

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報告書

試験番号：0883

CAS No. 1317-70-0

2020年 3月 30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
拡散防止措置及び動物福祉	i
厚生労働省担当課	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	A~T6	
FIGURES	1~13	
PHOTOGRAPHS	1~37	
APPENDICES	1~17-2	

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がん原性試験

試験目的

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 104 週間全身暴露（経気道投与）し、そのがん原性を検索した（がん原性試験群）。

また、がん原性試験群とは別にサテライト群を設けて、52 週間全身暴露した動物について肺の酸化チタン沈着量を測定し、発がんとの関連性を検索した。

試験法

本試験は「がん原性試験による調査の基準」（平成 9 年 3 月 11 日労働省労働基準局長基発第 144 号）に準拠し、OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 2009 年 9 月 7 日採択）を参考にして実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づき試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正平成 12 年 12 月 25 日労働省告示第 120 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

拡散防止措置及び動物福祉

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日制定、最終改正平成28年4月1日）を遵守した。

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 0158）。

厚生労働省担当課

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がん原性試験報告書

試験番号：0883

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	5
I-1 被験物質の性状等	5
I-1-1 名称等	5
I-1-2 構造及び物理化学的性状	5
I-2 被験物質等	5
I-2-1 使用被験物質	5
I-2-2 被験物質の製造量等	6
I-2-3 被験物質の主な用途	6
I-2-4 許容濃度等	6
I-3 被験物質の特性	6
I-3-1 同一性、安定性	6
I-4 試験動物	7
II 試験方法	8
II-1 投与	8
II-1-1 投与経路	8
II-1-2 投与方法	8
II-1-3 投与期間	8
II-1-4 投与濃度	8
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	8
II-1-6 被験物質の発生方法及び濃度調整	9
II-1-7 被験物質濃度の測定	10
II-1-8 吸入チャンバー内の粒子径分布の測定	10
II-1-9 吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察	11
II-2 動物管理	11
II-2-1 群の構成及び各群の使用動物数	11
II-2-2 群分け方法、個体識別方法、動物飼育室、 他試験及び異種動物との区別	12

II-2-3	飼育条件	12
(1)	飼育環境	12
(2)	飼料	13
(3)	飲水	13
II-3	観察・検査項目及び方法	14
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	14
II-3-2	体重測定	14
II-3-3	摂餌量測定	14
II-3-4	尿検査	14
II-3-5	血液学的検査	15
II-3-6	血液生化学的検査	15
II-3-7	病理学的検査	15
(1)	肉眼的検査	15
(2)	臓器重量	15
(3)	病理組織学的検査	15
II-3-8	臓器中酸化チタン沈着量の測定及び臓器の保存	16
II-3-9	気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収及び検査	16
II-4	数値処理と統計方法	17
II-4-1	数値の取り扱いと表示	17
II-4-2	統計処理	17
III	がん原性群成績	19
III-1	生死状況	19
III-2	一般状態	19
III-3	体重	19
III-4	摂餌量	20
III-5	尿検査	21
III-6	血液学的検査	21
III-7	血液生化学的検査	21
III-8	病理学的検査	22
III-8-1	肉眼的検査	22
III-8-2	臓器重量	23
III-8-3	病理組織学的検査	23
III-8-4	臓器中酸化チタン沈着量の測定	26
III-8-5	BALF の細胞観察及び細胞学的検査	26

III-8-6	BALF の生化学的検査	27
III-8-7	死因	27
IV	サテライト群成績	28
IV-1	生死状況	28
IV-2	一般状態	28
IV-3	体重	29
IV-4	摂餌量	29
IV-5	病理学的検査	30
IV-5-1	肉眼的検査	30
IV-5-2	臓器重量	31
IV-5-3	病理組織学的検査	32
IV-5-4	死因	35
IV-5-5	臓器中酸化チタン沈着量の測定	36
V	考察及びまとめ	37
V-1	生存率、一般状態、体重等	37
V-2	腫瘍性及び腫瘍関連病変	38
V-3	その他の影響	38
V-4	他試験の発がん性情報	40
VI	結論	41
VII	文献	42
VIII	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	44

要約

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ために、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）を F344/DuCrIj ラットに 104 週間全身暴露（経気道投与）し、その生体影響を検索した。また、がん原性試験群とは別にサテライト群を設け、発がんとの関連を検索した。

本試験は、がん原性試験群（各群雌雄 50 匹、合計 400 匹）及びサテライト群（各群雌雄 10 匹、合計 80 匹）ともに投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群を設けた。酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の投与（暴露）濃度は、がん原性試験群及びサテライト群とも 0（対照群）、0.5、2 及び 8 mg/m³ とし、同一濃度同一チャンバーで投与（暴露）を行った。投与（暴露）期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の全身暴露による経気道投与で、がん原性試験群は 104 週間、サテライト群は 52 週間とし、暴露及び飼育期間中、生死及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、尿検査（がん原性試験群）を行った。がん原性試験群は、暴露期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定、気管支肺胞洗浄液（BALF）検査、肺中酸化チタン量測定及び病理組織学的検査を行った。サテライト群は、52 週間の暴露期間終了後、直ちに暴露チャンバーと異なるチャンバーに動物を移動し、清浄空気下で飼育を継続した。定期的（暴露終了翌日、暴露終了 26 週、暴露終了 52 週）に動物を搬出・解剖し、肉眼観察、臓器重量の測定、肺中酸化チタン量測定及び病理組織学的検査を行った。

暴露の結果、がん原性試験群及びサテライト群の雌雄に生存率の低下は認められず、動物の一般状態に酸化チタンの影響はみられなかった。

がん原性試験群では、雌雄の暴露群で暴露期間の初期に体重増加の抑制がみられ、雌雄の 0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群では、暴露期間の多くの週で体重の低値が認められた。しかし、この低値は、酸化チタンの暴露によるものとは考えなかった。摂餌量でも体重同様、雌雄の暴露群で暴露期間の初期に有意な低値がみられた。暴露期間を通して、雌雄の 0.5 mg/m³ 群及び雌の 2 mg/m³ 群では、低値の週が多くみられたが、酸化チタンの暴露によるものとは考えなかった。尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査では、暴露の影響は認められなかった。8 mg/m³ 群の雌雄で肺の実重量と体重比の高値がみられ、肺重量の増加が認められた。

サテライト群では、暴露群の雄は、がん原性試験群と同様暴露期間の初期に軽度な体重増加の抑制がみられたが、その後は、対照群と大差なく推移した。雌は、対照群と同等か、それ以上で推移した。摂餌量は、雄では対照群との差はみられなかった。雌は、暴露期間初期に軽度な低値を示したが、その後は、対照群と差はなく推移した。

病理組織学的検査の結果、がん原性試験群の雌雄の肺に腫瘍性病変が認められた。雄では、細気管支-肺胞上皮癌の発生が 8 mg/m³ 群の 2 匹に認められ、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。8 mg/m³ 群の発生率は、当センターのヒス

トリカルコントロールデータの範囲の上限であった。一方、肺の総腫瘍（細気管支－肺胞上皮腺腫と細気管支－肺胞上皮癌を合わせた発生）の発生では、対照群と比較して有意な増加を認めなかった。したがって、雄の細気管支－肺胞上皮癌の発生は、発がん性を示す不確実な証拠（equivocal evidence of carcinogenic activity）と考えた。雌では、細気管支－肺胞上皮腺腫の発生が、対照群で1匹、0.5 mg/m³群で2匹、2 mg/m³群で3匹、8 mg/m³群で4匹認められ、統計学的な有意差は示されなかったものの、増加の傾向がみられた。さらに、8 mg/m³群における細気管支－肺胞上皮腺腫の発生は、当センターのヒストリカルコントロールデータを超えていた。したがって、細気管支－肺胞上皮腺腫の発生は発がん性を示す不確実な証拠（equivocal evidence of carcinogenic activity）と考えた。

腫瘍関連病変として、雌雄の肺に粒子誘発による肺胞上皮過形成及び肺胞壁の線維化が認められた。解剖時の肉眼的観察では、がん原性試験群及びサテライト群の雌雄の0.5 mg/m³群以上で肺の白色斑が全葉に散在性にみられ、酸化チタン貪食マクロファージを伴っていたことが病理組織学的に明らかにされた。両病変は、コレステリン肉芽腫や各種炎症細胞浸潤及び肺胞構造の破壊を伴っており、暴露濃度に対応した病変の強度の増強が認められた。8 mg/m³群では過形成と線維化の病巣における癒合が顕著であった。特にサテライト群では、肺胞上皮の過形成が最低暴露群の0.5 mg/m³群でも回復期間中に消失せず観察され、また、新たに肺胞壁の線維化が8 mg/m³群の52週間回復群の雌雄で認められた。肺の炎症反応が継続して認められ、腫瘍関連病変は時間経過に伴い進展することが示唆された。

肺中酸化チタン沈着量測定の結果、肺中の酸化チタンは暴露濃度に対応して増加した。2 mg/m³群の雌及び8 mg/m³群の雌雄では、52週暴露解剖群（サテライト群）から予測された量より多くの酸化チタンが、がん原性試験群（104週暴露）で認められたことから、クリアランスの遅延が生じた可能性が考えられた。

以上、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）を0、0.5、2及び8 mg/m³の濃度で2年間にわたり雌雄のF344/DuCrIjラットに全身暴露した結果、雄の細気管支－肺胞上皮癌と雌の細気管支－肺胞上皮腺腫の発生増加の傾向がみられた。

したがって、本試験条件下において、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の雌雄ラットに対するがん原性を示す不確実な証拠（equivocal evidence of carcinogenic activity）と結論された。

アナターゼ型ナノ酸化チタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雄)

投与濃度 (mg/m ³)		0	0.5	2	8	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		50	50	50	50		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫(A)	4	5	7	2	↑	↑
	細気管支-肺胞上皮癌 [#] (B)	0	0	0	2		
A+B		4	5	7	4		
皮膚/付属 器官	角化棘細胞腫	3	1	1	0		
	膵臓	4	5	3	5		
下垂体	腺腫	11	3 *	6	10		
甲状腺	C-細胞腺腫	7	7	8	10		
副腎	褐色細胞腫(C)	0	3	2	2		
	褐色細胞腫：悪性 [#] (D)	1	0	1	1		
	C+D	1	3	3	2		
皮下組織	線維腫	6	1	2	7		
脾臓	単核球性白血病 [#]	16	15	13	6 *		↓
精巣	間細胞腫	37	39	36	39		
脳	膠腫 [#]	1	0	3	0		

アナターゼ型ナノ酸化チタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雌)

投与濃度 (mg/m ³)		0	0.5	2	8	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		50	50	50	50		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫(E)	1	2	3	4		
	細気管支-肺胞上皮癌 [#] (F)	0	0	1	0		
	腺扁平上皮癌 [#] (G)	0	0	1	0		
	E+F+G	1	2	5	4		
肝臓	腺腫	3	3	1	0		
	下垂体	腺腫(H)	10	12	15	11 ^a	
甲状腺	腺癌 [#] (I)	0	2	0	2 ^a		
	H+I	10	14	15	13 ^a		
	C-細胞腺腫(J)	4	5	4	8		
乳腺	C-細胞癌 [#] (K)	0	0	0	1		
	J+K	4	5	4	9		
脾臓	線維腺腫	5	8	0 *	7		
子宮	単核球性白血病 [#]	8	5	10	4		
	子宮内膜間質性ポリープ	5	8	9	5		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

*：p≤0.05 で有意

**：p≤0.01 で有意

(Fisher 検定)

↑：p≤0.05 で有意増加

↑↑：p≤0.01 で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓：p≤0.05 で有意減少

↓↓：p≤0.01 で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

a：有効動物数 n=49

アナターゼ型ナノ酸化チタンのがん原性試験における主な肺非腫瘍性病変発生（ラット 雄）

投与濃度 (mg/m ³)		0	0.5	2	8
所見名	グレード	50	50	50	50
細気管支肺胞上皮過形成	1+	2	6	0	5
	2+	0	4	2	0
	Total	2	10 *	2	5
肺胞上皮過形成、粒子誘発	1+	0	30	39	1
	2+	0	1	5	48
	Total	0	31 **	44 **	49 **
線維症、肺胞壁	1+	0	2	2	15
	2+	0	0	0	13
	Total	0	2	2	28 **

アナターゼ型ナノ酸化チタンのがん原性試験における主な肺非腫瘍性病変発生（ラット 雌）

投与濃度 (mg/m ³)		0	0.5	2	8
所見名	グレード	50	50	50	50
細気管支肺胞上皮過形成	1+	1	0	1	2
	2+	0	1	2	0
	Total	1	1	3	2
肺胞上皮過形成、粒子誘発	1+	0	42	37	0
	2+	0	0	10	50
	Total	0	42 **	47 **	50 **
線維症、肺胞壁	1+	0	1	2	11
	2+	0	0	2	37
	Total	0	1	4	48 **

*: $p \leq 0.05$ で有意

**: $p \leq 0.01$ で有意

(Fisher 検定)

1+: 軽度

2+: 中等度

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等 (文献 1、2、3)

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 : $3.9\sim 4.3 \text{ g/cm}^3$
 溶 解 性 : 水に不溶

I-2 被験物質等

I-2-1 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 : $63 \text{ m}^2/\text{g}$
 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1、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-2-2 被験物質の製造量等 (文献 3)

国内でのアナターゼ型の生産量は、31,112 トン（酸化チタン全体を対象としており、ナノ粒子には限らない）（2012 年）と報告されている。

I-2-3 被験物質の主な用途 (文献 2)

光触媒、工業用触媒担体塗料

I-2-4 許容濃度等 (文献 1、2、4、5)

日本産業衛生学会；

許容濃度：0.3 mg/m³（二酸化チタンナノ粒子として）

発がん分類：2B（ヒトに対しておそらく発がん性があると判断できる。証拠が比較的十分ではない物質・要因）

米国産業衛生専門家会議（ACGIH）；

TLV-TWA：10 mg/m³（酸化チタン全体を対象としており、ナノ粒子には限らない）

発がん分類：A4（ヒトに対する発がん物質としては分類できない）

国立労働安全衛生研究所（NIOSH）；

Recommended Exposure Limit (REL)：0.3 mg/m³

（一次粒子径が 100 nm の粒子として）

国際がん研究機関（IARC）；

発がん分類：2B（ヒトに対しておそらく発がん性があると判断できる。ヒトでは発がん性を示す証拠は不十分である。実験動物では、発がん性についての十分な証拠がある）

I-3 被験物質の特性

I-3-1 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)日立製作所 Z-5010）で測定し、被験物質は酸化チタンであることを確認した。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)日立製作所 Z-5010）で測定し、それぞれのデータを比較した結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、試験期間中の被験物質は安定であることを確認した。それらの結果を APPENDIX 1 に示した。

I-4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー（株）（厚木飼育センター）の F344/DuCr1Cr1j ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 260 匹を 4 週齢で導入し、検疫は導入日を含む 8 日間、馴化を 8 日間実施した後、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動物 240 匹を選別し、がん原性試験群（4 群）、サテライト群（4 群）の 8 群に分けた。なお、がん原性試験に F344/DuCr1Cr1j 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。なお、がん原性試験群及びサテライト群ともに同濃度の投与（暴露）は、同じ吸入チャンバーを使用した。

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

がん原性試験群の投与期間は、1日6時間、1週5日の暴露で104週間とし、土日、祝日を除く計493回の暴露を行なった。サテライト群は、暴露期間を52週間とし、計247回の暴露を行なった。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、0.5、2及び8 mg/m³の3段階（公比4）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、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献6）及びOECD化学品テストガイドライン451（発癌性試験）（文献7）に従い、2年間（104週間）とした。

投与時間は、OECD化学品テストガイドライン451（文献7）に従い、1日6時間とした。

投与濃度は、13週間試験（試験番号0863）（文献8）の結果をもとに決定した。13週間試験は0（対照群）、6.3、12.5、25及び50 mg/m³の濃度で暴露した。結果、動物に死亡はみられず、体重増加の抑制も認められなかった。しかし、濃度依存的に6.3 mg/m³群から肺の肺胞上皮過形成が認められ、酸化チタンの肺沈着量も増加した。50 mg/m³群

ではマクロファージの崩壊も認められた。過形成性病変は腫瘍発生への関与、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 : 3.5mg、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全例、マクロファージの崩壊が雌雄各 9 例に認められ、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 例に認められ、肺沈着量は雌雄平均で 9.9mg であったが、マクロファージの崩壊は認められなかった。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 : 158.8mg、25 mg/m³ : 60.4mg、12.5 mg/m³ : 27.2mg、6.3mg/m³ : 14.0mg 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。

一方、最低濃度については、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、雌雄平均で 1.75mg と求められた。13 週間試験における同群の病理組織学的検査によると、雌の小數例に肺胞上皮の過形成が認められたが、雄に所見は観察されなかった。がん原性試験終了時の肺沈着量が 1.75mg となる投与濃度は、0.74 mg/m³ と推計されるが、この投与濃度で 2 年間の吸入投与を行った場合であっても、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、2 mg/m³、0.5 mg/m³ (公比 4) と決定した。

II-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

OPC の個数濃度 (CPM) に K 値 (個数濃度 - 質量濃度変換係数) を乗じて求めた質量濃度値 (mg/m^3) を吸入チャンバー内の被験物質濃度とした。K 値は、2 週間毎に暴露開始 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 mm Φ 、(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/m^3) を求め、この値を質量濃度測定時の OPC の個数濃度平均値で除して求めた。

2 年間 (104 週間) の暴露を行ったがん原性試験群及びサテライト群の濃度測定結果を TABLE A に示した。なお、サテライト群は、がん原性試験群と同じ吸入チャンバーで 1 年間 (52 週間) の暴露を行い、その濃度測定結果を示した。

がん原性試験群 (104 週間暴露) の各投与群の被験物質濃度 (平均値と標準偏差) は、 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ 群 : $0.51 \pm 0.02 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、 $2 \text{ mg}/\text{m}^3$ 群 : $2.03 \pm 0.06 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、 $8 \text{ mg}/\text{m}^3$ 群 : $7.99 \pm 0.21 \text{ mg}/\text{m}^3$ であった。

サテライト群 (52 週間暴露) の各投与群の被験物質濃度 (平均値と標準偏差) は、 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ 群 : $0.51 \pm 0.02 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、 $2 \text{ mg}/\text{m}^3$ 群 : $2.04 \pm 0.08 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、 $8 \text{ mg}/\text{m}^3$ 群 : $7.99 \pm 0.24 \text{ mg}/\text{m}^3$ であった。

がん原性試験群、サテライト群とも、設定濃度に対する実測濃度の変動率 ((平均実測濃度 - 設定濃度) / 設定濃度 $\times 100$) は最大で 2.0%、変動係数 (標準偏差 / 平均実測濃度 $\times 100$) は最大で 3.9% であり、高い精度でチャンバー内濃度が維持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

投与期間中 3 ヶ月毎に、Micro-orifice uniform deposit cascade impactor (MOUDI, 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ル (47 mm Φ 及び 90 mm Φ 、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 2 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、グラフから空気力学的質量中位径 (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 MMAD 及び og の結果を下記にまとめた。各暴露群の MMAD は $0.9 \sim 1.1 \mu\text{m}$ 、og は $2.2 \sim 2.4$ 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。

	0.5 mg/m ³		2 mg/m ³		8 mg/m ³	
	MMAD (μ m)	og	MMAD (μ m)	og	MMAD (μ m)	og
1 週	1.0	2.3	1.0	2.3	1.0	2.2
14 週	1.0	2.3	1.0	2.4	1.0	2.2
27 週	1.0	2.3	1.0	2.3	1.0	2.3
40 週	1.0	2.3	1.0	2.2	1.0	2.2
53 週	1.1	2.2	1.0	2.3	1.0	2.2
66 週	1.0	2.3	1.0	2.3	1.0	2.3
79 週	1.0	2.2	0.9	2.3	1.0	2.2
92 週	1.0	2.3	0.9	2.3	1.0	2.2

II-1-9 吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察

投与期間中 3 ヶ月毎に、吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察を行なった。0.2 μ m 孔のポリカーボネートフィルター (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は走査電子顕微鏡 (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 1~8 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かった。

II-2 動物管理

II-2-1 群の構成及び各群の使用動物数

がん原性試験群及びサテライト群の 2 群にわけ、それぞれ暴露群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設けた。両群とも同濃度群は同一チャンバーで飼育及び暴露を行った。

がん原性試験群については 1 群当たり雌雄各 50 匹の動物を用いた。サテライト群は、1 群当たり雌雄各 10 匹の動物を用いた。52 週間の暴露期間終了後、直ちに暴露チャンバーとは異なるチャンバーに移動して、清浄空気下で飼育を継続し、定期的 (暴露終了翌日、暴露終了 26 週 (暴露開始から 78 週)、暴露終了 52 週 (暴露開始から 104 週)) に動物を搬出した。

がん原性試験群

群番号	群名称	雄 動物数 (動物番号)	雌 動物数 (動物番号)
0	対照群	50匹 (1001~1050)	50匹 (2001~2050)
1	0.5 mg/m ³ 群	50匹 (1101~1150)	50匹 (2101~2150)
2	2 mg/m ³ 群	50匹 (1201~1250)	50匹 (2201~2250)
3	8 mg/m ³ 群	50匹 (1301~1350)	50匹 (2301~2350)

サテライト群

群番号	群名称	雄 動物数 (動物番号)	雌 動物数 (動物番号)
4	S 対照群	10匹 (1401~1410)	10匹 (2401~2410)
5	S 0.5 mg/m ³	10匹 (1501~1510)	10匹 (2501~2510)
6	S 2 mg/m ³	10匹 (1601~1610)	10匹 (2601~2610)
7	S 8 mg/m ³	10匹 (1701~1710)	10匹 (2701~2710)

II-2-2 群分け方法、個体識別方法、動物飼育室、他試験及び異種動物との区別

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 240 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 9）。群分けは、被験物質暴露開始日の前日（2017 年 2 月 2 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、暴露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（704、712、716、717 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

検疫期間中はバリア区域内の独立した飼育室（雄：716 室、雌：717 室）で飼育し、馴化及び投与期間は、吸入試験室（704、712 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

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。暴露期間中は、動物について、暴露日は吸入暴露前後に、非暴露日は 1 日 1 回、生死及び瀕死を確認した。一般状態の詳細な観察は、週 1 回、吸入暴露前に実施した。その他必要と認められた場合は随時観察を行った。なお、瀕死状態の動物は、速やかに安楽死させた。

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。暴露期間中は、全動物について、暴露開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（52 週及び 104 週にも測定）体重測定を行った。死亡及び瀕死動物は、飼育室からの搬出時に体重を測定した。定期解剖動物の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

全動物について、暴露開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（52 週及び 104 週にも測定）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 尿検査

暴露期間終期まで生存していた動物（サテライト動物を除く）から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

II-3-5 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（サテライト動物を除く）について、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に採血した血液（全血）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 5 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

II-3-6 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（サテライト動物を除く）について、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った。検査方法は、APPENDIX 5 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-3-7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

がん原性試験群及びサテライト群の全動物について肉眼的に病変の観察を行った。なお、定期解剖動物はイソフルラン麻酔下で採血後、腹大動脈を切断、放血することで安楽死させた。

(2) 臓器重量

がん原性試験群及びサテライト群ともに定期解剖時まで生存していた動物について、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、気管支肺胞洗浄液検査（BALF）を行った動物については、右肺のみの測定とし左肺は測定しなかった。

測定臓器：副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

がん原性試験群及びサテライト群の全動物について下記に示した器官・組織を摘出し、肺については4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液、その他の臓器については10%中性

リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡でがん原性試験群（104週間暴露）では下記に示した器官・組織を病理組織学的に検査した。サテライト動物は、肺、肝、腎、脾臓及び脳について検査した。なお、鼻腔については、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か所の横断面で切り出し、検査した。

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺に固定液を注入する）及び気管支、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、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

II-3-8 臓器中酸化チタン沈着量の測定及び臓器の保存

がん原性試験群は、定期解剖初日に動物番号の小さな動物（1群あたり雌雄各5匹）、サテライト群は全動物について、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液による固定前に肺から副葉を分離し、重量測定後、凍結保存した。解凍後、肺中酸化チタン沈着量を、偏光ゼーマン原子吸光光度計（(株)日立製作所 Z-5010）で測定した。なお、サテライト群については、肝臓の右葉、右腎臓、脾臓の正中断片側、脳の正中断右側についても、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液による固定前に一部を分離し、重量測定後、凍結保存した。

II-3-9 気管支肺胞洗浄液（BALF）の回収及び検査

肺重量測定用として雌雄各群25匹の動物を確保した上で、解剖最終日またはその前日に各群の動物番号の小さい順（最大8匹）から、BALF検査のために左肺を洗浄し、洗浄液を回収した。ただし、白血病の末期症状等が認められ、検査や採取が困難と思われる動物の検査は行わず、次の番号以降の動物について、実施した。回収までの操作はGLP試験とした。

回収液のうち検査に悪影響を及ぼす白血病の影響がないと判定したBALF（最大6匹）を選択し、細胞学的検査を行った後、凍結保存した。解凍後、生化学的検査を行った。これらの検査は、非GLPで行った。検査項目については、下記に示し、検査方法並びに単位及び桁数は、APPENDIX 6に示した。統計処理については、「II-4-2 統計処理」に記載した血液学的検査及び血液生化学的検査と同様の方法で行った。

細胞学的検査：総細胞数測定、細胞分類

生化学的検査：リン脂質、ALP、 γ -GTP

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、小数点以下第2位まで表示した。

粒子径の単位は、 μm を単位とし、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 4に示した単位と桁数により表示した。

肺中酸化チタン沈着量は、酸化チタン濃度を、 μg を単位とし小数点以下第3位まで測定し、この値を肺あたりの沈着量($\text{mg}/\text{肺}$)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、臓器毎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、実施した動物数を検査(測定)数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群(サテライト群はS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、Dunnett型の多重比較を行なった。

また、病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード1

～4に分け、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との χ^2 検定を行った。腫瘍性病変は、各群、各臓器の腫瘍毎に Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。ただし、サテライト動物の病理組織学的検査の結果についての検定は行わなかった。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、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。

Ⅲ がん原性群成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE B1, B2 に示し、生存率のグラフを FIGURE 3, 4 に示した。

—雄—

投与（暴露）による生存率の低下はみられなかった。生存率は、全群とも 87 週まで 80% 以上を維持した。98 週以降、2mg/m³ 群の生存率が他の群より低下（98 週の生存率は 2mg/m³ 群で 66%、他の群は 74% 以上）したが、暴露による影響とは考えなかった。暴露最終週（104 週）の生存率は、対照群；30 匹（60%）、0.5 mg/m³ 群；32 匹（64%）、2mg/m³ 群；27 匹（54%）、8 mg/m³ 群；37 匹（74%）であった。

—雌—

投与（暴露）による生存率の低下はみられなかった。生存率は、全群とも 93 週まで 80% 以上（2mg/m³ 群は 80%、他の群は 92% 以上）を維持した。この後、2 mg/m³ 群でやや死亡が増えたが、暴露最終週（104 週）の生存率は、対照群；42 匹（84%）、0.5 mg/m³ 群；43 匹（86%）、2mg/m³ 群；31 匹（62%）、8 mg/m³ 群；44 匹（88%）であった。

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—

暴露に関連した特徴的な所見あるいは異常所見は認められなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE D1~D4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

—雄—

全暴露群で暴露期間初期の 3 週から 6 週（0.5 mg/m³ 群は 8 週まで）にかけて、軽度な体重増加の抑制がみられた。0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群では、暴露期間中、有意差の認められない程度の低値（これ以降、やや低値と称す）で推移し、0.5 mg/m³ 群では暴露中盤（58 週）以降、2 mg/m³ 群では暴露終盤の 94 週及び 98 週で有意な低値がみられた。8 mg/m³ 群は、9 週以降、対照群とほぼ同様な体重増加がみられた。0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群の体

重増加の抑制は、暴露濃度との対応がみられないことから、酸化チタンの暴露によるものとは考えなかった。

暴露終了時（104 週）の暴露群の体重は、対照群に対し、0.5 mg/m³ 群：93%、2mg/m³ 群：95%、8 mg/m³ 群：99%であった。

—雌—

全暴露群で暴露期間初期の 1 週から 5 週（2 mg/m³ 群は 2 週から 9 週）の多くの週で、軽度な体重増加の抑制がみられた。また、0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群では、暴露期間の中盤以降にも軽度な体重増加の抑制がみられた。8 mg/m³ 群では、9 週以降、対照群とほぼ同様な体重増加がみられたが、暴露後半で有意差は認められないものの対照群よりやや低値となった。0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群の体重増加の抑制は、暴露濃度との対応がみられないことから、酸化チタンの暴露によるものとは考えなかった。

暴露期間終了時（104 週）の体重は、対照群に対し、0.5 mg/m³ 群：93%、2 mg/m³ 群：91%、8 mg/m³ 群：97%であった。

III-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E1～E4 及び FIGURE 9, 10 に示した。

—雄—

暴露期間初期の暴露 6 週に、全暴露群で有意な低値がみられた。特に、0.5 mg/m³ 群では、4 週から 8 週までの多くの週で有意に低値であった。この後も 0.5 mg/m³ 群は、多くの週で、やや低値で推移したが、暴露中盤（50 週）以降は対照群と同程度となり、高値の週が散見されるようになった。2 mg/m³ 群及び 8mg/m³ 群は、9 週以降、総じて対照群よりやや高値で推移し、暴露中盤（42 週）以降は、有意な高値を示す週が多くみられた。暴露初期の摂餌量と体重の動向は一致した。

104 週間の平均摂餌量（週平均）は、対照群：18.2g、0.5 mg/m³ 群：18.1g、2 mg/m³ 群：18.5g、8 mg/m³ 群：18.8g であった。

—雌—

全暴露群で暴露 1 週から 6 週まで（2 mg/m³ 群は 9 週まで）有意な低値がみられた。その後、0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群では、高値がみられた週があったが、多くの週でやや低値あるいは有意な低値であった。一方、最高暴露群の 8 mg/m³ 群は、8 週以降、対照群とほぼ同等かやや高値を示す週が多くみられた。

104 週間の平均摂餌量（週平均）は、対照群：13.0g、0.5mg/m³ 群：12.5g、2 mg/m³ 群：12.5g、8 mg/m³ 群：13.0g であった。

Ⅲ-5 尿検査

尿検査の結果を TABLE F1, F2 に示した。

—雄—

2 mg/m³ 群及び 8 mg/m³ 群で、ケトン体の有意な低値が示されたが、減少性の変化であることから毒性影響とは考えなかった。

—雌—

0.5 mg/m³ 群でケトン体の有意な高値、8 mg/m³ 群で蛋白の有意な高値がみられた。ケトン体の上昇はわずかなもので、また、暴露濃度に対応していないことから、毒性影響とは考えなかった。一方、蛋白の変化は、最高濃度群での変化であり、また、腎臓への影響を示唆するものであるが、腎機能の毒性指標となる他の尿検査の項目及び血液生化学的検査で異常が認められなかったこと、腎臓の病理組織学的検査で変化が観察されなかったことから、毒性影響とは考えなかった。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE G1, G2 に示した。

—雄—

0.5 mg/m³ 群でヘモグロビン、ヘマトクリット、MCV、MCH 及び MCHC の有意な低値並びに血小板の有意な高値がみられた。これらは、貧血状態を示すものと考えられるが、暴露濃度に対応していないことから、毒性影響とは考えなかった。

—雌—

毒性影響は認められなかった。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE H1, H2 に示した。

—雄—

0.5 mg/m³ 群で総ビリルビンの有意な低値並びにクロールの有意な高値がみられた。また、8 mg/m³ 群でクロールの有意な高値がみられた。0.5 mg/m³ 群の変化は、暴露濃度に対応したものでないこと、また、8 mg/m³ 群でのクロールの高値は、最高濃度群での変化

ではあるものの変化量が小さいことから、いずれも毒性影響とは考えなかった。

—雌—

0.5 mg/m³群で無機リン、AG比の有意な低値並びにCK、クロール及びクレアチニンの有意な高値がみられた。また、2 mg/m³群でAG比の有意な低値並びにCK、クレアチニンの有意な高値がみられた。また、全投与群でトリグリセライドの有意な低値がみられた。トリグリセライドを含めたこれらの変化は、全て、暴露濃度に対応したものではないことから、毒性影響とは考えなかった。

Ⅲ-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 肉眼的検査

定期解剖時の肉眼的観察をTABLE I1,I2に示した。肉眼写真の代表例をPHOTOGRAPH 10~13に示した。

—雄—

肺の白色斑が、対照群で1匹、0.5 mg/m³群で41匹、2 mg/m³群で50匹、8 mg/m³群で50匹認められた。

リンパ節(縦隔)の白色が、対照群で0匹、0.5 mg/m³群で0匹、2 mg/m³群で2匹、8 mg/m³群で20匹認められた。

甲状腺の結節が、対照群で2匹、0.5 mg/m³群で3匹、2 mg/m³群で4匹、8 mg/m³群で6匹認められ、腎臓の顆粒状が、対照群で1匹、0.5 mg/m³群で1匹、2 mg/m³群で0匹、8 mg/m³群で6匹認められたが、病理組織学的検査ではこれらの臓器に特定の腫瘍性病変、非腫瘍性病変の増加は見られなかった。

—雌—

肺の白色斑が対照群で2匹、0.5 mg/m³群で47匹、2 mg/m³群で50匹、8 mg/m³群で50匹認められた。

リンパ節(縦隔)の白色が対照群で0匹、0.5 mg/m³群で0匹、2 mg/m³群で1匹、8 mg/m³群で14匹認められた。

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 J1, J2 及び TABLE K1, K2 に示した。

—雄—

8 mg/m³ 群で肺の実重量と体重比の高値がみられ、肺重量の増加が認められた。また、0.5 mg/m³ 群で肺の体重比の高値がみられたが、これは体重の低値に起因するもので毒性影響とは考えなかった。

その他、0.5 mg/m³ 群で心臓、腎臓及び脳の体重比の高値がみられたが、この変化は体重の低値によるもので毒性影響とは考えなかった。また、2 mg/m³ 群で脳の体重比の高値がみられたが、暴露濃度との対応がみられないことから毒性影響とは考えなかった。

—雌—

8 mg/m³ 群で肺の実重量と体重比の高値がみられ、肺重量の増加が認められた。

その他、0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群で心臓、腎臓及び脳の体重比の高値並びに副腎の実重量の低値が認められたが、これらは体重の低値によるものであり、また、暴露濃度との対応がみられないことから毒性影響とは考えなかった。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

検査結果のうち、腫瘍性病変の結果は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE L1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE M1, 2 に示した。また、腫瘍のうち増加の傾向が認められた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおける最近 10 年間に行ったがん原性試験 (吸入暴露) のヒストリカルコントロールデータを TABLE N に示した。さらに、転移性病変は TABLE O1, 2 に非腫瘍性病変を TABLE P1, 2 に示した。病理組織所見の代表例は PHOTOGRAPH 14~27 に示した。

—雄—

1) 腫瘍性病変

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫の発生が、対照群で 4 匹、0.5 mg/m³ 群で 5 匹、2 mg/m³ 群で 7 匹、8 mg/m³ 群で 2 匹認められた。また、細気管支-肺胞上皮癌の発生が、8 mg/m³ 群で 2 匹 (4%) 認められ、Peto 検定 (死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。また、8 mg/m³ 群の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの上限 (最小 0%~最大 4%、平均発生率 0.8%) であった。なお、細気管支-肺胞上皮

癌の認められた一例は暴露 84 週で肺腫瘍が原因で死亡した。さらに、細気管支－肺胞上皮腺腫と細気管支－肺胞上皮癌を合わせた発生は、対照群で 4 匹、0.5 mg/m³ 群で 5 匹、2 mg/m³ 群で 7 匹、8 mg/m³ 群で 4 匹であった。

その他、脾臓の単核球性白血病の発生が、対照群で 16 匹、0.5 mg/m³ 群で 15 匹、2 mg/m³ 群で 13 匹、8 mg/m³ 群で 6 匹認められ、Cochran-Armitage 検定で減少傾向が示された。また、Fisher 検定において、8 mg/m³ 群で有意な低下が認められた。また、下垂体の腺腫の発生が、対照群で 11 匹、0.5 mg/m³ 群で 3 匹、2 mg/m³ 群で 6 匹、8 mg/m³ 群で 10 匹認められ、0.5 mg/m³ 群では、有意な低下が示されたが、暴露濃度との対応がみられないことから暴露の影響と判断しなかった。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着、肺胞腔に酸化チタンを貪食した肺胞マクロファージの沈着が全暴露群で認められ、暴露濃度に対応した沈着の程度の増強が認められた。また、肺胞上皮に粒子誘発による過形成が全暴露群で認められ、暴露濃度に対応した発生頻度と病変の程度の増強が認められた。さらに、肺胞壁の線維化が全暴露群に認められ、8 mg/m³ 群では有意な病変の程度の増強が認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成や肺胞壁の線維化は、病変内に粒子を貪食した肺胞マクロファージが認められ、コレステリン肉芽腫や各種炎症細胞浸潤及び肺胞構造の破壊を伴っていた ((PHOTOGRAPH 24,25))。これらには、暴露濃度に対応した病変の強度の増強が認められ、特に 8 mg/m³ 群では過形成と線維化の病巣における癒合が顕著であった。また、肺の細気管支－肺胞上皮過形成が、0.5 mg/m³ 群で病変の程度の増強がみられたが、暴露濃度との対応が認められないことから暴露による影響と判断しなかった。

<鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化が、全群で認められ、8 mg/m³ 群では有意な病変の程度の増強が認められた。また、鼻腔の鉍質沈着が 2 mg/m³ 群で増加が示されたが、暴露濃度との対応が認められないことから暴露による影響と判断しなかった。

<リンパ節>

縦隔リンパ節に粒子の沈着が、全暴露群で認められ、暴露濃度に対応した発生頻度と病変の程度の増強が認められた。

その他、脾臓の島細胞過形成が、全群で認められ、0.5 mg/m³ 群では、有意な病変の程度の増強が認められた。暴露濃度との対応が認められないことから暴露による影響と判断しなかった。

他の臓器には、特記すべき変化は認められなかった。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<肺>

細気管支—肺胞上皮腺腫の発生が、対照群で1匹、0.5 mg/m³群で2匹、2 mg/m³群で3匹、8 mg/m³群で4匹認められた。8 mg/m³群の発生率4匹(8%)は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲(最小0%~最大6%、平均発生率0.8%)を超えた。また、細気管支—肺胞上皮癌の発生が、2 mg/m³群で1匹認められた。さらに、腺扁平上皮癌の発生が、2 mg/m³群で1匹認められ、この腫瘍は当センターのヒストリカルコントロールデータには認められない稀な腫瘍であった。なお、細気管支—肺胞上皮腺腫、細気管支—肺胞上皮癌及び腺扁平上皮癌を合わせた発生は、対照群で1匹、0.5 mg/m³群で2匹、2 mg/m³群で5匹、8 mg/m³群で4匹であった。

その他、乳腺の線維腺腫の発生が、対照群で5匹、0.5 mg/m³群で8匹、2 mg/m³群で0匹、8 mg/m³群で7匹認められ、Fisher検定で2 mg/m³群に有意な低下が示された。しかし、暴露濃度との対応がみられないことから、暴露による影響と判断しなかった。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着、肺胞腔に酸化チタンを貪食した肺胞マクロファージの沈着が、全暴露群で認められ、暴露濃度に対応した沈着の程度の増強が認められた。また、肺胞上皮に粒子誘発による過形成が、全暴露群で認められ、暴露濃度に対応した病変の程度の有意な増強が認められた。さらに、肺胞壁の線維化が、全暴露群で認められ、8 mg/m³群では、有意な病変の程度の増強が認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成や肺胞壁の線維化は、病変内に粒子を貪食した肺胞マクロファージが認められ、コレステリン肉芽腫や各種炎症細胞浸潤及び肺胞構造の破壊を伴っていた(PHOTOGRAPH 24,25)。これらには、暴露濃度に対応した病変の強度の増強が認められ、特に8 mg/m³群では過形成と線維化の病巣における癒合が顕著であった。

<鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化が全群で認められ、2 mg/m³群で有意な病変の程度の低下が認められ、8 mg/m³群で有意な病変の程度の増加が認められた。その他、鼻腔の鉍質沈着が2 mg/m³群で認められたが、暴露濃度との対応がみられないことから、暴露による影響と判断しなかった

<リンパ節>

縦隔リンパ節に粒子の沈着が、全暴露群で認められ、濃度に対応した発生頻度及び病変の程度の増強が認められた。

その他、肝臓の好塩基性小増殖巢の減少が 2 mg/m³ 群で認められたが、暴露濃度との対応がみられないことから、暴露による影響と判断しなかった。

他の臓器には、特記すべき変化は認められなかった。

III-8-4 臓器中酸化チタン沈着量の測定

各群雌雄5匹を使用して測定した肺中酸化チタン量の結果を、TABLE Q に示した。

—雌雄—

肺沈着量は、雌雄とも暴露濃度に対応して増加し、また、各暴露群に共通して雄の沈着量が雌より多かった。0.5 mg/m³ 群と 2 mg/m³ 群の肺沈着量の比は、公比の 4 に近い、4.6 (雄)、5.7 (雌) であったが、2 mg/m³ 群と 8 mg/m³ 群の肺沈着量の比は、9.2 (雄)、8.9 (雌) であった。また、0.5 mg/m³ 群と 8 mg/m³ 群の濃度比は 16 であるが、肺沈着量比は、雄では 42.5、雌では、50.5 と求められた。これらの結果から、最高濃度の 8 mg/m³ 群は、雌雄とも他の群から推定される量の約 2 倍、酸化チタンが沈着した。

III-8-5 BALF の細胞観察及び細胞学的検査

本検査は、非 GLP で実施した。BALF の細胞学的検査の結果を TABLE R1, 2 に示し、対照群及び 8 mg/m³ 群の代表的な写真を PHOTOGRAPH 9 に示した。雄の 2mg/m³ 群は、検査数が 2 例であったため、統計学的検査を行わなかった。

—雄—

全暴露群で酸化チタンを貪食したマクロファージが観察された。特に、8 mg/m³ 群では、細胞質内に酸化チタンが充満し肥大したマクロファージや、崩壊したマクロファージが多数みられた。また、崩壊マクロファージの周囲には、酸化チタンが散在してみられた。さらに、同群では、好中球も多数認められた(PHOTOGRAPH 9)。

細胞学的検査では有意差は示されないが、8 mg/m³ 群で総細胞数の高値傾向がみられた。また、同群では、好中球比の有意な高値並びマクロファージ比の有意な低値が認められた。マクロファージ比の低値については、8 mg/m³ 群のマクロファージの実数値と他の群の数値とを比較したところ、総数の差は群間になくことが明らかになった。したがって、この低値は、好中球が著しく増加したために、相対的に示されたものであった。

—雌—

全暴露群で酸化チタンを貪食したマクロファージが観察された。2 mg/m³ 群以上の群では、細胞質内に酸化チタンが充満し肥大したマクロファージや、崩壊したマクロファージ

が多数みられた。崩壊マクロファージの周囲には、酸化チタンが散在してみられた。さらに、これらの群では、好中球も多数出現した(PHOTOGRAPH 9)。

細胞学的検査では、8 mg/m³群で総細胞数の有意な高値が認められ、また、好中球比の有意な高値、マクロファージ比の有意な低値が認められた。これらの差について、同群のマクロファージ数、好中球数及びリンパ球数を他の群と比較したところ、マクロファージ数は他の群と差がなかったが、好中球が有意に増加したこと、また、リンパ球が若干増加したことから、マクロファージの存在比の低値として示されたものであった。

III-8-6 BALF の生化学的検査

本検査は非 GLP で実施した。BALF の生化学的検査の結果を TABLE S1, 2 に示した。雄の 2mg/m³ 群は検査数が 2 例であったため、統計学的処理を行わなかった。

—雄—

8 mg/m³群で γ -GTP (クララ細胞及びII型上皮細胞の傷害性を示す指標) の有意な高値が認められた。また、2 mg/m³群でも 8 mg/m³群と同様、 γ -GTP の高値がみられたが、統計学的検定を行っていないため、有意な変化とは断言できなかった。この他、0.5 mg/m³群で ALP の有意な低値が認められたが、暴露濃度との対応がみられないことから毒性影響とは考えなかった。

—雌—

2 mg/m³群及び 8 mg/m³群で γ -GTP (クララ細胞及びII型上皮細胞の傷害性を示す指標) の有意な高値が認められた。この他、0.5 mg/m³群で ALP の有意な低値が認められたが、暴露濃度との対応がみられないことから毒性影響とは考えなかった。

III-8-7 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE T1,2 に示した。

—雌雄—

暴露群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

IV サテライト群の成績

IV-1 生死状況

生死状況を TABLE B3~B8 に示した。

—雄—

サテライト群として暴露終盤にあたる 49 週に、8 mg/m³群の 1 例が死亡した。対照群及び他の暴露群では、この期間に死亡はみられなかった。回復期間前期の 26 週間（暴露開始週を基準として 53 週から 78 週の 26 週間）では、8 mg/m³群のみ 6 匹、他の群は 7 匹で飼育が開始された。この期間中に、対照群と 2 mg/m³群で 1 匹ずつ死亡した。回復期間後期（暴露開始週を基準として 79 週から 104 週の 26 週間）では、これまでの 2 回の解剖で各群の雌雄の 6 匹供され、また、途中死亡動物が存在したため、対照群 3 匹、0.5 mg/m³群 4 匹、2 mg/m³群 3 匹、8 mg/m³群 3 匹で飼育が開始された。この期間中、対照群は、96 週と 100 週にそれぞれ 1 匹、0.5 mg/m³群は 90 週に 1 匹、2 mg/m³群は 102 週に 1 匹、死亡した。最終生存動物数は、対照群 1 匹、0.5 mg/m³群 3 匹、2 mg/m³群 2 匹、8 mg/m³群 3 匹であった。

—雌—

暴露期間中に、対照群及び暴露群ともに死亡はみられなかった。回復期間前期の 26 週間（暴露開始週を基準として 53 週から 78 週の 26 週間）では、各群 7 匹で飼育が開始された。同期間での死亡は、対照群及び暴露群ともにみられなかった。回復期間後期（暴露開始週を基準として 79 週から 104 週の 26 週間）では、これまでの 2 回の解剖期に各群とも 6 匹ずつ解剖に供されたため、各群 4 匹で飼育が開始された。この期間に、対照群では 84 週と 86 週にそれぞれ 1 匹、2 mg/m³群では 103 週に 1 匹、8 mg/m³群では 93 週に 1 匹死亡した。最終動物生存数は、対照群 2 匹、0.5 mg/m³群 4 匹、2 mg/m³群 3 匹、8 mg/m³群 3 匹であった。

IV-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C3~C8 に示した。

—雌雄—

暴露に関連した特徴的な所見あるいは異常所見は認められなかった。

IV-3 体重

体重の推移を TABLE D5~D10 及び FIGURE 7,8 に示した。

—雄—

がん原性試験群と同様、全暴露群で暴露期間初期の 5 週まで軽度な体重増加の抑制がみられた。0.5 mg/m³ 群と 2 mg/m³ 群は、その後の暴露期間中もやや低値で推移した。この傾向は回復期間中も同様であった。8 mg/m³ 群は、暴露期間終了時及び回復期間前期の前半までは対照群とほぼ同等かそれ以上で推移したが、回復期間前期の後半（暴露開始週を基準として 70 週）から、対照群よりやや低値となった。

—雌—

全暴露群で暴露期間及び回復期間前期は、対照群と比較してほぼ同等か、それ以上で推移した。回復期間後期中盤（暴露開始週を基準として 86 週）からは、2 mg/m³ 群と 8 mg/m³ 群は、やや低値となった。この結果については、対照群の生存動物（1 匹）の体重が高値であったためと考えられた。

IV-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E5~E10 及び FIGURE 11,12 に示した。

—雄—

暴露期間及び回復期間を通し対照群とほぼ同等か、それ以上で推移した。

—雌—

暴露群は、暴露期間初期の 9 週までやや低値あるいは有意な低値で推移した。特に 6 週には、有意な摂餌量の低値が暴露全群にみられた。その後は、突発的な高値を示す週がまれにみられるものの、多くの週でやや低値で推移した。しかし、暴露期間後半の 42 週以降は、対照群と同等あるいはやや高値で推移し、0.5 mg/m³ 群では、回復期間中もこの傾向にあった。しかし、2 mg/m³ 群及び 8 mg/m³ 群では、回復期間中は、やや低値の週が多かった。

IV-5 病理学的検査

IV-5-1 肉眼的検査

定期解剖時の肉眼的観察を TABLE I3~I8 に示した。肉眼写真の代表例を PHOTOGRAPH 28 ~31 に示した。

【52 週暴露後翌日解剖グループ】

-雄-

肺の白色斑が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 2/3 匹 (67%)、2 mg/m³ 群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³ 群で 4/4 匹 (100% : 8 mg/m³ 群の 1 匹が暴露期間の 49 週に死亡したため 4 匹検査した) 認められた。

リンパ節 (縦隔) の白色が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%) 認められた。

-雌-

肺の白色斑が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 3/3 匹 (100%)、2 mg/m³ 群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³ 群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

リンパ節 (縦隔) の白色が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³ 群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

【52 週暴露後 26 週回復グループ】

-雄-

肺の白色斑が、対照群で 0/4 匹 (0% : 回復期間中に 1 匹死亡したため 4 匹検査した)、0.5 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 4/4 匹 (100% : 対照群と同様、4 匹検査)、8 mg/m³ 群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

リンパ節 (縦隔) の白色が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%)、8 mg/m³ 群で 2/3 匹 (67%) 認められた。

-雌-

肺の白色斑が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³ 群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

肺の結節が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³ 群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

【52週暴露後52週回復グループ】

—雄—

肺の白色斑が、対照群で0/3匹(0%)、0.5 mg/m³群で2/4匹(50%)、2 mg/m³群で3/3匹(100%)、8 mg/m³群で3/3匹(100%)認められた。

—雌—

肺の白色斑が、対照群で0/4匹(0%)、0.5 mg/m³群で3/4匹(75%)、2 mg/m³群で4/4匹(100%)、8 mg/m³群で4/4匹(100%)認められた。

IV-5-2 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 J3~J8及びTABLE K3~K8に示した。

【52週暴露後翌日解剖グループ】

—雌雄—

雄の暴露群に変化はみられなかった。雌の肺の実重量が8 mg/m³群で有意に増加した。

【52週暴露後26週回復グループ】

—雌雄—

暴露群に臓器重量の増加は、認められなかった。

【52週暴露後52週回復グループ】

—雌雄—

雄の暴露群に変化はみられなかった。

雌の脾臓の体重比が全投与群で、また、実重量が0.5 mg/m³群と2 mg/m³群で有意に増加した。

IV-5-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE L 3 ~L 7 に示した。また、転移性病変は TABLE O3 ~O5 に、非腫瘍性病変は TABLE P3 ~P8 に示した。病理組織所見の代表例は PHOTOGRAPH 32~37 に示した。

【52 週暴露翌日解剖グループ】

—雄—

1) 腫瘍性病変

皮下の肉腫 (NOS) が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³群で 1/4 匹 (25%) 認められた。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 4/4 匹 (100%) 認められた。

肺胞腔に酸化チタンを貪食した肺胞マクロファージの沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 4/4 匹 (100%) 認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 1/3 匹 (33%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 4/4 匹 (100%) 認められた。

<造血系>

縦隔リンパ節に粒子の沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³群で 1/4 匹 (25%) 認められた。

—雌—

1) 腫瘍性病変

全ての臓器に腫瘍の発生は認められなかった。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 1/3 匹 (33%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

肺胞腔に酸化チタンを貪食した肺胞マクロファージの沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、

0.5 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 2/3 匹 (67%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

<リンパ節>

縦隔リンパ節に粒子の沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

【52 週暴露後 26 週回復グループ】

—雄—

1) 腫瘍性病変

皮膚の角化棘細胞腫が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³群で 0/3 匹 (0%) 認められた。

皮下の線維腫が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

腹膜の中皮腫が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/4 匹 (0%)、8 mg/m³群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、2 mg/m³群で 4/4 匹 (100%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

肺胞腔に酸化チタンを貪食した肺胞マクロファージの沈着が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³群で 0/3 匹 (0%) 認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 2/3 匹 (67%)、2 mg/m³群で 3/4 匹 (75%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

細気管支—肺胞上皮過形成が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³群で 0/3 匹 (0%) 認められた。

<リンパ節>

縦隔リンパ節に粒子の沈着が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/4 匹 (0%)、8 mg/m³群で 2/3 匹 (67%) 認められた。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<肺>

細気管支—肺胞腺腫が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 1/3 匹 (33%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 2/3 匹 (67%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

細気管支—肺胞上皮過形成が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 1/3 匹 (33%)、2 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

【52 週暴露後 52 週回復グループ】

—雄—

1) 腫瘍性病変

<肺>

細気管支—肺胞上皮腺腫が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/4 匹 (0%)、2 mg/m³群で 1/3 匹 (33%)、8 mg/m³群で 0/3 匹 (0%) 認められた。

<その他>

皮下の線維腫が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/4 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

脾臓の単核球性白血病が、対照群で 1/3 匹 (33%)、0.5 mg/m³群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³群で 1/3 匹 (33%)、8 mg/m³群で 1/3 匹 (33%) 認められた。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³群で 3/3 匹 (100%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³群で 1/3 匹 (33%)、8 mg/m³群で 3/3 匹 (100%) 認められた。

肺胞壁の線維化が、対照群で 0/3 匹 (0%)、0.5 mg/m³群で 0/4 匹 (0%)、2 mg/m³群で 0/3 匹 (0%)、8 mg/m³群で 2/3 匹 (67%) に認められた。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<肺>

細気管支—肺胞腺腫が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%)、8 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%) 認められた。

<その他>

脾臓の単核球性白血病が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%) 認められた。

下垂体の腺腫が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%)、8 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%) 認められた。

乳腺の線維腺腫が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%)、8 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%) 認められた。

陰核腺の腺腫が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%)、2 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%) 認められた。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

気管支関連リンパ組織に粒子の沈着が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 2/4 匹 (50%)、2 mg/m³ 群で 4/4 匹 (100%)、8 mg/m³ 群で 4/4 匹 (100%) 認められた。

粒子誘発による肺胞上皮の過形成が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 2/4 匹 (50%)、2 mg/m³ 群で 3/4 匹 (75%)、8 mg/m³ 群で 4/4 匹 (100%) 認められた。

細気管支—肺胞上皮過形成が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³ 群で 0/4 匹 (0%) 認められた。

肺胞壁の線維化が、対照群で 0/4 匹 (0%)、0.5 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、2 mg/m³ 群で 1/4 匹 (25%)、8 mg/m³ 群で 3/4 匹 (75%) 認められた。

IV-5-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE T3 ~T6 に示した。

—雌雄—

暴露群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

IV-5-5 臓器中酸化チタン沈着量の測定

各解剖期（52週間の暴露終了後翌日、26週及び52週の回復）に生存していた動物の肺沈着量を測定した結果をTABLE Q及びFIGURE 13に示した。なお、52週回復グループの雄の2 mg/m³群は、生存数が2匹となったため、標準偏差を求めなかった。

—雌雄—

暴露52週（暴露期間終了翌日解剖）の肺沈着量は、暴露濃度に対応して増加した。暴露濃度と沈着量（肺沈着した絶対量）を比較したところ、0.5 mg/m³群と2 mg/m³群は、濃度比（公比）4に対し、肺沈着量比は、雄5.6倍、雌は4.2倍であった。同様に、8 mg/m³群と2 mg/m³群では、5.2倍（雄）と7.6倍（雌）と求められた。最高暴露群の8 mg/m³群の雌は、他の群の雌雄及び8 mg/m³群の雄に比べて肺沈着率が高かった。

また、暴露52週（暴露期間終了翌日解剖）の値を基準（100%）として、各群の回復前期（回復26週）における肺保持率を求めた結果、0.5 mg/m³群の雄40%、雌36%、2 mg/m³群では、雄45%、雌58%、8 mg/m³群では、雄67%、雌67%であった。暴露濃度に対応し、酸化チタン消失（排出）率は減衰することが明らかとなった。特に8 mg/m³群の雌雄では、30%程度消失（排出）したのみで、多くが肺に沈着したままであった。また、回復期間26週から回復期間52週にかけての回復後期の26週間では、各暴露群ともほぼクリアランスされないことが示された。

暴露52週翌日の値を起点として各解剖期（26週回復及び52週回復）の測定値を直線で結び、グラフ（FIGURE 13）に示した。グラフにより、肺酸化チタン沈着量は減衰し、0.5 mg/m³群の雌雄と2 mg/m³群の雄の半減期は26週以内であることが示された。しかし、2 mg/m³群の雌と8 mg/m³群の雌雄では肺の沈着量は減少するものの、回復期間の26週以内に半減期は認められなかった。肺に沈着した酸化チタンが一次曲線的に減少すると仮定した場合、肺半減期は、0.5 mg/m³群では、雄23週、雌20週、2 mg/m³群の雄で24週と求められた。2 mg/m³群の雌及び8 mg/m³群ではクリアランスが遅延し、半減期は求められなかった。

V 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ために、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）を F344/DuCrIcrIj ラットに 104 週間全身暴露（経気道投与）し、その生体影響を検索した。また、がん原性試験群とは別にサテライト群を設け、発がんとの関連を検索した。

本試験は、がん原性試験群（各群雌雄 50 匹、合計 400 匹）及びサテライト群（各群雌雄 10 匹、合計 80 匹）ともに投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群を設けた。酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の投与（暴露）濃度は、がん原性試験群及びサテライト群とも 0（対照群）、0.5、2 及び 8 mg/m³ とし、同一濃度同一チャンバーで投与（暴露）を行った。暴露期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の全身暴露による経気道投与で、がん原性試験群は 104 週間、サテライト群は 52 週間とし、暴露及び飼育期間中、生死及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、尿検査（がん原性試験群）を行った。がん原性試験群は、暴露期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定、気管支肺胞洗浄液（BALF）検査、肺中酸化チタン沈着量測定及び病理組織学的検査を行った。サテライト群は、52 週間の投与期間終了後、直ちに暴露チャンバーと異なるチャンバーに動物を移動し、清浄空気下で飼育を継続した。定期的（52 週暴露終了翌日、暴露終了 26 週、暴露終了 52 週）に動物を搬出・解剖し、肉眼観察、臓器重量の測定、肺中酸化チタン沈着量測定及び病理組織学的検査を行った。

V-1 生存率、一般状態、体重等

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）暴露の結果、がん原性試験群及びサテライト群の雌雄に生存率の低下は認められず、動物の一般状態に酸化チタンの影響はみられなかった。

がん原性試験群では、雌雄の暴露群で暴露期間の初期に体重増加の抑制がみられ、雌雄の 0.5 mg/m³ 群及び 2 mg/m³ 群では、投与期間の多くの週で体重の低値が認められた。しかし、この低値は、酸化チタンの暴露によるものとは考えなかった。摂餌量でも体重同様、雌雄の暴露群で暴露期間の初期に有意な低値がみられた。投与期間を通して、雌雄の 0.5 mg/m³ 群及び雌の 2 mg/m³ 群では、低値の週が多くみられたが、酸化チタンの暴露によるものとは考えなかった。尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査では、暴露の影響は認められなかった。8 mg/m³ 群の雌雄で肺の実重量と体重比の高値がみられ、肺重量の増加が認められた。

サテライト群では、暴露群の雄で、がん原性試験群と同様暴露期間の初期に軽度な体重増加の抑制がみられたが、その後は大差なく推移した。雌は、対照群と同等か、それ以上で推移した。摂餌量については、雄は対照群との差はみられなかった。雌は、暴露期間初期に軽度な低値を示したが、その後は、対照群と差はなく推移した。

V-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）暴露の結果、がん原性試験群の雌雄の肺に暴露による影響がみられた。肺の病理組織学的検査では、雄で細気管支-肺胞上皮癌の発生が 8 mg/m³ 群の 2 匹に認められ、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向が示された。これらの群の発生率は、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲の上限であった。一方、肺の総腫瘍（細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生）は、雄の暴露群と対照群の間に有意な増加は認められなかった。したがって、雄の細気管支-肺胞上皮癌の発生は、発がん性を示す不確実な証拠（equivocal evidence of carcinogenic activity）と考えた。雌では、細気管支-肺胞上皮腺腫の発生が、対照群で 1 匹、0.5 mg/m³ 群で 2 匹、2 mg/m³ 群で 3 匹、8 mg/m³ 群で 4 匹認められた。統計学的な有意差は示されなかったものの、増加の傾向がみられた。また、8 mg/m³ 群における細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は、当センターのヒストリカルコントロールデータを超えていた。したがって、細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は発がん性を示す不確実な証拠（equivocal evidence of carcinogenic activity）と考えた。

上記に関連した非腫瘍性病変として、雌雄の肺に粒子誘発による肺胞上皮過形成及び肺胞壁の線維化が認められた。また、解剖時の肉眼的観察では、がん原性試験群及びサテライト群の雌雄の 0.5 mg/m³ 群以上で肺の白色斑が全葉に散在性にみられた。肺の白色斑のほとんどは、粒子誘発による過形成及び肺胞壁の線維化であり、酸化チタン貪食マクロファージを伴っていたことが、病理組織学的検査で明らかにされた。また、両病変は、コレステリン肉芽腫や各種炎症細胞浸潤及び肺胞構造の破壊を伴っており（PHOTOGRAPH 24,25）、暴露濃度に対応した病変の強度の増強が認められた。8 mg/m³ 群では過形成と線維化の病巣における癒合が顕著であった。線維化病変は、齧歯類を用いた種々の粒子状物質の長期吸入暴露試験で認められる肺の特徴的所見であり、ヒトでも結晶性遊離珪酸（シリカ）やアスベストに代表される吸入性粉塵暴露により発症する塵肺の主病変として認知されている。また、線維化病変は、塵肺の合併症の一つである原発性肺がん発症に対し発がんの母地として重要な役割を果たすと考えられている（文献 10）。

V-3 その他の影響

肺胞に到達した微粒子は、肺胞マクロファージに貪食され、気管支-粘液エスカレータあるいはリンパ系を介して除去・排泄されるが、その処理能力を超えた場合、間質組織に蓄積されると考えられている。本試験でも病理組織学的検査により間質組織に蓄積された酸化チタンが、確認された（PHOTOGRAPH 34~37）。また、サテライト群を用いた酸化チタンの肺沈着量測定の結果、各暴露群とも回復期間の 26 週までに排泄されず肺内に存在した酸化チタンは、その後回復期間を設けても、ほとんどが排出されず、存在し続けることが明ら

かにされた。蓄積された酸化チタンは、肉眼的には白色斑、病理組織学的には、過形成や肺胞壁の線維化病変内に認められる酸化チタン貪食マクロファージ、気管支関連リンパ組織内の酸化チタンとして観察され、これらが分析化学的に検出されたものと考えられた。

下表に、52 週暴露終了時と 104 週終了時で肺中に検出された酸化チタン絶対量（平均）を雌雄に分け示した。

性	解剖期	肺沈着量 (mg/肺)		
		0.5 mg/m ³	2 mg/m ³	8 mg/m ³
雄	52 週	0.15	0.84	4.34
	104 週	0.28	1.30	11.90
雌	52 週	0.11	0.46	3.50
	104 週	0.20	1.13	10.10

104 週の酸化チタン肺沈着量は 52 週の値に対して、0.5 mg/m³ 群では、雄 1.9 倍、雌 1.8 倍、2 mg/m³ 群では、雄 1.5 倍、雌 2.5 倍、8 mg/m³ 群では雄 2.7 倍、雌 2.9 倍となった。暴露期間が 2 倍となるため、単純計算すると 104 週の酸化チタン肺沈着量は 52 週の 2 倍と予測されたが、0.5 mg/m³ 群の雌雄及び 2 mg/m³ 群の雄では 2 倍以下であった。しかし、2 mg/m³ 群の雌及び 8 mg/m³ 群の雌雄では、2.5～2.9 倍となり、52 週の結果から予測される量より多くの酸化チタンが沈着した。がん原性試験群の 0.5 mg/m³ 群の雌雄及び 2 mg/m³ 群の雄の分析結果からは、沈着量の増加は認められなかった。老齢化により呼吸量が減少したことも関与すると思われるが、ラットにおける肺胞からのクリアランスはマクロファージによるものが主であることを考え合わせると、これらの群ではクリアランス機能が正常であったことを示唆すると考えた。一方、雌の 2 mg/m³ 群及び雌雄の 8 mg/m³ 群では、暴露濃度と期間から推定された以上の酸化チタンが肺に認められたことから、暴露期間後半にマクロファージクリアランスに遅延が生じた可能性が考えられた。

BALF 測定からは、2 mg/m³ 群以上で好中球とリンパ球が増加することが示され、この変化は、本試験に先立って行われた 13 週間吸入試験においても暴露濃度に対応して認められている。肺には、継続して炎症が惹起されていることが示唆された。サテライト群では、BALF 測定は行っていないが、肺胞上皮の過形成が最低濃度群の 0.5 mg/m³ 群でも回復期間中に消失せず観察されたこと、また、新たに肺胞壁の線維化が 52 週間回復グループの 8 mg/m³ 群で認められたことから、肺の炎症反応は回復期間中には解消しないことも示唆された。

がん原性試験の最高濃度は、ある程度の毒性影響が起きることが推定できる濃度で、かつ発がん性に関する反応以外に、毒性的兆候、病理組織学的病変による死亡率を増加させない濃度が適切であるとされている。本試験では、最高濃度の 8 mg/m^3 で肺線維症等の慢性毒性影響は観察されたが、投与による生存率の低下は認められなかった。したがって、上記の要件は満たしており、本試験における濃度設定は適切であったことが示された。

V-4 他試験の発がん性情報

これまでに齧歯類を用いた酸化チタンの発がん性試験は、全身吸入暴露 2 試験及び気管内投与 2 試験の合計 4 試験において肺発がん性が認められている。これらの結果は、動物における酸化チタンの発がん性を示す証拠として十分であると判断され、2006 年に国際がん研究機関 (IARC : International Agency for Research on Cancer) ワーキンググループは、顔料グレード及びウルトラファイン (現在のナノグレード) の酸化チタンについて、グループ 3 (ヒトに対する発がん性が分類できない) からグループ 2B (ヒトに対する発がん性が疑われる) に引き上げている (文献 2)。

下記に全身吸入暴露試験で発がん性陽性となった 2 試験をまとめた。

1. 顔料グレード酸化チタンを用いた全身吸入暴露試験 (文献 11)

Lee らは、雌雄の CD ラットを用いて、0, 10, 50 及び 250 mg/m^3 の酸化チタン (MMAD: $1.5\text{-}1.7 \mu\text{m}$) を 24 ヶ月 (6 時間/日、5 日/週)、全身吸入暴露した。病理組織学的解析の結果、 250 mg/m^3 群の雌雄に細気管支-肺胞腺腫の発生増加が認められた。加えて、 50 mg/m^3 群以上の雌雄で線維化の増加、さらに 10 mg/m^3 群以上の雌雄で、酸化チタン粒子貪食マクロファージを伴った肺胞上皮過形成の増加が認められた。以上の結果より、酸化チタン粒子の全身吸入暴露試験を行った結果、ラットに対し肺発がん性のみならず、肺線維症をも引き起こすことが報告されている。なお、本試験で Lung Burden は測定されていない。

2. ナノグレード酸化チタンを用いた全身吸入暴露試験 (文献 12)

Heinrich らは、雌の Wistar ラットを用いて、酸化チタン P25 (アナターゼ型約 80% + ルチル型約 20%、一次粒子サイズ 約 14 nm 、Degussa, Germany) を 24 ヶ月間 (18 時間/日、5 日/週) 全身吸入暴露し、その後さらに 6 ヶ月間清浄な空気下で飼育後に剖検した。暴露濃度は、最初の 4 ヶ月間 : 7.2 mg/m^3 、続く 4 ヶ月間 : 14.8 mg/m^3 、その後から実験終了まで : 9.4 mg/m^3 (平均 : 10.4 mg/m^3) であった。

30 ヶ月の最終剖検動物における病理組織学的解析の結果、対照群 217 匹中腺癌 1 例、肺腫瘍を有する総動物は 217 匹中 1 例であったのに対し、酸化チタン暴露群 100 匹中、良性扁平上皮腫瘍 20 例、扁平上皮癌 3 例、腺腫 4 例、腺癌 13 例であり、肺腫瘍を有する総

動物は 100 匹中 32 例と増加した。加えて細気管支-肺胞上皮過形成が 100 匹中 99 匹で認められている。

肺線維症については、30 ヶ月の最終剖検動物では評価されていないが、酸化チタン暴露の 24 ヶ月剖検群の全例で、軽度から中等度の間質性線維化が認められている。

Lung Burden は、3 ヶ月：5.2 mg/肺、6 ヶ月：23.2 mg/肺、12 ヶ月：34.8 mg/肺、18 ヶ月：40.1 mg/肺、22 ヶ月：37.8 mg/肺、24 ヶ月：39.3 mg/肺であった。

VI 結論

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）を 0、0.5、2 及び 8 mg/m³ の濃度で 2 年間にわたり雌雄の F344/DuCrIj ラットに全身暴露した結果、雄の細気管支-肺胞上皮癌と雌の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生増加の傾向がみられた。

したがって、本試験条件下において、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の雌雄ラットに対するがん原性を示す不確実な証拠（equivocal evidence of carcinogenic activity）と結論された。

VII 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) International Agency for Research on Cancer (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. IARC
- 3) 化学工業日報社. 2014. 16514の化学商品. 東京 : 二酸化チタン, 1366.
- 4) 日本産業衛生学会 許容濃度の勧告 (2019年度) . 2019. 産衛誌61 : 170-202.
- 5) National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH). 2011. Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Current Intelligence Bulletin 63. Cincinnati. OH. NIOSH.
- 5) 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発第144号, 平成9年3月11日.
- 6) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451:”Carcinogenicity Studies”. Paris: OECD.
- 8) 日本バイオアッセイ研究センター. 2017. 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. 神奈川: 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.
- 9) 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.
- 10) Wagner GR. 1997. Asbestosis and silicosis. Lancet 349(9061): 1311–1315. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)07336-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07336-9).

- 11) Lee KP, Trochimowicz H J, Reinhardt, CF. 1985. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol.* 79:179-92.

- 12) Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W *et al.* 1995. Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicology*, 7:533-556.

VIII 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

(1) 動物飼育環境条件の逸脱

電気設備点検（非常用回路への切換え及び全停電）による計画停電により、空調機（飼育室及び吸入チャンバー）及び吸入チャンバー給排気ファンが停止し、試験計画書で規定された飼育環境の設定範囲からの逸脱が以下の通り認められた。

電気設備点検が終了し、空調機の運転開始後、動物の一般状態に異常のないことを確認した。動物飼育環境条件の逸脱は、試験結果の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。

逸脱日	内容
2017年10月21日	12:00～18:00の全停電に伴い、空調機及び吸入チャンバーの運転が停止した。吸入チャンバー内換気量及び圧力データが欠落し、12:30～16:00の湿度が計画書に規定した範囲を超えた。
2018年10月20日	12:00～17:00の全停電に伴い、空調機及び吸入チャンバーの運転が停止した。吸入チャンバー内換気量及び圧力データが欠落した。

上記以外で、暴露時間外の飼育中に、チャンバー洗浄（チャンバーホッパー部）による湿度の上昇並びに水位上昇による換気量及び圧力の変動が不定期に発生し、吸入チャンバー飼育環境の逸脱（主に湿度の高値）が認められたが、試験結果の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。以下に設定値並びに逸脱の最大値を示す。

	設定値	測定値
換気量	10±1 回換気 (1667±1671 L/mim)	133.2 L/mim (0.8 回換気に相当)
湿度	50±20 %	78.7 %
圧力	0~15×10 pa	-70.2×10

(2) 尿検査データの欠落

投与最終週に生存している動物の自然排尿による新鮮尿を用いて尿検査を実施したが、以下の動物については新鮮尿の採取ができず、データ欠落となった。

検査日	データ欠落動物番号
2019年1月21日 ～	1006, 1013, 1030, 1039, 1042, 1047, 1103, 1217, 1238, 1247, 1248, 1319
2019年1月23日	2032, 2033, 2034, 2037, 2039, 2042, 2147, 2227

尿検査データの欠落については、評価に必要な検査動物数が確保されたことから、試験結果の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。

(3) 血液学的検査データの欠落

試験計画書では、定期解剖時に生存している全動物について血液学的検査を行うと規定されていたが、以下の動物について採血時のミスあるいは凝固により、検査を行うことができず計画書から逸脱した。

検査日	データ欠落動物番号
2019年2月4日~6日	1041 (凝固), 1210 (凝固), 2118, 2130 (凝固)

試験計画書では、定期解剖時に生存している全動物について血液学検査を行うと規定されていたが、多項目自動血球分析装置にて測定後、同装置データベースにより Positive (異常検体) と判定されたデータがあった。これについて、血液塗抹標本を作製し観察を行った結果、異常と認定したデータについては、不採用とした。この判断により、データ欠落となった動物番号を以下に示す。

検査日	データ欠落動物番号
2019年2月1日~7日	1006, 1029, 1138, 1247 2040, 2116, 2125, 2216, 2229, 2237, 2242, 2326, 2341

評価に必要な検査動物数が確保されており、血液学的検査データの欠落による試験結果の評価についての影響はなかったと判断した。

(4) 血液生化学検査データの欠落

試験計画書では、定期解剖時に生存している全動物について血液生化学検査を行うことになっていたが、以下の動物について採血時のミスにより、データが欠落となった。

検査日	データ欠落動物番号
2019年2月4日	2118

評価に必要な検査動物数が確保されており、血液生化学検査データの欠落による試験結果の評価についての影響はなかったと判断した。

(5) サテライト群 (52 週暴露後 52 週回復グループ) 臓器重量の欠落

定期解剖時まで生存している動物について、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳の湿重量 (臓器実重量) を測定すると規定されていた。

しかし、サテライト群の 52 週暴露後 52 週回復グループの定期解剖時 (2019 年 1 月 31 日) に副腎、精巣、卵巣、心臓の測定を行わず、計画書から逸脱した。試験結果の評価についての影響はなかったと判断した。

群番号	群名称	雄 動物数 (動物番号)	雌 動物数 (動物番号)
4	S 対照群	1 (1410)	2 (2409, 2410)
5	S 0.5 mg/m ³	3 (1507,1508,1509)	4 (2507,2508,2509,2510)
6	S 2 mg/m ³	2 (1607,1609)	3 (2608,2609,2610)
7	S 8 mg/m ³	3 (1708,1709,1710)	3 (2707,2708, 2709)

(6) BALF 回収時に発生したデータ逸脱

試験計画書では、肺重量測定用に雌雄 25 匹の動物を確保した上で、定期解剖時最終日またはその前日に生存している動物のなかから、動物番号の若い動物 (原則 6 匹) の BALF の回収を行い、検査すると規定されていたが、以下の動物は、手技上のミスにより検査に必要な量を確保できず、測定することができなかった。なお、2045 は回収液が肺へ混入したことから、肺重量を正確に反映していないと考え肺重量測定を行わなかったため、肺重量データが欠落した。

作業日	データ欠落動物番号
2019 年 2 月 7 日	2044,2045

BALF 回収を行い、白血病あるいはその疑いはなかったが、BALF 検査に必要な動物数が確保されたとの判断により、BALF 検査を行わなかった動物を下記に示す。試験結果の評価についての影響はなかった。

作業日	データ欠落動物番号
2019 年 2 月 7 日	1348, 2349, 2350

(7) 臓器中酸化チタン沈着量及び測定データの取り扱い

試験計画書では、サテライト群の全動物について肺の一部を用い、肺中酸化チタン沈着量を測定すると規定されておりこれにしたがった。計画書では、肺中酸化チタン沈着量は、酸化チタン濃度を、 μg を単位とし小数点以下第 3 位まで測定し、この値を肺 1g あたりの

沈着量 (mg/1g 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 位まで表示すると記載されていた。しかし、肺 1g あたりで沈着量を比較する場合、肺重量が同じであれば問題は発生しないが、解剖期の異なるデータ間で比較を行う時は、沈着量 (絶対値) に変化がなくとも、肺重量増加に伴い、相対値は減少する危険性を持つ。これにより誤った解釈を導き出す可能性があるため、肺あたりの重量で表示した。

また、測定データの取り扱いについては、計画書に記載されていなかった。測定した全データ (雌雄各 40 匹) のうち、解剖期 (3 回) に搬出された動物 (生存動物) のデータは採用したが、以下に示す途中死亡動物のデータは、採用しなかった。本件は、試験計画書からの逸脱には該当しないと考えるが、計画書に記載されるべき内容であったと史料し、記載した。試験結果の評価についての影響はなかったと判断した。

群番号	群名称	雄 動物数 (動物番号)	雌 動物数 (動物番号)
4	S 対 照 群	3 (1407, 1408, 1409)	2 (2407, 2408)
5	S 0.5 mg/m ³	1 (1510)	0
6	S 2 mg/m ³	2 (1608,1610)	1 (2607)
7	S 8 mg/m ³	1 (1703)	1 (2709)

(8) サテライト群の病理組織検査

試験計画書では、サテライト群の肺、肝、腎、脾臓及び脳について病理組織検査学的検索を行うと規定されていたが、上記以外でも肉眼的変化のみられた器官・組織の標本を作製し、病理組織学的検索を実施した。下記に追加して行った動物番号と器官・組織を試験計画書からの逸脱として示す。これらの器官・組織にみられた変化は試験結果の評価に影響するものではなかった。

群番号	群名称	雄 動物番号及び器官・組織	雌 動物番号及び器官・組織
4	S 対照群	1407 下垂体 1408 胸膜、リンパ節 1409 気管（甲状腺） 1410 皮下組織、舌	2401 眼 2402 下垂体 2405 下垂体 2408 子宮 2409 下垂体 2410 子宮
5	S 0.5 mg/m ³ 群	1510 リンパ節	2507 皮下組織 2508 下垂体 2510 子宮
6	S 2 mg/m ³ 群	1605 皮膚 1610 皮下組織	2607 下垂体 2608 皮膚 2610 下垂体
7	S 8 mg/m ³ 群	1703 鼻、目 1704 リンパ節 1706 リンパ節、皮下組織、 腹膜 1707 リンパ節 1708 皮下組織	2701 リンパ節 2705 下垂体