

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)
分担研究報告書(令和3年度)

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

0.2%リン酸水素二ナトリウムに懸濁した結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ酸化チタン (TiO_2) を F344/DuCrj ラット雌雄 (1群5匹) に 10、100、1000 mg/kg bw/day の用量で 28 日間反復経口投与した亜急性毒性試験について、昨年度に引き続き病理組織学的検査及び肝臓、腎臓及び脾臓中の Ti 濃度定量を実施した。その結果、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた TG の有意な増加の他に、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から、28 日間投与における無毒性量 (NOAEL) は 1000 mg/kg bw/day と結論した。また、28 日試験の臓器における Ti 量については、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で肝臓中 Ti 量の有意な増加が見られたが、極めて微量であった。また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。以上の結果より 90 日間反復投与毒性試験の投与量を 100、300、1000 mg/kg bw/day と設定し、F344/DuCrj ラット雌雄 (1群10匹) に 90 日間の強制経口投与を行った。投与期間中は一般状態、体重変化、摂餌量を観察し、投与 13 週目に尿検査、投与終了時は血液検査、血液生化学検査、臓器重量測定、病理組織学的検査、および肝臓、腎臓及び脾臓中の Ti 量測定を行った。その結果、全ての群で死亡および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。臓器重量では、雌雄ともに相対および絶対重量の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。血液生化学検査では雄の 300、1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な低下が見られたが、脂質代謝異常や肝機能障害に関連するその他の所見は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。病理組織学的検査では投与物質と考えられる黄褐色物質が頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺 (BALT)、気管 (上皮下) 及び回腸 (パイエル板) にみられたが、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。以上より、結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO_2 (D_{50} = 約 200 nm) を F344/DuCrj ラット雌雄に 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。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 TiO_2 が微量ながら取り込まれることが示唆された。一方、28 日間投与と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 TiO_2 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。

キーワード: ナノサイズ TiO_2 、亜急性毒性、亜慢性毒性

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, KRISS 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 パーセントアル粒子径 (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、昨年度は一次粒子径 6 nm のアナターゼ型 TiO₂ (D₅₀ = 約 200 nm) をラットに 28 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。今年度は引き続き、病理組織学的検査および主要臓器 (肝臓、腎臓、脾臓) の Ti 濃度定量を実施して 28 日間投与における無毒性量 (NOAEL) を判断するとともに、90 日間の反復投与毒性試験を実施して生体への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。

B. 研究方法

1. 28 日間反復投与毒性試験

1-1. 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。

1-2. 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。

2. 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。

(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. 28 日間反復投与毒性試験

1-1. 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 1A)。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 1B)。この他、種々の組織変化がみられたが、いずれも偶発性的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)。

1-2. 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 $0.033 \mu\text{g}$ 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 2)。

2. 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 3)。

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)。

2-3. 血液学的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 3)。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 4)。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 5)。

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 6) 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 4)。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 7)。

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 5)。

D. 考察

昨年度に引き続き、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 10、100、1000 mg/kg

bw/day の用量で投与した 28 日間反復投与毒性試験について検討したところ、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。

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）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 TiO_2 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 TiO_2 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。

E. 結論

結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO_2 (D_{50} = 約 200 nm) を F344/DuCrj ラット雌雄に 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 TiO_2 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン(IV)の28日間反復経口投与毒性試験. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 第38回日本毒性病理学会学術集会 2022年1月27日~28日 神戸国際会議場.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

Dose (mg/kg bw/day)		Male		Female	
		0	1000	0	1000
No. of animals		5	5	5	5
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
	Hemorrhage, alveoli, focal (minimal)	1	0	0	0
Tongue	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.

Table 2. 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 3. 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 4. 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 5. 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 6. 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 7-1 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg) :	0	100	300	1000
Findings	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 7-2 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 7-3 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 7-4 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose (mg/kg):	0	100	300	1000
	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

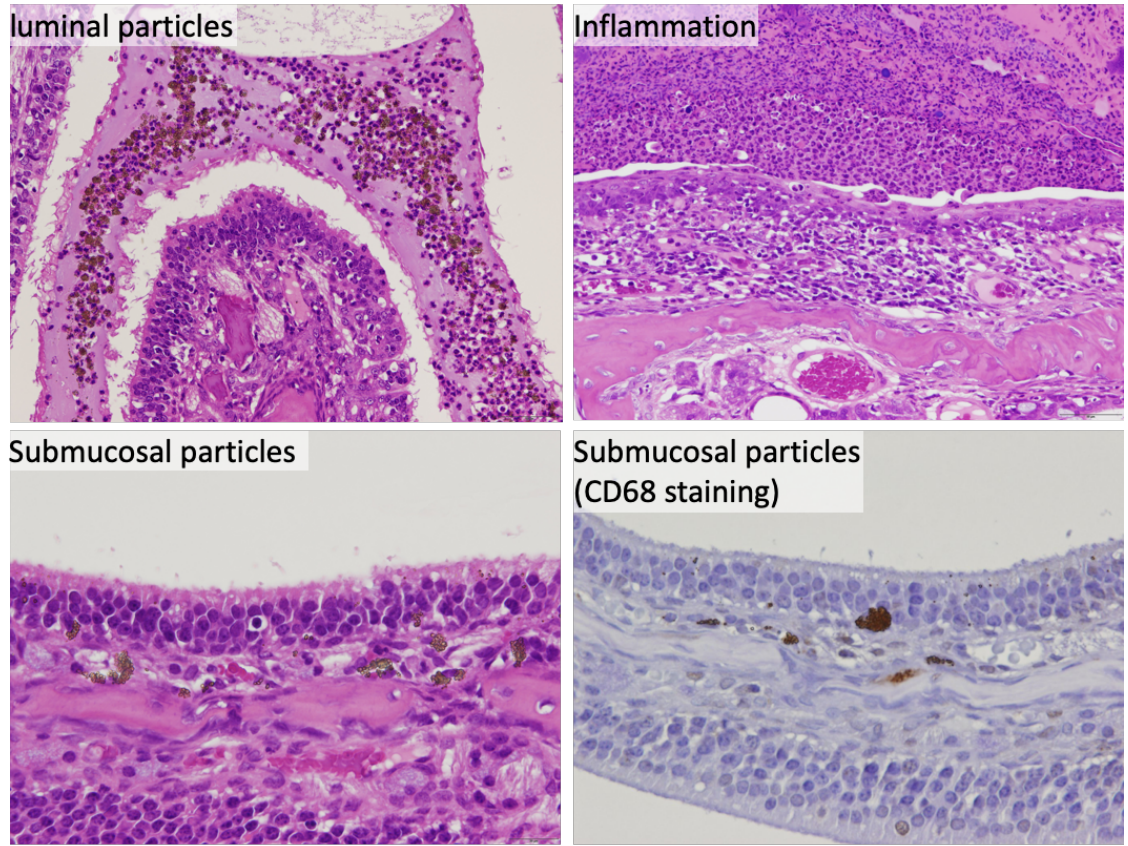
Table 7-5 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

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

M : Male

No statistically significant difference

A. Nasal cavity



B. Gastrointestinal tract

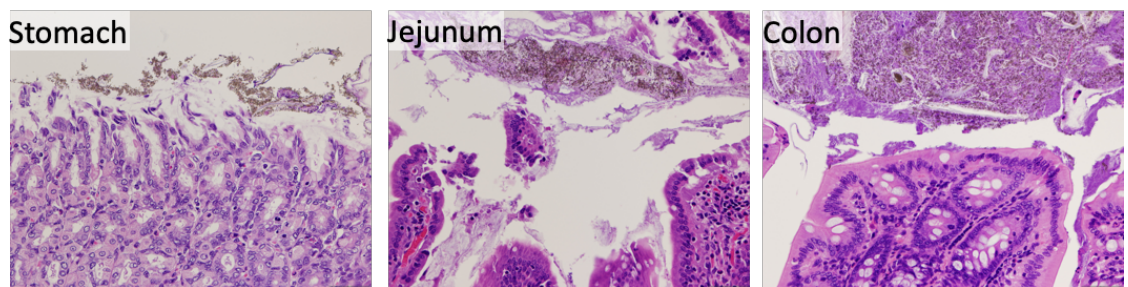


Figure 1. Representative images of yellowish brown materials found at submucosa of nasal cavity (**A**) and gastrointestinal tract (**B**) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 4 weeks.

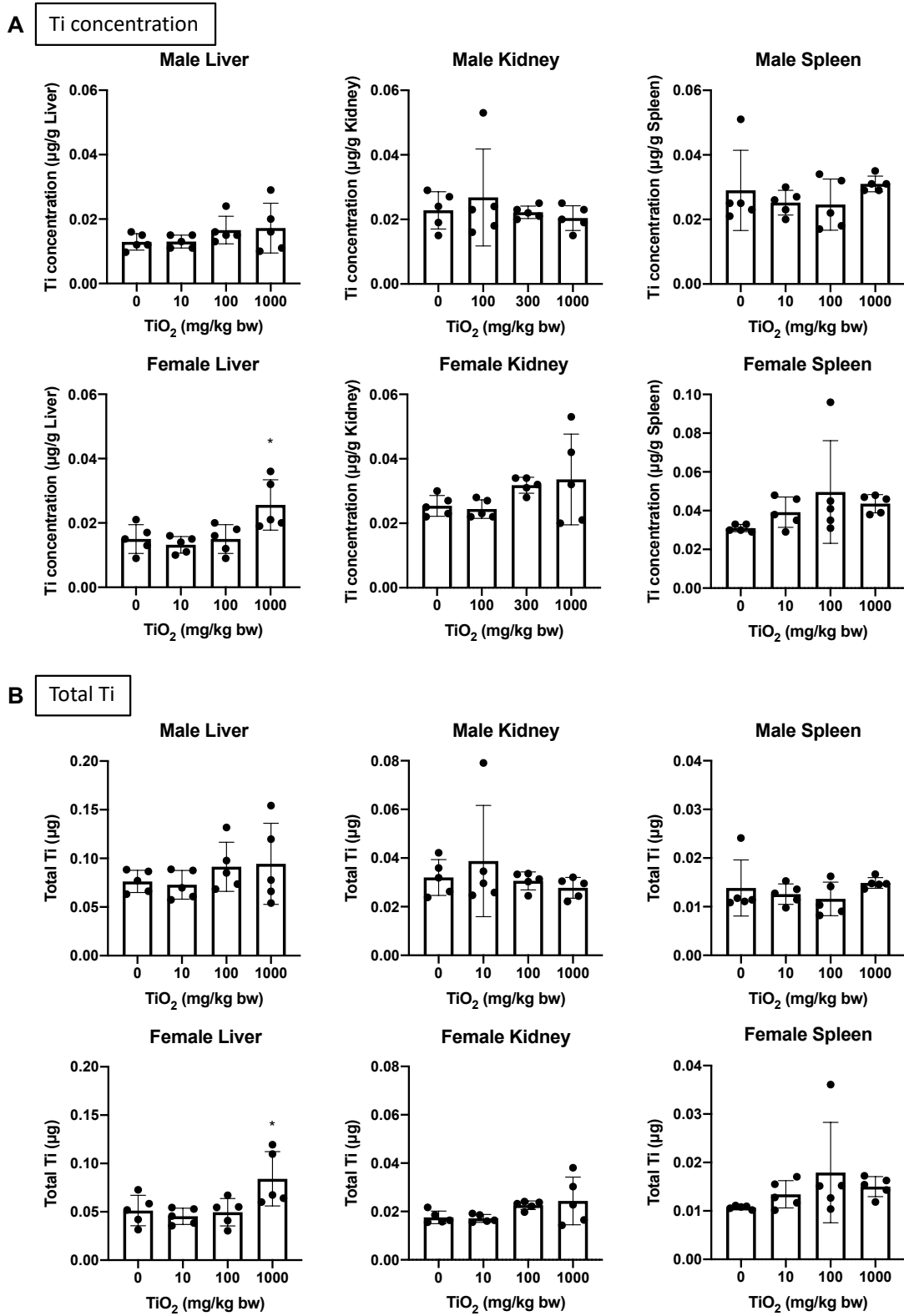
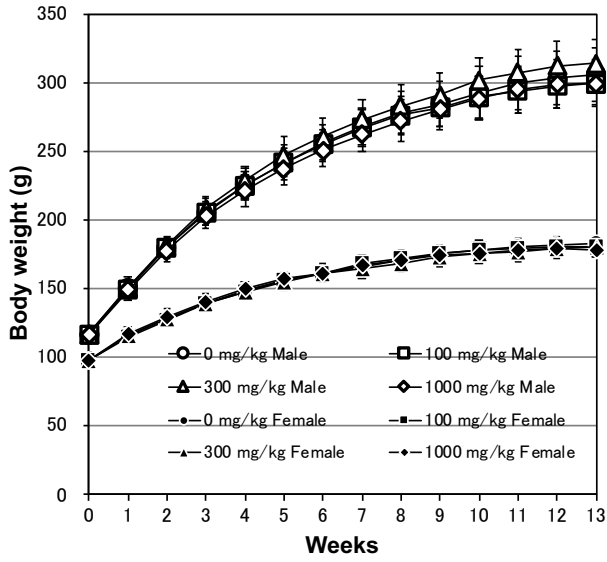


Figure 2.

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.

A 体重



B 摂餌量

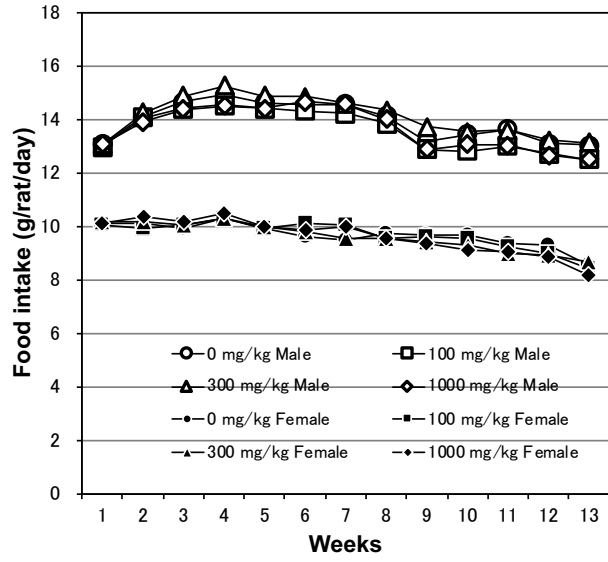


Figure 3. Body weight (A) and daily food intake (B) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

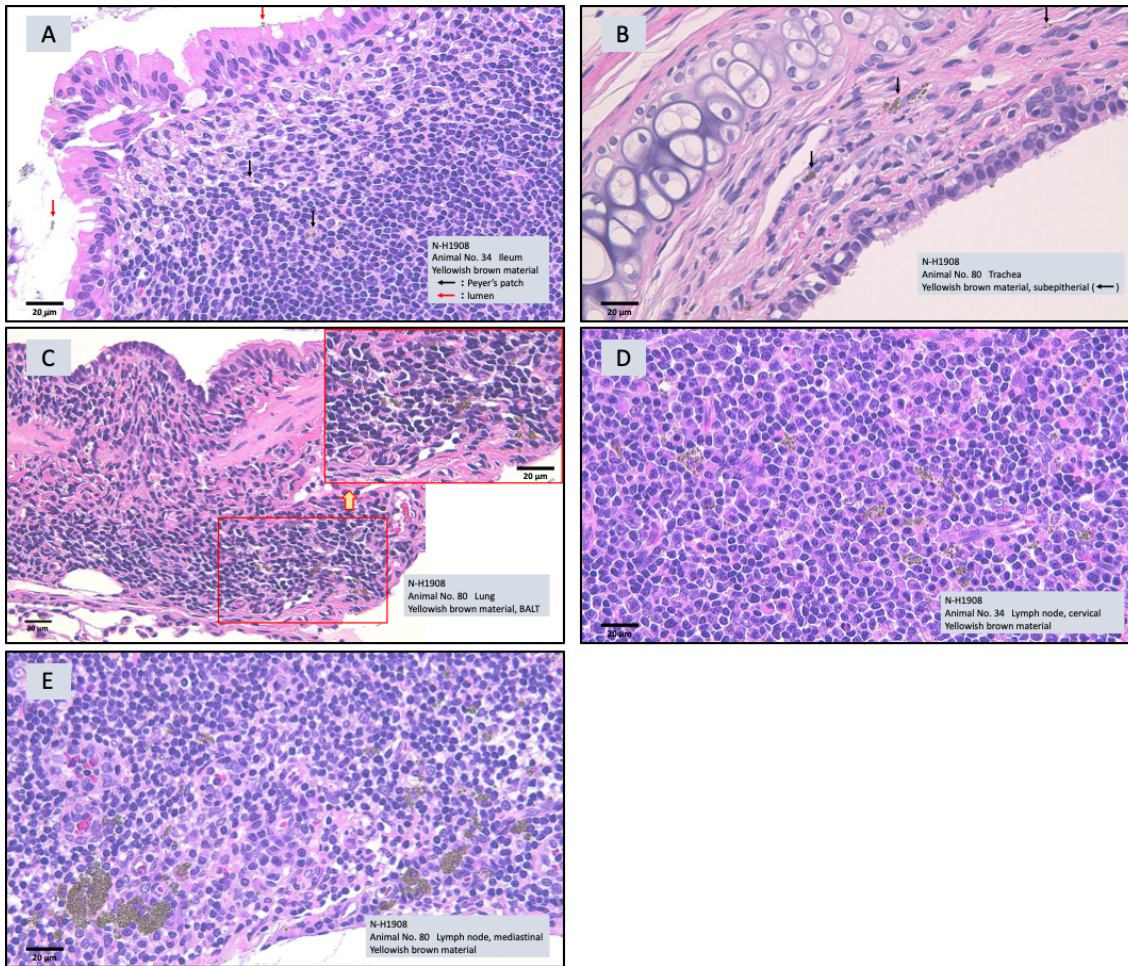


Figure 4. Representative images of yellowish brown materials found at ileum (A), trachea (B), lung (C), cervical lymph node (D), and mediastinal lymph node (E) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

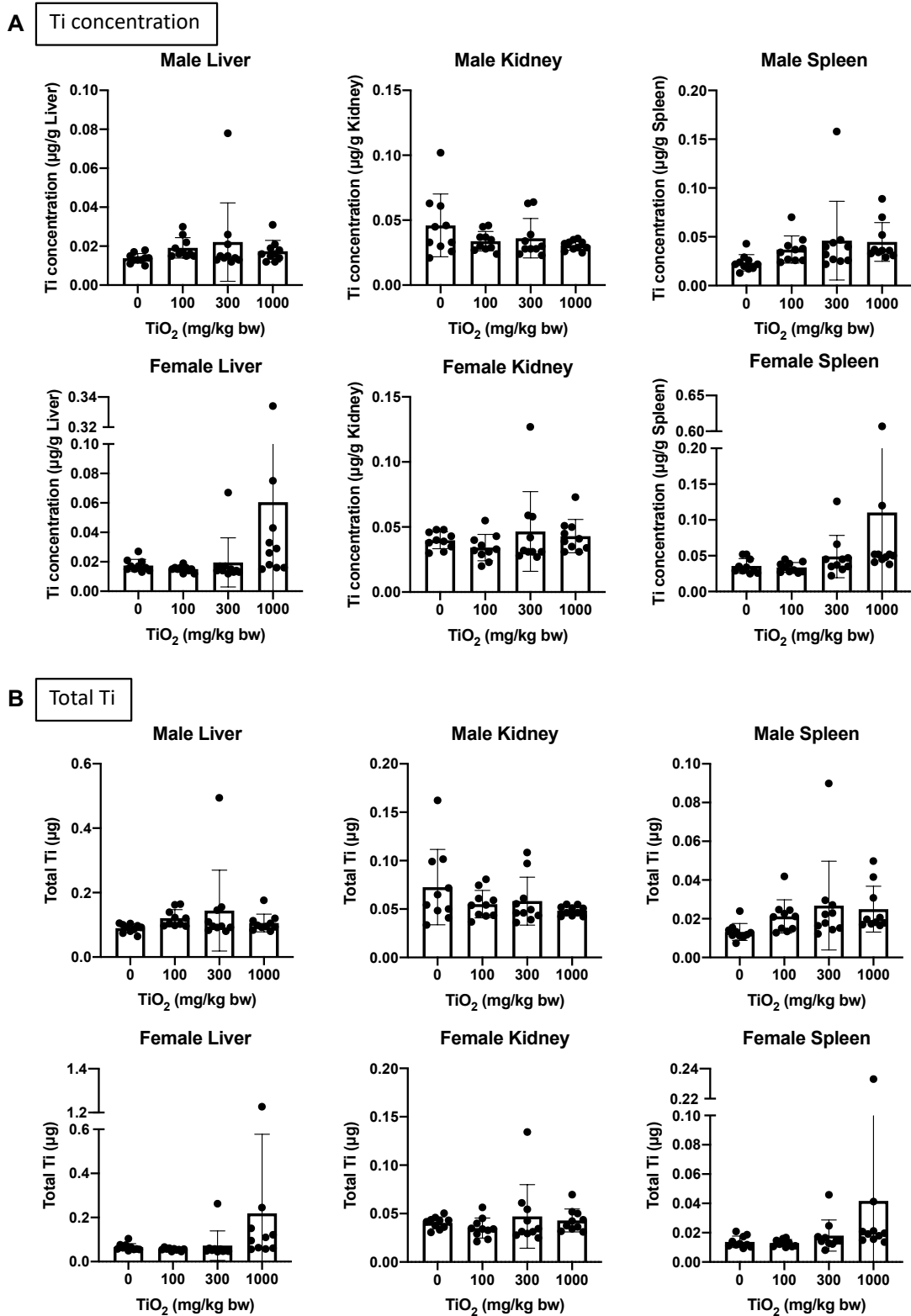


Figure 5. Titanium concentration (A) and total titanium (B) of the liver, kidney, and spleen of male and female F344/DuCrj rats administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.