

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアル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4年度 分担研究報告書

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 沖山 佳生
神戸大学大学院システム情報研究科

研究要旨

本研究では、短期吸入曝露された各種ナノマテリアル (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 NMs 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4年度の対象とした被験物質は、6種の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs) (MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600, TiDW)、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) (NM-200: NM200-JRCNM02000, NM-201: NM201-JRCNM02001, NM-202: NM202-JRCNM02002, NM-203: NM203-JRCNM10404, NM-204: NM204-JRCNM02004)、3種の銀ナノ粒子 (BioPure10、BioPure50、AgNO₃) とした。これらの被験物質の情報収集源は、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)、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、および当研究班で実施した *in vitro* 試験の h-CLAT 法による毒性評価結果と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。本収集データは、物理化学的性状と THP-1 細胞に与える影響との関連性解析により、THP-1 細胞の活性化に伴う NMs の指標 (EC200・EC150・MMP12) としての有用性について予試験的な解析を実施し検討した。

A. 研究目的

ナノマテリアル (NM) は、特有の物理的・化学的特性を有し多彩な機能を生ずる。近年、その需要においては生産現場の他、家庭用品や食品への応用など、消費者へ利用が拡大している。その一方でヒトへの健康影響の評価が重大な課題となっている。N

M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。また、欧州連合を中心とした諸外国ではNMの規制への枠組み

が進められており、今後、日本国内でも足並みを揃えていく必要がある。

現在、欧州（EU）の食品添加物としての二酸化チタン（TiO₂）であるE171は、ナノサイズの粒子径も含まれており、その安全性については欧州食品安全機関（EFSA）が2021年5月6日に公表した科学的意見書で「入手可能なあらゆる証拠に基づき、遺伝毒性（Genotoxicity）の懸念を排除することはできず、多くの不確実性を考慮した結果、食品添加物としたE171を安全と見なさない」と結論付けるものであった。このことは専門家らによって、E171に含まれるTiO₂に遺伝毒性があると結論付けてはいないが、その可能性があるとの懸念を排除することはできなかった。二酸化ケイ素（SiO₂）は様々な結晶多形を有し、国際がん研究機関（IARC）は、結晶質シリカをヒトへの発がん物質（グループ1）、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）、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。近年、SiO₂ナノ粒子は工業的・食品添加物等の幅広い分野で使用されているが、その安全性への評価報告は少ない。一方、銀ナノ粒子は、銀（Ag）を利用した抗菌・消臭作用として優れた特性を有しており、表面において細菌の増殖を防ぐ目的で銀ナノ粒子を組み込んだ製品が数多く開発されている。Agはイオン化しやすく、イオン化による生体への影響も考えられており、安全性面での評価が必要とされる。

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4年度は、令和2-3年度で実施された被検物質の6種のTiO₂ナノ粒子、5種のSiO₂ナノ粒子、3種のAgナノ粒子を対象化合物とし、物理化学的性状（物性）・有害性情報の収集・情報整理を行い、これらの被検物質について統合データセットを作成した。本収集データは、物理化学的性状とTHP-1細胞に与える影響との関連性解析により、THP-1細胞の活性化に伴うNM_sの指標（EC200・EC150・MMP12）としての有用性について予試験的な解析を実施し検討した。

B. 研究方法

ナノマテリアルの物性とTHP-1細胞に与える影響の関連性解析および評価

B1-1. 本研究の解析で実施された対象化合物

6種の二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs）（MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600, TiDW）、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NPs）（NM200-JRCNM02000: NM-200, NM201-JRCNM02001: NM-201, NM202- JRCNM02002: NM-202, NM203-JRCNM10404: NM-203, NM204-JRCNM02004: NM-204）、3種の銀ナノ粒子（BioPure 10, BioPure50, AgNO₃）とした。本研究で用いた様々なNM_sの一部の被検物質は国内の製造業者とJRC Nanomaterials Repository（Ispra, Italy）より供試された。

B1-2. 物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目

有害性情報データ（毒性評価）は、これまで本研究班で実施した皮膚感作性試験法

のOECDテストガイドライン化されている*in vitro*試験を用いたh-CLAT試験法による毒性試験結果を収集した。すべての被験物質の物理化学的性状(PCPs)の項目は、公開データの他、飯島分担研究者が実施した1次粒子径(nm)、h-CLAT毒性試験の溶媒中の物性評価(Z-average(nm), Zeta potential: (mV), Pdi)についても調査対象情報源とした(銀ナノ粒子は一部の項目について適応外)(Table 1)。

B1-3. 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。これらの解析を実施する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(PCPs)について同定が可能となる。

- PCPsとh-CLAT試験結果を全ての変数として用いた主成分分析(PCA)により全体の変数の変動パターンを検証した(Figure 1)。
- PCAモデルに対する個別の回帰直線の相関係数を算出しh-CLAT試験結果の指標であるEC200やEC150のPCPsに対する相関を検証した(data not shown)。
- OPLS法: $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 \dots$ の回帰式より、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)。本解析では物性値をXの説明変数とし、h-CLAT試験法による毒性試験結果(毒性値)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た。
- データマイニング (Table 1)
 - 毒性値のEC200やEC150は、より本解析に適応した新しいパラメ

ータとしてログスケール変換した値を用いて解析した。

- $pEC200 = -\log EC200 = -\log(EC200(\mu g/ml) \times 10^{-6})$
- $pEC150 = -\log EC150 = -\log(EC150(\mu g/ml) \times 10^{-6})$
- Potential rankは、EC150とEC200の値を考慮した相対的な数値化をし定義した。(「1」強い>>「4」弱い)
- h-CLAT: EC150およびEC200の欠損データについては10000と定義した。

C. 研究結果

C1-1. PCPsとh-CLAT試験結果値を変数とした主成分分析(PCA)

PCAの結果から、TiDWが95%信頼区間に入らずに逸脱していることが示唆された(Fig. 1)。また、PCAの3次元平面の変動パターンを担うような幾つかの測定変数等が示された(Fig. 2)。

PCAモデルに対する個別の回帰直線の相関係数を算出しh-CLAT試験結果の指標であるEC200やEC150のPCPsに対する相関を検証した結果、EC200の変数がh-CLAT試験(陽性・陰性)結果と若干高い相関を示した(data not shown)。

C1-2. pEC150・pEC200を用いた変数データの再解析: PCA

PCAからのLoadings Plotの結果より、h-CLAT試験結果(陽性)に着目すると、pEC200が近い距離に位置していることが示唆された(Fig. 3)。さらに、パラメータ値を算出した2つの変数のpEC150とpEC200に着目し、EC150、1/EC150、EC200、1/EC200について除外後再解析を実施した

結果、pEC200がCLAT試験結果（陽性）とほぼ重なった（Fig. 4）。

C1-3. *in vitro* h-CLAT 試験結果のマクロファージエラストーゼ Matrix

Metalloproteinase 12 (MMP12) との関連性解析

3種の銀ナノ粒子と6種の二酸化チタンナノ粒子、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子についてMMP12が新しいナノマテリアルの指標としての可能性について解析した結果、MMP12の最大値の相対発現量% (MMP12Max) やMMP12の最大値の相対発現量% (MMP12MaxConc) の各変数に対する相関は全て低かった (data not shown)。

C1-4. EC200とpEC200の変数データの比較:OPLS

EC200とpEC200のデータの比較 (Fig. 5AとFig. 5B) では、pEC200の方が綺麗に直線に載っていた。さらに、pEC150を除外してpEC200に関連する変数の解析を実施し (Fig. 5C-1)、Loadings Plotを確認した結果、pEC200の変数は、h-CLAT positive (正の相関) と反対側のh-CLAT Ranking (負の相関) が効いている (鍵となる) 事が示唆された (Fig. 5C-2)。

D. 考察

Fig. 1に示されるようにPCPsとh-CLAT試験結果値を変数としたPCAの結果から、TiDWが95%信頼区間に入らずに逸脱した要因は、Particle shapeが異なり、Z-average (nm)の値が大きい事が影響したと考えられた。また、Fig. 2のPCAの3次元平面の変動パターンを担うよう幾つかの測定変数等が示された中で、寄与率 (%) と交差検証 (Q2)の値が低かったh-CLAT_Ranking

や、MMP12の変数については、PCAによる変数全体の変動パターンにあまり寄与していない事が考えられた。また、*in vitro* h-CLAT試験結果のMMP12との関連性解析では、pEC200に対してMMP12Maxは正の相関がありそうだったが、95%信頼区間が正負に跨っているため、MMP12MaxはpEC200の指標としては難しいことが分かった。従って現時点では代替の指標としては難しいことが示唆された。

一方、PCAを用いたpEC150・pEC200を用いた変数データの再解析では、Fig. 3に示されるようにPCAからのLoadings Plotの結果より、h-CLAT試験結果 (陽性) に着目すると、pEC200が近い距離に位置していた。そこで、-Logとしてパラメータ値を求めた2つの変数 (pEC150とpEC200) に再度着目し、再解析を実施した結果、Fig. 4に示されるようにh-CLAT試験結果 (陽性) と、pEC200がほぼ重なり合っており、Fig. 3に示される結果より、さらに距離が近くなった。この結果は、二つの変数 (pEC200とh-CLAT試験結果 (陽性)) が同じ傾向を示すことを示唆し、pEC200がh-CLAT試験結果 (陽性) に指標としての可能性が考えられた。

上述の結果を踏まえ、pEC200の指標としての有用性について更に検証を進めるため、Fig. 5に示されるようにOPLSによるEC200とpEC200の変数データの比較検証を実施した。その結果、変数として対数 (-Log) を算出することで、より良い回帰直線が得られた (Fig. 5B)。また、Fig. 5C-1に示されるように、pEC150を除外した場合においても、綺麗な相関が見出せたことで、EC200の変数として対数 (-Log) を算出したpEC200は、ナノマテリアルの抗原提示活性化の指標として有用であると考えられた。

E. 結論

in vitro 研究として NMs の抗原提示細胞活性化能評価のデータベースを作成し *in silico* 研究としてナノマテリアルの *in vitro* h-CLAT 試験結果の指標としての有用性を検証した結果、h-CLAT 毒性試験の CD86 および CD54 発現に与える影響について指標となる「EC200」や「EC150」は、より本解析に適応した新しいパラメータとしてログスケール変換 ($pEC200 = -\log EC200$) することにより、 $pEC200$ が NMs による抗原提示活性化の指標として有用であることが示唆された。一方、今回の解析では、*MMP12* がナノマテリアルの *in vitro* h-CLAT 試験結果の新しい指標としては見出だせなかったが、引き続き試験結果のデータの集積や、*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、検証を進めていく予定である。

【謝辞】

This research was carried out with the support of a chemical substance risk research in the Health and Labor Sciences Research Grants (JPMH20KD1004). The test materials used in this study were five kinds of TiO₂ NPs provided by two domestic manufacturers (one company is TAYCA CORPORATION) and five kinds of SiO₂ NPs provided by JRC Nanomaterials Repository (Ispra, Italy).

F. 研究発表

F.1. 論文発表

Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Kohei Imai, Mirei Mizuno, Ken-Ichiro Matsumoto, Akiko Ohno, DTPA-Bound

Planar Catechin with Potent Antioxidant Activity Triggered by Fe³⁺ Coordination., *Antioxidants* (Basel) 2023., 18;12(2):225.

F.2. 学会発表

1. Akiko OHNO, Asuka NISHIDA, Kazutoshi IJIMA, Akihiko HIROSE, Takao ASHIKAGA, Physicochemical properties factor of titanium dioxide nanoparticles on activation of THP-1 cells, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022 年 6 月 30 日 (木) — 7 月 2 日 (土) (札幌)
2. Kazutoshi Iijima, Miho Suzuo, Yumi Miura, Asuka Nishida, Akiko Ohno, Takao Ashikaga, Evaluation of immunotoxicity of nanomaterials using undifferentiated and differentiated monocytic cell line, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022 年 6 月 30 日 (木) — 7 月 2 日 (土) (札幌)
3. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara, The position of nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022 年 6 月 30 日 (木) — 7 月 2 日 (土) (札幌)
4. Akiko OHNO, Asuka NISHIDA, Kazutoshi IJIMA, Akihiko HIROSE, Takao ASHIKAGA, *in silico* elucidation of physicochemical properties factor on activation of THP-1 cells of TiO₂ NP, 264th ACS National Meeting & Exposition, August 21-25, 2022 (Chicago)
5. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara, Effects of the nitro-group on the mutagenicity of nitrated benzo[a]pyrenes, August 21-25, 2022 (Chicago)

6. Takao Ashikaga, Akiko Ohno, Nishida Asuka, Kazutomo Iijima, Study on the activation of THP-1 cells by mixed exposure of silicon dioxide nanomaterial with skin sensitizer or febrile substance, 第 29 回日本免疫毒性学会学術年会, 2022 年 9 月 12 日 (月) - 9 月 13 日 (火) (札幌)
 7. Kazutoshi Iijima, Miho Suzuo, Maki Yamashiro, Akiko Ohno, Takao Ashikaga, Exploring new index in the evaluation of nanomaterials to activate antigen-presenting cells using THP-1 cells, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会, 2022 年 11 月 18 日 (月) - 11 月 20 日 (火) (静岡)
 8. Nishida Asuka, Takao Ashikaga, Akiko Ohno, Kazutoshi Iijima, Development of a method for evaluating inhalation toxicity potential of nanomaterials in a co-culture system of human bronchial epithelial cells and THP-1 cells, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会, 2022 年 11 月 18 日 (月) - 11 月 20 日 (火) (静岡)
 9. Maki Yamashiro, Takao Ashikaga, Akiko Ohno, Kazutoshi Iijima, Evaluation of the immunotoxicity of nanoparticles of cerium dioxide and zinc oxide using THP-1 cells, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会, 2022 年 11 月 18 日 (月) - 11 月 20 日 (火) (静岡)
 10. Arai Rion, Takao Ashikaga, Akiko Ohno, Kazutoshi Iijima, Evaluation and mechanistic analysis of adjuvant effect of nanomaterials using h-CLAT, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会, 2022 年 11 月 18 日 (月) - 11 月 20 日 (火) (静岡)
 11. Takao Ashikaga, Akiko Ohno, Nishida Asuka, Kazutomo Iijima, Development of toxicity evaluation method for nanomaterials using activation of THP-1 cell as an index, SOT 62nd Annual Meeting and ToxExpo, March 19-23, 2023.
 12. Akiko Ohno, Nishida Asuka, Kazutoshi Iijima, Takao Ashikaga, Evaluation of the effectiveness of index associated with activation of THP -1 cells using NMs, 日本薬学会第 143 年会, 2023 年 3 月 25 日 (土) - 28 日 (火) (札幌)
- 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. 物性値および h-CLAT 試験結果

		Ag			TiO2						SiO2					
		BioPure10	BioPure50	AgNO3	MT-150A	MT-500B	TiDW	AMT-100	TKP-102	AMT-600	NM-200	NM-201	NM-204	NM-202	NM-203	Sicstar
Physical	Primary particle size (nm)	10	52		15	35										70
	Particle shape	spherical	spherical	spherical	spherical	spherical	needle	spherical	spherical	spherical	spherical	spherical	spherical	spherical	spherical	
	Z-average (nm)	38	72		222	82	782	235	61	261	331	526	273	420	328	221
	Z-potential (mV)	-12.1	-17		-20.5	-23.9	-14.9	-22.4	-23.8	-16.7	-21	-18	-17	-16	-17	-10
	PDI	0.36	0.27		0.22	0.23	0.31	0.14	0.23	0.21	0.34	0.38	0.35	0.36	0.42	0.34
h-CLAT	Potential	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	Borderline	Borderline	Positive	Positive						
	Potential rank	11	12	1	14	14	13	4	6	7	5	10	3	8	9	2
	EC150 (ug ml-1)	127.6	159.5	1.64	10000	10000	178	10000	831	10000	10000	10000	10000	10000	10000	394.1
	pEC150 (-log(EC150(ug/ml)×10 ⁻⁶))	3.9	3.8	5.8	2	2	3.7	2	3.1	2	2	2	2	2	2	3.4
	1/EC150	0.0078	0.0063	0.6098	0.0001	0.0001	0.0056	0.0001	0.0012	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0025
	EC200 (ug ml-1)	118.4	122.9	1	10000	10000	10000	7.8	12	18.4	10.3	30.3	3.5	19.5	24.8	1.2
	pEC200 (-log(EC200(ug/ml)×10 ⁻⁶))	3.9	3.9	6	2	2	2	5.1	4.9	4.7	5	4.5	5.5	4.7	4.6	5.9
	1/EC200	0.0084	0.0081	1.0204	0.0001	0.0001	0.0001	0.128	0.0833	0.0543	0.0971	0.033	0.2874	0.0513	0.0403	0.8197

Figure 1. 物性値および h-CLAT 試験結果値を用いた PCA

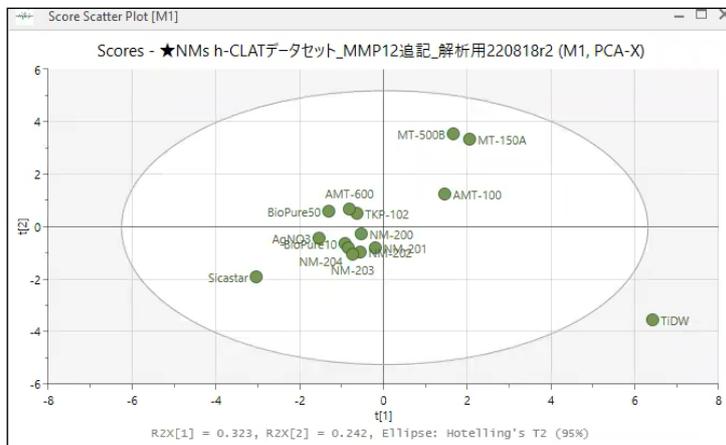
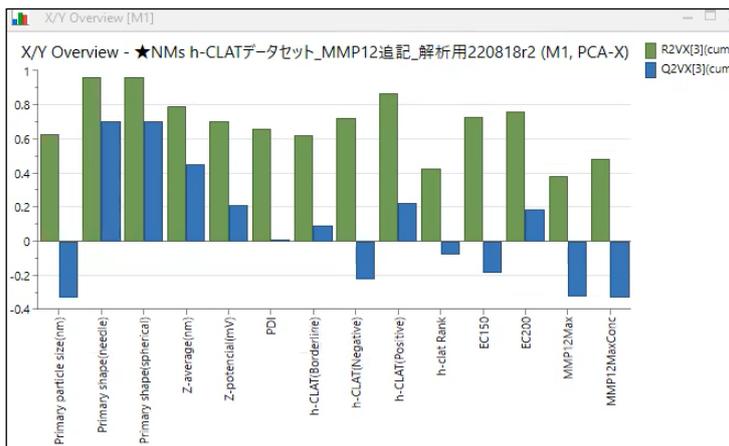


Figure 2. 各測定変数 (X : 物性) に対する寄与率 (%) と交差検証(Q2)



緑色 bar: 寄与率(%)

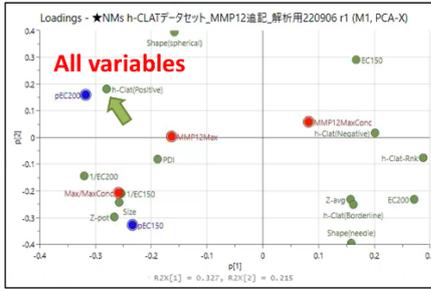
青色 bar: 交差検証(Q2)

Q2 値は、交差検証 (Cross validation) を行った際の応答変数の予測値の安定性を表す。

Figure 3. 全測定変数に対する PCA の Loadings Plot

Figure 4. EC150、1/EC150、 EC200、1/EC200 を除外した測定変数に対する PCA の Loadings Plot

Fig.3



pEC150 & pEC200
に着目



変数:
EC150, 1/EC150,
EC200, 1/EC200
を除外後再解析

Fig.4

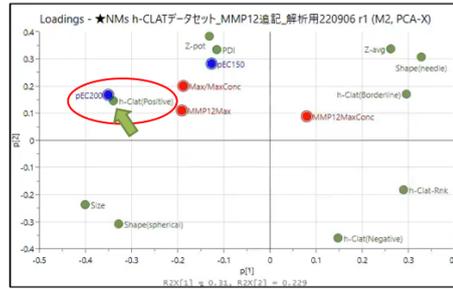


Figure 5A, 5B, 5C-1, 5C-2

3 つの測定変数 (Fig.5A: EC200、Fig.5B: pEC200、Fig.5C-1: pEC150 を除外した pEC200) に対する回帰直線と pEC150 を除外した Loadings plot (Fig.5C-2)

Fig.5A EC200

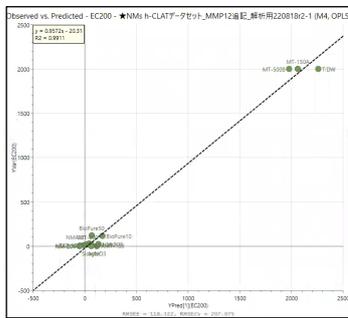


Fig.5B pEC200

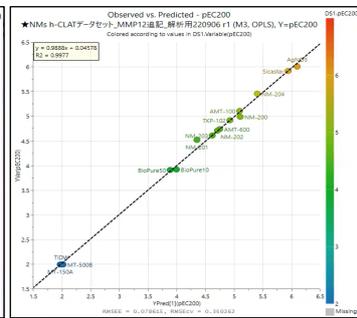


Fig.5C-1 pEC150 を除外した pEC200

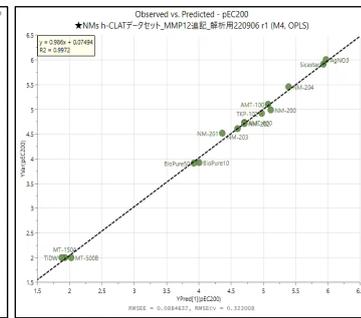


Fig.5C-2 pEC150 を除外した Loadings plot (棒グラフにて表示)

