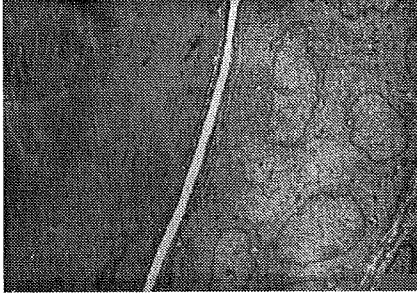


毛嚢(中間部)
(e) ×6000



(f) ×40000

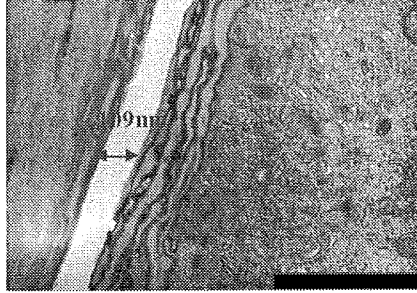
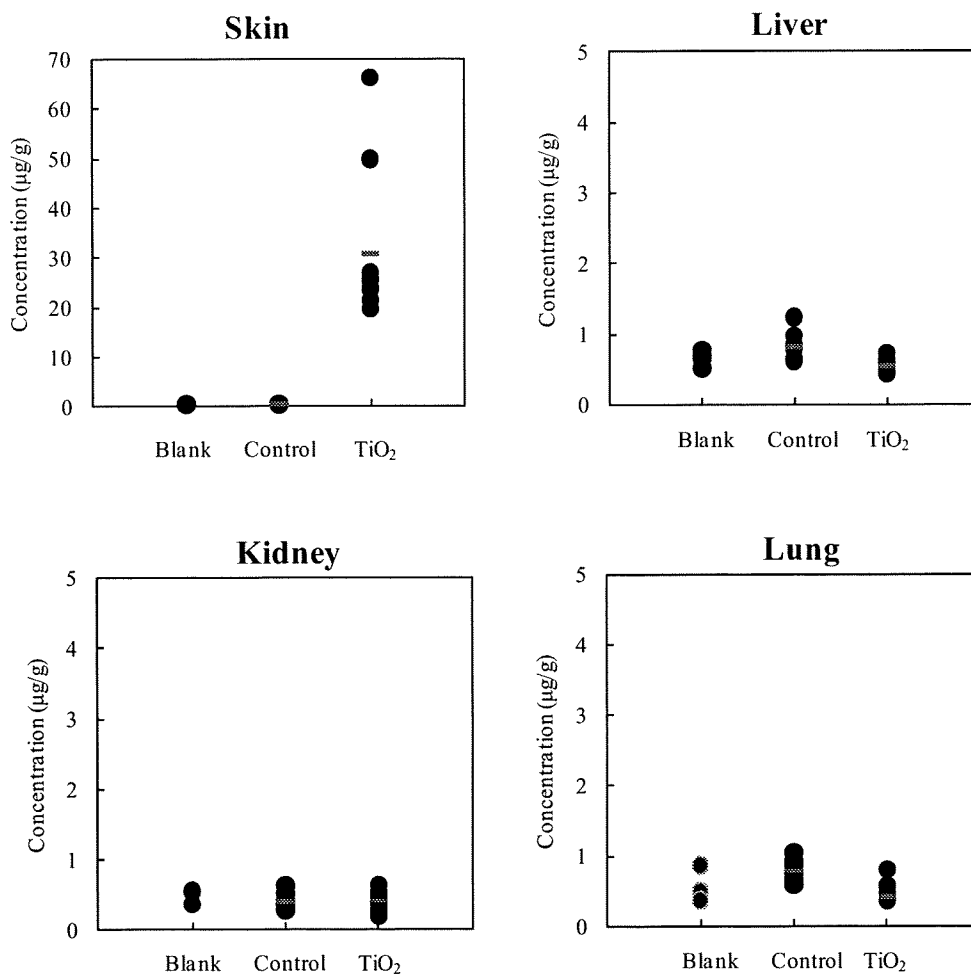


図2. 酸化チタン塗布部皮膚の電子顕微鏡写真(続き)

赤矢印は酸化チタンの凝集塊を示す。  スケール 500 nm、  スケール 100 nm



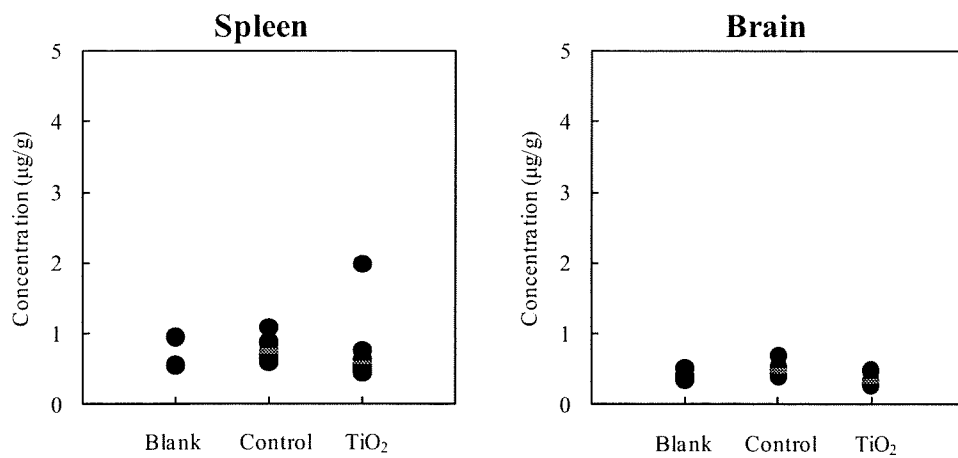


図3. 酸化チタンを反復投与したラットの組織中チタン濃度

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：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

研究分担者 藤井 まき子 昭和薬科大学 准教授
研究協力者 田村 嘉朗 昭和薬科大学 大学院生

研究要旨

これまで Yucatan micropig (YMP) 皮膚を用いて *in vitro* 皮膚移行性について検討を行ってきたが、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、酸化チタンの皮膚移行性を検討した。HM においても YMP 皮膚と類似の結果が得られた。相違点として、YMP 脱毛皮膚において毛包中への移行が高かった TC-25 は HM では移行が認められなかった。これは毛包が YMP に比べ小さいからと考えられる。ヒトの毛包は、HM と YMP の中間であり、したがって、YMP 皮膚を用いるとナノマテリアルの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。また、前年度行った 25nm 蛍光ポリスチレン (PS-25) の皮膚移行実験の方法を改善し、追試験を行った。前年度の結果では、PS-25 において生きた表皮中に蛍光が見られる場合があったが、これは実験手技の問題であることが明らかとなり、PS-25 は損傷皮膚においても皮膚には移行しないことが示された。

A. 研究目的

皮膚生理、構造がヒトに近い Yucatan micropig (YMP) 摘出健常 及び 3 種の損傷皮膚 (脱毛、脱脂、角層除去) 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、健常皮膚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、脱毛皮膚では健常皮膚との差は認められず、脱脂皮膚では真皮まで蛍光が観察され、さらに角層除去皮膚では適用量の約 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り、このモデル皮膚を用いた

in vitro ナノマテリアル皮膚移行評価を行うこととした。

前年度は、このモデル皮膚を用いて、懸濁液中で一次粒子の凝集が起らず、粒子径が既知である蛍光標識化ポリスチレン (PS、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) を用いナノマテリアルの分散状態の違いを考慮に入れた *in vitro* 皮膚移行試験を行った。その結果、PS、酸化チタンはともに、健常および角層除去皮膚においては、皮膚内へは移行しないこと、脱毛皮膚においては、PS は毛包へ移行すること、酸化チタンの場合、凝集が著しい場合は毛包への移

行は見られないが、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考えられることを見出し、皮膚の状態およびナノマテリアルの分散状態がナノマテリアルの皮膚移行に影響を与えることを報告した。

本年度は、in vivo での実験に用いられるヘアレスマウス (HM) 皮膚を用い、YMP 皮膚と比較するとともに、in vivo との関連を検討できるよう、HM 皮膚を用いた評価系を検討した。また、前年度の結果で、PS を適用した脱脂皮膚、角層除去皮膚において生きた表皮での蛍光が認められる例があったことから、この原因を追究し、実験手技の問題が示唆されたため、追試験を行った。

B. 研究方法

I 試薬

酸化チタンとして、いずれもルチル型の 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

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

Dispersion、三好化成) (T-disp) 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。粒子径の実測値を Table 1 に示す。

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)を和光純薬工業から入手し用いた。

蛍光ポリスチレン粒子 PS-25 (一次粒子径 25 nm) 表面修飾ポリスチレン粒子 PS-25-COOH、PS-25-NH₂(micromer[®]-greenF、micromod Partikel-technologie GmbH)) 1%懸濁液を用いた。

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常皮膚 (intact skin) とし、これを処理して損傷皮膚を作製した。

角層除去皮膚 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。

脱毛皮膚 Hair removed skin

スライドガラス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ゆっくりと剥離し、脱毛を行った。

2. HM 皮膚処理法

ヘアレスマウス (Hos:HR-1、6週令♀、三協ラボサービス) を安楽死させ、背部皮膚を摘出した。皮下組織を除去したものを健常皮膚とし、損傷皮膚を作製した。

角層除去皮膚 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 15 回行った。

脱毛皮膚 Hair removed skin

YMP 皮膚と同様に行った。

3. 酸化チタン皮膚透過試験

HM 皮膚に 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 回繰り返し、皮膚表面上に残る酸化チタンを除去した。

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。皮膚組織切片を目盛り付き試験官に入れ、硝酸 1 mL を添加して、約 12 時間放置後、約 80°C で 1 昼夜分解した。分解終了後、超純水を加え、全量 5 mL とした。試料溶液を 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 ($\mu\text{g}/\text{g}$, ng/mL) に換算した。

4. 蛍光ポリスチレン粒子皮膚透過試験

YMP 皮膚に 1%PS 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スライドガラスに塗布したシアノアクリレートに密着させた。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 回繰り返し、皮膚表面上に残る蛍光ポリスチレンを除去した後、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) にて皮膚の蛍光をコントロール皮膚の自家蛍光が認められない条件で観察した。

III 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 酸化チタンの HM 皮膚移行に関する検討

HM 皮膚は YMP 皮膚に比べ非常に薄い、健全およびいずれの損傷皮膚においてもレセプター中 Ti 濃度に変化は認められず、酸化チタン粒子は粒子径、分散状態にかかわらず皮膚透過しないことが示された (Fig. 1)。

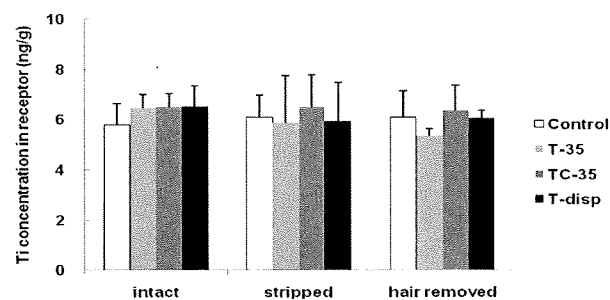


Fig. 1 Ti concentration in receptor phase at 24h after application of various TiO_2 to intact and damaged skin

また、皮膚中濃度を測定したところ、脱毛皮膚に T-disp を適用した場合のみ有意な Ti 濃度の上昇がみられた。角層除去皮膚においては適用後のシアノアクリレートストリッピングが行いにくく、ばらつきが大きくなったが、有意な Ti 濃度の上昇は見られなかった。

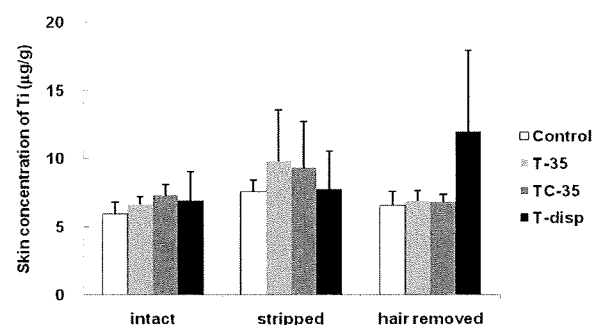


Fig. 2 Ti concentration in skin at 24 h after application of various TiO_2 to intact and damaged skin

II 蛍光ポリスチレンナノ粒子の皮膚移行に関

する検討

1. 実験方法の改良

前年度の検討で角層除去皮膚に 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が、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. 3)。

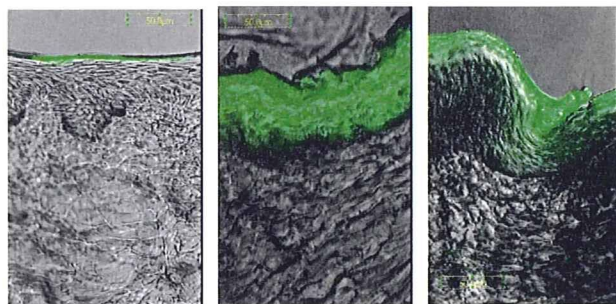


Fig. 3 CLSM images of skin at 24 h after application of PS-25 to stripped skin

この原因を検討した結果、皮膚マーキングに使用したマジックのインクの蛍光物質が透過した可能性と、OCT での包埋が十分でない場合、角層除去皮膚では表皮部分が乾燥状態となってしまう、切片作製後、表面に残っている PS が浸透する可能性が示唆された。

そこで、24h 適用後、皮膚表面に残っている PS 粒子をシアノアクリレートストリッピングで除去した後、OCT 包埋を行うこととした。また、皮膚マーキングに用いるマジックには予め観察波長付近に蛍光が観察されないことを確認したものを用いた。

実験方法を改良後の結果においては、角層除去皮膚において皮膚中に蛍光が認められるものは 1 例もなかった。このことから、PS-25 は皮膚バリア機能本体である角層が除去されても皮膚へは移行しないことが示された。

2. 表面修飾 PS

ナノマテリアルの表面状態が皮膚移行に与える影響を PS-25-COOH および PS-25-NH₂ を用いて検討した。

いずれを適用した場合も脱毛皮膚において一

部の毛包内に蛍光が認められたのみであった。

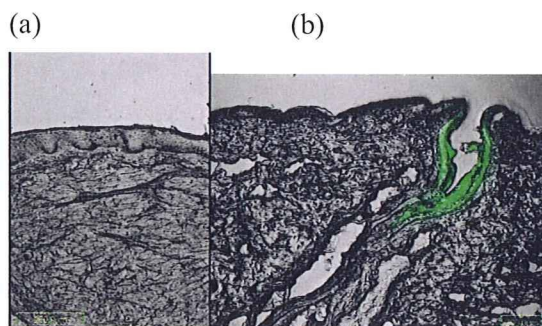


Fig. 4 CLSM images of skin at 24 h after application of PS-25-COOH to stripped skin (a) or hair removed skin (b)

3. 共存物質の影響

皮膚適用製剤には薬物の溶解剤や保湿剤として半極性溶媒であるグリセリンまたはプロピレングリコールを添加するケースが多くみられる。そこで、PS-25 懸濁液に 10% となるよう、グリセリンまたはプロピレングリコールを添加し、PS-25 の皮膚移行性を検討した。

現在のところ、例数は十分でないが、皮膚中に蛍光は観察されていない。今後例数を重ねる予定である。

D. 考察

HM 皮膚と YMP 皮膚を比較すると、角層、生きた表皮、真皮ともに厚さが数倍異なる。また、毛包について観察すると、HM の方が単位面積あたりの数は多いが、大きさは小さい (Fig.5)。

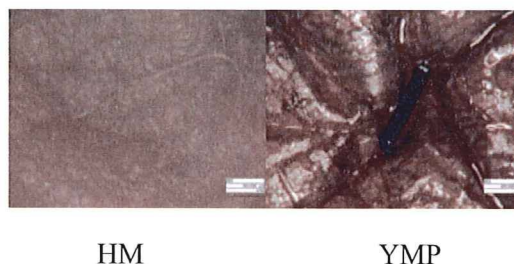


Fig. 5 Hair follicle of HM and YMP (x 160)

YMP 皮膚の方が機能としてはヒトに近いが、安全性試験などに用いるのはマウスやラットが多いことから今回は HM 皮膚を用いて、YMP 皮膚と比較を行った。

いずれの皮膚においてもバリア機能の本体である角層を除去しても酸化チタンの皮膚への移行は認められなかった。また、脱毛皮膚において、Ti 濃度は YMP 皮膚では TC-35 で有意に高く、T-disp で高い傾向が見られたが、HM 皮膚では TC-35 ではコントロールと変化がなく、T-disp において有意な上昇がみられた(Fig.6)。やや凝集の見られる TC-35 は、毛包の大きい YMP 皮膚では毛包内に侵入するが、HM は毛包が小さいため毛包内への侵入が見られなかったものと考えられる。

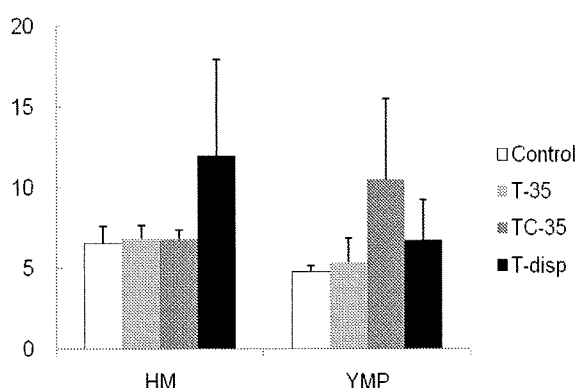


Fig. 6 Comparison of Ti concentration in hair removed skin of HM and YMP at 24h after application of TiO₂ suspension

以上より HM を用いても YMP と類似の結果が得られることが示された。しかし、毛包の大きさが異なるため、脱毛皮膚における毛包内への移行は YMP で過大に評価される可能性がある。前年度の検討において、PS-25 を角層除去皮膚や脱脂皮膚に適用した場合、生きた表皮まで蛍光が認められる例が見られた。蛍光物質がポリスチレン粒子から外れたのであれば、真皮まで蛍光が見られると考えられることから、PS-25 の皮膚移行が示唆されていた。しかし、再現性が得られないことから、この原因を検討したところ、実験手技上の問題として、マーキングに用いたマジックの蛍光が損傷皮膚においてマーク付近に浸透した可能性が示唆された。また、皮膚を凍結保存する際に包埋剤が十分でない

ために角層除去皮膚において著しい乾燥が見られる場合があり、切片作成・観察時に水が共存することにより、表面に残っている PS が浸透する現象が見られた。角層がある健常皮膚では、包埋が十分でない場合においても角層機能により生きた表皮の乾燥は見られない。そのため、角層除去皮膚および脱脂皮膚においてこのような現象が見られたと考えられる。そこで、このような実験手技上の問題を改善した。まず、マジックとして観察は長に蛍光がないものを選んだ。また、万一包埋が十分でなく、乾燥したとしても実験中に PS が浸透することがないように、凍結前に表面に残存している PS をシアノアクリレートにより取り除くこととした。その結果、表面修飾や添加物の影響も含め、角層除去皮膚においても皮膚中に蛍光は認められなかった。このことから、前年度に生きた表皮中で蛍光が認められたのは、実験手技の不備によるものであると考えられ、PS-25 は皮膚には移行しないものと考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの皮膚移行性を検討するための *in vitro* 評価方法を確立した。試験に用いるモデル皮膚としては YMP と HM で類似した結果が得られるが、毛包の大きさが脱毛時の毛包内へのナノマテリアルの侵入に影響することが明らかとなった。また、適用終了時に、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。

ナノマテリアルの皮膚移行に影響をする因子として皮膚の損傷とナノマテリアルの分散状態があげられる。数 nm の FD-4 が透過する角層除去皮膚においても、今回用いた数十 nm のナノマテリアルは皮膚移行しないことが示された。脱毛皮膚においてナノ分散したものを適用した場合、皮膚中濃度は高まるものの、ナノマテリアルは毛包内にとどまり、生きた組織内へ

の移行は今回の *in vitro* 試験では検出されなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mika Senzui、Toshiaki Tamura、Keiko Miura、Yoshiaki Ikarashi、Yoshiteru Watanabe、Makiko Fujii、Study on penetration of titanium dioxide nanoparticles into intact and damaged skin *in vitro*、*J. Toxicol. Sci.*、(2010) 35、107-113.

2. 学会発表

田村壽朗、藤井まき子、三浦慶子、小泉直也、渡辺善照、「ヘアレスマウス摘出皮膚における酸化チタンナノ粒子の皮膚移行性評価」、日本薬学会第130年会（岡山、2010.3）

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：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

研究分担者 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
松阪綾子 神奈川県衛生研究所 理化学部 主任研究員

研究要旨

昨年度、分散性の高い溶媒を用いナノサイズの二酸化チタン（TiO₂）と感作性物質をマウス損傷皮膚に同時に塗布し、TiO₂の接触性皮膚炎に及ぼす影響について検討を行ったところ、TiO₂は粒子径に依存して感作性物質の作用を増強する作用を持つことが明らかになった。TiO₂がDNCBを吸着し、DNCBの暴露量を増加させる可能性が考えられたことから、今年度はTiO₂をマウス損傷皮膚に12日間連続投与した後にTiO₂を洗浄してから皮膚感作性試験を行った結果、TiO₂投与群では感作性の増強が認められた。以上の結果から、TiO₂の接触皮膚炎増強作用は、ナノサイズのTiO₂が皮膚を透過するのではなく、皮膚表面でDNCBを吸着し、DNCBの暴露を持続させる他に、表皮の肥厚を引き起こす様な皮膚に対する障害作用の結果、DNCBの感作性を増強させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度の研究において、TiO₂と感作性物質を同時投与した場合、TiO₂は感作性物質の作用を増強し、この作用は粒子径に依存していることが示唆された。そこで、今年度は、この作用がTiO₂の皮膚損傷作用によるものかを明らかにするために、TiO₂の連続投与を行った後TiO₂を洗浄し、non-RI local lymph node 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。

B. 研究方法

1. 検体

35nmのTiO₂（シリカ・アルミナ・シリコ

ンコーティング）および250nmのTiO₂（シリコンコーティング）を使用した。媒体はシリコン(Sil)を用い、20%(w/w)の分散液を調製した。

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、0.2%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±3℃、湿度50±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

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. 実験スケジュール

実験スケジュールを図1に示す。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TiO₂またはsilを塗布した。Day13に市販のメイク洗浄液で両耳介及び頭部に付着しているTiO₂を除去した。day14から両耳介背側面に、25mLずつAOOまたは0.2%DNCBを塗布し、ドライヤーで乾燥した。感作は24時間間隔で3日間連続して行った。

各検体について、sil-AOO塗布群、TiO₂-AOO塗布群、sil-DNCB塗布群、およびTiO₂-DNCB塗布群を設けた。マウスは1群5~6匹とした。

6. 採材

Day13にTiO₂を洗浄除去した後、各群の2匹について両耳介の中央部を採材し、組織観察用採材を行った。一方は、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定した。一方は、背側部皮膚を軟骨より剥皮し、表皮シートを作製した。

残りの動物については、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。

7. 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℃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, ロシユ・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、Sil-AOO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。

8. 病理組織学的観察

PFAで固定した組織をパラフィン包埋し、薄

切後、トルイジン青染色を行い観察した。

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。

C. 結果

1. BrdU取り込み量

TiO₂の連続塗布後、DNCB投与前にTiO₂を洗浄して除去しているにもかかわらず、TiO₂投与群では、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。35nmおよび250nmの粒子径の両方で同様の反応が確認された。有意差はなかったが、35nm(SI 5.74)では250nm(SI 4.92)より強い反応が認められた(図2)。

また、同時塗布ではDNCB非投与のAOO-Sil群とAOO-TiO₂の間にも有意差(p<0.01)が認められたが、連続塗布試験では有意差は認められなかった。

2. 組織所見

SilまたはTiO₂を連続投与した後の耳介組織では、表皮細胞層の肥厚が認められた。テープストリッピングを行った場合、TiO₂塗布群ではsil塗布群より表皮が肥厚しており、250nmより35nmでより強い肥厚が認められた(図3)。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TiO₂粒子が観察された(図4)。特に、35nm塗布群では、限られた観察部位ではあったが、角質層間で粒子塊が観察された。

3. Langerhans細胞

Langerin (CD207)およびI-Ak (MHC class II)は表皮中に存在するLangerhans細胞に発現しているタンパクである。TiO₂塗布群では、トルイジン青染色の結果、表皮層の肥厚など、皮膚組織の変性が認められ、耳下リンパ節でのSI値も同時塗布試験より低かったことから、TiO₂

連続塗布により Langerhans 細胞が傷害され、細胞数が減少した可能性があった。しかし、免疫染色の結果、Langerhans 細胞数は、sil 塗布群と 35nmTiO₂ 塗布群の間で差はなかった (図 5)。

D. 考察

損傷皮膚において、TiO₂ の連続前投与は、昨年度に行った TiO₂ と DNCB の同時投与より反応性が弱いものの、非投与群に比べ DNCB の作用を有意に増強した。LLNA の SI 値は 250nm より 35nm で高く、粒子径が小さい方がより強く DNCB の作用を増強した。

テープストリッピングを行った皮膚では、シリコン塗布群でも軽度の表皮細胞層の肥厚が起こっていたが、TiO₂ 塗布群では真皮も含め皮膚の肥厚は著しく、粒子径が小さいほど皮膚が肥厚していた。

以上の結果より、ナノサイズの TiO₂ は、表皮に対し刺激物質として作用し、連続塗布により、皮膚、特に表皮細胞の増殖を促進させ、表皮の肥厚を起こす作用があり、この作用は粒子径に依存することが明らかになった。しかし、表皮細胞の変性像はほとんどなく、炎症性変化や Langerhans 細胞の増加や減少が認められなかったことから、強い刺激性ではないと考えられる。洗浄後に皮膚に残留していた TiO₂ は主に毛囊周囲にわずかに認められるだけであり、DNCB の作用の増強に直接的に関与した可能性は低いと考えられる。TiO₂ と DNCB 同時投与時における DNCB 作用の増強は、皮膚表面で DNCB が TiO₂ に吸着、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、TiO₂ 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。

E. 結論

バリア機能が傷害された皮膚において、TiO₂ は皮膚刺激性を有し、表皮細胞層の肥厚等を引

き起こし、皮膚に対して直接および間接的に免疫を増強させる作用を有している可能性が示唆された。この作用は、250nm 粒子より 35nm 粒子でより強く認められた。

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

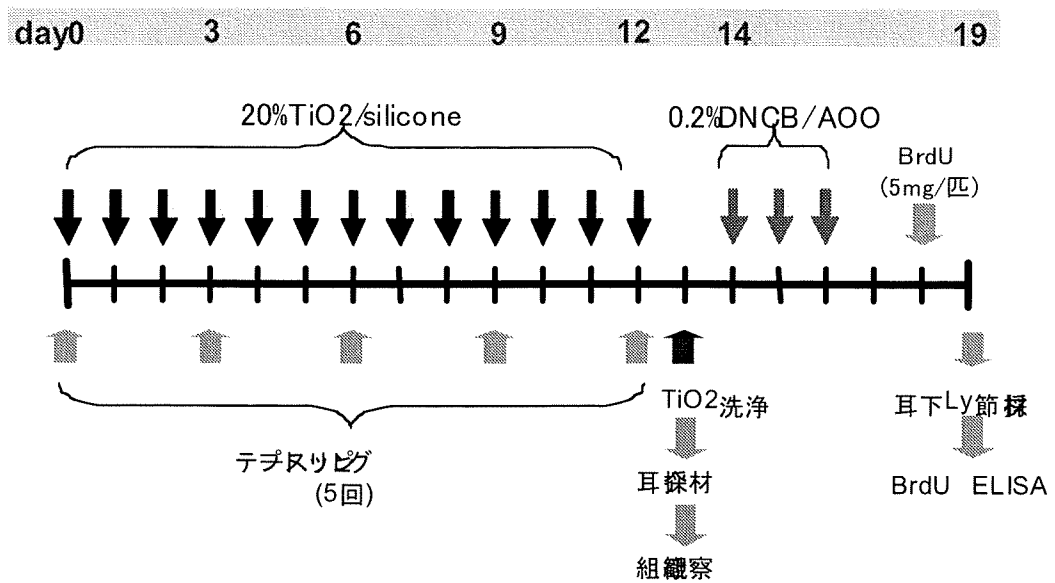


図1 TiO₂連続投与実験スケジュール

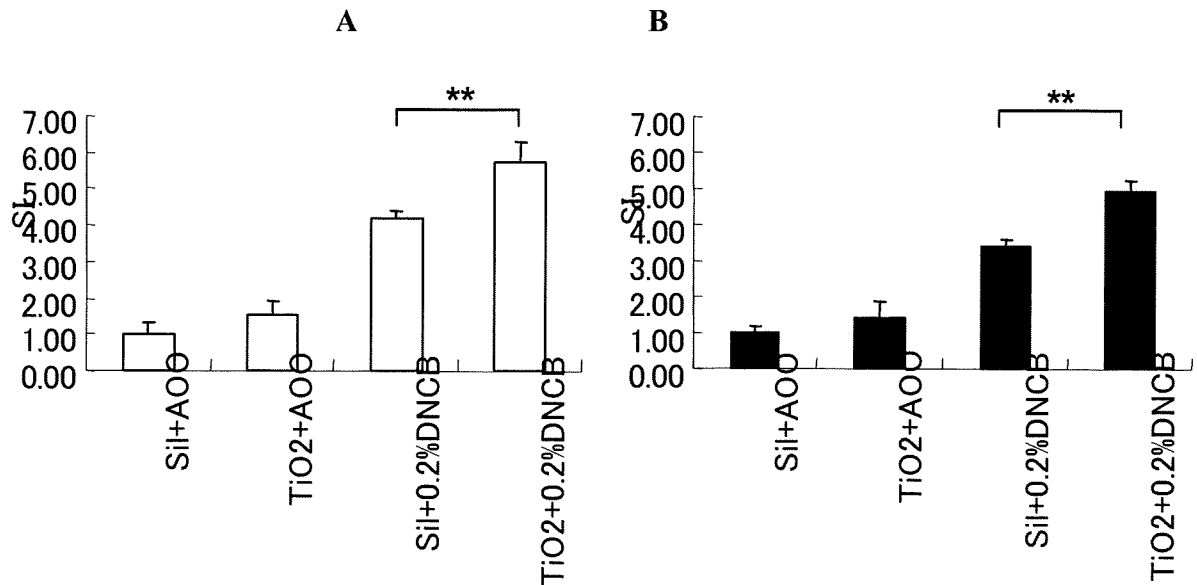


図2 TiO₂連続投与による Stimulation Index(SI)
 媒体: Sil: シリコン TiO₂: A; 35nm, B; 250nm
 平均値±標準誤差 検定: t 検定 **P<0.01

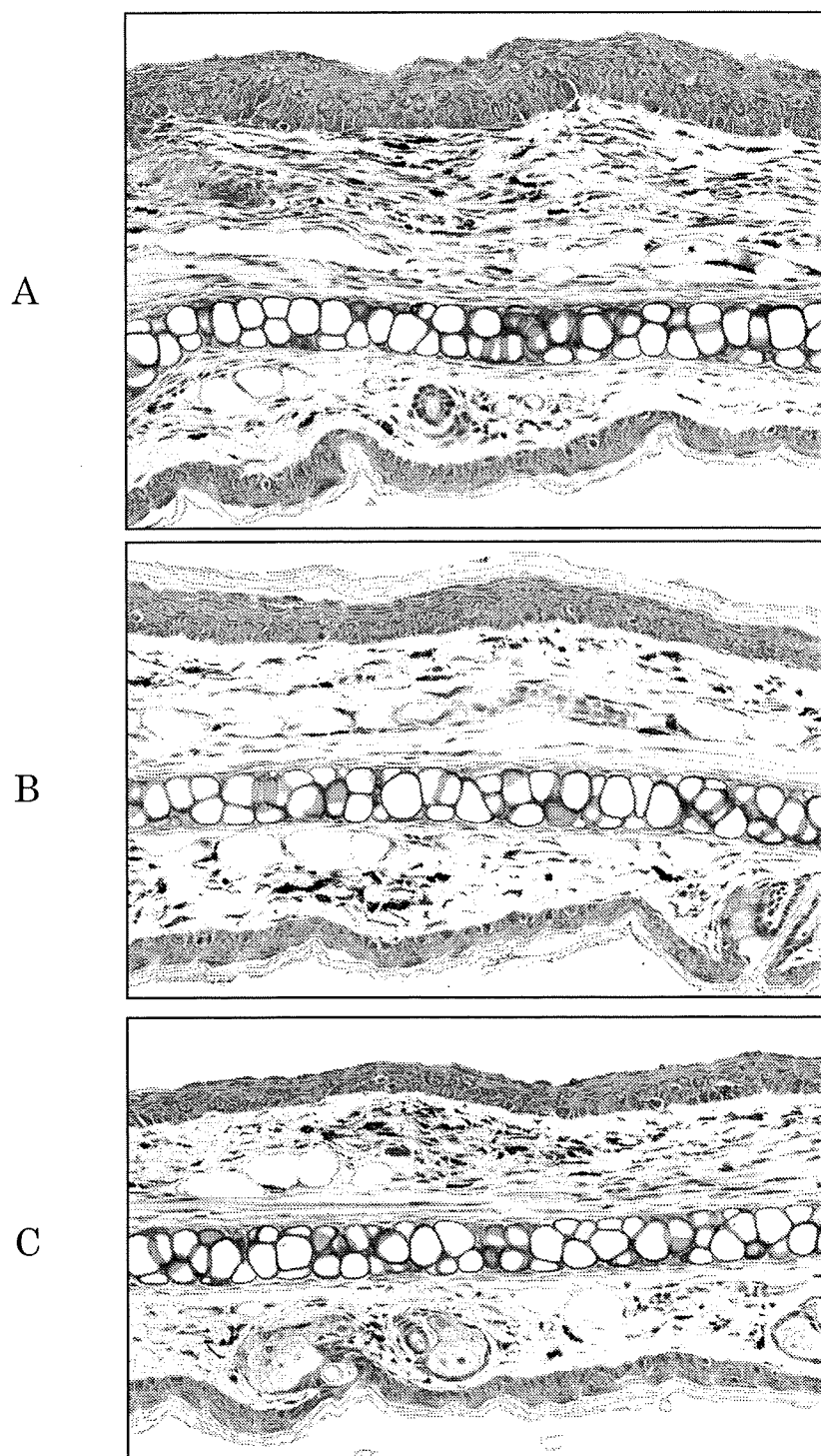


図3 TiO₂連続投与による耳介組織変化 (トルイジン青染色)

A : 35nm TiO₂, B : 250nm TiO₂, C : sil

上部 : 耳介背側部

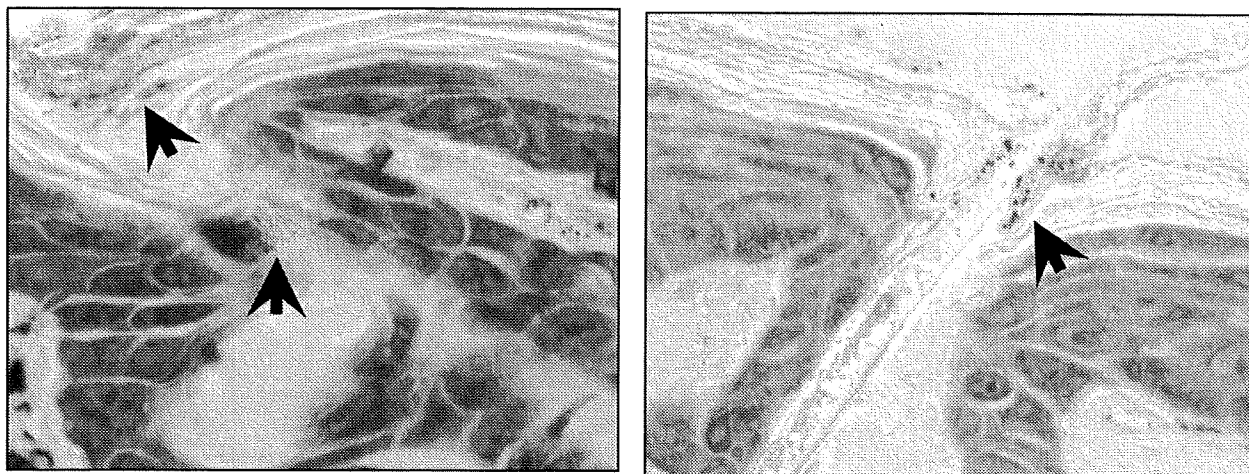


図4 TiO₂連続投与における耳介でのTiO₂の局在 (トルイジン青染色)
 A : 35nm TiO₂, B : 250nm TiO₂

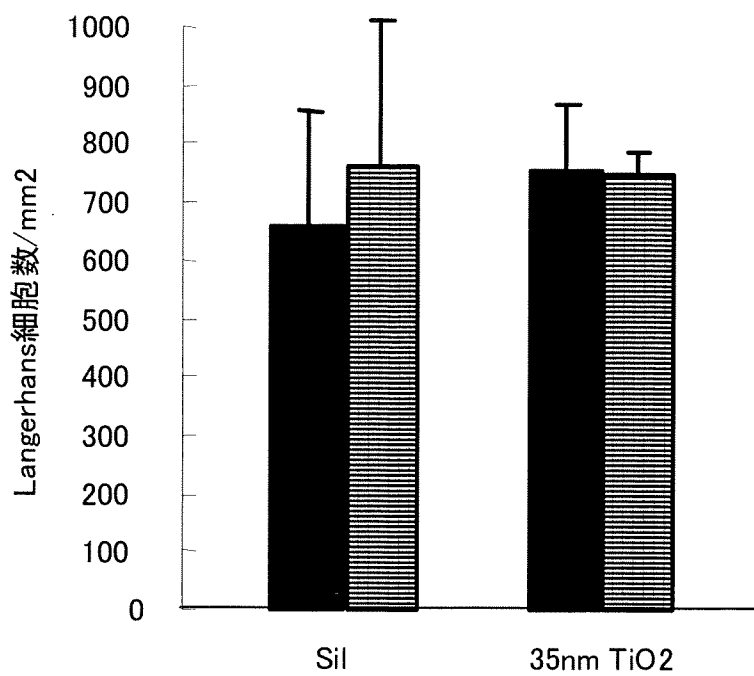


図5 35nm TiO₂連続投与における耳介でのLangerhans細胞数

■ I-Ak陽性細胞 ▨ Langerin陽性細胞

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の開発に関する研究

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の指標
の検討

研究分担者 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

テープストリッピングで角層を剥離した皮膚損傷マウスと DNFB を用いて皮膚炎を発症させた皮膚炎マウスの 2 つの系で、ナノ粒子二酸化チタンを経皮的に塗布し皮膚計測工学的手法で経時的に皮膚機能の計測、病理組織を施行して経皮毒性について検討した。皮膚炎マウスでは、アトピー性皮膚炎で増加する末梢血好酸球ならびに IgE を調べた。皮膚損傷マウス、皮膚炎マウスのいずれも、ナノ粒子二酸化チタンを塗布した皮膚は媒体対照と比べて、皮膚バリア機能指標である TEWL、角層水分含有量指標である高周波コンダクタンス、皮膚紅斑指標 a* の有意な差を認めなかった。皮膚炎マウスにおいても、投与皮膚局所の皮膚生理機能指標、末梢血好酸球%、IgE は対照と比較して有意な差を認めなかった。しかしながら、摘出した所属リンパ節に二酸化チタン粒子様の沈着物を認めた。皮膚透過バリアを成す角層が障害された皮膚に、単回あるいは約 2 週間ナノ粒子二酸化チタンを経皮的に投与したとき、皮膚局所では、媒体対照よりもさらに皮膚障害を来すという結果は得られなかったが、連続的に損傷皮膚に外用投与した場合には、経皮的に吸収されリンパ流に入る可能性が示され、全身的毒性について今後さらに検討していく必要がある。

A. 研究目的

二酸化チタンは、サンスクリーン剤など化粧品に配合されヒト皮膚に日常的に外用投与されている。近年、伸展性や見栄えの良さなどの理由で、ナノサイズの二酸化チタン粒子を使用することが多くなっている。ナノマテリアルの安全性評価のため、皮膚にナノ粒子の二酸化チタンを外用投与したときの皮膚毒性について検討することが目的である。角層が保たれている場合、ナノ粒子二酸化チタンは角層を透過しないと考えられるため、角層を粘着テープで剥離し角層を損傷したマウス皮膚と、実験的に皮

膚炎を作成したマウス皮膚にナノ粒子二酸化チタンを外用投与し、皮膚毒性について検討した。

B. 研究方法

1) 試料

二酸化チタン（平均一次粒子径：20nm、コーティング剤：シリコン）をポリエーテル系分散剤を用いて、溶媒（シリコン D5）に二酸化チタン 30%、分散剤 13%、シリコン D5 57%の割合に分散させたもの（二酸化チタン 300mg/ml）を、使用時には溶媒（ポリエーテル系分散剤 18.6%、シリコン D5 81.4%）で 100mg/ml に希釈して用いた。

2) 動物

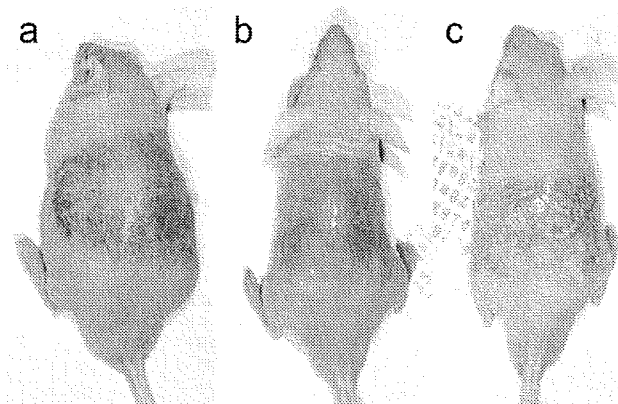
損傷皮膚モデルには、ヘアレスマウス（Hos/HR-1；突然変異により未熟な毛しかみられないマウス）雄 6 週を熊谷商店から購入し、動物飼育施設で 1 週間飼育後に試験に用いた。皮膚炎モデルには、NCヘアレスマウス（NC/Nga マウスを遺伝子操作により無毛化したもの）雄 5 週を株式会社免疫生物研究所から購入し、動物飼育施設で 1 週間飼育後に試験に用いた。

3) 方法

3) -1. 損傷皮膚単回外用投与

10 匹のヘアレスマウス（Hos/HR-1）をネンブタール腹腔麻酔し、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表面が光沢を持つまでおおむね 10～15 回繰り返した後、5 匹に 100mg/ml 二酸化チタン分散液、5 匹には溶媒対照をそれぞれ 100 μ l ずつ外用投与した（図 1）。角層を剥離せず残した 10 匹のうち 5 匹に 100mg/ml 二酸化チタン分散液、5 匹には溶媒対照をそれぞれ 100 μ l ずつ外用投与した。

図 1 a.ストリッピング直後、b.溶媒対照外用投与直後、c.二酸化チタン外用投与直後



3) -1-2. 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高周波コンダクタンスを Skicon-100 (I.B.S. 社)で、バリア機能指標である経表皮水分喪失量 transepidermal water loss (TEWL)を Model H4300 (日機装)で、色彩色差計 CR300 (コニカミノルタ)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、皮膚の赤み（紅斑）を a*で評価した。皮膚計測は、角層剥離前、剥離・試料投与 3 時間後、24 時間後、72 時間後にいずれもマウスをネンブタール腹腔麻酔後に施行した。測定環境は、室温 22.1～24.3 $^{\circ}$ C、相対湿度 16.2～24.8%であった。

3) -1-3. 病理組織

72 時間後の皮膚計測施行後、マウスを頸椎脱臼で安楽死させ、背部皮膚を採取した。ホルマリン固定後パラフィン包埋、HE 染色と免疫染色を施行した。免疫染色には Monoclonal Anti-mouse CD45 Antibody (R&D Systems, Inc. #MAB114) を用い炎症細胞を標識した。

3) -1-4. 病理組織ならびに透過型電子顕微鏡

角層損傷皮膚に試料の二酸化チタンを外用投与した場合に皮内に二酸化チタンが吸収されるかどうかを病理組織ならびに透過電子顕微で観察し検討した。ヘアレスマウス 10 匹をネンブタール腹腔麻酔後に、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表面が光沢を持つまでおおむね 10

〜15 回繰り返した後、100mg/ml 二酸化チタン分散液あるいは溶媒対照それぞれを 100 μ l ずつ外用投与し、1 時間後、3 時間後、24 時間後にそれぞれマウスを頸椎脱臼で安楽死させた後、背部皮膚を採取した。透過電顕の標本作製と観察は 1 時間後と 3 時間後の皮膚を、株式会社花市電子顕微鏡技術研究所（愛知県岡崎市）に委託した。

3) -2. 皮膚炎マウス連続外用投与

20 匹の NC ヘアレスマウスをネンブタール腹腔麻酔後、腹部皮膚にアセトンに溶解させた 0.15%DNFB (2,4-dinitrofluorobenzene) を 100 μ l ずつ外用投与（感作）(-Day 7)、1 週間後(Day 1) より 0.15%DNFB を 50 μ l ずつ背部皮膚に 1 週間に 2 回外用投与し皮膚炎を惹起させた。十分に皮膚炎が惹起した Day 18 にネンブタール腹腔麻酔後、皮膚生理指標の生体計測を施行し、その後 100mg/ml 二酸化チタン分散液ないし溶媒対照を背部皮膚にそれぞれ 100mg/ml ずつ外用投与を開始した。皮膚炎の維持のため、Day 24 にも 0.15%DNFB を 50 μ l ずつ背部皮膚に外用投与した。Day 19, 20, 25, 26, 27, 30, 31 にも同様に試料を外用投与した Day 32 の計測終了後に採血し安楽死させた後、背部皮膚を採取した。

3) -2-2. 皮膚生理指標の生体計測工学的評価

Day 18, 24, 32 にマウスをネンブタール腹腔麻酔後に施行した後、皮膚生理指標の生体計測を施行した。施行した項目は 3) -1-2. と同様に高周波コンダクタンス、TEWL、L*a*b* である。測定環境は、室温 (23.3〜23.9 $^{\circ}$ C)、相対湿度 (8.1〜17.8%) であった。

3) -2-3. 血中 IgE、好酸球

Day 32 の計測終了後に採血し、ELISA (Mouse IgE ELISA Quantitation Set Bethyl Laboratories, Inc. #E90-115) にて血中 IgE を、目視にて好酸球%を求めた。

3) -2-4. 病理組織

Day 32 に安楽死させた後、背部皮膚ならびに腋窩・そけいリンパ節を採取した。背部皮膚は、ホルマリン固定後パラフィン包埋、HE 染色と免疫染色を施行した。免疫染色には Monoclonal Anti-mouse CD45 Antibody (R&D Systems, Inc. #MAB114) を用い炎症細胞を標識した。リンパ節組織は、ホルマリン固定後パラフィン包埋、HE 染色のみ施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立大学法人東北大学の動物実験等に関する規定に則り承認を受けて実施した。また、遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を受け実施した。

4) 統計

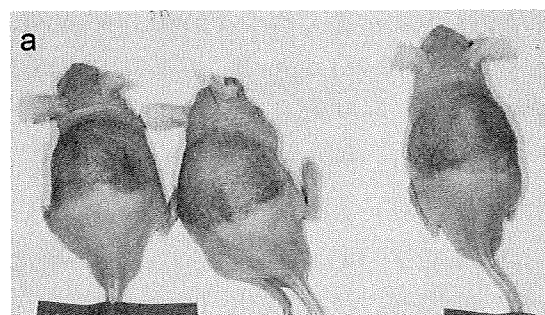
得られた測定値は、二酸化チタン群と溶媒対照群で両側分布非等分散の 2 群のステューデント T 検定を行い $p < 0.05$ であるとき有意差ありとした。

C. 研究結果

1) 損傷皮膚単回外用投与

角層剥離後、試料を外用投与 3 時間後には著明な紅斑がみられた (図 2)。24 時間後、紅斑は軽減し痂皮化がみられ、72 時間後には痂皮が脱落し表皮新生がみられた (図 3)。し 72 時間後に安楽死させるまで、二酸化チタンあるいは溶媒対照外用投与群ともに死亡したマウスはいなかった。

図 2. 処置 3 時間後。(a) 対照 ; (b) 二酸化チタン



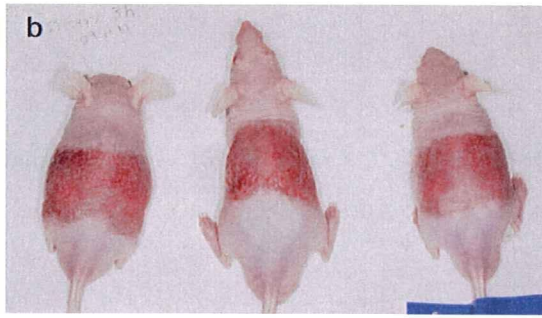
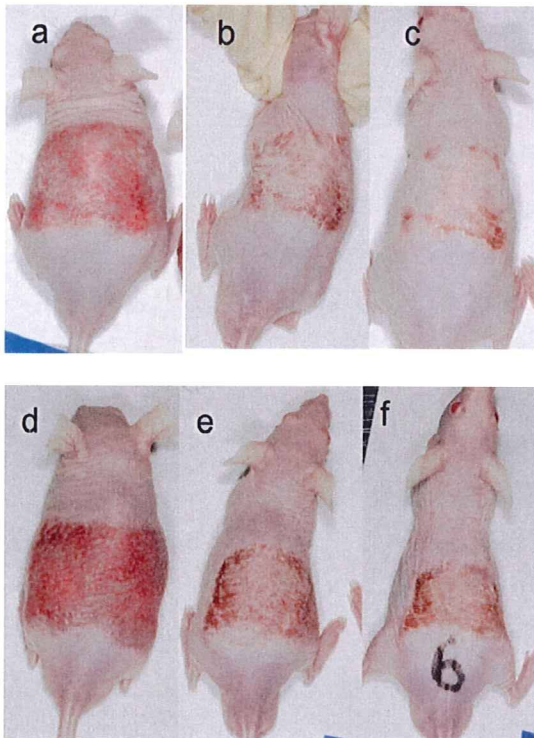


図3. 对照(a) 3時間後、(b)24時間後、(c)72時間後。二酸化チタン(d) 3時間後、(e) 24時間後、(f)72時間後。



化チタン群、溶媒群)と溶媒対照と比較して有意な差なく推移した(図3)。また、二酸化チタン外用投与群のバリア回復は、3時間後、24時間後と溶媒対照群と比較してやや遅れる傾向にあったが統計学的な有意差はなかった(図4)。

図3. テープストリッピング損傷皮膚に二酸化チタン外用投与後の TEWL 値(皮膚バリア機能指標)の推移

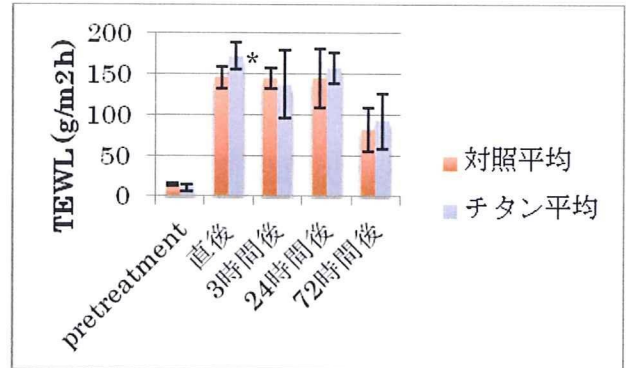
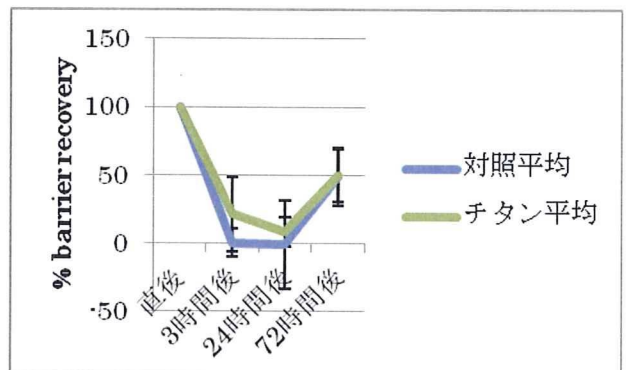


図4. テープストリッピング後に二酸化チタン外用したときのバリア回復



1) -1.皮膚生理指標

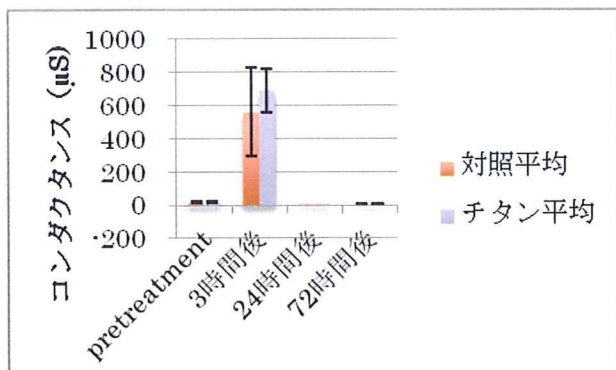
TEWL

皮膚バリア機能指標である TEWL は処置前、二酸化チタン群 $10.7 \pm 1.6 \text{ g/m}^2\text{h}$ 、溶媒群 14.7 ± 3.7 と有意差なく、テープストリッピング後ともに著明に増加した(二酸化チタン群 171.8 ± 16.4 、溶媒対照群 145.8 ± 13.8)。処置後の TEWL は3時間後 137.6 ± 42.3 、 145.4 ± 12.6 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群)、24時間後 157.8 ± 19.2 、 145.4 ± 36.1 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群)、72時間後 82.1 ± 34.4 、 82.3 ± 26.5 (それぞれ二酸化

高周波コンダクタンス

角層水分量指標である高周波コンダクタンスは、処置前、二酸化チタン群 $18.4 \pm 2.1 \mu\text{S}$ 、溶媒対照群 $19.0 \pm 1.9 \mu\text{S}$ と有意な差を認めなかった。処置後の高周波コンダクタンスは3時間後 692.0 ± 133.1 、 559.9 ± 265.7 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群)、24時間後 7.9 ± 3.6 、 8.6 ± 3.2 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群)、72時間後 2.5 ± 2.5 、 3.8 ± 7.2 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群)と推移し両群に有意な差を認めなかった。

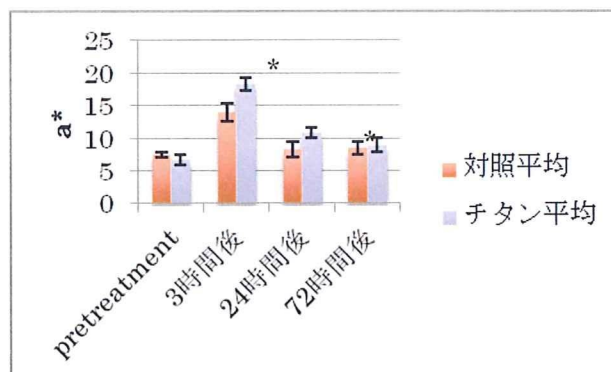
図 5. テープストリッピング損傷皮膚に二酸化チタン外用投与後の高周波コンダクタンス値 (角層水分量指標) の推移



紅斑 (赤み)

皮膚の赤さを示す a^* は、処置前、二酸化チタン群 6.70 ± 0.86 、溶媒群 7.42 ± 0.37 と有意差はなかった。処置後の値は、3 時間後 18.23 ± 1.04 、 14.04 ± 1.39 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群)、24 時間後 10.90 ± 0.77 、 8.27 ± 1.17 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群)、72 時間後 8.94 ± 1.02 、 8.43 ± 0.99 (それぞれ二酸化チタン群、溶媒群) であり、3 時間後と 24 時間後に両群に統計学的有意差を認めたが 72 時間後の値は両群に統計学的有意差はなかった (図 6)。

図 6. テープストリッピング損傷皮膚に二酸化チタン外用投与後の a^* (皮膚の赤み) の推移



1) -2. 病理組織・免疫組織

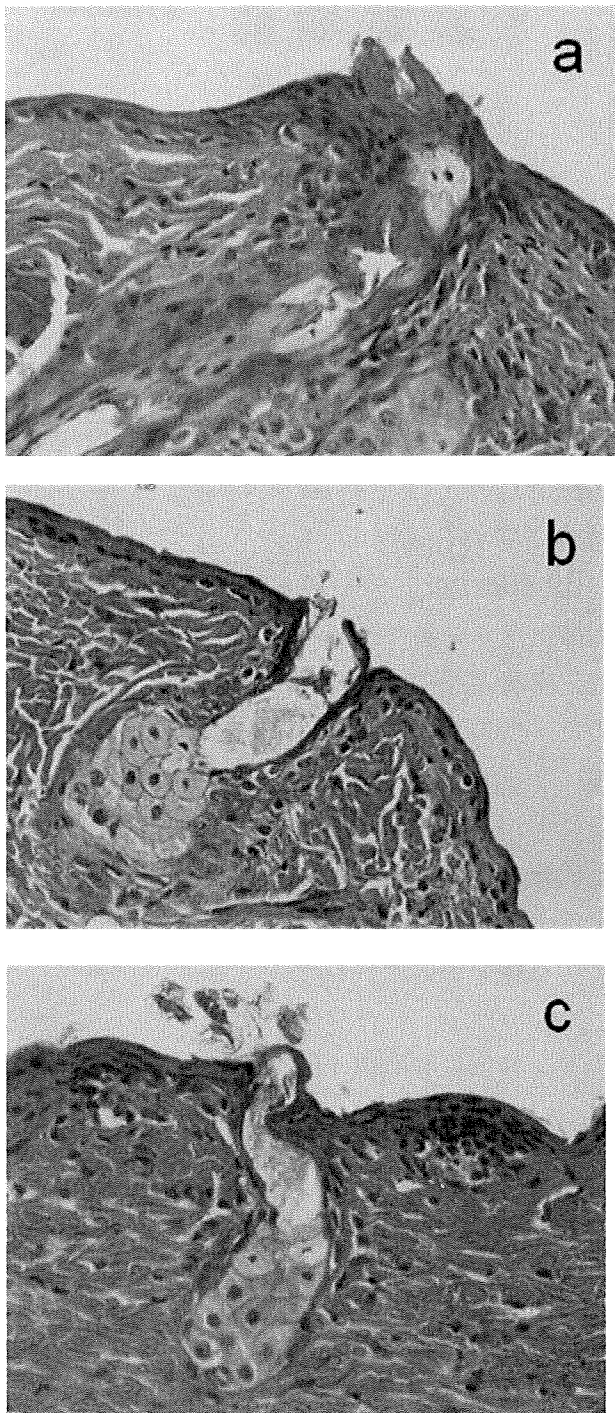
テープストリッピング、二酸化チタンあるいは溶媒対照外用投与処置 1 時間後、3 時間後、24 時間後、72 時間後の病理組織について検討した。

透過に関する検討

HE 組織では、テープストリッピング直後に二酸化チタンを外用投与し、1 時間後の組織では、皮膚表面や毛包内に二酸化チタン粒子を認めた (図 7a)。3 時間後 (図 7b)、24 時間後 (図 7c) と二酸化チタン粒子は排出される様子がみられた。皮膚表面に付着していた二酸化チタンは壊死した表皮とともに剥脱しその下で、毛包上皮から表皮細胞が供給され新しい表皮が新生する様子が観察された。

電顕では、テープストリッピング、二酸化チタン外用投与処置 1 時間後と 3 時間後の皮膚について検討した。皮膚表面や角層内、毛包内には多数のチタンを認めたが、角層より深部の生きた表皮 viable epidermis や真皮内にチタン粒子は確認されなかった。

図7. テープストリッピング直後に二酸化チタンを外用投与したマウス皮膚組織 (HE 染色)。投与 1 時間後 (a)、3 時間後 (b)、24 時間後 (c)。



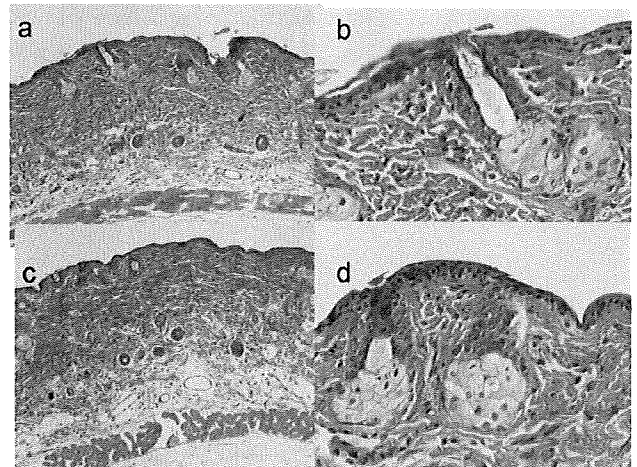
炎症細胞浸潤に関する検討

二酸化チタン、対照とも、1 時間後炎症細胞の浸潤はほとんどなく、3 時間後、24 時間後の組織で、真皮の腫脹が出現し炎症細胞浸潤が真皮に散在性に認められた。3 時間後の組織では、二酸化チタンで対照と比べ浸潤細胞がやや多

い印象があった (図8)。

CD45 での免疫染色を追加し現在検討中である。

図8. テープストリッピング直後に二酸化チタンを外用投与し 3 時間後に採取した組織 (HE 染色)。二酸化チタン 100 倍 (a)、400 倍 (b)、対照 100 倍 (c)、400 倍 (d)。



2) 皮膚炎マウス連続外用投与

DNFB で感作し、1 週後から DNFB を塗布開始 (Day 1) し週 2 回背部皮膚に塗布したところ皮膚炎を発症し次第に増悪した。紅斑や痂皮、小潰瘍が形成されるものもあった (図9)。Day 18 から二酸化チタンないし溶媒対照を背部皮膚に外用投与を開始し、Day 32 で終了するまで、Day 19 に溶媒対照群の 1 匹が死亡した。その他のマウスの生育は問題なく、二酸化チタン群と溶媒対照群で体重に有意な差を認めなかった (図10)。

図9 a. DNFB で惹起された皮膚炎 (Day 18)、b. 二酸化チタン外用投与直後 (Day 18)、c. 試験終了時 (Day 32)