

	(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	5.81	5.32	3.65	0.98	3.15	2.88	3.63	1.75	
酸化チタン(35 nm) 2%	4.04	10.02	1.24	1.40	1.37	1.26	3.22	3.50	
酸化チタン(35 nm) 10%	17.01	8.53	23.01	34.24	7.78	7.81	16.40*	10.70	
被覆化酸化チタン(35 nm) 10%	5.80	5.14	9.61	6.32	5.90	5.93	6.45	1.59	
酸化チタン(250 nm)	9.61	6.79	3.49	11.02	12.74	5.77	8.24	3.48	

雌の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いものも観察された。

#### C-4.2. ラット雌の肝臓中の酸化チタン量

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。

	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251-1	0.1376	84466	47.73	6.94	7.219	0.41
肝臓251-2	0.1098	74573	42.23	7.69		
肝臓251-3	0.1239	76931	43.54	7.03		
肝臓252-1	0.1250	77367	43.78	7.00	7.154	0.35
肝臓252-2	0.1196	79810	45.14	7.55		
肝臓252-3	0.1367	83541	47.21	6.91		
肝臓257-1	0.1280	40751	14.78	2.31	3.340	0.91
肝臓257-2	0.1406	77559	28.42	4.04		
肝臓257-3	0.1495	74864	27.42	3.67		
肝臓258-1	0.1575	80041	29.34	3.73	3.311	0.45
肝臓258-2	0.1462	67349	24.64	3.37		
肝臓258-3	0.1100	42957	15.60	2.84		
肝臓263-1	0.1669	122675	68.98	8.27	7.937	1.94
肝臓263-2	0.1036	88914	50.20	9.69		
肝臓263-3	0.1512	78199	44.24	5.85		
肝臓264-1	0.1960	108684	61.20	6.24	6.634	0.43
肝臓264-2	0.2077	131257	73.75	7.10		
肝臓264-3	0.1051	60594	34.45	6.56		
肝臓269-1	0.1143	58975	23.23	4.07	4.818	0.78
肝臓269-2	0.1318	79629	31.37	4.76		
肝臓269-3	0.1093	78056	30.75	5.63		
肝臓270-1	0.1139	67578	26.62	4.67	4.941	0.43
肝臓270-2	0.1656	98987	39.00	4.71		
肝臓270-3	0.1326	91491	36.05	5.44		
肝臓275-1	0.1429	74954	27.46	3.84	3.492	0.569
肝臓275-2	0.1154	45031	16.36	2.84		
肝臓275-3	0.1044	54369	19.83	3.80		
肝臓276-1	0.1582	73276	26.84	3.39	3.895	0.710
肝臓276-2	0.1048	51568	18.79	3.59		
肝臓276-3	0.1266	81273	29.80	4.71		

例示で示した雌のコントロールの肝臓(肝臓251と251)の方が高い酸化チタンの含量を示す場合が観察された。

雌のコントロール肝臓、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)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	7.22	7.15	2.95	2.97	2.44	3.71	4.41	2.19	
酸化チタン(35 nm) 2%	3.34	3.31	4.43	5.63	4.12	3.48	4.05	0.90	
酸化チタン(35 nm) 10%	7.94	6.63	4.76	4.31	3.64	4.78	5.34	1.61	
被覆化酸化チタン(35 nm) 10%	3.49	3.90	4.62	3.50	3.13	3.19	3.64	0.55	
酸化チタン(250 nm)	4.82	4.94	5.67	5.35	7.68	7.27	5.95	1.22	

one way ANOVA の Dunnett's Multiple Comparison Test を用いた統計処理をコントロールとの有意差検定(p<0.05)で行ったが、コントロールとの統計的に有意な差が観察されなかった。雄の肝臓の場合、酸化チタン(35 nm)の10%での28日間の処理の場合、コントロールと比較して統計的に有意な僅かな差が観察されたが、雌の肝臓では差が認められなかった。ナノマテリアルの酸化チタンの皮膚から吸収の可能性を慎重に検討する必要があることが考えられた。

#### C-4.3. ラット雌の腎臓中の酸化チタン量

ラット雌のコントロール腎臓、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) 10%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。

	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
腎臓251-1	0.1208	153525	39.82	6.59	6.65	0.55
腎臓251-2	0.1071	126971	32.81	6.13		
腎臓251-3	0.1013	141270	36.58	7.22		
腎臓252-1	0.1059	125663	32.47	6.13	7.47	1.28
腎臓252-2	0.1101	161376	41.89	7.61		
腎臓252-3	0.1243	207170	53.97	8.68		
腎臓257-1	0.1033	32796	7.06	1.37	1.45	0.39
腎臓257-2	0.1277	51082	11.95	1.87		
腎臓257-3	0.1292	33253	7.18	1.11		
腎臓258-1	0.1154	28195	5.63	1.01	0.76	0.27
腎臓258-2	0.1124	16545	2.72	0.48		
腎臓258-3	0.1117	23129	4.48	0.80		
腎臓263-1	0.1066	126338	32.64	6.12	6.38	0.43
腎臓263-2	0.1221	144689	37.49	6.14		
腎臓263-3	0.1056	140069	36.27	6.87		
腎臓264-1	0.1082	133060	34.42	6.36	6.27	0.40
腎臓264-2	0.1193	152076	39.43	6.61		
腎臓264-3	0.1016	114864	29.62	5.83		
腎臓269-1	0.1081	26603	12.27	2.27	3.00	0.81
腎臓269-2	0.1071	49145	20.71	3.87		
腎臓269-3	0.1144	37650	16.41	2.87		
腎臓270-1	0.1004	28621	13.02	2.59	1.94	0.57
腎臓270-2	0.1130	19505	9.61	1.70		
腎臓270-3	0.1138	17204	8.75	1.54		
腎臓275-1	0.1034	58761	14.00	2.71	1.51	1.04
腎臓275-2	0.104	26516	5.38	1.03		
腎臓275-3	0.1121	23105	4.47	0.80		
腎臓276-1	0.1078	15430	2.42	0.45	0.74	0.30
腎臓276-2	0.1264	23574	4.59	0.73		
腎臓276-3	0.1472	35373	7.75	1.05		

雌ラットのコントロールの腎臓中の酸化チタン量が酸化チタンを28日間閉塞パッチして処理したのものよりも大きな値を示すことが観察された。



雌のコントロール腎臓、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)							
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均値	標準偏差
コントロールの腎臓	6.65	7.48	3.42	2.25	2.51	1.31	3.94	2.53
酸化チタン(35 nm) 2%	1.45	0.77	2.54	2.10	1.71	1.57	1.69*	0.60
酸化チタン(35 nm) 10%	6.38	6.27	5.90	6.10	5.50	5.35	5.92	0.42
被覆化酸化チタン(35 nm) 10%	1.51	0.74	4.46	3.50	4.23	3.28	2.95	1.50
酸化チタン(250 nm)	3.00	1.94	1.46	1.12	1.61	1.57	1.78*	0.65

酸化チタン(35 nm)の2%と酸化チタン(250 nm)の10%でコントロールよりも低い値で統計的に有意な差が観察された。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。

ラット雄の腎臓の場合、酸化チタン(35 nm)の2%及び10%と酸化チタン(250 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。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。

#### C-4.4. ラット雌の肺、脾臓及び脳中の酸化チタン量

雌のコントロール肺、脾臓、脳及び酸化チタン(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匹の肺、脾臓、脳から得られた酸化チタンの測定値を下記に示した。

	(μg/g)							
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均値	標準偏差
コントロールの肺	1.05	0.83	5.60	4.75	2.73	2.85	2.97	1.92
酸化チタン(35 nm) 2%	5.56	5.67	3.27	3.34	3.07	2.77	3.95	1.31
酸化チタン(35 nm) 10%	1.59	0.58	2.67	3.67	2.00	2.77	2.21	1.07
被覆化酸化チタン(35 nm) 10%	3.56	2.84	1.46	1.38	0.81	0.49	1.76	1.20
酸化チタン(250 nm)	1.09	0.52	0.27	0.00	0.04	0.04	0.33*	0.42

	(μg/g)							
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均値	標準偏差
コントロールの脾臓	4.03	3.54	2.38	2.13	0.77	0.30	2.19	1.47
酸化チタン(35 nm) 2%	7.10	1.29	4.09	4.58	3.26	3.42	3.95	1.90
酸化チタン(35 nm) 10%	2.84	2.43	3.80	2.97	2.33	1.71	2.68	0.71
被覆化酸化チタン(35 nm) 10%	0.02	0.00	2.35	3.82	0.85	0.56	1.26	1.52
酸化チタン(250 nm)	0.59	0.16	0.24	0.05	5.68	4.96	1.95	2.63

	(μg/g)							
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	平均値	標準偏差
コントロールの脳	4.00	4.12	4.29	3.02	1.81	1.25	3.08	1.30
酸化チタン(35 nm) 2%	3.49	2.67	0.57	0.39	3.10	7.08	2.88	2.43
酸化チタン(35 nm) 10%	4.05	3.91	4.46	4.97	4.18	3.96	4.25	0.40
被覆化酸化チタン(35 nm) 10%	1.04	0.78	3.46	3.18	3.10	3.78	2.56	1.30
酸化チタン(250 nm)	2.83	2.03	1.48	1.20	4.39	4.08	2.67	1.34

ラット雌の肺の酸化チタン(250 nm)の10%でコントロールの平均値に比べて低い値での統計的に有意な差が観察されたが、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。

それ以外の脾臓あるいは脳では、コントロールと比べて統計的に有意な差が観察されなかった。

#### C-4.5. ラット雌の総括

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。

#### D. 結論

- 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%と被覆化酸化チタン(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。
- 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。

3. 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り込んで、再度の検討が必要であることが示唆された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

徳永裕司：化粧品に用いられるナノ粒子・酸化チタンの経皮吸収的な評価について、日本薬学会第128年会、2008年3月

## F. 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



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

分担研究課題名：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

分担研究者昭和薬科大学薬学部薬剤学研究室 准教授 藤井まき子

研究協力者昭和薬科大学薬学部薬剤学研究室 大学院生 泉水美香

## 研究要旨

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、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。

### A. 研究目的

ナノマテリアルの安全性評価にかかわる経皮吸収性、皮膚移行性に影響する皮膚の状態、ナノマテリアル製剤の状態を検討する。

### B. 研究方法

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。

### C. 研究結果

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

FD-4 は 1nm という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。

### E. 結論

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。

### F. 健康危機情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

日本薬学会第 128 年会(2008 年 3 月, 横浜)

ナノマテリアル皮膚移行性評価方法の確立ーバリア機能低下皮膚を用いた基礎検討ー

### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし



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

分担研究課題名: 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

分担研究者 宮澤真紀(神奈川県衛生研究所 理化学部 主任研究員)

研究協力者 小島 尚(神奈川県衛生研究所 理化学部 主任研究員)

## 研究要旨

ナノサイズの二酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) がマウス損傷皮膚における接触性皮膚炎に及ぼす影響について検討を行った。マウス耳介背側部にテープストリッピングを行い、35nm または 250nm の  $\text{TiO}_2$  と同時に感作性物質である 0.5%DNCB を塗布し、皮膚における炎症反応を観察するとともに、局所リンパ節における細胞増殖を測定した。 $\text{TiO}_2$  の存在により耳介腫脹反応は増悪したが、耳下リンパ節の細胞増殖反応に有意な差は認められなかった。また、 $\text{TiO}_2$  の粒子径またはコーティングによる差はなかった。皮膚では、 $\text{TiO}_2$  の存在により、表皮細胞の肥厚が亢進する傾向が認められたが、ハプテンとの同時暴露でさらに炎症反応の増悪が観察された。これらの結果から、 $\text{TiO}_2$  は損傷皮膚において炎症反応の増悪に関与するが、粒子径は影響を及ぼさないことが示唆された。

### A. 研究目的

ナノサイズの  $\text{TiO}_2$  は、化粧品等で汎用されているが、ナノ化することによって皮膚透過性が亢進する可能性があり問題になっている。海外の文献では、ナノサイズの  $\text{TiO}_2$  のほとんどが皮膚角質層でブロックされ、表皮細胞内には侵入しないことが報告されているが、損傷皮膚における透過性および皮膚免疫系への影響は検討されていない。そこで、テープストリッピングにより角質層を除去したマウス皮膚に  $\text{TiO}_2$  および感作性物質を塗布することにより、接触皮膚炎を引き起こし、ナノサイズの  $\text{TiO}_2$  がバリア機能を失った皮膚の局所免疫に及ぼす影響を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 検体

35nm の  $\text{TiO}_2$  A : SMT-500SAS (水酸化アルミニウムコーティング) および B : MT-500B、

250nm の  $\text{TiO}_2$  C : Lu-250 を使用した。A は媒体としてシリコン D5(S) に、B および C は媒体としてテトラエチルヘキサン酸ペンタエリスリチル (PT) に分散させ、20%(w/v) 試験液を調製した。

#### 2. 感作性物質

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

#### 3. 動物

8-12 週齢の CBA/JN 雌性マウス (日本チャールズリバー(株)) を、温度  $23\pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度  $50\pm 10\%$ 、明暗 12 時間の conventional 環境下で固形飼料 (CE-2 日本クレア) 及び水 (水道水) を自由摂取させ、1 週間以上の観察期間を経た後、試験に使用した。実験は、動物実験環境安全管理部会の



承認を受け、動物実験環境安全管理要領に則って行った。

#### 4. テープストリッピング

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)）を用いて除去した。

#### 5. Local lymph node assay (LLNA)

##### 1) 群

各検体について、I: AOO および媒体塗布群、II: AOO および TiO<sub>2</sub> 塗布群、III: 0.5%DNCB および媒体塗布群、およびIV: 0.5%DNCB および TiO<sub>2</sub> 塗布群を設けた。マウスは1群4匹とした。

##### 2) 感作方法

テープストリッピングを行ったマウス両耳介背側に、25 $\mu$ L ずつ AOO または 0.5%DNCB を塗布し、ドライヤーで乾燥させた後、媒体または 20% TiO<sub>2</sub> を塗布した。感作は 24 時間間隔で 3 日間連続して行った。

##### 3) 耳介腫脹測定

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を測定し、塗布前後の差の左右の平均を腫脹値とした。

##### 4) 採材

最終感作の 3 日後に体重測定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 $^{\circ}$ C 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た。

##### 5) BrdU 取り込み量の測定

最終感作の 2 日後に、10mg/mL の BrdU 生理食塩液溶液を、1 匹あたり 0.5mL 腹腔内投与した。採材後-20 $^{\circ}$ C で冷凍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、BrdU 取り込み量を測定した。

各検体について、媒体のみ塗布群 (I) の BrdU 取り込み量に対する II ~ IV 群の取り込み量の比を Stimulation index (SI) として比較を行った。

#### 6) 病理組織学的観察

固定した組織をパラフィン包埋した。薄切後、トルイジン青染色を行い顕微鏡観察を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 耳介腫脹反応

テープストリッピング後に TiO<sub>2</sub> 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。しかし、35nm と 250nm の粒子サイズによる差はなかった。また、35nm のサイズにおいても、TiO<sub>2</sub> のコーティングによる影響は認められなかった。(図 1)。

#### 2. 病理組織

組織的には、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 (I 群) でも、痂皮を形成している個体が認められた。

TiO<sub>2</sub> 塗布群 (II および IV 群) において、媒体のみを塗布した対照群 (I および III 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 TiO<sub>2</sub> 塗布群 (IV 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 (図 2)。

TiO<sub>2</sub> 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、凝塊物として観察された。どちらも毛に付着し、毛孔内まで入り込んでいた。

#### 3. 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 (III および IV 群) で対照群 (I および II 群) の 3~5 倍の大きさに腫大し、SI も 6~12 倍の高値を示した (図 3)。

各検体の TiO<sub>2</sub> 塗布群 (II 群) の SI は 1.1~1.9 であり、TiO<sub>2</sub> には感作性は認められなかった。

TiO<sub>2</sub> 塗布群 (II および IV 群) における SI は、感作性物質の有無にかかわらず媒体群 (I および III 群) に比べ軽度の上昇が認められるものの、有意差は認められなかった。また、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。

#### D. 考察

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の取り込み量を指標としたリンパ球の増殖には正の相関が認められた。一方で、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TiO<sub>2</sub>塗布群(ⅡおよびⅣ群)のほうが、媒体群(ⅠおよびⅢ群)に比べ、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認められ、腫脹反応の結果と符合するものであった。解剖時の観察では、TiO<sub>2</sub>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。このことから、TiO<sub>2</sub>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TiO<sub>2</sub>塗布群(Ⅱ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マウスの耳下リンパ節-体重比に比べ、有意に高かった(データ未表示)。以上のことから、バリア機能が傷害された皮膚において、TiO<sub>2</sub>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ある。しかし、いずれの反応においても、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。

#### E. 結論

バリア機能が傷害された皮膚において、TiO<sub>2</sub>は感作性は有しないものの、軽度のアジュバント効果および刺激性を有し、炎症を増悪させ、免疫系を賦活化する可能性があることが示唆された。しかし、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。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

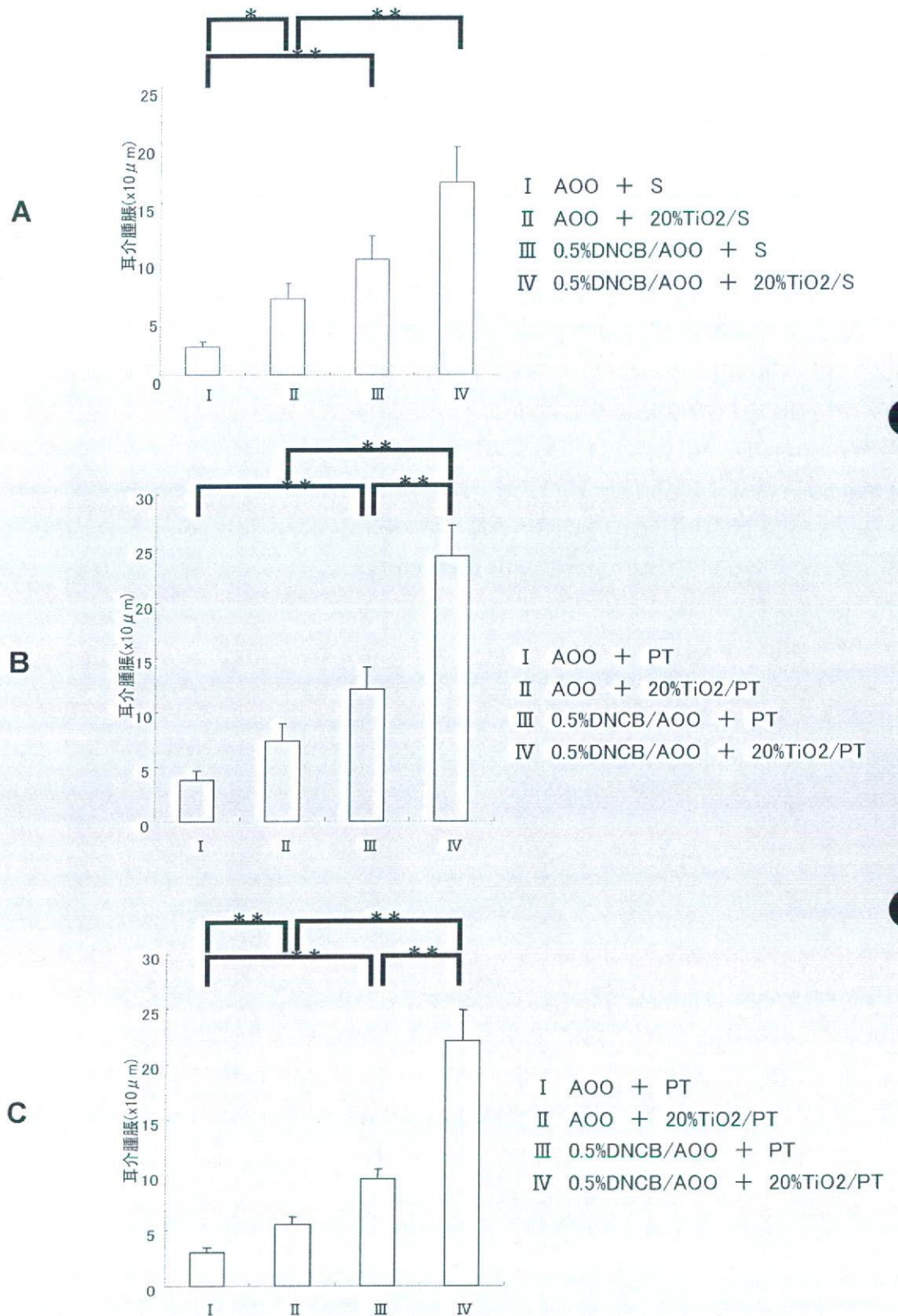


図1 耳介腫脹反応 (平均値±標準誤差)

A: SMT-500SAS (水酸化アルミニウムコーティング, 35nm)、B: MT-500B (35nm) および C: Lu-250



(250nm) における耳介腫脹反応。検定:t 検定 \* P<0.05、\*\*P<0.01

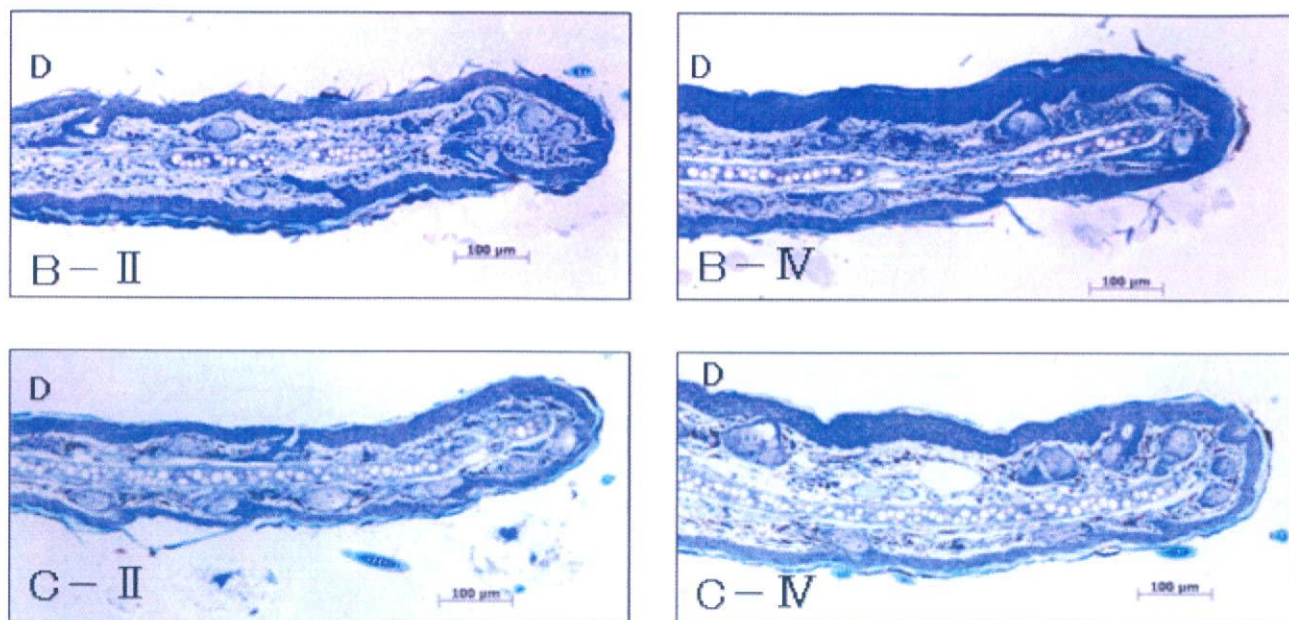


図2 耳介組織 (トルイジン青染色)

B-II : AOO+20%TiO<sub>2</sub>/PT、B-IV : 0.5%DNCB/AOO+20%TiO<sub>2</sub>/PT、C-II : AOO+20%TiO<sub>2</sub>/PT および C-IV : 0.5%DNCB/AOO+TiO<sub>2</sub>/PT。D : 背側部。



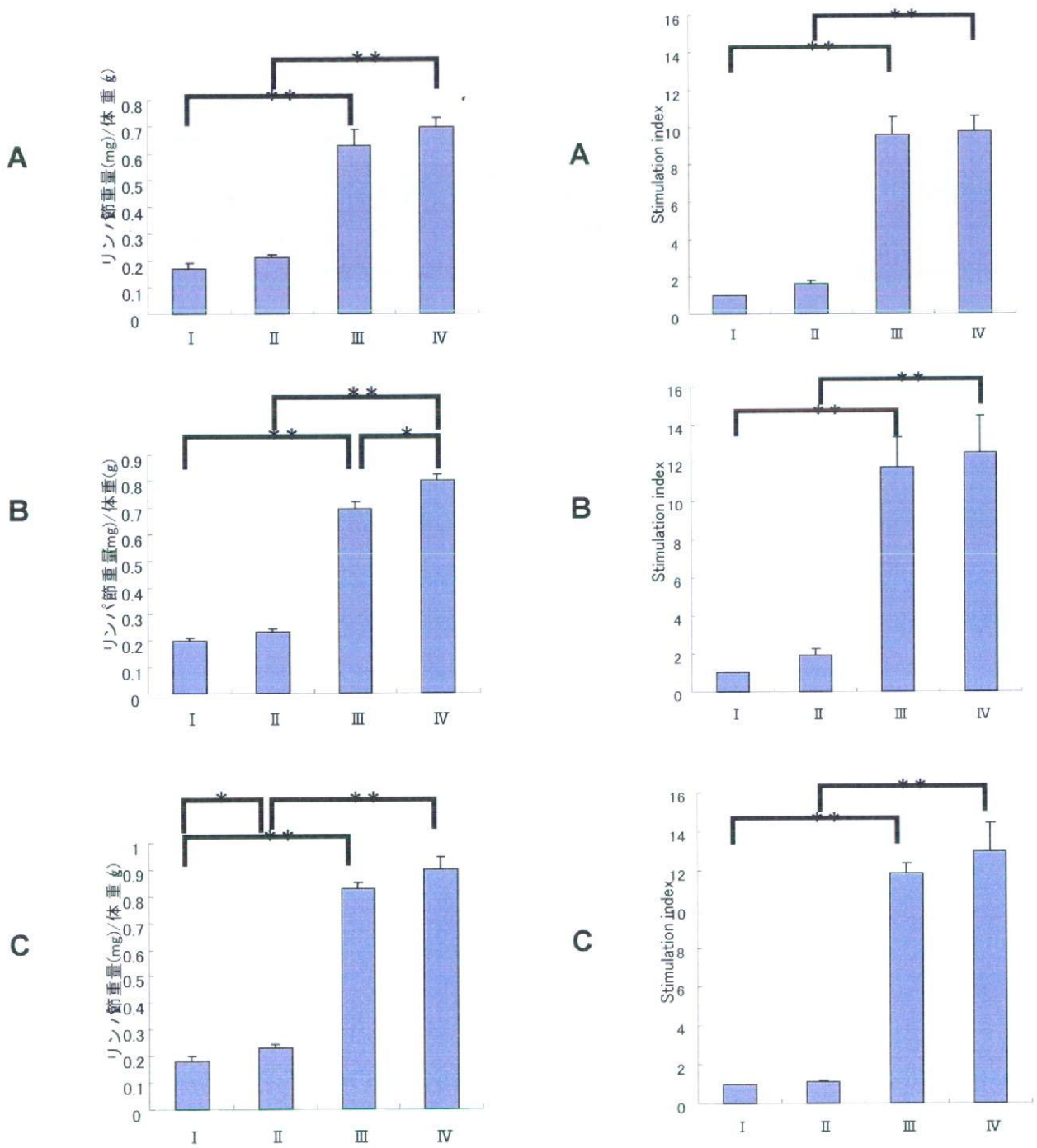


図3 耳下リンパ節重量-体重比(左) および耳下リンパ節細胞増殖反応(右)(平均値±標準誤差)  
 検定:t検定、\*P<0.05、\*\*P<0.01



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

分担研究課題名: 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

分担研究者 菊地克子 (東北大学大学病院講師)

研究協力者 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 (東北大学大学病院技官)

## 研究要旨

径 30nm 酸化チタン(コーティング有り、無し)をシリコン D5 に懸濁させた 20%液を作成し、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、4 日塗布後、9 日塗布後に、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。

## A. 研究目的

ナノ粒子化された化学物質を皮膚に塗布した場合の皮膚毒性について、生体計測工学的手法での評価指標について検討することを目的に本研究を施行した。平成 19 年は、ナノ粒子化された酸化チタンについて検討した。

## B. 研究方法

週数7週～11 週のヘアレスマウス(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 日目に単純塗布し(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、ネプ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う。

### 1. 試料

①コーティング有り径 30nm 酸化チタン(以下 C+)

②コーティング無し径 30nm 酸化チタン(以下 C-) 溶媒として、シリコン D5 を用い、酸化チタンは 20% (w/w)濃度にした。また、皮膚傷害性が知られているラウリル硫酸ナトリウム SLS を陽性対照として使用した。

### 2. 生体計測工学的指標

計測前には、マウスの背部皮膚を蒸留水で湿らせたコットンでぬぐい皮表に残存する試料を取り除き、その後、乾いたコットンで拭き取り 5～10 分風乾後に測定した。

計測環境条件: 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。そのことによる経時的变化が大きかったため、この報告書では、冬期に再試した測定値について述べる。

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。

### 3. 皮膚病理組織

12 日目に採取した皮膚をホルマリン固定後、HE 染色を行った（解析中）。

### 4. 炎症性サイトカインの定量

12 日目に採取した皮膚の一部は、凍結保存した。凍結保存してある組織で real-time PCR を行い、IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインの定量を行う（今後、予定している）。

（倫理面への配慮）

生体の皮膚を計測するという方法であり、また、計測後に、皮膚組織の病理組織学および炎症性サイトカインの定量を施行するにあたり、動物を用いた研究を計画した。動物実験は、「国立大学法人東北大学動物実験等に関する規定」に則る。

## C. 研究結果

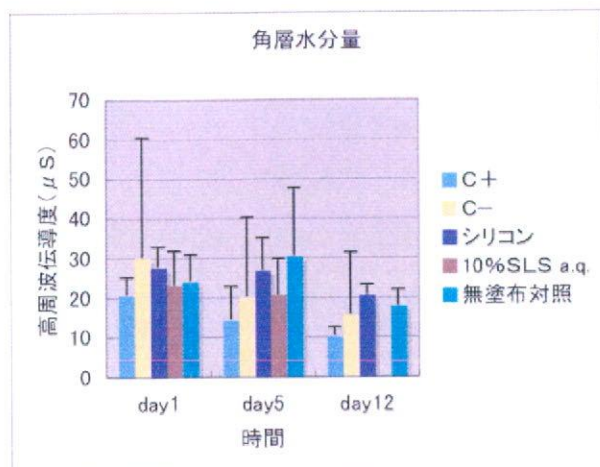
陽性対照の 10%SLS a.q. は 4 日間塗布で紅斑、鱗屑が出現したので、4 日塗布後の計測後、マウスを安楽死させ皮膚を採取した。

### 1. 生体計測工学的指標

#### ①角層水分量

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（図1）。

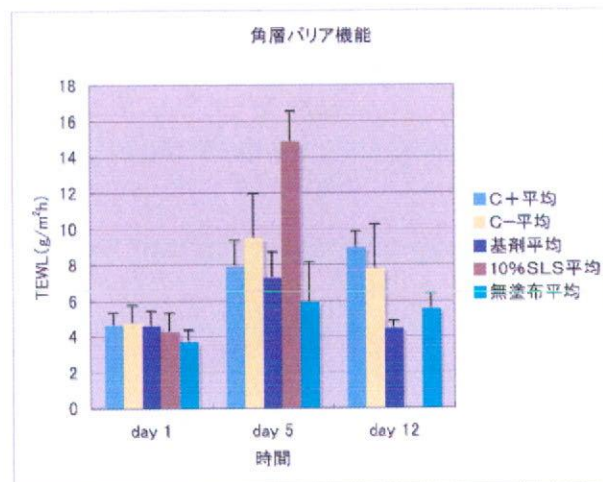
図1.角層水分量の変化



#### 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 TEWL 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（図2）。

図2. 角層水分バリア機能の変化

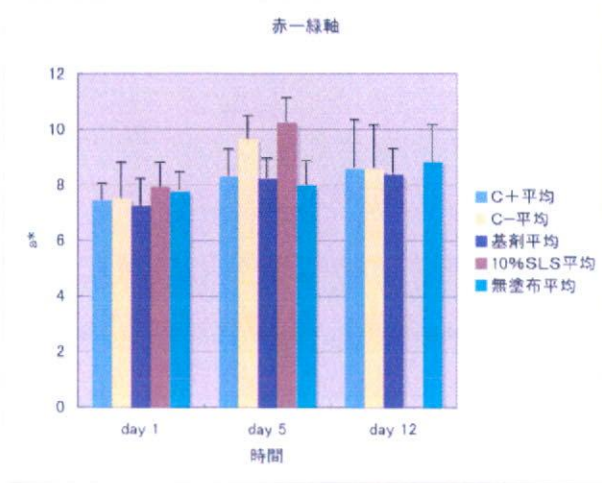


#### ③皮膚色

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ものである。L\*値が大きいほど白く明るい色であり、a\*値が大きいほど赤-緑方向で赤方向の色度が強く、b\*値が大きいほど黄-青方向で黄方向の色度が強いことを示している。

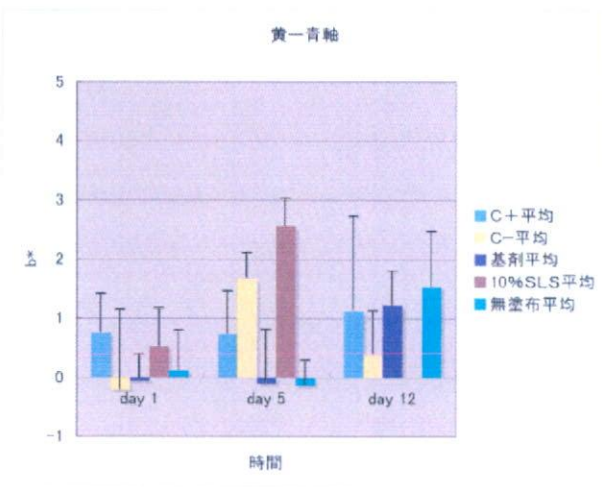
10%SLS を4日塗布後、肉眼的にも紅斑の出現を認めた。赤-緑の色度を示す a\*値が 10%SLS で上昇した（より赤の色度が増した）が、C+群、C-群は、溶媒群や無塗布群と比べ有意な変化を認めなかった（図3）。

図3. a\*値の変化



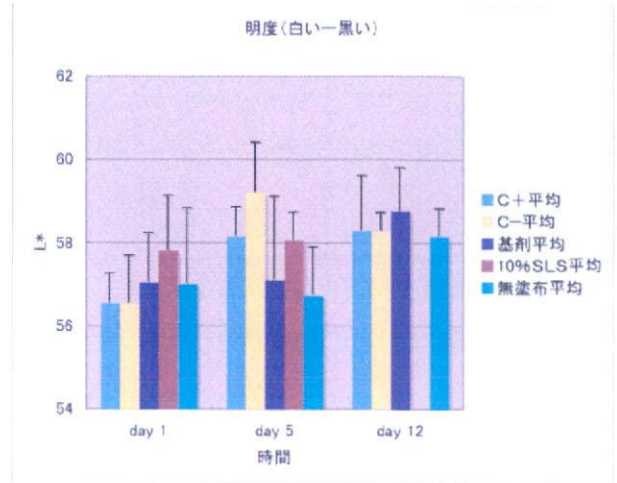
黄-青の色度を示すb\*値は10%SLSで上昇(より黄の色度が増す)傾向であったが、C+群、C-群は、溶媒群や無塗布群と比べて有意な変化がなかった(図4)。

図4. b\*値の変化



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を示さなかった(図5)。

図5. L\*値の変化



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定量に関しては解析中である。

#### D. 考察

径30nmのナノサイズ粒子(コーティング有りC+、無しC-)の酸化チタンをシリコン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。しかしながら、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、色を機器計測しても有意な変化はみられなかった。

しかしながら、作成した懸濁液中の酸化チタンがナノ粒子のまま存在し、経皮吸収されているかに関しては確証がない。その意味で、ナノサイズの粒子でない酸化チタンを用いて、これらの生体計測工学的指標がどのように変化するかを調べ、サイズの違いによりこれらの指標の変化に違いがあるかを検討する必要がある。

また、今後、テープstrippingを施行後の皮膚に試料を塗布する実験を行い、ナノサイズ酸化チタン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の検討結果に関しては、次年度に報告する。



## E. 結論

径 30nm のナノサイズ粒子（コーティング有り C+、無し C-）の酸化チタンをシリコン 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 TEWL 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、より大きな径の酸化チタンでも起こりうるのか確かめる必要がある。

## F. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分担研究報告書

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

分担研究課題名: 全体の取り纏め、*In vivo* 経皮吸収慢性評価のパラメータ検索

分担研究者 津田洋幸 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 教授  
研究協力者 深町勝巳 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 助教  
徐 結苟 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  
David B. Alexander 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 客員  
教授  
徳永裕司 国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部 部長  
内野 正 国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部 主任研究官

## 研究要旨

金属ナノ粒子は化粧品や日焼け防止軟膏として広く流通しているが、塗布による局所障害、皮膚透過性、発がん生、免疫障害、血流・リンパ流による他臓器への移行については十分に明らかではない。本研究ではそのうち直径 20nm 以下のルチル型、無コーティングの二酸化チタニウムの ( $\text{TiO}_2$ ) についてラットの皮膚に塗布した場合の吸収と臓器移行の状態と発がんプロモーション作用について検討し、障害発生機序の追究と試験法の開発と発がん性・発がんプロモーション作用評価法の標準化を行った。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 (Tg) とその野生型ラットの背部皮膚に発がん物質 DMBA を滴下後に、 $\text{TiO}_2$  (ルチル型、直径 20nm) を 100mg/0.5ml の pentalan (分散剤) に懸濁して週 1 回または 2 回塗布し Tg は 28 週、野生型は 40 週にて終了した。その結果、Tg と野生型ともに扁平上皮乳頭腫とがんの発生において発がんプロモーション作用が観察された。その作用は感受性の高い Tg により顕著であった。また、Tg において塗布部位から離れた乳腺がんの発生において増加傾向がみられた。Tg における 2 回/週投与群における  $\text{TiO}_2$  の臓器分布は、塗布局所皮膚、肺、肝、脳、脾、腎 (多い順) にみられた。発がんプロモーション作用機序については  $\text{TiO}_2$  ラジカル産生や炎症性サイトカインの誘導等が考えられる。解析は次年度の課題とした。

## A. 研究目的

ナノ粒子はその新機能や優れた物理化学的特性から多分野における全く新しい素材として世界中で開発が進められている。しかし、今までに無い素材であるために生体影響についての知見

は乏しい。しかしながらナノ粒子のカーボンブラックと  $\text{TiO}_2$  は雌ラットの肺において発がん性を示すことが分かってきた。さらに、神経系、免疫系への影響などのいくつかの懸念を示す報告がされているが、データは十分に得られていないのが



現状である。ナノ粒子の生体内への吸収や分布についての情報もほとんど得られていない。直径20nm以下の二酸化チタニウム (TiO<sub>2</sub>) は皮膚を透過して皮内の免疫系を障害する可能性が指摘されているが実態は明らかではない。金属ナノ粒子は化粧品や日焼け防止軟膏として広く流通しているために、塗布による局所障害、皮膚透過性、免疫障害、血流・リンパ流によって他臓器への移行の状態について、実際の暴露量を想定した有害性データと機序についてのデータを得ることは重要である。

19年度の研究においては、TiO<sub>2</sub>を含有する化粧品や日焼け防止軟膏あるいは一部で食品添加物として用いられているTiO<sub>2</sub>に注目して、皮膚と乳腺発がん高感受性トランスジェニックラットを用いて、比較的短期に皮膚塗布による皮膚透過の有無、皮膚発がんおよび塗布部位から遠隔の臓器である乳腺における発がんプロモーション作用について検討し、発がん性評価法の確立をめざした

## B. 研究方法

実験1.: 発がんのプロモーション作用による発がん性検索

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

(Hras128) および野生型ラットの背部を3 x 3 cmの大きさに剃毛し皮膚に発がん物質 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 2.5mg/0.5ml アセトン)を滴下後に、TiO<sub>2</sub>(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回または1回塗布しHras128は28週、野生型は40週にて終了した。陽性対照として既知の皮膚発がんプロモーター(弱発癌物質)である。

2-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)を100nmol/0.5mLアセトン溶液として週に3回塗布した。屠殺時におけるTiO<sub>2</sub>の組織分布は、凍結した臓器試料を硝酸・過酸化水素水混液中に入れ、マイクロウェーブオープンで融解した後、ICP-MSを用いて定量測定した(班員・徳永裕司)。

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

実験1と同じ系統の雌雄のHras128ラットを用いて、3 x 3cmの大きさに剃毛し皮膚にUVBを線源から20cmの距離で800mJ/cm<sup>2</sup>になる線量で7分間照射を週2回、10週間行い、その後に、照射部位にTiO<sub>2</sub>(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週で屠殺して乳腺腫瘍の発生を観察している。雄は41週を経過中である。

(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、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の審査を経て実験を実施した。

## C. 研究結果

実験1.: 発がんのプロモーション作用による発がん性検索

投与時のTiO<sub>2</sub>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。光学顕微鏡の分解能は200nmなのでそれより大きい凝集塊が混在していたと考えられた。臓器分布:屠殺時におけるTiO<sub>2</sub>の組織分布量(μg/g 湿重量)は値の大きい順に、皮膚8.45±5.12、肺3.55±2.18、肝3.46±3.18、脳(大脳+小脳)1.50±1.39、脾1.32±0.77、腎1.29±3.18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)の数/ラットは、Hras128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群に有意な増加(P<0.01)が見られた。wild群では、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回群で有意な増加(P<0.05)を認めた。腫瘍病変の大きさ(肉眼的に真上から観察した面積mm<sup>2</sup>/ラット)は、Hras128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投与では群359±219であり有意(P<0.05)の増加であった。wild群ではTPA投与で有意差は無かった。



乳腺腫瘍は、Hras128群で腫瘍の重量(g/ラット)は、溶媒群  $1.0 \pm 2.4$ 、週1回群  $17.7 \pm 15.5$ 、週2回群  $8.6 \pm 12.3$ 、TPA群  $11.4 \pm 9.3$  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群に有意の増加 ( $P < 0.05$ ) が見られた。wild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

現在経過中であるが、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、プロモーション作用については観察出来る段階ではない。乳腺における触知できる腫瘍の発生は、UVB照射単独よりも照射後にTiO<sub>2</sub>を塗布した群により多い傾向が観察されている。

#### D. 考察

雄ラットにおいて、皮膚に塗布したTiO<sub>2</sub>は、皮膚のみならず、塗布局所から離れた臓器である肺、肝、脳(大脳+小脳)、脾、腎に検出された。この実験では動物は1ケージに3匹のグループ飼育であった為に、塗布したTiO<sub>2</sub>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、いわゆる侵入門戸からのトランスロケーションについては結論出来ない。飼育時の頻回の観察ではグルーミングのような行動によってTiO<sub>2</sub>を舐めて摂取することは観察されていない。現在、同一実験プロトコールにおいて、1匹飼育法で追試中である。さらに、予め発がん物質DMBAを塗布することによってイニシエーション処置をした場合に、プロモーション作用を示すことが示された。実験に用いた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、Hras128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Hras128を用いるこの試験法は短期にプロモーション活性によって発がん(弱い)性を評価出来る

試験系と考える。

また、このHras128は雄でも乳腺発がん感受性が高い為に、TiO<sub>2</sub>の皮膚塗布によって乳腺腫瘍発生の増加が観察され、プロモーション作用のあることが示唆されたが、導入されているras遺伝子の活性化が関与しているかについて今後の検討が必要である。

観察された皮膚と乳腺における発がんプロモーション作用の機序については、他の粒子の場合のようにマクロファージによる貪食による活性酸素の発生による臓器障害と慢性炎症反応の関与が考えられているので、現在ROSによる細胞障害とサイトカインの発生等の解析を行っている。乳腺については、トランスロケーションしたTiO<sub>2</sub>が局所で関与しているのか、皮膚等における異物反応と慢性炎症が全身的に影響及ぼし、感受性の高い乳腺に発がんしたのかについては、今後の追究課題である。

#### E. 結論

ルチル型無コーティング、直径20nmのTiO<sub>2</sub>は、皮膚のみならず、塗布局所から離れた臓器である肝に検出され、トランスロケーションを示す可能性が見いだされた。皮膚および乳腺発がんのプロモーション作用によって、弱い発がん性を比較的短い期間に評価できる系を開発し、実用化に向けた基礎的情報が得られた。

#### F. 健康危機情報

ナノ粒子TiO<sub>2</sub>は既に化粧品や日焼け止めクリームとして広く用いられているため、更なる研究の積み重ねによって、今後どのような対応が必要であるかが明らかになると思われる。

#### 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.

## 2. 学会発表

1) Carcinogenicity of nanomaterials, is it  
specific to nanoscale? Nanomaterials:  
Evaluating The Benefits And The Risks,  
Symposium in The 11th International Congress  
of Toxicology (ICTXI), July 15-19, 2007,  
Montreal, Canada,

2) 「ナノ粒子の発がん性評価の現状—社会受容  
は可能か—」

日本薬学会第128年会シンポジウム「ナノマテ  
リアル医薬品への展開とリスク」  
パシフィコ横浜、2008年3月28日

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版 地	出版年	ページ

雑誌

著者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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- <i>ras</i> proto-oncogene transgenic rats.	. Food and Chemical Toxicology	45	1013-10 19	2007