

CONTIENE I.P.

ISSN 0025-7818

La medicina del lavoro

Sped. abb. post. 45% - art. 2, comma 20041, 66286 - Filiale di Parma - Base postale: Basso Riccione (Parma, Italy)

Volume 90, n. 1

CONTIENE INDICE 1998

Gennaio - Febbraio 1999

Associazione Lombarda di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale
**ESPOSIZIONE AMBIENTALE E OCCUPAZIONALE
A FIBRE VETROSE**

Pavia, 5 novembre 1998

- 3** Introduzione *Introduction* L. Alessio
- 5** Le fibre vetrose artificiali: evoluzione delle conoscenze Man made vitreous fibres: the current state of knowledge G. Chiappino
- 10** Caratteristiche chimico-fisiche e tossicologia delle fibre minerali artificiali Chemical and physical characteristics and toxicology of man-made mineral fibres (MMMFs) V. Fodà, S. Basilico
- 53** Patologia respiratoria da fibre e filato di MMVF Respiratory disease due to MMVF fibres and yarn L. Riboldi, G. Rivolta, M. Barducci, G. Errigo, O. Picchi
- 67** Studio multicentrico IARC sulla patologia neoplastica da fibre minerali artificiali vetrose (MMVF) IARC multicentre study on cancer risk due to exposure to man-made vitreous fibres (MMVF) D. Consonni, I. Bernucci, P.A. Bertazzi
- 84** Esposizione ambientale e occupazionale a fibre vetrose: iniziative della Commissione Europea Environmental and occupational exposure to glass fibres: the initiatives of the European Commission G.A. Aresini
- 88** NOTIZIARIO NOTICES
Endocrine Disruptors: congresso dei Keystone symposia on molecular and cellular biology (A. Baccarelli) - IX Conferenza Internazionale Combined Effects of Environmental Factors ICCEF 2000, 26-29 agosto 2000, Savonlinna, Finland
- 90** Ringraziamenti ai Revisori Scientifici *Acknowledgement of Scientific Reviewers*

CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE E TOSSICOLOGIA DELLE FIBRE MINERALI ARTIFICIALI

V. FOÀ, S. BASILICO*

«Chemical and physical characteristics and toxicology of man-made mineral fibres (MMMFs)». The evidence for the adverse health effects following exposure to asbestos (i.e. fibrogenic and carcinogenic effect) has prompted widespread removal of asbestos-containing materials and led to banning of asbestos internationally (in Italy, DPR 257/1992), resulting in the increased use of substitutes composed of both naturally occurring and synthetic materials, including man made mineral fibres (MMMFs) and man made organic fibres (MMOF). MMMFs represent a family of synthetic, inorganic vitreous substances derived primarily from glass, rock, slag, or clay. MMMFs are further divided into two categories: 1) man made vitreous fibres (MMVFs), further divided as follows: a) fibrous glass, including mainly continuous filament, special purpose fibres; and microfibres. The materials are typically composed of oxides of silicon, calcium, sodium, potassium, aluminum, and boron. b) Mineral wool, including glass wool, rock wool (derived from magma rock) and slag wool (made from molten slag produced in metallurgical processes such as the production of iron, steel, or copper). The main components of rock wool and slag wool are oxides of silicon, calcium, magnesium, aluminum, and iron. 2) Refractory/ceramic fibres, amorphous or partially crystalline materials made from kaolin clay or oxides of aluminum, silicon or other metal oxides (i.e. oxides of zirconium and yttrium). Less commonly, refractory fibres are also made from non-oxide refractory materials such as silicon carbide, silicon nitride, or boron nitride. Industrial production of MMVFs began in the second half of the 19th century, while ceramic fibres production began more recently, in the early 1970s. Major uses of MMMFs include thermal, acoustic and aerospace insulation, fireproofing, reinforcing material in plastics, cement and textile, optic fibres, air and liquid filtration, friction products, refractory coatings. Serious questions have been raised about health implications of MMMFs. Suspicion about the possible occurrence of adverse effects following exposure to MMMFs arises mainly from some similarities of MMVFs with asbestos (fibrous aspects, inhalability, chemical composition, free radical formation). The fibre characteristics that have been identified as crucial in

Dipartimento di Medicina del Lavoro, Clinica del Lavoro "Luigi Devoto", Università degli Studi di Milano, Via San Barnabè 8 - 20122 Milano

* Unità Operativa Ospedaliera di Medicina del Lavoro-CEMOC, Azienda Ospedaliera Istituti Clinici di Perfezionamento, Via Riva Villasanta 11 - 20145 Milano

influencing the pathogenesis of fibre-related adverse respiratory effects can be mainly divided into two groups: fibre dimension, and chemical composition and structure. Fibre dimension plays a determining role in conditioning penetration in the lung. In a broad sense, the term "respirable" means "capable of being carried by breath into the respiratory system". For regulatory purposes, "respirable fibres" (i.e. RFP) are defined in most countries following WHO criteria: length $>5 \mu\text{m}$, diameter $<3 \mu\text{m}$, length/diameter >3 . MMMFs are generally produced as fibres of diameter higher than asbestos, and too large in diameter to be respirable. Moreover, due to the production process, they are structurally amorphous. Since MMMFs have no crystalline domains, they also have no clearly defined structural faults and they fracture transversely, and randomly. Fragments that are too large to be taken up by macrophages can be resolved in the lung by a leaching - or dissolution - process which leads to a progressive reduction of particle length. In contrast, when abraded, asbestos tends to split longitudinally into new, fine, straight fibres: these fibrils are of much smaller diameter, more respirable, and consequently more hazardous than parent fibres. Fibre chemical composition plays a determining role in conditioning the higher or lower biological activity, durability, biopersistence, and biodegradability. The term "biological activity" means reactivity or ability to interact (possibly due to formation of active oxygen species, identified as a crucial step in the mechanism of action) with biological structures and tissues. Fibre "durability" is strictly related to its solubility. It can be defined as the ability to resist attack by biological fluids. Fibre "biopersistence" can be defined as the period of fibre retention in the lung or in other tissues. Biopersistence may be influenced by the number of fibres present, their dimensions, surface characteristics, chemical composition, surface area; it is also dependent on the site and the rate of deposition, as well as on rate of translocation, clearance, dissolution and biomodification of the fibre in the lung. "Biodegradability" refers to the breakdown and/or dissolution of fibres within the lung or other tissues; mechanical, chemical and/or enzymatic factors may be involved. Generally speaking, on the basis of the evidence of both *in vivo* and *in vitro* experimental studies, MMMFs have been demonstrated to be of lower biopersistence and higher biodegradability than asbestos. Base largely on the findings from implantation studies in experimental animals, the World Health Organization in 1987 declared glass wool, rock wool, slag wool, and ceramic fibres to be Group 2B agents, i.e. "agents possibly carcinogenic to humans". Since then, further studies have been performed (both epidemiologic and experimental). According to the evidence obtained, MMMFs appeared less hazardous than asbestos, leading to a more detailed assessment of toxicological properties of these materials. Classification and labelling of hazardous substances are governed by Directives 67/548/EEC, 88/379/EEC, and 93/18/EEC. As far as carcinogenic ability is concerned, MMMFs have been classified as follows: "rock/slag wool, production" is labelled as "T, R49" (toxic, may cause cancer by inhalation); "glass wool, production" is labelled as "Xn, R40" (harmful, possible risks of irreversible effects). More recently, the relevance of fibre dimension, and chemical composition and structure in influencing the pathogenesis of fibre-related respiratory adverse

effects was confirmed by Directive 97/69/EC, adapting to technical progress for the 23rd time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to classification, packaging and labelling of dangerous substances. The new criteria of classification on labelling of MMMFs contained in Directive 97/69/EC (which came into force in Italy by Ministry of Health Decree on September 1st, 1998), can be summarized as follows: mineral wool [Man-made vitreous (silicate) fibres] with random orientation with alkaline oxide and alkali earth oxide content greater than 18% by weight: Xn, R40; Xi, R38; S(2-)36/37; refractory ceramic fibres, special purpose fibres [Man-made vitreous (silicate) fibres] with random orientation with alkaline oxide and alkali earth oxide content less or equal to 18% by weight: T, R49, R38; S53-45. Therefore, the chemical composition of the fibre (i.e. the alkaline oxide and alkali earth oxide content) represents a primary crucial characteristic in determining the toxicological hazard. Moreover, further criteria are introduced by notes "R" and "Q"; note "R" can be applied to different MMMFs (mineral wools, refractory ceramic fibres, special purpose fibres): its application means that the classification as a carcinogen need not apply to fibres with a length weighted geometric mean diameter less than two standard errors greater than 6 µm. The note "Q" can be applied to mineral wools (glass, rock, slag wool); its application means that the classification as a carcinogen need not apply depending on toxicological evidence from *in vivo* studies, such as low biopersistence (fibres longer than 20 µm), and no occurrence of relevant adverse effects, tumorigenic and not, in experimental animals.

Key words: fibre dimension; biological reactivity; durability; biopersistence

INTRODUZIONE

L'utilizzo da parte dell'uomo di una serie di materiali naturali di origine minerale a struttura fibrosa, di tipo microcristallino e di differente composizione chimica, raggruppati sotto la generica denominazione di "amianto" è documentato fin dalle epoche più remote: in Finlandia, vasellame contenente asbesto è stato fatto risalire al 2500 a.C., mentre altri manufatti reperiti in Africa nelle regioni comprese tra Sudan e Kenya sono stati datati al periodo della cosiddetta "età della pietra" (8000-5000 a.C.). In epoche antiche, a partire dalla sua scoperta, la più rimarchevole proprietà dell'amianto - e

che ne aveva principalmente incentivato l'uso - era rappresentata dalla nota resistenza al fuoco ed al calore; la successiva scoperta di altre caratteristiche (resistenza meccanica allo strarimento ed attrito; resistenza all'azione di agenti chimici; potere coibente) ne hanno favorito una crescente diffusione ed un utilizzo sempre più diffuso, fino ad una produzione mondiale nell'ordine di 5.000.000 tonnellate/anno a metà degli anni ottanta. Proprio dagli inizi del XX secolo, tuttavia, il progressivo emergere dei gravi effetti avversi dell'amianto per la salute dell'uomo legati in modo prevalente - ma non esclusivo - all'esposizione professionale a questo materiale (con insorgenza di pneumopatie, pleuro-

patie, tumori) ha dapprima portato alla promulgazione in tutti i paesi di normative internazionali sempre più restrittive in materia di produzione ed utilizzo, per poi entrare in epoca recente alla sua definitiva messa al bando; a livello nazionale italiano, quali dettati legislativi più recenti vanno ricordati il DL 277 del 15.08.91 (capo III) che regolamentava l'esposizione professionale ad amianto, ed il DPR 257 del 27.03.92 che ha sancito la totale abolizione di importazione, commercio ed utilizzo dell'asbesto a partire dal 1994, e dovrebbe consentire in un prossimo futuro l'eliminazione dell'esposizione professionale e non - ad amianto.

Le progressive ingravescenti preoccupazioni per la salute, anche della popolazione generale, legate all'utilizzo dell'amianto hanno dato ampio respiro alla ricerca - e conseguente produzione - di altri materiali fibrosi artificiali in grado sia di vicariare vantaggiosamente l'asbesto nelle sue eccellenti proprietà tecniche e nelle sue differenti applicazioni industriali sia in particolare di non rappresentare un pericolo per la salute dell'uomo. Sembra opportuno ricordare - per inciso - che secondo i criteri di classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), con il termine "fibra" si definisce una particella allungata con rapporto lunghezza/diametro $\geq 3:1$.

Una classificazione generale dei diversi tipi di materiali fibrosi naturali ed artificiali - suddivisi in fibre artificiali minerali (*man made mineral fibers*, MMMF) e fibre artificiali organiche (*man made organic fibers*, MMOF) - è riportata in tabella 1. Come è evidenziato nella classificazione riportata in tabella, le MMMF comprendono a loro volta diversi tipi di materiali fibrosi; tra essi, le fi-

bre di vetro sono riportate quali di uso già in epoche remote, a far tempo dal 2000 a.C. (58); presso gli antichi Egizi queste fibre, quale materiale grezzo, venivano utilizzate a scopo decorativo. Per ciò che attiene ai tempi più recenti, le MMMF sono principalmente utilizzate nella produzione di materiali per l'isolamento termico ed acustico. Tra esse, le fibre vetrose artificiali (*man made vitreous fibers*, MMVF) sono prodotte in Europa dal 1840, mentre il primo impianto per la produzione a livello industriale negli Stati Uniti è entrato in attività nel 1897. La produzione mondiale delle MMVF è stata stimata nel 1985 nell'ordine di 6.000.000 di tonnellate (49). La produzione industriale delle fibre ceramiche data dell'inizio degli anni '70, ed ha visto un progressivo incremento: a metà del decennio successivo, il volume di affari legato alla loro commercializzazione negli USA era riportato quale superiore a 100 milioni di dollari (76).

FIBRE MINERALI ARTIFICIALI: FIBRE VETROSE E FIBRE REFRAITTARIE

Le MMMF sono prodotte tramite la sintesi industriale di minerali naturali e loro composti, come quarzo, ossidi di metalli alcalini ed alcalino-terrosi, ossidi di metalli pesanti, argilla. Le proprietà tecnologiche delle MMMF risultano strettamente legate alle loro caratteristiche chimico-fisiche. A titolo di esempio, la loro composizione chimica condiziona strettamente la resistenza agli acidi; essa è funzione del rapporto tra gli ossidi basici e la somma degli ossidi basici ed anfoteri: tanto maggiore il rapporto, più alta la resi-

stenza. Le proprietà isolanti sono invece funzione del diametro delle fibre, indipendente dalla loro composizione chimica.

Le MMMF sono ottenute tramite un ciclo produttivo che si articola in tre fasi: 1) fusione delle materie prime fino a temperature anche superiori a 1200°C; 2) filatura della massa fusa; 3) dimensionamento o fibraggio mediante trazione, soffiaggio e centrifugazione. Pertanto, le diverse caratteristiche chimico-fisiche del prodotto finale dipendono sia dalla composizione del materiale di partenza che dal processo di fibraggio.

Come indicato in tabella 1, tra le MMMF si annoverano fibre vetrose (*man made vitreous fibers*, MMVF) e fibre refrattarie (*fibres ceramiche*). A titolo di esempio, in tabella 2 è riportata la composizione chimica delle lane minerali (vetro, roccia, scoria) e delle fibre ceramiche (33). Il prospetto sinottico permette una visione comparativa dei differenti materiali; sembra inoltre opportuno precisare che nelle fibre possono essere presenti, in tracce, altri componenti quali per esempio: P_2O_5 , CaS, S, F, MnO.

Le MMVF risultano essere stabili fino ad una temperatura di 800°C, e sono ulteriormente classificabili come di seguito riportato:

— fibre di vetro a filamento continuo: sono prodotte per fusione in filiere e successiva trazione, e il loro diametro è generalmente compreso nell'intervallo 3-25 μm anche se può variare in un intervallo da 1 μm a oltre 100 μm . Il diverso tenore di silice ne condiziona le differenti proprietà tecniche e di conseguenza le applicazioni e gli utilizzi, principalmente in campo tessile, per usi elettrici e quali materiali di rinforzo per plastica e cemento;

— fibre isolanti: sono principalmente prodotte per fibraggio in centrifuga. Sotto questa denominazione sono raggruppati diversi tipi di materiali, quali lana di vetro, lana di scoria (ottenuta da scorie di altoforno) e lana di roccia. Nei periodi più recenti, il tentativo di ridurre la quantità di fibre grezze, responsabili della frequente insorgenza di dermatiti irritative da contatto, ha portato ad una riduzione del diametro medio di queste fibre che risulta essere nell'ordine di 5-12 μm (intervallo 0,5-200 μm), senza aumento della frazione respirabile che è rimasta compresa nell'intervallo 2-50%. Fra le caratteristiche di questi materiali si annoverano una buona resistenza alla trazione, e una bassa resistenza all'impatto ed all'abrasione. In quanto efficaci a varie temperature — in un intervallo che va da -30°C fino a 550°C (lana di vetro) e a 800°C (lana di roccia) — sono largamente utilizzate come isolanti termici. Allo scopo di aumentarne la resistenza chimica, possono essere rivestite con composti organo-metallici o con polimeri ad alta temperatura, oppure con microvermiculite;

— microfibre di vetro: a diametro compreso nell'intervallo 0,05-1 μm , sono principalmente utilizzate per i dispositivi di filtrazione e per alto isolamento termico-acustico.

Le fibre refrattarie (fibre ceramiche) sono silicati di alluminio sintetici, contenenti anche zirconio e boro. Sono a loro volta distinguibili in fibre vetrose (prodotte a temperature inferiori) e fibre prodotte attraverso processi chimici a temperature più elevate. Presentano estrema resistenza alle temperature (con temperature di utilizzo nell'intervallo 700-1800°C), hanno bassa conducibilità termica, elettrica ed acustica e risultano

inattaccabili agli acidi. Al pari di quanto accade per le MMMF, ed in particolare per le fibre vetrose, si tende a produrre fibre refrattarie molto sottili per sfruttarne al massimo le proprietà di isolamento; oltre ad avere un largo impiego come materiale isolante, trovano ampio utilizzo nell'industria aerospaziale.

Tabella 1 - Classificazione dei diversi tipi di fibre naturali ed artificiali

Fibre naturali	Fibre artificiali minerali (<i>man-made mineral fibers</i> , MMMF)	Fibre artificiali organiche (<i>man made organic fibers</i> , MMOF)
Asbesto	Filamento vetroso continuo	Aramidiche
Amosite	Microfibre vetrose	Carboniose
Cemosite	Lana di vetro	Poliolfeniche
Crisotilo	Lana di roccia	Poliestere
Crocidolite	Lana di scoria	Poliacrilonitrile
Atapulgite	Fibre ceramiche	
Erionite	Fibre per scopi speciali	
Wollastonite		

Tabella 2 - Composizione chimica delle lane minerali e delle fibre ceramiche

Composizione chimica (% in peso)	Lana di vetro	Lana di roccia	Lana di scoria	Fibre ceramiche
SiO ₂	34-73	45,5-52,9	40,6-41,0	0-53,9
Al ₂ O ₃	2,0-14,5	6,5-13,4	11,8-12,5	0-95,0
MgO	3,0-5,5	—	—	0-0,5
CaO	5,5-22,0	10,8-30,3	37,5-40,0	0-0,7
FeO	—	1,0-5,8	0,9-1,0	—
B ₂ O ₃	3,5-8,5	—	—	0-14
Na ₂ O	0,5-16,0	2,3-2,5	0,2-1,45	0-0,2
K ₂ O	0,5-3,5	1,0-1,6	0,3-0,4	0-0,1
TiO ₂	0-8,0	0,5-2,0	0,4-0,44	0-1,6
ZrO ₂	0-4,0	—	—	0-92
PbO	0-59,0	—	—	—
F ₂ O ₃	—	0,5-8,2	—	0-0,97
Y ₂ O ₃	—	—	—	0-8

RILEVANZA DELLE PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE DELLE FIBRE MINERALI ARTIFICIALI NEI CONFRONTI DELLE PROPRIETÀ TOSSICOLOGICHE

Le caratteristiche chimico-fisiche delle MMMF, al pari di quanto si registra nei confronti degli altri materiali fibrosi (tanto naturali quanto artificiali), rivestono un'importanza cruciale nel determinismo della loro potenzialità di azione biologica e dei conseguenti effetti tossicologici. Tra le caratteristiche chimico-fisiche di rilievo dal punto di vista tossicologico vanno principalmente annoverate le dimensioni delle fibre - quali lunghezza e diametro, nonché il rapporto tra le 2 grandezze - e le caratteristiche di struttura e composizione chimica. Le diverse caratteristiche risultano in grado di condizionare il comportamento tossicologico delle fibre secondo differenti modalità e tempi di azione. Secondo un assunto a valenza generale, gli aspetti morfologico-dimensionali condizionano in prima istanza la capacità delle fibre di raggiungere e di depositarsi in tratti diversi dell'apparato respiratorio, fino alle porzioni via via più fini e distali, secondo i concetti di "inalabilità" e "respirabilità": ai fini regolamentatori per "fibre respirabili" (*respirable fibre-shaped particulates*, RFP), definibili in senso lato quali "fibre in grado di essere trasportate all'interno dell'apparato respiratorio tramite la respirazione", si intendono particelle fibrose con lunghezza >5 µm, diametro <3 µm e rapporto lunghezza/diametro >3 (16). Ancora, il ruolo della lunghezza delle fibre nei confronti della loro attività biologica è stata indagata a livello sperimentale sia *in vivo* che *in vitro*, e le fi-

bre lunghe sono risultate più tossiche di quelle corte: a titolo di esempio, nel ratto trattato mediante impianto negli spazi pleurici fibre lunghe di asbesto si sono mostrate più cancerogene delle fibre corte (82), mentre fibre vetrose lunghe e sottili hanno mostrato *in vitro* un effetto citotossico simile a quello dell'asbesto (97).

Le caratteristiche strutturali e di composizione chimica risultano invece principalmente importanti nella patogenesi dell'effetto tossicologico: dalla maggiore o minore attività biologica (reattività nei confronti delle strutture biologiche, legata per esempio alla formazione di intermedi ossidanti, oppure interazione con i tessuti) alla maggiore o minore durabilità, biodegradabilità e biopersistenza delle fibre. Sembra opportuno sottolineare che in taluni casi il complesso delle caratteristiche chimico-fisiche risulta importante nel condizionare il comportamento tossicologico: esemplificando, nelle fibre "respirabili" sia la composizione chimica sia la lunghezza possono diminuire l'efficacia dell'azione dei macrofagi alveolari, aumentando conseguentemente il grado di durabilità delle fibre a livello polmonare.

Caratteristiche dimensionali

Regola generale, che vale per tutti i materiali fibrosi sia naturali che artificiali, è che la forma e le dimensioni delle fibre determinano le loro caratteristiche aerodinamiche, condizionandone la profondità di penetrazione e/o deposizione ai diversi livelli dell'apparato respiratorio. La capacità di un particolato di essere trasportato all'interno dell'apparato respiratorio tramite la respirazione, risulta essere principalmente determinata dalle

sue caratteristiche aerodinamiche; generalmente espresse come "diametro aerodinamico equivalente" (*aerodynamic equivalent diameter*, AED) o come "diametro aerodinamico medio di massa" (*mass median aerodynamic diameter*, MMAD). Questi parametri sono determinati sulla base del confronto tra la velocità di sedimentazione in aria di una particella e quella di una particella sferica di diametro noto e densità pari a 1,0 g/cm³; quale parametro grossolano, si può affermare che particelle con AED >100 µm possono raggiungere le porzioni superiori dell'albero respiratorio (naso, gola), mentre particelle con AED <5 µm possono via via raggiungere i tratti inferiori fino all'area degli scambi respiratori (bronchioli, alveoli). Sembra opportuno sottolineare che le dimensioni di una particella possono essere fisicamente anche largamente superiori al suo AED (16). L'AED di una fibra risulta essere principalmente determinato dal diametro, piuttosto che dalla lunghezza. Per fibre con diametro >12 µm per l'uomo, oppure >6 µm per i roditori, generalmente non in grado di raggiungere l'area polmonare deputata agli scambi respiratori, si utilizza il termine "inalabili" piuttosto che "respirabili" (69). Per contro, particelle fibrose dal diametro ≤3 µm, anche a lunghe fino a 100-200 µm, sono considerate "respirabili" (88, 89).

Gli atti iniziali della catena di eventi che possono condurre all'insorgenza di una patologia polmonare legata all'esposizione a fibre sono rappresentati da inalazione e deposito delle particelle nelle vie respiratorie delle stesse. Il depositarsi nelle vie respiratorie delle particelle può avvenire per impatto, sedimentazione o intercettazione; esso si attua secondo uno schema fisso, indipendentemente dalla natura del materiale inalato.

Impatto e sedimentazione sono strettamente influenzati dall'AED delle particelle: l'impatto, favorito da un flusso d'aria più veloce, avviene nei tratti delle vie respiratorie a calibro maggiore; per contro, la sedimentazione risulta favorita da bassa velocità di flusso e più lungo tempo di residenza, nei tratti di piccolo calibro dell'albero respiratorio. La probabilità della deposizione delle fibre per intercettazione aumenta all'aumentare della lunghezza delle particelle (88). Le biforcazioni bronchiali di calibro maggiore sono ritenute il sito di deposizione prevalente nell'uomo, e rappresentano anche il più frequente sito di insorgenza di neoplasia bronchiale legato all'esposizione alle fibre minerali naturali (42). Meno è noto relativamente alla deposizione a livello alveolare. Tuttavia nei roditori si è dimostrato che, conseguentemente all'inalazione di particelle o di fibre dalle dimensioni tali da raggiungere i tratti più profondi delle vie respiratorie, la deposizione avviene principalmente a livello delle biforcazioni alveolari. Si è ipotizzato che ciò sia una conseguenza delle caratteristiche del flusso d'aria (7, 95).

Un prospetto sinottico dei diametri nominali di alcune MMMF è riportato in tabella 3, mentre a scopo di comparazione in tabella 4 è riportata una classificazione di durabilità di alcune fibre naturali ed artificiali unitamente ai rispettivi valori di diametro. Il complesso dei dati riportati in tabella 3 e 4 indica che le MMMF sono generalmente caratterizzate da valori di diametro superiori a quelli delle fibre di asbesto. Da parte di alcuni Autori in questo dato è stato individuato un elemento importante nel condizionare la minore potenzialità cancerogena delle MMMF rispetto all'amianto, rilevata per

esposizione inalatoria tanto nell'uomo quanto nell'animale da esperimento. Le fibre a maggiore diametro si depositano nei tratti prossimali dell'albero respiratorio, e non possono raggiungere il tessuto polmonare nelle stesse quantità registrate nei confronti dell'amianto (76); di conseguenza, il diametro delle fibre risulta in grado di influenzare significativamente i livelli di esposizione e la dose assunta. Proprio la dose è stata ipotizzata quale principale fattore critico nella più elevata potenza cancerogena dell'asbesto rispetto alle fibre minerali artificiali (76). I livelli di esposizione a fibre aerodisperse in ambito professionale sono generalmente più bassi per le MMMF rispetto all'amianto, a parità di processi produttivi: alla base di tale situazione, oltre ai valori di diametro generalmente maggiori nelle MMMF rispet-

Tabella 3 - Diametri nominali di alcuni tipi di MMMF (orig. 76, modificata)

Tipo di fibra	Diametro (in µm)
Fibre ceramiche refrattarie	1,2-6,0
Fiberfrax® HSA	1,2
Fibermax* (come massa compatta)	2-3,5
Fiberfrax* (come massa compatta)	2-3,0
Fibre alluminio (come massa compatta)	3
Fibre zirconio (come massa compatta)	3-6
Lana di vetro	6-15
Isolante termico	0,05-3,0
Per scopi speciali	6-15
Filamento continuo	6-9,5
Isolamento elettrico	8-12
Nextel® 312	6-9
Lana minerale	

Tabella 4 - Classificazione di alcuni tipi di fibre minerali naturali ed artificiali di diverso diametro in relazione alla loro durabilità

Classificazione	Materiale	Mediana dei diametri (µm)	Velocità di dissoluzione (nm/giorno)	Vita della fibra (anni)
1	Lana di vetro TEL	3,5	3,45	0,4
2	Lana di vetro, superfine	0,38	1,4	1,0
3	Lana diabasi	4,0	1,14	1,2
4	Lana di vetro 475, JM 104	0,41	0,90	1,7
5	Lana di vetro E, JM 104	0,47	0,21	6,5
6	Lana di scoria	4,8	0,69	2,0
7	Refrattaria, Fiberfrax R	1,85	0,27	5,0
8	Refrattaria, Fiberfrax H	1,85	0,28	4,9
9	Refrattaria, Silice	0,77	1,1	1,2
10	Crisotilo	(0,074)	0,005	(=100)
11	Crocidolite	(0,17)	0,011	(=170)
12	Eritonite	(0,005)	0,0002	(=170)

La durabilità delle fibre è espressa come anni di "vita" delle fibre per esposizione a fluido extracellulare simulato (pH 7,6±0,2) derivato da una soluzione di Gamble

zione respirabile. Un ulteriore elemento che appare in grado di rendere meno pericolose le MMMF, ed in particolare le fibre vetrose, è rappresentato dai processi di lisciviazione ai quali va incontro il materiale vetroso: ne consegue che il grado di "durabilità" di questi materiali (cioè la capacità di rimanere inalterati nei liquidi biologici) sia largamente inferiore rispetto all'asbesto. Per inciso, fra le MMMF le fibre refrattarie risultano più frequentemente caratterizzate da dimensioni "respirabili" - in quanto c'è la tendenza a produzione di fibre refrattarie molto sottili per sfruttarne al massimo le proprietà di isolamento, con ampio utilizzo anche nell'industria aerospaziale - e possono quindi dare luogo ad un maggiore rischio di patologia a carico dell'apparato respiratorio.

Caratteristiche legate a struttura e composizione chimica

Come detto, tra le caratteristiche legate a struttura e composizione chimica delle fibre identificate come importanti nella patogenesi degli effetti lesivi a carico dell'apparato respiratorio (tanto di tipo fibrotico quanto di tipo neoplastico), si annoverano l'attività biologica, la durabilità, biopersistenza e biodegradabilità delle fibre. Quale ulteriore elemento in grado di condizionare l'insorgenza di effetti avversi, vanno inoltre considerati l'eventuale instaurarsi di una condizione di sovraccarico di particelle (*particle overload*) a livello polmonare, nonché - a livello dell'animale da esperimento - la possibilità di diverse risposte tossiche in relazione alle differenze tra specie, ceppi e generi.

Per "attività biologica" si intende la capacità da parte delle fibre di reagire ed intera-

to all'asbesto, stanno le peculiari differenze di comportamento dei sovramenzionati materiali durante la produzione e/o nelle fasi applicative, dovute alle rispettive caratteristiche strutturali. A differenza delle fibre naturali le MMMF, essendo ottenute da sostanze mantenute in fusione e successivamente raffreddate senza possibilità di cristallizzazione, sono generalmente caratterizzate da struttura amorfa. In analogia a quanto si osserva negli altri materiali strutturalmente amorfi, le MMMF sono caratterizzate dalla presenza di microfenditure che si estendono in profondità a partire dalla superficie. La formazione di queste microfenditure si deve a microfocolai di cristallizzazione che si sono formati nel corso del raffreddamento e che - essendo dotati di maggiore resistenza rispetto alla struttura amorfa che li circonda - rappresentano un possibile punto di frattura delle fibre ottenute. La presenza di queste microfenditure risulta essere elemento determinante nel condizionare il comportamento delle MMMF durante la produzione e/o nelle fasi applicative: le fibre tendono infatti a fratturarsi trasversalmente in corrispondenza delle stesse microfenditure, dando conseguentemente luogo alla formazione di fibre sempre più corte, ma senza modificazione del diametro iniziale delle fibre. Ne consegue che la frazione respirabile delle MMMF sarà rappresentata solo da quelle già in partenza caratterizzate da diametro <3-5 µm; questo dato rappresenta una rimarchevole differenza rispetto al comportamento di frattura lungo l'asse longitudinale delle fibre e danno luogo alla formazione di fibre di diametro via via inferiore, con conseguente progressivo aumento della fra-

gire con i tessuti e le strutture biologiche: a tale riguardo, la capacità di generare intermedi reattivi ossidanti (quali i radicali liberi) in grado di dar luogo a danno cellulare è stata identificata quale fase cruciale nel meccanismo dell'azione tossica. Per "durabilità" si intende il grado di resistenza alla dissoluzione che la fibra mostra rispetto all'attacco da parte dei fluidi biologici: essa risulta primariamente condizionata dalle caratteristiche di struttura e composizione chimica. Per "biopersistenza" si intende il periodo di ritenzione della fibra - a livello polmonare o di altri tessuti - conseguentemente ad esposizione o somministrazione; essa risulta influenzata dal numero di fibre presenti, dalle loro dimensioni, caratteristiche e area di superficie, composizioni chimiche, e differenze in questi parametri stamò alla base della differente tossicità mostrata da fibre diverse. Per "biodegradabilità" della fibra si intende la scomparsa e/o dissoluzione all'interno del polmone o di altri tessuti: essa risulta condizionata da fattori di natura meccanica, chimica, o legata ad attività enzimatiche (53).

La valutazione della durabilità e biosolubilità delle fibre è stata diffusamente attuata in studi *in vitro*, condotti mediante l'utilizzo di fluidi di sintesi la cui composizione chimica mima quella del liquido extracellulare. Il fluido più utilizzato è una soluzione di Gamble (o un suo derivato), caratterizzato da pH 7,4, che corrisponde al pH fisiologico e permette di mimare le condizioni "ambientali" a livello dell'organismo umano. La durabilità di differenti tipi di fibre minerali (sia naturali che artificiali) a diverso diametro per esposizione ad un fluido extracellulare simulato (pH 7,6±0,2) derivato da una solu-

zione di Gamble è stata valutata da Scholze e Conradt (70): i dati di tale studio sono riportati in sinossi in tabella 4, ed indicano che le MMMF (pur tra loro non uniformi) risultano nel loro complesso largamente meno durevoli rispetto alle fibre naturali.

La solubilità di alcune fibre polimeriche organiche (FPO, quali polietilene, polipropilene e fibre di policarbonato) e di alcune MMMF (3 diversi tipi di borosilicati) è stata saggiata *in vitro* in soluzione di Gamble a 37°C, al buio per 180 giorni (39). Il crisotilo è stato utilizzato quale controllo positivo. Quali indicatori, gli Autori riferiscono di aver valutato: il tasso di rilascio di Si dal crisotilo e dalle MMMF in momenti successivi e cadenzati, nonché - per il complesso delle fibre allo studio - eventuali modificazioni nella massa e nelle caratteristiche di superficie. La quota totale di Si rilasciata dalle MMMF è risultata compresa nell'intervallo 36-90% (tasso di dissoluzione variabile da 1,4x10⁻³%/die a 3,6x10⁻²%/die), a fronte di una quota rilasciata dal crisotilo nell'ordine del 1% (tasso di dissoluzione pari a 2,1x10⁻²%/die). Il decremento delle MMMF in termini di massa dopo 180 giorni è risultato compreso nell'intervallo 37,3-74,9%, a fronte di un decremento del crisotilo pari al 5%. Nelle FPO non si è rilevata alcuna dissoluzione, con un lieve incremento in termini di massa (0,08-0,50%). In 2 MMMF l'incremento dell'area di superficie è risultato del 1800% e del 22000%, mentre nella terza l'incremento non ha potuto essere determinato in quanto il residuo dopo 180 giorni è risultato pari a solo 0,12 g. La superficie delle MMMF ha mostrato significativi segni di corrosione, fino alla separazione discreta dei diversi strati, mentre a carico del crisotilo si sono rilevate

fini alterazioni trasversali per l'intera lunghezza della superficie delle fibre. A carico delle FPO non si è rilevata alcuna visibile alterazione a carico della superficie delle fibre. Gli Autori concludono che nelle MMMF l'esposizione a soluzione di Gamble per 180 giorni ha portato a significativi tassi di dissoluzione, al contrario delle FPO, dato che suggerisce che le medesime FPO siano più durevoli e possano persistere più a lungo a livello polmonare (39).

In altri studi si è invece utilizzato un fluido a pH nell'intervallo 4,5-5,0, che mima le condizioni del pH intracellulare all'interno dei fagocitosi dei macrofagi alveolari o interstiziali. I risultati degli studi *in vitro* sono espressi mediante un "coefficiente di dissoluzione" (K_{oss}) in $\text{ng cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, in soluzioni definite a pH noto. Secondo un criterio a valenza generale, più il valore di K_{oss} è elevato, più le fibre sono solubili; nella tabella 5 sono riportati i valori di K_{oss} osservati per diversi tipi di fibre a pH 7,4 (100) e a pH 4,5 (23). La dissoluzione delle fibre è stata posta in

Tabella 5 - Valori dei coefficienti di dissoluzione (K_{oss} espressi come $\text{ng cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) di differenti tipi di fibre, misurati sperimentalmente a valori di pH 4,5 (23) e a pH 7,4 (100)

Tipo di fibra	K_{oss} a pH 4,5	K_{oss} a pH 7,4
Crocidolite	0,1-0,5	0,3
Lana di roccia	65	23
Lana di scoria	400-500	119
Lana di vetro	6	142

Il pH 7,4 corrisponde al pH fisiologico, e permette pertanto di mimare le condizioni "ambientali" a livello dell'organismo umano; il pH 4,5 corrisponde a quello presente all'interno dei fagocitosi dei macrofagi alveolari o interstiziali

relazione a diversi fattori di ordine chimico, fisico e biologico (71). La struttura interna e di superficie, così come le dimensioni e la composizione chimica risultano essere elementi di grande rilievo. Un alto tenore di alcali, o in composti alcalino-terrosi, ed un basso tenore di alluminio o boro sono stati posti in relazione con un elevato tasso di solubilità; fra le fibre meno solubili, sono annoverate le fibre ceramiche e le fibre di vetro con alto contenuto di alluminio silicato (71).

Le fibre vetrose prodotte per scopi speciali e le fibre ceramiche refrattarie hanno inoltre mostrato caratteristiche di maggiore durabilità, seguite da lana di roccia, lana di scoria, lana minerale (47).

Bauer et al (2) riferiscono di aver studiato *in vitro* i processi di dissoluzione di diversi tipi di MMMF in 2 fluidi fisiologici sintetici, rispettivamente a pH 4 e pH 7,6 per periodi fino a 21 giorni: i materiali indagati erano lana di vetro (MMVF 11), lana di scoria (MMVF 22) e fibre ceramiche refrattarie (RCF1), con valutazione sia della dissoluzione in termini assoluti sia del progredire delle modificazioni a carico di struttura e composizione chimica. Le fibre allo studio, le cui caratteristiche di composizione chimica sono riportate in tabella 2, erano caratterizzate fisicamente come di seguito riportato: MMVF 11 - superficie: 1,5 m^2/g , diametro medio: 0,9 μm , lunghezza media 19,0 μm , densità: 2,5 g/cm^3 ; MMVF 22 - superficie: 2,0 m^2/g , diametro medio: 1,2 μm , lunghezza media 21,4 μm , densità: 2,5 g/cm^3 ; RCF1 - superficie: 2,6 m^2/g , diametro medio: 1,1 μm , lunghezza media 17,8 μm , densità: 2,7 g/cm^3 . Gli Autori riferiscono di aver rilevato i seguenti coefficienti di dissoluzione (K_{oss}), per valori espressi in $\text{ng cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$: DS: MMVF 11:

3,7±0,1 (pH 4) e 85±9 (pH 7,6), MMVF 22: 280±8 (pH 4) e 89±0,8 (pH 7,6), RCF1: 1,4±0,04 (pH 4) e 0,31±0,03 (pH 7,6). Il complesso dei dati riportati indica che nei diversi tipi di MMMF il K_{ass} , oltre ad essere condizionato dalle differenti composizioni chimiche, è funzione del pH ambientale: a pH 4, il processo di dissoluzione è risultato più rapido in MMVF 22 che in MMVF 11, mentre a pH 7,6 il processo è risultato più rapido per la lana di vetro che nella lana di scoria. La dissoluzione delle fibre ceramiche refrattarie, anche se più rapida in ambiente acido, è risultata comunque largamente inferiore rispetto a quella delle lane minerali. Per ciò che attiene all'influenza del pH sulle modificazioni di composizione e struttura chimica a carico dei materiali in funzione del tempo, in RCF1 le modificazioni sono risultate virtualmente nulle per entrambi i valori di pH testati. In MMVF 11 e MMVF 22 è stato invece osservato un progressivo arricchimento in Si e Al, e una perdita di cationi alcalini e alcalino-terrosi: al pari di quanto descritto nei confronti del K_{ass} , il processo di modificazione è risultato più rapido in MMVF 22 a pH 4, e in MMVF 11 a pH 7,6. In conclusione, la lana di vetro si è mostrata meno durevole della lana di scoria e delle fibre ceramiche a pH 7,6, ed ha inoltre mostrato assenza di evidenti modificazioni morfologiche nel processo di dissoluzione ad entrambi i valori di pH testati: è stato suggerito che questi dati siano alla base della minor attività biologica (tanto come capacità fibrogenica che come potenzialità tumorigene) nel polmone o nelle membrane sierose) e della conseguentemente inferiore pericolosità tossicologica della lana di vetro rispetto ad altri tipi di MMMF (2).

La biopersistenza delle MMMF è stata indagata *in vivo*, in comparazione con l'asbesto, in studi condotti mediante esposizione di ratti per via inalatoria. Musselman et al (55) riferiscono di aver esposto (*nose-only*) gruppi di ratti Fisher 344 rispettivamente alle lane di vetro MMVF 10 o MMVF 11, alla lana di roccia MMVF 21 e alla lana di scoria

MMVF 22 (diametro medio 1 µm e lunghezza media 15 µm, approssimativamente) a valori di esposizione di 30 mg/m³ per periodi fino a 545 giorni. Altri gruppi di ratti erano stati esposti a crocidolite (diametro medio 0,2 µm, lunghezza media 7 µm) per concentrazioni di 10 mg/m³ e ad aria filtrata, rispettivamente quali gruppi di controllo positivo e negativo. Gruppi di 9 ratti da ognuno dei gruppi esposti (unitamente a 9 animali dai gruppi di controllo) erano stati sacrificati a 1 h, 1, 5, 31, 90, 180, 270, 365, 545 giorni. Nelle MMMF, la diminuzione dei valori di diametro e di lunghezza (espressi come media geometrica) è risultata essere significativa in funzione del tempo di permanenza delle fibre a livello polmonare, mentre la variazione è risultata modesta nelle fibre di crocidolite. I valori di concentrazione (espressi come fibre per mg di polmone, peso secco (mg/DL)) di MMVF e di crocidolite (per diametri ≥0,5 µm e lunghezze >20 µm) dopo 1 giorno di esposizione sono risultati praticamente analoghi. A 270 giorni, per fibre a diametro ≥0,5 µm, la ritenzione (espressa come percentuale del valore rilevato al giorno 1) è risultata variare da 3 a 6±2% per le MMMF e pari a 27±9% per la crocidolite, mentre per fibre a lunghezza >20 µm i valori sono risultati - rispettivamente - nell'intervallo da 1 a 4±4% e di 37±20%. A 545 giorni, per fibre a lunghezza >20 µm, i livelli di MMMF sono risultati praticamente comparabili a i controlli negativi, mentre la crocidolite ha mostrato quote pari a 38±9% (pari ad una massa di 2000±400 mg/DL). Tra le MMMF, la *clearance* delle fibre della lana di roccia MMVF 21 (lunghezza >20 µm) è risultata più lenta rispetto alle altre, e la più elevata persistenza

è stata posta in relazione con il maggior contenuto in Fe (55).

La biopersistenza e la ritenzione di micro-fibre di vetro preparate a scopi speciali (codice 100-475, lunghezza >5 µm) è stata inoltre studiata *in vivo* in ratti maschi Wistar (40 animali), esposti per 2 settimane a valori di concentrazione pari a 700 f/ml (35, 72). Gruppi di 5 ratti sono stati sacrificati a 0 o 3 giorni, 1 o 4 settimane, 3, 6, 12 o 16 mesi dopo il termine dell'esposizione per studiare le modificazioni nei carichi polmonari in funzione del tempo. Il processo di rimozione è risultato inizialmente più rapido nelle fibre più lunghe (>15 µm) rispetto a quelle di lunghezza intermedia (5-15 µm), contemporaneamente ad un iniziale aumento delle fibre più corte, dato che suggerisce l'esistenza di un processo di frammentazione delle fibre più lunghe in frammenti di più piccole dimensioni. Dopo 1 settimana, la rimozione delle fibre intermedie è risultata a ritmo quasi costante, secondo una cinetica di pseudo-primo ordine: sulla base di questo dato si è ipotizzato che la riduzione del carico polmonare sia principalmente funzione di un meccanismo, e segnatamente della *clearance* macrofago-mediata. Tale ipotesi sembra confermata anche dal fatto che il processo di rimozione delle fibre più corte (ed in particolare quelle a lunghezza <2,5 µm), nelle quali le ridotte dimensioni consentono una più efficace fagocitosi macrofagica. Non si sono infine registrate variazioni nella distribuzione delle fibre in base al diametro nel corso dei 16 mesi successivi all'esposizione, né riduzione del diametro delle fibre nel corso del processo di dissoluzione. Il processo di rimozione delle microfibre 100-475 è risultato

rapido. Il suo andamento, espresso come decremento percentuale rispetto alla fase iniziale ed analizzato nelle diverse classi di lunghezza è risultato paragonabile a quello riportato da Musselman et al (55) per MMVF 11, anche se il tasso di rimozione è risultato complessivamente - meno rapido rispetto alle lane di vetro (MMVF 10 e MMVF 11), paragonabile a quello mostrato dalle fibre lunghe di lana di scoria (MMVF 22), e più elevato rispetto a quello della lana di roccia (MMVF 21).

La drasticamente ridotta biopersistenza *in vivo* delle lane minerali commerciali MMVF 10 e MMVF 11 (lane di vetro), MMVF 21 (lana di roccia) e MMVF 22 (lana di scoria), in comparazione rispetto alla crocidolite, è stata ulteriormente confermata da Hersterberg et al (30). I dati di uno studio condotto su ratti Fisher 344/N - esposti per via inalatoria (*nose-only*) a valori di concentrazioni di MMVF di 30 mg/m³ o di crocidolite a con-

centrazioni di 10 mg/m³ (6 h/giorno per 5 giorni), e sacrificio di gruppi di animali a periodi variabili dalla cessazione dell'esposizione (da 1 ora a 365 giorni) - sono riportati in tabella 6. Da un'analisi complessiva, nelle MMVF la rimozione è risultata più rapida nelle fibre più lunghe, mentre nella crocidolite nelle fibre più corte; in funzione del tempo, nelle MMVF si è inoltre osservato un decremento nei valori medi di lunghezza e diametro, mentre per la crocidolite il diametro medio è rimasto invariato e la lunghezza media è risultata aumentata. In funzione del tempo di persistenza nel polmone, in 3 delle MMVF testate si sono rilevate significative alterazioni nella morfologia e composizione chimica, mentre la crocidolite è rimasta invariata. In analogia a quanto concluso in precedenti studi di tossicocinetica delle fibre minerali naturali ed artificiali, Hersterberg et al (30) hanno concluso ipotizzando che la minor attività biologica (ivi compresa la po-

Tabella 6 - Sinossi comparativa dei dati di biopersistenza di alcune MMVF e di crocidolite in ratti *muschi Fisher 344/N* esposti per via inalatoria, in funzione della lunghezza delle fibre

Tipo di fibra	Fibra WHO (L ≥ 5 µm, D ≤ 3 µm)		
	L < 5 µm	L > 10 µm	L > 20 µm
MMVF 10 Lana di vetro	18	11	8
MMVF 11 Lana di vetro	9	4	1
MMVF 21 Lana di roccia	17	8	6
MMVF 22 Lana di scoria	7	0	0
Crocidolite	35	55	61

La biopersistenza è espressa come % di ritenzione del carico polmonare del giorno 1 dopo 365 giorni post-esposizione

TOSSICOLOGIA DELLE FIBRE MINERALI ARTIFICIALI

La crescente importanza e diffusione in termini di utilizzo industriale delle MMMF ha portato - già a partire dai primi anni '70 - all'attuazione di numerose indagini, sia in ambito sperimentale che di tipo epidemiologico nei confronti di popolazioni di soggetti esposti in ambito professionale, volte alla valutazione dei possibili effetti sulla salute legati all'esposizione a questi materiali.

Per ciò che attiene agli effetti di tipo locale, le MMMF sono note quali agenti irritanti nei confronti della cute e - per esposizione a particolato aerodisperso - delle mucose congiuntivali e oro-faringee. L'irritazione cutanea è generalmente legata al contatto diretto con fibre dal diametro >4,5-5,0 µm, dimensioni di comune riscontro tanto nelle lane minerali isolanti che nelle fibre vetrose a filamento continuo (34); l'effetto di irritazione (meccanica) conduce all'insorgenza di un quadro di dermatite irritativa di grado generalmente modesto e reversibile al cessare dell'esposizione.

La natura fibrosa delle MMMF, che le rende suscettibili di inalazione e ritenzione a livello dell'apparato respiratorio, ha focalizzato l'attenzione proprio sui possibili effetti respiratori, ed in particolare di quelli cancerogeni; oltre agli aspetti morfologici, sembra opportuno sottolineare che le similarità delle MMMF rispetto all'amianto dal punto di vista della composizione chimica hanno ugualmente condotto ad una attenta valutazione della possibile attività biologica posseduta dalle fibre medesime (76).

Principalmente sulla base di studi sperimentali, peraltro condotti mediante impianto

mentale, peraltro condotti mediante impianto

mentale, peraltro condotti mediante impianto

mentale, peraltro condotti mediante impianto

del materiale nell'organismo degli animali da laboratorio (62-64, 81), nel 1987 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha classificato i materiali lana di vetro, lana di roccia, lana di scoria e fibre ceramiche quali "agenti potenzialmente cancerogeni per l'uomo", all'occorrenza nella categoria "2b" secondo i criteri stabiliti dalla *International Agency for Research on Cancer* di Lione (33). Sulla base di ulteriori dati da studi condotti in ambito sperimentale o epidemiologici attuati nei confronti di popolazioni professionalmente esposte - unitamente alla produzione di nuovi materiali fibrosi, non tossicologicamente assimilabili a quelli precedentemente disponibili a livello commerciale - si è giunti ad una rivalutazione dell'attuale classificazione. A livello generale, alla luce delle evidenze attualmente disponibili, le MMMF sono risultate caratterizzate da una minore attività biologica delle rispetto all'asbesto, tanto negli effetti fibrotici quanto in quelli neoplastici. Da un punto normativo-regolamentario, il progredire delle conoscenze scientifiche ed il costante affinarsi delle metodiche analitiche ha tuttavia portato alla formulazione di una classificazione articolata delle MMMF per ciò che attiene alla potenzialità tumorigenica: secondo i criteri classificatori adottati

dall'Unione Europea, per "lana di roccia/scoria, produzione" è prevista etichettatura di pericolosità quale "T, R49" (tossico, cancerogeno per inalazione), mentre per "lana di vetro, produzione" è prevista etichettatura di pericolosità quale "Xn, R40" (nocivo, possibilità di effetti irreversibili).

Evidenze sperimentali

Sulla base di quanto precedentemente discusso relativamente alle caratteristiche proprie delle fibre e dei loro riflessi nei condizionali sperimentali sono stati condotti sia *in vivo* sia *in vitro*. Gli studi *in vivo* sull'animale, condotti tanto mediante esposizione inalatoria quanto mediante iniezione intratracheale o nelle cavità intrascirose (intrapleurale e intraperitoneale), sono volti sia all'evidenziazione della possibile insorgenza di effetti avversi (sia tumorali che non), sia allo studio della biosolubilità e della biopersistenza delle fibre nell'organismo. Le indagini condotte *in vitro*, oltre che per gli studi di durabilità e biosolubilità discussi precedentemente, sono state attuate per valutare il ruolo delle fibre relativamente a citotossicità, genotossicità, fibrogenicità; mediante questa tecnica, si so-

Tabella 7 - Prospetto sinottico delle attività biologiche di diverse fibre vetrose artificiali evidenziate da studi *in vivo* e *in vitro* (fonte: 91, modificato)

Tipo di fibra	Test <i>in vivo</i>		Test <i>in vitro</i>	
	Test inalatori	Test non inalatori	Citotossicità	Genotossicità
Fibra di vetro fine e durevole	--	+	++	+
Lana di vetro	--	--	--/+	--
Lana di scoria	--	--	+	n.d.
Lana di roccia	--	+	+	+

+++ molto positivo; + positivo; --/+ dubbio; -- negativo; n.d. non disponibile
si precisa che l'attività biologica nei test *in vivo* è stata valutata come cancerogenicità e/o fibrogenicità

no inoltre indagati i possibili meccanismi d'azione a livello molecolare dei diversi eventi patogeni sostenuti dalle fibre. Per comparazione, in tabella 7 sono riportate in sintesi le evidenze relative all'attività biologica di diverse fibre vetrose artificiali da studi *in vivo* e *in vitro*. A fronte della variabilità degli effetti biologici descritti, risulta probabile che gli stessi siano sostenuti da meccanismi d'azione differenti: essi non sono stati ancora completamente chiariti, ma appaiono influenzati dalle proprietà chimico-fisiche rilevanti delle fibre medesime (91).

Studi *in vivo*

Come precedentemente accennato, gli studi *in vivo* possono essere condotti sia per esposizione inalatoria che per somministrazione intracavitaria, ed entrambe le modalità presentano vantaggi e svantaggi. Gli studi sperimentali condotti per inalazione risultano ovviamente più vantaggiosi - rispetto ad altre modalità di esposizione o somministrazione - per la valutazione della tossicità delle fibre nei confronti dell'uomo; l'esposizione inalatoria mima infatti realisticamente le condizioni di esposizione umana, ed interessando il sistema respiratorio intatto, permette di osservare il ruolo svolto dal metabolismo e da altri meccanismi biofisici nel modulare quali-quantitativamente l'effetto tossico. L'insorgenza di fibrosi, tumore polmonare e mesotelioma pleurico conseguentemente ad esposizione ad asbesto è risultata simile nell'uomo e nell'animale da esperimento, pur alla luce di differenze quantitative (96). Tuttavia, quali svantaggi degli studi sperimentali condotti per inalazione possono essere annoverati: differenze inter-specie rela-

tivamente all'anatomia e fisiologia respiratoria; insorgenza di patologie specie-specifiche sia negli animali trattati (in particolare quale effetto del sovraccarico polmonare (*overloading*)) che nei gruppi di controllo; relativamente bassa sensibilità. Un'ulteriore limitazione degli studi inalatori è rappresentata da durata e costo, nonché dall'impossibilità di descrivere gli eventi a livello cellulare e/o molecolare. Al di là delle limitazioni sovramenzionate, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha concluso che i test condotti per inalazione rappresentano il miglior modello sperimentale per la valutazione dei rischi per la salute umana legati all'esposizione a fibre (98).

Gli studi condotti mediante somministrazione intraperitoneale o intrapleurale di dispersioni di fibre hanno mostrato elevate incidenze di mesotelioma nell'animale da esperimento: tale tecnica ha visto un esteso utilizzo nella valutazione del nesso esistente tra le dimensioni delle fibre e la potenzialità cancerogena delle stesse (64, 82). Il limite principale invocato nei confronti della tecnica per somministrazione intracavitaria consiste nel suo prevedere lo scavalco delle naturali difese (16). Studi condotti nei decenni scorsi sono inoltre stati oggetto di critica poiché le dosi somministrate eccedevano i quantitativi indicati come "dose massima tollerabile", con conseguente difficoltà nella valutazione degli effetti tossici osservati e nell'ottenimento delle relazioni dose-effetto e dose-risposta. Va tuttavia sottolineato che queste modalità di somministrazione - pur non fisiologiche - sono volte a mimare le condizioni successive alla transmigrazione delle fibre nella cavità intrapleurale o intraperitoneale dal polmone conseguentemente

ad inalazione. Ciò assume particolare rilievo nei confronti dell'insorgenza del mesotelioma da asbesto nell'uomo, per il quale proprio la transmigrazione sembra essere il principale meccanismo (31). I test intraperitoneali, ed in particolare quelli intraperitoneali, sono caratterizzati da elevata sensibilità, e possono pertanto condurre all'identificazione di anche modeste potenzialità cancerogene: risultati negativi ottenuti con questi test possono quindi essere interpretati come ragionevolmente riflettenti una assente potenziale cancerogena dei materiali allo studio nelle condizioni sperimentali indagate (38). Va tuttavia sottolineato che nei test intracavitari è stato rilevato il riscontro di risultati falsamente positivi - anche nei confronti dell'insorgenza di mesotelioma - e che non vi è consenso relativamente al loro valore predittivo nei confronti dell'insorgenza di tumore (16). Nel 1992, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha concluso che i test intraperitoneali non possono essere utilizzati per valutazioni quantitative di rischio, o per la comparazione delle pericolosità relative tra differenti tipi di fibre (98).

Gli studi a lungo termine condotti per esposizione inalatoria a fibre di vetrose riportati in letteratura sono numerosi. Esposizioni a concentrazioni variabili nell'intervallo 3-10 mg/m³ sia di fibre per scopi speciali (da fibre sottili a microfibre) sia di lane di vetro non ha dato luogo all'insorgenza di significative risposte tumorali o di marcate lesioni polmonari nei ratti (40, 48, 53, 79, 94), nei criceti (79), nelle scimmie (50) e nei bambini (20). Ugualmente, gli studi a lungo termine per inalazione disponibili non hanno fornito evidenze di danno polmonare o di neoplasia polmonare o mesoteliale in ratti

esposti a 5 o 10 mg/m³ di lana di roccia (40, 94) o in criceti esposti a 10 mg/m³ di lana di scoria (79). Sebbene questi studi non possano essere considerati conclusivi alla luce di certe limitazioni, la lana di vetro e le lane minerali appaiono marcatamente meno pericolose delle fibre di asbesto, che - testate per uguali concentrazioni e in condizioni similari - hanno dato luogo all'insorgenza sia di danno polmonare che di neoplasia; per contro, una considerevole evidenza di effetti fibrotici e neoplastici è stata osservata nell'esposizione a fibre ceramiche refrattarie (FCR) (91).

In studi condotti mediante instillazione intratracheale di fibre di vetro sottili o di microfibre si è osservata l'insorgenza di marcate fibrosi polmonari in ratti trattati a dosi ripetute settimanali per 5 settimane (78) o in criceti trattati per dosi singole (60). Wright e Kuschner (99) hanno inoltre riportato che, conseguentemente ad instillazione intratracheale di fibre di vetro sottili nelle cavie, fibre lunghe hanno causato estesa fibrosi polmonare, mentre fibre corte solitamente aggregazione macrofagica a livello alveolare. La somministrazione intratracheale di fibre vetrose ha dato luogo a variabili risposte cancerogene. In criceti Syrian-golden trattati settimanalmente con 8 dosi di 1 mg di microfibre di vetro di 2 lunghezze diverse (diametro medio 0,3 µm, lunghezza 7 o 4,2 µm) si è registrata l'insorgenza di livelli comparabili di carcinoma polmonare (4%), mesotelioma (27%), sarcoma toracico (4%) (52). Lo stesso gruppo di ricercatori (66) ha successivamente registrato una bassa incidenza di tumore polmonare (5/34) in ratti trattati settimanalmente con 20 dosi di 0,05 mg di microfibre di vetro. Per contro, altri studi

condotti per instillazione intratracheale di fibre sottili o microfibre di vetro non hanno evidenziato risposte cancerogene in ratti (22, 78), in criceti (17) o in cavie (99).

In studi condotti mediante somministrazione di MMVF per via intrapleurica si sono osservate risposte cancerogene differenti, in relazioni alle condizioni sperimentali ed alle dimensioni delle fibre testate. In una serie di studi condotti da Stanton e coautori (80-82), fibre di vetro ed altre fibre minerali sia naturali che artificiali - tra le quali asbesto di diverse dimensioni - erano state impiantate nella pleura viscerale di ratti (per dosi nell'ordine di 40 mg di polvere totale) conseguentemente a toracotomia aperta. Le aumentate incidenze di tumori pleurici osservate nei due anni successivi al trattamento erano risultate più elevate per fibre a diametro <0,25 µm e lunghezza >8 µm, sebbene incidessero relativamente alte di tumori siano state registrate per fibre a diametro fino a 1,5 µm e lunghezza > 4 µm. In altri studi condotti per iniezione intrapleurica nei ratti (37, 51, 92-94) e nei criceti (77) si è evidenziato che la cancerogenicità delle MMVF è strettamente correlata al diametro ed alla lunghezza delle fibre stesse: più le fibre sono lunghe e sottili, più la loro potenzialità cancerogena aumenta. In generale, per somministrazioni intraperitoneali di dosi nell'ordine di 20-25 mg, sia la lana di vetro che le microfibre di vetro si sono rivelate meno cancerogene dell'asbesto. In uno studio condotto mediante singola iniezione intraperitoneale nel topo, le fibre di vetro si sono dimostrate fibrogeniche nel topo (14); per dosi di 10 mg di fibre corte (lunghezza <10 µm) di diversi diametri (3,5 o 0,05 µm) si è registrata la presenza di piccoli granulomi con mini-

ma fibrosi, mentre per fibre più lunghe (>100 µm), il quadro di fibrosi massiva è risultato comparabile a quello indotto dall'asbesto. Wagner et al (94) riferirono che in uno studio condotto mediante singola iniezione intrapleurica nei ratti, la lana di roccia (20 mg) si è rilevata dotata di basso potere cancerogeno, dando luogo all'insorgenza di mesotelioma pleurico in 3/48 animali se somministrata con resina, e in 2/48 se somministrata senza. La lana di scoria, testata secondo lo stesso protocollo, non ha dato luogo all'insorgenza di neoplasia pleurica, mentre l'asbesto ha fatto registrare l'incidenza maggiore (6/48).

In studi condotti mediante somministrazione di MMVF per via intraperitoneale nei ratti, si è indagata la capacità di indurre l'insorgenza di tumori per dosi singole di 2-10 mg o dosi multiple (2 o 4) di 25 mg. L'induzione di tumore (principalmente rappresentato da mesotelioma sarcomatoso), per quote 5-79%, è risultata essere in relazione con la dose in numerosi studi con fibre a diverse dimensioni. Le fibre più corte si sono mostrate generalmente meno potenti, rispetto a quelle più lunghe, nell'indurre l'insorgenza di mesotelioma peritoneale (61-65). Evidenze comparabili erano state riportate da altri Autori in studi consimili nei ratti (79) e nei topi (14). L'iniezione intraperitoneale di MMVF corte e sottili nei ratti ha inoltre dato luogo all'insorgenza di marcata fibrosi addominale (63, 79). In uno studio intraperitoneale cronico nei ratti, dosi singole part a 5 o 10 mg di lana di scoria, lana di roccia, o roccia basaltica hanno prodotti incrementi non significativi di mesotelioma peritoneale (65). Tuttavia, la somministrazione intraperitoneale di lana basaltica spessa per dosi singole di 25 mg nel ratto ha

dato luogo a bassa incidenza di mesotelioma (16%) (65). In un successivo studio, condotto sempre per somministrazione intraperitoneale di lana basaltica spessa (5 dosi settimanali di 15 mg) nel ratto, l'incidenza di tumore si è rivelata pari al 58% (65).

Studi *in vitro*

Citotossicità

Gli studi di citotossicità *in vitro* hanno visto nel corso del tempo un'evoluzione legata al progressivo affinamento delle tecniche culturali e dei metodi di analisi: dalla semplice osservazione del fenomeno dell'emolisi dei globuli rossi in varie specie si è passati a metodi di valutazione della proliferazione di linee cellulari di diverso tipo, oppure alla valutazione dell'alterazione della permeabilità di membrana mediante quantificazione del rilascio di enzimi endocellulari o della captazione di coloranti.

La maggior parte degli studi di citotossicità attuati *in vitro* ha valutato le proprietà delle fibre di asbesto e delle fibre vetrose, in particolare microfibre di vetro quali le JM-100. Nel complesso, nonostante le già citate difficoltà a produrre fibre di specifiche dimensioni (in particolare, la lunghezza) in quantitativi sufficienti a saggiarne estensivamente le proprietà biologiche, le evidenze fornite da questi studi indicano che gli effetti citotossici, fino alla morte cellulare, legati all'esposizione sia alle fibre di amianto sia alle fibre di vetro sono strettamente legati alle dimensioni delle fibre. In saggi sperimentali diversi (proliferazione, colorazione, rilascio di LDH), fibre di vetro corte e fini (lunghezza <5 µm, diametro <1,5 µm) hanno

mostrato un grado di tossicità inferiore rispetto a fibre più lunghe e grossolane (lunghezza >10 µm, diametro >2 µm), per concentrazioni calcolate sulla base della massa (9, 41, 60, 85-87). Queste evidenze sono in accordo con quanto osservato *in vivo* in studi condotti mediante iniezione endocavitaria (66, 82).

Per ciò che attiene alle lane minerali, Nadeau et al (56) riferiscono che fibre di lana di roccia e scoria di dimensioni relativamente cospicue (lunghezza 221 µm, diametro 3,3 µm) sono risultate solo lievemente tossiche, mentre Davies (13) riferisce che frazioni "respirabili" delle stesse lane (dimensioni non riferite) sono risultate moderatamente tossiche rispetto alla crocidolite, e la lana di roccia più tossica della lana di scoria; in questo studio, a differenza di quanto riportato in precedenza da Brown et al (10), l'asportazione del rivestimento esterno non ha comportato - in nessuna delle due lane minerali - un aumento di tossicità.

Fra le fibre ceramiche refrattarie, fibre di alluminio e zirconio (entrambe per diametri nell'intervallo 2-6 µm) sono risultate non tossiche nei confronti macrofagi peritoneali di ratto (83). Fibre respirabili di alluminio non si sono dimostrate in grado di ridurre la capacità di vita negli elementi della linea cellulare monocitica P388D1 (21), ma hanno causato una riduzione dell'efficienza nella formazione di colonie in fibroblasti polmonari di criceto cinese (V79/4) ed un incremento di cellule giganti in cellule di tumore alveolare umano di tipo II (A549) (8). In uno studio condotto su cellule ovariche di criceto cinese (CHO), le fibre ceramiche refrattarie si sono dimostrate in grado di inibire significativamente la proliferazione (24); la compa-

razione degli effetti sostenuti da 4 tipi di fibre selezionati per dimensione (diametro 1 µm, lunghezza nell'intervallo 9-24 µm) ha evidenziato una positiva correlazione tra la citotossicità e la lunghezza delle fibre, essendo le 2 fibre più lunghe significativamente più tossiche di quelle più corte. I dati *in vitro* riferiti da Hart et al (24) trovano riscontro nelle evidenze osservate *in vivo* da Hersterberg et al (28) nei confronti delle stesse fibre: in studi a lungo termine condotti nei roditori per esposizione inalatoria, le fibre risultate più citotossiche *in vitro* si erano rivelate quali dotate di maggior attività fibrogenica dopo 6 mesi di esposizione, ed in grado di indurre le più elevate frequenze di tumore a carico dell'apparato respiratorio.

Più recentemente, il grado di citotossicità delle microfibre di vetro JM-100, indagato per campioni di diverse lunghezze, è stato studiato nei confronti macrofagi alveolari (MA) di ratto (3, 4). La scelta di saggiare la citotossicità delle fibre nei confronti dei MA deriva in prima istanza dal fatto che - in quanto principali macrofagi polmonari - essi risultano estensivamente implicati nei processi di fagocitosi delle fibre inalate; secondariamente, studi *in vitro* hanno dimostrato che l'asbesto è pure in grado di danneggiare i MA e che - a basse concentrazioni - stimola negli stessi la secrezione di specie ossidanti e di citochine infiammatorie (15). In uno studio preliminare, gli effetti citotossici delle microfibre di vetro JM-100 e della crocidolite sono stati studiati nei confronti di una microcoltura di MA (3). Quali indicatori dell'effetto citotossico si sono valutati il grado di vitalità cellulare e la funzione fagocitaria: per entrambi i tipi di fibre allo studio (saggiati con campioni polidispersi dal punto

di vista della lunghezza delle fibre), si è osservata una citotossicità concentrazione-dipendente a testimonianza della validità del modello microculturale per la valutazione della citotossicità delle fibre. Più in specifico, la citotossicità delle fibre JM-100 è stata successivamente studiata - mediante valutazione degli stessi indicatori - dai medesimi Autori per campioni di diverse lunghezze (4). Le fibre a lunghezza superiore (17 e 33 µm) si sono mostrate più citotossiche di quelle più corte (3, 4, 7 µm). La lunghezza delle fibre condiziona anche l'interazione fisica con i MA: all'esame in microscopia elettronica si è osservato che mentre un singolo AM è in grado di fagocitare completamente fibre di 3 µm, numerosi AM risultano allineati lungo le fibre di 33 µm: sulla base di questo dato, si è ipotizzato che una possibile spiegazione della maggiore citotossicità delle fibre più lunghe sia legata all'impossibilità di una loro efficace fagocitosi: quale conseguenza di una mancata, o incompleta, captazione, avverrebbe il rilascio di enzimi e altre sostanze ossidanti che porterebbero a danno cellulare (4).

Genotossicità

La capacità di indurre alterazioni nel corredo genomico di cellule in coltura è stata osservata in diversi tipi di fibre minerali, sia naturali che artificiali. È stato ipotizzato che queste alterazioni genetiche potrebbero essere implicate nella trasformazione delle cellule ad uno stadio preneoplastico nell'ambito del processo di oncogenesi (1, 26). In analogia a quanto rilevato negli studi di citotossicità discussi precedentemente, anche la frequenza di trasformazione neoplastica risulta

l'effetto clastogeno delle fibre minerali: il primo è un meccanismo diretto in cui il danno per rottura cromosomica sarebbe conseguente ad adsorbimento del DNA sulla superficie delle fibre, mentre il secondo - indiretto - sarebbe legato all'interazione del DNA con agenti ossidanti reattivi prodotti tanto dai siti superficiali attivi delle fibre tanto dalle cellule attivate dopo avvenuta fagocitosi (29).

Per ciò che attiene più in specifico alle potenzialità tumorigene mostrate da alcune MMMF, il meccanismo dell'azione tossica non risulta ancora del tutto chiarito (44). In analogia a quanto rilevato nei confronti dell'asbesto, anche in questo caso si assume che il coinvolgimento di queste fibre artificiali nella produzione di radicali liberi di ossigeno sia uno degli elementi più importanti nel dare il via al processo di oncogenesi. Quale conseguenza dello stress ossidativo, può aver luogo un danno al genoma cellulare con conseguente mutazione e occorrenza di cellule neoplastiche. È stato inoltre osservato che le MMMF sono in grado di aumentare il numero e l'attività dei granulociti neutrofili e dei macrofagi: la comparsa di frazioni di MMMF può esitare in un'aumentata produzione di radicali liberi di ossigeno, con possibili conseguenze danno a carico del DNA delle cellule epiteliali. In studi sperimentali si è osservato che la produzione di radicali liberi di ossigeno da parte dei granulociti neutrofili e dei macrofagi attivati risulta aumentata dall'influenza dei composti adsorbiti nel fumo di tabacco: le fibre, in associazione con il fumo di tabacco, sarebbero pertanto

schio di tumore largamente inferiore a quello rappresentato dall'asbesto (44).

Esposizione umana: gli effetti respiratori delle lane minerali isolanti

Nel corso dei processi di produzione e di installazione delle lane minerali isolanti, nel corso di operazioni che sottopongono le fibre a stress meccanico (quali taglio, macinatura, segatura, schiacciamento, pressatura) si può verificare la formazione di polveri. Va sottolineato che molto del particolato prodotto è grossolano, non respirabile e a conformazione non fibrosa. Della frazione fibrosa, una quota risulta respirabile (diametro <3 µm, lunghezza <100 µm).

La concentrazione di fibre aerodisperse, tanto negli ambienti produttivi quanto durante le fasi di installazione risulta in genere largamente inferiore a 1 fibra/ml. I bassi livelli di concentrazione sono dovuti al fatto che i materiali vengono prodotti utilizzando oli per la soppressione delle polveri ed un levante. Concentrazioni più elevate si possono rilevare solamente nel corso di particolari applicazioni, quali l'installazione di lane soffiare o spruzzate, la manipolazione di materiali non idonei, o di materiali vecchi in ambienti confinati ed in presenza di carenti condizioni di igiene del lavoro. Se correttamente installate, le lane minerali isolanti non presentano rischi di rilascio conseguentemente alla posa in opera; monitoraggi effettuati in edifici dove le stesse lane minerali sono state installate hanno evidenziato livelli insignificanti di esposizione nella popolazione gene-

risce che, per dar luogo alle alterazioni cromosomiche, le fibre debbano prima essere fagocitate dalle cellule. Nel corso della fagocitosi, le fibre entrano in rapporto con la membrana nucleare ed i filamenti del citoscheletro (possibilmente disturbando le funzioni), con la ulteriore possibilità di aggregarsi a livello perinucleare (27, 67); all'atto della divisione mitotica, nelle cellule in cui ha avuto luogo la fagocitosi, proprio la presenza di formazioni fibrose solide può impedire i normali movimenti migratori cromosomiali: a tale fenomeno sembrano riconducibili le anomalie cromosomiche rilevate nello stadio di anafase da Hersterberg e Barrett (26). Ancora, un ruolo rilevante nel condizionare l'insorgenza di anomalie a carico dei cromosomi è stato attribuito alle proprietà chimico-fisiche della superficie delle fibre (29).

La capacità di indurre clastogenesi da parte di asbesto, erionite e fibre di vetro è stata saggiata *in vitro* nei confronti di diverse specie cellulari. Evidenze positive di rotture di cromosomi e cromatidi sono state riportate nei confronti di cellule CHO, V79-4, mesoteliali pleuriche di ratto, mentre risposte clastogeniche minime o assenti sono state osservate in fibroblasti, linee cellulari linfoblastoidi e cellule dell'epitelio bronchiale di provenienza umana, e in cellule SHE (29). È stato suggerito che la resistenza mostrata separatamente da alcuni tipi di cellule sia da leggersi a una minore capacità di relazione con il DNA. Sembra comunque opportuno sottolineare che *in vivo* fibre solo debolmente clastogene, ma dotate di elevata

positivamente correlata alla lunghezza delle fibre. In colture di cellule di embrione di criceto siriano (SHE), fibre di vetro JM-100 della lunghezza media di 15 µm hanno indotto più elevate frequenze di trasformazione rispetto ad analoghe fibre della lunghezza media di 2,2 µm (27). Meno chiaro è invece risultato il ruolo del diametro delle fibre nel modulare la frequenza delle trasformazioni (25): le fibre più fini (diametro medio 0,13 µm) si sono rivelate più tossiche di quelle più spesse (diametro medio 0,8 µm) per livelli di esposizione determinati sulla base della massa, mentre per livelli di esposizione determinati in base al numero, i campioni di fibre più spesse hanno indotto un maggior numero di colonie trasformate per fibra.

Si è ipotizzato che le alterazioni numeriche nel corredo cromosomico cellulare possano svolgere un ruolo importante tanto nella cancerogenesi *in vivo* quanto nella trasformazione *in vitro*. Hersterberg e Barrett (25) hanno osservato l'induzione di trasformazioni in cellule SHE da parte di fibre di asbesto e di fibre vetrose fini JM-100, riferendo che concentrazioni in grado di indurre trasformazioni erano in grado di dar luogo all'insorgenza di alterazioni strutturali e numeriche a carico dei cromosomi. L'asbesto si è dimostrato in grado di causare alterazioni numeriche di cellule: ovariche (CHO) e polmonari (W79-4) nel criceto cinese, mesoteliali pleuriche e epiteliali tracheali nel ratto, mesoteliali e linfocitarie umane (29). Fibre vetrose fini (JM-100), a differenza delle grossolane (JM-110), si sono rivelate in grado di indurre

ve alla possibile insorgenza di alterazioni fibrotiche o neoplastiche hanno portato all'attuazione di studi epidemiologici nei confronti di gruppi di lavoratori addetti alla produzione di tali materiali. Si sottolinea che negli studi epidemiologici si è valutata l'esposizione a fibre minerali artificiali, ma anche il possibile ruolo di altri fattori quali fibre di asbesto, fumo di sigaretta, idrocarburi policiclici.

Gli studi epidemiologici di mortalità disponibili sono quelli sui lavoratori negli Stati Uniti (45, 46) e in Europa: la "coorte storica" europea, seguita da oltre 20 anni, è composta da oltre 20.000 addetti, provenienti da 13 impianti in 7 differenti nazioni ed è stata oggetto di numerosi follow-up (68, 73, 74), fino alle più recenti rivalutazioni (6, 49). Nel loro complesso questi studi - che hanno riguardato oltre 60.000 lavoratori del settore, alcuni dei quali con un'anzianità lavorativa superiore ai 40 anni - non hanno evidenziato alcuna correlazione tra esposizione alle lane minerali isolanti ed insorgenza di mesotelioma, mentre è stata ben evidenziata la correlazione tra mesoteliomi a livello pleurico e delle cavità addominali ed esposizione ad amianto. I 5 casi di mesotelioma registrati non sono stati infatti correlati all'esposizione a lane minerali isolanti: in 3 casi era stata identificata una situazione di co-esposizione ad amianto, mentre negli altri 2 casi (nei quali i soggetti in questione lavoravano a questa produzione da meno di 1 anno) il mesotelioma era insorto nel corso dell'ultimo anno di attività lavorativa.

Se nei confronti dell'insorgenza del mesotelioma non si è ravvisato rapporto di causalità con l'esposizione alle lane minerali isolanti, l'insieme delle valutazioni relative al-

l'insorgenza di tumore polmonare ha condotto a valutazioni differenziate nei confronti nei diversi tipi di prodotti.

Per ciò che attiene alla lana di vetro, in Europa si era registrato un eccesso nell'insorgenza di cancro polmonare, ma tale eccesso risultava chiaramente ridotto applicando fattori di verifica ed aggiustamento quali il confronto riferito ai rapporti di mortalità nazionale; si sottolinea inoltre che tale eccesso non è risultato in relazione alla durata dell'impiego (e quindi dell'esposizione). Negli Stati Uniti nelle ultime elaborazioni si era ravvisata un lieve aumento nell'insorgenza di cancro polmonare; tuttavia, poiché l'aumento di mortalità dovuto alla neoplasia polmonare era stato riscontrato tanto negli esposti quanto nei controlli, gli Autori avevano concluso che non vi era correlazione tra questo eccesso e l'esposizione a fibre.

Relativamente alla lana di roccia e scoria, in Europa si era riscontrato un eccesso di cancro polmonare; anche in questo caso, tuttavia, molti degli eccessi osservati riguardavano soggetti già precedentemente esposti ad asbesto e ad idrocarburi policiclici, e non erano pertanto direttamente correlati all'esposizione alla lana di roccia. Negli Stati Uniti, gli impianti dove era nota una condizione di coesposizione ad asbesto sono stati esclusi dall'indagine: gli Autori hanno concluso che non vi era evidenza di relazione tra l'esposizione a fibre e rischio di cancro polmonare. Nel gruppo di controllo il principale agente di rischio è stato identificato nel fumo di sigaretta. Nel loro complesso, questi studi hanno eccessi *border-line* relativamente all'insorgenza di fibrosi polmonare.

Nella letteratura scientifica, negli ultimi decenni gli studi epidemiologici di morbilità

Tabella 8 - Prospetto sinottico dei valori limite di esposizione proposti per le fibre minerali artificiali in ambito professionale

Nazione	WME (TWA) in fibre/ml
Germania	0,5
Austria	
Australia	
Swizzera	
Francia	1,0
Danimarca	
Norvegia	
Svezia	
USA*	2,0
Irlanda	
Paesi Bassi	
Canada	
Giappone	Valore non proposto
Regno Unito	

* valore proposto dalle industrie produttrici

attuali nei confronti di popolazioni professionalmente esposte a lane minerali sono risultati numerosi. Nel complesso, non si sono evidenziati effetti avversi per la salute a livello respiratorio conseguentemente ad esposizione a lane minerali isolanti. Negli Stati Uniti, per esempio, queste conclusioni sono state formulate da Hughes et al (32) sulla base dei risultati delle indagini compiute nell'arco di un decennio su 5 stabilimenti produttivi. In Australia, Brown et al (11) riferiscono che un'indagine attuata in 8 insediamenti produttivi non ha fornito evidenza di fibrosi polmonare, asma, cancro polmonare o lesioni pleuriche di origine professionale. In conclusione, le revisioni più recenti degli studi di morbilità hanno portato a concludere che non vi sia evidenza secondo la quale l'esposizione alle lane di vetro, roccia e scoria rappresenti un fattore di rischio per l'insorgenza di quadri ostruttivi cronici delle vie respiratorie, e tale esposizione non ha mostrato evidenze radiologiche relative a processi di tipo pneumoconiotico.

EVOLUZIONE DELL'INQUADRAMENTO NORMATIVO-REGOLAMENTATIVO

Valori limite di esposizione

Ai fini regolamentari, in alcune nazioni è stato proposto un valore limite di esposizione per le MMVF, espresso come media ponderata nel tempo (*time weighted average*, TWA o *valeurs limites moyennes d'exposition*, VME) per esposizioni di 8h/die, 5 gg/settimana. I valori di VME attualmente disponibili sono riportati in sinossi in tabella 8.

Classificazione ed etichettatura di pericolosità

La classificazione delle sostanze chimiche in termini di pericolosità (ivi compresa la cancerogenesi), segue i criteri sanciti dalle Direttive 67/548/EEC, 88/379/EEC e 93/18/EEC.

Più in specifico, i criteri di classificazione delle sostanze chimiche in termini di cancerogenesi sono normati secondo quanto sancito dalle Direttive comunitarie 88/379 e 93/18. La classificazione adottata dall'Unione Europea si articola nell'ambito di 3 categorie: per le sostanze allocate nelle categorie

1 ("sostanze note per gli effetti cancerogeni sull'uomo") e 2 ("sostanze che dovrebbero considerarsi cancerogene per l'uomo") - relativamente a classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze chimiche di utilizzo industriale a norma delle Direttive Comunitarie 67/548/CEE e 88/379/CEE - è previsto il simbolo "T", unitamente alle frasi di rischio R45 "può provocare il cancro", o R49 "può procurare il cancro per inalazione". La manipolazione di tali sostanze in ambito professionale è normata a livello nazionale italiano dalle disposizioni contenute nel D.lgs. 626/1994, titolo VII "Protezione da agenti cancerogeni". Per le sostanze classificate in categoria 3 ("sostanze da conside-

rare con sospetto per i possibili effetti cancerogeni sull'uomo") è previsto il simbolo "Xn" unitamente alla frase di rischio R40 "può provocare effetti irreversibili".

Nel 1996 la Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale (CCTN) ha espresso i pareri sulle evidenze di cancerogenesi delle fibre minerali artificiali, che sono riportati in sinossi in tabella 9 (12). Sembra opportuno sottolineare che le categorie 1, 2 e 3 della CCTN risultano assimilabili a quelle utilizzate nella classificazione dell'Unione Europea, mentre le categorie 4 e 5 corrispondono a sostanze non classificabili in termini di classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze chimiche a norma comunitaria.

Tabella 9 - Prospetto sinottico della classificazione delle fibre minerali artificiali relativamente alle evidenze di cancerogenesi da parte della Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale

Tipo di fibra	Categoria
Filamento continuo di vetro, produzione	Sottocategoria 4a "Sostanze non valutabili per l'assenza di studi o in quanto sono state oggetto di studi inadeguati o di studi limitati che comunque non hanno segnalato effetti cancerogeni. La classificazione è provvisoria in attesa della disponibilità di ulteriori dati"
Lana di vetro, produzione	Sottocategoria 3b: sostanze per le quali sono stati eseguiti studi sperimentali e/o epidemiologici insufficienti o limitati che hanno suggerito effetti cancerogeni. La classificazione è provvisoria in quanto è necessario effettuare ulteriori adeguati studi
Lana di roccia/scoria, produzione	Categoria 2 "Sostanze per le quali, sulla base di adeguati studi a lungo termine effettuati su animali e/o altre informazioni specifiche, esistono elementi sufficienti per ritenere verosimile che l'esposizione dell'uomo ad esse possa provocare sviluppo di tumori"

La Direttiva 97/69/EC del 5.12.1997

Come discusso nei paragrafi precedenti, il progredire delle conoscenze scientifiche ed il costante affinarsi delle metodiche analitiche ha portato alla formulazione di una classificazione maggiormente articolata delle MMMF per ciò che attiene alla potenzialità tumorigena. Relativamente a quest'ultima, risulta ormai accertato il ruolo cruciale svolta dalle proprietà chimico-fisiche dei diversi materiali fibrosi nel modularne la capacità oncogena, tanto come composizione e struttura chimica quanto come parametri dimensionali. Il fondamentale ruolo di questi elementi nel determinismo della maggiore o minore pericolosità tossicologica delle MMMF ha trovato un chiaro riscontro nei

contenuti della Direttiva 97/69/EC del 5 dicembre 1997, recepita a livello nazionale italiano con il Decreto del Ministro della Sanità del 1 settembre 1998.

Questa Direttiva rappresenta il 23° adeguamento tecnico alla Direttiva 67/548/EEC riguardo a classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose, con particolare riguardo ad alcuni tipi di MMMF. I nuovi criteri introdotti da tale normativa europea per la classificazione ed etichettatura delle fibre minerali artificiali sono riportati in tabella 10.

Da quanto riportato in tabella, risulta evidente come la prima caratteristica dirimente in termini di pericolosità tossicologica delle fibre consista nella composizione chimica: MMMF ha trovato un chiaro riscontro nei

Tabella 10 - Classificazione ed etichettatura di pericolosità delle fibre minerali artificiali secondo i criteri sanciti dalla Direttiva 97/69/EC recepita in Italia con Decreto del Ministro della Sanità, 1.9.98

Tipo di fibre	Classificazione	Etichettatura
Lane minerali (orientazione casuale, tenore di ossidi alcalini e ossidi alcalino terrosi superiore a 18% in peso)	Cancerogenesi cat. 3; R40 "può provocare effetti irreversibili"	Xn "nocivo" R38-40 Xi "irritante" S(2)-36/37 "usare indumenti protettivi adatti/usare guanti adatti"
Fibre ceramiche refrattarie; fibre per scopi speciali (orientazione casuale, tenore di ossidi alcalini e ossidi alcalino terrosi pari o inferiore a 18% in peso)	Xi "irritante" R38 "irritante per la pelle"	T "tossico" R49-38 Xi "irritante" S53-45 "evitare l'esposizione, procurarsi speciali istruzioni prima dell'uso - in caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile mostrargli l'etichetta)"
	Cancerogenesi cat. 2; R49 "può provocare il cancro per inalazione"	
	Xi "irritante" R38 "irritante per la pelle"	

miche refrattarie e per le fibre per scopi speciali, il minore o maggiore tenore in ossidi alcalini o alcalino-terrosi, che risulta in grado di condizionare la biolubilità e la durezza, rappresenta un dato cruciale per la classificazione ed etichettatura di percolosità. Anche la accertata rilevanza delle caratteristiche dimensionali (lunghezza e diametro) delle MMMF nel modularne le caratteristiche tossicologiche ha acquisito valore dirimente ai fini normativo-regolamentari ai sensi della Direttiva 97/69/EC, che introduce l'utilizzo delle annotazioni "Q" e "R" quali ulteriori nuovi elementi per la classificazione riportata in tabella 10.

La nota "R" può essere applicata a diversi tipi di MMMF, dalle lane minerali alle fibre ceramiche refrattarie e alle fibre per scopi speciali, e risulta funzionale al parametro dimensionale del diametro. Nello specifico, la Direttiva 97/69/EC prevede che - mediante apposizione della nota "R" - la classificazione di cancerogenesi non si applichi alle fibre con diametro geometrico medio ponderato (meno due errori standard) superiore a 6 µm.

La nota "Q" è specificamente inerente alle lane minerali; la sua applicazione è funzionale alle evidenze tossicologiche da studi *in vivo* condotti per diverse tecniche di esposizione e/o somministrazione, in termini tanto di ridotta biopersistenza (per fibre lunghe >20 µm), quanto di scarsa capacità di dar luogo a rilevanti effetti patogeni - tumoral e non - nell'animale da esperimento. La Direttiva 97/69/EC prevede che, mediante apposizione della nota "Q", la classificazione di cancerogenesi non si applichi ai materiali che rispettino una delle seguenti condizioni:

- conseguentemente all'attuazione di uno studio di biopersistenza a breve termine condotto per esposizione inalatoria, le fibre a lunghezza superiore a 20 µm mostrino un valore ponderato di emivita <10 giorni;
- conseguentemente all'attuazione di uno studio di biopersistenza a breve termine condotto per instillazione endotracheale, le fibre a lunghezza superiore a 20 µm mostrino un valore ponderato di emivita <40 giorni;
- l'esecuzione di un appropriato test intraperitoneale non abbia evidenziato un eccesso di insorgenza di tumore;
- conseguentemente all'attuazione di un adeguato studio a lungo termine condotto per esposizione inalatoria, non si sia rilevata l'insorgenza di rilevanti effetti patogeni o alterazioni neoplastiche.

EVOLUZIONE TECNOLOGICA, NUOVI MATERIALI ED IMPATTO NEI CONFRONTI DEI RISCHI PER LA SALUTE: RASSEGNA DELLE EVIDENZE TOSSICOLOGICHE SPERIMENTALI RELATIVE ALLE NUOVE FIBRE VETROSE

La avvenuta identificazione del rilievo delle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali fibrosi nei confronti della loro pericolosità tossicologica, aspetti dei quali si è discusso nei paragrafi precedenti e che sono stati fatti recentemente oggetto di normativa a livello europeo successivamente recepita a livello nazionale italiano, ha incentivato sia il livello scientifico che in ambito industriale la ricerca e produzione di nuovi materiali fibrosi artificiali, ivi comprese le MMMF e più in particolare le MMVF, che per le loro caratteristiche

per esposizione inalatoria nei ratti, la biopersistenza di 9 fibre vetrose artificiali di diversi livelli a quelli precedentemente disponibili a livello commerciale. Alcune delle evidenze tossicologiche disponibili in letteratura relativamente a queste fibre (le cui caratteristiche di composizione chimica sono riportate in tabella 11, mentre la loro distribuzione secondo i parametri dimensionali è riportata in tabella 12) sono discusse di seguito. Bernstein et al (5) riferiscono di aver valutato *in vivo*, mediante uno studio condotto

Tabella 11 - Composizione chimica delle fibre minerali artificiali di nuova produzione oggetto di indagini scientifiche (composizione espressa come % in ossidi)

Componenti*	Tipi di fibre									
	MMVF 11	A	B	C	F	G	H	J	L	
	Alcuni tipi di prodotto B	Nuova lana di vetro	B-01/09	Nuova lana di vetro	Nuova lana di roccia	Nuova lana di roccia	Nuova lana di roccia	Nuova X607	Lana di roccia commerciale	
SiO ₂	63,4	65,00	61,5	61,70	56,30	60,10	57,20	58,3	46,3	
Fe ₂ O ₃	0,25	0,11	0,11	0,11	0,25	6,05	0,28	0,10	13,22	
TiO ₂	0,06	0,02	0,02	0,02	0,10	0,05	0,09	0,05	2,57	
Al ₂ O ₃	3,88	1,90	0,31	0,97	3,15	0,45	3,90	1,25	13,5	
CaO	7,45	7,40	15,60	7,15	26,10	18,80	25,15	38,7	10,04	
MgO	2,82	2,55	2,99	2,94	6,40	8,30	9,85	0,4	9,1	
Na ₂ O	15,45	16,10	15,51	16,06	3,20	5,50	0,17	0,3	3,05	
K ₂ O	1,32	0,65	0,72	0,59	0,65	0,15	0,10	0,1	1,41	
B ₂ O ₃	4,45	4,70	3,15	9,20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
P ₂ O ₅	0,0	1,10	0,0	1,05	2,90	0,08	2,85	0,05	0,35	
SO ₃	0,33	0,03	0,0	0,20	0,0	0,05	0,03	0,0	0,0	
Cr ₂ O ₃	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,04	
MnO	0,01	0,0	0,01	0,01	0,04	0,0	0,0	0,0	0,21	
ZrO ₂	0,0	0,0	0,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Totale	99,42	99,56	99,96	100,0	99,09	99,53	99,62	99,25	99,79	
Densità	2,52	2,50	2,62	2,54	2,77	2,70	2,68	2,78	2,88	
AGS K _{max}	23,7	27,6	37,4	34,0	30,1	31,9	27,5	37,0	-3,4	

I principali componenti chimici relativi alla composizione del materiale fibroso nel suo complesso sono riportati come percentuale di ossidi per ognuno dei tipi di fibre. Le lane di vetro sono generalmente caratterizzate da più elevate concentrazioni di Na₂O, mentre le lane di roccia hanno generalmente concentrazioni più elevate di CaO. La fibra B, solubile e ad alto tenore di CaO e Na₂O è in parte differente ed è stata inclusa per comparazione. Sono inoltre riportate per ogni fibra la densità e l'indice di solubilità, chimica (K_{max}) derivato da German Bundesanstalt für Arbeitsschutz (TRGS 905)

ni di esposizione, e a 13, 26 e 52 settimane di distanza dal primo dei 5 giorni di esposizione (5 per gruppo). Gli Autori riferiscono che l'analisi dell'andamento generale della clearance polmonare del carico inalato suggerisce l'esistenza di una cinetica di eliminazione di 2° ordine: alla base del fenomeno, oltre alla compartimentazione del polmone in ambiti diversi (alveoli, interstizio, linfonodi, etc.) sta la diversa interazione delle fibre con i macrofagi in relazione alla loro lunghezza; per inciso, lo stesso meccanismo è stato suggerito quale passaggio cruciale per la più rapida eliminazione delle fibre più lunghe rispetto alle più brevi. Nel periodo indicato, la riduzione nella lunghezza totale delle fibre è risultata pari al 63% per la MMVF "A" e al 22% per "11". L'emivita ponderata delle fibre oggetto del presente

studio è risultata largamente condizionata dalla lunghezza delle fibre: la più breve è risultata essere quella delle fibre di lunghezza >20 µm, pari a 3,5 giorni per la lana di vetro "MMVF A" e a 13 giorni per "MMVF 11". Inoltre, sempre per le fibre di lunghezza >20 µm, si è rilevata una eccellente correlazione tra il tempo di dissoluzione *in vitro* (misurato a pH 7,4) e il valore di emivita ponderata ($r=0,97$, $p<0,01$); questo dato, che differisce marcatamente da quello osservato per le fibre di lunghezza inferiore, suggerisce che la scomparsa delle fibre a lunghezza >20 µm sia mediata dalla loro dissoluzione a pH 7,4, che può avvenire o a livello alveolare o nell'interstizio, qualora la fibra sia in grado di penetrarvi.

Sulla base delle evidenze osservate Bernstein et al (5) hanno formulato una serie di

conclusioni, che possono essere riassunte come di seguito riportato: 1) sembra improbabile che una fibra vetrosa artificiale la cui composizione chimica porri - per le fibre lunghe >20 µm - ad una rimozione rapida almeno quanto quella della MMVF "11", * rispetto ai valori rispettivamente di 13 e 13 giorni per la lana di roccia (fibre F, G, H), (MMVF 11) e 45 giorni (fibra L) degli analoghi prodotti commerciali attualmente disponibili, e rispetto al valore ponderato di emivita di 536 dell'asbesto crocidolite, per fibre di pari lunghezza (5).

Thévenaz et al (84) riferiscono i risultati di uno studio condotto per esposizione inalatoria (*nose-only*) in ratti maschi Fisher 344 (16 gruppi, 20 animali per gruppo), a 5 tipi di MMVF (MMVF "A", "C", "G", "H" e "F"), ognuna per 3 diversi livelli di concentrazione (20, 30, o 40 mg/m³). Tale indagine, attuata per esposizione continua (6h/giorno, 5 giorni/settimana, per 2 o 4 settimane consecutive, era volta allo scopo di fornire informazioni comparative relativamente agli effetti biologici subcronici dei differenti tipi di fibre, sia dati sulle possibili relazioni con la concentrazione/effetto per la definizione di un protocollo per un successivo studio di cancerogenesi per esposizione inalatoria alle stesse fibre. Un periodo di 2 settimane post-esposizione è stato inoltre attuato allo scopo di ottenere informazioni comparative su persistenza, regressione, o insorgenza di effetti polmonari ritardati dovuti alle fibre testate. Il protocollo dello studio prevedeva il sacrificio degli animali a 3 scadenze: dopo 2 settimane di esposizione (5 per gruppo), dopo 4 settimane di esposizione (10 per gruppo) ed al termine delle ulteriori 2 settimane post-esposizione (5 per gruppo). Nel complesso, i risultati dello studio possono essere così riassunti:

Tabella 12 - Distribuzione delle fibre minerali artificiali di nuova produzione oggetto di indagine scientifica secondo i parametri dimensionali

Parametri	MMVF 11	Fibra A	Fibra B	Fibra C	Fibra F	Fibra G	Fibra H	Fibra J	Fibra L
Numero valutato	727	757	717	696	797	725	719	763	685
Intervallo	0,1-7,2	0,2-2,7	0,1-4,5	0,1-4,7	0,1-4	0,2-4,8	0,1-7	0,1-4	0,1-5,3
diametro (µm)	1,6-140	1,4-110	1,5-300	1,5-760	1,2-340	2-170	1,3-200	1,5-400	1,8-600
Intervallo lunghezza (µm)	0,93	0,64	0,61	0,67	0,62	0,78	0,84	0,59	0,87
Diametro medio (µm)	0,81	0,37	0,43	0,48	0,49	0,51	0,73	0,38	0,79
Lunghezza media (µm)	17	13	19	20	13	15	19	17	27
SD (µm)	17	13	25	38	16	16	20	24	39
GML (µm)	0,69	0,56	0,52	0,56	0,5	0,67	0,66	0,51	0,63
GSD	2,2	1,7	1,7	1,8	1,9	1,7	2,0	1,7	2,2
GML (µm)	12	9,5	12	13	9,4	11	13	11	16,9
GSD	2,3	2,2	2,4	2,3	2,3	2,2	2,4	2,5	2,5

sunti: 1) nell'arco dell'intera durata dello studio gli animali hanno goduto di buona salute generale, non si è osservata l'insorgenza di alcun segno clinico, non si sono segnalati eventi di mortalità spontanea; 2) per tutte le fibre studiate, e per tutte le diverse esposizioni, il principale effetto osservato — dose-dipendente e reversibile al cessare dell'esposizione — è stato rappresentato dall'accumulo dei macrofagi polmonari. Quando i macrofagi venivano reperiti a livello del lume alveolare, in massima parte nelle zone subpleurali, tale lesione veniva denominata "aggregazione macrofagica alveolare"; quando l'accumulo dei macrofagi avviene nell'interstizio, la lesione veniva definita quale "microgranuloma". I microgranulomi erano stati preventivamente osservati a livello delle giunzioni bronchiolo-alveolari, consistendo generalmente di 3-5 macrofagi. Tanto nei macrofagi alveolari quanto nei microgranulomi erano state occasionalmente descritte fibre fagocitate. Tanto le aggregazioni macrofagiche quanto i microgranulomi rappresentano il prodotto di reazioni cellulari aspecifiche all'inalazione di particolato esogeno; l'effetto di aggregazione è risultato più spiccato per la lana di roccia, ma omogeneamente modificato in termini assoluti per tutte le fibre indagate, e reversibile conseguentemente al cessare dell'esposizione; 3) in corrispondenza di nessuna delle scadenze osservate in questo studio si è osservata comparsa di attività fibroblastica o di deposizione di collagene. Va tuttavia sottolineato che ciò non rappresenta un elemento predittivo relativamente all'eventuale comparsa di fibrosi conseguente a scadenze di osservazioni più dilazionate nell'ambito di studi a lungo termine. Gli Autori hanno infine concluso che alla lu-

ce della modestia degli effetti osservati, risulta infine arduo stabilire — sulla base unicamente della morfologia e della natura dei reperti apprezzati — un protocollo di dosi per la progettazione di uno studio a lungo termine (84).

Lambré et al (38) riferiscono i risultati di uno studio condotto mediante test intraperitoneali in ratti femmina Wistar Chi:(W)BR, e volto alla valutazione delle potenzialità oncogene di 5 fibre vetrose artificiali di nuova generazione (MMVF "A", "C", "F", "G", "H") e comparazione rispetto a quelle mosstrate dalla crocidolite. Sembra opportuno sottolineare che le fibre vetrose artificiali in oggetto erano caratterizzate da solubilità maggiore, misurata a pH 7,4, rispetto ad altri tipi di fibre isolati attualmente disponibili (5). Un secondo scopo dello studio era rappresentato dall'uso dei test intraperitoneali a scopi regolatori per la valutazione del rischio cancerogeno, secondo quanto recentemente proposto in Germania: a tale proposito, gli Autori sottolineano che l'indagine è stata condotta secondo precisi criteri di valutazione istologica, secondo le linee delle buone pratiche di laboratorio (*good laboratory practice*, GLP) e in accordo con quanto definito dal "Sottogruppo Polveri" (*dust subgroup*) della Commissione MAK tedesca.

Il protocollo prevedeva il trattamento di ratti femmina Wistar Chi:(W)BR (51 animali per gruppo, un gruppo per ogni dosaggio per ognuna delle sostanze testate) mediante somministrazione intraperitoneale con: MMVF "A" e "C" (lane di vetro, borosilicati modificati con sodio), 4 differenti dosi di 0,7, 2,1, 7, 35 mg; MMVF "F", "G" e "H" (lane di roccia, silicati modificati con calcio), 3 differenti dosi di 1,1, 7,7, 55 mg; cro-

cidolite, 3 dosi di 0,005, 0,05, 0,5 mg. L'osservazione è stata attuata per un periodo di 130 settimane. Il protocollo dello studio è stato disegnato secondo alcune premesse generali, riassumibili come di seguito riportato: a) il test intraperitoneale è stato scelto quale maggiormente sensibile nell'identificare la potenzialità oncogena, ed i ratti femmina "Wistar" in quanto classicamente utilizzati per queste modalità di somministrazione ed estensivamente studiati dal punto di vista tossicologico ed istopatologico; b) la stessa potenzialità oncogena è stata valutata in relazione con la presenza in percentuale — nel campione iniettato — di cosiddette "fibre critiche" (*critical fibres*, CF) caratterizzate da lunghezza >5 µm, diametro <2 µm, rapporto lunghezza/diametro >5; c) i campioni iniettati erano stati appositamente preparati allo scopo di migliorarne la composizione in CF: in prima istanza, ciò rispondeva all'esigenza di rendere il campione utilizzato quanto più simile alle fibre normalmente reperibili in ambito professionale (lunghezza media 5-10 µm, diametro medio <2 µm); secondariamente, ciò era volto a permettere l'iniezione delle più alte dose possibili di CF in un volume totale tollerabile in quanto un aumento dei volumi o delle iniezioni avrebbe potuto portare ad un aumento di artefatti relativamente agli effetti ed alle risposte osservati; d) la lunga durata dello studio (130 settimane) risponde all'esigenza di identificare anche possibili effetti ad ampia latenza, quali per esempio il mesoteloma o i tumori intraddominali a diffusione sierosa (*intra-abdominal tumours with serosal spread*, IATSS); e) la somministrazione di crocidolite (a fibre lunghe) è stata utilizzata quale controllo positivo, mentre un gruppo di controllo negati-

vo era rappresentato da animali trattati con soluzione fisiologica. I risultati dello studio possono essere riassunti come di seguito riportati: 1) la frequenza di insorgenza di patologie tumorali non concernenti le membrane sierose non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra esposti e controlli; inoltre, la frequenza di tali patologie in termini assoluti è risultata paragonabile a quella usualmente osservata; 2) per ciò che attiene all'insorgenza di neoplasie a carico delle membrane sierose, la sola fibra "H" ha dato luogo ad insorgenza di mesoteloma con frequenza pari al 17% (8/51) nel gruppo di animali trattati per dosi pari a 55 mg. In base al complesso delle evidenze emerse, gli Autori hanno formulato le seguenti conclusioni: tra le MMVF testate, collettivamente caratterizzate da elevato tasso di dissoluzione *in vitro* (K_{os} 28-34 ng·cm³·h⁻¹ a pH 7,4) e da bassa biopersistenza *in vivo* (emivita 3,5-13 giorni per fibre a lunghezza >20 µm) e con campioni arricchiti con fibre dalle dimensioni che ne determinano la maggiore potenzialità tossica, la sola MMVF "H" ha mostrato potenzialità oncogena (al dosaggio più alto, pari 55 mg e corrispondente ad una concentrazione di 0,5x10⁹ CF). Va sottolineato che tra le fibre testate la MMVF "H" è quella che — nello studio per inalazione *in vivo* condotto da Bernstein et al (5) — ha evidenziato la maggiore biopersistenza relativa anche se ugualmente modesta in termini assoluti. Nelle MMVF "A", "C", "F" e "G" non è stato ravvisata potenzialità cancerogena a nessuna delle dosi somministrate, confermando pertanto il basso potere cancerogeno delle fibre a rapida dissoluzione e scarsa biopersistenza. Le evidenze fornite dal controllo positivo mediante la somministrazione

di crocidolite, con insorgenza dose-correlata di neoplasia (sia mesotelioma che IATSS), hanno invece confermato la sensibilità del test intraperitoneale attuato nelle condizioni descritte (38).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il progredire delle conoscenze scientifiche ed il costante affinarsi delle metodiche analitiche ha portato alla formulazione di una classificazione maggiormente articolata delle MMMF rispetto al passato per ciò che attiene alle loro caratteristiche di pericolosità tossicologica e più in particolare alla loro potenzialità cancerogena. Alla luce delle evidenze attualmente disponibili, le MMMF sono risultate nel loro complesso caratterizzate da una minore attività biologica delle rispetto all'asbesto, tanto negli effetti fibrotici quanto in quelli neoplastici. Relativamente a questi ultimi, risulta ormai accertato il ruolo cruciale svolto dalle proprietà chimico-fisiche dei diversi materiali fibrosi nel modulare la capacità oncogena: tra le caratteristiche chimico-fisiche di rilievo dal punto di vista tossicologico vanno principalmente annoverate le dimensioni delle fibre - quali lunghezza e diametro, nonché il rapporto tra le 2 grandezze - e le caratteristiche di struttura e composizione chimica. Secondo un assunto a valenza generale, gli aspetti morfologico-dimensionali condizionano in istanza la capacità delle fibre di raggiungere e di depositarsi in tratti diversi dell'apparato respiratorio, fino alle porzioni via via più fini e distali; le caratteristiche strutturali e di composizione chimica risultano invece principalmente importanti nella patogenesi del-

RIASSUNTO

Le progressive ingravescenti preoccupazioni per la salute, anche della popolazione generale, legate all'utilizzo dell'amianto hanno portato alla sua messa al bando a livello internazionale (per l'Italia, a norma del DPR 257/1992) ed hanno ulteriormente incentrato la ricerca - e conseguente produzione - di materiali fibrosi artificiali in grado di vicariare vantaggiosamente l'asbesto nelle sue eccellenti proprietà tecniche e nelle sue differenti applicazioni industriali sia in particolare di non rappresentare un pericolo per la salute dell'uomo. Le fibre artificiali sono classificate in fibre artificiali minerali (*man made mineral fibers*, MMMF) e fibre artificiali organiche (*man made organic fibers*, MMOF). Le MMMF sono prodotte a livello industriale a partire dalla fine del XIX secolo e sono principalmente utilizzate per l'isolamento tecnico ed acustico, e nell'industria aerospaziale tramite la sintesi industriale di minerali naturali e loro composti, come quarzo, ossidi di metalli alcalini ed alcalino-terrosi, ossidi di metalli pesanti, argilla; tra essi si annoverano principalmente fibre vetrose sottili, lane minerali (vetro, roccia, scoria), fibre ceramiche refrattarie. Al di là degli effetti di tipo irritativo a carico della cute e delle mucose, legati all'azione meccanica del particolato fibroso nei confronti dei tessuti, le similitudini delle MMMF rispetto all'amianto dal punto di vista della composizione chimica hanno ugualmente condotto ad una attenta valutazione della possibile attività biologica posseduta dalle fibre medesime, con particolare riguardo agli effetti respiratori (sia tumorali che non).

Le caratteristiche chimico-fisiche delle

MMMF, al pari di quanto si registra nei confronti degli altri materiali fibrosi (tanto naturali quanto artificiali), rivestono un'importanza cruciale nel determinismo della loro potenzialità di azione biologica e dei conseguenti effetti tossicologici. Tra le caratteristiche chimico-fisiche di rilievo dal punto di vista tossicologico vanno principalmente annoverate le dimensioni delle fibre - quali lunghezza e diametro, nonché il rapporto tra le 2 grandezze - e le caratteristiche di struttura e composizione chimica. Secondo un assunto a valenza generale, gli aspetti morfologico-dimensionali condizionano in istanza la capacità delle fibre di raggiungere e di depositarsi in tratti diversi dell'apparato respiratorio, fino alle porzioni via via più fini e distali; le caratteristiche strutturali e di composizione chimica risultano invece principalmente importanti nella patogenesi dell'effetto tossicologico: dalla possibilità di generare specie reattive (ossidanti) alla maggiore o minore durabilità, biodegradabilità e biopersistenza delle fibre. Principalmente sulla base di studi sperimentali, peraltro condotti mediante impianto del materiale nell'organismo degli animali da laboratorio, nel 1987 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha classificato i materiali lana di vetro, lana di roccia, lana di scoria e fibre ceramiche quali "agenti potenzialmente cancerogeni per l'uomo", allocati nella categoria "2b" secondo i criteri stabiliti dalla *International Agency for Research on Cancer* di Lione. Alla luce delle evidenze scientifiche rese successivamente disponibili, le MMMF sono risultate caratterizzate da una minore attività biologica rispetto all'asbesto, tanto negli effetti fibrotici quanto in quelli neoplastici. Da un punto normativo-regola-

mentario, il progredire delle conoscenze scientifiche ed il costante affinarsi delle metodiche analitiche ha così portato alla formulazione di una classificazione articolata delle MMMF per ciò che attiene alla potenzialità tumorigena: secondo i criteri classificatori adottati dall'Unione Europea, per "lana di roccia/scoria, produzione" è prevista etichettatura di pericolosità quale "T, R49" (tossico, cancerogeno per inalazione), mentre per "lana di vetro, produzione" è prevista etichettatura di pericolosità quale "Xn, R40" (nocivo, possibilità di effetti irreversibili). Ancor più recentemente, il ruolo cruciale delle proprietà chimico-fisiche delle MMMF nel determinismo della maggiore o minore pericolosità tossicologica, e segnatamente della loro capacità oncogena, ha trovato un chiaro riscontro nei contenuti della Direttiva 97/69/EC del 5 dicembre 1997, che rappresenta il 23° adeguamento tecnico alla Direttiva 67/548/EEC riguardo a classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose, con particolare riguardo ad alcuni tipi di MMMF. I nuovi criteri introdotti da tale normativa europea (recepiti in Italia con Decreto del Ministro della Sanità 1.9.98, G.U. 18.11.98) per la classificazione ed etichettatura delle fibre minerali artificiali sono i seguenti: lane minerali (orientazione casuale, tenore di ossidi alcalini) ossidi alcalino-terrosi superiore a 18% in peso) Xn, R40-Xi, R38; fibre ceramiche refrattarie, fibre per scopi speciali (orientazione casuale, tenore di ossidi alcalini e ossidi alcalino terrosi pari o inferiore a 18% in peso) T, R49 - Xi, R38. L'accertata rilevanza delle proprietà chimico-fisiche delle MMMF nel modularne le caratteristiche tossicologiche ha acquisito valore dirimente ai fini normati-

vo-regolamentari ai sensi della Direttiva 97/69/EC, che introduce in prima istanza il parametro del tenore in ossidi alcalini e alcalino-terrosi quale prima chiave di lettura in termini di pericolosità tossicologica e successivamente l'applicazione delle annotazioni "Q" e "R" quali ulteriori nuovi elementi per la classificazione sovraripartita. La nota "R" può essere applicata a diversi tipi di MMMF, dalla lane minerali alle fibre ceramiche refrattarie e alle fibre per scopi speciali, e risulta funzionale al parametro di dimensione del diametro. Nello specifico, la Direttiva 97/69/EC prevede che - mediante apposizione della nota "R" - la classificazione di cancerogenesi non si applichi alle fibre con diametro geometrico medio ponderato (meno due errori standard) superiore a 6 µm. La nota "Q" è specificamente inerente alle lane minerali; la sua applicazione è funzionale alle evidenze tossicologiche da studi *in vitro* condotti per diverse tecniche di esposizione e/o somministrazione, in termini tanto di ridotta biopersistenza (per fibre lunghe >20 µm), quanto di scarsa capacità di dar luogo a rilevanti effetti patogeni - tumoral e non - nell'animale da esperimento. In conclusione, quale futuro scenario, sembra ragionevole ipotizzare che il progredire delle conoscenze scientifiche ed il continuo perfezionamento dei processi industriali porti alla identificazione e conseguente produzione di materiali fibrosi con caratteristiche di sempre minore biopersistenza e sempre maggiore solubilità nei fluidi biologici, e quindi sempre più sicuri e privi di caratteristiche di pericolosità dal punto di vista tossicologico, tanto nei confronti dei soggetti esposti in ambito professionale quanto della popolazione generale.

BIBLIOGRAFIA

1. BARRET JC, THOMASSEN DG, HESTERBERG TW: Role of gene and chromosomal mutations in cell transformation. *Ann NY Acad Sci* 1983; 407: 291-300
2. BAUER JF, LAW BD, HESTERBERG TW: Dual pH durability studies of man-made vitreous fiber (MMVF). *Environ Health Persp* 1994; 102: 61-65
3. BLAKE TL, JONES W, BARON P, et al: *Development of an alveolar macrophage microculture system to assess fiber toxicity*. Sixth International Meeting on the Toxicology of Natural and Man-Made Fibrous and Non-Fibrous Particles, Lake Placid NY, September 15-18, 1994 (as quoted in Blake et al (4))
4. BLAKE TL, CASTRANOVA V, SCHWEGLER-BERRY D, et al: Effect of fiber length on glass microfibrer cytotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1998; 54: 243-259
5. BERNSTEIN DM, MORSCHIEDT C, GRIMM HG, et al: Evaluation of soluble fibers using the inhalation biopersistence model, a nine-fiber Comparison Inhal Toxicol 1996; 8: 345-385
6. BOFFETTA P, SARACCI R, ANDERSEN A, et al: Cancer mortality among man-made vitreous fiber production workers. *Epidemiol* 1997; 8: 259-268
7. BRODY AR, ROE MW: Deposition pattern of inorganic particles at the alveolar level in the lungs of rats and mice. *Am Rev Resp Dis* 1983; 128: 724-729
8. BROWN GM, COWIE H, DAVIS JMG, et al: *In vitro* assays for detecting carcinogenic mineral fibres: a comparison of two assays and the role of fibre size. *Carcinogenesis* 1983; 7: 1971-1974
9. BROWN RC, CHAMBERLAIN M, DAVIES R, et al: *In vitro* biological effects of glass fibers. *J Environ Pathol Toxicol* 1979; 2: 1369-1383
10. BROWN RC, CHAMBERLAIN M, SKDMORE JW: *In vitro* effects of man-made mineral fibers. *Ann Occup Hyg* 1979; 22: 175-179
11. BROWN N, PEAT J, MELLIS C, WOOLCOCK A: Respiratory health of workers in the Australian glass wool and rock wool manufacturing industry. *J Occup Health Safety - Australia and New Zealand* 1996; 12: 319-325
12. COMMISSIONE CONSULTIVA TOSSICOLOGICA NAZIONALE (CCTN): Raccolta dei pareri espressi dalla Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale nel 1996, Serie Relazioni 97/2, 1997
13. DAVIES R: The effect of mineral fibers on macrophages. *IARC Sci Publ* 1980; 30: 419-425
14. DAVIS JM: *Pathological aspects of the injection of glass fiber into the pleural and peritoneal cavities of rats and mice*. Occupational Exposure to Fibrous Glass, Proceedings of a Symposium, NIOSH Publication 76-151; 141-149 Washington (DC): U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1976
15. DONALDSON K, BROWN RC, BROWN GM: Respirable industrial fibres: mechanism of pathogenicity. *Thorax* 1993; 48: 390-395
16. EUROPEAN CENTER FOR ECOTOXICOLOGY AND TOXICOLOGY OF CHEMICALS: *Toxicology of man-made organic fibers (MMOF)*, ECETOC Technical Report No 69
17. FERON VJ, SCHERREBERG PM, IMMEL HR, et al: Pulmonary response of hamsters to fibrous glass: chronic effects of repeated intratracheal instillation with or without benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1495-1499
18. FILM, Syndicat National des Fabricants d'Isolants en Laines Minérales Manufacturées, Laines minérales et santé. Paris: Livre Blanc, 1997
19. FUBINI B: Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Persp* 1997; 105: 1013-1020
20. GOLDSTEIN B, RENDALL REG, WEBSTER I: A comparison of the effects of exposure of beagons to crocidolite fibrous glass dust. *Environ Res* 1983; 32: 344-359
21. GORMLEY IP, BROWN GM, COWIE H, et al: The effects of fiber length on the *in vitro* toxicity of

22. GROSS P: The effects of fibrous class dust on the lung of animals. In *Occupational Exposure to Fibrous Glass*, Proceedings of a Symposium, NIOSH Publication 76-151: 166-179. Washington (DC): U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1976
23. GULDBERG M, CHRISTENSEN V, KRAIS W, et al: Method for determining *in vitro* dissolution rates of man-made vitreous fibres. *Glastech Ger Glass Sci Technol* 1995; 68: 181-187
24. HART GA, NEWMAN M, BUNN WB, et al: Cytotoxicity to refractory ceramic fibers to chinese marmoset ovary cells in culture. *Toxic in Vitro* 1992; 6: 317-326
25. HESTERBERG TW, BARRET JC: Dependence of asbestos- and mineral dust-induced transformation of mammalian cells in culture upon fiber dimension. *Cancer Res* 1984; 44: 2170-2180
26. HESTERBERG TW, BARRET JC: Induction by asbestos fibers of anaphase abnormalities: mechanism for aneuploidy induction and possibly carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1985; 6: 473-475
27. HESTERBERG TW, BUTTERICK CJ, OSHIMURA M, et al: Role of phagocytosis in syrian hamster cell transformation and cytogenetic effects induced by asbestos and short and long glass fibers. *Cancer Res* 1986; 46: 5795-5802
28. HESTERBERG TW, MAST R, MCCONNELL EE, et al: Chronic inhalation toxicity of refractory ceramic fibers in syrian hamsters. In *Proceedings of the International Workshop on Mechanisms of Fibre Carcinogenesis 1991* (as quoted in Hesterberg et al (29))
29. HESTERBERG TW, HART GA, BUNN WA, et al: *In vitro* toxicology of fibers: mechanistic studies and possible use for screening assays. In Warheit DB (ed): *Fiber Toxicology*. San Diego (CA): Academic Press, 1993: 139-170
30. HESTERBERG TW, MILLER WC, MUSSELMAN RP, et al: Biopersistence of man-made vitreous fibers and crocidolite asbestos in the rat lung following inhalation. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 29: 267-279
31. HEALTH & SAFETY EXECUTIVE: Minty CA, Meldrum M, Phillips AM, Ogdan TL, *et al*: *Aramid Respirable Fibres Criteria Document* for an Occupational Exposure Limit. HSE Books, Crown 1995
32. HUGHES JM, JONES RN, GLINDMEYER HW, et al: Follow-up study of workers exposed to man-made mineral fibres. *B J Ind Med* 1993; 50: 653-667
33. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: *Man-made mineral fibers and radon*. Lyon: IARC 1988 (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, no 43)
34. INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION: *Working document on safety in the use of mineral and synthetic fibres of a meeting of experts*. Geneva: 1989
35. INSTITUTE OF OCCUPATIONAL MEDICINE: 1995, a study to examine the post-exposure burdens and size distributions of three fibre types following high concentration inhalation exposure (Final Report), Edinburgh 1995 (written report by Searl (72))
36. KODAMA Y, MANESS SC, IGLEHART JD, et al: Cytotoxic and cytogenetic effects of asbestos to human bronchial epithelial cells in culture. *Carcinogenesis* 1993 (as quoted in Hesterberg et al (29))
37. LAFUMA J, MORIN M, PONCY JL: Mesothelioma induced by intrapleural injection of different types of fibers in rats. synergistic effects of other carcinogens. In Wagner JC, Davis W (eds), *Biological effects of mineral fibres*, IARC Scientific Publication 30 1980: 311-320
38. LAMBRÉ C, SCHORSCH F, BLANCHARD O, et al: An evaluation of the carcinogenic potential of five man-made vitreous fibres using the intraperitoneal test. *Inhal Toxicol* (in press)
39. LAW BD, BUNN WB, HESTERBERG TW: Solubility of polymeric organic fibers and man-made vitreous fibers in Gamble's Solution. *Inhal Toxicol* 1990; 2: 321-339
40. LE BOUFFANT L, HENIN JP, MARTIN JC, et al: Distribution of inhaled MMMF in the rat lung - long term effects. In *Biological effects of man-made mineral fibres*. Proceedings of a WHO/IARC Conference, Copenhagen Den- mark, April 20-22, 1982. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen 1984; 4: 143-169
41. LIPKIN LE: Cellular effects of asbestos and other fibers: correlation with *in vivo* induction of pleural sarcoma. *Environ Health Perspect* 1980; 34: 91-102
42. LIPPMANN M: Review of asbestos exposure indices. *Environ Res* 1988; 46: 86-106
43. LUOTO K, HOLOPAINEN M, SAVOLAINEN K: Durability of man-made vitreous fibres as assessed by dissolution of silicon, iron and aluminum in rat alveolar macrophages. *Ann Occup Hyg* 1995; 39: 855-867
44. LUTZ W, KRAJEWSKA B: Oxidative stress as a basic mechanism of the carcinogenic effect of man-made mineral fibers on the human body (in Polish). *Med Pr* 1995; 46: 275-284 (abstract)
45. MARSH GM, ENTERLINE P: Mortality among a cohort of US man-made mineral fiber workers: 1985 follow-up. *J Occup Med* 1990; 32: 594-604
46. MARSH G, STONE R, YOUNG A, et al: Mortality among United States rockwool and slagwool workers. 1989 Update. *J Occup Health Safety - Australia and New Zealand* 1996; 12: 297-312
47. MAST RW, UTELL MJ: Man-made vitreous fibers. In Zenz C, Dickerson OB, Horvath EP Jr (eds): *Occupational Medicine*, 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1994: 185-193
48. MCCONNELL EE, WAGNER JC, SKIDMORE JC, et al: A comparative study of the fibrogenic and carcinogenic effects of UICC Canadian Chrysotile B asbestos and glass microfibre (JM100). In *Biological effects of man-made mineral fibres*. Proceedings of a WHO/IARC Conference, Copenhagen Denmark, April 20-22, 1982. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen 1984; 4(2): 243-252
49. MIN LEE I, HENNINGENS CH, TRICHOPOULOS D, et al: Man-made vitreous fibers and risks of respiratory system cancer: a review of the epidemiologic evidence. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 725-738
50. MITCHELL RI, DONOFRIO DJ, MOORMANN WJ: Chronic inhalation toxicity of fibrous glass in rats and monkeys. *J Am Coll Toxicol* 1986; 5: 545-575
51. MONCHAUX G, BIGNON J, JAURAND MC: Mesotheliomas in rats following inoculation with acid-leached chrysotile asbestos and other mineral fibres. *Carcinogenesis* 1981; 2: 229-236
52. MOHR U, POTT F, VONNAHMO FI: Morphological aspects of mesotheliomas after intracheal instillation of fibrous dust in syrian golden hamsters. *Exp Pathol* 1984; 26: 179-183
53. MÜHLE H, POTT F, BELMANN B, et al: Inhalation and injection experiments in rats to test the carcinogenicity of MMMF. *Ann Occup Hyg* 1987; 31: 755-764
54. MÜHLE H, BELMANN B, POTT F: Durability of various mineral fibres in rat lungs. In Brown R, Hoskins J, Johnson N (eds): *Mechanisms in fibre carcinogenesis*, NATO ASI Series A: Life Sciences 1991; 223: 181-187
55. MUSSELMAN RP, MILLER WC, EASTES W, et al: Biopersistence of man-made vitreous fibers and crocidolite fibers in rat lungs following short-term exposures. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 139-143
56. NADÉAU D, PARADIS D, GAUDREAU A, et al: Biological evaluation of various natural and man-made mineral fibres: cytotoxicity, emphysema and chemiluminescence study. *Environ Health Persp* 1983; 51: 374 (abstract)

57. OSHIMURA M, HESTERBERG TW, TSUTSUI T, et al: Correlation of asbestos-induced cytogenetic effects with cell transformation of syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Res* 1984; 44: 5017-5022
58. PETERS GA, PETERS BJ: Sourcebook on asbestos disease: medical, legal and engineering aspects. Garland Law Publ, New York NY 1986; 2: 190-210
59. PEZERAT H, GUIGNARD J, CHERRIE JW: Man-made mineral fibers and lung cancer: an hypothesis. *Toxicol Ind Health* 1992; 8: 77-87
60. PICKRELL JA, HILL JO, CARPENTER RL, et al: *In vitro* and *in vivo* Response after exposure to man-made mineral and asbestos insulation fibers. *Am Ind Hyg Ass J* 1983; 44: 557-561
61. POTT F, FRIEDRICH KH: Tumoren der ratte nach i.p. injection faserformiger staube. *Naturwissenschaften* 1972; 59: 318
62. POTT F, HUTH F, FRIEDRICH KH: Tumorigenic effects of fibrous dust in experimental animals. *Environ Health Persp* 1974; 9: 313-315
63. POTT F, HUTH F, FRIEDRICH KH: Results of animal carcinogenesis studies after implantation of fibrous glass and their implications regarding human exposure. In *Occupational exposure to fibrous glass*. Proceedings of a Symposium, NIOSH Publication 76-151, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington DC 1976: 183-191
64. POTT F, HUTH F, SPURNY K: Tumor induction after intraperitoneal injection of fibrous dusts. In Wagner JC, Davis W (eds): *Biological effects of mineral fibers*. Lyon: IARC, 1980: 311-320 (IARC Scientific Publication 30)
65. POTT F, SCHLAPKOTER HW, ZIEM U, et al: New results from implantation experiments with mineral fibers. In *Biological effects of man-made mineral fibers*. Proceedings of a WHO/IARC Conference, Copenhagen Denmark, April 20-22, 1982, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen 1984; 4: 286-302
66. POTT F, ZIEM U, REIFFER F, et al: Carcinogenicity studies in fibres, metal compounds and some other dusts in rats. *Exp Pathol* 1987; 32: 129-152
67. RUTTNER JR, LANG AB, GUT DR, et al: Morphological aspects of interactions between asbestos fibers and human mesothelial cell cytoskeleton. *Exp Cell Biol* 1987; 55: 285-294
68. SARAACCI R, SIMONATO L, ACHESON ED, et al: Mortality and incidence of cancer of workers in the man-made vitreous fibres producing industry: an international investigation at 13 European plants. *Br J Ind Med* 1984; 41: 425-436
69. SCHLESINGER RB: Comparative deposition of inhaled aerosols in experimental animals and humans: a review. *J Toxicol Environ Health* 1985; 15: 197-214
70. SCHOLZE J, CONRADT R: An *in vitro* study of the chemical durability of siliceous fibres. *Ann Occup Hyg* 1987; 31: 683-692
71. SEARL A: A review of the durability of inhaled fibres and options for the design of safer fibres. *Ann Occup Hyg* 1994; 38: 839-855
72. SEARL A: A comparative study of the clearance of respirable para-aramid, chrysotile, and glass fibres from rat lungs. *Ann Occup Hyg* 1997; 41: 217-233
73. SIMONATO L, FLETCHER AC, CHERRIE JW, et al: The man-made mineral fiber European historical cohort study. Extension of the follow-up. *Scand J Work Environ Health* 1986; 12: 34-37
74. SIMONATO L, FLETCHER AC, CHERRIE JW, et al: The International Agency for Research on Cancer Historical Cohort Study of MMMF Production Workers in Seven European Countries: Extension of the follow-up. *Ann Occup Hyg* 1987; 31: 603-623
75. SINGOCK AM, DELHANTY JDA, CASEY G: A comparison of the cytogenetic response to asbestos and glass fibre in chinese hamster and human cell lines: demonstration of growth inhibition in primary human fibroblasts. *Mutat Res* 1982; 101: 257-268

76. STANGH J, COFFMAN MA: Man-made mineral fibers. In Clayton GD, Clayton FE (eds): *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology* (4th ed.). New York (NY): J Wiley & Sons Inc, 1991: 289-327
77. SMITH WE, HURBERT PD, SOBEL HJ: Dimensions of fibers in relation to biological activity. In Wagner JC, Davis W (eds): *Biological effects of mineral fibers*. Lyon: IARC, 1980: 357-360 (IARC Scientific Publication 30)
78. SMITH DM, ORTIZ LW, ARCHULETA RF, JOHNSON RF: *Long term health effects in hamsters and rats chronically exposed to man-made vitreous fibres*, 8EHQ-1186-0553 Suppl Office of Toxic Substances, Washington (DC); U.S. Environmental Protection Agency, 1986
79. SMITH DM, ORTIZ LW, ARCHULETA RF, JOHNSON RF: Long term health effects in hamsters and rats chronically exposed to man-made vitreous fibres. *Ann Occup Hyg* 1987; 31: 731-750
80. STANTON MF, WRENCH C: Mechanism of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 797-821
81. STANTON MF, LAYARD M, TEGERIS A: Carcinogenicity of fibrous glass: pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 587-603
82. STANTON MF, LAYARD M, TEGERIS A, et al: Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestos and other fibrous materials. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 959-975
83. STYLES JA, WILSON J: Comparison between *in vitro* toxicity of two novel fibrous mineral dusts and their tissue reactions *in vivo*. *Ann Occup Hyg* 1976; 19: 63-68
84. THEVENAZ P, TEICHERT U, BIEDERMANN K, et al: *4-week range finding inhalation study of respirable man-made vitreous fibers (MMVF A, C, G, H & F) in rats with a 2-week recovery period*. RCC Project 350998, Final Report November 14, 1997 (confidential)
85. TUKES F, BECK EG: Comparison of length-dependent cytotoxicity of inhalable asbestos and man-made mineral fibres. *IARC Sci Pub*, 1980; 30: 475-483
86. TUKES F, BECK EG: Macrophage functions after exposure to mineral fibres. *Environ Health Persp* 1983; 51: 67-72
87. TUKES F, BECK EG: Influence of well-defined mineral fibres of proliferating cells. *Environ Health Persp* 1983; 51: 275-279
88. TIMBRELL V: The inhalation of fibrous dusts. *Ann NY Acad Sci* 1965; 132: 255-237
89. TIMBRELL V: Fibres and carcinogenesis. *J Occup Health Soc Aust* 1983; 3: 3-12
90. VALLIATHAN V, MEGE JF, SHI X, DALAL NS: Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1992; 6: 404-413
91. VU VT, DEARFIELD KL: Effects of fibers in experimental studies. In Warheit DB (ed): *Fiber toxicology*. San Diego (CA): Academic Press, Inc, 1993: 449-492
92. WAGNER JC, TIMBRELL V: Mesothelioma in rats after inoculation with asbestos and other mineral. *Br J Cancer* 1973; 28: 173-185
93. WAGNER JC, BERRY GB, SKIDMORE JW: Studies on the carcinogenic effects of fiber glass of different diameters following intrapleural inoculation in experimental animals. In *Occupational exposure to fibrous glass*, Proceedings of a Symposium, Washington DC: NIOSH Publication, US Department of Health, Education and Welfare, 1976: 76-151
94. WAGNER JC, BERRY GB, HUI RJ, et al: Animal Experiments with MMM(V) fiber-effects on inhalation and intrapleural inoculation. In *Biological effects of man-made mineral fibers* 4, Vol. 2, pp. 209-233, Proceedings of a WHO/IARC Conference, Copenhagen Denmark, April 20-22, 1982, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen
95. WARHEIT DB, HAFSTSKY MA: Species comparison of proximal alveolar deposition patterns of

- inhaled particulates. *Exp Lung Res* 1190; 76: 81-97
96. WARHEIT DB, HARTSKY MA: Influences of gender, species and strain differences in pulmonary toxicological assessment of inhaled particles and/or fibres. In Mohr U, Dungworth DL, Mauderly JL, Oberdoester G (eds): *Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract*. Washington (DC): ILSI Press, 1994; 253-266
97. WHEELER C: Exposure to man-made mineral fibers: a summary of current animal data. *Toxicol Ind Health* 1990; 6: 293-307
98. WHO: European Programme for Occupational Health, 1992. Validity of methods for assessing the carcinogenicity of man-made fibres. Executive Summary of a WHO Consultation, May 19-20th 1992
99. WRIGHT GW, KUSCHNER M: The influence of varying length of glass and asbestos fibers on tissue response in Guinea pigs. In Watton WH (ed.): *Inhaled particles*. New York (NY): Pergamon, 1977; 455-474
100. ZOTTOS B, ROUYER-ARCHER E, DE MERINGO A, et al: *In vitro* measurement of fiber dissolution rate. *Inh Tox* (in press)