

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

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

平成21年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

名古屋市立大学

平成22年(2010年)5月

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 21 年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 津田 洋幸

平成 22 年 (2010 年) 5 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. 研究分担報告書	10
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	11
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	20
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 真紀	26
4. 皮膚計測工学によるナノマテリアルの経皮毒性の指標の検討 菊池 克子	32
5. <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	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	46
IV. 研究成果の刊行物・別冊	49

平成 2 1 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 21 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

研究代表者： 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】

いままでの研究でナノ粒子 TiO₂ (nTD) は塗布した場合に健常皮膚組織は透過しないが、角質除去や炎症等の障害や過度に脱毛した皮膚では、毛嚢経由で透過する可能性が除外出来なかった。とくに分散性の高い nTD は透過する可能性がある。これに基づき各班員は以下の研究を実施し、手法の妥当性を評価・検証した。

1) 津田：ラットの背部皮膚において角質剥離後に nTD (ルチル型・無コーティング) を塗布した場合でも透過しなかった。発がん性については、分散性の良い nTD (シリコン被覆、シリコン分散剤) を野生型マウスの背部に塗布しても発がんプロモーション作用は全く見られなかった。さらに皮膚発がん感受性の高い rasH2 マウスによる発がん二段階モデルに塗布した場合でも同じ結果であった。以上から nTD は皮膚を通過せず、発がん性も示さないことが明らかとなった。2) 五十嵐：nTD(ルチル型・被覆あり・粒径 35nm)を平均粒子径は 100 nm 以下で分散させた 10%、懸濁液を雄 SD 系ラットへ 24 時間閉塞塗布を 28 日間反復した。投与に起因した毒性学的な変化は認められなかった。皮膚部位の電子顕微鏡観察では、nTD の凝集塊は角化上皮間に認められたが、角質層や毛包から真皮層に透過している像は認めなかった。ICP-MS 分析において、チタニウムは血液、肝、脾、腎等の臓器中には検出されなかった。3) 宮澤：マウスの損傷皮膚に nTD と感作性物質 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)を同時に塗布した場合、DNCB の作用を増強する可能性が示唆された。nTD が DNCB を吸着し、DNCB の暴露量を増加させた可能性があるため、nTD を連続投与した後に洗浄し DNCB を投与すると増強が認められなかった。以上から、nTD が皮膚を透過するのではなく、表面で DNCB を吸着してその作用を持続させた可能性が示唆された。4) 藤井：nTD の皮膚移行性を、ヘアレスマウス (HM) とユカタンマイクロピッグ (YMP) より採取した脱毛皮膚組織 (上皮+真皮) を *in vitro* のモデルで透過性を比較したところ、両者とも透過はなく、類似した結果であった。また、塗布後、表面に残存しているナノマテリアルをシアノアクリ

レートで完全に除去することでリセプター層上の残存 nTD が除去されて、再現性のある結果が得られた。5) 菊地：角質を除去してバリア機能が傷害された皮膚において、nTD は DNCB 刺激でみられる軽微な皮膚刺激性を有し、表皮細胞層の肥厚等を引き起こした。この作用は、粒径 250nm 粒子より 35nm 粒子でより強く認められた。皮膚炎などのある炎症性損傷皮膚に、nTD を塗布した場合、肉芽に残存することが示された。以上から、透過性評価手法としては、健常と角質除去障害マウス・ラットの背部皮膚および耳介における評価、毛嚢の多いヘアレスマウスおよび *in vitro* の皮膚モデルが有用である。発がん性評価には皮膚発がん高感受性ヒト Ha-ras 遺伝子導入マウスおよびラットを用いたモデルが標準評価法として有用と考える。

A. 【研究目的】

1)津田：实际的な健康影響を評価可能なモデルを構築する目的で、nTD の障害皮膚における通過性と、化粧品としての利点が多いために広く用いられている皮膚通過性が疑われている分散性の高いシリコン被覆 nTD(シリコン nTD)の皮膚発がん性に対する影響を検討した。2)五十嵐：酸化チタン及び酸化亜鉛等の金属酸化物粒子は、塗布段階で既に数百 nm の凝集体となっており、これが試験結果に影響している可能性があった。本年度は、酸化チタン粒子がナノサイズで分散するように調製してラットに反復塗布し、臓器重量と病理学的検査により毒性の有無を調べた。投与部位の電子顕微鏡観察及び組織中のチタン濃度を分析し、酸化チタン粒子の経皮吸収性を評価した。3)藤井：これまで Yucatan micropig (YMP)皮膚を用いて nTD の *in vitro* 皮膚通過性について検討してきたが、種差および *in vivo* との相関性を確認する必要から、ヘアレスマウス

(HM) をモデル皮膚とし、皮膚透過性を検討した。また、前年度行った 25nm 蛍光ポリスチレン (PS-25) の皮膚透過性試験の改良追試験を行った。4) 宮澤：昨年度の研究において、nTD と感作性物質を同時投与した場合に nTD は感作性物質 DNCB の作用を増強することが示唆された。今年度は、この作用が nTD の皮膚損傷作用によるものかを明らかにするために、連続投与した後洗浄し、non-RI local lymphnode assay (LLNA) の手法を用いて検討した。さらに連続投与時の耳介組織について、組織学的検討を行った。5)菊地：昨年度までに、角層が障害されていない皮膚では nTD は皮膚を通過しないことが分かったので、今年度は、粘着テープで角層を損傷したマウス皮膚と、実験的に皮膚炎を作成した障害マウス皮膚に nTD を塗布し、生体計測工学的手法ならびに病理組織学的検討により経皮毒性について調べた。

B. 【研究方法】

1) 津田：8週齢SD系雄ラットの背部皮膚(3x3cm²)を粘着テープによって30回ストリッピングによる角質除去を行った直後にnTD(ルチル、ペンタラン分散)を0.5ml塗布して7日まで経時的に屠殺剖検し通過性を観察した。さらに毛嚢の無い状態での透過性確認のためにヒトケラチノサイトを多層培養した人工皮膚組織の表面に250および500ppmのnTD、100mgを0.5ml塗布して24および48時間後に隔膜下のレセプター層への移行を検討した。皮膚発がん性の再評価を行い、発がん感受性の高いヒト正常型Hras遺伝子導入雄マウスおよび同腹野生型マウスの背部を用い、背部皮膚を2x2cmに剃毛し発がん物質

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 300ug/0.1mlアセトン)を滴下後プロモーション段階で、入手出来得る最も分散性の高いnTD(直径35nm、ルチル型、シリコンコーティング、シリコン0.2mlに懸濁)を50mgまたは100mgを週5回塗布し、rasH2マウスは8週、野生型マウスは40週にて屠殺剖検した。またシリコンnTD/シリコン分散剤中のnTDの粒子の大きさの分布について、島津レーザー解析式粒度分布測定装置SALD-7100を用いて、粒度分布を相対粒子量(%)として測定した。

2) 五十嵐：表面処理したルチル型の平均一次粒子径35nmのnTDを分散剤とともに水に入れ、ビーズミル法により凝集

塊を分散させて10%懸濁液を調製した。雄性、6週齢のCrl:CD(SD)系ラット背部に試験液200μlを閉塞塗布した。24時間後除去して再度同様に操作した。これを28日間反復した。血液及び血清を分離し、肝臓、腎臓、脾臓、肺及び脳を採取し、硝酸及びフッ化水素酸を加えてマイクロウェーブ照射して分解し、ICP-MSを用いてチタニ

ウム濃度を測定した。肝臓、腎臓、皮膚については病理学的検査も実施した。皮膚上皮は透過型電子顕微鏡にても観察した。

3) 藤井：ヘアレスマウスHM

(Hos:HR-1、6週令♀)から摘出し、前年度のYucatan micropig (YMP)と同様に、健常、角層除去、脱毛皮膚の入ったセルを作成した。HMの毛は細くて数が多いため、アロンアルファで除去した。nTDは35nmコーティングなし(T-35)、アルミナシリカシリコンコーティング(TC-35)および分散在(T-disp)を用いた。10%懸濁液を24時間暴露した後、アロンアルファによるストリッピングで表面に残る酸化チタンを除去した後、皮膚中及びレセプター中のチタニウムをICP-MSを用いて定量した。PS-25を用いた実験では、24時間適用後、シアノアクリレートストリッピングで表面のポリスチレンを取り除き、OCTコンパウンドに包埋凍結を行った。

4) 宮澤：nTDのDNCBの感作作用増強の確認を行った。材料は35nmのnTD(シリカ・アルミナ・シリコンコーティン

グ) および 250nm の nTD (シリコンコーティング)、分散液はシリコン(Sil)に 20% (w/w)とした。感作物質 DNCD をアセトン・オリーブ油(4:1,v/v) に溶解し、0.2% 溶液を調製した。8-12 週齢の CBA/JN 雌マウスの両側の耳介背側部の表皮角質層をセロテープにより除去した。1 群 5~6 匹とし、試験初日(Day0)から 3 日間隔で計 5 回(Day12)、テープストリッピングを行い、その間毎日 nTD または sil を塗布した。Day13 に nTD を洗浄除去し、Day14 から両耳介背側面に、25mL の 0.2%DNCB を塗布し、24 時間間隔で 3 日間連続して行った。

各検体について、sil 塗布群、nTD 塗布群、sil-DNCB 塗布群、および nTD-DNCB 塗布群とした。各群の 2 匹について両耳介の中央部について、一方は、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定、他方は背側部皮膚を軟骨より剥皮し、表皮シートを作製した。残りの動物は、最終感作の 3 日後(day19)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℃で保存した。最終感作の 2 日後に、BrdU を腹腔内投与後、-20℃で冷凍した耳下リンパ節組織について ELISA によって BrdU 取り込み量を測定した。表皮シートは、アセトン固定後、抗 Langerin 抗体または抗 I-Ak 抗体を用いて蛍光抗体染色を行い、各抗体で染色される細胞を Langerhans 細胞として細胞数を測定した。

5) 菊地 : nTD (シリコンコーティング、

粒径 20nm、シリコン D5 分散) 100mg/ml の濃度に調整して試料とし、ヘアレスマウス (Hos/HR) 雄の背部皮膚をテープストリッピングした後、nTD を塗布 3 時間後、24 時間後、72 時間後に皮膚バリア機能指標である TEWL、角層水分量指標である高周波コンダクタンス、皮膚の色調の指標を計測した。NCヘアレスマウス雄に DNFB で皮膚炎を惹起後に、二酸化チタンを外用投与して約 2 週後に皮膚計測を施行後、皮膚と腋窩ならびに鼠径部リンパ節を採取した。同時に採血を行い、好酸球%と IgE を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究における倫理面への配慮については、各班員は動物実験及び所属施設において、「動物の保護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」に準拠するとともに、当該規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経て研究を実施した。ヒト組織材料を用いる実験は実施しなかった。

C. 【研究結果】

1)津田 : nTD の障害皮膚通過性 : 浅いテープストリッピングでは nTD は角質内と毛嚢腔内に少量見られた。30 回のストリッピングによってほぼ全層の角質剥離を行った場合でも、真皮、皮下組織への移

行はなかった。浅い剥離では残存上皮が、全層剥離の場合には残存毛嚢上皮が浸出物または肉芽とその下の真皮との境界部に移行 (migrate) しつつ増殖して3日で修復し、nTD を痂皮ごと押し上げて排除してしまうために、真皮、皮下組織には全く見られなかった。毛嚢組織の無い人工皮膚において通過性は認めなかった。発がん性評価では、rasH2 トランスジェニックマウスの皮膚腫瘍性病変 (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 8.0 ± 5.4 に対し、シリコン nTD 50m/0.5ml g 群および 100m/0.5ml g 群ではそれぞれ、 9.0 ± 3.7 および 7.5 ± 3.7 であり有意差はなかった。野生型マウスである C57Black では 40 週まで観察したが有意差は無かった。投与したシリコン nTD /シリコン分散剤中の nTD の平均粒子径は $0.16 \pm 0.074 \mu\text{m}$ で、 $0.13 - 0.17 \mu\text{m}$ の粒子径が全体の 80% を占め、分布の中間値は $0.16 \mu\text{m}$ であった。これは過去 2 年度でラットに用いた無コート nTD /ペンタラン分散中の nTD の平均粒子径 ($3.18 \pm 0.35 \mu\text{m}$ 、 $1.3 - 5.1 \mu\text{m}$ の粒子径が全体の 80%、分布の中間値は $3.57 \mu\text{m}$) よりも遥かに小さかった。

2)五十嵐:ラットの皮膚への閉塞塗布実験法において、nTD の平均粒径は 89nm であり、100 nm 以下のナノサイズのものが半数以上存在した。肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳の剖検で異常はなかった。角質最外層の 1 から 2 層内側に酸化チタンの凝

集塊が認められた。角質層が毛嚢に移行する部位、表皮・真皮層および毛嚢に nTD は認めなかった。ICP-MS の組織中チタン濃度が $5 \mu\text{g/g}$ 以上とした場合、血液及び血清および他の臓器では対照群と有意差は認めなかった。**3)藤井:**ヘアレスマウス

(HM) における nTD の皮膚移行性を検討した。HM において、健常、角層除去、脱毛のいずれの状態の皮膚に nTD を適用してもレセプター層 (培養液) 中の nTD 濃度増加はなかった。なお、HM のアロンアルファによる角層除去皮膚では、表面に残存した酸化チタンの除去が難しく、表面に酸化チタンが残存するので注意を要することが分かった。ナノサイズポリスチレン PS-25 を YMP 皮膚に適用した場合、前年度は一部の角層除去皮膚の生きた表皮中に蛍光が認められたが、この原因としてマーキングに用いたマジックインクに付着した PS-25 が切片作成・観察時に表面に残った可能性が考えられた。これらの要因を排除したところ、毛包以外での蛍光は全く認めなかった。また、表面電荷の異なる COOH、 NH_2 修飾 PS-25、およびプロピレングリコール、グリセリン、界面活性剤共存下においても同様にバリア機能の破壊された角層除去皮膚においても皮膚中に蛍光は認められず、脱毛皮膚の毛包においてのみ蛍光が認められることがあった。**4)宮澤:** nTD と DNCB の投与による感作増強作用の評価では、nTD の連続塗布後、DNCB 投与

前に nTD を洗浄除去しているにもかかわらず、非投与群に比べ SI 値が有意に高く、DNCB の作用を増強していた。粒子径 35nm および 250nm の両方で同様の反応が確認された。SiI または TiO₂ を連続投与した後の耳介組織では、表皮細胞層の軽度肥厚が認められた。テープストリッピングを行った場合でも nTD 塗布群では sil 塗布群より表皮が肥厚しており、粒径 250nm より 35nm でより強い肥厚が認められた。35nm 塗布群では、真皮層も肥厚し、線維芽細胞や肥満細胞が増加していた。洗浄後でも、35nm および 250nm の TiO₂ 塗布群で角質層の上部または毛孔内に観察された。**5)菊地:**ヘアレスマウス皮膚の生理機能に対する nTD の影響では、角層剥離させた損傷皮膚に nTD を単回塗布後、皮膚バリア機能指標 TEWL 値、角層水分量指標高周波コンダクタンス値、皮膚の赤み指標 a*値 (皮膚色調) は、3 時間後、24 時間後、72 時間後、いずれも投与群と溶媒対照群と比較して有意差を認めなかった。皮膚炎マウスの TEWL 値、高周波コンダクタンス値、a*値は、nTD 投与群は対照群と比べて有意差を認めなかった。IgE ならびに好酸球%も対照群と有意差はなく体重の変化にも差は認めなかった。

D. 【考察】

1)津田: ラットにおいて nTD (ルチル型・

無コーティング) を角質剥離背部皮膚に塗布した場合でも通過しなかった。障害皮膚では残存した表皮または毛嚢上皮が迅速に再生増殖して 3 日で修復してしまい、nTD を痂皮ごと押し上げて排除してしまうという、異物侵入に対する防御機構のために表皮を通過することはなかった。このことは、発がん性については皮膚発がん感受性の高い rasH2 マウスに分散性の良い nTD (シリコン被覆、シリコン分散剤) を用いてもプロモーション作用を示さないことの説明になる。**2)五十嵐:** さらに、ラットの皮膚への閉塞塗布実験法においても、平均粒径は 89nm の nTD でも皮膚の透過は認めず、肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳の異常はなかったことと一致する所見と考える。**3)藤井:** 以上の実験において真皮・皮下組織への移行は無いが毛嚢内に少量残留することが観察されたので、毛嚢経由の移行について検討した。ヘアレスマウス HM では体毛は少ないが毛嚢が逆に多い。しかし HM の脱毛皮膚においては毛嚢への移行が高かったが真皮への移行は全く認められなかった。ヒトの毛嚢の大きさは、HM と YMP (ミニブタ) との間であり、YMP 皮膚を用いた実験は脱毛皮膚への移行を過大に見積もる可能性が示唆された。蛍光ナノ粒子 PS-25 皮膚通過せいの再実験では、角層除去皮膚においても皮膚には移行しないことが示された。**4)宮澤:** さらに、損傷皮膚において nTD は DNCB の作用を

有意に増強したことは、表皮に対し弱い刺激物質として作用し、DNCB 同時投与時における DNCB 作用の増強は、nTD の吸着、保持されることにより、DNCB の暴露量が増加した可能性が考えられたが、nTD 前投与試験での結果から、TiO₂ の表皮に対する直接的な刺激作用を有する結果、DNCB の透過性を高め、感作性を増強させる可能性が示唆された。**5) 菊地:**角層を剥離した損傷皮膚に nTD を単回外用投与した場合、さらに皮膚炎を惹起させた皮膚 1 日 1 回 8 日間塗布した場合、皮膚局所の皮膚のバリア機能、角層水分量、皮膚の赤み(紅斑) 有意な差を認めず、皮膚局所での皮膚毒性は少ないと考えられたが完全には否定し得なかった。

E. 【結論】

1) 津田: シリコンコーティングした nTD は、シリコン分散剤中では分散性が高く小さな粒子径のまま保たれていた。しかし、この nTD を皮膚発がん高感受性マウスの皮膚に塗布しても、皮膚発がんプロモーション作用は示さなかった。これらの結果から分散性の高い nTD でも、正常皮膚を通過せずに対し皮膚発がん性も示さないことが示された。陽性対照の 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetone(TPA) では 8 週程度の早期に発がんすることから、二段階発モデルは短期に発癌性を検出するのに有用である。**2) 五十嵐:** nTD(ルチル型・被覆・粒径 35nm、分散剤中では

平均粒子径は 100 nm 以下)をラットへ 24 時間閉塞塗布法で 28 日間反復した実験でも表皮、真皮、血液及びには移行しなかった。閉塞状態なので動物が傾向的に nTD を摂取する可能性はなく経皮吸収される可能性は非常に少ないと考えられた。

この方法は確認の意味で重要である。**3) 藤井:** ナノマテリアルの皮膚移行性を検討するための *in vitro* 試験に用いるモデル皮膚として YMP と HM を比較したところ、両者で類似した結果が得られることが明らかとなった。また、適用後、表面に残存しているナノマテリアルを完全に除去することが再現性のある結果を得るうえで重要であることが示された。**4) 宮澤:** 角質を除去してバリア機能が傷害された皮膚において、nTD は DNCB 刺激でみられる軽微な皮膚刺激性を有し、表皮細胞層の肥厚等が引き起こされた。この作用は、250nm 粒子より 35nm 粒子でより強く認められた。**5) 菊地:** 皮膚炎などのある炎症性損傷皮膚に、ナノ粒子二酸化チタンを塗布してバリア機能を評価した場合、ほとんど障害作用はなく、皮膚局所での皮膚毒性は少ないと考えられた。

以上から、nTD は角質除去障害皮膚でもほとんど透過しない。発がんプロモーションもないマウスの角質除去耳介皮膚では真皮のごく軽度の炎症性肥厚をおこすが透過は確認出来なかった。透過性評価手法としては、健常と角質除去障害マウス・ラットの背部皮膚および耳介におけ

る評価、毛嚢の多いヘアレスマウスおよび *in vitro* の皮膚モデルが有用である。発がん性評価には皮膚発がん高感受性ヒト Ha-ras 遺伝子導入マウスおよびラットを用いた。これは標準評価法として有用であると考えられる。

F. 【健康危機情報】

なし。

平成21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. 研究分担報告書

平成 21 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

研究分担者 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

研究要旨

表面処理したルチル型酸化チタン（平均一次粒子径 35 nm）をナノサイズのまま分散する懸濁液を調製した。本液中での酸化チタン粒子の濃度は 10%、平均粒子径は 100 nm 以下で長期間安定であった。雄性 CD (SD) 系ラット背部に酸化チタン懸濁液を塗布し 24 時間閉塞した。この投与を 28 日間反復して行った。摂餌量、体重及び器官重量は対照群と有意な差は認めず、各器官の病理組織学的検査では、酸化チタンの投与に起因した毒性学的な変化は認められなかった。酸化チタンを塗布した皮膚部位の電子顕微鏡観察では、凝集した酸化チタン塊が角質層の間に認められた。しかし、酸化チタン粒子が角質層や毛包から表皮層や真皮層に浸透している像は認めなかった。対照群と酸化チタン群で、肝臓、腎臓等各臓器中のチタン濃度に有意な差はなかった。酸化チタン粒子はナノサイズの状態ですべて正常皮膚に連続的に塗布をしたとしても、検出できるレベルでの経皮吸収及び生体内分布はせず、一般毒性学的な影響もほとんどないと考えられた。

A. 研究目的

酸化チタンは、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などに配合されている。酸化チタンはナノメートル (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。化粧品のようにヒトに適用する製品には、ルチル型の結晶形の酸化チタンナノ粒子が用いられ、その粒子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粒子の分散性を良くし、製品の有用性の向上に役立っている。

動物に吸入させたナノ粒子が生体内に吸収され脳にまで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るようになって

た。化粧品には一早くナノサイズの微粒子が使われており、日常的に皮膚に塗布することから、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ナノ粒子については、特に、経皮吸収と生体内分布の有無を明らかにすることが課題とされている。

本研究ではこれまで、酸化チタン及び酸化亜鉛を試験対象物質として選定し、ラットに連続塗布した後、各臓器の金属量を分析することによって、経皮吸収性と体内分布を評価してきた。しかし、これらの金属酸化物粒子は、表面処理剤や媒体を変化させても、塗布段階で既に数百 nm の凝集体となっており、これが結果に影響している可能性もあった。

そこで本年度は、試験物質を 1 種類の酸化チタ

ンにしばってナノサイズで分散する懸濁液を調製し、これまでと同様の方法でラットに反復塗布した。臓器重量と病理学的検査により毒性影響の有無を調べた。また、投与部位の皮膚の電子顕微鏡観察、及び組織中のチタン濃度を分析して、酸化チタンの経皮吸収性と体内分布の可能性を評価した。

B. 研究方法

1. 試料

酸化チタン (TiO₂) SMT-500SAS (テイカ) は日本化粧品工業連合会を通して得た。この酸化チタンはルチル型の平均一次粒子径 35 nm の粒子で、表面を alumina、silica、silicone で処理されている。酸化チタンは分散剤とともに水に入れ、湿式分散機 LMZ015 (アシザワ・ファインテック) を用いて 10% 懸濁液を調製した。対照は、分散剤を入れた水とした。懸濁液中の粒子径は、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) を用いて測定した。

2. 動物

雄性、4 週齢の Crl:CD(SD)系ラットを日本チャールス・リバー社から購入した。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。馴化期間は約 2 週間とした。

3. 投与方法

1 群 10 匹で行った。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。媒体または酸化チタン懸濁液 200 µl を塗布後、リント布 2 枚、不透性シート (ブレンダーム™, 3M Health Care 社) で覆った後、伸縮性包帯 (SILKYTEX, Alcare 社) を巻いて固定した。20~24 時間後閉塞パッチを除去し、再度同様に塗布した。この操作を 28 日間反復して行った。

症状、死亡の有無及び皮膚状態については毎日

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、さらに最終投与日にも測定した。

(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。

4. 組織の採取

動物は採血前に 18~27 時間絶食させた。ペントバルビタール・ナトリウムを腹腔内投与して麻酔後、後大静脈腹部より血液を採取した。うち 1 ml はそのまま、残りは室温で放置後、遠心して血清を分離し、凍結保存した。

すべての器官、組織について異常の有無を検査後、肝臓、腎臓、脾臓、肺及び脳を採取し、重量を測定した。投与部位の皮膚は、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た。

5. 病理組織学的検査

肝臓 (外側左葉)、腎臓 (右)、皮膚について、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。

6. 電子顕微鏡検査

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。約 1.5 mm 角の小片を作成し、2.5% グルタルアルデヒド溶液に浸漬、1% 四酸化オスミニウムで後固定し、エタノールで脱水、プロピレンオキサイドで置換後、スパール樹脂に包埋した。ウルトラミクロトームで超薄切片とし、酢酸ウラン・クエン酸鉛溶液で二重染色をした後、透過型電子顕微鏡 (TEM、HT-700, 日立製作所) で検鏡した。

7. チタンの定量

各臓器は細切して約 0.2 g を、血清は 0.5 ml (0.5 g)、血液については 1 ml (1.0 g) を試料量として分解用容器 (HP-500, CEM 社) に入れ、超微量分析用硝酸 5 ml、超微量分析用フッ化水素酸

0.2 ml 及び超微量分析用超純水 1 ml を加えた。容器はマイクロウェーブ分解装置 (MARS 5, CEM 社) にセットし、180 psi で圧力制御しながら 1600W (100%) でマイクロウェーブを 20 分間照射、そのまま 20 分間保持して処理した。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、ヘリウムガスモードの誘電結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS 7500ce, Agilent 社) に導入して質量数 49 のピーク強度を測定した。検量線から試料溶液のチタン濃度を求め、組織中の濃度 ($\mu\text{g/g}$) に換算した。組織を加えずに酸のみを加えて同様に分解処理して分析し、得られた値を組織中濃度に換算したものをバックグラウンド値 (Blank) とした。

8. 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 Dunnett の多重比較検定、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

1. 試験液中の酸化チタンの粒度分布

ビーズミル法によって、水溶液に 10% 濃度で分散させた酸化チタン懸濁液の粒度分布を測定した。本懸濁液中の酸化チタンの平均粒子径は 89 nm であった。100 nm 以下のナノサイズのもの半数以上が存在する一方、200 nm 以上の粒子はほとんど存在しなかった (図 1)。粒度分布は超音波処理してもほとんど変化しなかった。また、室温で 28 日間放置した後、粒子径を測定したが変化は見られなかった。

2. 一般毒性所見

28 日間の投与期間を通して死亡の発生はなく、順調な体重増加が認められ、全例とも一般状態に異常は認められなかった。肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳の剖検で異常は認めなかった。酸化チタン投与群の 1 例で脾臓の肥大が認められた。また、肺の絶対及び体重比器官重量 (相対重量)、

肝臓の相対重量が有意に高値であった (表 1)。

3. 病理組織学的検査

酸化チタン塗布群の 1 例で投与部位皮膚直下の皮下に動脈炎がみられたが、皮膚そのものに変化はなかった。加えて、同例には脾臓の肉芽腫性炎及びクッパー細胞肥大も見られた。塗布群及び対照群の各 1 例で腎臓のリンパ球浸潤が認められた。なお、対照群の 2 例で投与部位皮膚に炎症性細胞浸潤が見られ、それぞれ 1 例ずつ腎臓の好塩基性尿細管嚢胞及び腎盂拡張が認められた (表 2)。

4. 電子顕微鏡的観察

角質層、毛嚢の浅部、中間層、深部に分けて観察した。角質最外層の 1 から 2 層内側に酸化チタンの凝集塊が認められた (図 2)。一方、角質層が毛穴に落ち込む部分に粒子は認めなかった。表皮の顆粒層から基底細胞層、並びに真皮層および毛包に酸化チタン粒子の存在は認めなかった。

5. 組織中のチタン濃度

今回の分析法では、組織に酸化チタン粒子が分布しているとの定量的判断を、組織中チタン濃度が $5 \mu\text{g/g}$ 以上となる時とした。反復塗布終了後、ラットの各組織のチタン濃度を測定した。対照群及び酸化チタン群とも個体ごとの値をプロットし、平均値を赤線で示した (図 3)。表 3 には、対照群及び酸化チタン群について臓器別にチタン濃度の平均値及び標準偏差を示した。酸化チタンを塗布しない皮膚のチタン濃度は平均 $0.49 \mu\text{g/g}$ であるが、塗布した皮膚では $30.8 \mu\text{g/g}$ であった。血液及び血清にチタンは検出しなかった。他の臓器では、対照群と酸化チタン群ともチタン濃度は $1 \mu\text{g/g}$ 未満で、両群で有意な差は認めなかった。

D. 考察

ナノ粒子の皮膚吸収性を調べるためには、試験粒子をナノサイズで投与することが重要である。数十 nm のサイズならば細胞間隙よりも小さく、理論的にはこの大きさの粒子が皮膚角質

層を浸透することは可能である。酸化チタンナノ粒子の経皮暴露による吸収性や毒性研究は、酸化チタンを超音波処理して分散したものを試料として用いているが、表面処理剤や媒体を変更しても凝集していた。そのため、ナノレベルで投与しているとはいえず、バルク状態の酸化チタンを評価していることと同じ可能性があった。本研究では、一次粒子径 35 nm の酸化チタン粒子が 100 nm 以下で安定して分散する懸濁液を試料とした。よって、本研究では、ナノサイズの酸化チタン粒子の経皮暴露による影響を検討できたと思われる。

酸化チタンの塗布によって 10 匹中 1 例で脾臓の肥大、肺の絶対及び相対重量、肝臓の相対重量が高値となった (表 1)。しかし、肺の変化については、背景データの範囲内の軽微な変動であった。肝臓の相対重量変化も軽微であり、対照群と絶対重量に差はなかったことから、酸化チタンの塗布とは関係ないと考えた。

酸化チタン塗布群の 1 例で投与部位の皮下に動脈炎が見られた。しかし、皮膚そのものに変化がなく皮膚の傷害が波及したものではないこと、別に実施した皮内投与実験では同様の変化が見られなかったことから、この皮膚所見は酸化チタンとの関係はないと考えられる。同例には脾臓の肉芽腫性炎及びクッパー細胞肥大もみられたが、偶発的なものと考えた。腎臓のリンパ球浸潤の発生頻度および程度は、塗布群及び対照群で差のない変化であった。以上の結果は、酸化チタンナノ粒子を反復塗布しても毒性学的影響は出ないことを示している。

酸化チタンを塗布した皮膚ではチタン濃度が 30.8 $\mu\text{g/g}$ となり、酸化チタンが残存していると思われた。電顕観察では、皮膚表面より 2、3 層内側の角質層間に酸化チタン粒子の凝集塊が認められ、これが定量されたと思われる。角質の乱れ部分から、酸化チタン粒子の凝集塊が侵入したのではないかと考えた。表皮層に酸化チタン粒子の存在は認めなかった。角質層が毛穴に落ち込む部分に粒子は認めなかった。また、

毛穴から表皮顆粒層や真皮層に透過している酸化チタン粒子も認めなかった。

毛穴や細胞間隙の大きさは酸化チタン粒子よりも大きいため、もし皮膚吸収されるならこの間隙を通ると予想される。しかし、それらの部分は皮脂が詰まっており、酸化チタン自体は脂質に溶解しない。そのため、酸化チタン粒子の皮膚浸透速度は非常に遅く、角質層が 1 日 1 層ずつ剥離する速度の方が早いと思われる。したがって、理論的にナノ粒子であろうと正常皮膚への浸透は難しいと考えられる。

皮膚以外の組織では、対照群と酸化チタン群ともチタン濃度は 1 $\mu\text{g/g}$ 未満でほとんど差がなかった。血液及び血清中のチタン濃度も両群で差はなかった。マイクロウェーブ分解処理ごとに、Blank においてもチタン濃度には 0.5 $\mu\text{g/g}$ の差が出る。各組織でのチタン濃度は Blank のばらつきの範囲内で、定量的に差が言えるレベルでなかった。今回の分析法では、組織に酸化チタン粒子が分布しているとの定量的判断をチタン濃度 5 $\mu\text{g/g}$ 以上としており、これをふまえると、得られた分析結果は、酸化チタンは経皮吸収されないか、例え経皮吸収されたとしても、各臓器への分布及び蓄積は検出限界以下であることを示唆している。

E. 結論

化粧品の使用を想定し、ルチル型酸化チタン (一次粒子径 35 nm) をナノサイズで分散した懸濁液をラットに 28 日間反復塗布し、酸化チタンナノ粒子の経皮吸収性及び生体内分布を検討した。病理組織学的検査からは、酸化チタンによる毒性所見は認められなかった。電子顕微鏡観察で角質層間に酸化チタンの凝集塊が認められたが、表皮層や真皮層に浸透している像は認めなかった。毛穴への入り込みもなかった。血液及び臓器中のチタン濃度は、Blank 及び対照群と酸化チタン群とで有意な差はなかった。酸化チタン粒子の経皮吸収を示す結果は得られず、表皮を通過したとしても検出できる

ような体内分布は認められず、一般的な毒性影響もないと考えた。

F. 健康危機情報

なし

G. 参考文献

1. Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. Arch Toxicol., 82, 151-157 (2008)
2. Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. Toxicology 254, 82-90 (2008)
3. Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. Toxicology 264, 110-118 (2009)
4. Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. Toxicol Lett., 191, 1-8 (2009)

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野 正、西村哲治. ラットに反復経皮投与した酸化チタン粒子の体内分布と毒性. 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会. 平成 21 年 7 月
- 2) 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野 正、徳永裕司、西村哲治. 経皮投与した微小金

属酸化物粒子の体内分布と毒性について. フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー, 平成 21 年 11 月

I. 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

3. その他

なし

表 1. 酸化チタンを反復塗布したラットの臓器重量

Group		Final body weight (g)	Organ weight (g, n=10)				
			Brain	Lungs	Liver	Spleen	Kidney
Control	Mean	307.9	2.00	1.03	10.45	0.56	2.26
	±S.D.	24.0	0.09	0.08	1.09	0.09	0.14
TiO ₂	Mean	311.3	2.00	1.11 *	11.50	0.71	2.28
	±S.D.	27.9	0.09	0.10	1.42	0.27	0.19

Group		Relative organ weight (g/100g body weight, n=10)				
		Brain	Lungs	Liver	Spleen	Kidney
Control	Mean	0.65	0.33	3.39	0.18	0.74
	±S.D.	0.06	0.02	0.21	0.02	0.06
TiO ₂	Mean	0.65	0.36 *	3.69 **	0.23	0.73
	±S.D.	0.06	0.02	0.20	0.07	0.04

*: p<0.05, **: p<0.01 (significantly different from control).

表 2. 肝臓、腎臓、脾臓及び皮膚の病理組織学的検査の結果

Organ and findings	Control					TiO ₂				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Liver	f(10)					f(10)				
Necrosis, hepatocyte, focal	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Hypertrophy, kupffer cell	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Cellular infiltration, mononuclear cell	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1
Kidney	f(10)					f(10)				
Tubule, basophilic	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Dilatation, pelvic cavity	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Cyst	9	1	0	0	1	10	0	0	0	0
Cellular infiltration, lymphocyte	9	1	0	0	1	9	1	0	0	1
Spleen	f(0)					f(1)				
Inflammation, granulomatous						0	1	0	0	1
Integument (treated site)	f(10)					f(10)				
Cellular infiltration, inflammatory, focal	8	2	0	0	2	10	0	0	0	0
Arteritis, subcutis	10	0	0	0	0	9	1	0	0	1

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

表 3. ラット組織中チタン濃度のまとめ

Tissue	Ti concentration ($\mu\text{g/g}$, Mean \pm SD, n=10)	
	Control	TiO ₂
Skin	0.49 \pm 0.05	30.80 \pm 15.70
Liver	0.82 \pm 0.18	0.54 \pm 0.09
Kidney	0.42 \pm 0.11	0.42 \pm 0.16
Lung	0.78 \pm 0.18	0.48 \pm 0.14
Spleen	0.77 \pm 0.15	0.70 \pm 0.49
Brain	0.48 \pm 0.08	0.33 \pm 0.06
Blood	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02
Serum	0.16 \pm 0.04	0.15 \pm 0.04

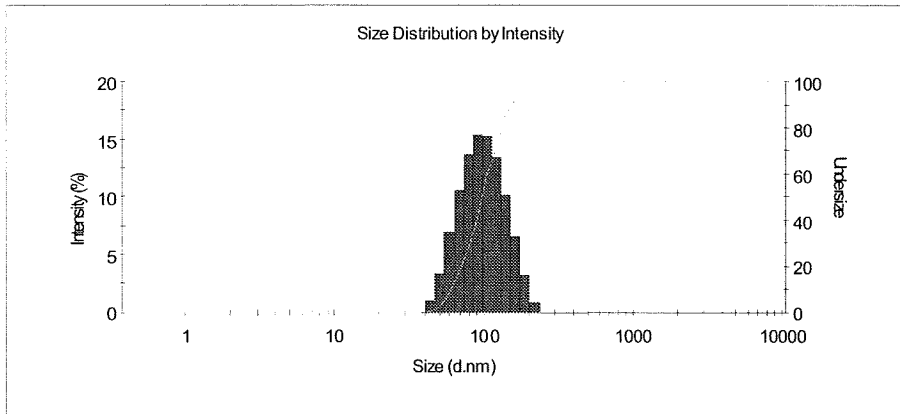


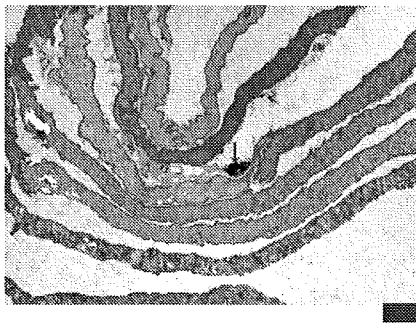
図 1. 酸化チタン懸濁液の粒度分布

角質層

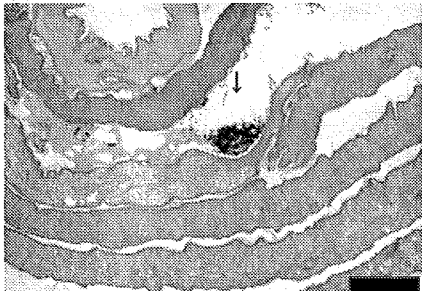
(a) $\times 1500$



(b) $\times 3000$



(c) $\times 6000$



(d) $\times 40000$

