

微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価

木村 恵理子

目次

記号と略号	1
緒言	2
第1編 ナノマテリアルの皮膚浸透・透過性の評価	
第1章 Fluoresbrite [®] および FITC-dextran 類の <i>in vitro</i> 皮膚透過性	5
第1節 理論	
1. 物質透過ルート	7
2. 皮膚透過係数と角層の落屑速度	8
3. 分子サイズ	9
第2節 実験方法	
1. 実験材料	11
2. 実験動物	12
3. 種々皮膚膜の作成	12
4. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験法	13
5. 共焦点レーザー顕微鏡による皮膚組織切片観察法	14
第3節 結果	
1. Fluoresbrite [®] の <i>in vitro</i> 皮膚透過性	15
2. FITC-dextran 類の <i>in vitro</i> 皮膚透過性	21
第4節 考察	28
第5節 小括	30
第2章 サンスクリーン剤塗布後の皮膚表面観察	31
第1節 実験方法	
1. 実験動物	31
2. 走査型電子顕微鏡および元素マッピングによる皮膚表面 観察法	31
第2節 結果	
1. サンスクリーン剤の皮膚表面分布	32
第3節 考察	34
第4節 小括	34

第2編 微粒子酸化チタンの皮膚障害性および感作性

第1章	3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた種々微粒子酸化チタン皮内投与後の障害性	35
第1節	実験方法	
1.	実験材料	36
2.	微粒子酸化チタンの粒子径およびゼータ電位の測定	37
3.	皮膚障害性試験法 (MTT assay、LDH assay、IL-1 α 放出量の測定)	37
4.	統計解析	38
第2節	結果	
1.	種々微粒子酸化チタンの物性	39
2.	微粒子酸化チタン皮内投与後の障害性	40
第3節	考察	41
第4節	小括	42
第2章	皮膚細胞を用いた障害性評価	43
第1節	実験方法	
1.	実験材料	43
2.	用いた皮膚細胞の培養条件	44
3.	種々微粒子酸化チタンを用いた刺激性試験法 (MTT assay、LDH assay、IL-1 α 放出量の測定、 H ₂ O ₂ 産生量の測定)	44
4.	種々微粒子酸化チタンを用いた遺伝毒性試験法 (BrdU assay、Comet assay)	46
5.	細胞形態観察法	47
6.	統計解析	47
第2節	結果	
1.	種々微粒子酸化チタンを用いた皮膚刺激性評価 (MTT assay、LDH assay、IL-1 α 放出量の測定、 H ₂ O ₂ 産生量の測定)	48
2.	種々微粒子酸化チタンを用いた遺伝毒性評価 (BrdU assay、Comet assay)	53
3.	細胞形態観察	55
第3節	考察	57
第4節	小括	61
第3章	微粒子酸化チタンの皮膚感作性評価	62

第1節	実験方法	
1.	実験材料	63
2.	実験動物	63
3.	種々微粒子酸化チタンを用いた皮膚感作性試験法 (Adjuvant and patch test 法)	63
第2節	結果	
1.	種々微粒子酸化チタンの皮膚感作性	66
第3節	考察	68
第4節	小括	68

第3編 微粒子酸化チタンの体内分布

第1章	微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布	69
第1節	実験方法	
1.	実験材料	69
2.	実験動物	69
3.	静脈内投与実験法	70
4.	ICP-MS のサンプル調製法	70
5.	ICP-MS の定量法	70
6.	透過型電子顕微鏡を用いた組織観察法	71
7.	血液生化学検査法	72
第2節	結果	
1.	微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布	72
2.	透過型電子顕微鏡を用いた微粒子酸化チタン静脈内 投与後の組織観察	76
3.	微粒子酸化チタン静脈内投与後の血液生化学検査	78
第3節	考察	79
第4節	小括	80

結論	81
----	----

謝辞	85
----	----

引用文献	86
------	----

略語		LDH	Lactase dehydrogenase
ALT	Alanine aminotransferase	LSE-high	Living Skin Equivalent-high
ART	Aluminum hydroxide coated rutile typed titanium dioxide nanoparticles	<i>M.W.</i>	Molecular weight
AST	Aspartate aminotransferase	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
BrdU	5-bromo-2'-deoxy-uridine	NAT	Non-coated anatase typed titanium dioxide nanoparticles
BUN	Blood urea nitrogen	NRT	Non-coated rutile typed titanium dioxide nanoparticles
CLSM	Confocal laser scanning microscope	PBS	Phosphate buffered saline
CPK	Creatine phosphokinase	PLGA	Poly-lactic-co-glycolic acid
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	SDS	Sodium dodecyl sulfate
DNA	Deoxyribonucleic acid	SEM	Scanning electron microscope
DNCB	1-choloro-2,4-dinitrobenzene	SRT	Silica coated rutile typed titanium dioxide nanoparticles
EDX	Energy dispersive X-ray spectrometry	TDDS	Transdermal drug delivery system
E-FCA	Emulsion formed Freund's complete adjuvant	TEM	Transmission electron microscope
FBS	Fetal bovine serum	記号	
FCA	Freund's complete adjuvant	<i>A</i>	有効透過面積
FD	Fluorescein isothiocyanate-dextran	<i>C₀</i>	適用濃度
FITC	Fluorescein isothiocyanate	<i>C_d</i>	適用物質濃度
HDF	Human dermal fibroblasts	<i>C_{min}</i>	定量限界濃度
HEK	Human epidermal keratinocytes	<i>D</i>	皮膚バリエー中拡散係数
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid	<i>K</i>	皮膚バリエー／基剤間分配係数
<i>i.v.</i>	Intravenous	<i>L</i>	皮膚バリエーの厚み
ICP-MS	Inductivity coupled plasma mass spectrometry	<i>Q</i>	単位面積当たりの累積透過量
IL-1 α	Interleukin-1 α	<i>T</i>	適用時間

緒言

ナノテクノロジーは、ナノメートルサイズで物質の構造・配列を制御することで新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術とされ、その技術開発が活発に進められている¹⁾。現在、本テクノロジーを利用して様々なナノマテリアルが製造され、医薬品、食品、化粧品、化成品など、様々な分野の商品が販売されている。ナノマテリアルとは少なくとも一次元の長さが約 1~100 nm のナノ物質またはナノスケールの内部構造を有する凝集体・塊を指し²⁾、非意図的に生成されるナノ粒子（非意図的ナノ粒子）と産業従事者が目的を持って生産するナノ粒子（工業ナノ粒子）に分けられる。非意図的ナノ粒子には、森林火災や火山の噴火による灰、ディーゼル排出の粒子などがある。一方、工業ナノ粒子は可溶性で生体内で分解されやすいものと不溶性で生体内で分解されにくいものに分類され、前者の例としてリポソーム³⁾、ニオソーム⁴⁾などが、後者の例としてカーボンナノチューブ⁵⁾やアスベストなどが挙げられる⁶⁾。安全性評価の観点からは、生体内で溶解し分解されるナノ粒子は溶解物や代謝物の毒性を評価すること、生体内で分解されにくいナノ粒子はそれ自体の蓄積性や毒性を評価することが重要と考えられる。今後、ナノマテリアルの使用量の増加に伴い、ヒトおよび環境中へ曝露の機会が増えることが考えられる。そのため、ナノマテリアルの曝露経路や性質を考慮した安全性評価法の確立が望まれている。

Table 1 に主なナノマテリアルの国内年間使用量を示す⁷⁾。カーボンナノチューブが最も使用量が多く、次いで、シリカ、酸化チタンの順である。この中でも、主な用途が化粧品である微粒子酸化チタンはヒトに曝露する機会が最も多い物質であることが考えられる。

微粒子酸化チタンは結晶構造の違いから、アナターゼ型（正方晶系）、ルチル型（正方晶系）、ブルカイト型（斜方晶系）の3つに分類され、工業用途ではアナターゼ型とルチル型が用いられる⁸⁾。

これまでの酸化チタン製品は、粒子径が200～300 nmのpigment gradeのルチル型が主流であったが、機能性（紫外線散乱効果の上昇、塗布時の透明感、使用感）を高めた、粒子径が10～20 nmのultrafineと呼ばれるナノサイズのものが開発され、1960～70年代から化粧品に配合されることが多くなってきている^{9,10)}。

現在まで問題なく安全に使用されてきた物質でも、ナノサイズ化され、表面積の増大、表面チャージ、粒子の形状によっては、ヒトに影響を及ぼすのではないかと推測され、ナノ粒子の安全性評価が始まっている。

Table 1 ナノマテリアルの国内年間使用量

物質名	国内使用量	主な用途
カーボンブラック	100万 t	タイヤ、自動車部品
シリカ	13,500 t	インク、合成ゴム、タイヤ
酸化チタン	1,250 t	化粧品、光触媒
酸化亜鉛	480 t	化粧品
カーボンナノチューブ	60 t	電子材料
フラーレン	2 t	スポーツ用品

微粒子酸化チタンを含む化粧品は連日皮膚に塗布するものであり、使用時に目、鼻、口などから直接体内に入る可能性が考えられる。また、塗布量は微量でも使用頻度が高いため、毎回洗浄し皮膚から取り除くものであっても皮膚に残る可能性も考えられる。よって、経皮曝露による安全性を考えることが大変重要である。一般に、経皮曝露後の化学物質の安全性は、皮膚透過試験によって皮膚透過量や吸収量を定量的に測定することで評価される。しかしながら、

微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛の健常皮膚を用いた透過性試験では、定量的な評価が十分に行われていないのが現状である。また、万が一生きて細胞がこれらに曝露された場合を想定して、培養細胞を用いた検討が行われているが、皮膚細胞を使用し、かつ同じ培養条件で試験したものはほとんどない。さらに、ナノ粒子が全身循環系へ移行したことを想定し、体内分布を検討した例もない。

そこで、本研究では経皮曝露によるナノ粒子の皮膚浸透・透過の可能性および経皮曝露後の安全性評価を目的として、第 1 編では、健常皮膚モデルとして intact skin、傷害皮膚を想定した皮膚モデルとして角層を剥離した stripped skin、カミソリで皮膚を傷つけた razor-treated skin、および注射針で孔をあけた needle-punctured skin を作成し、さらに、ナノ粒子の分散モデルとして平均分子量の異なる水溶性高分子と蛍光標識したポリスチレンビーズ (Fluoresbrite®, fluorescent polystyrene latex spheres, particle size : 50 nm) を用いて皮膚透過性を評価した。第 2 編では、ナノ粒子が皮膚組織内に貯留した場合を想定し、3 次元培養ヒト皮膚モデル中に種々微粒子酸化チタンを投与し、皮膚局所障害性試験を行った。さらに、角層下に存在する生きて細胞 (ヒト表皮角化細胞とヒト真皮線維芽細胞) が微粒子酸化チタンに曝露した場合を想定し、MTT assay により細胞障害性、LDH の放出量測定により細胞膜障害性、IL-1 α の放出量測定により炎症反応性、および H₂O₂ の放出量測定により酸化ストレス障害性を試験し、皮膚細胞に対するナノ粒子の刺激性を評価した。また、5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) assay による細胞増殖能、comet assay による DNA 障害性試験から、皮膚細胞中の遺伝子への影響を評価した。さらに第 3 編では、皮膚曝露後のナノ粒子が皮内を経由して全身循環系へ移行した場合を想定し、静脈内投与後のナノ粒子の体内分布について評価した。

第1編 ナノマテリアルの皮膚浸透・透過性の評価¹¹⁾

第1章 Fluoresbrite[®]および FITC-dextran 類の *in vitro* 皮膚透過性

ナノマテリアルの使用増加に伴い、ナノマテリアルを取扱う産業従事者だけでなく、それを使用する消費者がナノマテリアルに曝露される機会も増加することが予測される。化粧品や医薬部外品の分野では、ナノマテリアルの性質を利用した商品を多く製造している。特に、サンスクリーン剤やファンデーションには微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛が含まれている。これらの1回の使用量に含まれるナノ粒子の量は少ないものの、毎日皮膚に直接塗布することから、ナノ粒子の皮膚浸透性・透過性の評価は生体への毒性の観点からも非常に重要視されている。健全皮膚にナノ粒子が付着、あるいはナノ粒子を塗布されたりしたとしても、表皮や真皮まで移行する可能性は低いとされてきたが、皮膚の屈曲伸展時や外傷から直接移行するとの報告もある^{12, 13)}。また、Wuらは、微粒子酸化チタンを連続塗布すると皮膚を透過し他の臓器まで移行すると報告している¹⁴⁾。さらに、アトピー性皮膚炎や紫外線照射などにより皮膚バリア機能が低下している¹⁵⁾損傷皮膚では、これらの皮膚透過性が増大することが考えられる。そのため、ナノ粒子の皮膚浸透性・透過性および浸透・透過ルートの解明は急務である。現在まで、皮内分布を定性的に評価することでナノ粒子の皮膚浸透を評価した報告は多くある¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、皮膚透過係数を用いた定量的な指標でナノ粒子の皮膚浸透・透過を報告したものは少ない。また、損傷皮膚を用いた微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛の透過性試験では定量的な評価が十分にできないのが現状である。

そこで本編では、容易に定量・観察可能な不溶性モデル蛍光ナノ粒子として Fluoresbrite[®]を用い、健全皮膚もしくは損傷皮膚を介したナノ粒子の透過性を評価した。また、Fluoresbrite[®]との比較のため、可溶性モデル蛍光高分子として分子サイズの異なる fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) を用い、これらの皮膚透過性と分子サイズの関係についても評価した。

第1節 理論

1. 物質透過ルート¹⁹⁾

Figure 1 に物質透過ルートを示す。Type 1 は溶解拡散ルートであり、膜に溶解する物質のみが透過する。Type 2 は細孔ルートであり、細孔サイズよりも小さな物質が透過する。また、Type 3 は溶解拡散ルートと細孔ルートの複合ルートであり、さらに2つに分けられる。a は細孔が膜の途中まであり、細孔に移行した物質はその後、溶解拡散して膜を透過すると考えられる。そのため、不溶性の物質は細孔には侵入するものの、この膜を透過できないと考えられる。b は細孔が膜を貫通しており、溶ける物質は膜と細孔を透過するが、不溶性の物質は細孔を介してのみ透過する。ヒトの皮膚などはこの複合膜と考えることができる。皮膚を介した物質の透過は主に溶解・拡散現象であるため、膜に溶解する物質のみが皮膚を透過する (Type 1)。最近では、毛孔が水溶性物質や高分子化合物の皮膚透過ルートとして重要²⁰⁾という報告がある。毛孔は Type 2 で示す細孔ルートと仮定できるが、毛孔は皮膚を貫通していないため、毛孔に移行した物質はその後、皮膚に溶解・拡散し皮膚を透過すると考えられる。

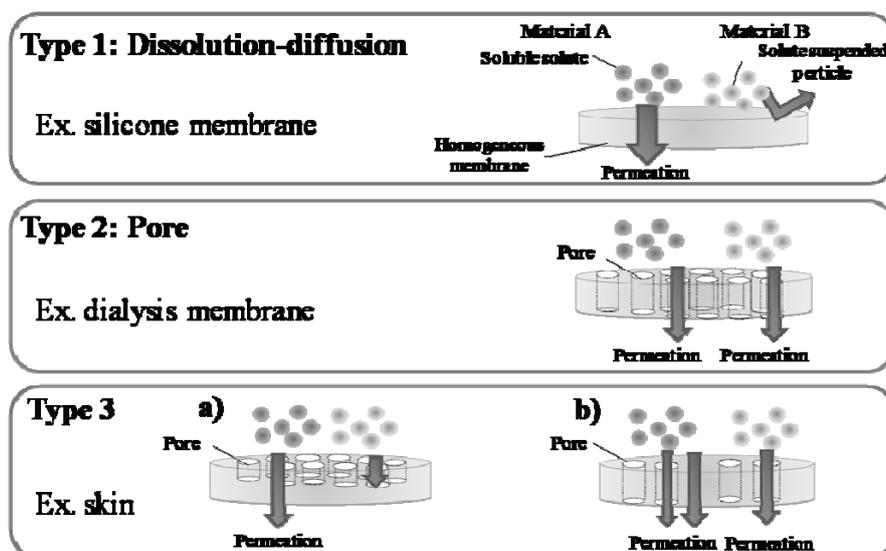


Fig. 1 Various permeation routes of materials.

2. 皮膚透過係数と角層の落屑速度

皮膚浸透性や透過性の定量的指標として透過係数 (permeability coefficient, P , cm/s) が用いられる。角層は部位によって異なるが、約 20 層の角質細胞層から成り、約 20 μm の厚みがある。角層は最外層から 1 日 1 層ずつ剥がれる (落屑する) ため (落屑層の厚みを 1 μm とすると) 落屑速度 (P_{des}) は 1 $\mu\text{m}/\text{day}$ 、すなわち約 1×10^{-9} cm/s となる。したがって、これ以下の P を示す物質は、丸 1 日かかってようやく角層 2 層目直前に移行したとしても、このとき物質が移行した部分 (1 層目) が剥がれる²¹⁾ため、角層を透過経路とする場合には論理的には角層下層に移行しない。ここで、 P と P_{des} の大小関係から、 $P - P_{\text{des}} \gg 0$ のとき皮膚透過する、 $P \cong P_{\text{des}}$ のとき皮膚浸透する、 $P - P_{\text{des}} \ll 0$ のとき皮膚透過および皮膚浸透は生じない、と分類・仮定することができる。

物質は皮膚 (角層) 中に生じる物質の濃度勾配に従って拡散・透過する。単位面積当たりの物質の皮膚透過速度 (dQ/dt) は Fick の拡散式から定常状態時に導かれる下記の(1)式で表される。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D \cdot K \cdot C_d}{L} \quad \dots(1)$$

また、透過係数 P は以下のようになる

$$P = \frac{D \cdot K}{L} \quad \dots(2)$$

ここで、式中の D は透過物質の皮膚バリアー中拡散係数、 K は同物質の皮膚バリアー/基剤間分配係数、 C_d は適用物質濃度、 L は皮膚バリアーの厚みを示す。

一方、適用した物質の皮膚透過が一定時間経過後でも認められない (定量できない) 場合は、適用物質濃度、レシーバー容量、有効透過面積、適用時間および各物質の定量限界濃度を用いて以下に示す P_c を算出した。

$$P_c = \frac{C_{\min} V}{ATC_0} \quad \dots(3)$$

ここで、 P_c は計算より求められた最大透過係数、 C_{\min} は定量限界濃度、 V はレシーバー容量、 A は有効透過面積、 T は適用時間、 C_0 は適用濃度を示す。

Table 2 に種々物質の皮膚透過係数を示す²¹⁾。皮膚を透過し全身作用を示す物質は 1×10^{-9} cm/s よりも大きな透過係数を示し、皮膚を浸透し局所作用を示す物質は 1×10^{-9} cm/s とほぼ同等の透過係数を示すことが分かる。

Table 2 Permeability coefficient of various compounds

透過係数 (cm/s)	物質名	分子量	皮膚
4×10^{-9}	クロモグリク酸ナトリウム	512	ヘアレスラット皮膚
5×10^{-9}	カルセインナトリウム	644	ヘアレスラット皮膚
2×10^{-8}	コルチコステロン ^{22, 23)}	346	ヒト皮膚
2×10^{-7}	水分子	18.0	ヒトおよびヘアレスラット皮膚
	5-フルオロウラシル	130	ヘアレスラット皮膚
	ジクロフェナク酸ナトリウム	318	ヘアレスラット皮膚
1×10^{-7}	一硝酸イソソルビド	191	ヒトおよびヘアレスラット皮膚
3×10^{-6}	硝酸イソソルビド	236	ヒトおよびヘアレスラット皮膚
8×10^{-6}	フルルビプロフェン	244	ヘアレスラット皮膚
1×10^{-5}	リドカイン(分子型)	234	ヒトおよびヘアレスラット皮膚
2×10^{-5}	5-フルオロウラシル	130	ヘアレスラット stripped skin

3. 分子サイズ

物質の皮膚浸透・透過性を考える上で、「500 ダルトン限界説」²⁴⁾を考える必要がある。Bos と Meinardi によると、皮膚感作性を示す物質の分子量のほとんどが 500 ダルトン以下であること、また、皮膚組織に薬物を送達するいわゆる局所作用を期待する外用医薬品や全身吸収性を期待して皮膚に適用する経皮薬物送達システム (Transdermal Drug Delivery System; TDDS) 中に含まれる薬物は

ほとんどが分子量 500 ダルトン以下であることを基準にして、この経験説を提唱している。Table 3 に示す限外ろ過膜の分離特性を調べるためのマーカー分子を例として考えると、分子量 500 ダルトン程度の物質の直径は 1.0~1.3 nm である。皮膚を透過しないと言われているタンパクでさえ直径が 5~8 nm であるため、一次粒子径が 10~60 nm の化粧品や医薬部外品中に含まれるナノ粒子²⁶⁾は、単分散（微小均一粒子）で皮膚に塗布されたとしても、皮膚を浸透・透過するとは考えられない。

Table 3 Molecular markers to examine the separation properties by ultrafiltration membrane²⁵⁾

	分子量 (g/mol)	分子径 (nm)
スクロース	340	1.1
ラフィノース	590	1.3
ビタミン B ₁₂	1,360	1.7
バシトラシン	1,410	1.7
インスリン	5,700	2.7
チトクローム C	13,400	3.8
ミオグロビン	17,000	4.0
α-キモトリプシノーゲン	25,000	4.6
ペプシン	35,000	5.0
オボアルブミン	43,000	5.6
仔牛血清アルブミン	67,000	6.4
アルドラーゼ	142,000	8.2
γ-グロブリン	150,000	8.4

第2節 実験方法

1. 実験材料

Fluoresbrite® Yellow Green (YG) plain Microspheres 0.05 μm は Polyscience, Inc. (Warrington, PA, U.S.A.) より購入したものをを用いた。Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4、FD-20、FD-40、FD-70、FD-250、FD-2000、以下総称して FD と略記) は Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入したものをを用いた。Table 4 に本研究で用いた FDs の物理化学的パラメーターを示す。サンスクリーン剤 (Allie comfortable protector EX、株式会社カネボウ化粧品、東京、日本) は市販のものを購入し用いた。その他の試薬および溶媒は市販の特級品を精製せずに用いた。

Table 4 Physicochemical properties of FITC-dextrans (FDs)

FDs	<i>M.W.</i> (kDa)	Stokes diameter, <i>d</i> (nm)	Log <i>d</i> (nm in <i>d</i>)
FD-4	3.38-4.40	2.8 ²⁷⁾	0.45
FD-20	21.2	6.6 ²⁷⁾	0.82
FD-40	35.6-38.5	9.0 ²⁷⁾	0.95
FD-70	69.8	12.0 ²⁷⁾	1.08
FD-250	250	21.0 ²⁸⁾	1.32
FD-2000	2000	41.6 ²⁹⁾	1.62

Refer to the references for the number in brackets

2. 実験動物

体重 220～260 g の雄性ヘアレスラット（WBN/ILA-Ht 系）は城西大学生命科学研究センター（坂戸、埼玉、日本）より購入した。なお、動物の飼育および実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従って行った。

3. 種々皮膚膜の作成

ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, *i.p.*）麻酔下、剃毛処理後のヘアレスラットの腹部から正中線を挟んで左右 1 枚ずつ皮膚を摘出した。なお、この時、ラット皮膚としては、健常皮膚（intact skin）に加え、セロハンテープ（セロテープ®、ニチバン株式会社、東京、日本）により 20 回テープストリッピングを行い、角層を完全に剥離した角層剥離皮膚（stripped skin）を用いた。また、20G、23G、27G または 30G 注射針（20G はレギュラーベベル、23-27G はショートベベルのテルモ注射針、30G はテルモ歯科用注射針、テルモ株式会社、東京、日本）により皮膚に貫通孔を形成させた 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、日本）で角層側に深さ約 0.5 mm の傷を約 5 mm 間隔で 2 本つけた razor-treated skin も用いた。なお、needle 処理は皮膚を動物から摘出し、皮膚をガラス製拡散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 20-30G 注射針を先端から 10 mm 刺した。この時、針は皮膚を完全に貫通したのを確認した。Razor 処理は割り箸で剃刀を挟み、刃の出ている部分を 0.5 mm に調整し、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。腹部皮膚を摘出後、真皮側の脂肪を丁寧にハサミで取り除いた。

4. *In vitro* 皮膚透過実験法

これら摘出皮膚を横型拡散セル（有効透過面積 0.95 cm²）に挟み、皮膚の自家蛍光と角層の水和状態の影響を除くため、表皮側および真皮側に phosphate buffered saline (PBS、pH7.4) を 3.0 mL 適用し、1 時間放置した。1 時間後、10 Hz の交流電流を供給する Impedance Meter (Advance、東京、日本) を用い、皮膚電気抵抗値を測定した。なお、電極は Ag-AgCl 電極を用いた。その後、表皮側および真皮側の溶液を取り除き、再度 PBS を真皮側に 3.0 mL 適用した。真皮側溶液より 0 時間目のサンプリング (0.5 mL) を行い、同量の PBS を真皮側に補充した。表皮側には PBS に分散させた Fluoresbrite[®]懸濁液、または溶解させた FD 溶液 (Intact skin の場合 FD-4, 20; 1.0 mg/mL、FD-40, 70; 7.5 mg/mL、FD-250; 10 mg/mL、stripped skin、razor-treated skin、needle-punctured skin の場合は全て 1 mg/mL) を 3.0 mL 適用した。なお、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 を使用した。実験中、セル内の温度を 32°C に保ち、表皮側と真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで攪拌した。経時的に真皮側溶液から 0.5 mL サンプリングを行い、その都度、同量の PBS を補充した。得られたサンプル中の Fluoresbrite[®]量および FD 量は蛍光分光光度計 (RF-5300、株式会社島津製作所、京都、日本) を用いて測定した。Table 5 に Fluoresbrite[®]および FD の定量条件を示す。

Table 5 Spectrofluorometric conditions for Fluoresbrite[®] and FDs measurement

	Fluoresbrite [®]	FDs
Excitation wavelength (nm)	441	490
Emission wavelength (nm)	486	520
Excitation and Emission bandwidth (nm)	5	5

5. 共焦点レーザー顕微鏡による皮膚組織切片観察法

Fluoresbrite[®]適用群に関しては透過実験終了後、回収したラット皮膚表面を PBS で十分に洗浄し、凍結包埋剤 (Super Cryoembedding Medium、Leica microsystems、Wetzlar、Germany) に包埋し、-80°C イソペンタン中で速やかに凍結させた。垂直方向の皮膚凍結切片(厚さ 20 μm)をクライオスタット (CM3050、Leica microsystems、Wetzlar、Germany) により作製し、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、日本) により観察した。

第3節 結果

1. Fluoresbrite®の *in vitro* 皮膚透過性

Figure 2a と b にヘアレスラット intact skin、stripped skin、razor-treated skin および needle-punctured skin を介した Fluoresbrite®の透過プロファイルを示す。Intact skin だけでなく皮膚透過の最大のバリアーといわれている角層を取り除いた stripped skin に 24 時間適用しても、Fluoresbrite®は皮膚を透過しなかった (Fig. 1a)。さらに、大変興味深いことに、razor で皮膚を深く傷をつけても Fluoresbrite®の皮膚透過性は観察されなかった (Fig. 2a)。一方で、20 G から 30 G の注射針で皮膚を貫通させると、Fluoresbrite®はレシーバー側に透過することを確認した (Fig. 2b)。また、図からわかるように、注射針の G (ゲージ) 数が小さくなるのに従い (注射針の径が大きくなるのに従い)、Fluoresbrite®の皮膚透過性が高くなることが分かった (Fig. 2b)。そこで、Fluoresbrite®透過量と注射針の外径および外径から求めた円の面積との関係を調べた。Fig. 2c より、注射針の外径が大きくなるに伴い、Fluoresbrite®の透過量が上昇する傾向がみられた。また、その形状は下に凸であった。Fig. 2d より明らかなように、Fluoresbrite®透過量は用いた注射針の外径円の面積にほぼ比例して増大することが分かった。

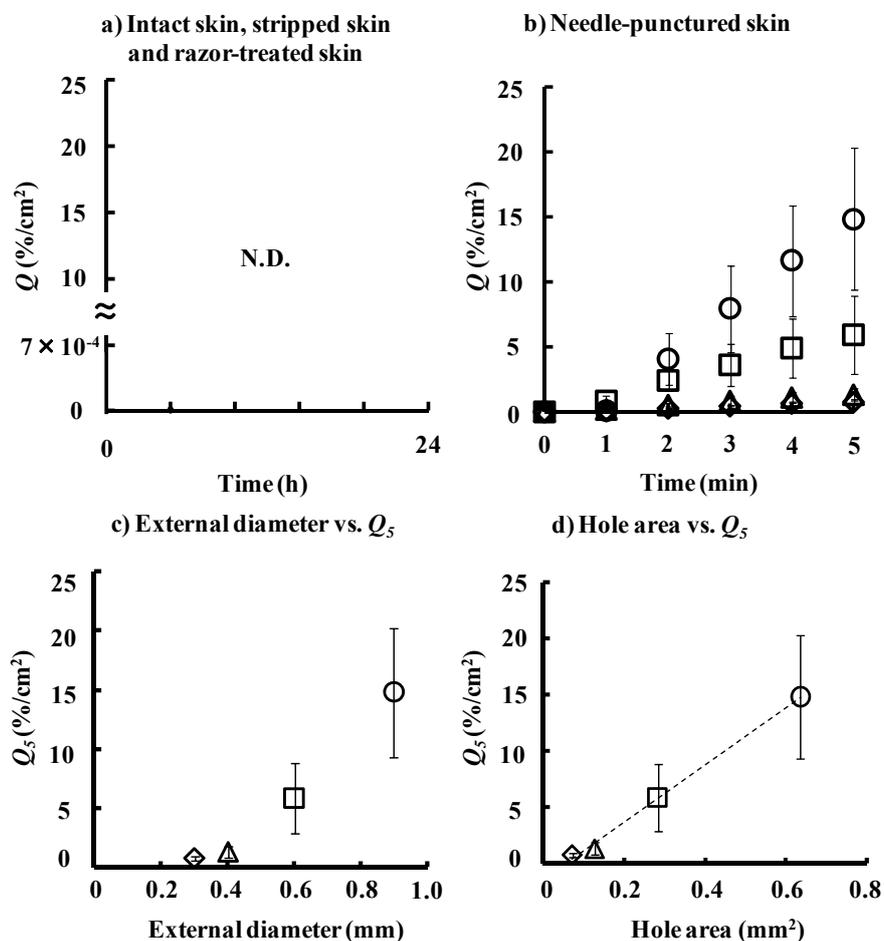


Fig. 2 Time course of changes in the cumulative fraction of Fluoresbrite[®] that permeated through intact skin, stripped skin and razor-treated skin (a) and needle-punctured skin (b). Relationship between area of needle-punctured hole and cumulative amount of Fluoresbrite[®] that through needle-punctured skin over 5 h (Q_5). Symbols: ○; 20G needle (external diameter: 0.9 mm), □; 23G needle (0.6 mm), △; 27G needle (0.4 mm), ◇; 30G needle (0.3 mm). Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

Figure 3にFluoresbrite[®]適用後のCLSMによる皮膚垂直切片画像を示す。Fig. 3aよりstripped skinでは皮膚表面に強い蛍光が観察された。なお、この蛍光部分は組織中の部分ではなく、あくまで皮膚表面である。また、皮膚の深部の毛孔や毛嚢部にも薄い蛍光がみられたが、これは毛タンパクに起因する自家蛍光と考えている。Fig. 3bから、皮膚に剃刀で傷を付けると、その傷を付けた部分に蛍光がみられることが分かった。しかし、蛍光が真皮へ貫通していないので、Fluoresbrite[®]の皮膚透過はないと考えられる。一方、Fig. 3cより、注射針で貫通した部分に沿ってFluoresbrite[®]に起因する蛍光がみられた。これより皮膚に注射針で貫通孔をつけるとFluoresbrite[®]は皮膚を浸透すると考えられる。また、皮膚表面から深部に行くにつれて、孔の大きさが次第に狭くなる様子が観察された。

Figure 4aおよびbそれぞれに表皮側および真皮側より観察したFluoresbrite[®]適用後のneedle-punctured skinの水平画像を示す。30 Gから20 Gへと用いた注射針の外径が大きくなるに伴い、表皮側および真皮側の皮膚に形成される貫通孔も大きくなる様子が観察された。

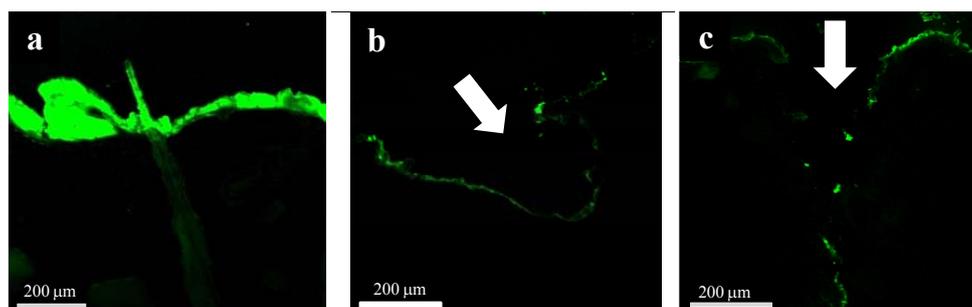
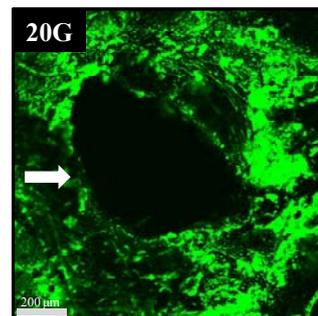
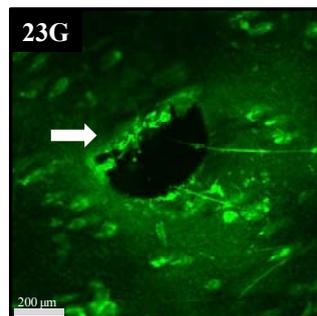
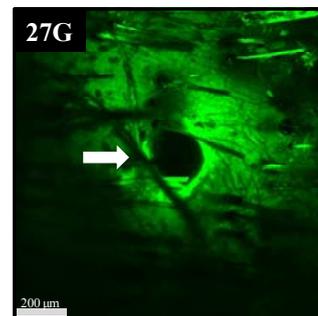
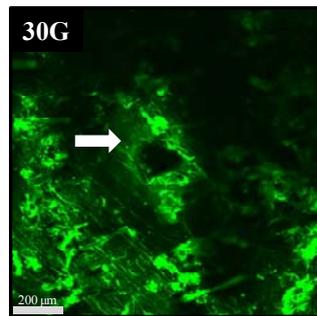


Fig. 3 CLSM image of vertical slice of hairless rat skin after application of Fluoresbrite[®]. a) stripped skin 24 h after application of Fluoresbrite[®], b) razor-treated skin 5 min after application of Fluoresbrite[®], c) needle-punctured skin 10 min after application of Fluoresbrite[®]. Each bar represents 200 μm . Arrows in b and c show site of razor-treated and needle-punctured, respectively.

a) Epidermis side



b) Dermis side

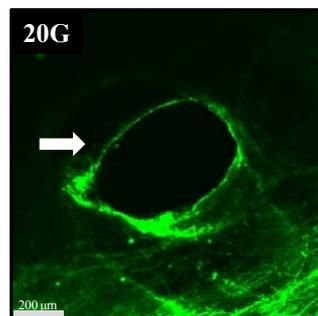
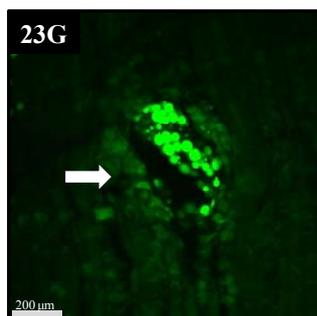
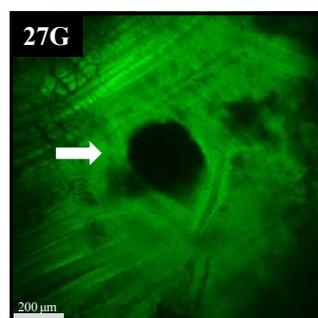
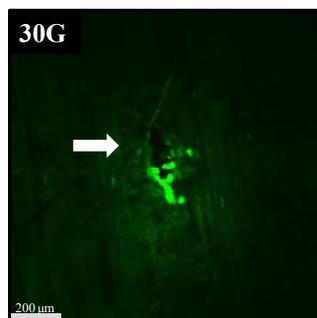


Fig. 4 Horizontal observation of the epidermis side (a) and dermis side (b) of hairless rat needle-punctured skin after application of Fluoresbrite[®]. Arrows show pores created by needle-puncture.

また、Figure 5a, b に皮膚表面（表皮側および真皮側）で観察された貫通孔より求めたヘイウッド径と Fluoresbrite[®]の皮膚透過係数の関係を示す。ヘイウッド径が大きくなるに伴い、Fluoresbrite[®]の皮膚透過係数が上昇する傾向がみられた。さらに、その形状は下に凸になることも明らかとなった。そこで Fluoresbrite[®]の皮膚透過係数と孔面積の関係を調べた。その結果を Fig. 5c, d に示す。Fluoresbrite[®]の皮膚透過係数は孔面積にほぼ比例することが明らかになった。また、Fig. 5c, d の x 軸切片が表皮側および真皮側共に約 80 μm であったことから、この程度の孔粒子径が Fluoresbrite[®]（粒径 0.05 μm ）の皮膚透過に必要なことが示唆された。Fig. 5a, b と Fig. 2c、Fig. 5c, d と Fig. 2d 共にグラフが似ている。この時の Fig. 2d の x 軸との交点の値は、0.056 mm^2 で、針の外径は 130 μm であった。この値は、Fig. 5c, d から求めた孔の面積や針の外径よりも大きな値を示した。

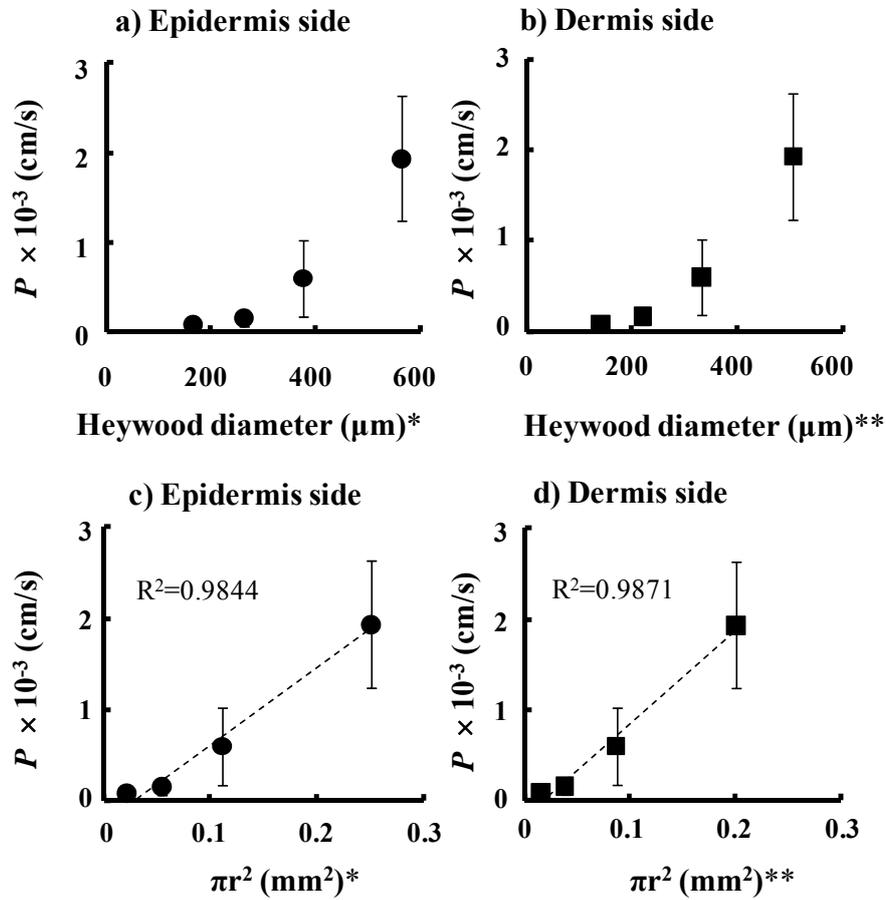


Fig.5 Relationship between permeability coefficients (P) of Fluoresbrite[®] and Heywood diameter (a, b) and area (c, d) of pores prepared by needle puncture. Heywood diameter was calculated by CLSM observation from epidermis side* and dermis side** of needle-punctured skin. The pore area was determined by $\pi \times (\text{Heywood diameter}/2)^2$. Intercept in x-axis in Fig. 4c and d are 79 and 77 nm, respectively. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3$).

2. FITC-dextran 類の *in vitro* 皮膚透過性

高分子モデル物質である FDs の皮膚透過性を同様に測定し、ナノマテリアルの皮膚透過性と比較した。Figure 6 に intact skin を介した FD-4 - FD-2000 の透過プロファイルを示す。FD-4 から FD-250 は Fluoresbrite®とは異なり intact skin を透過した。Intact 皮膚透過性は分子量の増加とともに低くなった。また、高分子量の FD になるほど透過速度の経時的変化が大きくなり、定常状態透過速度を得ることが難しくなった。なお、Fluoresbrite®と同様な溶質径を有する FD-2000 は 48 時間の intact skin 透過実験では透過が認められなかった。

Figure 7 に stripped skin および razor-treated skin を介したこれら FDs の透過プロファイルを示す。Stripped skin と razor-treated skin を介する FD 透過性の差について、8 時間累積透過量を基準に調べると、FD-4 や FD-20 では透過性に差が見られなかったが、FD-40、FD-70 や FD-250 では razor-treated skin での透過性の方が高くなる傾向がみられた。なお、FD-2000 では透過量が低く、定量感度も低いため、stripped skin と razor-treated skin の透過量の差がはっきりしないものと思われた。

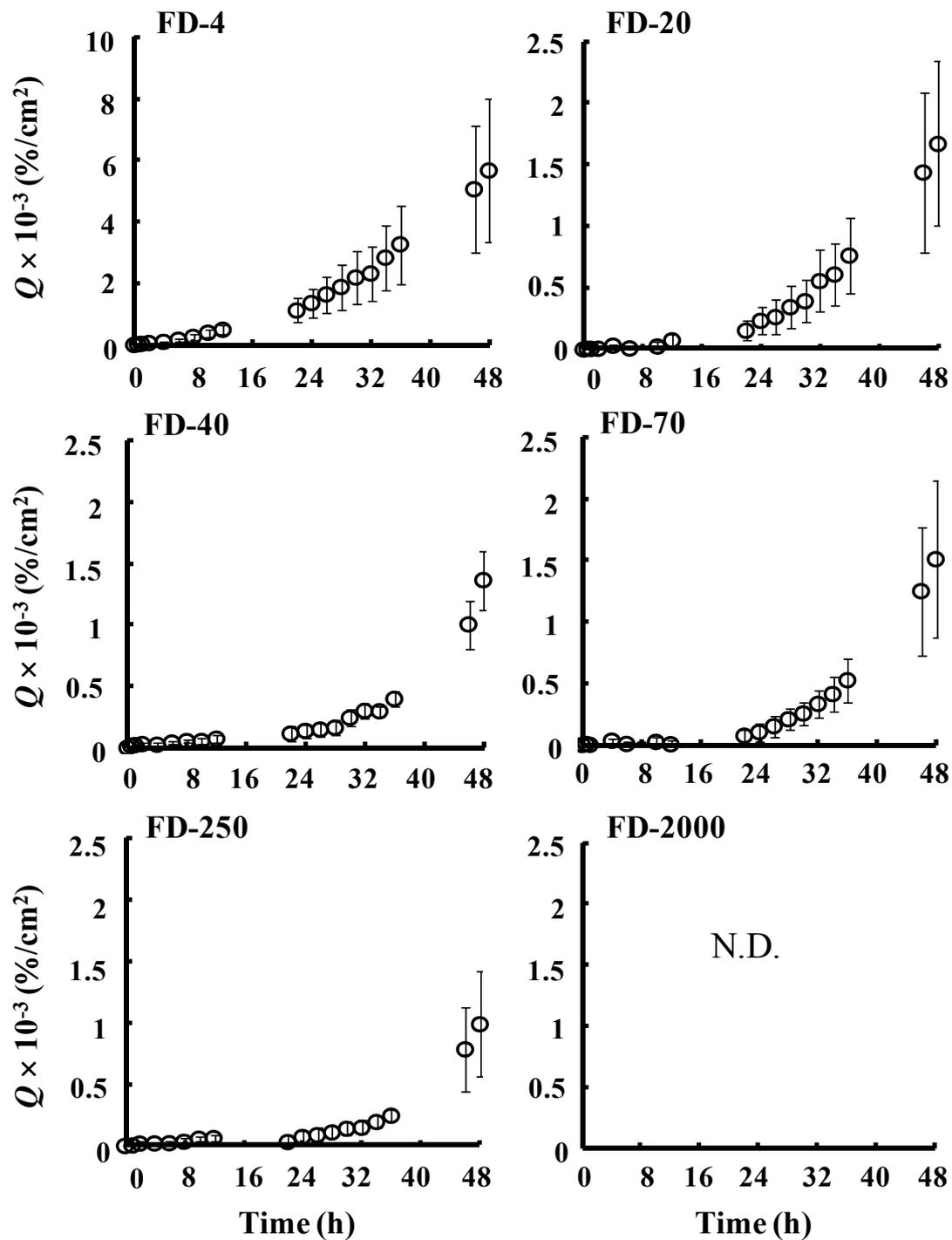


Fig. 6 Time course of changes in cumulative amount of FDs that permeated through hairless rat intact skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

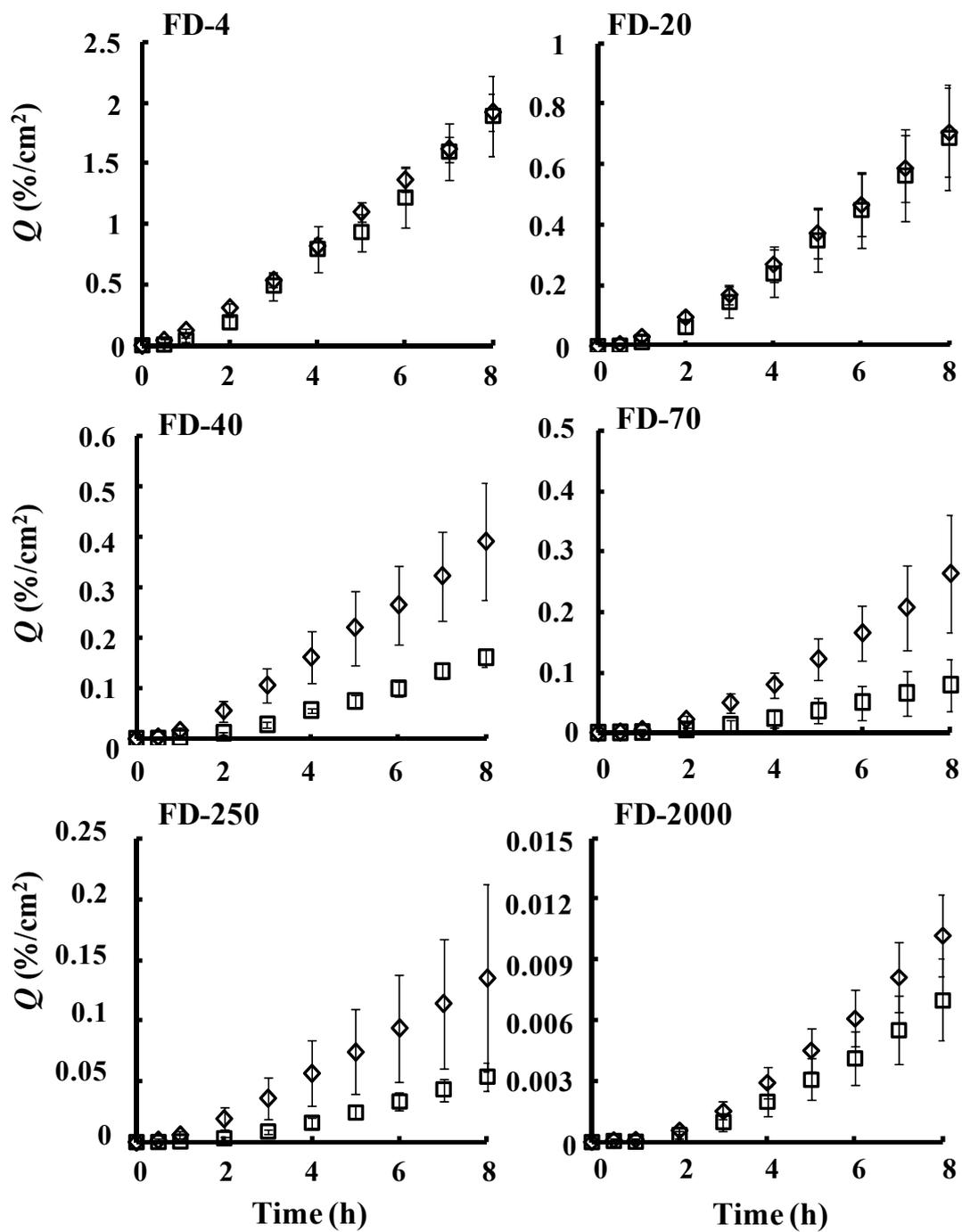


Fig. 7 Time course of changes in cumulative amount of FDs that permeated through hairless rat stripped skin (□) and razor-treated skin (◇). Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

Figure 8にFDの permeability coefficient と Stokes diameter である d の double logarithmic relation を示す。Log d の増加に伴い、intact skin、stripped skin および razor-treated skin を介する Log P は減少する傾向がみられた。Intact skin でFD-40 とFD-70の Log P の大小が逆転しているが、その理由は不明である。また、この時、intact skin の P は22~36時間目までの平均値、stripped-skin と razor-treated skin は定常状態の P を用いた。なお、図中の intact skin を介するFD-2000の値は算出できなかったため、下限定量限界値から計算した P 値を示した。

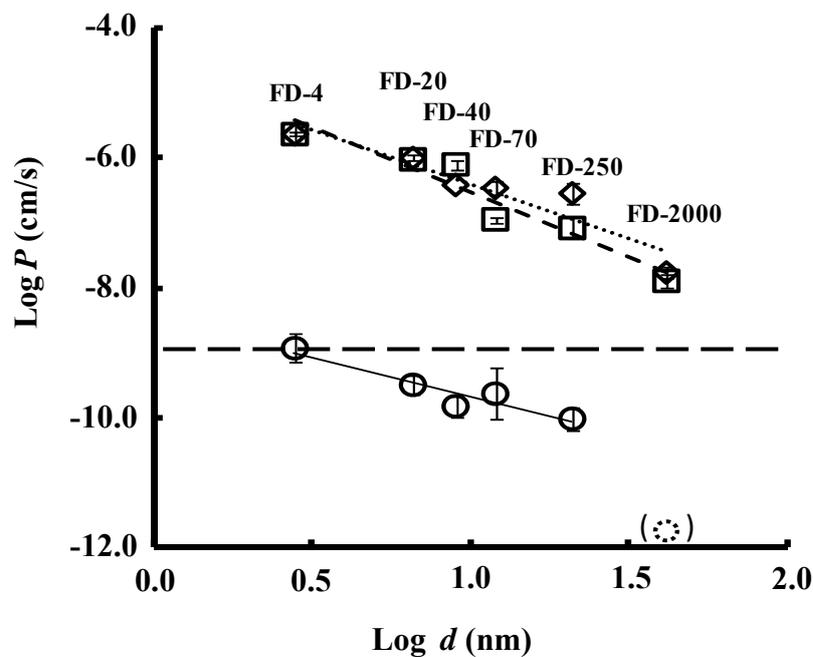


Fig. 8 Relationship between permeability coefficients (P) and Stokes diameter (d) of FDs. Symbols: ○; intact skin, ◻; stripped skin, ◊; razor-treated skin, ◻; FD-2000 estimated value. Dashed line shows desquamation rate. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

Figure 9 に各処理を施した皮膚の電気抵抗値を示す。Stripped skin の電気抵抗値は intact skin の約 1/20 とかなり低かった。同様な傾向は razor-treated skin でもみられた。しかし、大変興味深いことに、needle-punctured skin の電気抵抗値は stripped skin や razor-treated skin と比較して、高い値を示した。Needle-punctured skin を介してのみ Fluoresbrite[®]が皮膚を透過したが、この結果より Fluoresbrite[®]の皮膚透過性は皮膚の電気抵抗値に単純には逆比例しないことが明らかとなった。

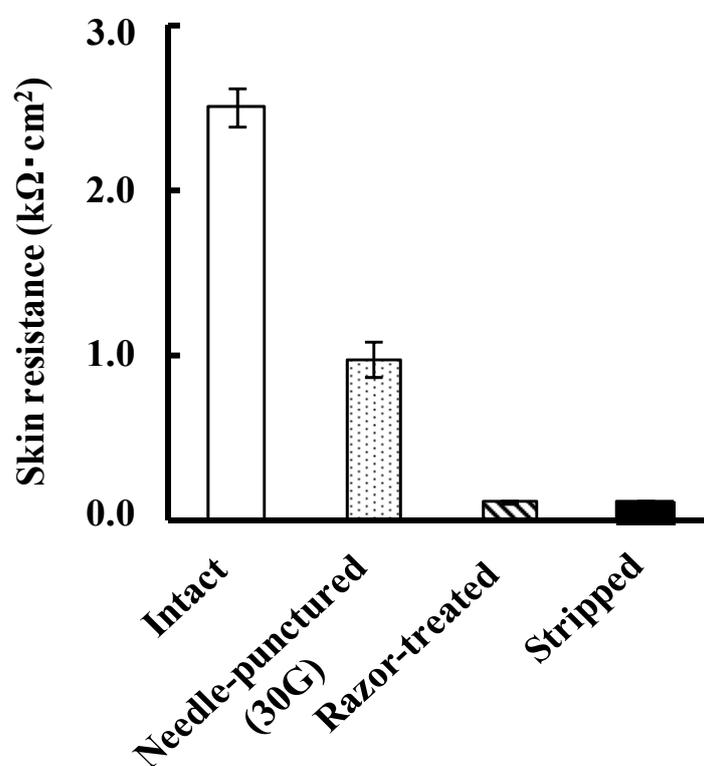


Fig. 9 Comparison of electric resistance in several skin samples 1 h after hydration. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 4-5).

Figure 10 に各処理を施した皮膚を介する FD-4 の透過性を示す。FD の皮膚透過性は razor-treated skin、stripped skin、needle-punctured skin、intact skin の順になった。Fluoresbrite[®]とは異なり、皮膚の電気抵抗値が下がると FD の皮膚透過性が増加することが示唆された。

Figure 11a に FD-4 の透過係数 P と各処理を施した皮膚の電気抵抗値の逆数との関係を示す。FD の皮膚透過係数は電気抵抗値の逆数と比例する傾向がみられた。しかしながら、Fig. 11b に示した Fluoresbrite[®] と皮膚の電気抵抗値の逆数との関係より、Fluoresbrite[®] の透過は電気抵抗値に依存しないことが分かった。

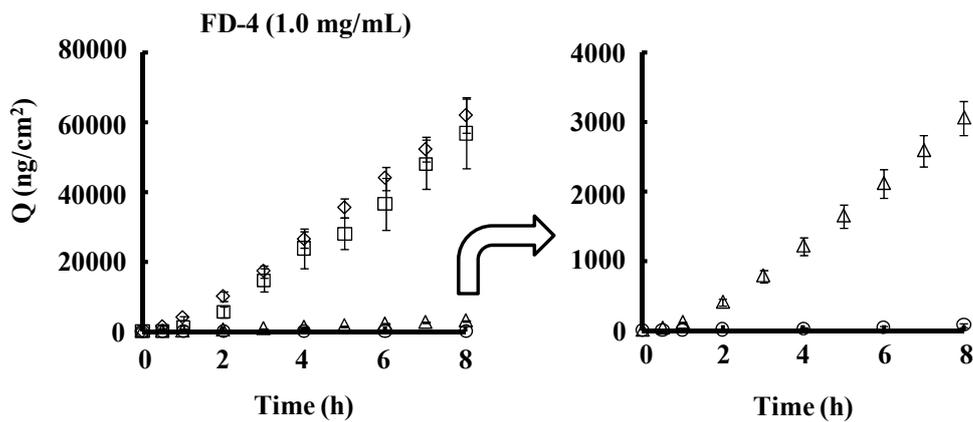


Fig. 10 Relationship between permeability coefficients (P) and reciprocal of electric resistance in several skin samples. Symbols: ○; intact skin, □; stripped skin, ◇; razor-treated skin, △; 30 G needle-punctured skin. Each value represents the mean \pm S.E. ($n=3-4$).

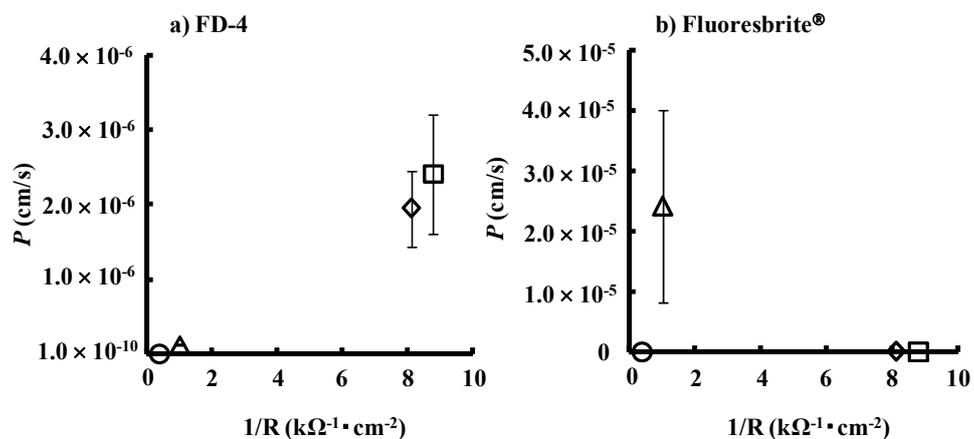


Fig. 11 Comparison of permeability coefficients (P) in several skin samples of FD-4 (a) and Fluoresbrite[®]. Symbols: ○; intact skin, □; stripped skin, ◇; razor-treated skin, △; 30 G needle-punctured skin. Each value represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

第4節 考察

Fluoresbrite[®]はヘアレスラット intact skin を透過しなかった (Fig. 2a)。そこで、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 値を算出すると 2.4×10^{-10} cm/s 以下となった。第1章、第1節の2で示したように、この値は落屑速度 (P_{des}) よりも低く、 $P - P_{des} \ll 0$ に分類できるため、角層を透過経路とする場合には Fluoresbrite[®]は皮膚透過および皮膚浸透はしないと考えることができる。また、Fluoresbrite[®]は角層を除いた stripped skin も透過しなかった (Fig. 2a, Fig. 3a)。Fluoresbrite[®]は媒質に溶けないため、たとえ角層にひびが入って浸透したとしても生きた表皮や真皮中を拡散しないことが推察された。さらに、Fluoresbrite[®]適用後の razor-treated skin 垂直切片画像 (Fig. 3b) から、Fluoresbrite[®]に起因する蛍光がその傷表面に観察された。Razor-treated skin の透過性も上がった。Fig. 2a から、Fluoresbrite[®]は生きた表皮や真皮に移行しないことが示唆された。しかし一方で、Fluoresbrite[®]は needle-punctured skin のような皮膚を貫通している細孔があれば皮膚を透過すること (Fig. 2b)、また、用いた注射針の外径が大きくなるにつれて透過量は増大することが分かった (Fig. 2c)。さらに透過量は細孔面積に密接に関係していることや Fluoresbrite[®] (0.05 μm 径) の透過にはその 1000 倍程度の細孔が必要であることも併せて示唆された (Fig. 5)。以上より、Fluoresbrite[®]は stripped skin や razor-treated skin を透過しなかったが皮膚を貫通した needle-punctured skin を透過したことから、Fluoresbrite[®]の皮膚透過では角層だけでなく真皮層も大きなバリアーになると考えられた。また、Zhang らもマイクロニードル処理により角層に小孔を形成した皮膚に乳酸・グリコール酸共重合体 (Poly-lactic-co-glycolic acid; PLGA) ナノスフィアを適用しても透過が認められないことを報告している³⁰⁾。

このことから、完全に貫通した皮膚でなければ不溶性のナノ粒子の透過はなく、その場に留まることが考えられた。

Fluoresbrite[®]と同様な溶質径 (41.6 nm) を有する FD-2000 は intact skin を透過しなかったが (Fig. 6)、stripped skin は透過した (Fig. 7)。前述した Fluoresbrite[®] と FD-2000 の皮膚透過性の違いには、皮膚への溶解性 (分配性) が大きく寄与していると考えられた。一方、溶質径が 3 nm 程度の FD-4 では intact skin 透過係数は角層の落屑速度である 1×10^{-9} cm/s 付近であった。第 1 章、第 1 節の 2 で示したように、 1×10^{-9} cm/s 以下の P を示す物質では、角層を透過経路とする場合、*in vivo* では皮膚透過しないと考えられる。しかし、FD-4 は needle-punctured skin だけでなく、razor-treated skin や stripped skin をそれ以上の P 値で透過した (Figs. 6, 7)。これは、FD-4 の皮膚透過のバリアーが角層にあることを示唆している。なお、FITC-dextrans の分子径 d の対数値、 $\text{Log } d$ の増加に伴い各皮膚の $\text{Log } P$ は減少したことを確認した (Fig. 8)。

各処理を施した皮膚の電気抵抗値を比較すると、needle-punctured skin の電気抵抗値が razor-treated skin や stripped skin の電気抵抗値より高い値を示した (Fig. 9)。抵抗値は断面積に反比例することから、razor や stripped skin では生きた表皮・真皮の抵抗はあるものの最大のバリアーである角層を取り除かれた面積が大きいいため電気抵抗値は低下したが、needle-punctured skin では貫通孔によって取り除かれた皮膚の面積が小さいため電気抵抗値は高いままであったと考えられた。

Fluoresbrite[®]は電気抵抗値が低い stripped skin および razor-treated skin を透過しなかったこと、また、電気抵抗値が高いが貫通孔 (細孔ルート) を形成させた needle-punctured skin は透過したこと、さらに FD-4 の皮膚透過は電気抵抗値の逆数と相関したが Fluoresbrite[®]の皮膚透過は電気抵抗値の逆数と相関しなかった

(Fig. 11a, b) ことから、水溶性高分子はわずかながら皮膚透過すること、しかし皮膚に溶解しないナノ粒子は生きた表皮・真皮は透過しないものの毛孔や汗腺などの細孔ルートに侵入することが示唆された。

第5節 小括

分散媒や皮膚に溶解しないと考えられるナノ粒子は、細孔ルートが皮膚を貫通している場合のみ皮膚を透過し、それ以外の場合には深い皮溝や毛孔には移行・侵入するものの皮膚を透過・貫通しないことが確認された。また、ナノ粒子は角層を取り除いた **stripped skin** も透過しなかったことから、ナノ粒子は生きた表皮や真皮中をほとんど拡散できないものと考えられた。以上、透過膜として皮膚をみた時、直径 50 nm 程度のナノ粒子は皮膚を透過・貫通しないと結論づけられた。したがって、ナノマテリアルを健常皮膚に適用しても安全であると考えられる。しかしながら、**razor-treated skin** や一部 **stripped** された皮膚のように角層が損傷した皮膚ではナノマテリアルが生きた表皮細胞に直接接触れ、何らかの影響を及ぼす可能性もあり、本章の研究から損傷皮膚に対してはナノマテリアルの安全性が 100%保証されたとは残念ながら断言できない。

第2章 サンスクリーン剤塗布後の皮膚表面観察

不溶性粒子のモデルとして用いた Fluoresbrite[®]は健全皮膚および損傷皮膚を透過しなかった。このことより、同じ不溶性の粒子と考えられる微粒子酸化チタンも皮膚を透過しないものと考えられる。しかし、注射針で細孔を形成した needle-punctured skin では 50 nm の Fluoresbrite[®]の透過が認められた。また、その透過ルートは注射針により形成された貫通孔であることが示唆された。そのため、実際に化粧品として使用されているナノ粒子も付属器官に侵入することが予測される。Alvarez-Román らの報告によると 100 nm 程度の蛍光ナノ粒子で毛嚢等の付属器官への浸入が観察された²⁰⁾こと、さらには 500 nm の Fluoresbrite[®]も付属器官への浸入も観察されている¹⁹⁾。

そこで、本章では、微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛等のナノ粒子を含む市販サンスクリーン剤を皮膚表面に塗布し、ナノ粒子の分布を観察した。

第1節 実験方法

1. 実験動物

ブタ (LWD) の耳介皮膚は埼玉実験動物 (杉戸、埼玉、日本) より購入した。

2. 走査型電子顕微鏡および元素マッピングによる皮膚表面観察法

ブタ耳から耳介外部皮膚を摘出し、これに市販サンスクリーン剤を 2 mg/cm^2 塗布した。その後、走査型電子顕微鏡 (SEM、S-3400N、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京、日本) により皮膚表面を観察した。また、元素マッピング (EDX、X-Max50、株式会社堀場製作所、京都、日本) より微粒子酸化チタン

と微粒子酸化亜鉛の皮膚分布を確認した。この実験でブタ皮膚を使用した理由は、皮膚の構造がヒトと類似しており、毛孔がヘアレスラットよりも大きく観察しやすく表面分布の評価によく使われている³¹⁻³³⁾ためである。

第2節 結果

1. サンスクリーン剤の皮膚表面分布¹⁾

Figures 12、13 にサンスクリーン剤適用後の皮膚表面の SEM 画像を示す。それぞれの図のバーの目盛りは Fig. 12a では 1.0 mm、b では 200 μm 、c では 50 μm であり、Fig. 12a から c の順に倍率が増えている。図中の白色ドットはサンスクリーン剤を示す。Fig. 12a と b からサンスクリーン剤は皮溝部に集積していること、また、Fig. 12c から毛嚢ロート部にサンスクリーン剤の凝集粒子があることが分かる。

Figure 13 にサンスクリーン剤適用後の皮膚表面の SEM 画像の元素マッピング像を示す。Fig. 13a は SEM 像である。なお、Fig. 13a-f は毛嚢を含む同一部位を示す。Fig. 13b の炭素 (C) 分布を示す紅色部分は Fig. 13a の SEM 画像の黒色部分と一致する。これらの部分はサンスクリーン剤に起因する微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛が少ない部位である。一方、Fig. 13c, d で示したそれぞれチタン (Ti) と亜鉛 (Zn) の分布は共に似ていて、かつ、SEM 画像の白色部分と一致する。すなわち、これらの領域はサンスクリーン剤中の微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛の集積部位である。これは、Ti や Zn の分布が C の分布 (Fig. 13b の黒色部分) とはまったく異なることによっても確認できる。さらに、Merge 像(C+Ti)と(C+Zn) (Fig. 13e, f) より、微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛は皮溝そして毛嚢ロート部のように皮膚表面の深い溝の部分に集積していると考えら

れた。

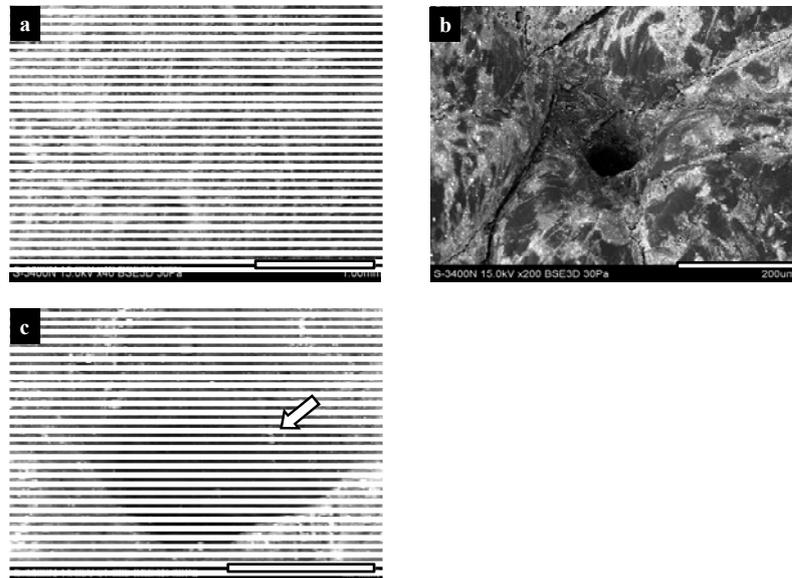


Fig. 12 SEM images of porcine skin surface after application of marketed sunscreen. Arrow shows aggregated nanoparticles irrupt into hair follicle. Each white bar represents 1.0 mm (a), 200 μm (b), 50 μm (c).

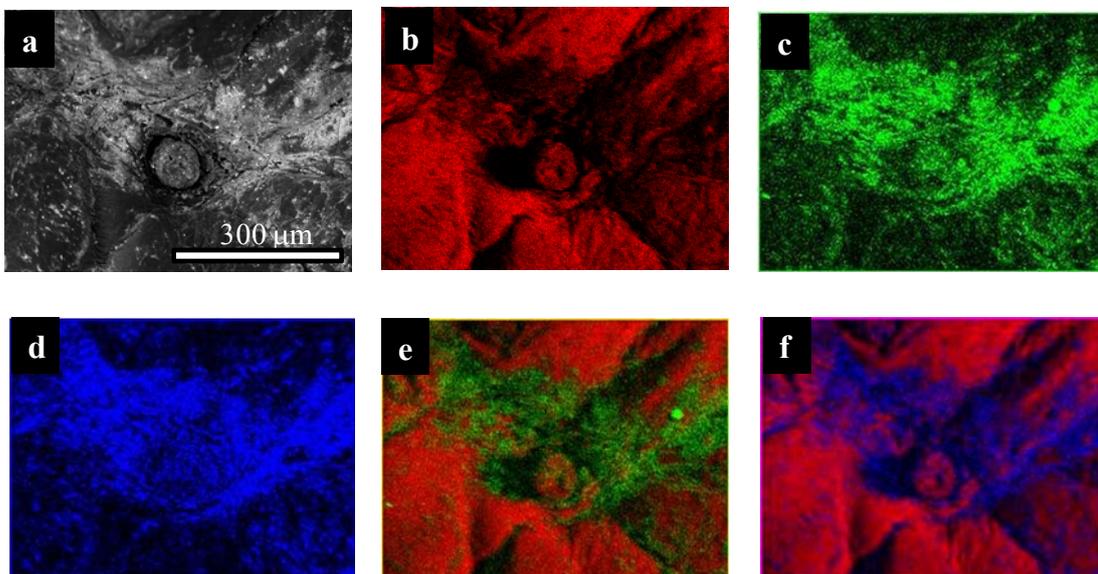


Fig. 13 SEM-EDX elemental mapping images of porcine skin surface after application of marketed sunscreen (a) original SEM image, (b) carbon mapping, (c) titanium mapping, (d) zinc mapping, (e) merged carbon and titanium mapping, (f) merged carbon and zinc mappings. The bar represents 300 μm.

第3節 考察

皮膚表面の SEM 画像および元素マッピングから、サンスクリーン剤中の微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛は、皮膚適用後皮溝や毛孔周辺に分布する傾向がみられた (Figs. 12, 13)。すなわち、ナノ粒子は皮膚表面から少し低くなった部位に集積することが推測された³⁴⁾。今までにもナノ粒子は皮膚を透過しない^{35, 36)}ものの、選択的に毛嚢中に侵入する³⁷⁻⁴⁰⁾と報告されているが、本研究の結果はそれらの報告と一致している。

第4節 小括

ナノ粒子を皮膚に適用すると皮溝や毛孔等の皮丘よりも低いところに集積することが分かった。毛孔に侵入したナノ粒子は直接生きた細胞に触れる機会があることから、ナノ粒子の安全性を考えると付属器官でのナノ粒子の分布、毛嚢経由でのナノ粒子の動態や生きた細胞への影響を考慮することが重要と考えられた。

第2編 微粒子酸化チタンの皮膚障害性および感作性

第1章 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた種々微粒子酸化チタン皮 内投与後の障害性⁴¹⁾

前編より、ナノマテリアルの皮膚浸透・透過の可能性を健常皮膚や損傷皮膚を用いて試験した。その結果、ナノマテリアルは健常皮膚だけでなく、高い透過バリアー能を有する *stripped skin* や真皮層にまで傷を付けた *razor-treated skin* でも透過しないことを確認した¹¹⁾。しかしながら、注射針で皮膚を完全に貫通させた *needle-punctured skin* ではナノ粒子の透過が認められた。また、サンスクリーン剤塗布後の皮膚表面観察より、付属器官へのナノ粒子の局在が観察された¹¹⁾。したがって、安全性保証のためには、付属器官に侵入後のナノ粒子の挙動を考える必要がある。付属器官の近くには生きた細胞が存在し、浸入したナノ粒子が貯留すると皮膚刺激や感作が生じることが懸念される。また、皮膚刺激はナノサイズ化による物理化学的性質の変化や表面コーティング剤の有無により影響されるものと考えられる。このようなナノ粒子のリスクを正しく評価するためには、実際に使用する製品中に含まれるナノ粒子が生きた皮膚中にどれだけ移行するのかを見積もり、その濃度が皮膚細胞に障害を与えるかを検討することが重要である。しかしながら、多くの文献⁴²⁻⁴⁴⁾は各々の試験法で皮膚刺激性や安全性の評価を行っているものの、皮膚細胞を使用し、かつ同じ培養条件で皮膚の刺激性や障害性の評価を網羅して検討した例は少ない。

そこで、本編ではまず、細胞を用いた試験より実際に想定される曝露に近い評価が可能な3次元培養ヒト皮膚モデル中に種々微粒子酸化チタンを投与し、

皮膚障害性を試験した。なお、本章で用いた3次元培養ヒト皮膚モデルは、ヒト線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルからなる真皮と多層分化したヒト角化細胞からなる角層を含む表皮を有し、実際のヒト皮膚組織の形状にきわめて類似していると言われている⁴⁵⁾。

第1節 実験方法

1. 実験材料

微粒子酸化チタンとして用いたシリカ処理ルチル型微粒子酸化チタン (Silica coated rutile typed titanium dioxide nanoparticles: SRT; MT-100WP)、水酸化アルミニウム処理ルチル型微粒子酸化チタン (Aluminum hydroxide coated rutile typed titanium dioxide nanoparticles; ART)、および無処理ルチル型微粒子酸化チタン (Non-coated rutile typed titanium dioxide nanoparticles; NRT; MT-150W)、無処理アナターゼ型微粒子酸化チタン (Non-coated anatase typed titanium dioxide nanoparticles; NAT; AMT-100) はテイカ株式会社 (大阪、日本) より供給された。また、3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 試薬と Triton X-100 は Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, U.S.A.) より、LDH cytotoxicity assay kit は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, U.S.A.) より、また Quantikine[®] (Human IL-1 α /IL-1F1 immunoassay) は R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, U.S.A.) より購入した。3次元培養ヒト皮膚モデルである Living Skin Equivalent-high (LSE-high) は東洋紡績株式会社 (大阪、日本) から購入した。正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞増殖用無血清液体培地 (HuMedia-KG2) は Kurabo Industries Ltd. (大阪、日本) から購入した。Dulbecco's

modified eagle medium (DMEM) は日本製薬株式会社 (東京、日本) から購入した。Fetal bovine serum (FBS) は株式会社ニチレイ (東京、日本) から購入した。

2. 微粒子酸化チタンの粒子径およびゼータ電位測定

種々微粒子酸化チタンを各培地に濃度を 0.01 および 0.1 mg/mL になるよう調整し、ソニケーター (Branson 5510、Branson ultrasonics Co., Danbury, CT, U.S.A.) を用いて分散させた。培地分散液中の微粒子酸化チタン粒子径は、Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.) を用いて測定した。さらに、Zeta sizer 3000HSA (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.) を用いてゼータ電位を測定した。

3. 皮膚障害性試験法 (MTT assay, LDH assay, IL-1 α 放出量の測定)

LSE-high をポリカーボネート膜ごとセルカルチャーインサートから切り抜いた。コントロールとして LSE アッセイ培地、ポジティブコントロールとして 1% Triton X-100 培地溶液および 10 mg/mL に調整した種々微粒子酸化チタン培地懸濁液をそれぞれ LSE-high に 10 μ L 皮内注射した。皮内投与後の LSE-high は新たな 6 well セルカルチャーインサートに移した。インサート外側に培地を 1.2 mL 適用後、インキュベート (48 時間、37°C、5% CO₂) した。インサート外側の培地を回収後、回収した培地中に放出した LDH および IL-1 α 量を測定した。測定方法は培養細胞と同様の kit を用い、説明書の手順に従った。その後、インサート外側に 0.333 mg/mL MTT 培地を 300 μ L/well 適用して再度インキュベート (4 時間、37°C、5% CO₂) した。LSE-high は生検パンチを用いてくり貫いた後、生成したホルマザンを 300 μ L の 0.04 N 塩酸イソプロパノール溶液で 2 時間抽出した。マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e、モレキュラーデバイス、東京、

日本)にて測定波長 570 nm、対照波長 650 nm で吸光度差を測定し、生細胞率を求めた。

4. 統計解析

3次元培養ヒト皮膚モデルにおける培地適用群と種々微粒子酸化チタン適用群間の相関性は ANOVA を用い、post-hoc test として Dunnett 検定により行い、いずれの場合も危険率 5%未満を有意と判断した。

第2節 結果

1. 種々微粒子酸化チタンの物性

Tables 6, 7 に各培地に分散させた種々微粒子酸化チタン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 300~4,000 nm であり、DMEM や Humedia-KG2 の添加で粒径が大きくなる傾向が見られた。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。

Table 6 Particle size of dispersed TiO₂ nanoparticles in various mediums

Particle	Primary particle size (nm)	TiO ₂ conc. (mg/mL)	Size (nm)						
			DMEM + 10% FBS		Humedia-KG2		LSE assay medium		
SRT	15	0.01	373 ± 14	1061 ± 53	514 ± 34				
ART	15		853 ± 130	3322 ± 1071	603 ± 264				
NRT	15		415 ± 62	3187 ± 31	846 ± 29				
NAT	6		629 ± 303	1219 ± 1563	652 ± 51				

Values are the mean ± S.E. (n = 3).

Table 7 Zeta potential of TiO₂ nanoparticles

Particle	Primary particle size (nm)	TiO ₂ conc. (mg/mL)	Zeta potential (mV)						
			DMEM + 10% FBS		Humedia-KG2		LSE assay medium		
SRT	15	0.01	-13.10 ± 0.50	-7.90 ± 0.36	-9.87 ± 0.58				
ART	15		-16.17 ± 0.69	-8.77 ± 1.58	-13.1 ± 1.30				
NRT	15		-15.27 ± 1.34	-8.43 ± 0.17	-13.1 ± 1.30				
NAT	6		-14.9 ± 0.49	-10.5 ± 2.09	-10.9 ± 0.35				

Values are the mean ± S.E. (n = 3).

2. 微粒子酸化チタン皮内投与後の障害性

Figure 14 に種々微粒子酸化チタンを LSE-high 中に投与した後の LSE-high の生細胞率 (%) と LSE-high からの LDH 放出量および IL-1 α 量を示す。NAT 投与後の生細胞率は、培地適用群と比較して 80% に低下した。しかし、他の微粒子酸化チタンを投与したものは control とほぼ同じ生細胞率を示した (Fig. 14a)。一方、種々微粒子酸化チタンを投与した後の LDH 放出量は、培地適用群と比較して有意な差は見られなかった。しかし、コーティングをしていない微粒子酸化チタン (NRT、NAT) を LSE-high に投与したほうがコーティングをした微粒子酸化チタン (SRT、ART) に比べ LDH 放出量が少ない傾向を示した (Fig. 14b)。しかし、種々微粒子酸化チタン投与後の IL-1 α 量は培地のみ適用群と比較して ART では低い傾向がみられたものの有意な差は見られなかった (Fig. 14c)。

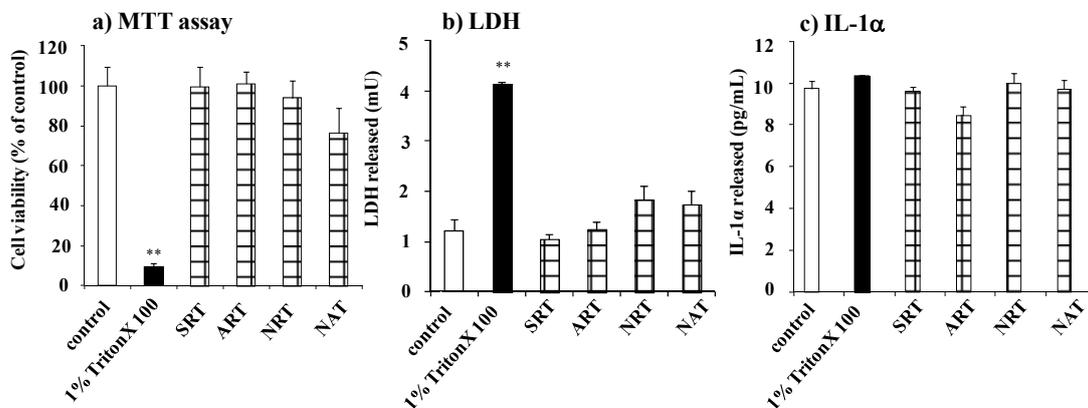


Fig. 14 Effect of TiO₂ nanoparticles on the cell viability of LSE-high (a), LDH (b) and IL-1 α release (c) from LSE-high. Values are the mean \pm S.E. (n = 3-6). Statistical analysis using non-repeated measures ANOVA with Dunnett test for post-hoc test. *P < 0.05 and **P < 0.01 were assumed to be significant. Symbols: ■; 10.0 mg/mL TiO₂ nanoparticles.

第3節 考察

1. 微粒子酸化チタンの物性

微粒子酸化チタンの粒子径測定値は 300~4,000 nm であったが、平均一次粒子径はこの値よりもはるかに小さい（おおよそ 6~15 nm）ことから、培地中で粒子が凝集していることが明らかである（Table 6）。これは培地の組成成分にイオンが多く含まれることや粒子間の静電気力やファンデルワールス力⁴⁶⁻⁴⁹⁾によるためと考えられる。また、培地の種類や粒子の表面コーティングの種類によって、粒子径が変化することも分かった（Table 6）。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（Table 7）原因として、微粒子酸化チタン粒子同士の静電反発が低下し凝集を促進したと考えられた^{50, 51)}。

2. 微粒子酸化チタン皮内投与後の障害性

NAT を皮内投与後に LSE-high 中の生細胞率が培地投与群と比較して 80%に低下していたことから、NAT が皮膚中に侵入した場合、皮膚中の生細胞に障害を生じる可能性があると考えられた（Fig. 14a）。しかし、培地適用群や他の微粒子酸化チタン適用群とも比較して有意な差はみられなかった。また、Figure 14b より、NRT および NAT を皮内投与すると LDH 放出量が増加したがコーティングした SRT や ART では培地投与群とほぼ同様であった（Fig. 14b）ことから、表面コーティングにより皮膚細胞への障害は減少する傾向が考えられた。

第4節 小括

3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた試験により、微粒子酸化チタンにコーティングをすることにより細胞障害性を軽減できることが考えられた。しかし、種々微粒子酸化チタン皮内投与後の3次元培養ヒト皮膚モデルの障害性試験では、細胞障害性に有意な差はみられなかった。3次元培養皮膚では皮内に投与できる量も限られ、評価することは難しい。しかし、今回用いた方法は、ナノ粒子の障害性を評価するスクリーニング法として使用することは可能と考えられる。

第2章 皮膚細胞を用いた障害性評価

3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた研究では微粒子酸化チタンによる明らかな障害性はみられなかった。そこで、より詳細に微粒子酸化チタンの障害性を試験するため、皮膚細胞であるヒト表皮角化細胞（HEK）およびヒト真皮繊維芽細胞（HDF）を用いて皮膚障害性および皮膚細胞中の遺伝子に及ぼす影響を検討することとした。

本章では、HEK および HDF を用いて、MTT assay により細胞障害性、LDH の放出量測定により細胞膜障害性、IL-1 α の放出量測定により炎症反応性、および H₂O₂ の放出量測定により酸化ストレス障害性を試験し、皮膚細胞へのナノ粒子の刺激性を評価した。また、BrdU assay により細胞増殖能を、さらに comet assay により DNA 障害性を試験することにより皮膚細胞中の遺伝子への影響を評価した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

種々微粒子酸化チタン、HuMedia-KG2、DMEM、FBS、MTT 試薬、LDH cytotoxicity assay kit、Triton X-100、Quantikine[®] (Human IL-1 α /IL-1F1 immunoassay) は第2編 第1章と同じものを用いた。Hydrogen peroxide assay kit は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, U.S.A.) より購入した。Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric kit は Roche Applied Science (Mannheim, Germany) より購入した。Comet assay kit は Trevigen Inc. (Gaithersburg, MD, U.S.A.) より購入した。

正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞（HEK）、トリプシン/EDTA 溶液、トリプシ

ン中和液および HEPES 緩衝液は Kurabo Industries Ltd. (大阪、日本) から購入した。ヒト真皮線維芽細胞 (HDF) は東洋紡績株式会社 (大阪、日本) から購入した。トリプシンは Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, U.S.A.) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品を精製せずに用いた。

2. 用いた皮膚細胞の培養条件

HEK は HuMedia-KG2 中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。HDF は 10% FBS 添加 DMEM 中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。数日間培養し、コンフルエントになり次第、実験に使用した。

3. 種々微粒子酸化チタンを用いた刺激性試験法

MTT assay

HEK または HDF を 2×10^4 cells/0.3 mL/well となるように、24 well マイクロプレートにセットした 24 well セルカルチャーインサート (ポアサイズ : 0.4 μ m、メンブラン : polyethylene terephthalate; PET) 内側へ播種し、インサート外側に培地を 0.5 mL 適用して、37°C、5% CO₂、24 時間の条件下でプレインキュベートした。その後、インサート内外の培地を除去した。種々微粒子酸化チタンは濃度が 0.01、0.1、1、10 および 100 mg/mL となるよう培地を用いて調整し、ネガティブコントロールとして HEK では HuMedia-KG2 を、HDF では DMEM + 10% FBS を用いた。これらはそれぞれインサート内側に 0.3 mL/well 適用した。インサート外側に培地を 0.5 mL 適用後、インキュベート (48 時間、37°C、5% CO₂) した。その後、製剤およびインサート外側の培地を除去し、インサート内側に 0.333 mg/mL MTT 培地を 300 μ L/well 適用して再度インキュベート (4 時間、37°C、5% CO₂) した。生成したホルマザンは 100 μ L の 0.04 N 塩酸-イソプロパノール溶液

で 30 分抽出し、マイクロプレートリーダーにて測定波長 570 nm、対照波長 650 nm の吸光度差を用いて定量した。死細胞率を求め、 T_{max} を 100 と仮定し、Sigmoid E_{max} model (1) 式に非線形最小二乗法を用いてフィッティングし、各パラメーターを算出した。

$$T = \frac{T_{max} \times C^\gamma}{TC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad \dots(1)$$

ここで、 T_{max} 、 C 、 TC_{50} 、および γ はそれぞれ最大細胞毒性（死細胞率、%）、種々微粒子酸化チタン濃度、50%細胞毒性濃度、形状因子を示す。

LDH assay

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、MTT assay と同条件でインキュベートした。0.01 または 0.1 mg/mL に調整した種々微粒子酸化チタン培地懸濁液を試験製剤として適用した。また、ネガティブコントロールは培地のみ、ポジティブコントロールは 1% Triton X-100 培地溶液を用いた。適用 48 時間後、インサート外側の培地 0.5 mL を回収した。その後、LDH cytotoxicity assay kit の手順に従い、分光光度法（測定波長；490 nm）により LDH 放出量を求めた。

IL-1 α 放出量の測定

LDH 放出量の測定と同様の操作を行った。回収した培地は Quantikine[®] (Human IL-1 α /IL-1F1 immunoassay) の手順に従い、分光光度法（測定波長；530 nm）により培地中の IL-1 α 量を求めた。

H₂O₂ 産生量の測定

LDH 放出量の測定と同様に操作した。回収した培地は hydrogen peroxide assay kit の手順に従い、蛍光分光光度法（励起波長；530 nm、蛍光波長；570 nm）により培地中の H₂O₂ 量を求めた。

4. 種々微粒子酸化チタンを用いた遺伝毒性試験法

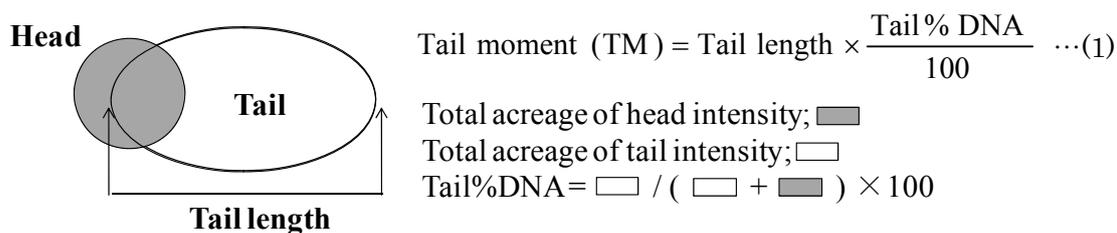
BrdU assay

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 時間プレインキュベートした後、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。0.01 または 0.1 mg/mL に調整した種々微粒子酸化チタン培地懸濁液を試験製剤とした。ネガティブコントロールは培地のみとした。その後の操作は cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric) の手順に従い、分光光度法（測定波長；450 nm）により培養細胞に取り込まれた BrdU を定量した。

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 時間プレインキュベートした後、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。0.01 または 0.1 mg/mL に調整した種々微粒子酸化チタン培地懸濁液を試験製剤とした。ネガティブコントロールは HEK で増殖添加剤を加えた HuMedia-KG2、HDF では DMEM + 10% FBS、また、ポジティブコントロールとしてはそれぞれ 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 の手順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; Casplab.com, Wroclaw, Poland) を用い、以下の (1) 式より Tail moment を求めた。



5. 細胞形態観察

種々微粒子酸化チタン適用 48 時間後の HEK および HDF を位相差顕微鏡 (Olympus Co., Tokyo, Japan) で観察した。

6. 統計解析

各細胞における培地適用群と種々微粒子酸化チタン適用群間の相関性は ANOVA を用い、post-hoc test として Dunnett 検定を行い、いずれの場合も危険率 5%未満を有意と判断した。

第2節 結果

1. 種々微粒子酸化チタンを用いた皮膚刺激性評価

MTT assay

HEK と HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した時の細胞障害性を MTT assay により評価した。Figure 15 に HEK と HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した時の死細胞率を示す。また、Table 8 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用後の 50%毒性発現濃度 (TC_{50}) と形状因子 (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い上昇した (Fig. 15)。 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 のほうが高くであることが分かった。また、共に SRT が一番安全で NAT の危険率が高いことが分かった。

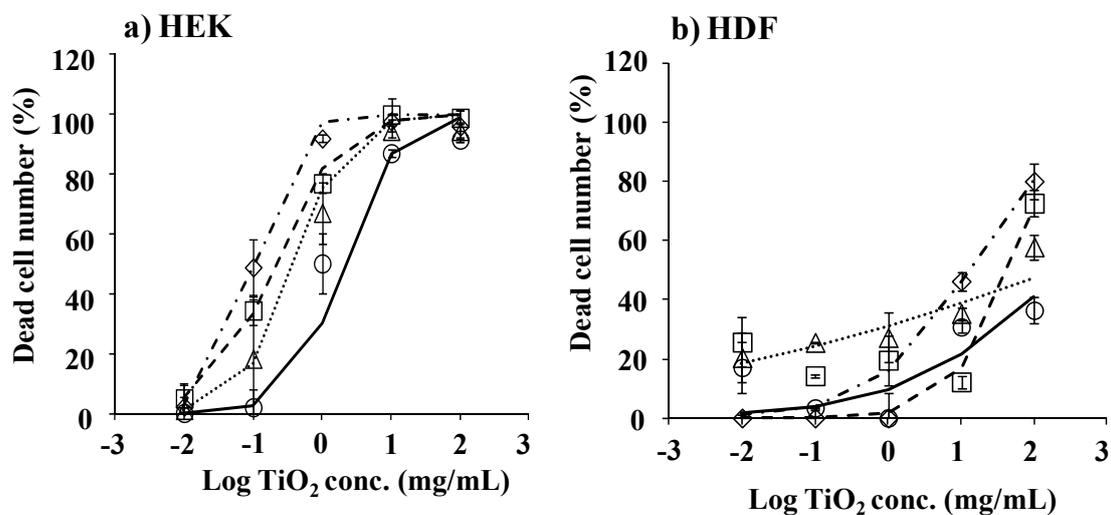


Fig. 15 Dead cell number of TiO₂ nanoparticles on HEK (a) and HDF (b). Values are the mean \pm S.D. (n = 3). Symbols: \circ ; SRT, \triangle ; ART, \square ; NRT, \diamond ; NAT.

Table 8 Cytotoxicity parameters of HEK and HDF 48 h after application of TiO₂ nanoparticles

Particle	HEK		HDF	
	TC_{50} (mg/mL)	γ	TC_{50} (mg/mL)	γ
SRT	2.03	1.19	238.2	0.41
ART	0.39	1.19	204.8	0.15
NRT	0.21	0.96	43.5	1.08
NAT	0.10	1.59	12.4	0.67

LDH assay

HEK と HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した時の細胞膜障害性を LDH の放出量の測定により評価した。Figure 16 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用した後の LDH の放出量を示す。HDF からの LDH の放出量は HEK からの放出量より高かった。しかし、HDF ではどの微粒子酸化チタンを適用しても培地適用群と比較して有意な差はみられなかった (Fig. 16b)。一方で、NAT を 0.10 mg/mL 適用した後の HEK からの LDH 放出量は培地適用群と比較して約 5 倍の増加を示した (Fig. 16a)。しかし、SRT、ART、NRT では濃度によらず培地適用群と LDH の放出量がほぼ同じであった (Fig. 16a)。

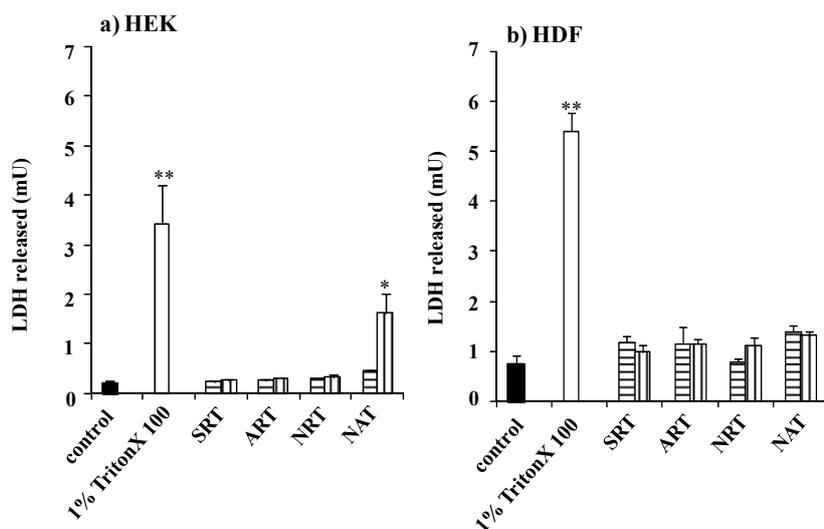


Fig. 16 Effect of TiO₂ nanoparticles on the LDH amount released from HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n = 3-9). Statistical analysis was performed by the same method as in Fig. 14. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ were assumed to be significant. Symbols: ; 0.01 mg/mL TiO₂ nanoparticles, ; 0.10 mg/mL TiO₂ nanoparticles.

IL-1 α 放出量の測定

HEK と HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した時の炎症反応性を IL-1 α 放出量の測定により評価した。Figure 17 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用後の IL-1 α の放出量を示す。各細胞とも微粒子酸化チタンの適用濃度が上昇するにつれて IL-1 α の放出量が増大した。コーティングをしていない微粒子酸化チタン (NRT、NAT) 0.10 mg/mL を HEK に適用した後の IL-1 α 放出量は、培地適用群に対して 1.5 および 2.6 倍増加した (Fig. 17a)。しかし、コーティングをしている微粒子酸化チタン (SRT、ART) では濃度によらず IL-1 α 放出量は同じであった (Fig. 17a)。一方、HDF では培地適用群と比較してコーティングの有無や結晶構造による IL-1 α 放出量の差はみられなかった (Fig. 17b)。

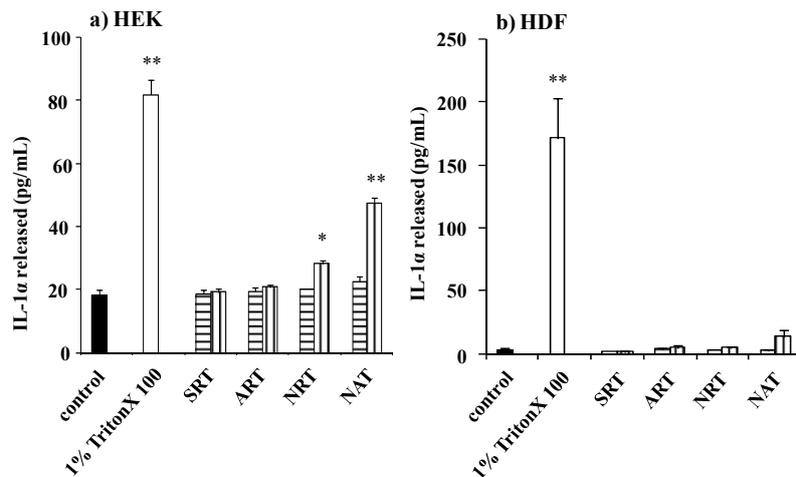


Fig. 17 Effect of TiO₂ nanoparticles on the IL-1 α amount released from HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n = 3-6). Statistical analysis was performed by the same method as in Fig. 14. * P <0.05 and ** P <0.01 were assumed to be significant. Symbols: the same as in Fig. 16.

H₂O₂ 産生量の測定

HEK と HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した時の酸化ストレス障害性を H₂O₂ 産生量の測定により評価した。Figure 18 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用後の H₂O₂ 産生量を示す。HEK、HDF 共に、NAT は他の微粒子酸化チタンを適用した時と比べ H₂O₂ 産生量が最も多かった。また、ART と NRT では HEK からの H₂O₂ 産生量が培地のみより高かった。

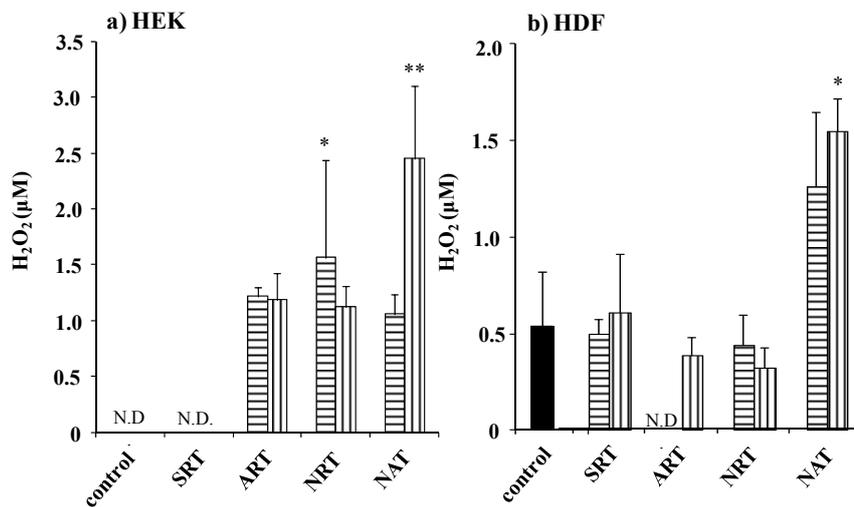


Fig. 18 Effect of TiO₂ nanoparticles on the H₂O₂ amount released from HEK and HDF. Values are the mean ± S.E. (n = 3). Statistical analysis was performed by the same method as in Fig. 14. **P*<0.05 and ***P*<0.01 were assumed to be significant. Symbols: the same as in Fig. 16.

2. 種々微粒子酸化チタンを用いた遺伝毒性評価

BrdU assay

HEK と HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した時の細胞増殖能を BrdU assay により評価した。Figure 19 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用後の細胞増殖能を示す。細胞増殖能は適用したどちらの細胞でも微粒子酸化チタンの濃度が高くなるにつれて低下した。コーティングをしていない微粒子酸化チタン (NRT、NAT) の細胞増殖能の低下がコーティングをしている粒子 (SRT、ART) のそれより著しかった。

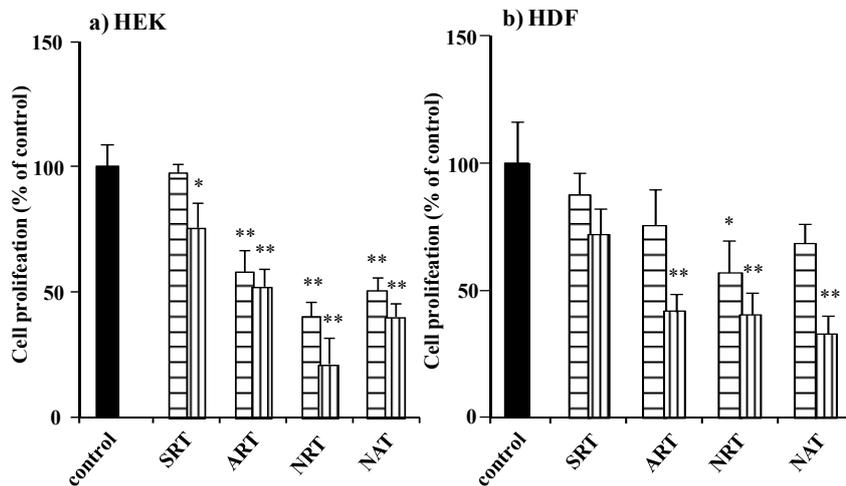


Fig. 19 Effect of TiO₂ nanoparticles on the cell proliferation of HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n = 3-7). Statistical analysis was performed by the same as in Fig. 14. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ were assumed to be significant. Symbols: the same as in Fig. 16.

Comet assay

HEK と HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した時の DNA 障害性を comet assay により評価した。Figure 20 に種々微粒子酸化チタン適用後の HEK および HDF の comet assay による DNA 損傷の程度を示す。コーティングをした微粒子酸化チタン (SRT、ART) はコーティングをしていない粒子 (NRT、NAT) より DNA 損傷が弱かった。また、ルチル型はアナターゼ型に比べ DNA 損傷の程度が弱かった。HEK および HDF 共に NAT を適用した後の DNA 損傷が一番強くあらわれた。しかし、HEK の方が HDF よりも DNA 損傷の程度は強かった。

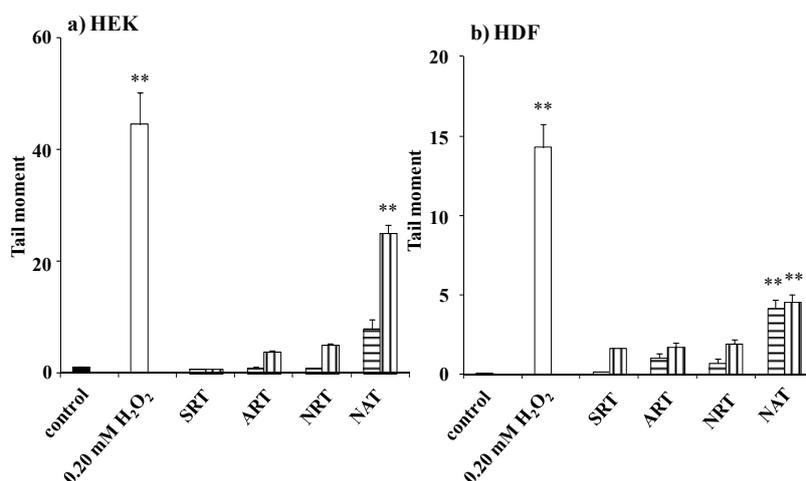


Fig. 20 Effect of TiO₂ nanoparticles on the DNA damage of HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n = 10). Statistical analysis was performed by the same as in Fig. 14. * P <0.05 and ** P <0.01 were assumed to be significant. Symbols: the same as in Fig. 16.

3. 細胞形態観察

Figure 21 に種々微粒子酸化チタン適用後の HEK および HDF の細胞観察画像を示す。適用濃度が高くなるほど微粒子酸化チタンの凝集が観察されたため、HEK、HDF 共に細胞の存在が確認できなくなった。適用した微粒子酸化チタンの種類や結晶構造の違いによる細胞の形態変化は観察されなかった。

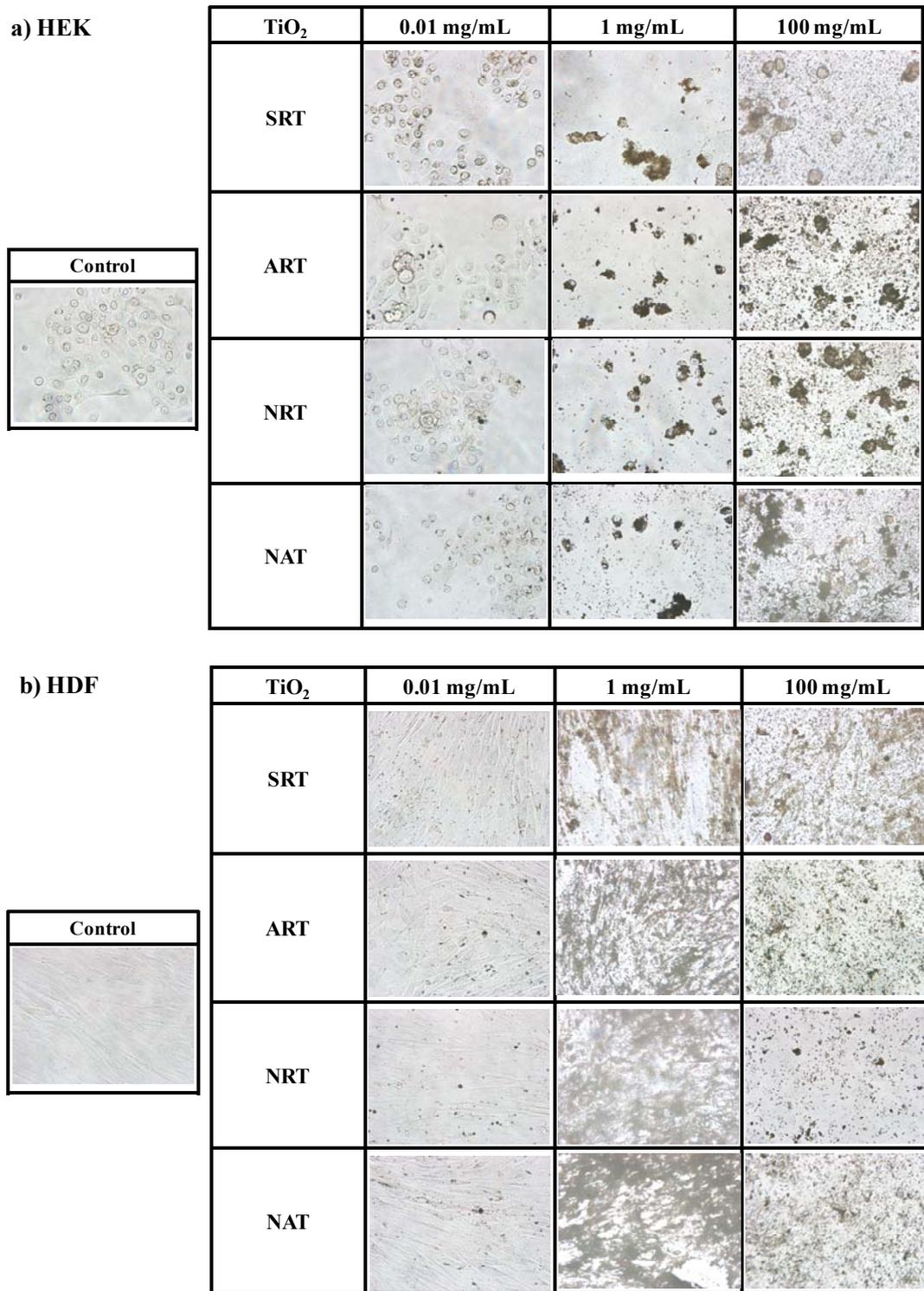


Fig. 21 Observation of HEK (a) and HDF (b) cells after application of different TiO₂ nanoparticles.

第3節 考察

1. 種々微粒子酸化チタンを用いた皮膚刺激性評価

MTT assay

HEK に微粒子酸化チタンを適用すると、どの酸化チタンも低濃度から死細胞率の急激な上昇がみられた (Fig. 15a)。一方で、HDF に種々微粒子酸化チタンを適用した場合には、アナターゼ型のみ低濃度から死細胞率の上昇がみられた (Fig. 15b)。また、 TC_{50} の値から微粒子酸化チタンの障害の強さを順にすると、HEK と HDF 共に NAT>NRT>ART>SRT の順になった。同じ粒子で TC_{50} の値を比べると、HEK のほうが HDF よりも低かった (Table 8)。Figure 15 と各細胞の TC_{50} の値より、微粒子酸化チタンへの耐性は HDF より HEK の方が低いと考えられる。また、Hill 式より求めた形状因子 (γ) (Table 8) が大きい場合は、Figure 15a をみても分かるように、ほんの少しの濃度増加により死細胞率が大きく増加する。また、NAT の HEK、HDF に対する障害作用は、他の微粒子酸化チタンよりも強く現れた。NAT から活性酸素種が多く生成することがこの原因であると思われる⁵²⁾。さらに、コーティングをした微粒子酸化チタン (SRT、ART) ではコーティングをしていない微粒子酸化チタン (NRT、NAT) 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することで軽減できると考えられた。なお、ポリマーコーティングを施すと微粒子酸化チタンの細胞障害性が軽減することを Pan らも報告している⁵³⁾。また、微粒子酸化チタン以外のナノ粒子でも表面コーティングにより細胞障害性に差がみられたという報告⁵⁴⁾があることから、表面コーティング化は安全性確保には大変有用と考えられた。また、今回用いた微粒子酸化チタンの中では SRT が一番安全であること

も明らかとなった。

ここで、実使用を想定して損傷皮膚が微粒子酸化チタンに曝露された場合を考えてみる。市販されているサンスクリーン剤には平均 3.8%の微粒子酸化チタン (38 mg/mL) が含まれている。また、第 1 編で求めた Fluoresbrite® の下限量限界値から算出した P 値の上限値 2.4×10^{-10} cm/s とサンスクリーン剤中の微粒子酸化チタン濃度から、サンスクリーン剤を塗布後の微粒子酸化チタン皮膚透過量を見積もると 1 日あたり $0.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となる。実際のサンスクリーン剤の塗布量が皮膚 1 cm^2 あたり 0.5 mg (液体の場合 $0.5 \mu\text{L}$) とされている⁵⁵⁾ことから、 TC_{50} より単位面積当たりの微粒子酸化チタン量を求めると HEK では SRT、ART、NRT、NAT の順に、1.02、0.20、0.11、 $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となり、HDF では 119、102、21.8、 $6.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となる。計算で求めた P 値の上限値を用いると、表皮細胞が微粒子酸化チタンに直接曝露された場合は細胞障害があらわれる可能性があると考えられた。しかし、健常皮膚の場合は 1×10^{-9} cm/s の速度で角層の落屑がおこるので、表皮細胞が微粒子酸化チタンに曝露される可能性は極めて少ない。

LDH assay

HEK は HDF と比べて微粒子酸化チタン適用後の LDH 放出量が少なかった (Fig. 16)。しかし、HDF では培地のみでも LDH が放出されることから、真皮への微粒子酸化チタンの影響は少ないことが示唆された。また、NAT を適用すると HEK からの LDH の放出量が増加したが、他の微粒子酸化チタンでは LDH の放出量は培地適用群とほぼ同じであった (Fig. 16)。したがって、LDH 放出試験でも、NAT の細胞膜害性は、他の微粒子酸化チタンよりも高いことが分かった。この原因として、アナターゼ型から生成する活性酸素量がルチル型から生じるより多いことに起因していると考えられた⁵²⁾。コーティングをしない微粒

子酸化チタンを使用するより適当なコーティングをすることで活性酸素の放出を抑制し、細胞膜障害が軽減されると考えられた。

IL-1 α 放出量の測定

IL-1 α の放出量から測定した HEK および HDF の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 (Fig. 17)。コーティングした微粒子酸化チタン (SRT、ART) の方がコーティングしていない微粒子酸化チタン (NRT、NAT) より IL-1 α の放出量が低かったので、表皮および真皮細胞の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。

H₂O₂ 産生量の測定

H₂O₂ 産生量は NAT を適用した時最も高かった (Fig. 18)。したがって、H₂O₂ の HEK、HDF に対する酸化ストレス障害はアナターゼ型よりもルチル型の微粒子酸化チタンを使用することで軽減出来ると考えられた。アナターゼ型の危険性については、Gurr からも発表している⁵⁶⁾、今回のデータはこの結果を支持している。

2. 種々微粒子酸化チタンを用いた遺伝毒性評価

BrdU assay

HEK、HDF の細胞増殖能は適用した微粒子酸化チタン濃度を増加させるに伴って減少した (Fig. 19)。微粒子酸化チタンは粒子として細胞質や核内に侵入し DNA 合成を阻害する報告がある⁵²⁾。また、細胞内で炎症反応が誘導されて活性酸素を生成し、それが核内の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^{53, 57)}。微粒

子の適用濃度の上昇に伴い細胞増殖能が低下することは Shukla らによって報告されている⁵²⁾。また、SRT を 0.01 mg/mL 適用しても HEK の細胞増殖能は培地適用群に対して差は見られなかったが、他の微粒子酸化チタンでは細胞増殖能の低下が見られた (Fig. 19)。さらに、0.01 mg/mL SRT、ART および NAT を HDF に適用しても培地適用群に対して差は見られなかったが、0.10 mg/mL 適用すると細胞増殖能の低下が見られた (Fig. 19)。したがって、これらの結果から皮膚細胞の細胞増殖能は微粒子酸化チタンの適用濃度、結晶構造および表面コーティングの有無によって影響されることが示唆された。

Comet assay

HEK および HDF 中の DNA 損傷は適用した微粒子酸化チタンの濃度に伴い上昇した。また、NAT を 0.10 mg/mL 適用した後の HEK の DNA 損傷は培地適用群のそれに対して 24 倍であった。さらに、NAT を HDF に 0.01 または 0.10 mg/mL 適用した後の HDF に対する DNA 損傷は、培地適用群に対して 42、46 倍であった (Fig. 20)。したがって、DNA 損傷は種々微粒子酸化チタンの適用濃度に伴い上昇すると考えられた。また、ルチル型の微粒子酸化チタンは DNA 損傷を引き起こしにくい、アナターゼ型は DNA 損傷を引き起こす可能性が示された。アナターゼ型の光触媒活性はルチル型よりも約 1.5 倍高く⁵⁸⁾、光触媒活性により生じる過酸化水素や酸化的 DNA 損傷もアナターゼ型が引き起こしやすくなると思われる。細胞種は異なるが、ルチル型よりアナターゼ型が DNA 損傷の程度が高いという結果は Gurr らの報告とも一致している⁵⁶⁾。

今回の試験は暗所で行っているが、光照射・非照射によらず、魚類の皮膚細胞⁵⁹⁾およびマウスリンパ腫細胞⁶⁰⁾、B 細胞⁶¹⁾、リンパ球^{62,63)}などを用いた試験において、DNA 損傷が引き起こされる結果が報告されている。しかしながら、

DNA 鎖切断の多くは修復されるので、comet assay による結果のみで遺伝毒性を判断することはできない。

3. 細胞形態観察

微粒子酸化チタン適用後に細胞の形態変化はなかったが、障害性がわずかだ
がみられたことから、形態変化を起こさずに障害性を生じることが考えられた。

第4節 小括

種々微粒子酸化チタンを適用後の皮膚細胞障害性および遺伝子への影響を検
討した結果、微粒子酸化チタンの結晶構造および表面コーティングの有無によ
って障害性は変化することが分かった。しかしながら、今回は、高容量の微粒
子酸化チタンを適用したため障害が生じたと考えられる。そのため、日常生活
の中で微粒子酸化チタンに曝露されたとしても細胞に障害を与える濃度よりも
低濃度であるため、細胞障害や遺伝障害はほとんどないと考えられる。

また、適用した微粒子酸化チタンの中で SRT が本研究において評価した中では
一番安全であることが分かった。市場で販売されている化粧品に含有されてい
る微粒子酸化チタンは SRT である。今まで細胞障害性などもまったく報告され
ていないのは、SRT を用いてきたことに起因していると考えられる。

第3章 微粒子酸化チタンの皮膚感作性評価

微粒子酸化チタンの皮膚細胞障害性は粒子表面のコーティングの有無および結晶構造により変化することが示唆された。実際に皮膚が微粒子酸化チタンに曝露された場合に生体に起こり得る影響を考えると、細胞障害の他に皮膚感作が挙げられる。

皮膚感作がある金属はニッケル、コバルト、クロムなどが知られている。これらの金属は汗や唾液等の体液により溶解し、イオン化した金属がアレルギーを引き起こすと言われている。金属チタンは歯科材料（インプラント）や人工関節として使用されており、生体内で不活性なため感作性は示さないと考えられてきた。しかし、インプラント手術が失敗した場合、チタンアレルギーが発症することが報告されている⁶⁴⁾。同様に、酸化チタンも生体内で不活性であり、感作性に関する報告はなく、すでに化粧品としてルチル型のもは長い間使用されてきたことから、感作を生じることはないと考えられてきた。

本章では、微粒子酸化チタンの感作性を評価することを目的とした。ナノ粒子が皮内に侵入した場合、真皮や皮下組織に存在する皮膚マクロファージ⁶⁵⁾やランゲルハンス細胞⁶⁶⁾に取り込まれて免疫応答が亢進することが考えられる。

そこで、本章では結晶構造の違いによる微粒子酸化チタンの感作性の有無を試験することとした。

第1節 実験方法

1. 実験材料

白色ワセリンは小堺製薬株式会社（東京）から購入した。1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。また、sodium dodecyl sulfate (SDS) は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。なお、種々微粒子酸化チタンは第2編 第1章で用いたものと同じものを用いた。

2. 実験動物

雄性モルモット (KwI:Hartley、体重 350~400 g) は埼玉実験動物供給所（埼玉）から購入した。なお、動物の飼育および実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従って行った。

3. 種々微粒子酸化チタンを用いた皮膚感作性試験法 (Adjuvant and patch test 法)

粉体や難溶性物質の感作性を評価する場合に用いる手段である Adjuvant and patch test 法⁶⁷⁾に基づいて行った。試験方法の概略を Figure 22 に、適用した物質を Table 9 に示す。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 (E-FCA) 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酸化チタン軟膏を 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 軟膏それぞれ 100 mg 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% に調製した酸化チタン軟膏および 0.1% DNCB 軟膏 200 mg 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。判定基準を Table 10 に示す。また、紅斑の程度の判定は通常、専門家により行われている。しかし、個人で紅斑色の感じ方が異なるため、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）で赤色の測定基準である a^* 値を測定することにより、数値により容易に判定が可能になるようにした。Table 11 に色彩色差計の測定条件を示す。

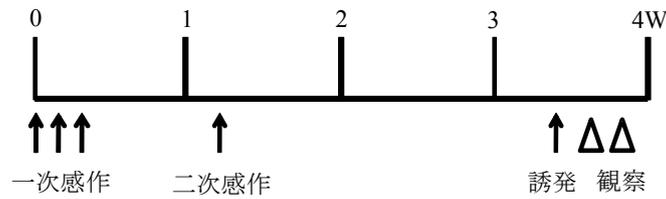


Fig. 22 Time schedule of skin sensitization tests.

Table 9 Application schedule

	一次感作	二次感作	誘発
Control	E-FCA 白色ワセリン	白色ワセリン	白色ワセリン
DNCB (positive control)	E-FCA 0.1% DNCB (白色ワセリンと混合)	0.1% DNCB (白色ワセリンと混合)	0.1% DNCB (白色ワセリンと混合)
TiO ₂	E-FCA 5% or 25% TiO ₂ (白色ワセリンと混合)	5% or 25% TiO ₂ (白色ワセリンと混合)	5% or 25% TiO ₂ (白色ワセリンと混合)

Table 10 Evaluation of skin reaction (scale of 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 (1mm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 (1mm以上盛り上がり、周囲にも広がる)	4

Table 11 Conditions for erythema measurement

照明・受光光学系	拡散照明垂直受光方式
観察光源	C光源
視野	2度
表色系・表色値*	L*a*b*

第2節 結果

1. 種々微粒子酸化チタンの皮膚感作性

Tables 12, 13 に NRT および NAT の皮膚感作の判定結果を示す。また、Figure 23 に色彩色差計での測定結果を示す。NRT および NAT 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 および NAT 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分かった。

Table 12 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
	NRT 5%	3/4	0.75	0.50
	NRT 25%	1/4	0.25	0.50
48 h	control	2/4	0.50	0.58
	DNCB	4/4	4.00	1.83
	NRT 5%	4/4	1.75	0.96
	NRT25%	2/4	0.50	0.58

*Fractional response (= positive/total)

Table 13 Effect of non-coated anatase type TiO₂ particles exposure on the skin sensitization

		Fractional response*	Mean response	S.D.
24 h	control	2/5	0.60	0.90
	DNCB	5/5	4.00	1.00
	NAT 5%	0/4	0	0
	NAT 25%	1/4	0.33	0.58
48 h	control	3/5	0.60	0.54
	DNCB	5/5	4.20	1.64
	NAT 5%	0/4	0	0
	NAT 25%	0/4	0	0

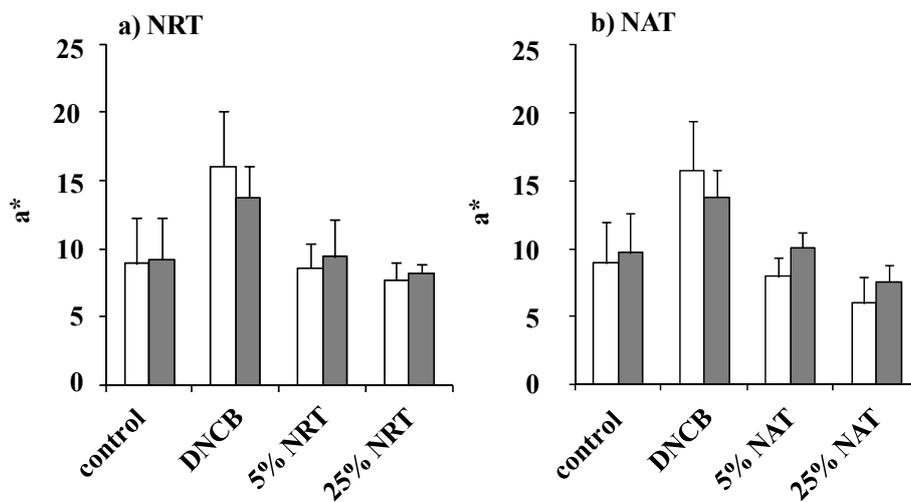


Figure 23 Effect of a) NRT and b) NAT exposure on the a* value.
 Symbols: □ ; 24 h, ■ ; 48 h after induction. Values are the mean ± S.E. (n = 4-5).

第3節 考察

ルチル型およびアナターゼ型共に、a*値が control 群の値とほぼ同じであるため、微粒子酸化チタンには皮膚感作性はないことが示唆された。

第4節 小括

結晶構造の違いによらず微粒子酸化チタン自体に皮膚感作性はみられないことが分かった。

第3編 微粒子酸化チタンの体内分布⁶⁸⁾

第1章 微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布

第1編より、微粒子酸化チタンの皮膚浸透性・透過性は認められなかった。また、第2編より細胞障害性および遺伝子への影響もほとんど認められなかった。しかしながら、万が一、全身循環系へ移行した場合を想定した安全性評価も必要である。また、妊娠した母マウスに微粒子酸化チタンを腹腔内投与すると仔マウスの脳に微粒子酸化チタンが確認されたと報告がある⁶⁹⁾。そこで、微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布を検討し、どの臓器に移行するのかを試験し、脳への移行性の有無を確認した。また、移行した臓器を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察し、組織や細胞内分布をみた。さらに、血液生化学検査を行い、炎症マーカーの値から各臓器の障害性を評価した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

種々微粒子酸化チタンは第2編 第1章と同じものを用いた。Solune-350はPerkin Elmer, Inc. (Waltham, MA, U. S. A.) より購入した。その他の試薬は市販のものを用いた。

2. 実験動物

7週令の雄性 ddY マウスは、三協ラボサービス株式会社 (東京、日本) より

購入した。なお、動物の飼育および実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従って行った。

3. 静脈内投与実験法

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%、1%、0.2%シリカ処理酸化チタン／生理食塩液分散体を 0.05 mL 投与し、5 分、72 時間、1 ヶ月、6 ヶ月後に心臓採血を行い、心肺灌流後、マウスから脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出した。また、その後、各臓器の質重量を測定し、Soluene-350 で臓器を溶解させ、結合誘導プラズマ質量分析装置 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) でチタンの定量を行い、酸化チタンに換算して各臓器中の分布量を求めた。なお、マウスの血液全量は、文献値⁷⁰⁾を参考に体重から換算した。

4. ICP-MS のサンプル調製法

Soluene-350 で臓器を溶解させた試料、約 0.1 g を正確にとり、160°C のホットプレート上で乾固し水分を蒸発させた。これを 500°C のホットプレート上で炭化した後、500°C の電気炉中で一晚灰化した。放冷後、硝酸 2 mL 及び水少量を加え、160°C のホットプレート上で 30 分加温溶解した。放冷後、水で 50 mL とし、試験溶液とした。

5. ICP-MS の定量法

試験溶液を 10 mL とり、硝酸及び内部標準液 (コバルトの 1 µg/mL 溶液) をそれぞれ 100 µL ずつ加え、ICP-MS に導入した。別に、市販のチタン標準液を水で段階的に希釈して調製した標準溶液を 10 mL とり、60%硝酸及び内部標準

液をそれぞれ 100 μ L ずつ加え、ICP-MS に導入した。コバルトに対するチタンのイオンカウント数比を Y 軸に、チタンの濃度を X 軸にとり、得られた検量線から試験溶液中のチタン濃度を求め、Solune-350 で臓器を溶解させた試料中のチタンを定量した。

Table 14 Operating conditions of ICP-MS

RF パワー	1600 W
プラズマ条件	
サンプリング位置	8.7 mm
プラズマガス (アルゴン)	15 L/min
キャリアーガス (アルゴン)	0.70 L/min
測定質量数	48 (チタン) 59 (コバルト; 内部標準元素として)
測定モード	パルスモード

6. 透過型電子顕微鏡を用いた組織観察法

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% シリカ処理酸化チタン/生理食塩液分散体を 0.05 mL 投与し、72 時間および 1 ヶ月後の肝臓を 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、透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope; TEM) で観察した。まず、観察の前処理として、2% グルタルアルデヒド/0.1 M カコジル酸緩衝液、4°C で前固定し、その後、2% 四酸化オスミウム水溶液、4°C、3 時間後固定を行った。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 ($t = 80-90$ nm) し、酢酸ウラニル/亜鉛染色液で 15 分間、室温で二重染色を行い、カーボン真空蒸着でコーティングを行い観察した。なお、電子顕微鏡による撮影は株式会社花市電子顕微鏡技術研究所 (岡崎、愛

知、日本) に依頼した。

7. 血液生化学検査法

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% シリカ処理酸化チタン/生理食塩液分散体を 0.05 mL 投与し、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)、creatinine phosphokinase (CPK)、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、lactate dehydrogenase (LDH)) を測定した。なお、測定は株式会社エスアールエル (立川、東京、日本) に依頼した。

第2節 結果

1. 微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布

動物体内には元からチタンが存在することがコントロール群から判明した。これまでに行った分析や文献からも食品中や土壌中にチタンが含まれることが判っている (Table 15)^{71,72)}。このことから動物は食事などからチタンを摂取していることが示唆された。

また、投与した酸化チタンのほとんど (約 60%) が静脈内投与後、肝臓に集積した (Figs. 24, 25)。一方、投与後 6 ヶ月には脾臓中のチタン濃度が上昇した。ナノマテリアルの分布が懸念されている脳への分布は観察されなかった。

投与量から求めた酸化チタンの回収率を表に示す (Table 16)。いずれも、回収率が 100% に至らなかった。

Table 15 Titanium level in several food stuffs and others

Food/Soil	Production area	Conc. (µg/g)	Food/Soil	Production area	Conc. (µg/g)
beef	Japan	0.17	lettuce ^a		41 ± 15
beef	Australia	0.26	Boston lettuce ^a		10 ± 14
pork	Japan	0.26	Japanese parsley ^a		53 ± 12
pork	USA	0.44	Japanese radish (leaf) ^a		37 ± 33
chicken	Japan	0.14	Welsh onion ^a		20 ± 13
egg	Japan	1.70	tomato ^a		39.1 ± 9.2
salmon	Norway	0.37	paprika ^a		14 ± 16
shrimp	India	2.52	sprout ^a		38 ± 16
onion	Japan	0.33	AIN 93G ^b	Josai Univ.	6.29
potato	Japan	0.12	α cornstarch		0.18
paprika	Netherlands	0.19	β cornstarch		0.18
carrot	USA	0.59	casein		1.60
corn	USA	0.60	cellulose		< 0.1
flour	mainly USA	0.31	soft water	USA	< 0.05
soybeans	Japan	3.24	water	Thailand	< 0.05
rice	Japan	0.91	soft water	France	< 0.05
orange	USA	0.65	mid-hard water	France	< 0.05
lemon	USA	1.64	hard water	France	< 0.05
grapefruit	South Africa	0.39	urban water	Thailand	< 0.05
banana	Philippines	< 0.1	soft water	Japan	< 0.05
Japanese parsley ^a	Japan	101 ± 19	soft water	Japan	< 0.05
Japanese parsley ^a	Japan	10 ± 13	water ^a	Japan	13 ± 17
Chinese cabbage ^a	Japan	29.5 ± 14	water ^a	Japan	3.2 ± 8.0
Chinese cabbage ^a	Japan	20 ± 13	soil ^a	Japan	4,980 ± 220
bok-choy ^a		35.0 ± 8.8	soil ^a	Japan	3,380 ± 180
Chinese cabbage ^a		22 ± 19	soil ^a	Japan	5,540 ± 230
Cabbage ^a		52.7 ± 11	soil ^a	Japan	5,870 ± 260
Macrophyll ^a		12.0 ± 6.0			

^a J. Itoh *et al.*⁷¹⁾, ^b received from Prof. Wada (Josai Univ.)

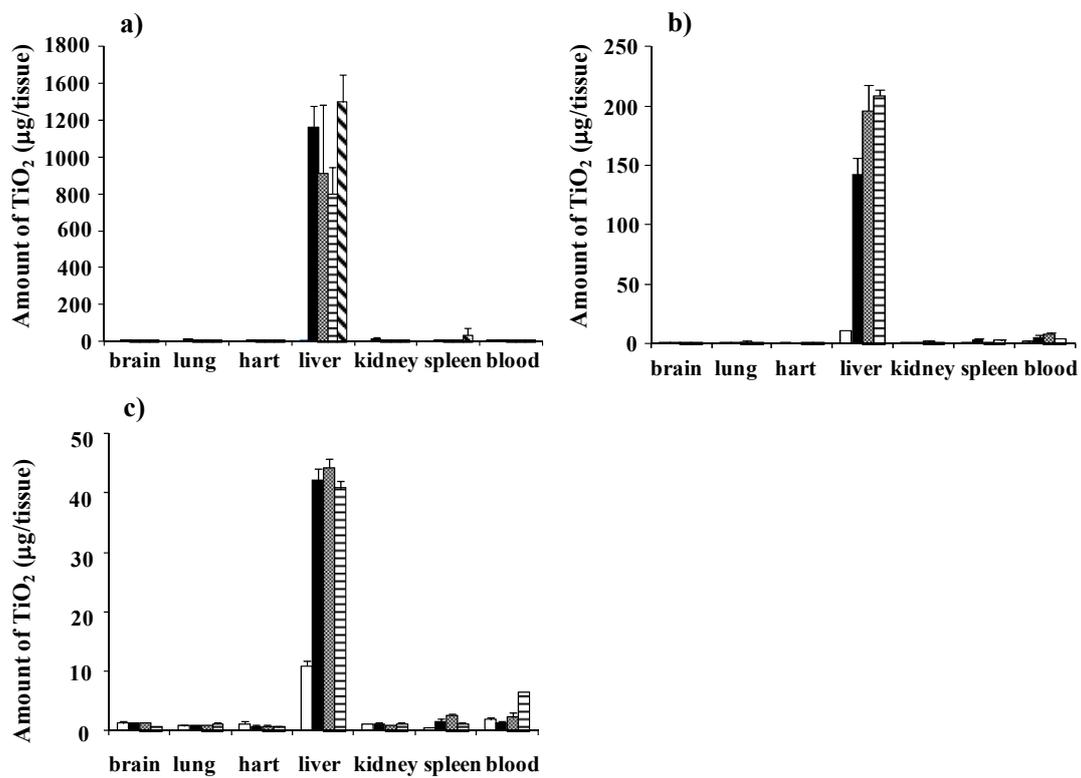


Fig. 24 Amount of TiO₂ after *i.v.* injection of TiO₂ nanoparticles.

(a): 5% TiO₂, (b): 1% TiO₂, (c): 0.2% TiO₂.

Symbols: □; control, ■; 5 min, ▨; 72 h, ▩; 1 month, ▪; 6 months.

Values are the mean ± S.E. (n = 3-5).

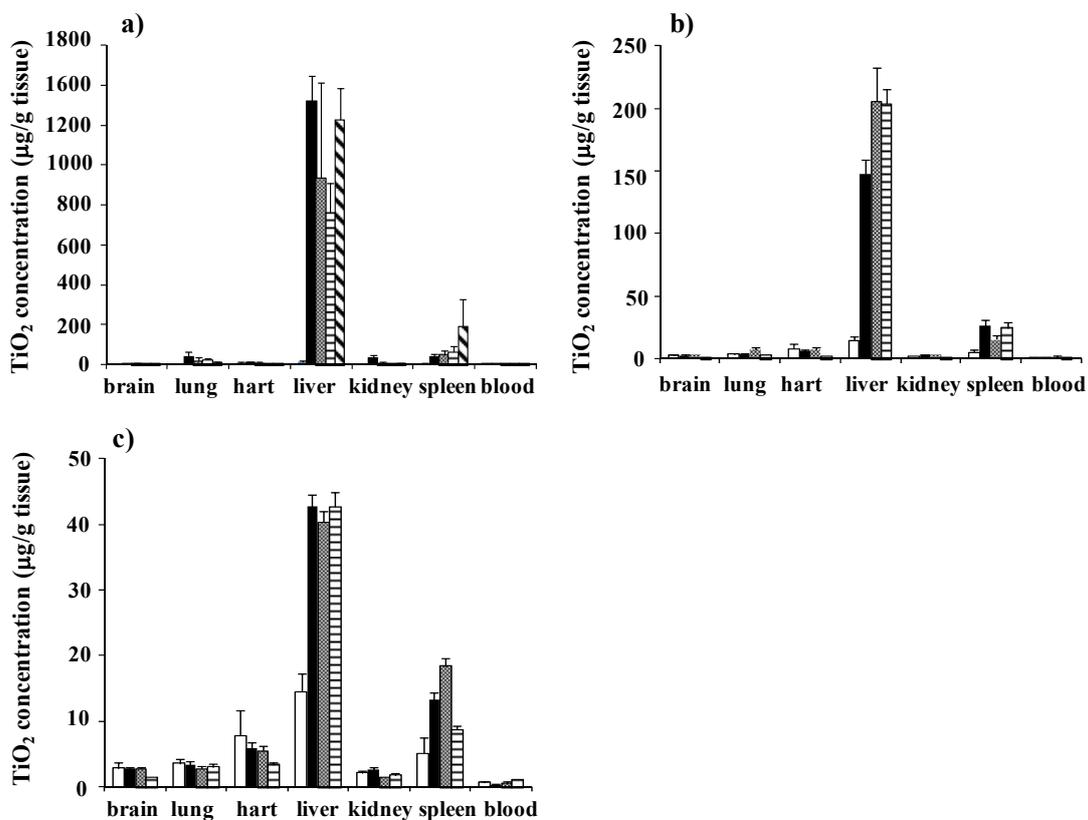


Fig. 25 Concentrations of TiO₂ in several tissues after *i.v.* injection of TiO₂ nanoparticles. (a): 5% TiO₂, (b): 1% TiO₂, (c): 0.2% TiO₂. Symbols: □; control, ■; 5 min, ▨; 72 h, ▩; 1 month, ▪; 6 months. Values are the mean ± S.E. (n = 3-5).

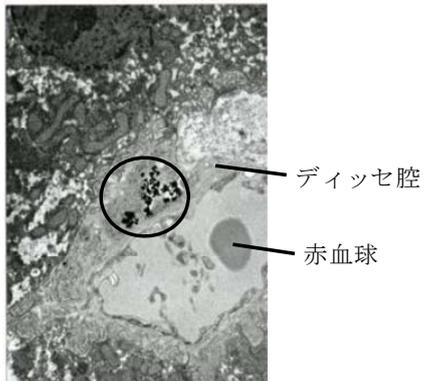
Table 16 Recovery ratio of TiO₂ after *i.v.* injection

	5 min	72 h	1 month	6 month
5%	66.7%	51.7%	45.5%	74.6%
1%	43.1%	58.5%	59.4%	—
0.2%	67.7%	73.0%	64.8%	—

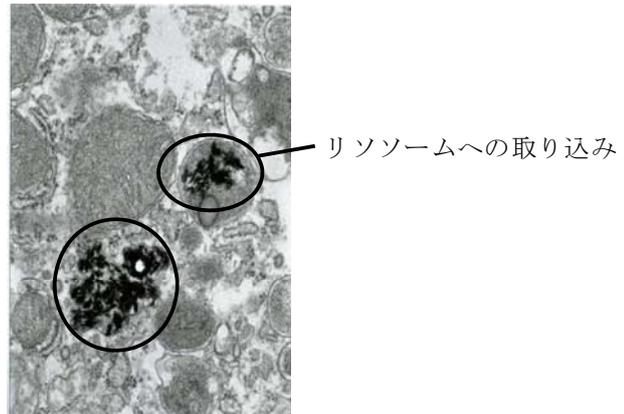
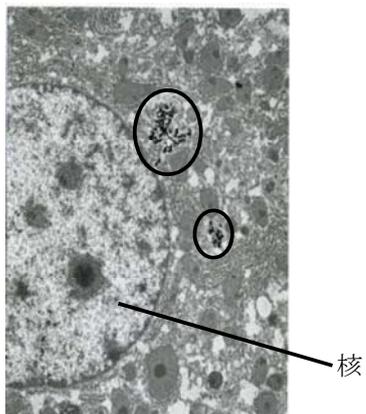
2. 透過型電子顕微鏡を用いた微粒子酸化チタン静脈内投与後の組織観察

TEM 観察の結果、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 (Fig. 26a)、投与 1 ヶ月後にはクッパー細胞や肝実質細胞中のリ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 (Fig 26b)。非投与群 (コントロール群) である Fig. 26c で粒子状物質が確認できないことから、Fig.26a および b 中の黒色部を酸化チタン粒子と認識し、存在する部位を○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。また、投与 1 ヶ月後の TEM 観察よりリソソーム画分に微粒子酸化チタンの取り込みが確認された。

(a)



(b)



(c)

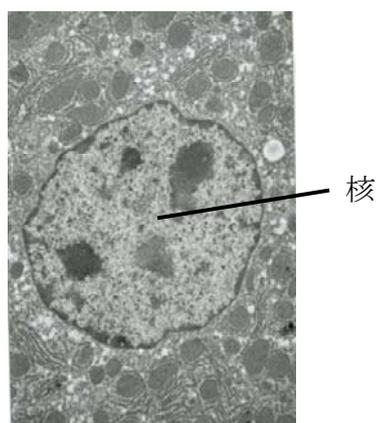
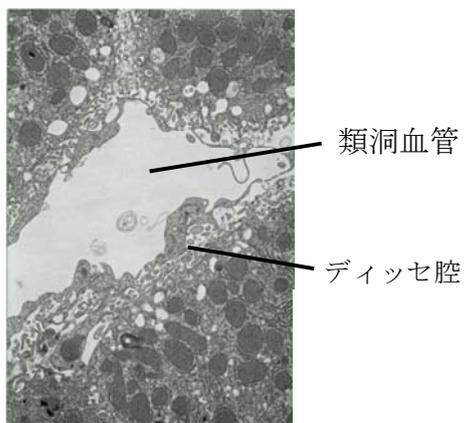


Fig. 26 TEM images on mouse liver after *i.v.* injection of TiO₂ nanoparticles. (a): 72 h after *i.v.* injection, (b): 1 month after *i.v.* injection, (c): control.

3. 微粒子酸化チタン静脈内投与後の血液生化学検査

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では、全ての項目において有意な差はみられなかった。しかし、BUNやLDHでは増加しているようにみられ、一方、CPKは減少しているようにみられた (Fig. 27)。また、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証拠は得られなかった。

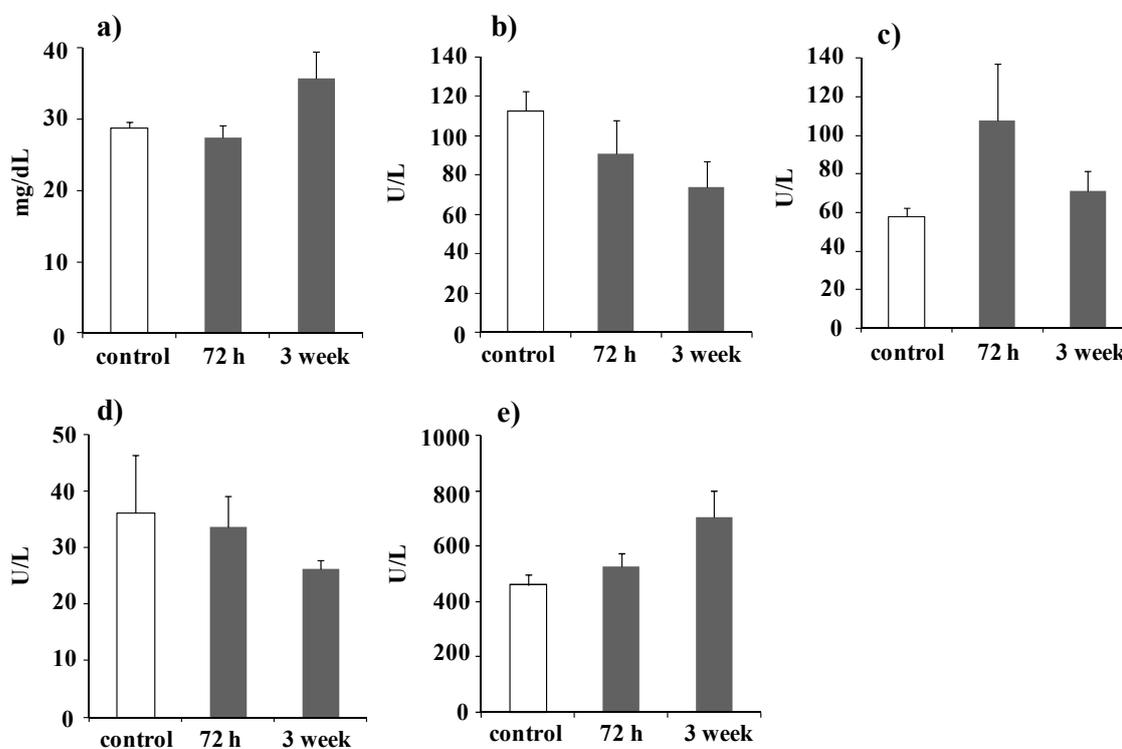


Fig. 27 Effect of TiO₂ nanoparticles on the inflammatory markers in mice.

(a) : BUN, (b) : CPK, (c) : AST, (d) : ALT, (e) : LDH. Values are the mean \pm S.E. (n = 5).

第3節 考察

1. 微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布

酸化チタンの腎臓への集積がみられないことから、静脈内投与した微粒子酸化チタンの尿中への排泄は考えられない。すなわち、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ると考える。

また、Wuらの報告によるとカーボンナノチューブをマウスの尾静脈から投与すると、肝臓、脾臓と肺に多く集積し、その消失過程は肝臓と腎臓であった⁷³⁾。実際、糞中と尿中への排泄が確認されている。

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と推察される。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、血液中に移行したナノ粒子が血液凝固系を活性化させることをSeatonらが報告している⁷⁴⁾。

チタンの回収率が100%に達していないことから、今回採取していない他の臓器へ分布している可能性も示唆された (Table 14)。

2. 透過型電子顕微鏡を用いた微粒子酸化チタン静脈内投与後の組織観察

静脈内投与1ヶ月後のTEM観察で、微粒子酸化チタンがリソソームに取り込まれていることが分かった。リソソームはその小胞内に多くの加水分解酵素を含み、細胞内の異物分解の役割を担っている。このことより、リソソームに取り込まれた微粒子酸化チタンはごく少量ずつ体外へ排泄される可能性が考えられた。

インプラントに金属チタンが使用されているが、生体内に長期間留置してお

くと、チタンは溶出しマクロファージにより貪食されるとの報告がある⁷⁵⁾。そのため、チタンは何らかの機構で体外に排泄されると考えられた。

3. 微粒子酸化チタン静脈内投与後の血液生化学検査

ラットに微粒子酸化チタンを静脈内投与し、炎症マーカーを測定した Fabian らの報告⁷⁶⁾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。静脈内投与後長時間経過時の炎症マーカーの値や他の炎症マーカーを詳細に検討していくことが重要と考えられる。

第4節 小括

静脈内投与後の体内分布より、投与した酸化チタンの約 60%が肝臓に集積することが分かった。脳への移行性は見られない。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。また、TEM 観察の結果より、投与 1 ヶ月後にはリソソームへの取り込みが確認されたが、形体変化はみられなかった。さらに、血液生化学検査の結果より、組織に障害が引き起こされている証拠は得られなかった。

以上のことより、微粒子酸化チタンがたとえ全身循環系へ移行したとしても、低用量ならば何らかの機構で消失する可能性も考えられるが、高用量の場合には蓄積する可能性も考えられた。また、組織に移行したとしても障害はみられなかった。

結論

現在、ナノマテリアルの中で、使用量の多いのが、サンスクリーン剤やファンデーション等の化粧品や医薬部外品に含まれている微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛である。そのため、これらのナノ粒子を曝露する可能性がある産業従事者や、製品を使用する生活者に対して安全性の保証をする必要がある。ナノ粒子の曝露経路として、様々な経路が挙げられるが、化粧品や医薬部外品の曝露を考えると、経皮曝露が重要である。化粧品や医薬部外品の塗布 1 回分に含まれるナノ粒子の量は少ないが、連日塗布することから、ナノ粒子の皮膚曝露による皮膚透過・浸透性は生体への毒性の観点からも非常に重要視されるようになり、ナノ粒子の皮膚透過・浸透の可能性および透過・浸透ルートの解明は急務であると考えられる。しかしながら、健常皮膚を用いた微粒子酸化チタンや酸化亜鉛の透過性試験では定量的な評価は十分にできていないのが現状である。

そこで、本研究では、健常皮膚モデルとして *intact skin*、傷害皮膚を想定した皮膚モデルとして角層を剥離した *stripped skin*、カミソリで皮膚を傷つけた *razor-treated skin*、および注射針で孔をあけた *needle-punctured skin* を作成し、ナノ粒子の分散モデルとして平均分子量の異なる水溶性高分子と蛍光標識したポリスチレンビーズを用いて皮膚透過性を評価した。また、角層下に存在する生きた細胞（ヒト表皮角化細胞とヒト真皮繊維芽細胞）が微粒子酸化チタンに曝露された場合を想定し、皮膚細胞障害性試験を行った。さらに、全身循環系へ移行した場合を想定し、静脈内投与後の体内分布についても評価した。

1. ナノマテリアルの皮膚浸透・透過性の評価

不溶性モデルナノ粒子として蛍光ポリスチレンビーズである Fluoresbrite[®]を水溶性モデル高分子として FITC-dextran 類を使用し、皮膚浸透・透過性を評価した。intact skin、stripped skin、razor-treated skin 透過実験では Fluoresbrite[®]の透過が認められなかった。しかし、needle-punctured skin では Fluoresbrite[®]の透過が認められた。このことから、不溶性のナノ粒子の透過ルートとして細孔ルートであることが示唆された。一方、FITC-dextran 類はどの皮膚でも透過がみられたものの、高分子になるほど透過量の減少がみられた。SEM および元素マッピングの観察結果から、ブタ皮膚に塗布した微粒子酸化チタンは皮丘より少し低い皮溝や毛孔開口部に集積することから、ナノ粒子は付属器官から浸透していく可能性があることが示唆された。

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。

2. 微粒子酸化チタンの皮膚障害性および感作性

ナノ粒子の皮膚浸透・透過性は認められなかったものの、細孔ルートである毛孔等の付属器官から侵入の可能性が示唆された。そのため、付属器官侵入後に直接生きた細胞に曝露する機会が考えられる。そこで、微粒子酸化チタンの皮膚細胞障害性をヒト表皮角化細胞およびヒト真皮線維芽細胞を用いて評価した。さらに、微粒子酸化チタンの結晶特性の違いによる感作性を評価した。

3次元培養皮膚モデルを用いた障害性試験では、微粒子酸化チタンによる障害はみられなかった。皮膚細胞を用いた実験から微粒子酸化チタンの細胞障害および遺伝障害は微粒子酸化チタンの濃度に伴い上昇することが分かった。しかし、適用した微粒子酸化チタン濃度は実使用による皮膚曝露の濃度よりもはる

かに高濃度であるため、実質的には、微粒子酸化チタンには皮膚障害性はほとんどないものと考えられた。また、生きた細胞が微粒子酸化チタンに曝露されたとしても、その結晶特性や粒子表面のコーティングの種類により細胞障害作用および遺伝毒性作用を軽減できることが明らかとなった。

また、結晶特性の違いによる微粒子酸化チタンの皮膚感作性はみられなかった。

3. 微粒子酸化チタンの体内分布

ナノ粒子が体内に侵入した場合を想定し、微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布を調べた。微粒子酸化チタン静脈内投与後の体内分布では、低濃度ならば体内から消失する可能性も考えられたが、高濃度では蓄積する可能性が考えられた。代表的な集積臓器は肝臓であったが、肝機能の大きな変化はみられなかった。なお、脳への移行は確認されなかった。

以上のことより、皮膚が微粒子酸化チタンに曝露されても、健常皮膚では粒子が浸透や透過する可能性はほとんどないが、損傷皮膚に使用または曝露する可能性を考慮すると、適切な結晶構造およびコーティングを選択・使用することで、より安全に使用可能であることが示唆された。

しかしながら、現在の安全性評価の問題点として、実使用条件と研究条件との間に大きな隔たりがあることが挙げられる。より実使用に近い条件での評価法を確立することが今後の課題である。また、経皮曝露による安全性は高いものの、特に経肺曝露については動物実験で障害性があるとの報告がいくつかある^{77, 78)}。ヒトへの曝露を減少させるフィルターなどの防曝技術の開発^{79, 80)}の発展も併せて必要であろう。

微粒子酸化チタンをはじめとするナノ粒子の安全性評価はヒトへの使用や曝露に対し臨機応変に対応していくことが大変重要である^{81, 82)}。

謝辞

本研究に際し終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり終始有益な、御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座助教 藤堂浩明 博士、助手 石井宏 博士に心から感謝の意を表します。

さらに、論文の査読をしていただいた城西大学薬学部衛生化学講座教授 川嶋洋一 先生、薬剤作用解析学講座教授 小林大介 先生に深謝いたします。

さらに、本研究の遂行にあたり、有益な御意見ならびに実験の御協力をいただきました株式会社コスメテクノ 黒田章裕 博士、安部隆 博士、テイカ株式会社 岡英雄 氏、 蒲田佳昌 氏ならびに国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 五十嵐良明 博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の実施に御協力いただきました、城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 河野雄一郎 修士、高坂美加 修士、安野浩崇 修士ならびに 羽田乃武子 博士をはじめとする関係諸氏に感謝いたします。

引用文献

- 1) Hirose A., Nishimura T., Kanno J., Research strategy for evaluation methods of the manufactured nanomaterials in NIHS and importance of the chronic health effects studies, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **127**, 15-25 (2009).
- 2) German chemical industry association: guidance for handling and use of nanomaterials at the workplace (2007).
- 3) Bangham A.D., Horne R.W., Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660-668 (1964).
- 4) Azmin M.N., Florence A.T., Handjani-Vila R.M., Stuart J.F., Vanlerberghe G., Whittaker J.S., The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 237-242 (1985).
- 5) Iijima S., Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, **354**, 56-58 (1991).
- 6) Steinberg D.C., Regulations in chemicals, sunscreen labeling and nanotechnology, *Cosmetic and Toiletries Magazine*, **122**, 36-40 (2007).
- 7) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会,
<<http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/nano/nanoindex.html>>, 厚生労働省医薬食品局化学物質安全対策室ホームページ, cited 20 December, 2011.
- 8) 清野 学, 酸化チタン - 物性と応用技術, 技報堂出版株式会社, 東京, (2003.)
- 9) 黒田 哲司, ナノ粒子の有害性評価とリスク対策, 株式会社 技術情報協会, 東京, (2007).
- 10) Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshioka Y., Evaluation of biological influence of nano-materials using toxicokinetic and toxicoproteomic approach, *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1715-1725 (2008).
- 11) Kimura E., Kawano Y., Todo H., Ikawashi Y., Sugibayashi K., Measurement of skin permeation/penetration of nanoparticles for their safety evaluation, 投稿準備中
- 12) Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A., Roberts J.R., Salmen R., DePree K., Adkins E.J., Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease, *Environ. Health. Perspect.*, **111**, 1202-1208 (2003).
- 13) Zhang L.W., Monteiro-Riviere N.A., Assesment of quantum dot penetration into

- intact tape-stripped, abraded and flexed rat skin, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **21**, 166-180 (2008).
- 14) Wu J., Liu W., Xue C., Zhou C., Lan F., Bia L., Xu H., Yang X., Zeng F.: Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.*, **191**, 1-8 (2009).
 - 15) Addor F.A., Aoki V., Skin barrier in atopic dermatitis, *An. Bras. Dermatol.*, **85**, 184-194 (2010).
 - 16) Schneider M., Stracke F., Hansen S., Schaefer U.F., Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermatoendocrinol.*, **1**, 197-206 (2009).
 - 17) Schilling K., Bradford B., Castelli D., Dufour E., Nash J.F., Pape W., Schulte S., Tooley I., van den Bosch J., Schellauf F., Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 495-509 (2010).
 - 18) Filipe P., Silva J.N., Silva R., Cirne de Castro J.L., Marques Gomes M., Alves L.C., Santos R., Pinheiro T., Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharm. Physiol.*, **22**, 266-275 (2009).
 - 19) 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).
 - 20) Alvarez-Román R., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Fessi H., Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Control. Release*, **99**, 53-62 (2004).
 - 21) Sugibayashi K., Margin of safety and exposure of nanomaterials used in cosmetics, *Fragrance Journal*, **36**, 38-41 (2008) (in Japanese).
 - 22) Johnson M.E., Blankschtein D., Langer R., Permeation of steroids through human skin, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1144-1146 (1995).
 - 23) Scheplein R.J., Blank I.H., Brauner G.J., Macfarlane D.J., Percutaneous absorption of steroids, *J. Invest. Derm.*, **52**, 63-70 (1969).
 - 24) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).
 - 25) Ito A., (http://chemeng.in.coocan.jp/memb/m_mb4.html), Chemical Engineering Department Tokyo Institute of Technology Web, cited 1 August, 2010.
 - 26) Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products, Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers concerning titanium dioxide, EU, October 2000.
 - 27) シグマアルドリッチ分析データ, < <http://www.sigmaaldrich.com/>> ,

Sigma-Aldrich web, cited 15 Apr. 2011.

- 28) Jaiswal J.K., Chakrabarti S., Andrews N.W., Simon S.M., Synaptotagmin VII Restricts Fusion Pore Expansion during Lysosomal Exocytosis. *Plos. Biol.*, **2**, (2004).
- 29) Kraneveld A.D., Koster A.S., Nijkamp F.P., Microvascular permeability in isolated vascularly perfused small intestine of rats. *Am. J. Physiol.*, **266**, G1170-G1178 (1994).
- 30) Zhang W., Gao J., Zhu Q., Zhang M., Ding X., Wang X., Hou X., Fan W., Ding B., Wu X., Wang X., Gao S., Penetration and distribution of PLGA nanoparticles in the human skin treated with microneedles. *Int. J. Pharm.*, **402**, 205-212 (2010).
- 31) Wu X., Price G.J., Guy R.H., Disposition of nanoparticles and an associated lipophilic permeant following topical application to the skin. *Mol. Pharm.*, **6**, 1441-1448 (2009).
- 32) Sekkat N., Kalia Y. N., Guy R.H., Bio physical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 2367-2381 (2002).
- 33) Simon G., Maibach H.I., The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations—an overview. *Skin. Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.*, **13**, 229-234 (2000).
- 34) Allec J, Chatelus A, Wagner N., Skin distribution and pharmaceutical aspects of adapalene gel. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **36**, S119-125 (1997).
- 35) Gamer A.O., Leibold E., Van Ravenzwaay B., The *in vitro* absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 301-307 (2006).
- 36) Jeong S.H., Kim J.H., Yi S.M., Lee J.P., Kim J.H., Sohn K.H., Park K.L., Kim M.K., Son S.W., Assessment of penetration of quantum dots through *in vitro* and *in vivo* human skin using the human skin equivalent model and the tape stripping methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 612-615 (2010).
- 37) Lademann J., Richter H., Teichmann A., Otberg N., Blume-Peytavi U., Luengo J., Weiß B., Schaefer U. F., Lehr C.M., Wepf R., Sterry W., Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **66**, 159-164 (2007).
- 38) Vogt A., Combadiere B., Hadam S., Stieler K. M., Lademann J., Schaefer H., Autran B., Sterry W., Blume-Peytavi U., 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1316-1322 (2006).
- 39) Toll R., Jacobi U., Richter H., Lademann J., Schaefer H., Blume-Peytavi U.,

- Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 168-176 (2004).
- 40) Senzui M., Tamura T., Miura K., Ikarashi Y., Watanabe Y., Fujii M., Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin. *in vitro. J. Toxicol. Sci.*, **35**, 107-113 (2010).
- 41) Kimura E., Kousaka M., Todo H., Ikarashi Y., Sugibayashi K., Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on the keratinocytes and fibroblasts, 投稿準備中
- 42) Lai, J.C., Lai, M.B., Jandhyam, S., Dukhande V.V., Bhushan A., Daniels C.K., Leung S.W., Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts, *Int. J. Nanomedicine*, **3**, 533-545 (2008).
- 43) Belade, E., Armand, L., Martinon, L., , Kheuang L., Fleury-Feith J., Baeza-Squiban A., Lanone S., Billon-Galland M.A., Pairon J.C., Boczkowski J., A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines, *Toxicol. In Vitro*, Epub ahead of print (2011).
- 44) Jin, C.Y., Zhu, B.S., Wang, X.F. & Lu, Q.H., Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells, *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 1871-1877 (2008).
- 45) Bell E., Ehrlich H.P., Sher S., Merrill C., Sarber R., Hull B., Nakatsuji T., Church D., Buttle D.J., Development and use of a living skin equivalent, *Plast. Reconstr. Surg.*, **67**, 386-392 (1981).
- 46) Dutta D., Sundaram S.K., Teeguarden J.G., Riley B.J., Fifield L.S., Jacobs J.M., Addleman S.R., Kaysen G.A., Moudgil B.M., Weber T.J., Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials, *Toxicol. Sci.*, **100**, 303-315 (2007).
- 47) Horie M., Nishio K., Fujita K., Endoh S., Miyauchi A., Saito Y., Iwahashi H., Yamamoto K., Murayama H., Nakano H., Nanashima N., Niki E., Yoshida Y., Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells, *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 543-553 (2009).
- 48) Lynch I., Dawson K.A., Linse S., Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles, *Sci. STKE*, **327**, 14 (2006).
- 49) Sayes C.M., Reed K.L., Warheit D.B., Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles, *Toxicol. Sci.*, **97**, 163-180 (2007).
- 50) Jiang J., Oberdörster G., Biswas P., Characterization of size, surface charge, and

- agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J. Nanopart. Res.*, **11**, 77-89 (2009).
- 51) 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).
- 52) Shukla R.K., Sharma V., Pandey A.K., 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).
- 53) 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)
- 54) Schins R.P., Duffin R., Höhr D., Knaapen A.M., Shi T., Weishaupt C., Stone V., Donaldson K., Borm P.J., Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells, *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 1166-1173 (2002).
- 55) Bodekaer M., Faurschou A., Philipsen P.A., Wulf H.C., Sun protection factor persistence during a day with physical activity and bathing, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **24**, 296-300 (2008).
- 56) Gurr J.R., Wang A.S.S., Chen C.H., Lan K.Y., Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells, *Toxicol.*, **213**, 66-73 (2005).
- 57) Schins R.P., Knaapen A.M., Genotoxicity of poorly soluble particles, *Inhal. Toxicol.*, **19**, 189-198 (2007).
- 58) Kakinoki K., Yamane K., Teraoka R., Otsuka M., Matsuda Y., Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine, *J. Pharm. Sci.*, **93**, 582-589 (2004).
- 59) Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J.F., Jha A.N., Hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells, *Mutation Research*, **640**, 113-122 (2008).
- 60) Nakagawa Y., Wakuri S., Sakamoto K., Tanaka N., The photogenotoxicity of titanium dioxide particles, *Mutation Research*, **394**, 125-132, (1997).
- 61) Wang J.J., Sanderson B.J.S., Wang H., Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO_2 particles in cultured human lymphoblastoid cells, *Mutation Research*, **628**, 99-106 (2007).
- 62) Kang S.J., Kim B.M., Lee Y.J., Chung H.W., Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes, *Environ.*

- Mol. Mutagen.*, **49**, 399–405 (2008).
- 63) Gopalan R.C., Osman I.F., Amani A., Matas M.D., Anderson D., The effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the Comet assay with UVA photoactivation of human sperm and lymphocytes, *Nanotoxicology*, **3**, 33-39 (2009).
- 64) Siddiqi A., Payne A.G., De Silva R.K., Duncan W.J., Titanium allergy: could it affect dental implant integration?, *Clin. Oral. Implants. Res.*, **22**, 673-680 (2011).
- 65) Kim S., Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 93-97 (2004).
- 66) Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J., Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health. Perspect.*, **113**, 823-839 (2005).
- 67) 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).
- 68) Sugibayashi K., Todo H., Kimura E., Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles, *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 293-298 (2008).
- 69) Takeda K., Suzuki K., Ishihara A., Kubo-Irie M., Fujimoto R., Tabata M., Oshio S., Nihei Y., Ihara T., Sugamata M., Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems, *J. Health. Sci.*, **55**, 95-102 (2009).
- 70) Morton D.B., Abbot D., Barclay R., Close B.S., Ewbank R., Gask D., Heath M., Mattic S., Poole T., Seamer J., Southee J., Thompson A., Trussell B., West C., Jennings M., Removal of blood from laboratory mammals and birds, *Lab Anim*, **27**, 1-22 (1993).
- 71) 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).
- 72) Hanawa T., Surface treatment of titanium in medical applications. *Journal of the Japan Institute of Light Metals*, **55**, 553-556 (2005) (in Japanese).
- 73) Wu H., Liu G., Zhuang Y., Wu D., Zhang H., Yang H., Hu H., Yang S., The behavior after intravenous injection in mice of multiwalled carbon nanotube / Fe₃O₄ hybrid MRI contrast agents, *Biomaterials*, **32**, 4867-76 (2011).
- 74) Seaton A., Macnee W., Donaldson K., Godden D., Particulate air pollution and acute health effects, *Lancet*, **345**, 176-178 (1995).

- 75) Watari F., Abe S., Tamura K., Uo M., Yokoyama A., Totsuka Y., Internal diffusion of micro/nanoparticles inside body, *Key Engineering. Materials.*, **361-363**, 95-98 (2008).
- 76) 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).
- 77) Oberdorster G., Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **74**, 1-8 (2000).
- 78) Donaldson K., Stone V., Gilmour P.S., Brown D.M., MacNee W., Ultrafine particles: mechanism of lung injury, *Philosophical Transactions of the Royal Society, London, A* **358**, 2741-2749 (2000).
- 79) Hinds W.C., *Aerosol Technology: Properties, behavior, and measurement of airborne particles* 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York (1999).
- 80) Kulkarni P., Namiki N., Otani Y., Biswas P., Charging of particles in unipolar coronas irradiated by *in-situ* soft X-rays: Enhancement of capture efficiency of ultrafine particles, *J. Aerosol Sci.*, **33**, 1279-1298 (2002).
- 81) Nohynek G.J., Leademann J., Ribaud C., Roberts M.S., Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety, *Critical Reviews in Toxicology*, **37**, 251-277 (2007).
- 82) Nohynek G.J., Dufour E.K., Roberts M.S., Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk?, *Skin. Pharm. Physiol.*, **21**, 136-149 (2008).