

肝臓、腎臓、脾臓及び嗅球を含む脳における Ti レベルは検出限界 (LOD: TiO₂として0.5 μg/tissue sample) 以下であった。肺及び縦隔リンパ節で Ti が検出された。ナノ TiO₂ 暴露後に TiO₂ として、肺では暴露直後に 2025 μg、14 日後に 1547 μg、縦隔リンパ節では暴露直後に 2.2 μg、14 日後に 8.5 μg が検出された。また、顔料グレード TiO₂ 暴露後に TiO₂ として、肺では暴露直後に 9182 μg、14 日後に 7257 μg、縦隔リンパ節では暴露直後に 8.2 μg、14 日後に 108 μg が検出された。ナノ及び顔料グレード TiO₂ ともに最終投与直後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の多形核白血球の増加及び肺に病理組織学的中等度の好中球性炎症がみられたが、14 日後にはこれらは回復傾向にあった。ナノ TiO₂ 暴露後の回復傾向は顔料グレード TiO₂ に比べて強かった。

C57BL/6BomTac マウス (22-23 匹/群) の妊娠 8-18 日の 1 日 1 時間、42 mg/m³ (デンマークの 8 時間加重平均職業暴露限界に相当) の UV-titan L181 (ルチル型: Zr, Si 及び Al 処理、ポリアルコール表面修飾、TiO₂: 70.8%, Zr: 8.7%, Si: 5.6%, Al: 2.4%, Na: 0.5%、揮発物質: 5.2%、X 線解析平均サイズ: 20.6 nm、比表面積: 107.7 m²/g、Kemira) を吸入暴露した (Hougaard *et al.*, 2010)。Ti 濃度を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により測定した (LOD: Ti として 0.25-5 μg/g) ところ、暴露後 5 及び 26-27 日の母動物 (F₀) の肺でそれぞれ 38 及び 33mg/kg の Ti が検出されたが、F₀ 及び児動物 (F₁) の肝臓、F₁ の胃内の母乳中には Ti は検出されなかった。TiO₂ 暴露群における F₀ の肺絶対及び相対重量、BALF 中の好中球数及びリンパ球数は増加し、マクロファージ数は減少していた。親 F₀/児 F₁ の生殖発生毒性の指標には TiO₂ 暴露の影響はみられなかった。11-16 週齢 F₁ のモリス水迷路試験では TiO₂ 暴露の影響は認められなかったが、TiO₂ 暴露群の F₁ において、14 週齢でのオープンフィールド

試験で雄の中央部への侵入頻度及び雌の中央部での滞在時間の減少がみられ、4 か月齢での音響驚愕反応試験で雌に強いプレパルス抑制がみられた。生後 19 週の TiO₂ 暴露群の雄 F₁ を無処置の雌 C57BL マウスと交配したところ、初回 F₂ 児出産までの日数が延長する傾向がみられた。

これらの実験結果は、妊娠マウスの肺に炎症反応がみられる濃度を吸入暴露したとき児の行動及び生殖に変化が惹起される可能性を示しているが、吸入暴露されたナノ及び顔料グレード TiO₂ は胸腔外の組織には移行しないことを示唆している。

3. 鼻腔内注入 (TABLE 1)

ナノ TiO₂ (ルチル型、サイズ: 21 または 71 nm、Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.) またはファイン TiO₂ (アナターゼ型、サイズ: 155 nm、Zhonglian Chemical Medicine Co.) を蒸留水に懸濁し、5 匹/群の CD-1 (ICR) マウスに 25 μg /mouse/day を 5 日間毎日、その後 10 μg /mouse/day を隔日に鼻腔内注入した (Wang *et al.*, 2007a)。1 カ月後のマウス嗅球切片を用いて、TiO₂ 分布をシンクロトロン放射 X 線蛍光により測定した。ナノ及びファイン TiO₂ とも嗅球神経線維層、嗅球室及び顆粒細胞層に分布していた。ファイン TiO₂ ではナノ TiO₂ に比べて嗅球に移行しやすく、より広範な分布がみられた。

ナノ TiO₂ (ルチル型、表面無修飾、平均サイズ: 71 nm、表面積: 23 m²/g、純度: > 99%、Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.) またはファイン TiO₂ (アナターゼ型、純度: > 99%、平均サイズ: 155 nm、表面積: 10 m²/g、Zhonglian Chemical Medicine Co.) の 500 μg /mouse/day (Tiとして300 μg /mouse/day) を 6 匹/群の雌 CD-1 (ICR) マウスに、隔日に、15回鼻腔内注入した (Wang *et al.*, 2008a)。TiO₂ は MilliQ 水に懸濁し、15-20 分間超音波処理し、2-3 分間攪拌後、マウスの鼻腔内に注入した。最

終注入後 24 時間に脳を採取し、ICP-MS により Ti レベルを測定した (LOD: Ti として 0.074 ng/mL)。Ti の主な標的部位は海馬及び嗅球であり、Ti レベルは海馬で最も高く (71 nm TiO₂: 約 280 ng/g、155 nm TiO₂: 約 240 ng/g)、次いで嗅球で高く (71 nm TiO₂: 約 200 ng/g、155 nm TiO₂: 約 190 ng/g)、小脳 (71 nm TiO₂: 約 130 ng/g、155 nm TiO₂: 約 170 ng/g) 及び大脳皮質 (71 nm TiO₂: 約 85 ng/g、155 nm TiO₂: 約 110 ng/g) で検出された。MilliQ 水を処置した対照群では、いずれの部位でも約 50 ng/g の Ti が検出された。TiO₂ 投与マウスでは、海馬に肥大した細長い錐体細胞、不規則錐体層が観察され、CA4 部位でグリア細胞繊維性産生タンパク質レベルの増加がみられ、全脳で脂質過酸化反応、タンパク質酸化、カタラーゼ活性上昇、グルタミン酸/一酸化窒素の過剰放出等の酸化ストレスに関連した変化がみられた。

上記の Wang *et al.* (2008a) の実験と同様のナノまたはファイン TiO₂ 500 µg/mouse/day を隔日に、1、5、10 または 15 回、6 匹/群の雌 CD-1 (ICR) マウスの鼻腔内注入し、それぞれの 1 日後 (2 日、10 日、20 日、30 日) に Ti レベルを ICP-MS により測定した (Wang *et al.*, 2008b)。いずれの TiO₂ とも、いずれの検査時点においても Ti は嗅球、海馬、大脳皮質及び小脳で検出された。嗅球中の Ti レベルは注入回数に伴って徐々に増加した。海馬中の Ti レベルは 2 日で有意に高くなり、10 日及び 20 日では Ti レベルが維持し、最終注入後に最も高くなった。大脳皮質では、Ti レベルは 10 日で有意に高くなり、30 日まで同様なレベルが保たれていた。小脳では注入回数の増加に伴って Ti レベルの上昇がみられた。腎糸球体萎縮、腎ボーマン嚢腔における間質性炎症細胞の浸潤及び縮小がみられたが、心臓、肝臓及び脾臓には病理学的変化はみられなかった。脳の各部位においては Wang *et al.* (2008a) と同様な変化が観察された。ルチル型 71 nm TiO₂ の鼻腔内注入

では炎症性サイトカイン (IL-1β 及び TNF-α) レベルはわずかに上昇しただけであったが、アナターゼ型 155 nm TiO₂ 注入後の血清 IL-1β 及び脳 TNF-α レベルの有意の上昇がみられた。

これらの実験結果は、鼻腔内注入されたナノ及びファイン TiO₂ とも、嗅球を介して脳に移行し、海馬に沈着することを示しており、中枢神経系への影響はルチル型 71 nm TiO₂ よりもアナターゼ型 155 nm TiO₂ で強いことを示唆している。

4. 経皮暴露 (TABLE 2 及び TABLE 3)

ヒトボランティアによる TiO₂ の経皮暴露実験結果を TABLE 2 に示した。

皮膚手術に来院した 13 人のボランティア (平均 71 歳、白人男性 9 人及び白人女性 4 人) の皮膚損傷部位の周囲にマイクロファイン TiO₂ を 8% 含むサンスクリーンを手術の 2 日前まで、9-31 日間、朝と正午に塗布し、手術時に塗布部位の皮膚を採取した (Tan *et al.*, 1996)。サンスクリーン塗布による皮膚に対する有害影響はみられなかった。塗布群の真皮で Ti レベルが増加したが、対照群と比べて有意差はなかった。本論文には TiO₂ の性状に関する記載はなかった。

マイクロ粒子 TiO₂ (UV-Titan M 160) を含有する水/油エマルジョン・サンスクリーン (L'Oréal) 2 mg/cm² をボランティアの手のひらに 4 日間 (13 日目に 1 日 5 回、4 日目に 1 回) 塗布し、1 時間後に皮膚を採取した (Lademann *et al.*, 1999)。Ti は角質層及び毛包で検出されたが、毛包間表皮には検出されなかった。本論文には TiO₂ の性状や含量等に関する記載はなされていないが、マイクロ粒子 TiO₂ はヒトの皮膚を通過しないことが示されている。

マイクロファイン TiO₂ 分散水またはオクチルパルミテート分散液 (マイクロファイン TiO₂ 40% 含有、Tioxide specialities Ltd.) または異なったシリコン油を使用した 2 種類の水/油エマルジョン (マイクロファイン TiO₂ 5% 含有) 2

TiO₂の体内分布TABLE 2. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after dermal application in human volunteers.

Materials / Characteristics	Exposure		Sampling / biopsy	Findings	References
	Duration / Frequency	Doses*			
8% Microfine TiO ₂ in sunscreen	9-31 days		2 days after last application	No significant elevation of Ti levels in dermis.	Tan <i>et al</i> , 1996
Microparticle UV-Titan M 160 (L'Oréal) in emulsion	4 days (5 times/day on days 1-3, once/day on day 4)	2 mg emulsion/cm ²	1 h after application	Detection of Ti in stratum corneum and hair follicles, but not inter follicular epidermis. No gross morphological abnormalities.	Lademann <i>et al</i> , 1999
40% Microfine TiO ₂ in octyl palmitate or water dispersion (TiOxide Specialities Ltd.)	Single (45 min)	2 µL dispersion or emulsion/cm ²	24 h after application	Detection of Ti in stratum corneum after application of dispersions in water or octyl palmitate. Deeper penetration of Ti after application of dispersion in octyl palmitate.	Bennat and Müller-Goymann, 2000
5% Microfine TiO ₂ in two types of emulsions				No penetration into skin.	
4% T805 (TiO ₂ , 20 nm in mean particle size, hydrophobically coated with trimethyloctylsilan, Degussa) in emulsion	Single (6 h)	4 mg emulsion/cm ² (160 µg TiO ₂ /cm ²) (11.2 cm ²)	6 h after application	Deposition of TiO ₂ on outmost surface of stratum corneum, but not deeper stratum corneum layer.	Pflücker <i>et al</i> , 2001; Schulz <i>et al</i> , 2002
4% Eusolex T-2000 (ultrafine TiO ₂ , 10-15 nm in mean size of primary particles, 100 nm in size of secondary aggregates, coated with Al ₂ O ₃ and SiO ₂ , Merck) in emulsion					
4% Tioveil AQ-10P (hydrophilic TiO ₂ , 100 nm in size, coated with alumina and silica, Solaveil) in emulsion					
3% T805 (approx. 20nm in diameter, coated with trimethyloctylsilan, Degussa) in emulsion	Single	3 mg emulsion/cm ² (60 µg TiO ₂ /cm ²)	5 h after application	Absence of TiO ₂ penetration into skin layers. Accumulation of TiO ₂ in upmost layer of stratum corneum.	Mavon <i>et al</i> , 2006

*: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

µL/cm² を若い健康な女性ボランティアの前腕の腹側に塗布し、45 分後に分散液またはエマルジョンをふき取って、塗布 24 時間後に皮膚表面を採取した (Bennat and Müller-Goymann, 2000)。TiO₂ の水またはオクチルパルミテート分散液を塗布したとき角質層で Ti が観察され、オクチルパルミテート分散液の塗布後に角質層のより深部で Ti が観察されたが、TiO₂ 水/油エマルジョンを塗布したときには Ti の皮膚への侵入は認められなかった。本論文の記述から、TiO₂ の性状等に関する情報は得られなかった。

T805 (微粉末化 TiO₂、平均粒子サイズ：20 nm、形状：立方体、トリメチルオクチルシラン表面修飾により疎水化、Degussa)、Eusolex T-2000 (ウルトラファイン TiO₂、一次粒子の平均サイズ：10-15 nm、二次凝集体サイズ：100 nm、形状：針状、非共有結合 Al₂O₃ (8-11%) /SiO₂ (1-3%) により表面修飾、両親媒性、Merck) または Tioveil AQ-10P (水及びプロピレングリコールに親水性分散した TiO₂、サイズ：100 nm、

形状：針状、4.25% アルミナ及び 1.75% シリカにより表面修飾、Solaveil) を 4% 含有したエマルジョン 4 mg/cm² (TiO₂ として 160 µg/cm²) をボランティアの前腕 11.3 cm² に 6 時間塗布し、試験部位の中央部をバイオプシーした (Pflücker *et al*, 2001; Schulz *et al*, 2002)。採取した皮膚組織は 4 °C、36 時間培養し、切片を作成して皮膚透過性について光学及び電子顕微鏡検査を行った。TiO₂ の粒子サイズ、形状及び表面修飾は皮膚吸収に影響を及ぼさなかった。微粉末化 TiO₂ は角質層の最も外側に沈着し、角質層の深部では観察されなかった。

T805 (平均直径：約 20 nm、トリメチルオクチルシラン表面修飾により疎水化、Degussa) 3% を含む水/油エマルジョン 2 mg/cm² (TiO₂ として 60 µg/cm²) を、3 人の健康な女性ボランティア (平均年齢 28 歳) の上腕部 11.3 cm² に 5 時間塗布した (Mavon *et al*, 2006)。TiO₂ は皮膚を通過せず、角質層の最外側に蓄積していた。

TABLE 3. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after dermal application in experimental animals.

Animals	Materials / Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References	
		Duration /Frequency	Doses*				
Hairless Wistar Yagi rats	10% ST-01 (uncoated anatase TiO ₂ nanoparticles, 26.4 nm in average size of primary particles, 392 nm in average size of aggregate particles, Ishihara Sangyo, Ltd.) in emulsion	Single application	60 mg emulsion/rat (15 cm ²) (6 mg TiO ₂ /rat)	4, 24, 72 and 168 h after application	TiO ₂ confined to stratum disjunctum of interfollicular epidermis and keratinized layer of follicular infundibulum and nor in viable skin.	Adachi <i>et al.</i> , 2010	
BALB/c nu/nu hairless mice	5% Nano TiO ₂ (anatase, hydrophobic, 10 nm in particle size, 160 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) in emulsion	60 consecutive days (3 h/day)	24 mg emulsion/mouse (3 cm ² /day) (1.2 mg TiO ₂ /mouse/day)	24 h after last application	Accumulation of Ti in spleen, heart and liver. Decreased body weight and increase relative weight of liver and spleen. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Only small trace of white blood cells in heart.	Wu <i>et al.</i> , 2009	
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophilia, 25 nm in particle size, 80 m ² /g in surface area, 99.6% purity, Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				Accumulation of Ti in spleen, heart and liver. Decreased body weight and increase relative weight of liver and spleen. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Focal necrosis in liver.		
	5% P25 (75% anatase and 25% rutile, hydrophilia, approx. 21 nm in particle size, 50 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Degussa) in emulsion				Accumulation of Ti in spleen, heart, liver, lung and brain. Decreased body weight and increase relative weight of liver and spleen. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Focal necrosis in liver.		
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophobic, 60 nm in particle size, 40 m ² /g in surface area, 99.6% purity, Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				Accumulation of Ti in spleen, heart, liver and lung. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Focal necrosis in liver.		
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophobic, 90 nm in particle size, 40 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				No accumulation of Ti in organs. No toxicological changes.		
NZW rabbits	20% TiO ₂ (<2-20 μm in particle size in suspension) in suspension	3 applications (2 h/day)	0.2 mL suspension/rabbit (2 cm ² /day)	24 h after last application	Ti deposition in outer layers of stratum corneum and outer aspects of hair follicles, but not in deeper aspects of epidermis or dermis. No erythema or other adverse reactions in skin.	Lansdown and Taylor, 1997	
Pig (male)	5% Nano TiO ₂ (anatase, hydrophobic, 5 nm in particle size, 200 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) in emulsion	30 consecutive days	24 mg emulsion/pig (3 cm ² /day) (1.2 mg TiO ₂ /pig/day)	24 h after last application	Detection of TiO ₂ particles in stratum corneum, stratum granulosum, pickle cell layer and basal cell layer, but not in dermis. Pathological changes in cell structure. No irritation.	Wu <i>et al.</i> , 2009	
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophobic, 60 nm in particle size, 40 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				Detection of TiO ₂ particles in stratum corneum, stratum granulosum and pickle cell layer, but not in dermis. Pathological changes in cell structure. No irritation.		
Yucatan minipigs (female)	4.7% T-Lite SF (rutile, 20-30 nm in diameter and 50-150 nm in length, coated with aluminium hydroxide/dimethicone copolymer, BASF) in cream	Total of 22 days (4 times daily, 5 days/week)	Total of 176 mg cream/cm ² (8.27 mg TiO ₂ /cm ²)	24 h after last application	Increased levels of Ti in epidermis including stratum corneum and upper follicular lumen. No increased levels of Ti in lymph nodes or liver. No toxicological changes in skin.	Sadrieh <i>et al.</i> , 2010	
	6.1% P25 (anatase/rutile, 30-50 nm in particle size, uncoated, Degussa) in cream						Total of 176 mg cream/cm ² (10.74 mg TiO ₂ /cm ²)
	5.6% CR-50 (rutile, 300-500 nm in particle size, uncoated, Ishihara Corporation) in cream						Total of 176 mg cream/cm ² (9.86 mg TiO ₂ /cm ²)

* : Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

このように、ヒトボランティアによる試験では皮膚に塗布されたナノ及び顔料グレード TiO₂ とともに角質層及び毛包までは侵入するが、真皮までは到達しないことが示されている。

実験動物を用いた TiO₂ の経皮暴露実験結果を TABLE 3 に示した。

8 週齢の雄ヘアレスラット (体重 202-267 g、Hairless Wistar Yagi ラット、日本 SLC) の背部皮膚 15 cm² に 1 cm² 当たり 4 mg の 10% の TiO₂ ナノ粒子 (ST-01、アナターゼ型、表面無修飾、Ishihara Sangyo Ltd.) を含む水/油エマルジョンを単回塗布 (TiO₂ として 6 mg/rat)、

4, 24, 72 または 168 時間後に皮膚サンプルを採取した (Adachi *et al.*, 2010)。TiO₂ の一次粒子の平均サイズは 26.7 nm、凝集粒子の平均サイズは 391.6 nm であった。TiO₂ は毛包間表皮の剥離層及び毛漏斗角質化層に局在していたが、表皮の生細胞領域には認められず、細胞の変化も観察されなかった。

7-8 週齢の BALB/c nu/nu ヘアレスマウス (6 匹/群) の背部皮膚 3 cm² に、ナノ TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ: 10 nm、表面積: 160 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.)、ナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 25 nm、表面積: 80 m²/g、純度: 99.5%、親水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.)、P25 (アナターゼ型 75% + ルチル型 25%、粒子サイズ: 約 21 nm、表面積: 50 m²/g、純度: 99.5%、親水性、Degussa)、ナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 60 nm、表面積: 40 m²/g、純度: 99.6%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) またはナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 90 nm、表面積: 40 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) 5% を含むエマルジョン 24 mg (TiO₂として 1.2 mg /mouse/day) を連続 60 日間塗布 (3時間/日) し、最終塗布の 24 時間後に剖検した (Wu *et al.*, 2009)。原子吸光分析 (AAS) により Ti 濃度を測定した (LOD: Ti として 20 ng/mL)。Ti の蓄積は、10 nm 及び 25 nm TiO₂ 塗布後の心臓、肝臓及び脾臓、P25 塗布後の心臓、肝臓、脾臓、肺及び脳、60 nm TiO₂ 塗布後の心臓、肝臓、脾臓及び肺にみられた。しかし、90 nm TiO₂ 塗布ではこれらの組織への Ti の蓄積はみられなかった。10 nm TiO₂、25 nm TiO₂ 及び P25 塗布により、体重の低下、肝臓及び脾臓の比重量の増加がみられた。皮膚では、10 nm、25 nm 及び 60 nm TiO₂、P25 塗布により過剰な角質化、真皮薄化及びしわ表皮がみられ、10 nm TiO₂ 及

び P25 塗布後に顕著であった。肝臓では、25 nm TiO₂ 及び P25 塗布により限局性壊死が観察された。心臓では 10 nm TiO₂ 塗布後だけに微量の白血球がみられたが、他の TiO₂ 塗布後の心臓には病理組織学的変化は認められなかった。脾臓で局所的なマクロファージの増殖、肺でわずかな肥厚がみられただけであり、脳、腎臓及び嚢リンパ小節に異常は認められなかった。60 nm TiO₂ 塗布では異常は観察されなかった。脂質酸化ストレスのバイオマーカーであるマロンジアルデヒド (MDA) レベルの上昇が 10 nm、25 nm 及び 60 nm TiO₂、P25 塗布後の皮膚、10 nm 及び 25 nm TiO₂、P25 塗布後の肝臓で認められた。また、スーパーオキシドデスムターゼ (SOD) レベルの低下が 10 nm TiO₂ 及び P25 塗布後の皮膚及び肝臓でみられた。これらのことは、TiO₂ の蓄積した組織における病理学的変化と酸化ストレスとの関連性を示唆している。これらの実験結果から、90 nm よりも小さな TiO₂ はマウスの皮膚を通過して、全身に移行すること示している。

TiO₂ を脱イオン水、ポリエチレングリコールまたはキャスターオイルに 20% に懸濁し、0.2 mL/rabbit を 2 匹の New Zealand White ウサギ (体重 2.5 kg) の毛刈りした背部皮膚 2 cm² に 24 時間間隔で 2 時間、3 回塗布し、その後 24 時間に検査した (Lansdown and Taylor, 1997)。懸濁液中の粒子サイズは <2-20 μm であった。Ti 粒子が角質層の外層及び毛包の外面に観察されたが、表皮の深部及び真皮には認められなかった。塗布部位の皮膚に紅斑その他の有害反応はみられなかった。これらのことから TiO₂ はウサギ皮膚を通過しないことが示された。

ナノ TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ: 5 nm、表面積: 200 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) 及びナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 60 nm、表面積: 40 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co.,

Ltd.) 5% を含むエマルジョン 24 mg (TiO_2 として 1.2 mg/pig) を 4 週齢の雄ブタの耳介背側に連続 30 日間塗布し、最終塗布の 24 時間後に組織 (直径 2 mm) を採取した (Wu *et al*, 2009)。 TiO_2 は角質層、顆粒層及び有棘細胞層から検出され、より深部の基底細胞層からは 5 nm TiO_2 塗布後のみに検出されたが、真皮からは検出されなかった。 TiO_2 塗布による細胞間隙拡大、デスモソーム損傷及び基底細胞核周囲の空胞増大等の病理学的変化がみられたが、皮膚刺激性は認められなかった。

T-Lite SF (ルチル型, 直径: 20-30 nm、長さ: 50-150 nm、水酸化アルミニウム/ジメチコン共重合体により表面修飾、BASF) の 4.7%、P25 (アナターゼ型/ルチル型の混合物、粒子サイズ: 30-50 nm、表面無修飾、Degussa) の 6.1%、CR-50 (ルチル型、粒子サイズ: 300-500 nm、表面無修飾、Ishihara Corporation) の 5.6% を含むクリーム 2 mg/cm² (総量: 176 mg/cm², 約 1321 mL/pig) を 4 か月齢の雌 Yucatan ミニブタ (3 匹/群) の背部及び腹部に 1 日 4 回、週 5 日、22 日間塗布した (Sadrieh *et al*, 2010)。 TiO_2 総塗布量は、T-Lite SF で 8.27 mg/cm² (94 $\mu\text{g} \times 4 \times 22/\text{cm}^2)、P25 で 10.74 mg/cm² (122 $\mu\text{g} \times 4 \times 22/\text{cm}^2)、CR-50 で 9.86 mg/cm² (112 $\mu\text{g} \times 4 \times 22/\text{cm}^2) であった。ICP-MS により Ti レベルを測定した。いずれの TiO_2 塗布後にもリンパ節及び肝臓における Ti レベルの上昇はみられなかった。いずれの TiO_2 処置でも Ti は表皮で多く、角質層及び上部毛包腔に観察され、T-Lite SF で顕著であった。いずれの TiO_2 処置でも刺激性や皮膚細胞の構造異常等の皮膚に対する悪影響はみられなかった。これらのことから、ナノサイズ及び顔料グレードの TiO_2 とも健全なミニブタの表皮を通過しないことが示された。$$$

このようにナノ及び顔料グレード TiO_2 の経皮暴露による動物実験の結果、ラット、ウサギ及びブタでは TiO_2 は角質層及び毛包からは検

出されるが、真皮から検出されないことから、Ti は皮膚を通過しないことが示されている。しかし、ヘアレスマウスを用いた塗布実験においては、90 nm ルチル型 TiO_2 を除いて、ナノサイズの TiO_2 は皮膚を通過して、心臓、肝臓、脾臓、肺または脳に移行して蓄積することが示されている。

5. 経口投与 (TABLE 4)

TiO_2 (ルチル型、粒子サイズ: 475 nm、Polysciences LtD.) を蒸留水に懸濁し、12.5 mg/kg/day を 10 日間、12-14 週齢の雌 SD ラットに強制経口投与し、最終投与後 24 時間 (15 時間絶食後) に組織を採取した (Jani *et al*, 1994)。組織中 Ti 濃度を ICP-AES により測定した。検出された TiO_2 は投与量に対して、結腸で 1.13%、パイエル板及び腸間膜リンパ節で 2.18% であり、また小腸、肝臓、肺、腹膜組織、脾臓でも Ti が検出されたが、心臓及び腎臓では検出されなかった。これらの所見は、 TiO_2 粒子は胃腸からパイエル板を介して取り込まれ、腸間膜網に移行し、その後腸間膜リンパ節に蓄積され、また、一部の粒子は全身循環に移行し、肝臓及び脾臓に取り込まれることを示している。

ナノ TiO_2 (サイズ: 25 nm または 80 nm、純度: > 99%、Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.) またはファイン TiO_2 (サイズ: 155 nm、純度: > 99%、Zhonglian Chemical Medicine Co.) を 0.5% の Hydroxypropylmethylcellulose K4M (HPMC) に懸濁し、一晚絶食させた CD-1 (ICR) マウス (雌雄各 10 匹/群) に 5 g/kg を単回強制経口投与した (Wang *et al*, 2007b)。Ti レベルを ICP-MS により測定した (LOD: Ti として 0.074 ng/mL)。投与 2 週後の雌マウスにおける Ti は主に肝臓、腎臓、脾臓及び肺に蓄積し、Ti レベルは、80 nm TiO_2 投与群では肝臓で最も高く、25 nm 及び 155 nm TiO_2 投与群では脾臓で最も高かった。肝臓における Ti レ

TiO₂の体内分布

TABLE 4. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after oral gavage.

Animals	Materials / Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References
		Duration /Frequency	Doses*			
SD rats (female)	TiO ₂ (rutile, 475 nm in particle size, Polysciences Ltd.)	Daily for 10 days	12.5 mg/kg/day	24 h after last administration	Detection of Ti in Peyer's patches colon, small intestine, peritoneal tissue, mesentery network and node, liver, spleen and lung, but not in kidney or heart.	Jani <i>et al</i> , 1994
CD-1(ICR) mice (male and female)	Nano TiO ₂ (25 nm in size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	Single	5 g/kg	2 weeks after administration	Accumulation of Ti in liver, kidney, spleen and lung. Highest Ti levels in spleen. Increased relative weight of liver and serum ALT, ALT/AST ratio, BUN, LDH and α -HBDH levels in females, and serum BUN and CR levels in males.	Wang <i>et al</i> , 2007b
	Nano TiO ₂ (80 nm in size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)				Accumulation of Ti in liver, kidney, spleen and lung. Highest Ti levels in liver. Increased relative weight of liver and serum LDH and α -HBDH levels in females, and serum BUN and CR levels in males. Vacuoles in neurons of hippocampus, renal tubule filled with proteinic liquids and hydropic degeneration around central vein and spotty necrosis of hepatocyte in liver.	
	Fine TiO ₂ (155 nm in size, Zhonglian Chemical Medicine Co.)				Accumulation of Ti in liver, kidney, spleen and lung. Highest Ti levels in spleen. Vacuoles in neurons of hippocampus, serious swelling in renal glomerulus and hydropic degeneration around central vein and spotty necrosis of hepatocyte in liver.	
CD-1(ICR) mice (female)	Nano TiO ₂ (anatase, 5 nm in average grain size)	Every other day for 30 days	62.5, 125, 250 mg/kg/day	One day after last administration	Change in biochemical and hematological parameters and parameters of immunologically component cells at 62.5 mg/kg/day and higher. Change in body weight, relative weight of liver, spleen and thymus at 125 mg/kg/day and higher. Histopathological changes in liver at 250 mg/kg/day.	Duan <i>et al</i> , 2010

*: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

ベルは、80 nm TiO₂ 投与群では 3970 ng/g、25 nm TiO₂ 投与群では 106 ng/g、155 nm TiO₂ 投与群で 107 ng/g であった。マウスには投与 2 週間後と殺まで投与による異常はみられなかった。雌雄のマウス体重には TiO₂ 投与の影響はみられなかった。雄マウスでは、25 nm 及び 80 nm TiO₂ 投与群において腎毒性の指標である血清中の血液尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニン (CR) レベルの上昇が観察された。雌マウスでは、25 nm TiO₂ 投与群の血清 BUN レベル、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 及び ALT/ アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 比が、25 nm 及び 80 nm TiO₂ 投与群で肝臓比重量、血管系損傷の指標である血清乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 及び α -ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ (α -HBDH) レベルが高値であった。病理組織学的所見は雌雄とも同様であり、80 nm 及び 155 nm TiO₂ 投与群において、海馬神経細胞に脂肪変性を示唆する空胞の増加、肝臓に中心静脈周囲の水腫性変性及び肝細胞の散在性壊死が観察された。また、80 nm TiO₂ 投与群にタンパク質

様液体で充満した腎尿細管、155 nm TiO₂ 投与群に腎糸球体の重篤な腫脹がみられた。心臓、肺、精巣、卵巣及び脾臓には TiO₂ 投与の影響はみられなかった。25 nm TiO₂ 投与群ではいずれの組織にも病理組織学的変化は認められなかった。

雌 CD-1 (ICR) マウスにナノ TiO₂ (アナターゼ型、平均粒子サイズ: 5 nm) を 0.5% の HPMC に懸濁し、62.5, 125 または 250 mg/kg/day を隔日に 30 日間強制経口投与し、最終投与の 1 日後にマウスをと殺して検査した (Duan *et al*, 2010)。62.5 mg/kg 以上の投与で、白血球数及び網状赤血球比率の上昇、B 細胞及びナチュラルキラー細胞の比率の低下、血清 IL-2 レベルの低下、血清 NO レベルの上昇がみられた。125 mg/kg 以上の投与で、体重低下、肝臓、腎臓、脾臓及び胸腺の比重量の増加、ALT、AST、アルカリフォスファターゼ、コリンエステラーゼ、総コレステロール及びトリグリセライド血清レベルの上昇、A/G 比及び総ビリルビンレベルの低下、赤血球数、ヘモグロビン、平均赤血球色素濃度等の低下が観察された。

250 mg/kg の投与で、CD3、CD4 及び CD8細胞の比率の低下、肝臓に広範囲の肝細胞の構造不鮮明及び間質血管の充血が観察された。このように経口投与された高用量のナノ TiO₂ は血液及び免疫系の障害を惹起することが示された。

これらの実験結果は、経口投与されたナノ及び顔料グレード TiO₂ は、消化管から吸収され、他の器官に移行し、毒性影響を惹起することを示している。

6. 静脈内注射 (TABLE 5)

45-55 日齢の雌 SD ラット (8 匹/群) に 250

mg/kg の TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ：200-400 nm、BET 表面積：48.6 m²/g) を尾静脈に注射した (Huggins and Froehlich, 1966)。投与した TiO₂ の 69% 及び 78% がそれぞれ注射後 5 分及び 15 分の肝臓で検出された。投与後 6 時間の TiO₂ レベルは、肝臓 (4.1 mg/g) で最も高く、次いで脾臓 (3.0 mg/g) で高く、腹腔、腸骨及び縦隔リンパ節でも 0.4-0.5 mg/g であった。投与後 24 時間の TiO₂ レベルは、腹腔リンパ節 (9.4 mg/g) で最も高く、次いで肝臓 (3.9 mg/g)、脾臓 (1.5 mg/g) であった。投与後 1 年の TiO₂ レベルは、腹腔リンパ節

TABLE 5. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after intravenous (iv), intraperitoneal (ip), subcutaneous (sc) or intraarticular (ia) injection.

Injection route	Animals	Materials/ Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References
			Duration /Frequency	Doses ^a			
iv	SD rats (female)	TiO ₂ (anatase, 200-400 nm in particle size, 99% pure, water-dispersible)	Single	250 mg/kg	Designated time after injection	Highest levels of Ti in liver at 6 h after injection. Highest levels of Ti in celiac lymph nodes at 24 h and one year after injection.	Huggins and Froehlich, 1966
	Wistar rats (male)	Nano TiO ₂ (70% anatase and 30% rutile, no surface coating, 20-30 nm in size, 48.6 m ² /g in BET surface area)		5 mg/kg	1, 14 and 28 days after injection	Highest Ti levels in liver, followed in decreasing order by levels in spleen, lung and kidney. No detection of Ti in plasma, blood cells, lymph nodes or brain. No toxicological changes.	Fabian <i>et al</i> , 2008; van Ravenzwaay <i>et al</i> , 2009
	BALB/c mice (female)	TiO ₂ nanoparticles (80% anatase and 20% rutile, approx. 50 m ² /g in surface area, DeGussa AG)	2 consecutive days	Total 560 mg/kg	One day after last injection	Aggregates of TiO ₂ particles in lung, liver, lymph nodes, spleen and kidney.	Patri <i>et al</i> , 2009
ip	Wistar rats (male)	TiO ₂ (anatase, approx. 1 µm, Sphere-like shape, Sigma Chemical Co.)	Single	16, 1600, 16000 mg/kg	5-10 months after injection	Macrophages loaded with particles in peritoneum, vicinity of sinusoid capillaries of liver, alveoli of lung and splenic cords at all doses. No changes in body weight, behavior or general conditions.	Olmedo <i>et al</i> , 2002
	Wistar rats (male)	TiO ₂ (anatase, approx. 1 µm, Sphere-like shape, Sigma Chemical Co.)		16000 mg/kg	3 and 6 months after injection	Monocytes containing Ti. Detection of Ti in liver, spleen and lung at 6 months post-injection.	Olmedo <i>et al</i> , 2003
	ICR mice (male and female)	Nano-sized TiO ₂ (anatase, 80-110 nm, mostly 100 nm, in size)		324-2592 mg/kg	24 h, 48 h, 7 days and 14 days after injection	Retention of Ti in spleen, lung, kidney and liver, and highest in spleen. Passive behavior, loss of appetite, tremor and lethargy. Most severe histopathological lesion in spleen.	Chen <i>et al</i> , 2009
sc	Slc:ICR mice	TiO ₂ particles (anatase, 25-70 nm in particle size, 20-25 m ² /g in surface area, Sigma-Aldrich)	Gestational days 3, 7, 10 and 14	100 µg/mouse/day	4 days and 6 weeks of age (male offspring)	Detection of aggregates of TiO ₂ in Leydig cells, Sertoli cells and spermatids at both age of pups and cells of olfactory bulb and cerebral cortex in 6-week-old pups. Decreased body weight, daily sperm production, epididymal sperm mortality and number of Sertoli cells in pups. Histopathological changes in testes of pups.	Takeda <i>et al</i> , 2009
	BALB/c mice (female)	TiO ₂ nanoparticles (80% anatase and 20% rutile, approx. 50 m ² /g in surface area, DeGussa AG)	2 consecutive days	Total 5600 mg/kg	One day after last injection	Aggregates of TiO ₂ particles in liver, lymph nodes, and spleen.	Patri <i>et al</i> , 2009
ia	SD rats (male)	TiO ₂ nanoparticles (anatase, 45 nm in length, 13 nm in width, >99.8% pure Hangzhou Wan Jing New Material Co., Ltd.)	4 times (every other day)	0.2, 2, 20 mg/kg/day	7 days after last injection	Brown particles in knee joint, heart and lung. Increased relative weight of lung and kidney at 20 mg/kg. Increase in serum LDH levels and AST/ALT ratio at 2 mg/kg and higher. Slightly histopathological changes in heart, lung, liver and knee joint at 0.2 mg/kg, and severe changes in major organs at 2 mg/kg and higher. Change in parameters of oxidative damage in synovium at 1.2 mg/kg and higher.	Wang <i>et al</i> , 2009

^a: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

(127.7 mg/g) で最も高く、次いで脾臓 (18.2 mg/g)、肝臓 (3.9 mg/g) であった。これらのことから、静脈内投与された TiO₂ は、投与直後には肝臓で多くが検出されるが、時間経過とともに腹腔リンパ節に移行して蓄積することが示された。

ラット血清に 0.5% に分散したナノ TiO₂ (アナターゼ型 70% + ルチル型 30%、表面無修飾、サイズ: 20-33 nm、BET 表面積: 48.6 m²/g) 5 mg/kg を 7 週齢の雄 Wistar [Crl:WI (Han)] ラットの尾静脈内に単回注射した (Fabian *et al*, 2008; van Revenzwaa *et al*, 2009)。注射後 1 日、14 日または 28 日後に各 3 匹のナノ TiO₂ 注射ラットをと殺し、血漿、血球、肺、リンパ節、腎臓、脾臓及び脳を採取し、Ti レベルを ICP-AES により測定した。血漿、血球、縦隔・腸間膜・膝窩リンパ節及び脳では Ti は検出限界 (TiO₂ として 0.5 µg/tissue sample) 以下であった。組織内 Ti レベルには注射後の時間経過とともに減少する傾向がみられた。TiO₂ レベルは肝臓で最も高く (1 日後: 134 µg/g wet tissue、14 日後: 100 µg/g wet tissue、28 日後: 111 µg/g wet tissue、次いで脾臓 (1 日後: 79 µg/g wet tissue、14 日後: 49 µg/g wet tissue、28 日後: 33 µg/g wet tissue)、肺 (1 日後: 9 µg/g wet tissue、14 日後: 3 µg/g wet tissue、28 日後: 2 µg/g wet tissue) であり、腎臓では 0.7 µg/g wet tissue より低かった。TiO₂ 投与による毒性学的変化は認められなかった。

TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型約 80% 及びルチル型約 20%、表面積: 約 50 m²/g、Degussa AG) を 8-10 週齢の雌 BALB/c マウスに 2 日間連続、総量 560 mg/kg を尾静脈内注射し、2 回目の注射の 1 日後に剖検した (Patri *et al*, 2009)。平均径 1-2 µm の凝集体として Ti が肺、肝臓、リンパ節、脾臓及び腎臓に観察された。組織内で TiO₂ ナノ粒子は不整形な凝集体として、貪食細胞中に認められた。肝臓では、大部

分の粒子がクッパー細胞の空胞にみられた。

これらの実験結果は、静脈内投与されたナノ及び顔料グレード TiO₂ は、他の器官に移行することを示している。

7. 腹腔内投与 (TABLE 5)

体重約 100 g の雄 Wistar ラット (10 匹/群) に 16、1600 または 16000 mg/kg の TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ: 1 µm、球形、Sigma Chemical Co.) を単回腹腔内注射し、5-10ヶ月生存させた後、検査した (Olmedo *et al*, 2002)。いずれの投与群のラットにも一般状態、体重及び行動の異常、腹膜と腸管との癒着や肉芽、肺、脾臓及び肝臓の肉眼的異常は認められなかった。16000 mg/kg 投与群のラットの腹腔内に白色の沈殿物が観察された。病理組織学的検査では、いずれの TiO₂ 投与量においても TiO₂ を含有したマクロファージが腹膜、肝臓の洞様毛細血管周囲、肺胞及び脾索に観察された。腎臓に異常はみられなかった。

体重約 100 g の雄 Wistar ラット 20 匹に生理食塩水に懸濁した 16000 mg/kg の TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ: 1 µm、球形、Sigma Chemical Co.) を単回腹腔内注射し、3-6ヶ月に採血し、6ヶ月にと殺した (Olmedo *et al*, 2003)。Ti 粒子を含有した単球が 3 及び 6ヶ月の血液標本に観察され、Ti が投与後 6ヶ月の肝臓、脾臓及び肺に認められた。

ナノサイズの TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ: 80-110 nm、大部分は 100 nm) 324、648、972、1296、1944 または 2592 mg/kg を一夜絶食後の 4 週齢 ICR マウス (雌雄各 5 匹/群) に単回腹腔内注射した (Chen *et al*, 2009)。Ti は脾臓、肺、腎臓及び肝臓で認められ、特に、脾臓で最も多く、投与後 24 時間でも検出された。投与後 2 日間に全ての TiO₂ 投与群のマウスに受動行動、食欲喪失、震顫及び嗜眠がみられた。1296 mg/kg 以下の投与ではこれらの症状は徐々に消失した。1944 mg/kg 以上の投与量で

は下痢、体重低下及び被毛光沢消失も観察された。病理組織学的検査では、肝臓、脾臓、肺及び腎臓に病変がみられたが、病理学的には重篤ではなかった。

これらの実験結果は、腹腔内投与されたナノ及び顔料グレード TiO₂ とも、他の器官に移行し、毒性影響を発現させることを示している。

8. 皮下注射 (TABLE 5)

0.05% Tween 80 に懸濁した 100 μ g/mouse/day の TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型、粒子サイズ: 25-70 nm、表面積: 20-25 m²/g、Sigma-Aldrich) を Slc:ICR マウス (6 匹/群) の妊娠 3、7、10 及び 14 日に皮下投与し、自然分娩した雄児を生後 4 日または生後 6 週に検査した (Takeda *et al.*, 2009)。100-200 nm の TiO₂ 凝集体が生後 4 日及び 6 週の児の精巢のライディヒ細胞、セルトリ細胞及び精子細胞で観察され、TiO₂ 粒子が 6 週齢雄児の嗅球及び大脳皮質に認められた。体重、1 日精子産生量、精巢上体精子運動性及びセルトリ細胞の減少、精細管の崩壊及び管腔中成熟精子の減少が 6 週齢雄児に観察された。この報告では、発生毒性の最も重要な指標である胚/胎児/新生児の生存及び形態学的変化に関するデータは示されておらず、また発生毒性発現に関わる母体毒性の詳細についても記載されていない。

TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型約 80% 及びルチル型約 20%、表面積: 約 50 m²/g、Degussa AG) を 8-10 週齢の雌 BALB/c マウスに 2 日間連続、総量 5600 mg/kg を皮下注射し、2 回目の注射の 1 日後に剖検した (Patri *et al.*, 2009)。平均径 1-2 μ m の凝集体として Ti が肝臓、リンパ節及び脾臓に観察された。組織内の TiO₂ ナノ粒子は不整形な凝集体として、貪食細胞中に認められた。肝臓では、大部分の粒子がクッパー細胞の空胞にみられた。

これらの実験結果は、皮下投与されたナノ

TiO₂ は、他の器官に移行し、毒性影響を発現させることを示している。

9. 関節内投与 (TABLE 5)

体重 180-200 g の雄 SD ラット (10 匹/群) に TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型、長さ: 45nm、幅: 13 nm、純度: 99.8% 以上、Hangzhou Wan Jing New Material Co., Ltd.) 0.2、2 または 20 mg/kg/day を隔日に 4 回、後肢膝関節内に注射し、7 日後にと殺し、検査した (Wang *et al.*, 2009)。心臓においては茶色粒子の拡散した凝集体が心室心内膜にみられ、肺では粒子を貪食したマクロファージが肺胞で観察された。膝関節では TiO₂ 粒子の凝集した大きな沈着がみられた。心、肺、肝及び膝関節の病理組織学的変化は 0.2 mg/kg では軽度であったが、2 mg/kg 以上では重篤であった。投与 6 時間までマウスの活動低下がみられたが、体重やその他の一般状態に TiO₂ 投与の影響は認められなかった。20 mg/kg 投与群で肺及び肝の比重量増加がみられ、血清生化学的検査では、2 mg/kg 以上の LDH レベル及び AST/ALT 比の上昇がみられた。膝関節の滑膜において酸化ストレスの指標である GSH-Px 活性が 0.2 mg/kg 以上で、GSH 及び GSSG 活性が 20 mg/kg で上昇し、H₂O₂ レベルが 2 mg/kg 以上で上昇した。これらの所見は、膝関節内に投与された TiO₂ ナノ粒子は血流を介して他の組織に移行して毒性影響を惹起することを示している。

10. 考察及び結論

ナノサイズ及び顔料グレードの TiO₂ を種々の経路により暴露した後の体内分布及び毒性について公表されている科学論文を収集整理してまとめた。

ヒトでは吸入、経皮及び経口による TiO₂ の暴露が想定される (ENRHES, 2009)。ヒトの暴露経路ではないが、ラットまたはマウスに静脈

内、腹腔内または皮下注射された TiO₂ は肝臓、脾臓、肺、腎臓等の全身の器官に分布することが示されている。これらの所見は、ヒトで実際に起こる暴露経路により体内に吸収された TiO₂ の体内動態を知る上で情報源となる。ナノ TiO₂ をマウスの妊娠 3, 7, 10 及び 14 日に皮下投与したとき、生後 4 日及び生後 6 週齢の児の精巣及び 6 週齢の児の脳内で Ti が検出され、また精巣に病理学的変化を惹起することが示されている (Takeda *et al.*, 2009)。この実験における TiO₂ の投与時期は器官形成期前及び器官形成期に相当し、これらの時期に Ti が胚へ移行すれば、胚死亡や胎児奇形の発現が疑われる。器官形成期後の時期は胎児の成長期であり、また新生児期は生殖器や神経系が成熟する時期である。これらの時期の化学物質暴露により機能障害を惹起し易い。母動物中に蓄積された TiO₂ が、これらの時期に精巣や海馬/大脳皮質に移行し、変化を起こした可能性がある。妊娠動物への TiO₂ 投与時期と児動物における影響発現との関連性について更に検討が必要である。

ナノ材料で表面加工された人工関節を装着したときの関節腔内におけるナノ材料の挙動について調べるために、ナノ TiO₂ をラットの関節腔内に注射したところ、TiO₂ は全身に移行し、主要臓器に病理組織学的及び生化学的変化を引き起こすことが観察されている (Wang *et al.*, 2009)。この結果は静脈内、腹腔内及び皮下注射された TiO₂ の場合と同様に、体内に取り込まれた TiO₂ は全身に移行して、諸器官に毒性影響を及ぼす可能性を示している。

経口投与したナノ及び顔料グレードの TiO₂ とも全身に移行し、主に肝臓及び脾臓に蓄積し、肝、脾及び腎臓に病理組織学的変化を惹起するが、500 nm TiO₂ では腎臓及び心臓への移行は認められていない (Jani *et al.*, 1994) が、25-155 nm の TiO₂ では心臓及び腎臓への移行が認められている (Wang *et al.*, 2007b)。また、海馬

の神経細胞の変化が 80 nm 及び 155 nm TiO₂ の 5 g/kg 単回投与後に観察されている (Wang *et al.*, 2007b)。使用動物、被験物質、投与期間、投与量が実験ごとに異なるために、試験結果を単純に比較することは困難であるが、経口投与された TiO₂ はナノ及び顔料グレードに関わらず、吸収され、全身に移行すると考えられる。

ナノ ¹³C 元素粒子を雄 F344 ラットに 6 時間全身吸入暴露した実験において、高濃度の ¹³C が肝臓から検出されたことから、粒子が肺胞壁から循環系に入り、肺外の組織へ粒子が移行することが示唆されており (Oberdörster *et al.*, 2002)、放射ラベルしたカーボン粒子 (個別粒子サイズ: 5-10 nm) をヒトボランティアに吸入暴露したとき、血液から放射活性が検出されたことから、肺から全身循環系へのナノ粒子の移行が示唆されている (Nemmar *et al.*, 2002)。また、ナノ ¹³C 元素粒子暴露後の大脳、小脳及び嗅球においても ¹³C レベルが上昇したことから、鼻腔粘膜に沈着した粒子が嗅神経経路を介して脳へ移行することが示唆されている (Oberdörster *et al.*, 2004)。嗅神経経路を介する嗅球への移行については、空気力学的中央粒子径 1.5-2 μm の MnSO₄ 及び Mn₃O₄ をラットに吸入暴露したとき Mn が嗅球で検出され (Dorman *et al.*, 2001, 2004)、また、タンパク質、神経病原性ウイルス、ニッケル、カドミウム、水銀、銀で表面修飾したコロイド金粒子等が嗅球への移行することが知られている (Tjalve and Henriksson, 1999; Oberdörster *et al.*, 2004)。嗅覚ニューロン狭部の直径は約 200 nm と報告されており (De Lorenzo, 1957; Tjalve and Henriksson, 1999)、Elder *et al.* (2006) は 200 nm 未満のサイズの粒子が移行しやすいと述べている。ナノ及び顔料グレード TiO₂ の鼻腔内注入実験でも、粒子は嗅球/海馬へ移行して蓄積することがマウスで示されている (Wang *et al.*, 2007a, 2008ab)。これらの所見は、吸入また

は鼻腔内暴露した粒子は全身循環系または神経系に移行する可能性を示しているが、粘液線毛排除機構や特に全身暴露では被毛に付着した粒子を舐めて経口摂取することがあり、粒子が消化管を介して移行した可能性も考えられる。一方、ラットを用いた吸入暴露実験では、ナノ及び顔料グレードの TiO_2 とも胸腔内にとどまり、胸腔内の肺及び縦隔リンパ節でのみ検出されただけであり、 TiO_2 は胸腔外の組織では検出されなかったことが報告されている (van Ravenzwaay *et al.*, 2009)。また、妊娠マウスにナノ TiO_2 を吸入暴露した実験においても肺以外で Ti は検出されていない (Hougaard *et al.*, 2010)。しかし、これらの実験における Ti の検出限界は $0.3 \mu\text{g}/\text{tissue}$ および $0.25 \mu\text{g}/\text{g}$ であり、低レベルの Ti の全身または神経系への移行の可能性を完全には否定できない。

経皮暴露については、ヒトボランティアによる実験においてナノサイズ TiO_2 を塗布した群で真皮の Ti レベルの有意ではない上昇がみられている (Tan *et al.* 1996) が、その後のヒトボランティアによる塗布実験 (Lademann *et al.*, 1999; Bennat and Müller-Goymann, 2000; Schulz *et al.*, 2002; Mavon *et al.*, 2006)、さらにヒト皮膚を用いた *in vitro* の実験でも Ti の真皮への移行はみられず、Ti は角質層または毛包までの移行にとどまっている (Nohynek *et al.*, 2008)。ラット (Adach *et al.*, 2010)、ウサギ (Lansdown and Taylor, 1997) 及びブタ (Wu *et al.*, 2009; Sadrieh *et al.*, 2010) にナノサイズの TiO_2 を塗布したとき、Ti は角質層及び毛包から検出されたが、真皮までは到達せず、ナノサイズの TiO_2 は皮膚を通過しないことが示されている。しかしながら、ナノサイズの TiO_2 をヘアレスマウスに塗布した実験では 90 nm の TiO_2 を除いて皮膚を通過して全身の組織に移行したと報告されている (Wu *et al.*, 2009)。Wu *et al.* (2009) の論文については、ヘアレスマウスの

飼育状態及び論文の記述不備に関するコメントが提出されている (Jonaitis *et al.*, 2010)。マウスは個別または 6 匹までの集団で飼育され、自ら TiO_2 塗布部を舐めたり噛んだりすることから保護するために首かせを装着したが、その他の部分の覆いは行っていない (Wu *et al.*, 2009)。集団飼育ではマウス間で塗布部位を舐め合ったり、咬み合ったりすることによって経口摂取された TiO_2 が全身へ移行した可能性がある (Jani *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2007b)。皮膚剥離したヘアレスマウスではナノ粒子が全身移行することが示されている (Gopee *et al.*, 2009) ことから、創傷部位から TiO_2 が皮膚を通過して全身に移行した可能性もある。また、 TiO_2 が経気道摂取された可能性もある。Wu *et al.* (2009) の実験の対照群における Ti レベルは、特に腎臓では種々の TiO_2 を塗布したときと同等であり、脳では Degussa P25 を除いて TiO_2 を塗布した時より高かったことは、対照群動物が TiO_2 に汚染していることを窺わせる。これらの理由により、Wu *et al.* (2009) の動物実験の妥当性が疑われるが、コメントに対する論文の著者からの回答はなされていない。

ヒトにおけるリスク評価では、ヒトにおける暴露が想定される経路による毒性影響発現について検討することが必須であり、実際の暴露濃度に近い暴露量を用いた動物実験が必要とされる。ヒトでの実際の暴露が想定される吸入及び経皮暴露による動物実験においてはこれらの経路以外に経口による摂取も起こる可能性があり、実験成績の評価に重大な影響を及ぼすことがあるので、動物の飼育管理をも含めて適正な実験を行うことが望まれる。

11. 謝辞

本研究は、(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 委託研究「ナノ粒子特性評価手法の研究開発 (P06041)」により行った。

引用文献

- Adachi K, Yamada N, Yamamoto K, Yoshida Y, Yamamoto O. (2010) *In vivo* effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. *Nanotoxicology*, **4**, 296-306.
- Bennat C, Müller-Goymann CC. (2000) Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Int J Cosmet Sci*, **22**, 271-283.
- Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. (2009) *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol*, **29**, 330-337.
- De Lorenzo. (1957) Electron microscope observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. *J Biophysic Biochem Cytol*, **3**, 839-850.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. (2001) Ultrafine particles. *Occup Environ Med*, **58**, 211-216.
- Dorman DC, Struve MF, James RA, Marshall MW, Parkinson CU, Wong BA. (2001) Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, **170**, 79-87.
- Dorman DC, McManus BE, Parkinson CU, Manuel CA, McElveen AM, Everitt JI. (2004) Nasal toxicity of manganese sulfate and manganese phosphate in young male rats following subchronic (13-week) inhalation exposure. *Inhal Toxicol*, **16**, 481-488.
- Duan Y, Liu J, Ma I, Li N, Liu H, Wang J, Zheng L, Liu C, Wang X, Zhao X, Yan J, Wang S, Wang H, Zhang X, Hong F. (2010) Toxicological characteristics of nanoparticles anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials*, **31**, 894-899.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. (2006) Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect*, **114**, 1172-1178.
- Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S, Nakanishi J. (2010) Reproductive and developmental toxicity of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol*, **30**, 343-352.
- ENRHES (Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety) (2009) Project Final Report. [cited July 14, 2010], available from: <http://nmi.jrc.ec.europa.eu/documents/pdf/ENRHES%20Review.pdf>.
- Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B. (2008) Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol*, **82**, 151-157.
- Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Latendresse JR, Warbitton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ, Howard PC. (2009) Quantitative determination of skin penetration of PEG-coated CdSe quantum dots dermabrased but not intact SKH-1 hairless mouse skin. *Toxicol Sci*, **111**, 37-48.
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Cretzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K. (1995) Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol*, **7**, 533-556.
- Hougaard, K.S., Jackson, P., Jensen, K.A., Sloth, J.J., Löschner, K., Larsen, E.H., Birkedal, R.K., Vibenholt, A., Boisen, A.-M.Z., Wallin, H., Vogel, U. (2010) Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part. Fibre. Toxicol*

- 2010, 7:16 doi:10.1186/1743-8977-7-16.
- Huggins CB, Froehlich JP. (1966) High concentration of injected titanium dioxide in abdominal lymph nodes. *J Exp Med*, **124**, 1099-1106.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 93. Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. World Health Organization, Lyon.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (1982) Environmental Health Criteria 24. Titanium. World Health Organization, Geneva.
- Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. (1994) Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI and translocation to systemic organs after oral administration. *Int J Pharm*, **105**, 157-168.
- Jonaitis TS, Card JW, Magnusson B. (2010) Concern regarding nano-sized titanium dioxide dermal penetration and toxicity study. *Toxicol Lett*, **192**, 268-269.
- Kahru A, Dubourguier HC. (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, **269**, 105-119.
- Lademann J, Weigmann HJ, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. (1999) Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **12**, 247-256.
- Lansdown ABG, Taylor A. (1997) Zinc and titanium oxides: promising UV-absorbers but what influence do they have on the intact skin? *Int J Cosmet Sci*, **19**, 167-172.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. (1985) Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol*, **79**, 179-192.
- Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Moretto P. (2006) In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol*, **20**, 10-20.
- Mueller NC, Nowack B. (2008) Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol*, **42**, 4447-4453.
- Nemmar A, Hoet M, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Memery B. (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, **105**, 411-414.
- Nohynek GJ, Dufour EK, Roberts MS. (2008) Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacol Physiol*, **21**, 136-149.
- Oberdörster G., Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*, **65**, 1531-1543.
- Oberdörster G., Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, **16**, 437-445.
- Oberdörster G., Oberdörster E, Oberdörster J. (2005) Nanotechnology: an emerging discipline evolving from studied of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, **113**, 823-839.
- Olmedo D, Guglielmotti MB, Cabrini RL. (2002) An experimental study of the dissemination of titanium and zirconium in the body. *J Mater Sci Mater Med*, **13**, 793-796.
- Olmedo D, Tasat D, Guglielmotti MB, Cabrini RL. (2003) Titanium transport through the blood stream. An experimental study on rats. *J Mater Sci Mater Med*, **14**, 1099-1103.

- Patri A, Umbreit T, Zheng J, Nagashima K, Goering P, Francke-Carroll S, Gordon E, Weaver J, Miller T, Sadrieh N, McNeil S, Stratmeyer M. (2009) Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. *J Appl Toxicol*, **29**, 662-672.
- Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Gers-Barlag H. (2001) The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronized titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **14** (Suppl. 1), 92-97.
- Robichaud CO, Uyar A, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. (2009) Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environ Sci Technol*, **43**, 4227-4233.
- Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, McNeil SE, Howard PC, Doub WH, Buhse LF. (2010) Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicol Sci*, **115**, 156-166.
- Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Wendel V, Gers-Barlag H, Wittern KP. (2002) Distribution of sunscreen on skin. *Adv Drug Del Rev*, **54** (Suppl. 1), S157-S163.
- Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. (1996) A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreen. *Austr J Dermatol*, **37**, 185-187.
- Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M. (2009) Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci*, **55**, 95-102.
- Tjälve H, Henriksson J. (1999) Uptake of metals in the brain via olfactory pathway. *Neurotoxicology*, **20**, 181-196.
- van Ravenzwaay B, Landsiedel R, Fabian E, Burkhardt S, Stauss V, Ma-Hock L. (2009) Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz. *Toxicol Lett*, **186**, 152-159.
- Wang JX, Chen CY, Yu HW, Sun J, Li B, Li YF, Gao YX, He W, Huang YY, Chai ZF, Zhao YL, Deng XY, Sun HF. (2007a) Distribution of TiO₂ particles in the olfactory bulb of mice after basal inhalation using microbeam SRXRF mapping techniques. *J Radioanal Nucl Chem*, **272**, 527-531.
- Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. (2007b) Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, **168**, 176-185.
- Wang J, Chen C, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li Y, Li B, Ge C, Zhou G, Gao Y, Zhao Y, Chai Z. (2008a) Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett*, **183**, 72-80.
- Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. (2008b) Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology*, **254**, 82-90.
- Wang JX, Fan YB, Gao Y, Hu QH, Chen TC. (2009) TiO₂ nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intra-articular injection. *Biomaterials*, **30**, 4590-4600.
- Wu J, Lui W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H,

Yang X, Zeng FD. (2009) Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett*, **191**, 1-8.

江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井莊輔、中西準子 (2009) ナノサイズ二酸化チタンの遺伝毒性評価、環境毒性学会誌、**12**, 71-84.

江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井莊輔、中西準子 (2010) 二酸化チタンの発がん性評価、環境毒性学会誌、**13**, 15-26.

化学工業日報社 (2009 15509の化学商品、2009年1月、2100 pp.

経済産業省 (2009) ナノマテリアル製造事業者等における安全対策のあり方研究会報告書、平成21年3月、
<http://www.meti.go.jp/press/20090331010/20090331010.html>.

日本食品添加物協会 (2008) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定、その1 指定添加物品目 (第8回最終報告)、平成19年度厚生労働科学研究補助金 (食品の安全性高度化推進事業) 「国際動向を踏まえた食品添加物の企画の向上に関する調査研究」分担研究「わが国における食品添加物生産量統計とその国際比較」、平成20年3月、<http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do>

(受付：2010年11月13日；受理2010年12月27日)



Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats

Mutsuko Hirata-Koizumi^{a,*}, Sakiko Fujii^b, Atsushi Ono^a, Akihiko Hirose^a, Toshio Imai^{a,1},
Kumiko Ogawa^a, Makoto Ema^a, Akiyoshi Nishikawa^a

^a Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

^b Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd., Sapporo 004-0839, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2010

Received in revised form 2 November 2010

Accepted 11 November 2010

Available online 19 November 2010

Keywords:

Aluminium sulfate

Flocculant for water treatment

Food additive

Two-generation reproductive toxicity

Developmental toxicity

Rat

ABSTRACT

In a two-generation reproductive toxicity study, male and female rats were given aluminium sulfate (AS) in drinking water at 0, 120, 600 or 3000 ppm. AS reduced water consumption in all treatment groups, and body weight was transiently decreased in the 3000 ppm group. In the F1 and F2 pups, preweaning body weight gain was inhibited at 3000 ppm, and the liver and spleen weight was decreased at weaning. At this dose, vaginal opening was slightly delayed. There were no compound-related changes in other reproductive/developmental parameters, including developmental neurobehavioral endpoints. The data indicated that the NOAEL of AS in this two-generation study is 600 ppm for parental systemic toxicity and reproductive/developmental toxicity. The total ingested dose of aluminium from drinking water and food (standard rat diet, containing 25–29 ppm of aluminium) combined for this 600 ppm group was calculated to be 8.06 mg Al/kg bw/day.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aluminium is the most abundant metal on Earth and constitutes 8.13% of the crust [1]. It is released into the environment largely by natural processes, but also due to anthropogenic activities [2]. People engaging in certain occupations, such as welding, aluminium soldering and production of abrasives, could be exposed to aluminium-containing dust particles by inhalation [3–5]; however, aluminium exposure by the general population is considered to occur mainly through food ingestion [1] although the use of aluminium-containing antacids and buffered analgesics may result in much higher aluminium intake [6,7]. While aluminium is inherently contained in most foodstuffs, its salts are artificially added to various food products (acidity regulator, raising agent, anti-caking agent, etc.) [8]. Use of aluminium and aluminium compounds in the processing, packaging and storage of food products is also a significant factor in the increased aluminium levels in foods [8]. On the other hand, aluminium salts are widely used as flocculants in the treatment of drinking water to reduce organic matter, color, turbidity and microorganism levels [9], which may lead to

increased aluminium intake by the general public. Total dietary exposure to aluminium, including exposure via drinking water, has been assessed using a duplicate diet, total diet or market basket approach in a number of countries [8]. Based on these data, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) estimates that the mean total dietary exposure of the adult population ranges from 14 to 280 mg Al/week [8].

In humans, aluminium is regarded as a primary cause of dialysis encephalopathy syndrome, in which various neurological symptoms, such as speech difficulty, myoclonus and dementia, have been observed in patients on chronic hemodialysis [10,11]. For more general exposure, it is suspected that oral aluminium exposure via foods and drinking water may be associated with the risk of Alzheimer's disease and cognitive impairment, but this hypothesis remains controversial [12–14]. The neurotoxicological properties of aluminium have been clearly shown in laboratory animals, and the observed effects include encephalopathy, impairments of cognitive and motor function and neurofibrillary degeneration [15–18]. In animals, aluminium compounds also affect male reproductive systems [19–23], and developmental toxicity, including effects on the developing nervous system, has been reported after maternal exposure [24–32].

Concerning the adverse effects of aluminium on human health, its reference values in food and drinking water should be established based on appropriate toxicological data; however, the available data are insufficient to assess its health effects. As human data, there have been a number of epidemiological studies about

* Corresponding author at: Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81 3 3700 9878; fax: +81 3 3700 1408.

E-mail address: mkoizumi@nihs.go.jp (M. Hirata-Koizumi).

¹ Present address: Central Animal Laboratory, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan.

the neurological effects of aluminium exposure via drinking water, but these studies did not account for aluminium intake from food, which is the most important route of exposure. Epidemiological studies on dietary aluminium exposure are preliminary at this time [8]. As for animal studies, most have focused on the specific endpoints or mechanisms of action, and the dosage is insufficient for dose–response assessment. In addition, considering the low oral bioavailability of aluminium [33,34] and actual human exposure via food and drinking water, many available study results from administration by gavage as well as by the parenteral route are not appropriate to evaluate the risk. In the WHO guidelines for drinking water quality, it was concluded that a health-based guideline value cannot be derived because of limitations in the animal data as a model for humans and the uncertainty surrounding human data [9]. JECFA clearly stated the need for further data on the bioavailability and developmental and multigenerational toxicity while it established a provisional tolerable weekly intake (PTWI) for aluminium of 1 mg/kg bw in food based on the available toxicological information [8].

In the present study, a two-generation reproductive toxicity study was conducted for aluminium sulfate (AS). AS is a water-soluble salt of aluminium, and is primarily used as a flocculant for water purification, paper sizing agent, fire extinguisher materials, etc. [35,36]. The present study was conducted according to OECD test guidelines under GLP. The selected route of administration is via drinking water because it is relevant to human exposure. As for the reproductive toxicity of aluminium, oral exposure studies evaluating sufficient endpoints in both sexes as well as multigenerational studies have not been reported yet; therefore, the data presented would provide useful information to assess the risk to human health from aluminium exposure.

2. Materials and methods

This study was conducted in 2008–2009 at the Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd. (Sapporo, Japan). The study design complied with the OECD guideline 416 “Two-generation reproduction toxicity study” [37], and the Japanese guidelines for the designation of food additives and for revision of standards for the use of food additives [38]. All procedures involving the use and care of animals were performed in accordance with the principles for Good Laboratory Practice [39,40] and applicable animal welfare regulations [“Act on Welfare and Management of Animals” [41,42], “Standards Relating to the Care, Management of Laboratory Animals and Relief of Pain” [43] and “Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiment and Related Activities in the Testing Facility under the Jurisdiction of the Ministry of Health, Labour and Welfare” [44]].

2.1. Chemical and dosing

AS (CAS No. 10043-01-3) was obtained from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan). The AS (Lot No. 007X1828) used in this study was 98.5% pure, and was kept in a sealed container under cool and dark conditions. The test article was dissolved in ion-exchanged water, and served as drinking water to the animals. Control rats were given the ion-exchanged water alone as drinking water. Before the start of the study, the stability of AS in ion-exchanged water at concentrations of 0.1, 0.6 and 15 mg/mL was confirmed after at least 4-day storage at room temperature following 6-day refrigerated storage; therefore, dosing solutions were prepared at least once every 6 days and kept in a cool place until serving. Fresh drinking water was served at least once every 4 days. During the study, the concentrations of AS in drinking water were analyzed in the first and last preparations and once every 3 months, and confirmed to be 97.5–106.3% of the target by high performance liquid chromatography. AS contained in the drinking water for the control group was less than the quantitation limit (5 µg/mL).

Prior to the present two-generation reproductive toxicity study, a dose-finding study was performed in male and female rats given drinking water containing AS at 0, 1000, 3000, 10,000 or 30,000 ppm. In that study, males were dosed for 7 weeks, beginning 14 days before mating, and females were dosed for 6–8 weeks beginning 14 days before mating to day 4 of lactation throughout the mating and gestation period. In the highest dose group, animals were euthanized at the end of the 2nd week of administration because of a marked decrease in body weight as a result of water avoidance. Water consumption also decreased in all other treatment groups. Decreased food consumption and body weight were observed at 3000 ppm and above. At autopsy, thickening of the limiting ridge in the stomach, and atrophy of the thymus and spleen were detected at 10,000 ppm. The relative weights of the

liver, thymus and spleen were decreased in females in 3000 and 10,000 ppm groups. Although there were no changes in any reproductive parameters, the body weights of pups on postnatal day (PND) 4 were decreased at 10,000 ppm. Taking into account the results of this dose-finding study, the dose levels of AS in the present study were set as 120, 600 or 3000 ppm.

2.2. Animals and housing conditions

CrI:CD(SD) rats (4 weeks old) were purchased from Atsugi Breeding Center, Charles River Laboratories Japan, Inc. (Yokohama, Japan). This strain was chosen because they are the most commonly used in reproductive and developmental toxicity studies, and historical control data are available. The animals were acclimated to the laboratory for 7 days, and subjected to treatment at 5 weeks of age. They were carefully observed during the acclimation period, and male and female rats found to be in good health were selected for use. The rats were distributed into four groups of 24 males and 24 females each by stratified random sampling based on body weight, and all animals were assigned a unique number and the ear was tattooed prior to the start of the experiment.

Throughout the study, animals were maintained in an air-conditioned room at 21–25 °C, with a relative humidity of 36–59%, a 12-h light/dark cycle (8:00–20:00) and ventilation at 10–15 times/h. They were housed individually, except for the acclimation, mating and nursing periods, in suspended wire-mesh cages. From day 17 of gestation to day 21 after delivery, the wire-mesh floor of the cage was replaced with a stainless-steel tray, and individual dams and litters were reared using wood chips as bedding (White Flake; Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan). All animals were fed *ad libitum* with a standard rat diet (CRF-1; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan), but were supplied with different drinking water solutions, as mentioned above, through two generations. Aluminium concentration in the standard diet, analyzed by atomic absorption spectrometry for each lot of diet, ranged from 25 ppm to 29 ppm.

2.3. Experimental design

Twenty-four F0 rats (5-week-old males and females)/sex/group were exposed to AS in drinking water at 0, 120, 600 or 3000 ppm. After 10-week administration of AS, each female rat was mated with a male rat of the same dosage group, and pregnant females were allowed to deliver spontaneously and nurse their pups. Administration of AS was continued throughout the mating, gestation and lactation periods. F0 parental male rats were necropsied after the parturition of paired females. F0 females were necropsied after weaning of their pups.

For the second (F1) generation, 24 male and 24 female weanlings in each group were selected as F1 parents on PNDs 21–25 to equalize the mean body weights among groups as much as possible. One male and 1 female F1 weanlings were selected from each of litters born during the 5 days including the day of the largest number of F0 parturition, and if the number of litters was insufficient, a second weanling pup in the litter was selected with care to prevent litter effects. The day on which F1 parental animals were selected was designated as day 0 of dosing for the F1 generation. F1-selected rats were given drinking water with the respective formulation, and were mated, allowed to deliver and nurse their F2 pups, and necropsied in the same manner as described for F0 rats. Unselected F1 weanlings and all F2 weanlings were necropsied on PND 26.

2.4. Mating procedures

Each female was mated with a single male of the same dosage group until successful copulation occurred or the mating period of 2 weeks had elapsed. For F1 matings, cohabitation of siblings was avoided. During the mating period, vaginal smears were examined daily for the presence of sperm, and the presence of sperm in the vaginal smear and/or a vaginal plug were considered as evidence of successful mating. The day of successful mating was designated as day 0 of gestation. Females that did not mate successfully during the 2-week mating period were cohabited with another male from the same group who had been proven to copulate with limits of not less than 7 days.

2.5. Parental data

Throughout the study, all parental animals were observed for clinical signs of toxicity at least twice a day. The body weight and food consumption were measured weekly. For females exhibiting evidence of successful mating, body weight and food consumption were recorded on gestational days 0, 7, 14 and 20 of gestation and days 0, 7, 14 and 21 of lactation (and additionally day 4 of lactation for body weight). Water consumption was recorded twice a week, and on days 0, 4, 7, 11, 14, 17 and 20 of gestation and days 0, 4, 7, 11, 14, 17, 19 and 21 of lactation. The intake of test substance was calculated based upon mean values for body weight and water consumption in each group.

For each female, daily vaginal lavage samples were evaluated for estrous cyclicity throughout the last 2 weeks of the premating period and during cohabitation until evidence of copulation was detected. Females having repeated 4–6 day estrous cycles were judged to have normal estrous cycles.

2.6. Litter data

Once insemination was confirmed, female rats were checked at least three times daily on days 21–25 of gestation to determine the time of delivery. The females were allowed to deliver spontaneously and nurse their pups until PND 21 (the day of weaning). The day on which dams held their pups under the abdomen in the nest by 13:00 was designated as day 0 of lactation or PND 0. On PND 0, all live and dead pups were counted, and live pups were sexed and examined grossly. They were observed daily for clinical signs of toxicity, and the body weight of live pups was recorded on PNDs 0, 4, 7, 14 and 21. On PND 4, litters were randomly adjusted to eight pups of four males and four females. No adjustment was made for litters of fewer than eight pups. Pups were assigned a unique number and limb tattooed on PND 4.

2.7. Developmental landmarks

All F1 and F2 live pups were observed for pinna unfolding from PND 1 to PND 4. Body weight was recorded daily during this period. The anogenital distance (AGD) was measured using calipers on PND 4 in all F1 and F2 pups, and the normalized value of AGD to body weight, AGD/cube root of the body weight ratio, was calculated. One male and one female F1 and F2 pup selected from each dam were evaluated for incisor eruption beginning on PND 8 and eye opening beginning on PND 12, and continued until each pup fulfilled the criteria. The body weight of the respective F1 and F2 pups was recorded on the day the criteria were fulfilled. Surface righting reflex, negative geotaxis and mid-air righting reflex were assessed on PND 5, 8 and 18, respectively, for one male and one female F1 and F2 pup selected from each dam. All F1 offspring selected as F1 parents were observed daily for male preputial separation beginning on PND 35 or female vaginal opening beginning on PND 25 until completion. The body weight of the respective F1 rats was recorded on the day of completion of these pubertal landmarks.

2.8. Behavioral test

Spontaneous locomotor activity was measured at 4 weeks of age in 10 male and 10 female F1 rats randomly selected from each group, using a multi-channel activity monitoring system (SUPERMEX; Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan). Rats were placed individually in transparent polycarbonate cages [285 (W) mm × 450 (D) mm × 210 (H) mm, CL-0108-1; CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan], which were placed under an infrared sensor that detects thermal radiation from animals, and spontaneous motor activity was determined at 10-min intervals and for 60 min.

A test in a water-filled multiple T-maze was conducted in 10 male and 10 female F1 rats selected from each group at 6 weeks of age. The apparatus was similar to that described by Biel [45]. The water temperature of the maze was kept 20.5–22 °C. As a preliminary swimming ability test, each rat was allowed to swim three times in a straight channel on the day before the maze trial, and then tested in the maze with three trials per day for the next three consecutive days. The elapsed time between entry into the water at the starting point and touching the goal ramp, and the number of errors were recorded. To prevent the exhaustion of the rats, no animal was allowed to remain in the water for more than 3 min in any trial.

2.9. Termination/necropsy (adults)

All surviving parental male rats were euthanized by exsanguination under ether anesthesia after the parturition of paired females. All female rats showing successful reproductive performance were evaluated for estrous cycle stage by examination of the vaginal smear after weaning of pups, and euthanized at the proestrous stage by exsanguination under ether anesthesia. Females that did not copulate or had not completed parturition and dams with total litter loss were euthanized in the same way around the same time as females with successful reproduction. For all parental animals, the external surfaces were examined. The abdomen and thoracic cavity were opened, and gross internal examination was performed. Major organs were removed and the number of uterine implantation sites was recorded for each female. The testis and epididymis were fixed with Bouin's solution and preserved in 70% ethanol, and the other organs were stored in 10% neutral-buffered formalin. The brain, pituitary, thyroids, thymus, liver, kidneys, spleen, adrenals, testes, epididymides, seminal vesicles (with coagulating glands and their fluids), ventral prostate, uterus and ovaries were weighed before fixation. The thyroid and seminal vesicle were weighed after fixation.

Histopathological evaluations were performed in all animals of the control and highest dose groups, in females with abnormal estrous cycles, abnormal delivery or totally dead pups, in males and females without evidence of copulation or insemination, and in all animals with grossly abnormal reproductive organs. Of these animals, the testes, epididymides, seminal vesicles, ventral prostate, coagulating gland, ovaries, uterus and vagina, which were fixed as mentioned above, were embedded in paraffin by a routine procedure. They were sectioned, stained with hematoxylin–eosin and examined histopathologically under a light microscope. If treatment-related histopathological changes were found in the highest dose group, were the same tissues from the next lower dose group then examined.

In 10 F1 females, randomly selected from the control and highest dose groups, the number of primordial follicles was counted as follows. The right ovary, fixed in 10% neutral-buffered formalin, was dehydrated and then embedded in paraf-

fin in longitudinal orientation by routine procedures. Sections were cut serially at 5 µm and every 20th section was serially mounted on a slide and stained with hematoxylin and eosin. About 40 sections per ovary were used to determine the primordial follicles.

2.10. Termination/necropsy (pups)

Following the adjustment of litter size on PND4, culled pups were euthanized by inhalation of carbon dioxide and subjected to a gross external and internal observation. Grossly abnormal organs/tissues were removed and stored in 10% neutral-buffered formalin. All pups found dead before weaning were necropsied immediately, and the whole body was stored in 10% neutral-buffered formalin.

F1 weanlings not selected to become parents and all F2 weanlings were euthanized and necropsied on PND 26, as described for adults. For one male and one female F1 and F2 weanlings selected from each dam, the brain, thymus, liver, kidneys, spleen, adrenals, testes, epididymides, ventral prostate, uterus and ovaries were removed and the organ weights were measured. Major organs, including the weighed organs, were stored in 10% neutral-buffered formalin.

Since test substance-related organ weight changes were found in the liver and spleen of the highest dose group, they were histopathologically examined for 10 male and 10 female F1 and F2 weanlings in the control and highest dose groups. The examined animals were randomly selected from animals whose organs were stored. If treatment-related histopathological changes were observed in the highest dose group, were the same tissues from the next lower dose group then examined. For the histopathological examination, paraffin sections were routinely prepared and stained with hematoxylin and eosin.

2.11. Sperm parameters

Sperm parameters were determined for all F0 and F1 male adults on the day of the scheduled sacrifice. The right testis was used to count testicular homogenization-resistant spermatid heads. The right epididymal cauda was weighed and used for sperm analysis. For sperm motility, the percentage of motile sperm and progressively motile sperm, and the swimming speed and pattern were determined using a computer-assisted cell motion analyzer (TOX IVOS; Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA). After recording sperm motion, the cauda epididymal fluid was diluted and the sperm were enumerated with a hemacytometer under a light microscope. Sperm count per gram of epididymal tissue was obtained by dividing the total count by the gram weight of the cauda epididymis. The sperm was stained with eosin and mounted on a slide glass. Two hundred sperm in each sample were examined under a light microscope, and the percentage of morphologically abnormal sperm was calculated.

2.12. Statistical analysis

Parametric data, such as body weight, food and water consumption, length of the estrous cycle and gestation, precoat interval, the number of implantations and pups born, delivery index, reflex response time, age at sexual maturation, parameters of behavioral tests, organ weight and sperm parameters, were analyzed by Bartlett's test for homogeneity of distribution. For preweaning pups, body weight, AGD, viability, and age at the completion of developmental landmarks were similarly analyzed using the litter as the experimental unit. When homogeneity was recognized, one-way analysis of variance was performed. If a significant difference was detected, Dunnett's test was conducted for comparisons between control and individual treatment groups. Data without homogeneity were analyzed using the Kruskal–Wallis rank sum test. If significant differences were found, the Mann–Whitney's *U* test was conducted for comparison between the control and each dosage group. The incidence of parental animals with clinical signs, and autopsy and histopathological findings, the incidence of females with normal estrous cycles, incidence of weanlings with histopathological findings, copulation, fertility and gestation index, neonatal sex ratio and completion rate of negative geotaxis were compared between the AS and control group using Fisher's exact test. The incidence of pups with clinical signs or autopsy findings per litter, the completion rate of pinna unfolding in each litter, and the success rate of surface and mid-air righting reflex were analyzed by the Wilcoxon rank sum test. The number of primordial follicles in the control and highest dose groups was compared by Student's *t*-test because the homogeneity of variance was indicated by the *F*-test. All of these statistical analyses were conducted using the 5% level of probability as the criterion for significance.

3. Results

3.1. Clinical observations, water consumption, food consumption and body weight during the pre-mating, mating, gestation and lactation periods (F0 and F1)

In the 120 ppm group, one F1 male was found dead at 9 weeks of dosing. In this animal, soiling of periocular and perinasal fur and decreased locomotor activity were observed before death. At

autopsy, various changes, including accumulation of ascitic and pleural fluid and dark purple discoloration of the liver and kidneys, were found. In the 600 ppm group, a subcutaneous mass was observed in the abdominal region of one F0 female from the beginning of 5 weeks of dosing, and this animal was found dead at 2 weeks of gestation. One F1 male at 3000 ppm was also found dead at 12 weeks of dosing without any clinical signs of toxicity. In these two animals, no abnormality was found on gross internal examination. No significant difference was seen between control and AS-treated groups in the incidence of clinical signs of toxicity in either male or female F0 and F1 rats (data not shown).

Water consumption, food consumption and the body weight of F0 parental animals are shown in Figs. 1–3, respectively. In F0 males and females of all AS-treated groups, water consumption was significantly lower than in controls almost throughout the dosing period. In F0 males, there were significant decrease in food consumption in the first week of dosing at 600 and 3000 ppm, and during week 8 and weeks 13–14 of dosing at 3000 ppm. Food consumption of F0 females showed a significantly lower value during week 1 of dosing at 3000 ppm and during week 3 of lactation at 600 and 3000 ppm. The body weight of F0 males and females was significantly lowered in the first 2 or 3 weeks of dosing at 3000 ppm.

Figs. 4–6 show the water and food consumption, and body weight of F1 parental animals, respectively. Water consumption was significantly decreased through the dosing period in 600 ppm and 3000 ppm treated males, and during weeks 3–6, week 8 and week 10 of dosing in 120 ppm treated males. In F1 females, significant reductions in water consumption were found almost throughout the dosing period at 3000 ppm, during week 10 of dosing and week 3 of lactation at 600 ppm, and during weeks 9–10 of dosing at 120 ppm. Food consumption was significantly decreased during week 10 of dosing in F1 males of the 600 and 3000 ppm groups, and during week 3 of lactation in F1 females of the same groups. There was also a transient significant increase in food consumption during week 6 of dosing in F1 females of the 120 ppm group. The body weight of F1 males and females exhibited no significant differences between the control and AS-treated groups, except that F1 females of the 120 ppm group had significantly higher body weight during weeks 6–8 of dosing.

Based on water consumption and body weight, daily AS intakes during the pre-mating and post-mating periods in males and during the pre-mating, gestation and lactation periods in females were calculated for each of the AS-treated groups. Calculated mean AS intakes during the whole of these period were 8.6, 41.0 and 188 mg/kg bw/day in F0 males, 14.4, 71.5 and 316 mg/kg bw/day in F0 females, 10.7, 50.2 and 232 mg/kg bw/day in F1 males, and 15.3, 74.2 and 338 mg/kg bw/day in F1 females, in the 120, 600 and 3000 ppm groups, respectively. The total ingested dose of aluminium from drinking water and food combined was estimated from the water and food consumption and body weight. Average aluminium intake was 1.62, 2.96, 8.06 and 31.2 mg Al/kg bw/day in F0 males, 2.29, 4.50, 13.5 and 52.0 mg Al/kg bw/day in F0 females, 1.93, 3.55, 9.78 and 38.5 mg Al/kg bw/day in F1 males, and 2.35, 4.72, 14.0 and 55.6 mg Al/kg bw/day in F1 females for control through high-dose groups.

3.2. Reproductive effects (F0 parents/F1 offspring and F1 parents/F2 offspring)

During the pre-mating period, AS produced no significant deviations in the estrous cycle of F0 and F1 females although a few control and AS-treated rats had persistent diestrus. The incidence of females with a normal estrous cycle also did not change significantly in either generation (data not shown).

The reproductive performance of F0 and F1 parental animals are summarized in Table 1. During the mating period, copulation

was not observed in two males each in the control, 120 ppm and 3000 ppm groups and in one female of the control group in the F0 generation. In the F1 generation, one male in the control group, two males and one female in the 120 ppm group, one male in the 600 ppm group, and three males and one female in the 3000 ppm group did not copulate. Among females with successful copulation, one female each in the control and 3000 ppm group and two females at 120 ppm in the F0 generation and two females each in the control, 600 ppm and 3000 ppm groups, and four females at 120 ppm in the F1 generation were not impregnated. In addition, one pregnant F0 female each at 120, 600 and 3000 ppm and one pregnant F1 female at 120 ppm did not deliver live pups; however, there were no significant differences in the copulation, fertility or gestation index, and the pre-coital interval or gestation length between the control and AS-treated groups in F0 and F1 generation. No significant changes were observed in the number of implantations or pups delivered, and delivery index in either generation.

As for the sperm parameters examined for scheduled-sacrificed adults, in F0 generation, the absolute number of cauda epididymal sperm was significantly decreased at 3000 ppm ($253.8 \pm 61.3 \times 10^6$ /cauda versus $286.3 \pm 40.3 \times 10^6$ /cauda in the control); however, no significant changes were found in the number per gram of tissue. No such change was observed in F1 adults. There were no significant differences in the number of testis sperm, the percentage of motile sperm and progressively motile sperm, the swimming speed and pattern, and the percentage of morphologically abnormal sperm between control and AS-treated groups in either F0 or F1 adults (data not shown).

3.3. Developmental effects (F1 and F2)

Gross examination of delivered pups revealed one F1 pup with trauma in the perianal region and tail in the control group and one F1 pup with hemimelia and oligodactyly in the 120 ppm group, but no significant difference was found in the incidence between the control and AS-treated groups. No malformed F2 pups were found in any groups.

Table 2 shows sex ratio of delivered pups, and the viability and body weight during the preweaning period. No significant changes were found in the sex ratio of pups and the viability index in either generation. In the 3000 ppm group, the body weight of male and female F1 pups was significantly lower than the control on PND 21. Body weights of F2 female pups were also significantly lower than controls on PND 21 at 3000 ppm. There were no significant differences in the body weight of male F2 pups between the control and AS-treated groups during the preweaning period.

For the physical development of male and female F1 pups and male F2 pups, there was no significant difference in the completion rate of pinna unfolding, and the age at completion of incisor eruption and eye opening between the control and AS-treated groups. In female F2 pups, the completion rate of pinna unfolding on PND 2 was significantly lower in the 600 ppm group ($17.0 \pm 35.4\%$, compared with 45.8 ± 46.9 in controls), but no dose dependency was observed in this change. No significant changes were found in the completion rate of pinna unfolding on PND 1, 3 or 4 and in other physical developmental landmarks in female F2 pups. The AGD and AGD per cube root of the body weight ratio were not significantly different between control and AS-treated groups in male and female F1 and F2 pups (data not shown).

All male and female F1 pups in all groups achieved the surface righting reflex on PND 5, negative geotaxis reflex on PND 8 and mid-air righting reflex on PND 18. No significant changes were observed in the response time of surface righting and negative geotaxis reflex. In F2 pups, one female of the 600 ppm group failed in one of three trials of the mid-air righting reflex on PND 18; however, there was no significant difference in the mean success rate between the