

酸化チタン（ナノ粒子）初期リスク評価書（2013年7月）  
別添 2（有害性評価書）【抜粋】

## 1. 健康影響

(1) 実験動物に対する毒性

## カ 遺伝毒性（変異原性）

## ・試験結果のコメント、評価等

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株、TA102株、TA1535株、TA1537株、）大腸菌（WP2urvA株）を用いて、UV/vis照射またはS9の有無にかかわらず陰性であった<sup>18, 19)</sup>。3報告のうち2報告は、二酸化チタンの中で炎症誘発能が強いP25を用いた試験であった。細菌を用いた試験において二酸化チタンナノ粒子の変異原性は認められなかった<sup>18)19)</sup>。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<sup>18, 19)</sup>。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<sup>18, 19)</sup>。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<sup>18, 19, 61)</sup>。

- ・ *In vivo* の遺伝毒性試験において小核試験は、1報告のみで、P25総量 500 mg/kg を飲水投与した成熟雄マウス末梢赤血球にて陽性が認められた<sup>18, 19)</sup>。
- ・ 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 m<sup>2</sup>/g, Evonik 製) を、P-遺伝子を組み込んだ妊娠 8.5-18.5 日に 600 µg/mL (総投与量: 500 mg/kg) を飲水投与し、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<sup>44)</sup>。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。

試験方法		使用細胞種・動物種	結果
In vitro	復帰突然変異試験	P25ネズミチフス菌 TA98株, TA100株、 TA102 株 <sup>18)19)</sup> UV/vis照射の有無にかかわらず	—
		ultrafine TiO <sub>2</sub> (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) <sup>18)19)</sup>	—

		二酸化チタン(直径 < 40 nm、 Sigma-Aldrich 社製) ネズミチフス菌 TA97株 <sup>18)19)</sup>	—
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) <sup>18)19)</sup>	非UV/vis 照射	(—)
		UV/vis照射	(+)
	ultrafine TiO <sub>2</sub> (uf-C) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) (—S9、+S9) <sup>18)19)</sup>	—	
	8種のナノサイズTiO <sub>2</sub> チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-WBL) <sup>18)19)</sup> UV照射の有無にかかわらず	—	
姉妹染色分体交換試験	TiO <sub>2</sub> (Standard solution, Merck) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) <sup>18)19)</sup>	+	
	TiO <sub>2</sub> (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) <sup>18)19)</sup>	+	
マウスリンフォーマTK試験	P25 マウス・リンパ腫細胞 (L5178Y) <sup>18)19)</sup> 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 <sub>2</sub> 5 nm (アナターゼ型, 平均一 次粒子直径: 5 nm, 比表面積: 114 m <sup>2</sup> /g, Sigma-Aldrich)	—	
	2) TiO <sub>2</sub> 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 <sup>2</sup> /g, Inframat Advanced Materials LLC),	+	
	3) TiO <sub>2</sub> -320 mesh (直径: -325 mesh, 比表面積: 8.9 m <sup>2</sup> /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) <sup>18)19)</sup>	—	

遺伝子突然変異試験 <i>hprt</i> 遺伝子座位	TiO <sub>2</sub> (純度99%, アナターゼ型, サイズ中央値 : 6.57 nm, 比表面積 : 148 m <sup>2</sup> /g, Sigma-Aldrich) ヒトB細胞リンパ芽球様株化細胞 (WIL2-NS) <sup>18)19)</sup>	+	
	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 <sub>2</sub> (アナターゼ型, 結晶サイズ : 170 nm, Kemira) ラット肝上皮細胞 <sup>18)19)</sup>	-
		TiO <sub>2</sub> (Standard solution, Merk) チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) <sup>18)19)</sup>	+
		TiO <sub>2</sub> (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) <sup>18)19)</sup>	+
		二酸化チタン (アナターゼ : 10nm(Hombikat UV100), 20 nm(Millenium PC500) ) ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B) <sup>18)19)</sup> photoactivation (-)	+
		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) <sup>18)19)</sup> 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 <sup>61)</sup>	いずれも +
	酸化的DNA損傷試験	Ultrafine TiO <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich 社製、99%、結晶型未記載) ヒトlymphblastoid 細胞(WIL2-NS) <sup>18)19)</sup>	+
		TiO <sub>2</sub> (ルチルとアナターゼの混合, 不明) ヒト肺上皮細胞(A549) <sup>18)19)</sup>	+

		二酸化チタン(TiO <sub>2</sub> )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] <sup>18)19)</sup>	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) <sup>18)19)</sup> photoactivation (-)	+
In vivo	酸化了的 DNA 損傷試験	P25 0.15-1.2 mg 気管内投与 90 日のラット肺 <sup>18)19)</sup>	-
	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 <sup>18)19)</sup> UV照射にかかわらず	+
	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 <sup>44)</sup>	+

- : 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。

- ・ナノサイズの二酸化チタンばく露による培養マウス脳ミクログリア(BV2)への障害性について in vitro で検討している。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±3.6 m<sup>2</sup>/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 <sup>47)</sup>。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±1.2 mV、生理的緩衝液 HBSS 中で -9.25±0.73 mV であった。脳ミクログリアに対して細胞障害性を示さない濃度の 2.5 から 120 ppm P25 ばく露により、早期 (5 分以内) かつ持続性 (120 分まで) の活性酸素種 (過酸化水素 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、酸素ラジカル O<sup>2•</sup>) の増加が検出された。
- ・二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>、Tioxide Europe 社製)、ナノサイズ粒子の二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>-np、Degussa 社製)を用いて、ヒト肺胞上皮由来細胞(A549)にて酸化ストレスの早期の指標として glutathione(GSH)を検討し、いずれの粒子の場合も glutathione(GSH)が低下したことを示した <sup>48)</sup>。
- ・二酸化チタンナノ粒子 (10-100 μg/mL) で 24 から 72 時間、培養線維芽細胞 (NIH3T3 細胞、ヒト fibroblast HFW 細胞) に加え、活性酸素種産生をもたらした <sup>49)</sup>。

- ・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  $12 \pm 2$  nm、表面積  $210 \text{ m}^2/\text{g}$ 、ゼータ電位  $-24 \text{ mV}$ )が気管支上皮細胞 (16HBE14o-細胞、正常ヒト気管支上皮細胞)に加え、フリーラジカルの産生能を検討し、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<sup>50)</sup>。
- ・二酸化チタンとして P25 粒子を用いて培養細胞である phagocytic cell line (RAW 264.7) にて活性酸素種産生の検討を行い、P25 粒子 ( $0.5 \text{ mg/L}$ )は、非生物的 (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 細胞では活性酸素種を産生しなかった<sup>51)</sup>。
- ・各種の吸入性金属系ナノ粒子(Ag 150 nm, Al 100 nm, Zn 100 nm, Ni 100nm,  $\text{TiO}_2$  30 nm)及びミクロンサイズ粒子( $\text{TiO}_2$   $1 \mu\text{m}$ , Silica  $1\text{-}5 \mu\text{m}$ )をヒト肺胞上皮細胞に、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<sup>52)</sup>。

## キ 発がん性

### 吸入ばく露

- ・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:  $7.2 \text{ mg/m}^3$ , 続く 4 ヶ月間:  $14.8 \text{ mg/m}^3$ , 9 ヶ月から実験終了まで:  $9.4 \text{ mg/m}^3$  (平均:  $10.4 \text{ mg/m}^3$ ) であり、累積ばく露量は  $88.1 \text{ g/m}^3 \times \text{時間}$  (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 13.5 ヶ月間、1 日 18 時間、週 5 日全身吸入ばく露し、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、 $10.4 \text{ mg/m}^3$  であり、累積ばく露量は  $51.5 \text{ g/m}^3 \times \text{時間}$  (13.5 ヶ月)であった。 $\text{TiO}_2$ 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<sup>53)</sup>。
- ・8 週齢の雌雄各 50 匹の SD ラットに  $15.95 \text{ mg/m}^3$  の  $\text{TiO}_2$  粒子、一次粒子径: 99.9%が  $0.5 \mu\text{m}$  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<sup>54)</sup>。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雄の各 1 例の気道に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 例に観察された。生存率および腫瘍発生率に TiO<sub>2</sub> ばく露による影響は認められず、TiO<sub>2</sub> の発がん性を示す所見も示されなかった。

#### 気管内注入

- ・8-9 週齢の雌性 Wistar ラットに TiO<sub>2</sub> 粒子 (P25; 一次粒子径 25nm 以下、比重 3.8 g/mL、比表面積 52 m<sup>2</sup>/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 9.9m<sup>2</sup>/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/rat を 6 回注入し、良性・悪性を含めた肺腫瘍発生率は 52.4%、67.4%、69.6%であった。AL23 に関しても 10mg/rat を 6 回、20mg/rat を 6 回注入し、肺腫瘍発生率は 29.5%、63.6%であった<sup>55)</sup>。
- ・微粒子 (F) TiO<sub>2</sub> (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) TiO<sub>2</sub> (粒子サイズ : 21 nm) 6 mg を週 1 回、5 週間 (計 30mg)、Wistar ラットに気管内注入し、129 週後に腫瘍誘発性を検討した<sup>56)</sup>。F-TiO<sub>2</sub> および UF-TiO<sub>2</sub> 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-TiO<sub>2</sub> 群で 20.9%、UF-TiO<sub>2</sub> 群で 50%であった。F-TiO<sub>2</sub> 群の腫瘍発生率は肺胞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-TiO<sub>2</sub> 群では肺胞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。
- ・雌雄の Syrian golden ハムスターに 3 mg/0.2 mL の TiO<sub>2</sub> 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<sup>57)</sup>。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、TiO<sub>2</sub> ばく露ではすべてのハムスターが死亡した。TiO<sub>2</sub> 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。
- ・雄 Syrian golden ハムスターに TiO<sub>2</sub> 粒子を 0.15 mL の生理食塩水に懸濁して 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。TiO<sub>2</sub> 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。

#### 経口投与/経皮投与・その他の経路等

- ・TiO<sub>2</sub> 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<sup>58)</sup>。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/rat) 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/rat) 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/rat) 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、TiO<sub>2</sub>による腫瘍発現頻度の上昇はみられなかった。

## (2) ヒトへの影響（疫学調査及び事例）

### 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<sup>9-13)</sup>。
- ・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<sup>62)</sup>。
- ・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の可能性がある) (2010)<sup>5)</sup>

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、気管内注入試験で雌ラットに肺腫瘍を有意に発生、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<sup>6)</sup>

EU Annex VI：設定なし<sup>7)</sup>

NTP 12<sup>th</sup>：設定なし<sup>8)</sup>

ACGIH：A4 (ヒト発がん性について分類できない物質) (1996)<sup>14)</sup>

DFG MAK：発がん性区分 3A (inhalable fraction: except for ultrafine particles)<sup>15)</sup>