

最終的には噴霧直後とは異なるマクロファージが誘導されることが示唆される。ナノ材料によっては、発がん促進作用をもつマクロファージが誘導され続ける可能性もあり、ナノ材料の肺内噴霧による肺発がん性の検索には、マクロファージの誘導メカニズムについて詳細な検討が必要である。

マクロファージには、炎症に関与する M1 型や腫瘍の増殖促進作用を有する M2 型があることが知られている。本研究では、肺内噴霧によって誘導されたマクロファージのうち、M2 型がどの程度誘導されているのか検索するため、そのマーカーである CD163 および CD204 を用いた。その結果 CD163 陽性マクロファージはほとんど観察されず、CD204 陽性マクロファージが多くても 50% であった。これらの結果から噴霧直後は炎症や腫瘍の促進作用をもつ様々なタイプのマクロファージが誘導され、噴霧後、長期間経過するとマクロファージの多様性が減弱していることが示唆された。これらのマクロファージは共通の性質を有すると考えられる。従って、残存したマクロファージが肺胞上皮の増殖促進作用を示し肺発がん促進機構を惹起するかどうか、吸入曝露後長期間経過して発生するリスクの評価に重要であると考えられる。

E. 結論

本研究により以下のことが明らかとなった。

- 1) いずれの群でも、噴霧直後にマクロファージが誘導と肺の炎症像が観察されたが、30 日経過すると炎症は消退しマクロファージの数も減少した。
- 2) 噴霧直後に誘導された CD204 陽性マクロファージは 30 日経過するとその数は対照群と同じ程度にまで減少した。
- 3) 噴霧直後に、クロシドライトを貪食したマクロファージのうち約 80% が IL-1 β を分泌していたが、30 日経過するとほとんどが分泌しなかった。

このように、ナノ材料の吸入曝露による肺発がん機構に関与するマクロファージの反応は、噴霧直後と噴霧後長期間経過した時点では異なる可能性があり、曝露直後のリスク評価のみならず曝露後長期間経過した時点でのリスク評価の必要性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Sagawa, M. Futakuchi, J. Xu, K. Fukamachi, Y. Sakai, Y. Ikarashi, T. Nishimura, M. Suzui, H. Tsuda, A. Morita. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. *The Journal of toxicological sciences* 2012; 37: 317-327. doi.
2. A. Takagi, A. Hirose, M. Futakuchi, H. Tsuda, J. Kanno. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer science* 2012; 103: 1440-1444. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02318.x.
3. J. Xu, M. Futakuchi, H. Shimizu, D.B. Alexander, K. Yanagihara, K. Fukamachi, M. Suzui, J. Kanno, A. Hirose, A. Ogata, Y. Sakamoto, D. Nakae, T. Omori, H. Tsuda. Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer science* 2012; 103: 2045-2050. doi: 10.1111/cas.12005.
4. K. Fukamachi, H. Tanaka, Y. Sakai, D.B. Alexander, M. Futakuchi, H. Tsuda, M. Suzui. A novel reporter rat strain that expresses LacZ upon Cre-mediated recombination. *Genesis* 2013. doi: 10.1002/dvg.22371.
5. M. Futakuchi. Animal model of lung metastasis of hepatocellular carcinoma; A tool for the development of anti- metastatic therapeutics. *Journal of Cancer Therapy* 2013; 4 420-425. doi: 10.4236/jct.2013.42A051.
6. M. Futakuchi, R.K. Singh. Animal model for mammary tumor growth in the bone microenvironment. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 2013. doi: 10.1007/s12282-013-0439-5.
7. Y. SAKAI, K. FUKAMACHI, M. FUTAKUCHI, H. HAYASHI, M. SUZUI. Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced by tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells. *ONCOLOGY REPORTS* 2013. doi: 10.3892/or.2013.2441.

2. 学会発表

1. 酒々井眞澄, 沼野琢旬, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸. 多層カーボンナノチューブの肺ばく露 2 週間および 52 週間経過後の影響. 第 29 回日本毒性病理学会 2013 年 1 月 31 日、2 月 1 日
2. 深町勝巳, 大嶋浩, 二口充, 津田洋幸, 酒々井眞澄. ラット肺がんモデルにおける血清診断マーカー. 第 29 回日本毒性病理学会 2013 年 1 月 31 日、2 月 1 日
3. 二口充, 徐結苟, 深町勝巳, 津田洋幸, 酒々井眞澄. ナノ材料の吸入曝露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索. 第 29 回日本毒性病理学会 2013 年 1 月 31 日、2 月 1 日
4. 酒々井眞澄, 徐結苟, 深町勝巳, 二口充, 菅野純, 広瀬明彦, 津田洋幸. 多層カーボンナノチューブ (CNT) の肺組織、細胞増殖および遺伝子発現への影響解析. 第 29 回日本毒性病理学会 2013 年 1 月 31 日、2 月 1 日
5. 深町勝巳, 二口充, 徐結苟, 井上義之, 高月峰夫, 酒々井眞澄, 津田洋幸. フラーレンの気管内噴霧による肺発がん促進作用. 第 29 回日本毒性病理学会 2013 年 1 月 31 日、2 月 1 日
6. 二口充, 徐結苟, 井上義之, 高月峰夫, 津田洋幸, 酒々井眞澄. カーボンブラックの気管内噴霧により誘発された肺胞過形成様病変. 第 29 回日本毒性病理学会 2013 年 1 月 31 日、2 月 1 日
7. 池永周平, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. カーボンナノチューブ (CNT) の長さの違いによる肺組織への影響. 156 回名古屋市立大学医学会例会, 2012 年 6 月 19 日. 名古屋
8. 酒々井眞澄, 深町勝巳, 二口充, 森脇健太. 定量的構造活性相関によるパルミチン酸誘導体の抗がん活性スクリーニング. がん予防大会 2012 2012 年 6 月 22 日、23 日、岐阜
9. 酒々井眞澄, 徐結苟, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸. 長さの異なる多層カーボンナノチューブの肺組織、細胞増殖および遺伝子発現への影響. 第 39 回日本毒性学会 2012 年 7 月 17 日-19 日 仙台.
10. 深町勝巳, 徐結苟, 二口充, 橋爪直樹, 井上義之, 高月峰夫, 津田洋幸, 酒々井眞澄. フラーレンの肺内噴霧による肺発がんプロモーション作用の検討. 第 39 回日本毒性学会 2012 年 7 月 17 日-19 日 仙台.
11. 沼野琢旬, 徐結苟, 二口充, 深町勝巳, 清水秀夫, 古川文夫, 酒々井眞澄, 津田洋幸. ルチル型とアナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン (TiO₂) 気管内噴霧によるラット肺組織に対する影響. 第 39 回日本毒性学会 2012 年 7 月 17 日-19 日 仙台.
12. 二口充, 徐結苟, 井上義之, 高月峰夫, 津田洋幸, 酒々井眞澄. ナノサイズカーボンブラックの肺内噴霧により誘発された肺胞過形成. 第 39 回日本毒性学会 2012 年 7 月 17 日

-19 日 仙台

13. M. Futakuchi, J. Xu, Y. Inoue, M. Takatsuki, H. Tsuda, S. Masumi. Reactive Pulmonary Hyperplasia Induced by Intra Pulmonary Spray of Nano-Sized Carbon Black Particles. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology July, 17-20, 2012, Sendai, Japan.
14. 池永周平, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブ (CNT) の長さの違いにおける遺伝子発現への影響. 第 31 回分子病理学研究会 2012 年 7 月 22 日
15. 池永周平, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の長さの違いにおける遺伝子発現への影響. 平成 24 年度がん若手研究者ワークショップ 2012 年 9 月 15 日
16. T. Numano, J. Xu, M. Futakuchi, K. Fukamachi, M. Suzui, H. Tsuda. Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2012; Sep.19-21, Sapporo.
17. S. IKENAGA, K. FUKAMACHI, M. FUTAKUCHI, H. TSUDA, M. SUZUI. Effects of carbon nanotubes on rat lung tissues, cell proliferation, and gene expression. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2012; Sep.19-21, Sapporo.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

PCT 出願

「アスベスト曝露マーカー及びその用途」

出願番号 PCT/JP2012/056321

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究分担報告書

研究課題名：カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究

研究分担課題名：カーボンナノマテリアルによる肺毒性と発がん作用の中期評価法と
その分子機序解析法の開発

研究分担者 津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

研究協力者 飯郷 正明 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分野 研究員

徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

研究要旨

単層/多層カーボンナノチューブ (S/MWCNT)、フラーレン (C60) 等の炭素ナノマテリアルについて、中・短期の有害作用検出システムの確立を目的として、ラットを用い全身吸入曝露の代替法として当該研究班で開発した経気管内噴霧 (Transtracheal intra-pulmonary spraying, TIPS) 投与方法を用いて、毒性、発がん性の探索とその機序に基づく短・中期 *in vivo-in vitro* 評価モデルの構築を行った。

1) 発がん 2 段階モデルでは PF68 分散 MWCNT-M (原体) には明らかな肺胞腺がんプロモーション作用はなかった。2) ラットへの短期投与 (9 日に 1.25mg) による炎症/免疫反応/増殖性病変の解析では、MWCNT-M、MWCNT-N は crocidolite (青アスベスト) と同様に胸腔内に移行して胸膜中皮の過形成増殖を誘発した。3) 胸腔洗浄液上清にはヒト中皮腫細胞に対する増殖促進作用があり、そのペレットの解析ではマクロファージを主体とする炎症細胞と MWCNT が見出された。さらに正常 MWCNT を貪食したラットの初代培養マクロファージは、培養液中に肺がん細胞と中皮腫細胞に対する増殖作用が見出された。

この結果は、検体が肺胞から胸腔に移動して中皮腫を発生させる可能性を示唆する。以上から、TIPS 投与方法を用いて、S/MWCNT の有害作用とくに発がん性について、マクロファージの関与を明らかにした。また、発がん標的は肺胞上皮よりも、胸膜中皮を考慮に入れる必要がある。さらに中期評価法として発がんプロモーション試験法、2 週以内の短期 *in vivo* 試験、およびマクロファージの炎症・障害作用への関与を解析する *in vitro* 試験法を組み合わせた機序 (MOA) に基づく方法が有用であることを示した。

A. 研究目的

炭素ナノマテリアルの有害作用についての知見は未だ乏しく、とくに呼吸器における慢性毒性と発がん性の評価は未だ得られていない。その理由は、ヒトの主な曝露経路を想定した全身吸入曝露

試験には、高価な専用設備と長期試験の実施には莫大な費用が必要となるからである。これを補完する信頼度の高い中・短期の毒性・発がん性の評価法の開発が求められている。

本研究では、炭素系ナノマテリアルを被検物質と

して、ラットを用いてこれらの短期有害作用（急性、亜急性毒性、免疫毒性）および慢性毒性・発がん性をより短期（20～40週程度）に明らかにし、その機序（mechanism of action, MOA）を重視した一連の *in vivo-in vitro* 評価システムの開発を行った。被検物質は単層カーボンナノチューブ（SWCNT）及び製造会社の異なる各種多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を用いた。

B. 研究方法

ラットを用いて TIPS 投与方法による 1) 20～40 週の中期肺毒性・発がんプロモーション作用検出系の開発、2) 9～14 日間の肺と胸膜腔の炎症、増殖病変等の分子解析試験、3) 初代培養マクロファージ・気管支上皮、および不死化がん細胞等に被検物質を曝露させた場合のサイトカイン産生、免疫反応、増殖反応の機序把握による一連の試験系の開発を行った。

1. 発がん 2 段階モデルによるプロモーション作用または MWCNT のみの長期投与の検討
10 週齢雌雄 SD または F344 系ラットに肺標的発がん物質の N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を 2 週間飲水投与し、その 2 週後に麻酔下で被検物質を 250 及び 500µg/ml (=250 および 500ppm) にて 1 回あたり 0.5ml を 2 週に 1 回肺 TIPS 投与し、40 週後（18 回投与）に屠殺剖検した。被検物質は MWCNT-M「あり姿（製造梱包されたままの原体）」（コポリマー PF68 分散）を用い全身臓器への分布と、DHPN 誘発肺胞上皮過形成と腺腫、腺がん発生のプロモーション作用の検索を行った。

2. 短期投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

「あり姿（濾過、分画を行わない原体）」の SWCNT-N、MWCNT-M を 0.1% Tween 含有生食に分散して、250 及び 500µg/ml (=250 および 500ppm) をラットに 9 日間に 5 回投与し、最終投与から 6 日、30 日後に麻酔下で開腹し、横隔膜より胸腔内に DMEM 細胞培養液 10mL を注入して洗浄液を吸引採取した。洗浄液遠沈ペレットを 4%パラフ

ォルム固定パラフィンブロックとした。肺の光顕および電顕標本を作成し、炎症反応と被検物質のマクロファージ取り込みを検討した。さらに被検物質の肺、肝、腎、脾、脳、リンパ節および全身臓器への移動について偏光顕微鏡、走査および透過電顕にて、局在観察を行った。また、肺の一部は生化学用に冷凍保存した。陽性対照は同用量の crocidolite (IARC Group 1) を用いた。」

3. *in vitro* 系による食食マクロファージを介する炎症と培養液の不死化細胞に対する増殖活性、気管上皮の障害、および免疫担当細胞反応の解析

1) ラット胸水を採取して、その上清のヒト不死化中皮細胞、悪性中皮腫細胞に対する増殖活性を検討した。

2) マクロファージの活性の解析：正常ラットにチオグリコレート（6% 溶液 0.5ml/rat）を TIPS 投与によって肺胞マクロファージを誘導した後肺からマクロファージを濾過採取し、一定数を RPMI 1640（10% FBS）培地に移し、その培養液中に「MWCNT-M、MWCNT-N を 10ppm の濃度で加えて、24 時間後に培養上清を採取した。その培養上清をヒト肺がん細胞株 A549、ヒト中皮細胞等の培養液に加えて増殖活性を観察した。

4. データのヒトへの外挿とリスク評価

以上の実験より、SWCNT、MWCNT、フラーレンについて、陽性対照の CB（肺発がん物質）、MWCNT-M（中皮腫発がん物質）およびアスベスト（肺腺がんと中皮腫発がん物質）と比較して毒性および発がんプロモーション作用の機序に関与する因子を解析し、最終的には動物より得られたデータからヒトリスクへの外挿を試みた。

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、各班員は動物実験において我が国の「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、遺伝子組換え実験の承認等の審査を経て研究を実施した。ヒト材料を用いる実験は実施しなかった。

C. 研究結果

1. 発がん2段階モデルによるプロモーション作用および長期投与の影響

「あり姿」MWCNT-M：氷砂糖溶液に分散した場合には明らかなプロモーション作用はなかったため、今回は分散性に優れかつ肺毒性（炎症）の少ないPF-68コポリマーにて再実験した。その結果、可逆性の肺胞上皮過形成の増加が見られたが明らかなプロモーション作用はなかった。

2. 短期（9～14日）投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

1) 肺と胸腔内炎症および多臓器への移動：
MWCNT-M、MWCNT-N、crocidoliteを投与した肺胞内ではMWCNTを貪食したマクロファージ、好中球、リンパ球が混在する線維化炎症巣が散在性に発生した。胸膜洗浄液の炎症細胞数（主としてマクロファージ、他好中球、リンパ球）は、対照群で $7.35/10^4\text{ml}$ に対して、MWCNT-Nは11.20、MWCNT-Mは13.95、crocidoliteは12.13で有意に増加した（ $p<0.05\sim 0.001$ ）。MWCNTは胸腔生食洗浄液ペレットと縦隔リンパ節に最も多く、肝、腎、脳にも少数観察された。肺胞からリンパ流を介して縦隔に入ったと考えられた。また臓（肺）側胸膜中皮細胞の過形成増殖巣が発生し、中皮8個以上からなる過形成巣数のPCNA値が対照の9～10倍（ $p<0.001$ ）に増加した。なお、SWCNT-Nは細く、偏光活性が無いために局在の正確な把握が困難であった。

2) ヒト不死化中皮細胞培養液中に胸腔浸出液の上清を加えると増殖活性（1.2～1.4倍）が見出された（Xu, et al., Cancer Science, vol.103, p2045, 2012）。

3. *in vitro*系による貪食マクロファージを介する炎症と培養液の不死化細胞に対する増殖活性、ならびに気管上皮の障害、免疫担当細胞反応の解析

MWCNT-M、MWCNT-N、C60の5回/9日のTIPS投与によるサイトカインアレイ解析：*In vivo*にて観察された胸膜中皮の過形成増殖の機序解析のために、正常ラット肺より初代マクロファージを採取して培養液に移して、MWCNT-M、MWCNT-Nおよびcrocidoliteに曝露させた培養液上清、およびこれらの物質を*in vivo*で投与したラットの胸水洗浄液上清は、いずれもヒト不死化中皮細胞、悪性中皮腫細胞に対する増殖活性を、両系において対照の1.3～1.4倍に増加させ、明らかな増殖活性を示した。

D. 考察

この研究の難しいところは、被検物質として扱う炭素ナノマテリアルの生体作用を明らかにしつつ評価法の開発を同時に行うことにある。そのために、以下の3種の実験からなる枠組みを設けて有害作用を観察しつつ評価系の開発を行った。ラットへの投与は検体を肺内に効率よく送達できるTIPS法を用いた。

その結果、

（1）DHPN投与後に「あり姿」MWCNT-MをPF68に懸濁して25、250、500ppmを40週投与した実験を2回実施したが、肺胞上皮腫瘍の発生に明らかなプロモーション作用は見られなかった。前回の結果と併せ、再度確認する必要がある。胸腔と全身臓器の分布を観察したところ、胸膜洗浄液と縦隔リンパ節に多く、肝、腎、脳にも少量見出されたことから、リンパ、血液を介して肺から全身に移動することが明らかとなった。また臓（肺）側胸膜中皮細胞の増殖巣が発生したことは、MWCNTの腹腔内投与による中皮腫の発生の機序の一端を担うものと考えられた。また、アスベスト吸入による悪性中皮腫の発生における初期変化とも考えられる。したがってMWCNTの発がん標的は肺胞上皮よりはむしろ胸膜中皮である可能性がある。

E. 結論

TIPS投与法を用いて、カーボンナノマテリアルの

有害作用とくに発がん性について、マクロファージの関与を明らかにした。また、発がん標的は肺胞上皮に加え、胸膜中皮も考慮に入れる必要が充分あることがわかった。さらに通常の2年吸入曝露試験に替わる評価法として40週以内の発がんプロモーション試験法、有害作用・発がん性機序の解析法として2週以内の *in vivo* 試験、およびマクロファージの関与を解析する *in vitro* 試験法を組み合わせた MOA を考慮する方法が実地に有用であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xu J, Futakuchi M, Alexander DA, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. Archives of Toxicology, in press 2013.
- 2) Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H. Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. Cancer Sci 103: 2045-50, 2012.
- 3) Takagi, A., Hirose, A., Futakuchi, M., Tsuda, H., and Kanno, J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. Cancer Sci. Cancer science 103: 1440-1444, 2012.

2. 学会発表

- 1) T. Numano, J. Xu, M. Futakuchi, K.

Fukamachi, F. Furukawa, M. Suzui, H. Tsuda. Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.

- 2) 酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブの肺ばく露2週間および52週間経過後の影響. 第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つくば: 2013年1月31日
- 3) 二口充、徐結苟、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄. ナノ材料の吸入曝露後、長時間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索. 第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つくば: 2013年1月31日
- 4) 酒々井眞澄、徐結苟、深町勝巳、二口充、菅野純、広瀬明彦、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブ (CNT) の肺組織、細胞増殖および遺伝子発現への影響解析. 第29回日本毒性病理学会 2013年1月31日、2月1日
- 5) 深町勝巳、二口充、徐結苟、井上義之、高月峰夫、酒々井眞澄、津田洋幸. フラレーンの気管内噴霧による肺発がん促進作用. 第29回日本毒性病理学会 2013年1月31日、2月1日
- 6) 二口充、徐結苟、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄. カーボンブラックの気管内噴霧により誘発された肺胞過形成様病変. 第29回日本毒性病理学会 2013年1月31日、2月1日
- 7) 沼野琢旬、徐結苟、二口充、深町勝巳、酒々井眞澄、津田洋幸. アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタニウムの肺組織および培養マクロファージへの影響. 第71回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012年9月19日
- 8) 池永周平、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. カーボンナノチューブのラット肺組織、細胞増殖、遺伝子発現の影響.

第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012 年 9 月 19 日

- 9) 深町勝巳、大嶋浩、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. ラット肺がんモデルにおける血清診断マーカー. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012 年 9 月 20 日
- 10) 酒々井眞澄、池永周平、深町勝巳、二口充、徐結苟、津田洋幸. カーボンナノ材料の肺障害性の検討. 第 27 回発癌病理研究会; 修善寺: 2012 年 8 月 28 日
- 11) 酒々井眞澄、徐結苟、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 長さの異なる多層カーボンナノチューブの肺組織、細胞増殖および遺伝子発現への影響. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012 年 7 月 17 日
- 12) 二口充、徐結苟、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄. ナノサイズカーボンブラッグの肺内噴霧により誘発された肺胞過形成. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012 年 7 月 18 日
- 13) 深町勝巳、徐結苟、二口充、橋爪直樹、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄. フラーレンの肺内噴霧による肺発がんプロモーション作用の検討. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012 年 7 月 18 日
- 14) 沼野琢旬、徐結苟、二口充、深町勝巳、清水秀夫、古川文夫、酒々井眞澄、津田洋幸. ルチル型とアナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン (TiO₂) 気管内噴霧によるラット肺組織に対する影響. 第 39 回日本毒

性学会 2012 年 7 月 17 日-19 日 仙台.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得状況

PCT 出願

「アスベスト曝露マーカー及びその用途」

出願番号 PCT/JP2012/056321

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sagawa Y, Futakuchi M, Xu J, Fukamachi K, Sakai Y, Ikarashi Y, Nishimura T, Suzui M, Tsuda H, Morita A.	Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice.	J Toxicol Sci	37	317-327	2012
Takagi, A., Hirose, A., Futakuchi, M., Tsuda, H., and Kanno, J.	Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice.	Cancer science.	103	1440-1444	2012
Ohba t, Sawada E, Suzuki Y, Yamamura, H, Ohya S & Imaizumi Y.	Ca ²⁺ influx facilitated by membrane hyperpolarization due to ATP-sensitive K ⁺ channel openers enhances ciliary beating in mouse airway ciliated cells.	J Pharmacol Exp Ther		投稿、改訂中	2012
Xu, J., Futakuchi, M., Shimizu H., Alexander, D.B., Yanagihara, K., Fukamachi, K., Suzui, M., Kanno, J., Hirose, A., Ogata, A., Sakamoto, Y., Nakae, D., Omori, T., and Tsuda, H.	Multi-walled Carbon Nanotubes Translocate into the Pleural Cavity and Cause Hyperplasic Visceral Mesothelial Proliferation.	Cancer Science.	103	2045-2050	2012
Ohba t, Xu J, Sawada E, Suzuki Y, Tsuda H & Imaizumi Y.	Interference of carbon-nanotubes on functional activities in primary cultured airway ciliary cells of the mice.			投稿準備中	2012
Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Sumida K, Deguchi Y, Sukata T, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Tsuda H.	Circulating MicroRNAs in Serum of Human K-ras Oncogene Transgenic Rats With Pancreatic Ductal Adenocarcinomas.	Pancreas.	41 (7)	1013-1018	2012

吉岡智史、西村一彦、高村岳樹、酒々井眞澄、津田洋幸、板橋 豊	「キラル高速液体クロマトグラフィ/大気圧化学イオン化質量分析法によるグリシドール脂肪酸エステル光学異性体分析」	分析化学	61 (9)	783-790	2012
Masuda M, Toh S, Wakasaki T, Suzui M, Joe AK.	Somatic evolution of head and neck cancer-biological robustness and latent vulnerability.	Mol Oncol	7	14-28	2012
Alexander DB, Iigo M, Yamauchi K, Suzui M, Tsuda H.	Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids.	Biochem Cell Biol	90	279-306	2012
Fukamachi K, Tanaka H, Sakai Y, Alexander DB, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M.	A novel reporter rat strain that expresses LacZ upon Cre-mediated recombination.	Genesis	51	268-274	2012
Futakuchi M.	Animal model of lung metastasis of hepatocellular carcinoma; A tool for the development of anti-metastatic therapeutics.	Journal of Cancer Therapy	4	420-425	2013
Futakuchi M, Singh RK.	Animal model for mammary tumor growth in the bone microenvironment.	Breast cancer (Tokyo, Japan)		in press	2013
Xu J, Futakuchi M, Alexander DA, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H.	Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles.	Archives of Toxicology		in press	2013
Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Hayashi H, Suzui M.	Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells.	Oncol Rep	30	64-70	2013

Yabushita S., Fukamachi K., Tanaka H., Fukuda T., Sumida K., Deguchi Y., Mikata K., Nishioka K., Kawamura S., Uwagawa S., Suzui M., Alexander DB., and Tsuda H.	Metabolomic and transcriptomic profiling of human <i>K-ras</i> oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas.	Carcinogenesis		in press	2013
Yabushita S., Fukamachi K., Kikuchi F., Ozaki M., Miyata K., Sukata T., Deguchi Y., Tanaka H., Kakehashi A., Kawamura S., Uwagawa S., Wanibuchi H., Suzui M., Alexander DB., and Tsuda H.	Twenty-One Proteins Up-Regulated in Human <i>H-ras</i> Oncogene Transgenic Rat Pancreas Cancers are Up-Regulated in Human Pancreas Cancer.	Pancreas		in press	2013

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Original Article

Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice

Yoko Sagawa^{1,2}, Mitsuru Futakuchi², Jiegou Xu^{2,3}, Katsumi Fukamachi²,
Yuto Sakai^{2,4}, Yoshiaki Ikarashi⁵, Tetsuji Nishimura⁵, Masumi Suzui², Hiroyuki Tsuda³
and Akimichi Morita¹

¹Department of Geriatric and Environmental Dermatology and ²Department of Molecular Toxicology,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, 1-Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku,
Nagoya 467-8601, Japan

³Nanotoxicology Project Laboratory, Nagoya City University and ⁴Department of Drug Metabolism and Disposition,
Nagoya City University Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
3-1 Tanabedohri, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

⁵Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received December 5, 2011; Accepted December 27, 2011)

ABSTRACT — Nano-sized titanium dioxide particles (TiO₂) are widely used in cosmetics, sunscreens and food additives. We previously reported that topical application of non-coated rutile type TiO₂ did not exhibit a promoting effect on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats, and that this was likely due to lack of penetration of TiO₂ into the epidermis. In the present study, we examined the promoting effect of silicone coated TiO₂ (sTiO₂) suspended in silicone oil and non-coated TiO₂ (ncTiO₂) suspended in Pentalan 408 on a two-stage skin chemical carcinogenesis model: sTiO₂ suspended in silicon oil forms smaller particles than ncTiO₂ suspended in Pentalan because of the smaller sizes of aggregates formed. The model used skin carcinogenesis-sensitive human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic mice (rasH2) and rats (Hras128) and their wild-type counterparts and CD-1 mice to test the effects of topical application of TiO₂. Animals were initially treated with a single dose of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) and then with 0, 10, or 20 mg sTiO₂ (mice) or 0, 50, or 100 mg ncTiO₂ (rats). The incidence and multiplicity of skin tumors (squamous cell papilloma and carcinoma) did not increase over DMBA alone controls in skin carcinogenesis-sensitive mice or rats or wild-type animals. Analysis of rat skin indicated that sTiO₂ and ncTiO₂ did not penetrate though either healthy or damaged skin. Furthermore sTiO₂ did not penetrate an *in vitro* human epidermis model. Our results indicate that treatment with sTiO₂ or ncTiO₂ did not promote skin carcinogenesis in mice or rats, probably due to lack of penetration through the epidermis.

Key words: Nano-size TiO₂, Skin carcinogenesis, Hras, Rat, Mouse

INTRODUCTION

Nano-sized titanium dioxide (TiO₂) particles are used in sunscreen formulations to protect against skin lesions caused by exposure to UV light (Gelis *et al.*, 2003; Rouabhia *et al.*, 2002; Suzuki, 1987). Nano and larger scale titanium dioxide particles are known to be carcinogenic to the rat lung (Baan *et al.*, 2006; Baan, 2007). Recently, we demonstrated a promoting effect on rat lung carcinogenesis by nano-size TiO₂ particles administered

by a novel intrapulmonary spraying method (Xu *et al.*, 2010). The mechanism of promotion of lung carcinogenesis involved the induction of MIP1 α protein expression by ncTiO₂-laden alveolar macrophages (Xu *et al.*, 2010).

We also examined the carcinogenic effect of TiO₂ (mean manufacturer's particulate diameter of 20 nm) on the skin in a UVB-initiated two-stage rat carcinogenesis model and found that topical application of TiO₂ did not promote skin carcinogenesis in this model. This result is probably due to the inability of TiO₂ to penetrate through

Correspondence: Akimichi Morita (E-mail: amorita@med.nagoya-cu.ac.jp)

the epidermis and reach the underlying tissue (Xu *et al.*, 2011). This speculation is consistent with a report by Newman *et al.* (2009) demonstrating an absence of penetration of TiO₂ through the epidermis and hair follicles (Newman *et al.*, 2009). On the other hand, Wu *et al.* (2009) reported that TiO₂ (4 nm and 60 nm length) could penetrate through the stratum corneum (SC) and become located in the deep layer of the epidermis after being topically applied to pig ear for 30 days (Wu *et al.*, 2009). These inconsistent observations may be due to differences in particle size and the animals used.

The skin is histologically composed of the SC, epidermis, dermis and the subcutaneous tissue. The SC is the rate-limiting barrier against exposure to various exogenous chemical and physical agents (Schaefer *et al.*, 2003). For solid materials, including nano-sized particles, to cause inflammatory lesions, they need to penetrate the SC to interact with macrophages and other inflammatory leukocytes. Long-term activation of inflammatory leukocytes has the potential to cause skin carcinogenesis. Thus, the potential skin-carcinogenicity of TiO₂ is dependent on its size and ability to penetrate through the SC.

The surface of the TiO₂ used in cosmetics is usually coated with aluminum oxide or silicone oils to prevent aggregate formation and to enhance dispersal (Nohynek *et al.*, 2008). The particle size of TiO₂ suspended in silicone oils is known to be smaller than that of non-coated TiO₂ suspensions (Senzui *et al.*, 2010; also compare Fig. 1E with Fig. 1F). In our previous study, we showed that rutile type non-coated TiO₂ (ncTiO₂) did not penetrate the epidermal tissue and thus did not cause promotion of chemically-induced skin carcinogenesis. In the present study, we used rutile type TiO₂ coated with silicone (sTiO₂) suspended in silicon oil to minimize aggregation and improve the penetrating ability of the particles.

The ability of sTiO₂ suspended in silicone oil and ncTiO₂ suspended in Pentalan408 to promote skin carcinogenesis was examined using the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-initiated skin carcinogenesis model employing skin carcinogenesis-sensitive animals and their wild-type counterparts as the test animals. The rasH2 mouse carries a human c-Ha-ras proto-oncogene and is highly susceptible to chemically induced skin carcinogenesis (Muto *et al.*, 2006). The Hras128 rat also carries a human c-Ha-ras proto-oncogene and highly susceptible to chemically induced skin carcinogenesis (Park *et al.*, 2004).

In addition to the animal models, we also used an *in vitro* model to examine sTiO₂ particle penetration into skin. Unlike animal skin, the *in vitro* model does not have

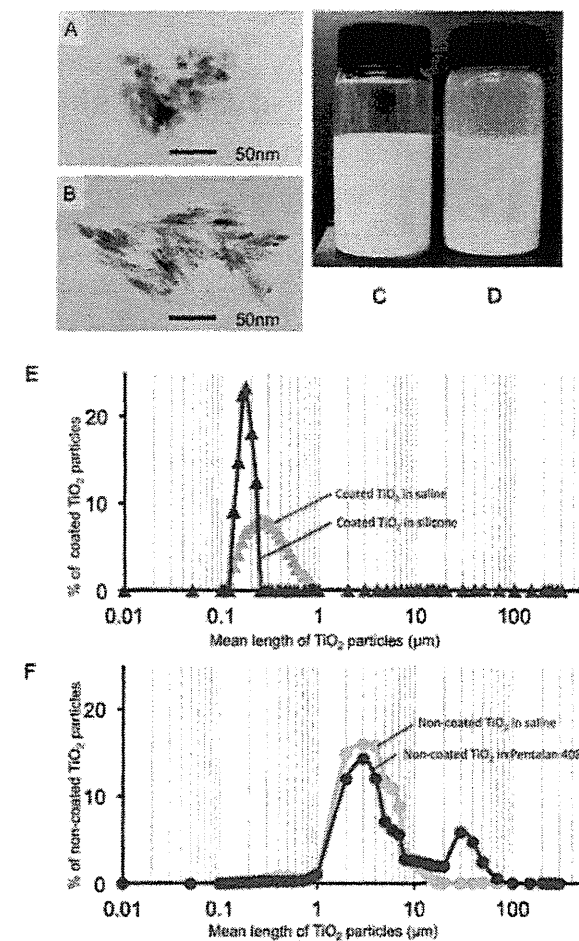


Fig. 1. Physicochemical features of sTiO₂ / ncTiO₂. sTiO₂ particles were round to oval in shape (A), and ncTiO₂ particles were club shaped (B). sTiO₂ particles remained evenly dispersed in silicone solution (C) while ncTiO₂ particles formed a white sediment at the bottom of the bottle 3 days after preparation (D). Size distribution of sTiO₂ suspended in saline (gray triangles) and in silicone (black triangles) (E). Size distribution of ncTiO₂ suspended in saline (gray circles) and in Pentalan 408 (black circles) (F). % of TiO₂ particles (Y axis) was calculated as the ratio of TiO₂ particles of a particular mean length/total particles examined.

hair follicles, allowing direct examination of the ability of sTiO₂ particles to penetrate through a layer of human skin epidermal keratinocytes.

Lack of TiO₂ skin carcinogenicity**Table 1.** TiO₂ materials and animal strains used in this study

Coating status of TiO ₂	Size	Concentration of TiO ₂ (mg/ml)	Suspended in	Skin assay (Carcinogen Strain (or <i>in vitro</i> system))
Coated (rutile type)	35 nm	50, 100	Silicone	Carcinogenesis (DMBA) rasH2 mouse, C57BL mouse
		100, 200	Silicone	Penetration LabCyte EPI-MODEL
Non-coated (rutile type)	20 nm	100, 200	Pentalan 408	Carcinogenesis (DMBA) Hras128 rat, Sprague-Dawley rat
		50, 100	Pentalan 408	Carcinogenesis (DMBA) CD1 mouse
		200	Pentalan 408	Penetration Sprague-Dawley rat

MATERIALS AND METHODS**Animals**

Male rasH2 mice and Hras128 rats, known to be highly sensitive to chemically induced skin carcinogenesis (Muto *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2004), and their wild-type counterparts, CB6F1 mice and SD rats, were purchased from CLEA Japan Co., Ltd. (Tokyo, Japan). To confirm the results, CD-1 mice, which are frequently used in skin carcinogenesis studies, were also included in this series of studies. The animals were housed in the animal center of Nagoya City University Medical School, maintained on a 12 hr light-dark cycle and received Oriental MF basal diet (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) and water *ad libitum*. All animals were kept for 1 week for acclimation. The experiments were conducted according to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, and the study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Nagoya City University Medical School.

Preparation of suspensions of titanium dioxide (TiO₂) and size analysis

sTiO₂ particles (silicone coated, mean manufacturer's particulate diameter of 35 nm) and ncTiO₂ particles (rutile type, mean manufacturer's particulate diameter of 20 nm) were provided by Japan Cosmetic Association, Tokyo, Japan. Size, coating, dose and suspension vehicles and animals used are summarized in Table 1. The size distribution of sTiO₂ suspended in silicone oil (cyclopentasiloxane, KF-995, Shin-Etsu Chemicals Co., Tokyo, Japan) or in saline and ncTiO₂ particles suspended in Pentalan 408 (pentaerythritol tetraethylhexanoate, CAS7299-99-2, Nikko Chemicals Co., Tokyo, Japan) or in saline was determined by a Particle Size Distribution Analyzer (Shimadzu Techno-Research Inc., Kyoto, Japan). The

shape of suspended sTiO₂ and ncTiO₂ was observed by transmission electron microscopy (JEOL Co. Ltd., Tokyo, Japan). Freshly made suspensions were sonicated for 30 min, and suspensions were sonicated again for 30 min just prior to use.

Experimental design*Skin carcinogenesis study of silicone coated TiO₂ (sTiO₂) using rasH2 mice*

The back skin of 7-week-old female rasH2 mice (60 mice) and wild-type CB6F1 mice (60 mice) was shaved (2 × 2 cm area) and the animals received a single topical application (painting) of 0.1 ml DMBA solution (2 mg/ml in acetone). Two weeks later, the animals were divided into 3 groups and the area which was painted with DMBA was shaved and painted with silicon oil alone or sTiO₂ suspended in silicone oil 5 times a week until termination of the experiment: Group 1 mice (15 mice of each strain) were painted with 0.2 ml silicone oil; group 2 mice (15 mice of each strain) were painted with 0.2 ml of 50 mg/ml sTiO₂ suspended in silicone oil; group 3 mice (15 mice of each strain) were painted with 0.2 ml of 100 mg/ml sTiO₂ suspended in silicone oil. Group 4 consisted of 15 mice of each strain painted with 0.2 ml 100 mg/ml sTiO₂ suspended in silicone oil 5 times a week without prior DMBA treatment. The rasH2 mice were killed at experimental week 8 and wild-type CB6F1 mice were killed at experimental week 40.

Skin carcinogenesis study of non-coated TiO₂ (ncTiO₂) using Hras128 rats

The back skin of 10-week-old male Hras128 rats (50 rats) and wild-type SD rats (36 rats) was shaved (3 × 3 cm area) and the animals received a single topical application (painting) of 0.5 ml DMBA solution (5 mg/ml in acetone)

(Park *et al.*, 2004). Two weeks later, the animals were divided into 3 groups and the area which was painted with DMBA was shaved and painted with Pentalan 408 alone or ncTiO₂ suspended in Pentalan 408 twice a week until termination of the experiment: Group 1 rats (17 Hras128 and 12 SD rats) were painted with 0.5 ml Pentalan 408 alone; group 2 rats (16 Hras128 and 12 SD rats) were painted with 0.5 ml of 100 mg/ml ncTiO₂ suspended in Pentalan 408; group 3 rats (17 Hras128 and 12 SD rats) were painted with 0.5 ml of 200 mg/ml sTiO₂ suspended in Pentalan 408. The Hras128 rats were killed at experimental week 28 and wild-type SD rats were killed at experimental week 40.

Skin carcinogenesis study of non-coated TiO₂ (ncTiO₂) using wild-type CD1 mice

The back skin of 10-week-old female CD1 mice (62 mice) was shaved (2 × 2 cm area) and the animals received a single topical application (painting) of 0.1 ml DMBA solution (2 mg/ml in acetone). Two weeks later, the animals were divided into 4 groups and the area which was painted with DMBA was shaved and painted with Pentalan 408 alone twice a week, ncTiO₂ suspended in Pentalan 408 twice a week, or TPA 4 times a week (positive control) until termination of the experiment: Group 1 mice (16 mice) were painted with 0.2 ml Pentalan 408; group 2 mice (16 mice) were painted with 0.2 ml of 50 mg/ml ncTiO₂ suspended in Pentalan 408; group 3 mice (15 mice) were painted with 0.2 ml of 100 mg/ml ncTiO₂ suspended Pentalan 408; group 4 mice (15 mice) were painted with 0.2 ml TPA solution (200 nmol/ml in acetone). Group 1-3 mice were killed at experimental week 52; group 4 mice were killed at experimental week 40.

Skin penetration study of non-coated TiO₂ (ncTiO₂) in SD rats

Based on our previous study showing lack of TiO₂ penetration through the normal skin (Xu *et al.*, 2011), ncTiO₂ was applied to damaged skin, which is postulated to be more susceptible to particle penetration. The back skin of 10-week-old female SD rats (24 rats) was shaved (3 × 3 cm area) and the epidermis was removed by stripping the epidermis off with a fresh piece of adhesive tape (3M's No. 3760, Scotch Mending Tape, Sumitomo 3M Ltd., Tokyo, Japan): Stripping was done 30 times to completely remove the epidermis. The epidermis-stripped skin was then painted with 0.5 ml of Pentalan or 0.5 ml of 200 mg/ml ncTiO₂ suspended in Pentalan 408 at 4-day-intervals over the course of 3 and a half weeks (7 treatments in 3½ weeks). Localization of ncTiO₂ particles in the epidermis was determined by histological observa-

tion. Skin tissue samples were taken at 1, 3, and 7 days after stripping to examine recovery of the epidermis and penetration of ncTiO₂ into the skin.

Skin penetration study of silicone coated TiO₂ (sTiO₂) in the in vitro skin model

To evaluate whether optimally dispersed sTiO₂ particles could penetrate into the epidermis, we applied sTiO₂ particles dispersed in silicone oil to the LabCyte EPI-MODEL kit (Japan Tissue Engineering Co. Ltd., Aichi, Japan), which is constructed of human skin epidermis keratinocytes on a mesh over a receiving chamber. In 12 wells: 4 wells had silicone oil alone applied directly to the human skin epidermis keratinocytes for 48 hr; 4 wells had 100 mg/ml sTiO₂ suspended in silicone oil applied directly to the human skin epidermis keratinocytes for 48 hr; and 4 wells had 200 mg/ml sTiO₂ suspended in silicone oil applied directly to the human skin epidermis keratinocytes for 48 hr. The medium in the receiving chamber was collected for elemental titanium analysis by an inductively coupled plasma/mass spectrometry (ICP-MS) (HP-4500, Hewlett-Packard Co., Houston, TX, USA) as described previously (Xu *et al.*, 2011).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis and Bonferroni-Dunn's multiple comparison tests. Statistical significance was analyzed using a two-tailed Student's *t*-test and Bonferroni-Dunn's multiple comparison test. A value of *P* < 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Size distribution of ncTiO₂ and sTiO₂ particles

Transmission electron microscopy (TEM) analysis showed that the shape of sTiO₂ particles was generally round to oval (Fig. 1A), while ncTiO₂ particles were more clubbed shaped (Fig. 1B). The sTiO₂ in silicone oil solutions remained without obvious sedimentation for 3 days after preparation (Fig. 1C). In contrast, the ncTiO₂ in Pentalan 408 solutions contained considerable sedimentation 3 days after preparation (Fig. 1D). The particle size distribution of sTiO₂ and ncTiO₂ solutions is shown in Figs. 1E and 1F. The mean length of sTiO₂ particles suspended in saline and silicone was 0.16 ± 0.07 and 0.28 ± 0.22 μm, respectively (Fig. 1E). The mean length of ncTiO₂ particles suspended in saline and Pentalan 408 was 3.18 ± 0.35 and 4.97 ± 0.50 μm, respectively (Fig. 1F). These results indicate that sTiO₂ in silicone oil remained dispersed for a longer time than ncTiO₂ in Pentalan 408.

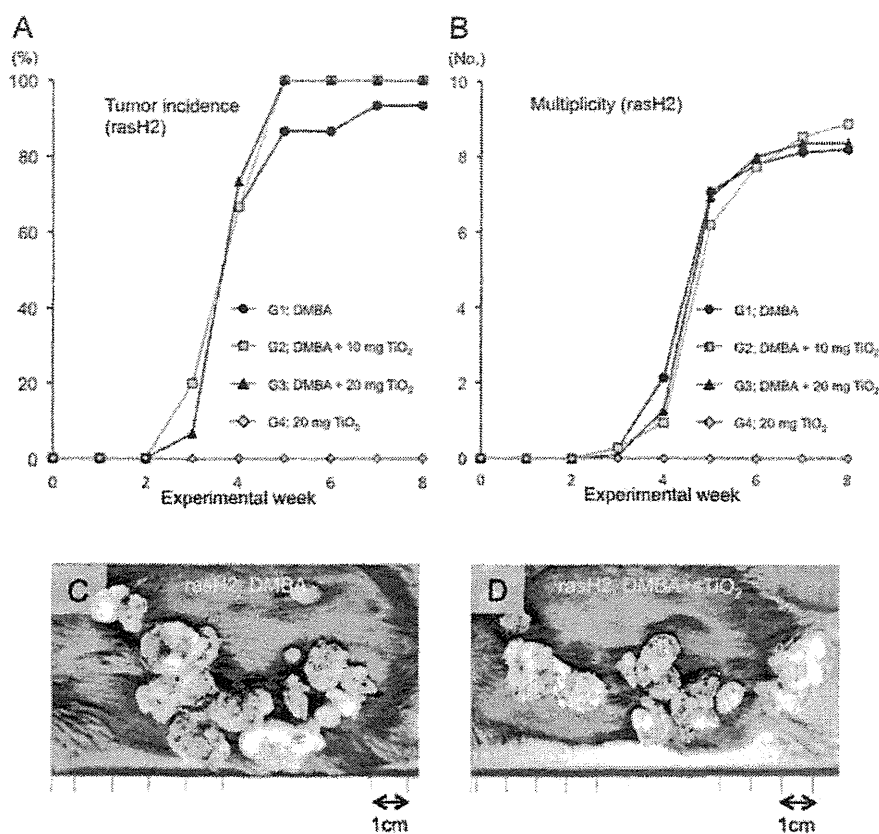
Lack of TiO₂ skin carcinogenicity

Fig. 2. Effects of sTiO₂ in a two-stage carcinogenesis model using rasH2 mice. The incidence of skin tumors in rasH2 mice: DMBA treated group (black circles), DMBA followed by treatment with 10 mg sTiO₂ (gray squares) or 20 mg sTiO₂ (black triangles). 20 mg sTiO₂ treated group (gray diamonds) (A). Multiplicity of skin tumors in rasH2 mice: DMBA treated group (black circles), DMBA followed by treatment with 10 mg sTiO₂ (gray squares) or 20 mg sTiO₂ (black triangles). 20 mg sTiO₂ treated group (gray diamonds) (B). Representative macroscopic appearance of skin tumors initiated with DMBA in rasH2 mice (C). The gross morphology of the tumors did not show obvious differences between the DMBA (C) and DMBA + sTiO₂ (D) groups.

Skin carcinogenesis study of sTiO₂ in silicone oil using rasH2 mice

Figures 2A and 2B show the time lapse incidence and multiplicity (number/mouse) of macroscopic skin tumors in rasH2 mice. No statistically significant differences were found between sTiO₂ treated rasH2 mice (groups 2 and 3: DMBA plus 50 mg/ml and 100 mg/ml sTiO₂, respectively) and control rasH2 mice (group 1: DMBA alone) (Figs. 2A and 2B, Table 2-1). Similarly, no statistically significant differences were found between treated and control groups of wild-type CB6F1 mice (Table 2-2). No tumors were induced in group 4 (sTiO₂ alone) of either rasH2 (Figs. 2A and 2B, Table 2-1) or wild-type CB6F1 mice (Table 2-2). Skin tumors were histologically SCP and SCC in rasH2 and wild-type CB6F1 mice. Rep-

resentative macroscopic skin tumors induced by DMBA alone and by DMBA plus sTiO₂ are shown in Fig. 2C and 2D, respectively.

Skin carcinogenesis study of ncTiO₂ using Hras128 rat

Figures 3A and 3B show the time lapse incidence and multiplicity (number/rat) of macroscopic skin tumors in Hras128 rats. No statistically significant differences were found between sTiO₂ treated and control rasH2 rats (Figs. 3A and 3B, Table 3-1). Similarly, no statistically significant differences were found between treated and control groups of wild-type SD rats (Table 3-2).

Microscopically, TiO₂ was not observed within the SCP or SCC tissue (Figs. 4A and 4B). TiO₂ was observed

Table 2-1. Effects of sTiO₂ on skin carcinogenesis in rasH2 mice

Group	Treatment	No. of mice	SCP		SCC		SCP + SCC	
			Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity
1	DMBA + Silicone	15	14 (93)	7.27 ± 4.74	5 (33)	0.60 ± 0.99	14 (93)	7.87 ± 5.17
2	DMBA + 10 mg TiO ₂	15	15 (100)	8.13 ± 3.66	9 (60)	1.00 ± 1.00	15 (100)	9.13 ± 3.76
3	DMBA + 20 mg TiO ₂	15	15 (100)	6.80 ± 3.88	8 (53)	0.73 ± 0.80	15 (100)	7.53 ± 3.31
4	20 mg TiO ₂	15	0	0	0	0	0	0

SCP, squamous cell papilloma; SCC, squamous cell carcinoma.

Multiplicity: number of tumors per mouse.

Table 2-2. Effects of sTiO₂ on skin carcinogenesis in wild-type CB6F1 mice

Group	Treatment	No. of mice	SCP		SCC		SCP + SCC	
			Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity
1	DMBA + Silicone	15	1 (7)	0.07 ± 0.26	1 (7)	0.07 ± 0.26	2 (13)	0.13 ± 0.35
2	DMBA + 10 mg TiO ₂	15	2 (13)	0.13 ± 0.35	0	0	2 (13)	0.13 ± 0.35
3	DMBA + 20 mg TiO ₂	15	2 (13)	0.20 ± 0.56	0	0	2 (13)	0.20 ± 0.56
4	20 mg TiO ₂	15	0	0	0	0	0	0

SCP, squamous cell papilloma; SCC, squamous cell carcinoma.

Multiplicity: number of tumors per mouse.

on the surface and in the upper SC tissue and upper part of the hair follicles, but not in the underlying epidermis, dermis or subcutaneous tissues (Figs. 4C and 4D).

Skin carcinogenesis study of ncTiO₂ using wild-type CD1 mice

No statistically significant differences in tumor incidence or multiplicity was observed between treated and control groups of CD1 mice (Table 4). TPA treatment after DMBA significantly increased the incidence and multiplicity of SCP ($P < 0.001$).

Skin penetration study of ncTiO₂ in SD rats

Figures 5 A-D shows skin tissue samples collected before (Fig. 5A) and 1, 3 and 7 days after (Figs. 5B-D) removing the epidermis by tape-stripping. On day 1 the epidermis was completely removed (Fig. 5B), and a mass of fibrin exudate and underlying granulation tissue rich

with neutrophils was the main feature of the skin surface. On day 3, regenerated epidermis already covered the granulation tissue (Fig. 5C). On day 7, the surface of the skin was fully covered by regenerated keratinocytes showing cornification and had an almost normal appearance (Fig. 5D).

The shaved back skin of SD-rats was painted with 100 mg TiO₂ suspended in Pentalan 408. Fig. 5E shows the presence of ncTiO₂ particles in the SC layer of the skin of these animals. Extensive histological observation failed to detect TiO₂ within the epidermis or dermis. In another series of experiments, the epidermis was removed from the back skin of SD rats by tape-stripping and the freshly stripped skin was painted with 100 mg ncTiO₂ suspended in Pentalan 408. This was repeated every 4 days for 3½ weeks (7 times total). Figure 5F shows the presence of TiO₂ on the surface of the regenerating epidermis 1 day after the last stripping/painting procedure. Extensive

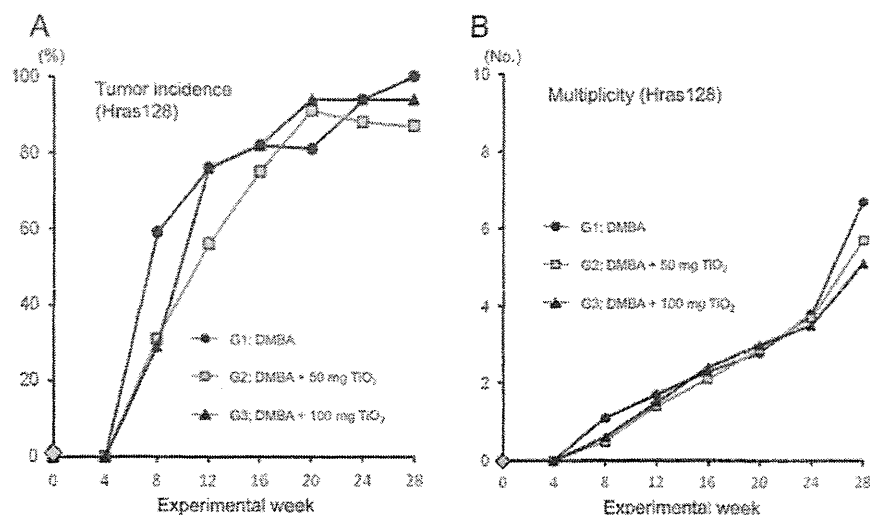
Lack of TiO₂ skin carcinogenicity

Fig. 3. Effects of ncTiO₂ in a two-stage carcinogenesis model using Hras128 rats. The incidence of skin tumors in Hras128 rats: DMBA treated group (black circles), DMBA followed by treatment with 50 mg ncTiO₂ (gray squares) or 100 mg ncTiO₂ (black triangles) (A). Multiplicity of skin tumors in rash2 mice: DMBA treated group (black circles), DMBA followed by treatment with 100 mg ncTiO₂ (gray squares) or 200 mg ncTiO₂ (black triangles) (B).

Table 3-1. Effects of ncTiO₂ on skin carcinogenesis in Hras128 rats

Group	Treatment	No. of rats	SCP		SCC		SCP + SCC	
			Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity
1	DMBA + Pentalan 408	17	16 (94)	9.65 ± 7.05	0	0	16 (94)	9.65 ± 7.05
2	DMBA + 50 mg TiO ₂	16	14 (88)	6.81 ± 6.21	2 (13)	0.19 ± 0.54	14 (88)	7.00 ± 6.52
3	DMBA + 100 mg TiO ₂	17	16 (94)	7.59 ± 3.86	2 (12)	0.12 ± 0.331	16 (94)	7.71 ± 3.93

SCP, squamous cell papilloma; SCC, squamous cell carcinoma.

Multiplicity: number of tumors per rat.

Table 3-2. Effects of ncTiO₂ on skin carcinogenesis in wild-type SD rats

Group	Treatment	No. of rats	SCP		SCC		SCP + SCC	
			Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity
1	DMBA + Pentalan 408	12	3 (25)	0.25 ± 0.45	0	0	3 (25)	0.25 ± 0.45
2	DMBA + 50 mg TiO ₂	12	2 (17)	0.17 ± 0.39	2 (17)	0.17 ± 0.39	4 (33)	0.33 ± 0.49
3	DMBA + 100 mg TiO ₂	12	1 (8)	0.08 ± 0.29	0	0	1 (8)	0.08 ± 0.29

SCP, squamous cell papilloma; SCC, squamous cell carcinoma.

Multiplicity: number of tumors per rat.

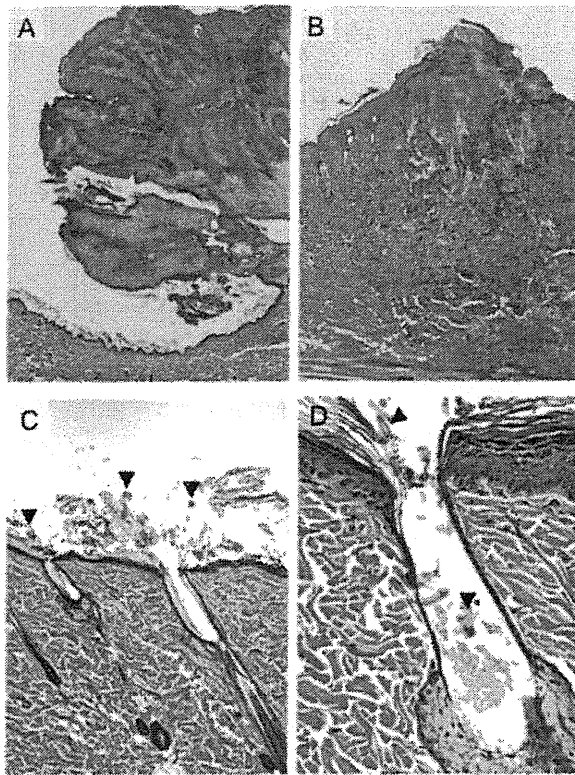


Fig. 4. Effects of ncTiO₂ in a two-stage carcinogenesis model. Representative histological features of SCP (A) and SCC (B) on the back skin of a Hras128 rat. TiO₂ aggregates were seen on the surface of stratum corneum (C, arrowheads), but not in the underlying epidermis, dermis or subcutaneous tissue. Some aggregates were found in the upper layer of stratum corneum (arrowheads) and in the lumen of the hair follicle (D) but not in the dermis.

histological observation failed to detect any TiO₂ particles in the underlying epidermis or dermis, indicating that ncTiO₂ failed to penetrate into the stripped skin. In addition, no inflammatory lesions were found in the epidermis or subcutaneous tissue of these animals. These results indicate that TiO₂ particles do not penetrate into the epidermis of either normal or damaged skin.

***In vitro* skin penetration study**

The amount of elemental titanium in the receiving chamber did not show any significant increase over the vehicle group (Table 5). All the observed values are equivalent to background. The results indicate that sTiO₂ particles did not penetrate the human epidermis in this model.

DISCUSSION

TiO₂ particles, including both nano and larger sized particles, are known to be carcinogenic to the rat lung (Baan *et al.*, 2006). We have shown that alveolar macrophages play an important role in promotion of lung carcinogenesis when TiO₂ particles are inhaled into the lung (Xu *et al.*, 2011). Because of this, TiO₂ particles, especially nano-sized particles, are deemed to have the potential to induce skin tumors after long-term topical application should the particles penetrate into the epidermis and subcutaneous tissue and interact with macrophages. The current study is the first systematic study of the skin promotion/carcinogenesis effects of TiO₂ in a two-stage chemical carcinogenesis animal model. We found that even the smallest available sized TiO₂ (sTiO₂) did not exhibit promoting effects on the highly sensitive rasH2 mouse skin carcinogenesis model. Furthermore, we observed that TiO₂ without coating (ncTiO₂) did not cause skin tumor promotion in the skin carcinogenesis-sensitive Hras128 rat model or in the CD1 mouse. These results are in agreement with another recent study reporting the lack of carcinogenicity of topically applied TiO₂ (Furukawa *et al.*, 2011).

We also found that topically applied ncTiO₂ did not penetrate normal rat skin or skin which had the epidermis completely removed, nor did sTiO₂ penetrate the *in vitro* human epidermis model. Thus, the lack of skin promotion/carcinogenesis effects is probably due to lack of penetration of the particles through the epidermis to the dermis where cytogenetic cells of skin carcinogenesis reside. In another study, we found no promoting effect of TiO₂ particles in a UVB-initiated long-term (52 weeks) skin carcinogenesis study and no penetration of TiO₂ particles through the epidermis (Xu *et al.*, 2011).

Results showing lack of TiO₂ penetration through the epidermis are in accordance with other reports. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies using murine, porcine, or human skin have shown that nano-sized TiO₂ does not penetrate the skin (reviewed in Nohynek *et al.* (2008)). In addition to these studies, Gottbrath *et al.* (2003) report that after topical application of TiO₂ to the underside of the forearm of a human volunteer, ultrafine TiO₂ did not penetrate beyond the SC.

Contrary to these findings, there is a single report by Wu *et al.* (2009) that TiO₂ particles (4 and 60 nm) did penetrate into the deep layers of the epidermis after topical application to the pig ear for 30 days (Wu *et al.*, 2009). They also reported that nano-size TiO₂ particles could penetrate the skin of hairless mice after 60 days dermal exposure, although they did not examine promotion/car-