

104 週間) が行われ、17 日間 (用量設定) 試験において 150 mg/kg bw/day の雄マウスに腹臥位および振戦がみられたことから、一連の試験で最も低い NOAEL は 75 mg/kg bw/day とされた。104 週間試験において、最低用量 112 mg/kg bw/day 以上で雌雄マウスに運動失調、横臥位、振戦がみられ、最も低い LOAEL は 112 mg/kg bw/day とされた。13 週間試験において、雄ラットで高値が認められた副腎重量に、雄マウスでは低値がみとめられた。副腎と肝臓の重量変化は 104 週間試験やその他の試験でも認められなかったため、それらの意義は不明とされた。

雌雄ラットに 3,000 mg/L の濃度まで飲水投与した二世世代生殖毒性試験 (OECD TG 416) では、上述した急性中枢神経系影響や副腎と肝臓の重量変化は認められなかった。3,000 mg/L で各世代の雌雄に体重の低値が認められたが、同用量で認められた飲水量の減少による影響とされた。最高用量でも毒性影響は認められず、反復投与毒性の NOAEL は雌雄ともに 3,000 mg/L (雄: 233* mg/kg bw/day、交配前・妊娠期の雌: 304 mg/kg bw/day、授乳期の雌: 660 mg/kg bw/day、それぞれ F0 と F1 の平均値) とされた。また、甲状腺に関する詳細な評価が付加的に行われ、3,000 mg/L まで甲状腺への影響は認められなかった。生殖発生に関する項目についても各世代ともに 3,000 mg/L まで影響は認められず、生殖毒性の NOAEL は雌雄ともに 3,000 mg/L (雄: 233* mg/kg bw/day、交配前・妊娠期の雌: 304 mg/kg bw/day、授乳期の雌: 660 mg/kg bw/day、それぞれ F0 と F1 の平均値)、また、F1 への投与における 発生毒性の NOAEL は雌雄ともに 3,000 mg/L (雄: 245 mg/kg bw/day、雌: 295 mg/kg bw/day) とされた。(※初期評価文書の Dossier では 223 mg/kg bw/day となっている。)

妊娠 6-19 日の雌ラットに 0、40、80 または 250 mg/kg bw/day を強制経口投与した出生前発生毒性試験 (OECD TG 414) では、250 mg/kg bw/day で母動物の体重増加量の減少が認められ、母体毒性の NOAEL は 80 mg/kg bw/day、発生毒性の NOAEL は最高用量の 250 mg/kg bw/day とされた。催奇形性は認められなかった。

妊娠 6-15 日の雌ラットに 0、125、250 または 500 mg/kg bw/day を強制経口投与した出生前発生毒性試験 (OECD TG 414 準拠) では、胎児や胚吸収に関して投与の影響は認められず、また、催奇形性も認められなかった。母体毒性と発生毒性の NOAEL は最高用量の 500 mg/kg bw/day とされた。

ヒトの創傷皮膚への高濃度曝露による症例報告や主に 1950 年代に行われた動物試験の結果から、本物質の経皮または経口投与が甲状腺に影響を及ぼすことが示唆されたが、職業曝露者の調査を含むその他の多くの試験では甲状腺への影響は認められなかった。上述した二世世代生殖毒性試験 (OECD TG 416) でも、3,000 mg/L (雄: 233* mg/kg bw/day、交配前・妊娠期の雌: 304 mg/kg bw/day、それぞれ F0 と F1 の平均値) まで甲状腺に影響は認められなかった。

細菌を用いる復帰突然変異試験が複数行われ、ほぼ全ての結果が陰性であった。一方、本物質は哺乳動物の培養細胞に染色体異常 (破損や小核) を引き起こした。姉妹染色分体交換 (SCE) は、*in vitro* では 7 試験中 5 試験で認められず、また、*in vivo* では 3 試験の全てにおいて認められなかった。ラットの肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験は陰性であった。マウスリンフォーマ試験の結果は S9mix 非存在下で陽性であったが、観察されたコロニーが小さいため、遺伝子の変異ではなく染色体異常に関係があると考えられた。*In vitro* 小核試験では S9mix 存在/非存在下で陽性であった。シリアン・ハムスター胚細胞を用いた形質転換試験は陰性であった。*In vivo* 小核試験の結果は、数種の試験で陰性、1 試験で陽性であった。その他の信頼性の低い試験の結果を考え合わせると、本物質は *in vitro* では染色体異常を引き起こす可能性があるが、*in vivo* での遺伝毒性はない。

2 年間、ラットとマウスに本物質を強制経口投与 (週 5 日) した試験において、発ガン性は認められなかった。

4) 結論と勧告

本物質は健康に対して有害性 (感作性) を示すが、現況においては十分なリスク管理がなされているので、健康影響について LP と勧告された。環境に対しても有害性 (魚類・ミジンコ・藻類への急性毒性: 1~100 mg/L) を示すが、ミジンコへの慢性毒性は 21 日間試験において最高濃度でも認められず、また、本物質は容易に生分解し、魚類における生物濃縮性の計算値は低いと推定される。これより本物質は、現況においては環境影響について LP と勧告された。

(3) N-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド

英名 N-Cyclohexyl-2-benzothiazolsulfenamide (95-33-0) (日本政府、ドイツ政府、原案: EU の評価文書)

本物質 (CBS) の主な加水分解物はメルカプトベンゾチアゾール (MBT) (149-30-4)、および、シクロヘキシルアミン (CHA) (108-91-8) である。これらの加水分解物による試験結果も本物質の評価に利用された。

1) 曝露状況

本物質は加硫促進剤としてゴム製品の製造に使用される。本物質には吸入や皮膚接触による職業曝露の可能性がある。消費者製品において本物質の使用実績が認められないので、消費者曝露の可能性は低いと考えられた。

2) 環境影響

媒体別分配割合の予測の結果、本物質が大気・土壌・水圏に放出された場合は主に土壌 (71.1%) と底質 (18.9%) に分布し、その他、水圏 (9.7%) にも分布する。本物質は容易に生分解されず、また、魚類への生物濃縮性も高いと推定される (BCF: 1,248 または 3,094 [ともに計算値])。

水生生物に対する急性毒性について、魚類の LC₅₀ は 2.1 mg/L (96 時間、流水、OECD TG 203)、ミジンコの EC₅₀ は 0.79 mg/L (48 時間、半止水、遊泳阻害、OECD TG 202)、藻類の EC₅₀ は 0.15 mg/L 以上 (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。慢性毒性については、ミジンコの NOEC は 0.058 mg/L (21 日間、繁殖阻害: OECD TG 202)、藻類の NOEC は 0.0084 mg/L (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。本物質の試験濃度は水への溶解度 (0.32 mg/L) より全般的に高いので、止水条件で認められた影響の一部は分解生成物によって引き起こされた可能性がある。

3) 健康影響

ラットに本物質を経口投与したところ、速やかに吸収・代謝された。MBT と CHA への加水分解が *in vitro* でみられたことから、吸収前に胃腸管内でも同様の加水分解が起こる可能性があると考えられた。経口または吸入による吸収率は 100% と考えられた。物理化学的・動態力学的情報から経皮吸収率は 10% とされた。

ラットとマウスの単回経口投与での LD₅₀ は 5,000 mg/kg bw 以上であった。ウサギの経皮での LD₅₀ は 7,940 mg/kg bw 以上であった。

本物質は腐食性物質ではない。本物質を含む市販製品についてヒトにおけるパッチテストを行ったところ皮膚刺激性を示すケースは少ないが、ウサギの皮膚および眼に対しては軽微な刺激性が認められた (OECD TG 404, TG 405)。雌雄ラットに 0, 4.3, 14.4, または 48 mg/m³ を 6 時間・週 5 日吸入曝露させた 28 日間反復吸入毒性試験では、曝露直後に中程度の炎症が

鼻で散発的に認められたが、それらは 24 時間以内に回復した。本物質はモルモット (Buehler 法) では皮膚感作性を示さないが、ヒトへのパッチテストで明らかな感作性が認められ、疫学データからも皮膚感作性の可能性が示された。

上述の 28 日間反復吸入毒性試験において、最高濃度でも全身性の毒性影響は認められず、無毒性濃度 (NOAEC) は 48 mg/m³ とされた。

ラットに 0、25、80、250 または 800 mg/kg bw/day の本物質を強制経口投与した 28 日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 407) において、250 mg/kg bw/day 以上で雌雄に血液凝固障害、雄に腎臓の近位尿細管上皮における硝子滴の増加が認められ、反復投与毒性の NOAEL は雌雄ともに 80 mg/kg bw/day とされた。

雌雄ウサギに 0、125、500 または 2,000 mg/kg bw/day の本物質を 1 日 6 時間経皮投与した 21 日間反復経皮投与毒性試験 (OECD TG 410) において、最高用量でも本物質による毒性影響は認められず、反復投与毒性の NOAEL は雌雄ともに 2,000 mg/kg bw/day とされた。

細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ試験の結果は陰性であった。染色体異常試験では弱い陽性が認められたが、本物質の加水分解物である MBT と CHA の遺伝毒性試験は全て陰性であることから、本物質には遺伝毒性はないとされた。

マウスに約 18 ヶ月間、95.3 mg/kg bw/day (TWA) の本物質を経口投与した試験において発ガン性は認められなかった。さらに、ラットやマウスに MBT または CHA を経口投与した種々の長期試験でも発ガン性は認められず、MBT については雌雄マウス・雄ラットで 750 mg/kg bw/day、雌ラットでは 350 mg/kg bw/day、CHA については雌雄ラットで 440 mg/kg bw/day まで、雌雄マウスでは 500 mg/kg bw/day まで、発ガン性は認められなかった。

ラットに MBT を混餌投与した二世世代試験において、8,750 ppm (700 mg/kg bw/day) 以上で肝臓と腎臓の組織への毒性影響が認められたが、最高用量 (15,000 ppm (1,200 mg/kg bw/day)) でも生殖への有害影響は認められなかった。その他、8,750 ppm 以上で食物摂取の開始に伴い児体重が減少したが、嗜好性の低下により摂餌量が低下したためとされた。

ラットに CHA を反復経口投与した複数の毒性試験 (投与期間: 3 ヶ月~2 年) では、概ね 200 mg/kg bw/day 以上で精細管萎縮や精子形成の低下が認められた。3 ヶ月間毒性試験の NOAEL は 100 mg/kg bw/day (CBS 換算では 276 mg/kg bw/day 相当)、2 年間毒性試験の NOAEL は 82 mg/kg bw/day (CBS 換算では 218 mg/kg bw/day 相当) であった。

妊娠 0-20 日の雌ラットに 0、0.001、0.01、0.1、または 0.5% (0、0.7、7.1、69.6、288.8 mg/kg bw/day 相当) の本物質を混餌投与した発生毒性試験では、69.6 mg/kg bw/day 以上で母体重増加量の低下、288.8 mg/kg bw/day で摂餌量の減少が認められ、母毒性の NOAEL は 7.1 mg/kg bw/day とされた。 また、288.8 mg/kg bw/day で雌雄胎児体重および胎盤重量の低値が認められ、発生毒性の NOAEL は 69.6 mg/kg bw/day とされた。 妊娠 6-15 日の雌ラットに 0、100、300、500 または 900 mg/kg bw/day の本物質を強制経口投与した出生前発生毒性試験 (OECD TG 414 準拠) では (900 mg/kg bw/day 投与は著しい毒性から試験を中断)、300 mg/kg bw/day 以上で母体重増加量の低値、500 mg/kg bw/day で胎児重量の低値が認められた。妊娠 6-15 日の雌ラットに 0、50、150、450 mg/kg bw/day の本物質を強制経口投与した発生毒性試験では、450 mg/kg bw/day で母体重増加量および胎児重量の低値等が認められた。これらの試験で認められた胎児重量の低値は母体重増加量が 15-30% 減少した場合に観察され、本物質投与による特異的な胎児毒性や催奇形性は認められなかった。

4) 結論と勧告

本物質は健康に対して有害性 (感作性、反復投与毒性) を示すが、現況においては十分なリスク管理がなされているので、健康影響について LP と勧告された。環境に対しては有害性 (ミジンコ・藻類への急性毒性: 1 mg/L 以下) を示すことから、環境影響については FW

と勧告され、曝露量に関する調査が要請され、底質への曝露が著しい場合には底生生物に対する毒性評価を行うことが推奨された。

参考文献：

1. 江馬 眞 (2006) : OECD の高生産量化学物質安全性点検プログラムとその実施手順. 化学生物総合管理, 2, 83-103.
2. 高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2004) : OECD 化学物質対策の動向 (第 5 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 122, 37-42.
3. 高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2005a) : OECD 化学物質対策の動向 (第 6 報). 化学生物総合管理, 1, 46-55.
4. 高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2005b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 7 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 123, 46-52.
5. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006a) : OECD 化学物質対策の動向 (第 8 報). 化学生物総合管理, 2, 147-162.
6. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 9 報). 化学生物総合管理, 2, 163-175.
7. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006c) : OECD 化学物質対策の動向 (第 11 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 124, 62-68.
8. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007a) : OECD 化学物質対策の動向 (第 10 報). 化学生物総合管理, 2, 286-301.
9. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 12 報). 化学生物総合管理, 3, 43-55.
10. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007c) : OECD 化学物質対策の動向 (第 13 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 101-106.
11. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2008) : OECD 化学物質対策の動向 (第 14 報). 化学生物総合管理, 4, 225-236.
12. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2009) : OECD 化学物質対策の動向 (第 15 報). 化学生物総合管理, 5, 193-200.
13. 長谷川隆一, 中館正弘, 黒川雄二 (1999a) : OECD 化学物質対策の動向. J. Toxicol. Sci., 24, app. 11-19.
14. 長谷川隆一, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 菅野誠一郎, 福間康之臣, 高月峰夫, 中館正弘, 黒川雄二 (1999b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 2 報). J. Toxicol. Sci., 24, app. 85-92.
15. 長谷川隆一, 小泉睦子, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 菅野誠一郎, 高月峰夫, 黒川雄二 (2000) : OECD 化学物質対策の動向 (第 3 報). J. Toxicol. Sci., 25, app. 83-96.
16. 長谷川隆一, 小泉睦子, 広瀬明彦, 菅原尚司, 黒川雄二 (2001) : OECD 化学物質対策の動向 (第 4 報). J. Toxicol. Sci., 26, app. 35-41.
17. 松本真理子, 田中里依, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2005a) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム : 第 19 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 1, 280-288.
18. 松本真理子, 鈴木理子, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2005b) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム : 第 20 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 1, 445-453.
19. 松本真理子, 高橋美加, 平田睦子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2006a) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム : 第 18 回初期評価会議までの概要. 化学生物総合

化学生物総合管理 第 6 巻第 2 号 (2010.12) 180-188 頁

連絡先 : 〒158-8501 世田谷区上用賀 1-18-1 E-mail: hirose@nihs.go.jp

受付日 : 2010 年 1 月 25 日 受理日 : 2010 年 6 月 27 日

- 管理, 2, 104-134.
20. 松本真理子, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2006b): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 21 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 2, 135-146.
 21. 松本真理子, 日下部哲也, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2007a): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 22 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 2, 302-312.
 22. 松本真理子, 大井恒宏, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2007b): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 23 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 3, 56-65.
 23. 松本真理子, 山本展裕, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2007c): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 24 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 3, 180-189.
 24. 松本真理子, 山本展裕, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2008a): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 25 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 4, 136-143.
 25. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞, 広瀬明彦 (2008b): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 26 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 4, 237-245.
 26. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦 (2009): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 27 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 5, 105-115.
 27. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦 (2009): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 27 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 5, 201-209.

次世代冷媒の候補とされている 2,3,3,3-Tetrafluoroprop-1-ene (HFO-1234yf) の毒性評価

Evaluation for Toxicity of 2,3,3,3-Tetrafluoroprop-1-ene (HFO-1234yf)
Developed as a Refrigerant for Next Generation

江馬 眞¹、納屋聖人¹、吉田喜久雄¹、永翁龍一¹

¹独立行政法人 産業技術総合研究所 安全科学研究部門/〒305-8569 つくば市小野川16-1

Makoto EMA¹, Masato NAYA¹, Kikuo YOSHIDA¹ and Ryuichi NAGAOSA¹

Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology (AIST)/16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

ABSTRACT

This paper summarizes the results of toxicity studies of 2,3,3,3-tetrafluoroprop-1-ene (HFO-1234yf), which has been developed as a refrigerant for the next generation, and the developmental toxicity of hydrofluorocarbons (HFCs), including 1,1,1,2,2-pentafluoroethane (HFC-125), 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFC-134a), 1,1,1-trifluoroethane (HFC-143a), 1,1-difluoroethane (HFC-152a), difluoromethane (HFC-32) and 1,1,1,3,3-pentafluoropropane (HFC-245fa), used as refrigerants, based on data published as openly available information. Only limited information on the toxicity of HFO-1234yf was available. HFO-1234yf did not show specific effects on acute, repeated exposure, cardiac sensitization and reproductive toxicity studies or particularly serious genotoxicity to living species. In developmental toxicity study of HFO-1234yf, pregnant rabbits died at 5,500 ppm and higher. In developmental toxicity studies of HFCs in rabbits, HFC-125 at 50,000 ppm, HFC-134a at 10,000 ppm and higher and HFC-32 at 50,000 ppm were maternally toxic, but not maternally lethal. Although this paper provides initial information on the toxicity of HFO-1234yf, further review of detailed information about the toxicity of HFO-1234yf is needed to adequately clarify its toxicity and assess the risks of this compound. Detailed information on toxicity studies of HFO-1234yf should be disclosed to ensure transparency concerning risk assessment of this compound.

Key words: Refrigerants, Toxicity, Developmental toxicity, 2,3,3,3-Tetrafluoroprop-1-ene (HFO-1234yf), 1,1,1,2,2-Pentafluoroethane (HFC-125), 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (HFC-134a), 1,1,1-Trifluoroethane (HFC-143a), 1,1-Difluoroethane (HFC-152a), Difluoromethane (HFC-32), 1,1,1,3,3-Pentafluoropropane (HFC-245fa)

1. はじめに

1974年にモリーナとローランドが、成層圏に達したフロンが紫外線によって分解されて発生した塩素によるオゾン層破壊の可能性を指摘した (Molina and Rowland, 1974)。その後、冷却剤、消火剤、発泡剤、溶媒やエアゾール噴射剤等に含まれる Chlorofluorocarbons (CFCs)、四塩化炭素、臭化物やハロンのようなオゾン破壊物質によるオゾン破壊が進んでいることが認識されるようになった (Thompson, 2003)。1985年にはウィーン条約が締結され、1987年には「モントリオール議定書」が採択され、その後締約会合を重ね、1992年には5種類 (CFC-11、CFC-12、CFC-113、CFC-114、CFC-115) を含めて、15種類の特定フロン (CFCs) を1996年までに全廃することとされた (環境再生保全機構, 2010)。CFCs に替わって、「塩素を含まないこと、含んでいても分子内に水素を有し、成層圏に達する前に消滅しやすいこと」、「地球温暖化への影響が少ないこと」及び「毒性がないこと」を条件とした代替フロン (Pearson, 2003) として、Hydrochlorofluorocarbons (HCFCs) 及び Hydrofluorocarbons (HFCs) が開発された。しかし、HCFCs は CFCs ほどではないが、オゾン層を破壊する性質を有しており、モントリオール議定書により 2020年までに全廃することとなっている。HFCs は、低オゾン破壊能及び低温暖化効果、HCFCs 及び CFCs と同様な高揮発性、高熱伝導率、低表面張力、低可燃性等を有することから、CFCs 及び HCFCs の代替冷媒として広く使われている (Tsai, 2005)。EU では 2006年6月に欧州F-Gas規制が交付され、乗用車及び軽トラックのエアコンに使用する冷媒は地球温暖化係数 (GWP) が 150 以下であること、また、今後6年間で 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (HFC-134a) の使用を規制することとし、2011年から販売される新車から段階的廃止を開始し、2017年1月から全ての新車への使用を禁止するとしている (日本冷凍空調

学会, 2010)。

現在冷媒として使われている HFCs は速やかに揮発して環境中に放出され、主に二酸化炭素、一酸化炭素、トリフルオロ酢酸、フッ化カルボニル、フッ化水素及びギ酸等に分解される (Franklin, 1993; ECETOC, 1994, 2004ab, 2006ab, 2008; OECD, 2004, 2005, 2006)。これらの分解物質のうちのいくつかは強い腐食性や刺激性を有しており (江馬ら, 2009a)、生殖発生毒性も有している (江馬ら, 2009a; Ema *et al*, 2009a)。また、1,1,1,2,2-Pentafluoroethane (HFC-125), HFC-134a, 1,1,1-Trifluoroethane (HFC-143a), 1,1-Difluoroethane (HFC-152a), Difluoromethane (HFC-32) 及び 1,1,1,3,3-Pentafluoropropane (HFC-245fa) についてはヒトで最も起こりうる曝露経路である吸入曝露による健康影響に関する情報を収集整理してまとめた (江馬ら, 2009b)。これらの HFCs の生殖発生毒性の詳細については別稿 (Ema *et al*, 2009b) を参照されたい。

本稿では、次世代の冷媒として開発された 2,3,3,3-Tetrafluoroprop-1-ene (HFO-1234yf) の毒性について、公開されている資料を収集して、まとめた。その結果、ウサギを用いた発生毒性試験において高濃度の HFO-1234yf 曝露により妊娠ウサギの死亡が認められた (AIHA WEEL Committee, 2008b) ことから、現在冷媒として使われている HFCs の発生毒性と比較検討した。

2. 2,3,3,3-Tetrafluoreprop-1-ene (HFO-1234yf) の毒性

HFO-1234yf は微燃性の気体であり、大気中半減期は約 11日、GWP は 4、オゾン層破壊係数 (ODP) は 0 (Nielsen *et al*, 2007) と報告されている (TABLE 1)。

HF-1234yf の毒性試験が実施されているが、これらの試験報告書を入手することはできず、また、これらの報告書の論文化はされていないので、試験の詳細についての情報は得られなか

TABLE 1. Chemical identification, environmental hazard, exposure limit and annual production volume of HFO-1234yf and HFCs.

Synonym	IUPAC Name	Chemical formula	CAS Registry number	Atmospheric lifetime	ODP ^a	GWP ^b	Exposure limit (ppm)	Annual production	References
HFO-1234yf	2,3,3,3-Tetrafluoroprop-1-ene	CF ₃ CFCH ₂	754-12-1	11 days	0	4	500 ppm ^c	-	Nielsen <i>et al.</i> , 2007; AIHA, 2009
HFC-125	1,1,1,2,2-Pentafluoroethane	CHF ₂ CF ₃	354-33-6	29 years	0	3,400	1,000 ^c	38.5 kt in 2006	OECD, 2005; Tsai, 2005; AFEAS, 2006
HFC-134a	1,1,1,2-Tetrafluoroethane	CH ₂ FCF ₃	811-97-2	13.8 years	0	1,300	1,000 ^{cd}	156.6 kt in 2006	Tsai, 2005; AFEAS, 2006; ECETOC, 2006a
HFC-143a	1,1,1-Trifluoroethane	CF ₃ CH ₃	420-46-2	52 years	0	4,300	1,000 ^c	16.3 kt in 2006	Tsai, 2005; ECETOC, 2006b
HFC-152a	1,1-Difluoroethane	CH ₃ CHF ₂	75-37-6	1.4 years	0	120	1,000 ^c	20.4 kt	ECETOC, 2004a; Tsai, 2005; OECD, 2006
HFC-32	Difluoromethane	CH ₂ F ₂	75-10-5	5 years	0	550	1,000 ^c	15.0 kt	OECD, 2004; Tsai, 2005; ECETOC, 2008
HFC-245fa	1,1,1,3,3-Pentafluoropropane	CHF ₂ CH ₂ CF ₃	460-73-1	7.2 years	0	950	300 ^c	-	ECETOC, 2004b; Tsai, 2005

a: Ozone depletion potential.

b: Global warming potential with 100 year time horizon (relative to GWP of carbon dioxide = 1).

c: American Industrial Hygiene Association (AIHA) Workplace Environmental Exposure Limits (WEEL) based on 8 hour time-weighted average (8 hr-TWA).

d: Maximum workplace concentration (MAK) (DFG, Germany).

った。試験結果として無毒性量 (NOAEL) または無影響量 (NOEL) 等の限定的な情報が製品安全性データシート (Honeywell, 2010) 及び会議用資料 (Minor, 2008; Rinne, 2009) 等に記載されている。

HFO-1234yf の毒性試験結果を TABLE 2 に示した。

ラットを用いた 4 時間の急性吸入曝露試験においては 400,000 ppm でも死亡は認められず、また、2、4 及び 13 週間の反復吸入曝露試験でも NOEL または NOAEL は 50,000 ppm であったと報告されている (Minor, 2008; Rinne, 2009; Honeywell, 2010)。13 週間反復吸入曝露試験におけるゲノミック検査では反応はみられず、発がん性試験を行う必要はないとしている (Minor, 2008; Rinne, 2009)。Schuster *et al.* (2008) はラットを用いた 13 週間反復曝露試験の報告書を引用して、最高濃度 50,000 ppm を 90 日間曝露 (8 時間/日、5 日/週) したときでも HFO-1234yf による臨床生化学的及び病理組織学的な変化は認められなかったと記載し

ている。イヌを用いた吸入曝露による心臓感作性試験では 12% (120,189 ppm) においても感作性は認められなかった (Honeywell, 2010)。

ラットの鼻部吸入曝露による発生毒性試験では、NOAEL は 50,000 ppm であったとしている (Minor, 2008; Rinne, 2009; Honeywell, 2010) が、AIHA WEEL Committee (2008ab) において鼻部吸入曝露のストレスにより発現したと考えられる胎児の骨化遅延が対照群を含む全ての群に観察されたことについて議論されている。ウサギ全身吸入曝露による発生毒性試験では原因不明の妊娠ウサギの死亡が 5,500、7,500 及び 10,000 ppm で観察されたが、2,500 及び 4,000 ppm では曝露の悪影響は認められず (AIHA WEEL Committee, 2008b)、ウサギ発生毒性の LOAEL を 5,500 ppm、NOAEL を 4,000 ppm としている (Minor, 2008; Rinne, 2009; Honeywell, 2010)。これらの結果から、米国産業衛生協会は 8 時間加重平均作業環境曝露限界濃度 (8-hour WEEL-TWA) を 500 ppm に設定している (AIHA WEEL Committee, 2008b;

TABLE 2. Toxicity studies of HFO-1234yf.

Test	Animals/cells	Exposure		Findings	References
		Route	Frequency/length (Concentrations)		
Acute toxicity	Rats	Inhalation	4 hr	No deaths at 400,000 ppm.	Minor, 2008; Rinne, 2009; Honeywell, 2010
Repeated exposure toxicity	Rats	Inhalation	2 weeks	NOEL = 50,000 ppm.	Honeywell, 2010
Repeated exposure toxicity	Rats	Inhalation	4 weeks	NOAEL = 50,000 ppm.	Honeywell, 2010
Repeated exposure toxicity	Rats	Inhalation	13 weeks	NOAEL = 50,000 ppm. (Not active at 50,000 ppm in genomic test)	Minor, 2008; Rinne, 2009; Honeywell, 2010
Cardiac sensitization	Dogs	Inhalation		No effects for exposure up to 12% (120,189 ppm).	Minor, 2008; Rinne, 2009; Honeywell, 2010
Developmental toxicity	Rats	Inhalation (nose only)		NOAEL = 50,000 ppm. Fetal skeletal retardation in all groups.	Minor, 2008; Rinne, 2009; Honeywell, 2010
Developmental toxicity	Rabbits	Inhalation (whole body)		NOAEL/LOAEL = 4,000/5,500 ppm. Deaths of dams at 5,500 ppm and higher.	Minor, 2008; Rinne, 2009; AIHA WEEL Committee, 2008b; Honeywell, 2010
Two-generation reproductive toxicity	Rats	Inhalation	6 hr/day	NOAEL = 5,000 ppm (interim: one-generation segment).	Minor, 2008; Rinne, 2009
<i>In vitro</i> genotoxicity (Ames test)	<i>S. typhimurium</i> (TA1535, TA98, TA100) and <i>E. coli</i> (WP2uvrA)			Positive in TA100 and WP2uvrA at 20% and higher. Negative in TA98, TA100 and TA1535.	Honeywell, 2010
<i>In vitro</i> genotoxicity (Chromosome aberration test)	Human lymphocytes		4 hr	Negative at 760,000 ppm.	Honeywell, 2010
<i>In vivo</i> genotoxicity (Micronucleus test)	Mice	Inhalation	4 hr (up to 200,000 ppm)	Negative	Honeywell, 2010
<i>In vivo</i> genotoxicity (Micronucleus test)	Rats	Inhalation	4 weeks (up to 50,000 ppm)	Negative	Honeywell, 2010
<i>In vivo</i> genotoxicity (Unscheduled DNA synthesis test)	Rats	Inhalation	4 weeks (up to 50,000 ppm)	Negative	Honeywell, 2010

AIHA, 2009)。Schuster *et al.* (2010) はウサギ発生毒性試験の報告書を引用して、妊娠ウサギの瀕死と死亡は体重増加抑制、摂餌量減少、心臓病変及び軽度の尿細管壊死と関連していたが、母体毒性は胚/胎児の外表形態を含む発生に悪影響を及ぼさなかったと記述している。ラットを用いた吸入曝露による2世代繁殖試験については1世代終了時の暫定 NOAEL を 5,000 ppm としている (Minor, 2008; Rinne, 2009)。

ウサギを用いた発生毒性試験の 5,500 ppm 以上で妊娠ウサギの死亡がみられたが、ラットの発生毒性試験及び2世代繁殖試験では母体死

亡についての記述はなく、ラット反復曝露試験では 50,000 ppm でも曝露の影響は認められなかったことから、ウサギは HFO-1234yf に対してラットよりも高い感受性を有していると考えられる。

雄 SDラットに 2,000-50,000 ppm の HFO-1234yf に 6 時間曝露し、曝露ラットの尿を採取して HFO-1234yf の生体内変換を調べたところ、ラットにおける生体内変換率は非常に低く、生成されたエポキシドがグルタチオン抱合により効率的に無毒化されるためにラットでは毒性が弱いと考えられる (Schuster *et al.*, 2008)。一

方、雌 NZW ウサギを 2,000-50,000 ppm の HFO-1234yf に 6 時間曝露し、曝露ウサギの尿を採取して HFO-1234yf の生体内変換を調べたところ、ウサギにおける生体内変換率は依然として低いが、ラットに比べて高いことが HFO-1234yf の毒性発現の種差の要因であると推察されている (Schuster *et al*, 2010)。

遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* の計 5 種類の試験が実施されている。細菌を用いた復帰突然変異試験においては 20% 以上の濃度で *Salmonella typhimurium* TA100 及び *Escherichia coli* WP2uvrA で陽性反応がみられ、*Salmonella typhimurium* TA98、TA100 及び TA1535 では陰性であったと記載されているが、代謝活性化存在下/非存在下等の実験条件については不明である (Honeywell, 2010)。ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では 760,000 ppm で陰性であった (Honeywell, 2010)。*in vivo* の遺伝毒性試験では、マウスに 4 時間 200,000 ppm まで、またはラットに 4 週間 50,000 ppm まで吸入曝露後の小核試験、ラットに 4 週間 50,000 ppm まで吸入曝露後の不定期 DNA 合成試験では陰性であったと報告されている (Honeywell, 2010)。

以上のように、毒性試験の試験方法、試験結果、NOEL/NOAEL 設定の根拠となったエンドポイント等が明らかにされていないので、試験結果の詳細についての解析は不可能である。急性曝露試験、反復曝露試験、心臓感作性試験及び2世代繁殖試験では特段の毒性は記載されていない。*in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験の結果から、HF-1234yf は生体内では遺伝毒性を示さないことが示唆される。ウサギ発生毒性試験では、妊娠ウサギの原因不明の死亡が 5,500 ppm 以上の濃度で認められていることから、HFO-1234yf は毒性発現に何らかの関与をしている可能性が窺われる。以下に、HFO-1234yf の発生毒性試験の結果と比較するために、現在冷媒として使用されている HFCs の発

生毒性試験の結果を示した。

3. 1,1,1,2,2-Pentafluoroethane (HFC-125) の発生毒性

HFC-125 は不燃性の気体であり、主に市販の冷凍及び空調システムの混合成分として、また、消火剤として使用されている (ECETOC, 1994)。2006年の年間生産量は 38.5 kt であり (AFEAS, 2006)、大気中半減期は 29年、ODP は 0、GWP は 3,400、曝露限界は 1,000 ppm と報告されている (OECD, 2005; Tsai, 2005) (TABLE 1)。

HFC-125 の吸入曝露による発生毒性試験結果を TABLE 3 に示した。

CrI:CD (SD) BRラットの妊娠 6-15日に 5,000, 15,000 または 50,000 ppm を 6 時間/日、全身吸入曝露し、胎児への影響を調べた。50,000 ppm 曝露中の母動物に不安定歩行がみられたが、胎児に曝露の影響は認められなかった (ECETOC, 1994; Kawano *et al*, 1995)。

New Zealand White (NZW) ウサギの妊娠 6-18日に 5,000, 15,000 または 50,000 ppm を 6 時間/日、全身吸入曝露し、胎児への影響を調べた。50,000 ppm で妊娠ウサギの体重及び摂餌量の一過性のわずかな低下がみられたが、胎児に曝露の影響は観察されなかった (ECETOC, 1994; Kawano *et al*, 1995)。

以上のように、ラット発生毒性試験では 50,000 ppm で妊娠動物の不安定歩行が観察されたが、胚/胎児への影響は認められず、ウサギ発生毒性試験においても 50,000 ppm で母動物の一過性の体重及び摂餌量のわずかな低下がみられただけであり、胚/胎児に対する影響は認められなかった。いずれの動物種でも催奇形性は認められていない。妊娠ウサギの死亡に関する記述はなかった。

3. 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (HFC-134a) の生殖発生毒性

HFC-134a は無色の不燃性気体であり、単独

TABLE 3. Developmental toxicity studies of inhaled HFC-125 and HFC-134a.

Compounds	Animals	Exposure		Findings	References
		Duration	Concentrations (ppm)		
HFC-125	Crl:CD(SD)BR rats (female)	6 hr/day on GDs 6-15 (whole body exposure)	5,000, 15,000, 50,000	Unsteady gait in dams at 50,000 ppm. No adverse effect on fetuses.	ECETOC, 1994; Kawano <i>et al</i> , 1995
HFC-125	NZW rabbits (female)	6 hr/day on GDs 6-18 (whole body exposure)	5,000, 15,000, 50,000	↓ Maternal body weight gain and food consumption (slight and transient) at 50,000 ppm.	ECETOC, 1994; Kawano <i>et al</i> , 1995
HFC-134a	AHA rats (male and female)	1 hr/day (male: pre- to postmating, female: premating to lactation) (snout-only exposure)	2,500, 10,000, 50,000	↓ Body wt gain of F ₀ males at 50,000 ppm. ↓ Body wt of F ₂ pups on LD 21 at 50,000 ppm.	Alexander and Libretto, 1995; Alexander <i>et al</i> , 1996
HFC-134a	AHA rats (female)	1 hr/day on GDs 17-20 and LDs 1-21 (snout-only exposure)	2,500, 10,000, 50,000	No adverse effects on reproduction or development.	Alexander and Libretto, 1995; Alexander <i>et al</i> , 1996
HFC-134a	Alpk/APfSD Wistar-derived rats (female)	6 hr/day on GDs 6-15	1,000, 10,000, 50,000	Abnormal clinical signs in dams at 1,000 ppm and higher. ↓ Fetal wt at 50,000 ppm. ↓ Fetal ossification at 50,000 ppm.	ECETOC, 2006a
HFC-134a	NZW rabbits (female)	6 hr/day on GDs 7-19 ^a	2,500, 10,000, 40,000	↓ Maternal body wt gain at 10,000 ppm and higher. ↓ Maternal food consumption at 10,000 ppm and higher.	Collins <i>et al</i> , 1995

a: The day of insemination was designated as gestational day (GD) 1.

または他の成分と混合して、HCFC の代替として、また家庭、車及び産業用の冷媒として使われている (ECETOC, 2006a)。HFC-134aはHFCs の内で最も広く使われており (Tsai, 2005)、2006年の年間生産量は 156.6 kt であった (AFEAS, 2006)。HFC-134a の大気中半減期は 13.8年、ODP は 0、GWPは 1,300、曝露限界は 1,000 ppm と記載されている (Tsai, 2005; ECETOC, 2006a) (TABLE 1)。

HFC-134a の吸入曝露による生殖発生毒性試験結果を TABLE 3 に示した。

妊娠前及び妊娠初期曝露試験では、AHA ラットに 2,500、10,000 または 50,000 ppm の鼻部吸入曝露を 1 時間/日、毎日行った。雄ラット (F₀) には交配前 10 週間及び交配期間中を含めて 18週間、雌ラット (F₀) には交配前3週から実験終了まで曝露した。約半数の雌ラットについて妊娠 20日に胎児を検査した。残りの半数は自然分娩させ、児 (F₁) の生後 70日に交配させ、得られた児 (F₂) の性成熟まで飼育した。HFC-134a 曝露に関連する死亡及び一般状態の変化は認められなかった。50,000 ppm

の雄F₀で体重増加抑制がみられたが、その他、親及び児動物に曝露の影響は認められなかった (Alexander and Libretto, 1995; Alexander *et al*, 1996)。

周産期及び授乳期曝露試験では、AHA ラット (F₀) に 2,500、10,000 または 50,000 ppm を 1 時間/日、妊娠 17-20日及び分娩後 1-21日の毎日、鼻部吸入曝露を行った。自然分娩児 (F₁) は生後 84日頃に交配させ、妊娠 20日に胎児 (F₂) を検査した。HFC-134a に関連する死亡及び一般状態の変化は認められなかった。親及び児動物に曝露の影響は認められなかった (Alexander and Libretto, 1995; Alexander *et al*, 1996)。

Alpk/APfSD ラットの妊娠 6-15日に 6 時間/日、1,000、10,000 または 50,000 ppm を吸入曝露したところ、HFC-134a 曝露の母体で一般症状の異常がみられ、50,000 ppm でわずかであるが有意な胎児体重の低値及びわずかな骨化遅延が認められた (ECETOC, 2006a)。これらの所見から、HFC-134a は 50,000 ppm で発生毒性を示すが、催奇形性を示さないことが示唆された。

NZW ウサギの妊娠 7-19日に 2,500、10,000 または 40,000 ppm を 6 時間/日、吸入曝露し、胎児への影響を検討した。10,000 ppm 以上で母動物の体重増加抑制及び摂餌量の低下が観察されたが、胎児に曝露の影響は認められなかった (Collins *et al.*, 1995)。

以上に示したように、ラット発生毒性試験の 50,000 ppm で母体及び発生毒性がみられ、ウサギ発生毒性試験の 10,000 ppm で母体毒性がみられたが、ラット、ウサギとも催奇形性は認められなかった。ラット発生毒性試験の最高投与濃度 (300,000 及び 50,000 ppm) において胎児骨化遅延が観察されている。ウサギ発生毒性試験では妊娠ウサギの死亡に関する記述はなかった。

4. 1,1,1-Trifluoroethane (HFC-143a) の発生毒性

HFC-143a は無色の可燃性の気体で、主に空調及び冷房システムの混合成分として使われており (ECETOC, 2006b)、年間生産量は 2006 年で 16.3 kt であった (AFEAS, 2006)。大気中半減期は 52年、ODPは 0、GWPは 4,300、曝露限界は 1,000 ppm と報告されている (Tsai, 2005; ECETOC, 2006b) (TABLE 1)。

HFC-143a の吸入曝露による発生毒性試験結果を TABLE 4 に示した。

CrI:CDBR ラットの妊娠 6-15日に 6 時間/日、毎日、1,000、10,000 または 50,000 ppm を全身吸入曝露し、胎児への影響を検査したところ、母体及び胎児に曝露に関連した影響はみられなかった (Brock *et al.*, 1996)。

NZW ウサギの妊娠 6-18日の毎日、2,000、10,000 または 40,000 ppm を 6 時間/日、全身吸入曝露し、胎児への影響を調べた (Brock *et al.*, 1996)。HFC-143a 曝露の母体及び胎児に曝露に関連すると考えられる異常はみられなかった。

以上のように、HFC-143a については、発生毒性試験は何れも全身曝露により実施されており、ラットの 50,000 ppm まで、ウサギの

40,000 ppm まで曝露に関連する影響は認められず、催奇形性も観察されなかった。妊娠ウサギの死亡に関する記述はなかった。

5. 1,1-Difluoroethane (HFC-152a) の発生毒性

HFC-152a は無色の可燃性の気体であり、冷媒として、非オゾン層破壊噴霧剤として、また CFC-11 及び CFC-12 の代替物質の発泡剤として使われている (ECETOC, 2004a)。HFC-152a の年間生産量は 20.4 kt と見積もられている (ECETOC, 2004a)。HFC-152a の大気中半減期は 1.4年、ODP は 0、GWP は 120、曝露限界は 1,000 ppm とされている (OECD, 2006) (TABLE 1)。

HFC-152a の吸入曝露による発生毒性試験結果を TABLE 4 に示した。

CD ラットの妊娠 6-15日に 5,000 または 50,000 ppm を 6 時間/日、毎日、全身吸入曝露して胎児に対する影響を検討した。母動物及び胎児に HFC-152a に関連した影響は認められなかった (ECETOC, 2004a; OECD, 2006)。

以上のように、HFC-152a は、ラット発生毒性試験では 50,000 ppm までの曝露による有害影響は観察されていない。ウサギの発生毒性試験は見当たらなかった。

6. Difluoromethane (HFC-32) の発生毒性

HFC-32 は無色無臭の可燃性気体であり、98% 以上が家庭用固定空調システムに、他の HFCs と共に Chlorodifluoromethane (HCFC-22) の代替として使われている (OECD, 2004; ECETOC, 2008)。HFC-32 の年間生産量は 15.0 kt と見積もられている (OECD, 2004)。HFC-32 の大気中半減期は 5 年、ODP は 0、GWP は 550、曝露限界は 1,000 ppm と報告されている (Tsai, 2005; ECETOC, 2008) (TABLE 1)。

HFC-32 の吸入曝露による発生毒性試験結果を TABLE 4 に示した。

TABLE 4. Developmental toxicity studies of inhaled HFC-143a, HFC-152a, HFC-32 and HFC-245fa.

Compounds	Animals	Exposure		Findings	References
		Duration	Concentrations (ppm)		
HFC-143a	CrI:CDBR rats (female)	6 hr/day on GDs 6-15* (whole body exposure)	2,000, 10,000, 40,000	No adverse effect on dams or fetuses.	Brock <i>et al</i> , 1996
HFC-143a	NZW rabbits (female)	6 hr/day on GDs 6-18 (whole body exposure)	2,000, 10,000, 40,000	No adverse effect on dams or fetuses.	Brock <i>et al</i> , 1996
HFC-152a	CD rats (female)	6 hr/day on GDs 6-15* (whole body exposure)	5,000, 50,000	No adverse effect on dams or fetuses.	ECETOC, 2004a; OECD, 2006;
HFC-32	Alpk:APfSD Wistar-derived rats (female)	6 hr/day on GDs 7-16* (whole body exposure)	5,000, 15,000, 50,000	↓ Maternal food consumption at 50,000 ppm. ↑ Minor external/visceral defects in fetuses at 49,800 ppm.	Ellis <i>et al</i> , 1996
HFC-32	NZW rabbits (female)	6 hr/day on GDs 6-18 (whole body exposure)	5,000, 15,000, 50,000	↓ Maternal body wt (transient) at 50,000 ppm. No adverse effect on fetal development.	Ellis <i>et al</i> , 1996
HFC-245fa	CrI:CDBR VAF/Plus rats (female)	6 hr/day on GDs 7-21 (whole body exposure)	500, 2,000, 10,000, 50,000	↓ Maternal body wt at 50,000 ppm. No adverse effect on fetal development.	Rusch <i>et al</i> , 1999
HFC-245fa	CrI:CDBR VAF/Plus rats (female)	6 hr/day on GDs 6-19 (whole body exposure)	500, 2,000, 10,000, 50,000	↓ Maternal body wt and food consumption at 10,000 ppm and higher. ↓ Fetal wt at 50,000 ppm.	Rusch <i>et al</i> , 1999; ECETOC, 2004b

a: The day of copulation (sperm positive vaginal smear) was designated as gestational day (GD) 1.

Alpk:APfSD ラットの妊娠 6-15日に 5,000、15,000 または 50,000 ppm を 6 時間/日、全身吸入曝露したところ、50,000 ppm において、母動物で摂餌量の減少、胎児で尿管のわずかな拡張、斑状肝及び肝の嚢胞等の変異が増加した (Ellis *et al*, 1996)。

NZW ウサギの妊娠 6-18日に 5,000、15,000 または 50,000 ppm を 6 時間/日、毎日、全身吸入曝露した (Ellis *et al*, 1996)。母動物及び胎児に HFC-32 の曝露に関連した影響は認められなかった。

このように、HFC-32 は、ラット発生毒性試験において、50,000 ppm で母体毒性及び発生毒性がみられたが、催奇形性は認められなかった。ウサギ発生毒性試験の 50,000 ppm でも母動物及び胚/胎児に対する影響は認められず、妊娠ウサギの死亡に関する記述はなかった。

7. 1,1,1,3,3-Pentafluoropropane (HFC-245fa) の発生毒性

HFC-245fa は不燃性、揮発性、無色の液体ま

たは室温/正常気圧下で固体であり、CFC-11 の非オゾン層破壊物質の代替として発泡及び冷房システムに、また Dichlorofluoroethane (HCFC-141b) の非オゾン層破壊物質の代替として泡膨張に使われている (ECETOC, 2004b)。HFC-245fa の大気中半減期は 7.2年、ODP は 0、GWP は 950、曝露限界は 300 ppm と報告されている (ECETOC, 2004b; Tsai, 2005) (TABLE 1)。

HFC-245fa の吸入曝露による発生毒性試験結果を TABLE 4 に示した。

CrI:CDBR VAF/Plus ラットの妊娠 7-21日に 500、2,000、10,000 または 50,000 ppm を全身吸入曝露したところ、50,000 ppm で母動物の体重増加に一過性の抑制がみられたが、胎児への影響は認められなかった (Rusch *et al*, 1999)。

CrI:CDBR VAF/Plus ラットの妊娠 6-19日に 500、2,000、10,000 または 50,000 ppm を全身吸入曝露したところ、10,000 ppm 以上で母動物の体重増加抑制及び摂餌量の低下、50,000 ppm で胎児体重低下が観察された (Rusch *et*

al, 1999; ECETOC, 2004b)。

このように、HFC-245fa は、ラット発生毒性試験において、10,000 ppm 以上で母体毒性、50,000 ppm で発生毒性がみられたが、催奇形性を示す所見は得られていない。ウサギの発生毒性試験は見当たらなかった。

8. まとめ

次世代の冷媒として開発された HFO-1234yf に関して公表されている毒性試験情報を収集整理した。また、HFO-1234yf の発生毒性試験の結果を現在冷媒として使われている HFC-125、HFC-134a、HFC-143a、HFC-152a、HFC-32 及び HFC-245fa の発生毒性と比較検討した。

HFO-1234yf の急性曝露試験、反復曝露試験、心臓感作性試験及び2世代繁殖試験では特段の毒性は記載されておらず、また、遺伝毒性試験の結果から生体内では遺伝毒性を示さないと考えられる。ウサギは HFO-1234yf に対してラットよりも高い感受性を有していると考えられる。

HFO-1234yf と化学構造が類似しており、現在冷媒として使われている HFCs の発生毒性について検討したところ、HFC-125、HFC-134a、HFC-143a 及び HFC-32 のウサギを用いた発生毒性試験が報告されていたが、妊娠ウサギの死亡に関する記載は見当たらなかった。しかし、HFC-134a については、ラット発生毒性試験の 50,000 ppm で母体及び発生毒性、ウサギ発生毒性試験の 10,000 ppm で母体毒性がみられたことから、HFO-1234yf と同様に HFC-134a に対してウサギはラットよりも感受性が高いことが窺われた。

Minor (2008)、Rinne (2008)、日本冷凍空調学会 (2010)、Schuster *et al.* (2010) は HFO-1234yf の毒性は低いとしている。しかしながら、現在のところ毒性試験報告書は公表されておらず、毒性試験の詳細な情報は入手できないので、HFO-1234yf の安全性について断定的な結論を下すことはできない。化学物質の安全性

を担保するためには、実験動物を用いた毒性試験による知見を集積し、第三者による透明性のある信頼性の高い毒性評価を行うことが不可欠である。HFO-1234yf の安全性を確認し、またリスク評価を行うためには、毒性試験結果を詳細に検討して信頼性のある毒性評価を行う必要があり、透明性を確保するために毒性試験報告書の公表が望まれる。

9. 謝辞

本研究は、(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 委託研究 [『ノンフロン型省エネ冷凍空調システム開発』の実用的な運転モード及び評価手法ならびに安全基準の構築] により行った。

引用文献

- AFEAS (Alternative Fluorocarbons Environmental Acceptability Study) (2006) AFEAS production, sales, and emission data for 2006. [cited May 19, 2009]; available from <http://www.afeas.org/data.php>.
- AIHA (American Industrial Hygiene Association) (2009) ERPG (Emergency Response Planning Guidelines) and WEEL (Workplace Environmental Exposure Levels) Handbook, AIHA, Fairfax, VA.
- AIHA (American Industrial Hygiene Association) WEEL (Workplace Environmental Exposure Levels) Committee (2008a) WEEL Committee Winter 2008 Meeting Minutes, February 20-22, 2008, Belleview Biltmore Resort. [cited August 4, 2010]; available from http://www.aiha.org/foundations/GuidelineDevelopment/weel/Documents/WEELminutes_Feb08.pdf.
- AIHA (American Industrial Hygiene Association) WEEL (Workplace Environmental Exposure Levels) Committee (2008b) Meeting

- Minutes of WEEL Fall Meeting, October 1-3, 2008. AIHA Headquarters, Fairfax, VA. [cited August 4, 2010]; available from <http://www.aiha.org/foundations/GuidelineDevelopment/weel/Documents/WEELminutesOct08.pdf>.
- Alexander DJ, Libretto SE. (1995) An overview of the toxicology of HFA-123a (1,1,1,2-tetrafluoroethane). *Human Exp Toxicol*, 14,715-720.
- Alexander DJ, Libretto SE, Adams MJ, Hughes EW, Bannerman M. (1996) HFA-134a (1,1,1,2-tetrafluoroethane) : effects of inhalation exposure upon reproductive performance, development and maturation of rats. *Human Exp Toxicol*, 15,508-517.
- Brock WJ, Trochimowicz HJ, Farr CH, Millischer R-J, Rusch GM. (1996) Acute, subchronic, and developmental toxicity and genotoxicity of 1,1,1-trifluoroethane (HFC-143a). *Fundam Appl Toxicol*, 31,200-209.
- Collins MA, Rusch GM, Sato F, Hext PM, Millischer R-J. (1995) 1,1,1,2-Tetrafluoroethane : repeat exposure inhalation toxicity in the rat, developmental toxicity in the rabbit, and genotoxicity in vitro and in vivo. *Fundam Appl Toxicol*, 25,271-280.
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (1994) Pentafluoroethane (HFC-125) (CAS No. 354-33-6), Joint Assessment of Commodity Chemicals No.24. European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (2004a) 1,1-Difluoroethane (HFC-152a) (CAS No. 75-37-6), Joint Assessment of Commodity Chemicals No.45. European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (2004b) 1,1,1,3,3-Pentafluoropropane (HFC-245fa) (CAS No. 460-73-1), Joint Assessment of Commodity Chemicals No.44. European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (2006a) 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (HFC-134a) (CAS No. 811-97-2), Joint Assessment of Commodity Chemicals No.50. European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (2006b) Trifluoroethane (HFC-143a) (CAS No. 420-46-2), Joint Assessment of Commodity Chemicals No.32. European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (2008) Difluoromethane (HFC-32), CAS No. 75-10-5 (Second Edition), Joint Assessment of Commodity Chemicals No.32. European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- Ellis MK, Trebilcock R, Naylor JL, Tseung K, Collins MA, Hext PM, Green T. (1996) The inhalation toxicology, genetic toxicology, and metabolism of difluoromethane in the rat. *Fundam Appl Toxicol*, 31,243-251.
- Ema M, Naya M, Yoshida K, Nagaosa R. (2009a) Reproductive and developmental toxicity of

- degradation products of refrigerants in experimental animals. *Reprod Toxicol*, 29, 1-9.
- Ema M, Naya M, Yoshida K, Nagaosa R. (2009b) Reproductive and developmental toxicity of hydrofluorocarbons used as refrigerants. *Reprod Toxicol*, 29, 125-131.
- Franklin J. (1993) The Atmospheric degradation and impact of 1,1,1,2-tetrahydrofluoroethane (hydrofluorocarbon 134a). *Chemosphere*, 8, 1565-1601.
- Honeywell (2010) Material Safety Data Sheet: 2,3,3,3-tetrafluoroprop-1-ene, HFO-1234yf (revision date 02/18/2010). [cited August 4, 2010]; available from <http://www.1234facts.com/pdf/HFO-1234yf%2002-18-10.pdf>.
- Kawano T, Trochimowics HJ, Malinverno G, Rush GM. (1995) Toxicological evaluation of 1,1,1,2,2-pentafluoroethane (HFC-125). *Fundam Appl Toxicol*, 28,223-231.
- Minor B. (2008) HF-1234yf, low GWP refrigerant for MAC applications. Mobile Air Conditioning Climate Protection Partnership Meeting in Washington, DC. (December, 2008) [cited August 4, 2010]; available from <http://www.epa.gov/cpd/mac/5%20Minor.pdf>.
- Molina ML, Rowland FS. (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature*, 249,810-812.
- Nielsen OJ, Javadi MS, Sulbaek Anderson MP, Hurley MD, Wallington TJ, Singh R. (2007) Atmospheric chemistry of $\text{CF}_3\text{CF}=\text{CH}_2$: kinetics and mechanisms of gas-phase reactions with Cl atoms, OH radicals, and O_3 . *Chem Phys Lett*, 439, 18-22.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2004) Difluoromethane. SIDS Initial Assessment Report for SIAM 18 (Paris, France, April 2004).
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2005) 1,1,1,2,2-Pentafluoroethane. SIDS Initial Assessment Report for SIAM 20 (Paris, France, April 2005).
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2006) 1,1-Difluoroethane. SIDS Initial Assessment Report for SIAM 22 (Paris, France, April 2006).
- Pearson SF. (2003) Refrigerants past, present and future. The International Congress of refrigeration in Washington DC USA. [cited July 22, 2008]; available from : <http://www.iifir.org/en/doc/1055pdf>.
- Rinne F. (2009) HFO-1234yf technology update-part 1. VDA Alternative Refrigerant Winter Meeting 2009, Saalfelden, Austria (February, 2009). [cited August 4, 2010]; available from http://www2.dupont.com/Refrigerants/en_US/assets/downloads/SmartAutoAC/MAC_HFO_1234yf_VDA_022009.pdf.
- Rusch GM, Coombs D, Hardy C. (1999) The acute, genetic, developmental, and inhalation toxicology of 1,1,1,3,3-pentafluoropropane (HFC 245fa). *Toxicol Sci*, 52,289-301.
- Schuster P, Bertermann R, Rusch GM, Jepson GW, Dekant W. (2008) Biotransformation of 2,3,3,3-tetrafluoropropene (HFO-1234yf). *Toxicol Appl Pharmacol*, 244, 247-253.
- Schuster P, Bertermann R, Snow TA, Han X, Rusch GM, Dekant W. (2010) Biotransformation of 2,3,3,3-tetrafluoropropene (HFO-1234yf) in rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol*, 233, 323-332.
- Thompson WM. (2003) Ozone in the earth's atmosphere. [cited October 1, 2008]; available from: <http://www.physics.isu.edu/weather/>

kmdbd/paper.PDF.

Tsai W-T. (2005) An overview of environmental hazards and exposure risk of hydrofluorocarbons (HFCs). Chemosphere, 61,1539-1547.

江馬 眞、納屋聖人、吉田喜久雄、永翁龍一 (2009a) 冷媒の分解物の毒性評価、環境毒性学会誌、12, 1-18.

江馬 眞、納屋聖人、吉田喜久雄、永翁龍一 (2009b) 冷媒として使用されているハイドロフルオロカーボンの毒性評価、環境毒性学会誌、12, 85-105.

独立行政法人 環境再生保全機構 (2010) フロン低減の試み 4. 特定フロンの全廃へ向けて (2010年10月29日引用) ; http://www.erca.go.jp/taiki/siryuu/pdf/W_D_004.pdf.

日本冷凍空調学会 (2010) 最近気になる用語、HFO-1234yf (2010年8月4日引用) ; <http://www.jsrae.or.jp/annai/yougo/187.html>.

(受付：2010年9月30日；受理2010年11月1日)

種々の暴露経路による二酸化チタンの体内分布及び毒性

Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide
after various routes of exposure

江馬 眞¹、小林憲弘¹、納屋聖人¹、花井荘輔¹、中西準子¹

¹独立行政法人 産業技術総合研究所 安全科学研究部門/〒305-8569 つくば市小野川16-1
Makoto EMA¹, Norihiro KOBAYASHI¹, Masato NAYA¹, Sosuke HANAI¹
and Junko NAKANISHI¹

Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology (AIST)/16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

ABSTRACT

This paper reviews studies on tissue distribution and toxicity after various routes of exposure to titanium dioxide (TiO₂), widely used in the production of paints, paper and plastics, as food additives and colorants, and increasingly, as nanoparticles in pharmaceutical and cosmetics products, based on data published in openly available scientific literature. Titanium (Ti) was detected in the lung and mediastinal lymph nodes, but not in the liver, kidney, spleen or basal brain with olfactory bulb, in rats that inhaled nano TiO₂. Accumulation of TiO₂ particles was observed in the brain, especially the olfactory bulb and hippocampus, after intranasal instillation of nano and fine TiO₂ in mice. After dermal application of ultrafine and fine TiO₂ in human volunteers, rabbits and pigs, deposition of Ti was observed in the stratum corneum and hair follicles, but not in the dermis. One report showed the accumulation of Ti in the spleen, heart, liver, lung and brain and histopathological changes in these tissues in mice that received dermal application of nano TiO₂. However, there are serious concerns about this report due to the housing conditions of animals, which might have negatively impacted the experimental results. After oral administration of nano and fine TiO₂ to mice, accumulation of Ti in the liver, kidney, spleen and kidney and histopathological changes in these organs and hippocampus were found. Although this review provides initial information on tissue distribution and toxicity after various routes of exposure to TiO₂, further studies using characterized materials, relevant route of exposure, and dose closely reflecting actual levels of exposure are required.

Key words: Titanium dioxide, Nanomaterials, Tissue distribution, Toxicity, Inhalation, Oral administration, Dermal application, Intranasal instillation, Injection

1. はじめに

二酸化チタン (TiO₂; Titanium dioxide) は鉱物の一種であり、酸化チタン (IV) あるいは単に酸化チタンと呼ばれる。白色の塗料、絵具、釉薬等に顔料として使用され、白チタンとも言われる無機化合物である。結晶構造としてはアナターゼ型とルチル型等があり、アナターゼ型は一般的に光触媒としての活性が強く、ルチル型は触媒としての活性が低く熱安定性等に優れており塗料の顔料として用いられている。最近注目されているナノサイズ(ウルトラファイン)の TiO₂ 粒子は、顔料グレード(ファインあるいはミクロンサイズ)の TiO₂ 粒子と比べて重量当たりの表面積が大きく、光触媒活性が顔料グレードの TiO₂ より強いことから機能性材料として、最近ではビルの外装や空気清浄機等にも使用されている。また、光吸収、散乱性についても特性を有しており、可視光の散乱性が低く透明感をもたらすことから化粧品として、紫外線のうち、特に UV-B を吸収し、UV-A 短波を反射することから日焼け防止剤としても用いられている。2006 年の TiO₂ の国内生産量は約 24 万トン(化学工業日報社、2009)であり、ナノサイズ TiO₂ の国生産要量は 950 トンと推計されている(経済産業省、2009)。最近の報告では、ナノサイズ TiO₂ の世界の生産量は年間 5000-64000 トンであり、米国での生産量は年間 40000 トンと見積もられ、新用途への展開が期待されることから、今後さらに需要が増大することが予測される(Robichaud *et al*, 2009)。

チタン (Ti) の濃度は都市大気で 0.1 μg/m³ より低く、飲水で 0.5-1.5 μg/L、ヒト尿では 10 μg/L であり、ヒトの食事経由の Ti 摂取は 300-400 μg/day と報告されている(IPCS, 1982)。わが国における平成 16 年度における TiO₂ の食品着色料としての摂取量は 0.074 mg/day と推定されている(日本食品添加物協会、2008)。また、ナノ TiO₂ の環境中の予測濃度は大気で 0.0015-0.042 μg/m³、水で 0.7-16 μ

g/L、土壌で 0.4-4.8 μg/kg と見積もられている(Mueller and Nowack, 2008)。

ナノサイズの TiO₂ 粒子の安全性に関して、粒子サイズが小さく重量当たりの表面積が大きいことから生体との相互作用が増加し、顔料グレードの TiO₂ 粒子に比べて反応性が高い可能性等が示唆されている(Donaldson *et al*, 2001; Oberdöster *et al*, 2005)。しかしながら、ナノサイズを含めて TiO₂ の安全性については十分に評価されていない。

ナノTiO₂ 粒子の生態影響に関しては、ENRHES (2009) 及び Kahru and Dubourguier (2010) にまとめられている。

ヒト健康影響については、TiO₂、カーボン・ブラック、ディーゼル排出微粒子等の難溶性粒子の高濃度の暴露により吸引された粒子は長期に残留するため、それらの吸入部位における発がん性が懸念されている。国際がん研究機関(IARC: International Agency for Research on Cancer)は TiO₂ の発がん性について、グループ 3 (ヒトに対する発がん性が分類できない)に分類していたが、2006 年 6 月に IARC 作業グループは、顔料グレード及びウルトラファイン TiO₂ に関する吸入及び気管内注入による動物実験の結果は、動物における TiO₂ の発がん性を示す証拠として十分であると結論し、分類をグループ 2B (ヒトに対する発がん性が疑われる)に変更した(IARC, 2010)。ナノサイズも含めて、TiO₂ の発がん性試験の結果(江馬ら、2010)及び発がん性のスクリーニングとして試験され、ヒトにおける発がん性を予測するために行われている遺伝毒性(江馬ら、2009)、また生殖発生毒性(Ema *et al*, 2010)についてはすでに整理して報告した。化学物質の安全性評価を行う上で化学物質が体内に吸収されるか否か、吸収された場合の化学物質の体内分布を調べることは、化学物質の毒性発現に関して重要な情報をもたらす。そこで、本稿では種々の経路により動物に暴露した TiO₂ の体内分布及

びそのときの毒性についてナノサイズも含めて、公表されている科学論文を収集整理してまとめた。

2. 吸入暴露 (TABLE 1)

脱イオン水に 0.5% に懸濁したナノ TiO₂ (アナターゼ型 70% 及びルチル型 30%、表面無修飾、サイズ: 20-33 nm、BET表面積: 48.6 m²/g) 88 mg/m³ [Heinrich *et al.* (1995) の発がん性試験の陽性反応濃度の 10 倍]、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) 274 mg/m³ [Lee *et al.* (1985) の発がん性試験で重篤な影響濃度] を 7 週齢の雄 Wistar ラット [CrI:WI (Han)] に 5 日間連続 (6 時間/日) 頭部—鼻部吸入暴露を行った (van Revenzwaay *et al.*, 2009)。最終暴露の直後及び 14 日後に 3 匹/群の暴露ラットの肺、縦隔リンパ節、腎臓、脾臓及び脳を採取し、Ti レベルを誘導結合プラズマ原子発光分析 (ICP-AES) により測定した。ナノ及び顔料グレード TiO₂ の最終暴露直後及び 14 日後の

TABLE 1. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide (TiO₂) after inhalation or intranasal instillation.

Exposure method	Animals	Materials/ Characteristics	Exposure		Sampling /autopsy	Findings	References
			Duration /Frequency	Concentrations /doses*			
Inhalation (Head-nose)	Wistar rats (male)	Nano TiO ₂ (70% anatase and 30% rutile, no surface coating, 20-30 nm in size, 48.6 m ² /g in BET surface area)	5 consecutive days (6 h/day)	88 mg/m ³	Immediately after last inhalation and after 14 days recovery	Detection of Ti in lung and mediastinal lymph nodes. No detection of Ti in liver, kidney, spleen or basal brain with olfactory bulb. Mild neutrophilic inflammation and activated macrophages in BALF and/or lung.	van Ravenswaay <i>et al.</i> , 2009
		Pigmentary TiO ₂ (rutile, 200 nm in median particle size, 6 m ² /g in BET surface area, 99.4 % pure, KRONOS International)		274 mg/m ³			
Inhalation	CS7BL/6 BomTac	UV-titan L181 (rutile modified with Zr, Si, Al and coated with polysaccharol, 20.6 nm in average size, 107.7 m ² /g in surface area, Kemira)	Gestational days 8-18 (1 h/day)	43 mg/m ³	5 and 26-27 days after exposure	Detection of Ti in lung of dams. No detection of Ti in liver of dams or liver or stomach milk of offspring. Inflammation in lung of dams. Moderate neurobehavioral alterations in offspring.	Hougaard <i>et al.</i> , 2010
Intranasal instillation	CD-1 (ICR) mice	Nano TiO ₂ (rutile, 21 nm in average size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	Daily 5 instillation and once every other day	Daily 25 µg/mouse + 10 µg/mouse/day (every other day)	One month after instillation	Accumulation of TiO ₂ particles in olfactory nerve layer, olfactory bulb and granular cell layer of olfactory bulb.	Wang <i>et al.</i> , 2007a
		Nano TiO ₂ (rutile, 71 nm in average size, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)					
		Fine TiO ₂ (anatase, 155 nm in average size, Zhonglian Chemical Medicine Co.)					
	CD-1 (ICR) mice (female)	Nano TiO ₂ (rutile, no surface coating, 71 nm in average size, 23 m ² /g in surface area, > 99% pure, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	15 instillations (every other day)	500 µg/mouse/day	24 h after last instillation	Major target sites for Ti: hippocampus and olfactory bulb. Detection of Ti in cerebellum and cerebral cortex. Histopathological changes in hippocampus. Oxidative stress in brain.	Wang <i>et al.</i> , 2008a
	Fine TiO ₂ (anatase, no surface coating, 155 nm in average size, 10 m ² /g in surface area, > 99% pure, Zhonglian Chemical Medicine Co.)				Accumulation of TiO ₂ particles in olfactory nerve layer, olfactory bulb and granular cell layer of olfactory bulb. Wider distribution area of 155 nm TiO ₂ .		
	Nano TiO ₂ (rutile, no surface coating, 71 nm in average size, 23 m ² /g in surface area, > 99% pure, Hangzhou Dayang Nanotechnology Co., Ltd.)	1, 5, 10, 15 instillations (every other day)		One day after 1, 5, 10 and 15 times for instillation	Detection of Ti in olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex and cerebellum at any time point. Histopathological changes in hippocampus, olfactory bulb and kidney.	Wang <i>et al.</i> , 2008b	
	Fine TiO ₂ (anatase, no surface coating, 155 nm in average size, 10 m ² /g in surface area, > 99% pure, Zhonglian Chemical Medicine Co.)	Max. 15 instillations (every other day)			Detection of Ti in olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex and cerebellum at any time point. Histopathological changes in hippocampus, olfactory bulb and kidney. Increased levels of IL-1β and TNF-α.		

*: Doses were expressed as TiO₂ unless otherwise noted.