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2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 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

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と共に、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)および *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 2 年度は、6 種の二酸化チタンナノ粒子を対象化合物(TiO₂NPs: MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600, TiDW)として物理化学的性状(物性)の測定および各種 *in vitro/in vivo* 試験の有害性情報の情報収集・整理を行う。更に、物理化学的性状の特性評価や、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として、物理化学的性状データと有害性(毒性)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

ナノマテリアルは、同じ物質でも粒径サ イズが1-100 nm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、ナノマテリ アルは、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。ナノマテリ アル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。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。

二酸化チタンナノ粒子(TiO2NP)は、化 粧品の日焼け止めや顔料の他、塗料や繊維 やインキ、食品添加物など幅広く使用され ている。TiO2の材料は、平均一次粒子径が 200-400nmや、100nm以下の粒子体 (TiO₂ NP)がある。また、TiO2の結晶構造は、ア ナタース型とルチル型の2種類が存在し、さ らに材料の種類によってはアナタース型と ルチル型の混合型を有するのもある。これ まで、TiO₂NPの結晶構造や、粒子径、表面 積などでin vitro/in vivo試験による毒性の違 いについては議論されてきている。しかし、 物理化学的性状は一部のデータ情報のみで あり、詳細な物理化学的性状と有害性情報 (毒性)との関連性はあまり分かっていな い。さらに、TiO₂ 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2年度は、対象化合物は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) 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。二酸化チタ ンナノ粒子の情報収集源については、物理 化学的性状は化学分析の測定を実施し、収 集した。さらに、本研究班で今年度実施さ れたin vitro試験でのh-CLAT試験法による 毒性試験結果や、厚生労働科学研究成果デ ータベースMHLW GRANTS SYSTEM へ の公表分についても収集・整理した。その 後、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とし て、解析に資する物性データと有害性デー タは、多変量解析法による関連性解析にて 検証した。

B. 研究方法

今年度の本研究で実施する対象化合物は 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)とした(Table 1)。

【物理化学的性状・有害性情報の情報整理 項目】

▶ <u>物理化学的性状データ</u>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 について測 定・収集・整理した。 ▶ 有害性情報データは、本研究班で今年度 実施された6種の二酸化チタンナノ粒子 によるin vitro試験でのh-CLAT試験法に よる毒性試験結果の他、厚生労働科学研 究成果データベースMHLW GRANTS SYSTEMで公表された二酸化チタンナ ノ粒子の厚労科学研究費補助金化学物 質リスク研究事業研究報告書、及びこ れらの研究成果として公表された原著 論文の公表分(in vitro試験結果:細胞毒 性試験、遺伝毒性試験等のEC50値等、in vivo試験結果:吸入ばく露試験、気管内 投与試験、腹腔内投与・経口投与試験に よる急性毒性、免疫毒性、アジュバント 効果等)を調査対象情報源とし、収集・ 整理した。(Table 2)

【物理化学的性状の分析対象項目】

- ▶ <u>成分分析(化学分析)</u>: 蛍光 X 線法による定性分析(対象元素: Na~U:下限0.1%)(Table 3)、ICP 発光分光分析法による定量分析(対象元素: Fe、Si、P、Al、Cr、Zr、Ca、Mg、Ti、Ce、Nb:下限0.01%、Si・Pは0.05%)、原子吸光分析法による定量分析(対象元素: Na、K:下限0.01%)、燃焼-赤外線吸収法による定量分析(対象元素: S、下限0.01%)
- 細孔分布・比表面積測定(粒子解析): 窒素吸着 BET 多点法による細孔分布ならびに比表面積測定(Table 4)
- <u>親水性および疎水性評価(表面化学分</u> <u>析)</u>:粒体浸透速度測定、粒体接触角測定 (Figure 1)

【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 7)。

【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(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 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(Figure 3A, 3B, 3C)
- > OPLS 法: Y=f(x)=a1x1+a2x2+...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 *in vivo* 試験結 果(腹腔内投与毒性試験・皮膚毒性試験 結果)のデータについて PCA 法による 検体間の傾向を検証した。(Figure 4A, 4B, 4C)
- in vitro 試験の h-CLAT 試験法毒性試験 結果のデータと in vivo 試験毒性試験結 果との紐付けの解析法の実施(Figure 5A, 5B)
- ▶ ①物性⇔②in vitro 毒性試験結果⇔③in vivo 毒性試験結果について、MOCA (Multiblock Orthogonal Component Analysis)による3ブロックの統合解析 を実施し、共通する変動の変数について 探索した(予試験)。
- MOCA法: O2PLSの改良版で、同じサンプルに対し複数の分析方法で得られた2つ以上のブロックデータを統合解析する。得られた全ブロックデータで共通の変動および各ブロックでの固有の変動を同時に可視化する。

C. 研究結果

1. 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 30 項目のデータ を収集した。収集・整理された<u>物理化学的</u> <u>性状データシート</u>および <u>in vitro / in vivo 有</u> <u>害性情報シート</u>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 の各項目について 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。
- Crystal: Phase, system, size1, size 2 に分 類し定義した。
- Size1,2: TiDW の needle 状の length (Vertical x Horizontal) を別々の項目に て定義した。
- O (wt%):TiO₂(%)の値から換算し算出 した。
- h-CLAT 試験法毒性試験結果: 欠損デー タについては 10000 と定義した。
- h-CLAT2 試験法毒性試験結果:
 negative, positive(semipositive), positive
 は、「0, 1, 2」と数値化により定義した。
- *in vivo* 毒性試験結果(MHLW GRANTS SYSTEM): IgE, IgG1, IgG2の測定結果の「増加、増加傾向、変化なし」は「0,1.5, 2」と数値化により定義した。
- 2. 成分分析(化学分析)
- ▶ <u>定性分析</u>は日本電子(株)製エネルギー 分散型蛍光X線分析装置JSX-3100RII を用いて蛍光X線分析(EDX)によっ て実施した(Table 3)。定量分析はICP 発光分光分析装置 島津製作所 ICPS8100、原子吸光装置Varian AA240、 炭素・硫黄分析装置 CS-844を用いて ICP 発光分光分析法、原子吸光分析法、 燃焼-赤外線吸収法によって実施した。 その結果、Ce(セリウム)は<0.01、Nb(二</p>

オブ)は、<0.4 で検出された。

- > 細孔分布・比表面積測定(粒子解析)は、 マイクロメリティクス製 細孔分布測 定装置 ASAP-2020 を用いて真空中、 300℃×3Hr 前処理を行い、窒素吸着 BET 多点法によって実施した(Table 4)。
- ▶ 粒子解析は、比表面積はBET プロット の傾き及び切片を用い、BET 式より単 分子層吸着量を求め、単分子層吸着量 にガス分子一個の占める断面積(分子) 占有断面積)をかけて算出した。一方、 細孔分布は、BJH 解析による細孔分布 曲線を用いて求めた。結果として MT-150Aは、他の検体と比較すると大きな 穴を占有されていた。TKP-102 は AMT-150Aと同じ比表面積であるが、細孔径 が小さく(1/3~1/4)なり、結果的にそ の容積も小さくなった。AMT-100 は比 表面積が最大だが、MT-150Aに比べて 細孔径が非常に小さいため、その容積 も小さくなり、小さな穴で占有されて いることが推察された。AMT-600 に関 しては比較的少数の大きな穴で占有さ れていることが推察された。MT-500B はガス吸着による細孔分布測定の上限 (100nm)付近から上限以上において ガスの吸着が確認されたことから、細 孔容積は求めることができなかった。 また、TiDW の細孔は検出されなかっ た (Table 4)。
- ▶ <u>表面化学分析</u>は、親水性および疎水性評価には二つの測定方法(粒体浸透速度測定および粒体接触角測定)によって実施した(Figure 1)。

- ・ <u>粒体浸透速度測定</u>は、協和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500(温 度:26±1°C湿度:40±5°C液体:蒸留水、 粉体カラム半径:5mm)によって実施し、 試料をカラムに充填し、カラムを液体表 面に鉛直に接液させた。その後、毛管現 象により液体が粉体粒子の空壁(毛管) を上昇(浸透)したことによるカラムの 重量変化を測定することにより浸透速 度を求めた。
- ・ 粒体接触角測定は、協和界面科学製 高 機能表面張力測定装置 DY-500(温度: 26±1℃湿度:40±5℃、毛管半径測定用液 体:イソプロパノール (IPA) 粉体カラ ム半径:5mm)を用いて、浸透速度法に よって分析した。 Figure 1 に親水性お よび疎水性の傾向をプロットした結果 から、特に、TiDW の浸透速度(青色の プロット)は、4.9と高い親水性の傾向 を示した。一方、粉体接触角の結果より、 TiDW, MT-150A, AMT-100, TKP-102 (ほぼ有意差なし>) AMT-600 >MT500B となり、AMT-600、MT500B は疎水性の 傾向を示した。6 検体の中で TiDW は浸 透速度の結果と合わせて最も親水性が 高いと示唆された。

3. 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 TiO₂ NPs の物理
化学的性状についてデータマイニングを
した後、PCA 法 (Figure 2A) および、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 (Figure 2B)。その結
果、全 6 物質の TiO₂ NPs の 30 項目につい
てクラスター化し類似性が示された
(Figure 2B)。

4. *in vitro* 細胞毒性試験(h-CLAT 試験法 および MHLW GRANTS SYSTEM から の *in vitro* 細胞毒性試験報告結果)

in vitro 細胞毒性試験 (h-CLAT 試験法) の 6 種の TiO₂ NPs の試験報告について収 集・整理した (Table 5)。その結果、TKP-102、AMT-600 の 2 物質間では Positive、 AMT-100 、 TiDW の 2 物質間では C Semipositive (総合的な判定は Positive だが Negative の判定項目も有するために不確定 な Positive として扱うことからデータマイ ニング上、TKP-102、AMT-600 の 2 物質間 の Positive と区別をするために Semipositive と定義)、MT-150A と MT-500B の 2 物質間 では Negative の結果と判定された。

一方、MHLW GRANTS SYSTEM を情報 源とした TiO₂ NPs の *in vitro* 細胞毒性試験 結果報告については、1 試験の酸化チタン の細胞毒性試験(細胞生存率%)および、 1 試験の酸化ストレス測定試験(8-OH-dG 測定)、酸化チタン A.B.C.D の 4 試験の免 疫毒性試験(サイトカイン/アジュバント効 果:IL-1α、IL-1β、IL-6、TNFα)について 収集・整理した(Table 6)。1 試験の前立腺 正常上皮細胞株 RWP を用いた Alamar Blue Assay による細胞毒性試験(細胞生存率%) の結果は、毒性を示さなかった(data not shown)。また、1 試験の前立腺癌細胞株 DU145 を用いた酸化ストレス測定試験の 結果は、DNA 付加体形成が認められた

(data not shown)。さらに、Table 6 に示す ように酸化チタン A.B.C.D を検体として用 いた 4 試験の免疫毒性試験では、培養ヒト 角化細胞における I L-1 β 、 I L-1 α 誘導は 見られなかった(酸化チタン A.B.C)が、 THP-1 マクロファージからの NLRP3 イン フレマソーム活性を介した IL-1 β 産生(酸 化チタン A.B.C)、THP-1 マクロファージか らの TNFα、IL-6 分泌(酸化チタン A.B.C)、 THP-1 マクロファージからのサイトカイン 放出(酸化チタン A.D)で誘導が見られた。

(酸化チタンA:MT-150A、酸化チタンB:
 MT-500B、酸化チタンC:AMT-100、酸化
 チタンD:不明)

5. 物理化学的性状情報と *in vitro* 毒性試験 結果(h-CLAT 試験法)の多変量解析に よる関連性解析

物性データと *in vitro* 毒性試験結果デー タとの関連性解析については、直交部分的 最小二乗回帰分析 (OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression) により実施された (Figure 3A-C)。

その結果、Scores plot より横軸の第一主成 分の正の方向(右側)に行くほど Positive の 結果と一致した(Figure 3A)。さらに Loadings plot から棒グラフで表示させた Figure 3B より、毒性に関連する変数(物性) は、正の相関が大きくなるに伴い、毒性の Positive に関連する変数(物性)が示唆され た(Figure 3B, 3C)。従って、OPLS 法によ り第一主成分(横軸)で毒性と関連する物 性項目が探査可能であることが示唆され た。Loadings plot から棒グラフで表示させ た Figure 3B から、毒性が Negative である MT-150A MT-500B に寄与する変数(物性)

(インパクトが大きく、エラーバーが比較 的落ち着いている)は、Crystal Phase(Rutile)、
Pore volume(cm3/g)、Ca が挙げられた。また、毒性が Positive な TKP-102 AMT-600 に 寄与する変数(物性)(インパクトが大きく、 エラーバーが比較的落ち着いている)は、
Crystal Phase(Anatase)、 P が挙げられた

(Figure 3B)。一方、インパクトが大きく、 ばらつきも大きいような、毒性が Negative に影響している(傾向として高い)変数(物 性)は、Na Porediameter(nm)が挙げられ、毒 性の Positive に影響している(傾向として 高い)変数(物性)は Zr,Nb,Zeta potential(m V)が挙げられた。(Figure 3C)

6. *in vivo* 毒性試験(MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vivo* 毒性試験報告結 果)

MHLW GRANTS SYSTEM から収集され た TiO₂ NPs の *in vivo* 毒性試験報告結果に ついては、肺への影響をエンドポイントと した 4 試験の吸入暴露試験、9 試験の気管 内投与試験、3 試験の腹腔内投与試験、2 試 験の胸膜腔内投与試験データについて、 HESS 搭載用に収集・整理した(Table 7)。 その他、免疫毒性試験でのサイトカイン_ アジュバント効果をエンドポイントとし た腹腔内投与試験、経皮適応、経口投与試 験データの合計 9 試験について収集・整理 した(Table 6)。

▶ 反復投与吸入毒性試験結果

反復投与毒性試験(吸入暴露および気 管内投与試験)の有害性情報は、Taquann 法による吸入暴露試験が4試験、気管内 投与試験が9試験の毒性試験データの 結果について収集した。これらの収集項 目では、試験種類、動物種、試験条件(約 28項目)の他、EndopointとしてBAL細 胞数の増加、炎症、生化学値等の変動が 生じたLOAEL等(約511項目)の合計 約539項目について調査し、収集・整理 を行った(Table 7)。

その結果、MT-500(ルチル型、粒子径: 35 nm) Bは2試験実施されていた。そ のうちの1試験では、C57BL/6NcrSlc、 野生型、p53+/-マウス(5回(2h/day,合 計 10h)への全身吸入暴露直後のマウス 肺には、細気管支の気管支上皮に接する ように、微細な粒状物質を貪食したマク ロファージを認めた。さらに CC-10 の 免疫染色で CC-10 陽性のクララ細胞の 増殖を伴い、粒状物質は CD68 陽性の活 性型マクロファージに貪食されている ことを確認した。暴露終了後13週目の 肺では肉眼的に顕著な変化は見られず、 また、病理組織学的にも変化に乏しく、 酸化チタンの全身吸入暴露による影響 はほとんど認めなかったが、限局的に肺 胞の線維化を伴うリンパ球の集簇像を 認め、小肉芽腫様変化と考えた。同部位 はCC-10陽性の細胞に変化は見られず、 SPC 陽性の二型肺胞上皮細胞増生が見 られた。また、CD68 陽性の活性型マク ロファージの集簇像も認めた。ただし、 これらの変化はごく限局的に認められ たのみであり、酸化チタンの全身吸入暴 露後13週での変化としては極軽微な変 化であった。

AMT-600 (アナターゼ型、粒子径:6 nm)は1試験実施されており、 C57BL/6NcrSlc マウス (5回 (2h/d, 1回 /w, 合計 10h) への T-TiO2の組織負荷量 の肺負荷量では曝露直後で 150.11±9.05 µg/g; 1 週目: 112.47±13.94 µg/g; 4 週目 63.05±7.21 µg/g; 8 週目: 25.85±11.36 µg/g (8 週後の負荷量は約 1/6 の減衰傾向)、縦隔負荷量では TiO₂ の負荷は認められなかった。肺組織負 荷量の測定結果から、本実験の吸入曝 露条件では、マクロファージの運動機 能についての影響はみられていないと 考えられた。病理組織学的検査では、曝 露終了日(0週)から曝露終了後8週 までいずれの解剖期にも毒性病変を認 められなかった。BALF 塗抹細胞の百 分比では、各群の0、1、4 週でのBALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファ ージであり、T-TiO2曝露群4週でマク ロファージの他に単球 0.4%、リンパ球 0.1%であった。BALF 塗抹肺胞マクロフ ァージにおける検体の貪食率では、0週 から4週までほとんどすべての肺胞マ クロファージが検体粒子を貪食してい たと述べられていた。

MT-500B、AMT-600 ともに、肺胞マク ロファージの影響による増加はみられ たが、全身吸入暴露による顕著な病変へ の影響は認められなかったと述べられ ていた。

▶ <u>免疫毒性試験</u>

① 腹腔内投与試験 抗原腹腔内投与によるマウス感作にお けるアジュバント効果の検討[平成 26 年度:掲載報告書 No.201624004B および 201428014A]】

試験検体

- 酸化チタン MT-150A (ルチル型、粒子 径:15 nm)
- 酸化チタン MT-500B (ルチル型、粒子 径:35 nm)
- 酸化チタン AMT-100 (アナターゼ型、 粒子径:6 nm)

モデル抗原(卵白アルブミン;OVA、 20 μg)及び酸化チタン(2mg あるいは 10mg)を生理食塩水 300 μL に懸濁し、 BALB/cマウス(雌性、7 週齢、1 群 5 匹) に腹腔内投与した(1 次免疫)。14 日後に 再度投与し(2 次免疫)、翌日に血液を採 取して、血清中のOVA 特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。試験 結果は、3 種の酸化チタン(MT-150A、 MT-500B、AMT-100)とも、陽性対照ア ジュバントとして用いた Alum と同様に、 OVA 特異的な IgE 及び IgG1 抗体の産 生を用量依存的に増強すると述べられ ていた。

② 経皮適用試験

抗原経皮感作時の共存効果の検討[平成 26-28 年度:掲載報告書 No.201624004B および 201428014A]】

試験検体

- 酸化チタン MT-150A (ルチル型、粒子 径:15 nm)
- 酸化チタン MT-500B(ルチル型、粒子 径:35 nm)
- 酸化チタン AMT-100 (アナターゼ型、 粒子径:6 nm)

モデル抗原 OVA(1-2µg)及び酸化チタ ン(12.5 ng-1.25 mg)の混合懸濁液を BALB/cマウス(7週齢、1群5匹)に経 皮感作し、血液を採取して、血清中の OVA 特異的IgE 及びIgG1抗体をELISA 法で測定した。試験結果は、粒子径が最 も小さい酸化チタン AMT-100 (6 nm、ア ナターゼ型) では、OVA 貼付時に 125 ng を添加した場合に、抗原特異的抗体産生、 アレルギー反応惹起時の体温低下、アナ フィラキシースコア、血中ヒスタミン濃 度の全てにおいて、OVA 単独群と比較 して有意な増大が見られた。酸化チタン MT-150A (15 nm、ルチル型) では、OVA 貼付時に 12.5 µg を添加した場合に、ア レルギー反応惹起時の体温低下及びア ナフィラキシースコアにおいて、OVA 単独群と比較して有意な増大が見られ、

抗体産生や血中ヒスタミン濃度におい ては増大する傾向が見られた。また、1.25 µg、125µgを添加した場合にも同様の 傾向が見られた。一方、粒子径が最も大 きい酸化チタン MT-500B では、どの用 量の場合も有意な変化は見られなかっ た。これらの結果より、酸化チタンナノ マテリアルが抗原タンパク質の経皮感 作を増強すること、また、この効果は粒 子径に依存する(粒子径が小さい方が効 果が大きい)こと、結晶構造(ルチル型、 アナターゼ型)による顕著な差は見られ ないと述べられていた。

今回、MHLW GRANTS SYSTEM から収 集された TiO₂ NPs の *in vivo* 毒性試験報告 結果の肺への影響をエンドポイントとし た有害性情報について、今年度に実施した TiO₂ NPsの6検体のうち2検体(MT-500B、 AMT-600)が同一検体で試験されていたが、 解析用データには検体数が少ないため (n=3 以上)適応できなかった。従って、 *in vivo* の免疫毒性試験の予試験的な解析に は、今年度に実施した TiO₂ NPs の6検体の うち3検体(MT-150A、MT-500B、AMT-600) が同一検体であったマウスを使用した腹 腔内投与試験と皮膚適応の上記2試験につ いて収集した *in vivo* の免疫毒性試験結果 の解析用データに適応した。

in vivo 試験結果について PCA 法によ る検体間の傾向についての多変量解析

MHLW GRANTS SYSTEM から収集され た TiO₂ NPs の *in vivo* 免疫毒性試験報告結 果 (免疫毒性試験データ) について、6 検 体の TiO₂ NPs のうち 3 検体 (MT-150A MT-500B AMT-100) の結果が得られていたこと から、物性および *in vivo* 試験結果の共通の 解析用検体として選択し、まず免疫毒性試 験データだけを PCA 法により検体間の傾 向を検証した(Figure 4)。

一方、*in vitro* 試験による h-CLAT 試験法 の結果から、AMT-100 は、Semiposi (MT-150A MT-500B: Negative) であることから、 *in vivo* 免疫毒性試験データからの PCA 法 で照らし合わせると、第2主成分(縦方向) で毒性の相関がみられた(Figure 4A)。 Figure 4B の loadings plot から、第2主成分 の 正 に 相 関 (左上部分) する IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng の 2つの変数が、毒性の Positive に寄与して いることが示唆された。また、Figure 4C に 示されるように、同じく正に相関している

(右上の) IgE_OVA2_12.5ng と
IgG1_OVA2_12.5ng の2つの変数に関しては、AMT100とMT150Aの2検体に共通に上がってきていることが示された。従って、低濃度(12.5ng)の投与では、AMT100とMT150Aの2検体間で、IgE_OVA2と
IgG1_OVA2が上がり(Figure 4C)、さらに10倍濃い濃度(125ng)の投与では、AMT100のみ毒性がでていることが示唆された

(Figure 4B)。従って、h-CLAT 試験法の結 果と比較すると AMT100 は Positive

(Semipositive) な傾向であることから、in vivo 免疫毒性試験データからの PCA 法の 結果から IgE_OVA2 と IgG1_OVA2 が、h-CLAT 試験法の毒性結果の Positive

(Semipositive)に寄与する変数であること が推察された。

従って、次の 8. で h-CLAT 試験法の毒 性結果データと紐付ける解析をすること で検証した。

8. *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性試験 結果と *in vivo* 試験の毒性試験結果との 関連性(紐付け)解析(OPLS法)

in vitro 試験の h-CLAT 試験結果は、デー タマイニングより、0,1,2と数字が高い と Positive に相当するように定義した(h-CLAT2)。前述の 7.で in vivo 試験による免 疫毒性試験データの PCA 法による解析結 IgE OVA2 125ng 果から、 と IgG1 OVA2 125ng がh-CLAT 試験結果と正 の相関を持つことが推測されたことから、 in vitro 試験の毒性試験結果データ(h-CLAT2) を Y 変数として、*in vivo* 試験結果 データ(投与条件)をX変数とした OPLS 法の実施により、in vitro/in vivo 毒性試験結 果間の関連性について検証した(Figure 5A, 5B)

解析結果より、Figure 5Aの Scores plot で 第一主成分の正の相関が毒性の Positive に 寄与していることが示唆された。そこで、 Loadings plot で表示させると、横軸で正の 相関(毒性が Positive)のある変数(投与条 件)は、 IgE OVA2 125ng と IgG1 OVA2 125ng であることが示唆され た (Figure 5A)。さらに Lodings plot の棒グ ラフで寄与している変数(投与条件)につ いて詳細をみるとエラーバーが大きいが インパクトのある2変数(IgE OVA2 125ng と IgG1 OVA2 125ng) が、毒性の Positive と正の相関を持つ傾向であることが示唆 された (Figure 5B)。一方、横軸で負の相関 (左側)の変数 (IgE_OVA20-2、IgE_OVA 2 -125 μg, IgG1 OVA 2 -125 μg, IgE OVA 2 -12.5 μg、 IgG1 OVA 2 -12.5 μg、 IgE OVA 2 -1.25 µg、IgG1 OVA 2 -1.25 µg)の値が大き くなると毒性のNegative な結果になる傾向 であることが示唆された(Figure 5B)。 従って、毒性が Positive に寄与する投与量

は、インパクトが大きくエラーバーが小さ い 2 変数 (IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng) がマーカとして挙げら れ、*in vivo*の免疫毒性試験では、この変数 の上がり下がりを見ることで、毒性が Positive になる傾向があると考えられた。

 ①物性⇔②in vitro 毒性試験データ⇔③ in vivo 免疫毒性試験データ(腹腔内投 与毒性試験・皮膚毒性試験の 2 試験結 果) について、MOCA (Multiblock Orthogonal Component Analysis)による 3 ブロック間の統合解析の実施と共通 変動の変数の探索(予試験)

MOCA 法は、同じサンプルに対し複数 の分析方法で得られた2つ以上のブロック データを統合解析できる。また、全ブロッ クで共通の変動、各ブロックでの固有の変 動について同時に可視化を可能とする解 析手法である。*in vivo*免疫毒性試験で使用 した検体は MT-150A、MT-500B、AMT-100 の3検体であったことから、MOCA 法によ る解析は、この3検体に絞っての3ブロッ ク間の統合解析の実施と、共通変動の変数 を探索した。

解析結果は、Figure 6A の Scores plot で、 まず3ブロック其々に Scores プロットが 作成され、Scores plot の凡例(単位)は tj(avg)[1]は average (平均)で表示されて いることから、3ブロック其々に Scores plot の重ね合わせの結果の MOCA 法によ る Scores plot となる (Figure 6A)。しか し、Figure 6A の loadings plot および Figure 6B の Score Correlation Matrix の結果か ら、*in vivo* 試験の免疫毒性結果が計算さ れなかった。これは in vivo 毒性試験結果 と共通で相関しているところが示され ず、物性と *in vitro* 毒性試験結果の関連性 のみが見出されたと考えられた(*in vitro* との共通な部分が見つけられなかったので、成分として抽出されなかった)。
Figure 6C に示される Joint components と 3 ブロック間の R2X から、第一主成分

(Joint components 1 の R2X) では物性と in vitro 毒性試験結果は、累積指数が 0.733 の 0.67 となり、相関がみられたものの、 in vivo(皮膚_毒性)の累積指数は、「---」と 表示され、相関がなかったことを示唆し た。一方で、下段の unique component 1 は in vivo 免疫毒性試験データのみ 71%と計 算されてきたことから、in vivo 免疫毒性 試験データは、(かなり)独立しているこ とが示唆された。従って、①物性⇔②in vitro 毒性試験データ⇔③in vivo 免疫毒性 試験データの 3 ブロック間では、in vivo 免疫毒性試験データは独立して変動をし ていると推察された。

10. HESS DB 搭載のための情報整理およ びデータシートの作成

HESS 搭載用に規格化されたシートをひ な形として用いて今回情報収集した TiO₂ NPsのデータコンテンツに特化した項目を 追加した。その結果、実施期間、被験物質、 試験動物、試験条件情報等について約28項 目と、毒性試験結果情報(NOEL、LOEL) 血液学的検査、生理学的検査、尿の一般検 査、病理組織学的所見等の約511項目につ いて、新たな規格データシートを作成した (Table 7)。

D. 考察

成分分析の定性分析による Ce の検出は、 定量分析結果から偏析の可能性として考 えられた。Nb(ニオブ)は、製造元より酸化 チタン製造に用いる原料に 0.1-0.2%程度 含まれている情報から、本試験結果と一致 し二酸化チタンナノ粒子そのものに含有 していたものではないことがわかった。ま た、TiDW に関して細孔が検出されなかっ た理由は、針状の形状によるものと考えら れた。一方で、検出された細孔については 微粒子の凝集による空壁である可能性も 考えられた。TiDW は、他の検体に比べて、 ばらつきが大きかったが、その原因(要因) として、検体調整で一様の状態の作成が難 しくダマができやすい様子がみられ、針状 結晶で圧縮成形のばらつきが発生してい ることが示唆された。

6種のTiO2NPsの物性データの階層的ク ラスタリング解析では、大きく3ブロック でクラス分類された。また、3つのクラス 分類された結果と in vitro 毒性試験結果 (h-CLAT 試験法結果)との比較では、毒性結 果との関連性は見いだせなかった。そこで、 物性データと有害性データとの関連性に ついて調べるため、6種の TiO₂ NPs につい て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)を用いて、 OPLS 法による多変量解析を実施した。そ の結果、毒性と関連する変数(物性項目) が横軸から探査可能であることが示唆さ れた。さらに解析を進めた結果、毒性に寄 与する変数(物性項目)として、毒性が Positive な結果に関連する相関の強い変数

(物性項目)は、Crystal Phase (Anatase)、 P、 Zr、Nb、Zeta potential (mV)、一方、毒性が Negative な結果に関連する相関の強い変数

(物性項目)は、Crystal Phase (Rutile)、Pore volume (cm3/g)、Ca、Na、Porediameter (nm) となり、毒性が Positive および Negative に 対する相関の高い主な物性項目の組み合 わせとして挙げられた。毒性が Positive で ある物性項目の組み合わせから、結晶形態 の Anatase 型は Rutile 型よりも毒性情報と して比較的報告があることや、impurity の 量、一次粒子径よりも分散性に伴う二次粒 子径の影響が毒性に寄与していることを 反映していると考えられた。

次に、in vitro 試験の毒性試験データと in vivo 試験の毒性試験データとの関連性解析 (紐付け)を行うため、Y 変数を h-CLAT 試験法データ(h-CLAT2:数値化したもの)、 X 変数を in vivo 毒性試験データとして OPLS 法にて検証した結果では、 in vitro 毒 性試験結果に関連する相関の高い in vivo 毒 性結果が導き出された。従って、本解析法 により in vitro / in vivo の毒性試験結果との 紐付けが可能であることが示唆されるも のであった。さらに、本解析結果は、 in vivo 毒性試験データのみの PCA 法による解析 でも同様の傾向が得られていることから、 本手法の有用性を証明するものであった。

MOCA 法はマルチブロック解析により 全ブロック間で共通している部分だけを 抽出してくる手法である。一方で、in vitro の h-CLAT 試験法の結果と in vivo の毒性 試験結果の関連性については OPLS 法に より検証されたにもかかわらず、MOCA 法ではこの情報が計算過程で埋もれてし まっていた。この要因として、今回、物 性のデータが一番確からしくでているこ とより、物性のデータにかなりひっぱら れていたと考えられた。さらに、in vivo 毒性試験結果での PCA 法の解析結果を見 直すと、全体的にばらつきが大きかった 要因もあり、MOCA 法による解析でこの ような部分の影響が計算過程で埋もれて しまったものと考えられた。

E. 結論

6種の二酸化チタンNMについて、物性は

成分分析と細孔分布・比表面積測定の実施 により、各種二酸化チタンナノ粒子のナノ 特異的な物性を明らかにした。二酸化チタ ンナノ粒子の有害性情報に関するin vitro毒 性試験データは、OECDテストガイドライ ン法h-CLAT試験において6種の二酸化チタ ンナノ粒子のTHP-1細胞を用いた細胞生存 率、CD86およびCD54発現に与える影響の 結果について纏めた。invivo有害性情報は、 二酸化チタンナノ粒子のこれまで厚生労働 科学研究で実施された結果(厚生労働科学 研究成果データベースMHLW) や、公開さ れた文献等から取得した。特に、肺に炎症 所見のある試験結果については、HESSデー タベースへの搭載用にデータシートへ纏め た。その後、これらの収集した物性やin vitro/in vivoの有害性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 グし、物性についての特性解析、物性と有 害性データとを紐づける関連性解析、in vitro/in vivo毒性試験間での毒性を紐づける 関連性解析、物性/in vitro毒性試験結果/in vivo毒性試験結果の3ブロック間の共通解 析を実施した。その結果、有害性評価に鍵 となる物理化学的性状の組み合わせや 様々な多変量解析手法の有用性が見出さ れた。今回のMOCA法による解析では、in vivo毒性試験結果の相関が見いだせなかっ た。これは、計算過程でインパクトの強い 物性データに引っ張られてしまったと考え られた。物性とin vitro毒性試験結果の関連 性については、これまで解析でされてきて いたように、説明(計算)がされやすいこ とが示唆され、MOCA法では、物性とinvitro 毒性結果の関連性の解析部分が、やはり一 番に相関として見出されたものであった。 従って、相関が見つけにくいin vivo毒性試 験結果については計算されてこなかったこ

とから、本試験解析結果で記載した3.から8. の解析手順で丁寧に作成モデルを検証し追っていくことが重要であると結論づける。

G. 研究発表

- G.1. 論文発表 該当なし
- G.2. 学会発表
- 大野彰子,渡邉昌俊,広瀬明彦:多変 量解析を用いたナノマテリアルの毒 性評価手法の開発,第47回日本毒性 学会学術集会(2020.6.29-7.1,web開催)
- <u>Ohno A</u>, Watanabe M, Hirose A: Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
- Fukuhara K, <u>Ohno A</u>: Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
- 西田明日香,足利太可雄,<u>大野彰</u>
 子,飯島一智:銀ナノ粒子の抗原 提示細胞活性化能の解析,日本動 物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 大野 彰子,沖山 佳生,広瀬 明彦,福 原 潔:ニトロ多環芳香族炭化水素の 構造と変異原性に関するドッキング スタディ,日本薬学会第141年会(2021. 3.26-29,web 開催)
- 6) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保敬, 今井
 耕平, 水野美麗, 松本謙一郎, 大野彰
 <u>子</u>: C-メチルフィセチンのラジカル消

去作用,日本農芸化学会 2021 年度大 会 (2021.3.18-3.21, web 開催)

- 7) Iijima K, Nishida A, <u>Ohno A</u>, Hirose A, Ashikaga T: Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell LineTHP-1, 2021 SOT Virtual Annual Meeting (2021.3.22,USA, web 開催)
- H. 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

NM	Crystal type	Crystal system	Crystal size	Surface coating	Composition (TiO ₂ , %)
MT-150A	Rutile	tetragon	15	uncoating	92.9
MT-500B	Rutile	tetragon	35	uncoating	99.5
AMT-100	Anatase	tetragon	6	uncoating	86.9
TKP-102	Anatase	tetragon	15	uncoating	97.5
AMT-600	Anatase	tetragon	30	uncoating	97.5
TiDW	Rutile	needle	5.15x0.27	uncoating	100

 Table 1
 Surveyed substances: Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs).

Table 2Target materials (TiO2 NPs) collected from database of the MHLW GRANTS SYSTEM.

研究課題名	代表	研究報告書等	研究対象 ナノマテリアル
ナノマテリアルのヒト健康影 響の評価手法に関する総合研 究 - 全身暴露吸入による毒性 評価研究 -	今井田克己	 平成26 (2014) - 28 (2016) 年度_201624003B 総合研究報告書 平成26 (2014)_201428013A総括 平成27 (2015)_201524009A総括 平成28 (2016) 201624003A総括 	TiO ₂ (MT-500B)
ナノマテリアルの吸入曝露に よるヒト健康影響の評価手法 に関する研究-生体内マクロ ファージの機能に着目した有	相磯成敏	- 平成29 (2017) 年度_201725011A総括	
害性カテゴリー評価基盤の構 築		- 平成30 (2018)年度_201825007A総括	TiO ₂ (AMT-600)
ナノマテリアル曝露に上ス場		- 平成27 (2015) - 29 (2017) 年度_ 201725017B総合 研究報告書	チタン酸カリウムTiO ₂ (anatase型 及びrutile型)
性及び遅発毒性評価手法の開	広瀬明彦	- 平成27 (2015) 年度_201524021A総括	
発に関する研究		- 平成28 (2016) 年度_201624019A総括	
		- 平成29 (2017) 年度_201725017A総括	
金日田冷したスナノコニルマ		- 平成29 (2017) - 令和元 (2019) 年度_201924002B 総合研究報告書	
食品用速となるリノマテリノルの暴露による毒性評価に関	小川久美子	- 平成29 (2017) 年度_201723022A総括	TiO ₂
する研究		- 平成30 (2018) 年度_201823008A総括	
		- 令和元 (2019) 年度_ 201924002A総括	
は国州物府への免疫内外に対		- 平成26 (2014) - 平成28 (2016) 年度_201624004B	TiO ₂
れ原住物員への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露	空运 4 7	- 平成26 (2014) 年度_201428014A総括	
の影響に関する評価手法の開	女连叩丁	- 平成27 (2015) 年度_201524010A総括	
光圳九		- 平成28 (2016) 年度_201624004A総括	
生体影響予測を基盤としたナ		- 平成30 (2018) 年度_201825013A総括	
ノマテリアルの統合的健康影 響評価方法の提案	渡邉昌俊	- 令和元 (2019) 年度_201926009A総括	TiO ₂ (MT-150A、MT-500B、AMT- 100、TKP-102、AMT-600)

	推定	存在比(%)	
	Ti	Ce	Nb
MT-150A	99.8	<0.1	0.2
MT-500B	99.7	<0.1	0.3
AMT-100	98.7	0.9	0.4
TKP-102	99.6	<0.1	0.4
AMT-600	99.7	<0.1	0.3
TiDW	100	<0.1	<0.1

Table 3 Results of X-ray fluorescence analysis using TiO₂ NPs (estimated presence ratio).

Table 4 F	Results of multipoint	BET nitrogen	adsorption	analysis us	sing TiO ₂ NPs.
-----------	-----------------------	--------------	------------	-------------	----------------------------

		メンポア領域 BJH 角	释析 (1~100nm)
	比表面積	細孔容積	細孔径※1
	(m2/g)	(cm3/g)	(nm)
MT-150A	109	0.44	46
MT-500B	35	-	-
AMT-100	325	0.36	2.7
TKP-102	109	0.32	13
AMT-600	55	0.24	26
TiDW	2.8	-	-

Table 5 Results of the h-CLAT test using TiO₂ NPs.

		MT-150A	MT-500B	AMT-100	TKP-102	AMT-600	TiDW
h-CLAT 判定	h-CLAT	Negative	Negative	Positive (Semipos itive)	Positive	Positive	Positive (Semipos itive)
EC200 (CD54発現濃度閾 値)(ug/mL)	EC200	10000	10000	7.81	11.95	18.36	10000
CD54の相対発現量の最大値 (%)	CD54Max	112.39	246.36	204.65	295.81	224.05	183.66
CD54の相対発現量の最大値を とった濃度における生存率(%)	CD54MaxSI	96.27	96.5	96.05	96.41	96.31	95.9
CD54の相対発現量の最大値を とった濃度(ug/mL)	CD54MaxC onc	31.25	250	7.813	2000	125	7.813
EC150 (CD86発現濃度閾 値)(ug/mL)	EC150	10000	10000	10000	831.44	10000	177.73
CD86の相対発現量の最大値 (%)	CD86Max	120.06	141.34	116.72	157.15	127.71	144.31
CD86の相対発現量の最大値を とった濃度における生存率(%)	CD86MaxS R	96.15	96.4	96.05	94.59	96.18	94.92
1000ug/mLにおける生存率(%)	1000SR	94.6	96.95	97.11	95.36	98.26	94.27

注釈1:陰性の場合、欠損値として10000を入力

注釈 2: AMT100, TiDW は Positive の判定だが Negative な要素もあることから解析データで 区別のため Semipositive と記載

		_	_																																													
CCL5		(1)	(1)						,																		1																,				,	
TNFα																																									4	¢	←				,	
9-1I																																									<i>~</i>	<u> </u>	Ļ				,	
lgG2	+				t	t	ţ	î	t	t	t t	t	î	î	î	¢	î	† •	- 1	1	1	1	t	¢	î	t	t	î	t	t	t .	1	î	t	î	î	î										,	
lgG1	t				t	~	î	t	î	† ·	t t	4	•		Ļ	Ļ	↓ .	- ·	- +	- +	- 1	(1)	((L)	t t	(t)	î	î	î	† ·	t ·	1	î	t	î	(1)	(1)											
IgE					ţ	Ļ	ţ	î	î	î,	t t	¢	ţ		î	î	î	- ·	- •	- +	- 1	(1)	(1)	(1)	Ì 1	(1)	î	î	î	t i	t ·	t t	î	ţ	î	ļ	÷										,	
MgI	t																																			-												
IL-10				Ļ																																-			•									
IL-4				t								ı																								-										1		
IL-2		1		t								ī															1									-										1		
IL-1β																																				-		Ļ	Ļ	Ļ				t	î	† •	+	
lL-1α																											-									-								t	¢	t		
INF- Y		1		Ļ								ī																								-												
Dose	gπ 0.	1.025 mg/kg).25 mg/kg).5 mg/kg	2 mg	.0 mg	-2.5 ng	.25 ng	25 µg	.2.5 µg	-25 μg 25 mg	DVA30 mg-TiO2 1.88 mg	<u> 0.VA20 ue-酸化チタンA2 me</u>	DVA20 μg-酸化チタンA 10 mg	DVA20 μg-酸化チタンB2mg	JVA20 μg-酸化チタンB10 mg	DVA20 μg-酸化チタンC2 mg	DVA20 μg-酸化チタンC10 mg	J VAI UU μ 程- 睽 化ナダンA 1.25 mg	J VADU /J g- 阪门 レイタ / A 1.20 mg	J VAZU J g- 欧 L ケ ジ / A 1.20 III g J VA1 ・・・ 熱心 エク、・A 1 つ いっ	JVAI μg-欧毛ナダ /A I.22 UB	2 Mrit は 5 欧ルノノイノハ 17 2 M B J NA1 ルロ-際化 チタンA 12 F ルロ	DVA1 μg-酸化チタンA 1.25 μg	DVA1 μg-酸化チタンA 125 ng	DVA1 μg-酸化チタンA 12.5 ng	JVA2 μg-酸化チタンB 1.25 mg	DVA2 μg-酸化チタンB 125 μg	J VAZ μg-酸化ナタンB 12.5 μg) VA2 μg-酸化チタンB 1.25 μg	JVAZ μg-販化ナメ /B 120 UB) MAZ μ g- 政心 ケメンロ IZ:3 II g J VA2 ニ s- 酸小 チタンC 1 25 m g	DVA2 μg-酸化チタンC 125 μg	DVA2 μg-酸化チタンC 12.5 μg	DVA2 μg-酸化チタンC 1.25 μg	DVA2 μg-酸化チタンC 125 ng	DVA2 μg-酸化チタンC 12.5 ng	酸化チタンA 50~250μg/mL	酸化チタンB50~250μg/mL	後化チタンC 50~250 µg/mL	酸化チタンA 50~125 μg/mL	竣化チタンB 50~125μg/mL	酸化チタンC 50~125μg/mL	後化チタンA 50~125μg/mL	毅化チタンB50~125μg/mL	酸化チ タンC 50~125 μg/mL	碳化チタンA pft、Zpf J mL # ルチ タン D E 0 250 J g / mL	
Time	腹腔内投与1年後 1	0.000	KSV影张5日後	RSV感染5日後 (酸腔内按与 (Day 0, 1次先 本) 110% (C 11) 王先	授), I4日後 (Uay I4) 冉反 拉左 (2次色応) の翌日			4クール感作後 1			Day 25, 43		47-ル感作後 0	1.7	+/-//201F1&	4クール感作後 [0		4.4	*/ // // // // // // // // // // // // /				4クール感作後 0		0			4クール感作後 					14	42-12-2011-120-12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-12-			Pill	6h	PELL	PRAL	6h	1011		6h	142.0	6h	
測定項目	血清中イムノグロブリン分画	BALF中サイトカイン・ケモカ	4 >	Cytokines in BALF	サインの中国がオイ	血病中OVA 特殊的机体			血清中抗原特異的抗体			血清中OVA特異的抗体	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	血清中抗原特異的抗体	血油由枯菌味噌的祛 体	111 111 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 1	血清中抗原特異的抗体		血港由抗陌蛙 嬰的技体					血清中抗原特異的抗体					血清中抗原特異的抗体					而准于长国林园的长体	血病针奶尿被类的奶体			THP-Iマクロファージからの	NLRP3インフレマソーム活性を	介したIL-18産牛	THD-1 マクロフェージからの		TNFα、IL-b犰泌	培養ヒト角化細胞におけるIL-	18 11 -10 霧崩	тр. I сти гост тор 1-2 /с ст 22 44 /с /с ++	IHP-1×2 H Z H Z H Z H Z H Z H Z H Z H Z H Z H	
試験方法	ELISA	*0! II	ELISA	ELISA	i i	ELIDA			ELISA			ELISA	i	ELISA	EI ICA	LLIGN	ELISA		FLICA	ELION				ELISA					ELISA						ELION			MILIOL EVTM	MILITLEA	MAP	MILIDI EVTM		MAP	MILIPLEX TM			MILIPLEX	
ו +⊭	チタン酸カリウム	チタン酸カリウム	(K20 · 8Ti02,	TiO2 (Tavca Corp.)	した。	□\≈+21漸		佰	二 酸化チタンB			酸化チタンC		愛化チタンA			び 酸化チタンC	72	「響きよるこ」	東下レント				酸化チタンA					、 酸化チタンB	5	· 传		5 4	し、マイ語	殿北ケメノし			酸化チタンA	酸化チタンB	酸イチタンC	酸化ナダンA	酸化チタンB	酸化チタンC	酸化ナタンA	酸化チタンB	離北去タンC	一般に イントス	211/11/11/11/11/

Table 6Results of *in vitro* and *in vivo* immunotoxicity studies with endpoints of cytokine adjuvanteffects collected from database of the MHLW GRANTS SYSTEM.

Table 7HESS database sheet

		-									1000						1000			10000		
				10.000	1	100	1	ł	1 201	100010000	-	-	-	1	1	100				10 100	-	1000
			00.000	1000	1	10000	20.0010	0.000	21,281,22		1004.00		10.000			11001					Ī	
			10,000	10000	100110	10000	102.03	10010	201403	10.001	20020					200305						
	5		11 m	あいた たま	COMPANY OF A	are a Mireday St	THE NUMBER	PRE FOR CARES	ALC: REVENUES	the rest first the	SCHEMIST 10-	 108 (1944)	1980/1417/081	Add + Rest > Built	200 Jan 1 - 1000	10	1	10.00		11		1
		I Ko	P1081+116	2471+18281A	101	index*	 Presson and Base Mill 1933 	010 010 010 010	COLUMN TAN	in the state	THETTOTAL DATA	The second second	and a structure of the	ALC: NOT THE REPORT OF	1110 22001 0	- set a retrainment	States of the second	100		The second s	-	Terrandoria de la construcción d
		formed and a data data	- Petri gena, a 1 art. 8 martin 1 artenia - 1 martin 1 artenia - 1 artenia 1 artenia - 1 artenia	ACCOUNT OF A	A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	A DESCRIPTION OF THE PARTY OF T	The second secon	and	And a second sec	A the second sec	A long of the long	 Weingerstein Weingerstein Weingerstein Weingerstein 	¹ Finge could be find that a short of the second could be set of the second could be set of the second	rest of a state of the state of the state of the state	The space of the second		and the second s	Annual Contraction	and a set	m(1010) m		an inplation of the second
		10+ 10 10	tic et-tication dive. Made and BBAC Name A	Linci High, Ridd 2009 Kin BBAL R	Inclusion and Inclusion and Inclusion and Inclusion	CELECTO CELECTO DEN- TELECTO TELECTO TELECTO	Pick American 201 American 2012 N N N	116 2011	78.12 The second	tili pa litee reich (20 7 Bis- R	10, a 10, a	4 Insertio Elite TRACE TRACE TRACE TRACE	titue bioretici itta e 100.12 Taranti	a trajenta BA aproper BASL SELL GRADE	and and a second	TRIL TRIL Tauruh Offic	Link Control of Contro	10.100 m		Zan : Alm : Dan :		76 H.C. Million Digital
10		D confide for games	T-11-FUEL	TARK	Tanan Ta	₩	茶椿	開、物	故縣地	<u>ل</u>	いた	助物 .	省に	条件	き雑言			100	-	NUM		ABV74
1.3		I,	TOR (NUM)	A SUBJECT	All and												-	Nin Nin	1 Post	ŧ	Not a	2 2
14.1		Carden The Brance Distance of the second	145	12 COL	12 20	100 100	12.00	10 March 10	No. 1 Internet of	100 March 100 Ma	00 00 00 00 00 00	100 100 100 100 100 100 100 100 100 100	10 Materia	12 K	1a i	i e Tere	12 11	100	0.38 . 4 c	6 <mark>4</mark> 5	-31	- 57
3 34		factors and the	100	argue .	3	. Term	- tria	1997	. 5 <u>8</u> -	- ģe	- 50	- 50	- 50	airt.	. 1. C		. g	in the	110	avera -	100	ala.
1.1		1 contraction of the second	1997	Cent	1111	101	80	1122	2 F	ż	1	i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	181	282	187.	La L		10	1.00	THE	LINK.	1811
-		Traditional	1.0714-91200	140	A CLUB OF CLUB	THE PARTY OF	111111	A 128410	NUT OF TAXABLE	in the second	410000	4144 B 41	014-007	010400	ACC REAL PROPERTY.	10110 - 11110 - 1110	1.1	604 B(n.) 1-	-	****		1000
3.3		Tar monte Para monte Para	88 ····	8	100	a	A CAREER	an more all	21 Linguist	a district	All address of	a Antoine an	ation and	131 Throws and Mile	la sur a ditta	2 · ·	a Refe	n n n n n n n n n n n n n n n n n n n	2	ata Sector		ALC: NO.
	The sould The sould are softened	Comer Comer	Rissi dina 1 Same bina di	VALUE DI BURN VALUE DI BURN VALUE DI CONT VALUE DI CONT VA	**************************************	No. 1 CONTRACT	A de la contra de	A DESCRIPTION OF A DESC	A PERSON A P	A CONTRACTOR OF A CONTRACTOR OF A CONTRACTOR OF A CONTRACTOR OF A CONTRACTOR A CONT	ALL ARCHIVES	 Notes of a life Notes of a life Notes of a life 	A REAL PROPERTY A	-	-	MINISTRATION MINISTRATICS MINISTRATICS MINISTRATICS	Automatical Control of	-MIC DEC	1 MILLING	THE STREET		PRESENTING AND A CONTRACT OF A
-		Annual Add Add a	1010-010	NIC 110	1001	10.00	AND INCOME.	110 110 100 100	AL DEPUTATION	1 100 1	A NU II	THE THE T	NU UN	100 000	1000000	101 100 101	100	100	The NET	0.000	148.01-00	0.0110
D and the	NOR. VOR. Mich Inc.	23		33	-	44	and	a de la composición de la comp		ain ain ain		a dia a dia dia dia dia dia dia dia dia	and an and an and an	the state of the s	antija nerita	11	and an and a second		1111	11		11
Distriction Dispersion	Quart and thick had- tioned age that had-	bath trig mage trig made	411	855		414	antike antike	100 m		1000		100 H 100 H	antia atta atta atta	100 m 100 m 100 m			And the second s		- 2.2			
fi pointes El pointes	formal applications:	and an other			-	411	400			414		a de la com	-			antes actes			111	11		-
Displaying in	the Party and American		a inte	and the second	the state	10.10	terias	in the	1000	uta uta	a barbar la barbar	to the local sectors	unite unite unite unite	to the	and an and an and an and an	ation total	to the second second	inter miles	14	to los	a line	-
D quite rue D quite rue D quite rue D quite rue	<u>*</u>	511項目			1000 A			to leas to leas to loca		nin nin nin nin nin nin nin nin nin nin		to fine to fine the fine to fine the fine to fine the fine to fine the fine to fine	utin trim utin trim utin trim	u fau u fau u fau u fau	antina antina antina	al cita	a cite of a cite		1235	2222		1
Distant of the	Distant Distant Distant Distant	the trace			antia.	111	antika antika	100				in the in the	with with with with	n title n toth	antita metric		Particle Section 1	and a second	a in	1.		111
Dipatria Dipatria	ter transition data frances 10 Object resplaces 10 Object resplaces			EA 64	E	144			į	1				1.444	- 7 1 4				ł	111	111	111
li berlite Bişekresi Ai vestesi	All Days and the L		μäΗ	転	Ж	同刊版	NOE	Ľ, Ľ			後子目	り板道	t, ±1	£,∃	小俠道	L, JKO		发快1	腔	1	a in a	1 1 1
D point out	the first shield furning the second s	Number of American	1 111		10.14	11 IN	unitas Victorias	10.000	1 100	wiss ho for	and the second s	to date the date to date the date	unios mias unios mias	ta tinu ta tinu	terfes	stat utat	Factor of the last	In Lot Market	10 101	to line a	a num	100
D and the	In First shield furn	Number Street	100		and and a	1012	antes antes	10.00	100	and and a		the first of the f	with the second	n dan n tita	antian article	and	Parties with a	NAME AND ADDRESS OF AD	100	100		
E and the	Di Para di Africo O Den regione	Ditar Instru- Rish brocket angli (111			11	11	10.0		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		n nie h nie n nie h nie	and the second	10 M	antita .		Partie and and a	and a state		11		11
1000	C (140, 000) (14 (140, 000) (14 14 Outo controlo	Total and and and a local and			100									100	1000	813 813						
0.000		the state along the state of th				123		「東京の		स्तर										53.83	10.00	11.0
the second se	the section and the section of the s	fal through they are a			3	83			1	E H		10.44.44	0	a tea	and							
D and its	in barres i alter 10 mars data i alter 11 mars i an tarres			313 212 313 212	111	04.8	anima anima anima	100 10 100 10 100 10		여면	는 Mai Ha	46.01	ĸ	10 100 10 100 10 100	antification of the second sec		1000		213	213	111	- 111



Figure 1 Results of permeation velocity and contact angle measurements using TiO₂ NPs (hydrophilic and hydrophobic trends).

Figure 2A PCA based on data of physicochemical properties of TiO₂ NPs.





Figure2B Dendrogram for PCA based on data of physicochemical properties of TiO₂ NPs.

Figure 3A Results of OPLS analysis of the relationship between data of physical properties and *in vitro* toxicity test results (h-CLAT) among TiO₂ NPs.



Figure 3B, 3C Results of OPLS analysis (loading plot) of the relationship between data of physical properties and *in vitro* toxicity test results (h-CLAT) : calculation of variables (physical properties) contributing to toxicity by bar graphing of loading plots.



3B) インパクトが大きく、エラーバーが小さい物性↓



Figure 4 PCA results of *in vivo* toxicity test results data between three TiO₂ NPs (MT-150A MT-500B AMT-100) collected from database of the MHLW GRANTS SYSTEM.



4A)

4B)

Loading Plot: IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng



AMT100だけに寄与している変数(投与条件)



4C)

Loading Plot: IgE_OVA2_12.5ng と IgG1_OVA2_12.5ng







Figure 5 Results of OPLS analysis of the relationship between *in vitro* h-CLAT toxicity test results data and *in vivo* toxicity test results among three TiO₂ NPs (MT-150A MT-500B AMT-100)



5B) Calculation of variables (dosing conditions) contributing to toxicity by bar graphing of loading plots.



Figure 6 Results of MOCA analysis between 3 blocks (3 samples/data of physical properties/*in vitro* h-CALT toxicity test results data/*in vivo* toxicity test results data)







6C)

Component	R2X	R2X(cum)	R2X	R2X(cum)	R2X	R2X(cum)
Model		0.993		1		0.712
Blocks	物性		毒性		皮膚_毒性	
Joint		0.993		1		0
1	0.7,	0.733	0.67	0.67		
2	0.26	0,993	0.33	1		
Uniqu		0		0		0.712
1					0.712	0.712