

二酸化チタンナノ粒子の気管内投与後のマウス肺における影響

北條 理恵子*1, 須田 恵*1, 柳場 由絵*1, 安田 彰典*1
三浦 伸彦*1, 長谷川 達也*2, 鈴木 哲矢*1,3, 王 瑞生*1

二酸化チタン (TiO₂) のナノサイズの粒子 (NPs) は呼吸器系へのばく露後、肺の急性炎症反応を誘発することが動物実験で観察されている。また、肺に入った粒子は排出や他の臓器への移行があるが、一部は長期にわたって肺に留まることも知られているため、遺伝毒性や発がん性が懸念されている。本研究では、マウスに 0 (対照群), 20, 100, 500 μg の TiO₂ NPs を気管内投与し、肺組織における遺伝子突然変異及び炎症作用等の影響を調べた。投与 3 日及び 90 日後のマウスを解剖し、肺病理観察や Ti 定量を行った。90 日後のマウスについては、右肺から気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採集し、さらに肺組織における *gpt* アッセイ (遺伝子点突然変異) を解析した。投与後のマウスの体重変化や 90 日後の肺左葉の重量においては TiO₂ NPs 投与による影響は観察されなかった。BALF 解析の結果、検出された白血球 (100-180 個/μL) のほとんどが単球であったが、群差は見られなかった。肺組織損傷のマーカーとして、BALF 中の lactic dehydrogenation enzyme (LDH), 総タンパク量 (μ-TP), tumor necrosis factor (TNF-α) を測定したが、いずれも TiO₂ NPs 投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった。*gpt* アッセイの結果、対照群の肺組織において低い変異率が検出されたが、TiO₂ NPs の各投与群で変異率の上昇は認められなかった。一方、間質性肺炎が 100 と 500 μg 投与群において散見され、光学および電子顕微鏡では肺組織に TiO₂ の凝集体が観察された。これらの結果から、気管内投与された TiO₂ NPs は、90 日経過後も粒子の残留が観察できたが、遺伝子変異は生じていないことが判明した。しかし、軽微な炎症等が 90 日経過後もみられたことから、より長期の作用を観察する必要があると思われる。

キーワード: 二酸化チタン, ナノ粒子, マウス, *gpt* アッセイ, 気管内投与

1 はじめに

二酸化チタン (TiO₂) は工業的に生産され、屈折率が高く、白色度、隠蔽力、着色力、分散性、耐候性、化学的安定性等の性質を合わせ持つこともあり塗料やインキ、紙、プラスチック、繊維、ゴム、化粧品などに幅広く使用されてきた¹⁾。これまで TiO₂ は毒性が極めて低いと考えられてきたが²⁾、一次粒径が 100nm 以下のナノサイズの粒子 (NPs) では肺腫瘍を引き起こす可能性が報告された³⁾。近年、触媒活性に優れる TiO₂ NPs の応用が新しい顔料の開発や光触媒反応、磁化領域などで広がっている⁴⁾。一方で、そのサイズに由来する表面積の増大により、TiO₂ NPs は従来の 100nm 以上の微細粒子 (FPs) とは異なる生理活性を示すことも報告されている⁵⁾。また、過去の研究では TiO₂ NPs は TiO₂ FPs よりも毒性が強いとされる結果も示されているため、ヒトへの健康影響が懸念される^{6,7)}。国際がん研究機構 (IARC) では、従来グループ 3 であった発がん分類を 2006 年にグループ 2B に再分類した⁸⁾。ナノサイズの TiO₂ 粒子は、同量の FPs に比べより多くが肺胞間質に入り込むため、肺の炎症反応がより重篤になることが複数の研究で明らかにされている^{9,10)}。

TiO₂ NPs はおもに工業用製品の製造過程あるいは工業用製品の使用 (食品摂取も含む) により体内に取り込

まれる。製造過程、すなわち労働現場で主流といわれるばく露経路は吸入である¹⁾。吸入により鼻口腔から体内に取り込まれた TiO₂ NPs は、鼻咽喉領域を経て、肺胞領域に到達し、その後体循環に入る。しかしながら、一部は肺に長期にわたって留まることが知られている¹¹⁾。また、気管内投与により肺での DNA 損傷が増加することも報告されている^{12,13,14)}。500 μg の TiO₂ NPs を直接気管内に単回投与した結果、急性期 (投与 1 日後) のみならず、少なくとも亜慢性期 (90 日後) まで TiO₂ NPs 投与による IL-6 や総タンパク量の増加等の炎症反応が見られた⁹⁾。

TiO₂ NP の中でも、P25 と呼ばれる TiO₂ ナノ粒子はアナターゼ型及びルチル型の両結晶を含む酸化チタンで、さまざまな光触媒反応系において高い活性を示すことから広く用いられている¹⁵⁾。P25 における毒性影響については多くの知見が得られている¹⁶⁾ が、気管内投与における肺への影響については一貫した結果が得られていない^{17,18)}。

本研究では、市販の P25 (アナターゼ型:ルチル型=約 8:2 混合組成) TiO₂ ナノ粒子を使用し、変異原性を調べることができるレポーター遺伝子が導入された *gpt* Delta マウスを用い TiO₂ NPs を気管内投与し、肺組織における *gpt* アッセイ (遺伝子点突然変異) を解析した。また、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) と肺の組織切片における TiO₂ NPs の炎症等の有無を調べた。

2 材料と方法

1) 動物

雄性 C57BL/6J 及び *gpt* Delta マウス (日本 SLC 株式会社, 静岡) を 7 週齢で購入し、1 週間の馴化後実験に

*1 (独)労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ

*2 山梨県富士山科学研究所

*3 現所属: 広島大学大学院医歯薬保健学研究院

連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ 北條理恵子

E-mail: hojo@h.jniosh.go.jp

使用した。これらの動物は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の SPF 環境下で飼育され、12 時間の明暗サイクル (08:00 - 20:00) の条件下で飼育した。固形飼料 (CE-2, 日本ククリア株式会社, 東京) 及び飲用水は自由摂取とした。

本動物実験は「労働安全衛生総合研究所動物実験委員会」の審査を受け承認された。動物の愛護、実験全般の実行および動物の管理等は、独立行政法人労働安全衛生総合研究所動物実験委員会が定める動物実験指針および動物実験施設利用規定を遵守して行われた。また、遺伝子改変動物の使用は「労働安全衛生総合研究所組換え DNA 実験委員会」の審査を受け承認された。

2) TiO_2 NPs の調剤

TiO_2 NPs (AEROXIDE® TiO_2 P 25, Evonik Japan Co., Ltd) は、 180°C で 1 時間乾熱滅菌し使用した。 TiO_2 NPs は、本研究の予備実験で良好な分散性が確認されたため、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターでろ過滅菌した蒸留水に懸濁し、水槽式超音波装置 (Branson 2510, ブランソン, 神奈川) で 30 分間超音波処理し、分散した。動的光散乱法で測定した Z-Average の二次粒子径のピークは、 $20 \mu\text{g}$ 投与液では平均 132.8 d.nm 、 $100 \mu\text{g}$ 投与液は 123.3 d.nm 、 $500 \mu\text{g}$ 投与液では 127.1 d.nm であった。

3) 気管内投与と解剖

気管内投与当日、実験小動物用簡易吸入麻酔装置 (KN-1071, 夏目製作所, 東京) にてイソフルラン (アボットジャパン, 東京) 浅麻酔を施したマウスの下顎が床面と平行になるよう保定台に固定した。その後、喉頭鏡 (KN-1021, 夏目製作所, 東京) でガイドしながらマイクロスプレイヤー (Penn-Century Inc., PA, USA) を用いて、0 (蒸留水のみ投与)、20, 100, $500 \mu\text{g}$ の TiO_2 NPs を、一匹あたり $40 \mu\text{L}$ の量で気管内投与した。 C57BL/6J マウスは投与 3 日後にイソフルラン麻酔を施し解剖した。 gpt Delta マウスについては投与当日、3, 7, 14, 30, 60 および 90 日後の体重を測定し、生存率を確認した後に解剖した。開腹して採血したあとに肺を取り出し、左肺の重量を測定した。その後、左肺を 10% 中性ホルマリン液 (060-03845, 和光純薬工業株式会社, 大阪) にて固定し、パラフィン包埋後に $4 \mu\text{m}$ の厚さの切片を作製し、H & E 染色して光学顕微鏡による病理組織解析に用いた。また、同切片を用いて偏光顕微鏡下で TiO_2 粒子の存在の有無を調べた。一部の左肺は、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) により肺組織内の Ti 定量に使用した。一部の gpt Delta マウスについては、左肺を結紮したあと、右肺より BALF を収集し、その後 gpt アッセイに使用した。BALF の収集は以下の手順で行われた。 2.5 mL シリンジに 1.0 mL の BAL 回収液 (0.05 mM EDTA 入り 10 mM PBS) を入れ、直径 1.00

mm のカテーテル (アトム栄養カテーテル 43003, アトムメディカル, 東京) に接続した。カテーテルを右肺の主気管支から挿管し、BAL 回収液の注入・採取作業 3 回を 1 セットとして気管を洗浄し、3 セット実施して BALF を回収した。採取した BALF を、 4°C 、 1000 rpm 、10 分間の条件で遠心分離した。肺組織損傷のマーカーとして BALF 上清中の lactic dehydrogenation enzyme (LDH)、総タンパク量 ($\mu\text{-TP}$) を、自動分析装置 (Chemistry Analyzer 7070, 日立製作所, 東京) により測定した。残りの上清は -80°C にて保存し、タンパク定量、ELISA 法による tumor necrosis factor (TNF- α) 定量を行った。残った沈査に BAL 回収液 1.0 mL を加え、攪拌して多項目自動血球分析装置 (XT-2000i, Sysmex, 兵庫) を用いて BALF 中の白血球の型別分類を行った。肺の組織における変異原性を解析するため、BALF 回収後の右肺を用いて gpt アッセイを行った¹⁵⁾。 gpt 遺伝子突然変異頻度は、6-チオグアニン耐性のコロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出した。 gpt アッセイの陽性対照としてエチルニトロソウレア (ENU) 処理を施したマウス 3 匹を用いた。

$500 \mu\text{g}$ 群の C57BL/6J マウス及び gpt Delta マウス各 1 匹を用いて電顕で肺組織における TiO_2 ナノ粒子の観察と元素分析を行った。

4) 統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差として示した。各投与群 ($20, 100, 500 \mu\text{g}$ 群) の体重及び左肺重量は、それぞれ測定日ごとに対照群 ($0 \mu\text{g}$ 群) と t 検定で比較した。BALF の統計解析は、すべての群での等分散を確認したあと、対照群と各投与群を Dunnett 法による両側検定にて比較した。有意水準は 0.05 とした。

3 結果

1) TiO_2 NPs 投与 3 日後 (C57BL/6J マウス)

表 1. TiO_2 NPs 気管内投与 3 日後の左肺病理組織所見

実験群 [動物数]	炎症	うっ血	細胞浸潤	顆粒状 物質	その他
0 μg (4 匹)	軽~中 (2 匹)	軽 (2 匹) 中 (2 匹)	軽 (1 匹) 中 (1 匹)	—	
20 μg (4 匹)	中 (1 匹)	中 (4 匹)	軽 (1 匹) 中 (1 匹)	—	出血(1)
100 μg (4 匹)	軽 (1 匹) 中 (2 匹)	中 (4 匹)	中 (3 匹)	—	間質性肺炎 (軽度)
500 μg (6 匹)	強 (2 匹)	中 (6 匹)	中 (4 匹)	中 (4 匹)	間質性肺炎

0, 20, 100, $500 \mu\text{g}$ の TiO_2 NPs を $40 \mu\text{L}$ /匹気管内投与し、3 日後に解剖したオスの C57BL/6J マウスの左肺病理所見。軽：軽度の損傷、中：中程度の障害、強：強度の損傷。括弧内は障害がみとめられた動物の数。

0, 20, 100, 500 μg の TiO_2 NPs を気管内投与した C57BL/6J マウスはすべて投与 3 日目まで生残した。体重及び肺重量に TiO_2 NPs 投与の影響はみられなかった。左肺の病理組織解析の結果を表 1 に示した。対照群(0 μg 群) の 2 検体において軽度から中程度の肺の炎症像を確認した(図 1A 及び B)。同様に、軽度の間質性肺炎と気管周囲の結合組織や脂肪組織内に単核球の浸潤が散見され、肺外膜周囲に繊維素・リンパ球の析出が認められた。4 検体すべてに軽度から中程度のうっ血を認めたが著変はみとめられなかった。20 μg 群では、1 例に気管支周囲のリンパ球浸潤、別の 1 例に肺胞内の出血が認められた(図 1C 及び D)。1 例に中程度の炎症が見られ、すべての個体にうっ血が確認された。100 μg 群では、3 例に

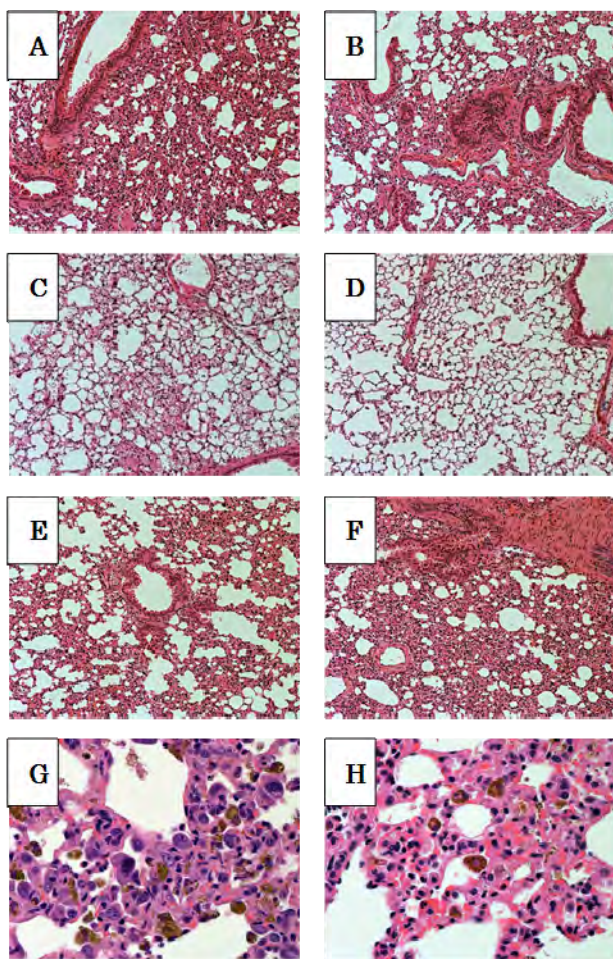


図 1. TiO_2 NPs 投与 3 日後の C57BL/6J マウス左肺病理組織像

40 μL の TiO_2 NPs を気管内投与し、3 日後に解剖したオスの C57BL/6J マウスの左肺病理所見。左肺摘出後、10 % 中性ホルマリンで固定、パラフィン包埋後に 4 μm の厚さの切片を作製し、H & E 染色した。A 及び B: 0 μg (蒸留水のみ投与) 群, C 及び D: 20 μg 投与群, E 及び F: 100 μg 投与群, G 及び H: 500 μg 投与群。A-F は 100 倍で検鏡した像。G 及び H は、肺組織内に褐色粒子をみとめたため 400 倍で検鏡した。

軽度の間質性肺炎がみとめられた(図 1E 及び F)。3 例に細胞浸潤が見られ、全個体にうっ血が生じていた。500 μg 群では、2 例に強度の間質性肺炎が認められ、気管支周囲の単核球浸潤や茶褐色顆粒を貪食したマクロファージの存在が多数確認された(図 1G 及び H)。また、気管支上皮に茶褐色物質が付着している像も散見された。500 μg 群の 2 例では肺炎像はほとんど認められなかったが、これらの個体の細気管支周囲に茶褐色顆粒を貪食したマクロファージの浸潤がみられた。2 例には著変は認められなかった。500 μg 群の 6 例すべてにおいてうっ血が確認された。茶褐色顆粒は偏光顕微鏡下で白色に発光した(図 2C 及び D)ため、金属由来の物質であることが推察された。Ti 定量の結果、20 と 100 μg 群では値の高い個体が 1-2 匹あったが、500 μg 群ではほとんどの個体で高値を示した(データ未掲載)。

2) TiO_2 NPs 投与 90 日後 (*gpt* Delta マウス)

TiO_2 NPs 投与 90 日後においてすべての動物の生残が確認された。それぞれ投与当日、投与 3, 7, 14, 30, 60 および 90 日後の体重を対照群と各投与群(20, 100, 500 μg 群) で比較したところ、すべての時期において対照群と各投与群との間に統計学的な有意差はみとめられなかった。また、左肺の重量にも TiO_2 NPs の投与量による差はみとめられなかった。

BALF 内の LDH, $\mu\text{-TP}$, TNF- α , タンパク定量の結果、特に投与量依存的に変化した指標はみられなかった(図 2)。また、表 2 に TiO_2 NPs 気管内投与 90 日後の *gpt* Delta マウスの右肺 BALF の白血球数と細胞分画の結果を示した。BALF 中には白血球が 1 μL あたり 100-180 個検出された。白血球分画では単球(マクロファージ)が最も多く(約 95 %), 好中球やリンパ球はそれぞれ 1.5-3 %であった(表 2)。白血球数、細胞分画も含め、BALF 中のすべての測定指標において対照群と各投与群との間に統計学的な有意差はみとめられなかった。

遺伝子点突然変異解析(*gpt* アッセイ)の結果、陽性対照として ENU 処理群では著しい上昇があった。対照群マウスの肺組織において低い変異率が検出されたが、 TiO_2 NPs の各投与群において変異率の上昇は認められなかった。なお、今回は活性酸素などによって誘発される遺伝子欠失突然変異の解析は行わなかった。

各群における肺の病理組織所見では、肺のうっ血症状が投与量にかかわらず全例にみとめられた(表 3)。間質性肺炎、マクロファージ内の茶褐色の顆粒状物質は、0 μg 群(図 3A 及び B) および 20 μg 群(図 3C 及び D)の動物では 1 例もみられなかったが、100 μg 群(図 3E 及び F) および 500 μg 群(図 3G 及び H)では観察された。この茶褐色顆粒は TiO_2 粒子と推察された。その同定のため、100 及び 500 μg 群の左肺の切片を偏光顕微鏡で観察したところ、この顆粒状物質は金属由来の粒子であることを確認した(図 4 の右側)。さらに、500 μg 群の

表 2 TiO₂ NPs 気管内投与 90 日後の *gpt* Delta マウスの右肺 BALF 内白血球数及び細胞分画

CELLULAR COMPONENTS IN THE BALF DATA							
Doses ($\mu\text{g}/\text{匹}$)	N	WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	DIFFERENTIAL COUNT OF WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)				
			NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO
0	7	1.00 \pm 0.42	0.03 \pm 0.08	0.01 \pm 0.04	0.96 \pm 0.40	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
20	6	1.69 \pm 0.90	0.03 \pm 0.08	0.04 \pm 0.08	1.46 \pm 1.09	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
100	7	1.03 \pm 0.52	0.03 \pm 0.08	0.01 \pm 0.04	0.99 \pm 0.48	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
500	7	1.31 \pm 0.77	0.04 \pm 0.07	0.04 \pm 0.05	1.06 \pm 0.81	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

TiO₂ NPs を一匹あたり 40 μL の投与量でそれぞれ 0 (7 匹), 20 (6 匹), 100 (7 匹), 500 (7 匹) μg を気管内投与し, 90 日後に解剖したオスの *gpt* Delta マウスの BALF 内白血球解析結果. 解剖時, 左肺を結紮後, 右肺より BALF を収集した. WBC: 白血球細胞数 ($\times 10^2/\mu\text{L}$), 及び細胞分画, NEUT: 好中球数, LYMPH: リンパ球数, MONO: 単球数, EO: 好酸球数, BASO: 塩基球数を示す ($\times 10^2/\mu\text{L}$). 数値は投与群ごとの平均 \pm 標準偏差.

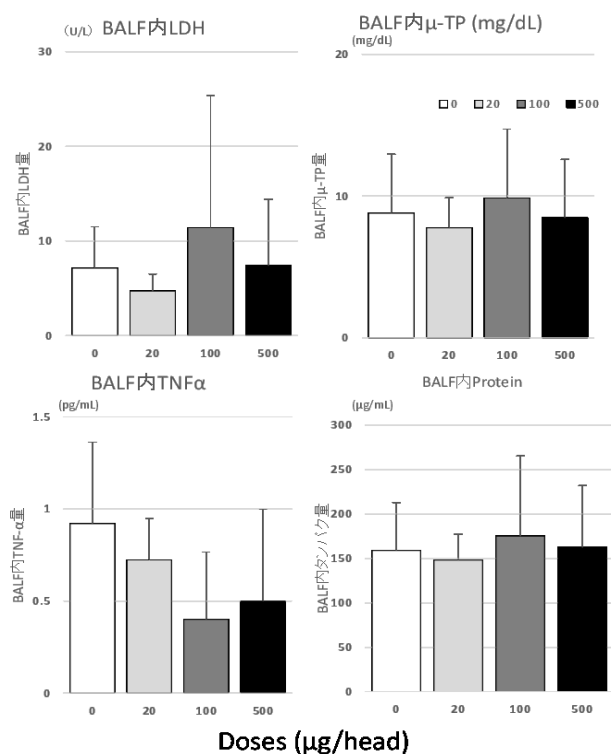


図 2. TiO₂ NPs 気管内投与 90 日後の *gpt* Delta マウス 右肺 BALF 細胞障害マーカー

TiO₂ NPs を一匹あたり 40 μL の投与量でそれぞれ 0 (7 匹), 20 (6 匹), 100 (7 匹), 500 (7 匹) μg を気管内投与し, 90 日後に解剖したオスの *gpt* Delta マウスの BALF 内 LDH, μTP , TNF- α , タンパク定量の結果. 数値は投与群ごとの平均 \pm 標準偏差.

電顕像を EDS 分析により解析したところ, 顆粒状にみられた組織内粒子に Ti 元素が含まれていることが同定された.

4 考察

1) TiO₂ NPs 投与 3 日後

今回の対照群の気管内投与では 2 例で著変が認められなかったが, 残りの 2 例では炎症がみられた. 軽~中程度のうっ血が全例に見られたこともあり, この炎症は投与による物理的刺激あるいは異物 (蒸留水) 混入によると考えられるが, 著変が生じなかった 2 例については炎症が生じなかったのか治癒した後であるのかは判断が難しい. TiO₂ NPs の投与量が多くなるにつれて炎症の重篤度が大きくなっているため, TiO₂ NPs により 3 日目に急性肺病変が生じていることが示唆された. 特に 500 μg 群では, ばく露影響と思われる間質性肺炎の所見が 2 例にみとめられたが, 100 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 以下の投与では肺に顆粒はみられなかった. ICP-MS による肺組織内の Ti 定量では 100 μg 用量以下は一部の個体において軽微な上昇, 500 μg 群はほとんどの個体で高値を示した. 吸入ばく露試験において直径 20 nm, 250 nm の 2 種類の TiO₂ 粒子をほぼ同一重量濃度ばく露し, 1 年間の観察期間において肺内反応の解析を行った研究では, 小さな粒子は大きな粒子より肺内の残留性が高く, 特に間質への移行, 肺胞上皮細胞の増殖, 間質に初期の線維芽細胞巣, 肺胞マクロファージの機能障害を示した¹⁸⁾. この結果を参照した場合, 本研究において投与した TiO₂ NPs が 3 日以内にすべて排泄, あるいは他臓器へ移行されたものとは考えにくい. 一部のマウスへの気管内投与が左右均等にならず, 投与液が右肺に集中した可能性もある.

2) TiO₂ NPs 投与 90 日後

全群の BALF 中にみられた白血球のほとんどが単球で占められていることから, 炎症反応が生じていることが示唆された. 通常, 炎症の急性期 (4 - 24 時間) には好中球が増加し, その後は単球が増加し始め, 約 48 時間後には減少する¹⁹⁾. 本実験においては, 90 日後にも

依然として単球が優勢であったことから、炎症は慢性に移行していることが考えられる。しかしながら、BALF内LDH、 μ -TP、TNF- α 、タンパク定量の結果、特に投与量依存的に変化した指標はなく、この炎症反応は軽度であると思われる。投与3日後の結果と同様、TiO₂ NPsの投与量が増えるにしたがって炎症症状の重篤度が増し、細胞内に茶褐色の顆粒状物質が多くなっていく傾向がみとめられた。また、間質性肺炎、細胞浸潤、気腫は100 μ g群および500 μ g群でのみ生じたため、TiO₂ NPs ばく露による影響の可能性がある。これらの結果は、粒径20 nmと250 nmのTiO₂をラットに気管内注入した結果、粒子表面積が重量や個数に比べ、粒子のサイズにかかわらず、BALFの好中球比率(肺内炎症)と正相関する報告²⁰⁾及びRourgaardら(2011)の500 μ gの単回気管内投与の3か月の回復期にも依然として炎症症状が認められていたという結果と一致するものである。しかしながら、彼らは同様の炎症症状が同量のTiO₂ FPsでも生じることを示している¹¹⁾。これらの結果と本実験の結果を併せて考えると、炎症症状の重篤度の変化はTiO₂ NPs ばく露の影響と考えられるが、サイズ特異的な毒性であるとはいえない。結論として、本実験で見られた肺の炎症反応は、粒径や表面積のみに依存するものではなく、他の要因も含めて考えなければならない。たとえば、同じ粒径でもアナターゼ型では反応を示すが、ルチル型では反応に乏しいなどの結晶構造も肺内反応へ関与するという報告があり²¹⁾、また、結晶構造の違いにより毒性の強さが違うことが指摘されている²²⁾ こともあるため、

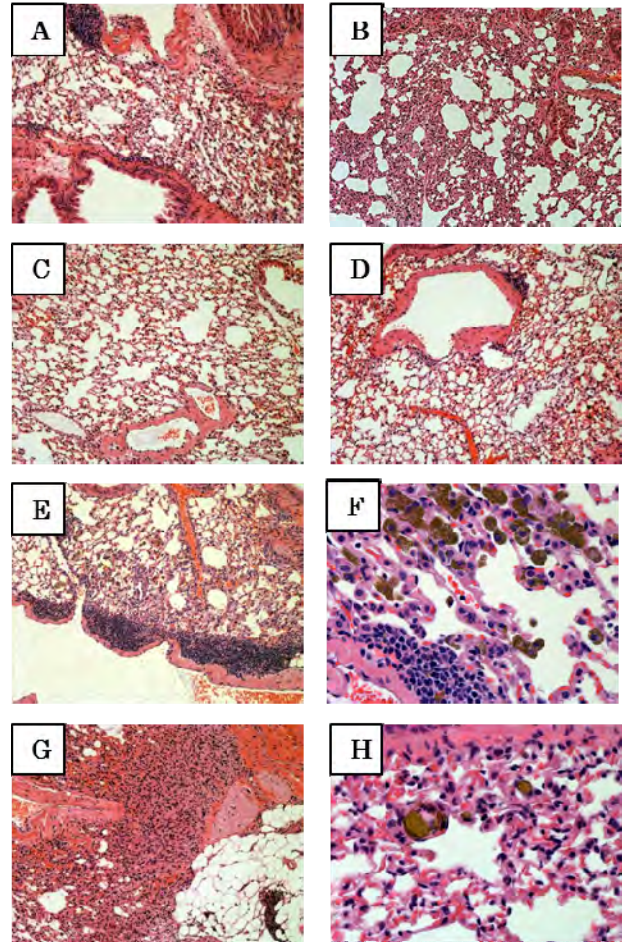


図3. TiO₂ NPs 投90日後のC57BL/6J *gpt* Deltaマウスの左肺病理組織像

表3 TiO₂ NPs 気管内投与90日後のC57BL/6J *gpt* Deltaマウス左肺病理組織所見

実験群 [動物数]	炎症	うっ血	細胞浸潤	顆粒状 物質	その他
0 μ g (4匹)	弱 (1匹)	中 (3匹) 強 (1匹)	中 (1匹) 強 (1匹)	中 (1匹)	
20 μ g (4匹)	—	中 (4匹)	軽 (1匹)	—	
100 μ g (4匹)	弱 (1匹) 中 (1匹) 強 (1匹)	中 (4匹)	極強 (1匹)	中 (1匹) 強 (1匹)	出血 (1匹) 壊死 (1匹) 気腫 (1匹) 間質性肺炎
500 μ g (5匹)	強 (3匹)	中 (5匹)	中 (1匹)	中 (2匹)	気腫 (1匹) 間質性肺炎

TiO₂ NPsを一匹あたり40 μ lの量で、それぞれ0, 20, 100, 500 μ gの気管内投与し、90日後に解剖したオスのC57BL/6J *gpt* Deltaマウスの左肺病理所見。軽:軽度の損傷, 中:中程度の損傷, 強:強度の障害, 極強:激しい損傷。括弧内は障害がみとめられた動物の数。

40 μ lのTiO₂ NPsを気管内投与し、90日後に解剖したオスのC57BL/6 *gpt* Deltaマウスの左肺病理所見。摘出後、10%中性ホルマリンで固定、パラフィン包埋後に4 μ mの厚さの切片を作製し、H&E染色した。A及びB:0 μ g(蒸留水のみ投与)群, C及びD:20 μ g投与群, E及びF:100 μ g投与群, C及びD:500 μ g投与群。A-D, EおよびFは100倍で検鏡した像。F及びHは、肺組織内に褐色粒子をみとめたため400倍で検鏡した。

比表面積のみを毒性評価の用量基準として考慮することには疑問がある。今後は、結晶構造の違いにも着目した研究が必要であると考えられる。

先行研究におけるTiO₂ NPs投与の肺への影響の報告では、急性炎症が主流であったが^{23, 24, 25)}、本研究においては投与から90日間が経過しても肺の組織内にTiO₂粒子が残存していた。これはTiO₂による持続炎症の原因であるかもしれない。また、単回投与であっても、100 μ g以上の投与量である場合、TiO₂ NPsのクリアランスには少なくとも90日以上を要することになる。右肺を

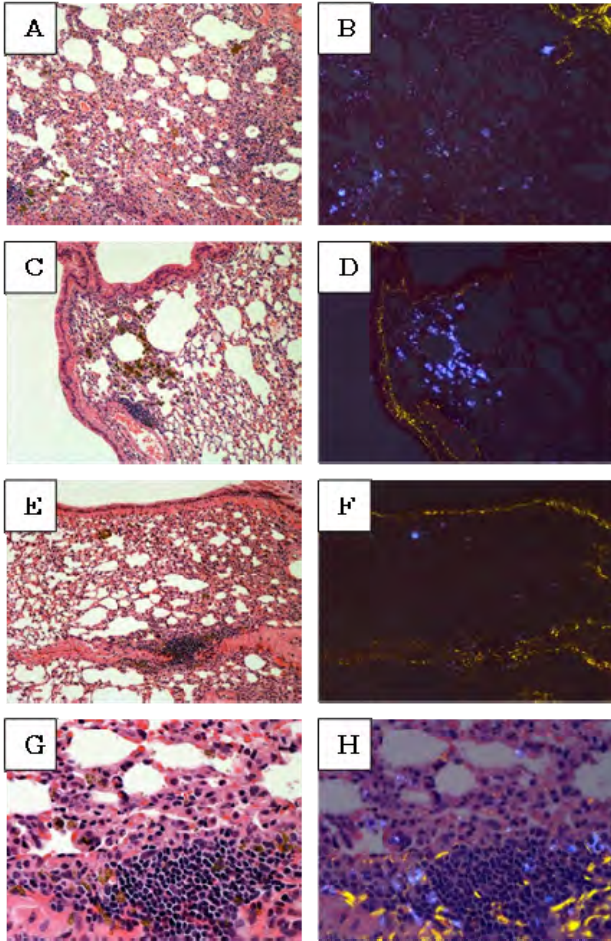


図 4. TiO₂ NPs 気管内投与 90 日後の C57BL/6J *gpt* Delta マウス左肺病理組織像 (左: H & E 染色, 右: 偏光顕微鏡像)

40 μ l の TiO₂ NPs を気管内投与し, 90 日後に解剖したオスの C57BL/6J *gpt* Delta マウスの左肺病理所見. A 及び C: H&E 染色した 100 μ g 投与群マウスの肺の病理組織像 (4 μ m 厚), B 及び D: それぞれ A 及び C の病理組織切片を偏光顕微鏡で撮影した病理組織像. E 及び G: H&E 染色した 500 μ g 投与群マウスの肺の病理組織像 (4 μ m 厚), F 及び H: それぞれ E 及び G の病理組織切片を偏光顕微鏡で撮影した病理組織像. 左図の H&E で見られる茶褐色顆粒は, 偏光顕微鏡下では白色に発光している. 白色発光は, その物質が金属由来であることを意味する. 黄色発光は弾性繊維と一致する.

使用した *gpt* アッセイの結果では, ばく露による影響がみられなかったことから, 今後はより長期にわたる観察が必要であると思われる.

参 考 文 献

1) 酸化チタン (ナノ酸化チタン) の安全性等について. 日本

酸化チタン工業会. 2014; 1-15.

- 2) Participants IRSIW: The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal. Toxicol.* 2000; 12: 1-17.
- 3) Lee K.P., Trochimowicz H. J., Reinhardt C. F. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985; 79:179-192.
- 4) 森本泰夫, 田中勇武. ナノ粒子の有害性評価. *産業衛生学雑誌.* 2008 ; 50 : 37-48.
- 5) Tsuji J. S., Maynard A. D., Howard P. C., James J. T., Lam C. W., Warheit D. B., Santamaria A. B. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2006; 89: 42-50.
- 6) Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.* 2008; 82: 151-157.
- 7) Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2001; 74: 1-8.
- 8) IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Titanium dioxide Vol. 93. Lyon: IARC. 2010
- 9) Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre. Toxicol.* 2013; 10:15.
- 10) Sager T. M., Kommineni C., Castranova V. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part. Fibre. Toxicol.* 2008; 5: 17.
- 11) Roursgaard M., Jensen K. A., Poulsen S. S., Jensen N. E., Poulsen L. K., Hammer M., Nielsen G. D., Larsen S. T. Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice. *Scientific World Journal.* 2011; 11: 801-25.
- 12) Saber A. T., Jacobsen N. R., Mortensen A., Szarek J., Jackson P., Madsen A. M., Jensen K. A., Koponen I. K., Brunborg G., Gützkow K. B., Vogel U., Wallin H. Nanotitanium dioxide toxicity in mouse lung is reduced in sanding dust from paint. *Part. Fibre. Toxicol.* 2012; 9:4.
- 13) Saber A. T., Jensen K. A., Jacobsen N. R., Birkedal R., Mikkelsen L., Møller P., Loft S., Wallin H., Vogel U. Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology.* 2012; 6: 453-71.

- 14) Hwang Y. J., Jeung Y. S., Seo M. H., Yoon J. Y., Kim D. Y., Park J. W., Han J. H., Jeong S. H. Asian dust and titanium dioxide particles-induced inflammation and oxidative DNA damage in C57BL/6 mice. *Inhal. Toxicol.* 2010; **22**: 1127-33.
- 15) Ohtani B., Orieto-Mahancy O. -O., Li D., Abe R. J. *Photochem. Photobiol. A Chem.* 2010; **216**: 179.
- 16) 有害性評価書 物質名：酸化チタン.
- 17) Nohmi T., Suzuki T., Masumura K. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat. Res.* 2000; 455: 191-215.
- 18) Ferin J., Oberdörster G., Penney D. P. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; **6**: 535-542.
- 19) 田ノ上雅彦, 吉澤靖之, 木村雄二, 矢野平一, 長谷川鎮雄, 青木延雄. 免疫複合体による肺障害の経時的変化. *日胸疾会誌.* 1989; **27**: 583-590.
- 20) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託事業「NEDO「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」プロジェクトの成果について」. (online) . available from <http://www.meti.go.jp/committee/kenkyukai/seisan/nanomaterial_kanri/>. (accessed 2014-09-19) .
- 21) 森本泰夫, 大神明, 大藪貴子, 村上昌宏, 明星敏彦, 廣橋雅美, 山崎小由美, 西賢一郎, 角谷力, 轟木基, 山本誠, 田中勇武. 金属ナノ粒子の吸入曝露試験による肺傷害の検討. *分子呼吸器病.* 2008; **12**: 65-70.
- 22) Sayes C. M., Wahi R., Kurian P. A., Liu Y., West J. L., Ausman K. D., Warheit D. B., Colvin V. L. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 2006; **92**: 174-85.
- 23) Ma-Hock L, Burkhardt S, Strauss V, Gamer AO, Wiench K., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal. Toxicol.* 2009; **21**: 102-118.
- 24) Grassian V., O'shaughnessy P., Adamcakova-Dodd A., Pettibone J. M., Thorne P., S. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ. Health Perspect.* 2007; **115**: 397-402.
- 25) Liu R., Zhang X., Pu Y, Yin L., Li Y., Zhang X., Liang G., Li X., Zhang J. Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages in vivo. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010; **10**: 5161-5169.