

別添 4.

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）  
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

令和5年度 分担研究報告書

食品及び食品用容器包装に使用されるナノマテリアル等の新規素材の  
安全性評価に関する研究

分担課題：ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

研究分担者 小川久美子

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター病理部 部長

研究協力者 赤木純一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター病理部 主任研究官

**研究要旨**

我々はこれまでの研究で、結晶子径 6 nm の TiO<sub>2</sub> 粒子の 90 日間反復経口投与による毒性影響は認められなかったことを明らかにしている。そこで異なる結晶子径（6、30、180 nm）の TiO<sub>2</sub> 粒子の 90 日間反復経口投与による生体影響を調べたところ、結晶子径 180 nm の TiO<sub>2</sub> 粒子の 90 日間反復経口投与により、肝臓チタン濃度の微量の増加が見られた。このことから反復経口投与した TiO<sub>2</sub> 粒子が肝臓に到達しうることが示されたため、異なる結晶子径の TiO<sub>2</sub> 粒子による DNA 鎖切断の誘発について  $\gamma$ -H2AX の免疫染色像を指標として検討したところ、いずれの群でも  $\gamma$ -H2AX の誘導は見られず DNA 鎖切断は誘発されていないことが示された。臓器重量、病理組織学的検査、および血液生化学において肝毒性の指標となる変化が見られなかったことと合わせて、これらのさまざまな結晶子径の TiO<sub>2</sub> 粒子は肝臓への毒性影響を示さないことが示唆された。

消化管吸収と二次粒子径の関連を調べるため、透過型電子顕微鏡による正確な粒度分布解析を実施したところ、二次粒子径は 6 nm < 180 nm < 30 nm の順であり、ナノ粒子の割合が最も高いのは 6 nm の TiO<sub>2</sub> 粒子であった。したがって、180 nm 群で見られた肝臓へのチタンの蓄積は単に二次粒子径が小さいことによるものではなく、TiO<sub>2</sub> 粒子の消化管吸収に関わる要因についてはさらなる検討が必要と考えられた。

TiO<sub>2</sub> アグロメレート（凝集体）の沈着が見られた小腸パイエル板において、マクロファージによる粒子の貪食像が見られたことからマクロファージ関連サイトカインである IL-6 および TNF- $\alpha$  の発現を調べたところ、いずれの群でもこれらの発現に変化は見られなかった。引き続き、RNA シークエンスによるパイエル板の網羅的遺伝子発現解析を進めている。

## A. 研究目的

我々のこれまでの研究で、結晶子径 6 nm のアナターゼ型二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) ナノ粒子 (二次粒子のメジアン径約 200 nm) をラットに 90 日間反復経口投与試験したところ、投与に伴う有害影響は見られなかった一方で、凝集した TiO<sub>2</sub> 粒子の沈着が小腸パイエル板に認められたことから、経口摂取された TiO<sub>2</sub> が消化管から生体内に取り込まれることが示唆されている。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO<sub>2</sub> 粒子の生体内への取り込みと毒性影響を検討し、粒子径による生体影響の違いを明らかにすることを目的とする。令和 5 年度は、異なる結晶子径を持つ TiO<sub>2</sub> 粒子の消化管を介した組織への沈着について、量的・質的検討を行うとともに、免疫染色および RNA シークエンシングによりパイエル板におけるナノ酸化チタン投与に関連するシグナルを検討する。

## B. 研究方法

### 1. 肝臓中のチタン濃度再測定

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。前回測定ではブランクにチタンが検出されたため器具を新規購入し洗浄を行なって十分に低いブランク結果が得られることを確認してから実施した。またコリジョンガスを酸素から酸素+ヘリウムに変更した。試料調製には硝酸を用いた Ultra WAVE 電子レンジ (マイルストーンゼネラル、川崎) 消化を行った。チタンの汚染リスクを低下させるため分解液を PFA 製ビーカーに移し替えて濃縮を行い、その後 PP 製定容容器に移し替えを行なった。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: O<sub>2</sub> (0.1 mL/min) + He (10 mL/min)、内部標準: <sup>103</sup>Rh、ICP-MS 分析の対象元素は <sup>47</sup>Ti<sup>16</sup>O<sup>+</sup>であった。

### 2. 電子顕微鏡による二次粒径解析

透過電子顕微鏡 (TEM) による TiO<sub>2</sub> 粒子の粒度分析は日本電子株式会社 (東京) に委託して実施した。測定試料は投与液と同一の条件 (それぞれの TiO<sub>2</sub> 粉末 3g に分散剤として 0.2% 炭酸水素二ナトリウム 29.5mL を添加後 10 秒間ボルテックスで攪拌) で調製した溶液を、フォルムバル膜を展開した TEM グリッドに分散して作成した。TEM 観察は JEM-2100F (日本電子) を用いて加速電圧 200 kV で実施し、円相当径 =  $2 \cdot \sqrt{(\text{測定面積}/\text{円周率})}$  として粒径を算出した。

### 3. 免疫染色

肝臓および小腸の免疫染色では、pH 6.8 のクエン酸ナトリウム緩衝液 (Daco) 中でオートクレーブ (121°C、15 分) により抗原の賦活化を行なった。その後 3% 過酸化水素水を含むメタノールで内因性ペロオキシダーゼを失活させ、10% ヤギ血清 ( $\gamma$ -H2AX および TNF- $\alpha$ ) または 10% ウサギ血清 (IL-18) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体 ( $\gamma$ -H2AX (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) : 1000 倍希釈、IL-18 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) : 500 倍希釈、TNF $\alpha$  (Abcam, Cambridge, UK) : 1000 倍希釈) を 4°C で一晩反応させ、適切な動物種のヒストファインシンプルステインラット MAX-PO を二次抗体として用い、3,3'-diaminobenzidine 化学発色により検出した。

#### 4. レーザーマイクロダイセクション (LMD) によるパイエル板の RNA シークエンス解析

パイエル板を含む小腸ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックから 10  $\mu\text{m}$  厚で 5 枚の連続切片を薄切し、PEN-メンブランスライド (Leica, Wetzlar, Germany) に貼り付けて 37°C で一晩乾燥させた。レーザーによる RNA の損失を最小限に抑えるため、LMD6 (Leica) によりパイエル板の全周をレーザーでマーキングした後、26 ゲージの注射針 (テルモ、東京) を用いて実体顕微鏡下でパイエル板部位を摘出した。Deparaffinization Solution (Qiagen, Venlo, NLD) で脱パラフィン化した後、RNeasy FFPE kit (Qiagen) で RNA を抽出した。RNA 品質検定、ライブラリー作製、および RNA シークエンス解析はタカラバイオ株式会社 (東京) に委託して実施した。

#### 5. 統計学的処理

臓器中チタン濃度については Dunnett 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。

### C. 研究結果

#### 1. 肝臓中のチタン濃度の再解析

これまでの研究で 180 nm 群の肝臓でチタン濃度のわずかな増加が見られたが、バックグラウンド値 (ブランク) と肝臓検体のチタン濃度の差が小さく、検出下限 ( $3\sigma$ ) を満たしていなかったため、肝臓中のチタン濃度について予備サンプルを用いて再測定を実施した。委託先との綿密な議論による測定条件再検討の結果、複数回測定したブランクのチタン濃度がいずれも不検出となる条件での測定を実施することができた。その結果、より低い p 値 ( $p < 0.01$ ) で 180 nm 群の肝臓でチタン量の有意な増加を検出することができ測定結果の信頼性が向上した (Figure 1)。ただし、対象群と比較したチタンの濃度の差は 75.9 ng Ti/g 肝臓と微量であり、肝臓毒性を示唆する所見はいずれの群でも認められなかった (Table 1)。また、DNA 鎖切断マーカーである  $\gamma$ -H2AX の誘導はいずれの群でも見られなかった (Figure 2)。

#### 2. 電子顕微鏡による二次粒径解析

正確な粒径分布を得るため、透過型電子顕微鏡による粒度分布解析を実施した。検出された最小の粒子サイズは 6 nm と 30 nm では 25.3 nm、180 nm では 50.5 nm であり、動的光散乱法 (DLS) による粒径解析で検出されたよりも小さいサイズの粒子の存在が確認された (Figure 3)。二次粒子のメジアン径は  $6 \text{ nm} < 180 \text{ nm} < 30 \text{ nm}$  の順で、それぞれ 178.4 nm、252.3 nm、および 362.1 nm であり、ナノ粒子 ( $> 100 \text{ nm}$ ) の割合はそれぞれ 23.4%、10.1%、および 9.82%であった (Figure 4)。

#### 3. パイエル板マクロファージ活性化の検

## 討

パイエル板に沈着した TiO<sub>2</sub> アグロメレートの一部はマクロファージに貪食された像が見られたことから (Figure 5)、マクロファージ関連サイトカインとして IL-18 および TNF- $\alpha$  の発現を免疫染色により検討した。その結果、いずれの群においてもこれらのサイトカインの亢進は見られなかった (Figure 6)。

### 4. パイエル板の RNA シークエンス解析

パイエル板は空腸と回腸にそれぞれ存在するが、TiO<sub>2</sub> アグロメレートの沈着が多く見られる傾向があった空腸のパイエル板を優先的に解析に供することとした。ただし、FFPE 検体の RNA は分解が進んでいることが予想され、トータル RNA 量が多いほどライブラリー作製に成功する確率が上昇するため予備検体として回腸パイエル板からも抽出を実施した。抽出した RNA の品質チェックの結果、いずれの試料も高度に分解が進んでいたものの、おおむねライブラリー作製可能性のある RNA サンプルが得られた (Table 2)。ただし、30 nm 群では DV200 (200 塩基長以上の RNA の割合) が 30%以上のサンプルが得られず、この群のデータが1個体も得られないことが懸念されたため、No. 21 については空腸と回腸のパイエル板由来の RNA を両方用いてライブラリー作製を実施した。その結果、No. 23 のみライブラリー品質検定で不適合となったがそれ以外のサンプルでは品質基準を満たすライブラリーが作製できた (Table 3)。また No. 23 についてもシークエンス解析が成功する可能性があったため、すべてのサンプルについて RNA-シークエンスを実施したところ、すべてのサンプルについてシークエンスデータを取得することができた。ただし、ラットリ

ファレンスへのマッピング率が全体として7割前後と、通常の RNA シークエンスと比較して低い結果であった。

## D. 考察

予備サンプルを用いた再測定でも 180 nm 群の肝臓でチタン量の有意な増加 ( $p < 0.01$ ) が見られたことから、結晶子径 180 nm の TiO<sub>2</sub> の 90 日間反復経口投与により肝臓にチタンが蓄積することが確認できた。異なる結晶子径の TiO<sub>2</sub> 粒子の 90 日間反復経口投与実験に先立って実施した DLS による粒径分析では、結晶子径とは逆に 180 nm の二次粒子径が最も小さいという結果が得られており、180 nm 群のみで肝臓のチタン量増加が見られたことから、消化管粘膜上皮を介した TiO<sub>2</sub> 粒子の肝臓への移行は二次粒径の小さいことが寄与する可能性が示唆されていた。ただし、動的光散乱法で得られるのは散乱強度分布を理想球体の流体力学径として換算した粒度分布であり、散乱強度は粒径の 10<sup>6</sup> に比例するため大きな粒子の影響がきわめて強くなるという特徴がある。そこで今回は正確な粒径分布を得るため、透過型電子顕微鏡による粒度分布解析を実施した。その結果、二次粒子径は 6 nm < 180 nm < 30 nm の順で、ナノ粒子の割合が最も高いのは 6 nm の TiO<sub>2</sub> 粒子であった。したがって、180 nm 群で見られた肝臓へのチタンの蓄積は単に二次粒子径が小さいというわけではなく別の理由によるものと考えられた。一方で、180 nm 群を含めてすべての群で肝臓毒性を示唆する毒性学的所見は認められず、DNA 鎖切断マーカーである  $\gamma$ -H2AX の誘導も見られなかったことから、微量の TiO<sub>2</sub> 粒子が肝臓に到達していても毒性影響はみられないと考えられた。また、TiO<sub>2</sub> アグロメレートの沈着が見られた小腸パ

イエル板において免疫サイトカインの亢進は調べた限りにおいて見られなかったことから、経口暴露され消化管に取り込まれた TiO<sub>2</sub> 粒子がマクロファージを活性化する可能性は現時点では認められなかった。

RNA シークエンスのためのライブラリー調製では、FFPE 検体からの LMD による RNA サンプルという厳しい条件ながら各群 3 匹 (計 12 匹) のすべての個体でライブラリーを作製し、シークエンス解析を実施することができた。現在、データ解析を進めている。

## E. 結論

結晶子径の異なる TiO<sub>2</sub> 粒子を 90 日間反復経口投与した結果、パイエル板へのアグロメレート沈着に加えて、180 nm 群では肝臓チタン量の増加が見られた。しかし、肝臓への毒性影響は認められず、パイエル板におけるマクロファージの活性化やマクロファージ関連サイトカインの亢進などの免疫応答も見られなかった。引き続き、パイエル板の RNA シークエンス解析や反復経口投与後の排出について検討する。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

1. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Hirotoishi Akane, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite

diameter of 6 nm in rats. *Particle and Fibre Toxicology* 2023, 20(1), 23.

### F.2. 学会発表

1. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Hirotoishi Akane, Mizuho Uneyama, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa. 90-day repeated oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 第50回日本毒理学学会学術年会, 2023年6月20日 札幌
2. 赤木 純一、水田 保子、畝山 瑞穂、小川 久美子. 結晶子径が異なる二酸化チタン粒子のラットを用いた90日間反復経口投与による毒性影響とチタン蓄積の検討. 第40回日本毒性病理学会学術集会, 2024年1月23日 東京
3. Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Uneyama M, Akane H, Toyoda T. Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30 and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. The 63th SOT Annual Meeting, 2024年3月10-14日 Salt Lake City, USA

## 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

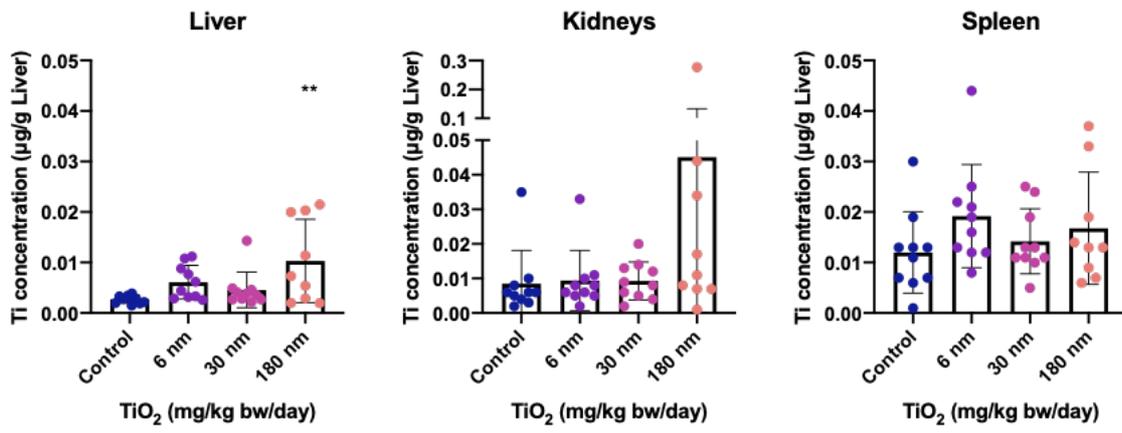
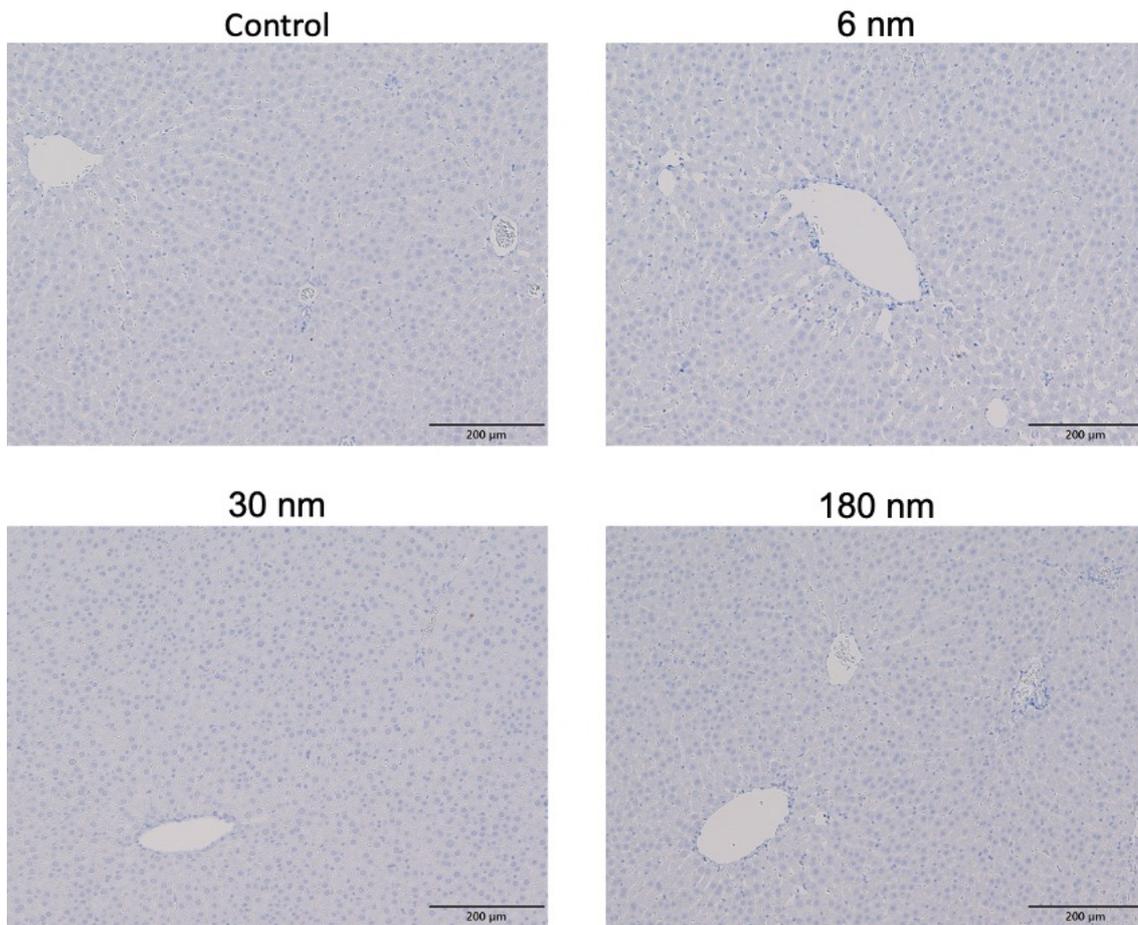
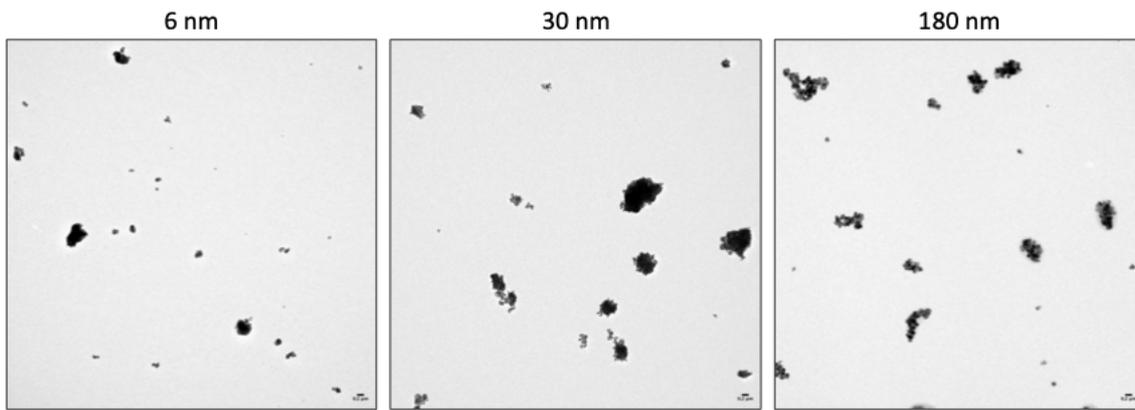


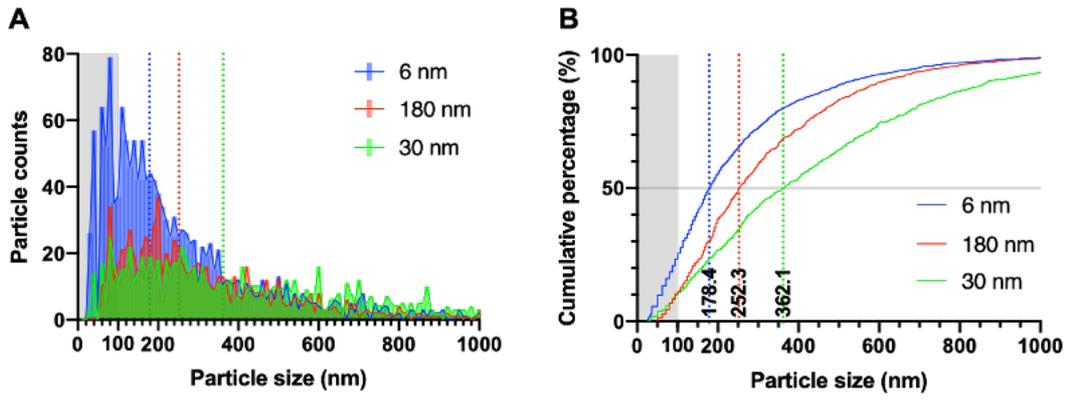
Figure 1. 主要臓器中のチタン量。



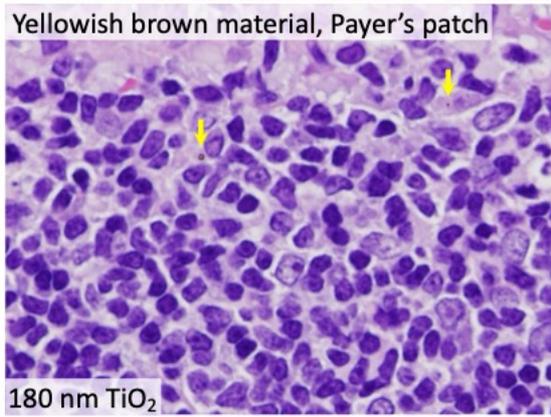
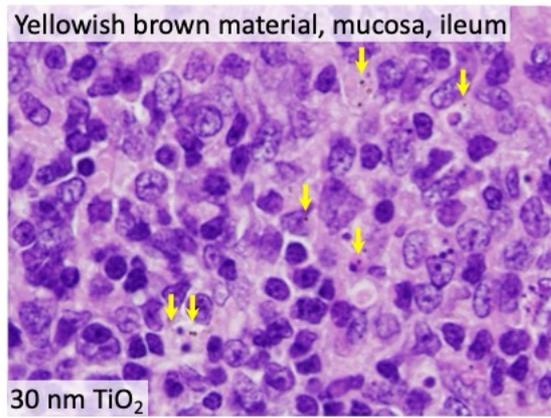
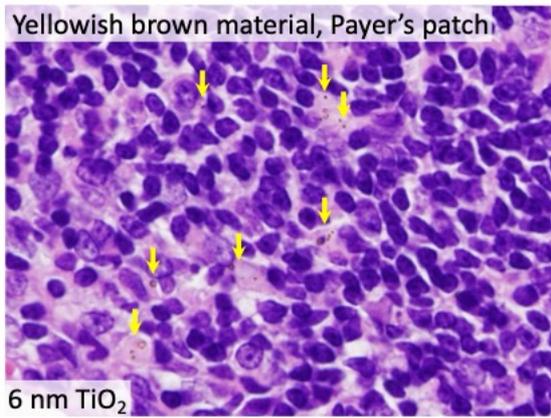
**Figure 2.** 肝臓の  $\gamma$ -H2AX 染色像。



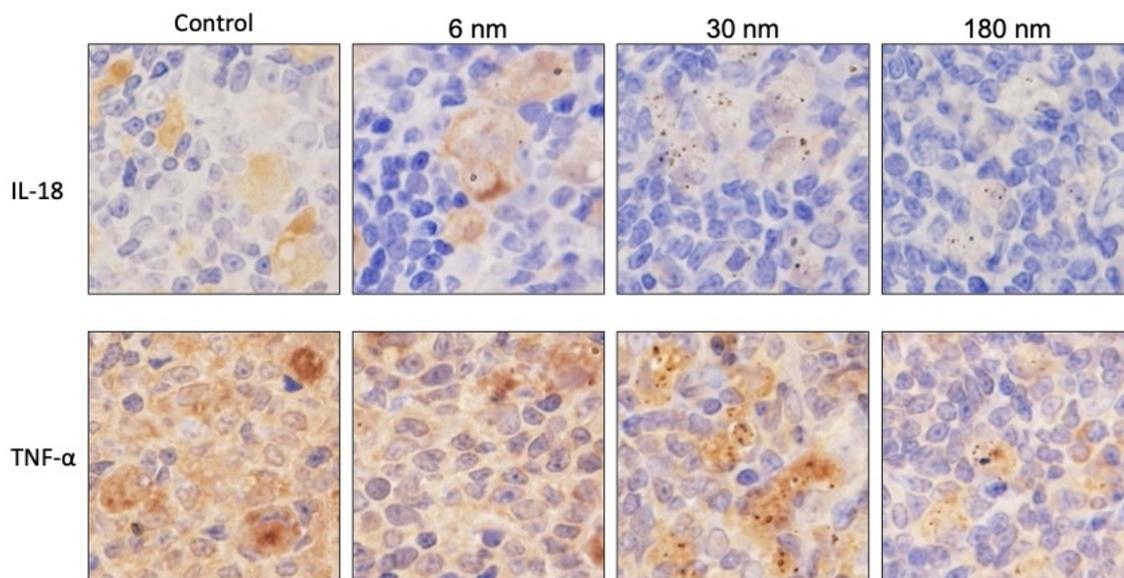
**Figure 3.** 本研究で用いた異なる結晶子径を持つ TiO<sub>2</sub> 粒子の代表的透過電子顕微鏡像。



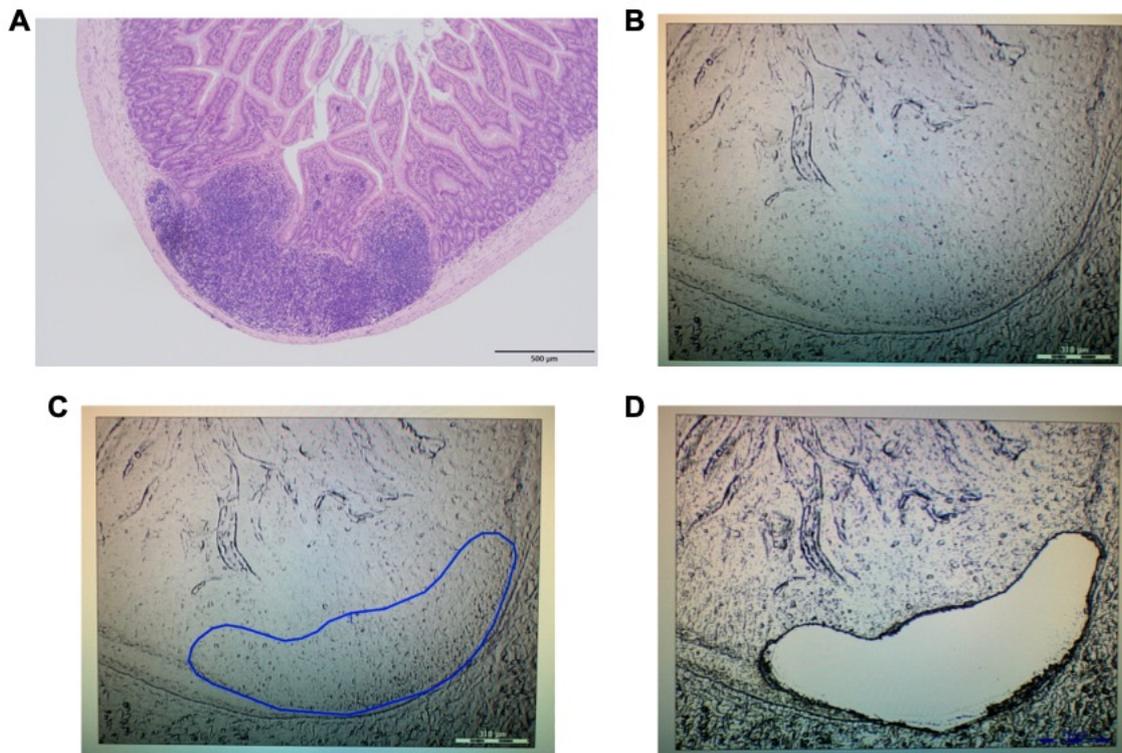
**Figure 4.** 異なる結晶子径を持つ TiO<sub>2</sub> 粒子の透過電子顕微鏡観察による粒度分布(A)および積算粒度分布(B)。破線はメジアン径を示す。ナノ粒子 (> 100 nm) の分布を灰色で示した。



**Figure 5.** 小腸パイエル板に沈着した TiO<sub>2</sub> 粒子



**Figure 6.** パイエル板のマクロファージ関連サイトカイン免疫染色像。



**Figure 7.** パイエル板のレーザーマイクロダイセクション (LMD)。パイエル板を含む小腸組織標本(A)の未染色標本を PEN-メンブレンスライド (Leica) 上に作成し(B)、パイエル板全体を LMD により切り出した(C, D)。

**Table 1.** 肝毒性と関連する毒性学的指標

Group	Control	6 nm	30 nm	180 nm
No. of animals	10	10	10	9 <sup>†</sup>
<i>Organ weight</i>				
Body weight (g)	292.0 ± 16.7	292.0 ± 9.5	291.2 ± 12.2	295.2 ± 11.6
Liver (g)	6.627 ± 0.521	6.627 ± 0.347	6.603 ± 0.455	6.620 ± 0.451
Liver (w/bw%)	2.268 ± 0.078	2.268 ± 0.073	2.266 ± 0.098	2.241 ± 0.087
<i>Histopathological findings</i>				
Liver hyperplasia, bile duct	2	0	2	5
<i>Serum biochemistry</i>				
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
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. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with 0 mg/kg bw/day group.

<sup>†</sup>One animal was euthanized due to a technical error during administration.

**Table 2.** RNA サンプルの品質検定結果

Group		サンプル名称	残液量(ul)	濃度(ng/ul)	残総量(ng)	RIN	DV200(%)	判定
Control	Jejunum/PP	22LR 1J PP	9	3.9	35.5	1.8	42.37	△
Control	Jejunum/PP	22LR 2J PP	9	3.1	28.2	1.6	25.29	×
Control	Jejunum/PP	22LR 9J PP	9	2.0	17.6	1.8	36.26	△
6 nm	Jejunum/PP	22LR 13J PP	9	3.8	33.9	1.7	24.37	×
6 nm	Jejunum/PP	22LR 16J PP	9	9.2	82.5	1.8	48.15	△
6 nm	Jejunum/PP	22LR 20J PP	6	3.3	19.9	1.7	34.53	△
30 nm	Jejunum/PP	22LR 21J PP	9	3.3	29.5	1.8	22.30	×
30 nm	Jejunum/PP	22LR 23J PP	9	3.0	26.6	1.6	4.62	×
30 nm	Jejunum/PP	22LR 27J PP	9	4.9	44.0	1.6	25.41	×
180 nm	Jejunum/PP	22LR 33J PP	9	3.4	30.5	1.8	33.24	△
180 nm	Jejunum/PP	22LR 34J PP	9	3.7	32.9	1.6	31.45	△
180 nm	Jejunum/PP	22LR 40J PP	9	3.6	32.3	1.6	10.38	×
Control	Ileum/PP	22LR 1I PP	9	6.3	57.1	1.6	34.76	△
Control	Ileum/PP	22LR 2I PP	9	5.0	45.0	1.8	37.51	△
Control	Ileum/PP	22LR 9I PP	6	2.2	13.3	1.7	29.88	×
6 nm	Ileum/PP	22LR 13I PP	9	3.6	32.1	1.7	28.79	×
6 nm	Ileum/PP	22LR 16I PP	9	3.6	32.1	1.7	28.91	×
30 nm	Ileum/PP	22LR 21I PP	9	3.7	33.3	1.7	22.72	×
180 nm	Ileum/PP	22LR 33I PP	9	4.3	38.5	1.6	30.13	△
180 nm	Ileum/PP	22LR 34I PP	9	5.4	49.0	1.7	19.50	×

◎, RIN > 6; ○, RIN 5-6 / DV200 >=60%; △, DV200 30%-60%; ×, DV200 <=30%.

**Table 3.** ライブラリの品質検定結果

Group	組織	サンプル名称	品質検定結果	解析に使用	データ取得
Control	Jejunum/PP	22LR 1J PP	○	○	○
Control	Jejunum/PP	22LR 2J PP	○	○	○
Control	Jejunum/PP	22LR 9J PP	○	○	○
6 nm	Jejunum/PP	22LR 13J PP	○	○	○
6 nm	Jejunum/PP	22LR 16J PP	○	○	○
6 nm	Jejunum/PP	22LR 20J PP	○	○	○
30 nm	Jejunum/PP + Ileum/PP	22LR 21J/I PP	○	○	○
30 nm	Jejunum/PP	22LR 23J PP	×	○	○
30 nm	Jejunum/PP	22LR 27J PP	○	○	○
180 nm	Jejunum/PP	22LR 33J PP	○	○	○
180 nm	Jejunum/PP	22LR 34J PP	○	○	○
180 nm	Jejunum/PP	22LR 40J PP	○	○	○