

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2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、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、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（SiO₂ NPs: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。

今年度は、二つのナノマテリアルに着目し、①ティ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。

B. 研究方法

本研究で実施した対象化合物は、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(表1)。

【有害性情報の調査対象情報源】

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: $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$ 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・整理された物理化学的性状データシートおよび *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 : impurity 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) , 毒性は弱いがあり (+ : 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-3100R II 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°C×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°C湿度 : 40±5°C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°C湿度 : 40±5°C、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 ($R^2=0.9084$) 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 TiO₂ 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 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 TiO₂ NPs 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 5B）。従って、本解析結果では、図 5A 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索可能であることが示唆された。特に、図 5B 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 LOEL 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 検体を用いた 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 検体を用いた 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 SiO₂ にカプセル化された Mn_{1-x}Zn_xFe₂O₄（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、100µg/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、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/DuCrIcRli 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, 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/DuCrIcRli ラット (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; Lot.111117, 戸田工業) (pH 10.5、一次粒径 5-15 nm) 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

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) (pH9.7、一次粒径 5-15 nm) を検体に用いて、中期発がん性試験として、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。

D. 考察

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かった。5 種の TiO_2 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

本研究で 5 種の TiO_2 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、実施する必要がある。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

該当なし

2. 学会発表

1. 大野彰子, 渡邊昌俊, 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)

2. FUKUHARA K, OHNO A. Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
3. OHNO A., 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)
4. 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)
5. IIJIMA K, NISHIDA A, OHNO A., 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)
6. 大野 彰子, 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)
7. 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-メチルフェニール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)

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

特になし

3. その他

特になし

Table 1 5種のTiO₂ NPsの調査対象物質

	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 2 5種のTiO₂ NPsの物理化学的性状

Property		Method/Instrument	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
	Impurity (µg/g K)	ICP-AES	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	Impurity (µg/g P) ※1	ICP-AES	< 100	< 100	680	770	620
	Impurity-coating (µg/g Al)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	Impurity (µg/g Cr)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	Impurity (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
	TiO ₂ (%) (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 (m ² /g)	surface area (m ² /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 (%)

Table 3 窒素吸着多点法測定結果

	比表面積(m ² /g)	マイクロ領域 BJH 解析 (1~100nm)	
		細孔容積 (cm ³ /g)	細孔径※1 (nm)
MT-150A	109	0.44	46
MT-500B	35	-	-
AMT-100	325	0.36	2.7
TKP-102	109	0.32	13
AMT-600	55	0.24	26

Table 4 浸透速度測定結果

	粉体浸透速度(mm ² /s)				
	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
MT-150A	0.9	0.8	0.8	0.8	0
MT-500B	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
AMT-100	0.9	0.7	1	0.8	0.2
TKP-102	0.7	0.7	0.9	0.7	0.1
AMT-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	平均値	標準偏差
MT-150A	53.8	56.4	57.2	55.8	1.8
MT-500B	87.8	83	82.8	84.5	2.8
AMT-100	53.9	61.9	46.5	54.1	7.7
TKP-102	59.6	63.3	54.2	59.1	4.6
AMT-600	75.7	77.4	77.4	76.9	1

Figure 1 浸透速度と接触角（親水性および疎水性の傾向）

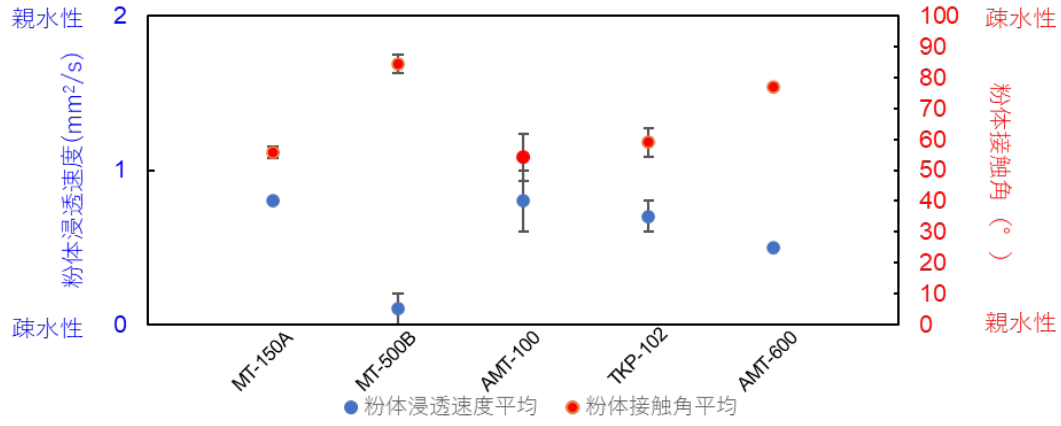


Figure 2 浸透速度と接触角（親水性および疎水性の傾向）との相関図

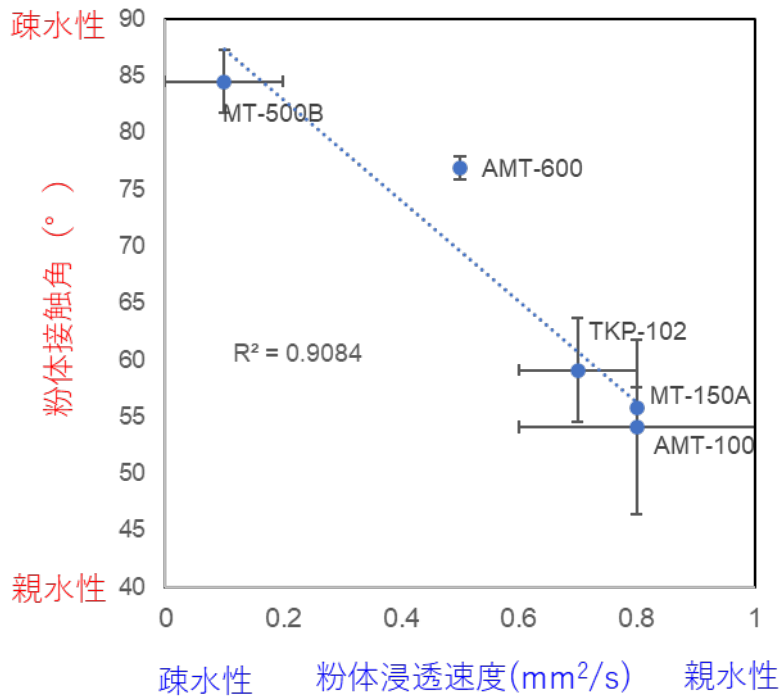


Figure 3 5種のTiO₂ NPsの主成分分析 (PCA)

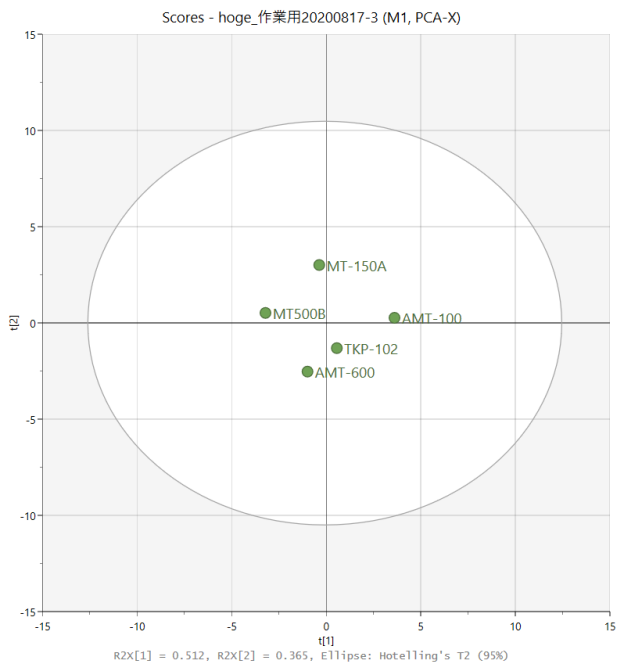


Figure 4 5種のTiO₂ NPsのクラスタリング (HCA)

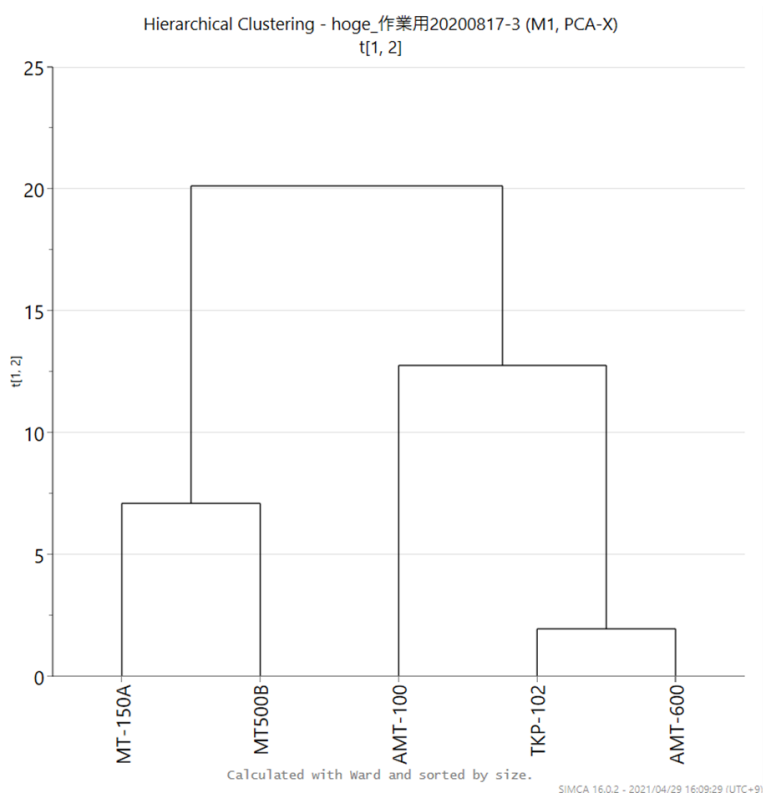
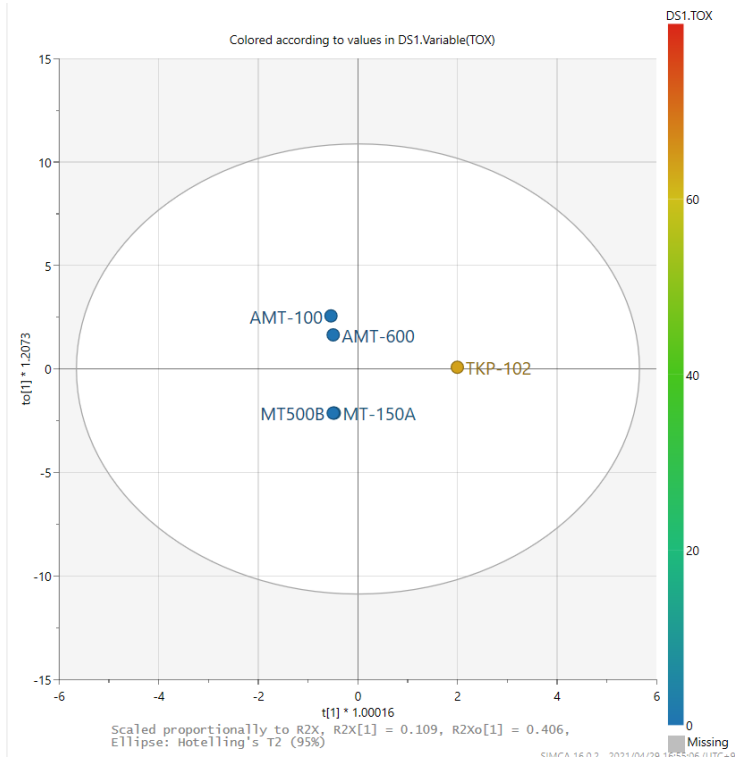


Figure 5 5種のTiO₂ NPsの物理化学的性状とA549細胞毒性試験結果と物性との多変量解析 (OPLS解析)

5A) Scores plot



5B) Loadings plot

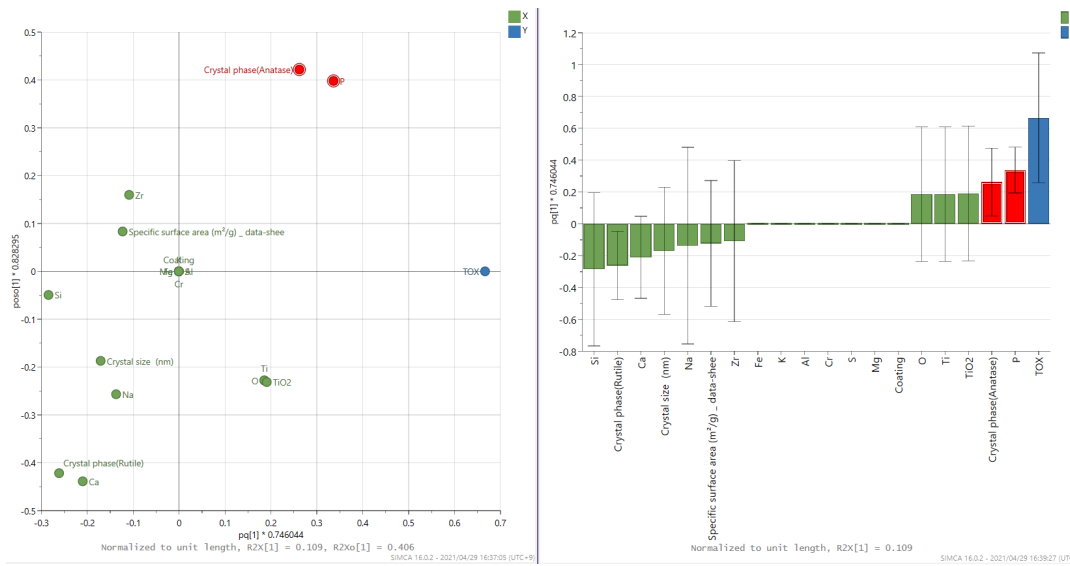


Table 6 マグネタイトの有害性情報 (遺伝毒性)

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 μ g/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 μ g/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)

検体	Cell assay	Test cell type	Time	濃度	結果	備考
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	↓	濃度依存的に生存細胞数が減少
マグネタイト	細胞生存率	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	24、48、72h	10 μ g/mL	↓	A549: 10 μ g/mLより生存細胞率が低下 DU-145: 1 μ g/mLより生存細胞率が低下
	細胞生存率	ヒト前立腺細胞株 (DU145)	24、48、72h	1 μ g/mL	↓	
	細胞生存率	ヒト前立腺細胞株 (LNCaP、RWPE-1)	24、48、72h	1、10 μ g/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PEI max-nanoparticle	Alamar Blue Assay (生存細胞数測定)	CL6 cells	0.8 μ g 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)	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs
	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs-COOH
	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (LNCaP)	72h	100, 200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs
	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (LNCaP)	72h	100, 200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs-COOH
マグネタイト (酸化鉄ナノ粒子) (濃邊先生より本研究班全体に分配)	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	↓	表面修飾マグネタイト 72時間培養では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	→	表面修飾マグネタイト
	MTT assay LDH assay	3D皮膚再構成系	24h	0, 2, 6.7, 20 mg/mL	→	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	↓	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	→	表面非修飾マグネタイト
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)	NR assay	GDL1	24h	6.25-200 μ g/mL	→	表面修飾を有さないMGT (BMS-10)
	NR assay	GDL1	24h	6.25-200 μ g/mL	→	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 μ g/mL	↓	表面修飾を有さないMGT (BMS-10)
	NR assay	RAW264.7	24h	6.25 μ g/mL	↓	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	↓	LNCaPは濃度依存的に細胞生存率が低下
Fe3O4 NPs (Toda Kogyo Corporation (Otake, Hiroshima, Japan))	Alamar Blue Assay	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	100 μ g/mL	↓	
	Alamar Blue Assay	前立腺癌細胞株 (PC-3)	24、72h	10、100 μ g/mL	↓	
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SiO ₂ にナノ粒子化されたMn ^{1-x} Zn ^x Fe ₂ O ₄ (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	↓	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

Table 8 マグネタイトの有害性情報 (酸化ストレス)

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	↑
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	↑
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	↑
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)	↑
マグネタイト	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?	↑
	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?	→
	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 μ g/mL	↑
	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?	→
	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 g/mL?	↓
マグネタイト	hOGG1遺伝子発現	24, 48, 72h	DU-145	不明	↓
	hOGG1遺伝子発現	24, 48, 73h	RWPE1	不明	↑
マグネタイト	8-OH-dG測定	24, 48, 74h	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	10 μ g/mL	↑
	8-OH-dG測定	24, 48, 75h	ヒト前立腺細胞株 (DU145)	1 μ g/mL	↑
	ROS生成	24, 48, 76h	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	10 μ g/mL	↑
	ROS生成	24, 48, 77h	ヒト前立腺細胞株 (DU145)	1 μ g/mL	↑
Fe2O3	8-OH-dG測定	不明	ICRマウス尿	1, 3 mg?	(↑)
Fe3O4	8-OH-dG測定	不明	ICRマウス肝臓	1, 3 mg?	→
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)	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	1 μ g/mL	→
	ROS生成	25h	前立腺癌細胞株DU145	10 μ g/mL	→
	ROS生成	26h	前立腺癌細胞株DU145	100 μ g/mL	↑
	ROS生成	27h	前立腺癌細胞株DU145	200 μ g/mL	↑
	ROS生成	28h	前立腺癌細胞株LNCaP	1 μ g/mL	→
	ROS生成	29h	前立腺癌細胞株LNCaP	10 μ g/mL	→
	ROS生成	30h	前立腺癌細胞株LNCaP	100 μ g/mL	→
	ROS生成	31h	前立腺癌細胞株LNCaP	200 μ g/mL	→
	ROS生成	32h	前立腺癌細胞株DU145	1 μ g/mL	→
	ROS生成	33h	前立腺癌細胞株DU145	10 μ g/mL	→
	ROS生成	34h	前立腺癌細胞株DU145	100 μ g/mL	→
	ROS生成	35h	前立腺癌細胞株DU145	200 μ g/mL	→
	ROS生成	36h	前立腺癌細胞株LNCaP	1 μ g/mL	→
	ROS生成	37h	前立腺癌細胞株LNCaP	10 μ g/mL	→
	ROS生成	38h	前立腺癌細胞株LNCaP	100 μ g/mL	→
ROS生成	39h	前立腺癌細胞株LNCaP	200 μ g/mL	→	
磁性体ナノ粒子 (MgNPs-Fe3O4)	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	1 μ g/mL	→
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	10 μ g/mL	↑
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	100 μ g/mL	↑
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株PC-3	1 μ g/mL	→
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株PC-3	10 μ g/mL	↑
ROS生成	24h	前立腺癌細胞株PC-3	100 μ g/mL	↑	
Fe3O4 NPs (Toda Kogyo Corporation)	ROS生成	24h	PC-3 or DU145 cells	1, 10, 100 μ g/mL	↑

↑ : 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

