

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6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

研究分担者 大野 彰子

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 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6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、3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204)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験物質は、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 NM 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。

二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NMs）は、微細な粒子径と大きな表面積から多方面での応用が期待される一方で、生体内への影響、特に呼吸器系への安全性が懸念されている。吸入されたナノシリカ粒子は肺に沈着し、マクロファージに取り込まれた場合、粒子の特性によってはマクロファージの炎症反応を引き起こし、持続的な炎症は肺組織の損傷や線維化につながる可能性

が示唆されている。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.1-1. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の *in silico* による特性解析

今年度の本研究で実施するナノマテリアルの対象化合物は、3種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204) とした。これらの被験物質の一部の物理化学的性状 (物性) と情報収集源は、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) 等に加えて、新たな物性 (重金属不純物や表面活性) の追加試験結果や、当研究班内で実施した *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や、*in vivo* 吸入暴露試験については dossier と、当研究班内で実施した結果について収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施することとした。

【物理化学的性状および有害性情報の調査対象情報源】

- OECD で公表されている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) Silicon dioxide. - Manufactured nanomaterial の Summary dossier
- 関連する個別 dossier、ANNEX
- 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

- 本研究班で実施された *in vitro* h-CLAT 毒性試験結果

新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) は、以下の条件で測定した。

【重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) 測定】

- ICP 質量分析装置 : Agilent 7700x (アジレント・テクノロジー)
- マイクロウェーブ試料分解装置 : ETHOS-UP (マイルストーンゼネラル)

方法 : 試料 0.1g 程度を PTFE 容器に量りとり、フッ化水素酸、硝酸を加えて密閉し、マイクロウェーブ分解を行った。放冷後、超純水で定容した。

【Specific surface area ratio (H₂O / N₂) の測定】

- マイクロメリティックス社製 3Flex (比表面積・細孔分布測定装置)
- マイクロメリティックス社製 Smart VacPrep (前処理装置)

方法 : 試料約 0.3g をセルに採取し、上記前処理装置を用いて 100°C、約 12 時間の減圧乾燥を行った後、水蒸気吸着法 / N₂ ガス吸着法により測定を実施した。

尚、水蒸気吸着法は、占有断面積は 0.125nm で設定し、測定は 25°C の温度下で実施された。

B.1-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

【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

R5 年度に収集した呼吸器感作性被検物質 33 化合物の正準 SMILES 構造に基づき、情報化学ならびに計算化学の観点から、物性値ならびに構造的特徴量の収集を行なった。

具体的な手順として、最初に化合物が水和物やイオン対を構成するものについては、そのままでは評価が困難であるため、溶媒に該当する文字列を SMILES から削除した。その後、RDKit ライブラリを用い、各化合物の 1 次元 (1D; 化学組成や SMILES 表記の官能基に基づく)、2 次元 (2D; 化学構造式に基づく)、3 次元 (3D; 立体座標に基づく) 構造を構築した。3D 構造については汎用分子力場 (UFF) を用いた構造最適化を実施した。これらの各次元の構造情報に基づき RDKit および Mordred、量子化学計算ライブラリである PySCF を用いて特性データを取得した。以上の処理はすべて Python 言語を用いて実施した。

C. 研究結果

C.1-1. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の *in silico* による特性解析

予試験的に実施した SiO₂ NMs (NM-200~NM-204) の物性情報と *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性結果のデータとの関連性については、直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) を用いて解析した。

【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項目を X の説明変数とし、毒性値 (h-CLAT 試験法による毒性試験結果) 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。

解析結果では、毒性の高い化合物に寄与するいくつかの変数 (物性) の組み合わせが示唆された (data not shown)。

- ✓ コーティングなし
- ✓ 凝集体/凝集体の形態 (nm) : 角張った球形度の低い形
- ✓ 等電点 (平均) : pH(2-4)、
- ✓ アスペクト比
- ✓ 比表面積 (m²/g)

また、新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) を実施した。

【重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) 測定結果】

・ NM-201 について、As の含有量は 0.5mg/kg 未満、Cd の含有量は 0.2mg/kg 未満、Hg 及び Pb の含有量は 0.5mg/kg 未満であった。

・ NM-202 について、As の含有量は 0.5mg/kg 未満、Cd の含有量は 0.2mg/kg 未満、Hg 及び Pb の含有量は 0.1mg/kg 未満であった。

・ NM-204 について、As の含有量は 0.5mg/kg 未満、Cd の含有量は 0.2mg/kg 未満、Hg の含有量は 0.5mg/kg 未満、及び Pb の含有量は 1.2mg/kg であった。

【Specific surface area ratio (H₂O / N₂) の測定結果】 (表 2)

水蒸気吸着量は、相対圧力 (P/P₀) 0.9 における試料 1g あたりの吸着量を示し、NM-202 < NM-204 < NM-201 の順で吸着量は増加した。

BET 法による比表面積は、試料 1g に対する表面積値を示しており、N₂ ガスなど他のガスで得られる値とは異なるが、NM-202 < NM-204 < NM-201 の順で増加した。

比表面積値比は、水蒸気吸着法と N₂ ガス

吸着法で得られた比表面積値の比で、試料間の親水性比較のための指標となり、NM-202<<NM-204≈NM-201の順であった。

一方、*in vivo* 試験による吸入暴露試験の有害性情報に関しては、今後、HESS（ラット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、規格化されたシートをひな形として用い、情報収集したSiO₂ NPsのデータコンテンツに特化した項目を追加することで、新たな規格データシートを作成した。

C.2-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

昨年度は情報化学に基づく、下記分子特性データを取得した。

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

令和6年度は量子化学に基づく、下記分子特性データを取得した (表3)。

- 3D (量子化学計算): 反応性軌道エネルギー (HOMO/LUMO) およびエネルギーギャップ、双極子モーメント

ただし、今回は真空中でのHF/6-31G*レベルのテスト計算の実施にとどまったことから、今後、電子相関や溶媒効果の考慮、量子化学的な構造最適化、基底関数の改良など、精密化を行う必要がある。また、吸着性に関わる分極率の見積もりのため励起状態計算を実施する予定である。

D. 考察

先行研究で実施されたSiO₂ NMs (NM-

201, NM-202, NM-204)を用いた *in vitro* h-CLAT 試験結果は、すべて陽性であり、陽性判定のランキングは、NM-201<NM-202<NM-204であった。

NM-204はEC200の活性化能が高く、毒性が強かったことは、一次粒子径や二時粒子径が最も小さい値であることが影響していると考えられ、その他の物性項目についても候補として挙げた。昨年度に実施した6種のMWCNTs (NM-400~403, NT-7(ND), NT-7(N))を用いた、物性データ結果と毒性試験結果 (EC200)との関連性の解析では、毒性が強い被験物質の物性項目として細胞への吸着能を示す Specific surface area ratio (H₂O/N₂) の影響が大きいことが示唆された。従って、今年度のSiO₂ NMsの研究で、新たな物性項目の一つとして加えることとした。さらに、重金属 (As, Cd, Pb, Hg) は、不純物として被験物質に含まれると、細胞や臓器へのダメージが強化され、急性毒性や慢性毒性、発がん性、環境への影響が生じる可能性がある。陽性判定の一番強いNM-204に含まれる重金属の鉛が可溶性の化学形でナノシリカに比較的容易に溶出する場合: 1.2 mg/kg という含有量と、ナノシリカの暴露濃度によっては、THP-1細胞に影響を与える可能性はあり、特に、12時間という暴露時間は、細胞応答を観察するのに十分な長さであると考えられる。仮に、鉛が不溶性の化学形でナノシリカに強く結合している場合: 鉛の溶出がごく微量であれば、THP-1細胞への影響は小さいかもしれないが、ナノシリカ粒子自体が細胞に取り込まれ、細胞内で徐々に鉛が放出される可能性も否定できない。従って、h-CLATアッセイの指標への影響: 直接的な細胞死が見られなくても、亜致死的な濃度の鉛が細胞の活性化状態や表面マーカーの発現に影響を与える可能性を示

唆する。

従って、化学物質における重金属の存在を評価し、適切に管理することが重要であることから、これらの純金属の不純物についても、新たな物性項目の一つとして加えることとした。

また、比表面積値比は、水蒸気吸着法と N₂ ガス吸着法で得られた比表面積値の比であり、試料間の親水性比較のための指標となる。NM-201、NM-202、NM-204 は相対圧約 0.8 以上で吸着量が増加する傾向は同じだが、NM-202 は他の 2 試料と比較して、水蒸気吸着量、比表面積値（水蒸気）が低く、比表面積値比（水蒸気/N₂ ガス）も小さいことから親水性は低いと考えられた。

化学構造からの有害性予測においては、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ことが知られている。例えば、RDKit や PaDEL-descriptor といったツールは、化学構造の記述子 (descriptor) を計算するために用いられ、これらの記述子は機械学習モデルの入力として利用することができる。従って、これらのツールを活用することにより、化学物質の毒性を予測する際に有用であると考えられる。また、量子化学計算を利用した毒性予測においては、PySCF のような量子化学計算プログラムを使用することで、化学物質の電子状態に関する詳細な計算が可能となる。これにより、HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) および LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) のエネルギーや、分子の電荷分布などの情報が得られる。これらの情報は、化学物質の反応性や安定性を理解するための重要な手がかりとなり、さらにその情報が毒性予測においても有益であることが示唆される。

E. 結論

化学物質の安全性評価において、物性データと毒性データの関連性解析は重要な役割を果たす。これらのデータ間には相関関係が見られることが多く、統合的な解析によって新たな毒性予測手法の開発が期待される。具体的には、既存の物性データに加え、実験的および計算化学的に得られる物性項目を拡充し、毒性指標との相関性を検証することで、予測精度向上を目指す。さらに、オープンソースライブラリーや機械学習等の情報科学的手法を活用し、1D、2D、3D 構造記述子を含む多様な物性項目を用いた予測モデルを構築することで、より高度な毒性予測を実現する。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K, Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells, *Front. Toxicol.*, 01 July 2024.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.

F.2 学会発表

1. 飯島一智, 山城真輝, 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄: 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
2. 大野彰子: 食品分野に含まれるナノ粒子の健康影響, 科学的根拠に基づく健康寿命を伸ばす会 第 30 回講演会 (2024.10.9)
3. 前田洋祐, 佐藤亜紗子, 武吉正博, 立花滋博, 成田和人, 小林諒太, 島田真理子, Priyanka M, Rahul D, Abhay D, Namhee K, Miriam J, 福山朋季, 松本一

- 彦, 赤堀有美, 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇, 小野敦: 皮膚感作性試験代替法 α -Sens[®] の Validation 研究 (Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
4. 大野彰子, 沖山佳生, 山城真輝, 飯島一智, 足利太可雄: ナノマテリアルの免疫毒性評価系における in vitro h-CLAT 試験法の有用性, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 5. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子の THP-1 細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 6. 荒井りおん, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標候補遺伝子の発現解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 7. 坂本玲奈, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデル / THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 8. 石ヶ守里加子, 今井正彦, 大野彰子, 戸塚ゆ加里: マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価, 日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 (2024.12.7)
 9. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Maki Yamashiro, Kazutoshi Iijima, Akihiko Hirose, Takao Ashikaga, Usefulness of Evaluation System for Activation Potential of Various Nanoparticles Using Monocytic Cell Line THP-1 and Prediction of Toxicity, SOT 64th Annual Meeting (2025.3.18)
 10. 大野彰子, 動物実験代替法に向けた化学物質の安全性評価手法の開発と国際動向, 日本薬学会第 145 年会 (2025.3.28)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 2. その他
特になし

表1 3種のナノシリカの代表的な物性値と h-CLAT 試験結果 (その他の詳細な物性値は data not shown)

SiO ₂ NPs					
	Measurement method		NM-201	NM-202	NM-204
Physical properties	TEM	Particle size / nm	17	15	10
	TEM	Particle shape	spherical	spherical	spherical
	DLS(buffer of aggregates in h-CLAT test)	Z-average / nm	526	420	273
	DLS(buffer of aggregates in h-CLAT test)	Z-potential / mV	-18	-16	-17
	DLS(buffer of aggregates in h-CLAT test)	PDI	0.38	0.36	0.35
h-CLAT test (THP-1active)		Potential	Positive	Positive	Positive
		Potntial Rank	3	2	1
		EC200 / ug ml-1	30.3	19.5	3.5
		EC150 / ug ml-1	-	-	-

表2 3種のナノシリカの水蒸気吸着測定結果

	NM-201	NM-202	NM-204
測定温度(°C)	25(恒温槽)	25(恒温槽)	25(恒温槽)
P/Po=0.9吸着量(mmol/g)	24.7	6.4	17.8
比表面積値 多点BET法 窒素吸着(m ² /g)	215	42.4	199.7
比表面積値(水蒸気/N ₂ ガス)	1.55	0.22	1.54
試料重量(処理後)(g)	0.314	0.298	0.313

表3 呼吸器感作性物質等の (3D 量子化学計算)

Index	Simulation	CAS	Chemical SMILES	Formula	FormalCh	E_HOMO	E_LUMO	Gap	Dipole	Index	Simulation	CAS	Chemical SMILES	Formula	FormalCh	E_HOMO	E_LUMO	Gap	Dipole		
0	Respiratory	7660-30-4	PubChem	O=C(O)(O)C1=CC=CC=C1	C7H7O3	-	-6.103	0.223	6.326	1.820	17	Skin	101-86-0	PubChem	CCOC(=O)C1=CC=CC=C1	C10H10O2	-	-6.321	0.073	6.394	3.800
1	Respiratory	601-58-3	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.930	0.654	6.480	3.306	18	Skin	97-53-0	PubChem	OC(=O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.928	0.130	6.492	1.050
2	Respiratory	85-61-7	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720	19	Skin	93-89-2	PubChem	OC(=O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.931	0.073	6.394	2.771
3	Respiratory	821-205-0	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720	20	Skin	97-80-5	PubChem	OC(=O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.927	0.066	6.417	1.847
4	Respiratory	110-93-0	PubChem	C1=CC=CC=C1	C6H6	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
5	Respiratory	85471-92-5	ChemScribe	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
6	Respiratory	852-30-7	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
7	Respiratory	111-30-3	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
8	Respiratory	11070-44-3	ChemScribe	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
9	Skin	805-51-4	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
10	Skin	900-11-8	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
11	Skin	97-00-7	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
12	Skin	85-55-0	ChemScribe	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
13	Skin	85591-61-7	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
14	Skin	443-30-4	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
15	Skin	97-54-1	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
16	Skin	8392-40-9	PubChem	O=C(O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.440	0.137	6.577	5.720											
											21	Non-sensitizing	127-51-5	PubChem	OC(=O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.928	0.066	6.417	3.911
											22	Non-sensitizing	54884-57-2	PubChem	OC(=O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.928	0.130	6.492	1.050
											30	Sensitizing	57-85-8	PubChem	OC(=O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.411	0.066	6.417	1.847
											31	Sensitizing	151-21-3	PubChem	OC(=O)C1=CC=CC=C1	C7H6O2	-	-6.927	0.073	6.394	2.771

量子科学計算：形式電荷

双極子モーメント

反応性軌道 (HOMO/LUMO) エネルギー、およびエネルギーギャップ