

ンタランに懸濁させた各酸化亜鉛の粒度分布を測定した。各酸化亜鉛の積算分布グラフを図1に示した。サイズや表面コーティングによる差は少なかった。平均粒子径は545~1364 nmであり(表3)、動物に適用する段階で、既にナノサイズで存在する粒子はほとんどないと思われた。細胞間隔は100 nm、毛穴の大きさは約200~500 nm、毛包は100 μmといわれている。よって、凝縮した状態では、細胞内への吸収、細胞間や毛包を通じて皮膚透過するとは考えにくい大きさといえる。

1-2. 臓器中の亜鉛濃度

各酸化亜鉛を反復塗布した雌性ラットの肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳及び適用部位の皮膚の亜鉛濃度を図2に示した。亜鉛標準溶液のICP-MSにおける定量限界濃度(5 ng/ml, ppb)から組織中の定量限界濃度を計算すると、 $5 \text{ ng/ml} \times 20 \text{ ml} / 0.1 \text{ g} = 1000 \text{ ng/g} (= 1 \text{ ppm})$ である。各群とも各個体の値をプロットし、それらの平均値を赤の棒線で示した。酸化亜鉛を塗布したラットの皮膚では、媒体のペンタランのみを塗布した対照群に比べ亜鉛濃度は高かった。これは、毛包等に付着、残存したものが定量されたと考えた。肝臓の亜鉛濃度は、酸化亜鉛10%懸濁液塗布群で有意に増加した。一方、腎臓、脾臓などでは対照群と試験群間で差は認めなかった。粒子サイズや表面コーティングによる差はなかった。肝臓での濃度の増加の原因として、汗などにより酸化亜鉛がイオン化して、これが吸収された可能性を考えている。イオンあるいは粒子によるものかどうかの区別として、酸化亜鉛の解離の程度、塩化亜鉛溶液等での試験結果と比較する方法があるかもしれない。

2. 酸化チタン

2-1. 媒体中の粒度分布

酸化チタンの10%シリコンオイル懸濁液では、凝集して粒径が非常に大きくなっているものがあり、測定不可能であった。そこで、各酸化チタンを0.4%濃度でシリコンオイル

に懸濁させて10分間超音波処理した後、更に0.03%に希釈して20分間超音波処理した。これを装置に適切量入れて、粒度分布を測定した。分析時の濃度は、SMT-500SASで0.0017%、MT-500Bで0.0034%、AMT-600で0.0026%であった。粒度の積算分布グラフを図3に、平均粒子径及びメディアン径を表4に示した。SMT-500SASの平均粒子径は689 nm、MT-500Bでは4752 nm、及びAMT-600では2985 nmであった。それぞれの酸化チタンのメディアン径も平均粒子径とほぼ同様の値であった。積算分布が10%となる粒径は最も小さい平均粒子径を示すSMT-500SASでさえ245 nmと、ナノサイズの粒子は検出されなかった。ルチル型酸化チタンに関しては、SMT-500SASとMT-500Bの比較からわかるように、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。MT-500Bは、昨年度、懸濁に用いたペンタラン中では2相性の分布となり、シリコンオイル中よりも小さい粒径のものがあるため平均粒子径は小さくなった(図4)。

酸化チタンに適切な表面コーティングをして、懸濁させる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り、こうした懸濁液を用いることがナノ粒子の影響評価に必要であると思われる。

2-2. 反復塗布試験

2-2-1. 一般状態、体重、摂餌量

酸化チタンをSD系ラットに4週間反復投与したが、投与期間を通して死亡の発生はなく、全例で一般状態に異常は認められなかった。体重及び摂餌量の推移を図5に示した。投与期間を通して、各試験群とも対照群と比較して有為な差は認められなかった。

2-2-2. 血液学的検査

SMT-500SAS塗布群の雄性ラットで白血球数が対照群に比べ増加し(表5)、形態別では好中球率の低下及びリンパ球率の上昇が認められた(表6)。同群の雌性では、いずれの検査項目においても対照群と差は認められな

かった。MT-500B 群の雄で白血球数の高値、白血球形態別では単球率が高かった。同群の雌では、好酸球率が低下した。AMT-600 群では、雌雄とも白血球数の高値が見られ、更に雄では単球率の高値が認められた。

以上のほか、SMT-500SAS 群の雄で APTT の延長、AMT-600 群の雌で APTT の短縮が認められたが、いずれの変化も PT に変動がないことから、投与とは関連のない変化と判断した。

白血球数、リンパ球（比率および絶対数）及び単球（比率および絶対数）のいずれも、背景データ内の変動で生理的変動範囲内のものであった。後述のように、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障害性変化は認められなかった。リンパ球及び単球の増加を伴う白血球数の増加の原因は明らかでなかったものの、これらの変化の毒性学的意義はないと判断した。

2-2-3. 血液生化学的検査

SMT-500SAS 群では、雄で γ -GTP の高値がみられ、同群の雌では GPT、総コレステロール及びリン脂質の高値が認められた（表 7）。MT-500B 群では、雌雄ともに被験物質投与に起因した変化は認められなかった。なお、雌でみられたクレアチニンの有意な差は軽微な変化であることから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。AMT-600 群では、雌で総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及びカルシウムの高値が認められた。

これらの変化は、関連する他のパラメータに変動がなく、背景データに近似した変動であること、かつ病理組織学的検査で肝臓に異常が認められていないことから、被験物質投与とは関連のない偶発的变化と判断した。

2-2-4. 臓器重量

臓器の剖検では全例で異常は認められなかった。臓器重量も、酸化チタン塗布各群とも対照群と差は認めなかった（表 8）。

2-2-5. 病理組織学的検査

投与部位皮膚における変化として、対照群の雌 1 例、SMT-500SAS 群の雄 1 例、

MT-500B 群の雄 1 例、AMT-600 群の雄 2 例で限局性の炎症性細胞浸潤が認められた（図 6）。しかし、対照群と被験物質投与群との間で発生頻度および程度の差はなく、いずれも限局性の軽微な変化であることから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した（表 9）。

対照群の雌雄各 1 例、AMT-600 群の雄 1 例および雌 2 例で肝臓の単核細胞浸潤、対照群および MT-500B 群の各群雄 1 例で腎臓の好塩基性尿細管が認められたが、対照群と被験物質投与群との間で発生頻度及び程度の差はなかった（図 7）。

SMT-500SAS 群の雌 1 例で肝細胞の巣状壊死、同群の雌雄各 1 例で腎臓の単核細胞浸潤が認められた。これらの変化は健常動物で時折認められるものであり、いずれもごく低頻度、かつ限局性の軽微な変化であることから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した（図 8）。

以上、被験物質投与に起因した変化は認められないと判断した。

2-2-6. 電子顕微鏡的観察

酸化チタンを適用した皮膚部位の電子顕微鏡写真を図 9 から図 11 に示した。SMT-500SAS では皮膚表面の角質層に酸化チタンの粒子が凝集して残っている像が認められた。図 9 は、毛が皮膚表面に出ている部分を示したが、酸化チタンの粒子が、毛穴の周りの 1 から 2 層の角層に詰まっていた。この角質層は毛とともに皮膚内側に入り込むが、角質としては最も外側の 1 から 2 層であり、組織内に透過しているものはなかった。MT-500B でも角質層上及び毛穴壁層には酸化チタン粒子が存在するものの、角質内部には粒子は認めなかった（図 10）。AMT-600 の写真では角質層の破れた部分から酸化チタンが入り込んでいる様子が認められたが、角質層内部及び真皮層に入っているものはなかった（図 11）。AMT-600 も SMT-500SAS や MT-500B と同様に、凝集して皮膚角質上に残存していることがわかった。電子顕微鏡観

察では限られた部分しかわからないが、観察した範囲では酸化チタンが角質層を通過して皮膚に浸透している像は認めず、nm サイズであっても酸化チタン粒子が皮膚透過するとは考えられなかった。

2-3. 臓器中のチタン濃度

28日間反復塗布した後、ラットの各臓器中のチタン濃度を測定し、経皮吸収と体内分布の有無を調べた。各群とも個体ごとにプロットし、それらの平均を赤の棒線で示した(図12)。対照群の肝臓、腎臓及び脾臓でのチタン濃度は、おおよそ1 µg/gであった。この1 µg/g という値はチタン標準液を用いての定量限界濃度から計算される定量限界レベルでの値であり、また、臓器を入れない分解容器に分解液を入れたものについても同等レベルの値が出ることもあり、本当にチタンが臓器に含まれているかどうかを言うのにも困難な量であった。肝臓では塗布群でむしろチタン濃度が低下しているように算出された群もあった。腎臓では対照群と比較して酸化チタン塗布群でチタン濃度の増加は認めなかった。脾臓ではAMT-600塗布群でわずかに高い濃度を示す個体もあるが、平均値は対照群と有意な差はなかった。個体によっては濃度が高くなるものもあるが、その増加は極微量で群ごとの差は有意でなく、定量限界付近の操作上のばらつきの範囲として無視できるものと考えられる。よって、各臓器にチタンは含まれないか、酸化チタンを反復塗布しても量的に変化はないと考えた。

D. 結論

ペンタランに懸濁した酸化亜鉛粒子は、ほとんどが数百 nm 程度の大きさまで凝集した。酸化亜鉛を塗布したラットの皮膚では、媒体のみを塗布した対照群に比べ亜鉛濃度が高く、毛包等に付着、残存したものが定量された。酸化亜鉛塗布群では肝臓中の亜鉛濃度が増加した。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から考えて、粒子の形で細胞間を通過して体内に移行、あるいは毛包を通じて皮膚吸収するとは考えにくい。汗などにより酸化亜鉛がイオン化して、これが吸収された可能性を考えた。

酸化チタン粒子は塗布に用いた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。電子顕微鏡像では酸化チタンは角質層上に凝集して乗っており、角質層及び真皮層に粒子として透過している像は認められなかった。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、塗布群の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ても検出できる量は蓄積していないことを示唆する。ナノサイズの酸化チタン粒子の皮膚透過性について結論づけるには、単分散させた酸化チタンを用いて試験する必要があると思われる。また、こうした分散させた酸化チタンを強制的に皮内に投与して、臓器に分布するかどうか確認することが必要と思われた。

E. 参考文献

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)

F. 研究発表

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

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

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: に関する研究

ナノマテリアルの経皮吸収に及ぼす因子解析に

分担研究者 藤井 まき子 (昭和薬科大学 准教授)

研究協力者 泉水 美香 (昭和薬科大学 大学院生)

五十嵐 良明 (国立医薬品食品研究所 環境衛生第二室 室長)

研究要旨

ナノマテリアルとして 25nm のポリスチレン粒子 (PS-25) および数種のルチル型酸化チタンを健常皮膚または損傷皮膚に適用した。PS-25 は損傷皮膚においても皮膚中への移行はほとんどの場合見られなかったが、毛包への移行は見られ、特に hair removed skin において著しかった。酸化チタンは 10% シリコン懸濁液とした。凝集が著しく、コーティングを施したものや、分散剤を含む場合にナノ粒子が見られた。皮膚に適用した場合、いずれの酸化チタンにおいても intact, stripped skin の両者において皮膚中 Ti 濃度に変化はなかったが、hair removed skin にナノ粒子を含む試料を適用した場合、皮膚中 Ti 濃度に有意な上昇がみられた。EPMA にて存在部位を確認したところ、表面から 1mm 以上の深さまで移行しているが、毛包内にとどまっていることが示された。

A. 研究目的

前年度の研究において、皮膚生理、構造がヒトに近い Yucatan micropig 摘出 intact skin 及び 3 種の損傷皮膚 (hair-removed skin, delipidized skin, stripped skin) に健常皮膚で皮膚移行がほとんど起こらない fluorescein isothiocyanate dextran (FD-4、Mw : 4000) を適用し、モデル皮膚としての性質を検討した。その結果、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 との差は認められず、delipidized skin では真皮まで蛍光が観察され、さらに stripped skin では適用量の約 30% がレセプター相で検出されるという差があることが明らかとなった。

一方、試料として用いるナノマテリアルは、単分散性を示すものや、幅広い粒度分布を持った多

分散性を示す場合があり、分散状態の違いが皮膚移行性に大きく影響を及ぼす可能性がある。しかし、製剤中のナノマテリアルの状態を評価した上での皮膚移行性評価はほとんどない。

そこで本検討では、懸濁液中で一次粒子の凝集が起こらず、粒子径が既知である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酸化チタン (多分散系) を用いた。特性が明らかとなった種々の状態の皮膚にこれらのナノマテリアルを適用し、分散状態の違いを考慮に入れた in vitro 皮膚移行試験について検討した。

B. 研究方法

I 試薬

蛍光ポリスチレン粒子 (PS-1000 (一次粒子径 1000 nm) (Fluorescent Microsphere Suspensions, Duke Scientific Corporation), PS-250 (一次粒子径 250 nm), PS-100 (一次粒子径 100 nm), PS-25 (一次粒子径 25 nm) (以上 micromer[®]-greenF, micromod Partikel-technologie GmbH)) 1%懸濁液を用いた。

酸化チタンとして、いずれもルチル型の T-250 (一次粒子径 250 nm, 表面処理なし, LU-205, 石原産業), T-35 (一次粒子径 35 nm, 表面処理なし, MT-500B, テイカ), TC-35 (一次粒子径 35 nm, アルミナ, シリカ, シリコンの表面処理品, SMT-500-SAS, テイカ)を用いた。また、一次粒子径短径 10 nm, 長径 100 nm, アルミナの表面処理品を用いた市販の予製製剤 (SAS-TTO-S-3 / D5 (50%) MiBrid Dispersion, 三好化成) (TCD-100)を用いた。酸化チタンの場合は、分散媒にはシリコン (KF-995, 信越化学)を用いた。

酸化チタン定量時には、超純水 (超微量分析用), 硝酸 (超微量分析用), フッ化水素酸 (超微量分析用)を和光純薬工業から入手し用いた。

その他の試薬は、市販の特級品をそのまま用いた。

II 皮膚透過試験

1. YMP 皮膚処理法

5ヶ月齢の雌 Yucatan micropig (YMP) 摘出皮膚 (スキンセット, 日本チャールスリバー)を用いた。凍結された YMP 皮膚を室温で約 20 分間自然解凍した後、皮下脂肪を取り除いた。この状態の皮膚を健全皮膚 (intact skin) とし、これを処理して損傷皮膚を作製した。

Stripped skin

粘着テープ (Scotch[®]313, 3M) を表皮に貼り付け、角層を剥がすストリッピングを角層がテープに付かなくなるまで行った。

Delipidized skin

Jokura らの方法¹⁾を参考にした。改良 Franz

型拡散セルに健全皮膚を装着後、アセトン: エーテル混液 (1:1) 2 mL を 40 分間適用した。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、ピンセットを用いて除去した。

2. 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 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 適用後、改良 Franz 型拡散セルに取り付けた。適用 24 時間後に、セルから取り外した皮膚を OTC コンパウンドに包埋し、凍結した。皮膚切片 (厚さ 20 μm) を作製し共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM, FLUOVIEW FV-300, OLYMPUS) にて皮膚の蛍光を観察した。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、CLSM で角層中の蛍光を観察した。いずれの場合も、コントロール皮膚の自家蛍光が認められない条件で実験を行った。

3. 酸化チタン皮膚透過試験

10%酸化チタン・シリコン懸濁液を 2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 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[®], 東亜合成) を塗り、皮膚の角層側に密着させた。シアノアクリレート乾燥後、スライドガラスから皮膚を剥離した。この操作を 2 回行い、皮膚表面上に残る酸化チタンを除去した。表皮と真皮を剥離する場合には予めこの操作を 2 回行い、その後、加温により表皮と真皮を剥離した。

Ti の定量は誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS, Agilent 社 7500 型) を用いた。皮膚組織切片をマイクロウェーブ用分解ライナー容器 (HP-500 型テフロン製容器) に入れ、硝酸 5 mL を添加して、マイクロ波分解装置 (MARS5, CEM) を用いて Ti をイオン化させた。試料溶液 100 μL を ICP-MS に導入し、質量数 47 のイオン

ピーク面積を測定した。Ti 標準溶液 (1~500 ppb) を用いて作成した検量線から試料溶液中の Ti 量を求め、皮膚およびレセプター相中の Ti 濃度 ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/mL}$) に換算した。

III 酸化チタンの分散性評価

酸化チタンは超音波を用いてシリコン中に懸濁させた。粒子径測定は 1000 倍希釈しダイナミック光散乱光度計 (DLS-8000HL, 大塚電子) で平均粒子径、累積粒度分布を測定した。

また、実際に塗布した状態での酸化チタンの状態を観察するために、酸化チタン懸濁液を皮膚に $2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 塗布し、乾燥後、デジタル実体顕微鏡 (3D DIGITAL FINE SCOPE VC3000, OMRON) により皮膚表面を 80 倍の倍率で観察した。

走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-5200LV, 日本電子) により観察する場合は、表皮を真皮から剥離し、試料台に貼り付けた両面テープに表皮を貼付した。酸化チタン懸濁液を塗布した後、真空乾燥機で水分およびシリコンを蒸発させた。Pt/Pd 蒸着を行った後、加速電圧 20 kV, 拡大倍率 150, 3500, 20000 倍にて観察した。

IV 統計学的評価

有意差検定は、分散分析を行った後に Dunnett 法を用いて行い、危険率が 5%未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありとした。また、各測定値は平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で表した。

C. 研究結果

I 蛍光ポリスチレンナノ粒子の皮膚移行に関する検討

1. 健常皮膚での皮膚移行性評価

Intact skin に PS-25 を適用したところ、全例において蛍光は皮膚表面でのみ観察され、これは PS-100, PS-250, PS-1000 においても同様であった (Fig. 1-a)。角層をストリッピングし観察したところ、ストリッピング 1 回目では蛍光が認められたが、2 回目では、皮溝の部分のみで蛍光が確認でき、3 回目で蛍光が認められなくなった

(Fig. 1-b)。次に、毛包への移行性を検討した。皮膚表面から深さ 20 μm , 100 μm , 150 μm 付近の領域の水平切片を観察したところ、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 150 μm 付近での蛍光は認められなかった。PS-100, 250 においては、毛包開口部でのみ蛍光が認められ、毛包下部では蛍光は認められなかった。PS-1000 については、皮膚表面でのみ蛍光が認められ、毛包中では認められなかった。

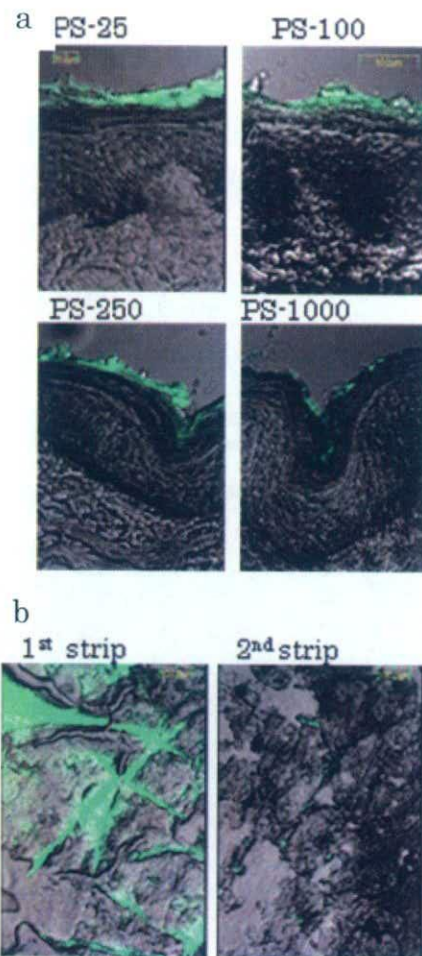


Fig. 1
CLSM images of skin after 24 h application of PS to intact skin
a; cross-section
b; stripped stratum corneum

ニオソームなど分子集合体からなる変形する粒子では、粒子径が 40 nm 程度でも健常皮膚内へ移行すると報告されている。PS は生分解性がない変形しない球状の粒子であるため、健常皮膚へは移行しないものと考えられる。また、毛包は空間が大きく、PS は毛包内に入り込むが、組織が毛と接触している毛包下部へは到達しないことが示された。

2. 損傷皮膚での皮膚移行性評価

(1) Stripped skin

PS-25 を適用すると、ほとんどの場合、皮膚表面のみで蛍光が認められた。しかし、生きた表皮へ移行し、基底膜付近にまで移行した例を 3 例で認めた (Fig. 2)。この原因は明らかではなく、今後検討の必要がある。

PS-100, 250, 1000 の粒子では皮膚表面のみで蛍光が認められた。

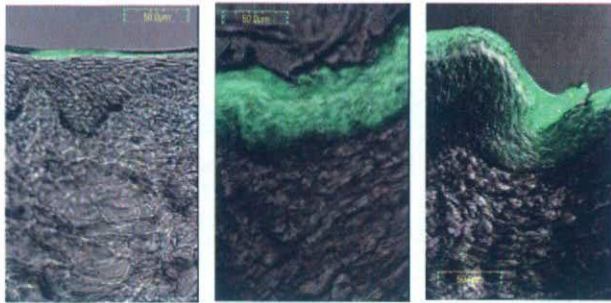


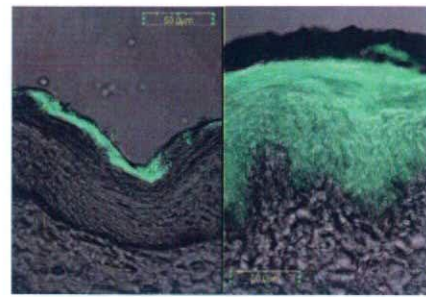
Fig. 2 CLSM images of skin at 24 h after application of PS to stripped skin

(2) Delipidized skin

原因は不明であるが、PS-25 は *stripped skin* の生きた表皮内へ移行する可能性が示唆された。そこで、PS-25 については、*delipidized skin* を用いた検討を行った (Fig. 3)。

垂直切片画像から PS-25 の皮膚移行性を観察したところ、多くの場合は皮膚表面と表面に近い角層に蛍光が認められた。*Stripped skin* と同様、基底膜まで蛍光が認められる場合が 1 例あった。このことから、角層機能の低下により、PS が何らかの要因で生きた表皮まで移行する可能性が示された。

テープストリッピングを行い、採取した角層における蛍光を観察した。ストリッピングを行うと、角層状態の悪化に伴う重層剥離が認められた。ストリッピング 2 回目で、皮溝以外の部分にも蛍光が認められ、*intact skin* よりも角層の深い部位まで PS-25 は移行していることが示された。



1st strip

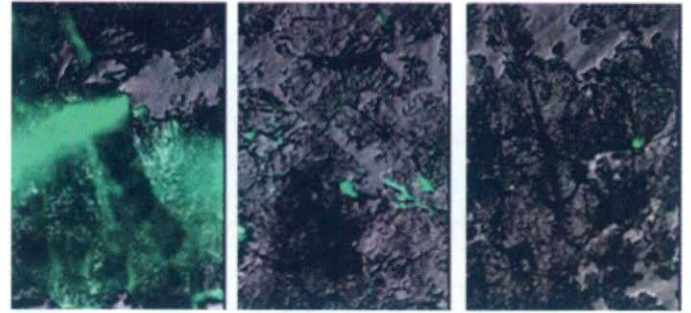


Fig. 3 CLSM images of skin after 24 h application of PS to delipidized skin
a: cross-section b: stripped stratum corneum

(3) Hair removed skin

Hair removed skin に PS-25 を適用したところ、毛包全体で蛍光が認められ、毛が存在する状態では到達できない血管系の存在する毛乳頭付近まで蛍光が認められた (Fig. 4)。しかし、周辺の生きた組織への移行は認められなかった。皮膚によっては、脱毛後であっても毛の組織が残っている場合があり、このような場合には蛍光が認められなかった。よって、毛の存在が物理的に粒子の毛包下部への移行を妨げていると考えられる。

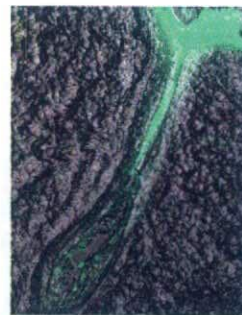


Fig. 3
CLSM images of skin at 24 h after application of PS-25 to hair-removed skin

100 nm 以上の PS を用いて、脱毛時の皮膚移行性を検討した。PS-100 については、毛包開口部、PS-250 については、毛包開口部および毛包中 400 μm 付近まで蛍光が認められた。また、

PS-1000 では、毛包膨大部で蛍光が認められた。しかし、いずれの場合も周辺組織への移行は認められなかった。

これらのことから、脱毛皮膚の毛包部へはナノ材料でない場合でも、移行すると考えられる。

II 酸化チタンを用いたナノ材料皮膚移行に関する検討

1. 酸化チタンの分散性評価

一般にナノ材料は凝集しやすく、分散液中ではナノ状態でないことが多い。また、皮膚に適用後、乾燥過程において凝集することも考えられる。ナノ材料であるために吸収が変化するのであればその分散状態を把握することは重要である。そこで、製剤中及び皮膚適用後の酸化チタンの状態を確認した。

(1) 製剤中の酸化チタン

今回は製剤として 10% シリコン懸濁液を用いたが、この状態のまま測定できる適切な粒子径測定方法がなかったため、製剤をシリコンで 1000 倍希釈し、動的光散乱法により粒子径を測定した。散乱強度分布をから求めた平均粒子径および 100 nm 以下の粒子の割合を Table 1 に示す。T-250、T-35 では凝集が著しく、平均粒子径は 1 μm を超えていた。これらは、多分散系の懸濁液であり、測定中に生じる粒子同士の凝集または大きな粒子の沈降により粒子径が時間と共に変化するため、測定を行うことができない場合があった。TC-35 および TCD-100 では平均粒子径は 100

Table 1 Average particle size and the percentages of particle smaller than 100 nm measured by dynamic laser scattering apparatus

	Size average (nm)	<100 nm (%)
T-250	1200	0
T-35	1700	0
TC-35	80	56
TCD-100	130	30

nm 程度であり、懸濁液中での凝集が示唆されたが、比較的分散状態は良く、いわゆるナノ粒子である 100nm 以下の粒子が存在することが示された。

以上より、分散性向上の処理が施されていない酸化チタンは凝集性が著しく、分散性向上のための表面処理や分散剤の使用は、酸化チタンの分散性向上に大きく寄与することが示された。

(2) 皮膚適用後の酸化チタン

酸化チタン懸濁液を YMP 皮膚に塗布し、乾燥後、実体顕微鏡にて外観を観察した (Fig. 5)。製剤中での平均粒子径が 1000 nm を超えた T-250 および T-35 は、皮膚上に白く残ったが、粒子径が 100 nm 以下の TC-35 及び TCD-100 では、均一に塗布できることが示された。

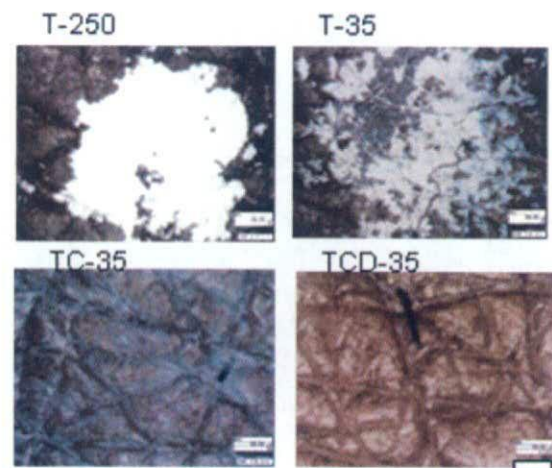


Fig.5 TiO₂ on the surface of intact skin

さらに酸化チタンの状態を観察するために、走査型電子顕微鏡を用いて皮膚上で乾燥後の TiO₂ の状態を観察した (Fig. 6)。黒の部分は皮膚表面を示し、白の部分が TiO₂ を示す。T-250 では、250 nm 程度の粒子が凝集していることが観察された。また、T-35 は凝集した 5 μm 以上の大きな粒子が多数観察され、これは小さな粒子が凝集していることが強拡大像より確認された。TC-35 および TCD-100 では約 100 nm に分散した粒子が認められたが、大きさが 1 μm を超える凝集体も認められた。また、TCD-100 は分散剤を含むため、他の酸化チタンとは異なる乾燥状態を示したが、

大きな凝集体はなく、均一であった。

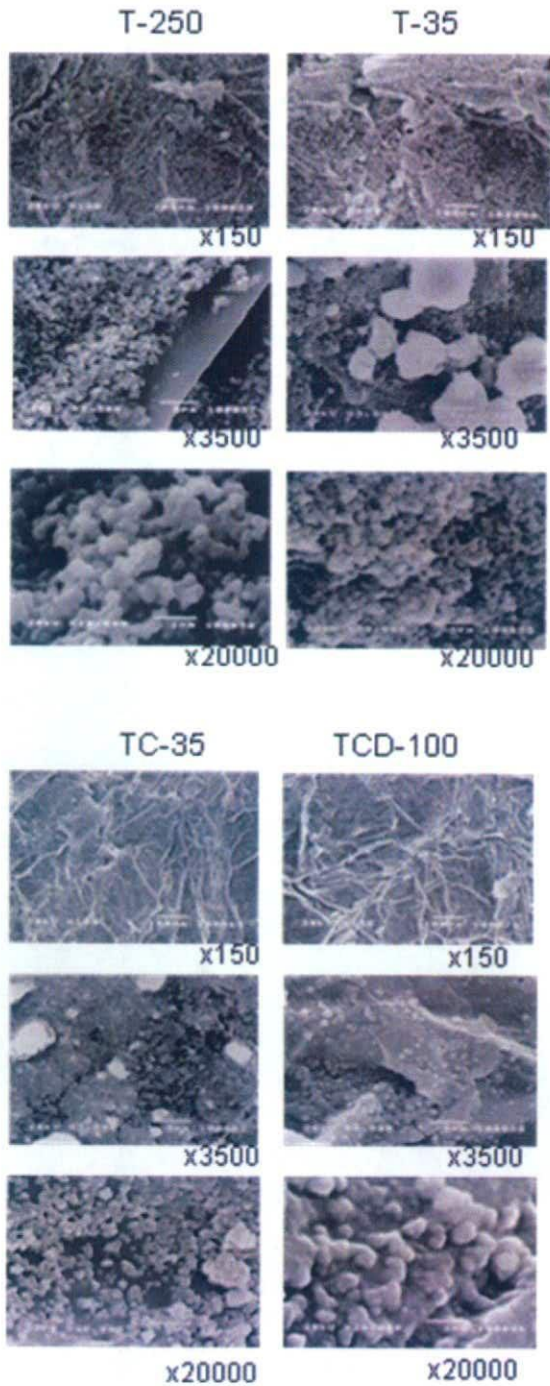


Fig. 6 SEM images of TiO₂ on the surface of intact epidermis

2. 酸化チタンの皮膚移行性評価

分散状態が異なる4種の懸濁液を intact skin, stripped skin 及び hair removed skin に適用し、皮膚移行性を検討した。24時間適用終了後に、シアノアクリレートストリッピングを行うと、角層

上部とともに毛が除去された。この状態の皮膚についてTiの定量を行った。皮膚はTiを含むことから、コントロールには分散媒であるシリコンのみを適用した皮膚を用いた。

結果を Fig.7 に示す。Intact skin と stripped skin ではいずれの懸濁液でも組織単位重量あたりのTi量およびレセプター相中Ti濃度にコントロールとの差は認められなかった。

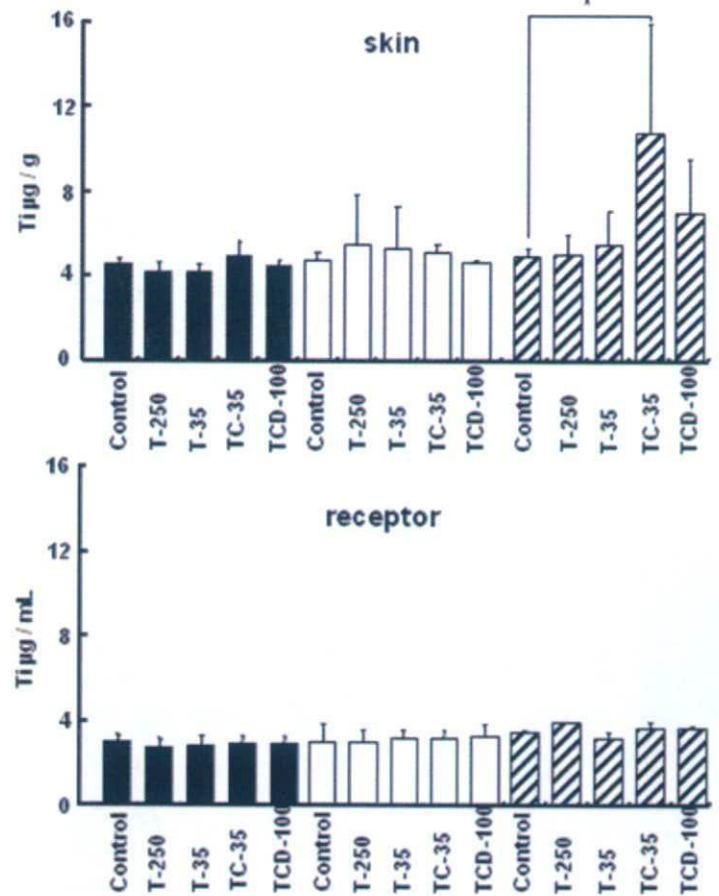


Fig. 7 Concentration of Ti in skin and receptor at 24 h after application of 10% TiO₂ silicon suspension

■ intact skin, □ stripped skin, ▨ hair removed skin

Hair removed skin では TC-35 適用皮膚でコントロールと比べて皮膚中 Ti 濃度が有意に上昇した。また、TCD-100 適用皮膚においては高い傾向にあった。しかし、レセプター相中の Ti 濃度に差は認められなかった。これより、hair removed skin では、100 nm 以下の粒子の割合が高い TiO₂ 懸濁液を適用すると Ti が皮膚へ移行し

やすいことが示された。

次に、Ti の皮膚への移行部位を表皮と真皮を剥離して検討した。真皮と表皮では質量が大きく違うため、単位面積当たりの Ti 量で示した(Fig. 8)。真皮において皮膚中 Ti 量に差は認められなかったが、表皮においては、100 nm 以下の粒子の割合が高い懸濁液を適用した TC-35, TCD-100 において高い傾向が認められた。これは全層皮膚と類似の傾向であり、Ti は表皮に存在することが示唆された。

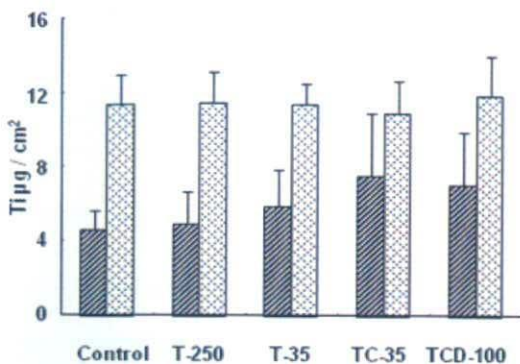


Fig. 8 Concentration of Ti in epidermis and dermis

表皮として定量される範囲には、皮膚内ではない毛包空間が含まれる。そこで、皮膚内の分布を EPMA を用いて観察した。その結果、Ti は毛包空間にあり、表面から 1mm を超える深さでも検出された (Fig. 9)。

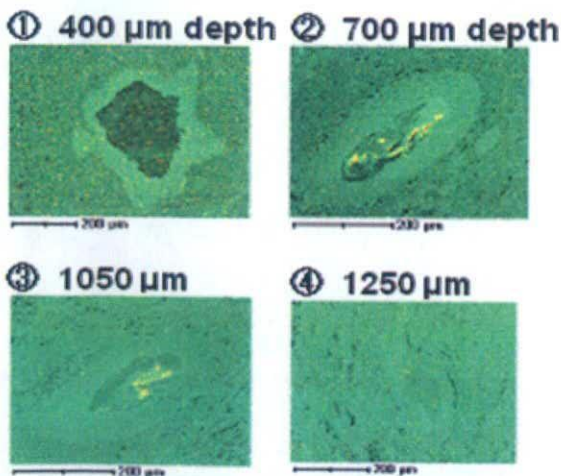


Fig. 9 EPMA images of Ti around hair follicle at various depth of hair-removed skin

D. 考察

粒子径 25 nm のポリスチレン粒子は、*intact skin* においては、皮膚内へは移行しないこと、毛包への移行は認められたが、毛包下部や周辺組織へは移行しないことが示された。また、角層を除去して直接生きた表皮に適用した *stripped skin* よび角層機能を低下させた *delipidize skin* においても、粒子径 25 nm 程度のポリスチレンは多くの場合、皮膚内へ移行しないことが示された。しかし、生きた表皮において蛍光が観察されることが稀ではあるがみられたので、この点についてはさらに検討が必要である。

Hair removed skin においては、毛包へ移行した後に、毛乳頭部位まで移行することが示された。これはナノマテリアルのみの現象ではなく、1000 nm 程度の粒子であっても同様であった。脱毛後、数十 µm の空間があるため、容易に粒子が入り込めるものと考えられる。

酸化チタンは、ポリスチレン粒子と異なり、凝集しやすく、均一なナノ分散状態は得られにくい。実際の化粧品への使用は、分散性向上のため、種々の表面処理を行った酸化チタンが用いられ、分散剤が併用されている。表面処理をしていない T-35 は凝集が著しく、ナノ粒子は認められなかった。親油性コーティングを施した TC-35 はシリコンへの分散性は良好であり、凝集は認められるものの、ナノ粒子として存在する割合が比較的高かった。皮膚適用したところ、凝集の有無にかかわらず、*intact skin*, *stripped skin* ともに、皮膚内の有意な Ti 濃度の変化は見られなかった。しかし、*hair removed skin* の場合は 100 nm 以下の粒子を多く含む懸濁液を適用した場合、皮膚中 Ti 濃度の上昇がみられ、これは毛包への移行のためと示唆された。ポリスチレンではナノ粒子でない 1 µm の粒子の移行も認められたが、酸化チタンの場合、凝集が著しいこと、また、毛包への移行は溶媒が乾燥時に表面張力により毛細管内へ引き込まれる現象と関連していると考えられることから、小さい粒子のみが移動したの

ではないかと考えられる。したがって、酸化チタンのような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、分散状態を把握することが必要であると考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの皮膚移行について、液中で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酸化チタン (TiO₂) 懸濁液を健常および損傷皮膚に適用することで以下のことを明らかにした。

1. ナノマテリアルは多くの場合、皮膚の損傷の有無にかかわらず、生きた組織には移行しない。
2. 毛包には侵入し、特に脱毛時には深い位置まで移行する。特にナノ粒子ではその傾向が強く認められる。
3. 原因は不明であるが、ポリスチレンではまれに表皮まで移行することがある。
4. 多分散性を示す場合は、ナノマテリアルの分散状態を把握する必要がある。

今回の結果では、血管系への移行が問題となりうるのは、血管系の露出する脱毛時のみであると推察される。しかし、まれに表皮への移行が認められたことから、この原因についてはさらに検討する必要がある。

本実験系は多くのナノマテリアルを対象としたスクリーニング試験に応用できると考えられる。しかし、*in vitro* の結果であり、特に損傷時には炎症因子、免疫細胞などの影響があると考えられ、*in vivo* での検討も必要であると考えられる。

引用文献

- 1) Y. Jokura, S. Ishikawa, H. Tokuda, G. Imokawa, *J. Invest. Derm.*, **104**, 806-812 (1995).

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

- 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)

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

研究課題名:ナノマテリアルの安全性確認における健康影響評価手法の確立に関する研究

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(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 TiO_2 と同時に感作性物質である 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。分散性が高いシリコンと低いペンタランを媒体として比較したところ、シリコンを用いたとき、35nm の TiO_2 で耳下リンパ節の細胞増殖反応に有意な差が認められた。ペンタランでは同様の傾向が認められたものの、有意差はなかった。しかし、 TiO_2 のコーティングによる差は認められなかった。これらの結果から、 TiO_2 は感作性物質の作用を増強する作用を持ち、この作用は粒子径に依存していることが示唆された。

A. 目的

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、 TiO_2 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示唆されたが、粒子径やコーティングによる影響の差違は認められなかったという結果が得られた。しかし、その後の研究で、使用した媒体であるペンタランは粘稠性が高く、 TiO_2 粒子の分散性が著しく劣ることが班会議で報告された。そこで、本年度は分散性が比較的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、ナノサイズの 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について検討した。

B. 方法

1. 検体

35nm の TiO_2 A : SMT-500SAS (シリカ・アルミナ・シリコンコーティング) および B : MT-500B (無コーティング)、250nm の TiO_2 C : Lu-250 (無コーティング)、D : DN-SH(2) (シリコンコー

ティング) を使用した。媒体は、シリコン D5(Sil) またはペンタラン(Pt)を用いた。

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、0.1, 0.2, 0.4 および 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

塗布開始前日に、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))を用い

て除去した。

5. non-RI local lymph node assay (LLNA)

1) 群

各検体について、AOO-媒体塗布群、AOO-TiO₂塗布群、DNCB-媒体塗布群、および DNCB-TiO₂塗布群を設けた。マウスは1群4~6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 μ Lずつ AOO 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。

3) 採材

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材して重量を測定し、-20°C で保存した。

4) Bromodeoxyuridine(BrdU)取り込み量の測定

最終感作の 2 日後に、10mg/mL の BrdU 生理食塩溶液を、1 匹あたり 0.5mL 腹腔内投与した。採材後-20°C で冷凍した耳下リンパ節を 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、AOO-媒体塗布群の BrdU 取り込み量に対する TiO₂ および DNCB 塗布群の BrdU 取り込み量の比を Stimulation index (SI)として表し、感作性強度の指標とした。

6. 検討項目

1) 至適 TiO₂ 濃度の検討

TiO₂ の至適濃度を求めるため、0%、2%および 20%TiO₂ 塗布群について、AOO 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 には A、媒体には Sil を用いた。

2) 至適 DNCB 濃度の検討

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 Sil 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。TiO₂ には、A、B および C を用いた。

3) 媒体による反応性の相違の検討

分散性の異なる媒体による反応の相違を明らかにするため、Pt または Sil を媒体としたときの 20% TiO₂ の反応性について検討した。

Pt を媒体としたとき、TiO₂ は A、B および C を用いた。Sil を媒体としたとき、TiO₂ は A、B、C および D を用いた。

20%各 TiO₂ について、AOO および 0.2%DNCB を設けて検討した。

7. 耳介におけるサイトカイン等の mRNA の発現の検討

LLNA 解剖時にマウスの耳を採材し、耳背側の表皮および真皮を軟骨より剥離した後、mRNA 抽出用検体とした。媒体には Pt を、TiO₂ には B を用い、0、0.1 および 0.5%DNCB 塗布群について、炎症性タンパク、サイトカイン等の mRNA の発現量を定量的 PCR 法で解析した。

C. 結果

1. 至適 TiO₂ 濃度の検討

耳下リンパ節重量・体重比は、AOO と TiO₂ の同時塗布では TiO₂ の濃度を変えても有意差は認められなかったが、0.2%DNCB と TiO₂ を同時塗布することにより、TiO₂ の濃度依存的に有意に増加した。

SI は、ハプテンの存在に関わらず、2% TiO₂ 同時塗布群では対照群と比べたとき有意差が認められず、20% TiO₂ 同時塗布群では有意な増加が認められた(図 1)。

2. 至適 DNCB 濃度の検討

Sil 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は6-8を示し、どのTiO₂でもSilと0.2%DNCB同時塗布群に比べてSIが増加する傾向にあった(データ未表示)。

3. 媒体による反応性の相違の検討

Silを媒体としたとき、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り、より強くなった。Ptでは、TiO₂の粒子径による反応性の差異は認められたものの、リンパ節重量・体重比およびSIともにSilより弱く、有意差はなかった(図2および3)。

4. 耳介におけるサイトカイン等のmRNAの発現

TiO₂等の最終投与から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法を用いて測定した結果、MCP-1の有意な増加が認められた(図4)。

D. 考察

昨年度および今年度のPtを用いた実験では、35nm、250nmの粒子径に関わらず、TiO₂の存在により耳介の炎症反応の増悪やリンパ節重量・体重比の増加傾向は観察されるものの有意差は認められなかった。今回、より分散性の高いSil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。ナノサイズのTiO₂の分析において、粒子や媒体の分散性

の差異が大きな問題になっているが、今回の結果でもその重要性が明らかになった。

また、分散性の高いSilでは粒子径による影響が顕著だったが、Ptでは粒子系による差も大きくなかった。シリコンコーティングをしている粒子径の異なるAおよびDでは、リンパ節重量・体重比ではコーティングをしていないBおよびCより高い値を示したにもかかわらず、SIでは、BとA、CとDがほぼ同じ値になり、コーティングの差異は認められなかった。Sil中では、シリコンコーティングした粒子の方が分散性は高いと考えられるので、TiO₂粒子による感作性の増強以外に、炎症を増悪させる因子が関与し、リンパ節重量が増加している可能性が考えられる。

耳介のサイトカイン等のmRNA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と考えられているMCP-1が有意に増加していたが、他の炎症性サイトカインのmRNAは有意差が認められなかったことから、採材した時期が適当ではなかったと考えられる。リンパ節の重量増加の原因を明らかにすることも含め、mRNA抽出の適期を再検討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、TiO₂は感作性は有しないものの、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、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、コーティングによる影響の差違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

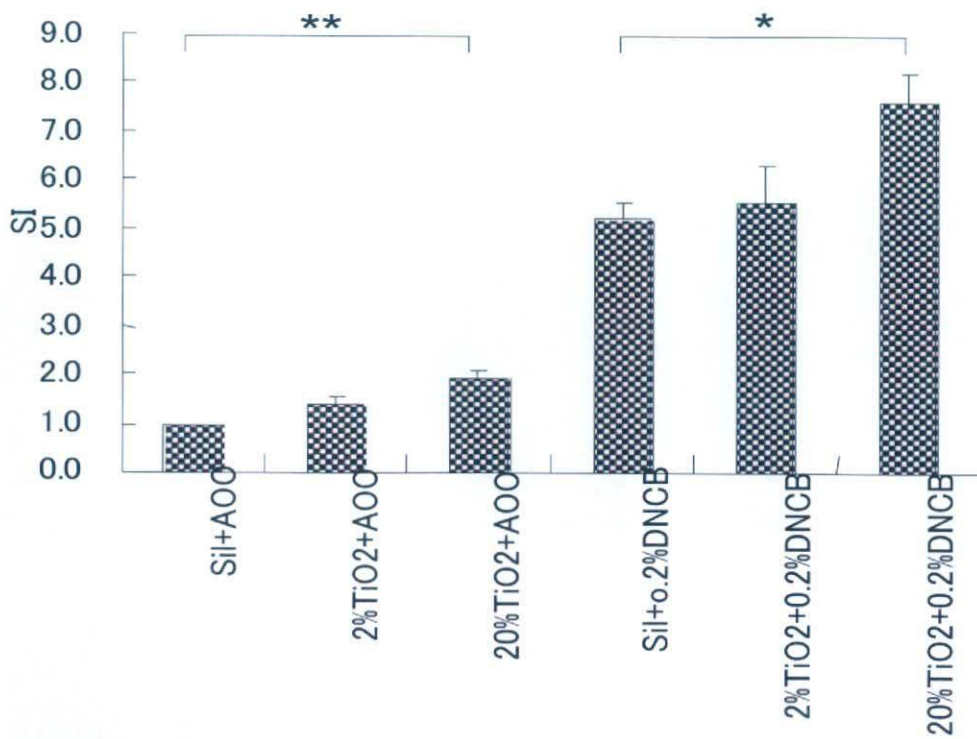
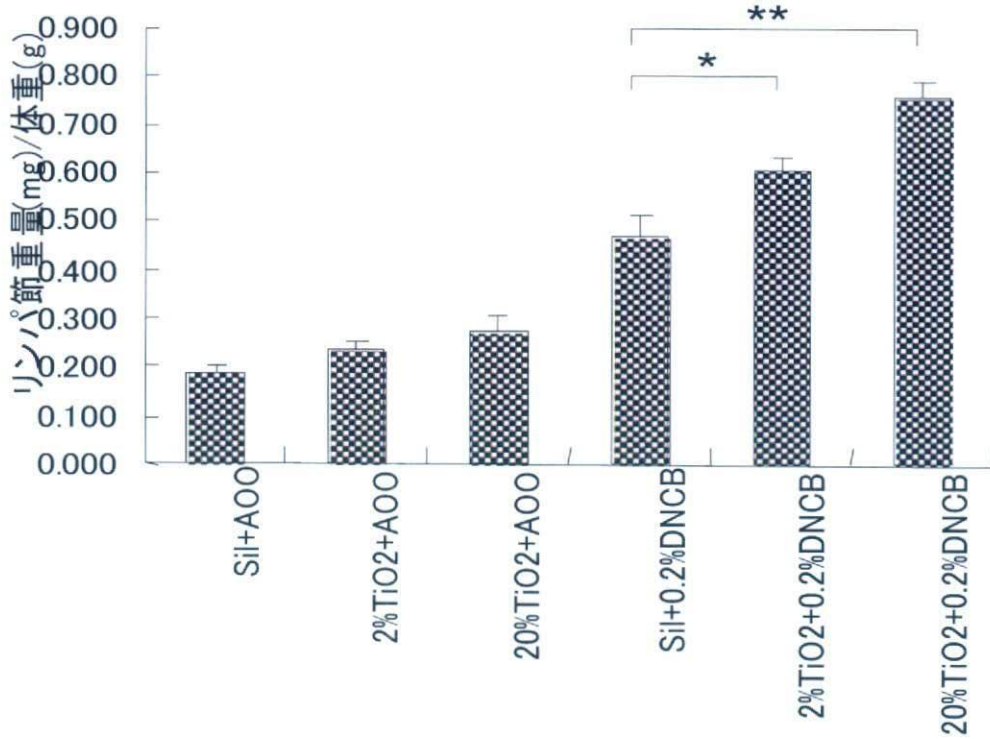


図1 0.2%DNCBの感作性強度に対するTiO₂濃度の影響
 平均値±標準誤差

SI: Stimulation index, TiO₂: A, 媒体: Sil

検定:

Dunnett 多重比較検定 *P<0.05, **P<0.01

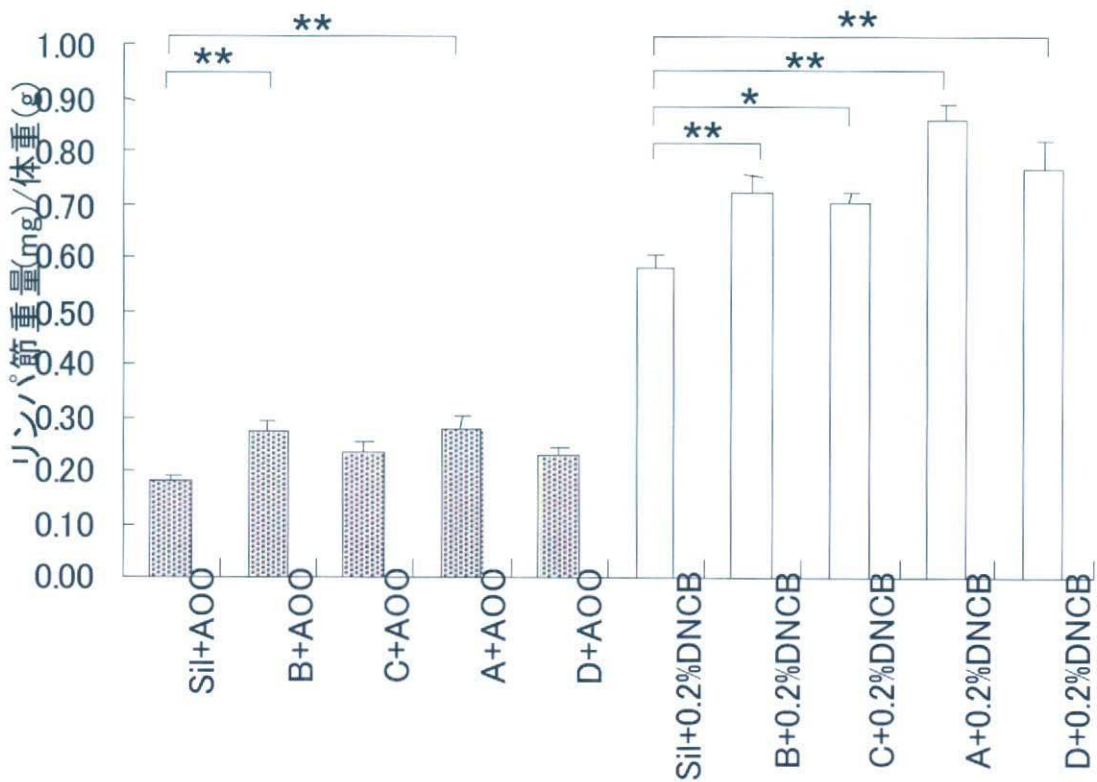
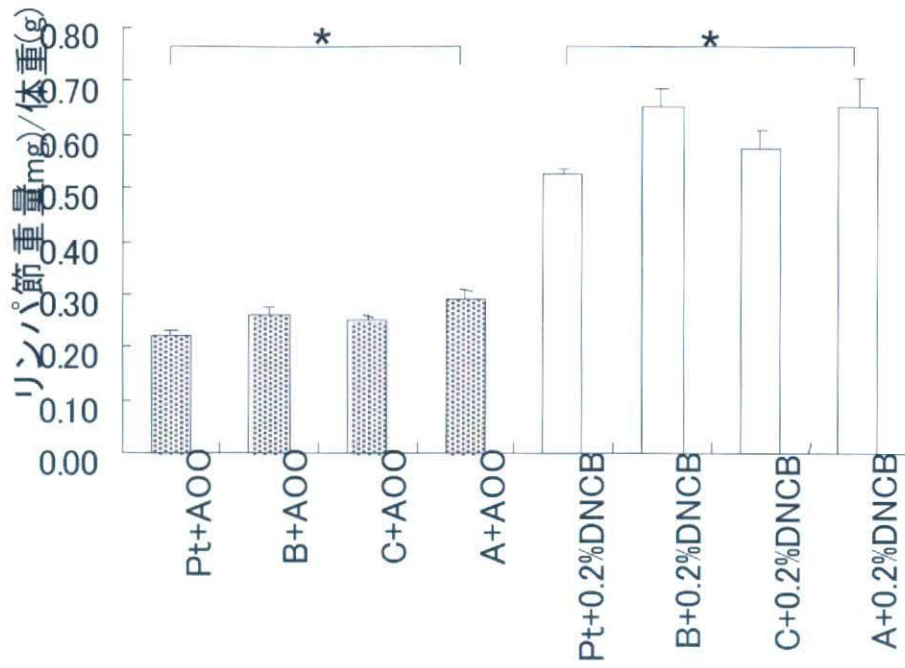


図2 媒体およびTiO₂による耳下リンパ節重量-体重比の相違

媒体：PtおよびSil，TiO₂：A，B，CおよびD

平均値±標準誤差

検定：Dunnett 多重比較検定 *P<0.05、**P<0.01

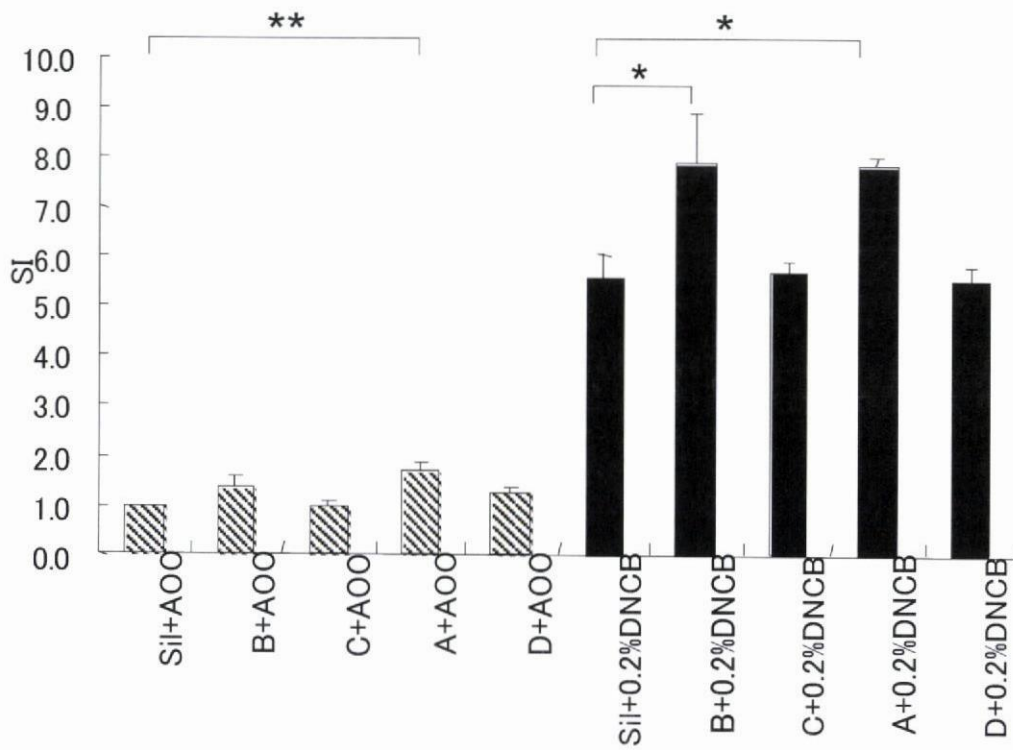
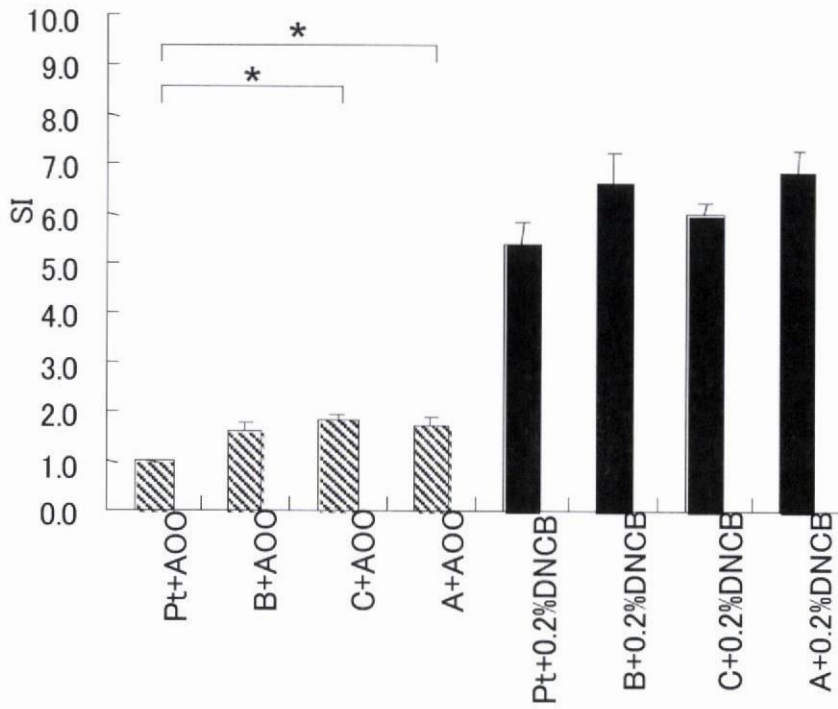


図3 媒体およびTiO₂によるStimulation Index(SI)の相違

媒体：PtおよびSil, TiO₂：A, B, CおよびD

平均値±標準誤差

検定：Dunnnett 多重比較検定 *P<0.05、**P<0.01

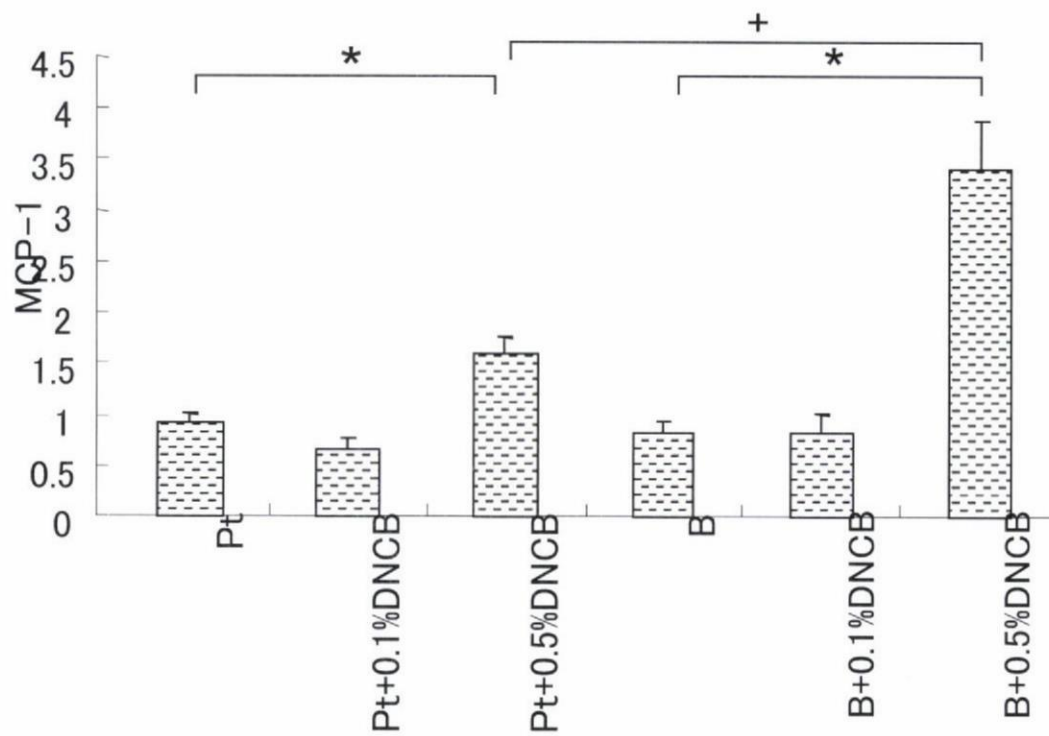


図4 耳介における MCP-1mRNA の発現量

媒体 : Pt, TiO₂ : B,

平均値 ± 標準誤差

検定 : Dunnett 多重比較検定 *P<0.05、**P<0.01

t 検定 +P<0.05