

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の rasH2 マウス
を用いた吸入による中期がん原性試験報告書

試験番号：0887

CAS No. 1317-70-0

2019年 3月 5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	ii
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	iii
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~P2	
FIGURES	1~6	
PHOTOGRAPHS	1~3	
APPENDICES	1-1~4	

標題

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の rasH2 マウスを用いた吸入による中期がん原性試験

試験目的

本試験は、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）を遺伝子改変マウス（rasH2 マウス）に 26 週間全身暴露（経気道投与）し、そのがん原性を検索した。

試験法

本試験は、「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」（平成 28 年度第 3 回発がん性評価ワーキンググループ：2017 年 3 月 1 日厚生労働省）に準拠して実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づく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 28 年 4 月 18 日厚生労働省告示第 208 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）を参考にして実施した。

拡散防止措置及び動物福祉

本試験は、「日本バイオアッセイ研究センターにおける遺伝子組換え生物使用実験安全管理規程」（平成 26 年 9 月 3 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日）及び「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）、「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。

また、本試験は、日本バイオアッセイ研究センターの遺伝子組換え生物使用実験安全委員会（承認番号 2017-01）及び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 0167）。

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

試験施設及び運営管理者

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
所長 菅野 純
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日	2017年 5月 10日
動物導入日	2017年 5月 26日
被験物質投与開始日	2017年 6月 5日
被験物質投与終了日	2017年 12月 4日
定期解剖日	2017年 12月 5、6、7、8日
試験終了日	2019年 3月 5日

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の rasH2 マウス
を用いた吸入による中期がん原性試験報告書

試験番号：0887

本文

本文目次

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

II-2-3	飼育条件	10
(1)	飼育環境	10
(2)	飼料	10
(3)	飲水	10
II-3	観察・検査項目及び方法	11
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	11
II-3-2	体重測定	11
II-3-3	摂餌量測定	11
II-3-4	血液学的検査	11
II-3-5	血液生化学的検査	11
II-3-6	病理学的検査	12
(1)	肉眼的観察	12
(2)	臓器重量	12
(3)	病理組織学的検査	12
II-4	数値処理と統計方法	13
II-4-1	数値の取り扱いと表示	13
II-4-2	統計処理	13
III	試験成績	14
III-1	生死状況	14
III-2	一般状態	14
III-3	体重	14
III-4	摂餌量	15
III-5	血液学的検査	15
III-6	血液生化学的検査	16
III-7	病理学的検査	16
III-7-1	肉眼的観察	16
III-7-2	臓器重量	17
III-7-3	病理組織学的検査	17
III-7-4	死因	19
IV	考察及びまとめ	20
IV-1	生存率、一般状態、体重、摂餌量	20
IV-2	腫瘍性及び腫瘍関連病変	20

IV-3	その他の影響	21
V	結論	21
VI	文献	22
VII	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）を遺伝子改変マウス（*rasH2* マウス）に 26 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、投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群（各群雌雄とも 25 匹、合計 200 匹）を設け、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の投与（暴露）濃度は、0（対照群）、2、8 及び 32 mg/m³ とした。投与期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の全身暴露による経気道投与で 26 週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、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、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

暴露の結果、投与による生存率の低下は認められず、動物の一般状態に雌雄とも酸化チタンの影響はみられなかった。体重は、雌雄とも投与群が対照群より高値で推移した。摂餌量では、雄は対照群より高値であったが、雌は対照群とほぼ同量で差はなかった。病理組織学的検査では、雌雄とも暴露による腫瘍の発生増加は認められず、腫瘍関連病変の発生増加もみられなかった。非腫瘍性病変として、32 mg/m³ 群の雌雄で、酸化チタンを大量に貪食したマクロファージを主体としたリンパ球等の炎症性細胞の集簇巣が認められ、酸化チタン暴露による肺の炎症が示された。その他、血液学的検査では、32 mg/m³ 群の雄で軽度な貧血がみられ、臓器重量測定では、同群の雌雄で肺重量の増加が認められた。

本試験の最高濃度（32 mg/m³）は、毒性影響を示す濃度で、かつ腫瘍以外の毒性による死亡率を増加させない濃度であり、がん原性試験の最高濃度として適切であったことが示された。

以上、遺伝子改変マウス（*rasH2* マウス）を用いて、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の 26 週間にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄ともがん原性を示す証拠は得られなかった（no evidence of carcinogenic activity）と結論された。

酸化チタンの中期がん原性試験における主な腫瘍発生 (rasH2 マウス 雄)

投与濃度 (mg/m ³)		0	2	8	32	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	4	1	4		
	細気管支-肺胞上皮癌 [#]	0	0	0	1		
	細気管支-肺胞上皮腺腫 +細気管支-肺胞上皮癌 [#]	1	4	1	5		
皮下 脾臓	血管腫	0	1	0	0		
	血管腫	2	1	1	1		
	血管肉腫 [#]	0	1	1	1		
	血管腫+血管肉腫 [#]	2	2	2	2		
膵臓	血管腫	0	0	1	0		
腹膜	血管肉腫 [#]	0	0	0	1		
全臓器	血管腫	2	2	2	1		
	血管肉腫 [#]	0	1	1	2		

酸化チタンの中期がん原性試験における主な腫瘍発生 (rasH2 マウス 雌)

投与濃度 (mg/m ³)		0	2	8	32	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	0	0	0	2	↑	↑
	細気管支-肺胞上皮癌 [#]	1	1	0	0		
	細気管支-肺胞上皮腺腫 +細気管支-肺胞上皮癌 [#]	1	1	0	2		
皮下	血管腫	0	0	0	1		
	血管肉腫 [#]	1	0	0	0		
脾臓	血管腫	1	2	2	0		
	血管肉腫 [#]	0	0	0	1		
膀胱	血管腫	1	0	0	0		
子宮	血管肉腫 [#]	0	1	0	0		
脳	血管肉腫 [#]	0	0	0	1		
胸膜	血管肉腫 [#]	1	0	0	0		
縦隔	血管肉腫 [#]	0	0	1	0		
全臓器	血管腫	2	2	2	1		
	血管肉腫 [#]	1	1	1	2		

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)

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）

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）

NIOSH；

Recommended Exposure Limit (REL)：0.3 mg/m³

（一次粒子径が100 nmの粒子として）

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（株式会社 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、試用期間中の被験物質は安定であることを確認した。その結果を APPENDIX 1 に示した。

I-4 試験動物

動物は、日本クレア（株）（富士生育場）の Jic:CB6F1-Tg rasH2@Jcl (rasH2 マウス) マウスの雌雄を使用した。

雌雄各 105 匹を 6 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、群分け時体重範囲、雄：22.2～26.7 g、雌：18.1～21.9 g を試験に用いた。

なお、中期がん原性試験に Jic:CB6F1-Tg rasH2@Jcl マウスを選択した理由は、発がん感受性が高く、継世代的にも安定的であり再現性に優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26週間とし、土日を除く計130回の暴露を行なった。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、2、8及び32 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、「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」（文献6）に準拠して、26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rasH2マウス（non-Tg）を用いた4週間試験（試験番号0862）の結果をもとに決定した。雌雄マウスに0（対照群）、6.3、12.5、25及び50 mg/m³の濃度で酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）を4週間暴露した結果、各群に死亡はみられず、一般状態の観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査、BALF検査、剖検観察及び臓器重量の測定でも変化はみられなかった。しかし、50 mg/m³群で雌の摂餌量が投与3及び4週に、有意な低値を示し、また、同群の雄で鼻腔の嗅上皮の剥離及び肺胞の過形成性が、そ

れぞれ1例みられた。

一般的に、肺沈着量と肺毒性は関連し、肺沈着量は投与濃度のみならず投与期間とも関係すると考えられる。肺毒性と沈着量の関係が比例関係にあると仮定して、以下の様のがん原性試験の投与濃度を求めた。中期がん原性試験の投与期間は26週間であり、4週間試験の6.5倍にあたる。4週間試験で過形成性病変のみられた50 mg/m³群と同量の酸化チタンが、中期がん原性試験（26週間）の投与終了時の肺に沈着すると推定される投与濃度は、7.69 mg/m³ (50/6.5=7.69 mg/m³) と計算された。過形成性病変は、腫瘍発生に關与する所見と考えられるが、4週間試験では1例にみられたにすぎない。この計算で求めた濃度をがん原性試験の最高濃度に設定した場合、腫瘍の発生が認められないか、認められたとしても少数の動物に限定され、その結果、発がん性評価のために十分なデータが得られない可能性が示唆された。従って、最高濃度としては、7.69 mg/m³は低いと考え、これよりも高い濃度が望ましいと判断した。7.69 mg/m³よりも高い投与濃度として、4週間試験で実施した50 mg/m³を想定してみると、4週間試験では、雌雄に体重減少はみられていないものの、摂餌量の低値が投与3及び4週に雌でみられている。特に4週では対照群の86%であった。50 mg/m³の濃度で26週間の暴露を行った場合、摂餌量の低値に伴う体重減少が推察される。この他、4週間試験では non-Tg rasH2マウスを、がん原性試験では Tg rasH2マウスを用いることから、動物間での感受性の差も懸念される。これらのことから、中期がん原性試験の最高濃度は、50 mg/m³より低い濃度がふさわしいと考えた。

一方、中間濃度について、最高濃度としては低いと棄却した7.69 mg/m³の濃度を設定した場合、前述したように26週間の投与で過形成性病変の発生が予見され、投与の影響が期待されることから、中間濃度としては妥当な濃度であると判断した。従って、この値に近い8 mg/m³を中間濃度に設定した。

最高濃度は、8 mg/m³以上で50 mg/m³以下の濃度が望ましいことから、これらの算術平均値の29 mg/m³に近似し、また、長期用吸入チャンバー（換気流量：414 L/min）で暴露可能な上限濃度（35 mg/m³）に近い32 mg/m³を設定した。

以上のことから、中期がん原性試験は雌雄とも最高濃度を32 mg/m³とし、以下、公比4で8 mg/m³、2 mg/m³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、この値に質量濃度測定時の OPC の個数濃度平均値を乗じて求めた。濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度 (平均値と標準偏差) は、2 mg/m^3 群 : $2.0 \pm 0.0 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、8 mg/m^3 群 : $8.1 \pm 0.2 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、32 mg/m^3 群 : $32.0 \pm 0.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ であった。設定濃度に対する実測濃度の変動率 ($(\text{平均実測濃度} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$) は最大で 1.25%、変動係数 (標準偏差 / 平均実測濃度 $\times 100$) は最大で 2.5% 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

投与期間中に 3 回 (投与 1、13、25 週)、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ル (47 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、グラフから空気動力学的質量中位径 (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。各投与群の MMAD は 0.8~1.0 μm 、og 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。

	2 mg/m^3		8 mg/m^3		32 mg/m^3	
	MMAD (μm)	og	MMAD (μm)	og	MMAD (μm)	og
1 週	0.8	2.0	0.9	2.1	1.0	2.1
13 週	0.8	2.0	0.9	2.0	0.9	2.1
25 週	0.9	2.0	0.9	2.0	1.0	2.1

II-1-9 吸入チャンバー内の酸化チタンの形態観察

投与期間中に3回（投与1、13、25週）、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 μm孔のポリカーボネートフィルター（47 mmΦ、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

投与群3群及び対照群1群の計4群を設け、各群雌雄25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	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対照群	25匹 (1001~1025)	25匹 (2001~2025)
1	2 mg/m ³ 群	25匹 (1101~1125)	25匹 (2101~2125)
2	8 mg/m ³ 群	25匹 (1201~1225)	25匹 (2201~2225)
3	32 mg/m ³ 群	25匹 (1301~1325)	25匹 (2301~2325)

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100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8）。群分けは、被験物質投与開始日の前日（2017年6月5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（713、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

検疫期間中はバリア区域内の独立した飼育室（713 室）で飼育し、馴化及び投与期間は、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。以下に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示し、吸入試験室の温湿度の実測値（平均値±標準偏差）を〈 〉内に、また、吸入チャンバー内の環境測定結果を APPENDIX 3 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 ; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$
 〈701 室 ; $21.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、702 室 ; $20.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 〉

吸入チャンバー内 ; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 吸入試験室 ; $55 \pm 15\%$
 〈701 室 ; $56 \pm 8\%$ 、702 室 ; $61 \pm 10\%$ 〉

吸入チャンバー内 ; $50 \pm 20\%$

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 ; 7~9 回/時

吸入チャンバー内 ; 10 ± 1 回/時

圧 力 : 吸入チャンバー内 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

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 (112(W)×212(D)×120(H) mm/匹)

馴化及び投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (100(W)×116(D)×120(H) mm/匹)

(2) 飼料

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造の CRF-1 固型 (30kGy- γ 線照射滅菌飼料) を固型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、試験に使用する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。投与期間中では、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

全動物について、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 4 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-3-5 血液生化学的検査

全動物について、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 4 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、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 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。

測定臓器：胸腺、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

全動物について下記に示した器官・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、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。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。

皮膚、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（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、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上部、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、胸骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

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、小数点以下第1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。

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。腫瘍性病変は、各群、各臓器の腫瘍ごとに Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。

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 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE B1, B2 に示した。

—雄—

2 mg/m³ 群で 1 匹、死亡した。死因は、病理検査により血管肉腫による出血と診断された。死亡と投与濃度との間に対応がみられないことから、酸化チタンの暴露による死亡とは考えなかった。

—雌—

対照群及び 8 mg/m³ 群でそれぞれ 1 匹、32 mg/m³ 群で 2 匹（1 匹は安楽死）死亡した。死因は、病理検査により血管肉腫による出血と診断された。死亡と投与濃度との間に対応がみられないことから、酸化チタンの暴露による死亡とは考えなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C1, C2 に示した。

—雄—

死亡動物を含む全動物に特記すべき変化はみられなかった。

—雌—

暴露期間後期（23 週）に、32 mg/m³ 群の 1 例に自発運動量の減少がみられた。同動物は、翌日に瀕死状態に陥ったため安楽死させた。この動物以外に、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—

投与期間を通し、各群とも順調な体重増加がみられた。投与群は、対照群より高値で推移し、特に、8mg/m³ 以上の群で統計学的に有意な高値が投与期間 17 週以降のほぼ全週でみられた。投与期間終了時の体重は、対照群に対し、2 mg/m³ 群は 104%、8mg/m³ 群は 107%、

32 mg/m³ 群は 104%であった。

—雌—

投与期間を通し、各群とも順調な体重増加がみられた。投与群は、対照群より高値で推移し、2 及び 8mg/m³ 群で統計学的に有意な高値が認められた週があった。投与期間終了時の体重は、対照群に対し、2 mg/m³ 群は 104%、8mg/m³ 群は 106%、32 mg/m³ 群は 102%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—

投与群は、投与期間を通し対照群より高値で推移し、多くの週で統計学的に有意な高値がみられた。中でも、8 mg/m³ 群で顕著であった。

26 週間の平均摂餌量は、対照群：4.0g、2 mg/m³ 群：4.2g、8 mg/m³ 群：4.4g、32mg/m³ 群：4.2g であった。

—雌—

投与期間を通し、投与群と対照群の間に顕著な差はみられなかった。

26 週間の平均摂餌量は、対照群：3.9g、2 mg/m³ 群：3.9g、8 mg/m³ 群：4.0g、32mg/m³ 群：3.9g であった。

III-5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F1, F2 に示した。なお、雄では対照群及び 2 mg/m³ 群で各 1 例、雌は 8 mg/m³ 群で 1 例、採血量の不足により検査を行えなかった。

—雄—

32mg/m³ 群で統計学的に有意な赤血球数及びヘマトクリット値の低値がみられ、有意差は認められないがヘモグロビン濃度も対照群より低値であった。さらに、同群では、統計学的に有意な MCV 及び MCH の高値が認められた。これらのことから、32mg/m³ 群は、軽度な貧血状態にあると判断した。8 mg/m³ 群で有意な赤血球数の減少及び MCH の高値が認められたが、貧血とは考えなかった。この他、白血球分類において、2 及び 32 mg/m³ 群で有意な単球比の低値がみられたが、毒性影響は明らかではなかった。

—雌—

2 及び 32 mg/m³ 群で統計学的に有意な赤血球数の低値がみられた。全投与群で MCV の有意な高値がみられた。これらの変化には、いずれも濃度相関性が認められず、毒性影響とは考えなかった。また、32 mg/m³ 群で白血球の有意な低値がみられたが、毒性影響は明らかではなかった。

Ⅲ-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。なお、雄は対照群で 2 例、2 mg/m³ 群で 1 例、雌は 8 mg/m³ 群で 1 例、採血量の不足により検査を行えなかった。

—雄—

全投与群で統計学的に有意な A/G 比及びカリウムの低値並びにグルコース、カルシウム及び無機リンの高値がみられ、2 及び 8mg/m³ 群で有意な総蛋白の高値がみられた。また、2 mg/m³ 群で有意なクロールの低値がみられた。これらの変化は、いずれも濃度相関性が認められないこと及び変化量が小さいことから、毒性影響とは考えなかった。

—雌—

全投与群で統計学的に有意なカリウムの低値並びに ALT、LDH 及び CK の高値、8 及び 32mg/m³ 群で有意な尿素窒素の低値及びグルコースの高値、2 及び 8mg/m³ 群で有意な総蛋白の高値がみられた。LDH の変化については、濃度相関性が認められており、肝臓・心筋・肺・腎臓・赤血球・骨格筋等への影響を示唆するものと考えられるが、この変化と関連する他の検査項目並びに病理組織学的検査で、明らかな毒性影響は認められなかった。LDH の変化以外は、いずれも濃度相関性は、認められなかった。また、32mg/m³ 群で有意なナトリウムの高値がみられたが、この変化の程度は、僅かなものであった。以上の結果、全投与群で LDH の高値がみられたが、毒性影響は明らかではなかった。

Ⅲ-7 病理学的検査

Ⅲ-7-1 肉眼的観察

定期解剖時の肉眼的観察を TABLE H1, H2 に示した。

—雄—

肺の白色斑が 32 mg/m³ 群で全動物の 25 匹に観察された。

—雌—

肺の白色斑が 32 mg/m³ 群で 23 匹に観察された。

Ⅲ-7-2 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 I1, I2 及び TABLE J1, J2 に示した。

—雄—

2 及び 32 mg/m³ 群で有意な肺の重量（実重量及び体重比）増加がみられ、8 mg/m³ 群で実重量の有意な高値が認められた。しかし、2 mg/m³ 群の変化は投与濃度との対応がみられないこと、8 mg/m³ 群は実重量のみの変化であることから、これらの群での肺重量増加は、投与による毒性影響とは考えなかった。また、8 及び 32 mg/m³ 群で肝臓の重量（実重量及び体重比）増加がみられたが、投与濃度との対応は認められなかった。以上の結果、32 mg/m³ 群で投与による有意な肺の重量増加が認められた。

—雌—

2 及び 32 mg/m³ 群で有意な肺の重量（実重量と体重比）増加がみられ、8 mg/m³ 群で実重量の有意な高値が認められた。しかし、2 mg/m³ 群の変化は投与濃度との対応がみられないこと、8 mg/m³ 群は実重量のみの変化であることから、これらの群での肺重量増加は、投与による毒性影響とは考えなかった。また、全投与群で卵巣の重量（実重量と体重比）増加が認められたが、濃度相関性が認められなかったことから毒性影響とは考えなかった。その他、肝臓重量で、2 mg/m³ 群で体重比、8 mg/m³ 群で実重量と体重比の増加がみられたが、これらも濃度との対応はみられなかった。以上の結果、32 mg/m³ 群で投与による有意な肺の重量増加が認められた。

Ⅲ-7-3 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 K 1, 2 に、統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）の結果を TABLE L 1, 2 に、坦腫瘍動物数と腫瘍数の結果を TABLE M 1, 2 に示した。転移性病変は TABLE N に、非腫瘍性病変は TABLE O 1, 2 に示した。また、死因を TABLE P 1,2 に示した。

—雄—

1) 腫瘍性病変

全ての臓器において、被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

坦腫瘍動物数は、対照群 3 匹 (12%) に対し、2 mg/m³ 群で 7 匹 (28%)、8 mg/m³ 群で 5 匹 (20%)、32 mg/m³ 群で 8 匹 (32%) であった。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

炎症性細胞の浸潤 (巣状) が、32 mg/m³ 群で 25 匹に認められ、その程度はいずれも軽度であった。また、粒子の沈着が投与群の全動物に認められ、その程度は 2 mg/m³ 群で軽度、8 mg/m³ 群で中等度、32 mg/m³ 群で重度であった。

<縦隔リンパ節>

粒子の沈着が、32 mg/m³ 群で 13 匹に認められた。その程度は、いずれも中等度であった。

その他、鼻腔で鼻腺の呼吸上皮化生が対照群よりも 2 mg/m³ 群で減少したが、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—

1) 腫瘍性病変

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫の発生が 32 mg/m³ 群で 2 匹 (8%) に認められ、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加が示された。しかし、細気管支-肺胞上皮癌の発生が、対照群及び 2 mg/m³ 群で各 1 匹 (4%) に認められたことから、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では、対照群と投与群との間に有意差は示されなかった。

坦腫瘍動物数は対照群 4 匹 (16%) に対し、2 mg/m³ 群で 4 匹 (16%)、8 mg/m³ 群で 3 匹 (12%)、及び 32 mg/m³ 群で 7 匹 (28%) であった。

2) 非腫瘍性病変

<肺>

炎症性細胞の浸潤 (巣状) が、32 mg/m³ 群で 25 匹に認められ、その程度はいずれも軽度であった。また、粒子の沈着が投与群の全動物に認められ、沈着の程度は 2 mg/m³ 群で軽度、8 mg/m³ 群で中等度、32 mg/m³ 群で重度であった。

<縦隔リンパ節>

粒子の沈着が 32 mg/m³ 群で 8 匹に認められ、その程度はいずれも中等度であった。

Ⅲ-7-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE P 1,2 に示した。

—雌雄—

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加は認められなかった。

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ために、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）を遺伝子改変マウス（*rasH2* マウス）に 26 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、投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群（各群雌雄とも 25 匹）を設け、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の投与（暴露）濃度は、0（対照群）、2、8 及び 32 mg/m³ とした。投与期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の全身暴露による経気道投与で 26 週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、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、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の暴露の結果、雄で 1 例、雌で 4 例死亡したが、これらは血管肉腫による出血死と断定し、酸化チタンの毒性による死亡とは考えなかった。一般状態の観察では、試験途中で安楽死させた 32 mg/m³ 群の雌の 1 例に自発運動量の減少等が認められたが、この動物以外に特記すべき変化はみられなかった。体重は、雌雄とも投与群が対照群より高値で推移し、投与期間終了時の体重は、雄では、対照群に対し、2 mg/m³ 群：104%、8 mg/m³ 群：107%、32 mg/m³ 群：104%、雌では、2 mg/m³ 群：104%、8 mg/m³ 群：106%、32 mg/m³ 群：102%であった。摂餌量は、雄では、対照群より高値であったが、雌は対照群とほぼ同量で差はなかった。

IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雄では、酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）暴露による腫瘍及び腫瘍関連病変の発生増加は認められなかった。一方、雌では、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生が Peto 検定（有病率法）で有意な増加が示された。しかし、対照群と 2 mg/m³ 群の各 1 匹（4%）に細気管支-肺胞上皮癌の発生が認められたことから、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に有意差は示されなかった。

32 mg/m³ 群での細気管支-肺胞上皮腺腫の発生（2 匹/25 匹）は、今年度、本結果と同時に報告する 2-ブロモプロパン及び 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの *rasH2* マウスを用いた中期がん原性試験（文献 9、10）の雌の対照群と同程度かそれ以下（それぞれ 3 匹/25 匹、2 匹/25 匹）であった。したがって、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫の 2 匹の発生に関しても、酸化チタンの暴露の影響ではないと判断した。

以上のことから、雌雄とも酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）暴露によるがん原性を

示す証拠は得られなかった。

IV-3 その他の影響

32 mg/m³ 群の雄で軽度な貧血が認められ、また、同群の雌雄で肺重量の増加が認められた。肉眼的観察では、32 mg/m³ 群の雌雄で肺の白色斑が観察された。病理組織学的検査では、32 mg/m³ 群の雌雄で、酸化チタンを大量に貪食したマクロファージを主体としたリンパ球等の炎症性細胞の集簇巣が認められ、酸化チタン暴露による肺の炎症が示された。

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 32 mg/m³ で肺毒性は観察されたが、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 結論

遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) を用いて、酸化チタン (ナノ粒子、アナターゼ型) の 26 週間にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論された。

VI 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) 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 (2018年度) . 2018. 産衛誌60 : 116-148.
- 5) National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH). 2011. Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Current Intelligence Bulletin 63. Cincinnati. OH. NIOSH.
- 6) 「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」平成28年度第3回発がん性評価グループ資料 (平成29年3月1日)
- 7) OECD. 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 8) 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.
- 9) 日本バイオアッセイ研究センター. 2018. 2-ブロモプロパンの rasH2 マウスを用いた吸入による中期がん原性試験報告書.
- 10) 日本バイオアッセイ研究センター. 2018. 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの rasH2 マウスを用いた強制経口による中期がん原性試験報告書.

Ⅶ 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。