

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の
ラットを用いた吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号：0856

CAS No. 1317-70-0

2015年12月22日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

目次

| | |
|---------------------------|--------------|
| 標題 | |
| 試験目的 | |
| 試験法 | |
| 動物福祉 | |
| 試験委託者 | |
| 試験施設及び運営管理者 | |
| 試験日程 | |
| 試験関係者一覧 | |
| 試資料の保管 | |
| 試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付 | |
| 陳述書 | |
| 本文 | |
| TABLES | A ~ M |
| FIGURES | 1 ~ 7 |
| PHOTOGRAPHS | 1 ~ 4 |
| APPENDICES | 1 ~ 4 |

標題

酸化チタン(ナノ粒子、アナターゼ型)のラットを用いた吸入による2週間毒性試験

試験目的

酸化チタン(ナノ粒子、アナターゼ型)の吸入によるがん原性試験の投与濃度決定試験(13週間試験)の予備試験として、酸化チタン(ナノ粒子、アナターゼ型)(被験物質番号1264)をラットに2週間全身暴露(経気道投与)して、その生体影響を検索した。

試験法

本試験はOECD化学品テストガイドライン412(亜急性吸入毒性:28日試験 2009年9月7日採択)を参考にして実施した。

動物福祉

本試験は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示第88号、最終改正平成25年8月30日環境省告示第84号)、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日厚生労働大臣官房厚生科学課長通知)及び「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規定」(平成24年4月25日規程第17号、最終改正平成25年3月28日規程第12号)を遵守する。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査された(承認番号0104)。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞が関1-2-2

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の
ラットを用いた吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号：0856

本文

要約

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）のがん原性試験の投与濃度決定試験（13週間試験）の予備試験として、その生体影響を検索する目的で F344/DuCrIj ラットを用いた吸入による2週間の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群4群と対照群1群の計5群の構成で、各群雌雄とも5匹とし、合計50匹を用いた。投与濃度は、雌雄とも0（対照群）、0.2、1、5、及び25 mg/m³とした。投与期間は1日6時間、週5日間の投与（全身暴露による経気道投与）で2週間とした。

投与期間中は、生死確認、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液の検査（細胞学的検査及び生化学的検査）、病理学的検査（肉眼的観察、臓器重量及び病理組織学的検査）及び肺中の酸化チタン量の測定を行った。

酸化チタンの暴露の結果、動物に死亡はみられず、一般状態の観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液の検査、肉眼的観察及び臓器重量では、特記すべき変化はみられなかった。しかし、病理組織学的検査で、25 mg/m³群の鼻腔及び鼻咽頭に酸化チタンの暴露の反応性変化と考えられる杯細胞過形成が認められた。また、全投与群で肺の細気管支及び肺胞腔に酸化チタンの沈着が認められ、肺胞腔の酸化チタンは全て肺胞マクロファージに貪食されていた。酸化チタンの沈着は5 mg/m³以上の群で肺の気管支関連リンパ組織、25 mg/m³群で肺胞壁、鼻咽頭の鼻腔関連リンパ組織及び縦隔リンパ節に認められた。肺中の酸化チタン量は、暴露濃度に相関して増加し、肺1gあたり各群とも雌雄間でほぼ同程度であった。

以上のように、酸化チタンの暴露により25 mg/m³群で鼻腔及び鼻咽頭に反応性変化が認められたのみであった。従って、13週間試験では、毒性、特に肺毒性検出のために2週間試験の最高濃度の25 mg/m³よりも高い濃度が必要と考え50 mg/m³を最高濃度に設定した。また、この次に高い濃度は、投与期間の違いによる毒性発現の差異を比較するために2週間試験でも実施した25 mg/m³を設定した。以下の濃度は、12.5及び6.3 mg/m³（公比2）とした。

試験材料

-1 被験物質の性状等

-1-1 名称等

名 称： 酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）
 別 名（IUPAC）： 二酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）
 C A S N o . : 1317-70-0

-1-2 構造及び物理化学的性状（文献1、2）

化 学 式： TiO_2
 分 子 量： 79.9
 性 状： 無色～白色の結晶性粉末
 比 重： 3.9～4.3
 溶 解 性： 水に不溶

-2 使用被験物質（テイカ（株）検査成績表及び不純物分析結果）

製 造 元： テイカ（株）
 グ レ ー ド： 光触媒用酸化チタン
 商 品 名： 酸化チタンAMT-600
 ロ ッ ト 番 号： 6545
 結 晶 形 態： アナターゼ型
 一 次 粒 径： 30 nm
 酸化チタン含有量： 97.9 %
 水 分： 1.5 %
 不 純 物： SO_3 : 0.2～0.3 %、 Nb_2O_5 : 0.2～0.3 %、 P_2O_5 : 0.1～0.2 %
 比 表 面 積： 63 m^2/g
 選 択 理 由： AMT-600の一次粒径が、ナノ酸化チタンの吸入暴露や気管内
 投与試験の報告に多い20～29 nm（文献2）に近いことを理
 由とし、選択した。
 保 管 条 件： 室温で暗所に保管

－3 試験動物

動物は、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）のがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株)(厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795)の F344/DuCrI CrIj ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 28 匹を 4 週齢で導入し、検疫・馴化を 2 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 25 匹(群構成時体重範囲、雄：107～120 g、雌：90～100 g)を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCrI CrIj ラット (SPF) を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

試験方法

－1 投与

－1－1 投与経路

投与経路は、全身暴露による経気道投与とした。

－1－2 投与方法

投与方法は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

－1－3 投与期間

投与期間は、1 日 6 時間、週 5 日の暴露で 2 週間とし、計 10 回の暴露を行った。

－1－4 投与濃度

投与濃度は、0.2、1、5、及び 25 mg/m³ の 4 段階（公比 5）に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

－1－5 投与経路、投与期間、投与時間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、がん原性試験の投与濃度を決定する13週間試験の投与濃度を決定するため、週5日の暴露で2週間とした。

投与時間はOECD化学品テストガイドライン412(文献3)に従い1日6時間とした。

投与濃度は、Ma-Hockら(文献4)のナノ酸化チタン(一次粒径平均25.1 nm、組成：ルチル14%、アナターゼ86%)を0、2、10、及び50 mg/m³の濃度でラットに5日間(1日6時間)吸入暴露した試験結果を参考にして決定した。Ma-Hockらは、50 mg/m³群で肺重量の増加及び肺の病理組織学的変化が認められたと報告したが、本試験では、投与日数がMa-Hockらの試験の2倍の10日間であることから、最高濃度として25 mg/m³を設定した。また、粉じん暴露の試験であることから低濃度での毒性兆候を把握するために、公比は通常使用する2~3よりも大きい5を選択し、25 mg/m³以下、5、1、及び0.2 mg/m³を設定した。

－1－6 被験物質の発生方法及び濃度調整

酸化チタンエアロゾルの発生方法をFIGURE 1に示した。

粉じん発生装置(ダストフィーダーDF-3、柴田科学(株))で酸化チタンエアロゾルを作製し、これを微粒子発生装置(セイシン企業(株)特注)に導入し、エアロゾルの整粒及び分溜を行い、吸入チャンバーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はOPC(Optical particle controller、OPC-AP-600、柴田科学(株))で監視し、その上下限信号によりダストフィーダーの運転を帰還制御し、吸入チャンバー内濃度の定常性を維持した。

－1－7 被験物質濃度の測定

暴露開始から終了までOPCを使用して吸入チャンバー内の酸化チタン濃度を連続測定した。暴露期間中の1週1日、2週1日に、暴露開始1時間後から3回、フッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター(T60A20、55 mmΦ、(株)東京ダイレック)に吸入チャンバー内の酸化チタンを捕集して質量濃度(mg/m³)を実測した。この値と質量濃度測定時のOPCの個数濃度平均値から個数濃度-質量濃度変換係数(K値)を算出した。個数濃度にK値を乗じて求めた質量濃度を吸入チャンバー内の被験物質濃度として表示し、集計した。なお、暴露開始日では、試験開始前の予備暴露により求めたK値を使用して吸入チャンバー内濃度を表示した。

濃度測定結果を **TABLE A** に示した。各投与群の被験物質濃度に関しては、その平均値と設定濃度の差（（平均値－設定濃度）／設定濃度×100）が2%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が12%以内であり、高い精度で吸入チャンバー内濃度が管理されていることが示された。

－1－8 吸入チャンバー内の粒子径分布の測定

投与期間中に1回、**MOUDI**（**Micro-orifice uniform deposit cascade impactor**、**MOUDI-MSP**社）を使用して、吸入チャンバー内の酸化チタンの粒子径を測定した。吸入チャンバー内の酸化チタンを **MSP**社製純正アルミホイル（47 mm、シリコンオイルを塗布）に捕集し、各ステージの捕集重量を測定した。

各ステージの酸化チタン捕集重量と捕集重量累積率を **APPENDIX 1**（1）～（4）に示した。その結果を基に確率対数による累積頻度分布グラフを作成し（**FIGURE 2～5**）、空気動学的質量中位径（**MMAD**： **Mass Median Aerodynamic Diameter**）及び幾何標準偏差（**g**： **geometric standard deviation**）を求め、下記に示した。投与群の吸入チャンバー内の酸化チタンの **MMAD** は **0.77～0.86** μm、**g** は全ての群で **2.1** となり、投与群間で差はみられなかった。

| 群 名 称 | MMAD (μ m) | g |
|-------------------------|--------------|-----|
| 0.2 mg/m ³ 群 | 0.77 | 2.1 |
| 1 mg/m ³ 群 | 0.84 | 2.1 |
| 5 mg/m ³ 群 | 0.80 | 2.1 |
| 25 mg/m ³ 群 | 0.86 | 2.1 |

－1－9 吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察

投与期間中に1回、吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察を行なった。金蒸着を施した **0.2** μm のポアサイズのニュークリポアフィルター（47 mm、**Whatman**社）に吸入チャンバー内の酸化チタンを捕集し、走査電子顕微鏡（**SEM**； **Scanning electron microscope**、（株）日立ハイテクノロジーズ **SU8000** 形）を用いて観察した。

各投与群の吸入チャンバー内の酸化チタンの **SEM** 写真を **PHOTOGRAPH** に示した。二次粒子となった大型の粒子が多数観察されたが、一部微小な酸化チタンも観察された。これらの分散は、全投与群ともに良好で、投与群間に大きな差はみられなかった。

－2 動物管理

－2－1 各群の使用動物数

投与群 4 群と対照群 1 群の計 5 群を設け、各群雌雄各 5 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数及び動物番号

| 群番号 | 群名称 | 雄 使用動物数(動物番号) | 雌 使用動物数(動物番号) |
|-----|-------------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 対照群 | 5 匹 (1001 ~ 1005) | 5 匹 (2001 ~ 2005) |
| 1 | 0.2 mg/m ³ 群 | 5 匹 (1101 ~ 1105) | 5 匹 (2101 ~ 2105) |
| 2 | 1 mg/m ³ 群 | 5 匹 (1201 ~ 1205) | 5 匹 (2201 ~ 2205) |
| 3 | 5 mg/m ³ 群 | 5 匹 (1301 ~ 1305) | 5 匹 (2301 ~ 2305) |
| 4 | 25 mg/m ³ 群 | 5 匹 (1401 ~ 1405) | 5 匹 (2401 ~ 2405) |

－2－2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した（文献 5）。

動物の個体識別は、検疫・馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室（701、702 室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

－2－3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間は検疫室（717 室）、馴化及び投与期間は吸入試験室（701、702 室）の吸入チャンパー内で動物を飼育した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンパー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。

検疫室及び吸入試験室の温湿度は実測値（平均値 ± 標準偏差）を < > 内に、また、吸入チャンパー内の環境の測定結果は APPENDIX 2 に示した。吸入試験室及び吸入チャンパー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温 度 : 検 疫 室 ; 22 ± 3 < 23.6 ± 0.1 >
 吸 入 試 験 室 ; 22 ± 3
 < 701 室 ; 22.0 ± 0.3 、 702 室 ; 21.9 ± 0.2 >
 吸入チャンバー内 ; 22 ± 3
 湿 度 : 検 疫 室 ; 55 ± 20 % < 51 ± 0 % >
 吸 入 試 験 室 ; 50 ± 20 %%
 < 701 室 ; 51 ± 4 %、 702 室 ; 52 ± 4 % >
 吸入チャンバー内 ; 50 ± 20
 明暗サイクル : 12 時間点灯 (8:00 ~ 20:00) / 12 時間消灯 (20:00 ~ 8:00)
 換気回数 : 検 疫 室 ; 15 ~ 17 回 / 時
 吸 入 試 験 室 ; 15 ~ 17 回 / 時
 吸入チャンバー内 ; 10 ± 1 回 / 時
 圧 力 : 吸入チャンバー内 ; 0 ~ -15 × 10Pa
 ケージへの動物の収容方法 : 単飼
 ケージの材質・形状・寸法等 :
 検疫期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ (170(W) × 294(D) × 176(H) mm / 匹)
 検疫・馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (125(W) × 216(D) × 176(H) mm / 匹)
 投与及び観察期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (150(W) × 216(D) × 176(H) mm / 匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) 千葉工場製造の CR-LPF 固型 (30kGy- 線照射滅菌飼料) を自由摂取させた。ただし、暴露中及び定期解剖前日の夕方からは絶食させた。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株) から分析データを入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

(3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水(神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。ただし、被験物質暴露中は給水しなかった。

なお、飲水は、試験施設として3ヶ月ごとに実施している水質検査((財)食品薬品安全センター秦野研究所に依頼) で、建築物衛生法施行規則第4条に基づく水質基準に適合していることを確認し、その記録を保管した。

－3 観察・検査項目及び方法

－3－1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

－3－2 体重測定

体重測定は週 1 回行った。また、定期解剖動物の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

－3－3 摂餌量測定

摂餌量は週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

－3－4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、病理学的検査直前にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

－3－5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、病理学的検査直前にイソフルラン麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

－3－6 気管支肺胞洗浄液の検査

血液学的検査及び血液生化学的検査用に採血を終えた動物の左肺の肺門部気管支を結紮して、右肺を生理食塩水で洗浄し回収した気管支肺胞洗浄液を使用して、下記の項目について検査を行なった。検査方法は **APPENDIX 4** に示した。

細胞学的検査項目：総細胞数、細胞分類

生化学的検査項目：総蛋白、アルブミン、LDH、ALP、 γ -GTP

－3－7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について、肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時の生存動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：胸腺、左肺、腎臓、脾臓、肝臓

(3) 臓器の採取保存

全動物について、下記の器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺は浸透固定、右肺は注入固定）、骨髓（大腿骨）、リンパ節（縦隔等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、胸郭、横隔膜

(4) 病理組織学的検査

全動物について、鼻腔（切歯の後端（レベル1）、切歯乳頭（レベル2）、第一臼歯の前端（レベル3）の3ヶ所（文献6））、鼻咽頭、喉頭、気管、肺及び縦隔リンパ節を切り出し、パラフィン包埋、薄切及びヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。

－3－8 肺中の酸化チタン量の測定

病理組織学的検査に使用しなかった左肺の一部を使用して酸化チタン量を原子吸光法により測定し、肺 1g あたりの酸化チタン量を求めた。

－4 数値処理及び統計方法

－4－1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は mg/m^3 を単位として、小数点以下第 3 位までを表示した。

粒子径の単位は、 μm を単位とし、小数点以下第 2 位まで表示し、 g は小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と桁数により表示した。

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査、生化学的検査は APPENDIX 4 に示した単位と桁数により表示した。

肺中の酸化チタン量の測定は、左肺で行い μg を単位として、肺 1 g あたりの酸化チタン量を小数点以下第 2 位まで表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

－4－2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液の検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、そ

の結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は **Dunnett** の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して、**Kruskal-Wallis** の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には、**Dunnett** 型の多重比較を行った。

各検定は 5%の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有意水準の表示を行った。

試験成績

－1 生死状況

生存動物数を TABLE B1, B2 に示した。

－雌雄－

動物の死亡はみられなかった。

－2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C1, C2 に示した。

－雌雄－

特記すべき変化はみられなかった。

－3 体重

体重及び生存動物数を TABLE D1, D2 に示し、体重及びその推移を TABLE D3, D4 及び FIGURE 6, 7 に示した。

－雄－

各投与群とも体重は順調に増加し、投与期間を通じて対照群との間に差は認められなかった。投与期間終了時の投与群の体重は、対照群に対し、**0.2 mg/m³ 群：98 %、1 mg/m³ 群：99 %、5 mg/m³ 群：100 %、及び 25 mg/m³ 群：97 %**であった。

－雌－

各投与群とも体重は順調に増加し、投与期間を通じて対照群との間に差は認められなかった。投与期間終了時の投与群の体重は、対照群に対し、**0.2 mg/m³ 群：96 %、1 mg/m³ 群：97 %、5 mg/m³ 群：94 %、及び 25 mg/m³ 群：93 %**であった。

－4 摂餌量

摂餌量及び生存動物数を TABLE E1, E2 に示し、摂餌量を TABLE E3, E4 に示した。

－雄－

投与期間を通じて、被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。投与期間終了時の投与群の摂餌量は、対照群に対し、**0.2 mg/m³ 群：98 %、1 mg/m³ 群：101 %、5 mg/m³ 群：100 %、及び 25 mg/m³ 群：95 %**であった。

－雌－

投与期間を通じて、被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。投与期間終了時の

投与群の摂餌量は、対照群に対し、**0.2 mg/m³ 群：94 %**、**1 mg/m³ 群：93 %**、**5 mg/m³ 群：97 %**、及び **25 mg/m³ 群：93 %**であった。

－5 血液学的検査

血液学的検査の結果を **TABLE F1, F2** に示した。

－雄－

対照群及び **25 mg/m³ 群**の各 1 匹については、検査時の血液凝固により測定ができず、4 匹で行った。

白血球数の高値が **25 mg/m³ 群**にみられた。しかし、白血球分類では対照群及び **25 mg/m³ 群**の間に差はなかった。この白血球数の高値は僅かで毒性学的に意味のある変化とは判断しなかった。

－雌－

対照群及び **25 mg/m³ 群**の各 2 匹、**0.2 mg/m³ 群**及び **5 mg/m³ 群**の各 1 匹については、検査時の血液凝固により測定ができず、対照群及び **25 mg/m³ 群**の検査は各 3 匹、検査は各 4 匹で行った。

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

－6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を **TABLE G1, G2** に示した。

－雄－

無機リンの高値が **25 mg/m³ 群**にみられ、また、リン脂質の低値が **1 mg/m³ 群**及び **5 mg/m³ 群**、クレアチニンの低値が **5 mg/m³ 群**及び **25 mg/m³ 群**にみられた。これらの変化は、いずれもわずかな変化であること、特にリン脂質及びクレアチニンの変化は、減少性的変化であり、しかも投与濃度との相関がみられないことから、これらを毒性学的に意味のある変化とは判断しなかった。

－雌－

ナトリウムの高値が **1 mg/m³ 以上**の群にみられ、クロールの高値が **5 mg/m³ 群**にみられた。これらの変化は、いずれもわずかな変化であること、クロールの変化は投与濃度との相関がみられないことから、これらを毒性学的に意味のある変化とは判断しなかった。

－7 気管支肺胞洗浄液の検査

－7-1 気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査の結果を TABLE H1, H2 に示した。

－雌雄－

特記すべき変化は認められなかった。

－7-2 気管支肺胞洗浄液の生化学的検査

気管支肺胞洗浄液の生化学的検査の結果を TABLE I1, I2 に示した。

－雌雄－

特記すべき変化は認められなかった。

－8 病理学的検査

－8-1 肉眼的観察

－雌雄－

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

－8-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量及び体重比を TABLE J1, J2 と TABLE K1, K2 に示した。

なお、気管支肺胞洗浄液の検査に右肺を使用したため、右肺の重量は測定せず、肺重量は左肺の測定値を表示した。

－雄－

腎臓の体重比の高値が 5 mg/m³ 以上の群に示された。しかし、これらの変化の程度は軽微であること、また、実重量では統計学的な差はなく、投与濃度との相関性もみられないことから、解剖時体重のわずかな低値によるものと考え、腎重量に差はないと判断した。

－雌－

肺の体重比の高値が 1 mg/m³ 群及び 25 mg/m³ 群に示された。しかし、これらの変化の程度は軽微であること、また、実重量では統計学的な差はなく、投与濃度との相関性もみられないことから、解剖時体重のわずかな低値によるものと考え、肺重量に差はないと判断した。

－8－3 病理組織学的検査

病理組織学的検査は鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺及び縦隔リンパ節について行い、その結果を TABLE L1, L2 に示した。

－雄－

全投与群で、肺の細気管支及び肺胞腔に粒子（酸化チタン）の沈着（軽度）が全匹に認められた。沈着していた酸化チタンは褐色の不定形を示し、肺胞腔で観察した酸化チタンは、全て肺胞マクロファージに貪食されていた。また、貪食した肺胞マクロファージは気管支終末部に集まる傾向を示した。

また、 5 mg/m^3 以上の群では、気管支関連リンパ組織に酸化チタンの沈着（軽度）が全匹に認められた。さらに 25 mg/m^3 群では、これらに加え鼻腔の杯細胞過形成（軽度）及び鼻咽頭の杯細胞過形成（軽度）が 4 匹認められ、酸化チタンの沈着（軽度）が鼻腔関連リンパ組織に 2 匹、肺胞壁及び縦隔リンパ節に 5 匹認められた。

－雌－

全投与群で、肺の細気管支及び肺胞腔に粒子（酸化チタン）の沈着（軽度）が全匹に認められた。沈着していた酸化チタンは褐色の不定形を示し、肺胞腔で観察した酸化チタンは、全て肺胞マクロファージに貪食されていた。また、貪食した肺胞マクロファージは気管支終末部に集まる傾向を示した。

また、 25 mg/m^3 群では、鼻腔の杯細胞過形成（軽度）が 2 匹、鼻咽頭の杯細胞過形成（軽度）が 4 匹認められ、酸化チタンの沈着（軽度）が鼻腔関連リンパ組織に 4 匹、縦隔リンパ節に 3 匹、肺胞壁及び気管支関連リンパ組織に 5 匹認められた。

－9 肺中の酸化チタン量の測定

肺 1g あたりの酸化チタン量を TABLE M に示した。

－雄－

0.2 mg/m^3 群で $18.24 \pm 2.30 \mu\text{g}$ 、 1 mg/m^3 群で $63.33 \pm 7.55 \mu\text{g}$ 、 5 mg/m^3 群で $212.92 \pm 33.62 \mu\text{g}$ 、及び 25 mg/m^3 群で $816.71 \pm 156.39 \mu\text{g}$ であった。このように酸化チタン量は、投与濃度に相関して増加した。

－雌－

0.2 mg/m^3 群で $17.04 \pm 2.24 \mu\text{g}$ 、 1 mg/m^3 群で $67.79 \pm 6.89 \mu\text{g}$ 、 5 mg/m^3 群で $221.30 \pm 19.96 \mu\text{g}$ 、及び 25 mg/m^3 群で $937.11 \pm 157.89 \mu\text{g}$ であった。このように酸化チタン量は、投与濃度に相関して増加した。

考察及びまとめ

酸化チタン(ナノ粒子、アナターゼ型)の予備試験として、その生体影響を検索する目的で F344/DuCrIj ラットを用いた吸入による 2 週間の試験を実施した。

本試験は、投与群 4 群と対照群 1 群の計 5 群の構成で、各群雌雄とも 5 匹とし、合計 50 匹を用いた。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、0.2、1、5、及び 25 mg/m³ とした。投与期間は 1 日 6 時間、週 5 日間の投与(全身暴露による経気道投与)で 2 週間とした。投与期間中は、生死確認、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液の検査、病理学的検査及び肺中の酸化チタン量の測定を行った。

－1 用量－反応関係

酸化チタン(ナノ粒子、アナターゼ型)の暴露の結果、動物に死亡はみられず、一般状態の観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液の検査、肉眼的観察及び臓器重量では特記すべき変化はみられなかった。しかし、病理組織学的検査で、25 mg/m³ 群に鼻腔及び鼻咽頭の杯細胞過形成が認められた。この杯細胞過形成は刺激物の反復吸入暴露による反応として認められる(文献 7)。従って、酸化チタンの暴露により鼻腔と鼻咽頭の上皮は反復刺激を受け、その物理的的刺激に対する反応性変化として杯細胞過形成が出現したものと考えた。なお、杯細胞過形成以外に鼻腔や鼻咽頭に病理組織学的変化は認められなかった。酸化チタンの沈着が全投与群の肺の細気管支や肺胞腔に、また、5 mg/m³ 以上の群で肺の気管支関連リンパ組織、25 mg/m³ 群で肺胞壁、鼻咽頭の鼻腔関連リンパ組織及び縦隔リンパ節に認められた。肺胞腔にみられた酸化チタンは、肺胞マクロファージに貪食されており、肺胞マクロファージに貪食されていない酸化チタンはみられなかった。また、酸化チタンを貪食した肺胞マクロファージは気管支終末部に集まる傾向を示した。これらの肺胞マクロファージには、病理組織学的な変化はみられなかった。気管支関連リンパ組織及び縦隔リンパ節に酸化チタンの沈着が観察されたことから、肺に沈着した酸化チタンはリンパ行性に移動したと考えられた。

肺中の酸化チタン量は、原子吸光分析により雌雄とも投与濃度に相関して増加することが明らかにされ、同じ投与濃度では肺 1g あたりの量に雌雄差は認められなかった。肺中の酸化チタン量の濃度相関性、肺胞マクロファージによる貪食作用及びリンパ節での酸化チタンの観察結果から、肺胞に到達した酸化チタンは、正常なクリアランス機構により速やかに肺から排泄されているものと推察した。

以上、酸化チタン(ナノ粒子、アナターゼ型)の 2 週間吸入暴露により、酸化チタンは肺胞まで達していること、マクロファージの貪食やリンパ節への移行により肺胞から排泄されていることが示された。肺中の酸化チタン量は、投与濃度相関的に増加した。病理組織学

的には、鼻腔及び鼻咽頭に反応性変化が認められたが、肺には変化は検出されなかった。

－2 13 週間試験の濃度決定

本試験の結果より、13 週間試験の投与濃度を以下のように決定した。

本試験では、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の暴露の結果、動物に死亡はみられず、一般状態の観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液の検査、肉眼的観察及び臓器重量では特記すべき変化はみられなかったが、病理組織学的検査で鼻腔及び鼻咽頭に反応性変化が認められた。

従って、13 週間試験では、最高濃度での体重への影響を考え、さらに、肺毒性検出のために、2 週間試験の最高濃度の 25 mg/m³ よりも高い濃度が必要と考え 50 mg/m³ を最高濃度に設定した。また、次に高い濃度は、投与期間の違いによる毒性発現の差異を比較するために 2 週間試験でも実施した 25 mg/m³ を設定した。以下の濃度は、12.5 及び 6.3 mg/m³（公比 2）とした。

文献

1. 日本産業衛生学会 許容濃度等に関する委員会. 2013. 許容濃度の暫定値の提案理由 (2013 年度) 二酸化チタンナノ粒子. 産衛誌 55 : 234-239.
2. IARC. 2010. Carbon Black, Titanium Dioxide and Talk. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 93: 193-276. Lyon: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
3. OECD. 2009. OECD Guideline for The Testing of Chemicals 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-day Study. Paris: Adapted: 7 September 2009. Organisation for Economic Co-operation and Development.
4. Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, Ravenzwaay BV et al. 2009. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. Inhal Toxicol 21:102-118.
5. 阿部正信 . 1986 . 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立 . 薬理と治療 14 : 7285-7302 .
6. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. Exp Toxic Pathol. 49:97-104.
7. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D et al. 2009. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse, respiratory tract. Toxicol Pathol. 37(Supplement): 5S-73S.

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。