

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-一般-006)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 津田 洋幸

平成 21 年 (2009 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	
1. ナノマテリアルの経皮的な吸収・分布に関する研究 五十嵐 良明.....	15
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.....	23
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	31
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	39
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の検索 津田 洋幸.....	44

平成 20 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

平成 20 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）
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 特任教授

【研究要旨】

ナノ粒子は化粧品等に用いられているが、皮膚からの吸収の有無や局所から皮膚以外の臓器に移動する可能性等の評価法が確立されていない。本研究では、正常または障害皮膚において最も使用の多いナノサイズ二酸化チタニウム(nTD)と酸化亜鉛(nZO)等の透過性、皮膚機能と免疫能への影響、発がんへの関与について明らかにし、それらの評価法を開発する事を目的とした。方法は、ラット、ヘアレスマウスおよびミニブタの正常、角質除去、脱脂および脱毛した皮膚、ヒト培養細胞を用いた人工皮膚、透過モデル皮膚塗布による透過性と有害作用について検討し、評価モデルの構築を目指した。nTDは調製中または塗布時に容易にナノ粒子より大きいミクロンサイズの凝集塊を作り、健全皮膚を透過しないことが分かった。ラットにおいてnZOはイオン化して皮膚組織を通過した可能性が高い。マウス耳介角質除去皮膚にシリコン分散35nmTDとハプテン(DNCB)を塗布した場合に耳下リンパ節の感受性が増強された。ミニブタの脱毛皮膚では毛包に侵入するが周囲組織に移行しなかった。以上から、nTDは調整段階で凝集塊をつくるため皮膚組織を通過する可能性は極めて低い。良好な分散状態(被覆+シリコンオイル分散等)では障害、乾燥および脱毛皮膚から毛根に侵入し局所に軽度の起炎症作用を示す。しかし毛包や周囲組織への移行は極めて少ないことが分かった。これらから標準的なプロトコールを構築する基礎データが得られた。

分担研究者

五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長

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 眞紀 神奈川県衛生研究所 理化学部 主任研究員

菊地 克子 東北大学大学病院講師

津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科
津田研究室 特任教授

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

伊藤 由美子 東北大学大学院 技官

飯郷 正明 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

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 分子毒性学大学院生

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

西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所・環
境衛生部 部長

内野 正 国立医薬品食品衛生研究所 環境
衛生部 主任研究官

A. 研究目的

正常または障害皮膚におけるナノ粒子の浸透性、皮膚機能と免疫能への影響、発がんへの関与について検討することによって、これらの生体影響を評価するシステムを構築することを目指した。材料は、正常および障害された動物の皮膚、人工皮膚、皮膚透過モデルを用いる。また投与するnTDの分散液中における凝集状態を検討し、皮膚透過性との関連を明らかにする。班員のプロジェクトについては以下に示す。

1) 皮膚発がん高感受性のヒトプロト型 **c-Ha-ras** 遺伝子導入 (**Hras128**) ラットを用いた皮膚塗布二段階発がんモデルにおいて、ルチル型・無コーティング nTD に弱い発がんプロモーション作用を示唆する結果を得た。この結果について、再実験を行うと共に検体の、*in vivo* と *in vitro* における皮膚透過性ならびに傷害皮膚での通過性について検討を行い、発がんプロモーション

作用の確認とその機序を明らかにする事を目的とした(津田)。

2) ラットに nTD を連続塗布した後の皮膚吸収性の有無を評価した。前年度に肝及び腎の濃度は雄雌で異なっていた。そのため、今年度は動物数を増やして再検討した。溶媒中での二酸化チタニウム粒子の分散性を解析し、次に二酸化チタニウムを経皮曝露させ、血液学的並びに病理学的検査を行い、毒性発現の有無を調べた。皮膚の電顕観察を行うとともに、雄性ラットについては臓器中のチタニウム濃度を ICP-MS による測定を行い、皮膚吸収性を評価した(五十嵐)。

3) 昨年度の研究において、バリア機能が傷害された皮膚において、nTD は感受性を有しないが、軽度のアジュバント効果および刺激性を有する可能性が示唆された。本年度は分散性のより高いシリコンを媒体とし、non-RI local lymph node assay (LLNA) の手法を用いて、nTD がバリア機能を失った皮膚の局所免疫に及ぼす影響について検討した(宮澤)。

4) 前年度の研究において、ヒト皮膚組織に近い Yucatan micropig (ミニブタ) からの摘出正常及び損傷皮膚(脱毛、脱脂、角質除去)に蛍光 isothiocyanate dextran (FD-4, Mw: 4000) を塗布したところ脱脂皮膚では真皮まで蛍光粒子が観察され、さらに角質除去では約 30% が透過モデルのレセプター相で検出された。粒子の分散状態が透過性に関与する可能性があるため、今年度は懸濁液中で一次粒子の凝集が起こらない蛍光標識化ポリスチレン (粒子径 25, 100, 250, 1000 nm) と化粧品に汎用されている種々の二酸化チタニウム (多分散系) について皮膚透過性を検討した(藤井)。

5) ヘアレスマウスにおいて、ナノ粒子化された化学物質のうち二酸化チタニウムを健常皮膚ならびに損傷皮膚の両者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によって角層水分量指標であるコンダクタンス、バリア機能指標である経表皮水分喪失量 transepidermal water loss (TEWL)、ならびに L*a*b* 表色系による皮膚色調の定量を行った(菊地)。

B.研究方法

1)津田

実験1 発がん二段階モデルを用いた nTD による皮膚発がんのプロモーション作用の検証: 1回目 (H. 19) の実験では弱い発がんプロモーション作用が示唆されたので、同一モデルで再実験を実施した。皮膚および乳腺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 ラット) および野生型ラット (SD ラット) の背部を 3x3cm 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) を滴下した。100mg または 50mg の nTD (直径 20nm, ルチル型、無コーティング) を pentalan (分散剤) 0.5ml に懸濁し、週2回塗布した。Hras128 ラットは 28 週、SD ラットは 40 週にて屠殺剖検した。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-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)、100nmol を 0.5ml のアセトンに溶解して週に3回塗布した。

実験2 人工皮膚を用いた nTD の *in vitro* 表皮透過性試験: 藤井班員の報告では、ミニプタでは毛嚢を経由して nTD が表皮、皮下組織に侵入する可能性が指摘されたので、毛嚢のない人工皮膚を用いて nTD の透過性を検討した。人工皮膚は、ヒト三次元培養皮膚モデル (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) を用いた。二層の培養プレートの上層の底面フィルター上にヒト皮膚扁平上皮をはりつけ、その上に nTD または溶媒を 43.6μl ペンタランに nTD を 4.4 または 8.8mg/well (ラットの実験と同じ濃度) 塗布した。12時間インキュベートした後、人工皮膚を透過して下層に移行した nTD 量を、ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometer) を用いて原子吸光度として測定した。

実験3 Tape stripping による障害皮膚における nTD の *in vivo* 表皮透過性試験: Tape stripping: 3cm 角に切り取った市販のテープを、バリカンで剃毛したラットの背部皮膚にテープをはりつけた後、角質ごとテープを剥がした。この操作を5回、10回、20回、30回、50回、連続に

繰り返した後、背部表皮が3日後、7日後にどの程度再生しているか病理組織学的に検討した。**実験4** nTD の真皮内投与によるサイトカインの発現: 角質と表皮の一部が剥離した場合あるいは表皮の防御機構が障害されている状態では、nTD は真皮・皮下組織に到達することが予想される。そこで我々は、nTD を皮内に注入した場合、異物肉芽腫におけるサイトカインの発現上昇を検討した。雄 SD ラットの背部皮膚を剃毛し、nTD を1回あたり 5000ppm の濃度で 100μl 皮内に4カ所投与した。1週間に2回の割合で合計4回投与した後屠殺剖検し、皮膚および血液中の MIP1α の発現を検索した。

2)五十嵐

試薬及び材料: 酸化亜鉛 (ZnO) の MZY-303S 及び MZ-300、ZO-250、nTD の SMT-500SAS (粒径 35nm アルミナ・シリカ・シリコンコーティング・ルチル型)、MT-500B (35nm 非コーティング・ルチル型) 及び AMT-600 (30nm 非コーティング・アナターゼ型) を用いた。テトラエチルヘキサン酸ペンタエリスリチル (ペンタラン, pentalan-408) およびシリコンオイル (環状シリコンオイル, TSF405) を用いた。酸化亜鉛及び二酸化チタニウムはペンタラン及びシリコンオイル分散、超音波で 30 分処理して、塗布用試料溶液を使用直前に調製した。

動物: CrI:CD (SD) 系ラットを用いた。1 ケージ当たり 1 匹ずつ入れて、固形飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業) 及び水を自由に摂取させた。

投与方法:

・**酸化亜鉛:** 1 群 6 匹で行った。投与 7 日前より、ラットの背部から側腹部を適時電気バリカンで剃毛し、体表面積の約 10% に相当する適用部位を設けた。媒体または試験溶液を経口投与用管のついた注射筒にとり 10μl/cm² ずつ皮膚に均等に塗布し、リント布 2 枚、不透性シート (ブレンダーム) で覆ったのち、伸縮性包帯を巻いて固定し閉塞した。20~24 時間後、閉塞パッチを除去し、投与部位を微温湯でしめらせたガーゼで拭き、その日の投与を行うまでの間リント布で覆った。この操作を 28 日間反復して行った。

・二酸化チタニウム: 1群 10匹で行った。試験物質の投与7日前及び前日に、背部から側腹部を毛刈りし、体表面積の約10%に相当する適用部位(4×5 cm)を設けた。マイクロピペットを用いて、媒体または試験溶液 200 µl を28日間反復して塗布した。除毛は雄では7日、雌では5日以降は毎日実施した。

血液学的検査、組織の採取と電子顕微鏡検査: 採血終了後致死させ、肝臓、脾臓、腎臓(左)、肺及び脳はチタン測定用として-30°C冷凍庫で保存した。投与部位の皮膚左半分は、表面をセロハンテープで約20回ストリッピング後にチタニウム測定用とした。肝臓、腎臓、皮膚の一部は病理組織検査用または電子顕微鏡検査用とした。

臓器中の亜鉛の定量: 細切した臓器 0.1~0.2 g をHP-500型テフロン製分解容器にとり、分解溶媒として硝酸 3 ml、過酸化水素水 2 ml 及び超純水 2 ml を加え、密栓した後、マイクロウェーブ処理した。13本の分解容器に対し、80 psi で圧力制御し、600W (80%)のマイクロウェーブを20分間照射、そのまま2分間保持して分解を行った。放冷後、分解液に超純水を加えて正確に20 ml としたものを試料溶液とした。試料溶液 100 µl をHPLCポンプでICP-MSに導入し、マス数66のピーク面積を測定した。亜鉛標準液(1~500 ppb)を用いて作成した検量線より試料溶液中の亜鉛濃度を求め、臓器中の濃度(µg/g, ppm)に換算した。

臓器中のチタンの定量: 細切した臓器約0.2 g を分解容器にとり、硝酸 5 ml 及び超純水 1 ml を加え、密栓した後、マイクロウェーブ処理した。13本の分解容器に対し、80 psi で圧力制御し、1600W (100%)のマイクロウェーブを20分間照射、そのまま20分間保持して分解した。放冷後、分解液に超純水を加えて正確に20 ml としたものを試料溶液とした。試料溶液をICP-MSに導入し、マス数47、48及び49のイオンカウントを測定した。チタン標準液を用いて作成した検量線より試料溶液中のチタン濃度を求め、臓器中の濃度(µg/g, ppm)に換算した。粒度分布の測定: 島津製作所製レーザ回折式粒度分布測定

装置 SALD-7100 を用い、プロトコールに従って適切条件下の濃度での粒度分布を測定した。統計処理: 分散の均一性を Bartlett 法(有意水準: 5%)により検定した。分散が均一な場合は、Dunnett の多重比較検定を用いて対照群との比較を行い、分散が均一でない場合は、Steel の多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準を1および5%とし、両側検定とした。

3) 宮澤

被検物質: 二酸化チタニウム(TiO₂ A (SMT-500SAS): 粒径 35nm、シリカ・アルミナ・シリコンコーティング、および TiO₂ B (:MT-500B): 粒径 35nm、無コーティング、TiO₂ C (Lu-250): 粒径 250nm、TiO₂ D (DN-SH(2)): 無コーティング)、TiO₂ D: 粒径 250nm、シリコンコーティング)を使用した。媒体は、シリコンまたはペンタランを用いた。

感作性物質: 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCD) をアセトン・オリーブ油(4:1,v/v, AO) に溶解し、0.1、0.2、0.4 および 0.5% 溶液を調製した。動物: 8-12 週齢の CBA/JN 雌性マウスを用いた。

テープストリッピング: 検体塗布前日に、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))で除去した。

Non-RI local lymph node assay (LLNA): 分散剤(AO)群、TiO₂ 群、DNCB、および DNCB-TiO₂ 群とした。1群 4~6 匹とした。

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面に、25µL ずつ AO または DNCB を塗布し、ドライヤーで乾燥させた後、媒体または TiO₂ を塗布した。感作は24時間間隔で3日間連続して行った。最終感作の3日後に体重測定を行った後、左右の耳下リンパ節を採取して重量を測定し、-20°Cで保存した。

BrdU 取り込み率の測定: 最終感作の2日後に、10mg/mL の生食溶解 BrdU 0.5mL /マウス腹腔内投与した。冷凍した耳下リンパ節を BrdU ELISA キットで測定し、Stimulation index (SI)を算出した。

検討項目: [至適 TiO₂ 用量の検討]: 0%、2%お

よび 20%TiO₂ 塗布群について、AO または 0.2%DNCB 塗布を行い、6 群間での反応性の相違について検討した。TiO₂ A・シリコンオイル分散試料を用いた。[至適 DNCB 用量の検討]: DNCB の至適濃度を求めるため、0%、0.1%、0.2%および 0.4%DNCB 塗布群について、20% TiO₂ 塗布群とシリコンオイル塗布群の両群を設定し、8 群間での反応性の相違について検討した。[媒体による反応性の相違の検討]ペンタランでは 20% TiO₂ A, B, C およびシリコンオイルでは TiO₂ A, B, C, D を用いた。各 TiO₂ について、AO および 0.2%DNCB で検討した。[耳介におけるサイトカイン等の mRNA の発現の検討]耳背側面の表皮と真皮を摘出して mRNA 抽出用検体とした。TiO₂ B をペンタラン分散し、0、0.1 および 0.5%DNCB 塗布群の炎症性タンパク、サイトカイン等の mRNA 発現を解析した。

4) 藤井

被検物質: 蛍光ポリスチレン粒子は、PS-1000 (粒径 1000 nm)、PS-250 (粒径 250 nm)、PS-100 (粒径 100 nm)、PS-25 (粒径 25 nm) (以上 micromer[®]-greenF)1%懸濁液を用いた。二酸化チタニウムは、ルチル型表面処理なし(粒径 250 nm)、ルチル型表面処理あり(粒径 35 nm、テイカ)、ルチル型表面処理あり(粒径 35 nm、アルミナ、シリカ、シリコン表面処理品)を用いた。また、粒径 短径 10 nm、長径 100 nm、アルミナの表面処理品を用いた市販品 (SAS-TTO-S-3 / D5 (50%) (MiBrid Dispersion)も用いた。二酸化チタニウムの分剤にはシリコン (KF-995) を用いた。

皮膚透過試験:「ミニブタ皮膚処理法」5ヶ月齢の雌 Yucatan micropig (YMP、ミニブタ) 摘出皮膚を用いた。凍結された YMP 皮膚の皮下脂肪組織を除去し、これを健常皮膚とし、これをストリッピング処理(角層がテープに附着しなくなるまで行う)して損傷皮膚を作製した。

Delipidized skin: Jokura らの方法を参考にした。改良 Franz 型拡散セルに健常皮膚を装着後、アセトン:エーテル混液 (1 : 1) 2 mL を 40 分間適用後に溶媒を取り除き乾燥させた。

Hair removed skin: 適用面積 (1.1 cm²) 内にお

いて肉眼で確認できる毛をピンセットにて除去した。

蛍光ポリスチレン粒子皮膚透過試験: 1% 蛍光ポリスチレン懸濁液を 10 μL / cm² 適用後、改良 Franz 型拡散セルに取り付け、24 時間後にセルから取り外した皮膚から切片 (20 μm) を作製し共焦点レーザー顕微鏡にて検体の蛍光を観察した。角層を観察する場合は、両面テープ (Scotch[™] 665-3-18, 3M) を貼り付けたスライドガラスにてストリッピングし、角層中の蛍光を観察した。

二酸化チタニウム皮膚透過試験: 10% 二酸化チタニウム・シリコン懸濁液を 2 μL / cm² 適用後、改良 Franz 型拡散セルに取り付けた。24 時間適用後、レセプター相のサンプリングを行い、その後、セルから皮膚を取り外した。スライドガラスの上にシアノアクリレート (アロンアルファ) を塗り、皮膚の角層側と密着させた。乾燥後にスライドガラスから皮膚を剥離した。この操作を 2 回を行い、皮膚表面上に残る二酸化チタニウムを除去した。表皮と真皮を剥離する場合には予めこの操作を 2 回を行い、その後、加温により表皮と真皮を剥離した。チタニウム量は ICP-MS にて計測した。皮膚およびレセプター相中のチタニウム濃度 (μg / g, μg / mL) に換算した。

二酸化チタニウムの分散性評価: シリコンオイル中に懸濁させ、粒子径は 1000 倍希釈しダイナミック光散乱光度計 (DLS-8000HL) にて測定した。実際に塗布した状態は、分散液を皮膚に 2 μL / cm² 塗布し、実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察を行った。

5) 菊池

被検物質: SMT-500SAS (35nm、ルチル、アルミナ / シリカ / シリコンコーティング)、MT-500B、AMT-600、Lu-205 (250nm、ルチル、非コーティング) を用いた。

健常皮膚連続塗布モデル: 試料を Day 1-5、Day 8-11 に単純塗布した (Day 6、7 は無塗布)。

損傷皮膚単回塗布モデル: マウス背部皮膚にセロハンテープで角層を剥離し、滲出液により皮膚面が光沢を持つまで 10-15 回連続で行った

後、試料を塗布した。

皮膚生理指標の生体計測工学的評価:皮膚の生理指標として、角層水分量指標であるコンダクタンスを Skicon200EX (I. B. S. 社)、バリア機能の指標である経表皮水分喪失量

transepidermal water loss (TEWL)を DermaLab (Cortex Technology) を用いて計測した。色彩色差計測では国際照明委員会 (CIE) 採用の表色系 L*値 a*値 b*値を計測して皮膚色を定量した。健常皮膚モデルにおいては、Day 1 の試料塗布前、Day 5 の試料塗布前、Day 12 に皮膚計測を施行した。損傷皮膚モデルにおいては、ストリッピング前後 (Day 1)、試料塗布 24 時間後 (Day 2)、72 時間後 (Day 4)、7 日後 (Day 8) に皮膚計測を施行した。

病理組織ならびに透過型電子顕微鏡:健常皮膚においては、Day 12 の皮膚計測後背部の皮膚を採取した。損傷皮膚試験ではテープストリッピング後に試料を塗布してから3時間後、24 時間後に皮膚を採取した。

試料の透過に関する追加実験:コーティング型 35nm 二酸化チタニウムを 1%濃度でシリコンオイルに懸濁させ超音波処理し、マウスの背部皮膚全体に2時間おきに3回塗布した後、2時間経過 (最初の塗布から6時間後) 後、セロハンテープで1、2、3、5、10および15回剥離後の皮膚を直径6ミリの円形のトレパンで皮膚を生検し走査型電顕ならびにエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX) でのチタニウムを分析した。

(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、各施設における動物実験倫理委員会の審査を経て実験を実施した。

C. 研究結果及び考察

1) 津田

実験1 nTD による皮膚発がんのプロモーション作用の検証

再実験の結果、Hras128 ラットでは肉眼的に観察された皮膚腫瘍性病変の平均発生個数は、溶媒対照群 6.7 ± 4.8 、nTD 50mg 群 5.7 ± 5.4 、nTD 100mg 群 5.1 ± 2.8 、TPA 群 7.3 ± 5.8 それ

ぞれ観察され、nTD 塗布による有意な上昇はみられなかった。また SD ラットにおいても、平均 0.5 個の腫瘍性変化が観察されたが、nTD による明らかな変化はみられなかった (現在、病理組織学的検索を行っている)。

実験2 人工皮膚を用いた nTD の in vitro 表皮透過性試験

ヒト三次元培養皮膚モデルを用いて透過した nTD の量を測定したところ、溶媒対照群で 1well あたり $0.14 \pm 0.02 \mu\text{g}$ に対し nTD 250ppm 塗布群では $0.15 \pm 0.03 \mu\text{g}$ 、nTD 500ppm 群では $0.29 \pm 0.27 \mu\text{g}$ と有意な差はなく、nTD は人工皮膚における角質層と扁平上皮層を通過しないことが示された。

実験3 Tape stripping による障害皮膚における nTD の in vivo 表皮透過性試験

5回の Tape stripping では、表皮を完全に剥離できず、3日後には対照の表皮の厚さに戻っていた。30回の Tape stripping では完全に表皮が脱落していたが、3日後では約 50%、7日後ではほぼ元通りの表皮の厚さであった。

実験4 nTD の真皮内投与によるサイトカインの発現

皮膚における MIP1 α の発現は、弱く観察されたが、血液中の MIP1 α の発現は検出できなかった。現在、病理組織標本を作成し、nTD が真皮内のどの細胞にとりこまれているか検討している。

2) 五十嵐

酸化亜鉛の媒体中の粒度分布:レーザ回折式粒度分布測定装置を用いて懸濁させた各酸化亜鉛の粒度分布を測定したところ、平均粒子径は 545~1364 nm でありナノサイズ粒子はなかった。細胞間隔は 100 nm、毛穴の大きさは約 200~500 nm、毛包は 100 μm であることから、細胞内への吸収、細胞間や毛包を通じて皮膚透過は起こり得ないと考えられた。

臓器中の亜鉛濃度:皮膚ではペンタラン溶媒群に比べ亜鉛投与群は高値を示した。これは毛包に残存したものと考えた。肝臓の亜鉛濃度は、nZO10%懸濁液塗布群で有意に増加した。粒

子サイズやコーティングによる差はなかった。肝臓で増加の原因として、酸化亜鉛がイオン化して吸収された可能性がある。

二酸化チタニウムの媒体中の粒度分布: nTD は検出されなかった。ルチル型 nTD は表面コーティングがないと分散性は悪く、活性の強いアナターゼ型よりも粒径は大きくなった。適切な表面コーティングと性能の良い分散媒体と組み合わせることによって平均粒子径を小さくすることが可能である。

28 日間反復塗布試験

・血液学的検査: SMT-500SAS (粒径 35nm・ルチル型アルミナ・シリカ・シリコンコーティング) および MT-500B (35nm・ルチル型・非コーティング) 塗布で白血球数、好中球数は毒性学的意義のない変動範囲であった。血液生化学的検査でも γ -GTP、総コレステロール、リン脂質、トリグリセライド等の変化は毒性学的意義はないと考えられた。病理組織学的検査では、投与部位皮膚、肝臓及び腎臓に炎症やその他の毒性変化はなかった。

・電子顕微鏡的観察: nm サイズであっても二酸化チタニウム粒子が皮膚透過するとは考えられなかった。

・臓器中のチタン濃度: 対照群の肝臓、腎臓及び脾臓でのチタン濃度は、おおそ定量限界レベルの 1 $\mu\text{g/g}$ であった。肝、腎、脾における平均値は対照群と有意な差はなく、移行しないと考えた。

3) 宮澤

至適 TiO₂ 濃度の検討: 耳下リンパ節重量-体重比は、アセトン・オリーブ (AO) と TiO₂ の同時塗布では用量を変えても AO 群有意差は認められなかったが、0.2%DNCB と TiO₂ を同時塗布すると、リンパ節重量は TiO₂ の濃度依存的に有意に増加した。Stimulation Index (SI) は、20% TiO₂ 同時塗布群では有意な増加が認められた。

至適 DNCB 濃度の検討: シリコンオイルとハプテンである DNCB を同時投与したとき、0.2%DNCB 同時塗布群の SI は 5-6 で、感作

性陽性 (SI 3以上) であった。20%TiO₂ と種々の濃度の DNCB を同時に投与したときも、TiO₂ の種類 (A、B および C) に関わらず、

0.2%DNCB で SI 6-8 を示し、SI が増加する傾向にあった。

媒体による反応性の相違の検討: シリコンオイル分散剤のとき、リンパ節重量-体重比および SI において、粒子径 35nm の TiO₂ (A および B) では、250nm の TiO₂ (C および D) に比べ、高い値を示す傾向があった。この傾向は

0.2%DNCB と同時塗布することによって、より顕著になった。ペンタランでは有意差はなかった。

耳介におけるサイトカイン等の mRNA の発現: TiO₂ の最終投与から 3 日後の耳介における炎症性サイトカイン等の mRNA の発現量を定量的 PCR 法にて測定した結果、MCP-1 の有意な増加が認められた。

以上から、ペンタランより分散性の高いシリコンオイルを媒体としたことにより、35nm の TiO₂ では耳下リンパ節のリンパ節重量-体重比および SI は TiO₂ の濃度に依存し有意に増加し、損傷皮膚においては、TiO₂ は DNCB による感作性を増強することが明らかになった。耳介の mRNA 解析では遅延型アレルギーにおいて単球および T 細胞の組織浸潤に関与する MCP-1 が有意に増加していたが、他の炎症性サイトカインは有意な変化は認めなかったことから、採材した時期が適当ではなかったと考えられる。

4) 藤井

健全皮膚での皮膚移行性評価: 蛍光ポリスチレン (粒径 25-1000、PS-25、PS-100、PS-250、PS-1000) を塗布したところ、深さ 20-100 μm 付近では毛および毛包の間隙で蛍光が認められたが毛包への移行はなかった。

損傷皮膚での皮膚移行性評価:

テープストリッピング角質除去では、PS-25 では、基底膜付近にまで移行した例を小数認めたが、PS-100、250、1000 は表面に留まった。アセトン脱脂皮膚では、PS-25 については基底膜まで蛍光が認められる場合が 1 例あり、脱脂による角層機能の低下の関与が示唆された。脱毛皮膚

では、PS-25 蛍光は血管系の存在する毛乳頭付近まで認められたが周辺組織への移行はなかった。100 nm 以上の PS では毛包開口部および毛包中まで蛍光が認められたが周辺組織への移行は認められなかった。

二酸化チタニウムの皮膚移行性評価:

・分散性評価: 製剤をシリコンオイルで 1000 倍希釈し、動的光散乱法により粒子径を測定した。TC-35 および TCD-100 ではいずれも平均粒子径は 100 nm 程度であり、100nm 以下の粒子も存在することが示された。表面処理や分散剤の使用は分散性向上に大きく寄与することが示された。

・皮膚移行性評価: 分散状態が異なる 4 種の二酸化チタニウムを正常、角質除去、脱毛皮膚における移行性を検討した。脱毛皮膚では TC-35 (粒径 35nm) は皮膚組織(表皮と真皮)に有意に増加した。表皮では毛包と毛囊の間に存在した。以上から、粒子径 25 nm のポリスチレン粒子は、正常皮膚では直接皮膚内へは移行しないが毛包周囲への移行は認められた。毛包下部や周辺組織へは移行しなかった。角層を除去および脱脂皮膚では、粒子径 25 nm 程度のポリスチレンの一部が移行したが侵入経路について検討が必要である。脱毛皮膚では 1000 nm 程度の凝集塊まで毛包から毛乳頭部位まで移行した。nTD の親油性コーティング TC-35 はシリコンへの分散性は良好であり、ナノ粒子として存在する割合が高く、脱毛の場合は毛包に残存した。凝集しやすいナノマテリアルの皮膚移行を検討する際は、分散状態の把握が必要である。

4) 菊地

ヘアレスマウス健全皮膚の角層水分量に与える影響:

角層水分量指標であるコンダクタンスは MT-500B (35nm, ルチル, 非コーティング) および AMT600 (30nm, アナターゼ, 非コーティング) がシリコン対照と比較して低下する傾向がみられたが、有意差は認めなかった。TEWL 値、L*値 a*値 b*値はいずれの試料も対照と比較して有意な変化を認めなかった。つまり、nTD によるバリア機能低

下 (TEWL 値の上昇) ならびに、炎症性発赤 (a*値の上昇) はなかった。

損傷皮膚単回塗布モデル:

滲出があるまで角層を剥離した皮膚に試料を塗布して皮膚生理指標を測定した。角層水分量が対照と比較して低下する傾向が認められたが有意差はなかった。TEWL 値については、対照と比べて有意な回復の遅延は認めなかった。

L*a*b*値、バリア機能低下 (TEWL 値の上昇) ならびに炎症による発赤はなかった。

病理組織ならびに透過型電子顕微鏡:

・健全および損傷皮膚連続塗布モデル: いずれにも SMT-500SAS (35nm, ルチル, アルミナ/シリカ/シリコンコーティング), MT-500B, AMT-600, Lu-205 (250nm, ルチル, 非コーティング) を塗布した場合、表皮層あるいは真皮層 (特に毛包周囲) に二酸化チタニウム粒子は観察されなかった。電顕でも同様であった。表皮、真皮の炎症細胞浸潤も対照と比べて差異はなかった。

・試料の透過に関する追加実験: EDX において、C (炭素) と Ti (チタン) の元素比は、1回剥離後 (炭素 96.55%, チタン 3.45%)、2回剥離後 (炭素 96.87%, チタン 3.13%)、3回剥離後 (炭素 97.34%, チタン 2.66%)、5回剥離後 (炭素 97.28%, チタン 2.72%)、10回剥離後 (炭素 99.21%, チタン 0.79%)、15回剥離後 (炭素 99.30%, チタン 0.70%) であった。すなわち連続して角層剥離を行っても、試料と付着してくる角層細胞は 2 枚目以降はなかった。

以上より、ヘアレスマウス健全皮膚に、媒体に懸濁させた SMT-500SAS を塗布しそれを走査電顕で観察した結果、単粒子で存在するものがわずかながら確認された。しかしながら、角層をテープで連続 10 回剥離後の皮膚では、透過してその下層の表皮あるいは真皮に透過する可能性はほとんどないと考えられた。計 9 日間連続塗布後も健全皮膚においては、角層水分量や皮膚バリア機能の変化、発赤などの変化は認められず、経皮毒性は観察されなかった。

D. 結論

・ラット発がん二段階モデルを用いた nTD を塗布

した皮膚発がんのプロモーション作用を検索したが、正常皮膚に塗布した実験ではnTDが表皮を通過しなかったため、nTDによる修飾作用は明確には観察できなかった。今後、皮膚の防御機構を担う表皮の角質層を除去するTape stripping法を用いて、角質層を除去した場合のnTDの表皮層透過性および皮膚発がんプロモーション作用を検討し、正常皮膚の結果と併せてnTDの皮膚発がん性に対する影響の結論を出す予定である(津田)。

・ペンタランに懸濁したnZOは、ほとんどが数百nm程度の大きさまで凝集した。これを塗布したラットの皮膚では、亜鉛濃度が媒体のみを塗布した対照群に比べて皮膚と肝で高く計測された。毛包等に着、残存した凝集体と、酸化亜鉛がイオン化して吸収された肝に達したものである可能性がある。

・nTDでも媒体中ではほとんど数百nm以上の大きさに凝集していた。電子顕微鏡像では二酸化チタニウムは角質層表面に凝集していて透過している像はなかった。粒子の一次粒子径、結晶形及び表面コーティングの違いによって、肝臓及び腎臓中のチタン濃度に無処置群との差はなかった。皮膚透過性について結論づけるには、単分散させた二酸化チタニウムを用いて試験する必要があると思われる。また皮内に投与して、臓器に分布するかどうか確認することが必要と思われる(五十嵐)。

・マウスの耳介のバリア機能が傷害された皮膚において、TiO₂は感作性を有しないが、粒子径に依存して軽度のアジュバント効果および刺激性を有し、免疫系を賦活化する可能性が示唆された。しかし、コーティングによる影響の差は認められなかった(宮澤)。

・ミニプタにおいて、単分散性を示すポリスチレン粒子(PS)および4種の異なる多分散性の二酸化チタニウム(TiO₂)懸濁液は皮膚の損傷にかかわらず、皮膚組織には移行しなかった。ポリスチレンではまれに表皮まで移行することがあるが、両者とも毛包に侵入し、特に脱毛皮膚では毛嚢内まで入るが周囲組織に移行しなかった。血管系への移行が問題となりうるのは、血管系

の露出損傷された脱毛時のみであると推察される(藤井)。

・ヘアレスマウスの角層はヒトと較べて機能が劣るが、二酸化チタニウム粒子9日間連続塗布でも角層を通過しなかった。また、角層を剥離損傷した皮膚においても、単に1回のみでは経皮吸収する可能性は殆どないことがわかった。しかしながら、用いた試料は、ほとんどが凝集塊を形成していたことが皮膚角層を透過しない理由であると考えられ、ナノサイズの粒子径を保ったままの試料を投与した場合の検討が必要である(菊地)。

以上から、nTDは調整段階で凝集塊をつくるためナノ粒子では無くなり、皮膚組織を通過する可能性は極めて低い。良好な分散状態(被覆+シリコンオイル分散等)では障害、乾燥および脱毛皮膚から毛根に侵入し局所に軽度の起炎症作用を示す。しかし毛包や周囲組織への移行は極めて少ないことが分かった。可能な限り良好な分散状態における有害作用について検討し、標準的なプロトコールを構築する必要がある。

E.健康危機情報

なし

F.研究発表

<津田>

1. 論文発表

1. Matsuoka, M., Fukamachi, K., Uehara, N., Tsuda, H. and Tsubura, A. Induction of a novel histone deacetylase
I/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis. *Cancer Sci* 99:309-315, 2008.
2. Kurosawa, G., Akahori, Y., Morita, M., Sumitomo, M., Sato, N., Muramatsu, C., Eguchi, K., Matsuda, K., Takasaki, A., Tanaka, M., Iba, Y., Hamada-Tsutsumi, S., Ukai, Y., Shiraiishi, M., Suzuki, K., Kurosawa, M., Fujiyama, S., Takahashi, N., Kato, Ryoichi., Mizoguchi, Y., Shamoto, M., Tsuda, H., Sugiura, M., Hattori, Y., Miyakawa, S., Shiroki, R., Hoshinaga, K., Hayashi, N., Sugioka, A. and Kurosawa, Y. Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic. *PNAS* 105:7287-7292.2008
3. Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Yoshida, H., Tsuda, H. and Tsubura, A. Rat mammary preneoplasia and neoplasia: a model for human breast cancer research. *Trends in Cancer Reseach.* 3, 1-13, 2007.
4. Fukamachi, K., Imada, T., Ohshima, Y., Xu, Jiegou. and Tsuda, H. Purple corn color suppresses Ras protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Sci* 99:1841-1846. 2008
5. Tamano, S., Sekine, K., Takase, M., Yamauchi, K., Iigo, M. and Tsuda, H. Lack of Chronic Oral Tpxicity of Chemopreventive Bovine Lactoferrin in F344/DuCrj Rats. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 9, 313-316, 2008
6. Iigo, M., Alexander, D. B., Long, N., Xu, J.,

Fukamachi, K., Futakuchi, M., Takase, H. and Tsuda, H. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. *Biochimie.* 91,86-101, 2009

2. 学会発表

1. 発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原性早期検出の試み、第35回日本トキシコロジー学会、2008年6月26-28日、東京
2. Lessons from possible carcinogenic mechanism of asbestos, 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
3. Promotion of Nano-sized TiO₂ on lung and mammary gland carcinogenesis in female human H-ras gene Transgenic Rats, 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
4. ナノサイズ二酸化チタンおよびフラーレン(C60)の肺発がん促進作用とその機序の解析、第23回発がん病理研究会、2008年8月25-27日、鳥羽
5. ナノサイズ二酸化チタニウムの肺と乳腺発がん促進作用とその機序の解析、第25回日本毒性病理学会、2009年1月27-28日、浜松

<五十嵐>

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 徳永裕司、小濱とも子、内野 正、五十嵐良明. ナノマテリアルの評価手法に関する研究の進展、経皮暴露研究について. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会. 平成20年6月
- 2) 小濱とも子、徳永裕司、五十嵐良明、内野正、西村哲治. ナノマテリアル酸化チタンの経皮的な吸収及び体内分布. 第45回全国衛生化学技術協議会年会. 平成20年11月

<宮澤>

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

<藤井>

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- ① 泉水 美香, 藤井 まき子, 田村 壽朗, 小泉 直也, 渡辺 善照, 「蛍光ポリスチレンを用いたナノマテリアル皮膚移行性評価」, 日本薬剤学会第 23 年会(札幌, 2008.5)
- ② 藤井 まき子, 「経皮吸収について」, ナノ粒子テクノロジーの国際動向 -レギュレーションと安全性-に関するシンポジウム(東京, 2008.11)
- ③ 泉水美香, 藤井まき子, 三浦慶子, 田村壽朗, 小泉直也, 渡辺善照, 「酸化チタンナノ粒子の皮膚移行性評価」, 日本薬学会第 129 年会(京都, 2009.3)

<菊地>

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G.知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

<津田>

1. 特許取得 (出願中)
発明の名称: ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途
出願日: 平成 21 年 3 月 24 日
出願番号: 特願 2009-071951
発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苛
特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他
該当なし

<五十嵐>

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

<宮澤>

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

<藤井>

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

<菊地>

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G.参考文献

<五十嵐>

1. 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)
2. 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)
3. Gamer AO, Leibold E, van Ravenzwaay B. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicol. In Vitro* 20, 301-307 (2006)
4. Korn M das GA., Ferreira AC, Costa ACS, Nobrega JA, Silva CR. Comparison of decomposition procedures for analysis of titanium dioxide using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Microchemical J.*, 71, 41-48 (2002)
5. Sugibayashi K, Todo H, Kimura E. Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles. *J. Toxicol. Sci.*, 33, 293-298 (2008)
6. Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.*, 168, 176-185 (2007)

平成 20 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

平成 20 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）
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的な吸収・分布に関する研究

分担研究者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 室長

研究要旨

ペンタランに懸濁した酸化亜鉛を雌性ラットに反復塗布し、臓器中の亜鉛濃度を測定した。酸化亜鉛塗布群では肝臓中の亜鉛濃度が増加したが、腎臓、脾臓、肺、脳などでは塗布群と対照群とで差は認められなかった。粒子サイズや表面コーティングによる差はなかった。適用時の酸化亜鉛の粒子サイズは μm レベルとなっており、粒子の形での皮膚吸収は考えにくく、汗などによりイオン化した亜鉛が吸収された可能性を考えた。ルチル型及びアナターゼ型酸化チタンのシリコンオイル懸濁液を雌雄SD系ラットに4週間反復経皮投与した。媒体中で酸化チタン粒子はほとんどが数百nm以上の大きさに凝集した。体重及び摂餌量は試験群間で有意な差は認めず、剖検、器官重量及び病理組織学的検査でも被験物質投与に起因した変化は認められなかった。雄性酸化チタン塗布群では白血球数、形態別ではリンパ球及び単球が増加し、雌性では総コレステロール、リン脂質ないしトリグリセライドの高値が認められた。しかし、いずれの変化も器質的な変化を伴わず生理的変動範囲内の変動であり、毒性学的意義は低いと判断した。塗布部位の皮膚の電顕観察では粒子が皮膚浸透している像は認めなかった。雄性ラットの臓器中チタン濃度を測定した。酸化チタン粒子の一次粒子径、結晶形及び表面コーティングの違いによって、肝臓及び腎臓中のチタン濃度に差はなかった。ナノサイズではない酸化チタンは正常皮膚を透過しないか、ナノサイズのものがあって透過したとしても、検出できる量は蓄積しないと考えられた。

A. 研究目的

酸化チタン及び酸化亜鉛は、白色顔料及び紫外線散乱剤として、サンスクリーン製品等の化粧品や壁面塗料などに配合されている。酸化チタン及び酸化亜鉛の粒子はナノメートル (nm) サイズまで微細化すると白色度が減少して透明性が増し、紫外線の散乱効果も増加することが知られている。酸化チタンは紫外線を吸収すると活性酸素を発生させることが知られており、こうした酸化チタンの光触媒作用を利用した汚れ防止塗料が販売されている。一方、ヒトに適用する製品では、活性酸素による皮膚傷害の可能性を抑えるため、酸化チタン粒子の表面をコーティングしたものが使われている。こうした表面処理は、酸化チタンだけでなく酸化亜鉛についても行われ、粒子の分散性の向上にも役立っている。

吸入曝露したナノ粒子が生体内に分布したとの報告がされたことから、ナノ粒子の安全性が危惧されている。化粧品等は日常的に使用するものであり、接触する機会も多い。化粧品等は皮膚に塗布されることが多く、これらに含まれる酸化チタンや酸化亜鉛等の金属酸化物のナノ粒子が経皮吸収され、健康影響を及ぼすのかどうかを明らかにすることは重要な課題とされている。

昨年度は、最もよく使われている酸化チタンを試験物質として選定した。化粧品等の実際の使用法を考慮し、ラットに連続塗布した後、各臓器のチタン量を分析することによって、酸化チタンの皮膚吸収性の有無を評価した。その結果、酸化チタンを塗布したラットの肝臓及び腎臓中の酸化チタンの濃度の変化に関して、雄と雌とでは異なる評価となった。そのため、ナノサイズの酸化チタン粒子が皮膚吸収されるかどうかについて判断するには、一群当たりの動物物数を増やし、使用する酸化チタンの種類を絞り込んで、再度検討することが必要であるとされた。

本年度はまず、酸化亜鉛について同様の試験を行い、臓器中の亜鉛濃度を測定することによって、経皮吸収性を評価した。次に、酸

化チタンについて再検討した。まず、塗布に用いる溶媒中での酸化チタン粒子の分散性を解析した。次に、酸化チタンを経皮曝露させ、血液学的検査及び病理学的検査を行い、毒性影響の有無を調べた。皮膚の電顕観察を行うとともに、雄性ラットについては臓器中のチタン濃度を測定し、皮膚吸収性を評価した。

B. 研究方法

1. 試薬及び材料

酸化亜鉛 (ZnO) MZY-303S 及び MZ-300 はテイカ、ZO-250 はヨシダ製薬から、酸化チタン (TiO₂) SMT-500SAS、MT-500B 及び AMT-600 はいずれもテイカから、日本化粧品工業連合会を通して供与された。それぞれの粒子の性状を表 1 に示した。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 (ペンタラン, pentalan-408) は日光ケミカルズから、シリコンオイル (環状シリコンオイル, TSF405) はモメンティブ・パフォーマンス・マテリアル社から入手した。

酸化亜鉛及び酸化チタンは一定量を試験管にとり、それぞれにペンタラン及びシリコンオイルを加えて振り混ぜたのち、超音波洗浄機につけ、ときどき振り混ぜながら 30 分間処理して、塗布用試料溶液を調製した。試料溶液は用事調製した。

超微量分析用超純水、超微量分析用硝酸、超微量分析用ふっ化水素酸、有害金属測定用硝酸、原子吸光用過酸化水素は和光純薬工業から購入した。原子吸光用チタン標準原液 (1000 ppm)、原子吸光用亜鉛標準原液 (1000 ppm) は関東化学から入手した。その他の試薬は市販品を用いた。

2. 器具及び装置

マイクロウェーブ分解装置は CEM 社の MARS 5 型を用いた。分解容器には HP-500 型テフロン製容器を用いた。

誘電結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) は Agilent 社 7500 型を用いた。島津製作所製 HPLC ポンプ LC-10AT_{VP} 及びオートサンプラー SIL-10A を接続し、コントローラ

SCL-10Avpにより試料溶液を ICP-MS に導入した。別に、Agilent 社製オートサンプラー I-AS を用いた。

粒子径測定装置としては、島津製作所製レーザ回折式粒度分布測定装置 SALD-7100 を用いた。

シャープマニファクチャリングシステム製 UT205 型超音波洗浄機を粒子の分散用に用いた。

電子顕微鏡は日本電子 JEOL 100S 型及び JEOL 1200EX 型、日立製作所 S-4700 型を用いた。

3. 動物

CrI:CD(SD)系ラット、雌雄 4 週齢を日本チャールス・リバー社から購入した。酸化チタンの試験時に入荷した時の雄の体重は 76~87 g、雌は 65~77 g であった。動物は、21~25°C、湿度 50~58%、換気率 10~20 回/時、12 時間照明の飼育室で、ステンレススチール製ケージに 1 ケージ当たり 1 匹ずつ入れて、固形飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業) 及び水を自由に摂取させた。飲水として、次亜塩素酸ナトリウムを約 2 ppm 添加した井戸水を用いた。検疫馴化期間は約 2 週間とした。

4. 投与方法

4-1. 酸化亜鉛

1 群 6 匹で行った。試験物質の投与 7 日前より、ラットの背部から側腹部を適時電気バリカンで毛刈りし、体表面積の約 10% に相当する適用部位を設けた。媒体または試験溶液を経口投与用管のついた注射筒にとり 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ずつ皮膚に均等に塗布し、リント布 2 枚、不透性シート (ブレンダーーム™, 3M Health Care 社) で覆ったのち、伸縮性包帯 (SILKYTEX, Alcare 社) を巻いて固定し閉塞した。20~24 時間後、閉塞パッチを除去し、投与部位を微温湯でしめらせたガーゼで拭き、その日の投与を行うまでの間リント布で覆った。この操作を 28 日間反復して行った。

4-2. 酸化チタン

1 群 10 匹で行った。試験物質の投与 7 日前及び前日に、ラットの背部から側腹部を毛刈りし、

体表面積の約 10% に相当する適用部位 (4×5 cm) を設けた。マイクロピペットを用いて、媒体または試験溶液 200 μl を皮膚に塗布後、スパーテルで均一にならし、リント布 2 枚、不透性シートで覆ったのち、伸縮性包帯を巻いて固定し閉塞した。20~24 時間後、閉塞パッチを除去し、投与部位を微温湯でしめらせたガーゼで拭いた。この操作を 28 日間反復して行った。電気バリカンでの除毛は当初週 3 回の頻度で行っていたが、毛に付着した試料の拭きとりが十分でないことから、雄では 7 日、雌では 5 日以降は毎日実施した。

5. 一般状態観察

症状及び死亡の有無は毎日、投与前後の 2 回観察し、皮膚状態についても観察した。体重及び摂餌量は投与期間を通して週 1 回の頻度で測定した。さらに最終投与日 (剖検前日) にも測定した。

6. 血液学的検査

動物は採血前に 18~27 時間絶食させ、投与期間終了時の剖検時に実施した。ペントバルビタール・ナトリウム 30 mg/kg を腹腔内に投与して麻酔した後、後大静脈腹部より血液 2.0~2.5 ml を採取した。血液凝固系検査には、3.8 w/v % クエン酸ナトリウム 0.1 ml を入れた試験管に血液 0.9 ml を分注し、1870×g、4°C で 15 分間遠心して得られた血漿を用いた。他の検査には、残りの血液を EDTA-2K 2 mg 加採血ビン (SB-41, シスメックス) に分注したものをを用いた。

7. 血液学的検査

後大静脈腹部より採取した血液 0.5 mL を室温で約 60 分間放置後、1870×g、4°C で 10 分間遠心して得られた血清を検査に用いた。

8. 組織の採取

採血終了後、動物を放血致死し、すべての器官、組織について異常の有無を検査後、下記臓器を採取し、重量を測定した。採取に使用した器具は、各個体および操作ごとに交換した。肝臓 (外側左葉を除く)、脾臓、腎臓 (左)、肺 (気管支を含む) 及び脳はチタン測定用として -30°C 冷凍庫で保存した。投与部位の皮

膚左半分は、表面をセロハンテープで約 20 回ストリッピングを行った後に剥離して、チタン測定用とした。肝臓の外側左葉、右側腎臓、及びは投与部位の皮膚の右上半分は病理組織検査用とした。皮膚右下半分は電子顕微鏡検査用とした。

9. 病理組織学的検査

各臓器は 10 vol % 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した後、パラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、鏡検した。

10. 電子顕微鏡検査

塗布部位の中心に近い皮膚を 0.5×2 cm の範囲で切り出し、2.5% グルタルアルデヒド溶液で約 1 時間前固定した。前固定後、皮下組織を除去し、表皮側を含む約 1.5 mm 角の小片を 4 個作成し、2.5% グルタルアルデヒド溶液に浸漬した。次に、0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に 4°C で 1 晩、1% 四酸化オスミニウム固定液に 4°C で 2 時間入れて後固定した。固定後、50, 70, 80, 90% と段階的に濃度を上げたエタノール溶液で 1 時間ずつ、100% エタノールで 1 時間、3 回処理して脱水した。プロピレンオキサイドで 2 回、各 1 時間ずつ処理後、Spurr 樹脂に入れ、60°C で 2 日間重合して包埋した。包埋組織は、ダイヤモンドナイフのついたウルトラミクロトーム (LKB 社製 U-5 型 Ultratome) を使用して、800~1000 Å の厚さの切片に薄切した。酢酸ウラニル溶液で 10 分間、佐藤氏混合鉛液で 3 分間電子染色した後、透過型電子顕微鏡 (TEM) で検鏡した。

11. 臓器中の亜鉛の定量

細切した臓器 0.1~0.2 g を HP-500 型テフロン製分解容器にとり、分解溶媒として硝酸 3 ml、過酸化水素水 2 ml 及び超純水 2 ml を加え、密栓した後、マイクロウェーブ処理した。13 本の分解容器に対し、80 psi で圧力制御し、600W (80%) のマイクロウェーブを 20 分間照射、そのまま 2 分間保持して分解を行った。放冷後、分解液に超純水を加えて正確に 20 ml としたものを試料溶液とした。試料

溶液 100 µl を HPLC ポンプで ICP-MS に導入し、マス数 66 のピーク面積を測定した。亜鉛標準液 (1~500 ppb) を用いて作成した検量線より試料溶液中の亜鉛濃度を求め、臓器中の濃度 (µg/g, ppm) に換算した。

12. 臓器中のチタンの定量

細切した臓器約 0.2 g を分解容器にとり、硝酸 5 ml 及び超純水 1 ml を加え、密栓した後、マイクロウェーブ処理した。13 本の分解容器に対し、80 psi で圧力制御し、1600W (100%) のマイクロウェーブを 20 分間照射、そのまま 20 分間保持して分解した。放冷後、分解液に超純水を加えて正確に 20 ml としたものを試料溶液とした。試料溶液を ICP-MS に導入し、マス数 47, 48 及び 49 のイオンカウントを測定した。チタン標準液を用いて作成した検量線より試料溶液中のチタン濃度を求め、臓器中の濃度 (µg/g, ppm) に換算した。ICP-MS の条件を表 2 に示した。

13. 粒度分布の測定

島津製作所製レーザ回折式粒度分布測定装置 SALD-7100 を用い、プロトコールに従って適切条件下の濃度での粒度分布を測定した。

14. 倫理面への配慮

動物実験に関しては、三菱化学安全科学研究所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。

15. 統計処理

数値データは分散の均一性を Bartlett 法 (有意水準: 5%) により検定した。分散が均一な場合は、Dunnnett の多重比較検定を用いて対照群との比較を行い、分散が均一でない場合は、Steel の多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準を 1 および 5% とし、両側検定とした。

C. 研究結果及び考察

1. 酸化亜鉛

1-1. 媒体中の粒度分布

攪拌機能のついた島津製作所製レーザ回折式粒度分布測定装置 SALD-7100 を用い、ペ