

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: 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 伊藤由美子(東北大学大学病院技官)

研究要旨

ナノ粒子化された酸化チタンの経皮毒性について、生体計測工学的手法により皮膚生理指標を評価して検討した。酸化チタンは一次粒子径がナノサイズであっても、凝集して塊を形成するため、「ナノ粒子」の経皮毒性を性格に評価することは困難であった。比較的一次粒子が残る試料を作成し、健常皮膚に連続塗布(計 9 日)ならびにテープ剥離し作成した損傷皮膚に 1 回塗布し、皮膚生理指標を計測したが、媒体対照と比較して、角層水分量ならびに皮膚バリア機能のさらなる低下は認められなかった。病理組織ならびに電子顕微鏡の観察にても、角層を通過して生きた表皮層や真皮層には酸化チタン粒子は証明しえなかった。凝集のない「ナノ粒子」の試料での証明が必要ではあるが、今回の試料での結果からは、ナノ粒子化された酸化チタンは比較的凝集して塊を形成する傾向があるため、皮膚に塗布した場合、特に健常皮膚では連続塗布でも経皮吸収される可能性は低く、また、皮膚障害もほとんど来たさないと考えられた。

A. 研究目的

ナノ粒子化された化学物質のうち酸化チタン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で皮膚の生理指標を計測し検討することを目的に本研究を施行した。皮膚の生理指標としては、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 $L^*a^*b^*$ 表色系による皮膚の定量を用いた。

B. 研究方法

I) 試料

SMT-500SAS (Lot. 15068, 覆型 35nm), MT-500B (Lot. 1880202, 非覆型 35nm), AMT-600 (Lot. 6540, 非覆型 30nm), Lu-205 (Lot.-, 非覆型 250nm) をそれぞれシリコンに 10%(w/w) の濃度で調整し超音波処置後用いた。SMT-500SAS はシリコンに均一白濁した懸濁液となったが、その他

の試料は、肉眼的に明らかに塊が生じ均一な懸濁液は調整できなかった。始めに行った健常皮膚モデルでは、SMT-500SAS (Lot. 15068, 覆型 35nm), MT-500B (Lot. 1880202, 非覆型 35nm), AMT-600 (Lot. 6540, 非覆型 30nm), Lu-205 (Lot.-, 非覆型 250nm) のすべての試料について検討したが、損傷皮膚モデルではより皮膚を透過する可能性のある小粒子にしぼり同粒子径の覆型、非覆型である SMT-500SAS と MT-500B についてのみ行った。

II) 動物

週数 7 週～11 週のヘアレスマウス(Hos:HR-1)を用いた。1 試料あたり 5 匹のマウスを処置した。

III) 方法

ヘアレスマウスの背部皮膚を用いて、以下の方法で検討した。

1) 塗布方法

1)-1. 健常皮膚連続塗布モデル

試料を Day 1 から Day 5, Day 8 から Day 11 に単純塗布した (Day 6, 7 は無塗布)。

1)-2. 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を粘着させ角層を剥離する操作を、滲出液により皮膚面が光沢を持つまでおおむね10回から15回連続で行った後、試料を塗布した。

2) 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。さらに色彩色差計で 1976 年国際照明委員会 (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。試料塗布前および皮膚計測前には、ネンプタールを腹腔内注射による麻酔を施行し、測定部皮膚をクレンジング、ついで蒸留水を含ませた綿で皮表に付着する余分な試料をふき取った。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。

3) 病理組織ならびに透過型電子顕微鏡

健常皮膚モデルにおいては、Day 12 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た。テープストリッピング処置による損傷皮膚に試料を塗布してから3時間後ならびに 24 時間後のマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後に皮膚を採取した。採取した皮膚は、病理組織学的ならびに透過電顕での観察を行った (透過電顕標本作成ならびに写真撮影は徠超微

形態研究所 (横浜市) に委託した)。

4) 試料の透過に関する追加実験

溶媒 (シリコン) に最もよく懸濁する SMT-500SAS (Lot. 15068, 覆型 35nm) をシリコンに 1% に懸濁させ超音波処理した試料を、マウスの背部皮膚全体に塗布 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 時間経過) したマウスを準備した。ネンプタールで腹腔内麻酔し、セロハンテープで 1 回剥離後、2 回剥離後、3 回剥離後、5 回剥離後、10 回剥離後、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、表面を走査型顕微鏡での観察ならびにエネルギー分散型 X 線分析装置での Ti 分析を施行し、どのレベルまで Ti が浸透しているかを調べた (東北大学大学院環境科学研究科田路研究室の協力による)。

(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的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

1) 酸化チタン粒子について

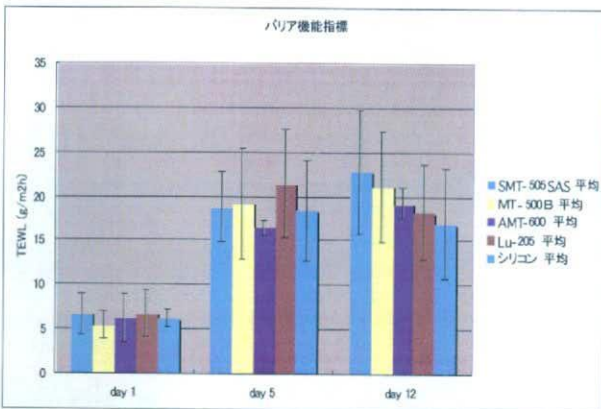
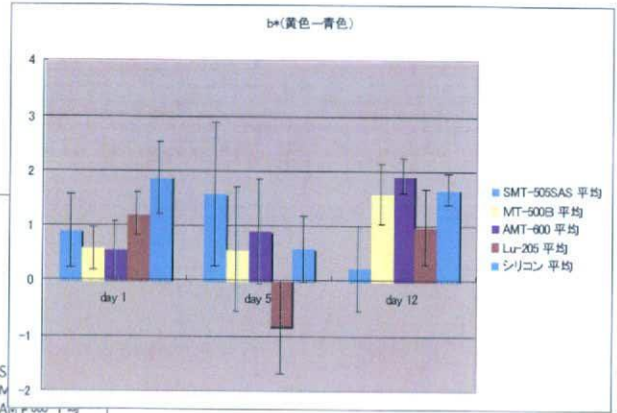
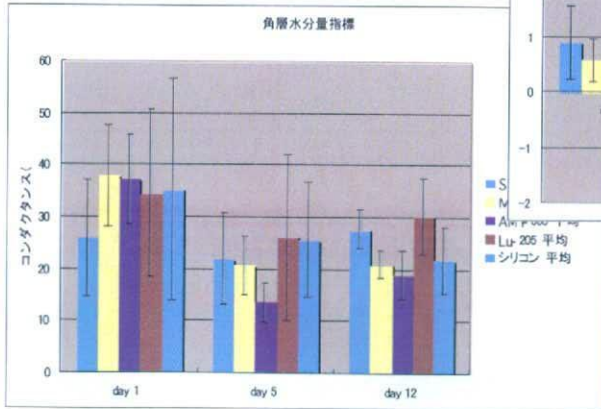
SMT-500SAS について、原末、シリコン懸濁液中のものを電顕で観察したところ、単一の粒子として存在しているものは少なく、数個、あるいは、大きな塊を形成しているものが多く観察された。

2) 生体計測工学的指標による検討

2)-1. 健常皮膚連続塗布モデル

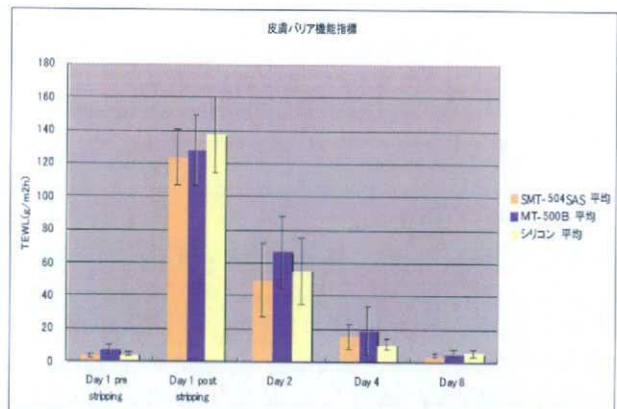
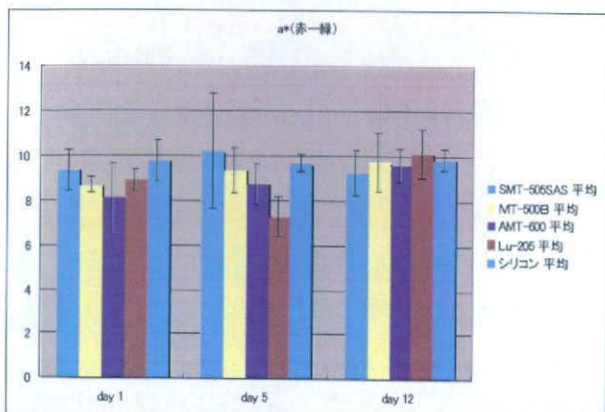
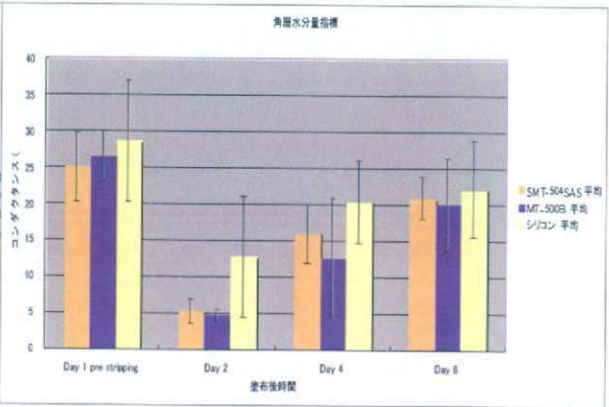
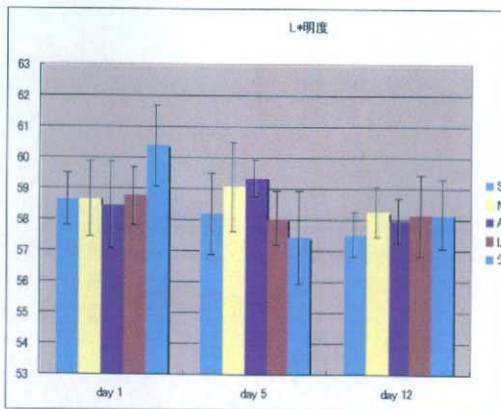
角層水分量指標であるコンダクタンスは MT-500B (非覆型 35nm) および (AMT-600 非覆型 30nm) がシリコン対照と比較して低下する傾向がみられたものの統計学的有意差は認めなかった。TEWL 値、L*値 a*値 b*値はいずれの試

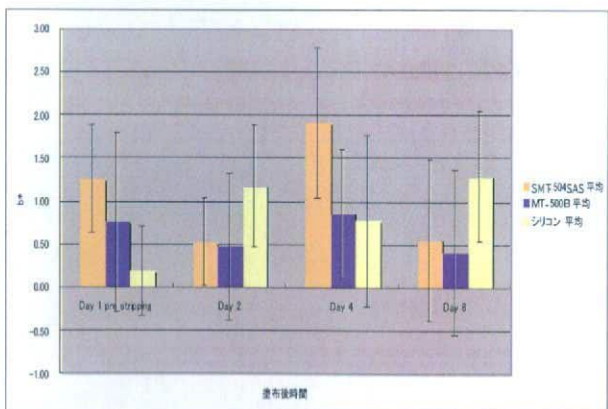
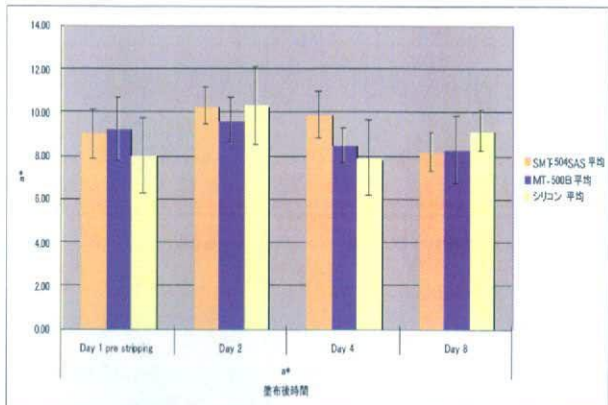
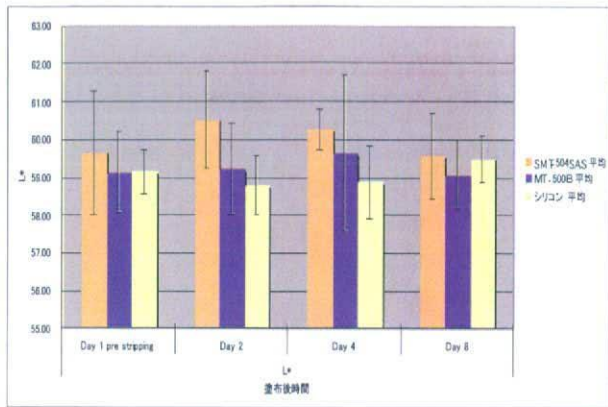
料も対照と比較して有意な変化を認めなかった。つまり、バリア機能低下 (TEWL 値の上昇)ならびに、炎症による発赤 (a^* 値の上昇)はなかった。



2)-2. 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。健常皮膚モデルと同様に角層水分量指標であるコンダクタンスが、対照と比較して低下する傾向が認められたが、統計学的有意差はなかった。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*のそれぞれの値も対照と比べて有意な変化を認めなかった。つまり、対照以上のバリア機能低下 (TEWL 値の上昇)ならびに、炎症による発赤 (a^* 値の上昇)はなかった。





3) 病理組織ならびに透過型電子顕微鏡

3)-1. 健常皮膚連続塗布モデル

SMT-500SAS, MT-500B, AMT-600, Lu-205 のいずれの試料を塗布した皮膚でも病理組織において角層表面に試料塊を認めるのみで、角層の下層の生きた表皮層あるいは真皮層（特に毛包周囲）に酸化チタン粒子は観察されなかった。の電顕でも同様に角層より下層には粒子は観察されなかった。また、表皮、真皮の炎症細胞浸潤も対照と比べて酸化チタン試料を塗布した皮膚でより浸潤細胞が多いという結果は得られなかった。

3)-2. 損傷皮膚単回塗布モデル

SMT-500SAS, MT-500B のいずれの試料を塗布

した皮膚でも病理組織において角層表面に試料塊を認めるのみで、角層の下層の生きた表皮層あるいは真皮層（特に毛包周囲）に酸化チタン粒子は観察されなかった。電顕でも同様に角層より下層には粒子は観察されなかった。また、表皮、真皮の炎症細胞浸潤も対照と比べて酸化チタン試料を塗布した皮膚でより浸潤細胞が多いという結果は得られなかった。

4) 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。また、セロハンテープよりも粘着力が弱い電顕試料固定用のカーボンテープを用いて連続して角層剥離を行ってそれに付着した角層ならびに試料の観察をおこなったところ、1 枚目には明らかに粒子が観察されたものの、2 枚目以降では粒子は明らかではなかった。

D. 考察

1) 試料の問題

一次粒子径は 30~35nm であっても、原末の段階で塊を形成し、これらを媒体に懸濁しても塊が多く「ナノ粒子」として存在しているものは少なかったため、「ナノ粒子」の皮膚毒性を検証するには問題があった。

2) ヘアレスマウス健常皮膚に、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、中には単粒子で存在するものも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チタンはほぼ確認されなくなり、角層を透過してその下層の生きた表皮層あるいは真皮層に透過する可能性はほとんどないものと思われた。計 9 日間連続塗布後にも健常皮膚においては、角層を透過した証拠

はえられず、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、経皮毒性は証明しえなかった。

3) 角層を滲出が生じるまで剥離した後の皮膚に酸化チタンを塗布したが、今回は、生きた表皮層や真皮層には酸化チタン粒子は確認されず、角層損傷皮膚においても1回の塗布のみでは、角層透過はおこることはほとんどないものと思われた。皮膚生理指標の測定においても対照と比べて、角層水分量や皮膚バリア機能のさらなる低下をきたしうる可能性は少ないと考えられた。しかしながら、角層が損傷された皮膚に連続して酸化チタン試料を塗布した場合は、経皮的に吸収される可能性は否定できない。

E. 結論

ヘアレスマウス皮膚を用いた酸化チタンの経皮吸収ならびに皮膚へ与える影響について、生体計測工学的手法により皮膚生理指標を測定して検討した。ヘアレスマウスの角層はヒト角層とくらべて機能がおとるものの、計9日間連続塗布にても酸化チタン粒子は角層を通過する可能性はほとんどないものと思われた。また、セロハンテープにより剥離にて角層を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非常に少ないことがわかった。

しかしながら、今回用いた試料は、調整した時点で必ずしも一次粒子のままではなく、ほとんどが凝集して大きな塊を形成していたがため、皮膚角層を透過しないという可能性は充分にあり、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にどのような変化が起こるかを検討できないうちは、ナノ粒子の酸化チタンの経皮毒がないといえず、さらなる検討が必要である。

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

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

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：*In vivo* 経皮吸収慢性評価のパラメータの検索

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 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

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

西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部 部長

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

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

ナノ粒子二酸化チタン（nTD）の皮膚発がん性に対する影響を検索する目的で、ルチル型・無コーティング nTD を用いて、検体を皮膚に擦り込まない状態で、正常皮膚および表皮の防御機能を担う角質層がない状態の皮膚に対する皮膚発がんプロモーション作用の検索を行い、さらに *in vivo* および *in vitro* における nTD の皮膚透過性について検討した。その結果、皮膚・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）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、溶媒対照群に比べ nTD 塗布による有意な上昇はみられず、野生型ラットにおいても差はみられなかった。人工皮膚を用いた nTD の皮膚透過性の検討では、nTD は角質層と扁平上皮層を通過しないことが明らかとなった。今後、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。

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に対する影響についての知見は乏しかった。このうち、ナノ粒子二酸化チタン（nTD）は、化粧品、ねり歯磨剤、食品添加剤および白色塗料の材料として既に市場に出ており、皮膚に塗布されることが多いが、皮膚発がん性に対する影

響は未だ詳細に検討されていない。前年度の実験において皮膚発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入(Tg)ラット(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 について弱い発がんプロモーション作用を示唆する結果を得た。今年度は、この結果について再実験を行い、正常皮膚に対する nTD の皮膚発がんプロモーション作用を確認すること、さらに *in vivo* および *in vitro* における nTD の

皮膚透過性について検討し、表皮の防御機能が低下あるいは無くなった状態の皮膚に対する nTD の皮膚発がんプロモーション作用を nTD 塗布に対する影響を検索することを目的として、以下の4つの実験をおこなった。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、実験2) 人工皮膚を用いた nTD の *in vitro* 表皮透過性試験、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、実験4) nTD の真皮内投与によるサイトカインの発現。

B. 研究方法

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 3x3 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、ミニブ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: 3 cm 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、表皮ごとテープを剥がす。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

表皮が剥離した場合あるいは表皮の防御機構が破壊されている状態では、nTD は真皮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、異物肉芽腫が形成されて MIP1 α の発現上昇がみられるかどうか検討した。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 100ul 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 MIP1 α の発現を検索した。

(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、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
Hras128 ラットを用いた検索では、塗布部に扁平上皮乳頭腫および扁平上皮がんが観察され、それらの平均発生個数はそれぞれ増加傾

向を示したが有意な上昇ではなかった。それら二つを合わせた皮膚腫瘍性病変（扁平上皮乳頭腫+扁平上皮がん）の平均発生個数は、溶媒対照群 1.7 ± 1.8 、nTD 50mg 群 3.9 ± 3.3 、nTD 100mg 群 6.5 ± 4.2 、TPA 群 9.0 ± 2.6 と、対照群に比して nTD 100mg 群および TPA 群にそれぞれ有意な増加が見られた ($p < 0.01$, $p < 0.01$)。SD ラットを用いた検索では、平均 0.5 個の扁平上皮乳頭腫が観察されたが、TiO₂ 塗布による影響は見られなかった。

この結果を確認する目的で、再度実験を行った。その結果、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 個の腫瘍性病変が観察されたが、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人工皮膚を透過した nTD の量を測定したところ、溶媒対照群で 1 well 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、検出量に有意な差は見られなかった。すなわち、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明らかとなった。

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。

D. 考察

皮膚は、表皮、真皮および皮下脂肪組織の 3 層構造をとり、それぞれ外側からの異物に対する防御、真皮は皮膚組織の機能的維持および皮膚組織の構造上の維持という機能をもつ。nTD が発がんプロモーション作用を惹起するには、皮膚の 3 層のうちどこに到達するか確認することが重要である。従って、本研究では、nTD を皮膚に擦り込まない状態で塗布した場合の皮膚発がんプロモーション作用を検索し、nTD の皮膚透過性について、*in vitro* で人工皮膚を用いて検索し、*in vivo* では tape stripping 法を用いて検索した

Hras128 ラットを用いた 1 回目の皮膚発癌性の検索では、皮膚腫瘍性病変（扁平上皮乳頭腫+扁平上皮癌）の発生個数で有意な上昇がみられたものの、それらの単独の発生個数では有意な上昇は見られなかったため、nTD の皮膚発がんプロモーション作用は弱いものと考えられるが、この作用は追試では確認できなかった。この原因の一つとして、Hras128 ラットで違いが検出されたが、SD ラットではほぼ同じ発生個数で違いは検出されなかった点が挙げられる。すなわち、Hras128 ラットは皮膚発がん感受性が高いため、DMBA の投与量や nTD の塗布量のわずかな違いが増幅された結果、発生個数の差として検出された可能性がある。これらの結果を併せると、nTD を正常皮膚に塗布した場合の皮膚発癌プロモーション作用は増加する傾向にあるが統計学的有意差においては検出限界ぎりぎり、プロモーション作用はないと考えられる。

人工皮膚は皮膚の表皮の成分である角層、有棘細胞層および基底細胞で構成されている。人工皮膚を透過した nTD の量は、対照群と nTD 塗布群で差は見られなかったことから、

nTD は正常皮膚に塗布した場合、表皮層を直接に透過することはないことが示唆される。したがって障害のない角質層をもつ正常皮膚に nTD を塗布した実験では、nTD が表皮を通過しなかったために、発がん修飾作用がみられなかったと考えられる。今後、Tape stripping 法を用いた *in vivo* における表皮層透過性を追試し、*in vitro* の結果を併せて、皮膚透過性に関する結論を出す予定である。

in vivo において nTD の表皮透過性を検索するには、表皮の角質層がある皮膚と、表皮の角質層がない皮膚のそれぞれに nTD を塗布し、有棘細胞層を通過して皮下組織に取り込まれた nTD の量を測定する必要がある。本研究では、有棘層のない皮膚をつくるのに、市販のテープを表皮に貼付けた後に有棘層ごとテープで剥がし取る Tape stripping 法を用いた。表皮の再生力は強いために、Tape stripping によって表皮を剥がしても数日で再生した表皮により、nTD は透過できなくなってしまう。本研究の結果から、nTD を剥離した表皮に投与するには、30 回の Tape stripping に加え、3 日間の塗布を繰り返すことが透過性を観察することのできる条件と考えられた。

表皮が剥離した場合あるいは表皮の防御機構が破壊されている状態では、nTD は真皮に到達することが予想される。皮内に到達した nTD は、マクロファージに異物として認識され、貪食された後、皮内に異物肉芽腫が形成されることが予想される。以前に我々は、nTD が肺内に噴霧された場合、nTD を貪食した肺胞マクロファージが MIP1 α を分泌し、肺胞上皮細胞の細胞増殖が惹起された結果、肺発がん性が促進されることを報告した。そこで我々は、nTD を皮内に注入した場合、異物肉芽腫が形成されて MIP1 α の発現上昇がみられるかどうか予備的に検討した。nTD を皮内に投与することにより、nTD を貪食したマクロファージおよびその周辺に肉芽腫の形成を予測しており、病理組織学的検索の結果が待たれる。Western blotting の検索により、MIP1 α の発現は予想より低く、血液中に

MIP1 α の発現がみられなかったのは、短期間の皮内投与により、nTD を貪食したマクロファージの数が少ないのが予想され、今後の病理組織学的検索と併せて、さらに追究する予定である。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuoka, M., Fukamachi, K., Uehara, N., Tsuda, H. and Tsubura, A. Induction of a novel histone deacetylase 1/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., Shiraishi, 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 finemale 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ニウムおよびフ

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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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