

有害性評価書

物質名：酸化チタン（ナノ粒子）

1. 化学物質の同定情報（ICSC 2002）

名 称：酸化チタン（IV）

別 名：二酸化チタン

化 学 式：TiO₂

分 子 量：79.9

CAS 番号：酸化チタン： 13463-67-7

ルチル型： 1317-80-2

アナターゼ型：1317-70-0

労働安全衛生法施行令別表 9（名称を通知すべき有害物）第 191 号

2. 物理化学情報

(1) 物理的・化学的性状（ICSC 2002）

外 観：無色～白色の結晶性粉末

密度：3.9～4.3 g/cm³

沸 点：2500～3000

融 点：1855

溶解性（水）：溶けない

(2) 物理的・化学的危険性（ICSC 2002）

ア 火災危険性：不燃性

イ 爆発危険性：報告なし

ウ 物理的危険性：報告なし

エ 化学的危険性：報告なし

(3) その他

酸化チタンには、アナターゼ（Anatase；鋭錐石）、ルチル（Rutile；金紅石）、ブルカイト（Brookite；板チタン石）の 3 種の結晶形態がある。このうち、工業的に利用されているのはルチルとアナターゼで、ブルカイトは工業面の利用はない。

3. 生産・輸入量／使用量／用途（酸化チタン工業会）（化工日 2013）

生産量：（ナノ酸化チタン（ルチル型、アナターゼ型合計） 13,490 トン（2010 年）

用 途：（ルチル型）化粧品、塗料、トナー外添剤、ゴム充填剤、反射防止膜

（アナターゼ型）光触媒、工業用触媒担体塗料

製造業者：石原産業、堺化学工業、チタン工業、テイカ、富士チタン工業

4. 健康影響

【体内動態（吸収・分布・代謝・排泄）】

難溶性物質なので、生体内で溶解、代謝はしないと考えられる。肺からの排泄は、肺泡マクロファージに貪食され、リンパ管、または末梢気道に排泄される経路が主であり、これらの経路はミクロンサイズの二酸化チタンと変わらないが、クリアランスが遅延する。脳、心臓、肝臓、脾臓、縦隔リンパ節等の他臓器への移行も認められている。

(1) 実験動物に対する毒性

ア 急性毒性

致死性

・経口試験にて二酸化チタンナノ粒子の LD₅₀ が 5000 mg/kg 体重以上であった 1 報告 (Warheit et al. 2007c)、中災防 2011、蒲生ら 2011)以外は、得られていない。

	マウス	ラット	ウサギ
吸入、LC ₅₀	情報なし	情報なし	情報なし
経口、LD ₅₀	情報なし	5,000 mg/kg 体重以上 Uf-C(P25 と同じ)	情報なし
経皮、LD ₅₀	情報なし	情報なし	情報なし
腹腔内 LD ₅₀	情報なし	情報なし	情報なし

Uf-C : P25 ; 中位径 21nm、表面積 38.5 m²/g、79%アナターゼ/21%ルチル、表面活性 0.9 delta b (ブランクに対する活性比)、蒸留水中の粒径 (動的光散乱 (DLS) 径) 140±44 nm

健康影響

気管内注入試験

・雄性 F344 ラットに、一次粒径 20 nm (Degussa 社製 表面積 50 m²/g)および 250 nm (Fisher 社製 表面積 6.5 m²/g) のアナターゼ型 TiO₂ 粒子を 500 µg/匹で気管内注入し、注入後 24 時間時点において肺の炎症を検討した結果、一次粒径 20 nm の TiO₂ 粒子を注入したラット群は、BALF 中の総細胞数、マクロファージ数、好中球割合のいずれについても対照群と比較して有意に高く、250 nm の TiO₂ 粒子を注入した群と比べてより重度の炎症反応を引き起こした(Oberdörster et al. 1992)。

・Wistar 系雄性ラットに、一次粒径 29 nm の TiO₂ 粒子 (Evonik Degussa 社製) および一次粒径 250 nm の TiO₂ 粒子 (Tioxide Ltd.社製) を、125 と 500 µg/匹の 2 用量で気管内注入し、注入後 24 時間後の炎症反応を調べた結果、BALF 中の好中球比率、γ-glutamyl transpeptidase (γ-GTP) 活性、タンパク濃度、LDH 濃度は、粒径 29 nm の TiO₂ 粒子 500 µg を注入したラット群においてのみ、有意な増加が認められた(Renwick et al. 2004)。

- ・雄性 F344 ラットに、一次粒径 21 nm の P25-TiO₂ ナノ粒子 (Evonik Degussa 社製、P25: 表面積 38.5 m²/g, 79%アナターゼ/21%ルチル) を 0.26、0.52、および 1.04 mg/匹の 3 用量で気管内注入し、最長 42 日間の観察期間において、肺の病理組織および BALF 検査を行った結果、P25-TiO₂ ナノ粒子の注入により BALF 中の好中球数、LDH、アルブミン濃度、およびサイトカイン (TNF- α , MIP-2, IL-28 など) 濃度の有意な増加が持続した。また、粒径 1 μ m の TiO₂ 粒子 (Sigma Aldrich 社製: #224227、ルチル型) を、P25-TiO₂ ナノ粒子と同等の表面積用量を気管内注入し、肺の炎症反応を比較した結果、同様に炎症反応が増加したが、P25-TiO₂ ナノ粒子の方がより低い用量 (粒子重量) で大きな変化が見られた (Sager et al. 2008)。
- ・雄性 SD ラットに、DuPont 社製の一次粒径 300 nm のルチル型 TiO₂ 粒子 (R-100)、幅 20–35 nm、長さ 92–233 nm のロッド形状をしたアナターゼ型 TiO₂ 粒子 (nano rod)、一次粒径 5.8–6.1 nm のアナターゼ型 TiO₂ 粒子 (nano dot) の 3 種類の粒子を 1 および 5 mg/kg で気管内注入し、3 ヶ月間肺の炎症を比較した結果、いずれの TiO₂ 粒子ばく露群でも 1 mg/kg ばく露群ではほとんど影響が認められず、5 mg/kg ばく露群では注入後一過性の炎症がみられたが、投与後 1 週間後には対照群と同程度まで回復した (Warheit et al. 2006)。
- ・雄性 SD ラットに、粒径の異なる 4 種類の TiO₂ 粒子 (Table 1 参照、F-1 は fine 粒子、uf-1, uf-2, uf-3 は ultrafine 粒子である) すなわち、R-100 TiO₂ 粒子、DuPont 社製の粒径約 140 nm のルチル型 TiO₂ 粒子 2 種類 (uf-1 および uf-2)、および uf-3 TiO₂ ナノ粒子 (P25) を 1 および 5 mg/kg で気管内注入し、注入後 3 ヶ月まで、肺の炎症を比較した結果、uf-3 以外の 3 種類の TiO₂ 粒子では、一過性の軽微な炎症が引き起こされた。一方、uf-3 TiO₂ 粒子では、炎症細胞数・炎症バイオマーカーの増加および肺組織の炎症が持続した (Warheit et al. 2007)。

Table 1. Warheit (2007) らが試験に使用した二酸化チタンの物理化学的特性

試料	結晶構造	中位径 (nm)		比表面積 (m ² /g)	pH		表面活性 delta b*
		in water*	in PBS		deionized water	in PBS	
F-1	ルチル	382.0 ± 36%	2667.2 ± 35%	5.8	7.49	6.75	0.4
uf-1	ルチル	136.0 ± 35%	2144.3 ± 45%	18.2	5.64	6.78	10.1
uf-2	ルチル	149.4 ± 50%	2890.7 ± 31%	35.7	7.14	6.78	1.2
P25 (uf-3)	アナターゼ 80% / ルチル 20%	129.4 ± 44%	2691.7 ± 31%	53.0	3.28	6.70	23.8

*: 界面活性剤として 0.1% ピロリン酸四ナトリウムを含む水

delta b: ブランクに対する活性比

・一次粒径の違いが肺に及ぼす影響を検討するために、雄性 SD ラットに、石原産業社製 3 種類のアナターゼ型 TiO_2 粒子 (一次粒径 5、23、および 154 nm) 5 mg/kg を気管内注入し、肺の炎症を検討した結果、いずれの TiO_2 粒子でも、注入後 1 週間あるいは 1 ヶ月時点までに回復する一過性の炎症反応がみられたが、一次粒径の違いによる反応の差異は認められなかった。さらに凝集状態の差異の検討を行うために、一次粒径 5 nm 粒子を用いて、二次粒径 18、65、および 300 nm の粒子を作製、5 mg/kg を気管内注入し、同様に肺の炎症を比較した。いずれの TiO_2 粒子でも、注入後 1 週間あるいは 1 ヶ月までに回復する一過性の炎症反応がみられたが、二次粒径の違いによる反応の差異は認められなかった(Kobayashi et al. 2009)。

経口試験

・雌雄 CD-1 (ICR) マウスに、サイズの異なる 2 種類のナノ TiO_2 (サイズ: 25 nm または 80 nm、純度: > 99%、Hangzhou Dayang Nanotechnology 製) またはファイン TiO_2 (サイズ: 155 nm、純度: > 99%、Zhonglian Chemical Medicine 製) を、5 g/kg で単回経口投与した。投与 2 週後の雌マウスにおいて、Ti は主に、肝臓、腎臓、脾臓および肺に蓄積し、3 群の比較では、80 nm TiO_2 投与群では肝臓で最も高く、25 nm TiO_2 および 155 nm TiO_2 投与群では脾臓で最も高かった。雄マウスでは、25 nm および 80 nm TiO_2 において、腎毒性の指標である血清中の尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン (CR) 濃度の上昇が認められた。雌マウスでは、25 nm TiO_2 投与群の血清 BUN レベル、ALT および ALT/AST 比が、25 nm および 80 nm TiO_2 投与群で血管系損傷の指標である血清 LDH および α -hydroxybutyrate dehydrogenase (α -HBDH) レベルが高値であった。病理組織学的所見は雌雄とも同様であり、80 nm および 155 nm TiO_2 投与群において、海馬領域の細胞減少、肝臓に中心静脈周囲の水腫性変性および肝細胞の散在性壊死が観察された。また、80 nm TiO_2 投与群で、腎尿細管、155 nm TiO_2 投与群では腎系球体の重度な腫脹がみられた。心臓、肺、精巣、卵巣および脾臓には TiO_2 投与の影響はみられなかった。25 nm TiO_2 投与群ではいずれの組織にも病理組織学的変化は認められなかった (Wang JX et al. 2007)。

イ 刺激性及び腐食性

・NZW ウサギの皮膚に、ultrafine TiO_2 -C (uf-C: P25: 表面積 38.5 m^2/g , 79%ルチル、21%アナターゼ、表面活性 0.9 delta b (ブランクに対する活性比)、蒸留水中の粒径 (動的光散乱 (DLS) 径) 140 ± 44 nm、液中の pH 4.8) 0.5g を 4 時間塗布し、その後 72 時間まで、Draize スコアを評価した結果、皮膚の刺激性は認められなかった (Warheit et al. 2007c)。

・8 週齢の雄のヘアレスラットの皮膚に TiO_2 ナノ粒子 (ST-01、アナターゼ型、1 次粒子径 26.7 nm、2 次粒子径 391.6 nm 表面無修飾、Ishihara Sangyo Ltd.) を単回塗布した結果、 TiO_2 は毛包間表皮の剥離層および毛漏斗角質化層に局在していたが、表皮の生細胞領域には認められず、細胞の変化も観察されなかった (Adachi et al. 2010)。

・NZW ウサギに Ultrafine-C (uf-C; TiO₂)約 57mg を片目に点眼し、その後 72 時間まで、結膜、虹彩、角膜を評価した結果、急性期に結膜の発赤（スコア 1，2）が認められたが、可逆的であり、24 時間及び 48 時間後には正常に戻った。有意な所見は認められなかった(Warheit et al. 2007c)。

ウ 感作性

・Ultrafine-C (uf-C:P25:表面積 38.5 m²/g、79%アナターゼ、21%ルチル、表面活性 0.9 delta b (ブランクに対する活性比)、蒸留水中の粒径 (動的光散乱 (DLS) 径) 140±44 nm 液中の pH 4.8)について、局所リンパ節試験法 (local lymph Node Assay (LLNA)) を行った。雌性 CBA/JHsd マウスの両耳に二酸化チタンナノ粒子を 3 日間連続で塗布し、耳介リンパ節における ³H-Thymidine の取り込みを測定した結果、Ultrafine TiO₂-C に皮膚感作性は認められなかった(Warheit et al. 2007c)。

エ 反復投与毒性 (生殖毒性、遺伝毒性、発がん性、神経毒性評価は別に記載)

吸入ばく露

・Wistar 系雄性ラットに、二酸化チタン(TiO₂ 表面コートなし、純度 95.1%、アナターゼ 86%/ルチル 14%、一次粒子径 25.1±8.2 nm (粒径の範囲 13-71 nm)、表面積 51.1±0.2 m²/g、Zeta 電位 16.1±2.2 mV in 1 mM KCl)を 0、2、10 及び 50 mg/m³ で、6 時間/日、5 日間吸入ばく露し、ばく露終了後 16 日まで観察した。ばく露濃度に依存して、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数、好中球数、clusterin, haptoglobin, monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)、macrophage colony stimulating factor (M-CSF)、macrophage-derived chemoattractant (MDC)、macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)、myeloperoxidase、osteopontin 濃度が増加した。これらの変化は、ばく露直後とばく露終了後 3 日後で顕著であったが、総細胞数と haptoglobin 以外のマーカーは、ばく露終了後 16 日後も増加した。気管支・細気管支および肺胞における上皮細胞の細胞増殖能の亢進が、ばく露終了直後に全ての用量で観察されたが、一過性であった (Ma-Hock et al. 2009)。

・ラット (Wistar、雌、一群 24 匹) に 8.6 mg/m³ の二酸化チタンナノ粒子 (アナターゼ型、空気力学的直径 4.8 μm、1 次粒子径 15-40nm) を 7 時間/日、5 日/週、1 年間吸入ばく露したところ、肺間質へ細胞浸潤を認め、そのマクロファージは二酸化チタン粒子を貪食していたこと、およびリンパ組織にもチタン粒子を貪食したマクロファージを認めた(Takenaka et al. 1986)。

・雄性 C57BL/6 マウスに、米国の Nanostructured & Amorphous Materials Inc (NanoAmor) 社製の一次粒径 3-5 nm のアナターゼ型 TiO₂ 粒子 (平均一次粒径 3.5 ± 1.0 nm, BET 表面積 219 ± 3 m²/g、チャンバー内の SMPS のモビリティ径 120-128 nm)を、0.77 および 7.22 mg/m³ で、4 時間/日、1 日または 10 日間吸入ばく露した。1 日のばく露においては、高濃度では、BALF 中マクロファージ数の一過性の増加を認めたが、低濃度では有意な変化は認められなかった。一方、10 日間のばく露では、ばく露

終了後 2 週間まで、BALF 中のマクロファージ数の有意な増加が認められたが、一過性であった。また、BALF 中の好中球およびリンパ球数、LDH、タンパク、サイトカイン (INF- γ 、IL-6、IL-18) 濃度については、有意な変化は認められなかった(Grassian et al. 2007)。

- Fisher 344 ラットに、平均 1 次粒径が 21nm (Degussa 社製、表面積 50 m²/g、密度 3.8、空気力学的直径 1.7 μ m、アナターゼ)と 250nm (Fisher Scientific 社製、表面積 6.5 m²/g、密度 3.8、空気力学的直径 1.9 μ m、アナターゼ)の二酸化チタンを各々 23.5 $\pm$ 3.2 mg/m³、23.0 $\pm$ 4.1 mg/m³ で、6 時間/日、5 日/週、12 週間にわたり全身ばく露した。リンパ節内の沈着量は、21nm の粒子が 250nm のそれと比較して多かった。また、BAL で洗浄されずに肺に残存した粒子とリンパ節の粒子の割合も、21nm の粒子の方が 250nm の粒子と比べて多かった。21nm の粒子の肺内の半減期は 501 日で、250nm の粒子の半減期の 174 日に比べ、ほぼ 3 倍に遅延した。以上より、粒径の小さな粒子は、間質へ移行しやすく、肺内滞留性が高かった(Ferin et al. 1992)。

- ラットに二酸化チタンナノ粒子(石原産業製、一次粒子 35nm、ルチル型)を 4 週間 (6 時間/日、5 日/週、18 日間)、吸入ばく露し、肺内沈着量や肺病理学的所見の検討を行った。ばく露チャンバー内の空気中幾何平均径及び平均粒子個数濃度は、51 $\pm$ 9 nm、2.8 $\times$ 10⁵ 個/cm³ であった。二酸化チタンの初期沈着量 (吸入終了 4 日後)は 12.3 $\pm$ 1.1 μ g であり、半減期は 2.5 ヶ月であった。二酸化チタンによる肺組織の炎症反応及び BALF 中の総細胞数や好中球の増加は認められなかった。なお、matrix metalloproteinases (MMPs)、Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)、コラーゲンの遺伝子発現の亢進も認められなかった(Morimoto et al. 2011)。

- 雄性 Wistar ラットに、ナノ TiO₂ (アナターゼ型 70%/ルチル型 30%、表面無修飾、サイズ：20–33 nm、BET 表面積：48.6 m²/g) または顔料グレード TiO₂ (ルチル型、純度：99.4%、粒子サイズ中央値：200 nm、BET 表面積：6 m²/g、KRONOS International) を各々 88 mg/m³、274 mg/m³ の重量濃度で 6 時間/日、5 日間鼻部吸入ばく露を行った。ばく露終了の直後および 14 日後に組織内の Ti を測定したところ、両 TiO₂ とも、肝臓、腎臓、脾臓および嗅球を含む脳において Ti は検出されなかった。一方、肺および縦隔リンパ節では、Ti が検出され、顔料グレード TiO₂ がナノ TiO₂ より両組織における沈着量が多かった。ナノおよび顔料グレード TiO₂ ともに最終投与直後に BALF 中の多形核白血球の増加および肺に病理組織学的中等度の好中球性炎症がみられたが、一過性であった。ナノ TiO₂ ばく露後の回復傾向は、顔料グレード TiO₂ に比べて速かった(van Ravenzwaay et al. 2009)。

- 雌性 F344 ラット、雌性 B3C3F1 マウス、および雌性 SYR ハムスターに、TiO₂ ナノ粒子 (Evonik Degussa 社製; P25; 平均一次粒径 21 nm、アナターゼ 80%/ルチル 20%) を 0.5、2、および 10 mg/m³ の重量濃度で、13 週間 (6 時間/日、5 日/週) の吸入ばく露を行い、ばく露終了後 4、13、26、および 52 週間 (ハムスターでは 49 週) 後に肺の反応を測定した。TiO₂ ナノ粒子のチャンバー内の空気力学的直径は、1.29–1.44 μ m であった。ラットやマウスにおいては、10 mg/m³ ばく露群では、BALF 中の総細胞数、そ

の分画である好中球数、マクロファージ数、リンパ球数、LDH やタンパク濃度の有意な増加が認められたが、2 mg/m³ 以下のばく露群ではほとんど影響が認められなかった。なお、10 mg/m³ ばく露群のラットおよびマウスでは、肺内のクリアランスが遅延し、肺の過負荷が起きていることが示された。一方、ハムスターにおいては、10 mg/m³ ばく露群においても、上記の炎症反応の有意な増加は見られなかった。なお、2 mg/m³ 群ラットの 13 週ばく露終了直後に、BrdU 陽性肺胞細胞の有意な増加がみられたが、4 週間後には認められず、一過性であった(Bermudez et al. 2004)。

- ・ 6 種類の二酸化チタン粒子の吸入ばく露による炎症反応を検討した。使用した二酸化チタン粒子は、nanoTiO₂ + SiO₂ rutile (Sigma-Aldrich 製、粒径 10 nm×40 nm、ルチル型、比表面積 132 m²/g、組成 TiO₂、SiO₂ にてコート)、 nanoTiO₂ アナターゼ (Sigma-Aldrich 製、粒径 < 25 nm、アナターゼ型、比表面積 222 m²/g、組成 Ti、O)、 coarse TiO₂ ルチル (Sigma-Aldrich 製、粒径 < 5 μm、ルチル型、比表面積 2 m²/g、組成 Ti、O)、 nanoSiO₂ (NanoAmor 製、粒径 10 nm、非晶質、比表面積 515 m²/g、組成 Si、O)、 nanoTiO₂ ルチル/アナターゼ(NanoAmor 製、粒径 30 nm×40 nm、ルチル型 90%/アナターゼ型 10 %、比表面積 23 m²/g、組成 Ti、O) 、 nanoTiO₂ アナターゼ/ブルカイト (Reactor-generated/FIOH、粒径 21 nm、アナターゼ型 + brookite [3 : 1]、比表面積 61 m²/g、組成 Ti、O)であった。雌マウスに 32 mg/m³ で、2 時間/日、4 日間あるいは、2 時間/日、4 日/週、4 週間、1 吸入ばく露した。その結果、nanoTiO₂ + SiO₂ rutile のみが、肺の好中球増多を認めた。その他の粒子では肺の炎症反応を引き起こさなかった。肺の好中球増多には、肺組織中の tumor necrosis factor-α (TNF-α) と neutrophil-attracting chemokine CXCL1 の発現亢進を伴っていた(Rossi et al. 2010)。

鼻腔内注入

- ・ 雌 CD-1(ICR)マウスに、ナノ TiO₂ (ルチル型、表面無修飾、平均サイズ : 71 nm、比表面積 : 23 m²/g、純度 : > 99%、Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.) または ファイン TiO₂(アナターゼ型、純度 : > 99% ,平均サイズ : 155 nm、比表面積 : 10 m²/g , Zhonglian Chemical Medicine Co.) を 500 μg /匹で、隔日、15 回鼻腔内注入し、脳組織における ICP-MS により Ti レベルを測定した。Ti レベルは海馬で最も高く、次いで嗅球で高く、小脳および大脳皮質で検出された。病理学的検討では、両 TiO₂ とも海馬において肥大した細長い錐体細胞、不規則錐体層が観察され、全脳で脂質過酸化反応、タンパク質酸化、カタラーゼ活性上昇、グルタミン酸/一酸化窒素の過剰放出などの酸化ストレスが亢進した反応が認められた。ファイン TiO₂ 注入後の血清 IL-1β および脳 TNF-α 濃度の有意の上昇がみられたが、ナノ TiO₂ 投与マウスでは IL-1β および TNF-α 濃度は軽度の上昇のみであった(Wang J et al. 2008b)。

経口投与

- ・ 雌 SD ラットに、蒸留水に懸濁した TiO₂ (Polysciences 製、ルチル型、粒子サイズ : 475

nm) を 12.5 mg/kg/日 で 10 日間経口投与し、組織中の Ti 濃度を測定した。検出された TiO₂ は投与量に対して、結腸で 1.13%、パイエル板及び腸間膜リンパ節で 2.18% であり、また小腸、肝臓、肺、腹膜組織、脾臓でも Ti が検出されたが、心臓及び腎臓では検出されなかった。これらの所見は、TiO₂ 粒子は小腸のパイエル板を介して取り込まれ、腸間膜網に移行し、その後腸間膜リンパ節に蓄積され、また、一部の粒子は全身循環に移行し、肝臓および脾臓に取り込まれることを示唆した(Jani et al. 1994)。

- ・雌 CD-1(ICR)マウスに、ナノ TiO₂(アナターゼ型 ,平均粒子サイズ:5 nm)を 62.5、125、250 mg/kg/日 で隔日 30 日間強制経口投与し、最終投与の 1 日後全身的影響を検討した。62.5 mg/kg 以上の投与で、白血球数および網状赤血球比率の上昇、B 細胞及びナチュラルキラー細胞の比率の低下、血清 IL-2 レベルの低下、血清 NO レベルの上昇がみられた。125 mg/kg 以上の投与で、体重低下、肝臓、腎臓、脾臓および胸腺の比重量の増加、ALT、AST、alkaline phosphatase、cholinesterase、total cholesterol および triglyceride の血清レベルの上昇、A/G 比および総ビリルビンレベル、赤血球数、ヘモグロビン、平均赤血球色素濃度などの低下が観察された。250 mg/kg の投与で、CD3、CD4 および CD8 細胞の比率の低下、肝臓に広範囲の肝細胞の構造不鮮明および間質血管の充血が認められた(Duan et al. 2010)。

経皮投与

- ・ヘアレスラットに、10%ナノ TiO₂ (石原産業製、アナターゼ型、表面積：236 m²/g、一次粒子径：26.4 ± 9.5 nm) を含むエマルジョン (凝集径：391.6 ± 222 nm) を 0.4 mg/cm² (TiO₂)の用量で 4 時間塗布し、24、72、168 時間後に Ti 粒子と形態的观察を行った。Ti 粒子は、角質層上層や毛包漏斗部角質層に認められたが、生細胞領域には観察されなかった。皮膚の病理学的所見において形態的变化は認められず、さらに免疫染色によるアポトーシス細胞の増加も認められなかった(Adachi et al. 2010)。
- ・4 週齢の雄ブタの耳介背側に、ナノ TiO₂ (アナターゼ型、粒子サイズ：5 nm、表面積：200 m²/g、純度：99.5%、疎水性、Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) およびナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ：60 nm、表面積：40 m²/g、純度：99.5%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology 社製) を 1.2 mg/pig で、連続 30 日間塗布し、最終塗布の 24 時間後に Ti 粒子と組織学的検討を行った。TiO₂ は角質層、顆粒層および有棘細胞層から検出され、より深部の基底細胞層からは 5 nm TiO₂ 塗布後のみに検出されたが、真皮からは検出されなかった。TiO₂ 塗布による細胞間隙拡大、デスモソーム損傷及び基底細胞核周囲の空胞増大などの病理学的変化がみられたが、皮膚刺激性は認められなかった。さらに、7-8 週齢の BALB/c ヘアレスマウス (6 匹/群) の背部皮膚に、粒子サイズが 10nm から 90nm までの 5 種類 TiO₂ を 1.2 mg /匹/日で連続 60 日間塗布して Ti 粒子と組織学的検討を行った。使用した粒子は、ナノ TiO₂(アナターゼ型 , 粒子サイズ:10 nm ,表面積:160 m²/g、純度:99.5%、疎水性、Zhejiang Wanjin Material Technology Co., Ltd.) ナノ TiO₂ (ルチル型、粒子サイズ:25 nm , 表面積:80 m²/g、純度:99.5%、親水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd.) P25 (ア

ナターゼ型 75%+ルチル型 25%、粒子サイズ：約 21 nm、表面積：50 m²/g、純度：99.5%、親水性、Degussa） ナノ TiO₂（ルチル型、粒子サイズ：60 nm、表面積：40 m²/g、純度：99.6%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology 社製）またはナノ TiO₂（ルチル型、粒子サイズ：90 nm、表面積：40 m²/g、純度：99.5%、疎水性、Zhejiang Hongsheng Material Technology 製）であった。Ti の蓄積は、10 nm TiO₂、25 nm TiO₂、P25、60 nm で、心臓、肝臓、脾臓等で認められたが、90 nm TiO₂ ではこれらの組織への Ti の蓄積はみられなかった。皮膚では、10 nm TiO₂、25 nm TiO₂ および 60 nm TiO₂、P25 塗布により過剰な角質化、真皮薄化およびしわ表皮がみられた。肝臓では、25 nm TiO₂ および P25 塗布により限局性壊死、心臓では 10 nm TiO₂ 塗布後だけに微量の白血球浸潤がみられた。60 nm と 90 nm の TiO₂ 塗布後には異常は観察されなかった。これらの実験結果から、90 nm よりも小さな TiO₂ はマウスの皮膚を通過して、全身に移行すること示している(Wu et al. 2009)。

・雌ミニブタに T-Lite SF（ルチル型、直径：20-30 nm、長さ：50-150 nm、水酸化アルミニウム/ジメチコーン共重合体により表面修飾、ドイツ BASF 製） P25（アナターゼ型/ルチル型、粒子サイズ：30-50 nm、表面無修飾、Degussa 社製） CR-50（ルチル型、粒子サイズ：300-500 nm、表面無修飾、石原産業製）を 1 日 4 回、週 5 日、22 日間塗布し Ti 粒子と組織学的検討を行った。いずれの TiO₂ 塗布後にもリンパ節および肝臓における Ti レベルの上昇は認められず、Ti は表皮で多く、角質層および上部毛包腔に観察され、T-Lite SF で顕著であった。いずれの TiO₂ 処置でも刺激性や皮膚細胞の構造異常所見は認められなかった。これらのことから、ナノサイズおよび顔料グレードの TiO₂ とも健常なミニブタの表皮を通過しないことが示された(Sadrieh et al. 2010)。

オ 生殖毒性

吸入ばく露

・妊娠 8-18 日の C57BL/6BomTac マウスに 42 mg/m³ (1.7×10⁶n/cm³; peak-size: 97 nm) の UV-titan L181（ルチル型：Zr, Si, Al により修飾、ポリアルコール表面修飾、TiO₂: 70.8%、Zr: 8.7%、Si: 5.6%、Al: 2.4% , Na: 0.5%、揮発物質：5.2%、X 線解析平均サイズ：20.6 nm、比表面積：107.7 m²/g、Kemira 製）を吸入ばく露（1 時間/日 計 11 日間）した。母動物の肺で Ti が検出され、炎症（BALF の好中球数増加）を認めたが、母および児動物の肝臓、児動物胃内の母乳中には Ti は検出されなかった。児動物の行動に関しては、14 週齢に実施したオープンフィールド試験において TiO₂ ばく露群の F1 児のフィールド中央部への侵入頻度および雌の中央部での滞在時間の減少がみられ、4 ヶ月齢に実施した聴覚性驚愕反応試験では雌に強いプレパルス抑制の増強効果がみられた。しかし、11-16 週齢に実施したモリス水迷路試験による記憶学習に関しては、F1 児に TiO₂ ばく露の影響は認められなかった。生殖能に関しては、生後 19 週に TiO₂ ばく露群の雄 F1 児を無処置の雌 CBA/J マウスと交配したところ、初回交配開始から F2 児出産までの期間が、有意ではないが、延長する傾向がみられた(Hougaard et al. 2010)。

320 鼻腔内注入

- 321 ・妊娠 14 日および非妊娠マウスに、TiO₂ 50 µg/マウスを単回鼻腔内注入し、投与後 48 時
322 間に肺の炎症反応を観察した。TiO₂ 投与により、非妊娠マウスに比べて妊娠マウスで肺
323 胞洗浄液 (BALF) 中の好中球が著しく増加し、血清中の炎症性サイトカインの上昇が
324 みられた。妊娠マウスから得られた児の生後 4 日に卵白アルブミン (OVA) とミョウバ
325 ンを腹腔内投与し、生後 4-14 日に OVA を噴霧し、気道過敏性を検討した。TiO₂ 投与
326 の児では気道の過敏反応性の上昇および BALF 中の好酸球増加および肺に炎症細胞浸潤
327 がみられた(Fedulov et al. 2008)。

328 経口投与/経皮投与/その他の経路等

- 329 ・Slc:ICR マウスの妊娠 6、9、12 および 15 日に、TiO₂ ナノパウダー (アナターゼ型、粒
330 子サイズ：25–70 nm、表面積：20–25 m²/g、Sigma-Aldrich Japan) を 100 µg/匹 皮
331 下投与し、妊娠 16 日の雄胎児および生後 2、7、14、21 日の雄児の脳を採取し、網羅的
332 遺伝子の解析を行った。TiO₂ 投与群で、発現が変化した遺伝子は成長に従って増加し、
333 生後 21 日で最も多くなった。また、脳の発生、細胞死、酸化的ストレス反応に関連する
334 遺伝子等の発現に変化が認められた(Shimizu et al. 2009)。
- 335 ・ICR マウスの妊娠 3、7、10、14 日に、TiO₂ (Sigma-Aldrich 製 アナターゼ型、粒子サ
336 イズ：25–70 nm、表面積：20–25 m²/g、純度：99.9%) を 100 µg/匹の用量で皮下投与
337 し、生後 4 日及び 6 週の雄児における TiO₂ の蓄積や精巣の病理学的及び機能的解析を行
338 った。雄児の脳および精巣中に TiO₂ 粒子が観察された。また、6 週齢の雄児の精巣の形
339 態学的異常 (精細管の構造異常など) 1 日精子産生能、精巣上体精子運動能およびセル
340 トリ細胞数の減少などの機能的異常が観察された(Takeda et al. 2009)。
- 341 ・ICR マウスに妊娠 6、9、12、15、18 日に、TiO₂ (Sigma-Aldrich 製、アナターゼ型、
342 粒子サイズ：25–70 nm、表面積：20–25 m²/g) を 100 µg/匹で皮下投与し、6 週齢の児動
343 物の脳内の影響を検討した。脳内のドパミンやその代謝産物(3,4-dihydroxyphenylacetic
344 acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA)、3-methoxytyramine (3-MT)) の濃度が、前
345 頭前皮質や新線条体で上昇していることが認められた(Takahashi et al. 2010)。
- 346 ・TiO₂ (Tayca 製 ルチル型、粒子サイズ：35 nm) 0.8mg を BALB/c マウスの妊娠 16 日、
347 17 日に 2 日続けて静脈注入し、妊娠 18 日に母及び児動物への影響を検討した。母体重、
348 子宮重量が低下した。胎盤重量の低下はなかったが、血管構築に係わる抗血管新生因子
349 である fms-like tyrosine kinase-1(Flt-1)の胎盤での濃度が低下した。胎児に関しては、
350 胎児死亡率の増加、体重減少がみられ、さらに胎盤、肝臓、脳組織において TiO₂ が検出
351 された(Yamashita et al. 2011)。

352 力 遺伝毒性

- 353 ・細菌を用いた復帰突然変異試験に関しては、ネズミチフス菌 (TA97 株、TA98 株、TA100
354 株、TA102 株、TA1535 株、TA1537 株) 大腸菌 (WP2uvrA 株) を用いて、UV/vis 照
355 射または S9 の有無にかかわらず陰性であった。3 報告のうち 2 報告は、二酸化チタン
356
357

の中で炎症誘発能が強い P25 を用いた試験であった。ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験では、チャニーズ・ハムスター肺線維芽細胞とチャニーズ・ハムスター卵巣細胞を用いた 3 報告のうち、2 報告では陰性であったが、1 報告では、UV/vis 照射により陽性（照射なしでは陰性）となった。*gpt delta* 遺伝子や *hprt* 遺伝子の遺伝子突然変異試験では、陽性および陰性の結果が認められた。これらの染色体異常試験と同等と考えられるマウスリンフォーマ TK 試験では、陰性であった。ヒトのリンパ球を用いた試験も含む *in vitro* の小核試験や姉妹染色分体交換試験では陽性の結果が多く認められた(中災防 2011、蒲生ら 2011、森本ら 2008)。

- ・ *In vivo* の遺伝毒性試験において小核試験は、1 報告のみで、P-遺伝子を組み込んだ成熟雄 C57Bl/6Jp^{un}/p^{un} マウスに、二酸化チタンナノ粒子 P25 (アナターゼ型 75% + ルチル型 25%、一次粒子サイズ：21 nm、比表面積：50 m²/g, Evonik 製) を、60、120、300 及び 600 µg/mL (総投与量 50、100、250、500 mg/kg) を 5 日間飲水投与し、末梢血中の小核を有する赤血球を計測した結果、500 mg/kg にて有意に小核を有する赤血球が増加した(中災防 2011、蒲生ら 2011)。

- ・ P-遺伝子を組み込んだ C57Bl/6Jp^{un}/p^{un} マウスに、二酸化チタンナノ粒子 P25 (アナターゼ型 75% + ルチル型 25%、一次粒子サイズ：21 nm、比表面積：50 m²/g, Evonik 製) を含む飲水 (600 µg/mL (総投与量：500 mg/kg)) を、妊娠 8.5-18.5 日に投与し、遺伝毒性を DNA deletion assay (遺伝子欠失が認められると、色素を持たない網膜色素細胞が色素をもつ) にて検討した。生後 20 日の児の眼の網膜色素細胞の色素陽性率が増加したことから、二酸化チタンナノ粒子が、児動物の DNA 欠失頻度を上昇させたことを示している(Trouiller et al. 2009)。

試験方法		使用細胞種・動物種	結果
<i>In vitro</i>	復帰突然変異試験	P25ネズミチフス菌 TA98株, TA100株、 TA102 株(中災防 2011、蒲生ら 2011) UV/vis照射の有無にかかわらず	-
		ultrafine TiO ₂ (uf-C) = P25 ネズミチフス菌TA98株、 TA100株、 TA1535株およびTA1537株、 大腸菌 WP2urvA株 (- S9、 + S9) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	-
		二酸化チタン(直径 < 40 nm、 Sigma-Aldrich 社製) ネズミチフス菌 TA97株 (中災防 2011、蒲生ら 2011)	-

	染色体異常試験	P25 チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞 (CHL/IU) (中災防 2011、蒲生ら 2011) 非UV/vis 照射 (-) UV/vis照射 (+)	
		ultrafine TiO ₂ (uf-C) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO)(- S9、 + S9) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	-
		8種のナノサイズTiO ₂ チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-WBL) (中災防 2011、蒲生ら 2011) UV照射の有無にかかわらず	-
	姉妹染色分体交換試験	TiO ₂ (Standard solution, Merck) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
		TiO ₂ (アルドリッチ社製 20nm) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
	マウスリンフォーマTK試験	P25 マウス・リンパ腫細胞 (L5178Y) (中災防 2011、蒲生ら 2011) UV/vis照射の有無にかかわらず	-

	遺伝子突然変異試験 <i>gpt</i> 遺伝子座位 (欠失を含む)	1) TiO ₂ 5 nm (アナターゼ型, 平均一次粒子直径: 5 nm, 比表面積: 114 m ² /g, Sigma-Aldrich) 2) TiO ₂ 40 nm (アナターゼ型, 平均一次粒子直径: 40 nm, 比表面積: 38.2 m ² /g, Inframat Advanced Materials LLC) 3) TiO ₂ -320 mesh (直径: -325 mesh, 比表面積: 8.9 m ² /g, Sigma-Aldrich) <i>gpt delta</i> トランスジェニック・マウス由来の初代培養胚線維芽細胞 (MEF) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	- +
	遺伝子突然変異試験 <i>hprt</i> 遺伝子座位	TiO ₂ (純度99%, アナターゼ型, サイズ中央値: 6.57 nm, 比表面積: 148 m ² /g, Sigma-Aldrich) ヒトB細胞リンパ芽球様株化細胞 (WIL2-NS) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
	小核試験	P25, UV-TITAN M160 (ルチル型, 水酸化アルミニウムおよびステリン酸による表面修飾, 結晶サイズ: 20 nm, Kemira) および顔料TiO ₂ (アナターゼ型, 結晶サイズ: 170 nm, Kemira) ラット肝上皮細胞 (中災防 2011、蒲生ら 2011)	-
		TiO ₂ (Standard solution, Merk) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
		TiO ₂ (アルドリッチ社製 20nm) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) (中災防 2011、蒲生ら 2011) ¹	+

		二酸化チタン (アナターゼ : 10nm(Hombikat UV100), 20 nm(Millennium PC500)) ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B) photoactivation (-) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
		3種類の二酸化チタン(ナノサイズルチル 型、ナノサイズアナターゼ型、微小粒子 ルチル型): ヒト気管支上皮細胞 (BEAS 2B) (中災防 2011、蒲生ら 2011) ナノサイズアナターゼ型のみ 他の2つの試験 (ナノサイズルチ ル型、微小粒子ルチル型)	+ -
		P25 50, 100 µg/ml 成人健康女性から採取した末梢血リンパ 球 (森本ら 2008)	いずれも +
	酸化了的DNA損傷試験	Ultrafine TiO ₂ (Sigma-Aldrich 社製、 99%、結晶型未記載) ヒトlymphblastoid 細胞(WIL2-NS) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
		TiO ₂ (ルチルとアナターゼの混合, 不明) ヒト肺上皮細胞(A549) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
		二酸化チタン(TiO ₂)ナノ粒子(アナタ ーゼ、slashed circle < 100 nm) ヒトlung diploid fibroblast cell [IMR-90]、ヒトbronchial epithelial cell [BEAS-2B] (中災防 2011、蒲生ら 2011)	いずれも -
	酸化了的DNA損傷試験 (コメットアッセイ)	二酸化チタン (アナターゼ : 10nm (Hombikat UV100), 20 nm(Millennium PC500)) ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B) photoactivation (-) (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+

<i>In vivo</i>	酸化 DNA 損傷試験	P25 0.15-1.2 mg 気管内投与 90 日のラット肺 (中災防 2011、蒲生ら 2011)	-
	小核試験	P25 総量500 mg/kgを5日間飲水投与した成 熟雄マウス末梢赤血球 UV照射にかかわらず (中災防 2011、蒲生ら 2011)	+
	遺伝子欠失試験	P25 (アナターゼ型75% + ルチル25%) 胎児期 8.5-18.5日) Pun マウス (Trouiller et al. 2009)	+

- : 陰性 + : 陽性 ? : どちらとも言えない。

二酸化チタンによるフリーラジカル産生に関する論文は以下の通りである。

- ・マウス脳ミクログリア(BV2)の活性酸素産生に対するナノサイズの二酸化チタンばく露の影響について *in vitro* で検討した。使用した二酸化チタンは、P25 (Degussa 社製、アナターゼ型 70%・ルチル型 30%、粒径 30 nm、表面積 $52.7 \pm 3.6 \text{ m}^2/\text{g}$) で、2 種類の溶媒 (細胞培養液 DMEM、生理的緩衝液 HBSS) に懸濁した。両溶媒において、5 から 120 ppm までの濃度増加に伴い、凝集サイズ (幾何平均流体力学的半径 : particle geometric mean hydrodynamic diameter) は 826 から 2368 nm まで変動した。また、ゼータ電位は、細胞培養液 DMEM 中で $-11.6 \pm 1.2 \text{ mV}$ 、生理的緩衝液 HBSS 中で $-9.25 \pm 0.73 \text{ mV}$ であった。脳ミクログリア細胞に対して細胞障害性を示さない 2.5 から 120 ppm の濃度の P25 ばく露により、早期 (5 分以内) かつ持続的 (120 分まで) に活性酸素種 (過酸化水素 H_2O_2 、酸素ラジカル O_2^-) の産生がみられた (Long et al. 2006)。
- ・二酸化チタン (TiO_2 、Tioxide Europe 社製)、ナノサイズ粒子の二酸化チタン ($\text{TiO}_2\text{-np}$ 、Degussa 社製) を用いて、ヒト肺胞上皮由来細胞 (A549) における酸化ストレスの早期の指標である glutathione (GSH) 枯渇を検討した結果、いずれの粒子の場合も glutathione (GSH) の低下がみられた (Monteiller et al. 2007)。
- ・培養線維芽細胞 (NIH3T3 細胞、ヒト fibroblast HFW 細胞) に、二酸化チタンナノ粒子 ($10\text{-}100 \text{ }\mu\text{g/mL}$) を 24 から 72 時間加えた結果、活性酸素種の産生がみられた (Huang et al. 2009)。
- ・二酸化チタンナノ粒子 (粒径 15 nm、透過型電子顕微鏡による粒径 $12 \pm 2 \text{ nm}$ 、表面積 $210 \text{ m}^2/\text{g}$ 、ゼータ電位 -24 mV) を気管支上皮細胞 (16HBE14o-細胞、正常ヒト気管支上皮細胞) に加え、活性酸素種の産生能を検討した結果、活性酸素種の産生は認められたが、過酸化水素の上昇は認められなかった (Hussain et al. 2010)。
- ・二酸化チタンとして P25 粒子を用いて、phagocytic cell line (RAW 264.7) の活性酸素種産生に対する影響を検討し、P25 粒子 (0.5 mg/L) は、非生物学的 (無細胞下) 条件下 (abiotic conditions) では自然に活性酸素種を産生するのに対し、RAW 264.7 細胞存在下

では活性酸素種を産生しなかった(Xia et al.2006)。

- ・ヒト肺胞上皮細胞に、各種の吸入性金属系ナノ粒子(Ag 150 nm, Al 100 nm, Zn 100 nm、Ni 100nm、 TiO₂ 30 nm)及びミクロンサイズ粒子(TiO₂ 1 μm、Silica 1-5 μm)を 1 時間ばく露し ROS 産生(2'7'-dichlorodihydrofluorescein dacetate [DCFDA] 法)を測定した。細胞内の ROS 産生上昇は、n-Zn のみ有意となった(Park et al. 2007)。

キ 発がん性

吸入ばく露

- ・雌 Wistar ラットに、二酸化チタンナノ粒子 (Evonik Degussa 社製; P25; 平均一次粒径 21 nm、一次粒子サイズ: 15 ~ 40 nm、アナターゼ 80% / ルチル 20%) を乾式分散により、18 時間/日、5 日/週、24 ヶ月間、全身吸入ばく露し、さらにラットを 6 ヶ月間清浄な空気下で飼育した後、肺腫瘍発生を検討した。ばく露濃度は、最初の 4 ヶ月間: 7.2 mg/m³、続く 4 ヶ月間: 14.8 mg/m³、9 ヶ月から実験終了まで: 9.4 mg/m³ (平均: 10.4 mg/m³) であり、累積ばく露量は 88.1 g / m³ x 時間 (24 ヶ月)であった。18 ヶ月で肺に最初の腫瘍発生がみられ、二酸化チタンナノ粒子ばく露による肺腫瘍発生数は、良性扁平上皮腫瘍 (benign squamous-cell tumor)20/100 (対照群 0/217)、扁平上皮癌 (squamous-cell carcinoma)3/100 (対照群 0/217)、腺腫 (adenoma)4/100 (対照群 0/217)、腺癌 (adenocarcinoma)13/100 (対照群 1/217)で、腫瘍発生ラット数は 32/100 であり、対照群の担肺腫瘍ラット数 (1/217)より有意に高かった。ただし、ばく露群に認められた肺腫瘍の中に良性嚢胞状角化扁平上皮腫瘍(Keratinizing cystic squamous-cell tumor)が含まれていた。この腫瘍を除外した場合の肺腫瘍発生数は 19/100 であり、この腫瘍発生率も対照群に比べて有意に高かった。本評価書では、肺腫瘍発生数を 19/100 として計算した。同様に P25 を雌性 NMRI マウスに 18 時間/日、5 日/週、13.5 ヶ月間全身吸入ばく露し、さらに最長 9.5 ヶ月間清浄な空気下で飼育した後、肺腫瘍を検討した。平均ばく露濃度は、10.4 mg/m³ であり、累積ばく露量は 51.5 g/m³ × 時間 (13.5 ヶ月)であった。TiO₂ ばく露マウスで観察された肺腫瘍は、腺腫 (11.3%) と腺癌 (2.5%) だけであり、腺腫と腺癌を合わせた発生率は 13.8% であり、非ばく露群のマウスでの発生率 (30%) より低かった(Heinrich et al. 1995)。
- ・8 週齢の雌雄各 50 匹の SD ラットに 15.95 mg/m³ の TiO₂ 粒子、一次粒子径: 99.9% が 0.5 μm 以下) を 12 週間 (6 時間/日, 5 日/週) 吸入ばく露し、実験開始後 140 週に腫瘍誘発性を検討した。140 週後の死亡率は雄で 88%、雌で 90% であった。気道に腺腫および扁平上皮乳頭腫が、各々雄の 1 例で中等度から重度な炎症を伴って観察され、細気管支肺胞腺腫が雌 1 例で観察された。生存率および腫瘍発生率に TiO₂ ばく露による影響は認められず、TiO₂ の発がん性を示す所見も示されなかった(Thyssen et al. 1978)。

気管内注入

- ・8-9 週齢の雌性 Wistar ラットに、TiO₂ 粒子 (P25; 一次粒子径 25nm 以下、比重 3.8 g/mL、比表面積 52 m²/g、AL23; 平均一次粒子径 200nm 以下、アナターゼ、比重 3.9 g/mL、

比表面積 9.9m²/g) を複数回気管内注入し、肺腫瘍の発生率を検討した。陰性対照群では肺腫瘍を発生しなかったのに対し、P25 を 5mg/rat を 3 回、5mg/rat を 6 回、10mg/匹を 6 回注入した結果、良性・悪性を含めた肺腫瘍発生率は各々52.4%、67.4%、69.6%であった。AL23 に関しても 10mg/匹を 6 回、20mg/匹を 6 回注入した結果、肺腫瘍発生率は各々29.5%、63.6%であった(Pott et al. 2005)。

- ・ Wistar ラットに、微粒子 (F) TiO₂ (粒子サイズ : 0.25 μm) の 10 mg を週 1 回、6 週間 (計 60mg) または、ウルトラファイン (UF) TiO₂ (粒子サイズ : 21 nm) 6 mg を週 1 回、5 週間 (計 30mg) 気管内注入し、129 週後に腫瘍誘発性を検討した。 F-TiO₂ および UF-TiO₂ とともに慢性炎症を惹起した。腫瘍発生率は対照群で 5%、F-TiO₂ 群で 20.9%、UF-TiO₂ 群で 50%であった。F-TiO₂ 群の腫瘍発生率は肺泡マクロファージおよび顆粒球の増加の程度と相関していたが、UF-TiO₂ 群では肺泡マクロファージ及び顆粒球増加の程度が低いにも関わらず、腫瘍発生率は高かった(Borm et al. 2000)。
- ・ 雌雄の Syrian golden ハムスターに 3 mg/0.2 mL の TiO₂ 粒子 (平均サイズ : 0.5 μm) を週 1 回、15 週にわたって気管内注入した。実験開始後 80 週では無処置対照群の生存率は 46%であったが、TiO₂ ばく露ではすべてのハムスターが死亡した。TiO₂ ばく露ハムスターの肺に間質の線維化および軽度の炎症が観察されたが、肉芽腫形成や腫瘍は認められなかった (Stenbäck et al, 1976) 。
- ・ 雄 Syrian golden ハムスターに 0.15 mL の生理食塩水に懸濁した TiO₂ 粒子 1 mg を週 1 回、8 週間にわたり気管内注入し、観察期間を 130 週おいた。TiO₂ ばく露の 135 匹のハムスターには肺がんおよび中皮腫は認められなかったが、2 匹に胸部肉腫が観察された (Mohr et al. 1984)。

経口投与/経皮投与・その他の経路等

- ・ ラットに TiO₂ ナノ粒子 (P25、アナターゼ型、Degussa 社製) を週 1 回腹腔内注射したのち、最大 2.5 年の経過観察を行い、腫瘍発生率 (子宮の腫瘍を除いた腹部における肉腫、中皮腫および癌腫の発生率) を検討した。腫瘍を有するラットの頻度は、9 週齢の雌 Wistar ラットに 5 回腹腔内注射 (総投与量 90 mg/匹) した群で 5.3% , 8 週齢の雌 SD ラットに 5 mg/rat を単回腹腔内注射した群で 3.8%、4 週齢の雌 Wistar ラットに 5 mg/匹を単回腹腔内注射した群で 0%、5 週齢の雌 Wistar ラットに 3 回腹腔内注射 (2 + 4 + 4 mg/匹 , 総投与量 10 mg/匹) した群で 0%、また、8 週齢の雌 Wistar ラットに 20 回腹腔内注射 (5 mg/匹を 20 回、総投与量 100 mg/匹) した群で 9.4%であった。生理食塩水を腹腔内注射した 5 つの対照群の腫瘍発生ラットの発現率は 0-6.3%であり、TiO₂ による腫瘍発現頻度の上昇はみられなかった(Pflücker et al. 2001)。

ク 神経毒性

- ・ 二酸化チタンナノ粒子 (平均粒径 5-6nm (溶液中の径と記されているが、おそらく 1 次粒子径だと思われる)、比表面積 174.8 m²/g、DLS 径 208-330nm) 2.5、5、10 mg/kg/日を CD-1 マウスの鼻腔に、90 日間連続投与 (ばく露量が明瞭に記載されていないが、おそらくこの量

と思われる)し、脳の損傷を検討したところ、二酸化チタンナノ粒子は脳内に蓄積し、脳内のグリア細胞の増殖亢進や壊死領域を認めたこと、海馬細胞のアポトーシスを認めた (Ze et al. 2014)。また、同著者の同じ実験デザインの論文により、マウスの脳で、酸化ストレスの亢進と神経膠細胞の増殖亢進や出血巣を認めた (Ze et al. 2013)。

(本文献は Society for Biomaterials(USA)の機関誌に掲載されているため本評価書に加えたが、仏 OMNT (Observatoire des micro et nanotechnologies)から、同著者のグループから同様の内容が他のジャーナル(Chemosphere)に発表されていること、文献の不正確な引用、方法の記述不備、結果の記述と解釈の信頼性及び動物倫理上の問題などが指摘・公表(Bencsik & Lestaevel 2014)されていることを付記する。)

(2) ヒトへの影響 (疫学調査及び事例)

ア 急性毒性

- ・調査した範囲内では、報告は得られていない。

イ 刺激性及び腐食性

- ・T805 (微粉末化 TiO_2 、平均粒子サイズ: 20 nm、形状: 立方体、トリメチルオクチルシラン表面修飾により疎水化、Degussa 製) Eusolex T-2000 (ウルトラファイン TiO_2 、一次粒子の平均サイズ: 10–15 nm、二次凝集体サイズ: 100 nm、形状: 針状、非共有結合 Al_2O_3 (8–11%)/ SiO_2 (1–3%) により表面修飾、両親媒性、Merck 製) または Tioveil AQ-10P (水及びプロピレングリコールに親水性分散した TiO_2 、サイズ: 100 nm、形状: 針状、コーティング: 4.25%アルミナおよびシリカ 1.75%シリカにより表面修飾、Solaveil) を 4%含有したエマルジョンを 4 mg/cm^2 (TiO_2 として $160 \mu\text{g/cm}^2$) の用量でボランティアの前腕 11.3 cm^2 に 6 時間塗布した。 TiO_2 の粒子サイズ、形状および表面修飾は皮膚吸収に影響を及ぼさなかった。微粉末化 TiO_2 は角質層の最も外側に沈着し、角質層の深部では観察されなかった (Schulz et al. 2002、Mavon et al. 2006)。
- ・T805 (平均直径: 約 20 nm、トリメチルオクチルシラン表面修飾により疎水化、Degussa) 3%含む水/油エマルジョンを 2 mg/cm^2 (TiO_2 として $60 \mu\text{g/cm}^2$) の用量で、3 人の健康な女性ボランティアの上腕部 11.3 cm^2 に 5 時間塗布した。 TiO_2 は皮膚を通過せず、角質層の最外側に蓄積していた (Pflücker et al. 2001)。

ウ 感作性

- ・調査した範囲内では、報告は得られていない。

エ 反復ばく露毒性 (生殖毒性、遺伝毒性、発がん性、神経毒性評価は別に記載)

- ・58 歳の喫煙歴のない男性で、3 ヶ月間マスクを装着せずポリスチレン粒子の静電塗装 (二酸化チタンナノ粒子を含有するも、物理化学的特性、塗装中の濃度など不明) を行い、病理組織上 器質化肺炎を伴う細気管支炎パターン (現在の器質化肺炎パターン) を伴う間

質性肺炎を認めた。肺組織からは、100-300nm のサイズの TiO_2 や結晶質シリカが認められた。結晶質シリカの肺障害パターンとは異なること、塗装中の主な無機物が二酸化チタンナノ粒子であったことから、二酸化チタンナノ粒子による肺障害と考察している。この塗装には、過敏性肺炎を誘発するイソシアヌル酸トリグリシジル、シリカなどの他の無機物（成分や濃度不明）が含まれていた（Cheng et al. 2012）。

オ 生殖毒性

・調査した範囲内では、報告は得られていない。

カ 遺伝毒性

・調査した範囲内では、報告は得られていない。

キ 発がん性

・調査した範囲内では、報告は得られていない。

発がんの定量的リスク評価

・二酸化チタンについてのユニットリスクに関する報告はない（IRIS、OEHHA 2009b）。

・NIOSH は発がん試験より 1/1000 過剰発がんのリスク評価を行っている。肺重量あたりの表面積保持量（二酸化チタン重量保持量 × 比表面積/肺重量/1000）を計算し、肺腫瘍発生率とベンチマーク用量モデルから過剰発がんの肺内保持量（表面積用量）を算出し、MPPD モデルによるヒトの吸入ばく露濃度を推定した。1/1000 および 1/10000 の過剰発がん率より求めたナノ粒子の吸入ばく露濃度（45 年ばく露）は、それぞれ、0.29 mg/m^3 、0.07 mg/m^3 である。（NIOSH 2011）。

・本有害性評価書では、Appendix において、ナノ（ultrafine）粒子と微粒子（fine）二酸化チタン発がん性試験のデータに基づいて、ナノ及び微粒子二酸化チタンの定量的リスク評価を行った。

発がん性分類

以下は、二酸化チタンのすべての粒子に対する分類で、ナノ粒子に限らない。

IARC： 2B（ヒトに対する発がん性が疑われる）（2010）（IARC 2010）

疫学的研究：不十分な証拠（1 報告でわずかに肺がん発症が増加、2 報告では、有意な発症を認めない）

動物試験：十分な証拠（ラットの吸入ばく露試験 2 件、気管内注入試験で肺腫瘍を有意に発症、マウスやハムスターでは認められず）

メカニズム：二酸化チタンまたは難溶性粒子は肺腫瘍をひきおこすかもしれない

発がん性において、疫学的研究にて不十分な証拠、動物試験では十分な証拠であること、腫瘍発生の機序としての証拠は強くはないことから、Group 2B と判断した。

産衛学会：設定なし(産衛 2013)

EU Annex VI：設定なし (CLP 2008)

NTP 12th：設定なし (NTP 2011)

ACGIH：A4 (ヒト発がん性について分類できない物質) (1996) (ACGIH 2013)

DFG MAK：発がん性区分 3A (inhalable fraction: except for ultrafine particles) (DFG 2010)

ク 神経毒性

調査した範囲内では、報告は得られていない。

(3) 許容濃度の設定

ACGIH TLV-TWA：10 mg/m³ (1992) (ACGIH 2013)

(二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。発がんに関する分類も同じ。)

発がんに関する分類 A4 (ヒトに対する発がん性については分類できない)

勧告根拠：

ラットに二酸化チタン粉末を 0、10、50、250 mg/m³ の濃度で吸入ばく露させた慢性実験において、250 mg/m³ 投与群で肺への炎症および扁平上皮がんの形成を認めた。なお 10mg/m³ の投与群では肺の既存の構築は保たれており、線維化の進行や不可逆的な病変も認められない。疫学的調査では、二酸化チタンのばく露と呼吸器疾患との間には関連性が無かったと報告されている。さらに二酸化チタンへの職業ばく露が肺の線維化、発がん、もしくは他の健康影響との関連を示す確実な証拠はない。以上のことから、TLV-TWA 値として 10 mg/m³ を勧告する。

二酸化チタンの発がん性を調べた動物実験は陰性もしくは結論に達していないことから、これらの結果をもとに二酸化チタンを A4 に分類する。Skin や SEN 表記あるいは TLV-STEL を提言する十分なデータはない(ACGIH 2001)。

日本産業衛生学会：0.3 mg/m³ (二酸化チタンナノ粒子) (産衛 2013) 勧告根拠：

二酸化チタンナノ粒子に関する疫学的報告はない。動物ばくばく露試験では、10 mg/m³ の長期吸入ばく露により、ラットでは肺腫瘍の発生が増加したがマウスでは増加しなかったことから、ラットにおける発がんは overload により慢性炎症から上皮化生を由来するラット特有のものであると考えられるので、採用しない。Bermudez らの亜慢性試験 (13 週間) において、2 mg/m³ のばくばく露濃度は、overload ではないこと、肺にほとんど影響もないことから NOAEL と考えた。ILSI Workshop report に基づいて種差の不確実係数を 3 としたこと、さらにばく露期間が短いことによる不確実係数を 2 とすると、ヒトに影響を及ぼさないばく露濃度は、0.33 mg/m³ と推定される。

以上の疫学的研究や動物ばく露研究から、総合的に判断して、二酸化チタンナノ粒子の許容濃度は、0.3 mg/m³ と設定する。

NEDO プロジェクト :

許容暴露濃度 (PL:時限) : 0.6 mg/m³(蒲生ら 2011)

Bermudez らの亜慢性試験であるラットの 13 週間の吸入ばく露試験において、過剰負荷がなく、かつほとんど生体反応を認めないばく露濃度 2 mg/m³ を NOAEL とした。ヒトへの換算 (週 5 日間、1 日 8 時間の人の作業に換算する時間加重平均濃度 NOAEL_{human} 1.82 mg/m³, これに用量指標の選択に関する不確実性係数 3 で除した) を行い、許容暴露濃度を 0.6 mg/m³ とした。ただし、当面 15 年程度の亜慢性のばく露期間を想定した許容濃度であり、10 年程度での見直しを前提としている。

NIOSH : Recommended Exposure Limit (REL): 吸入性粒子 TiO₂ 微粒子 2.4 mg/m³、TiO₂ 超微粒子 0.3 mg/m³ (1 週間 40 時間 (1 日 10 時間まで)) (NIOSH 2011)

根拠: ラットの長期吸入ばく露試験 (2 年間) において肺重量あたりの肺保持量 (粒子表面積) を用量の指標としてベンチマーク用量計算ソフトを用いて BMDL (ベンチマーク用量信頼下限値) を算出し、1/1,000 過剰肺腫瘍リスクを生じる用量をラットからヒトへ外挿した。

EC : Derived No Effect Level (DNEL) : 0.017 mg/m³

引用文献

- (ACGIH 2001) ACGIH: Titanium Dioxide. In: Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices for Titanium Dioxide. (2001)
- (ACGIH 2013) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) : TLVs and BELs with 7th Edition Documentation (CD-ROM) (2013)
- (Adachi et al. 2010) Adachi K, Yamada N, Yamamoto K, Yoshida Y, Yamamoto O. (2010) In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. Nanotoxicology 4(3): 296-306
- (Bencsik & Lestaevel 2014) Concerns regarding nanosized titanium dioxide nasal exposure and neurotoxicity study by Ze et al. J Biomed Mater Res A. 2014 Sep 18. doi: 10.1002/jbm.a.35336. [Epub ahead of print]
- (Bermudez et al. 2004) Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. Toxicol Sci 77: 347 – 357.

- (Borm et al. 2000) Borm PJA, Hohr D, Steinfatz Y, Zeittrager I, Albercht C (2000) Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dusts, titanium dioxides, and quartz. *Inhal. Toxicol* 12(3): 225-231
- (Cheng et al. 2012) Cheng TH, Ko FC, Chang JL, Wu KA. (2012) Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia due to titanium nanoparticles in paint. *Ann Thorac Surg* 93: 666-669
- (CLP 2008) European Commission Joint Research Centre : Details on Substances Classified in Annex VI to Regulation (EC) No 1272/2008
(<http://tcsweb3.jrc.it/classification-labelling/clp/>)
- (DFG 2010) Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) : List of MAK and BAT values. (2010)
(http://www.mrw.interscience.wiley.com/makbat/makbat_chemicals_fs.html)
- (Duan et al. 2010) Duan Y, Liu J, Ma I, Li N, Liu H, Wang J, Zheng L, Liu C, Wang X, Zhao X, Yan J, Wang S, Wang H, Zhang X, Hong F (2010) Toxicological characteristics of nanoparticles anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials* 31, 894–899.
- (Fedulov et al. 2008) Fedulov AV, Leme A, Yang Z, Dahl M, Lim R, Mariani TJ, Kobzik L (2008) Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 57–67.
- (Ferin et al. 1992) Ferin J, Oberdorster G, Penney DP (1992) Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6, 535-542.
- (Grassian et al. 2007) Grassian VH, O' Shaughnessy PT, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, Thorne PS (2007) Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect* 115, 397–402.
- (Heinrich et al. 1995) Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995) Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicol* 7, 533–556.
- (Hougaard et al. 2010) Hougaard KS, Jackson P., Jensen KA, Sloth JJ, Löschner K, Larsen EH, Birkedal RK, Vibenholt A, Boisen A-MZ, Wallin H, Vogel U. (2010) Effects of prenatal exposure to

- surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. Part Fibre Toxicol 2010, 7,16
doi:10.1186/1743-8977-7-16.
- (Huang et al. 2009) Huang S, Chueh PJ, Lin YW, Shih TS, Chuang SM (2009) Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. Toxicol Appl Pharmacol 241, 182-194.
 - (Hussain et al. 2010) Hussain S, Thomassen LCJ, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F, Boland S(2010)Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. Part Fibre Toxicol 7, 10.
 - (IARC 2010) International Agency for Research on Cancer (IARC) : IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Carbon Black, Titanium dioxide and Talc Vol.93. (2010)
 - (ICSC 2002) International Programme on Chemical Safety (IPCS): 国際化学物質安全性ガイド(ICSC)日本語/英語版 ICSC 番号 338 (2002)
 - (IFA 2010) IFA (Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance). 2010. Criteria for assessment of the effectiveness of protective measures. <http://www.dguv.de/ifa/en/fac/nanopartikel/beurteilungsmassstaebe/index.jsp>, accessed on May 31, 2012.
 - (IRIS) US. Environmental Protection Agency (EPA) : Integrated Risk Information System (IRIS), Cancer Unit Risk Values
 - (Jani et al. 1994) Jani PU, McCarthy DE, Florence AT (1994) Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI and translocation to systemic organs after oral administration. Int J Pharm 105, 157–168.
 - (Kobayashi et al. 2009) Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J (2009) Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results. Toxicology 264, 110–118.
 - (Long et al. 2006) Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B (2006) Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2). implications for

nanoparticle. Environ Sci Technol 40, 4346-4352.

- (Ma-Hock et al. 2009) Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R (2009) Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. Inhalation Toxicology 21, 102-118.
- (Mavon et al. 2006) Mavon A, Miquel C, Lejeune O, Payre B, Moretto P (2006) In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. Skin Pharmacol Physiol 20, 10–20.
- (Mohr et al. 1984) Mohr U, Pott F, Vonnahme FJ (1984) Morphological aspects of mesotheliomas after intratracheal instillations of fibrous dust in Syrian golden hamsters. Exp Pathol 26, 179–183.
- (Monteiller et al. 2007) Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K (2007) The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: The role of surface area. Occup Environ Med 64, 609-615.
- (Morimoto et al. 2011) Morimoto Y, Oyabu T, Ogami A, Myojo T, Kuroda E, Hirohashi M, Shimada M, Lenggoro W, Okuyama K, Tanaka I. (2011) Investigation of gene expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA in rat lung in inhaled nickel oxide and titanium dioxide nanoparticles. Ind Health 49, 344-352.
- (NIOSH 2011) NIOSH (2011): Current Intelligence Bulletin 63. Occupational exposure to titanium dioxide. NIOSH Publication No 2011-160. ([http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160/pdf/](http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf) assessed on January 7, 2013)
- (NTP 2011) National Institute of Health : Carcinogens Listed in NTP 12th Report (<http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc12>)
- (Oberdörster et al. 1992) Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm AC, Finkelstein J (1992) Role of the alveolar macrophage in lung injury: Studies with ultrafine particles. Environ Health Perspect 97, 193–199.
- (OEHHA 2009b) California EPA(OEHHA): Air Toxics Hot Spots Program Risk Assessment Guidelines Part II “Technical Support Document for Cancer Potency Factors: Methodologies for derivation,

listing of available values, and adjustments to allow for early life stage exposures. May 2009”(2009)

(http://www.oehha.ca.gov/air/hot_spots/2009/TSDCancerPotency.pdf)

- (Park et al. 2007) Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn EK, Lim Y, Lee KH(2007) Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhalation Toxicology* 19, Supplement 1, 59-65.
- (Pflücker et al. 2001) Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Gers-Barlag H. (2001) The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronized titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14 (Suppl. 1), 92-97.
- (Pott et al. 2005) Pott F, Roller M. (2005) Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol* 10(4): 249-281
- (Renwick et al. 2004) Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004) Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* 61, 442–447.
- (Rossi et al. 2010) Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, Vippola M, Jensen KA, Miettinen M, Sirola K, Nykasenoja H, Karisola P, Stjernvall T, Vanhala E, Kiilunen M, Pasanen P, Mäkinen M, Hameri K, Joutsensaari J, Tuomi T, Jokiniemi J, Wolff H, Savolainen K, Matikainen S, Alenius H (2010) Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci* 113, 422-433.
- (Sadrieh et al. 2010) Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, Mcneil SE, Howard PC, Doub WH, Buhse LF (2010) Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicol Sci* 115, 156–166.
- (Sager et al. 2008) Sager TM, Kommineni C, Castranova V (2008) Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: Role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol* 5, 17.

- (Schulz et al. 2002) Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Wendel V, Gres-Barlag H, Wittern KP. (2002) Distribution of sunscreen on skin. *Adv Drug Del Rev* 54 (Suppl. 1), 157–163.
- (Shimizu et al. 2009) Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K (2009) Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicol* 6, 20.
- (Stenbäck et al. 1976) Stenbäck F, Rowland J, Sellakumar A (1976) Carcinogenicity of benzo(a)pyrene and dusts in the hamster lung (instilled intratracheally with titanium oxide, aluminum oxide, carbon and ferric oxide). *Oncology* 33, 29–34.
- (Takahashi et al. 2010) Takahashi Y, Mizuo M, Shinkai , Oshio S, Takeda K (2010) Paternal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neocortex of mice. *J Toxicol Sci* 35, 749-756.
- (Takeda et al. 2009) Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M (2009) Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci* 55, 95–102.
- (Takenaka et al. 1986) Takenaka S, Dornhöfer-Takenaka H, Muhle H (1986). Alveolar distribution of fly ash and of titanium dioxide after long-term inhalation by Wistar rats. *J Aerosol Sci* 17, 361–364. doi:10.1016/0021-8502(86)90105-9.
- (Thyssen et al. 1978) Thyssen J, Kimmerle G, Dickhaus S, Emminger E, Mohr U (1978) Inhalation studies with polyurethane foam dust in relation to respiratory tract carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol* 1, 501–508.
- (Trouiller et al. 2009) Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH (2009) Titanium dioxide nanoparticles induced DNA damage and gene instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69, 8784-8789.
- (van Ravenzwaay et al. 2009) van Ravenzwaay B, Landsiedel R, Fabian E, Burkhardt S, Stauss V, Ma-Hock L (2009) Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz. *Toxicol Lett* 186, 152–159.

- (Wang J et al. 2008) Wang J, Cken C, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li Y, Li B, Ge C, Zhou G, Gao Y, Zhao Y, Chai Z (2008) Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett* 183, 72–80.
- (Wang JX et al. 2007) Wang JX, Chen CY, Yu HW, Sun J, Li B, Li YF, Gao YX, He W, Huang YY, Chai ZF, Zhao YL, Deng XY, Sum HF (2007) Distribution of TiO₂ particles in the olfactory bulb of mice after basal inhalation using microbeam SRXRF mapping techniques. *J Radioanal Nucl Chem* 272, 527–531
- (Warheit et al. 2006) Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL (2006) Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: Toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci* 91, 227–236.
- (Warheit et al. 2007) Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230, 90–104.
- (Warheit et al. 2007c) Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM (2007c) Development of a base set of toxicity test using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 171, 99–110.
- (Wu et al. 2009) Wu J, Lui W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD (2009) Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett* 191, 1–8.
- (Xia et al. 2006) Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE (2006) Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters* 6, 1794–1807.
- (Yamashita et al. 2011) Yamashita K, Yoshioka Y, Hagashisaka K et al (2011) Silica titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice, *Nature Nanotech.* 6, 312–328/
- (Ze et al. 2013) Ze Y, Zheng L, Zhao X, Gui S, Sang X, Su J, Guan N, Zhu L, Sheng L, Hu R, Cheng J, Cheng Z, Sun Q, Wang L, Hong F. (2013) Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain mice.

- (Ze et al. 2014) Ze Y, Hu R, Wang X, Sang X, Ze X, Li B, Su J, Wang Y, Guan N, Zhao X, Gui S, Zhu L, Cheng Z, Cheng J, Sheng L, Sun Q, Wang L, Hong F. (2014) Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. J. Biomed. Mater Res A. 102(2): 470-478
- (化工日 2013) 化学工業日報社: 16313 の化学商品(2013 年)
- (蒲生ら 2011) 蒲生昌志 編: ナノ材料リスク評価書 - 二酸化チタン(TiO_2) - 最終報告書版: 2011. 7.22、NEDO プロジェクト (P06041) 「ナノ粒子特性評価手法の調査研究」(2011)
- (産衛 2013) (社)日本産業衛生学会: 許容濃度の暫定値の勧告、産業衛生学雑誌 55 巻 5 号(2013)
- (酸化チタン工業会) 日本酸化チタン工業会資料
- (中災防 2011) 中央労働災害防止協会: 平成 22 年度ナノマテリアルの有害性等の情報収集報告書報告。酸化チタン (2011)
- (森本ら 2008) 森本泰夫, 田中勇武 (2008) ナノ粒子の有害性評価. 産衛誌 50, 37-48.

617

618

619
620

有害性総合評価表

物質名：酸化チタン（ナノ粒子）

有害性の種類	評 価 結 果
ア 急性毒性	<u>致死性</u> <u>ラット</u> 吸入毒性：LC₅₀ = データなし 経口毒性：LD₅₀ = 5,000 mg/kg bw <u>マウス</u> 吸入毒性：LC₅₀ = データなし 経口毒性：LD₅₀ = データなし <u>ウサギ</u> 経口毒性：LD₅₀ = データなし <u>健康影響</u> ・吸入ばく露試験や気管内注入試験において、肺の炎症（非特異的炎症）を認める。 但し、1 次粒子がナノ粒子であるほど急性期の炎症は強い傾向にあるが、一過性である。
イ 刺激性/腐食性	皮膚刺激性/腐食性：なし 1 報告のみであるが、P25 によるウサギ急性皮膚刺激試験が行われており、有意な皮膚の刺激性は認められなかった。 眼に対する重篤な損傷性/刺激性：なし 1 報告のみであるが、P25 による急性眼刺激性試験が行われており、有意な結膜、虹彩、角膜の刺激性は認められなかった。
ウ 感作性	皮膚感作性：なし 1 報告のみであるが、P25 による局所リンパ節試験法が行われており、耳介リンパ節おける有意な H3-Thymidine の取り込みを認めず、皮膚感作性を認めなかった。 呼吸器感作性：報告なし 調査した範囲内で情報は得られていない
エ 反復投与毒性(生殖毒性/遺伝毒性/発がん性/神経毒性は別に記載)	反復投与毒性： NOAEL = 2 mg/m³ 根拠： TiO₂ ナノ粒子（P25）を用いて、雌性ラット、マウスに対して、0.5、2、および 10 mg/m³ の重量濃度で、13 週間(6 時間/日、5 日/週)の吸入ばく露試験を行い、10 mg/m³ では肺炎症を認めたが、2 mg/m³ 以下の気中濃度ではほとんど影響が認められ

	なかった。さらに、2 mg/m³では、肺内のクリアランスも遅延していない。0.5 mg/m³では肺への影響が認められず、肺内のクリアランスも遅延していない。 本有害性評価書では、2 mg/m³群ラットの13週ばく露終了直後にみられたBrdU陽性肺胞細胞の有意な増加は一過性とみなし、炎症性反応は、10 mg/m³群で明らかに認められ、かつ、TiO₂ナノ粒子ばく露に関連した肺反応であることから、NOAELは2.0 mg/m³であると判断した。(有害性評価書 P 6 ~ 7 Bermudez et al.2004) 不確実性係数 UF = 10 根拠：種差 (10) 評価レベル = 0.15 mg/m³ 計算式：2 mg/m³ × 6/8(時間補正) × 5/5(日数補正) × 1/10(種差) = 0.15 mg/m³
オ 生殖毒性	生殖毒性：判断できない。 根拠：生理的ばく露とは異なる手法や投与量で行われている方法がほとんどであるので、必ずしも信頼できる評価レベルとはいえないことから、生殖毒性については、判断できないとした。 (参考) LOAEL = 42 mg/m³ × 0.708 = 29.7 mg/m³ 根拠：妊娠8-18日のC57BL/6BomTacマウスに42 mg/m³(1.7×10⁶n/cm³; peak-size: 97 nm)のUV-titan L181(ルチル型：Zr, Si, Alにより修飾、ポリアルコール表面修飾、TiO₂: 70.8%、Zr: 8.7%、Si: 5.6%、Al: 2.4%、Na: 0.5%、揮発物質：5.2%、X線解析平均サイズ：20.6 nm、比表面積：107.7 m²/g、Kemira製)を吸入ばく露(1時間/日計11日間)した。母動物の肺でTiが検出され、炎症(BALFの好中球数増加)を認めたが、母および児動物の肝臓、児動物胃内の母乳中にはTiは検出されなかった。児動物の行動に関しては、14週齢に実施したオープンフィールド試験においてTiO₂ばく露群のF1児のフィールド中央部への侵入頻度および雌の中央部での滞在時間の減少がみられ、4ヶ月齢に実施した聴覚性驚愕反応試験では雌に強いプレパルス抑制の増強効果がみられた。しかし、11-16週齢に実施したモリス水迷路試験による記憶学習に関しては、F1児にTiO₂ばく露の影響は認められなかった。生殖能に関しては、生後19週にTiO₂ばく露群の雄F1児を無処置の雌CBA/Jマウスと交配したところ、初回交配開始からF2児出産までの期間が、有意ではないが、延長する傾向がみられた。 (有害性評価書 P 9 Hougaard et al. 2010) 不確実性係数 UF = 100 根拠：種差 (10)、LOAELからNOAELへの変換 (10) 評価レベル = 0.037 mg/m³ 計算式：42 mg/m³ × 0.708 × 1/8 × 1/100 (UF) = 0.037 mg/m³

カ 遺伝毒性	遺伝毒性：あり 根拠：複数の <i>in vitro</i> の小核試験、<i>in vivo</i> の小核試験および遺伝子欠失試験で陽性を認めるので、遺伝毒性ありと考える。但し、TiO₂ のように難溶解性の粒子における遺伝毒性は、核に対する直接作用よりは、フリーラジカルが引き起こす間接的(2次的)遺伝毒性が関与する。(有害性評価書 P 10-15)
キ 発がん性	発がん性：ヒトに対する発がん性が疑われる IARC の発がん分類：2B (ヒトに対しての発ガン性が疑われる) (二酸化チタンのすべての粒子に対する分類で、ナノ粒子に限らない。) 根拠： 疫学的研究：不十分な証拠(1 報告でわずかに肺がん発症が増加、2 報告では、有意な発症を認めない) 動物試験：十分な証拠 メカニズム：二酸化チタンまたは難溶性粒子は肺腫瘍をひき起こすかもしれない。 以上より、疫学的研究にて不十分な証拠、動物試験では十分な証拠であること、腫瘍発生の機序としての証拠は強くはないことから、Group 2B と判断した。 閾値の有無：あり 根拠：遺伝毒性試験で <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で陽性反応が得られているが、2 次的な遺伝毒性と考えられること、および肺内保持量が overload を超えており、閾値をもって肺腫瘍発生率が増加することから閾値ありと考えた。 [閾値ありの場合] LOAEL = 10.4 mg/m³ 根拠：Wistar ラットに二酸化チタンナノ粒子(21 nm)を乾式分散により、18 時間/日、5 日/週、24 ヶ月間全身吸入ばく露(平均：10.4 mg/m³)し、腫瘍発生ラット数は 19/100 であり、非ばく露群(1/217)より有意に高かった。二酸化チタンのクリアランスに関するデータはないが、おそらく過負荷の状態であり、腫瘍形成には、粒子の過負荷が関与すると考える。しかし、唯一の長期吸入ばく露試験であるので、LOAEL として採用した。(有害性評価書 P 16 Heinrich et al. 1995) 不確実性係数 UF = 1,000 根拠：種差(10) \ LOAEL から NOAEL への変換(10)、がんの重大性(10) 評価レベル = 0.023 mg/m³ 計算式：10.4 mg/m³ × 18/8(時間補正) × 1/1,000(UF) = 0.023mg/m³

	参考[閾値なしの場合] (本項の計算は Appendix に記載) (P35 ~) ユニットリスク (UR): 報告なし 発がんの過剰発生リスク (10^{-4})に相当するばく露濃度 1) ナノ粒子の発がん性試験における肺腫瘍発生率と用量を直線外挿した場合 この値を基に、労働時間補正(18/8)と労働生涯補正 (45/75) を行う。 過剰発生リスク (10^{-4})に相当するばく露濃度= $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 労働生涯補正後の発がん過剰発生リスク (10^{-4})に相当するばく露濃度= $18.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 計算式: $5 \mu\text{g}/\text{m}^3 / (45/75) \times (18/8) = 18.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 2) リスク評価の算出 ベンチマーク用量モデルから過剰発がんの肺内保持量 (表面積用量) を算出し、MPPD モデルによるヒトの吸入ばく露濃度を推定した。基本的には NIOSH の方法と類似しているが、モデル式の平均化をしていないこと、肺重量の基準値が異なる。 1/1000 および 1/10000 の過剰発がん率より求めたナノ粒子の吸入ばく露濃度 (45 年ばく露) は、それぞれ、$0.28\text{--}0.30 \text{ mg}/\text{m}^3$、$0.03 \text{ mg}/\text{m}^3$ である。 3) NIOSH の報告 ベンチマーク用量モデルから過剰発がんの肺内保持量 (表面積用量) を算出し、MPPD モデルによるヒトの吸入ばく露濃度を推定した。1/1000 および 1/10000 の過剰発がん率より求めたナノ粒子の吸入ばく露濃度 (45 年ばく露) は、それぞれ、$0.29 \text{ mg}/\text{m}^3$、$0.07 \text{ mg}/\text{m}^3$ である。
ク 神経毒性	神経毒性: 判断できない 二酸化チタンナノ粒子 2.5、5、$10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$を CD-1 マウスの鼻腔に、90 日間連続投与 ((ばく露量が明瞭に記載されていないが、おそらくこの量と思われる)) し、脳障害を検討したところ、二酸化チタンナノ粒子は脳内に蓄積し、脳内のグリア細胞の増殖亢進や壊死領域を認めたこと、海馬細胞のアポトーシスを認めた (Ze et al. 2014)。また、同著者の同じ実験デザインの論文により、マウスの脳で、酸化ストレスの亢進と神経膠細胞の増殖亢進や出血巣を認めた (Ze et al. 2013)。これらの論文は、過剰投与していることが考えられること、また論文の内容に関して、問題点も指摘されていることから判断できない。(有害性評価書 P 17 ~ 18 Ze et al. 2013)
ケ 許容濃度の設定	ACGIH TLV-TWA: $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ (二酸化チタン全体を対象としており、ナノ粒子に限らない。) 発がんに関する分類 A4 (ヒトに対する発がん性については分類できない) 根拠: ラットに二酸化チタン粉末を 0、10、50、$250 \text{ mg}/\text{m}^3$ の濃度で吸入ばく露させた慢性実験において、$250 \text{ mg}/\text{m}^3$ 投与群で肺への炎症および扁平上皮がんの形成を認めた。なお $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ の投与群では肺の既存の構築は保たれており、線維化の進行や不可逆的な病変も認められない。疫学的調査では、二酸化チタンのばく露と呼吸器疾患との間には関連性がなかったと報告されている。さらに二酸化チタンへの職業ばく露

が肺の線維化、発がん、もしくは他の健康影響との関連を示す確実な証拠は無い。以上のことから、TLV-TWA 値として 10 mg/m^3 を勧告する。

二酸化チタンの発がん性を調べた動物実験は陰性もしくは結論に達していないことから、これらの結果をもとに二酸化チタンを A4 に分類する。Skin や SEN 表記あるいは TLV-STEL を提言する十分なデータはない(Oberdörster et al. 1992)。

日本産業衛生学会等 0.3 mg/m^3 (二酸化チタンナノ粒子)

勧告根拠：

二酸化チタンナノ粒子に関する疫学的報告はない。動物ばく露試験では、 10 mg/m^3 の長期吸入ばく露により、ラットでは肺腫瘍の発生が増加したがマウスでは増加しなかったことから、ラットにおける発がんは overload により慢性炎症から上皮化生を由来するラット特有のものであると考えられるので、採用しない。Bermudez らの亜慢性試験 (13 週間) において、 2 mg/m^3 のばく露濃度は、overload ではないこと、肺にほとんど影響もないことから NOAEL と考えた。ILSI Workshop report に基づいて種差の不確実係数を 3 としたこと、さらにばく露期間が短いことによる不確実係数を 2 とする (31) と、ヒトに影響を及ぼさないばく露濃度は、 0.33 mg/m^3 と推定される。以上の疫学的研究や動物ばく露研究から、総合的に判断して、二酸化チタンナノ粒子の許容濃度は、 0.3 mg/m^3 と設定する。

NEDO プロジェクト：許容ばく露濃度 (PL:時限) : 0.6 mg/m^3

Bermudez らの亜慢性試験であるラットの 13 週間の吸入ばく露試験において、過剰負荷がなく、かつほとんど生体反応を認めないばく露濃度 2 mg/m^3 を NOAEL とした。ヒトへの換算 (週 5 日間、1 日 8 時間の人の作業に換算する時間加重平均濃度 $\text{NOAEL}_{\text{human}} 1.82 \text{ mg/m}^3$, これに用量指標の選択に関する不確実性係数 3 で除した) を行い、許容暴露濃度を 0.6 mg/m^3 とした。ただし、当面 15 年程度の亜慢性のばく露期間を想定した許容濃度であり、10 年程度での見直しを前提としている。

NIOSH : Recommended Exposure Limit (REL): 0.3 mg/m^3

ラットの長期吸入ばく露試験 (2 年間) において肺重量あたりの肺保持量 (粒子表面積) を用量の指標としてベンチマーク用量計算ソフトを用いて BMDL (ベンチマーク用量信頼下限値) を算出し、1/1,000 過剰肺腫瘍リスクを生じる用量をラットからヒトへ外挿した。

EC : Derived No Effect Level (DNEL) : 0.017 mg/m^3

622
623
624
625
626
627

Appendix 二酸化チタンナノ(ultrafine)粒子の定量的リスク評価

1) ナノ粒子(超微粒子(ultrafine))と微粒子(fine)の用量—反応(炎症反応と発がん性)関係における dosemetrics

図1は二酸化チタンのナノ粒子と微粒子をラットに気管内投与した肺洗浄液(BALF)中の好中球比率を示す。ナノ粒子は微粒子に比べて、同一質量濃度でより多くの好中球を産生することがわかる。

図1 異なる粒子サイズを気管内注入した BALF 好中球比率 –重量基準
(Ferin et al. 1992、IUCLID 2000)

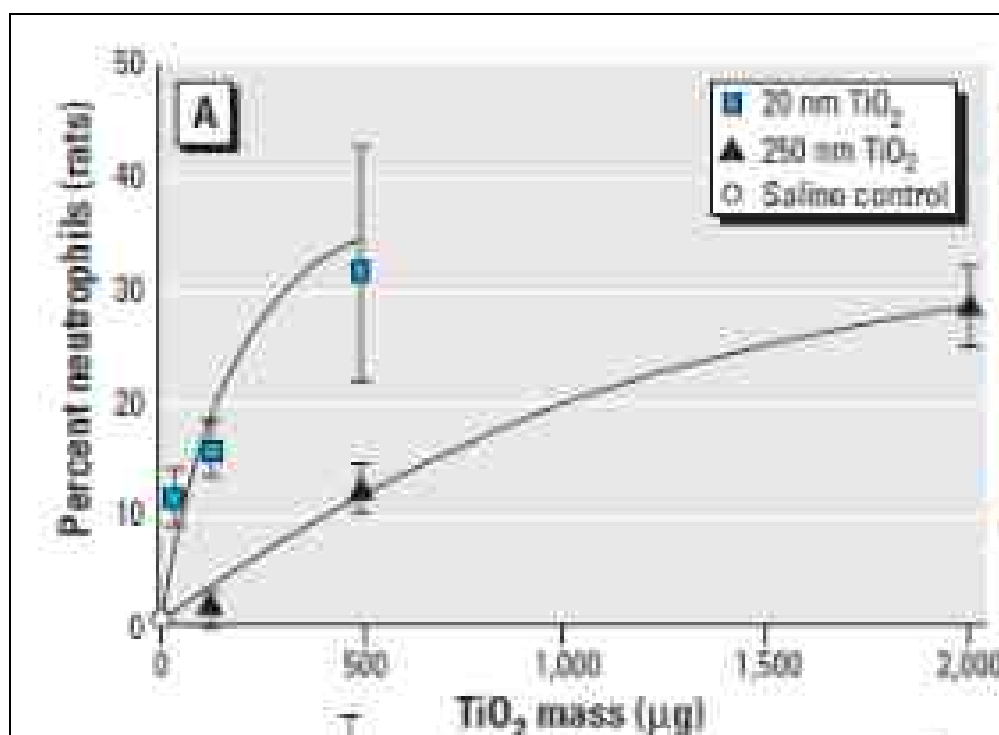
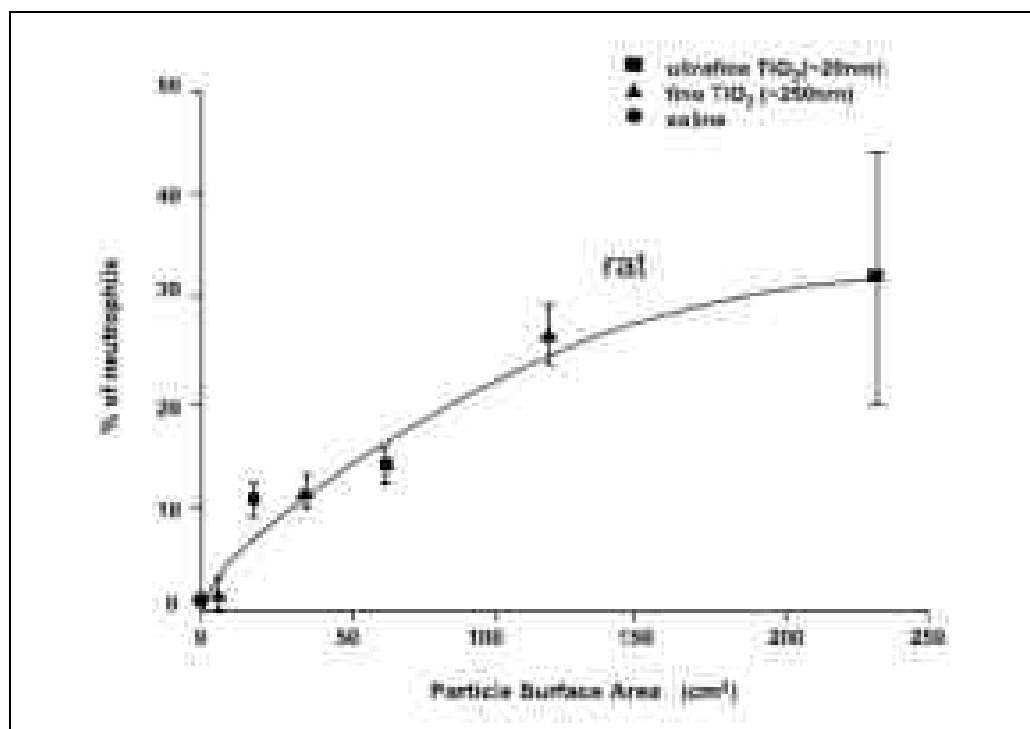


図2は、dosemetrics として質量濃度ではなく、粒子の表面積を用いた場合のラット肺洗浄液中の好中球産生率との関係を示す。図1の質量濃度に比べて、粒子の表面積は dosemetrics として炎症性反応をよりの確に表現できる。

643

644 図2. 異なる粒子サイズを気管内注入した BALF 好中球比率 –表面積基準

645 (Ferin et al. 1992、IUCLID 2000)



646

647

648 図3は長期吸入ばく露試験における肺腫瘍の発生率と難溶性低毒性化学物質の表面積用量

649 との関連を示している。表面積用量を用いると一定の用量から急に比率が上昇している。

650 低毒性の物質でも過剰投与すると肺腫瘍の発生率が増加することを示している。この過剰投

651 与による肺腫瘍の発生率の増加は、NIOSH、IARC のレポートに報告されている(IARC 2010、

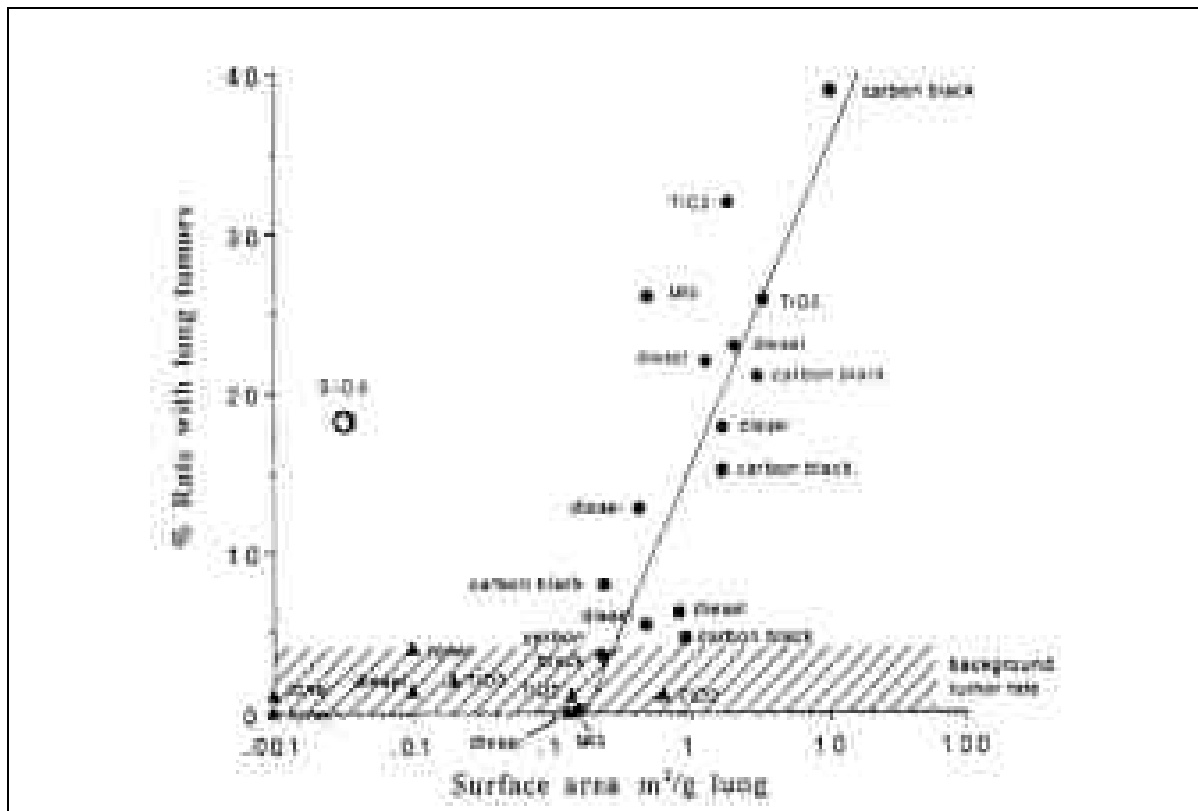
652 NIOSH 2011)。また、この傾向に関しては、肺腫瘍だけでなく、肺の炎症(図1と2を参照)

653 と表面積用量においても認められる。

654

655
656

図 3 難溶性低毒性化学物質の用量(表面積)と腫瘍発生率 (NIOSH 2011)



657
658
659

2) 微粒子及び超微粒子投与（ばく露）の発がん性試験及び亜慢性毒性試験の結果と肺過負荷

2-1) 定量的リスク評価に用いる二酸化チタン微粒子及びナノ粒子の発がん性試験

・ Lee et al による二酸化チタン微粒子の発がん性試験

二酸化チタン微粒子エアロゾル(E.I.duPont 製、吸入性粉じん約 84%、MMAD: 1.5 ~ 1.7 μm 、ばく露濃度 : 0、10、50、250 mg/m^3)を雌雄 CD ラットに 6 時間/日、5 日/週、2 年間反復吸入ばく露し、肺腫瘍を検討した。対照群に比べて、ばく露群に臨床症状、体重の変化、死亡率の変化は見られなかった。2 年ばく露終了後のチタン肺負荷量は、乾燥肺重量 1 g 当り、10 mg/m^3 群では 3.1%(26.5 mg/lung)、50 mg/m^3 群では 16.9%(124 mg/lung)、250 mg/m^3 群では 28%(665 mg/lung)であった。肺クリアランス機序は損傷され、250 mg/m^3 で過負荷になった。しかし、10 と 50 mg/m^3 群では肺クリアランス速度に差はなかった。過負荷の肺クリアランスメカニズムを示す早期の肺反応は粉塵を吞噬したマクロファージ、粉じんを含む泡沫性細胞、それらの細胞の残屑等の集積を特徴とした。過負荷の肺クリアランスメカニズムのマーカである肺胞蛋白症は 1 年ばく露終了後の 50 と 250 mg/m^3 群に発現した。250 mg/m^3 の 2 年ばく露終了後に、II 型肺細胞の過形成を示す肺胞に細気管支肺胞腺腫が発現した。また、肺胞道領域の細気管支化を示す扁平上皮化生から進展した角質性扁平上皮癌が認められた。腺腫は 250 mg/m^3 群

の雄では 77 匹中 12 例、雌では 74 匹中 413 例および扁平上皮癌は 250 mg/m³ 群の雄では 77 匹中 1 例、雌では 74 匹中 13 例に認められた(Lee 1985、Lee et al. 1986)。

• Muhle et al と Bellmann et al による二酸化チタン微粒子の発がん性試験

99.5%のルチル型二酸化チタン微粒子(ドイツ、Bayer AG 社製、吸入性粉じん MMAD 1.1 μm、GSD 1.6、ばく露濃度：0、5mg/m³)を雌雄 F-344 ラットに 6 時間/日、5 日/週、2 年間反復吸入ばく露した。体重、臨床生化学指標、摂餌量、臓器重量はばく露群と対照群の間に有意差はみられなかった。2 年ばく露終了後の肺と肺周囲リンパ節のチタン肺負荷量は、重量 1 g 当り、雄では 3.2 mg/g、雌では 2.24 mg/g であった。2 年間吸入ばく露後の肺腫瘍発生率は、対照群では腺腫が 100 匹中 2 例と腺癌が 100 匹中 1 例(合計 3 例)であり、ばく露群では腺腫が 100 匹中 1 例、腺癌が 100 匹中 1 例(合計 2 例)であった(Muhle et al. 1991、Bellmann et al. 1991)。

• Heinrich et al による二酸化チタンナノ粒子の発がん性試験

二酸化チタンナノ粒子(Evonik Degussa 社製; P25; 平均一次粒径 21 nm、一次粒子サイズ：15–40 nm、アナターゼ 80% / ルチル 20%)を乾式分散により、雌 Wistar ラットに 24 ヶ月間、1 日 18 時間、週 5 日全身吸入ばく露し、さらにラットを 6 ヶ月間清浄な空気下で飼育した後、肺腫瘍発生を検討した。ばく露濃度は、最初の 4 ヶ月間：7.2 mg/m³、続く 4 ヶ月間：14.8 mg/m³、9 ヶ月から実験終了まで：9.4 mg/m³(平均：10.4 mg/m³)であり、累積ばく露量は 88.1 g/m³ x 時間(24 ヶ月)であった。18 ヶ月で肺に最初の腫瘍発生がみられ、二酸化チタンナノ粒子ばく露による肺腫瘍発生数は、良性扁平上皮癌(benign squamous-cell carcinoma)20/100(非ばく露群 0/217)、扁平上皮癌(squamous-cell carcinoma)3/100(非ばく露群 0/217)、腺腫(adenoma)4/100(非ばく露群 0/217)、腺癌(adenocarcinoma)13/100(非ばく露群 1/217)で、腫瘍発生ラット数は 32/100 であり、非ばく露群(1/217)より有意に高かった(Heinrich et al. 1995)(本有害性評価書の発がん性項にて既述)。

2-2)高濃度の二酸化チタン粒子ばく露による肺過負荷

水に不溶性で低い毒性の粒子・繊維状物質の実験動物への吸入ばく露と気管内投与は肺への過負荷を引き起こす(Lung overload)ことが知られている。二酸化チタン微粒子エアロゾルの吸入ばく露では、上記の Lee らによる 250 mg/m³の 2 年間吸入ばく露試験(Lee 1985、Lee et al. 1986)と下記の 250 mg/m³の 3 か月吸入ばく露試験の 2 つの研究が報告されている。

- ルチル型 p-TiO₂(DuPont 製、MMAD 1.44 μm、GSD 1.72)粒子の濃度 0、10、50、250 mg/m³を雌 CDF(F344)/CrIBR ラット、雌 B3C3F1/CrIBR マウス、雌 LVG(SYR)BR ハムスターに 6 時間/日、5 日/週、13 週間吸入ばく露し、ばく露終了後 0、4、13、26、52 週間の回復期を設定し、ばく露終了時とその後の肺とリンパ節の粒子負荷と肺反応(炎症、細胞毒性、肺細胞の増殖性)を検討した。肺および肺周囲のリンパ節の TiO₂ 粒子の負荷量はばく露濃度に依存して増加した。ラットとマウスでは 50 と 250 mg/m³で肺過負荷がみられた。炎症として、3 種の動物ともにマクロファージと好中球及び肺洗浄

液中の可溶性炎症成分の増加が認められた。250 mg/m³群では、ばく露終了後 52 週まで、肺洗浄液中の炎症性成分は増加していた。肺障害はラットが最も重度であり、250 mg/m³群で進行性の上皮変化と線維増殖性変化がみられた。上皮性の増殖変化が BrdU ラベル肺上皮細胞の増加として認められた。結論として、吸入した p-TiO₂ 粒子に対する肺反応には大きな種差が存在すること、肺過負荷を誘発する条件では、ラットはマウスやハムスターよりもより重度で持続性の炎症性反応を惹起すること、および高濃度 250 mg/m³の 90 日ばく露によってラットは進行性の線維増殖性障害と肺胞上皮性化生を引き起こす(Bermudez et al. 2002)。

2-3) 肺過負荷に対する見解

・Oberdörster(1997)の見解(Oberdörster 1997)：粒子・繊維状物質の実験動物への 2 年間反復吸入ばく露による発がん性試験では、用量設定は最も重要な課題であり、最高ばく露濃度は最大耐性量(Maximum Tolerated Dose: MTD)を遵守することが求められている。従来の MTD の定義は、腫瘍以外の病変による死亡率の増加がないこと、及び体重減少が 10%以下であることであった。粒子・繊維状物質ばく露に対する MTD に関しては意見の一致はみられず、体重と生存率以外の要因を加えた定義の修正が必要である。粒子・繊維状物質に対する MTD は 90 日試験で得られた非腫瘍性病変(肺の炎症、上皮細胞の増殖、肺重量の増加、粒子クリアランスの阻害、マクロファージによる粒子のクリアランス、有意な肺の病理組織所見)の中でも、粒子・繊維状物質の肺におけるクリアランスの阻害と持続的な肺の炎症反応は MTD を決定する際の重要な因子であり、肺腫瘍発生の中で重要な役割を演じる(上記 Bermudes et al の論文(Bermudez et al. 2002)を参照)。例えば、US.EPA は高濃度の二酸化チタン粒子エアロゾルの吸入ばく露による肺腫瘍は、肺への粒子過負荷(Lung overload)によって惹起される二次的な発がんであるとみなした。Oberdörster は、2 年吸入ばく露による発がん性試験の結果で高濃度群のみに有意な腫瘍形成がみられた場合には、MTD の条件を再考すべきであるとしている。マウスとハムスターは、ラットに比較して、肺の炎症反応、線維症、発がんに対して感受性が低いので、このマウス・ハムスター対ラットの種差、さらには炎症細胞の浸潤性及びヒトとげっ歯類との種差を解明すること、及び粒子によって誘発される肺腫瘍のメカニズムの解明が MTD を理解するのに重要である。Muhle et al (Muhle et al. 1991)は、発がん性試験で用いたカーボンブラック(トナー)の用量(1、4、16 mg/m³)において、高用量は MTD に適合していることを論じているが、同じ発がん性試験で用いた二酸化チタン微粒子 5 mg/m³の用量の MTD 適合性は言及していない。

・NIOSH の見解：Lee らによる 250 mg/m³二酸化チタン微粒子ばく露によるラット 肺腫瘍発生率の増加(Lee 1985、Lee et al. 1986)は、従前の NIOSH による TiO₂ 職業性発がん物質の指定の根拠となっていた。その後、NIOSH は TiO₂ 職業性発がん物質の指定を取り消す代わりに、Heinrich らによる 10 mg/m³二酸化チタンナノ粒子ばく露によるラット肺腫瘍の発現と Muhle らによる 5 mg/m³二酸化チタン微粒子ばく露による肺腫瘍が認められないという結果も合わせて、これらの 3 報の肺腫瘍発生率とチタン粒子の

表面積との用量—反応関係を活用して、発がん性の定量的リスク評価を行い、二酸化チタン微粒子及びナノ粒子の Recommended Exposure Limit 値を提言した(NIOSH 2011)。NIOSH は、ラットで観察された TiO₂ 微粒子の肺過負荷による肺腫瘍の発現がヒトで認められるかどうかについては、炭鉱夫のような高濃度の粉じんが浮遊する職場で働くヒトでも観察されると報告されている(Calberg et al. 1971、Douglas et al. 1986)ことを勘案すると、ヒトと同様な肺過負荷がラットにも生じたと考察している(NIOSH 2011)。炭粉 200 mg/m³ を 2 年間吸入ばく露されたラットに炭粉の肺過負荷による肺腫瘍が観察されたとの報告もある(Martin et al. 1977)。また、NIOSH の Castranova(Castranova 2000) は、吸入性結晶シリカにばく露された労働者にみられるばく露濃度依存性の肺癌(Attfield 2004)は、炎症と酸化性の組織損傷が肺腫瘍の原因として存在すると主張している。従って、NIOSH は、肺過負荷を引き起こした Lee et al らの発がん性試験の肺腫瘍のデータを含めて二酸化チタン微粒子の表面積を dose-metric として用いた定量的リスク評価は有効であるとしている。

・本有害性評価書における見解：

リスク計算（低濃度外挿）に用いる式は、確率ベースでも、発がんメカニズムベースでも、低濃度と高濃度では傾きが異なる。低濃度は、slope が緩徐である。つまり、低濃度は Overloading に達する前のデータ、高濃度は Overloading の後のデータを当てはめたのだと考察される。従って、今回の計算は、理論式よりも実測値に合わせること（3つのモデル式を用いてそれぞれに比率を配分し、実測値にフィットさせた）により、Overloading をあまり気にせず、リスク評価したと考えられる。（従来は、1つの理論式で低濃度リスクを評価していたことが多かった）。なお、慢性高濃度暴露試験は、1980年代から1990年の前半には良く行われていましたが、近年は行われていない。

3) 二酸化チタン超微粒子(ultrafine)発がんの定量的リスク評価

3-1) 過剰発がん率と用量を直線外挿する場合（Worst case）

二酸化チタンナノ粒子による発がん試験は、1濃度しかないので、直線外挿を行い、1/1000、1/10000の過剰発がん濃度を求める。

Heinrich らによる二酸化チタンナノ粒子吸入ばく露発がん性試験における腫瘍発生率 (Heinrich et al. 1995)		
ばく露濃度	0 mg/m ³	10 mg/m ³
肺腫瘍 (雌)	1/217 (0.5 %)	19/100 (19 %)
肺保持量 mg TiO ₂ /lung (雌)	0 mg	39.29mg
肺重量 (g) (雌)	1.44 mg	

$$\text{過剰発がん率} = (19/100 - 1/217) \div (1 - 1/217) = 0.18625$$

$$10^{-3} \text{ のリスク濃度} = 10 \times 0.001 \div 0.18625 = 50 \mu\text{g}/\text{m}^3 \quad (\text{worst case})$$

10⁻⁴ のリスク濃度 = $10 \times 0.0001 \div 0.18625 = 5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (worst case)

3-2) 表面積基準による定量的リスク評価

本来であれば、ナノ粒子による発がん性試験の結果を基にしてリスク評価を行いたいのであるが、上述のように 1 濃度しかないので、ベンチマーク用量を用いた評価が困難である。よって、二酸化チタン微粒子の発がん試験のデータを追加した。以下に示すのは、追加した二酸化チタン微粒子の発がん試験の結果である。

Lee らによる二酸化チタン微粒子吸入ばく露発がん性試験のばく露濃度—腫瘍発生率(Lee 1985、Lee et al. 1986)				
ばく露濃度	0 mg/m ³	10 mg/m ³	50 mg/m ³	250 mg/m ³
肺腫瘍 (雄) (雌)	2/79 (2.5 %)	2/71 (2.8 %)	1/75 (1.3 %)	12/77 (15.6 %)
	0/77 (0 %)	0/75 (0 %)	0/74 (0 %)	14/74 (18.9 %)
肺保持量 (雄) mg TiO ₂ /lung (雌)	0 mg	20.7 mg	118.3 mg	784.8 mg
	0 mg	32.3 mg	130 mg	545.8 mg
肺重量 (雄) (g) (雌)	3.25 mg			
	2.35 mg			

Muhle による二酸化チタン微粒子吸入ばく露発がん性試験における腫瘍発生率 (Muhle et al. 1991、Bellmann et al. 1991)		
	0 mg/m ³	5 mg/m ³
肺腫瘍 (雌)	3/100 (3.0 %)	2/100 (2.0 %)
肺保持量 mg TiO ₂ /lung (雌)	0 mg	2.72 mg
肺重量 (g) (雌)	1.05 mg	

リスク評価の算出方法としては、まず、肺重量あたりの表面積保持量（二酸化チタン重量保持量 × 比表面積/肺重量/1000）を計算し、肺腫瘍発生率とベンチマーク用量モデルにて 1/1000 の過剰発がん用量を算出、2）次にヒトの肺内保持量を算出し、MPPD モデルによるヒトの吸入ばく露濃度を推定した。

以下に、上記の吸入ばく露試験により算出したラット肺重量あたりの表面積保持量とラット肺の過剰腫瘍発生率を示す。

ナノ粒子 (雌)	
TiO ₂ 表面 積保持量	肺腫瘍発 生率
0	1/217

ナノ粒子と微粒子 (雌)	
TiO ₂ 表面積 保持量	肺腫瘍発 生率
0	1/294

ナノ粒子と微粒子 (雄、 雌)	
TiO ₂ 表面積 保持量	肺腫瘍発 生率
0	6/473

1.31	19/100	0.068586	0/75	0.0129	2/100
		0.276043	0/74	0.031782	2/71
		1.158954	14/74	0.068586	0/75
		1.31	19/100	0.181636	1/75
				0.276043	0/74
				1.158954	14/74
				1.20497	12/77
				1.31	19/100

799
800 次に EPA のベンチマーク用量計算ソフトを用いて、上記のデータより BMDL を計算した。これ
801 により 1/1000、1/10000 の BMDL を求めた。

802
803

	ナノ粒子 + 微粒子 (雌)				ナノ粒子 + 微粒子 (雄・雌)			
	1/1000	1/1000*	1/10000	1/10000*	1/1000	1/1000*	1/10000	1/10000*
Multistage (polynomial 3)	0.014 P=0.62	0.008	0.0015 P=0.63	0.0008	0.015 P=0.64	0.0082	0.0016 P=0.64	0.0008
Multistage Cancer (polynomial 3)	0.014 P=0.62	0.0077	0.0015 P=0.63	0.0008	0.015 P=0.62	0.0082	0.0016 P=0.62	0.0008
Weibull	0.03 P=0.44	0.0076	0.007 P=0.44	0.0007	0.04 P=0.56	0.0082	0.0075 P=0.56	0.0008
Log-probit	0.067 P=0.55	0.0072	0.0292 P=0.55	0.0007	0.0711 P=0.61	0.0077	0.0304 P=0.61	0.0008

804 1/1000* : BMDL (1/10) の 1/100 として算出、1/10000* : BMDL (1/10) の 1/1000 として算出

805 1/1000 : BMDL (1/1000) として算出、1/10000 : BMDL (1/10000) として算出

806
807 各モデル式による BMD(1/10)あたりの曲線は、sub-linear であるので、1/1000 や 1/10000 の
808 BMDL は、BMDL (1/10) の 1/100、1/1000 を直線外挿するよりは、計算ソフトによる BMDL
809 (1/1000)、BMDL (1/10000) を直接求めることにした。なお、使用したモデル式は、multistage
810 である。

811

812 雌のデータによる吸入ばく露濃度推定

	ヒトの保持量への変換		ヒトの吸入ばく露濃度
	粒子表面積 (m ² /lung) (×1100)	粒子重量 (g/lung) (÷ 48)	MPPD によるばく露濃度
multistage 雌 1/1000	15.4	0.321	0.28 mg/m ³

multistage 雌 1/1000*	8.8	0.183	0.16 mg/m ³
multistage 雌 1/10000	1.65	0.034	0.03 mg/m ³
multistage 雌 1/10000*	0.88	0.018	0.02 mg/m ³

813

814 雄・雌のデータによる吸入ばく露濃度推定

	ヒトの保持量への変換		ヒトの吸入ばく露濃度
ナノ粒子	粒子表面積 (m ² /lung) (×1100)	粒子重量 (g/lung) (÷48)	MPPD によるばく露濃度
multistage 雄・雌 1/1000	16.5	0.344	0.30 mg/m ³
multistage 雄・雌 1/1000*	9.02	0.188	0.16 mg/m ³
multistage 雄・雌 1/10000	1.76	0.037	0.03 mg/m ³
multistage 雄・雌 1/10000*	0.902	0.019	0.02 mg/m ³

815 ヒトの肺重量は、EPA の 1100g を用いた。

816 MPPD2 モデルのヒトの吸入ばく露の条件

817 モデル：Yeh/Schum Symmetric model

818 1 分間の呼吸回数 17.5 回/分、1 回換気量：1143 ml

819 作業時間 8 時間/日、5 回/週、45 年間 (2250 weeks)

820 比重 3.8、MMAD：0.8 (GSD 1.8)、48 m²/g

821

822 3-3) NIOSH による定量的リスク評価（表面積基準）

823 リスク評価の算出方法としては、まず、(1) 肺重量あたりの表面積保持量（二酸化チタン重量保
824 持量×比表面積/肺重量/1000）を計算し、肺腫瘍発生率とベンチマーク用量モデルにて 1/1000 の
825 過剰発がん用量を算出、(2) 次にヒトの肺内保持量を算出し、MPPD モデルによるヒトの吸入ば
826 く露濃度を推定した。用いた発がん性試験のデータは、3-2)項と同じである。

827 まず、ベンチマーク用量計算ソフトを用いて 9 つのモデル式別の BML、BMDL を算出し、こ
828 のうち、multistage、Weibell、Log-probit の 3 つのモデル式の平均用量モデル（比率は、multistage
829 が 0.14、Weibell が 0.382、log-probit が 0.478 である）を用いて、BML、BMDL を算出した。
830 得られた平均用量モデル（MA）からの BMDL よりヒトの肺内保持量を算出し、この保持量を基
831 に MPPD モデルによるヒトの吸入ばく露濃度を推定した。1/1000 および 1/10000 の過剰発がん
832 率より求めたナノ粒子の吸入ばく露濃度（45 年ばく露）は、0.29 mg/m³、0.07 mg/m³ である。

833

引用文献

- (Attfield 2004) Attfield MD, Costello J (2004) Quantitative exposure-response for silica dust and lung cancer in Vermont granite workers. *Am J Ind Med* 45: 129 – 138.
- (Bellmann et al. 1991) Bellmann B, Muhle H, Creutzenberg O, Basenbrock C, Kilpper R, MacKennzie JC, Morrow P, Mermelstein R. (1991) Lung clearance and retention of toner, utilizing a tracer technique, during chronic inhalation exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 17: 300 – 313.
- (Bermudez et al. 2002) Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Jamszem DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2002) Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 70: 86 – 97.
- (Calberg et al. 1971) Calberg JR, Crable JV, Limtiaca LP, Norris HB, Holtz JL, Mauer P, Wolowicz FR (1971) Total dust, coal, free silica, and trace metal concentrations in bituminous coal miners' lungs. *Am Ind Hyg Assoc J* 32: 432 – 440.
- (Castranova 2000) Castranova V (2000) From coal mine dust to quartz: mechanisms of pulmonary pathogenicity. *Inhalation Toxicology* 3: 7 – 14.
- (Douglas et al. 1986) Douglas AN, Robertson A, Chapman JS, Ruckley VA (1986) Dust exposure, dust recovered from the lung, and associated pathology in a group of British coalminers. *Br J Ind Med* 43: 795 – 801.
- (Ferin et al. 1992) Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992) Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6, 535-542.
- (Heinrich et al. 1995) Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995) Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicol* 7, 533 – 556.
- (IARC 2010) International Agency for Research on Cancer (IARC) : IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Carbon Black, Titanium dioxide and Talc Vol.93. (2010)
- (IUCLID 2000) IUCLID Dataset. 13463-67-7 (18 Feb. 2000)
- (Lee 1985) Lee KP, Trochimowicz, Reinhardt CF. (1985) Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol* 79: 179 – 192.
- (Lee et al. 1986) Lee KP, Henry III NW, Trochimowicz, Reinhardt CF. (1986) Pulmonary response to impaired lung clearance in rats following

- excessive TiO₂ dust deposition. *Environ Res* 41: 144 – 167.
- (Martin et al. 1977) Martin JC, Daniel H, LeBouffant L (1977) Short- and long-term experimental study of the toxicity of coal-mine dust and some of its constituents. In: *Inhalation Particles IV* (WH Walton, ed). Vol. 1, pp.361-372. Pergamon, Oxford.
 - (Muhle et al. 1991) Muhle H, Bellmann B, Creutzenberg O, Basenbrock C, Ernst H, Kilpper R, MacKennzie JC, Morrow P, Mohr U, Takenaka S, Mermelstein R. (1991) Pulmonary response to toner upon chronic inhalation exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 17: 280 – 299.
 - (NIOSH 2011) NIOSH (2011): Current Intelligence Bulletin 63. Occupational exposure to titanium dioxide. NIOSH Publication No 2011-160. ([http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160/pdf/](http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf) assessed on January 7, 2013)
 - (Oberdörster 1997) Oberdörster G (1997) Pulmonary carcinogenicity of inhaled particles and the maximum tolerated dose. *Environmental Health Perspectives* 105, 1347 -1355.