

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（H30-化学-一般-004）令和元年度分担研究報告書

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
分担研究課題名：*in silico* 評価系に関する研究

分担研究者：大野彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
研究協力者：広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

研究要旨：ナノマテリアルは、同じ物質でも粒径サイズが 1–100 nm と定義されており結晶構造など物性の違いにより、多彩な機能を生ずる特性を有している。近年、ナノマテリアルは、生産現場のほか家庭用品などへの利用の拡大と共に、ヒトへの健康影響の評価が重大な課題となっている。ナノマテリアルの有害性については、物理化学的特性や表面修飾により有害性が異なることが知られており、物理化学的性状と有害性情報を関連付けるような評価法が必要とされる。国内では、こうした評価を行うための情報整理が未だされていないのが現状である。一方、海外では、EU US がナノマテリアルの規制への枠組みを進めており、さらに経済協力開発機構（以下、「OECD」と記載）では、ナノマテリアルの規制に向けた代表的なナノマテリアルについての特有の物理化学的性状と有害性情報等を収載した報告書（*dossier*：有害性評価書）を公開している。本研究では、ナノマテリアルの生体への健康影響に対する安全性評価に向けて *in vitro* / *in vivo* の自験データおよび文献などのデータによるナノマテリアルの安全性評価のデータの集積とデータベースの構築を目的として、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データおよび QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。

今年度は、5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NPs: NM200、NM201、NM202、NM203、NM204）について、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムで作成し評価文書およびナノマテリアルの公開データベースに収載された物理化学的性状情報と有害性情報について収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施した。さらに収集・整理した物理化学的性状と有害性情報との関連性について多変量解析法を実施し、本解析手法の有用性について検討した。

A. 研究目的

2011 年に欧州において、ナノマテリアルの定義が確定し、各国でナノマテリアルに対する登録制度に向けて整備を進めている。しかし、一般の化学物質の登録システムを中心としていることから、食品接触剤、医療器具、化粧品、農薬、食品および飼料は適応除外となっている。さらに、ナノマテリアルの安全性や暴露に関するような情報の十分なデータについては、未だ乏しい状況である。産業用ナノマテリアルのナノ粒子は、粒径サイズが 1–100 nm とされ、それよりも大きな粒径のものは微粒子に分類されている。一方、ナノマ

テリアルは物理化学的特性が従来の粒子と異なることから、既存の毒性試験法が適応可能かどうかについて問題となっている。また、近年、ヒト健康影響への可能性が指摘されておりナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきている。冒頭で述べたように、欧州連合では、ナノ材料の安全性のデータの届出・登録の義務化への整備が進められており、一方、国内では、カーボンナノチューブ等で形状やサイズによって毒性が異なる可能性を指摘している。

二酸化ケイ素（SiO₂）のナノ粒子は、医薬品・食品等では吸湿防止、流動性向上、歯磨き粉の研

磨剤などや、ゴムの強度向上、インク・塗料では発色や着色性の向上のため等、工業的にも幅広く利用されている。また、二酸化ケイ素ナノ粒子の結晶多形は、圧力や温度などの条件により様々に形成し、結晶質や、非晶質(アモルファス)に大別される。

国際がん研究機関 (IARC)は、結晶質シリカ (石英やクリストバル石 CAS:14808-60-7) をヒトへの発がん物質 (グループ 1) と分類している。炭素 (C) とケイ素 (Si) の 1:1 の化合物である髭状炭化ケイ素(CAS: 409-21-2)は、ヒトに対しておそらく発がん性がある物質 (グループ 2 A)、また、繊維状炭化ケイ素(CAS: 308076-74-6) はヒトに対して発がん性の可能性がある物質 (グループ 2 B)、非晶質二酸化ケイ素のヒトへの発ガン性は分類できない (グループ 3) としている。しかし、二酸化ケイ素のナノ粒子の安全性評価は進んでおらず、ヒトへの暴露による健康影響の評価が重要な課題となっている。

ナノマテリアルの特性から、その有害性は他の化学物質とは異なることが指摘されており、ナノマテリアルの健康影響を評価するためには物理化学的性状と有害性情報を関連付けた評価法が必要となる。しかし、現状ではこうした評価を行うための情報が殆ど整理されていない。近年、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムでは、代表的なナノマテリアルについて、ナノマテリアル特有の物理化学的性状情報と有害性情報を収載した dossier(ドシエ: 安全性データ集)試験データの報告書を公開している。

本研究では、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データおよび QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。今年度は、二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) について、OECD の dossier およびナノマテリアルの公開データベースに収載された物理化学的性状情報と有害性情報について収集・整理し、解析に資するデータの資料作成を行った。さらに収集・整理した物理化学的性状データと有害性データとの関連性について解析を実施した。

B. 研究方法

1. 対象物質

OECD ウェブサイト上の Silicon dioxide - Manufactured nanomaterial¹にて公表されている Summary dossier²に収載された二酸化ケイ素ナノ粒子 (NM-200、NM-201、NM-202、NM-203、NM-204) を対象とした (Table 1)。

2. 調査対象情報源

以下の情報源を調査対象情報源とした。

(1) OECD 関連資料

Summary dossier 及び関連する個別 dossier、ANNEX の情報を収集した。各調査対象物質に関連する個別 dossier 及び ANNEX の情報を収集した (Table 2)。

(2) eNanoMapper³

EU FP7 eNanoMapper project で開発されたナノマテリアルの毒性データベース <https://data.enanomapper.net/> (以下、「eNanoMapper」と記載)。eNanoMapper に収載された情報のうち、*in vitro* 細胞毒性試験に関するエンドポイントを対象とした (Table 2)。

(3) 文献情報⁴⁻³⁶

(1)、(2) に収載された情報について原著文献の収集を行い、文献に記載された情報を収集整理の対象とした。

3. 情報整理の項目

以下の物理化学的性状、有害性情報を情報整理の対象とした。

(1) 物理化学的性状

組成、凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、その他のプロパティとして約 62 項目についてデータを収集・整理を行った (Table 3)。

(2) 有害性情報

以下のエンドポイントを情報整理の対象とした。

- 反復投与毒性試験 (吸入暴露経路: 17 試験、気管内投与経路: 5 試験)

試験種類、動物種、試験条件の他、Endpoint として BAL 細胞数の増加、炎症、生化学値等の変動

が生じた LOAEL 等について、約 519 項目の調査し収集・整理を行った (Table 7)。

➤ *in vivo/ in vitro* 遺伝毒性試験

試験種類、試験動物、細胞種、試験条件、結果 (陽性/陰性等) を収集・整理した (Table 4、Table 5)。

➤ *in vitro* 細胞毒性試験

試験種類、細胞種、試験条件、結果 (EC₅₀ 等) を収集・整理した (Table 6)。

尚、eNanoMapper については、以下の 4 項目を収集対象とした。

- LDH release assay
- Cell viability assay
- Cytotoxicity assay
- Genotoxicity assay

4. 情報整理及びデータベース (DB) 搭載用のデータシートの作成

収集した情報について MS-Excel のデータシートにて作成した。有害性情報に関しては、今後、HESS DB(「有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称: HESS) :ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース」)に搭載できるように形式を整理し作成した (Table 7)。

5. 多変量解析法

収集したデータについて多変量解析ソフトウェア SIMCA15 (Umetrix 社製)で以下の解析を実施した。これらの解析を行うことにより物質間の類似性や毒性の変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

➤ 物理化学的情報に基づく主成分分析法

(PCA : Principal Component Analysis) からによる階層的クラスタリング解析の実施 (Figure 1A、Figure 1B)

➤ 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と毒試験情報との関連性についての直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) の実施 (Figure 2)

➤ OPLS 法 : X 変数を使って Y 変数のモデルを構築し、X から Y を予測する PLS 法の改良型であり、今回の解析では X を説明変数として物性値とし、Y を目的変数として毒性値を設定した。

C. 研究結果

SiO₂ NPs の解析用データシートの作成および解析方法

1. 物理化学的性状

物理化学的性状データシートについては解析を実施するため、以下についてデータマイニングを実施した。これらのデータは主に OECD からの情報に基づいて作成しており、約 62 項目のデータを収集した。

➤ データマイニング

- Particle size, size distribution : Elementary particle size of agglomerated Silica (nm)の NM200 は平均値を算出した。
- Composition : impurity の各項目について、下限値を採用した。
- Agglomeration/aggregation : Isoelectric Point (Mean) (pH)について、2 : <2、3 : 2-4 と定義した。
- Shape : Sphericity について、1: low / 2: low to medium / 3: medium と定義した。
- Solubility : NM203 は平均値を採用。NM204 は 1mol=60.08430g から換算した。

2. 階層的クラスタリング解析

収集・整理した SiO₂ NPs の物理化学的性状についてデータマイニングをした後、PCA 解析後 (Figure 1A)、階層的クラスタリング解析を実施した。その結果、全 5 物質の SiO₂ NPs の 62 項目についてクラスター化し類似性が示された (Figure 1B)。

3. 反復投与吸入毒性試験結果および多変量解析

有害性情報の項目において反復投与毒性試験 (吸入暴露および気管内投与試験) では、吸入暴露試験が 17 試験、気管内投与試験が 5 試験の毒性試験データについて収集した。これらの試験種

類、動物種、試験条件の他、EndpointとしてBAL細胞数の増加、炎症、生化学値等の変動が生じたLOEL等について、合計約519項目について調査し、収集・整理を行った。

➤ 吸入毒性試験

- 収集・整理した反復投与吸入毒性試験の中で、OECDのテストガイドラインTG412に準拠しTNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)で実施された亜急性吸入毒性試験結果では、Wister雌雄ラット(NM202, NM203は雄ラットのみ)に各種SiO₂ナノ粒子[NM200: 粒径: Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm) : 2.83-3.27、NM201: MMAD (μm) : 2.83-3.27、NM202: MMAD (μm) : 1.2-1.3 or 2.2-3.5、NM203: MMAD (μm) : 1.2-1.3 or 2.2-3.5、NM204: MMAD (μm) : 2.83-3.27]を含むエアロゾルを1.16 (±0.36), 5.39 (±0.58)および25.2 (±1.5) mg/m³の濃度で、5日間(6時間/日)吸入暴露した。試験結果では、肺の絶対及び相対重量の増加肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められた。
- 気管支肺胞洗浄液(BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid)中の多形核白血球(PMN: polymorphonuclear leukocytes)数、マクロファージ数、総蛋白、酵素活性(LDH, ALP, γ-GTP (GGT)等)の増加が認められたことから、これらの肺炎症所見のEndpointを中心に解析対象とした。気管内投与毒性試験結果では、SD雌雄ラットに各種SiO₂ナノ粒子(NM200、NM201、NM202、NM203)を含むサンプル溶液を3、6及び12 mg/kg体重の濃度で、サンプリング前の48、24、3時間前にそれぞれ3回、気管内注入が実施されていた。試験結果では、全てのSiO₂ナノ粒子において、考慮された用量にかかわらず、最小用量(3 mg/kg重量)でBAL中のPMN数、総細胞数、酵素活性(LDH, ALP, γ-GTP (GGT)等)、好中球数の有意な増加がみられたことにより肺への炎症所見が確認された。従って、気管内投与毒性試験

を実施した全てのSiO₂ NPsにおいて最小用量で炎症所見がみられたことから解析には至らなかった。

- 多変量解析(直交部分的最小二乗回帰分析: Orthogonal Partial Least Squares Regression, OPLS法)
OECDのテストガイドラインTG412に準拠し実施された亜急性吸入毒性試験結果において、病理組織学的所見の結果からBALF中の総蛋白のLOEL値(NM200: 26.2 mg/m³、NM201: 26.2 mg/m³、NM202: 5.41 mg/m³、NM203: 5.41 mg/m³、NM204: 26.2 mg/m³)からの5物質間の毒性の強さはNM202・NM203>NM200・NM201・NM204であった。物性値(項目)と有害性情報との関連性について調べるため、収集した物性値と各SiO₂ NPsのLOEL値を用いて、OPLS法による多変量解析を実施した(Figure 2)。Figure 2で、横軸はY変数(毒性値)の変動、縦軸はX変数(物性: Y変数グループ内の変動)を示した。従って、本解析法により毒性と関連する物性値が横軸から探索可能であることが示唆された。さらに解析を進めた結果、毒性に寄与する変数(物性)の共通項目として、毒性の強い化合物は、Impurity(Si)、Coating: 無し、Morphology of aggregates/agglomerates (nm): 凝集体の形態: Angular・low sphericity、Specific surface area (m²/g)のSAXS surface (m²/g): 空孔や、BET surface (m²/g): 比表面積、Impurity(S/Na/Mg/Zr/K)等の相関の高い物性項目の組み合わせが挙げられた。

4. HESS DB搭載のための情報整理およびデータシート作成

HESS搭載用に規格化されたシートをひな形として用いて今回情報収集したSiO₂ NPsのデータコンテンツに特化した項目を追加した。その結果、実施期間、被験物質、試験動物、試験条件情報等について約26項目と、毒性試験結果情報(NOEL、LOEL)血液学的検査、生理学的検査、尿の一般検査、病理組織学的所見等の約493項目について、新たな規格データシートを作成し

た (Table 7)。

5. *in vivo* / *in vitro* 遺伝毒性試験 (OECD による試験対象物質は 4 物質 : NM200-NM203)

in vivo / *in vitro* 遺伝毒性試験および *in vitro* 細胞毒性試験では、試験種類、試験動物、細胞種、試験条件、曝露量 (時間)、陽性/陰性、EC₅₀ 等の計 7 項目について収集・整理を行った。

in vivo の遺伝毒性試験結果は、いずれの試験データからも陽性は認められなかった (Table 4)。

しかし、*in vitro* 遺伝毒性試験の Comet 試験結果 (試験対象物質は 4 物質 : NM200-NM203) は、A549 細胞 (3h) で NM203 を除く 3 物質間、24 h で NM200 を除く NM201、NM202、NM203 の 3 物質間にて陽性を示した (Table 5)。一方、Caco-2 細胞では、3h で NM201 を除く 3 物質間、24 h で 4 物質間全てに陽性を示した (Table 5)。

OECD TG 487 試験法に準拠した Micronucleus 試験 (試験対象物質は 4 物質 : NM200-NM203) 結果は、A549 細胞 (48 h) で NM201、NM202 の 2 物質間で陽性を示した。一方、同試験の Caco-2 細胞の結果は、52 時間で 4 物質間全てに陽性を示した (Table 5)。*in vitro* 遺伝毒性試験の結果より、試験時間が長くなるにつれて、A549 細胞では、NM201、NM202、NM203 が陽性を示し、Caco-2 細胞では、全て陽性を示す傾向であった。

6. *in vitro* 細胞毒性試験 (EC₅₀)

in vitro 細胞毒性試験結果 (Endpoint : EC₅₀) で SiO₂ NPs の試験報告について 26 試験について収集・整理した (Table 6)。物性が揃っている OECD の SiO₂ NPs は、主に NM200 および NM203 の 2 物質間のみであった。その結果、2 物質間の毒性の強さの傾向は NM200 < NM203 となった (24 h の LDH assay 結果を除く)。

D. 考察

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、日焼け止め製品としての化粧品や、塗料・抗菌雑貨など家庭用品等、一般消費者に向け幅広く利用されており、電子材料などの産業分野においても、今後、新素材として更なる応用が期待されている。

本研究では、二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) に着目し、情報源として OECD の関連資料 (評価文書:dossier) およびその他の関連資料として eNanoMapper を調査・収集とした。また、主に物理化学的性状データと有害性情報 (ラットを用いた吸入暴露および気管内経路の毒性試験、および *in vivo* / *in vitro* 遺伝毒性試験、*in vitro* 細胞毒性試験) について収集し、データシートの策定に向けた各々の項目について整理した。

2003 年に TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL) で実施されたラット亜急性吸入毒性試験結果から、Endpoint として肺への毒性影響が明らかな BALF 中の総細胞数や多型核白血球数について、より詳細な毒性影響の値について調べる (算出する) ため、原典に戻り細胞数から推定される高用量群で増加する細胞数の割合

(差) が認められる付近の暴露濃度について再算出を試みようとした。しかし、原典情報の入手に至らなかったことから、毒性値は LOEL 値を利用して、その後の物性と有害性との関連性について多変量解析を実施した。多変量解析結果から、毒性の強い NM202、NM203 の物性値 (項目) の特徴として、不純物は少なくシリカ (Si) の純度が高いが、コーティングが無く、また、比表面積が大きい項目が挙げられた。また、空孔や、比表面積の値が大きいものは細胞 (生体) への吸着のし易さ (吸着能) が高くなり、排出されにくい性質を有する事が示唆された。

2013 年に NANOGENOTOX で実施されたラット気管内投与試験 (48h) は、遺伝毒性試験を主目的として行なわれた試験と記載されていた。毒性の Endpoint として肺への毒性影響が明らかな BALF 中の BAL の細胞数、酵素活性への影響を観察していた。その結果、4 種の全ての SiO₂ NPs (NM200-NM203) において最小用量の 3 mg/kg で BAL 中の好中球数の有意な増加がみられていた。気管内投与試験法は、投与器具として金属製経ロゾンデ針 (以下、経ロゾンデ) のほか、投与液をエアロゾル状に噴出するタイプのゾンデ (以下、スプレーゾンデ) を用いて、直接、試験動物への経気道投与を可能とする。また、全身暴露試験法と比較した際、目的とする投与量を正確に投与でき、且つ、用量反応関係が分かる。従って、

気管内投与試験法は実験動物の気管内に被験物質を液体中に分散させて直接投与することから、主に被験物質の肺有害性を評価する試験法である。気管内投与試験でのばく露形態は直接投与により局所的な強い反応が出やすいことなど、実環境とは異なることから、上部気道への毒性影響を評価できないため、吸入毒性試験の完全な代替試験にはなりにくいと考えられている。しかし、被験物質の相対的な毒性比較評価に有用であることは広く認知されている。今回、投与後、一般的な毒性エンドポイントと、気管支肺胞洗浄（BAL）液検査が実施されデータを収集したが、実施された全てのSiO₂ NPsにおいて一番低い濃度（最小用量）にて肺への炎症所見が得られていたことから、解析には至らなかった。この結果は吸入暴露試験の肺毒性影響よりもさらに低い濃度であった。気管内投与試験法はOECDでのガイドライン化には未だ至っておらず、通常、対照群をもうける必要があると考えられるものの本試験では対照群の記載はされていなかった。

E. 結論

今年度の収集データの対象ナノマテリアルは、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NPs）とした。SiO₂ NPsの情報収集源は、各種試験データ項目が多く揃っているOECDのナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成された評価文書およびナノマテリアルの毒性データベース（eNanoMapper）とした。これらに収載された物性と有害性情報についてデータシートの作成を行った。物性情報は約62項目について収集した。有害性情報は、ナノマテリアルの投与試験で、特に肺への毒性所見をエンドポイントとした吸入毒性試験および気管内投与試験法の反復投与毒性試験と、*in vivo/in vitro* 遺伝毒性試験、*in vitro* 細胞毒性試験を収集対象とした。しかし、物性と有害性との関連性についての多変量解析の実施は、一機関の吸入毒性試験のみであった。解析の実施にあたり、データマイニングのリソースの選択や高精度なデータの収集が必要であった。さらに、有害性評価の横並びに試験されたデータ数の不足から、今後、更なるデータ収集や、自験データを組み込むことが必要とされた。

F. 引用文献

1. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/silicon-dioxide-manufactured-nanomaterial.htm>
2. SILICON DIOXIDE: SUMMARY OF THE DOSSIER Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 71
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2016\)23&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2016)23&doclanguage=en)
3. <https://search.data.enanomapper.net/enm/index.html?search>
4. Arts, J.H., Muijser, H., Duistermaat, E., Junker, K., and Kuper, C.F., Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months., *Food Chem Toxicol* 2007 Oct; 45(10):1856-67.
5. Reuzel, P.G., Bruijntjes, J.P., Feron, V.J., and Woutersen, R.A., Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats., *Food Chem Toxicol* 1991 29: 341-354.
6. Chen, Y., Chen, J., Dong, J. and Jin, Y., Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats., *Toxicol Ind Health* 2004 20: 21-27.
7. Ernst, H., Rittinghausen, S., Bartsch, W., Creutzenberg, O., Dasenbrock, C., Gorlitz, B.D., Hecht, M., Kairies, U., Muhle, H., Müller, M., Heinrich, U. and Pott, F., Pulmonary inflammation in rats after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO₂, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO)., *Exp Toxicol Pathol* 2002 54: 109-126
8. Downs, T. R., Crosby, M. E., Hu, T., Kumar, S., Sullivan, A., Sarlo, K., Reeder, B., Lynch, M., Wagner, M., Mills, T. and Pfuhler, S., Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not., *Mutat Res* 2012 745: 38-50
9. Barnes, C.A., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A.,

- Palus, J., Lesniak, A. et al., Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity., *Nano Lett* 2008 8: 3069-3074.
10. Gonzalez, L., Thomassen, L.C., Plas, G., Rabolli, V., Napierska, D. and Decordier, I. et al., Exploring the aneugenic and clastogenic potential in the nanosize range: A549 human lung carcinoma cells and amorphous monodisperse silica nanoparticles as models., *Nanotoxicology* 2010 Dec;4:382-95.
 11. Napierska, D., Thomassen, L.C., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Martens, J.A. and Hoet, P.H., Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells., *Small* 5. 2009 Apr;5(7):846-53.
 12. Park, E.J., and Park, K., Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro., *Toxicol Lett* 2009 184(1): 18-25.
 13. Brown, S.C., Kamal, M., Nasreen, N., Baumuratov, A., Sharma, P., Antony, V.b. and Moudgil, B.M., Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity., *Advanced Powder Technol* 2007 18: 69-79.
 14. Chang, J.S., Chang, K.L., Hwang, D.F., and Kong, Z.L., In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line., *Environ Sci Technol* 2007 41. 2064-2068
 15. Choi, S.J., Oh, J.M. and Choy, J.H., Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells., *J Inorg Biochem* 2009 103: 463-471.
 16. Eom, H.J., and Choi, J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B., *Toxicol In Vitro* 2009 23: 1326-1332.
 17. Jin, Y., Kannan, S., Wu, M., and Zhao, J.X. Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chem Res Toxicol* 2007 20. 1126-1133.
 18. Lin, W., Huang, Y.W., Zhou, X.D., and Ma, Y., In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells., *Toxicol Appl Pharmacol* 2006 217. 252-259
 19. Lu, F., Wu, S.H., Hung, Y., and Mou, C.Y., Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles., *Small* 2009 5: 1408-1413.
 20. Slowing, II, Wu, C.W., Vivero-Escoto, J.L. and Lin, V.S., Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small* 2009 5 (1). 57-62.
 21. Wahl, B., Daum, N., Ohrem, H.L., and Lehr, C.M., Novel luminescence assay offers new possibilities for the risk assessment of silica nanoparticles., *Nanotoxicology* 2008 2: 243-251.
 22. Ye, Y., Liu, J., Xu, J., Sun, L., Chen, M., and Lan, M. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line., *Toxicol In Vitro* 2010 24: 751-758.
 23. Park Y.H., Kim, J.N., Jeong, S.H., Choi, J.E., Lee, S.H., Choi, B.H., Lee, J.P., Sohn, K.H., Park, K.L., Kim, M.K., and Son, S.W., Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an in vivo model., *Toxicology*. 2010 267: 178-181.
 24. Rabolli V, Thomassen LC, Princen C, Napierska D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, et al., Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types., *Nanotoxicology* 2010 Sep;4(3):307-18.
 25. Thomassen, L.C., Aerts, A., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders M, et al., Synthesis and characterization of stable monodisperse silica nanoparticle sols for in vitro cytotoxicity testing., *Langmuir* 2010 Jan 5;26(1):328-35.
 26. Nymark, P. et al., Extensive temporal transcriptome and microRNA analyses identify molecular mechanisms underlying mitochondrial dysfunction induced by multi-walled carbon nanotubes in human lung cells. *Journal*

- Nanotoxicology* 2015 9 (5); 624-635.
27. Warheit, D.B., McHugh, T.A., and Hartschy, M.A. "Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts." *Scand J Work Environ Health* 1995 21 Suppl 2: 19-21.
 28. Lison, D., Thomassen, L.C., Rabolli, V., Gonzalez, L., Napierska, D., Seo, J.W. et al., Nominal and effective dosimetry of silica nanoparticles in cytotoxicity assays., *Toxicol Sci* 2008 104 (1). 155-162.
 29. Sayes, C.M., Reed, K.L., and Warheit, D.B., "Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles." *Toxicol Sci* 2007 97 (1). 163-180.
 30. Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X. et al., SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells., *Part Fibre Toxicol* 2010 7: 1.
 31. Johnston CJ, Driscoll KE, Finkelstein JN, Baggs R, O'Reilly MA, Carter J, Gelein R, and Oberdorster G., Pulmonary Chemokine and Mutagenic Responses in Rats after Subchronic Inhalation of Amorphous and Crystalline Silica, *Toxicol Sci* 2000 56, 405-413.
 32. Farcas L, Torres Andón F, Di Cristo L, Rotoli BM, Bussolati O, Bergamaschi E, et al., Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy, *PLoS ONE* 10(5): e0127174. 2015
 33. Puzyn, T., Rasulev, B., Gajewicz, A., Hu, X., Dasari, T.P., Michalkova, A., Hwang, H.-M., Toropov, A., Leszczynska, D. & Leszczynski, J. Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nature Nanotechnology* 2011 6; 175-178.
 34. Liu, R., Rallo, R., George, S., Ji, Z., Nair, S., Nel, A.E., and Cohen, Y., Classification NanoSAR Development for Cytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles., *Small*, 2011 7 (8); 1118-1126.
 35. Docter D, Bant, C, Westmeier D, Galla H J, Wang Q, Kirkpatrick J C, Nielsen P, Maskos M, and Stauber R H, The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles, *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014, 5, 1380-1392.
 36. Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., and Schins, R.P.F. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Journal Nanotoxicology* 2009 3 (4); 355-364.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai K, Nakanishi I, Ohkubo K, Ohno A, Mizuno M, Fukuzumi S, Matsumoto K, Fukuhara K. Synthesis and Radical-Scavenging Activity of C-Methylated Fisetin Analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 27 (8), 1720-1727, 2019.

2. 学会発表

1. 大野彰子、山田隆志、広瀬明彦。「データベースを活用した神経毒性の *in silico* 予測手法の開発」第46回日本毒性学会学術年会（徳島、2019年6月）
2. 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、大久保 敬、大野彰子、水野美麗、福住俊一。「C-メチルフィセチンのラジカル消去活性」第72回日本酸化ストレス学会学術集会（北海道、2019年6月）
3. 福原 潔、中西郁夫、今井耕平、松本謙一郎、大野彰子。「鉄錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発」第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（京都、2019年9月）
4. 大野彰子、渡邊昌俊、広瀬明彦。「多変量解析手法を用いた二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状に基づく毒性評価への応用」（京都、2020年3月）
5. 福原 潔、中西郁夫、大久保敬、今井耕平、水野美麗、松本謙一郎、大野彰子。「C-メチルフラボノイドのラジカル消去作用」日本農芸化学会 2020年度大会（東京、2020年3月）

6. Fukuhara K., Imai K., Nakanishi I, Matsumoto K., Ohno A. Planar catechin conjugated with DTPA as a promising antioxidant triggered by Fe³⁺ coordination, 258th ACS National Meeting, (August, 2019, San Diego, USA)

3.講演発表

1. 大野彰子.「薬学研究分野（医薬品・食品・化学物質）への多変量解析法の活用例」
Umetrics 日本ユーザー会 2019（東京国際フォーラム、2019年12月）

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得（該当なし）
2. 実用新案登録（該当なし）
3. その他（該当なし）

Table 1. Surveyed substances: Silicon dioxide nanoparticles (SiO₂ NPs, NM200-NM204).

NM	Label name	Crystal type	Surface coating	Composition (SiO ₂ , ≥ %)
NM-200	Synthetic Amorphous Silica PR-A-02	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	96
NM-201	Synthetic Amorphous Silica PR-B-01	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	97
NM-202	Synthetic Amorphous Silica PY-AB-03	Pyrogenic	uncoating	99
NM-203	Synthetic Amorphous Silica PY-A-04	Pyrogenic	uncoating	99
NM-204	Synthetic Amorphous Silica PR-A-05	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	98

Table 2. Target materials (SiO₂ NPs, NM200-NM204) collected from the organization for economic co-operation and development (OECD).

項目	タイトル	備考
物理化学的性状	PhysChem_Summary	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報を委託者提供の参考シート (Physicochemical properties of the TiO ₂ NPs) の項目に沿って整理
	PhysChem_OECD_Summary dossier	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報
	PhysChem_Case study Report	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報をTiO ₂ のCase study report の項目に沿って整理した
	PhysChem_OECD Part 1 (NM200)	個別dossier (Part 1 – NM 200) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 2 (NM201)	個別dossier (Part 2 – NM 201) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 3 (NM202)	個別dossier (Part 3 – NM 202) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 4 (NM203)	個別dossier (Part 4 – NM 203) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 5 (NM204)	個別dossier (Part 5 – NM 204) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 6 (AIST etc)	個別dossier (Part 6 – JP AIST data on SiO ₂ UFP-80 and NanoTek) に記載された物理化学的性状データ(データなし)
	有害性	反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD
反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD_詳細		“反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD” データシートに整理した情報の詳細情報 (HESS DB形式)
細胞毒性 (in vitro)_EC50		EC ₅₀ が得られた <i>in vitro</i> 細胞毒性試験結果のばく露時間、試験法、細胞種、EC ₅₀ を要約
細胞毒性 (in vitro)_EC50 (>100)		EC ₅₀ > 100 µg/mLと報告された <i>in vitro</i> 細胞毒性試験結果のばく露時間、試験法、細胞種、EC ₅₀ を要約
Mutagenicity (in vitro)_Summary		<i>In vitro</i> 遺伝毒性試験結果を要約
Mutagenicity (in vivo)_Summary		<i>In vivo</i> 遺伝毒性試験結果を要約
細胞毒性 (in vitro)_OECD		Summary dossierに記載された <i>in vitro</i> 細胞毒性 (遺伝毒性情報を除く)
細胞毒性 (in vitro)_ eNanoMapper		eNanoMapperのLDH release assay、Cell viability assay、Cytotoxicity assay、Genotoxicity assayの情報
Mutagenicity (in vitro)_OECD		Summary dossierに記載された <i>in vitro</i> 遺伝毒性情報
Mutagenicity (in vivo)_OECD		Summary dossierに記載された <i>in vivo</i> 遺伝毒性情報

Table 3. SiO₂ NPs: Physicochemical properties.

Property			Method/ Instrument		NM200	NM201	NM202	NM203	NM204
Particle size, size distribution	Primary particle size (nm)	Equivalent diameter for sphere	SAXS	1	22	22	15	16	21
	Primary particle size (nm)		TEM	2	14±7	17±8	15±7	13±6	13±6 (measurements: 10-15)
	Primary particle size (nm)		TEM	3	23±8	19±4	18±3	16±3	-
	Primary particle size (nm)		TEM	4	18	18	20	45	-
	Mean diameter (nm)		TEM	5	31±3	43±4	53±9	48±4	-
	Feret Min (nm)		TEM	6	21.9	33	58	53	-
	Feret Max (nm)		TEM	7	34.5	51	37.2	33.5	-
	Elementary particle size of agglomerated Silica (nm)		TEM	8	ly around 10-15)	-	-	-	-
Composition	Total non-SiO ₂ content including coating and impurities (% w/w)		EDS	9	1.5	2.21	1.64	0.63	0.47
	Impurity (% w/w Al)		EDS	10	0.46	0.74	0.45	0.43	0.48
	Impurity (% w/w S)		EDS	11	0.87	0.46	0	0.04	0.21
	Impurity (% w/w Na)		EDS	12	0.88	0.44	0	0	0.18
	Impurity (% w/w Ca)		EDS	13	-	0	0.18	-	0
	Impurity (% w/w K)		ICP-OES	14	0.005-0.01	0.001-0.005	-	-	-
	Impurity (% w/w Fe)		ICP-OES	15	0.005-0.01	0.001-0.005	-	-	0.001-0.005
	Impurity (% w/w Zr)		ICP-OES	16	0.001-0.005	0.005-0.01	-	-	0.005-0.01
	Impurity (% w/w Mg)		ICP-OES	17	0.001-0.005	0.001-0.005	-	-	-
	O (wt%)		EDS	18	53.02	53.06	53.14	53.21	53.17
	Si (wt%)		EDS	19	44.77	45.27	46.23	46.32	45.96
	Coating		TGA	20	Yes (or H ₂ O)	Yes (or H ₂ O)	No	No	Yes (or H ₂ O)
	Weight of coating (wt%)		TGA	21	3	3	-	-	3
Agglomeration/aggregation	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	22	207.1±12.3	208.1±34.5	175.9±4.5	172.9±9.2	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	23	0.390±0.041	0.352±0.028	0.355±0.001	0.427±0.025	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	24	-	197.0±15.7	-	147.5±4.5	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	25	-	0.337±0.020	-	0.244±0.017	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	26	181.5±4.3	-	-	-	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	27	0.238±0.006	-	-	-	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	28	-	-	-	146.8±0.6	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	29	-	-	-	0.229±0.015	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	30	240.5±2.3	-	-	245.7±37.2	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (in DLS)	DLS	31	0.248±0.006	-	-	0.299±0.024	-
	2Rg1 (nm)	Gyration radius of primary part	SAXS	32	18	20	16	-	-
	2Rg2 (nm)	Gyration radius of primary part	SAXS	33	440	180	100	-	-
	Df	Gyration radius of primary part	SAXS	34	2.45	2.45	2.5	-	-
	Npart/agg	Gyration radius of primary part	SAXS	35	3600	457	200	-	-
	Morphology of aggregates/agglomerates (nm)		TEM	36	medium sphericity	medium sphericity	ar. low sphericity	ar. low sphericity	-
Zeta Potential around pH 7 (mV)		Lazer-Dppler-E	37	-45	-40	-40	-35	-	
Isoelectric Point (Mean) (pH)		Lazer-Dppler-E	38	< 2	< 2	2-4	2-4	-	
Crystalline phase	Crystalline type		XRD	39	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous
	Crystalline impurities		XRD	40	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)
	Crystalline size (mean)		-	41	-	-	-	-	-
Aspect ratio			42	1460	1461	1518	1533	-	
Specific surface area	SAXS surface area (m ² /g)		SAXS	43	123±4.9	123±8.3	184±17.8	167±13.4	131±22.9
	BET surface area (m ² /g)		BET	44	189.16	140.46	204.11	203.92	136.6
	Total pore volume (mL/g)		BET	45	0.7905	0.5815	0.5136	0.499	0.5057
	Micropore surface area (m ² /g)		BET	46	30.044	-	-	-	0
	Micropore volume (mL/g)		BET	47	0.01181	0.00916	0.00084	0	0.00666
Shape	Sphericity		TEM	48	low to medium	medium	low	low	-
	Surface coating	Weight of coating (wt%)	-	49	3	3	-	-	3
Density	Density (g/mL)		Weighing	50	0.12	0.28	0.13	0.03	0.16
Dustiness	Inhalable Mass Dustiness index (mg/kg)		Small rotating C	51	6459±273	6034±199	4988±1866	5800±1488	24969±601
	Respirable Mass Dustiness index (mg/kg)		Small rotating C	52	293±193	218±24	91±11	354±6	1058±1
	Respirable Mass Dustiness index (mg/kg)		Vortex Shaker (53	34000	6500	17000	51000	14000
Surface chemistry	O (%)		EDS	54	71.43	67.9	-	-	-
	Si (%)		EDS	55	20.3	20.83	-	-	-
	C (%)		EDS	56	5.96	8.28	-	-	-
	Na (%)		EDS	57	1.83	2.89	-	-	-
Pour density	Water content (wt% dry)		Weighing	58	8	8	1	1	6
	Bulk density (g/cm ³)		Weighing	59	0.12	0.28	0.13	0.03	0.16
Porosity	Total pore volume (mL/g)		BET	60	0.7905	0.5815	0.5136	0.499	0.5057
	Micropore volume (mL/g)		BET	61	0.01181	0.00916	0.00084	0	0.00666
Solubility	Saturation concentration (mmol/L)		Flask method	62	2.4±0.03	2.4±0.03	2-2.5	201 mg/l	-
	24h 0.05% BSA (µg/L Ti)		-	63	-	-	-	-	-
	24h Gambles solution (µg/L Ti)		-	64	-	-	-	-	-
	24h Caco2 (µg/L Ti)		-	65	-	-	-	-	-
Biodurability	Biodurability (µg/g Ti)		-	66	-	-	-	-	-
	Biodurability (µg/g Al)		-	67	-	-	-	-	-
	Biodurability (µg/g Si)		-	68	-	-	-	-	-
Redox	Redox caco2 medium		-	69	-	-	-	-	-
	Redox Gamble's solution		-	70	-	-	-	-	-
	Redox BSA		-	71	-	-	-	-	-

Table 4. Mutagenicity (*in vivo*)

Time	Cell assay	Administration route	Test Organism/System	Result					Colloidal silica Levasil from HC Stark Lev 50, Lev 200
				NM 200	NM 201	NM 202	NM 203	Aerosil 200	
3 administrations at 0, 24 and 45 h. Sacrifice 3 h after the last administration	Comet assay (BAL cells, lung, blood, liver, spleen, kidney, bone marrow)	Intratracheal	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	-		
	Micronucleus assay in bone marrow (OECD TG 474)	Intratracheal	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	-		
	Comet assay	Oral (gavage)	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	equivocal		
	Micronucleus assay in bone marrow (OECD TG 474)	Oral (gavage)	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	equivocal		
	Micronucleus assay in colon	Oral (gavage)	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	equivocal		
	Comet assay (BAL cells, lung, blood, liver, spleen, kidney, bone marrow)	Intravenous	Rat (Sprague-Dawley, male)				-		
3 injections on 3 consecutive days. Sacrifice 4 h after the last injection	Micronucleus assay in bone marrow (OECD TG 474)	Intravenous	Rat (Sprague-Dawley, male)				-		
	Comet assay (lung, liver, blood)	Intravenous	Rat (male)						+
	Micronucleus assay in peripheral blood reticulocytes	Intravenous	Rat (male)						+
6 h/d, 5 d/wk for 90 days	Inflammation	Intravenous	Rat (male)						+
	ex-vivo/in vitro gene mutation assay (HPRT assay) in alveolar epithelial cells	Inhalation (whole body)	Rat (Fischer 344, male)					-	

Table 5. Mutagenicity (*in vitro*)

Time	Cell assay	Test cell type	Result										
			NM200	NM201	NM202	NM203	NM204	equivalent to NM 202	equivalent to NM 203	Commercial colloidal and laboratory synthesized silica	Purposely synthesized SAS (2): Stöber SAS (16, 60 and 104 nm)	Amorphous SiO ₂ , fumed (Sigma) (14 nm)	
no data	Bacterial Reverse Mutation Assay (OECD TG 471)	Styphimurium TA 1535, TA 1537, TA 98 and TA 100							-	-			
3 (hr)	Comet assay	BEAS-2B	+		+	+							
4 (hr)	In vitro mammalian cell gene mutation tests (OECD TG 476)	L5178Y TK +/- mouse lymphoma cells	-										
	In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (OECD TG 473)	Chinese hamster lung fibroblasts (V79)	-										
	Fpg-modified comet assay	Caco-2											-
5 (hr)	In vitro mammalian cell gene mutation tests (OECD TG 476)	Chinese hamster Ovary (CHO)							-	-			
2 h (+S9) 18 h (-S9)	In vitro mammalian cell gene mutation Test (OECD TG 476)	Chinese hamster Ovary (CHO)							-				
	In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (OECD TG 473)	Chinese hamster lung fibroblasts (V79)								-			
3, 24 (hr)	Comet assay	16-HBE	+/-	-/-	-/-	-/-							
		A549	Equivocal/-	+ /Equivocal	+ /Equivocal	-/+							
		Caco-2	+ /+	- /Equivocal	Equivocal/ Equivocal	+ /+							
3 (hr)	Comet assay	BEAS-2B	+	Equivocal	+	+							
4, 24 (hr)	Comet assay	Primary rat (Wistar) alveolar macrophage	-										
3, 6, 24 (hr)	Comet assay	Mouse embryonic fibroblast cells									-		
24 (hr)	In vitro mammalian cell gene mutation tests (OECD TG 476)	L5178Y TK +/- mouse lymphoma cells	-	-	-	-							
	Comet assay	BEAS-2B					Equivocal/-						
		Caco-2					-/+						
30 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	Human primary peripheral blood	-	-	-	-							
40 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	A549										+	
41 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	16HBE	-	-	-	-							
48 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	BEAS-2B	-	-	-	-	+ /Equivocal						
		A549	-	+	+	-							
		Caco-2					-/+						
52 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	Caco-2	+	+	+	+							

BEAS-2B : Human bronchial epithelium
 16HBE : Human bronchial epithelial cell
 A549 : Human bronchoalveolar carcinoma
 Caco-2 : Human intestinal epithelial cells

Table 6. Cytotoxicity (*in vitro*), endpoint: EC₅₀

Time	Cell assay	Measurement condition	No.	NM 200	NM 201	NM 202	NM 203	NM 204	JP-PAIST data on SiO ₂ LFPF-90 and NanoTeK	Ludox L-14 (14 nm)	Ludox L-15 (15 nm)	Stober silica S-16 (16 nm)	Stober silica S-19 (19 nm)	Stober silica nanoparticles (29 nm)	Stober silica S-60 (60 nm)	Stober silica S-104 (104 nm)	Stober silica S-335 (335 nm)	unspecifed 15 nm silica nanoparticles from Merck	SAS colloids (21 nm)	SAS colloids (48 nm or 85 nm)	SAS from Wang Jung New Material Co (15 nm)	SAS from Wang Jung New Material Co (30 nm)	SAS from Wang Jung New Material Co (micro-sized, 385 nm)	FI-25 SiO ₂	FI-50 SiO ₂	SiO ₂ 15 nm	SiO ₂ 60 nm	SiO ₂ 20 nm	Amorphous SiO ₂ ASP30 (Nyscop Nano Technologies)					
4 (hr)	Luminescence assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type																																
		MTT assay	ED50 (μg/mL)																													80		
8 (hr)	Razaurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)					84-88																											
		Test cell type					RAW 264.7																											
		LDH assay	ED50 (μg/mL)				75-100																											
8 (hr)	MTT assay	ED50 (μg/mL)																														80		
		Test cell type																																
		Razaurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)	25-60			< 10																											
24 (hr)	Razaurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type		MH-S																														
		ED50 (μg/mL)					84-88																											
24 (hr)	crystal violet staining	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type																																
		ED50 (μg/mL)																																
24 (hr)	WST-1 assay	ED50 (μg/mL)	1500			421																												
		Test cell type		A549			A549																											
		ED50 (μg/mL)	112			1155																												
24 (hr)	WST-6 assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type		THP-1			THP-1																											
		ED50 (μg/mL)																																
24 (hr)	LDH assay	ED50 (μg/mL)	184			2802																												
		Test cell type		A549			A549																											
		ED50 (μg/mL)					75-100																											
24 (hr)	MTT assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type																																
		ED50 (μg/mL)																																
48 (hr)	Razaurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)	25-60			< 10																												
		Test cell type		MH-S			MH-S																											
		ED50 (μg/mL)																																
72 (hr)	Razaurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)	25-60			< 10																												
		Test cell type		MH-S			MH-S																											
		ED50 (μg/mL)																																
240 (hr)	WST-1 assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type		NH3T3			NH3T3																											
		ED50 (μg/mL)																																

- Caco-2 : Human intestinal epithelial cells
- Colon HT29 : Human colorectal adenocarcinoma
- RAW 264.7 : Mouse peritoneal macrophage
- J774 : Mouse monocyte
- HMDM : Human monocyte-derived macrophages
- THP-1 : Human monocytic leukaemia
- EAHY926 : Human endothelial cells
- L-02 : Human hepatic cell line
- HaCaT : Human keratinocyte cell line
- MH-S : Mouse alveolar macrophage
- A549 : Human bronchoalveolar carcinoma
- NRK-52E : Normal rat kidney cell
- NIH3T3 : Mouse fibroblast cell
- mES : D3 mouse embryonic stem cell

Figure 1A. PCA based on physicochemical properties of SiO₂ NPs.

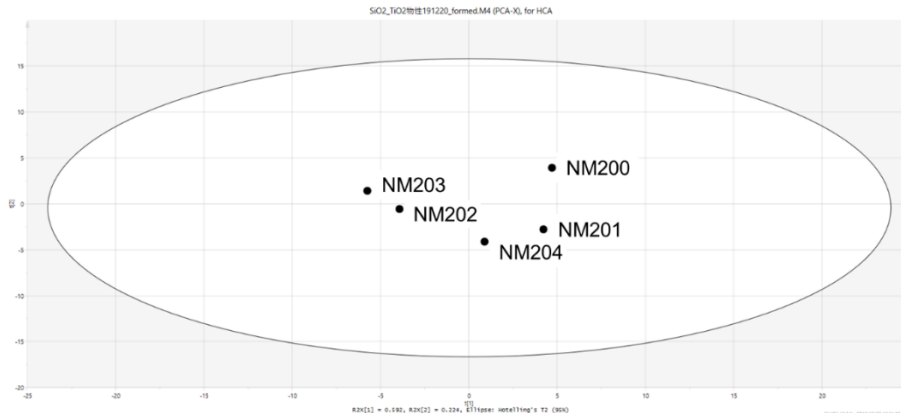


Figure1B. Dendrogram for PCA based on physicochemical properties of SiO₂ NPs.

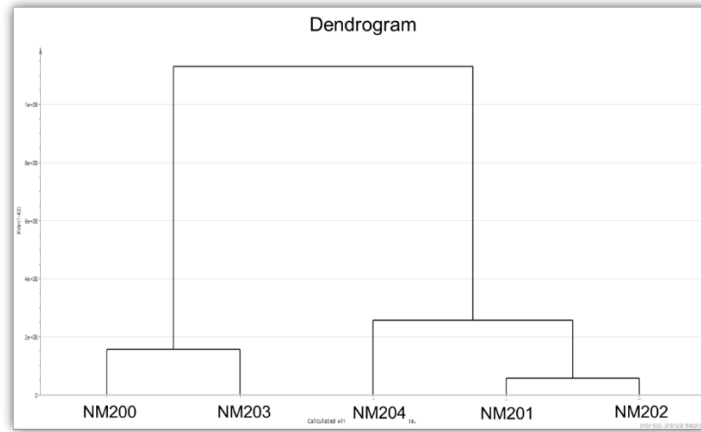


Figure 2. Multivariate analysis results for repeated dose toxicity (inhalation).

