

## ナノ粒子曝露後のマウス臓器中における酸化チタンの定量

松井康人<sup>\*1</sup>, 坂井伸光<sup>\*1</sup>, 田中昭代<sup>\*2</sup>, 藤巻秀和<sup>\*3</sup>, 内山巖雄<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 京都大学大学院工学研究科  
606-8501 京都府京都市左京区吉田本町

<sup>\*2</sup> 九州大学大学院医学研究科  
812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

<sup>\*3</sup> (独) 国立環境研究所  
305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

### 1 背景

酸化チタン (TiO<sub>2</sub>, 二酸化チタン) は化学的に安定で無害とされており, これまで幅広い用途で使用されてきた。高い屈折率を有することから, 強い白色度を発現し, チタン白として古くから顔料として使用されている。90年代には, 白色顔料に加え, 光による触媒作用が注目され, 光触媒市場は拡大を続けている。

触媒の反応は, 反応物を吸着することによって化学反応を促進させることで進行する。これらの触媒作用の効率を上げるためには, 吸着するための表面積を大きくする必要がある。これには, 光触媒としての酸化チタン粒子の粒子径を小さくすることが求められる。現在では, 先に述べた顔料としての酸化チタン粒子の, 粒子径の数百から数千分の一, つまり数 nm から数百 nm の粒子を使用することで, 触媒作用の効率を上げている。一方で近年, 100nm 以下の極微小粒子 (ナノ粒子) の排出挙動<sup>1)</sup>や健康影響<sup>2,3)</sup>が注目されている。この理由として, 1) 粒子数の多いナノ粒子は肺の深部まで達すること, 2) 表面積が大きいと健康への影響も大きいとされていることが挙げられる<sup>4)</sup>。

著者らが最も懸念しているのは, 粒径が数ナノである光触媒としての酸化チタンが, 今後ナノ粒子として大気中, 室内空気中に飛散することである。高層ビルの外壁, 車のダッシュボード, 高速道路の遮音壁などに光触媒の塗布が進んでいる。時間の経過とともに, 基材の劣化は避けられない。非常に有益な触媒作用をもつ酸化チタンを, 安全に普及させるためには, 触媒作用が人体に与える影響に加え, ナノ粒子としての健康影響も確認する必要がある。

### 2 目的

本研究では, 酸化チタンのナノ粒子を, マウスに気管内投与することで, 曝露後の血液中, 臓器中の Ti を定量する。これにより, ナノ粒子の生体内分布を調べることを目的とする。粒径の異なるナノ粒子を投与することで, 粒径による生体内分布の違いについて調べる。血液中の Ti の定量により, 粒子が空気血液関門 (air-blood barrier) を通過し, 肺から血液中へ移行するかどうかの検討が可能となる。循環器系の臓器中の Ti の定量では, 血液中に移行したナノ粒子が, ある器官に特異的に移行しやすいかどうかを検討する。また, 大脳中の Ti の定量では, 外来の物質から脳の神経を守るための血液脳関門 (blood-brain barrier) を通過

し、高次脳中枢へ移行するかどうかを検討する。

今後、1) 酸化チタン粒子そのものの毒性の試験、2) 光を用いた触媒反応によるラジカル生成が、人体に与える影響に関する研究、3) 大気中へ飛散している酸化チタンナノ粒子の定量をおこなう。これにより、最終的には酸化チタン光触媒の安全性、有害性を明確にすることを目的とする。

### 3 方法

#### 3.1 気管内投与

投与には、マウス (BALB/c, male, 8weeks) を 18 匹用いた。対照群 (ctrl) と、粒径 15nm, 100nm の酸化チタンを投与した 3 群を各 6 匹とした。粒径 15nm, 100nm の投与群は、生理食塩水に酸化チタン粒子を溶かし、1.25mg/mL としたものを気管内に投与した。15nm 酸化チタンは、SUPELCO 社製 titanium (IV) oxide nanopowder 99.7% (アナタース) を用い、100nm 酸化チタンは、TAYCA 社製 micro titanium dioxide (ルチル、アナタース混合) を用いた。この溶液を、超音波細胞破碎機 (UD-201, TOMY) を用いて、duty 60, out put 2, 5min 超音波処理した。対照群には、生理食塩水のみを投与した。投与量は各群 100 $\mu$ L とした。

吸入麻酔薬であるハロセン (halothane) を、実験動物麻酔装置 (SN-487, シナノ製作所) にて、デシケーター内に導入し、外科的処置が可能な麻酔深度まで吸入をおこなった。その後、気管にカニューレを挿入した。口蓋より投与液が排泄されたものは、燕下された可能性が高く、実験群には加えなかった。投与後は、どのマウスも心臓マッサージをおこない、安静にした。

ネンブターール 5% 注射液を腹腔内に注射後、開胸し、左心室より採血した。その後、生理食塩水により還流した。摘出した臓器は、肺、肝臓、脾臓、腎臓、大脳と血液である。

#### 3.2 前処理

臓器をメノウ乳鉢 ( $\phi$ 60mm $\times$ 20mm) にてペースト状にした。試料重量が約 40mg となるよう秤量し、テフロン容器に導入した。これに硝酸 (60% Nitric Acid, Wako) 1mL, インジウム標準液 (1000mg/L In in 0.5mol/L HNO<sub>3</sub>, Wako) を重量あたり 1000ppm となるよう添加した。この容器にマイクロウェーブ 150W を 2 分間照射した。1 分間の冷却後、さらに 150W で 2 分間照射し、室温にて放熱したものを最終試料液とした。

ターゲットホルダーに厚さ 4 $\mu$ L のポリプロピレン製バックリングフィルムを貼り付けたものに、試料液を塗布することで測定対象とした。試料液 5 $\mu$ L をバックリングフィルム上に滴下し、白熱灯照射下で乾燥させ、ターゲットとした。

#### 3.3 分析条件

小型サイクロトロン (島津 MCY-1750) から、陽子ビームを照射した。照射量 2400 から 3500nC, 平均ビーム電流 90nA, ビーム径  $\phi$ 6mm, 測定時間 2 分から 45 分とした。これにより発生した特性 X 線を、高エネルギー用と、低エネルギー用の 2 台の Si (Li) 半導体検出器で同時に測定してスペクトルを得た。高エネルギー用の検出器には、吸収体として、Mylar フィルム (厚さ 300 $\mu$ m) を取り付けた。この吸収体により、低エネルギーの X 線を吸収し、重元素に対して、感度を高める。この検出器より、K 以上の元素を分析した。低エネルギー用の検出器には、吸収体を装着せず、コリメータで立体角を絞り、強度の高い低エネルギー X 線を測定した。この検出器を用いて、Na から Ca までの元素を分析した。スペクトルのピーク面積を解析するためのプログラムとして、SAPIX<sup>5,6)</sup>を用いた。

### 4 結果

大脳、腎臓、肝臓、肺、脾臓、血液中の Ti 量の結果を図 1 に示す。縦軸は、ホモジェナイズした臓器中の Ti 含有量 ( $\mu$ g/g) を示し、横軸は、ctrl, 15nm, 100nm の 3 群 (各 6 匹) を示している。3 群の内、気管内投

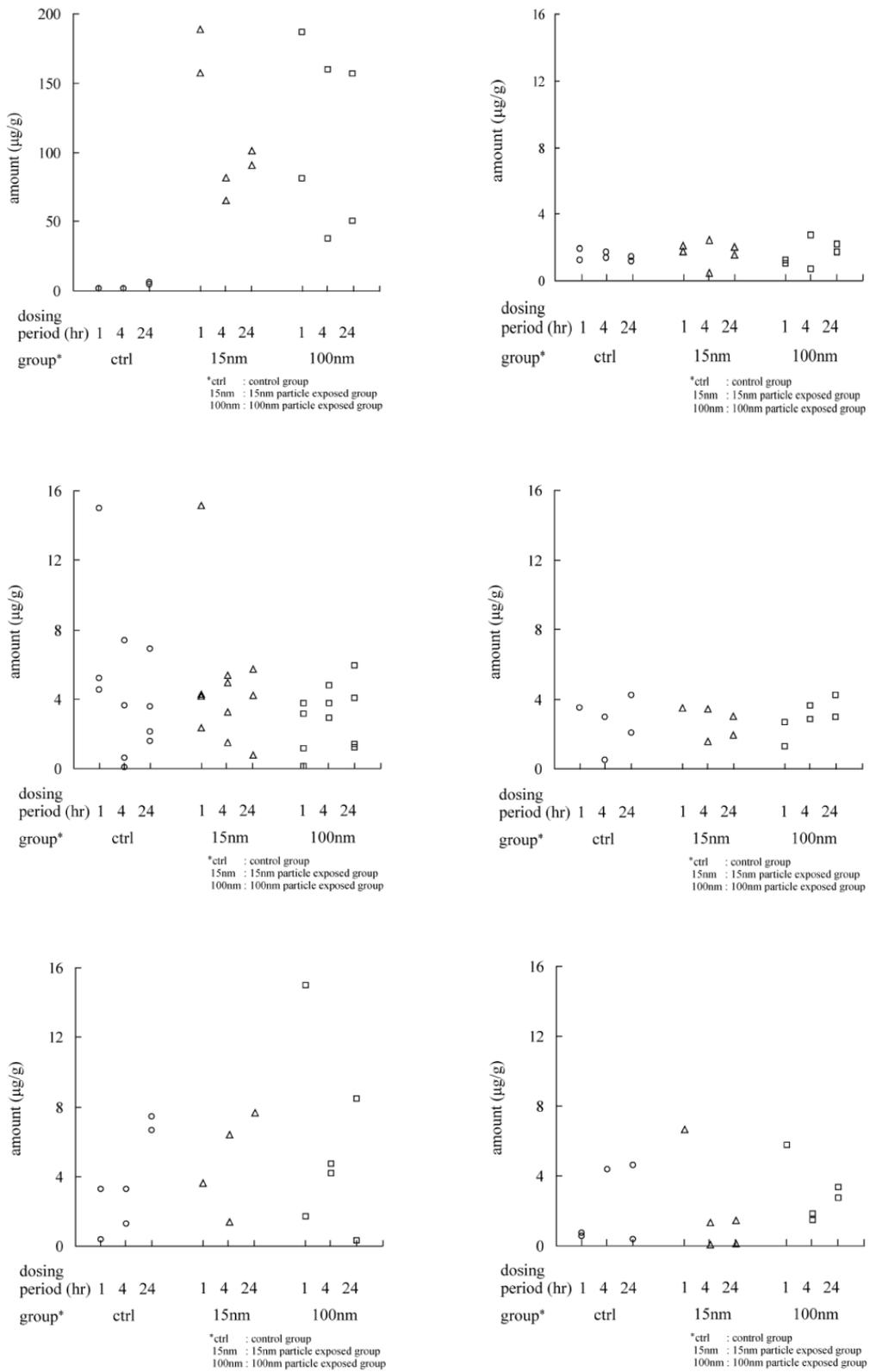


図1. 血液と各臓器中の Ti 量

左上；肺， 右上；血液  
 左中；腎臓， 右中；肝臓  
 左下；脾臓， 右下；大脳

与から解剖までの時間が異なる3群(1h, 4h, 24h後に解剖, 各2匹)があり, 供試したマウスは18匹(2匹×時間の異なる3群×ctrl, 15, 100nmの3群)となっている。

肺以外の臓器では, 有意な差が見られなかった。肺では, 15nm群, 100nm群で顕著な増加が見られた。気管内投与後に, 血液を還流しているが, 肺胞洗浄はおこなっていない。したがって, 肺における投与群で, 定量値が高いことは, 気管内に酸化チタン粒子が投与されていることを示す。また, 投与群の15nmと100nmを比較すると, いずれの臓器も有意な差は見られず, 粒径の違いによる分布の特性を認めることはできなかった。さらに, 曝露時間によるTi量の変化は, ctrl, 15nm, 100nm各群間で変化はなく, 曝露時間による分布量の変化量の変化を確認することはできなかった。

## 5 考 察

今回の実験では, 肺を除く臓器, 血液中において, Ti量の有意な増加は確認できなかった。肺においては, 対照群と比較すると, 投与群で有意な増加が認められた。これにより, 投与により, 酸化チタン粒子が肺に導入されたことは確認できた。投与は気管もしくは, 主気管支におこなった。還流により, 完全に脱血できていると考えるならば, 肺において定量できているTiは, ほぼ肺胞腔にあると示唆される。血液や臓器からはTiが検出されなかった。

これらの原因として, 5つの原因が考えられる。1つ目は, 肺胞の呼吸部である呼吸細気管支, 肺胞上皮のもっとも薄い肺胞嚢に, 投与液が到達していない可能性である。解剖学的死腔に投与液が滞留していた場合, 粒子状の物質が体内に侵入することは考えにくい。投与から解剖までの時間を1, 4, 24時間の3群で比較しているが, これが原因であるとする, 24時間後には, 投与液が呼吸部に達していなかったことになる。2つ目は, 呼吸部に投与液は到達していたが, ナノ粒子がそもそも肺胞上皮を通過することがないとする場合である。肺胞内に到達した投与液中の粒子が, 毛細血管内の血液に入るためには, 1) 肺胞上皮, 2) 基底膜, 3) 毛細血管内皮の3層(血液空気関門)を通過する必要がある。しかしながら, 毛細血管内皮において, 電子顕微鏡にてナノ粒子を捉えた報告は過去に多い。Stearnsらは, ハムスターに酸化銅ナノ粒子(11nm)を投与し, 粒子が肺胞上皮から基底膜に取り込まれ, リンパに乗ったことを観察しており<sup>7)</sup>, 通過しない原因は考えにくい。3つ目は, 肺胞上皮に到達した酸化チタン粒子が, 生体内で凝集している可能性である。液相中では, 酸化チタン粒子は帯電している。酸化チタンの等電点(pH)は, ルチルで約5, アナターズ約6である。投与液は, pH7.2の生理食塩水が溶媒となっており, これに酸化チタンを溶解させると, 粒子の表面電位は負になる。大量の多価カチオンが肺胞内に存在すれば, 不安定な分散系となる。投与液量に対し, 肺胞内のカチオンや, 肺胞マクロファージが放出する酸性物質は微量であると思われるので, 安定な分散系である可能性が高い。4つ目は, 肺胞に投与液が到達し, 血管に移行しているが, その量が微量で検出できなかった可能性である。粒子状の酸化チタンが, 硝酸による灰化ですべて溶解していないため, もしくは, すべて灰化していたとしても, 血液に移行している粒子の量が, 検出下限値以下であるために定量できなかったと考えられる。5つ目は, 灰化の方法の不備により, 粒子状TiO<sub>2</sub>が溶解していない, もしくは臓器が最後まで灰化されていなかった可能性が考えられる。

今後, 投与粒子の凝集と, 臓器の灰化法の再検討をおこなうことで, 今回の結果の原因を追及していく。仁科記念サイクロトロンセンターPIXEを用いることで, 肺から, 血液, 臓器への移行を継続して確認して行く予定である。

## 参考文献

- 1) W.E.Wilson, L.L.Spiller, T.G.Ellestad et al. (1977) General motors sulfate dispersion experiment Summary of EPA measurement. J.Air.Pollut.Control Assoc. 27, 46-51
- 2) K.Donaldson, X.Y.Li, and W.MacNee. (1997) ULTRAFINE (NANOMETRE) PARTICLE MEDIATED LUNG INJURY. J.Aerosol Sci. 29, 553-560

- 3) R.B.Baggs, J.Ferin, G.Oberdorster. (1997) Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet. Pathol.* 34 (6), 592-597
- 4) U.S. EPA (2004) Air Quality Criteria for Particulate Matter Volume I, EPA/600/P-99/002aF
- 5) K.Sera, T.Yanagisawa, H.Tsunoda, S.Futatsugawa, S.Hatakeyama, Y.Saitoh, S.Suzuki and H.Orihara. (1992) Bio-PIXE at the Takizawa Facility. (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron) *Int'l Journal of PIXE.* 2-3, 325-330
- 6) K.Sera, S.Futatsugawa. (2000) Spectrum Analysis Taking Account of the Tail, Escape Functions and Sub-lines. (SAPIX version 4) *Int'l Journal of PIXE.* 10-3, 4, 101-114
- 7) R.C.Stearns, G.G.K.Murthy, W.Skornic, M.Katler, J.J.Goldeski. (1994) Detection of ultrafine copper oxide particles in the lungs of hamsters by electron spectroscopic imaging. *ICEM 13*, Paris 17-22 July

## **Behavior of ultra fine particles of Titanium dioxide after intratracheal administration to rats**

<sup>\*1</sup>Y. Matsui, <sup>\*1</sup>N. Sakai, <sup>\*2</sup>A. Tanaka, <sup>\*3</sup>H. Hujimaki and <sup>\*1</sup>I.Uchiyama

<sup>\*1</sup> Graduate School of Engineering Kyoto University  
Yoshida honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

<sup>\*2</sup> Graduate School of Medicine Kyushu University  
6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Hukuoka 0812-8581, Japan

<sup>\*3</sup> National Institute for Environmental Studies  
Onogawa, 16-2, Tukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

### **Abstract**

Titanium dioxide has penetrated the market as a photocatalysis and been used in products which are familiar with the public. For example, it was painted to sound abatement shields along the express ways, mixed in plastics on the dashboard of cars and painted to outward walls of buildings. However, the continued use of it may be detrimental to our health. The purpose of our work is to unveil the movement of ultra fine particle of titanium dioxide. The purpose of this paper is to report on our work. For the purpose of our work, we injected titanium dioxide with saline to rats and removed the brains, lungs, kidneys, livers, spleens and bloods to measure it. Then, we measured it in these organs. Particle induced X-ray Emission (PIXE) have been successfully employed as measurement of various metals in biomaterials. As a result, all organs didn't show significant accumulation compared with the control group. The saline added titanium dioxide was administered into the trachea, because it obviously increased in the lung exposed it. In conclusion, ultra fine particles of titanium dioxide didn't invade the body through the respiratory system. We consider that ultra fine particles will invade the body, so we suspect that the aggregation prevented infestation to the body.