

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（TiO₂ NPs: 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、物理化学的性状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（TiO₂ NP）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ものもある。これまで、TiO₂ NP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】

➤ 物理化学的性状データは、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】

- 成分分析 (化学分析)：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)
- 親水性および疎水性評価 (表面化学分析)：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: $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$ 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。

- 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⇔②*in vitro* 毒性試験結果⇔③*in 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・整理された物理化学的

性状データシートおよび *in vitro / in vivo* 有害性情報シートは、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)

➤ 定性分析は日本電子(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(ニ

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°C×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 (Table 4)。
- 表面化学分析は、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)。

- ・粒体浸透速度測定は、協和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500 (温度: 26±1°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°C湿度: 40±5°C、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 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 IL-1β、IL-1α 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 インフレイマソーム活性を介した IL-1β 産生 (酸化チタン A.B.C)、THP-1 マクロファージか

らの TNF α 、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(mV)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、Endpoint 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暴露直後で 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、本実験の吸入暴露条件では、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、暴露終了日 (0 週) から暴露終了後 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。

▶ 免疫毒性試験

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(1-2 μ g)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 μ g 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 μ g、125 μ g 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、今年度を実施した 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、今年度を実施した 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。

7. *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 法による解析結果から、IgE_OVA2_125ng 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 Loadings 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_OVA2-125 μg, IgG1_OVA2-125 μg, IgE_OVA2-12.5 μg, IgG1_OVA2-12.5 μg, IgE_OVA2-1.25 μg, IgG1_OVA2-1.25 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。

9. ①物性⇔②*in 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 $tj(\text{avg})[1]$ 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関連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⇔②*in vitro* 毒性試験データ⇔③*in 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隙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、検体調整で一樣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TiO₂NPs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での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。*in vivo*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*in vitro*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

- 1) 大野彰子, 渡邊昌俊, 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回日本毒理学学会学術集会 (2020.6.29-7.1, web開催)
- 2) ○ Ohno A, 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)
- 3) Fukuhara K, Ohno A: Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
- 4) 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 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)
- 5) 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, 大野彰子: 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, Ohno A, Hirose A, Ashikaga T: Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-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

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

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 2 Target 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害性カテゴリー評価基盤の構築	相磯成敏	- 平成29 (2017) 年度_201725011A総括 - 平成30 (2018)年度_201825007A総括	TiO ₂ (AMT-600)
ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究	広瀬明彦	- 平成27 (2015) - 29 (2017) 年度_201725017B総合研究報告書 - 平成27 (2015) 年度_201524021A総括 - 平成28 (2016) 年度_201624019A総括 - 平成29 (2017) 年度_201725017A総括	チタン酸カリウムTiO ₂ (anatase型及びrutile型)
食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究	小川久美子	- 平成29 (2017) - 令和元 (2019) 年度_201924002B 総合研究報告書 - 平成29 (2017) 年度_201723022A総括 - 平成30 (2018) 年度_201823008A総括 - 令和元 (2019) 年度_201924002A総括	TiO ₂
抗原性物質への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露の影響に関する評価手法の開発研究	安達玲子	- 平成26 (2014) - 平成28 (2016) 年度_201624004B 総合研究報告書 - 平成26 (2014) 年度_201428014A総括 - 平成27 (2015) 年度_201524010A総括 - 平成28 (2016) 年度_201624004A総括	TiO ₂
生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案	渡邊昌俊	- 平成30 (2018) 年度_201825013A総括 - 令和元 (2019) 年度_201926009A総括	TiO ₂ (MT-150A、MT-500B、AMT-100、TKP-102、AMT-600)

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

	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 4 Results of multipoint BET nitrogen adsorption analysis using TiO₂ NPs.

	比表面積 (m ² /g)	メソポー領域 BJH 解析 (1~100nm)	
		細孔容積 (cm ³ /g)	細孔径※1 (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 (Semipositive)	Positive	Positive	Positive (Semipositive)
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(%)	CD54MaxS	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)	CD54MaxConc	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(%)	CD86MaxSR	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

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

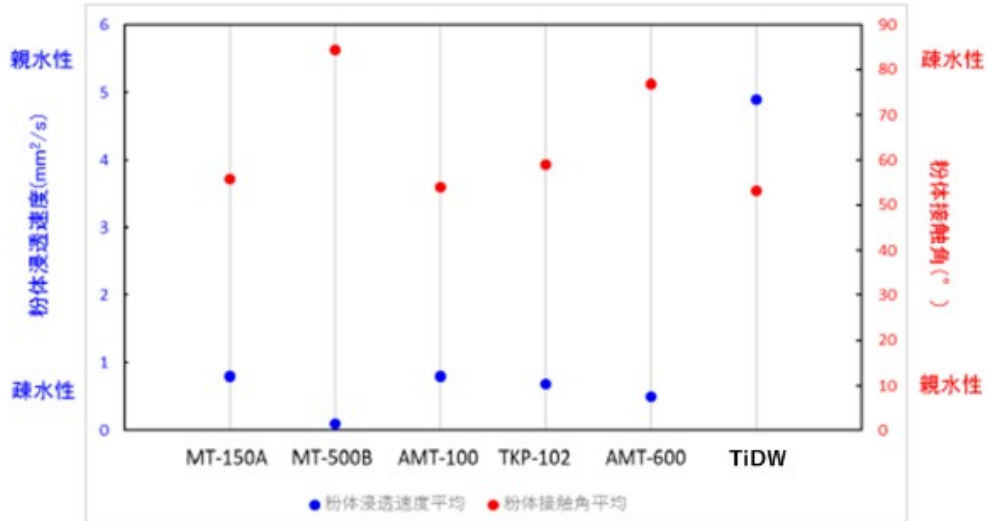


Figure 2A PCA based on data of physicochemical properties of TiO₂ NPs.

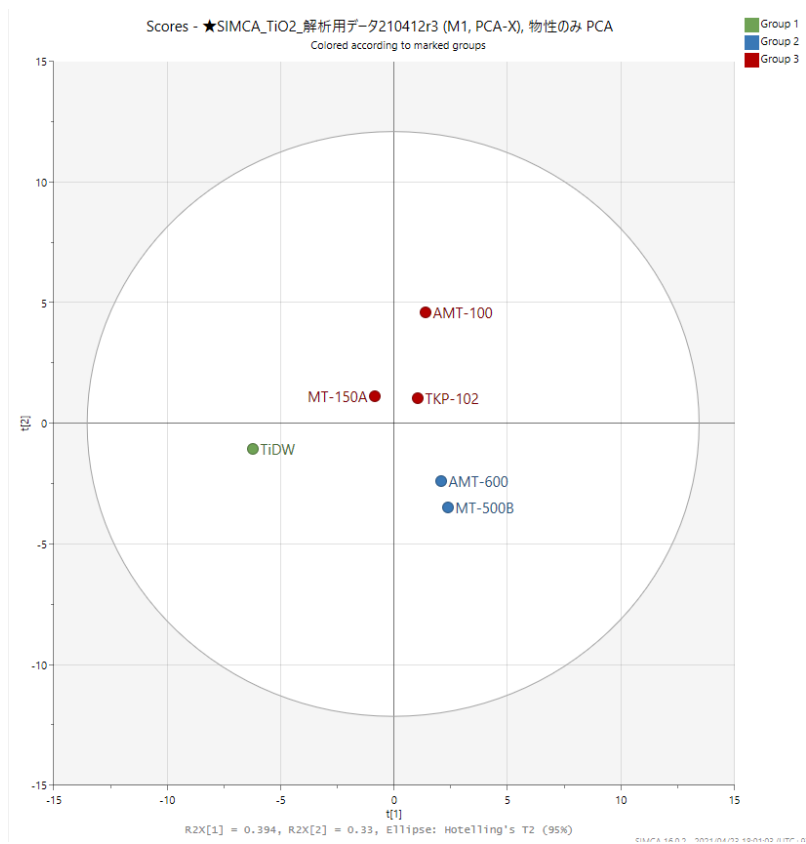


Figure 2B Dendrogram for PCA based on data of physicochemical properties of TiO₂ NPs.

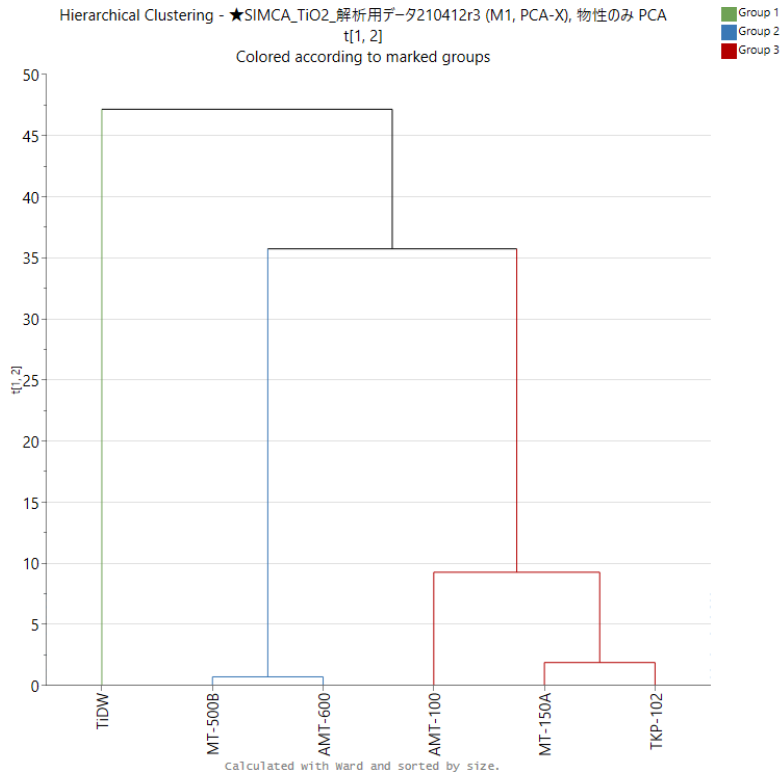


Figure 3A Results of OPLS analysis of the relationship between data of physical properties and *in vitro* toxicity test results (h-CLAT) among TiO₂ NPs.

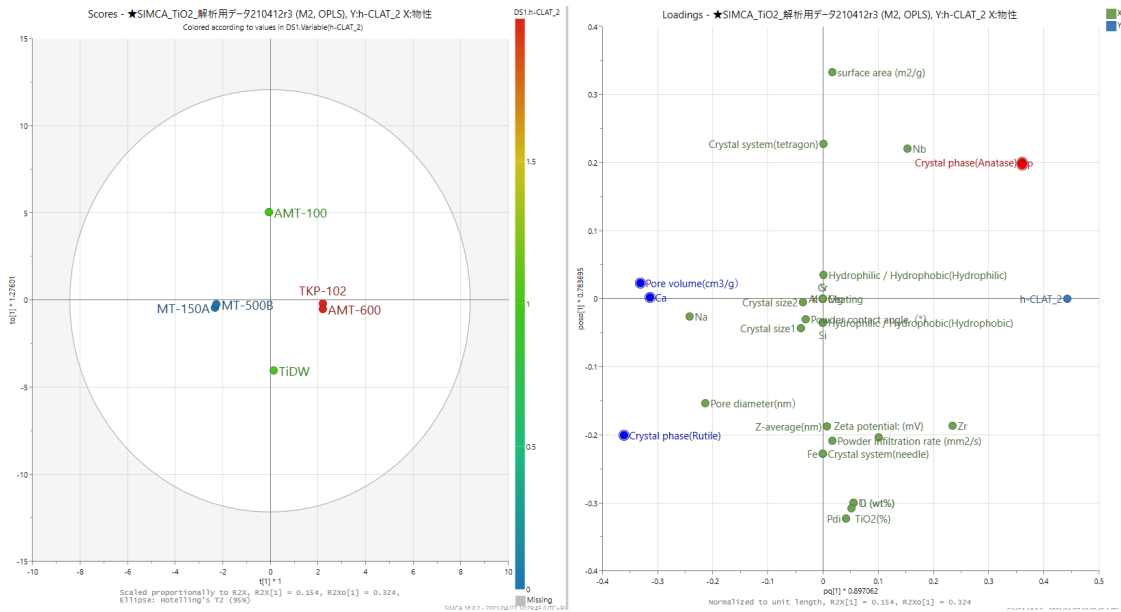
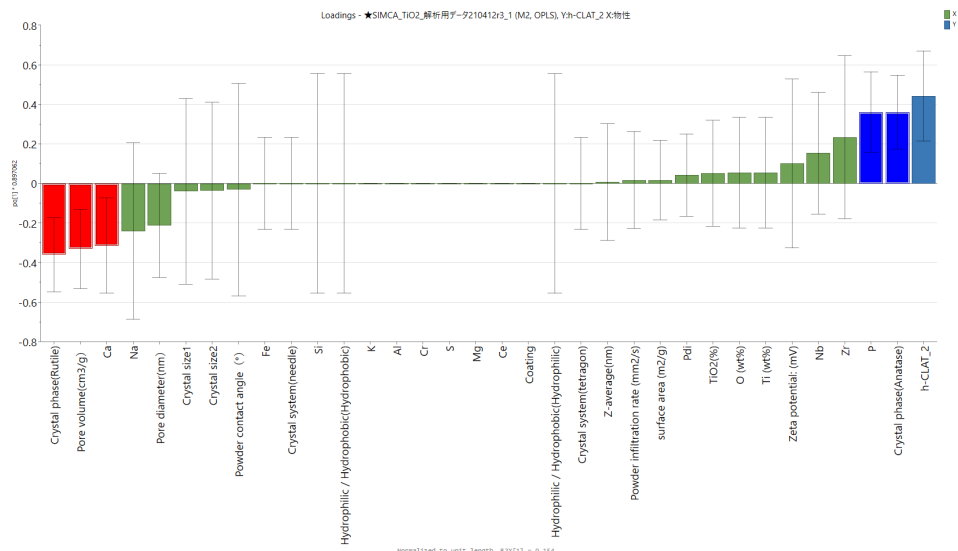


Figure 3B, 3C Results of OPLS analysis (loading plot) of the relationship between data of physical properties and *in vitro* toxicity test results (h-CLAT) : calculation of variables (physical properties) contributing to toxicity by bar graphing of loading plots.

3B) インパクトが大きく、エラーバーが小さい物性↓



3C) インパクトおよびエラーバーが大きい物性↓

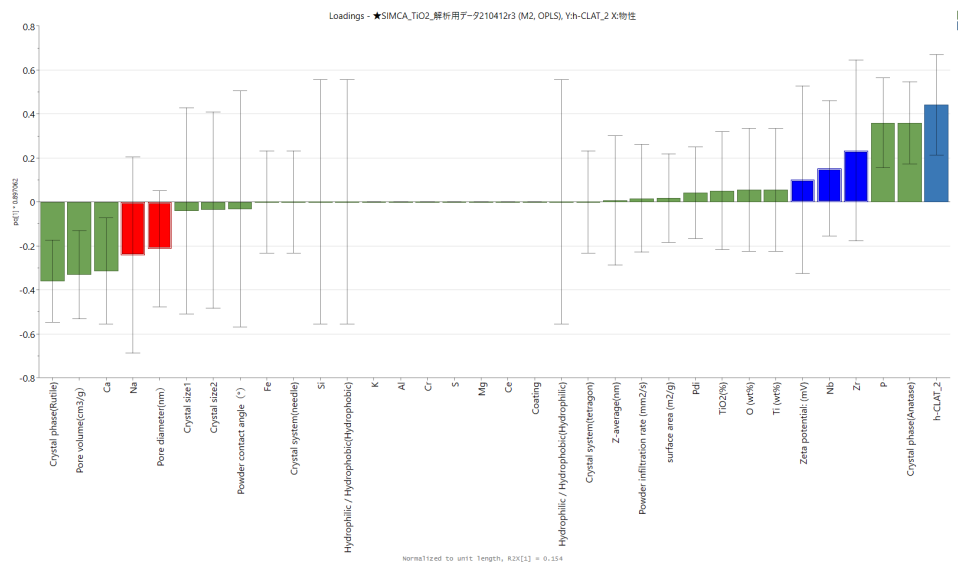
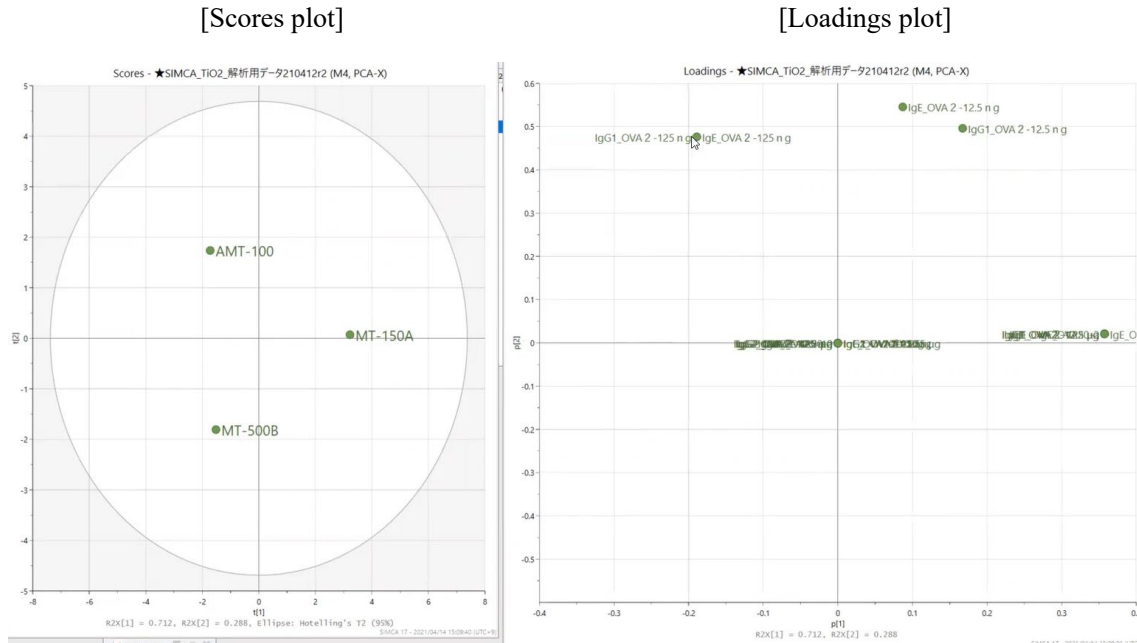


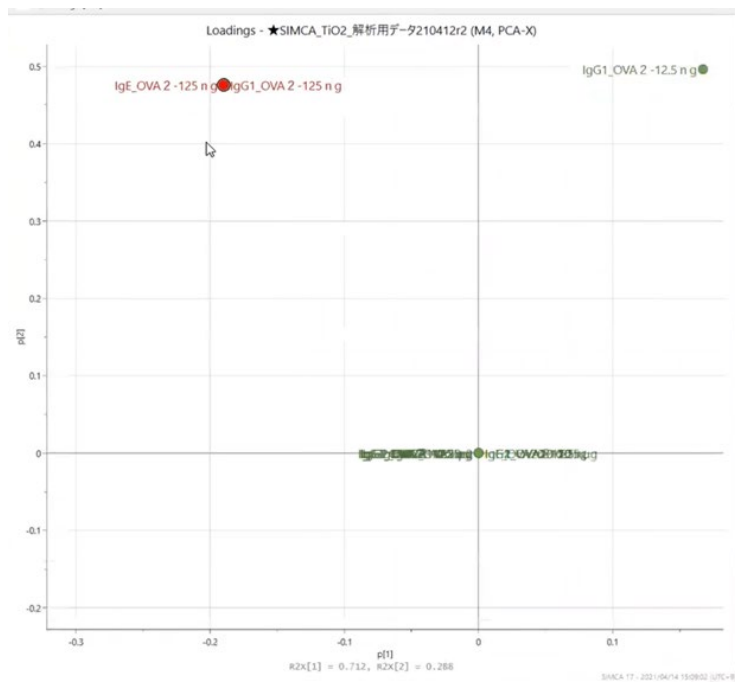
Figure 4 PCA results of *in vivo* toxicity test results data between three TiO₂ NPs (MT-150A MT-500B AMT-100) collected from database of the MHLW GRANTS SYSTEM.

4A)

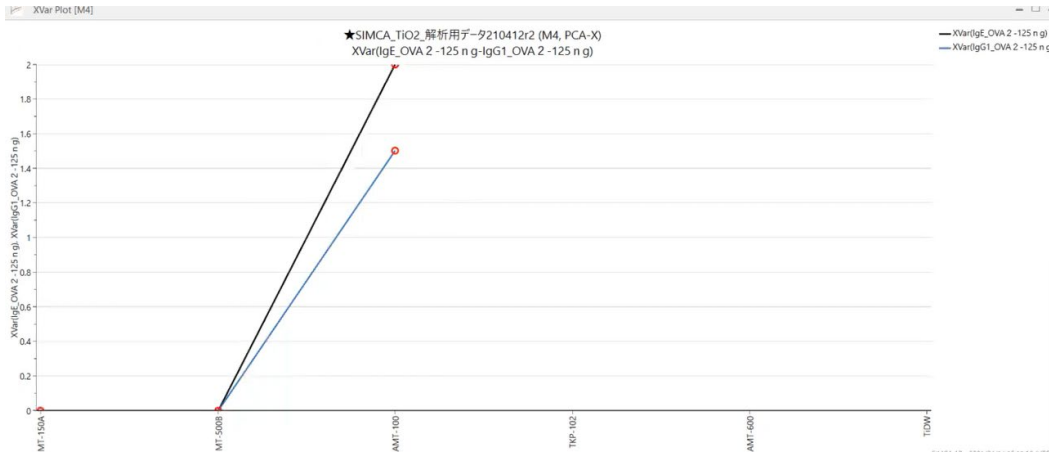


4B)

Loading Plot: IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng

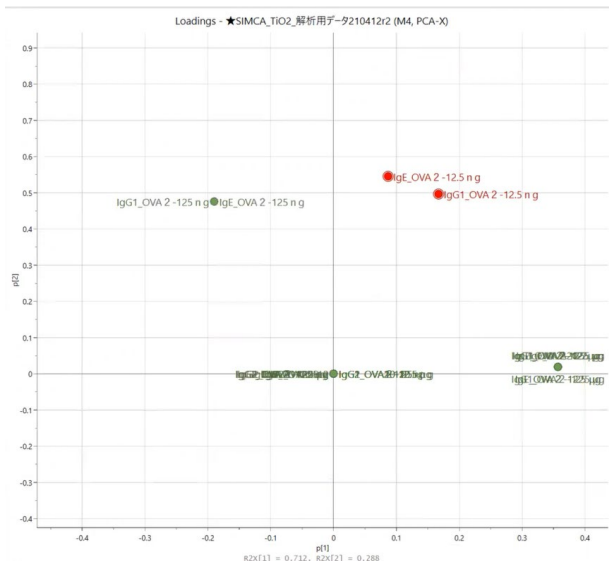


AMT100 だけに寄与している変数 (投与条件)



4C)

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



AMT100 と MT150A に寄与している変数 (投与条件)

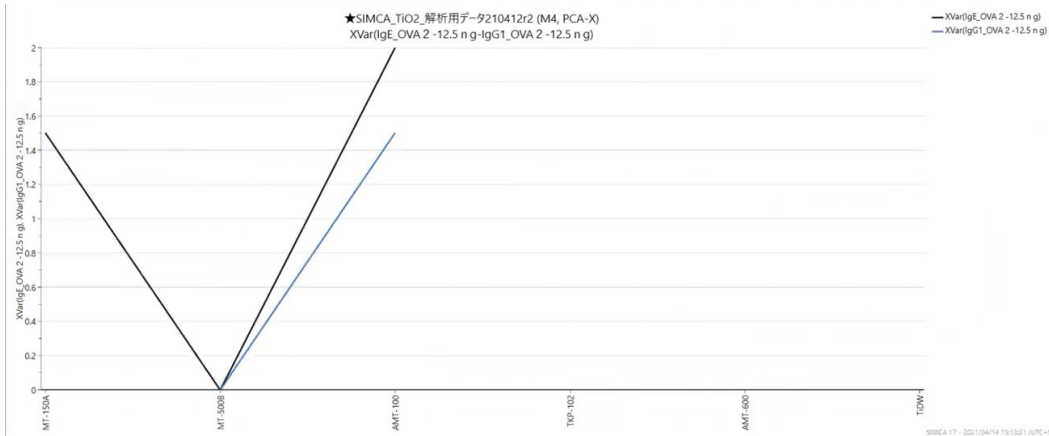
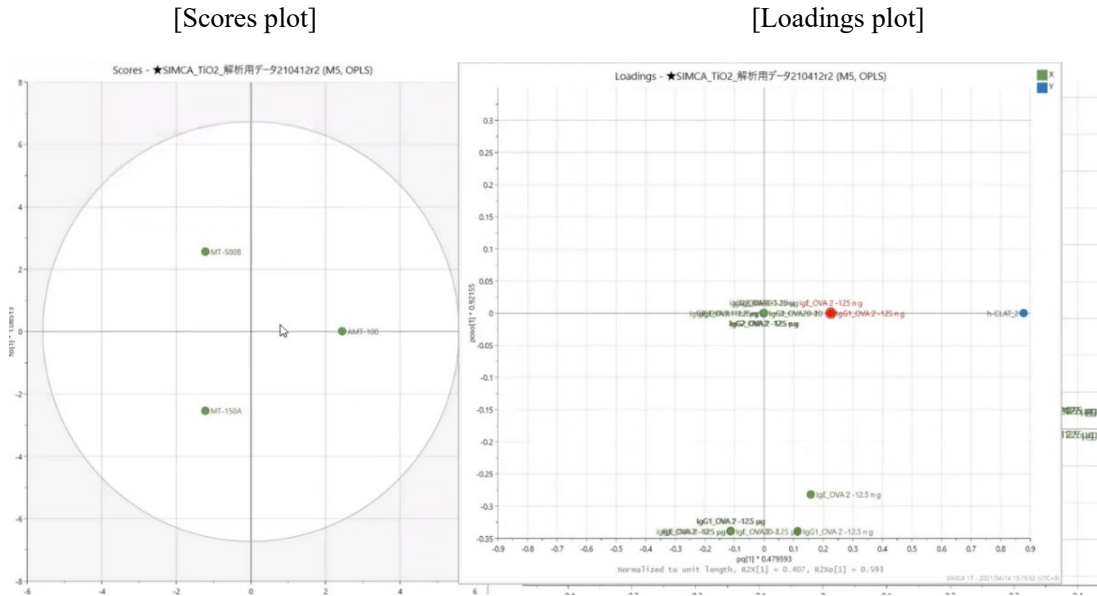


Figure 5 Results of OPLS analysis of the relationship between *in vitro* h-CLAT toxicity test results data and *in vivo* toxicity test results among three TiO₂ NPs (MT-150A MT-500B AMT-100)

5A)



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

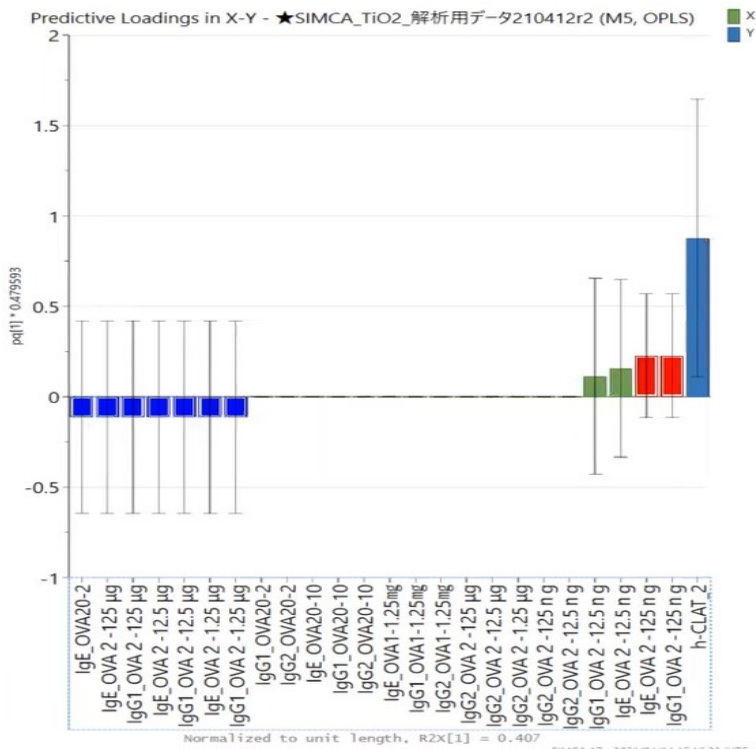
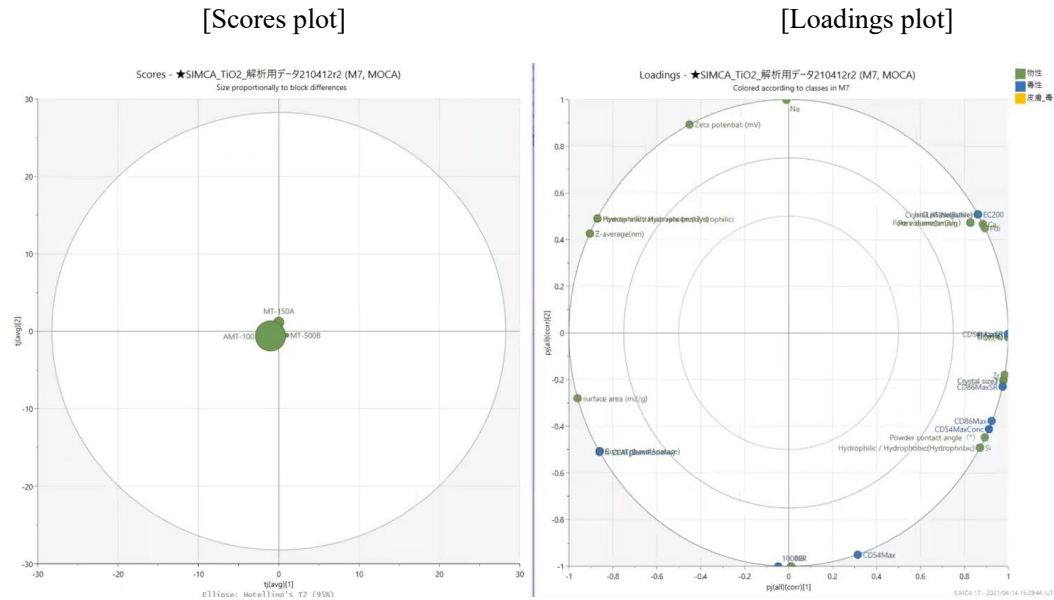
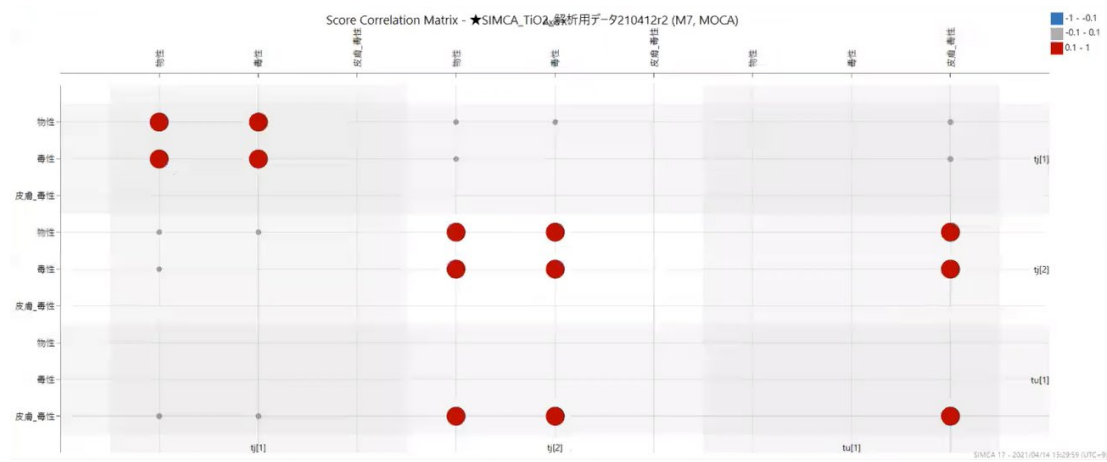


Figure 6 Results of MOCA analysis between 3 blocks (3 samples/data of physical properties/*in vitro* h-CALT toxicity test results data/*in vivo* toxicity test results data)

6A)



6B) Score Correlation Matrix



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