

E207

統計解析及び *in vitro* 試験によるナノ材料のハザード評価

(東大院工) ○(学)宮負 健一*・(正)稲澤 晋・(正)荒川 正幹・(正)船津 公人・(正)山口 由岐夫
(国際医セ) (正)花田 三四郎・(正)山本 健二

1. 緒言

ナノ材料の研究開発は世界中で行われており、サイズ・化学種・表面等の異なる物性を持った新規材料が次々と生産されている。一方、それらの人体への吸入曝露は肺の線維化(塵肺)等の原因となるため、ハザード評価や曝露評価が急務である。

ハザード評価の課題には、材料の物性とハザードの相関関係の明確化や、より簡便な *in vitro* 試験による *in vivo* のハザード推定手法の確立がある。

本研究では、既報の *in vitro*・*in vivo* 試験結果の統計解析と、結晶質及びアモルファスのシリカ粒子を用いた *in vitro* 試験により上記解決を図った。

2. 統計解析の方法と結果

150報の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の論文を解析対象とした。試験材料は各種金属や炭素やシリカなどで、1次粒径はナノからミクロンまで、細胞種は多種多様で、実験動物は約90%がラットだった。

in vitro 試験の解析では、細胞生存率について、粒子曝露時間を24hに標準化した場合の EC50 (50%有効濃度：50%の細胞死に要する粒子濃度)を粒子重量濃度単位[$\mu\text{g}/\text{mL}$]で求めた。細胞毒性の高さは溶解度の高さと正に相関した(図1)。

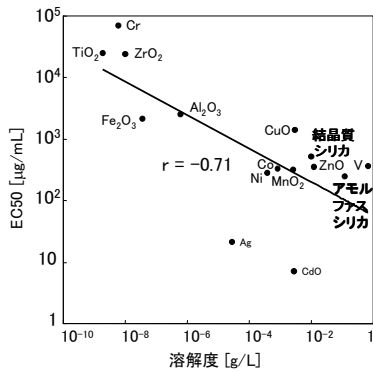


図1. 金属・シリカ粒子の溶解度と EC50 の関係

in vivo 試験の解析では、粒子の生理食塩水分散液を気管内投与し、数日後に回収した気管支肺胞洗浄液中の LDH(乳酸脱水素酵素：細胞死の際放出される、肺線維化やガンのマーカー)値を扱った。LDH 値を粒子表面積濃度[$\text{cm}^2/\text{kg-weight}$]と投与後の時間減衰項で関係づけるモデル式により、各化学種の材料のデータをフィッティングした。さらに100 cm^2/kg 投与時の1日後・1月後の LDH 値をモデルから求め、*in vivo* 指標とした。

図2は、横軸が pEC50(= -Log₁₀EC50)、縦軸が *in*

in vivo 指標の散布図である。pEC50 と1日後の LDH 値とは中程度の相関があったが、1月後の LDH 値とはほとんど相関がなかった。また、アモルファスシリカと、肺線維化能がより高く許容濃度基準のより厳しい結晶質シリカに着目した。アモルファスの方が細胞毒性は高い(pEC50 が大きい)にも関わらず *in vivo* の LDH 値は小さく、逆相関となった。つまり、*in vivo* の細胞毒性の高低は *in vitro* 試験の細胞毒性の高低から単には予測できず、EC50 に代わる *in vitro* 指標が必要であると言える。

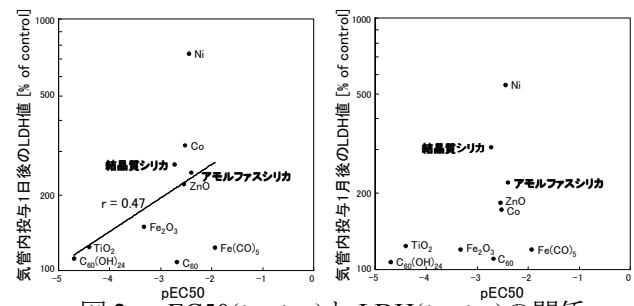


図2. pEC50(*in vitro*)と LDH(*in vivo*)の関係

3. 新規 *in vitro* 指標の探索方法と結果

肺線維化促進因子の TGF- β 1 産生量に着目して *in vitro* 比較試験を行った。結晶質シリカ粒子(一次粒径 400 nm)と、アモルファスシリカ粒子(12・120・1400 nm の3種)を、1.56~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でマウス肺胞マクロファージに48h曝露させ、TGF- β 1 及び MIP-2 の産生量と細胞生存率を測定した。

TGF- β 1 産生量は、結晶質シリカのみコントロールレベルを越え、*in vivo* での肺線維化能並びに図2の LDH 値と相関した(図3)。 *in vivo* のハザード推定指標として TGF- β 1 が有望と示唆された。

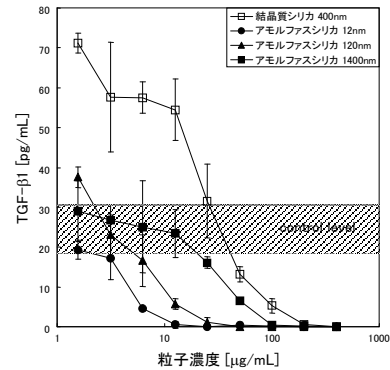


図3. シリカ粒子(4種)の濃度と TGF- β 1 産生量の関係

* TEL, FAX: 03-5841-7309

E-mail: kenichi@chemsys.t.u-tokyo.ac.jp