

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 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

研究代表者 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 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_2 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た (Akagi et al, Part Fibre Toxicol. 2023)。本研究では、異なる結晶子径 (6、30、180 nm) の TiO_2 粒子の 90 日間反復経口投与による生体影響を調べており、今年度は小腸パイエル板で見られた TiO_2 粒子の取り込みについて生理的意義を検討するとともに、その排出性について検討するためのラットを用いた反復強制経口投与実験を実施した。病理組織学的検査において観察された TiO_2 粒子は数百 nm 以上の非ナノ粒子であり、ナノサイズ粒子は光学顕微鏡では観察できないため、パイエル板におけるナノサイズ TiO_2 粒子の局在を電子顕微鏡により観察した。その結果、100~200 nm 程度のチタンがパイエル板のリンパ細胞内に認められた。さらに、レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法によりパイエル板中のチタン元素分布のイメージング解析を行ったところ、投与群ではパイエル板全体にチタン元素の分布が検出された。 TiO_2 の取り込みによる生体影響を検討するため、レーザーマイクロダイセクションによりパイエル板の RNA シークエンス解析を行ったところ、少数の遺伝子の発現変動が見られたものの、 TiO_2 投与群に共通して変化する遺伝子はほとんどなく、免疫毒性などの有害影響を示唆する遺伝子発現変化はいずれの群でも見られなかったと結論した。

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_2) 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_2 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_2 が消化管から生体内に取り込まれることが示唆された (Akagi et al, Part Fibre Toxicol. 2023)。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO_2 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 6 年度は、異なる結晶子径を持つ TiO₂ 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した。

B. 研究方法

1. 透過型電子顕微鏡 (TEM) によるパイエル板中 TiO₂ 粒子の観察

0.2%炭酸水素二ナトリウム (DSP) に懸濁した 6、30、180 nm の TiO₂ を 90 日間反復経口投与したラット小腸 (パイエル板を含む) のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックから 3 μ m 厚の未染色標本を薄切し、脱パラフィン後に 2%四酸化オスミウム水溶液で後固定した。エタノール脱水後、EPON812 を用いて熱重合によりエポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクロトームにより 80~90 nm 厚に超薄切し、酢酸ウラニル/鉛染色液により電子染色を行った。作成した超薄切片をグリッドに載せ、HITACHI H-7600 透過型電子顕微鏡を用いて加速電圧 100 kV 電圧で透過電子顕微鏡観察を行った。

2. レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法 (LA-ICP-MS) によるパイエル板のチタン量イメージング

パイエル板を含む小腸 FFPE ブロックから 10 μ m 厚の切片を薄切し、ESL213 レーザーアブレーション装置 (ESI) を用いてチタン元素のイメージング質量分析を行った。波長 213 nm (Nd-YAG レーザー)、レーザー出力 8% (1.2 J/cm²)、キャリアガス Ar、繰り返し周波数 10 Hz、XY ステージ速度 25 μ m/sec、スポットサイズ 25 μ m の

ライン測定で 1000 μ m 角程度の範囲を測定した。ICP 質量分析は 7900 四重極 ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) を使用し、⁴²Ti (存在率 7.44%) の質量数を測定した。検量線は LA-ICP-MS 用標準物質 Solid scale (富士フイルム和光純薬, 大阪) を使用して 10、50、100、300 ppm の検量線を作成した。

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

各群 3 匹のパイエル板を含む小腸 FFPE ブロックから 10 μ 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 で一晚乾燥させた。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, the Netherlands) で脱パラフィン化した後、RNeasy FFPE kit (Qiagen) で RNA を抽出した。RNA の品質は Agilent TapeStation を用いて評価した。得られた Total RNA を材料とし、SMART-Seq Stranded Kit および SMARTer RNA Unique Dual Index Kit (タカラバイオ, 草津) を用いて以下の通りライブラリー作成を行った。ランダムプライマーを用いて cDNA を合成し、SMART (Switching Mechanism At 5' End of RNA Template) 法により 1st strand cDNA の末端に特定の配列を付与した。続いて、その特定配列に対応する検体ごとに異なるタグ配列を有する Index 付きのプライマーを用いて PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物を、AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, United States) を用いた磁気ビーズ法にて精製し、scZapR と scR-

Probe によりリボソーム cDNA の切断を行なった。最後に、アダプターを認識するプライマーを使用して未切断 cDNA を PCR 増幅し、シーケンスライブラリーを構築した。ライブラリーの品質評価を Agilent TapeStation を用いて実施したところ、30 nm 群の 1 検体においてライブラリー濃度が 1.3 nmol/L と低く、シーケンス解析に不適合と判断し、除外した。残る 11 検体について NovaSeq 6000 を用いて 150 塩基長のペアエンドリードによるシーケンス解析を実施した。RNA シーケンスのリードマッピングには、参照ゲノム配列として *Rattus norvegicus* (ラット) の mRatBN7.2 アセンブリに基づく配列 (mRatBN7.2.dna.toplevel.fa) および対応する遺伝子定義ファイル (mRatBN7.2.107.gtf.gz) を使用し、DRAGEN Bio-IT Platform を用いて遺伝子発現量解析を行った。

4. 生体内に取り込まれた TiO₂ の排出性検討のための反復経口投与

5 週齢の F344/DuCrj ラット雄 40 匹をジャクソン・ラボラトリー・ジャパンより購入し、基礎飼料 (CRF-1 ; オリエンタル酵母工業, 東京) 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℃、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, 東京) を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 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、同所が定める「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

の各群の平均体重の標準偏差が最小になるように 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。

被験物質の投与は、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 : 2.4 mm、フチガミ器械, 向日) を用いて 0.2% DSP に懸濁した TiO₂ 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。投与 90 日目に各群 5 匹を一晩絶食させ、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。

5. 統計学的処理

LA-ICP-MS によるパイエル板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, United States) 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放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. TEM によるパイエル板中 TiO₂ 粒子の観察

ラットに投与した 6、30、180 nm の TiO₂ の二次粒子のメジアン径はそれぞれ 178、362、252 nm であり、大半の粒子が光学顕微鏡で観察不可能な数百 nm 以下の粒子径であったことから (図 1)、ナノサイズの TiO₂ 粒子の局在を観察するため、パラフィン包埋小腸組織標本の戻し電顕法によりパリエル板を TEM 観察した。その結果、パリエル板において細胞内に TiO₂ 粒子の存在が確認できた (図 2A)。また、6 nm 群と 180 nm 群では小腸粘膜上皮細胞においても TiO₂ 粒子の取り込みが見られた (図 2B)。

2. LA-ICP-MS によるパリエル板のチタン量イメージング

パリエル板のチタン量をイメージング質量分析したところ、対照群においても局所的にチタンが検出されたが、投与群においては HE 染色した連続切片で TiO₂ 粒子が光学顕微鏡下で見られない領域であってもパリエル板領域全体にわたってチタンのシグナルの分布が見られた (図 3A,B)。

3. パリエル板の網羅的遺伝子発現解析

レーザーマイクロダイセクションによりパリエル板領域のみを切り出し、RNA を抽出して RNA シークエンスにより遺伝子発現を解析した (図 4A)。各群 3 匹の検体について解析したところ、30 nm 群の 1 検体はライブラリの品質チェックを通らなかったため結果から除外した。クラスタリング解析の結果、いずれの群でもクラスター形成は見られなかった (図 4B,C)。発現変動遺伝子解析では、6 nm 群と 30 nm 群で少数の遺伝子の発現変動が見られたが、180 nm 群では全く見られなかった (図 4D)。6 nm 群では一部のケモカイン (*Ccl6*, *Ccl20*) の発現増加が見られ、Gene Ontology 解析で

ケモカイン関連の変動が示唆されたが、これらの経路に関わる因子 (*Il-13*, *Il-17* など) の発現変動は見られなかった (図 4E)。TiO₂ 投与群に共通する発現変動遺伝子を調べたところ、6 nm 群と 30 nm 群で共通して変動が見られた遺伝子は 2 遺伝子の発現増加のみであった。また、TiO₂ 投与群全体で発現変動が見られた遺伝子は 1 遺伝子の低下のみであった。

4. 生体内に取り込まれた TiO₂ の排出性検討

生体内 (パリエル板等) に取り込まれた TiO₂ が排出されるか検討するため、90 日間反復経口投与後 8 週間回復を実施している。現在 13 週における解剖群 (各群 5 匹) の剖検を終了し、休薬期間中である。投与に伴う体重および摂餌量の変動は見られていない (図 5)。

D. 考察

これまでの研究では光学顕微鏡下で TiO₂ の取り込みを観察しており、ナノサイズ粒子の挙動が明らかになっていなかった。本年度の研究では、TEM 観察によりナノサイズの TiO₂ 粒子がパリエル板の細胞内に存在することが観察された。さらに、6 nm および 180 nm では消化管粘膜上皮細胞にも TiO₂ 粒子が見られ、経口摂取した TiO₂ が消化管粘膜を介して取り込まれることが示唆された。LA-ICP-MS では、パリエル板全体にわたってチタンのシグナルが検出され、排出実験における定量的評価の手法を確立できた。

パリエル板の RNA シークエンス解析では少数の遺伝子発現変動が見られたものの TiO₂ 投与に共通する変化はほとんど見られず、TiO₂ がパリエル板の遺伝子発現に与える影響は乏しいと考えられた。

6 nm 群で見られた一部のケモカイン (*Ccl6*, *Ccl20*) の発現増加は、その上流因子等の変動が見られなかったこと、および炎症反応が惹起されなかったことから偶発的な変動と考えられた。

以上の結果から、経口投与されたナノサイズ TiO_2 はパイエル板に取り込まれ、一部は光学顕微鏡で確認できる非ナノサイズ粒子として存在するが、免疫毒性影響は示さないと考えられた。

引き続き、 TiO_2 の排出を検討するための回復実験を実施して経口摂取した TiO_2 の動態および生体影響について検討する。

E. 結論

結晶子径の異なる TiO_2 粒子の 90 日間反復経口投与によるパイエル板へのナノサイズ TiO_2 粒子の取り込みを電子顕微鏡観察およびイメージング質量分析により明らかにした。パイエル板の RNA シークエンス解析では免疫系の異常を示唆する変動は認められず、マクロファージの活性化や炎症反応、組織障害などの変化も見られなかったことから TiO_2 粒子の取り込みによるパイエル板への免疫毒性影響は見られなかったと考えられた。引き続き、反復経口投与後の排出性について検討する。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし (準備中)

F.2 学会発表

16. 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子。さまざまな結晶子径の二酸化チタン粒子のラットへの90日間反復経口投与による生体影響と蓄積性の検討。第37回発癌病理

研究会 2024年8月22日 米子

17. 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子。ラットを用いた二酸化チタンナノ粒子の反復経口曝露による生体影響の検討。第47回日本分子生物学会年会 2024年11月29日、福岡
18. 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子。F344ラットへの反復経口投与によりパイエル板に沈着した二酸化チタン粒子による生体影響の検討。第41回日本毒性病理学会 2025年1月30日、三島
19. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Mizuho Uneyama, Hirotohi Akane, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa. Study of the biological effects of titanium dioxide with varying crystallite sizes following repeated oral administration in F344 rats. The 64th Annual Meeting of Society of Toxicology. 2025年3月19日, Orlando, FL, 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

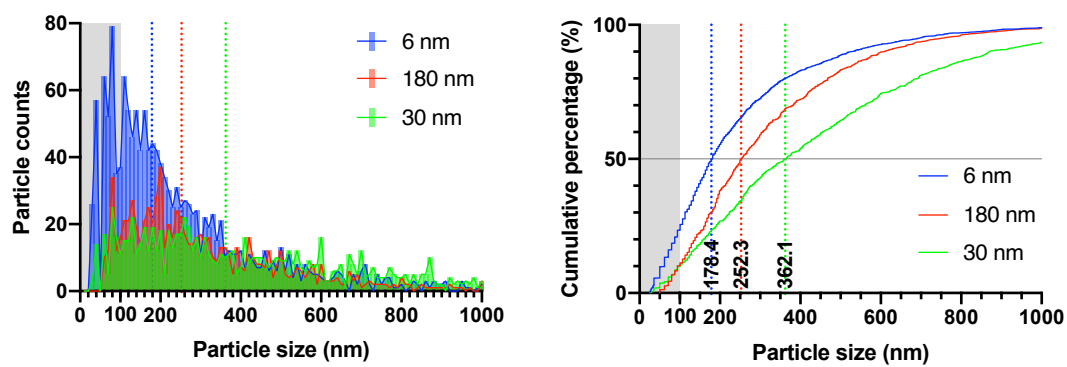
2. 実用新案登録

なし

3. その他

受賞

本研究の成果は第41回日本毒性病理学会総会及び学術集会において食品安全優秀発表賞 (San-Ei Gen F.F.I. Award) (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) を受賞した。



Crystalite size (nm)	Median secondary particle size (nm)	Nanoparticle ratio (%)
6	178.4	27.2
30	362.1	11.5
180	252.3	13.2

図 1. 実験に用いた二酸化チタンの二次粒子径とナノ粒子比率。

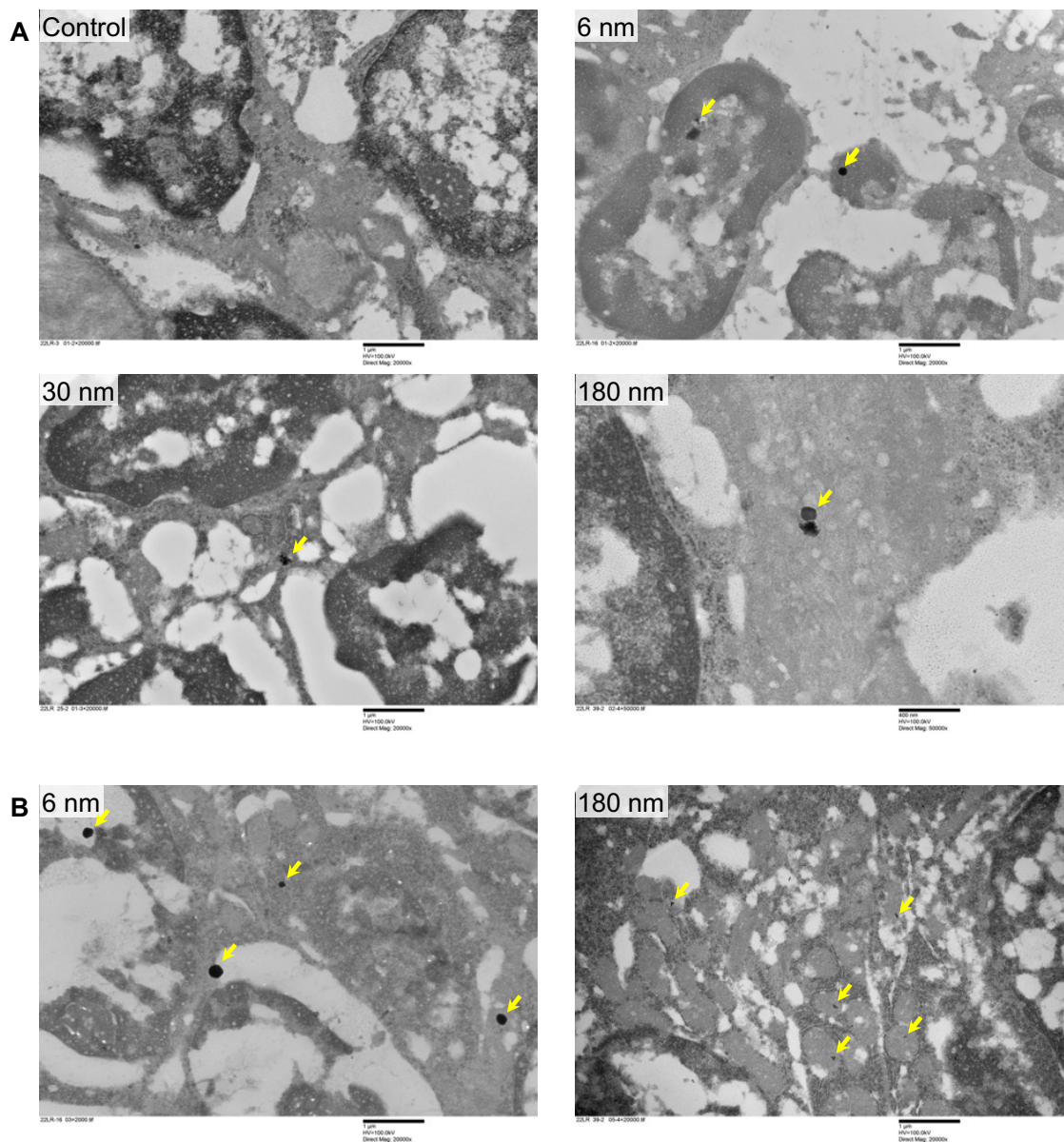


図 2. 電子顕微鏡により観察されたパイエル板(A)および小腸粘膜上皮(B)の細胞内二酸化チタンナノ粒子。黄矢印は二酸化チタン粒子を示す。

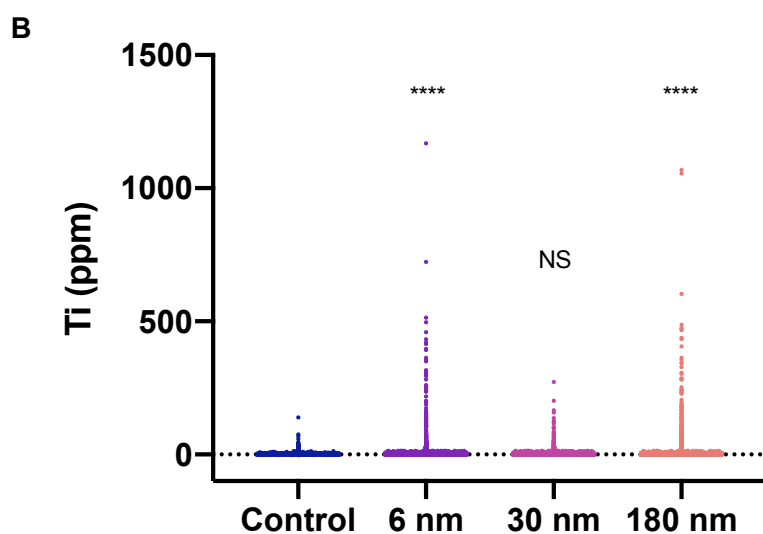
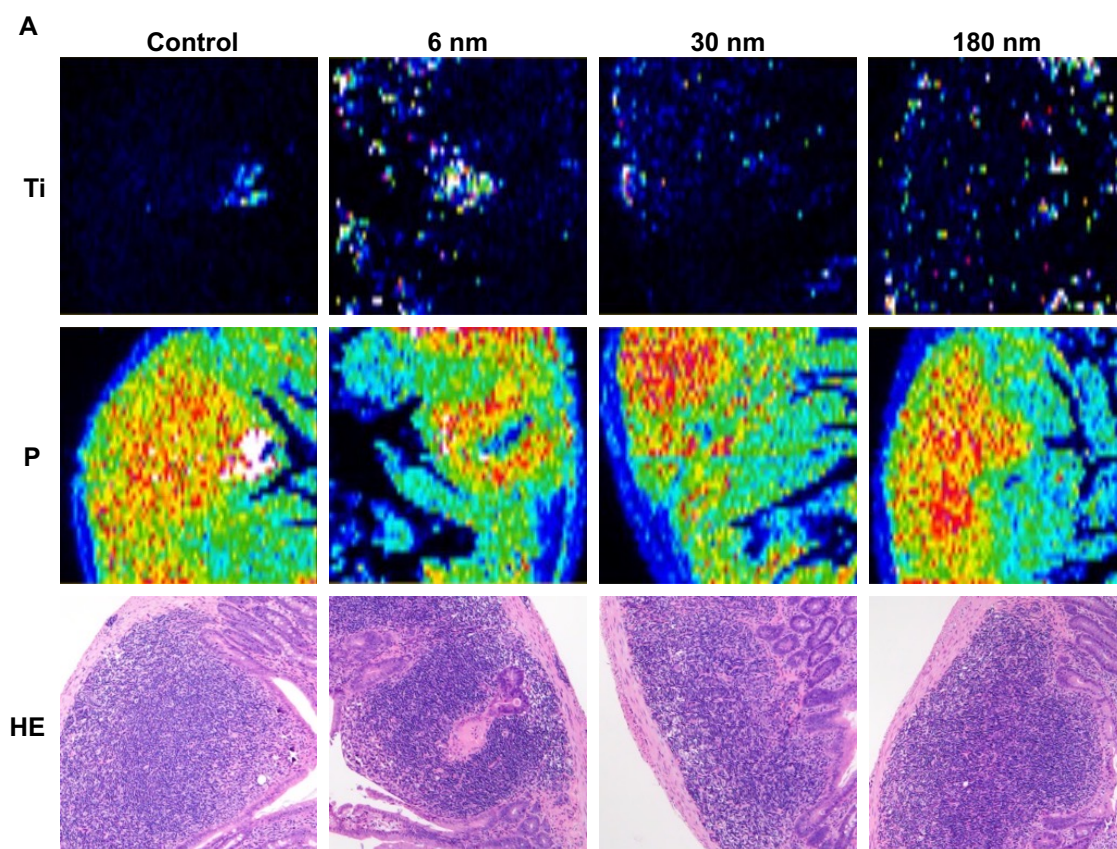
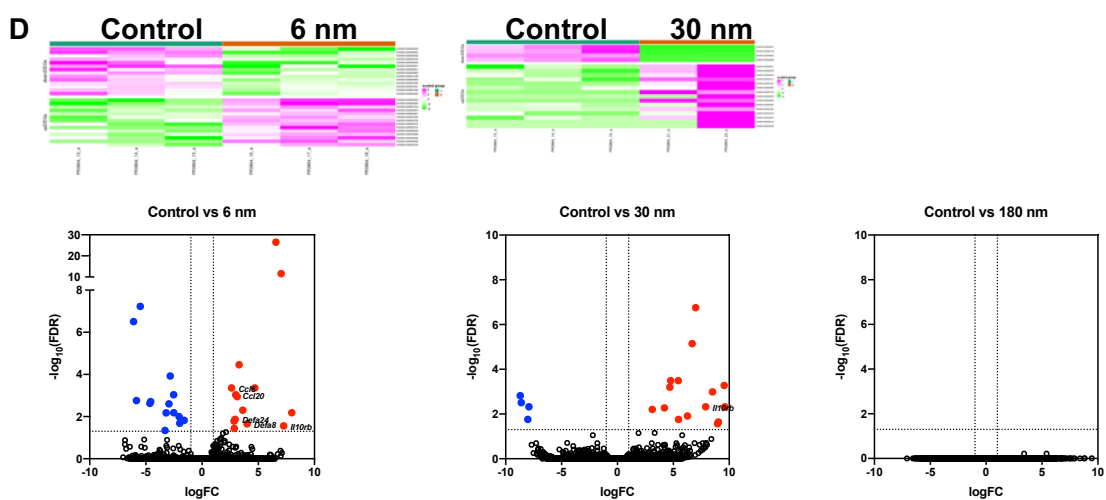
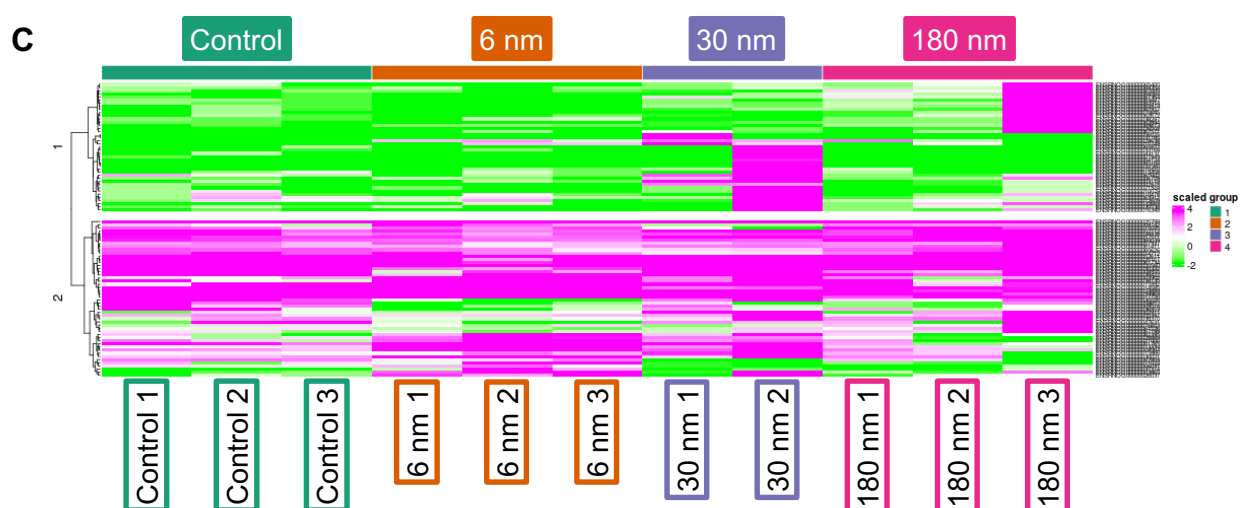
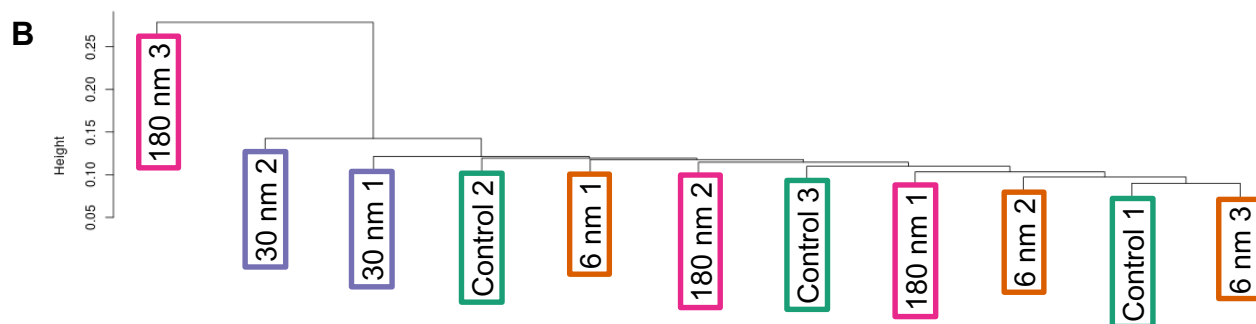
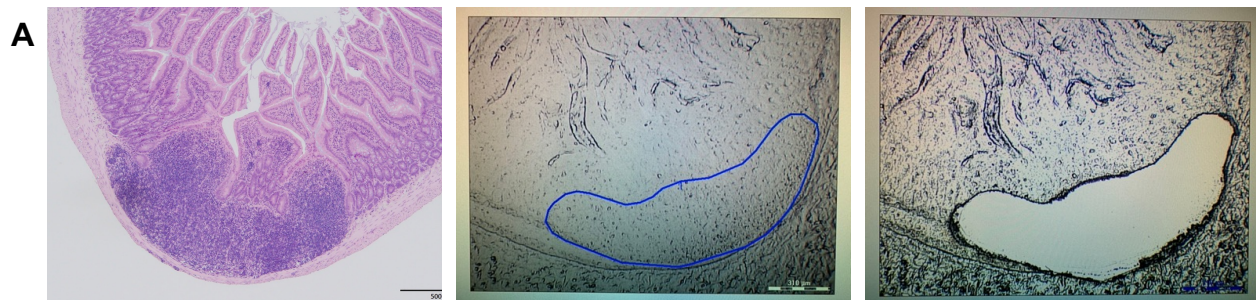


図 3. LA-ICP-MS によるパイエル板中チタン量のイメージング。(A) パイエル板における Ti および P (組織を可視化する指標) の分布、(B) Ti のシグナル強度分布。**** $P < 0.0001$, NS=有意差なし (Control との比較)。



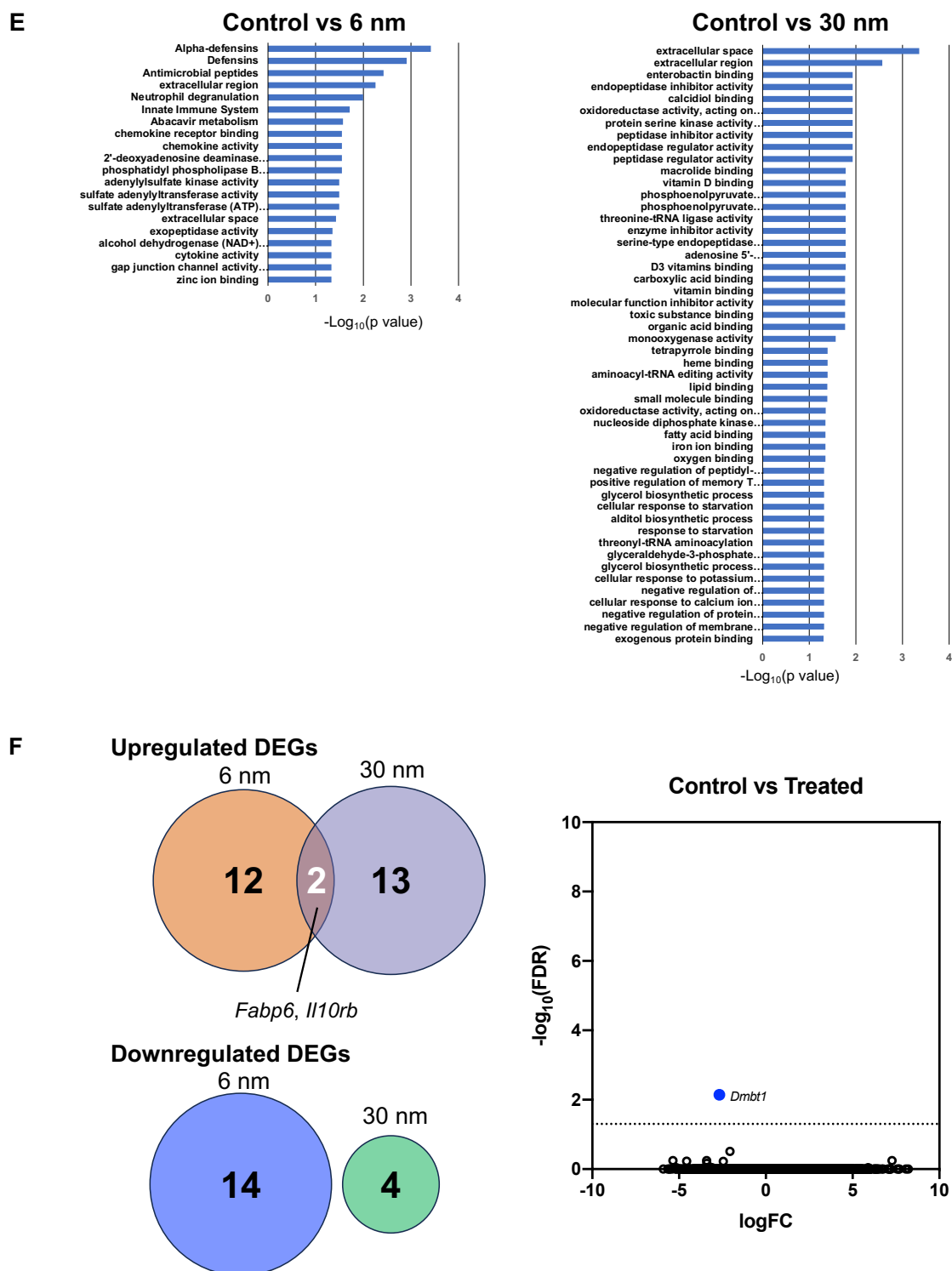


図 4. パイエル板の RNA シークエンス解析。(A) パイエル板のレーザーマイクロダイセクション、(B) 階層的クラスター分析の樹状図、(C) ヒートマップ、(D) 発現変動遺伝子解析、(E) GO 解析、(F) 二酸化チタン投与群の共通発現変動遺伝子解析。

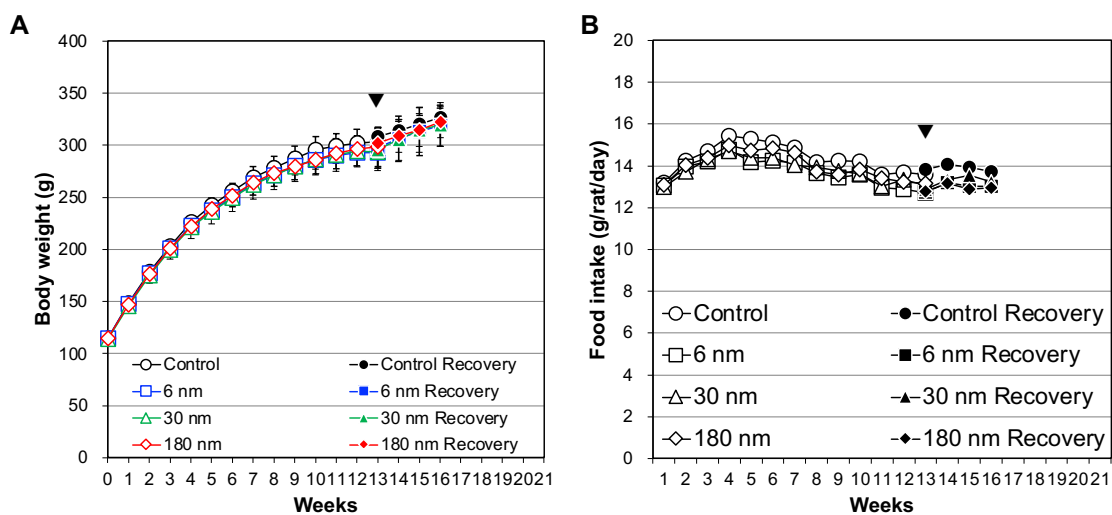


図 5. 結晶子径の異なる二酸化チタンの 90 日間反復経口投与後回復実験の経過。Recovery は休薬期間を示す。(A) 体重、(B) 摂餌量。