

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法の開発に関する研究

(H19-化学-006)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 津田 洋幸

平成 20 年 (2008 年) 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法の開発に関する研究	
津田 洋幸	2
II. 分担研究報告書	11
1. 生体試料中のナノマテリアル測定法の開発に関する研究	
徳永 裕司	12
2. ナノマテリアルの経皮吸収に及ぼす因子解析に関する研究	
藤井まき子	22
3. ナノマテリアルの経皮暴露による免疫毒性学的解析に関する研究	
宮澤 眞紀	22
4. 皮膚計測工学によるナノマテリアルの経皮毒性指標の検討	
菊地 克子	29
5. 全体の取り纏め、 <i>In vivo</i> 経皮吸収慢性評価のパラメータ検索	
津田 洋幸	33

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法の開発に関する研究

主任研究者 津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨：

<津田：ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法の開発に関する研究>

ルチル型、無コーティングの二酸化チタン (TiO_2) をテトラエチルヘキサン酸ペンタエリスリチル (Pantalan) 分散後皮膚に塗布し、発がんプロモーション作用について、皮膚と乳腺発がん高感受性の雄性ヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子トランスジェニックラット (Hras128系) (以後Tg) および野生型を用いて検討し、標準的発がん性評価法の開発とその機序を追究した。扁平上皮乳頭腫およびがんの発生において発がんプロモーション作用 (弱い発がん性) がみられた。Tgにおいて皮膚から離れた乳腺でがんの発生の増加傾向がみられた。発がんプロモーション作用機序についてはラジカル産生や炎症性サイトカインの誘導を調べている。

<徳永：ナノマテリアルの経皮的な吸収・分布に関する研究>

TiO_2 をラット雌雄の背部皮膚に閉塞貼付の試験にて皮膚と他の臓器の蓄積状態を調べた。10%用量で、雄ラットでは無コーティング TiO_2 は皮膚、肝、腎、コーティング TiO_2 皮膚に蓄積量が有意に増大していた。肺、脾、脳では対照群と差はなかった。雌ラットでは、無コーティングで皮膚で有意に上昇していたが、肝、腎、肺、脾、脳では対照群レベルであった。現在動物数を増やし再現性を確認している。

<宮澤：ナノマテリアルの経皮暴露による免疫毒性学的解析に関する研究>

TiO_2 がマウス損傷皮膚における影響について、耳介皮膚における炎症反応と局所リンパ節での細胞増殖を測定した。 TiO_2 で皮膚表皮細胞の肥厚が傾向が認められ、ハプテンとの同時暴露でさらに炎症は増強された。これらの変化は TiO_2 の粒子径またはコーティングによる差はなかった。

TiO_2 は粒子径によらず損傷皮膚で炎症反応を増悪させることが示唆された。

<菊地：皮膚計測工学によるナノマテリアルの経皮毒性指標の検討>

径 30nm TiO_2 (コーティング有り、無し) をシリコン D5 に 20% で懸濁させ、ヘアレスマウスの背部皮膚に途中に無塗布日 2 日を挟み計 9 日間塗布した。塗布前、塗布 4 日後、塗布 9 日後に、マ

ウスに麻酔し、背部皮膚の角層水分量、角層水分バリア能、皮膚色を非侵襲的な機器計測による生体計測工学的の方法で評価した。角層水分量の低下および角層水分バリア機能の低下が示唆される結果を得た。

<藤井：ナノマテリアルの経皮吸収に及ぼす因子解析に関する研究>

健康皮膚で皮膚移行がほとんど起こらない fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4、Mw：4000) を皮膚生理と構造がヒトに近い Yucatan micropig 摘出 intact skin 及び3種のバリア機能低下皮膚 (hair removed skin、delipidized skin、stripped skin) に適用した。Intact skin では皮膚表面及び角層ストリッピング4回目まで蛍光が認められ、hair removed skin では intact skin との差は認められなかった。一方、delipidized skin では真皮まで蛍光が観察された。Stripped skin では適用量の約30%がレセプター相で検出された。以上から、検体そして用いた無コーティング TiO₂ を皮膚に塗布し他場合、皮膚角質を通過して皮膚組織内に蓄積し、傷害皮膚の炎症反応の増強、角層水分バリア機能の低下、また発がんプロモーション作用を示すことが観察された。

分担研究者

徳永 裕司 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学 部長
藤井 まき子 昭和薬科大学薬学部 薬剤学研究
室 准教授
宮澤 真紀 神奈川県衛生研究所 理化学部
主任研究員
菊地 克子 東北大学大学院医学系研究科
津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科
生体防御・総合医学専攻
分子医学講座 分子毒性学 教授

協力研究者

泉水 美香 昭和薬科大学薬学部薬剤学研究室
大学院生
小島 尚 神奈川県衛生研究所 理化学部
主任研究員
鈴木 弘実 東北大学大学院医学系研究科皮膚科
学講座研究員
伊藤 由美子 東北大学大学院医学系研究科
深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科

生体防御総合医学専攻 分子医学講
座 分子毒性学 助教

David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科
生体防御総合医学専攻 分子医学講
座 分子毒性学 客員教授

徐 結荷 名古屋市立大学大学院医学研究科
分子医学講座 分子毒性学 院生

佐川 容子 名古屋市立大学大学院医学研究科
感覚器・形成学講座 加齢環境皮膚科
学加齢分野 大学院生

内野 正 国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生
化学部 主任研究員

A. 研究目的

ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法の開発において、ルチル型、無コーティングまたはコーティングされたナノサイズ二酸化チタン (TiO₂) またはナノサイズより大きい粒子を皮膚に塗布した場合の、発がんプロモーション作用の検出手法、皮膚および他の臓器における計測手法の確立と局所沈着とトランスロケーションの有無、損傷皮膚における透過性の計測手法の開発、免疫機能への影響、角層水分バリア機能等、

への影響についての解析方法を検討した。同時に、実際に惹起される有害作用の有無と程度、更にその機序を明らかにして、メカニズムに基づく評価法の開発と標準化に確立を目指した。

B. 研究方法

<津田：発がんのプロモーション作用による発がん性検索>

実験1：皮膚および発がん高感受性の雄ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (Tg) および野生型ラット (7週齢) の背部を 3x3 cm の大きさに剃毛し、発がん物質 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 2.5mg/0.5mL アセトン溶液) を滴下後に、TiO₂ (直径 20nm、ルチル型、無コーティング) を 100mg/0.5mL pentalan (分散剤) に懸濁し 0.5mL を週 2 回または 1 回塗布し Tg は 28 週、野生型は 40 週にて終了した。陽性対照は既知の皮膚発がんプロモーター (弱発癌物質) の 2-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA, 100nmol/0.5mL アセトン溶液) 0.5mL を週 3 回塗布した (各群 12 匹)。屠殺時における TiO₂ の組織分布を ICP-MS を用いて測定した (各群 5 匹) (班員・徳永裕司)。

実験2：UVB 発がんにおけるプロモーション作用による発がん性検索

実験 1 と同じ系統の雌雄の Tg ラット (10 週齢) を用いて、背部皮膚を 3x3 cm の大きさに剃毛し、UVB を線源から 20cm の距離で 800mJ/cm² になる線量で 7 分間照射を週 2 回、10 週間行い、その後、照射部位に TiO₂ (直径 20nm、ルチル型、無コーティング) を 100mg/0.5mL の pentalan (分散剤) に懸濁して週 2 回塗布した。雌は 31 週で屠殺、雄は 41 週経過中である (各群 6-8 匹)。

<徳永：ナノマテリアルの経皮的な吸収・分布に関する研究>

試薬及び材料：有害金属測定用硝酸、原子吸光用過酸化水素、原子吸光用チタン標準原液 (1000 ppm, 関東化学), 原子吸光用亜鉛標準原液 (1000 ppm, 関東化学)、ICP 汎用混合液 (Ce, Li, Tl, Y 1mg/L, 輸入元：西進商事) を用いた。TiO₂ および酸化亜鉛はテイカ株式会社、Pentalan は日光ケミカルズ株式会社より提供を受けた。替え刃メス

及びコルク板は市販品を用いた。得られた臓器は -30℃ で冷凍保存した。測定条件は、CEM 社

(Matthews, North Carolina 28105, USA) MARS5 型湿式分解装置は最大出力 1200 W でラフチャーメンブレンで封印された 13 個の HP-500 型テフロン容器をターンテーブルに装着し、各段階の圧力 (圧力センサーでテフロン容器中の温度を制御) をコンピュータ制御しながら測定臓器の疎解を行った。出力は 600 W の 80 % で PSI 80 で 20 分マイクロ波の照射を行い、2 分間の HOLD 状態に置き、冷却する条件を用いた。

ピーク対応のレオダイインジェクターを装着した島津製 LC-10ADVP 型液体クロマトグラフ用ポンプを連結した HP 製 4500 型 ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometer) あるいは Agilent 製 7500 型 ICP/MS を用いた。下表に ICP-MS の操作条件を示した。ポンプはミリ Q 水を 0.7 mL/min で送液した。

Instrument conditions for ICP-MS

Radio frequency power	1500 W
RF matching	1.98 V
Sample depth	8.5 mm
Sample skimmer cones	Pt
Peristaltic pump	0.1 rpm
Argon flow rate	
Plasma	15 L/min
Nebulizer	1.01 L/min
Spray chamber temperature	20°C
Integration time	0.3 sec
measurement time (sec)	55 sec

使用動物と飼育条件：4 週齢の雌雄 CrI:CD (SD) 系ラット (雄 60~100 g, 雌 55~95 g) 36 匹を用い、約 2 週間の検疫馴化後に使用した。投与 7 日前より動物には塗布部の保護のために首枷を装着し、適時に背部から側腹部を剃毛した。ステンレスケージに 1 匹飼いとし、固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。飲水は次亜塩素酸ナトリウム添加 (約 2 ppm) 井戸水を自由摂取させた。雄雌それぞれ 30 匹とし、投与処置期間は 28 日間とした。

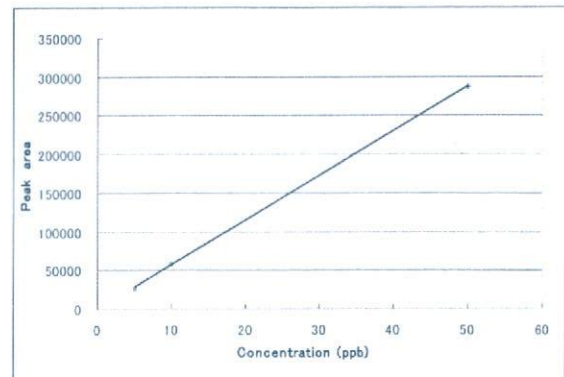
被験物質と媒体との混合物の調製法及び調製頻度：無コーティング TiO₂ (35 nm) 2%、10%、コーティング TiO₂ (35 nm) 10%、無コーティング TiO₂

(250 nm) 10%液を調製して用いた。被験物質を最終調製量の約6~8割の媒体を入れたビーカーに入れ、5分程度超音波処理して分散液作成し、調製液量をメスシリンダーに取って混和後、バイアル瓶に移して使用した。調製は吸気ドラフト内にて行った。

投与方法：ラットの雄30匹を5群の6匹ずつをコントロール、無コーティングTiO₂ (35 nm)の2%および10%、コーティングTiO₂ (35 nm)および無コーティングTiO₂ (250 nm)の10%に分け、28日間皮膚投与した。背部皮膚の体表面積の約10%に相当する範囲を剃毛して投与した。媒体または被験物質混合物を、経口投与用チューブを付けた1または2.5 mLのポリプロピレン製注射筒に量り取り塗布した。適用部位は約4×5 cm、5×8 cmないし5×10 cmのリント布で覆い、更にこの上から適用部位より縦横が1 cm大きいリント布で覆い、さらにその上を不透性シート（ブレンダー™, 3M Health Care）で覆ったのち、伸縮性包帯（SILKYTEX, Alcare 社, 15~20 cm）で巻いて固定し、20~24時間閉塞した。20~24時間閉塞後包帯を除去して、湿らせたガーゼで、更にティッシュペーパーで除去した。なお、除去後、その日の投与までの間は、リント布で覆った。投与容量は、OECDガイドライン427に従い、10 mL/cm²とした。被験物質は、28日間反復投与後屠殺し、各臓器を凍結保存（-30℃）した。なお、投与部位（背部皮膚）については、皮膚は表面をセロハンテープで約20回ストリッピングした後採取した。摂餌量は週2回測定した。

臓器中のTiO₂の測定：凍結臓器を解凍後に約0.1~0.2 gをフロン製容器に入れ、硝酸/過酸化水素水混液(3:1) 5 mL及びミリQ水2 mLを正確に加えて密栓した。MARS 5型 湿式分解装置にテフロン容器13個を装着した。疎解後30分間放冷し、ミリQ水を加えて正確に20 mLとし、試料溶液とした。試料溶液100 μLを用い、HPLC-ICP/MSに注入し、試料溶液中のTiO₂量のピーク面積をm/z 47を用いて測定した。チタン標準原液を用いて調製した5、10及び50 ppbの標準溶液100 μLを

用いて予め作成した検量線より試料溶液中のTiO₂量を測定した。検量線を下に示す。



<宮澤：ナノマテリアルの経皮暴露による免疫毒性学的解析に関する研究>

検体A：35nmのTiO₂ SMT-500SAS（水酸化アルミニウムコーティング）、シリコンD5(S)分散、**B：**MT-500B、250nmのTiO₂、Pentalan分散、**C：**Lu-250、として、いずれも20%(w/v)試験液を調製した。

感作性物質：2,4-dinitrochlorobenzene (DNCD)をアセトン・オリーブ油(4:1, v/v, A00)に溶解し、0.5%溶液を調製した。

動物：8-12週齢CBA/JN雌性マウス（日本チャールズリバー）を、通常の温・湿度・光制御動物室にて固形飼料（CE-2日本クレア）及び水（濾過水道水）を自由摂取させ、1週間以上の馴化後に使用した。マウスの両側の耳介背側部の表皮角質層をセロテープ（ニチバン(株)）でテープストリッピング除去した。

局所リンパ節変化の評価 (Local lymph node assay (LLNA))：各検体について、I：A00および媒体塗布群、II：A00およびTiO₂塗布群、III：0.5%DNCDおよび媒体塗布群、IV：0.5%DNCDおよびTiO₂塗布群、とした。マウスは1群4匹とした。感作方法は、テープストリッピングを行ったマウス両耳介背側面に、25μLずつA00または0.5%DNCDを塗布し、ドライヤーで乾燥させた後、媒体または20% TiO₂を塗布した。感作は24時間間隔で3日行った。耳介腫脹値は、テープストリッピング実施前と最終感作の3日後に左右耳介の厚さの差の左右の平均をとった。最終感作の3

日後に体重および耳介の腫脹を測定した後、左右の耳下リンパ節を採材し、重量を測定した。耳下リンパ節は、採材後-20℃で保存した。右耳介の一部は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、病理組織学的観察を行った。細胞増殖活性は、最終感作の2日後に、BrdU は5mg/ラット 腹腔内投与した。耳介リンパ節を15mLの生理食塩液ですりつぶした後ろ過し、ELISAキット(Cell Proliferation ELISA, BrdU, ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いて測定した。

<菊地：皮膚計測工学によるナノマテリアルの経皮毒性指標の検討>

7-11週齢のヘアレスマウス(Hos:HR-1)の背部皮膚に、以下の試料を1日目から5日目、8日目から11日目に塗布し(6日目と7日目は無塗布)、1日目の試料塗布前、5日目の試料塗布前、12日目に皮膚計測を施行した。試料塗布前および皮膚計測前には、ネブタールを腹腔内注射による麻酔を施行した。12日目の皮膚計測を施行後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、背部の皮膚を採取し、病理組織学的検討および炎症性サイトカインの定量を行った。

試料

1) コーティング有り径30nm TiO₂ (以下C+)

2) コーティング無し径30nm TiO₂ (以下C-)

溶媒はシリコンD5を用い、TiO₂は20%(w/w)濃度にした。陽性対照として、皮膚傷害性が知られているラウリル硫酸ナトリウムSLSを用いた。

生体計測工学的指標

マウスの背部皮膚を蒸留水で湿らせたコットンで残存する試料を取り除き、5-10分風乾後に測定した。計測環境条件は、冬期に施行し、室温21℃-23℃、相対湿度9-11%RHであった。秋に施行したときは、試験期間中に相対湿度が52.2%RHから17.2%RHに高湿度で開始しその後大きく低下したために経時の変化が大きかったため、この報告書では、冬期に再試したデータを記載した。

1) 角層水分量の指標として、高周波伝導度をスキコン®200 (I. B. S. 社)を用いて測定した。2) 角層水分バリア機能の指標として、経表皮水分喪

失量 transepidermal water loss (TEWL)をH4300型水分蒸発量測定器(日機装サーモ株式会社)で測定した。3) 皮膚色を色彩色差計CR300(コニカミノルタ)で計測し、L*a*b*標識系で評価した。

病理組織学的検索

12日目に採取した皮膚について解析中である。

炎症性サイトカインの定量

12日目に採取した皮膚を凍結保存し、real-time PCR解析によって、IL-1 α 、TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインの定量を行っている。

<藤井：ナノマテリアルの経皮吸収に及ぼす因子解析に関する研究>

Yucatan micropig 摘出 intact skin 及び3種のバリア機能低下皮膚にFD-4溶液適用後、皮膚各部位中のFD-4を定量し、また、皮膚断面の蛍光を観察した。

倫理面への配慮

実験は動物保護および倫理指針を遵守し、各所属施設または委託先における実験倫理委員会の審査を経て、実験動物に対する動物愛護を配慮して実施された。

C. 研究結果

<津田>

【実験1】投与時のTiO₂の状態：100mg/0.5mLにてpentalanに懸濁してスライドガラスに滴下して観察したところ1時間以上放置した場合に、光学顕微鏡で観察できる粒子が散見された。直径200nmより大きい凝集塊が混在していたと考えられた。

TiO₂の臓器分布：屠殺時におけるTiO₂の組織分布量($\mu\text{g/g}$ 湿重量)は高用量群(100mg x 2/週)(pentalan投与群)は値の大きい順に、皮膚10.9 \pm 5.10 (2.45 \pm 2.82)、肺6.72 \pm 3.13 (3.26 \pm 0.57)、肝5.75 \pm 1.04 (1.31 \pm 1.82)、脳(大脳+小脳)4.79 \pm 1.39 (2.45 \pm 2.82)、脾5.35 \pm 0.77 (4.04 \pm 0.64)、腎2.12 \pm 2.06

(1.38±1.89)であった。皮膚、肺、肝、脾において対象と有意であった。

皮膚腫瘍病変：皮脂腺上皮過形成/上皮腫+扁平上皮乳頭腫+扁平上皮がんを併せた病変(数/ラット)は、Tg群で、溶媒群 1.81±1.8、週1回群 4.1±2.8、週2回群 7.1±4.2、TPA群 10.2±3.80 であって、週2回群とTPA群に有意の増加

(P<0.01)が見られた。Wild群で、溶媒群 0.17±0.39、週1回群 0.30±0.48、週2回群 0.80±0.92 であり、週2回群で有意の増加 (P<0.05)を認めた。腫瘍病変の屠殺時の肉眼的な直径計測から得た皮膚上の面積(mm²/ラット)は、Tg群で、溶媒群 97±150、週1回群 142±182、週2回群 249±211 であった。陽性対照のTPA群ではTgで 359±219 であり有意(P<0.05)の増加であった。Wild群では差は無かった。

乳腺腫瘍は、Tg群で腫瘍の重量(g/ラット)は、溶媒群 1.0±2.4、週1回群 17.7±15.5、週2回群 8.6±12.3、TPA群 11.4±9.3 であって、週1回群で有意の増加(P<0.05)が見られた。発生頻度では溶媒群 16.7%、週1回群 66.7%、週2回群 45.5%、TPA群 83.3% であって、TPA群が増加した(P<0.05)。Wild群では差はなかった。

【実験2】UVB発がんのプロモーション作用による発がん性検索

経過中にある。皮膚ではUVBによる発がんイニシエーション作用はDMBAに較べて弱いために腫瘍の発生数が少なく、現時点ではデータは得ていない。一方、乳腺では触知できる腫瘍の発生は、UVB照射単独よりも照射後にTiO₂を塗布した群により多い傾向が観察されている。

<徳永>

一般状態、体重、摂餌量、剖検及び器官重量では、いずれの群でも被験物質投与に起因する変化は認めなかった。飲水中のチタン量は1.90~2.41 ppb、餌中のチタン量は5.99 µg/g であった。雄の皮膚中のTiO₂：皮膚秤取量、同一試料で3回測定したデータの平均値から硝酸・過酸化水素混液のブランク値を差し引いた値、検量線から求めたTiO₂の量(ppb)、皮膚1g中のTiO₂の量(µg/g)

を得た。コントロール中にはTiO₂が含まれていないが、比較のため、T量として検量線から得られた値を1.668倍して酸化TiO₂に補正して示した。各々のデータでは、被覆化TiO₂で処理した皮膚の平均値の4.33±3.41 µg/g(S.D.)の様なバラツキの大きいものとTiO₂(250 nm)での皮膚の平均値4.33±0.20 µg/g(S.D.)の様にバラツキが小さいものがあった。したがって、毛のう孔に入り込んだTiO₂が測定値のバラツキであると考えてテープで20回ストリッピングを行い、皮膚表面の角質を除去した試料で測定した。統計処理は、one way ANOVAのDunnett's Multiple Comparison Testで行った。コントロール皮膚、TiO₂(35 nm) 2%、10%、被覆化TiO₂(35 nm) 10%、TiO₂(250 nm)で処理した群において、28日間のTiO₂の閉塞貼付の試験により、背部の適応部位の酸化TiO₂量は明らかに増加していた。角質内のTiO₂は除去されているため、測定値は皮膚組織への沈着と考えられた。

毛胞部に滞留するTiO₂は、毛胞部に存在する毛細血管を通じて血液中に移行する可能性が考えられる。また、皮膚真皮層に吸収されたTiO₂は皮膚組織中のリンパ細胞に貪食され、リンパ管を通じて全身に行き渡る可能性が考えられる。全身に分布した場合を考え、検討対象に肝、脳、脾、腎さらにTiO₂の気中への放散を考え、肺を加えた。

雄の肝のTiO₂量：肝ではTiO₂(35 nm)の場合、コントロールと比較して統計的に有意な差が観察されたが、その差は僅かなものであった。腎では、2%および10%とコーティングTiO₂(35 nm)の10%群で有意差が観察された。経皮吸収されたTiO₂が腎に到達することが示された。脾および脳の場合も増加はなかった。

以上から、雄の皮膚では、コントロールに比べて各群で統計的に有意な差(p<0.05)が観察され、28日間投与により、皮膚(毛胞を含む)への蓄積が観察された。臓器別に見た場合、ラット雄の肝臓において、TiO₂(35 nm) 10%で統計的に有意な差が観察された。また、腎臓において、TiO₂(35 nm)

2%及び10%と被覆化TiO₂(35 nm) 10%でコントロールに比べて統計的に有意な差が観察された。しかし、肺、脾臓及び脳では、コントロールと比べて差が認められなかった。

雌の皮膚のTiO₂：

コントロールの皮膚に比べ、TiO₂ (35 nm)の10%の適用の場合に統計的に有意な差が観察されたが、各平均値のバラツキが大きいためはまだ結論できない。

雌の肝、腎、肺、脾、脳のTiO₂量：肝、腎、肺、脾、脳とも有意差はなかった。雄の肝と腎の場合には有意の増加が観察されたが、雌では差が認められなかった。TiO₂の皮膚から吸収の可能性を慎重に検討する必要がある。雄と雌のラットの違いによるものとも考えられるが、実験に用いる動物数を増やして再度実験を実施し、統計的な解析を行う必要があることが示唆された。

以上から、ラット雌の場合には、経皮的にTiO₂が吸収されない可能性が示された。

<宮澤>

耳介腫脹反応：テープストリッピング後にTiO₂を塗布した群(ⅡおよびⅣ群)においては対照群(ⅠおよびⅢ群)に比し、耳介の肥厚傾向が認められたが、35nmと250nmの粒子サイズによる差はなかった。また、35nmのサイズでTiO₂のコーティングによる影響は認められなかった。

病理組織学的検査：テープストリッピングの実施により表皮細胞層の肥厚が認められた。テープストリッピングの影響は、耳の中央部で最も強く、媒体対照群でも、痂皮を形成している個体が認められた。TiO₂塗布群において、媒体のみを塗布した対照群と比べ広域に表皮細胞層の肥厚が確認された。0.5% DNCB塗布およびTiO₂塗布群において、表皮細胞層の肥厚だけでなく、より広い領域でリンパ球を主体とする炎症性細胞の浸潤や肥満細胞の脱顆粒が観察された。TiO₂は250nm検体で角質層上に粒子状物質として観察されたが、35nm検体では、凝集体として観察された。どちらも毛に付着し、毛孔内まで入り込んでいた。

リンパ節の細胞増殖反応：耳下リンパ節重量は、

0.5%DNCB塗布群で対照群の3~5倍に腫大し、BrdU取り込み率も6~12倍の高値を示した。粒子径およびコーティングによる差も認められなかった。

<菊地>

陽性対照の10%SLS a. q. は4日間塗布で紅斑、鱗屑が出現したので、4日塗布後の計測後、マウスを安楽死させ皮膚を採取した。

生体計測工学的指標：

1) 角層水分量

指標である高周波伝導度は、溶媒塗布群や無塗布群に比べ、C+群、C-群で低下傾向を認めた。10%SLSはあまり変化なかった。

2) 角層水分バリア機能

角層水分バリア機能指標である経表皮水分喪失量は、10%SLSを4日塗布後、著明に上昇した。溶媒塗布群や無塗布群に比べ、C+群、C-群で上昇傾向を認めた。

3) 皮膚色

L*a*b*標識系は、Lが色の明るさを示し、aが赤-緑方向の色度を、bが黄-青方向の色度を表す。L*値が大きいかほど白く明るい色であり、a*値が大きいかほど赤-緑方向で赤方向の色度が強く、b*値が大きいかほど黄-青方向で黄方向の色度が強いことを示している。10%SLSを4日塗布後、肉眼的にも紅斑の出現を認めた。赤-緑の色度を示すa*値が10%SLSで上昇した(より赤の色度が増した)が、C+群、C-群は、溶媒群や無塗布群と比べ有意な変化を認めなかった。黄-青の色度を示すb*値は10%SLSで上昇(より黄の色度が増す)傾向であったが、C+群、C-群は、溶媒群や無塗布群と比べて有意な差はなかった。色の明度を示すL*値は、10%SLS、C+、C-のいずれの群においても、溶媒群や無塗布対照群と比べて有意な変化はなかった。塗布部位皮膚の病理組織学的検討および炎症性サイトカインの解析を実施中である。

<藤井>

Intactでは生きた組織中へのFD-4の移行は認められなかったが、損傷の程度により皮膚移行性が上昇した。

D. 考察

<津田>

雄ラットにおいて、皮膚に塗布したTiO₂は、塗布部位から離れた肝に検出された。脳（大脳+小脳）、脾、腎では有意ではなかった。この観察から、少なくとも肝にトランスロケーションする可能性が示された。この実験ではグループ飼育であった為に、塗布したTiO₂が能動または受動的行為によって、経口摂取された可能性を否定し得ない為に、一匹飼にて再検討している。この実験で用いたTgラットは皮膚発がん高感受性であるため短期に腫瘍の発生に至ったが、腫瘍の発生数は少ないがwild型にも同様の傾向が見られているので、Tgに特有な現象ではなく、一般化出来る現象と考える。従ってTgを用いるこの試験法は通常（40-50週）より短期（30週以内）にそのプロモーション活性によって弱い発がん性を評価出来る試験系と考える。また、このTgは雄でも乳腺発がん感受性が高い為に、TiO₂の皮膚塗布によって離れた乳腺においても腫瘍発生の増加が観察されたが、その機序について今後の検討が必要である。

<徳永>

雄の皮膚では、皮膚（毛胞を含む）への蓄積が観察された。臓器別に見た場合、肝臓において、TiO₂(35 nm) 10%で統計的に有意な差が観察された。また、腎臓において、TiO₂(35 nm) 2%及び10%と被覆化TiO₂(35 nm) 10%でコントロールに比べて統計的に有意な差が観察された。しかし、肺、脾臓および脳では、コントロールと比べて差が認められなかった。一方、雌の皮膚では、コントロールの皮膚に比べ、10% TiO₂(35 nm)の有意に増加したが、投与群によるバラツキが大きく一定の傾向をみる事ができなかった。肝、腎、肺、脾および脳中のTiO₂量はコントロール差がなく、雌の場合には、経皮的にTiO₂が吸収されない可能性が示された。

従って、ラットの雄と雌での経皮的なTiO₂の臓器への異なる分布結果が得られた。動物数を増やし、使用するTiO₂を絞り込んで、再度の検討が

必要であることが示唆された。

<宮澤>

耳下リンパ節の重量-体重比とBrdUのELISA値との相関は0.80であったことから、リンパ節重量とBrdUの取り込み量には正の相関が認められた。一方、耳介腫脹反応と耳下リンパ節重量-体重比の相関は低く、ヒスタミン等のケミカルメディエーターを指標とした耳介腫脹反応の測定系を検討する必要があると考える。耳下皮膚組織像はTiO₂塗布群のほうが、溶媒群より耳介全体で表皮細胞層の肥厚または真皮での炎症性細胞の浸潤が多く認められ、腫脹反応の結果と相関した。剖検時の観察では、TiO₂は耳の辺縁部に多く付着していたことから、テープストリッピングの影響が強い中央部だけでなく、辺縁部でも炎症反応が強化されたと考えられる。以上から、TiO₂には感作性はないものの、軽度のアジュバント効果を有し、免疫系を賦活化する可能性が示唆された。

各検体のTiO₂塗布群の耳下リンパ節重量-体重比は、テープストリッピングや塗布を行わない群より有意に高かった(データ未表示)。したがって、バリア機能が傷害された皮膚において、TiO₂単独でも軽度の刺激性を有し、炎症を増悪させる可能性が示された。しかし、いずれの現象においても、粒子径やコーティングによる差は認められなかった。今後は、皮膚における炎症の相違を多角的に解析する必要があると考える。以上から、バリア機能が傷害された皮膚において、TiO₂は軽度のアジュバント効果を有し、炎症を増悪させ、免疫系を賦活化する可能性が示唆された。これらの作用には、粒子径やコーティングによる影響の差は認められなかった。

<菊地>

30nmのTiO₂(コーティング有りC+、無しC-)をシリコンD5に懸濁して塗布した時の、皮膚角層機能と、皮膚色に関して生体工学的手法を用いて検討した。検討したマウス数(n=5)は少ないが、9日間の塗布にて、C+、C-はともに、角層水分量の低下、角層水分バリア機能の低下を来し

うる可能性が示唆された。しかし、紅斑や鱗屑の発症など、肉眼的に皮膚炎の惹起は確認されず、また、皮膚色には変化はみられなかった。これらの変化がナノ粒子特有であるかについて検討が必要である。

今後、テープストリッピングを施行後の皮膚に試料を塗布する実験を行い、ナノサイズTiO₂の傷害皮膚へ塗布した場合の皮膚の変化について、生体計測工学的的手法および病理組織学的検討と炎症性サイトカイン定量を行う予定である。塗布部位の病理組織学的検討および炎症性サイトカイン定量は進行中である。

以上から、径30nmのナノサイズ粒子（コーティング有りC+、無しC-）のTiO₂をシリコンD5に懸濁した20%液をヘアレスマウスの背部皮膚に計9日間（途中に無塗布した2日を挟む）塗布したところ、角層水分量指標である高周波伝導度の低下と角層水分バリア機能の指標の経表皮水分喪失量の上昇傾向が示された。ナノ粒子に特徴的な所見であるのか、より大きな径のTiO₂でも起こりうるのか確かめる必要がある。

<藤井>

FD-4は1nmといわゆるナノマテリアルに比べ小さい物質ではあるが、損傷により通常は皮膚透過しない物質が皮膚透過する可能性が示された。皮膚の状態により、ナノマテリアルの吸収性が異なることが示唆されたので、さらに20nm程度の物質についても検討が必要である。

<まとめ>

以上から、ルチル型無コーティングナノサイズTiO₂は、皮膚に塗布した場合に、皮膚および乳腺発がんのプロモーション作用を示し、発がん性を比較的短い期間に評価できる系の実用化に向けた基礎的情報が得られた。雄ラットで、無コーティング型TiO₂は皮膚、肝、腎、コーティング型では皮膚に蓄積量が有意に増大していた。雌ラットでは、無コーティング型で皮膚で有意に上昇していたが、肝、腎、肺、脾および脳では対照群レベルであった。ウサギの耳介において、表皮細胞層の肥厚だけでなく、より広い領域でリンパ球を主

体とする炎症性細胞が観察された。マウスのバリア機能が傷害された皮膚には、軽度のアジュバント効果を有し、炎症を増悪させる可能性が示唆された。またバリア機能の指標の経表皮水分喪失量の増加傾向が示された。

F. 健康危機情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ueda, S., Ohshima Y., Fukamachi, K., Shirai, T., Hirano, S., Matsuda, E., and Wakabayashi, K. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1013-1019, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ナノマテリアルの経皮毒性に関する評価手法開発に関する研究

ナノマテリアルの経皮的な吸収・分布に関する研究

分担研究者 徳永 裕司 国立医薬品食品衛生研究所 部長

研究要旨

化粧品の紫外線遮蔽剤として広く利用されている酸化チタンを取り上げ、ナノマテリアルの酸化チタンをラット雌雄の背部皮膚に28日間の閉塞パッチ状態で適用し、酸化チタンの皮膚からの経皮吸収の可能性を肝臓、腎臓、肺、脾臓及び脳を用いて検討したので報告する。

1. 28日間の投与期間を通じてラットの死亡の発生はなく、一般状態でも全例で何ら異常は認められなかった。また、体重、摂餌量、剖検及び器官重量では、いずれの群でも被験物質投与に起因する変化は認められなかった。投与期間中の飲水中のチタン量は1.90～2.41 ppbの範囲であり、餌の中のチタン量は5.99 $\mu\text{g/g}$ であった。
2. ラット雄の皮膚では、コントロールに比べて各群で統計的に有意な差($p < 0.05$)が観察され、28日間投与により、皮膚(毛胞を含む)への蓄積が観察された。臓器別に見た場合、ラット雄の肝臓において、酸化チタン(35 nm) 10%で統計的に有意な差が観察された。また、腎臓において、酸化チタン(35 nm) 2%及び10%と被覆酸化チタン(35 nm) 10%でコントロールに比べて統計的に有意な差が観察された。しかし、肺、脾臓及び脳では、コントロールと比べて差が認められなかった。
3. ラット雌の皮膚では、コントロールの皮膚に比べ、酸化チタン(35 nm)の10%の適用の場合に統計的に有意な差が観察されたが、各平均値のバラツキが大きく、酸化チタンを適応したものであっても統計的に有意な差($p < 0.05$)を得ることができなかった。肝臓、腎臓、肺、脾臓及び脳中の酸化チタン量はコントロールと比べて差がなく、ラット雌の場合には、経皮的に酸化チタンが吸収されないとの結果が示された。
4. ラットの雄と雌での経皮的な酸化チタンの臓器への蓄積性が肝臓及び腎臓で異なる結果が得られた。動物数を増やし、使用する酸化チタンを絞込んで、再度の検討が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

ナノメートル (nm)とは、10億分の1mのことを表す長さの単位である。ナノマテリアルとは、1～100 nmの大きさで、その構造を制御した物質を呼んでいる。化粧品の世界では、紫外線遮蔽剤の原料として、酸化チタン及び酸化亜鉛が消費者の美容上の要望から1990年代から使われ始めた。特に、化粧品の場合、紫外線の吸収により酸化チ

タンから生ずる活性酸素の発生を極力抑えるため、ナノマテリアル化された酸化チタンあるいは酸化亜鉛の表面を水酸化アルミニウム、シリカ、ジメチコンなどで表面処理した製品が化粧品の用途(クリーム、乳液、口紅)に応じて使われている。

2000年、米国のクリントン大統領がNational Nanotechnology Initiativeを発表したのをきっかけにナノテクノロジーにより製造されるナノマテリアルが世界的に注目され始めた。ナノテクノロジー

一は、現在非常な注目を集めている科学技術であり、エレクトロニクス、医療応用、環境改善を始めとして、人類に非常に大きな貢献をもたらすものとして期待されており、その経済効果も大きいと予想されている。

大きなベネフィットへの期待の一方で、科学技術である以上、リスクは必ず存在する。リスクを最小に抑えながらその発展を図ろうとするいわゆる「責任あるナノテクノロジーの展開」は、世界的な合意事項となっている。ナノ材料の製造・製造されたナノ材料の使用の現場、研究開発現場でのナノ材料の取り扱いにおいて、取扱者の健康・環境への影響がないように管理することは重要な一環である。材料がナノサイズになることにより、新たなリスクがあるかどうかについては、現時点において、研究の蓄積が少なく、国際的な合意はまだ形成されていない。研究者、作業員へのリスクを最小にするためには、有害性が不確定であれば、暴露量の管理を行う必要がある。

ナノテクノロジーの安全性について議論される場合の対象は、ナノ粒子である。生体への侵入経路は、エアロゾルの形態から呼吸による可能性が高い。しかし、化粧品を考えた場合は、経皮吸収の可能性を加味する必要がある。

本年度は、化粧品の紫外線遮蔽剤として広く利用されている酸化チタン及び酸化亜鉛を取り上げ、ナノマテリアルの酸化チタンあるいは酸化亜鉛をラットの背部皮膚に 28 日間の閉塞パッチ状態で適用し、酸化チタンあるいは酸化亜鉛の皮膚からの経皮吸収を肝臓、腎臓、肺、脾臓及び脳への移行の可能性として検討したので報告する。なお、酸化亜鉛に関する動物実験を実施したが、分析を含めた十分な検討が出来なかったため、来年度の報告にまとめて掲載することとした。ラットを用いた動物実験は、株式会社パナファーム・ラボラトリーズ（現、三菱化学安全科学研究所・熊本研究所）に委託して実施した。

B. 研究方法

B-1. 試薬及び材料

有害金属測定用硝酸、原子吸光用過酸化水素、原子吸光用チタン標準原液 (1000 ppm, 関東化学),

原子吸光用亜鉛標準原液 (1000 ppm, 関東化学), ICP 汎用混合液 (Ce, Li, Tl, Y 1mg/L, 輸入元: 西進商事) を購入して用いた。酸化チタン及び酸化亜鉛はテイカ株式会社, ペンタランは日光ケミカルズ株式会社より提供を受けた。

フェザー替え刃メス及びコルク板は市販品を購入した。

得られた臓器の保存にはサンヨー製 Medical Freezer を用い、 -30°C で保存した。

CEM 社 (Matthews, North Carolina 28105, USA) 製 MARS5 型湿式分解装置は最大出力 1200 W でラフチャーメンブレンで封印された 13 個の HP-500 型テフロン容器をターンテーブルに装着し、各段階の圧力 (圧力センサーでテフロン容器中の温度を制御) をコンピュータ制御しながら測定臓器の疎解を行った。出力は 600 W の 80 % で PSI 80 で 20 分マイクロ波の照射を行い、2 分間の HOLD 状態に置き、冷却する条件を用いた。

ピーク対応のレオダインインジェクターを装着した島津製 LC-10ADVP 型液体クロマトグラフ用ポンプを連結した HP 製 4500 型 ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometer) あるいは Agilent 製 7500 型 ICP/MS を用いた。下表に ICP-MS の操作条件を示した。ポンプはミリ Q 水を 0.7 mL/min で送液した。

Instrument conditions for ICP-MS

Radio frequency power	1500 W
RF matching	1.98 V
Sample depth	8.5 mm
Sample skimmer cones	Pt
Peristaltic pump	0.1 rpm
Argon flow rate	
Plasma	15 L/min
Nebulizer	1.01 L/min
Spray chamber temperature	20°C
Integration time	0.3 sec
measurement time (sec)	55 sec

B-2. 使用動物

CrI:CD(SD)系ラットの雌雄 4 週齢 (雄 60~100 g, 雌 55~95 g) のそれぞれ 36 匹を日本チャールス・リバー株式会社から購入した。入荷時に種, 系統, 週齢, 動物数及び性別を確認し, 一般状態及び外観を観察するとともに体重を測定する。検疫馴化期

間は約2週間とし、この間に一般状態の観察及び体重測定を行い、健康な動物のみを試験に供した。また、投与7日前より動物には首枷を装着するとともに、背部から側腹部を電気バリカンで除毛した。投与開始までの間、除毛は適時に行った。

B-3. 投与実験

ステンレススチール製ケージ(W260 × H200 × D380 mm)に1ケージ当たり1匹を入れ、24°C(許容範囲 21~27°C)、湿度 55%(許容範囲 35~75%)の飼育室で午前7時点灯、午後7時消灯の12時間、換気率 10~20回/時にて、固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取で給餌を行った。飲水は井戸水を使い、次亜塩素酸ナトリウムを添加(約 2 ppm)し、自由摂取で行った。

動物入荷日は、9月4日で2週間の馴化を行い、雄雌それぞれ30匹を選び、雄への投与期間は9月18日~10月16日、雌への投与期間は9月20日~10月18日まで実施した。剖検日は、雄が10月16日、雌が10月18日であった。

B-4. 被験物質と媒体との混合物の調製法及び調製頻度

調製は各物質の各濃度別に行った。なお、調製は調製室A042のドラフト内で実施した。

- (1) 必要量の被験物質を秤量し、最終調製量の約6~8割の媒体を入れたビーカーに入れた。
- (2) (1)を超音波処理(5分程度)して分散液を得た。
- (3) (2)をメスシリンダーに移し、ビーカー内を媒体で数回共洗いし、洗液をメスシリンダーに移した。この操作を数回繰り返す、完全にビーカーを洗い込んだ。
- (4) 媒体を加え、正確に調製液量にメスアップした。
- (5) メスシリンダーを転倒混合後、バイアル瓶に移した。

調整頻度は、8日間に1回以上の頻度で調製した。調製液は、酸化チタン(35 nm)2%液、酸化チタン(35 nm)10%液、被覆酸化チタン(35 nm)10%

液、酸化チタン(250 nm)10%液を調製して用いた。

B-5. 投与方法

ラットの背部の被毛を電気バリカンで除毛し、体表面積の約10%に相当する適用部位を設けた。媒体または被験物質混合物を、経口用チューブを付けた1又は2.5 mLのポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒に量り取り、適用部位皮膚に均一になるように塗布した(ただし、投与部位に損傷がみられた場合はその部分を避けて塗布する)。適用部位は約4×5 cm、5×8 cmないし5×10 cmのリント布で覆い、更にこの上から適用部位より縦横が1 cm大きいリント布で覆い、さらにその上を不透性シート(ブレンダーTM, 3M Health Care)で覆ったのち、伸縮性包帯(SILKYTEX, Alcare社, 15~20 cm)で巻いて固定し、20~24時間閉塞した。20~24時間閉塞後、被験物質混合物、リント布及び伸縮性包帯を除去した。投与部位を微温湯でしめらせたガーゼで拭き、更にティッシュペーパーで水分を取り除いた。なお、除去後、その日の投与を行うまでの間は、投与部位をリント布で覆った。投与容量は、OECDガイドライン427に従い、10 µL/cm²とした。

摂餌量は投与期間を通して週2回の頻度で測定した。更に、投与期間終了日にも測定した。すなわち、13~17時に飼料を入れた給餌器を秤量してケージにセットし、翌日の約24時間後に給餌器をケージから取り出して残量を秤量した。なお、摂餌量の表示日は、残量の測定日とした。

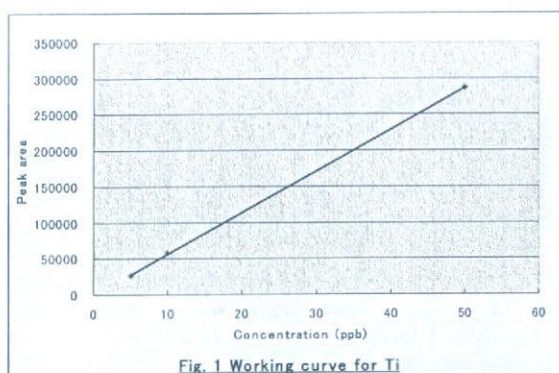
28日間の反復投与実験を実施した。28日間の投与後、剖検後、全例について、各臓器を採取し、低温フリーザー(設定温度;-30°C)内で凍結保存した。なお、投与部位(背部皮膚)については、皮膚は表面をセロハンテープで約20回ストリッピングした後、低温フリーザー(設定温度;-30°C)内で凍結した。

B-6. 臓器中の酸化チタンの測定

凍結された臓器を冷凍庫から取り出し、解凍を行った。フェザー替え刃メス2本を持ち、コルク板上で解凍後の臓器を切断した。切断した臓器約0.1~0.2 gを精密に量り、HP-500型テフロン製容

器に入れ、硝酸/過酸化水素水混液(3:1) 5 mL 及びミリ Q 水 2 mL を正確に加えて密栓した。MARS 5 型 湿式分解装置にテフロン容器 13 個を装着した。B-1 に示した条件に従い疎解を行った。疎解後、30 分間放冷し、ミリ Q 水を加えて正確に 20 mL とし、試料溶液とした。試料溶液 100 μ L を用い、HPLC-ICP/MS に注入し、試料溶液中のチタン量のピーク面積を m/z 47 を用いて測定した。

チタン標準原液を用いて調製した 5, 10 及び 50 ppb の標準溶液 100 μ L を用いて予め作成した検量線より試料溶液中のチタン量を測定した。検量線を Fig. 1 に示した。



B-7. 倫理面への配慮

株式会社パナファーム・ラボラトリーズでの動物実験に関しては、当該機関での動物実験に関する倫理規定に従って、実験動物に対する動物愛護を配慮して実施された。

C. 結果及び考察

試験に用いたラットの群構成は下記であった。

ラットの群構成 (CrI: CD(SD)系)

試験群	投与容量 (μ L/cm ²)	性別	使用動物 数	動物番号
対照	10	雄	6	201~206
		雌	6	251~256
酸化チタン(平均粒子径 35 nm)	2%	雄	6	207~212
		雌	6	257~262
酸化チタン(平均粒子径 35 nm)	10%	雄	6	213~218
		雌	6	263~268
表面処理酸化チタン (平均粒子径 35 nm)	10%	雄	6	219~224
		雌	6	269~274
酸化チタン(平均粒子径 250 nm)	10%	雄	6	225~230
		雌	6	275~280

C-1. 一般状態、体重、摂餌量、剖検、器官重量

C-1-1. 一般状態、体重、摂餌量及び剖検

一般状態に関して、投与期間を通じて全例で症

状及び背部皮膚(投与部位)に異常は認められなかった。

体重の推移は、投与期間を通じて各被験物質投与群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

摂餌量の推移は、投与期間を通じて対照群と各被験物質群との間には差が認められなかった。検査結果は、全例で異常は認められなかった。

C-1-2. 器官重量

酸化チタン(平均粒子径 250 nm)の 10%群では、雄で脾臓の相対重量の高値が見られ、雌で脳の絶対重量の低値が認められたが、絶対もしくは相対重量の変動を伴わない、いずれも片性のみの変化であり、かつ背景データ内(± 2 S.Dの範囲内)の変動であったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

背景データ (CrI: CD(SD)系、10週齢)							
性別	項目(単位)	動物数	平均値	標準偏差	最大値	最小値	+2 S.D.
雌	脳 (g)	60	1.95	0.08	2.14	1.72	2.11
雄	脾臓(g/100 gBW)	60	0.2	0.03	0.28	0.14	0.26

C-1-3. 一般状態、体重、摂餌量、剖検、器官重量の総括

酸化チタンの非臨床試験の一環として、2 及び 10%の酸化チタン(35 nm)、10%の被覆酸化チタン(35 nm)及び 10%の酸化チタン(250 nm)を雌雄 6 匹の CrI: CD (SD)系ラットに 4 週間反復投与し、以下の結果を得た。

投与期間を通じて死亡の発生はなく、一般状態でも全例で何ら異常は認められなかった。また、体重、摂餌量、剖検及び器官重量では、いずれの群でも被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

C-2. 飲水及び餌の中のチタン量

ラットへの投与期間は 9 月 18 日~10 月 17 日の間で 1 週間毎に飲水を採取し、その中のチタン量の測定を行った。飲水中のチタン量は 1.90~2.41 ppb の範囲であった。餌の中のチタン量は 5.99 μ g/g であった。

C-3. ラット雄について

C-3-1. ラット雄の皮膚中の酸化チタン

ラットの雄30匹を5群の6匹ずつをコントロール、酸化チタン(35 nm)の2%及び10%、被覆酸化チタン(35 nm)及び酸化チタン(250 nm)の10%に分け、28日間皮膚投与した。皮膚秤取量、同一試料で3回測定したデータの平均値から硝酸・過酸化水素混液のブランク値を差し引いた値、検量線から求めた酸化チタンの量(ppb)、皮膚1g中の酸化チタンの量($\mu\text{g/g}$)を下記に例示した。

	秤取量(g)	平均値-ブランク	酸化チタン量(ppb)	皮膚中の量($\mu\text{g/g}$)	平均値($\mu\text{g/g}$)	標準偏差
皮膚201-1	0.1218	83216	11.88	1.95	2.16	0.19
皮膚201-2	0.1222	102212	14.19	2.32		
皮膚201-3	0.1013	79577	11.17	2.21		
皮膚202-1	0.1254	96383	13.41	2.14	1.98	0.15
皮膚202-2	0.1478	105084	14.57	1.97		
皮膚202-3	0.1613	106870	14.81	1.84		
皮膚207-1	0.1063	74587	9.54	1.80	2.46	0.58
皮膚207-2	0.1103	114559	15.67	2.84		
皮膚207-3	0.1120	112131	15.30	2.73		
皮膚208-1	0.1094	82683	10.78	1.97	1.85	0.10
皮膚208-2	0.1079	75740	9.72	1.80		
皮膚208-3	0.1145	78851	10.20	1.78		
皮膚213-1	0.1812	483694	64.99	7.17	6.66	1.83
皮膚213-2	0.1074	182136	24.83	4.62		
皮膚213-3	0.1162	352499	47.52	8.18		
皮膚214-1	0.1485	402087	54.12	7.29	6.67	1.21
皮膚214-2	0.1749	342449	46.18	5.28		
皮膚214-3	0.1181	326182	44.01	7.45		
皮膚219-1	0.1160	434680	58.99	10.17	9.54	1.68
皮膚219-2	0.1118	324900	42.68	7.64		
皮膚219-3	0.1305	512292	70.52	10.81		
皮膚220-1	0.1120	335230	44.22	7.90	4.53	3.41
皮膚220-2	0.1179	80489	6.37	1.08		
皮膚220-3	0.1341	245732	30.92	4.61		
皮膚225-1	0.1092	278992	43.78	8.02	6.90	1.22
皮膚225-2	0.1136	207456	31.83	5.60		
皮膚225-3	0.1185	268101	41.97	7.08		
皮膚226-1	0.1123	174101	26.26	4.68	4.53	0.20
皮膚226-2	0.1294	195766	29.88	4.62		
皮膚226-3	0.1489	208792	32.06	4.31		

なお、コントロール中には酸化チタンが含まれていないが、比較のため、チタン量として検量線から得られた値を1.668倍して酸化チタン量に補正して示した。

各々のデータの平均値の標準偏差で見た場合、被覆酸化チタンで28日間処理した皮膚220の3回の平均値の $4.33 \pm 3.41 \mu\text{g/g}$ (S. D.) の様なバラツキの大きいものと酸化チタン(250 nm)での皮膚225の3回の平均値 $4.33 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ (S. D.) の様にバラツキが小さいものがあった。28日間の投与した皮膚をテープで20回ストリッピングを行い、皮膚表面の角層を除いて実験に供している。ラットの背中には毛穴があり、毛穴に入り込んだ酸化チタンが測定値に大きなバラツキを与える原因の一部であると考えた。

C-3-2. ラット雄のコントロールの皮膚と酸化チタン(35 nm)での皮膚中の酸化チタン量の比較

コントロールのラットの皮膚中のチタン量(酸化チタンに換算)の測定値を下記に示した。同一の皮膚での3回の測定値の平均値は個体差のバラツキによるのか $0.076 \sim 2.16 \text{ g/g}$ と大きくバラツキていることが観察された。

コントロールの皮膚中の酸化チタン濃度

	皮膚中の量($\mu\text{g/g}$)	平均値($\mu\text{g/g}$)	標準偏差
皮膚201-1	1.95	2.16	0.19
皮膚201-2	2.32		
皮膚201-3	2.21		
皮膚202-1	2.14	1.98	0.15
皮膚202-2	1.97		
皮膚202-3	1.84		
皮膚203-1	0.75	0.87	0.14
皮膚203-2	0.83		
皮膚203-3	1.03		
皮膚204-1	1.29	1.28	0.19
皮膚204-2	1.46		
皮膚204-3	1.08		
皮膚205-1	-0.24	0.08	0.30
皮膚205-2	0.36		
皮膚205-3	0.11		
皮膚206-1	-0.02	0.70	0.80
皮膚206-2	1.56		
皮膚206-3	0.55		

次に、ナノマテリアルの酸化チタン(35 nm)を用いたときの測定値を下記に示した。

酸化チタン(35 nm)で処理した皮膚

	皮膚中の量($\mu\text{g/g}$)	平均値($\mu\text{g/g}$)	標準偏差
皮膚213-1	7.17	6.66	1.83
皮膚213-2	4.62		
皮膚213-3	8.18		
皮膚214-1	7.29	6.68	1.21
皮膚214-2	5.28		
皮膚214-3	7.45		
皮膚215-1	10.89	7.05	3.32
皮膚215-2	5.25		
皮膚215-3	5.03		
皮膚216-1	25.09	16.22	8.98
皮膚216-2	16.44		
皮膚216-3	7.13		
皮膚217-1	2.14	7.87	5.40
皮膚217-2	8.62		
皮膚217-3	12.86		
皮膚218-1	1.68	4.97	2.85
皮膚218-2	6.51		
皮膚218-3	6.73		

コントロールの皮膚に比べてナノマテリアルの酸化チタン(35 nm)で28日間処理した皮膚の場合、

バラツキも大きいのが明らかにコントロールに比べて高値を与えていることが観察された。コントロール皮膚中の酸化チタン量はチタン量に1.668をかけて酸化チタン量に補正して用いた。

コントロール皮膚、酸化チタン(35 nm) 2 %, 10 %, 被覆化酸化チタン(35 nm) 10 %, 酸化チタン(250 nm)で処理した各群6匹の測定結果を下記に示した。

	(μg/g)						平均値	標準偏差
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		
コントロールの皮膚	2.16	1.98	0.87	1.28	0.08	0.70	1.18	0.80
酸化チタン(35 nm) 2 %	2.46	1.85	6.31	3.64	3.08	4.81	3.69*	1.64
酸化チタン(35 nm) 10 %	6.66	6.68	7.05	16.22	7.87	4.97	8.24*	4.02
被覆化酸化チタン(35 nm) 10 %	6.90	4.53	4.27	5.25	6.70	4.84	5.41*	1.12
酸化チタン(250 nm)	9.54	4.53	6.58	4.00	3.97	3.90	5.42*	2.26

統計処理は、one way ANOVA の Dunnett's Multiple Comparison Test で行い、コントロールとの有意差検定(p<0.05)で行った。有意差があった場合は「*」を平均値の部分に付した。28日間の酸化チタンの閉塞貼付の試験により、背部の適応部位の酸化チタン量は明らかに増加していた。角質部分の20回のテープストリッピングを皮膚試料の作成前に行っているため、角質への酸化チタンの滞留は除かれている。酸化チタンの毛胞部位あるいは皮膚中への滞留が考えられた。

毛胞部に滞留する酸化チタンは、毛胞部に存在する毛細血管を通じて血液中に移行する可能性が考えられる。また、皮膚真皮層に吸収された酸化チタンは皮膚組織中のリンパ細胞に貪食され、リンパ管を通じて全身に行き渡る可能性が考えられる。全身に分布した場合を考え、検討対象に「肝臓」と「脳」を加えた。酸化チタンの閉塞パッチの状態からの気中への放散を考え、対象臓器に「肺」を加えた。リンパ管を通じての移行を考え、対象臓器に「脾臓」を加えた。更に、酸化チタンの排泄を考え、対象臓器に「腎臓」を加えた。

C-3-3. ラット雄の肝臓中の酸化チタン量

コントロール肝臓中の酸化チタン量はチタン量に1.668をかけて酸化チタン量に補正して用いた。

下表にコントロール肝臓、酸化チタン(35 nm) 2 %, 10 %, 被覆化酸化チタン(35 nm) 10 %, 酸化

チタン(250 nm)の各2匹から得られた肝臓の秤取量、ピーク面積、検量線から得られた値(ppb)、肝臓中の量(μg/g)及び3回の測定値の平均値を例示した。平均値に大きな差がないことが観察された。

	秤取量(g)	平均値-ブランク	酸化チタン量(ppb)	肝臓中の量(μg/g)	平均値(μg/g)	標準偏差
肝臓201-1	0.1610	121539	19.17	2.38		
肝臓201-2	0.1366	167441	28.10	4.11		
肝臓201-3	0.1251	179521	30.45	4.87		
肝臓202-1	0.1358	135058	21.80	3.21	3.27	0.75
肝臓202-2	0.1156	98702	14.72	2.55		
肝臓202-3	0.1228	150878	24.88	4.05		
肝臓207-1	0.1057	134863	21.76	4.12	3.58	0.64
肝臓207-2	0.1439	161952	27.03	3.76		
肝臓207-3	0.1973	168507	28.31	2.87		
肝臓208-1	0.1314	125383	19.92	3.03	4.31	1.21
肝臓208-2	0.1037	142432	23.23	4.48		
肝臓208-3	0.1134	181313	30.80	5.43		
肝臓213-1	0.1216	95310	14.06	2.31	2.65	0.44
肝臓213-2	0.1457	116103	18.11	2.49		
肝臓213-3	0.1603	152757	25.24	3.15		
肝臓214-1	0.1137	102140	15.39	2.71	4.14	1.82
肝臓214-2	0.1028	186311	31.77	6.18		
肝臓214-3	0.1336	143811	23.50	3.52		
肝臓219-1	0.1330	55663	21.39	3.22	3.50	0.28
肝臓219-2	0.1743	87750	32.90	3.77		
肝臓219-3	0.1432	65933	25.07	3.50		
肝臓220-1	0.1120	49434	19.16	3.42	3.29	0.42
肝臓220-2	0.1247	59010	22.59	3.62		
肝臓220-3	0.1082	38427	15.21	2.81		
肝臓225-1	0.1929	237615	32.22	3.34	3.19	0.17
肝臓225-2	0.1263	148217	20.32	3.22		
肝臓225-3	0.1433	157196	21.51	3.00		
肝臓226-1	0.1443	58618	8.38	1.16	2.44	1.56
肝臓226-2	0.1072	163767	22.39	4.18		
肝臓226-3	0.1461	103995	14.43	1.97		

コントロール肝臓、酸化チタン(35 nm) 2 %, 10 %, 被覆化酸化チタン(35 nm) 10 %, 酸化チタン(250 nm) 10 %で処理した各群6匹の肝臓から得られた酸化チタンの測定値を下記に示した。

	(μg/g)						平均値	標準偏差
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		
コントロールの肝臓	3.79	3.27	2.98	2.88	4.39	3.08	3.40	0.58
酸化チタン(35 nm) 2 %	3.58	4.32	4.17	5.65	5.31	5.04	4.68	0.78
酸化チタン(35 nm) 10 %	2.40	4.14	6.09	6.12	5.82	5.45	5.00*	1.47
被覆化酸化チタン(35 nm) 10 %	3.19	2.44	3.39	3.38	3.34	3.69	3.24	0.42
酸化チタン(250 nm)	3.50	3.29	3.80	3.54	1.83	2.83	3.13	0.71

酸化チタン(35 nm)の場合、コントロールと比較して統計的に有意な差が観察されたが、その差は僅かなものであった。このデータを持って酸化チタン(35 nm)が皮膚から血流を通して肝臓に蓄積することを判定することは困難であると考えた。

C-3-4. ラット雄の腎臓、肺、脾臓及び脳中の酸化チタン量

コントロール腎臓、酸化チタン(35 nm) 2 %, 10 %, 被覆化酸化チタン(35 nm) 10 %, 酸化チタン(250 nm)で処理した各群6匹の腎臓から得られた酸化チタンの測定値を下記に示した。

	(μg/g)						平均値	標準偏差
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		
コントロールの腎臓	0.46	0.98	1.61	2.02	1.35	0.64	1.18	0.60
酸化チタン(35 nm) 2%	1.75	2.06	2.13	2.79	2.75	2.53	2.34*	0.42
酸化チタン(35 nm) 10%	1.44	1.57	3.00	3.45	3.41	3.45	2.72*	0.96
被覆酸化チタン(35 nm) 10%	1.03	0.64	2.92	2.73	2.51	3.03	2.14*	1.04
酸化チタン(250 nm)	2.68	2.57	2.68	2.85	2.13	2.76	2.61	0.25

腎臓に関しては、酸化チタン(35 nm)の2%及び10%と被覆酸化チタン(35 nm)の10%で統計的に有意な差がコントロールの腎臓との間に観察された。排泄臓器の腎臓中には、コントロールと比較して、多くの酸化チタンが検出された。経皮を通じて吸収する酸化チタンが存在することが示唆された。次に、肺、脾臓、脳中の酸化チタンの測定を行い、その結果を下記に示した。

	(μg/g)						平均値	標準偏差
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		
コントロールの肺	2.09	2.86	2.20	1.91	1.02	1.02	1.85	0.72
酸化チタン(35 nm) 2%	1.82	2.02	0.82	0.93	1.10	0.78	1.24	0.54
酸化チタン(35 nm) 10%	2.68	2.67	2.06	3.05	3.96	2.58	2.83	0.64
被覆酸化チタン(35 nm) 10%	0.70	1.38	3.08	3.92	4.80	3.05	2.82	1.54
酸化チタン(250 nm)	2.80	1.90	2.29	2.52	3.04	2.58	2.52	0.40

	(μg/g)						平均値	標準偏差
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		
コントロールの脾臓	4.44	4.67	3.22	3.28	3.74	4.11	3.91	0.60
酸化チタン(35 nm) 2%	3.28	3.66	4.35	3.60	3.30	3.77	3.66	0.39
酸化チタン(35 nm) 10%	5.03	4.43	2.29	2.39	2.49	2.32	3.16	1.23
被覆酸化チタン(35 nm) 10%	3.79	4.71	5.89	5.89	6.40	5.98	5.44	0.99
酸化チタン(250 nm)	4.32	3.48	4.30	4.47	10.27	7.26	5.68	2.59

	(μg/g)						平均値	標準偏差
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		
コントロールの脳	4.20	4.88	2.22	2.36	3.19	2.38	3.20	1.11
酸化チタン(35 nm) 2%	2.42	1.66	1.14	1.14	0.57	0.98	1.32*	0.64
酸化チタン(35 nm) 10%	4.46	4.29	2.38	2.82	2.54	2.39	3.15	0.97
被覆酸化チタン(35 nm) 10%	2.71	2.37	4.65	4.70	3.85	3.97	3.71	0.97
酸化チタン(250 nm)	4.44	5.18	4.58	4.76	2.85	5.80	4.80	0.99

酸化チタンを投与した肺及び脾臓中の酸化チタン量とコントロールの肺及び脾臓中の酸化チタン量とは、統計的に有意な差が観察されなかった。酸化チタン(35 nm)の2%の脳の場合、コントロールの脳と比較して統計的に有意な差が観察されたが、コントロールと比べて低い平均値であり、酸化チタンの経皮吸収があった場合は、コントロールより高い値を与えることが一般であるとの考えから、何らかの測定上の要因により低い値を与えたものと判断した。

C-3.5. ラット雄の総括

ラット雄の皮膚では、コントロールに比べて各郡で統計的に有意な差(p<0.05)が観察され、28日間投与により、皮膚(毛胞を含む)への蓄積が観察された。臓器別に見た場合、ラット雄の肝臓において、酸化チタン(35 nm) 10%で統計的に有意な差が観察された。また、腎臓において、酸化チタン(35 nm) 2%及び10%と被覆酸化チタン(35 nm) 10%でコントロールに比べて統計的に有意な差が観察された。しかし、肺、脾臓及び脳では、コントロールと比べて差が認められなかった。

C-4. ラット雌について

C-4.1. ラット雌の皮膚中の酸化チタン

ラットの雌30匹を5群の6匹ずつをコントロール、酸化チタン(35 nm)の2%及び10%、被覆酸化チタン(35 nm)及び酸化チタン(250 nm)の10%に分け、28日間皮膚投与した。皮膚秤取量、同一試料で3回測定したデータの平均値から硝酸・過酸化水素混液のブランク値を差し引いた値、検量線から求めた酸化チタンの量(ppb)、皮膚1g中の酸化チタンの量(μg/g)を下記に例示した。

	秤取量(g)	平均値-ブランク	酸化チタン量(ppb)	皮膚中の酸化チタン量(μg/g)	平均値(μg/g)	標準偏差
皮膚251-1	0.1079	53643	27.37	5.074	5.8	0.6
皮膚251-2	0.1363	84762	41.73	6.123		
皮膚251-3	0.1129	70432	35.12	6.221		
皮膚252-1	0.1251	64315	32.30	5.163	5.3	1.3
皮膚252-2	0.1527	61909	31.19	4.085		
皮膚252-3	0.1104	74492	36.99	6.701		
皮膚257-1	0.1037	77331	22.29	4.30	4.04	0.29
皮膚257-2	0.1167	75569	21.78	3.73		
皮膚257-3	0.1217	86389	24.91	4.09		
皮膚258-1	0.1090	139096	40.15	7.37	10.02	2.39
皮膚258-2	0.1115	231740	66.94	12.01		
皮膚258-3	0.1057	195574	56.48	10.69		
皮膚263-1	0.1105	254456	73.51	13.31	17.01	7.32
皮膚263-2	0.1052	463061	133.83	25.44		
皮膚263-3	0.1153	245342	70.88	12.29		
皮膚264-1	0.1108	117755	33.98	6.13	8.53	2.51
皮膚264-2	0.1023	197342	57.00	11.14		
皮膚264-3	0.1011	145480	42.00	8.31		
皮膚269-1	0.1411	117913	66.33	9.40	9.61	0.68
皮膚269-2	0.1193	109884	61.87	10.37		
皮膚269-3	0.1301	104690	58.98	9.07		
皮膚270-1	0.1326	110646	62.29	9.40	10.18	2.18
皮膚270-2	0.1279	96439	54.39	8.50		
皮膚270-3	0.1078	121179	68.15	12.64		
皮膚275-1	0.1221	91207	32.79	5.37	5.804	0.579
皮膚275-2	0.1295	116324	41.84	6.46		
皮膚275-3	0.1065	82683	29.72	5.58		
皮膚276-1	0.1099	90677	32.60	5.93	5.143	0.686
皮膚276-2	0.1122	73191	26.29	4.69		
皮膚276-3	0.1233	82488	29.65	4.81		

コントロールの皮膚中の酸化チタン量(補正後)に比べ、酸化チタンの背面皮膚への28日間の閉塞パッチにより、酸化チタン量の増加が観察された。各群の皮膚中の酸化チタン量をまとめて下記に示した。