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(SiO₂NPs:NM200 シリー ズ)や二酸化チタンナノ粒子(TiO₂NPs: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。

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)
- OPLS 法: Y = f(x) = alxl + 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: 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、燃烧-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 \succ 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 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 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。

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、100µg/mL)、Fe₃O₄NPs(ROS 生成、 27h、前立腺癌細胞株 DU145、200ug/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; \checkmark 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

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 5-15 nm)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。

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

本研究で5種のTiO₂NPs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 該当なし
 2.学会発表
 1. 大野彰子,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, <u>大野彰子</u>, 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)
- 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, <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)

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

	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
	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
	lmpurity (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(%)

Table 3 窒素吸着多点法測定結果

		メソポア領域 BJH 解析 (1~100nm					
	₩ 志云珪(m 2 /m)	細孔容積	細孔径※1 (nm)				
	比衣面槓(III /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 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						



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)

給休	Cell accav	Test cell type	Time	遭由	結里	備考
快座	Alamar Blue	Test cell type	Time	/废/文	和木	(用 ^5
マグネタイト	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
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 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	, o
検体 マグネタイト マグネタイト アー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 非修飾磁性体ナノ粒子 (Fe3O4NPs) (戸 田工業株式会社より購入) 表面を力ルポキンル基で修飾した磁性 体ナイ和子 (Fe3O4NPs-COOH) (Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), 京都大学より購入) マグネタイト (酸化鉄ナノ粒子)(渡邉先 生より本研究班全体に分配) マグネタイト(酸化鉄ナノ粒子)(渡邉先 生より本研究班全体に分配) マグネタイトナノ粒子 (MGT) 表面修飾を有さないMGT (BMS-10) 表面修飾を有さなしMGT (BMS-5)	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 µ/g/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
マダットノー(志)に終土 パンマン(海湾ル	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	\rightarrow	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
	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
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	→	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	Ţ	表面非修飾マグネタイト 24時間培養では200 µg/mLで、72時間培養では100 及び200 µg/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	Ļ	表面修飾を有さないMGT (BMS-10)
	NR assay	RAW264.7	24h	6.25 μg/mL	Ļ	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	100 μ g/mL	Ļ	
(Otake, Hiroshima, Japan))	Alamar Blue Assay	前立腺癌細胞株 (PC−3)	24、72h	10、100μg/mL	Ļ	
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)	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

	計除士計	Time	Test cell tons	進由	(注田)
快1个	1 武駛力法	Time	l est cell type	涙 <u></u> 人	柏未
	8-oxo-dG, H E	マウス肺細		0.2	•
マクネタイト	dG, H & dA, H	胞	里回気官内投与3~168時間後	mg/mouse	I
	<i>E</i> 測定			-	
マグネタイト	8-OH-dG測定	3,24,72,	単回気管内投与マウスの摘出	0.2 mg/body	1
		168時間後	肺	;	
フェライト (酸化鉄) Fe304	8-OH-dG测定	気管内投与3	気管内投与マウスの肺組織	0.2 mg/hody	1
		時間後	DNA	oliz mg/ body	•
フェライト (酸化鉄) F=304	8-01-40测定	不明	培養細胞 (DU-145, LNCaP)	0.1、1、10	↑ (
		1.61	DNA	(単位不明)	•
	POS生成	げ(震)口谷	ヒト前立腺がん細胞株: DU−	1、10 μ	↑ (
	KU3主成	はて路2日夜	145, PC-3	g∕mL?	I
	POS件 dt	げノ索クロ後	ヒト前立腺がん細胞株: LNCaP	1、10 μ	_
	RUS主成	はく路2口仮	ヒト肺がん細胞株: A549	g/mL?	
マビュタノ	8-OH-dGの生	ばノ雷の口後	ヒト前立腺がん細胞株: DU-	1 11 / 1	^
x2x21F	成	はく路2日仮	145, PC-3	ι μg/mL	I
	8-OH-dGの生	(ドノモッログ)	ヒト前立腺がん細胞株: LNCaP	1.10 μ	
	成	はく蕗2日後	ヒト肺がん細胞株: A549	g/mL?	\rightarrow
	修復酵素遺伝		Lト前立腺がん細胞株: DU-145	1.10 <i>µ</i>	
	子	はく露2日後	ビト肺がん細胞株·A549	g/ml?	Ļ
	, bOGG1遣伝子			8/ III	
	A 相	24、48、72h	DU-145	不明	Ļ
マグネタイト	元気				
	AT 2010	24、48、73h	RWPE1	不明	1
	光坑				
	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)	$1 \mu\text{g/mL}$	1
	DOO ((((((((((•
	ROS生成	24、48、76h	<u>ヒト肺がん田米細胞株(A549)</u>	10 μg/mL	1
	ROS生成	24、48、77h	<u>ヒト前立腺細胞株 (DU145)</u>	$1 \mu \text{g/mL}$	Î
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?	\rightarrow
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	1μg/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	1
	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) (戸田	ROS生成	29h	前立腺癌細胞株LNCaP	$10 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
工業株式会社より購入)	ROS生成	30h	前立腺癌細胞株LNCaP	$100 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ	ROS生成	31h	前立腺癌細胞株LNCaP	200 μ 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	$10 \mu\text{g/mL}$	\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	$200 \mu\mathrm{g/mL}$	\rightarrow
	ROS生成	36h	前立腺癌細胞株LNCaP	$1 \mu \text{g/mL}$	\rightarrow
	ROS生成	37h	前立腺癌細胞株LNCaP	$10 \mu\text{g/mL}$	\rightarrow
	ROS生成	38h	前立腺癌細胞株LNCaP	100 µ g/mL	\rightarrow
	ROS生成	39h	前立腺癌細胞株LNCaP	200 µg/mL	\rightarrow
	ROS牛成	24h	前立腺癌細胞株DU145	1 μ g/ml	\rightarrow
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	10 // g/ml	1
l	ROS生成	24h	前立腺癌細胞格DI1145	100 // g/ml	1
磁性体ナノ粒子 (MgNPs-Fe3O4)	ROS生成	24h	前立眼癌細胞株PC-3	1 // g/ml	\rightarrow
	R05生成	24h		10 // g/ml	↑
		246		100 // g/mL	1
	105王成	240		1 10 100 ···	
Fe3O4 NPs (Toda Kogyo Corporation)	ROS生成	24h	PC-3 or DU145 cells	π/m^{1}	1
				lg∕ m∟	

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

						11 P	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	気管内投与	1	*
	-			研究班	pr.	\$170 第班	产 均	CHE	演過班	·
				総合研究報告書No.	2010	35007B	201035	5007B	2017250038	201725003B
				総括·分担研究報告書No.	2009-	1012A	200941	1012A	不明	不明
				ばく露期間	1	10	1回/4週間	制、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	2	24	25
ID				Name (製造元)	マグネタイトスラリー (pH10	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: Lot.140528,
							pHI	0.0)	戸田工業)	戸田工業)
				Size and other information	EDSで鉄及び酸素を検出、それ	.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 r	pH 10.5	pH 9.7
				curtana area (m2/a)	121	7	128	771		122.9
				surrace area (m2/g) 溶媒	121	なし 記なし	1282	なし	TB	TB
				分散法	81	載なし	38SB	なし	Taguann法	Tequann法
Filter				エアロソル 生成法 Test suideline		-			-	
Filter				Route	気管	内噴霧	気管内	内噴霧	気道内投与	気道内投与
Filter				Species	F	lat.	R	at	Rat	Mouse
Filter				Gender	F344/t male/	female	F344/Di male/f	uGriGrii female	F366 male	A/JJmsSie 不明
Filter				Test group	N	lain	Ma	in	Main	Main
Filter Filter				Administration period Recovery period (day)		-	1回/4週間	8, #†13(m)	週1回、計4回	通1回、計4回
Filter				Dose unit	mj	s/kg	mg/	/kg	mg/kg	mg/kg
Filter				Min dose		5	0.	2		
Filter				Purity	124	+0 EGU	記載	なし	記載なし	記載なし
Filter				Test laboratory	国立がんセ	ンター研究所	国立がんセン	/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	21	109	20	09	2015	2017
riiser	1	▲用量試験の場合の入力:		Tobicación 文献No.		-			90 mg. 2010 176	180
Filter		影響有:LOEL ≤ 用量		Reliability		4	4		4	4
Filter	1	影響なじ: DEL>X H重 用量以上の試験で影響なしの場 NOEL> Max dose : 該当しない 学: Endpoint treeへの追記	拾の入力:	Comment	単回気管内スプレー投与し、2 的・病理学:	週間後に血液学的・血液生化学 約検査を実施	1回/4週間、計13回投与し、523 的・病理学的・免疫制	目間後に血液学的・血液生化学 組織学的検査を実施	納発がんイニシェーター活性の検討 0、5 mg/ka体置、通回、計4回 国群(マグネタイト投与群)の結果を入力 第日第一次の小人	中期発がん性試験 NNK 2 mg/マウスを獲扱内投与後、マヴネタイト0、 5.0 mg/kg体型では週間(4回間)(3回)、気管内 投与 II群(マグネタイト投与群)の結果を入力
riter		Examination		Parameter (NOEL/LOEL)	NUEL	LOEL	NUEL	LOEL	#/# <u>#</u> (5 mp/kg)	#Mile (o mp/kg)
Endpoint tree category v	***	items v Organ (Tissue) v Ti NOEL/LOEL Whole bads	90661	v rinangs v	NUEL v	LUEL v	nuEL v	LUEL v	LUEL v	LUEL V
Endpoint tree	2	NOAEL/LOAEL Whole body		Total	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	3	General signs Whole body		Death Reduminent 1	no data	no data	no data	no data	no data	5
Endpoint tree	4	General signs Whole body		Body weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	6	General signs Whole body General signs Whole body		Food consumption 1	no data	no data	no data	no data	> 5	no data
Endpoint tree	8	General signs Whole body		Water consumption 1	no data	no data	no data	no data	> 5	no data
Endpoint tree	9	General signs Whole body		Water consumption 1	no data	no data	no data	no data	> 5	no data
Endpoint tree Endpoint tree	10	General signs Whole body Urinalysis Urine		Osmic pressure 1	no cata 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 Endpoint tree	92	Unnarysis Hematological (Binod cell (Frothered	vte)	Uther findings RBC 1	no data no data	no data no data	no data	no data no data	no data	no data > 5
Endpoint tree	94	Hematological Blood cell (Erythroc	yte)	RBC	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	95	Hematological Blood cell (Erythroc	yte)	HGB 1	no data	no data	no data	no data	no data	>5
Endpoint tree	95 97	Hematological Blood cell (Erythroc	:yte)	HCT 1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	98	Hematological Blood cell (Erythroc	:yte)	HCT I	no data	no data	no data	no data	no data	>5
Endpoint tree	100	Hematological Blood cell (Erythroc	yte)	MCV1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	101	Hematological Blood cell (Erythroc	:yte)	MCH 1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	102	Hematological (Blood cell (Erythroc	vte)	MCHC 1	no data	no data	no data	no data	no data	>5
Endpoint tree	104	Hematological eBlood cell (Erythroc	:yte)	MCHC I	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	105	Hematological eBlood cell (Erythroc Hematological eBlood cell (Erythroc	:yte) :yte)	Reticulocyte Reticulocyte	no data no data	no data	no data no data	no data no data	no data no data	> 5 no data
Endpoint tree	107	Hematological (Blood cell (Erythroc	yte)	Methemoglobin 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	108	Hematological (Blood cell (Leukocyt Hematological (Blood cell (Leukocyt	te) te)	WBC I	no data no data	no data no data	no data no data	no data no data	no data no data	>5
Endpoint tree	110	Hematological (Blood cell (Leukocyt	te)	NEUT 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	118	Hematological eBlood cell (Leukocyt	te)	BASO	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	120	Hematological (Blood cell (Platelet)		PLT 1	no data	no data	no data	no data	no data	> 5
Endpoint tree	121	Hematological (Blood cell (Platelet)	tion	PLT I	no data	no data	no data	no data	no data	> 5 no data
Endpoint tree	179	Blood chemical Blood serum	and ty	Other findings	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	180	Organ weights Brain		Absolute organ weight	no data	no data	no data	no data	> 5	>5
Endpoint tree	182	Organ weights Brain		Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	>5	>5
Endpoint tree	183	Organ weights Brain		Relative organ weight I	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	244	Necropsy Intestine			no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	245	Histopethologic Intestine			no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	246	Organ weights Liver Organ weights Liver		Absolute organ weight Absolute organ weight	no data no data	no data	no data no data	no data no data	> 5	>5
Endpoint tree	248	Organ weights Liver		Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	249	Necroosy Liver		Melative organ weight 1 Enlarged (Necropsy)	no data no data	no data	no data no data	no data no data	> b no data	> 5 no data
Endpoint tree	281	Histopathologic Pancreas			no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	282	Organ weights Heart Organ weights Heart		Absolute organ weight Absolute organ weight	no data no data	no data	no data no data	no data no data	> 5	>5
Endpoint tree	284	Organ weights Heart		Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	285	Necroosy Heart		Helative organ weight 1	no data no data	no data	no data no data	no data no data	> b no data	> 5 no data
Endpoint tree	287	Histopathologic Heart		Myocardial necrosis	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	288	Histopathologic Heart		Myocardial degeneration Myocardial fibrosis	no cata no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	290	Histopathologic Heart		Cell infiltration/Inflamation	no data	no data	no data	no data	no data	no deta
Endpoint tree Endpoint tree	291	Histopathologic Heart Organ weights Lung		Uther findings Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	no data	no data 5
Endpoint tree	293	Organ weights Lung		Absolute organ weight 1	no data	no data	no data	no data	>5	>5
Endpoint tree Endpoint tree	294	Organ weights Lung Organ weights Lung		Metative 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	296	Necropsy Lung		marbled/discolored area 1, swollen	_		1		no data	no deta
	200	Necropsy Lung		lung Deposit of black material	-		0.2		no data	
Endpoint tree	297	Histopethologic Lung		Hemorrhage	no data	no data	no data	no data	no data	no deta
Endpoint tree Endpoint tree	298	Histopathologic Lung Histopathologic Lung		Foamy cell accumulation Edema	no data no data	no data no data	no data	no data no data	no data no data	no data no data
				Cell infiltration/Inflamation						
Endpoint tree	300	Histopathologic Lung		(macrophage, neutrophil)	-	5	-	0.2	5	5
1				Other findings (fibrotic reaction, colleges content)						
Endpoint tree	301	Histopathologic Lung		Deposit of black material, Hypertrophy	_	5	0.2	1	5	no data
1	1			of alveolar type II cells,						
		Histopathologi Lung		Deposits in alveolus cavity		15	no data	no data	no data	no data
-		Histopathologi Lung		granuloma formation		15	0.2	no data	no data	no data
Endpoint tree	302	Necropsy Trachea es	pithelium	Enlarged	15	45	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	303	Histopathologic Trachea		accumulation of particle-laden	10	45	0.2	1	no data	no data
<u> </u>		Histopethologic Trachea		macrophages increase of goblet cell	1	45	no data	no data	no data	no deta
Endpoint tree	304	Necropsy Bone marrow			no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	305	Histopathologic Bone marrow Histopathologic Bone marrow		Hematopoiesis I Hematopoiesis I	no data no data	no data no data	no data	no data no data	no data	no data
Endpoint tree	307	Histopathologic Bone marrow		Other findings	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	308	Organ weights Spleen		Absolute organ weight 1 Absolute organ weight	no data	no data	no data	no data	> 5	>5
Endpoint tree	310	Organ weights Spleen		Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree	311	Organ weights Spleen	_	Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	> 5	> 5
Endpoint tree Endpoint tree	312	Necropsy Spleen		cniarged (Necropsy) Atrophy (Necropsy)	no cata no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	314	Necroosy Soleen		Other findings	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	315	Histopathologic Spleen		Pigmentation (Hemosiderin) Pigmentation (Other)	no data no data	no data no data	no data	no data no data	no data	no data
Endpoint tree	317	Histopathologic Spleen		Extramedullary hematopolesis	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	318	Histopathologic Spleen	with follow	Congestion	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	320	Histopathologic Spleen L	ymph follicle	Atrophy	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	321	Histopathologic Spleen		Fibrosis	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	322	Histopathologic Spleen		Other findings	no cata no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	324	Organ weights Thymus		Absolute organ weight	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree Endpoint tree	325	Organ weights Thymus Organ weights Thymus		Absolute organ weight 1 Relative organ weight 1	no data no data	no data no data	no data	no data no data	no data no data	no data
Endpoint tree	327	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) Other Sedere	no data	no data	no data	no data	no data	no data
Endpoint tree	329	Histopathologic Thymus Ti	hymocyte	Atrophy	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	1	di data di	no data
Endpoint tree Endpoint tree	332	Necropsy Lymph node Histopathologic Lymph node		entarged mediastinal lymph nodes macrophase accumulation	no data no data	no data no data	no data	no data no data	no data	no data
		Necroosy Lymph node		Deposit of brown particles	-	5	0.2		no data	no data
Endpoint tree	224	Necropsy Lymph node		Discoloration to greyish black Absolute organ weight 1	- no data	no 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 Kidney	-	Relative organ weight 1	no data	no data	no data	no data	5.0	> 5
Endpoint tree	337	Necropsy Kidney		Enlarged (Necropsy)	no data	no data	no data	no data	no data	no data

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)