

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和5年度 分担研究報告書

ナノマテリアルを含む化学物質の呼吸器感作の免疫毒性法に関するin silico解析
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、*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5年度は、NMs を含む呼吸器感作物質となる化学物質の被験物質の物理化学的性状（物性）の収集および *in vitro* / *in vivo* 免疫毒性試験結果に関連する比較検証データを取得し、物性と *in vitro* や *in vivo* 試験の結果に関する関連性解析の実施により、毒性に影響を与える物性についての検証を実施することとした。NM の対象となる被験物質は、6種のカーボンナノチューブ（MWCNTs: NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, NT-7 (ND), NT-7 (D)）とした。また、呼吸器系感作物質として化学物質の物質評価を整理するための対象となる被検物質は、①呼吸器感作物質として9化合物、②皮膚感作物質として13化合物、③非感作性物質として11化合物とし、今年度はこれらの物性の収集する項目について検討することとした。

A. 研究目的

ナノマテリアル（NM）の特徴とした同一化合物でも物性の僅かな違いや、化学物質の構造に由来する反応性から、呼吸器系に対して特有の影響を及ぼす可能性が考えられる。さらに、これらの物質が呼吸器感作を引き起こすと、免疫系は異常反応を示し、アレルギー反応や喘息などの症状を引き起こす可能性がある。このようなナノマテリアルを含む化学物質の生物学的影響について適切に評価し、理解することは、

安全なナノテクノロジーと化学物質の使用にとって重要である。

カーボンナノチューブ（CNT）は、その特異的な物性から工業産業界を中心とした多岐にわたる分野での用途が期待されている。しかし、CNTの生体内への影響については、その毒性が懸念されている。特に、肺に対するCNTの研究で、ストレートタイプの多層カーボンナノチューブ（MWCNT）はアスベストと同様にその形状や強度の特徴から肺線維症、肺がん、中

皮腫等を引き起こすことが危惧されている。このような性質の CNT は生体内に入ると、免疫細胞であるマクロファージにより取り込まれ、本来、マクロファージは体内に侵入した異物を取り込み、分解する役割を果たすのだが、その長さや細胞膜への親和性から、マクロファージの細胞膜を突き抜け、破壊してしまう可能性がある。このようなマクロファージ炎症応答が引き金となって中皮腫様の病態が起きるとも云われている。

従って、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、*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。

B. 研究方法

B-1. データ収集・整理

今年度の本研究で実施する対象化合物はナノマテリアルに関しては、6種のカーボンナノチューブ(MWCNTs: NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, NT-7 (ND), NT-7 (D)) 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記載された物理化学的性状 (物性)、不純物や表面活性の追加試験等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。

【有害性情報の調査対象情報源】

OECD で公表されている Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) - Manufactured nanomaterial の Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX や the Joint Research Centre of the European Commission (JRC) 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、また本研究班で実施された h-CLAT 毒性試験結果を調査対象情報源とした。

B-2. 関連性解析

【多変量解析法】

収集したデータについて、解析に資するデータにデータマイニングを実施した ((表 1_※1 を参照))。

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有害性 (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 1)
- 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 試験法毒試験結果のデータ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 2)
- 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。

B-3. 呼吸器感作性物質に関する被検物質の物性データ項目の整理

【呼吸器感作性物質の調査対象情報源】

以下の 3 種類に分類し、各化合物について整理を行っており、正準 SMILES 記法による化学構造の線形表記法を作成した (data not shown)。

- ① 呼吸器感作物質として 9 化合物
- ② 皮膚感作物質として 13 化合物
- ③ 非感作性物質として 11 化合物

C. 研究結果

C-1. データ収集・整理

表 1 に示すように MWCNTs (NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, NT-7) と *in vitro* h-CLAT 試験結果との関連性解析に向けたデータシートは、物理化学的性状および有害性情報の情報整理項目を作成した。物理化学的性状データは、不純物、結晶子サイズ、比表面積、その他のプロパティ等について収集整理した。情報が不足していた不純物は誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によって測定され、表面活性の測定データを取得した。有害性情報データは、本研究班で実施された *in vitro* 試験結果 (h-CLAT 毒性試験) を収集整理した。

C-2. 多変量解析

➤ 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 6 種の MWCNTs の物理化学的性状についてデータマイニングの実施後、PCA 法より階層的クラスタリング法

(HCA) による類似度調査の解析を実施した。その結果、特に、NM-402、NM-400、NM-403 のグループと NM-401、MWNT-7(ND)、MWNT-7(D) のグループに大きく二分され、類似性が示された (図 1)。

➤ 物理化学的性状情報と *in vitro* h-CLAT 試験法毒試験結果のデータとの関連性解析評価 (直交部分的最小二乗回帰分析: OPLS)

OPLS 法により毒性に関連する x 変数(物性)は、正の相関が大きくなるに伴い、毒性の Positive (EC200) に関連する x 変数 (物性) が示唆され、毒性と関連する物性項目が探査可能である。図 2 の Loadings plot から x 変数 (物性) の棒グラフの表示により、毒性が Negative な方向に寄与する変数 (物性) は、不純物の Li (リチウム) として、また毒性が Positive な方向に寄与する x 変数 (物性) は、Specific surface area ratio (H₂O/N₂)、Mass median diameter (μm) が挙げられた。

C-3. 呼吸器感作性物質に関する被検物質の物性データ項目整理

呼吸器感作性物質等は大きく 3 群 (①呼吸器感作性物質、②皮膚感作性物質、③非感作性物質) に分けられた (data not shown)。これらの被検物質の実験データ (MW、logKow、Boiling Point) 等に加えて、特に分子の吸着性を特徴づけるも化学情報学・計算化学的な物質の特性データを付加するための項目について検討している。その結果、下記について候補となる項目として挙げられた。

- 1D: 水素結合ドナー/アクセプター数
- 2D: logP、極性表面積 (PSA)
- 3D: PSA、van der Waals 体積

- 3D (量子化学計算) : 電荷分布、双極子モーメント、分極率、反応性軌道エネルギー (HOMO/LUMO)

これらは、オープンソースライブラリー (RDKit、PaDEL-descriptor、PySCF 等) を利用した科学情報学・計算化学的な方法で進めていく予定である。

D. 考察

先行研究による h-CLAT 試験では、MWCNTs が THP-1 細胞を活性化することを新たに見出している。なかでも NM402 は EC200 の活性化能が高く、比較的毒性が強かったことは、他の被験物質の不純物測定と比較すると、不純物が多く特に鉄が影響している可能性が示唆された。本研究では 6 種の MWCNTs (NM-400~403, NT-7 (ND), NT-7 (N)) で、物性データ結果と毒性試験結果 (EC200) との関連性の解析で、毒性が Negative な方向に寄与する変数 (物性) で不純物の Li (リチウム) が挙げられた理由としては、含有量の低さが反映されていた。また、毒性が Positive な方向に寄与する変数 (物性) は、2 項目挙げられた。一つ目の項目の Specific surface area ratio (H_2O/N_2) は、この比率より、物質の表面に対する水蒸気と窒素ガスの相対的な吸着能力を評価することができる。これは、物質の表面が水蒸気と窒素ガスに対してどの程度反応しやすいか、または物質の細孔 (微細な穴) の分布や大きさについての情報を提供することから、細胞への吸着能にも影響すると考えられる。

毒性の強さに関しては、比表面積の大きさに関連していると考えられるが、本結果解析より、疎水性が高いことが更なる毒性の強さへの要因になるものと思われた。二

つ目の項目として、Mass median diameter (μm) が挙げられた。これは MWCNTs の長径に対応する長さであり、なかでも毒性の強い NM402 は $1.488\mu m$ と他の被検物質に比べて比較的短かったことが毒性に影響したものと考えられた。これらの結果は、EC200 と相関が比較の見えやすい物性であると考えられる。一方、インパクトが大きく、ばらつきも大きい (エラーバーが大きいのはその値の 95% 信頼区間から大きく外れている) その他の変数 (物性) に関しては、毒性への影響に関する変数 (物性) として挙げられるものの、本解析結果から確度は低いものと考えられた。

化学構造からの有害性予測では、特定の化学構造が特定の生物活性や毒性を示す傾向がある。現在、正準 SMILES 記法による化学構造の線形表記法を作成がなされ、今後、RDKit や PaDEL-descriptor は化学構造の記述子を計算予定である。今後、これらの記述子は、機械学習モデルの入力として使用できることから、毒性の予測に役立つと考える。また、量子化学計算と毒性予測においては、PySCF のような量子化学計算を使用することで、電子状態計算が実施可能となる。これらの計算から得られる情報 (HOMO/LUMO エネルギー、電荷分布など) は、化学物質の反応性や安定性を理解するのに役立ち、これらの情報は毒性予測にも寄与する可能性を示唆する項目と考える。

E. 結論

物性データと毒性データの関連性の解析では、各データ間にはしばしば相関関係が存在することから、これらのデータを組み合わせることで、新たな毒性を

予測することが可能となりうる。今後、物性項目の収集と毒性を指標とした検証や、オープンソースライブラリーを利用した1D、2D、3Dの科学情報学・計算法的な物性項目についてのプログラムの作成によって、毒性予測を実施する。

【謝辞】

The test materials used in this study were one type of MWCNT (NT-7) provided by one domestic manufacturer and five types of MWCNTs (MWCNTs: NM-400, NM-401, NM-402, NM-403), provided by the JRC Nanomaterials Repository (Ispra).

F. 研究発表

F.1. 論文発表

総説解説 (国内誌)

1. 大野彰子: ナノマテリアルの概要, *ファルマシア*, 2023;59(7):629-633.
doi:10.14894/faruawpsj.59.7_629

F.2 学会発表

1. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子とリポ多糖共暴露による抗原提示細胞活性化能の評価, 第 50 回日本毒性学会学術年 (2023.6.21, 横浜).
2. 飯島一智, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 荒井りおん, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄: 気管支モデル/単球系細胞株共培養系を用いたナノマテリアル吸入毒性評価と細胞間相互作用の解析, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜).
3. 大野彰子, 西田明日香, 沖山佳生, 飯島一智, 足利太可雄: Verification of

usefulness as evaluation index for nanomaterials using the h-CLAT test method, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜).

4. Ohno A, Nishida A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T, Verification of the effectiveness of EC 200 and EC 150 indicators of THP-1 cell activation on various nanomaterials, 266th ACS National Meeting & Exposition, (August 13-17, 2023, San Francisco).
5. 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価法の開発とその活性化メカニズムの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 川崎).
6. 荒井りおん, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支上皮モデルと THP-1 細胞を組み合わせたナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発に向けた気管支上皮分泌サイトカインの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 川崎).
7. 大野彰子: ナノマテリアルの安全性評価における国際動向, 第36回日本酸化ストレス学会関東支部会 (2023.12.3, 川崎).
8. ナノマテリアルの生体影響: 国際的な安全性評価への取り組み, 大野彰子, 日本薬剤学会 ビジネスエコ創剤 FG 日本薬剤学会ビジネスエコ創剤 FG セミナー 2023 年度「未来医療と医薬エコシステム」招待講演 (2024.2.16, online)
9. Ashikaga T, Ohno A, Arai R, Iijima K: Activation of THP-1 cells by mixed exposure to silicon dioxide nanomaterial and

skin sensitizer or febrile substance, SOT
63nd Annual Meeting (2024.3.12, Salt Lake
City, USA).

10. 大野彰子, 動物実験代替法としての生
体模倣システム (MPS) と国際動向, 日
本薬学会第144年会 シンポジウム講演,
(2024. 3. 30, 横浜) .

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

表1 6種のMWCNTs(NM400-403, NT-7)の物性データおよびh-CLAT試験結果

No	Title	NM-400	NM-401	NM-402	NM-403	MWNT-7(ND)	MWNT-7(D)	備考欄(※1)
1	cmpAg	0.00005	0.00006	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	
2	cmpAl	1.4	0.001	0.97	0.096	0.001	0.001	
3	cmpC	91	100	92	97	96	96	
4	cmpCa	0.0025	0.028	0.0025	0.003	0.0025	0.0025	
5	cmpCd	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	
6	cmpCl	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	
7	cmpCo	0.041	0.00005	0.00006	0.17	0.00005	0.00005	
8	cmpCr	0.0023	0.00005	0.00019	0.00006	0.00027	0.00027	
9	cmpFe	0.11	0.005	0.3	0.012	0.005	0.005	
10	cmpGa	0.00017	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	
11	cmpH	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
12	cmpK	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
13	cmpLi	0.0005	0.0005	0.0056	0.0052	0.0005	0.0005	
14	cmpMg	0.00025	0.00035	0.00025	0.18	0.00025	0.00025	
15	cmpMn	0.00005	0.00005	0.00058	0.18	0.00005	0.00005	
16	cmpN	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
17	cmpNa	0.048	0.0025	0.0025	0.0025	0.0033	0.0033	
18	cmpNi	0.00019	0.00007	0.00021	0.0039	0.00011	0.00011	
19	cmpO	7.4	0	6.7	2.3	3.9	3.9	
20	cmpS	0.002	0.068	0.002	0.002	0.064	0.064	
21	cmpSi	0.001	0.001	0.0093	0.001	0.001	0.001	
22	cmpTi	0.00005	0.00007	0.00006	0.00005	0.00005	0.00005	
23	ssa_n2	268.9	20	221.9	189.3	19.8	19.8	
24	vpore_n2	1.37	0.069	1.4	1.42	0.059	0.059	
25	dpore_n2	20.4	13.8	25.2	30	12	12	
26	abs_h2o	4.29	0.25	2.53	1.89	0.13	0.13	
27	ssa_h2o	24.8	1.13	8.35	5.25	0.78	0.78	
28	rssa_h2o_n2	0.09	0.06	0.04	0.03	0.04	0.04	
29	thick	11	67	11	12	7	7	
30	lglen	846	4048	1372	443			
31	coating	pristine	pristine	pristine	pristine	pristine	pristine	
32	COOH		0.02	0.14	0.09			
33	dia_amv	20	50.5	37.5	13			代表値および最大値・最小値が記載されているもの、NM-401の代表値が欠損していたため、すべて最大値と最小値の算術平均を記載
34	len_amv	5050	3150	700	5200			代表値および最大値・最小値が記載されているもの、NM-401, 402, 403の代表値が欠損していたため、すべて最大値と最小値の算術平均を記載
35	aspect	79	66	125	42			
36	mmidia_amv	85		1.488	1.7			代表値のみ記載されたNM-400は代表値を、最大値および最小値のみ記載されたNM-402&403はそれらの算術平均を記載
37	pore_amv	0.07	0.11	0.055	0.16			代表値のみ記載されたNM-401と403は代表値を、最大値および最小値のみ記載されたNM-400&402はそれらの算術平均を記載
38	ssa_amv	275	226.4	162	244.5			代表値のみ記載されたNM-401は代表値を、最大値および最小値のみ記載されたNM-400, 402, 403はそれらの算術平均を記載
39	dust	420	4200	1700	4900			
40	sol	2			2			
41	deg			NRD	NRD			
42	ec150			6.95	1.77		8.46	
43	ec200	6.61	3.66	0.402	0.803	3.2	1.35	

※1 line 33,34, 36-38: 備考欄記載内容に従いデータマイニング後の値を示す。

※2 line 32-41: MWNT-7(ND/D)の文献値はなし

図1 6種のMWCNTs(NM400-403, NT-7)の物性データのクラスタリング解析結果

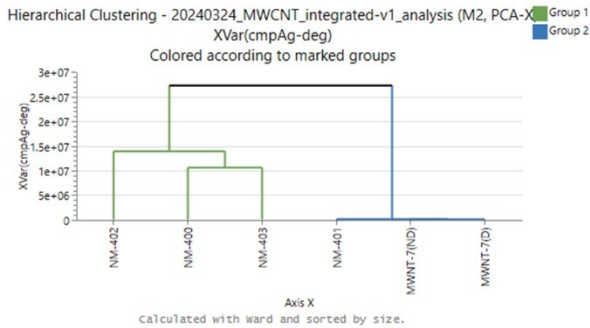


図2 6種のMWCNTs(NM400-403, NT-7)のEC200(Y変数)と物性データ(X変数)のOPLS法によるLoading plotによる解析結果

