

200940024A

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 21 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 22 (2010) 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・・・・・・・・・・9

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・・・・・・・・・・23

杉林 堅次

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・39

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

平成 21 年度 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)
総括研究報告書

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

研究代表者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長

研究要旨

サンスクリーン剤やファンデーション等の化粧品や医薬部外品にはナノサイズの微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛等が添加されている。こうしたナノ物質が配合された化粧品及び医薬部外品の品質及び安全性を確保するためには、配合される物質の物性やサイズに対応した評価をすることが必要である。本研究では、そのために必要とされる試験法や評価指標について検討をする。化粧品等の主たる暴露経路は皮膚であり、これに使用されるナノ物質が皮膚に浸透する可能性が否定されない場合には、角層下の生細胞に対する作用をも評価する必要がある。

試験に用いた酸化チタンは、表面処理剤及び添加する分散剤の種類によって粒度分布が変化し、ビーズミル法によって安定したナノサイズ酸化チタン懸濁液を調製することができた。しかし、こうした懸濁液の調製条件をすべてのナノ物質に対し規定をすることは困難であり、試験時に粒度分布を確認することが重要と考えた。ナノ物質の生体内吸収と分布の有無を評価するためには、組織中の微量検出法が必要であり、酸化チタンの場合は試料に硝酸フッ化水素酸混液を加えてマイクロウェーブ分解した後、ICP-MS でチタンを分析し、定量限界濃度を求めた。

傷害皮膚を想定したモデルとしてラット *stripped skin*、及び健常皮膚モデルとしてラット *intact skin* を用いて、モデル高分子や微粒子酸化チタンなどの皮膚透過性を測定し、ナノ粒子の皮膚透過速度を予測した。*Intact skin* では分子径が大きいものほど透過係数が低いことから、ナノ粒子が皮膚を透過する可能性はほとんどないことが示唆された。ラットに酸化チタンを皮下投与したが、先の値を超えるようなチタン濃度は検出できず、大量の酸化チタンが角質層を通過し表皮層に達したとしても、検出できる量が体内分布することはないと思われた。しかし、ナノ物質の吸収性の有無については、用いる試験系の定量検出限界によって変動する可能性がある。

浮遊系細胞で抗原提示能を有するヒト単球由来細胞株に対するルチル型酸化チタンナノ分散液の毒性を、細胞内 ATP 量を指標とする方法で評価したが、ほとんど毒性を示さなかった。MTT 試験を用いてヒト真皮由来繊維芽細胞 (HDF) に対する各種酸化チタンの細胞毒性を評価した。ルチル型のシリカ微粒子処理酸化チタンに適用しても、HDF への細胞障害性は見られなかった。しかし、アナターゼ型の微粒子酸化チタンは濃度が高くなるにつれて生細胞率の低下が見られた。

モルモット感作性試験において、ルチル型の無処理微粒子酸化チタンで感作性は見られなかった。*in vitro* 系で、皮膚感作性物質の感作誘導反応に関係するサイトカイン産生に対する影響を検討した。今回、限られた数の感作性物質であるが、それらの反応は酸化チタンで増強されなかった。酸化チタンについてナノサイズに特徴的となるような細胞毒性や皮膚感作性の発現、あるいは反応性の増強といった影響は認められなかった。

研究分担者

五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長

杉林堅次 城西大学 薬学部薬粧品動態制御学講座 教授

A. 研究目的

化粧品や医薬部外品分野で酸化チタンは、白色顔料及び紫外線遮蔽剤として、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。酸化チタン粒子は、ナノメートルサイズまで微細化すると透明性が増し、紫外線遮蔽効果も増加することが知られ、実際、製品には一次粒子径がナノサイズの酸化チタンが配合されている。酸化チタンは紫外線を吸収すると活性酸素が発生するが、それらによる皮膚傷害の可能性を抑えるため、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一般に使われている。表面処理は、粒子の分散性の向上にも役立っている。

化学物質はナノサイズになると、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。このため、以前は食品添加物や顔料として 100 nm 以上の粒子径で問題なく使用されていた微粒子酸化チタンがナノサイズにすることによってヒトに影響を及ぼすのではないかという推測から、ますます微粒子酸化チタンの安全性に対する懸念が高まっている。よって、ナノ物質が配合された化粧品及び医薬部外品の品質及び安全性を確保するためには、配合される物質の物性やサイズに対応した評価をすることが重要と考えられる。しかし、どのような試験が必要なのか、追加試験するならどのような手法や判定指標を用いるべき確立されていない。ナノ物質の考える暴露経路として、経気道暴露、経口暴露、さらには経皮暴露が挙げられる。化粧品等に使われているナノ物質の主たる暴露経路は皮膚である。したがって、ナノ物質が皮膚を浸透するかどうかを検討することが特に重要とな

る。また、もしナノ物質が皮膚に浸透する、もしくは浸透する可能性が否定できない場合には角層の下層（生きた表皮、真皮）の生細胞に対する作用を評価する必要がある。

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では、酸化チタンを対象物質とした。昨年度に引き続き、各種媒体中での粒度分布を動的光散乱法により分析した。酸化チタンの種類あるいは分散法による粒度分布の変化を検討し、ナノサイズの粒子としての評価が適切な懸濁液を調製した。酸化チタン粒子の生体内分布を評価するため、組織中のチタン濃度の分析法の確立を行い、生体内に移行したときの酸化チタン粒子の検出限界濃度を決定した。強制的に酸化チタン懸濁液をラットに皮下投与し、各臓器中のチタン濃度を測定して体内分布の有無を評価した。酸化チタン自体の浮遊系抗原提示細胞に対する毒性強度と代表的な皮膚感作性物質の反応性に対する影響を検討した。細胞毒性試験に関しては、色素、酵素、ATP など細胞生存率を求めるための適切な判定指標の選択を行った。感作性反応は細胞のサイトカイン産生量を指標として、これに及ぼす影響を検討した。

微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究では、傷害皮膚を想定し、皮膚バリア除去モデルとしてヘアレスラット *stripped skin*、健康皮膚モデルとしてヘアレスラット *intact skin* を選び、用途により異なるルチル型及びアナターゼ型微粒子酸化チタンなどの皮膚透過性を測定した。また、ナノ粒子の分散モデルとして平均分子量の異なる水溶性高分子を用いて、モデル高分子の皮膚透過性を評価することで、微粒子酸化チタンの皮膚浸透速度を予測した。加えて、角層下に存在する生細胞にナノ粒子及び市販のサンスクリーン剤を暴露させ

たときの細胞障害性について、ヒト真皮由来繊維芽細胞を用いた MTT 試験にて評価した。

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

表面処理剤や一次粒子径の異なる種々のルチル型及びアナターゼ型結晶形の酸化チタン MT-100AQ、SMT-500SAS、MT-500SA、MT-500H、MT-500B、LU-205 及び AMT-600 について各種分散法を用いて懸濁液を調製し、粒度分布を測定した。

このうち、5%酸化チタン (SMT-500SAS) 懸濁液を Crl : CD (SD) 系雄性ラット背部に 50 μ l ずつ 2 か所に皮内投与し、7 及び 28 日後に各臓器の病理組織検査を行った。また、臓器は約 0.2 g、血清は 0.5 ml (0.5 g)、血液については 1 ml (1.0 g) を試料量として、硝酸 5 ml、フッ化水素酸 0.2 ml 及び超純水 1 ml を加え、圧力制御しながらマイクロウェーブを照射して分解し、ヘリウムガスモードの誘電結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) に導入して質量数 49 のピーク強度を測定した。検量線からチタン濃度を求め、組織中の濃度 (μ g/g, ppm) に換算した。

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に対する細胞毒性を、TetraColor ONE アッセイ、LDH アッセイ及び ATP アッセイで試験し、酸化チタンの評価に適する方法を検討した。TetraColor ONE と LDH については吸光度で、ATP に関しては発光を測定した。

酸化チタンの皮膚感作性及び硫酸ニッケルなどによる感作誘導反応に対する増強効果の有無を調べるため、THP-1 細胞にこれらの物質を併用して暴露し、24 時間培養上清中の IL-8、TNF- α 、RANTES 及び MIP-1 β の含量を ELISA キットで測定した。

B-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

In vitro 皮膚透過性試験: 雄性ヘアレスラッ

ト (WBM/ILA-Ht) 腹部を剃毛後、皮膚を摘出した。Stripped skin はセロハンテープで 20 回テープストリッピングを行った。摘出皮膚を Franz 型拡散セル (有効透過面積 1.77 cm²) に挟み、真皮 (レシーバー) 側に pH 7.4 等張リン酸緩衝液 (PBS) を 6.0 mL を適用した。0.25 mM FITC-dextran (FD-4, FD-10, FD-40) /PBS 溶液を各 1.0 mL 適用した。実験中、セルの温度は 32°C に保ち、レシーバーセル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 で回転させて攪拌した。レシーバー液から 0.5 mL を経時的にサンプリングし、薬物濃度を蛍光分光光度計 (励起波長: 495 nm、蛍光波長: 515 nm) を用いて測定した。同様に、side-by-side 型拡散セル (有効透過面積 0.95 cm²) に皮膚を挟み、レシーバー側に PBS を 3.0 mL を適用した。角層側には 2.6% 蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite[®], 一次粒子径 50 nm) 及び 0.5% ルチル型のシリカ処理微粒子酸化チタン (MT-100WP, 平均一次粒子径 15 nm) を 1.0 ~ 3.0 mL 適用し経時的にサンプリングした。サンプル溶液中の蛍光ポリスチレンビーズ濃度は励起波長: 441 nm、蛍光波長: 486 nm で測定した。サンプル溶液の酸化チタン量は、適切な前処理後、ICP-MS で測定した。

細胞障害性試験 (MTT 試験) : 2×10^4 cells/0.3 mL/well のヒト真皮線維芽細胞 (human dermis fibroblast, HDF) を 24 well セルカルチャーインサート内に播種し、インサートの外側に培地 0.5 mL を適用して 24 時間培養した後、インサート内外の培地を除去し、内側に試験製剤各 0.3 mL を外側に培地 0.5 mL を適用して 37°C で 48 時間培養した。サンスクリーン剤は 18800 g で 10 分遠心後の上清を、ルチル型のシリカ処理微粒子酸化チタン及びアナターゼ型の微粒子酸化チタンは 0.005 ~ 0.1 g/mL に調製したものを用いた。コントロールは培地のみ、ポジティブコントロールとして 10% SDS 培地溶液を用いた。製剤を除去し PBS で 3 回リンス後、インサート内側に

0.333 mg/mL MTT - 培地を 300 μ L/well 適用し 4 時間静置した。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（測定波長：570 nm、対照波長：650 nm）により、ホルマザン量を測定した。

皮膚感作性試験：Adjuvant and patch test 法にもとづいて行った。一次感作は、雄性 Hartley 系モルモット肩甲骨上に 2 cm \times 4 cm 投与部位を設け、四隅に注射用水とフロイント完全アジュバント（1：1）の油中水型乳化液を 0.1 mL/site 皮内投与した。投与部位の角層に注射針で井型の傷をつけ、白色ワセリンと混合した 0.01% Sudan I 軟膏及び 5%、25%ルチル型の無処理微粒子酸化チタン軟膏をそれぞれ 100 mg、24 時間閉塞塗布した。陽性対照として 0.1% DNCB 軟膏を貼付した。この閉塞適用の操作を 3 日間連続して行った。二次感作では、初回貼付感作から 7 日目に同部位を除毛し、白色ワセリンに混合した 10% SDS を 100 mg 開放塗布し、24 時間後に除去し、0.01% Sudan I 軟膏及び 5%、25%ルチル型の無処理微粒子酸化チタン軟膏、0.1% DNCB 軟膏を 200 mg を貼付し、いずれも 48 時間閉塞塗布した。二次感作から 2 週間後に感作モルモットの体側部を除毛し、その部位に適用物質を貼付し 24 時間閉塞塗布した。閉塞塗布後 24 時間及び 48 時間後に皮膚反応（紅斑、痂皮形成、浮腫）の有無及びその程度を観察・評価した。

倫理面への配慮：動物実験に関しては、三菱化学安全科学研究所での動物実験に関する倫理規定、及び城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、「城西大学動物実験規定（平成 21 年 4 月）」に従って、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施された。

C. 研究結果

1. 酸化チタンの分散性

シリコーンオイルに懸濁されている酸化チタン化粧品原料の平均粒子径は数百 nm と、沈殿物は生じず粒径分布も狭いものの、100 nm

以下のサイズの粒子は認めなかった。

各酸化チタンは生理食塩水に入れるとマイクロメートルサイズまで凝集して、超音波洗浄器で 20 分間処理してもナノサイズの粒子はできなかった。ホモジナイザーで処理すると粒子径は小さくなるが、分布は逆に幅広くなった。分散剤として、ヘキサメタリン酸ナトリウムよりも AT の方が酸化チタンの分散に有効であった。超音波処理して AT を加えた水に分散させた場合、SMT-500SAS は平均粒子径 500 nm 程度、親水性の MT-100AQ、MT-500SA 及び MT-500H については 211~380 nm であった。

分散剤を加えてビーズミル法で調製する方法が酸化チタンの分散に効果的であった。SMT-500SAS を 10%濃度で生理食塩水に懸濁したとき平均粒子径は 131 nm、水には 89 nm とナノサイズで分散することができた。この懸濁液は、超音波処理、あるいは 121 $^{\circ}$ C で 15 分間高圧蒸気滅菌、さらに、室温で 28 日間放置後も粒子径はほとんど変化なかった。水で調製した酸化チタンナノ懸濁液を生理的浸透圧となるよう等量の 1.8%食塩水と混合すると若干粒子径は大きく分布幅も広がった。一方、生理食塩水に懸濁した酸化チタンナノ粒子を培地で各濃度に希釈し 24 時間培養したとき、1000 μ g/ml 以下では培養前とほとんど同じ粒度分布を示した。

2. チタンの定量法

ICP-MS におけるチタンのピーク強度は、質量数 48 でモニターした時が最も強く、以下 47、49 の順であった。しかし、48 には他元素の干渉を認めた。さらに、コリジョンセルにヘリウムを使用しオクタポールリアクションシステム (ORS) を作動させ、できるだけ他元素の干渉を低減するようにして分析した。チタン標準液は 1~500 ng/ml の濃度範囲でピーク強度との間に良好な直線性が得られた。チタン標準溶液の定量限界濃度を 1 ng/ml とした。

ホモジナイズしたラット肝臓約 0.1~0.2 g に酸化チタン MT-500B を添加し、硝酸 5 ml または硝酸 5 ml とフッ化水素酸 1 ml 混合溶液を加

えマイクロウェーブ分解した。酸化チタンはチタン量に換算し、分解液のチタン量から回収率を求めた。容器に酸だけを入れ分解した時でも常時数十 ng のチタンが検出された。肝臓のチタン濃度は約 1 μ g/g であった。硝酸とフッ化水素酸混合溶液では、酸化チタン 10000 ng の添加回収率は 102%、1000 ng では 96.7%と、いずれも添加した酸化チタンを良好にチタンに分解し定量することができた。

3. In vitro 皮膚透過性試験

蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite[®]) 及びルチル型のシリカ処理微粒子酸化チタンの皮膚透過量は共に検出限界以下であった。理論分子径 10 nm 以下の水溶性高分子 FITC-dextran をナノ粒子の分散モデルとして用いて皮膚透過性を推察した。Stripped skin では full-thickness skin よりはるかに高い皮膚透過性が得られた。Intact skin と stripped skin とも、FITC-dextran の理論分子径が増大するにつれて、その皮膚透過性の対数値は直線的に減少し、透過係数の対数値と理論分子径の対数値との間に良好な相関関係が得られた。透過係数の直線回帰式は intact skin が (5) 及び stripped skin が (6) となった。

$$\text{Log } P = -4.57 \times 1.176 - 6.59 \dots (5)$$

$$\text{Log } P = -2.92 \times 1.176 - 4.25 \dots (6)$$

これに酸化チタンの一次粒子径 (15 nm) を外挿し、intact 及び stripped skin を介した P を算出したところ、intact skin で 1.1×10^{-12} cm/s、stripped skin で 2.1×10^{-8} cm/s となった。酸化チタンを含有するサンスクリーン剤を intact skin に適用した場合を考えると、 P_i 、 P_{TiO_2} (酸化チタンの透過速度) が P_{des} (角層の落屑速度) よりも小さくなるため、どれだけ広範囲に適用したとしても、酸化チタンは皮膚に透過しないこととなる。一方、stripped skin 100 cm² に酸化チタンが暴露された場合、 J_s (stripped skin の透過速度) は 798 pg/cm²/s と計算され、理論的には 1 時間で 0.3 mg が皮内に浸透する。

4. 皮内投与試験

病理組織学的検査では、全例の投与部位にマ

クロファージの集ぞくがみられ、マクロファージの細胞内には酸化チタンとみられる結晶状物質が認められた。また、7 日目に 1 例、28 日目 4 例で、マクロファージの集ぞく巣の近部の血管周囲にリンパ球浸潤もみられた。他の臓器については、試験群間で変化は認められなかった。28 日目、酸化チタン投与群に肝臓中チタン濃度が高い値を示す動物がいるものの、有意な差と認められる濃度 (3 μ g/g) 未満であった。他の組織においても酸化チタン群と対照群とで有意な差は認められなかった (図 5)。

5. 細胞毒性試験

TetraColor ONE アッセイ、LDH アッセイ、ATP アッセイいずれの方法を用いても同様の評価が得られた。しかし、TetraColor ONE アッセイによるヒト単球系由来 THP-1 細胞に対する細胞毒性試験では、酸化チタン SMT-500SAS は培地を白濁し吸光度の測定に正の妨害を与えるため正確に判定できなかった。LDH アッセイ、ATP アッセイで、酸化チタンは 10 mg/ml までこの細胞に毒性を示さなかった。

酸化チタンを HDF に 48 時間適用した時の生細胞率を MTT で調べた。ルチル型のシリカ処理微粒子酸化チタンでは、濃度にかかわらず約 80% の生細胞率であるが、アナターゼ型酸化チタンでは濃度依存的に生細胞率が減少した。サンスクリーン剤を HDF に適用した時の生細胞率は約 40% 未満であった。上清を適用した群の方が、サンスクリーン剤そのものを適用した群より生細胞率は低い傾向にあった。市販サンスクリーン剤 A から採取した上清に酸化チタンを分散させたものを HDF に適用した。ルチル型シリカ処理よりもアナターゼ型の分散体を適用した方が生細胞は低い傾向にあった。

6. 皮膚感作性とサイトカイン産生

ルチル型の無処理微粒子酸化チタンはモット試験で皮膚感作性を示さなかった。誘導後の皮膚の状態を観察しても明らかな紅斑や浮腫は見られなかった。

THP-1 細胞を各試験物質と 24 時間培養した後の培養上清中の IL-8、TNF- α 、RANTES 及

び MIP-1 β 量を測定した。酸化チタンを添加すると試験物質未添加（対照）に比べ IL-8 産生量は低下した。NiSO₄ によって誘導される IL-8 産生量は、酸化チタンを 10 及び 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で共存させた場合でも差はなかった。CA の IL-8 を産生は酸化チタンの添加により抑制された。RANTES、TNF- α 及び MIP-1 β 産生についても酸化チタン共存による増加は認めなかった。

D. 考察

ナノ粒子の生体や細胞に対する影響を評価するためにはそのサイズが重要でありマイクロメートルレベルの凝集体で試験しても意味はない。特に、酸化チタンのような凝集しやすい物質には、適切な粒度分布を持つ試験液での試験が望まれる。酸化チタンナノ粒子を超音波処理して水系溶媒に分散させてもマイクロメートルレベルの粒子径にしかならなかったが、分散剤 AT を添加しマイクロビーズで凝集した粒子をほぐすことによって SMT-500SAS を 10%濃度で安定したナノ粒子懸濁液とすることができた。この酸化チタン懸濁液は動物への塗布や細胞に適用する試料溶液として長期に渡って安定して使用できることがわかった。ナノ粒子の懸濁液は調製条件によって粒度分布が変化し、物質によっても凝集性は異なる。ナノ物質の試験溶液の調製法を規定することは困難で、試験時にその粒度分布を確認することが必要と思われる。

酸化チタンは硝酸フッ化水素酸混合溶液が定量的にチタンに分解できた。ICP-MS で臓器中のチタンを定量するには、質量数 49 でモニターし、コリジョンセルにヘリウムガスを使用した ORS を作動させ、多原子イオンの干渉を低減するのが有効であった。ラット肝臓に添加した 1000 ng の酸化チタンの回収率は 96%以上あった。一方、分解容器等からは組織中に約 1 $\mu\text{g/g}$ レベルに相当するチタンの溶出があり、バックグラウンドとして常に検出された。このばらつき幅と明確な差を有する定量値は 3 $\mu\text{g/g}$

と考え、この値を超えたときに外部から流入した酸化チタン粒子があるとした。

ラット intact skin を用いた in vitro 皮膚透過性試験において、FITC-dextran の透過係数は理論分子径が増大すると 1×10^{-9} cm/s をはるかに下回るため、一次粒子径が約 15 nm である微粒子酸化チタンは皮膚を透過しないと予測できる。一方、微粒子酸化チタンの stripped skin 透過係数が直線回帰式で得られる予測値 (2.1×10^{-8} cm/s) となるならば、皮内に浸透する可能性が示唆された。したがって、傷害皮膚にナノ粒子が数時間暴露されたと想定した場合、生細胞に対する障害性を評価することが必要になると考えられる。

酸化チタンを皮内投与した部位にはマクロファージが集積し、その近部の血管周囲にはリンパ球浸潤もみられたが、各組織におけるチタン濃度はいずれも 1 $\mu\text{g/g}$ 未満で対照群と有意な差は認められなかった。反復塗布での皮膚吸収量ははるかに少ないと考えられる。したがって、酸化チタンナノ粒子を含む化粧品を日常的に健常皮膚に使用しても、酸化チタン粒子が皮膚吸収され毒性学的影響を起こすようなリスクはほとんどないと考える。吸収の有無の判定は、機器の検出感度と分析条件に依存する。もし、より高感度の分析技術を用いた場合には吸収については異なる結論が得られる可能性もある。ナノ粒子全般に皮膚吸収性試験は必要なのか、それとも物質ごとに検討するのか、判定するには更に議論が必要である。

細胞毒性は最も基本的ですべての物質に必須とされる試験項目である。ここでは浮遊系の抗原提示細胞に対する試験法を確立した。酸化チタン懸濁液の場合はそれ自体の毒性強度が弱く、結果的に試験濃度は高くなり培地が白濁した。TetraColor ONE は細胞の培養液に直接添加しそのまま吸光度を測定できるが、酸化チタンによる濁りによって正確に吸光度を測定し判定することが困難であった。ルミノメーターを使う ATP アッセイは生細胞中 ATP のルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光を測

定するため、細胞や酸化チタンが白濁して一緒にある状態でも希釈しそのまま分析できる。本アッセイは短時間に試薬を混和するだけで簡単に測定が可能であり、他のアッセイと同等の評価ができることがわかった。検査した結果、酸化チタンは 10 mg/ml まで毒性を示さず、細胞毒性は非常に弱いことがわかった。

ルチル型のシリカ処理微粒子酸化チタンを HDF に適用しても細胞障害性は見られなかった。アナターゼ型の微粒子酸化チタンは濃度が高くなるにつれて生細胞率が低下することから、角層下に移行すれば、皮膚毒性が生じることが懸念される。市販サンスクリーン剤にはルチル型が使用されており、酸化チタンによる影響は見られないが、分散媒が障害を与える可能性があった。今後は、ヒト表皮角化細胞 (Human epidermal keratinocyte, HEK) に対する細胞障害性についても検討を行う。

酸化チタン自体の感作性、及び酸化チタンが他物質の感作性誘導反応に及ぼす影響を評価した。モルモットを用いた *adjuvant and patch test* では、ルチル型の無処理微粒子酸化チタンは皮膚反応は示さず感作性はないことが示唆された。THP-1 細胞に酸化チタンを暴露すると、いずれの濃度でも IL-8 及び RANTES 産生量は低下した。TNF- α 産生は、酸化チタンを添加しても変化なかった。サイトカインの産生が感作性反応とどのように関係するのか、サイトカイン相互のネットワークも合わせて今後検討する必要はあるが、今回の結果からは酸化チタンナノ粒子が皮膚感作性の誘導反応を増強する効果はないと考えた。

E. 結論

超音波を用いた方法では、照射強度を増強あるいは処理時間を延長しても、酸化チタンを 100 nm 以下の粒子径で分散させることはできなかった。ビーズミル法を用いるとナノサイズの粒子径で安定して存在する懸濁液を調製できた。物質によって凝集性は異なり調製法を規定することは困難である。試験時にその粒度分

布を確認することが結果の評価には重要と思われた。

試料に硝酸-フッ化水素酸混液を加えてマイクロウェーブ分解した後、ICP-MS でチタンを定量した。分解操作により、試料がなくとも一定量のチタン(バックグラウンド)が検出され、組織に移行してきた酸化チタンと区別できる値を、組織中チタン濃度が約 3 $\mu\text{g/g}$ とを超えるとき酸化チタン粒子が存在すると判定した。

Intact skin では分子径が大きいものほど透過係数が低いことから、ナノ粒子が皮膚を透過する可能性はほとんどないことが示唆された。ラットに酸化チタンを皮下投与しても毒性は認めなかった。各臓器中のチタン濃度は対照群と試験群で差は認めず、大量の酸化チタンが角質層を通過し表皮層に達したとしても、検出できるほどの量が体内分布し毒性を示すことはないと思われた。今後、*in vitro* 系におけるモデルナノ粒子の機能損傷皮膚で透過性を評価することにより、ナノ粒子の皮膚浸透について結論が得られるものとする。

酸化チタンナノ粒子が化粧品中の他成分の品質や安全性に影響がないかどうか、細胞毒性及び皮膚感作性をとり上げて検討した。浮遊系細胞を用いる細胞毒性試験では細胞内 ATP 量を測定することによって生存率を求めた。ヒト線維芽細胞に対しルチル型のシリカ処理酸化チタンは障害性を示さないが、アナターゼ型酸化チタンは細胞生存率を低下させた。モルモット感作性試験において、ルチル型の無処理酸化チタンに感作性は見られなかった。化学物質の皮膚感作誘導反応と関係するサイトカインの産生を酸化チタンが増強するような効果は認めなかった。ナノ物質として新たに試験を追加する必要があるような影響はなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Senzui M, Tamura T, Miura K, Ikarashi Y, Watanabe Y, Fujii M. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. J. Toxicol. Sci., 35, 107-113 (2010)

2. 学会発表

1) 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野正、西村哲治. ラットに反復経皮投与した酸化チタン粒子の体内分布と毒性. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会. 平成21年7月

2) 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野正、徳永裕司、西村哲治. 経皮投与した微小金属酸化物粒子の体内分布と毒性について. フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシコロジー. 平成21年11月

3) Kimura E., Todo H., Sugibayashi K., Do titanium dioxide-nanoparticles permeate through skin? Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, October 16 (2009)

H. 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

II. 分担研究報告

平成 21 年度 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研究事業)
分担研究報告書

研究課題名：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

分担課題名：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

分担研究者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長

研究要旨

ナノ物質が配合された化粧品及び医薬部外品の品質及び安全性を確保するためには、配合される物質の物性やサイズに対応した評価をすることが必要と考えられるが、実際どのような試験や評価指標を追加するべきか未だ明確ではない。本年度はナノサイズの酸化チタンを対象とし、各種媒体あるいは調製法の違いによって粒度分布に差が生じるか検討した。酸化チタンの表面処理剤及び添加する分散剤の種類によって粒度分布は変化した。超音波を用いた方法では、照射強度を増強あるいは処理時間を延長しても 100 nm 以下の粒子径で分散させることはできなかった。分散剤を添加すると平均粒子径は小さくなり、さらに、ビーズミル法を用いると 80 nm 以下の粒子径で安定して存在する懸濁液を調製できた。以上のように、調製条件によって粒度分布は変化し、物質によって凝集性も異なることから、ナノ粒子を試験する際、懸濁液の調製法を一つに規定することは困難で、むしろ試験時にその粒度分布を確認することが必要と思われる。

酸化チタンナノ粒子の生体内吸収と分布の有無を評価するためには、組織中のナノ粒子の微量検出法の確立が望まれている。今回、試料に硝酸フッ化水素酸混液を加えてマイクロウェーブ分解した後、ICP-MS で定量する方法を採用した。いずれの試料にも一定量のチタン（バックグラウンド）が検出され、移行してきた酸化チタンと区別できる定量値は、組織中チタン濃度が約 3 µg/g とし、この値以上となるとき酸化チタン粒子が組織に存在すると判定した。強制的にラットに酸化チタンを皮下投与すると、投与部位にはマクロファージの集積が認められたが、各臓器の病理組織学的反応及び臓器中のチタン濃度は対照群と試験群で差は認めなかった。大量の酸化チタンが角質層を通過し表皮層に達したとしても、検出できる量が体内分布することはないと思われた。

化粧品には種々の成分が添加されることから、酸化チタンナノ粒子が他成分の品質や安全性に影響がないかどうか、細胞毒性及び皮膚感作性について検討した。細胞毒性試験では培地に酸化チタンを懸濁したとき濁りがあり、色素の取り込みなどで判定する試験法は難しいことがわかった。ここでは細胞内 ATP 量を測定することによって生存率を求めた。化学物質の皮膚感作誘導反応と関係するサイトカインについて、その産生を酸化チタンが増強するような効果は認めなかった。今回、試験法自体の改良は必要と思われたが、ナノ物質としての新たな試験を追加する必要性は認めなかった。

A. 研究目的

化粧品や医薬部外品分野で酸化チタンは、白色顔料及び紫外線遮蔽剤として、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。酸化チタン粒子は、ナノメートルサイズまで微細化すると透明性が

増し、紫外線遮蔽効果も増加することが知られ、実際、製品中には一次粒子径がナノサイズの酸化チタンが配合されている。酸化チタンは紫外線を吸収すると活性酸素が発生するが、それらによる皮膚傷害の可能性を抑えるため、一般には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、粒子の分散性の向上にも役立っている。

化学物質はナノサイズになると、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。よって、ナノ物質が配合された化粧品及び医薬部外品の品質及び安全性を確保するためには、配合される物質の物性やサイズに対応した評価をすることが重要と考えられる。しかし、どのような試験が必要なのか、追加試験するならどのような手法や判定指標を用いるべき確立されていない。

本年度は酸化チタンを対象物質とした。昨年度に引き続き、各種媒体中での粒度分布を動的光散乱法により分析した。化粧品原料と試験液中の酸化チタン粒子の平均粒子径と分散性を比較するとともに、酸化チタンの種類あるいは分散法による粒度分布の変化を検討し、ナノサイズの粒子（ナノ粒子）としての評価が適切な懸濁液を調製した。

ナノ粒子の健康影響で最も危惧されるのは、そのサイズから疑われる生体への吸収と体内分布である。酸化チタン粒子の生体内分布を評価するためには、組織中のナノ粒子の微量分析が必要である。そこで、組織中のチタン濃度の分析法の確立を行い、生体内に移行したときの酸化チタン粒子の検出限界濃度を決定した。強制的に酸化チタン懸濁液をラットに皮下投与し、各臓器中のチタン濃度を測定して体内分布の有無を評価した。

化粧品には種々の成分が添加されることから、酸化チタンナノ粒子を共存させた場合に他成分の品質や反応性に影響がないかどうか検

討した。本年は、酸化チタン自体の細胞毒性強度と代表的な皮膚感作性物質の反応性に対する影響を検討した。細胞毒性試験に関しては、色素、酵素、ATP など細胞生存率を求めるための適切な判定指標の選択を行った。感作性反応は細胞のサイトカイン産生量を指標として、これに及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1. 材料及び試薬

酸化チタン (TiO₂) として表面処理剤の異なるルチル型結晶形の MT-100AQ、SMT-500SAS、MT-500SA、MT-500H、MT-500B、LU-205、及びアナターゼ型結晶形の AMT-600 を用いた。それぞれの粒子の性状を表 1 に示した。媒体として、環状シリコンオイル (TSF405)、リン酸緩衝液、生理食塩水、水を用いた。分散剤として、ヘキサメタリン酸ナトリウム及び AT (仮称) を用いた。

2. 細胞

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を ATCC から入手した。培地として、FBS を 10%、penicillin 100 units/ml、streptomycin 100 µg/ml、amphotericin B 250 ng/ml 及び 2-mercaptoethanol 55 nmol/ml を含有した RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) を用いた。

3. 動物

CrI:CD(SD)系 5 週齢、雄性ラットを日本チャールス・リバーから入手した。動物は、ステンレススチール製ケージに 1 ケージ当たり 1 匹ずつ入れて、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。馴化期間は 8 または 9 日間とした。

4. 元素分析

エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (PANalytical 社 Epsilon 5) により分析した。

5. 粒度分布の測定

酸化チタンを 1~10% の濃度で各媒体に入れ、ある場合は分散剤を指定量添加後、シャープマニファクチャリングシステム製 UT205 型超音波洗浄器 (出力 200W)、VCX 型超音波

ホモジナイザー (Sonics & Materials 社製) またはスターミルラボスターミニ LMZ015 型 (アシザワ・ファインテック) を用い、一定時間処理して懸濁液とした。調製に用いた媒体を用いて酸化チタンが 0.01% になるよう希釈し、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) で粒度分布を測定した。

6. 皮内投与試験

10%酸化チタン (SMT-500SAS) 懸濁液を 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌し、超音波洗浄器で 20 分間処理した後、等量の 1.8% NaCl 溶液と混合した。対照には、分散剤入り精製水に、等量の 1.8% NaCl 溶液を加えたものを用いた。

1 群当たり 10 匹のラットを用い、6 週齢で投与を開始した。ラット背部を毛刈りし、1 か所につき 50 μ l ずつ 2 か所に皮内投与した。投与 7 及び 28 日後に各試験群について 5 匹ずつ、採血し、血清を得た。各臓器の重量 (絶対重量) を測定するとともに、体重比臓器重量 (相対重量) を算出した。肝臓 (外側左葉)、腎臓 (右)、投与部位皮膚 (右側の上半分) については、10 vol% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した後、パラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、鏡検した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、三菱化学安全科学研究所で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。

7. チタンの定量

臓器は約 0.2 g を細切して、血清は 0.5 ml (0.5 g)、血液については 1 ml (1.0 g) を試料量として分解用容器に入れ、硝酸 5 ml、フッ化水素酸 0.2 ml 及び超純水 1 ml を加えた。マイクロウェーブ分解装置は CEM 社の MARS 5 型を用い、180 psi で圧力制御しながら 1600W (100%) でマイクロウェーブを 20 分間照射、そのまま 20 分間保持した。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、ヘリウムガスモードの誘電結合プラ

ズマー質量分析計 (ICP-MS, Agilent 社 7500ce 型) に導入して質量数 49 のピーク強度を測定した。検量線からチタン濃度を求め、組織中の濃度 (μ g/g, ppm) に換算した。組織を加えず分解処理し同様に希釈したものについて分析し、得られた値を組織中濃度として換算したものをバックグラウンド (blank) 値とした。

8. 細胞毒性試験

8-1. TetraColor ONE アッセイ

酸化チタン懸濁液は高圧蒸気滅菌後、培地で指定の濃度に調整した。試験物質は生理食塩水または DMSO に溶解し、培地で希釈して指定の濃度に調整して用いた。

THP-1 細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) を 50 μ l ずつ 96 穴プレートに入れ、種々の濃度の試験溶液を 50 μ l ずつ加えた。24 時間培養後、TetraColor ONE を 10 μ l ずつ加えて、更に 2 時間培養後、対照波長 600 nm、測定波長 450 nm における吸光度を測定した。各試験物質とも濃度ごとに control に対する吸光度の強度比 (%) を求め、50% となる濃度を IC50 (μ g/ml)、75% にする濃度を CV 75 (μ g/ml) とした。

8-2. LDH アッセイ

24 穴プレートの各穴に、THP-1 細胞 (2×10^6 cells/ml) 浮遊液及び試験溶液をそれぞれ 500 μ l ずつ入れて 24 時間培養した。培養終了後、4°C、1200 rpm で 2 分間遠心して上清を分取し、さらに 10000 rpm で 10 分間遠心した。この上清を、LDH 測定キットのプロトコールに従って操作し、対照波長 600 nm、測定波長 490 nm における吸光度を測定した。

8-3. ATP アッセイ

8-2 と同様に培養後、細胞浮遊液を生理食塩水で 100 倍希釈し、100 μ l を ATP 抽出液 100 μ l と混合後、20 秒間静置した。発光試薬 100 μ l 加え、すばやくルミノメーター (LUMITESTER C-100, キッコーマン) を用いて 10 秒間の発光量 (RLU) を読みとった。

9. サイトカイン産生

24 穴プレートの各穴に THP-1 細胞 2×10^6 cells/ml の細胞浮遊液及び試験溶液をそれぞ

れ 500 μ l ずつ入れ 24 時間培養した。試験物質の濃度は CV75 と低濃度側に公比 1.2 で 2 濃度、を設定した。培養終了後、遠心して得られた上清中の IL-8、TNF- α 、RANTES 及び MIP-1 β の含量を ELISA キットで測定した。

C. 研究結果

1. 酸化チタンの分散性

1-1. 分散溶媒の影響

SMT-500SAS を除く各酸化チタンを生理食塩水に入れ、超音波洗浄器で 20 分間処理したときの平均粒子径を表 2 にまとめた。表面処理していない MT-500B、LU-205 及び AMT-600 は表面処理した酸化チタンより大きな値を示した。水、生理食塩水及び PBS とそれぞれの媒体に酸化チタンを懸濁させたが、媒体中の塩濃度に応じた一定の傾向は認められなかった。

化粧品原料として取り扱われている酸化チタンはシリコンオイルに懸濁されている。この 2 ロットを入手し粒度分布を測定した結果、それぞれ平均粒子径は 396 及び 800 nm 程度であった (図 1)。沈殿物は生じず粒径分布も狭いものの、100 nm 以下のナノサイズで存在する粒子は認めなかった。

1-2. 分散剤の効果

生理食塩水に酸化チタンを 1%、分散剤ヘキサメタリン酸ナトリウムを 5%濃度で加え 20 分間超音波処理した。MT-100AQ に関しては分散剤の添加で粒径が 1479 nm から 663 nm に小さくなったが分布が 2 分極化した。MT-500H については逆に 3379 nm と大きくなった。

親油性の SMT-500SAS は水系の媒体には浮遊して分散させることは困難であるが、分散剤 AT を添加することにより平均粒子径が 500 nm 程度の懸濁液とすることが可能であった。親水性の MT-100AQ、MT-500SA 及び MT-500H についても、分散剤の添加で粒径は 211~380 nm と、いずれも分散剤を入れない場合よりも小さくなった (図 2)。

1-3. 分散方法の影響

酸化チタンを生理食塩水に加えて超音波洗浄器での処理時間を 10 分、20 分と長くすると、

MT-500SA の粒径は小さくなったが、MT-100AQ と MT-500H は変化しなかった。

次に、生理食塩水に酸化チタンと分散剤 AT を加えて、ホモジナイザー (出力 375 W) で 1 分間、または超音波洗浄浴で 20 分間処理した。MT-100AQ の場合、両処理で 200~300 nm とほとんど差はないが、ホモジナイザーで処理した場合ピークがいくつも表れる粒度分布を示した。MT-500SA 及び MT-500H はホモジナイザーで処理した方が粒子径は小さくなるが、分布は逆に幅広くなった表 3。

ビーズミル法はマイクロビーズで凝集した粒子をほぐすことによって単一の粒子に分散する方法である。SMT-500SAS のシリコンオイルへの分散を試みたが、オイルの粘性のため装置が作動不良を起こし断念した。そこで、分散剤 AT を加えた水溶液に分散させた。酸化チタンを生理食塩水に 10%濃度で懸濁したとき平均粒子径は 131 nm、水に 10%濃度で懸濁したときは 89 nm、5%では 74 nm とナノサイズで分散することができた (図 3)。

1-4. 安定性

ビーズミル法で調製した酸化チタン懸濁液を超音波処理、あるいは 121 $^{\circ}$ C で 15 分間高压蒸気滅菌しても平均粒子径はほとんど変化しなかった。さらに、室温で 28 日間放置後も粒子径は 77 nm と変化は見られなかった。

水で調製した懸濁液を生理的浸透圧となるよう等量の 1.8%食塩水と混合したところ、混合直後は、混合前よりわずかに大きい程度の粒子径であるが、超音波処理して時間がたつと大きく分布幅も広がった (図 4)。

生理食塩水に 10%濃度で懸濁した酸化チタン SMT-500SAS の平均粒子径は 101 nm であった。これを培地で各濃度に希釈し 24 時間培養器中で静置し粒度分布を測定した。培地中の濃度が 1% (10000 μ g/ml) のとき平均粒子径は 550 nm であるが、0.1% (1000 μ g/ml) 以下では培養前とほとんど同じ粒度分布を示した。

2. チタンの定量法

2-1. 検量線

ICP-MSにおけるチタンのピーク強度は、質量数48でモニターした時が最も強く、以下47、49の順であった。しかし、48には他元素の干渉を認めたため、ここでは49をモニターした。さらに、コリジョンセルにヘリウムを使用しオクタポールリアクションシステム(ORS)を作動させ、できるだけ他元素の干渉を低減するようにして分析した。チタン標準液は1~500 ng/mlの濃度範囲でピーク強度との間に良好な直線性が得られた。チタン1 ng/mlのピークカウント値はブランク(0 ng/ml)と約10の差があり、標準溶液の定量限界濃度を1 ng/mlとした。

2-2. 添加回収試験

ホモジナイズしたラット肝臓、湿重量として約0.1~0.2 gを分解容器に採取した。酸化チタンMT-500Bを添加し、硝酸5 mlまたは硝酸5 mlとフッ化水素酸1 ml混合溶液を加えマイクロウェーブ分解した。酸化チタンはチタン量に換算し、分解液のチタン量から回収率を求めた。容器に酸だけを入れ分解した時でも常時数十ngのチタンが検出された。肝臓のチタン濃度は約1 µg/gであった。酸化チタン10000 ngの硝酸分解での回収率は35.4%であった。一方、硝酸とフッ化水素酸混合溶液では、酸化チタン10000 ngの添加回収率は102%、1000 ngでは96.7%と、いずれも添加した酸化チタンを良好にチタンに分解し定量することができた。

3. 皮内投与試験

酸化チタン SMT-500SAS の元素分析で、チタン以外には表面処理剤のケイ素やアルミニウムが数%、ニオブが0.2%検出されたが、他はごく微量であった。

病理組織学的検査では、全例の投与部位にマクロファージの集ぞくがみられ、マクロファージの細胞内には酸化チタンとみられる結晶状物質が認められた。また、7日目に1例、28日目4例で、マクロファージの集ぞく巢の近部の血管周囲にリンパ球浸潤もみられた。これらの変化は、28日目の方がわずかに増強する傾向がみられた。対照群及び酸化チタン投与群の

各1例で腎臓に変化が認められたが、これらの試験群間で反応に差はなかった。

28日目、酸化チタン投与群に肝臓中チタン濃度が高い値を示す動物がいるものの、有意な差と認められる濃度(3 µg/g)未満であった。他の組織においても酸化チタン群と対照群とで有意な差は認められなかった(図5)。

4. 細胞毒性

ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)について細胞毒性強度を評価した。TetraColor ONE アッセイ、LDH アッセイ、ATP アッセイいずれの方法を用いても同様のIC50及びCV75値(65 µg/ml)を示した。酸化チタンのTetraColor ONE アッセイによる細胞毒性試験では、培地を白濁し吸光度の測定に正の妨害を与えるため正確に判定できなかった。LDH アッセイでは、酸化チタンは10 mg/mlで約90%の細胞生存率を示した。ATP アッセイにおいても、LDH アッセイ同様に、酸化チタンは細胞毒性を示さなかった。

5. サイトカイン産生

THP-1細胞を各試験物質と24時間培養した後の培養上清中のIL-8、TNF-α、RANTES及びMIP-1β量を測定した。酸化チタンは最終濃度が0、10、100及び1000 µg/mlで共存するよう添加した。

試験物質未添加(対照)のIL-8量は70 pg/ml程度であった。酸化チタンを添加するとIL-8産生量は低下した。NiSO₄によって誘導されるIL-8産生量は、酸化チタンを10及び100 µg/mlの濃度で共存させた場合でも差はなかった。CAは17.4 µg/mlで最高約1200 pg/mlのIL-8を産生した。このIL-8産生は酸化チタンの添加により抑制された。SLSではIL-8は産生されず、酸化チタンを共存させても変化はなかった(図6)。

RANTESは対照で170 pg/mlの産生量があるが、酸化チタンを添加すると低下した。NiSO₄の添加によってRANTES産生量は増加するが、酸化チタンが共存すると低下した。CA及びSLS添加の場合も同様であった(図6)。

酸化チタンを添加しても TNF- α は産生されなかった。NiSO₄ によって誘導される TNF- α 産生は、酸化チタンを 10 及び 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で共存させて培養すると低下した。MIP-1 β 産生は NiSO₄ により著しく増加するが、酸化チタンが共存すると減少した。

D. 考察

ナノ粒子の生体や細胞に対する影響を評価するためにはそのサイズが重要でありマイクロメートルレベルの凝集体で試験しても意味はない。特に、酸化チタンのような凝集しやすい物質には、適切な粒度分布を持つ試験液での試験が望まれる。例えば、入手した化粧品原料の酸化チタン懸濁液の粒子径は 396 及び 800 nm 程度と、ナノサイズで存在する粒子はなかった。そこでまず、酸化チタンの表面処理剤の違い、媒体への分散剤の添加、あるいは分散方法によって粒度分布がどのように変化するかを検討し、酸化チタンを適用段階でナノ粒子として存在させることが可能かどうかを調べた。

超音波処理して水系溶媒に分散させた場合、酸化チタンの表面処理に関係なくマイクロメートルレベルの粒子径にしかならなかった。この分散法では、分散剤としてヘキサメタリン酸ナトリウムを加えても効果がなかった。分散剤 AT は、親油性の表面処理をした SMT-500SAS を平均粒子径は 500 nm 以下で水系媒体に分散させることができ、有用と思われた。超音波ホモジナイザーは酸化チタンの凝集塊を若干小さくするものの、ナノレベルの大きさに分散させるような著しい効果は認めなかった。

ビーズミル法はマイクロビーズで凝集した粒子をほぐすことによって単一の粒子に分散する方法である。分散剤 AT を添加し SMT-500SAS を 10%濃度で水に懸濁したときの平均粒子径は 89 nm、生理食塩水には 131 nm、であった。本懸濁液は 28 日間放置後も粒子の凝集は起こらず、高圧蒸気滅菌処理しても粒径は変化しなかった。この酸化チタン懸濁液は、試験が長期に渡る毒性評価でも安定に、塗布や

細胞に適用する試料溶液として使用できることが示唆された。以上のように、調製条件によって粒度分布は変化し、物質によって凝集性も異なることから、ナノ粒子を試験する際、懸濁液の調製法を一つに規定をすることは困難で、むしろ試験時にその粒度分布を確認することが必要と思われる。

ICP-MS で臓器中のチタンを定量するには、質量数 49 でモニターし、コリジョンセルにヘリウムガスを使用した ORS を作動させ、多原子イオンの干渉を低減するのがチタン分析では有効である。チタン標準溶液の定量限界は 1 ng/ml であった。酸化チタンを ICP-MS で分析するためには、チタンイオンに定量的に分解する必要がある、分解条件が重要である。分解液として硝酸-フッ化水素酸混合溶液がよく、ラット肝臓に添加した 1000 または 10000 ng の酸化チタンの回収率は 96%以上あった。一方、分解容器等からは組織中に約 1 $\mu\text{g/g}$ レベルに相当するチタンの溶出があり、バックグラウンドとして常に検出された。この blank におけるばらつき幅から明確な差を有する定量値は 3 $\mu\text{g/g}$ が適当と考え、この値を超えたときに外部から移行した酸化チタン粒子の存在があるとした。

多量の酸化チタンが表皮層と透過したと仮定した単回皮内投与を実施した。皮内投与した部位にはマクロファージが集積し、その近部の血管周囲にはリンパ球浸潤もみられた。これらの変化自体は異物進入に対する生体の防御反応である。酸化チタンを投与したラットの各組織におけるチタン濃度はいずれも 1 $\mu\text{g/g}$ 未満で対照群と有意な差は認められなかった。このことは、皮膚内に透過した酸化チタンは体内に分布していかないか、仮に移行していたとしても毒性学的影響を及ぼさない微量であることを示している。反復塗布での皮膚吸収はあったとしてもはるかに少ない量と考えられる。したがって、酸化チタンナノ粒子を含む化粧品を日常的に健常皮膚に使用しても、酸化チタン粒子が皮膚吸収され毒性学的影響を起こすような

リスクはほとんどないと考える。吸収の有無の判定は、機器の検出感度と分析条件に依存する。もし、より高感度の分析技術を用いた場合には吸収については異なる結論が得られる可能性もある。ナノ粒子全般に皮膚吸収性試験は必要なのか、それとも物質ごとに検討するのか、判定するには更に議論が必要である。

今回調製した酸化チタンナノ粒子は細胞培養系でも安定して分散しており、ナノ粒子を *in vitro* 系で評価できることがわかった。細胞毒性は最も基本的ですべての物質に必須とされる試験項目である。酸化チタンの場合は皮膚に関連した細胞を用いることが適切と思われる。後述するように *in vitro* 皮膚感作性試験も実施することから、ここでは浮遊系の抗原提示細胞に対する試験法を確立した。細胞毒性の判定は生細胞数を細胞に取り込まれる色素を吸光度や蛍光などの量的変化により測定する。こうした色素としては、ニュートラルレッド、MTT、*alamarBlue*、WST-1 及び *TetraColor ONE* などがある。酸化チタン懸濁液の場合はそれ自体の毒性強度が弱く、結果的に試験濃度は高くなり培地が白濁した。*TetraColor ONE* は細胞の培養液に直接添加しそのまま吸光度を測定できるが、上記のように酸化チタンによる濁りによって正確に吸光度を測定し判定することが困難であった。LDH アッセイは、細胞死による細胞内 LDH の溶出量から試験物質の毒性を求める方法で、ELISA で測定する。酸化チタンは測定時に遠心して取り除く必要があるが、分散しているため、あらかじめ弱い遠心で細胞を分離した後、強い遠心が必要である。ポジティブコントロールとの比較で判定するため、陽性対照の値により値がばらつく可能性がある。一方、ルミノメーターを使う ATP アッセイは生細胞中 ATP のルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光を測定するため、細胞や酸化チタンが白濁して一緒にある状態でも希釈しそのまま分析できる。本アッセイは短時間に試薬を混和するだけで簡単に測定が可能であり、他のアッセイと同等の評価ができることがわかった。

ATP アッセイで検査した結果、酸化チタンは 10 mg/ml まで毒性を示さず、細胞毒性は非常に弱いことがわかった。

次に、酸化チタン自体の感作性、及び酸化チタンが他物質の感作性誘導反応に影響を及ぼすかどうか評価した。感作性に関連するサイトカインの産生量を指標として判断した。酸化チタンを添加するといずれの濃度でも IL-8 及び RANTES 産生量は低下した。TNF- α は通常の培養では産生されず、酸化チタンを添加しても変化なかった。MIP-1 β に関しては、酸化チタンを 100 μ g/ml 以下添加しても産生量に変化はなかった。本試験系で酸化チタンが感作性反応を引き起こすような結果は認めなかった。

感作性物質として水溶性の NiSO₄ 及び脂溶性の CA を、非感作性刺激性物質として SLS を選択した。NiSO₄ で産生が誘導される TNF- α と MIP-1 β は酸化チタン共存の影響を受けなかった。CA 及び SLS による TNF- α と MIP-1 β 産生は酸化チタンの共存により減少した。IL-8 及び RANTES に関しては、酸化チタンの共存で産生量は減少した。サイトカインの産生が感作性反応とどのように関係するのか、サイトカイン相互のネットワークも合わせて今後検討する必要はあるが、今回の結果からは酸化チタンナノ粒子が皮膚感作性の誘導反応を増強する効果はないと考えた。

E. 結論

超音波を用いた方法では、照射強度を増強あるいは処理時間を延長しても、酸化チタンを 100 nm 以下の粒子径で分散させることはできなかった。分散剤を添加すると平均粒子径は小さくなり、さらに、ビーズミル法を用いると 80 nm 以下の粒子径で安定して存在する懸濁液を調製できた。物質によって凝集性は異なり懸濁液の調製法を一つに規定することは困難と思われる。試験時にその粒度分布を確認することが結果の評価には重要と思われた。

試料に硝酸-フッ化水素酸混液を加えてマイクロウェーブ分解した後、ICP-MS でチタン

を定量した。分解操作により、試料がなくとも一定量のチタン(バックグラウンド)が検出され、組織に移行してきた酸化チタンと区別できる値を、組織中チタン濃度が約 3 µg/g とした。この値以上となる時酸化チタン粒子が存在すると判定した。ラットに酸化チタンを皮下投与しても毒性は認めなかった。各臓器中のチタン濃度は対照群と試験群で差は認めず、大量の酸化チタンが角質層を通過し表皮層に達したとしても、検出できる量が体内分布し毒性を示すことはないと思われた。

酸化チタンナノ粒子が化粧品中の他成分の品質や安全性に影響がないかどうか、細胞毒性及び皮膚感作性をとり上げて検討した。細胞毒性試験は細胞内 ATP 量を測定することによって生存率を求めた。化学物質の皮膚感作誘導反応と関係するサイトカインの産生を酸化チタンが増強するような効果は認めなかった。試験系に関しては若干の改良が必要であるが、ナノ物質として新たに試験を追加する必要性は認めなかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 参考文献

1. Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, Coester C, Tuomi T, Rehberg M, Krombach F. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part. Fibre Toxicol.*, 5, 14 (2008)
2. Vallés G, González-Melendi P, González-Carrasco JL, Saldaña L, Sánchez-Sabaté E, Munuera L, Vilaboa N. Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles. *Biomaterials* 27, 5199-5211 (2006)
3. Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ, Schins RP. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells

upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 222, 141-151 (2007)

4. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767-773 (2006)
5. Hirota M, Moro O. MIP-1beta, a novel biomarker for in vitro sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicol. In Vitro* 20, 736-742 (2006)

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Senzui M, Tamura T, Miura K, Ikarashi Y, Watanabe Y, Fujii M. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *J. Toxicol. Sci.*, 35, 107-113 (2010)

2. 学会発表

- 1) 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野正、西村哲治. ラットに反復経皮投与した酸化チタン粒子の体内分布と毒性. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会. 平成21年7月
- 2) 五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野正、徳永裕司、西村哲治. 経皮投与した微小金属氧化物粒子の体内分布と毒性について. フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシコロジー. 平成21年11月

I. 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