

アスベスト及びその代替物の検査法の開発と生体影響に関する研究

栗田 雅行, 大久保 智子, 齋藤 育江, 狩野 文雄, 中村 義昭,
大山 謙一, 坂本 義光, 高橋 省, 藤田 博, 小縣 昭夫

Research Project on Efficient Testing Methods for Asbestos and Biological Adverse Effects of Asbestos Substitutes

Masayuki KURITA, Tomoko OKUBO, Ikue SAITO, Fumio KANO, Yoshiaki NAKAMURA,
Ken-ichi OHYAMA, Yoshimitsu SAKAMOTO, Osamu TAKAHASHI, Hiroshi FUJITA and Akio OGATA

アスベスト及びその代替物の検査法の開発と生体影響に関する研究

栗田 雅行^{*1}, 大久保 智子^{*2}, 齋藤 育江^{*2}, 狩野 文雄^{*2}, 中村 義昭^{*1},
大山 謙一^{*3}, 坂本 義光^{*3}, 高橋 省^{*3}, 藤田 博^{*3}, 小縣 昭夫^{*4}

平成18年度から3年に及ぶ健康安全研究センターの重点研究プロジェクトのひとつとして、計9課題の調査研究を行ったので、その概要を報告する。本調査研究のうち、5課題は建材、化粧品原料、空気等に含まれるアスベスト量に関する検査法の開発と実態調査、4課題は主にアスベスト代替物の生体影響を病理組織学的、細胞毒性学的、生理学的見地などから検討したものである。

その結果は、アスベスト等の分析法の開発と実態調査において、1) 電子顕微鏡・吸光光度計・イオンクロマトグラフなど既存の機器を使用した定量方法が開発できた、2) X線回折装置による分析法を検討し建材及びタルカムパウダー中のアスベストを高感度に分析できた、3) 建材中のアスベスト量や塵埃中のアスベスト数の測定法を改良し検査の迅速化ができた、4) 市販品であるアスベスト簡易測定キットの性能試験、流通している化粧品や室内堆積塵・浮遊塵中のアスベスト量の実態調査を検討した方法を用いて行い、製品や室内環境の実態を把握できた。

また、アスベスト代替物等の生体影響に関する研究では、培養細胞実験で、1) アスベスト代替物は概ねアスベストより弱いものの細胞膜傷害及び酸化ストレスを惹起した、2) 小核誘発性試験でアスベストと同程度以下の影響があった、3) エピカテキンがアスベストのマクロファージによる活性酸素放出や酸化性DNA障害を抑制し、肉芽腫発生を減少させる傾向があった。加えて、動物実験では、アスベスト代替物によるラット陰嚢腔内投与で中皮細胞への障害は認められなかったが、マウス腹腔投与では炎症惹起等においてアスベストより強いものがみられた。

キーワード：アスベスト、アスベスト代替物、検査法、生体影響、事業報告、建材、クロシドライト、アモサイト、クリソタイル、トレモライト、電子顕微鏡、X線回折装置、イオンクロマトグラフィ、酸、金属、タルク、位相差顕微鏡、室内空気、ポリフェノール、エピカテキン、マクロファージ、培養細胞、活性酸素種、8-OHdG、陰嚢腔、ロックウール、ワラストナイト、チタン酸カリウムウイスカー、病理組織学、肉芽腫、フェントン反応、過酸化脂質、チャイニーズハムスター肺由来細胞 V79-4、変異原性試験、小核

健康安全研究センターでは、日本酒、水道水、室内空気などに含まれるアスベストをその繊維数として評価する検査や、アスベストの生体影響に関する研究をこれまで実施してきた。平成16年にクボタのアスベスト工場における従業員や付近住民の健康影響が報道されたことを契機に、アスベストへの社会的関心の高まりが再燃した。一方、長年にわたり建築材料に使用されてきたアスベストの含有率を知るための検査法やアスベスト代替物の安全性について、十分な情報の蓄積がないままになっていた。そこで、平成18年から3年にわたり、これらについて以下に示す調査研究を行ったので、その概要を示す。

本調査研究は、重点研究プロジェクトとして計9課題からなり、前半の5課題は建材、化粧品原料、空気に含まれるアスベスト量に関する検査法の開発と実態調査、そして後半の4課題は主にアスベスト代替物の生体影響を病理組織学的、細胞毒性学的、生理学的見地などから検討したものである。これら9課題は共通した部分はあるものの、それぞれ

独立して実施されたものであるため、個々に記載する形態とした。

1 電子顕微鏡分析法によるアスベスト分析の半定量化と建材試料への応用の検討

はじめに

我が国におけるアスベストに関する検査法については、近年その検査方法の変化が著しい¹⁾。これまで本センターでは、吹付け材中のアスベストの有無に関する定性分析として、透過型電子顕微鏡とエックス線解析装置を用いた検査（分析電子顕微鏡法）を行ってきた。建材中のアスベスト含有率についてJISによる検査法が2006年に制定（2008年改訂²⁾）されたことを踏まえ、分析電子顕微鏡法によるこれまでの検査過程を見直して検査精度の向上と迅速化を検討するとともに、建材（成型材）中のアスベスト含有率の半定量化を検討した。

^{*1} 東京都健康安全研究センター医薬品部微量分析研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*2} 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*3} 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*4} 東京都健康安全研究センター環境保健部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

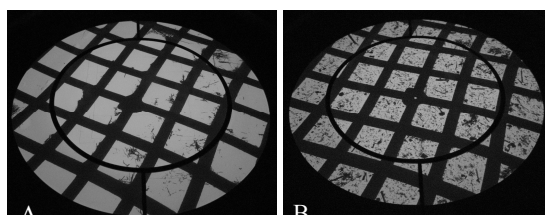


写真1 電顕用メッシュ上のアスベスト繊維の均一性
A:従来の方法, B::新たな方法

実験方法

アスベスト成型材は、5 mm角程度に荒く砕いたものをステンレス製50 mL粉砕ジャーに三分の一程度入れ、φ25 mmボール1個とともにボールミルMM301 (Retsch製) 粉砕機により1分間粉砕したものを使用した。対照として、日本作業環境測定協会のアスベスト標準品を用いた。懸濁させたアスベスト溶液を1分間超音波処理したのち、電子顕微鏡用のメッシュに載せて処理したものをKvex製エックス線解析装置が付いた透過型電子顕微鏡H-7000 (日立製) により形態観察と元素分析を行い、アスベストの種類を確定した。JIS法に従った検査には、分散染色顕微鏡はECLIPSE 80iTP-DPH (Nikon製)、X線回折装置はX'Pert Pro MPD

(PANalytical製)を用いた(測定条件: 管電圧40 kV, 管電流40 mA, 亜鉛板による基底標準吸収補正法)。画像解析用ソフトウェアはNIS-Elements (Nikon製)を使用した。

結果及び考察

建材には固化を目的にカルシウムを主成分とする主にセメント系の物質がアスベスト量より多量に含まれているため、光学顕微鏡などでアスベスト繊維を観察する妨害になる。ここでは、Yuらの方法³⁾に準拠した0.4 M アンモニアEDTA溶液 (pH 7.2) によりこうした観察の妨害となるマトリックス成分を除去することによって、アスベスト繊維の確認を行った。

従来の検査は定性分析であったため、試料の状態や使用量、懸濁溶液の種類や液量等に関する検査過程を明確に規定してなく、電子顕微鏡において適正な画像が得られるまでこうした検査手順を試行錯誤的に繰り返していた。検討の結果、粉砕した試料2 mgをイソプロピルアルコール2 mLに懸濁して電子顕微鏡用の試料を作成することで、半日近く要していた処理時間を1時間足らずで済ませることが可能となった。特に、以下で示す半定量化に必要なアスベスト試料のより均一な分散化が実現できた(写真1)。写真1では、全体像を把握するために200倍という低倍率の画像であるため、電子顕微鏡用メッシュに見かけ上の歪みがみられる。

得られた1,500倍の電子顕微鏡画像を白黒2値化して編集し、画像解析ソフトによって単位面積当たりの光学密度(相対値)を求めた。一方、JIS法に基づくX線回折法により求めたアスベスト含有率とこの光学密度の累積値とは直線的な関係(図1)がみられたことから、画像解析によりお

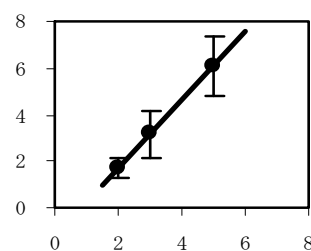


図1. アモサイト含有成型材の光学密度(縦軸)とX線回折装置の定量値(横軸)との関係

よそのアスベスト含有率の半定量化が可能となった。

文 献

- 1) 栗田雅行: 都臨技会誌, 35, 280-281, 2007.
- 2) 日本規格協会: JIS A 1481 建材製品中のアスベスト含有率測定方法, 2008.
- 3) Yu, S., Harris, M., and Llacer, V.: *Microscope*, 41, 45-49, 1993.

2 アスベストのX線回折分析法の高感度化に関する研究

は じ め に

アスベストは防火、防音性に優れていることから、建築材料によく用いられてきた。しかし、アスベストは発がん性があり、最近アスベストによる中皮種の増加が社会的問題となり、アスベストを含む建材は使われなくなった。しかし今後、アスベストが使われている建築物が老朽化などにより解体されると、アスベストの作業者への健康影響や周辺への飛散が懸念される。したがって、建材中のアスベスト含有量を測定することは、アスベストの放出を防ぎ、ヒトへの悪影響を未然に防止するために必要である。現在、アスベストを0.1%を超えて含有する製品がアスベスト含有製品と規定され、建材製品中のアスベスト含有量測定はJIS法に規定されている¹⁾。しかし、JIS法は粉砕方法や酸処理法に煩雑な点もあり、今後多くの建材中のアスベスト含有量を測定するには簡便で感度の高い測定が必要である。今回は建材として多く使われているスレート板を用いて、X線回折装置を用いたアスベストの分析法について検討したので報告する。

実験方法

試料はスレート板A, Bの2種類を用いた。X線回折装置はPANalytical製X'Pert Pro MPDを用い、測定条件は管電圧40 kV, 管電流40 mA, 定量は亜鉛板を用いた基底標準吸収補正法により、検量線を用いて行った。粉砕機はRetsch製ボールミルMM301, 粉砕ジャーはステンレス製50 mL, ボールはφ25 mmを用いた。ジャーに1 cm角以下に砕いたスレート板5 gを入れ、25回/秒で粉砕した。酸によるスレート板の処理はJIS法に準じ、すなわち200 mL コニカルビーカー

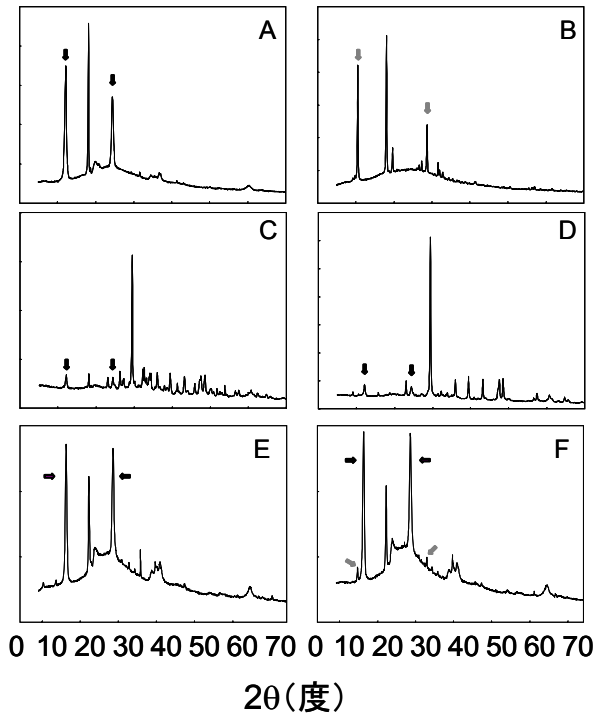


図1. X線回折パターン

A; クリソタイル, B; クロシドライト, C; スレート板A (粉体), D; スレート板B (粉体), E; スレート板A (ギ酸処理済), F; スレート板B (ギ酸処理済), ➡; クリソタイルピーク, ➡; クロシドライトピーク

に粉碎したスレート板を正確に量り入れ、酸と水を加え、1分間超音波で分散後、恒温槽で攪拌、静置操作を行った。反応液は、あらかじめ重量を測定したふっ素樹脂バインダーグラスファイバーフィルター〔東京ダイレック (株), T60A20, 直径25 mm〕でろ過、水洗し、乾燥させた後、重量を測定し、残渣率を求めた。フィルターはX線回折装置を用いて回折ピークを測定し、アスベスト標準品〔(社) 日本作業環境測定協会〕で検量線を作製し、これを用いて定量した。

結果及び考察

クリソタイル、クロシドライトの回折角5-70°のX線回折パターンを図1-A, Bに示した。クリソタイルでは12.1°, 24.3°付近、クロシドライトは10.5°, 28.6°付近に強い回折ピークが見られた。また粉碎したスレート板A, BのX線回折パターンを図1-C, Dに示した。回折ピークからスレート板A, Bにはクリソタイルが認められたが、その強度は弱かった。スレート板A, BをそれぞれJIS法に従って6.7%ギ酸で処理後、フィルターに回収した試料の回折ピークをそれぞれ図1-E, Fに示した。粉碎したスレート板より、酸処理を行うことでセメント由来のピークが減少し、アスベストのピークがはっきり確認でき、スレート板Bにはクロシドライトの回折ピークも確認された。

次にスレート板の処理方法を検討した。スレート板の主成分はセメントであることから、セメントを溶解させる条件を調べるが必要と考え、酸の種類、濃度などについて

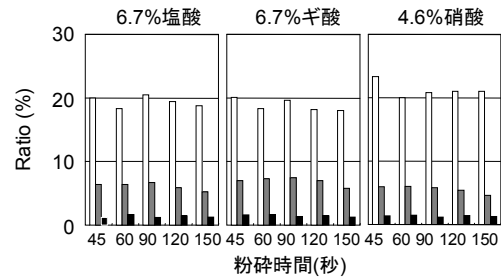


図2. スレート板Bの粉碎時間による残渣率とアスベスト量
□; 残渣率, ■; クリソタイル濃度, ■; クロシドライト濃度

て検討した。酸は塩酸、ギ酸、硝酸、酢酸を用い、酸の濃度はJIS法の6.7%および5, 10% (硝酸は3.45, 4.6, 6.9%) にして実験を行った。条件はJIS法に従い、セメント標準試料〔(社) セメント協会 化学分析用 R211〕100 mgに酸60 mLを加え、超音波分散後、30°Cの恒温槽で30秒攪拌 (80 rpm), 1分30秒静置を6回繰り返し、フィルターでろ過し、乾燥後、残渣率を求めた。その結果、各酸とも濃度が高いほどセメントを溶解したが、6.7% (硝酸4.6%) と10% (硝酸6.9%) ではあまり差はなかった。酢酸は他の酸に比べ、セメントの溶解度が低かった。反応温度を40, 50°Cに上げると、より溶解する傾向がみられた。試料量を50 mgにして同様の実験を行ったところ、100 mgの場合と比べ、ろ過時間は短縮、残渣率は減少し、温度による溶解度の差はみられなかった。次に反応時の攪拌、静置操作の条件 (攪拌条件) を検討した。セメント100 mgを6.7% (硝酸4.6%) の酸に超音波分散後、反応温度30°Cで、①1分攪拌 (80 rpm), 11分静置, ②2分攪拌 (80 rpm), 22分静置, ③12分攪拌 (80 rpm), ④12分攪拌 (40 rpm) で反応させたが、30秒攪拌, 1分30秒静置を6回繰り返すJIS法と差はあまりみられなかった。以上のことから試料量は50 mg, 酸は塩酸、ギ酸および硝酸、濃度はJIS法と同じ6.7% (硝酸4.6%) に設定し、次に実際にスレート板を用いて条件検討を行った。

スレート板は粉碎機で25回/秒、45, 60, 90, 120, 150秒間粉碎した。処理条件はJIS法に準じて行い、X線回折によるアスベストの定量と残渣率を行った。スレート板Aは、粉碎時間90秒、ギ酸処理でクリソタイル量が多く、残渣量が比較的少なかった。スレート板Bは粉碎時間60秒、ギ酸処理で残渣率が低く、クリソタイル量は60, 90秒でほぼ同じであった (図2)。塩酸、硝酸ではクリソタイル量が少なく、溶解していると考えられた。クロシドライト量は、処理条件による差はみられなかった。JIS法では試料を目開き425~500 μmのふるいを通してふるい分け、すべての試料がふるい下になるまで粉碎およびふるい分けの操作を繰り返すことになっている。90秒間粉碎したスレート板を目開き500 μmのふるいでふるい分けしたところ、スレート板Aは99.9%, スレート板Bは97.3%が通過した。粉碎時間と各種酸の濃度によるアスベスト量と残渣率の変化を調べたが、差は見られなかった。また処理温度を30, 40, 50°C

表 1. 攪拌条件によるスレート板 B の残渣率および
アスベスト量

攪拌条件	6.7%塩酸			6.7%硝酸			4.6%硝酸		
	残渣率	クリソタイル	クロシドライト	残渣率	クリソタイル	クロシドライト	残渣率	クリソタイル	クロシドライト
① 1分攪拌 11分静置	20.6%	7.15%	1.26%	20.5%	7.94%	1.29%	21.7%	7.02%	1.28%
② 2分攪拌 22分静置	20.0%	4.94%	1.23%	19.3%	6.03%	1.27%	20.3%	5.42%	1.28%
③ 12分攪拌 80rpm	20.2%	5.44%	1.41%	20.2%	5.73%	1.28%	21.3%	5.22%	1.30%
④ 12分攪拌 40rpm	20.8%	5.48%	1.28%	19.6%	5.85%	1.31%	21.2%	5.02%	1.22%
30秒攪拌 JIS 1分30分 静置	20.5%	6.68%	1.20%	19.6%	7.45%	1.29%	20.8%	5.78%	1.18%

に変化させたが、差はあまりみられなかった。次に攪拌条件①②③④について検討した結果、スレート板Aは条件③12分攪拌（80 rpm）で良好な結果が得られた。スレート板Bは条件①1分攪拌、11分静置で良好な結果が得られた（表1）。

今回、2種のスレート板を用いて実験を行ったが、スレート板それぞれの粉碎や攪拌の最適条件は異なっていた。しかし、今回の結果から6.7%硝酸を用いることにより、温度、攪拌、静置などの処理条件の違いは結果に大きな違いを示すものではなかった。また試料量を100 mgにした場合、ろ過に時間がかかり、さらに残渣が乾燥するとフィルターからはがれることが多く、X線回折装置で測定しにくかった。以上のことから、スレート板は25回/秒、90秒粉碎し、6.7%硝酸を用いて1分超音波分散後、30℃で1分攪拌、11分静置の条件でX線回折分析法により良好な結果が得られた。これによりJIS法に比べ、操作が簡素化された。

今回用いたX線回折装置の検出下限と定量下限は、それぞれ、クリソタイルで0.02%と0.05%、クロシドライトで0.04%と0.11%、アモサイトで0.07%と0.21%であった。試料量を50 mgにした場合、アスベスト0.1%含有製品ではアスベストは0.05 mgしかなく、今回用いたアスベスト0.1 mgを検出可能なX線回折装置では、検出されない可能性がある。したがって位相差、分散顕微鏡による定性分析においてアスベスト繊維が検出され、定量分析で検出されない場合、試料量を100 mgにして再度定量分析を行い確認することが必要と考える。

文 献

- 1) 日本規格協会：JIS A 1481 建材製品中のアスベスト含有率測定方法，2008。

3 アスベスト及びその代替物の物理化学的分別に関する研究

は じ め に

本研究では、建材中のアスベスト含有率測定について、汎用の機器を用いたスクリーニング法の確立を目的とした。

まず、アスベスト及びその代替物の物理化学的性状を把握することにより、建材からアスベストを効率良く分別するための前処理法について検討した。次に、多検体処理が可能で精度の高いスクリーニング法として、汎用のイオンクロマトグラフを用い、金属成分を指標としたアスベスト測定法について検討を行った¹⁾。また、スクリーニング法の確立以外に、市販のアスベスト検査試薬についての評価を行った。

実験方法

1. 有機酸によるセメント除去法の検討

市販のセメント粉末、クリソタイル、クロシドライト及びアモサイト0.5 gに、20%酢酸または20%硝酸10 mlを加えて攪拌後、40℃の水浴中で加温した。試料は時々振とうしながら、溶液中のマグネシウム及び鉄濃度を3時間後まで測定し、各試料からの金属溶出率を算出した。なお、マグネシウムはイオンクロマトグラフィーにより、鉄はオルトフェナントロリンによる定量法²⁾により測定を行った。

2. 無機酸によるアスベスト中金属溶出法の検討

フッ化水素酸及び塩酸による60℃、30分の加温処理及び乾固を組み合わせて、クリソタイルからマグネシウム及び鉄を効率よく溶出させる方法について検討を行った。

3. アスベスト含有建材の金属分析

市販のセメントに水道水を加え、これにクリソタイル、クロシドライト及びアモサイトのいずれかを加えて混合し、固まった後にセメント中のアスベスト含有率が0.1%～15%となる模擬建材を作成した。模擬建材は有機酸によりセメントを除去し、分別したアスベストから金属（ナトリウム、マグネシウム、鉄）を溶出させて定量し、建材中のアスベスト含有率（%）と金属濃度（mg/g）の検量線を作成した。次に、実際に建築物に使用されていたアスベスト含有建材3種（スレートA、スレートB及びアスベスト板）について、ナトリウム、マグネシウム、鉄を定量し、これらの重量比を文献値³⁾と比較することによりアスベストの種類の同定を行った。建材中のアスベスト含有率については、クリソタイルはマグネシウム、クロシドライト及びアモサイトについては鉄の測定結果から、検量線を用いて求めた。

4. 市販のアスベスト検査試薬の有効性評価

3種の検査試薬A、B、Cを購入し、クリソタイル、クロシドライト及びロックウールを手順書に従って処理し、アスベストかどうかの判定が正しくできるかについて評価した。

結果及び考察

セメントは、硝酸、酢酸のいずれにおいても1時間の処理で約90%の除去が可能であった。一方、3時間の硝酸処理ではクリソタイル中のマグネシウムが18%失われることがわかった。以上の結果よりアスベストからの金属溶出を抑えたセメント除去法として、硝酸処理、酢酸処理および水洗を組み合わせた方法を考案した。まず、セメントを20%硝酸

酸により40°Cで30分加温した後、遠心分離して上清を捨てた。次に、超純水を加えて混和後、遠心して水を捨てた(水洗)。続いて残渣に20%酢酸を加えて40°Cで30分間加温し、遠心後、水洗を2回繰り返した。この方法により、99%以上のセメント除去が可能であった。

アスベスト中の金属を溶出する方法としては、アスベス

Building materials containing asbestos

↓ ← grind to powder

0.2 g powder

↓ ← 20% formic acid 5 mL

Warm at 40°C, 30 min.

↓

Centrifuge 2500 rpm, 5 min.

↓

Discard supernatant

↓ ← Distilled water 5 ml

Centrifuge 2500 rpm, 5 min.

↓

Discard supernatant

↓ ← 20% acetic acid 5mL

Warm at 40°C, 30 min.

↓

Centrifuge 2500 rpm, 5 min.

↓

Discard supernatant

↓ ← Distilled water 5 mL

Centrifuge 2500 rpm, 5 min.

↓

Discard supernatant

↓ ← Hydrofluoric acid 2 mL

Warm at 60°C, 30 min.

↓

Dry at 140°C

↓ ← Hydrochloric acid 2 mL

Ultrasonication, 5 min.

↓

Warm at 60°C, 30 min.

↓

Dry at 140°C

↓ ← 10 mM Nitric acid

Ultrasonication, 5 min.

↓

Analyze the metal content

Fig. 1 Flow of Asbestos Measurement Procedure

トにフッ化水素酸を加えて加温・乾固後、塩酸を加えて加温・乾固する方法により、鉄、マグネシウム及びナトリウムを効率よく溶出する方法を確立した。測定操作全体のフローをFig.1に示す。

模擬建材を測定した結果、アスベスト含有率(%)とマグネシウム及び鉄濃度(mg/g)との間に良好な直線性がみられた。両者の相関をFig.2に示す。また、セメントについてブランクを求め(n=5)、この値の5倍をアスベスト含有率の定量下限値とすると、クリソタイル:0.05%相当、クロシドライト及びアモサイト:0.25%相当と求められた。次に実際に建築物に使用されていたアスベスト含有建材の分析結果より、スレートA・Bはクリソタイル、アスベスト板はアモサイトを含むことが推定された。各建材中のアスベスト含有率は、スレートA:9.8%、スレートB:8.8%、アスベスト板:15.3%と求められ、X線回折装置による測定結果と比較したところ、両者はアスベストの種類が一致し、含有率も同程度であった。

市販のアスベスト検査試薬3製品では、クリソタイル、クロシドライト、ロックウールについて、アスベストかどうかをいずれも正しく判定できる製品はなかった。

文献

- 1) 斎藤育江, 栗田雅行, 小縣昭夫: 東京健安研セ年報, 60, 237-244, 2009.
- 2) 日本薬学会: 衛生試験法・注解1990, 70, 1995, 金原出版, 東京.
- 3) 環境庁大気保全局企画課: 石綿・ゼオライトのすべて, 5-32, 1987, 財団法人日本環境衛生センター, 川崎市.

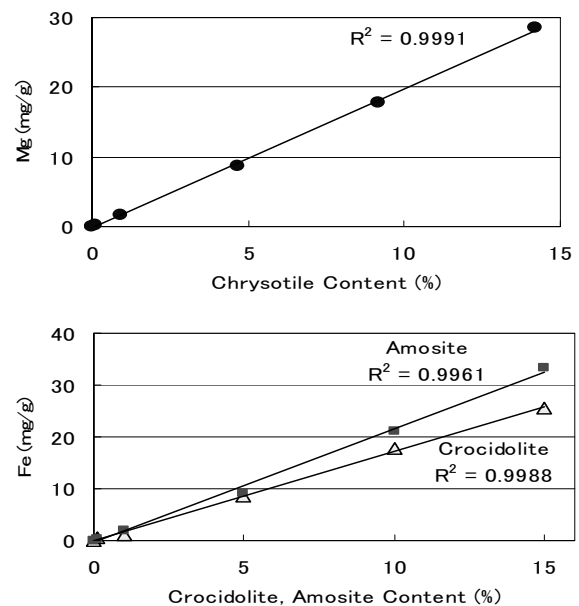


Fig. 2 Calibration Curves of Asbestos Concentration in Standard Cement

4 空調ダクトの堆積塵及び浮遊塵中のアスベスト及び代替物の検出法の開発と飛散量測定に関する研究

はじめに

建築物内の空調機械室には、防火・耐熱・防音機能をもたせるために、アスベスト及び代替繊維（ロックウール）が長年にわたり使用されてきた。アスベストの毒性が明らかになり、ビルや住宅に使用される建材の使用が禁止された。さらに、既存の施設については、アスベストの有無と種類の確認が義務づけられたことに加えて、それらの剥離や飛散を防止するための処理を施すようにとの通達が出て、各種の封じ込めや除去作業がなされた結果、室内空気中のアスベスト繊維濃度は安全レベルに保たれている。本研究の目的は、浮遊アスベスト及び代替繊維の空气中濃度を迅速かつ正確に把握する測定法を開発することと吹き付けアスベスト履歴記録があるビルにおける空調機械室及び室内の浮遊アスベスト繊維濃度を測定することである。

測定方法の検討

アスベスト測定法には、現在JIS法による方法がある。その測定法は建材製品中のアスベスト含有率測定方法（JIS A1481：2008）¹⁾と空气中的繊維状粒子測定方法（JIS K3850-1:2006）²⁾で、いずれもX線回折法や電子顕微鏡法などを用いる研究室レベルの測定方法であり、現場測定などにすぐに応用できるものではない。そこで今回のプロジェクトでは迅速性と簡便性に焦点を当てた測定法を検討した。

1. 測定装置

1) アスベスト判定装置

堆積塵中のアスベスト判定に、偏光解析装置（PVS：レックス）を使用した。

2) 浮遊アスベスト繊維採取装置

メンブランフィルター・サンプラー及びPMサンプラー（NW-354:柴田科学）を使用した。

3) 浮遊アスベスト繊維計測装置

PVS及び偏光アナライザー付き位相差顕微鏡を用いた。

2. 測定方法

1) アスベスト判定法

堆積塵を少量の水を入れた乳鉢に加えて、よく摺り合わせ、混濁液として、円形スライドグラスに乗せ、クロスニコル鏡筒の観察位置にセットした。PVSの点滅モード及び透過照明モードで回転リングを回転させて、消光現象を観察して、アスベストの有無を判定した。

2) メンブランフィルター法

建築物の空調機械室及び室内の空気を20 L/分で4時間吸引したメンブランフィルター（ミリポアAA）を4等分にカットし、界線入りスライドグラス（松浪S6118）に乗せ、アセトン・トリアセチン法で透明化したものを試料とした。

3) PM4ホルダー測定法

PM4ホルダー（NW-354:柴田科学）に円形スライドグラス（25 mm）をセットし、4時間空気を採取した。採取後、

スライドグラスを、PVS装置の試料台にセットして、アスベストの有無を判定した。

4) 浮遊アスベスト繊維計数法

位相差顕微鏡の光源部と接眼部の両方に偏光板を装着し、位相差板と偏光板（回転アナライザー）を操作し、対物レンズ40倍で、アスベスト繊維を計数した。本法は、JIS K3850-1:2006による位相差光学顕微鏡法に偏光法を併用させた方法⁴⁾で、アスベスト繊維の識別精度を高めた改良法である。

3. 現場調査

1) 調査施設

都内の建築物17施設で調査した。用途別では、事務所が7施設、旅館（ホテル）が5施設、興行場が2施設、店舗が2施設、学校及び会議ホールが1施設である。建築竣工年は、1958年（昭和33年）から1987年（昭和62年）の建築物で、施工時の吹き付けアスベストの種類と濃度が明らかなビルを対象とした。なお、空調システムは、中央管理方式のものである。

2) 調査測定の年月と測定項目

2006年から2008年までの11月から3月に、各施設の室内と外気について測定した。なお、一部は空調機械室の空気を採取して、堆積塵及び浮遊塵中のアスベスト繊維を測定した。

測定結果及び考察

1. 測定結果

今回採取した空調機械室の堆積塵についてPVSを用いてアスベスト繊維を判定した結果では、室内塵中の有機性繊維との判別が難しく、微量のアスベスト繊維に特有の消光現象を認めることができなかった。建材のバルク試料など掻き取り採取が可能であれば、今後の現場調査に有効な手段となりうることがわかった。

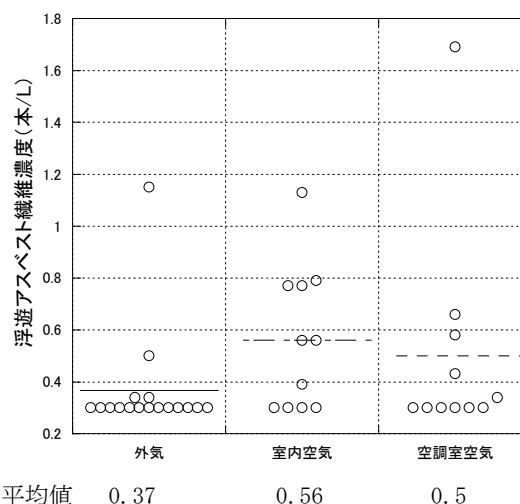


図 1. 採取箇所別の浮遊アスベスト繊維濃度

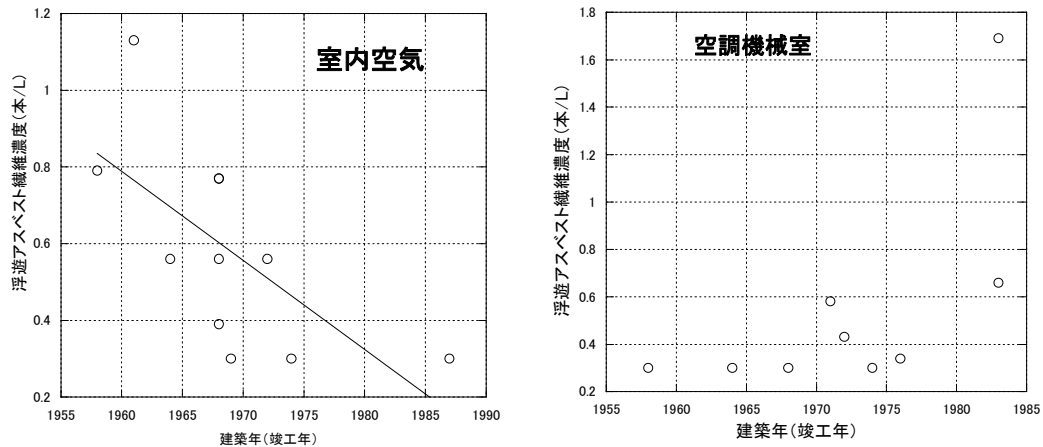


図 2. ビル建築年と浮遊アスベスト繊維濃度

浮遊塵の大きさを $4\mu\text{m}$ 以上と以下とに分粒できるPM4ホルダーで採取したスライドガラスをPVS解析装置で検査した結果、 $4\mu\text{m}$ 以下のフィルターからはアスベスト繊維は検出されず、スライドガラスに捕集された $4\mu\text{m}$ 以上の長い繊維のみに偏光による消光現象が認められた。それらアスベスト繊維のアスペクト比は10以上であり、本法のみではアスベスト繊維の判定は困難であった。

偏光アナライザーを位相差顕微鏡に装着してメンブランフィルターに採取されたアスベスト繊維を計数する方法を検討した結果、位相差法では判別に迷う鉱物繊維に特有の消光現象が見られるか否かでより精度の高い計数が可能となった。なお、フィルターをプラズマによる低温灰化装置で灰化することで、偏光アナライザーによるアスベストなどの鉱物性繊維の検出がより正確となることがわかった。

2. 調査結果

調査対象ビルの室内及び空調機械室のアスベスト繊維数を測定した結果を、図1に示した。外気に比べて室内の浮遊アスベスト繊維濃度は高い傾向が認められた。なお、空調機械室と室内には有意な差が認められなかった。外気濃度は、検出限界 (0.3 本/L) に近いもので、室内空気はそれに比較して、2倍を超える濃度は検出されなかった。

建築年と室内及び空調機械室の浮遊アスベスト繊維濃度の関係を調査した結果を図2に示した。竣工年の古いビルほど、室内の浮遊アスベスト繊維濃度が高い傾向が見られた。一方空調機械室ではそうした傾向が見られなかった。竣工以後に施工された吹付けアスベストの封じ込めの処理効果が有効と思われた。

文 献

- 1) 日本規格協会: JIS A 1481 建材製品中のアスベスト含有率測定方法, 2008.
- 2) 日本規格協会: JIS K 3850-1 空気中の繊維状粒子測定方法, 2006.
- 3) 日本規格協会: 改訂JIS法によるアスベスト含有建材の

最新動向と測定法, 2008.

- 4) 小坂浩, 宇野泰明: 空気清浄コンタミネーションコントロール, 46(6), 32-39, 2009.

5 タルカムパウダー中のアスベスト分析法の検討

はじめに

近年アスベストによる健康被害が多発したことを契機として、タルク中のアスベストの問題が再浮上してきた。そこで著者らはタルカムパウダー等の化粧品についてアスベスト (トレモライト及びクリソタイル) の調査を行い、当時都内に流通する製品にはトレモライト及びクリソタイルは含有されていないことを報告した¹⁾。しかし、その後平成21年に韓国製タルカムパウダーからアスベストが検出されたとの報道があるなど、タルクを含有する化粧品の安全性は未だ危惧される状況にある。

著者らがすでに報告¹⁾したアスベストの分析方法是、昭和62年厚生省 (現, 厚生労働省) 通知による「X線回折法を用いたタルク中のアスベスト定量法 (暫定法)」²⁾で、本通知で定めた検出下限 (トレモライト 0.5%, クリソタイル 0.8%) を満足するものであった。しかし、検出器の感度が低く、労働安全衛生法で定める含有基準の 0.1%³⁾までの検出は不可能であった。そのため今回、検出器が改良されたX線回折装置を導入し、より低レベルの測定を検討したところ、トレモライトは 0.1%, クリソタイルは 0.2%まで測定することが可能になった。さらに本法を用い、最近5年間に都内に流通していたタルクを含有する化粧品について、改めてアスベストの調査を行ったので、併せて報告する。

実験方法

1. 測定試料

平成16年12月～平成20年6月に都内で市販されていたタ

ルク含有化粧品 36検体. (内訳 タルクパウダー15, ファンデーション8, アイシャドー6, チーク4, 白粉2, 洗顔パウダー1).

2. 標準品及び試薬

トレモライト標準品: 0.5%トレモライト, クリソタイル標準品: 0.8%クリソタイル (いずれも社団法人日本作業環境測定協会製), タルク (関東化学製).

3. 装置

X線回折装置: X'Pert PRO MPD (PANalytical製), かく拌・脱泡機: HM-500 (キーエンス製)

4. 標準試料の調製

トレモライト標準品, クリソタイル標準品とタルクをかく拌・脱泡機専用容器に正確に量り, スラリーとしてエタノール 10 mLを加え, 5 分間攪拌した. 混和物をそれぞれシャーレに入れ, ドラフトで 6 時間風乾後 105°Cで 1 時間乾燥し, 各標準試料 (トレモライト0.1, 0.25%, クリソタイル 0.1, 0.2, 0.4%) とした.

5. 測定試料の調製

粉末試料はそのまま, 固形試料は粉末化して用いた.

6. 測定方法

標準試料及び測定試料をX線回折装置用測定専用ホルダーに約 0.3 g 取り, ガラス板で表面を平らにし, 以下の条件で面積 (counts 2 θ) の測定を行った.

7. 測定条件

測定範囲(2 θ): トレモライト 9.0167~11.9867°, クリソタイル 22.0167~26.9867°及び 10.0167~13.9867°, 電圧: 45 kV, 電流: 40 mA, ターゲット: Cu, ダイバージェンスリット: 1/2°, X線検出器: 半導体アレイ, ステップサイズ (2 θ): 0.0002°, スキャンステップ時間: 1000 秒.

結果及び考察

1. 測定方法の検討

新規に導入されたX線回折装置は, 検出器に100チャンネルのシグナルを同時測定できる半導体アレイを採用し, 検出したシグナルを積算するシステムを導入しているため,

高感度及び高速で測定できるようになった. 装置の測定精度を確認するため, トレモライト標準品 (0.5%トレモライト) 及びクリソタイル標準品 (0.8%クリソタイル) を用い, 同一試料を 5 回繰り返し測定した. その結果, トレモライトでは相対標準偏差が 2.9% (9.0167~11.9867°), クリソタイルでは 2.8% (22.0167~26.9867°) 及び3.9% (10.0167~13.9867°) といずれも良好な結果が得られた.

次にトレモライト及びクリソタイルの各濃度の標準試料について測定を行い, 検出限界について検討した. 図1に各測定範囲における限界濃度のX線回折チャートを示したが, 図から明らかなように, トレモライトは 0.1%まで検出することが可能であった. しかし, クリソタイルについては, 22.0167~26.9867°では 25.5°付近にある妨害ピークの影響で0.4%まで, 10.0167~13.9867°では S/N 比が悪く, 0.2%までの検出が限界であった.

2. 市販タルク含有化粧品の測定

前報¹⁾において, タルク以外の配合無機成分による測定への影響を検討し, 一部のマイカが 10.50°付近のトレモライトの測定を妨害すること, マイカ, 酸化クロム等がクリソタイルの 24.50°付近の測定を妨害するが, 12.00°付近では妨害しないことを報告した. 今回測定対象とした製品の中には, マイカ及び酸化クロムが配合されたものがあったが, いずれにもトレモライト及びクリソタイルの測定を妨害するピークは認められず, 配合無機成分による測定上の問題はなかった.

そこで本法を用い, 表1に示す市販のタルク含有化粧品 36検体について測定を行った結果, いずれからトレモライト及びクリソタイルは検出されなかった.

文 献

- 1) 中村義昭, 森謙一郎, 他: 東京健安研セ年報, 57, 151-155, 2006.
- 2) 厚生省薬務局審査第二課長通知: ベビーパウダーの品質確保について, 昭和62年11月6日薬審第二1589号.

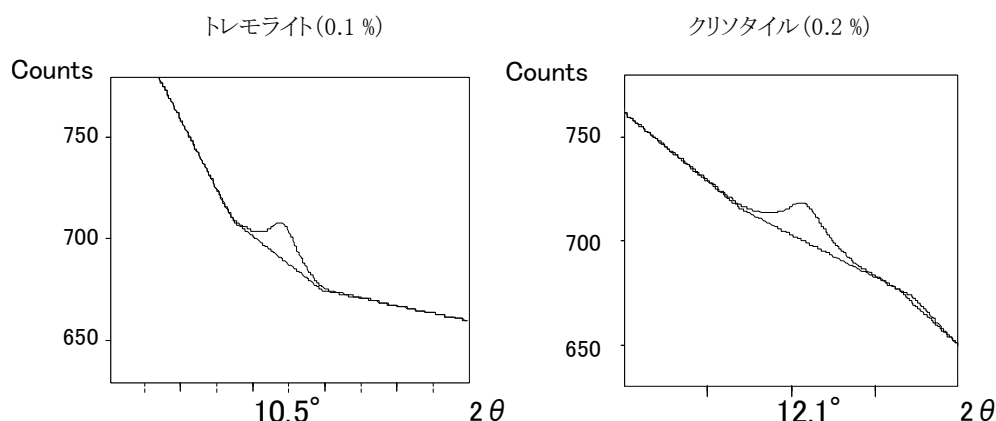


図 1. 各測定範囲における限界濃度の X 線回折チャート

表1. 測定試料 (市販タルク含有化粧品)

種類	n	製造国	配合無機成分
タルカムパウダー	15	日本(9), イギリス(2), タイ(2), イタリア(1), 台湾(1)	タルク, 酸化亜鉛, クロロヒドロキシアルミニウム, 炭酸マグネシウム, 炭酸カルシウム
ファンデーション	8	日本(4), 台湾(2), 中国(1), 韓国(1)	タルク, マイカ, 酸化鉄, 酸化チタン, 酸化亜鉛, 硫酸バリウム, カオリン, グンジョウ
アイシャドー	6	日本(2), 台湾(2), 中国(1), アメリカ(1)	タルク, マイカ, 酸化鉄, 酸化チタン, 酸化クロム, オキシ塩化ビスマス, カオリン, グンジョウ
チーク	4	日本(2), 台湾(1), 中国(1)	タルク, マイカ, 酸化鉄, 酸化チタン, カオリン
白粉	2	日本(2)	タルク, マイカ, 酸化鉄, 酸化チタン
洗顔パウダー	1	日本(1)	タルク

3) 厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課長通知: 石綿を含有する粉状のタルクの製造, 輸入, 譲渡, 提供又は使用の禁止の徹底について, 平成18年10月16日基監発第1016001号.

6 アスベスト曝露による腫瘍発生を抑制する因子の研究

はじめに

近年, アスベスト繊維吸入が原因と思われる中皮腫による死亡例が報じられ社会問題となっている. また, 過去にアスベスト繊維を吸入し, 中皮腫発生存備軍となっている人も少なくないと考えられる¹⁾. このような中で, 中皮腫発生を抑制する物質あるいは方法等を見いだすことが急務となっている. そこで, まず*in vitro*実験として, アスベスト繊維によるマクロファージの活性酸素種放出量に及ぼすポリフェノール等の影響について比較検討するために, マクロファージ培養細胞 (J774.1) に各化学物質とクロシドライトを作用させて培養した後, 細胞の放出活性酸素種(過酸化水素を除く)量を2', 7-ジクロロフルオレセイン-ジアセテート (DCFH-DA) 蛍光法²⁾で測定した. またアスベスト繊維による胸膜細胞傷害に及ぼすポリフェノール等の影響を比較検討するために, クロシドライトとヒト胸膜培養細胞 (MeT-5A) に各化学物質とクロシドライトを作用させて培養した後, DNA中の8ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 濃度をELISAキットで測定した. 更に, *in vitro*実験でクロシドライトによる影響を抑制する作用を呈したエピカテキンのアスベスト繊維吸入による中皮腫発生に及ぼす影響を検討するために, クロシドライト気管内注入ラットにエピカテキン溶液を自由飲水させ, 12か月後の肺について検討した.

実験方法

1. マクロファージ活性酸素種放出抑制試験

1) 試験物質: エピカテキン, 没食子酸エピガロカテキン, クルクミン, カプサイシン, ダイゼイン及びゲニスタインはナカライテスクから購入し, ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解させ, 細胞生存率が90%を下回らない 1×10^{-5} Mの濃度で試験を実施した.

2) 細胞: J774.1細胞はヒューマンサイエンス振興財団から分譲された.

3) クロシドライトは日本作業環境測定協会から購入し, リン酸バッファー液に浮遊させた.

4) 試験方法: 10%牛胎仔血清含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて5% CO₂, 37°C, 飽和水蒸気下で細胞の前培養を行い, 2.2×10^5 個/mLの細胞液90 μ Lを96ウェルプレートに注入し, 2×10^4 個/well播種した. これらに試験物質10 μ Lを添加して1晩培養した. ハンクス平衡塩 (HBSS) で洗浄後, 無血清DMEM, 220 μ M DCFH-DA/PBS 10 μ L, クロシドライト (1 mg/mL) 5 μ Lを加え1時間培養し. 蛍光マイクロプレートリーダー (CytoFluor, PerSeptive Biosystems製) で蛍光量を測定した.

細胞生存率は, 染色法^{3,4)}で測定した.

2. 胸膜細胞傷害抑制試験

1) 試験物質: 没食子酸エピガロカテキン, エピカテキン, クルクミン, カプサイシン, ダイゼイン及びゲニスタインはナカライテスクから購入し, DMSOで溶解させた.

2) 細胞: MeT-5A細胞はアメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) から分譲された.

3) クロシドライトをリン酸バッファー液に浮遊させた.

4) 試験方法: 細胞を10%牛胎仔血清含有F12/DMEMを用いて5% CO₂, 37°C, 飽和水蒸気下で前培養し, 10^6 個を6穴プレートに播種した. 細胞が底面に付着した後, 無血清培地に交換し, 試験物質とクロシドライト (2 mg) を添加して48時間培養した. その後DNA抽出キット (和光純薬) を用いて細胞からDNAを抽出した. 得られたDNAをヌクレアーゼP1 (ヤマサ醤油) 及びアルカリフォスファターゼ (シグマアルドリッチ) で処理し, ELISAキット (日本老化制御研究所) を用いて8-OHdG濃度を測定した.

3. 動物実験

1) 動物: F344雄ラット6週齢はチャールスリバーから購入した.

2) 投与物質: エピカテキンはナカライテスクから購入し, 超純水で50 mg/Lになるように溶解し, 自由飲水させた (1 mg/day/rat). クロシドライトは, 実験開始時に2 mg/0.2 mL/ratを気管内投与した.

3) 検分方法: 12か月後の肺の副葉を8-OHdG測定用とし, それ以外の肺葉は形態病理学的観察に用いた.

結果及び考察

1. マクロファージ活性酸素種放出抑制試験

クロシドライト添加細胞にそれぞれの化学物質を作用させた時の蛍光量比を図1に示した。エピカテキン、没食子酸、エピガロカテキン、及びクルクミンに顕著な蛍光量減少が見られ、マクロファージの活性酸素種発生抑制作用があることが示唆された。

2. 胸膜細胞傷害抑制試験

表1に添加化学物質ごとの胸膜培養細胞の8-OHdG産生率を示した。エピカテキン (10^{-6} M) またはカプサイシン (10^{-5} M) を添加した場合、8-OHdG濃度の減少が見られた。エピカテキン及びカプサイシンは、クロシドライトによる8-OHdG生成を抑制する作用があることが推察された。

3. 動物実験

肺副葉における8-OHdG量を図2に示した。クロシドライト群で増加し、クロシドライト+エピカテキン群でクロシドライト群より減少する傾向が見られた。クロシドライト

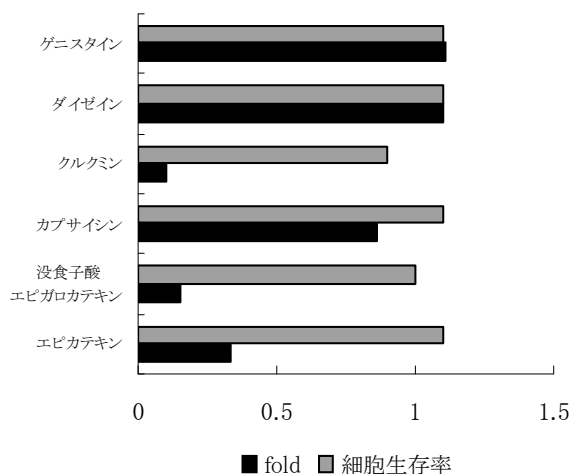


図1. 蛍光量比 (対溶媒コントロール)

表1. 胸膜培養細胞の8-OHdG産生率に及ぼすポリフェノールの影響

化学物質	濃度(M)	8-OHdG産生比
—	—	1.00
エピカテキン	10^{-7}	0.92
	10^{-6}	0.63 *
	10^{-5}	0.94
没食子酸エピガロカテキン	10^{-7}	1.00
	10^{-6}	0.96
	10^{-5}	0.97
カプサイシン	10^{-7}	1.07
	10^{-6}	1.00
	10^{-5}	0.78 *
クルクミン	10^{-7}	1.18
	10^{-6}	1.02
	10^{-5}	1.12
ダイゼイン	10^{-7}	0.96
	10^{-6}	1.25
	10^{-5}	1.14
ゲニシタイン	10^{-7}	1.11
	10^{-6}	1.09
	10^{-5}	1.76

*: $p < 0.01$

を投与したラット肺には腫瘍は見られなかったが、大小の肉芽腫が散見された (図3)。肉芽腫発生数がクロシドライト+エピカテキン群でクロシドライト群よりも減少する傾向が見られた (図4)。エピカテキンを摂取することで、クロシドライトによる肺組織への刺激及び障害が軽減されるように思われた。今後実験期間を延長して、腫瘍発生の有無を確認する必要がある。

文 献

- 1) 厚生労働省：アスベスト問題に関する厚生労働省の過去の対応の検証 (第2回アスベスト問題に関する関係閣僚による会合資料 平成17年8月26日)。

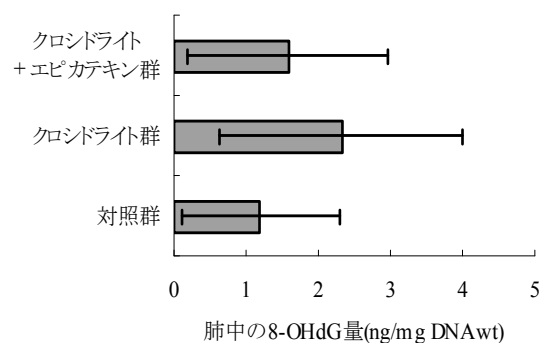


図2. クロシドライト気管内注入ラット肺での8-OHdG生成量に及ぼすエピカテキンの影響

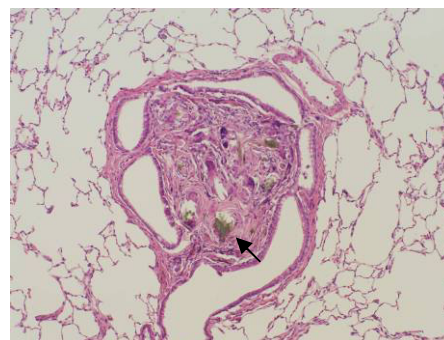


図3. 肺に見られたクロシドライト群の肉芽腫 (x100) クロシドライト (矢印) を貪食細胞が取囲む。

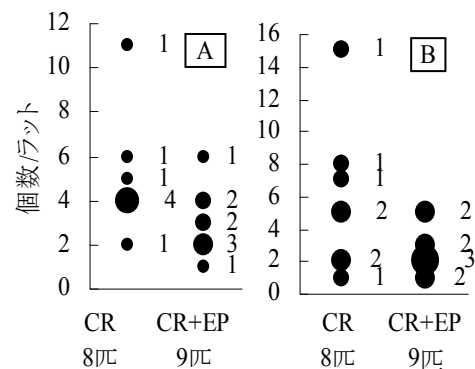


図4. ラット肺に見られた肉芽腫数
A, 肺胞における直径 10 μ m 以上の肉芽腫;
B, 細気管支における直径 15 μ m 以上の肉芽腫;
グラフ内数値はラット数; CR, クロシドライト;
CR+EP, クロシドライト+エピカテキン。

<http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/roudou/sekimen/kagou/050826.html> (2010年8月20日現在, なお本URL変更または抹消の可能性がある)

- 2) 二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二: 酸化ストレスマーカー, 29-30, 2005, 学会出版センター, 東京.
- 3) Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F. and Villalobos, M., *et al.*: *Environ. Health. Perspect.*, **103**: 608-612, 1995.
- 4) Villalobos, M., Olea, N. and Brotons, J.A., *et al.*: *Environ. Health. Perspect.* **103**: 844-850, 1995.

7 アスベスト代替物の生体影響評価のための病理組織学的検討

はじめに

アスベスト代替物は天然の鉱物及び天然の鉱物から人工的に作られた繊維性の物質で, その種類は多く, 物理的性状や化学的性状は多岐にわたっているが, 形態が繊維状の代替物については, 生体に対してアスベスト類似の作用が懸念されており, WHOにおいてもこれらの代替物の安全性の検討が継続して行われている¹⁾. 本報告ではアスベスト代替物の, 特に胸膜及び腹膜の表層部を覆う中皮組織に対する影響をより早期に観察することを目的とした病理組織学的検討法を計画した. F344ラットでは, 自然発生病変として, 陰嚢腔周辺から中皮腫が発現し, また実験的にも誘発されることが報告されている²⁾. そこで, 陰嚢腔という狭い空間に投与することにより, 少量の試料でも, 局所的に, より高濃度の曝露条件が得られ, より効果的な作用が可能であると考え, 今回は陰嚢腔内への投与を試みた.

実験方法

1. 被験物質

代替物として, セラミックスファイバー (CF, 新日化サーマルセラミックス㈱, SUPERWOOL 607), ロックウール (RW, 日東紡, ロックファイバー #42) [以上, 人造鉱物繊維], ワラストナイト (WN, 巴工業㈱, NYGROS 5) [天然鉱物繊維], チタン酸カリウムウイスカー (TK, JFA標準試料) [人造結晶質繊維], 陽性対照としてクロシドライト (CR, UICC標準試料) を用いた. このうちCF, RWについては, 入手した試料が長い繊維の束状のため, ボールミルにより粉碎したものを投与用試料とし, その他は, 入手した試料をそのままの状態, いずれも2%カルボキシメチルセルロース溶液 (2% CMC) に懸濁させ投与液とした.

2. 代替物の投与液濃度の設定

CR懸濁液1 mg/mL中の繊維の分布は, 光学顕微鏡下 (400~1,000倍) で, 繊維径5 µm以下, 繊維長20 µm以下の繊維が約 1.5×10^8 本であった. 従って CF, RW, WNの投与液濃度は, CR懸濁液と同サイズ分布の繊維を含むように重量濃度を調整した. TKは微細粉末状であり, 入手した試料をそ

のまま懸濁液とした. 投与液濃度及び用量を表1に示した.

3. 陰嚢腔内投与

F344/DuCrIjラット (12週齢, 雄) を用い, CR, CF, RW, WN, TK (各群15匹) を表1に示した用量で, 麻酔下陰嚢腔内に単回投与 (注入) した. 投与後7, 28日目 (短期曝露試験) に, 各2及び3例を, 52週目 (長期曝露試験) に各10匹を屠殺し検査に用いた. TKについては, 投与後7及び28日目についてのみ観察を行った.

結果及び考察

短期試験 (投与後7及び28日目) では, 主に陰嚢腔及び各生殖器漿膜について, 病理組織学的観察を行った. CR群および各代替物群に共通して, 陰嚢腔内各部位に漿膜表面における大食細胞等の単核球の集簇 (図2-a), 漿膜下に投与繊維を含む肉芽腫の形成 (図2-b) がみられた. 投与後28日目では, 漿膜表面における細胞集簇は7日目に比べ軽減し, また肉芽腫では, 含まれる繊維量が多くなる傾向が見られた. 投与した各繊維は, 投与後7及び28日目で, 陰嚢腔内及び腹腔内各部位のほか, 胸腔内のリンパ節 (図1-c) にも認められ, 繊維量は投与後の経過時間に比例して多くなる傾向が見られた. TK群では7日目で軽度な中皮細胞の肥大がみられたが, 28日目では, 明らかでなかった.

投与後52週目では, CR, CF, RW, WN群について, 7及び28日目で観察した部位に加えて, 腹腔内各部位の腹膜及び各臓器実質についても観察を行った. 28日目までに観察された陰嚢腔における大食細胞等の集簇は認められなかった. 肉芽腫の存在は, 主に陰嚢腔内の各部位に継続して認められたが, 投与後28日目に比べて, 肉芽腫を構成する細胞密度は低下し, 線維成分の占める割合が多くなっていた (図2-a,b,c). また投与した各繊維の蓄積量は, 胸腔内リンパ節とともに, 28日目に比べて, 軽減していた. また52週目では, いずれの繊維投与群において, 中皮細胞の増殖性変化は認められなかった.

今回観察された陰嚢腔内における大食細胞等, 単核球の集簇や肉芽腫の形成は, 異物に共通した, 炎症性反応と考えられるが, いずれも52週までに軽減する傾向を示した. 今回の試験で陽性対照として用いたCRにおいても, 他の繊維群と大きな違いは認められなかった. CRでは腹腔内投与で中皮腫の発現が報告されているが³⁾, 今回の実験におい

表1. 実験に用いた試料と用量

アスベスト/代替物	試料濃度 ^{a)} (mg/ml)	用量 ^{b)} (mg/kg 体重)
クロシドライト (CR, 陽性対照)	1	2
セラミックスファイバー (CF)	75	150
ロックウール (RW)	75	150
ワラストナイト (WN)	5	10
チタン酸カリウム ウイスカー (TK)	2	4

a) 2%CMC懸濁液中の試料濃度.

b) 試料懸濁液を 0.2ml/100g体重の割合で投与した.

ては、中皮腫発現には、用量が少なく、また投与後の経過時間も短かったものと考えられた。

多層カーボンナノチューブ（以下MWCNT）はアスベスト代替物と同様、その形状がアスベストと似ていることから、アスベスト類似の作用が懸念されている。MWCNTを1 mg/kgの用量で今回の実験と同条件で別に行った陰嚢腔内投与試験では、投与後40週前後で中皮腫の発現（図3-a）や中皮細胞の過形成が認められた。その際に観察された肉芽腫（図3-b）は、今回の各繊維投与群に比べて、細胞密度が高く、また核も肥大した細胞が多く、活動的な状態にあると考えられた⁴⁾。この様な状態の肉芽腫は、異物に対する反応が持続していることを示していると考えられる。肉芽腫と中皮腫の発現との直接的な関連は明らかでないが、生体内で異物に対する反応性変化が持続していることが中皮腫発現の要因のひとつとして考えられる。今回、投与経路が陰嚢腔内という特殊な投与経路であったが、陰嚢腔は腹腔と連続しており結果的には、従来の腹腔内投与と同様の曝露条件であると考えられる。腹腔内投与はヒトにおける曝露環境（呼吸器系を介した曝露による影響）を反映しないが、繊維状物質の中皮組織に対する直接的な障害作用の観察が可能である。適切な陽性対照を設定することにより、アスベスト代替物などの繊維状物質のより早期に評価するためには、簡便で有用な方法と思われる。

文 献

- 1) WHO : WHO Workshop on Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos

Substitutes, 2005, Lyon, France.

- 2) Johnson, K.A., Gorzinski, S.J., Bodner, K.M., et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **85**, 154-168, 1986.
- 3) Cullen RT, Miller BG, and Clark S, et al. : *Inhal Toxicol.* **14**: 685-703, 2002.
- 4) Sakamoto Y., Nakae D., Fukumori N., et al. : *J Toxicol Sci.*, **34**: 65-76, 2009.

8 アスベスト代替物による肺傷害の危険度比較及びその他の臓器への生体影響に関する研究

はじめに

アスベストによる肺傷害や中皮腫発生のメカニズムの中心に活性酸素の関与が想定され、それによる膜傷害及び炎症惹起がその原因とされている。その仮定に基づきアスベスト代替物数種について*in vitro*及び*in vivo*でのアッセイを行い、その危険性を推定した。

実験方法

*In vitro*の実験では、マクロファージ、赤血球、中皮細胞をマウス、ラットから採取し、アスベスト代替物（0.1 mg/mL）と接触させ、活性酸素種や過酸化脂質の定量を行った。*In vivo*の実験は、マウスに、アスベスト代替物の懸濁液を腹腔内投与し（用量はマウス1匹当たり0.1 mg）、2日間飼育後、中性生理食塩水で洗浄し、洗浄液の過酸化脂質、炎症指標等を測定した。

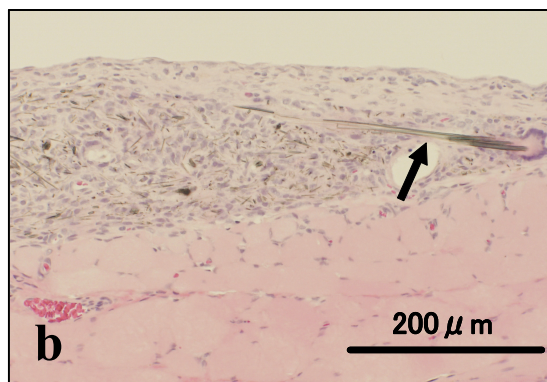
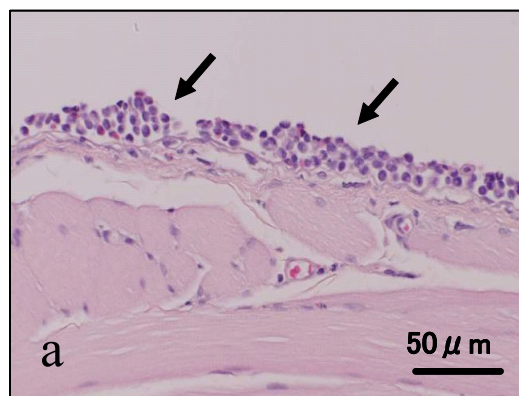


図1. クロンドライト(CR)及びワラストナイト(WN)投与後28日目の組織像

- a) CR群、陰嚢腔漿膜表面における大食細胞などの単核球の集簇(矢印)。
- b) CR群、精巣上体漿膜下のCR繊維(矢印)を含む肉芽腫(矢印)。
- c) WN群、胸部リンパ節内のWN繊維(矢印)。

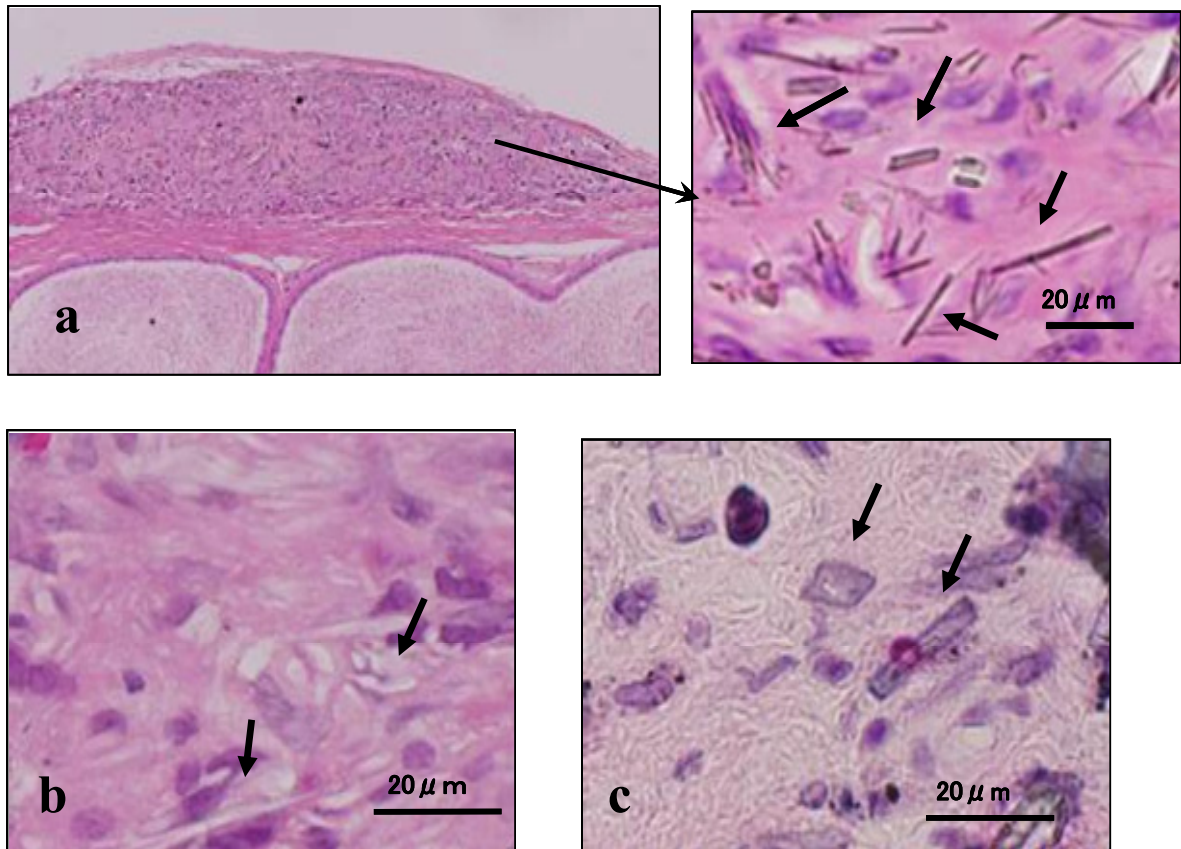


図 2. クロシドライト (CR), ワラストナイト (WN) 及びロックウール (RW)

投与後 52 週目の組織像

- a) CR 群, 精巣上体漿膜下の CR 繊維 (拡大図, 矢印) を含む肉芽腫.
- b) WN 群, 精巣上体漿膜下の繊維 (矢印) を含む肉芽腫.
- c) RW 群, 精巣上体漿膜下の繊維 (矢印) を含む肉芽腫.

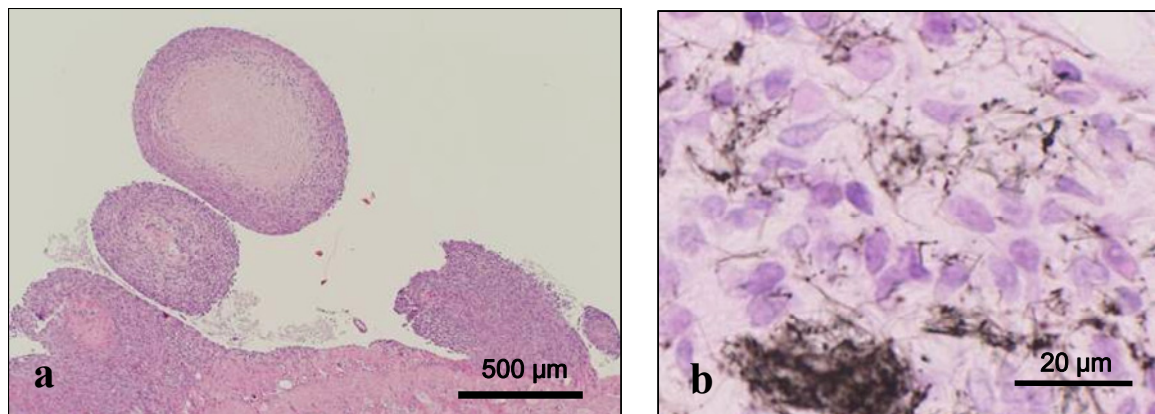


図 3. 多層カーボンナノチューブの陰嚢腔内投与によって生じた中皮腫 (a) と肉芽腫 (b)

結果及び考察

1. *In vitro* 実験の結果

フェントン反応により, 過酸化水素からヒドロキシラジカルを非酵素的に生成する能力は, 陽性対照のアスベストにおいて, クロシドライト (珪酸第二鉄) が最も高く, アモサイト (珪酸第一鉄) がそれに次いだ, クリソタイル (珪酸マグネシウム) に認められなかった. クロシドライト

と同等の活性が, 人造ミネラルファイバー (珪酸カルシウム) である SC Bulk 1260 及び TOMBO no.5100 fine flecks bulk に認められた. また, アモサイトと同等の活性が, アタパルジャイト (天然珪酸アルミニウム) の Attagel 350 と, 人造ミネラルファイバーの Rockwool 42S に認められた (図1). マウス腹腔マクロファージと代替物等を接触させると, 陽性対照のクロシドライト, アモサイト, クリソタイル及び

代替物ワラストナイト（天然珪酸カルシウム）のNYAD 400において、過酸化水素の放出が認められた。ラット赤血球と接触させた場合は、クロシドライト、人造ミネラルファイバーのSuperwool 607およびTOMBO no.5100 fine flecks bulk, クリソタイル, タルク（珪酸マグネシウム）の順に、過酸化脂質生成量が多かった。マウス腹腔マクロファージと接触させた場合は、陽性対照のクロシドライトのみにおいて、過酸化脂質の生成を促進した。マウス腹腔中皮細胞と接触させた場合は、陽性対照クロシドライト、アモサイト、代替物アタパルジャイトのAttagel 40およびAttagel 350の順に、過酸化脂質の生成が高かった。

2. *In vivo*実験の結果

マウス腹腔内へアスベスト及びその代替物を1回注射して2日後の、腹腔内洗浄液中の過酸化脂質量は、クロシドライト、アモサイト、クリソタイル, SC Bulk 1260, TOMBO 5100 fine flecks bulk, Attagel 350, Nyglos 5（ワラストナイト）投与群の順に高かった（図2）。同様の処理に伴う炎症惹起能は、タンパク質放出能を指標とすると、Nyglos 5がクロシドライトより高く、TOMBO 5100 fine flecks bulkがクロシドライトと同等に高く、Rockwool 42S, SC bulk 1260も有意に高かった。マクロファージ集合能を指標とすると、Attagel 350, SC bulk 1260がアスベストより遥かに高く、Rockwool 42S, TOMBO no.5100 fine flecks bulk, Superwool 607がアスベスト並み、Attagel 40, NYAD 1250も有意に高かった。なお陽性対照のアスベスト3種に差は見られなかった。

以上の結果より、アスベスト代替物の*in vitro*における酸化ストレス惹起能は、総体として、陽性対照のアスベストより弱いと考えられ、その活性に繊維のFenton反応促進能が関与していると思われる。また、*in vivo*における酸化ス

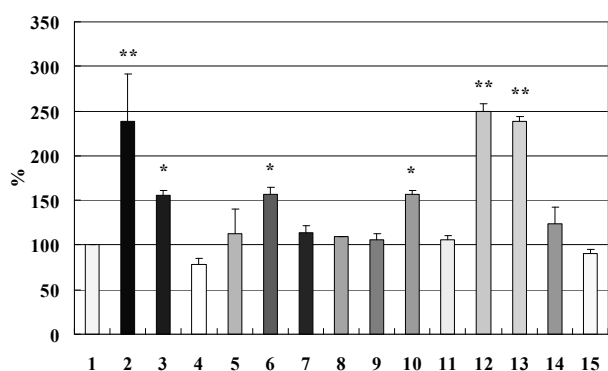


図1. ヒドロキシラジカルの生成（Fenton 反応）。

水（1）；クロシドライト（2）；アモサイト（3）；クリソタイル（4）；Attagel 40（5）；Attagel 350（6）；Nyglos 5（7）；NYAD 400（8）；NYAD 1250（9）；Rockwool 42S（10）；Superwool 607（11）；SC Bulk 1260（12）；TOMBO no.5100 fine flecks bulk（13）；カオリン（14）；タルク（15）

(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

トレス惹起能は、SC bulk 1260のようにアスベストと同等のものもあったが、全体的には、陽性対照のアスベストより弱く、その活性には繊維による好中球やマクロファージ動員能が関与していることが推測された。炎症惹起能においては、代替物に、アスベストより高いものや同等のものも存在したが、今回観察しているのは急性炎症なので、発癌性など慢性的疾患の評価には、繊維の体内停滞性と慢性炎症というもう一つの因子が関与するので、今回の結果のみで、その危険度を結論づけることは出来ない¹⁾。

文 献

- 1) 高橋 省, 坂本義光, 大橋則雄, 他: *J. Toxicol. Sci.* 34(supl.), S166, 2009 (第36回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集)

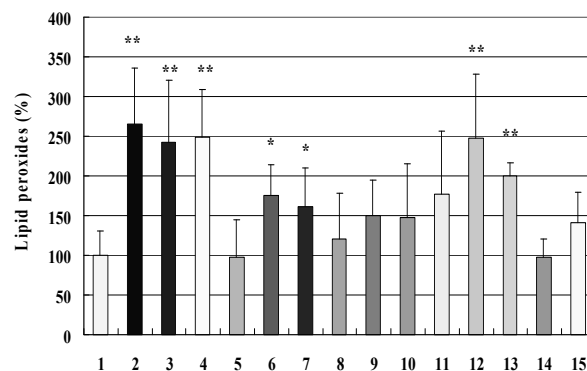


図2. 腹腔洗浄液中の相対過酸化脂質量。

生理食塩水投与対照群(1)；クロシドライト投与群(2)アモサイト投与群(3)；クリソタイル投与群(4)；Attagel 40投与群(5)；Attagel 350投与群(6)；Nyglos 5投与群(7)；NYAD 400投与群(8)；NYAD 1250投与群(9)；Rockwool 42S(10)投与群；Superwool 607投与群(11)；SC Bulk 1260投与群(12)；TOMBO no.5100 fine flecks bulk投与群(13)；カオリン投与群(14)；タルク投与群(15)。

(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

9 アスベスト代替物の培養細胞に対する影響

はじめに

現在, WHO では代替物の生体影響情報の収集を行い, 代替物の安全性を評価しようとしている¹⁾. 代替物の変異原性を調べることにより発がんリスク評価のための情報を提供することができる. そこで変異原性試験のひとつである培養細胞を用いた小核試験を実施した.

今回はチャイニーズハムスター肺由来細胞である V79 を用いた. V79 細胞は, クリソタイルによって小核が誘発されることが Lu ら²⁾により報告されていることから, この細胞を用いることにより代替物の遺伝毒性をアスベストと比較して評価することができる. 以下は, 代替物の中で天然鉱物繊維の 5 品目及び人工鉱物繊維の 1 品目について V79 の 1 クローンである V79-4 細胞を用いて小核試験を実施した. なお詳細は既報 3,4)に報告されている.

実験方法

培地は, Earle's MEM にウシ胎仔血清を 10%の濃度で添加したものを用いた. 細胞は, チャイニーズハムスター肺由来細胞である V79 の 1 クローンである V79-4 を ATCC より購入して用いた. 小核試験は, 細胞を直径 35 mm の小型シャーレまたは同直径の 6 well プレートに播種し, 37°C, CO₂ 5%の条件で 24 時間培養した. これに試料溶液を添加し, 48 時間の培養後, 標本を作製した. 少量の培地で細胞懸濁液を作成し, 一部をスライドガラスに塗沫冷風乾燥した. 細胞はメタノール固定後ギムザ染色を行った. 細胞数は, 細胞懸濁液に Cell Counting KIT-8 (和光純薬) を添加し, 3 時間後に 450 nm で吸光度を測定し求めた. 小核及び多核細胞は, 2000 細胞あたりの出現数を求め, χ^2 検定により有意性の検討を行った.

結果及び考察

小核試験の結果は, 100 $\mu\text{g/mL}$ の値を Table1 に示す. 陽性対照のアスベストでは, 3 種類とも小核の有意な増加が見られ, 100 $\mu\text{g/mL}$ にて対照群の 10-40 倍の出現を見た. 代替物で小核細胞の有意な増加が見られたものは, アタパルジャイトの Atagel 350 で対照群の約 3 倍に達し, ワラストナイトでは, NYGLOS 5 で対照群の 4 倍以上であった. チタン酸カリウムウィスカーでは対照群の約 18 倍であった.

今回の試験では, 同型の核を 2 個以上含む多核細胞が対照群でも見られたが, 使用した全てのアスベスト及び代替物の投与により増加した.

細胞増殖率については, いずれの化合物でも増殖の抑制が見られた. 増殖抑制効果が最も強かったのがクリソタイルであり, 続いてアタパルジャイト>クロシドライト≒アモサイト>チタン酸カリウムウィスカー>ワラストナイトの順であった.

代替物では, アタパルジャイトの Atagel 350 及びワラス

トナイトの NYGLOS 5 で小核細胞数が有意に増加した. しかし, この増加数は 3 種類のアスベストに比べて 100 $\mu\text{g/mL}$ においてもかなり少なくアスベストが 10 $\mu\text{g/mL}$ から有意であること^{3,4)}と比較すると, アスベストの 1/5 から 1/10 の比較的弱い作用であると考えられる. チタン酸カリウムウィスカーの V79-4 細胞に対する小核誘発性は, アスベストに比較してほぼ同程度であり, 特にクロシドライト及びアモサイトの出現傾向に類似していた. これはチタン酸カリウムウィスカーがアスベストと同程度の変異原性を有している可能性があることを示している.

Table1. Micronucleus Test of Asbestos and Asbestos Substitutes

	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	MN ¹⁾	PN ¹⁾	Growth (%)
Attapulgit				
Atagel 40	0	6	17	100
	100	7	71***	52
Atagel 350	0	6	17	100
	100	17*	50***	53
Wollastonite				
NYGLOS 5	0	5	11	100
	100	22**	82***	91
NYAD 400	0	7	28	100
	100	10	69***	89
NYAD 1250	0	7	28	100
	100	9	51**	82
MMMF				
Potassium Titanate whisker	0	4	11	100
	100	74***	496***	79
Asbestos				
Amosite	0	5	11	100
	100	83***	485***	61
Crocidolite	0	7	15	100
	100	72***	363***	63
Chrysotile	0	5	11	100
	100	183***	409***	34

1) : MN: Micronucleated cells, PN: Polynucleated cells.

The number of cells per 2000 cells.

* : χ^2 -test $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

文 献

- 1) WHO: WHO Workshop Mechanisms of Fibre Carcinogenesis and Assessment of Chrysotile Asbestos Substitutes, 2005, IARC, Lyon.
- 2) Lu, J., Keane, M.J., Ong, T. and Wallace, W.E.: Mutation Res, **320**: 253-259, 1994.
- 3) 藤田博, 小縣昭夫, 上原眞一: 東京健安研セ年報, **58**, 299-301, 2007.

- 4) 藤田博, 大橋則雄, 小縣昭夫: 東京健安研セ年報, 59, 335-337, 2008.

まとめ

平成18年度から3年に及ぶ健康安全研究センターの重点研究プロジェクトのひとつとして実施した以下に示す計9課題の調査研究における結果の概要は次のとおりであった.

1. 電子顕微鏡分析法によるアスベスト分析の半定量化と建材試料への応用の検討

検査の精度向上と迅速化, 及びアスベスト含有率の半定量化により既存機器である電子顕微鏡の有効利用が図れた.

2. アスベストのX線回折分析法の高感度化に関する研究

建材(スレート板)に含有されるアスベストを一定の処理条件下で精度良く簡素化した定量できる方法を確立できた.

3. アスベスト及びその代替物の物理化学的分別に関する研究

アスベスト中の金属など含有成分の特徴を利用した迅速で簡便かつ高精度なスクリーニング法を確立でき, 市販品の判別キット有効性を評価した.

4. 空調ダクトの堆積塵及び浮遊塵中のアスベスト及び代替物の検出法の開発と飛散量測定に関する研究

開発した迅速測定法による実態調査から, 外気濃度に比較して高い結果のものがあった.

5. タルカムパウダー中のアスベスト分析法の検討

X線回折法を高感度化した方法により, タルク配合の化

粧品について調査を行い, アスベストが検出されないことを確認した.

6. アスベスト曝露による腫瘍発生を抑制する因子の研究

エピカテキンは, 培養細胞のクロシドライトによる活性酸素発生の抑制と, 8-OHdG産生の減少効果があり, その経口摂取によってクロシドライト気管内注入ラットの肉芽腫発生数を減少させた.

7. アスベスト代替物の生体影響評価のための病理組織学的検討

代替物のラット陰嚢腔内投与により, 漿膜における炎症性細胞の浸潤, 肉芽腫形成やリンパ節への繊維の蓄積等の繊維の体内分布を認めた.

8. アスベスト代替物による肺傷害の危険度比較及びその他の臓器への生体影響に関する研究

代替物は, 酸化ストレス及び細胞膜傷害についてアスベストより概ね弱く, *in vivo*における炎症惹起能はアスベストより高いものと同等のものがあった.

9. アスベスト代替物の培養細胞に対する影響

V79-4細胞に対する小核誘発性は, 代替物であるアタパルジャイト1品目及びワラストナイト1品目ではアスベストよりは弱く, チタン酸カリウムウィスカーではアスベストと同程度であった.

これらの結果を踏まえ, アスベストと同じ結果をもたらすのではないかと危惧されるカーボンナノチューブをはじめとするナノ材料の生体影響など, 新たな課題へと展開していくことが必要である.

Research Project on Efficient Testing Methods for Asbestos and Biological Adverse Effects of Asbestos Substitutes

Masayuki KURITA*, Tomoko OKUBO*, Ikue SAITO*, Fumio KANO*, Yoshiaki NAKAMURA*,
Ken-ichi OHYAMA*, Yoshimitsu SAKAMOTO*, Osamu TAKAHASHI*, Hiroshi FUJITA* and Akio OGATA*

The Tokyo Metropolitan Institute of Public Health typically conducts relevant scientific research projects on the health effects of chemicals and microbes from food, drugs, water, and air. Herein, we summarize the results of our project, conducted from fiscal year 2006 to 2008, on efficient asbestos testing methods and biological adverse effects of asbestos substitutes.

The project consisted of 9 studies performed independently and is described below.

1. Semiquantitative measurement of asbestos in bulk building materials using transmission electron microscopy

A transmission electron microscope (TEM) is useful system to identify asbestos in building materials, although several hours are required to prepare an asbestos specimen. The purpose of this study was to reduce the asbestos sample preparation time and to semiquantitatively determine the asbestos mass percentage in bulk materials using TEM and image analysis. We dispersed building materials crushed with a ball mill into isopropyl alcohol instead of pure water, and adopted alcohol immersion for TEM specimen preparation. This procedure shortened the required length of time to begin an asbestos fiber observation by about one-fourth, and provided TEM images of asbestos fibers spread uniformly over the TEM field of view. The accumulated optical density value acquired through TEM image analysis was compared with the asbestos mass percentage measured by X-ray diffraction from the same sample. Data set analysis of amosite in building material indicated a positive linear relationship between optical density and mass percentage. TEM is useful in determining the presence of asbestos in bulk building materials.

2. High-sensitivity quantitative analysis of asbestos in slate boards by X-ray diffraction

A high-sensitivity method to quantitate asbestos in slate boards was developed using X-ray diffraction. The crushing and treatment conditions of slate board were modified, and the amount of asbestos in slate board and the rate of slate board residue were examined. Optimum slate board crushing conditions were determined to be 50 mg of slate board crushing for 90 s, 25 times/s, dispersion for 1 min by ultrasonication, shaking for 1 min, and incubation for 11 min in 6.7% formic acid at 30°C. This method is simpler than the JIS method.

3. Asbestos separation and content measurement in building materials on the basis of metal analysis

An efficient asbestos separation from building materials and asbestos content measurements based on metal analysis were developed. When formic acid and acetic acid were used for building material pre-treatment, more than 99% of the cement was removed from the samples. Separated asbestos was then treated with hydrofluoric acid and hydrochloric acid to dissolve metals. Metals such as sodium and magnesium were analyzed by ion chromatography, whereas iron was analyzed by an *o*-phenanthroline method. From the ratio of sodium, magnesium, and iron concentrations, the asbestos type present in the sample was identifiable. The detection limits of asbestos content in building materials by this method were 0.05% for chrysotile (based on magnesium content) and 0.25% for crocidolite and amosite (based on iron content). When building materials were analyzed for metal weight using this method, the asbestos type and content were similar to results obtained by X-ray diffraction analysis.

4. Methods to detect settled and airborne asbestos or surrogate fiber concentrations

Rapid detection methods for settled and airborne asbestos fibers are presented. In the sampling data of airborne asbestos fibers in 17 buildings in Tokyo, the airborne asbestos fiber concentration in indoor air was higher than that in outdoor air. Indoor air concentration correlated with the building construction year.

5. Examination of asbestos analysis in talcum powder

A method to detect low-level asbestos in cosmetics containing talcum powder was investigated using an X-ray diffraction device equipped with a semiconductor array detector. Tremolite and chrysotile detection limits were 0.1 and 0.2%, respectively. Of 36 investigated cosmetics, including commercially available talcum powders and eye shadows, neither tremolite nor chrysotile was detected.

6. Effects of polyphenol on tumorigenesis induced by crocidolite *in vitro* and *in vivo*

The effects of 6 polyphenols, epicatechin, epigallocatechin gallate, curcumin, capsaicin, daidzein, and genistein, on active oxygen release in cultured macrophages (J774.1) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) formation in cultured human mesothelial cells (Met-5A), induced by crocidolite, were investigated. Moreover, the effect of epicatechin on tumorigenesis resulting from crocidolite was studied in male rats. Epicatechin, epigallocatechin, gallate, or curcumin remarkably decreased crocidolite-induced macrophage active oxygen release. Epicatechin or capsaicin remarkably decreased 8-OHdG formation in Met-5A cells induced by crocidolite. Oral administration of epicatechin dissolved in water (1 mg/day/rat) for 1 year slightly decreased 8-OHdG formation and incidence of

granulomas caused by crocidolite in the lung. Rats had free access to drinking water. It seems that epicatechin intake reduced lung irritation and injury caused by crocidolite exposure.

7. Assessment of asbestos substitutes by histopathological examination

Asbestos fibers target the mesothelium, resulting in toxic and carcinogenic effects. Asbestos substitutes have some physical similarities to asbestos. To investigate early mesothelial reactions due to asbestos-substitute fibers, we administered asbestos-substitute fibers, ceramic fibers (CF), rock wool (RW), wollastonite (WN), and potassium titan whiskers (TW) into the rat scrotal cavity.

Male Fischer 344 rat mesotheliomas spontaneously develop from the tunica vaginalis adhering to the epididymis or testis tunica albuginea, with specific chemical induction in the scrotum. We expected that the bursal and small space of the scrotal cavity disturbs test chemical diffusion and retains chemicals at relatively high levels for a considerable period, thereby causing efficient exposure in this region.

Asbestos-substitute fibers were suspended in 2% carboxymethyl cellulose solution and injected into the rat scrotal cavity at the doses of 150 mg/kg CF and RW, 10 mg/kg in WN, 2 mg/kg in TW, and 2 mg/kg in crocidolite (CR), which served as a positive control. Rats were sacrificed at 7 days, 28 days, and 52 weeks after a single injection. On days 7 and 28 post-injection, aggregation of inflammatory cells, such as macrophages, on the mesothelium surface and granuloma formation contained fibers in submesothelial connective tissue for all asbestos substitute groups and the crocidolite group. At 52 weeks post-injection, inflammatory cells in the scrotal cavity were cleared, and only granulomas with fibers were observed. Observed granulomas were reduced in size, and the fibrous granuloma component was increased relative to those on days 7 and 28. Mesothelial proliferative lesions were not observed in the asbestos substitute groups or the CR group.

8. Lung injury risks of asbestos alternatives

Crocidolite asbestos, SC Bulk 1260, and TOMBO no. 5100 fine flecks bulk represent the high catalytic activities in the Fenton reaction system, and such activities of amosite asbestos, Attagel 350, and Rockwool 42S were less, but significantly higher, than the control. Hydrogen peroxide release was observed after murine peritoneal macrophage contact with crocidolite, amosite, chrysotile, and NYAD 400. Lipid peroxide generation from erythrocytes, peritoneal macrophages, and mesothelial cells was consistently high after crocidolite asbestos exposure. Lipid peroxidation activity of substitutes is organ-dependent. Peritoneal lavage fluid was collected 2 days after single intraperitoneal administration of fibers to mice. Lipid peroxide levels in these fluids, from the highest to lowest, were crocidolite, amosite, chrysotile, SC Bulk 1260, TOMBO no.5100 fine flecks bulk, Attagel 350, and Nyglos 5. In conclusion, lung injury risks of substitutes may be lower than asbestos.

9. Micronucleus test of asbestos substitutes in Chinese hamster lung V79-4 cells

Chinese hamster lung V79-4 cells are sensitive to the micronucleus inducibility of asbestos. Attapulgit (2 samples) and wollastonite (3 samples), natural mineral fibers, potassium titanate whisker, a man-made mineral fiber, are used as asbestos substitutes; thus, these materials were tested for their ability to induce micronucleated cells in V79-4 cells. Micronucleated cells significantly increased in 1 attapulgit sample, 1 wollastonite sample, and the potassium titanate whisker sample.

Keywords: asbestos, asbestos substitute, testing method, biological effect, research project, building material, crocidolite, amosite, chrysotile, tremolite, electron microscopy, X-ray diffraction device, ion chromatography, metal, talc, phase contrast microscopy, indoor air, polyphenol, epicatechin, macrophage, cultured cell, reactive oxygen species, 8-OHdG, scrotal cavity, rockwool, wollastonite, potassium titanate whisker, histopathology, granuloma, Fenton reaction, lipid peroxide, Chinese hamster lung V79-4 cell, micronucleus

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan