

20103400/A

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 22 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

平成 23 (2011) 年 5 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・・・・・・・・・・7
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・・・・・・・・・・17
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 22 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)
総括研究報告書

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

研究代表者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究要旨

化粧品及び医薬部外品は主に皮膚に直接塗布して使用することから、経皮暴露による影響を考慮に入れた品質及び安全性確保が必要である。一次粒子径がナノメートルサイズの微粒子、いわゆるナノ物質であっても原料や製剤中ではナノサイズで存在しないことも多いため、粒度分布など試験時の粒子のキャラクタライゼーションをしておくことは重要である。市販試薬のシリカ粒子はナノサイズで安定して単分散しているが、化粧品原料として使われているシリカは凝集しているものがほとんどであった。ナノ物質の皮膚からの侵入を仮定して、これらに対し細胞の異物認識と抗原提示機能が影響を受けるかどうか調べた。シリカ粒子のヒト単球由来細胞に対する細胞毒性は酸化チタンに比べてやや強く、平均粒子径が小さい方が強く表れた。また、皮膚感作性物質としても知られる硫酸ニッケルの細胞毒性は、シリカナノ粒子が共存した場合、若干強く表れた。シリカナノ粒子は単独で IL-8、RANTES を産生されることから、シリカ粒子がこうしたケモカインやサイトカインを介して皮膚アレルギー性反応の増悪に関与する可能性が示唆された。

傷害皮膚を想定した皮膚モデルとして角層を剥離した *stripped skin*、注射針で皮膚に貫通孔をあけた *needle-punctured skin*、カミソリで皮膚に傷をつけた *razor-treated skin*、さらに健常皮膚モデルとして *intact skin* を用いて、モデル高分子やナノ粒子の皮膚透過性を評価した。酸化チタンのように皮膚に溶解しない物質は、角層を介して皮内に侵入する可能性は低いことが示された。皮膚を貫通した細孔ルートが存在する場合は、ナノ粒子の透過は認められるものの、非貫通部位が存在する場合は、透過は認められず、細孔壁面にとどまると考えられた。酸化チタンのヒト真皮繊維芽細胞とヒト表皮角化細胞に対する細胞障害性および遺伝毒性は粒子表面にコーティングを施すことで軽減した。

以上、角層浸透性や毛孔からの皮内移行性に関する試験方法の確立が、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の評価には必須であると考えられた。ナノ物質は、その材質、サイズともに安全性に影響することが明らかであり、それぞれについて評価する必要があると思われた

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、配合されるナノ物質について評価をすることが重要と考えられる。現在、化粧品や医薬部外品に酸化チタンやシリカ等のナノ物質が配合されている。化粧品は皮膚に直接塗布することから、経皮暴露による安全性を評価することが重要である。ナノ粒子の皮膚透過及び浸透性の解明は化粧品成分としての有用性とともに入体への毒性の観点からも重要視されている。

シリカはファンデーションの体質顔料として、感触向上、滑り感、吸水吸油、毛穴を目立たせなくする効果などをもたせるために配合されている。また、薬剤や香料の除放剤や液状製剤の固形化に用いられる。シリカの形状は不定形あるいは球状で、結晶性があるか否か（非晶質）、更には空隙率等の違いがある。そこで種々のシリカの各種媒体中での粒度分布を測定し、製剤中での存在状態を確認した。次に、ナノ物質が異物として皮膚から浸入したと仮定した場合の影響として、特に、抗原認識反応の一つである皮膚感作性反応に対する効果を、ヒト単球由来細胞を用いて検討した。

健常皮膚モデルとして intact skin を、傷害皮膚を想定した皮膚モデルとして角層を剥離した stripped skin、カミソリで皮膚を傷つけた razor-treated skin、および注射針で貫通孔をあけた needle-punctured skin を用いた。モデルナノ粒子として蛍光標識ポリスチレンビーズ、及びこれと同等の粒子径を有し、平均分子量の異なる水溶性高分子を用いて皮膚透過性を評価した。加えて、角層下に存在する生細胞（ヒト真皮繊維芽細胞とヒト表皮角化細胞）に微粒子酸化チタンを暴露させたときの細胞障害性及び遺伝毒性を評価した。

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

各種シリカ分散液を入手した。試薬グレードのシリカとして、懸濁液は平均一次粒子径 20、50 及び 100 nm の SiO₂ 粒子が水またはエチレングリコール (EG) に懸濁したもの、シリカ粒子は平均一次粒子径 500 nm のものを用いた。化粧品原料グレード (化成品) のシリカとして、親水性フュームドシリカ粒子 (平均一次粒子径 12 nm) を得た。化成品のシリカ懸濁液としては EG に分散する KS-SiO₂EG 及び水に分散する弱アルカリ性の KS-SiO₂WAL、弱酸性の KS-SiO₂WAC) を得た。それらの平均粒子径を動的光散乱法により測定した。シリカナノ粒子を各種媒体に懸濁させたときの粒度分布変化を求めた。

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞浮遊液に各ナノ物質を指定濃度になるよう添加して、24～72 時間培養した。市販キットを用いて ATP 量を測定し、細胞生存率 (%) を求めた。培養上清をビーズアレイ測定キットで処理し、炎症性サイトカイン (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70) 及びケモカイン (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 及び IP-10) をフローサイトメータにより測定した。

B-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

雄性ヘアレスラット (WBM/ILA-Ht) の腹部剃毛皮膚をテープストリッピングにより角層を完全に除去し、更に、注射針で貫通孔を形成させた needle-punctured skin、および剃刀で角層を傷つけた razor-treated skin を作成した。摘出した皮膚を side by side 型拡散セル (有効透過面積 0.95 cm²) に挟み、真皮 (レシーバー) 側に pH7.4 等張リン酸緩衝 (PBS) を 3.0 mL を適用した。角層側には蛍光ポリスチレンビーズ適用し、経時的にレシーバー液から 0.5 mL 経時的にサンプリングし、蛍光分光光度計で測定し、蛍光ポリスチレンビーズ濃度を求めた。また、これらの皮膚に対する FITC-dextran

(FD-4, FD-20, FD-40, FD-70, FD-250, FD-2000)の *in vitro* 皮膚透過性についても同様に蛍光分光光度計で測定して求めた。透過実験終了後、皮膚を凍結包埋し、垂直方向の皮膚凍結切片を作製し、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

種々酸化チタンを 0.01 または 0.1 mg/mL の濃度に培地に分散させ、光動的散乱法により粒子径及びゼータ電位の測定を行った。ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞は 24 穴プレートに入れて 24 時間 pre-incubate し、酸化チタンを加えて 48 時間培養したときの細胞障害性を MTT 染色法により評価した。酸化チタンによる細胞膜障害性は LDH 放出量、炎症作用は IL-1 α 産生量をそれぞれ市販キットで処理し、分光光度計によって求めた。DNA 合成能は細胞の BrdU 取り込み量から、DNA 障害性は comet assay で評価した。

C. 研究結果

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

1-1. シリカの粒度分布

試薬グレードのシリカ懸濁液を希釈して 0.1 及び 1% に希釈した時の平均粒子径はほぼ表示通りの値を示し、ナノサイズで分散していた。シリカ粒子 (SiO₂-500) を水、生理食塩水、EG 及び各種添加剤を加えた溶液に懸濁させたところ、生理食塩水中では平均粒子径が 1000 nm を超えたものの、水や EG には 500 nm 付近の平均粒子径が得られた。化成品シリカ粒子を 0.1% Tween 80 溶液で 0.1% 濃度に超音波処理して懸濁させたときの平均粒子径は 468 nm、EG 液では 210 nm であった。化成品シリカ懸濁液の水希釈液の平均粒子径は 126~140 nm、EG 懸濁液の希釈液の平均粒子径は 371~415 nm となった。

1-2. 細胞毒性

THP-1 細胞の ATP 量を指標として判定した。試薬グレードのシリカはいずれも 1000 μ g/ml で細胞生存率を低下させた。一次粒子径 20 nm

のものは水に分散したもののほうが EG に分散したものより細胞毒性が強かった。50 nm 及び 100 nm のシリカは 1000 μ g/ml でもほとんど細胞毒性はなかった。

THP-1 細胞に各シリカ 100 μ g/ml を加え 24 時間培養した後、種々の濃度の硫酸ニッケルを入れ、更に 24 時間培養した。硫酸ニッケルによる細胞生存率は、SiO₂-500EG を加えて前培養したときと添加せずに前培養したコントロールとで差はなかった。SiO₂-20EG 及び SiO₂-50EG ではコントロールよりも低下した。

1-3. サイトカイン産生

THP-1 細胞にシリカを添加して培養した上清中に検出されるサイトカインは IL-8 のみで、48 時間で一定となった。試験したシリカの中では SiO₂-20W による産生量がコントロールに比べて最も増加した。また、SiO₂-50EG、SiO₂-100EG の方が SiO₂-20EG よりも若干多かった。

ケモカインで検出されるのは IL-8、RANTES 及び IP-10 であった。IP-10 についてはコントロールとシリカを添加したときとで差はなかった。RANTES については IL-8 よりも多量に産生されており、シリカによる産生量の増加傾向は IL-8 と同様であった。シリカによるこれらの産生量は硫酸ニッケルに比べると非常に微量であり、刺激性物質と同等程度であった。

C-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

2-1. 健常皮膚および角層剥離皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験

蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite®) を intact skin および stripped skin に 24 時間適用しても、Fluoresbrite は透過しなかった。Intact skin を介した Fluoresbrite® の Pc 値を算出すると 2.4×10^{-10} cm/s で、これは落屑速度よりも低かった。Stripped skin において、Fluoresbrite® はその皮膚表面と毛嚢中のみ観察された。一方、FDs は intact skin、stripped skin を透過した。特に、Fluoresbrite® と同様な溶質径を有する

FD-2000 できえ各皮膚を透過した。FDs の理論分子径 (d) が増大するにつれて、その stripped skin 透過係数の対数値は減少した。溶質径が 7 nm 以上の FDs の intact skin 透過係数は角層の落屑速度である 1×10^{-9} cm/s 以下であった。Intact skin では FD-40、FD-70 の間で透過係数の上昇がみられた。

2-2. 損傷皮膚を用いた in vitro 皮膚透過実験

Fluoresbrite® は intact skin および stripped skin と同様に razor-treated skin を透過せず、皮膚(傷)表面に観察された。Pc の値を算出すると、 2.4×10^{-10} cm/s であった。一方、needle-punctured skin では Fluoresbrite® は透過した。注射針により皮膚に形成された貫通孔内に Fluoresbrite® が観察された。一方、FDs は razor-treated skin を透過した。さらに、razor-treated skin を介した種々 FDs の透過性は stripped skin と同程度であった。

2-3. 酸化チタンの細胞障害性

培地に分散させた微粒子酸化チタンの粒子径は 300 nm-4000 nm であり、分散媒として DMEM や Humedia-KG2 を用いた時には粒子径が大きくなった。また、ゼータ電位の絶対値が小さくなると、粒子径は大きくなる傾向が見られた。

MTT 試験の結果、酸化チタンの細胞障害性は HDF よりも HEK に強く現れた。HDF と比較して HEK の形状因子 (γ) 値は約 4-7 倍であった。また、NAT の細胞障害性は種々培養細胞に適用した場合、他の微粒子酸化チタンよりも強く現れた。コーティングを施した微粒子酸化チタンではコーティングを施していない TC50 の値が高かった。HEK および HDF の LDH 放出量は 0.10 mg/mL NAT を適用した際に培地適用群と比較してそれぞれ 7 および 3 倍の増加を示し、細胞膜障害性が認められた。更に、粒子表面にコーティングを施すると IL-1 α 放出量が少なくなった。

2-4. 酸化チタンの遺伝毒性

HEK および HDF の DNA 合成量は酸化チタンの適用濃度の増加に伴い減少した。また、

SRT の DNA 合成量の減少が最も少なかった。ルチル型酸化チタンは DNA 障害を引き起こしにくい、アナターゼ型は DNA 障害を引き起こす可能性が示された。

D. 考察

シリカは、表面のシラノール基の処理によって粒子の性質が大きく変わるとされている。動的光散乱法により各媒体に分散したナノ粒子の平均粒子径及び粒度分布を調べた。試薬シリカ懸濁液は単分散しており、in vitro あるいは in vivo でナノサイズの粒子の影響を見る検体として有用と思われた。化成品シリカ懸濁液の平均凝集粒子サイズは 126~140 nm であり、一定の大きさに凝集したシリカが安定に存在していると考えられた。試薬シリカ粒子は、水及び EG には良好に分散させることができたが、親水性の化成品シリカ(一次粒子径 10 nm 程度)については 210~238 nm の凝集体にしかならなかった。化成品シリカ粒子と試薬シリカ粒子では重量当たりの体積も違い、空隙率など大きな差があると思われる。

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に対し、一次粒子径 20 nm の試薬シリカが水に分散したものは EG に分散したものより細胞毒性が強かった。SiO₂-50W 及び SiO₂-100W は 1000 μ g/ml で細胞生存率は 80~90% であった。培養上清中には IL-8、RANTES 及び IP-10 が検出された。SiO₂-20W による産生量がコントロールに比べて最も増加した。IL-8 は感受性を評価する簡便な指標として採用されている。シリカによる IL-8 産生量は皮膚感受性物質の硫酸ニッケルの産生量に比べると非常に少なく、刺激性物質のラウリル硫酸ナトリウムと同程度しかなかった。よって、シリカ自体には皮膚感受性はないと考えられる。シリカはサイトカインの産生を通して免疫機能に影響を与える可能性があり、今後、ナノ物質をアレルゲンと併用して適用し免疫反応性の増強作用があるかどうか検討する必要がある。

蛍光ポリスチレンビーズ Fluoresbrite® は

intact skin、stripped skin 及び razor-treated skin を透過せず、皮膚表面と毛嚢中のみ観察された。一方、FDs は intact skin、stripped skin を透過した。Razor-treated skin を介した種々 FDs の透過性は stripped skin と同程度であった。Fluoresbrite® と FDs の皮膚透過性の違いは、(皮膚細孔を含む) 皮膚への分配性 (溶解性) が大きく寄与していると考えられた。FDs の理論分子径 (d) が增大するにつれて、その stripped skin 透過係数の対数値は減少した。Fluoresbrite® 及び溶質径が 7 nm 以上の FDs の Pc 値は落屑速度よりも低く、角層ルートからのみを透過経路とする場合には皮膚透過および皮膚浸透は生じないと考えることができる。しかしながら、細孔ルートと考えられる毛孔へは移行するため、細孔ルートのサイズによってはナノ粒子が皮膚を透過する可能性があると考えられた。

一方、needle-punctured skin を介する場合、Fluoresbrite® は透過し、用いた注射針の外径が大きくなるにつれて、その透過量は増大した。皮膚垂直切片を見ると画像で注射針により皮膚に形成された貫通孔内に Fluoresbrite® が観察された。このため、Fluoresbrite® は注射針により形成された貫通孔 (細孔ルート) を透過していると考えられた。また、皮膚に損傷を負っていても傷が貫通していなければナノ粒子は皮膚を透過しないことがわかった。

酸化チタンは培地で凝集し、ゼータ電位の絶対値が小さく、すなわち、粒子同士の静電反発が低下すると、凝集を起し粒子径は大きくなる傾向が見られた。酸化チタンの細胞障害性は HDF よりも HEK に強く現れた。細胞の感受性の違いや酸化チタンの取り込み量の違いに起因していると考えられる。HDF と比較して HEK の形状因子 γ 値は約 4-7 倍であることから、表皮は真皮よりも酸化チタンによる細胞障害性に注意する必要があると考えられた。NAT の細胞障害性は、他の微粒子酸化チタンよりも強く現れた。この原因として、NAT から生成される活性酸素種の量が多いことに起因していると思われる。粒子にコーティングを施すこ

とで細胞障害性は軽減できると考えられた。

酸化チタンは粒子として核に侵入し DNA 合成を阻害する可能性あること、また、活性酸素を生成し、ピリミジン塩基およびプリン塩基を部分的に切断することにより、DNA や RNA の分解を起こすことが知られている。本試験でも皮膚細胞の DNA 合成量は酸化チタンを適用すると減少した。よって、酸化チタンが皮膚浸透した場合、表皮および真皮の皮膚修復能が低下することが示唆される。しかし、酸化チタンの結晶形、表面コーティングを変えることによってこの作用は軽減・抑制されることがわかった。ルチル型の微粒子酸化チタンは DNA 障害を引き起こしにくい、アナターゼ型は DNA 障害を引き起こす可能性が示された。この原因として、酸化チタンより生成される活性酸素が考えられた。

E. 結論

種々の一次粒子径をもつシリカ粒子の細胞傷害性とサイトカイン産生能を調べ、それらの関連性を検討した。シリカ粒子のヒト単球由来細胞に対する細胞毒性は酸化チタンに比べてやや強く、平均粒子径が小さい方が強く表れた。シリカナノ粒子は IL-8、RANTES を産生させた。サイトカイン産生量と細胞毒性との間には明確な相関性は認めなかった。シリカ自体の皮膚感受性はないが、こうしたケモカインを介して他の物質による皮膚アレルギー性反応の増悪に関与する可能性が示唆された。シリカといっても様々な特性があることから、キャラクタライゼーションし、その影響を評価することが必要と思われた。

酸化チタンのように皮膚に溶解しない物質は、角層を介して皮内に侵入する可能性は低いことが示された。皮膚を貫通した細孔ルートが存在する場合は、ナノ粒子の透過は認められるものの、貫通していない場合、透過は認められず、細孔壁面にとどまると考えられた。損傷皮膚に酸化チタンを使用する際は細胞障害性があり注意が必要であるが、適切な結晶形を選択

し、表面にコーティングを施すことで毒性は軽減した。角層浸透性や毛孔からの皮内移行性に関する試験方法の確立が、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の評価には必須であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T.: Effects of coating materials and size of titanium dioxide particles on their cytotoxicity and penetration into the cellular membrane. *J. Toxicol. Sci.*, **36**, 95-100 (2011)
- 2) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F, Ikarashi Y., Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1394-1399 (2010)

2. 学会発表

- 1) 五十嵐良明、瀧田葉子、相場友里恵、小濱とも子、内野 正、西村哲治. 反復経皮投与したナノサイズ酸化チタンの吸収性及び毒性について. 日本薬学会第 130 年会. 2010 年 3 月
- 2) 五十嵐良明、相場友里恵、内野 正、西村哲治. 酸化チタンナノ粒子のラット皮膚透過性. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会. 2010 年 7 月
- 3) Y. Ikarashi, Y. Aiba, Y. Takita, T. Uchino and T. Nishimura. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after repeated dermal exposure. XII International Congress of Toxicology, July 2010
- 4) Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Obama, T., Sugimoto, N., Hirose, A., Ikarashi, Y. Bio-distribution of the fullerenes intravenous

administrated. 2010 Annual meeting of the Korean Society of Environmental Health and Toxicology, November 2010

- 5) 木村恵理子、高坂美加、河野雄一郎、藤堂浩明、五十嵐良明、杉林堅次. 皮膚適用した微粒子酸化チタンの安全性. 日本薬剤学会第 25 年会. 2010 年 5 月
- 6) 河野雄一郎、木村恵理子、藤堂浩明、五十嵐良明、杉林堅次. 皮膚に暴露されるナノマテリアルの皮膚浸透の可能性;何コの粒子が皮膚に侵入・透過するか?. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 2010 年 10 月
- 7) 高坂美加、河野雄一郎、木村恵理子、藤堂浩明、五十嵐良明、杉林堅次. 微粒子酸化チタンの安全性評価. 日本薬学会第 131 年会. 2011 年 3 月
- 8) 河野雄一郎、高坂美加、木村恵理子、藤堂浩明、五十嵐良明、杉林堅次、ナノ粒子の皮膚透過性評価. 第 131 年会日本薬学会. 2011 年 3 月
- 9) 木村恵理子、河野雄一郎、高坂美加、藤堂浩明、杉林堅次. ナノ粒子の皮膚浸透性と安全性. 日本薬学会第 131 年会. 2011 年 3 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

II. 分担研究報告

平成 22 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 生活衛生化学部 室長

研究要旨

化粧品及び医薬部外品は主に皮膚に直接塗布して使用することから、経皮暴露による影響を考慮に入れた品質及び安全性確保が必要である。一次粒子径がナノメートルサイズの微粒子、いわゆるナノ物質であっても原料や製剤中ではナノサイズで存在しないことも多く、表れた結果がそのナノサイズと相関するものかどうかは、試験時の粒度分布などを調べておくことが重要である。本年度は、化粧品によく用いられているシリカを対象とした。種々の一次粒子径をもつシリカ粒子の細胞傷害性とサイトカイン産生能を調べ、それらの粒子分布との関連性を検討した。更に、これらの結果を酸化チタンとの結果と比較した。シリカについては実製品仕様の原料グレードものと試薬グレードのものでは粒度分布の違いが認められた。試薬グレードのシリカ粒子はナノサイズで安定して単分散しているが、化粧品原料シリカはナノサイズのものほとんど認めなかった。ナノ物質が異物として皮膚から浸入したと仮定した場合の影響として、特に、抗原認識反応の一つとして皮膚感作性反応に対する効果を検討した。まず、シリカ粒子のヒト単球由来細胞に対する細胞毒性を細胞内 ATP 量により求めた。シリカ粒子の細胞毒性は酸化チタンに比べてやや強く、平均粒子径が小さい方が強く表れた。シリカナノ粒子の他成分の細胞毒性に対する増強効果の有無を調べた。皮膚感作性物質としても知られる硫酸ニッケルの細胞毒性は、シリカナノ粒子が共存した場合、若干強く表れた。シリカナノ粒子は単独で単球由来細胞から若干の炎症性サイトカイン IL-8 を産生した。同時にケモカイン RANTES も産生されることから、シリカ粒子がこうしたケモカインやサイトカインを介して皮膚アレルギー性反応の増悪に関与する可能性が示唆された。このような反応は酸化チタンでは認めなかった。以上、ナノ物質は材質とサイズともに安全性に影響することが明らかであり、ナノ成分それぞれについて評価する必要があると思われた。

A. 研究目的

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、配合されるナノ物質について評価をすることが重要と考えられる。シリカは水や各種有機溶媒に不溶な合成無機物質である。シリカの形状は不定形あるいは球状で、結晶性があるか否か（非晶質）、更には空隙率等の違いがあり、それぞれの特性に基づいた粉末が食品や工業用粉末の流動性の向

上、医薬品の製造助剤、化粧品のエマルジョン安定剤として添加される。シリカを強熱して二酸化ケイ素 (SiO_2) を 96.0%以上含むようなものが化粧品では用いられている。シリカはファンデーションの体質顔料として、感触向上、滑り感、吸水吸油、毛穴を目立たせなくする効果などをもたせるために配合されている。また、薬剤や香料の除放剤や液状製剤の固化化に用いられる。更に、ハミガキの研磨剤としても使用される。ファンデーション等に用いられているシリカはナノサイズ (1~100 nm) であり、酸化チタンと同様に代表的なナノ物質として知られている。本年度はシリカを対象ナノ物質とした。種々のシリカの各種媒体中での粒度分布を測定し、製剤中での存在状態を確認した。次に、ナノ物質が異物として皮膚から浸入したと仮定した場合の影響として、特に、抗原認識反応の一つである皮膚感作性反応に対する効果を検討した。シリカ粒子のヒト単球由来細胞に対する細胞毒性を求め、他成分の細胞毒性に対する増強効果の有無を調べた。更に、細胞のサイトカイン産生量を測定し、シリカ粒子が感作性反応に及ぼす影響について考察した。

B. 研究方法

1. 材料及び試薬

試薬グレードのシリカとして、Johnson Matthey社 Alfa Aesarのシリカ懸濁液を用いた。このシリカ懸濁液は平均一次粒子径 20、50 及び 100 nm の SiO_2 粒子が水またはエチレングリコール (EG) に懸濁したもので、以下それぞれを SiO_2 -20W、 SiO_2 -20EG、 SiO_2 -50EG、 SiO_2 -100EG と記載した。それぞれの性状を表 1 に示した。また、試薬グレードのシリカ粒子として平均一次粒子径 500 nm のもの (SiO_2 -500) を用いた。化粧品原料グレード (化成品) のシリカとして、親水性フュームドシリカ粒子 (KF- SiO_2 , 平均一次粒子径 12 nm) を得た。化成品のシリカ懸濁液としては EG に分散する KS- SiO_2 EG 及び水に分散する弱アルカリ性の KS- SiO_2 WAL、弱酸性の

KS- SiO_2 WAC) を得た。比較ナノ物質として、一次粒子径 35 nm の表面処理していないルチル型酸化チタン (TiO_2 -B)、またはシリコンで表面処理した酸化チタン (TiO_2 -SAS) の水分散液を用いた。

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%、2-mercaptoethanol 55 nmol/ml 及び 1% antibiotic-antimycotic mixture (Invitrogen 社) を含有した RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) を用いた。

3. 粒度分布の測定

シリカの濃度が 0.1% または 1% になるようにそれぞれ水、及びリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2) で希釈して vortex mixture で 1 分間攪拌、または超音波洗浄器 (出力 200W) で処理した後、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) で粒度分布を測定した。

4. 細胞毒性試験

24 穴プレートの各穴に、THP-1 細胞浮遊液 (0.4×10^6 cells) を入れ、各ナノ物質を指定濃度になるよう添加して、24~72 時間培養した。細胞浮遊液を PBS で 100 倍希釈し、これについて市販キットを用いて ATP 量を測定した。すなわち希釈細胞浮遊液 100 μl を ATP 抽出液 100 μl と混合後、20 秒間静置した。発光試薬 100 μl 加え、すばやくルミノメーターを用いて 10 秒間の発光量 (RLU) を読みとり ATP 量とした。試験物質添加群のコントロールに対する比を細胞生存率 (%) とした。

5. サイトカイン産生

4 を試験した残りの細胞浮遊液をとり、3000 rpm で 10 分間遠心して上清を得た。上清を BD Cytometric Bead Array (CBA) human inflammatory cytokine kit または chemokine kit (BD Biosciences) で処理し、BD FACSAarray によって炎症性サイトカイン (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70) 及びケモカイン (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 及び IP-10) を測定した。

C. 研究結果

1. シリカの粒度分布

試薬グレードのシリカ懸濁液を、シリカの濃度が 0.1% または 1% になるように希釈して vortex mixture で 1 分間攪拌したのち、粒度分布を測定した。シリカ濃度が 0.1 及び 1% であっても得られた粒度分布に差はなかった。図 1 には 1% に希釈した各シリカ懸濁液の粒度分布と平均粒子径を示した。SiO₂-20W (20 nm、水) を水 (赤線) で希釈したときのシリカ粒子の平均粒子径は 44 nm、PBS (黄緑線) で希釈したときも 42 nm であった。SiO₂-50EG 及び SiO₂-100EG についても同様に希釈、処理後測定したときも表示に近い平均粒子径の値が得られた。超音波洗浄器で 5 分間処理した場合も、同レベルの粒子径と分布を保持していた。

試薬グレードのシリカ粒子 (SiO₂-500) を水、生理食塩水、EG 及び各種添加剤を加えた溶液に懸濁させた。生理食塩水中では平均粒子径が 1000 nm を超えたものの、水や EG には 500 nm 付近の平均粒子径が得られた (図 2)。生理食塩水に Tween 80 を添加した媒体ではシリカ粒子の凝集が若干改善された。

化粧品原料グレード (化成品) の KF-SiO₂ を EG または 0.1% Tween 80 溶液で 0.1% 濃度に調製し 5 分間超音波処理した後、粒度分布を測定した。KF-SiO₂ の平均粒子径は 0.1% Tween 80 溶液中で 468 nm、EG 液では 210 nm であった (図 3)。

化成品のシリカ懸濁液を水または生理食塩水で希釈したときの粒度分布を図 4 に示した。水懸濁液について平均粒子径は 126~140 nm と、希釈液による差及び液性による差はほとんどなかった。EG 懸濁液の希釈液の平均粒子径は 371~415 nm となった。

2. 細胞毒性

免疫機能に及ぼす影響を in vitro で評価するための基礎的検討として、ナノ物質の細胞毒性を調べた。アレルギーの感作誘導期の抗原提示作用を模倣する試験系で使用されるヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を用い、ATP 量を指標

として判定した。試薬グレードのシリカはいずれも 1000 µg/ml で細胞生存率を低下させた。一次粒子径 20 nm のものは水に分散したものが EG に分散したものより細胞毒性が強かった。SiO₂-50W 及び SiO₂-100W は 1000 µg/ml で細胞生存率は 80~90% で、酸化チタンはこの濃度ではほとんど細胞毒性はなかった (図 5)。

シリカが硫酸ニッケルの細胞毒性に影響を及ぼすかどうか検討した。THP-1 細胞に各シリカ 100 µg/ml を加え 24 時間培養した後、種々の濃度の硫酸ニッケルを入れ、更に 24 時間培養した。硫酸ニッケルによる細胞生存率は、SiO₂-500EG を加えて前培養したときと添加せずに前培養したコントロールとで差はなかった。SiO₂-20EG 及び SiO₂-50EG ではコントロールよりも低下した (図 6)。

3. サイトカイン産生

THP-1 細胞にシリカを添加して培養した上清中の炎症性サイトカインを図 7 に示した。検出されるサイトカインは IL-8 のみで、24 時間よりは 48 時間培養したときに産生量が多いが、更に 72 時間まで培養時間を長くしても産生量に変化はなかった。試験したシリカの中では SiO₂-20W による産生量がコントロールに比べて最も増加した。また、SiO₂-50EG、SiO₂-100EG の方が SiO₂-20EG よりも若干多かった。

ケモカインについて同様に測定したところ、検出されるのは IL-8、RANTES 及び IP-10 であった。IP-10 についてはコントロールとシリカを添加したときとで差はなかった。RANTES についてはコントロールにおいても IL-8 よりも多量に産生されており、シリカによる産生量の増加傾向は IL-8 と同様であった (図 8)。しかし、皮膚感作性物質の硫酸ニッケルによる IL-8 の産生量に比べると非常に微量であり、刺激性物質のラウリル硫酸ナトリウムと同等程度であった (図 9)。

D. 考察

粒子径の異なる試薬及び化成品シリカ懸濁

液を各種媒体で希釈した後、動的光散乱法により粒子径を調べた。試薬シリカ懸濁液はラベル表示とほぼ一致した平均粒子径を示し、単分散していることがわかった。本試薬は *in vitro* あるいは *in vivo* で試験する段階でもナノサイズで存在すると予想され、ナノサイズの粒子の影響を見る検体として有用と思われた。化成品シリカ懸濁液のラベル表示では平均凝集粒子サイズ(d-50 値)が 100~120 nm とあり、検査で得られた値は 126~140 nm でほぼ一致した。このシリカの一次粒子径は不明であるが、粒度分布の形から 10~数十 nm と考えられる。これらの化成品は、一定の大きさに凝集したシリカが安定に存在していると予想した。EG に分散している化成品シリカの凝集粒子径は 200 nm と表示されているが、水や生理食塩水で希釈するといずれも水に分散しているものよりも粒度分布の幅が広がった。シリカ表面のシラノール基の処理によって粒子の性質が大きく変わるとされている。細胞培養のような水溶液で試験する場合には、水溶液に懸濁しているシリカを用いた方がナノサイズの影響を見る上では適しており、EG に懸濁するようなシリカではナノサイズとしての効果は出にくく、バルクサイズのものと同様の反応が出る可能性がある。

シリカ粒子から懸濁液を自家調製する場合は、試薬シリカ粒子 (SiO₂-500) については、水及び EG には良好に分散させることができた。親水性の化成品シリカ (一次粒子径 10 nm 程度) については各種媒体を検討したが、二次平均粒子径は 210~238 nm にしか小さくならなかった。化成品シリカ粒子は SiO₂-500 よりも重量当たりの体積が大きいことから空隙率など大きな差があると思われる。

感作誘導期の抗原提示作用を模倣する試験系で使用されるヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を用い、試薬シリカの細胞毒性を判定した。一次粒子径 20 nm のものは水に分散したものが EG に分散したのものより細胞毒性が強かった。SiO₂-50W 及び SiO₂-100W は 1000 µg/ml で細胞生存率は 80~90%で、酸化チタン

はこの濃度ではほとんど細胞毒性はなかった。培養上清中に検出される炎症性サイトカインは IL-8 のみで 48 時間で一定に達した。ケモカインで検出されるのは IL-8、RANTES 及び IP-10 であった。試験したシリカの中では SiO₂-20W による産生量がコントロールに比べて最も増加した。また、SiO₂-50EG、SiO₂-100EG の方が SiO₂-20EG よりも若干多かった。THP-1 細胞を用いた *in vitro* の皮膚感作性試験では、感作性物質を暴露すると IL-8 が産生されることから、感作性を評価する簡便な指標として採用されている。今回シリカによる IL-8 産生量は皮膚感作性物質の硫酸ニッケルの産生量に比べると非常に少なく、刺激性物質のラウリル硫酸ナトリウムと同程度しかなかった。よって、シリカ自体には皮膚感作性はないと考えられる。また、細胞毒性の強度と IL-8 の産生量との間には明確な相関性は認めなかったことから、本サイトカインは細胞毒性に寄与するものではないと考えられる。IL-8 産生は単球活性化によるものとする、シリカはサイトカインの産生を通して免疫機能に影響を与える可能性がある。今後、ナノマテリアルを他のアレルギー性物質と併用したときのケモカイン産生について検討し、ナノマテリアルの免疫反応性の増強作用の有無を確認する必要がある。

E. 結論

種々の一次粒子径をもつシリカ粒子の細胞傷害性とサイトカイン産生能を調べ、それらの粒子分布との関連性を検討した。シリカ粒子のヒト単球由来細胞に対する細胞毒性は酸化チタンに比べてやや強く、平均粒子径が小さい方が強く表れた。硫酸ニッケルの細胞毒性は、シリカナノ粒子が共存した場合、若干強く表れた。シリカナノ粒子は単独で単球由来細胞から若干の炎症性サイトカイン IL-8 を産生した。同時にケモカイン RANTES も産生した。各サイズのシリカについて、サイトカイン産生量と細胞毒性との間には明確な相関性は認めなかった。シリカ自体のサイトカイン産生量から見て

皮膚感作性はないと考えられるが、こうしたケモカインやサイトカインを介して他の物質による皮膚アレルギー性反応の増悪に関与する可能性が示唆された。試薬グレードのシリカ粒子はナノサイズで安定して単分散しているが、化粧品原料シリカはナノサイズのものほとんど認めないように、シリカといっても様々な特性を有する。細胞に対する反応は、一般的なシリカの作用として捉えるのではなく、キャラクタライゼーションした上でその性質のシリカの効果として捉えることが必要と思われる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T.: Effects of coating materials and size of titanium dioxide particles on their cytotoxicity and penetration into the cellular membrane. J. Toxicol. Sci., 36, 95-100 (2011)

2. 学会発表

1) 五十嵐良明、瀧田葉子、相場友里恵、小濱とも子、内野 正、西村哲治. 反復経皮投与したナノサイズ酸化チタンの吸収性及び毒性について. 日本薬学会第 130 年会. 2010 年 3 月
2) 五十嵐良明、相場友里恵、内野 正、西村哲治. 酸化チタンナノ粒子のラット皮膚透過性. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会. 2010 年 7 月

3) Y. Ikarashi, Y. Aiba, Y. Takita, T. Uchino and T. Nishimura. Tissue distribution and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after repeated dermal exposure. XII International Congress of Toxicology, July 2010

4) Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Obama, T., Sugimoto, N., Hirose, A., Ikarashi, Y. Bio-distribution of the fullerenes intravenous

administrated. 2010 Annual meeting of the Korean Society of Environmental Health and Toxicology, November 2010

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

表 1. 試験に用いた試薬グレードシリカの性状

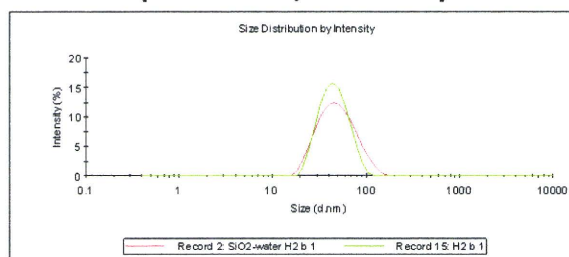
(a) 試薬グレード

	SiO ₂ -20W	SiO ₂ -20EG	SiO ₂ -50EG	SiO ₂ -100EG
Particle size	20 nm	20 nm	50 nm	100 nm
Particle charge	(-)			
Density	1.3	1.3	1.3	
Solvent	H ₂ O	Ethylene glycol	Ethylene glycol	Ethylene glycol
Concentration (%)	40	30	30	30
Viscosity (cps)	13	85	60	60
pH	10	6	3	3

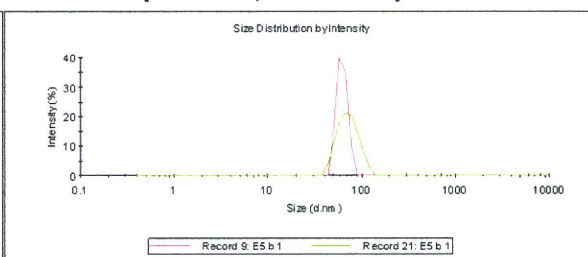
(b) 化粧品原料グレード

	KS-SiO ₂ EG	KS-SiO ₂ WAL	KS-SiO ₂ WAC
Mean aggregate size (d-50 value) (nm)	200	120	100
Solvent	Ethylene glycol	Water	Water
SiO ₂ content (wt%)	20	20	12
Stabilizing agent		Ammonia	Ammonia
pH	3.0	9.5-10.5	5.0-7.0

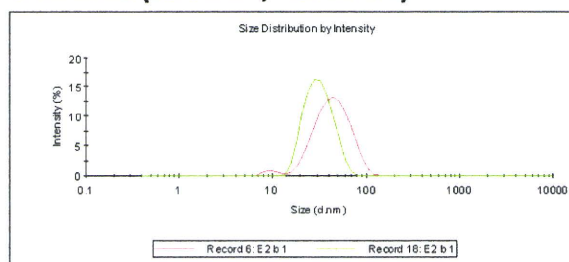
SiO₂-20W (water 44 nm, PBS 42 nm)



SiO₂-50EG (EG 78nm, PBS 69 nm)



SiO₂-20EG (EG 38 nm, PBS 29 nm)



SiO₂-100EG (EG 105 nm, PBS 98 nm)

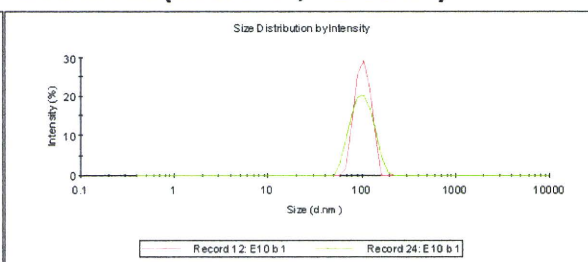
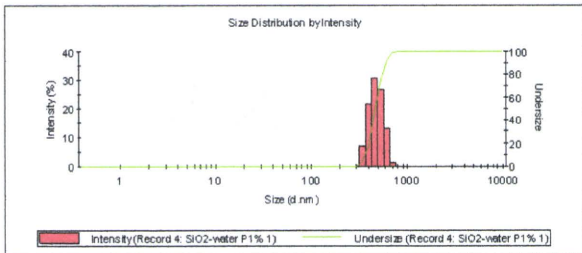
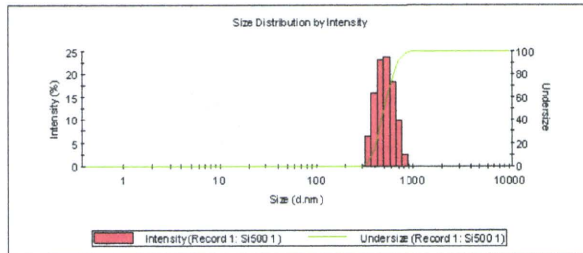


図 1. 各種媒体に希釈した試薬シリカ懸濁液の粒度分布

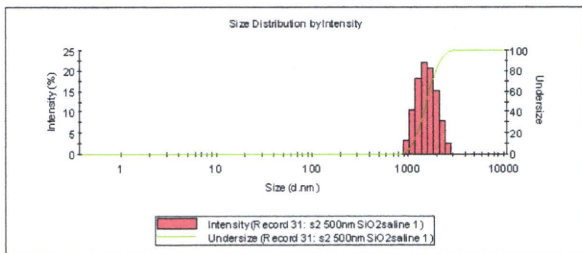
in water (477 nm)



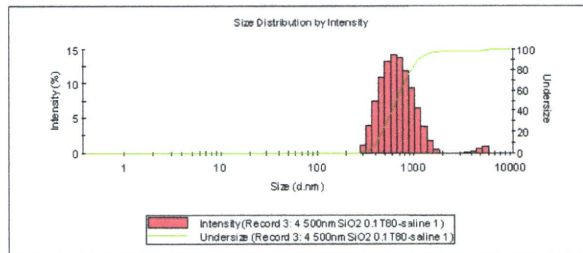
in 0.1% Tween 80-water (501 nm)



in saline (1717 nm)



in 0.1% Tween 80-saline (637 nm)



in EG (561 nm)

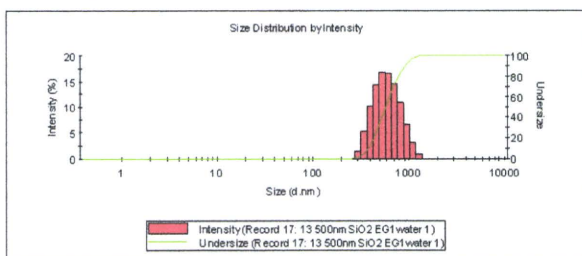
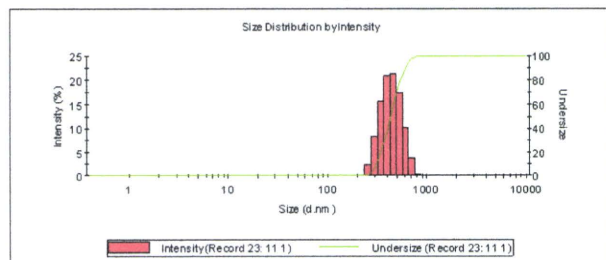


図 2. 試薬グレードシリカ (SiO₂-500) の各種媒体中での粒度分布

in 0.1% Tween 80-water (468 nm)



in EG (210 nm)

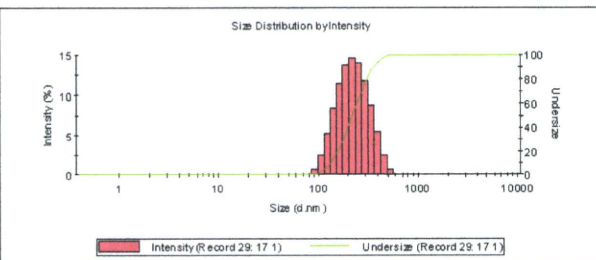


図 3. 化成品シリカ (KF-SiO₂) の各種媒体中での粒度分布

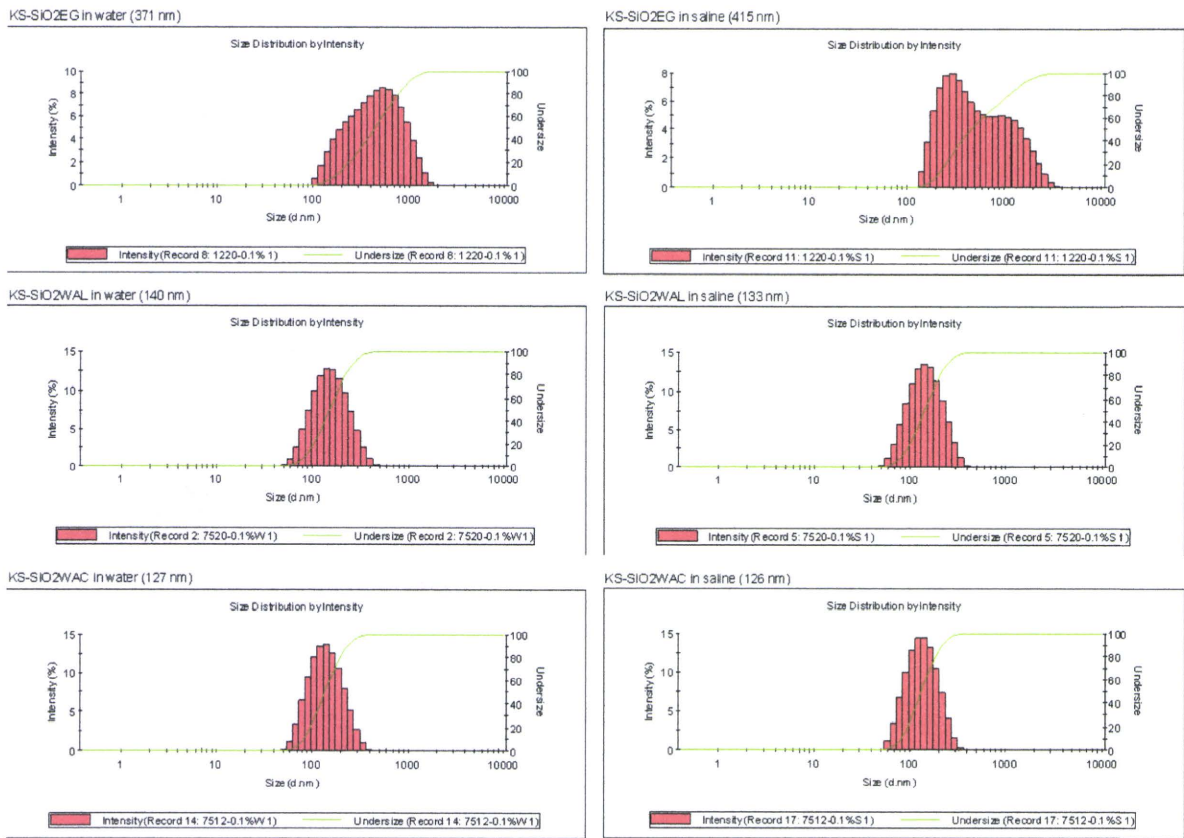


図 4. 各種化成品シリカ懸濁液を水または生理食塩水で希釈したときの粒度分布

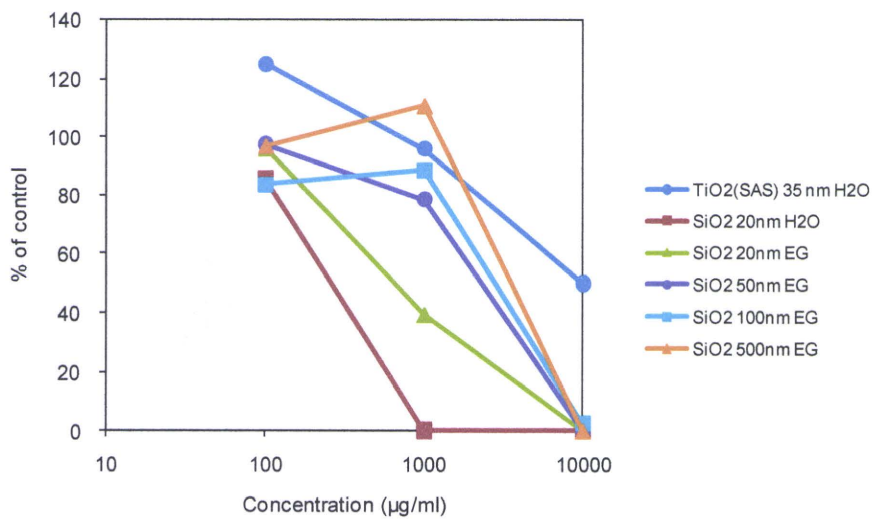


図 5. 試薬シリカの細胞毒性

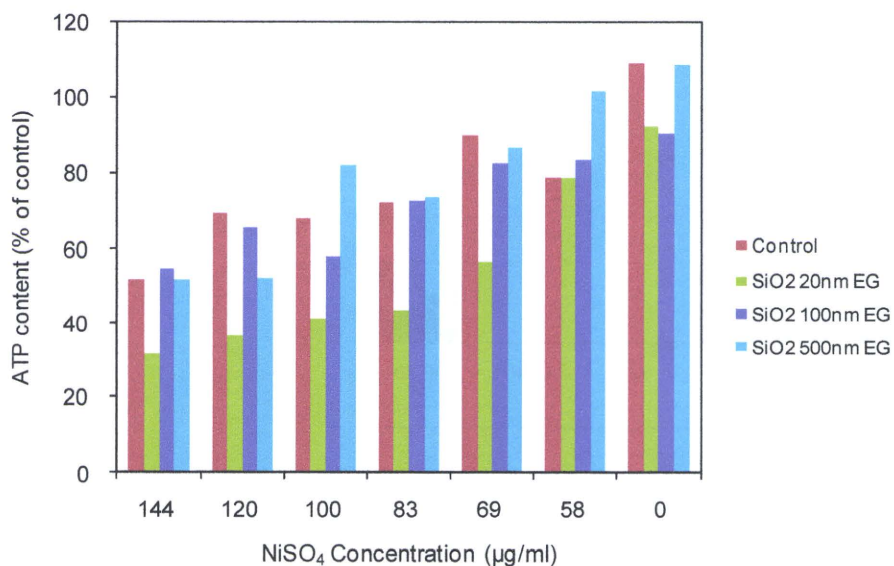


図 6. 試薬シリカ共存下での硫酸ニッケルの細胞毒性

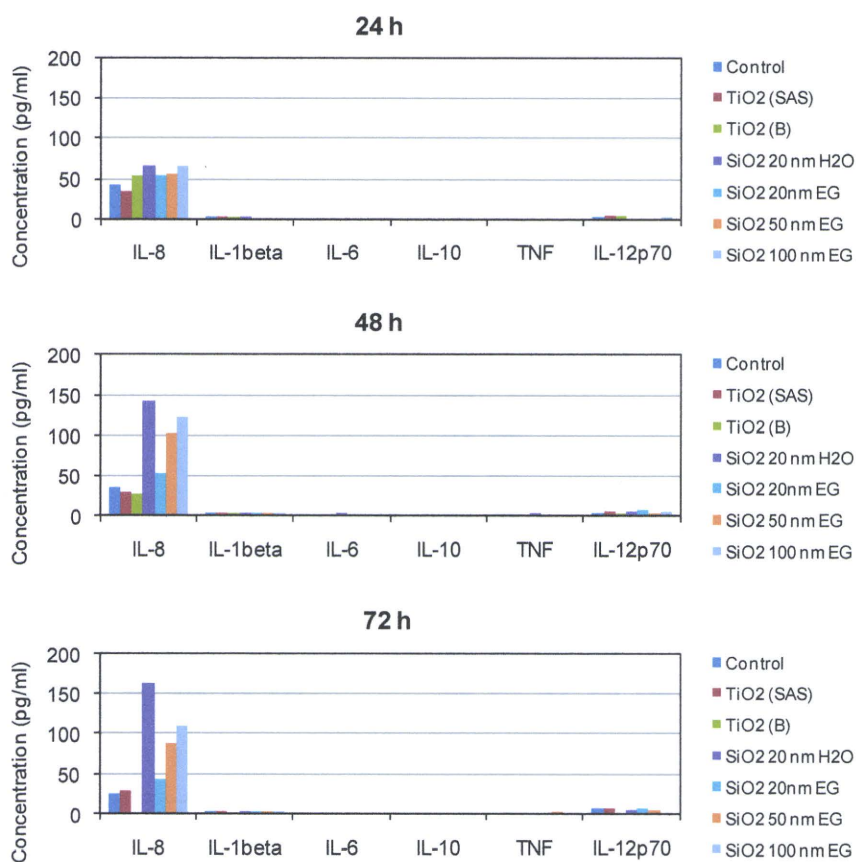


図 7. シリカの炎症性サイトカイン産生能

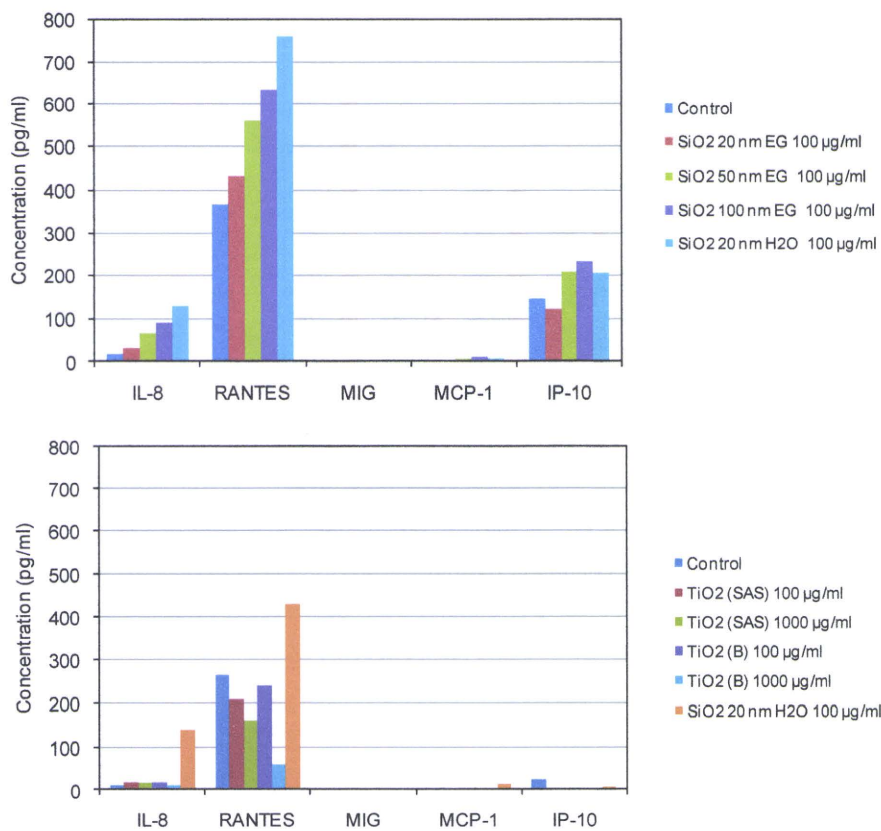


図 8. シリカのケモカイン産生能

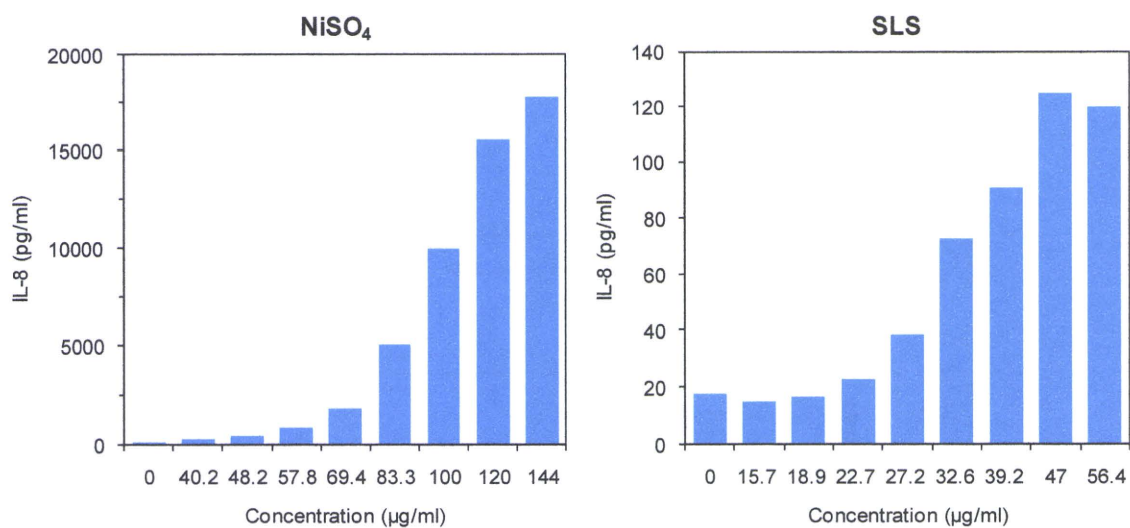


図 9. 硫酸ニッケル及びラウリル硫酸ナトリウムによる IL-8 産生