

平成22年9月

足立孝司 学位論文審査要旨

主査 林 一彦
副主査 山元 修
同 黒沢 洋一

主論文

In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin

(ヘアレスラット皮膚に曝露した工業用二酸化チタンナノ粒子の *in vivo* における影響)

(著者：足立孝司、山田七子、山本和弘、吉田雄一、山元 修)

平成22年 Nanotoxicology 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin

(ヘアレスラット皮膚に曝露した工業用二酸化チタンナノ粒子の *in vivo*における影響)

有害物質の人体内への侵入を考えた時、曝露経路としての皮膚は呼吸器に次ぎ主要な臓器と考えられる。ナノ材料は最近開発速度が目覚しいが、過去のアスベスト被害の苦い経験からもナノ粒子の呼吸器や皮膚への生物学的影響の評価が必要とされており、すでにくつかの報告もなされている。二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子の経皮吸収については、角質を透過するか否かはいまだ結論は出ていない。本研究ではこれらの点を明らかにするために動物皮膚へTiO₂ナノ粒子を単回曝露し、ナノ粒子の皮膚における局在や形態学的な変化の観察を行った。

方 法

実験には8週齢ヘアレスラット (雄) の実験群30匹、対照群15匹を用いた (鳥取大学医学部動物実験委員会の承認済み)。10 wt% TiO₂含有エマルジョンとコントロールエマルジョンをラット背部皮膚15 cm²の範囲に4 mg/cm²外用し、4 時間後の皮膚を採取し、光学顕微鏡 (光顕) および透過型電子顕微鏡 (電顕) により観察した。一部はエネルギー分散型X線分光装置 (EDX) または電子エネルギー損失分光法 (EELS) による元素分析に供した。免疫組織化学的染色を行い、表皮細胞の対象抗原の局在の変化を観察した。Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 法によるアポトーシス細胞の検討も行った。テープストリッピング法を用いて、皮表面の粒子の分布についての走査型電顕による観察とEDXによる元素分析を行った。また、FITC 標識した10wt%TiO₂含有エマルジョンも作製し、同様に単回4 時間曝露実験を行い、共焦点レーザー顕微鏡用試料を作成し、観察を行った。さらに、曝露24 時間後、72 時間後、168 時間後の皮膚も採取し、経時的变化を観察した。

結 果

光顕的に曝露4 時間後のTiO₂曝露群で黄褐色の粒状物質が毛包間表皮角質層上層ならびに毛包漏斗部角質層に局在していた。表皮や毛包の生細胞領域への侵入はみられなかった。

表皮の厚さに変化はなかった。表皮、毛包、真皮に明らかな病理組織学的変化はみられなかった。24 時間後、粒子は角質層上層上部にはまだ少し残っていた。72 時間後にはこれらの粒子は毛包漏斗部角質層の上部にのみ残っており、168 時間後には毛包開口部角質層上部にわずかにみられるのみであった。

免疫組織化学的に曝露群とコントロール群の間に明らかな相違はなかった。

共焦点レーザー顕微鏡観察では角質層上層と毛包漏斗部毛管部に蛍光信号がみられたが、表皮、毛包の生細胞領域や真皮には蛍光はみられなかった。

透過型電顕による観察では、曝露群すべての角質層上層と一部の毛包漏斗部に電子密な微細顆粒状物質あるいはその凝集体が観察された。元素分析でこれらがTiO₂であることが確認された。角質層下層や生細胞領域にTiO₂と思われる物質は確認されなかった。細胞学的変化は確認されなかった。

走査型電顕による観察では粒状物質が皮表面全体に均一にみられ、EDX分析でチタンと確認された。テープストリッピング40 回剥離後、粒状物質は毛包開口部およびその周囲にのみ分布し、チタンを検出した。80 回剥離後、一部の毛包開口部にのみわずかに粒状物質がみられ、チタンを検出した。

考 察

TiO₂ナノ粒子の経皮吸収に関する実験の多くは生細胞領域へは侵入しないと報告している。しかし、TiO₂ナノ粒子の皮膚透過性を示唆する報告もある。

著者らの病理組織学的検討では、粒子のほとんどは角質層上層上部と毛包漏斗部に局在し、共焦点レーザー顕微鏡でも同様の結果であった。光顕レベルでは生細胞領域にナノ粒子の分布はみられなかった。

ナノ粒子の局在をより詳細かつ正確に評価するために、その目的に最も適した透過型電顕を用い、EDXまたはEELSによる元素分析も行った。これらの結果、TiO₂粒子は生細胞領域には観察されず、角質層上層と毛包漏斗部角質層に局限していた。

過去に3つの研究で、テープストリッピング法を用いたTiO₂曝露皮膚の検討がなされている。これらの研究ではテープストリッピング後の皮膚組織の分光分析は行われているが、著者らのようなテープストリッピング後の皮表面の走査型電顕による観察とEDXによる元素分析は初めてである。毛包周囲の角質層深部にTiO₂粒子が局在していた理由として毛孔周囲の角質細胞間の密着性が比較的ゆるく、微細粒子が通過しやすい可能性と毛包漏斗部に入った微細粒子が漏斗部における角質細胞の連続性が途切れた部分から角質細胞間隙に入り込んだ可能性を考えた。

今回の研究で、毛包漏斗部角質層に局在するTiO₂ナノ粒子が生細胞に近接していることが初めて明らかにされた。この事実は、この領域で皮膚のバリア機能が崩壊したときにナノ粒子が生細胞領域に侵入する可能性を否定できなかった。皮膚のバリア機能は紫外線曝露によって障害される可能性があるが、著者らの研究では紫外線曝露は行っておらず、さらなる研究が必要である。

結 論

TiO₂ナノ粒子の経角質層経路や経毛包経路による生細胞領域への侵入はみられなかった。