3ヶ月後、4ヵ月後に行った。また、両群ともに、各測定日ごとに磁化直後の残留磁界値をプロットし、肺内の四三酸化鉄のクリアランスを比較した。

病理学的評価では、12匹を同様に曝露させ曝露終了1日後、3日後、14日後、28日後に3匹ずつ屠殺した。

結果は、肺磁界測定法では、コントロー

ル群とRW曝露群では緩和、四三酸化鉄のクリアランスに差はなかった。また、肺内滞留試験では肺内繊維数、繊維サイズともに曝露終了1日後に比べ90日後、180日後に有意に減少した。また、半減期は石綿に比べ短かった。また、肺の病理組織学的変化では、28日後までの時点で、肺の繊維化や肺癌や胸膜中皮腫はみられなかった。

以上の結果から、2年間で試験した2種類の日本製ロックウールは、石綿に比べ、半減期が短く病理学的に変化がなかったことから、石綿に比べ安全であることが示唆された。

今後の課題として、今回の繊維を含めた3種類（日本製2種類、外国製1種類）曝露1年後までの肺磁界測定法、肺内滞留性、肺病理学的評価をすすめていくこと必要である。また、他の石綿代替品についても同様の評価方法で安全性の評価を進めていく必要がある。

2) 肺磁界測定の検討

中館 俊夫分担研究者は、粉じん作業による健康障害の予防のために、粉じんの磁性を利用して肺内に沈着している粉じん量を推定する肺磁界測定法（Magnetopneumography）について、その有用性を文献的に検討するとともに、装置を小型化し、可搬性を高めることで、粉じん作業の現場で容易に測定ができるような簡便な装置の開発と測定手技の検討を試みた。その結果、肺磁界測定法が、磁性粉じん取り扱い作業の曝露評価および健康リスク評価に有用であることを確認するとともに、今回開発した可搬型肺磁界測定装置が従来の設置型装置とほぼ同等な感度、精

度を有することを確認した。本装置は、作業の現場での測定が可能であり、溶接作業等における健康診断／スクリーニング、労働衛生教育、胸部異常所見の精密検査に利用できるものと考えられる。

2. 胸膜プラークのモデルフィルムの検討

森永 謙二分担研究者は、胸部間接及び直接撮影のフィルムのなかから典型的な石灰化及び非石灰化胸膜プラーク陰影を呈する症例と、類似陰影を呈する症例を収集し、一部の症例については読影トライアルを実施した。胸膜プラークに類似した症例の内訳は結核性病変で両側に石灰化胸膜肥厚像のある例、心膜に石灰化肥厚像のある例、胸壁に石灰化肥厚像のある例、扁平上皮癌の事例で側胸部に非石灰化肥厚像がある例、肥満による側胸部の非石灰化肥厚像を呈する例である。このうち心膜石灰化肥厚像の1例は、読影結果では石綿によるものか、結核等の他の原因によるものかの鑑別が難しかった。また肥満による両側非石灰化肥厚像については半数前後がプラーク様陰影としていた。

横隔膜部の石灰化プラークは特異的な所見を呈するので、両側に所見がない(片側の)場合でも何例かの典型的症例を経験すれば、比較的容易に診断が可能である。陳旧性肺結核による胸膜石灰化所見を収集したが、これらを今後供覧すれば、その後に石灰化胸膜プラークと鑑別することは比較的容易に行えると思われる。しかし、側胸部の非石灰化プラークは正常の胸壁を構成する軟部組織である前鋸筋と外斜胸壁筋が重複して生じる陰影、胸膜外脂肪組織との鑑別は困難な場合がしばしばあるので、そのよう

な事例については CT 写真との組み合わせで提示することにより、より理解し易い教材になるものと思われる。

3. 新たな画像診断機器、肺機能評価基準値を用いたじん肺健康診断手法

1) エックス線写真条件—DR の検討

村田喜代史分担研究者は、じん肺健康診断に使用される胸部エックス線写真において、新しく臨床に利用されるようになったデジタル・ラジオグラフィー（DR）を用いる場合に、どのような条件で撮像および表示をするべきかについて、従来のフィルム法と比較して検討し、試案を作成した。じん肺健康診断におけるデジタル画像の応用については、今回の検討において、適切な撮像表示条件が守られれば、DR によるじん肺エックス線分類の判定は、フィルムによる判定とほとんど変わらないことが明らかとなった。読影における判定のばらつきについては、平成17年度と平成18年度を合わせたデータで、フィルムと DR の間には82.8%の一致率がみられ、Kappa 解析でも、Kappa 値は0.7448と良好な一致率を示したことから、じん肺エックス線分類の判定において、フィルムと DR の間には有意の差がないと判断することができると思われる。むしろ判定のばらつきという点からみると、ばらつきはフィルムよりもDRの方が小さいことが示されたことから、DRの方が安定した判定が可能と言えるのかもしれない。結論として、一定の適正な条件が定められれば、じん肺判定においてフィルムとDRの間には本質的な違いがないと考えられる。メーカー間の相違については、メーカーの協力を得て、メ

ーカーごとに適切表示条件をどのように設定するのか、十分な検討を要請した。その結果、平成18年度では、各メーカーの DR 写真において、撮像表示においてポイントとなるパラメータを設定することができた。

2) じん肺有所見者の肺機能の評価に関する研究

阿部 直分担研究者は、「じん肺診査ハンドブック」の管理区分の見直しができるように、2001年に日本呼吸器学会から発表された「日本人のスパイログラムと動脈血ガス分圧基準値」をもとに、ハンドブックに掲載されている「著しい肺機能障害」の判定基準の問題点を検討した。さらに、「著しい肺機能障害」に関する新たな指標を含む様々な改訂基準値案を作成し、平成6年(1994年)度に全国47都道府県労働基準局にじん肺管理区分の決定を申請した者21,723名分のデータを対象に改訂基準値案を検証した。その結果、著しい肺機能障害がある』と判定される人数、つまりじん肺ハンドブックにより%VCの限界値未満と判定される人数、すなわちBaldwinの予測式により求められた%VCが60%未満となる人数は427名であった。2001年に日本呼吸器学会から発表された、VCの基準値では、60%未満となる人数は597名であった。Baldwinの予測式により求められた427名に対応する日本呼吸器学会の限界値は56.6%で、その場合の人数は428名であった。

解析21,723名の内、じん肺ハンドブックの1秒率の限界値未満となる人数は180名であった。Gaenslerの1秒率が70%未満で、この人数に対応する2001年日本呼吸器

学会の基準による1秒量の限界値は34.7%であり、その際の人数は181名であった。現時点で改訂できる箇所のみ、できるだけ早く改訂する方針で、現実的な改訂を実施することも考えられる。その場合、BaldwinらのVCの基準値の予測式を使用しているために、身長、年齢、性別などによって申請者に生じている不公平を除く目的で、1. 2001年日本呼吸器学会VCの予測式に基づく基準値に改訂する。また、2. 1秒率に代えて、2001年日本呼吸器学会の1秒量の予測式に基づく%FEV₁による基準値に変更する。さらに、改訂がスムーズに行われるように、3. 認定者数に大きな変更がなく、じん肺の総補償額に変更がないようにすること、が考えられる。以上の考え方に従うと、1. %VCは「Baldwinらの予測式の60%未満」に代えて、「2001年日本呼吸器学会のVCの予測値の56.6%未満」、2. 「1秒率がハンドブックの基準値未満」に代えて、「Gaenslerの1秒率が70%未満、かつ、1秒量が予測値の34.7%未満」に改訂することが妥当と考えられる。

厚生労働科学研究費補助金
労働安全衛生総合研究事業

**職業性呼吸器疾患の予防及び
健康管理に関する研究**

平成 17～18 年度総合研究報告書

平成 17～18 年度厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
総合研究報告書

鼻部吸入曝露実験によるロックウールの肺障害性評価

主任研究者：相澤 好治（北里大学医学部衛生学公衆衛生学）

研究協力者：工藤雄一郎（北里大学医学部衛生学公衆衛生学）

小谷 誠（東京電機大学）

研究要旨

石綿代替繊維の一種であるロックウール（以下 RW）の安全性を検討するため、ラットに対して鼻部吸入曝露実験を行い、肺磁界測定法、肺内滞留性、肺の病理学的評価により RW の肺障害性を評価した。

1 年目は、NT 社製 RW を用い、ラットに対して短期間の鼻部吸入曝露実験を行った。その後、繊維の肺内動態を長径別繊維数の変動と、長径・短径のサイズ変化の両面から観察し RW の肺内滞留性について検討した。また、肺磁界測定装置を独自に開発した。

肺内滞留性実験は雄 Fischer344 ラットを 1 回の実験につき 12 匹用い合計 2 回実験した（合計 24 匹）。曝露濃度（標準偏差）は目標曝露濃度 $100\text{fiber}/\text{cm}^2$ （長径 $>20\mu\text{m}$ ）で 1 日 6 時間、5 日連続曝露した。曝露後終了直後、1 週後、2 週後、4 週後に 1 回の実験につき 3 匹ずつ解剖し、肺を摘出し、肺内繊維数および肺内繊維サイズ（長径・短径）を走査型電子顕微鏡を用いて計測した。肺内繊維数は曝露終了直後に比べて 4 週後で減少し、特に長径 $>20\mu\text{m}$ で顕著に減少した。また、半減期は長径 $>20\mu\text{m}$ で 28 日であった。先行研究では、石綿の長径 $>20\mu\text{m}$ の半減期は 986 日であった。肺内繊維サイズは、曝露終了直後に比べて 4 週後で減少した。以上の結果から、RW は石綿に比べ肺内滞留性が低いことが示唆された。また、肺障害性の新しい評価法として肺磁界測定装置を開発し、ラットを用いて予備実験を行い、実用化できることがわかった。

2 年目は、前年度とは異なる NC 社製の RW を使用しラットに対して鼻部吸入曝露実験を行い、肺磁界測定法、肺内滞留性（肺内繊維数と繊維サイズ（長径、短径）の推移）、肺の病理学的評価により RW の肺障害性を評価した。

肺磁界測定法では、鼻部曝露装置を用いてオス Fischer344 ラット（6～10 週令）6 匹を目標曝露濃度 $100\text{fiber}/\text{cm}^2$ （長径 $>20\mu\text{m}$ ）で 1 日 6 時間、5 日連続曝露した。コントロール群 6 匹は RW を曝露させず、肺磁界測定法のみ行った。曝露終了 1 日後に磁界測定の指標として、四三酸化鉄 3mg を生理食塩水 0.2ml に入れ、ラットに気管内投与した。陰性対照群 6 匹には四三酸化鉄のみ投与した。その後 50mT で 1 秒間外部磁化を行った。磁化後、ラットから発生する残留磁界を 40 分間計測した。残留磁界値はパソコン上に出力した。肺磁界測定は、RW 曝露群および陰性対照群ともに曝露終了 1 日後、3 日後、2 週後、4 週後、2 ヶ月後、3 ヶ月後、4 ヶ月後に行った。また、両群ともに、各測定日ごとに磁化直後の残留磁界値をプロットし、肺内の四三酸化鉄のクリアランスを比較した。

病理学的評価では、12匹を同様に曝露させ曝露終了1日後、3日後、14日後、28日後に3匹ずつ屠殺した。

結果は、肺磁界測定法では、コントロール群とRW曝露群では緩和、四三酸化鉄のクリアランスに差はなかった。また、肺内滞留試験では肺内繊維数、繊維サイズともに曝露終了1日後に比べ90日後、180日後に有意に減少した。また、半減期は石綿に比べ短かった。また、肺の病理組織学的変化では、28日後までの時点で、肺の繊維化や肺癌や胸膜中皮腫はみられなかった。

以上の結果から、2年間で試験した2種類の日本製ロックウールは、石綿に比べ、半減期が短く病理学的に変化がなかったことから、石綿に比べ安全であることが示唆された。

今後の課題として、今回の繊維を含めた3種類（日本製2種類、外国製1種類）曝露1年後までの肺磁界測定法、肺内滞留性、肺病理学的評価をすすめていくこと必要である。また、他の石綿代替品についても同様の評価方法で安全性の評価を進めていく必要がある。

I. 緒言

石綿は石綿肺、肺がん、中皮腫の原因となることが多くの疫学的研究、動物実験あるいは *in vitro* 実験によって明らかになり^{1), 2), 3)}、世界的に使用が禁止ないし、制限されている^{4), 5), 6)}。

我が国では、2006年に石綿の重量0.1%を越える製品の製造、輸入、使用、販売が禁止された^{7), 8)}。このようなことから政府は2008年までに石綿の使用を全面禁止するとの方針を発表した。このため、石綿の代替化が急速に進んでいる。

石綿代替繊維として人造鉱物繊維(MMMF; Man-made mineral fibers)が開発された。その中の一つにロックウール(Rock Wool: RW)がある。RWは断熱材、保温材、吸音板を中心に幅広く使われている。しかしその一方では、石綿とRWを含む代替繊維が、形態的に類似しているため有害性に対する危惧がもたれている。RWの安全性について、IARC(国際ガン研究機関)の報告では、現在Group3(ヒトのデータでは不十分な発がん

性で、動物のデータで制限つきないし不十分な発がん性を示す)に分類されている⁹⁾。

石綿や、RWなどの人造鉱物繊維の曝露影響を最も受けるのは呼吸器系である。呼吸器系に対する影響を評価する方法として、*in vivo* 実験では短期及び長期吸入曝露実験や、気管内注入試験が行われてきた。この中で、吸入曝露実験はヒトが実際に曝露される状況に近く、人体への危険性を評価するには最も適した方法であることが、IARC⁹⁾などの報告で確認されている。

私どもの研究室では、これまでに細胞磁界測定法という独自の方法を用いて、石綿の1つであるクリソタイル、RWやその他の人造鉱物繊維の細胞障害性を評価してきた^{10), 11), 12), 13), 14)}。その結果、細胞磁界測定法では、RWは石綿の一種であるクリソタイルに比べ細胞障害性が低かった¹¹⁾。

しかし、肺磁界測定法を用いて人造鉱物繊維の安全性を評価する研究は、これまで行われて来なかった。このため、肺磁界測定を行うことにより人造鉱物繊維の肺障害

性を評価する必要があると考えた。また、同じ RW でも化学組成が異なり、安全性に違いが生じる。

そこで、本研究では、ラットに対し、鼻部吸入曝露実験により RW を吸入させた。その後、昨年度は NT 社製 RW の肺内滞留性（肺内繊維サイズ（長径・短径）の推移と肺内滞留繊維数の推移）を評価した。本年度は、NT 社製 RW をラットに曝露させた。その後、肺磁界測定法、肺内滞留性および病理学的評価を行い RW の肺障害性を評価した。

II. 試料と方法

本実験は、北里大学動物実験指針に則り施行した (No. 2004022)。

II-1 試料

試料は、ロックウール工業会から提供を受けた NC 社製および NT 社製の RW である。今回の実験に使用した RW の化学組成を蛍光 X 線回折を用いて分析したところ Table 1、2 の如くであった。

元々、RW は塊状で存在し、サイズ（長径と短径）も一様ではない。そこで、動物試験用の繊維試料調整法として、Kohyama ら¹⁵⁾の方法に従って RW のサイズを調整した。RW をシリンダー（径 6 cm、28.3cm²）に詰め、手動式錠剤成形圧縮機（前川試験機製作所、TYPE:BRM-32）を用いて 2 度加圧（160kg/cm²=4.5MPa）した。このようにして得られた繊維を実際に発塵させ、曝露チャンパー内で測定した繊維の幾何平均長径（幾何標準偏差）は得られた繊維のサイズは、幾何平均長径（幾何標準偏差）14.28μm（2.25）、幾何平均短径（幾何標準偏差）1.76μm（2.08）であった（NT 社製）。また NC 社製は、15.49μm（2.02）、幾何平均短径（幾

何標準偏差）は 2.44μm（1.59）であった。その後、鼻部吸入曝露実験装置で RW を発生させやすくするために、加圧後の試料とガラスビーズ（アズワン株式会社製、BZ-02）を混合した。混合比率は、RW 試料：ガラスビーズ=1：39 とした。

II-2 鼻部吸入曝露実験装置

このように作成した試料は、以前に Kudo ら¹⁶⁾が報告した方法にて発生させた。試料発生部の試料貯蔵槽に上記の方法で作成した試料を投入した。ガラスビーズと混合した試料はエアーコンプレッサーから送られた空気によって流動化され、ガラスビーズと試料が分離する。その結果、試料は気中へ放出される。また発生した試料は、サブチャンパー内へ送られ、一定濃度に希釈・均一化され、その後曝露チャンパーに移送される。曝露チャンパー内の排気流量は 40l/min に設定した。曝露チャンパー内の粉塵を一定濃度（26,000cpm）に保つために、デジタル粉塵計でモニタリングし、フィーダーにフィードバックをかけ試料の発生量を調節した。ラットホルダーは、曝露チャンパーに差し込むような形でセットした (Figure 1)。

II-3 曝露実験

オス Fischer 344 ラット（6～10 週齢）を使用した。肺磁界測定法では、実験群、コントロール群ともに各 6 匹ずつ使用した。実験群では RW を曝露させた。コントロール群では RW を曝露させず、肺磁界測定のみ行った。また、肺内滞留性実験では、肺磁界

測定法とは別に曝露実験を行い、1 回の実験に 12 匹使用し、2 回実験した（合計 24 匹）。病理学的評価の実験は、これらの実験とは別に 12 匹曝露させた。曝露濃度の設定は、EU で設定された基準に則って設定した¹⁷⁾。実験室の環境に慣らすため、1 週間程ケージで予備飼育した。餌及び水は自由摂取とした。飼育室内は、気温 22℃、湿度 40% の新鮮ろ過空気に保った。

実験は、1 日 6 時間連続曝露を 5 日連続で行った。ラットの固定位置は実験期間中、日ごとに上下左右入れ替えを行った。曝露実験中、曝露チャンバー内の濃度確認を 5 回（曝露開始後 30 分、60 分、90 分、120 分、150 分）行った。曝露チャンバー内の濃度を測定するためにあらかじめ用意したプラスチックホルダーに、メンブランフィルター（以下 MF、MILLIPORE 社、孔径 0.8 μm 、直径 25mm）、フィルター T60A20（以下 T60A20、東京ダイレック株式会社、直径 25mm）、ニュークリポアフィルター（以下 NF、野村マイクロ・サイエンス株式会社、孔径 0.2 μm 、直径 25mm）をセットした。所定の時間において、電動式吸引ポンプ（Gilian, GilAir-5）を用いて MF に 1 分間、T60A20 に 10 分間、NF に 5 分間、吸引速度は 500ml/min で採塵し、それぞれ繊維数濃度 (fiber/cm³) 計測、質量濃度 (mg/m³) 計測、電子顕微鏡撮影 (SEM) を行うことで濃度を確認した。

鼻部曝露チャンバー中の粉塵の計測には、MF 上で捕集した繊維の中で、位相差顕微鏡によりアスペクト比（縦横比）が 3 より大きいもののみを繊維数の判断についての規定¹⁸⁾に従って計測ソフト WinRoof（ミタニコーポレーション、東京）を用いて計測した。鼻部曝露チャンバー内（発塵繊維）の粉塵質量

濃度 (mg/m³) の測定は、T60A20 に捕集した検体を電子天秤で量り、その値と採取前の値から質量濃度 (mg/m³) を計算した。

II-3- (1) 肺磁界測定法

肺磁界測定装置の概観図を Figure2 に示す。

曝露実験終了 1 日後、ラットにジエチルエーテルで吸入麻酔し、RW 曝露群とコントロール群両方に、気管内にカテーテルを挿入し、緩和の指標として粒径 0.26 μm の四三酸化鉄（戸田工業株式会社、東京）3mg を生理食塩水 0.2ml に懸濁し注入した。その後、ネンプタール（ラットの体重 100g あたり 0.15ml）を用いて腹腔内麻酔した。麻酔後、ラットをターンテーブルの上ののせ、50mT で 1 秒間胸部を磁化し、磁化後の残留磁界をフラックスゲート磁束計を用いて 40 分間測定した。試料台は 12 秒間に 1 回プローブ上を通るようになっている。磁化後 40 分間の残留磁界を測定すると緩和の程度を示す曲線が表される。また外部磁化終了後 2 分までの残留磁界を対数変換するとほぼ直線になるので、この直線と Y 軸の交点を B_0 とした。従って、外部磁化中止 t 秒後の残留磁界を B 、磁化直後の残留磁界を B_0 、緩和係数を λ とすると $B=B_0 e^{-\lambda t}$ となり、この式から緩和係数 (λ) を求めた。残留磁界値はパソコン上に出力した。測定は、曝露終了 1 日後、3 日後、2 週後、4 週後、2 ヶ月後、3 ヶ月後、4 ヶ月後に行った。

II-3- (2) 肺内滞留性実験

(A) 曝露後の処理

NT 社製 RW の実験は、曝露終了直後、6 匹のラットを屠殺し、これを直後群とし、以

後1週後、2週後、4週後の観察期間を経てそれぞれ6匹ずつ屠殺したものをそれぞれ、1週後群、2週後群、4週後群とした。

一方NC社製RWは、曝露実験終了1日後、ラットをただちに屠殺し、これを曝露終了直後群(n=6、以下直後群)とした。以後90日後、180日後の観察期間を経て屠殺したものをそれぞれ、曝露終了90日後群(n=6、以下90日後群)、曝露終了180日後群(n=6、以下180日後群)とした。なお、ラットは週1回体重測定を行った。また、曝露期間中、終了後は断続的にラットの状態を観察し外観上の兆候に変化がないか確認した。

(B) ラット肺内繊維数および繊維サイズの計測

ラットを、ネンブタール麻酔後、腹部大動脈を切開、脱血死させ肺を摘出した。摘出した肺は、秤量瓶に入れ-20℃で保存した。その後、肺組織を常温にて解凍し、ミンチにし、一定重量になるまで凍結乾燥した。凍結乾燥終了後の重量を乾燥肺重量

(17mg)とした。これを低温灰化装置(ヤナコ株式会社、PLASMA ASHER、LTA-102)にて24時間灰化した。

低温灰化後、秤量瓶にフィルター(Sartorius製、Minisart)を通した蒸留水を加えて繊維を懸濁し、吸引ろ過装置でNF(孔径0.2μm)に捕集し、自然乾燥させた。作成した検体を使用して、走査型電子顕微鏡(オリンパス、BX41)を用いて1検体につき400本以上計測した。計測対象の繊維は、長径と短径の比(以下アスペクト比)が3より大きいものとした。繊維の計測は、上記の繊維数の判断についての規定¹⁸⁾に従い、長径(L)のサイズ別(L≤5、5<L≤20、L>20)

に分けて計数した。また、計数した繊維の中のWHO繊維(長径が5μmより大きく、短径3μm未満のもの)⁹⁾も算出した。その後、乾燥肺重量中の繊維数に換算した。さらに繊維のサイズ(長径・短径)も計測した。計測にあたり、長径0.47μmおよび短径0.05μm以上の繊維を計測した。

(C) 肺内滞留繊維の半減期の算出

直後群の総繊維数/全肺重量(fiber/mg)の幾何平均を100%としたときの半減期を算出した¹⁹⁾。半減期は、指数近似曲線から求めた。この時の指数近似曲線の式は下記の通りである。

$$y = 100e^{-ax}$$

ただし、

e : 自然対数の底

a : 定数

x : 半減期(日)

y : 肺内繊維数(%)

II-3- (3) 病理学的評価

曝露実験終了1日後、3日後、2週後、4週後にラットを3匹ずつ屠殺し、肺を摘出し、ホルマリンで固定し、H.E染色と透過型電子顕微鏡により肺の組織を観察した。

II-4 統計学的解析

肺磁界測定法では、実験結果はコントロール群、実験群ともに6匹のラットより得られたデータから、算術平均値および標準誤差を算出した。その後t検定にて検定を行った。

肺内滞留性実験では、総繊維数、長径、短径については幾何平均および幾何標準偏

差を算出した。また、長径、短径は2回の実験で、ラットの肺内に入った繊維を1匹につき最低400本測定し、6匹まとめた値の幾何平均値を算出した。1元配置分散分析を行い、Scheffe法による多重比較により検定を行った。

III. 結果

III-1. 曝露チャンバー内の繊維数濃度と質量濃度

(1) NT社製の曝露実験

実験期間中の曝露チャンバー内の繊維数濃度は、算術平均（標準偏差）で420.8(103.1) fiber/cm³、L>20μmで104.4(31.9)であった。質量濃度は算術平均（標準偏差）で51.9(14.1) mg/m³であった。

また、繊維の長径および短径の度数分布（ヒストグラム）はFigure3, 4の如くであり、幾何平均長径（幾何標準偏差）は11.38(2.02) μm、幾何平均短径（幾何標準偏差）は1.34(1.60) μmであった。

(2) NC社製の曝露実験

肺磁界測定法では、実験期間中の曝露チャンバー内の繊維数濃度は、算術平均（標準偏差）で650.2(367.3) fiber/cm³、L>20μmの繊維は156.6(104.7) fiber/cm³、質量濃度は算術平均（標準偏差）170.4(29.3) mg/m³であった。

肺内滞留性実験では、繊維数濃度は、算術平均（標準偏差）で総繊維が344.72(161.55) fiber/cm³、L>20μmが93.08(50.20) fiber/cm³であった。質量濃度は算術平均（標準偏差）で100.00(29.90) mg/m³であった。

病理学的評価では、繊維数濃度は、算術

平均（標準偏差）で総繊維が390.7(170.42) fiber/cm³、L>20μmが95.0(45.77) fiber/cm³であった。質量濃度は算術平均（標準偏差）で100.24(26.44) mg/m³であった。

各実験の発塵繊維の長径と短径のヒストグラムをFigure5-10に示す。

III-2. 肺磁界測定法

磁化直後の残留磁界を100%として磁化後40分間の残留磁界をプロットし緩和曲線を作成したところ、緩和は曝露終了1日後、3日後、2週後、4週後、2ヶ月後、3ヶ月後、4ヵ月後のどれもRW曝露群とコントロール群ともに迅速に認められた。40分値は、両群間に有意差はみられなかった（Figure11-17）。

磁化後2分間の緩和係数は、どの測定日においても、RW曝露群とコントロール群間で著しい差はなく、両群間に有意差は認められなかった（Figure18）。

各測定日の磁化直後の残留磁界値（B₀）を曝露終了1日後を100%としてプロットし、クリアランス曲線を作成したところ、RW曝露群Control群ともに迅速な減衰が認められた。また、どの測定日においてもRW曝露群とControl群間に有意差は認められなかった（Figure19）。

III-3. 肺内滞留性実験

(1) NT社製RW

肺内繊維数の時間的推移と直後群の幾何平均値を100%としたときの滞留繊維数の割合をTable3とFigure20に示した。総繊維、サイズ別繊維、WHO繊維では一時的な増加は見られたが、それぞれ直後から4週後にかけて繊維数は減少した。また、L>20

μm では、他のサイズに比べ繊維数の減少が大きかった。Scheffe 法による多重比較では、総繊維、サイズ別繊維、WHO 繊維は直後群に比べ 4 週後群では有意に減少した ($p < 0.05$)。

直後群の幾何平均値を 100%とした時の指数近似曲線 (Figure21) の式から繊維の半減期を算出した。半減期は $L > 20\mu\text{m}$ で 28 日、WHO 繊維で 50 日であった。特に発がん性が高いとされている $L > 20\mu\text{m}$ の半減期では特に減少していた。

長径と短径の時間的推移を Table4 に示した。Scheffe 法による多重比較では、長径は一時的な増加は見られるものの直後群に比べ 4 週後群では有意に減少した ($p < 0.05$)。また、短径は、直後から 4 週後にかけて減少を示し、直後群に比べ 4 週後群で有意に減少した ($p < 0.05$)。

(2) NC 社製 RW

肺内滞留繊維数の時間的推移と 1 日後群の幾何平均値を 100%としたときの滞留繊維数の割合を Table5 と Figure22 に示した。

総繊維数、サイズ別繊維、WHO 繊維は観察期間を経るにつれて減少した。Sheffe 法による多重比較ではどのカテゴリーでも 1 日後群に比べ 90 日後群、180 日後群で有意に減少した ($p < 0.05$) (Table5)。

1 日後群の幾何平均値を 100%とした時の肺内繊維数を、時間に対してプロットして得られたデータは Figure 23 のように直線的 (指数関数的) に減少したので、1-コンパートメントモデルを用いて半減期を計算した。半減期は総繊維で 35 日、長径が $20\mu\text{m}$ より長い繊維では 55 日、WHO 繊維では 74 日であった。特に $L > 20\mu\text{m}$ の半減期

が短かった。

長径と短径の時間的推移を Table6 に示した。長径・短径共に観察期間を経るにつれて減少した。Sheffe 法による多重比較では長径および短径ともに 1 日後群に比べ 90 日後群、180 日後群で有意に減少した ($p < 0.05$)。

1 日後群、90 日後群、180 日後群の肺内繊維の電子顕微鏡像を Figure24-27 に示す。1 日後群に比べ 90 日後群、180 日後群では繊維が横方向に折れている像や繊維の辺縁が崩れている像が観察された。

III-4. 病理学的評価

4 週後群の肺の電子顕微鏡像を Figure28 ~30 に示す。肺組織では、繊維を貪食しているマクロファージがみられた。マクロファージは、核、細胞質ともにほぼ正常な形態を保持していた。肺組織は、肺の線維化などは見られず、ほぼ正常であった。

IV. 考察

石綿や MMVF の繊維サイズと生体内滞留性が有害性、特に発がん性の重要な要因として指摘されている。繊維サイズに関しては、長径 $5\mu\text{m}$ 以上で短径 $3\mu\text{m}$ 以下の吸入された繊維のうち細く長いものほど発がん性は強くなる^{9), 19)}。一方、生体内滞留性に関しては、肺組織内で溶解・運搬されずに長く滞留する繊維ほど発がん性が高いと見られる^{9), 19)}。特に長径 $20\mu\text{m}$ 以上で半減期が長い繊維は、生体内での溶解性が低いので、線維化やがんを引き起こしやすいと言われている^{9), 19)}。

吸入曝露実験では、一定濃度で繊維状物

質を安定して発生させ、吸入させることが重要である。今回行った実験は、EUで規定された目標繊維数濃度 ($L > 20 \mu\text{m}$ を $100 \text{fiber}/\text{cm}^3$ 以上) を満たしていたため、曝露条件として適切であったと言える。EUは世界的にも研究が進んでおり、この条件は現在一番妥当性があると考えられている。

肺磁界測定法はCohen²⁰⁾より初めて行われた手法である。肺磁界測定法の原理は、磁性粒子が滞留した肺に外部から磁化をかけると、外部磁化を中止後、肺から微弱な磁界(残留磁界)を計測することができる。残留磁界は時間とともに急速に減衰する。この減衰を緩和と呼ぶ。これは、肺胞マクロファージに貪食された四三酸化鉄が、外部磁化により磁化され一方方向に配列し、外部磁化を止めると細胞骨格により食胞がランダムに回転して、残留磁界は急速に減衰すると考えられる。

しかし、肺障害性のある有害物質が投与されると、その物質が物理的、化学的に細胞骨格に影響を与える。そのため、食胞の回転が悪くなり、磁性方向が失われにくくなることで、残留磁界の減衰が遅延すると考えられる。緩和係数は初期の緩和の程度を示し、細胞障害性の程度を表している。

すなわち、この値が大きい程マクロファージに対する障害性が低く、小さい程障害性が高いと言える。肺磁界測定法で観察される緩和は、生体のみでみられ、剖検肺や死亡した動物肺ではみられない。よって、肺磁界測定法は、非侵襲的に同一個体の長期的な肺障害性評価が可能と言える。

また、外部磁化直後の残留磁界を経時的に測定し、プロットすると肺内滞留酸化鉄量の推移(クリアランス)を推定すること

もできる。元々、肺には投与された物質を排出する自浄作用がある。肺を障害する物質を同時に投与するとこの自浄作用が落ちる。その結果、肺内滞留酸化鉄量の肺からのクリアランスも遅延するので、投与物質が肺障害性を示すかどうかの評価に用いられる。

これまでに肺磁界測定法を用いた研究では、相澤ら²¹⁾²²⁾が、家兔にガリウムヒ素やシリカを気管内投与したところ、量依存的に緩和とクリアランスの遅延が観察され、これらの物質は、高濃度で肺障害性があることが証明された。また、岡田ら²³⁾は、家兔に石灰石を気管内投与した。その結果、緩和とクリアランスは遅延せず、石灰石の肺障害性はなかったと報告している。

本実験で得られた緩和曲線では、RW曝露群とControl群間に有意差は認められず、両群とも迅速な緩和がみられた。これは下記の理由による。繊維の貪食には繊維の長径が関係する。長径が $20 \mu\text{m}$ より短い繊維は肺胞マクロファージに貪食され、食胞内で消化されたためと考えられる⁹⁾¹⁹⁾。また、長径が $20 \mu\text{m}$ より長い繊維は肺胞マクロファージが貪食しきれないため、繊維が体液により横断面で折れて短くなり、その後肺胞マクロファージに貪食され食胞内で消化されると考えられる⁹⁾¹⁹⁾。以上のことから、曝露後、RWは肺胞マクロファージにより貪食され、細胞骨格による食胞の回転が速やかに行われたため、緩和は迅速であったと言える。

緩和係数は残留磁界が急速に減少する2分間で測定し、この値が大きい程緩和が迅速であると言える。緩和係数も、RW曝露群とControl群間に有意差は認められなかつ

たことから、緩和曲線の結果と同様、RW 曝露後も食胞の回転は速やかに行われたと考えられる。

クリアランス曲線では、RW 曝露群の磁化直後の残留磁界値は、Control 群と同様、時間の経過とともに減衰し、両群間に有意差は認められなかった。このことから、RW 曝露後も磁性粒子は速やかにクリアランスされたと言える。

肺内滞留性実験では、肺内滞留繊維数は、NT 社製 RW では直後群から4週後にかけて繊維数が減少した。また NC 社製 RW では1日後から180日後にかけて減少した。いずれも特に長径 $20\mu\text{m}$ より長い繊維で繊維数の減少の割合が著しかった。長径が $20\mu\text{m}$ 以下の繊維は、肺胞マクロファージに貪食され、その後気管・気管支の粘液線毛運動によって排泄されることや、肺上皮細胞に取り込まれ肺間質からリンパ管へ輸送されることが報告されており^{9), 19)}、この排泄メカニズムによって減少したと考えられる。長径が $20\mu\text{m}$ より長い繊維は、肺胞マクロファージが取り込むことのできない長いサイズであり、気管で捕捉され粘液線毛運動によって体外へ排泄されたと考えられる^{9), 19)}。また、繊維が折れて短くなり、肺胞マクロファージに貪食されたことも考えられる^{9), 19)}。

半減期は、肺内滞留繊維数から導きだされるので、肺内滞留繊維数の推移に左右される。つまり肺内滞留繊維数が減少すると、半減期も短くなる。今回実験した RW の半減期は、先行研究¹⁹⁾で行われた石綿に比べると短かった。

肺内繊維サイズ(長径・短径)に関しては、長径・短径ともに NT 社製、NC 社製ともに

観察期間を経るにつれて減少した。この理由として繊維の排泄メカニズムである肺胞マクロファージによる貪食や、体液による溶解によって繊維の辺縁が崩れたことが考えられる^{9), 19)}。これらの所見は、肺内繊維の電子顕微鏡像でも、1日後に比べ90日後、180日後の方が、折れて短くなり、繊維の辺縁の侵食像がみられる繊維が多かったことから支持されるものと考えられる。

また、病理学的所見は、観察期間は曝露後28日までであるが、肺胞マクロファージに対する障害や肺組織に線維化や癌化はみられず、明らかな変化は観察されなかった。これらの理由も上記のようにマクロファージの繊維の貪食や溶解によるもの^{9), 19)}と考えられる。

以上のことから、本研究では2種類の RW の肺障害性は低いことが示唆された。

今後の課題として、肺磁界測定法を用いた長期間(1年後)の観察による RW の肺障害性評価を行う必要がある。また、肺内滞留性実験では、曝露後長期間(1年後)の観察による肺内滞留性の評価を行い RW の安全性評価をさらにすすめる必要がある。これらの研究は現在進行中であり、今後結果を発表する予定である。同時に長期間(1年後)の病理学的変化の観察を行い、総合的に RW の安全性を評価する必要がある。

参考文献

- 1) Doll R: Mortality from lung cancer in asbestos workers. Br J Ind Med; 12, 81-86, 1995.
- 2) 環境庁大気汚保全局企画課監修: 石綿・ゼオライトのすべて, (財)日本環境衛生センター; 1987, pp. 1-476.