

種々の暴露経路による二酸化チタンの体内分布及び毒性

Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide
after various routes of exposure

江馬 眞¹、小林憲弘¹、納屋聖人¹、花井莊輔¹、中西準子¹

¹独立行政法人 産業技術総合研究所 安全科学研究部門/〒305-8569 つくば市小野川16-1

**Makoto EMA¹, Norihiro KOBAYASHI¹, Masato NAYA¹, Sosuke HANAI¹
and Junko NAKANISHI¹**

Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology (AIST)/16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

ABSTRACT

This paper reviews studies on tissue distribution and toxicity after various routes of exposure to titanium dioxide (TiO₂), widely used in the production of paints, paper and plastics, as food additives and colorants, and increasingly, as nanoparticles in pharmaceutical and cosmetics products, based on data published in openly available scientific literature. Titanium (Ti) was detected in the lung and mediastinal lymph nodes, but not in the liver, kidney, spleen or basal brain with olfactory bulb, in rats that inhaled nano TiO₂. Accumulation of TiO₂ particles was observed in the brain, especially the olfactory bulb and hippocampus, after intranasal instillation of nano and fine TiO₂ in mice. After dermal application of ultrafine and fine TiO₂ in human volunteers, rabbits and pigs, deposition of Ti was observed in the stratum corneum and hair follicles, but not in the dermis. One report showed the accumulation of Ti in the spleen, heart, liver, lung and brain and histopathological changes in these tissues in mice that received dermal application of nano TiO₂. However, there are serious concerns about this report due to the housing conditions of animals, which might have negatively impacted the experimental results. After oral administration of nano and fine TiO₂ to mice, accumulation of Ti in the liver, kidney, spleen and kidney and histopathological changes in these organs and hippocampus were found. Although this review provides initial information on tissue distribution and toxicity after various routes of exposure to TiO₂, further studies using characterized materials, relevant route of exposure, and dose closely reflecting actual levels of exposure are required.

Key words: Titanium dioxide, Nanomaterials, Tissue distribution, Toxicity, Inhalation, Oral administration, Dermal application, Intranasal instillation, Injection

1. はじめに

二酸化チタン (TiO₂: Titanium dioxide) は鉱物の一種であり、酸化チタン (IV) あるいは単に酸化チタンと呼ばれる。白色の塗料、絵具、釉薬等に顔料として使用され、白チタンとも言われる無機化合物である。結晶構造としてはアナターゼ型とルチル型等があり、アナターゼ型は一般的に光触媒としての活性が強く、ルチル型は触媒としての活性が低く熱安定性等に優れており塗料の顔料として用いられている。最近注目されているナノサイズ(ウルトラファイン)の TiO₂ 粒子は、顔料グレード (ファインあるいはミクロンサイズ) の TiO₂ 粒子と比べて重量当たりの表面積が大きく、光触媒活性が顔料グレードの TiO₂ より強いことから機能性材料として、最近ではビルの外装や空気清浄機等にも使用されている。また、光吸収、散乱性についても特性を有しており、可視光の散乱性が低く透明感をもたらすことから化粧品として、紫外線のうち、特に UV-B を吸収し、UV-A 短波を反射することから日焼け防止剤としても用いられている。2006 年の TiO₂ の国内生産量は約 24 万トン (化学工業日報社、2009) であり、ナノサイズ TiO₂ の国生産要量は 950 トンと推計されている (経済産業省、2009)。最近の報告では、ナノサイズ TiO₂ の世界の生産量は年間 5000-64000 トンであり、米国での生産量は年間 40000 トンと見積もられ、新用途への展開が期待されることから、今後さらに需要が増大することが予測される (Robichaud *et al*, 2009)。

チタン (Ti) の濃度は都市大気で 0.1 μg/m³ より低く、飲水で 0.5-1.5 μg/L、ヒト尿では 10 μg/L であり、ヒトの食事経由の Ti 摂取は 300-400 μg/day と報告されている (IPCS, 1982)。わが国における平成 16 年度における TiO₂ の食品着色料としての摂取量は 0.074 mg/day と推定されている (日本食品添加物協会、2008)。また、ナノ TiO₂ の環境中の予測濃度は大気で 0.0015-0.042 μg/m³、水で 0.7-16 μ

g/L、土壌で 0.44.8 μg/kg と見積もられている (Mueller and Nowack, 2008)。

ナノサイズの TiO₂ 粒子の安全性に関して、粒子サイズが小さく重量当たりの表面積が大きいことから生体との相互作用が増加し、顔料グレードの TiO₂ 粒子に比べて反応性が高い可能性等が示唆されている (Donaldson *et al*, 2001; Oberdöster *et al*, 2005)。しかしながら、ナノサイズを含めて TiO₂ の安全性については十分に評価されていない。

ナノTiO₂ 粒子の生態影響に関しては、ENRHES (2009) 及び Kahru and Dubourguier (2010) にまとめられている。

ヒト健康影響については、TiO₂、カーボン・ブラック、ディーゼル排出微粒子等の難溶性粒子の高濃度の暴露により吸引された粒子は長期に残留するため、それらの吸入部位における発がん性が懸念されている。国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) は TiO₂ の発がん性について、グループ 3 (ヒトに対する発がん性が分類できない) に分類していたが、2006 年 6 月に IARC 作業グループは、顔料グレード及びウルトラファイン TiO₂ に関する吸入及び気管内注入による動物実験の結果は、動物における TiO₂ の発がん性を示す証拠として十分であると結論し、分類をグループ 2B (ヒトに対する発がん性が疑われる) に変更した (IARC, 2010)。ナノサイズも含めて、TiO₂ の発がん性試験の結果 (江馬ら、2010) 及び発がん性のスクリーニングとして試験され、ヒトにおける発がん性を予測するために行われている遺伝毒性 (江馬ら、2009)、また生殖発生毒性 (Ema *et al*, 2010) についてはすでに整理して報告した。化学物質の安全性評価を行う上で化学物質が体内に吸収されるか否か、吸収された場合の化学物質の体内分布を調べることは、化学物質の毒性発現に関して重要な情報をもたらす。そこで、本稿では種々の経路により動物に暴露した TiO₂ の体内分布及

びそのときの毒性についてナノサイズも含めて、公表されている科学論文を収集整理してまとめた。

2. 吸入暴露 (TABLE 1)

脱イオン水に 0.5% に懸濁したナノ TiO₂ (アナターゼ型 70% 及びルチル型 30%、表面無修飾、サイズ：20-33 nm、BET表面積：48.6 m²/g) 88 mg/m³ [Heinrich *et al.* (1995) の発がん性試験の陽性反応濃度の 10 倍]、または顔料グレード TiO₂ (ルチル型、純度：99.4%、粒

子サイズ中央値：200 nm、BET表面積：6 m²/g、KRONOS International) 274 mg/m³ [Lee *et al.* (1985) の発がん性試験で重篤な影響濃度] を 7 週齢の雄 Wistar ラット [CrI:WI (Han)] に 5 日間連続 (6 時間/日) 頭部一鼻部吸入暴露を行った (van Revenzwaay *et al.*, 2009)。最終暴露の直後及び 14 日後に 3 匹/群の暴露ラットの肺、縦隔リンパ節、腎臓、脾臓及び脳を採取し、Ti レベルを誘導結合プラズマ原子発光分析 (ICP-AES) により測定した。ナノ及び顔料グレード TiO₂ の最終暴露直後及び 14 日後の

TABLE 1. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after inhalation or intranasal instillation.

Exposure method	Animals	Materials/ Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References
			Duration /Frequency	Concentrations /doses ^a			
Inhalation (Head-nose)	Wistar rats (male)	Nano TiO ₂ (70% anatase and 30% rutile, no surface coating, 20-30 nm in size, 48.6 m ² /g in BET surface area)	5 consecutive days (6 h/day)	88 mg/m ³	Immediately after last inhalation and after 14 days recovery	Detection of Ti in lung and mediastinal lymph nodes. No detection of Ti in liver, kidney, spleen or basal brain with olfactory bulb. Mild neutrophilic inflammation and activated macrophages in BALF and/or lung.	van Ravenzwaay <i>et al.</i> , 2009
		Pigmentary TiO ₂ (rutile, 200 nm in median particle size, 6 m ² /g in BET surface area, 99.4 % pure, KRONOS International)		274 mg/m ³			
Inhalation	C57BL/6 BomTac	UV-titan L181 (rutile modified with Zr, Si, Al and coated with polyalcohol, 20.6 nm in average size, 107.7 m ² /g in surface area, Kemira)	Gestational days 8-18 (1 h/day)	43 mg/m ³	5 and 26-27 days after exposure	Detection of Ti in lung of dams. No detection of Ti in liver of dams or stomach milk of offspring. Inflammation in lung of dams. Moderate neurobehavioral alterations in offspring.	Hougaard <i>et al.</i> , 2010
Intranasal instillation	CD-1 (ICR) mice	Nano TiO ₂ (rutile, 21 nm in average size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	Daily 5 instillation and once every other day	Daily 25 µg/mouse + 10 µg/mouse/day (every other day)	One month after instillation	Accumulation of TiO ₂ particles in olfactory nerve layer, olfactory bulb and granular cell layer of olfactory bulb.	Wang <i>et al.</i> , 2007a
		Nano TiO ₂ (rutile, 71 nm in average size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)					
		Fine TiO ₂ (anatase, 155 nm in average size, Zhonglian Chemical Medicine Co.)				Accumulation of TiO ₂ particles in olfactory nerve layer, olfactory bulb and granular cell layer of olfactory bulb. Wider distribution area of 155 nm TiO ₂ .	
	CD-1 (ICR) mice (female)	Nano TiO ₂ (rutile, no surface coating, 71 nm in average size, 23 m ² /g in surface area, > 99% pure, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	15 instillations (every other day)	500 µg/mouse/day	24 h after last instillation	Major target sites for Ti : hippocampus and olfactory bulb. Detection of Ti in cerebellum and cerebral cortex. Histopathological changes in hippocampus. Oxidative stress in brain.	Wang <i>et al.</i> , 2008a
	Fine TiO ₂ (anatase, no surface coating, 155 nm in average size, 10 m ² /g in surface area, > 99% pure, Zhonglian Chemical Medicine Co.)						
	Nano TiO ₂ (rutile, no surface coating, 71 nm in average size, 23 m ² /g in surface area, > 99% pure, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	1, 5, 10, 15 instillations (every other day)		One day after 1, 5, 10 and 15 times for instillation	Detection of Ti in olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex and cerebellum at any time point. Histopathological changes in hippocampus, olfactory bulb and kidney.	Wang <i>et al.</i> , 2008b	
	Fine TiO ₂ (anatase, no surface coating, 155 nm in average size, 10 m ² /g in surface area, > 99% pure, Zhonglian Chemical Medicine Co.)	Max. 15 instillations (every other day)			Detection of Ti in olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex and cerebellum at any time point. Histopathological changes in hippocampus, olfactory bulb and kidney. Increased levels of IL-1β and TNF-α.		

^a : Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

肝臓、腎臓、脾臓及び嗅球を含む脳における Ti レベルは検出限界 (LOD: TiO₂として0.5 μ g/tissue sample) 以下であった。肺及び縦隔リンパ節で Ti が検出された。ナノ TiO₂ 暴露後に TiO₂ として、肺では暴露直後に 2025 μ g、14 日後に 1547 μ g、縦隔リンパ節では暴露直後に 2.2 μ g、14 日後に 8.5 μ g が検出された。また、顔料グレード TiO₂ 暴露後に TiO₂ として、肺では暴露直後に 9182 μ g、14 日後に 7257 μ g、縦隔リンパ節では暴露直後に 8.2 μ g、14 日後に 108 μ g が検出された。ナノ及び顔料グレード TiO₂ ともに最終投与直後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の多形核白血球の増加及び肺に病理組織学的中等度の好中球性炎症がみられたが、14 日後にはこれらは回復傾向にあった。ナノ TiO₂ 暴露後の回復傾向は顔料グレード TiO₂ に比べて強かった。

C57BL/6BomTac マウス (22-23 匹/群) の妊娠 8-18 日の 1 日 1 時間、42 mg/m³ (デンマークの 8 時間加重平均職業暴露限界に相当) の UV-titan L181 (ルチル型: Zr, Si 及び Al 処理、ポリアルコール表面修飾、TiO₂: 70.8%, Zr: 8.7%, Si: 5.6%, Al: 2.4%, Na: 0.5%, 揮発物質: 5.2%, X 線解析平均サイズ: 20.6 nm、比表面積: 107.7 m²/g、Kemira) を吸入暴露した (Hougaard *et al.*, 2010)。Ti 濃度を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により測定した (LOD: Ti として 0.25-5 μ g/g) と、暴露後 5 及び 26-27 日の母動物 (F₀) の肺でそれぞれ 38 及び 33mg/kg の Ti が検出されたが、F₀ 及び子動物 (F₁) の肝臓、F₁ の胃内の母乳中には Ti は検出されなかった。TiO₂ 暴露群における F₀ の肺絶対及び相対重量、BALF 中の好中球数及びリンパ球数は増加し、マクロファージ数は減少していた。親 F₀/子 F₁ の生殖発生毒性の指標には TiO₂ 暴露の影響はみられなかった。11-16 週齢 F₁ のモリス水迷路試験では TiO₂ 暴露の影響は認められなかったが、TiO₂ 暴露群の F₁ において、14 週齢でのオープンフィールド

試験で雄の中央部への侵入頻度及び雌の中央部での滞在時間の減少がみられ、4 か月齢での音響驚愕反応試験で雌に強いプレパルス抑制がみられた。生後 19 週の TiO₂ 暴露群の雄 F₁ を無処置の雌 C57BL マウスと交配したところ、初回 F₂ 児出産までの日数が延長する傾向がみられた。

これらの実験結果は、妊娠マウスの肺に炎症反応がみられる濃度を吸入暴露したとき児の行動及び生殖に変化が惹起される可能性を示しているが、吸入暴露されたナノ及び顔料グレード TiO₂ は胸腔外の組織には移行しないことを示唆している。

3. 鼻腔内注入 (TABLE 1)

ナノ TiO₂ (ルチル型、サイズ: 21 または 71 nm、Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.) またはファイン TiO₂ (アナターゼ型、サイズ: 155 nm、Zhonglian Chemical Medicine Co.) を蒸留水に懸濁し、5 匹/群の CD-1 (ICR) マウスに 25 μ g /mouse/day を 5 日間毎日、その後 10 μ g /mouse/day を隔日に鼻腔内注入した (Wang *et al.*, 2007a)。1 カ月後のマウス嗅球切片を用いて、TiO₂ 分布をシンクロトロン放射 X 線蛍光により測定した。ナノ及びファイン TiO₂ とも嗅球神経線維層、嗅球室及び顆粒細胞層に分布していた。ファイン TiO₂ ではナノ TiO₂ に比べて嗅球に移行しやすく、より広範な分布がみられた。

ナノ TiO₂ (ルチル型、表面無修飾、平均サイズ: 71 nm、表面積: 23 m²/g、純度: > 99%、Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.) またはファイン TiO₂ (アナターゼ型、純度: > 99%、平均サイズ: 155 nm、表面積: 10 m²/g、Zhonglian Chemical Medicine Co.) の 500 μ g /mouse/day (Tiとして300 μ g /mouse/day) を 6 匹/群の雌 CD-1 (ICR) マウスに、隔日に、15回鼻腔内注入した (Wang *et al.*, 2008a)。TiO₂ は MilliQ 水に懸濁し、15-20 分間超音波処理し、2-3 分間攪拌後、マウスの鼻腔内に注入した。最

終注入後 24 時間に脳を採取し、ICP-MS により Ti レベルを測定した (LOD: Ti として 0.074 ng/mL)。Ti の主な標的部位は海馬及び嗅球であり、Ti レベルは海馬で最も高く (71 nm TiO₂: 約 280 ng/g、155 nm TiO₂: 約 240 ng/g)、次いで嗅球で高く (71 nm TiO₂: 約 200 ng/g、155 nm TiO₂: 約 190 ng/g)、小脳 (71 nm TiO₂: 約 130 ng/g、155 nm TiO₂: 約 170 ng/g) 及び大脳皮質 (71 nm TiO₂: 約 85 ng/g、155 nm TiO₂: 約 110 ng/g) で検出された。MilliQ 水を処置した対照群では、いずれの部位でも約 50 ng/g の Ti が検出された。TiO₂ 投与マウスでは、海馬に肥大した細長い錐体細胞、不規則錐体層が観察され、CA4 部位でグリア細胞繊維性産生タンパク質レベルの増加がみられ、全脳で脂質過酸化反応、タンパク質酸化、カタラーゼ活性上昇、グルタミン酸/一酸化窒素の過剰放出等の酸化ストレスに関連した変化がみられた。

上記の Wang *et al.* (2008a) の実験と同様のナノまたはファイン TiO₂ 500 µg /mouse/day を隔日に、1、5、10 または 15 回、6 匹/群の雌 CD-1 (ICR) マウスの鼻腔内注入し、それぞれの 1 日後 (2 日、10 日、20 日、30 日) に Ti レベルを ICP-MS により測定した (Wang *et al.*, 2008b)。いずれの TiO₂ とも、いずれの検査時点においても Ti は嗅球、海馬、大脳皮質及び小脳で検出された。嗅球中の Ti レベルは注入回数に伴って徐々に増加した。海馬中の Ti レベルは 2 日で有意に高くなり、10 日及び 20 日では Ti レベルが維持し、最終注入後に最も高くなった。大脳皮質では、Ti レベルは 10 日で有意に高くなり、30 日まで同様なレベルが保たれていた。小脳では注入回数の増加に伴って Ti レベルの上昇がみられた。腎糸球体萎縮、腎ボーマン囊腔における間質性炎症細胞の浸潤及び縮小がみられたが、心臓、肝臓及び脾臓には病理学的変化はみられなかった。脳の各部位においては Wang *et al.* (2008a) と同様な変化が観察された。ルチル型 71 nm TiO₂ の鼻腔内注入

では炎症性サイトカイン (IL-1β 及び TNF-α) レベルはわずかに上昇しただけであったが、アナターゼ型 155 nm TiO₂ 注入後の血清 IL-1β 及び脳 TNF-α レベルの有意の上昇がみられた。

これらの実験結果は、鼻腔内注入されたナノ及びファイン TiO₂ とも、嗅球を介して脳に移行し、海馬に沈着することを示しており、中枢神経系への影響はルチル型 71 nm TiO₂ よりもアナターゼ型 155 nm TiO₂ で強いことを示唆している。

4. 経皮暴露 (TABLE 2 及び TABLE 3)

ヒトボランティアによる TiO₂ の経皮暴露実験結果を TABLE 2 に示した。

皮膚手術に来院した 13 人のボランティア (平均 71 歳、白人男性 9 人及び白人女性 4 人) の皮膚損傷部位の周囲にマイクロファイン TiO₂ を 8% 含むサンスクリーンを手術の 2 日前まで、9-31 日間、朝と正午に塗布し、手術時に塗布部位の皮膚を採取した (Tan *et al.*, 1996)。サンスクリーン塗布による皮膚に対する有害影響はみられなかった。塗布群の真皮で Ti レベルが増加したが、対照群と比べて有意差はなかった。本論文には TiO₂ の性状に関する記載はなかった。

マイクロ粒子 TiO₂ (UV-Titan M 160) を含有する水/油エマルジョン・サンスクリーン (L'Oréal) 2 mg/cm² をボランティアの手のひらに 4 日間 (13 日目に 1 日 5 回、4 日目に 1 回) 塗布し、1 時間後に皮膚を採取した (Lademann *et al.*, 1999)。Ti は角質層及び毛包で検出されたが、毛包間表皮には検出されなかった。本論文には TiO₂ の性状や含量等に関する記載はなされていないが、マイクロ粒子 TiO₂ はヒトの皮膚を通過しないことが示されている。

マイクロファイン TiO₂ 分散水またはオクチルパルミテート分散液 (マイクロファイン TiO₂ 40% 含有、Tioxide specialities Ltd.) または異なったシリコン油を使用した 2 種類の水/油エマルジョン (マイクロファイン TiO₂ 5% 含有) 2

TiO₂の体内分布

TABLE 2. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after dermal application in human volunteers.

Materials / Characteristics	Exposure		Sampling /biopsy	Findings	References
	Duration /Frequency	Doses ^a			
8% Microfine TiO ₂ in sunscreen	9-31 days		2 days after last application	No significant elevation of Ti levels in dermis.	Tan <i>et al</i> , 1996
Microparticle UV-Titan M 160 (L'Oréal) in emulsion	4 days (5 times/day on days 1-3, once/day on day 4)	2 mg emulsion/cm ²	1 h after application	Detection of Ti in stratum corneum and hair follicles, but not inter follicular epidermis. No gross morphological abnormalities.	Lademann <i>et al</i> , 1999
40% Microfine TiO ₂ in octyl palmitate or water dispersion (Tioxide Specialities Ltd.)	Single (45 min)	2 µL dispersion or emulsion/cm ²	24 h after application	Detection of Ti in stratum corneum after application of dispersions in water or octyl palmitate. Deeper penetration of Ti after application of dispersion in octyl palmitate.	Bennat and Müller-Goymann, 2000
5% Microfine TiO ₂ in two types of emulsions				No penetration into skin.	
4% T805 (TiO ₂ , 20 nm in mean particle size, hydrophobically coated with trimethyloctylsilan, Degussa) in emulsion	Single (6 h)	4 mg emulsion/cm ² (160 µg TiO ₂ /cm ²) (11.2 cm ²)	6 h after application	Deposition of TiO ₂ on outmost surface of stratum corneum, but not deeper stratum corneum layer.	Pflücker <i>et al</i> , 2001; Schulz <i>et al</i> , 2002
4% Eusolex T-2000 (ultrafine TiO ₂ , 10-15 nm in mean size of primary particles, 100 nm in size of secondary aggregates, coated with Al ₂ O ₃ and SiO ₂ , Merck) in emulsion					
4% Tioveil AQ-10P (hydrophilic TiO ₂ , 100 nm in size, coated with alumina and silica, Solaveil) in emulsion					
3% T805 (approx. 20nm in diameter, coated with trimethyloctylsilan, Degussa) in emulsion	Single	3 mg emulsion/cm ² (60 µg TiO ₂ /cm ²)	5 h after application	Absence of TiO ₂ penetration into skin layers. Accumulation of TiO ₂ in upmost layer of stratum corneum.	Mavon <i>et al</i> , 2006

^a: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

µL/cm² を若い健康な女性ボランティアの前腕の腹側に塗布し、45 分後に分散液またはエマルジョンをふき取って、塗布 24 時間後に皮膚表面を採取した (Bennat and Müller-Goymann, 2000)。TiO₂ の水またはオクチルパルミテート分散液を塗布したとき角質層で Ti が観察され、オクチルパルミテート分散液の塗布後に角質層のより深部で Ti が観察されたが、TiO₂ 水/油エマルジョンを塗布したときには Ti の皮膚への侵入は認められなかった。本論文の記述から、TiO₂ の性状等に関する情報は得られなかった。

T805 (微粉末化 TiO₂、平均粒子サイズ：20 nm、形状：立方体、トリメチルオクチルシラン表面修飾により疎水化、Degussa)、Eusolex T-2000 (ウルトラファイン TiO₂、一次粒子の平均サイズ：10-15 nm、二次凝集体サイズ：100 nm、形状：針状、非共有結合 Al₂O₃ (8-11%) /SiO₂ (1-3%) により表面修飾、両親媒性、Merck) または Tioveil AQ-10P (水及びプロピレングリコールに親水性分散した TiO₂、サイズ：100 nm、

形状：針状、4.25% アルミナ及び 1.75% シリカにより表面修飾、Solaveil) を 4% 含有したエマルジョン 4 mg/cm² (TiO₂ として 160 µg/cm²) をボランティアの前腕 11.3 cm² に 6 時間塗布し、試験部位の中央部をバイオプシーした (Pflücker *et al*, 2001; Schulz *et al*, 2002)。採取した皮膚組織は 4 °C、36 時間培養し、切片を作成して皮膚透過性について光学及び電子顕微鏡検査を行った。TiO₂ の粒子サイズ、形状及び表面修飾は皮膚吸収に影響を及ぼさなかった。微粉末化 TiO₂ は角質層の最も外側に沈着し、角質層の深部では観察されなかった。

T805 (平均直径：約 20 nm、トリメチルオクチルシラン表面修飾により疎水化、Degussa) 3% を含む水/油エマルジョン 2 mg/cm² (TiO₂ として 60 µg/cm²) を、3 人の健康な女性ボランティア (平均年齢 28 歳) の上腕部 11.3 cm² に 5 時間塗布した (Mavon *et al*, 2006)。TiO₂ は皮膚を通過せず、角質層の最外側に蓄積していた。

TABLE 3. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after dermal application in experimental animals.

Animals	Materials / Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References
		Duration /Frequency	Doses ^a			
Hairless Wistar Yagi rats	10% ST-01 (uncoated anatase TiO ₂ nanoparticles, 26.4 nm in average size of primary particles, 392 nm in average size of aggregate particles, Ishihara Sangyo, Ltd.) in emulsion	Single application	60 mg emulsion/rat (15 cm ²) (6 mg TiO ₂ /rat)	4, 24, 72 and 168 h after application	TiO ₂ confined to stratum disjunctum of interfollicular epidermis and keratinized layer of follicular infundibulum and nor in viable skin.	Adachi <i>et al</i> , 2010
BALB/c nu/nu hairless mice	5% Nano TiO ₂ (anatase, hydrophobic, 10 nm in particle size, 160 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) in emulsion	60 consecutive days (3 h/day)	24 mg emulsion/mouse (3 cm ²)/day (1.2 mg TiO ₂ /mouse/day)	24 h after last application	Accumulation of Ti in spleen, heart and liver. Decreased body weight and increase relative weight of liver and spleen. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Only small trace of white blood cells in heart.	Wu <i>et al</i> , 2009
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophilia, 25 nm in particle size, 80 m ² /g in surface area, 99.6% purity, Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				Accumulation of Ti in spleen, heart and liver. Decreased body weight and increase relative weight of liver and spleen. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Focal necrosis in liver.	
	5% P25 (75% anatase and 25% rutile, hydrophilia, approx. 21 nm in particle size, 50 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Degussa) in emulsion				Accumulation of Ti in spleen, heart, liver, lung and brain. Decreased body weight and increase relative weight of liver and spleen. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Focal necrosis in liver.	
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophobic, 60 nm in particle size, 40 m ² /g in surface area, 99.6% purity, Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				Accumulation of Ti in spleen, heart, liver and lung. Excessive keratinization, thinner dermis and epidermis with wrinkles. Focal necrosis in liver.	
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophobic, 90 nm in particle size, 40 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				No accumulation of Ti in organs. No toxicological changes.	
NZW rabbits	20% TiO ₂ (<2-20 μm in particle size in suspension) in suspension	3 applications (2 h/day)	0.2 mL suspension/rabbit (2 cm ²)/day	24 h after last application	Ti deposition in outer layers of stratum corneum and outer aspects of hair follicles, but not in deeper aspects of epidermis or dermis. No erythema or other adverse reactions in skin.	Lansdown and Taylor, 1997
Pig (male)	5% Nano TiO ₂ (anatase, hydrophobic, 5 nm in particle size, 200 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) in emulsion	30 consecutive days	24 mg emulsion/pig (3 cm ²)/day (1.2 mg TiO ₂ /pig/day)	24 h after last application	Detection of TiO ₂ particles in stratum corneum, stratum granulosum, pickle cell layer and basal cell layer, but not in dermis. Pathological changes in cell structure. No irritation.	Wu <i>et al</i> , 2009
	5% Nano TiO ₂ (rutile, hydrophobic, 60 nm in particle size, 40 m ² /g in surface area, 99.5% purity, Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) in emulsion				Detection of TiO ₂ particles in stratum corneum, stratum granulosum and pickle cell layer, but not in dermis. Pathological changes in cell structure. No irritation.	
Yucatan minipigs (female)	4.7% T-Lite SF (rutile, 20-30 nm in diameter and 50-150 nm in length, coated with aluminium hydroxide/dimethicone copolymer, BASF) in cream	Total of 22 days (4 times daily, 5 days/week)	Total of 176 mg cream/cm ² (8.27 mg TiO ₂ /cm ²)	24 h after last application	Increased levels of Ti in epidermis including stratum corneum and upper follicular lumen. No increased levels of Ti in lymph nodes or liver. No toxicological changes in skin.	Sadrieh <i>et al</i> , 2010
	6.1% P25 (anatase/rutile, 30-50 nm in particle size, uncoated, Degussa) in cream		Total of 176 mg cream/cm ² (10.74 mg TiO ₂ /cm ²)			
	5.6% CR-50 (rutile, 300-500 nm in particle size, uncoated, Ishihara Corporation) in cream		Total of 176 mg cream/cm ² (9.86 mg TiO ₂ /cm ²)			

^a: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

このように、ヒトボランティアによる試験では皮膚に塗布されたナノ及び顔料グレード TiO₂ ともに角質層及び毛包までは侵入するが、真皮までは到達しないことが示されている。

実験動物を用いた TiO₂ の経皮暴露実験結果を TABLE 3 に示した。

8 週齢の雄ヘアレスラット (体重 202-267 g、Hairless Wistar Yagi ラット、日本 SLC) の背部皮膚 15 cm² に 1 cm² 当たり 4 mg の 10% の TiO₂ ナノ粒子 (ST-01、アナターゼ型、表面無修飾、Ishihara Sangyo Ltd.) を含む水/油エマルジョンを単回塗布 (TiO₂ として 6 mg/rat)、

4, 24, 72 または 168 時間後に皮膚サンプルを採取した (Adachi *et al.*, 2010)。TiO₂ の一次粒子の平均サイズは 26.7 nm、凝集粒子の平均サイズは 391.6 nm であった。TiO₂ は毛包間表皮の剥離層及び毛漏斗角質化層に局在していたが、表皮の生細胞領域には認められず、細胞の変化も観察されなかった。

7-8 週齢の BALB/c nu/nu ヘアレスマウス (6 匹/群) の背部皮膚 3 cm² に、ナノ TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ: 10 nm、表面積: 160 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.)、ナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 25 nm、表面積: 80 m²/g、純度: 99.5%、親水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.)、P25 (アナターゼ型 75% + ルチル型 25%、粒子サイズ: 約 21 nm、表面積: 50 m²/g、純度: 99.5%、親水性、Degussa)、ナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 60 nm、表面積: 40 m²/g、純度: 99.6%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) またはナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 90 nm、表面積: 40 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) 5% を含むエマルジョン 24 mg (TiO₂として 1.2 mg /mouse/day) を連続 60 日間塗布 (3時間/日) し、最終塗布の 24 時間後に剖検した (Wu *et al.*, 2009)。原子吸光分析 (AAS) により Ti 濃度を測定した (LOD: Ti として 20 ng/mL)。Ti の蓄積は、10 nm 及び 25 nm TiO₂ 塗布後の心臓、肝臓及び脾臓、P25 塗布後の心臓、肝臓、脾臓、肺及び脳、60 nm TiO₂ 塗布後の心臓、肝臓、脾臓及び肺にみられた。しかし、90 nm TiO₂ 塗布ではこれらの組織への Ti の蓄積はみられなかった。10 nm TiO₂、25 nm TiO₂ 及び P25 塗布により、体重の低下、肝臓及び脾臓の比重量の増加がみられた。皮膚では、10 nm、25 nm 及び 60 nm TiO₂、P25 塗布により過剰な角質化、真皮薄化及びしわ表皮がみられ、10 nm TiO₂ 及

び P25 塗布後に顕著であった。肝臓では、25 nm TiO₂ 及び P25 塗布により限局性壊死が観察された。心臓では 10 nm TiO₂ 塗布後だけに微量の白血球がみられたが、他の TiO₂ 塗布後の心臓には病理組織学的変化は認められなかった。脾臓で局所的なマクロファージの増殖、肺でわずかな肥厚がみられただけであり、脳、腎臓及び嚢リンパ小節に異常は認められなかった。60 nm TiO₂ 塗布では異常は観察されなかった。脂質酸化ストレスのバイオマーカーであるマロンジアルデヒド (MDA) レベルの上昇が 10 nm、25 nm 及び 60 nm TiO₂、P25 塗布後の皮膚、10 nm 及び 25 nm TiO₂、P25 塗布後の肝臓で認められた。また、スーパーオキシドデスマターゼ (SOD) レベルの低下が 10 nm TiO₂ 及び P25 塗布後の皮膚及び肝臓でみられた。これらのことは、TiO₂ の蓄積した組織における病理学的変化と酸化ストレスとの関連性を示唆している。これらの実験結果から、90 nm よりも小さな TiO₂ はマウスの皮膚を通過して、全身に移行すること示している。

TiO₂ を脱イオン水、ポリエチレングリコールまたはキャスターオイルに 20% に懸濁し、0.2 mL/rabbit を 2 匹の New Zealand White ウサギ (体重 2.5 kg) の毛刈りした背部皮膚 2 cm² に 24 時間間隔で 2 時間、3 回塗布し、その後 24 時間に検査した (Lansdown and Taylor, 1997)。懸濁液中の粒子サイズは <2-20 μm であった。Ti 粒子が角質層の外層及び毛包の外面に観察されたが、表皮の深部及び真皮には認められなかった。塗布部位の皮膚に紅斑その他の有害反応はみられなかった。これらのことから TiO₂ はウサギ皮膚を通過しないことが示された。

ナノ TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ: 5 nm、表面積: 200 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) 及びナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 60 nm、表面積: 40 m²/g、純度: 99.5%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co.,

Ltd.) 5% を含むエマルジョン 24 mg (TiO₂ として 1.2 mg/pig) を 4 週齢の雄ブタの耳介背側に連続 30 日間塗布し、最終塗布の 24 時間後に組織 (直径 2 mm) を採取した (Wu *et al.*, 2009)。TiO₂ は角質層、顆粒層及び有棘細胞層から検出され、より深部の基底細胞層からは 5 nm TiO₂ 塗布後のみに検出されたが、真皮からは検出されなかった。TiO₂ 塗布による細胞間隙拡大、デスモソーム損傷及び基底細胞核周囲の空胞増大等の病理学的変化がみられたが、皮膚刺激性は認められなかった。

T-Lite SF (ルチル型, 直径: 20-30 nm、長さ: 50-150 nm、水酸化アルミニウム/ジメチコン共重合体により表面修飾、BASF) の 4.7%、P25 (アナターゼ型/ルチル型の混合物、粒子サイズ: 30-50 nm、表面無修飾、Degussa) の 6.1%、CR-50 (ルチル型、粒子サイズ: 300-500 nm、表面無修飾、Ishihara Corporation) の 5.6% を含むクリーム 2 mg/cm² (総量: 176 mg/cm², 約 1321 mL/pig) を 4 か月齢の雌 Yucatan ミニブタ (3 匹/群) の背部及び腹部に 1 日 4 回、週 5 日、22 日間塗布した (Sadrieh *et al.*, 2010)。TiO₂ 総塗布量は、T-Lite SF で 8.27 mg/cm² (94 µg x 4 x 22/cm²)、P25 で 10.74 mg/cm² (122 µg x 4 x 22/cm²)、CR-50 で 9.86 mg/cm² (112 µg x 4 x 22/cm²) であった。ICP-MS により Ti レベルを測定した。いずれの TiO₂ 塗布後にもリンパ節及び肝臓における Ti レベルの上昇はみられなかった。いずれの TiO₂ 処置でも Ti は表皮で多く、角質層及び上部毛包腔に観察され、T-Lite SF で顕著であった。いずれの TiO₂ 処置でも刺激性や皮膚細胞の構造異常等の皮膚に対する悪影響はみられなかった。これらのことから、ナノサイズ及び顔料グレードの TiO₂ とも健常なミニブタの表皮を通過しないことが示された。

このようにナノ及び顔料グレード TiO₂ の経皮暴露による動物実験の結果、ラット、ウサギ及びブタでは TiO₂ は角質層及び毛包からは検

出されるが、真皮から検出されないことから、Ti は皮膚を通過しないことが示されている。しかし、ヘアレスマウスを用いた塗布実験においては、90 nm ルチル型 TiO₂ を除いて、ナノサイズの TiO₂ は皮膚を通過して、心臓、肝臓、脾臓、肺または脳に移行して蓄積することが示されている。

5. 経口投与 (TABLE 4)

TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ: 475 nm、Polysciences Ltd.) を蒸留水に懸濁し、12.5 mg/kg/day を 10 日間、12-14 週齢の雌 SD ラットに強制経口投与し、最終投与後 24 時間 (15 時間絶食後) に組織を採取した (Jani *et al.*, 1994)。組織中 Ti 濃度を ICP-AES により測定した。検出された TiO₂ は投与量に対して、結腸で 1.13%、パイエル板及び腸間膜リンパ節で 2.18% であり、また小腸、肝臓、肺、腹膜組織、脾臓でも Ti が検出されたが、心臓及び腎臓では検出されなかった。これらの所見は、TiO₂ 粒子は胃腸からパイエル板を介して取り込まれ、腸間膜網に移行し、その後腸間膜リンパ節に蓄積され、また、一部の粒子は全身循環に移行し、肝臓及び脾臓に取り込まれることを示している。

ナノ TiO₂ (サイズ: 25 nm または 80 nm、純度: > 99%、Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.) またはファイン TiO₂ (サイズ: 155 nm、純度: > 99%、Zhonglian Chemical Medicine Co.) を 0.5% の Hydroxypropylmethylcellulose K4M (HPMC) に懸濁し、一晚絶食させた CD-1 (ICR) マウス (雌雄各 10 匹/群) に 5 g/kg を単回強制経口投与した (Wang *et al.*, 2007b)。Ti レベルを ICP-MS により測定した (LOD: Ti として 0.074 ng/mL)。投与 2 週後の雌マウスにおける Ti は主に肝臓、腎臓、脾臓及び肺に蓄積し、Ti レベルは、80 nm TiO₂ 投与群では肝臓で最も高く、25 nm 及び 155 nm TiO₂ 投与群では脾臓で最も高かった。肝臓における Ti レ

TABLE 4. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after oral gavage.

Animals	Materials / Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References
		Duration /Frequency	Doses ^a			
SD rats (female)	TiO ₂ (rutile, 475 nm in particle size, Polysciences Ltd.)	Daily for 10 days	12.5 mg/kg/day	24 h after last administration	Detection of Ti in Peyer's patches colon, small intestine, peritoneal tissue, mesentery network and node, liver, spleen and lung, but not in kidney or heart.	Jani <i>et al</i> , 1994
CD-1(ICR) mice (male and female)	Nano TiO ₂ (25 nm in size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	Single	5 g/kg	2 weeks after administration	Accumulation of Ti in liver, kidney, spleen and lung. Highest Ti levels in spleen. Increased relative weight of liver and serum ALT, ALT/AST ratio, BUN, LDH and α -HBDH levels in females, and serum BUN and CR levels in males.	Wang <i>et al</i> , 2007b
	Nano TiO ₂ (80 nm in size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)				Accumulation of Ti in liver, kidney, spleen and lung. Highest Ti levels in liver. Increased relative weight of liver and serum LDH and α -HBDH levels in females, and serum BUN and CR levels in males. Vacuoles in neurons of hippocampus, renal tubule filled with proteinic liquids and hydropic degeneration around central vein and spotty necrosis of hepatocyte in liver.	
	Fine TiO ₂ (155 nm in size, Zhonglian Chemical Medicine Co.)				Accumulation of Ti in liver, kidney, spleen and lung. Highest Ti levels in spleen. Vacuoles in neurons of hippocampus, serious swelling in renal glomerulus and hydropic degeneration around central vein and spotty necrosis of hepatocyte in liver.	
CD-1(ICR) mice (female)	Nano TiO ₂ (anatase, 5 nm in average grain size)	Every other day for 30 days	62.5, 125, 250 mg/kg/day	One day after last administration	Change in biochemical and hematological parameters and parameters of immunologically component cells at 62.5 mg/kg/day and higher. Change in body weight, relative weight of liver, spleen and thymus at 125 mg/kg/day and higher. Histopathological changes in liver at 250 mg/kg/day.	Duan <i>et al</i> , 2010

^a: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

ベルは、80 nm TiO₂ 投与群では 3970 ng/g、25 nm TiO₂ 投与群では 106 ng/g、155 nm TiO₂ 投与群で 107 ng/g であった。マウスには投与 2 週間後と殺まで投与による異常はみられなかった。雌雄のマウス体重には TiO₂ 投与の影響はみられなかった。雄マウスでは、25 nm 及び 80 nm TiO₂ 投与群において腎毒性の指標である血清中の血液尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニン (CR) レベルの上昇が観察された。雌マウスでは、25 nm TiO₂ 投与群の血清 BUN レベル、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 及び ALT/ アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 比が、25 nm 及び 80 nm TiO₂ 投与群で肝臓比重量、血管系損傷の指標である血清乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 及び α -ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ (α -HBDH) レベルが高値であった。病理組織学的所見は雌雄とも同様であり、80 nm 及び 155 nm TiO₂ 投与群において、海馬神経細胞に脂肪変性を示唆する空胞の増加、肝臓に中心静脈周囲の水腫性変性及び肝細胞の散在性壊死が観察された。また、80 nm TiO₂ 投与群にタンパク質

様液体で充満した腎尿細管、155 nm TiO₂ 投与群に腎糸球体の重篤な腫脹がみられた。心臓、肺、精巣、卵巣及び脾臓には TiO₂ 投与の影響はみられなかった。25 nm TiO₂ 投与群ではいずれの組織にも病理組織学的変化は認められなかった。

雌 CD-1 (ICR) マウスにナノ TiO₂ (アナターゼ型、平均粒子サイズ: 5 nm) を 0.5% の HPMC に懸濁し、62.5, 125 または 250 mg/kg/day を隔日に 30 日間強制経口投与し、最終投与の 1 日後にマウスをと殺して検査した (Duan *et al*, 2010)。62.5 mg/kg 以上の投与で、白血球数及び網状赤血球比率の上昇、B 細胞及びナチュラルキラー細胞の比率の低下、血清 IL-2 レベルの低下、血清 NO レベルの上昇がみられた。125 mg/kg 以上の投与で、体重低下、肝臓、腎臓、脾臓及び胸腺の比重量の増加、ALT、AST、アルカリフォスファターゼ、コリンエステラーゼ、総コレステロール及びトリグリセライド血清レベルの上昇、A/G 比及び総ビリルビンレベルの低下、赤血球数、ヘモグロビン、平均赤血球色素濃度等の低下が観察された。

250 mg/kg の投与で、CD3、CD4 及び CD8細胞の比率の低下、肝臓に広範囲の肝細胞の構造不鮮明及び間質血管の充血が観察された。このように経口投与された高用量のナノ TiO₂ は血液及び免疫系の障害を惹起することが示された。

これらの実験結果は、経口投与されたナノ及び顔料グレード TiO₂ は、消化管から吸収され、他の器官に移行し、毒性影響を惹起することを示している。

6. 静脈内注射 (TABLE 5)

45-55 日齢の雌 SD ラット (8 匹/群) に 250

mg/kg の TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ：200-400 nm、BET 表面積：48.6 m²/g) を尾静脈に注射した (Huggins and Froehlich, 1966)。投与した TiO₂ の 69% 及び 78% がそれぞれ注射後 5 分及び 15 分の肝臓で検出された。投与後 6 時間の TiO₂ レベルは、肝臓 (4.1 mg/g) で最も高く、次いで脾臓 (3.0 mg/g) で高く、腹腔、腸骨及び縦隔リンパ節でも 0.4-0.5 mg/g であった。投与後 24 時間の TiO₂ レベルは、腹腔リンパ節 (9.4 mg/g) で最も高く、次いで肝臓 (3.9 mg/g)、脾臓 (1.5 mg/g) であった。投与後 1 年の TiO₂ レベルは、腹腔リンパ節

TABLE 5. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after intravenous (iv), intraperitoneal (ip), subcutaneous (sc) or intraarticular (ia) injection.

Injection route	Animals	Materials/ Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References
			Duration /Frequency	Doses ^a			
iv	SD rats (female)	TiO ₂ (anatase, 200-400 nm in particle size, 99% pure, water-dispersible)	Single	250 mg/kg	Designated time after injection	Highest levels of Ti in liver at 6 h after injection. Highest levels of Ti in celiac lymph nodes at 24 h and one year after injection.	Huggins and Froehlich, 1966
	Wistar rats (male)	Nano TiO ₂ (70% anatase and 30% rutile, no surface coating, 20-30 nm in size, 48.6 m ² /g in BET surface area)		5 mg/kg	1, 14 and 28 days after injection	Highest Ti levels in liver, followed in decreasing order by levels in spleen, lung and kidney. No detection of Ti in plasma, blood cells, lymph nodes or brain. No toxicological changes.	Fabian <i>et al.</i> , 2008; van Ravenzwaay <i>et al.</i> , 2009
	BALB/c mice (female)	TiO ₂ nanoparticles (80% anatase and 20% rutile, approx. 50 m ² /g in surface area, DeGussa AG)	2 consecutive days	Total 560 mg/kg	One day after last injection	Aggregates of TiO ₂ particles in lung, liver, lymph nodes, spleen and kidney.	Patri <i>et al.</i> , 2009
ip	Wistar rats (male)	TiO ₂ (anatase, approx. 1 µm, Sphere-like shape, Sigma Chemical Co.)	Single	16, 1600, 16000 mg/kg	5-10 months after injection	Macrophages loaded with particles in peritoneum, vicinity of sinusoid capillaries of liver, alveoli of lung and splenic cords at all doses. No changes in body weight, behavior or general conditions.	Olmedo <i>et al.</i> , 2002
	Wistar rats (male)	TiO ₂ (anatase, approx. 1 µm, Sphere-like shape, Sigma Chemical Co.)		16000 mg/kg	3 and 6 months after injection	Monocytes containing Ti. Detection of Ti in liver, spleen and lung at 6 months post-injection.	Olmedo <i>et al.</i> , 2003
	ICR mice (male and female)	Nano-sized TiO ₂ (anatase, 80-110 nm, mostly 100 nm, in size)		324-2592 mg/kg	24 h, 48 h, 7 days and 14 days after injection	Retention of Ti in spleen, lung, kidney and liver, and highest in spleen. Passive behavior, loss of appetite, tremor and lethargy. Most severe histopathological lesion in spleen.	Chen <i>et al.</i> , 2009
sc	Slc:ICR mice	TiO ₂ particles (anatase, 25-70 nm in particle size, 20-25 m ² /g in surface area, Sigma-Aldrich)	Gestational days 3, 7, 10 and 14	100 µg/mouse/day	4 days and 6 weeks of age (male offspring)	Detection of aggregates of TiO ₂ in Leydig cells, Sertoli cells and spermatids at both age of pups and cells of olfactory bulb and cerebral cortex in 6-week-old pups. Decreased body weight, daily sperm production, epididymal sperm mortality and number of Sertoli cells in pups. Histopathological changes in testes of pups.	Takeda <i>et al.</i> , 2009
	BALB/c mice (female)	TiO ₂ nanoparticles (80% anatase and 20% rutile, approx. 50 m ² /g in surface area, DeGussa AG)	2 consecutive days	Total 5600 mg/kg	One day after last injection	Aggregates of TiO ₂ particles in liver, lymph nodes, and spleen.	Patri <i>et al.</i> , 2009
ia	SD rats (male)	TiO ₂ nanoparticles (anatase, 45 nm in length, 13 nm in width, >99.8% pure Hangzhou Wan Jing New Material Co., Ltd.)	4 times (every other day)	0.2, 2, 20 mg/kg/day	7 days after last injection	Brown particles in knee joint, heart and lung. Increased relative weight of lung and kidney at 20 mg/kg. Increase in serum LDH levels and AST/ALT ratio at 2 mg/kg and higher. Slightly histopathological changes in hear, lung, liver and knee joint at 0.2 mg/kg, and severe changes in major organs at 2 mg/kg and higher. Change in parameters of oxidative damage in synovium at 1.2 mg/kg and higher.	Wang <i>et al.</i> , 2009

^a: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.

(127.7 mg/g) で最も高く、次いで脾臓 (18.2 mg/g)、肝臓 (3.9 mg/g) であった。これらのことから、静脈内投与された TiO₂ は、投与直後には肝臓で多くが検出されるが、時間経過とともに腹腔リンパ節に移行して蓄積することが示された。

ラット血清に 0.5% に分散したナノTiO₂ (アナターゼ型 70% + ルチル型 30%、表面無修飾、サイズ：20-33 nm、BET 表面積：48.6 m²/g) 5 mg/kg を 7 週齢の雄Wistar [CrI:WI (Han)] ラットの尾静脈内に単回注射した (Fabian *et al.*, 2008; van Revenzwaaay *et al.*, 2009)。注射後 1 日、14 日または 28 日後に各 3 匹のナノ TiO₂ 注射ラットをと殺し、血漿、血球、肺、リンパ節、腎臓、脾臓及び脳を採取し、Ti レベルを ICP-AES により測定した。血漿、血球、縦隔・腸間膜・膝窩リンパ節及び脳では Ti は検出限界 (TiO₂ として 0.5 μg/tissue sample) 以下であった。組織内 Ti レベルには注射後の時間経過とともに減少する傾向がみられた。TiO₂ レベルは肝臓で最も高く (1 日後：134 μg/g wet tissue、14 日後：100 μg/g wet tissue、28 日後：111 μg/g wet tissue、次いで脾臓 (1 日後：79 μg/g wet tissue、14 日後：49 μg/g wet tissue、28 日後：33 μg/g wet tissue)、肺 (1 日後：9 μg/g wet tissue、14 日後：3 μg/g wet tissue、28 日後：2 μg/g wet tissue) であり、腎臓では 0.7 μg/g wet tissue より低かった。TiO₂ 投与による毒性学的変化は認められなかった。

TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型約 80% 及びルチル型約 20%、表面積：約 50 m²/g、Degussa AG) を 8-10 週齢の雌 BALB/c マウスに 2 日間連続、総量 560 mg/kg を尾静脈内注射し、2 回目の注射の 1 日後に剖検した (Patri *et al.*, 2009)。平均径 1-2 μm の凝集体として Ti が肺、肝臓、リンパ節、脾臓及び腎臓に観察された。組織内で TiO₂ ナノ粒子は不整形な凝集体として、貪食細胞中に認められた。肝臓では、大部

分の粒子がクッパー細胞の空胞にみられた。

これらの実験結果は、静脈内投与されたナノ及び顔料グレード TiO₂ は、他の器官に移行することを示している。

7. 腹腔内投与 (TABLE 5)

体重約 100 g の雄 Wistar ラット (10 匹/群) に 16、1600 または 16000 mg/kg の TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ：1 μm、球形、Sigma Chemical Co.) を単回腹腔内注射し、5-10ヶ月生存させた後、検査した (Olmedo *et al.*, 2002)。いずれの投与群のラットにも一般状態、体重及び行動の異常、腹膜と腸管との癒着や肉芽、肺、脾臓及び肝臓の肉眼的異常は認められなかった。16000 mg/kg 投与群のラットの腹腔内に白色の沈殿物が観察された。病理組織学的検査では、いずれの TiO₂ 投与量においても TiO₂ を含有したマクロファージが腹膜、肝臓の洞様毛細血管周囲、肺胞及び脾索に観察された。腎臓に異常はみられなかった。

体重約 100 g の雄 Wistar ラット 20 匹に生理食塩水に懸濁した 16000 mg/kg の TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ：1 μm、球形、Sigma Chemical Co.) を単回腹腔内注射し、3-6ヶ月に採血し、6ヶ月にと殺した (Olmedo *et al.*, 2003)。Ti 粒子を含有した単球が 3 及び 6ヶ月の血液標本に観察され、Ti が投与後 6ヶ月の肝臓、脾臓及び肺に認められた。

ナノサイズの TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ：80-110 nm、大部分は 100 nm) 324、648、972、1296、1944 または 2592 mg/kg を一夜絶食後の 4 週齢 ICR マウス (雌雄各 5 匹/群) に単回腹腔内注射した (Chen *et al.*, 2009)。Ti は脾臓、肺、腎臓及び肝臓で認められ、特に、脾臓で最も多く、投与後 24 時間でも検出された。投与後 2 日間に全ての TiO₂ 投与群のマウスに受動行動、食欲喪失、震顫及び嗜眠がみられた。1296 mg/kg 以下の投与ではこれらの症状は徐々に消失した。1944 mg/kg 以上の投与量で

は下痢、体重低下及び被毛光沢消失も観察された。病理組織学的検査では、肝臓、脾臓、肺及び腎臓に病変がみられたが、病理学的には重篤ではなかった。

これらの実験結果は、腹腔内投与されたナノ及び顔料グレード TiO₂ とも、他の器官に移行し、毒性影響を発現させることを示している。

8. 皮下注射 (TABLE 5)

0.05% Tween 80 に懸濁した 100 μ g/mouse/day の TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型、粒子サイズ: 25-70 nm、表面積: 20-25 m²/g、Sigma-Aldrich) を Slc:ICR マウス (6 匹/群) の妊娠 3、7、10 及び 14 日に皮下投与し、自然分娩した雄児を生後 4 日または生後 6 週に検査した (Takeda *et al*, 2009)。100-200 nm の TiO₂ 凝集体が生後 4 日及び 6 週の児の精巣のライディヒ細胞、セルトリ細胞及び精子細胞で観察され、TiO₂ 粒子が 6 週齢雄児の嗅球及び大脳皮質に認められた。体重、1 日精子産生量、精巣上体精子運動性及びセルトリ細胞の減少、精細管の崩壊及び管腔中成熟精子の減少が 6 週齢雄児に観察された。この報告では、発生毒性の最も重要な指標である胚/胎児/新生児の生存及び形態学的変化に関するデータは示されておらず、また発生毒性発現に関わる母体毒性の詳細についても記載されていない。

TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型約 80% 及びルチル型約 20%、表面積: 約 50 m²/g、Degussa AG) を 8-10 週齢の雌 BALB/c マウスに 2 日間連続、総量 5600 mg/kg を皮下注射し、2 回目の注射の 1 日後に剖検した (Patri *et al*, 2009)。平均径 1-2 μ m の凝集体として Ti が肝臓、リンパ節及び脾臓に観察された。組織内の TiO₂ ナノ粒子は不整形な凝集体として、貪食細胞中に認められた。肝臓では、大部分の粒子がクッパー細胞の空胞にみられた。

これらの実験結果は、皮下投与されたナノ

TiO₂ は、他の器官に移行し、毒性影響を発現させることを示している。

9. 関節内投与 (TABLE 5)

体重 180-200 g の雄 SD ラット (10 匹/群) に TiO₂ ナノ粒子 (アナターゼ型、長さ: 45nm、幅: 13 nm、純度: 99.8% 以上、Hangzhou Wan Jing New Material Co., Ltd.) 0.2、2 または 20 mg/kg/day を隔日に 4 回、後肢膝関節内に注射し、7 日後にと殺し、検査した (Wang *et al*, 2009)。心臓においては茶色粒子の拡散した凝集体が心室心内膜にみられ、肺では粒子を貪食したマクロファージが肺胞で観察された。膝関節では TiO₂ 粒子の凝集した大きな沈着がみられた。心、肺、肝及び膝関節の病理組織学的変化は 0.2 mg/kg では軽度であったが、2 mg/kg 以上では重篤であった。投与 6 時間までマウスの活動低下がみられたが、体重やその他の一般状態に TiO₂ 投与の影響は認められなかった。20 mg/kg 投与群で肺及び肝の比重量増加がみられ、血清生化学的検査では、2 mg/kg 以上の LDH レベル及び AST/ALT 比の上昇がみられた。膝関節の滑膜において酸化ストレスの指標である GSH-Px 活性が 0.2 mg/kg 以上で、GSH 及び GSSG 活性が 20 mg/kg で上昇し、H₂O₂ レベルが 2 mg/kg 以上で上昇した。これらの所見は、膝関節内に投与された TiO₂ ナノ粒子は血流を介して他の組織に移行して毒性影響を惹起することを示している。

10. 考察及び結論

ナノサイズ及び顔料グレードの TiO₂ を種々の経路により暴露した後の体内分布及び毒性について公表されている科学論文を収集整理してまとめた。

ヒトでは吸入、経皮及び経口による TiO₂ の暴露が想定される (ENRHES, 2009)。ヒトの暴露経路ではないが、ラットまたはマウスに静脈

内、腹腔内または皮下注射された TiO₂ は肝臓、脾臓、肺、腎臓等の全身の器官に分布することが示されている。これらの所見は、ヒトで実際に起こる暴露経路により体内に吸収された TiO₂ の体内動態を知る上で情報源となる。ナノ TiO₂ をマウスの妊娠 3, 7, 10 及び 14 日に皮下投与したとき、生後 4 日及び生後 6 週齢の児の精巣及び 6 週齢の児の脳内で Ti が検出され、また精巣に病理学的変化を惹起することが示されている (Takeda *et al*, 2009)。この実験における TiO₂ の投与時期は器官形成期前及び器官形成期に相当し、これらの時期に Ti が胚へ移行すれば、胚死亡や胎児奇形の発現が疑われる。器官形成期後の時期は胎児の成長期であり、また新生児期は生殖器や神経系が成熟する時期である。これらの時期の化学物質暴露により機能障害を惹起し易い。母動物中に蓄積された TiO₂ が、これらの時期に精巣や海馬/大脳皮質に移行し、変化を起こした可能性がある。妊娠動物への TiO₂ 投与時期と児動物における影響発現との関連性について更に検討が必要である。

ナノ材料で表面加工された人工関節を装着したときの関節腔内におけるナノ材料の挙動について調べるために、ナノ TiO₂ をラットの関節腔内に注射したところ、TiO₂ は全身に移行し、主要臓器に病理組織学的及び生化学的变化を引き起こすことが観察されている (Wang *et al*, 2009)。この結果は静脈内、腹腔内及び皮下注射された TiO₂ の場合と同様に、体内に取り込まれた TiO₂ は全身に移行して、諸器官に毒性影響を及ぼす可能性を示している。

経口投与したナノ及び顔料グレードの TiO₂ とも全身に移行し、主に肝臓及び脾臓に蓄積し、肝、脾及び腎臓に病理組織学的変化を惹起するが、500 nm TiO₂ では腎臓及び心臓への移行は認められていない (Jani *et al*, 1994) が、25-155 nm の TiO₂ では心臓及び腎臓への移行が認められている (Wang *et al*, 2007b)。また、海馬

の神経細胞の変化が 80 nm 及び 155 nm TiO₂ の 5 g/kg 単回投与後に観察されている (Wang *et al*, 2007b)。使用動物、被験物質、投与期間、投与量が実験ごとに異なるために、試験結果を単純に比較することは困難であるが、経口投与された TiO₂ はナノ及び顔料グレードに関わらず、吸収され、全身に移行すると考えられる。

ナノ ¹³C 元素粒子を雄 F344 ラットに 6 時間全身吸入暴露した実験において、高濃度の ¹³C が肝臓から検出されたことから、粒子が肺胞壁から循環系に入り、肺外の組織へ粒子が移行することが示唆されており (Oberdörster *et al*, 2002)、放射ラベルしたカーボン粒子 (個別粒子サイズ: 5-10 nm) をヒトボランティアに吸入暴露したとき、血液から放射活性が検出されたことから、肺から全身循環系へのナノ粒子の移行が示唆されている (Nemmar *et al*, 2002)。また、ナノ ¹³C 元素粒子暴露後の大脳、小脳及び嗅球においても ¹³C レベルが上昇したことから、鼻腔粘膜に沈着した粒子が嗅神経経路を介して脳へ移行することが示唆されている (Oberdörster *et al*, 2004)。嗅神経経路を介する嗅球への移行については、空気動力学的中央粒子径 1.5-2 μm の MnSO₄ 及び Mn₃O₄ をラットに吸入暴露したとき Mn が嗅球で検出され (Dorman *et al*, 2001, 2004)、また、タンパク質、神経病原性ウイルス、ニッケル、カドミウム、水銀、銀で表面修飾したコロイド金粒子等が嗅球への移行することが知られている (Tjälve and Henriksson, 1999; Oberdörster *et al*, 2004)。嗅覚ニューロン狭部の直径は約 200 nm と報告されており (De Lorenzo, 1957; Tjälve and Henriksson, 1999)、Elder *et al*. (2006) は 200 nm 未満のサイズの粒子が移行しやすいと述べている。ナノ及び顔料グレード TiO₂ の鼻腔内注入実験でも、粒子は嗅球/海馬へ移行して蓄積することがマウスで示されている (Wang *et al*, 2007a, 2008ab)。これらの所見は、吸入また

は鼻腔内暴露した粒子は全身循環系または神経系に移行する可能性を示しているが、粘液線毛排除機構や特に全身暴露では被毛に付着した粒子を舐めて経口摂取することがあり、粒子が消化管を介して移行した可能性も考えられる。一方、ラットを用いた吸入暴露実験では、ナノ及び顔料グレードの TiO_2 とともに胸腔内にとどまり、胸腔内の肺及び縦隔リンパ節でのみ検出されただけであり、 TiO_2 は胸腔外の組織では検出されなかったことが報告されている (van Ravenzwaay *et al.*, 2009)。また、妊娠マウスにナノ TiO_2 を吸入暴露した実験においても肺以外で Ti は検出されていない (Hougaard *et al.*, 2010)。しかし、これらの実験における Ti の検出限界は $0.3 \mu\text{g}/\text{tissue}$ および $0.25 \mu\text{g}/\text{g}$ であり、低レベルの Ti の全身または神経系への移行の可能性を完全には否定できない。

経皮暴露については、ヒトボランティアによる実験においてナノサイズ TiO_2 を塗布した群で真皮の Ti レベルの有意ではない上昇がみられている (Tan *et al.* 1996) が、その後のヒトボランティアによる塗布実験 (Lademann *et al.*, 1999; Bennat and Müller-Goymann, 2000; Schulz *et al.*, 2002; Mavon *et al.*, 2006)、さらにヒト皮膚を用いた *in vitro* の実験でも Ti の真皮への移行はみられず、Ti は角質層または毛包までの移行にとどまっている (Nohynek *et al.*, 2008)。ラット (Adach *et al.*, 2010)、ウサギ (Lansdown and Taylor, 1997) 及びブタ (Wu *et al.*, 2009; Sadrieh *et al.*, 2010) にナノサイズの TiO_2 を塗布したとき、Ti は角質層及び毛包から検出されたが、真皮までは到達せず、ナノサイズの TiO_2 は皮膚を通過しないことが示されている。しかしながら、ナノサイズの TiO_2 をヘアレスマウスに塗布した実験では 90 nm の TiO_2 を除いて皮膚を通過して全身の組織に移行したと報告されている (Wu *et al.*, 2009)。Wu *et al.* (2009) の論文については、ヘアレスマウスの

飼育状態及び論文の記述不備に関するコメントが提出されている (Jonaitis *et al.*, 2010)。マウスは個別または 6 匹までの集団で飼育され、自ら TiO_2 塗布部を舐めたり噛んだりすることから保護するために首かせを装着したが、その他の部分の覆いは行っていない (Wu *et al.*, 2009)。集団飼育ではマウス間で塗布部位を舐め合ったり、咬み合ったりすることによって経口摂取された TiO_2 が全身へ移行した可能性がある (Jani *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2007b)。皮膚剥離したヘアレスマウスではナノ粒子が全身移行することが示されている (Gopee *et al.*, 2009) ことから、創傷部位から TiO_2 が皮膚を通過して全身に移行した可能性もある。また、 TiO_2 が経気道摂取された可能性もある。Wu *et al.* (2009) の実験の対照群における Ti レベルは、特に腎臓では種々の TiO_2 を塗布したときと同等であり、脳では Degussa P25 を除いて TiO_2 を塗布した時より高かったことは、対照群動物が TiO_2 に汚染していることを窺わせる。これらの理由により、Wu *et al.* (2009) の動物実験の妥当性が疑われるが、コメントに対する論文の著者からの回答はなされていない。

ヒトにおけるリスク評価では、ヒトにおける暴露が想定される経路による毒性影響発現について検討することが必須であり、実際の暴露濃度に近い暴露量を用いた動物実験が必要とされる。ヒトでの実際の暴露が想定される吸入及び経皮暴露による動物実験においてはこれらの経路以外に経口による摂取も起こる可能性があり、実験成績の評価に重大な影響を及ぼすことがあるので、動物の飼育管理をも含めて適正な実験を行うことが望まれる。

11. 謝辞

本研究は、(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 委託研究「ナノ粒子特性評価手法の研究開発 (P06041)」により行った。

引用文献

- Adachi K, Yamada N, Yamamoto K, Yoshida Y, Yamanoto O. (2010) *In vivo* effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. *Nanotoxicology*, **4**, 296-306.
- Bennat C, Müller-Goymann CC. (2000) Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Int J Cosmet Sci*, **22**, 271-283.
- Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. (2009) *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol*, **29**, 330-337.
- De Lorenzo. (1957) Electron microscope observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. *J Biophysic Biochem Cytol*, **3**, 839-850.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. (2001) Ultrafine particles. *Occup Environ Med*, **58**, 211-216.
- Dorman DC, Struve MF, James RA, Marshall MW, Parkinson CU, Wong BA. (2001) Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, **170**, 79-87.
- Dorman DC, McManus BE, Parkinson CU, Manuel CA, McElveen AM, Everitt JI. (2004) Nasal toxicity of manganese sulfate and manganese phosphate in young male rats following subchronic (13-week) inhalation exposure. *Inhal Toxicol*, **16**, 481-488.
- Duan Y, Liu J, Ma I, Li N, Liu H, Wang J, Zheng L, Liu C, Wang X, Zhao X, Yan J, Wang S, Wang H, Zhang X, Hong F. (2010) Toxicological characteristics of nanoparticles anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials*, **31**, 894-899.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. (2006) Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect*, **114**, 1172-1178.
- Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S, Nakanishi J. (2010) Reproductive and developmental toxicity of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol*, **30**, 343-352.
- ENRHES (Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety) (2009) Project Final Report. [cited July 14, 2010], available from: <http://nmi.jrc.ec.europa.eu/documents/pdf/ENRHES%20Review.pdf>.
- Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B. (2008) Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol*, **82**, 151-157.
- Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Latendresse JR, Warbitton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ, Howard PC. (2009) Quantitative determination of skin penetration of PEG-coated CdSe quantum dots dermabrased but not intact SKH-1 hairless mouse skin. *Toxicol Sci*, **111**, 37-48.
- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Cretzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K. (1995) Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol*, **7**, 533-556.
- Hougaard, K.S., Jackson, P., Jensen, K.A., Sloth, J.J., Löschner, K., Larsen, E.H., Birkedal, R.K., Vibenholt, A., Boisen, A-M.Z., Wallin, H., Vogel, U. (2010) Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part. Fobre. Toxicol*

- 2010, 7:16 doi:10.1186/1743-8977-7-16.
- Huggins CB, Froehlich JP. (1966) High concentration of injected titanium dioxide in abdominal lymph nodes. *J Exp Med*, **124**, 1099-1106.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 93. Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. World Health Organization, Lyon.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (1982) Environmental Health Criteria 24. Titanium. World Health Organization, Geneva.
- Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. (1994) Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI and translocation to systemic organs after oral administration. *Int J Pharm*, **105**, 157-168.
- Jonaitis TS, Card JW, Magnusson B. (2010) Concern regarding nano-sized titanium dioxide dermal penetration and toxicity study. *Toxicol Lett*, **192**, 268-269.
- Kahru A, Dubourguier HC. (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, **269**, 105-119.
- Lademann J, Weigmann HJ, Rickmeyer C, Barthelme H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. (1999) Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **12**, 247-256.
- Lansdown ABG, Taylor A. (1997) Zinc and titanium oxides: promising UV-absorbers but what influence do they have on the intact skin? *Int J Cosmet Sci*, **19**, 167-172.
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. (1985) Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol*, **79**, 179-192.
- Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Moretto P. (2006) In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol*, **20**, 10-20.
- Mueller NC, Nowack B. (2008) Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol*, **42**, 4447-4453.
- Nemmar A, Hoet M, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Memery B. (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, **105**, 411-414.
- Nohynek GJ, Dufour EK, Roberts MS. (2008) Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacol Physiol*, **21**, 136-149.
- Oberdörster G., Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*, **65**, 1531-1543.
- Oberdörster G., Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, **16**, 437-445.
- Oberdörster G., Oberdörster E, Oberdörster J. (2005) Nanotechnology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, **113**, 823-839.
- Olmedo D, Guglielmotti MB, Cabrini RL. (2002) An experimental study of the dissemination of titanium and zirconium in the body. *J Mater Sci Mater Med*, **13**, 793-796.
- Olmedo D, Tasat D, Guglielmotti MB, Cabrini RL. (2003) Titanium transport through the blood stream. An experimental study on rats. *J Mater Sci Mater Med*, **14**, 1099-1103.

- Patri A, Umbreit T, Zheng J, Nagashima K, Goering P, Francke-Carroll S, Gordon E, Weaver J, Miller T, Sadrieh N, McNeil S, Stratmeyer M. (2009) Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. *J Appl Toxicol*, **29**, 662-672.
- Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Gers-Barlag H. (2001) The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronized titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **14** (Suppl. 1), 92-97.
- Robichaud CO, Uyar A, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. (2009) Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environ Sci Technol*, **43**, 4227-4233.
- Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, Mcneil SE, Howard PC, Doub WH, Buhse LF. (2010) Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicol Sci*, **115**, 156-166.
- Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Wendel V, Gers-Barlag H, Wittern KP. (2002) Distribution of sunscreen on skin. *Adv Drug Del Rev*, **54** (Suppl. 1), S157-S163.
- Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ. (1996) A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreen. *Austr J Dermatol*, **37**, 185-187.
- Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M. (2009) Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci*, **55**, 95-102.
- Tjälve H, Henriksson J. (1999) Uptake of metals in the brain via olfactory pathway. *Neurotoxicology*, **20**, 181-196.
- van Ravenzwaay B, Landsiedel R, Fabian E, Burkhardt S, Stauss V, Ma-Hock L. (2009) Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz. *Toxicol Lett*, **186**, 152-159.
- Wang JX, Chen CY, Yu HW, Sun J, Li B, Li YF, Gao YX, He W, Huang YY, Chai ZF, Zhao YL, Deng XY, Sum HF. (2007a) Distribution of TiO₂ particles in the olfactory bulb of mice after basal inhalation using microbeam SRXRF mapping techniques. *J Radioanal Nucl Chem*, **272**, 527-531.
- Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. (2007b) Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett*, **168**, 176-185.
- Wang J, Cken C, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li Y, Li B, Ge C, Zhou G, Gao Y, Zhao Y, Chai Z. (2008a) Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett*, **183**, 72-80.
- Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. (2008b) Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology*, **254**, 82-90.
- Wang JX, Fan YB, Gao Y, Hu QH, Chen TC. (2009) TiO₂ nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intra-articular injection. *Biomaterials*, **30**, 4590-4600.
- Wu J, Lui W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, XuH,

Yang X, Zeng FD. (2009) Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett*, **191**, 1-8.

江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井莊輔、中西準子 (2009) ナノサイズ二酸化チタンの遺伝毒性評価、環境毒性学会誌、**12**, 71-84.

江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井莊輔、中西準子 (2010) 二酸化チタンの発がん性評価、環境毒性学会誌、**13**, 15-26.

化学工業日報社 (2009 15509の化学商品、2009年1月、2100 pp.

経済産業省 (2009) ナノマテリアル製造事業者等における安全対策のあり方研究会報告書、平成21年3月、

<http://www.meti.go.jp/press/20090331010/20090331010.html>.

日本食品添加物協会 (2008) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定、その1 指定添加物品目 (第8回最終報告)、平成19年度厚生労働科学研究補助金 (食品の安全性高度化推進事業) 「国際動向を踏まえた食品添加物の企画の向上に関する調査研究」分担研究「わが国における食品添加物生産量統計とその国際比較」、平成20年3月、<http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do>

(受付：2010年11月13日；受理2010年12月27日)