

穿孔を形成させた *needle-punctured skin*、および剃刀（フェザー剃刀 S 両刃、フェザー安全剃刀株式会社、大阪）で角層側に深さ約 0.5 mm の傷を 2 本つけた *razor-treated skin* を用いた。なお、*needle* 処理は皮膚を動物から摘出し、皮膚をセルにアロンアルファで固定した後、有効透過面積内の 1ヶ所に 20G、23G、27G、または 30G 注射針を先端から 10 mm 刺した。Razor 処理は、剃刀の刃の部分が 0.5 mm となるよう、木製のストッパーを装着した。その剃刀を一定の力で左から右に引くことで有効透過面積内に 2 本の傷をつけた。なお、*razor* 処理および皮膚の摘出は麻酔下で行った。

2) **Fluoresbrite[®]透過実験**：摘出したヘアレスラット腹部皮膚を *side by side* 型拡散セル（有効透過面積 0.95 cm²）に挟み、真皮（レシーバー）側に pH7.4 等張リン酸緩衝（PBS）を 3.0 mL を適用した。レシーバー側から 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を補充した。角層側には蛍光ポリスチレンビーズ（Fluoresbrite[®]）を 3.0 mL 適用した。*needle-punctured skin* を用いる場合には、貫通孔への空気の侵入を防ぐため 0.1% Tween 80 含有 PBS を用いた。実験中、セルの温度は 32°C に保ち、両セル内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラー（マルチスターラー M-1、アズワン株式会社、大阪）により 1,200 rpm で回転させることで攪拌した。レシーバー液から 0.5 mL 経時的にサンプリングし、その都度、同量の PBS を補充した。サンプル溶液中の蛍光ポリスチレンビーズ濃度は蛍光分光光度計（RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都）

を用いて測定（励起波長：441 nm、蛍光波長：486 nm）した。

3) **FITC-dextran 透過実験**：同様に摘出したヘアレスラット腹部皮膚を *side by side* 型拡散セル（有効透過面積 0.95 cm²）に挟み、真皮（レシーバー）側に pH7.4 PBS 3.0 mL を適用した。レシーバー側から 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を補充した。FITC-dextran（FD-4, FD-20, FD-40, FD-70, FD-250, FD-2000）/PBS 溶液を各 3.0 mL 適用した。実験中、セルの温度は 32°C に保ち、両セル内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラーにより 1,200 rpm で回転させることで攪拌した。レシーバー液から 0.5 mL 経時的にサンプリングし、その都度、同量の PBS を補充した。サンプル溶液の FD 濃度は蛍光分光光度計（RF-5300PC）を用いて測定（励起波長：490 nm、蛍光波長：520 nm）した。

D-5 皮膚観察：透過実験終了後、回収したラット皮膚表面を PBS で十分に洗浄した。その後、*stripped skin*、*razor-treated skin*、および *needle-punctured skin* は、凍結包埋剤（Super Cryoembedding Medium、Section Lab Co. Ltd.）に包埋し、-80°C イソペンタン中で速やかに凍結させた。クライオスタット（CM3050、LEICA、Wetzler、Germany）により垂直方向の皮膚凍結切片（厚さ 20 μm）を作製し、作製した切片を共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM、FV1000、オリンパス株式会社、東京）にて観察した。

D-6 微粒子酸化チタンの粒子径およびゼータ電位：種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ、濃度を 0.01 または 0.1 mg/mL に調製した。調製後、超音波洗浄機

(Branson 5510、ヤマト科学株式会社、東京) を用いて分散させた。微粒子酸化チタン培地分散液はマイクロチューブに 1 mL 入れ、Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.) を用いて粒子径を測定した。さらに、同様に調製した微粒子酸化チタン培地分散液を 3 mL 取り、Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.) を用いてゼータ電位の測定を行った。

D-7 細胞培養：ヒト表皮角化細胞 (human epidermis keratinocytes, HEK) は倉敷紡績株式会社 (大阪) より購入した。HEK は増殖添加剤を加えた HuMedia-KG2 中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。ヒト真皮線維芽細胞 (human dermis fibroblast, HDF) は東洋紡績株式会社 (大阪) より購入した。HDF は炭酸水素ナトリウムおよび 10% fetal bovine serum (FBS; Nichirei biosciences Inc., 東京) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium

(DMEM; 日本製薬株式会社、東京) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。

D-8 細胞障害性試験 (MTT 試験)^{11), 12)}：

2×10^4 cells/0.3 mL/well の HEK および HDF を 24 well セルカルチャーインサート内に播種し、インサートの外側に培地 0.5 mL を適用して 24 時間 pre-incubate した後、インサート内外の培地を除去し、インサート内側に試験製剤各 0.3 mL をインサ

ート外側に培地 0.5 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01~100 mg/mL に調製したものをを用いた。コントロールとして、HEK は増殖添加剤を加えた HuMedia-KG2、HDF は DMEM + 10% FBS を用いた。また、ポジティブコントロールとしては 10% SDS 培地溶液を用いた。製剤を除去し、細胞を PBS で 3 回リンスした。インサート内側に 0.333 mg/mL MTT 培地を 300 μ L/well 適用し、37°C、5% CO₂ 存在下で 4 時間インキュベートした。生成したホルマザンを 0.04 N 塩酸-イソプロパノール液で 30 分抽出し、分光光度法 (測定波長：570 nm、対照波長：650 nm) により、ホルマザン量を測定し、TC₅₀ を求めた。

D-9 細胞膜障害性試験 (LDH 放出量測定)：

1×10^5 cells/0.3 mL/well の HEK および HDF を 24 well セルカルチャーインサート内に播種し、インサートの外側に培地 0.5 mL を適用して 24 時間 pre-incubate した後、インサート内外の培地を除去し、インサート内側に試験製剤各 0.3 mL をインサート外側に培地 0.5 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 mg/mL に調製したものをを用いた。また、コントロールとして培地のみ、ポジティブコントロールとして 1% Triton X-100 培地溶液を用いた。試験製剤適用 48 時間後、インサート外側の培地 0.5 mL を回収し、LDH cytotoxicity assay kit を用い

て、分光光度法（測定波長；490 nm）により LDH 放出量を求めた。

D-10 炎症反応（IL-1 α 測定）： 1×10^5 cells/0.3 mL/well の HEK および HDF を 24 well セルカルチャーインサート内に播種し、インサートの外側に培地 0.5 mL を適用して 24 時間 pre-incubate した後、インサート内外の培地を除去し、インサート内側に試験製剤各 0.3 mL を、インサート外側に培地 0.5 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 mg/mL に調製したものをを用いた。コントロールとして培地のみ、ポジティブコントロールとして 1% Triton X-100 培地溶液を用いた。試験製剤適用 48 時間後、インサート外側の培地 0.5 mL を回収し、培地中の IL-1 α を Quantikine[®] (Human IL-1 α /IL-1F1 immunoassay) を用いて調整し、分光光度法（測定波長；530 nm、対照波長 570 nm）により、IL-1 α 放出量を求めた。

D-11 DNA 合成に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響（BrdU）： 1×10^4 cells/0.1 mL/well の HEK および HDF を 96 well プレート内へ播種し、インキュベーター内で 24 時間 pre-incubate した後、well 内の培地を除去し、試験製剤を各 0.1 mL 適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 mg/mL になるように調製したものをを用いた。コントロールとして培地のみ、ポジティブ コントロールとして

10% SDS 培地溶液を用いた。以後、cell proliferation ELISA、BrdU (colorimetric) に従い実験を行った。分光光度法（測定波長；370 nm、対照波長；492 nm）により、培養細胞に取り込まれた 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を定量した。

D-12 DNA 障害に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響（comet assay）： 2×10^5 cells/1.0 mL/well の HEK および HDF を 6 well プレート内に播種し、24 時間 pre-incubate した後、培地を除去し、試験製剤各 1.0 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 4 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 g/mL に調製したものをを用いた。コントロールとして HEK は増殖添加剤を加えた HuMedia-KG2、HDF は DMEM + 10% FBS を用いた。ポジティブコントロールとして 0.2 mM H₂O₂ 培地溶液を用いた。その後、試験製剤を除去し、6 well 内側の種々培養細胞をセルスクレイパーにより回収した。HEK は 1000 rpm、5 分、HDF は 500 rpm、10 分遠心分離操作を行い、培地を除去後、PBS で 1 回洗浄した。以後、comet assay kit に従い実験を行った。また、使用した電気泳動は 20 V、300 mA、30 分の条件下で行い、測定は励起波長 494 nm、蛍光波長 521 nm で行った。画像解析は comet assay software project (Casp; OSDN 株式会社、東京) を用い、Tail moment を求めた。

D-13 皮膚感作性試験：Adjuvant and patch test 法¹³⁾にもとづいて行った。一次感作で

は、モルモットの肩甲骨上の 4 cm × 6 cm の部位を剃毛した。その翌日に正中線をはさんだ 2 cm × 4 cm 投与部位の四隅に注射用水とフロイント完全アジュバント (FCA) の 1:1 の油中水型 (w/o) 乳化液を 0.1 mL/site 皮内投与した。続いて皮内投与部位の角層に滅菌した注射針を用いて井型の傷をつけた。擦過傷で囲む部位に、白色ワセリンと混合した 5% または 25% になるように調製した NRT 軟膏を 100 mg 適用した。また、陽性対照として白色ワセリンと混合した 0.1% DNCB 軟膏をそれぞれ 100 mg を適用し、24 時間閉塞塗布した。この閉塞適用の操作を 3 日間連続して行った。二次感作では、初回貼付感作から 7 日目に同部位を除毛し、被験物質の浸透性を高めるため白色ワセリンに混合した 10% SDS を一次感作部位に 100 mg 開放塗布した。その 24 時間後 (一次感作後 8 日目) に SDS 軟膏を除去し、5% または 25% に調製した NRT 軟膏および 0.1% DNCB 軟膏を 200 mg を適用し、いずれも 48 時間閉塞塗布した。二次感作から 2 週間後に感作モルモットの体側部を除毛し、その部位に適用物質を貼付し 24 時間閉塞塗布した。閉塞塗布後 24 時間および 48 時間後に皮膚反応 (紅斑、痂皮形成、浮腫) の有無およびその程度を判定基準に従い、観察・評価した。なお、紅斑の程度は色彩色差計 (CR-400、コニカミノルタセンシング株式会社、大阪) で a* 値を測定した。

D-14 静脈内投与実験：1) 体内動態：ペントバルビタール麻酔下のマウスの尾部を微温湯に浸し、尾静脈から 5% SRT/生

理食塩液分散体を 0.05 mL 投与し、5 分、72 時間、1 ヶ月、6 ヶ月後のマウスから心臓採血を行い、心肺灌流後、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出後、各臓器の質重量を測定し、Solune-350 で臓器を溶解させ、ICP-MS でチタンの定量を行った。

2) 組織観察：静脈内投与後の肝臓を 2% グルタルアルデヒド・2% パラホルムアルデヒド/HEPES 緩衝液で固定し、細断したものを 2% グルタルアルデヒド/0.1 M カコジル酸緩衝液中で 4°C で前固定し、その後、2% 四酸化オスmium水溶液で 4°C、3 時間、固定した。室温で 50~100% エタノールで脱水後、EPON812 で 60°C、48 時間熱重合をさせ試料を包埋した。包埋した試料をウルトラミクロトームで超薄切 (厚み 80-90 nm) し、酢酸ウラニル/亜鉛染色液で室温で 15 分間、二重染色を行い、カーボン真空蒸着でコーティングを行い Transmission electron microscope (TEM) 観察した。

3) 炎症マーカーの測定：静脈内投与後 72 時間、3 週間後のマウスの血清を採取し、炎症マーカー (blood urea nitrogen (BUN)、creatin phosphokinase (CPK)、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、および lactase dehydrogenase (LDH)) の測定を行った。

E. 研究結果および考察

E-1 FITC-dextran の分子径：Table 1 に本実験で用いた FDs (FD-4, FD-20, FD-40, FD-70, FD-250, FD-2000) の理論分子径を示す。

E-2 健全皮膚および角層剥離皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験 : Figure 1 に intact skin および stripped skin を介した蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite®) の累積透過量と時間の関係を示す。Intact skin および stripped skin に 24 時間適用しても、Fluoresbrite®は透過しなかった。蛍光分光光度計を用いた定量における限界濃度や適用濃度から intact skin を介した Fluoresbrite®の P_c 値を算出すると 2.4×10^{-10} cm/s となった。これは落屑速度よりも低く、B-3 で記載した、③の $P - P_{des} \ll 0$ に分類できるため、角層を透過経路とする場合には皮膚透過および皮膚浸透は生じないと考えることができる。そこで、皮膚の観察を行った。Figure 2 に Fluoresbrite®適用後の皮膚垂直切片画像を示す。Intact skin は stripped skin よりも一般的に透過性が低いため、画像観察は行わず、観察が容易な stripped skin で観察した。stripped skin において、Fluoresbrite®はその皮膚表面と毛嚢中にも観察された。この結果から、Fluoresbrite®は皮膚(角層)に溶解拡散しないことが示唆された。しかしながら、細孔ルートと考えられる毛孔へは移行するため、細孔ルートのサイズによってはナノ粒子が皮膚を透過する可能性があると考えられた。

Figures 3、4 に intact skin、stripped skin を介した FDs の累積透過量と時間の関係を示す。FDs は Fluoresbrite®とは異なり intact skin、stripped skin を透過した。特に、Fluoresbrite®と同様な溶質径を有する FD-2000 でさえ各皮膚を透過した。これらの結果から、Fluoresbrite®および FDs の皮膚透過性の違いは、(皮膚細孔を含む)

皮膚への分配性(溶解性)が大きく寄与していると考えられた。

Figure 5 に FDs の皮膚透過係数 (P) と理論分子径 (d) の関係を示す。FDs の理論分子径 (d) が增大するにつれて、その stripped skin 透過係数の対数値は減少した。また、溶質径が 7 nm 以上の FDs の intact skin 透過係数は角層の落屑速度である 1×10^{-9} cm/s 以下であった。なお、 1×10^{-9} cm/s 以下の P を示す物質では、角層ルートからのみなる皮膚へは *in vivo* では浸透しないと考えられた。また、intact skin では FD-40、FD-70 の間で透過係数の上昇がみられた。この原因としては、FD-70 の透過実験時間を FD-40 のそれより長くしたことによって、皮膚の状態変化(バリア能の低下)がより大きくなったためと考えられた。今後、実験条件(実験時間など)を一定にして再度実験を行う必要がある。

E-3 損傷皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験 : Figure 6 に razor-treated skin および needle-punctured skin を介した Fluoresbrite®の累積透過量と時間の関係を示す。Fluoresbrite®は intact skin および stripped skin と同様に razor-treated skin を透過しなかった。また、 P_c の値を算出すると、 2.4×10^{-10} cm/s であった。一方、needle-punctured skin を介する場合、Fluoresbrite®は透過した。また、用いた注射針の外径が大きくなるにつれて、その透過量は増大した。このため、Fluoresbrite®は注射針により形成された貫通孔(細孔ルート)を透過していると考えられた。Figure 7 に Fluoresbrite®適用後の皮膚垂直

切片画像を示す。Razor-treated skin では、Fluoresbrite®はその皮膚（傷）表面に観察された。一方、needle-punctured skin では、注射針により皮膚に形成された貫通孔内にFluoresbrite®が観察された。これらの結果から、Fluoresbrite®の needle-punctured skin での透過ルートは注射針により形成された貫通孔（細孔ルート）であることが示唆された。また、皮膚に損傷を負っていても傷が貫通していなければナノ粒子は皮膚を透過しないことがわかった。

Figures 8, 9にそれぞれ razor-treated skin を介した FDs の透過プロファイル、FDs の $\text{Log}d$ と $\text{Log}P$ の関係を示す。種々FDs は razor-treated skin を透過した。さらに、razor-treated skin を介した種々FDs の透過性は stripped skin と同程度であった。

E-4 微粒子酸化チタンの粒子径およびゼータ電位測定：Tables 2、3に種々微粒子酸化チタンを各培地に分散させた時の粒子径およびゼータ電位を示す。微粒子酸化チタンの粒子径は 300 nm-4000 nm であり、分散媒として DMEM や Humedia-KG2 を用いた時には粒子径が大きくなった。また、ゼータ電位の絶対値が小さくなると、粒子径は大きくなる傾向が見られた。これは、微粒子酸化チタン粒子同士の静電反発が低下し凝集を起こしたと考えられた^{14), 15)}。

E-5 細胞障害性試験 (MTT 試験)：Table 4 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用した場合の 50%毒性発現濃度 (TC_{50}) および形状係数 (γ) を示す。細胞障害性は適用した微粒子酸化チタン濃

度に伴って上昇した。 TC_{50} の値より微粒子酸化チタンの細胞障害性は HDF よりも HEK に強く現れた。この結果は、HEK および HDF の感受性の違いや、微粒子酸化チタンの細胞への取り込み量の違いに起因していると考えられる。また、C-2 の(5)式より求めた形状因子 (γ) が大きい場合は濃度の増加により死細胞率の速やかな増加が起こる。HDF と比較して HEK の γ 値は約 4-7 倍であることから、表皮は真皮よりも微粒子酸化チタンによる細胞障害性に注意する必要があると考えられた。また、NAT の細胞障害性は種々培養細胞に適用した場合、他の微粒子酸化チタンよりも強く現れた。この原因として、NAT から生成される活性酸素種の量が多いことに起因していると思われる¹⁴⁾。また、コーティングを施した微粒子酸化チタンではコーティングを施していない微粒子酸化チタンよりも TC_{50} の値が高いため、微粒子酸化チタンの細胞障害性はコーティングを施すことで軽減できると考えられた。

E-6 細胞膜障害性試験 (LDH 放出量測定)：Figure 10 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用した場合の LDH 放出量 (mU) を示す。HEK は他の細胞と比較して LDH 放出量が少なかった。この原因として、Humedia-KG2 に含まれる成分と何らかの相互作用を起こしていると考えられた。また、HEK および HDF の LDH 放出量は 0.10 mg/mL NAT を適用した際に培地適用群と比較してそれぞれ 7 および 3 倍の増加を示した。したがって、細胞膜障害性は NAT を適用した場合、他

の微粒子酸化チタンよりも増加することが分かった。

E-7 炎症反応に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響 (IL-1 α 測定) : Figure 11 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用した場合の IL-1 α 放出量 (pg) を示す。炎症反応は適用した微粒子酸化チタン濃度に伴って上昇した。また、コーティングを施していない粒子よりコーティングを施している粒子の方が IL-1 α 放出量が少ないことから、炎症反応は微粒子酸化チタンをコーティングすることで軽減できると考えられた。

E-8 DNA 合成に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響 (BrdU) : Figure 12 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用した時の DNA 合成量を示す。微粒子酸化チタンは粒子として核に侵入し DNA 合成を阻害する可能性があること¹⁵⁾、また、活性酸素を生成し、ピリミジン塩基およびプリン塩基を部分的に切断することにより、DNA や RNA の分解を起こすことが知られている¹⁷⁾。DNA 合成量は適用した種々微粒子酸化チタンの濃度に伴い減少した。また、HEK および HDF に適用した場合、SRT の DNA 合成量の減少が最も少なかった。皮膚細胞の DNA 合成量は微粒子酸化チタンの適用濃度、結晶形および表面コーティングの有無に影響を受けると考えられた。また、微粒子酸化チタンが皮膚浸透した場合、表皮および真皮の皮膚修復能を低下させることがわかった。さらに、結晶形の表面コーティングを変えることによって軽減・抑制される

ことがわかった。

E-9 DNA 障害に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響 : Figure 13 に HEK および HDF の DNA 障害に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響を示す。DNA 障害は種々微粒子酸化チタンの適用濃度に伴い上昇した。また、ルチル型の微粒子酸化チタンは DNA 障害を引き起こしにくい、アナターゼ型は DNA 障害を引き起こす可能性が示された。この原因として、微粒子酸化チタンより生成される活性酸素が考えられた。

E-10 皮膚感作性試験 : Tables 5、6 に皮膚感作の観察判定基準およびその判定結果を示す。また、Figure 14 に色彩色差計での測定結果を示す。NRT は皮膚感作性を示さなかった。誘導後の皮膚の状態を観察しても明らかな紅斑や浮腫は見られなかった。色彩色差計による感作部位の測定では、DNCB で a*値の上昇がみられた。NRT 適用群では a*値が control 群とほぼ同じであった。色彩色差計による測定では DNCB 群で a*値の上昇がみられたことより、皮膚に紅斑が形成され炎症が生じたことがわかった。微粒子酸化チタン適用群では、a*値が control 群の値とほぼ同じであるため、感作試験の結果より、NRT には感作性はないことが示唆された。

E-11 静脈内投与実験 : 1) 体内動態 : 動物組織にはチタンが存在することがコントロール群から判明した。この原因として、食品や土壌中にチタンが含まれており¹⁸⁾、¹⁹⁾、食事などからチタンを摂取して

いることが示唆された。Figures 15, 16 に各臓器中の SRT 量および濃度を示す。酸化チタンのほとんど（チタン量として約 60%）が静脈内投与後、肝臓に集積した。一方、投与後 6 ヶ月には脾臓のチタン濃度が上昇した。脳への分布は観察されなかった。投与 6 ヶ月後に脾臓や肝臓中の酸化チタン量が増量するのはおそらく投与した酸化チタンが赤血球を凝集し、それらが脾臓で処理され、その後、最終的な処理過程である肝臓に再集積したものだと考えられる。なお、投与した酸化チタンが赤血球を凝集させることは予備検討で確認済みである。また、腎臓への集積もみられないことから、尿中への排泄は考えられない。静脈内投与後、酸化チタンはほとんどが肝臓に集積し、ごく少量が体外に排泄されていくものと考えられる。

2) 組織観察 : Figure 17 に微粒子酸化チタン投与後の組織 TEM 観察画像を示す。投与 72 時間後には肝臓の血管内皮細胞と肝実質細胞との間に存在するディッセ腔に微粒子酸化チタンが確認され (Figure 17b)、投与 1 ヶ月後にはクッパー細胞や肝実質細胞中のライソソーム中に微粒子酸化チタンの取り込みが確認された (Figure 17c)。未処理 (コントロール) の Figure 17a に粒子状物質が確認できないことから、Fig. 17b, c の黒点を酸化チタン粒子と認識し、存在する部位を黒線で囲んだ。なお、酸化チタン粒子の取り込みによる形態変化はみられなかった。

3) 炎症マーカー : Figure 18 に微粒子酸化

チタンの静脈内投与後の炎症マーカーの測定結果を示す。BUN や LDH に増加傾向がみられ、CPK は減少傾向を示した。静脈内投与後の酸化チタンのほとんどが肝臓に集積することから、AST、ALT に注目したが、肝臓に炎症が生じているという証拠は得られなかった。また、ラットにおける静脈内投与時の炎症マーカーを測定した文献¹⁹⁾でも、炎症反応や臓器毒性は見られなかったことが報告されている。

F. 結論

1. 酸化チタンのように皮膚に溶解しない物質は、角層を介して皮内に侵入する可能性は低いことが示された。また、皮膚を貫通した細孔ルートが存在する場合は、ナノ粒子の透過は認められるものの、非貫通部位が存在する場合は、透過は認められず、細孔壁面にとどまると考えられた。これらの結果より、損傷皮膚ではナノマテリアルが生きた細胞に直接接触し、影響を及ぼす可能性があるため、ナノマテリアルを皮膚適用するには損傷のない皮膚を選択することが大変重要であると考えられた。角層の浸透性評価及び細孔（毛孔）からの皮内浸透性に関しては、今回の検討では十分な評価を行うことができていない。毛孔への浸透性評価実験方法は、未だ確立されていないため、評価実験方法の確立が急務であると考えられる。

2. 微粒子酸化チタンの細胞障害性および遺伝毒性は、微粒子酸化チタンの濃度に伴い上昇することが明らかとなっ

た。また、種々培養細胞を用いた実験では、微粒子酸化チタン表面にコーティングを施すことで細胞障害性および遺伝毒性を軽減できることが明らかとなった。以上のことより、損傷皮膚に微粒子酸化チタンを使用する際には、適切な結晶形およびコーティングを選択し、これらを使用することが望ましいと考えられた。また、皮膚感作性試験結果より、ルチル型酸化チタンに感作性は現れなかった。

3. 静脈内投与実験の結果より、たとえ、全身循環に移行したとしても、少量なら、肝臓から消失する可能性も考えられるが、高容量では蓄積する可能性が考えられた。また、組織マーカーの測定結果より、組織に炎症はみられなかった。

4. Figure 19にナノ粒子の安全性を評価する上で重要と考えられる評価スキームを示す。本検討から、酸化チタンなどの分散媒や皮膚に溶解しない物質は、皮溝や毛孔周辺に集積しやすく、経角層ルートを紹介した角層浸透性は著しく低い、もしくは角層に浸透しないと考えられた。したがって、従来の*in vivo*及び*in vitro*皮膚透過性試験に加えて、「角層浸透性評価」や毛孔などの付属器官からの「皮内移行性」に関する評価方法の確立が必要であると考えられた。

【参考文献】

1) Nanotechnologies, terminology and definitions for nano-objects; nanoparticle, nanofibre and nanoplate. ISO/TS 27687: 1st

version (2008).

2) Oberdörster G., Ferin J., Lehnert E. B., Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury, *Environ. Health Perspect.*, **102**, 173-179 (1994).

3) Oberdörster G., Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles, *Inhal. Toxicol.*, **8**, 73-89 (1996).

4) Scientific committee on consumer products: preliminary opinion on safety on nanomaterials in cosmetic products (2007).

5) Scientific committee on emerging and newly-identified health risks: opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risk of nanomaterials (2007).

6) B. Behling: EC committee proposes new nanomaterials risk assessment procedure. *The Rose Sheet*, **28**, 12 (2007).

7) Scheuplein R. J., Mechanism of percutaneous absorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility., *J. Invest. Dermatol.*, **45**, 334-347 (1965).

8) Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., López-Quintela M.A., Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin, *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1701-1712 (2007).

9) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F., Ikarashi Y., Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through

- skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1394-1399 (2010).
- 10) 杉林 堅次, 化粧品に用いられるナノ粒子の暴露と安全性問題のあり方, *Fragrance Journal*, **36**, 38-41 (2008).
- 11) Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 12) Sayes M. C., Wahi R., Kurian A. P., Liu Y., West L. J., Ausman D. K., Warheit B. D., Colvin L. V., Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells, *Toxicol. Sci.*, **92**, 174-185 (2006).
- 13) Sato Y., Katsumura Y., Ichikawa H., Kobayashi T., Kozuka T., Morikawa F., Ohta S., A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens, *Contact. Derm.*, **7**, 255-237 (1981).
- 14) Jiang J., Oberdorster G., Biswas P., Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies., *Nanopart Res.*, **11**, 77-89 (2009).
- 15) Richard C.M., Braydich-Stolle L., Schrand A.M., Schlager J.J., Hussain S.M., Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique., *Toxicol. Sci.*, **101**, 239-253 (2007).
- 16) Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A., ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells., *Toxicol. In Vitro.*, **25**, 231-241 (2010).
- 17) Pan Z., Lee W., Slutsky L., Clark R.A.F., Pernodet N., Rafailovich M.H., Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells., *Small*, **5**, 511-520, (2009).
- 18) Itoh J., Saitoh Y., Futatsugawa S., Sera K., Elemental analysis of the vegetables on the market; Comparison with wild plants. *NMCC Annual Report*, **13** (2005).
- 19) Hanawa T., Surface treatment of titanium in medical applications. *J. Jap. Ins. Light Metals*, **55**, 553-556 (2005).
- 20) Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wolleben W., van Ravenzwaay B., Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.*, **82**, 151-157 (2008).
- E. 研究発表
1. 論文発表
- 1) Sugibayashi K., Todo H., Kimura E., Safety evaluation of titaniumdioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles, *J. Toxicol. Sci.*, **33**(3), 293-298 (2008).
- 2) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F, Ikarashi Y., Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**(8), 1394-1399 (2010).

2. 学会発表
- 1) 木村 恵理子、藤堂 浩明、杉林 堅次、微粒子酸化チタンの安全性評価に対する一考察、日本薬剤学会 第 23 年会、札幌、2008 年 5 月。
 - 2) 木村 恵理子、藤堂 浩明、杉林 堅次、微粒子酸化チタンの体内分布と毒性評価、第 129 年会 日本薬学会、京都、2009 年 3 月。
 - 3) Kimura E., Todo H., Sugibayashi K., Do titanium dioxide-nanoparticles permeate through skin?, Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, October, 2009.
 - 4) 木村 恵理子、高坂 美加、河野 雄一郎、藤堂 浩明、五十嵐 良明、杉林 堅次、皮膚適用した微粒子酸化チタンの安全性、日本薬剤学会 第 25 年会、P-79、徳島、2010 年 5 月。
 - 5) 河野 雄一郎、木村 恵理子、藤堂 浩明、五十嵐 良明、杉林 堅次、皮膚に暴露されるナノマテリアルの皮膚浸透の可能性；何コの粒子が皮膚に侵入・透過するか？、第 54 回日本薬学会関東支部大会、東京、2010 年 10 月。
 - 6) 高坂 美加、河野 雄一郎、木村 恵理子、藤堂 浩明、五十嵐 良明、杉林 堅次、微粒子酸化チタンの安全性評価、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月。
 - 7) 河野 雄一郎、高坂 美加、木村 恵理子、藤堂 浩明、五十嵐 良明、杉林 堅次、ナノ粒子の皮膚透過性評価、第 131 年会日本薬学会、静岡、2011 年 3 月。
 - 8) 木村 恵理子、河野 雄一郎、高坂 美加、藤堂 浩明、杉林 堅次、ナノ粒子の皮膚浸透性と安全性、日本薬学会 第 131 年会、静岡、2011 年 3 月。

Table 1 Physicochemical properties of FITC-dextrans (FDs).

| FDs | <i>M.W.</i> (kDa) | Stokes diameter, <i>d</i> (nm) | Log <i>d</i> |
|---------|----------------------|-----------------------------------|--------------|
| FD-4 | 3.38 | 2.8 | 0.45 |
| FD-20 | 21.2 | 6.6 | 0.82 |
| FD-40 | 35.6 | 9.0 | 0.95 |
| FD-70 | 69.8 | 12.0 | 1.08 |
| FD-250 | 250 | 21.0 | 1.32 |
| FD-2000 | 2000 | 41.6 | 1.62 |

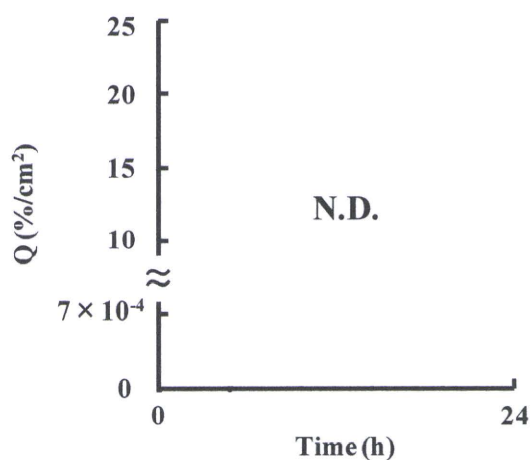


Fig. 1 Time course of changes in cumulative amount of Fluoresbrite[®] that penetrated through intact skin and stripped skin.

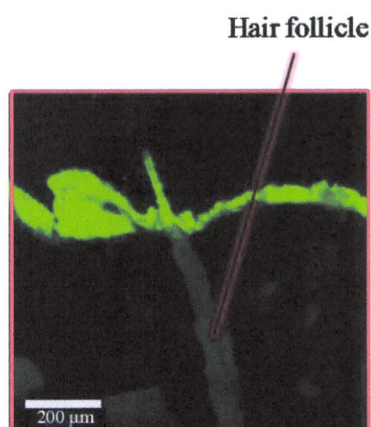


Fig. 2 CLSM image of vertical slice of hairless rat stripped skin 24 h after application of Fluoresbrite[®].

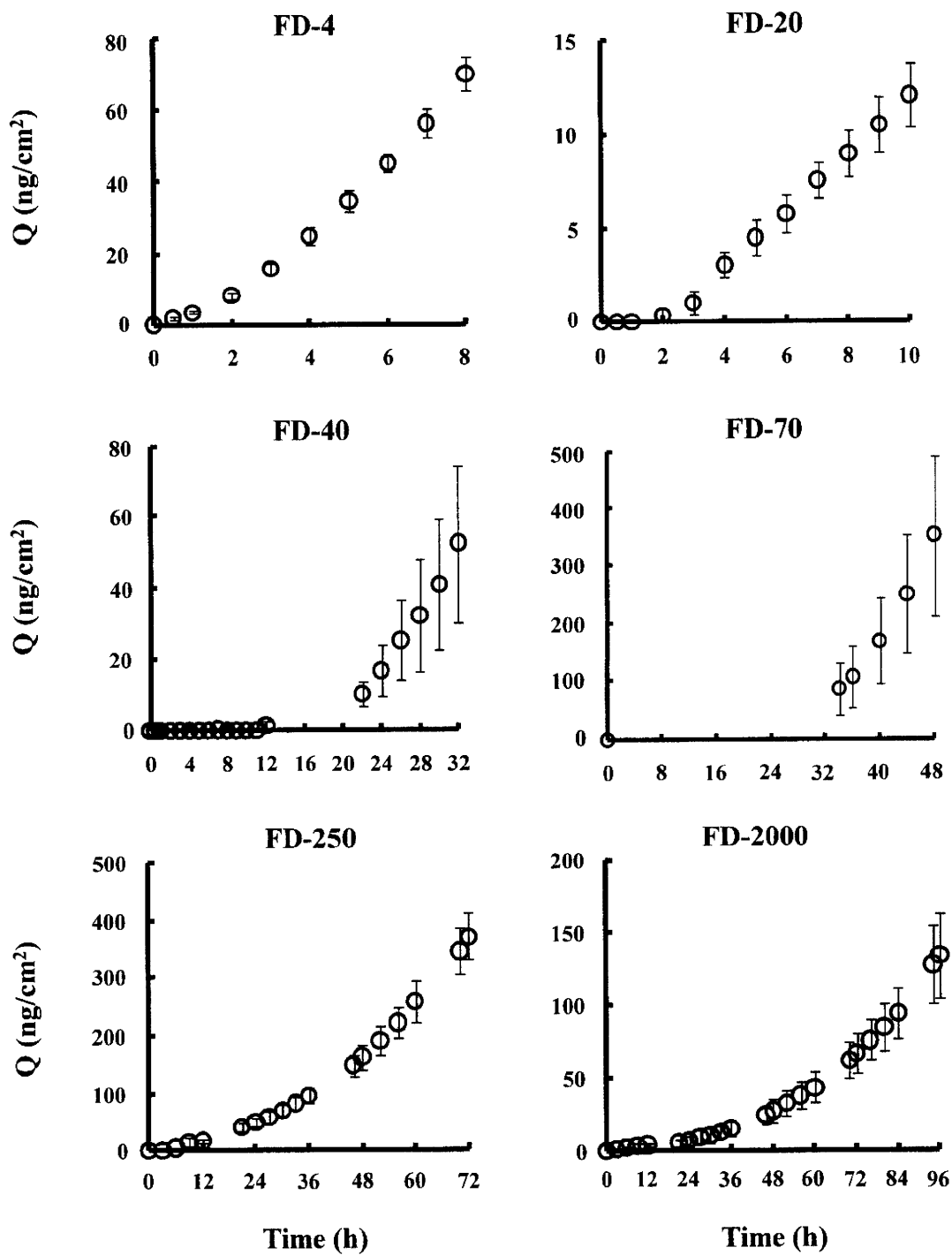


Fig. 3 Time course of changes in cumulative amount of FITC-dextran that penetrated through intact skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

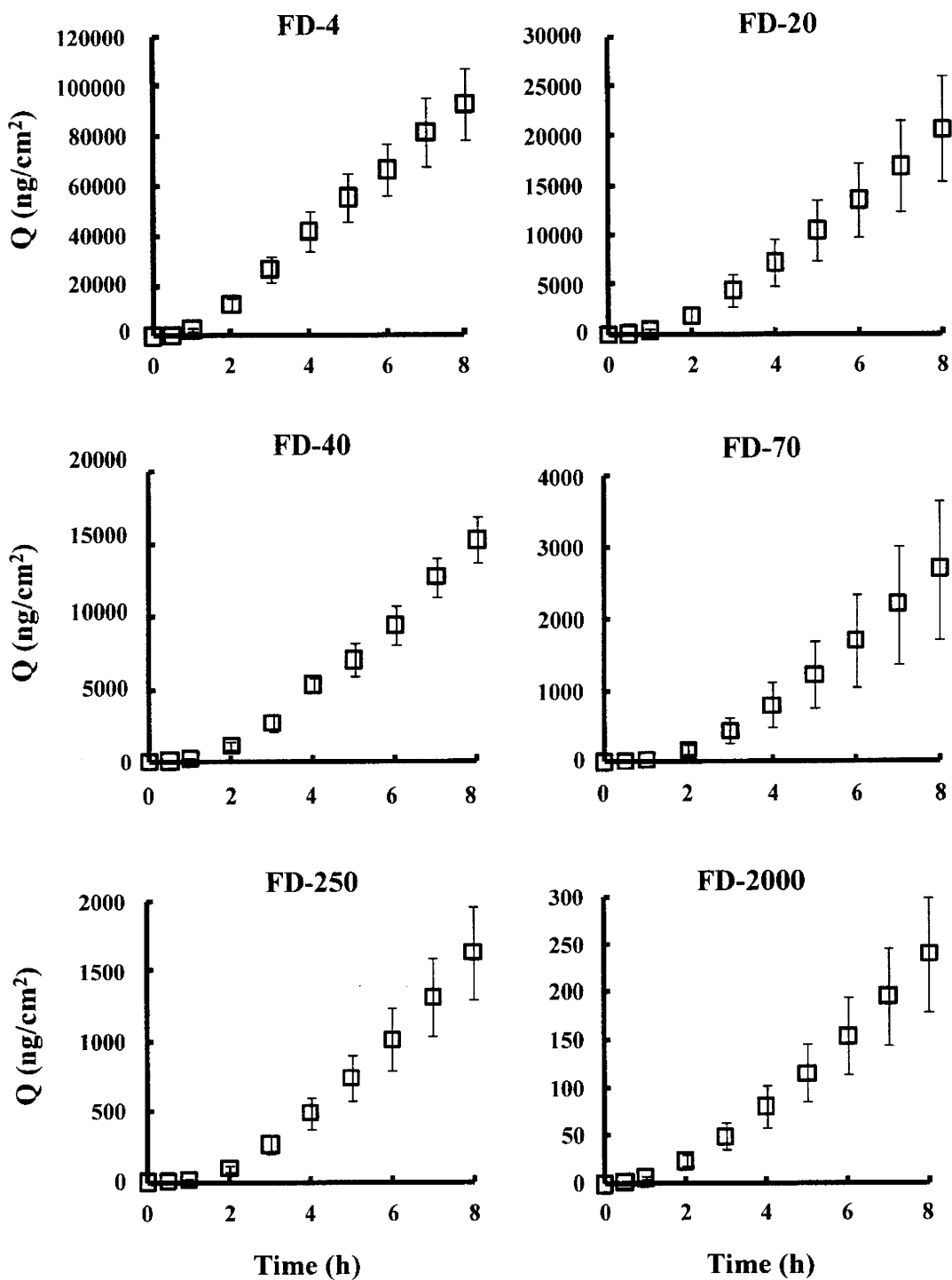


Fig. 4 Time course of changes in cumulative amount of FITC-dextran that penetrated through stripped skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

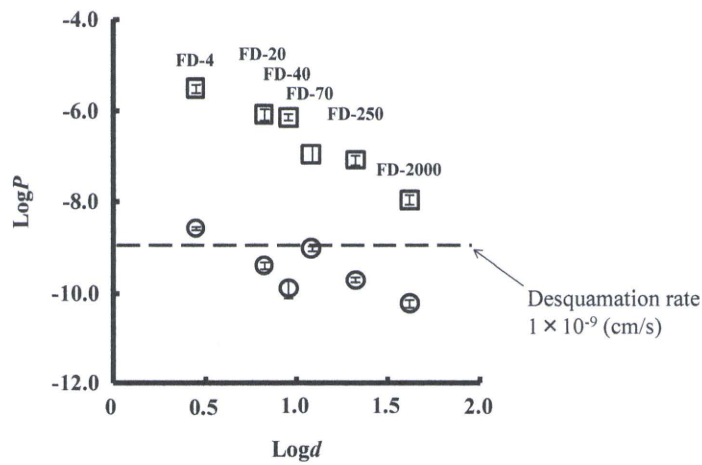


Fig. 5 Relationship between permeability coefficients (P) and Stokes diameter (d) of FITC-dextran. Symbols: \circ ; intact skin, \square ; stripped skin. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

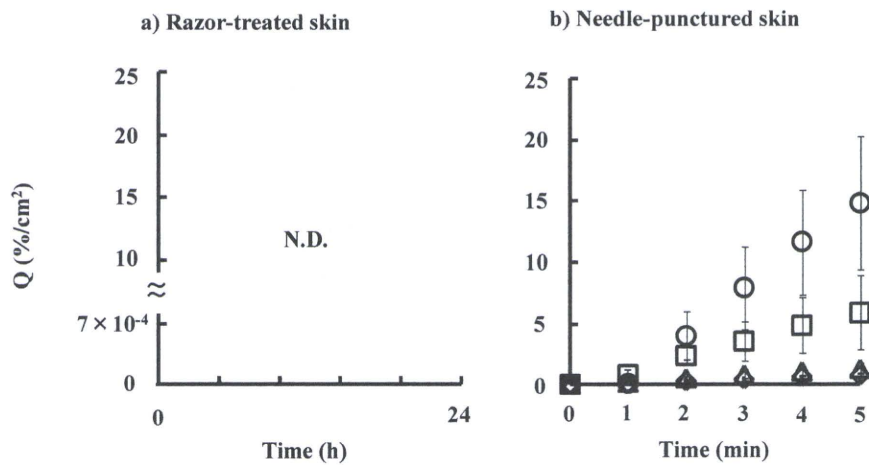


Fig. 6 Time course of changes in the cumulative fraction of Fluoresbrite[®] that penetrated through razor-treated skin (a) and needle-punctured skin (b). Symbols: \circ ; 20G needle (external diameter: 0.9 mm), \square ; 23G needle (0.6 mm), Δ ; 27G needle (0.4 mm), \diamond ; 30G needle (0.3 mm). Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

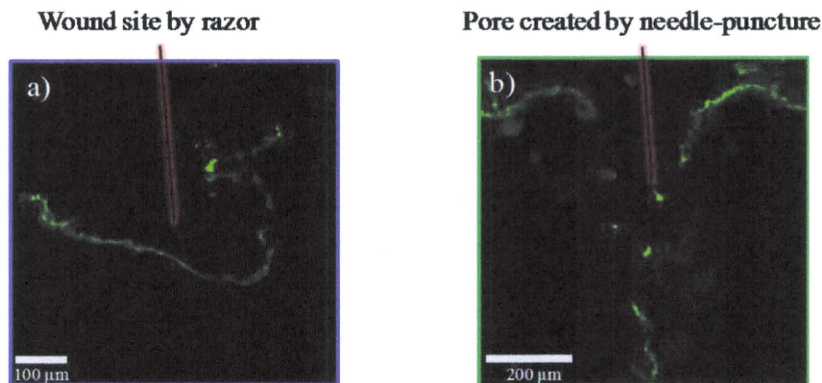


Fig. 7 CLSM image of vertical slice of hairless rat skin after application of Fluoresbrite[®] a) razor-treated skin 5 min after application of Fluoresbrite[®], and b) needle-punctured skin 10 min after application of Fluoresbrite[®].

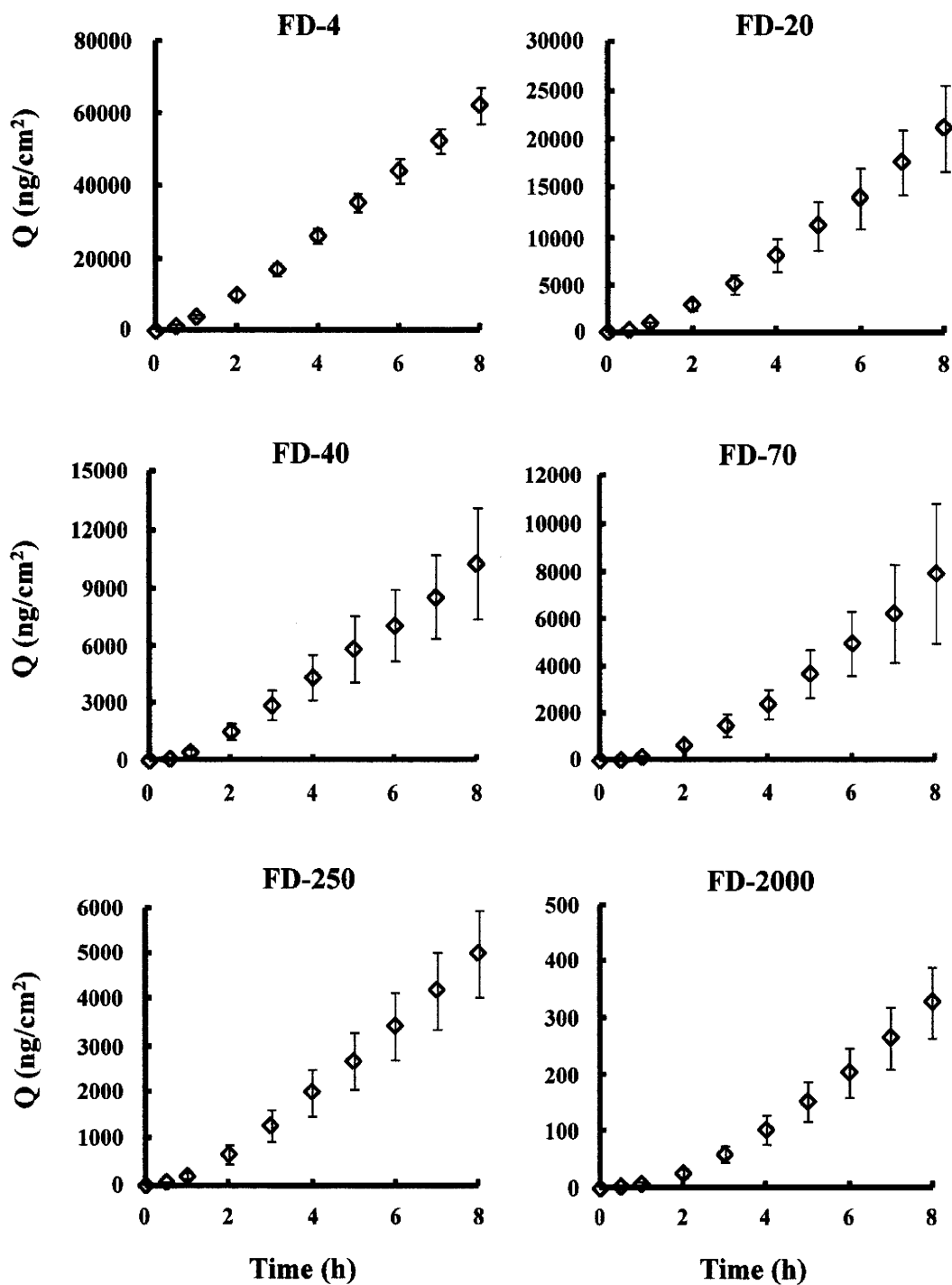


Fig. 8 Time course of changes in cumulative amount of FITC-dextran that penetrated through razor-treated skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

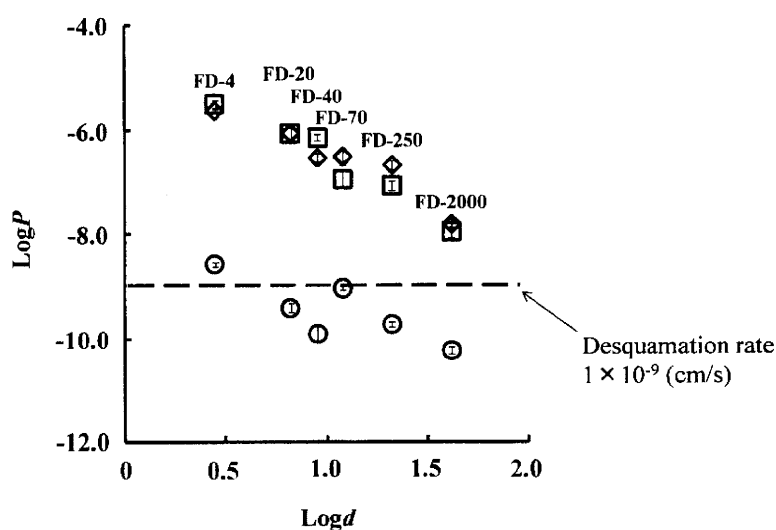


Fig. 9 Relationship between permeability coefficients (P) and Stokes diameter (d) of FITC-dextrans. Symbols: \circ ; intact skin, \square ; stripped skin. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

Table 2 Particles size of TiO_2 particles. Values are the mean \pm S.E. ($n = 3$).

| Particle | Primary particle size (nm) | Size (nm) | | |
|----------|----------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | | DMEM+10% FBS | DMEM | Humedia-KG2 |
| SRT | 15 | 373 \pm 14 | 1050 \pm 146 | 1061 \pm 53 |
| ART | 15 | 853 \pm 130 | 4071 \pm 939 | 3322 \pm 1071 |
| NRT | 15 | 415 \pm 62 | 3908 \pm 679 | 3187 \pm 31 |
| NAT | 6 | 629 \pm 303 | 2091 \pm 216 | 1219 \pm 1563 |

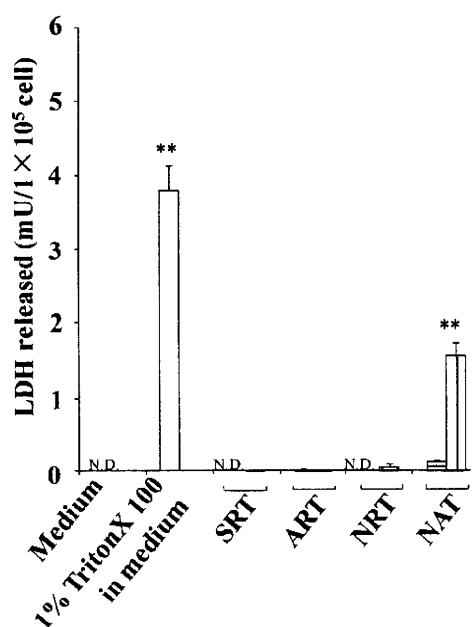
Table 3 Zeta potential of TiO_2 particles. Values are the mean \pm S.E. ($n = 3$).

| Particle | Size (nm) | | |
|----------|-------------------|------------------|-------------------|
| | DMEM+10% FBS | DMEM | Humedia-KG2 |
| SRT | -13.10 \pm 0.50 | -3.50 \pm 1.60 | -31.57 \pm 0.36 |
| ART | -16.17 \pm 0.69 | 0.70 \pm 2.39 | -8.77 \pm 1.58 |
| NRT | -15.27 \pm 1.34 | 0.00 \pm 2.40 | -8.43 \pm 0.17 |
| NAT | -14.93 \pm 0.49 | -10.5 \pm 6.06 | -10.53 \pm 2.09 |

Table 4 Cytotoxicity parameters of HEK and HDF 48 h after application of TiO₂ particles.

| | HEK | | HDF | |
|-----|---------------------------------|----------|---------------------------------|----------|
| | <i>TC</i> ₅₀ (mg/mL) | γ | <i>TC</i> ₅₀ (mg/mL) | γ |
| SRT | 1.12 | 1.01 | 384.28 | 0.24 |
| ART | 0.48 | 0.95 | 64.11 | 0.18 |
| NRT | 0.23 | 0.90 | 45.57 | 0.17 |
| NAT | 0.11 | 1.23 | 0.02 | 0.18 |

a) HEK



b) HDF

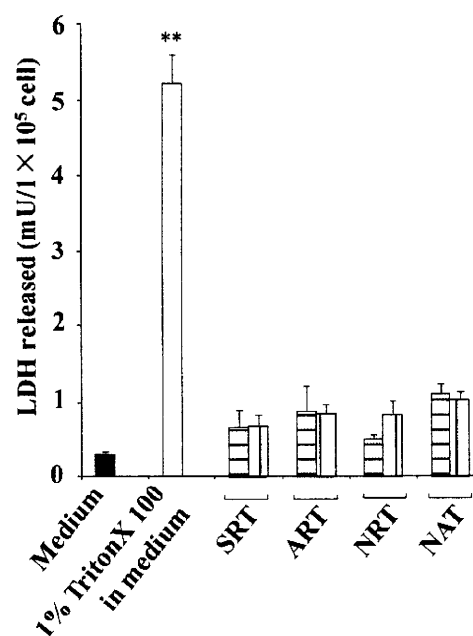


Fig. 10 Effect of TiO₂ particles on the LDH amount released from HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n=3). Statistical analysis was performed by ANOVA assumed with non-repeated measures. **P*<0.05 and ***P*<0.01 was assumed to be significant. Symbols: \square ; TiO₂ conc. 0.01 mg/mL, \blacksquare ; TiO₂ conc. 0.10 mg/mL.

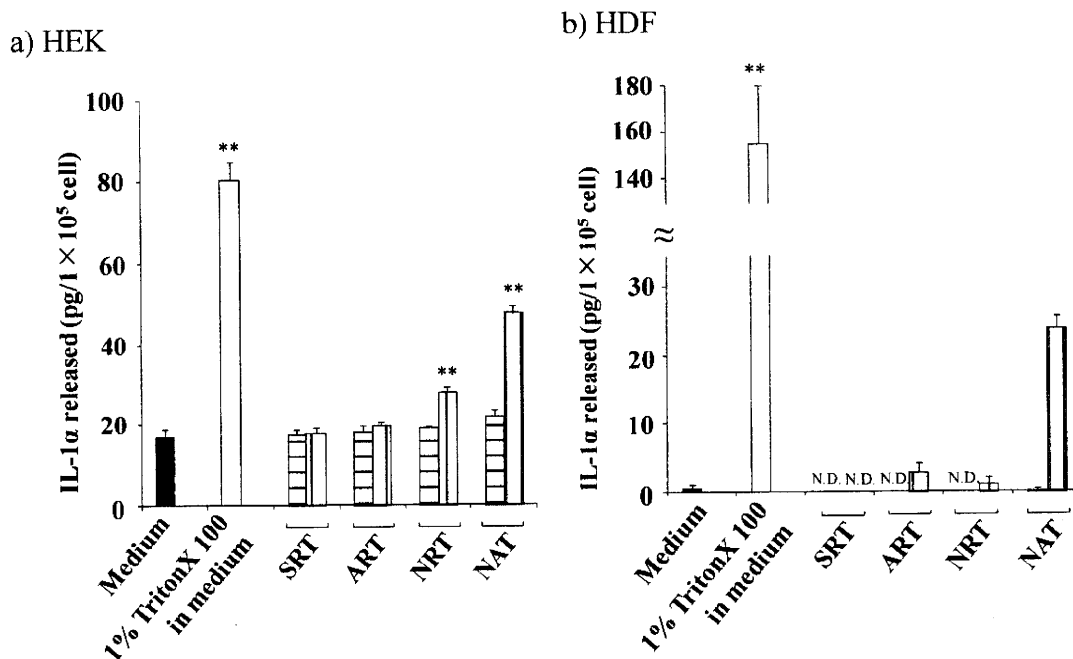


Fig. 11 Effect of TiO₂ particles on the IL-1α amount released from HEK and HDF. Values are the mean ± S.E. (n=3). Statistical analysis was performed by ANOVA assumed with non-repeated measures. **P*<0.05 and ***P*<0.01 was assumed to be significant. Symbols: ▨; TiO₂ conc. 0.01 mg/mL, ▩; TiO₂ conc. 0.10 mg/mL.

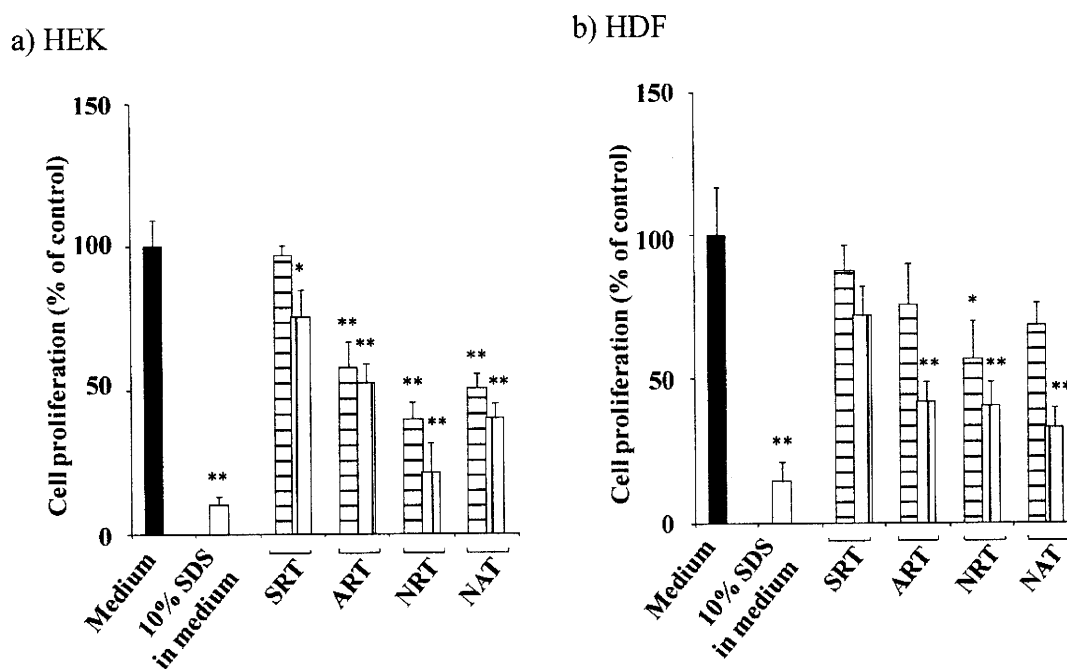
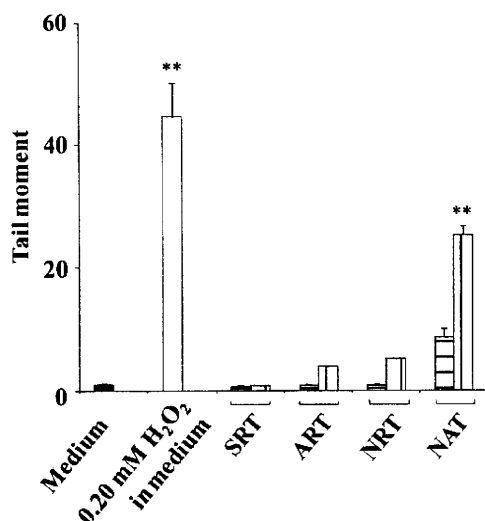


Fig. 12 Effect of TiO₂ particles on the cell proliferation of HEK and HDF. Values are the mean ± S.E. (n=3). Statistical analysis was performed by ANOVA assumed with non-repeated measures. **P*<0.05 and ***P*<0.01 was assumed to be significant. Symbols: ▨; TiO₂ conc. 0.01 mg/mL, ▩; TiO₂ conc. 0.10 mg/mL.

a) HEK



b) HDF

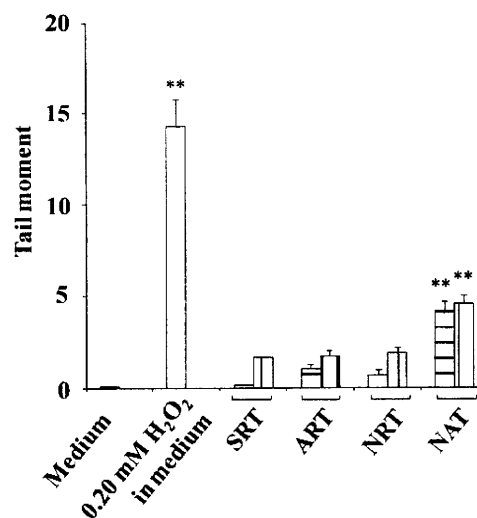


Fig. 13 Effect of TiO₂ particles on the DNA damage of HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n=3). Statistical analysis was performed by ANOVA assumed with non-repeated measures. * P <0.05 and ** P <0.01 was assumed to be significant. Symbols: □; TiO₂ conc. 0.01 mg/mL, ▤; TiO₂ conc. 0.10 mg/mL.

Table 5 Evaluation of skin reaction (scale for scoring).

| 紅斑痂皮形成 | | 浮腫形成 | |
|-----------------------------|----|--------------------------------|----|
| 皮膚反応の程度 | 評点 | 皮膚反応の程度 | 評点 |
| 紅斑なし | 0 | 浮腫なし | 0 |
| ごく軽度の紅斑 (やっと認められる程度) | 1 | ごく軽度の浮腫 (やっと認められる程度) | 1 |
| 明らかな紅斑 | 2 | 明らかな紅斑 (周囲と明らかに区分可能) | 2 |
| 中等度から強い紅斑 | 3 | 中等度浮腫 (1 mm 程盛り上がっている) | 3 |
| 深紅色の強い紅斑に軽い痂皮形成 (障害は深部に) | 4 | 強い浮腫 (1 mm 以上盛り上がり、周囲にも広がる) | 4 |

Table 6 Effect of non-coated rutile type TiO₂ particles exposure on the skin sensitization.

| | Fractional response* | Mean response | S.D. | |
|------|----------------------|---------------|------|------|
| 24 h | Control | 2/4 | 0.75 | 0.96 |
| | DNCB | 4/4 | 4.00 | 1.15 |
| | Sudan I | 4/4 | 2.00 | 0.82 |
| | TiO ₂ 5% | 3/4 | 0.75 | 0.50 |
| | TiO ₂ 25% | 1/4 | 0.25 | 0.50 |
| 48 h | Control | 2/4 | 0.50 | 0.58 |
| | DNCB | 4/4 | 4.00 | 1.83 |
| | Sudan I | 4/4 | 1.75 | 1.50 |
| | TiO ₂ 5% | 4/4 | 1.75 | 0.96 |
| | TiO ₂ 25% | 2/4 | 0.50 | 0.58 |

*Fractional response (= positive/total)