

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-³⁰⁾⁶⁵⁾

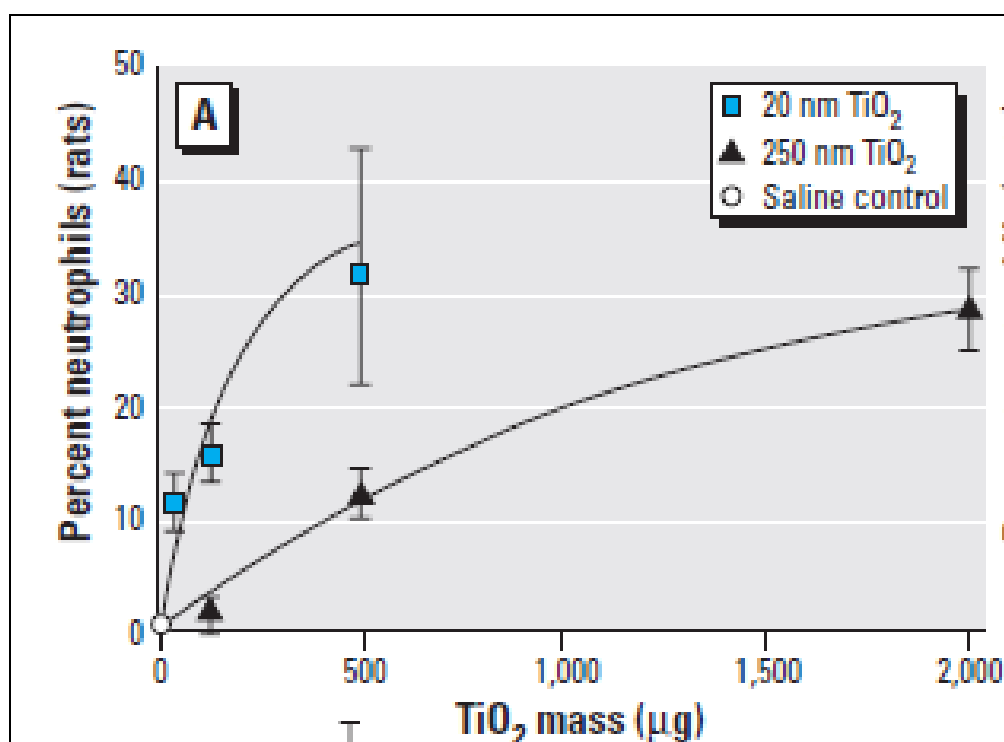


図2は、dosemetrics として質量濃度ではなく、粒子の表面積を用いた場合のラット肺洗浄液中の好中球産生率との関係を示す。図1の質量濃度に比べて、粒子の表面積は dosemetrics として炎症性反応をよりの確に表現できる。

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-³⁰⁾⁶⁵⁾

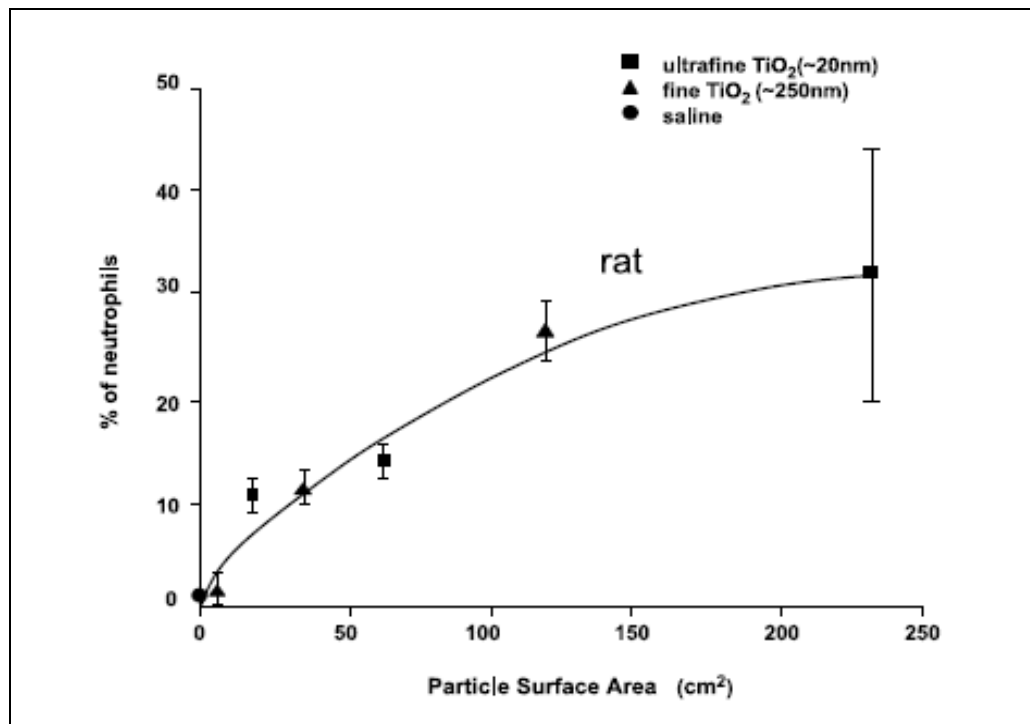
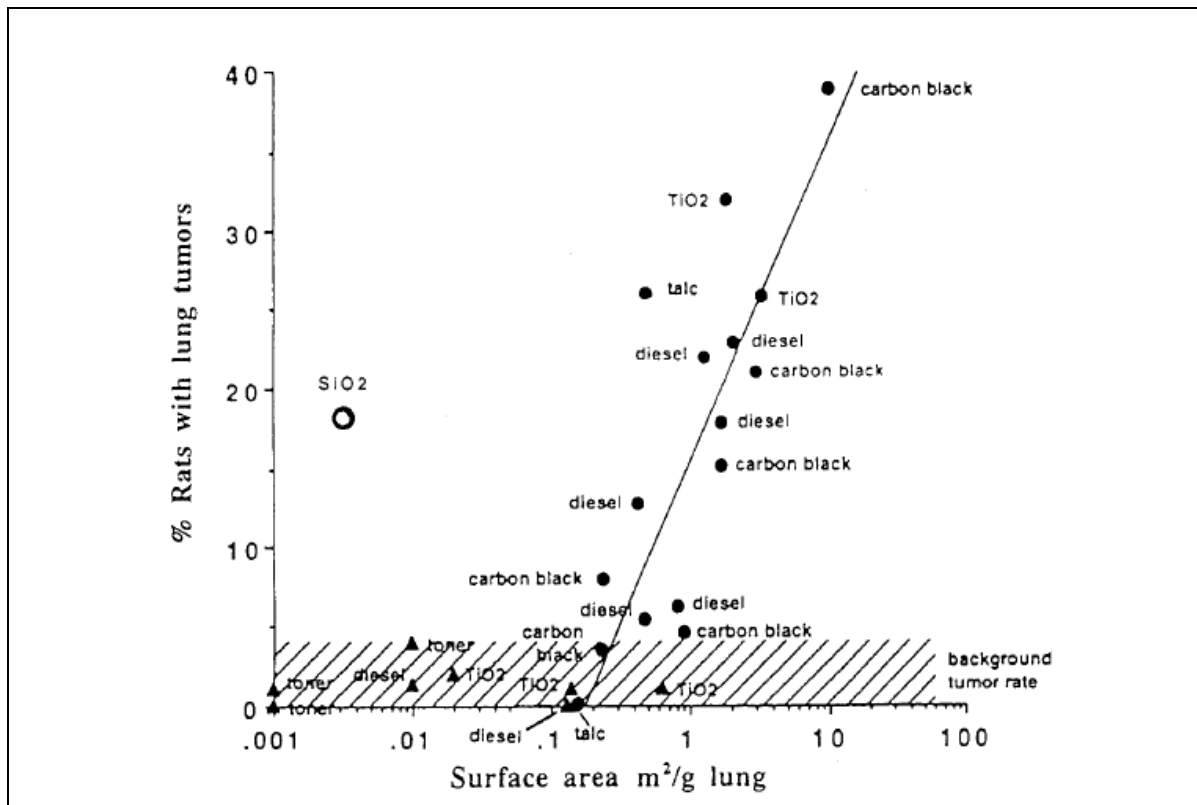


図 3 は長期吸入ばく露試験における肺腫瘍の発生率と難溶性低毒性化学物質の表面積用量との関連を示している。表面積用量を用いると一定の用量から急に比率が上昇している。低毒性の物質でも過剰投与すると肺腫瘍の発生率が増加することを示している。この過剰投与による肺腫瘍の発生率の増加は、NIOSH、IARC のレポートに報告されている^{5, 62)}。また、この傾向に関しては、肺腫瘍だけでなく、肺の炎症（図 1 と 2 を参照）と表面積用量においても認められる。

図 3 難溶性低毒性化学物質の用量(表面積)と腫瘍発生率⁶²⁾



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泡に細気管支肺腺腫が発現した。また、肺泡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^{s1, s2)}。

- **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^{s3, s4)}。

- **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⁵³⁾(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^{s1, s2)}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)/Cr1BR ラット、雌 B3C3F1/Cr1BR 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/m^3 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-TiO_2 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/m^3 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^{s5)}。

2-3) 肺過負荷に対する見解

- ・ Oberdörster(1997)の見解^{s8)} : 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^{s5)}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^{s3)}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/m^3)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/m^3 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/m^3 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^{s1, s2)}は、従前の NIOSH による TiO_2 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 TiO_2 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/m^3 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/m^3 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⁶²⁾。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^{s7,s8)}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⁶²⁾。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^{s9)}。また、NIOSH の Castranova^{s10)}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^{s11)}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 dosemetric 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（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 ⁵³⁾		
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	

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

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

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

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 ^{s1,s2)}				
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)	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	784.8mg
	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 ^{s3,s4)}		
	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)		ナノ粒子と微粒子 (雌)		ナノ粒子と微粒子 (雄、雌)	
TiO ₂ 表面 積保持量	肺腫瘍発 生率	TiO ₂ 表面積 保持量	肺腫瘍発 生率	TiO ₂ 表面積 保持量	肺腫瘍発 生率
0	1/217	0	1/294	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

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。これにより 1/1000、1/10000 の BMDL を求めた。

	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

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

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

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 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 (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 である。

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 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

雄・雌のデータによる吸入ばく露濃度推定

ナノ粒子	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 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

ヒトの肺重量は、EPA の 1100g を用いた。

MPPD2 モデルのヒトの吸入ばく露の条件

モデル : Yeh/Schum Symmetric model

1 分間の呼吸回数 17.5 回/分、1 回換気量 : 1143 ml

作業時間 8 時間/日、5 回/週、45 年間 (2250 weeks)

比重 3.8、MMAD : 0.8 (GSD 1.8)、48 m²/g

3-3) NIOSH による定量的リスク評価（表面積基準）

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。用いた発がん性試験のデータは、3-2)項と同じである。

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 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。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。

引用文献

- s1) 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.
- s2) 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.
- s3) 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.
 - s4) 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.
 - s5) 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.
 - s6) Oberdörster G (1997) Pulmonary carcinogenicity of inhaled particles and the maximum tolerated dose. *Environmental Health Perspectives* 105, 1347–1355.
 - s7) 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.
 - s8) 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.
 - s9) 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.
 - s10) Castranova V (2000) From coal mine dust to quartz: mechanisms of pulmonary pathogenicity. *Inhalation Toxicology* 3: 7 – 14.
 - s11) 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.