

酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の
F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入によるがん原性試験結果

日本バイオアッセイ研究センター

1 被験物質

1-1 名称等

名 称： 酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）
別 名（IUPAC）： 二酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）
C A S N o . : 1317-70-0

1-2 化学式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： 3.9～4.3 g/cm^3
溶 解 性： 水に不溶

1-3 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 m^2/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ばく露や
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



1-4 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。

1-5 被験物質の主な用途（文献 2、3）

光触媒、工業用触媒担体塗料

1-6 許容濃度等（文献 1、2、4、5）

日本産業衛生学会；

許容濃度：0.3 mg/m³（二酸化チタンナノ粒子として）

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

米国産業衛生専門家会議（ACGIH）；

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

発がん分類：A4（ヒトに対する発がん物質としては分類できない）

国立労働安全衛生研究所（NIOSH）；

Recommended Exposure Limit (REL)：0.3 mg/m³

（一次粒子径が 100 nm の粒子として）

国際がん研究機関（IARC）；

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

1-7 遺伝毒性

多くの遺伝毒性試験が行われており、陽性、陰性の両方の結果が報告されている。そのなかでネズミチフス菌（TA97 株、TA98 株、TA100 株、TA102 株、TA1535 株、TA1537 株）、大腸菌（WP2urvA 株）を用いた Ames 試験では、UV 照射または S9 の有無にかかわらず陰性であった（文献 6、7、8）。チャニーズ・ハムスター肺線維芽細胞やチャニーズ・ハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験では陽性と陰性の結果であったが、UV 照射により陽性（照射なしでは陰性）となった（文献 6、7）。また、培養細胞を用いた小核試験でも陰性と陽性の報告（文献 9、10）がある。酸化チタンナノ粒子（アナターゼ型 75% + ルチル型 25%、一次粒子径 21nm）をマウス雄に総投与量 50、100、250、500mg/kg となるように 5 日間飲水投与を実施し、末梢血を用いたコメットアッセイを行った結果、500 mg/kg で DNA 損傷の上昇がみられ、肝臓では 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine レベルの上昇が認められた。骨髄細胞を用いたリン酸化ヒストンタンパク質（ γ -H2AX）アッセイでは、 γ -H2AX 陽性細胞の上昇が 50 mg/kg 以上の投与群で認められ、末梢赤血球を用いた小核試験で 500mg/kg で小核を有する細胞の頻度上昇が認められた（文献 11）。

以上のように、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験の複数の試験で陽性の結果を示していることから、酸化チタンナノ粒子は遺伝毒性を有すると考えられる。ナノ酸化チタンは過酸化水素、ヒドロキシラジカルを産生するとされ、フリーラジカルによる様々な反応の結果、最終的に遺伝毒性を惹起する可能性は考えられるが、ただし、遺伝毒性試験において酸化チタンは、核内ではなく細胞質に局在すること、フリーラジカルは細胞質内のミトコンドリアの障害においても産生されることから、酸化チタンナノ粒子に認められる遺伝毒性は間接的な反応の可能性が高い（文献 12、13）。

2 目的

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

3 方法

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

4 投与濃度設定理由

13 週間試験（試験番号 0863）の結果をもとに決定した。0（対照群）、6.3、12.5、25 及び 50 mg/m³ の濃度で、雌雄ラットに 13 週間試験ばく露した結果、動物に死亡はみられず、体重増加の抑制も認められなかった。しかし、濃度依存的に 6.3 mg/m³ 群から肺の肺胞上皮過形成が認められ、酸化チタンの肺沈着量も増加した。50 mg/m³ 群ではマクロファージの崩壊も認められた。過形成性病変は腫瘍発生への関与、マクロファージの崩壊はクリアランス阻害が疑われる所見であることから、これらの所見と肺沈着量(mg/肺 1g)をもとにがん原性試験の投与濃度を設定した。13 週間試験での肺の沈着量は、雄では、50 mg/m³ 群：18.4mg、25 mg/m³ 群：6.4mg、12.5 mg/m³ 群：3.5mg、6.3mg/m³ 群：2.2mg であり、雌は、50 mg/m³ 群：21.3mg、25 mg/m³ 群：8.7mg、12.5 mg/m³ 群：3.5mg、6.3mg/m³ 群：1.3mg であった。50 mg/m³ 群では、中等度の過形成が雌雄全例、マクロファージの崩壊が雌雄各 9 例に認められ、肺沈着量は雌雄平均で 19.9mg であった。25 mg/m³ 群では、軽度の過形成が雄 5 例、雌 9 例に認められた。肺沈着量は雌雄平均で 7.6mg であったが、マクロファージの崩壊は認められなかった。この結果から、がん原性試験の最高濃度は、2 年間の投与終了時の肺沈着量として 20 mg を超えない量が望ましいと考えた。がん原性試験（104 週間）では投与期間が 13 週間試験の 8 倍となることから、13 週間試験の雌雄平均肺沈着量を 8 倍してがん原性試験の推定肺沈着量を求めた。各ばく露濃度における推定肺沈着量は、50 mg/m³：158.8mg、25 mg/m³：60.4mg、12.5 mg/m³：27.2mg、6.3mg/m³：14.0mg と計算された。これらのデータから肺沈着量が 20 mg となるばく露濃度は 8.5 mg/m³ と求められた。前述したように肺沈着量は 20 mg を超えない濃度が望ましいことから、がん原性試験の最高濃度は、8 mg/m³（予測肺沈着量：18.9mg）を選択した。一方、最低濃度については、13 週間試験の最低濃度である 6.3 mg/m³ 群では、酸化チタンの肺沈着量は、雄で 2.2 mg、雌で 1.3 mg、雌雄平均で 1.75mg と求められた。13 週間試験にお

ける同群の病理組織学的検査によると、雌の小数列に肺胞上皮の過形成が認められたが、雄に所見は観察されなかった。がん原性試験終了時の肺沈着量が 1.75mg となる投与濃度は、0.74 mg/m³と推計されるが、この投与濃度で 2 年間の吸入投与を行った場合であっても、僅かな毒性は観察されないと考え、2 年間の最低投与濃度は、これに近い濃度が妥当と考えた。

以上のことから、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも最高濃度を 8 mg/m³とし、以下、2 mg/m³、0.5 mg/m³（公比 4）と決定した。

5 結果

がん原性試験群では、雌雄のばく露群でばく露期間の初期に体重増加の抑制（図 1）がみられ、雌雄の 0.5 mg/m³群及び 2 mg/m³群では、ばく露期間の多くの週で体重の低値が認められた。しかし、この低値は、酸化チタンのばく露によるものとは考えなかった。摂餌量でも体重同様、雌雄の 0.5 mg/m³群及び雌の 2 mg/m³群では、低値の週が多くみられたが、これも酸化チタンのばく露によるものとは考えなかった。尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査では、ばく露の影響は認められなかった。8 mg/m³群の雌雄で肺の実重量と体重比の高値がみられ、肺重量の増加が認められた。

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

病理組織学的検査及び肺沈着測定結果

—がん原性試験群 雌雄—

① 腫瘍性病変（表 1、2）

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

② 非腫瘍性病変（表 3、4）

<肺>

雌雄の肺に粒子誘発による肺胞上皮過形成及び肺胞壁の線維症（線維化）が認められた。解剖時の肉眼的観察では、がん原性試験群及びサテライト群の雌雄の 0.5 mg/m³群以上で肺の白色斑が全葉に散在性にみられた。病理組織学的観察では、酸化チタン貪食マクロファージ、コレステリン肉

芽腫や各種炎症細胞浸潤及び肺胞構造の破壊がみられ、ばく露濃度に対応した病変の強度の増強が認められた。8 mg/m³ 群では病巣において、過形成と線維化の癒合が顕著であった。

③ 肺沈着量

雌雄ともばく露濃度に対応して沈着量は増加し、また、各ばく露群に共通して雄が雌より多かった。0.5 mg/m³ 群と 2 mg/m³ 群の肺沈着量の比は、公比の 4 に近い、4.6 (雄)、5.7 (雌) であったが、2 mg/m³ 群と 8 mg/m³ 群の肺沈着量の比は、9.2 (雄)、8.9 (雌) であった。これらの結果から、最高濃度の 8 mg/m³ 群は、雌雄とも他の群から推定される量の約 2 倍、酸化チタンが沈着した。また、がん原性試験群 (104 週ばく露) の 2 mg/m³ 群の雌及び 8 mg/m³ 群の雌雄では、サテライト群の 52 週間ばく露翌日群の沈着量から推定される量より多くの酸化チタンが認められたことから、これらにはクリアランスの遅延が生じた可能性が考えられた

—サテライト群 雌雄 (52 週間ばく露翌日群、26 週回復群、52 週回復群) —

① 腫瘍性病変

雌雄に腫瘍性病変は認められなかった。

② 非腫瘍性病変

肺胞上皮の過形成が全ばく露群の 52 週間ばく露翌日群でみられた。この所見は最低ばく露群の 0.5 mg/m³ 群でも回復期間中に消失せず観察され、また、新たに肺胞壁の線維化が 8 mg/m³ 群の 52 週間回復群の雌雄で認められた。腫瘍関連病変は時間経過に伴い進展することが示唆された。

③ 肺沈着量

雌雄とも 52 週間ばく露翌日群の肺沈着量は、ばく露濃度に対応して増加した。26 週回復群の沈着量は、52 週間ばく露翌日群に比べて各群とも減衰した。しかし、52 週回復群では、26 週回復群と差は認められなかった。回復期間の 26 週までに排泄されず肺内に存在した酸化チタンは、これ以降はほとんど排出されないことが明らかとなった。

6 まとめ

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

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

表1 がん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雄)

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

表2 がん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雌)

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

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

*：p ≤ 0.05 で有意

**：p ≤ 0.01 で有意

(Fisher 検定)

↑：p ≤ 0.05 で有意増加

↑↑：p ≤ 0.01 で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓：p ≤ 0.05 で有意減少

↓↓：p ≤ 0.01 で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

a：有効動物数 n=49

表 3 がん原性試験における主な肺非腫瘍性病変発生 (ラット 雄)

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

表 4 がん原性試験における主な肺非腫瘍性病変発生 (ラット 雌)

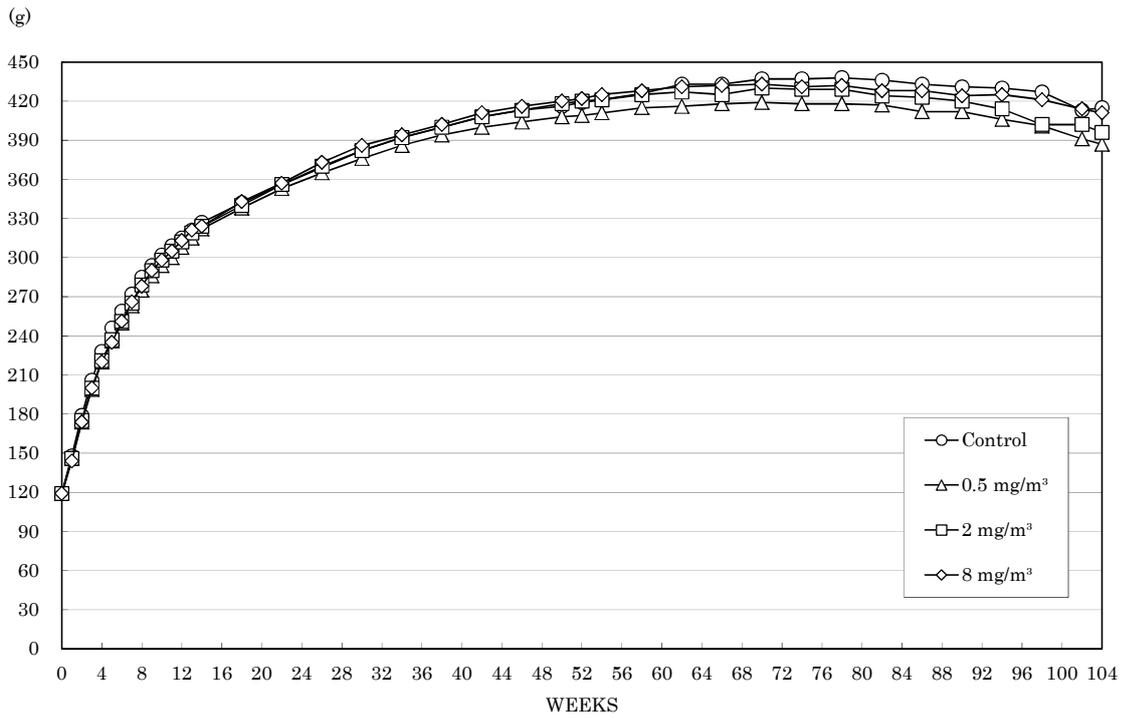
投与濃度 (mg/m ³)		0	0.5	2	8
所見名	グレード	50	50	50	50
細気管支肺胞上皮過形成	1+	1	0	1	2
	2+	0	1	2	0
	Total	1	1	3	2
肺胞上皮過形成、粒子誘発	1+	0	42	37	0
	2+	0	0	10	50
	Total	0	42 **	47 **	50 **
線維症、肺胞壁	1+	0	1	2	11
	2+	0	0	2	37
	Total	0	1	4	48 **

*: $p \leq 0.05$ で有意 **: $p \leq 0.01$ で有意 (Fisher 検定)

1+: 軽度

2+: 中等度

(ラット 雄)



(ラット 雌)

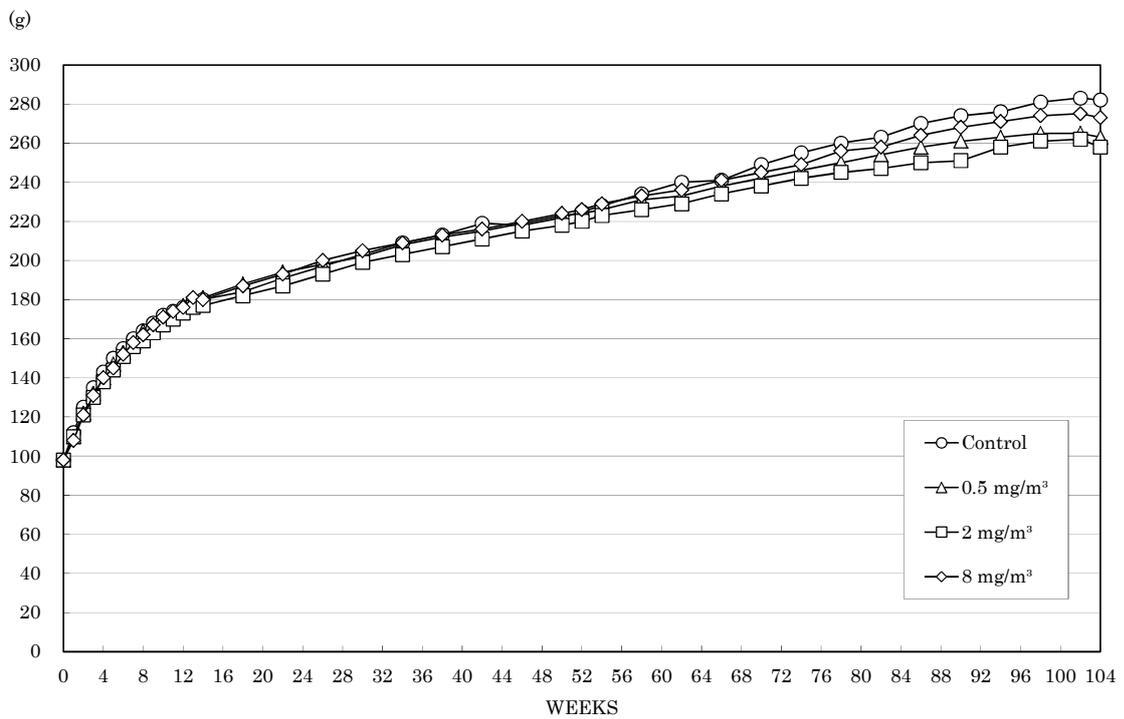


図1 酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）のがん性試験における体重推移

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) Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K, Tanaka N. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat Res.* 1997, 27; 394(1-3): 125-32.
doi: 10.1016/s1383-5718(97)00126-5.
- 7) Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EC, Reed KL, Sayes CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett.* 2007, 10; 171(3): 99-110.
doi: 10.1016/j.toxlet.2007.04.008. Epub 2007 Apr 27.
- 8) Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers.
Mutat Res. 2009, 681(2-3): 241-58. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.10.002.
- 9) Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology.* 2005, 15; 213(1-2): 66-73. doi: 10.1016/j.tox.2005.05.007.
- 10) Wang JJ, Sanderson B, Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res.* 2007, 2; 628(2): 99-106.
doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.12.003. Epub 2006 Dec 15.

- 11) Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 2009, 15; 69(22): 8784-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2496. Epub 2009 Nov 3.
- 12) Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RPF, Hoffmann E, Dopp E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol.* 2009, 21; 6:17. doi: 10.1186/1743-8977-6-17.
- 13) Uchino T, Tokunaga H, Ando M, Utsumi H. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment. *Toxicol In Vitro.* 2002, 16(5): 629-35. doi: 10.1016/s0887-2333(02)00041-3.