

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 7 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 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

本研究は、短期吸入曝露された各種ナノマテリアル（NMs）が免疫系に及ぼす影響について、*in vitro* および *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を行うことを目的とする。得られた知見に基づき、短期吸入曝露による毒性発現経路（AOP）の特定、*in vitro* 試験法の確立、および将来的な OECD テストガイドライン化に向けた基盤的知見の収集を目指している。令和 7 年度は、前年度に引き続き、NMs を含む呼吸器感作性物質の物理化学的性状（物性）データの収集、および *in vitro* / *in vivo* 免疫毒性試験結果の比較検証を実施した。具体的には、3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204）を対象とし、分担研究者が実施した吸入曝露試験データを用いて、物性と *in vivo* 毒性発現の関連性解析を実施した。また、呼吸器感作性物質の評価体系を整理するため、呼吸器感作物質（9 化合物）、皮膚感作物質（13 化合物）、非感作性物質（11 化合物）を対象物質として選定し、今年度はこれら化学物質の物性収集における検討項目について整理・検討を行った。

A. 研究目的

ナノマテリアル（NM）は、粒子径や表面積といった物理化学的性状（物性）の違いにより、従来の化学物質とは異なる特有の生物学的挙動を示す。特に呼吸器系への曝露は、免疫系の異常反応による感作や、マクロファージの活性化を介した持続的な炎症、組織の線維化を引き起こす懸念がある。安全な社会実装のためには、これら NM の特性に合致した高精度な毒性評価系の構築が急務となっている。中でも二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NMs）は、その優れた機能性から広く応用されている一方で、吸入による肺沈着やマクロファージへの取

り込みを介した炎症反応、さらには肺組織の損傷や線維化のリスクが懸念されている。以上の背景を踏まえ、本研究では短期吸入曝露された各種 NMs が免疫系に与える影響について、*in vitro* および *in vivo* 試験の連携体制を通じた毒性メカニズムの解明と評価系の開発を目的とする。得られた知見を基に、短期吸入曝露による毒性発現経路（AOP）の特定および *in vitro* 試験法の確立を図り、将来的な OECD テストガイドライン化に向けた基盤的知見を収集する。

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

今年度の本研究における対象物質は、昨年に引き続き、3種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204) とした。解析用資料の作成にあたり、これら被験物質の物理化学的性状 (物性) および毒性評価結果について、既存の評価文書 (Dossier) に加え、新規試験データや当研究班の実測データを収集・整理した。具体的には、*in vitro* 試験 (h-CLAT 法) の結果や、*in vivo* 吸入曝露試験に関する知見 (Dossier および当研究班の実施結果) を統合している。

【物理化学的性状および有害性情報の調査対象・情報源】

- ・ OECD ナノマテリアル安全性評価プログラム公表文書: "Silicon dioxide - Manufactured nanomaterial" Summary Dossier
- ・ 関連する個別 Dossier および ANNEX
- ・ 欧州委員会共同研究センター (JRC) による情報、および関連する原著論文
- ・ 本研究班で実施した *in vitro* h-CLAT 毒性試験結果

なお、新たな物性項目である重金属不純物 (As, Cd, Pb, Hg) および比表面積比 (Specific surface area ratio: H₂O / N₂) については、追加測定した (表 1)。

B.1.2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

これまでに収集した呼吸器ならびに皮膚感作性被検物質 33 化合物 (図 1)

- 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

について、昨年度には情報化学ならびに量子化学の観点から、物性値ならびに構造的特徴量の収集を行ない、併せて多変量解析

による感作性判別を試行してきた。

R7 年度は、昨年度までの微視的特徴量との対比として、巨視的・熱力学的物性値を収集し、感作性判別能に関する調査を行うこととした。

熱力学的量の取得は、OECD の眼刺激性に関するディファインド・アプローチとしても用いられている OPERA プログラムを用いて、R6 年度に作成した被験物質の正準 SMILES に基づく QSAR 予測値を取得した。各被験物質に対して取得した具体的な物性値は、融点、沸点、オクタノール水分分配係数 (LogP および LogD)、水溶解度、蒸気圧、ヘンリーの法則、および pKa である。

これらの物性値を元に PLS-DA 解析による感作性の分類を実施した。この時、物性値に対する PCA 解析において LogP とほぼ差がなかった LogD と、比較的多くの被検物質で定義されなかった pKa については、今回はプレリミナリーな解析として除外した。

各種データ処理は Python 言語を、多変量解析は R および ropls ライブラリを用いた。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」に則って実施した。ボランティアおよびヒト組織は使用しなかった。これらのことから、倫理的問題は無いと考える。

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

令和 7 年度は、予備試験として実施した SiO₂ NMs (NM-200~NM-204) の物性データ

および既往の *in vitro* h-CLAT 試験による毒性評価結果に加え、新たに *in vivo* 吸入曝露試験結果（指標：BALF 中 CCL5 値）との関連性について検討した（表 2）。

解析手法には、直交部分的最小二乗回帰分析（OPLS：Orthogonal Partial Least Squares Regression）を用いた。本解析では、説明変数（X）を物性項目、目的変数（Y）を毒性値（h-CLAT 試験結果等）と設定し、物性から毒性を予測するモデルの構築を試みた。

【解析結果】

予備的な解析の結果、毒性の強さに寄与する複数の物性項目の組み合わせが特定された。*in vivo* 吸入曝露試験結果との関連性解析において、毒性と強い関連（特に、値が小さいほど毒性が高まる傾向）が認められた共通の物性項目は以下の通りである。

- TEM 測定による粒子径 (nm)
- DLS (h-CLAT 試験用凝集バッファ溶液中) 測定によるキュムラント法 Z 平均粒子径 (nm) および多分散指数 (PDI)
- EDS 測定によるコーティング剤や不純物を含む非 SiO₂ 成分の総量 (% w/w)
- BET 法測定による全細孔体積 (mL/g)

【データベースへの対応】

一方、*in vivo* 吸入曝露試験の有害性情報に関しては、将来的に「HESS（化学物質の有害性評価支援システム統合プラットフォーム）」へ搭載することを目指し、データ整備を行った。具体的には、既存の規格化シートをひな形とし、収集した SiO₂ NMs 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（表 3）。

C.1.2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

最終年度は、取得した微視的特徴量ならびに巨視的特徴量を記述子として PLS-DA

解析を実施した。

まず、微視的特徴量を用いた感作性判別を実施したところ、第 1 成分 (t1) 軸において感作性グループと非感作性グループを分離されることを見出した（図 2）。特に、LUMO エネルギー、分子量、分子表面積、分子体積との関連性が見られた。また、各感作性を特徴付ける主要な物性値として以下の関連性を見出した。

- 呼吸器感作性：水素結合のアクセプター数、トポロジカル極性表面積
- 皮膚感作性：（正味電荷）
- 非感作性物質：分子体積、分子量

一方、熱力学量を記述子とした感作性に関する PLS-DA 解析を実施した結果、t1 軸に関して呼吸器感作性グループと皮膚感作性および非感作性グループが分離されることを見出した（図 3）。また、各感作性を特徴付ける物性値として、

- 呼吸器感作性：融点、水溶解度
- 皮膚感作性：蒸気圧、ヘンリーの法則
- 非感作性物質：LogP、沸点

という関連性を見出すことができた。

D. 考察

二酸化ケイ素ナノマテリアル（SiO₂ NMs）の特性解析に関する *in vivo* 吸入曝露試験（指標：BALF 中 CCL5 値）の結果は、先行研究である *in vitro* h-CLAT 試験の結果と整合し、対象とした SiO₂ NMs（NM-201, NM-202, NM-204）すべてにおいて陽性反応が認められた。毒性の強さは「NM-201 < NM-202 < NM-204」の順であり、NM-204 において最も高い CCL5 値が観測された。

本解析の結果、粒子径が小さく、不純物による表面被覆が少ない高純度な粒子、かつ多孔質ではないソリッドな構造を持つ SiO₂ NMs において、BALF 中 CCL5 の上昇

が顕著であることが示唆された。そのメカニズムとして、第一に「微細化によるマクロファージへの取り込み効率の促進」が挙げられる。マクロファージは数百 nm 以下の微細な粒子を貪食しやすい傾向があり、PDI が小さく巨大凝集が少ない粒子特性がこれを助長したと考えられる。加えて、微細化による総表面積の増大が細胞内小器官との接触面積を広げ、ROS 産生や炎症シグナル (NF- κ B 経路等) を活性化させたものと推察される。第二に「不純物の欠如による活性シラノール基の露出」が考えられる。非 SiO₂ 成分が少ない粒子は表面のマスクング効果が乏しく、露出した活性シラノール基 (Si-OH) が細胞膜成分と直接相互作用することで、より強い攻撃性 (膜損傷・炎症惹起能) を示したと考えられる。

呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析に関して、今回実施した熱力学量を記述子とした分類解析では、呼吸器感作性グループと皮膚感作性および非感作性グループの分離に成功した。これは、昨年度の微視的量を用いた解析での、呼吸器感作性および皮膚感作性グループと非感作性グループの分離と異なる結果であった。どちらも単独では三つの感作性を完全に分離するものではなかった一方で、微視的量による分類は感作性そのものの有無を分離し、熱力学量は (非感作性物質を除けば) 感作対象組織を分離することを表している。これは、各器官の表面への付着と化学的な細胞への影響 (反応性) を微視的 (情報化学・量子化学的) 性質が反映し、各器官への影響の違いを巨視的 (熱力学的) 性質が反映している可能性を示唆するものである。

この仮説が正しければ、微視的性質による分類と巨視的性質による分類を段階的に組み合わせることで、三つの感作性を分離できる可能性がある。今後、量子化学計

算レベルの高精度化や今回除外された熱力学量等を加味した記述子を元に分類の高精度化が期待されるところである。

E. 結論

化学物質の安全性評価において、物理化学的性状 (物性) と毒性データの関連性を解明することは不可欠である。本研究を通じて、ナノマテリアルから低分子化学物質に至るまで、物性と毒性データの間に有意な相関関係が存在することが確認され、統合的な解析が新たな毒性予測手法の開発に資することが示された。今後は、多面的な物性情報と毒性指標との相関性を詳細に検証することで、より信頼性の高い安全性評価システムの構築に貢献することを目指す。

また、呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析では、微視的分類と巨視的分類を段階的に組み合わせることで、呼吸器感作性、皮膚感作性、および非感作性の高精度な分類体系を確立する。そのために、量子化学計算レベルの高精度化や、熱力学量等を加味した新たな記述子の拡充を行い、*in silico* による特性解析および感作性判別の高度化を推進していく。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Fukuhara K, Obama T, Ohinata H, Takaki T, Kato M, Ishigamori R, Totsuka Y, Itabe H, Ohno A, Evaluation of graphene oxide-mediated NET formation using HL-60-derived neutrophil-like cells. *Preprint at bioRxiv*. 2025. <https://doi.org/10.1101/2025.06.06.658248>
2. Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y, Genotoxicity assessment of mesoporous silica and

graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ.* 2026;48:2.
<https://doi.org/10.1186/s41021-025-00350-y>

F.2 学会発表

1. 小林果, 平生祐一郎, 福原潔, 大野彰子, 森有利絵, 川西正祐, 村田真理子, 及川伸二: 天然ポリフェノール Salvianolic acid B による活性酸素生成および DNA 損傷, 第 78 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2025.5.23, 小田原)
2. 大野彰子, 赤木純一, 爲廣紀正, 広瀬明彦, 小川久美子: 食品等に含まれるナノマテリアルに関する国際的な安全性評価への取り組み, 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.4, 沖縄)
3. Ohno A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T: Relationship analysis between the effects of MWCNTs on THP-1 cells and their physical properties, American Chemical Society (ACS) Fall 2025 (2025.8.19, Washington DC, USA)
4. Fukuhara K, Ohno A: Investigation of Graphene Oxide Induced NET Formation Using HL-60-Derived Neutrophils as a Model for Immunotoxicity Evaluation, American Chemical Society (ACS) Fall 2025 (2025.8.19, Washington DC, USA)
5. 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: イオン溶出および細胞内取り込みに着目した酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1, 横浜)
6. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化における酸化ストレスと吸着イオンの影響, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.2, 横浜)
7. 石ヶ守 里加子, 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包括的毒性評価, 日本環境変異原ゲノム学会大 54 回大会 (2025.11.22, 静岡)
8. 大野彰子, アドバンスドマテリアルを利用した医薬品・医療機器等の安全性評価に資する研究, 第 10 回日本医療研究開発機構レギュラトリーサイエンス公開シンポジウム(2025.12.3, 東京)
9. 福原 潔, 大野彰子, 医療機器におけるナノマテリアル NETs 誘導を介した遺伝毒性への新たな視点, 日本薬学会第 146 年会 (2026.3.27, 大阪)

【謝辞】

The test materials used in this study were three types of SiO₂ NMs (NM-201, NM-202, and NM-204) provided by the JRC Nanomaterials Repository (Ispra). We would like to express our sincere gratitude to the JRC Nanomaterials Repository for their generous contribution of these materials.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Class	Type	Measurement method	Description	NM-201	NM-202	NM-204
Properties	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
	Chemical composition	EDS	Total non-SiO2 content including coating and impurities (% w/w)	2.21	1.64	0.47
		EDS	Impurity (% w/w Al)	0.74	0.45	0.48
		EDS	Impurity (% w/w S)	0.46	0	0.21
		EDS	Impurity (% w/w Na)	0.44	0	0.18
		EDS	Impurity (% w/w Ca)	0	0.18	0
		ICP-OES	Impurity (% w/w K)	0.001	-	-
		ICP-OES	Impurity (% w/w Fe)	0.001	-	0.001
		ICP-OES	Impurity (% w/w Zr)	0.005	-	0.005
		ICP-OES	Impurity (% w/w Mg)	0.001	-	-
		EDS	O (wt%)	53.08	53.14	53.17
		EDS	Si (wt%)	45.27	46.23	45.96
		TGA	Coating	Yes (or H2O)	-	No Yes (or H2O)
		TGA	Weight of coating (wt%)	3	-	3
	Crystalline phase	XRD	Crystalline type	amorphous	amorphous	Amorphous
		XRD	Crystalline impurities	Na2SO4, Bohemite (Al2O4)	Na2SO4, Bohemite (AlO(OH)), Bohemite (Al2O4)	-
		XRD(?)	Aspect ratio	1461	1518	-
	Specific surface area	SAXS	SAXS surface area (m²/g)	123	184	131
		BET	BET surface area (m²/g)	140.46	204.11	136.6
		BET	Total pore volume (mL/g)	0.5815	0.5136	0.5057
		BET	Micropore surface area (m2/g)	-	-	0
		BET	Micropore volume (mL/g)	0.0092	0.0008	0.0067
	Dustiness	Small rotating Drum (SD)	Inhalable Mass Dustiness index (mg/kg)	6034	4988	24969
Small rotating Drum (SD)		Respirable Mass Dustiness index (mg/kg)	218	91	1058	
Solubility	Flask method	Saturation concentration (mmol/L)	2.4	2.25	-	
	ICP-MS	As (mg/kg)	<0.5	<0.5	<0.5	
	ICP-MS	Cd (mg/kg)	<0.2	<0.2	<0.2	
	ICP-MS	Pb (mg/kg)	<0.5	<0.1	1.2	
	ICP-MS	Hg (mg/kg)	<0.5	<0.1	<0.5	
	MMAD (Mean)	Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (nm)	1,658nm(L) 2030nm(H)	515~ 609 (L), 709nm (H)	1,439nm(L), 1,468nm(H)	
	MMAD	MMAD Low (nm)	1658	515~609	1439	
	MMAD	MMAD High (nm)	2030	709	1468	
	N2/H2	Surface area (m²2/g)	123	184	131	
	in vitro	h-CLAT test (THP-1active)	Potential	Positive	Positive	Positive
		h-CLAT test (THP-1active)	Potential Rank	3	2	1
		h-CLAT test (THP-1active)	EC200 / ug ml-1	30.3	19.5	3.5
		h-CLAT test (THP-1active)	EC150 / ug ml-1	-	-	-
	in vivo	CCL5 in BALF	ED150 (mg/m³)	75	27.1	13
		Exacerbation of pneumonia	Score	1	2	3

表1. 3種のSiO₂ NPsの物性測定 /in vitro h-CLAT/in vivo 吸入暴露試験結果のデータ整理

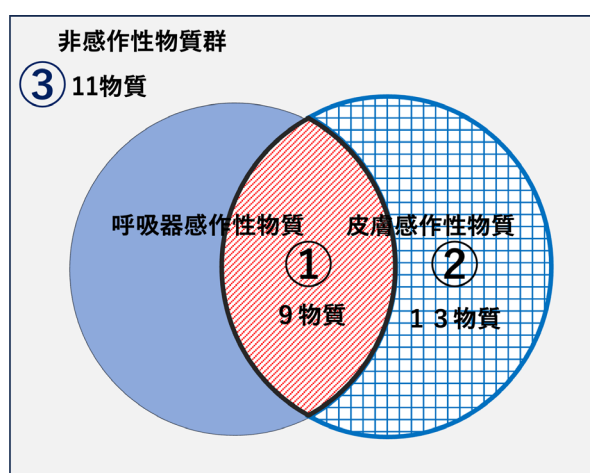


図1. 呼吸器感作性物質等 (①呼吸器感作性物質、②皮膚感作性物質、③非感作性物質) のベン図

	Measurement method		NM-201	SiO ₂ NMs NM-202	NM-204
Physical properties	Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm)		1,658nm(L), 2030nm(H)	515～609 (L), 709nm (H)	1,439nm(L), 1,468nm(H)
	surface area (m^2/g)		123 m^2/g	184 m^2/g	131 m^2/g
in vivo試験エンドポイント		単位			
CCL5 in BALF	対照群(0 mg/m^3)に対して150%(1.5-fold)上昇させる曝露量	ED150 (mg/m^3)	75.0	27.1	13.0
Exacerbation of pneumonia	1. 影響度が低い 2. 影響度が高い 3. 極めて影響度が高い	Score	1	2	3

表2. 3種のSiO₂ NMsによる*in vivo*吸入曝露試験結果（指標：BALF中CCL5値、RSV感染影響評価結果参照）

実施機関/論文著者、報告年、ばく露期間	TNO 2003 5 days					NIHS 2024 5 days		
	1	5	7	10	12	1	2	3
整理番号								
Name (製造元、粒子径)	Substance declared equivalent to NM-200 (precipitated)	Substance declared equivalent to NM-201 (precipitated)	Substance declared equivalent to NM-202 (pyrogenic)	Substance declared equivalent to NM-203 (pyrogenic)	Substance declared equivalent to NM-204 (precipitated)	NM-201 (precipitated)	NM-202 (pyrogenic)	NM-204 (precipitated)
Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm)	2.83~3.27	2.83~3.27	1.2 - 1.3 μm or 2.2 - 3.5 μm (depending on the technical device used)	1.2 - 1.3 μm or 2.2 - 3.5 μm (depending on the technical device used)	2.83~3.27	1,658nm(L), 2030nm(H)	515~609 (L), 709nm (H)	1,439nm(L), 1,468nm(H)
surface area (m ² /g)	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	123 m ² /g	184 m ² /g	131 m ² /g
溶解	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし
分散法	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし
エアロゾル生成法	Miniature screw conveyor, a dust feeder, (Institute's design) connected to a low-level	Miniature screw conveyor, a dust feeder, (Institute's design) connected to a low-level	Miniature screw conveyor, a dust feeder, (Institute's design) connected to a low-level	Miniature screw conveyor, a dust feeder, (Institute's design) connected to a low-level	Miniature screw conveyor, a dust feeder, (Institute's design) connected to a low-level	Lab-developed dust generator; direct injection, compressed air	Lab-developed dust generator; direct injection, compressed air	Lab-developed dust generator; direct injection, compressed air
Test guideline	OE	実施機関、被験物質、試験動物、試験条件等（約22項目）						
Route	inhalation							body)
Species	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Mouse	Mouse	Mouse
Strain	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	C57BL/6N/Sic	C57BL/6N/Sic	C57BL/6N/Sic
Gender	male and female	male and female	male	male	male and female	male	male	male
Test group	Main	Main	Main	Main	Main	Main	Main	Main
Administration period (day)	5 (6h/day)	5 (6h/day)	5 (6h/day)	5 (6h/day)	5 (6h/day)	5 (6h/day)	5 (6h/day)	5 (6h/day)
Recovery period (day)	1 or 3 months	1 or 3 months	1 or 3 months	1 or 3 months	1 or 3 months	4W or 8W	4W or 8W	4W or 8W
Dose unit	mg/m ³	mg/m ³	mg/m ³	mg/m ³	mg/m ³	mg/m ³	mg/m ³	mg/m ³
Min dose	1.16 (± 0.36)	1.16 (± 0.36)	1.39 (± 0.15)	1.39 (± 0.15)	1.16 (± 0.36)	7.8±1.8	6.9±0.4	10.3±1.1
Max dose	25.2 (± 1.5)	25.2 (± 1.5)	25.3 (± 0.9)	25.3 (± 0.9)	25.2 (± 1.5)	33.6±2.4	25.1±6.4	25.6±2.5
Purity	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	記載なし	> 99%	> 99%	> 99%
Test laboratory	TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)	TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)	TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)	TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)	TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)	National Institute of Health Sciences(NIHS)	National Institute of Health Sciences(NIHS)	National Institute of Health Sciences(NIHS)
Year reported	2003	2003	2003	2003	2003			

表3. 3種のSiO₂ NPsの*in vivo* 吸入曝露試験結果のHESS形式によるデータ収集・整理

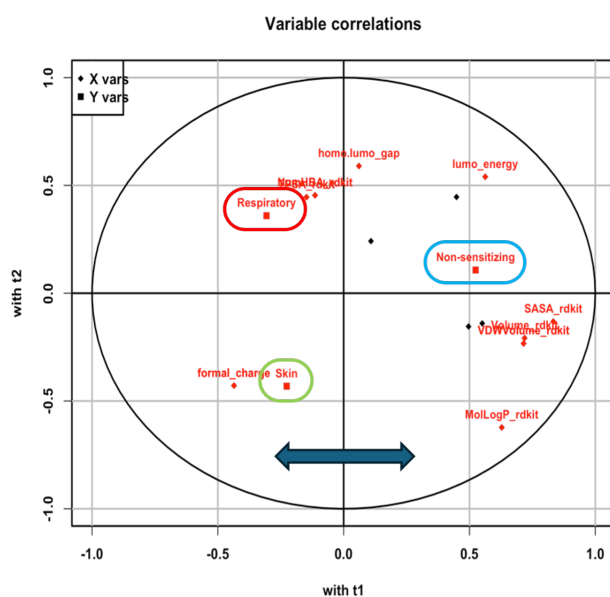


図2. 微視的特徴量を用いた呼吸器・皮膚感作性に関するPLS-DA解析のローディングプロット

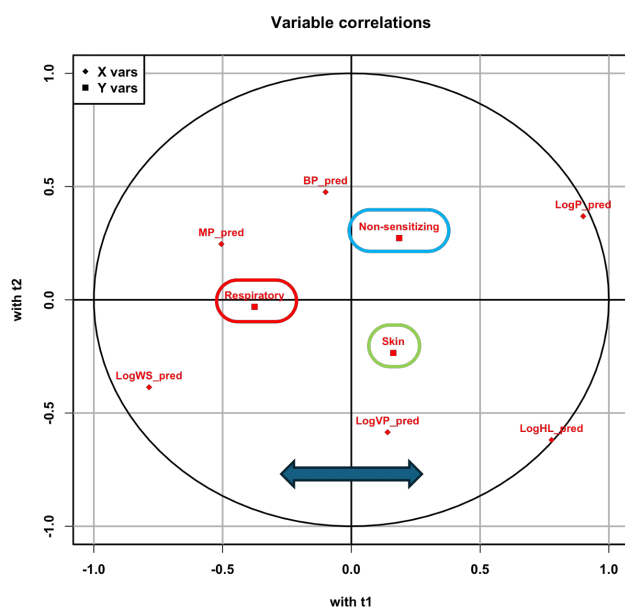


図3. 巨視的特徴量を用いた呼吸器・皮膚感作性に関するPLS-DA解析のローディングプロット