

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
ナノ材料の短期吸入曝露等による免疫毒性に関する *in vitro/in vivo* 評価手法  
開発のための研究

令和3年度 分担研究報告書

ナノ材料の *in silico* 評価系に関する研究

研究分担者 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

**研究要旨**

本研究では、短期吸入曝露された各種ナノ材料（NMs）の免疫系に与える影響について *in vitro/in vivo* 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発や得られた知見を基に各種 NM の短期吸入曝露による毒性発現の毒性発現経路（AOP）、*in vitro* 試験法の確立および将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。令和3年度の対象とした被験物質は、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO<sub>2</sub> NPs: NM200-JRCNM02000, NM201-JRCNM02001, NM202-JRCNM02002, NM203-JRCNM10404, NM204-JRCNM02004）とした。SiO<sub>2</sub> NPs の情報収集源は、OECD のナノ材料安全性評価プログラムで作成した評価文書（dossier）およびナノ材料の公開データベースに記載された物理化学的性状、*in vivo* 試験の有害性情報について、さらに当研究班で実施した *in vitro* 試験の h-CLAT 法による評価および評価試験溶媒中での物理化学的性状の追加試験により得られたデータについて収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施した。これらの収集データは、物理化学的性状の特性評価や、ナノ材料の物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価として、物理化学的性状データと有害性データとの関連性解析を実施し、*in silico* 評価系に資する解析手法の確立と毒性メカニズムの予測を目指す。

**A. 研究目的**

ナノ材料は、同じ物質でも1つの次元でナノ領域（100 nm未満）の大きさにある粒子と定義されており、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、ナノ材料は、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。ナノ材料の有害性については、物理化学的性状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や、有害性を示すような物理化学的性状の特徴を見出すこと

が必要とされる。諸外国ではナノマテリアルの規制への枠組みが進められているが、国内では未だ整備が進んでいない現状である。

二酸化ケイ素 ( $\text{SiO}_2$ ) の結晶多形は、圧力や温度などの条件により様々に形成し、結晶シリカ (一般的には石英) や、非晶質 (シリカゲルや珪藻土) に大別される。

国際がん研究機関 (IARC) は、結晶質シリカ (石英やクリストバル石 CAS:14808-60-7) をヒトへの発がん物質 (グループ1) と分類している。炭素 (C) とケイ素 (Si) の 1:1 の化合物である髭状炭化ケイ素 (CAS:409-21-2) は、ヒトに対しておそらく発がん性がある物質 (グループ2A)、また、繊維状炭化ケイ素 (CAS:308076-74-6) はヒトに対して発がん性の可能性がある物質 (グループ2B)、一方、非晶質二酸化ケイ素のヒトへの発ガン性は分類できない (グループ3) としている。しかし、二酸化ケイ素のナノ粒子 ( $\text{SiO}_2$  NPs) の安全性評価は進んでおらず、ヒトへの暴露による健康影響の評価が重要な課題となっている。さらに、 $\text{SiO}_2$  NPsの毒性試験結果の報告件数が未だ少ないことから、より多くのデータを収集・整備していく必要がある。

本研究では、短期吸入曝露された各種 NM の免疫系に与える影響について、*in vitro/in vivo* 試験法研究の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、得られた知見を基に *in vitro* 試験法の確立と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。

令和3年度は、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子 ( $\text{SiO}_2$  NPs: NM200-JRCNM02000, NM201-JRCNM02001, NM202-JRCNM02002, NM203-JRCNM10404, NM204-JRCNM02004) を対象化合物とし、

物理化学的性状 (物性) ・有害性情報の収集・情報整理を行った。 $\text{SiO}_2$  NPsの情報収集源は、OECDのナノマテリアル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) およびナノマテリアルの公開データベースに収載された物理化学的性状、*in vivo* 試験の有害性情報について、さらに当研究班が実施した *in vitro* 試験の h-CLAT 法による評価では物理化学的性状の追加試験により得られたデータについて収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施した。

## B. 研究方法

### B1.1. 本研究で実施する対象化合物 : 5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子

$\text{SiO}_2$  NPs (NM200-JRCNM02000: NM-200, NM201-JRCNM02001: NM-201, NM202-JRCNM02002: NM-202, NM203-JRCNM10404: NM-203, NM204-JRCNM02004: NM-204) were donated by European Commission, Joint Research Center (JRC), JRC Nanomaterials Repository (Ispra, Italy) (Table 1).

### B1.2. 物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目

OECD で公表されている Silicon dioxide (NM-200—NM-204) - Manufactured nanomaterial の Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX の情報、及びこれらの研究成果として公表された原著論文、また本研究班の足利研究代表者が実施した h-CLAT 毒性試験結果および飯島分担研究者が実施した h-CLAT 毒性試験の溶媒中の物性評価 (Z-average(nm), Zeta potential: (mV), Pdi) を調査対象情報源とした (Table 2, Table 3)。

- 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、また DLS 測定データは、本研究班の横浜国大飯島分担研究者の測定データについて約 65 項目を収集・整理した (Table 2A, 2B)。
- 有害性情報データは、本研究班の足利研究代表者が実施した *in vitro* 試験結果 (h-CLAT 毒性試験) を収集整理し、*in vivo* 試験結果 (鼻部吸入暴露試験\_気管内投与試験) は OECD の公開データより収集・整理した (Table 3, 4, 5)。

### B1.3. 情報整理及びデータベース (DB) 搭載用のデータシートの作成

収集した情報について MS-Excel のデータシートにて作成した。有害性情報に関しては、今後、HESS DB [有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称: HESS) :ラットを対象 (今回はマウスも対象) とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース] に搭載できるように形式を整理し作成した (Table 4)。

### B1.4. 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 SIMCA17 (Umetrix 社製) で以下の解析を実施した。これらの解析を行うことにより物質間の類似性や毒性の変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

- 物理化学的情報に基づく主成分分析法 (PCA : Principal Component Analysis) から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 (Figure 1)。

- 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 (h-CLAT試験法毒性試験結果) 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。
- 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 h-CLAT 試験法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) を実施した (Figure 2A, 2B)。
- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と *in vivo* 試験結果 (鼻部吸入暴露試験について (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) を実施した (Figure 3A, 3B) )。
- ①物性 ⇔ ② *in vitro* 毒性試験結果 (h-CLAT 試験) ⇔ ③ *in vivo* 毒性試験結果 (鼻部吸入暴露試験) について、共通する物性変数について探索した (Figure 4)。

## C. 研究結果

### C1. 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 65 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* / *in vivo* 有害性情報シートは、このあとの多変量解析のため、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

での検出限界以下 (<) 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。
- 範囲がある場合、下限値を採用した。
- O (wt%) : SiO<sub>2</sub>(%)の値から換算し算出した。
- AggMorphology: 1: Rounded, medium sphericity / 1.5: Sub-rounded, low to medium sphericity / 2: Angular, low sphericity
- CrystallImpurity: 1: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Boehemite (AlO(OH)) / 1.5: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Boehemite (AlO(OH)), Boehmite (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) / 2: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Boehmite (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) と定義した。
- Sphericity: 1: low / 1.5: low to medium / 2: medium と定義した。
- Solubility[Saturation concentration (mmol/L) ] : NM203 は平均値を採用。NM204 は 1mol=60.08430g から換算した。
- h-CLAT: 陰性の場合、欠損データについては 10000 と定義した。
- h-CLAT : 全て positive だったので、Classification: 「1.極めて強い、2.非常に強い、3.強い」と数値化により定義した。

### C.2.1. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO<sub>2</sub> NPs)の階層的クラスタリング解析による類似度の評価

収集した 65 項目の物理化学的性状 (物性) データについての特性解析を実施した結果、類似度は 3 つのグループで示された (Figure 1)。また、最初に大きくクラスタ化した要因は PCA (主成分分析法) によりコーティングの有無であった。

### C.2.2. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO<sub>2</sub> NPs)の物性データと抗原提示細胞活性化能の関連性解析

5 種の SiO<sub>2</sub> NPs について OECD の公開データからと分担研究の飯島先生からの DLS 測定データより収集した物性データと *in vitro* 毒性試験データ (h-CLAT 試験法結果) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した (Figure 2A)。その結果、毒性と関連する変数 (物性項目) が Loadings Plot の横軸から探査可能であることが示唆された (Figure 2B)。さらに信頼度を加味した解析 (S-plot) を進めた結果、寄与度 0.2 以上、信頼性 0.6 以上の場合の毒性に寄与する変数 (物性項目) として、毒性が強い (NM201) のは、正の相関の高い変数 (物性項目\_AggZaverage\_Buffer、Total impurity:Total non-SiO<sub>2</sub> content including coating and impurities (% w/w)、Impurity\_Al) として、また、毒性が極めて強い (NM204) のは、負の相関の高い変数 (物性項目\_DustinessInhaSD、DustinessRespSD、Morphology of aggregates/agglomerates: Angular\_low sphericity、Pdi:Ultra-pure water dispersion、Aspect ratio) として示唆された。

### C.2.3. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO<sub>2</sub> NPs)の物性データと *in vivo* 毒性試験データの関連性解析

OECD の公開データから収集した 5 種の SiO<sub>2</sub> NPs の物性データと *in vivo* 毒性試験データ (鼻部吸入暴露試験) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した (Figure 3A)。鼻部吸入暴露試験結果の毒性に寄与する重要な物性項目とした特徴変数を解析した結果、毒性が弱い

(NM200、NM201、NM204) は、正の相関の高い変数（物性項目\_ParticleSize\_1、CoatingYorN(Yes)、AggZaverage\_1、Agg2Rgl、CrystalImpurity、Micropore\_Vol、Sphericity、PourWaterContent、MicroporeVol、MMAD1、MMAD2)として、また、毒性が強い(NM202、NM203) は、負の相関の高い変数（物性項目\_FeretMin(nm)、Impurity\_Ca、Coating\_N(No)、AggD、AggMorphology(nm)、AggIsoElecPointMean(pH)、AspectRatio、SAXS\_SurfArea(m<sup>2</sup>/g)）として挙げられた(Figure 3B)。

#### C.2.4. 二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO<sub>2</sub> NPs)の物性データと *in vitro* / *in vivo* 毒性試験結果データ間の共通の物性項目の探索

*in vitro* / *in vivo*毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性の相関をScatter plotにて探索した結果、相関係数(R=0.4128)は、正の相関であった(Figure 4)。相関はあまり高くはないが、元データを比較してみると信頼性若しくは寄与度は下がるものの散布図の直線上に近い幾つかの物性について共通物性項目[Impurity\_Al、Feret Max (nm)、Micropore surface area (m<sup>2</sup>/g)、PdI:Ultra-pure water dispersion (intra vial study)]として挙げられた。今回、相関が低かった理由の一つに、NM204の物性の欠損データの多さが影響したと考えられた。

#### D. 考察

物性データと抗原提示細胞活性化能(h-CLAT 試験法結果)の関連性解析の結果から、毒性の極めて強い NM204 の物性は、巻き上がり度が高いことが示唆された。一方で、毒性の強い NM201 は、他の検体よりも二次粒子径としての凝集性が高く、また全体の不純物の含有率が多いが、不純物

としてのアルミニウムが特徴的に挙がってきている。これは恐らくコーティング材由来のアルミニウムと推察された。従って、NM201 の毒性の強さに由来する物性は、凝集のし易さとコーティング材の性質が影響しているものと考えられた。

*in vivo* 毒性試験データ(鼻部吸入暴露試験)との関連性解析の結果から、毒性の弱い(NM200、NM201、NM204) は、一次粒子径が大きく、コーティングされており、二次凝集性が高い、巻き上がりにくい物性の性質を有することが示唆された。一方で、毒性の強い(NM202、NM203) は、フェレット径は大きく、不純物のカルシウムの含有(NM200、NM201、NM203 は欠損値)、コーティングが無く、高いアスペクト比と表面積が大きい物性の性質を有する事が示唆された。また、物性のみのクラスタリングで最初に大きくクラスター化した要因もコーティングの有無であったことから、クラスター化の最初の類似度と *in vivo* の毒性結果との関連性について反映している可能性が示唆された。

*in vitro* / *in vivo* 毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性項目の探索では、相関が低かった理由の一つに、NM204 の物性の欠損データが多いことが影響したと考えられたことから、欠損データを作らないことや解析では補っていくことの検討が必要であると考えられる。

#### E. 結論

5種の二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO<sub>2</sub> NPs)について、公開された文献や本研究班の分担研究者の測定値などからの約65項目の物性および *in vitro* / *in vivo* 有害性情報を収集・整理した。*in vitro* 有害性情報は本研究班の足利代表者研究者が実施した h-CLAT

法による 5 種の SiO<sub>2</sub> NPs の THP-1 細胞を用いた細胞生存率、CD86 および CD54 発現に与える影響について、*in vitro* 有害性情報は、OECD の公開データより鼻部吸入暴露試験\_気管内投与試験結果について纏めた。これらの物性および *in vitro/in vivo* の有害性情報の収集データについては、解析用データに整理・データマイニング後、収集した物性についての特性解析や *in vitro/in vivo* 有害性データとの関連性解析により幾つかの物性項目の特徴を見出した。今後は *in vitro/in vivo* 間の有害性データに共通な物性との相関解析の算出方法について改善し進めていく予定である。

#### 【謝辞】

We are grateful to the JRC Nanomaterials Repository for being the supplier of materials in this study.

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

A. Ohno, Y. Okiyama, A. Hirose, K. Fukuhara, The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2022, 441, 115974

### F.2. 学会発表

1. Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE : ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (Web 開催(2021.7.7-9) (神戸)
2. 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, 第 48 回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9) (神戸)

戸)

3. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催) , Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
4. Kiyoshi Fukuhara, Akiko Ohno : C-Methylated fisetins with strong antioxidative activities, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催) , Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
5. 足利太可雄、西田明日香、大野彰子、飯島一智:二酸化ケイ素ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究、第 28 回日本免疫毒性学会学術年会 (Web 開催)、(2022.9.6-9.7)
6. Akiko Ohno, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : The position of nitro group affecting the mutagenicity of nitrated benzo[a]pyrenes、第 80 回日本癌学会学術総会 (ハイブリッド開催) (2021.9.30- 10.2) (横浜)
7. Kiyoshi Fukuhara, Akiko Ohno : Potent radical-scavenging activities of C-methyl fisetins、第 80 回日本癌学会学術総会 (ハイブリッド開催) (2021.9.30-10.2) (横浜)
8. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : In silico analysis of mutagenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons,日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (ハイブリッド開催) (2021.11.1-2) (横須賀)

9. 大野彰子、西田明日香、飯島一智、高橋祐次、広瀬明彦、足利太可雄. *in silico* による TiO<sub>2</sub>NPs の物性と THP-1 細胞への活性化の関連性解析、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）（2021.11.13, 沖縄）
10. 足利太可雄、西田明日香、大野彰子、飯島一智、二酸化ケイ素ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）（2021.11.13, 沖縄）
11. 西田明日香、足利太可雄、大野彰子、飯島一智、THP-1 細胞を用いたナノマテリアルによる抗原提示細胞活性化能の評価、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）（2021.11.13, 沖縄）
12. 鈴尾美穂、三浦結美、西田明日香、足利太可雄、大野彰子、飯島一智、未分化および分化 THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子による抗原提示細胞の活性化および MMP-12 遺伝子発現の解析、日本動物実験代替法学会第 34 回大会（ハイブリッド開催）（2021.11.13, 沖縄）
13. Fukuhara K, Mori K, Okiyama Y, Ohno A, Misawa T, Mizuno M, Demizu Y, Shibamura M. Rationally designed peptide modulators of A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease, AIMECS2021\_13thAFMC International Medicinal Chemistry Symposium (2021.11.29-12.2, On line)
14. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. Application to toxicity evaluation of silicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021 (2021.12.16-21, On line)
15. 福原 潔、森 一憲、沖山佳生、三澤隆史、水野美麗、出水庸介、柴沼質子、大野彰子、アミロイド $\beta$  の神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発、日本農芸化学会 2022 年度大会（2022.3.15-18, 京都）
16. 大野彰子、ナノマテリアルの有害性評価と今後の課題：*in silico* 手法によるナノマテリアル有害性評価へのアプローチ、日本薬学会第 142 年会シンポジウム（オンライン開催）（2022. 3. 26）

#### G. 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 Surveyed substances: Silicon dioxide nanoparticles (SiO<sub>2</sub> NPs, NM200-NM204).

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

Table 2 Target materials (SiO<sub>2</sub> NPs, NM200-NM204) collected from the organization for economic co-operation and development (OECD) (2A, 2B).

(2A)

項目	タイトル	備考
物理化学的性状	PhysChem_Summary	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報を委託者提供の参考シート (Physicochemical properties of the TiO <sub>2</sub> NPs) の項目に沿って整理
	PhysChem_OECD_Summary dossier	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報
	PhysChem_OECD Part 1 (NM200)	個別dossier (Part 1 – NM 200) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 2 (NM201)	個別dossier (Part 2 – NM 201) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 3 (NM202)	個別dossier (Part 3 – NM 202) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 4 (NM203)	個別dossier (Part 4 – NM 203) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 5 (NM204)	個別dossier (Part 5 – NM 204) に記載された物理化学的性状データ
有害性	反復投与毒性 (吸入、気管内投与)_OECD	Summary dossierに記載された反復投与毒性 (吸入、気管内投与) の情報
	反復投与毒性 (吸入、気管内投与)_OECD_詳細	“反復投与毒性 (吸入、気管内投与)_OECD” データシートに整理した情報の詳細情報 (HESS DB形式)

(2B) Results of collected physicochemical properties of five SiO<sub>2</sub> NPs.

Property		Method/ Instrument	NM200	NM201	NM202	NM203	NM204		
Particle size, size distribution	Primary particle size (nm)	SAXS	1	22	22	15	16	21	
	Primary particle size (nm)	TEM	2	14.7	17.8	15.7	13.6	(manual measurements: 10-15)	
	Primary particle size (nm)	TEM	3	23 ± 8	19 ± 4	18 ± 3	16 ± 3	-	
	Feret Min (nm)	TEM	6	21.9	33	58	53	-	
	Feret Max (nm)	TEM	7	34.5	51	37.2	33.5	-	
	Elementary particle size of agglomerated Silica (nm)	TEM	8	5-20 (average size mainly around 10-15)	-	-	-	-	
	Composition	Total non-SiO <sub>2</sub> content including coating and impurities (% w/w)	EDS	9	1.5	2.21	1.64	0.63	0.47
	Impurity (% w/w Al)	EDS	10	0.46	0.74	0.45	0.43	0.48	
	Impurity (% w/w S)	EDS	11	0.87	0.46	0	0.04	0.21	
	Impurity (% w/w Na)	EDS	12	0.88	0.44	0	0	0.18	
	Impurity (% w/w Ca)	EDS	13	-	0	0.18	-	0	
	Impurity (% w/w K)	ICP-OES	14	0.005-0.001	0.001-0.005	-	-	-	
	Impurity (% w/w Fe)	ICP-OES	15	0.005-0.001	0.001-0.005	-	-	0.001-0.005	
	Impurity (% w/w Mg)	ICP-OES	17	0.001-0.005	0.001-0.005	-	-	-	
	O (wt%)	EDS	18	53.02	53.08	53.14	53.21	53.17	
	Si (wt%)	EDS	19	44.77	45.27	46.23	46.32	45.96	
	Coating	TGA	20	Yes (or H2O)	Yes (or H2O)	No	No	Yes (or H2O)	
	Weight of coating (wt%)	TGA	21	3	3	-	-	3	
Agglomeration/aggregation	Z-average	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	22	207.1 ± 12.3	208.1 ± 34.5	175.9 ± 4.5	172.9 ± 9.2	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	23	0.390 ± 0.041	0.352 ± 0.028	0.355 ± 0.001	0.427 ± 0.025	-
	Z-average	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	24	-	197.0 ± 15.7	-	147.5 ± 4.5	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	25	-	0.337 ± 0.020	-	0.244 ± 0.017	-
	Z-average	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	26	181.5 ± 4.3	-	-	-	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	27	0.238 ± 0.006	-	-	-	-
	Z-average	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	28	-	-	-	146.8 ± 0.0	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	29	-	-	-	0.229 ± 0.013	-
	Z-average	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	30	240.5 ± 2.3	-	-	245.7 ± 37.2	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (intra vial study)	DLS	31	0.248 ± 0.008	-	-	0.299 ± 0.024	-
	ZRg1 (nm)	Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	32	19	20	16	-	-
	ZRg2 (nm)	Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	33	440	180	100	-	-
	Df	Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	34	2.45	2.45	2.5	-	-
	Np/n/ag	Gyration radius of primary particles and aggregates	SAXS	35	2600	497	200	-	-
		Morphology of aggregates/agglomerates (nm)	TEM	36	Sub-rounded, low to medium sphericity	Rounded, medium sphericity	Angular, low sphericity	Angular, low sphericity	-
	Zeta Potential around pH 7 (mV)	Lazer-Dppler-Electrophoresis	37	-45	-40	-40	-35	-	
	Isoelectric Point (Mean) (pH)	Lazer-Dppler-Electrophoresis	38	< 2	< 2	2-4	2-4	-	
Crystalline phase	Crystalline type	XRD	39	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	
	Crystalline impurities	XRD	40	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Boehmite (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Boehmite (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Boehmite (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), Boehmite (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ), Boehmite (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Boehmite (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	-	
	Crystalline size (mean)	-	41	-	-	-	-	-	
Aspect ratio		-	42	1480	1461	1518	1533	-	
Specific surface area	SAXS surface area (m <sup>2</sup> /g)	SAXS	43	123 ± 6.9	123 ± 8.3	184 ± 17.8	167 ± 13.4	131 ± 22.9	
	BET surface area (m <sup>2</sup> /g)	BET	44	189.16	140.46	204.11	203.92	136.9	
	Total pore volume (mL/g)	BET	45	0.7925	0.5815	0.5136	0.499	0.5057	
	Micro pore surface area (m <sup>2</sup> /g)	BET	46	30.04	-	-	-	0	
	Micro pore volume (mL/g)	BET	47	0.01181	0.00916	0.00984	0	0.00566	
Shape	Sphericity	TEM	48	low to medium	medium	low	low	-	
Surface coating	Weight of coating (wt%)	-	49	3	3	-	-	3	
Density	Density (g/mL)	Weighing	50	0.12	0.28	0.13	0.03	0.18	
Dustiness	Inhalable Mass Dustiness index (mg/Kg)	Small rotating Drum (SD)	51	6459 ± 273	6034 ± 199	4988 ± 1866	5800 ± 1488	24969 ± 601	
	Respirable Mass Dustiness index (mg/Kg)	Small rotating Drum (SD)	52	293 ± 193	218 ± 74	91 ± 11	354 ± 6	1058 ± 1	
	Respirable Mass Dustiness index (mg/Kg)	Vortex Shaker (VS)	53	3400	6500	17000	51000	14000	
Surface chemistry	O (%)	EDS	54	71.43	67.0	-	-	-	
	Si (%)	EDS	55	20.3	20.83	-	-	-	
	C (%)	EDS	56	5.96	8.28	-	-	-	
	Na (%)	EDS	57	1.83	2.89	-	-	-	
Pour density	Water content (wt% dry)	Weighing	58	8	8	1	1	6	
	Bulk density (g/cm <sup>3</sup> )	Weighing	59	0.12	0.28	0.13	0.03	0.18	
Porosity	Total pore volume (mL/g)	BET	60	0.7925	0.5815	0.5136	0.499	0.5057	
	Micro pore volume (mL/g)	BET	61	0.01181	0.00916	0.00984	0	0.00566	
Solubility	Saturation concentration (mmol/L)	Flask method	62	2.4 ± 0.03	2.4 ± 0.03	2-2.5	201 mg/l	-	
Agglomeration/aggregation	Zeta pot. buffer (h-CLAT)	DLS	63	-20.99	-18.06	-15.92	-17.36	-17.34	
Agglomeration/aggregation	Z-average buffer (h-CLAT)	DLS	64	331.23	526.12	420.25	328.03	273.09	
Agglomeration/aggregation	PdI buffer (h-CLAT)	DLS	65	0.34	0.38	0.36	0.42	0.35	

Table 3 Results of the h-CLAT test using SiO<sub>2</sub> NPs.

		NM-200	NM-201	NM-202	NM-203	NM-204
h-CLAT 判定	h-CLAT	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Classification	Classification	2	3	2	2	1
EC200 (CD54発現濃度閾値) (ug/mL)	EC200	10.3	30.3	19.5	24.8	3.5
CD54の相対発現量の最大値 (%)	CD54Max	1131.5	434.7	4812.2	2795.3	3439.6
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度における生存率 (%)	CD54MaxSR	82.89	84.92	70.34	71.3	78.67
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度(ug/mL)	CD54MaxConc	1000	1000	1000	1000	100
EC150 (ug/mL)(CD86発現濃度閾値) (ug/mL)	EC150	10000	10000	10000	10000	10000
CD86の相対発現量の最大値 (%)	CD86Max	107.8	95.3	102.9	108.2	127.1
CD86の相対発現量の最大値をとった濃度における生存率 (%)	CD86MaxSR	96.48	97.3	97.37	71.3	85.78
1000ug/mLにおける生存率 (%)	1000SR	82.89	84.92	70.34	71.3	77.96



Table 5 Results of the nose-only inhalation exposure test using SiO<sub>2</sub> NPs.

TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)\_2003\_5 days, [Test guideline: TG412, Species: Rat (wister), Administration period (day): 5 (6h/day), 1.16 (± 0.36), 5.39 (±0.58), 25.2 (± 1.5) mg/m<sup>3</sup>]

	NM200	NM201	NM202	NM203	NM204
MMAD (μm)	3.05	3.05	1.25	1.25	3.05
MMAD (μm)	3.05	3.05	2.85	2.85	3.05
MΦ numbers in BALF ↓	25.2	25.2	5.41	5.41	25.2
Total protein in BALF ↑	25.2	25.2	5.41	5.41	25.2
PMN numbers in BALF ↑	5.39	5.39	5.41	5.41	5.39

Figure 1 Similarity of physicochemical properties data of five SiO<sub>2</sub> NPs by hierarchical clustering analysis after analysis by PCA.

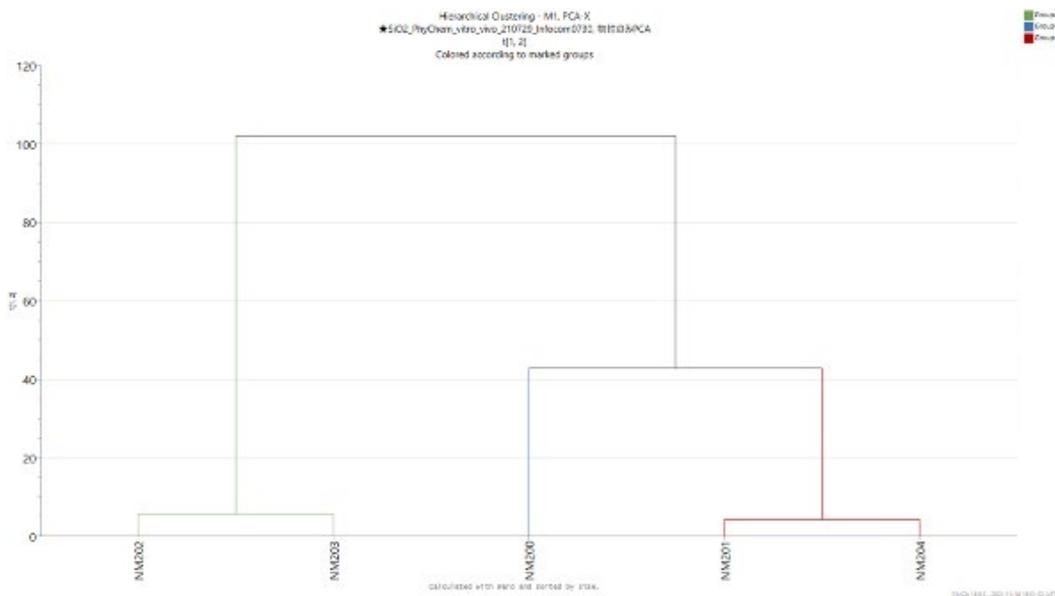
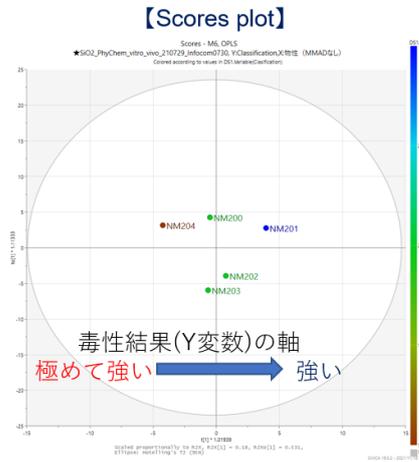


Figure 2 Relationship analysis between physicochemical property data of five SiO<sub>2</sub> NPs and *in vitro* h-CLAT test data.

(2A) Scores plot



(2B) Loadings plot

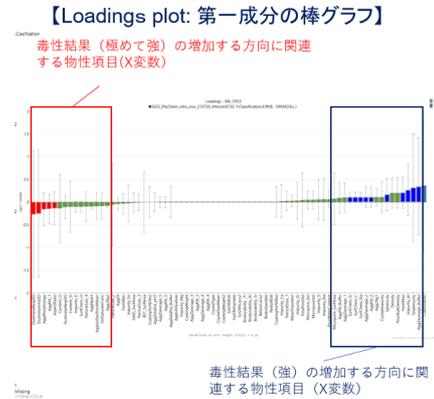
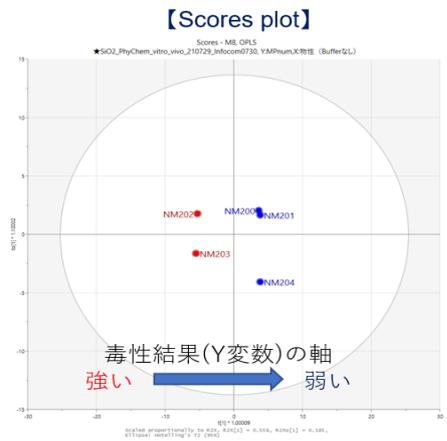


Figure 3 Relationship analysis between physicochemical property data of five SiO<sub>2</sub> NPs and *in vivo* toxicity test data.

(3A) Scores plot



(3B) Loadings plot

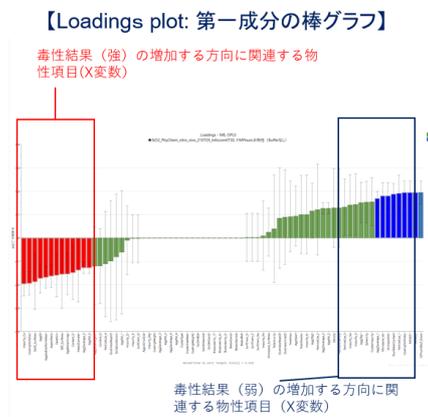


Figure 4 Correlation plot of common physicochemical property data between *in vitro* h-CLAT test data / *in vivo* nose-only inhalation exposure test results data (common physicochemical property variables: scatter plot)

