

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report**

NICKEL SULPHATE

CAS No: 7786-81-4

2009

欧州連合
リスク評価書（2009年最終承認版）
硫酸ニッケル

Nickel Sulphate

CAS No: 7786-81-4

EINECS No: 232-104-9

RISK ASSESSMENT

Final version
May 2009

Chapters 0, 1, 2, 4, 5, 6 & 7 – human health only

Danish Environmental Protection Agency

FINAL APPROVED VERSION

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
2017年6月

本部分訳文書は、nickel sulphate (CAS No: 7786-81-4)に関するEU Risk Assessment Report, (2009)の第4章「ヒトの健康」のうち、第4.1.2項「ヒトの健康への影響についての評価」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、

<https://echa.europa.eu/documents/10162/4eb55951-12de-496c-b741-35aafc8eeeb3>

を参照のこと。

4.1.2 ヒトの健康への影響についての評価

本セクションでは、硫酸ニッケルが健康へ及ぼす影響について、評価・検討を行う。硫酸ニッケルを被験物質として行われた試験について、以下に述べる。EU 規則 793/93 に基づき、現在レビューの対象となっている他のニッケル化合物には、ニッケル金属、塩化ニッケル、硝酸ニッケル、炭酸ニッケルがある。硫酸ニッケル以外のニッケル化合物を被験物質として行われた試験の結果も、硫酸ニッケルによる影響を評価する上で関係してくる可能性がある。他のニッケル化合物を被験物質として行われた試験は、それぞれの化合物のリスク評価報告書か、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化学物質のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』のいずれかに記載されている。他のニッケル化合物で得られた結果は、関係があるとみなした場合には、考察のセクションで述べることもあり、また、硫酸ニッケルに関する最終的な結論に影響する可能性がある。

硫酸ニッケルの情報は、金属業界から豊富に提供されている。その他にも、ニッケルとニッケル化合物に関するデータが、大量に公表されている。これらのデータの多くは、UK HSE(英国健康安全局、1987)、IARC(国際がん研究機関、1990)、IPCS(国際化学物質安全性計画、1991、1996)、US ATSDR(米国環境有害物質・特定疾病対策庁、1995)、Nordic Expert Group(北欧専門家グループ、Aitio, 1995)などの、良質なレビューの中で精査されている。ニッケルが皮膚に及ぼす影響についても、詳しく検討されている(Maibach and Menné, Eds. 1989)。ニッケル生産者環境研究協会(Nickel Producers Environmental Research Association、NiPERA)は、Eurométaux(欧州の非鉄産業界を代表するロビー組織)と共同で、欧州委員会向けに、ニッケルやニッケル化合物の基準策定に係る資料も作成している(NiPERA, 1996)。また、Toxicology Excellence for Risk Assessment(TERA、リスク評価に関する毒性学的先駆機関)は、Metal Finishing Association of Southern California Inc.、米国環境保護庁(US-EPA)およびカナダ保健省(Health Canada)向けに、可溶性ニッケル塩の毒性学的レビューを作成している(TERA, 1999)。

ヒトの健康に対するニッケルの有害性とリスクを確定するのに不可欠なデータの多くは、

すでに十分評価されていると思われるため、本リスク評価報告書では、上述のレビューを広範に利用し、それに加えて一次文献(重要とみなされるもの)を検討した。そのため、本リスク評価報告書で引用した試験が、必ずしもすべてチェックされたわけではなく、試験については、多くの場合、要約形式で記載した。レビューから引用した情報については、「～より引用」として、一次資料を示した。

結果の記載に当たっては、p 値が 0.05 未満で統計的に有意な結果に対してのみ、「有意」という用語を用いた。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝および分布

4.1.2.1.1 吸収

4.1.2.1.1.1 動物試験

4.1.2.1.1.1.1 吸入

硫酸ニッケルで吸入曝露または気管内点滴曝露を行ってニッケルの吸収を検討した試験の情報は、得られていない。しかし、以下に示す 2 件の試験から、硫酸ニッケルの吸収に関連した情報がある程度得られている。

1 件目は吸入試験(Benson *et al.* 1995)で、雄の F344/N ラット(90 匹/群)が、硫酸ニッケル六水和物[エアロゾル、空気動学的質量中央径(MMAD)が 2.0~2.4 μm]に、0、0.12、または 0.5 mg/m^3 (ニッケルとして 0、0.03 または 0.11 mg/m^3 に相当)の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日で最長 6 ヶ月間、全身曝露された。B6C3F1 マウスの群も設けられ、硫酸ニッケル六水和物に 0、0.25、または 1.0 mg/m^3 (ニッケルとして 0、0.06、0.22 mg/m^3 に相当)の濃度で、同様に曝露された。このニッケル曝露が 2 ヶ月に達した時点で、各曝露濃度においてラットおよびマウスの一部でサブグループを構成した。そのサブグループの動物(サブグループ A 動物)には、 $^{63}\text{NiSO}_4$ への 2 時間の鼻部曝露を行い、後から吸入された粒子の肺への沈着および滞留に対してニッケルの反復吸入が及ぼす影響が検討された。サブグループ A の動物は、 ^{63}Ni 標識化したエアロゾルへこのように急性曝露した後、元の吸入チャンバーに戻し、所定の屠殺実施時点(0~30 日の間に 8 回に分けて実施)まで、再び全身曝露を行った。曝露開始から 6 ヶ月の時点で、各硫酸ニッケル濃度群からの被験動物で別のサブグループを構成し、更なる肺のクリアランスを調べるため、これらサブグループの動物(サブグループ C の動物)を $^{63}\text{NiSO}_4$ に吸入曝露した。この放射性標識した粒子への曝露の後、サブグループ C の動物は、サブグループ A の動物と同様に屠殺した。反復吸入曝露による肺へのニ

ニッケル負荷を調べたところ、対照群または曝露群のラットおよびマウスの肺におけるニッケル量は、いずれの屠殺の時点においても、用いた試験法の検出限界(肺におけるニッケルが 1.10~2.48 μg)未満であった。肺の組織病理学検査では、ラット、マウスのいずれの肺からも粒子は検出されなかった。

$^{63}\text{NiSO}_4$ への曝露直後に屠殺したサブグループ A および C のラットでは、 $^{63}\text{NiSO}_4$ に起因する肺のニッケル量は、サブグループ A の動物では 3.9~11.6 μg 、サブグループ C の動物では約 9~14 μg であった。 $^{63}\text{NiSO}_4$ への急性曝露により吸入されたニッケルは、サブグループ A と C の対照群および $^{63}\text{NiSO}_4$ 曝露群のいずれのラット群においても、肺から急速に排泄された。 $^{63}\text{NiSO}_4$ への曝露の 32 日後のサブグループ A の動物、同 29 日後のサブグループ C の動物では、対照群と曝露群の肺に存在したニッケル量は、 $^{63}\text{NiSO}_4$ への曝露を実施した日に存在していた量の 1%未満であった。初期肺負荷(initial lung burden, ILB)の 99%以上は、約 2~3 日の半減期で排泄された。ほんのわずかな量(0.5%未満)が、肺に残存し、見かけ上、約 30 日にわたって排泄がみられなかった。サブグループ A および C の対照群と、 NiSO_4 曝露群とでは、いずれの濃度群についても、ラットの肺からの ^{63}Ni のクリアランスに有意差はみられなかった。

マウスの $^{63}\text{NiSO}_4$ への急性曝露の後では、サブグループ A のマウスの肺には、約 1 μg 以下のニッケル($^{63}\text{NiSO}_4$ 曝露由来)が存在し、サブグループ C のマウスの肺には、1.2~1.5 μg のニッケルが存在した。サブグループ A のマウスでは、約 1.5 日の半減期で ^{63}Ni の大部分(78~96%)が排泄された。サブグループ C のマウスでは、約 1.1~1.5 日の半減期で ^{63}Ni の大部分(90%以上)が排泄された。排泄が「より遅い」相の半減期は、約 5 日(サブグループ A の対照群および高用量群)から 17 日(サブグループ A の低用量群)とばらつきがみられた。サブグループ C のマウスにおいては、「より遅い」相の半減期は、5~6.5 日であった。ラット同様に、サブグループ A と C の対照群と、 NiSO_4 曝露群とでは、いずれの濃度群についても、マウスの肺からの ^{63}Ni のクリアランスに有意差はみられなかった。

結論として、ラットおよびマウスの肺からの $^{63}\text{NiSO}_4$ の排泄は迅速で、その排泄は、最大 6 ヶ月間の硫酸ニッケルの従前吸入があっても、両動物種とも影響を受けなかった。

もう 1 件の試験は、Medinsky *et al.*(1987)によるもので、雌雄の F344 ラットに、 ^{63}Ni 標識した硫酸ニッケル(等張食塩水を媒体とした溶液)が気管内点滴投与された。投与用量をラット 1 匹あたり 17、190、1800 nmole ニッケル(ニッケルとして 1 匹あたり 1、11.2、105.7 μg に相当)として投与溶液を 3 種類作製し、15 匹ずつのラットに投与した。ニッケルは迅速に肺から血液に移行した(血液中の放射能レベルで測定)。血中ニッケル濃度は、投与後 4 時間で最高となり、投与後 24 時間および 96 時間にかけては低下した。肺におけるニッケル残存量は、投与 4 時間後で投与量の 8%(最高用量群)~49%(最低用量群)、24 時間後

で 10% (最高用量群) ~ 28% (最低用量群)、96 時間後で 1.4% (最高用量群) ~ 12% (最低用量群) であった。ニッケル投与量が増加すると、投与したニッケルのうち長い半減期で排泄される画分の割合が低下した。さらに、肺からのニッケルクリアランスの半減期は、ニッケル投与量の増加に伴い短縮した。肺におけるニッケルの半減期は、最低用量群の 36 時間から最高用量群の 21 時間の範囲であった。 ^{63}Ni の主要な排泄経路は尿であり、17、190 nmole 群では 50% が、1800 nmole 群では 80% が尿中に排泄された。

4.1.2.1.1.1.2 経口

雄の Wistar ラットに 10 mg のニッケル(5%デンプン生理食塩水溶液中硫酸ニッケル)を単回強制経口投与した試験では、経口投与後 24 時間の吸収率は 11% であった (Ishimatsu *et al.* 1995)。

マウスに硫酸ニッケル六水和物の 1、5 または 10 g/L の溶液を投与した試験では、血中濃度が投与量と投与期間の増加とともに上昇し、試験終了時の曝露 180 日目で最高値を記録した (Dieter *et al.* 1988、NiPERA 1996 より引用)。

4.1.2.1.1.1.3 経皮

アルビノラットの雄を用いた試験で、生理食塩水を媒体とした硫酸ニッケルを、ニッケルとして 40、60、または 100 mg/kg 体重に相当する用量で、15 日または 30 日間毎日投与した。15 日間および 30 日間の投与後の肝臓と、30 日間投与後の精巣に、顕微鏡的变化がみられ、ニッケルは皮膚から吸収され得ることが示された。詳細については、第 4.1.2.5.1.3 項を参照のこと。(Mathur *et al.* 1977、IPCS 1991 より引用)。

Norgaard (1957、IPCS 1991 より引用) は、背中 5 cm × 5 cm 部分を除毛したモルモットとウサギ (2 匹ずつ) に、 ^{57}Ni (硫酸ニッケル七水和物) の 5% 水溶液 10 μL を適用し、24 時間後に臓器および体液における放射能を測定した。尿中、血液、腎臓、肝臓の放射能の相対分布レベル (パルス数/分で測定) から、ニッケルがモルモットとウサギの皮膚からの吸収され得ることが示された。

硫酸ニッケルの 5% 水溶液をモルモットの皮膚に適用した試験では、角質層でのみ、ニッケルの軽度な浸透が確認された。硫酸ニッケルと一緒にラウリル硫酸ナトリウム (5% 水溶液) を適用した場合は、ニッケルのわずかな皮膚浸透が真皮の深さまでみられたため、ラウリル硫酸ナトリウムは、ニッケルの浸透を強め、角質層を透過させると考えられた。(Lindberg *et al.* 1989、NiPERA 1996 より引用)。

4.1.2.1.1.2 ヒトのデータ

4.1.2.1.1.2.1 吸入

データは、得られていない。

4.1.2.1.1.2.2 経口

Sunderman *et al.* (1989) は、健康なボランティアに、硫酸ニッケルをニッケルとして 12 µg/kg 体重 (n = 4)、18 µg/kg 体重 (n = 4)、50 µg/kg 体重 (n = 1) の用量で、飲用水で投与 (試験 1)、または食物中に添加して投与 (試験 2) し、ニッケル吸収の動態を調べた。試験 1 では、各被験者は、水で溶かした各用量の硫酸ニッケル量を摂取する 12 時間前から摂取後 3 時間まで絶食させられた。試験 2 では、各被験者は、各用量の硫酸ニッケルを添加したスクランブルエッグを含む標準的なアメリカの朝食を食する 12 時間前から絶食させられた。ニッケル濃度は、硫酸ニッケル投与の 2 日前から 4 日後までの血清、尿、および糞便を試料として測定した。飲用水で投与した場合の血清中の最高ニッケル濃度は、食物を介して投与した場合の濃度の平均 33 倍であった。尿分析でニッケルの平均吸収率を推算した結果、食物で摂取した場合が $0.7 \pm 0.4\%$ であったのに対し、飲用水で摂取した場合は、 $27 \pm 17\%$ であった。

5.6 mg のニッケル (乳糖を媒体とした硫酸ニッケル六水和物) を非空腹時のボランティアに単回経口投与した試験では、累積尿中排泄量から、1~5% の腸管吸収があることが示された (Christensen & Lagesson 1981、IARC 1990 より引用)。

ニッケルとして 5.6 mg の硫酸ニッケルを経口投与した試験では、投与後 2、3 日にわたり、ニッケル排泄量の増加が確認された (Menné *et al.* 1978)。

空腹時に硫酸ニッケルを摂取させた試験では、投与量の 4~20% が 24 時間以内に尿中に排泄された (Cronin *et al.* 1980、IARC 1990、IPCS 1991 より引用)。

Solomons *et al.* (1982) は、硫酸ニッケル六水和物 22.4 mg (ニッケル 5 mg) を標準用量として、標準的な食事 2 回、水、および 5 種の飲料 (牛乳、コーヒー、紅茶、オレンジジュース、コカ・コーラ[®]) で摂取させ、血漿ニッケル濃度を連続的に測定し、ヒトにおけるニッケルの生物学的利用能を推定した。血漿ニッケル濃度は、空腹時、およびニッケルの有無を表示しないで試験食を摂取させた後では安定したが、標準用量のニッケルを水にて摂取させた後は上昇した。飲料に含ませて摂取させた場合については、5 種の飲料のうちコカ・コーラ[®]を除くと、血漿中濃度の上昇はかなり小さかった。

Gawkrodger *et al.* (1986)は、ニッケルへの感受性の高い被験者に対し、硫酸ニッケル七水和物を経口投与し、血清ニッケル濃度を測定した。硫酸ニッケル七水和物は、乳糖に混ぜて、朝食前にニッケルとして 2.5 mg を 2 日連続で投与(8 人)、またはニッケルとして 5.6 mg を単回投与(5 人)した。5.6 mg の単回投与後、または 2 回目の 2.5 mg 投与後のそれぞれ 72 時間の時点における平均血清ニッケル濃度は、それぞれ 2.6 µg/L と 2.7 µg/L であった。皮膚炎の症状が出ていない各被験者の平均基礎血清ニッケル濃度は、投与前では 1.2 µg/L で、プラセボ(乳糖)投与後 72 時間の時点での濃度は、1.0 µg/L であった。

4.1.2.1.1.2.3 経皮

Hostýnek *et al.* (2001)の *in vivo* 試験では、ヒトの皮膚におけるニッケル塩(硫酸ニッケル、塩化ニッケル、硝酸ニッケル、酢酸ニッケル)の浸透を、テープ剥離法により測定した。37.1 µg/cm²の用量となるように、メタノールを媒体とした硫酸ニッケル六水和物の溶液 100 µL を、アトピーを有していない被験者の前腕の手のひら側または背中(皮膚面積:2.83 cm²)に塗布した。陰性対照として、各被験者の同一部位の皮膚の非曝露部分から試料を採取し、すべての試薬や物質について、ニッケル含有量の分析を行った。前腕の曝露(n = 3)では、30 分後の時点で、硫酸ニッケル塗布量の約 89%が皮膚表面から回収され、背中での曝露(n = 2)では、塗布後 24 時間以内に、約 53%が皮膚表面から回収された。著者によると、塗布したニッケルの大部分は、皮膚表面に残存するか、角質層の最上層に吸収される。

4.1.2.1.1.3 *in vitro* 試験

Fullerton *et al.* (1986)の *in vitro* 試験では、ヒトの皮膚全層(胸部皮膚手術から取得)を介したニッケルの浸透を調べるため、拡散セルを用い、硫酸ニッケルを閉塞状態で適用した。1 cm²あたり 184 µg のニッケルが適用されるようになる濃度で、1.8 cm²の皮膚表面に硫酸ニッケル水溶液を塗布した。浸透の進行は遅く、浸透が検出され始めるまで約 50 時間を要した。約 240 時間後では、塗布した硫酸ニッケル水溶液から約 7%のニッケルが、真皮基質に移行していた。

ヒトの表皮を介する ⁶³Ni(比放射能が 1 µCi/mL で、生理食塩水を媒体とした 0.1、0.01 ないしは 0.001 mol/L の硫酸塩溶液)の拡散(拡散セルを用いた *in vitro* 試験)は、適用の 17、24、90 時間後、いずれもわずかであった。最初の 5 時間は、拡散は起きなかった。発汗や界面活性剤は、ニッケルの拡散をわずかに増強した(Samitz & Katz 1976、IPCS 1991 より引用)。

Tanojo *et al.* (2001)は、連続フロースルー拡散セル装置を用い、数種類のニッケル塩(硫酸

ニッケル、塩化ニッケル、硝酸ニッケル、酢酸ニッケル)について、ヒトの死体の脚から切り取った皮膚の角質層を通過する浸透量を *in vitro* で定量した。ドナー液には硫酸ニッケル六水和物の水溶液(Ni^{2+} 濃度が 1%)が、レセプター液には純水が用いられた。ドナー液、レセプター液、および角質層において、ニッケル濃度が分析された。96 時間後、適用量のうち、約 97%がドナー液から、約 1%がレセプター液から、0.6%が角質層から回収された。

4.1.2.1.2 分布と排泄

4.1.2.1.2.1 動物試験

4.1.2.1.2.1.1 吸入

F344 ラットおよび B6C3F1 マウス(各群雄雌 5 匹ずつ)の比較吸入試験が行われており、硫酸ニッケル六水和物のエアロゾル(空気動学的質量中央径が $1.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$)に、0、3.5、15、または 30 mg/m^3 の濃度(ニッケルとして 0、0.8、3.3 または 6.7 mg/m^3 に相当)で、1 日 6 時間、週 5 日で 16 日間の曝露が行われた。ラットにおける肺負荷(肺 1 g 中のニッケル量、 μg で表示)は、 3.5 mg/m^3 群では、雄で 5.1 ± 0.7 、雌で 7.6 ± 0.7 、 15 mg/m^3 群では、雄で 9.4 ± 2.1 、雌で 10.5 ± 2.4 、 30 mg/m^3 群では、雄で 7.7 ± 2.7 、雌で 9.2 ± 4.8 であった。マウスにおける肺負荷(肺 1 g 中のニッケル量、 μg で表示)は、 3.5 mg/m^3 群が、雄で 3.53 ± 0.94 、雌で 3.69 ± 1.03 であった(Benson *et al.* 1988)。

F344/N ラットの雄(各群 90 匹)を用いた吸入試験(Benson *et al.* 1995)では、硫酸ニッケル六水和物[エアロゾル、空気動学的質量中央径(MMAD)が $2.0 \sim 2.4 \mu\text{m}$]に、0、0.12、または 0.5 mg/m^3 (ニッケルとして 0、0.03 または 0.11 mg/m^3 に相当)の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日で最長 6 ヶ月間、全身曝露が行われた。B6C3F1 マウスの群も設けられ、0、0.25 または 1.0 mg の濃度の $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{m}^3$ (ニッケルとして 0、0.06 または 0.22 mg/m^3 に相当)へ、同様に曝露が行われた。対照群または曝露群のラットおよびマウスの肺におけるニッケル量は、すべての測定時点において、用いた試験法の検出限界(肺におけるニッケルが $1.10 \sim 2.48 \mu\text{g}$)未満であった。肺の組織病理学検査では、ラット、マウスのいずれの肺からも粒子は検出されなかった。

NTP の試験(NTP, 1996a)では、F344 ラットおよび B6C3F1 マウスを、硫酸ニッケル六水和物のエアロゾル(MMAD が $1.8 \sim 3.1 \pm 1.6 \sim 2.9 \mu\text{m}$)に、1 日 6 時間、週 5 日で、13 週間または 2 年間吸入曝露した。

13 週間曝露の場合は、ラットおよびマウス(各群雌雄 6 匹ずつ)を、0、0.12、0.5、または

2 mg/m³(ニッケルとして 0, 0.027, 0.11, 0.45 mg/m³に相当)の濃度で吸入曝露した。肺におけるニッケル濃度は、0.5 および 2 mg/m³ 群のラットの場合、雄では、4、9、13 週の時点で、雌では 13 週の時点で、対照群と比較して有意に増加していた。最高濃度群の場合、雌の肺におけるニッケル濃度が、対照群と比較して有意に増加していた。

2 年間曝露の場合は、ラットを 0, 0.12, 0.25、または 0.5 mg/m³(ニッケルとして 0, 0.027, 0.056 または 0.11 mg/m³に相当)の濃度で、マウスを 0, 0.25, 0.5、または 1.0 mg/m³(ニッケルとして 0, 0.056, 0.11 または 0.22 mg/m³に相当)の濃度で吸入曝露した。肺におけるニッケル負荷量は、7 ヶ月後(ラットは各群雌雄 7 匹ずつ、マウスは各群雌雄 5 匹ずつ)および 15 ヶ月後(各群雌雄 5 匹ずつ)に測定した。ラットの肺におけるニッケル負荷量は、曝露濃度が上がるとともに増加し、7 ヶ月後では 0.5 mg/m³群で、15 ヶ月後では 0.12 mg/m³以上の群で対照群の値より有意に高くなった。マウスにおいては、肺ニッケル負荷量は、検出限界未満であった。

Dunnick *et al.*(1989)は、硫酸ニッケル(六水和物、ニッケルとして、0.027、0.11、または 0.45 mg/m³)をラットやマウスに吸入させた試験で、4、9、13 週後に屠殺した被験動物の肺におけるニッケル濃度が両動物種で同様であることを確認した。これは、ニッケルの半減期が 2 日未満ということと整合しており、肺におけるニッケル量が定常状態に達していたことを示している。1 g の肺に沈着したニッケル量(μg)を比較すると、ラットの方がマウスより大幅に多かった。

Medinsky *et al.*(1987)は、雌雄の F344 ラットに、⁶³Ni 標識した硫酸ニッケル(等張食塩水を媒体とした溶液)を、ニッケルとして 1、11.2、または 105.7 μg/匹に相当する用量で、気管内点滴投与した。各投与量から被験動物を選択し、1 群を構成して代謝ケージに入れ、点滴投与の 4、7、10、16、24、36、38、60、72 および 96 時間後の時点で、尿と糞便について ⁶³Ni の分析を行った。同様に第 2 群を設け、投与 4、24、48、72 時間後に屠殺して、組織中の ⁶³Ni の分析を行った。対象組織は、肝臓、脳、甲状腺、胸腺、脾臓、大腿骨、腎臓、咽頭、心臓、肺、気管、鼻甲介、筋肉、会陰脂肪、副腎、精巣または卵巣、胃、大腸、小腸、膀胱、毛皮などであった。

4、24 および 96 時間の時点で ⁶³Ni 濃度が高かったのは、肺、気管、咽頭、腎臓、膀胱、副腎、血液、大腸、甲状腺であった。濃度が低かったのは、筋肉、脂肪、骨、肝臓、脳であった。投与後 4 時間の時点で、肺組織 1 g あたりの残存量は、点滴投与量のそれぞれ 49、21、8%であった。投与後 96 時間の時点では、体内に残存するニッケルの 50%超が肺に残存していた。⁶³Ni の主要な排泄経路は尿であり、ニッケルとして 1 および 11.2 μg を投与された群では約 50%が、105.7 μg を投与された群では 80%が尿中に排泄された。尿中排泄の半減期は、最大用量では 4.6 時間であったが最小用量では 23 時間へと長期化した。糞便へ

の排泄量は、初期投与量の約 30% (1 および 11.2 μg 群)、および 13% (105.7 μg 群) であった。

気管内点滴投与で行われた他の試験では、F344 ラットに、1 μmol のニッケルを投与するため、263 μg の硫酸ニッケル六水和物 (1052 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、ニッケルとして 235 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重に相当) が単回投与された。被験動物群 (各群雌雌 3 匹ずつ) は、点滴投与の 1 日または 7 日後に屠殺し、肺におけるニッケル負荷量を測定した。肺におけるニッケル負荷量 (肺中のニッケルを μmol で表示) は、投与 1 日後には 0.14 ± 0.06 、投与 7 日後には、 0.03 ± 0.01 であった (Benson *et al.* 1986)。

4.1.2.1.2.1.2 経口

Severa *et al.* (1995) は、硫酸ニッケルに曝露したラットの体液および臓器におけるニッケルの分布について調査した。ニッケルとして 100 mg/L の濃度の硫酸ニッケル溶液を 6 カ月間、雌雄のラットに飲水投与した。硫酸ニッケルの投与により、体液および臓器におけるニッケル濃度が上昇した。雌雄ともに、ニッケル濃度が最も高かったのは、肝臓であった。雄のラットでは、ニッケル濃度が高いものから順に、肝臓 > 腎臓 = 全血 = 血清 > 精巣 > 尿であった。雌では、肝臓 > 腎臓 = 全血 = 血清 = 血漿 > 尿 > 卵巣と、同様な順であった。3 カ月の曝露でも、6 カ月曝露したラットと比べ、臓器 (卵巣以外)、血液、尿におけるニッケル濃度に有意な差は示されなかった。

Obone *et al.* (1999) は、雄の成熟 Sprague-Dawley ラットに、硫酸ニッケル六水和物を 0、0.02、0.05、または 0.1% (ニッケルとして 0、44.7、111.8 または 223.5 mg/L に相当) の濃度で 13 週間飲水投与した。全般的には、飲料水中のニッケル曝露濃度の増加とともにそれぞれの臓器におけるニッケルの生体内蓄積が増加したが、ほとんどの場合、それらの増加は有意ではなかった。0.1% 硫酸ニッケル (ニッケルとして 223.5 mg/L) を飲水投与した場合の臓器へのニッケルの生体内蓄積は、高いものから順に、腎臓 > 精巣 > 肺 = 脳 > 脾臓 > 心臓 = 肝臓であった。

マウスに硫酸ニッケル六水和物の 1、5、または 10 g/L 溶液を摂取させた場合の血液中のニッケル濃度は、投与量および投与期間の増加とともに上昇し、試験終了時の曝露 180 日目に最高値を記録した。ニッケル濃度は肝臓よりも腎臓の方が高かった。肺におけるニッケル濃度は測定されなかった (Dieter *et al.* 1988、NiPERA 1996 より引用)。

ラット 1 匹につき硫酸ニッケル 2.5 mg を毎日 30 日間経口投与した結果、ニッケル蓄積量は、気管 > 鼻咽頭 > 頭蓋骨 > 食道 > 腸 > 皮膚 > 肝臓 = 脾臓 > 胃 > 腎臓 > 肺 = 脳 > 心臓の順に高かった (Jiachen *et al.* 1986、IARC 1990 より引用)。

ラット 1 匹につき 2.5 µg の硫酸ニッケルを 30 日間経口投与した場合、気管、鼻咽頭、肺、頭蓋骨、骨組織、心臓、脾臓、および腎臓におけるニッケル含有量は、対照群と比べて有意に高かった (Huang *et al.* 1986、IPCS 1991 より引用)。

イヌへ硫酸ニッケル(0、100、1000、または 2500 ppm)を 2 年間の混餌投与した試験では、摂取したニッケルの 1~3%が尿中に排泄された (Ambrose *et al.* 1976)。

4.1.2.1.2.2 ヒトのデータ

硫酸ニッケルと塩化ニッケルに曝露されていた電気めっき工の小規模集団を対象に行われた生物学的モニタリングによって、ニッケルの尿中排泄の半減期は 17~39 時間と推定されている (Tossavainen *et al.* 1980、NiPERA 1996 より引用)。

Sunderman *et al.* (1989) は、健康なボランティアに硫酸ニッケルを、ニッケルとして 12 µg/kg 体重 (n = 4)、18 µg/kg 体重 (n = 4) ないしは 50 µg/kg 体重 (n = 1) の用量で、飲水投与 (投与方法 1)、または食物中に添加して投与 (投与方法 2) し、ニッケルの分布と排泄動態を調べた。投与方法 1 では、各被験者は、水で溶かした各用量の硫酸ニッケルを摂取したが、摂取の 12 時間前から摂取後 3 時間までは絶食とされた。投与方法 2 では、各被験者は、各用量の硫酸ニッケルを添加したスクランブルエッグを含む標準的なアメリカの朝食を食する 12 時間前から絶食とされた。ニッケル濃度が、硫酸ニッケル投与の 2 日前から 4 日後までに採取された血清、尿、および糞便の試料において、測定された。飲用水で投与した場合の尿中の最高ニッケル濃度は、食物を介して投与した場合の濃度の平均 22 倍であった。尿分析でニッケルの平均吸収率を推算した結果、食物を介して投与した場合が $0.7 \pm 0.4\%$ であったのに対し、飲水投与の場合は $27 \pm 17\%$ であった。糞便中への平均排泄率は、飲水投与の場合が $76 \pm 19\%$ であったのに対し、食物を介した投与の場合は $102 \pm 20\%$ であった。吸収、移行、および排泄の速度定数には、投与に用いた媒体の違いによって有意な影響を受けることはなかった。吸収したニッケルの排泄半減期は、平均 28 ± 9 時間 (17~48 時間の範囲) であった。腎臓での平均ニッケルクリアランスは、投与方法 1 で 8.3 ± 2.0 mL/min/1.73 m²、投与方法 2 で 5.8 ± 4.0 mL/min/1.73 m² であった。

Christensen & Lagesson (1981、IARC 1990 より引用) は、乳糖を媒体とした硫酸ニッケル六水和物により、5.6 mg のニッケルをボランティア 8 人に単回経口投与した。血液中のニッケルは、大部分が血清に存在した。血清および全血液のニッケル濃度は、非常に高い正の相関 ($r = 0.99$) を示した。血清中のニッケルの半減期は、11 時間であった (最初の 32 時間は 1 コンパートメントモデル)。血清ニッケル濃度および尿中ニッケル排泄量は、高い正の相関 ($r = 0.98$) を示した。

硫酸ニッケル六水和物を乳糖に混ぜ、ニッケルとして 2.5 mg を健常者(2 人)[訳注:3 人と思われる]に単回経口投与した試験では、3 時間の時点で、全員に血清ニッケルの増加がみられたが、その範囲は、正常値(約 1 µg/L)の 30 倍からわずか 5 倍までとばらついていた。血清ニッケル濃度は、その後減少したが、投与後 48 時間の時点ででは、被験者 3 人すべてがなお正常値を上回っていた。血清における最高濃度は、被験者の年齢に反比例していた。24 時間尿へのニッケル排出量は、必ずしも血清レベルに反映されていなかった。血清濃度が最高値を示した被験者は、尿中へのニッケル排出量が最大であった(投与後 48 時間まで 24 時間ごとに回収した 2 つの試料での値がいずれも自身の対照値の 10 倍以上)。一方、血清濃度が最小だった被験者の尿中へのニッケル排出量は、血清濃度が 2 番目に高かった被験者よりも多かった(Gawkrodger *et al.* 1986)。

6 人の女性と 7 人の男性に硫酸ニッケルの錠剤でニッケルを 5.6 mg 投与した試験では、1～2 日後に排泄量が 3～4 倍に増加した。3 日後でもまだ、尿中のニッケル含有量は、投与前と比べ 2 倍であった。性別間で、ニッケル経口投与前または投与後に有意な差はみられなかった(Menné *et al.* 1978)。

空腹時に硫酸ニッケルを摂取させた試験では、24 時間以内に投与量の 4～20%が尿中より排泄された(Cronin *et al.* 1980、IARC 1990 より引用)。

硫酸ニッケルと塩化ニッケルを含む水溶液(ニッケルとして 1.63 g/L)を誤飲した作業員の群では、1 日後の血清ニッケル濃度が、対照の作業員の群でニッケルとして 0.004 mg/L であったのに対し、平均 0.286 mg/L となっていた。血清ニッケルの半減期は、平均で 60 時間であった。曝露された作業員の群では、平均尿中ニッケル濃度が、対照群がニッケルとして 0.050 mg/L だったのに対し、5.8 mg/L であった。症状が認められた作業員においては、推定ニッケル経口摂取量は、0.5～2.5 g であった(Sunderman *et al.* 1988、TERA 1999、US ATSDR 1995 より引用)。

硫酸ニッケルは迅速に吸収され、血清アルブミンと結合し二価ニッケルイオンとして移送される(Glennon & Sarkar 1982、NiPERA 1996 より引用)。

4.1.2.1.2.3 経胎盤移行

硫酸ニッケルの経胎盤移行を検討した試験の情報は、得られていない。塩化ニッケルを投与されたげっ歯類で、経胎盤移行が示されており、また、ニッケルがヒトの胎盤を通過することも示されている。経胎盤移行については、『Risk Assessment Report on nickel chloride (塩化ニッケルのリスク評価報告書)』および『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports (個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文

書)』の中で取り上げられている。

4.1.2.1.2.4 細胞への取り込み

TERA(1999)によると、動物細胞へのニッケルの取り込みは、金属イオン輸送系による取り込み、膜を介した親油性ニッケル化合物の拡散、および食細胞活動の、3つの機序によって起こり得る。細胞への取り込みは、可溶性ニッケル化合物と不溶性ニッケル化合物では異なり、不溶性ニッケル化合物は、食作用によって細胞に取り込まれるが、可溶性ニッケル化合物は、食作用ではなく、イオン輸送系または膜を介した拡散によって細胞に取り込まれる。細胞への取り込みについては、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』の中で論じられている。

4.1.2.1.3 考察と結論

硫酸ニッケルのトキシコキネティクスは、吸入、気管内点滴投与、経口投与、および経皮適用の場合について検討されている。

4.1.2.1.3.1 吸収

4.1.2.1.3.1.1 吸入

硫酸ニッケルの吸入または気管内点滴投与によりニッケルの吸収を検討することを目的とした試験の情報は、得られていない。しかし、実験動物を用いた2件の試験から、硫酸ニッケルの吸収に関連した情報がある程度得られている。ヒトに関するデータは得られていない。

Benson *et al.*(1995)による硫酸ニッケルの吸入試験では、ラットおよびマウスに硫酸ニッケル六水和物のエアロゾル[空気動力学的質量中央径(MMAD)が2.0~2.4 μm]を吸入させたところ、ラットやマウスでは肺からの硫酸ニッケルのクリアランスが大きく、ラットでは2~3日の半減期で吸入硫酸ニッケルの99%、マウスでは1日未満の半減期で80~90%が除去された。硫酸ニッケル六水和物のエアロゾルをラットやマウスに反復吸入させても、いずれの肺にもニッケルの蓄積は引き起こされなかった。また、硫酸ニッケル六水和物に2ヵ月間曝露した場合と6ヵ月間曝露した場合のいずれにおいても、その後に吸入された⁶³NiSO₄のクリアランスに影響は生じなかった。硫酸ニッケルに曝露された動物の肺には、組織学的検査で、硫酸ニッケル粒子は確認されなかった。血中および尿中のニッケル濃度

は測定されなかったため、この試験からは、クリアランスが肺から血流への吸収によって生じたものなのか、または気道から粘液線毛機能によって引き起こされたものなのかについて、確証は得られない。

Medinsky *et al.* (1987)による気管内点滴投与試験では、投与量の増加とともに尿中ニッケルの排泄量増加がみられた(低用量側 2 群では 50%、最高用量群では 80%)ことから、硫酸ニッケル(等張生理食塩水を媒体とした溶液で投与)が、肺から血中に用量依存的に迅速に吸収されていることが示された。

硫酸ニッケルに吸入曝露された場合に吸収されるニッケルの分量は、得られているデータからは定量化することはできない。気道への粒子の沈着は、粒子の大きさ(MMAD)をはじめとする粒子特性に左右され、気道から血流中へのニッケルの吸収は、吸入されたニッケル化合物の溶解性に左右される。硫酸ニッケルなどの可溶性ニッケル化合物は、吸入曝露の場合、気道から吸収されるものと思われる。これは、Medinsky *et al.* (1987)による試験のデータから裏付けられており、この試験では、投与した硫酸ニッケルの 50~80%(用量に依存)が気道から吸収され得ることが示されている。硫酸ニッケルへの吸入曝露によるニッケルの吸収が、気管内点滴投与による場合と同様であると仮定すると、硫酸ニッケルを吸入した場合の気道からのニッケルの吸収は、最大 80%に及ぶことも考えられる。さらに、Benson *et al.* (1995)による硫酸ニッケルの吸入試験では、ラットやマウスにおける肺からの硫酸ニッケルのクリアランスが、迅速で膨大であることが示されている(ラットでは 2~3 日の半減期で最大 99%、マウスでは 1 日未満の半減期で 80~90%)。吸入試験における肺からの硫酸ニッケル粒子(MMAD が 2.0~2.4 μm の吸入可能な粒子)のクリアランスが、沈着や粘液線毛作用によるものではなく、吸収によるものであると仮定すると、硫酸ニッケルを吸入した場合の肺からのニッケルの吸収は、最大 99%に及ぶことも考えられる(ニッケルとして、ラットでは最大 0.11 mg/m^3 、マウスでは最大 0.22 mg/m^3 の濃度で達し得る)。ラットを対象とした他の吸入試験(Benson *et al.* 1988, NTP 1996)では、肺におけるニッケル負荷が、吸入した空気中の硫酸ニッケルの濃度の増加に伴って増加し(ニッケルとして、少なくとも 0.8 mg/m^3 まで)、また、曝露期間の増加によっても増加することが示されている。

ラットを用いた塩化ニッケルの気管内点滴投与試験(Carvalho & Ziemer, 1982, English *et al.*, 1981, Clary, 1975)では、投与した塩化ニッケルのうち最大で約 97%が気道から吸収されることが示されている。詳細については、『Risk Assessment Reports on nickel chloride(塩化ニッケルのリスク評価報告書)』および『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

結論としては、硫酸ニッケルと塩化ニッケルについて得られたデータから、これらの化合

物を吸入した場合のニッケルの吸収率は、最大 97~99%と高い可能性があることが示されている。ここで、吸収率については、吸入された空気中のニッケル化合物の濃度および曝露期間の両方に明らかに依存的であることに留意する必要がある。リスクの総合判定に際しては、空気動学的直径が 5 μm 未満(吸入され得る)の粒子の硫酸ニッケルに吸入曝露された場合における気道からのニッケルの吸収率として、100%という値を適用することになる。空気動学的直径が 5 μm より大きい(吸入され得ない)ニッケル粒子については、大部分が粘液線毛の作用によって気道から排除されて、胃腸管に移動して吸収されるため、気道で生じるニッケルの吸収は無視できると考えられる。したがって、吸入され得ない粒子の画分については、粘液線毛の作用によって気道から 100%排除されて胃腸管に移動するとみなされ、経口吸収の場合の値が適用される。

詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports (個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

4.1.2.1.3.1.2 経口

ヒトを対象とした多くの試験において、硫酸ニッケルを経口摂取した場合のニッケルの吸収率が調べられている。しかし、それらの試験で、硫酸ニッケルを経口投与した場合の一般的なニッケル吸収率を推定することはできない。情報が得られた試験では、吸収の程度は、硫酸ニッケルを飲水投与するのか、投与が空腹時に行われるのか否か、または食事とともに投与するのかにより影響を受けることが示されている。ボランティアを対象に行われた試験(Sunderman *et al.* 1989)では、被験者が空腹状態の場合、ニッケルを食事と一緒に投与した際のニッケル吸収率が投与量の約 1%だったのに対し、飲水投与した際は 27%であった。別の試験(Christensen & Lagesson 1981、IARC 1990 より引用)では、乳糖を媒体として硫酸ニッケルが投与されているが、その場合の吸収は約 1~5%であったことが示されている。空腹時に硫酸ニッケルを摂取した場合には、4~20%という高めの吸収率が認められている(Cronin *et al.* 1980、IARC 1990 より引用)。また、ニッケルの吸収は、水よりも食事と一緒に投与した場合の方が、明らかに緩慢であったことも示されている。

ラットに硫酸ニッケルを経口摂取させた試験(Ishimatsu *et al.* 1995)では、5%デンプン生理食塩水溶液を媒体として投与が行われ、吸収率は 11%であった。

経口曝露の場合の硫酸ニッケルの吸収率は、空腹時に硫酸ニッケルを飲水投与すると、27%と高くなり得るが、非空腹時に硫酸ニッケルを食事とともに投与すると、約 1~5%程度になるようである。

ボランティアを対象に行われた試験(Nielsen *et al.* 1999)では、投与したニッケル化合物が

記載されていないが、空腹時にニッケルを飲水投与すると、投与量の 25.8%が尿中に排泄されたのに対し、ニッケルを食事に混合して投与すると、尿中排泄は投与量の 2.5%であった。Diamond *et al.*(1998、TERA 1999 より引用)は、生物動力学的モデルを用い、ヒトを対象に行われたいくつかの試験のデータに基づいて、ニッケルの吸収率を推定した。その結果、投与したニッケルの吸収率は、絶食後にニッケルを経口摂取させた場合は 12~27%、食事中(または食事時間の近く)に食物、飲料水、またはカプセルにより経口摂取させた場合は 1~6%と推定された。詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

結論としては、得られたデータから、空腹時に飲水投与されたニッケルの吸収率は最大約 25~27%と高く、非空腹時や食事と一緒に(または食事時間の近く)に投与されたニッケルの吸収率は約 1~6%であることが示唆されている。リスクの総合判定に際しては、空腹時に硫酸ニッケルに曝露されるというシナリオを想定し、硫酸ニッケルへ経口曝露された場合の胃腸管からのニッケルの吸収率として、30%という値を適用することになる。他の曝露シナリオを想定した場合はいずれも、胃腸管からのニッケルの吸収率として、5%という値を用いることとする。

詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

4.1.2.1.3.1.3 経皮

経皮吸収について考えるときは、皮膚へのニッケルの浸透と、ニッケルが皮膚を介して血流中に輸送される経皮輸送とを区別する必要がある。詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

近年、ヒトを対象に行われた硫酸ニッケルの *in vivo* 試験(Hostýnek *et al.* 2001)では、塗布された被験物質の大半が、24 時間後にも皮膚表面に残存していたことが示されている。吸収があった場合でも、著者によると、それは角質層の最上層で生じている。ヒトの皮膚(死体の脚の皮膚の角質層)を用いた *in vitro* 試験(Tanojo *et al.* 2001)では、被験物質を塗布した後 96 時間の時点で、塗布量のうち約 97%がドナー液、約 1%がレセプター液、0.6%が角質層で回収された。ヒトの皮膚を用いた他の *in vitro* 試験(Fullerton *et al.* 1986、Samitz & Katz 1976、IPCS 1991 より引用)では、得られたデータは少ないが、皮膚接触による吸収にはかなりの時間がかかる可能性があることが示されている。

実験動物を対象とした試験では、ラット(Mathur *et al.* 1977、IPCS 1991 より引用)、モルモットおよびウサギ(Norgaard 1957、IPCS 1991 より引用)において、皮膚を介してニッケルが吸収され得ることが示されている。モルモットを対象とした別の試験(Lindberg *et al.* 1989、NiPERA 1996 より引用)では、ニッケルは角質層に浸透するのみであることが示されている。

ニッケルの吸収は、硫酸ニッケルへの皮膚接触によって発生する。しかし、適用された量の大半は皮膚表面や角質層に残存し、吸収されるのはわずかであると考えられる。

ニッケル金属を被験物質とし、ヒトを対象として近年に行われた *in vivo* 試験(Hostýnek *et al.* 2001)では、適用された被験物質の大半は、24 時間後でも皮膚表面に残存していたか、角質層に浸透していたことが示されている。詳細については、『Risk Assessment Reports on nickel metal(ニッケル金属のリスク評価報告書)』を参照のこと。

ヒトの皮膚を用いた *in vitro* 試験では、適用量の大半がドナー液中に残存し、少量のみがレセプター液から検出されており、ヒトを対象に行われた *in vivo* 試験の知見が支持されている。また、それらの *in vitro* 試験はまた、やはり皮膚接触による吸収にはかなりの時間がかかる可能性があることを示している。詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

結論としては、得られたデータから、皮膚接触によるニッケルの吸収は、さまざまなニッケル化合物で起こる可能性があるもののわずかであり、適用された量の大部分は皮膚表面や角質層に残存することが示されている。硫酸ニッケルへ皮膚接触した場合にどのくらいニッケルが吸収されるかを評価するには、データが少なすぎる。ヒトの皮膚を用いて行われた可溶性ニッケル化合物(硫酸ニッケル、塩化ニッケル、硝酸ニッケル、酢酸ニッケル)の *in vitro* 試験(Tanojo *et al.* 2001)では、適用された量のうち約 98%がドナー液中に残存し、1%以下がレセプター液から検出され、1%未満が角質層に保持されたことが示されている。EU が作成した改訂版技術指針書(Technical Guidance Document, TGD)によれば、皮膚に吸収されたがレセプター液中には移行しなかった分量も、経皮吸収されたものとして推定吸収量に含めなければならない。リスクの総合判定に際しては、硫酸ニッケルに皮膚接触した場合のニッケルの吸収率として、2%という値を適用することになる。

詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

4.1.2.1.3.2 分布と排泄

ラットを対象とした2件の吸入試験(Benson *et al.* 1988、NTP 1996)では、肺におけるニッケル負荷が、吸入した空気中の硫酸ニッケルの濃度に伴って増加し(ニッケルとして、少なくとも最大 0.8 mg/m³まで)、また、曝露期間の増加によっても増加することが示されている。Benson *et al.*(1988)の試験では、ラットの肺におけるニッケル負荷が、15 mg/m³で曝露した場合と 30 mg/m³で曝露した場合とでほぼ同様であったため、肺でのニッケル負荷が定常状態に達する可能性が示されている。別の(3件目の)試験(Dunnick *et al.* 1989)では、ラットとマウスに硫酸ニッケル(ニッケルとして、0.02~0.4 mg/m³)を吸入させたところ、4、9、13週間後の時点で、両動物種の肺におけるニッケル濃度が同様であることが確認された。硫酸ニッケルを気管内に単回投与した場合、投与後96時間では、体内に残存したニッケルのうち、50%超が肺に残存していた。肺におけるニッケルの沈着は、ラットではマウスと比較して明らかに多かった。ヒトに関するデータは得られていない。

一般的に、ニッケル化合物に職業曝露された労働者や、ニッケル化合物を吸入投与または気管内点滴投与された実験動物では、ニッケルは肺に沈着する傾向が示されている。実験動物におけるニッケルの組織分布については、曝露経路(吸入ないしは気管内点滴投与か、または経口投与か)による差が多少認められているが、有意な差ではないように思われる。組織への蓄積は、通常は1 ppm未滿と、低いことが示されている。ニッケルの組織中濃度の上昇が最も顕著な部位は、腎臓である。ニッケル濃度の上昇は、肺でも認められることが多く(経口投与であっても)、肝臓でも認められる。その他の組織では、ニッケル濃度の上昇はあまり認められない。ヒトにおけるニッケルの組織分布については、情報がほとんど得られなかった。

吸収されたニッケルは、曝露経路に関係なく、いずれの場合でも尿中に排泄される。経口摂取されたニッケルは、胃腸管からの吸収が比較的悪いいため、ほとんどは糞便中に排泄される。ヒトにおいては、硫酸ニッケルを経口摂取した場合のニッケルの尿中排泄率は、空腹時に飲水投与すると投与量の20~30%であったが、食事と一緒に、または食事時間の近くに投与すると投与量の1~5%であった。

硫酸ニッケルと塩化ニッケルに曝露されていた電気めっき工の小規模集団を対象に行われた生物学的モニタリングによって、ニッケルの尿中排泄の半減期は17~39時間と推定されている。

吸入されたニッケル粒子の気道からの排出は、呼気を介して、気道からの吸収によって、粘液線毛による除去によってのいずれかの機序で行われる可能性がある。

詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports (個々の化合物のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物試験

硫酸ニッケルについては、各種動物および各種経路を用いて、多くの試験が行われている。急性毒性の評価に関連するとみなされた試験の情報は、経口投与によるものしか得られていないが、それらを Table 4.1.2.2.1A に示した。

4.1.2.2.1.1 吸入

硫酸ニッケルを用いて適切に実施された吸入試験の情報は、得られなかった。気管内点滴投与による試験 (Benson *et al.* 1986) の情報は、得られている。この試験は、吸入による急性毒性と気管内点滴投与による急性毒性との関連性が不明であるため、リスク評価には採用されない。

4.1.2.2.1.2 経口

FDRL (1983) によって、GLP に準拠した経口急性毒性試験が実施されている。この試験では、各群雌雄 5 匹ずつの Sprague-Dawley ラットに、ニッケルとして 22、40、70、125、または 223 mg/kg 体重 (純度 98.8% の硫酸ニッケル六水和物で 100、178、316、562、1000 mg/kg 体重) の用量で、同一濃度の被験物質が単回経口投与された。投与後、ラットは 15 日間にわたって観察された。その後、全ラットについて、肉眼剖検が行われた。症状としては、活動性低下、下痢、下肢浮腫、および運動失調が認められた。LD₅₀ は、雄ではニッケルとして 72 mg/kg 体重 (硫酸ニッケル六水和物では 325 mg/kg 体重)、雌ではニッケルとして 61 mg/kg 体重 (硫酸ニッケル六水和物では 275 mg/kg 体重) であった。

小核試験の用量設定のために行われた試験 (Covance 2003) で、雄の Sprague-Dawley ラット (6 匹/群) に、ニッケルとして 0、27.5、55、または 110 mg/kg 体重/日 (純度 99.99% の硫酸ニッケル六水和物で 0、125、250、500 mg/kg 体重/日) の用量で、3 日間、強制経口投与が実施されている。ニッケルとして 55 mg/kg 体重/日の群のラットでは、2 回目の投与後に 1 匹の死亡が確認された。毒性臨床症状は、唾液分泌、わずかな活動性低下、雑音を有する不規則な努力性呼吸であった。最高用量群での毒性臨床症状は、唾液分泌、わずかな活動性

低下、および接触に対する過敏であった。

その後、2 回目の用量設定試験が行われており、ニッケルとして 0、165、220、275、330、または 385 mg/kg 体重/日 (純度 99.99%の硫酸ニッケル六水和物で 0、750、1000、1250、1500、1750 mg/kg 体重/日) が 3 日間、経口投与された。ニッケルとして 275 mg/kg 体重/日の群のラットでは、1 回目の投与後に 1 匹の死亡が確認された。2 回目の投与後の時点で、死亡率(死体で発見、重度の毒性発現による切迫屠殺、またはその被験物質投与群で重度の毒性が発現したことによる殺処分)は、ニッケルとして 220 mg/kg 体重/日の群で 1/6 匹、275 mg/kg 体重/日の群で 5/6 匹、330 mg/kg 体重/日の群で 6/6 匹、385 mg/kg 体重/日の群で 6/6 匹であった。3 回目の投与後の時点で、死亡率(死体で発見、重度の毒性発現による切迫屠殺、またはその被験物質投与群で重度の毒性が発現したことによる殺処分)は、ニッケルとして 165 mg/kg 体重/日の群で 4/6 匹、220 mg/kg 体重/日の群で 3/6 匹であった。毒性臨床症状は、活動性低下、斜視または閉眼、唾液分泌、不規則呼吸、横臥、立毛、触ると冷たく感じられる、接触に対する過敏、黒色便/軟便などであった。

主試験では、ニッケルとして 0、27.5、55、110 mg/kg 体重/日 (純度 99.99%の硫酸ニッケル六水和物で 0、125、250、500 mg/kg 体重/日) が 3 日間、経口投与された。いずれの群においても、死亡は確認されなかった。毒性臨床症状は、活動性低下や唾液分泌で、何匹かで認められた。最高用量群の 4 匹については、さらに毒性臨床症状として、黒色便、不規則呼吸、斜視や閉眼が確認された。

Table 4.1.2.2.1A: Summary of acute oral toxicity studies

Species	End point	Dose	Result	Reference
Rat	LD ₅₀	50% aqueous solution	112 mg Ni/kg (500 mg NiSO ₄ ·6H ₂ O/kg)	Kosova (1979 - quoted from UK HSE 1987)
Rat	LD ₅₀	22, 39, 70, 124 and 220 mg Ni/kg (100, 178, 316, 562, 1000 mg nickel sulphate hexahydrate/kg)	72 mg Ni/kg (325 mg NiSO ₄ ·6H ₂ O/kg) (males) 61 mg Ni/kg (275mg NiSO ₄ ·6H ₂ O/kg) (females)	FDRL (1983)

4.1.2.2.1.3 経皮

経皮経路については、雄ラットに、0.25%生理食塩水を媒体とした溶液で、ニッケルとして 40、60、100 mg/kg に相当する硫酸ニッケル六水和物(硫酸ニッケル六水和物量は不明)を 30 日間毎日皮膚適用した試験の情報が得られている (Mathur *et al.* 1977a)。中毒による臨床症状や死亡は認められなかった。この試験は、附属書 V に記載の方法に従って行われておらず、硫酸ニッケルの経皮 LD₅₀ の判定に採用することはできない。

4.1.2.2.1.4 その他の投与経路

硫酸ニッケルをニッケルとして 6.7 mg/kg 体重/日ないしは 8.9 mg/kg 体重/日の用量で、2 日間腹腔内投与した試験の情報が 1 件得られている (Adler & Adler 1977)。6.7 mg/kg 体重/日の投与では、死亡したラットは認められなかったが、8.9 mg/kg 体重/日の投与では、48 時間後までに 9 匹のうち 8 匹のラットが死亡した。

4.1.2.2.1.5 動物試験に関する結論

硫酸ニッケルによる急性毒性に関するデータは、主に、硫酸ニッケル六水和物を使用した試験に基づいている。硫酸ニッケルの急性経口 LD₅₀ については、ニッケルとして 61~72 mg/kg 体重 (硫酸ニッケル六水和物の用量で 275~325 mg/kg 体重) (FDRL 1983) から 112 mg/kg 体重 (硫酸ニッケル六水和物の用量で 500 mg/kg) (Kosova 1979) までの報告が得られている。FDRL の試験は、GLP に従って行われた試験、あるいは適切に行われた試験であり、リスクの総合判定に採用される。この試験では、雄よりも雌の方が感受性が高く、その LD₅₀ は、ニッケルとして 61 mg/kg 体重 (硫酸ニッケル六水和物の用量で 275 mg/kg 体重) である。リスクの総合判定には、この値が適用されることになる。

硫酸ニッケル六水和物は、附属書 VI の、「Xn; R22」(飲み込むと有害)を付すべき有害物質としての分類基準を満たしている。FDRL の試験における雌の LD₅₀ 値が、無水硫酸ニッケルとして再計算された場合は、162 mg/kg となり、「T; R25」(飲み込むと有毒)を付すべき有毒物質としての分類が適切となる。高生産量化学物質 (第 2 章参照) として市販されている、硫酸ニッケル一水和物について算出されている LD₅₀ を考慮した場合も、「T; R25」に分類されると考えられる。世界調和システム (Globally Harmonized System, GHS) の基準境界値が 300 mg/kg 体重であることに基つくと、六水和物を含むすべての市販の硫酸ニッケル商品は、FDRL の試験における雌の LD₅₀ 値に基づき、カテゴリー 3 の急性毒性物質に分類されると考えられる。

硫酸ニッケルにおいては、附属書 V に記載の吸入試験法に準拠して適切に実施された試験は見つかっておらず、急性吸入毒性のデータは得られていない。硫酸ニッケルは吸入を介して吸収される可能性があるため、毒性が発現する懸念を排除することはできない。リスクの総合判定には、NTP (1996a) による 16 日間の反復投与毒性試験から得られた、体重減少と気道への有害影響 (委縮と炎症) に関する LOAEC である、ニッケルとして 0.7 mg/m³ が採用される。この吸入試験は、反復曝露試験 (16 日間に 12 回の曝露) であるため、附属書 V に記載の方法 (単回 4 時間曝露) による試験に比較して、より重大な毒性が示されることが予想される。したがって、この反復曝露試験の結果を採用することは、安全側に考慮し

た手法であると考えられる。

反復曝露試験のデータは、分類に直接には役立てることはできない。なぜなら、反復曝露（例えば 16 日間に 12 回の曝露）の場合は、附属書 V に記載の方法（単回 4 時間曝露）による試験と比較して、より重度の毒性が現れることが予想されるからである。しかし、NTP の 16 日間反復毒性吸入試験（NTP、1996a）では、「T; R23」分類の境界値（「T; R25」などからすると低めの値）のおよそ 30 分の 1 の濃度でラットの死亡がみられており、最高用量群のラットでは、雌では 100%、雄では 40%が試験終了前に死亡している。可溶性ニッケル化合物が経口投与で急性毒性を発現するという証拠は示されており、しかも、経口よりも吸入の場合の方が、吸収率がかなり高い。

経皮曝露については、データが得られていないため、急性 LD₅₀ 値を推定することができない。しかし、経皮経路からの吸収が低いことを考慮すると、急性毒性の程度は低いと予想される。経皮による影響については、懸念の対象にならないとみなされる。

4.1.2.2.2 ヒトにおけるデータ

19 世紀、ニッケル塩は薬として使われていた。1883 年の報告では、65～195 mg の硫酸ニッケル（六水和物塩として投与されていた可能性が高いので、おそらくニッケルとして 15～44 mg に相当）が、下痢やてんかんの治療に使われており、耐容性が高く、治療に有益であったとされている。一方、325 mg（ニッケルとして 73 mg）が投与された場合には、めまい、吐き気、非定型的な徐脈、軽度の体温低下を引き起こしたと記載されている（Da Costa 1883、Sunderman *et al.* 1988 より引用）。

2 歳半の幼女が少なくとも 5 g と推測される硫酸ニッケル結晶を誤飲して死亡した事例が報告されている。子どもはすぐに昏迷状態となり、項部（後頭部から首の後ろにかけて）の硬直、紅斑、瞳孔散大、頻脈、肺鬱血が引き起こされた。心停止後、繰り返し蘇生を行ったが、誤飲してから 8 時間後に死亡した。剖検の結果、急性出血性胃炎が確認された（Daldrup *et al.* 1983）。

労働災害の事例では、32 人の電気めっき工が、硫酸ニッケルと塩化ニッケルに汚染された水（ニッケルとして 1.63 g/L）を誤飲したことが報告されている。その内 20 人に吐き気、嘔吐、腹部不快感、下痢、めまい、倦怠感、頭痛、咳、息切れなどの症状が現れた。これらの症状は、多くの患者では数時間で消失したが、7 人では 1～2 日間継続した。症状を発現しためっき工のニッケル摂取量は、0.5～0.25 g と推定された。この用量は、成人の体重を 70 kg とした場合、ニッケルとして 7.1～35.7 mg/kg 体重に相当する。15 名のめっき工にお

ける曝露後 1 日目の血清ニッケル濃度は、ニッケルとして 13~1,340 µg/L で、尿中ニッケル濃度は、クレアチニン 1 g あたり、ニッケルとして 0.15~12.0 mg であった。臨床検査では、網状赤血球数、尿中アルブミン、血清ビリルビン値の上昇が示された。すべてのめっき工は、明らかな後遺症もなくすぐに回復し、曝露後 8 日までには作業に復帰した (Sunderman *et al.* 1988)。

4.1.2.2.3 結論

ニッケルとして 61 mg/kg 体重 (硫酸ニッケル六水和物で 275 mg) という急性経口毒性の LD₅₀ 値が、FDRL の試験における雌の LD₅₀ 値から得られており、これがリスク総合判定に採用される。現行の、硫酸ニッケルを「Xn; R22」(飲み込むと有害)を付して有害とする分類は、第 30 次 ATP [Adaptation to Technical Progress (技術的な進歩への適合)] においても変更はない。

急性吸入毒性に関するデータは、得られていない。硫酸ニッケルの急性経口毒性、気道を介する被吸収性、および 16 日間の吸入試験で観察された致死性を考慮すれば、急性吸入毒性について分類を行うことは妥当と思われる。化学物質の分類と表記に関する技術委員会 (Technical Committee for Classification and Labelling, TC C&L) は、硫酸ニッケルを、「Xn; R20」(吸入すると有害)を付す有害物質に分類することに同意している。この分類は、第 30 次 ATP の附属書 I の記載事項に含まれている。

リスクの総合判定には、NTP (1996a) による 16 日間の反復投与毒性試験から得られた、体重減少と気道への有害影響 (委縮と炎症) に関する LOAEC である、ニッケルとして 0.7 mg/m³ が採用される。この吸入試験は、反復曝露試験 (16 日間に 12 回の曝露) であるため、附属書 V に記載の方法 (単回 4 時間曝露) による試験と比較して、より重大な毒性が示されることが予想される。したがって、この反復曝露試験の結果を採用することは、安全側に考慮した手法であると考えられる。

硫酸ニッケルのリスク評価に、急性吸入毒性試験は、これ以上必要ないと思われる。

急性経皮毒性については、データは得られておらず、評価を行うことができない。しかし、この経路からの吸収が乏しいことを考慮すると、急性毒性の程度は低いと予想される。

4.1.2.3 刺激性・腐食性

4.1.2.3.1 動物試験

4.1.2.3.1.1 皮膚刺激性と眼刺激性

硫酸ニッケルの皮膚刺激性と眼刺激性については、いくつかの試験で検討されており、それらを Table 4.1.2.3A に要約した。

皮膚刺激性は、附属書 V に記載の方法で行われた試験で検討されている (Springborn Laboratories, Inc.: SLI 1991a)。硫酸ニッケルは、この試験では、わずかな皮膚刺激性(紅斑)しか引き起こさなかった。

他に 3 件の試験の情報が得られており、それらのうち 2 件では、30 日間の反復適用が行われ、皮膚への有害影響が確認されている。

Table 4.1.2.3.A: Summary of skin and eye irritation studies

	Species	Result	Grading (irritation scores)	Method	Reference
Skin	rabbits, Adult New Zealand White: 2 male, 1 female	not irritant	0.42 (erythema) 0.00 (oedema)	Annex V	SLI 1999a
	Rabbits	Pustules seen on wounded skin but not intact skin		50% aqueous solution	Wahlberg & Maibach 1981
	Rats	skin atrophy, acanthosis and hyperkeratinisation		40 – 100 mg Ni/kg bw/day repeated application for 30 days	Mathur <i>et al.</i> 1977a.
	Rats	Erythema, eschar		50% aqueous solution daily for 30 days	Kosova (1979 – quoted from UK HSE 1987)
Eye	rabbits, Adult New Zealand White: 2 male, 1 female	not irritant	0.00 (corneal opacity) 0.33 (iris lesion) 0.67 (conjunctival redness) 0.44 (conjunctival oedema)	Annex V	SLI 1999b

上記の表に、SLI(1999)により GLP に準拠して最近実施された 2 件の試験が記載されているが、それらの結果は、硫酸ニッケルに腐食性はなく、皮膚刺激性、眼刺激性のいずれも EU の分類基準を満たしていないことを示している。

しかし、UK HSE(1987)は、Wahlberg & Maibach(1981)、Mathur *et al.*(1977)、および Kosova(1979)の試験を引用し、これらの古いデータでは、ニッケル塩が皮膚に影響を及ぼすことが示されていると述べている。これらの試験の内 2 件においては、30 日間の反復投与によって影響が認められている。しかしこれらのデータは、分類基準(EC 1999)に照らすと、安易に解釈することはできない。

4.1.2.3.1.2 呼吸器刺激性

硫酸ニッケルの呼吸器刺激性を単回曝露で検討した試験の情報は、得られていない。比較的短期間の曝露により行われたいくつかの試験では、肺の炎症および嗅上皮の変性が認められた[Benson *et al.* 1988(12 日間のエアロゾル吸入)、Dunnick *et al.* 1989(13 週間の吸入)、Benson *et al.* 1989(13 週間のエアロゾル吸入)、すべて NiPERA, 1996 より引用]。マウスとラットにおいて、16 日間の硫酸ニッケルへの吸入曝露だけで、嗅上皮の委縮および肺の炎症が生じたことが報告されている(NTP, 1996a)。この試験で検討された最低濃度はニッケルとして 0.7 mg/m³で、これが最小毒性量(Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL)とみなされる。

4.1.2.3.2 ヒトにおけるデータ

4.1.2.3.2.1 皮膚刺激性

皮膚刺激性を検討する新たな手法を開発するために行われた試験において、硫酸ニッケルも被験物質に含められている(Frosch & Kligman, 1976)。この試験では、様々な濃度の硫酸ニッケル 0.1 mL を、ピペットで 2 枚重ねの不織綿布のディスクに保持させた。接触感作試験用にデザインされたチャンバーにディスクを取り付け、非閉塞性テープまたは Dermicel[®]テープで皮膚に固定した。チャンバー使用の利点は、パッチの場合と比べ、被験物質の損失がなく、均一に皮膚と接触することであった。被験者は、各群 5~10 人の肌の色が薄い若い白人とした。被験物質は、前腕内側部に 1 日 1 回 3 日間適用され、除去後 30 分に、試験開始 72 時間の時点としての測定を行った。試験は、傷をつけた(有傷)皮膚および無傷の皮膚に対して行われた。反応は、0~4 までの 5 段階で評価された(1:紅斑、2:増高した紅斑の増加、3:他の病変の有無に関わらず、部分的に融合した重度の紅斑、4:浮腫、壊死、水

疱形成を伴う場合も含めた重度の融合性紅斑)。有傷の皮膚では、用量依存性の刺激反応がみられ、スコアは0.13%溶液での1から1%溶液での4にわたっていた。硫酸ニッケルの用量-反応曲線を描くと、傾きが非常に急であった。著者は、試験結果について、0.13%の濃度では「最低限の刺激性」しかみられなかったが、1%の濃度では「非常に激しい刺激性」が認められたと記載している。

有傷の皮膚における感度と無傷の皮膚における感度との比較は行われている。ただし、無傷の皮膚に関する詳細な結果は示されていない。無傷の皮膚で「3日の時点での刺激反応」が現れる閾値濃度は20.0%であり、それが有傷の皮膚では、0.13%であった。有傷の皮膚の閾値濃度に対する無傷の皮膚の閾値濃度の比率は、154倍であった。この比率は、界面活性剤、無機塩類、抗菌剤、および酸を含む被験物質の中で、最高値であった(Frosch & Kligman, 1976)。

硫酸ニッケルの皮膚刺激性は、皮膚感作性の検討を主目的とした試験でも報告されている。

Kalimo & Lammintausta(1984)は、硫酸ニッケルと塩化ニッケルのパッチテストを行っている。曝露時間は24時間ないしは48時間であった。2.5%溶液が使用されることもあるが、ここでは5%塩化ニッケル溶液が使用され、閉塞条件下でやはり刺激症状を引き起こした。標準的に調製された硫酸ニッケルの被験物質(5%と予測)を用いたパッチテストでも、閉塞条件下で刺激性が示された。

Fullerton *et al.*(1989)は、パッチテストで標準的に用いられる、ワセリンを媒体とした5%硫酸ニッケルの代用になり得るものとして、ハイドロゲル状の塩化ニッケル六水和物を用いて、様々な濃度で試験を行った。その結果、標準的に調製された5%硫酸ニッケルを用いたパッチテストにおいても、ハイドロゲル状の0.5%~2%塩化ニッケルでのパッチテストにおいても、ある程度の刺激性が示されている。

Storrs *et al.*(1989)は、ワセリンを媒体とした2.5%硫酸ニッケルのパッチテストを行い、1123人の被験者のうち8人が刺激症状を示したと記載している。

Wahlberg(1990)は、同じ濃度で適用した場合、塩化ニッケルが硫酸ニッケルよりも強い刺激性を示すと報告している。

湿疹の既往歴がない25人の健康なボランティアを対象として硫酸ニッケルのパッチテストが行われている。適用箇所は5箇所、5、10、20%濃度の硫酸ニッケルの箇所と対照2箇所であった。ニッケル非感受性被験者においては、5~20%硫酸ニッケル水溶液では、皮膚に刺激性反応はみられないと結論付けられている(Seidenari *et al.* 1996)。

4.1.2.3.2 呼吸器刺激性

硫酸ニッケルと職業性喘息については、多くの症例報告においてその関連性が論じられている。第 4.1.2.4.2 項を参照のこと。

非アレルギー性の呼吸器刺激に関する情報は、短期間曝露と関連するものは得られていない。

4.1.2.3.3 結論

ウサギを用いて附属書 V に記載の方法で行われた試験で、硫酸ニッケルは皮膚刺激性を示さなかった。しかし、ヒトにおけるデータでは、20%を超える濃度の硫酸ニッケルは、皮膚刺激症状を引き起こす可能性があることが示されている。このヒトにおけるデータに基づいて、第 30 次 ATP では、硫酸ニッケルは、「Xi; R38」に分類され、20%という特定濃度基準が設定されている。

硫酸ニッケルは、実験動物においては眼刺激性を示していない。TC C&L は、硫酸ニッケルを眼刺激性物質として分類しないことに同意している。

得られたデータからは、呼吸器刺激性に関する結論を何ら導出することはできない。呼吸器刺激性の分類の判断は、主にヒトの経験に基づくものであるが、その情報が得られていない。呼吸器刺激性に関する懸念は存在する。しかし、この懸念には、慢性影響 (T; R48/23) に関して提唱される分類によって対処を行うのがより適切であると考えられる。慢性影響には、調製物に関する指令 (EC, 1999) に基づいて付与される一般的な濃度基準よりも低い特定濃度基準が設定されるためである。

4.1.2.4 感作性

4.1.2.4.1 動物試験

4.1.2.4.1.1 皮膚感作性

硫酸ニッケルの皮膚感作性については、モルモットを用いて数多くの試験が行われている。これらのうち、いくつかの試験については Table 4.1.2.4A に要約している。

Table 4.1.2.4.A: Summary of skin sensitisation studies in animals

Species	Result	Method	Reference
Guinea pig	11/22*, 4/7	Skin painting	Lammintausta <i>et al.</i> (1985, 1986)
Guinea pig	20/20, 7/20, 12/20	Optimization test	Maurer <i>et al.</i> (1979)
Guinea pig	13/14	Intradermal 1%, challenge 2%	Bezian <i>et al.</i> (1965)
Guinea pig	21/30, 27/30	Open adm. + SLS + potassium alun injections	Zissu <i>et al.</i> (1987)
Guinea pig	Maximum response 40% positive after 3% i.d. induction	GPMT I.d. induction 0.01%-3% aqueous Topical induction 0.25%-10% pet Challenge 1% pet	Rohold <i>et al.</i> (1991)
Guinea pig	1% lanolin: 57-93% pos. 3% lanolin: 60-100% pos. 1% hydroxypropyl cellulose: 67-75% pos.	Open epicutaneous pretreatment SLS 0.3%-3% in lanolin or 0.3%-3% in hydroxypropyl cellulose i.d. injections of adjuvant	Nielsen <i>et al.</i> (1992)

硫酸ニッケル六水和物について、用量-反応関係が、モルモットのマキシミゼーション法により調べられている。それぞれ 6 段階の設定濃度で皮内注射(0.01%~3.0%水溶液)と皮膚適用(ワセリンを媒体とした 0.25%~10.0%調製物)で感作を誘導し、最初は、ワセリンを媒体とした 1%硫酸ニッケルで惹起した。48 時間後の時点で、皮内注射の場合、感作誘導に用いた用量と反応の間に直線的な関係が認められ(皮膚適用では認められず)、3%硫酸ニッケルで皮内感作誘導した場合に 40%というもっとも高い感作率が示された。1 週間後の再惹起の際には、反応は現れなくなっていた。35 日目にワセリンを媒体とした 10%硫酸ニッケルによる閉塞パッチで増幅を施し、ワセリンを媒体とした 2%の硫酸ニッケルで惹起し、72 時間観察し、統計学的に分析を行ったところ、非直線的な用量-反応関係が示された。また、惹起に対する反応の出現率が 40%と最も高かったのは、最初に 3%硫酸ニッケルの皮内注射で感作を誘導後皮膚適用を施し、2%調製物で惹起した場合であった(Rohold *et al.*, 1991)。

上記の試験で、惹起に対する反応を示す動物の割合が 40%と低いことが判明したため、開放皮膚適用法が試され、こちらの方がより効率的であることが判明した。1%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液で前処理を施した直後から、上背部の皮膚に、1%ラノリンクリーム(ワセリン基剤、pH5 SAD クリーム)またはヒドロキシプロピルセルロースを媒体とした 0.3~3%の硫酸ニッケルを、4 週間毎日塗布した。アジュバントとして硫酸アルミニウムカリウムを毎週皮内注射した。水を媒体とした 2%硫酸ニッケルとワセリンを媒体とした 1%硫酸

ニッケルで、それぞれ 1 週間おきに 2 回惹起した。両方の惹起の結果および濃度を考慮すると、感作が成立した割合は、1%ラノリンクリームを媒体とした 1%調製物では 57~93% (14 匹中 8~13 匹)、同じく 3%調製物では 60~100% (15 匹中 9~15 匹)、ヒドロキシプロピルセルロースを媒体とした 1%調製物では 67~75% (12 匹中 8~9 匹)であった。最初に感作誘導されてから 10 週間後に再惹起した結果、皮膚接触アレルギー反応が相変わらず生じたことが確認された(Nielsen *et al.*, 1992)。Basketter & Scholes(1992)は、0.5、1、2.5%の濃度で、マウスに対して局所リンパ節試験(local lymph node assay, LLNA)を実施している。この LLNA において、硫酸ニッケルは陰性結果を示した。

動物において、ニッケルに対する免疫学的寛容が獲得されるということが、いくつかの試験で実証されている(Vreeburg *et al.* 1984、van Hoogstraten *et al.* 1992a および b、van Hoogstraten *et al.* 1993、Ishii *et al.* 1993、van Hoogstraten *et al.* 1994、Troost *et al.* 1995; and Artik *et al.* 1999)。マウスやモルモットを使用した多くの試験では、ニッケルに対する持続性の免疫寛容が、皮膚の曝露を行う前に実施されたニッケルの経口投与により誘発された(Ishii *et al.*, 1993; van Hoogstraten *et al.*, 1992; Vreeburg *et al.*, 1984)。マウスでは、感作の前に硫酸ニッケルで胃内を処置(プライミング)することにより、同じ抗原(硫酸ニッケル)を皮膚適用した際の遅延型皮膚過敏反応が、耳介腫脹の測定結果に基づき、低減されたことが観察された(van Hoogstraten *et al.*, 1993)。これらの試験は、ニッケルに対する免疫学的寛容誘発の可能性を調査することが目的であったが、間接的に硫酸ニッケルがマウスにおいて皮膚感作を誘発する可能性を有することを示している。

4.1.2.4.1.1 動物における皮膚感作性に関する試験の結論

さまざまなプロトコルによる多くの試験から、硫酸ニッケルが、モルモットとマウスにおいて皮膚感作を誘発することが示されている。

4.1.2.4.1.2 呼吸器感作性

動物における呼吸器感作性に関するデータは、得られていない。

4.1.2.4.2 ヒトのデータ

4.1.2.4.2.1 皮膚感作性

ニッケルアレルギーは、ニッケルイオンに皮膚が曝露されることによって誘発されるが、

ニッケルによる免疫学的影響は、もっぱらニッケルイオンに起因すると考えられている (Menné 1994)。ニッケルへの一次感作のほとんどは、金属製品 (耳飾り、ピアス、アクセサリ、ジーンズのボタン、その他ニッケルを放出する製品など) との皮膚接触によって引き起こされる (European Environmental Contact Dermatitis Group, 1990)。しかし、職業感作は、硫酸ニッケルによって引き起こされる可能性があり、硫酸ニッケルへの感作はまた、試験的にも実証されている。

ニッケルアレルギーは、通常、硫酸ニッケルのパッチテストによって診断される。そのため、硫酸ニッケルがニッケルイオン源として使用されている多くのパッチテストの試験のデータがある。その試験のほとんどが、ニッケル金属感作に関連したもので、「ニッケルとニッケル化合物に関するバックグラウンド文書」で確認することができる。ニッケルアレルギー誘発の閾値を設定するために行われた硫酸ニッケルパッチテストの 3 試験については、本文書に要約されている。

4.1.2.4.2.1.1 人為的感作

Kligman (1966) は、ヒトにおいて被験物質により皮膚感作が認められるかどうかを調べるための、ヒト用のマキシミゼーション法を確立した。この方法は、1 群 25 人を被験者とし、感作頻度に依存したアレルギー誘発率が得られるようにデザインされている。さらに、この方法では、硫酸ニッケルで実施される場合には、10% 硫酸ニッケルでの 48 時間にわたる処置を 5 回繰り返す手順が、感作誘導法として用いられている。処置は、四肢 (前腕部またはふくらはぎ) の同一箇所、閉塞状態で行われた。被験者が感作されたかどうかについては、2.5% の濃度の硫酸ニッケルを用いて感作惹起することにより調べた。25 人中 12 人において感作が成立し、著者はこのデータから、硫酸ニッケルはヒトに対し中等度の感作性を示す物質として分類されると解釈している。

4.1.2.4.2.1.2 職業的感作

硫酸ニッケルが使用される場所におけるニッケル感作の発現を検討するためには、ニッケルめっきの職場環境に目を向ける必要があると思われる。硫酸ニッケルがニッケルめっき産業において、長年使用されてきたことは知られているが、他の可溶性ニッケル化合物がどの程度使用されてきたかは認識されていない。

職場環境におけるニッケル皮膚炎は、1889 年にすでに「Das Galvanizierekzem (めっき工の湿疹)」として認識されている (Blaschko 1989)。1930 年まで、ニッケル皮膚炎は、ニッケルめっき工の間では珍しくなかった。1925 年には、パッチテストによってニッケルアレルギー

一が電気めっき産業における皮膚炎の原因であることが示された。産業衛生の改善により、その後 10 年間で、ニッケル感作の数は大きく減り続けた。デンマークで調べられた 621 人のニッケル感受性患者のうち、ニッケルめっき工は、わずか 25 人であった (Marcussen 1960)。1960 年以降、電気めっき産業におけるニッケル感受性の報告は、散発的な数で推移している (Mathur 1984)。Schubert *et al.* (1987) は、176 人のニッケル感受性患者を調べ、そのうち、電気めっき工は 2 人だけだったことを確認している。

職場における調査が 1 件、フィンランドの合計 38 箇所の電気めっき工場を対象に実施されている。ニッケルめっき作業 (浴槽作業、吊り掛け作業、溶液調製) に携わる全労働者 (163 人) に、ニッケル皮膚炎や手の皮膚炎、防護対策、アトピー等に関する問診を実施した。硫酸ニッケルを用いたパッチテストは、TRUE Test™ 法で行われ、問診については、全労働者 (男性 94 人、女性 69 人) から回答を得た。平均年齢は、女性が 41.1 歳、男性が 43.1 歳であった。ニッケルに職業曝露された期間は、男性 (14 年) の方が女性 (10 年) よりも長かった。ほとんどの労働者が、保護手袋を着用していた。女性の 35% と男性の 30% が、現在手に皮膚炎がある、または過去にあったと報告した。アトピー性皮膚炎の既往歴のある人は 19% であった。女性の 15% (8 人) と男性の 4% (2 人) が、硫酸ニッケルのパッチテストでアレルギー反応を示した。そのうちの 70% は、現在または過去において、手に湿疹が生じたことがあると回答した。電気めっき労働者におけるニッケルアレルギー罹患率は、フィンランドのクリニックでパッチテストを受けた患者における罹患率と同様であった (Kanerva *et al.* 1997)。

4.1.2.4.2.1.3 アレルギー反応の惹起

ニッケルアレルギーの誘発や惹起は、硫酸ニッケルへの皮膚曝露あるいは硫酸ニッケルの経口摂取のいずれにおいても結果的に起こる可能性がある。経口摂取とアレルギー反応の惹起についてのデータは、「ニッケルとニッケル化合物に関するバックグラウンド文書」で確認することができる。

皮膚反応の惹起に要するニッケルの量を検討するため、Uter *et al.* (1995) は、ニッケルイオンとして $264 \sim 0.026 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度範囲で硫酸ニッケルの連続希釈列を設け、462 人のニッケル感受性患者にパッチテストを行った (Table 4.1.2.4.2.A)。Andersen *et al.* (1993) は、ニッケルイオンとして $67 \sim 0.002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の硫酸ニッケルの 10 段階希釈列パッチ (TRUE test 利用) と 2 個のプラセボパッチを用いて、72 人のニッケル感受性患者を検査した。これらの試験の結果は、「バックグラウンド文書」で考察されている。

Table 4.1.2.4.2.A: Total/threshold reactions (modified after Uter et al. 1995)

$\mu\text{g Ni}^{++}/\text{cm}^2$	Ni conc	Of all reactions ^{a)}			No. +-++++/thresh	N (tested)
		%(+)	%(++)	%(+++)		
264.0	5%	36.7	50.0	13.3	39	462
105.6	2%	42.2	47.1	10.7	17	
52.8	1%	49.4	42.5	8.1	37	
26.4	0.5%	60.7	31.4	7.9	70	
5.3	0.1%	68.3	26.0	5.7	65	329
2.64	0.05%	68.9	24.6	6.5	30	
0.53	100 ppm	83.8	16.2	-	19	
0.264	50 ppm	100	-	-	5	92
0.053	10 ppm	100	-	-	4	
0.026	5 ppm	-	-	-		
0	0 ppm	- **)	-	-		

a) %s are calculated from all reactions to a given concentration 'all reactions' are equal to or more than the cumulative frequency of threshold reactions, as patients without a determinable threshold⁾ are included here.

) patients without a determinable threshold are those with a negative reaction (few) or a questionable reaction to the next higher concentration

***) Uter (2003).

上述の試験のパッチテストでは、浸透を強化するため 48 時間閉塞状態で硫酸ニッケルが適用されている。

ニッケル溶液への反復浸漬試験も実施されている。Allenby & Basketter(1994)は、ニッケルとして 1 ppm(0.0001%)の濃度の硫酸ニッケル溶液に、1 回 10 分間、1 日 2 回で 1 週間、被験者の手を浸漬させた。浸透を促すため、皮膚刺激性のドデシル硫酸ナトリウムが用いられた。アレルギー反応の惹起を示したニッケル感受性被験者は認められなかった。

4.1.2.4.2.1.4 感作の閾値と惹起の閾値

感作と惹起の両閾値、すなわち無影響濃度(No Observed Effect Level、NOEL)の決定は、リスクの総合判定にとって重要である。また、化学物質の混合物の分類上、特定濃度基準を設定する場合にも、NOEL の決定がやはり重要である。

4.1.2.4.2.1.4.1 惹起

診断目的でのパッチテストでは、ワセリンを媒体とした 2.5 または 5%の硫酸ニッケルが使用される。経験的にこの濃度(ニッケルとして 132 または 264 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)は、ニッケルアレルギー

ギーの人に陽性反応を誘発することがわかっている。この反応における生物学的ばらつきはかなり大きい。そのため、得られたデータに基づく、ニッケル感受性の人における惹起の閾値、すなわち無影響濃度 (NOEL) を、科学的根拠のある値として設定することはできない。ただし、職業曝露については、リスクの総合判定で使用するのに適した経験的な閾値を、Uter *et al.* (1995) のデータに基づいて推定できる可能性がある。Uter の試験では、かなりの数の患者が、ニッケルとして $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の 48 時間パッチテストで反応を示している (329 人中 19 人)。次にテストした群では、92 人中 5 人の患者が、 $0.26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度のニッケルで反応を示した。しかし、これらの患者は、わずかにプラス 1(+) の反応で陽性とされており、また、集団の中では最も感受性のある群であることを考慮に入れなければならない。職業曝露が 48 時間続くことは考えにくく、ニッケル産業の労働者が、極端に感受性の高いニッケルアレルギー患者になる可能性は低いため、経験的な閾値 (NOEL) をニッケルとして $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ とすることが提案される。

4.1.2.4.2.1.4.2 感作

曝露によるリスクを推定する際には、皮膚の単位面積あたりの曝露量 (Robinson *et al.*, 2000) に加えて、浸透の起こりやすさ、すなわち、曝露期間の長さや閉塞適用であったかどうかとも考慮に入れる必要がある。

硫酸ニッケルへの皮膚曝露を行った試験のデータが得られなかったため、皮膚感作を引き起こし得る硫酸ニッケルの用量を推定することはできない。感作の閾値には、最良な推定値として、ニッケルとして $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と導出された惹起の閾値を採用することが提案される。感作には、惹起よりも高い投与量が必要であると想定されるため、この感作の推定閾値は惹起の推定閾値よりも安全側に考慮されていることになる。

この様に、惹起の閾値と感作の閾値は、ニッケルとして $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と導出されたが、この値は、0.005% よりわずかに多い濃度に相当する。特定濃度基準には、0.01% が提案される。

4.1.2.4.2.1.5 皮膚感作性に関するヒトにおけるデータの結論

硫酸ニッケルはヒトにおける皮膚感作物質であり、R43 の分類基準を満たしている。

感作された被験者では、硫酸ニッケルのパッチテストは、低い濃度でも陽性反応を引き起こす可能性がある。得られたデータに基づく、ニッケル感受性の人における惹起の閾値、すなわち NOEL を、科学的根拠のある値として設定することはできない。しかし、リスクの総合判定には、上述の論拠に基づき、経験的に導出された閾値、すなわちニッケルとし

て $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ という値を使用することが提案される。もし、曝露が閉塞状態でない場合には、アレルギー反応を惹起する潜在的リスクが低くなる可能性がある。

硫酸ニッケルへの皮膚曝露を行った試験のデータが得られなかったため、皮膚感作を引き起こし得る硫酸ニッケルの用量を推定することはできない。しかし、リスクの総合判定には、上述の論拠に基づき、経験的に導出された閾値、すなわちニッケルとして $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ という値を使用することが提案される。

R43 を付するという現行の分類は、適切であると考えられる。また、皮膚感作性に関して、硫酸ニッケルの特定濃度基準を 0.01% とすることも、この濃度が通常の皮膚感作に関する一般的な濃度基準の 100 分の 1 であることから、正当であると考えられる。

4.1.2.4.2.2 呼吸器感作性

職業性の喘息の単発症例が、5 件報告されている。これらの症例は、電気めっきまたは金属めっき工程において、硫酸ニッケルに曝露されたことが原因とされている (Block *et al.* 1982, Malo *et al.* 1982, Malo *et al.* 1985, McConnell *et al.* 1973, Novey *et al.* 1983)。

5 例とも、臨床症状と硫酸ニッケル専用の気管支吸入誘発テストの結果に基づき、診断が下された。この気管支吸入誘発テストにおいて、3 例は遅発型喘息反応だけを、1 例は即時型反応だけを、もう 1 例は遅発型と即時型の両方の反応を示した。皮膚の感作性テストでは、3 例が陽性であり (Malo *et al.* 1982, McConnell *et al.* 1973, Block *et al.* 1982)、2 例が陰性であった (Malo *et al.* 1985, Novey *et al.* 1983)。特異的 IgE 抗体は、2 例で検出され (Malo *et al.* 1982, Novey *et al.* 1983)、どちらの症例でも即時型反応がみられ、1 例では遅発型反応も併せて認められた。放射性アレルギー吸着法 (radio-allergosorbent test; RAST 法) による特異的 IgE の測定は、2 例 (Block *et al.* 1982, McConnell *et al.* 1973) を除いて実施されたが、1 例は陰性であった (Malo *et al.* 1985)。また、はんだ付けの煙の中のニッケルにより、職業性鼻炎を発症した症例も、1 例確認された。この症例は、硫酸ニッケルの点鼻による反応誘発試験で陽性を示した (Niordson 1981)。これらの結果は、ニッケルが免疫学のおよび非免疫学的機序によって喘息を誘発する可能性があることを示している (Malo *et al.* 1985)。

4.1.2.4.2.2.1 呼吸器感作性に関するヒトにおけるデータの結論

硫酸ニッケルは、ヒトにおける呼吸器感作物質であり、R42 の分類基準を満たしている。

特定濃度基準を提案するには、根拠が何も得られてない。

4.1.2.4.3 結論

硫酸ニッケルは、ヒトにおいては皮膚および呼吸器感作物質、実験動物においては皮膚感作物質であり、R42 と R43 の分類基準を満たしている。

感作された被験者では、硫酸ニッケルを用いてパッチテストを行うと、低い濃度で陽性反応が生じる可能性がある。得られたデータからは、ニッケルに感受性を有する人に反応を惹起させる濃度に関し、科学的根拠のある閾値(NOEL)を設定することはできない。しかし、リスクの総合判定には、経験的に導出された閾値、すなわちニッケルとして $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ という値を使用することが提案される。非閉塞状態での曝露は、アレルギー反応を惹起する潜在的リスクが低い可能性がある。

ニッケル皮膚炎の患者における経口経路での惹起に関しては、最大無毒性量(No Observed Adverse Effect Level、NOAEL)を確立することはできない。空腹の患者で反応を誘発させる用量については、最小毒性量(Lowest Observed Adverse Effect Level、LOAEL)として、 $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重という値が確立されている(Nielsen *et al.* 1999)。ただし、この用量は、48 時間ニッケル含有量の少ない食事で過ごした患者の空腹時における急性 LOAEL であることに留意する必要がある。反復曝露での LOAEL はより低い可能性があるが、食事にニッケルイオンが混合されていると当該イオンの吸収が低下するため、非空腹時の患者における LOAEL はおそらくより高くなると思われる。詳細については、ニッケルとニッケル化合物に関する「バックグラウンド文書」を参照のこと。

リスクの総合判定には、皮膚感作性に関して経験的に導出された閾値、すなわちニッケルとして $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ という値を使用することが提案される。

硫酸ニッケルは、すでに R42/R43 に分類されている。この既存の分類は、「R43 に関する特定濃度基準は 0.01%」の追加事項とともに、第 30 次 ATP で確認されている。

4.1.2.5 反復投与毒性

4.1.2.5.1 動物試験

ごく最近のレビュー(TERA 1999)では、硫酸ニッケルへの吸入曝露の場合、肺と鼻の両方でみられた影響から、非発がん性影響の標的器官を、気道と特定している。経口曝露の場合は、最も感受性のある標的は腎臓で、特に糸球体機能が低減されると述べている。経皮経路に関しては、一般毒性についての言及がなされていない。以下に、情報が得られた反

復投与毒性試験の内容を記載する。

硫酸ニッケルの反復投与毒性に関しては、3つの主要な投与経路それぞれによる試験が、数多く報告されている。

吸入による反復投与毒性については、13試験の情報が得られている。〔ラットの16日、13週(3件)、6ヵ月、9ヵ月、2年間試験については、Table 4.1.2.5.Gを参照。マウスの16日、13週(3件)、6ヵ月、2年間試験については、Table 4.1.2.5.Hを参照。〕

経口反復曝露による影響については、8試験の情報が得られている(ラット:13週間一飲水投与、90日間一強制経口、3および6ヵ月間一飲水投与、7ヵ月間一強制経口、2年間一混餌投与; イヌ:2年間一混餌投与; マウス:21日間一混餌投与、180日間一飲水投与、これらのうち7試験については、Table 4.1.2.5.Iを参照)。

経皮反復毒性については、3試験の情報が得られているが、いずれもリスク評価には有用でないと思われる。

4.1.2.5.1.1 吸入

米国国家毒性プログラム(National Toxicology Program, NTP)は、ラットやマウスに硫酸ニッケル六水和物を亜急性、亜慢性および慢性吸入させた場合に生じ得る毒性影響について、包括的な調査を実施した(NTP, 1996a)。慢性試験は、慢性/発がん併合試験として実施された。被験物質の質量基準平均粒径は、 $1.8\sim 3.1\ \mu\text{m} \pm 1.6\sim 2.9\ \mu\text{m}$ で、純度は、98%超であった。本セクションでは、硫酸ニッケル六水和物の慢性毒性に関するデータを扱い、観察された最も重要な毒性影響を表にして示した。硫酸ニッケル六水和物の発がん性に関するデータは、セクション4.1.2.7.1にて記載する。

4.1.2.5.1.1.1 ラットおよびマウスにおける NTP 試験

4.1.2.5.1.1.1.1 ラットでの16日間の試験

F344/N ラット(各群雌雄5匹ずつ)を、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして0、0.7、1.4、3.1、6.1、12.2 mg/m³相当〔硫酸ニッケル六水和物(純度98%超)としては0、3.5、7、15、30、60 mg/m³〕の濃度で曝露した。曝露は1日6時間、週5日のみとし、16日間で合計12日行われた。さらに、組織負荷試験のために、別途F344/N ラットの群(各群雌雄4~5匹)を設け、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして0、0.7、3.1、6.1 mg/m³相当(硫酸ニッ

ケル六水和物としては 0、3.5、15、30 mg/m³ の濃度で曝露した。試験結果については、Table 4.1.2.5A に要約している。

主試験では、12.2 mg/m³ (ニッケル換算) 群の雄 2 匹、6.1 mg/m³ 群の雌 1 匹および 12.2 mg/m³ 群の全ての雌が、試験終了期間前に死亡した。被験物質に曝露されたすべての群で、最終的な平均体重は、雌雄ともに対照群と比べ有意に低値であった。雄では平均体重増加量も同様に、対照群と比べ有意に低値であった。すべての曝露群(被験物質に曝露された群)において、0.7 mg/m³ 群を除き、ラットに呼吸数増加や活動レベル低下などの臨床所見が観察された。また、すべての曝露群において、肺の絶対・相対重量は、対照群と比べ有意に高値であった。顕著な体重減少(20~50%)にも関わらず、肺の絶対重量は、45~100% 増加していた。さらに、すべての曝露群において、肺の炎症(気管支上皮の変性を含む)が、雌雄両方で認められた。他に、気管支上皮の壊死が、12.2 mg/m³ 群の雌に認められた。また、鼻腔の嗅上皮の萎縮が、曝露を受けたすべての群で、雌雄を問わず認められた。さらに、鼻の呼吸上皮の変性が、3.1 mg/m³ 群の雌雄に観察されたが、12.2 mg/m³ 群の雄と、6.1 および 12.2 mg/m³ 群の雌には認められなかった。また、気管支リンパ節におけるリンパ過形成が、3.1 mg/m³ 群の雄、1.4 および 3.1 mg/m³ 群の雌に認められた。肺中ニッケル濃度は、被験物質に曝露されたすべての群において、雌雄とも対照群より高値を示した。最小曝露濃度であるニッケルとして 0.7 mg/m³ (硫酸ニッケル六水和物として 3.5 mg/m³) が、雌雄両方において、20%の体重減少、45%の肺の絶対重量増加、嗅上皮の萎縮、および肺の炎症に関する最小毒性濃度(LOAEC)であった。

Table 4.1.2.5A: Summary of 16-day rat study (NTP, 1996a)

Exposure level mg Ni/m ³	Effects observed	Response rate	NOAEC/ LOAEC mg Ni/m ³
0, 0.7, 1.4, 3.1, 6.1, 12.2	Lung inflammation in males	0/5, 5/5, 5/5, 5/5, 5/5, 4/5	- /0.7
	Lung inflammation in females	0/5, 5/5, 5/5, 5/5, 5/5, 5/5	- /0.7
	Degeneration, bronchial epithelium in males	0/5, 5/5, 5/5, 5/5, 5/5, 0/5	- /0.7
	Degeneration, bronchial epithelium in females	0/5, 5/5, 5/5, 5/5, 4/5, 0/5	- /0.7
	Necrosis, bronchial epithelium in males	- , - , - , - , - , -	-
	Necrosis, bronchial epithelium in females	0/5, 0/5, 0/5, 0/5, 0/5, 4/5	6.1/12.2
	Lymph node, bronchial hyperplasia in males	0/2, 4/5, 4/4, 5/5, 0/3, 0/5	1.4/3.1
	Lymph node, bronchial hyperplasia in females	0/3, 3/4, 4/4, 4/4, 0/2, 0/4	0.7/1.4
	Lymph node, mediast. Hyperplasia in males	0/2, 2/3, 3/3, 2/3, 0/3, 0/3	-
	Lymph node, mediast. Hyperplasia in females	0/3, 3/5, 3/4, 2/3, 0/4, 0/2	-
	Atrophy of olfactory epithelium in males	0/5, 5/5, 5/5, 5/5, 5/5, 4/5	- /0.7
	Atrophy of olfactory epithelium in females	0/5, 5/5, 5/5, 5/5, 5/5, 5/5	- /0.7
	Degeneration of resp. Epitelium in males	0/5, 1/5, 1/5, 5/5, 4/5, 0/5	1.4/3.1
	Degeneration of resp. Epitelium in females	0/5, 0/5, 0/5, 5/5, 2/5, 2/5	1.4/3.1

4.1.2.5.1.1.1.2 ラットでの13週間試験

各群雌雄 10 匹ずつの F344/N ラットを、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.027、0.056、0.11、0.22、0.44 mg/m³ 相当(硫酸ニッケル六水和物としては 0、0.12、0.25、0.5、1、2 mg/m³)の濃度で、1日6時間、週5日の頻度にて、13週間曝露した。さらに、組織負荷試験のために、別途雌雄 6 匹ずつの F344/N ラットの群を設け、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.027、0.11、0.44 mg/m³ 相当(硫酸ニッケル六水和物としては 0、0.12、0.5、2 mg/m³)の濃度で曝露した。試験結果については、Table 4.1.2.5B に要約している。

主試験では、0.44 mg/m³(ニッケル換算)群の雄 1 匹が、試験終了期間前に死亡したが、他は雌雄とも、試験終了まですべて生残した。最終的な平均体重と体重増加量は、すべての曝露群(被験物質に曝露された群)において、対照群と同等であった。試験期間中には、顕著な臨床所見はみられなかった。好中球数とリンパ球数に、曝露に関連した増加が認められ、これらの影響は、雌のラットにおいて最も顕著であった。肺の絶対・相対重量は、0.027 mg/m³ 群を除くすべての曝露群において、全般的に対照群よりも有意に高い値が示された。

肺における炎症性病変(肺泡マクロファージ集簇、慢性炎症、間質の浸潤)が、曝露に関連して認められ、すべての曝露群の雌雄両方において、発生率および重症度の増高が示された(0.22 mg/m³以上の群では、雄において、気管支リンパ節や縦隔リンパ節のリンパ過形成も発現)。0.22 および 0.44 mg/m³ 群では、雌雄において、嗅上皮の萎縮が認められた。肺におけるニッケル濃度は、0.11 と 0.44 mg/m³ 曝露群の場合、雄では 4、9、13 週の時点で、雌では 13 週の時点で、対照群よりも高値を示した。

さらに、後述の生殖毒性評価の一環として、最終屠殺時に 0.11、0.22、0.44 mg/m³ 群のすべての雄から、精子形態評価(精液濃度、精子奇形および運動性)用に精液試料を採取した。また、右精巣上体と右精巣の重量を測定した。膣の細胞学的評価(各発情段階の相対出現頻度、発情周期長)用に、すべての雌から試験終了前、連続最長 7 日間、膣試料を採取した。その結果、精子形態や膣細胞像には、有意な影響は認められなかった。

この試験では、肺の慢性炎症が、最も重篤な有害影響として検出された。雌は雄よりも感受性が高かった。マクロファージの集簇が、すべての曝露濃度において確認された。この影響については、適応修復反応と解釈すべきか、または最終的に線維症を誘発する一連の有害事象と解釈すべきかが、議論の対象となっている。TERA のレビュー(1999)によれば、マクロファージ集簇の生物学的意義に関して、明確な結論を出すことはできないとされている。マクロファージ集簇自体は、有害な反応とみなされないとも考えられる。しかし、マクロファージの集簇は、炎症の発現に密接に関係しているため、リスク評価との関連においては、有害事象の兆候としてとらえられるべきとも考えられる。マクロファージ集簇の毒性的意義に関する明確な結論が得られていない状況では、この試験からは、この影響に関する NOAEC や LOAEC を定めることは難しい。炎症については明らかな有害影響であるとみなされ、それに関する NOAEC/LOAEC は、ニッケルとして 0.056/0.11 mg/m³(硫酸ニッケル六水和物としては 0.25/0.5 mg/m³)である。

Table 4.1.2.5.B: Summary of 13-week rat study (NTP, 1996a)

Exposure level mg Ni/m ³	Effects observed	Response rate	NOAEC/ LOAEC mg Ni/m ³
0, 0.027, 0.056, 0.11, 0.22, 0.44	Inflammation, chronic active in males	0/10, 0/10, 0/10, 2/10, 10/10, 8/9	0.11/0.22
	Inflammation, chronic active in females	0/10, 0/10, 0/10, 4/10, 10/10, 10/10	0.056/0.11
	Interstitial infiltrate in males	1/10, 0/10, 1/10, 5/10, 10/10, 9/9	0.11/0.22
	Interstitial infiltrate in females	0/10, 0/10, 0/10, 6/10, 10/10, 10/10	0.056/0.11
	Macrophage hyperplasia in males	0/10, 10/10, 10/10, 10/10, 10/10, 9/9	- /0.027
	Macrophage hyperplasia in females	0/10, 8/10, 10/10, 10/10, 10/10, 10/10	- /0.027
	Lymph node, bronchial hyperplasia in males	0/5, -, 0/8, 4/10, 8/10, 9/9	0.11/0.22
	Lymph node, bronchial hyperplasia in females	0/7, -, 0/10, 4/10, 9/9, 10/10	0.11/0.22
	Lymph node, mediast. Hyperplasia in males	0/5, -, -, 0/10, 9/10, 7/9	0.11/0.22
	Lymph node, mediast. Hyperplasia in females	0/9, -, -, 0/8, 8/10, 9/10	0.11/0.22
	Atrophy of olfactory epithelium in males	0/10, 0/10, 0/10, 1/10, 10/10, 9/9	0.11/0.22
	Atrophy of olfactory epithelium in females	0/10, 0/10, 1/10, 2/10, 10/10, 10/10	0.11/0.22

4.1.2.5.1.1.1.3 ラットでの2年間試験

F344/ラット(各群雄 63～65 匹および雌 63～64 匹)を、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.027、0.056、0.11 mg/m³ 相当(硫酸ニッケル六水和物としては 0、0.12、0.25、0.5 mg/m³)の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日の頻度で 104 週間吸入曝露した。7 ヶ月時に、各群雌雄 5 匹ずつのラットについて病理組織学的検査を行い、さらに、別の各群雌雄 7 匹ずつのラットで、肺と腎臓におけるニッケル負荷量の測定を行った。15 ヶ月時には、各群雌雄 5 匹ずつのラットで、血液学的数値への影響、肺と腎臓におけるニッケル負荷量、および病理組織学的所見について評価が行われた。試験結果については、Table 4.1.2.5C に要約している。

生存率、体重、臨床所見、および血液学的所見：

被験動物の生存率は、被験物質へ曝露された群(曝露群)のいずれにおいても、雌雄とも対照群と同等であった。試験 2 年目の期間中は、0.11 mg/m³ 群の雌の平均体重が、対照群と比較してわずかに低値であった(6%～9%減)。試験終了時、すべての曝露群の雄および 0.027 と 0.056 mg/m³ 群の雌の最終的な平均体重は、対照群と比較して同等であった。硫酸ニッケル六水和物への曝露に関連すると思われる臨床所見や血液学的変化は認められなかった。15 ヶ月時の中間評価では、肺の相対重量の増加がすべての曝露濃度で雌雄ともに確認されたが、有意な増加は最高濃度群のみであった。

病理学的所見：

肺以外の臓器には、硫酸ニッケルが原因と考えられる病理学的所見は認められなかった。試験終了時、炎症性肺病変の発生率増加が、すべての曝露群の雌雄で全般的に認められた。慢性活動性炎症、マクロファージ増殖症、肺胞タンパク症、および線維症の発生率が、0.056 および 0.11 mg/m³ 群の雌雄で、統計学的に有意に増加していた。慢性活動性炎症、肺胞タンパク症、および線維症の重症度は、曝露濃度が上昇するにつれて増高した。慢性活動性炎症については、多巣性で、肺胞腔内にマクロファージ、好中球、および細胞残屑が軽微から軽度集簇して形成されると記載されている。線維症については、「肺実質および胸膜下組織における肺胞中隔を巻き込んだ結合組織とコラーゲンの増加、および胸膜下組織または肺葉の先端における限局性の硬化領域の出現」と描写されている。肺胞過形成については、重症度が軽微から軽度であり、「肺胞腔内へのマクロファージ(通常は、淡染で空胞化した豊富な細胞質を持つ)の集簇」によるものと記載されている。気管支リンパ節でのリンパ過形成の発生率増加が、2年間試験の終了時、0.11 mg/m³ 群の雌雄で認められた。嗅上皮の萎縮(平均重症度が軽微～軽度のもの)の発生率は、0.11 mg/m³ 群の雄雌において、試験終了時、対照群よりも有意に高かった。

7 ヶ月時の中間評価では、慢性活動性炎症の増加がすべての曝露群の雄に認められた。雌のラットにも、同様の傾向が観察された。

組織負荷に関する分析：

15 ヶ月時の中間評価において、曝露された雄雌のラットの肺におけるニッケル負荷量は、対照群よりも多かった。7 ヶ月時の中間評価では、最高濃度群においてのみ、肺のニッケル負荷量が増加していた。15 ヶ月時では、肺におけるニッケル負荷量の値は、曝露濃度の上昇とともに増加していた。

15 ヶ月と7 ヶ月時の中間評価では、ニッケルとして 0.027 mg/m³(硫酸ニッケル六水和物として 0.12 mg/m³)の最低曝露濃度で、肺重量と慢性炎症の増加傾向がみられており、こうした傾向は、この濃度で有害影響が生じた可能性を示唆している。しかし、その濃度が NOAEC や LOAEC を提示するものであるかどうかを判断することは困難である。そのため、炎症、線維症、マクロファージ増殖症に関する明確な影響量である、ニッケルとして 0.056 mg/m³ が、LOAEC とみなされる。ただし、データからは、より低用量でも有害な影響が起り得ることが示されており、留意を要する。

Table 4.1.2.5.C: Summary of 2-year rat study (NTP, 1996a)

Exposure level mg Ni/m ³	Effects observed, 24 months	Response rate	NOAEC/ LOAEC mg Ni/m ³
0, 0.027, 0.056, 0.11	Inflammation, chronic active in males	14/54, 11/53, 42/53, 46/53	0.027/0.056
	Inflammation, chronic active in females	14/52, 13/53, 49/53, 52/54	0.027/0.056
	Macrophage hyperplasia in males (*)	7/54, 9/53, 35/53, 48/53	0.027/0.056
	Macrophage hyperplasia in females (*)	9/52, 10/53, 32/53, 45/54	0.027/0.056
	Alveolar proteinosis in males	0/54, 0/53, 12/53, 41/53	0.027/0.056
	Alveolar proteinosis in females	1/52, 0/53, 22/53, 49/54	0.027/0.056
	Lung fibroses in males	3/54, 6/53, 35/53, 43/53	0.027/0.056
	Lung fibroses in females	8/52, 7/53, 45/53, 49/54	0.027/0.056
	Lymph node, bronchial hyperplasia in males	0/51, 0/48, 3/47, 10/52	0.056/0.11
	Lymph node, bronchial hyperplasia in females	2/50, 1/52, 0/51, 11/49	0.056/0.11
	Atrophy of olfactory epithelium in males	0/54, 0/53, 3/53, 7/53	0.056/0.11
	Atrophy of olfactory epithelium in females	0/51, 1/52, 1/53, 7/54	0.056/0.11

(*) There is no clear conclusion with regard to whether macrophage hyperplasia response should be interpreted as an adverse effect.

4.1.2.5.1.1.1.4 マウスでの 16 日間試験

各群雌雄 5 匹ずつの B6C3F1 マウスを、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.7、1.4、3.1、6.1、12.2 mg/m³ 相当〔硫酸ニッケル六水和物(純度 98%以上)としては 0、3.5、7、15、30、60 mg/m³〕の濃度で曝露した。平日のみ曝露し、16 日間で合計 12 回の曝露とした。さらに、組織負荷試験のために、別途雌雄 5 匹ずつの B6C3F1 マウスの群を設け、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.7 mg/m³ 相当(硫酸ニッケル六水和物としては 0、3.5 mg/m³)の濃度で曝露した。試験結果については、Table 4.1.2.5D に要約している。

主試験で 1.4 mg/m³ 以上の濃度で曝露された群のマウスがすべて、試験終了前に死亡した。一方、対照群と 0.7 mg/m³ のマウスはすべて、試験終了まで生残した。1.4、3.1、6.1、12.2 mg/m³ 群では、雌雄の最終平均体重と体重増加量が、対照群よりも有意に少なく、またこれらの群では、消瘦、活動性低下、呼吸数増加といった臨床症状が認められた。1.4 mg/m³ 以上の群の雌雄における肺の絶対・相対重量は、対照群に比べ有意に高値であった。0、0.7、1.4 mg/m³ 群のマウスのみ、病理組織学的検査が実施されている。0.7、1.4 mg/m³ 群の雌雄で、肺に炎症がみられた。1.4 mg/m³ 群の雌雄でみられた肺の炎症病変には、肺胞と気管支上皮の壊死が認められた。さらに鼻腔嗅上皮の萎縮が、0.7 mg/m³ 群の雌雄で観察された。0.7 mg/m³ 群のマウスにおける肺中ニッケル濃度は、対照群よりも高値であった。

この試験では、最小曝露量、すなわちニッケルとして 0.7 mg/m^3 (硫酸ニッケル六水和物として 3.5 mg/m^3) が、雌雄いずれについても、肺の炎症に関する LOAEC と判断された。これより高い曝露量である、ニッケルとして 1.4 mg/m^3 (硫酸ニッケル六水和物として 7 mg/m^3) では、全マウスの死亡という、明らかな毒性が示された。

Table 4.1.2.5.C: Summary of 2-year rat study (NTP, 1996a)

Exposure level mg Ni/m^3	Effects observed	Response rate	NOAEC/ LOAEC mg Ni/m^3
0, 0.7, 1.4	Lung inflammation in males	0/5, 4/5, 5/5	-/0.7
	Lung inflammation in females	0/5, 5/5, 5/5	-/0.7
	Lymph node, bronchial hyperplasia in males	0/4, 0/3, 0/4	-
	Lymph node, bronchial hyperplasia in females	0/2, 1/4, 0/4	-
	Atrophy of olfactory epithelium in males	0/5, 5/5, 0/5	-/0.7
	Atrophy of olfactory epithelium in females	0/5, 0/5, 0/3	-/-

4.1.2.5.1.1.1.5 マウスの 13 週間試験

各群雌雄 10 匹ずつの B6C3F1 マウスを、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.027、0.056、0.11、0.22、0.44 mg/m^3 相当 (硫酸ニッケル六水和物として 0、0.12、0.25、0.5、1、2 mg/m^3) の濃度で、週 5 日の頻度にて 13 週間曝露した。さらに、組織負荷試験のために、別途雌雄 5~6 匹ずつの B6C3F1 マウスの群を設け、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.027、0.11、0.44 mg/m^3 相当 (硫酸ニッケル六水和物としては 0、0.12、0.5、2 mg/m^3 相当) の濃度で曝露した。試験結果については、Table 4.1.2.5E に要約している。

主試験では、対照群の雄 4 匹と雌 3 匹、および 0.027 mg/m^3 群の雌 1 匹が試験終了前に死亡したが、曝露に関連すると思われる死亡ではなかった。他のマウスについては、すべて試験終了まで生残した。最終体重の平均値と体重増加量は、すべての曝露群において、対照群と同等であった。被験物質に関連した臨床所見はみられなかった。雌マウスでは、雌のラットで報告されたのと同様の血液学的変化 (好中球数とリンパ球数の増加) が認められたが、マウスでの影響は軽微であった。 0.22 mg/m^3 群の雄と 0.44 mg/m^3 群の雄雌では、肺の絶対・相対重量が、対照群に比べ有意に高値であった。 0.11 mg/m^3 以上の群の雄雌すべてに、肺胞マクロファージ数の増加が認められた。 0.44 mg/m^3 群では、肺において、慢性活動性炎症が雌に認められ、間質性浸潤と線維化が雌雄両方に認められた。 0.44 mg/m^3 群ではさらに、鼻腔の嗅上皮の萎縮が、雄雌両方で観察された。肺中ニッケル濃度は、 0.44 mg/m^3 群の雌では対照群よりも有意に高値であった。

さらに、後述の生殖影響評価の一環として、最終屠殺時に 0.11 、 0.22 、 0.44 mg/m^3 群のす

EURAR: NICKEL SULPHATE

すべての雄から、精子形態評価(精子濃度、精子奇形、および運動性)用に精子試料が採取された。また、右の精巣上体と精巣の重量を測定した。膣の細胞学的評価(各発情段階の相対出現頻度、発情周期長)用に、すべての雌から試験終了前、連続最長 7 日間、膣試料を採取した。これらの結果、精子形態や膣細胞像には、有意な影響は認められなかった。

この試験における最も重篤な有害影響は、肺の慢性炎症であった。雌は雄よりも感受性が高かった。マクロファージの集簇が、他の病変が生じるよりも低い濃度で起こることがわかった。この影響については、適応修復反応とすべきか、または最終的に線維症をもたらす一連の有害事象とすべきかが、議論の対象となっている。TERA のレビュー(1999)によれば、マクロファージ集簇の生物学的意義に関しては、最終的な結論を導き出せないとされている。マクロファージ集簇自体は、有害な反応とみなされないと考えられる。しかし、マクロファージ集簇は、炎症の発現に密接に関係しているため、リスクの評価との関連においては、有害事象の兆候としてとらえられるべきとも考えられる。マクロファージ集簇の毒性的意義に関する明確な結論が得られていない状況では、この試験からは、この影響に関する NOAEC や LOAEC を定めることは難しい。炎症、線維症、および萎縮については明らかな有害影響であるとみなされ、それらに関する NOAEC および LOAEC は、ニッケルとして 0.22 および 0.44 mg/m³(硫酸ニッケル六水和物として 1 および 2 mg/m³)である。

Table 4.1.2.5.E: Summary of 13-week mouse study (NTP, 1996a)

Exposure level mg Ni/m	Effects observed	Response rate	NOAEC/ LOAEC mg Ni/m ³
0, 0.027, 0.056, 0.11, 0.22, 0.44	Inflammation, chronic active in males	0/6, 0/9, 0/10, 0/10, 2/10, 2/10	-
	Inflammation, chronic active in females	0/7, 0/10, 0/10, 0/10, 1/10, 9/10	0.22/0.44
	Interstitial infiltrate in males	0/6, 0/9, 0/10, 0/10, 2/10, 8/10	0.22/0.44
	Interstitial infiltrate in females	1/7, 0/10, 0/10, 1/10, 1/10, 8/10	0.22/0.44
	Macrophage hyperplasia in males (*)	0/6, 0/9, 0/10, 10/10, 10/10, 10/10	0.056/0.11
	Macrophage hyperplasia in females (*)	0/7, 0/10, 0/10, 10/10, 10/10, 10/10	0.056/0.11
	Fibrosis in male	0/6, 0/9, 0/10, 0/10, 2/10, 10/10	0.22/0.44
	Fibrosis in female	0/7, 0/10, 0/10, 0/10, 1/10, 8/10	0.22/0.44
	Lymph node, bronchial hyperplasia in males	2/6, -, -, -, 6/10, 8/10	-
	Lymph node, bronchial hyperplasia in females	4/7, -, -, -, 7/10, 10/10	-
	Atrophy of olfactory epithelium in males	0/6, 0/9, 0/10, 0/10, 0/10, 10/10	0.22/0.44
	Atrophy of olfactory epithelium in females	0/7, 0/10, 0/10, 0/10, 0/10, 5/10	0.22/0.44

(*) There is no clear conclusion with regard to whether macrophage hyperplasia response should be interpreted as an adverse effect.

4.1.2.5.1.1.1.6 マウスの2年間試験

各群雌雄 80 匹ずつのマウスを、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとして 0、0.056、0.11、0.22 mg/m³ 相当 (硫酸ニッケル六水和物としては 0、0.25、0.5、1 mg/m³) の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日で 104 週間吸入曝露した。7 ヶ月時に、各群雌雄 5 匹ずつのマウスについて病理組織学的検査を行い、さらに別の各群雌雄 5 匹ずつのマウスで、肺と腎臓におけるニッケル負荷量の測定を行った。15 ヶ月時には、各群雌雄 5 匹ずつのマウスについて、この 15 ヶ月で生じた血液学および病理組織学的変化の評価を行い、さらに別の各群雌雄 5 匹ずつのマウスにおいて、肺と腎臓におけるニッケル負荷量を測定した。試験結果については、Table 4.1.2.5F に要約している。

生存率、体重、臨床的および血液学的所見:

マウスの生存率は、被験物質へ曝露された群 (曝露群) のいずれにおいても、雌雄とも対照群と同等であった。平均体重は、0.22 mg/m³ 群の雄とすべての曝露群の雌において、試験 2 年目の期間中、対照群と比べて低値であった。被験物質への曝露に関連すると思われる臨床所見や血液学変化は認められなかった。

病理学的所見:

2 年間の試験終了時、すべての曝露群のほとんどの雌雄に炎症性肺病変が認められた。これらの病変は、マクロファージ増殖症、慢性活動性炎症、細気管支化 (肺胞上皮の過形成)、肺胞タンパク症、および間質への炎症細胞浸潤などの像を示していた。気管支リンパ節におけるマクロファージの増殖やリンパの過形成が、2 年間の試験の終了時、0.22 mg/m³ 群のほとんどの雌雄と 0.11 mg/m³ 群の何匹かの雌に認められた。嗅上皮の萎縮が、0.11 および 0.22 mg/m³ 群の雄と 0.22 mg/m³ 群の雌に、2 年間の試験の終了時に認められた。他の器官には、硫酸ニッケルに関連した変化はみられなかった。

組織負荷に関する分析:

15 ヶ月時の肺の絶対重量は、0.11 および 0.22 mg/m³ 群の肺負荷量測定に供された雌において、対照群と比較して有意に高値であった。この試験では、すべての曝露群で肺に慢性炎症が認められている。雌は雄に比べて感受性が高かった。

肺の慢性炎症に関する LOAEC は、ニッケルとして 0.056 mg/m³ (硫酸ニッケル六水和物として 0.25 mg/m³) とされるが、NOAEC は定められない。

Table 4.1.2.5.F: Summary of 2-year mouse study (NTP, 1996a)

Exposure level mg Ni/m ³	Effects observed	Response rate	NOAEC/ LOAEC mg Ni/m ³
0, 0.056, 0.11, 0.22	Inflammation, chronic active in males	1/61, 2/61, 8/62, 29/61	0.056/0.11
	Inflammation, chronic active in females	1/61, 7/60, 14/60, 40/60	0/0.056
	Bronchialisation in males	1/61, 4/61, 19/62, 39/61	0.056/0.11
	Bronchialisation in females	0/61, 9/60, 32/60, 45/60	0/0.056
	Macrophage hyperplasia in males	6/61, 9/61, 35/62, 59/61	0.056/0.11
	Macrophage hyperplasia in females	7/61, 24/60, 53/60, 59/60	0/0.056
	Interstitial infiltration in males	1/61, 0/61, 3/62, 17/61	0.11/0.22
	Interstitial infiltration in females	0/61, 4/60, 16/60, 39/60	0.056/0.11
	Alveolar proteinosis in males	0/61, 0/61, 0/62, 42/61	0.11/0.22
	Alveolar proteinosis in females	0/61, 0/60, 11/60, 45/60	0.056/0.11
	Lymph node, bronchial hyperplasia in males	2/46, 4/49, 2/45, 17/54	0.11/0.22
	Lymph node, bronchial hyperplasia in females	15/50, 9/54, 16/58, 26/56	0.11/0.22
	Atrophy of olfactory epithelium in males	0/61, 0/61, 12/61, 37/60	0.056/0.11
	Atrophy of olfactory epithelium in females	0/61, 2/59, 1/60, 17/60	0.11/0.22

4.1.2.5.1.1.2 肺障害の機序を検討した試験

Benson *et al.* (1995) は、雄の F344/N ラットと B6C3F1 マウスに硫酸ニッケルを吸入させ、肺における粒子のクリアランスの測定と病理組織検査を実施した。マウスやラットは、1日6時間、週5日で最長6ヵ月間、曝露チェンバー内で全身曝露された。硫酸ニッケルへの曝露が、ラットではニッケルとして 0.027、0.11 mg/m³ 相当(硫酸ニッケル六水和物としては 0.12、0.5 mg/m³)の濃度で、マウスではニッケルとして 0.056、0.22 mg/m³ 相当(硫酸ニッケル六水和物としては 0.25、1.0 mg/m³)の濃度で行われた。全身曝露が2ヵ月ないしは6ヵ月行われた時点で、肺におけるクリアランス測定のため、群分けしたラットとマウスを、⁶³Ni で標識した硫酸ニッケル六水和物または ⁸⁵Sr で標識したポリスチレンラテックス (PSL) 微粒子に急性鼻部曝露した。さらに、別の群のラットとマウスを、全身曝露が2ヵ月ないしは6ヵ月行われた時点、および全身曝露が完了して2ヵ月ないしは4ヵ月経過した時点で安楽死させ、左肺の組織病理学的変化の評価と右肺のニッケル量の測定を行った。予め2ヵ月ないしは6ヵ月の曝露を受けていたラットやマウスにおいて、⁶³Ni で標識した硫酸ニッケル六水和物で急性曝露した後の当該化合物の肺クリアランスに、低減は認められなかった。スチレン微粒子のクリアランスには、2ヵ月間曝露を受けていたラットで低減がみられたが、6ヵ月間曝露を受けていたラットでは低減はみられなかった。硫酸ニッケル六水和物に曝露されたラットとマウスの肺に、ニッケルの蓄積はみられなかった。マ

ウスには、ごくわずかな病理組織学的変化しかみられなかったが、ラットでは肺胞マクロファージ増殖症および慢性肺炎がみられた。⁸⁵Sr で標識した微粒子のクリアランスは、硫酸ニッケルに 2 ヶ月間曝露(微粒子投与中も硫酸ニッケルに継続して曝露)されたラットの群では低減がみられているが、別の 2 ヶ月間曝露群(硫酸ニッケルへのそれ以上の曝露なし)のラットには低減が生じなかったということに注意する必要がある。さらに、硫酸ニッケルに 6 ヶ月間曝露され、それからスチレン微粒子を投与されたラットでも、肺クリアランスの低減はみられていない。Benson は、異なる試験から非同時進行対照群が流用されているため、1 例の曝露シナリオのみにおいてクリアランス低減がみられたという結果は、人為的にもたらされた可能性があるとし唆している。この考えは、⁸⁵Sr で標識化した微粒子のクリアランス低減が、硫酸ニッケルに 6 ヶ月間曝露されたラットやマウス、または酸化ニッケルに 2 または 6 ヶ月間曝露されたラットやマウスには、より重度の肺病変がみられ肺ニッケル負荷量のはるかに大きいにもかかわらず、観察されなかったという事実から固められている。

Benson *et al.*(1992)は、肺に関する生化学的評価項目に及ぼす硫酸ニッケルの影響について検討した。雌雄の F344/N ラットと B6C3F1 マウスを、硫酸ニッケルとして 0.12~2.0 mg/m³(ニッケルとして 0.027~0.44 mg/m³に相当)の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日の頻度で 13 週間、吸入曝露した。この亜慢性曝露により、乳酸脱水素酵素(LDH)とベータグルクロニダーゼ(BG)活性、および総蛋白(TP)とコラーゲン様ペプチド(CP)の増加が引き起こされた。この結果から、それぞれ肺における細胞損傷または細胞死、食作用活性の増高、血管透過性の増高、細胞外コラーゲン基質の代謝回転増高が生じたことが示唆される。BG 増加の程度は LDH 増加よりも大きく、これは、BG 増加が活性食細胞の存在によるものであり、単に損傷または細胞死した食細胞からの酵素放出によるものではないことを示している。マウスでは線維症が発生したが、ラットには発生しなかった。

Benson *et al.*(1989)は、ラット(各群雄雌 6 匹ずつ)およびマウス(各群雄雌 8 匹ずつ)を対象に、硫酸ニッケル六水和物が肺に及ぼす生化学的反応を検討するため、ニッケルとして 0、0.027、0.11、0.44 mg/m³ 相当(硫酸ニッケル六水和物としては 0、0.12、0.5、2.0 mg/m³)の濃度で 1 日 6 時間、週 5 日の頻度にて、13 週間の曝露を行った。生化学的反応は、被験動物の肺から回収された気管支肺胞洗浄液を試料として測定された。評価されたパラメータは、乳酸脱水素酵素(LDH)、ベータグルクロニダーゼ(BG)、および総蛋白(TP)であった。総細胞数および白血球百分率は、気管支肺胞洗浄液中に回収された細胞で算定された。肺の組織学的分析も実施された。著者は、性別に関連する有意な差はみられなかったと述べており、そのため、結果は性別を分けずに報告されている。中および高濃度群のラットとマウスで、LDH と BG の著しい増高が認められ、この増高は、濃度依存的かつ統計学的に有意であった。これらの濃度群のラットでは、総蛋白にも同様の増加が認められた。有核細

胞の総数の著しい増加が、ラットでは低～高濃度群で、マウスでは中および高濃度群で、濃度依存かつ統計学的に有意に認められた。ラットの中および高濃度群では、好中球の百分率が顕著に上昇し、マクロファージの百分率が顕著に低下した。ラットでは、肺の慢性炎症と間質への細胞浸潤が中および高濃度群に認められ、マクロファージ集簇が被験物質への曝露を受けた全群で認められた。マウスでは、マクロファージ集簇と間質への細胞浸潤が中および高濃度群で認められ、肺の慢性炎症と線維症が高濃度群でのみ確認された。ラットとマウス両方において、BG の増高は LDH や TP の増高よりも大幅であった。慢性活動性炎症、マクロファージ増殖症、および間質への食細胞の浸潤は、組織学的検査によりラットとマウスの両方に認められた。BG、TP、好中球、およびマクロファージにみられた統計学的に有意な増加は、慢性活動性炎症の程度と良く相関していた。

情報が乏しいが、Kosova(1979、UK HSE 1987 より引用)の試験では、ラットの硫酸ニッケル(の粉塵)への曝露が、ニッケルとして 0、1.1、2.2 mg/m³〔「硫酸ニッケル」(硫酸ニッケル六水和物と推定される)としては 0、5.0、10.0 mg/m³〕の濃度にて、毎日 4 時間で 9 ヶ月間実施されている。主な影響は、肺について報告されており、2.2 mg/m³群において、上皮細胞の破壊、肺胞中隔の肥厚、肺胞内腔の気腫性膨張が認められている。ほかに肝損傷および腎尿細管壊死も報告されている。1.1 mg/m³群では、わずかな病理学的変化と体重減少が確認されている。

4.1.2.5.1.1.3 反復吸入毒性に関する要約および結論

硫酸ニッケルの吸入毒性は、マウスおよびラットにおいて、NTP(1996a)による高品質なものを含め、多くの試験で検討されている。ラットは、マウスよりも毒性影響に対して感受性が高い。呼吸器系は主要な標的器官で、深刻な影響が肺(慢性炎症と線維症)と鼻部(嗅上皮の委縮)の両方に生じた。

Table 4.1.2.5 G と 4.1.2.5 H では、ラットおよびマウスにおける硫酸ニッケルの反復吸入試験の概要を示している。これらの試験から、硫酸ニッケルの吸入がラットやマウスに慢性の肺損傷をもたらすことが示された。NTP による 2 年間試験は、ヒトの一生涯の曝露量の観点から、最も重要な意味を持つ。ラットでは、試験における最低曝露量、すなわちニッケルとして 0.027 mg/m³ の濃度での曝露で、7 ヶ月と 15 ヶ月経過後の中間評価時に有害影響とみなされ得る兆候がみられたため、NOAEC を確定することはできなかった。そのため、明確な有害影響(肺の炎症と線維症)が示された 0.056 mg/m³(ニッケル換算)という曝露濃度を LOAEC として採用した。マウスでの試験は、より高濃度で実施されており、NOAEC の確定に至らなかった。マウスの LOAEC は、ニッケルとして 0.056 mg/m³であった。リスクの総合判定には、ニッケルとして 0.056 mg/m³(硫酸ニッケル六水和物として

0.25 mg/m³) という LOAEC を考慮に入れる。

Table 4.1.2.5.G: Repeated dose inhalation studies with nickel sulphate in rats

Duration	Dose levels As mg Ni/m ³	NOAEC mg Ni/m ³	LOAEC mg Ni/m ³	Effect at LOAEC	Reference
16 days	0, 0.7, 1.4, 3.1, 6.1, 12.2	No dose level without effect	0.7	Atrophy of olfactory epithelium, lung inflammation	NTP (1996a)
13 weeks	0, 0.027, 0.056, 0.11, 0.22, 0.44	0.056	0.11	Chronic active inflammation	NTP (1996a)
		No dose level without effect	0.027	Macrophage accumulation	
13 weeks	0.027, 0.11, 0.44	0.027	0.11	Chronic inflammation	Benson <i>et al.</i> (1989)
13 weeks	0.027, 0.44			Increases in indices of cell damage	Benson <i>et al.</i> (1992)
2 or 6 months, plus exposure-free interval of 0, 2, or 4 months	0.027, 0.11			Chronic alveolitis	Benson <i>et al.</i> (1995)
9 months	0, 1.1, 2.2	No dose level without effect	1.1	Decreased bodyweight, lung effects at 2.2	Kosova (1979)
2 years	0, 0.027, 0.056, 0.11	No definitive NOAEC due to increased lung weights and increase in chronic inflammation at 0.027 at the 7 and 15 months interim evaluations	0.056	Chronic lung inflammation, fibrosis (both sexes)	NTP (1996a)

Table 4.1.2.5.H: Repeated dose inhalation studies with nickel sulphate in mice

Duration	Dose levels as mg Ni/m ³	NOAEC mg Ni/m ³	LOAEC mg Ni/m ³	Effect at LOAEC	Reference
16 days	0, 0.7, 1.4	No dose level without effect	0.7	Atrophy of olfactory epithelium, lung inflammation	NTP (1996a)
13 weeks	0.027, 0.11, 0.44	0.11	0.44	Chronic inflammation, fibrosis	Benson <i>et al.</i> (1989)
13 weeks	0.027, 0.44			Increases in indices of cell damage and fibrosis	Benson <i>et al.</i> (1992)
13 weeks	0, 0.027, 0.056, 0.11, 0.22, 0.44	0.056 0.22	0.11 0.44	Macrophage hyperplasia inflammation, fibrosis and atrophy	NTP (1996a)
2 or 6 months, plus exposure-free interval of 0, 2, or 4 months	0.056, 0.22	No dose level without effect	0.056	Minimal histopathological changes	Benson <i>et al.</i> (1995)
2 years	0, 0.056, 0.11, 0.22	No dose level without effect	0.056	Chronic lung inflammation in females	NTP (1996a)

非発がん性影響に関する NOAEC の問題については、欧州委員会 (European Commission) の環境大気に関する方針声明 (2000) の中で広範に議論されている。この中で、ラットとマウスで実施された NTP (1996a) の 2 年間吸入試験が、環境大気の事案を扱う作業部会によって分析されている。欧州委員会 (2000) は、以下のように結論づけている。「ラットでは、ニッケルとして 0.06 mg/m^3 の濃度にて明らかな有害影響が認められている。肺線維症については、この 2 年間試験において、 0.03 mg/m^3 の濃度 (ニッケルとして) での曝露で雄にわずかな増加が認められるが、統計学的に有意ではない。しかし、雄ラットには、15 ヶ月の時点で行われた中間評価において、肺重量の増加傾向がみられている。これらの結果から、ニッケルとして 0.03 mg/m^3 の濃度で有害影響を生じる可能性が示されているため、この濃度は、ラットにおける NOAEL とみなせないと考えられる。これは、硫酸ニッケル六水和物で実施された NTP 試験では、マウスの LOAEL が 0.06 mg/m^3 (ニッケルとして) で、ラットの LOAEL はおそらく 0.06 mg/m^3 (ニッケルとして) より低く、ラットとマウスのどちらにおいても NOAEL は特定できないことを意味する。」毒性、生態毒性および環境に関する (EU の) 科学委員会 (CSTEE) は、彼らの方針説明文書にて、前述の結論への同意を示し、ニッケルとして 0.03 mg/m^3 という曝露量について、「明らかに NOAEL 値を表しているとはいえない」とみなしている (CSTEE, 2001)。さらにこの方針説明文書には、 0.03 mg/m^3 とい

う曝露量について作業部会の業界会員が示した見解も記載されている。その記載によれば、業界、NTP、カリフォルニア EPA、そして TERA のリスク評価審査部会の会員は、0.03 mg/m³ をこの試験の NOAEC として確定している。

本文書作成者は、この問題をはっきりさせることのできる、CSTEE による上述の評価よりも新しいデータを入手できていない。本文書作成者は、CSTEE の判断に同意しているため、ニッケルとして 0.056 mg/m³ という LOAEC を、今後のリスクの総合判定において考慮に入れる。

4.1.2.5.1.2 経口

4.1.2.5.1.2.1 一般毒性

4.1.2.5.1.2.1.1 ラット

ラットの 90 日間強制経口試験が、硫酸ニッケル六水和物を使用し、2 年間発がん性試験の用量設定試験として、GLP に準拠して実施されている。雌雄各 10 匹ずつのラットの群を設け、ニッケルとして 0、11、17、22、28、33 mg/kg 体重/日 (硫酸ニッケル六水和物としては 0、50、75、100、125、150 mg/kg 体重/日) の用量で投与を行った。試験早期に高用量群の雄に顕著な体重減少がみられたため、雄のみ 28 日目に用量を減らし、硫酸ニッケル六水和物として 125 と 150 mg/kg 体重/日であったのを、それぞれ 30 と 15 mg/kg 体重/日とした。硫酸ニッケル六水和物として 150 mg/kg 体重/日を投与した群で、雌 1 匹が 44 日目に死亡していることが確認されたが、死因は特定できなかった。この試験では、臨床所見として、投与後に流涎と活動性低下がみられた。この所見は、投与開始から 2 週間目までの間に最も顕著に現れ、最高用量群で最も重度であった。

被験物質の投与を受けたラットでは、統計学的な絶対重量の減少および相対重量の増加が様々な器官で認められた。しかし、これらの影響は、病理組織学的変化を伴うものではなかった。この試験で有意と確認された唯一の有害影響は、被験物質投与群における体重減少であった (対照群と比べ 8~13% の低下)。肉眼的または顕微鏡的に目立った変化はみられなかった。体重への影響がみられなかった用量がなかったため、LOAEL は、雄がニッケルとして 7 mg/kg 体重/日 [硫酸ニッケル六水和物としては 30 mg/kg 体重/日 (28 日目に 125 mg/kg 体重/日から減らした用量)]、雌が 11 mg/kg 体重/日 (硫酸ニッケル六水和物としては 50 mg/kg 体重/日) と判断された (SLI、草稿の日付不明、2002 年に投稿)。

Obone *et al.* (1999) は、雄の成熟 SD ラット 8 匹からなる群に、硫酸ニッケル六水和物を、

ニッケルとして 0、44.7、111.75、223.5 mg/L 相当(硫酸ニッケル六水和物の 0、0.02、0.05、0.1%溶液)の濃度の飲用水として、13 週間自由摂取させた。屠殺前、代謝ケージで 24 時間尿を採取し、糖と蛋白の含有量、N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼと γ-グルタミントランスペプチターゼの活性を測定した。ラットは体重測定後、屠殺された。血液試料を採取し、血液学的パラメータや血漿コリンエステラーゼ活性を含む臨床生化学パラメータを測定し、また器官重量を測定した。病理組織学的検査を肝臓、腎臓、心臓、脳、精巣、肺、脾臓、胸腺、および腸について実施した。気管支肺胞洗浄液を採取し、細胞損傷の指標として分析した。肺組織ホモジネートを調製し、各種酵素を検査した。精巣組織のホモジネートも調製し、各種酵素活性と蛋白含有量を測定した。脾臓および胸腺組織ホモジネートにおいて、免疫毒性パラメータを測定した。肝臓と腎臓の細胞溶解物を用いて、DNA 損傷を蛍光光度法によって評価した。組織におけるニッケル含有量を、質量分析法により測定した。

被験動物はすべて投与期間終了まで生残し、明らかな毒性の臨床兆候は認められなかった。最高用量群では、最終平均体重にわずかだが統計学的に有意な減少(4%)がみられた。それより低用量の群では、体重への影響はみられなかった。

被験物質投与群のいずれにおいても、検査した組織に肉眼的または顕微鏡的变化はみられなかった。

肝臓の絶対・相対重量は、最高用量側の 2 群で減少した(本文書作成者の推定では 15%)。

腎臓の相対重量は、最低および最高用量群で増加した(推定 10%)。

肺の絶対重量は、最低および最高用量群で増加し(推定 10%)、相対重量は、最高用量群でのみ増加した。

精巣と心臓は、絶対重量のみ被験物質投与群すべてで減少した(推定 5%)。

脾臓の相対重量が、被験物質投与群すべてで増加した(推定 5%)。

脾臓と胸腺のリンパ球亜集団(T 細胞と B 細胞)には、傾向が定まらない影響がみられた。脾臓と胸腺の両方において、総細胞数が、対照群と比較して、中用量群(ニッケルとして 111.75 mg/L)では増加、最高用量群(ニッケルとして 223.5 mg/L)では減少した。

中用量群と最高用量群において、有意な尿量低下(1/3 に低下)と尿糖低下(1/4 に低下)がみられた。最高用量群では、血中尿素窒素が有意に増加した(ほぼ 2 倍)。著者によれば、この所見は糸球体損傷によるものである可能性がある。肺酵素の検査では、アルカリホスフ

ァターゼのみで影響がみられ、気管支肺胞洗浄液には減少が確認された。精巢の酵素には影響はみられなかった。血漿アセチルコリンエステラーゼは影響を受けなかった。

この試験では、ニッケルを反復経口投与しても、特定のエンドポイントに顕著な毒性影響は引き起こされなかった。わずかな体重減少が、最高用量群に認められた。各種器官の重量変化はわずかで、病変を示唆する形態学的証拠を伴わなかったため、これらの変化を単純に有害と解釈することはできない。免疫学的に重要な器官である脾臓と胸腺の病理組織学的検査では、有害な変化は認められなかった。脾臓の重量は増加しており、免疫機能抑制は示されていない。他の免疫関連器官(リンパ節、骨髄)は、検査されていない。胸腺と脾臓の B および T 細胞の数に一様でない影響がみられたが、特に投与量との一貫した関連性がみられないため、これらの影響の毒性学的意味は不確かである。腎臓に関しては、相対重量の増加、尿量減少、および血中尿素窒素の増加により、有害影響が生じたことが示されたとすることは可能である。しかし、病理組織学的変化が認められていないため、これらの臨床的生化学変化を簡単に解釈することはできない。尿量減少は、硫酸ニッケルが含まれていることで水の味が損なわれ、おそらくそのために水分摂取が減少したことと関連していると考えられる。飲水量の測定は実施したと報告されているが、残念ながら公表されたデータはない。

この試験には、いくつか欠点がある。1 群あたりの被験動物数はわずか 8 匹であり、また対象は雄のみである。詳細な臨床的観察、行動学的検査、および眼の検査は行われていない。病理組織学的評価がすべての器官について実施されていない。通常、反復投与毒性試験では、免疫系への影響評価に関連する器官も含め、すべての器官で実施される。それでもなお、この試験はかなりよく実施されているとみなすことができ、硫酸ニッケルの反復投与毒性の評価に有益であると考えられる。

この試験の LOAEL は、非常に重篤というわけではないが、生物学的に重要な有害影響とみなせることから、4%の体重減少と腎臓および肺の相対重量の増加に基づいて定められ、ニッケルとして 111.75 mg/L とされる。NOAEL は、ニッケルとして 44.7 mg/L と設定される。この試験では、摂餌量と飲水量を測定したと報告されているが、データは公表されていない。飲水量が 0.1 L/kg 体重/日であるという仮定に基づくと、経口 LOAEL はニッケルとして 11 mg/kg 体重/日(硫酸ニッケル六水和物として 49 mg/kg 体重/日)、NOAEL はニッケルとして 4.5 mg/kg 体重/日(硫酸ニッケル六水和物として 20 mg/kg 体重/日)となる。

Ambrose *et al.*(1976)は、長期混餌投与試験を実施している。離乳したばかりの Wistar ラット(各群雌雄 25 匹ずつ)に、硫酸ニッケル六水和物を混餌投与した。飼料中の濃度は、ニッケルとして 0、100、1000、2500 ppm(ニッケルとして 0、10、100、250 mg/kg 体重/日に相当、摂餌量を 100 g/kg 体重/日と仮定して本文書作成者が算出)であった。試験報告では、飼

料中における硫酸ニッケル六水和物の実際の濃度は示されていないが、計算すると、それぞれ 0、45、450、1121 mg/kg 体重/日となる。投与は、最長 2 年間実施された。基礎飼料に含まれるニッケル量に関する情報は報告されていない。3 ヶ月ごとに、各群雌雄 5 匹ずつから血液と尿の試料を採取した。対照群を含め、全群において生存率は低かった(68～92%の死亡率)。このため、最終屠殺時、肉眼的および顕微鏡的な病理学的検査が可能だったのは、各群 2～8 匹だけだった。心臓、脾臓、腎臓、肝臓、および精巣の重量を測定し、病理組織学的検査に供した。さらに、肺、膀胱、胃、小腸、大腸、骨格筋、脳、皮膚、骨髄、下垂体、甲状腺、副腎、膵臓、および生殖腺の病理組織学的検査を行った。体重は、対照群と比較して、1000 ppm 以上の群の雌では 6 週目から有意に低く、2500 ppm 群の雌雄ではどちらも試験開始時から有意に低かった。78 週時、中用量群の体重が、雌では 18%雄では 8%減少しており、高用量の体重は、雌では 32%雄では 35%減少していた。血液学的検査項目(ヘモグロビン、ヘマトクリット、および白血球百分率)、および尿検査項目(還元物質と蛋白)には、曝露に関連した変化はみられなかった。明らかな用量-反応関係は示されなかったが、1000 ppm 群の雌で肝臓の相対重量が有意に減少し、心臓の相対重量が統計学的有意に増加した。組織学的所見は実質的に陰性であり、ニッケルの混餌投与で独自に生じるような影響は特に示されなかった。この試験では、全群で死亡率が高かったため、2 年間の投与をやり終えて屠殺および病理組織学的検査が可能だったのは少数であった。しかし、雌において 18%の体重減少が認められ、これが生物学的に重要な有害影響とみなされることに基づき、NOAEL をニッケルとして 10 mg/kg 体重/日(硫酸ニッケル六水和物として 45 mg/kg 体重/日)、LOAEL をニッケルとして 100 mg/kg 体重/日(硫酸ニッケル六水和物として 450 mg/kg 体重/日)とすることは可能である。

Itskova *et al.* (1969、UK HSE 1987 より引用)は、ラットにニッケルとして 0.5、5、50、500、5000 µg/kg 体重相当の硫酸ニッケルを 7 ヶ月間、毎日強制経口投与した。統計学的に有意な体重増加抑制が、最高用量群で認められた。血液学的パラメータや少数の検体で検査された血清臨床パラメータに、影響はみられなかった。病理学的検査では唯一の有意な変化として、腸絨毛の著しい増殖が、500 および 5000 µg/kg 体重群で認められ、それは円形細胞浸潤を伴い、また尖部壊死を伴う場合もあった。UK HSE によれば、試験報告の内容は乏しく、さらなる詳細情報は提示されていなかった。これらの欠点のため、この試験をリスク評価には用いない。

OECD テストガイドライン 451 に準拠して、硫酸ニッケル六水和物を Fischer ラットに 2 年間(強制)経口投与した発がん性試験が実施されている(CRL 2005)。雌雄各 60 匹ずつのラットの群を設け、ニッケルとして 0、2.2、6.7、11 mg/kg 体重/日(硫酸ニッケル六水和物としては 0、10、30、50 mg/kg 体重/日)の用量で、1 日 1 回、104 週間投与を行った。被験物質は水に溶解し、容量を体重 1 kg あたり 10 mL として強制経口投与した。雄では、対照群と

比較して統計学的に有意な体重増加抑制が、被験物質投与群で用量依存的に認められた(それぞれ 5%、11%、12%)。同様に、雌でも、対照群と比較して、用量依存的な体重増加抑制が(それぞれ 4%、8%、10%)みられたが、統計学的に有意だったのは、中および高用量群のみであった。体重増加抑制は、飼料消費量との相関関係を有してはいなかった。雌の生存率は、用量依存的に減少し、中および高用量群では統計学的に有意であった。試験終了時の雌の死亡率は、ニッケルとして 0、2.2、6.7、11 mg/kg 体重/日の各用量群で、それぞれ 23、33、43、45%であった。雄の生存率には、投与に関連した明らかな影響はみられなかった(死亡率は、0、2.2、6.7、11 mg/kg 体重/日群で、それぞれ 60、48%、50%、57%)。

非腫瘍性の顕微鏡的所見は、いずれも被験物質の投与に関連したものではないと判断された。

4.1.2.5.1.2.1.2 イヌ

Ambrose *et al.* (1976)は、イヌの慢性試験も実施している。雄雌各 3 匹のビーグル犬に、硫酸ニッケル六水和物を、飼料とともに摂取させた。飼料中濃度は、ニッケルとして 0、100、1000、2500 ppm [1 ppm の飼料中濃度が 0.075 mg/kg 体重/日の用量に相当する (OECD 1999) と仮定すると、ニッケルとして 0、7.5、75、188 mg/kg 体重/日の用量に相当] に設定され、2 年間曝露が行われた。100 と 1000ppm 群では、とくに影響はみられなかった。最高用量群では、体重増加抑制が生じた。高用量では、嘔吐が引き起こされたため、最高用量の 2500ppm には、1700ppm から段階的に増加して最終的に到達させる必要があった。高用量の雌雄では、2 年間の試験終了時の測定で多尿症が認められた。3 ヶ月間隔で実施した血液学検査の値は、変動があるものの基準値以内であった。最高用量群では、ヘマトクリット値が低値を示す傾向がみられた。最高用量群のイヌはまた、最後の 2 ヶ月間は多尿を示した。最高用量群ではさらに、肝臓と腎臓の相対重量が、統計学的に有意な増加を示していた(対照群と比較して 18%)。この群においては、6 匹中 5 匹に多発性胸膜下末梢コレステロール肉芽腫が確認され、2 匹に骨髄の顆粒球増多が認められた。低および中用量群では、病理組織学的影響は認められなかった。この試験における NOAEL は、ニッケルとして 75 mg/kg 体重/日、LOAEL は 75 mg/kg 体重/日であった(体重減少、肺肉芽腫、骨髄増殖に関して)。この試験は、適切に実施されたと思われるが、群の規模が小さいため、病理所見(肺肉芽腫など)を硫酸ニッケルに関連づけて解釈することは難しくなっている。

4.1.2.5.1.2.2 腎毒性

Vyskocil *et al.* (1994b)は、Wistar ラット(各群雌雄 20 匹ずつ)に、硫酸ニッケル(水和度不明)を 0 または 100 ppm の濃度で 6 ヶ月間飲水投与した。3 ヶ月の時点で、雌雄 10 匹ずつ

を中間屠殺した。ニッケル摂取量は、著者により、飲水量に基づいて算定された。用量は、3 ヶ月ずつの2期間の平均では、雄でニッケルとして 6.9 mg/kg 体重/日、雌で 7.6 mg/kg 体重/日であった。曝露開始 3 ヶ月後と 6 ヶ月後に尿検査を実施しているが、病理組織学的検査は行っていない。尿検査では、総蛋白のほか、糸球体濾過機能の指標としてのアルブミン、乳酸脱水素酵素(LDH)ならびに β 2-ミクログロブリン(β 2m)、および尿細管機能の指標としての N-アセチル- β -D-グルコサミニターゼ(NAG)といったパラメータが測定された。腎臓重量と体重も測定された。雌雄どちらにも、体重増加量への影響は見られなかった。いずれの測定時点においても、被験物質の曝露を受けた全群で、雌雄の腎臓重量はわずかに増加していた。そして、6 ヶ月の時点で雄に認められた増加は、やはりわずかなものではあったが、統計学的に有意であった。尿細管機能の指標に影響はみられなかった。しかし、糸球体濾過機能の指標である尿中アルブミン値には、6 ヶ月の時点で雌において有意な増加が認められた。雄における尿中アルブミンの増加は、統計学的に有意なものではなかったが、個々の被験動物のデータをみると、6 ヶ月の時点において明らかな増加が示された。雄において影響が統計学的に有意ではなかったのは、雄で設定された 2 つの対照群において異常な高値が示されたことに起因している。したがって、この試験では、用量が 1 段階であったため、尿中アルブミンの増加に関する LOAEL は、雄がニッケルとして 6.9 mg/kg 体重/日、雌が 7.6 mg/kg 体重/日であった。この試験の難点は、雄と雌の両方において、反応に大きなばらつきがあることである。本リスク評価書を作成するにあたり、この試験の著者に連絡し、個々の被験動物のデータを入手し、このばらつきの意味するところを明らかにしようとした。また、ニッケルに曝露された個々の被験動物が、3 ヶ月の測定時点から 6 ヶ月の測定時点にかけて、アルブミン尿症の増悪を示していたかどうかを見極めようとした(尿アルブミン値のベースラインが示されていないため)。

しかし、個別データは、すでに入手不可能であった。雄で示された結果は、雄ラットでは尿中アルブミン値に概して大きなばらつきがみられた点から、また、(群の規模に左右されるが)統計学的に有意でないことから、雌の結果よりも信頼性に欠ける。そのため、この試験の LOAEL は、雌のデータを採用し、尿中アルブミン増加に関し、ニッケルとして 7.6 mg/kg 体重/日とする。

4.1.2.5.1.2.3 免疫毒性

Dieter *et al.* (1988) は、マウスにおいて、骨髄毒性と免疫毒性に関連する閾値のある影響を確認し、どのリンパ網内系細胞集団がニッケルによるそれらの影響に最も感受性があるかを特定するため、試験を実施している。雌の B6C3F1 マウス(10 匹/群)を硫酸ニッケル(水和度の報告なし)に何段階かの用量で曝露した。0、1、5、10 g/L の濃度で被験物質を含む水を、180 日間自由に摂取させた。実測に基づく用量は、硫酸ニッケルとして 0、115.7、

285.7、395.7 mg/kg 体重/日 (ニッケルとして 0、44、108、150 mg/kg 体重/日、硫酸ニッケル六水和物の場合は、ニッケルとして 0、25、64、88 mg/kg 体重/日に相当)であった。水消費量、血液および組織におけるニッケル濃度、体重、器官重量、病理組織学的所見、免疫反応、骨髄細胞充実度、骨髄増殖性、および細胞酵素活性が評価された。死亡したマウスはいなかった。硫酸ニッケルとして 285.7、395.7 mg/kg 体重/日群のマウスにおける水消費量は、対照群よりも少なかった。この反応は、395.7 mg/kg 体重/日群においては、脱水と化学毒性の両方によるものと思われた。血中ニッケルは、曝露開始から 4、8、16、23 週の時点で測定されている。平均血中ニッケル値は、時間と用量に比例して、4~8 週にかけて増加した。8 週より後の時点での平均血中ニッケル値は、23 週の時点で 395.7 mg/kg 体重/日投与群において増加がみられたのを除いては、被験物質の投与を受けたいずれの群においても大きな増加はみられなかった。ニッケルの蓄積がみられた主な器官は、腎臓であった。

体重と器官重量の減少が、胸腺重量の用量依存的な減少を除き、395.7 mg/kg 体重/日群に限って認められた。病理組織学的検査は各群 6 匹について行われ、中、高用量群の全マウスに、軽度な尿細管ネフローゼが確認された。しかし、低用量群や対照群では確認されなかった。胸腺では、皮質のリンパ球が密な領域の減少を特徴とした萎縮が、対照群では 6 匹中 1 匹のみで軽度のみみられたのに対し、被験物質が投与された群では、いずれにおいても検査した 6 匹すべてで認められた。胸腺萎縮の組織学的所見は、被験物質の投与を受けたすべて群で胸腺重量が統計学的に有意に減少していたことによって裏付けられている。硫酸ニッケルによる最初の毒性影響は、骨髄系で生じていた。免疫機能アッセイでは、ヒツジ赤血球 (SRBC) に対するプラーク形成細胞 (PFC) 反応、リンパ球増殖反応、脾臓細胞のナチュラルキラー (NK) 細胞活性、および回旋病菌 (*Listeria monocytogenes*) を用いた感染誘発に対する抵抗性などが測定された。

骨髄増殖アッセイでは、骨髄細胞充実度および幹細胞増殖反応などが調べられた。いずれの用量においても、B 細胞マイトジェンに対するリンパ球増殖反応に有意な減少がみられたが、T 細胞マイトジェンに対する反応には減少はみられなかった。さらに高用量群では、PFC 反応と脾臓細胞充実度に統計学的に有意な低下が認められた。顆粒球-マクロファージ増殖性反応に統計学的有意な用量依存的低下が被験物質の投与を受けたすべて群で認められ、高用量側 2 群では、骨髄細胞充実度に低下が認められた。低用量群においてもリンパ球増殖反応の低下は認められたが、この試験の著者は、他の免疫パラメータに変動がないため、この影響を骨髄系への影響から続発的に生じたものと解釈している。しかし、病理組織学的検査で胸腺萎縮と胸腺重量の減少が観察されていることに基づき、この試験の LOAEL は、硫酸ニッケルとして 115.7 mg/kg 体重/日 (ニッケルとして 44 mg/kg 体重/日、報告された被験物質が硫酸ニッケル六水和物の場合は、ニッケルとして 25 mg/kg 体重/日に相当)と判断された。NOAEL は確定できなかった。この試験は良質であり、免疫系にもたら

す硫酸ニッケルの影響を評価するのに適していると考えられる。

Schiffer *et al.* (1991、TERA, 1999 より引用)は、雌の SJL マウスに、2700 ppm の硫酸ニッケル六水和物(ニッケルとして 600 ppm)を、4 週間混餌投与した。*In vivo* と *in vitro* のいずれの測定においても、T 細胞依存性抗原に対する増殖反応の低減少がみられ、B 細胞依存性抗原に対する増殖反応の低減少も、*in vitro* の測定で認められた。投与濃度は、マウスの摂餌量を 200 g/kg 体重/日と仮定すると、ニッケルとして約 120 mg/kg 体重/日の用量に相当する。

4.1.2.5.1.2.4 他の毒性試験

Chatterjee *et al.* (1979)は、若齢ラットに硫酸ニッケルを投与し、その間にビタミン C を大量摂取させ、その効果を検証した。離乳した雄の Wistar ラットの群に、ニッケルとして、0 または 33 mg/kg 体重/日の用量で、硫酸ニッケルを 21 日間混餌投与した。第 3 群を設け、33 mg/kg 体重/日のニッケルと、200 mg/kg 体重/日のアスコルビン酸を同時期に投与した。硫酸ニッケルの摂取は、ラットの成長率を低下させた。肝臓と腎臓の重量は正常であった。この試験の結果は、高用量のビタミン C を毒性用量のニッケル塩を与えられているラットに投与することで、成長率だけでなく、特定の酵素の活性を、かなりの程度まで正常に近づけることができることを示すものであった。この試験では、成長抑制と様々な生化学的パラメータの変化に関し、ニッケルとして 33 mg/kg 体重/日という LOAEL が導かれる。

4.1.2.5.1.2.5 反復経口投与に関する要約および結論

経口投与による長期毒性試験は、ラット、マウス、およびイヌにおいて実施されている。生存率減少や体重減少などの非特異的毒性症状が主に観察された。さらに、尿中アルブミンの増加(腎機能低下の指標)、軽度の尿細管ネフローゼ、および免疫抑制性の影響が観察された。

Table 4.1.2.5.I に、ラット、マウス、およびイヌにおける硫酸ニッケルの反復経口投与試験のうち重要と思われる試験の概要を示している。これらの試験により、硫酸ニッケルの経口投与は、低用量(ニッケルとして 7.6~11.2 mg/kg 体重/日)では、わずかな体重減少と尿中アルブミン増加などの比較的軽度な影響をもたらす、高用量(ニッケルとして 25~188 mg/kg 体重/日)では、顕著な体重減少、胸腺の萎縮、軽度の尿細管ネフローゼなどのより重篤な影響を引き起こすことが示されている。Ambrose *et al.* の 2 年間試験は、ヒトの一生涯の曝露との関連性が最も密接だが、影響がより短期の試験においてより低用量でみられているため、最も感度の高い試験とは言えない。Obone *et al.* によるラットを用いた 13 週間

試験では、その2年間試験(ニッケルとして 11.2 mg/kg 体重/日)よりも低い用量で、わずかな体重減少がみられている。Vyskocil *et al.*(1994b)の3~6ヵ月試験では、ラットを用いた前述の13週間試験(ニッケルとして 7.6 mg/kg 体重/日)とほぼ同量で、尿中アルブミンの増加が示されている。Obone *et al.*の試験と同様に、SLIの2002年の草稿には、ラットを用いた90日間強制経口試験において、ニッケルとして7~11 mg/kg 体重/日の用量で8%の体重減少が生じたことが示されている。OECDテストガイドライン451に準拠した2年間の発がん性試験では、ニッケルとして2.2~11 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与した場合、雌雄合算で4%~12%の体重増加抑制が記録されている。最高用量側2群では、雌の生存率に、統計学的有意性を示す用量依存的な低下が認められた。被験物質投与が原因と考えられる非腫瘍性の顕微鏡的所見は観察されなかった(CRL、2005)。

反復経口投与毒性のLOAELは、体重減少と死亡率の増加(CRL、2005に基づく)に基づいて、ニッケルとして6.7 mg/kg 体重/日に設定する。同じ試験から、ニッケルとして2.2 mg/kg 体重/日という用量をNOAELとして採用する。ただし、体重増加抑制(雌雄とも)と死亡率増加(雌)が、統計的に有意でない程度ながら起こっているため、このNOAELを本当にNOAELとみなしてよいかどうか、不確実性が残っている。

Table 4.1.2.5.I: Repeated dose oral studies with nickel sulphate

Duration and species	Dose levels mg Ni/kg bw/day	NOAEL mg Ni/kg bw/day	LOAEL mg Ni/kg bw/day	Effect at LOAEL	Reference
4 weeks, mice, food	120	No dose level without effect	120	Decrease in indices of immune function	Schiffer <i>et al.</i> (1991)
13 weeks, rats, drinking water	0, 4.5, 11.2, or 22.4	4.5	11	4% reduction in body weight	Obone <i>et al.</i> (1999)
90 days, rats gavage	0, (7)11, 17, 22, 28, and 33	No dose level without effect	(7) 11	8% reduction in body weight	SLI draft not dated (submitted 2002)
3 or 6 months, rats, drinking water	0 or 6.9 (males) or 7.6 (females)	No dose level without effect	7.6	Increased urinary albumin	Vyskocil <i>et al.</i> (1994b)
6 months, mice, drinking water	0, 25, 64 or 88 (assuming hexahydrate was given)	No dose level without effect	25	Reduced thymus weight, thymus atrophy	Dieter <i>et al.</i> (1988)
2 years, rats, food	0, 10, 100, or 250	10	100	18% reduction in body weight in females	Ambrose <i>et al.</i> (1976)
2 years, dogs, food	0, 7.5, 75, or 188	75	188	Decreased body weight gain, lung granulomas, bone marrow hyperplasia	Ambrose <i>et al.</i> (1976)
2 years, rats, gavage	0, 2.2, 6.7, or 11	2.2*	6.7	Decreased survival rate, (females) reduced body weight gain (both sexes)	CRL (2005)

* associated with a slight decrease in body weight gain (both sexes) and survival (females)

4.1.2.5.1.3 経皮

Mathur *et al.* (1977)は、ラットに硫酸ニッケルを皮膚適用し、皮膚、肝臓、腎臓、および精巣における細胞病理学的変化と組織病理学的変化を観察した。群分けした雄ラットの剃毛した側腹部皮膚(4 × 4 cm)に、被験物質を15日間(各群4匹ずつ)または30日間(各群4匹ずつ)塗布した。被験物質は、硫酸ニッケル六水和物を、ニッケルとして0、40、60、100 mg/kg 体重/日相当の用量となるように0.25 mLの生理食塩水で溶解して調製した。死亡および臨床症状はどのラットにも認められなかった。肉眼的検査と病理組織学的検査が皮膚、肝臓、腎臓、精巣について実施された。15日間投与群よりも30日間投与群の方が、顕著な影響が現れた。ニッケルとして60と100 mg/kg 体重/日の用量で硫酸ニッケルを塗布さ

れたラットの皮膚には、過角化、空胞変性、基底層の水腫様変性、表皮の委縮が認められた。ニッケルとして 40 mg/kg 体重/日を塗布された群では、30 日間塗布された群のみにわずかな皮膚影響が現れた。精巣には 15 日間塗布では変化がみられなかったが、30 日間塗布では、ニッケルとして 60、100 mg/kg 体重/日以上を塗布された群に、精細管の変性と浮腫が認められた。肝臓においては、ニッケルとして 60 または 100 mg/kg 体重/日を塗布された群に、15 日間塗布では肝細胞の腫脹と羽毛様変性が認められ、30 日間塗布ではより重度の病変(何箇所もの巣状壊死、類洞の拡張とうっ血)がみられた。腎臓に変化はみられなかった。この試験では、ニッケルとして 40 mg/kg 体重/日という用量が、精巣および肝臓の変性変化に関する NOAEL、皮膚への局所影響に関する LOAEL と判断された。この試験には、試験デザインや報告内容にいくつかの難点がある。例えば、群規模が小さく、雄のみが対象となっており、限定された器官にしか検査を行っていない。飼料摂取量や体重についての情報も、公表文書に示されていない。そのため、この試験は、リスクの総合判定にあたり、有用とはみなされない。

さらに、硫酸ニッケルの皮膚への反復適用による影響に関し、報告内容の乏しい 2 件の試験の情報が得られている(Kosova 1970、UK HSE 1987 より引用)。14 日間の尾への適用(25 または 50%溶液)または、30 日間の背中への適用(50%溶液)が行われたが、全身性の影響はみられなかった。他にも、用量の記載がないなどの欠点があるため、これらの試験はリスク評価には使用されない。

4.1.2.5.1.3.1 皮膚への反復適用に関する要約および結論

良質な反復経皮毒性試験の情報は得られていない。Mathur *et al*(1977)の試験では、経口投与試験ではみられなかった影響(精巣および肝臓の変性変化)が報告された。しかしこの試験には欠点があるため、これらの知見に信頼性があるとはみなされず、反復経皮投与毒性の NOAEL/LOAEL は確定できなかった。

4.1.2.5.1.4 その他の投与経路

筋肉または腹腔内注射にて反復投与した場合の硫酸ニッケルの毒性が調べられている(Knight *et al.* 1991、Mathur *et al.* 1977b、Mathur & Tandon 1979、Mathur & Tandon 1981、Kasprzak *et al.* 1983)。これらの投与経路は、リスク評価にあたって重要ではないと考えられるため、ここでは詳しく記載しない。

4.1.2.5.2 ヒトのデータ

英国の技術系企業で働くめっき工を対象に実施された死亡率調査では、1年を超えて曝露を受けためっき工において、呼吸器疾患による標準化死亡比(SMR)が増加したと報告されている(Burges 1980)。この調査の対象は、可溶性ニッケルのみに曝露され、クロムや他のニッケル化合物には曝露されていない男性めっき工であった。調査コホートの規模は比較的小さく(508人のめっき工、死亡例101人)、他のリスク要因については調べられていない。最近の調査(Pang *et al.*, 1996)では、このコホートについてその後16年の追跡調査データが加えられているが、非発がん性の呼吸器影響に関しては、実際の数値と予測値との間に有意な差は認められなかった。この調査では、非悪性呼吸器疾患による死亡例は実質的に無く、この調査のデータは、ニッケル精錬所において可溶性および不溶性のニッケルに混合曝露された労働者を対象とした、別の調査のデータと整合している(Roberts *et al.*, 1989)。この調査の労働者においても、非悪性呼吸器疾患での死亡例は認められていない。ニッケルの非発がん性影響に関しては、他に疫学的調査の情報は得られていない。

腎臓の変化に関しては、いくつかの文献で取り上げられている。Vyskocil *et al.*(1994a)は、ある化学工場で可溶性ニッケル化合物に高用量で曝露されていた労働者(男性14人、女性12人)を対象として、腎臓損傷の生化学的マーカーの検査を実施した。主な曝露源は、硫酸ニッケルと塩化ニッケルであった。他の重金属や腎毒性のある化合物は、現場には無かった。生化学的マーカーの検査結果は、条件を合わせて選択した男女各12人の対照群の結果と同様であった。平均曝露期間は、男性が25年、女性が15年であった。この化学工場において、労働者は、 0.05 mg/m^3 という曝露限界値(TLV)を4~26倍上回る高濃度のニッケルに曝露されていた。労働者の尿中ニッケル濃度は、クレアチニン1gあたり、平均して男性が5.0、女性が10.3 μg であった。男女とも、LDH、アルブミン、トランスフェリンの平均尿中排泄量に変化はみられず、男性では総蛋白、 β_2 -ミクログロブリン($\beta_2\text{-m}$)、レチノール結合蛋白(RBP)にも、女性ではリゾチームにも変化はみられなかった。男性では、リゾチームとN-アセチル- β -D-グルコサミニターゼ(NAG)が増加し、女性では、総蛋白、 $\beta_2\text{-m}$ 、NAG、RBPが増加していた。尿中ニッケル濃度との有意な相関関係が、女性($r = 0.462$, $p = 0.022$)および男性($r = 0.4$, $p = 0.018$)の $\beta_2\text{-m}$ 濃度との間に、さらに、男性のNAG濃度($r=0.405$, $p=0.019$)との間に認められた。これらの結果は、腎尿細管機能への可溶性ニッケル化合物による有害な影響を示している。著者は、他の文献も示している様に、これらの影響は高用量においてのみ起こると考えられると結論づけている。

4.1.2.5.3 結論

最新のレビューでは、肺と鼻の両方で影響がみられたことから、吸入曝露による非発がん

性影響に関し、硫酸ニッケルの標的器官を気道と特定している。経口曝露に関しては、最も影響を受けやすい標的は腎臓で、特に糸球体機能が低減されると述べている。経皮経路に関しては、一般毒性についての言及はなされていない(TERA 1999)。

本評価書作成者は、硫酸ニッケルへの反復曝露により生じる毒性は、曝露経路に依存して様相が異なるという TERA のレビューに同意している。

硫酸ニッケルを吸入した場合、主な標的は呼吸器系であり、慢性炎症や線維症という形で重篤な影響が引き起こされる。最も感度の高い試験は、NTP による、ラットを用いた 2 年間試験であった。この試験のデータでは、最低曝露レベル(ニッケルとして 0.027 mg/m^3)で観察された影響の生物学的意義を明瞭に解釈することが困難なため、確定的な NOAEC を決定することはできない。そのため、ニッケルとして 0.056 mg/m^3 (硫酸ニッケル六水和物として 0.25 mg/m^3)を、肺の炎症と線維症に関する LOAEC として、リスクの総合判定に使用する。このデータは、低用量でも有害な影響が起り得ることを示しており、留意を要する。これは、環境大気に関する方針声明(欧州委員会、2000)が拠り所とした、ニッケルおよびニッケル化合物による非発がん影響について CSTEE が行った評価と整合している。

TERA のレビューは、経口曝露の場合、腎臓が最も影響を受ける標的器官であると結論づけている。しかし、いずれの試験でも、腎臓に顕著な病理組織学的損傷は示されていない。ラットでは蛋白尿症の発生が腎臓への影響を示しているが、組織病理学的には病変の存在は確認されなかった。しかし、マウスを用いた 1 件の試験では、高用量で軽度の尿細管腎症が生じている。本評価書作成者は、硫酸ニッケルが腎臓に有害な影響を及ぼす可能性があることに同意しているが、有意な腎毒性は実証されていないことも認めている。胸腺の重量減少と免疫細胞への様々な影響から、免疫系障害が示されている。免疫系への影響は、体重減少を引き起こす用量より高い用量で認められている。一方尿中アルブミンの増加は、体重減少を示すのとほぼ同じ用量で生じている。

Obone *et al.*(1999)による 13 週間飲水投与試験では、4%の体重減少と器官の相対重量の増加がみられ、これに基づき、硫酸ニッケル六水和物の 13 週間飲水投与における LOAEL は、ニッケルとして 11 mg/kg 体重/日と導出された。NOAEL はニッケルとして 4.5 mg/kg 体重/日であった。別の 90 日間強制経口投与試験では、ニッケルとして $7\sim 11 \text{ mg/kg}$ 体重/日で、8%の体重減少が生じた(SLI、草稿の日付不明、2002 年に投稿)。Vyskocil *et al.*(1994b)による 3~6 ヶ月間の飲水投与試験では、尿中アルブミン増加がニッケルとして 7.6 mg/kg 体重/日の用量で確認されている。ニッケル硫酸六水和物をラットに混餌投与した Ambrose *et al.*(1976)の 2 年間試験では、体重への同様の影響が生じた。そのため、雌における 18%の体重減少に関し、NOAEL はニッケルとして 10 mg/kg 体重/日、LOAEL はニッケルとして 100 mg/kg 体重/日と確定された。イヌを用いた Ambrose *et al.*(1976)の 2 年間試験では、体

重減少、肺肉芽腫、骨髄過形成に関し、NOAEL がニッケルとして 75 mg/kg 体重/日、LOAEL がニッケルとして 188 mg/kg 体重/日とみなされている。しかし、群規模が小さな(雌雄 3 匹ずつ)試験であったため、低用量で生じる影響が見過ごされている可能性がある。OECD テストガイドライン 451 に準拠した 2 年間の発がん性試験では、ニッケルとして 2.2~11 mg/kg 体重/日を強制経口した場合、雌雄合算で 4%~12%の体重増加抑制が生じている。高用量側 2 群では、雌の生存率に、統計学的有意性を示す用量依存性な低下が認められた(CRL、2005)。

CRL(2005)の試験から、体重減少と死亡率増加に基づき、ニッケルとして 6.7 mg/kg 体重/日という LOAEL と 2.2 mg/kg 体重/日という NOAEL が導出され、これらはともに以降、経口反復投与毒性に関するリスクの総合判定で考慮されることになる。ただし、体重増加抑制(雌雄とも)と死亡率増加(雌)が、統計学的に有意でない程度ながら起こっているため、この NOAEL を本当に NOAEL とみなしてよいかどうか、不確実性が残っている。

入手された情報からは、経皮経路における NOAEL/LOAEL を確定することはできなかった。

硫酸ニッケルは、肺線維症を含む肺の慢性炎症を、ニッケルとして 0.056 mg/m³ から硫酸ニッケル六水和物として 0.25 mg/m³ の濃度での長期吸入曝露において引き起こしたため、「T; R48/23」としての分類要件を満たしている。硫酸ニッケルは、第 30 次 ATP において、「T; R48/20」に分類され、「T; R48/23」に関して 1%超という特定濃度基準が、「Xn; R48/20」に関して 0.1%超という特定濃度基準が設定されている。

他のニッケル化合物に関するデータを見ても、硫酸ニッケルについての結論に影響は及ぼされない(ニッケルとニッケル化合物に関するバックグラウンド文書参照)。

4.1.2.6 変異原性

硫酸ニッケルおよび他のニッケル化合物の遺伝毒性は、IPCS(1991)、IARC(1990)、UK HSE(1987)、ECETOC(1989)、US ATSDR(1997)、NiPERA⁶(1996)、TERA(1999)など、多くの組織によってレビューされている。ここでは、公表されたこれらのレビュー、HEDSET、および業界によって提出された他の情報に基づいて検証を行う。上述のレビューに取り上げられていないいくつかの試験も対象に加えてある。

⁶ NiPERA は、自身のレビューが NiPERA とは無関係の科学者によって作成されていること、およびレビューの結論が NiPERA の現時点の見解を必ずしも反映していないことを明示している。

4.1.2.6.1 *In vitro* 試験

4.1.2.6.1.1 DNA の損傷と修復

Table 4.1.2.6.1.A に示すように、硫酸ニッケルを用いて DNA 損傷作用を調べた試験の情報がいくつか得られている。

表に示されているように、硫酸ニッケルは酵母細胞では遺伝子変換を誘発し、ヒトの気管支上皮細胞では DNA 合成を阻害した (Lechner *et al.* 1984)。しかし、DNA 損傷や DNA 鎖切断は、ヒト線維芽細胞やヒト胃粘膜細胞では引き起こされなかった。

Table 4.1.2.6.1.A: *In vitro* studies with nickel sulphate on DNA damage and repair

Species (test system)	Endpoint	Result	Reference	Review
Fungi				
<i>S. cerevisiae</i> D7 (diploid strain)	gene conversion	Positive	Singh (1984)	NiPERA (1996), UK HSE, TERA
Mammalian cells				
Human diploid fibroblasts XP cells	DNA strand breaks, alkaline elution	Negative	Fornace (1982)	IPCS, IARC, NiPERA (1996), TERA
Human gastric mucosal cells	DNA damage	Negative	Pool-Zobel <i>et al.</i> (1994)	US ATSDR, TERA
Human bronchial epithelial cells	inhibition of DNA synthesis	Positive	Lechner <i>et al.</i> (1984)	IPCS, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA

4.1.2.6.1.2 遺伝子突然変異

遺伝子突然変異試験の情報は、Table 4.1.2.6.1.B に要約されている。

4.1.2.6.1.2.1 原核生物

硫酸ニッケルを被験物質とした試験の情報は 1 件のみ得られており、その試験は、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) (TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA98, TA 100) と大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 uvrA⁻(pKM 101) (修復能欠損株) を用いて実施されている (Arlauskas *et al.* 1985)。試験は硫酸ニッケルの他、23 種の金属塩とともに行われた。データとしては示されていないが、硫酸ニッケルは、適用した試験条件の下で、これらの細菌株において復帰突然変異を誘発しなかったと記載されている。また、硫酸ニッケルは、T4 ファージにおいて正突然変異を誘発しなかった (Corbett *et al.* 1970, IPCS, IARC, UK HSE, NiPERA 1996 より引用)。

4.1.2.6.1.2.2 真核生物

硫酸ニッケルは、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) D7 株を用いた復帰突然変異試験において、*ilv* 座で点突然変異を誘発しなかった (Singh, 1984, UK HSE, NiPERA 1996, US ATSDR, TERA より引用)。ヒトリンパ芽球 TK6 において、*hprt* 遺伝子座での突然変異を示さなかった (Skopek, 1995)。さらに、硫酸ニッケルは、報告内容が乏しい試験において、シリアンハムスター初代胚細胞にウアバイン耐性を誘発しなかった。しかし、ベンゾ(a)ピレンの突然変異誘発作用が硫酸ニッケル存在下で大幅に増高したことから、硫酸ニッケルが共変異原であることが示唆されている (Rivedal & Sanner 1980, UK HSE, IPCS, IARC より引用)。少数の試験では、硫酸ニッケルが哺乳類の培養細胞で弱い変異原性を示すことが明らかにされている。マウス L5178Y リンフォーマ細胞を用いた哺乳類細胞試験系 (*tk*^{+/+}座) においては、弱い陽性反応がみられ (McGregor *et al.*, 1988)、また、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞株では、硫酸ニッケルは、増殖時間延長型の *tk* 遺伝子座変異体を誘発したが、正常増殖時間型の *tk* 遺伝子座変異体を誘発しなかった。しかし、これらのアッセイは両方とも、点突然変異に加え、染色体異常につながり得る多遺伝子座欠失も検出する可能性がある。チャイニーズハムスター G12 細胞 (細菌の *gpt* 遺伝子が安定的に導入された *hprt* チャイニーズハムスター V79 細胞) に対しては、硫酸ニッケルは、*gpt* 遺伝子座で陽性反応を示した (Christie *et al.* 1992)。しかし、その後の試験において、不溶性ニッケル化合物によって誘発された *gpt* の不活化は、真の意味での突然変異ではなく、遺伝子の DNA メチル化が増高したことによるものであったことが示されている (Klein 1994; Lee *et al.* 1995)。

Table 4.1.2.6.1.B: *In vitro* studies with nickel sulphate on gene mutations

Species (test system)	End point	Result	Reference	Review
Prokaryotes				
T4 Bacteriophage	forward mutation	Negative	Corbett <i>et al.</i> (1970)	IPCS, IARC, UK HSE, NiPERA (1996)
<i>S. typhimurium</i> TA 1535, TA 1537, TA1538, TA 98, TA 100	reverse mutation	Negative	Arlauskas <i>et al.</i> (1985)	IPCS, IARC, US ATSDR, NiPERA (1996)
<i>E. coli</i> WP 2 uvrA-	reverse mutation	Negative	Arlauskas <i>et al.</i> (1985)	IPCS, IARC, NiPERA (1996)
Fungi				
<i>S. cerevisiae</i> D7 (diploid strain)	reverse mutation	Negative	Singh (1984)	NiPERA (1996), UK HSE, US ATSDR, TERA
Mammalian cells				
Syrian hamster embryo cells	ouabain resistance	Negative	Rivedal & Sanner (1980)	IPCS, IARC, UK HSE
Syrian hamster embryo cells	ouabain resistance	Positive (co-mutagenic with BaP)	Rivedal & Sanner (1980)	IPCS, IARC, UK HSE
Mouse lymphoma L5178Y <i>tk⁺/tk⁻</i> cells	thymidine kinase locus	positive (weak) at toxic levels	McGregor <i>et al.</i> (1988)	IPCS, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
Chinese Hamster G12 cells (V79 <i>hprt⁻</i> transfected with bacterial <i>gpt</i>)	<i>gpt⁺/hprt⁻</i> locus	positive (weak) ^(*)	Christie <i>et al.</i> (1992)	IARC, NiPERA (1996)
Human lymphoblasts TK6	<i>hprt</i> locus <i>tk</i> locus	negative: <i>hprt</i> negative: <i>tk_{normal}</i> positive: <i>tk_{slow}</i>	Skopek (1995)	NiPERA (1996)

1): Due to DNA methylation of the gene (see text)

4.1.2.6.1.3 染色体への影響

染色体への影響を調べた試験を、Table 4.1.2.6.1.C に要約して示した。

4.1.2.6.1.3.1 姉妹染色分体交換(SCE)

硫酸ニッケルの姉妹染色分体交換(SCE)誘発能に関しては、10件の独立した試験の情報が得られている。これらの試験では、マウス乳がん細胞、マウスマクロファージ、チャイニーズハムスターやシリアンハムスターの細胞、ヒト末梢リンパ球などの様々な細胞株が使

用されている。Table 4.1.2.6.1.C に示すように、10 試験すべてで陽性という結果が得られた。また、同じ Table に示すように、いくつかの試験では用量-反応関係も認められが、すべての試験においてではなかった。

4.1.2.6.1.3.2 染色体異常(CA)

硫酸ニッケルの染色体構造異常(CA)誘発能については、2 件の独立した試験の情報が得られている。シリアンハムスター胚細胞、ラット肺上皮細胞、およびヒト末梢リンパ球において、影響が調べられた。Table 4.1.2.6.1.C に示したように、すべての試験系において、ギャップ、切断、交換などの染色体異常の増加が認められた。

4.1.2.6.1.3.3 その他の試験

硫酸ニッケルが紡錘体機能阻害を誘発し、そのため染色体の数的異常を引き起こし得ることが、Andersen (1985) の試験 (IPCS, NiPERA, 1996 より引用) で示されている。Seoane & Dulout (2001) は、ヒト 2 倍体線維芽細胞を用い、0~800 μM の用量で硫酸ニッケルの動原体(キネトコア)染色小核試験を実施した。染色体異常誘発物質と異数性誘発物質を区別するために、分別染色が用いられた。異数性誘発物質は動原体陽性の小核を有し、染色体全体を含んでいるものとみなされる。硫酸ニッケルは、小核の用量依存的な増加を示したが、その小核は、動原体陽性および陰性の両方のものが認められた。この作用は、動原体陽性のものが優位で、統計学的にも有意であった。塩化ニッケルについても同様の影響がみられている。影響がみられた用量は、やはり被験物質とされたカドミウム塩やクロム酸塩よりも、かなり高かった。

EURAR: NICKEL SULPHATE

Table 4.1.2.6.1.C: *In vitro* studies with nickel sulphate on chromosomal effects

Species (test system)	Endpoint	Result	Reference	Review
Mammalian cells: Sister chromatid exchange (SCE)				
Mouse mammary carcinoma cells FM3A	SCE	Positive	Nishimura & Umeda (1979)	IPCS, TERA
Mouse macrophage cell line P338D ₁	SCE	Positive	Andersen (1983)	IPCS, IARC, US ATSDR
Don Chinese hamster cells	SCE	Positive at LC ₅₀	Ohno <i>et al.</i> (1982)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
Chinese hamster ovary cells	SCE	Positive at 0.75 mg/l	Deng & Qu (1981)	IPCS, IARC, UK HSE
Syrian hamster embryo cells	SCE	Positive (dose response)	Larramendy <i>et al.</i> (1981)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
Human peripheral lymphocytes	SCE	Positive (dose response at 20, 200 µmol/l)	Wulf (1980)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996)
Human peripheral lymphocytes	SCE	Positive (dose response)	Deng & Qu (1981)	IPCS, IARC, UK HSE
Human peripheral lymphocytes	SCE	Positive (dose response)	Larramendy <i>et al.</i> (1981)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
Human peripheral lymphocytes	SCE	Positive	Andersen (1983)	IARC, US ATSDR
Human peripheral lymphocytes	SCE	Positive (dose response; interactions with Cr(VI), UV-light and X-rays.)	Katsifis <i>et al.</i> (1996)	
Mammalian cells: Chromosomal aberrations (CA)				
Syrian hamster embryo cells	CA	Positive (gaps, breaks, exchanges, minutes, dicentrics)	Larramendy <i>et al.</i> (1981)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
Rat lung epithelial cells	CA	Positive (exchanges)	Brooks & Benson (1988)	NiPERA (1996)
Human peripheral Lymphocytes	CA	Positive (breaks, rings, minutes)	Larramendy <i>et al.</i> (1981)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
Mammalian cells: Other studies				
Human peripheral lymphocytes	Spindle disturbance	Positive	Andersen (1985)	IPCS, NiPERA (1996)
Human diploid fibroblasts	kinetochore-stained micronucleus assay	Positive (kinetochore-positive cells) weakly positive (kinetochore-negative cells)	Seoane & Dulout (2001)	

4.1.2.6.1.4 細胞形質転換

細胞形質転換に関する試験を、Table 4.1.2.6.1.D に要約して示した。

硫酸ニッケルがげっ歯類細胞とヒト細胞において、細胞形質転換を誘発し得ることが、数件の試験で示されている。硫酸ニッケルとベンゾ(a)ピレンなどの他の発がん性化合物との併用した場合には、細胞にこれらの化合物を順次作用させることにより相乗効果が認められ、いくつかの試験では、硫酸ニッケルのみでの処理で陽性の結果が得られている (Table 4.1.2.6.1.D 参照)。これらの試験は、硫酸ニッケルが、イニシエーターとプロモーターの両方の作用を及ぼすことが可能であることを示している (Rivedal & Sanner 1980, 1981, IPCS, NiPERA 1996, UK HSE, TERA より引用)。いくつかの試験では、硫酸ニッケルとたばこの煙抽出物の相乗効果が示されており、硫酸ニッケルが喫煙の影響を強める可能性が示唆されている (Rivedal *et al.* 1980, IPCS, NiPERA 1996, UK HSE より引用)。さらに、硫酸ニッケルが、チャイニーズハムスターV79 細胞と他の哺乳類細胞株において、ギャップ結合を介した細胞間情報伝達を抑制することができるという証拠が示されている (Loch-Carusio *et al.* 1991, Miki *et al.* 1987, TERA より引用)。

Table 4.1.2.6.1.D: *In vitro* studies with nickel sulphate on cell transformation and intercellular communication

Species (test system)	Endpoint	Result	Reference	Review
Mouse embryo fibroblasts	cell transformation	Negative	Miura <i>et al.</i> (1989)	US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
Rat hereditary renal tumour cells (HRT)	initiation and promotion test	Positive (both as initiator and promotor)	Eker & Sanner (1983)	IPCS, UK HSE
Rat embryo cells infected with Rauscher leukaemia virus	transformed foci	Positive	Traul <i>et al.</i> (1981)	IPCS, UK HSE
Normal rat kidney cells (NRK) infected with Makoney murine sarcoma virus	transformed foci	Positive max at 10 mg/l	Wilson & Khoobyarian (1982)	IPCS, IARC, UK HSE
Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive (dose response)	Di Paolo & Casto (1979)	IPCS, IARC, UK HSE, NiPERA (1996), TERA
Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive at 19, 76 μ mol/l – synergistic effect with BaP	Rivedal & Sanner (1980)	IPCS, IARC, UK HSE, NiPERA (1996)
Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive – synergistic effect with BaP	Rivedal & Sanner (1981)	IPCS, IARC, UK HSE, NiPERA (1996)

Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive with cigarette smoke extract only (synergistic effect)	Rivedal <i>et al.</i> (1980)	IPCS, IARC, UK HSE, NiPERA (1996)
Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive	Pienta <i>et al.</i> (1977)	IARC
Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive	Zhang & Barrett (1988)	IARC, NiPERA (1996)
Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive	Kerckaert <i>et al.</i> (1996)	
Syrian hamster embryo cells (SHE)	transformed foci	Positive – enhanced transformation of cells by SA7 simian adenovirus	Casto <i>et al.</i> (1979)	UK HSE, NiPERA (1996)
Human bronchial epithelial cells	growth control and morphology	Positive	Lechner <i>et al.</i> (1984)	IPCS, IARC, NiPERA (1996), TERA
Human foreskin fibroblasts	anchorage independence	Positive	Biedermann & Landolph (1987)	IPCS, IARC, NiPERA (1996), US ATSDR
NIH3T3 cells	inhibition of intercellular communication	Positive (dose response)	Miki <i>et al.</i> (1987)	IPCS, IARC, TERA
Chinese hamster V79 cells	inhibition of metabolic coupling	Positive	Loch-Carusio <i>et al.</i> (1991)	TERA

4.1.2.6.1.5 *in vitro* 試験に関する考察と結論

硫酸ニッケルは、*S. typhimurium* や *E. coli* を用いた細菌試験では、陰性という結果を示した。しかし、情報が得られた試験は 1 件だけで、適切に実施されたものではなく、データも示されていない。さらに、コバルト(II)などのほかの金属イオンにおける細菌試験では、得られる結果が、使用される試験株と試験条件に大きく影響を受けることが示されている (Arlauskas *et al.* 1985; Pagano & Zeiger 1992; Beyersmann 1994; Binderup 1999)。2 件の試験から、コバルト(II)がサルモネラ菌株 TA97 に対してのみ遺伝毒性を示し、通常のプレート法よりもプレインキュベーション法においてより強い遺伝毒性を示すとみられることが明らかにされている (Pagano & Zeiger 1992; Binderup 1999)。この試験条件で TA97 株を用い、硫酸ニッケルを被験物質として実施された試験の情報は、得られていない。

酵母において点突然変異を引き起こす証拠は確認されなかった。哺乳類細胞株で実施された遺伝子突然変異試験はごくわずかで、それらで得られた陽性という結果は、おそらく点突然変異よりも他の遺伝的事象(染色体異常や DNA のメチル化)によるものと考えられる。したがって、硫酸ニッケルが点突然変異を誘発するという信頼できる証拠はない。

10 件の試験で姉妹染色分体交換(SCE)が陽性という結果が得られ、さらに別の 2 件の試験で染色体異常が陽性という結果が得られている。これらの結果は、ヒト細胞および哺乳類細胞でのものである。

いくつかの試験から、げっ歯類およびヒトの細胞において、硫酸ニッケルが細胞形質転換を誘発する能力を有することが示されている。ベンゾ(a)ピレンなどの他の発がん性化合物と合わせて硫酸ニッケルでの処理を行うと、相乗効果が認められた(Rivedal & Sanner, 1980, 1981)。いくつかの試験では、硫酸ニッケルとたばこの煙抽出物の相乗効果が確認されており、硫酸ニッケルが喫煙の影響を強める可能性が示唆されている(Rivedal *et al.* 1980)。Miki *et al.*(1987)の試験と Loch-Caruso *et al.*(1991)の試験の結果からは、硫酸ニッケルが細胞間情報伝達を抑制し得ることが示されている。

NiPERA (2002)は、これらの相乗効果と *in vitro* での細胞内情報伝達への効果について、硫酸ニッケルがイニシエーターとしてよりも強力なプロモーターとして作用する証拠と認めている(Rivedal & Sanner, 1980, 1981; Christie & Tummolo, 1987)。そのプロモーター作用を支持するように、非細胞毒性濃度の硫酸ニッケルは、プロリフェリン蛋白のメッセンジャーRNA(mRNA)濃度を対照値の 1000 倍を超えて増加させることが確認されている。プロモーター作用を有する化合物のみがプロフェリン合成を誘発することが、C3H10T1/2 細胞を用いた試験で示されている(Parfett, 1992)。

結論として、硫酸ニッケルが点突然変異を誘発するという確実な証拠はないが、硫酸ニッケルは様々な哺乳類細胞において、染色体異常や姉妹染色分体交換を引き起こしており、*in vitro* では明らかに染色体異常誘発性を有する。

4.1.2.6.2 *In vivo* 試験

4.1.2.6.2.1 DNA 損傷

DNA 損傷に関する試験の情報は、Table 4.1.2.6.2A に要約されている。

硫酸ニッケルは、ラット肝上皮細胞で DNA 合成を抑制したが、腎上皮細胞では抑制しなかった。しかし、この結果を得た試験は、結論を引き出せるほど十分に詳述されていない(Amlacher & Rudolf 1981、UK HSE より引用)。

Benson *et al.*(2002)は、吸入による発がんの標的器官である肺における、不溶性および可溶性のニッケル化合物によるがん誘発メカニズムの類似点と相違点を解明するため、ラットを用いて包括的な *in vivo* 試験を実施した。エンドポイントのいくつかは、不溶性の亜硫化

ニッケルないしは可溶性の硫酸ニッケル六水和物を用いた吸入曝露により検討された。遺伝毒性/発がん性の評価において最も重要なエンドポイントは、DNA 損傷であり、これは、コメットアッセイや DNA 分解、DNA のメチル化および細胞増殖の測定により、DNA 鎖切断や酸化的 DNA 損傷として検出される。

どちらの化合物も、コメットアッセイにおいて、最高曝露用量(硫酸ニッケルについてはニッケルとして 0.22 mg/m³)で DNA 鎖切断を誘発した。このアッセイでは、酸化的 DNA 損傷の兆候は認められなかった。DNA 鎖切断は、硫酸ニッケルよりも亜硫酸ニッケルの方がより低用量で、かつより早期に誘発され、13 週間の回復期間の後まで持続して検出された。これらの知見は、ニッケルや他の金属で行われた *in vitro* 試験と整合しており、おそらくは、食作用のため可溶性金属よりも不溶性金属の方が細胞内濃度が高くなることに起因するものと考えられる。主に小さな DNA の断片が認められ、これがコメットアッセイの結果に影響を与えた可能性がある。DNA 鎖切断が観察されたのと同じ曝露濃度では、炎症が認められている。このことによりアポトーシスが起き、コメットアッセイで交絡が生じた可能性がある。しかし、すべての曝露濃度で 800 未満という良好な中央値が得られており、大きな損傷を受けた細胞はごくわずかであると考えられる。さらに、酸化的損傷が鎖切断を引き起こしたという兆候は、鎖切断が炎症により続発的に生じた場合に予測される規模では認められなかった。認められた遺伝毒性的損傷は、炎症やアポトーシスとは無関係である可能性が高い。加えて、試験で報告された DNA 分解は、コメットアッセイで使用する細胞ではなく、肺組織全体のホモジネートで測定されているため、コメットアッセイの DNA 鎖切断とその DNA 分解とを関連づけることはできない。

この Benson *et al.* (2002) の試験は、ニッケルのリスク評価報告書でレビューされている試験と整合性があり、これらの試験では、ニッケル化合物が、可溶性および不溶性のどちらであっても、主として DNA の構造的な損傷を誘発することが示されている。この *in vivo* 試験は、最も重要な曝露経路(吸入)と標的器官(肺)が対象とされ、合理的な曝露濃度範囲で実施された。この試験では、亜硫酸ニッケルと硫酸ニッケルの発がん作用の違いについて正当に論じているが、標的器官における両化合物の遺伝毒性に焦点を当てている。しかし硫酸ニッケルの細胞毒性を除外して解釈することはできない。

Table 4.1.2.6.2.A: *In vivo* studies with nickel sulphate on DNA damage

Species/Strain	Endpoint/test condition	Result	Reference	Review
Mammals				
Mouse, CBA strain	Intraperitoneal Inhibition of DNA synthesis at 15-30% of LD ₅₀	Negative: kidney epithelium Positive: hepatic epithelium	Amlacher & Rudolf (1981)	UK HSE

Rats, F344	Inhalation DNA damage (Comet assay) 0, 0.125, 0.5, 1 mg/m ³ 0, 0.03, 0.11, 0.22 mg Ni/m ³	significant increase at highest dose after 13 weeks but cytotoxicity cannot be ruled out	Benson <i>et al.</i> , (2002)	
------------	--	--	-------------------------------	--

4.1.2.6.2.2 遺伝子突然変異

遺伝子突然変異に関しては、*in vivo* 試験の情報は得られていない。

4.1.2.6.2.3 染色体への影響

染色体への影響を調べた試験を、Table 4.1.2.6.2B～D に要約して示した。

硫酸ニッケルは、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) における欠失突然変異を指標とした試験で、伴性劣性致死突然変異を誘発した。この試験では、異数性誘発も観察され、その結果、軽度の性染色体消失が確認された (Rodrigues-Armaiz & Ramos 1986、IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA 1996, TERA より引用)。

Mathur *et al.* (1978) は、ラットに硫酸ニッケルを腹腔内投与し、ニッケルの体内分布と細胞遺伝学的変化誘発性を調べた。被験物質投与群を 2 群設け、生理食塩水に溶解した硫酸ニッケル六水和物を、ニッケルとして 3 ないしは 6 mg/kg 体重の用量で毎日投与し、対照群には生理食塩水を投与した。各群 3 匹ずつを、投与 7 日と 14 日後に屠殺し、染色体異常 (CA) 分析に供した。様々な臓器におけるニッケル分布も測定された。CA 分析の結果は示されていない。この試験では、以下の様な結果が示されている。「ニッケルとして 3 または 6 mg/kg 体重の用量を 7 日または 14 日間投与されたラットには、骨髄細胞と精原細胞のいずれにも、顕著な染色体変化は誘発されなかった。14 日間 6 mg/kg 体重の用量を投与されたラットでは、骨髄細胞にわずかな染色分体切断が示された。しかし、被験物質投与群と対照群の動物における染色分体切断の頻度と分裂指数に、有意な差は認められなかった。精原細胞には、いずれの用量およびいずれの投与期間においても、染色体異常や分裂指数の異常は示されなかった。」このように陰性という結果が報告されているが、それを裏付けるデータがないことを考えると、この試験が被験物質が陰性であることを示す有力な証拠を提供しているとみなすことは難しい。

骨および精巣におけるニッケル濃度は、両方の用量について測定されている。

EURAR: NICKEL SULPHATE

Distribution of nickel (mg/g fresh weight) in rats exposed to nickel sulphate hexahydrate i.p. (Mathur et al.1978).

Tissue	Control	3 mg/kg		6 mg/kg	
		7 days	14 days	7 days	14 days
Testis	0.32 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.75 ± 0.03	0.67 ± 0.06	1.03 ± 0.002
Bone	0.15 ± 0.01	0.37 ± 0.009	0.72 ± 0.07	0.60 ± 0.05	1.12 ± 0.05

被験物質投与群のいずれにおいても、対照群よりも有意 ($P < 0.001$) に高い濃度が示され、また、7日後の値よりも14日後の値の方が有意 ($P < 0.001$) に高かった。NiPERA は、この試験における総投与量が、ニッケルとして 21 mg/kg 体重 (3 mg × 7 日) から 84 mg/kg 体重 (6 mg × 14 日) で、吸収は 100% であったとコメントしている。上述の陰性結果は、骨のニッケル濃度が対照群よりも 10 倍高く、Sobti & Gill (1989) および Sharma *et al.* (1987) の経口試験よりも全体的に高い吸収量だった被験動物で認められている (NiPERA, 2002)。

硫酸ニッケル(無水)を 73 mg/kg 体重(ニッケルとして 28 mg/kg 体重)の用量で、4、8、12 ないしは 16 日間経口投与した試験では、染色体異常(環状染色体、断片化)の発生頻度の増加が報告されている (Sharma *et al.* 1987)。使用された被験物質に提示された CAS 登録番号 (7786-81-4) から、それが無水物であったと判断される。この試験では、塩化ニッケルと硝酸ニッケルについても調べられているが、記載されている情報が非常に限られている。試験した用量が 1 段階のみであり、対照群は置かれているが、陽性対照が置かれていない。また、各群の被験動物数が記載されていない (NiPERA, 2003 の引用では各群 1 匹とされている)。被験動物は、4、8、12 または 16 日の間、毎日投与を受けた。最終投与からいつの時点で試料採取を行ったかは、記載されていない。1 匹につき 100 個の分裂中期細胞についてスコア付けが行われたが、スコア付けを盲検法で行ったかどうかについて示されていない。また、ギャップをスコアに加味したかどうかについても言及されていない。結果は、平均値ではなく、個々の数値でしか示されていない。1 細胞あたりの染色体異常の発生頻度は、対照群で 0.02~0.06 個であったのに対し、硫酸ニッケル投与群では 0.26~0.45 個であった。被験物質とした 3 種類のニッケル化合物では、いずれも 12 日目に最高頻度が認められ、硫酸ニッケルが最も高頻度、塩化ニッケルが最も低頻度を示した。試験した用量が 1 段階のみであったため、用量-反応関係に関する直接的な情報は得られなかった。NiPERA (1996) では、この試験の結果を陽性と報告している。NiPERA (2003) では、この試験について、1 段階以上の用量群で有意な増加が認められるという要件は満たしているが、ギャップをスコアに加味したかどうか不明である、被験動物数が十分でない、試験した用量が 1 段階だけである、盲検法によるスコア付けが行われていないことに基づき、結果は不明確であると評価している。この試験は、IARC、IPCS、US ATSDR、および TERA のいずれのレビューにも収載されていない。また精通した専門家グループ向けに作成された文書にも収載されていない (van Benthem, 1997)。この試験では、4 µg/mL の被験物質で処

理したステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) において、染色体逆位が有意に増加したことも報告されている。

硫酸ニッケルの小核試験が、大規模な共同研究の一環として実施されている (Morita *et al.*, 1997)。同じ試験の中で、塩化ニッケル(六水和物)と酸化ニッケルも検討されている。硫酸ニッケル六水和物の試験は、第一製薬の H Shimada 氏率いるグループにより、雄の ddY マウス (5 匹/群) を用いて実施された。被験物質は、CAS 登録番号の 10101-97-0 に照らして六水和物であると特定され、生理食塩水で溶解された。被験物質は、0、5、10 ないしは 20 mg/kg 体重(ニッケルとして 0、1.1、2.2 および 4.4 mg/kg 体重に相当)の用量で、2 回腹腔内投与された。20 mg/kg 体重の用量については、最大耐量と記されている。24 時間間隔で 2 回の投与が行われ、最終投与の 24 時間後に骨髓試料を採取した。1,000 個の幼若赤血球数についてスコア付けを行った。この試験は、数多くの化学物質についての共同研究であるため、各試験の記載内容は限定される。

Frequency of micronucleated PCEs in bone marrow cells (Morita et al, 1997).

Dose mg/kg	harvest time h	% Mn-PCEs		NCE/PCE ratio	
		mean	SE	Mean	SE
0	24	0.16	0.11	-	
5	24	0.16	0.11	-	
10	24	0.30	0.19	-	
20	24	0.24	0.11	-	

20 mg/kg 体重が最大耐量という記述に関しては、論説の中にそれを示す文書は見当たらない。多染性赤血球に対する正染性赤血球の割合 (NCE/PCE 比) への影響については数値が示されておらず、この試験の情報から結論を導くことはできない。共同研究では、硫酸ニッケルは、「2 回目の腹腔内投与の 24 時間後の観察で、ddY マウスの骨髓において小核を有する多染性赤血球の生成を誘発していなかった」と結論づけている。この試験は、TERA (1999) ではレビューされていない。NiPERA (2003) は、被験動物数と被験物質投与群数、骨髓試料採取時間、および分析が適切であることから、この試験の有用性は高いと判断している。曝露用量は、十分に高い(最大耐量) (NiPERA、2003)。

硫酸ニッケルの *in vivo* 骨髓小核試験が、ラットへの経口投与で実施されている (Covance 2003)。この試験は、附属書 V B.12 (OECD 試験ガイドライン 474) の手順に準拠して行われた。骨髓の曝露量を最大にするために、反復投与(連続 3 日間、24 時間に 1 回投与)が採用された。骨髓試料の採取は、最終投与から 24 時間後に 1 回だけ行われた。

EURAR: NICKEL SULPHATE

試験の曝露用量は、硫酸ニッケル六水和物として 125、250 ないしは 500 mg/kg 体重/日を 3 日間(ニッケルとして 27.5、55、110 mg/kg 体重/日を 3 日間)とされた。用量設定試験においては、骨髄細胞毒性(PCE:NCE 比の有意な減少)は、硫酸ニッケル六水和物として 750 または 1000 mg/kg 体重/日 × 3 日の投与では認められなかった。しかし、この用量設定試験では、硫酸ニッケル六水和物として 750 mg/kg 体重/日 × 3 日の投与により、有意な致死率(6 匹中 4 匹死亡)が示されている。因みに、FDRL の試験で示された LD₅₀ は、硫酸ニッケル六水和物として 325 mg/kg であり、この値はリスクの総合判定に用いられている。

主試験では、最高用量の 500 mg/kg 体重/日群に死亡は認められなかったが、毒性臨床症状として活動性低下や流涎などが確認された。硫酸ニッケル六水和物は、この用量では骨髄に対し有意な細胞毒性を示さず、また統計学的に有意な PCE:NCE 比の減少も引き起こさなかった。さらに、硫酸ニッケル六水和物は、設定した 3 段階の用量のいずれにおいても、小核多染性赤血球の統計学的に有意な増加を引き起こさなかった。

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Harvest time	% Mn -PCEs		Ratio PCE:NCE	
			mean	S.E.	mean	S.E.
Vehicle (water)		24 h	0.07	0.02	1.14	0.14
Cyclophosphamide	60mg/kg	24 h	2.22*	0.15	0.79**	0.03
Nickel sulphate hexahydrate	125mg/kg bw/day	24 h	0.01	0.01	0.93	0.14
	250mg/kg bw/day	24 h	0.07	0.03	1.13	0.11
	500mg/kg bw/day	24 h	0.06	0.02	0.91	0.10

* Significantly greater than the corresponding vehicle control, p ≤0.01.

** Significantly less than the corresponding vehicle control, p ≤0.05.

この試験では、血漿中および骨髄中のニッケル濃度も測定されている。結果は以下の表に示す。ニッケル濃度は、血漿中では統計学的に有意に増加したが、骨髄中では非有意な増加にとどまった。

	Plasma (ppb)		Bone Marrow (ppb)	
	Mean	SD	Mean	SD
Vehicle Control	<50	0	11.0	5.5
125 mg/kg/day	163*	80.9	13.2	2.7
250 mg/kg/day	519*	272.4	27.9	24.1
500 mg/kg/day	1568*	786.2	38.5	43.4

* Significantly greater than the corresponding vehicle control, p ≤0.01.

Sobti & Gill(1989)もまた、小核試験を、硫酸ニッケル、硝酸ニッケル、および塩化ニッケルを被験物質として実施している。硫酸ニッケルは、水を媒体として 73 mg/kg 体重(ニッケルとして 28 mg/kg 体重)の用量で、Lacca マウスに単回経口投与された。この被験物質に提示された CAS 登録番号(7786-81-4)から、それが無水物であったと判断される。陰性対照群は設けられていたが、陽性対照群については報告されていない。1 群あたりの被験動物数は示されていない。投与から 6 および 30 時間後に、骨髄試料が採取され、投与終了から 5 週間後に、精巣上体を用いて精子塗抹標本が作製された。1 匹あたり何個の細胞をスコア付けに供したか、また、スコア付けが盲検下で行われたかどうかは不明である。この試験は、標本スライドの作製については Robert & Bernard(1982)の方法に、染色については Schmid(1973、1975)の方法に準拠したとされているが、他の詳細については記載されていない。

Frequency of micronucleated PCEs in bone marrow cells and in spermatozoa (Sobti & Gill, 1989).

Dose mg/kg	harvest time	Mn-PCEs/1000		NCE/PCE ratio	
		mean	SE	Mean	SE
bone marrow					
0	6 h	1.33	0.272	-	
	30 h	1.66	0.272	-	
73	6 h	2.33.	0.272	-	
	30 h	4.33	0.272	-	
Spermatozoa					
0	5 weeks	8.66	0.547		
73	5 weeks	25.66	0.982		

小核の有意な増加($p < 0.05$)が、投与から 6 時間後と 30 時間後の両時点で認められた。また、投与から 5 週間後には、精子頭部異常の有意な増加($p < 0.01$)も認められた。様々なタイプの異常精子が認められ、ミジンコ形、ポリープ形、不定形、巨大不定形、金床形などと記載されている。著者は、試験の結果について、彼らが以前に得ていた染色体異常に関する知見と整合していると述べている(Sharma *et al.* 1987)。この試験は、US ATSDR、NiPERA (1996)、TERA の各レビューでは、陽性を示す証拠として報告されている。また、この試験は、精通した専門家グループ向けに作成された文書にも収載されている(van Benthem, 1997)。NiPERA (2003)は、この試験の結果について、有意な増加が 1 用量で認められているが傾向に関する情報が無い、推奨される時点での試料採取が 1 回だけである、被験動物数が十分でない、設定用量が 1 段階だけである、投与容量が明らかでない、スコア付けが盲検下で行われていないことに基づき、不明確であるとしている。

精錬所の労働者の末梢リンパ球を対象として、CA 試験および SCE 試験が実施されている。事務作業員からなる対照群が設けられた(Waksvik & Boysen, 1982)。その結果、ギャップの有意な増加が認められたが、姉妹染色分体交換は認められなかった。被験者はすべて非喫煙者および非飲酒者で、日常的に薬を服用している者はいなかった。また、他の多くの交絡因子も除外された。曝露を受けていた労働者を 2 群にわけて検討が行われた。一方の群は、粉碎、焙焼、製錬に従事していた 9 人の労働者から成り、主に一酸化ニッケルと亜硫化ニッケルに曝露されていた。もう一方の群は、電気めっきに従事していた 10 人から成り、平均 25.5 年(8~31 年)の間、主に塩化ニッケルと硫酸ニッケルに、ニッケルとして 0.2 mg/m^3 ($0.1 \sim 0.5 \text{ mg/m}^3$) の空气中濃度で曝露されていた。この群の平均血漿中濃度は $5.2 \text{ } \mu\text{g/L}$ で、分裂中期細胞の 18.3% がギャップを有していた。7 人の事務作業員からなる対照群では、平均血漿中濃度は $1 \text{ } \mu\text{g/L}$ で、ギャップを有していた分裂中期細胞は平均 3.7% であった。これらの事務作業員は、年齢や性別が曝露を受けた群と整合するように選定されていた(Waksvik & Boysen, 1982、IARC より引用)。

Waksvik *et al.*(1984) は、同じ工場で働き、同じ様に空气中濃度が 1 mg/m^3 以上のニッケルに 25 年以上曝露され、退職後平均 8 年が経った 9 人の労働者を調査した。彼らは、鼻部形成異常を有することが知られていた労働者のグループから選択され、調査時点においてもまだ $2 \text{ } \mu\text{g/L}$ の血漿中ニッケル濃度を示していた。これらの退職した労働者では、有意($p < 0.05$)なギャップの保有がみられ、分裂中期細胞における染色分体切断の発生頻度は 4.1% で、年齢、生活様式、服薬状況を整合させて選択した 11 人の非曝露退職者での 0.5% と比較して有意に($p < 0.001$)増加していた(Waksvik *et al.* 1984、IARC より引用)。

NiPERA (2003) は、Waksvik & Boysen(1982)や Waksvik *et al.*(1984)の調査を、それらの労働者に染色体異常を誘発したのがニッケル曝露であることを示す証拠とは認められないと考えている。報告されたデータは混同されており⁷、調査対象とした労働者の数は非常に少なく、血漿中ニッケル濃度との相関関係は認められていない。UK HSE (1987)による Waksvik & Boysen(1982)の調査の評価では、染色体切断はニッケル労働者においても事務員以上には頻発しておらず、分裂中期における SCE 数にも有意な差はないと認識され、工程労働者のリンパ球に染色体ギャップの増加がみられたのは、体細胞へのニッケルの遺伝的影響の現れかもしれないと考えられている。IARC のレビューでは、Waksvik & Boysen (1982)と Waksvik *et al.*(1984)の調査についての結論を、他の関連データの要約に収載している。また、IPCS のレビューにもこれらの調査が収載されている。US ATSDR のレビュー

⁷ Waksvik & Boysen(1982)の調査の基本となる対象集団は、Waksvik *et al.*(1981a & 1981b)の 2 試験とほとんど同じであるように思われる。NiPERA (2003)は、曝露を受けていた 2 グループ(グループ 1:電気めっき工、グループ 2:焙焼、製錬作業)のデータは、1981 年の 2 つの報告書と 1982 の報告書で入れ替わっている可能性があることを指摘している。IARC は、その後 *Mutat. Res.*, 104, 395(1982)に掲載されたオリジナル論文の正誤表において、この労働者らの曝露状況が明確にされたと述べている。

では、Waksvik & Boysen(1982)の調査についての言及はあるが、硫化ニッケルの結果についてのみ触れられている。これらの試験は、van Benthem(1997)による精通した専門家グループ向けのレビューには記載されていない。

Deng *et al.*(1983, 1988)は、ニッケルに曝露されていた7人の電気めっき工からリンパ球を採取し、姉妹染色分体交換と染色体異常の発生頻度を調査した。空気中のニッケル濃度は、0.0053~0.094 mg/m³(平均 0.024 mg/m³)であった。対照被験者として、同じ工場から年齢と性別を整合させて10人の事務員を選択した。他の交絡因子も考慮に入れられた。曝露を受けていた労働者は、姉妹染色分体交換の発生頻度が増加していた[7.50 ± 2.19(SEM)対 6.06 ± 2.30(SEM) p < 0.05]。これらの値について、IARCの作業部会は、群間差は小さいと述べている。分裂中期細胞における染色体異常(ギャップ、切断、断片化)の発生頻度は、対照群で0.8%であったのに対し、ニッケルめっき工では4.3%に増加していた(Deng *et al.* 1983, 1988, IARCより引用)。

Senft *et al.*(1992)は、チェコ共和国で硫酸ニッケルと酸化ニッケルを生産する化学工場の労働者から末梢リンパ球を採取し、染色体異常を測定した。試料は、硫酸ニッケルの生産に携わっていた15人、酸化ニッケルの生産に携わっていた6人、および対照被験者19人から採取した。曝露を受けていた2群を合わせると、染色体異常(ギャップ、染色分体および染色体の切断)の平均数に、対照群と比べ、わずかだが有意な増加(1.6倍)がみられた。CAの数値と雇用期間または尿、血清、毛におけるニッケル濃度との間に明らかな単純相関は認められなかった(NiPERA, 1996より引用)。NiPERA(2002)によるその後のデータ分析で、主に硫酸ニッケルに曝露されていた15人の労働者のグループにおける染色体異常の発現は、対照群の4.05 ± 2.27%と比べ5.2 ± 1.9%と、統計学的な差はないことが示された。Senft *et al.*(1992)は、対照群での染色体異常の発生(4.05 ± 2.27%、範囲1~10%)は、末梢リンパ球での染色体異常の基準値とされている2%以下よりも有意に高いと指摘しており、化学工場全体がニッケルに汚染された環境下にあったのではないかと原因を示唆している。NiPERA(2003)は、Senft *et al.*(1992)の調査が、これらの労働者に染色体異常を誘発したのがニッケル曝露であるという証拠を示しているとみなすことはできないと考えている。

Table 4.1.2.6.2.B: *In vivo* studies with nickel sulphate on chromosomal effects in plants and insects.

Species / Strain	Endpoint / test system	Result	Reference	Review
Plants				
<i>Vicia faba</i>	mitotic effects	Positive	Komczynski <i>et al.</i> (1963)	IPCS
Insects				
<i>D. melanogaster</i> white-males BASC-females	sex-linked recessive lethal mutation	Positive	Rodrigues-Armaiz & Ramos (1986)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA
<i>D. melanogaster</i> X ^{C2} y B/sc ⁸ Y-males y ² w ^a -females	sex chromosome loss assay	Positive (weak)	Rodrigues-Armaiz & Ramos (1986)	IPCS, IARC, UK HSE, US ATSDR, NiPERA (1996), TERA

Table 4.1.2.6.2.C: *In vivo* studies with nickel sulphate on chromosomal effects in mammals

Species/Strain / Endpoint/ test system	Route of administration / Dose / No. of doses	Result	Reference	Review
Mammals – chromosomal aberrations (CA) in bone marrow and spermatogonia				
Rat	Intraperitoneal 3, 6 mg Ni/kg repeated dosing for 7 and 14 days	Negative	Mathur <i>et al.</i> (1978)	IPCS, IARC, US ATSDR, TERA, NiPERA (2003)
Mammals – chromosomal aberrations (CA) in bone marrow				
Mouse (Lacca)	Oral 73 mg/kg [28 mg Ni/kg] for 4, 8, 12 or 16 days	Positive equivocal	Sharma <i>et al.</i> (1987)	NiPERA (1996) NiPERA (2003)
Mammals – micronucleus test (MN) in bone marrow				
Mouse ddY	Intraperitoneal 2 x 0, 5, 10 and 20 mg/kg [2 x 0, 1.1, 2.2 and 4.4 mg Ni/kg]	Negative	Morita <i>et al.</i> (1997).	NiPERA (2003).
Rat (Sprague-Dawley)	Oral 3 x 125, 250, 500 mg/kg bw [3 x 28, 56, 112 mg Ni/kg bw for 3 days	Negative	Covance (2003)	
Mammals – micronucleus test (MN) in bone marrow and spermatozoa				
Mouse (Lacca)	oral 73 mg/kg [28 mg Ni/kg]	Positive equivocal	Sobti & Gill (1989)	US ATSDR, NiPERA, TERA NiPERA (2003)

Table 4.1.2.6.2.D: *In vivo* studies with nickel sulphate in humans.

CA, SCE, peripheral lymphocytes				
Electrolysis workers n=10 Control: Office workers. n = 7 Roasting-smelting workers also studied	soluble nickel: NiSO ₄ , NiCl ₂ exposure 0.1 – 0.5 mg Ni/m ³	Positive (gaps) Negative (breaks) Negative SCE Cannot be used as evidence.	Waksvik & Boysen (1982)	UK HSE, IARC, IPCS, (US ATSDR), NiPERA (1996) NiPERA (2003)
Retired nickel refinery workers, n = 9 Control n = 11	25 years exposure to > 1 mg Ni/m ³ – combined NiSO ₄ , NiCl ₂ , NiO and Ni ₃ S ₂ ,	Positive gaps and breaks Negative SCE Cannot be used as evidence	Waksvik <i>et al.</i> (1984)	IARC, IPCS, NiPERA (1996) NiPERA (2003)
Electroplating workers n = 7 Control n = 11	nickel exposure: 0.0053 – 0.094 mg/m ³	mainly gaps, but also breaks & fragments small increase in SCE	Deng <i>et al.</i> (1983, 1988)	IARC
CA peripheral lymphocytes				
Nickel sulphate chemical plant n = 15 Control n = 19 Nickel oxide production workers (n=6) also studied	NiSO ₄ (0.31-2.86 mg Ni/m ³) NiO (0.28-1.52 mg Ni/m ³)	Positive for combined exposure groups (gaps and breaks) Cannot be used as evidence	Senft <i>et al.</i> (1992)	NiPERA (1996) NiPERA (2003)

4.1.2.6.2.4 *In vivo* 試験に関する考察と結論

Benson *et al.* (2002)による試験は、ニッケル化合物の *in vivo* 遺伝毒性に関するデータベースにおける、最も包括的なデータを提供している。この試験は、直接的な DNA 損傷の誘発と炎症やアポトーシスに誘発した非直接的損傷とを区別することができないため、酷評された。試験で使用されたニッケル化合物は、およそ同じ濃度で炎症も遺伝毒性も誘発したと思われる。

経口投与や腹腔内投与による *in vivo* 試験では、相反する結果が得られている。2 件の染色体異常試験のうち、腹腔内投与試験 (Mathur *et al.*, 1978) の方は陰性を示しているが、この結論を裏付けるデータが提示されていない。経口投与試験 (Sharma *et al.*, 1987) の方は、全体にわたって陽性と捉えているが、NiPERA (2003) は、その結果を不明確とみなしている。塩化ニッケルとは異なり、硫酸ニッケルが染色体異常に関して明らかに陽性であると示している *in vivo* 試験の情報は得られていない。3 件の小核試験の情報が得られているが、最

近行われた 2 件の試験(腹腔内投与の Morita *et al.*, 1997 と経口投与の Covance 2003)では陰性という結果が得られたのに対し、残りの 1 件の経口投与試験では陽性という結果が得られている(Sobti & Gill, 1989)。Sharma *et al.*(1987)、Sobti & Gill(1989)、および Morita *et al.*(1997)の試験では、いずれも塩化ニッケルのリスク評価について、より詳細に検討されている。Morita(1997)の試験は、矛盾する結果が得られたことについて、用いた動物の系統の違いで説明がつく可能性があることを示唆している。

ヒトに関しては、ここではまず 3 件の調査を取り上げたが、いずれも硫酸ニッケルと塩化ニッケルの両方への曝露が考えられるものであった。この 3 件(Waksvik & Boysen 1982、Waksvik *et al.* 1984、Deng *et al.* 1983、1988)は、IARC のレビューでは、重要性のあるデータとみなされている。さらに取り上げた Senft の調査では、化学工場の労働者における影響が検討されている。NiPERA(2003)は、Waksvik と Senft の調査のいずれについても、ニッケル曝露が曝露された労働者に染色体異常を誘発したことを示す証拠として採用できないと考えている。

4.1.2.6.3 結論

上記で検討したデータから、硫酸ニッケルが *in vitro* で遺伝毒性、特に染色体異常誘発性を示すという明らかな証拠が得られている。動物およびヒトにおいては、多くの *in vivo* 試験の情報が得られている。Benson *et al.*(2002)の試験は、ニッケル化合物の *in vivo* 遺伝毒性に関するデータベースにおける、最も包括的なデータを提示しており、吸入投与の場合、硫酸ニッケルは、ほぼ同じ濃度で肺細胞に炎症と遺伝毒性を誘発するものと思われる。他の動物試験のいくつかからは、矛盾する結果が得られている。最近行われた 2 件の小核試験のうち、腹腔内投与と経口投与では、結果は陰性であった。ヒトを対象として実施された調査からは、不十分な証拠しか得られていない。

生殖細胞に関しては、明確な結論が導けるような試験の情報は得られておらず、遺伝性の影響に関しては、知見がほとんど得られていない。ニッケルイオンが精巣に達するという証拠が得られているが、Mathur *et al.*(1978)の試験では、精原細胞への影響はみられなかった。Sobti & Gill(1989)の試験では、影響が認められているが、それは染色体損傷ではなく、生殖細胞への毒性作用を反映したものと考えられる。

2004 年 4 月の専門家会議では、硫酸ニッケルを「カテゴリー 3 の変異原物質; R68」に分類することに関して、精通した専門家グループの意見が求められた。当該専門家グループは、硫酸ニッケル、塩化ニッケル、硝酸ニッケルについて、「カテゴリー 3 の変異原物質; R68」に分類すべきであると結論付けている。この結論は、全身曝露により、体細胞において *in*

vivo 遺伝毒性を生じたという証拠に基づいている。したがって、生殖細胞が影響を受ける可能性は除外できない。ただし、当該専門家グループは、生殖細胞への影響を調べるための追加試験を実施することは、現実的ではないと判断している (European Commission, 2004)。

吸入曝露で肺の細胞について *in vivo* コメットアッセイを追加的に実施することも、リスクの総合判定の目的に鑑みて不要であると考えられる。陽性の結果であれば、変異原物質として分類するという結論は変わらない。また、陰性の結果が得られても、閾値の概念を導入して発がん性のリスク評価を行うことが妥当であるとするには、証拠として不十分であるとみなされる。したがって、この影響について追加試験を行っても、ここで行ったリスク評価の結果を著しく変える新たな情報が得られることはないと考えられる。

硫酸ニッケルは、第 30 次 ATP では、「カテゴリー3 の変異原物質; R68」に分類されている。

4.1.2.7 発がん性

4.1.2.7.1 動物のデータ

4.1.2.7.1.1 吸入

米国国家プログラム (NTP : National Toxicology Program) は、硫酸ニッケル六水和物の慢性吸入がラットやマウスに及ぼす毒性影響について、包括的な検討を行った (NTP 1996a)。慢性毒性・発がん性併合試験が実施された。硫酸ニッケル六水和物の発がん性影響に関するデータは、本セクションにて要約されており、最も重要な影響については、Table 4.1.2.7.1.A と Table 4.1.2.7.1.B に記載されている。他の影響に関するデータは、セクション 4.1.2.5.1 を参照のこと。

NTP の試験デザインは、適切なものであった。試験結果は、試験報告の中で結論付けられている様に、信頼性があると思われる。ラット (F344/N) およびマウス (B6C3F1) を、硫酸ニッケル六水和物 (空気動力的質量中央径が 1.8~3.1 ± 1.6~2.9 μm) に、ニッケルとしてそれぞれ 0.11 mg/m³ までまたは 0.22 mg/m³ までの濃度で吸入曝露した例では、いずれの動物種においても曝露に関連した腫瘍の発現はみられなかった。

Table 4.1.2.7.1.A: Summary of inhalation carcinogenicity studies on nickel sulphate hexahydrate in experimental animals.

Route of administration	Species, group size and sex	Concentration, exposure duration	Results	References
-------------------------	-----------------------------	----------------------------------	---------	------------

EURAR: NICKEL SULPHATE

Inhalation	F344/N rats 63-65 males, 63-64 females per group	0, 0.03, 0.06 or 0.11 mg Ni/m ³ 6 hours/day, 5 days/week, 2 years	No exposure related neoplasms observed	NTP (1996a)
Inhalation	B6C3F1 mice 80 males, 80 females per group	0, 0.06, 0.11 or 0.22 mg Ni/m ³ 6 hours/day, 5 days/week, 2 years	No exposure related neoplasms observed	NTP (1996a)

Table 4.1.2.7.1.B: Summary of relevant primary tumour rates at terminal sacrifice (in lungs and in all organs) reported in the NTP (1996a) inhalation study.

Organ: Neoplasm	Male F344 rats				Female F344 rats				Male B6C3F1 mice				Female B6C3F1 mice			
	Dose groups: ppm Ni				Dose groups: ppm Ni				Dose groups: ppm Ni				Dose groups: ppm Ni			
	0	0.03	0.06	0.11	0	0.03	0.06	0.11	0	0.06	0.11	0.22	0	0.06	0.11	0.22
Lung: Alveolar/ Bronchiolar adenoma	0/54	0/53	0/53	2/53	0/52	0/53	0/53	1/54	5/61	5/61	3/62	5/61	3/61	3/60	2/60	0/60
Lung: Alveolar/ Bronchiolar	1/54	0/53	1/53	1/53	0/52	0/53	0/53	0/54	9/61	13/61	4/62	3/61	4/61	3/60	9/60	2/60
Lung: Alveolar/ Bronchiolar carcinoma or Alveolar/ Bronchiolar adenoma	1/54	0/53	1/53	3/53	0/52	0/53	0/53	1/54	13/61	18/61	7/2	8/61	7/61	6/60	10/60	2/60
All organs: Benign tumours	49/54	50/53	50/53	51/53	35/52	42/53	35/53	36/54	24/61	16/61	25/62	16/62	27/61	34/60	23/60	16/60
All organs: Malignant tumours	37/54	43/53	41/53	41/53	35/52	33/53	37/53	29/54	20/61	22/61	25/62	13/62	26/61	27/60	26/60	26/60
All organs: Malignant and benign tumours	53/54	52/53	51/53	51/53	49/53	52/53	50/53	48/54	38/61	35/61	41/62	27/62*	41/61	45/60	40/60	36/60

4.1.2.7.1.2 経口

硫酸ニッケルをラットやイヌに経口投与した発がん性試験のデータが得られている。また、Fischer ラットへ(強制)経口投与を行った、OECD テストガイドライン 451 に準拠した発がん性試験の情報が 1 件得られている。これらの試験の発がん作用についてのデータは、Table 4.1.2.7.1.C に要約した。他の作用についてのデータはセクション 4.1.2.5.1 を参照のこと。

Ambrose *et al.* (1976)による試験では、ラット、イヌともに、腫瘍は認められなかった。しかし、この試験では、被験動物(ラットとイヌ)の数が乏しく、ラットの全群で死亡率が高かったため(死因は報告されていない)、2 年間の投与をやり終えて屠殺および病理組織学的検査が可能だったのは少数であった。また試験のデザインと結果についての情報もわず

かであった。

CRL(2005)による試験では、雄雌各 60 匹ずつのラットの群が設けられ、ニッケルとして 0、2.2、6.7、11 mg/kg 体重/日 (硫酸ニッケル六水和物としては 0、10、30、50 mg/kg 体重/日) の用量で、1 日 1 回、104 週間の投与が行われた。被験物質は水に溶解され、容量を体重 1 kg あたり 10 mL として強制経口投与された。腫瘍に関するデータの統計解析では、尾の角化棘細胞腫の発生率に、対照群(0/60 匹)と比べ、低用量群の雄(9/59 匹)で統計学的に有意な増加が認められた。この増加に用量依存性は無く、中用量(4/60 匹)および高用量(3/60 匹)では、統計学的に有意な水準に達しなかった。ほぼ同様のパターンが、やはり雄において、皮膚の角化棘細胞腫について認められた。下垂体腫瘍(下垂体前葉部腺腫 - この系統のラットに多くみられる腫瘍)の発生率に、統計学的に有意ではない増加が雌で認められ、対照群の 16/60 匹に対し、低用量で 26/60 匹、中用量で 22/59 匹、高用量で 10/58 匹であったが、用量-反応関係はみられなかった。雄の皮膚において、扁平上皮乳頭腫の発生率増加がみられ、対照群の 0/60 匹に対し、低用量で 5/60 匹、中用量で 2/60 匹、高用量で 4/58 匹であったが、これにも用量-反応関係は認められなかった。結論として、硫酸ニッケル六水和物の 1 日 1 回経口投与は、よくみられる腫瘍、まれな腫瘍のいずれについても用量依存的な増加はもたらさなかった。

Table 4.1.2.7.1.C: Summary of oral carcinogenicity studies of nickel sulphate hexahydrate in experimental animals.

Route of administration	Species, group size and sex	Concentration, exposure duration	Results	Reference
Oral, dietary	Wistar rats 25 males and females per group	0, 100, 1000 or 2500 ppm Ni in feed 2 years	No treatment related neoplasms observed	Ambrose <i>et al.</i> (1976)
Oral, dietary	Beagle dogs 3 males and females per group	0, 100, 1000 or 2500 ppm Ni in feed 2 years	No treatment related neoplasms observed	Ambrose <i>et al.</i> (1976)
Oral, gavage	Fischer rats 60 males and females per group	0, 2.2, 6.7, 11 mg Ni/kg bw/day (gavage) 2 years	No treatment related neoplasms observed	CRL (2005)

4.1.2.7.1.3 経皮

皮膚接触での硫酸ニッケルの発がん性を検討した試験のデータは、得られていない。

4.1.2.7.1.4 その他の投与経路

筋肉内注射やインプラント、または腹腔内注射による硫酸ニッケルの発がん性が、ラットを用いた試験で検討されている。これらの試験については、Table 4.1.2.7.1.D に要約した。腫瘍の発生は、腹腔内注射および筋肉内インプラントによる投与で認められ、筋肉内注射による投与では認められなかった。

Table 4.1.2.7.1.D: Summary of carcinogenicity studies of nickel sulphate in experimental animals by other routes of administration than inhalation, oral administration, and dermal contact.

Route of administration	Species, group size and sex	Concentration, exposure duration	Results	Reference
Intramuscular injections to one or both thigh muscles	Wistar rats, 32 males and females No control group	Single dose of 5 mg of nickel sulphate hexahydrate Observation for 603 days	No local tumours at the injection sites, no other treatment-related tumours	Gilman (1962 – quoted from IARC 1990, TERA 1999)
Intramuscular implants (in sheep fat pellets)	NIH black rats, 35 animals per group Vehicle controls	3 implants (interval unspecified) of 7 mg of nickel sulphate (hydration not stated) Observation for 18 months	Implantation-site sarcomas in 1/35 No tumours in controls (0/35)	Payne (1964 – quoted from IARC 1990, TERA 1999). Reported as an abstract.
Intramuscular injections	Wistar rats 20 males Positive (nickel subsulphide) and negative (sodium sulphate) controls	15 injections of 0.26 mg of nickel as nickel sulphate (hydration not stated) every second day during one month Observation for 2 years	No injection site tumours in treated animals or in negative controls Local sarcomas in positive controls (16/20)	Kasprzak <i>et al.</i> (1983 – quoted from IARC 1990, TERA 1999)
Intraperitoneal injections	Wistar rats 30 females Controls: 1 ml saline x 3 1 ml saline x 50 2 ml saline x 4	50 injections of 1 mg nickel as nickel sulphate heptahydrate twice weekly Observation for 132 weeks	Abdominal tumours in 6/30 (p<0.05) (1 mesothelioma, 5 sarcomas) 1/33 (sarcoma) 0/34 3/66 (1 mesothelioma, 3 sarcomas)	Pott <i>et al.</i> (1989, 1992) (Pott <i>et al.</i> , 1992 cited in IARC and TERA 1999 as, 1990)

4.1.2.7.1.5 プロモーター作用に関する試験

硫酸ニッケルの発がんプロモーター作用を実験動物において検討した試験のデータが、3件得られている。これらの試験の結果については、Table 4.1.2.7.1.E に要約した。これらの試験は、鼻咽頭または口腔への局所投与の場合、または投与を受けた母動物から生まれた仔動物が混餌投与を受けた場合に、硫酸ニッケルが発がんプロモーター作用を示したこと

をほのめかしているが、その証拠能力はかなり弱い。したがって、これらの試験に基づいて、硫酸ニッケルの発がんプロモーター作用に関して結論を導き出すことはできない。

Table 4.1.2.7.1.E: Summary of promoter studies of nickel sulphate in experimental animals.

Route of administration	Species, group size and sex	Concentration, exposure duration	Results	Reference
1 Topical insertion into the nasopharynx 2 In drinking water	Rats 12 animals Controls: Initiated only or nickel sulphate only	Initiation (*) followed by 1) 0.02 ml 0.5% nickel sulphate in 4% aqueous gelatin once a week (0.04 mg Ni/week), for 7 weeks 2) 1 ml of aqueous 1% nickel sulphate (3.8 mg Ni/day) for 6 weeks Observation for 371 days	1) Two tumours in the nasopharynx (one papilloma, one early carcinoma) 2) Two tumours in the nasopharynx (one squamous cell carcinoma, one fibrosarcoma) No tumours in any of the controls	Ou <i>et al.</i> (1980 – quoted from IARC 1990, TERA 1999, IPCS 1991)
3) Topical insertion in the oral cavity 4) In drinking water	Rats 22 animals Controls: Initiated only or nickel sulphate only	Initiation (*) followed by 3) 0.02 ml 0.5% nickel sulphate in 4% aqueous gelatin once a week (0.04 mg Ni/week), for 7 weeks 4) 1 ml of aqueous 1% nickel sulphate (3.8 mg Ni/day) for 6 weeks Observation for 371 days	3) 5/22 developed carcinomas (2 in the nasopharynx, 2 in the nasal cavity, 1 of the hard palate) 4) No tumours developed No tumours in any of the controls	Liu <i>et al.</i> (1983 – quoted from IARC 1990, TERA 1999, IPCS 1991). Reported in an abstract.

Route of administration	Species, group size and sex	Concentration, exposure duration	Results	Reference
Feed	Rats 13 females	Initiation (*) on day 18 of gestation followed by: Pups of treated dams fed 0.05 ml of 0.05% nickel sulphate (9.5 µg Ni/day) daily for one month increasing every month with 0.1 ml (19µg Ni/day) for further 5 months Untreated pups of treated dams Untreated pups of uninitiated dams Controls: Initiated dams	5/21 pups (24%) developed carcinomas of the nasal cavity 3/11 pups (27%) developed tumours (one nasopharyngeal squamous-cell carcinoma, one neurofibrosarcoma of the peritoneal cavity, one granulosa-thecal-cell carcinoma of the ovary) No tumours No tumours (0/13)	Ou <i>et al.</i> (1983 quoted from IARC 1990, TERA 1999, IPCS 1991). Reported in an abstract.

(*) Initiation: single s.c. injection of 9 mg/ml dinitrosopiperazine

4.1.2.7.1.6 実験動物における発がん性に関する考察と結論

4.1.2.7.1.6.1 吸入

硫酸ニッケル六水和物(空気動力的質量中央径が 1.8~3.1 ± 1.6~2.9 µm)を被験物質として、ラットとマウスにおける吸入試験が行われている(NTP 1996a)。ラット(F344/N)およびマウス(B6C3F1)を、硫酸ニッケル六水和物に、ニッケルとしてそれぞれ 0.11 mg/m³まで、および 0.22 mg/m³までの濃度で、2年間吸入曝露したが、いずれの動物種にも曝露に関連した腫瘍は認められなかった。『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(それぞれの化学物質のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』で詳述されているように、硫酸ニッケルに関する NTP 試験の陰性結果については、確定的とはみなせないという議論が膨らんでいることに留意すべきである。

酸化ニッケルを被験物質とした試験(NTP 1996b)と亜硫化ニッケルを被験物質とした試験(NTP, 1996c)では、ラットが吸入した場合の発がん性について、それぞれ、ある程度の証拠ならびに明らかな証拠が得られている。また、酸化ニッケルでは、雌マウスにおいて不明確な結果が得られている。

硫酸ニッケル、酸化ニッケル、亜硫化ニッケルを被験物質とした NTP 試験の結果から、ニ

ッケルの可溶型と不溶型では、実験動物を吸入曝露した場合に、発がん性や発がん作用強度に違いがあるのかどうかという疑問が提起されている。ただし、この疑問を検討できるほどの十分なデータは、得られていない。詳細については、『Background document in support of the individual Risk Assessment Reports(それぞれの化学物質のリスク評価報告書を裏付けるバックグラウンド文書)』を参照のこと。

他には、硫酸ニッケルの吸入による発がん性について、結論を得るのに適切とみなされる実験動物データは、得られていない。

結論としては、硫酸ニッケルを含む様々なニッケル化合物の発がん性についてデータは得られているが、それらのデータでは、実験動物が硫酸ニッケルを吸入した場合の発がん性について結論を導くには、不十分であると考えられる。

4.1.2.7.1.6.2 経口

経口投与による硫酸ニッケルの発がん性が、ラットやイヌを用いた、ガイドラインに準拠していない 2 件の古い試験で調べられている。この 2 件の試験では、ラット、イヌともに、腫瘍は認められなかった。硫酸ニッケルを被験物質として、OECD テストガイドライン 451 に準拠して行われた、ラットへの(強制)経口投与による 2 年間の発がん性試験では、発がん性は全く認められていない。他のニッケル化合物に関するデータは、酢酸ニッケルをラットやマウスに飲水投与した試験のものしか得られていないが、その試験でも、曝露に関連した腫瘍の発生は認められていない。

結論としては、硫酸ニッケルについては経口投与による発がん性のデータが十分に存在し、経口投与された実験動物で、発がん性がまったく認められなかったことが示されている。

4.1.2.7.1.6.3 経皮

実験動物において亜硫酸ニッケルの発がん性を、皮膚接触により検討した試験のデータは得られていない。

その他のニッケル化合物に関するデータは、雄のハムスターの頬袋の粘膜に α 型の硫化ニッケルを塗布した試験のものしか得られていない。それによると、被験動物の頬袋、口腔、および腸管に、腫瘍の発生は認められなかった。

結論としては、得られているデータは、実験動物に皮膚接触させた場合の硫酸ニッケルの発がん性を評価するには少なすぎる。

4.1.2.7.1.6.4 その他の投与経路

ラットにおいて硫酸ニッケルの発がん性を筋肉内注射やインプラント、または腹腔内注射により検討した試験のデータが得られている。腹腔内注射および筋肉内インプラントによる投与の場合に、腫瘍の発生が認められたが、筋肉内注射による投与では認められなかった。

その他のニッケル化合物に関するデータからは、それらの化合物が、少数の例外を除き、実験動物の様々な部位に注射した場合に、局所的な腫瘍を生じさせることが示されている。

結論としては、得られたデータから、ニッケル化合物は、少数の例外を除き、実験動物の様々な部位に注射した場合に、局所的な腫瘍を生じさせることが示されている。ヒトは、吸入、経口摂取、皮膚接触以外の経路で硫酸ニッケルに曝露されることはないため、このような投与経路とは関係がないことに留意すべきである。ただし、それらの試験における陽性の知見は、ヒトに対する硫酸ニッケルの発がん性を評価する際に、証拠の重み付けの一部として考慮される可能性がある。

4.1.2.7.1.6.5 プロモーター作用に関する試験

実験動物において、硫酸ニッケルの発がんプロモーター作用を検討した 3 件の試験のデータが得られている。これらの試験は、鼻咽頭または口腔への局所投与の場合、または投与を受けた母動物から生まれた仔動物が混餌投与を受けた場合、硫酸ニッケルが発がんプロモーター作用を示したことをほのめかしているが、その証拠能力はかなり弱い。

塩化ニッケル、ニッケル金属に関するデータから、これらの化合物にはプロモーター作用があることが示唆されている。

結論としては、得られたデータから、硫酸ニッケル、塩化ニッケル、およびニッケル金属は、特定のイニシエーターと合わさると、発がんプロモーター作用を示す可能性があることが示唆される。ただし、得られた試験データでは、他のニッケル化合物と同様に、硫酸ニッケルの発がんプロモーター作用に関して結論を導き出すことはできない。さらに、硫酸ニッケルの発がん性の評価においてこのような情報を使用することには難がある。

4.1.2.7.1.7 結論

吸入

硫酸ニッケルのデータを含む、様々なニッケル化合物の発がん性について、実験動物におけるデータが得られているが、実験動物に硫酸ニッケルを吸入させた場合の発がん性について結論を導くには、それらのデータでは不十分であると考えられる。

経口曝露

ラットを用い、OECD テストガイドライン 451 に準拠して適切に行われた試験では、硫酸ニッケルの経口投与による発がん性は全く認められなかった。

経皮曝露

経皮曝露に関して得られているデータは、実験動物に皮膚接触させた場合の硫酸ニッケルの発がん性を評価するには少なすぎる。ただし、硫酸ニッケルへの経口曝露では発がん性は認められていないなど、経皮曝露に発がんの重大な懸念はないと考えられる適切な根拠が存在する。

4.1.2.7.2 ヒトにおける調査

ヒトのがんに関する調査の多くは、“水溶性ニッケル”、すなわち水への溶解度が高いニッケル塩への曝露に関連するリスクを考慮したものである。ニッケルへの曝露事例では、水溶性ニッケル塩の主な形態は、硫酸ニッケルと塩化ニッケルである。他にも多くの水溶性ニッケル化合物があり（ニッケルとニッケル化合物に関するバックグラウンド文書の附属書を参照）、そのうちのいくつかはそれらの曝露事例において存在していた可能性がある。しかし、いずれにしても発がんリスクへのそれらの影響は、無視できるほどわずかであると考えられる。ただし、硫酸塩と塩化物の区別は、ここで行なう評価において着目すべき点であり、曝露実態、調査結果、および考察のセクションで言及される。

4.1.2.7.2.1 がんに関する疫学的調査の概説

ニッケルに曝露された労働者における呼吸器がんの過剰リスクを最初に指摘したのは、1933年、ウェールズの Clydach にあるニッケル精錬工場についての報告であり、その工場は、ニッケルカルボニル生成を基幹業務としていた (Bridge 1933)。確固とした証拠は、20

年後に公表された(Doll 1958)。がんの発症リスクは、もともとニッケルカルボニル生成が原因とされていたが、その後、カルボニル生成に先立って行われるヒ素を含む原料などの原料装入工程が関係すると考えられるようになり(Morgan 1958)、また、カナダの調査(Mastromatteo 1967)とノルウェーの調査(Løken 1950, Pedersen *et al.* 1973, Magnus *et al.* 1982)では、硫化および酸化ニッケルに関連していると考えられている。

Clydach の工場に関するこれらの最初の公表文献では、分析が、労働者の所属部門および勤続年数のみによって実施されている。硫酸ニッケルへの相当な曝露を受けていた労働者には、かなりの発がんリスク上昇傾向が認められた。これらの労働者は、硫酸銅生成作業部門、硫酸ニッケル生成作業部門、および焼成(焙焼)作業部門に属していた(Morgan 1958)。前者の2つの部門の労働者は、多量の硫酸ニッケルを含む水溶液を取り扱っており、焼成(焙焼)部門では、鼻腔がんを発症した人のほとんどが、のちに硫酸ニッケルの存在が指摘された、送気管の清掃に携わる労働者であった(Warner 1984, Thomassen *et al.* 1999)。

ノルウェーの2件の調査(Pedersen *et al.* 1973, Magnus *et al.* 1982)でも、水溶性ニッケルが主として関与するニッケル曝露を受けていた電解工程労働者で肺がんの発症リスクが上昇したことが示されている。これらの部門における水溶性ニッケルへの曝露は、主に硫酸ニッケルによるものだが、1952年以降は、部門によっては塩化ニッケルも含まれたものになった。これらの知見は、カナダの調査とは対照的なものであった。カナダの調査では、同様の種類の労働でも、肺がんの発症リスク上昇との関連性は認められていない(Roberts *et al.* 1984)。

肺と副鼻腔以外の部位のがんも、ニッケルを含む物質に曝露された労働者群において、予想より過剰に認められた。しかし、この過剰が偶然なのか、ある形態のニッケルへの曝露によるリスク上昇の指標なのか、または他の交絡する職業曝露を示すものなのかについては明らかではない。上述のノルウェーの精錬所では、咽頭がんの過剰が確認され、ロシアのある精錬所では、胃がんの発症リスクの上昇が報告されている(Saknyn 1973)。

多くのニッケル精錬所では、塩化ニッケルは生産過程では使用されていないため、関係のある水溶性ニッケルは主として硫酸ニッケルであった(Clydach, ウェールズ; Kristiansand, ノルウェー 1910~1952; Harjavalta, フィンランド; Port Colborne, カナダ 1926~1942)。概して、これらの精錬所で上記の期間働いていた労働者は、いくつかの種類のニッケル化合物に曝露されていた。しかし、ニッケル曝露が主として硫酸ニッケルによるものであった群が存在する。加えて、これらの精錬所で観察された空气中ニッケル濃度は、硫酸ニッケルが最も高値であった。

ここに示すレビューは、硫化ニッケル鉱石やマットの処理を行うニッケル精錬所での業務

に関連した肺がんと鼻腔がん、およびニッケル電気メッキ工を対象とした 1 件の調査でみられた肺がんと鼻腔がんに基づいている。レビュー対象には、4 カ国における 7 件のコホート調査と 1 件の症例対照研究調査が含まれ、そのうち 6 件は、ニッケル精錬所での調査である (Table 4.1.2.7.2.A~B)。さらにもう 1 件、1991 年のニッケル鉱山およびニッケル銅精鉱(マット)の生産に従事する労働者に関する調査 (Shannon *et al.* 1991) について、考察セクションにおいてのみ言及している。

Table 4.1.2.7.2.A: Description of the cohort studies included in the evaluation.

Cohort	Study size	Length of employment	Follow-up	Type of analysis	Included in ICNCM	Exposure data	Data on smoking
Refineries							
Clydach I	2521	5 years	1907-1984	SMR	yes	yes	no
“ II	2524	5 years	1931-1985	SMR	yes	yes	no
				Regression analysis			
Port Colborne*	2614	1 year	1950-1984	SMR	yes	yes	no
Kristiansand I	3250	1 year	1953-1984	SMR	yes	yes	no
“ II	4764	1 year	1953-1993	SIR	no	yes	yes
				Regression analysis			
Kristiansand IV	5297	1 year	1953-2000	SIR	no	yes	yes
				Regression analysis			
Outokumpu, Harjavalta	1155	3 months	1953-1995	SIR	no	yes	no
Electroplaters							
Great Britain	284	3 months	1945-1995	SMR	no	no	no
				Regression analysis			

*Non leaching, sintering, calcining

Table 4.1.2.7.2.B: Description of case-control study included in the evaluation.

Cohort	Cancer site; study	Period of employment	Length of employment	Period of diagnosis	Type of analysis	Exposure data	Data on smoking
Kristiansand III	lung cancer; 213 cases, 525 controls	1910-1994	1 year	1953-1995	conditional logistic regression	yes	yes

調査の対象には、11,000 人以上のニッケル精錬所労働者 [3250 人はノルウェー精錬所 (Kristiansand I) の労働者] の情報、さらに 4,764 人の労働者のコホート (Kristiansand II) の情報が含まれ、このコホートは、同じ精錬所について行われた最新のコホート調査の対象者

5,297 人(Kristiansand IV)の中に含まれていた。これらの調査は以前に公表されており、4 コホートについての調査が、International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man (ICNCM : ヒトに対するニッケルの発がん性に関する国際委員会)の報告書(Doll *et al.* 1990)に収載されている。追跡調査期間は、30 年を超え、ICNCM で報告されているすべての調査に曝露データがあり、標準化死亡比(SMR)について、従前からある手法により分析が行われていた。ICNCM の報告が公表された後、フィンランドとノルウェーから 2 件のコホート調査が公表されている。ノルウェーのコホート調査(Kristiansand II と IV)には、喫煙の情報も含まれ、外部および内部の両方の発症率を参照して分析が行われた。ノルウェーのコホートで実施された肺がんの症例対照調査と最新のコホート調査(Kristiansand IV)には、所属部門の情報と時間が明確な曝露データが含まれていた。この曝露データは、1973 年～1994 年の職場環境において 5,900 人を対象に行われた個人別のニッケル曝露量の測定データ、および 1990 年代以降の精錬所における粉塵およびエアロゾルの化学種別分析データに基づいている(Grimsrud *et al.* 2000)。1973 年以前の曝露量は、これらの測定データから、その後起きたと推定または報告された労働衛生上の変化を考慮し、曝露濃度の時代的な相対変化を加味して、外挿により算出された。上述の症例対照調査には、問診により入手した喫煙習慣の詳細情報も含まれている。

ICNCM の報告書で行われた分析は、各国/州の男性の集団における死亡率および基準罹患率に基づいている。ノルウェーの調査のうち 1 件とフィンランドの調査では、がん登録制度からのデータを用いて標準化罹患比(SIR : standardized incidence ratio)分析が行われている。ノルウェーの調査では、その国の男性集団に基づいて結果を求めているのに対し、フィンランドの調査では、地域の集団における罹患率を参照している。

追跡調査が不能な事例があることは、Clydach の調査での最初の記録が 1930 年以前である労働者のサブコホートと、Port Colborne 精錬所の死亡率調査のコホートを除き、すべてのコホートにおいて、ほとんど問題とならなかった。

4.1.2.7.2.2 曝露状況

International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man(ヒトに対するニッケルの発がん性に関する国際委員会)の報告書(Doll *et al.* 1990)は、ニッケルに曝露されている労働者におけるがんリスクの分析に、曝露量の測定結果を組み込んだ最初に公表された調査報告書であった。1950 年以前の曝露量は、化学処理工程の情報、相対的なほこりっぽさについての労働者の印象、職場の技術的および物理的条件に関する知見に基づいて予測されている。1950 年～1970 年は、粉塵と総ニッケル量を分析するには、数種類の粒子数測定法と定点フィルタ試料採取法だけが利用可能であった。1970 年以降は、フィルターポンプを備えた

個人用のエアロゾル試料採取手段が、いくつかの精錬所でとられるようになった。場合によっては、屋根を介して建物から出る空気中のニッケルの濃度を測るなど、代用的な測定も行われた。ICNCM の報告書(Doll *et al.* 1990)に記されている推定平均曝露量の中には、総ニッケル濃度として 100 mg/m³ を超える非常に高い値を報告するものもあり、このような場合、総粉塵濃度が 1.5~2 倍以上ほど高値であった。

エアロゾル試料中の個々のニッケル化合物の分析は、ICNCM の調査には含まれていなかった。そのため、ニッケルの各形態(ニッケル金属、酸化ニッケル、硫化ニッケル、水溶性ニッケル)の比率は、概してその作業工程で確認されるニッケル含有物質の組成に反映されるとみなされた。

ICNCM の報告書に記載の、ニッケルに曝露されていた労働者の 10 集団のほとんどで、問題とされる水溶性ニッケル化合物は、硫酸ニッケルであった。硫酸ニッケルは、希硫酸で酸化ニッケルを浸出させる際に生成され、その後工程で水溶液とエアロゾル中に確認されている。乾燥結晶が作られ、次の工程が行われる精錬施設へ運ばれる。硫酸ニッケルは、高温精錬の工場においても、硫化物マットを焙焼して金属酸化物を作る焙焼炉の送気管中で、微粒子が硫酸化されることにより生成している。

ICNCM の報告書(Doll *et al.*, 1990)で対象とされたコホート、および他のいくつかの調査で対象とされたコホートについて、硫酸ニッケル曝露量を Table 4.1.2.7.2.C に要約した。

Table 4.1.2.7.2.C: Ranges of proportions and absolute concentrations of water-soluble nickel in cohorts from the ICNCM report (1990) and some other studies

Cohort	NiSO ₄ exposure	Period considered	Soluble nickel as percent of total nickel	Soluble nickel in air, indicated level (mg*m ⁻³)
Clydach refinery, Wales (UK)				
Hydrometallurgy	+	1902-1979	30-100%	0.7-2
Copper plant	+	1902-1960	5-10%	0.04-1.1
Pyrometallurgy and nickel plant	+	1902-1984	0-15%	0-0.75
Falconbridge operations, Ontario (Canada)	(+)	1933-1978	0-50%	<0.01
Hanna Nickel Smelting Company, Oregon (USA)	-	1953-1977	0	0
Huntington Alloys, West Virginia	(+)	1948-1984	0-80%	<0.05
Copper Cliff sinter plant, Ontario (Canada)	+	1948-1963	n.r.	<4
Coniston sinter plant, Ontario (Canada)	+	1914-1972	n.r.	0-1
Port Colborne refinery, Ontario (Canada)				

EURAR: NICKEL SULPHATE

Cohort	NiSO ₄ exposure	Period considered	Soluble nickel as percent of total nickel	Soluble nickel in air, indicated level (mg*m ⁻³)
Leaching, calcining, sintering plant	+	1926-1958	n.r.	<3
Electrolysis department	+	1950-1976	n.r.	generally: <0.3; highly exposed: 1-3
Other	+	1950-1976	n.r.	<0.2
Sudbury non-sinter areas, Ontario (Canada)	+	1950-1976	n.r.	<0.2
Kristiansand refinery (Norway)				
Roasting and smelting departments*	+	1946-1984	0*	0*
Electrolysis departments	+	1946-1984	33-100%	0.3-1.3
Oak Ridge Gaseous Diffusion Plant, Tennessee (USA)	-	1948-1953	0	0
Outokumpu Oy refinery (Harjavalta, Finland) †	+	1960-1985	90% ‡	0.1-0.4 ‡
Société Le Nickel mine and smelter (New Caledonia)	+	1926-1982	n.r.	0.1
Henry Wiggin Alloy Company, Hereford (UK)	+	1953-1985	0-50%	<1
Monchegorsk nickel refinery, Kola Peninsula (Russia)				
Electrolysis department §	+	1990s	55-99%	0.04-0.3
Roasting and smelting dep. §	+	1990s	1.5-22%	0.04-0.7

+ reported exposure

(+) reported low exposure

- no exposure +/- exposure reported in some departments

n.r. not reported

* more recent studies on exposure (Andersen *et al.*, 1998; Thomassen *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 1999b; and Grimsrud *et al.*, 2000) have indicated the presence of water-soluble nickel as nickel sulphate even in these departments

† exposures reported in Kiilunen *et al.*, 1997a, epidemiology reported in ICNCM 1990 and Anttila *et al.*, 1998

‡ between 1960 and 1973 the air in the refinery probably was contaminated with nickel sulphides from the smelter (Kiilunen *et al.*, 1997a)

§ exposures reported by Thomassen *et al.*, 1999

ICNCM の報告書 (Doll *et al.* 1990) では、作業部門により、硫酸ニッケルの量に大きな差があることが示されている。湿式精錬の部門では、純ニッケルまたは銅が電解液槽に貯留され、また結晶化、沈殿、ろ過、乾燥を介して金属塩が得られるが、硫酸ニッケルがニッケル曝露源の主要な形態の 1 つであった (総ニッケルの 30~100%)。高温精錬の部門では、焙焼、精錬、焼結、金属化、揮発処理が行われ、水溶性ニッケル化合物の総ニッケルに対する割合はより少ない (0~15%) が、それでも総ニッケル量が多いため、硫酸ニッケル濃度は、高温精錬の現場の方が湿式精錬の現場よりもかなり高いと考えられる場合が多くあつ

た。これは、Clydach(ウェールズ、UK)、Copper Cliff、Coniston、Port Colborne(オンタリオ、カナダ)でのケースである。ノルウェーの Kristiansand の精錬所では、焙焼部門と精錬部門における曝露の内訳(曝露マトリックス)が、この点で他の場所とは異なっていた。すなわち、ICNCM の報告書においては、これらの職場環境には、無視できる量の水溶性ニッケル(0 とみなした)しか存在しなかったとみなされている。

なお、Kristiansand(ノルウェー)のニッケル精錬所における過去の曝露については、Grimsrud *et al.*(2000)により、5,900 人の労働者を対象とした調査の中で再評価されている。この調査の対象期間は 1973~1994 年で、労働者がフィルターポンプを身に着け、試料採取が行われた。試料採取は勤務日の全日にわたって行われ、その後総ニッケル量の分析が行われた。その結果、以前の想定よりも、曝露量は概して少なかったことが示された。1990 年代以降に行われた粉塵試料における水溶性ニッケル、ニッケル金属、硫化ニッケル、および酸化ニッケルといった化学種別分析により、追加情報が得られており、他の場所で明らかとなっている次の見解を裏付けている。すなわち、焙焼の現場であれ精錬の現場であれ、水溶性ニッケルがかなりの量存在し、そのため空気中の硫酸ニッケル濃度は、焙焼や精錬の現場の方が、多くの湿式精錬作業現場よりも高くなっている、ということである。

Kristiansand の精錬所において、ニッケル電解に硫酸塩 22%と塩化物 78%の混合物を用いる工程が 1952 年に導入されるまで、水溶性ニッケルは、硫酸ニッケルが主流であった。しかし、銅の電解は、継続して高濃度の硫酸ニッケルを含む電解液で行われた。

ニッケル生産者環境研究協会(NiPERA)への報告書で、英国エディンバラの労働医学研究所(IOM: Institute of Occupational Medicine)の Aitken *et al.*(1998)は、焙焼や精錬の現場において、エアロゾル中の粒子サイズが細くなるほど水溶性ニッケル化学種の割合が上昇し、吸引可能画分では総ニッケルの 26%を、吸入可能画分になると総ニッケルの 72%を占めていたことを明らかにしている。吸入可能画分は、肺の最も深い部分まで届くと予想される最小粒子から成る(Aitken *et al.* 1998 の Table 5 参照)。最近の調査では、水溶性ニッケルの粒子分布はもっと均等であることが示されており、上記のように上昇した理由としては、粒子の大きさが水への溶解度に影響するということが可能性として考えられる。

さらに、Kristiansand 精錬所における、マットの破碎、焙焼、および精錬の各作業現場での水溶性ニッケルの推定割合が、Werner らにより 1999 年にいくつか公表されている(Werner *et al.* 1999b)。それによると、これらの作業現場におけるエアロゾル中の水溶性ニッケルの内、重量パーセントで 8~10%が、おそらく硫酸ニッケルであるとされている。

1990 年代終わりには、Thomassen *et al.*(1999)が、ロシアのコラ半島にある、焙焼、製錬、電解精錬のステップで複合的に精錬作業を行っているニッケル精錬所において、職業曝露

に関する調査を実施している。総ニッケルの最高濃度は、焙焼と精錬の作業現場で認められ、水溶性ニッケルの最高濃度は、焙焼炉の上で確認された。最小粒子(吸入可能画分)の総量は、全吸引可能粒子の総量と比べ少ないが、吸入可能画分におけるニッケル量は、焙焼と精錬の現場の方が精錬所の他のどの場所よりも高かった。この精錬所での曝露量は、1960年代とそれ以前(焙焼部門と旧アノード鑄造部門)、または1970年代から1980年代初め(新アノード鑄造部門と電解精錬部門)の期間において、ロシア以外のニッケル精錬所の同様の部門における量と相同であると考えられた。やはり、これらの曝露濃度が労働者の健康に与える影響は、労働者がその多くの時間をどの現場で過ごしたかに依存していると思われる。

1997年、Kiilunen *et al.* (1997a)は、フィンランド Harjavalta の Outokumpu ニッケル精錬所において、電解精錬の際に生じる水溶性ニッケル塩への曝露に関し、過去および現在の実態を調査した。作業部門は、浸出(金属抽出)、溶液の精製、ニッケル電解採取の現場から成り、これらの現場において、固定式空気試料採取装置による試料採取、フィルターポンプによる防護マスク内外からの個人別試料採取、および生物学的検査(尿および血液)が実施された。調査した場所における総ニッケル中の水溶性硫酸ニッケルの割合は、溶解性の低いニッケル種の割合が11%あった浸出工程の現場の労働者を除き、95%であった。塩化ニッケルは、この工場では使用されておらず、対象となる水溶性ニッケルのほとんどが硫酸ニッケルであった。

Harjavalta ニッケル精錬所の定点採取された試料では、曝露濃度は0.17~0.80 mg/m³の範囲であり、1980年代に最も高濃度が記録されている。1979~1981年に個人別に採取された試料は6~28試料で、それらに基づく年平均値は0.16~0.23 mg/m³であった。なお、この期間はマスク未着用であった。1990年代以降にマスクの外側で個人別に採取された試料では、最大平均値が71 µg/m³(溶接中)と、概して低い値が示された。防護マスクは、最高濃度の場所では使用されており、マスク内側の測定値は、最大平均7 µg/m³であった。それでもタンクハウス内では、0.1 mg/m³を超える空气中ニッケル濃度が報告されている。

Harjavalta ニッケル精錬所における平均粒子サイズは、12 µmと推定され、肺よりも上気道により顕著な沈着が生ずることが示唆される。さらに著者は、尿中ニッケル値は、吸入されたニッケルだけでなく、仕事に手の汚染により取り込まれたニッケルを含む、全取り込みを反映していることを示している。2~4週間の休暇後に尿中ニッケル濃度が上昇したことについては、水溶性ニッケル塩が体内に保持されることを示すものとして解釈された。この解釈は、動物を水溶性ニッケル化合物に曝露した試験における知見と整合するものである(Benson *et al.* 1995、NTP 1996a)。

別の調査において、Kiilunen *et al.* (1997b)が、フィンランドのニッケルめっき工の曝露状況

を調べ、また、めっき産業における曝露についての以前の報告をレビューしている。1970年代から80年代にかけて、最高 $170 \mu\text{g}/\text{m}^3$ というニッケル濃度が、作業領域で確認されている(フィンランドとドイツ)が、他の調査では、ほとんどが $0.5\sim 15\mu\text{g}/\text{m}^3$ という低い濃度を報告している。めっき工において1~5週間の休暇後に尿中ニッケル濃度の上昇が認められているが、この知見は、水溶性のニッケル化学種に曝露されていためっき工におけるニッケル排泄を調査した Tossavainen *et al.* (1980)の知見を支持するものであった。

Tossavainen は、尿中排泄の半減期が17~39時間であることを示しており、これらの調査はともにその結果を、ヒトが水溶性のニッケル化学種に曝露されると蓄積が起ることを示すものと解釈している。Tsai *et al.* (1996a)は、2軒のニッケルめっき店を調査し、不溶性ニッケルへの曝露が生じていることを明らかにしている。

4.1.2.7.2.3 疫学的調査の結果

4.1.2.7.2.3.1 Clydach、南ウェールズ

南ウェールズ、Clydach の精錬所における肺がんと鼻腔がんの発症リスクについては、何度か公表がなされている。ICNCM の報告書(Doll *et al.* 1990)には、1984年の終わりまでに死亡した2521人のデータを含む最新の情報が、曝露量の推定値と共に提示されている。呼吸器がんの発症リスクが年々減少する傾向にあったことが明らかにされている。全体の結果としては、216人に肺がん(SMR: 273、95%信頼区間(CI): 238~313)が、75人に鼻腔がん(SMR: 14033、95% CI: 11107~17682)が認められた。1930年以前に最初に雇用された1348人の労働者において、肺がんによる死亡が172人(SMR: 393、95% CI: 336~456)、鼻腔がんによる死亡が74人(SMR: 21120、95% CI: 16584~26514)確認された。

精錬所において、労働者が専ら1種類のニッケル化学種に曝露されていた作業現場はわずかであった。湿式精錬の現場で働いていた労働者は、主に硫酸ニッケルに曝露されたと考えられた。この現場の業務に5年以上携わり、最初の曝露から15年以上経過した労働者では、5例の肺がん(SMR: 333、95% CI: 108~776)と4例の鼻腔がん(SMR: 36363、95% CI: 9891~93089)が確認され、過剰リスクが認められた(Table 4.1.2.7.2.D)。この精錬所の銅を扱う施設における肺がん発症リスクは、湿式精錬の現場におけるリスクよりも多少高かったが、鼻腔がんの発症リスクについては、2つの作業現場で差は認められなかった。

このClydach 精錬所での累積曝露量に基づくクロス集計から、硫化ニッケルと、場合によっては酸化ニッケルが、水溶性ニッケルによる影響と合わせて、肺がんと鼻腔がんの発症リスクを増加させた要因であることが示唆されている。ただし、著者は、作業環境における測定データが存在していないため、この解釈には留意を要すると強調している。だが、

著者は、銅を扱う施設における肺がんと鼻腔がんの高いリスクは、水溶性ニッケルのみへの曝露、または酸化ニッケルと水溶性ニッケルへの複合曝露と関連している可能性はあると指摘している。この現場の作業工程においては、塩化ニッケルは使用されておらず、水溶性の形態のニッケルは、大部分が硫酸ニッケルであった。

この後、Clydach 精錬所のがんデータは、Easton らにより、多変量回帰分析を用いて検討された (Easton *et al.* 1992)。彼らは、国際的な調査 (ICNCM, Doll *et al.* 1990) で算出された推定曝露量と、4 群のニッケル化合物への累積曝露量データを用いて分析を行った。最も適合性の良いモデルによると、リスクは水溶性もしくは金属ニッケルへの曝露と相関しており、酸化ニッケルや硫化ニッケルが原因とみなされるリスクは、あったとしても、はるかに低いことが示された。著者は、いずれの曝露量データも確定的なものとして認められておらず、分析には不確実性があることを強調している。しかし、不溶性ニッケル化合物についてのデータは、かなりばらついている一方で、最も強い影響を示すデータは、水溶性ニッケル曝露群で認められている。そのため、この分析の結果は、「リスクの一部」が水溶性ニッケル(硫酸ニッケル)に起因していること、また、さらに少なくとも 1 つの不溶性ニッケル化学種がリスクに寄与していることを示唆していると解釈された。

Table 4.1.2.7.2.D: MOND/INCO (Clydach, South Wales, UK) nickel refinery—average nickel exposure levels and cancer risks in “high-risk” departments in workers with 15 or more years since first exposure ^a

Department	Estimated airborne concentration (mg/m ³ Ni) ^a				Duration in department							
	Metallic nickel	Oxidic nickel	Sulphidic nickel	Soluble nickel	Ever				≥5 years			
					Lung cancer		Nasal cancer b		Lung cancer		Nasal cancer b	
					Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)
Furnaces, 1905-63	5.6	6.4	2.6	0.4	9	409	3	24781	1	370	3	1000
Linear calciners, 1902-30; Milling and grinding, 1902-36	5.3	18.8	6.8	0.8	16	725	7	44509	12	1244	6	78280
Copper plant, before 1937	-	13.1	0.4	1.1	17	317	5	13912	8	541	2	14541
1938-60	-	0.4	0.01	0.01	-	(185-507)	-	(4507-32415)	-	(233-1066)	-	(1759-52493)

EURAR: NICKEL SULPHATE

Hydrometallurgy 1902-79	0.5	0.9	0.05	1.3	7	196 (79-404)	4	18779 (5108-48074)	5	333 (108-776)	4	36363 (9891-93089)
----------------------------	-----	-----	------	-----	---	-----------------	---	-----------------------	---	------------------	---	-----------------------

- a From Doll et al. (1990). Estimated airborne concentrations of nickel species and mortality from or incidence of lung cancer and nasal cancer by department.
Standardised mortality ratio (SMR) and 95% confidence interval (CI).
- b The working group expressed reservations about the accuracy of these estimates.

4.1.2.7.2.3.2 Kristiansand、ノルウェー

上述の ICNCM の報告書に、ノルウェーの精錬所の男性労働者 3,250 人から成るコホートのデータが含まれている。このコホートは、対象者が 1946～1969 年に最初に雇用され、少なくとも 1 年間働いた労働者に限定されており、1984 年の終わりまでのがんの発生率および死亡者数が追跡されている。追跡期間中、77 人が肺がんで死亡し (SMR: 262、95% CI: 207～327)、3 人が鼻腔がんで死亡した (SMR: 453、95% CI: 93～1324)。また、さらに 4 人の発症例があった。焼成、焙焼、精錬の現場に配属されたことは無く、5 年以上電解の現場に携わり、最初の曝露から 15 年以上経過した労働者の群では、19 人の肺がん死亡者 (SMR: 476、95% CI: 287～744) および 2 人の鼻腔がん死亡者が確認された (Table 4.1.2.7.2.E 参照)。

Table 4.1.2.7.2.E: Falconbridge (Kristiansand, Norway) nickel refinery – average nickel exposure levels and cancer risks in workers with 15 or more years since first exposure ^a

Department	Estimated airborne concentration (mg/m ³ Ni) ^a				Duration in department							
	Metallic nickel	Oxidic nickel	Sulphidic nickel	Soluble nickel	Ever				≥5 years			
					Lung cancer		Nasal cancer ^b		Lung cancer		Nasal cancer ^b	
					Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)
Calcining, roasting, smelting; never in electrolysis	0.3-1.3	5.0-10.0	0.3	Negl. ^c	14	225 (122-377)	5	-	8	254 (109-500)	5	-
Electrolysis; never in calcining, roasting smelting	Negl.-1.3	Negl.-1.3	Negl.-1.3	0.3-5.0	30	385 (259-549)	2	-	19	476 (287-744)	2	-

- a From Doll et al. (1990). Estimated airborne concentrations of nickel species and mortality from or incidence of lung cancer and nasal cancer by department.
Standardised mortality ratio (SMR) and 95% confidence interval (CI).
- b Three deaths and four incident cases.
- c Negl., negligible exposure.

精錬所内のどこよりも電解工程の作業現場における水溶性ニッケル濃度が高かったため、水溶性ニッケルは、観察されたリスクの原因であると結論づけられた。また、この分析から、水溶性ニッケルに最も高用量で曝露されていた群で、肺がんの発症リスクが増加したという確固たる証拠も得られた。さらに、電解作業に携わっていた労働者は、焙焼、精錬、焼成作業に携わっていた労働者よりも、肺がんの発症リスクが高かったことが示唆された。

また、電解の現場については、ほぼこの作業現場のみで長い期間働いていた労働者において、2件の鼻腔がんが発生しており、ここで認められた量の水溶性ニッケルへの曝露により、鼻腔がんの発症リスクも増加したという証拠が示されている。

より近年に出されたノルウェーの報告 (Andersen *et al.*, 1996) では、1916年まで遡ってデータの取得が試みられ、それ以降のデータが得られた労働者全員 (4,764人) を対象として、水溶性ニッケルへの曝露量、酸化ニッケルへの曝露量、喫煙、および年齢について、多変量回帰分析が行われた。分析によると、他の変数に関して調整を施した上で、水溶性ニッケルに最大量で曝露を受けていた群では、肺がんの発症リスクが3倍に増加したことが示された (Table 4.1.2.7.2.F)。酸化ニッケルへの曝露では、リスクの増加がやや認められたのみだった。この分析によって、喫煙とニッケル曝露の相乗効果が示唆された。以前の疫学的知見から、酸化ニッケルが最も重要な役割を担うと考えられたため (Doll *et al.* 1990)、硫化ニッケルによる影響は検討されなかった。曝露の内訳をみると、酸化ニッケルおよび硫化ニッケルへの曝露は、ほとんど例外なく互いにかかなり密接に発生していた。

Table 4.1.2.7.2.F: Falconbridge (Kristiansand, Norway) nickel refinery – Relative risks (RR) of lung cancer by cumulative exposure to water-soluble nickel and nickel oxide, considering the two variables simultaneously by a multivariable Poisson regression analysis^a

Variable	Mean exposure [(mg/m ³)*years]	Cases (n)	RR	95% CI	Test for linear trend
Water-soluble nickel [(mg/m ³)*years]:					<i>P</i> < 0.001
< 1	0.1	86	1.0	Referent	
1-4	2.3	36	1.2	0.8-1.9	
5-14	8.8	23	1.6	1.0-2.8	
≥ 15	28.9	55	3.1	2.1-4.8	
Nickel oxide [(mg/m ³)*years]:					<i>P</i> = 0.05
< 1	0.4	53	1.0	Referent	
1-4	2.5	49	1.0	0.6-1.5	
5-14	8.3	53	1.6	1.0-2.5	
≥ 15	44.3	45	1.5	1.0-2.2	

a From Andersen *et al.*, 1996; adjusted for smoking habits and age; workers with unknown smoking habits excluded

(three cases of lung cancer).

このノルウェーのコホートにおいて、症例対照分析が最近行われている (Grimsrud *et al.* 2002)。この分析では、新たな職務-曝露マトリックス (Grimsrud *et al.* 2000) が、個々の累積曝露量を計算するのに使用された。喫煙に関して調整を行った結果、水溶性ニッケルへの曝露と肺がんの発症リスクとの間に曝露用量-反応関係が強く示された。曝露量に関係なく、他のタイプのニッケルによりリスクが増加する可能性を除外することはできなかった (Table 4.1.2.7.2.G)。

Table 4.1.2.7.2.G: Falconbridge (Kristiansand, Norway) nickel refinery – Relative risks (Odds ratio) of lung cancer by cumulative exposure to nickel, no lagging of exposure, with adjustment for smoking, in a nested case-control study a

Nickel exposure	Odds ratio	95% CI	Exposed cases N (% of all)	Exposed controls N (% of all)	Likelihood-ratio test
Water-soluble nickel, continuous, log _e -transformed Rise in OR per unit of ln(CE _{w-s} + 1) ^b	1.7	1.3-2.2	204 (96%)	472 (90%)	P = 0.0001
Ever versus never exposed to any form of nickel	1.5	0.6-3.5	204 (96%)	472 (90%)	

a From Grimsrud *et al.*, (2002).

b ln = the natural logarithm; CE_{w-s} = cumulative exposure to water-soluble nickel in (mg/m³)*years

この Kristiansand 精錬所について上述の 3 件の分析結果が得られている (ICNCM, Doll *et al.* 1990、Andersen *et al.* 1996、Grimsrud *et al.* 2002) が、がん発症リスクの増加の原因となっている水溶性ニッケルのタイプは特定されていない。1952 年以前は、硫酸ニッケルが主流であった。塩化ニッケルは、硫酸と塩化物の混合ニッケル電解 (78% は塩化物として、22% は硫酸としてのニッケル) が始まった 1952 年に導入された。一方、銅電解作業現場におけるニッケル曝露のタイプは、この変化による影響を受けなかった (硫酸ニッケルが主流のまま)。

この Kristiansand 精錬所のコホートでのがん発症に関する最新の調査報告 (Grimsrud *et al.* 2003) においては、肺がんの発症リスクは、曝露量の再評価を行って新たな職務-曝露マトリックスを得て、それに基づいて作業現場での勤続期間と水溶性ニッケルや酸化ニッケルへの累積曝露量との観点から分析されている (Grimsrud *et al.* 2000)。銅電解、銅浸出、および硫酸ニッケル生産の作業を長期間 (15 年以上で、焙焼、精錬、焼成業務は 1 年未満) 行った労働者において、非常に高い発症率が確認された (SIR: 700, 95% CI: 370~1200)。この群においては、硫酸ニッケルへの曝露がニッケル曝露の優勢な形態であった。硫酸ニッケル電解が基本だった 1910~1952 年の間に、ニッケル電解、銅浸出、電解物精製に長期間携わっていた労働者 (15 年以上で、焙焼、精錬、焼成作業は 1 年未満) においても、肺がんの発

症リスクが非常に増加していた(SIR: 550、95% CI: 300~920)。年齢と喫煙習慣に関して調整を行い、ポアソン回帰分析を用いて内部比較を実施したところ、ニッケル曝露による影響に用量依存性が認められた。用量依存性は、酸化ニッケルよりも水溶性ニッケルでより明確に認められた。しかし、この最近の分析においては、他の形態のニッケルによる影響に関して調整を行うことは不可能であった。

4.1.2.7.2.3.3 Port Colborne, カナダ

Port Colborne の電解作業部門を対象とした分析が行われている。その労働者は、ICNCM の報告書にある INCO 社のコホートの一部を成しており、主として 1950~1984 年まで追跡が行われている。1942 年以前、これらの労働者は、硫酸ニッケルを主とした水溶性ニッケルへの曝露を受けていた。1942 年からは、工程に塩素が取り入れられ、硫酸塩と塩化物の混合電解物が生じるようになった。ニッケルの約 60%が塩化物として、40%が硫酸塩として存在していた(Ullmanns Encyklopädie 1979)。電解作業部門の労働者における鼻腔がん発症(4 例)のリスク増加は、15 年間その作業に携わり、浸出、焼成、焼結作業には 1 年未満しか携わっていない労働者の群で、最も顕著に示された。このうち 1 人は、浸出、焼成、焼結業務の経験は 3 ヶ月未満で、電解作業部門には、20 年以上の所属していた。浸出、焼成、焼結での曝露はないが、曝露を受け始めてから 15 年以上の電解作業従事者では、肺がんの発症リスク増加は認められず、すなわち死亡例が 19 人で、それに基づく SMR は 88 (95% CI : 53~137)であった。また、これらの労働者群に鼻腔がんを発症した者はいなかった(Table 4.1.2.7.2.H 参照)。高用量の水溶性ニッケルに 5 年以上曝露され、浸出、焼成、焼結作業に従事したのが 5 年未満であった電解作業員の小規模な群(25 人)では、鼻腔がんによる死亡は観察されなかったが、肺がんによる死亡者が 3 人報告され、予想よりも 3 倍高い肺がん死亡率が示された。

Table 4.1.2.7.2.H: INCO (Ontario, Canada) nickel refinery facilities – average nickel exposure levels and cancer risks in workers with 15 or more years since first exposure ^a

Plant, department Period	Estimated airborne concentration (mg/m ³ Ni) ^a					Duration in department							
	Metallic nickel	Oxidic nickel	Sulphidic nickel	Soluble nickel	Total nickel	Ever				≥5 years			
						Lung cancer		Nasal cancer ^b		Lung cancer		Nasal cancer ^b	
						Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)	Obs	SMR (95% CI)
Coniston, sinter	Negl. ^b	0.1-0.5	1-5	Negl.	1-5	8	292 (126-576)	0	-	6	492 (181-1073)	0	-
Copper Cliff, sinter													
1948-54	Negl.	25-60	15-35	<4	40-100	63	307 (238-396)	6	3617 (1327-7885)	33	789 (543-1109)	4	13146 (3576-33654)
1955-63	Negl.	5-25	3-15	<2	8-40								
Port Colborne, leaching, calcining, sinter													
1926-35	Negl.	20-40	1020	<3	30-80	72	239 (187-302)	19	7776 (4681-12144)	38	366 (259-502)	15	18750 (10500-30537)
1936-45	Negl.	3-15	2-10	<3	5-25								
1946-58	Negl.	5-25	3-15	<3	8-40								
Port Colborne, electrolysis ^d	<0.5	<0.2	<0.5	<0.3	<1	19	88 ^d (53-137)	0 ^{c,d}	-	10 ^{d,e}	89	0 ^{c,d}	-

a From Doll et al. (1990). Estimated airborne concentrations of nickel species and mortality from lung cancer and nasal cancer by department. Standardised mortality ratio (SMR) and 95% confidence interval (CI);

b Negl., negligible exposure;

c Two nasal cancer deaths occurred in men with >20 years in electrolysis and only short exposure (three months and seven months) in leaching, calcining and sintering;

d Never worked in leaching, calcining and sintering;

e Workers with ≥10 years in electrolysis

1930～1957年にPort Colborneのニッケル精錬所で働いていた労働者における呼吸器がんに関し、Sutherlandが報告を行っており(1959)、肺がんと鼻腔がんのリスク増加が認められたことについて、溶銑炉と焼結炉での作業に起因し、非常に高用量で不溶性ニッケルに曝露されていたことと関係があると判断している(Doll et al. 1990)。さらに、副鼻腔がん症例の12例中2例では、曝露を受ける他の業務に就いていた期間をすべて合わせても、電解作業部門での勤続期間の方が3～10倍長かった。肺がんに関しては、22例中4例が、焼結炉での作業経験はないが、電解作業部門での勤務歴が19～22年であり、この4例中2例のみが溶銑炉での2年未満の勤務歴を有していた。ただし、発がんの予測値は、炉におけ

る作業による影響を評価するために導出されたものであるため、これらのデータから確固たる結論を導き出すことはできない。

4.1.2.7.2.3.4 Harjavalta, フィンランド

このフィンランドの精錬所の男性労働者 1155 人のうち、精錬工程労働者は、418 人であった (Anttila *et al.*, 1998)。この精錬所は、1960 年に稼働が開始され、がん発症症例の追跡調査が 1995 年まで行われた。この精錬所内での曝露は主に硫酸ニッケルに対してであり、1991 年においてはニッケル曝露の内の 90% を占めていた。25 年間の追跡調査期間中、精錬所の労働者の群において、肺がんが 6 人 (SIR : 261, 95% CI : 96~567)、鼻腔がんが 2 人 (SIR : 4110, 95% CI : 497~1480) 認められた (Table 4.1.2.7.2.I)。これらの肺がん 6 例および鼻腔がん 2 例は、20 年の潜伏期間を加味して追跡した群に含まれていた。精錬工 566 人からなる別の群では、硫酸ニッケルへの微量の曝露が生じていたが、肺がんの SIR は 139 で、鼻腔がんは認められていない。

Table 4.1.2.7.2.I: Harjavalta, Finland. Levels of cancer risks *

Department	Exposures (mg/m ³ Ni)		Duration in department and latency time											
	NiSO ₄ as % of total Ni	Total Nickel	Ever				> 20 years latency				> 5 years employment			
			Lung cancer		Nasal cancer		Lung cancer		Nasal cancer		Lung cancer		Nasal cancer	
			Obs	SIR (95% CI)	Obs	SIR (95% CI)	Obs	SIR (95% CI)	Obs	SIR (95% CI)	Obs	SIR (95% CI)	Obs	SIR (95% CI)
Smelter	Estimated 10%	0.02-0.2	15	139 (78-228)	0	-	13	200 (107-342)	0	-	8	101 (43-198)	0	-
Refinery	Measured 90%	0.1-0.4	6	261 (96-567)	2	4110 (497-14800)	6	338 (124-736)	2	6710 (812-24200)	3	199 (41-580)	2	7520 (910-27100)

* From Anttila *et al.*, 1998.

1960~1973 年には、粉砕、浸出、および電解工程が、同じ建物内で行われており、可溶性と不溶性のニッケル化合物の混合物への曝露が生じていた。しかし、著者は、鼻腔がん と肺がんの発症リスク増加は精錬所に限定されており、そこでは主に硫酸ニッケルへの曝露が生じていたため、硫酸ニッケルが呼吸器がんの発症リスクを高めた主要原因だろうと結論付けている。

他の精錬所

Saknyn & Shabynina(1970)と Saknyn(1973)は、ソ連の4つのニッケル精錬所において、労働者の肺がん死亡率が増加していた(SMRs: 200、280、380、400)ことを報告している。主に硫酸ニッケルと塩化ニッケルに曝露されていた電解工程労働者において、肺がんの発症リスクが特に高かった(SMR: 820)と報告されている。

電気めっき工

ニッケルめっきに携わる労働者を対象とした調査の情報が、数件得られている。これらの調査のほとんどにおいて、クロム曝露による交絡の影響が考えられたため、ニッケルおよび硫酸ニッケルに関する評価は困難であった。しかし、284人の英国の電気めっき工を対象としたがん死亡率コホート調査については、他のタイプの曝露による交絡影響を受けている可能性がかなり小さかった(Pang *et al.* 1996)。このコホートは、1945～1975年に最初に雇用され、少なくとも3ヵ月間就労していた全男性労働者を含んでいた。死亡に関し、1993年の終わりまで追跡調査が行われた。肺がんは11例のみ認められ、それに基づく肺がんの全体的なSMRは108であり、1年以上曝露された人において、肺がん発症リスクの有意な増加は認められなかった。ただし、胃がん発症リスクは増加していた(8例認められ、SMR: 322、95% CI: 139～634)。

我々の知る限りでは、この調査は、金属表面処理施設で主に硫酸ニッケルに曝露されているニッケルめっき工を対象とした、唯一の調査である。ただし、この調査は、対象とした労働者数が累計7000人・年に満たない少数であったなど、いくつか不十分な点を有していた。ほとんどの労働者は、職業曝露を受けていたのが1年未満であり(中央値0.86年)、また曝露量のデータは、得られていない。

4.1.2.7.2.4 がんの疫学に関する考察

Clydachの湿式精錬とKristiansandの電解工程の労働者において、肺がんと鼻腔がんの相当な過剰リスクが認められたが、原因の少なくとも一部として、それらの労働者が硫酸ニッケルへ曝露されていたことが挙げられる。ノルウェーの調査(Andersen *et al.* 1996)では、喫煙と酸化ニッケルに関して調整を行ったところ、多変量回帰分析で3倍のリスクが示された。フィンランドの調査は規模が小さかったが、Clydachとノルウェーの調査で得られた結果を強く裏付けている。水溶性ニッケル化合物が重要な要因であるという指摘は、ノルウェーの症例対照調査で得られた結果によって一層強いものとなった。対照的に、Port

Colborne の精錬所では、焼結炉での就労歴がない労働者に、肺がんと鼻腔がんのリスク増加は認められなかった様であった。英国の電気めっき工を対象とした調査は、規模が小さいが、呼吸器がんのリスク増加を認めなかった。

要約すると、ICNCM の試験の対象となった 3 つの精錬所(Clydach、Kristiansand、および Port Colborne)の労働者を合わせてみると、高用量で硫酸ニッケル曝露を受ける部門(Clydach の湿式精錬所と銅を扱う施設、Falconbridge と Port Colborne の電解作業部門)に 5 年以上就労していた労働者の群では、15 年の潜伏期間を加味した場合、42 人が肺がんで死亡(SMR : 231、95% CI : 166~312)し、8 人が鼻腔がんで死亡(または鼻腔がん発症)(SMR > 1,500)したことが確認された(Table 4.1.2.7.2.D~E と H 参照)。

精錬所労働者コホートはいずれも、雇用期間の観点から、一緒に組み入れて検討するには難点があった。例えば、短いところではフィンランド精錬所については 3 ヶ月であり、長いところでは Clydach 精錬所については 5 年であった。つまり、フィンランドのコホートには、多くの短期労働者が含まれていて、それらの群ではしばしば高い肺がんリスクが示されているが、鼻腔がんについてはリスク増高は示されていない。しかし、5 年以上働いていた労働者群をみると、肺がんが確認された人数は 6 人から 3 人に減少し、SIR は 261 から 199 に減少している。カナダとノルウェーの調査については、1 年という労働期間を組み入れ基準として検討が行われ、短期労働者のデータが調査結果に与える影響はわずかなものとなっていた。ノルウェーの調査(Andersen *et al.* 1996 および Grimsrud *et al.* 2003)の分析には、外部と内部両方の参照集団が使用されている。

フィンランドを除くすべての調査において、各国の死亡率・罹患率の参照値が、SMR や SIR の算出に使用された。フィンランドの調査では、精錬所がある地域の参照値が使用された。一般集団では非常にまれな疾患である鼻腔がんのリスク分析には、地域の参照値よりも安定していることから、国の参照値を使用するのがより望ましいとされている。

Clydach 精錬所の調査では、労働者 400 人分の追跡を行えなかった。主に 1930 年以前に最初に雇用された労働者であり、個人情報と揃わなかった期間があり、追跡不能となった。これらの被験者については、生存が確認できた最後の日までは追跡が行われている。フィンランドとノルウェーのコホートについては、ほぼ完全に追跡が行われている。さらに、この 2 ヶ国においては、すべての新たながん症例が、がん登録簿に記録済みであることがわかっている。コホートとがん登録簿データの関連付けは、固有の個人識別番号に基づいて行われた。実際に認められた症例数と予測症例数も同じ基礎情報に基づいており、正確な比較が可能であった。

Roberts *et al.*(1989)は、カナダのコホートの追跡調査について報告している。Port Colborne

の労働者に関しては、追跡調査終了時の生存状況が、コホートに含まれた 4287 人の被験者のうち 1820 人(42%)分について欠落していた。しかし、ICNCM の調査における分析では、生存状況が不明なカナダの労働者が、追跡調査の全期間の終わりまでは生存していたと仮定している。この手法によると、予測死亡者数が過大に見積もられ、実際の死亡者数の情報が無いことと併せて、低すぎる SMR が導出される可能性がある。

Port Colborne では、炉での作業経験が 5 年未満で電解作業に長期にわたり携わっていた労働者において、鼻腔がんのリスクが高くなったことが示され、また肺がんのリスク増加が示唆された。さらに、「高用量の水溶性ニッケルへの曝露を受けた」グループに属し、電解作業に長期にわたり携わっていた労働者のサブグループでは、肺がんのリスク増加が示唆された。しかし、これらの労働者は全員、Port Colborne で最もリスクの高い現場として認識されている、浸出、焼成、焼結の作業部門で(5 年未満ではあるが)曝露を受けていた。そのため、Port Colborne のデータをもとに確固たる結論を導き出すのは困難である。

肺がんに関する調査で喫煙情報が無い場合には、不確実性の要因が存在することが多い。精錬所での結果から、勤続年数や最初の雇用からの年数でみたリスクの傾向に一貫性が示された。長期の労働者と比較して、短期雇用の労働者の方が喫煙率が高いことを示す証拠はほとんどなかった。Andersen *et al.*(1996)による調査では、喫煙データと曝露量の推定値を含めて分析が行われている。この調査では、可溶性ニッケル(主に硫酸ニッケル)に関連した有意な過剰リスクが示された。Andersen *et al.*(1996)の調査には、精錬所労働者とノルウェーの一般集団の中で 1960 年代の調査で喫煙習慣のあった代表的標本集団の男性とを組み合わせたグループについての、肺がん罹患率比の分析が含まれていた。ニッケルへの曝露は、喫煙者、非喫煙者両方において、リスク増加に関与していた。これらの知見は、症例対照調査(Grimsrud *et al.* 2002)の結果によって裏付けられている。この症例対照調査では、職場環境において直接的に測定された、より信頼性の高いニッケル濃度に基づいて、曝露レベルが見直されており、喫煙の影響についてもより良い対照が置かれている。また、鼻腔がん喫煙が関与しているとする証拠もあるが、職業曝露の方が明らかに重要である(Doll 1996)。ニッケル精錬所の調査結果は、喫煙の影響だけで説明することはできない。

ニッケル化学種の個別の発がん性評価は、ニッケル精錬所労働者のコホートの多くが混合曝露を受けていたことが妨げとなっている。しかし、硫酸ニッケルの評価に関しては、硫酸ニッケルがニッケル曝露の優勢な形態であるため、特に関連性の高いサブグループが存在する。これらサブグループ内においても、酸化ニッケル、ニッケル金属、および硫化ニッケルに曝露された可能性のある労働者がいたが、それらへの曝露レベルは一般的に低かった。酸化ニッケルや硫化ニッケルへの曝露濃度が低くそれらへの曝露期間も短い場合は、がんが引き起こされる危険性は、硫酸ニッケルにより生ずるとすることが妥当だと思われる。

異なる精錬所における異なる時期でのニッケル濃度の推定値を算出し比較することは、各精錬所によって測定数がゼロから数百まで様々であり、当然、誤分類を起ししやすい。化学的に類似性があっても、工業的、物理的、および構造的条件は大きく異なることが考えられ、そのため、化学組成や粒子の大きさなど、曝露の特性に大きな差がもたらされる。したがって、比較的曝露特性が一定していたグループ内における発がんリスクを、相対的な尺度によるものであっても時間や累積曝露量によってデータを分析し、得られた用量-反応関係の知見とともに示す方が、ニッケル濃度の絶対値が非常に不確かとなる各精錬所間についての比較よりも、注目に値する。結果が分かれることで、そうした乖離が曝露の差異(定性的または定量的差異)によるものなのか、偶然なのか、または疫学調査の不足によるもののかなど、何で説明されるべきかについて不確かさが常に残るが、曝露について明らかな定量的差異のあるコホート間で横断的にリスクを比較することは、興味深いことと言える。

Grimsrud *et al.*(2000)が行った曝露実態の調査により、ノルウェーの精錬所での全ニッケル濃度が、ICNCM の調査における予測濃度よりも全般的に低かったことが示されている(Doll *et al.* 1990)。Table 4.1.2.7.2.J は、個人別曝露量測定値のより包括的な分析に基づく、ノルウェーの電解作業部門におけるニッケル曝露濃度が低くなることを示している。電解作業部門での水溶性ニッケル濃度は、銅のタンクハウスとニッケルのタンクハウスにおいて、0.3~1.3 mg/m³から約0.1 mg/m³に減少している。水溶性ニッケルへの累積曝露量が最高値であった労働者は、参照集団と比較し、肺がんのリスクが3倍増であることが、Andersen *et al.*(1996)の分析から予測できているが、リスクを増加させた水溶性ニッケルの濃度は、以前に考えられていたよりも低かったということになる。Grimsrud の症例対照調査では、水溶性ニッケルへの曝露が発がんリスクに強い用量依存性の影響を示すことが確認された。

同様の関連性がフィンランドの調査でも認められたが、カナダのコホートについてはそのような報告は為されていない。

Table 4.1.2.7.2.J: Details of concentration of total nickel and soluble nickel in air in selected nickel refineries and departments

Refinery	Reference	Time period	Measurements	Typical level of total nickel (mg/m ³)	Typical level of soluble nickel (mg/m ³)
Clydach, hydrometallurgy area, NiSO ₄ and CuSO ₄	ICNCM (Doll <i>et al.</i> , 1990)	1902-1930	Virtually no measurements	2	0.7-2

EURAR: NICKEL SULPHATE

Kristiansand, Copper tank house, electrowinning	ICNCM (Doll <i>et al.</i> , 1990)	1946-1984	Stationary and personal measurements as basis for expert estimates (ranges)	0.3-1.6	0.3-1.3
	Grimsrud <i>et al.</i> , 2000	1945-1977	Personal measurements and speciation analyses from the 1990s	0.13	0.10
Kristiansand, Copper leach	ICNCM (Doll <i>et al.</i> , 1990)	1946-1984	Stationary and personal measurements as basis for expert estimates (ranges)	0.6-5.6	0-1.3
	Grimsrud <i>et al.</i> , 2000	1945-1977	Personal measurements and speciation analyses from the 1990s	0.87-1.47	0.43-0.72
Outokumpu, Nickel tank house, electrowinning	Kiilunen <i>et al.</i> , 1997a	1979-1981	Personal measurements and speciation analyses	0.16-0.23	0.14-0.18
Kristiansand, Nickel tank house, electrorefining	ICNCM (Doll <i>et al.</i> , 1990)	1946-1984	Stationary and personal measurements as basis for expert estimates (ranges)	0.3-1.9	0.3-1.3
	Grimsrud <i>et al.</i> , 2000	1945-1977	Personal measurements, speciation analyses from the 1990s	0.12	0.10
Kristiansand, Copper cementation etc.	ICNCM (Doll <i>et al.</i> , 1990)	1946-1984	Stationary and personal measurements as basis for expert estimates (ranges)	0.9-3.9	0.3-1.3
	Grimsrud <i>et al.</i> , 2000	1945-1977	Personal measurements, speciation analyses from the 1990s	0.18-1.16	0.14-0.52*
Port Colborne, Nickel tank house, electrorefining	ICNCM (Doll <i>et al.</i> , 1990)	1950-1984	Stationary and personal measurements	less than 0.5	less than 0.15
Monchegorsk, Nickel tank house, electrorefining	Thomassen <i>et al.</i> , 1999	1990s	Personal measurements with speciation analysis	0.05-0.3	0.04-0.3

* In the Copper cementation department the air concentration of metallic nickel was taken to be equally high as the level of water-soluble nickel

ノルウェーの精錬所の電解作業部門では、空気中のニッケルの 80%以上が可溶性の形態として存在していたと推定されている。1956 年以前に曝露された労働者においては、鼻腔のがんリスクが確認された。その期間には、優勢な水溶性化学種は硫酸ニッケルであった。

Grimsrud *et al.* (2000)により作成された曝露マトリックスでは、ノルウェーの精錬所で水溶性化学種として確認されたすべてのニッケルの割合は、空気中の水溶性ニッケルがごく少量と思われていた乾式精錬部門も含め、全作業部門において、10%以上と推定されている。しかし、これらの推定は、Warner (1984)と Thomassen *et al.* (1999)の記載に追従するもので、また、部分的にはそれ以前に公表されていた Andersen *et al.* (1998)の調査結果に基づいたものであった。焙焼と精錬作業部門で確認された水溶性ニッケルは、主に硫酸ニッケルで、

特に排気管の中と焙焼炉の建物の最上階などで、湿式精錬作業部門における濃度と同等の濃度で存在していた。これらの知見は、焙焼や精錬作業部門においてでも、がん発生に硫酸ニッケルが重要な役割を果たしていることを示唆している。

Shannon *et al.* (1991) の調査では、ニッケル銅の採鉱と精鉱物(マット)の生産に従事していた労働者において、硫酸ニッケルへの曝露は、2、3 の作業部門(装入原料生産施設および磁硫鉄鉱処理施設)でしか起きないと考えられていた。しかし、純ニッケルに加工するためのマットを受け入れる精錬所(Kristiansand, Norway)では、本格的な処理の前の積み卸ろし、粉碎、破碎といった作業の部門における空気中のニッケルのうち、12%が水溶性化学種の形で存在すると考えられた(Grimsrud & al. 2000)。他の精錬所の情報(Doll & al., 1990、Grimsrud & al. 2000、Thomassen *et al.* 1999)に基づく、硫化ニッケルが酸化ニッケルに転換される焼結作業の部門においても、硫酸ニッケルが生成すると考えられた。したがって、職業性がんが引き起こされたことは、証拠としては弱いものの、ここでも硫酸ニッケル単独曝露、または他の不溶性ニッケル形態との共曝露と関連していると考えられることができる。

4.1.2.7.2.5 がん疫学に関する要約

ここでの評価対象には、4 カ国からの7つのコホート調査が含まれる。その内6件は4カ所のニッケル精錬所のデータに基づき、1件はニッケル電気めっき工のデータに基づいている。さらに、それらのニッケル精錬所のうち、1カ所についての症例対照調査も対象とする。これらの調査は、硫酸ニッケルへの曝露に関連した肺がんと鼻腔がんの潜在的発症リスクに関する疫学的証拠を提示している。ニッケル精錬所についてのすべての調査には、ニッケル曝露量の推定が含まれており、ノルウェーの2件の調査には喫煙データが含まれている。

それらの精錬所の内1カ所については、曝露量の推定値は実質的に実際の測定値に基づいてない(Clydach)。総ニッケルの定点測定と個人別測定の組み合わせに基づいた推定値もあり(Kristiansand, Port Colborne, Harjavalta)、この場合、最も信頼性が高いのは個人別試料のデータである。ただし、1970年以前の個人別試料のデータは無い。1970年以前については、ほとんどの推定値が、職場環境での経験や化学処理工程に関する知識に基づいている。同様に、特定のグループのニッケル化合物(金属、酸化、硫化、および水溶性ニッケル)の割合は、主に処理工程において認められた材料の組成を反映していると判断された。ノルウェーのコホート(Kristiansand)を対象とした症例対照調査は、多数の個人別測定データに基づいている。これらの個人別測定データは、一部は発がんの危険性があると認識された作業部門で取得されている。水溶性ニッケルの割合に関する新たなデータは、1990年代の精錬所の粉塵とエアロゾルの分析から算出された。

以前は、精錬所における硫酸ニッケルへの曝露は、主に電解作業部門と湿式精錬作業部門で起きると考えられたが、その後の分析では、焙焼や焼成の作業部門でも軽視できない濃度での曝露が生じていることが証明された。カナダとフィンランドの電解作業部門における水溶性ニッケルへの曝露濃度は、範囲で示されており、ニッケルとして $0.1\sim 0.4\text{ mg/m}^3$ の間であった。ノルウェーの精錬所の 1978 年以前の水溶性ニッケル濃度は、ICNCM により、主に $0.3\sim 1.3\text{ mg/m}^3$ の間であったと推定されているが、より最近の推定によれば、 $0.1\sim 0.7\text{ mg/m}^3$ の間であったと考えられる。ウェールズの精錬所については、湿式精錬部門における水溶性ニッケル濃度ははるかに高かった ($0.7\sim 2.0\text{ mg/m}^3$) と考えられる。ロシアの精錬所についての最近の調査では、電解作業部門における水溶性ニッケル濃度が $0.04\sim 0.3\text{ mg/m}^3$ であったことが示され、これは 1978 年以前のカナダやノルウェーのニッケル電解作業部門での値と同等であった。

ウェールズ、ノルウェー、フィンランドの 3 ヶ所の精錬所すべてにおいて、肺がんと鼻腔がんの有意な過剰リスクが証明された。この過剰リスクは、水溶性ニッケルへの曝露に関連しており、曝露期間に依存していた。ウェールズとノルウェーについては、水溶性ニッケルへの累積曝露もまた、肺がんリスクに密接に関連していた。さらに、ノルウェーの最新の 2 件の調査 (Andersen *et al.* 1996 および Grimsrud *et al.* 2002) では、喫煙と難溶性ニッケルに関して調整した場合に、水溶性ニッケルへの累積曝露量が最も高い労働者において、3~4 倍のリスクが示された。曝露と発がんの関連性は、そのコホート調査において行われた傾向検定で有意に陽性と確認された。カナダの電解精錬所についての調査結果は、他の 3 ヶ所の精錬所の調査結果のように明確ではなく、水溶性ニッケルへの曝露による肺がんや鼻腔がんのリスク増加を示唆する弱い証拠を提示するのみであった。

カナダとノルウェーの精錬所のニッケル電解作業部門では、それぞれ 1942 年と 1952 年以降に硫酸ニッケルと塩化ニッケルへの混合曝露が生じるようになったが、1926 年と 1910 年以降、この部門における水溶性ニッケルへの曝露は、主に硫酸ニッケルによるものであった。ノルウェーの精錬所については、硫酸ニッケルが優勢な水溶性ニッケル形態だった期間にがんのリスクが高かったことを示す強固な証拠がある。Clydach と Harjavalta の精錬所においても、がんに関連した水溶性ニッケルのタイプは、硫酸ニッケルであったと考えられる。これらの精錬所では、塩化ニッケルの使用はなかった(またはわずかな量での使用だった)ためである。

電気めっき工を対象とした英国の調査では、陰性という結果が得られているが、わずかな人・年についてしか調べられておらず、曝露データもないため、新たな情報はほとんど提示されていない。

4.1.2.7.2.6 がん疫学に関する結論

ここで行った疫学データに関する評価により、肺がんや鼻腔がん、ニッケル精錬所において起きているような硫酸ニッケルへの曝露とに強固な関連性があることが実証された。精錬および焙焼の作業部門で発生したニッケル曝露において、硫酸ニッケルの割合が比較的高かったことから、これらの作業現場においてさえも、硫酸ニッケルが発がんリスクを高める原因になり得ることが示唆された。

4.1.2.7.3 発がん性に関する全体的な評価

4.1.2.7.3.1 疫学

硫化ニッケル鉱石を取り扱う 3 カ所のニッケル精錬所(英国ウェールズの Clydach 精錬所、ノルウェーの Kristiansand 精錬所、およびフィンランドの Harjavalta にある精錬所)について行われた疫学的調査から、様々な量の不溶性ニッケル化合物の存在もあったものの、主に硫化ニッケルに曝露されていた労働者において、肺がんや鼻腔がんのリスクが増加したことが証明された。カナダの Port Colborne 精錬所の電解作業労働者においては、呼吸器がんと硫酸ニッケルへの曝露との関連性は、明確ではなかった。

Clydach では、肺がんや鼻腔がんによる死亡リスクの増加が、硫酸ニッケルが曝露におけるニッケルの優勢な形態であった、湿式精錬部門で働く労働者に認められた。硫酸ニッケルへの曝露は、他の作業部門でも確認されており、データをクロス集計した場合、酸化ニッケルや硫化ニッケルに高度の曝露を受けていた労働者において、がんのリスクに関し、用量-反応関係が認められることが証明された。他のタイプのニッケルへの曝露に関する調整、または他の高リスクな部門での作業に関する調整を行った回帰分析でも、用量-反応関係が示された。曝露量の測定データは存在しないが、高リスクが職業環境からもたらされたことに関して疑う余地はなかった。5 年以上、主に硫酸ニッケルに曝露されていたニッケル精錬所の労働者群においては、肺がんのリスクが全国的なデータから予測された値よりも 3 倍高かった。塩化ニッケルは、生産工程において使用されていなかった。喫煙に関する調整はできなかったが、この肺がんのリスク増加は、喫煙という交絡因子で説明するにはあまりにも大きすぎるものであった。同じ群における鼻腔がんのリスクは、一般集団において予想される罹患率の 100 倍以上と報告されている。鼻腔がんのリスクは、喫煙習慣の影響をわずかにしか受けていない。

Kristiansand 精錬所では、1910～1952 年の間、電解作業部門においては、硫酸ニッケルへの曝露が支配的であった。ノルウェーの精錬所の労働者全体における肺がんのリスクは、ノ

ルウェー国内の罹患率と比較して、3 倍に上昇していた。コホート全体では、鼻腔がんのリスクが、一般集団に予想される罹患率の 18 倍で、主に 1952 年以前に雇用された労働者にこうした影響が認められた。用量-反応関係に関しては、電解作業部門に就労していた期間に比例して肺がんリスクが増加したことが証明された。肺がん罹患率データから、他の高リスク群(焙焼や精錬作業労働者)と比較して、電解作業労働者がより高いリスクを有することが示唆された。1945 年以前に初めて雇用された労働者は、その後に雇用された労働者よりも高いリスクを有していると思われた。1952 年以前の期間に関するこれらの結果は、がんのリスクと硫酸ニッケルへの曝露との関連性について、強固な証拠を提示している。硫酸ニッケルに限定されたデータではないが、後年に得られた追加データは、これらの知見を裏付けている。

1952 年、電解作業部門のいくつかで工程の変更があり、硫酸ニッケルの 80%が塩化ニッケルに置き換えられた。それでも 1952 年から 1970 年代にかけて雇用された労働者において、1952 年以前に雇用された労働者と同様の肺がんリスクの上昇が確認されている。回帰分析では、年齢、喫煙(喫煙経験の有無)、および酸化ニッケルへの累積曝露に関して調整を行ったところ、水溶性ニッケル(硫酸ニッケルと塩化ニッケル)への累積曝露量と肺がんとの間に、用量-反応関係が認められた。同じコホートについて実施された最近の症例対照調査では、4 つのニッケル化学種への累積曝露量が新たな曝露マトリックスから算出され、個々人の全勤務時間における曝露量測定値を重視して、粉塵およびエアロゾルの化学種別分析に基づいた検討が行われている。肺がんと水溶性ニッケルとの用量-反応関係についての以前の知見が、この分析で再確認された。この分析では、喫煙(生活習慣)に関して至適な調整が行われ、水溶性が劣るニッケル化学種への曝露に関する調整も行われた。

Harjavalta の精錬所でも、Clydach や Kristiansand の 2 つの精錬所と同様に、硫化ニッケル精鉱を取り扱っていた。肺がんと鼻腔がんのリスク増加は、硫酸ニッケルが支配的な化学種であった職場環境にいた労働者群で証明された。過去のニッケルへの曝露量については、十分な記載がある。この肺がんリスク分析においては、喫煙に関する調整を行うことができなかった。がんの症例数自体が少なかったこともあり、用量-反応関係は確認されていない。

Port Colborne 精錬所の電解作業労働者は、1942 年まで主に硫酸ニッケルに曝露され、同年以降は硫酸ニッケルと塩化ニッケルの混合曝露を受けていた。ただし、この群における呼吸器がんによる死亡の原因を、硫酸ニッケルへの曝露だけによることはできなかった。

上記に要約した疫学的データは、可溶性ニッケル化合物(硫酸ニッケルなど)への曝露と、少なくとも 3 つの別々のコホートにおける呼吸器がんリスク増加との間に、用量依存的な

明らかな関連性があることを証明している。

4.1.2.7.3.2 動物試験

硫酸ニッケル六水和物を用いた長期吸入試験が、雄雌のラットとマウスにおいて行われている。曝露群と対照群の動物との間で腫瘍発生数の比較を行ったところ、硫酸ニッケル吸入による発がん性は認められなかった。高い急性毒性のため、硫酸ニッケルで達成される最大ニッケル用量は、概して可溶性の低いニッケル化合物で得られる用量ほど多くはなかった。ニッケルとして 0.11 mg/m^3 の濃度で亜硫化ニッケルに 2 年間ラットを曝露した試験では陽性という結果が得られたのに対し、ニッケルとして 0.11 mg/m^3 の同じ濃度で硫酸ニッケル六水和物に曝露した試験では、陰性という結果が得られた。

硫酸ニッケルの経口投与に関しては、2 件の古い試験と、1 件の OECD テストガイドライン 451 に準拠して適切に行われた試験については、結果は陰性であった。他に、プロモーター作用を調べた 3 件の経口投与試験の情報があり、報告内容に不備があったが、プロモーター作用を示唆する結果が得られ、他の水溶性ニッケル化合物で示された結果が支持された。他の投与経路に関しては、ラットにおいて、腹腔内投与が発がん活性を引き起こすことが示され、筋肉内にペレットを埋め込んだ場合にもある程度の発がん活性が報告されている(要旨のみ)。一方、硫酸ニッケルの水和物や無水物をラットに筋肉内投与した試験の情報が 5 件得られているが、結果は陰性であった。

国際がん研究機関(IARC)の作業部会は、ニッケル塩が動物に発がん性があることを示す証拠はわずかであると結論づけている。特に硫酸ニッケルの動物に対する影響に限って評価した場合、発がん性の最も確固たる証拠は、ラットに腹腔内注射した場合に認められている。その発がん影響は明らかであったが、その投与経路は、ヒトにおける発がん性評価には関連性がない。この腹腔内投与試験は 1990 年のもので、それより後で実施された硫酸ニッケルの吸入試験や筋肉内投与試験で、陰性という結果が得られている。

業界での議論で認識された重要な問題は、ヒトで示された陽性という疫学的調査の結果と、NTP の吸入試験で示された陰性という結果との間の相違をどの様に解釈するかに関連している。

NTP の吸入試験は、毒性、生態毒性と環境に関する科学委員会(CSTEE, 2001)において、委員会の環境大気汚染に関する方針声明に沿って審議された。CSTEE は、「NTP の試験において硫酸ニッケル六水和物に発がん性が認められなかったからと言って、水溶性ニッケル化合物に発がん性の可能性がないと証拠づけることはできない。ニッケルの発がん性は、

活性物質としてのニッケルイオンの時間積分細胞内濃度に依存し、したがって様々なニッケル化学種の相対的発がん性は、それらの化学種の生物学的利用能と肺負荷量に関連すると考えられる。」と結論づけた。

Sanner and Dybing は、より高濃度で試験されていたら、硫酸ニッケルは発がん性を示しただろうという見解を示し(Appendix 7.5 参照)、これについての議論が展開されている。

NiPERA は、より高濃度で試験されていた場合でも、硫酸ニッケル六水和物は、それ自体だけでは発がん性を示さなかつただろうという別の見解を提示している(Appendix 7.6 参照)。ラットとマウスで行われた NTP の吸入試験は、硫酸ニッケル六水和物への曝露が、ラットとマウスに炎症や線維症といった呼吸器毒性を引き起こす可能性があることを、明確に示している。慢性炎症を引き起こす以上の濃度で硫酸ニッケル六水和物に慢性吸入曝露されると、硫化ニッケル、特定の酸化ニッケル、タバコの煙などの呼吸器発がん物質(非遺伝毒性機序)へ同時曝露された場合、発がん性が強まる可能性がある。この見解は、諸々の疫学的調査の知見と一致している(NiPERA, 2002)。

水溶性ニッケルによる発がん作用のメカニズムは、完全には解明されていない。炎症以外にも、がんの発生を誘発、促進できる水溶性ニッケルによる特定の作用がある可能性がある。

4.1.2.7.3.3 作用機序に関する考察

ニッケルの発がん作用は、多くの試験において検討されてきた。業界からは、水溶性ニッケルは、イニシエーター作用よりもむしろプロモーター作用を有することが示唆されており、水溶性ニッケルは完全発がん物質ではない可能性があると言明されてきた。しかし、疫学においては、発がん作用機序を識別することはできない。発がん作用機序に関し、様々なモデルが開発されているが、現時点では完全な解明には至っていない。NiPERA による有望なモデルのいくつかを、Appendix 7.7 に提示した。

4.1.2.7.3.4 結論

疫学的には、硫酸ニッケルを「カテゴリー1：ヒトに対する発がん性が認められる」と分類するのに十分な根拠が得られている。これらの根拠は、2004年4月の、精通した専門家グループの会議でレビューされている。当該専門家グループは、硫酸ニッケルと塩化ニッケルについて、ヒトに対して発がん性を示す物質(カテゴリー1の発がん性物質)とみなすべきであるとの結論に達している。得られたデータは、これらの物質へのヒトの曝露と肺が

んの発生との因果関係を確立するのに十分であると判断された。この結論を支持する証拠が、肺がんのデータよりも少ないが、鼻腔がんに関するデータから得られている (European Commission 2004)。

肺がんに関してこの様な結論を導くにあたっては、疫学データが、水溶性ニッケル化合物における明瞭な曝露-反応関係を示しているとの認識が得られている。また、各疫学調査や各調査期間のデータを横断的に比較してもそれぞれを個別にみても、結果に一貫性があると認められ、さらに、発がんとの非常に高い関連性が疫学データから読み取れるとみなされた。調査対象者ごとに作業現場の空気試料が採取されるようになっており、曝露量の測定がより確かになっていること、そして水溶性画分の分析能が改善されていることから、得られた知見の信頼性は向上している。不溶性ニッケル化合物への共曝露や喫煙などの交絡因子への対処が十分なされており、結論導出に際し、信頼性の水準が交絡因子のために低下しているということはない (European Commission 2004)。

硫酸ニッケルがヒトに発がん性を示すことについて明瞭な証拠が得られているが、発がん性がないという証拠も、OECD テストガイドライン 451 に準拠して行われた硫酸ニッケルのラットへの経口投与試験で示されている (CRL, 2005)。経皮曝露に関して得られているデータは、実験動物における硫酸ニッケルの発がん性を評価するには、少なすぎる。ただし、硫酸ニッケルを経口投与しても発がん性は認められないなど、経皮曝露に発がんの重大な懸念はないと考えられる適切な根拠が存在する。

硫酸ニッケルは、吸入以外の経路による投与では発がん性の懸念がなく、TC C&L は、硫酸ニッケルを「カテゴリー1 の発がん性物質; R49(吸入によりがんを引き起こすおそれがある)」に分類することに同意している⁸。

4.1.2.8 生殖毒性

4.1.2.8.1 動物試験

4.1.2.8.1.1 生殖能力への影響

Wistar ラットを用いた三世代生殖試験が実施されており、Ambrose *et al.* (1976) により簡潔に報告されている。各群雌雄 30 匹ずつの離乳ラットに、硫酸ニッケル六水和物を、ニッケルとして 0、250、500、1,000 ppm の濃度で 11 週間混餌投与した。各群の雌 20 匹を、個

⁸ この分類は、第 30 次 ATP の附属書 I の記載事項に含まれている。

別に同一群内の雄と交配させた。交配期間は 7 日間で、それを雄を換えて最多で 3 回行った。交配に供した動物数、妊娠例数、生存仔出産例数および死産例数、生後 1、5、21 日における生存仔数、および一腹当たりの仔動物の離乳時総体重を記録した。F1a の生存仔は離乳時に屠殺して剖検した。親(Po)ラットは、F1b 世代を作るため、再び交配させた。F1b および F2b 世代の交配は、親世代と同様に実施した(各群 17~20 匹を交配に供した)。F3b の離乳ラット(各群雌雄 10 匹ずつ)には、詳細な病理組織学的検査を実施した。摂餌量のデータの報告はないため、曝露量は大まかな推定でしかわからない。SLI の二世世代試験では、雄が 25~28 g/日、雌が 18~20 g/日の飼料を摂取している。これより平均体重を 350 g、摂餌量を 18~28 g/匹/日とみなすと、大まかな曝露量は、ニッケルとして 0、13~20、26~40、52~80 mg/kg 体重/日と算出された。F0 ラットの体重は、高用量群でわずかに減少し、平均で雄では 13%、雌では 8%の減少が報告されている。受胎率は、F1a 世代では 250 および 1000 ppm 群で、F2b 世代では 1000 ppm 群でとわずかに低下した(対照群の 70~79%と比べ、約 60%)。しかし、統計学的に有意な差ではなかった。F1b、F2a、F3a、および F3b 世代では、高用量で曝露を受けた動物の受胎率も、対照群の値と同様であった。試験の結果に基づくと、生殖能力への影響に関する NOAEL は 1000 ppm(ニッケルとして 52~80 mg/kg 体重/日)と思われるが、報告データが少ないため、この NOAEL には不確実性が伴われる。

Sprague-Dawley ラットを用い、後述の二世世代試験の予備試験として、一世代用量設定試験が実施されている(SLI 2000a)。雄雌 8 匹ずつの群に、硫酸ニッケル六水和物が 0、10、20、30、50、75 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与された。投与は交配開始の 2 週間前から実施された。F1 世代への投与は、出生後 21 日から開始された。これらの用量では、F0 の生存率、体重増加量、肉眼剖検所見、および生殖能力への影響は認められなかった。しかし、各群の動物数が少ないため、これらの結果に基づき、75 mg/kg 体重/日(ニッケルとして 16.8 mg/kg 体重/日)を疑問の余地がない NOAEL として確立することはできない。

OECD テストガイドライン 416 に準拠して、1999 年 1 月に実施された二世世代生殖試験では、Sprague-Dawley ラットに、硫酸ニッケル六水和物が、1、2.5、5.0、10 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与された(SLI 2000b)。親(F0)世代の動物は、その成長期に投与を受け、その期間には、少なくとも 1 回の精子形成周期、または数回の完全発情周期が含まれていた。生殖能力、精子の質、発情周期および性成熟に、投与の影響はみられなかった。また、親動物の生存率と成長率への影響も認められなかった。さらに、投与に関連した毒性臨床症状は認められず、肝臓、生殖器官および他の器官の病理組織学的検査でも、投与の影響はみられなかった。この試験は、適切に実施され、報告内容も十分であるが、最高用量においても、F0 動物にいかなる毒性の兆候も示されなかったことから、投与用量の面で OECD テストガイドラインを満たしていない。そのため、この試験の結果からは、硫酸ニッケル

が 10 mg/kg 体重/日(ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日)の NOAEL よりも高い用量において生殖能力に影響を及ぼす可能性に関して、結論を導くことはできない。

Waltschewa *et al.*の試験では、雄ラットが、ニッケルとして 5.6 mg/kg 体重/日の硫酸ニッケル(25 mg/kg 体重/日)を 4 ヶ月間経口投与され、その後発情期の雌とともに 24 時間ケージに入れられた(Waltschewa *et al.* 1972、UK HSE 1987 より引用)。妊娠した雌の数は、対照群の雄と同居させた雌では 3/10 匹だったが、ニッケルに曝露された雄と同居させた雌では 0/10 匹だった。精子数の減少と精巣弛緩も報告されているため、この試験では、雄ラットの生殖器官が硫酸ニッケルの影響を受けた可能性が示唆された。LOAEL はニッケルとして 5.6 mg/kg 体重/日で、NOAEL は確定されなかった。

マウスに硫酸ニッケルを(ニッケルとして 28 mg/kg 体重/日)単回経口投与した試験では、投与 5 週間後に精子異常の増加が認められた(Sobti & Gill 1989)。

硫酸ニッケル(ニッケルとして最高 1.6 mg/m³)に、ラットとマウスを、16 日の期間のうち 12 日間、1 日 6 時間曝露した亜急性吸入試験では、精巣変性が生じたことが報告されている(Benson *et al.* 1988、RTI 1995 より引用)。著者は、その精巣病変は、ニッケルによる直接的な影響よりもおそらく衰弱によるものであると示唆している(Benson *et al.* 1987)。この試験は、Dunnick *et al.*が報告している試験での用量を設定する取り組みの一部を成すものであった(以下参照)。

ラットとマウスを、ニッケルとして 0.02~0.45 mg/m³ の濃度の硫酸ニッケル六水和物に、1 日 6 時間、週 5 日の頻度で 13 週間曝露した試験では、精子の形態、数ならびに活動性、および膣細胞診所見への影響は観察されなかった(Dunnick *et al.* 1989、NTP 1996a)。曝露に関連した死亡率への影響はなく、体重増加量への影響がわずかにみられた。

6.2 mg/kg 体重/日の硫酸ニッケルをラット(3~5 匹/群)に単回、または 1 日 1 回の頻度で 30 日間、皮下注射した試験では、精子形成にある程度の抑制がみられたが、一時的なもので、最終的には精巣の回復が認められた(Hoey 1966、IARC 1989 より引用)。

60 mg/kg 体重/日の硫酸ニッケル六水和物を 30 日間経皮投与されたラットにおいて、精巣の精細管変性が報告されている(Mathur *et al.* 1977、IPCS 1991 より引用)。この影響は、100 mg/kg 体重/日で 30 日間投与した場合、より重度化した。40 mg/kg 体重/日で 30 日間投与した場合と、100 mg/kg 体重/日で 15 日間投与した場合では、何の影響もみられなかった。この試験では、ラットが皮膚から被験物質をなめることを防止したとは示されていないため、これらの影響は経口曝露による可能性もあると考えられた。

Forgacs *et al.*(1998)は、マウスを *in vivo* または *in vitro* で硫酸ニッケル七水和物に曝露した

後、*in vitro* でライディッヒ細胞によるテストステロン(T)産生を測定し、曝露の影響を調べた。この試験では、CFLP マウスに、硫酸ニッケル七水和物が 10、20、40 mg/kg 体重(ニッケルとして 2.1、4.2、8.4 mg/kg 体重)の用量で、または 0.9%塩化ナトリウム水溶液が 1.0 mL の容量で、反復投与(3 日おきに 4 回の皮下注射)された。テストステロン基礎産生能は変わらないままだったが、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)刺激性に対するテストステロン産生反応の低下が、ニッケルとして 4.2 mg/kg 体重/日以上で曝露された動物から得た精巣間質細胞の 48 時間培養物で認められた。体重や精巣、精巣上体、副腎および腎臓の重量には、ニッケルに関連した変化は認められなかった。腎臓の尿細管に用量依存性の病変が認められた以外は、検査した器官において、組織病理学的変化は認められなかった。ライディッヒ細胞のテストステロン産生能への直接的な影響を調べるため、刺激性が最大限に発揮される濃度の hCG の存在下または非存在下で、精巣間質細胞をニッケルイオン(62.5~1000 μ M)と共に 48 時間培養した。テストステロン基礎産生能への影響はなかったが、hCG 刺激性のテストステロン産生は、125 μ M 以上のニッケルイオンと培養した場合に、用量依存性に低下した。この影響の時間的依存性を評価するため、250 と 1000 μ M のニッケルイオンの存在下または非存在下において、様々な時間で細胞を培養した。1000 μ M のニッケルイオンの存在下で少なくとも 4 時間の培養した場合、hCG 刺激性のテストステロン産生に低下が認められた。一方、250 μ M では、低下させるには少なくとも 16 時間が必要とされた。細胞生存率は、代謝活性測定法によって算定された。細胞生存率は、250 μ M のニッケルイオンの存在下では変わらず、1000 μ M のニッケルイオンの存在下で 48 時間培養し終えた場合でも、わずかな低下が認められただけであった。これらの結果から、一般毒性や有意な細胞毒性を何も生じない用量で、マウスを *in vivo* でまたはマウスのライディッヒ細胞を *in vitro* で処置すると、そのライディッヒ細胞の培養物において、刺激によるテストステロン産生が用量依存的に低下することが示された。時間経過を追って調べた試験のデータからは、ライディッヒ細胞のテストステロン産生への影響は、時間、濃度の両方に依存しており、細胞毒性が原因ではないことが示された。この試験は、ニッケルへの曝露がライディッヒ細胞におけるテストステロン産生に影響を与え得ることを示しているが、投与経路が皮下であり、また、報告データが少ないため、その結果を NOAEL や LOAEL の設定に使用することはできない。

4.1.2.8.1.2 発生毒性

硫酸ニッケルを用いた標準的な出生前発生毒性試験の情報は得られていない。

ラットを用いた三世代生殖試験が実施されており、Ambrose *et al.*(1976)により簡潔に報告されている。各群雌雄 30 匹ずつの離乳ラットに、硫酸ニッケル六水和物を、ニッケルと

して 0、250、500、1,000 ppm の濃度で 11 週間混餌投与した。摂餌量のデータは報告されていないが、大まかな曝露量は、ニッケルとして 0、13~20、26~40、52~80 mg/kg 体重/日と算出された(4.1.2.8.1.1 セクション参照)。交配に供した動物の数、妊娠例数、生存仔出産例数および死産例数、生後 1、5、21 日における生存仔数、および一腹当たりの仔動物の離乳時総体重を記録した。F1a 生存仔は離乳時に屠殺して剖検した。親(Po)ラットは、F1b 世代を作るため、再び交配させた。F1b および F2b 世代の交配は、親世代と同様に実施した(各群 17~20 匹を交配に供した)。F3b の離乳ラット(各群雌雄 10 匹ずつ)には、詳細な病理組織学的検査を実施した。F0 ラットの体重は、高用量群でのみ減少し、雌では平均で 8%の減少が報告されている。死産仔数の増加が F1a 世代のニッケルを投与された全群、および F1b 世代の 500 および 1000 ppm 群でみられたが、それ以降の世代の仔動物の死亡率に、影響は認められなかった。1000 ppm 群では、全世代で離乳時平均体重に、平均で 27%の減少が、明確かつ一貫性をもって認められた。この試験の著者は、肉眼的剖検の結果、催奇形性の証拠は得られず、F3b 世代において行われた病理組織学的検査でも影響は認められなかったと報告しているが、根拠となるデータは示されていない。

統計解析が実施されていないことと、一腹ごとではなく仔動物ごとに結果が示されていることから、この試験の評価は複雑なものになっている。統計学的解析から、F1a 世代のニッケル投与を受けた全群と F1b の 500 および 1000 ppm 群において認められた死産仔数増加は、統計学的に有意であることが示されている(以下の Table 4.1.2.8.1.A 参照)。これらの結果から、この試験の LOAEL は、最低用量レベル、すなわち 250 ppm(ニッケルとして 13~20 mg/kg 体重/日)と判断される。

Table 4.1.2.8.1.A: Statistical analysis of the number of pups born dead in the 3-generation reproduction study by Ambrose et al. (1976).

	Dose	Litters	Born alive	Born dead	Born, total per litter	Born alive per litter	Born dead per litter	% Born dead per litter
F1a	0	14	113	5	8.4	8.1	0.4	4.2%
	250	11	72	17*	8.1	6.5	1.5	19.1%
	500	14	96	13*	7.8	6.9	0.9	11.9%
	1000	12	93	16*	9.1	7.8	1.3	14.7%
F1b	0	14	143	3	10.4	10.2	0.2	2.0%
	250	16	164	6	10.6	10.3	0.4	3.5%
	500	14	109	27*	9.7	7.8	1.9	19.9%
	1000	15	93	31*	8.3	6.2	2.1	25.0%

* p-values from 0.0-4.7%, Fishers exact test (rapporteur analysis)

Sprague-Dawley ラットで用量設定のための一世代試験が実施されており、雌雄 8 匹ずつの各群に対し、0、10、20、30、50、ないしは 75 mg/kg 体重/日の硫酸ニッケル六水和物が強制経口投与された(SLI 2000a)。F0 動物には交配開始の 2 週間前から投与を実施し、F1 世

代には出生後 21 日から投与を開始した。授乳 4 日目に、出生仔を無作為に選択し、一腹当たり最大 8 匹とした。これらの用量では、F0 世代の生存率、体重増加量、妊娠期間、および肉眼剖検所見に影響は認められなかった。投与を受けた親ラットの仔動物の着床後・周産期死亡率(すなわち、着床数 - 出生時生存仔数)の評価では、30、50、75 mg/kg 体重/日群において、統計学的に有意な増加が示された。10、20 mg/kg 体重/日の曝露でも増加が示されたが、統計学的に有意な差ではなかった。一腹当たりの平均生存仔数は、75 mg/kg 体重/日群で有意に減少していた。授乳 0 日目の仔の死亡数(死産仔数)は、50 mg/kg 体重/日投与群を除き、投与を受けた全群で有意に増加していた。この用量設定試験の結果から、新生仔死亡に関する LOAEL が 10 mg/kg 体重/日(ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日)であることが示されたが、NOAEL は特定されなかった。

Table 4.1.2.8.1.B: One-generation range-finding study (SLI, 2000a)

Dose	0	10	20	30	50	75
Postimplantation/perinatal lethality ^a	0.4+0.3	2.6+1.9	1.6+0.6	2.3+0.8*	2.7+0.5**	4.8+0.8**
No. dead/live, day 0	1/128	12/100**	10/106**	10/92**	4/89	23/80**

a) mean±sem; * p< 5%; **p<1% (SLI 2000a)

OECD テストガイドライン 416 に準拠して実施された二世世代生殖試験では、ラットに硫酸ニッケル六水和物を 1、2.5、5.0、10 mg/kg 体重/日(ニッケルとして 0.2、0.6、1.1、2.2 mg/kg 体重/日)の用量で、強制経口投与した(SLI 2000b)。F0 のラットには、交配前、交配中、妊娠中、および第 1 世代(F1)への授乳中に被験物質を投与した。F1 仔動物へは、授乳期から成体になるまでの成長期間、交配期間、F2 世代を妊娠・出産する期間、そして F2 世代への授乳期間、投与を継続した。授乳 4 日目に、仔動物を無作為に選択し、一腹当たり最大 8 匹とした。これらの用量では、F0 世代または F1 世代の成長率および妊娠期間に影響は認められなかった。F1 仔動物における出生後 0 日までの着床後・周産期死亡率(すなわち、着床数 - 出生時生存仔数)は、10 mg/kg 体重/日群で高値を示したが、統計学的に有意な差ではなかった(対照群で 0.9 匹であったのに対し、10 mg/kg 体重/日で 2.1 匹、マン・ホイットニー検定で $p = 8.6\%$ 【訳注: $p = 0.086$ 】)。F2 仔動物における着床後・周産期死亡率の値は、F2 対照群の値と同様であった。著者はこの結果から、最高用量である 10 mg/kg 体重/日(ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日)が、この試験で検討した発生に係るエンドポイント(着床後・周産期死亡率という変数を含む)に関する NOAEL であることが示されたと述べている。

Table 4.1.2.8.1.C: Two-generation study, F1 offspring (SLI, 2000b)

Dose	0	1	2.5	5	10
Postimplantation/perinatal lethality ^a , day 0	0.9+0.2	1.5+0.4	1.2+0.3	1.3+0.2	2.1+0.4

Postimplantation/ perinatal lethality ^a , day 4 (%)	1.0+0.2 (7.1+1.5%)	1.2+0.2 (8.1+1.4%)	1.2+0.3 (8.7+2.0%)	1.4+0.2 (11.0+2.2%)	2.3+0.4** (15.8+2.8%)*
--	-----------------------	-----------------------	-----------------------	------------------------	---------------------------

a) mean±sem; * p<5% (Rapporteur statistics); **p<1% (Sommer et al., 2002)

出生日以降にも周産期死亡が発生するため、デンマーク環境庁(EPA)は、NIPERA が賛同している着床から周産期 4 日目までの連続した全期間における評価を希望した。ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日群における着床後・周産期死亡率は、一腹仔当たり、2.29 + 0.43(平均 + 標準誤差)匹で、対照群では、1.00 + 0.22 匹である。統計解析では、マン・ホイットニー検定により、5.8%という p 値が得られている。

出生前発生毒性試験において着床後胚損失の分析を行う際には、このパラメータは、多くの場合、一腹仔当たりの損失率として計算される。同様の計算で、周産期 4 日までの着床後・周産期死亡率を算出すると、対照群で 7.1 + 1.5% (平均 + 標準誤差)、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日群で 15.8 + 2.8%となる。この差は、マン・ホイットニー検定によると、統計学的に有意(p = 4.4%【訳注:p = 0.044】)である。

このデータには、仔動物に死亡がみられなかった出産例が複数含まれており(対照群で 25 匹中 11 匹、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日群で 28 匹中 8 匹)、これら 2 群のデータ分布は、同じ形状を示していないようである(図 1)。

マン・ホイットニー検定に使用したデータは、特定の確率分布に従っていないと仮定されるが、基になる各集団は連続的であり、同じ形状を有していると想定される。つまり、マン・ホイットニー検定は、ここで示されたデータにとっては、最適な検定方法ではない可能性がある。そのため、Fisher のカイ二乗検定による分析も行われた。対照群では 25 の妊娠例のうち 3 匹以上の損失があったのは 0 例で、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日群では 28 の妊娠例のうち 3 匹以上の損失があったのは 8 例(29%、範囲 4~7 匹)であった。Fisher のカイ二乗検定では、この差に統計学的有意性が認められた(p 値は 0.5%【訳注:0.005】)。30%以上の損失がみられた妊娠例数(対照群で 25 妊娠例のうち 0 例、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日群で 28 妊娠例のうち 8 例)について Fisher のカイ二乗検定を行うと、上記の損失数について行ったのと同様の結果が得られ、やはり p 値は 0.5%【訳注:0.005】であった。

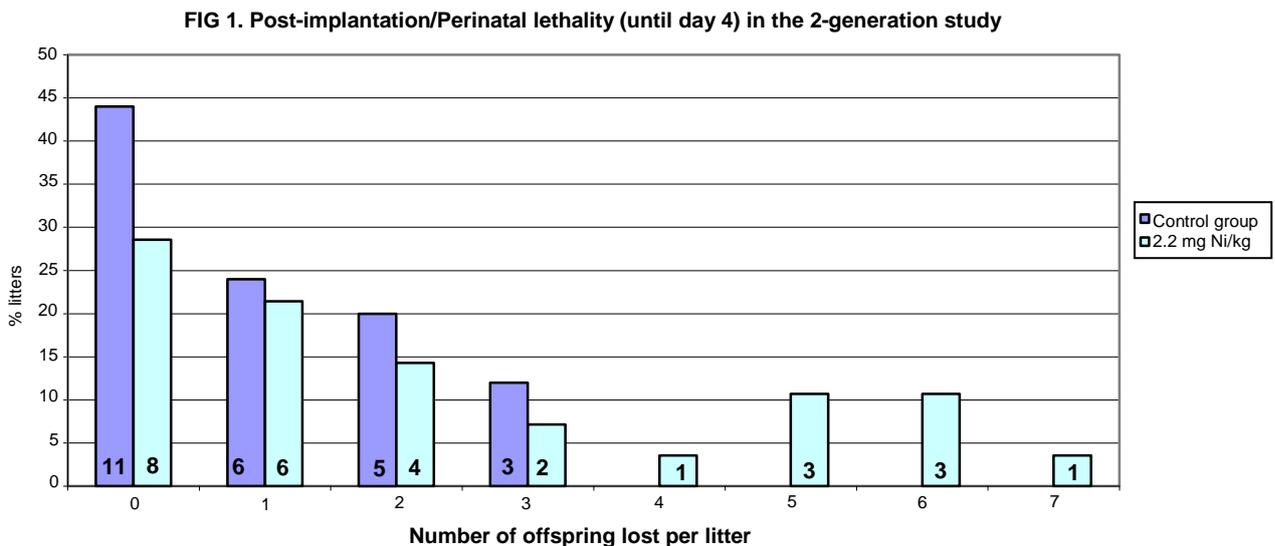
この試験の第一世代についての結果に関しては、Sommer *et al.*(2002)によって、さらなる分析が行われた。その要旨に若干修正を加えた文書が、附属書として本報告書に含まれている(Appendix 7.8 参照)。データは、過分散のある一般線形モデルにおいて分析され、統計単位としては、妊娠例数が使用された。主な結果としては、周産期および出産後の死亡率の有意な上昇が、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日の用量を投与した群で認められ、その有意性は、対照群と比較した場合(p = 0.8%【訳注:p = 0.008】)および対照群と第 2、3、4

の曝露群の総合データと比較した場合(p = 0.04%[訳注:p = 0.0004])に確認された。こちらの分析では、対照値として曝露群の値を含めているため、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日を投与した群でみられた周産期の胚損失および出産後の死亡の増分の有意性を、過小評価してしまっている可能性がある。

8 件の試験に基づく背景対照群における 0 日目の着床後・出産前胚損失の平均値は、一腹当たり 0.88~2.31 個の範囲であり、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日を投与した群における値は、2.1 と、この範囲に収まっている。しかし、この背景対照群における着床数と一腹当たりの生存仔数は、概してこの硫酸ニッケルでの第二世代試験における数よりも多かった(下表を参照のこと)。排卵率の高い母動物は、着床前後の胚損失が多い傾向があり、結果として通常の一腹仔数となっている可能性がある。そのため、その背景対照群における胚損失は、この第二世代試験における胚損失を評価する上で最も適切なものであるとはみなされない。同時対照群における胚損失の数値は、着床数に基づいて適切なものであるように思われる。したがって、この値が曝露群における胚損失の評価に使用される。

Table 4.1.2.8.1.D: Historical control values from 8 studies compared to Control group in SLI (2000b) 21-year study.

	Implantations per litter	Live pups per litter	Loss per litter
Historical control values (8 studies)	14.8-17.3	13.0-15.5	0.9-2.3
Control group in 2-generation study	13.6	12.6	0.9



結論として、一腹当たりの数で有意性を判断した統計解析では、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日投与された群において、着床後・周産期死亡率の高い妊娠例が統計学的に有意に増

加し、また、F1 世代における着床後・周産期平均死亡率も統計学的に有意に増加したことが示された。

F2 出生仔の着床後・周産期死亡率には、統計学的に有意な影響は認められなかった。しかし、この世代の親動物は F1 世代から選ばれており、明らかに出生前または出生後に死亡した F1 出生仔を反映していない。したがって、影響に対して最も高い感受性を有していたかもしれない動物のデータが、F2 の産出データに含まれていなかった可能性がある（この件に関する更なる検討については Appendix 7.9 を参照）。

一腹当たりの数値に関して行われた補足的な統計解析では、F1 における着床後・周産期死亡率の増加が統計学的に有意であることが示され、また F1 にみられた影響が F2 にはみられなかったという知見に関しては上述の考察が行われている。これらの統計解析および考察結果に基づくと、10 mg/kg 体重/日（ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日）という用量を、明確な NOAEL とみなすことはできない。したがって、この試験での NOAEL は、5 mg/kg 体重/日（ニッケルとして 1.1 mg/kg 体重/日）とする。この二世世代試験では、最高用量でも F0 動物に毒性の兆候が引き起こされなかったため、設定した投与用量の面で OECD テストガイドライン 416 が満たされていない。ただし、事前に行われた用量設定のための一世代試験の結果、母体毒性が認められない用量で着床後・周産期死亡率が増加したことが示されているため、最高用量で母体毒性が誘発されていないという状態で発生毒性を評価することは、この場合許容され得ると考えられる。

Morvai *et al.* (1982) の要約書によると、上述の試験以前に、硫酸ニッケルが、ラットとマウスにおいて胎仔毒性や催奇形性を示し、ウサギにおいては胎仔毒性を示し、自然流産をもたらすことが報告されている。しかし、これらの試験の詳細を、公表文献の中に見出すことはできない。この要約書には、非妊娠および妊娠ラットの群に、10 日間毎日、または器官形成期の第 6～15 日の間、硫酸ニッケルを 100 mg/kg 体重/日（ニッケルとして 22 mg/kg 体重/日）の用量で強制経口投与したと記載されている。著者は、ニッケルが、胎仔毒性と催奇形性の影響を引き起こしたと結論付けている。この試験で報告されている結果によると、100 mg/kg 体重/日（ニッケルとして 22 mg/kg 体重/日）の用量で、先天性異常が引き起こされる可能性がある。しかし、要約書に報告されているだけであるため、これらの知見を厳密に評価することはできない。

4.1.2.8.2 ヒトのデータ

4.1.2.8.2.1 受胎能への影響

データは、得られていない。

4.1.2.8.2.2 発生毒性

ロシアのニッケル精錬所で湿式精錬に携わっていた女性労働者を対象とした横断調査に、先天性奇形率と自然流産率の増加が報告されている (Chashschin *et al.* 1994)。その公表報告書中には、「結果は十分に確かめられておらず、決定的なものではないと考えなければならないが、調査を必要とする懸念事項を明示していることから提出に至った」という、著者の申述が含まれている。湿式精錬という用語から、現場は電解施設であり、曝露の全てまたは大部分が、可溶性ニッケルによるものと思われるが、実際のニッケル化学種に関する情報は得られていない。ニッケルへの平均曝露濃度は、電解作業部門で約 0.2 mg/m^3 、電解物精製部門で 0.13 mg/m^3 であったことが明らかにされた。ニッケルに曝露されていた女性における自然流産と構造的奇形の発生率は、電解作業部門で 15.9% (46/290 人)、電解物精製部門で 16.9% (60/290 人) であった。ニッケルへの職業曝露がない 342 人のその地域の建設現場で働く女性労働者で構成した対照群においては、自然流産と奇形の発生率は、それぞれ 8.5% と 5.8% であった。これらの自然流産と奇形の発生率増加は、統計学的に有意であった (カイ二乗検定)。しかし、調査対象の妊娠例をどのように抽出したかについての詳細情報は乏しく、年齢、飲酒、喫煙などの交絡因子の取り扱いに関する情報は示されていない。さらに、他の環境条件として、温度ストレス、重いアノードを持ち上げる労務、塩素ガスへの曝露などが存在し、これらが生殖成績に影響を与えた可能性がある。そのため、この調査では、約 0.2 mg/m^3 の可溶性ニッケルへ曝露されていた期間における自然流産と奇形の発生率増加が示唆されているものの、調査デザインおよび報告内容の不備により、それらの知見は決定的なものではないと判断される。

Vaktskjold *et al.* (2006) は、この後、登録情報に基づくコホート調査デザインに沿って、ニッケル精錬所で働いていた女性労働者の新生児における生殖器奇形について調査を実施した。生殖器奇形という悪影響はみられなかったが、著者も述べているように、高濃度での曝露例がほとんど無かったため、この結果の解釈は、慎重に行われるべきである。

4.1.2.8.3 要約と結論

硫酸ニッケルがヒトの生殖に及ぼす影響に関しては、情報が得られていない。ロシアの精

EURAR: NICKEL SULPHATE

錬所で湿式精錬に携わっていた女性労働者を対象とした横断調査では、約 0.2 mg/m³ の可溶性ニッケルへ曝露されていた期間における自然流産と奇形の発生率増加が示唆されているが、調査デザインおよび報告内容に不備があるため、確定的な知見とはみなされない。

動物試験の結果については、Tables 4.1.2.8.3.A と 4.1.2.8.3.B に要約した。

Table 4.1.2.8.3.A: Summary of studies on fertility and reproductive organs

Test type/ Exposure period	Route of exposure	Species	Doses	NOAEL Parental	NOAEL repro	Endpoint	Reference
3-generation	diet	rat	0, 250, 500, 1000 ppm Ni as nickel sulphate hexahydrate	500 ppm (40 mg Ni/kg bw/day)	1000 ppm? (52-80 mg Ni/kg bw/day)	Fertility	Ambrose <i>et al.</i> (1976)
1-generation range finding	gavage	rat	10, 20, 30, 50, 75 mg/kg bw/day	75 mg/kg bw/day (16.8 mg Ni/kg bw/day)	75 mg/kg bw/day? (16.8 mg Ni/kg bw/day)	Fertility	SLI (2000a)
2-generation	gavage	rat	1, 2.5, 5, 10 mg/kg bw/day as nickel sulphate hexahydrate	10 mg/kg bw/day (2.2 mg Ni/kg bw/day)	>10 mg/kg bw/day (2.2 mg Ni/kg bw/day)	Fertility and sperm quality	SLI (2000b)
Repeated dose, 4 months	gavage	rat	25 mg/kg bw/day	25 mg/kg bw/day (5.6 mg Ni/kg bw/day)	< 25 mg/kg bw/day (5.6 mg Ni/kg bw/day)	Sperm count	Waltchewa <i>et al.</i> (1972)*
Repeated dose, 6 h/day, 12 days over 16 day period	inhalation	rat	1.6 mg nickel/m ³	< 1.6 mg Ni/m ³ (emaciation)	< 1.6 mg Ni/m ³	Testicular degeneration	Benson <i>et al.</i> (1988)*
Repeated dose study, 13 w	inhalation	rat, mice	0.45 mg Ni/m ³	?	0.45 mg Ni/m ³	Sperm morphology and motility, vaginal cytology	Dunnick <i>et al.</i> (1989), NTP (1996a)
Single dose or 30 days	sc	rat	6.2 mg/kg bw/day nickel sulphate	?	< 6.2 mg/kg bw/day	Reversible sperm effects	Hoey (1966)*
Single dose	oral	mice	28 mg Ni/kg	?	<28 mg Ni/kg	Abnormal spermatozoa	Sobti & Gill (1989)

EURAR: NICKEL SULPHATE

Test type/ Exposure period	Route of exposure	Species	Doses	NOAEL Parental	NOAEL repro	Endpoint	Reference
30 days	dermal	rats	40, 60, 100 mg/kg bw/day	?	40 mg/kg bw/day (ca. 10 mg Ni/kg bw/day)	Testes effect	Mathur <i>et al.</i> (1977)*

* Secondary source evaluation based on UK HSE 1987, RTI 1995, IARC 1990, IPCS 1991

Table 4.1.2.8.3.B: Summary of studies on developmental toxicity

Test type	Route of exposure	Species	Doses	NOAEL Maternal toxicity	NOAEL Developmental toxicity	Reference
3-generation	diet	Rat	0, 250, 500, 1000 ppm Ni as nickel sulphate hexahydrate	500 ppm (40 mg Ni/kg bw/day)	< 250 ppm (13-20 mg Ni/kg bw/day) Neonatal mortality in F1	Ambrose <i>et al.</i> (1976)
1-generation range-finding	gavage	Rat	10, 20, 30, 50, 75 mg/kg bw/day as nickel sulphate hexahydrate	75 mg/kg bw/day (16.8 mg Ni/kg bw/day)	< 10 mg/kg bw/day (2.2 mg Ni/kg bw/day) Neonatal mortality	SLI (2000a)
2-generation	gavage	Rat	1, 2.5, 5, 10 mg/kg bw/day as nickel sulphate hexahydrate	>10 mg/kg bw/day (2.2 mg Ni/kg bw/day)	5 mg/kg bw/day (1.1 mg Ni/kg bw/day) Peri- postnatal mortality in F1, but not F2 at 10 mg/kg bw/day (2.2 mg Ni/kg bw/day)	SLI (2000b)

硫酸ニッケルに関し、2件の経口投与による多世代生殖試験、および用量設定のために実施された1件の一世代試験の情報が得られている (Ambrose *et al.* 1976、SLI 2000a、SLI 2000b)。これらの経口投与による試験では、生殖能力への影響は示されなかった。吸入、皮膚接触によるデータは得られていない。Ambrose *et al.* (1976)による試験および一世代用量設定試験 (SLI 2000a) では、NOAELとして、それぞれニッケルとして 52~80 mg/kg 体重/日および 16.8 mg/kg 体重/日という値が示されている。しかし、Ambrose *et al.*の試験の方は、報告データが少なく、用量設定試験の方は、試験に供された動物の数がほんのわずかである (8匹/群)。そのため、最も信頼性のある NOAEL は、OECD テストガイドライン 416 に準拠して近年に実施された二世世代試験 (SLI 2000b) で得られた値であり、すなわち、その試験における最高用量の、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日である。以降のリスクの総合判定にはこの値を考慮に入れるが、NOAEL はおそらくこの値より高いと考えるべきである。

内容が不十分な試験においてではあるが、経口、吸入、皮下のいずれの経路による投与でも、ラットとマウスで、雄の生殖器官への影響が報告されている。これらの試験から可能

性として考えられる LOAEL は、経口曝露と吸入曝露でそれぞれ、ニッケルとして 5.6 mg/kg 体重/日および 1.6 mg/kg 体重/日である。1 件の反復投与毒性試験では、吸入曝露での精子や発情周期への影響に関する NOAEL を、ニッケルとして 0.45 mg/m³としている。OECD テストガイドライン 416 に準拠して近年実施された二世世代試験(SLI 2000b)では、精子の質を含め雄の生殖器官への影響は認められなかった。そのため NOAEL は、試験における最高用量、すなわち、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日とされている。以降のリスクの総合判定には、雄の生殖器官への影響に関する吸入曝露の NOAEL(ニッケルとして 0.45 mg/m³)と経口投与の NOAEL(ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日)を考慮に入れる。

OECD テストガイドライン 416 に準拠して近年実施された二世世代試験(SLI 2000b)における最高用量は、以前に他の試験で観察された周産期胚損失・出生後死亡の用量-反応特性に基づいて設定された。その結果として、その最高用量において、F0 動物には毒性のいかなる兆候も引き起こされておらず、その二世世代試験は、設定用量に関して、OECD TG 416 のガイドラインを満たさないものとなっている。したがって、この二世世代試験の結果は、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日を超える用量で、硫酸ニッケルが生殖能力や生殖器官に影響を与える可能性について、確証を与えるものではない。

硫酸ニッケルを用いて経口または吸入経路で実施された、標準的な出生前発生毒性試験の情報は、いずれも得られていない。複数の多世代生殖試験と 1 件の一世代用量設定試験により、母体毒性を引き起こさない用量で曝露されたラットにおいて、発生毒性(死産、着床後・周産期死亡)が引き起こされるという一貫した証拠が示されている。OECD テストガイドライン 416 に準拠して実施された二世世代試験(SLI 2000b)において、ニッケルとして 2.2 mg/kg 体重/日の用量で F1 世代の着床後・周産期死亡率の増加が認められたことに基づくと、規制を目的とした場合、発生毒性に関する NOAEL は、ニッケルとして 1.1 mg/kg 体重/日と設定される。以降リスクの総合判定には、この値を考慮に入れる。

ニッケル化合物に関するバックグラウンド文書から、塩化ニッケルおよび不特定のニッケル塩で行われた試験の情報が得られており、それらから、経口曝露されたラットにおいて着床後・周産期死亡率が増加するという証拠が示されている。塩化ニッケルについては、ニッケルとして 1.33 mg/kg 体重/日という LOAEL が不確かながら特定されており、この値は、ニッケルとして 1.1 mg/kg 体重/日という硫酸ニッケルの NOAEL よりも高い。このため、他のニッケル化合物のデータを見渡してみても、硫酸ニッケルに関する結論には影響は生じない。

母体毒性を引き起こさない用量で曝露されたラットにおいて、発生毒性(死産、着床後・周産期死亡率)が引き起こされるという一貫した証拠が示されている。TC C&L は、硫酸ニッケル

ケルを、「カテゴリー2の生殖毒性物質; R61⁹」に分類することに同意している。

標準的な出生前発生毒性試験(OECD テストガイドライン 414 に準拠)の情報は得られなかった。そのため、改訂 TGD の最小データ要件は満たされていない。しかし、上述の多世代試験は、生殖毒性に関する OECD スクリーニングテストよりも大きな規模で行われているため、改訂前 TGD の最小データ要件は過分に満たされている。それらの多世代試験における周産期・出生後の死亡に関する知見に基づくと、硫酸ニッケルが発生毒性に関してカテゴリー2 に分類されるのであれば、発生毒性について追加試験を行う差し迫った必要性はないと考えられる。

OECD テストガイドライン 416 に準拠して近年に実施された二世世代試験では、最高用量でも親動物に毒性の兆候は認められなかった。そのため、生殖能力に対して硫酸ニッケルが影響を及ぼす可能性については、十分に検討されたとは言えない。したがって、生殖能力に対して硫酸ニッケルが影響を及ぼす可能性に関しては、明瞭な結論を導出するために、より高用量で追加試験を行うことが重要な意味をもつことになる。ただし、そのような試験により、生殖能力や発生への影響に関してすでに特定されている値よりも低い NOAEL が導けるかという点、そうした期待には、何も根拠が無い。したがって、そのような試験の結果により、リスク評価の結論が影響を受ける可能性は低い。

⁹ この分類は、第 30 次 ATP の附属書 I の記載事項に含まれている。

7.5 BACKGROUND DOCUMENT ON THE SENSITIVITY OF THE NTP STUDIES

The conclusions of the inhalation studies recently published by US National Toxicology Program (NTP 1996b, c and a) were: **Nickel subsulfide**; *clear* evidence of carcinogenic activity in male and female rats, **nickel oxide**; *some* evidence of carcinogenic activity in male and female rats, and **nickel sulfate hexahydrate**; *no* evidence of carcinogenic activity in male and female rats.

The present document will address the lack of alveolar/bronchiolar neoplasms in the rats exposed to nickel sulfate hexahydrate and discuss whether this compound would have been expected to induce tumours if the tumour inducing potency of the sulfate were the same as that of the subsulfide or oxide. The document is based on NTP (1996b), NTP (1996c), NTP (1996a) and Dunnick *et al.* (1995).

Exposure levels of the nickel compounds

Table 7.5.1 shows the exposure levels of the nickel compounds used in the 2-year carcinogenicity studies. The nickel concentration at the highest level of nickel sulfate hexahydrate corresponds to the low dose with nickel subsulfide. The nickel concentration at the next higher dose of nickel subsulfide (which was the highest dose used) is nearly 7 times higher than the nickel concentration at the highest dose of nickel sulfate hexahydrate. The nickel level at the lowest exposure concentration of nickel oxide was almost 5 times higher than the nickel concentration at the highest exposure level of nickel sulfate hexahydrate.

Table 7.5.1 Exposure levels of nickel compounds or nickel in 2-year rat studies and mean bodyweight of the exposed male and female rats in per cent of that found in the control groups

Dose	Nickel sulfate hexahydrate (22.3% nickel) (mg/m ³)	Nickel subsulfide (73.3% nickel) (mg/m ³)	Nickel oxide (76.6% nickel) (mg/m ³)
Low dose Compound Nickel	0.125 0.03	0.15 0.11	0.62 0.5
Mean body weight (per cent of controls) (males, females)	99, 97	98, 96	100, 96
Medium dose Compound Nickel	0.25 0.06	1 0.73	1.25 1.0
Mean body weight (per cent of controls) (males, females)	101, 97	85, 78	95, 92
High dose Compound Nickel	0.5 0.11	- -	2.5 2.0
Mean body weight (per cent of controls) (males, females)	98, 94		93, 90

Survival of rats exposed to nickel sulfate, nickel subsulfide, and nickel oxide were in general similar to those of the controls. The final mean body weights of the exposed rats relative to the controls are included in the table 1. The relative mean bodyweights at the highest doses used for the rats exposed to nickel sulfate were 98% and 94% for the males and females, respectively, for nickel subsulfide the mean bodyweight was 85% and 78% for males and females, respectively, and for nickel oxide the mean bodyweights were 93% and 90% for males and females, respectively, compared to the untreated controls.

Increase in lung weights

Lung weights in exposed animals were greater than controls, and this was considered to be related to inflammatory lung reactions that occurred in response to nickel exposure. Table 7.5.2 shows the increase in lung weights after 7-months. The results at 7-months were used since the exposure increase in lung weights were greater during the first 7 months than during the subsequent 8 months. The average of the absolute lung weights in the male and female controls, respectively, were used in the calculation of the increase in lung weights. No significant increase (P# 0.01) in the lung weights were found among the rats exposed to nickel sulfate. The lung

weights of the rats exposed to nickel subsulfide were significantly increased in all groups. The lung weights were also significantly increased among the rats exposed to the medium and high dose of nickel oxide. At 15-months the lung weights in the high-exposure nickel sulfate rats was 33-41% higher than in the controls; the high-exposure lung weight in the nickel subsulfide rats was 300% higher than controls; in the nickel oxide studies the high-exposure lung weight in rats was 86-94% higher than controls.

The finding that the lung weights increased more in the nickel subsulfide and nickel oxide exposed rats than in the nickel sulfate exposed animals correlated with a more severe inflammatory response in the lungs after exposures to the first two substances (Dunnick *et al.*, 1995).

Table 7.5.2. Increase in lung weight after 7-months

DOSE		INCREASE IN LUNG WEIGHT (g)		
		Nickel sulfate hexahydrate	Nickel subsulfide	Nickel oxide
Low dose	Male	-	0.63*	0.10
	Female	-	0.52*	0.08
Medium dose	Male	-	1.73*	0.71*
	Female	-	1.36*	0.42*
High dose	Male	0.14	-	0.84*
	Female	0.22	-	0.55*

*Significant (P # = 0.001)

Lung nickel burden

Analysis of the nickel lung burden data showed a considerable accumulation of nickel in the lungs of the nickel oxide exposed animals (Table 7.5.3). Thus, at the same level of nickel exposure, the lung nickel burden in the nickel oxide exposed animals was about 20 times higher than in the nickel subsulfide-treated animals. On the other hand, the lung nickel burden in the nickel subsulfide exposed animals was 6 times higher than that found in the nickel sulfate exposed rats at the same nickel exposure level. The nickel lung burden reflects the half-life of the compounds in the rat lung. Thus, the half-life of nickel oxide is approximately 120 days while nickel subsulfide has a half-life of 5 days and nickel sulfate of 1 - 3 days.

Table 7.5.3. Nickel lung burden after 7-months

DOSE		NICKEL LUNG BURDEN (µg nickel/g lung)		
		Nickel sulfate Hexahydrate	Nickel subsulfide	Nickel oxide
Low dose	Male	-	6	175
	Female	-	6	173
Medium dose	Male	-	9	388
	Female	-	9	477
High dose	Male	1	-	701
	Female	1	-	713

Lung tumour induction

Table 7.5.4. Total number of lung adenomas and carcinomas. The number of animals available in each group for evaluation of tumours varied between 52 and 54.

DOSE		ADENOMA/CARCINOMAS COMBINED		
		Nickel sulfate hexahydrate	Nickel subsulfide	Nickel oxide
Control	Male	1 ^A	1	1
	Female	1	1	1
	Sum	2	2	2
Low dose	Male	0	6	1
	Female	0	6	1
	Sum	0	12	2
Medium dose	Male	1	11	6
	Female	0	9	6
	Sum	1	20	12
High dose	Male	3	-	4
	Female	1	-	5
	Sum	4		11

^AThe average of the controls in the three groups has been used

There was a significant dose-related increase in adenoma/carcinomas combined both in male and female rats exposed to nickel subsulfide (Table 7.5.4). There was a significant increase in adenoma/carcinomas combined both in male and female rats exposed to the two highest doses of nickel oxide. The number of tumours at the two highest doses were similar. There was no significant increase of lung tumours in rats exposed to nickel sulfate hexahydrate. No lung tumours was found in the low dose groups, one carcinoma was found among the males in the medium dose groups, and two adenomas and one carcinoma was found among the males and one adenoma among the females in the high dose groups.

Number of tumours as a function of nickel-exposure, increase in lung weight, and nickel lung burden

Fig. 7.5.1 shows the number of lung adenoma/carcinomas combined in male/female rats combined as a function of the Ni-exposure in rats exposed to nickel sulfate, nickel subsulfide, and nickel oxide. The results clearly demonstrate that nickel subsulfide is significantly more potent in inducing lung tumours than nickel oxide and nickel sulfate. On the other hand, it would not be expected that nickel sulfate should induce lung tumours at the doses tested if it had the same tumour inducing potency as nickel oxide.

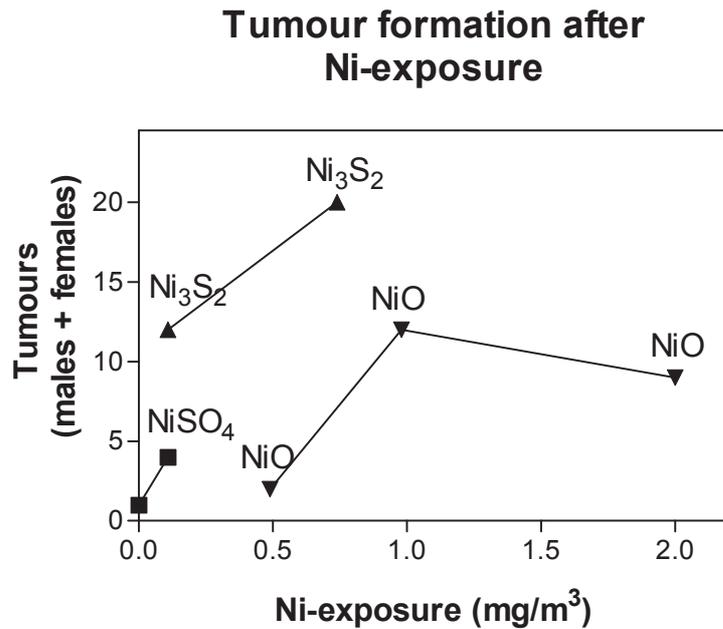


Fig 7.5.1. Number of alveolar/bronchiolar tumours (adenoma + carcinoma) after inhalation exposure to nickel sulfate hexahydrate, nickel subsulfide, and nickel oxide as a function of the nickel concentration

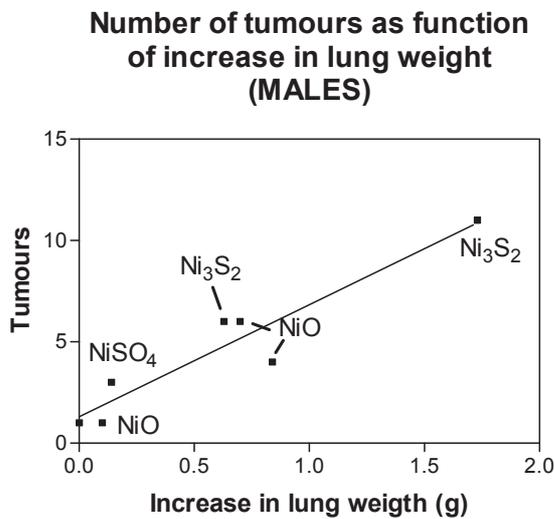


Fig. 7.5.2. Number of alveolar/bronchiolar tumours (adenoma + carcinoma) in male rats after inhalation exposure to nickel sulfate hexahydrate, nickel subsulfide, and nickel oxide as a function of the increase in lung weight after 7-months.

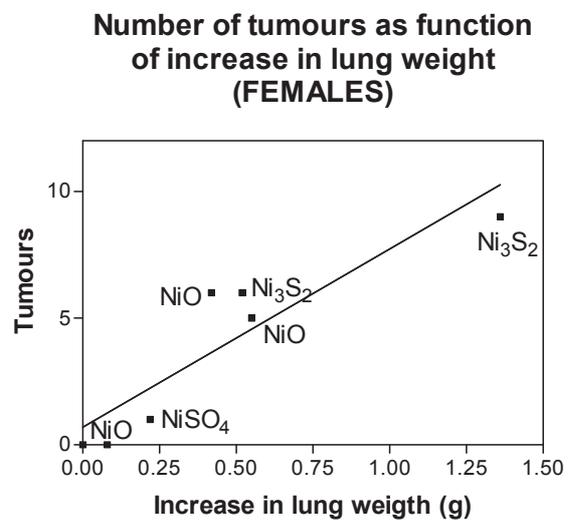


Fig. 7.5.3. Number of alveolar/bronchiolar tumours (adenoma + carcinoma) in female rats after inhalation exposure to nickel sulfate hexahydrate, nickel subsulfide, and nickel oxide as a function of the increase in lung weight after 7-months.

The number of lung tumours as a function of increase in lung weight are shown in Figs 7.5.2 and 7.5.3. Both among the males and females the number of tumours are directly proportional to the increase in lung weight. No increase in lung weight was found among the rats exposed to the low and medium dose of nickel sulfate. The

results with the high dose of nickel sulfate fall slightly above the line for males and slightly below the line for the females.

In Fig 7.5.4 is shown the number of tumours as a function of nickel lung burden. Since the nickel lung burden in the animals exposed to nickel oxide was about 30 times higher than among the animals exposed to nickel subsulfide the data for nickel oxide would clearly fall below the line if they were included. However, the data clearly demonstrate that nickel sulfate fall on the same line as nickel subsulfide.

Based on the data presented it would have been expected that nickel sulfate could be equally potent as nickel subsulfide in inducing lung tumours in the rats if the tumours are related to the increase in lung weight during the first 7 months or nickel lung burden.

The exposure concentrations for nickel sulfate were selected based on the minimal to mild inflammatory lung lesions observed in the 13-week toxicity studies. As pointed out above the increase in lung weights is considered to be related to inflammatory lung reactions. Thus, the possibility should be considered that the nickel sulfate hexahydrate exposure could have been higher without experiencing more toxic effects than that observed in the experiments with nickel subsulfide and nickel oxide.

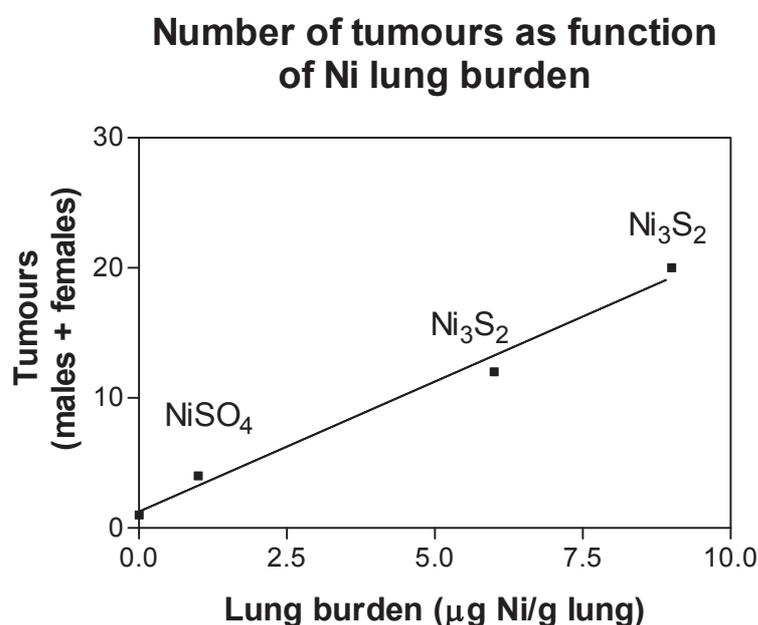


Fig. 7.5.4. Number of alveolar/bronchiolar tumours (adenoma + carcinoma) in male and female rats combined after inhalation exposure to nickel sulfate hexahydrate and nickel subsulfide as a function of the increase in nickel lung burden after 7-months

On the other hand, it was noted that nickel sulfate was more acutely toxic than nickel subsulfide or nickel oxide, causing death of animals at exposure concentrations of 2 mg/m³ (Dunnick *et al.*, 1995). Thus, the maximum increase in the nickel sulfate hexahydrate concentration could not have been increased by more than a factor of two to three due to its acute toxicity.

It was pointed out by members of the *Technical Reports Review Subcommittee* that it would have been possible to use higher exposure concentration of nickel sulfate hexahydrate.

Conclusion.

The number of lung tumours in the NTP nickel inhalation studies was found to increase linearly with the observed increase in lung weight. Thus, the results could be seen to fall on a straight line for all three nickel compounds tested. The increase in lung weight is assumed to be caused by inflammatory processes in the lung. Moreover, the number of tumours found for nickel sulfate and nickel subsulfide increased proportionally with

the nickel lung burden. It is concluded that nickel sulfate may have the same tumour inducing potency as nickel subsulfide and nickel oxide when using concentrations giving the same increase in lung weight, and the same tumour inducing potency as nickel subsulfide when using concentrations giving the same nickel lung burden. Thus, it is likely that nickel sulfate would have shown carcinogenic activity if tested at a higher concentration. It was pointed out by members of the *Technical Reports Review Subcommittee* that it could have been possible to use higher exposure concentration of nickel sulfate hexahydrate than the one used.

7.6 NIPERA COMMENTS ON THE NEGATIVE NTP STUDY WITH NICKEL SULFATE HEXAHYDRATE AND ITS SIGNIFICANCE WITH REGARD TO MODE OF ACTION FOR WATER SOLUBLE NICKEL COMPOUNDS

The relevancy of the negative NTP studies with nickel sulfate hexahydrate to evaluate human cancer risk was raised in the appended comments by Sanner and Dybing (Appendix 7.5). First, it was suggested that the maximum tolerated dose (MTD) was not reached in the NTP two-year bioassay and that if concentrations higher than 0.5 mg/m³ of nickel sulfate hexahydrate (0.11 mg Ni/m³) would have been tested, a positive tumor response would have been observed. This conclusion was based on lung weights and lung burdens after 7 months of exposure. Based on their analyses, Sanner and Dybing dismiss the negative studies by relevant route of exposure in two different animal species. NIPERA's response to these comments can be found below together with further discussion on how the negative animal data can be reconciled with the human and *in vitro* data.

1) Sanner and Dybing indicated that concentrations tested in the NTP rat study were not adequate, a higher (2-3-fold) concentration should have been tested

Sanner and Dybing suggested that the MTD was not reached in the NTP study and that a concentration three times as high (0.3 mg Ni/m³ instead of 0.1 mg Ni/m³, MMAD 2.2 μm) could have been tested. As is typical, the two-year bioassay concentrations were selected based on the results from the subchronic studies, and those results showed similar toxicities for 0.1 mg Ni/m³ of nickel sulfate hexahydrate or nickel subsulfide. Nevertheless, the tumorigenic responses in the two-year study were quite different, with a positive response for lung tumor induction for nickel subsulfide and a negative response for nickel sulfate. In the two year study, nickel subsulfide seemed to cause more lung toxicity than nickel sulfate (at same exposure levels) and it is fair then to consider what would have happened if higher concentrations of nickel sulfate hexahydrate would have been tested. It is known from studies by Dunnick *et al.* (1989) and Benson *et al.* (1988), that the dose-response curve for whole animal toxicity (*i.e.*, mortality) in rats is very steep. A recent short-term inhalation study of nickel sulfate hexahydrate and nickel subsulfide in rats conducted by J. Benson at Lovelace Research Institute (Benson *et al.*, 2002), has confirmed that a higher dose (than 0.1 or 0.2 mg Ni/m³ of nickel sulfate hexahydrate) in the two year bioassay would have resulted in an unacceptable level of toxicity-based mortality. J. Benson is the same investigator who conducted the cancer bioassay for NTP. The original design of Benson's recent study included exposure of rats to nickel sulfate hexahydrate at 0.03, 0.1, and 0.4 mg Ni/m³ for 13-weeks (a much shorter exposure than the 2 years of the NTP bioassay). However, after the first week of the study, an adjustment to the nickel sulfate concentrations had to be made because 12/39 rats (31%) exposed to the highest concentration of nickel sulfate hexahydrate (2 mg/m³, 0.4 mg Ni/m³, MMAD 1.9 μm) had died. The highest concentration of nickel sulfate hexahydrate was then reduced to 1 mg/m³ (0.2 mg Ni/m³), and new animals were added to the study. These toxicity results confirm a steep dose-response for toxicity/mortality and indicate that for a two-year study (rather than a 13-week exposure period) a concentration at or below 0.2 mg Ni/m³ would need to be selected. Otherwise, decreased survival would diminish, rather than increase, the chances of detecting tumors. These results confirm that the 0.5 mg/m³ (0.1 mg Ni/m³) exposure level used in the two-year NTP bioassay was indeed at or no more than two-fold below the maximum tolerated dose (or minimum toxicity dose). A report on the results from the short-term inhalation study will be available by 3rd quarter 2002. Further discussion of the NTP bioassay study design and results (including selection of the MTD) can be found in Haber *et al.* (2000, pages 219-220).

2) Sanner and Dybing suggest that a 2-3-fold higher exposure level of nickel sulfate hexahydrate would have been positive based on: D-R for lung tumors versus lung weight and D-R for lung tumors versus lung burdens

Based on the above toxicity discussion, at the most, a two-fold higher exposure level of nickel sulfate hexahydrate could have been tested in rats. If a two-fold higher exposure was tested (0.2 mg Ni/m³ instead of 0.1 mg Ni/m³), there is no suggestion based on existing lung weight or lung burden data that a positive tumor response would have been seen (Table 1).

Table 1. Results from the NTP rat carcinogenicity study (NTP Reports 1996)

Ni sulfate (mg Ni/m ³)	Males absolute lung weight (3, 7, 15 months)	Females absolute lung weight (3, 7, 15 months)	Male lung burden (µg Ni/lung) (3, 7, 15 month)	Female lung burden (µg Ni/lung) (3, 7, 15 month)
0	1.35 (<i>1.24</i>); 1.67; 2.12	1.02;1.25; 1.37	0 (<i>0.08</i>); 0; 0	0; 0; 0
0.03	1.25; 1.62; 2.48	1.02; 1.22; 1.58	0.15; 0; 0.37	0; 0; 0.26
0.06	1.51; 1.65; 2.50	1.16;1.22; 1.49	ND; 0; 1.12	ND; 0; 0.74
0.11	1.64, 1.89; 3.00	1.34;1.45; 1.82	(1.49; 1.43; 3.58)	1.40;1.32; 3.03
0.22	<i>1.91; nd; nd</i>		<i>4.8; nd; nd</i>	

Figures in italics from Benson *et al* 2002

Ni subsulfide (mg Ni/m ³)	Males absolute lung weight (3, 7, 15 months)	Females absolute lung weight (3, 7, 15 months)	Male lung burden (µg Ni/lung) (3, 7, 15 month)	Female lung burden (µg Ni/lung) (3, 7, 15 month)
0	1.15; 1.87; 2.27	0.85;1.31; 1.52	0; 0; 0	0; 0; 0
0.11	1.56; 2.38; 3.31	1.23; 1.75; 2.52	8; 12; 14	6; 9; 9
0.73	nd; 3.48; 6.84	nd;2.59; 4.14	ND; 28; 21	ND; 23; 29

Ni oxide (mg Ni/m ³)	Males absolute lung weight (3, 7, 15 months)	Females absolute lung weight (3, 7, 15 months)	Male lung burden (3, 7, 15 month)	Female lung burden (3, 7, 15 month)
0	1.18; 1.72; 2.20	0.98;1.14; 1.56	0; 0; 0	nd; 0; 0
0.5	1.35; 1.85; 2.15	1.03; 1.31; 1.79	86; 326; 696	nd; 226; 471
1.0	1.47; 2.43; 3.30	1.13;1.65; 2.41	ND; 930; 2439	ND; 792; 1703
2.0	1.70; 2.59; 4.09	1.55;1.78; 3.02	276; 1817; 4573	nd;1279; 2810

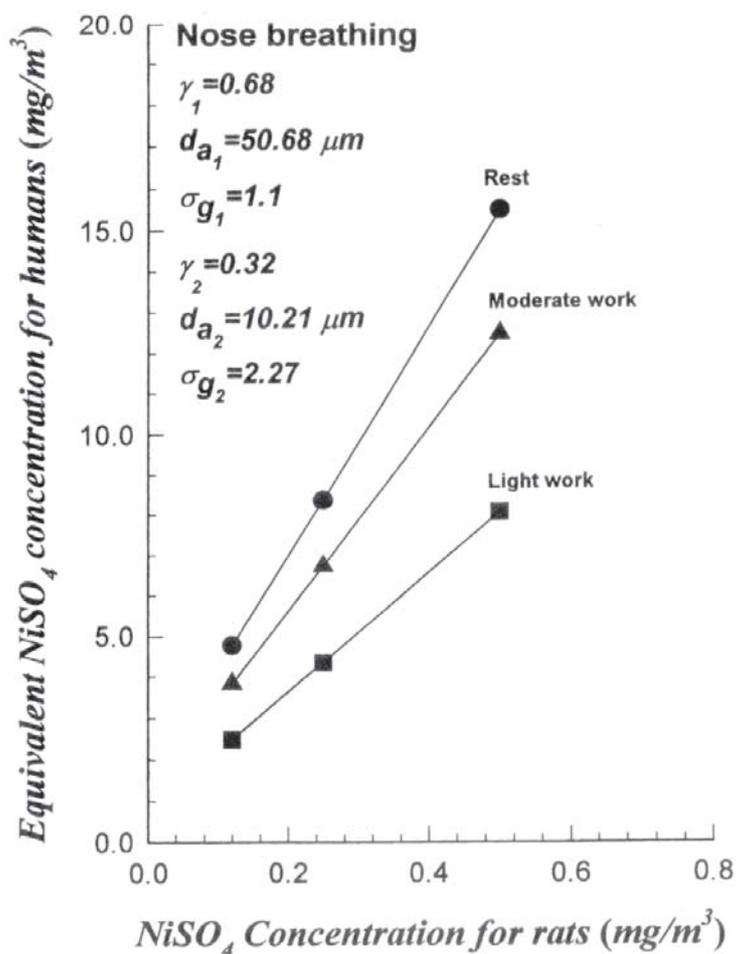
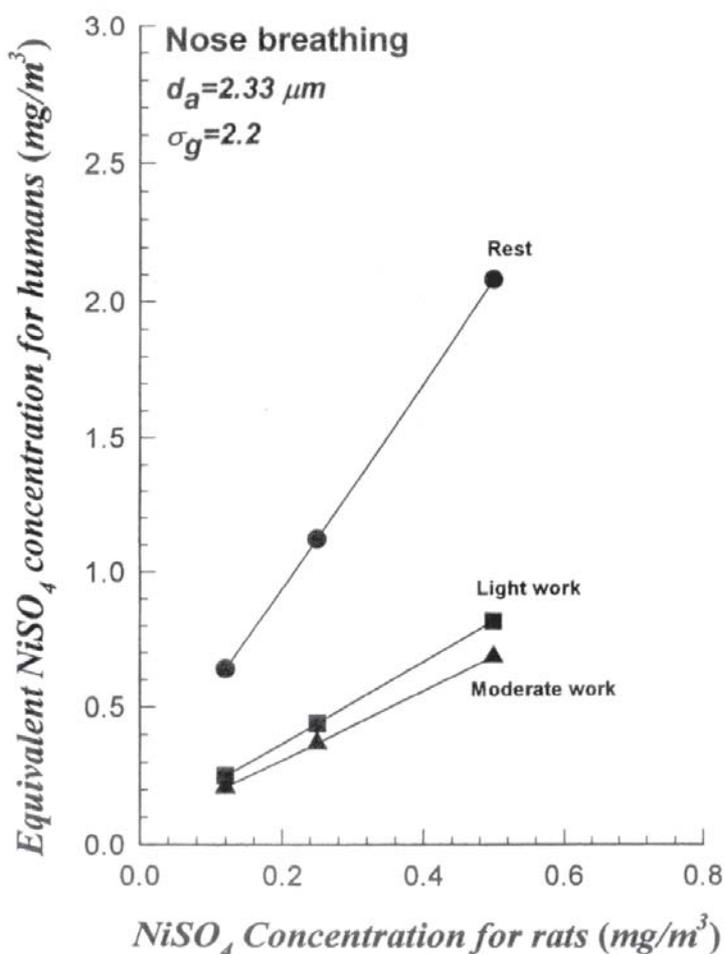
If lung weights for 0.1 mg Ni/m³ nickel sulfate are compared to those corresponding to the lowest concentrations at which positive tumor responses were observed for nickel subsulfide and nickel oxide, they are found to be equivalent (differ by less than 10% males and 30% females) (values in bold). Yet, nickel sulfate did not result in significant tumor induction while the other two compounds did. This supports the fact that lung weights (as surrogate for lung inflammation) can be indicative of a contributing factor to tumor formation but are not directly correlated with a tumor causing effect. Therefore, speculations about what “could have happened” if higher lung weights had been achieved for nickel sulfate are not justified when the data from all time points are used.

With regard to lung burdens, the lung burdens as a function of exposure levels to Ni (mg Ni/m³) can be plotted for the different time points (Figure 1). The data indicates that at ≤ 0.22 mg Ni/m³ (2-fold higher nickel sulfate exposures than the highest level tested in NTP), the nickel lung burdens would still be below those seen for 0.11 mg Ni/m³ of nickel subsulfide for comparable lengths of exposure. These results are in agreement with results showing that nickel lung burdens did not increased linearly with high nickel sulfate exposures (Benson *et al.*, 1988) and did not increase linearly with time of exposure (Dunnick *et al.*, 1989). The Benson *et al.* (1988) results may be due to the observed increased clearance (decreasing T1/2) at higher soluble nickel exposures (Medinsky *et al.*, 1987). Even if the bioavailability of nickel from nickel sulfate was as high as it is for nickel subsulfide, there would not be sufficient nickel in the lungs of the rats to reach the levels found in the animals that showed a positive response for nickel subsulfide. The lack of relevance of lung nickel burdens for predicting lung cancer risk is further illustrated by the fact that lung burdens for rats inhaling 0.5 mg Ni/m³ of nickel oxide were much higher than those for rats inhaling 0.1 or 0.7 mg Ni/m³ of nickel subsulfide, yet not treatment-related induction of tumors was observed in the nickel oxide exposure group.

It is clear then that nickel sulfate hexahydrate does not have the same cancer potency as nickel subsulfide (at equal nickel exposure levels, 0.1 mg Ni/m³, nickel subsulfide was positive and nickel sulfate hexahydrate was negative).

It is clear that if nickel sulfate had the same potency as nickel oxide, nickel sulfate would not have been expected to be positive at 0.1 mg Ni/m³ (tested), 0.2 mg Ni/m³ (2-fold higher) or 0.5 mg Ni/m³ (5-fold higher). If nickel sulfate had been tested at 1 mg Ni/m³ (which is the concentrations at which nickel oxide gave a positive response), all the rats would have been dead and there would be no tumors. Therefore, to speculate that nickel sulfate is carcinogenic because “it could have been positive if tested at higher *and lethal* concentrations” is not justifiable. Because of the higher overall toxicity of nickel sulfate hexahydrate in animals, animals cannot be exposed to concentrations high enough to

MMAD 2.2. μm) is equivalent to 2-3 mg Ni/m^3 of workplace dust. The workplace soluble nickel exposure values showed in Table 4.1.2.7.2.C of the DRA are below this range, consistent with the fact that if humans are as sensitive as rats to the toxic effects of nickel sulfate, levels above 2-6 mg Ni/m^3 (equivalent to animal 0.22 mg Ni/m^3 , MMAD 2.2. μm ; twice as high as tested in NTP study) would not be tolerated by the workers without severe respiratory symptoms. So workers have experienced a range of soluble nickel exposures that were not shown in the rat studies to induce tumors. However, based on the rat data, workplace exposure above 0.1-0.2 mg Ni/m^3 may induce sufficient respiratory tract inflammation to enhance the tumorigenicity of inhalation carcinogens such as sulfidic or oxidic nickel, acid mists, soluble cobalt compounds, or cigarette smoke.



- 5) **Sanner and Dybing suggest that nickel sulfate hexahydrate is an animal carcinogen (negative NTP rat inhalation study due to low exposure tested). Then, there must be other positive studies with nickel sulfate or other soluble nickel compounds that support this notion.**

Contrary to the situation for nickel subsulfide, there are more than a dozen animal studies that were negative after exclusive exposures to soluble nickel salts (Table 2). Besides the NTP inhalation studies, five oral studies in mice, rats, and dogs (Schroeder *et al.*, 1964; Schroeder *et al.*, 1974; Schroeder and Mitchner, 1975; Ambrose *et al.*, 1976; Kurokawa *et al.*, 1985) have also been negative. Less relevant routes of exposure such as intramuscular injection also gave negative results in rats (Gilman, 1962; Payne, 1964; Kasprzak *et al.*, 1983; Kasprzak, 1994). In an intraperitoneal injection study in rats, a relatively weak positive response for soluble nickel compounds at the injection site was reported by Pott and collaborators (1992). The positive finding was not reproduced in another intraperitoneal injection study conducted by Kasprzak *et al.* (1990).

There is only one study, an intraperitoneal transplacental study that can be considered positive (Diwan *et al.*, 1992). This study is a transplacental rat carcinogenicity study in which rat dams were injected intraperitoneally with nickel acetate and the surviving pups were examined for tumors. In this study,

intraperitoneal injection of nickel acetate by itself did not induce kidney tumors in the offspring of treated female rats. These results confirm the lack of kidney carcinogenicity seen with nickel acetate alone by Kasprzak *et al.* (1990). Surprisingly, the Diwan *et al.* study shows increased pituitary tumors in offspring of nickel acetate treated rats (42%) than in offspring of those exposed to sodium acetate (13%). It should be noted that the historical data for the Fischer 344 rat indicate an average of 23 percent and 45 percent pituitary adenoma incidence for males and females, respectively (Haseman *et al.*, 1990). The observed increases in pituitary tumors in offspring of animals treated with nickel acetate may be explained by the toxic effects of the Ni²⁺ ion (quite evident in this study with 88% pup mortality) rather than to a carcinogenic effect. Toxicity can interfere with hormonal function. It has been shown that in the rat, pituitary tumors can occur as a consequence of hormonal disruption (Mennel, 1978).

The lack of pituitary tumors in other studies (with soluble and insoluble nickel compounds) such as the transplacental study by Sunderman *et al.* (1981), intraperitoneal study by Kasprzak *et al.* (1990), oral studies by Ambrose *et al.* (1976), Schoeder and Mitchener (1975), and the inhalation NTP studies (NTP 1996 a,b,c) are consistent with this explanation, raising doubt about the relevance of this study for evaluating human carcinogenic potential.

Table 2. Carcinogenicity Studies of Soluble Nickel Compounds

Reference	Material	Range or Highest Exposure	Species	Result
Inhalation Studies				
NTP 1996	NiSO ₄ •6H ₂ O	0.5 mg/m ³	Rats	–
NTP 1996	NiSO ₄ •6H ₂ O	1.0 mg/m ³	Mice	–
Oral Studies				
Schroeder <i>et al</i> 1964	Ni acetate	5 ppm Ni	Mice	–
Schroeder <i>et al</i> 1974	Ni acetate	5 ppm Ni	Rats	–
Schroeder & Mitchener 75	Ni acetate	5 ppm Ni	Mice	–
Ambrose <i>et al</i> 1976	NiSO ₄ •6H ₂ O	2500 ppm Ni	Rats	–
Ambrose <i>et al</i> 1976	NiSO ₄ •6H ₂ O	2500 ppm Ni	Dogs	
Kurokawa <i>et al</i> 1985	Ni Cl ₂ •6H ₂ O	600 ppm Ni	Rats	
Intramuscular Studies				
Gilman 1962	NiSO ₄ •6H ₂ O	100 mg Ni/kg	Rats	–
Payne 1964	NiCl ₂	26 mg Ni/kg	Rats	–
Kasprzak <i>et al</i> 1983	NiSO ₄ •6H ₂ O	19 mg Ni/kg	Rats	–
Kasprzak 1994	NiSO ₄ •6H ₂ O	15 umol/site	Rats	–
Kasprzak 1994	NiSO ₄ anhy	60 umol/site	Rats	–
Intraperitoneal Studies				
Kasprzak <i>et al</i> 1990	Ni acetate	5.3 mg Ni/kg	Rats	–
Diwan <i>et al</i> 1992 [transplacental]	Ni acetate	5.3 mg Ni/kg	Rats	+ for pituitary*
Pott <i>et al</i> 1992	NiCl ₂ •6H ₂ O NiSO ₄ •6H ₂ O Ni acetate Controls	50 mg Ni	Rats	+/- (4/32) +/- (6/30) +/- (5/31) (0-1/33)

Ultimately, more than a dozen animal studies conducted to date, yield no evidence for the carcinogenicity of soluble nickel salts by themselves, supporting the negative results from the NTP inhalation study with nickel sulfate hexahydrate.

6) How can negative animal data be reconciled with positive association seen in epidemiological studies?

Workers in epidemiological studies were never exposed solely to soluble nickel salts but always to a mixture with more insoluble nickel compounds, soluble cobalt compounds, acid mists, arsenic compounds, cigarette smoke, etc.

Epidemiological studies reveal that only respiratory tumors have been consistently associated with inhalation exposure to certain nickel compounds. Based on data from ten different cohorts, the report

of the International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man (ICNCM, 1990) concluded that more than one form of nickel can give rise to lung and nasal cancer and that much of the respiratory cancer risk seen among nickel refinery workers could be attributed to exposure to a mixture of oxidic and sulfidic nickel, at very high concentrations (≥ 10 mg Ni/m³). The ICNCM also concluded that the carcinogenicity of soluble nickel acting alone could not be ruled out, but the evidence to support this hypothesis was unclear and somewhat contradictory. The ICNCM report suggested that an explanation for the contradictions was that soluble nickel exposure increases the risk of respiratory cancer by enhancing risks associated with exposures to less soluble forms of nickel.

The association between soluble nickel exposures and increased respiratory cancer risk continues to be seen in more recent updates of some of these cohorts (Andersen *et al.*, 1996, Anttila *et al.*, 1998; Grimsrud *et al.* in press). However, since mixed exposures (to more insoluble nickel compounds, cobalt compounds, acid mists, cigarette smoking, etc) are present in these cohorts, it is not possible to use these data alone to determine whether soluble nickel exposures by themselves can cause cancer or if they merely act to enhance the risks of known carcinogens.

The only epidemiologic studies of workers exposed almost exclusively to soluble nickel are those of nickel platers (Sorahan *et al.*, 1987; Pang *et al.*, 1996). These studies are small (in terms of workers), but they provide no evidence to suggest that soluble nickel exposure at or below 0.1 mg Ni/m³ increase respiratory cancer risk.

In addition, there are animal studies that suggest that although soluble nickel compounds are not carcinogenic by themselves they may be able (at certain concentrations) to enhance the tumorigenicity of carcinogenic substances. For these effects to occur, exposures to soluble nickel have to be high enough to induce chronic toxicity and cell proliferation. Interestingly these effects are manifested in lung (after inhalation) and kidney (after oral ingestion) which are the target sites for toxicity.

In the Kasprzak *et al.* (1990) study, the administration of a soluble nickel compound by itself did not induce any kind of tumor, while the administration of the non-genotoxic carcinogen sodium barbital resulted in kidney tumors in male rats. When the soluble nickel compound was administered prior to sodium barbital, a higher number of kidney tumors (male rats) were induced. This phenomenon was later explained by the enhanced susceptibility of male rat kidneys to the sodium barbital effects, possibly involving the α -2 microglobulin mechanism (Kurata *et al.*, 1994). EPA and other regulatory agencies agree that this type of tumor should not be considered in carcinogenicity hazard assessment for humans. The results from Kasprzak *et al.* (1990) are consistent with a possible "enhancing" role for soluble nickel in the kidney rather than an initiator/complete carcinogen role. These results are also in agreement with the results from the Kurokawa *et al.* (1985) study, in which oral administration of nickel chloride did not induce any kind of tumors, but it enhanced the formation of kidney tumors by N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) in male rats. There are a few studies with nickel sulphate quoted in IARC that although not well described, tend to support the above findings from other soluble nickel compounds.

Tumor Promoter Studies with Soluble Nickel Compounds

REFERENCE	MATERIAL	RANGE OR HIGHEST EXPOSURE	SPECIES	RESULT
Oral Studies				
Kurokawa et al 85	<ul style="list-style-type: none"> • Ni Cl₂•6H₂O • EHEN+NiCl₂ 	600 ppm Ni 600 ppm Ni	♂ Rats	<ul style="list-style-type: none"> • - • + for kidney
Intraperitoneal Studies				
Kasprzak et al 90	<ul style="list-style-type: none"> • Ni acetate • NaBB • Ni acetate + NaBB* 	5.3 mg Ni/kg	♂ Rats	<ul style="list-style-type: none"> • - • + for kidney • + for kidney
Diwan et al 92 [transplacental]	<ul style="list-style-type: none"> • Ni acetate • Ni acetate + NaBB* 	5.3 mg Ni/kg	Rats	<ul style="list-style-type: none"> • -for kidney • + for pituitary* • + for kidney (♂) & + for pituitary*

The NTP inhalation studies of rats and mice indicate that exposure to soluble nickel compounds can induce respiratory toxicity manifested by inflammation and fibrosis in rats and mice. Chronic inhalation

of soluble nickel at concentrations above those that cause chronic inflammation does not appear to produce tumors but it may enhance the carcinogenicity of concomitant exposures to respiratory carcinogens such as nickel subsulfide, certain nickel oxides and/or cigarette smoke. Exposures to concentrations of soluble nickel compounds below the threshold for respiratory toxicity would not be expected to enhance carcinogenic effects of other substances.

7) How can the genotoxicity of soluble nickel compounds observed in *in vitro* studies be reconciled with the general lack of carcinogenicity of soluble nickel compounds in animal studies

In general, studies of genotoxicity in bacteria or cultured cells have indicated that nickel compounds can induce chromosomal aberrations and cellular transformation but not gene mutations. Most nickel compounds (and perhaps metallic nickel) have the ability to induce these effects albeit at different concentrations. Soluble nickel compounds require higher concentrations than particulate nickel compounds to see the same effects. The lower genotoxic potency of soluble nickel compounds is attributed to the ineffective cellular uptake of the nickel ion from soluble nickel compounds compared to the effective phagocytosis mechanism for more insoluble nickel compounds.

Current models for nickel-mediated induction of respiratory tumors suggest that the main determinant of the respiratory carcinogenicity of a nickel compound is likely to be the bioavailability of the Ni (II) ion at nuclear sites of target epithelial cells (Costa, 1991; Oller *et al.*, 1997; Haber *et al.*, 2000). Only those nickel compounds that result in sufficient amounts of bioavailable nickel ions at nuclear sites of target cells (after inhalation) will be respiratory carcinogens.

The factors that will influence Ni (II) ion bioavailability in epithelial cells of the lung are: presence of particles on bronchio-alveolar surface, mechanism of lung clearance (dependent on solubility), mechanism of cellular uptake (dependent on particle size, particle surface area, particle charge), and intracellular release rates of Ni (II) ion. Those nickel compounds that are: (1) insoluble enough to allow accumulation of particles at the cell surface, (2) have an intermediate lung clearance rate that allows them to persist in the lung, (3) have a high uptake of particles into epithelial cells via phagocytosis, and (4) have increased release rates of Ni (II) ion inside the cells, will result in greater accumulation of Ni (II) ion at nuclear target sites. Inhalable size particles of nickel subsulfide represent a good example of a high Ni (II) bioavailable dust for respiratory carcinogenesis.

By contrast, water soluble nickel compounds will not be present as particles on the cell surface (rather there will be Ni (II) ions and counter ions), will experience rapid clearance from the lung (decreasing the availability of Ni (II) ions for transport into the cell), will have inefficient transport into the cells through the cell membrane (*e.g.*, magnesium channels, Hausinger, 1992), and will avidly bind to proteins inside and out of the cells (Harnett *et al.*, 1982). The end result is that even inhalation of very high concentrations of soluble nickel compounds will not lead to high enough bioavailability of Ni (II) ions (at nuclear target sites of lung epithelial cells) to induce tumors.

Only inhalation studies can be used to evaluate the interaction of all the above mentioned factors that determine Ni (II) ion bioavailability at target sites. The NTP animal studies (NTP 1996 a,b,c) are consistent with the nickel ion bioavailability theory described above.

The DRA document cites the Haber *et al.* (2000, pages 220-224) discussion of a mode of action that suggests that soluble nickel compounds may have a different mode of action at low (non carcinogenic) and high (carcinogenic) doses. This is a theoretical possibility that is consistent with the model described above. *In vivo*, however, the high concentrations of soluble nickel compounds needed to induce tumors (rather than simply to promote cell proliferation) are unlikely to be reached because humans or animals would be expected to experience severe respiratory toxicity before high enough levels are achieved at target nuclear sites. The available animal data support this contention.

The *in vitro* data can be reconciled with the negative animal data because *in vitro* studies do not account for organ clearance. Therefore, if concentrations of soluble nickel are high enough in the Petri dish, given enough time, some nickel ions will eventually reach the nucleus of the cells. *In vivo*, this is not the case. The inefficient cellular uptake of nickel ions is complemented by the rapid clearance of soluble nickel compounds. Because of the toxicity of soluble nickel compounds, exposed animals are likely to die before a high enough concentration of nickel ions (*i.e.*, the concentration needed to induce tumors) can be reached in the nucleus of respiratory target cells.

The model discussed above fits not just the available respiratory data for various categories of nickel compounds, but also fits with the lack of carcinogenicity for soluble nickel via oral exposure. After ingestion, a fraction of the free nickel ion will be absorbed from the gastrointestinal tract into blood. In blood, the nickel ion circulates mainly bound to albumin or amino acids. Bioavailability of nickel ions at nuclear sites of systemic target cells will be limited by some of the same factors that operate in the lung: inefficient cellular uptake, rapid kidney clearance, high affinity for blood amino acids and proteins. Therefore, the lack of systemic carcinogenicity of oral nickel is consistent with the respiratory mechanism of tumor induction by nickel compounds.

8) Can animal-based respiratory toxicity data (used as a surrogate for tumor promotion effects) predict excess cancer risks seen in workers exposed to soluble nickel compounds?

If soluble nickel compounds can enhance the respiratory carcinogenicity of inhalation carcinogens, this enhancement will occur at concentrations above those that cause chronic lung inflammation, (*i.e.*, chronic cell proliferation). Seilkop and Oller (2002) have used respiratory toxicity data from the NTP inhalation study with nickel sulfate hexahydrate to predict excess cancer risk in workers exposed to equivalent concentrations to those that induce chronic lung inflammation in rats.

Table 3 shows the estimated range of workplace inhalable exposures to soluble nickel (0.5 –1.0 mg Ni/m³, for model with best fit) that could result in enhanced tumorigenicity (SMR = 200) of other exposures. These exposure levels can be compared with soluble nickel exposures at Kristiansand shown in Table 4 (from Grimsrud *et al.*, 2002).

Table 3. Occupational Exposure Limits and High Risk Concentrations Derived from Fitted Animal Dose-Response Curves (from Seilkop and Oller, *Respiratory Cancer Risks Associated with Low-level Nickel Exposure: An Integrated Assessment Based on Animal, Epidemiological, and Mechanistic Data, submitted to JOEM*)

Nickel Compound, Animal Endpoint	Model	Model Fit Observed (Obs) and Expected (Exp) Responses					Occupational Exposure Limit Concentrations Associated with 10 ⁻⁴ Risk ³ (mg Inhalable Ni/m ³)	"High Risk" Concentrations Associated with SMR=200 ⁴ (mg Inhalable Ni/m ³)
		Dose (mg Ni/m ³)	n	Data	Model ¹	p-value ²		
Nickel Oxide Lung Tumors, Male and Female Rats[41]	Weibull	0.0	107	2	1.5	0.56	0.5 – 1.1 (8-18)	9-19 (12-24)
		0.5	106	1	1.5			
		1.0	106	12	12			
	Gamma	0.0	107	2	1.5	0.56	0.6 – 1.4 (6-14)	9-19 (11-23)
0.5	106	1	1.5					
1.0	106	12	12					
Nickel Sulfate Lung Inflammation, Male and Female Rats[42]	Weibull	0.0	106	28	27.0	0.72	0.1-0.2 (1.0-1.4)	0.5 – 1.0 (1.1-2.0)
		0.03	106	26	27.0			
		0.06	106	91	91.0			
	Gamma	0.0	106	28	26.0	0.50	0.2 – 0.4 (0.5-0.7)	0.6-1.1 (0.7-1.3)
		0.03	106	26	28.2			
		0.06	106	91	90.7			
Nickel Sub sulfide Lung Tumors, Male and Female Rats[40]	Linear	0.0	106	2	4.4	0.03	0.002 – 0.010 (0.004- 0.015)	1.8 – 6.1 (2.8 – 9.4)
		0.11	106	12	7.3			
		0.44	106	20	22.1			
Nickel Sub sulfide DNA strand breaks, Male Rats [57]	Hill	0	5	268	263	NA ⁵	0.02 – 0.06 (0.8 – 2.8)	0.6-2.0 (1.2 –4.0)
		0.04	4	256	263			
		0.11	5	316	316			
		0.44	5	339	339			

¹ Model prediction. ² p-value for X² (1 df) goodness of fit test.

³ Range reflects upper and lower limits of estimated animal to human exposure extrapolation factors (Table 6) applied to lower 95% confidence limit on exposure corresponding to 10⁻⁴ increased risk in animals. Parenthesized range reflects animal to human extrapolation of maximum likelihood estimate of exposure corresponding to 10⁻⁴ risk in animals.

⁴ Range reflects upper and lower limits of estimated animal to human exposure extrapolation factors (Table 6) applied to lower 95% confidence limit on exposure corresponding to a 6×10^{-2} increased risk in animals, which approximates the 75-year lifetime background lung cancer risk in U.S. white males[36] and Canadian males[37]. Thus, the exposure corresponding to an increased risk of 6×10^{-2} would double the human background risk, producing an SMR of 200. Parenthesized range reflects animal to human extrapolation of maximum likelihood estimate of exposure corresponding to 6×10^{-2} increased risk in animals.

⁵ NA – model has as many parameters as data points; goodness of fit statistic could not be calculated

Table 4. Exposure estimates for Kristiansand's nickel refinery (based on data from Table 3 Grimsrud *et al.*, 2002).

	Years	Total Ni	Inhalable Ni	% soluble	Inhalable soluble	Inhalable Insoluble
Crushing, grinding	1910-94	0.7-1.4	1.4-2.8	0.12	<i>0.2-0.3</i>	1.2-2.5
Old smelter building no. 1	1910-29	4.0	8	0.10	0.8	7.2
	30-50	4.0	8	0.10	0.8	7.2
	51-77	2.6-4.4	5.2-8.8	0.10	0.5-0.9	4.5-7.9
Calcining smelting dep	51-77	1.5-3.4	3.0-6.4	0.10	0.3-0.6	2.7-5.8
	78-94	0.5	1.0	0.12	0.1	0.9
Roasting dep	1910-77	1.9-5.3	3.8-10.6	0.10	0.4-1.1	3.4-9.5
	78-94	0.4	0.8	0.15	0.1	0.7
Copper leaching	1910-94	0.1-1.5	0.2-3.0	0.49	0.1-1.5	0.1-0.15
Copper electrolysis	1910-94	0.03-0.2	0.06-0.4	0.80	<i>0.05-0.3</i>	0.01-0.08
Copper cementation	1927-77	0.6-1.2	1.2-2.4	0.45	0.5-1.1	0.66-1.3
Electrolysis purification	1927-77	0.2-0.5	0.4-1.0	0.80	0.3-0.8	0.1-0.2
	78-94	0.03-0.2	0.06-0.4	0.98	<i>0.06-0.4</i>	≤ 0.01
Nickel electrolysis	1910-77	0.1-0.2	0.2-0.4	0.87	<i>0.2-0.3</i>	0.03-0.05
	78-94	0.03-0.1	0.06-0.2	0.83	0.05-0.2	0.01-0.03

Soluble exposure ranges in bold are all consistent with SMRs of 200 due to the tumor enhancing effects of soluble nickel. Elevated SMRs ($100 \leq \text{SMR} \leq 200$) may be predicted for soluble nickel exposure ranges in italics. Based on this analysis, the epidemiological data for Kristiansand would be consistent with soluble nickel compounds acting as tumor promoters.

Together, the negative animal data, in conjunction with the epidemiological and mechanistic data suggest a possible enhancing rather than a direct carcinogenic role for soluble nickel compounds.

References

[References are shown in Chapter 6. The references shown here are additional references].

Diwan, B. A., Kasprzak, K. S., and Rice, J. M. Transplacental carcinogenic effects of nickel(II) acetate in the renal cortex, renal pelvis and adenohypophysis in F344/NCr rats. *Carcinogenesis* 13(8):1351-1357 (1992).

U.S. EPA. Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry. U.S. Environmental Protection Agency. EPA/600/8-90/66F, (1994).

Haseman, J.K.; Eustis, S.L.; and Arnold, J. Tumor Incidences in Fischer 344 Rats: NTP Historical Data. In: *Pathology of the Fischer Rat: Reference and Atlas*, edited by Boorman, G.A.; Eustis, S.L.; Elwell, M.R.; Montgomery, Jr., C.A.; and MacKenzie, W.F., pp. 555-564, Academic Press, San Diego, California, (1990).

Harnett, P. B., Robison, S. H., Swartzendruber, D. E., Costa, M. Comparison of protein, RNA, and DNA binding and cell-cycle-specific growth inhibitory effects of nickel compounds in cultured cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 64: 20-30, (1982).

Hausinger, R. P. Biological utilization of nickel. In *Nickel in human health: current perspectives* (E. Nieboer, and J. O. Nriagu, Eds. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY. Pages 21-36, (1992).

Hsieh, T. H.; Yu, C. P.; Oberdörster, G. Deposition and clearance models of Ni compounds in the mouse lung and comparisons with the rat models *Aerosol Science and Technology*, 31:359-372 (1999).

ICNCM. Report of the International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man, Scand Work *Environ Health* 1990; 16:1-82, (1990). [Listed in Chapter 6 as Doll *et al.* (1990)]

Kasprzak, K. S. Lack of carcinogenic activity of promptly soluble (hydrated) and sparingly soluble (anhydrous) commercial preparations of nickel (II) sulfate in the skeletal muscle of male F334/NCR rats. *Toxicologist*, 14:239 (1994).

Kurata Y, Diwan BA, Lehman-McKeeman L, Rice JM, Ward JM. Comparative hyaline droplet nephropathy in male F344/NCr rats induced by sodium barbital and diethylacetylurea, a breakdown product of sodium barbital. *Toxicol Appl Pharmacol.* Jun;126(2):224-32, (1994).

Kurokawa, Y., Matsushima, M.; Imazawa, T.; Takamura, N.; Takahashi, M; and Hayashi, Y. Promoting effect of metal compounds on rat renal tumorigenesis. *J. Am. Coll. Toxicol.* 4:321-330 (1985).

Kasprzak, K. S., Diwan, B. A., Konishi, N., Misra, M., and Rice, J. M. Initiation by nickel acetate and promotion by sodium barbital of renal cortical epithelial tumors in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 11(4):647-652 (1990).

Mennel, H.D. Transplantation of tumors of the nervous system induced by resorptive carcinogens. *Neurosurg. Rev.*, 1:123 (1978).

NTP (National Toxicology Program) Technical Report. Toxicological and carcinogenesis studies of nickel subsulfide in F344/N rats and B6C3F1 mice. NTP TR 453, NIH Publication Series No. 96-3369. (1996a). [Listed in Chapter 6 as NTP (1996b)]

NTP (National Toxicology Program) Technical Report. Toxicological and carcinogenesis studies of nickel oxide in F344/N rats and B6C3F1 mice. NTP TR 451, NIH Publication Series No. 96-3363, (1996b). [Listed in Chapter 6 as NTP (1996c)]

NTP (National Toxicology Program) Technical Report. Toxicological and carcinogenesis studies of nickel sulfate hexahydrate in F344/N rats and B6C3F1 mice. NTP TR 454, NIH Publication Series No. 96-3370, (1996c). [Listed in Chapter 6 as NTP (1996a)]

Oller, A. R., Costa, M., and Oberdörster, G. Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143:152-166 (1997).

Seilkop, S.K. and Oller, A. R. Respiratory cancer risks associated with low-level nickel exposure: An integrated assessment based on animal, epidemiological, and mechanistic data. Submitted to JOEM.

Sorahan, T., Burges D.C.L., Waterhouse, J. A. H. A mortality study of nickel/chromium platers. *Br. J. Ind. Med.* 44: 250-258, (1987).

Sunderman, F.W; McCully, K. S.; Rinehimer, L. A. Negative test for transplacental carcinogenicity of nickel subsulfide in Fischer rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 31:545-554 (1981).

Yu, C. P., Hsieh, T. H., and Oberdörster, G. Dosimetry of inhaled nickel compounds. Abstract and presentation made at the American Association for Aerosol Research Annual Meeting held June 22-26, 1998, Cincinnati, Ohio. *Chem. Pathol. Pharmacol.* 31:545-554 (1998).

Yu, C. P.; Hsieh, T. H.; Oller, A. R.; Oberdörster, G. Evaluation of the human Ni retention model with workplace data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33:165-72 (2001).

7.7 NIPERA COMMENTS ON MECHANISTIC CONSIDERATIONS ON NICKEL ION CARCINOGENICITY

(The following text is an extract of the comments provided by NiPERA in April 2002 as agreed at the Industry-Rapporteur meeting on carcinogenicity in April 12th 2002).

Current models for nickel-mediated induction of respiratory tumours suggest that Ni (II) ion bioavailability will be the main determinant of the respiratory carcinogenicity of a nickel compound (Costa, 1991; Oller *et al.*, 1997; Haber *et al.*, 2000). Only those nickel compounds that result in sufficient amounts of bioavailable nickel ions at nuclear sites of target cells (after inhalation) will be respiratory carcinogens. The factors that will influence Ni (II) ion bioavailability in epithelial cells of the lung are: presence of particles on bronchio-alveolar surface, mechanism of lung clearance (dependent on solubility), mechanism of cellular uptake (dependent on particle size, particle surface area, particle charge), and intracellular release rates of Ni (II) ion. Those nickel compounds that are: (1) insoluble enough to allow accumulation of particles at the cell surface, (2) have an intermediate lung clearance rate that allows them to persist in the lung, (3) have a high uptake of particles into epithelial cells via phagocytosis, and (4) have increased release rates of Ni (II) ion inside the cells, will result in greater accumulation of Ni (II) ion at nuclear target sites. Inhalable size particles of nickel subsulfide represent a good example of a high Ni (II) bioavailable dust for respiratory carcinogenesis.

By contrast, water soluble nickel compounds will not be present as particles on the lung surface (rather there will be Ni (II) ions and counter ions), will experience rapid clearance from the lung (decreasing the availability of Ni (II) ions for transport into the cell), will have inefficient transport into the cells through the cell membrane (*e.g.*, magnesium channels, Hausinger, 1992), and will bind to proteins inside and out of the cells (Harnett *et al.*, 1982). The end result is that even inhalation of very high concentrations of nickel sulphate hexahydrate will not lead to high enough bioavailability of Ni (II) ions to induce tumours. These predictions are consistent with the negative results in the NTP rat inhalation study and with the lack of systemic carcinogenicity of oral nickel. These results do not contradict the positive *in vitro* studies. *In vitro* there is no clearance. If concentrations are high enough and exposures long enough, eventually some Ni ion will reach the nucleus and cause a positive genotoxic effect. This is precluded *in vivo* by the rapid clearance and the whole animal toxicity/mortality that is evident at lower doses than those that can induce tumours.

The NTP inhalation studies of rats and mice clearly indicate that exposure to nickel sulphate hexahydrate can induce respiratory toxicity manifested by inflammation and fibrosis in rats and mice. Chronic inhalation of nickel sulphate hexahydrate at concentrations above those that cause chronic inflammation may enhance the carcinogenicity of concomitant exposures to respiratory carcinogens such as nickel subsulfide, certain nickel oxides and/or cigarette smoke (non genotoxic mechanism). This is in agreement with the findings from the epidemiological studies. Exposures to concentrations of soluble nickel compounds below the threshold for respiratory toxicity would not be expected to enhance carcinogenic effects of other substances.

7.8 FURTHER STATISTICAL ANALYSIS OF THE SLI 2000B 2-GENERATION REPRODUCTIVE TOXICITY STUDY

Modified from an abstract to the *International workshop on statistical modelling*.

Generalized linear model with overdispersion

- a case study of the toxicological effect of nickel sulphate hexahydrate on postimplantation-perinatal mortality rate in rats

Helle M. Sommer, Ph.D., M.Science, statistician, The Danish Veterinary and Food Administration; Ulla Hass, Ph.D, M. Science, reproductive toxicologist, The Danish Veterinary and Food Administration
Poul Thyregod, Associate Professor in Statistics, Danish Technical University

Keywords toxicity study, generalized linear model, binomial distribution, intralitter correlation, overdispersion.

This case study is based on the results of an oral (gavage) two-generation reproduction toxicity study in Sprague-Dawley rats with nickel sulphate hexahydrate (SLI 2000b).

In obtaining reliable results from toxicity studies one of the cornerstones is the choice of the statistical test method. Depending on the choice of method, different results may be obtained, however, some methods are usually more appropriate than others. In this presentation, an approach based upon binomial proportions (a generalized linear model with overdispersion) is described and compared to the method suggested by the industry (a Mann-Whitney test on the mortality rate per litter). A primary characteristic of the binomial overdispersion model is that it accounts for the structure of the type of data and for the important issue of the litter effect, and hence is believed to have greater power.

Toxicity study

Toxicity studies are performed to provide information concerning the toxic effects of a test substance, in this case the toxic effect of the presence of the substance in food / drinking water. The purpose of the study was to evaluate the potential effect of nickel sulphate hexahydrate on the integrity and performance of the male and female reproductive systems and the effects on peri-postnatal mortality rate. In this presentation, focus is on the mortality of the offspring due to maternal exposure during pregnancy and lactation. In order to determine the dose of the substance (given to the parents) that has an effect on the perinatal mortality of the offspring, the study was designed with a control group (group 1) and four test groups with increasing doses (group 2-5). The estimation of / decision on the dose that causes no toxic change, e.g., the no-observed-effect level, lies outside this presentation.

Each group contained between 25 to 28 female rats, which were given the substance orally dissolved in water at dosage levels of 1.0, 2.5, 5.0 or 10.0 mg/kg/day (group 2-5 respectively). Dosing began at 10 week prior to mating and continued until the day prior to scheduled euthanasia. Control animals were given water under the same experimental conditions. After the euthanasia of the maternal rats after weaning of the offspring, the peri-postnatal lethality in each litter was calculated (total number of implantations minus total number of live pups on the 4th day after birth in each litter).

The response is given, as the number of dead versus the total number of implantations in the litter. Each litter varies in size from 4 to 19, however there were no significant correlation between the size of the litter and the mortality rate. An example of the structure of the data is given in Table 1.

	Group 1 (control)	Group 2 1 mg/kg/day	Group 3 2.5 mg/kg/day	Group 4 5 mg/kg/day	Group 5 10 mg/kg/day
Litter 1	0 / 6	2 / 12	2 / 16	3 / 14	3 / 16
Litter 2	1 / 17	2 / 13	0 / 14	1 / 13	1 / 12
and so on ... litter 28
“Mean mortality rate” (percentage)	0,074	0,084	0,090	0,101	0,169

Statistical analysis

The response data can be described by binomial distributions (number of dead versus total number of implants). The data material can be analysed in pairs (e.g. a certain group versus the control) or as a regression due to the increasing dose. In both cases the analysis is carried out in the generalized linear model with a logistic link function ($\ln(p/(1-p)) = \mathcal{G}$) due to the binomial distributed response data. The canonic parameter \mathcal{G} could now be described by the linear function:

$$\mathcal{G} = \beta + g_j, j = 1, 2, \dots, 5 \quad (\text{comparing of groups})$$

or

$$\mathcal{G} = \beta + \gamma \cdot d_j, j = 1, 2, \dots, 5 \quad (\text{regression})$$

where β is the intercept, g is the deterministic effect from the groups, γ is the slop of the regression line and d is the dose level. A goodness of fit test for the level model and for the regression analysis revealed a bad fit ($P = 0.0005$) and it could be concluded that there was more variation in the system than could be explained by the model and thereby by the binominal distribution.

The intralitter correlation among responses from offspring in the same litter was suspected to be significant meaning that the biological variability between litters should not be ignored. Since the biological variability between litters turned out to be significant, the linear functions given above are insufficient in describing the system. This lack of fit is the so-called ‘litter effect’, and the tendency for fetuses from the same litter to respond more alike than fetuses from different litters has long been recognized. Consequently, the conventional binomial distribution provides poor fit to this kind of data, known as the “extra binomial variation” phenomenon, or overdispersion, and hence, in the framework of generalized linear models, this extra binomial variation could be modelled by introducing a dispersion parameter in the model. The dispersion parameter, ϕ , describes how many times larger the actual variance is compared to the variance of the binomial distribution.

Results

The main result shows a significant raise in the peri-postnatal mortality rate in the offspring due to maternal exposure of nickel sulphate hexahydrate before and during pregnancy. This result was found both

- 1) when analysing for total homogeneity comparing all 5 groups and
- 2) when comparing group 1 against 5 and
- 3) when comparing 1, 2, 3, and 4 against group 5 and
- 4) when using the regression analysis for all 5 dose levels.

The reason for pooling group 1 – 4 is due to the industry’s concern of the control group, which in their opinion showed an unrealistically low mortality rate compared to historical control values.

The dispersion parameter was found to be 1.3, meaning that the actual variance is 30% larger than what could be explained by the binomial distribution due to biological variability between the litters.

The significance level (P-values in Wald tests) for the mortality rate for analysis 1), 2), 3) and 4) for modelling with and without the overdispersion was found to be:

Analyses	P-value without overdispersion	P-value with overdispersion
1)	0.0004	0.0115
2)	0.0002	0.0078
3)	< 0.0001	0.0004
4)	< 0.0001	0.0004

Programming in SAS

All analyses under the generalized linear model were performed using SAS Insight (*fit* option) with the number of dead offspring set as response variable (Y), and the group indicator as explanatory variable (X). The *Response Distribution* was chosen to binomial and the logit (or canonical) *Link Function* was chosen. The dispersion parameter (*Scale*) was set to Deviance and *Quasi-likelihood* was chosen as estimation method. The *Binomial* number of trials was set to the size of the litters.

Discussion

In the framework of experimental design, the litters act as blocks, and hence a possible litter effect might be modelled as a random effect. In studies of maternal exposure during pregnancy, the litter effect could be included by a hierarchical distribution structure. To account for the litter effect, the literature has suggested that the beta-binomial distribution be used as a means to describe the extra binomial variation (e.g. Williams 1975, Haseman and Kupper 1979).

Lee and Nelder (2000) note that for generalized linear models, the variance functions under an adjustable dispersion parameter differs from that under a random effect model, and furthermore introduces a combined approach in a so-called hierarchical generalized linear model.

However, in the present study it was found that the small span of dosage levels did not warrant such an approach. Moreover an investigation of the deviance residuals did not suggest that a more detailed modelling was relevant.

Comparing with the Mann-Whitney method.

In the sector of industry, the Mann-Whitney U-test is the test analysis that is most often employed for these kinds of results from toxicity studies. Under this test, no significance was demonstrated for the present data set when comparing group 1 to group 5. However, the Mann-Whitney test simply does not use all information that lie within the data set and this fact contributes to a blurred picture compared to the generalized linear model and therefore the Mann-Whitney tests has less power to detect potential differences.

We find that the use of the Mann-Whitney test is not very appropriate for the present toxicity study. As it is a nonparametric test, it does not use information concerning the distribution of the data nor of the known sizes of the litters. The assumption on identical distribution of data in each group is clearly violated because of the varying litter sizes. Moreover a Mann-Whitney test assumes that there are no tied ranks (Altman 1991) which is not achieved for the present set of data. If there are many identical data values, complicated correlations should be applied to the large sample formula.

7.9 INFLUENCE OF A POTENTIAL NICKEL SENSITIVITY ON THE FREQUENCIES OF POSTIMPLANTATION/PERINATAL LETHALITY IN F1 AND F2 OFFSPRING

The influence of a potential genetic predisposition to nickel sensitivity/resistance on the frequency of postimplantation/perinatal lethality in F2 offspring can be estimated based on the frequency of postimplantation/perinatal lethality in F1 offspring. If it is assumed that there is a genetic predisposition to nickel resistance, it is reasonable to assume that the predisposition to vulnerability is recessive as only some of the offspring in the litters showed the effect in the F1 generation, and that inheritance is Mendelian.

The F0 generation and the F1 offspring will comprise homozygotes for nickel resistance and nickel sensitivity and heterozygotes for nickel resistance (AA : Ab:Ab : bb; A = dominant, resistance; b = recessive, sensitive). If, as a worst case, all of the F1 homozygous recessives were eliminated prior to weaning, the population would consist of heterozygous recessives and homozygous dominant resistants (AA; Ab: Ab), all with a resistant phenotype. At pairing of the F1 adults, the resulting F2 generation would again consist of AA, Ab and bb individuals. The bb individuals would be affected by nickel, and there would be additional perinatal mortality, greater than that seen in the controls.

The extent of the mortality would be determined by the relative frequencies of the gene types. The frequency of this hypothetical recessive gene (or genes) is not known. If the additional mortality at 2.2 mg Ni/kg bw/day in F1 is due to heritable sensitivity, then the frequency of recessive homozygotes must be relatively low. If a lethal recessive gene has a homozygous frequency of 1% in the first generation, the frequency in the second generation will be 0.83%, while a frequency of 9% in the first generation will lead to a frequency of 5.33% in the second generation. In other words, in successive generations, a rare recessive lethal gene is expressed at approximately the same frequency. This explains why rare recessive heritable conditions such as Wilson's disease and Huntington's chorea do not die out in the human population. However, the additional mortality in F1 is around 9% (control 7.4%, exposed 16.9%) and therefore the frequency of recessive homozygotes in the second generation is estimated to be around 5.3%. This implies that hypothetical sensitivity to nickel could not be totally eliminated by exposure at a single generation, but the frequency of sensitive offspring would be reduced from 9% to 5.3%. The mortality in F2 is 10.5% (37/252) and compared to the control value from F1 (7.4%) this gives an additional mortality of 3.1% in F2. This is somewhat lower than the expected 5.3%, however, due to the number of litters used and the variability in the end point, it cannot be expected to have an exact match.

Another test of this hypothesis can be made on this study since the study report allows investigation of paternity (see Table 4.1.2.8.3.A in chapter 4). The F1 adults are numbered according to their F0 parents (e.g. an F1 adult arising from F0 dam 308 is numbered 308-14). It is therefore possible to determine if the surviving offspring from litters at 2.2 mg Ni/kg bw/day passed on any susceptibility to the F2 offspring. Examination of the resulting lethality data demonstrates no obvious pattern at first glance (Table 7.9.A), even where both parents came from 'susceptible' litters. There are three cases where both F1 parents were from litters with high losses (> 25% loss) and the results in F2 are one case with low loss (11%) and two cases of high losses (29.4% and 100% loss), i.e. the frequency of affected litters is 67% (or 50% if the single case of total litter loss is excluded). The probability that litters will be affected when both parents are from affected litters is 44.4%. Consequently, the observations in the three litters of parents from affected litters, although based on low number of animals, is in agreement with the hypothesis.

Table 7.9.A: Comparison of Perinatal Mortality between F1 litters and F2 litters

F1 (N =28)		F2 (N = 24)		
Group 5 Dam No.	Pre, peri and post natal loss (%) F0F1 litter	Group 5 Dam No.	Group 5 Sire No.	Pre, peri and post natal loss(%), F1F2 Litter
308	18.8	308-14	336-02	21.4
318	8.3	318-04	337-04	8.3
		318-10	352-08	0.0
319	35.7	319-10	358-04	0.0
327	16.7	327-04	362-02	12.5
331	0.0	331-08	364-03	20.0
333	10.0	333-06	378-08	5.6
336	13.3	336-08	394-05	20.0
337	33.3	337-07	395-06	7.1
352	14.3			
358	18.8	358-09	399-02	0.0
362	0.0			
364	0.0	364-13	415-02	0.0
378	42.9	378-10	434-02	29.4
394	0.0	394-11	435-03	17.6
395	6.7	395-15	437-03	0.0
396	0.0	396-16	437-05	11.8
399	0.0			
405	35.7	405-08	441-02	11.1
415	0.0			
434	36.8	434-10	626-02	12.5
		434-08	331-06	20.0
435	6.3	435-13	627-07	0.0
437	37.5	437-08	308-02	0.0
438	6.3	438-15	318-03	6.3
441	31.3	441-10	319-07	100.0
448	0.0	448-04	327-02	13.6
452	40.0			
626	15.4			
627	15.4	627-11	333-04	11.1

Numbers in bold indicate where there was F1 Perinatal Mortality > 25% (i.e., 1 in 4 mortality in a litter). F1 adults arising from these litters and mortality in F2 litters where both parents are from these litter are also shown in bold.

The assumption of some heritability is important for the argument that the lack of significant perinatal mortality in the F2 generation is due to the death of susceptible individuals in the F1 generation. The calculations above demonstrate that the increase in offspring mortality in the F2 generation will be of a smaller magnitude than seen in the F1 generation, i.e. reduced from 9% in F1 to 5.3% in F2. The increase in F2 is around 3% and based on the number of litters included and the variability in the end point it is not surprising that this increase is not statistically significant. Therefore, it can be concluded that the finding of a significant effect in F1 but not in F2 may not be an inconsistency, but can be explained by the selection of the F1 parents (i.e. excluding sensitive, homozygous recessives).