

2008J8049A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

ナノ物質等を配合した化粧品及び医薬品部外品の安全性
及び品質確保に係わる試験法に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者	五十嵐良明	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	杉林 堅次	城西大学薬学部

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- ナノ物質等を配合した化粧品及び医薬品部外品の安全性及び品質確保に係わる・・・・・・・・・・1
試験法に関する研究
五十嵐良明

II. 分担研究報告

1. ナノ物質等を配合した化粧品等の分析及び安全性試験法に関する研究・・・・・・・・・・13
五十嵐良明
2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究・・・・・・・・・・31
杉林 堅次

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・37

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

ナノ物質等を配合した化粧品及び医薬品部外品の安全性及び品質確保
に係る試験法に関する研究

研究代表者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 室長

本研究は、ナノ物質が配合された化粧品及び医薬品部外品の安全性確保のための試験法や評価方法の確立を目的とした検討を行う。ここでは、サンスクリーン剤等に使用されている酸化亜鉛及び酸化チタン粒子をナノ物質とした。一次粒子径 30~40 nm の酸化亜鉛及び酸化チタンは各種媒体に懸濁させると数百 nm 以上の大きさに凝集し、100 nm 以下のナノサイズで存在するものは確認できなかった。動的光散乱法を原理とした粒度分布測定法を、高濃度にナノ物質が配合されている製品に適用することは困難であった。これらの粒子表面をコーティングすると凝集は抑制されるが、その程度は媒体により異なった。生体組織に吸収された酸化亜鉛を定量するには、もともと生体に含まれる亜鉛と区別する必要がある、微量の蓄積では判断が困難と考えられた。微量の酸化チタンを分析するには、マイクロウェーブ分解段階の条件設定が重要であった。酸化チタン自体には皮膚感作性を認めなかったが、感作性物質の反応を増強する傾向が観察され、再現性を含め更に検討することとした。強制的に微粒子酸化チタンを高用量静脈内投与し、酸化チタンの体内分布と脳への移行性の有無を調査した。また、微粒子酸化チタンの皮膚細胞に対する障害性、並びに *in vitro* 皮膚透過性について、三次元培養ヒト皮膚モデルを用いて評価した。その結果、微粒子酸化チタンは通常の使用方法では、経皮暴露による皮膚からの吸収は考えられず、体内に吸収されたとしても少量ならば消失し、高量で蓄積が考えられた。使用する皮膚の状態（健常皮膚や創傷皮膚）を考慮して、今後、経皮暴露による更なる検討が必要と考えられた。

研究分担者

五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 室長
杉林堅次 城西大学薬学部 教授

A. 研究目的

酸化チタン及び酸化亜鉛は、白色顔料及び紫外線散乱剤として、日焼け止めなどのサンスクリーン製品やファンデーションなどに使用されている。酸化チタンは紫外線を吸収すると活性酸素を発生することが知られており、これらによる皮膚傷害を抑えるため、粒子表面を水酸化アルミニウムやシリコンなどで処理したものが使われている。こうした表面処理は、酸化チタンだけでなく酸化亜鉛についても行われ、粒子の分散性の向上にも役立っている。酸化チタン及び酸化亜鉛はまた、

白色度を減少して透明性を出すように微粒子化して配合されている。このことから、化粧品や医薬品部外品はナノ物質の曝露源の一つと考えられる。

化学物質は nm の粒子サイズになると、表面積が指数的に増加し、物理的及び化学的性質がバルク状態とは大きく異なるとされている。ナノ物質は、溶解し生体内で分解されやすいものと不溶性のため生体内で分解されにくいものに分類される。前者の例としてリポソームやエマルション等があり、これらの溶解物や代謝物の毒性が懸念される。一方、後者の例としてカーボンナノチューブ

ブやアスベストなどがあげられ、物質自体の蓄積性や毒性が懸念される。少なくとも一方向の長さがおおむね 1~100 nm の粒子はナノ粒子と定義される。ナノ粒子は、目的を持って産生される工業ナノ粒子と非意図的ナノ粒子に分けられる。工業ナノ粒子については、食品や化粧品中に配合されるため、産業従事者だけでなく生活者の暴露も想定しなければならない。

ナノ粒子に対する安全性研究で一番の問題は、評価試験法やナノ粒子の測定法が未確立な点である。試験に用いるための調製段階で粒度分布が変化してしまうこと、ナノサイズで適用することが難しいこと、実際の製品への使用量と適用量に大きな隔たりがあることにより、ナノ粒子としての正確な評価ができないのが現状である。また、化粧品は一般に複数成分の混合製剤である。そのため、先に示すナノ物質単独の挙動はもちろんのこと、逆に、ナノ物質等を配合することによって他成分に影響があるのかどうか、さらには、ナノ物質配合製剤として、品質、皮膚浸透性及び安全性について総合的な評価が望まれる。本研究では、ナノ物質が配合された化粧品及び医薬部外品の安全性確保のため、新たな試験法や評価方法の必要性について検討する。

今年度は、酸化チタンの各種媒体中での粒子分布を測定した。次に、ナノ物質の皮膚吸収性を定量的に評価する方法として、ICP-MS に導入する試験溶液の調製条件、すなわちマイクロウェーブ分解による生体組織中の酸化チタン及び酸化亜鉛のチタン及び亜鉛イオンへの最適な分解条件を検討した。さらに、化学物質の皮膚機能傷害の一つとして、皮膚アレルギー（感作）性が酸化チタンによって影響をうけるかどうかについて検討した。ナノ粒子の考えうる暴露経路としては、経気道、経口及び経皮があげられる。そこで、酸化チタンが経皮暴露により皮内および全身循環系へ移行したと考え、強制的に微粒子酸化チタンを静脈内投与し、体内分布と脳への移行性の有無を調査した。また、線維芽細胞に対する障害性を調べるとともに、*in vitro* 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いて皮膚透過性を評価した。

B. 研究方法

B-1. ナノ物質等を配合した化粧品等の分析及び安全性試験法に関する研究

1. 試料

酸化亜鉛 (ZnO) MZ-300 は一次粒子径 30~40 nm で表面コーティングなし、MZY-303S は一次粒子径 30~40 nm で methicone で表面コーティング処理したもの、及びZO-250 は一次粒子径 250 nm で表面コーティングされていないものである。酸化チタン SMT-500SAS は一次粒子径 30~35 nm のルチル型酸化チタンで、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 SiO_2 、Silicone で表面コーティング処理したもの、MT-500B は一次粒子径 30~35 nm のルチル型酸化チタン、AMT-600 は一次粒子径 30~35 nm のアナターゼ型酸化チタンで、いずれも表面コーティングなしのものである。

2. 粒度分布及びゼータ電位の測定

酸化チタンを電導性テープに直接ふりかけ、あるいは水またはシリコンオイル中に 0.1%濃度とし 30 分間超音波処理後、スライドガラスに一滴滴下して乾燥後、白金蒸着して、SEM (日立製作所 S-4700 型) で観察した。

酸化チタン 0.01%懸濁液について、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) により粒度分布及びゼータ電位を測定した。

4. 亜鉛の定量

試料溶液 1 mL をマイクロウェーブ分解装置 (CEM 社、MARS 5 型) 用 HP-500 型テフロン製分解容器にとり、硝酸 3 mL、過酸化水素水 2 mL 及び超純水 1 mL を加え、密栓した。13 本の分解容器に対し、80 psi で圧力制御し、600W (80%) のマイクロウェーブを 20 分間照射、そのまま 2 分間保持して分解を行った。放冷後、超純水で正確に 20 mL としたものを試料溶液とした。試料溶液 100 μL を誘電結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS, Agilent 社 7500 型) に導入し、亜鉛のピーク面積カウントを測定した。亜鉛標準液 (1~500 ppb) を用いて作成した検量線より試料溶液の亜鉛濃度を求めた。

5. チタンの定量

試料溶液 1 mL、または臓器約 0.2 g をとり、硝酸 5 mL 及び超純水 1 または 2 mL を加えてマイ

クロウエーブ処理した。80 psi で圧力制御し、1600W(100%)で20分間照射、そのまま20分間保持した。放冷後、超純水を加えて正確に20 mLとしたものを試料溶液とした。試料溶液をICP-MSに導入し、検量線より試料溶液のチタン濃度を求め、臓器中の濃度 ($\mu\text{g/g}$, ppm) に換算した。

6. 皮膚感作性試験

Local lymph node assay (LLNA)・DA法を若干変更した。CBA系マウス(雌性7~10週齢)の両耳に、試験物質または媒体のみを25 μL ずつ塗布した。この操作を1, 2, 3及び7日目に計4回行った。8日目に、個体ごとに耳介リンパ節を採取し、重量を測定した。リンパ節をつぶし、リンパ節細胞 (lymph node cell, LNC) をPBS 1 mLに懸濁させた。100倍に希釈したLNC浮遊液100 μL を、ATP抽出液100 μL に加えて20秒間静置した後、発光試薬100 μL を加えて、ルミノメーターで10秒間の発光量 (relative light unit, RLU) を読みとり、ATP量とした。ATP量について、対照群に対する試験群の値の比 stimulation index (SI) を求め、3を超えるときを陽性とした。

7. 倫理面への配慮

動物実験に関しては、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験に関する倫理規定に従って、実験動物に対する動物愛護を配慮して実施された。

B-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

1. 粒子径の測定

シリカ処理微粒子酸化チタン (MT-150AW、rutile型、テイカ) の一次粒子径はTEM画像からimage processing software (Mac-View Ver. 3, Mountech Co., Ltd.)を用いて、また、二次粒子径は動的光散乱粒子径分析装置 (Microtrac 9340-UPA, Nikkiso Co., Ltd.)を用いて測定した。

2. 静脈内投与実験:

5%、1%、0.2%の酸化チタンの生理食塩液懸濁液を、7週齢のddYマウスの尾静脈から0.05 mL投与し、5分、72時間、1か月、6か月後に心臓採血し、心臓灌流をして、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出した。各臓器の湿重量を測定後、

Soluene-350で血液および臓器を溶解させ、チタンを定量した。投与後の肝臓を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transmission electron microscope (TEM, JEM2000EX, 日本電子)で観察した。さらに、血清中の炎症マーカー、BUN、CPK、AST、ALT、LDH量を測定した。

3. チタンの定量

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の電気炉中で一晩灰化した。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。

試験溶液10 mLに硝酸及び内部標準液(コバルトの1 $\mu\text{g/mL}$ 溶液)をそれぞれ100 μL ずつ加え、ICP-MS (Agilent 7500ce, Agilent Technologies社)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、硝酸及び内部標準液をそれぞれ100 μL 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、Soluene-350で臓器を溶解させた試料中のチタンを定量した。

4. 細胞障害性試験

96 well プレートに 2×10^4 cells/wellに調製したヒト真皮由来線維芽細胞 (HDF) を播き、24時間培養後0.001~5%に調製した酸化チタン懸濁液、コントロールとしてDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS)、ポジティブコントロールとして3%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液を48時間適用した。その後、MTT一培地を100 $\mu\text{g/well}$ 、4時間適用し、生成したホルマザンを0.04 N 塩酸-イソプロパノール液で30分抽出し、分光光度法により570 nmの吸光度を測定し、ホルマザン量を求めた。

5. In vitro 皮膚透過性試験

各種三次元培養ヒト皮膚モデル Epiderm は培養表皮モデル、LSE-high は表皮及び真皮から構

成される全層モデルとして、LDM は真皮モデルとして使用した。培養皮膚を side-by-side 拡散セルに装着し、角層側（ドナー）には3 mLの0.5%酸化チタン懸濁液を、真皮側（レシーバー）には3 mLの生理食塩水を適用した。セルの温度は32°Cに保ち、レシーバー内は、スターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラーにより1200 rpmで回転させることで攪拌した。経時的にレシーバー側から0.5 mLの溶液をサンプリングし、その都度、同容積の溶液を充填した。ICP-MSでサンプリング溶液のチタン濃度を測定した。適用24時間経過後に、レシーバー溶液を全量回収し、チタン濃度を測定した。

7. 倫理面への配慮

動物実験倫理委員会にて承諾後、城西大学生命科学センター倫理規定に従い行った。

C. 結果及び考察

C-1. ナノ物質等を配合した化粧品等の分析及び安全性試験法に関する研究

1. 酸化亜鉛の分散性

ペンタラン中の酸化亜鉛の Z-Average（平均粒子径）は約200~300 nmで、ヒストグラムでも分布幅は広くなかったが、PdI値は1.000を示し、実際にはグラフ範囲を超えた大きさの粒子径のものが多数存在した。水に懸濁した場合、一次粒子径30~40 nmの酸化亜鉛は幅広い2相の粒度分布を示した。ZO-250では一山のヒストグラムとなり、平均粒子径は1789 nmであった（図1）。しかし、いずれの Z-Average も懸濁液の一部の粒子の結果であると考えられた。各酸化亜鉛の粒子表面は正の電荷（19.5~23.5）を有し、これらの凝集の強さにほとんど差はないと思われた。以上のように、通常の超音波洗浄機で処理しただけでは、一次粒子径がナノサイズであっても、凝集してナノサイズで存在する粒子はほとんどないと思われた。

2. 亜鉛の定量

亜鉛標準液は5~500 ng/mlの濃度範囲で質量数66におけるカウント値との間に良好な直線性が得られた。試料溶液中の亜鉛の定量限界は5 ng/mlであった。酸化亜鉛は硝酸、過酸化水素及び水混液を加えてマイクロウェーブ処理すると、亜鉛ま

で良好に分解して回収された。

3. 酸化チタンの分散性

酸化チタンを SEM 観察したところ、SMT-500SAS 及び MT-500B では単一の粒子の存在がわずかに確認できるが、AMT-600 にはほとんど認めることができなかった。いずれも凝集して100 nm以上の大きさの塊になっているものがほとんどを占めていた（図2）。

各媒体中の酸化チタンの粒度分布を図3に示した。シリコーンオイル中では、表面コーティング処理したルチル型 SMT-500SAS が358 nm、表面コーティングのない MT-500B では560 nm となり、PdI 値も低く良好に分散した。一方、アナターゼ型の AMT-600 は1246 nmであった。エタノールに懸濁した SMT-500SAS の Z-Average は、今回用いた中では最も小さな値を示した。水に懸濁させたときはいずれも凝集し、すぐに沈殿を生じた。水中のゼータ電位を測定すると、SMT-500SAS は-39.3 mV と負の電荷を有したものの、MT-500B 及び AMT-600 はほとんど電荷がなく、表面コーティングすると粒子どうしの凝集が抑制されることがわかった。

今回用いた機器では、媒体の物理学的性質が不明であったり粘度が高かったりするものには測定できず、粒子がすぐに沈殿を生じるようなものにも適さない。また、粒子数は相対頻度%で表わされるため、ごく少数のナノ粒子の存在を確認できないという問題もあった。ナノ物質の適用時の粒度分布を測定しておくことは、その実験がナノ物質を試験しているのか、あるいはバルクと変わらない大きなサイズの凝集体を試験しているのか知ることができ、結果の解釈に重要である。

4. チタンの定量

チタン標準液の検量線は2.5~500 ng/mlの濃度範囲でピーク面積との間に良好な直線性が得られた。25%硝酸溶液を用いて標準液を調製したときの定量限界は10 ng/ml程度であった。試験溶液中の硝酸濃度が検出限界レベルに影響した。

試験ごとに酸化チタンが分解容器に付着残存している可能性が示され、十分に前洗浄してから使用することが必要と思われた。酸化チタンの分解液としては、硝酸3 ml+過酸化水素2 ml+水2 ml

の混液よりも硝酸+水の方が良かった。分解保持時間は20分とした(表1)。

ラット肝臓 0.2 g に各濃度のチタン標準溶液 1 ml を添加して処理した後、定量した。質量数 47 でモニターした場合には 48 や 49 でモニターするよりも多めに定量された。臓器に添加した 0.2、2 及び 10 µg のチタンの回収率は約 90% と良好であった(表 2)。今後、臓器に酸化チタンを添加して回収率を見る必要がある。また、ICP-MS の分析モードの変更、及び試料導入法の改良など、分解条件を含め、臓器中の酸化チタンの定量法については更に検討が必要である。

5. 皮膚感作性反応に及ぼす影響

5~20%の濃度でいずれの酸化チタンも SI 値は 3 を超えないことから、皮膚感作性は有しないと判断した(表 3)。次に、酸化チタンがけい皮アルデヒドの感作性誘導反応を増強するかどうか確認するため、それぞれの酸化チタンを CA と共存させて適用した。SMT-500SAS と MT-500B を比較した。SMT-500SAS と MT-500B を共存させた場合、CA による ATP 量の増加率は、これらを共存していない場合に比べて若干増加した。また、SMT-500SAS の方が MT-500B よりも増強効果が大きかった。これらの差は、表面コーティングの有無の違いによることから、コーティング剤の成分が影響している可能性もある。さらに、分散性、あるいは CA の皮膚吸収を促進するような因子もあるのかもしれない。こうした酸化チタン粒子の効果については、再現性を含めて検討を続ける必要がある。

C-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

用いた酸化チタンは針状結晶をしており、一次粒子径は 15 nm、二次粒子径は 220 × 105.2 nm であった。酸化チタンは静脈内投与後ほとんど(チタン量として約 60%) が肝臓に集積した(Fig. 1)。一方、投与後 6 ヶ月には脾臓のチタン濃度が上昇した。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ていくものと考えられている。投与 6 ヶ月後に脾臓や肝臓中の酸化チタン量が增量するのはおそらく投与時に

血管や赤血球などと結合した酸化チタンが脾臓で処理され、その後、最終的な処理過程である肝臓に再集積してきたものだと考えられる。

TEM 観察の結果、投与 72 時間後には肝臓のデイスの腔に微粒子酸化チタンが確認され、投与 1 ヶ月後にはクッパー細胞や肝実質細胞中のライ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。このことから、この画分の酵素が酸化チタンの消失に影響していることが考えられる。今後は、更にライソソーム画分における消失メカニズムを考えていかなければならない。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、脳への分布は観察されなかった。

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、BUN や LDH で増加傾向がみられたが、どれも有意な差は見られなかった。今後は、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。

細胞障害性試験(MTT 試験)では、シリカ処理微粒子酸化チタンおよび無処理酸化チタンとも添加濃度が高くなると生細胞率の減少傾向が見られた(Fig. 2)。HDF は皮膚組織の真皮を構成する主細胞であり、生細胞率の減少がみられた酸化チタン濃度は HDF に暴露されるとは到底考えられない高濃度であるが、万一、皮膚のバリア機能を失った状態の肌に暴露された場合、細胞障害が現れる可能性が示唆された。

3 種類の培養皮膚を用いて 24 時間の *in vitro* 皮膚透過性試験を行ったが、レシーバー側に酸化チタンは検出しなかった。ICP-MS のチタンの定量限界値および *in vitro* 皮膚透過性実験条件より酸化チタンの透過係数を 7.30×10^{-10} cm/s 以下であると推測できた。これは、角層の落屑速度 (ca. 1×10^9 cm/s) より低値であり、健全な皮膚に適用した酸化チタンの角層より下層の生きた表皮や真皮への移行の可能性は低いと考えられた。

D. 結論

一次粒子径 30~40 nm の酸化亜鉛または酸化チタン粒子は水、ペンタラン、またはシリコーンオイル中でいずれも凝集して幅広い粒度分布を示

し、ナノサイズで存在するものはなかった。生体組織中に蓄積した酸化亜鉛は、硝酸一過酸化水素混液を加えてマイクロウェーブ分解し ICP-MS で定量することが可能であるが、もともと生体中に含まれる亜鉛量との区別には大量の蓄積が必要と考えられた。微量の酸化チタンを定量するにはマイクロウェーブ分解容器の前洗浄が必須であり、分解液としては硝酸が今回検討した中では良かった。酸化チタンに関しては検出感度の上昇及びバックグラウンドレベルの低下を含め、今後、更に検討が必要であった。酸化チタンには皮膚感作性を認めなかった。一部の酸化チタンに、けい皮アルデヒドの感作誘導反応を増加する傾向が認められたが、ばらつきの範囲内かどうか繰り返し検査が必要である。

微粒子酸化チタンは通常の使用方法で経皮暴露による皮膚からの吸収は考えられないと思われる。例え、体内に吸収されたとしても少量ならば消失の可能性も考えられるが、高用量の場合は蓄積が考えられる。使用する皮膚の状態（健常皮膚や創傷皮膚）を考慮して今後、経皮暴露による更なる検討が必要と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Sugibayashi, H. Todo, E. Kimura. Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles. J. Toxicol. Sci., 33(3) 293-298 (2008).

2) 杉林堅次. 紫外線防御試験法の国際的動向と紫外線防御剤の開発の課題: 化粧品に用いられるナノ粒子の曝露と安全性問題のあり方. FRAGRANCE JOURNAL, 36(10), 38-41 (2008)

2. 学会発表

杉林堅次. ナノ粒子の皮膚暴露・皮膚浸透の可能性を考える. 第 15 回日本免疫毒性学会学術大会 (2008.9)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

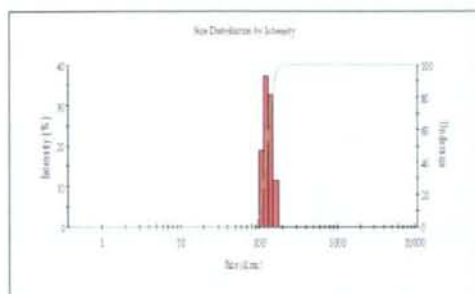
なし

2. 実用新案登録

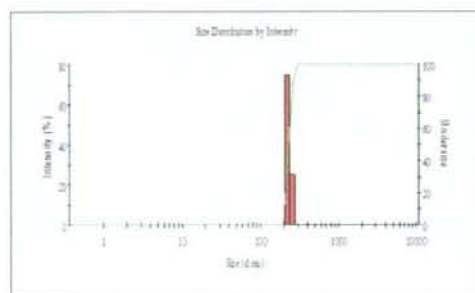
なし

Pentalan

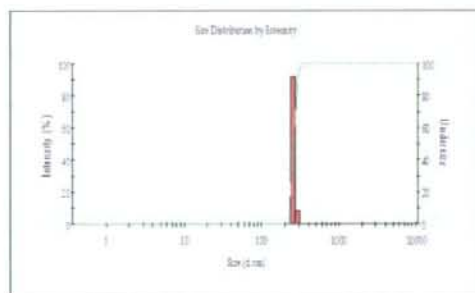
MZY-303S



MZ-300

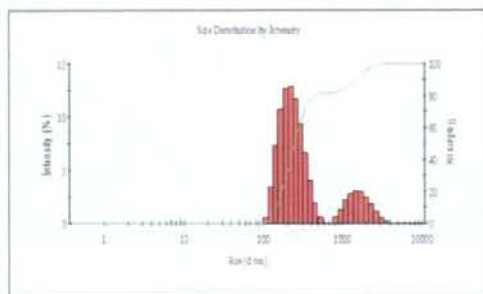


ZO-250

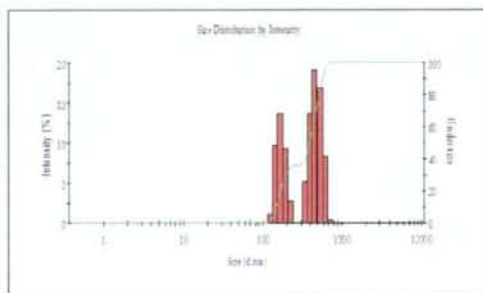


Water

MZY-303S



MZ-300



ZO-250

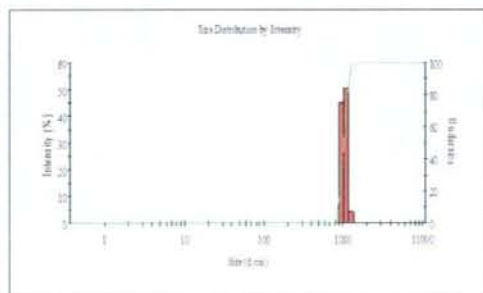


図1. ペンタラン及び水中の酸化亜鉛の粒度分布

SMT-505AS



MT-500B



AMT-600

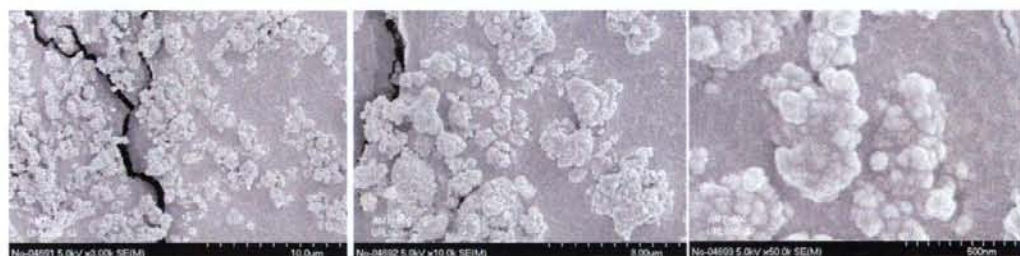
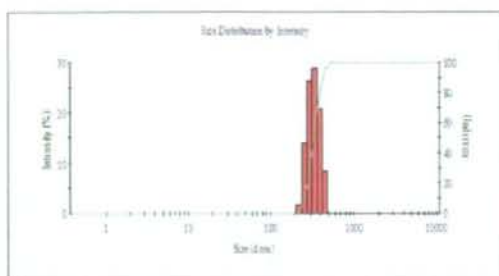


図2. 酸化チタン粒子の電子顕微鏡写真

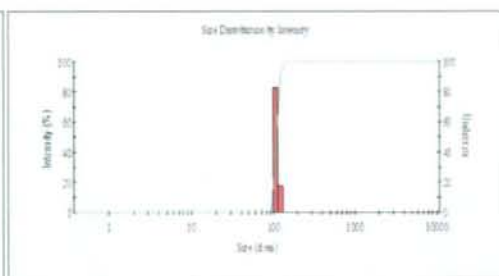
Silicone

SMT-500SAS

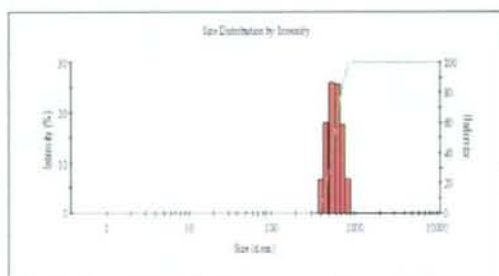


Pentalan

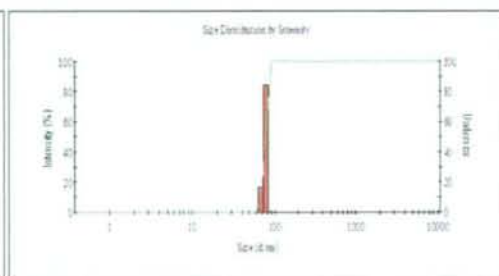
SMT-500SAS



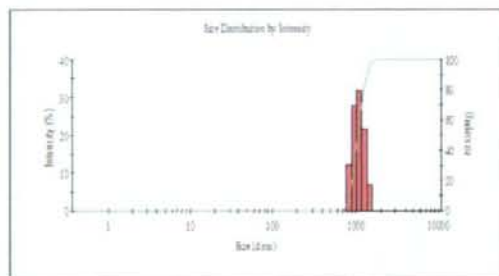
MT-500B



MT-500B



AMT-600



AMT-600

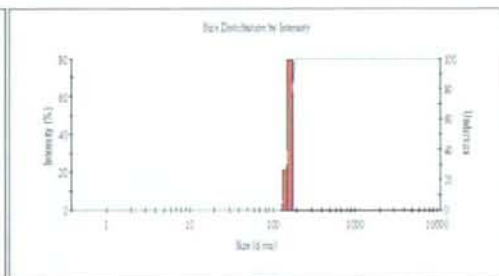
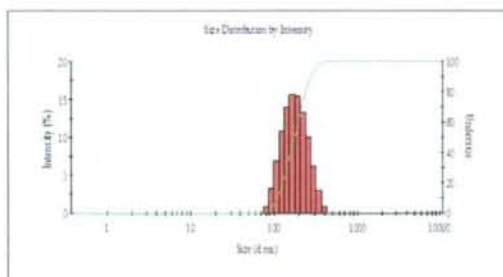


図3. シリコンオイル、ペンタラン、水及びエタノール中での酸化チタンの粒度分布

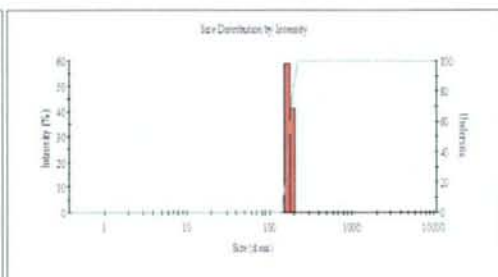
Water

SMT-500SAS

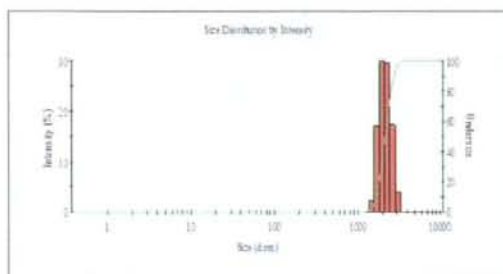


Ethanol

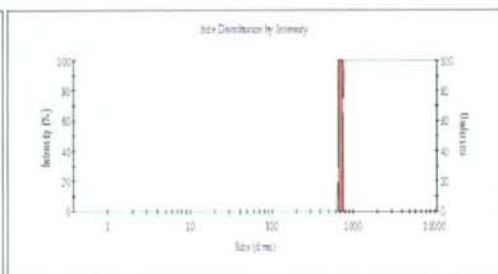
SMT-500SAS



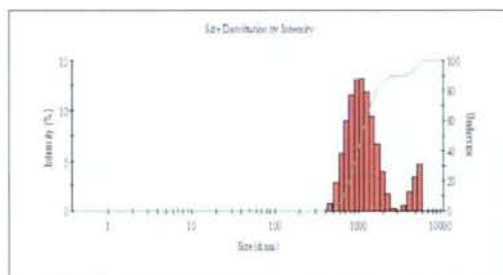
MT-500B



MT-500B



AMT-600



AMT-600

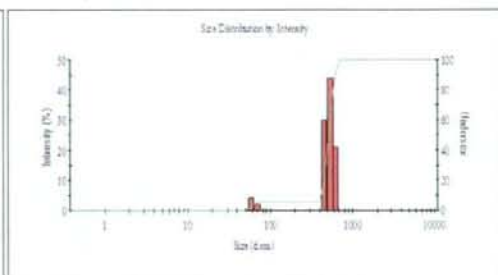


図3. 続き

表 1. 硝酸を分解液として用いた時の酸化チタンの添加回収試験の結果

	Addition (μg)		Detection (μg)		Recovery (%)
	TiO ₂	as Ti	as Ti	as Ti (-Blank)	
Experiment 1	0	(Blank)	0.39 \pm 0.04		
	0.32	0.19	0.55 \pm 0.16	0.16 \pm 0.02	84.0 \pm 9.7
	3.21	1.90	2.41 \pm 2.02	2.02 \pm 0.09	105.8 \pm 4.7
Experiment 2	0	(Blank)	0.00 \pm 0.00		
	3.32	1.98	1.83 \pm 0.00	1.83 \pm 0.00	92.5 \pm 1.7
	8.31	4.90	4.55 \pm 0.12	4.55 \pm 0.12	91.1 \pm 2.5
Experiment 3	0	(Blank)	0.08	0.02	
	0.32	0.19	0.24 \pm 0.00	0.16 \pm 0.00	84.4 \pm 0.7
	0.81	0.48	0.48 \pm 0.02	0.37 \pm 0.04	79.4 \pm 3.7
	1.61	0.96	0.94 \pm 0.03	0.82 \pm 0.07	85.6 \pm 3.5

Data are Mean \pm SD (n=3).

表 2. 肝臓に添加したチタンの回収試験

Ti addition (μg)	Ti concentration in digested solution (ng/ml)						Recovery(%)		
	Detected			Δ (-Liver only)					
	Ti47	Ti48	Ti49	Ti47	Ti48	Ti49	Ti47	Ti48	Ti49
0	67.3	12.5	10.7						
0.2	75.8	20.8	19.5	8.5	8.3	8.8	85.2	83.2	88.4
2	169.4	103.9	101.0	102.1	91.4	102.1	102.1	91.4	90.3
10	555.1	467.4	455.2	487.8	455.0	444.5	97.6	91.0	88.9

表 3. 酸化チタンの LLNA-DA の結果

Chemical	Concentration (%)	Lymph node weight		ATP content	
		(mg)	SI	(RLU)	SI
SMT-500SAS	0	5.3 \pm 0.3	-	33007 \pm 5131	-
	5	5.2 \pm 0.5	0.98	23334 \pm 7359	0.71
	10	5.5 \pm 0.8	1.03	31718 \pm 10930	0.96
	20	6.8 \pm 0.6	1.27	46309 \pm 10530	1.40
MT-500B	5	5.8 \pm 1.3	1.08	37922 \pm 10652	1.15
	10	5.5 \pm 0.2	1.02	28251 \pm 11396	0.86
	20	4.8 \pm 0.7	0.91	30547 \pm 5803	0.93
AMT-600	5	5.4 \pm 1.0	1.02	29062 \pm 5568	0.88
	10	5.9 \pm 0.4	1.12	35241 \pm 4477	1.07
	20	6.4 \pm 1.9	1.21	34200 \pm 11835	1.04

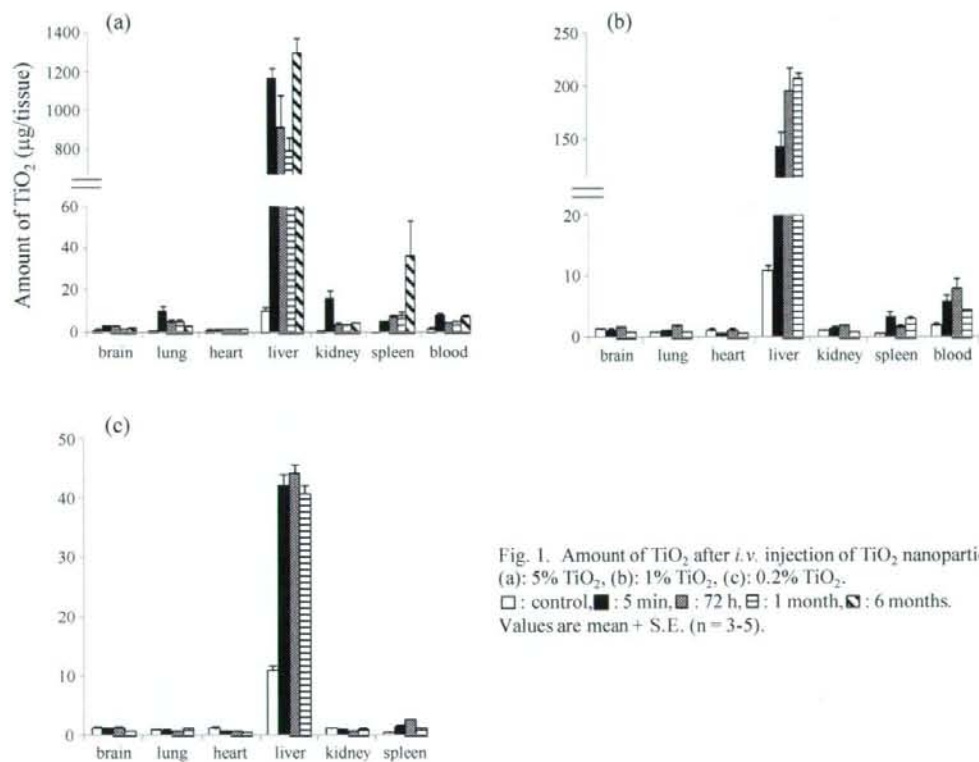


Fig. 1. Amount of TiO₂ after *i.v.* injection of TiO₂ nanoparticles. (a): 5% TiO₂, (b): 1% TiO₂, (c): 0.2% TiO₂. □ : control, ■ : 5 min, ▨ : 72 h, ▩ : 1 month, ▪ : 6 months. Values are mean + S.E. (n = 3-5).

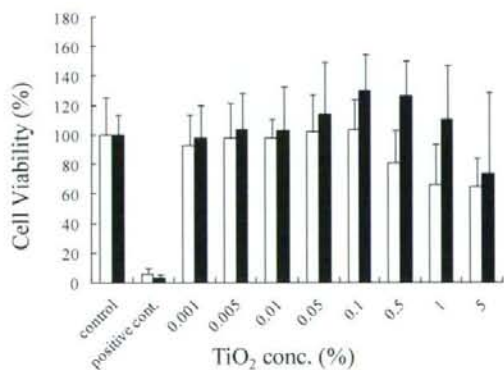


Fig. 2. MTT assay of TiO₂ microparticles. □ : silica coated TiO₂, ■ : noncoated TiO₂. Values are mean + S.D.

II. 分担研究報告

ナノ物質等を配合した化粧品及び医薬品部外品の安全性及び品質確保
に係わる試験法に関する研究

ナノ物質等を配合した化粧品等の分析及び安全性試験法に関する研究

研究分担者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 室長

本研究は、ナノ物質が配合された化粧品及び医薬品部外品の安全性確保のための試験法や評価方法を検討することを目的とする。酸化亜鉛及び酸化チタン粒子を各種媒体に懸濁し粒度分布を測定した。一次粒子径30~40 nmの酸化亜鉛は水中では数百 nm に、250 nm のものは1000 nm 以上凝集し、100 nm 以下のナノ粒子サイズで存在するものは確認できなかった。ペンタラン中でも同様に幅広い粒度分布を示した。一次粒子径35 nm のルチル型酸化チタンは、シリコンオイル中で平均粒子径は数百 nm、30 nm のアナターゼ型酸化チタンは1000 nm 以上となった。酸化チタンの表面をコーティングしたものでは凝集が抑制されたが、その程度は懸濁させる媒体により変化した。ゼータ電位と分散度は比較的相関するものの、動的光散乱法を原理とした分析では希釈が必要で、製品のような高濃度での粒度分布を測定は困難であった。生体組織中の酸化亜鉛は、硝酸一過酸化水素混液を加えてマイクロウェーブ分解し ICP-MS で定量することが可能であった。酸化亜鉛粒子の吸収性を判断するには、もともと生体に含まれる亜鉛と区別する必要があり、大量に蓄積することが必要と考えられた。酸化チタンの微量分析では、チタンへの分解処理段階でのマイクロウェーブ分解容器の前洗浄が重要であり、分解液としては硝酸が今回検討した中では良かった。酸化チタンには皮膚感作性を認めなかった。一部の酸化チタンに、けい皮アルデヒドの感作誘導反応を増加する傾向が認められたが、更に検討が必要である。

A. 研究目的

酸化チタン及び酸化亜鉛は、化粧品や医薬品部外品分野では、白色顔料及び紫外線散乱剤として、日焼け止めなどのサンスクリーン製品やファンデーションなどに使用されている。酸化チタン及び酸化亜鉛の粒子は、ナノメートル (nm) サイズまで微細化すると白色度が減少し、肌に塗布した時の透明性が増し、紫外線散乱効果も増加することが知られている。酸化チタンは紫外線を吸収すると活性酸素が発生することが知られており、それらによる皮膚傷害の可能性を抑えるため、一般には酸化チタン粒子の表面を水酸化アルミニウムやシリコンなどで処理したものが使われている。こうした表面処理は、酸化チタンだけでなく酸化亜鉛についても行われ、粒子の分散性の向上にも

役立っている。¹⁾

このように、化粧品や医薬品部外品には nm サイズの粒子 (ナノ粒子) が広く用いられ、日常的に使用する製品であることから、化粧品や医薬品部外品はナノ粒子の曝露源となる可能性がある。化学物質は nm の粒子サイズになると、表面積が指数的に増加し、物理学的及び化学的性質がバルク状態とは大きく異なるとされている。これにより、同一物質でも毒性の強さが異なるのではないかと危惧されている。^{2,3)} 化粧品や医薬品部外品は通常皮膚に塗布することが主であることから、これらに配合される nm サイズの物質 (ナノ物質) の酸化チタンや酸化亜鉛等については、特に、経皮曝露による健康影響を明らかにすることが重要である。⁶⁾

化粧品は一般に複数成分の混合製剤である。そのため、先に示すナノ物質単独の挙動はもちろんのこと、逆に、ナノ物質等を配合することによって他成分に影響があるかどうか、さらには、ナノ物質配合製剤として、品質、皮膚浸透性及び安全性について総合的な評価が望まれる。

本研究では、ナノ物質が配合されたことによって、化粧品及び医薬部外品の安全性確保のための試験法や評価方法について、新たに考慮すべき点があるかどうか検討する。

今年度は、金属酸化物のナノ粒子のキャラクタリゼーションとして、電子顕微鏡観察と各種媒体中での粒子分布を測定した。次に、ナノ物質の皮膚吸収性を定量的に評価する方法として、ICP-MSに導入する試験溶液の調製条件、すなわちマイクロウェーブ分解による生体組織中の酸化チタン及び酸化亜鉛のチタン及び亜鉛イオンへの最適な分解条件を検討した。さらに、化学物質の皮膚機能傷害の一つとして、皮膚アレルギー（感作）性が酸化チタンによって影響をうけるかどうかについて検討した。

B. 研究方法

1. 試薬及び材料

酸化亜鉛 (ZnO) MZY-303S 及び MZ-300 はテイカ、ZO-250 はヨシダ製薬から、酸化チタン (TiO₂) SMT-500SAS, MT-500B 及び AMT-600 はいずれもテイカから、日本化粧品工業連合会を通して供与された。MZ-300 は一次粒子径 30~40 nm で粒子表面をコーティングしていないもの、MZY-303S は一次粒子径 30~40 nm で methicone で表面コーティング処理したもの、及び ZO-250 は一次粒子径 250 nm で表面コーティングされていないものである。SMT-500SAS は、一次粒子径 30~35 nm のルチル型酸化チタンで、Al(OH)₃, SiO₂, Silicone で表面コーティング処理したものである。MT-500B は、一次粒子径 30~35 nm のルチル型酸化チタン、AMT-600 は、一次粒子径 30~35 nm のアナターゼ型酸化チタンで、いずれも表面コーティングはされていない。テトラエチルヘキサン酸ペンタエリスリチル (ペンタラン, pentalan-408) は日光ケミカルズから、

シリコーンオイル (環状シリコーンオイル, TSF405) はモメンティブ・パフォーマンス・マテリアル社から入手した。超微量分析用超純水、超微量分析用硝酸、超微量分析用ふっ化水素酸、有害金属測定用硝酸、原子吸光用過酸化水素は和光純薬工業から購入した。原子吸光用チタン標準原液 (1000 ppm)、原子吸光用亜鉛標準原液 (1000 ppm) は関東化学から入手した。その他の試薬は市販品を用いた。

2. 器具及び装置

マイクロウェーブ分解装置は CEM 社の MARS 5 型を用いた。分解容器には HP-500 型テフロン製容器を用いた。誘電結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) は Agilent 社 7500 型を用いた。島津製作所製 HPLC ポンプ LC-10ATvp 及びオートサンプラー SIL-10A を接続し、コントローラ SCL-10Avp により試料溶液を ICP-MS に導入した。粒子径測定装置としては、ゼータサイザー ナノ (nano-ZS, Malvern 社) を用いた。超音波洗浄機は、シャープ マニファクチャリング システム 製 UT205 型を用いた。走査型電子顕微鏡 (SEM) は日立製作所 S-4700 型を用いた。ルミノメーターとして、キッコーマン製 LUMITESTER C-100 を ATP 量測定に用いた。

3. 動物

CrI:CD (SD) シラットの雄 4 週齢 (60~100 g) を日本チャールス・リバーから入手した。検査後、馴化期間は約 2 週間とした。実験期間中、室温 24 ± 3 °C、湿度 35~75 %、7 時点灯、19 時消灯の 12 時間、換気率 10~20 回/時の条件下で飼育した。CBA/N 系マウス (雌性、7 週齢) を日本エスエルシーから購入した。馴化期間は約 1 週間とした。動物はいずれも、固形飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業) 及び水を自由に摂取させた。

4. 試験溶液の調製

酸化亜鉛及び酸化チタンは一定量をポリプロピレン製遠心管 (15 ml 用量, Corning 社) にとり、それぞれに各媒体を加えて少量ずつ加え、練り合わせるように混ぜながら、所定量にメスアップし、ミキサー (Vortex Genie2, Scientific Industries 社) を用いてよく攪拌した後、超音波洗浄機につけ、ときどき振り混ぜながら 30 分間処理した。

処理開始から15分までに2回、残りの15分間に1回、ミキサーでの攪拌を加えた。試料溶液は用事調製した。

5. 電子顕微鏡検査

酸化チタン粒子を電導性テープに少量ふりかけ、スプレーで余剰な粉体を吹き飛ばした後、白金蒸着して、SEM観察を行った。

酸化チタンを水またはシリコンオイルに懸濁して1%濃度の試験溶液を調製後、さらに希釈して0.1%とした。本溶液をスライドガラスに一滴滴下して、乾燥後、白金蒸着して、観察した。

6. 粒度分布及びゼータ電位の測定

酸化チタンに各溶媒を入れ、1%懸濁液を調製後、それぞれに使った媒体を用いて0.01%に希釈して測定した。試験溶液約1 mLを、ゼータサイザーナノ用測定キュベット（アシスト社、REF67.754）に入れ、粒度分布を測定した。また、キャピラリーセル（Malvern社、DTS-1060）に試験溶液を入れ、ゼータ電位を測定した。

7. 亜鉛の定量

試料溶液1 mLをHP-500型テフロン製分解容器にとり、硝酸3 mL、過酸化水素水2 mL及び超純水1 mLを加え、密栓した後、マイクロウェーブ処理した。13本の分解容器に対し、80 psiで圧力制御し、600W(80%)のマイクロウェーブを20分間照射、そのまま2分間保持して分解を行った。放冷後、分解液に超純水を加えて正確に20 mLとしたものを試料溶液とした。試料溶液100 μ LをHPLCポンプでICP-MSに導入し、マス数66のピーク面積を測定した。亜鉛標準液（1~500 ppb）を用いて作成した検量線より試料溶液の亜鉛濃度を求めた。

8. チタンの定量

試料溶液1 mL、または細切した臓器約0.2 gを分解容器にとり、硝酸5 mL及び超純水2 mLを加え、密栓した後、マイクロウェーブ処理した。標準物質を試験する場合、標準溶液1 mLを容器に入れ、硝酸5 mL及び超純水1 mLを加えて処理した。ブランクは、硝酸5 mL及び超純水2 mLを加え、そのままマイクロウェーブ処理した。13本の分解容器に対し、80 psiで圧力制御し、1600W(100%)のマイクロウェーブを20分間照射、

そのまま20分間保持して分解を行った。放冷後、分解液に超純水を加えて正確に20 mLとしたものを試料溶液とした。試料溶液100 μ Lを表1に示す条件のICP-MSに導入し、マス数47、48及び49のピーク面積を測定した。チタン標準液（1~500 ppb）を用いて作成した検量線より試料溶液中のチタン濃度を求め、臓器中の濃度（ μ g/g, ppm）に換算した。

9. 皮膚感作性試験

Local lymph node assay (LLNA)-DA法^{4,5)}に準じ、若干変更して行った。マウスの両耳に、マイクロピペッターを用いて試験物質または媒体のみを25 μ Lずつ塗布した。この操作を1, 2, 3及び7日目に計4回行った。試験8日目に、耳介リンパ節を採取し、プラスチックシャーレ（直径35 mm, 岩城硝子）に個体ごとにまとめ、重量を測定した。次に、このリンパ節を2枚のスライドガラス（S-1215, MATSUNAMI GLASS）に置き、はさんで押しつぶした。PBS 1 mLで洗いながら、スライドガラス上の組織をセルスクレーパー（Becton Dickinson社）でかきとり、プラスチックシャーレに移した。このリンパ節細胞（lymph node cell, LNC）の浮遊液を20 μ Lとり、PBS 1.98 mL入った試験管に入れ、100倍希釈した。1個体につき希釈液は2本調製した。この希釈LNC浮遊液について、ATP測定キットを用いてATP量を測定した。すなわち、LNC浮遊液100 μ Lを、ATP抽出液100 μ Lが入った測定用チューブ（Lumi Tube, キッコマン）に加えて混合し、20秒間静置した後、発光試薬100 μ L加えてすばやく攪拌し、ルミノメーターを用いて10秒間の発光量（relative light unit, RLU）を読みとり、ATP量とした。臓器重量及びATP量について、対照群に対する試験群の値の比を求め、stimulation index (SI)とした。LLNA-DAではATP量のSI値が3を超えるときを感作性陽性とした。

10. 倫理面への配慮

動物実験に関しては、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験に関する倫理規定に従って、実験動物に対する動物愛護を配慮して実施された。

C. 結果及び考察

1. 酸化亜鉛の分散性

各種溶媒に懸濁させた酸化亜鉛粒子の粒度分布を測定した。今回使用した装置では、高濃度での測定は困難であったため、0.01%まで希釈した懸濁液について分析した。図1には、ペンタランまたは水に懸濁させた酸化亜鉛の粒度分布を、縦軸に散乱光強度 (intensity, %)、横軸に粒子径を対数で示したヒストグラムを示した。それぞれの条件における酸化亜鉛の平均粒子径を表2にまとめた。表中の Z-Average (d.nm) は分布全体を一つのピークとみなした場合の粒子の直径を表し、PdI は分布幅を示す。PdI の値が小さいほどシャープなピークで分布幅が少ないこと、つまり、一定の粒子径で均一に分散できていることを示す。

ペンタラン中の酸化亜鉛の Z-Average は約 200~300 nm で、ヒストグラムでも分布幅は広くなかったが、PdI 値は 1.000 を示した。このことは、実際にはグラフ範囲を超えた大きさの粒子径のものが多数存在することを表している。凝集の強い大きな粒子が存在する懸濁液を測定するのは困難であった。

水に懸濁した酸化亜鉛の粒度分布とゼータ電位を測定した。酸化亜鉛の種類によって水中での粒度分布は異なり、一次粒子径 30~40 nm の MZY-303S では粒子径約 200 nm と 1500 nm 付近に極大分布のある幅広い 2 相となり、MZ-300 は約 150 nm と 400 nm 付近に極大分布があり、かつ MZY-303S よりそれぞれの山の幅が狭い 2 相となった。一方、一次粒子径の大きい ZO-250 では一山のヒストグラムとなり、平均粒子径は 1789 nm であった。いずれの粒子も PdI 値から、実際には大きな粒子径のものが存在する幅広い分布をし、得られた Z-Average は懸濁液の一部の粒子の結果であると考えられた。酸化亜鉛は、水中では表面コーティングの有無に関係なく、粒子表面は正の電荷を有した (表 3) 凝集の強さにほとんど差はないと思われた。

以上のことより、動物実験等を行う場合、通常の超音波洗浄機で処理しただけでは、一次粒子径がナノサイズであっても、凝集してナノサイズで存在する粒子はほとんどないと思われる。皮膚の

細胞間隙は約 100 nm、毛穴の大きさは約 200~500 nm、毛包は 100 nm といわれる。^{2,3)} よって、こうした凝集した粒子サイズでは、理論的には、細胞間を通過しての移行や毛包を通じて皮膚透過していくとは考えにくい。ナノ粒子の皮膚透過を見るには、十分に分散した懸濁液で試験する必要があると思われる。そのためには、媒体の選択や分散法について工夫することが重要である。

2. 亜鉛の定量

亜鉛標準原液 (1000 ppm) を 0.1% の硝酸で希釈し、各濃度の亜鉛標準液を調製した。これを ICP-MS に導入し、質量数 66 におけるカウント値を求めた。亜鉛は、5~500 ng/ml の範囲でカウント値との間で良好な直線性が得られた。試料溶液中の亜鉛の定量限界は、5 ng/ml であった。

酸化亜鉛 MZ-300 を水 1 ml に懸濁させて分解容器に入れ、硝酸 3 ml、過酸化水素 2 ml 及び水 1 ml を加えて、マイクロウェーブ分解処理した。酸化亜鉛 0.248 μg を添加したとき、亜鉛に換算しての増加量は 0.149 μg になる。表4に示すように、分解後の回収量は、3回の繰り返し試験の平均で 0.135 μg で、添加量の 91.4% が回収された。酸化亜鉛 2.480 μg の回収率は 120.1% と良好な結果が得られた。酸化亜鉛は今回用いた条件、硝酸と過酸化水素との混液で十分に亜鉛イオンまで分解し、ICP-MS で定量的に分析が可能であると思われる。

In vivo や in vitro で酸化亜鉛粒子の皮膚透過量を調べる目的で、皮膚等の亜鉛を ICP-MS で定量しようとする場合、分解溶液中に検出される亜鉛は、もともと皮膚に亜鉛イオンであったものなのか、それとも透過した酸化亜鉛がマイクロウェーブによって分解した亜鉛なのか、区別することはできない。また、既に生体には亜鉛が存在し、すべてが酸化亜鉛としているわけではないので、ICP-MS での亜鉛の定量値を、すべて酸化亜鉛に換算し直して比較すること意味がないと思われる。さらに、酸化亜鉛は汗などによりわずかに溶解しイオン化する。そのため、ナノ粒子固体としての皮膚吸収を ICP-MS で定量してみる物質としては適さない部分もある。亜鉛イオンが酸化亜鉛粒子によるものかどうかの区別として、酸化亜鉛の解離の程度や塩化亜鉛溶液等での試験との結果を比較する方