

201034001B

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～22 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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. 分担総合研究報告

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・・・・・・・・・・11
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・・・・・・・・・・ 33
杉林 堅次

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 61

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

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)
総合研究報告書

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 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塗布して使用することから、経皮暴露による健康影響を考慮することが重要である。一次粒子径がナノメートルサイズの微粒子、いわゆるナノ物質を配合した製品の場合、ナノ物質自体のサイズに応じた評価、及び製品中のナノ物質の存在状態に応じた評価が必要と考えられる。しかしながら、ナノ物質等を配合した化粧品及び医薬部外品の品質及び安全性の評価、及びそのための評価手法に関しては十分な検討が行われておらず、試験法の確立に関する研究が急務とされている。本研究は、化粧品や医薬部外品に用いられる酸化チタン等ナノ物質の試験時の存在状態、経皮曝露による皮膚透過性と体内動態、ナノ物質の皮膚透過性を評価するための試験方法、皮膚透過したナノ物質の表皮細胞及び抗原提示細胞機能に及ぼす影響について検討した。ナノ物質は、粒子の材質、結晶形及び表面処理、及び分散させる媒体の種類によって粒子径が大きく変化した。酸化チタンや酸化亜鉛粒子は各種媒体に超音波処理して分散させた場合、数百 nm の大きさに凝集するが、ビーズミル法を用いると酸化チタンの安定した懸濁液を調製できることがわかった。マイクロウェーブ分解法と ICP-MS を使った金属ナノ物質の組織中の定量法を開発した。酸化チタンをラットに皮下投与したが、組織中のチタン濃度の増加を確認できなかった。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、検出できる量が各臓器に分布、蓄積する可能性は低いことが示唆された。In vitro 皮膚透過性試験の結果、酸化チタンなどの分散媒や皮膚に溶解しない物質は、皮溝や毛孔周辺に集積しやすく、経角層ルートを介した角層浸透性は著しく低いもしくは角層へ浸透しないと考えられた。各種ナノ物質の浮遊系細胞に対する細胞毒性試験を実施し、細胞強度の比較を行った。酸化チタンに感作性を認めず、他の物質の感作性誘導反応を増強する作用もないことがわかった。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。シリカの免疫機能に対する影響については、今度詳細に検討する必要がある。以上、ナノ物質は材質とサイズともに生体反応に影響することから、それぞれについて評価する必要があると思われた。しかし、酸化チタン等についてはナノサイズであったとしても、安全性に関する新たな試験や評価を追加する必要性は認めなかった。一方で、化学物質の皮膚曝露後の安全性評価に用いられている in vivo 及び in vitro 皮膚透過性試験法では、ナノ物質の浸透性・透過性評価は難しく、「角層浸透性評価」や毛孔などの付属器官からの「皮内移行性」に関する評価方法の確立が必要であると考えられた。ナノ物質を含有する化粧品や医薬部外品については、従来の評価法だけではなく、新たな「セカンドステージ皮膚浸透試験法」ともいべき評価方法の確立が必須と考えられた。サイズの影響を見るためには適切な分散懸濁液を使用し、粒度分布等キャラクタライゼーションした上で、得られた結果を評価することが重要と考えられる。

研究分担者： 杉林堅次 城西大学 薬学部
化粧品動態制御学講座 教授

A. 研究目的

ナノ物質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。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。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。

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。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、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もナノサイズである。

化粧品や医薬部外品は日常的に使用する製品であり、このようにナノ粒子を含むことから、ナノ物質のヒトに対する主要な曝露源と考えられる。化粧品や医薬部外品は通常皮膚に塗布

することが主であることから、配合されるナノ物質について経皮曝露による健康影響を明らかにする必要である。また、化粧品は一般に複数成分の混合製剤であるため、逆に、ナノ物質等を配合することによって製剤中の他成分の品質及び安全性に影響がないかどうか評価する必要があるかもしれない。そのためには、ナノ物質配合製品の品質及び安全性確保のために求められる試験法や評価方法について検討することが重要である。

本研究では、金属酸化物のナノ粒子を対象とした。ナノ物質のキャラクタリゼーションとして、各種媒体中での粒子径及び粒度分布を測定した。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の最適な分解条件を検討した。ナノ粒子の皮膚曝露による皮膚透過・浸透の可能性および透過・浸透ルート の 解 明 は ナノ 粒 子 の 生 体 へ の 毒 性 評 価 の 観 点 か ら も 急 務 と さ れ て い る 。 そ こ で 、 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、および注射針で孔をあけた needle-punctured skin を作成し、モデル物質を用いて皮膚透過性を評価した。加えて、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、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）の細胞障害性、細胞膜障害性、炎症反応性を評価した。また、ナノ物質の DNA 障害性を評価した。さらに、全身循環系へ移行した場合を想定し、静脈及び皮内投与後の体内分布についても評価した。更に、皮膚機能傷害の一つとして、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。皮膚感作性についてはマウスを用いる試験と細胞からのサイトカイン産生を指標として評価した。

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

酸化亜鉛は、一次粒子径 30~40 nm で表面をコーティングしていない MZ-300 とした MZY-303S、及び一次粒子径 250 nm で表面コーティングされていない ZO-250 を用いた。酸化チタンは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。シリカは平均一次粒子径 20、50 及び 100 nm の試薬懸濁液と平均一次粒子径 12 nm の化成品懸濁液を用いた。酸化チタン粒子の形状は走査型電子顕微鏡で、元素組成はエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置を用いて分析した。

ナノ粒子は水、シリコンオイル、リン酸緩衝液等に加えて攪拌し、超音波処理して分散させた。また別に、酸化チタンはビーズミル分散機を用いて懸濁液とした。ゼータサイザーナノ (Malvern 社) で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。

皮内透過したナノ物質の体内分布を調べるため、酸化チタン懸濁液を 1 群当たり 10 匹の Crl : CD (SD) 系雄性ラットの背部に皮内投与した。投与 7 及び 28 日後に採血し、血清を得た。各臓器の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。一部臓器についてはヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、鏡検した。生体組織中のチタン量は、硝酸等を使ってマイクロウェーブ分解処理した後、ICP-MS によって定量した。

ナノ物質の皮膚感作性を LLNA-DA 法を用いて評価した。CBA マウスの両耳に、試験物質または媒体のみを 1, 2, 3 及び 7 日目に塗布し、8 日目に耳介リンパ節を採取し、個体ごとに重量を測定した。リンパ節細胞を遊離して、ルミノメーターを用いて ATP 量を測定し、媒体対照群に対する試験群の値の比を stimulation index (SI) とし、リンパ節活性化の程度とした。

抗原提示能を模倣するヒト単球由来細胞株

THP-1 細胞に対する細胞毒性を TetraColor ONE 色素の取り込み量、LDH 遊離量、ATP 量を指標として求めた。

ナノ物質を暴露した THP-1 細胞からの炎症性サイトカイン (IL-8, IL-18, 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 Cytometric Bead Array (CBA) で、あるいは培養上清の TNF- α 、MIP-18 等の濃度を 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

FITC-dextran (FD)、蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite[®], 一次粒子径 50 nm)、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) を試験に用いた。種々微粒子酸化チタンを 0.01 または 0.1 mg/mL の濃度で培地に入れ、超音波洗浄機を用いて分散させ、粒子径及びゼータ電位の測定を行った。

In vitro 皮膚透過性試験のため、ヘアレスラット腹部から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、および注射針で孔をあけた needle-punctured skin を作成した。これらの皮膚を side by side 型拡散セルに挟み、角質側に Fluoresbrite[®] または FD を適用し、経時的に真皮側レシーバー液を蛍光分光光度計で測定し、透過量を求めた。透過実験終了後、皮膚表面を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

ヒト表皮角化細胞 (HEK)、ヒト真皮線維芽細胞 (HDF) に対する種々酸化チタンの細胞傷害性を MTT 試験により求めた。酸化チタンの細胞膜障害性は LDH 放出量により、炎症

作用は IL-1 α 放出量から評価した。HEK 及び HDF の増殖性は BrdU の取り込みによる DNA 合成能を ELISA で求めた。酸化チタンの DNA 障害性は comet assay による Tail moment から求めた。

モルモット Adjuvant and patch test 法により酸化チタンの皮膚感作性の有無を調べた。また、マウスの尾静脈内投与後の体内動態を検討した。5分、72時間、1ヶ月、6ヶ月後採血を行い、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し重量を測定し、Soluen-350 で臓器を溶解させ、ICP-MS でチタンの定量を行った。72時間、3週間後の血清については、炎症マーカー BUN、CPK、AST、ALT 及び LDH の測定を行った。更に、肝臓については固定、包埋後、酢酸ウラニル/亜鉛染色液で二重染色、カーボンコーティングを行い TEM 観察した。

(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、三菱化学安全科学研究所及び城西大学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。

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. 酸化亜鉛

酸化亜鉛ナノ粒子を各種媒体に入れ、超音波処理した場合、平均粒子径約 200~300 nm あるいはマイクロメートルサイズの凝集体となった。各酸化亜鉛の粒子表面はわずかに正の電荷を有するが、サイズや表面処理の差はほとんどなかった。組織中の亜鉛は硝酸、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 ICP-MS で良好に定量できることがわかったが、酸化チタンの分布を確認するには多量の蓄積が必要であった。

2. 酸化チタン

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。各媒体に各種酸化チタンを入れ、超音波洗浄器で処理して調製したが、いずれも数百 nm の凝集体となった。水中では 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かった。ビーズミル法により 10%濃度で SMT-500SAS を分散剤 AT の入った生理食塩水に懸濁したとき、平均粒子径は 131 nm、水に懸濁したときは 89 nm、5%では 74 nm とナノサイズで分散することができた。調製した酸化チタン懸濁液を超音波処理、あるいは高圧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に変化は見られなかった。

ICP-MS は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を作動させ、質量数 49 でチタンをモニターした。各臓器は、硝酸または硝酸とフッ化水素酸の混合溶液を加えマイクロウェーブ分解した。酸化チタンを皮内投与し、7日目に1例、28日目に病理組織学的検査をした。投与部位にはマクロファージが集ぞくし、マクロファージ内には酸化チタンとみられる結晶状物質が認められた。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なかった。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。

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、酸化チタンで培地が白濁し吸光度の測定に正の妨害を与えた。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。

LLNA-DA 法により酸化チタンを塗布したとき、試験群のリンパ節細胞の ATP 量は SI が 3 を超えないことから、皮膚感作性を有しないと判断した。次に、酸化チタンを皮膚感作性物質と同時に適用した時、共存していない場合に比べて若干反応率が増加した。しかし、THP-1 細胞に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。

3. シリカ

試薬グレードのシリカ懸濁液は製品表示に近い平均粒子径の値が得られた。試薬シリカ粒子は水や EG には単分散した。化粧品原料の懸濁液については、水懸濁液で 126~140 nm、EG 懸濁液の平均粒子径は 371~415 nm と凝集体となっているが、安定した凝集径で浮遊した。

試薬シリカはいずれも 1000 µg/ml で THP-1 細胞の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。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、SiO₂-20EG 及び SiO₂-50EG が共存するとコントロールよりも低下した。

シリカで処理した THP-1 細胞の培養上清中に検出された炎症性サイトカインは IL-8 のみであった。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。ケモカインの中では IL-8 と RANTES が認められた。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った。

C-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

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 Pc 値を算出すると 2.4×10^{-10} cm/s となった。Stripped skin において、

Fluoresbrite®はその皮膚表面と毛嚢中にのみ観察された。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。FDs の理論分子径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。

損傷皮膚を用いた in vitro 皮膚透過実験では、Fluoresbrite®は intact skin および stripped skin と同様に razor-treated skin を透過しなかった。Pc の値を算出すると、 2.4×10^{-10} cm/s であった。一方、needle-punctured skin を介する場合、Fluoresbrite®は透過した。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。Razor-treated skin では、Fluoresbrite®はその皮膚（傷）表面に観察されたが、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。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。種々 FD は razor-treated skin を透過した。さらに、razor-treated skin を介した FD の透過性は stripped skin と同程度であった。

酸化チタンを培地に分散させた時、粒子径は 300 nm~4000 nm であった。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。酸化チタンの細胞障害性は HDF よりも HEK に強く現れた。NAT の細胞障害性は他の酸化チタンよりも強かった。LDH 放出量は、NAT を適用した場合他の酸化チタンよりも増加した。コーティングを施した酸化チタンは、施していないものよりも細胞障害性及び IL-1 α を指標とする炎症作用は弱かった。SRT による DNA 合成量の減少は最も少なかった。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より DNA 合成量の減

少率は変化した。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 障害を引き起こすことが示された。

モルモット Adjuvant and patch test 法で NRT は皮膚感作性を示さなかった。感作誘導、惹起後の皮膚には明らかな紅斑や浮腫は見られなかった。

動物組織には一定量のチタンが存在した。静脈投与後、酸化チタンのほとんど（チタン量として約 60%）が静脈内投与後、肝臓に集積した。一方、投与後 6 ヶ月には脾臓のチタン濃度が上昇した。脳への分布は観察されなかった。また腎臓への集積もみられなかった。投与 72 時間後に肝臓の血管内皮細胞と肝実質細胞との間に存在するディッセ腔に微粒子酸化チタンを TEM 観察で確認した。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が形態変化はみられなかった。血清中の BUN や LDH に増加傾向がみられ、CPK は減少傾向を示した。AST、ALT には変化が認められなかった。

D. 考察

本研究では、酸化亜鉛、酸化チタン、シリカを対象とし、媒体や調製法の違いによる粒子径の変化を調べて、各種試験でナノサイズの物質としての評価がされているかどうか確認した。酸化亜鉛及び酸化チタンについては通常行われている超音波洗浄器を用いた分散法では、数百 nm のサイズまで凝集し、ナノサイズの試験液としては不十分である。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とから、粒子同士の静電反発が凝集性に関係すると考えられた。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。本法を用いて、一次粒子径 35 nm の酸化チタンについて、二次平均粒子径が 89~131 nm と、半数以上がナノサイズで存在する懸濁液を調製できた。本懸濁液は滅菌等の処理をしても安定で

あり、酸化チタンのナノサイズの影響を評価するのに有用な試験液となることを確認した。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。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り、凝集性も異なった。このように、ナノ粒子は材質によって、あるいは同じ材質であっても凝集性が異なること、更には懸濁液の調製条件によっても粒子径は異なることがわかった。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、試験時にナノサイズで存在しているかどうか重要である。適切な方法で調製し、粒子径等キャラクタライゼーションをした上で試験することが必要と考えられた。

ナノ粒子の吸収を定量的に証明するため、生体組織の亜鉛やチタンの定量法について検討した。いずれも、組織及び金属酸化物をマイクロウェーブ分解し ICP-MS で定量した。亜鉛は生体内に一定量含有されているため、多量の酸化チタンの蓄積がないと定量的に区別できず、証明することは困難であることがわかった。動物組織には一定量のチタンが存在する。食品や土壌中にチタンが含まれており、これを摂取しているためと思われる。また、容器や機器への残存、分析操作中の外界からの汚染もあり、酸化チタンについては、バックグラウンド値を減少させるための前処理と試験条件の設定が必要であった。

化粧品品のナノ物質の影響として最も危惧されるのは、皮膚を透過して生体内に吸収、蓄積して毒性を示すことである。ヘアレスラットの健全皮膚（Intact skin）、角層剥離皮膚（stripped skin）及び損傷皮膚を用いてモデルナノ粒子蛍光ポリスチレンビーズ（Fluoresbrite®）及び FITC-dextran（FD）の in vitro 皮膚透過性を調べた。Intact skin 及び stripped skin を Fluoresbrite®は透過せず、皮膚表面と毛嚢中にのみ観察された。計算上 Fluoresbrite®の透過係数は落屑速度 1×10^9 cm/s よりも低く、角層を透過経路とする皮膚

浸透は生じないと考えた。一方、同等の理論分子径を有する FD は各皮膚を透過した。この違いは、Fluoresbrite®および FD の（皮膚細孔を含む）皮膚への分配性（溶解性）が寄与していると考えられた。Fluoresbrite®は皮膚（角層）に溶解拡散しないが毛孔へは移行するため、細孔ルート サイズによっては皮膚を透過する可能性があると考えた。Fluoresbrite®は razor-treated skin を透過しなかったが、needle-punctured skin を透過した。穴あけに用いた注射針の外径が大きくなるにつれて Fluoresbrite®の透過量は増大し、貫通孔内に存在を観察した。よって、Fluoresbrite®は注射針により形成された貫通孔（細孔ルート）を透過したと考えられた。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。

多量の酸化チタンが角質層に入ったときの生体分布の可能性を検討するため、ラットに単回皮内投与し各臓器中のチタンを定量した。投与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通常の生体の防御反応であった。各臓器のチタン濃度は対照群と酸化チタン投与群で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であっても検出されるような量ほど分布、蓄積しないことを意味する。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、酸化チタン粒子が検出されるような量が皮膚から吸収し臓器に蓄積する可能性は少ないと考えられた。

更に、静脈内投与試験を行い、全身循環系に入った場合の酸化チタンの体内動態を検討した。酸化チタンのほとんどが静脈内投与後、肝臓に集積した。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。AST 及び ALT の値から肝臓に炎症が生じているという証拠は得られなかった。静脈内投与による同様な結果は他のグループからも報告されている。投与 6 ヶ月後に脾

臓や肝臓中の酸化チタン量が増量するが、酸化チタンが赤血球を凝集し、それらが脾臓で処理され、その後、最終的な処理過程である肝臓に再集積したものだと考えた。腎臓に集積はみられないことから、少量なら肝臓から消失し体外に排泄されていくものと考えられる。

皮膚での局所的なナノ物質の影響を調べるため、皮膚各種細胞に対する毒性を調べた。酸化チタンの細胞障害性は HDF よりも HEK に強く現れた。LDH や IL-1 α 等の遊離が認められ、細胞膜、炎症が起こっていることが示唆された。表面コーティング処理していない NAT は他より細胞傷害性が強く現れた。この原因として、NAT から生成される活性酸素種が起因していると考えている。また、アナターゼ型酸化チタンはルチル型酸化チタンよりも強く DNA 障害を引き起こし、これも活性酸素種の生成に関係していると思われた。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があること、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。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可能性が示唆された。

抗原提示細胞に対する影響は、ヒト単球由来細胞 THP-1 細胞を用いた。本細胞は *in vitro* 皮膚感作性試験で用いられる。浮遊系細胞に対する細胞毒性を TetraColor ONE 色素の取り込み、LDH 遊離、ATP 量で判定した結果、ATP 量を測定する方法が良いと思われた。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。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。シリカは酸化チタンよりも強い細胞毒性を示した。ナノ物質のサイズと材質の両方が毒性強度に関係した。

不溶性のナノ物質は生体にとって異物であ

るため、免疫機能が働くと考える。経皮暴露における免疫機能として皮膚感作性があげられる。酸化チタンについてモルモット及びマウスを用いた皮膚感作性試験では、紅斑やリンパ節の活性化等の反応は起こらなかった。THP-1細胞からは感作誘導に関与する IL-8 の産生は誘導されなかった。以上のことから、酸化チタンに感作性はないと判断した。新たに OECD ガイドラインに採用された LLNA-DA 法は、従来のモルモット試験と同様に、適切な塗布溶媒を使うことによってナノ粒子の感作性を評価できることがわかった。次に、酸化チタンが他物質の感作性反応の増強などの効果を示すか検討した。皮膚感作性物質を酸化チタンとともにマウスに適用した場合、酸化チタンを入れない場合に比べて若干反応が増加し、感作性誘導反応の増強効果が疑われた。実験上、こうした酸化チタンを共存させて塗布すると、白色の色がマウスの耳につくことから、塗布の仕方が丁寧になった可能性もある。これを確認するため THP-1 細胞に各種物質と酸化チタンを一緒に適用した。感作性物質による IL-8 産生は酸化チタンの添加によりむしろ抑制され、酸化チタンは皮膚感作性の誘導を増強する作用はないと判断した。

シリカナノ粒子は単独で IL-8 及び RANTES のようなケモカインを産生した。各シリカについて、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。ケモカインの産生量から見てシリカに皮膚感作性はないと考えられるが、こうしたメディエーター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疑われる。しかし、シリカの種類やサイズによってこうした反応は異なることから、一般的にシリカの作用として捉えるのではなく、試験した物質の影響と捉えることが必要と思われた。

E. 結論

超音波を用いた方法では、酸化亜鉛や酸化チタンを 100 nm 以下の粒子径で分散させるこ

とはできなかった。シリカは同じ材質でも製造元により分散性は異なった。ビーズミル法を用いると、酸化チタンはナノサイズで安定して存在する懸濁液を調製できた。

酸化チタンなどの分散媒や皮膚に溶解しない物質は、皮溝や毛孔周辺に集積しやすく、経角層ルートを経た角層浸透性は著しく低い、もしくは角層に浸透しないと考えられた。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た。従来の *in vivo* 及び *in vitro* 皮膚透過性試験に加えて、「角層浸透性評価」や毛孔などの付属器官からの「皮内移行性」に関する評価方法の確立が必要であると考えられた。

皮内注射した酸化チタンは吸収や蓄積を検出できるまでの量は各臓器に分布しないことがわかった。静脈内投与実験の結果より、多量の酸化チタンが全身循環に移行したとすると、ほとんどが肝臓に蓄積するが、組織に炎症はみられなかった。

種々の皮膚細胞を用いた実験では、酸化チタンの結晶形及び表面コーティングにより細胞障害性及び遺伝毒性が異なることがわかった。シリカの細胞毒性は酸化チタンよりはやや強く、平均粒子径が小さい方が強く表れた

酸化チタン自体には皮膚感作性は認めず、他の皮膚感作性反応を増強する効果も認めなかった。シリカについてはケモカインを介した関与について今後検討が必要であった。

以上、材質やサイズの違いがある場合は、それぞれを評価する必要があると思われた。今回検討したナノ物質の毒性は弱く、ナノサイズの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。ナノ物質のサイズの影響を見るためには、適切に分散した懸濁液を使用し、粒度分布等を測定した上で、得られた結果と比較し評価することが重要と思われる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 (1), 107-113 (2010)

2) 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 (1), 95-100 (2011)

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

4) 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)

5) 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 (8), 1394-1399 (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. 2009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. 2009年11月

3) 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4)

4) 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

5) 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

6) 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

7) 木村恵理子、藤堂浩明、杉林堅次. 微粒子酸化チタンの安全性評価に対する一考察. 日本薬剤学会第23年会. 2008年5月

8) 杉林堅次. ナノ粒子の皮膚曝露・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年9月

9) 木村恵理子、藤堂浩明、杉林堅次. 微粒子酸化チタンの体内分布と毒性評価. 第129年会日本薬学会. 2009年3月

10) Kimura E., Todo H., Sugibayashi K., Do titanium dioxide nanoparticles permeate through skin?, *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences*, October, 2009

11) 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

12) 河野雄一郎、木村恵理子、藤堂浩明、五十嵐良明、杉林堅次. 皮膚に曝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

13) 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

14) 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

15) 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. 分担総合研究報告

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)
分担総合研究報告書

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塗布して使用することから、経皮暴露による影響を考慮した品質及び安全性の確保が重要である。一次粒子径がナノメートルサイズの微粒子、いわゆるナノ物質を配合した製品の場合、ナノ物質自体の評価、及び製品中のナノ物質のサイズに応じた評価が必要と考えられる。一次粒子径 30~40 nm の酸化亜鉛は超音波処理して分散させた場合、数百 nm の大きさに凝集した。酸化チタンは、粒子の結晶形及び表面処理剤、及び媒体に添加する分散剤の種類によって粒度分布が変化した。ナノサイズ酸化チタンの安定した懸濁液はビーズミル法によって調製することができた。市販試薬のシリカはナノサイズで単分散しているが、化粧品原料として使われているシリカは 100 nm 以上の凝集体となり安定して存在していた。

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る。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 で定量した。生体には一定量の亜鉛が含まれており、これと化粧品等からの亜鉛を区別することは量的に困難であった。酸化チタンの場合は、硝酸フッ化水素酸混液で分解した。分解操作で試料にはバックグランドレベルのチタンが常に検出されるため、移行した酸化チタンと区別するには組織中のチタン濃度が数 ppm 上昇することが必要であった。ラットに酸化チタンを皮下投与したが、増加を確認できるチタンは定量できなかった。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、検出できるレベルの量が体内に分布する可能性は低いと思われた。

ナノ物質の浮遊系細胞に対する細胞毒性試験は ATP を指標とする方法が良かった。マウスを用いた感作性試験では、酸化チタンに感作性を認めなかった。酸化チタンとけい皮アルデヒドを同時にマウスに塗布するとリンパ節細胞がより活性化したが、ヒト単球由来細胞からのサイトカイン産生は変化しないことから、酸化チタンによる感作性誘導の増強作用はないとした。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。また、シリカは単独で単球由来細胞から IL-8 を産生した。こうしたケモカインを介してアレルギー反応に影響する可能性があり、これについては今度検討する必要がある。

以上、ナノ物質は材質とサイズともに生体反応に影響することから、それぞれについて評価する必要があると思われた。酸化チタン等についてはナノサイズであったとしても、安全性に関して新たな試験や評価を追加する必要性は認めなかった。サイズの影響を見るためには試験法自体の改良も必要かもしれないが、適切な分散懸濁液を使用し、粒度分布等キャラクタライゼーションした上で、得られた結果を評価することが重要と考える。

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。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。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、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もナノサイズである。化粧品や医薬部外品は日常的に使用する製品であり、このようにナノ粒子を含むことから、ナノ物質のヒトに対する主要な曝露源と考えられる。

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必要である。化粧品や医薬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ナノ物質自体の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。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。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、金属酸化物のナノ粒子を対象とした。ナノ物質のキャラクタリゼーションとして、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の最適な分解条件を検討した。更に、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、皮膚機能傷害の一つとして、細胞毒性及び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。皮膚感作性についてはマウスを用いる試験と細胞からのサイトカイン産生を指標として評価した。

B. 研究方法

1. 材料及び試薬

酸化亜鉛 (ZnO) 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 MZ-300、一次粒子径 30~40 nm で methicone で表面コーティング処理した MZY-303S、及び一次粒子径 250 nm で表面コーティングされていない ZO-250 を用いた。酸化チタン (TiO_2) は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。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 (SiO_2 -20W、 SiO_2 -20EG、 SiO_2 -50EG、 SiO_2 -100EG) を用いた。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 (SiO₂-500) を用いた。化粧品原料グレード (化成品) のシリカとしては、親水性フェームドシリカ粒子 (KF-SiO₂, 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。媒体として、テトラエチルヘキサ酸ペンタエリスリチル (ペンタラン, pentalan-408)、シリコーンオイル (環状シリコーンオイル, TSF405)、リン酸緩衝液、生理食塩水及び水を用いた。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. 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。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 (出力 200W) を用いた。ミキサー (Vortex Genie2, Scientific Industries 社)、VCX 型超音波ホモジナイザー (Sonics & Materials 社製)、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) を粒子の分散に用いた。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。エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (PANalytical 社 Epsilon 5) を用いて元素分析した。

3. 動物

CrI: CD (SD) 系ラットの雄 4 週齢 (60~100 g) を日本チャールス・リバーから入手した。検疫後、馴化期間は約 2 週間とした。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. 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。

5. 懸濁液の調製と粒度分布の測定

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、Vortex 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。また別に、酸化チタンはビーズミル分散機を用い、一定時間処理して 10% 懸濁液とした。シリカは 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で処理した。

調製に用いた媒体を用いてナノ粒子が 0.01 ~ 0.1% 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。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。

6. 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 (図 1)。

酸化チタン懸濁液をスライドガラスに滴下して、乾燥後、白金蒸着して、観察した。

7. 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。

8. 皮膚感作性試験

Local lymph node assay (LLNA)・DA法に準じ、若干変更して行った。マウスの両耳に、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、個体ごとにまとめ、重量を測定した。リンパ節をスライドガラスで押しつぶし、PBS 1 mLで集めてリンパ節細胞(lymph node cell, LNC)浮遊液とした。この 20 μ L を PBS 1.98 mLに入れて希釈した浮遊液について、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。媒体対照群に対する試験群の値の比を stimulation index (SI)とした。

(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及び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。

9. 亜鉛の定量

試料溶液 1 mL を分解容器にとり、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。180 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。試料溶液を ICP-MS に導入し、マス数 66 のピーク強度を測定した。亜鉛標準液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。

10. 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。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 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、組織中の濃度に換算した。

11. 細胞毒性試験

11-1. TetraColor ONE アッセイ

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。

11-2. 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。

11-3. ATP アッセイ

上記同様に培養後、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を用いて10秒間の発光量(RLU)を読みとった。

試験物質のコントロールに対する強度比が

50%となる濃度を IC50 ($\mu\text{g/ml}$)、75%となる濃度を CV 75 ($\mu\text{g/ml}$)とした。

12. 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 μl ずつ入れ 24 時間培養した。試験溶液の濃度は CV75 を基に公比 1.2 で段階的に設定した。培養終了後、3000 rpm で 10 分間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。また別に、上清を BD Cytometric Bead Array (CBA) human inflammatory cytokine kit または chemokine kit (BD Biosciences) で処理し、BD FACSArray 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

C-1. 酸化亜鉛

1-1. 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。しかし 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 (表 2)。各酸化亜鉛の粒子表面は正の電荷を有し、MZ-303S が 20.7、MZ-300 が 23.7、ZO-250 が 19.5 とほとんど差はなかった。

1-2. 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 (表 3)。

C-2. 酸化チタン

2-1. 酸化チタンの分散性

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。

各媒体に酸化チタンを入れ、超音波洗浄器で処理して調製した。シリコンオイル中では、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 であった。SMT-500SAS はエタノールに懸濁した方が小さな値を示した。アナターゼ型の AMT-600 は 1246 nm であった (表 4)。化粧品原料として取り扱われている酸化チタンのシリコンオイル懸濁液は、粒径分布は狭いものの 100 nm 以下のサイズのもの認めなかった (図 2)。シリコンオイル中で、SMT-500SAS は 49.7 mV と正の電荷を有し、MT-500B 及び AMT-600 は負の電荷を有した。水中では逆に、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かった (表 5)。

ホモジナイザー (出力 375 W) で 1 分間処理すると粒子径はわずかに小さくなるが、粒度分布が広がり、いくつものピークを認めた。ビーズミル法により 10%濃度で SMT-500SAS を分散剤 AT の入った生理食塩水に懸濁したとき、平均粒子径は 131 nm、水に懸濁したときは 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)。調製した酸化チタン懸濁液を超音波処理、あるいは高圧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に変化は見られなかった。培地で希釈し 24 時間培養器中で静置し粒度分布を測定した。0.1% (1000 $\mu\text{g/ml}$) 以下では培養前とほとんど同じ粒度分布を示した。

2-2. チタンの定量

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。ここでは、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を作動させ、質量数 49 をモニターした。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。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、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 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。

2-3. 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 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 4)。

2-4. 皮膚感作性試験 (LLNA-DA)

5~20% の酸化チタンを塗布したとき、いずれも SI 値は 3 を超えないことから、試験した酸化チタン粒子は皮膚感作性を有しないと判断した (表 6)。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 (表 7)。

2-5. 細胞毒性

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。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。

2-6. 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-1 β 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 5)。RANTES、TNF- α 及び MIP-1 β についても同様に酸化チタンを添加すると低下した。

3. シリカ

3-1. シリカの粒度分布

試薬グレードのシリカ懸濁液 SiO₂-20W を水で希釈したときのシリカ粒子の平均粒子径は 44 nm、PBS 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 (図 6)。試薬シリカ粒子 (SiO₂-500) は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。

化粧品原料の KF-SiO₂ を EG または 0.1% Tween 80 溶液に 0.1% 濃度で加え 5 分間超音波処理した。KF-SiO₂ 懸濁液の平均粒子径は 0.1%