

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4年度 分担研究報告書

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

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

研究要旨

令和3年度までの研究で、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。

A. 研究目的

酸化チタン (TiO₂) は産業界で最も多く製造されているナノ材料の一つである。TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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

(TiO₂)-, 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 TiO₂ (AEROXIDER TiO₂ 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 TiO₂ (投与液中の 50 パーセントイル粒子径 (D₅₀) = 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 TiO₂ (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、昨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する。

B. 研究方法

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。

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. 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。

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。

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、オリエンタル酔

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。

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。

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・エオジン染色標本作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

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)。

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。

C. 研究結果

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。

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 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られ、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. 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 1)。

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 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

いずれも有意な変化は見られなかった (Table 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 4)。

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 2)。肺において、黄褐色粒子を含む肺泡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 5)。

D. 考察

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 LYMPH 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、いずれも偶発性的な変化であり毒性学的意義はないと判断した。

E. 結論

結晶子径 6、30、および 180 nm の TiO₂ を 1000 mg/kg bw/day の用量で F344/DuCrIj 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。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

4. 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.

F.2 学会発表

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
18. 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.

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

Table 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 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. Serum biochemistry of F344/DuCrIcrIj 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 4. Organ weights 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 [†]
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 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. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared with the control group.

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

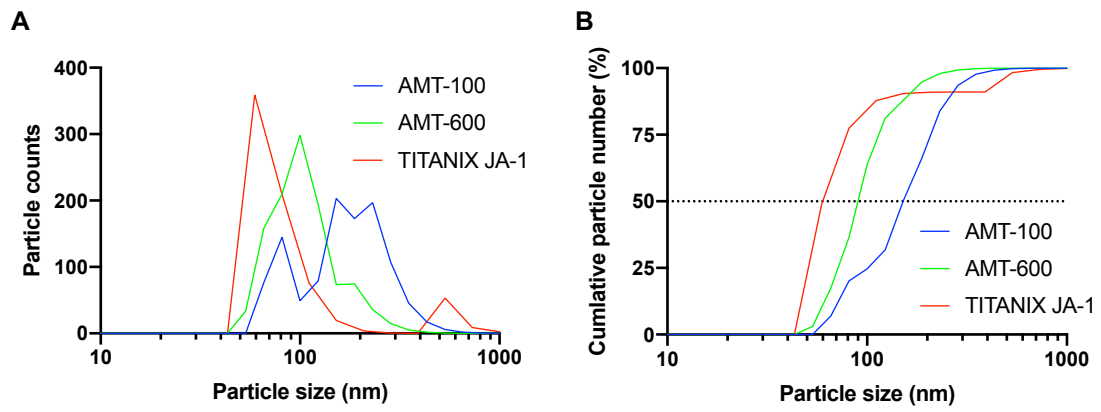


Figure 1. Particle size distribution of AMT-100, AMT-600, TITANIX JA-1 in the dosing suspension.

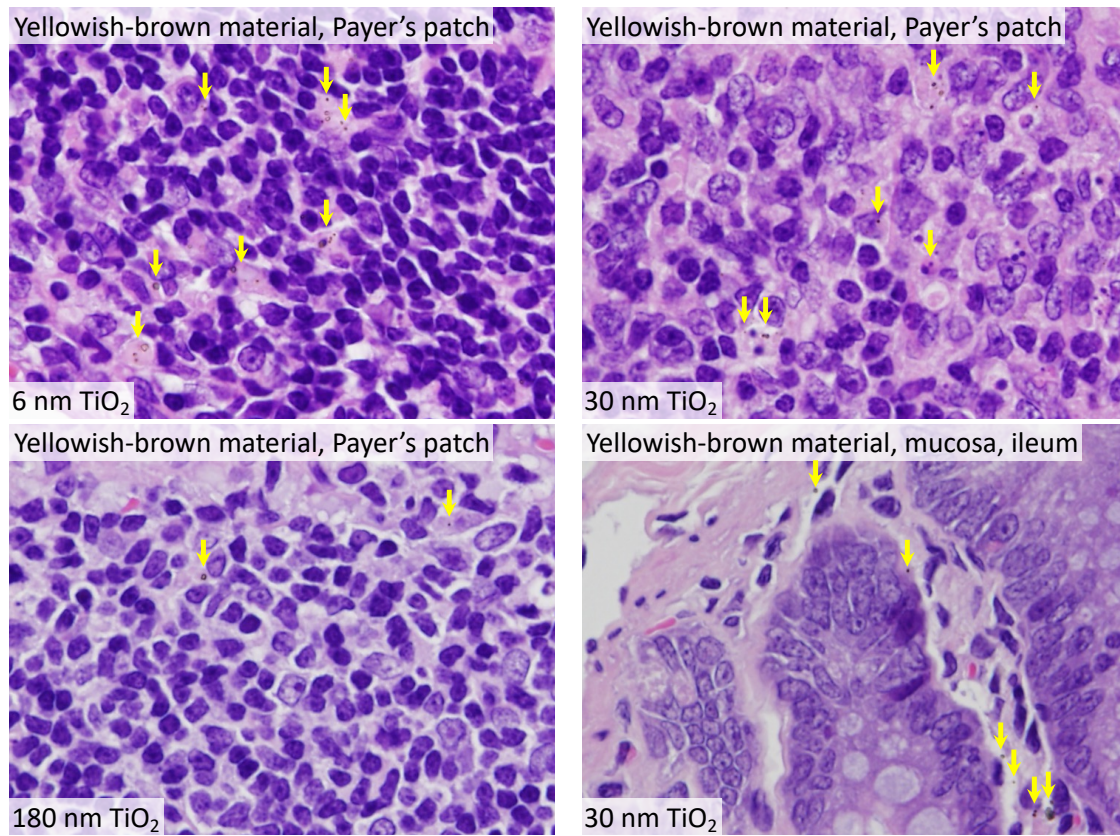


Figure 2. Deposition of yellowish-brown material in the small intestine of rats administrated with titanium dioxide for 90 days.