

法があるかもしれない。

### 3. 酸化チタンの分散性

媒体に懸濁前の乾燥状態における存在状態を走査型電子顕微鏡で観察した。酸化チタンごとに、左から3000倍、10000倍、50000倍の電顕写真を図2に示した。SMT-500SAS及びMT-500Bでは、一次粒子径30~35nmの単一の粒子の存在がわずかに確認できるが、AMT-600にはほとんど認めることができなかつた。いずれも凝集して100nm以上の大きさの塊になっているものがほとんどを占めていた。

電顕観察では、ごく少数でもnmの単一粒子と見ていけば定性することができるものの、どれくらいあるのかといった量的なものについて数値的に比較することは困難である。また、標本作製中に粒子が再凝集し、媒体中とは異なる状態の形態を見ている可能性もある。

粒度分布をゼータサイザーナノにより測定した結果を図3に、縦軸に散乱光強度頻度、横軸に粒子径を対数で示したヒストグラムと累積曲線で示した。また、それぞれの条件における酸化チタンの平均粒子径を表5にまとめた。ペンタラン中ではいずれの酸化チタンとも、Z-Average(平均粒子径)は163~300nmと、他の媒体に比べて小さい値を示した。しかしPdl値は1.000を示した。シリコンオイル中では、ルチル型で表面コーティング処理したSMT-500SASのZ-Averageが358nm、表面コーティングのないMT-500Bでは560nmとなり、Pdl値も低く良好に分散した。一方、アナターゼ型のAMT-600はZ-Averageが1246nmで、大きな粒子径となって存在した。エタノールに懸濁したSMT-500SASはZ-Averageが178nm、Pdl値0.126と、今回用いた媒体の中では小さな粒子として存在するものが多かった。一方、MT-500Bは1235nmと大きな値を示し、同じ媒体でも酸化チタンの種類によって粒度分布が異なることがわかった。水に懸濁させたときは、表面コーティングがない酸化チタンはいずれも凝集し、特にMT-500Bはすぐに沈殿を生じた。

各酸化チタン粒子の懸濁液について、ゼータ電位を測定した(表6)。シリコンオイル中で、SMT-500SASは49.7mVと正の電荷を有し、

MT-500B及びAMT-600は負の電荷を有した。水中では逆に、SMT-500SASは39.3mVと負の電荷を有したものの、MT-500B及びAMT-600はほとんど電荷がなかった。表面コーティングするとゼータ電位が変化し、粒子どうしの凝集が抑制されることがわかった。

ゼータ電位と粒度分布は比較的良好に相関し、どちらかの測定によっておおよその分散度を予測できる。しかし、今回用いた機器では、媒体が荷電するようなものでないと信頼性がないこと、媒体の物理学的性質が不明であったり粘度が高かったりするものは測定できないこと、すぐに沈殿を生じるようなものには適さない等の問題点がある。また、粒子数は相対頻度%で表わされるため、ごく少数のナノ粒子の存在を確認できない。

In vivoでナノ物質を試験する場合、適用時に粒子が凝集していても、物理的に、あるいは細胞の貪食等により単一の粒子になる可能性もある。こうした粒度分布を測定しておくことで、その実験がナノ物質を試験しているのか、あるいはバルクと変わらない大きなサイズの凝集体を試験しているのか知ることができる。いずれの方法を用いるにしても、あらかじめ、粒子のキャラクタライゼーションをしておくことは、得られる試験の結果の解釈に重要である。

## 4. チタンの定量

### 4-1. 検量線と定量限界

各濃度のチタン標準溶液について、時間分析で質量数47、48及び49でモニターしたピーク面積を測定した。検量線は、チタンは2.5~500ng/mlの濃度範囲でピーク面積との間に良好な直線性が得られた。25%硝酸溶液を用いて調製したチタン標準液の検出限界は2.5ng/mlであったが、正確な定量にはさらに高い濃度(10ng/ml程度)が必要であった。この濃度は0.1%硝酸で得られる値より大きく、試験溶液中の硝酸の濃度が高いほど、検出感度が低く定量感度も悪くなった。

### 4-2. 分解容器の前洗浄の必要性

前洗浄処理していないテフロン製の分解容器に、各濃度のチタン標準溶液を入れ、マイクロウェーブ処理したところ、添加量以上のチタンが検出された。同様の容器に水1ml、硝酸6ml及びふつ化

水素酸 3 ml を入れ、分解条件と同じ条件でのマイクロウェーブ処理を 2 回繰り返した。その結果、1 回目の分解液にはいずれの容器からもチタンが検出されたが、2 回目の分解液には少なくなり、いずれのものも同程度で定量限界レベルの値になった

(図 4)。したがって、分解容器には試験ごとに酸化チタンが付着して残存するため、微量の酸化チタンをマイクロウェーブ処理して分解し、定量するには、分解容器を十分に前洗浄することが必要と思われた。

#### 4.3. 分解溶媒の選択

酸化チタンの分解法として種々の方法が報告されている。<sup>7,9)</sup> ここでは、まず、酸化亜鉛と同様の分解液、硝酸 3 ml + 過酸化水素 2 ml + 水 2 ml の混液を検討した。例えば、MT-500B 約 0.3  $\mu\text{g}$  はチタン量として約 0.2  $\mu\text{g}$  に換算されるが、回収されるチタン量は 0.12~0.29  $\mu\text{g}$  で回収率は 61.5% 及び 109.3% であった。また、酸化チタン約 3.0  $\mu\text{g}$  の回収率も 22.1~76.5% と試験ごとにばらつき不十分であった。

次に、硝酸-ふっ化水素酸を分解液として用いた。ふっ化水素酸は腐食性が高いため、分解後、ホットプレート上で加熱して除去した。MT-500B を硝酸 3 ml、ふっ化水素酸 2 ml 及び水 2 ml を加えて処理した。酸化チタン約 0.3  $\mu\text{g}$ 、チタンとして 0.2  $\mu\text{g}$  を処理した分解液中のチタン検出量は、0.08~0.76  $\mu\text{g}$  であった。これは、添加量の 40.9~380.4% が回収されたと計算され、用いた条件では、分解時の容器からの溶出や濃縮時の容器間の相互汚染が大きいことが原因と思われた。

分解液を硝酸に変更した。MT-500B に、硝酸 5 ml、水 2 ml を加えて、マイクロウェーブ処理し、分解保持時間は、2 分から 20 分に延長した。分解液のみ加えて処理した Blank に 0.39  $\mu\text{g}$  のチタンが検出された。酸化チタン 0.32  $\mu\text{g}$ 、チタンとして 0.19  $\mu\text{g}$  を硝酸で分解した後、定量されるチタン量は 0.55  $\mu\text{g}$  となったが、Blank での値を差し引くと、0.55 - 0.39 = 0.16 ( $\mu\text{g}$ )、添加したチタン量の 84.0% となった。この 10 倍量の酸化チタンについて同様の検討を行ったところ、添加量の 105.8% が定量された (表 7)。このように、Blank 値を差し引かない場合の値は、実質量よりも多めに見積もる可能

性があるが、Blank 値は一定したものでないため、その時の値の大きさにより定量値が変化する可能性がある。濃度の低い試料については、定量値の信頼性が劣ることを念頭におくべきである。

#### 4.4. 添加回収試験

確立した条件で生体組織中のチタンを定量的に分析できるかどうか検討した。ラット肝臓 0.2 g に各濃度のチタン標準溶液 1 ml を添加して、硝酸 5 ml 及び水 2 ml を加えてマイクロウェーブ処理した。その後、水で 20 ml に定容したものを試験溶液とした。ここでは、チタンは質量数 47、48 及び 49 それぞれで検出した。試料溶液を質量数 47 でモニターした場合 (Ti47)、チタン濃度は 67.3 ng/ml、48 で検出した場合 (Ti48) は 12.5 ng/ml、49 でモニターした場合 (Ti49) では 10.7 ng/ml と定量された。臓器にチタン 0.2  $\mu\text{g}$  を添加して分解した試料溶液には、質量数 47 でモニターした場合 75.8 ng/ml、48 では 20.8 ng/ml、及び 49 では 19.5 ng/ml の濃度でチタンが検出された。質量数 47 でモニターした場合には 48 や 49 でモニターするよりも多めに定量された。臓器中にはチタンが存在すると仮定して、チタン添加臓器での濃度から臓器のみでの濃度を差し引くと、Ti47 : 75.8 - 67.3 = 8.5 (ng/ml)、Ti48 : 20.8 - 12.5 = 8.3 (ng/ml)、Ti49 : 19.5 - 10.7 = 8.8 (ng/ml) と、いずれの質量数でモニターした場合でもほぼ同程度の値を示し、この値は添加したチタンによる増加を示すものとした。これを添加量と比較して回収率を求めると、Ti47 では 84.0%、Ti48 では 83.2%、Ti49 では 88.4% とほぼ満足できる結果が得られた (表 8)。同様に、臓器に添加した 2  $\mu\text{g}$  及び 10  $\mu\text{g}$  のチタンの回収率は 88.9~102.1% と良好であった。

今回の検討は、臓器中のチタンはイオン状態であるとの観点で行っているが、酸化チタン粒子として存在する場合には、臓器に酸化チタンを添加して回収率を見る必要があり、今後の検討とした。ICP-MS の分析モードの変更、及び試料導入法の改良など、分解条件を含め、臓器中の酸化チタンの定量法については更に検討が必要である。

#### 5. 皮膚感作性反応に及ぼす影響

ナノ物質を含む製品の安全性評価として、ナノ物質自身の生体に及ぼす影響、例えば、化粧品で

あれば経皮吸収されて蓄積、標的臓器で毒性を示すかどうかを見る必要がある。一方、ナノ物質が他の成分に対し作用して品質を変化させたり、その生体影響を増悪させたりしないかどうかを確認することも重要である。化学物質の皮膚機能傷害の一つとして、皮膚アレルギー（感作）性がある。今回、酸化チタンが皮膚感作性反応に及ぼす影響について、LLNA<sup>10)</sup>の放射性物質を用いない改良法であるLLNA-DA法<sup>45)</sup>を用いて検討した。

感作性陽性対照物質としてCAを用いた。<sup>11)</sup> まず、CAを適用する溶媒によって反応性に差があるかどうか検討した。CAをそれぞれの濃度でエタノール(EtOH)またはアセトン-オリーブ油(4:1)混液(AOO)に溶解した。エタノール対照群でのリンパ節重量が低かったため、AOOを溶媒で用いたときよりもCA塗布群でのSI値は高いが、絶対リンパ節重量及びATP量の値は各濃度で差はなかった(表9)。ATP量のSI値が3を超えるCAの濃度は2.5~5%であった。CAの感作性強度を評価するための溶媒として、エタノール及びAOOは同様の試験結果を示すと判断した。

酸化チタンが感作性を有するかどうかを調べた。溶媒としては、分散性が良く、CAとの混合適用が可能であるエタノールを用いた。マウス耳介リンパ節の重量及びATP量は、5~20%の濃度のいずれの酸化チタン適用群もSI値が3を超えないことから、皮膚感作性は有しないと判断した(表10)。

次に、酸化チタンが感作性誘導反応を増強するかどうかを確認するため、それぞれの酸化チタンをCAと共存させて適用した。エタノール中のCAの濃度は0~10%、酸化チタンは5%とした。まず、MT-500BとAMT-600を比較した。MT-500B及びAMT-600共存下でのCAによるリンパ節重量及びATP量の増加反応は、両物質間で差はなく、MT-500BとAMT-600の反応性は同等であると判断した(表11)。次に、SMT-500SASとMT-500Bを比較するため試験した。SMT-500SASとMT-500Bを共存させた場合、CAによるATP量の増加率は、これらを共存していない場合に比べて若干増加した。また、SMT-500SASの方がMT-500Bよりも増強効果が大きかった。これらの差は、表面コーティングの有無の違いによること

から、コーティング剤の成分が影響している可能性もある。さらに、分散性、あるいはCAの皮膚吸収を促進するような因子もあるのかもしれない。実験上、こうした酸化チタンを共存させて塗布すると、白色の色がマウスの耳につくことから、塗布の仕方が丁寧になった可能性もある。こうした酸化チタン粒子の塗布が化学物質のアレルギー反応に影響を及ぼすかどうかということを検討した報告はなく、再現性を含めて今後検討を続ける必要がある。

#### D. 結論

水に懸濁した酸化亜鉛は表面が正の電荷を有し、一次粒子径30~40nmのMZ-Y-303S及びMZ-300は数百nmに2相性の、粒子径の大きいZO-250では1000nm以上に1相性の粒度分布を示した。ペンタラン中の酸化亜鉛はいずれも幅広い粒度分布を示し、平均粒子径も545nm~1364nmであった。生体組織中に蓄積した酸化亜鉛は、硝酸一過酸化水素混液を加えてマイクロウェーブ分解しICP-MSで定量することが可能であるが、大量の蓄積がもともと生体中に含まれる亜鉛量との区別には必要である。シリコンオイル中では、一次粒子径35nmのルチル型で表面コーティング処理したSMT-500SASの平均粒子径が358nm、表面コーティングのないMT-500Bでは560nm、一次粒子径30nmのアナターゼ型のAMT-600は1246nmであった。エタノールに懸濁した時のSMT-500SASが最も平均粒子径が小さく、水に懸濁させるといずれも $\mu\text{m}$ レベルに凝集した。ゼータ電位と分散度は比較的相関したが、凝集した粒子の多い懸濁液については正確な分析は困難であった。生体組織中の酸化チタンの定量には、チタンへの分解処理段階でのマイクロウェーブ分解容器の前洗浄が微量金属の分析には重要であり、分解液としては硝酸が今回検討した中では良かった。酸化チタンには皮膚感作性を認めなかった。一部の酸化チタンに、けい皮アルデヒドの感作誘導反応を増加する傾向が認められたが、ばらつきの範囲内かどうか、更に検討が必要である。

## E. 参考文献

1. 吉岡隆嗣, 岩崎敬子. 微粒子酸化チタン, 微粒子酸化亜鉛の分散. 島田邦男監修. 化粧品開発とナノテクノロジー. pp.136-143, シーエムシー出版, 東京 (2007)
2. A. M. Fond and G. J. Meyer. 酸化金属ナノ粒子類の生物学的毒性. 小林 剛訳註. ナノ素材の毒性・健康・環境問題. p.2-30, NTS, 東京(2007)
3. P. H. M. Hoet, I. Brukse-Hohlfeld and O. V. Salata. ナノ材料の健康インパクト. 小林 剛訳註. ナノ素材の毒性・健康・環境問題. p.46-70, NTS, 東京 (2007)
4. K. Idehara, G. Yamagishi, K. Yamashita and M. Ito. Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. I: J.Pharmacol. Toxicol. Methods, 58, 1-10 (2008)
5. T. Omoria, K. Ideharab, H. Kojima, T. Sozu, K. Arima, H. Goto, T. Hanada, Y. Ikarashi, T. Inoda, Y. Kanazawa, T. Kosaka, E. Maki, T. Morimoto, S. Shinoda, N. Shinoda, M. Takeyoshi, M. Tanaka, M. Uratani, M. Usami, A. Yamanaka, T. Yoneda, I. Yoshimura and A. Yuasa. Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. J.Pharmacol. Toxicol. Methods, 58, 11-26 (2008)
6. A. O. Gamer, E. Leibold and B. van Ravenzwaay. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. Toxicol. In Vitro 20, 301-307 (2006)
7. O. V. Borisov, D. M. Coleman, K. A. Oudsema and R. O. Carter III. Determination of platinum, palladium, rhodium and titanium in automotive catalytic converters using inductively coupled plasma mass spectrometry with liquid nebulization. J. Anal. Atomic Spectrom., 12, 239-246 (1997)

8. M. das G. A. Korn, A. C. Ferreira, A. C. S. Costa, J. A. Nobrega and C. R. Silva. Comparison of decomposition procedures for analysis of titanium dioxide using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Microchemical J., 71, 41-48 (2002)
9. A. P. Packer, D. Lariviera, C. Li, M. Chen, A. Fawcett, K. Nielsen, K. Mattson, A. Chatt, C. Scriver and L. S. Erhardt. Variation of an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the determination of cerium, strontium, and titanium in ceramic materials used in radiological dispersal devices (RDDs). Analytica Chim. Acta, 588, 166-172 (2007)
10. I. Kimber, R. J. Dearman, E. W. Scholes and D. A. Basketter. The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, 13-31 (1994)
11. D. Bickers, P. Calow, H. Greim, J. M. Hanifin, A. E. Rogers, J. H., Saurat, I. G. Sipes, R. L. Smith and H. Tagami, H. The RIFM expert panel. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. Fd. Chem. Toxicol., 43, 799-836 (2005)

## F. 研究発表

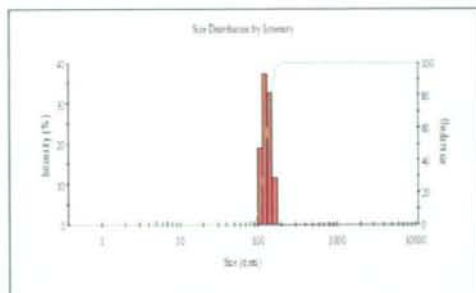
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

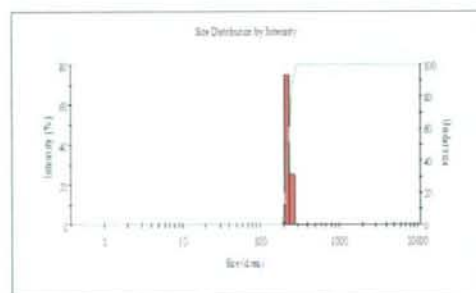
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

Pentalan

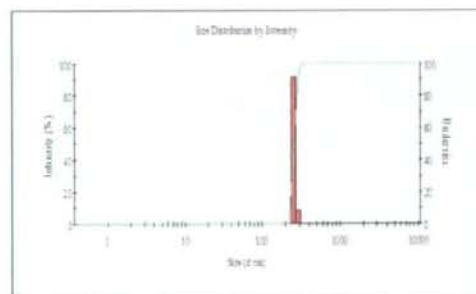
MZY-303S



MZ-300

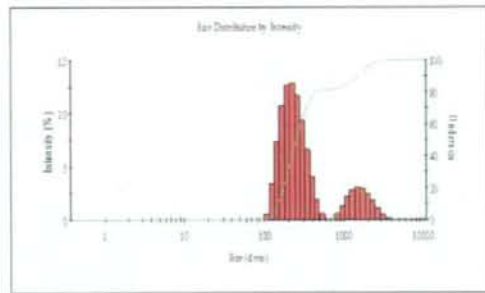


ZO-250

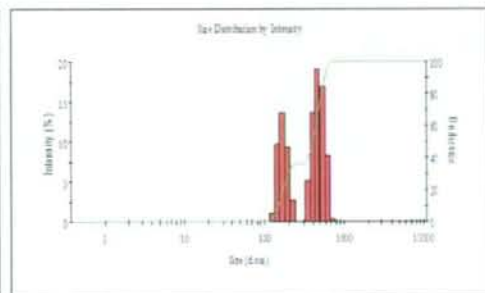


Water

MZY-303S



MZ-300



ZO-250

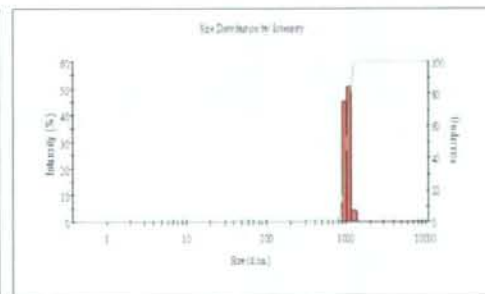


図1. ベンタラン及び水中の酸化亜鉛の粒度分布

表2. 酸化亜鉛粒子の各種溶媒中での分散性

	Z-Average (d.nm)	
	(Pdl)	
	Pentalan	Water
MZY-303S	180 (1.000)	253 (0.258)
MZ-300	282 (1.000)	329 (0.423)
ZO-250	308 (1.000)	1789 (0.546)

表3. 酸化亜鉛粒子のゼータ電位

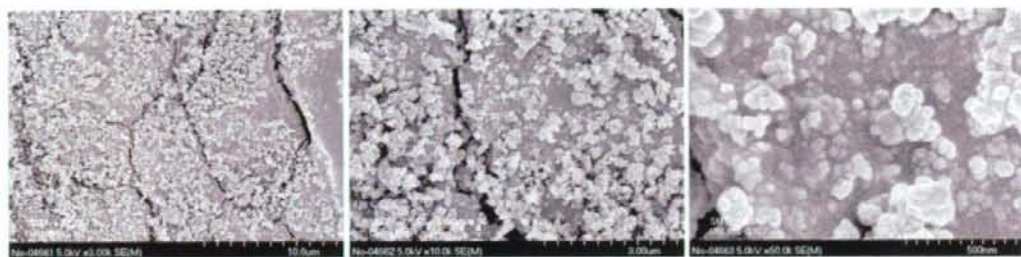
	Zeta Potential (mv)	
	Pentalan	Water
MZY-303S	-	20.7
MZ-300	-	23.5
ZO-250	-	19.5

表4. 酸化亜鉛の添加回収試験の結果

Addition ( $\mu\text{g}$ )		Detect as Zn ( $\mu\text{g}$ )		Recovery (%)	
ZnO	as Zn	Mean $\pm$ SD		Mean $\pm$ SD	
0.248	0.149	0.137	0.135 $\pm$ 0.007	93.2	91.4 $\pm$ 5.0
		0.127		85.9	
		0.141		95.3	
2.480	1.488	1.753	1.772 $\pm$ 0.034	118.8	120.1 $\pm$ 2.3
		1.812		122.8	
		1.753		118.8	

Data are Mean $\pm$ SD (n=3).

SMT-505AS



MT-500B



AMT-600

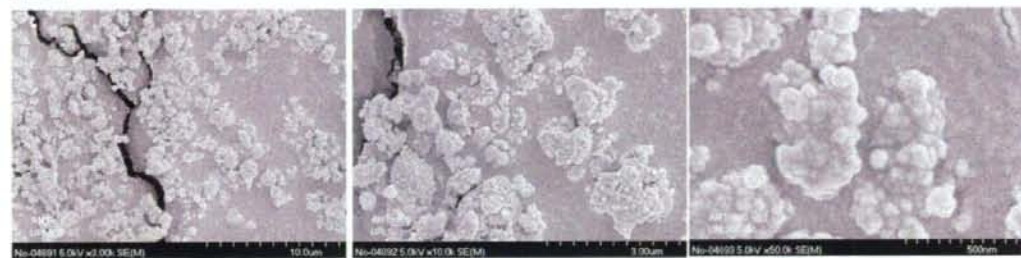
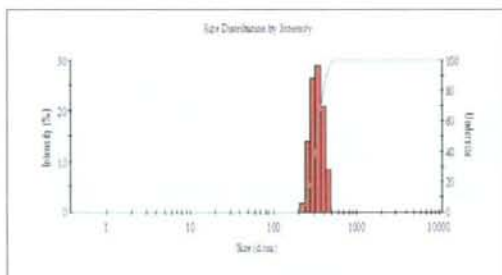


図2. 酸化チタン粒子の電子顕微鏡写真

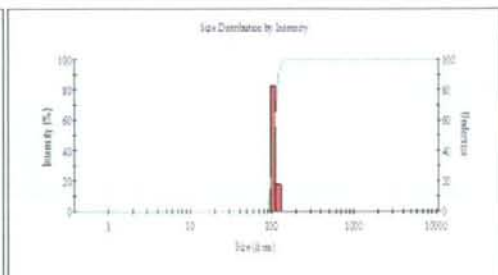
Silicone

SMT-500SAS

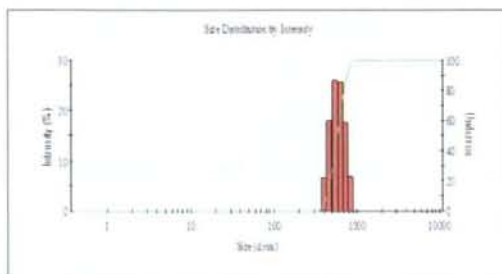


Pentalan

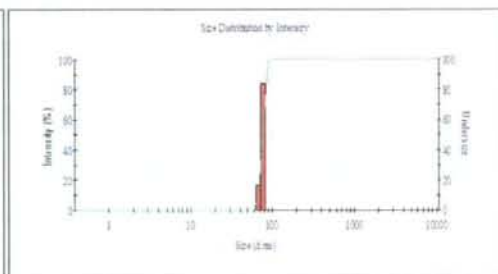
SMT-500SAS



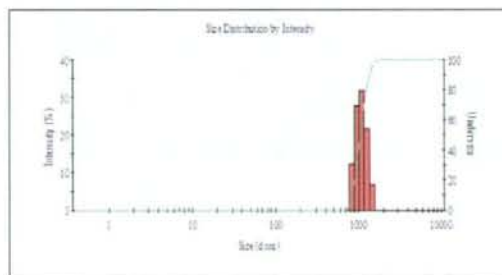
MT-500B



MT-500B



AMT-600



AMT-600

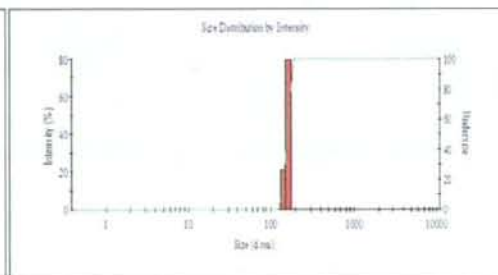
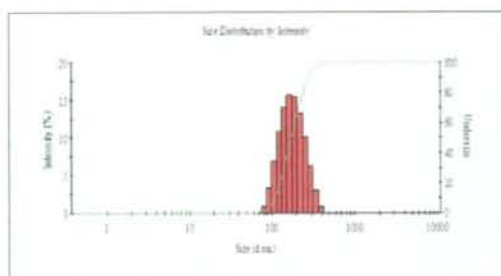


図3. シリコンオイル、ペンタラン、水及びエタノール中での酸化チタンの粒度分布



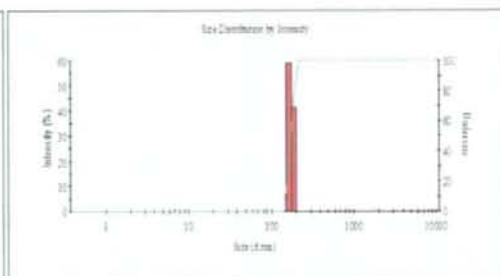
Water

SMT-500SAS

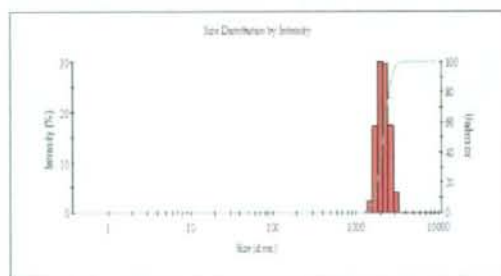


Ethanol

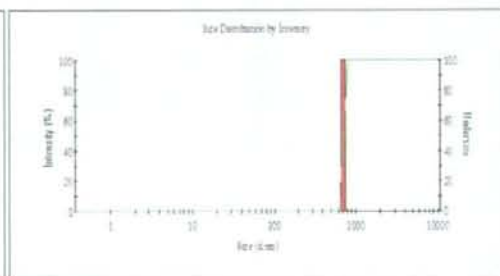
SMT-500SAS



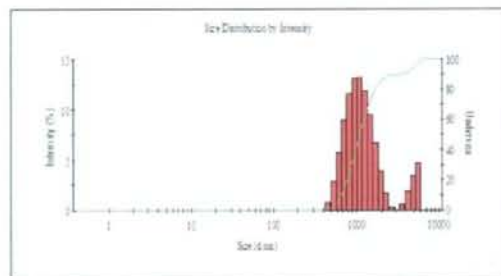
MT-500B



MT-500B



AMT-600



AMT-600

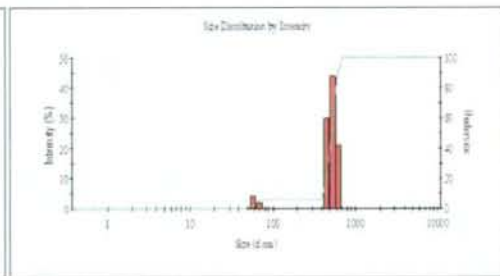


図3. 続き

表5. 各種溶媒中の酸化チタン粒子の平均粒子径

	Z-Average (d.nm) (Pdl)			
	Silicone	Pentalan	Water	Ethanol
SMT-500SAS	358 (0.195)	163 (1.000)	159 (0.161)	178 (0.126)
MT-500B	560 (0.035)	411 (1.000)	2006 (0.198)	1235 (0.162)
AMT-600	1246 (1.000)	300 (1.000)	1091 (0.397)	605 (0.429)

表6. 酸化チタン粒子のゼータ電位

	Zeta Potential(mv)			
	Silicone	Pentalan	Water	Ethanol
SMT-500SAS	49.7	-	-39.3	-43.1
MT-500B	-84	-	0.208	-14.6
AMT-600	-21.8	-	1.23	-0.413

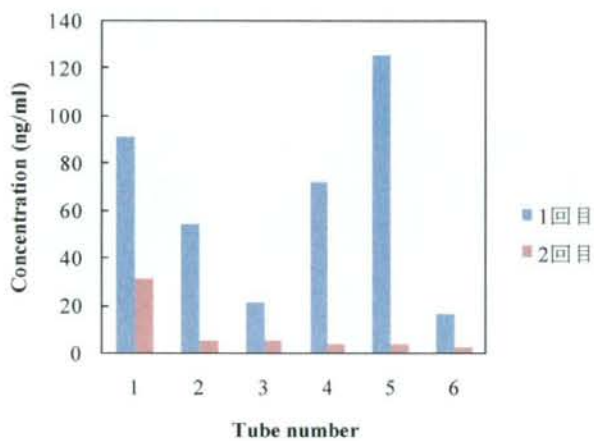


図4. ふっ化水素酸-硝酸混液を加えてマイクロウェーブ処理したときに容器から検出されるチタン濃度の変化

表7. 硝酸を分解液として用いた時の酸化チタンの添加回収試験の結果

	Addition ( $\mu\text{g}$ )		Detection ( $\mu\text{g}$ )		Recovery (%)
	TiO <sub>2</sub>	as Ti	as Ti	as Ti (-Blank)	
Experiment 1	0	(Blank)	0.39 $\pm$ 0.04		
	0.32	0.19	0.55 $\pm$ 0.16	0.16 $\pm$ 0.02	84.0 $\pm$ 9.7
	3.21	1.90	2.41 $\pm$ 2.02	2.02 $\pm$ 0.09	105.8 $\pm$ 4.7
Experiment 2	0	(Blank)	0.00 $\pm$ 0.00		
	3.32	1.98	1.83 $\pm$ 0.00	1.83 $\pm$ 0.00	92.5 $\pm$ 1.7
	8.31	4.90	4.55 $\pm$ 0.12	4.55 $\pm$ 0.12	91.1 $\pm$ 2.5
Experiment 3	0	(Blank)	0.08	0.02	
	0.32	0.19	0.24 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.00	84.4 $\pm$ 0.7
	0.81	0.48	0.48 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.04	79.4 $\pm$ 3.7
	1.61	0.96	0.94 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.07	85.6 $\pm$ 3.5

Data are Mean $\pm$ SD (n=3).

表8. 肝臓に添加したチタンの回収試験

Ti addition ( $\mu\text{g}$ )	Ti concentration in digested solution (ng/ml)						Recovery(%)		
	Detected			$\Delta$ (-Liver only)					
	Ti47	Ti48	Ti49	Ti47	Ti48	Ti49	Ti47	Ti48	Ti49
0	67.3	12.5	10.7						
0.2	75.8	20.8	19.5	8.5	8.3	8.8	85.2	83.2	88.4
2	169.4	103.9	101.0	102.1	91.4	102.1	102.1	91.4	90.3
10	555.1	467.4	455.2	487.8	455.0	444.5	97.6	91.0	88.9

表9. けい皮アルデヒド (CA) のLLNA-DAの結果

CA Concentration (%)	Solvent	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
0	EtOH	4.4 ± 1.3	-	67770 ± 17737	-
1		7.2 ± 1.2	1.63	150779 ± 25861	2.22
2.5		9.9 ± 1.8	2.25	247081 ± 38715	3.65
5		11.5 ± 2.1	2.63	268291 ± 25633	3.96
10		17.5 ± 2.7	3.98	430850 ± 69011	6.36
0	A00	6.4 ± 0.7	-	88025 ± 10174	-
1		7.5 ± 0.5	1.18	126804 ± 8727	1.44
2.5		6.9 ± 0.6	1.09	91951 ± 14515	1.04
5		11.4 ± 0.7	1.80	229372 ± 22218	2.61
10		14.1 ± 1.0	2.22	346747 ± 28721	3.94

表10. 酸化チタンのLLNA-DAの結果

Chemical	Concentration (%)	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
SMT-500SAS	0	5.3 ± 0.3	-	33007 ± 5131	-
	5	5.2 ± 0.5	0.98	23334 ± 7359	0.71
	10	5.5 ± 0.8	1.03	31718 ± 10930	0.96
	20	6.8 ± 0.6	1.27	46309 ± 10530	1.40
MT-500B	5	5.8 ± 1.3	1.08	37922 ± 10652	1.15
	10	5.5 ± 0.2	1.02	28251 ± 11396	0.86
	20	4.8 ± 0.7	0.91	30547 ± 5803	0.93
AMT-600	5	5.4 ± 1.0	1.02	29062 ± 5568	0.88
	10	5.9 ± 0.4	1.12	35241 ± 4477	1.07
	20	6.4 ± 1.9	1.21	34200 ± 11835	1.04

表 11. CA の感作性反応と酸化チタン共存の効果

(a) Experiment 1

TiO <sub>2</sub> added	Chemical	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
-	CA 0 %	5.6 ± 1.3	-	33060 ± 7244	-
	CA 1 %	8.1 ± 0.6	1.44	62982 ± 13313	1.91
MT-500B 5%	CA 0 %	5.4 ± 0.4	-	27579 ± 9102	-
	CA 1 %	8.3 ± 1.4	1.54	51239 ± 15965	1.86
	CA 2.5 %	13.6 ± 3.0	2.52	122197 ± 43577	4.43
	CA 5 %	15.0 ± 1.6	2.77	156071 ± 20130	5.66
AMT-600 5%	CA 0 %	6.0 ± 0.7	-	26213 ± 6706	-
	CA 1 %	8.9 ± 1.2	1.49	57831 ± 4940	2.21
	CA 2.5 %	14.0 ± 1.7	2.33	120065 ± 27679	4.58
	CA 5 %	14.3 ± 1.4	2.38	113968 ± 26306	4.35

(b) Experiment 2

TiO <sub>2</sub> added	Chemical	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
-	CA 0 %	4.5 ± 0.4	-	34899 ± 15361	-
	CA 1 %	6.2 ± 1.1	1.38	53051 ± 10367	1.52
	CA 2.5 %	8.2 ± 0.6	1.82	70737 ± 26583	2.03
	CA 5 %	11.7 ± 1.9	2.59	123191 ± 6743	3.53
SMT500SAS 5 %	CA 0 %	4.9 ± 0.9	-	38876 ± 10381	-
	CA 1 %	7.8 ± 3.4	1.59	100062 ± 15111	2.57
	CA 2.5 %	13.0 ± 2.7	2.67	161555 ± 42670	4.16
	CA 5 %	16.8 ± 4.2	3.44	235904 ± 76655	6.07
MT500B 5 %	CA 0 %	4.4 ± 0.3	-	30178 ± 5817	-
	CA 1 %	8.8 ± 0.9	2.01	65091 ± 24737	2.16
	CA 2.5 %	13.9 ± 2.2	3.18	145698 ± 53533	4.83
	CA 5 %	14.2 ± 2.5	3.25	134890 ± 32500	4.47

平成 20 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

ナノ物質等を配合した化粧品及び医薬品部外品の安全性及び品質確保に係わる  
試験法に関する研究

微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

研究分担者 杉林 堅次 城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 教授

研究要旨： 化粧品や医薬部外品はナノマテリアルの曝露源として、その経皮吸収と生体影響が注目されている。現在、ナノマテリアルの安全性を危惧されている物質の一つに、塗料や化粧品などに汎用されている微粒子酸化チタンがある。化粧品に使用されている微粒子酸化チタンは、サンスクリーン剤やファンデーションに配合されており、紫外線散乱の効果を発揮し、ナノ化することで肌に塗布した時に白くなるのを防ぎ、透明感を出すことを目的としている。このナノマテリアルの考えうる曝露経路として、経気道曝露、経口曝露や経皮曝露が挙げられる。そこで、まず酸化チタンが経皮曝露により、皮内および全身循環系へ移行したと考え、強制的に微粒子酸化チタンを高用量静脈内投与し、酸化チタンの体内分布と脳への移行性の有無を調査した。さらに、微粒子酸化チタンの皮膚細胞に対する障害性を評価した。また、微粒子酸化チタンの *in vitro* 皮膚透過性は、三次元培養ヒト皮膚モデルを用い評価した。

## A. 研究目的

ナノテクノロジーを使用したナノマテリアルは我々の生活の広範な分野で利用されている。一方で、これらのナノマテリアルは果たしてヒトに安全なのか世界的な議論になっている<sup>1),2)</sup>。ナノ粒子は少なくとも一方向の長さがおおむね 1-100 nm の粒子と定義される<sup>3)</sup>。また、ナノ粒子は、目的を持って産生される工業ナノ粒子と非意図的ナノ粒子に分けられる。非意図的ナノ粒子には、森林火災や火山の噴火による灰、溶接研磨などの工業生産の副産物とディーゼル排出の粒子があり、これらの暴露は今後の科学技術進歩に伴って減少出来ると考えられる。しかし、工業ナノ粒子は食品や化粧品中にも含まれているため、産業従事者だけでなく、生活者の暴露も想定しなければならない。また、安全性の観点からナノマテリアルは、溶解し生体内で分解されやすいものと不溶性で生体内で分解されにくいものに分類される<sup>4)</sup>。前者の例としてリポソーム、マイクロエマルジョンやナノエマルジョンなどが挙げられ、これらは溶解物や代謝物の毒性が懸念される。一方、後者の例としてカーボンナノチューブやアスベストなどが挙げられ、物質自体の蓄積性や毒性が懸念される。現在、検討されているナノ粒子の毒性研究の一番の問題点は、ナノ粒子に対する試験法や測定法が未確立な点である。また、一次粒子径と二次粒子径を正確に分離できない点や実際の使用量と研究量に大きな隔たりがあるため、正確な毒性評価ができないのが現状である。

現在、ナノマテリアルの安全性を危惧されている物質の一つに、塗料や化粧品などに汎用されている微粒子酸化チタンがある。

化粧品に使用されている微粒子酸化チタンは、サンスクリーン剤やファンデーションに配合されており、紫外線散乱の効果を発揮し、ナノ化することで肌に塗布した時に白くなるのを防ぎ、透明感を出すことを目的としている。このナノマテリアルの考えうる暴露経路として、経気道暴露、経口暴露や経皮暴露が挙げられる。そこで、まず強制的に微粒子酸化チタンを高用量静脈内投与し、酸化チタンの体内分布と脳への移行性の有無を調査した。また、微粒子酸化チタンを皮膚細胞に適用した時の細胞障害性を評価した。

## B. 理論

皮膚浸透性や皮膚透過性の定量的指標として透過係数が用いられる。角層は部位によって異なるが、約 20 層の角質細胞層から成り、約 20  $\mu\text{m}$  の厚みがある。最上層から一日一層剥がれるので 1  $\mu\text{m}/\text{day}$  すなわち  $10^{-9}\text{cm/s}$  以下の透過係数を示す物質は丸一日かかってようやく角層 2 層目に直前に移行したとしてもこのとき物質が移行した部分 (1 層目) が体から剥がれる。  $2 \times 10^{-8}\text{cm/s}$  なら一日で約 20  $\mu\text{m}$ 、すなわち角層下層まで到達すると考えることができる。

## C. 研究方法

**試薬:** シリカ処理微粒子酸化チタン (MT-150AW) はテイカ株式会社 (大阪) より供給された。

**微粒子酸化チタンの粒子径:** 実験に使用する微粒子酸化チタンの一次粒子径は TEM 画像から image processing software (Mac-View Ver. 3, Mountech Co., Ltd., Tokyo,

Japan)を用いて、また、二次粒子径は動的光散乱粒子径分析装置 (Microtrac 9340-UPA, Nikkiso Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

静脈内投与実験: 5%、1%、0.2%シリカ処理微粒子酸化チタン (rutile 型) /生理食塩液分散体を、7週令の ddY マウスの尾静脈から 0.05 mL 投与し、5分、72時間、1ヶ月、6ヶ月後にマウスから心臓採血を行い、心肺灌流をして脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出後、各臓器の質量を測定後、Soluene-350 で血液および臓器を溶解させ、ICP-MS でチタンの定量を行った。また、投与後の肝臓を 2%グルタルアルデヒド・2%パラホルムアルデヒド/HEPES 緩衝液で固定し細断して transmission electron microscope (TEM, JEM2000EX, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)にて観察した。さらに、血清を採取し、炎症マーカー (BUN, CPK, AST, ALT, LDH) 量を測定した。

ICP-MS のサンプル調製法: Soluene-350 で臓器を溶解させた試料、約 0.1 g を正確にとり、160°C のホットプレート上で乾固し水分を蒸発させた。これを 500°C のホットプレート上で炭化した後、500°C の電気炉中で一晩灰化した。放冷後、硝酸 2 mL 及び水少量を加え、160°C のホットプレート上で 30 分加温溶解した。放冷後、水で 50 mL とし、試験溶液とした。

ICP-MS の定量方法: 試験溶液を 10 mL とり、硝酸及び内部標準液 (コバルトの 1 µg/mL 溶液) をそれぞれ 100 µL ずつ加え、ICP-MS (Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) に導入した。別に、市販のチタン標準液を水で段階的に希釈して調製した標準溶液を 10 mL とり、60%硝酸及び

内部標準液をそれぞれ 100 µL ずつ加え、ICP-MS に導入した。コバルトに対するチタンのイオンカウント数比を Y 軸に、チタンの濃度を X 軸にとり、得られた検量線から試験溶液中のチタン濃度を求め、Soluene-350 で臓器を溶解させた試料中のチタンを定量した。ICP-MS の条件は、RF パワー1600W、サンプリング位置 8.7 mm、プラズマガス (アルゴン) 15 L/min、キャリアーガス (アルゴン) 0.70 L/min、パルスモードで測定した。

細胞障害性試験 (MTT 試験)<sup>5)</sup>: 96 well プレートに  $2 \times 10^4$  cells/well に調製したヒト真皮由来線維芽細胞 (HDF) を播き、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間インキュベート後 0.001~5% に調製した微粒子酸化チタン懸濁液、コントロールとして Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS)、ポジティブコントロールとして 3%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を各、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 48 時間適用した。その後、MTT-培地を 100 µg/well、4 時間適用し、生成したホルマザンを 0.04 N 塩酸-イソプロパノール液で 30 分抽出し、分光光度法により 570 nm の吸光度を測定し、ホルマザン量を求めた。

In vitro 皮膚透過性試験<sup>6)</sup>: 各種三次元培養ヒト皮膚モデル (Epiderm, LSE-high and LDM) を用いて評価した。Epiderm は培養表皮モデル、LSE-high は表皮および真皮から構成される全層モデルとして、LDM は真皮モデルとして使用した。培養皮膚を side-by-side 拡散セルに装着し、角層側 (ドナー) には、3 mL の 0.5% silica coated TiO<sub>2</sub> を、真皮側 (レシーバー) には 3 mL の生理食塩水を適用した。セルの温度は 32°C に



保ち、レシーバー内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラー（マルチスターラー MC-301、SCINICS Co., Tokyo, Japan）により 1,200 rpm で回転させることで攪拌した。経時的にレシーバー側から 0.5 mL の溶液をサンプリングし、その都度、同容積の溶液を充填した。サンプリング溶液の薬物濃度は ICP-MS でチタンの定量を行った。また、適用 24 時間経過後には、レシーバー溶液を全量回収し、溶液中の  $\text{TiO}_2$  濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

動物実験倫理委員会にて承諾後、城西大学生命科学センター倫理規定に従い行った。

#### D. 研究結果

微粒子酸化チタンの粒子径：一次粒子径は 15 nm で針状結晶をしていることが判った。また、二次粒子径は  $220 \pm 105$  nm であった。

静脈内投与実験：酸化チタンのほとんど（チタン量として約 60%）が静脈内投与後肝臓に集積した（Fig. 1）。一方、投与後 6 ヶ月には脾臓のチタン濃度が上昇した。また、脳への分布は観察されなかった。TEM 観察の結果、投与 72 時間後には肝臓のディッセの腔に微粒子酸化チタンが確認され、投与 1 ヶ月後にはクッパー細胞や肝実質細胞中のライソソーム中に微粒子酸化チタンの取り込みが確認された。なお、酸化チタン粒子の取り込みによる形態変化はみられなかった。また、微粒子酸化チタンの静脈内投与後の炎症マーカーの測定では、BUN や LDH で増加傾向がみられたが、どれも有意な差は見られなかった。

細胞障害性試験 (MTT 試験)：シリカ処

理微粒子酸化チタンおよび無処理酸化チタン共、それぞれ添加濃度が高くなると、生細胞率の減少傾向が見られた（Fig. 2）。

In vitro 皮膚透過性試験：3 種類の培養皮膚を用いて 24 時間の透過性試験を行ったが、 $\text{TiO}_2$  はレシーバー側に認められなかった（data not shown）。ICP-MS の Ti の定量限界値および *In vitro* 皮膚透過性実験条件より透過係数を算出すると  $\text{TiO}_2$  の皮膚透過係数は  $7.30 \times 10^{-10}$  cm/s 以下であると推測できた。

#### E. 考察

静脈内投与後、酸化チタンはほとんどが肝臓に集積しごく少量が体外に排泄されていくものと考えられている。投与 6 ヶ月後に脾臓や肝臓中の酸化チタン量が増量するのはおそらく投与時に血管や赤血球などと結合した酸化チタンが脾臓で処理され、その後、最終的な処理過程である肝臓に再集積してきたものだと考えられる。また、投与 1 ヶ月後の TEM 観察よりライソソーム画分に微粒子酸化チタンの取り込みが確認されたことから、この画分の酵素が酸化チタンの消失に影響していることが考えられる。今後は、更にライソソーム画分における消失メカニズムを考えていかなければならない。また、今回調査した炎症マーカーの値はどれも有意な差を示さなかったが、投与後長時間経過時の炎症マーカーの値や他の炎症マーカーを詳細に検討していくことが重要と考えられる。

細胞障害性試験では、適用した酸化チタン濃度が高くなるにつれて生細胞率の減少がみられた。HDF は皮膚組織の真皮を構成する主細胞であり、生細胞率の減少がみら

れた酸化チタン濃度は HDF に暴露される  
とは到底考えられない高濃度であるが、万  
一、皮膚のバリア機能を失った状態の肌  
に暴露された場合、細胞障害が現れる可能性  
が示唆された。

In vitro 皮膚透過性試験では、チタンの皮  
膚透過性が認められなかった (data not  
shown)。また、理論的に算出した TiO<sub>2</sub> の透  
過係数は、角層の落屑速度 (ca.  $1 \times 10^{-9}$  cm/s)  
より低値を示したことから、健全な皮膚に  
適用した TiO<sub>2</sub> は、角層より下層の生きた表  
皮や真皮への移行可能性は低いと考えられ  
た。

#### F. 結論

1. 微粒子酸化チタンは通常の使用方法で  
経皮暴露による皮膚からの吸収は考えられ  
ないと思われる。
2. たとえ、体内に吸収されたとしても少  
量ならば消失の可能性も考えられるが、高  
用量の場合は蓄積が考えられる。
3. 使用する皮膚の状態 (健全皮膚や創傷  
皮膚) を考慮して今後、経皮暴露による更  
なる検討が必要と考えられる。

#### G. 参考文献

- 1) Scientific Committee on Consumer  
Products: Preliminary opinion on safety on  
nanomaterials in cosmetic products. (2007).
- 2) Scientific Committee on Emerging and  
Newly-Identified Health Risks: Opinion on the  
appropriateness of the risk assessment  
methodology in accordance with the technical  
guidance documents for new and existing  
substances for assessing the risk of  
nanomaterials. (2007).

3) Nanotechnologies: Terminology and  
definitions for nano-objects ; Nanoparticle,  
nanofibre and nanoplate. ISO/TS 27687:2008  
1<sup>st</sup> version (2008).

4) B. Behling: EC committee proposes new  
nanomaterials risk assessment procedure. *The  
Rose Sheet*, **28**, 12 (2007).

5) T. Mosmann: Rapid colorimetric assay for  
cellular growth and survival: application to  
proliferation and cytotoxicity assays. *J.  
Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) K. Sugibayashi, H. Todo, E. Kimura, Safety  
evaluation of titanium dioxide nanoparticles by  
their absorption and elimination profiles. *J  
Toxicol Sci* 33(3) (2008) 293-298.
- 2) 杉林堅次、紫外線防御試験法の国際的動  
向と紫外線防御剤の開発の課題：化粧品に  
用いられるナノ粒子の曝露と安全性問題の  
あり方、*Fragrance journal*、10月号 (2008)  
38-41

##### 2. 学会発表

杉林堅次、ナノ粒子の皮膚曝露・皮膚浸透  
の可能性を考える、第 15 回 日本免疫毒性  
学会、9 月

#### I. 知的所有権の取得状況

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

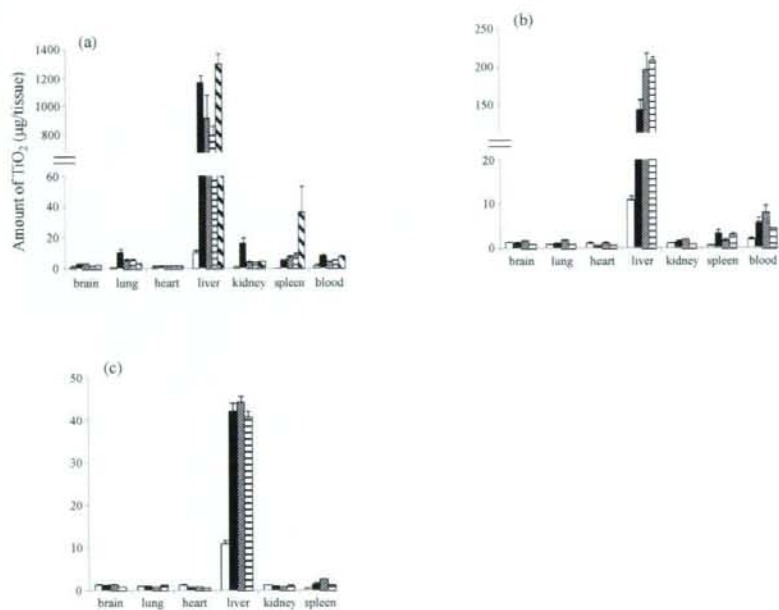


Fig. 1. Amount of TiO<sub>2</sub> after *i.v.* injection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. (a): 5% TiO<sub>2</sub>, (b): 1% TiO<sub>2</sub>, (c): 0.2% TiO<sub>2</sub>. □: control, ■: 5 min, ▨: 72 h, ▩: 1 month, ▪: 6 months. Values are mean + S.E. (n = 3-5).

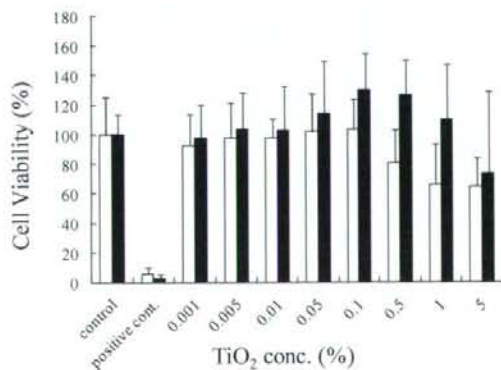


Fig. 2. MTT assay of TiO<sub>2</sub> microparticles. □: silica coated TiO<sub>2</sub>, ■: noncoated TiO<sub>2</sub>. Values are mean + S.D.

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表