

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進事業

食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究

(20KA1006)

令和2年度～令和4年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 久美子

令和5(2023)年 5月

目 次

I. 総合研究報告書

食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究 小川久美子	--- 1
--	-------

(資料)

【1. ナノ酸化チタンの経口反復投与毒性】

1) 6 nm の酸化チタンの 28 日間反復投与毒性試験. Table 1~5 Figure 1~5	----- 39
2) 6 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験. Table 1~6 Figure 1~3	----- 48
3) 6, 30, 180 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験 (1000 mg/kg bw/day) Table 1~5 Figure 1~2	---- 61

【2. ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析】

(実験 1, 2) 経皮感作時のOVA用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響, より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討 Figure 1~7 Table 1	----- 69
(実験 3) 粒子径15 nmのナノ酸化チタンの影響に関する検討 Figure 1~5 Table 1	----- 73
(実験 4) 経皮感作時及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響 Figure 1~5 Table 1	----- 76

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 79
--------------------	----------

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総合研究報告書（令和2年度～令和4年度）

食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究

研究代表者： 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

研究要旨

本研究は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータの蓄積、評価方法の検討並びにその暴露状況やリスク評価に関する国際動向の把握を目的としている。

ナノ酸化チタン及びナノ銀の経口反復投与毒性と体内動態解析に関する研究では、令和2年度は、ラットを用いた酸化チタンの90日間反復投与毒性試験の用量設定試験として、強制経口投与による28日間反復投与試験を実施した。0.2%リン酸水素二ナトリウム（DSP）に懸濁した結晶子径6nmのアナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン（50パーセントイル二次粒子径約200nm）をF344/DuCrjラットに10、100、1000mg/kg bw/dayの用量で28日間反復経口投与したところ、全ての群で死亡はみられず、体重、一般状態、血液学的検査、および臓器重量に毒性学的に有意な変化は見られなかった。血液生化学的検査では、雌の1000mg/kg bw/day群でトリグリセリドの有意な増加が見られた。

令和3年度は、ラットを用いた二酸化チタンの28日間反復投与試験の解析を継続し、体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量、病理組織学的検査において投与に関連する可能性のある毒性変化は認められなかったことと総合して、28日間試験におけるNOAELは1000mg/kg bw/dayと考えられた。その結果に基づき、F344/DuCrjラット雌雄を用いて、0.2% DSPに懸濁した結晶子径6nmのアナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン（50パーセントイル二次粒子径約200nm）について、0、100、300、1000mg/kg bw/dayの用量で90日間の反復強制経口投与毒性試験を実施し、併せて肝臓、腎臓及び脾臓中のTi量測定を行った。その結果、投与に関連した毒性学的に有意な変化は見られなかったことから、本試験におけるNOAELは1000mg/kg bw/dayと結論した。また、90日試験の主要臓器におけるTi量を測定したところ、肝臓、腎臓および脾臓中のTi含量に対照群との差異は見られなかった。90日間の反復投与によって、28日間投与では確認されなかった回腸パイエル板等のリンパ組織に被験物質と考えられる黄褐色粒子の沈着が見られ、経口暴露によって消化管から生体内にTiO₂が微量ながら取り込まれることが示唆された。一方、28日間投与試験検体と比較しても、肝臓、腎臓、脾臓におけるTiの蓄積は見られ

ず、炎症反応や組織障害等の生体反応も伴っていないことから、微量の TiO₂ の毒性学的意義は乏しいと考えられたが、生体への取込と粒子サイズの関係は更なる検討が必要と考えられた。

令和 4 年度は、これまでの結果から、ラットを用いた二酸化チタンの 90 日間反復経口投与毒性試験において、結晶子径 6 nm のアナターゼ型 TiO₂ (AMT-100、個数基準分布の 50 パーセントイル粒子径 = 約 200 nm) による有害影響は見られなかったが、投与された TiO₂ 粒子の凝集体とみられる黄褐色物質の沈着が小腸パイエル板に認められたことから、経口曝露された二酸化チタンが消化管で生体内に取り込まれることが示された。そこで本年度は、生体内への取り込みおよび毒性影響における粒子径の影響を明らかにすることを目標として、結晶子径の異なる 3 種類のアナターゼ型 TiO₂ 製品である AMT-100、AMT-600、TITANIX JA-1 (それぞれ結晶子径 6 nm、30 nm、および 180 nm) をラットに 90 日間反復経口投与した。その結果、投与に伴う体重および一般状態の変化は観察されず、尿検査、血液検査、血液生化学的検査および臓器重量においても毒性影響は見られなかった。病理組織学的検査では全ての TiO₂ 投与群で小腸パイエル板及びリンパ組織に黄褐色粒子の沈着は観察されたが、炎症や組織障害などの毒性影響は観察されなかった。以上の結果から、TiO₂ の生体影響に対する結晶子径の影響は小さいことが示された。

ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析では、

品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータを蓄積するため、化粧品等への配合とともに着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンが、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。OVA 2μg×4 回の経皮感作、OVA 30 mg×7 回の経口投与による追加免疫、その後の OVA 50 mg の経口投与によりアレルギー症状を惹起する抗原経皮感作-経口惹起実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討した。令和 2、3 年度においては、粒子径 6 nm、15nm 及び 30nm のアナターゼ型ナノ酸化チタンが経口投与時の共存により経口追加免疫を有意に増強することを示した。一方、粒子径 15nm 及び 30-50 nm のルチル型ナノ酸化チタンでは、このような経口追加免疫の増強効果は見られなかった。令和 4 年度においては、粒子径 6 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンを経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程において OVA と共存させ、その影響を検討した。その結果、これまでの検討と同様に OVA 経皮感作及び経口追加免疫を増強したが、経皮感作時の共存による経口追加免疫増強効果に対する影響は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要と考えられた。

食品関連分野のナノマテリアル並びに新規素材の安全性評価に関する国際動向調査では、

食品関連分野におけるナノマテリアル並びに新規素材の安全性評価に関する国際動向を調査することを目的とする。研究期間をとおして欧州食品安全機関（EFSA）が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークに関する調査を行った他、令和 2 および 4 年度に開催された米国食品医薬品局（FDA）のワークショップ「FDA’s NanoDay Virtual Research Symposium」に参加し、ナノテクノロジーの現状や FDA の科学的な根拠に基づくナノテクノロジーの規制政策、ナノテクノロジーのレギュラトリーサイエンス研究の概要に関する調査を実施した。FDA はナノテクノロジー製品に対する規制アプローチを明確にし、現在までに、FDA は 5 つの最終ガイダンス文書を発行している。令和 4 年には、ナノ材料を含む食品接触物質（FCS）の安全性評価について焦点をあてており、その安全性評価は FCS のナノスケール状態に関連するデータに基づいて実施され、新しい物理化学的特性を持つ場合には、追加または代替の試験方法が必要となる場合があることが示されていた。EFSA ネットワークに関して、令和 2 年度は EFSA の新ガイドライン（2018 年）の更新状況とそれを捕捉するテクニカルガイダンス案についての議論が行われていた。新ガイドラインの主な更新内容にはナノの範囲に関連する明確化、ナノ材料の物理化学的特性化に関する新しい技術更新、毒性評価に関するセクションの更新が含まれている。一方、「粒子に関するテクニカルガイダンス（ナノ粒子を含む小さな粒子の存在を確認するための規制対象食品・飼料製品申請のための技術的要件に関するガイダンス）」では、従来の材料におけるナノフラクションの存在の可能性を評価するアプローチを提案し、ナノ粒子がナノ特有のリスク評価の考慮を必要とするかどうかを評価する戦略を提供している。R3 年度は二つの EFSA ガイダンス文書の発行状況や更新内容についての議論に加えて EFSA 食品添加物・香料に関するパネルが再評価した食品添加物としての二酸化チタン（E171）の安全性評価に関する科学的意見を新たに発表した内容や、合成アモルファスシリカ（SAS）ナノ粒子の経口曝露のリスク評価に関する取り組みや腸管 *in vitro* モデルについての議論があった。R4 年度は、テクニカルガイダンスに関する付属書草案「酸性条件下での分解/溶解速度」が提示され議論された。また 2021 年に ANSES が公表した「食品中のナノ材料の健康リスク評価ガイド」の評価事例として 2022 年末に公表予定の「二酸化チタンへのナノ特定リスク評価の実装に関する意見」についての意見交換が行われた。また、OECD の工業ナノ材料に関する作業部会（WPMN）におけるナノテクノロジー分野の主な活動について、最近、OECD テストガイドライン（TG）125 の「ナノ材料の粒子サイズとサイズ分布」および TG124 の「産業用ナノ材料の体積比表面積の測定」が公表されたことや、ナノマテリアルに関する様々な分野でのプロジェクトのリストが提示された。さらに、最近、OECD WPNM は、新規素材（Advanced Materials）の安全性、革新性、持続可能性の側面に焦点をあてた活動を開始し、ナノ材料と先端材料が循環型経済に支えられた安全で持続可能な方法での開発を確保に向けて、先端材料の戦略的アプローチを開発していることが紹介されていた。今後の欧米における食品関連物質のナノ

マテリアル評価動向は、より具体的なガイダンスの適用例や詳細な評価手法の開発に関する議論が中心となっていくものと考えられた。

キーワード：酸化チタン、経口反復投与、ラット、経皮経口感作、マウスモデル、国際動向、EFSA、FDA

研究分担者：安達 玲子

国立医薬品食品衛生研究所

生化学部 室長

研究分担者：広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

安全性予測評価部 客員研究員

研究協力者：赤木純一

国立医薬品食品衛生研究所

病理部 主任研究官

研究協力者：為広 紀正

国立医薬品食品衛生研究所

生化学部 主任研究官

研究協力者：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：大畑 秀雄

国立医薬品食品衛生研究所

安全性予測評価部 研究員

研究協力者：最上 知子

国立医薬品食品衛生研究所

生化学部 客員研究員

A. 研究目的

本研究は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータの蓄積、評価方法の検討並びにその暴露状況やリスク評価に関する国際動向の把握を目的としている。

ナノ酸化チタンの経口反復投与毒性に関

して、酸化チタン (TiO_2) は産業界でも多く製造されているナノ材料の一つである。 TiO_2 は不溶性かつ不活性であるため、一般には人体に影響の少ない化合物とされている。経口摂取による TiO_2 の安全性について、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) による安全性評価では TiO_2 は毒性の低い A (1) に分類され、毒性学的に摂取量を制限する必要がないとされており、日本および各国において食品添加物として認可されている (蒲生昌志 編、ナノ材料リスク評価書 -二酸化チタン(TiO_2)-, 最終報告版:

2011.7.22)。動物実験では食品添加物として用いられている TiO_2 (AEROXIDER TiO_2 P25, KRIS CRM 301-03-001、一次粒子径 14-21nm、平均二次粒子径 142.9 ± 43.97 nm、アナターゼ 80%ルチル 20%、純度 99.9%) の 90 日間混餌投与における無毒性量 (NOAEL) は最高投与量である 1000 mg/kg であり (Heo, M.B. et al.

Particle Fibre Toxicol. (2020) 17, 34)、発生毒性試験において異なる粒子径を持つ顔料グレードまたは超微粒子/ナノスケール TiO_2 (投与液中の 50 パーセントイル粒子径 (D_{50}) = 42~213 nm) の無毒性量

(NOAEL) は、いずれも最高投与量である 1000 mg/kg bw/である (Warheit, D.B. et al., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 73, 887-896)。一方で、食品グレードの TiO_2 (E171) を 100 日間投与した場合には、

ヘルパーT細胞の増殖が抑制されるとともに大腸の微小炎症が促進され、前腫瘍性病変（異常陰窩巣）が発生するとともに、化学的に誘発された発がんモデルで異常陰窩巣の成長の促進が見られたとの報告がある（Bettini, S. et al., *Sci. Rep.* (2017) 7, 40373）。またTiO₂ナノ粒子のラットへの経口投与では肝、腎、心、雄性生殖器の障害、酸化ストレスの誘発、炎症性サイトカインの増加、免疫系のバランス異常などの毒性が報告されている

（Shakeel, M. et al., *Biol. Trace. Elem. Res.* (2016) 172, 1–36）。これまでに一次粒子径10 nm以下のTiO₂を用いた亜慢性毒性試験の報告はないことから、令和3年度までに結晶子径6 nmのアナターゼ型TiO₂（50パーセントイル二次粒子径 = 約200 nm）をラットに90日間反復経口投与し、一般状態、体重、臓器重量、血液学的検査、および血液生化学検査について検討した。その結果、一般毒性、蓄積性、大腸異常陰窩形成の促進、およびDNA鎖切断・染色体異常の誘発を示唆する所見は認められず、1000 mg/kg 体重/日の用量まで結晶子径6 nmのTiO₂の反復経口投与による毒性影響は見られなかったと結論した。ただし、小腸パイエル板に二酸化チタン粒子の沈着がみられたことから、経口投与されたTiO₂粒子が消化管から生体内に取り込まれることが示唆された。そこで今年度は結晶子径の異なるTiO₂粒子（6、30、180 nm）を90日間反復経口投与し、生体への取り込みおよび毒性影響を明らかにすることで、ヒトに対する健康影響リスク評価に役立てることを目的とした。

また、**ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析**に関して、化粧品等への配合とともに、着色あるいは遮光性・抗

菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタン等が、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討する。

令和2年度においては、検討を続けていた抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を精緻化して、アレルギーの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討し、粒子径6 nm・アナターゼ型及び粒子径30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を増強すること、粒子径30-50 nm・ルチル型のナノ酸化チタンではこのような増強効果は見られないことを示した。令和3年度においては、粒子径及び結晶型の影響についてさらに検討し、粒子径15 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンでは経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が見られ、一方、粒子径15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンでは経口惹起のみ増強する傾向が見られることを示した。令和4年度においては、粒子径6 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンを経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程においてOVAと共存させ、その影響を検討した。

さらに、**安全性評価に関する国際動向調査**に関して、現状では、ナノマテリアルの安全性や曝露などに関する科学的知見に乏しいことから、有害性に関する研究が積極的に進められている。欧州連合では、ナノマテリアル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、米国においても米国環境保護庁(EPA)を主体に規制および監視の検討や、食品医薬品局(FDA)によるナノテクノロジー製品への規制および安全性評価に向けた業界向けに幾つかのガイダンス文書の作成が進められている。更に、ナノテクノロジーの応用により食品・食品容器分野においても積極的な利用が期待され、食品添加物や食品サプリメントな

どへの使用が増えてきているが、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は依然不足している。本研究では、食品関連分野における国際動向を中心とするが、毒性評価に関する研究等は、食品用途に限らず分野を越えて共通する課題であるため、リスク評価手法の共通性の観点から関連する分野の動向も併せて調整の対象としている。令和2年度と令和4年度は、Web開催のFDAのワークショップ（FDA's NanoDay Virtual Research Symposium: 2020年10月と2022年10月開催）に参加しFDAのナノマテリアルの現状とナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の調査を実施した。また、EFSAの新ガイドライン（2018年）を捕捉するテクニカルガイダンス案について、食品と試料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議（2020年10月21日、2021年10月29日、2022年10月24-25日、Web会議）に関する調査を実施した。

B. 研究方法

B-1. ナノ酸化チタンの経口反復投与毒性

1) 6 nm の酸化チタンの 28 日間反復投与毒性試験

1-1. 被験物質および投与量

結晶子径 6 nm の 100%アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン（テイカ株式会社 AMT-100、純度 93%）を被験物質として使用した。食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針に基づき高用量を 1000 mg/kg bw/day とし、毒性情報がないこと、および粒子径 10 nm のナノサイズ銀投与により肝臓のうっ血、単細胞壊死を伴い個体が瀕死や死亡に至る高度の毒性が見られた（Cho et al, J. Toxicol. Pathol. 2018 31, 73–80）ことから用量範囲を広く取るために中用量、

低用量をそれぞれ 100 および 10 mg/kg bw/day と設定した。

被験物質は固体であるため、ラットへの強制経口投与試験を実施するため、懸濁液の調製方法を検討した。投与量を 10 ml/kg bw としたときの高用量の投与液濃度である 100 mg/ml で AMT-100 を超純水に懸濁すると速やかに沈降分離が見られ、超音波照射

（Bioruptor II-Type 12, ON 30 sec/OFF 30 sec × 60 cycles, High power）後も、非照射サンプルとほぼ同様に沈降分離した。分散剤として 0.2%リン酸水素二ナトリウム（DSP）を用いると、肉眼上、均一な乳状の懸濁液が得られ、静置 30 分以内に分離は見られなかった（Figure 1-1）。この懸濁液中における個数分布に基づく 50 パーセントイル二次粒子径（液中粒子径）は約 200 nm であった（Figure 1-2）。DSP は食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）に基づく食品添加物として食品への使用が認められており、0.2% DSP を 10 ml/kg bw 投与したときのリン摂取量は 4.36 mg/kg bw であり最大耐容摂取量 70 mg/kg bw（リンとして）（TRS 683-JECFA 26/25, 1982）を十分下回ることから DSP による毒性影響はないと考えられた。

以上より、0.2% DSP を分散剤として用いた 100 mg/ml AMT-100 を投与液として使用することとした。

1-2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 20 匹を日本チャールス・リバーより購入し、基礎飼料（CRF-1；オリエンタル酵母工業）および水道水にて 1 週間馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。動物は温度 23±1°C、湿度 50±5%、換気回数 20 回/時、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの

飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ(三協ラボサービス)を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに5匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週2回の頻度で交換した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て、同所の定める「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して行った。

動物は投与開始日の体重に基づいて、雌雄とも各群の平均体重の標準偏差が最小になるように1群5匹からなる4群に分け、試験期間中は基礎飼料および水道水を自由摂取させた。

1-3. 強制経口投与

ポリテトラフルオロエチレン製フレキシブルチューブ(長さ:85mm、外径:1.46mm、頭部:2.4mm、フチガミ器械)を用いてTiO₂懸濁液を毎日1回28日間強制経口投与した。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を週1回測定した。動物は投与期間終了後に一晩絶食させ、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った後、放血により安楽死させた。

1-4. 血液学および血液生化学的検査

採取した血液の一部を抗凝固剤(EDTA-2K)入りの試験管(ベノジェクトII真空採血管、テルモ株式会社)に移し、血液学的検査として赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、血小板数(PLT)および白血球数(WBC)、網状赤血球数(RET)、白血球分画(好中球;NEUT、好酸球;EO、好塩基球;BASO、単球;MONO、

リンパ球;LYMPH)を自動血球計算装置IDEXXプロサイトDx(アイデックスラボラトリーズ株式会社)を用いて測定した。血清生化学的検査では、総タンパク(TP)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、アルブミン(ALB)、総ビリルビン(T-BIL)、グルコース(GLU)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-CHO)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、ナトリウム(Na)、クロール(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)およびγ-グルタミルトランスアミナーゼ(γ-GT)の各項目を測定した。

1-5. 剖検および臓器重量

採血後に動物を放血死させ、剖検を実施するとともに、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、卵巣あるいは精巣を摘出し、重量を測定した。また、上記の組織に加え胸骨、気管、大動脈、甲状腺、舌、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、膵臓、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、子宮、膣、下垂体、大腿筋、坐骨神経、三叉神経、脊髄を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

1-6. 病理組織学的検査

対照群および最高用量群の全臓器について、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

1-7. 臓器中のTi量測定

肝臓、腎臓、および脾臓中のTi濃度は一

般財団法人日本食品分析センターに委託して、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により測定した。試料調製には硝酸を用い、消化には Ultra WAVE 電子レンジ (Milestone General, Kawasaki, Japan) を使用した。ICP-MS 測定は、Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて実施した。分析条件は、電波出力: 1550W、キャリアガス: Ar、流量: 15 L/min、コリジョンガス: O₂、内部標準: Rh、ICP-MS 分析の対象元素は ⁴⁸Ti¹⁶O⁺ と ¹⁰³Rh (内部標準) であった。臓器中の総 Ti 含有量は、臓器中の Ti 濃度に剖検時の臓器絶対重量を乗じて算出した。

1-8. 統計学的処理

試験期間中の体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果及び器官重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、多重比較を Dunnett 等の方法により対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行い、 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意と判定した。

2) 6 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験

2-1. 被験物質および投与量

昨年度実施した 28 日間反復投与毒性試験と同様に、結晶子径 6 nm の 100% アナターゼ型ナノサイズ TiO₂ (テイカ株式会社 AMT-100、純度 93%) を 0.2% リン酸水素二ナトリウムに分散させ、10 mL/kg bw の液量で投与した。投与量は 28 日間反復投与毒性試験の NOAEL が 1000 mg/kg bw/day であったことより、高用量を 1000 mg/kg bw/day とし、中用量、低用量をそれぞれ 300 および 100 mg/kg bw/day と設定した。

2-2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 40 匹を日本チャールス・リバーより購入し、基礎飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母工業) および水道水にて 1 週間馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。動物は温度 23±1°C、湿度 50±5%、換気回数 20 回/時、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ (三協ラボサービス) を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに 3 または 4 匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週 2 回の頻度で交換した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て、同所の定める「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して行った。

動物は投与開始日の体重に基づいて 1 群 10 匹からなる 4 群に分け、試験期間中は基礎飼料および水道水を自由摂取させた。

2-3. 強制経口投与

ポリテトラフルオロエチレン製フレキシブルチューブ (長さ: 85mm、外径: 1.46mm、頭部: 2.4mm、フチガミ器械) を用いて TiO₂ 懸濁液を毎日 1 回投与した。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を週 1 回測定した。動物は投与期間終了後に一晩絶食させ、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った後、放血により安楽死させた。

2-4. 尿検査

投与 13 週目に雌雄各群 10 匹中 5 匹を代謝ケージ (夏目製作所) に入れて個別飼育で絶食下 4 時間飼育し、自然尿を採取した。オ

ーションスティックス (尿試験紙) 10EA (アークレイ) を新鮮尿に浸し、半自動尿分析装置オーションイダテン AE-4070 (アークレイ) にて測定した。

2-5. 血液学および血液生化学的検査

採取した血液の一部を抗凝固剤 (EDTA-2K) 入りの試験管 (ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社) に移し、血液学的検査として赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT) および白血球数 (WBC)、網状赤血球数 (RET)、白血球分画 (好中球; NEUT、好酸球; EO、好塩基球; BASO、単球; MONO、リンパ球; LYMPH) を自動血球計算装置 IDEXX プロサイト Dx (アイデックスラボラトリーズ株式会社) を用いて測定した。

血清生化学的検査では、オリエンタル酵母工業株式会社に委託して、常法により総タンパク (TP)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb)、総ビリルビン (Bil)、グルコース、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、クロール (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP) および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) の各項目を測定した。

2-6. 剖検および臓器重量

採血後に動物を放血死させ、剖検を実施するとともに、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、

肝臓、副腎、腎臓、卵巣あるいは精巣を摘出し、重量を測定した。また、上記の組織に加え胸骨、気管、大動脈、甲状腺、舌、食道、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、膵臓、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、子宮、膣、下垂体、大腿筋、坐骨神経、三叉神経、脊髄を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

2-7. 病理組織学的検査

株式会社ボゾリサーチセンターに委託して、対照群および最高用量群の全臓器について、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

2-8. 臓器中の Ti 量測定

肝臓、腎臓、および脾臓中の Ti 濃度は 28 日試験の検体と同様に実施した。

3. 統計学的処理

体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果、臓器重量、臓器中 Ti 濃度、および臓器中総 Ti 量については Dunnett 検定、尿検査のスコアについては Dunn 検定、病理組織学的所見の発生頻度については Fisher の正確確率検定により対照群と各被験物質投与群との間で有意水準 0.05 の両側検定により判定した。統計解析には GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。

3) 6, 30, 180 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験 (1000 mg/kg bw/day)

3-1. 被験物質および投与量

昨年度までの実験に用いた結晶子径 6 nm

の TiO₂ (テイカ株式会社 AMT-100、純度 93%) に加えて、結晶子径 30 nm (同社 AMT-600、純度 98%)、および結晶子径 180 nm (同社 TITANIX JA-1、純度 99%) を 100 mg/mL の濃度で 0.2% リン酸水素二ナトリウムに分散させ、10 mL/kg bw の液量で投与した。昨年度の研究で 6 nm の TiO₂ の NOAEL が 1000 mg/kg bw/day であったことから、全ての粒子径について用量を 1000 mg/kg bw/day と設定した。

3-2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット雄 40 匹を日本チャールス・リバーより購入し、基礎飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母工業) および水道水にて 1 週間馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。動物は温度 23±1°C、湿度 50±5%、換気回数 20 回/時、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ (三協ラボサービス) を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに 3 または 4 匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週 2 回の頻度で交換した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て、同所の定める「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して行った。動物は投与開始日の体重に基づいて 1 群 10 匹からなる 4 群に分け、試験期間中は基礎飼料および水道水を自由摂取させた。

3-3. 強制経口投与

ポリテトラフルオロエチレン製フレキシブルチューブ (長さ: 85mm、外径: 1.46mm、頭部: 2.4mm、フチガミ器械) を用いて TiO₂ 懸濁液を毎日 1 回投与した。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察

し、体重および摂餌量を週 1 回測定した。動物は投与期間終了後に一晩絶食させ、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った後、放血により安楽死させた。

3-4. 尿検査

投与 13 週目に各群 10 匹中 5 匹を代謝ケージ (夏目製作所) に入れて個別飼育で絶食下 4 時間飼育し、自然尿を採取した。オーションスティックス (尿試験紙) 10EA (アークレイ) を新鮮尿に浸し、半自動尿分析装置オーションイダテン AE-4070 (アークレイ) にて測定した。

3-5. 血液学および血液生化学的検査

採取した血液の一部を抗凝固剤 (EDTA-2K) 入りの試験管 (ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社) に移し、血液学的検査として赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT) および白血球数 (WBC)、網状赤血球数 (RET)、白血球分画 (好中球; NEUT、好酸球; EO、好塩基球; BASO、単球; MONO、リンパ球; LYMPH) を自動血球計算装置 IDEXX プロサイト Dx (アイデックスラボラトリーズ株式会社) を用いて測定した。

血清生化学的検査では、オリエンタル酵母工業株式会社に委託して、常法により総タンパク (TP)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb)、総ビリルビン (Bil)、グルコース、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、ク

ロール (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP) および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP)、鉄 (Fe)、不飽和鉄結合能 (UIBC)、総鉄結合能 (TIBC) の各項目を測定した。

3-6. 剖検および臓器重量

採血後に動物を放血死させ、剖検を実施するとともに、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、卵巣あるいは精巣を摘出し、重量を測定した。また、上記の組織に加え胸骨、気管、大動脈、甲状腺、舌、食道、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、膵臓、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、子宮、膣、下垂体、大腿筋、坐骨神経、三叉神経、脊髄を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

3-7. 病理組織学的検査

全群全個体の主要臓器 (肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胃、小腸、大腸、精巣、眼) について、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

3-8. 臓器中チタン濃度測定

肝臓、腎臓、および脾臓中の Ti 濃度は一般財団法人日本食品分析センターに委託して、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により測定した。試料調製には硝酸を用いたマイクロ波消化を用いた。消化には Ultra WAVE 電子レンジ (Milestone General, Kawasaki, Japan) を使用し、以下のプログラ

ムで行った。ICP-MS 測定は、Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて以下の条件で分析を実施した。電波出力: 1550W、キャリアガス: Ar、流量: 15 L/min、コリジョン・リアクションセル導入ガス: O₂ (0.1 mL/min) + He (10 mL/min)、内部標準: Rh、分析対象元素: ⁴⁸Ti¹⁶O⁺ および ¹⁰³Rh (内部標準)。

3-9. 統計学的処理

体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果、臓器重量、臓器中 Ti 濃度、および臓器中総 Ti 量については Dunnett 検定、尿検査のスコアについては Kruskal-Wallis 検定、病理組織学的所見の発生頻度については Fisher の正確確率検定により対照群と各被験物質投与群との間で有意水準 0.05 の両側検定により判定した。統計解析には GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置は倫理規定に十分配慮して熟練者が実施し、実験終了時、動物はすべてイソフルランの深吸入麻酔下で大動脈からの脱血により安楽死させ、動物に与える苦痛を最小限に留めた。

B-2. ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

試料及び試薬

被験物質としては、

- ・酸化チタン A
(粒子径 15 nm・ルチル型)
- ・酸化チタン C
(粒子径 6 nm・アナターゼ型)
- ・酸化チタン D
(粒子径 15 nm・アナターゼ型)
- ・酸化チタン E
(粒子径 30 nm・アナターゼ型)
- ・酸化チタン F
(粒子径 30-50 nm・ルチル型)

(いずれも表面未処理)

を使用した。

抗原タンパク質としては、卵アレルギーである卵白アルブミン (OVA; Sigma A5503) を用いた。血清中の Mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) の定量は、MCPT-1 (mMCP-1) Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific 88-7503-88) を用いて行った。その他の試薬は特級グレードのものを用いた。

酸化チタンナノ材料の懸濁液調製

酸化チタンは、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後にボルテックスミキサーにより攪拌するというサイクルを 4 回繰り返し、最後に 25G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

【実験 1】経皮感作時の OVA 用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8

週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (1 or 2 μ g/50 μ L) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリー」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 7 回)、追加免疫を行った。この時、ナノ酸化チタン投与群では、OVA 30mg と TiO₂C 1.88mg (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 1, 25, 43 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。Day 49 に OVA 50mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1 時間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

経皮感作の操作は【実験 1】と同様に行った。1 群の匹数は 5 匹とした (経口投与時にナノ酸化チタンのみを投与する陰性対照群については 1 群 2 匹とした)。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。経皮感作時の OVA 用量は 2 μ g/50 μ L とした。経口投与に関するスケジュール、OVA 及びナノ酸化チタンの用量は【実験 1】と同様である。抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a

抗体の測定、経口投与後 1 時間の直腸温測定及び下痢症状スコアリングについても【実験 1】と同様に行った。

【実験 3】粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (2 μ g/50 μ L) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 7 回)、追加免疫を行った。この時、ナノ酸化チタン投与群では、OVA 30mg と TiO₂A または D 1.88mg (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 1, 25, 43 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。Day 49 に OVA 50mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 60 分間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。また惹起時は、60 分後に採血し、血清中の mMCP-1 濃度を測

定した。

【実験 4】経皮感作時及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (2 μ g/50 μ L)、あるいは OVA と酸化チタンの混合懸濁液 (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 7 回)、追加免疫を行った。この時、ナノ酸化チタン投与群では、OVA 30mg と TiO₂C 1.88mg (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 1, 25, 43 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 抗体を ELISA 法により測定した。Day 49 に OVA 50mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 60 分間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

統計解析

データはMicrosoft Excelにより集計した。Vehicle 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは Student t-test による OVA 投与群と OVA-ナノ酸化チタン投与群との有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。マウスへの検体の投与、採血等においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の動物施設利用規定に従った。

B3. 安全性評価に関する国際動向調査

R2 年度は、2020 年 10 月 Web 開催の FDA のワークショップ (FDA's NanoDay Virtual Research Symposium) に参加し FDA のナノマテリアルの現状とナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の調査を実施した。また、EFSA の新ガイドライン(2018 年)を捕捉するテクニカルガイダンス案について、第 10 回食品と試料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議(2020 年 10 月 21-22 日、Web 会議)に関する調査を実施した。

R3 年度は、EFSA の新ガイドライン(2018 年)を捕捉するテクニカルガイダンス案について、第 11 回食品と飼料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議(2021 年 10 月 29 日、Web 会議)に関する調査を実施した。また、OECD ナノマテリアル作業グループの先端的ナノ材料についての Ad-Hoc Working Group に関する 2 月に開催されたワークショップ(2022 年 2 月 9-10 日、Web 開催)に参加し、先端的ナノ材料について調査を実施した。

R4 年度は、R3 年度に引き続き、食品と飼料のナノテクノロジーに関するネットワー

ク会議(2022 年 10 月 24-25 日、Web 会議)に関する調査を実施した。また、2022 年 10 月に米国 FDA's Nano Day Virtual Research Symposium に参加し、食品接触物質(着色料である食品成分を含む)の安全性と規制状況に及ぼす影響について調査を実施した。

C. 研究結果

C-1. ナノ酸化チタンの経口反復投与毒性

1) 6 nm の酸化チタンの 28 日間反復投与毒性試験

1-1. 生存率、体重、摂餌量

試験期間中、雌雄すべての群において死亡はみられなかった。一部の動物で軟便および活動性の低下が一過性に観察されたが、群間に有意な差は見られなかった(Table 1-1)。雌雄ともに投与に伴う体重の変化は見られず、摂餌量も同程度であった(Figure 1-3)。

1-2. 血液学および血液生化学的検査

血液学的検査結果を Table 1-2 に示した。雄の 10 mg/kg bw/day 群で WBC の有意な低下が見られたが、軽微な変化であり、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で MCH の有意な低下が見られたが、軽微な変化であり、RBC、HGB、MCV および MCHC には変動が見られなかったことから毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

血液生化学的検査では、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な増加が見られた(Table 1-3)。また雄の 100 および 1000 mg/kg bw/day 群で CRE の有意な低下が見られたが、腎毒性を示唆する変動とは逆の変化であるため毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

1-3. 臓器重量

剖検日体重及び臓器重量を Table 1-4 に示した。雄の 10 mg/kg bw/day 群で脾臓の相対重量の有意な増加が見られたが、軽微な変化であり、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。その他の臓器には相対重量、絶対重量とも有意な差は見られなかった。

1-4. 病理組織学的検査

鼻腔において、嗅上皮の内腔および粘膜下組織に黄褐色の粒子が見られた (Figure 1-4A)。炎症や組織障害等の反応性変化は認められず、マクロファージマーカーである CD68 に対する免疫染色でもマクロファージの誘導は見られなかった。一方で、呼吸上皮では目視できる粒子がない領域において炎症反応が見られた。消化管では黄褐色の物質が内腔に見られたが、炎症は見られず、鼻腔とは異なり粘膜下組織に存在する粒子は明確には見られなかった (Figure 1-4B)。この他、種々の組織変化がみられたが、いずれも偶発性的な変化であり毒性学的意義のある病変は見られなかった (Table 1-5)。

1-5. 臓器中の Ti 量

対照群を含む全ての個体で肝臓、腎臓、脾臓中に Ti が検出された。多くのサンプルが検量線の下限值以下の濃度であったものの、全てのサンプルで定量下限 (limit of quantitation; LOQ) とされる 10σ (空試験の平均値+標準偏差の 10 倍) 以上の値が得られたことから、バックグラウンドノイズではなく生体内に存在する微量の Ti 元素が検出されたと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群では対照群と比べて有意に高い肝臓中 Ti (濃度、総量ともに) が検出された

が、1000 mg/kg bw/day 群と対照群との肝臓中の総 Ti 量の差は 0.033 μg であり、投与量と比較すると最終週の 1 日平均投与量の 0.41 ppm 相当であった。腎臓、脾臓では対照群と比較して有意な差は見られなかった (Figure 1-5)。

2) 6 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験

2-1. 生存率、体重、摂餌量

試験期間中、雌雄すべての群において死亡はみられなかった。雌雄ともに投与に伴う体重の変化は見られず、摂餌量も同程度であった (Figure 2-1)。

2-2. 尿検査

尿検査では、全ての項目で被験物質投与に関連した変化は見られなかった (Table 2-1)。

2-3. 血液学および血液生化学的検査

血液学的検査では、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で白血球分画の有意な変化 (NEUT、MONO、BASO の高値、LYMPO の低値) が見られた。ただし、各白血球分画の実測値では、統計学的に有意な差は認められなかった (Table 2-2)。この他、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で MCH の低値と EO の絶対値の高値、雌の 100 mg/kg bw/day 群で BASO 画分の低値と実測値の高値が見られた。

血液生化学的検査では、雄の 300、1000 mg/kg bw/day 群で TG の低値が見られた (Table 2-3)。この他、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で Na の高値、雄の 100、300 mg/kg bw/day 群および雌の 1000 mg/kg bw/day 群で Cl の低値が見られた。

2-4. 臓器重量

雄の 100 mg/kg bw/day 群で腎臓相対重量の高値が見られた (Table 2-4)。

2-5. 病理組織学的検査

病理組織学的検査では、黄褐色物質が頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺 (気管支随伴リンパ組織)、気管 (上皮) 及び回腸 (パイエル板) に見られた (Table 2-5) が、炎症や組織障害等の反応性変化は認められなかった (Figure 2-2)。この他、種々の組織変化がみられたが、自然発生性病変として知られる所見であり、毒性学的意義のある病変は見られなかった (Table 2-6)。

2-6. 臓器中の Ti 量

対照群を含む全ての個体で肝臓、腎臓、脾臓中に Ti が検出された。90 日間投与において、雌の 1000 mg/kg bw/day 群のうち 1 匹 (動物番号 38) の肝臓および脾臓の Ti 濃度において他の個体と比べて約 10 倍程度高値を示したが、群間での有意差は見られなかった (Figure 2-3)。

3) 6, 30, 180 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験 (1000 mg/kg bw/day)

3-1. 投与懸濁液中の粒子径

動的光散乱法による二次粒子径 (液中粒子径) の測定では、結晶子径 6、30、180 nm の TiO₂ 懸濁液の 50 パーセントイル二次粒子径はそれぞれ約 150、90、60 nm であった。

3-2. 生存率、体重、摂餌量

投与に伴う体重の変化は見られず、摂餌量も同程度であった (Figure 3-1)。一般状態の変化は観察されなかったが、投与 10 週目

に 180 nm 群のうち 1 匹にゾンデを噛み切れ、大部分が食道内に残存した状況となったため、動物福祉の観点から当該動物を深麻酔下で安楽死させた。

3-3. 尿検査

尿検査では、対照群と比較して 6 nm 群で比重の増加が見られた (Table 3-1)。

3-4. 血液学および血液生化学的検査

血液学的検査では、6 nm 群の MCV および MCH、30 nm 群の HGB、HCT、MCV、MCH、および WBC、180 nm 群の HGB、HCT、MCV、および MCH の低下が見られた。白血球分画では 30 nm 群の LYMPH および MONO の低下が見られた (Table 3-2)。

血液生化学的検査では、6 nm 群および 30 nm 群で T-BIL の低下、30 nm で ALB および IP の低下と Cl の増加、180 nm 群で Na の低下と Cl の増加が見られた。血液学的検査で HGB、HCT、MCV、MCH の低下が見られたことから鉄関連項目について追加の測定を実施したところ、Fe、UIBC、TIBC のいずれも有意な変化は見られなかった (Table 3-3)。

3-5. 臓器重量

全ての群で、絶対および相対臓器重量に有意な変化は見られなかった (Table 3-4)。

3-6. 病理組織学的検査

病理組織学的検査では、TiO₂ 投与群 (6、30、180 nm) において黄褐色物質の沈着が空腸および回腸のパイエル板に見られたほか、一部の個体で小腸粘膜下にも粒子が見られた (Figure 3-2)。肺において、黄褐色粒子を含む肺胞マクロファージが見られた。

これらの部位ではいずれも、炎症や組織障害等の反応性変化は認められなかった。30 nm 群および 180 nm 群の小脳において、空胞変性の有意な増加が見られた。全ての群において、肺、胃、小腸、大腸、腎臓、精巣に石灰沈着が見られた (Table 3-5)。

C-2. ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

【実験 1】経皮感作時の OVA 用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系に関するこれまでの筆者らの検討では、経皮感作時の OVA 用量を 2 μ g とし、今回と同様のスケジュール及び経口投与用量にて、1 群 3 匹で予備的検討を行った。その結果、経口投与時に粒子径の小さいナノ酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) を共存させた場合、OVA 経口投与時の体温低下及び下痢症状が増強される傾向が見られた。

本研究課題の初年度である今年度は、上記結果について 1 群 5 匹として再現性を検討した。また、これまでの経皮感作に関する検討の際と同様に、経皮感作時の OVA 用量を 1 μ g 及び 2 μ g の 2 段階に設定し、実験系の精緻化を目指した。ナノ酸化チタン C を共存させる群では、OVA:ナノ酸化チタン重量比は、経皮感作においてナノ酸化チタンによる増強効果が見られた 16:1 とした。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。追加免疫時の酸化チタン C 共存による顕著な影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体

温変化及び下痢症状スコアの結果を、Fig.3 及び Fig.4 に示す。体温に関して、OVA2 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA2-TiO₂C po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られ、また、経口追加免疫 5 回目では、OVA2 群との比較においても有意な体温低下が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO₂C po 群では、V 群と比較して有意な体温低下は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA2 群及び OVA2-TiO₂C po 群では、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。経口追加免疫 5 回目、7 回目では、OVA2 群と比較して OVA2-TiO₂C po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO₂C po 群では、V 群と比較してやや高いスコアであったが、有意差は見られなかった。これらの結果から、本検討での実験系に関して、経皮感作時に 2 μ g の OVA を用いることにより経口追加免疫・経口惹起が適切に検出可能であること、また、経口投与時の酸化チタン C の共存により経口追加免疫が増強されることが示された。

【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

ここまで、粒子径の小さい酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) に関して、経口投与時の共存効果を検討してきた。そこで次に、より粒子径の大きなナノ酸化チタンである、酸化チタン E (アナターゼ型、粒子径 30 nm)、及び酸化チタン F (ルチル型、粒子径 30-50 nm) の 2 種について、同様に経口投与時の共存効果を検討した。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。1 群 5 匹とし、経口投与

時に酸化チタン E あるいは F を共存させる群を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、酸化チタン C の場合と同様に 16:1 とした。経皮感作時の OVA 用量は 2 μ g とした。

Fig. 5 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。追加免疫時の酸化チタン E、F の共存による顕著な影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を、Fig.6 及び Fig.7 に示す。体温に関して、OVA 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA-TiO₂E po 群、OVA-TiO₂F po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。また、経口追加免疫 7 回目において、OVA-TiO₂E po 群では OVA 群との比較においても有意な体温低下が見られ、経口投与時の共存により追加免疫が増強されることが示された。また経口追加免疫 4 回目においても OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。一方 OVA-TiO₂F po 群では、OVA 群の体温低下との間に有意な差は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO₂E po 群、OVA-TiO₂F po 群で、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。また、経口追加免疫 4 回目では、OVA 群と比較して OVA-TiO₂E po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

なお、陰性対照群である酸化チタン E あるいは F のみを経口投与した群 (TiO₂E only 群、TiO₂F only 群) では、OVA 特異的抗体産生、OVA 経口投与時の体温低下、下痢症状とも見られなかった。

これらの結果から、経皮感作-経口追加免

疫・経口惹起実験系において、粒子径の小さい酸化チタン C (6 nm) だけでなく、同じアナターゼ型で粒子径がより大きい酸化チタン E (30 nm) に関しても、経口投与時に共存させることにより経口追加免疫が増強されることが示された。

【実験 3】粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を用いた、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する令和 2 年度における検討では、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を増強すること、粒子径 30-50 nm・ルチル型のナノ酸化チタンではこのような増強効果は見られないことが示された。

令和 3 年度においては、被験物質として、酸化チタン A (粒子径 15 nm・ルチル型)、及び酸化チタン D (粒子径 15 nm・アナターゼ型) の 2 種を用い、抗原経口暴露時のナノ酸化チタンの共存効果についてさらに検討した。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。1 群 5 匹とし、経口投与時に酸化チタン A あるいは D を共存させる群を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、これまでと同様に、経皮感作においてナノ酸化チタンによる増強効果が見られた 16:1 とした。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。追加免疫時の酸化チタン A、D の共存による影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体

温変化及び下痢症状スコアの結果を、Fig.3 及び Fig.4 に示す。体温に関して、OVA 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。経口追加免疫 6 回目及び 7 回目において、OVA-TiO₂D po 群では OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。また経口惹起時には、OVA-TiO₂A po 群及び OVA-TiO₂D po 群で OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群で、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。また、経口追加免疫 4 回目では、OVA 群と比較して OVA-TiO₂D po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

Fig.5 には、経口惹起 60 分後の血清中の mouse mast cell protease-1 (mMCP-1)の定量結果を示す。mMCP-1 はマウス小腸粘膜のマスト細胞のプロテアーゼであり、マスト細胞の活性化時に細胞外に放出される。Fig.5 に示すとおり、OVA 群、OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群では、経口惹起 60 分後の血清中の mMCP-1 濃度は、V 群の 6100-6600 倍ほどと非常に高く、V 群との間に有意差が見られた。OVA 群と OVA-TiO₂A po 群あるいは OVA-TiO₂D po 群との間では有意差は見られなかった。

なお、陰性対照群である酸化チタン A あるいは D のみを経口投与した群 (TiO₂A only 群、TiO₂D only 群) では、OVA 特異的抗体産生、OVA 経口投与時の体温低下、下痢症状、血清中 mMCP-1 濃度増大のいずれも見られなかった。

これらの結果から、経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系において、粒子径 15 nm

の 2 種のナノ酸化チタンのうち、アナターゼ型の酸化チタン D では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方ルチル型の酸化チタン A では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。

【実験 4】経皮感作時及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を用いた、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する令和 2、3 年度における検討では、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を増強すること、また粒子径 15 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンでは経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が見られることを示した。一方、粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンでは経口惹起のみ増強する傾向が見られ、粒子径 30-50 nm・ルチル型のナノ酸化チタンではこのような増強効果は見られなかった。

令和 4 年度においては、被験物質として、酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) を用い、経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程における共存効果について検討した。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。1 群 5 匹とし、経口投与時、あるいは経皮感作時及び経口投与時の両過程において酸化チタン C を共存させる群を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、これまでと同様に、経皮感作及び経口追加免疫においてナノ酸化チタンによる増強効果が見られた 16:1 とした。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA 経皮感作により IgE、

IgG1 抗体の産生が見られ(Day 25)、その後の経口追加免疫によってさらに増加した(Day 43)。経皮感作においては、これまでの検討と同様に、酸化チタン C の共存により抗体産生が増強される傾向が見られた(Day 25)。一方、追加免疫時の抗体産生に対する酸化チタン C の共存による影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を、Fig.3 及び Fig.4 に示す。体温に関して、OVA 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA-TiO₂C po 群、OVA-TiO₂C pc+po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。また経口追加免疫 6 回目において、OVA-TiO₂C po 群では OVA 群と比較して体温が優位に低下し、OVA-TiO₂C pc+po 群でも OVA 群と比較してより低下する傾向が見られた。一方、OVA-TiO₂C po 群と OVA-TiO₂C pc+po 群との間では差は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO₂C po 群、OVA-TiO₂C pc+po 群とも、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。また、経口追加免疫 5 回目及び 6 回目では、OVA-TiO₂C po 群及び OVA-TiO₂C pc+po 群で、OVA 群と比較して優位に高いスコアとなった。一方、OVA-TiO₂C po 群と OVA-TiO₂C pc+po 群との間では差は見られなかった。

C3. 安全性評価に関する国際動向調査

■ FDA's NanoDay Virtual Research Symposium

2000 年の国家ナノテクノロジー戦略(NNI)以降、ナノテクノロジーを応用した製品の米国食品医薬品局(FDA)への提出が増加することを予想し、2006年にナノテクノロジー・タスクフォース(NTF)を立ち上げ

た。このワークショップでは、その後のFDAに提出されたナノマテリアルを含む製品の件数が徐々に増加した状況を受け、科学的な根拠に基づくナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の報告となった。

FDAは、動物用医薬品へのナノマテリアルの使用に関する研究についても認識しており、FDAの獣医学センター(CVM)では、ナノテクノロジーを使用した幾つかの動物用医薬品について新規申請を承認していた。さらに、栄養補助食品を含む食品や化粧品においては、ナノテクノロジー由来の製品の開発や分析に期待される科学的進歩に伴ったことからFDAは、このような申請において新技術の使用を検討する際には、利害関係者がFDAに協議するように奨励している。また、FDAの食品安全・応用栄養センター(CFSAN)は、医薬品等で先行しているナノテクノロジーが食品分野にも展開されていく状況を踏まえ、CFSANが規制する製品へのナノテクノロジーの将来的な応用を審査する際に生じる可能性のある新しい課題に対して、FDAの科学者が対応可能となるように研究を行ってきた。一方、規制局(ORA)では、FDAの規制対象製品に含まれるナノマテリアルの検出と特性評価の分析方法を開発するために共同研究を行ってきた。

2007年、NTFは報告書を発表し、ナノテクノロジーの使用は、他の新興技術を使用した製品と同様に規制上の課題をもたらすことを明らかにすることを示した。この報告書では、公衆衛生を保護・促進するというFDAの使命を果たすために、ナノテクノロジーに関する科学的・規制的な政策課題に対して、FDAが活動するためのいくつかの提言がされていた。2007年のNTFの報告書の実施の一環として、FDAはナノテクノロジー製品に対する規制アプローチを明確にし、現在までに、FDAは5つの最終ガイダンス文書を発行している。

- ① FDA 規制製品がナノテクノロジーを使用の有無についての検討:すべてのFDA

規制製品に広く適用可能な2つの考慮すべきポイントを明らかにしていた。

- 1) 材料や最終製品は、少なくとも1つの外部寸法または内部構造や表面構造にナノスケール範囲（約 1nm から 100nm）を持つように設計されている。
- 2) 材料や最終製品は、たとえその寸法が1 マイクロメートル（1,000nm）までのナノスケールの範囲外であっても、その寸法に起因するような物理的・化学的特性や生物学的効果などの特性や現象を示すように設計されている。

これら2つの留意点については、全てのFDA規制製品に広く適用すべきという見解である。

これに関連してFDAは、②新たな技術を含む製造工程の大幅な変更のある食品成分および食品接触物質の安全性と規制状況に及ぼす影響への評価、③化粧品中のナノマテリアルの安全性、動物用食品へのナノマテリアルの使用、④リポソーム製剤に関するナノマテリアルの使用、⑤ナノマテリアルを含む生物学的製剤を含む医薬品に対してのガイダンス(案)を作成してきている。

FDAのナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究

2013年ナノテクノロジーレギュラトリーサイエンス研究計画でFDAは、ナノマテリアルを含む製品のレギュラトリーサイエンス活動において協調的なリーダーシップを発揮するためのフレームワークと実施計画を示した。このフレームワークは、FDAが規制上の意思決定に必要な科学的知識や、方法、ツールのギャップを特定することで対処できるように設計されている。

▶ ナノテクノロジー研究基盤の強化

2011年、FDAはナノテクノロジーに関わるレギュラトリーサイエンス研究を支援・促進し、全てのFDAの製品センターで規制上の課題に取り組むために2つのナノテクノロジーコア施設を設立した。(メリーランド州のFDA本部とアーカンソー州のジェファーソンラボ)

- 1) FDAの研究者に、ナノテクノロジー関

連の研究を行うための特性評価に関するツールや技術サポートを集中的に提供する。

- 2) FDAの審査官にナノテクノロジーとナノマテリアルの特性評価に関する実践的なトレーニングの場を提供し、製品審査とレギュラトリーサイエンスにおける知識のギャップを埋める。
- 3) 規制上の特定の問題に対処し、科学的根拠に基づき決定する基礎を確立するために、FDAが規制する製品について研究を実施する。

アーカンソー州のナノテクノロジーコア施設（ナノコア）は、NCTR、FDAの規制局アーカンソー研究所（ORA/ARKL）と、米国保健福祉省の国家毒性プログラム（NTP）が共同で運営している。また、ナノコア施設は、NCTRとORAのレギュラトリーサイエンス研究や、CDER、CFSAN、CDRHなど他のFDAセンターの活動をサポートしている。さらに、ナノコア施設には、分光法、粒子径、表面組成、安定性分析、特性評価、元素分析、顕微鏡、分離・分画、クロマトグラフィーなどの最先端の装置があり、ナノテクノロジーに関する分析を行うNCTRおよびORA/ARKLの研究者や研究員のニーズをサポートすることが可能である。ナノコア施設にある機器についてFDAは、ナノテクノロジーをベースにしたFDA規制製品を正確にモニターし、安全性や必要に応じて有効性を確保するための分析方法の開発が可能である。ナノコア施設/NCTRの主な研究は、FDA規制製品におけるナノマテリアルの同定と特性評価や、日焼け止めとその皮膚浸透性の評価、*in vivo* や *in vitro* との相関関係をサポートする薬物動態、有効性、生体内分布の研究、細胞および遺伝子毒性、ナノ粒子の生物への蓄積の影響を決定するような宿主抵抗性アッセイなどであった。

2022年10月に開催されたFDA's Nano Day Virtual Research SymposiumでRaymond Brinas氏は、ナノ材料を含む食品接触物質（FCS）の安全性評価と、ナノ材料を含む食

品接触物質に関する FDA の見解について解説した。

➤ 食品接触通知 (FCN: Food Contact Notification) プログラムの背景

FDA が関与する多くの食品安全問題に食品成分や食品接触物質に関する安全性取り上げられている。連邦食品医薬品化粧品法 (FD&C 法) が 1938 年に議会で可決後、1958 年の食品添加物改正では、食品添加物の新規用途の市販前承認を義務付けると同時に、食品添加物の定義や安全基準および審査基準の設定が行われた。さらに、1997 年の食品医薬品局近代化法 (FDAMA) において、製造工程や包装を通して食品に移行する可能性のある食品接触物質 (FCS) を定義し、食品添加物と同じ安全基準・審査基準を設けられ、1999 年の食品接触通知 (FCN: Food Contact Notification) プログラムにつながるものであった。FCS の安全性評価は FCS への日々の摂取量を EDI (Estimated Daily Intake) 消費者暴露と定義し、累積推定一日摂取量 (Cumulative EDI) と許容一日摂取量 (ADI) を比較することによって行われる。

➤ ナノ材料を含む食品接触物質 (FCS) に関連するガイダンス

FCS は、ナノスケールサイズにおいて量子効果により物理化学的特性が大きく変化することが知られており、2014 年に FDA は、ナノ製品の責任ある開発支援を目的とした産業界向けのガイダンス文書を策定し、ナノマテリアルを含む製品を評価する際に、次の 2 つの要素を考慮するものであった。

その一つは、材料または最終製品自体のサイズであった。ナノスケール (約 1nm~100nm) の範囲のサイズを少なくとも 1 つの次元で内部または表面構造に持つように設計されているかどうか、あるいは、そのサイズに起因する物理的・化学的特性または生物学的効果を含む特性・現象を示すように設計されているかどうか (1µm までであればナノスケール範囲外のサイズであっても) 考慮することが重要であった。もう一つは、製造工程の変更である。FCS の製造工程は時間の経過とともに変化する可能性が

あり、それに伴い FCS の安全性特性全体が影響を受ける可能性が生じる。このためガイダンス文書では、製造工程の一部の変更が食品の安全性や規制状況に与える影響の評価についての考察と提言を行っていた。特に重要と考えられる製造工程の変更では、1 つまたは複数の原材料の変更、原材料の濃度の変更、触媒の変更、微生物発酵由来の FCS に使用される微生物の供給源の変更 (菌株の変更を含む)、あるいは、製造または成分技術の変更 (FCS の粒度分布に影響を与えるような新興技術の使用など) である。

FDA は、ナノマテリアルを含むすべての製品を本質的に無害あるいは有害であると分類して判断を行なっているわけではなく、最終製品の特性や使用目的に沿った安全性を考慮していた。従って、FCS がナノ粒子を含む場合の安全性評価は、FCS のナノスケール状態に関連するデータに基づいて実施され、人工ナノ物質化された FCS が新しい物理化学的特性を持つ場合、FCS の安全性を判断するために追加または代替の試験方法が必要となる場合がある。また FDA は製造工程の変更に関して、FCS の同一性に加えられた変更を特定すること、FCS の使用に関する安全性評価を実施すること、FCS の種類に応じて規制状況に与える影響を検討することや、FDA に相談すること、そして十分な確証が得られた場合に適切に届出を行うことを推奨している。

■ EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議

➤ 2020 年 10 月に開催された食品及び飼料のナノテクノロジーに関する EFSA の科学ネットワーク会議 :

本会議では、粒子状 (ナノ) 物質に関連する 2 つの EFSA ガイダンス文章 (粒子に関するガイダンス-TR : Guidance on Particle on Technical Requirements、ナノに関するガイダンス-RA : Guidance on Nano - Risk Assessment) について、その背景と対象範囲について議論が行われた。2018 年に食品お

および飼料中におけるナノ科学およびナノテクノロジーの適用のリスクアセスメントに関する「ガイダンス」(Guidance on the risk assessment of the application of the nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. 第1部、ヒトと動物の健康)(ナノに関するガイダンス-RA)の初版が発行され、更新のためのレビュー中であり、主な更新内容にはナノの範囲に関連する明確化、ナノ材料の物理化学的特性化に関する新しい技術更新、毒性評価に関するセクションの更新が含まれている。一方、「粒子に関するガイダンス-TR(ナノ粒子を含む小さな粒子の存在を確認するための規制対象食品・飼料製品申請のための技術的要件に関するガイダンス)」では、従来の材料におけるナノフラクションの存在の可能性を評価するアプローチを提案し、ナノ粒子がナノ特有のリスク評価の考慮を必要とするかどうかを評価する戦略を提供している。そのために、材料の物理化学的特徴(例えば、溶解度、溶解速度、粒径特性)に基づく特定の基準と評価ルートが導入された。既存の安全性研究がナノフラクションを適切にカバーしていることを示す基準も提示されている。

- ナノファイバーの有害性評価への新たなアプローチ手法(NAMs)の使用(ナノセルロースのケーススタディ)

ナノファイバーの有害性評価のためのNAMsの使用に関する提案募集が開始された。この助成金は、1) ナノセルロースの経口曝露:胃腸での消化、ナノファイバーの取り込みと局所的な影響、2) gut-on-a-chip モデルの使用の検討

次の2つの項目に焦点を当てていた。

- ナノマテリアルとNAMs及び加盟国の活動

ナノネットワークでは、ナノマテリアルの有害性評価におけるNAMsの現状と貢献について議論していた。更にナノネットワークのメンバーの国レベルでの進行中の活動状況(例:ポルトガル、ギリシャ、スロバキア)や国際機関レベルでの参加(イタリアとオランダのOECD活動への参加など)に

ついて最新情報が紹介された。

- 2021年10月に開催された食品及び飼料のナノテクノロジーに関するEFSAの科学ネットワーク会議

新しく発行された「粒子に関するガイダンス-技術的要求事項(TR)」は、EFSAの管轄下にある従来の材料にナノ粒子が存在する可能性を評価するために作成された。本ガイダンスは、評価対象の材料が「ナノに関するガイダンス-RA」の適用への必要性(すなわち、ナノ特異的なリスクアセスメントの必要性の有無について)を判断するための情報要件と評価ルートを提供するものである。

また、食料および飼料製品に適用されるナノマテリアルのリスク評価に関するガイダンス:ヒトと動物の健康(Guidance on Nano-RA)は、2018年の初版が発行後に更新版が発行された。本ガイダンスの更新は、新たな科学的知見、「粒子に関するガイダンス-TR」で得られた新たな成果との調和や本ガイダンスを利用したステークホルダーからのフィードバックが取り込まれた。また、更新版では、材料がナノ特異的なリスク評価を必要とする場合に従うべき段階的アプローチが図示されていた。また、ワーキンググループ(WG)のメンバーによって、ガイドラインの実施例と共に提示された。ここでは、食品添加物、食品接触材料及び新規食品の分野におけるリスク評価書に関して、EFSAや他のパネル及びユニットからWGに寄せられた要望が取り上げられた。

- 二酸化チタン(E171)意見書について

ナノネットワークでは、欧州委員会の要請を受けてEFSA FAFパネル(EFSA食品添加物・香料に関するパネル)で最近再評価された食品添加物としての二酸化チタン(E171)の安全性評価に関する科学意見が新たに公表されたことを紹介していた。この再評価の意見書では、TiO₂ナノ粒子(NP)で得られたデータおよび拡張世代生殖毒性(EOGRT)試験研究からのデータを含みパネルが信頼できると考えた新たな

関連する科学的証拠に基づくものであり、食品添加物二酸化チタン (E 171) の最新の安全性評価を扱っている。E 171 の構成粒子のうち、最小外形寸法が 100 nm 未満のものは 50%未満であり、30 nm 未満の構成粒子は、粒子数の 1% 未満であることに留意するものであった。したがって、当委員会は、30 nm 未満の TiO₂NP を用いた研究は、E 171 の安全性評価との関連性は限定的であるとみなしていた。さらに当委員会は、TiO₂ 粒子の消化管吸収は低い、体内に蓄積する可能性があると結論付けていた。

一般毒性および臓器毒性に関する試験では、E171 では 1,000 mg/kg 体重/日まで、TiO₂ NP (>30 nm) では試験した最高用量の 100 mg/kg 体重/日まで有害影響を示さなかった。生殖および発生毒性に対する影響は、EOGRT 試験で実施された最高用量である 1,000 mg E 171/kg 体重/日まで観察されなかった。しかし、E171 による免疫毒性と炎症の可能性、及び TiO₂ NP による神経毒性の可能性の観察は、E171 による異常腺窩巢の誘導の可能性と共に、有害事象の可能性を示唆するものであった。

遺伝毒性に関する試験では、当委員会は、TiO₂ 粒子は DNA 鎖切断および染色体損傷を誘発する可能性があるが、遺伝子突然変異を誘発する可能性はないと結論づけた。TiO₂ 粒子の物理化学的性質と in vitro または in vivo 遺伝毒性試験の結果の間には明確な相関関係は観察されなかったが、E 171 に存在する可能性のある TiO₂ 粒子の遺伝毒性に対する懸念は否定できなかった。遺伝毒性に対する複数の作用様式が並行して作用する可能性があり、TiO₂ 粒子により誘発される異なる分子メカニズムの相対的な寄与は不明であった。また、閾値作用様式が想定できるかどうかについても不明であった。加えて、遺伝毒性に関する TiO₂ 粒子サイズのカットオフ値は同定できなかった。TiO₂ NP (ナノ粒子) の潜在的な発がん作用を検討するために、適切にデザインされた研究はなく、入手可能なすべての証拠に基づい

て、遺伝毒性の懸念は否定できず、多くの不確実性を考慮すると、当委員会は E 171 を食品添加物として使用した場合、もはや安全とは考えられないと結論づけていた。

➤ 加盟国からのフィードバック

RIVM (オランダ国立公衆衛生環境研究所) の SAS (synthetic amorphous silica : 合成非晶質シリカ) に関する取り組みが紹介された。合成非晶質シリカ (SAS) は、食品添加物 E551 として食品に適用されており、凝集体や凝集塊を形成する非晶質二酸化ケイ素 (SiO₂) ナノ粒子で構成されているものであった。アニエス・オーメン氏は、SAS を用いた最近の経口毒性試験をレビューし、そのいくつかはケイ素 (Si) の組織内濃度を報告しているものであった。本ネットワークは、背景と評価に利用できる実験データの概要が紹介された後に、作業の結論と残された不確実性を提示し、このテーマに関する更なる情報と研究の必要性に関する提言が議論された。

➤ EU プロジェクトの紹介

PATROLS プロジェクトの腸管 in vitro モデル: ライプニッツ環境医学研究所により、PATROLS で開発・応用されている先進的な腸管 in vitro モデルの概要が発表された。

The GRACIOUS フレームワーク: ナノマテリアルのリスク評価を支援するためのグルーピングとリードアクロスへの応用: 最近終了した GRACIOUS (Grouping, Read-Across, Characterisation and classification framework for regulatory risk assessment of manufactured nanomaterials and Safer design of nano-enabled products) プロジェクトの活動についてのものがあつた。GRACIOUS は、ナノマテリアルとナノフォームのリードアクロスやクラス分類につながるグループ化の実用化を可能にすることで、非常に革新的な科学に基づくフレームワークを生成することを目的とした Horizon 2020 プロジェクトである。

また、ネットワークでは、RiskGONE (Science-based Risk Governance of Nano-Technology) というリスク管理の実践、およ

びすべての利害関係者に対するリスクの認識に関する明確な理解に基づき、ナノテクノロジーに関するリスク・ガバナンスの枠組みおよび科学に基づく確固たる学際的リスク管理手順を促進することを目的としたH2020プロジェクトについての最近の活動についても報告された。このプロジェクトの進行中の活動やワークプランについての紹介や、ナノテクノロジーのリスク・ガバナンス協議会の設立、およびナノテクノロジー対応材料の Safety by Design のコンセプトの推進が含まれていた。

- EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議 (2022年10月)
- 粒子-技術要件に関するガイダンス (2021年) を更新するために作成された「酸性条件下での分解/溶解速度」に関する付属書草案：

ナノテクノロジーに関する横断的ワーキンググループ (ccWG Nano) により作成された「酸性条件下での分解/溶解速度」に関する付属文書の草案を提示し、最近公表されたナノ粒子を含む小粒子の存在を確立するために規制した食品および飼料製品の用途に関する技術的要件に関するガイダンス (2021) (粒子-技術要件に関するガイダンス) を更新することになる。この新しい付属書の目的は、酸性 pH 下でのみ溶解する物質の溶解速度を決定するための研究設計と、乳幼児や小児に適用される閾値に関して、より詳細な勧告を提供することであり、4月の科学委員会 (SC) 本会議での内部協議において、草案が承認されている。その後、寄せられたコメントに基づき、SCによる承認にむけた付属書草案の更新版が提示された。今回の会合では、ナノネットワークからの寄せられたコメントの議論と共に、SC総会の採択に向けた本付属書の最終草案の議論が行われた。

- ナノ材料に関する ANSES リスク評価方法論

2021年に ANSES は、「食品中のナノ材料の健康リスク評価ガイド」を発表し、

2022年末には、開発された方法論の実装の概念に関する事例として「二酸化チタンへのナノ特定リスク評価の実装に関する意見」の公表を予定した。本方法論は、4つの柱からなる段階的アプローチで構成されており、評価対象の食品添加物に含まれるナノ粒子の割合に焦点をあてるものであった。ナノ粒子の割合は、ゴールドスタンダード技術される電子顕微鏡分析法によって識別されていた。材料が人工ナノ材料に分類される場合、若しくは完全に溶解しない場合には、ナノ特異的曝露評価と有害性の特定、および特性評価を実施することとなっている。EFSA と ANSES は、相互の改善と調和の可能性を議論するために、それぞれのテスト戦略について情報交換していき、さらなる議論を深めていく。

- OECD のナノテクノロジー分野における継続的な活動と最近の成果

OECD の工業ナノ材料に関する作業部会 (WPMN) におけるナノテクノロジー分野の主な活動について、各試験と評価、曝露測定と曝露緩和、リスク評価と規制プログラム、先進材料とより安全で持続可能なイノベーションアプローチから成る内容について紹介した。OECD の主な業務の一つは、データシステムの相互の受け入れ対象となる化学物質の試験に関するガイドライン、およびガイダンスの適用に関する詳細な説明を提供する付属のガイダンス文書の作成である。また、最近、OECD テストガイドライン 125 の「ナノ材料の粒子サイズとサイズ分布」および、OECD テストガイドライン 124 の「産業用ナノ材料の体積比表面積の測定」が公表されており、さらにナノマテリアルに関する様々な分野で完了したプロジェクトや、進行中のプロジェクト、および将来のプロジェクトのリストが提示された。また、現在進行中のプロジェクトとして、GSPD (Guidance on Sample Preparation and Dosimetry) の改訂や、OECD Guidance on Grouping of Chemicals (GD 194) の 6.9 項の「製造ナノマテリアルに適用できる初期検討事項」、ナノマテリ

アルと先端材料検討のための TG/GD に関する残りのニーズについての検討などの概要が説明された。最近、OECD WPNM は、先端材料に関する活動を開始し、新規素材 (Advanced Materials) の安全性、革新性、持続可能性の側面に焦点をあて、ナノ材料と先端材料が循環型経済に支えられた安全で持続可能な方法での開発を確保に向けて、先端材料の戦略的アプローチを開発していると述べていた。現在、OECD は、ナノテクノロジーに関連する既存のツールを特定、分類する SSbD (Safe- and Sustainable-by-Design) の開発に取り組んでいることが紹介された。

- 進行中の活動および新たな懸念事項

EFSA 戦略 2027 で設計された EFSA NAMS4NANO プロジェクトの概要と、優先すべき研究領域として「NAMs データ統合」を特定した新アプローチ方法論 (NAMs) に関する EFSA ロードマップの実施について紹介した。NAMS4NANO プロジェクトは 2 段階で開発され、第 1 段階では、NAM と既存のデータを統合するナノ材料に関する関連するケーススタディの設計と、NAM データの使用と EFSA リスク評価への統合を促進する方法論の開発に焦点を当てるものであった。第 2 段階は 2023 年から開始され、ナノプラスチックに関するケーススタディの設計、ナノ汚染物質のリスク評価ガイダンスの開発、ナノプラスチックの国際的なリスク評価の推進に重点を置く予定である。本プロジェクト成果は、データ統合アプローチの開発という点で、NAMs に関する他の進行中の EFSA プロジェクトの成果との統合が予定されている。

NANOCELLUP プロジェクトの目的は、(1) ナノセルローズ (NC) の危険性に関する現在のデータギャップに対処するための NAM ベースの一連の研究の設計および実施、(2) 食品を介して曝露された消費者に対する NC の規制上の有害性評価の結果を含めた提案について提供することであった。Tier 1 試験 (3 種類の NC 型に属する

NC 材料パネルへの曝露後の細胞応答に関する情報) の結果は、NC (2-3 材料) の最終的な選択に使用される。Tier 2 試験ではマイクロバイームによる NC の消化/分解、消化管からの取り込みや、局所的な影響の評価に焦点が当てられる。また、Tier 2 試験で最も顕著な効果を示したものは、Tier 3 試験に供され、反復投与毒性が検討される。このプロジェクトには、IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment) への作成と、NC の経口暴露有害性を評価するために提案された NAM ベースの各試験の詳細な試験プロトコルの更新を含んでいる。

D. 考察

D-1. ナノ酸化チタンの経口反復投与毒性

1) 6 nm の酸化チタンの 28 日間反復投与毒性試験

0.2% DSP に懸濁した結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO₂ (50 パーセントアル二次粒子径約 200 nm) を F344/DuCrj ラットに 10、100、1000 mg/kg bw/day の用量で 28 日間反復経口投与したところ、全ての群で死亡はみられず、体重および一般状態に変化は見られなかった。血液生化学的検査では、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な増加が見られた。

病理組織学的検査において、黄褐色の粒状物質が鼻腔および消化管 (食道、胃、小腸、大腸) に認められた。黄褐色の粒状物質は投与したナノサイズ TiO₂ であると考えられ、経口投与液の体重あたり投与体積が 10 mL/kg bw と比較的多かったため、意図せず鼻腔へ逆流した可能性が推察された。嗅上皮では内腔だけでなく粘膜下組織においても黄褐色の粒状物質が見られた。マクロファージによる貪食像は認められず、被験物質がどのようにして粘膜下組織に移行した

かは明らかではないが、炎症や組織障害等の反応性変化は見られなかったことから、病理組織学的に毒性影響はないものと考えられた。呼吸上皮では炎症反応が見られたが、当該部位に黄褐色物質の存在は認められなかった。昨年度の検討において投与期間中全ての群で死亡はみられず、血液生化学的検査では雌の 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な増加が見られたが、その他体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量において投与に関連する可能性のある変化は認められなかったことと総合して、28 日間試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と考えられた。

2) 6 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験

100、300、1000 mg/kg bw/day の用量で実施した 90 日間の反復経口投与においても、投与期間中全ての群で死亡はみられず、体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量、および尿検査結果に毒性学的に有意な変化は見られなかった。

血液学的検査では、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で白血球分画の有意な変化が見られたが、総白血球数および各白血球分画の実測値には有意な差はなかったことから、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた MCH の低値は極めて軽微な変化であり、他の赤血球マーカーにも変動がないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた EO の絶対値の高値は、分画の変動を伴わない軽度な変化であり、毒性学的意義は乏しいと考えられた。雌の 100 mg/kg bw/day 群で BASO 画分の低値と実測値の高値が見られたが、用量

相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。血液生化学的検査では雄の 300、1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な低下が見られたが、脂質代謝異常を示唆するその他の血液生化学的変化は見られず、肝機能障害を示唆する血液学的変化や組織病理学的所見も見られなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。また、28 日試験で見られた雌の 1000 mg/kg bw/day 群における TG の有意な増加は、90 日試験では見られなかった。その他、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で Na の高値、雄の 100、300 mg/kg bw/day 群および雌の 1000 mg/kg bw/day 群で Cl の低値が見られたが、軽微な変化であり、腎機能異常に関連する所見は見られなかったことから毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

臓器重量では雄の 100 mg/kg bw/day 群で腎臓相対重量の高値が見られたが、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。その他、雌雄ともに臓器重量の有意な変化は見られなかった。

病理組織学的検査では、被験物質であると考えられる黄褐色の物質が頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺（気管支随伴リンパ組織; BALT）、気管（上皮下）及び回腸（パイエル板）に見られた。28 日試験と同様に、頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺及び気管の組織中にみられた黄褐色物質は逆流等による誤嚥により気道から肺胞に入った被験物質と考えられた。しかし、28 日試験とは異なり、回腸パイエル板にも黄褐色物質が見られたことから、消化管内においてもナノサイズ TiO₂ が生体内に取り込まれる可能性が示された。またパイエル板や肺の BALT を含む各リンパ組織では、軽度ながらマクロファージによる黄褐色物質の貪食像が見られて

おり、長期間の曝露により異物反応が誘導されている可能性が考えられた。一方で、90日試験においても黄褐色物質に対しての炎症反応や組織障害等の反応性変化は認められなかったことから、生体への影響は軽度と推察された。以上の結果から、90日間試験におけるNOAELは1000 mg/kg bw/dayと考えられた。

肝臓、腎臓、脾臓中のTi濃度測定では、28日試験、90日試験ともに対照群を含む全ての個体でLOQ以上のTi濃度を示したことから、生体内の微量Ti元素が検出されたと考えられた。28日間投与において雌の1000 mg/kg bw/dayで対照群と比べて有意に高い肝臓中Ti量が検出されたものの、対照群との差分(すなわち、投与によって増加した可能性のあるTi量)は最終週の1日平均投与量と比較してわずか0.41 ppmであり、90日間投与では有意な差は見られなかったことから偶発的な変動であった可能性が考えられた。90日間投与において、1000 mg/kg bw/day群で肝臓および脾臓のTi濃度において他の個体と比べて10倍程度高値を示す1例が見られたものの、群間での有意差は見られなかったことから偶発的な変動と判断した。以上の結果から、ナノサイズTiO₂は反復経口投与により一部が粘膜下およびリンパ節中に見られ、リンパ行性に組織中に移行する可能性が示唆されたものの、それに伴う炎症や組織傷害などの反応性変化は見られず、肝臓、腎臓、脾臓における蓄積は90日間の反復投与においても見られなかった。

3) 6, 30, 180 nm の酸化チタンの90日間反復投与毒性試験 (1000 mg/kg bw/day)

尿検査では6 nm群で比重の増加が見ら

れたが、軽微な変化であり、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。血液学的検査において、TiO₂投与群でHGB、HCT、MCV、MCHの低下が見られた。これらは小球性貧血に関連する因子であることから鉄関連項目の生化学検査を実施したところ、全ての群で投与に伴う変動は見られなかった。HGB、HCT、MCV、MCHの低下はいずれも軽微であり、RBCの変動がなく、鉄関連項目の変動も見られなかったことから、これらの変化の毒性学的な意義は低いと考えられた。30 nm群ではWBCの低下が見られ、白血球分画ではLYMPOおよびMONOの低下が見られたが、白血球百分率の変動は見られず、軽微な変化であることから毒性学的な意義は低いと考えられた。

血液生化学検査では、30 nm群でALBの有意な低下が見られたが、軽微な変化であり、A/G比の変動は見られず、肝機能障害に関連する病理組織学的所見も見られなかったことから、偶発的な変化と判断した。30 nm群で見られたClの増加とIPの低下、180 nm群で見られたNaの低下とClの増加はいずれも軽微な変化であり、腎臓における病理組織学的変化など電解質異常を示唆するその他の所見が見られなかったことから偶発的な変動と判断した。6 nm群と30 nm群で見られたT-BILの低下は、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

病理組織学的検査では、昨年度までの結果と同様に小腸パイエル板において黄褐色粒子の沈着が見られた。パイエル板に黄褐色粒子が見られた頻度に結晶子径による違いは見られず、沈着した粒子の量も同程度であった。30 nm群および180 nm群で見られた小脳の空胞化は対照群でも見られた軽微な変化であり、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。肺、胃、小腸、大腸、腎臓、精巣に石灰沈着が見られたが、対照

群と同程度であり、標本作製上のアーチファクトの可能性もあり、TiO₂の投与に伴う影響ではないと考えられた。この他、種々の組織変化がみられたが、いずれも偶発性の変化であり毒性学的意義はないと判断した。

D-2. ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

本研究班の目的は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータを蓄積することである。本分担研究では、化粧品等への配合とともに、着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタン等が、アレルゲン経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討する。

令和2年度においては、マウスを用いた抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を使用して、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討し、酸化チタンC(粒子径6nm・アナターゼ型)及び酸化チタンE(粒子径30nm・アナターゼ型)が経口追加免疫を有意に増強すること、酸化チタンF(粒子径30-50nm・ルチル型)ではこのような増強効果は見られないことを示した。令和3年度においては、粒子径15nm・アナターゼ型の酸化チタンDでは経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が見られること、一方、粒子径15nm・ルチル型の酸化チタンAでは経口惹起のみ増強する傾向が見られることを示した。

令和4年度においては、粒子径6nm・アナターゼ型の酸化チタンCを経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程においてOVA

と共存させ、その影響を検討した。用量は、これまでの検討において増強効果が見られたOVA:酸化チタンC重量比=16:1に基づき、経皮感作時はOVA 2µg+TiO₂C 125ng、経口追加免疫時はOVA 30mg+TiO₂C 1.88mgとした。検討の結果、酸化チタンCはこれまでの検討と同様に、OVA経皮感作及び経口追加免疫を増強したが、経皮感作時の共存による経口追加免疫増強効果に対する影響は見られなかった。これらの結果から、ナノ酸化チタンは、経皮感作及び経口追加免疫を増強するが、経皮感作時の共存により経口追加免疫増強を促進する効果は無いことが示唆された。

先行研究においては、ナノマテリアルの経皮感作増強効果は結晶型とは関係なく粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆されている。一方本研究ではこれまでに、粒子径6-30nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンは、同程度の粒子径のルチル型のナノ酸化チタンと比較して、抗原経口追加免疫を増強する程度が大きいことが示されている。今後、本モデル実験系を用いて、経皮感作時及び経口追加免疫時のナノ酸化チタンの増強効果の作用機序について検討し、ナノマテリアルが免疫系に影響を与えるメカニズム等の解析を進めることが必要と考えられた。

D3. 安全性評価に関する国際動向調査

米国では2000年に国家ナノテクノロジー戦略(NNI)が設立されたことで、米国政府機関によるナノテクノロジーへの研究開発投資が活発化し、ナノテクノロジーの分野で大きな進歩を遂げ、複雑な問題に対する新たな解決策を可能にしてきた。FDAは、ヒトや動物の医薬品、ワクチン、その他の生物学的製品、医療機器の安全性、有効性、品

質、セキュリティを確保することで、国民の健康を守る責任と、国内の殆どの食料品、化粧品、放射線を発する製品の安全性にも責任を負っている組織として活動している。2006年にFDAは、ナノテクノロジーを応用した製品のFDAへの申請が増加することを予想して、ナノテクノロジータスクフォース(NTF)を立ち上げ、ナノテクノロジーに関する科学の現状に対するFDAの規制当局の評価を支援してきた。NTFは2007年に、調査結果と長官への提言をまとめた包括的な公開レポートを発表したが、この報告書が発表されて以来、FDAでは規制審査のために提出されたナノマテリアルを含む製品の申請件数が徐々に増加してきた。ナノテクノロジー専用の予算を持つFDAは、ナノテクノロジーレギュラトリーサイエンス研究をサポートし、科学的専門知識と能力を構築するために2つのコア施設を設立することで、研究インフラの強化を続けてきた。FDAは、ナノマテリアルの重要な品質特性を確認するために、高度な物理化学的特性評価、*in vitro*の生体適合性、および*in vivo*の安全性に関する内部研究を実施し、FDAの科学者と審査官を新たな製品に対応できるように備えていくことの必要性について考慮するものであった。ナノテクノロジー製品は、単純なシステムから高度に複雑な多成分・多機能材料へと進化し続けており、FDAは科学を理解し、有益なナノテクノロジー製品を開発するためのイノベーションを支援することで公衆衛生を向上させる努力をしていくと考えてきた。ナノテクノロジーの規制政策では、産業界向けのガイダンス文書を発行してきており、ナノテクノロジー製品の規制に対するFDAの包括的なアプローチのフレームワークについて説明してきた。また、ナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究では、研究をサポートするための研究インフラを強化し、ナノテクノロジーに特化した学内助成プログラムを通じてセンター間の連携を促進させてきた。このように、データギャップやナノテクノロジー製品審

査の重要な側面に対処している科学者に対する訓練の実施や社内の科学的専門知識と能力を構築することで、ナノテクノロジーの応用を含むFDA規制製品の責任ある開発が今後も促進していくと考えられる。

2022年10月に開催されたFDA's Nano Day Virtual Research Symposiumの調査で、食品接触通知(FCN: Food Contact Notification)プログラムは、1938年にFD&C法が議会で可決後、1958年の法改正より食品用途への定義に道を開き、食品添加物の承認に関する自由市場審査プログラムが確立された。今回、Raymond Brinas氏による話題で最も関連する変更は、1997年のFDA近代化法(FDAMA)で、製造工程や包装を通して食品に移行する可能性のある食品接触物質を定義するものであった。米国成分規格と使用基準が記載されている21CFRが安全性の基準となっており、FCNにおいて求められる化学的情報は、FCSそのものの特性のみならず、移行レベルと暴露量の推定が重要であった。また、移行とは、包装材料から食品への化学物質の分配と定義されており、移行先の包装材料の物理化学特性、食品の温度保存時間、包装材料の大きさなど、いくつかの要因に依存するものと考えられた。FDAの食品接触物質の安全性評価は、消費者の暴露を評価し、利用可能な毒性学的情報によって食事暴露の可能性が裏付けられていることを確認した上で、消費者の累積推定1日摂取量(CEDI)と許容1日摂取量(ADI)との比較に基づくものであった。FDAでは、ナノマテリアルを含む製品を評価する際に、2つの要素について考慮しており、1つは寸法、もう1つはサイズに依存する特性であった。また食品接触物質に関連するもう一つの考慮される事項として、特に重要と考えられるのは製造工程の変更であった。FDAでは、ナノマテリアルを含むすべての製品を本質的に無害あるいは有害であると分類して判断しているのではなく、最終製品の特性や使用目的に沿った安全性を考慮する必要性が考えられた。

2020年のEFSAテクニカルガイダンスに

関するネットワーク会議では、ナノマテリアルやナノ断片を含む材料の適用件数が増加しているにもかかわらず、各国の開発者や関係者による EFSA 2018 ガイダンスの直接的な利用頻度は、現時点でまだかなり低いものであった。従って、ナノネットワークでは、国家レベルでの申請者やリスク評価者による実施を促進するためにも、セミナーや教育で 2 つのガイダンス文書を普及させることを奨励することを結論付けている。また、ナノネットワークでは、植物保護製品（すなわち、製剤または活性物質）におけるナノフォームの実施を検討すべきであり、更新された「ナノに関するガイダンス – RA」の採択に先立ち、ガイダンス文書への最終的なフィードバックを提供するため再度協議を行う予定であると結論付けている。

2021 年の EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、ネットワークメンバーは、ナノマテリアルのリスク評価に関する専門知識や EFSA との将来的な協力関係についてフィードバックを求められていた。ナノマテリアルやナノ断片を含む材料の適用件数が増加しているにもかかわらず、各国の開発者や関係者による EFSA 2018 ガイダンスの直接的な利用頻度は、現時点でまだかなり低いものであることから、ナノネットワークでは、国家レベルでの申請者やリスク評価者による実施を促進するためにも、セミナーや教育で 2 つのガイダンス文書を普及させることが奨励されている。

アドバンスドマテリアル (AdMa) に関しては、再生可能エネルギー、電子移動、デジタル化、医療、資源の効率的な利用もしくは節約など、さまざまな分野で大きな可能性を秘めている。また、AdMa の中には、リサイクルや廃棄物処理など、ライフサイクル全体の持続可能性に関する課題を提起するものも含まれる。AdMa と革新的な製造プロセスは、イノベーション研究の焦点となっており、経済、社会、環境に対して将来的にも期待されるものである。AdMa のいくつかについては、従来の化学

物質安全性の枠組みの中で、ナノマテリアルについて特定されたものと同様な課題や追加的な課題が生じることが予想される。AdMa の潜在的リスクは、化学組成以外の物理的性質な要素によって決定されると述べている。従って、従来のリスク評価が全ての AdMa の安全な適用と使用に対して常に保証できるかどうかという問題が生じてくる。従って、現行の化学物質の法規制やリスク評価ツールが、AdMa の潜在的リスクに適切に対処しているかについて評価する必要があると考えられる。

2022 年の EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、「酸性条件下での分解/溶解速度」に関する付属書草案が提示され、最近公表されたナノ粒子を含む小粒子の存在を確認するための規制対象食品および飼料製品の用途の技術的要件に関するガイダンス (2021) が更新され、酸性 pH 下でのみ溶解する物質の溶解速度を決定するための研究設計や、乳幼児や小児に適用される閾値に関するより詳細な勧告を提供するものであった。また、2021 年に ANSES は、「食品中のナノ材料の健康リスク評価ガイド」を発表し、2022 年末には、開発された方法論の実装の概念に関する事例として「二酸化チタンへのナノ特定リスク評価の実装に関する意見」が公表された。さらに、各プロジェクトについても活発に紹介され、今後、ネットワークメンバーによる更なる情報と研究の必要性に関する提言が議論されていくものと考えられた。

E. 結論

E-1. ナノ酸化チタンの経口反復投与毒性

0.2% DSP に懸濁した結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO₂ (50 パーセントイル二次粒子径約 200 nm) を F344/DuCrj ラットに 10、100、1000 mg/kg bw/day の用量で 28 日間反復経口投与したところ、全ての群で死亡はみられず、体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量、

病理組織学的検査において投与に関連する可能性のある毒性変化は認められなかったことと総合して、28日間試験におけるNOAELは1000 mg/kg bw/dayと考えられた。

結晶子径6 nmのアナターゼ型ナノサイズTiO₂ (D₅₀ = 約200 nm)をF344/DuCrjラット雌雄に0、100、300、1000 mg/kg bw/dayの用量で90日間反復投与したところ、経口投与に関連した毒性学的に有意な変化は見られなかったことから、本試験におけるNOAELは1000 mg/kg bw/dayと結論した。90日間の反復投与によって、28日間投与では確認されなかった回腸パイエル板等のリンパ組織において被験物質と考えられる黄褐色粒子の沈着が見られ、経口暴露によって消化管から生体内にTiO₂が微量ながら取り込まれることが示唆された。肝臓、腎臓、脾臓におけるTiの蓄積は見られず、炎症や組織傷害などの生体反応も伴っていないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

結晶子径6、30、および180 nmのTiO₂を1000 mg/kg bw/dayの用量でF344/DuCrjラットに90日間投与したところ、いずれも毒性影響は見られなかった。小腸パイエル板における粒子の沈着は同程度であり、主要臓器中のチタン量の増加は軽微であった。以上の結果から、TiO₂の生体影響に対する結晶子径の影響は小さいことが示された。

E-2. ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等で暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータを蓄積するため、化粧品等への配合とともに着色あるいは遮光性・抗菌性

を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンが、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。抗原経皮感作-経口惹起実験系については、OVA 2μg×4回の経皮感作、OVA 30 mg×7回の経口投与による追加免疫、その後のOVA 50 mgの経口投与によりアレルギー症状を惹起する実験系を確立することができた。

この実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討したところ、酸化チタンC (アナターゼ型、粒子径6 nm)、及び酸化チタンE (アナターゼ型、粒子径30 nm)が、抗原の経口投与による追加免疫を増強することが示された。一方、酸化チタンF (ルチル型、粒子径30-50 nm)ではこのような増強効果は見られなかった。

また、酸化チタンD (粒子径15 nm・アナターゼ型)では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方、酸化チタンA (粒子径15 nm・ルチル型)では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。

さらに、経皮感作時のナノ酸化チタンの共存がナノ酸化チタンによる経口追加免疫増強作用に与える影響について検討した。その結果、酸化チタンCでは、これまでの検討と同様にOVA経皮感作及び経口追加免疫に対する増強効果が見られたが、経皮感作時の共存による経口追加免疫増強作用は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

E3. 安全性評価に関する国際動向調査

本研究では、食品関連分野におけるナノマテリアル並びに新規素材の安全性評価に関する国際動向を調査することを目的とする。研究期間をとおして欧州食品安全機関 (EFSA) が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークに関する調査を行った他、令和 2 および 4 年度に開催された米国食品医薬品局 (FDA) のワークショップ「FDA's NanoDay Virtual Research Symposium」に参加し、ナノテクノロジーの現状や FDA の科学的な根拠に基づくナノテクノロジーの規制政策、ナノテクノロジーのレギュラトリーサイエンス研究の概要に関する調査を実施した。

FDA はナノテクノロジー製品に対する規制アプローチを明確にし、現在までに、FDA は 5 つの最終ガイダンス文書を発行している。令和 4 年には、ナノ材料を含む食品接触物質 (FCS) の安全性評価について焦点をあてており、その安全性評価は FCS のナノスケール状態に関連するデータに基づいて実施され、新しい物理化学的特性を持つ場合には、追加または代替の試験方法が必要となる場合があることが示されていた。EFSA ネットワークに関して、令和 2 年度は EFSA の新ガイドライン (2018 年) の更新状況とそれを捕捉するテクニカルガイダンス案についての議論が行われていた。新ガイドラインの主な更新内容にはナノの範囲に関連する明確化、ナノ材料の物理化学的特性化に関する新しい技術更新、毒性評価に関するセクションの更新が含まれている。一方、「粒子に関するテクニカルガイダンス (ナノ粒子を含む小さな粒子の存在を確認するための規制対象食品・飼料製品申請のための技術的要件に関するガイダンス)」では、従来の材料におけるナノフラクションの存在の可能性を評価するアプローチを提案し、ナノ粒子がナノ特有のリスク評価の考慮を必要とするかどうかを評価する戦略を提供している。R3 年度は二つの EFSA ガイダンス文書の発行状況や更新内容についての議論に加えて EFSA 食品添加物・香料

に関するパネルが再評価した食品添加物としての二酸化チタン (E171) の安全性評価に関する科学的意見を新たに発表した内容や、合成アモルファスシリカ (SAS) ナノ粒子の経口曝露のリスク評価に関する取り組みや腸管 *in vitro* モデルについての議論があった。R4 年度は、テクニカルガイダンスに関する付属書草案「酸性条件下での分解/溶解速度」が提示され議論された。また 2021 年に ANSES が公表した「食品中のナノ材料の健康リスク評価ガイド」の評価事例として 2022 年末に公表予定の「二酸化チタンへのナノ特定リスク評価の実装に関する意見」についての意見交換が行われた。また、OECD の工業ナノ材料に関する作業部会 (WPMN) におけるナノテクノロジー分野の主な活動について、最近、OECD テストガイドライン (TG) 125 の「ナノ材料の粒子サイズとサイズ分布」および TG124 の「産業用ナノ材料の体積比表面積の測定」が公表されたことや、ナノマテリアルに関する様々な分野でのプロジェクトのリストが提示された。さらに、最近、OECD WPNM は、新規素材 (Advanced Materials) の安全性、革新性、持続可能性の側面に焦点をあてた活動を開始し、ナノ材料と先端材料が循環型経済に支えられた安全で持続可能な方法での開発を確保に向けて、先端材料の戦略的アプローチを開発していることが紹介されていた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Akagi J-A, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T, Ogawa K. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. (2023) Particle and Fibre Toxicology, in press.
2. Tamehiro N, Adachi R, Kondo K. Assessment of immune responses in an animal model of wheat food allergy via

- epicutaneous sensitization. *Methods Mol Biol* 2021; 2223: 37-47.
3. Akiyama H, Adachi R. Japanese food allergy-labeling system and comparison with the international experience; detection and thresholds. *Food Safety* 2021; 9(4) 101-116.
 4. Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 2020 Oct 15;17(1):48.
 5. Ohno A., Okiyama Y., Hirose A., Fukuhara K., The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2022, 441, 115974
 6. Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D. A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021 Oct;34(4):353-358.
 7. Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T. Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jun;188: 114580.
 8. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198.
 9. Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Particle and Fibre Toxicology*, 19:30(2022)
 10. Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. *Part Fibre Toxicol.* 19, 38, 2022
- F.2 学会発表
1. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ナノサイズ酸化チタン(IV)の毒性研究.第49回日本毒性学会学術年会. 2022年7月1日 札幌.
 2. Ogawa K : Further facts from orally exposed nanomaterials. Global Summit on Regulatory Science 2022. 2022年10月20日 シンガポール.
 3. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性. 第59回全国衛生化学技術協議会年会. 2022年10月31日-11月1日 川崎.
 4. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武

- 士, 小川久美子. ナノサイズ酸化チタンの90日間反復経口投与による毒性研究. 第39回日本毒性病理学会学術集会. 2023年1月25日-26日 東京.
5. Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology. 2023年3月22日 米国ナッシュビル.
 6. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 結晶子径6 nmの超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性. 日本薬学会第143年会. 2023年3月27日 札幌.
 7. Tamehiro N, Adachi R, Kondo K. Functional food ingredients modulate mast cell signaling. JSA/WAO Joint Congress 2020. 2020年9月
 8. Maeno A, Hojo M, Sakamoto Y, Yuzawa K, Hasegawa Y, Kubo Y, Nagasawa A, Ando H, Tanaka K, Kaihoko F, Ikushima K, Yamamoto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Hirose A, Nakae D. Chronic toxicity study of multi-walled carbonnanotubes (MWCNT) in rats by repeated intratracheal instillations: a progress report at 1 year. 第47回日本毒性学会学術年会 (Online) 2020.6.29
 9. Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE, Development to toxicity assessment method of nanomaterials using multivariate analysis. 47回日本毒性学会学術集会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
 10. Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE: Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
 11. Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-13.
 12. Hirose A, Hojo M, Taquahashi Y, Kanno J, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Ohnishi M, Goto Y, Nakae D. Development of an intermittent exposure type chronic toxicity assessment method for MWCNT as an alternative to the continuous two-year inhalation protocol. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-13.
 13. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A, Maeno A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A and Nakae D. Declines in serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. 60th SOT annual meeting (SOT2021) (Online), 2021.3.12.
 14. Iijima K, Nishida A, Ohno A, Hirose A, Ashikaga T. Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1. 60th SOT annual meeting (SOT2021) (Online), 2021.3.22.
 15. Ohno A, Watanabe M, Hirose A: ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用, 第48回日本毒性学会学術年会 (Hybrid 開催(2021.7.7-9)) (神戸)
 16. 前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、生嶋清美、平松恭子、海銚藤文、山本行男、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大. 多層カー

- ボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較：1 年経過時点での報告. 第 48 回日本毒性学会学術年会. (Hybrid 開催 (2021.7.7-9) (神戸)
17. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催) , Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
 18. Akiko Ohno, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : The position of nitro group affecting the mutagenicity of nitrated benzo[a]pyrenes、第 80 回日本癌学会学術総会 (Hybrid 開催) (2021.9.30-10.2) (横浜)
 19. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : In silico analysis of mutagenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (Hybrid 開催) (2021.11.1-2) (横須賀)
 20. 大野彰子、西田明日香、飯島一智、高橋祐次、広瀬明彦、足利太可雄. in silico による TiO₂NPs の物性と THP-1 細胞への活性化の関連性解析、日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (Hybrid 開催) (2021.11.13, 沖縄)
 21. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. Application to toxicity evaluation of silicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021 (2021.12.16-21, On line)
 22. 広瀬明彦、大野彰子、ナノマテリアルの有害性評価と今後の課題：ナノマテリアル曝露に対するリスク評価法における国際動向、日本薬学会第 142 年会シンポジウム (オンライン開催) (2022. 3. 26)
 23. Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J. Preliminary report of the two-year, every 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube in male mice, the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, (Virtual, March 27-31, 2022)
 24. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, (Virtual, March 27-31, 2022)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

1. ナノ酸化チタンの経口反復投与毒性

1) 6 nm の酸化チタンの 28 日間反復投与毒性試験

Table 1-1. General conditions of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)		0	10	100	1000
Findings	Day				
<i>Male</i>					
No. of animals		5	5	5	5
Loose stools	9	-	-	1	-
	18	1	1	-	-
	23	-	-	1	-
Low activity	16	-	-	-	1
<i>Female</i>					
No. of animals		5	5	5	5
Loose stools	9	-	-	-	1
Low activity	14	-	1	-	-

Table 1-2. Haemaology of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	10	100	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	5	5	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.90 \pm 0.53	8.91 \pm 0.25	8.90 \pm 0.42	9.03 \pm 0.21
HGB (g/dL)	15.5 \pm 0.8	15.4 \pm 0.4	15.5 \pm 0.6	15.5 \pm 0.2
HCT (%)	45.2 \pm 3.0	45.1 \pm 1.6	45.3 \pm 2.0	45.7 \pm 0.7
MCV (fL)	50.7 \pm 0.7	50.5 \pm 0.4	50.9 \pm 0.6	50.6 \pm 0.4
MCH (pg)	17.5 \pm 0.2	17.2 \pm 0.2	17.4 \pm 0.2	17.2 \pm 0.1
MCHC (g/dL)	34.4 \pm 0.5	34.1 \pm 0.4	34.2 \pm 0.3	34.0 \pm 0.1
RET (%)	3.16 \pm 0.35	3.03 \pm 0.20	2.97 \pm 0.18	3.01 \pm 0.20
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	512 \pm 289	751 \pm 60	730 \pm 76	774 \pm 22
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6.75 \pm 1.10	4.73 \pm 0.83 *	5.89 \pm 1.21	5.10 \pm 0.74
Differential Cell count				
NEUT (%)	19.7 \pm 5.18	23.7 \pm 4.05	28.6 \pm 7.14	26.5 \pm 2.03
LYMPH (%)	75.8 \pm 5.50	72.9 \pm 4.13	66.8 \pm 6.95	69.8 \pm 2.49
MONO (%)	2.78 \pm 0.99	2.56 \pm 0.46	3.30 \pm 1.80	2.72 \pm 0.49
EO (%)	1.52 \pm 0.99	0.72 \pm 0.15	0.98 \pm 0.45	0.76 \pm 0.20
BASO (%)	0.20 \pm 0.06	0.12 \pm 0.10	0.24 \pm 0.10	0.26 \pm 0.12
<i>Female</i>				
No. of animals	5	5	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.06 \pm 0.22	9.05 \pm 0.25	9.23 \pm 0.31	9.17 \pm 0.10
HGB (g/dL)	16.1 \pm 0.3	16.1 \pm 0.5	16.3 \pm 0.5	16.1 \pm 0.2
HCT (%)	46.8 \pm 1.0	46.4 \pm 1.6	47.4 \pm 1.7	46.8 \pm 0.6
MCV (fL)	51.6 \pm 0.6	51.2 \pm 0.4	51.3 \pm 0.4	51.1 \pm 0.5
MCH (pg)	17.8 \pm 0.1	17.8 \pm 0.1	17.7 \pm 0.2	17.5 \pm 0.1 **
MCHC (g/dL)	34.4 \pm 0.3	34.8 \pm 0.3	34.4 \pm 0.1	34.3 \pm 0.3
RET (%)	2.52 \pm 0.16	2.62 \pm 0.24	2.58 \pm 0.27	2.53 \pm 0.40
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	707 \pm 43	670 \pm 184	598 \pm 237	740 \pm 98
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.35 \pm 1.26	4.04 \pm 1.07	4.18 \pm 1.11	4.90 \pm 1.97
Differential Cell count				
NEUT (%)	17.6 \pm 2.76	17.7 \pm 4.36	16.9 \pm 4.83	18.1 \pm 5.89
LYMPH (%)	77.4 \pm 2.79	74.4 \pm 10.86	78.1 \pm 4.14	77.2 \pm 6.29
MONO (%)	3.24 \pm 0.48	3.26 \pm 0.80	3.24 \pm 0.48	2.80 \pm 0.53
EO (%)	1.52 \pm 0.45	4.34 \pm 5.78	1.56 \pm 1.03	1.64 \pm 0.44
BASO (%)	0.18 \pm 0.10	0.36 \pm 0.32	0.20 \pm 0.11	0.30 \pm 0.11

Values are mean \pm S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 1-3. Serum biochemistry of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	10	100	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	5	5	5	5
TP (g/dL)	6.02 ± 0.17	6.10 ± 0.11	6.18 ± 0.15	6.02 ± 0.07
ALB (g/dL)	4.26 ± 0.16	4.34 ± 0.05	4.40 ± 0.09	4.26 ± 0.10
A/G	2.42 ± 0.10	2.48 ± 0.17	2.48 ± 0.17	2.44 ± 0.19
BUN (mg/dL)	21.82 ± 2.74	20.68 ± 0.72	20.56 ± 1.09	20.16 ± 1.59
CRE (mg/dL)	0.348 ± 0.047	0.296 ± 0.022	0.282 ± 0.017 *	0.280 ± 0.020 *
Na (mEq/L)	142.6 ± 0.8	143.4 ± 1.0	143.8 ± 0.7	142.6 ± 1.0
K (mEq/L)	5.06 ± 1.41	4.30 ± 0.38	4.02 ± 0.19	4.28 ± 0.10
Cl (mEq/L)	100.8 ± 2.0	101.6 ± 0.5	101.2 ± 1.2	101.2 ± 0.4
Ca (mg/dL)	10.56 ± 0.72	10.54 ± 0.28	10.44 ± 0.26	10.24 ± 0.27
IP (mg/dL)	8.24 ± 1.43	7.26 ± 1.07	6.92 ± 0.54	7.18 ± 0.24
AST (IU/L)	100.8 ± 25.2	108.6 ± 46.3	88.0 ± 9.5	80.4 ± 2.9
ALT (IU/L)	41.6 ± 1.6	43.2 ± 2.1	42.2 ± 2.5	39.8 ± 3.8
ALP (IU/L)	809.8 ± 42.3	790.4 ± 51.2	815.6 ± 32.2	796.6 ± 12.0
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	58.2 ± 3.7	55.2 ± 6.5	56.0 ± 4.1	56.4 ± 4.2
TG (mg/dL)	61.6 ± 13.4	47.8 ± 6.6	54.0 ± 9.7	54.4 ± 4.5
T-BIL (mg/dL)	0.048 ± 0.007	0.048 ± 0.004	0.056 ± 0.008	0.050 ± 0.011
GLU (mg/dL)	157.0 ± 38.9	139.2 ± 15.7	136.0 ± 10.9	145.2 ± 11.4
<i>Female</i>				
No. of animals	5	5	5	5
TP (g/dL)	5.80 ± 0.21	5.86 ± 0.12	5.96 ± 0.33	5.94 ± 0.15
ALB (g/dL)	4.24 ± 0.14	4.30 ± 0.11	4.36 ± 0.23	4.34 ± 0.05
A/G	2.74 ± 0.10	2.80 ± 0.11	2.76 ± 0.17	2.72 ± 0.26
BUN (mg/dL)	20.82 ± 1.19	19.52 ± 1.75	21.04 ± 1.44	21.08 ± 1.24
CRE (mg/dL)	0.324 ± 0.019	0.312 ± 0.021	0.338 ± 0.050	0.318 ± 0.017
Na (mEq/L)	143.4 ± 1.0	143.4 ± 0.5	143.2 ± 0.7	143.0 ± 0.6
K (mEq/L)	3.90 ± 0.11	3.92 ± 0.07	3.96 ± 0.29	3.92 ± 0.12
Cl (mEq/L)	103.8 ± 0.7	103.2 ± 1.2	103.6 ± 1.0	103.6 ± 0.5
Ca (mg/dL)	9.80 ± 0.46	9.90 ± 0.30	10.14 ± 0.08	10.10 ± 0.17
IP (mg/dL)	6.44 ± 0.22	6.80 ± 0.50	6.58 ± 0.61	6.82 ± 0.39
AST (IU/L)	106.0 ± 28.8	88.0 ± 12.5	87.8 ± 9.2	77.0 ± 4.6
ALT (IU/L)	35.4 ± 2.2	32.6 ± 2.3	33.0 ± 2.8	34.6 ± 3.6
ALP (IU/L)	567.6 ± 25.0	589.0 ± 56.6	585.2 ± 24.1	592.2 ± 33.5
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	74.0 ± 6.5	78.6 ± 8.0	75.8 ± 8.7	78.8 ± 3.2
TG (mg/dL)	21.4 ± 8.3	24.8 ± 7.7	21.2 ± 7.8	42.8 ± 10.2 **
T-BIL (mg/dL)	0.054 ± 0.010	0.056 ± 0.008	0.046 ± 0.015	0.056 ± 0.016
GLU (mg/dL)	92.8 ± 9.1	89.2 ± 4.3	92.4 ± 15.6	102.6 ± 5.1

Values are mean ± S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 1-4. Organ weights of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	10	100	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	5	5	5	5
Body weight (g)	209.5 ± 6.1	207.6 ± 8.5	207.8 ± 14.6	209.2 ± 9.7
Absolute (g)				
Brain	1.801 ± 0.063	1.839 ± 0.044	1.831 ± 0.024	1.816 ± 0.024
Thymus	0.279 ± 0.025	0.282 ± 0.019	0.291 ± 0.016	0.276 ± 0.035
Lungs	0.739 ± 0.052	0.772 ± 0.054	0.756 ± 0.055	0.783 ± 0.044
Heart	0.717 ± 0.059	0.719 ± 0.047	0.715 ± 0.058	0.702 ± 0.047
Spleen	0.480 ± 0.024	0.498 ± 0.017	0.476 ± 0.033	0.481 ± 0.026
Liver	6.007 ± 0.984	5.573 ± 0.269	5.500 ± 0.515	5.518 ± 0.435
Adrenals	0.034 ± 0.003	0.035 ± 0.002	0.036 ± 0.005	0.038 ± 0.003
Kidneys	1.417 ± 0.098	1.439 ± 0.085	1.377 ± 0.088	1.369 ± 0.090
Testes	2.652 ± 0.097	2.754 ± 0.032	2.700 ± 0.208	2.620 ± 0.264
Relative (%)				
Brain	0.860 ± 0.019	0.887 ± 0.021	0.885 ± 0.061	0.870 ± 0.046
Thymus	0.133 ± 0.011	0.136 ± 0.008	0.141 ± 0.008	0.132 ± 0.015
Lungs	0.352 ± 0.020	0.372 ± 0.014	0.364 ± 0.007	0.374 ± 0.012
Heart	0.342 ± 0.020	0.346 ± 0.014	0.344 ± 0.016	0.335 ± 0.009
Spleen	0.229 ± 0.006	0.240 ± 0.005 **	0.229 ± 0.004	0.230 ± 0.002
Liver	2.858 ± 0.383	2.685 ± 0.061	2.642 ± 0.082	2.634 ± 0.087
Adrenals	0.016 ± 0.002	0.017 ± 0.001	0.017 ± 0.002	0.018 ± 0.001
Kidneys	0.676 ± 0.029	0.693 ± 0.021	0.663 ± 0.014	0.654 ± 0.019
Testes	1.267 ± 0.051	1.329 ± 0.053	1.299 ± 0.039	1.257 ± 0.149
<i>Female</i>				
No. of animals	5	5	5	5
Body weight (g)	134.0 ± 5.5	131.8 ± 2.8	133.4 ± 3.8	131.0 ± 4.4
Absolute (g)				
Brain	1.693 ± 0.046	1.678 ± 0.057	1.680 ± 0.042	1.699 ± 0.031
Thymus	0.228 ± 0.014	0.233 ± 0.009	0.225 ± 0.017	0.214 ± 0.012
Lungs	0.625 ± 0.032	0.611 ± 0.054	0.586 ± 0.025	0.566 ± 0.023
Heart	0.504 ± 0.007	0.507 ± 0.034	0.492 ± 0.023	0.497 ± 0.010
Spleen	0.347 ± 0.016	0.342 ± 0.008	0.356 ± 0.017	0.344 ± 0.021
Liver	3.421 ± 0.094	3.446 ± 0.111	3.326 ± 0.134	3.267 ± 0.150
Adrenals	0.041 ± 0.004	0.043 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.040 ± 0.002
Kidneys	0.928 ± 0.067	0.929 ± 0.046	0.949 ± 0.030	0.956 ± 0.033
Ovaries	0.053 ± 0.004	0.055 ± 0.008	0.055 ± 0.016	0.048 ± 0.010
Relative (%)				
Brain	1.266 ± 0.076	1.273 ± 0.026	1.259 ± 0.018	1.298 ± 0.052
Thymus	0.171 ± 0.011	0.177 ± 0.004	0.168 ± 0.014	0.164 ± 0.011
Lungs	0.466 ± 0.015	0.463 ± 0.036	0.439 ± 0.016	0.433 ± 0.019
Heart	0.377 ± 0.014	0.384 ± 0.019	0.369 ± 0.023	0.380 ± 0.013
Spleen	0.259 ± 0.003	0.260 ± 0.006	0.267 ± 0.008	0.263 ± 0.017
Liver	2.556 ± 0.095	2.614 ± 0.052	2.493 ± 0.100	2.494 ± 0.102
Adrenals	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.003	0.030 ± 0.001	0.031 ± 0.001
Kidneys	0.692 ± 0.023	0.704 ± 0.022	0.711 ± 0.024	0.730 ± 0.028
Ovaries	0.040 ± 0.002	0.042 ± 0.006	0.041 ± 0.011	0.037 ± 0.007

Values are mean ± S.D. ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 1-5. Histopathological findings of F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	No. of animals	Male		Female		
		0	1000	0	1000	
Heart	Infiltration, mononuclear cell, myocardium, focal (minimal)	0	1	0	0	
Pituitary gland	Cyst (minimal)	0	1	0	0	
Nasal cavity	Yellowish brown material, nasal lumen (mild)	0	1	0	1	
	Yellowish brown material, submucosa (minimal)	0	4 *	0	4 *	
	Inflammation, acute (minimal, mild, moderate)	1 (0, 1, 0)	3 (0, 1, 2)	0	1 (1, 0, 0)	
	Hyperplasia, mucous cell, respiratory epithelium (minimal, mild)	1 (1, 0)	2 (1, 1)	0	0	
	Metaplasia, squamous cell, transitional epithelium (minimal)	1	2	0	0	
	Lung	Alveolar macrophage aggregation, containing yellowish brown material (minimal)	0	1	0	0
		Infiltration, eosinophile/mononuclear cell, perivascular (minimal)	0	0	1	0
Tongue	Hemorrhage, alveoli, focal (minimal)	1	0	0	0	
	Inflammation, neutrophile/eosinophile, lingual gland (minimal)	0	0	1	0	
Parotid gland	Focus, hypertrophic, basophilic (minimal)	1	1	0	1	
Esophagus	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	3	0	2	
Stomach	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	5 **	0	4 *	
Duodenum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	4 *	0	3	
Jejunum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	5 **	0	3	
Ileum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	4 *	0	4 *	
Cecum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	5 **	0	4 *	
Colon	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	3	0	2	
Rectum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	2	0	2	
Liver	Necrosis, focal (minimal)	1	1	0	1	
Testis	Atrophy, tubular, unilateral (severe)	0	1	-	-	
Prostate	Infiltration, monocuclear cell, interstitial (minimal)	1	1	-	-	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

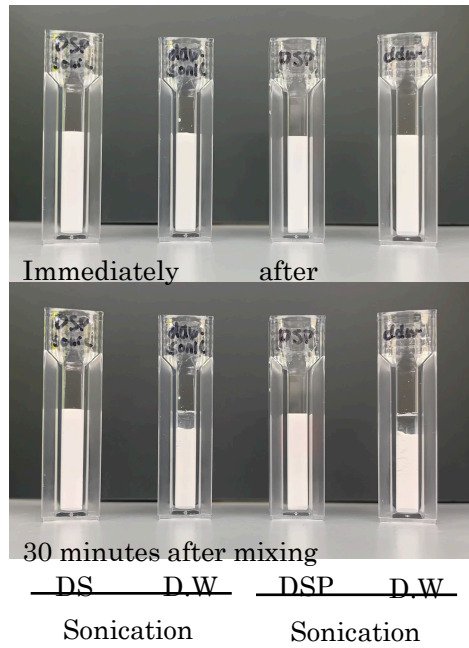


Figure 1-1. Comparison of solvents for TiO_2
 TiO_2 : AMT-100 (primary diameter 6 nm)
 Concentration : 100 mg/ mL
 Solvent : 0.2% Na_2HPO_4 (DSP) or distilled water (D.W.)

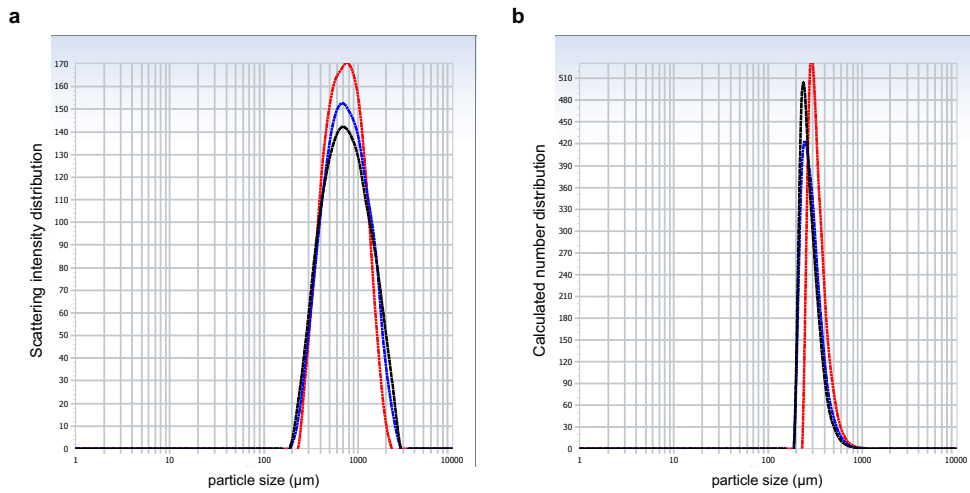


Figure 1-2. Scattering intensity distribution (a) and calculated number distribution (b) of titanium dioxide suspended in 0.2% disodium phosphate measured by dynamic light scattering.

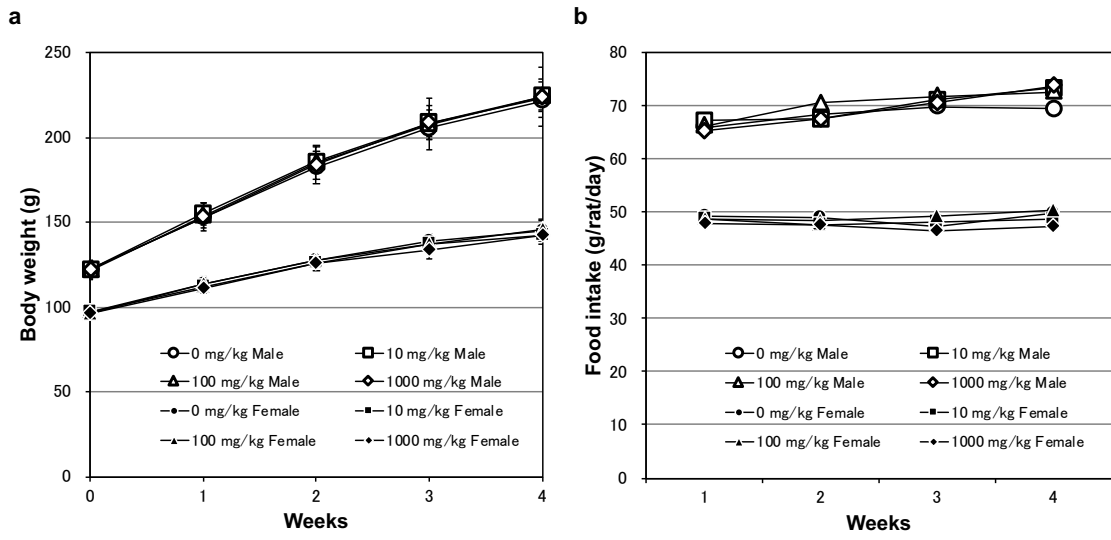
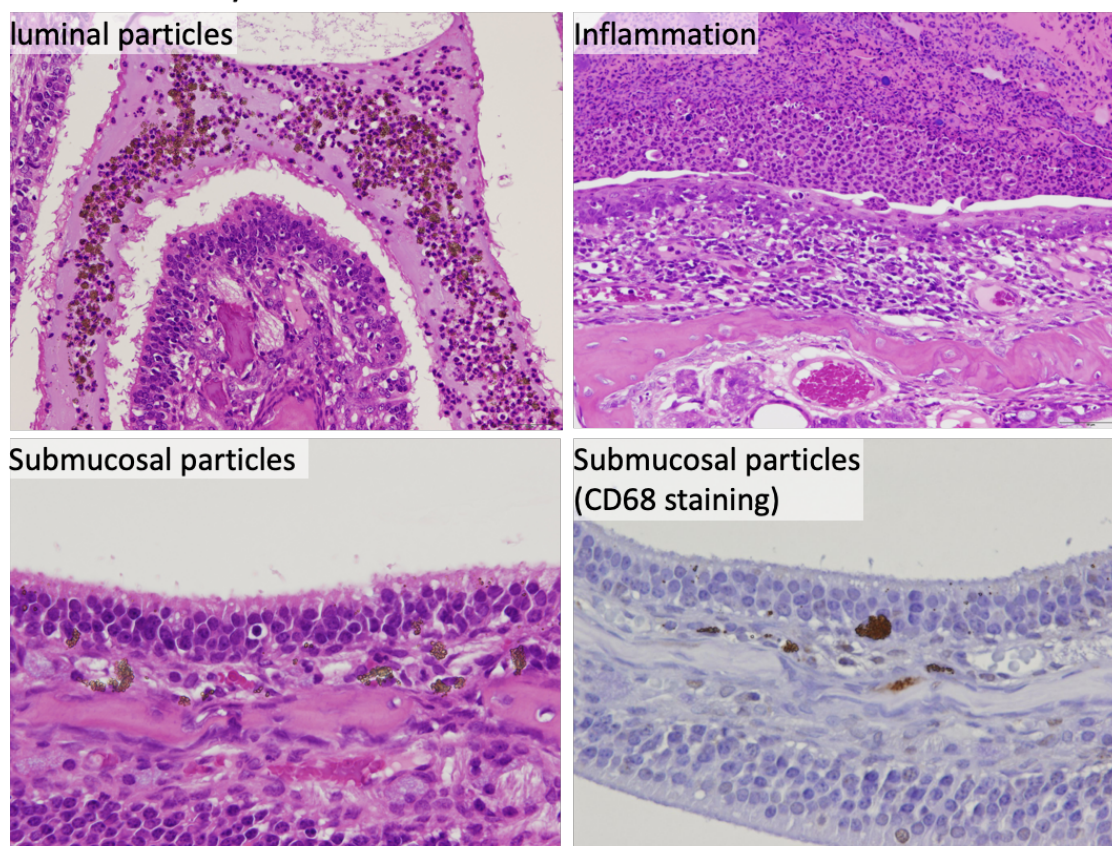


Figure 1-3. Body weight (a) and daily food intake (b) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium dioxide for 4 weeks.

A. Nasal cavity



B. Gastrointestinal tract

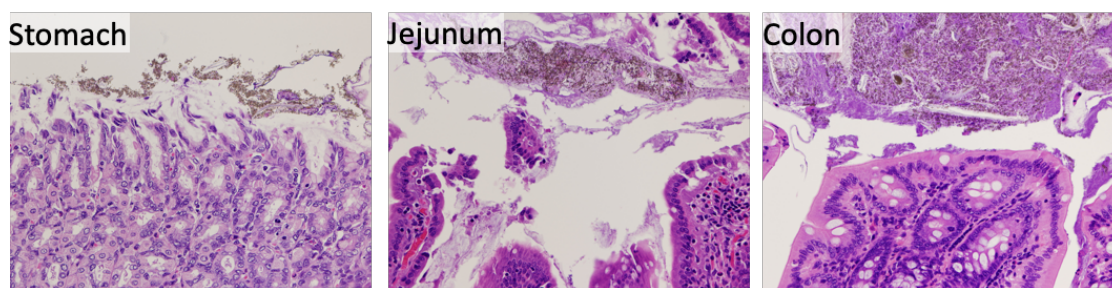


Figure 1-4. Representative images of yellowish brown materials found at submucosa of nasal cavity (A) and gastrointestinal tract (B) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 4 weeks.

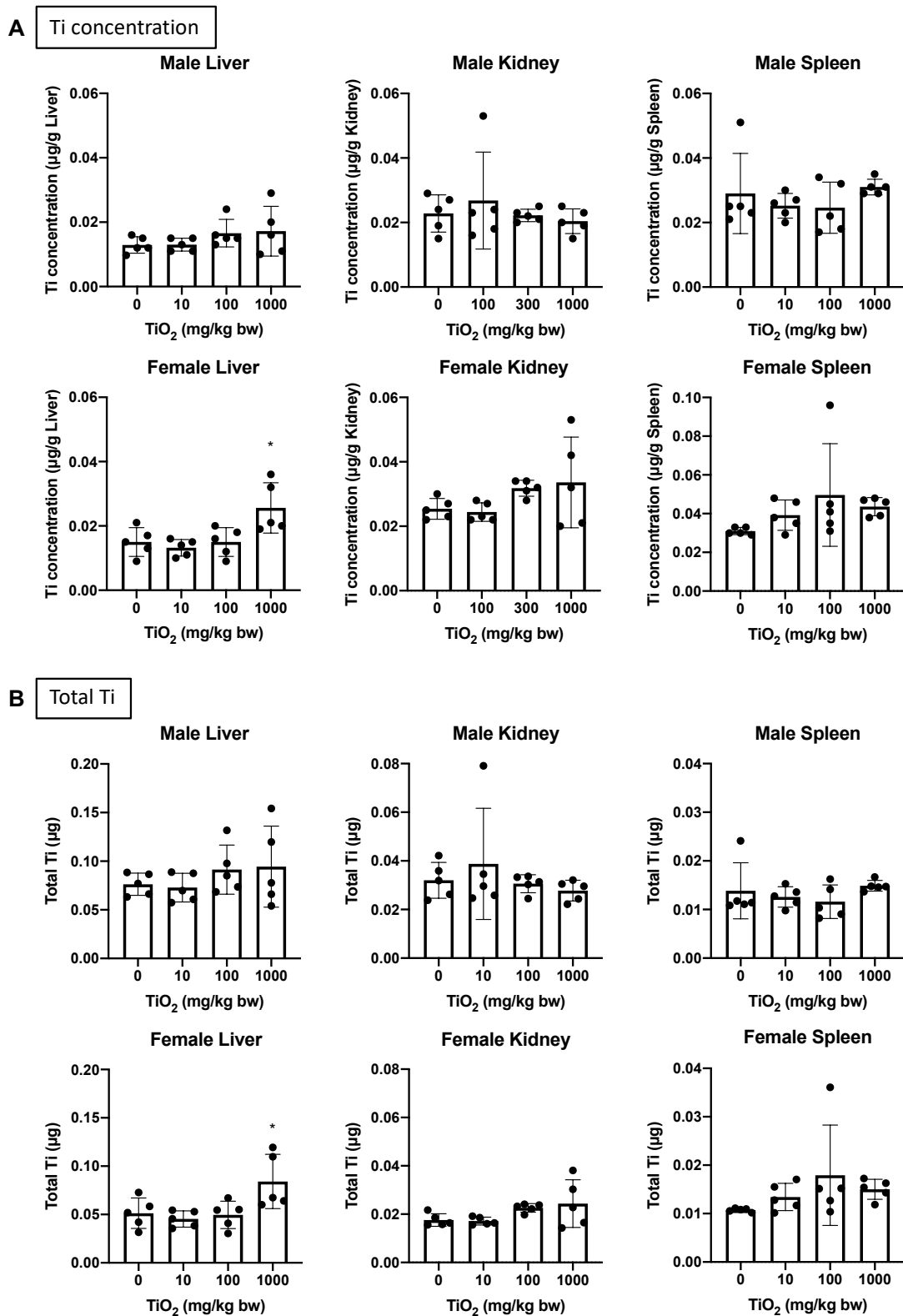


Figure 1-5. Titanium concentration (A) and total titanium (B) of the liver, kidney, and spleen of male and female F344/DuCrj rats administered titanium(IV) oxide for 4 weeks. * $P < 0.05$ compared with control group.

2) 6 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験

Table 2-1. Urinalysis data at week 13 in F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)		Male				Female			
		0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5
Glucose	—	5	5	5	5	5	5	5	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
Protein	—	0	2	0	1	1	3	3	2
	±	3	1	3	3	3	2	2	2
	1+	2	2	2	1	1	0	0	1
Bilirubin	—	5	5	5	5	5	5	5	5
Urobilinogen	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	7	0	1	0	0	0	2	1	0
	7.5	5	3	1	4	1	0	1	3
	8	0	1	4	1	4	3	3	2
Supecific grabvity	< 1.005	0	2	0	0	0	0	0	0
	1.01	1	1	0	1	0	1	0	0
	1.015	3	0	3	2	2	2	3	3
	1.02	0	1	2	1	2	2	2	1
	1.025	0	0	0	1	0	0	0	1
	> 1.03	0	1	0	0	1	0	0	0
Occult blood	-	3	5	5	5	5	5	5	5
	±	1	0	0	0	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0	0	0	0	0
Ketone body	—	5	3	5	5	4	5	5	4
	±	0	1	0	0	1	0	0	1
	1+	0	1	0	0	0	0	0	0
Nitrile	—	5	5	5	5	5	5	5	5
Leukocytes	—	5	3	4	5	5	5	5	5
	25 Leu/μl	0	1	1	0	0	0	0	0
	75 Leu/μl	0	1	0	0	0	0	0	0
Color	Colorless	0	2	1	2	0	1	0	0
	Light yellow	3	1	3	3	1	2	1	1
	Yellow	2	2	1	0	4	2	4	4

Table 2-2. Haemaology of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	100	300	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	10
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.38 \pm 0.19	9.23 \pm 0.29	9.21 \pm 0.33	9.34 \pm 0.18
HGB (g/dL)	15.4 \pm 0.2	15.1 \pm 0.6	15.0 \pm 0.6	15.3 \pm 0.3
HCT (%)	45.1 \pm 0.8	44.6 \pm 1.8	44.0 \pm 1.9	44.9 \pm 1.1
MCV (fL)	48.0 \pm 0.3	48.3 \pm 0.7	47.8 \pm 0.7	48.1 \pm 0.4
MCH (pg)	16.4 \pm 0.2	16.4 \pm 0.2	16.3 \pm 0.2	16.4 \pm 0.1
MCHC (g/dL)	34.2 \pm 0.3	34.0 \pm 0.2	34.1 \pm 0.2	34.1 \pm 0.2
RET (%)	2.42 \pm 0.22	2.51 \pm 0.26	2.41 \pm 0.19	2.42 \pm 0.19
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	643 \pm 53	621 \pm 90	640 \pm 27	625 \pm 69
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.01 \pm 0.70	3.67 \pm 0.69	3.36 \pm 0.81	3.58 \pm 1.12
Differential Cell count				
NEUT (%)	22.7 \pm 3.35	27.2 \pm 4.75	27.0 \pm 2.76	33.5 \pm 6.81 **
LYMPH (%)	72.3 \pm 3.60	67.7 \pm 4.76	67.6 \pm 2.83	60.0 \pm 7.08 **
MONO (%)	3.64 \pm 0.54	3.69 \pm 0.53	3.87 \pm 0.65	4.34 \pm 0.61 *
EO (%)	1.01 \pm 0.39	1.10 \pm 0.52	1.14 \pm 0.32	1.71 \pm 1.48
BASO (%)	0.30 \pm 0.08	0.29 \pm 0.14	0.41 \pm 0.15	0.47 \pm 0.18 *
NEUT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.91 \pm 0.21	0.99 \pm 0.22	0.90 \pm 0.21	1.16 \pm 0.32
LYMPH ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	2.90 \pm 0.52	2.49 \pm 0.55	2.28 \pm 0.60	2.20 \pm 0.86
MONO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.15 \pm 0.04	0.14 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03	0.16 \pm 0.06
EO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.05
BASO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01
<i>Female</i>				
No. of animals	10	10	10	10
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.85 \pm 0.18	8.89 \pm 0.24	8.89 \pm 0.15	8.84 \pm 0.31
HGB (g/dL)	15.6 \pm 0.3	15.6 \pm 0.4	15.6 \pm 0.2	15.5 \pm 0.5
HCT (%)	45.3 \pm 1.1	45.4 \pm 1.3	45.4 \pm 0.8	45.0 \pm 1.6
MCV (fL)	51.2 \pm 0.4	51.0 \pm 0.3	51.1 \pm 0.4	50.9 \pm 0.2
MCH (pg)	17.6 \pm 0.1	17.5 \pm 0.1	17.6 \pm 0.1	17.5 \pm 0.1 **
MCHC (g/dL)	34.4 \pm 0.2	34.4 \pm 0.3	34.4 \pm 0.3	34.4 \pm 0.2
RET (%)	2.33 \pm 0.19	2.24 \pm 0.25	2.41 \pm 0.38	2.30 \pm 0.44
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	677 \pm 69	674 \pm 34	719 \pm 40	701 \pm 100
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.32 \pm 1.12	3.89 \pm 1.02	4.04 \pm 0.41	4.19 \pm 0.96
Differential Cell count				
NEUT (%)	23.4 \pm 6.81	25.8 \pm 6.07	25.0 \pm 4.14	24.0 \pm 3.96
LYMPH (%)	71.4 \pm 7.08	69.3 \pm 6.32	70.0 \pm 4.24	69.9 \pm 4.33
MONO (%)	3.68 \pm 0.61	3.53 \pm 0.68	3.53 \pm 0.42	3.37 \pm 0.63
EO (%)	2.52 \pm 1.48	1.01 \pm 0.30	1.15 \pm 0.29	2.40 \pm 1.63
BASO (%)	0.47 \pm 0.18	0.34 \pm 0.07 *	0.37 \pm 0.11	0.43 \pm 0.09
NEUT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1.03 \pm 0.32	0.99 \pm 0.28	1.02 \pm 0.25	0.99 \pm 0.25
LYMPH ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3.07 \pm 0.86	2.70 \pm 0.80	2.82 \pm 0.24	2.94 \pm 0.73
MONO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.16 \pm 0.06	0.14 \pm 0.05	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03
EO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.05 \pm 0.05	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.10 \pm 0.07 *
BASO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00 *	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00

Values are mean \pm S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 2-3. Serum biochemistry of F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	100	300	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	10
TP (g/dL)	6.30 ± 0.16	6.27 ± 0.18	6.25 ± 0.24	6.31 ± 0.17
ALB (g/dL)	4.19 ± 0.09	4.17 ± 0.13	4.13 ± 0.15	4.16 ± 0.12
A/G	2.01 ± 0.07	2.02 ± 0.10	1.97 ± 0.08	1.96 ± 0.07
BUN (mg/dL)	21.85 ± 1.77	21.80 ± 1.80	20.11 ± 1.68	21.66 ± 1.85
CRE (mg/dL)	0.368 ± 0.033	0.346 ± 0.028	0.337 ± 0.032	0.336 ± 0.027
Na (mEq/L)	140.9 ± 1.4	141.3 ± 0.8	142.0 ± 1.4	142.2 ± 0.8 *
K (mEq/L)	4.26 ± 0.16	4.30 ± 0.16	4.20 ± 0.21	4.09 ± 0.18
Cl (mEq/L)	99.1 ± 1.4	100.4 ± 0.8 *	100.2 ± 0.9 *	100.1 ± 0.6
Ca (mg/dL)	9.96 ± 0.23	9.88 ± 0.27	9.83 ± 0.18	9.94 ± 0.18
IP (mg/dL)	5.06 ± 0.34	4.98 ± 0.38	4.82 ± 0.49	5.06 ± 0.42
AST (IU/L)	97.0 ± 22.0	87.2 ± 16.1	99.8 ± 22.9	108.3 ± 36.0
ALT (IU/L)	59.9 ± 10.2	52.1 ± 9.0	56.5 ± 8.2	67.6 ± 14.4
ALP (IU/L)	388.3 ± 35.6	375.4 ± 28.8	381.0 ± 34.1	393.9 ± 34.0
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	66.2 ± 8.4	66.7 ± 5.1	64.3 ± 3.6	59.6 ± 6.0
TG (mg/dL)	93.1 ± 25.4	78.2 ± 11.5	66.1 ± 13.7 **	73.9 ± 14.2 *
T-BIL (mg/dL)	0.043 ± 0.012	0.048 ± 0.009	0.040 ± 0.009	0.043 ± 0.008
GLU (mg/dL)	179.7 ± 20.8	172.7 ± 20.8	171.1 ± 25.9	175.5 ± 26.9
<i>Female</i>				
No. of animals	10	10	10	10
TP (g/dL)	6.53 ± 0.16	6.43 ± 0.19	6.58 ± 0.14	6.57 ± 0.16
ALB (g/dL)	4.43 ± 0.16	4.36 ± 0.13	4.47 ± 0.13	4.50 ± 0.14
A/G	2.10 ± 0.12	2.11 ± 0.11	2.13 ± 0.12	2.19 ± 0.14
BUN (mg/dL)	22.10 ± 3.57	22.00 ± 2.92	20.58 ± 2.35	20.63 ± 1.78
CRE (mg/dL)	0.355 ± 0.029	0.368 ± 0.034	0.349 ± 0.015	0.354 ± 0.024
Na (mEq/L)	141.8 ± 1.0	142.2 ± 1.0	142.1 ± 0.9	142.6 ± 0.8
K (mEq/L)	3.85 ± 0.18	3.90 ± 0.27	3.88 ± 0.15	3.93 ± 0.16
Cl (mEq/L)	101.3 ± 0.8	102.0 ± 1.2	102.4 ± 0.7	103.1 ± 1.3 **
Ca (mg/dL)	10.16 ± 0.16	9.90 ± 0.35	9.93 ± 0.21	9.91 ± 0.35
IP (mg/dL)	4.79 ± 0.66	5.01 ± 0.64	4.33 ± 0.89	4.49 ± 0.65
AST (IU/L)	76.5 ± 6.3	75.7 ± 5.1	75.9 ± 4.4	80.8 ± 5.7
ALT (IU/L)	38.4 ± 2.8	39.0 ± 4.5	38.4 ± 4.3	40.8 ± 6.4
ALP (IU/L)	282.3 ± 41.7	275.8 ± 23.5	292.3 ± 54.3	266.9 ± 30.7
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	91.7 ± 6.0	86.3 ± 5.7	95.2 ± 6.7	88.4 ± 5.4
TG (mg/dL)	52.4 ± 16.6	38.9 ± 19.5	42.6 ± 17.1	52.3 ± 27.1
T-BIL (mg/dL)	0.051 ± 0.012	0.047 ± 0.012	0.043 ± 0.013	0.047 ± 0.009
GLU (mg/dL)	131.4 ± 24.6	134.3 ± 17.0	132.6 ± 16.0	120.9 ± 13.8

Values are mean ± S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 2-4. Organ weights of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	100	300	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	291.4 ± 16.4	285.8 ± 17.0	297.3 ± 16.8	284.4 ± 16.7
Absolute				
Brain (g)	1.911 ± 0.046	1.914 ± 0.034	1.916 ± 0.030	1.902 ± 0.035
Thymus (g)	0.168 ± 0.016	0.162 ± 0.028	0.182 ± 0.018	0.159 ± 0.026
Lungs (g)	0.906 ± 0.042	0.875 ± 0.061	0.923 ± 0.057	0.893 ± 0.061
Heart (g)	0.829 ± 0.058	0.829 ± 0.042	0.851 ± 0.039	0.833 ± 0.054
Spleen (g)	0.570 ± 0.043	0.569 ± 0.049	0.583 ± 0.035	0.553 ± 0.035
Liver (g)	6.553 ± 0.644	6.400 ± 0.468	6.649 ± 0.399	6.183 ± 0.501
Adrenals (g)	0.035 ± 0.004	0.034 ± 0.003	0.034 ± 0.003	0.035 ± 0.003
Kidneys (g)	1.578 ± 0.076	1.622 ± 0.104	1.613 ± 0.086	1.586 ± 0.098
Testes (g)	2.944 ± 0.116	2.964 ± 0.293	2.912 ± 0.268	2.949 ± 0.346
pituitary (mg)	6.61 ± 0.83	6.68 ± 0.80	7.12 ± 0.77	6.91 ± 0.75
thyroid (mg)	14.63 ± 1.61	12.59 ± 2.44	13.87 ± 2.69	12.33 ± 1.84
salivary gland (g)	0.453 ± 0.033	0.448 ± 0.026	0.465 ± 0.018	0.446 ± 0.030
seminal vesicle (g)	0.844 ± 0.122	0.804 ± 0.097	0.897 ± 0.093	0.830 ± 0.087
prostate gland (g)	0.638 ± 0.082	0.667 ± 0.064	0.696 ± 0.072	0.680 ± 0.071
Relative (%)				
Brain	0.659 ± 0.035	0.672 ± 0.039	0.646 ± 0.031	0.671 ± 0.035
Thymus	0.059 ± 0.005	0.056 ± 0.008	0.061 ± 0.008	0.056 ± 0.010
Lungs	0.312 ± 0.017	0.340 ± 0.109	0.311 ± 0.014	0.314 ± 0.018
Heart	0.284 ± 0.009	0.290 ± 0.008	0.286 ± 0.011	0.293 ± 0.015
Spleen	0.196 ± 0.014	0.199 ± 0.008	0.196 ± 0.008	0.194 ± 0.007
Liver	2.245 ± 0.107	2.238 ± 0.046	2.236 ± 0.029	2.172 ± 0.073
Adrenals	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.001
Kidneys	0.538 ± 0.026	0.568 ± 0.022 **	0.543 ± 0.011	0.558 ± 0.019
Testes	1.012 ± 0.054	1.039 ± 0.099	0.981 ± 0.084	1.036 ± 0.085
pituitary	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000
thyroid	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001
salivary gland	0.155 ± 0.007	0.157 ± 0.005	0.157 ± 0.008	0.157 ± 0.009
seminal vesicle	0.290 ± 0.042	0.281 ± 0.029	0.303 ± 0.038	0.292 ± 0.030
prostate gland	0.219 ± 0.024	0.234 ± 0.020	0.235 ± 0.027	0.240 ± 0.027
<i>Female</i>				
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	173.0 ± 5.3	171.1 ± 5.3	170.3 ± 7.1	169.4 ± 7.1
Absolute				
Brain (g)	1.796 ± 0.028	1.787 ± 0.031	1.779 ± 0.030	1.784 ± 0.037
Thymus (g)	0.158 ± 0.015	0.152 ± 0.018	0.147 ± 0.008	0.154 ± 0.015
Lungs (g)	0.676 ± 0.029	0.694 ± 0.036	0.674 ± 0.134	0.686 ± 0.039
Heart (g)	0.555 ± 0.018	0.548 ± 0.032	0.554 ± 0.030	0.540 ± 0.027
Spleen (g)	0.386 ± 0.019	0.385 ± 0.013	0.372 ± 0.023	0.374 ± 0.027
Liver (g)	3.751 ± 0.122	3.693 ± 0.149	3.640 ± 0.182	3.624 ± 0.176
Adrenals (g)	0.040 ± 0.003	0.041 ± 0.004	0.039 ± 0.006	0.040 ± 0.006
Kidneys (g)	1.021 ± 0.057	1.027 ± 0.032	1.000 ± 0.051	1.001 ± 0.041
Ovaries (g)	0.049 ± 0.006	0.045 ± 0.009	0.044 ± 0.006	0.043 ± 0.007
pituitary (mg)	11.49 ± 2.02	11.72 ± 1.33	10.58 ± 1.97	11.44 ± 1.92
thyroid (mg)	10.95 ± 2.36	9.54 ± 0.94	11.35 ± 1.35	11.07 ± 1.12
salivary gland (g)	0.326 ± 0.012	0.335 ± 0.011	0.333 ± 0.018	0.333 ± 0.023
Relative (%)				
Brain	1.039 ± 0.029	1.045 ± 0.028	1.047 ± 0.048	1.055 ± 0.061
Thymus	0.091 ± 0.007	0.089 ± 0.009	0.087 ± 0.005	0.091 ± 0.008
Lungs	0.391 ± 0.014	0.406 ± 0.023	0.396 ± 0.076	0.405 ± 0.026
Heart	0.321 ± 0.016	0.321 ± 0.016	0.325 ± 0.013	0.319 ± 0.013
Spleen	0.223 ± 0.009	0.225 ± 0.009	0.218 ± 0.011	0.221 ± 0.020
Liver	2.169 ± 0.063	2.160 ± 0.095	2.138 ± 0.061	2.140 ± 0.092
Adrenals	0.023 ± 0.001	0.024 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.004
Kidneys	0.590 ± 0.029	0.601 ± 0.020	0.587 ± 0.020	0.592 ± 0.029
Ovaries	0.028 ± 0.003	0.026 ± 0.005	0.026 ± 0.003	0.025 ± 0.004
pituitary	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001
thyroid	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001
salivary gland	0.189 ± 0.006	0.196 ± 0.009	0.195 ± 0.008	0.197 ± 0.010

Values are mean ± S.D. **P < 0.01 compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 2-5. Test material related histopathological findings of F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)		0	100	300	1000	0	100	300	1000
		<i>Male</i>				<i>Female</i>			
No. of animals:		10	10	10	10	10	10	10	10
Organs									
Findings									
Lymph node, cervical	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material	1	0	0	6*	10**	0	4	6*	8**
Lymph node, mediastinal	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<9>	<9>	<10>	<10>
Yellowish brown material	1	0	3	4	7**	0	2	3	4*
	2	0	0	0	0	0	0	1	1*
Lung	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material, Bronchus-associated lymphoid tissue	1	0	2	1	5*	0	2	3	3
	2	0	0	1	0	0	0	0	1
Trachea	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material, subepithelial	1	0	2	2	7**	0	2	1	4
Intestine, ileum	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material, Peyer's patch	1	0	0	0	4	0	0	0	3

<>, Number of animals examined. G (Grade) 1, Minimal; 2, Mild.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 2-6-1. Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose (mg/kg):	0	100	300	1000
	Number:	10	10	10	10
Adrenal					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Aorta					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Bone, femur					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Bone, sternum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Brain					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Bulbourethral gland					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Coagulating gland					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Epididymis					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	9
Sperm, decreased, lumen		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Esophagus					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	1
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	9*
Present		0	0	0	9
Eye					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		6	0	0	10
Atrophy, outer retina		4	0	0	0
minimal		4	0	0	0
Heart					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		4	0	0	6
Infiltrate, inflammatory cell		6	0	0	4
minimal		6	0	0	3
mild		0	0	0	1
Intestine, cecum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0

M : Male

Fisher Exact test * = p < 0.025

Table 2-6-2.

Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg):	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Intestine, cecum (continued)					
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Intestine, colon					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Intestine, duodenum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Intestine, ileum					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	4	4	0
Yellowish brown material, lumen		0	6*	6*	10*
Present		0	6	6	10
Yellowish brown material, Peyer's patch		0	0	0	4
minimal		0	0	0	4
Intestine, jejunum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	1
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	9*
Present		0	0	0	9
Intestine, rectum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Kidney					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Liver					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		7	0	0	9
Hepatodiaphragmatic nodule		3	0	0	1
Present		3	0	0	1
Lung					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	8	7	2
Yellowish brown material, alveolar		0	1	3	8*
Present		0	1	3	8
Yellowish brown material,					
bronchus-associated lymphoid tissue		0	2	2	5*
minimal		0	2	1	5
mild		0	0	1	0

M : Male

Fisher Exact test * = p < 0.025

Table 2-6-3. Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg) :	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Lymph node, cervical					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	10	4	0
Yellowish brown material		0	0	6*	10*
minimal		0	0	6	10
Lymph node, mediastinal					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	7	6	3
Yellowish brown material		0	3	4	7*
minimal		0	3	4	7
Lymph node, mesenteric					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Mammary gland					
Number examined		9	0	0	10
Not remarkable		9	0	0	10
No sample		1	0	0	0
Muscle, femur					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Pancreas					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Parathyroid					
Number examined		10	0	0	9
Not remarkable		10	0	0	9
No sample		0	0	0	1
Pituitary					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	9
Aberrant craniopharyngeal structure		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Prostate					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		8	0	0	7
Infiltrate, inflammatory cell		2	0	0	3
minimal		2	0	0	3
Salivary gland, sublingual					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Salivary gland, submandibular					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10

M : Male

Fisher Exact test * = p < 0.025

Table 2-6-4. Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg) :	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Sciatic nerve					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Seminal vesicle					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Skin					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Spinal cord (cervical, thoracic, lumbar)					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Spleen					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Stomach					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Testis					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	8
Dilatation, tubule		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Degeneration/Atrophy, tubule		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Thymus					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Thyroid					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Tongue					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Trachea					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	8	8	3
Yellowish brown material, subepithelial		0	2	2	7*
minimal		0	2	2	7
Trigeminal nerve					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10

M : Male

Fisher Exact test * = $p < 0.025$

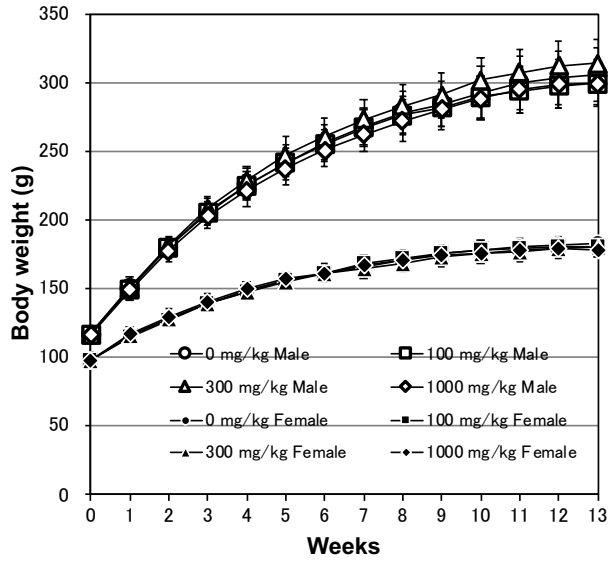
Table 2-6-5. Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg) :	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Urinary bladder					
	Number examined	10	0	0	10
	Not remarkable	10	0	0	10

M : Male

No statistically significant difference

A 体重



B 摂餌量

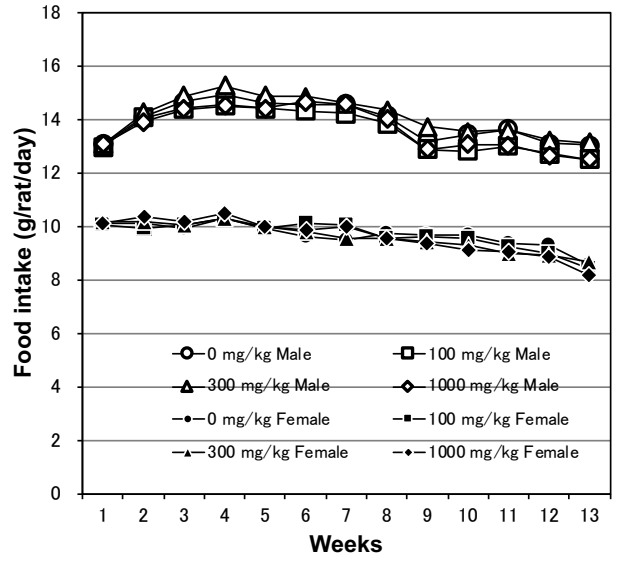


Figure 2-1. Body weight (A) and daily food intake (B) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

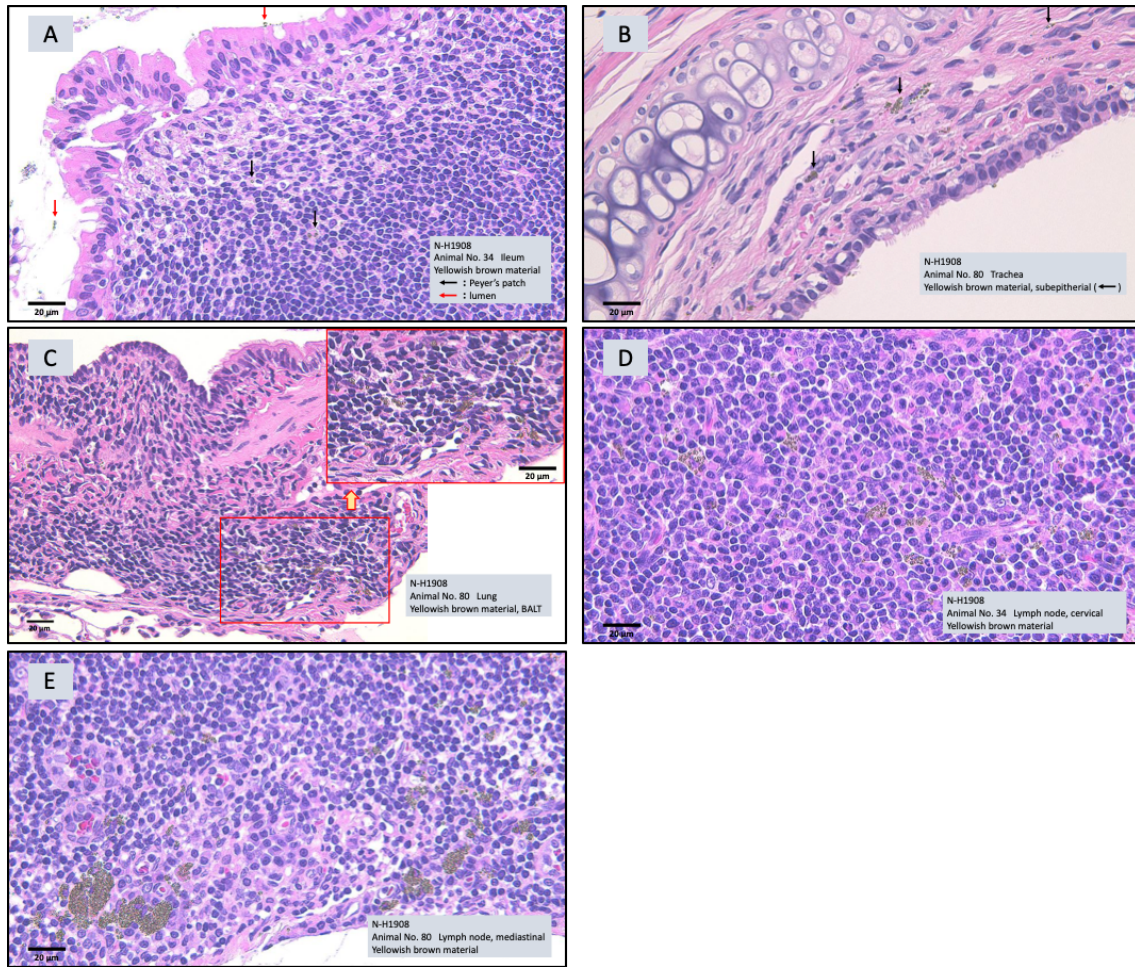


Figure 2-2. Representative images of yellowish brown materials found at ileum (A), trachea (B), lung (C), cervical lymph node (D), and mediastinal lymph node (E) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

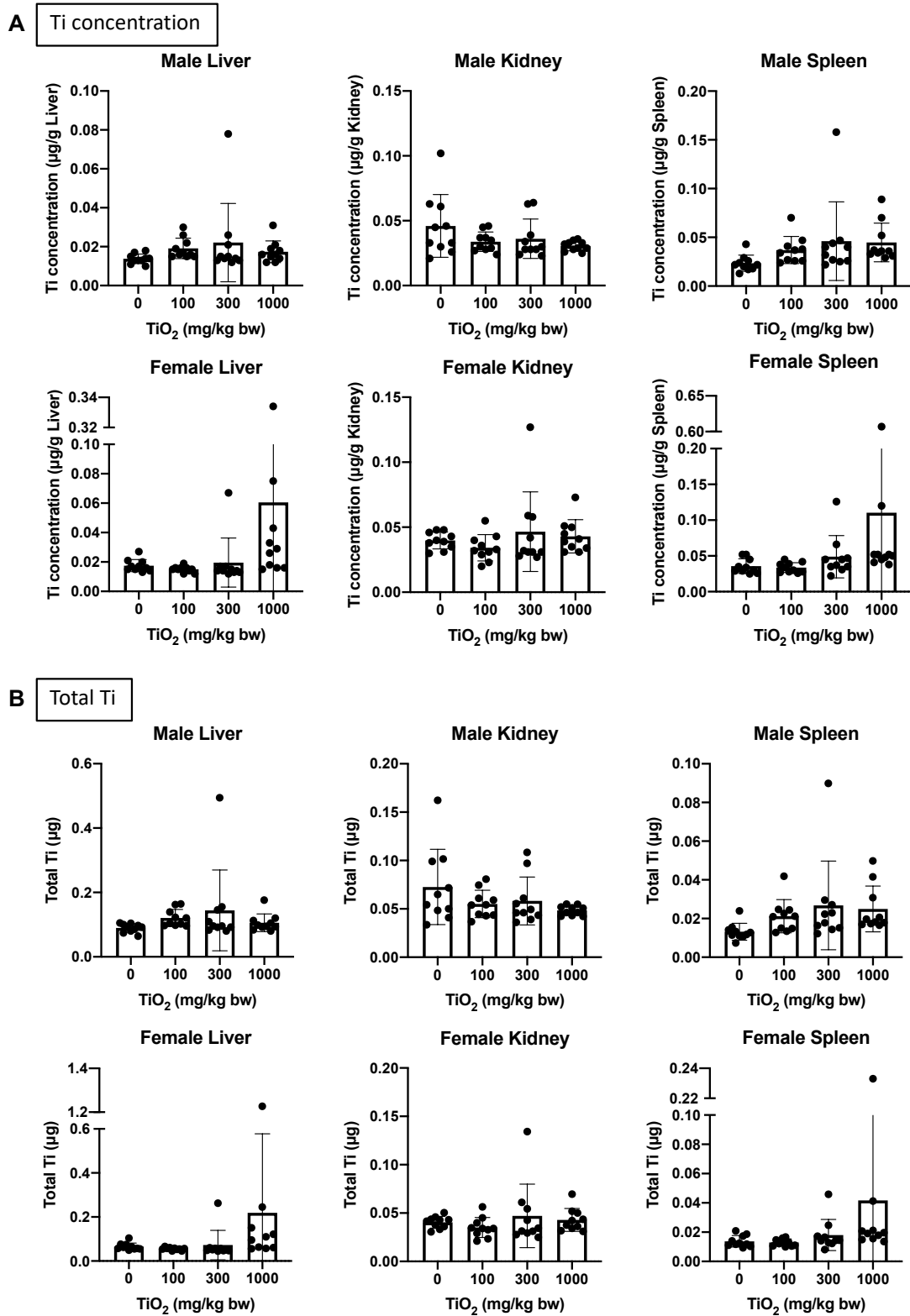


Figure 2-3. Titanium concentration (A) and total titanium (B) of the liver, kidney, and spleen of male and female F344/DuCrj rats administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

3) 6, 30, 180 nm の酸化チタンの 90 日間反復投与毒性試験 (1000 mg/kg bw/day)

Table 3-1. Urinalysis data of F344/DuCrI CrIj rats treated with titanium dioxide of different crystallite sizes for 13 weeks.

Group		Male			
		Control	6 nm	30 nm	180 nm
No. of animals		5	5	5	5
Glucose	—	5	5	5	5
Protein	—	0	0	2	1
	±	5	3	2	4
	1+	0	2	1	0
Bilirubin	—	5	5	5	5
Urobilinogen	Normal	5	5	5	5
pH	7	0	0	1	1
	7.5	4	3	4	4
	8	1	2	0	0
Supacific grabvity	< 1.005	5	1	3	4
	1.01	0	4	2	0
	1.015	0	0	0	1
	1.02	0	0	0	0
	1.025	0	0	0	0
	> 1.03	0	0	0	0
Occult blood	-	3	4	2	3
	±	0	1	0	0
	1+	0	0	3	2
	2+	1	0	0	0
	3+	1	0	0	0
Ketone body	—	5	4	5	5
	±	0	1	0	0
Nitrile	—	5	5	5	5
Leukocytes	—	5	5	5	4
	25 Leu/μl	0	0	0	1
Color	Colorless	4	3	3	4
	Light yellow	1	2	2	1

* $P < 0.05$ compaed with the control group by Kruskal-Wallis test.

Table 3-2. Haemaology of F344/DuCrIcrlj rats treated with titanium dioxide of different crystallite sizes for 13 weeks.

Group	Control	6 nm	30 nm	180 nm
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	9 [†]
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.59 \pm 0.30	9.57 \pm 0.30	9.40 \pm 0.13	9.40 \pm 0.28
HGB (g/dL)	15.8 \pm 0.5	15.5 \pm 0.4	15.2 \pm 0.2	15.3 \pm 0.4 *
HCT (%)	46.8 \pm 1.7	46.0 \pm 1.2	44.8 \pm 0.6	45.0 \pm 1.4 *
MCV (fL)	48.7 \pm 0.5	48.1 \pm 0.5 **	47.6 \pm 0.5	47.9 \pm 0.4 **
MCH (pg)	16.5 \pm 0.2	16.2 \pm 0.1 *	16.1 \pm 0.2	16.2 \pm 0.1 *
MCHC (g/dL)	33.8 \pm 0.3	33.8 \pm 0.2	33.9 \pm 0.2	33.9 \pm 0.3
RET (%)	2.68 \pm 0.25	2.70 \pm 0.25	2.53 \pm 0.23	2.77 \pm 0.26
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	644 \pm 28	637 \pm 42	615 \pm 29	648 \pm 28
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5.50 \pm 0.81	5.14 \pm 1.06	4.44 \pm 0.55 *	4.64 \pm 0.89
Differential Cell count				
NEUT (%)	25.5 \pm 3.88	26.7 \pm 2.47	29.6 \pm 4.23	28.6 \pm 4.85
LYMPPH (%)	68.9 \pm 3.42	67.9 \pm 2.56	64.6 \pm 5.08	65.7 \pm 5.53
MONO (%)	4.25 \pm 0.61	3.81 \pm 0.43	4.00 \pm 0.82	4.06 \pm 0.70
EO (%)	1.10 \pm 0.24	1.35 \pm 0.47	1.58 \pm 0.68	1.34 \pm 0.31
BASO (%)	0.20 \pm 0.12	0.27 \pm 0.16	0.23 \pm 0.13	0.29 \pm 0.15
NEUT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1.38 \pm 0.09	1.36 \pm 0.29	1.32 \pm 0.26	1.31 \pm 0.23
LYNPH ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3.81 \pm 0.75	3.49 \pm 0.77	2.87 \pm 0.39 *	3.07 \pm 0.79
MONO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.24 \pm 0.07	0.20 \pm 0.05	0.18 \pm 0.04 *	0.19 \pm 0.03
EO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02
BASO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01

Values are mean \pm S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared with the control group.

[†]One animal was euthanized due to a technical error during administration.

Table 3-3. Serum biochemistry of F344/DuCrI CrIj rats treated with titanium dioxide of different crystallite sizes for 13 weeks.

Group	Control	6 nm	30 nm	180 nm
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	9 [†]
TP (g/dL)	6.77 ± 0.24	6.71 ± 0.14	6.62 ± 0.17	6.67 ± 0.17
ALB (g/dL)	4.54 ± 0.17	4.47 ± 0.09	4.35 ± 0.13	4.42 ± 0.11
A/G	2.01 ± 0.10	1.99 ± 0.07	1.93 ± 0.07	1.98 ± 0.07
BUN (mg/dL)	23.96 ± 2.64	24.75 ± 3.15	24.03 ± 1.11	23.47 ± 1.31
CRE (mg/dL)	0.375 ± 0.036	0.368 ± 0.028	0.370 ± 0.024	0.367 ± 0.018
Na (mEq/L)	141.7 ± 1.4	140.8 ± 0.9	140.7 ± 0.7	140.2 ± 0.4
K (mEq/L)	4.59 ± 0.42	4.46 ± 0.11	4.42 ± 0.16	4.31 ± 0.16
Cl (mEq/L)	101.1 ± 1.2	102.0 ± 0.7	103.2 ± 0.8	102.3 ± 0.5
Ca (mg/dL)	10.46 ± 0.39	10.40 ± 0.09	10.32 ± 0.15	10.39 ± 0.13
IP (mg/dL)	5.48 ± 0.70	5.24 ± 0.64	4.84 ± 0.54	4.86 ± 0.37
AST (IU/L)	95.5 ± 24.0	84.9 ± 12.4	91.0 ± 11.9	87.3 ± 16.9
ALT (IU/L)	66.0 ± 12.4	59.6 ± 8.3	63.7 ± 6.8	61.9 ± 10.0
ALP (IU/L)	416.9 ± 33.5	433.4 ± 54.5	415.2 ± 52.2	407.9 ± 10.3
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	70.3 ± 6.9	67.0 ± 5.7	65.6 ± 5.4	65.0 ± 5.8
TG (mg/dL)	114.1 ± 26.5	111.9 ± 22.0	99.1 ± 22.3	102.4 ± 21.5
T-BIL (mg/dL)	0.056 ± 0.005	0.047 ± 0.007	0.048 ± 0.006	0.050 ± 0.005
GLU (mg/dL)	182.1 ± 25.2	163.8 ± 23.6	180.7 ± 9.8	183.2 ± 24.3
Fe (µg/dL)	115.6 ± 12.9	112.0 ± 8.3	106.6 ± 11.7	106.9 ± 9.1
UIBC (µg/dL)	379.6 ± 16.7	384.8 ± 22.3	373.9 ± 18.7	381.7 ± 21.8
TIBC (µg/dL)	495.2 ± 26.1	496.8 ± 21.2	480.5 ± 24.1	488.6 ± 23.7

Values are mean ± S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

[†]One animal was euthanized due to a technical error during administration.

Table 3-4. Organ weights of F344/DuCrI CrIj rats treated with titanium dioxide of different crystallite sizes for 13 weeks.

Group	Control	6 nm	30 nm	180 nm
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	9 [†]
Body weight (g)	292.0 ± 16.7	292.0 ± 9.5	291.2 ± 12.2	295.2 ± 11.6
Absolute				
Brain (g)	1.896 ± 0.054	1.896 ± 0.048	1.932 ± 0.039	1.925 ± 0.055
Thymus (g)	0.175 ± 0.028	0.175 ± 0.030	0.174 ± 0.023	0.155 ± 0.014
Lungs (g)	0.921 ± 0.071	0.921 ± 0.064	0.922 ± 0.061	0.926 ± 0.058
Heart (g)	0.822 ± 0.042	0.822 ± 0.359	0.834 ± 0.034	0.835 ± 0.026
Spleen (g)	0.552 ± 0.044	0.552 ± 0.029	0.559 ± 0.043	0.561 ± 0.037
Liver (g)	6.627 ± 0.521	6.627 ± 0.347	6.603 ± 0.455	6.620 ± 0.451
Adrenals (g)	0.034 ± 0.005	0.034 ± 0.006	0.034 ± 0.005	0.035 ± 0.005
Kidneys (g)	1.615 ± 0.113	1.615 ± 0.102	1.638 ± 0.082	1.629 ± 0.106
Testes (g)	2.884 ± 0.214	2.884 ± 0.300	2.815 ± 0.574	2.793 ± 0.367
Relative (%)				
Brain	0.649 ± 0.032	0.649 ± 0.011	0.664 ± 0.021	0.653 ± 0.019
Thymus	0.060 ± 0.010	0.060 ± 0.010	0.060 ± 0.009	0.052 ± 0.004
Lungs	0.316 ± 0.018	0.316 ± 0.199	0.316 ± 0.010	0.314 ± 0.018
Heart	0.282 ± 0.011	0.282 ± 0.125	0.287 ± 0.012	0.283 ± 0.013
Spleen	0.189 ± 0.008	0.189 ± 0.007	0.192 ± 0.012	0.190 ± 0.009
Liver	2.268 ± 0.078	2.268 ± 0.073	2.266 ± 0.098	2.241 ± 0.087
Adrenals	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002
Kidneys	0.552 ± 0.023	0.552 ± 0.026	0.563 ± 0.019	0.552 ± 0.024
Testes	0.988 ± 0.046	0.988 ± 0.086	0.965 ± 0.182	0.946 ± 0.120

Values are mean ± S.D.

[†]One animal was euthanized due to a technical error during administration.

Table 3-5. Histopathology of F344/DuCr1Cr1j rats treated with titanium dioxide of different crystallite sizes for 13 weeks.

Group		Control	6 nm	30 nm	180 nm
<i>Male</i>					
	No. of animals	10	10	10	9 [†]
Heart	necrosis, cardiomyocyte, focal	0	1	0	3
	edema/fibrosis, focal	1	4	2	4
	hypertrophy, cardiomyocyte, diffuse	0	1	0	0
	infiltrate, mononuclear cell, myocardium, focal	7	6	8	7
	myxomatous degeneration, valve	6	8	6	5
	hyperplasia, Schwann cell, subepicardium	1	0	0	0
Spleen	pigment, macrophage	10 ****	10 ****	10 ****	9 ****
Lung	aggregate, alveolar macrophage	3	1	0	0
	aggregate, alveolar macrophage, containing yellowish brown material	0	10 ****	8 ***	4 *
	mineralization, medial/mural, artery	6	5	6	5
	hypertrophy, medial/mural, artery	4	1	3	2
	infiltrate, eosinophile/mononuclear cell, perivascular	2	0	0	0
	metaplasia, osseous	1	1	0	0
	hemorrhage	0	0	1	0
Stomach	infiltrate, neutrophil, forestomach	0	1	0	0
	infiltrate, neutrophil, glandularstomach	0	1	1	0
	erosion, glandularstomach	1	0	0	0
	mineralization, fundic gland	6	5	4	6
	mineralization, medial/mural, artery	2	1	1	3
	mineralization, muscularis propria	0	3	3	3
	yellowish brown material, lumen	0	10 ****	10 ****	9 ****
Duodenum	yellowish brown material, lumen	0	10 ****	10 ****	8 ***
Jejunum	yellowish brown material, lumen	0	9 ***	7 **	8 ***
	yellowish brown material, Peyer's patch	0	8 ***	7 **	5 *
	mineralization, mucosa	0	0	0	0
	mineralization, Peyer's patch	6	3	4	0 *
Ileum	yellowish brown material, lumen	0	10 ****	10 ****	9 ****
	yellowish brown material, Peyer's patch	0	6 *	5 *	6 **
	mineralization, mucosa	1	0	0	0
	mineralization, Peyer's patch	0	2	0	1
Cecum	yellowish brown material, lumen	0	10 ****	10 ****	9 ****
	yellowish brown material, Peyer's patch	0	2	0	1
	mineralization, mucosa	3	8	7	6
	mineralization, Peyer's patch	0	0	0	0
	erosion	0	0	1	0
Colon	yellowish brown material, lumen	0	8 ***	9 ***	9 ****
	mineralization, mucosa	5	5	3	3
	erosion	0	1	0	0
Rectum	yellowish brown material, lumen	0	7 **	8 ***	9 ****
	mineralization, mucosa	3	4	6	8 *
	hemorrhage	2	0	0	1
	thrombosis	0	0	1	0
Liver	fatty change	0	1	2	1
	necrosis, focal	0	1	0	0
	hyperplasia, bile duct	2	0	2	5

Kidney	basophilic tubule	8	7	4	6
	mineralization	7	2	2	1 *
	infiltrate, mononuclear cells	1	2	4	2
	pigment, macrophage	0	0	1	0
Testis	atrophy, tubule, unilateral	0	1	3	1
	vacuolation, Sertoli cell	3	0	5	4
	multinucleated giant cells	1	0	2	1
	mineralization	5	8	5	8
	infiltrate, mononuclear cell	0	1	1	0
Cerebrum	degeneration, neuron	10	10	10	9
Cerebellum	vacuolation	5	8	10 *	9 *
Eye	atrophy, outer retina	1	1	0	0
	persistent hyaloid vessel, unilateral	2	0	0	0
	retinal rosette, unilateral	0	0	0	1
Harderian gland	infiltrate, mononuclear cells	1	1	0	1

Values are mean \pm S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compaed with the control group.

†One animal was euthanized due to a technical error during administration.

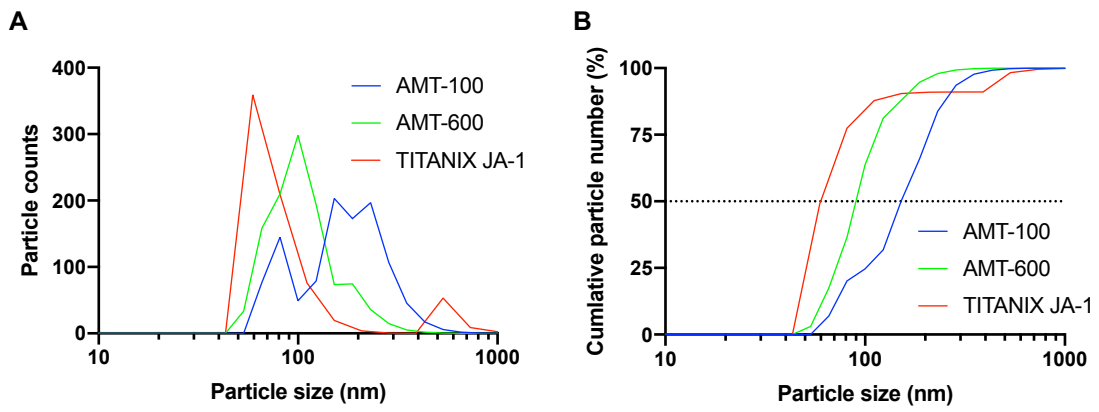


Figure 3-1. Particle size distribution of AMT-100, AMT-600, TITANIX JA-1 in the dosing suspension.

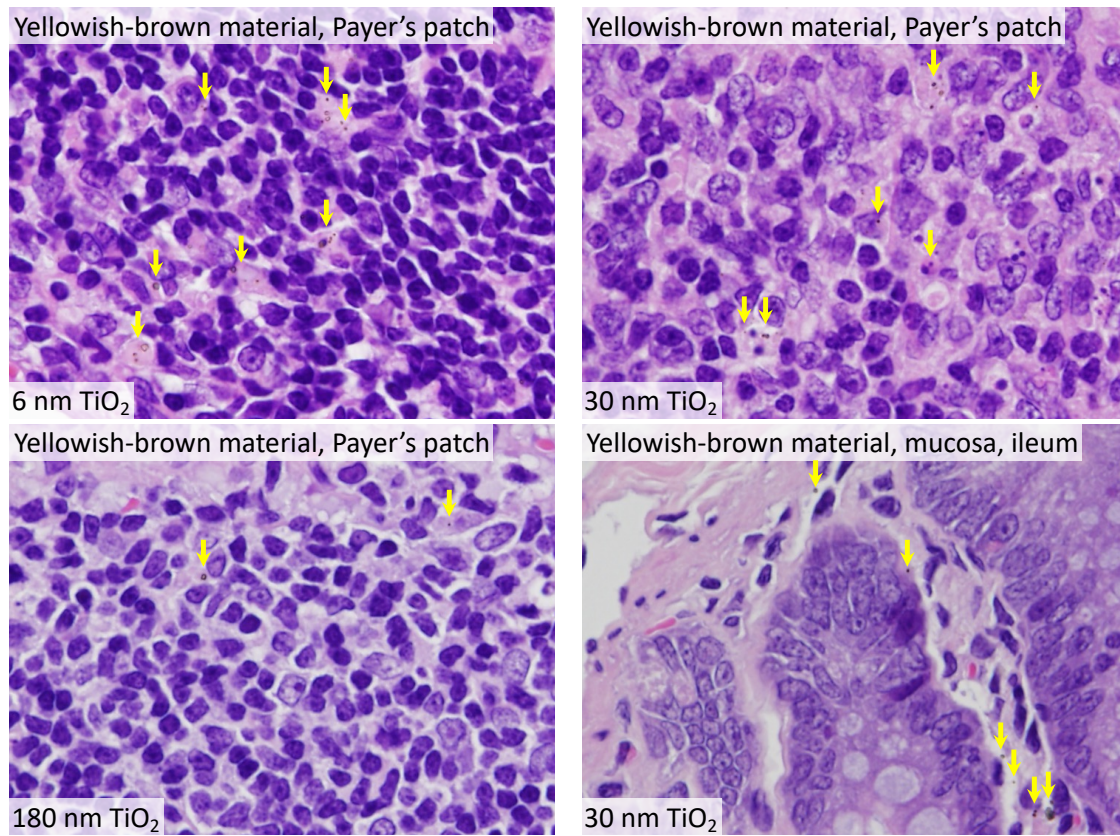
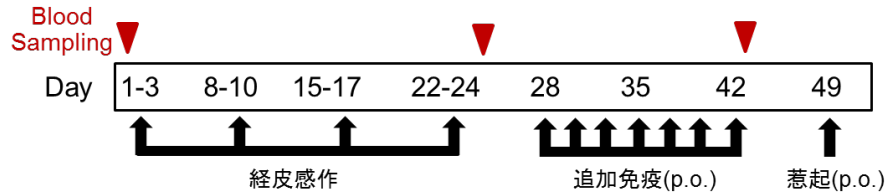


Figure 3-2. Deposition of yellowish-brown material in the small intestine of rats administrated with titanium dioxide for 90 days.

2. ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

実験 1, 2

投与スケジュール



実験1 経皮感作時のOVA用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響(1群5匹 x 5群)

群名	経皮感作	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)
Vehicle (V)	PBS	Saline	OVA 50mg
OVA1	OVA 1 μ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA2	OVA 2 μ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA1-TiO ₂ C po	OVA 1 μ g	OVA 30mg+TiO ₂ C 1.88mg	OVA 50mg
OVA2-TiO ₂ C po	OVA 2 μ g	OVA 30mg+TiO ₂ C 1.88mg	OVA 50mg

※ TiO₂C: 粒子径6nm, アナターゼ型

実験2 より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討(1群5匹 x 4群、1群2匹 x 2群)

群名	経皮感作	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)
Vehicle (V)	PBS	Saline	OVA 50mg
OVA	OVA 2 μ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ E po	OVA 2 μ g	OVA 30mg +TiO ₂ E 1.88mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ F po	OVA 2 μ g	OVA 30mg+TiO ₂ F 1.88mg	OVA 50mg
TiO ₂ E only (2匹)	PBS	TiO ₂ E 1.88mg	OVA 50mg
TiO ₂ F only (2匹)	PBS	TiO ₂ F 1.88mg	OVA 50mg

※ TiO₂E: 粒子径30nm, アナターゼ型. TiO₂F: 粒子径35-50nm, ルチル型.

Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

Score 0	solid state
1	funicular form
2	slurry
3	watery state

※Allergy 67, 201-9 (2012). スコア2以上を下痢とする。

実験 1, 2

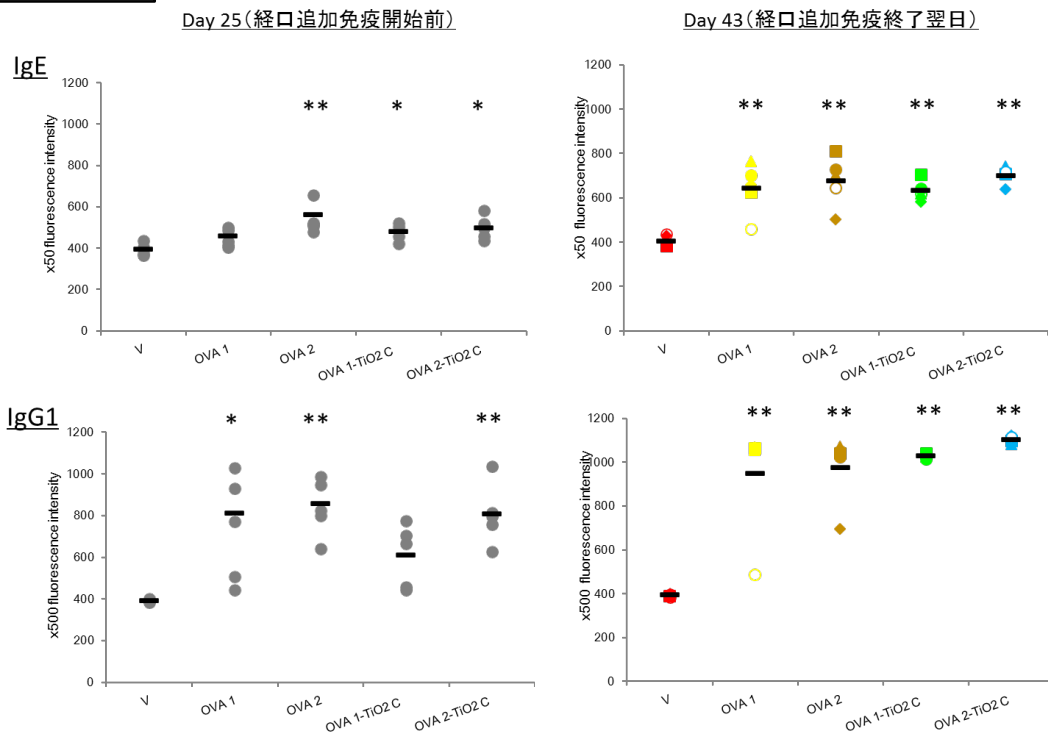
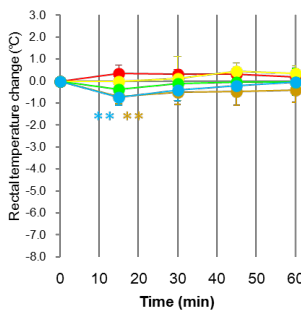
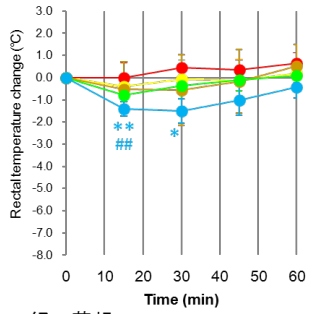


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験1】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05, **p<0.01 vs V group by Dunnett's test.

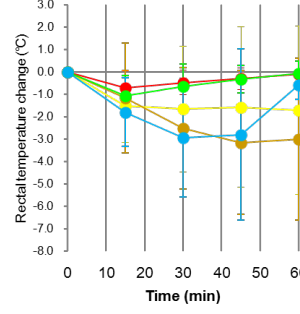
経口追加免疫
1回目



5回目



7回目



経口惹起

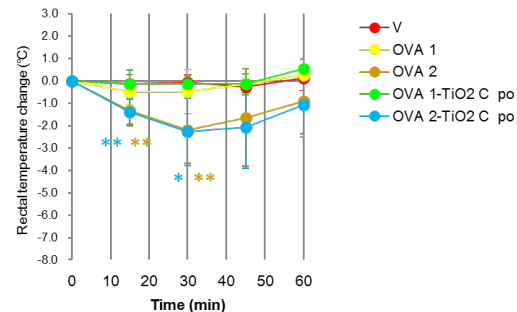


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)
*p<0.05, **p<0.01 vs V group by Dunnett's test.
##p<0.01 vs OVA2 group by Student's t-test.

実験 1, 2

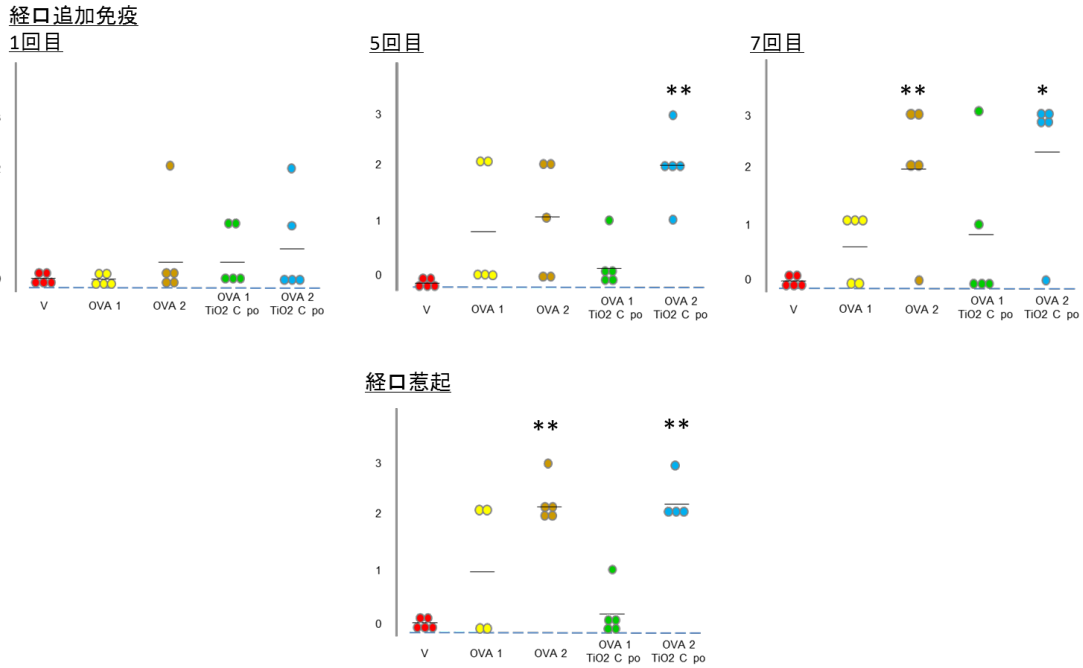


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング (【実験1】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05, **p<0.01 vs V group by Dunnett's test.

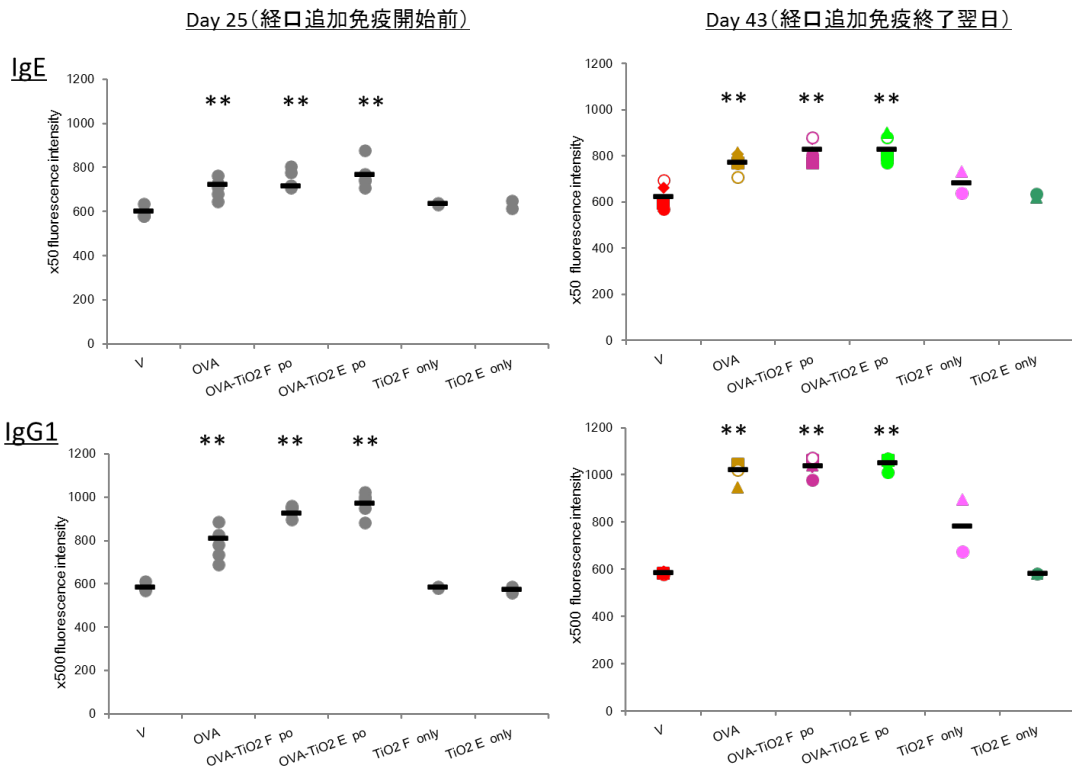
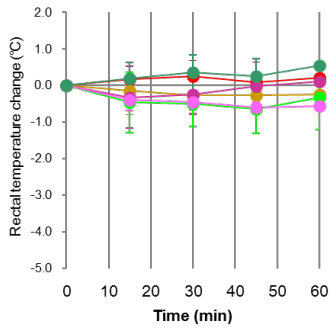


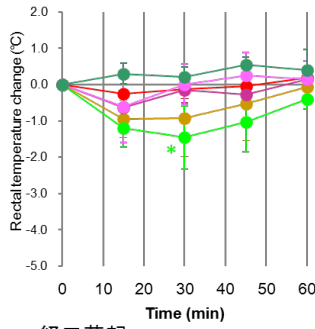
Figure 5 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生 (【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05, **p<0.01 vs V group by Dunnett's test.

実験 1, 2

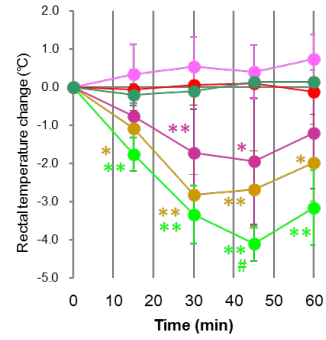
経口追加免疫
1回目



4回目



7回目



経口惹起

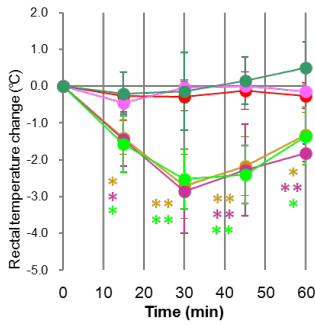
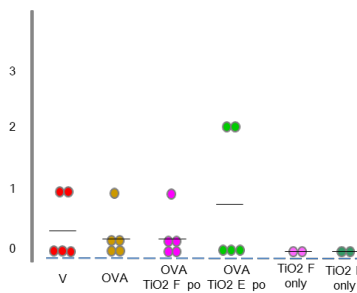
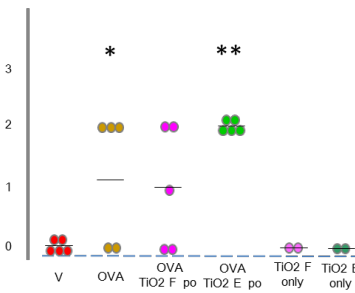


Figure 6 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)
*p<0.05, **p<0.01 vs V group by Dunnett's test.
##p<0.05 vs OVA group by Student's t-test.

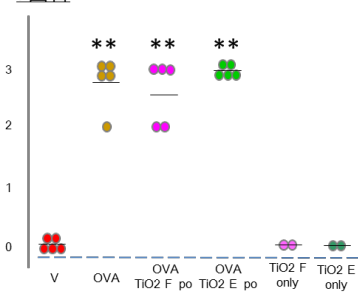
経口追加免疫
1回目



4回目



7回目



経口惹起

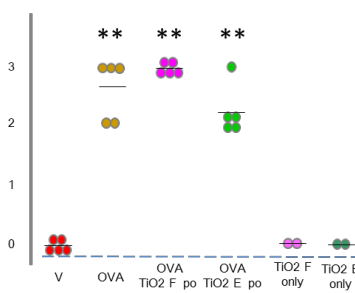
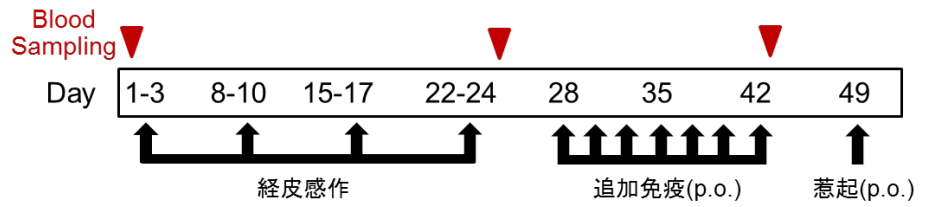


Figure 7 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05, **p<0.01 vs V group by Dunnett's test.

実験 3.

投与スケジュール



粒子径15nmのナノ酸化チタンの影響に関する検討(1群5匹 x 4群、1群2匹 x 2群)

群名	経皮感作	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)
Vehicle (V)	PBS	Saline	OVA 50mg
OVA	OVA 2 μ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ A po	OVA 2 μ g	OVA 30mg +TiO ₂ A 1.88mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ D po	OVA 2 μ g	OVA 30mg+TiO ₂ D 1.88mg	OVA 50mg
TiO ₂ A only (2匹)	PBS	TiO ₂ A 1.88mg	OVA 50mg
TiO ₂ D only (2匹)	PBS	TiO ₂ D 1.88mg	OVA 50mg

※ TiO₂A: 粒子径15nm, ルチル型. TiO₂D: 粒子径15nm, アナターゼ型.

Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

Score 0	solid state
1	funicular form
2	slurry
3	watery state

※Allergy 67, 201-9 (2012). スコア2以上を下痢とする。

実験 3.

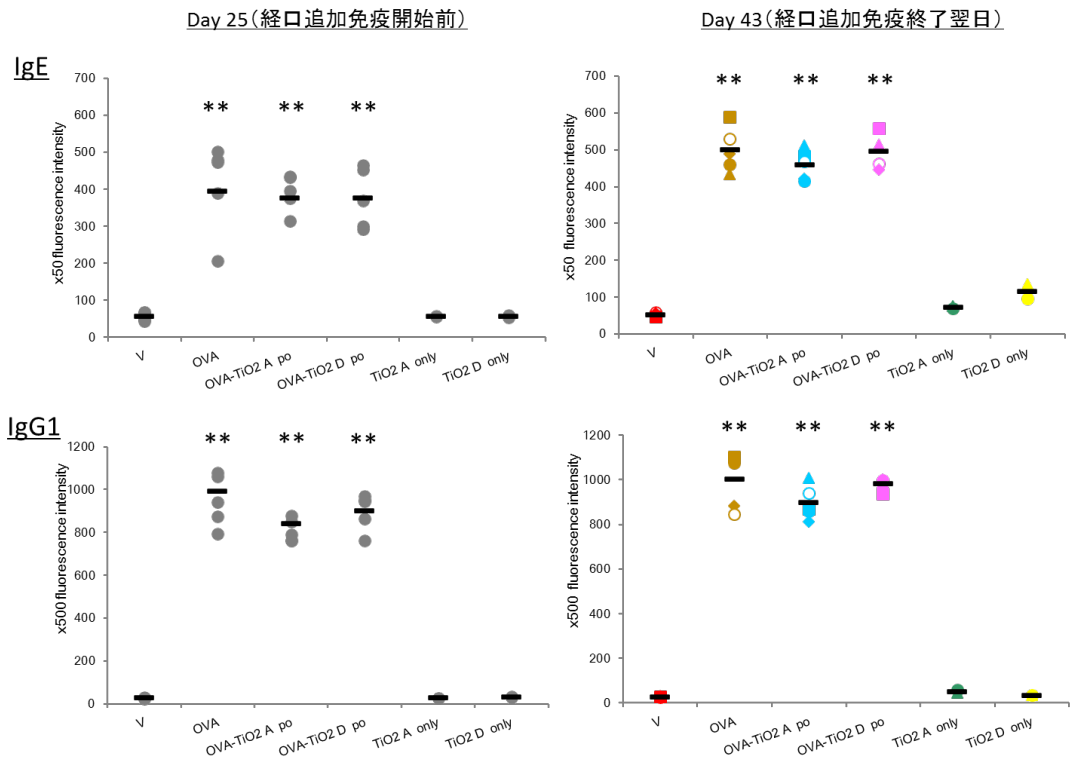


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。**p<0.01 vs V group by Dunnett's test.

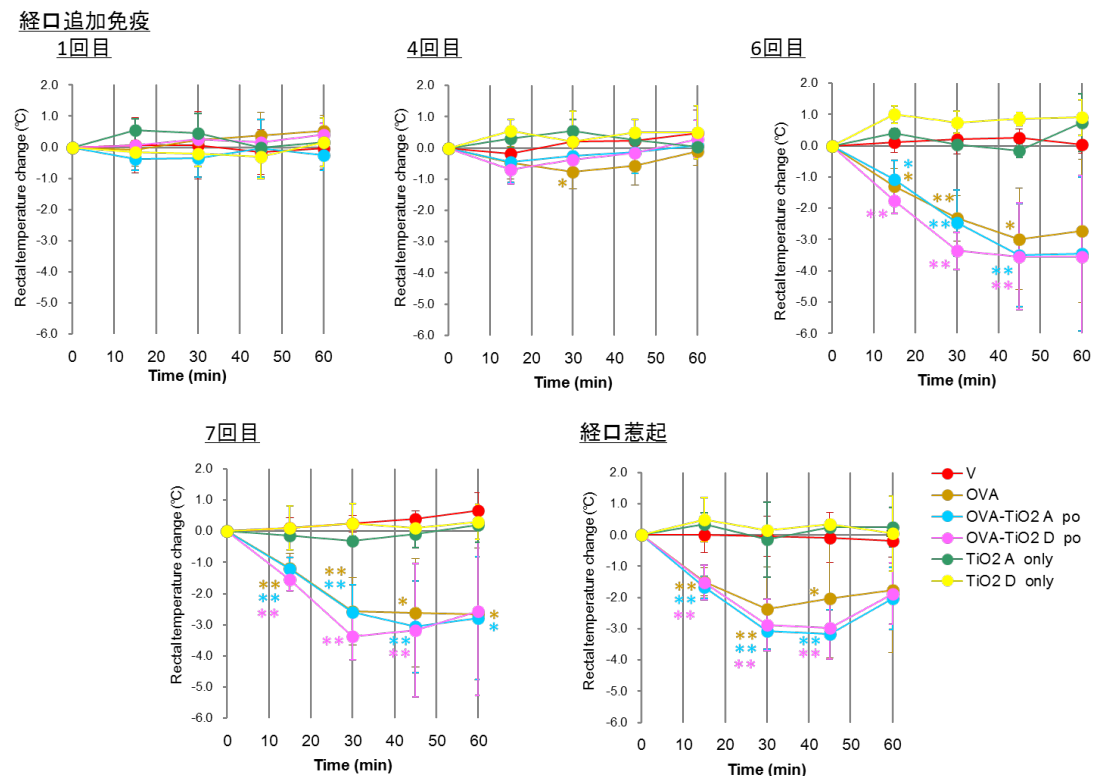


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下
*p<0.05, **p<0.01 vs V group by Dunnett's test.

実験 3.

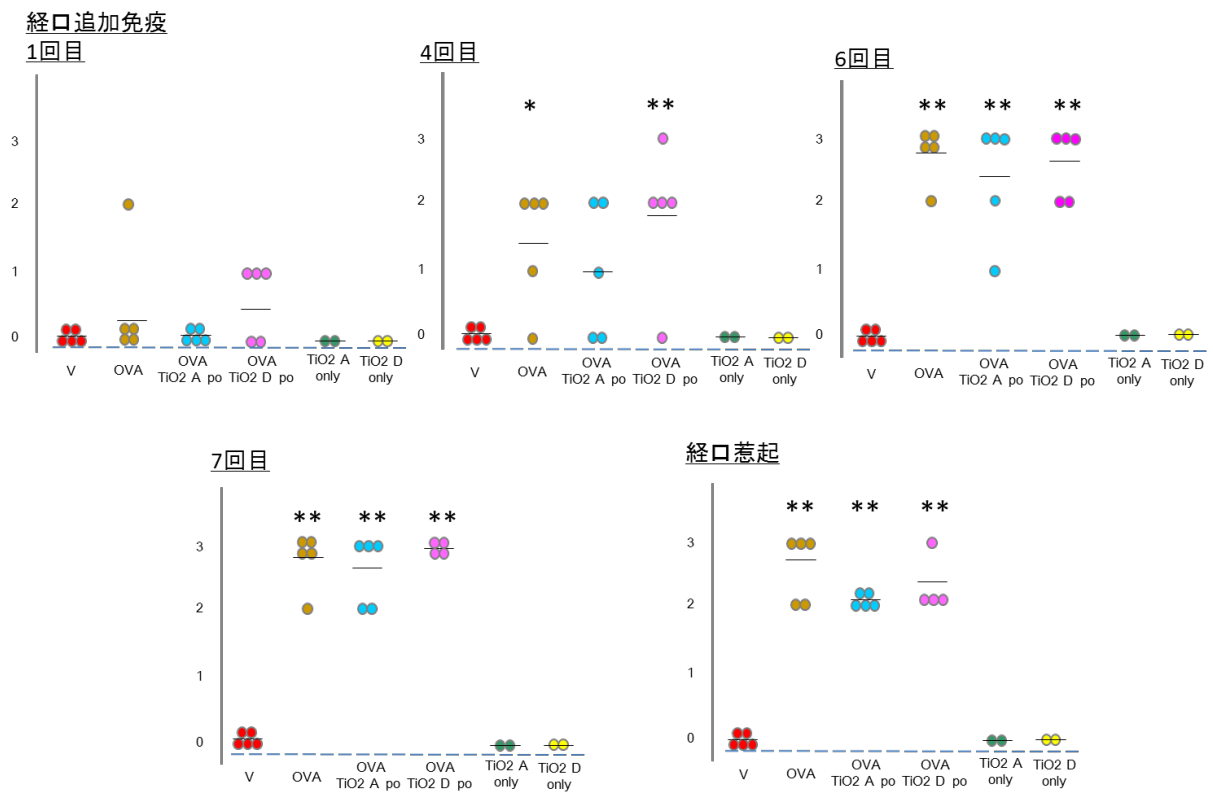


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング
 ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

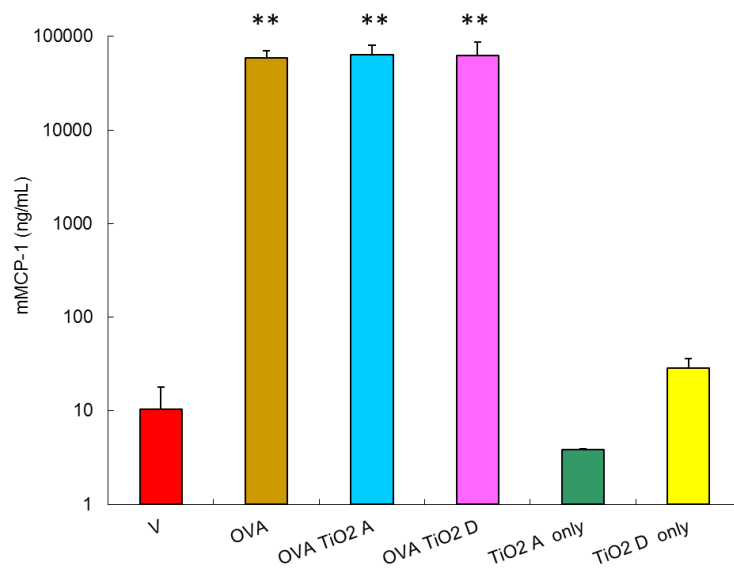
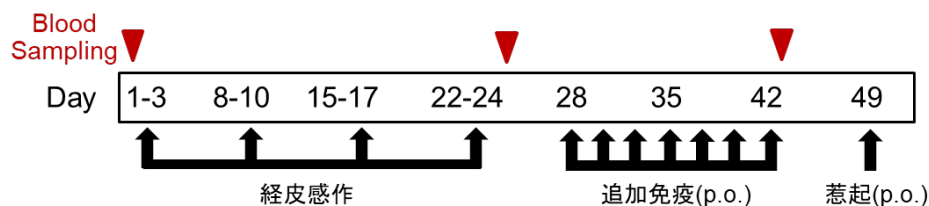


Figure 5 経口惹起60分後の血清中mMCP-1濃度
 ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

実験 4.

投与スケジュール



経皮感作時及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響 (1群5匹 x 5群)

群名	経皮感作	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)
Vehicle (V)	PBS	Saline	OVA 50mg
OVA	OVA 2 μ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ C po	OVA 2 μ g	OVA 30mg+TiO ₂ C 1.88mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ C pc+po	OVA 2 μ g+TiO ₂ C 125ng	OVA 30mg+TiO ₂ C 1.88mg	OVA 50mg
TiO ₂ C only	TiO ₂ C 125ng	TiO ₂ C 1.88mg	OVA 50mg

※TiO₂C: 粒子径6nm, アナターゼ型

Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

Score 0	solid state
1	funicular form
2	slurry
3	watery state

※Allergy 67, 201-9 (2012). スコア2以上を下痢とする。

実験 4.

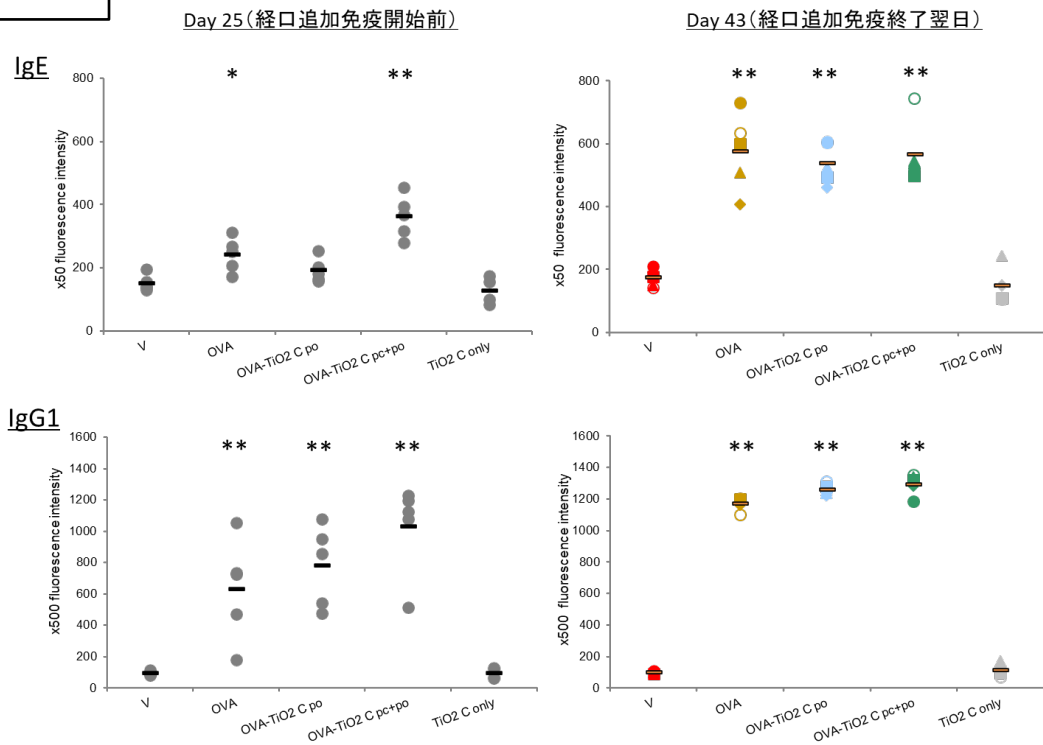


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

経口追加免疫

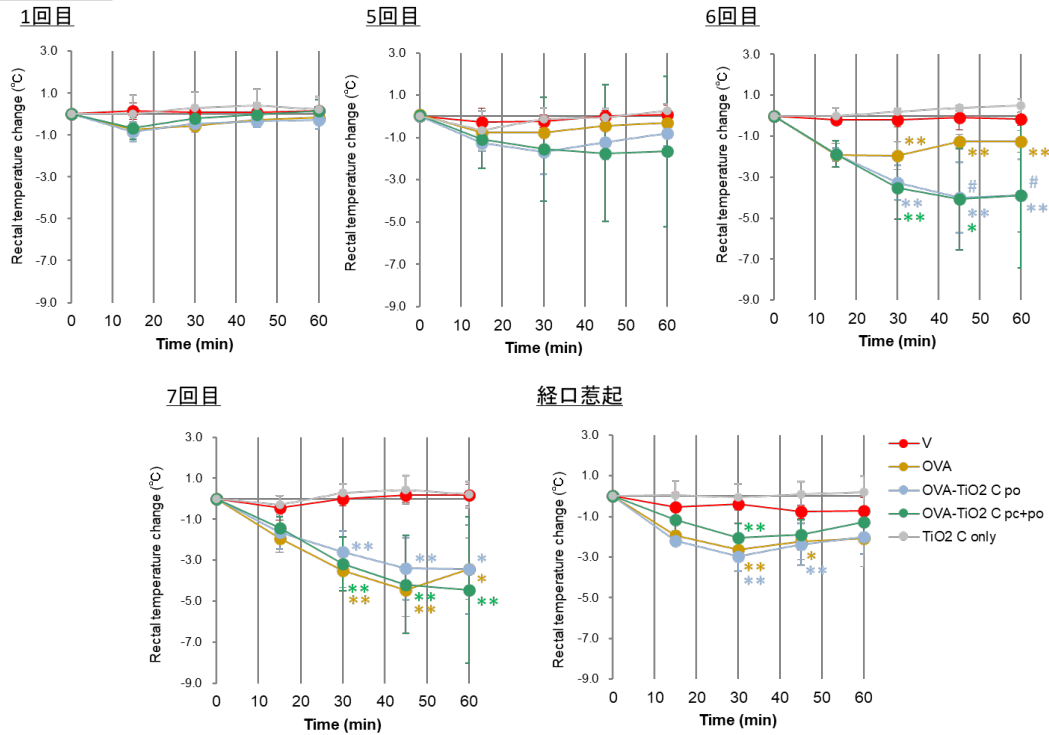


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test. # $p < 0.05$ vs OVA group by Student's t-test.

実験 4.

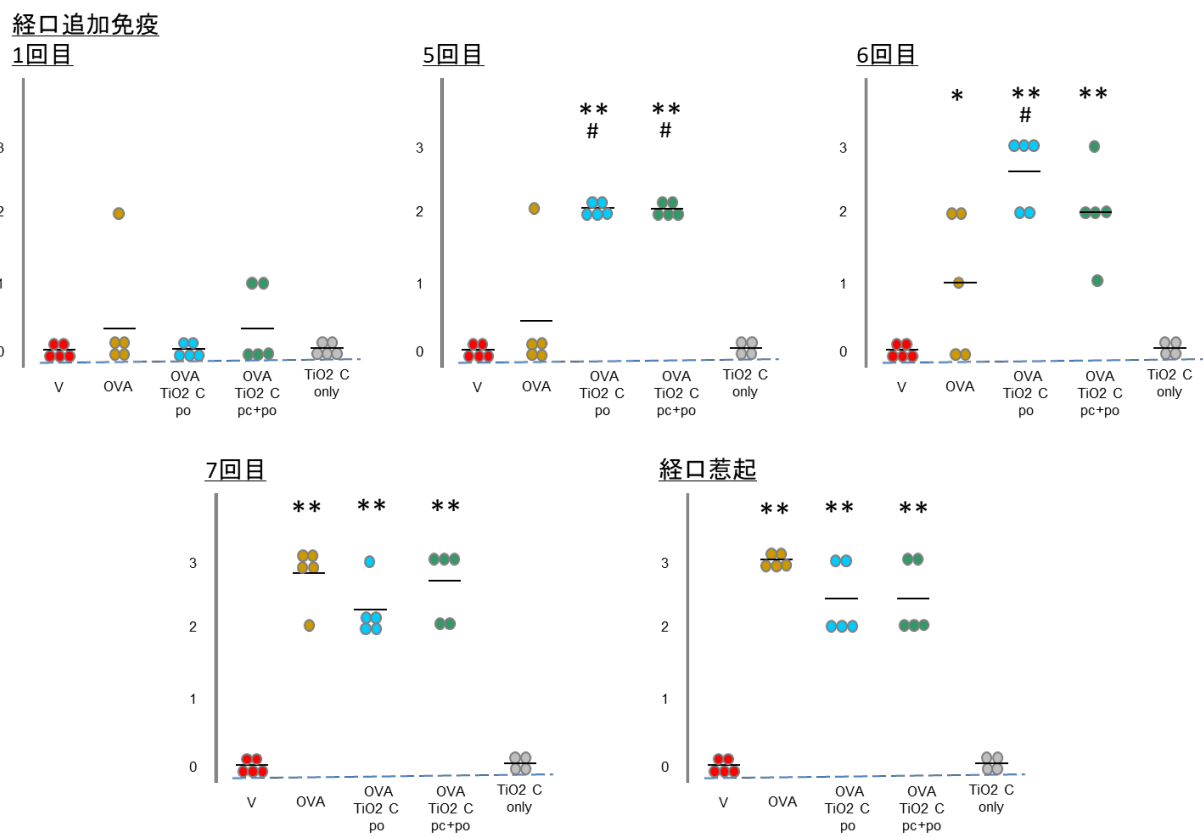


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング
 ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test. # $p < 0.05$ vs OVA group by Student's t-test.

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akagi J-A, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T, Ogawa K.	Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats.	Part Fibre Toxicol.		<i>in press.</i>	2023
Tamehiro N, Adachi R, Kondo K.	Assessment of immune responses in an animal model of wheat food allergy via epicutaneous sensitization.	Methods Mol Biol	2223	37-47	2021
Akiyama H, Adachi R.	Japanese food allergy-labeling system and comparison with the international experience; detection and thresholds.	Food Safety	9(4)	101-116	2021
Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H.	Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat.	Part Fibre Toxicol.	17(1)	48	2020
Ohno A., Okiyama Y., Hirose A., Fukuhara K.	The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes.	Toxicol. Appl. Pharmacol.,	441	115974	2022

Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D.	A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat.	J Toxicol Pathol.	34(4)	353-358	2021
Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T.	Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages.	Biochem Pharmacol.	188	114580	2021
Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D.	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins.	Cancer Sci.	112(6)	2185-2198	2021
Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H.	Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study.	Part Fibre Toxicol.	19	30	2022

<p>Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D.</p>	<p>Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats.</p>	<p>Part Fibre Toxicol.</p>	<p>19, 38, 2022</p>	<p>38</p>	<p>2022</p>
--	--	----------------------------	---------------------	-----------	-------------