

## TiO<sub>2</sub>長期経皮暴露試験—評価手順書

鳥取大学医学部皮膚病態学

足立孝司、山元 修

### 1. はじめに

近年のナノテクノロジーの進歩は眼を見張るものがあり、すでに化粧品（サンスクリーン）に幅広く使われている二酸化チタンや酸化亜鉛をはじめ、フラーレン、カーボンナノチューブなどの工業ナノ粒子が我々の周りで普通に用いられはじめている。しかしながら、近年問題となったアスベスト被害の苦い経験から、過去に夢の物質と考えられたものでも、健康障害を引き起こしうることを我々は学んだ。動物実験で通常有害性が低いと考えられてきた物質でも、ナノレベルのサイズでは障害を起こす可能性が指摘されている。この問題は、工業ナノ粒子の開発・応用の分野で国際的にもトップに立っている産業立国日本の経済にとっても大きな問題である。この工業ナノ粒子の安全性の検討については、日本の将来および国民への説明といった点で、早急に行われるべき課題であり、現在新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）のナノ粒子の特性評価に関する研究開発プロジェクトにより精力的に取り組まれている。その一部として、我々はナノ粒子の皮膚への影響の評価を行っているが、その際の手順をここにまとめた。

### 2. 概要

検討対象は、現在市販のサンスクリーンなどに広く使われている二酸化チタン（TiO<sub>2</sub>）ナノ粒子である。連日暴露後の皮膚の変化について評価を行う。

### 3. 評価方法

#### (1) テストエマルジョン仕様

ST-01（石原産業（株））を原料とし、SC ミル（三井鉱山（株））によるビーズミル解砕処理（酢酸使用）して得られたスラリーを用いて乳化する。

〔TiO<sub>2</sub>含有 W/O エマルジョンの調整〕

- 1) 油層（乳化剤）を攪拌（十字羽型攪拌機）しながら水を徐々に添加し粗乳化させる。
- 2) クレアミックス処理（18,000rpm、非密閉）×2min にてエマルジョンを微細化させる。

表 1 TiO<sub>2</sub>含有 W/O エマルジョンの組成

処方	原料	配合割合〔wt%〕
油層	NILLOL ニコムルス WO(W/O 乳化剤)	4.0
	〔配合成分〕（配合割合は不明）	
	シクロペンタシロキサシ、PEG-10、ジメチコン、ジステアルジモニウムヘクトライト	

	デカメチルシクロペンタシロキサン KF-995	50.0
	酸化チタン（ビーズミル解砕品）	10.0
水層	酢酸	0.55
	精製水	to 100

蛍光顕微鏡観察には蛍光色素 FITC 修飾 TiO<sub>2</sub> 含有エマルジョンを使用する。

蛍光色素 FITC 修飾 TiO<sub>2</sub> の作製手順は以下の通りである。

<FITC250mg を溶解したアセトン 250ml 中に TiO<sub>2</sub> 原料粉末 50g を添加し、超音波処理にて分散させる>→<エバポレーター（40℃水浴中、真空度-60kPa）にてアセトンを蒸発させる>→<乳鉢解砕して篩（目開き 50 μm）を通す>→<ビーズミル解砕する>

注：なお、我々の実験での上記仕様はホソカワミクロン社に依頼して作製した。

## (2) 粒径計測

使用するエマルジョンをコロジオン薄膜を支持膜とした 100 メッシュ銅グリッド上に滴下、乾燥させ、透過型電子顕微鏡で観察、撮影する。写真上で一次粒子、凝集粒子について粒径を計測し、ヒストグラムを作成する。

## (3) 実験動物

6 週齢の HWY(Hairless Wistar Yagi) ラット（雄）（日本 SLE）を用いる。

## (4) 経皮暴露試験

経皮暴露試験には表 1 のように調整した 10wt%TiO<sub>2</sub> 含有 W/O エマルジョンを使用し、コントロールには成分に TiO<sub>2</sub> を含まない以外は表 1 と同様の組成の W/O エマルジョンを使用する。ペントバルビタールナトリウム麻酔下に HWY ラットの背部皮膚 15cm<sup>2</sup>（5×3cm）の範囲に 4mg/cm<sup>2</sup> の TiO<sub>2</sub> 含有ならびにコントロールエマルジョンを外用し、2 週間、4 週間、8 週間連日塗布を行い、暴露皮膚を採取する。同時に、肝、腎、脾、脳、肺も摘出する。

## (5) 光顕観察

光顕用試料は 10% 中性緩衝ホルマリンで浸漬固定する。HE 染色切片を作製し、粒状物質の局在および形態学的変化を生物顕微鏡により観察する。表皮の顆粒層～基底層の厚さを接眼マイクロメーターで測定し、暴露群とコントロール群の厚さ平均値の差を *t* 検定で分析する。

## (6) 免疫組織化学的染色

採取した 2 週間、4 週間、8 週間暴露後の皮膚を 10% 中性緩衝ホルマリンで浸漬固定後、パラフィン包埋したブロックから未染色パラフィン切片を作製する。脱パラフィン後、抗原賦活化が必要な場合は前処理（酵素処理あるいは熱処理）を行う。一次抗体を加えて、固定組織標本中の抗原に一次抗体を結合させた後、アルカリフォスファターゼ発色で染色し、表皮細胞における対象抗原の局在の変化を観察する。なお、一次抗体の種類ごとに前処理の種類・温度・時間、一次抗体の反応時間を検討し、至適条件を設定する必要がある。また TUNEL 染色も行い、アポトーシス細胞の有無を観察する。

我々の実験では、ケラチノサイト分化に関連して各種サイトケラチン (Cytokeratin 10, 14, 5+8, 17, acidic cytokekeratin, pankeratine) の発現を、基底細胞のマーカーとして p63 を、重金属暴露の指標として Metallothionein、Heat shock protein を、細胞増殖マーカーとして Ki-67 を、線維芽細胞のマーカーとして fibroblast を、真皮間質の樹枝状細胞や紡錘形細胞のマーカーとして Factor XIIIa を適用した。

抗体	メーカー	希釈倍率
anti-cytokeratin 10 (LHP1)	Abcam	25 倍
anti-cytokeratin 14 (LL002)	YLEM	50 倍
anti-cytokeratin 5+8 (RCK102)	Abcam	50 倍
anti-cytokeratin 17 (E3)	DAKO	20 倍
anti-acidic cytokekeratin (AE1)	abcam	50 倍
anti-pankeratin (AE1/AE3)	PROGEN Biothechnik	100 倍
anti-metallothionein (E9)	Zymed laboratories	40 倍
anti-rat Ki-67 (MIB-5)	DAKO	10 倍
anti-phospho-Heat Shock Protein 27 (pSer15)	Affinity BioReagent	50 倍
anti-phospho-Heat Shock Protein 47 (Colligin)	Stressgen	50 倍
p63 (4A4)	Santa Cruz	50 倍
Anti-fibroblasts (TE-7)	Abcam	100 倍
Anti-Factor XIIIa (AC-1A1)	Abcam	25 倍

#### (7) 共焦点レーザー顕微鏡観察

FITC 標識した TiO<sub>2</sub> 含有エマルジョンを使用し、2 週間、4 週間、8 週間暴露後の皮膚を採取する。凍結組織包埋剤に包埋、凍結させ、クリオスタットで切片を作製する。共焦点レーザー顕微鏡観察により同一視野で FITC 標識粒子の蛍光を緑 (488 nm)、ラット皮膚の自発蛍光を赤 (543 nm) でそれぞれ撮影し、画像編集ソフトで画像を統合し、FITC 標識された粒状物質の局在を観察する。

#### (8) 透過型電顕観察・分析

2 週間、4 週間、8 週間暴露後のラット背部皮膚の電顕用試料はカコジル酸緩衝 2.5% グルタルアルデヒドで浸漬固定を行う。0.1M カコジル酸緩衝液で洗浄後、1% 四酸化オスミウムで後固定し、エタノールの上昇系列にて脱水する。メチルグリシジルエーテル (QY-2) による置換後、Epon812 49.12%、dodecenyl succinic anhydride 24.62%、2,4,6-trimethylaminomethyl phenol 1.76% により包埋する。

ダイヤモンドナイフとウルトラマイクロトームにより超薄切片 (50~80nm) を作製し、コロジオン薄膜を支持膜とした 100 メッシュグリッドに載せる。この際注意すべきなのは、角質層表面の接線方向がメッシュのバーに並行になるように載せることである。これは表

皮全体の観察を容易にするためである。超薄切片そのままではコントラストが低く観察が難しいため、電子染色を行う。形態学的観察にはウラン-鉛二重染色を行う。粒状物質の観察や元素分析のためにはウランのみ染色が望ましい。さらに、元素分析のためにカーボン蒸着による補強を行う。透過型電子顕微鏡で粒状物質の局在、形態学的変化を観察する。グリッド上の超薄切片の表皮全体を弱拡大で撮影し、すべての視野を高倍で分割撮影し、くまなく詳細かつ注意深く解析する。Ti ナノ粒子の電顕像は電子密な微細顆粒状物質あるいはその凝集体としてみられるので、これを見逃さないようにする。Ti が疑われる粒状物質は電子エネルギー損失分光法やエネルギー分散型 X 線分析装置による元素分析を行い、Ti であることを確認する。

#### **(9) 走査型電顕観察・分析**

2 週間、4 週間、8 週間暴露後の角質層剥離前の皮膚と透明粘着テープ（スコッチ<sup>TM</sup>、No.CC1220-BX-J）を用いてテープストリッピング法により 1, 40（中等度剥離）、80（高度剥離）回角質層剥離後の皮膚をホルマリン蒸気固定する。低真空走査型電子顕微鏡で皮膚表面を観察し、粒状物質の分布、局在を観察する。粒状物質はエネルギー分散型 X 線分析装置による元素分析を行い、Ti であることを確認する。

注 1：動物種によって角質層の最適剥離回数は異なるので、予備実験を行い、中等度剥離、高度剥離の至適条件を決める必要がある。

注 2：ホルマリン蒸気固定する理由は、浸漬固定の場合、剥離表面より Ti 成分が遊離脱落する可能性が否定できないためである。

#### **(10) 臓器中チタン濃度の測定**

摘出臓器（脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓）を-80℃で凍結保存する。試料を自然解凍後、試料質量を測定する。試料質量に対して 3 倍量の超純水を加え、ホモジナイザー（テフロン製）でホモジナイズする。各試料から 1g を採取、蒸発乾固後、硝酸 1ml 及び過酸化水素 0.3ml 添加し、マイクロ波試料前処理（ETHOS 1）180℃、20 分加熱を行う。冷却後、加熱し、蒸発乾固直前まで濃縮し、硝酸 0.5ml を加え、超純水 10ml に定容する。高分解能 ICP 質量分析装置により、実測試料中の Ti 濃度を測定する（測定質量数  $m/z=49$ 、質量分解能  $R=4,000$ ）。実測質量中の Ti 濃度から、試料中の Ti 濃度を算出する。

注：なお、我々の実験では東レリサーチセンターに委託した。