

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 13 週間毒性試験報告書

試験番号：0863

CAS No. 1317-70-0

2017 年 3 月 28 日

独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A1～O	
FIGURES	1～7	
PHOTOGRAPHS	1～3	
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 13 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を決定するために、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 13 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 413（亜慢性吸入毒性：90 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 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、最終改正平成 27 年 2 月 20 日厚生労働省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程」（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）を遵守した。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 0120）。

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 13 週間毒性試験報告書

試験番号：0863

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	2
I-1 被験物質の性状等	2
I-1-1 名称等	2
I-1-2 構造及び物理化学的性状	2
I-2 使用被験物質	2
I-3 同一性、安定性	3
I-4 試験動物	3
II 試験方法	4
II-1 投与	4
II-1-1 投与経路	4
II-1-2 投与方法	4
II-1-3 投与期間	4
II-1-4 投与濃度	4
II-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	4
II-1-6 被験物質の発生方法及び濃度調整	5
II-1-7 被験物質濃度の測定	5
II-1-8 吸入チャンバー内の粒子径分布の測定	5
II-1-9 吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察	6
II-2 動物管理	6
II-2-1 各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法	7
II-2-3 飼育条件	7
(1) 飼育環境	7
(2) 飼料	8
(3) 飲水	8
II-3 観察・検査項目及び方法	8
II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察	8
II-3-2 体重測定	8

II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	血液学的検査	9
II-3-5	血液生化学的検査	9
II-3-6	気管支肺胞洗浄液 (BALF) 検査	9
(1)	BALF の細胞学的検査	9
(2)	BALF の生化学的検査	9
II-3-7	病理学的検査	9
(1)	肉眼的観察 (剖検)	9
(2)	臓器重量	10
(3)	臓器の採取保存	10
(4)	病理組織学的検査	10
II-4	数値処理と統計方法	10
II-4-1	数値の取り扱いと表示	10
II-4-2	統計処理	11
III	試験成績	12
III-1	生死状況	12
III-2	一般状態	12
III-3	体重	12
III-4	摂餌量	12
III-5	血液学的検査	13
III-6	血液生化学的検査	13
III-7	気管支肺胞洗浄液 (BALF) 検査	14
III-7-1	BALF の細胞学的検査	14
III-7-2	BALF の生化学的検査	14
III-8	病理学的検査	15
III-8-1	肉眼的観察 (剖検)	15
III-8-2	臓器重量	15
III-8-3	病理組織学的検査	16
III-9	肺中酸化チタン量の測定	18
IV	考察及びまとめ	19
IV-1	用量-反応関係	19
IV-2	無毒性量 (NOAEL)	20

IV-3	がん原性試験の濃度決定	21
V	文献	22
VI	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	23

要約

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がん原性試験の投与濃度を決定するために、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）をラットに13週間全身暴露（経気道投与）して、その生体影響を検索した。

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10匹とし、合計100匹を用いた。投与濃度は、雌雄とも0（対照群）、6.3、12.5、25及び50 mg/m³とした。投与期間は1日6時間、1週5日間の投与（全身暴露による経気道投与）で13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（BALF）検査、肉眼的観察（剖検）、臓器重量の測定、病理組織学的検査及び肺中酸化チタン量の測定を行った。

酸化チタンの暴露の結果、雌雄に死亡はみられず、一般状態の観察及び体重測定においても特記すべき変化はみられなかった。摂餌量の測定では、投与期間の初期に僅かな低値が雌の12.5 mg/m³以上の群でみられたが、その後は対照群との差はなかった。血液学的検査では、白血球分類で好酸球比の増加が雄の12.5 mg/m³以上の群でみられた。血液生化学的検査では、AST、尿素窒素及びLDHの高値が雌の50 mg/m³群でみられた。BALFの細胞学的検査では、雌雄とも主に好中球及びリンパ球の増加に由来する総細胞数の増加が50 mg/m³群でみられた。細胞分類では、好中球比の増加が雄の12.5 mg/m³以上の群、雌では全投与群でみられた。また、リンパ球比の増加が雌雄の25 mg/m³以上の群でみられた。BALFの生化学的検査では、LDHの高値が雄の12.5 mg/m³以上の群、雌では全投与群でみられ、また、総蛋白の高値が雌雄の12.5 mg/m³以上の群、アルブミンの高値が雌雄の50 mg/m³群でみられた。剖検観察では、肺の白色斑及び縦隔リンパ節の白色が雌雄の25 mg/m³以上の群でみられた。臓器重量の測定では、肺重量の増加が雌雄の25 mg/m³以上の群でみられた。病理組織学的検査では、鼻腔で杯細胞過形成、呼吸上皮及び嗅上皮にエオジン好性変化が、雄の12.5 mg/m³以上の群、雌は全投与群でみられた。鼻咽頭では、杯細胞過形成が雌雄の全投与群でみられた。肺では、肺胞上皮の過形成が、雄の12.5 mg/m³以上の群、雌は全投与群でみられた。また、粒子の沈着が雌雄の全投与群の鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）、肺（肺胞腔）、気管支関連リンパ組織（BALT）及び縦隔リンパ節にみられた。肺胞腔では、ほとんどの粒子が肺胞マクロファージに貪食されていた。さらに、肺胞マクロファージの崩壊が雌雄の50 mg/m³群でみられた。肺中酸化チタン量は、雌雄の全投与群で投与濃度に対応して増加した。

以上、病理組織学的検査で最低濃度の6.3 mg/m³群から雌雄の呼吸器系に組織変化がみられた。従って、無毒性量（NOAEL）は求められず、最少毒性量（LOAEL）を6.3 mg/m³と考えた。また、がん原性試験の投与濃度は雌雄とも最高濃度を8 mg/m³とし、以下、2 mg/m³、0.5 mg/m³（公比4）を設定した。

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等 (文献 1、2)

I-1-1 名称等

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

I-1-2 構造及び物理化学的性状

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

I-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、アナターゼ型ナノ酸化チタンの吸入暴露や気管内投与試験報告に多い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

I-3 同一性、安定性

被験物質の同一性は、酸化チタン中のチタン含量を偏光ゼーマン原子吸光光度計（株式会社 日立製作所 Z-5010）で測定し、確認した。また、被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に酸化チタン中のチタン含量を偏光ゼーマン原子吸光光度計（株式会社 日立製作所 Z-5010）で測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

I-4 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）の F344/DuCrIcrlj ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 55 匹を 4 週齢で導入し、検疫及び馴化をそれぞれ 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常がみられなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 50 匹（群わけ時体重範囲、雄：109～124 g、雌：91～104 g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCrIcrlj 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。

II 試験方法

II-1 投与

II-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。

II-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なった。

II-1-3 投与期間

投与期間は、1日6時間、1週5日の暴露で13週間とし、土日を除く計60回の暴露を行なった。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、6.3、12.5、25及び50 mg/m³の4段階（公比2）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。

II-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ため、週5日の暴露で13週間とした。

投与時間は、OECD 化学品テストガイドライン 413（文献3）に従い1日6時間とした。

投与濃度は、2週間毒性試験（試験番号0856）の結果をもとに決定した。2週間試験は、F344/DuCr1Cr1j ラットの雌雄を用いて、0（対照群）、0.2、1、5及び25 mg/m³の濃度で行った。その結果、動物に死亡はみられず、一般状態、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（BALF）測定、臓器重量及び病理組織学的検査でも異常所見はみられなかった。

以上のことから、13週間試験の最高投与濃度は、毒性検出のためには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、以下、12.5 及び 6.3 mg/m³ (公比 2) とした。

II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

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、エアロゾルの分粒を行い、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粉じん発生装置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。

II-1-7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の酸化チタン濃度は、OPC を使用して連続測定し、2 週間毎に 7 回 (暴露期間中の奇数週)、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) にチャンバー内の酸化チタンを捕集して質量濃度 (mg/m³) を求め、この値と質量濃度測定時の OPC の個数濃度平均値により個数濃度-質量濃度変換係数 (K 値) を算出し、個数濃度から変換した質量濃度を吸入チャンバー内の被験物質濃度とした。濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度の平均値と標準偏差は、6.3 mg/m³ 群は 6.37±0.29 mg/m³、12.5 mg/m³ 群は 12.69±0.87 mg/m³、25 mg/m³ 群は 25.04±1.56 mg/m³、50mg/m³ 群は 49.89±2.88 mg/m³ であった。平均値と設定濃度の差 ((平均値-設定濃度) / 設定濃度×100) は最大で 1.5%、変動係数 (標準偏差 / 平均値×100) は約 4.6~6.9% の範囲であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

II-1-8 吸入チャンバー内の粒子径分布の測定

投与期間の 1、6 及び 13 週に、MOUDI (Micro-orifice uniform deposit cascade impactor、MOUDI-II、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ール (47 mmΦ、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の捕集重量と捕集重量累積率を APPENDIX 1 に示した。その結果をもとに確率対数による累積頻度分布グラフ (FIGURE 2) を作成し、グラフから空気動学的質量中位径 (MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter) 及び幾何標準偏差 (og; geometric standard deviation) を求めた。濃度毎に 3 回測定した MMAD 及び og の

結果を下記にまとめた。各投与群の MMAD は 0.9~1.0 μm 、 σg は 2.0~2.1 であった。暴露濃度及び捕集日にかかわらず粒子径の分布に差はみられなかった。

	6.3mg/m ³		12.5mg/m ³		25mg/m ³		50mg/m ³	
	MMAD (μm)	σg	MMAD (μm)	σg	MMAD (μm)	σg	MMAD (μm)	σg
1 週	0.9	2.1	0.9	2.1	0.9	2.1	1.0	2.1
6 週	1.0	2.0	0.9	2.1	0.9	2.1	1.0	2.0
13 週	0.9	2.1	0.9	2.0	1.0	2.0	0.9	2.1

II-1-9 吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察

投与期間の 1、6 及び 13 週に、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 Φ 、Whatman 社) に吸入チャンバー内の酸化チタンを捕集した。捕集した酸化チタンを走査電子顕微鏡 (SEM; Scanning electron microscope SU8000 形、(株) 日立ハイテクノロジーズ) を用いて観察し、SEM 画像を PHOTOGRAPH 1~3 に示した。暴露濃度及び捕集日にかかわらず全ての SEM 像に大きな違いはなく、分散良好な酸化チタンが確認された。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 4 群及び対照群 1 群の計 5 群を設け、各群雌雄 10 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	使用動物数 (動物番号)	
		雄	雌
0	対照群	10 匹 (1001~1010)	10 匹 (2001~2010)
1	6.3 mg/m ³ 群	10 匹 (1101~1110)	10 匹 (2101~2110)
2	12.5 mg/m ³ 群	10 匹 (1201~1210)	10 匹 (2201~2210)
3	25 mg/m ³ 群	10 匹 (1301~1310)	10 匹 (2301~2310)
4	50 mg/m ³ 群	10 匹 (1401~1410)	10 匹 (2401~2410)

II-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い動物から体重の中央値に近い雌雄各 50 匹を選別し、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 4）。群分けは、被験物質投与開始日の前日（2015 年 9 月 7 日）に行なった。

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なった。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。

II-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

全飼育期間中、吸入試験室（701、702 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件並びに使用したケージの材質等を以下に示した。

吸入試験室の温湿度の実測値（平均値±標準偏差）は<>内に、また、吸入チャンバー内の環境測定結果は APPENDIX 2 に示した。吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような変化はみられなかった。

温 度	: 吸 入 試 験 室 ; 22±3℃ < 701 室 ; 21.3±0.3℃、702 室 ; 20.7±0.3℃ > 吸入チャンバー内 ; 22±3℃
湿 度	: 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	: 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)
馴化及び投与期間	: 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：千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30kGy- γ 線照射滅菌飼料) を飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、被験物質暴露中及び定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

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) から分析データを使用ロットごとに入手し保管した。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。

飲水の水質は、動物試験施設として定期的 (年 2 回) に実施している水道水の検査において、水道法に定められている水質基準に適合していることを確認し、保管した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

検疫及び馴化期間中は、生死及び瀕死の確認を毎日 1 回以上行った。一般状態の詳細な観察は、検疫開始日 (導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日 (群分け時) に行った。投与期間中は、暴露を行った日は暴露の前後、暴露しなかった日は午前中に生死及び瀕死の確認を行った。一般状態の詳細な観察は、週1回暴露の前に行った。

II-3-2 体重測定

検疫及び馴化期間中は、全動物について、検疫開始日 (導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日 (群分け時) に体重を測定した。投与期間中は、全動物について、週 1 回体重測定を行い、定期解剖動物の搬出時にも体重 (搬出時体重) を測定した。

II-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。

II-3-4 血液学的検査

各群の動物番号後半の 5 匹を用いて、剖検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及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記※印検査項目）に採血した。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、クエン酸ナトリウム入り採血管の血液は遠心分離し、得られる血漿を用いて、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：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、※プロトロンビン時間、※活性化部分トロンボプラスチン時間、白血球数、白血球分類

II-3-5 血液生化学的検査

各群の動物番号後半の 5 匹を用いて、剖検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なった。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

II-3-6 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 検査

各群の動物番号前半の 5 匹を用いて、右肺を生理食塩水で洗浄し回収した BALF 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。

(1) BALF の細胞学的検査

検査項目：総細胞数、細胞分類

(2) BALF の生化学的検査

検査項目：総蛋白、アルブミン、LDH、ALP、 γ -GTP

II-3-7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察 (剖検)

全動物について、肉眼的に観察を行なった。

(2) 臓器重量

全動物について、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。なお、肺重量は、BALF検査を行なった動物については、左肺のみを測定した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(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）、骨髄（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、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、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、下記の器官、組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、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。

鼻腔（3箇所を横断）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（縦隔、腋窩、鼠径等）、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、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、横隔膜、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

II-3-8 肺中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肺の一部を使用して、肺中酸化チタン量を原子吸光法で測定した。

II-4 数値処理と統計方法

II-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 を単位として表示した。電子天秤の mg 基準で小数点以下第 3 位まで測定し、捕集空気量で除し、小数点以下第 2 位までを表示した。

粒子径の単位は、 μm を単位とし、平均粒子径等は小数点以下第 1 位まで表示した。

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。

血液学的検査及び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 (BALF) の細胞学的検査及び生化学的検査は、APPENDIX 4 に示した単位と桁数により表示した。

肺中酸化チタン量は、酸化チタン濃度を μg を単位として小数点以下第 3 位まで測定し、この値を肺 1g あたりの沈着量 ($\text{mg}/1\text{g}$ 肺) として算出して、小数点以下第 3 位を四捨五入して小数点以下第 2 位までを表示した。

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。

II-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。

各検査及び測定は、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 (BALF) 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、Dunnnett の多重比較により平均値の検定を行なった。また、分散の等しくなかった場合には、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、Dunnnett 型の多重比較を行なった。また、病理組織学的検査 (非腫瘍性病変) については、 χ^2 検定を行なった。なお、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なった。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE B1, B2 に示した。

—雌雄—

動物に死亡はみられなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C1, C2 に示した。

—雌雄—

動物に特記すべき変化はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE D1~D4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

—雄—

各群とも順調に体重は増加し、対照群と各投与群の間に差はみられなかった。

投与期間終了時の体重は、対照群に対し、6.3 mg/m³ 群は 101%、12.5 mg/m³ 群は 104%、25 mg/m³ 群は 104%、50 mg/m³ 群は 104%であった。

—雌—

各群とも順調に体重は増加し、対照群と各投与群の間に差はみられなかった。

投与期間終了時の体重は、対照群に対し、6.3 mg/m³ 群は 101%、12.5 mg/m³ 群は 103%、25 mg/m³ 群は 101%、50 mg/m³ 群は 99%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E1~E4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

—雄—

対照群と各投与群に差はみられなかった。

投与期間最終週の摂餌量は、対照群に対し、6.3 mg/m³ 群は 101%、12.5 mg/m³ 群は 103%、25 mg/m³ 群は 108%、50 mg/m³ 群は 104%であった。

—雌—

投与期間の 2 週に 12.5 mg/m³ 以上の群で摂餌量の低値がみられたが、これ以外に差はみられなかった。

投与期間最終週の摂餌量は対照群に対し、6.3 mg/m³ 群は 102%、12.5 mg/m³ 群は 102%、25 mg/m³ 群は 101%、50 mg/m³ 群は 102%であった。

III-5 血液学的検査

各群の動物番号の後半の 5 匹を用いて血液学的検査を行い、結果を TABLE F1, F2 に示した。

—雄—

12.5 mg/m³ 以上の群で白血球分類の好酸球比の増加がみられた。

—雌—

25 mg/m³ 群で MCV の高値がみられたが、投与濃度との対応がみられないことから投与によるものとは考えなかった。

III-6 血液生化学的検査

各群の動物番号の後半の 5 匹を用いて血液生化学的検査を行い、結果を TABLE G1, G2 に示した。

—雄—

特記すべき変化はみられなかった。

—雌—

6.3 及び 50 mg/m³ 群で AST 及び尿素窒素の高値、50 mg/m³ 群で LDH の高値がみられた。6.3 mg/m³ 群の AST 及び尿素窒素の高値は投与濃度との対応がみられないことから投与によるものとは考えなかった。

Ⅲ-7 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 検査

各群の動物番号の前半の5匹を用いてBALFの細胞学的検査及び生化学的検査を行った。

Ⅲ-7-1 BALFの細胞学的検査

BALFの細胞数及び細胞分類検査を行い、結果をTABLE H1, H2及びTABLE I1, I2に示した。

—雄—

50 mg/m³群で好中球及びリンパ球の増加に由来する総細胞数の増加がみられた。細胞分類では、12.5 mg/m³以上の群で好中球比の増加及び肺胞マクロファージ比の減少がみられ、25 mg/m³以上の群でリンパ球比の増加がみられた。ただし、肺胞マクロファージ比の減少については、実数換算して対照群 330 個/μL に対し、6.3 mg/m³群は 315 個/μL、12.5mg/m³群は 328 個/μL、25 mg/m³群は 328 個/μL、50 mg/m³群は 348 個/μL と求められ、投与群での肺胞マクロファージの減少はなかったと考えた。

—雌—

50 mg/m³群で好中球及びリンパ球の増加に由来する総細胞数の増加がみられた。細胞分類では、6.3 mg/m³以上の群で好中球比の増加及び肺胞マクロファージ比の減少がみられ、25 mg/m³以上の群でリンパ球比の増加がみられた。ただし、肺胞マクロファージ比の減少については、実数換算して対照群 348 個/μL に対し、6.3 mg/m³群は 305 個/μL、12.5mg/m³群は 327 個/μL、25 mg/m³群は 337 個/μL、50 mg/m³群は 261 個/μL と求められた。投与群に減少傾向はみられたが有意な差は示されなかったため、投与群での肺胞マクロファージの減少はなかったと考えた。

Ⅲ-7-2 BALFの生化学的検査

BALFの生化学的検査を行い、結果をTABLE J1, J2に示した。

—雄—

12.5 mg/m³以上の群で総蛋白及びLDHの高値、12.5及び50 mg/m³群でアルブミンの高値、25 mg/m³群でALPの低値がみられた。12.5 mg/m³群のアルブミンの高値及び25 mg/m³群のALPの低値は、投与濃度との対応がみられないことから投与によるものとは考えなかった。

—雌—

6.3 mg/m³以上の群でLDHの高値、12.5 mg/m³以上の群で総蛋白の高値、12.5及び50 mg/m³群でアルブミンの高値、25 mg/m³以上の群でALPの低値がみられた。12.5 mg/m³群のアルブミンの高値は、投与濃度との対応がみられないことから投与によるものとは考えなかった。ただしALPについては対照群に対して減少性の変化であるため投与との関連は不明であった。

Ⅲ-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 肉眼的観察（剖検）

定期解剖時の肉眼的観察（剖検）をTABLE K1, K2に示した。

—雄—

肺の白色斑が25 mg/m³以上の群で各10匹、縦隔リンパ節の白色が25 mg/m³群で7匹、50 mg/m³群で9匹にみられた。この他、肝臓のヘルニアが全群に散見されたが、投与によるものとは考えなかった。

—雌—

肺の白色斑が25 mg/m³以上の群で各10匹、縦隔リンパ節の白色が25 mg/m³群で6匹、50 mg/m³群で10匹にみられた。この他、肝臓のヘルニアが全群に散見されたが、投与によるものとは考えなかった。

Ⅲ-8-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比について、TABLE L1, L2及びTABLE M1, M2に示した。なお、肺重量は、各群の動物番号後半の5匹を用いて、両肺の重量を測定して評価した。

—雄—

肺の実重量と体重比の高値が25 mg/m³以上の群でみられた。対照群に対する肺の実重量と体重比は、25 mg/m³群では115%と113%、50 mg/m³群では各114%であった。

—雌—

肺の実重量と体重比の高値が25 mg/m³以上の群でみられた。対照群に対する肺の実重量と体重比は、25 mg/m³群では117%と115%、50 mg/m³群では117%と122%であった。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE N1, N2 に示した。

—雄—

鼻腔、鼻咽頭、肺、縦隔リンパ節及びリンパ関連組織に被験物質の影響が観察された。

[50 mg/m³群]

鼻腔では、杯細胞過形成（軽度）が 10 匹、呼吸上皮及び嗅上皮にエオジン好性変化（軽度）がそれぞれ 10 匹みられた。

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 10 匹、鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）に粒子の沈着（軽度）が 9 匹みられた。

肺では、肺胞上皮の過形成（中程度）が 10 匹、肺胞マクロファージの崩壊（軽度）が 9 匹みられた。過形成は、肺胞腔に粒子を貪食した肺胞マクロファージの集簇を伴っており、その周囲を取り囲むように立方状あるいは卵円形の細胞が増殖した所見であった。肺胞マクロファージの崩壊は、粒子を貪食した肺胞マクロファージが破裂し、変性あるいは壊死した像として観察され、これらの組織学的変化を伴った肺胞マクロファージの周囲に貪食粒子の残屑がみられた。肺胞腔では粒子の沈着（中程度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、気管支関連リンパ組織（BALT）に粒子の沈着（軽度）が 10 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度～中程度）が 10 匹みられた。

[25 mg/m³群]

鼻腔では、杯細胞過形成（軽度）が 6 匹、呼吸上皮及び嗅上皮にエオジン好性変化（軽度）がそれぞれ 10 匹みられた。

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 8 匹、NALT に粒子の沈着（軽度）が 6 匹みられた。

肺では、肺胞上皮の過形成（軽度）が 5 匹みられた。肺胞腔では粒子の沈着（軽度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、BALT に粒子の沈着（軽度）が 9 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度）が 9 匹みられた。

[12.5 mg/m³群]

鼻腔では、杯細胞過形成（軽度）が 2 匹、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 9 匹、嗅上皮のエオジン好性変化（軽度）10 匹みられた。

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 2 匹、NALT に粒子の沈着（軽度）が 7 匹みられた。

肺では、肺胞上皮の過形成（軽度）が 1 匹みられた。肺胞腔では粒子の沈着（軽度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、BALT に粒子の沈着（軽度）が 9 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度）が 6 匹みられた。

[6.3 mg/m³群]

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 1 匹、NALT に粒子の沈着（軽度）が 6 匹みられた。

肺胞腔では粒子の沈着（軽度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、BALT に粒子の沈着（軽度）が 6 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度）が 3 匹みられた。

—雌—

鼻腔、鼻咽頭、肺、縦隔リンパ節及びリンパ関連組織に被験物質の影響が観察された。

[50 mg/m³群]

鼻腔では、杯細胞過形成（軽度）が 10 匹、呼吸上皮及び嗅上皮にエオジン好性変化（軽度）がそれぞれ 10 匹みられた。

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 10 匹、NALT に粒子の沈着（軽度）が 9 匹みられた。

肺では、肺胞上皮の過形成（中程度）が 10 匹、肺胞マクロファージの崩壊（軽度）が 9 匹みられた。肺胞腔では粒子の沈着（中程度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、気管支関連リンパ組織（BALT）に粒子の沈着（軽度）が 10 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度～中程度）が 10 匹みられた。

[25 mg/m³群]

鼻腔では、杯細胞過形成（軽度）が 10 匹、呼吸上皮及び嗅上皮にエオジン好性変化（軽度）がそれぞれ 10 匹みられた。

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 9 匹、NALT に粒子の沈着（軽度）が 9 匹みられた。

肺では、肺胞上皮の過形成（軽度）が 9 匹みられた。肺胞腔では粒子の沈着（軽度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、BALT に粒子の沈着（軽度）が 8 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度）が 9 匹みられた。

[12.5 mg/m³群]

鼻腔では、杯細胞過形成（軽度）が 5 匹、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 10 匹、嗅上皮のエオジン好性変化（軽度）が 9 匹みられた。

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 5 匹、NALT に粒子の沈着（軽度）が 8 匹みられた。

肺では、肺胞上皮の過形成（軽度）が 4 匹みられた。肺胞腔では粒子の沈着（軽度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、BALT に粒子の沈着（軽度）が 9 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度）が 7 匹みられた。

[6.3 mg/m³群]

鼻腔では、杯細胞過形成（軽度）が 3 匹、嗅上皮にエオジン好性変化（軽度）が 1 匹みられた。

鼻咽頭では、杯細胞過形成（軽度）が 1 匹、NALT に粒子の沈着（軽度）が 9 匹みられた。

肺では、肺胞上皮の過形成（軽度）が 2 匹みられた。肺胞腔では粒子の沈着（軽度）が 10 匹みられ、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。また、BALT に粒子の沈着（軽度）が 9 匹、縦隔リンパ節に粒子の沈着（軽度）が 6 匹みられた。

III-9 肺中酸化チタン量の測定

肺の一部を使用して酸化チタン濃度を原子吸光法で測定し、肺1gあたりの沈着量(mg/1g肺)として表示した。測定結果を TABLE O 及び FIGURE 7に示した。

—雌雄—

肺沈着量は雌雄とも投与濃度に対応して増加した。雌雄で肺沈着量を比較すると、12.5 mg/m³以下の群では雄が雌より高値、25 mg/m³以上の群では雌が雄より高値であった。

IV 考察及びまとめ

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）のがん原性を検索する目的で、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による2年間（104週間）の試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験（13週間試験）を実施した。

本試験は、投与群4群、対照群1群の計5群（各群雌雄各10匹）を設けた。酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の投与濃度は、0（対照群）、6.3、12.5、25及び50 mg/m³とし、1日6時間、1週5日間で13週間、全身暴露による経気道投与を行った。投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重、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（BALF）検査、肉眼的観察（剖検）、臓器重量の測定、病理組織学的検査及び肺中酸化チタン量の測定を行った。

IV-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、雌雄に死亡はみられず、一般状態の観察、体重測定においても特記すべき変化はみられなかった。摂餌量の測定では、雄は対照群との差はみられなかったが、雌は、投与期間の初期に12.5 mg/m³以上の群で低値がみられたが、これ以外に変化はみられなかった。

血液学的検査では、雄は、白血球分類の好酸球比の増加が12.5 mg/m³以上の群でみられたが、雌では特記すべき変化はみられなかった。血液生化学的検査では、雄では特記すべき変化はみられなかったのに対し、雌はAST、尿素窒素及びLDHの高値が50 mg/m³群でみられた。

BALF検査では、雌雄とも主に好中球及びリンパ球の増加に由来する総細胞数の増加が50 mg/m³群でみられ、細胞学的検査では、好中球比の増加が雄では12.5 mg/m³以上の群、雌では全投与群、リンパ球比の増加が雌雄とも25 mg/m³以上の群でみられた。生化学的検査では、LDHの高値が雄は12.5 mg/m³以上の群、雌では全投与群でみられた。さらに、総蛋白の高値が雌雄の12.5 mg/m³以上の群、アルブミンの高値が雌雄の50 mg/m³群でみられた。

肉眼的観察（剖検）では、肺の白色斑と縦隔リンパ節の白色が雌雄とも25 mg/m³以上の群でみられた。

臓器重量では、肺重量の増加が雌雄とも25 mg/m³以上の群でみられた。

病理組織学的検査では、主に呼吸器系（鼻腔、鼻咽頭、肺）、縦隔リンパ節、鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）及び気管支関連リンパ組織（BALT）に暴露による影響がみられた。鼻咽頭の杯細胞過形成が雌雄の全投与群でみられ、鼻腔の杯細胞過形成、呼吸上皮及び嗅上皮にエオジン好性変化が、雄は12.5 mg/m³以上の群、雌は全投与群でみられた。肺の肺胞上皮過形成が、雄は12.5 mg/m³以上の群、雌は全投与群でみられた。

雌雄の鼻腔や鼻咽頭に観察された杯細胞過形成は、刺激物の反復吸入暴露による反応としてみられる変化であること（文献 5）、また、鼻腔の呼吸上皮や嗅上皮にみられたエオジン好性変化は、継続的な弱い刺激に対する反応として現れることが報告されている（文献 6）。本試験でも同様な病理組織学的変化が鼻腔や鼻咽頭にみられていることから、本被験物質が呼吸とともに同部位を通過する際、物理的な刺激を加えていたものと考えた。

肺胞上皮の過形成は、肺胞腔に粒子を貪食した肺胞マクロファージの集簇を伴い、その周囲を取り囲むように、肺胞上皮が増殖していた。Lee らは、酸化チタンの吸入暴露により肺胞上皮の過形成が観察され、この過形成はⅡ型肺胞上皮由来であると報告した（文献 7）。本試験でみられた肺胞上皮の過形成もⅡ型肺胞上皮由来である可能性は高いと考えられた。また、雌雄の 50 mg/m³ 群でみられた肺胞マクロファージの崩壊は、25 mg/m³ 以下の暴露群では観察されなかったことから、酸化チタンの直接的作用ではなくマクロファージの過剰貪食による崩壊の可能性を示し、クリアランスの阻害を示唆する所見と考えられた。本試験の肺中酸化チタン量の測定では、投与濃度と肺沈着量の間に関係係数 r^2 として雄は 0.971、雌は 0.996 の良好な 1 次回帰直線が求められることから、現時点では明らかなクリアランス阻害は起こっていないものの、50 mg/m³ 群での肺胞マクロファージの崩壊としてその兆候が観察されたと考えた。

NALT、肺、BALT 及び縦隔リンパ節に粒子の沈着が雌雄の全投与群でみられ、肺及び縦隔リンパ節では、50 mg/m³ 群でその程度が増強した。特に NALT に粒子が観察されたことから、本被験物質は暴露により上部気道から直接体内へ侵入することが示された。肺では、粒子のほとんどが肺胞マクロファージに貪食され、貪食マクロファージはこの後、リンパ行性に縦隔リンパ節に移行すると考えられた。

肺の酸化チタン量は、雌雄とも投与濃度に対応して増加し、沈着量と肺胞上皮の過形成の発生例数は良く対応した。

上記に示した以外の器官、組織には、被験物質の影響と思われる病理組織学的変化はみられなかった。

以上、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の吸入暴露による 13 週間試験の結果、病理組織学的検査により雌雄の 6.3 mg/m³ から呼吸器系に変化がみられた。

IV-2 無毒性量 (NOAEL)

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）のラットへの 13 週間吸入暴露により、血液生化学的検査、BALF 検査、臓器重量及び病理組織学的検査で投与群に変化がみられた。これらのうち、病理組織学的検査で最低濃度の 6.3 mg/m³ から雌雄の呼吸器系に組織変化がみられたため、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）のラットに対する無毒性量 (NOAEL) は求められず、最小毒性量 (LOAEL) を 6.3 mg/m³ と考えた。

IV-3 がん原性試験の濃度決定

本試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では各群とも動物の死亡はみられなかった。一般状態の観察でも雌雄に変化はみられず、体重増加の抑制もみられなかった。しかし、病理組織学的検査で、6.3 mg/m³群から濃度依存的に肺の肺胞上皮過形成がみられ、酸化チタンの肺沈着量も増加した。50 mg/m³群では肺胞マクロファージの崩壊もみられた。過形成性病変は腫瘍発生への関与、肺胞マクロファージの崩壊はクリアランス阻害が疑われる所見であることから、これらの所見と肺沈着量(mg/肺1g)をもとにがん原性試験の投与濃度を設定した。13週間試験での肺の沈着量は、雄では、50 mg/m³群：18.4mg、25 mg/m³群：6.4mg、12.5 mg/m³群：3.5mg、6.3mg/m³群：2.2mgであり、雌は、50 mg/m³群：21.3mg、25 mg/m³群：8.7mg、12.5 mg/m³群：3.3mg、6.3mg/m³群：1.3mgであった。50 mg/m³群では、中等度の過形成が雌雄の全例、肺胞マクロファージの崩壊が雌雄各9例にみられ、肺沈着量は雌雄平均で19.9mgであった。25 mg/m³群では、軽度の過形成が雄5例、雌9例にみられ、肺沈着量は雌雄平均で9.9mgであったが、肺胞マクロファージの崩壊はみられなかった。この結果から、がん原性試験の最高濃度は、2年間の投与終了時の肺沈着量として20 mg を超えない量が望ましいと考えた。がん原性試験（104週間）では投与期間が13週間試験の8倍となることから、13週間試験の雌雄平均肺沈着量を8倍してがん原性試験の推定肺沈着量を求めた。各暴露濃度における推定肺沈着量は、50 mg/m³：158.8 mg、25 mg/m³：60.4 mg、12.5 mg/m³：27.2 mg、6.3 mg/m³：14.0 mg と計算された。これらのデータから肺沈着量が20 mg となる暴露濃度は8.5 mg/m³と求められた。前述したように肺沈着量は20 mg を超えない濃度が望ましいことから、がん原性試験の最高濃度は、8 mg/m³（予測肺沈着量：18.9mg）を選択した。

13週間試験の最低濃度である6.3 mg/m³群では、酸化チタンの肺沈着量は、雄で2.2 mg、雌で1.3 mg、雌雄平均1.75mgであった。肺胞上皮の過形成は雌に少数例みられたが、雄には観察されなかった。がん原性試験終了時の推定肺沈着量が1.75mg となる投与濃度は0.74 mg/m³と求められた。この投与濃度で2年間の吸入投与を行った場合、僅かな毒性は観察されると考え、2年間の最低投与濃度は、これに近い濃度が妥当と考えた。

以上のことから、がん原性試験の投与濃度は雌雄とも最高濃度を8 mg/m³とし、以下、公比4で2 mg/m³、0.5 mg/m³と決定した。

V 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 413: " Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study ". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 4) 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.
- 5) 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 : 5S-73S.
- 6) Elizabeth FM, Rodney AM. 2007. A review of upper respiratory tract inhalation pathology. Comp Clin Pathol. 4: 215-222
- 7) 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

VI 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。