

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 30 年度分担研究報告書

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
in silico 評価系に関する研究

分担研究者：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：化学物質の中でも極めて特殊な性状を有するナノマテリアルは、生産現場のほか家庭用品などへの利用が拡大しており、ヒトへの健康影響の評価が重大な課題となっている。ナノマテリアルの有害性については、物理化学的特性や表面修飾により有害性が異なることが知られており、物理化学的性状と有害性情報を関連付けるような評価が必要となる。国内において、こうした評価を行うための情報整理が未だされていないのが現状である。一方、海外では、EU US がナノマテリアルの規制への枠組みを進めており、さらに経済協力開発機構（以下、「OECD」と記載）でナノマテリアルの規制に向け代表的なナノマテリアルについての特有の物理化学的性状と有害性情報等を収載した報告書（dossier：有害性評価書）が公開されている。本研究では、ナノマテリアルの生体への健康影響に対する安全性評価に向けた、*in vitro* / *in vivo* の自験データおよび文献などのデータによるナノマテリアルの安全性評価のデータの集積とデータベースの構築を目的として、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目および QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。

今年度は、二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs）について、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成され評価文書等に収載された物理化学的性状情報と有害性情報について収集・整理し、解析に資するデータの資料作成（データマイニング）を行った。さらに収集・整理した物理化学的性状データと有害性データとの関連性について解析を実施した。その結果、データ解析の基礎となる物性値ならびに有害性情報の広域かつ高精度なデータの収集と、データマイニングのためのリソースの選択が非常に重要であった。また、物理化学的性状データと有害性データについて関連性を見出すための解析手法として多変量解析法がナノマテリアルの安全性評価に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、一般消費者に向け幅広く利用されており、日焼け止め製品としての化粧品や、塗料・抗菌雑貨など家庭用品の他、電子材料などの産業分野においても、今後、新素材として更なる応

用が期待されている。産業用ナノマテリアルのナノ粒子は、粒径サイズが 1 - 100 nm とされ、それよりも大きな粒径のものは微粒子に分類されている。一方、ナノマテリアルは物理化学的特性が従来の粒子と異なることから、既存の毒性試験法が適応可能かどうか問

題となってきた。従って、ヒト健康影響への可能性が指摘されており、ナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきている。欧州連合では、ナノ材料の安全性のデータの届出・登録の義務化への整備が進められており、国内においては、カーボンナノチューブ等で形状やサイズによって毒性が異なる可能性が示唆されている。二酸化チタン(TiO_2)は、代表的な金属酸化物粒子である。一般的には TiO_2 の微粒子は毒性が低いとされているが、二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs)は微粒子のものに比べ、サイズが小さいことや表面積が大きく、酸素反応活性化能が高く強い光触媒作用を有するため、ヒトへの暴露による健康影響の評価が重要な課題となっている。こうしたナノ物質の持つ特性から、その有害性が他の化学物質とは異なることが指摘されており、ナノ物質の健康影響を評価するためには物理化学的性状と有害性情報を関連付けた評価が必要となる。しかし、現状ではこうした評価を行うための情報が整理されていない。近年、OECDのナノマテリアル安全性評価プログラムの代表的なナノマテリアルについて、ナノマテリアル特有の物理化学的性状情報と有害性情報を掲載した dossier(ドシエ：安全性データ集)試験データの報告書が公開されている。

本研究では、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目および QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。今年度は、二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs)について、OECDのナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成され評価文書等に掲載された物理化学的性状情報と有害性情報について収集・整理し、解析に資するデータの資料作成を行った。さらに収集・整理した物理化学的性状データと有害性データとの関連性について解析を実施した。

B. 研究方法

1. 対象物質

OECD ウェブサイト上の Titanium dioxide (NM100-NM105) - Manufactured nanomaterial¹にて公表された Summary dossier と dossier² に掲載されている二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs :NM-100、NM-101、NM-102、NM-103、NM-104、NM-105 (P25)) を本研究での収集・整理の対象物質とした (Table 1)。

2. 調査対象情報源

以下の情報源を調査・収集対象情報源とした。

(1) OECD 関連資料

Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX の情報を収集した (Table 2)。

(2) その他の関連資料

- 物理化学的性状の情報の情報源として
 - Case study on grouping and read-across for nanomaterials –Genotoxicity of nano- TiO_2 (以下、Case study report)
- *in vitro* 細胞毒性試験の情報源として
 - eNanoMapper データベース³

(3) 文献情報⁴⁻⁴⁷

(1)、(2) に掲載された情報のうち原著文献の収集を行い、文献に記載された情報について収集・整理を実施した。

3. 情報整理の対象として

以下の物理化学的性状、有害性情報を情報整理の対象とした。

(1) 物理化学的性状

凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、酸化還元電位、その他のプロパティとして 168 項目を収集・整理を行った (Table 3)。

(2) 有害性情報

➤ 吸入曝露または気管内投与試験

反復投与試験が 14 試験、2 つの発がん性試験を含む反復投与以外の 9 試験の毒性試験データを収集した。これらの試験種類、動物種、試験条件、BAL 細胞数の増加、炎症、生化学値等の約 170 項目の Endpoint について調査し、LOEL 値等について収集・整理を行った。

➤ *in vitro* 細胞毒性試験（遺伝毒性試験を除く）

試験種類、細胞種、試験条件、曝露量（時間）、EC₅₀ 等を収集・整理した。

なお、eNanoMapper データベースについては、以下の 4 種類の試験についてデータの収集対象とした。

- LDH release assay
- Cell viability assay (MST-1, MST-8)
- MTT assay
- その他の細胞毒性試験

3. 情報整理及び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。

4. 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 SIMCA15 (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クラスタリ

ング解析法の実施

- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と吸入毒試験情報との関連性についての主成分分析法 (PCA : principal component analysis) の実施

C. 研究結果

(1) 物理化学的性状

データマイニング

物理化学的性状データシートについては解析を実施するため、以下についてデータマイニングを実施した (Table 3)。Table3 は主に OECD からの情報に基づいて作成しており、それ以外のデータは Case study report の情報から得た。その結果、168 項目のデータを収集した。

- Crystalline type : Anatase 型と Rutile 型を 1 および 0 と表記し、別々の項目に分けて記載した。
- Composition : impurity の各項目について、単位の表記が ppm、%、wt%であったため %w/w に換算し統一した (O と Ti は wt% と表記)。
- Dustiness : 桁数が 3 桁以上であったため Log10 に換算した。

階層的クラスタリング解析

Table3 に示されているデータマイニング後の物理化学的性状のエクセルシートについて階層的クラスタリング解析を示す (Figure 1)。その結果、全 6 物質の TiO₂ NPs の 168 項目についてクラスター化させた類似性を示した (Figure 1)。さらに PCA 解析の実施をしたスコアプロットの結果より、5 物質の TiO₂ NPs 間の変動について第一主成分 (PC1) および第二主成分 (PC2) によって特徴づけられた。PC1 のプラスの方向は NM100 に、マイナスの方向には NM101 および NM102 が分布し、PC2 はプラスの方向に

のみ NM105、NM103 および NM104 が分布し、それぞれを特徴づけることができた (Figure 2)。PC1 および PC2 の各主成分に対する物理化学的性状の項目について解析を行った結果、PC1 のプラス方向においては、Dustiness での Inhalable Mass Dustiness index (mg/kg)、Agglomeration/aggregation での 1 min sonifier/DMEM + 1% or 5% FBS の Zeta Potential (mV)、Anatase 型の Crystal size (nm) や Primary particle diameter (nm)、等の項目が特徴づけられ、PC1 のマイナス方向には、Agglomeration/aggregation での 20 min US-bath/DMEM + 5% or 10% FBS の Z-Average (d. nm)、等の項目が特徴づけられた。一方、PC2 のプラス方向においては、Crystal type の Rutile 型や、Agglomeration/aggregation での untreated/MQ Water の Z-Average (d.nm) や PdI、等の項目が特徴づけられた。

NM103、NM104、NM105：反復投与吸入毒性試験の結果および解析

収集・整理したデータの中で OECD の TG412 に準拠して Fraunhofer Institute (Germany) で 3 物質の NPs (NM103、NM104、P25) を用いて吸入毒性試験が実施されていたことから、解析対象とした。

(1) 吸入毒性試験結果

Wistar 雌雄ラットに各種 TiO₂ ナノ粒子 (NM103: 粒径: 20nm、Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm): 0.62-1.17、surface area (m²/g): 60、NM104: 粒径: 20nm、MMAD (μm): 1.00-1.57、surface area (m²/g): 60、NM105: 粒径: 22nm、MMAD (μm): 0.59-0.87、surface area (m²/g): 61) を含むエアロゾルを 0、3、12 及び 48 mg/m³ の濃度で、28 日間 (6 時間/日、5 日/週) 吸入曝露した。これらの試験では、肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められ、気管支肺胞洗浄液 (BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid) 中の総細胞数、

多形核白血球 (PMN: polymorphonuclear leukocytes) 数、マクロファージ数、総蛋白、酵素活性 (LDH, ALP, γ-GTP (GGT) 等)、マクロファージの粒子の蓄積性 (Accumulation of particle-laden macrophages) の増加が認められたので、これらの Endpoint を中心に解析した。

(2) 多変量解析

Endpoint として毒性影響が明らかな総細胞数 (LOEL 値: NM103(12 mg/m³)、NM104(12 mg/m³)、NM105(48 mg/m³))、多形核白血球数 (LOEL 値: NM103(48 mg/m³)、NM104(12 mg/m³)、NM105(48 mg/m³) について、原典⁴⁸ に戻り細胞数から推定される対照群から高用量群で増加する細胞数の約 20% 付近 (0 mg/m³ を control とした Total cell numbers : 3 倍、PMN : 100 倍付近の値) の曝露濃度をベンチマークドーズ (BMD: benchmark dose) として曝露濃度を再算出した。その結果、毒性の強さは NM104 > NM103 > NM105 であった。物性値と関連づけるため各 NPs の BMD を用いて PCA 解析を実施した結果、最も強い毒性を示した NM104 は、Specific surface area (m²/g) の SAXS surface (m²/g): 空孔、および BET surface (m²/g): 比表面積等が寄与している事が示唆された。次に毒性が強かった NM103 は、Dustiness (粒子の巻き上がり性) での Number Dustiness index (1/mg): 全体量に対する巻き上がり粒子数、Porosity: 多孔性等が主に寄与している事が示唆された。最も毒性の低かった NM105 は、Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm): 半径順に並べて質量の和が全体の半分になるところの直径: 値が大きいと沈着しにくい性質を示す) Composition での impurity で Ti が主に寄与している事が示唆された。

P25: 単一濃度の反復投与吸入毒性試験

異なる粒子径を有する二酸化チタン P25

による影響を比較した単一濃度の反復投与吸入毒性試験は、二箇所の機関(University of Rochester と BASF)で実施された 6 試験 (University of Rochester : 5 試験、BASF : 1 試験)より得た。F344 雌雄ラットに P25 の TiO₂ ナノ粒子(粒径 : 20-30nm、MMAD (μm) : 0.71-1.70、surface area (m²/g) : University of Rochester: 50、BASF: 48.6)および対照物質として NM105(P25)の TiO₂ 微粒子(粒径 : 200-250 nm、MMAD (μm) : 0.74-1.9、surface area (m²/g) : University of Rochester: 6.5、BASF: 6)を含むエアロゾルを単一濃度 [University of Rochester: 23.5(mg/m³)、BASF: 100(mg/m³)] で、6 時間/日、10 日間(University of Rochester: 1 試験)または、12 週間 (University of Rochester: 4 試験) 5 日間 (BASF: 1 試験) 吸入曝露した。これらの亜急性試験の結果、TiO₂ 微粒子ではいずれの試験期間においても毒性を示す所見は認められなかった。一方、TiO₂ NPs を曝露した群では、試験毎による多少の違いはあるが肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められ、BALF 中の総細胞数、多形核白血球数、マクロファージ数、総蛋白、酵素活性 (LDH, ALP, γ-GTP (GGT), N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG), and/or β-glucuronidase)の増加が認められた。これらの試験結果から、TiO₂ NPs にのみ毒性が認められた。但し、対象とした TiO₂ 微粒子についての物理化学的性状のデータが揃っていないため、解析には至らなかった。

in vitro 細胞毒性試験

OECD の In vitro 細胞毒性結果の収集データ(NM102 を除く 5 物質の TiO₂ NPs)では、いずれの試験データからも EC₅₀ は算出されず、細胞毒性は認められなかった。一方、eNanoMapper データベースからの収集データ ((NM100 を除く 5 物質の TiO₂ NPs)の細胞毒性試験結果について、曝露 (時間)、アッセイ法、細胞種および EC₅₀ (ug/mL) の項

目について収集し Table 4 に示した。尚、細胞毒性の同一条件のアッセイ (曝露時間、アッセイ法、細胞種) は、4 つの組み合わせ (NO.1*、NO.3*、NO.5*、NO.6*) だった。

さらに、eNanoMapper データベースにおいて NM103 のみ EC₅₀ (ug/mL) > 100 が記載されていた (Table 5)。Table 5 に示されるように、曝露 (時間) と細胞アッセイ法および細胞腫において同一条件を満たすものはなかった。

D. 考察

本研究では、TiO₂ ナノ粒子に着目し、OECD 関連資料 (Table 2) およびその他の関連資料 (Case study report、eNanoMapper データベース)を調査・収集対象の情報源として、物理化学的性状情報および有害性情報(反復投与毒性 : 吸入曝露および気管内投与試験、遺伝毒性情報を除く *in vitro* 細胞毒性)を収集した。

TiO₂ NPs (NM100-NM105)の物理化学的性状の全データから階層的クラスタリング解析を実施した結果、クラスタ化による類似性を示すことが出来た (Figure 1)。さらに PCA 解析の実施をしたスコアプロットの結果より、5 物質の TiO₂ NPs 間の変動について第一主成分 (PC1) および第二主成分 (PC2) によって特徴づけることが出来た (Figure 2)。PC1 では、Crystal type の Anatase 型の Crystal size (nm) や Primary particle diameter (nm) の物理化学的性状の項目が特徴づけられ、PC2 は Crystal type の Rutile 型や不純物として多く含まれている元素等が特徴付けられた。

反復投与吸入毒性試験の結果から、肺の所見として毒性影響が明らかに認められた Endpoint について BMD による曝露濃度を再算出し、3 物質間の毒性の強さは NM104>NM103>NM105 となった。肺の所見の結果より、肺間質への細胞浸潤・繊維化および粒子を含むマクロファージの蓄積が認

められ、肺の炎症反応を引き起こしたことから、粒径の小さな粒子は、間質へ移行しやすく、マクロファージが粒子を貪食していたことが示唆された。さらに、物理化学的性状と毒性と関連性について PCA 解析を実施し、解析した結果、NM104 の毒性の強さを特徴づける物理化学的性状は、空孔が大きく、かつ比表面積が大きいことで生体への吸着能が高くなり、さらに、MMAD の値が小さいことで生体へ沈着率が高まることが示唆された。一方、NM103 は粒子の巻き上がりの値は高いものの、NM104 に比べて比表面積の値が小さいことから生体への吸着能が NM104 に比べて弱くなり、この物理化学的性状が毒性の強さへ影響したと推察された。

P25 の TiO₂ ナノ粒子および TiO₂ 微粒子の単用量の吸入曝露試験の結果から、TiO₂ 微粒子は、いずれの試験結果においても毒性所見は認められなかった。しかし、TiO₂ ナノ粒子を曝露した群は肺間質への細胞浸潤・繊維化が認められ、肺の炎症反応を引き起こしたことから、粒径の小さな粒子は、間質へ移行しやすく、マクロファージが粒子を貪食していたことが示唆された。今回、P25 単用量の反復投与毒性試験(吸入試験)の収集データから、TiO₂ のナノ粒子の対象物質となる TiO₂ 微粒子の物理化学的性状の情報が少なかつたため、物理化学的性状と毒性を関連付ける解析に至らなかった。解析を実施するためには両者の同様な物理化学的性状の項目の測定値が必要となるため、今後の収集課題の一つと考えられた。

in vitro 細胞毒性の情報収集の結果で OECD の dossier からの NM102 を除く 5 物質の TiO₂ NPs の収集データでは、顕著な毒性を示す結果は認められなかったが、eNanoMapper データベースからの NM100 を除く 5 物質の TiO₂ NPs の収集データでは Table 4 に示されるように 9 つの細胞毒性試験において毒性を有する結果(EC₅₀)を得た。

細胞種は異なるが 24 h のアッセイ結果から、各々の NPs との毒性の強さの傾向として NM104 (EC₅₀: 151.2 ug/mL) が最も強かった。しかし、NM102 の 24 h の同一アッセイ法 (WST-1) の結果より、用いた細胞種の違いが毒性の強さ (EC₅₀) に大きく影響することが示唆された。また、NM103 および NM104 の 2 物質の TiO₂ NPs の長期試験 (10 日) で細胞毒性を示した結果より、これら 2 物質は、細胞に入り留まりやすい物理化学的性状を有する可能性が示唆された。Table 4 および Table 5 で示されるように、同一アッセイ条件 (曝露時間、アッセイ法、細胞種) の組み合わせにおいて、統一されたデータ条件がなく、さらに、NM100-NM105(P25) の TiO₂ NPs で横断的に細胞毒性評価の試験データが揃っていないことから、物質間の細胞毒性を比較解析に資する十分なデータがなく、また、アッセイ法や細胞種の違いにより毒性の結果が異なることから、今後、体系的な実験的データの収集が必要であると考えられた。

本研究で課題となった点として、物理化学的性状に関しては、単位の統一や桁数の調整、結晶型への分類など、適正な形式に変換が必要であった。一方、有害性情報 (*in vivo*) に関しては、HESS DB に搭載するために、規格化されたシートをひな形として、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することで新たな規格データシートを作成する必要があった。さらに、物理化学的性状と Endpoint からの毒性影響について関連付ける解析を実施するにあたり、より正確な毒性濃度の値を算出するため、LOEL 値を参照して原典⁴⁸に戻り BDM として再計算する必要があった。

E. 結論

本研究のナノマテリアルの安全性評価において、多変量解析法は物理化学的性状と有害性の関連性について有用な解析手法であ

ることが示唆された。また多変量解析を実施するためにはデータ解析の基礎となる物性値ならびに有害性情報の広域かつ高精度なデータの収集と、データマイニングのためのリソースの選択が非常に重要であった。今後、ナノ粒子の健康影響のさらなる解明に繋がっていくために、さらに収集データ数を増やし、より複雑なデータに対し解析を実施することが必要である。

F. 引用文献

1. <http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/titanium-dioxide-nm100-nm105-manufactured-nanomaterial.htm>
2. TITANIUM DIOXIDE: SUMMARY OF THE DOSSIER Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 73
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2016\)25&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)25&doclanguage=en)
3. <https://search.data.enanmapper.net/enm/index.html?search>
4. Ferin, J., Oberdörster, G., Soderholm, S. C., and Gelein, R., Pulmonary Tissue Access of Ultrafine Particles., *Journal of Aerosol Medicine*, 4(1), 57-68. 1991.
5. van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., Fabian, E., Burkhardt, S., Strauss, V., and Ma-Hock, L., Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: Nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz., *Toxicology Letters*, 186(3), 152-159. 2009.
6. Ma-Hock, L., Burkhardt, S., Strauss, V., Gamer, A. O., Wiench, K., van Ravenzwaay, B., and Landsiedel, R., Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance., *Inhalation Toxicology*, 21(2), 102-118. 2009.
7. Creutzenberg, O., Pohlmann, G., Hansen, T., Rittinghausen, S., Taugner, F., Ziemann, C. Nano- and microscaled titanium dioxide: Comparative study on the inflammatory and genotoxic effects after a 3-week inhalation in rats., *Toxicology Letters*, 189: S182. 2009.
8. Eydner M, Schaudien D, Creutzenberg O, Ernst H, Hansen T, Baumgärtner W, Rittinghausen, S., Impacts after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index., *Inhalation Toxicology*, 24 (9):557-69. 2012.
9. Creutzenberg O, Bellmann B, Korolewicz R, Koch W, Mangelsdorf I, Tillmann T, Schaudien, D., Change in agglomeration status and toxicokinetic fate of various nanoparticles *in vivo* following lung exposure in rats., *Inhalation Toxicology*, 24: 821-830. 2012.
10. Ferin, J., Oberdörster, G., and Penney, D. P., Pulmonary Retention of Ultrafine and Fine Particles in Rats., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 6(5), 535-542. 1992.
11. Oberdörster, G., Ferin, J., and Lehnert, B. E., Correlation Between Particle-Size, In-Vivo Particle Persistence, and Lung Injury., *Environmental Health Perspectives*, 102, 173-179. 1994.
12. "Oberdörster, G., Ferin, J., Soderholm, S., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Morrow, P. E., "Increased Pulmonary Toxicity of Inhaled Ultrafine Particles: Due to Lung Overload Alone? *Ann Occup Hyg* 38(inhaled_particles_VII), 295-302. 1994.
13. Baggs, R. B., Ferin, J., and Oberdörster, G. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats., *Veterinary Pathology*, 34(6), 592-597. 1997
14. Bermudez, E., Mangum, J. B., Wong, B. A.,

- Asgharian, B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I., Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles., *Toxicol. Sci.*, 77(2), 347-357. 2004.
15. Muhle, H., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Heinrich, U., and Mermelstein, R., Dust Overloading of Lungs - Investigations of Various Materials, Species-Differences, and Irreversibility of Effects., *Journal of Aerosol Medicine*, 3, S111- S128.1990.
16. Creutzenberg O, Biological interactions and toxicity of nanomaterials in the respiratory tract and various approaches of aerosol generation for toxicity testing., *Archives of Toxicology*, 86: 1117-1122. 2012.
17. Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W., and Levsen, K., Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and 2 Different Strains of Mice to Diesel-Engine Exhaust, Carbon-Black, and Titanium-Dioxide., *Inhalation Toxicology*, 7(4), 533-556. 1995.
18. Pott, F., and Roller, M., Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats., *European Journal of Oncology*, 10(4), 249-281. 2005.
19. Scuri, M., Chen, B. T., Castranova, V., Reynolds, J. S., Johnson, V. J., Samsell, L., Walton, C., and Piedimonte, G., Effects of Titanium Dioxide Nanoparticle Exposure on Neuroimmune Responses in Rat Airways., *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 73(20), 1353-1369. 2010.
20. Park, E. J., Yoon, J., Choi, K., Yi, J., and Park, K., Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation., *Toxicology*, 260(1-3), 37-46. 2009.
21. Gustafsson, A., Lindstedt, E., Elfsmark, L. S., and Bucht, A., Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat., *Journal of Immunotoxicology*, 8(2), 111-121. 2011.
22. Nurkiewicz, T. R., Porter, D. W., Hubbs, A. F., Cumpston, J. L., Chen, B. T., Frazer, D. G., and Castranova, V., Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction., *Particle and Fibre Toxicology*, 5, 1-12. 2008.
23. Nurkiewicz, T. R., Porter, D. W., Hubbs, A. F., Stone, S., Chen, B. T., Frazer, D. G., Boegehold, M. A., and Castranova, V., Pulmonary nanoparticle exposure disrupts systemic microvascular nitric oxide signaling., *Toxicol. Sci.*, 110(1), 191-203. 2009.
24. LeBlanc, A. J., Cumpston, J. L., Chen, B. T., Frazer, D., Castranova, V., and Nurkiewicz, T. R., Nanoparticle Inhalation Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation in Subepicardial Arterioles., *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 72(24), 1576-1584. 2009.
25. LeBlanc, A. J., Moseley A. M., Chen B. T., Frazer D., Castranova V., and Nurkiewicz T. R., Nanoparticle Inhalation Impairs Coronary Microvascular Reactivity via a Local Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism., *Cardiovasc Toxicol.*, 10:27–36. 2010.
26. Farcas L, Torres Andón F, Di Cristo L, Rotoli BM, Bussolati O, Bergamaschi E, et al., Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials, *PLoS ONE*, 10(5):

- e0127174. 2015
27. Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., and Schins, R.P.F., Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells., *Nanotoxicology*, 3 (4), 355-364. 2009.
 28. Puzyn, T., Rasulev, B., Gajewicz, A., Hu, X., Dasari, T.P., Michalkova, A., Hwang, H.-M., Toropov, A., Leszczynska, D. & Leszczynski, J., Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles., *Nature Nanotechnology*, 6 (3), 175–178. 2011.
 29. Liu, R., Rallo,R., George, S., Ji, Z., Nair, S., Nel, A.E., and Cohen, Y., Classification NanoSAR Development for Cytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles., *Small*, 7 (8) 1118-1126. 2011.
 30. Renwick, L. C., Donaldson, K., and Clouter, A., Impairment of Alveolar Macrophage Phagocytosis by Ultrafine Particles.,*Toxicology and Applied Pharmacology*, 172(2), 119-127. 2001.
 31. Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., and Nel, A. E., Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm., *Nano Letters*, 6(8), 1794-1807. 2006.
 32. Kang, J. L., Moon, C., Lee, H. S., Lee, H. W., Park, E. M., Kim, H. S., and Castranova, V., Comparison of the biological activity between ultrafine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress., *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 71(8), 478-485. 2008.
 33. Han, W., Wang, Y. D., and Zheng, Y. F., In vitro biocompatibility study of nano TiO₂ materials., *Advanced Materials Research*, 47-50, 1438-1441. 2008.
 34. Komatsu, T., Tabata, M., Kubo-Irie, M., Shimizu, T., Suzuki, K. I., Nihei, Y., and Takeda, K., The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro., *Toxicology in Vitro*, 22, 1825-1831. 2008.
 35. VanWinkle, B. A., Mesy Bentley, K. L., Malecki, J. M., Gunter, K. K., Evans, I. M., Elder, A., Finkelstein, J. N., Oberdörster, G. and Gunter, T. E., Nanoparticle (NP) uptake by type I alveolar epithelial cells and their oxidant stress response., *Nanotoxicology*, 3(4), 307-318. 2009.
 36. Zhao, J. S., Bowman, L., Zhang, X. D., Vallyathan, V., Young, S. H., Castranova, V., and Ding, M., Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles Induce JB6 Cell Apoptosis Through Activation of the Caspase-8/Bid and Mitochondrial Pathways., *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*, 72(19), 1141-1149. 2009.
 37. Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Mayne-L'hermite, M., Reynaud, C., Cassio, D., Gouget, B., and Carriere, M., Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study., *J. Nanopart. Res.*, 12(1), 61-73. 2010.
 38. Simon, M., Barberet, P., Delville, M. H., Moretto, P., and Sez nec, H., Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity., *Nanotoxicology*, 5 (2), 125-139. 2011.
 39. Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry,

- G. V., and Veronesi, B., Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticle neurotoxicity., *Environmental Science and Technology*, 40(14), 4346-4352. 2006.
40. Long, T. C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G. V., and Veronesi, B., Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro., *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1631-1637. 2007.
41. Liu, S., Xu, L., Zhang, T., Ren, G., and Yang, Z., Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells., *Toxicology*, 267(1-3), 172-177. 2010.
42. Shin, J. A., Lee, E. J., Seo, S. M., Kim, H. S., Kang, J. L., and Park, E. M. Nanosized titanium dioxide enhanced inflammatory responses in the septic brain of mouse., *Neuroscience*, 165(2), 445-454. 2010.
43. Liu, R., Yin, L. H., Pu, Y. P., Li, Y. H., Zhang, X. Q., Liang, G. Y., Li, X. B., Zhang, J. A., Li, Y. F., and Zhang, X. Y., The immune toxicity of titanium dioxide on primary pulmonary alveolar macrophages relies on their surface area and crystal structure., *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10(12), 8491-8499. 2010.
44. Winter, M., Beer, H. D., Hornung, V., Krämer, U., Schins, R. P. F., and Förster, I., Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells., *Nanotoxicology*, 5(3), 326-340. 2011.
45. Hamzeh & Sunahara, In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells, *Toxicology in Vitro*, 27, 864-873. 2013.
46. Roblegg E, Fröhlich E, Meindl C, Teubl B, Zaversky M, Zimmer A., Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa., *Nanotoxicology*, 6(4):399-413. 2012.
47. Creutzenberg, O., Bellmann, B., Heinrich, U., Fuhst, R., Koch, W., and Muhle, H., Clearance and Retention of Inhaled Diesel Exhaust Particles Carbon-Black and Titanium-Dioxide in Rats at Lung Overload Conditions., *Journal of Aerosol Science*, 21 (Suppl. 1), S455-S458. 1990.
48. DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES - ANNEX 21 Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 54

G. 研究発表

(論文発表)

- (1) K. Imai, I. Nakanishi, K. Ohkubo, A. Ohno, M. Mizuno, S. Fukuzumi, K. Matsumoto, K. Fukuhara. Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **27** (8), 1720-1727, 2019.

(学会発表)

- (1) 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、松本謙一郎、大野彰子. 金属イオン配位により活性化する抗酸化物質の開発、日本農芸化学会 2019 年度大会、東京 (2019. 3)
- (2) 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、松本謙一郎、大野彰子. 金属錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発：、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、京都 (2018. 11)
- (3) K. Fukuhara, T. Arai, A. Ohno, K. Mori, M. Shibamura, N. Miyata, H. Nakagawa.

Potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease: a peptide that blocks amyloid β induced neurotoxicity, ACS Fall 2018 National Meeting, Boston, 2018 August 19

- (4) T. Yamada, M. Kurimoto, M. Miura, T. Kawamura, K. Jojima, N. Taira, H. Ohata, S. Tsujii, A. Ohno, A. Hirose. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

Table 1. Target substances: Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs, NM100-NM105).

NM	Product name	Crystal type	Surface coating	Composition (TiO ₂ , %)
NM-100	Tiona AT-1	Anatase	uncoating	98.7
NM-101	Hombikat UV 100	Anatase	uncoating	91.7
NM-102	PC105	Anatase	uncoating	95.4
NM-103	UV TITAN M262	Rutile	Al ₂ O ₃ and SiO ₂	89.0
NM-104	UV TITAN M212	Rutile	Al ₂ O ₃ and SiO ₂ , glycerol	89.0
NM-105 (P25)*	Aeroxide P25	85% Anatase 15% Rutile	uncoating	99.0

* Principle material: Aeroxide®P 25 (P25) was chosen as principle material, meaning all endpoints will be addressed for this material, because of its widespread use on the market and within the scientific community to perform comprehensive investigations.

Table 2. Target materials (TiO₂ NPs, NM100-NM105) collected from the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).

Type	Title	Remarks
Summary dossier	TITANIUM DIOXIDE: SUMMARY OF THE DOSSIER Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 73	
Individual dossier	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 1/1 - NM 105	NM-105の物理化学的性状
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 1/3 - NM 105	NM-105の有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 2- NM 100	NM-100の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 3- NM 101	NM-101の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 4- NM 102	NM-102の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 5- NM 103	NM-103の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 6- NM 104	NM-104の物理化学的性、有害性
ANNEX	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 19	NM100-NM105の物理化学的性状をまとめたJRCレポート
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 3	Nanogenotoxで用いられたNM100-NM105の物化性状情報
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 10	NanogenotoxによるNM100-NM105の気管内投与試験のDossier
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 21	Fraunhofer ITEMのCreutzenbergらによるNM 103, 104, 105を用いたラットの28日間反復吸入ばく露試験

Figure 1. Hierarchical clustering based on physicochemical values of the TiO₂ NPs.

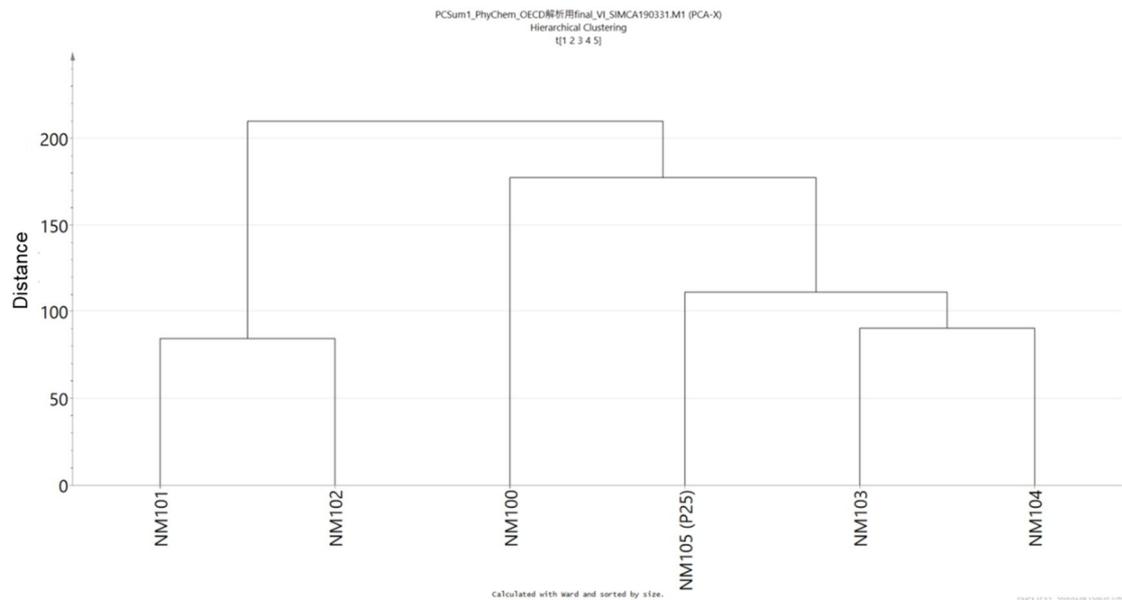


Figure 2. PCA analysis based on physicochemical values of the TiO₂ NPs.

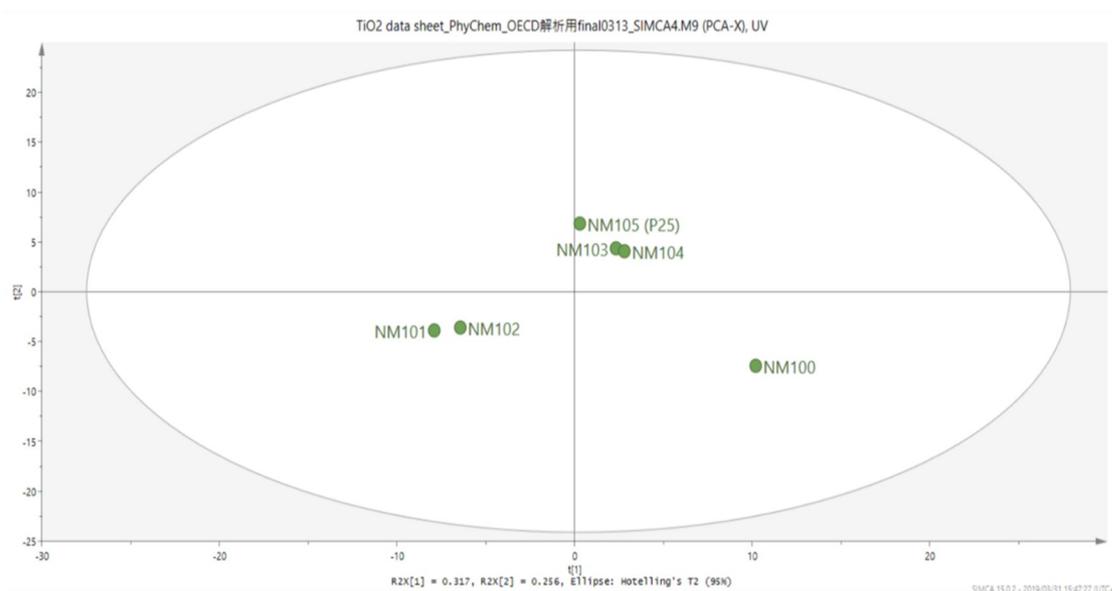


Table 3. Physicochemical properties of the TiO₂ NPs.

Property	Method/ Instrument	NM100	NM101	NM102	NM103	NM104	NM105 (P25)			
1	Particle size, size distribution	Primary particle diameter (nm) Anatase	TEM	1	50	6	21	21		
2		Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	2			26	26		
3		Primary particle diameter (nm) Anatase	TEM	3		22		24		
4		Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	4			26	26		
5		Primary particle diameter (nm) Anatase	TEM	5	116.9	4.5	22	20.5		
6		Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	6			23.7	23		
7		Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	7				15		
8		Feret mean (Manual Mesurement) (nm)	TEM	8				22.6		
9		Feret mean (Automatical Mesurement) (nm)	TEM	9				21.6		
10	Composition	Impurity (% w/w Fe)	EDS	10	0.49	0	0.07	0	0	
11		Impurity (% w/w Si)	EDS	11	0.28	0.29	0.08	0.68	0.18	0.07
12		Impurity (% w/w K)	EDS	12	0.25	0	0.001	0.001	0.001	0
13		Impurity (% w/w P)	EDS	13	0.21	0.27	0.001	0	0	0
14		Impurity-coating (% w/w Al)	EDS	14	0.09	0.09	0.05	3.43	3.22	0.04
15		Impurity (% w/w Cr)	EDS	15	0.03	0	0.005	0	0	0
16		Impurity (% w/w Zr)	ICP_OES	16	0.005	0.01	0.005	0.001	0.001	0
17		Impurity (% w/w Ca)	ICP_OES	17	0.001	0.001	0.005	0.005	0.01	0
18		Impurity (% w/w Na)	ICP_OES	18	0.001	0.1	0.001	0.01	0.01	0.001
19		Impurity (% w/w S)	ICP_OES or EDS	19	0	0.22	0.01	0.26	0.32	0
20		Impurity (% w/w Mg)	ICP_OES	20	0	0	0	0.001	0.001	0
21		O (wt%)	EDS	21	40.08	40.35	40.07	40.82	40.68	40.07
22		Ti (wt%)	EDS	22	58.57	58.79	59.73	54.74	55.6	59.81
23	Agglomeration/aggregation	Size (d.nm)	untreated/MQ Water	23	391.2	1609	1115	973.2	727.8	1102
24		Z-Average (d.nm)	untreated/MQ Water	24	343	1746	1062	671.6	367.8	720
25		Pdl	untreated/MQ Water	25	0.176	0.264	0.187	0.287	0.376	0.539
26		Zeta Potential (mV)	untreated/MQ Water	26	-34	-10.1	2.73	40.4	32.5	49.4
27		monomodal	untreated/MQ Water	27						
28		Zeta Deviation	untreated/MQ Water	28	8.26	3.49	8.86	5.27	5.33	6.12
29		Size (d.nm)	untreated/PBS	29	1440	1188	1528	1977	1817	4526
30		Z-Average (d.nm)	untreated/PBS	30	2289	1229	1579	1397	1600	3342
31		Pdl	untreated/PBS	31	0.355	0.239	0.769	0.255	0.232	0.382
32		Zeta Potential (mV)	untreated/PBS	32	-36.5	-23.3	-7.21	-35.5	-18.4	-23.5
33		monomodal	untreated/PBS	33						
34		Zeta Deviation	untreated/PBS	34	6.81	12.7	31.5	30.7	9.58	28.1
35		Size (d.nm)	untreated/DMEM + Lglutamine	35	995.5	1438	2745	2255	3059	1881
36		Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + Lglutamine	36	2129	1954	2427	1665	2869	2868
37		Pdl	untreated/DMEM + Lglutamine	37	0.662	0.359	0.181	0.256	0.247	0.317
38		Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + Lglutamine	38	-0.839	-8.84	-4.92	-19.9	-7.88	-4.71
39		monomodal	untreated/DMEM + Lglutamine	39	-7.62		-5.77	-9.46		
40		Zeta Deviation	untreated/DMEM + Lglutamine	40	49.8	13.3	25.2	20.9	22.2	12
41		Size (d.nm)	untreated/DMEM + 1% FBS	41	736	1201	1415	1040	1156	2454
42		Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + 1% FBS	42	606.8	1166	1295	828.8	1111	1599
43		Pdl	untreated/DMEM + 1% FBS	43	0.168	0.201	0.081	0.269	0.208	0.268
44		Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + 1% FBS	44	-8.7	-9.59	-11.9	-8.8	-29.4	-11.6
45		monomodal	untreated/DMEM + 1% FBS	45						
46		Zeta Deviation	untreated/DMEM + 1% FBS	46	16.6	11	37.2	9.41	27.4	15.4
47		Size (d.nm)	untreated/DMEM + 5% FBS	47	845.4	1278	1414	991.1	719.3	1709
48		Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + 5% FBS	48	621.9	1039	1234	653.2	657.5	1116
49		Pdl	untreated/DMEM + 5% FBS	49	0.231	0.232	0.139	0.293	0.22	0.379
50		Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + 5% FBS	50	-9.95	-8.17	-11	-10.8	-10.6	-10.7
51		monomodal	untreated/DMEM + 5% FBS	51						
52		Zeta Deviation	untreated/DMEM + 5% FBS	52	15.3	24.8	13	12	13.1	21.9
53		Size (d.nm)	untreated/DMEM + 10% FBS	53	639.1	1406	1521	1156	711.2	1030
54		Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + 10% FBS	54	582.4	1127	1227	683.3	617.8	937.3
55		Pdl	untreated/DMEM + 10% FBS	55	0.262	0.194	0.182	0.369	0.201	0.341
56		Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + 10% FBS	56	-7.89	-10.5	-8.69	-8.47	-10.4	-8.58
57		monomodal	untreated/DMEM + 10% FBS	57						
58		Zeta Deviation	untreated/DMEM + 10% FBS	58	20.9	12.8	17.7	13.6	13.9	13.4
59		Size (d.nm)	1 min sonifier/MQ Water	59	259.3	719.5	703	2649	207.7	352.6
60		Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/MQ Water	60	201.3	500.9	505.7	1977	194.3	227.5
61		Pdl	1 min sonifier/MQ Water	61	0.205	0.274	0.248	0.393	0.236	0.211
62		Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/MQ Water	62	-24.5	-27.2	-27.1	39.1	-23.4	-23.8
63		monomodal	1 min sonifier/MQ Water	63						
64		Zeta Deviation	1 min sonifier/MQ Water	64	10.5	5.5	7.29	6.08	4.87	5.1
65		Size (d.nm)	1 min sonifier/PBS	65	2116	2254	2525	1629	4031	1682
66		Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/PBS	66	1624	1827	2079	2275	3197	3585
67		Pdl	1 min sonifier/PBS	67	0.219	0.283	0.188	0.442	0.334	0.443
68		Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/PBS	68	-26.7	-19.7	-25.1	-20.8	-16.9	-20.5
69		monomodal	1 min sonifier/PBS	69	-27.6					
70		Zeta Deviation	1 min sonifier/PBS	70	161	16	12.8	16.5	20.8	17.3
71		Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	71	2973	2854	3488	4043	1701	4673
72		Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	72	2514	2350	2701	3551	3306	3507
73		Pdl	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	73	0.332	0.217	0.268	0.279	0.434	0.395
74		Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	74	20.5	22.3	-3.14	-8.44	-7.29	-2.55
75		monomodal	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	75	1.58	-5.52				
76		Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	76	35.5	43.7	9.89	25.5	14.8	11.7

77	Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	77	405.3	678.5	837.5	275.6	333.6	306.8	
78	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	78	310.4	521.2	590	263.5	278.5	265.3	
79	Pdl	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	79	0.207	0.232	0.243	0.243	0.194	0.177	
80	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	80	-9.14	-11.8	-13.6	-9.98	-8.88	-9.37	
81	monomodal	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	81	-10						
82	Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	82	41.6	18.8	20.4	19.1	-19.7	19.1	
83	Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	83	408.8	755.5	901.8	432.4	278.2	336.9	
84	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	84	315.2	569.2	617.3	345.8	228.5	286.3	
85	Pdl	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	85	0.194	0.232	0.27	0.25	0.161	0.207	
86	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	86	107	-15	-13.4	-12	15.1	9.43	
87	monomodal	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	87	1.75		-11.5		-11.8	-11.5	
88	Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	88	275	19.9	25.3	19.8	37.6	35.5	
89	Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	89	345.8	823.6	1077	370.9	334.4	349.8	
90	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	90	283.9	623.4	732.2	286.9	267.8	281.2	
91	Pdl	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	91	0.176	0.24	0.27	0.196	0.178	0.196	
92	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	92	78.4	-13	-10.5	-12.4	-9.38	-9.92	
93	monomodal	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	93	-4.19			-11.9	-9.5		
94	Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	94	193	16.9	13.5	25.6	48.7	15.3	
95	Size (d.nm)	20 min US-bath/MQ Water	95	378.8	1111	1103	765.3	344.5	902	
96	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/MQ Water	96	307.6	1130	794.1	596.9	290.8	474.4	
97	Pdl	20 min US-bath/MQ Water	97	0.199	0.351	0.254	0.393	0.306	0.443	
98	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/MQ Water	98	-40.6	-27.5	30.3	39.1	24.6	-32.6	
99	monomodal	20 min US-bath/MQ Water	99							
100	Zeta Deviation	20 min US-bath/MQ Water	100	6.58	3.67	9.37	6.08	4.39	3.37	
101	Size (d.nm)	20 min US-bath/PBS	101	1042	1265	1789	1449	2779	4437	
102	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/PBS	102	1217	1276	1809	1350	2284	4514	
103	Pdl	20 min US-bath/PBS	103	0.317	0.238	0.231	0.25	0.227	0.274	
104	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/PBS	104	-20.2	-21.7	-18.5	-20.9	-20.3	-33.2	
105	monomodal	20 min US-bath/PBS	105							
106	Zeta Deviation	20 min US-bath/PBS	106	16.7	12.9	15.6	11.2	9.63	14.4	
107	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	107	1059	1974	2001	2916	3207	1956	
108	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	108	1754	1992	1997	2268	2636	2938	
109	Pdl	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	109	0.515	0.247	0.227	0.264	0.209	0.341	
110	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	110	-1.55	3.6	-3.46	-8.76	-9.98	-8.55	
111	monomodal	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	111	-1.84	-7.32					
112	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	112	25.4	27.5	14.9	15.4	18.1	11.5	
113	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	113	631.9	1368	1063	684.1	975.4	969.6	
114	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	114	540.2	668.7	975.4	526.8	520.4	743.9	
115	Pdl	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	115	0.195	0.282	0.054	0.317	0.282	0.48	
116	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	116	-11.4	-12	-12.4	-10.0	-10.2	-7.76	
117	monomodal	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	117							
118	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	118	16.2	44	17.6	15.4	12.8	12.2	
119	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	119	522.7	1073	1487	1079	925	848.3	
120	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	120	450.4	1065	1197	656.9	696.2	921.8	
121	Pdl	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	121	0.223	0.302	0.179	0.367	0.221	0.456	
122	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	122	-10.4	-11.3	-9.47	-13.7	-9.38	-11.9	
123	monomodal	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	123							
124	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	124	16.9	13.6	12	20.3	11.8	12.2	
125	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	125	565.7	1255	1228	1155	605.2	1110	
126	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	126	473.1	957.9	874.8	570.3	480.8	619.8	
127	Pdl	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	127	0.204	0.234	0.235	0.417	0.239	0.391	
128	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	128	-11.3	-11.5	-10.4	-11.8	-10.5	-5.43	
129	monomodal	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	129	-10.2					-9.61	
130	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	130	14.3	14	19.5	14.1	13.4	26.5	
131	Pdl	DLS	131			0.427	0.242	0.221	0.171	
132	Isoelectric Point (pH)	ultrasonic spectroscopy	132				6		6.9	
133	Crystalline type (Anatase)	XRD	133	1	1	1	0	0	0.85	
134	Crystalline type (Rutile)	XRD	134	0	0	0	1	1	0.15	
135	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Peak fit	135	56.66	5	18			18	
136	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Peak fit	136					19		
137	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/TOPAS	137	61.87	5	16			18	
138	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/TOPAS	138				19	20		
139	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Fullprof	139	168.18	7	18			19	
140	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Fullprof	140				20	18		
141	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Scherrer eq.	141	100	7	23			27	
142	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Scherrer eq.	142				26	27		
143	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/TOPAS, IB	143	100	7	26			27	
144	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/TOPAS, IB	144				25	25		
145	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/TOPAS, FWHM	145	100	10	28			31	
146	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/TOPAS, FWHM	146				28	29		
147	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Scherrer eq.	147	100		30			23	
148	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Scherrer eq.	148				18	23		
149	Aspect ratio	TEM	149						1.36	
150	Specific surface area (m ² /g)	SAXS surface (m ² /g)	150		169.5	65.6	51.1	52.4	47.0	
151	BET surface (m ² /g)	BET	151	9.23	316.07	77.992	50.835	56.261	46.175	
152	Total pore volume (ml/g)	BET	152	0.0324	0.319	0.2996	0.2616	0.1935	0.1937	
153	Micro surface area (m ² /g)	BET	153	0	13.625	1.108	0	0	0	
154	micropore volume (ml/g)	BET	154	0	0.00179	0.00034	0	0	0	
155	Dustiness	Number Dustiness Index (1/mg)	Small Rotating Drum	155	6.04	5.47	7.26	5.62	5.50	
156	Inhalable Mass Dustiness Index (mg/kg)	Small Rotating Drum	156		2.86	2.43	3.96	3.59	3.01	
157	Respirable Mass Dustiness Index (mg/kg)	Small Rotating Drum	157		1.38	1.18	2.51	1.58	1.45	
158	Number Dustiness Index (1/g)	measured by CPC (180s) Vortex Shaker (VS) m	158		5.20	4.98	5.73	4.63	4.54	
159	Number Dustiness Index (1/g)	measured by CPC (360s) Vortex Shaker (VS) m	159		6.49	5.85	6.28	5.32	5.36	
160	Number Dustiness Index (1/g)	measured by ELPI Vortex Shaker (VS) m	160		5.51	4.98	6.30	5.40	6.00	
161	Respirable Mass Dustiness Index (mg/kg)	Vortex Shaker (VS) m	161		3.75	3.96	4.28	3.81	4.04	
162	covered by hydrophobic layer of dimethicone (C2H6OSi)n		162				1			
163	high hydrophilic surface		163					1		
164	Porosity	total pore volume (ml/g)	BET	164	0.0324	0.319	0.2996	0.2616	0.1935	0.1937
165	micropore volume (ml/g)		BET	165	0	0.00179	0.00034	0	0	0
166	Photocatalytic activity		UV-Vis	166			0	0	1	
167	Radical formation potential	OH ⁻ generation		167			0	0	0	
168	Surface reactivity			168			0	1	0	

Table 4. Cytotoxicity assay data of the TiO₂ NPs (NM101-NM105) extracted from eNanoMapper database.

Time	Cell assay	Measurement condition	NO	NM100	NM101	NM102	NM103	NM104	NM105 (P25)
24 (hr)	WST-1 assay	EC ₅₀ (µg/mL)	1*			1484.4			187.8
		Test cell type				A549			A549
		EC ₅₀ (µg/mL)	2		1041.9	350.8			
	LDH assay	Test cell type			NCI-H292	16HBE			
		EC ₅₀ (µg/mL)	3*				8250.3	151.2	
		Test cell type					A549	A549	
48 (hr)	WST-1 assay	EC ₅₀ (µg/mL)	4						306.4
		Test cell type							A549
144 (hr)	MTT assay	EC ₅₀ (µg/mL)	5*				4.0	107.2	
		Test cell type					NIH/3T3	NIH/3T3	
240 (hr)	MTT assay	EC ₅₀ (µg/mL)	6*				1.3	23.0	
		Test cell type					mES	mES	
240 (hr)	WST-1 assay	EC ₅₀ (µg/mL)	7				37.4		
		Test cell type					NIH/3T3		
		EC ₅₀ (µg/mL)	8				11.4		
		Test cell type					mES		
		EC ₅₀ (µg/mL)	9				23.5		
		Test cell type					mES		

1*, 3*, 5*, 6*:Combination of assays with the same time and cell lines, A549, NIH/3T3, mES
A549 : human adenocarcinoma-derived alveolar basal epithelial
NIH/3T3 : mouse fibroblast cell
mES : D3 mouse embryonic stem sell

Table 5. Cytotoxicity assay data extracted from eNanoMapper database for NM103 with EC₅₀ (> 100).

Time	Cell assay	Test cell type	NM103	Number of assay tests for different doses	
			EC ₅₀ (µg/mL)		
6, 24 (hr)	LDH release assay	HMDM	> 100	2	
24 (hr)	WST-1 assay	TM3	> 100	2	
		TM4	> 100	2	
	WST-8 assay	16HBE	> 100	2	
		NIH3T3	> 100	2	
		NRK-52E	> 100	2	
		RAW 264.7	> 100	2	
		RLE-6TN	> 100	2	
		LDH release assay	NRK-52E	> 100	2
	24, 48, 72 (hr)	Rasazurin assay, NRU assay	RAW 264.7	> 100	2
			MH-S	> 100	2
			Calu-3	> 100	2
			NIH3T3	> 100	2
240 (hr)	WST-1 assay	NIH3T3	> 100	1	

HMDM (human monocyte-derived macrophages)

TM3 (mouse Lydig cell)

TM4 (mouse Sertoli cell)

16HBE (human bronchial epithelial cell)

NIH3T3 (mouse fibroblast cell)

NRK-52E (normal rat kidney cell)

RAW 264.7 (mouse peritoneal macrophage)

NRK-52E (normal rat kidney cell)

RLE-6TN (Rat lung epithelial cell)

MH-S (mouse alveolar macrophage)

Calu-3 (human lung adenocarcinoma)