

繊維の生体溶解性評価方法

浜松研究所 RD部門 北原英樹

昨今の環境問題に対する意識の高まりを受け、欧州では既に無機繊維の使用に関する規制が整備されてきている。繊維の生体に対する評価を行うには適切な動物実験による確認が基本となるが、今回、疑似生体液が常に供給される形式で繊維の溶解試験を実施し、その後のラットを用いた動物実験を通してその評価試験の有効性が検証できた。

1. 緒言

従来より無機繊維は耐熱断熱性能に優れることから、工業炉、建築物をはじめとする各種構造物の断熱部位に広く使用されている。

一方で、この無機繊維は、製造や保管、運搬、あるいは施工に際してその一部が空中に浮遊し、この浮遊無機繊維の一部が呼吸により人体に入り込むことがある。一般に異物（繊維）を吸入した場合の体内からの排除メカニズムに関しては、以下のような知見がある。吸入された繊維は気道を通して、大きなものは鼻腔や口腔に捕らえられ、鼻汁や唾液と共に体外へ出されたり、胃などの消化器官系に飲み込まれる。鼻腔や口腔を通り抜けて奥に入った繊維は気管・気管支に沈着する。気管・気管支には線毛があり、気道粘液と一緒に線毛運動により喉頭へと運ばれ、消化器系に飲み込まれたり、痰として外に排出される。さらに小さい繊維は肺の奥へと運ばれ、その一部が肺胞（空気と血液の間で酸素や二酸化炭素のガス交換を行う風船状の部分）に沈着する。ここには線毛は無く、肺胞マクロファージ（食細胞）というアメーバのように動き回る細胞が繊維を取り囲み、線毛のある場所迄運んだり、リンパ液・リンパ管を経て肺胞表面から取り除く仕組みになっている。

しかし、異物の取り囲みにより肺胞マクロファージが刺激を受けたり、損傷を受けることもあり、それにより蛋白質分解酵素やコラーゲン繊維分解酵素が細胞から出て、これらの酵素の量が多くなると肺胞細胞が炎症を起こしたり、コラーゲン化を呈するようになる。炎症を起こした細胞は抵抗力が弱まっており、細胞内の核の中にあるDNAが損傷されやすくなるとともに、細胞の破壊と再生過程とが頻繁になり、異常細胞が出現する機会が多くなる結果、DNA細胞の変質や癌細胞が誘発されることがある。よって、この繊維の生体内への影響を抑えるためには、肺胞内に沈着する繊維若しくは肺胞マクロファージに取り囲まれる繊維を、それまでの過程で生体内へ溶解させる事が重要である。

繊維の各成分が生体内に溶解する事での影響に関しては、繊維の主要な成分は SiO_2 、 CaO 、 MgO 、 Al_2O_3 であり、これらがイオンとして溶解する事を考慮しなければならない。この内、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} については、種々酵素の構成要素であり生命活動に必要な金属イオンである。また、Alは Al^{3+} として細胞内に入り込めばリン酸イオンの正常な生理的機能を阻害する毒素として働くと考えられているが、生体内のpH領域に於いてAlは殆ど $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ の形で溶けており、リン酸イオンと

結合しにくく、また、Siがある事でアルミノ珪酸塩を生成し、Alの排出を助けているといわれている。即ち、繊維構成成分が溶解する事では生体内に悪影響は無いと捉える事ができる。

現在、世界的な環境意識の高まりにより、無機繊維が生体内に及ぼす影響を、in-vitro的（生体外での評価）、in-vivo的（生体内での評価）、疫学的な見地等より盛んに研究されており、また、欧州では後述するようにこの動きを受けて、1999年に人造鉱物繊維の使用に関する明確な規制区分を法制化した。

今回、その一環として、動物実験の代替となるin-vitroでの試験方法を構築し、その後のラットを用いた動物実験に於いて、該試験方法の正当性を見極める事ができたので、以下にその概要について報告する。

2. 欧州に於ける規制化区分と評価項目

表1に現在施行されている、EUにおける規制化区分を示す（EU指令97/69/EC）。

表1に示すように、欧州では繊維をカテゴリ別に4段階に区分けし、カテゴリ1の繊維は使用禁止、カテゴリ2、3の繊維製品については、梱包ケースに所定のラベル表示が義務づけられている。

これを回避するにはカテゴリ0（適用除外繊維）の認定を取得せねばならず、これは別途定めるプロトコル（試験規定）に沿った動物実験を受験し合格する必要がある。表2に欧州での動物実験プロトコルを示す。

表2に示すように、動物実験は繊維の溶解性に関する項目と発癌性に関する項目に大別され、合計4種類の基準があり、カテゴリ0の認定を取得するには、この内1種類の試験に合格すれば良いとされている。現在、海外では実際に数種類の生体溶解性繊維が上市されているが、これら繊維は主に繊維の溶解性に関する項目で合格している。

動物実験代替となるin-vitroでの試験方法を検討する場合、上記③、④は実施する事ができず、必然的に①、②の溶解性での項目に限定される。よって、繊維を疑似生体液内でどの程度溶解する

表1 欧州に於ける規制化状況

区分	内容	繊維例	備考
カテゴリ-1	発癌性有り	石綿	指定物質
カテゴリ-2	恐らく発癌性有り	RCF	繊維組成での区分*
カテゴリ-3	発癌の可能性有り	RW, GW, SW	
カテゴリ-0	発癌性無し	生体溶解性繊維	動物実験での証明

*繊維組成はKNB値（繊維中Na₂O、K₂O、MgO、CaO、BaO）の合計値であり、この値が18未満ではカテゴリ-2、18以上ではカテゴリ-3に区分される。

表2 動物実験プロトコルと認定基準

項目	規定内容
繊維の溶解性に関する試験	①短期吸入試験による生体内滞留試験で20μmより長い繊維が10日未満の荷重半減期となる。 ②気管内注入による短期の生体内滞留試験で20μmより長い繊維が40日未満の荷重半減期となる。
発癌性に関する試験	③腹腔内投与試験で過大な発癌性の証拠が無い事が確認できる。 ④長期吸入試験で、関連ある病原性変化若しくは腫瘍性変化が無い事が確認できる。

のかに主眼を置いた試験方法を検討した。

3. 生体溶解性評価試験

3.1 振盪試験

種々物質の溶解量を評価する一般的な試験方法として、疑似生体液への繊維の溶解度（全繊維量に対する溶解量の割合）を測定した。

(1) 試験方法

繊維を200メッシュアンダーとなる迄粉碎したものを試料とし、約1gを精秤した後300mlの活栓付き三角フラスコに入れる。そこに疑似生体液（生理食塩水）150mlを加え該三角フラスコを水平振盪器（YAMATO製BT-47）内に設置した。その後、液温を40℃に保持したまま毎分120回の水平振盪を1、3、5、10、24、50時間継続して与え疑似生体液内に繊維を溶解させた。振盪後、それぞれの溶出液を濾過して、その濾液についての含有元素量をICP発光分析装置により定量化し、元試料の組成・重量より溶解度を求めた。以下、

本試験方法を振盪試験と記述する。

表3に今回用いた疑似生体液（生理食塩水）の組成を示す。

(2) 試験繊維

表4に振盪試験に供した繊維の組成を示す。

また、これらの繊維は動物実験でカテゴリ-0に区分されている。

(3) 試験結果

図1に試験結果を示す。

図1に示すように、溶解度は試験時間の経過と共に収束していく傾向となった。これは、繊維溶解過程における溶解生成物の蓄積により溶液自体が飽和（平衡）状態になるためと考えられる。

即ち、溶解過程で生成したOH⁻が溶液のpHを増加させ、溶解生成物は溶液の飽和濃度近く迄蓄積され、結果的に溶解の速度を低下させる方向に働くと捉える事ができる。実際に生じる生体内での繊維の溶解挙動を鑑みると、肺の奥深くに吸入された繊維は、肺内に分散して血流から切り離さ

表3 疑似生体液組成（水1リットルに対する添加量）

成分	添加量 (g)
塩化ナトリウム	6.78
炭酸水素ナトリウム	2.27
塩化アンモニウム	0.54
グリシン	0.45
燐酸二水素ナトリウム	0.18
クエン酸ナトリウム	0.06
塩化カルシウム	0.02
硫酸	0.14
ホルマリン	1ml
溶液pH	7.40

表4 振盪試験繊維組成（単位：mass %）

成分	繊維A	繊維B
SiO ₂	66.6	77.7
CaO	20.1	0.3
MgO	12.7	18.9
Al ₂ O ₃	0.4	2.2
Fe ₂ O ₃	0.1	0.6

れ、小さなイオンが拡散できるサブミクロンオーダーの薄さを有する生体膜組織に取り入れられるために、このような状況は起こり得ない。以上より、一般的な溶解度を測定する方法では、生体内で起こり得ない状況になっており、新たな試験方法を構築する必要があると判断された。

3.2 滴下試験

振盪試験では、繊維の溶解過程における反応生成物が蓄積する事の影響を大きく受ける事が確認でき、対策として溶液が常に新たに補充される形（フロータイプ）での試験実施により、この影響を抑える事ができ、繊維の溶解速度が大きのまま維持できると考えられる。よって、繊維上に疑似生体液を滴下し、繊維中に前期疑似生体液が通過する過程に於いて繊維の溶解が起こり、通過した溶出液を分析する事によって溶解度及び溶解速度が算出できる。以下、本試験方法を滴下試験を記述する。

(1) 試験方法

図2に滴下試験測定装置の概要図を示す。

上図に示すように、濾紙上に繊維を置き、繊維上にマイクロポンプより注射針を經由した所定量の生理食塩水を滴下させて、繊維、濾紙を通った濾液をタンク内に溜める。溜めた濾液については、24時間毎に取り出して濾液中の含有元素をICP発光分析装置により定量化し、元試料の組成・重量より溶解度を、また、後述するように繊維径、繊維密度の値より単位時間・単位表面積当たりの溶解度、即ち溶解速度定数を算出した。尚、試験は

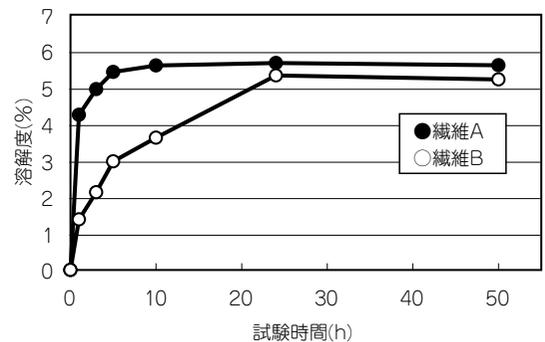


図1 振盪試験結果

4日間連続して行った。

また、試験に供した繊維は、目開き45μmの篩により粒子を取り除き約0.1g精秤したものをいい、疑似生体液の滴下量は0.3ml/minとした。

(2) 試験繊維

表5に滴下試験に供した繊維の組成を示す。尚、前述の振盪試験を行っている繊維A, Bについても同時に本試験を実施した。

(3) 溶解度測定結果

前記のように、滴下試験は振盪試験で観られた溶解生成物の蓄積による溶液自体が飽和（平衡）状態になる事を避ける目的で実施したもので、溶解量の時系列変化が重要となる。即ち、常に新たな疑似生体液が供給されるので、そこでは平衡状態は起こり得ず、時間の経過と共に溶解量は増加しなければならない。よって、この溶解量の測定による検証を行った。図3に溶解量の測定結果を溶解度として示す。

上図に示すように、時間の経過と共に溶解度は増加しており、これは、図1に示したような振盪試験で観られた溶解生成物の蓄積による平衡状態は生じておらず、生体内に取り込まれた繊維は常に新たな生体液と接触しうる実際の状況を良く模擬しているものと判断する事ができる。

(4) 繊維の溶解性の評価

次に、繊維の溶解性を評価するために、溶解速度定数の考え方を導入した。これは、繊維の溶解性に関する欧米の研究者間での共同研究結果として提示された考え方であり、溶解性に大きな影響を及ぼす繊維表面積の寄与分を考慮して溶解性を

表5 滴下試験繊維組成（単位：mass %）

成分	繊維C	繊維D	繊維E	繊維F
SiO ₂	64.4	25.6	3.5	生体溶解性繊維の一例
CaO	31.2	0.0	0.0	
MgO	3.3	0.0	0.0	
Al ₂ O ₃	0.6	74.3	96.4	
Fe ₂ O ₃	0.3	0.0	0.0	

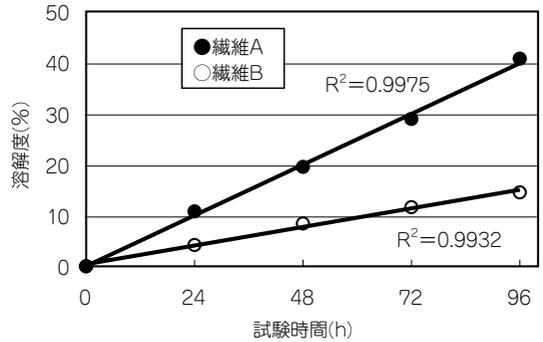


図3 滴下試験結果

評価するものである。

即ち、繊維の溶解反応量は繊維表面積にAに依存しており、繊維質量をMとすると溶解速度定数kは以下の微分式で示される。

$$dM/dt = -kA \dots\dots\dots(1)$$

繊維の初期質量をM₀、初期繊維径をD₀、繊維密度をρすると、(1)式は以下に示す(2)式と等価である（時間t経過後）。

$$1 - (M/M_0)^{1/2} = 2 \times kt/D_0 \cdot \rho \dots\dots\dots(2)$$

(1)式から(2)式への変換は、繊維の溶解に於いては繊維長には変化が無く一定に保たれ、繊維径が均一に細くなる事により生じるとした仮定を設ける事により導出できる（繊維密度ρは溶解前後で一定）。

この考え方を参考にして、繊維表面積の影響を考慮した溶解度である溶解速度定数k（単位：ng/cm²・h）を以下の手順により算出した。

- ①対象繊維の繊維径を300本以上測定する。
- ②図2に示した装置を用い、滴下試験を4日間

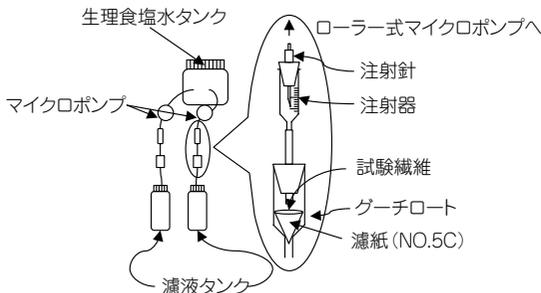


図2 滴下試験装置概要図

実施する。

- ③24h毎の溶出量をICPにより定量化し、繊維の質量減少量を求める。
- ④①で測定した繊維1本毎に上記(2)式を当てはめ、③の測定結果との連立式を組み立て、これを解く事により溶解速度定数kを算出する。尚、繊維密度 ρ の値は、アッペンの式により繊維組成から求めた値を採用した。

(5) 溶解速度定数測定結果

図4に溶解速度定数測定結果の一例として、繊維A及びBについての測定結果を示す。

上図に示すように、測定値はほぼ一定の値を示しており、4日間(96時間)の平均値をその繊維の溶解速度定数として評価した。

表6及び図5に今回測定した7種類の繊維についての溶解速度定数を比較して示す。

上記比較結果から確認できるように、繊維A～Cの溶解速度定数は、一般的に生体溶解性が無いと位置付けられている繊維D、Eに比べ、50～数百倍程度の溶解速度定数を有しており、本滴下試験に於いてその事が裏付けられた。

よって、本滴下試験は生体溶解性を評価する手法と成り得る可能性がある事が確認できた。ここで注意しなければならないことは、溶解性がないあるいは小さいからといって前述のカテゴリー0に区分されないとはいえないことである。表2に示すように発ガン性に関する試験で③あるいは④に該当すればカテゴリー0に区分されることになる。

4. 動物実験による検証

上記検討により、滴下試験は繊維が生体内に取り込まれた際の溶解状況を模擬できる試験と判断する事はできるが、あくまでin-vitro試験であるため、これを実証するには動物実験での検証試験が必要である。

よって、滴下試験に於いて溶解速度定数に差がある繊維Bと繊維Fについて、人造鉱物繊維等各種物質の生体内での毒性評価試験に実績のある、産業医科大学産業生態科学研究所に、ラットを用いた動物実験を依頼して溶解度の違いを評価した。

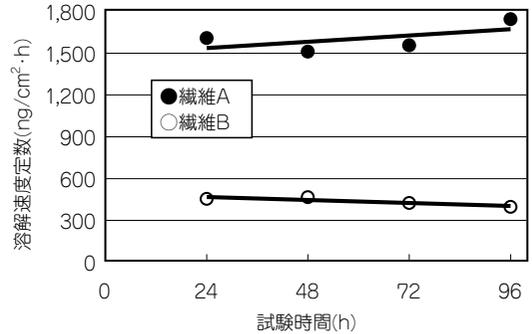


図4 溶解速度定数測定結果

表6 溶解速度定数比較表 (単位: ng/cm²·h)

繊維A	繊維B	繊維C	繊維D	繊維E	繊維F
1,593.3	424.8	972.5	13.3	3.3	870.5

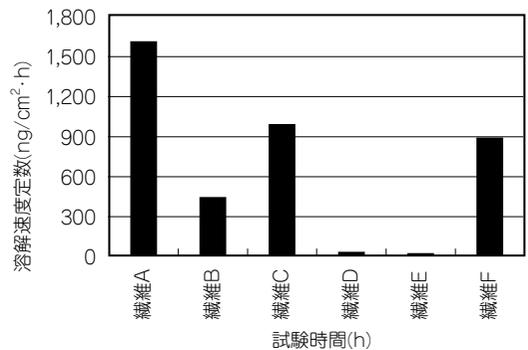


図5 溶解速度定数比較

4.1 実験方法

- ①Wistar系雄性ラット75匹を、25匹ずつ以下の3群に分ける。

- I群: 繊維B注入群
- II群: 繊維F注入群
- III群: 生理食塩水注入群

ラットにエーテル麻酔下で、上記I、II群は生理食塩水の懸濁液として経気道的に肺内注入を行う。注入は1回で、注入量は0.4ml生理食塩水中に2mgとし、III群は生理食塩水のみを注入する。尚、注入した繊維は前記滴下試験と同様に、目聞き45 μ mの篩により粒子を取り除いた繊維とし

た。

- ②ラットは注入後、翌日、3日後、1週間、2週間、4週間後に各群5匹の解剖を行う。
- ③各解剖時に各群の体重、臓器重量を計量した後、図6に示す方法により肺の灰化を行い、ICP発光分析装置を用いて各群のSi量を定量する。
- ④同時点で解剖された、I群及びII群のラットの肺内に存在するSi量から、III群のラットの肺内に存在するSi量の平均値を差し引いた値を、各試験繊維由来によるSi量として肺内に残留している各繊維量を算出する。この値の経時変化を測定し、繊維の荷重半減期を求める。

動物実験に際しては、この他、ラットの体重の計量（週毎）や行動観察・評価も同時に行っているが、ここでは繊維の荷重半減期に焦点を絞って議論を進める。

4.2 実験結果

図7、8に実験結果を示す。

繊維加重半減期の測定は、肺内に存在する繊維量をCとすると、

$$dC/dt = -VC$$

で表記（排出速度が繊維量に比例するとした速度式）でき、変数分離後、初期条件t = 0, C = C₀で上記微分方程式を解くと以下の式となる。

$$C/C_0 = \exp(-Vt)$$

肺内の滞留性の指標となる排泄速度の生物学的半減期 (T_{1/2}) は、上式より以下の式となる。

$$T_{1/2} = 0.693/V$$

図7、8で求めた指数回帰式の傾きを上式に代入すると繊維荷重半減期T_{1/2}が求まる。しかし、図7に示すように繊維Bの場合は、他の測定値と比較して著しく低い値が認められる。これらの測定値を示したラットについては、一定量注入した繊維が肺胞部迄到達しなかった可能性があるとも考えられるので、これらを「異常値」として除外した結果について図9に示す。

繊維Bの荷重半減期は、図7と図9の結果より求まる値の範囲内にあるのが妥当と判断し、荷重

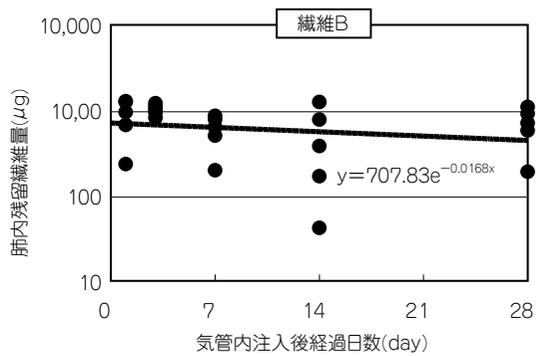


図7 肺内残留繊維量測定結果1

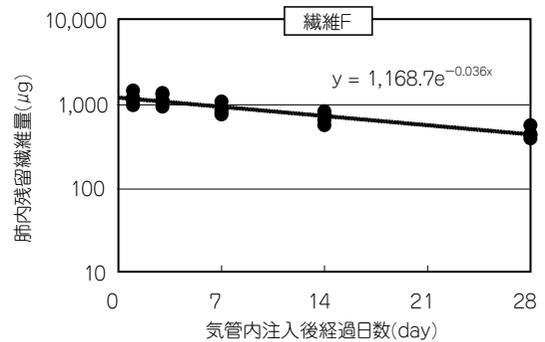


図8 肺内残留繊維量測定結果2

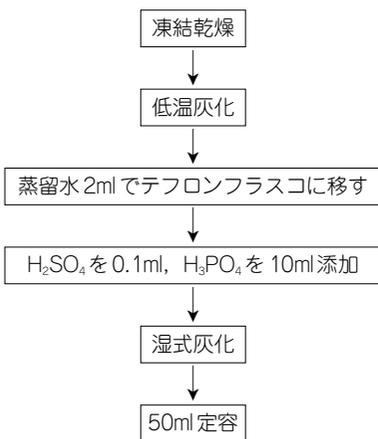


図6 肺内繊維の分解フローチャート

半減期を算出した。

以上の結果より求まる荷重半減期の値を表7に示す。

表7に示すように、繊維Fの荷重半減期の値は繊維Bに比較して半分以下となっており、これは、表6に示した溶解速度定数の測定結果と整合しており、この結果により、滴下試験で測定した結果が動物実験で検証できたと判断することができる。

尚、認定繊維である繊維Bの荷重半減期が表2に示した欧州動物実験プロトコルの基準である40日より長い結果となったのは、試験方法の違いが考えられる。即ち、欧州動物実験プロトコルでは、繊維長が20 μ m以上の繊維がどの程度20 μ m以下になるかで評価するのに対し、本動物実験では、繊維長ではなく繊維重量がどの程度減少したかで評価したものである。そのため、厳密には欧州での動物実験を完全には模擬したものではないが、溶解時に繊維長が短くなれば、当然繊維重量も減少するので、本動物実験でも相対的な評価としては欧州規定の動物実験と同等の結果になると判断できる。

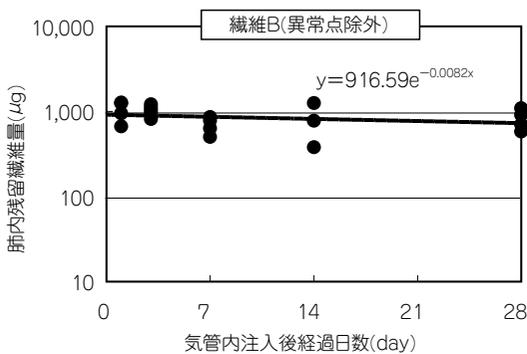


図9 肺内残留繊維量測定結果3

表7 繊維荷重半減期測定結果

繊維B	繊維F
41日～85日	19日

5. 結 言

繊維の生体溶解性を評価する手法として、振盪試験のような一定量の疑似生体液中への繊維の溶解量を測定する手法では、繊維溶解時の溶解蓄積物の生成により平衡状態となり正確な評価ができず、より生体内の状況に近い、常に新たな疑似生体液が供給される滴下試験により、評価が可能である事を示した。また、滴下試験の結果は、産業医科大学に於ける動物実験での検証により、両者は整合性がとれている事が確認できた。

この検討により、期間・費用を要する動物実験に対して、ある程度の見極めが可能となるin-vitroでの試験方法が確立でき、この意義は非常に大きいと考える。

[謝 辞]

本研究を遂行するに際し、動物実験による検証研究について、産業医科大学産業生態科学研究所長田中勇武氏、大藪貴子氏にご協力を頂いた。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 日本石綿協会；THE ASBESTOS (1996)
- 2) Friedrich Pott; Gefahrst Reinhalt Luft Vol.58 (1998) 85-91
- 3) F. Draeger ; Gefahrst Reinhalt Luft Vol.58 (1998) 93-96
- 4) B.K. Zoitos et al. ; "IN VITRO MEASUREMENT OF FIBER DISSOLUTION RATE RELEVANT TO BIOPERSISTENCE AT NEUTRAL pH" (1997)
- 5) 山根正之；はじめてガラスを作る人のために (1989) 90-97

筆者紹介



北原 英樹

浜松研究所 RD部門 (無機材料)
チームリーダー