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)(分担)総合研究報告書

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、二つのナノマテリアルに着目し、①テイカ社から提供された5種の二酸化チタンナ ノ粒子(TiO₂ NPs: MT-150A、MT-500B、AMT-100、TKP-102、AMT-600)については、これ らまでの有害性評価に重要となる物理化学的性状の項目について測定を含めた物性情報を 収集すると共に、有害性データについての物性との関連性解析を実施した。(2)マグネタイ トについては、これまでの研究で実施(主に厚生労働科学研究成果データベース MHLW GRANTS SYSTEM への公表分)されている有害性情報と物性情報を収集した。

A. 研究目的

化学物質の中でも極めて特殊な性状を有するナ ノマテリアルは、生産現場のほか家庭用品などへ の利用が拡大しており、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が 必要となる。国内において、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、EUUS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)でナノマテリ アルの規制に向け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)が公開さ れている。分担研究者の大野は、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 た、*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 ータ項目および 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。

これまで 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等に収載され公開さ れている二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂NPs:NM200 シリーズ)や二酸化チタンナノ粒子(TiO₂ NPs:NM100 シリーズ)について、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てきた。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 タとの関連性に関する多変量解析法を実施する ことにより、多変量解析手法の有用性と有害性評 価に鍵となる物理化学的性状の組み合わせを見 出した。

最終年度は、二つのナノマテリアルに着目し、① テイカ社から提供された5種の二酸化チタンナノ 粒子(TiO₂NPs:MT-150A、MT-500B、AMT-100、 TKP-102、AMT-600)については、これらまでの有 害性評価に重要となる物理化学的性状の項目につ いて測定を含めた物性情報を収集すると共に、有 害性データについての物性との関連性解析を実施 した。②マグネタイトについては、これまでの研 究で実施(主に厚生労働科学研究成果データベー スMHLW GRANTS SYSTEM への公表分)されて いる有害性情報と物性情報を収集した。

B. 研究方法

本研究で実施した対象化合物は、以下。

- OECD ウェブサイト上の Titanium dioxide (NM100-NM105) - Manufactured nanomaterial¹ にて公表された Summary dossier と dossier²に収載されている二酸化 チタンナノ粒子(TiO2 NPs :NM-100、NM-101、NM-102、NM-103、NM-104 、NM-105 (P25)) を本研究での収集・整理の対象物 質とした。
- 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。
- 3) 5種の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs: MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600) およびマグネタイトとした。

【有害性情報の調査対象情報源】

二酸化チタンナノ粒子(TiO2 NPs:NM-100、NM-101、NM-102、NM-103、NM-104、NM-105 (P25)) および二酸化ケイ素ナノ粒子 (NM-200、NM-201、 NM-202、NM-203、NM-204) は、OECD 関連情報、 eNanoMapper データベースなどより情報収集し た。TiO₂ NPs は、本研究班内で実施された A549 細胞を用いた *in vitro* 毒性試験結果を用い、マグ ネタイトナノ粒子は、厚生労働科学研究成果デー タベース MHLW GRANTS SYSTEM に公表され た厚労科学研究費補助金化学物質リスク研究事 業研究報告書 、及びこれらの研究成果として公 表された原著論文を調査対象情報源とした(表 6 -9)。

【物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目】

物理化学的性状データは、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 パティ等について収集整理した(表 2)。調査対 象情報源に記載された有害性情報は、*in vivo* 試験 結果(吸入ばく露試験、気管内投与試験、腹腔内 投与・経口投与試験による急性毒性、免疫毒性、 アジュバント効果)*in vitro* 試験結果(細胞毒性試 験、遺伝毒性試験等の EC50 値等)について収集 整理した(表 6-9)。

【二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状の分 析対象項目(表 2)】

- 不純物の成分分析(化学分析):高周波誘導結 合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)(Ce、 Nb は蛍光 X 線分析)による定性分析(対象 元素:K、Ca、Na、S、Ce、Nb:下限 0.1%、 Fe、Si、P、Al、Cr、Zr、Ti:下限 0.01%)、ICP 発光分光分析法による定量分析(対象元素: P、Zr、Ca、Ti、Ce、Nb:下限 0.01%)
- ▶ 細孔分布・比表面積測定(粒子解析)(表 3): 窒素吸着 BET 多点法による細孔分布ならび に比表面積測定
- 親水性および疎水性評価(表面化学分析)(表
 4,表5,図1,図2):粒体浸透速度測定、粒
 体接触角測定

【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 (表 9)】

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(本研究内ではマ ウスも記載)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。

【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検体間の類似 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) からの階層的ク ラスタリング解析法 (HCA: Hierarchical Clustering Analysis)の実施により、サンプル間 の距離が近いものからクラスターを形成し、 類似度の高いクラス分類した(図3,図4)

- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報 と in vitro 試験での A549 細胞を用いた毒試験 結果との関連性について直交部分的最小二乗 回帰分析(OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression)の実施した(図 5A, 5B)
- OPLS 法: Y = f(x) = alx1 + a2x2 + ... の回帰 式から、Y 変数に連動する X 変数を探索する (X 変数を使って Y 変数のモデルを構築す る)。今回の解析では物性値を X の説明変数 とし、毒性値(細胞生存率の毒性試験結果)を Y の目的変数として設定し X 変数から Y 変数 のモデルを構築し予測する。

C. 研究結果

1. データマイニング

物理化学的性状データ項目は主に先行研究で 得られた OECD からの試験情報に基づいて作成 しており、約23項目のデータを収集した。収集・ 整理された<u>物理化学的性状データシート</u>および *in vitro*有害性情報は、多変量解析のため、以下に ついてデータマイニングを実施した。

- Composition: inpurity の各項目についての検 出限界以下(<)は、「0」と定義した。
- 未測定データ・測定不能データは「空欄」と定 義した。
- O(wt%):TiO2(%)の値から換算し算出した。
- A549 細胞の毒性試験結果:毒性無し(-: MT-500B、AMT-100、AMT-600),毒性は弱い が有り(+:MT-150A),毒性有り(+++: TKP-102)は、「0, 2, 64」と数値化により定義 した。

2. 化学分析

二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状の分析 結果を以下に示す(表2)。

▶ 成分分析(化学分析)は、①K、Ca、Na、S、Ce、Nb:下限 0.1%、Fe、Si、P、Al、Cr、Zr、Ti:下限 0.01%に関して、定性・定性分析は高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)島津製作所 ICP8100 によって実施した。②Ce・Nb に関して、定性分析は日本電子(株)製エネルギー分散型蛍光X線分析装置 JSX-3100RIIを用いて蛍光X線分析(EDX)によって実施した。定量分析は ICP発光分光分析装置島津製作所 ICPS8100、原子吸光装置 Varian AA240、炭素・硫黄分析装置 CS-844 を用いて ICP 発光分光分析法、原

子吸光分析法、燃焼-赤外線吸収法によって 実施した。その結果、Ce(セリウム)は<0.01、 Nb(ニオブ)は、<0.4 で検出された。細孔分布・ 比表面積測定(粒子解析)に関しては、マイ クロメリティクス製 細孔分布測定装置 ASAP-2020を用いて真空中、300℃×3Hr 前処 理を行い、窒素吸着 BET 多点法によって実 施した(表3)。

- 粒子解析は、比表面積は BET プロットの傾 \geq き及び切片を用い、BET 式より単分子層吸着 量を求め、単分子層吸着量にガス分子一個の 占める断面積(分子占有断面積)をかけて算 出した。一方、細孔分布は、BJH 解析による 細孔分布曲線を用いて求めた(表3)。その結 果、MT-150Aは、他の検体と比較すると大き な穴を占有されていた。TKP-102 は AMT-150A と同じ比表面積であるが、細孔径が小 さく(1/3~1/4)なり、結果的にその容積も小 さくなった。AMT-100は比表面積が最大だが、 MT-150A に比べて細孔径が非常に小さいた め、その容積も小さくなり、小さな穴で占有 されていることが推察された。AMT-600 に関 しては比較的少数の大きな穴で占有されて いることが推察された。MT-500B はガス吸 着による細孔分布測定の上限(100nm)付近 から上限以上においてガスの吸着が確認さ れたことから、細孔容積は求めることができ なかった(表3)。
- 表面化学分析は、親水性および疎水性評価に \geq は二つの測定方法(粒体浸透速度測定および 粒体接触角測定)によって実施した(表4、 表5、図1、図2)。粒体浸透速度測定は、協 和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500(温度:26±1℃湿度:40±5℃液体:蒸留水、 粉体カラム半径:5mm)によって実施し、試 料をカラムに充填し、カラムを液体表面に鉛 直に接液させた。その後、毛管現象により液 体が粉体粒子の空壁(毛管)を上昇(浸透) したことによるカラムの重量変化を測定す ることにより浸透速度を求めた(表 4)。粒体 接触角測定は、協和界面科学製 高機能表面 張力測定装置 DY-500(温度:26±1℃湿度: 40±5℃、毛管半径測定用液体:イソプロパノ ール(IPA) 粉体カラム半径:5mm)を用いて、 浸透速度法によって分析した(表5)。

得られた表4,表5の結果より、親水性および 疎水性の傾向(図1)および相関(図2)を示す。 図2から散布図を表示させたところ、高い逆相関 (R²=0.9084)を示し、MT-150A、AMT-100、TKP-102(ほぼ有意差なし>)AMT-600>MT500B とな り、AMT-600、MT500Bは疎水性の傾向を示した。

3. 物理化学的性状の類似性評価(階層的クラス タリング解析: HCA)

収集・整理した5種のTiO₂NPs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法および、階層的クラスタリング法(HCA)による類似度調査のための解析を実施した(図3、図4)。その結果、全5検体のTiO₂NPsの23項目についてクラスター化し類似性が示された(図4)。

4. *in vitro* 細胞毒性試験(令和元年度 MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vitro* 細胞毒性試験報告結果:同一研究班内での試験報告結果)

in vitro 細胞毒性試験(A549 細胞を用いた細胞 生存率%)は、本研究班内で実施された 5 種の TiO₂ NPs の試験報告について収集・整理した。そ の結果、毒性は、TKP-102<<MT-150A の2検体 間で示し、AMT-100、AMT-600、MT-500Bの3検 体間で示されなかった。

5. 物理化学的性状データと *in vitro* 毒性試験結果 の多変量解析による関連性解析

物理化学的性状データと *in vitro* 毒性試験結果 との関連性解析については、直交部分的最小二乗 回帰分析(OPLS:Orthogonal Partial Least Squares Regression)により実施された(図 5A,5B)。本解 析では物性項目(値)を説明変数(X)とし、毒 性値(細胞生存率の毒性試験結果)を目的変数(Y) として設定し、X 変数から Y 変数のモデルを構築 し予測した。

その結果、図 5Aの Scores plot より、第一主成 分の正の方向が毒性 (+) の結果の強さに対応して いた。さらに Loadings plot の棒グラフより、正の 相関が大きくなる (インパクトが大きくなる) に 伴い、毒性 (+) に関連する変数(物性)が示された (図 5 B)。従って、本解析結果では、図 5 A の Scores plot より第一主成分 (横軸) で毒性との相関 の傾向が分かり、関連する物性項目が横軸から探 査可能であることが示唆された。特に、図 5 B か ら、毒性 (+) に寄与する変数 (インパクトが大き く、エラーバーが比較的落ち着いている) は、不 純物 (P)、 Crystal Phase(Anatase)が挙げられた。一 方、毒性 (-) に寄与する変数 (インパクトが大 きく、エラーバーが比較的落ち着いている) は、

Si、Crystal Phase(Rutile)、Ca、Crystal size(nm)が挙 げられた。

6. マグネタイトナノ粒子の有害性情報(MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vitro/in vivo* 毒性試 験報告結果)

MHLW GRANTS SYSTEM を情報源とした in vitro/in vivo のマグネタイトの有害性情報につい ては、合計74試験を収集した(表6-9)。肺をエ ンドポイントとした気管内投与試験による in vivo 急性毒性試験(1試験)慢性毒性試験(1試験)、 その他2試験の in vivo 試験(肺発がんイニシエー ター活性の検討および中期発がん性試験)では、 試験種類、動物種、試験条件、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 いての Endpoint について調査し収集・整理を行っ た(表9)。一方、in vitro 毒性試験報告結果につ いて、①遺伝毒性試験(5 検体を用いた6試験) では、試験種類、試験動物、細胞種、試験条件、 結果 (陽性/陰性等)、②細胞毒性試験(10 検体を もちいた24試験)では、試験種類、細胞種、試 験条件、結果 (細胞毒性有り・無し)、③酸化スト レス測定試験(11 検体をもちいた 40 試験)では、 試験種類、細胞種、試験条件、結果 (ROS 産生、 DNA 付加体形成の増加有り・変化なし、DNA 付 加体形成の増加傾向)の項目について収集・整理 した (表 6-8)。

 in vitro 毒性試験(MHLW GRANTS SYSTEM からの in vitro 毒性試験報告結果)(表 6-8)
 MHLW GRANTS SYSTEM から収集された マグネタイトナノ粒子の in vivo 毒性試験報告 結果は、遺伝毒性試験(5 検体を用いた6 試験)、 細胞毒性試験(10 検体を用いた24 試験)、酸 化ストレス測定試験(11 検体を用いた40 試験)
 について収集・整理した(表 6-8)。

遺伝毒性試験結果(表 6)

in vitro 遺伝毒性試験は、試験種類、試験動物、 細胞種、試験条件、結果 (陽性/陰性等)、につ いて収集・整理した結果、6試験全てにおい て陽性となった。

細胞毒性試験結果(表7)

in vitro 細胞毒性試験は、試験種類、細胞種、 試験条件、結果 (細胞毒性有り・無し)、につ いて収集・整理した結果、24 試験のうち15 試験で毒性を有した。特に、①アモルファス SiO にカプセル化された Mn1-xZnxFe₂O₄(x=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8)の検体で、 Human prostate cancer cells (DU145)、breast cancer cells (KPL4, MCF7, MDA-MB231)を用 いた試験結果は、30min で4 種類のがん細胞 すべてで約 80%の細胞生存率の低下を認め た。また、② 非修飾磁性体ナノ粒子 (Fe₃O₄NPs) (戸田工業株式会社より購入)、表 面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ 粒子 (Fe₃O₄NPs-COOH) (Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), 京都大学より 購入)の検体で、前立腺癌細胞株 (DU145)、前 立腺癌細胞株 (LNCaP)をもちいた 4 試験の 結果においても、全ての検体間で細胞毒性が 認められた。

酸化ストレス測定試験結果(表 8)

in vitro 酸化ストレス測定試験は、試験種類、 細胞種、試験条件、結果 (ROS 産生、DNA 付 加体形成の増加有り・変化なし、DNA 付加体 形成の増加傾向)について収集・整理した。結 果は、40 試験のうち18 試験間で ROS 産生・ DNA 付加体形成の増加有り・変化なし、DNA 付加体形成の増加傾向を認めた。特に、上記 の細胞毒性試験結果で同一検体として試験 されていた非修飾磁性体ナノ粒子 (Fe₃O₄NPs) (戸田工業株式会社より購入)、と 表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナ ノ粒子 (Fe₃O₄NPs -COOH) (Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), 京都 大学より購入)は、16 試験のうち 2 試験: Fe₃O₄NPs(ROS 生成、26h、前立腺癌細胞株 DU145、100ug/mL)、Fe₃O₄NPs (ROS 生成、 27h、前立腺癌細胞株 DU145、200µg/mL) で ROS 産生が認められたが、残り 14 試験間で の変化は認められなかった。

in vivo 毒性試験(MHLW GRANTS SYSTEM からの in vivo 毒性試験報告結果)(表 9)

MHLW GRANTS SYSTEM から収集したマ グネタイトナノ粒子の *in vivo* 毒性試験報告 結果については、肺をエンドポイントとした 4 試験の気管内投与試験データについて、 HESS 搭載用に収集・整理した。

反復投与毒性試験結果

反復投与毒性試験(気管内投与試験)の有害 性情報は4試験の毒性試験データについて収 集した。これらの収集項目では、試験種類、 動物種、試験条件の他、Endopoint 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 等について調査し、収集・整理 を行った。4試験の結果は以下であった。

✓ マグネタイトスラリー (pH10.1, Lot: 90316)
 (戸田工業) (EDS で鉄及び酸素を検出、それ)

以外の不純物 (元素) は検出無) を検体に用 いて、F344/DuCrlCrli ラット (male/female, 5 mg/kg、15 mg/kg、45 mg/kg,単回) に気管内 スプレー投与し、2 週間後に血液学的・血液 生化学的・病理学的検査を実施した。その結 果、5 mg/kg で雄の精巣重量増加、5 mg/kg 以 上で雌雄の肺の腫大・浮腫・黒色物質沈着、 マグネタイト貪食マクロファージ浸潤・II 型 肺胞上皮増生、胸腺リンパ節の褐色粒子沈着、 雌の肺の炎症細胞浸潤、15 mg/kg 以上で雌雄 の肺重量増加、肺胞腔内マグネタイトの沈 着・肉芽形成、45 mg/kg で雌雄の気管支上皮 軽度腫大・気管支粘膜杯細胞増加、異物巨細 胞浸潤、雄の肺血管周囲浮腫を認めた。

- 磁性ナノ粒子マグネタイト (Lot. 90828. \checkmark pH10.5: Lot. 100316, pH10.0) (EDS で鉄及び 酸素を検出、それ以外の不純物 (元素) は検 出無) を検体に用いて、F344/DuCrlCrli ラッ ▶ (male/female, 0.2 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 1回/4週間、計13回)に気管内スプレー投与 し、52週間後に血液学的・血液生化学的・病 理学的・免疫組織学的検査を実施した。その 結果、0.2 mg/kg以上で雌雄の肺のマグネタイ ト貪食肺胞マクロファージの肺胞腔浸潤、1.0 mg/kg 以上で雌雄の肺の黒色物質沈着、胸腺 リンパ腫の軽度腫大・灰黒色化、肺の肉芽形 成·Ⅱ型肺胞上皮腫大·肺胞/細気管支上皮過 形成、雄の血管周囲/気管周囲/間質炎症細胞 浸潤、5.0 mg/kg で雌雄の肺絶対/相対重量増 加、肺の軽度の腫大、雌の血管周囲/気管周囲 /間質炎症細胞浸潤を認めた。
- 磁性ナノ粒子マグネタイト (BMS-11; \checkmark Lot.111117, 戸田工業) (pH 10.5、一次粒径 5-15nm)を検体に用いて、肺発がんイニシエー ター活性の検討するため、F344 ラット (male, 5.0 mg/kg、1 日おき 15 日間、計 8 回) に気管 内投与し、また、Ⅱ群 (マグネタイト投与群、 0.0、5.0 mg/kg 体重、週1回、計4回)では、 マグネタイトの肺発がんイニシエーター活 性を検討するためマグネタイトを気管内投 与後,肺発がんプロモーション作用を有する γ-オリザノールあるいはグリセロールを投与 し、肺における腫瘍性病変の発生について病 理学検査を実施した。その結果、マグネタイ ト投与群 (II・IV群) では肺重量増加、マグネ タイト投与群(VI群)では肺重量増加傾向、 マグネタイト投与群(II・IV・VI群)の肺で

は,暗褐色を呈するマグネタイトの広汎な沈 着、マグネタイト単独投与群(II群)の肺では, マグネタイトを貪食した肺胞マクロファー ジの肺胞腔及び肺胞壁への浸潤、炎症性細胞 浸潤,Ⅱ型肺胞上皮の腫大等、マグネタイト投 与群(II・IV・VI群)のリンパ節においては, HE 染色で黄褐色, 鉄染色 (ベルリン青染色) で青色を呈する顆粒を貪食したマクロファ ージの浸潤 (胸腺リンパ節において顕著)を 認めた。さらに、マグネタイトを気管内投与 した後, 肺発がんのプロモーターとされる γ-オリザノールあるいはグリセロールを投与 した群においては、マグネタイト単独投与に よる肺の病変が修飾されず,肺の過形成性病 変も観察されず、本条件下では、マグネタイ トが肺発がんイニシエーターとしての活性 を有しなかった。

- 磁性ナノ粒子マグネタイト (BMS-11; Lot.140528, 戸田工業) (pH 9.7、一次粒径 5-15nm)を検体に用いて、中期発がん性試験と て、A/JJmsSlc NNK 2 mg/マウスを腹腔内投与 後、マグネタイト 0、5.0 mg/kg 体重で 16 週 間(4週間毎に1回),気管内投与した。II群 (マグネタイト投与群)の結果は、NNK を投 与したマウスの肺に、多発性に結節あるいは 白斑が認められ、組織学的検索で肺胞上皮の 過形成あるいは気管/肺胞上皮腺腫が高い確 率で認められた.肺胞上皮の過形成及び腺腫 の発現率と個体当たりの腫瘍数にマグネタ イト併用投与の影響は認められず,本試験条 件下では、マグネタイトが肺に対する発がん 性を有しないことが明らかとなった.一方、 マグネタイト5 mg/kg 体重投与群でみられた 所見では、肺全例にマグネタイトの沈着と思 われる黒色斑や、マグネタイトと思われる黄 褐色の顆粒を貪食したマクロファージの浸 潤、炎症性細胞の浸潤、肺、卵巣の絶対・相 対重量増加を認めた。
- ✓ 平成 30 年度の二酸化チタンおよび令和元年 度の二酸化ケイ素に関しては、個別の分担研 究報告書を参照。

D. 考察

平成 30 年度の二酸化チタン、令和元年度の二酸 化ケイ素に関しては、OECD 関連資料およびその 他の関連資料 (Case study report、eNanoMapper デ ータベース)を調査・収集対象の情報源として、 物理化学的性状情報および有害性情報(反復投与 毒性:吸入曝露および気管内投与試験、遺伝毒性 情報を除く *in vitro* 細胞毒性)を収集した。物理化 学的性状の重要性、単位の統一や桁数の調整、結 晶型への分類など、適正な形式に変換の必要性を 認めた。毒性評価において、同一アッセイ条件(曝 露時間、アッセイ法、細胞種)の組み合わせにお いて、統一されたデータ条件がなく、さらに、横 断的に細胞毒性評価の試験データが揃っていない ことから、物質間の細胞毒性を比較解析に資する 十分なデータがなく、また、アッセイ法や細胞種 の違いにより毒性の結果が異なることから、今後、 体系的な実験的データの収集が必要であると考え られた。

成分分析の定性分析から、Ce については、定量 分析結果から偏析の可能性として考えられた。ま た、Nb は、製造元より酸化チタン製造に用いる 原料に 0.1-0.2%程度含まれている報告から、本試 験結果と一致し、二酸化チタンナノ粒子そのもの への含有ではなった。5種の TiO2 NPs について、 物理化学的性状データの特性解析 (HCA法)によ るクラスタリングの実施結果のみでは、毒性試験 結果(A549細胞に与える毒性評価試験結果)と関 連性は見いだせず、物性項目データ数の情報が少 ないことが理由の一つと考えられた。また、更に 検討をすすめた物理化学的性状データと細胞毒 性試験結果(A549 細胞に与える毒性評価試験結 果)とのOPLS解析による関連性解析の結果から、 最も毒性を示した TKP-102 は、不純物(P)の多 さと Crystal phase (Anatase) の影響が示唆された。 従って、これらの物理化学的性状の組み合わせが in vitro 試験での毒性に影響することが考えられ た。一方、マグネタイトナノ粒子の有害性情報に ついては、MHLW GRANTS SYSTEM から in *vitro/in vivo* 毒性試験報告結果より74 試験を収集・ 整理した。マグネタイトナノ粒子に関しては、物 理化学的性状の情報数が殆どなく、現在は収集し たデータ内で入手困難な検体が多かった理由に より、物理化学的性状に必要な測定ができず、有 害性情報との解析に資するデータが揃わなかっ た。今回、収集・整理したマグネタイトナノ粒子 の毒性の傾向としては、in vitro 毒性試験で遺伝毒 性は試験されたすべての検体間で陽性を示し、ま た、細胞毒性、酸化ストレス試験では試験された 約半分の検体が、それぞれで細胞毒性を有し、酸 化ストレスを引き起こしていた。従って、どのよ

うな物理化学的性状を有するかについては不明 であることから各検体の測定データの収集の必 要性が求められた。

E. 結論

平成30年度の二酸化チタン、令和元年度の二酸 化ケイ素および令和2年の二酸化チタンの解析よ り、ナノマテリアルの安全性評価において、多変 量解析法は物理化学的性状と有害性の関連性につ いて有用な解析手法であることが示唆された。ま た多変量解析を実施するためにはデータ解析の基 礎となる物性値ならびに有害性情報の広域かつ高 精度なデータの収集と、データマイニングのため のリソースの選択が非常に重要であった。今後、 ナノ粒子の健康影響のさらなる解明に繋げていく ために、さらに収集データ数を増やし、より複雑 なデータに対し解析を実施することが必要である。

最終年度では、自検データを組み入れ、5種の TiO₂ NPs に関する物理化学的性状データの情報収 集と、in vitro 毒性試験結果の収集データについ て、解析用データに整理・データマイニングし、 物理化学的性状の特性解析および、A549 細胞に 与える毒性評価試験結果との関連性解析を実施し た。OPLS 法による多変量解析で毒性に関連する 物理化学的性状項目の組み合わせを見出したが、 物理化学的性状の情報については項目数の不足が 見られた。マグネタイトナノ粒子に関しては、in vitro/in vivo 毒性試験報告結果からの有害性情報に 関しては、in vitro 試験で同一検体間の統一され た試験法や条件で毒性試験を検討し、実施する必 要があった。また、in vivo 試験では、肺に炎症所 見のある気管内投与試験結果データは、わずか4 試験のみであった。さらに、マグネタイトナノ粒 子の物理化学的性状については、情報が殆どなか ったことから、毒性試験結果との関連性解析を進 めていくためにも物理化学的性状の収集が今後の 課題となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Imai K, Nakanishi I, Ohkubo K, <u>Ohno A</u>, 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

- <u>大野彰子</u>,渡邉昌俊,広瀬明彦:多変量解 析を用いたナノマテリアルの毒性評価手法 の開発,第47回日本毒性学会学術集会 (2020. 6.29-7.1, web 開催)
- FUKUHARA K, <u>OHNO A.</u> Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
- <u>OHNO A</u>, WATANABE M, HIROSE A. Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
- 西田明日香,足利太可雄,大野彰子,飯島一 智:銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解 析,日本動物実験代替法学会第33回大会 (2020.11.12,web開催)
- IIJIMA K, NISHIDA A, <u>OHNO A</u>, ASHIKAGA T. Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1, SOT 60th Annual Meeting and ToxExpo (March 15-18, 2021, virtual meeting)
- <u>大野 彰子</u>,沖山 佳生,広瀬 明彦,福原 潔: ニトロ多環芳香族炭化水素の構造と変異原 性に関するドッキングスタディ,日本薬学会 第 141 年会(2021. 3.26-3.29, web 開催)
- 福原 潔,中西郁夫,大久保敬,今井耕平, 水野美麗,松本謙一郎,<u>大野彰子</u>: C-メチル フィセチンのラジカル消去作用,日本農芸化 学会 2021 年度大会(2021. 3.18-3.21, web 開 催)
- <u>大野彰子</u>、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)
- 福原 潔, 今井耕平, 中西郁夫, 大久保 敬, <u>大野彰子</u>, 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)
- 10. 福原 潔、中西郁夫、今井耕平、松本謙一 郎、<u>大野彰子</u>.「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)

- <u>大野彰子</u>、渡邉昌俊、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)
- 福原 潔、中西郁夫、大久保敬、今井耕平、 水野美麗、松本謙一郎、<u>大野彰子</u>.「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)
- Fukuhara K., Imai K., Nakanishi I, Matsumoto K., <u>Ohno A</u>. Planar catechin conjugated with DTPA as a promising antioxidant triggered by Fe3+ coordination, 258th ACS National Meeting, (August, 2019, San Diego, USA)
- <u>大野彰子</u>.「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)
- 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、松本謙一郎、 大野彰子. 金属イオン配位により活性化する 抗酸化物質の開発、日本農芸化学会 2019 年度 大会、東京(2019.3)
- 16. 福原 潔,今井耕平,中西郁夫,松本謙一郎,大野彰子. 金属錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発:、第36回メディシナルケミストリーシンポジウム、京都(2018.11)
- K. Fukuhara, T. Arai, <u>A. Ohno</u>, K. Mori, M. Shibanuma, N. Miyata, H. Nakagawa. Potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease: a peptide that blocks amyloid β induced neurotoxicity, ACS Fall 2018 National Meeting, Boston, 2018 August 19
- T. Yamada, M. Kurimoto, M. Miura, T. Kawamura, K. Jojima, N. Taira, H. Ohata, S. Tsujii, <u>A. Ohno,</u> <u>A. Hirose</u>. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)

- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1. 特許取得
- 特になし 2.実用新案登録
- 2. 天元初来立 特になし
- **3.その他** 特になし

	種類	Crystal phase	Crystal size (nm)	Surface coating	Composition (TiO ₂ , %)
MT-150A	微粒子酸化 チタン	Rutile	15	uncoating	99.8
MT-500B	微粒子酸化 チタン	Rutile	35	uncoating	99.7
AMT-100	光触媒作用 酸化チタン	Anatase	6	uncoating	98.7
TKP-102	光触媒作用 酸化チタン	Anatase	15	uncoating	99.6
AMT-600	光触媒作用 酸化チタン	Anatase	30	uncoating	99.7

Table 1 5種の TiO₂ NPs の調査対象物質

Table 2 5種の TiO₂ NPs の物理化学的性状

Property		Method/Inst rument	MT-150A	MT-500B	AMT-100	TKP-102	AMT-600
Crystal phase			Rutile	Rutile	Anatase	Anatase	Anatase
Crystal size (nm)			15	35	6	15	30
Composition ※	Impurity (µg/g Fe)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	Impurity (µg/g Si)	ICP-AES	< 100	100	< 100	< 100	100
	lmpurity (µg/g K)	ICP-AES	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	lmpurity (µg/g P) ※1	ICP-AES	< 100	< 100	680	770	620
	Impurity-coating (µg/g AI)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	Impurity (µg/g Cr)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	lmpurity (µg/g Zr) ⊛1	ICP-AES	280	300	270	300	470
	Impurity (μg/g Ca) ※1	ICP-AES	870	910	160	290	280
	Impurity (µg/g Na)	ICP-AES	2000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	Impurity (µg/g S)	ICP-AES	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	Impurity (µg/g Mg)		-	-	-	-	-
	Impurity (% Ce) %3	ICP-AES	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Impurity (% Nb) %3	ICP-AES	0.11	0.16	0.16	0.17	0.15
	O (wt%)		0.0	39.8	34.8	39.0	39.1
	Ti (wt%) %2	ICP-AES	55.7	59.6	52.1	58.4	58.5
	TiO2(%) (括弧内はdata-sheetの値)	ICP-AES	92.9(90<)	99.5(90<)	86.9(93)	97.5(96)	97.5(98)
Coating			no	no	no	no	no
Hydrophilic / Hydrophobic			Hydrophilic	Hydrophobic	Hydrophilic	Hydrophilic	Hydrophobic
Specific surface area (m²/g)	surface area (m²/g) (括弧内はdata- sheetの値)	BET	109	35	325(280)	109(110)	55(52)
micropore distribution	micropore distribution (細孔容積 _cm ³ /g)	BET	0.44	-	0.36	0.32	0.24
	micropore distribution ⁽ 細孔径 nm)	BET	46	-	2.7	13	26

※1 不純物は6化合物の各種元素について定性分析後、P, Ca, Zr, Ti については定量分析を実施した。

※2 TiO₂はTiの定量結果より換算した。

※3 推定存在比(%)

		メソポア領域 BJH 解析 (1~100nm)			
	以主云往(…2/…)	細孔容積	細孔径※1 (nm)		
	比衣囬楨(m-/g)	(cm^3/g)			
M T-150A	109	0.44	46		
M T-500B	35	-	-		
AM T-100	325	0.36	2.7		
TKP-102	109	0.32	13		
AM T-600	55	0.24	26		

Table 3 窒素吸着多点法測定結果

Table 4 浸透速度測定結果

		粉体浸透速度(mm2/s)							
	1回目	2 回目	3 回目	平均值	標準偏差				
M T-150A	0.9	0.8	0.8	0.8	0				
M T-500B	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1				
AM T-100	0.9	0.7	1	0.8	0.2				
TKP-102	0.7	0.7	0.9	0.7	0.1				
AM T-600	0.5	0.5	0.5	0.5	0				

Table 5	粉体接触角測定結果
---------	-----------

		粉体接触角(°)								
	1回目	2 回目	3 回目	平均值	標準偏差					
M T-150A	53.8	56.4	57.2	55.8	1.8					
M T-500B	87.8	83	82.8	84.5	2.8					
AM T-100	53.9	61.9	46.5	54.1	7.7					
TKP-102	59.6	63.3	54.2	59.1	4.6					
AM T-600	75.7	77.4	77.4	76.9	1					

親水性 2 100 疎水性 90 粉体浸透速度(mm²/s) ē 80 粉体接触角 70 Ŧ 60 1 50 40 Į ੇ 30 20 10 748.102 疎水性 0 MT-150A AMT-600 0 親水性 **M¹⁵⁰⁸ A^{M100}** • 粉体浸透速度平均 • 粉体接触角平均

Figure 1 浸透速度と接触角(親水性および疎水性の傾向)

Figure 2 浸透速度と接触角(親水性および疎水性の傾向)との相関図





Figure 3 5種の TiO₂ NPs の主成分分析 (PCA)

Figure 4 5種の TiO₂ NPs のクラスタリング (HCA)



 Figure 5
 5種の TiO₂ NPs の物理化学的性状と A549 細胞毒性試験結果と物性との多変量解析 (OPLS 解析)



5A) Scores plot



5B) Loadings plot

Table 6 マグネタイトの有害性情報(遺伝毒性)

検体	試験法	Test cell type	Time	濃度	結果
マグネタイト	コメットアッセイ	マウス肺細胞	単回気管内 投与3、24、 72時間後	0.05、0.2 mg/mouse	+
マグネタイト	gpt遺伝子突然変異	マウス肺細胞	反復気管内 投2ヵ月後	0.2 mg/mouse	+
Fe2O3 Fe3O4	末梢血小核試験	マウス末梢血網状赤血球	腹腔内投与 0、24、48、72 時間後	1、3 mg	+
マグネタイト	小核試験	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	不明	200 µg/mL (その他の濃 度は不明)	+
	姉妹染色分体交換試験	チャイニーズハムスター (CHO) 細胞株	不明	2 µg/mL (その他の濃 度は不明)	+
マグネタイトナノ粒子 (MGT) 表面修飾を有さないMGT (BMS-10) 表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を 有するMGT (BMSC-5)	gpt遺伝子突然変異	GDL1、RAW264.7	24時間ばく 露、6~7日 間培養後	不明	+

+: 陽性

Table 7 マグネタイ	トの有害性情報	(細胞毒性)
---------------	---------	--------

给休	Coll assau	Test cell type	Time	進度	 	供去
快评	Alamar Blue	Test cell type	Time	辰良	和木	1/# 1/5
マグネタイト	Alamar Blue Assay (生存 細胞数測定)	前立腺癌細胞株DU145 前立腺正常上皮細胞株RWPE1	24、48、72h	記載なし	Ļ	濃度依存的に生細胞数が減少
	細胞生存率	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	24、48、72h	10 μg/mL	Ļ	A549:10 μg/mLより生存細胞率が低下 DU-145:1 μg/mLより生存細胞率が低下
マグネタイト	細胞生存率	ヒト前立腺細胞株 (DU145)	24、48、72h	1 μg/mL	Ļ	
	細胞生存率	ヒト前立腺細胞株 (LNCaP, RWPE-1)	24、48、72h	1、10 μg/mL?	→	
γ-Fe2O3 (d= 70 nm) (CIK NanoTek社 より購入) をPEI maxで表面コーティング したPEImax-nanoparticle	Alamar Blue Assay (生存 細胞数測定)	CL6 cells	0.8 μg for 4h on the magnetic sheet	0.8 μ g for 4h on the magnetic sheet	→	
非修飾磁性体ナノ粒子 (Fe3O4NPs) (戸	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	200 μg/mL	Ļ	Fe3O4NPs
田工業株式会社より購入) 表面をカルボキシル基で修飾した磁性	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	200 µg/mL	Ļ	Fe3O4NPs-COOH
体ナノ粒子 (Fe3O4NPs-COOH) (Institute for Integrated Cell-Material	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (LNCaP)	72h	100, 200 μg/mL	Ļ	Fe3O4NPs
Sciences (iCeMS), 京都大学より購入)	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (LNCaP)	72h	100, 200 μg/mL	Ļ	Fe3O4NPs-COOH
	MTTアッセイ LDHアッセイ	3D皮膚再構成系	24h	0, 2, 6.7, 20 mg/mL	→	表面修飾マグネタイト
	Alamar Blue Assay	NKEK単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	Ļ	表面修飾マグネタイト 72時間培養では200μg/mLで強い細胞毒性
ラビュカノレ (私ルが土 パーマン)(海湾ナ	Alamar Blue Assay	HepG2単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	\rightarrow	表面修飾マグネタイト
マクネタイト (酸化鉄デク粒子) (波達光 生より本研究班全体に分配)	MTT assay LDH assay	3D皮膚再構成系	24h	0, 2, 6.7, 20 mg/mL	\rightarrow	表面非修飾マグネタイト
	Alamar Blue Assay	NKEK単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	Ļ	表面非修飾マグネタイト 24時間培養では200 µ g/mLで、72時間培養では100 及び200 µ g/mLで強い細胞毒性
	Alamar Blue Assay	HepG2単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	\rightarrow	表面非修飾マグネタイト
	NR assay	GDL1	24h	6.25−200 μg/mL	\rightarrow	表面修飾を有さないMGT (BMS-10)
マグネタイトナノ粒子 (MGT) 表面修飾を有さないMGT (BMS-10)	NR assay	GDL1	24h	6.25−200 μg/mL	\rightarrow	表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を有するMGT (BMSC-5)
表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を有す るMGT (BMSC-5)	NR assay	RAW264.7	24h	200 μg/mL	ţ	表面修飾を有さないMGT (BMS-10)
	NR assay	RAW264.7	24h	6.25 μg/mL	ţ	表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を有するMGT (BMSC-5)
Fe3O4磁性体ナノ粒子	不明	前立腺癌細胞株 (DU145、 LNCaP) 前立腺由来間質細胞株 (PrSC)	記載なし	1, 10, 100 μ g/mL	Ļ	LNCaPは濃度依存的に細胞生存率が低下
Fe3O4 NPs (Toda Kogyo Corporation	Alamar Blue Assay	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	100µg/mL	Ļ	
(Otake, Hiroshima, Japan))	Alamar Blue Assay	前立腺癌細胞株 (PC-3)	24、72h	10、100μg/mL	ţ	
Core-Shell (塩化鉄(III)六水和物、PVA 溶液、ピロール-3-カルボン酸から合成)	WST-1 Assay	human ovary cancer cell line (HAC-2) folate-receptor negative cells (MCF-7)	24h	不明	→	
アモルファスSiOIこカプセル化された Mn1-xZnxFe2O4 (x=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8)	細胞生存率	Human prostate cancer cells (DU145) breast cancer cells (KPL4, MCF7, MDA-MB231)	30 min	1 mg/ml	Ļ	4種類のがん細胞すべてで約80%の細胞生存率の 低下 After application of an AC magnetic field of 31 kHz and 90 Oe for 30 min, the cells were stained with trypan blue, and the remaining cells were counted.

↓: 細胞毒性有り、→: 細胞毒性無し

検体	試験方法	Time	Test cell type	濃度	結果
マグネタイト	8-oxo-dG、H ε dG、H ε dA、H ε 測定	マウス肺細 胞	単回気管内投与3~168時間後	0.2 mg/mouse	Î
マグネタイト	8-OH-dG測定	3、24、72、 168時間後	単回気管内投与マウスの摘出 肺	0.2 mg/body	1
フェライト(酸化鉄)Fe3O4	8-OH-dG測定	気管内投与3 時間後	気管内投与マウスの肺組織 DNA	0.2 mg/body	1
フェライト(酸化鉄)Fe3O4	8-OH-dG測定	不明	培養細胞 (DU-145, LNCaP) DNA	0.1、1、10 (単位不明)	1
	ROS生成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: DU− 145, PC−3	1,10 μ g/mL?	1
	ROS生成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: LNCaP ヒト肺がん細胞株: A549	1.10 μ g/mL?	\rightarrow
マグネタイト	8-OH-dGの生 成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: DU- 145. PC-3	1 μg/mL	1
	8-OH-dGの生 成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: LNCaP ヒト肺がん細胞株: A549	1、10 μ g/mL?	\rightarrow
	修復酵素遺伝 子	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: DU-145 ヒト肺がん細胞株: A549	1.10 μ	Ļ
	, hOGG1遺伝子 発現	24、48、72h	DU-145	不明	Ļ
マクネタイト	hOGG1遺伝子 発現	24、48、73h	RWPE1	不明	Î
	8-OH-dG測定	24、48、74h	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	10 μg/mL	1
マグネタイト	8-OH-dG測定	24、48、75h	ヒト前立腺細胞株 (DU145)	1 μg/mL	1
	ROS生成	24、48、76h	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	10 µg/mL	1
	ROS生成	24、48、77h	ヒト前立腺細胞株 (DU145)	$1 \mu \text{g/mL}$	1
Fe2O3	8-OH-dG測定	不明	ICRマウス尿	1, 3 mg?	(1)
Fe304	8-OH-dG測定	不明	ICRマウス肝臓	1, 3 mg?	\rightarrow
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	$1 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
	ROS生成	25h	前立腺癌細胞株DU145	$10 \mu\mathrm{g/mL}$	\rightarrow
	ROS生成	26h	前立腺癌細胞株DU145	100 μ g/mL	Î
	ROS生成	27h	前立腺癌細胞株DU145	200 µ g∕mL	Î
	ROS生成	28h	前立腺癌細胞株LNCaP	$1 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
非修飾磁性体ナノ粒子 (Fe3O4NPs) (ア田	ROS生成	29h	前立腺癌細胞株LNCaP	$10 \mu\mathrm{g/mL}$	\rightarrow
上美株式会社より購入)	ROS生成	30h	前立腺癌細胞株LNCaP	$100 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
表面をカルホキンル基で修飾した燃性体ナノ	ROS生成	31h	前立腺癌細胞株LNCaP	$200 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
粒子 (Fe3O4NPs-COOH) (Institute for	ROS生成	32h	前立腺癌細胞株DU145	$1 \mu \text{g/mL}$	\rightarrow
Integrated Cell-Material Sciences (ICeMS),	ROS生成	33h	前立腺癌細胞株DU145	10 μ g/mL	\rightarrow
京都大学より購入)	ROS生成	34h	前立腺癌細胞株DU145	$100 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
	ROS生成	35h	前立腺癌細胞株DU145	$200 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
	ROS生成	36h	削立脲癌細胞株LNCaP	$1 \mu \text{g/mL}$	\rightarrow
	RUS生成	3/h	削立脲 澏細胞 株LNCaP	10 μ g/mL	\rightarrow
	RUS生成	38h	削立脲 澏細胞 株LNCaP	100 µ g/mL	\rightarrow
	RUS生成	39h	<u>削立脉強細胞株LNCaP</u>	200 µ g/mL	\rightarrow
	RUS生成	24h	削立脉癌神胞体DU145	10 μ / mL	\rightarrow
	RUS生成	24h	削立尿癌神胞株DU145	10 µ g/mL	1
磁性体ナノ粒子 (MgNPs-Fe3O4)	RUS生成	24h	削立脉癌神胞株DU145	100 µ g/mL	
	RUS生成	24h	削立脉癌神胞体PC-3	10 μ / mL	\rightarrow
	RUS生成	24h	削立脉癌細胞株PC-3	10 μ g/mL	
	RUS生成	24h	削立脉瘤細胞株PC-3	100 µg/mL	
Fe3O4 NPs (Toda Kogyo Corporation)	ROS生成	24h	PC-3 or DU145 cells	g/mL	Î

Table 8 マグネタイトの有害性情報(酸化ストレス)

↑ : ROS 産生、DNA 付加体形成の増加

(†) : DNA 付加体形成の増加傾向

→ :変化なし

	-						辺安	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	気管内投与		8 †
	1				研究班	7	(項班	P:	8H	演過班	x 違法
					総合研究報告書No.	2010	135007B	20103	I5007B	201725003B	201725003B
					総括·分担研究報告書No.	2009	41012A	20094	1012A	不明	不明
					ばく露期間		単回	1回/4週間	間、計13回	15日間(1日おき、計8回)	15日間(1日おき、計8回)
ID					整理番号		1		2	24	25
ID					Name (緊後示)	マグネタイトスラリー (aH1	0.1. Lot: 90316) (戸田工業)	磁性ナノ粒子マグネタイト (Lot	. 90828,pH10.5: Lot. 100316,	磁性ナノ粒子マグネタイト(BMS-11; Lot.111117,	磁性ナノ粒子マグネタイト(BMS-11:Lot140528,
-	_							pH1	(0.0)	戸田工業)	户田工業)
					Size and other information	EDSで鉄及び酸素を検出、それ	れ以外の不純物 (元素) は検出せ ず	EDSで鉄及び酸素を検出、それ	以外の不純物 (元素) は検出せ *	pH 10.5	pH 9.7
	-					631	9	424	9 14-1	一次程经0-15 nm	——次租住5-15 nm
	-				surface area (m2/g) 溶媒	12	戦なし 載なし	1240	iau Iau	TB	123.8 TB
					分散法	121	戦なし	1240	ねし	Taquann法	Tequann法
Filter	-				エアロゾル生成法 Test auideline		-		-		
Filter					Route	気管	内噴霧	気管	内噴霧	気道内投与	気道内投与
Filter	_				Species		Rat	R	lat	Rat	Mouse
Filter	-				Gender	F344/ male	/female	F344/U male/	female	F344 male	A/JJmsSic 不明
Filter					Test group	,	Main	м	ain	Main	Main
Filter	-				Administration period		単回	1回/4週間	間、計13回	週1回、計4回	週1回、計4回
Filter					Dose unit	m	ig/kg	mg	i/kg	mg/kg	mg/kg
Filter					Min dose		5	0	.2	-	-
Filter	-				Max dose Purity	12	45 載なし	12.1	5 9/21.	5 彩彩なし	5 彩版なし
Filter					Test laboratory	国立がんも	1.29-研究所	国立がんせ:	ンター研究所	東京都健康安全研究センター	東京都健康安全研究センター
Filter					Year reported	2	009	20	009	2015	2017
Filter		単用量試験の	場合の入力:		Publication 文献No		-		-	多田ら.2015 175	多田ら.2017 180
Filter		影響有:LOEL	≤用量		Reliability		4		4	4	4
		影響なし:LOI	EL>x 用量								+ 45 B (7 / 14 B B B)
	1 2	用量以上の調	は験で影響なしの	場合の入力:		米田を作ってつ、 わたしょ		100/4/000 0410/00 kt ma	****	肺発がんイニシエーター活性の検討	(中朝光がつ注意)線 NNK 2 mg/マウスを復腔内投与後、マグネタイト0、
Filter		NOEL > Max d	ose		Comment	単回気管内スプレー投与し、2 的・病理学	(週间便に皿液子的・皿液生化子 約線香を実施	1回/4週間、計13回投与し、52: 的・病理学的・免疫;	週間復に皿液子的・皿液生化子 組織学的検査を実施	0、5 mg/kg体重、週1回、計4回	5.0 mg/kg体重で16週間(4週間毎に1回)、気管内
		ー: 該当しない 新書: Endpoint	tranco (Dilla III)			F7 8147	FIGAL CAUC		and Friday Course	II群 (マグネタイト投与群)の結果を入力	校与 Ⅲ間 (マグネタイト投与間)の結果を入力
	_	, , chopolin	Cicc Sydenc				-				
Filter	-	Evamination			Parameter (NOEL/LOEL)	NOEL	LOEL	NOEL	LOEL	单用量 (5 mg/kg)	単用量 (5 mg/kg)
Endpoint tree category v	- No -	items *	Organ (Tissue) v	Tissue	v Hindings v	NOEL	LOEL	NOEL	LOEL	LOEL	LOEL
Endpoint tree	2	NOAEL/LOAFI	Whole body	1	Total	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	3	General signs	Whole body	-	Death	no data	no data	no data	no data	no data	
Endpoint tree	4	General signs	Whole body	I	Body weight I	no oata no data	no data	no data	no data	> 5	>5
Endpoint tree	6	General signs	Whole body		Food consumption 1	no data	no data	no data	no data	> 5	no data
Endpoint tree	7	General signs	whole body Whole body	1	Water consumption 1	no oata no data	no data	no data	no data	> 5	no deta
Endpoint tree	9	General signs	Whole body		Water consumption 1	no data	no data	no data	no data	> 5	no data
Endpoint tree	10	General sizes	Whole body		Hyperthermia Domio pressure 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	91	Urinalysis	Urine		Osmic pressure 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	92	Urinalysis	Bland or " / - ··	montel	Other findings	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	94	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	RBC 1	no data	no data	no data	no data	no data	>5
Endpoint tree	95	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	HGB 1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree Endpoint tree	96	Hematological	Blood cell (Ervthe	rocvte)	HGB 1 HCT 1	no data no data	no data	no data no data	no data	no data	>5
Endpoint tree	98	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	HCTI	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	99	Hematological -	Blood cell (Erythe Blood cell (Erythe	rocyte)	MCV 1	no data on data	no data	no data on data	no data	no data	>5
Endpoint tree	101	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	MCH 1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	102	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	MCH I	no data	no data	no data	no data	no data	>5
Endpoint tree	103	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	MCHC I	no data	no data	no data	no data	no data	>5
Endpoint tree	105	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	Reticulocyte 1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	100	Hematological	Blood cell (Erythr	rocyte)	Methemoglobin 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	108	Hematological	Blood cell (Leuko	cyte)	WBC 1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	110	Hematological	Blood cell (Leuko Blood cell (Leuko	icyte) icyte)	NEUT 1	no data no data	no data	no data no data	no data	no data	> 5 no data
Endpoint tree	118	Hematological	Blood cell (Leuko	cyte)	BASO 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	119	Hematological Hematological	Blood cell (Leuko Blood cell (Platek	cyte) et)	BASO I PLT 1	no data no data	no data	no data on data	no data	no data	no data
Endpoint tree	121	Hematological	Blood cell (Platel	et)	PLT	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	122	Hematological Ricod chemical	Blood cell (Coagu Blood conum	lation)	PT I Other Enderr	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	180	Organ weights	Brain		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	181	Organ weights	Brain		Absolute organ weight I	no data	no data	no data	no data	>5	> 5
Endpoint tree	183	Organ weights	Brain		Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	>5	>5
Endpoint tree	184	Necropsy	Brain		-	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	244	Necropsy Histopathologic	Intestine			no data no data	no data	no data no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	246	Organ weights	Liver		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	247	Organ weights Organ weights	Liver		Absolute organ weight 1 Relative organ weight 1	no data no data	no data	no data no data	no data no data	> 5	>5
Endpoint tree	249	Organ weights	Liver		Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	250	Necropsy Histonethologic	Panereas		Enlarged (Necropsy)	no data no data	no data	no data on data	no data	no data	no data
Endpoint tree	282	Organ weights	Heart		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	283	Organ weights Organ weights	Heart		Absolute organ weight I	no data	no data	no data	no data	>5	>5
Endpoint tree	285	Organ weights	Heart		Relative organ weight I	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	286	Necropsy	Heart		Max and all an area allo	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	288	Histopathologic	Heart		Myocardial degeneration	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	289	Histopathologic	Heart		Myocardial fibrosis	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	290	Histopathologic	Heart		Other findings	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	292	Organ weights	Lung		Absolute organ weight 1 Absolute organ weight	on data	5 15	no data	no data	5.5	5
Endpoint tree	293	Organ weights	Lung		Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data		5 5
Endpoint tree	295	Orean weights	Lung		Relative organ weight I	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	296	Necropsy	Lung		lung	-		1		no data	no data
Endepiet to: -	-	Necropsy	Lung	1	Deposit of black material	- 	ee data	0.2	no data	no data	5 data
Endpoint tree	297	Histopathologic	Lung		Foamy cell accumulation	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	299	Histopathologic	Lung	F	Edema	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	300	Histopathologic	Lung		Cell infiltration/Inflamation	ŀ		ŀ	0.5		s 5
H	+				Other findings (fibrotic reaction						4
L	1				collagen content)	1					
endpoint tree	301	restopathologic	Lung		of alveolar type II cells.	Ī		0.2	1		no cara
	1				ebeniar/bronchinie enithelial						
1	1	Histopathologi	Lung		preposits in alveolus cavity granuloma formation		5 15	no oàtă 0.2	ino calta	no data	no data
Production and	1	Histopethologi	Lung		edema around pulmonary vascularity	1	5 45	no data	no data	no data	no data
endpoint tree	302	recropsy	rachea	epitheaum	eccumulation of particle-laden	1	- 41	no oàta	no ožtá	no data	no datal
Endpoint tree	303	Histopathologic	Trachea		macrophages	1	5 45	0.2	1	no data	no data
Endpoint tree	304	Histopethologic Necropsy	Bone marrow		increase of goblet cell	no data	no data	no data no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	305	Histopathologic	Bone marrow		Hematopoiesis	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	306	Histopathologic	Bone marrow		Hematopoiesis Other Seder	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	308	Organ weights	Spleen		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	309	Organ weights	Spleen		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	>5
Endpoint tree	310	Organ weights	Spleen		Relative organ weight	no data	no data	no data	no data	> 5	>5
Endpoint tree	312	Necropsy	Spleen	F	Enlarged (Necropsy)	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	313	Necropsy	opteen Spieen		Other findings	no cata no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	315	Histopathologic	Spleen		Pigmentation (Hemosiderin)	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	316	Histopethologic	Spleen		Pigmentation (Other) Extramedullary hematonolosis	no data no data	no data	no data no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	318	Histopathologic	Spleen		Congestion	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	319	Histopethologic	Spleen	Lymph follicle	Hyperplasia Atrophy	no data no data	no data	no data no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	321	Histopathologic	Spleen	ayngar adiicie	Fibrosis	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	322	Histopathologic	Spleen	-	Hemorrhage Other Sederat	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	323	Organ weights	Thymus		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	325	Organ weights	Thymus	-	Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	326	Organ weights Organ weights	Thymus		Relative organ weight I	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	328	Necropsy	Thymus		Atrophy (Necropsy)	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	329	Necropsy	Thymus Thymus	Thymocyte	Other findings Atrophy	no data no data	no data	no data no data	no data no data	no data no data	no data no data
Endpoint tree	331	Histopathologic	Thymus	.,	Other findings	no data	no data	0.2			no data
Endpoint tree Endpoint tree	332	Necropsy	Lymph node		enlarged mediastinal lymph nodes macrophase accumulation	no data no data	no data	no data no data	no data no data	no data no data	no data no data
		Necropsy	Lymph node		Deposit of brown particles	-		0.2		no data	no data
Endpoint tree	334	Necropsy Orean mulab*-	Lymph node Kidney		Discoloration to greyish black Absolute grean weight 1	- on data	nn data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	335	Organ weights	Kidney		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	336	Organ weights Organ meinte	Kidney		Relative organ weight Relative organ weight	no data	no data	no data	no data	> 5	5 > 5 > 5
Endpoint tree	338	Necropsy	Kidney		Enlarged (Necropsy)	no data	no data	no data	no data	no data	no deta

Table 9 マグネタイトの *in vivo* 気管内投与試験による有害性情報(HESS database sheet)