

二酸化チタンナノ粒子を尾静脈投与したマウスにおける遺伝毒性

鈴木 哲矢^{*1,*2} 三浦 伸彦^{*1} 北條 理恵子^{*1} 柳場 由絵^{*1}
須田 恵^{*1} 長谷川 達也^{*3} 宮川 宗之^{*1,*4} 王 瑞生^{*1}

二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs) は、化粧品、塗料、食品、光触媒など幅広い用途で利用されている。二酸化チタンは本来、毒性が低いと考えられてきたが、ナノサイズ化することにより比表面積が大きくなることで、表面活性が増大し、生体に悪影響を及ぼす可能性が懸念されている。TiO₂ NPs の遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* での研究が盛んにおこなわれているが、その遺伝毒性の結果については意見が分かれている。本稿では、変異原性を調べるためのレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである *gpt* Delta マウスに、TiO₂ NPs を 2, 10 及び 50 mg/kg の投与量で、1 回/週、計 4 回尾静脈投与し、末梢血及び肝臓について各種遺伝毒性の解析を行った。血液については、小核試験及び *Pig-a* アッセイを行い、肝臓については、アルカリコメットアッセイ、*gpt* アッセイ及び *Spi* アッセイを行った。赤血球における *Pig-a* 遺伝子突然変異頻度及び小核を有する網状赤血球の出現頻度は、TiO₂ NPs の投与により変化は見られなかった。また、肝臓においても DNA 損傷性、*gpt* 遺伝子突然変異頻度及び *Spi* 変異体頻度の有意な増加は見られなかった。これらの結果は、TiO₂ NPs は、骨髄及び肝臓では遺伝毒性を示さないことを示唆している。

キーワード: 二酸化チタンナノ粒子, DNA 損傷性, 小核, 遺伝子突然変異, *gpt* Delta マウス

1 はじめに

二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs) は、様々な用途に利用されているが、粒子サイズが小さくなることで、その表面活性が増大し、人の健康への影響が懸念されている。国際がん研究機関 (IARC) は、TiO₂ を人に対する発癌性が分類できないとするグループ 3 に分類していたが、ナノサイズの TiO₂ (10-50 nm) を、ラットへ慢性的に吸入ばく露すると肺がんが増加したという結果に基づいて、2006 年に人に対して発がん性の可能性があるとするグループ 2B に再分類した^{1,2)}。遺伝毒性を示す発がん性物質は、閾値が設定できないものとして許容濃度の設定が行われるため、TiO₂ NPs のリスク評価における重要事項の一つとして遺伝毒性の有無が挙げられる。これまでに多くの *in vitro* での研究がなされており、いくつかでは、サイズや結晶系にもよるが、遺伝毒性を示すことが報告されている^{3,4)}。一方で、遺伝毒性を示さなかったという報告もある^{3,4)}。近年、*in vivo* での研究報告も増加しているが、TiO₂ NPs の遺伝毒性について統一した結果は得られていない⁵⁻¹⁶⁾。マウスに TiO₂ NPs を経口投与すると、骨髄での小核及び白血球と肝細胞での DNA 損傷が増加することが報告されている⁹⁾。さらに Trouiller らは、TiO₂ NPs の懸濁液をマウスに飲水投与すると様々な遺伝毒性を誘発することを報告している⁶⁾。また、TiO₂ NPs を気管内注入すると肺、肝臓及び末梢血単球細胞で DNA 損傷が増加することも報告されている

7,8,13)。一方で、尾静脈投与したマウスの末梢血では遺伝毒性は見られなかった⁹⁾。Lindberg らは、吸入ばく露したマウスの II 型肺胞上皮細胞及びクララ細胞での DNA 損傷及び赤血球での小核が増加しないことを報告している¹⁰⁾。さらに、ラットでも遺伝毒性を示さなかったことが報告されている^{11,12)}。ここ最近の報告においても、複数の遺伝毒性のエンドポイントの結果は一致していない¹⁴⁻¹⁶⁾。このように、TiO₂ NPs の遺伝毒性はいまのところ明確ではない。また、これらの報告の多くにおいて、遺伝毒性の濃度依存性や標的とする組織でのばく露の確認は行われていない。

TiO₂ NPs は、消化管、肺や表皮など様々なばく露経路から体内に入ることが知られている⁴⁾。沈着した部位から、TiO₂ NPs は、循環血流を経て様々な組織に移行する。また、マウスやラットにおいて尾静脈投与により循環血液中に直接導入した TiO₂ NPs は、長期間にわたって肝臓と脾臓に蓄積することが知られている¹⁷⁻²⁰⁾。このように、ばく露組織から血流中に移行した TiO₂ NPs は、肝臓や脾臓に蓄積し、長期間にわたり生体に悪影響を及ぼす可能性があると考えられる。

本稿では、投与した TiO₂ NPs が蓄積する組織である肝臓及び遺伝毒性試験としてよく利用される末梢血での遺伝毒性とその濃度依存性を明確にするために、変異原性を調べることができるレポーター遺伝子が導入された *gpt* Delta マウスに TiO₂ NPs を多段階の投与量で尾静脈投与し、末梢血と肝臓における遺伝毒性を検討した²¹⁾。さらに、肝臓でのばく露を調べるため、肝臓組織の電子顕微鏡及び偏光顕微鏡による観察を行った。

*1 労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ

*2 現所属：広島大学大学院医歯薬保健学研究院

*3 山梨県富士山科学研究所

*4 現所属：帝京大学医療技術学部スポーツ医療学科

連絡先：〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ 王 瑞生

E-mail: wang@h.jniosh.go.jp

2 方法

1) 動物及び投与

動物は、7週齢の雄性 C57BL/6J *gpt* Delta マウスを日本 SLC 株式会社より購入し、8週齢で実験に使用した。これらの動物は室温 22 ± 1°C、湿度 55 ± 5% の SPF 環境下で飼育され、固形飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社) 及び水は自由に摂取させた。

TiO₂ NPs は、EVONIC 社の AEROXIDE® TiO₂ P25 (1次平均粒子径 21 nm, アナターゼ 80%, ルチル 20% の混合物) を購入し、180°C、1時間乾熱滅菌したものを使用した。TiO₂ P25 分散液の調製は、納屋及び小林らの報告を参考に行った^{12,22)}。TiO₂ P25 は、投与時に 10 mg/mL となるように 2 mg/mL リン酸水素二ナトリウム (DSP) に懸濁し、水槽式超音波装置 (Bransonic 2510, ブラソン) で 30 分間超音波処理し、分散した。分散液中での粒子サイズは、Zetasizer Nano-ZS (マルバーン) を用いて、動的光散乱法 (DLS) で測定した。懸濁液上清のエンドトキシン濃度は、ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) を用いて測定した。8週齢の雄性 *gpt* Delta マウスに 0, 2, 10, 50 mg/kg の投与量で 1 回/週、計 4 回尾静脈投与を行った。最終投与後、2 日後と 9 日後に採血及び 3 日後と 9 日後に肝臓の採材を行った。

2) *Pig-a* アッセイ

Pig-a アッセイは、最終投与後 9 日目の血液について、大谷らの方法に従い行った²³⁾。赤血球マーカーである TER-119 に対するフィコエリスリン (PE) 標識抗体及び *Pig-a* 遺伝子変異の指標となる CD24 に対するフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗体を採血した血液と混合し、冷暗所で 30 分間静置した。静置後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えて遠心し、未反応の抗体を除去し、細胞を PBS に再懸濁した。この細胞懸濁液について、フローサイトメーター (Epics XL-MCL, Beckman Coulter) を用いて解析を行った。前方散乱光と側方散乱光により単一細胞集団をゲーティングし、抗 TER-119 抗体に標識されている PE の蛍光を指標に、単一細胞集団の中から赤血球をゲーティングした。次に、抗 CD24 抗体に標識されている FITC の蛍光を指標に、TER-119 陽性細胞のうち CD24 陰性の細胞数をカウントし、CD24 陰性の赤血球数を全赤血球数で除することにより *Pig-a* 遺伝子突然変異頻度を算出した。*Pig-a* 遺伝子突然変異頻度は、約 1,000,000 個の TER-119 陽性細胞をカウントして測定した。

3) 小核試験

小核試験は、最終投与後 2 日目及び 9 日目に採血した血液について、In Vivo Mouse MicroFlow PLUS Kit (Litron Laboratories) を用いて、マニュアルに従い行った。CD71 に対する蛍光標識抗体とヨウ化プロピジウムで染色し、フローサイトメーター (Epics XL-MCL, Beckman Coulter) で小核を有する網状赤血球の出現頻

度 (MN-RETs) を測定した。MN-RETs は、各試料につき約 20,000 個の CD71 陽性赤血球をカウントし測定した。

4) アルカリコメットアッセイ

肝細胞における DNA 損傷性を解析するため、最終投与後 3 日目に採材した肝臓を用いてアルカリコメットアッセイを行った。肝臓の一部を切り取り、1 mL の氷冷したバッファー (20 mM EDTA-2Na and 10% DMSO in Hank's balanced salt solution (Ca²⁺ and Mg²⁺ free), pH 7.5) 中で細かく刻んだ。1-2 min 静置して大きな塊を沈澱後、上清を 20 µL 取り、200 µL の融解した 0.5% 低融点アガロースと混和し、30 µL を 20 ウェルコメットスライド (Trevigen) に移した。5 min 程度静置し、ゲルを固化させた後、溶解液 (2.235 M NaCl, 10 mM Trizma base, 100 mM EDTA, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH=10) 中で 60 分間溶解した。泳動バッファー中に浸漬し、20 分間静置後、Trevigen 社の泳動システムを用い 21 V (1 V/cm) の下で 20 分間泳動してから中和バッファー (0.4 M Tris buffer, pH 7.5) で洗浄した後、エタノールで脱水処理を行った。SYBR Gold で DNA 染色し、蛍光顕微鏡の下で Comet IV (Perceptive Instruments) を用いて各試料につき 100 個細胞のコメットテールを観察した。本稿では DNA の損傷度にテール輝度 (TI 値) を用いた。

5) *gpt* 及び *Spi* アッセイ

肝細胞における変異原性を解析するため、最終投与後 9 日目に採材した肝臓を用いて *gpt* 及び *Spi* アッセイを行った。高分子量のゲノム DNA は、RecoverEase DNA Isolation Kit (Agilent Technologies) を用いて抽出した。Transpack Packaging Extract (Agilent Technologies) を用いてトランスジーン λEG10 をファージ粒子として回収し、以前の報告に従い *gpt* 及び *Spi* アッセイを行った^{24,25)}。*gpt* 遺伝子突然変異頻度は、6-チオグアニン耐性のコロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出した。*Spi* 変異体頻度は、回収したファージを P2 溶原菌と非溶原菌に感染させ、変異プラーク数を回収ファージ数で除して突然変異体頻度を算出した。

6) 肝臓組織の顕微鏡観察

肝臓の一部を 2.5% グルタルアルデヒドで前固定し、その後、1% 四酸化オスミウムで後固定した。標本は、エタノールで脱水後、酸化プロピレン処理し、エポキシ樹脂で包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラン及びクエン酸鉛で染色後、日本電子株式会社の JEM-2100F 透過電子顕微鏡 (TEM) で観察を行った。

切除した肝臓の一部を、10% 中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、切片を作製した。肝組織は、H&E 染色後、偏光顕微鏡で観察した。

7) 統計解析

データは平均値 + 標準偏差として示した。統計解析は、一元配置分散分析後、Dunnnett 検定を用いて行い、有意水準は 0.05 とした。

上記一連の実験は「労働安全衛生総合研究所動物実験委員会」の審査を受け承認され、労働安全衛生総合研究所動物実験指針に従って行った。また、遺伝子改変動物の使用は「労働安全衛生総合研究所組換え DNA 実験委員会」の審査を受け承認された。

3 結果

1) 懸濁液中での TiO₂ の粒子サイズの評価

TiO₂ P25 は、超音波処理で DSP 中に分散し、各投与量に合わせてマウスへの投与体積が同じになるよう希釈した。各濃度 (0.4, 2.0, 10 mg/mL) での TiO₂ P25 のサイズを、DLS 法により測定した。濃度に関わらず、TiO₂ P25 粒子の懸濁液中での Z 平均粒子径は、約 150 d.nm であった。最高濃度である 10 mg/mL の上清中のエンドトキシンの濃度は、0.0133 ± 0.001 EU/mL であり、実験に影響しないレベルであった。

2) 末梢血における遺伝毒性

TiO₂ P25 の最終投与後 9 日目に採血した血液について *Pig-a* 遺伝子突然変異頻度の測定を行った結果を、図 1 に示した。*Pig-a* 遺伝子突然変異頻度は、DSP 対照群と比較して、TiO₂ P25 投与群のいずれの投与量においても有意な変化は見られなかった (図 1)。

TiO₂ P25 の骨髄での急性及び持続性の染色体異常誘発性・異数性誘発性を調べるため、最終投与後 2 日目と 9 日目の血液について、小核試験を行った結果を図 2 に示した。MN-RETs は、DSP 対照群と比較して、TiO₂ P25 投与群のいずれの投与量においても有意な変化は見られなかった (図 2A)。しかしながら、50 mg/kg TiO₂ P25 投与群における全赤血球中に対する網状赤血球の比 (%RETs) は、DSP 対照群と比較して有意に増加して

いた (図 2B)。これらの結果は、TiO₂ P25 は、骨髄の造血幹細胞に対して変異原性、染色体異常誘発性・異数性誘発性は示さないが、高濃度の投与で造血機能に影響することを示唆している。

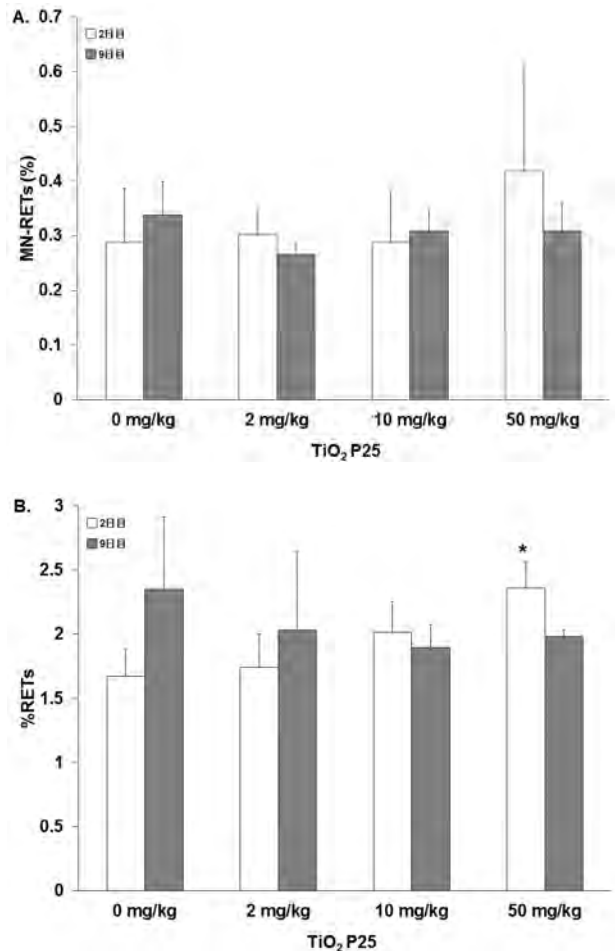


図2 TiO₂ P25 最終投与後 2 日目及び 9 日目の末梢血における小核を有する赤血球の頻度 (MN-RETs) (A) 及び全赤血球に対する網状赤血球の比 (%RETs) (B)。**P* < 0.05 vs DSP 対照群。

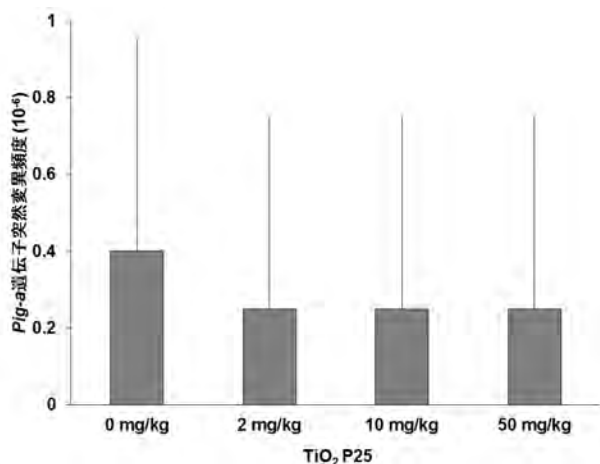


図1 TiO₂ P25 最終投与後 9 日目の末梢血における *Pig-a* 遺伝子突然変異頻度。

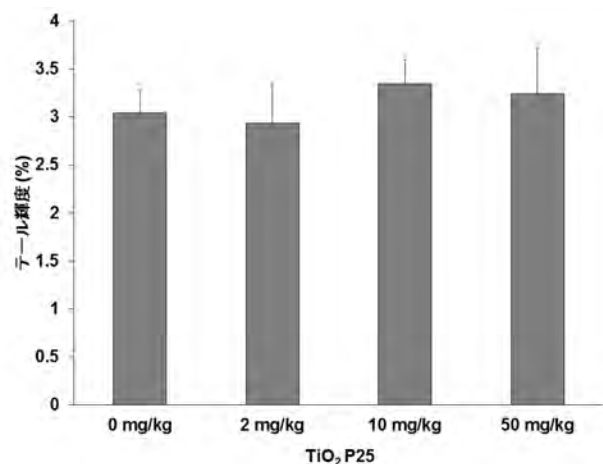


図3 TiO₂ P25 最終投与後 3 日目の肝臓における DNA 損傷度。

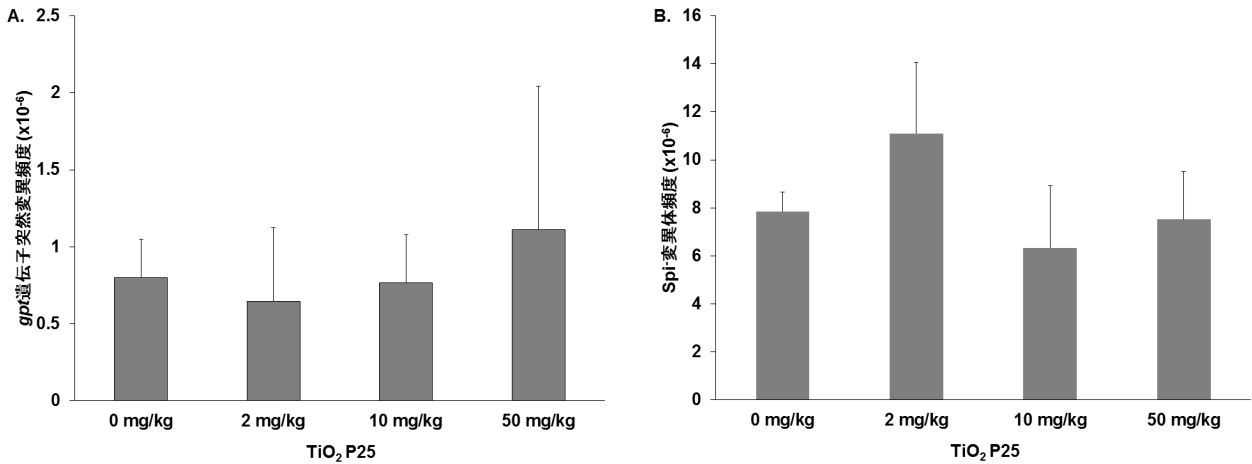


図4 TiO₂ P25 最終投与後9日目の肝臓における *gpt* 遺伝子突然変異頻度 (A) 及び *Spi*-変異体頻度 (B)。

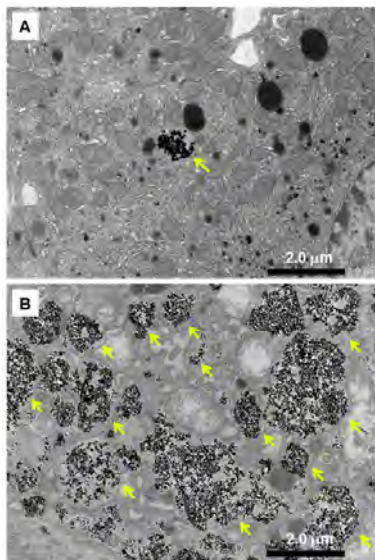


図5 TiO₂ P25 最終投与後9日目の肝臓の電子顕微鏡像。肝実質細胞 (A) 及びクッパー細胞 (B)。矢印は TiO₂ 粒子を示す。

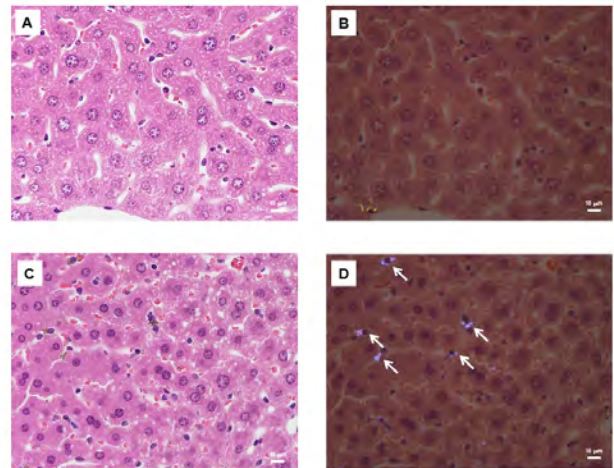


図6 TiO₂ P25 最終投与後9日目の肝臓の顕微鏡像。A. DSP 対照群-明視野観察, B. DSP 対照群-偏光観察, C. 50 mg/kg TiO₂ 投与群-明視野観察, D. 50 mg/kg TiO₂ 投与群-偏光観察。矢印は TiO₂ 粒子を示す。

3) 肝臓における遺伝毒性

TiO₂ P25 の最終投与後3日目に採材した肝臓についてアルカリコメットアッセイを行った結果を、図3に示した。TiO₂ P25 投与群での TI 値は、DSP 対照群と比較して有意な差は見られなかった (図3)。

肝臓における変異原性を調べた *gpt* 及び *Spi* アッセイの結果をそれぞれ図4に示した。DSP 対照群に比較して、TiO₂ P25 投与群のいずれの投与量においても *gpt* 遺伝子突然変異頻度及び *Spi*-変異体頻度に有意な増加は見られなかった。これらの結果は、TiO₂ P25 は、マウスの肝細胞では遺伝毒性を示さないことを示している。

4) 肝臓での TiO₂ NPs の局在

肝臓における TiO₂ P25 の粒子の局在を調べるために 50 mg/kg TiO₂ P25 を投与したマウスの肝臓切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) 及び偏光顕微鏡で観察を行った (図5, 図6)。TEM での観察では、チタンを含む大きな塊が肝実質細胞及びクッパー細胞で見られたが、その多くがクッパー細胞に存在していた。また、両細胞において TiO₂ P25 の粒子は、細胞質にある膜構造内で極度に凝集した状態であった。さらに、偏光顕微鏡での観察では、TiO₂ P25 と考えられる結晶が肝実質細胞の間にあるクッパー細胞に多く観察された。この結晶は肝実質細胞でも観察されたが、クッパー細胞に比較するとかなり少なかった。これらの結果は、尾静脈投与し

た TiO₂ P25 は肝臓に蓄積し、主にクッパー細胞に局在していることを示唆している。

4 考察

ナノサイズの TiO₂ 粒子は、IARC によってグループ 2B に分類されている。そのため、その遺伝毒性は、人の健康を考える上で重要な問題となる。日本のリスク評価では遺伝毒性有りとして評価されている²⁶⁾。これまでに TiO₂ NPs の遺伝毒性に関する多くの研究報告がなされているが、その結果は一致しておらず、統一した見解は得られていない³⁻¹³⁾。さらに、ほとんどの研究では、末梢血あるいは骨髄での小核試験または肝臓や肺などでの DNA 損傷性しか解析されておらず、肝臓のような TiO₂ NPs が蓄積する組織における変異原性を調べた報告はほとんどない。本稿では、TiO₂ P25 を尾静脈投与したマウスの肝臓と造血系の両組織における遺伝毒性を解析した。

末梢血において、*Pig-a* 遺伝子突然変異頻度及び MN-RETs は、DSP 対照群と TiO₂ P25 投与群で有意な差は見られなかった。TiO₂ NPs は、尾静脈投与により骨髄に到達するが、*Pig-a* 遺伝子突然変異頻度及び MN-RETs は増加しないことが報告されており、今回の結果と一致する⁹⁾。MN-RETs の陰性の結果は、他の TiO₂ NPs を尾静脈投与した研究でも報告されている^{15,16)}。一方で、異なる経路で TiO₂ NPs を投与した研究で、多染性赤血球において小核が増加することが報告されている^{5,6,15)}。実験に使用した TiO₂ NPs の特性、分散状態、投与経路などの複数の因子がこれらの赤血球での相反する結果の原因となっていると考えられる。しかしながら、これらの因子がナノ材料の毒性に影響すると考えられるにも関わらず、いくつかの報告では、TiO₂ NPs の特性や分散状態が記載されておらず、結果の比較及び毒性の評価を難しくしている。また、これらの研究においては TiO₂ NPs が骨髄に到達しているとも言及されていない。興味深いことに、小核の陽性の結果は、ギムザ染色した多染性赤血球で評価した報告で見られる^{5,6,15)}。対照的に、アクリジンオレンジや DAPI のような蛍光試薬を用いて染色を行い、解析を行った結果では、小核は陰性の結果が得られている^{9,10,15,16)}。TiO₂ 粒子は赤血球に取り込まれることが知られており²⁷⁾、これらの取り込まれた粒子が染色方法によっては非特異的に染色され、小核のように誤認されて偽陽性の結果となるのかもしれない。染色方法による違いが、骨髄や赤血球での小核試験の結果に影響しうるかどうかはさらなる研究が必要である。

TiO₂ NPs は尾静脈投与後、大部分は肝臓と脾臓に蓄積する¹⁷⁻²⁰⁾。データは示していないが、今回の研究では TiO₂ P25 は投与量依存的に肝臓に蓄積していた。TiO₂ NPs は、齧歯動物の肝臓で DNA 損傷を誘発することがこれまでに報告されている^{5,6,8)}。しかしながら、これらの報告では DNA 損傷の増加の程度は、わずかであり、用量依存性も見られない。さらに、毒性影響を評価する際には、標的組織でのばく露が重要であるにも関わらず、

これらの論文では肝臓への TiO₂ NPs 粒子の移行も確認していない。最近、Louro らは変異原性を解析するレポーターとして *LacZ* 遺伝子を有するトランスジェニックマウスの肝臓と脾臓で TiO₂ NPs の変異原性がないことを報告している¹⁶⁾。我々は、Loura らの報告と比較して、より広い用量範囲で投与を行ったが、肝臓における遺伝毒性は検出できなかった。これらの結果は、TiO₂ P25 が効率的に循環血液中に移行し、肝臓に蓄積しても、肝臓では遺伝毒性は示さないことを示唆している。組織学的な解析では、TiO₂ P25 は、肝実質細胞よりむしろクッパー細胞に主に蓄積していた。このことは、TiO₂ P25 の肝臓での蓄積はクッパー細胞などの食細胞に偏っており、蓄積量に対してばく露した細胞数の絶対数が少ないことを示唆している。さらに、TiO₂ P25 の平均一次粒径は約 21 nm であり核膜孔の開口部の直径 (約 10 nm) に比較して大きい。そのため、TiO₂ P25 が凝集していなくても、核内に受動拡散し、DNA と直接的に相互作用する可能性は少ない。また、細胞に TiO₂ NPs をばく露すると、細胞内で活性酸素が増加することが知られており、細胞において発生した活性酸素が DNA 損傷を誘発するかもしれない²⁸⁾。しかし、活性酸素の反応性は高く、寿命が短いため、離れた場所で生じた活性酸素が DNA と反応する確率は低いと考えられる。このように、細胞の核内で TiO₂ P25 が見られないことは、肝組織で遺伝毒性影響がないことを説明するかもしれない。

5 結論

本稿での TiO₂ NPs の血中濃度は、吸入や経口のような他のばく露経路から血中に移行する量よりはるかに高いと考えられる。しかしながら、このような条件下でさえ、顕著な遺伝毒性はみられなかった。それゆえに、TiO₂ NPs の作業環境中で使用する濃度での吸入や経口摂取は、肝臓や骨髄で遺伝毒性を引き起す可能性は低いと考えられる。しかしながら、肝臓における TiO₂ の生体内持続性を考慮すると、肝臓や他の TiO₂ が蓄積する組織における遺伝毒性の有無を検証するために、より長期間の実験を行う必要がある。

参考文献

- 1) IARC, IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc, Vol. 93, Lyon, France, (2010).
- 2) Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, et al. Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal. Toxicol.* 1995; 7: 533-556.
- 3) Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2011; 15: 481-508.

- 4) Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Part. Fibre Toxicol. 2013; 10: 15.
- 5) Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko VV, Daugel-Dauge NO, Kovalenko MA, Krivtsova EK, et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. Mutat. Res. 2011; 726: 8-14.
- 6) Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. Cancer Res. 2009; 69: 8784-8789.
- 7) Saber AT, Jacobsen NR, Mortensen A, Szarek J, Jackson P, Madsen AM, et al. Nanotitanium dioxide toxicity in mouse lung is reduced in sanding dust from paint. Part. Fibre Toxicol. 2012; 9: 4.
- 8) Saber AT, Jensen KA, Jacobsen NR, Birkedal R, Mikkelsen L, Moller P, et al. Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. Nanotoxicology. 2012; 6: 453-471.
- 9) Sadiq R, Bhalli JA, Yan J, Woodruff RS, Pearce MG, Li Y, et al. Genotoxicity of TiO₂ anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. Mutat. Res. 2012; 745: 65-72.
- 10) Lindberg HK, Falck GC, Catalan J, Koivisto AJ, Suhonen S, Jarventaus H, et al. Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. Mutat. Res. 2012; 745: 58-64.
- 11) Landsiedel R, Ma-Hock L, Van Ravenzwaay B, Schulz M, Wiench K, Champ S, et al. Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. Nanotoxicology. 2010; 4: 364-381.
- 12) Naya M, Kobayashi N, Ema M, Kasamoto S, Fukumuro M, Takami S, et al. In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2012; 62: 1-6.
- 13) Hwang YJ, Jeung YS, Seo MH, Yoon JY, Kim DY, Park JW, et al. Asian dust and titanium dioxide particles-induced inflammation and oxidative DNA damage in C57BL/6 mice. Inhal. Toxicol. 2010; 22: 1127-1133.
- 14) Chen Z, Wang Y, Ba T, Li Y, Pu J, Chen T, et al. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. Toxicol. Lett. 2014; 226: 314-319.
- 15) Dobrzynska MM, Gajowik A, Radzikowska J, Lankoff A, Dusinska M, Kruszewski M. Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo. Toxicology. 2014; 315: 86-91.
- 16) Louro H, Tavares A, Vital N, Costa PM, Alverca E, Zwart E, et al. Integrated approach to the in vivo genotoxic effects of a titanium dioxide nanomaterial using LacZ plasmid-based transgenic mice. Environ. Mol. Mutagen. 2014; 55: 500-509.
- 17) Umbreit TH, Francke-Carroll S, Weaver JL, Miller TJ, Goering PL, Sadrieh N, et al. Tissue distribution and histopathological effects of titanium dioxide nanoparticles after intravenous or subcutaneous injection in mice. J. Appl. Toxicol. 2012; 32: 350-357.
- 18) Xie G, Wang C, Sun J, Zhong G. Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles. Toxicol. Lett. 2011; 205: 55-61.
- 19) Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B, Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. Arch. Toxicol. 2008; 82: 151-157.
- 20) Sugibayashi K, Todo H, Kimura E. Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles. J. Toxicol. Sci. 2008; 33: 293-298.
- 21) Nohmi T, Katoh M, Suzuki H, Matsui M, Yamada M, Watanabe M, et al. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi- and 6-thioguanine selections. Environ. Mol. Mutagen. 1996; 28: 465-470.
- 22) Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J, Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. Toxicology. 2009; 264: 110-118.
- 23) Ohtani S, Unno A, Ushiyama A, Kimoto T, Miura D, Kunugita N. The in vivo Pig-a gene mutation assay is useful for evaluating the genotoxicity of ionizing radiation in mice. Environ. Mol. Mutagen. 2012; 53: 579-588.
- 24) Nohmi T, Suzuki T, Masumura K. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. Mutat. Res. 2000; 455: 191-215.
- 25) Shibata A, Masutani M, Nozaki T, Kamada N, Fujihara H, Masumura K, et al. Improvement of the Spi- assay for mutations in gpt delta mice by including magnesium ions during plaque formation. Environ. Mol. Mutagen. 2003; 41: 370-372.
- 26) 厚生労働省. リスク評価書(中間報告)(酸化チタン(IV)). <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002grzr-att/2r9852000002gscs.pdf>
- 27) Rothen-Rutishauser BM, Schurch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. Environ. Sci. Technol. 2006; 40: 4353-4359.

- 28) Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2014; 8: 233-278.