

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)
分担 研究年度終了報告書

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

微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

分担研究者 杉林 堅次 城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 教授

研究要旨：ナノマテリアルは医薬品、食品、化粧品、化成品、その他様々な分野に応用され、新たな産業発展にとって重要な新素材である。その中でも、化粧品は微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛などのナノ粒子を含む製品が多くあり、皮膚に直接塗布して使用する。また、化成品は塗料や光触媒作用を目的としたナノ粒子を含む製品が皮膚に接触する可能性がある。これらのことから、経皮暴露を想定したナノ粒子の安全性評価が大変重要である。そこで、ナノ粒子が皮膚を透過するかどうかを検討する必要性があり、もしナノ粒子が皮膚に浸透する、もしくは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障害性や毒性も評価する必要がある。

本研究では、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、さらに健全皮膚モデルとして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。また、角層下に存在する生細胞に微粒子酸化チタンを直接暴露させたときの細胞障害性と遺伝毒性について、ヒト真皮繊維芽細胞とヒト表皮角化細胞を用いて評価した。

A. 研究目的

ナノマテリアルの多くは人々の生活を豊かにしている。ナノ粒子は少なくとも一方向の長さが概ね 1-100 nm の粒子と定義されている¹⁾。ナノサイズの粒子は表面積が大きく、物理化学的性質が通常サイズの粒子と異なることから、有害性が現れるとの報告もある^{2),3)}。それらが毒性を示すかまたは安全であるかについて様々な議論がなされている^{4),5)}。

現在、ナノマテリアルの中で、使用量の多いのが、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含まれている微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛等である。そのため、これらのナノ粒子を曝露する可能性がある産業従事者や、製品を使用する生活者に対して安全性の保証をする必要がある。

近年、ようやくナノ粒子の安全性評価を目的とした曝露試験が盛んに行われるようになった。ナノ粒子を最も多く用いている商品は化粧品であり、皮膚に直接塗布することから、経皮曝露による安全性を評価することは大変重要である。ナノ粒子の皮膚透過・浸透性は化粧品としての有用性だけでなく、生体への毒性の観点からも非常に重要視されるようになり、ナノ粒子の皮膚透過・浸透の可能性および透過・浸透ルートの解明は急務であると考えられる。そこで、本研究では、健全皮膚モデルとして 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 を作成した。一方、ナノ粒子の分散モデルとして、容易に定量・観察

が可能な蛍光標識したポリスチレンビーズを用いた。ポリスチレンビーズと同等の溶質粒子径を有し、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曝露させたときの細胞障害性を MTT アッセイ、細胞膜障害性を LDH 放出量測定法、炎症反応性を IL-1 α 濃度の測定により評価した。また、DNA 合成に及ぼす影響を BrdU 測定、DNA 障害性を遺伝毒性試験 comet assay により評価した。なお、工業的に使用されている微粒子酸化チタンの結晶形には主にルチル型とアナターゼ型が存在するため、実験にはそれぞれの結晶形を用いた。なお、ルチル型は化粧品に、アナターゼ型は光触媒を有するコーティング剤として汎用されている。

B. 皮膚透過について

B-1 物質の皮膚透過ルートについて：物質の皮膚透過ルートには角質細胞間隙や細胞内を経由する「角層実質ルート」と毛嚢や汗腺を経由する「付属器官ルート」がある⁷⁾。「角層実質ルート」は多くの物質の主な透過経路と考えられている。これは、「付属器官ルート」である汗腺や毛孔が皮膚全体の 0.1% の面積しか有さないためである。しかし、高分子やイオン性物質などの皮膚透過性が著しく低い物質の主な皮内侵入ルートは、毛孔などの付属器官との報告がある^{7),8)}。

B-2 物質透過膜について：物質透過膜には 3 種類ある。1 つ目は溶解拡散膜であり、

膜に溶解する物質のみが透過する。代表的な例としてシリコン膜が挙げられる。2つ目は細孔透過膜であり、分散媒で満たされた膜の細孔を物質が拡散し、透過する。例としては透析膜が挙げられる。3つ目は溶解拡散膜と細孔透過膜の複合膜と考えることができ、皮膚はこの複合膜である。皮膚を介した物質の透過は主に溶解・拡散現象であるため、溶解拡散膜に溶解する物質のみが皮膚を透過すると考えられる。最近では、毛孔が水溶性物質や高分子化合物の皮膚透過ルートとして重要であるという報告が多くある⁹⁾。毛孔は細孔透過膜の細孔ルートと仮定できる。実際には、毛孔は皮膚を貫通していないため、毛孔に移行した物質はその後、皮膚に溶解・拡散し皮膚を透過すると考えられる。

B-3 物質の「角層実質ルート」を介した浸透性：角層は部位によって異なるが、約20層の角質細胞層から成り、約20 μmの厚みがある。角層は最外層から1日1層ずつ剥がれる（落屑する）ため落屑速度 (P_{des}) は1 μm/day、すなわち約 1×10^{-9} cm/s となる。これ以下の透過係数 (permeability coefficient, P , cm/s) を示す物質は、丸1日かかってようやく角層2層目直前に移行したとしても、このとき物質が移行した部分(1層目)が体から剥がれるため¹⁰⁾、「角層実質ルート」を介しては角層下層に移行しないと考えられる。ここで、 P と P_{des} の大小関係から、① $P - P_{des} \gg 0$ のとき物質は皮内に浸透し、皮内から全身循環系へ移行する、② $P \ll P_{des}$ のとき皮膚に移行し浸透するが、全身

循環系へは移行しない(皮膚浸透の程度を評価する必要がある)③ $P - P_{des} \ll 0$ のとき皮膚へ移行せず皮膚浸透は生じない、と分類・仮定することができる。

C. 解析

C-1 物質の透過係数の算出法：物質は、皮膚(角層)中に生じる物質の濃度勾配に従って拡散・透過する。単位面積あたりの物質の定常状態皮膚透過速度 (dQ/dt) は、Fickの拡散式から(1)、(2)式により表現される。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{C_d K D}{L} \quad (1)$$

$$P = \frac{K D}{L} \quad (2)$$

ここで、 C_d は適用物質濃度、 K は物質の皮膚バリアー/基剤分配係数、 D は物質の皮膚バリアー中拡散係数、 L は皮膚バリアーの厚み、 P は物質の透過係数である。一方、適用した物質の皮膚透過が一定時間経過後でも認められない場合は、適用物質濃度、レシーバー容量、有効透過面積、適用時間および各物質の定量限界濃度を用いて P_c を算出した。

$$P_c = \frac{C_{min} V}{A T C_0} \quad (3)$$

ここで、 P_c は計算より求められた最大透過係数、 C_{min} は定量限界濃度、 V はレシーバー容量、 A は有効透過面積、 T は適用時間、 C_0 は適用濃度を示す。

C-2 細胞障害性の評価：微粒子酸化チタンによる障害性を評価するために式(4)より死細胞率を算出した。

死細胞 (%)

$$= 100 - \left(\frac{\text{吸光度}(\text{sample}570\text{nm} - \text{sample}650\text{nm})}{\text{吸光度}(\text{control}570\text{nm} - \text{control}650\text{nm})} \times 100 \right) \quad (4)$$

各適用濃度から得られた死細胞率から Sigmoid E_{\max} model (5) 式に非線形最小二乗法を用いてフィッティングし、(5) 式中の各パラメーターを算出した。

$$T = \frac{T_{\max} \times C^{\gamma}}{TC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}} \quad (5)$$

なお、 T_{\max} は最大細胞毒性 (死細胞率、%)、 C は種々微粒子酸化チタン濃度、 TC_{50} は 50% 毒性濃度、および γ は形状因子を示している。

D. 研究方法

D-1 試薬: Fluorescein isothiocyanate-dextran

(FITC-dextran, average molecular weight, 3.38, 21.2, 35.6, 69.8, 250, 2000 kDa ; それぞれ FD-4, FD-20, FD-40, FD-70, FD-250, FD-2000 と略す) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U. S. A.) より購入した。蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite® yellow green microspheres) (一次粒子径 ; 50 nm) は Polysciences Inc. (PA, U.S.A.) から購入した。また、ルチル型のシリカ処理微粒子酸化チタン (MT-100WP, SRT)、ルチル型の無処理微粒子酸化チタン (MT-150AW, NRT)、ルチル型の水酸化アルミニウム処理微粒子酸化チタン (ART)、およびアナターゼ型の無処理微粒子酸化チタン (AMT-100, NAT) はテイカ株式会社 (大阪) より供給された。3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 試薬は Sigma-Aldrich より購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級品を精製せず

に用いた。

D-2 実験動物 : 雄性ヘアレスラット

(WBM/ILA-Ht、体重 220-260 g) は城西大学生命科学センター (埼玉) から購入した。

D-3 倫理面への配慮 : 動物の飼育及び実験は当該研究実施機関の動物実験管理委員会である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 22 年 4 月)」に従い、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を行った。

D-4 *In vitro* 皮膚透過性試験 : 1) 皮膚の処理法 ;

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下、ヘアレスラット腹部を剃毛処理後、正中線を挟んで左右から 2 枚ずつ皮膚を摘出した。また、stripped skin の場合はセロハンテープ (セロテープ®、ニチバン株式会社、東京) で 20 回テープストリッピングを行い、角層を完全に除去した後摘出した。さらに、注射針 (テルモ注射針、またはテルモ歯科用注射針、テルモ株式会社、東京) により皮膚に貫通孔を形成させた needle-punctured skin、および剃刀 (フェザー剃刀 S 両刃、フェザー安全剃刀株式会社、大阪) で角層側に深さ約 0.5 mm の傷を 2 本つけた razor-treated skin を用いた。なお、needle 処理は皮膚を動物から摘出し、皮膚をセルにアロンアルファで固定した後、有効透過面積内の 1ヶ所に 20G、23G、27G、または 30G 注射針を先端から 10 mm 刺した。Razor 処理は、剃刀の刃の部分が 0.5 mm となるよう、木製のストッパーを装着

した。その剃刀を一定の力で左から右に引くことで有効透過面積内に2本の傷をつけた。なお、razor処理および皮膚の摘出は麻酔下で行った。

2) Fluoresbrite 透過実験：摘出したヘアレスラット腹部皮膚を side by side 型拡散セル（有効透過面積 0.95 cm^2 ）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。レシーバー側から 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を補充した。角層側には蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite[®]) を 3.0 mL 適用した。needle-punctured skin を用いる場合には、貫通孔への空気の侵入を防ぐため 0.1% Tween 80 含有 PBS を用いた。実験中、セルの温度は 32°C に保ち、両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（マルチスターラーM-1、アズワン株式会社、大阪）により 1,200 rpm で回転させることで攪拌した。レシーバー液から 0.5 mL 経時的にサンプリングし、その都度、同量の PBS を補充した。サンプル溶液中の蛍光ポリスチレンビーズ濃度は蛍光分光光度計（RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都）を用いて測定（励起波長：441 nm、蛍光波長：486 nm）した。

3) FITC-dextran 透過実験：同様に、摘出したヘアレスラット腹部皮膚を side by side 型拡散セル（有効透過面積 0.95 cm^2 ）に挟み、真皮（レシーバー）側に pH7.4 PBS 3.0 mL を適用した。レシーバー側から 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を補充した。FITC-dextran（FD-4, FD-20, FD-40, FD-70, FD-250, FD-2000）/PBS 溶液を各 3.0 mL 適用した。実験中、

セルの温度は 32°C に保ち、両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 1,200 rpm で回転させることで攪拌した。レシーバー液から 0.5 mL 経時的にサンプリングし、その都度、同量の PBS を補充した。サンプル溶液の FD 濃度は蛍光分光光度計（RF-5300PC）を用いて測定（励起波長：490 nm、蛍光波長：520 nm）した。

D-5 皮膚観察：透過実験終了後、回収したラット皮膚表面を PBS で十分に洗浄した。その後、stripped skin、razor-treated skin、および needle-punctured skin は、凍結包埋剤（Super Cryoembedding Medium、Section Lab Co. Ltd.）に包埋し、 -80°C イソペンタン中で速やかに凍結させた。クライオスタット（CM3050、LEICA、Wetzler、Germany）により垂直方向の皮膚凍結切片（厚さ $20 \mu\text{m}$ ）を作製し、作製した切片を共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM、FV1000、オリンパス株式会社、東京）にて観察した。

D-6 微粒子酸化チタンの粒子径およびゼータ電位：種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ、濃度を 0.01 または 0.1 mg/mL に調製した。調製後、超音波洗浄機

（Branson 5510、ヤマト科学株式会社、東京）を用いて分散させた。微粒子酸化チタン培地分散液はマイクロチューブに 1 mL 入れ、Zetasizer Nano（Malvern Instruments Ltd.、Worcestershire、U.K.）を用いて粒子径を測定した。さらに、同様に調製した微粒子酸化チタン培地分散液を 3 mL 取り、Zetasizer 3000HSA（Malvern

Instruments Ltd., Worcestershire, U.K.) を用いてゼータ電位の測定を行った。

D-7 細胞培養：ヒト表皮角化細胞 (human epidermis keratinocytes, HEK) は倉敷紡績株式会社 (大阪) より購入した。HEK は増殖添加剤を加えた HuMedia-KG2 中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。ヒト真皮線維芽細胞 (human dermis fibroblast, HDF) は東洋紡績株式会社 (大阪) より購入した。HDF は炭酸水素ナトリウムおよび 10% fetal bovine serum (FBS; Nichirei biosciences Inc., 東京) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 日本製薬株式会社、東京) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。

D-8 細胞障害性試験 (MTT 試験)^{10), 11)}：

2 × 10⁴ cells/0.3 mL/well の HEK および 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 pre-incubate した後、インサート内外の培地を除去し、インサート内側に試験製剤各 0.3 mL をインサート外側に培地 0.5 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01~100 mg/mL に調製したものをを用いた。コントロールとして、HEK は増殖添加剤を加えた HuMedia-KG2、HDF は DMEM + 10% FBS をを用いた。また、ポジティブコントロールとしては 10% SDS 培地溶液を用いた。製剤を除去し、細胞を PBS で 3 回リンスした。インサート内側に 0.333 mg/mL MTT 培地を 300 μL/well 適用し、37°C、5%

CO₂ 存在下で 4 時間インキュベートした。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、IC₅₀ を求めた。

D-9 細胞膜障害性試験 (LDH 放出量測定)：1 × 10⁵ cells/0.3 mL/well の HEK および 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 pre-incubate した後、インサート内外の培地を除去し、インサート内側に試験製剤各 0.3 mL を、インサート外側に培地 0.5 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 mg/mL に調製したものをを用いた。コントロールとして培地のみ、また、ポジティブコントロールとして 1% Triton X-100 培地溶液を用いた。試験製剤適用 48 時間後、インサート外側の培地 0.5 mL を回収し、LDH cytotoxicity assay kit を用いて、分光光度法 (測定波長；490 nm) により LDH 放出量を求めた。

D-10 炎症反応 (IL-1α測定)：1 × 10⁵ cells/0.3 mL/well の HEK および 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 pre-incubate した後、インサート内外の培地を除去し、インサート内側に試験製剤各 0.3 mL を、インサート外側に培地 0.5 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。

試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 mg/mL に調製したものをを用いた。コントロールとして培地のみ、ポジティブコントロールとして 1% Triton X-100 培地溶液を用いた。試験製剤適用 48 時間後、インサート外側の培地 0.5 mL を回収し、培地中の IL-1 α を Quantikine[®] (Human IL-1 α /IL-1F1 immunoassay) を用いて調整し、分光光度法 (測定波長; 530 nm、対照波長 570 nm) により、IL-1 α 放出量を求めた。

D-11 DNA 合成に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響 (BrdU): 1×10^4 cells/0.1 mL/well の HEK および HDF を 96 well プレート内へ播種し、インキュベーター内で 24 時間 pre-incubate した後、well 内の培地を除去し、試験製剤を各 0.1 mL 適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベートした。試験製剤としては種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 mg/mL になるように調製したものをを用いた。コントロールとして培地のみ、ポジティブコントロールとして 10% SDS 培地溶液を用いた。以後、cell proliferation ELISA、BrdU (colorimetric) に従い実験を行った。分光光度法 (測定波長; 370 nm、対照波長; 492 nm) により、培養細胞に取り込まれた 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を定量した。

D-12 DNA 障害に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響 (comet assay): 2×10^5 cells/1.0 mL/well の HEK および HDF を 6 well プレート内に播種し、24 時間

pre-incubate した後、培地を除去し、試験製剤各 1.0 mL を適用して 37°C、5% CO₂ 存在下で 4 時間インキュベートした。試験製剤として種々微粒子酸化チタンを培地に分散させ 0.01 または 0.1 g/mL に調製したものをを用いた。コントロールとして HEK は増殖添加剤を加えた HuMedia-KG2、HDF は DMEM + 10% FBS を用いた。ポジティブコントロールとして 0.2 mM H₂O₂ 培地溶液を用いた。その後、試験製剤を除去し、6 well 内側の種々培養細胞をセルスクレイパーにより回収した。HEK は 1000 rpm、5 分、HDF は 500 rpm、10 分遠心分離操作を行い、培地を除去後、PBS で 1 回洗浄した。以後、comet assay kit に従い実験を行った。また、使用した電気泳動は 20 V、300 mA、30 分の条件下で行い、測定は励起波長 494 nm、蛍光波長 521 nm で行った。画像解析は comet assay software project (Casp; OSDN 株式会社、東京) を用い、Tail moment を求めた。

E. 研究結果および考察

E-1 FITC-dextran の分子径: Table 1 に本実験で用いた FDs (FD-4, FD-20, FD-40, FD-70, FD-250, FD-2000) の理論分子径を示す。

E-2 健全皮膚および角層剥離皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験: Figure 1 に intact skin および stripped skin を介した蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite[®]) の累積透過量と時間の関係を示す。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。蛍光分光光度計を用いた定量における限界

濃度や適用濃度から intact skin を介した Fluoresbrite® の P_c 値を算出すると 2.4×10^{-10} cm/s となった。これは落屑速度よりも低く、B-3 で記載した、③の $P - P_{des} \ll 0$ に分類できるため、角層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。そこで、皮膚の観察を行った。Figure 2 に Fluoresbrite® 適用後の皮膚垂直切片画像を示す。Intact skin は stripped skin よりも一般的に透過性が低いため、画像観察は行わず、観察が容易な stripped skin で観察した。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。この結果から、Fluoresbrite® は皮膚（角層）に溶解拡散しないことが示唆された。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。

Figures 3、4 に intact skin、stripped skin を介した FDs の累積透過量と時間の関係を示す。FDs は Fluoresbrite® とは異なり 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 でさえ各皮膚を透過した。これらの結果から、Fluoresbrite® および 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。

Figure 5 に FDs の皮膚透過係数 (P) と理論分子径 (d) の関係を示す。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。また、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。なお、 1×10^{-9} cm/s 以下の P を示す物質では、角層ルートからのみなる皮膚へは *in vivo* では浸透しないと考えられた。また、intact skin では FD-40、FD-70 の間で透過係数の上昇がみられた。この原因としては、FD-70 透過実験時間を FD-40 のそれより長くしたことによって、皮膚の状態変化（バリア能の低下）がより大きくなったためと考えられた。今後、実験条件（実験時間など）を一定にして再度実験を行う必要がある。

E-3 損傷皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験

Figure 6 に razor-treated skin および needle-punctured skin を介した Fluoresbrite® の累積透過量と時間の関係を示す。Fluoresbrite® は intact skin および stripped skin と同様に razor-treated skin を透過しなかった。また、 P_c の値を算出すると、 2.4×10^{-10} cm/s であった。一方、needle-punctured skin を介する場合、Fluoresbrite® は透過した。また、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。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。Figure 7 に Fluoresbrite® 適用後の皮膚垂直切片画像を示す。Razor-treated skin では、Fluoresbrite® はその皮膚（傷）表面に観察された。一方、needle-punctured skin では、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。これらの結果から、Fluoresbrite® の needle-punctured skin での透過ルートは注射針により形成された貫通孔（細孔ルート）であること

が示唆された。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。

Figures 8, 9にそれぞれrazor-treated skinを介したFDsの透過プロファイル、FDsのLogdとLogPの関係を示す。種々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。

E-4 微粒子酸化チタンの粒子径およびゼータ電位測定 : Tables 2, 3に種々微粒子酸化チタンを各培地に分散させた時の粒子径およびゼータ電位を示す。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。これは、微粒子酸化チタン粒子同士の静電反発が低下し凝集を起こしたと考えられた^{14), 15)}。

E-5 細胞障害性試験 (MTT 試験) : Table 4に種々微粒子酸化チタンをHEKおよびHDFに適用した場合の50%毒性濃度(TC_{50})および形状係数(γ)を示す。細胞障害性は適用した微粒子酸化チタン濃度に伴って上昇した。 TC_{50} の値より微粒子酸化チタンの細胞障害性はHDFよりもHEKに強く現れた。この結果は、HEKおよびHDFの感受性の違いや、微粒子酸化チタンの細胞への取り込み量の違いに起因していると考えられる。また、C-2の(5)式より求めた形状因子(γ)が大きい場合は濃度の増加により死細胞率の速やかな

増加が起こる。HDFと比較してHEKの γ 値は約4-7倍であることから、表皮は真皮よりも微粒子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。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。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¹⁴⁾。また、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微粒子酸化チタンよりも TC_{50} の値が高いため、微粒子酸化チタンの細胞障害性はコーティングを施すことで軽減できると考えられた。

E-6 細胞膜障害性試験 (LDH 放出量測定) : Figure 10に種々微粒子酸化チタンをHEKおよびHDFに適用した場合のLDH放出量(mU)を示す。HEKは他の細胞と比較してLDH放出量が少なかった。この原因として、Humedia-KG2に含まれる成分と何らかの相互作用を起こしていると考えられた。また、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倍の増加を示した。したがって、細胞膜障害性はNATを適用した場合、他の微粒子酸化チタンよりも増加することが分かった。

E-7 炎症反応に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響 (IL-1 α 測定) : Figure 11に種々微粒子酸化チタンをHEKおよびHDFに適用した場合のIL-1 α 放出量(pg)を示す。炎症反応は適用した微粒子酸化チタン濃

度に伴って上昇した。また、コーティングを施していない粒子よりコーティングを施している粒子の方が IL-1 α 放出量が少ないことから、炎症反応は微粒子酸化チタンをコーティングすることで軽減できると考えられた。

E-8 DNA 合成に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響 (BrdU) : Figure 12 に種々微粒子酸化チタンを HEK および HDF に適用した時の DNA 合成量を示す。微粒子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¹⁴⁾、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¹⁵⁾。DNA 合成量は適用した種々微粒子酸化チタンの濃度に伴い減少した。また、HEK および HDF に適用した場合、SRT の DNA 合成量の減少が最も少なかった。皮膚細胞の DNA 合成量は微粒子酸化チタンの適用濃度、結晶形および表面コーティングの有無に影響を受けると考えられた。また、微粒子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を低下させることがわかった。さらに、結晶形の表面コーティングを変えることによって軽減・抑制されることがわかった。

E-9 DNA 障害に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響: Figure 13 に HEK および HDF の DNA 障害に及ぼす種々微粒子酸化チタンの影響を示す。DNA 障害は種々微粒子酸化チタンの適用濃度に伴い上昇した。また、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、微粒子酸化チタンより生成される活性酸素が考えられた。

F. 結論

1. 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。また、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。これらの結果より、損傷皮膚ではナノマテリアルが生きた細胞に直接触れ、影響を及ぼす可能性があるため、ナノマテリアルを皮膚適用するには損傷のない皮膚を選択することが大変重要であることが明らかとなった。

2. 微粒子酸化チタンの細胞障害性および遺伝毒性は、微粒子酸化チタンの濃度に伴い上昇することが明らかとなった。また、種々培養細胞を用いた実験では、微粒子酸化チタン表面にコーティングを施すことで細胞障害性および遺伝毒性を軽減できることが明らかとなった。以上のことより、損傷皮膚に微粒子酸化チタンを使用する際には、適切な結晶形およびコーティングを選択し、これらを使用することが望ましいと考えられた。

3. 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。

【参考文献】

- 1) Nanotechnologies, Terminology and definitions for nano-objects; Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. ISO/TS 27687: 1st version (2008).
- 2) Oberdörster G., Ferin J., Lehnert E. B., Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury, *Environ. Health Perspect.*, **102**, 173-179 (1994).
- 3) Oberdörster G., Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles, *Inhal. Toxicol.*, **8**, 73-89 (1996).
- 4) Scientific Committee on Consumer Products: Preliminary opinion on safety on nanomaterials in cosmetic products (2007).
- 5) Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks: Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risk of nanomaterials (2007).
- 6) Scheuplein R. J., Mechanism of percutaneous absorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility., *J. Invest. Dermatol.*, **45**, 334-347 (1965).
- 7) Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., López-Quintela M.A., Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin, *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1701-1712 (2007).
- 8) 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).
- 9) 杉林 堅次, 化粧品に用いられるナノ粒子の暴露と安全性問題のあり方, *Fragrance Journal*, **36**, 38-41 (2008).
- 10) Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 11) Sayes M. C., Wahi R., Kurian A. P., Liu Y., West L. J., Ausman D. K., Warheit B. D. and Colvin L. V., Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells, *Toxicol. Sci.*, **92**, 174-185 (2006).
- 12) Jiang J., Oberdorster G., Biswas P., Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies., *Nanopart Res.*, **11** 77-89 (2009).
- 13) Richard. C.M., Braydich-Stolle L., Schrand A.M., Schlager J.J., Hussain S.M., Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique., *Toxicol. Sci.*, **101**, 239-253 (2007).
- 14) Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A., ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells., *Toxicol. In Vitro.*, **25**, 231-241 (2010).

15) Pan Z., Lee W., Slutsky L., Clark R.A.F., Pernodet N., Rafailovich M.H., Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells., *Small*, **5**, 511-520, (2009).

第 131 年会日本薬学会、静岡、2011 年 3 月。

5) 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、静岡、2011 年 3 月。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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) 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、P-79、徳島、2010 年 5 月。
- 2) 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；何コノ粒子が皮膚に侵入・透過するか？、第 54 回日本薬学会関東支部大会、東京、2010 年 10 月。
- 3) 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、静岡、2011 年 3 月。
- 4) 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、

Table 1 Physicochemical properties of FITC-dextran (FDs).

| FDs | <i>M.W.</i> (kDa) | Stokes diameter, <i>d</i> (nm) | Log <i>d</i> |
|---------|----------------------|-----------------------------------|--------------|
| FD-4 | 3.38 | 2.8 | 0.45 |
| FD-20 | 21.2 | 6.6 | 0.82 |
| FD-40 | 35.6 | 9.0 | 0.95 |
| FD-70 | 69.8 | 12.0 | 1.08 |
| FD-250 | 250 | 21.0 | 1.32 |
| FD-2000 | 2000 | 41.6 | 1.62 |

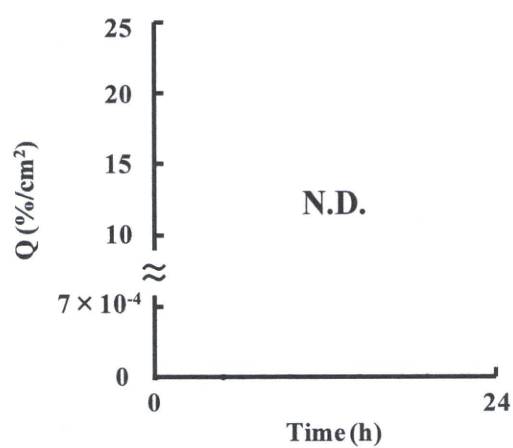


Fig. 1 Time course of changes in cumulative amount of Fluoresbrite® that penetrated through intact skin and stripped skin.

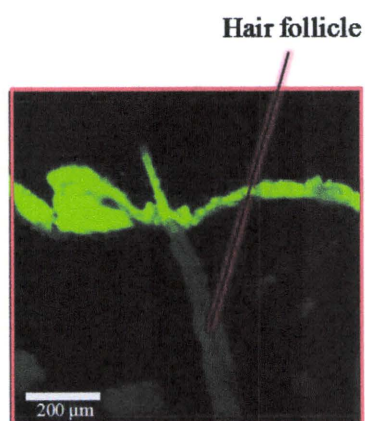


Fig. 2 CLSM image of vertical slice of hairless rat stripped skin 24 h after application of Fluoresbrite®.

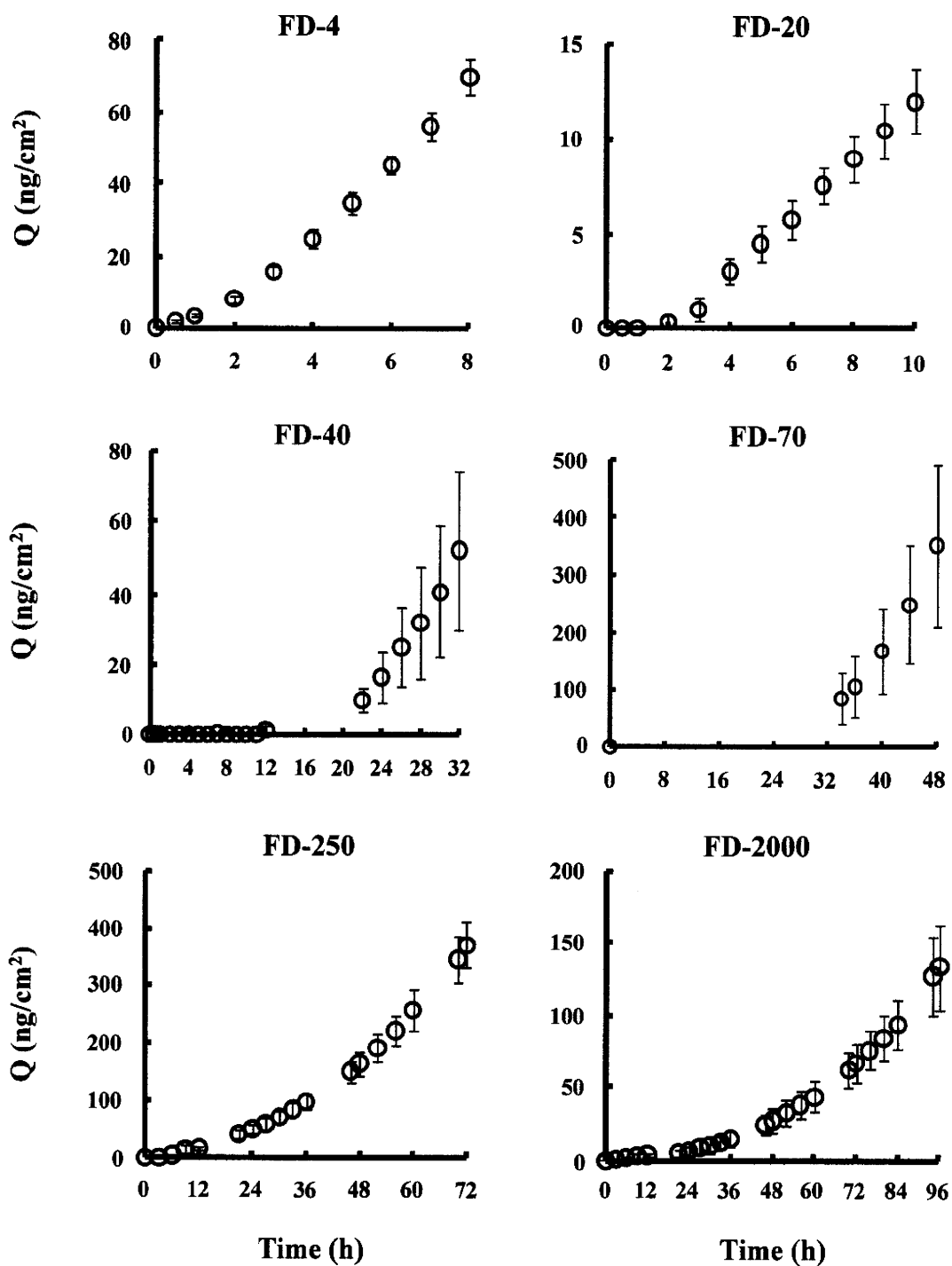


Fig. 3 Time course of changes in cumulative amount of FITC-dextran that penetrated through intact skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

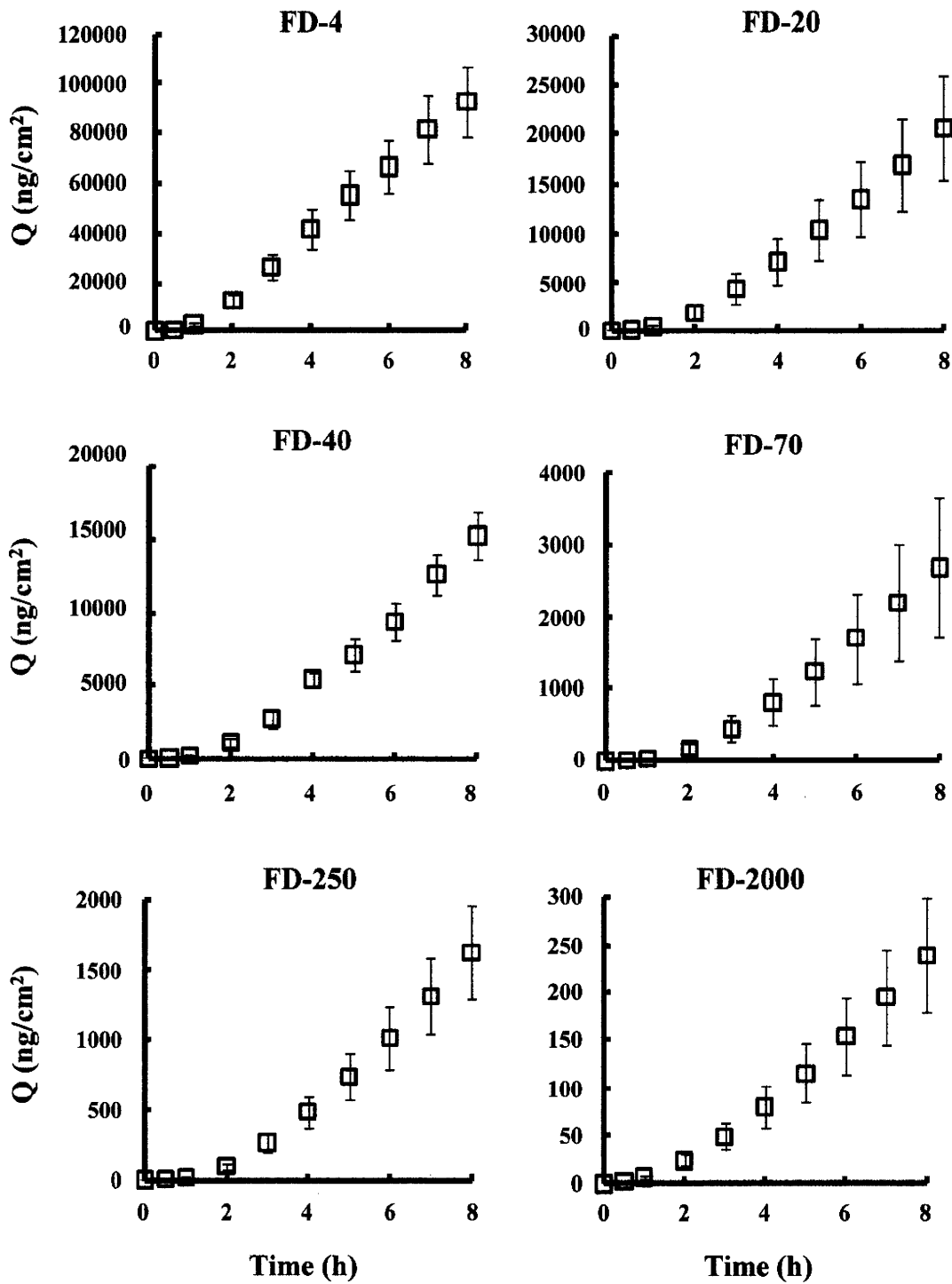


Fig. 4 Time course of changes in cumulative amount of FITC-dextran that penetrated through stripped skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

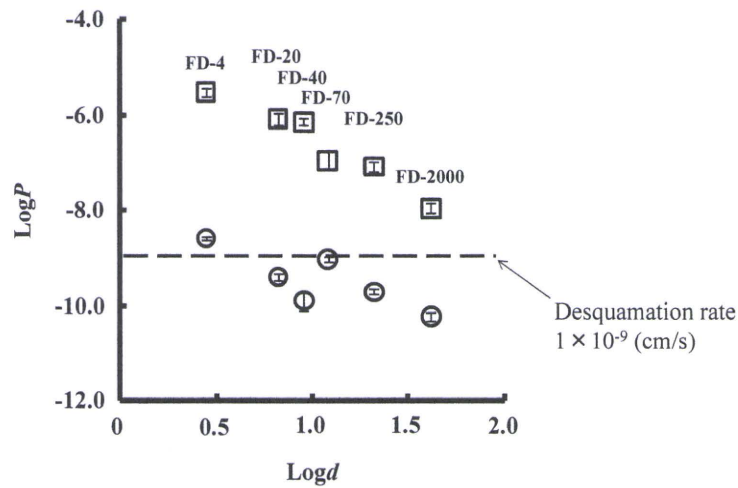


Fig. 5 Relationship between permeability coefficients (P) and Stokes diameter (d) of FITC-dextran. Symbols: \circ ; intact skin, \square ; stripped skin. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

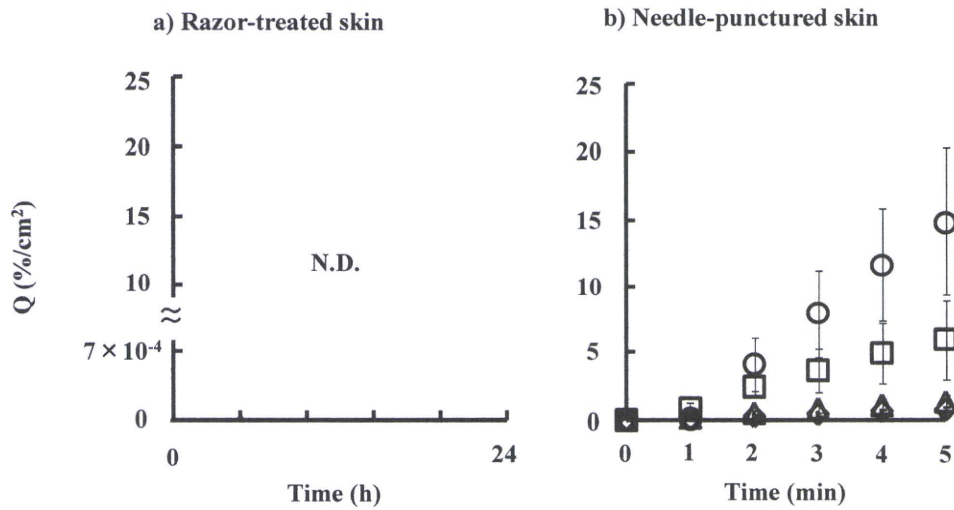


Fig. 6 Time course of changes in the cumulative fraction of Fluoresbrite[®] that penetrated through razor-treated skin (a) and needle-punctured skin (b). Symbols: \circ ; 20G needle (external diameter: 0.9 mm), \square ; 23G needle (0.6 mm), Δ ; 27G needle (0.4 mm), \diamond ; 30G needle (0.3 mm). Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

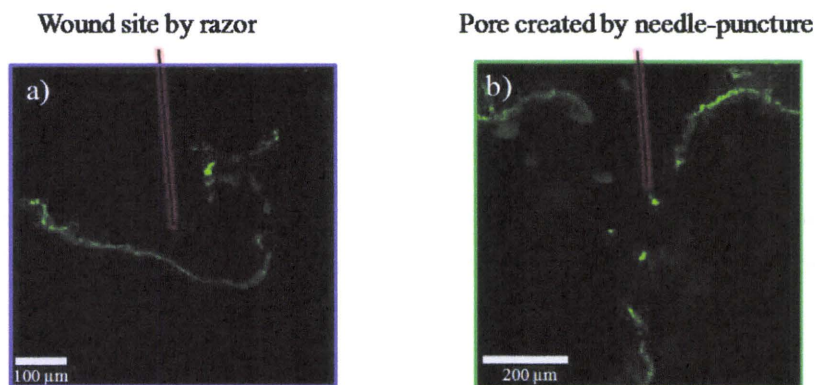


Fig. 7 CLSM image of vertical slice of hairless rat skin after application of Fluoresbrite[®]. a) razor-treated skin 5 min after application of Fluoresbrite[®], and b) needle-punctured skin 10 min after application of Fluoresbrite[®].

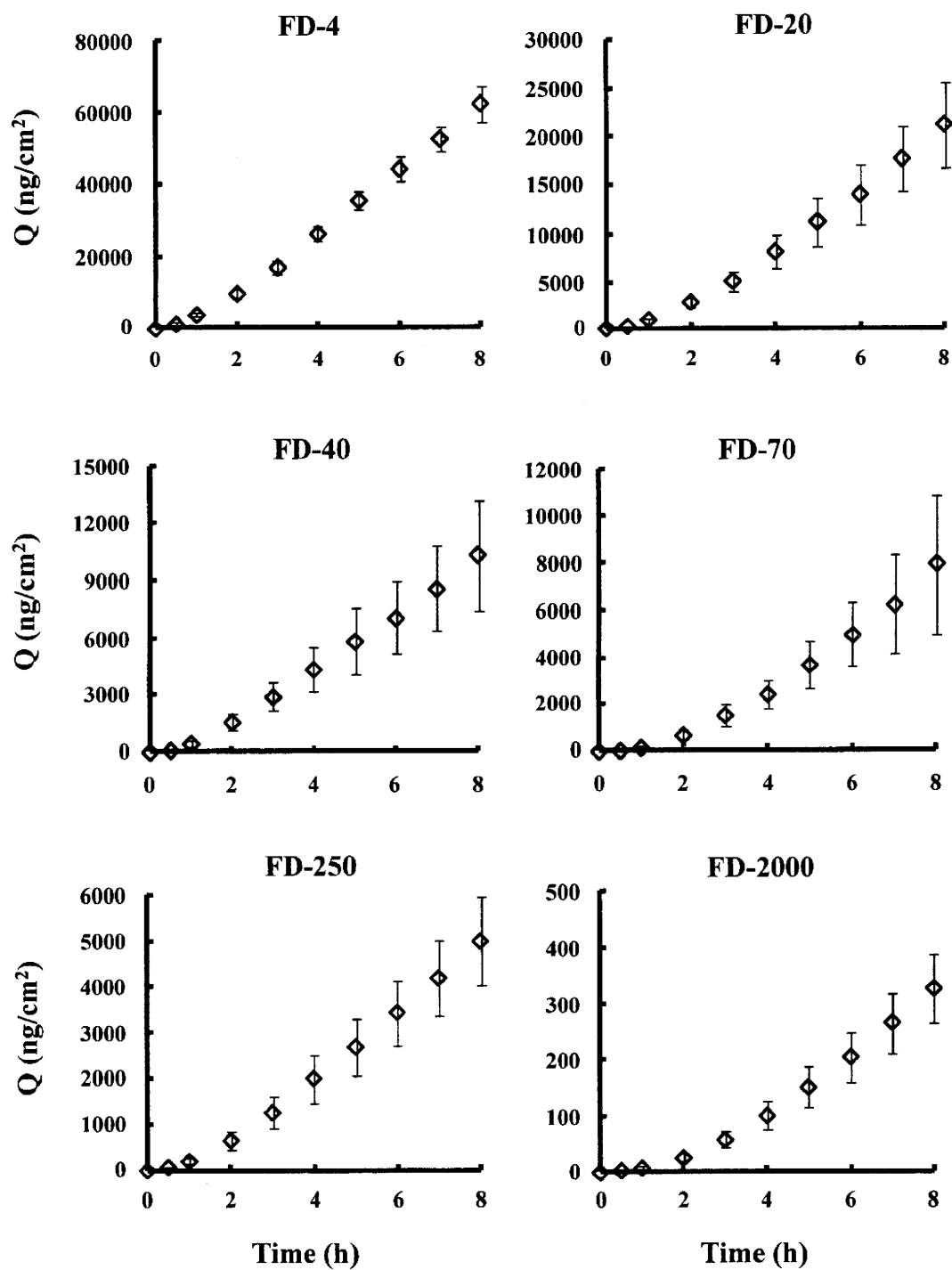


Fig. 8 Time course of changes in cumulative amount of FITC-dextran that penetrated through razor-treated skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

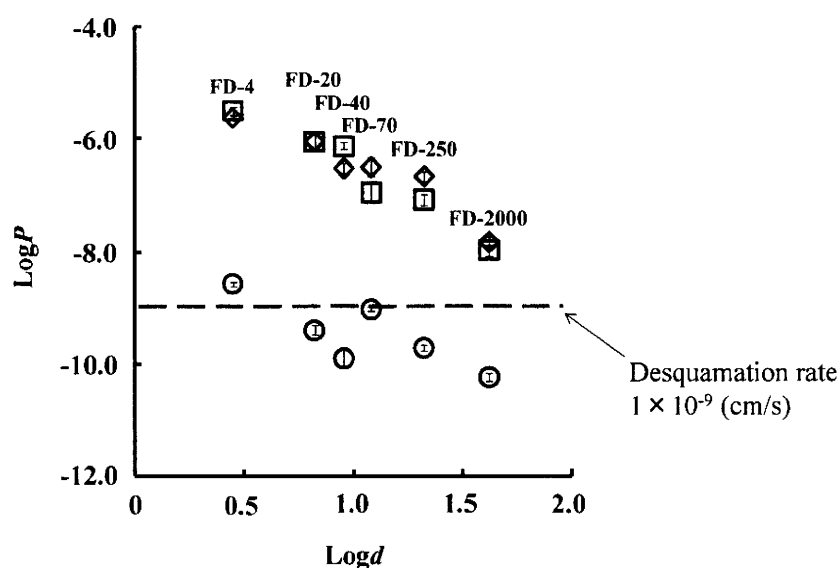


Fig. 9 Relationship between permeability coefficients (P) and Stokes diameter (d) of FITC-dextrans. Symbols: \circ ; intact skin, \square ; stripped skin. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

Table 2 Particles size of TiO_2 particles. Values are the mean \pm S.E. ($n = 3$).

| Particle | Primary particle size (nm) | Size (nm) | | |
|----------|----------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | | DMEM+10% FBS | DMEM | Humedia-KG2 |
| SRT | 15 | 373 \pm 14 | 1050 \pm 146 | 1061 \pm 53 |
| ART | 15 | 853 \pm 130 | 4071 \pm 939 | 3322 \pm 1071 |
| NRT | 15 | 415 \pm 62 | 3908 \pm 679 | 3187 \pm 31 |
| NAT | 6 | 629 \pm 303 | 2091 \pm 216 | 1219 \pm 1563 |

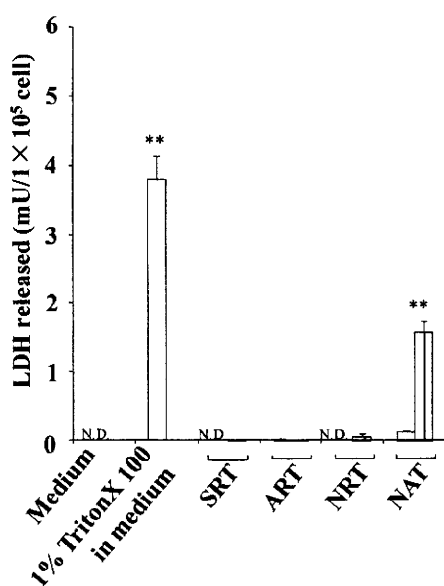
Table 3 Zeta potential of TiO_2 particles. Values are the mean \pm S.E. ($n = 3$).

| Particle | Size (nm) | | |
|----------|-------------------|------------------|-------------------|
| | DMEM+10% FBS | DMEM | Humedia-KG2 |
| SRT | -13.10 \pm 0.50 | -3.50 \pm 1.60 | -31.57 \pm 0.36 |
| ART | -16.17 \pm 0.69 | 0.70 \pm 2.39 | -8.77 \pm 1.58 |
| NRT | -15.27 \pm 1.34 | 0.00 \pm 2.40 | -8.43 \pm 0.17 |
| NAT | -14.93 \pm 0.49 | -10.5 \pm 6.06 | -10.53 \pm 2.09 |

Table 4 Cytotoxicity parameters of HEK and HDF 48 h after application of TiO₂ particles.

| | HEK | | HDF | |
|-----|---------------------------------|----------|---------------------------------|----------|
| | <i>TC</i> ₅₀ (mg/mL) | γ | <i>TC</i> ₅₀ (mg/mL) | γ |
| SRT | 1.12 | 1.01 | 384.28 | 0.24 |
| ART | 0.48 | 0.95 | 64.11 | 0.18 |
| NRT | 0.23 | 0.90 | 45.57 | 0.17 |
| NAT | 0.11 | 1.23 | 0.02 | 0.18 |

a) HEK



b) HDF

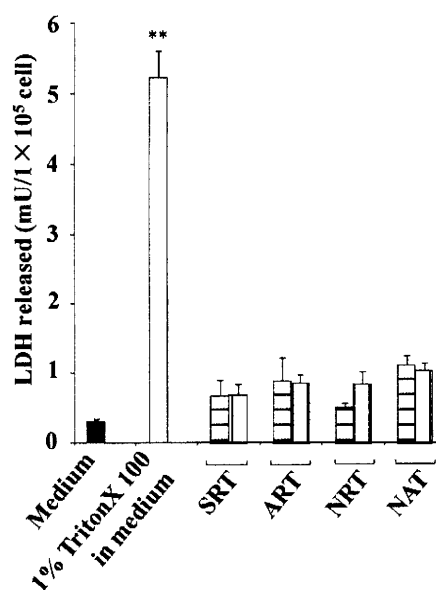
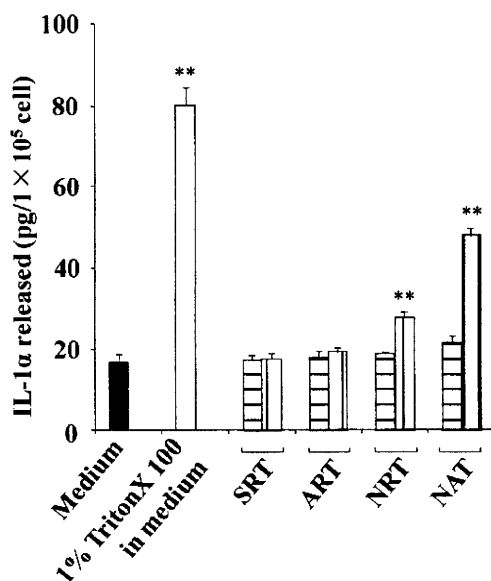


Fig. 10 Effect of TiO₂ particles on the LDH amount released from HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n=3). Statistical analysis was performed by ANOVA assumed with non-repeated measures. **P*<0.05 and ***P*<0.01 was assumed to be significant. Symbols: \square ; TiO₂ conc. 0.01 mg/mL, \blacksquare ; TiO₂ conc. 0.10 mg/mL.

a) HEK



b) HDF

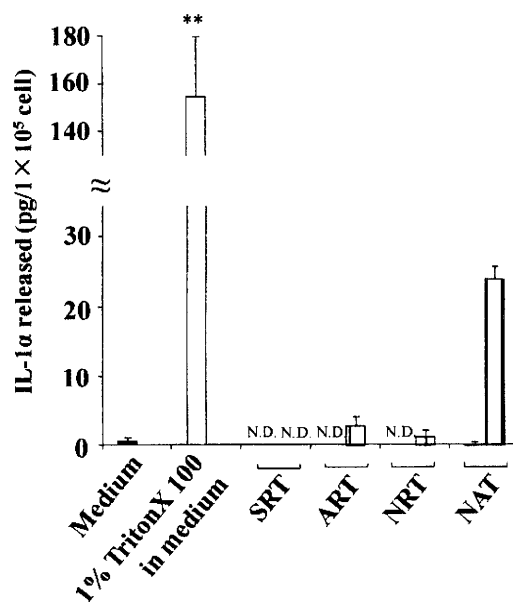
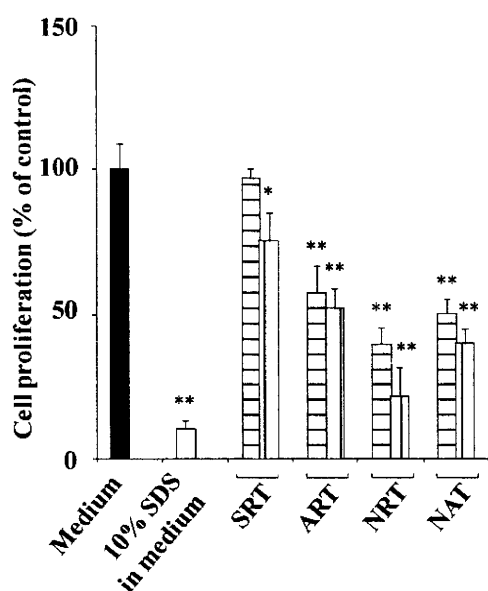


Fig. 11 Effect of TiO₂ particles on the IL-1 α amount released from HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n=3). Statistical analysis was performed by ANOVA assumed with non-repeated measures. * P <0.05 and ** P <0.01 was assumed to be significant. Symbols: ; TiO₂ conc. 0.01 mg/mL, ; TiO₂ conc. 0.10 mg/mL.

a) HEK



b) HDF

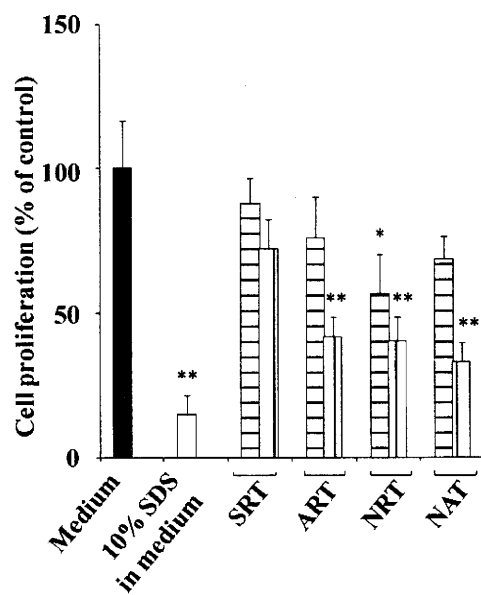


Fig. 12 Effect of TiO₂ particles on the cell proliferation of HEK and HDF. Values are the mean \pm S.E. (n=3). Statistical analysis was performed by ANOVA assumed with non-repeated measures. * P <0.05 and ** P <0.01 was assumed to be significant. Symbols: ; TiO₂ conc. 0.01 mg/mL, ; TiO₂ conc. 0.10 mg/mL.