

Tween 80 溶液中で 468 nm、EG 液では 210 nm であった。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を図 7 に示した。シリカ-水懸濁液の平均粒子径は 126~140 nm、シリカ-EG 懸濁液の平均粒子径は 371~415 nm であった。

### 3-2. 細胞毒性

試薬グレードのシリカはいずれも 1000  $\mu\text{g/ml}$  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。SiO<sub>2</sub>-50W 及び SiO<sub>2</sub>-100W は 1000  $\mu\text{g/ml}$  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 8)。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  $\mu\text{g/ml}$  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、SiO<sub>2</sub>-20EG 及び SiO<sub>2</sub>-50EG が共存するとコントロールよりも低下した。

### 3-3. 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 9 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 SiO<sub>2</sub>-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、SiO<sub>2</sub>-50EG、SiO<sub>2</sub>-100EG の方が SiO<sub>2</sub>-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、シリカで増加が認められるのは IL-8 と RANTES であった(図 10)。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。

## 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、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。多くのナノサイズの金属酸化物は凝集しやすいため、適切な懸濁液を調製し、その粒子径や粒度分布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望ましい。本研究では、酸化亜鉛、酸化チタン、シリカを対象とした。懸濁液の調製法の違いによる粒子径の変化を調べることにより、各種試験でナノ物質としての評価がされているかどうか確認することができた。それぞれの試験の結果は試験液の粒子径と比較することによって、各物質ナノサイズの影響があるかどうか明らかにした。

酸化亜鉛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、ナノサイズとしての影響を見ることはできなかった。

酸化チタンを水系溶媒に超音波処理して分散させた場合、粒子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。本分散法では、分散剤としてヘキサメタリン酸ナトリウム等を加えても効果がなかった。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。よって、これらの方法で調製した懸濁液を用いて試験しても、ナノサイズの影響を見ることはできないと考えられる。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。分散剤を添加して水や生理食塩水に懸濁させると、5~10%濃度でも平均粒子径は 89~131 nm と、半数以上がナノサイズで存在することがわかった。本懸濁液は滅菌等の処理をしても安定であり、酸化チタンのナノ粒子としてのサイズの影響を評価するのに有用な試験液であった。

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。試薬シリカ懸濁液は単分散しているが、化成品シリカ懸濁液は 126~140 nm と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。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た。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。

化粧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。そこで、生体組織の亜鉛やチタン等を定量してナノ粒子の吸収を証明できるかどうか検討した。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。酸化チタンについては、バックグラウンドを減少させるため、ICP-MS では質量数 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必要があった。また、マイクロウェーブ分解ではチタンを溶解するためフッ化水素酸-硝酸混液を分解液として用いる必要があり、分解容器の洗浄度もチタンの定量には大きく影響することがわかった。

多量の酸化チタンが表皮層と透過したと仮定し、単回皮内投与を実施した。この投与量は長期に反復して塗布した場合よりもはるかに多くの皮膚吸収があったとしたモデルである。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。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全皮膚に使用しても、酸化チタン粒子が皮膚吸収される可能性は少ないと考える。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。

細胞毒性はすべての物質に必須とされる最も基本的で評価項目である。本研究では特に、不溶性のナノ物質が皮膚から吸収されると仮定し、これを異物として細胞が認識する抗原提示段階についての影響を見た。THP-1 細胞は皮膚感作性試験で用いられる抗原提示細胞用ヒト単球由来細胞で、浮遊系細胞株である。細胞毒性は、TetraColor ONE 色素、LDH 遊離、ATP 量を指標として判定した。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、酸化チタンによって培地が濁るため正確に吸光度を測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 の溶出量を ELISA で測定する方法であるが、生存率は陽性対照との比較で判定するため値が実験ごとにばらつく可能性がある。一方、ATP アッセイは生細胞中 ATP のルシフェリー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。20 nm の試薬シリカは酸化チタンよりも強い細胞毒性を示した。

次に、ナノ粒子自体の感作性、及び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。5~20%の濃度でマウスに塗布したところ、いずれの酸化チタンもリンパ節細胞の活性化反応は認めなかった。また、THP-1 細胞から感作誘導に関与する IL-8 の産生を誘導しなかった。よって、酸化チタンには皮膚感作性は有しないと判断した。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かった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。NiSO<sub>4</sub>及びCA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。RANTES、TNF- $\alpha$ 及びMIP-1 $\beta$ についても同様に酸化チタンを添加すると低下した。よって、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。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疑われた。こうした反応はシリカの種類によって異なることから、一般的にシリカの作用として捉えるのではなく、試験に用いたシリカの効果として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が、ビーズミル法を用いるとナノサイズで安定して存在する懸濁液を調製できた。シリカは同じ材質でも試薬と化粧品原料では分散性は異なった。

酸化亜鉛や酸化チタンの吸収性を確認するため、生体組織中のチタン及び亜鉛の定量法を確立した。強制的に酸化チタンを皮内注射して生体内に分布するかどうか調べたが、吸収や蓄積を検出できるまでの量は分布しないことがわかった。

酸化チタンとシリカには皮膚感作性は認めなかった。浮遊系細胞を用いる細胞毒性試験では細胞内ATP量を測定して評価するのが適切と思われた。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。シリカはIL-8等を産生させることから、こうしたケモカインを介した他の物質の皮膚

アレルギー反応への関与について今後検討が必要である。

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、サイズの影響も認めなかった。よって、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。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であった。

#### 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 (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 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**, 95-100 (2011)

##### 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) 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

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

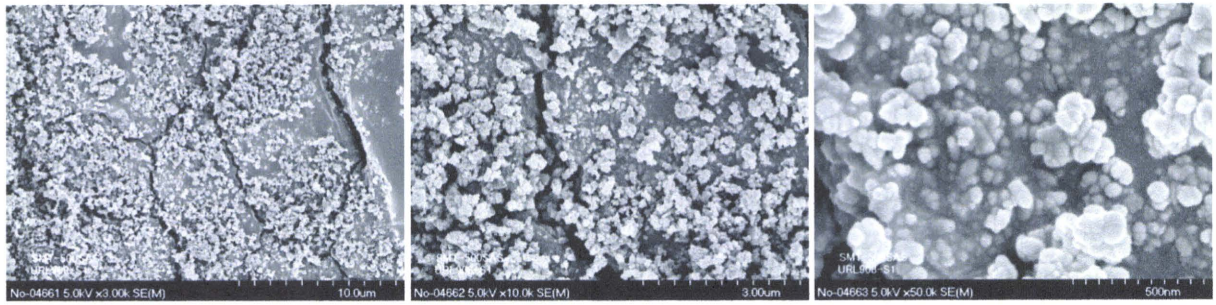
##### 1. 特許取得

なし

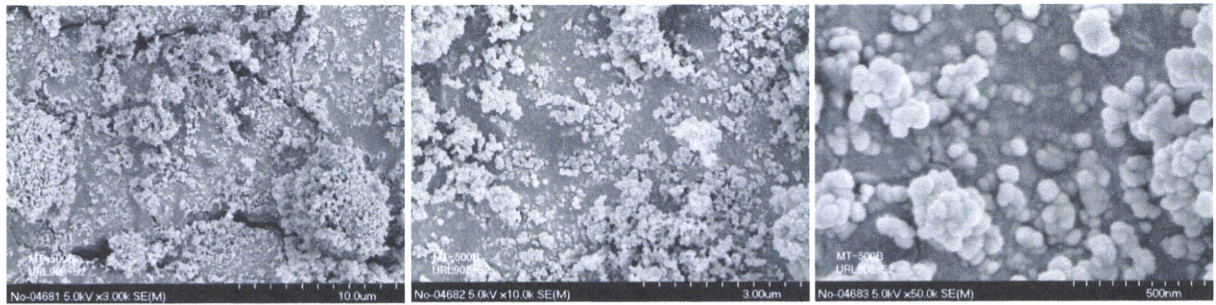
##### 2. 実用新案登録

なし

SMT-500SAS



MT-500B



AMT-600

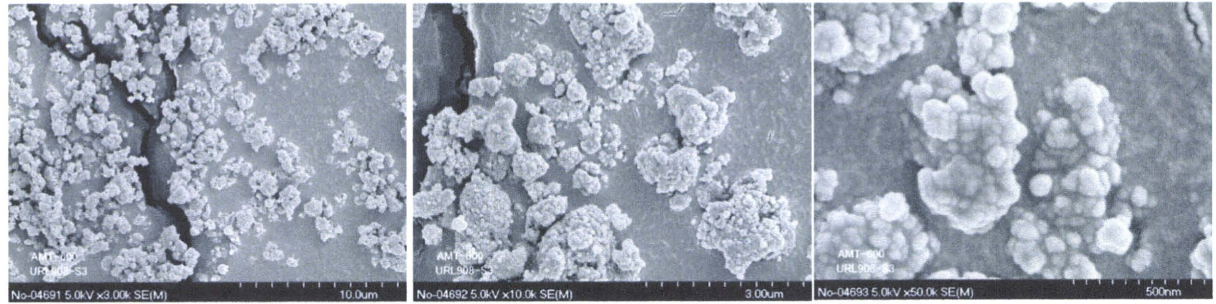


図 1. 酸化チタン粒子の電子顕微鏡写真

表 1. 試験に用いた酸化チタン

|                              | MT-100AQ  | SMT-500SAS  | MT-500SA                                  | MT-500H                        | MT-500B | LU-205 | AMT-600 |
|------------------------------|---|---|---|--------------------------------|---------|--------|---------|
| Particle size (nm)           | 15  | 35  | 35  | 35                             | 35      | 250    | 30      |
| Crystalline phase            | Rutile  | Rutile  | Rutile                                    | Rutile                         | Rutile  | Rutile | Anatase |
| TiO <sub>2</sub> content (%) | 73  | 80  | 90  | 93                             | 98      |        | 98      |
| Surface modifiers            | Al(OH) <sub>3</sub> , SiO <sub>2</sub> ,<br>alginate acid | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , SiO <sub>2</sub> ,<br>silicone | Al(OH) <sub>3</sub> ,<br>SiO <sub>2</sub> | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | -       | -      | -       |

表 2. 酸化亜鉛粒子の各種溶媒中での分散性

|          | Z-Average (d.nm)<br>(Pdl) |                 |
|----------|---------------------------|-----------------|
|          | Pentalan                  | Water           |
| MZY-303S | 180<br>(1.000)            | 253<br>(0.258)  |
| MZ-300   | 282<br>(1.000)            | 329<br>(0.423)  |
| ZO-250   | 308<br>(1.000)            | 1789<br>(0.546) |

表 3. 酸化亜鉛の添加回収試験の結果

| Addition (µg) |       | Detect as Zn (µg) |               | Recovery (%) |             |
|---------------|-------|-------------------|---------------|--------------|-------------|
| ZnO           | as Zn | Mean ± SD         |               | Mean ± SD    |             |
| 0.248         | 0.149 | 0.137             | 0.135 ± 0.007 | 93.2         | 91.4 ± 5.0  |
|               |       | 0.127             |               | 85.9         |             |
|               |       | 0.141             |               | 95.3         |             |
| 2.480         | 1.488 | 1.753             | 1.772 ± 0.034 | 118.8        | 120.1 ± 2.3 |
|               |       | 1.812             |               | 122.8        |             |
|               |       | 1.753             |               | 118.8        |             |

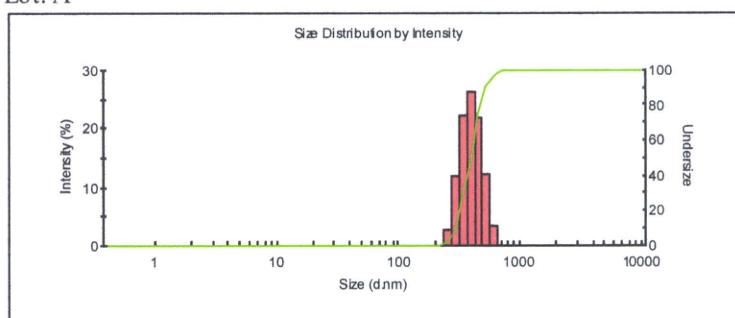
Data are Mean±SD (n=3).

表 4. 各種溶媒中の酸化チタン粒子の平均粒子径

|            | Z-Average (d.nm)<br>(Pdl) |                |                 |                 |
|------------|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|            | Silicone                  | Pentalan       | Water           | Ethanol         |
| SMT-500SAS | 358<br>(0.195)            | 163<br>(1.000) | 159<br>(0.161)  | 178<br>(0.126)  |
| MT-500B    | 560<br>(0.035)            | 411<br>(1.000) | 2006<br>(0.198) | 1235<br>(0.162) |
| AMT-600    | 1246<br>(1.000)           | 300<br>(1.000) | 1091<br>(0.397) | 605<br>(0.429)  |



Lot. A



Lot. B

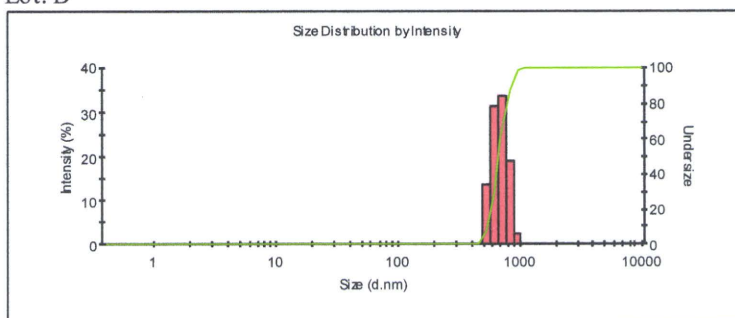


図 2. 化粧品原料として用いられる酸化チタン分散体の粒度分布

表 5. 酸化チタン粒子のゼータ電位

|            | Zeta Potential(mv) |          |       |         |
|------------|--------------------|----------|-------|---------|
|            | Silicone           | Pentalan | Water | Ethanol |
| SMT-500SAS | 49.7               | -        | -39.3 | -43.1   |
| MT-500B    | -84                | -        | 0.208 | -14.6   |
| AMT-600    | -21.8              | -        | 1.23  | -0.413  |

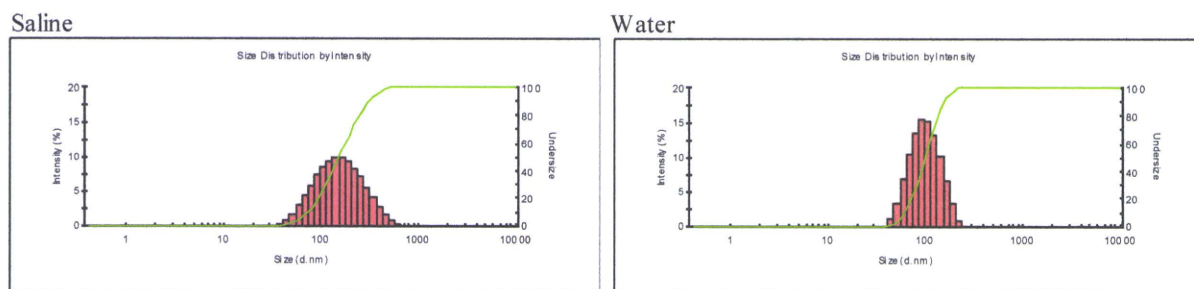


図 3. ビーズミル法で調製した酸化チタン懸濁液の粒度分布

Liver

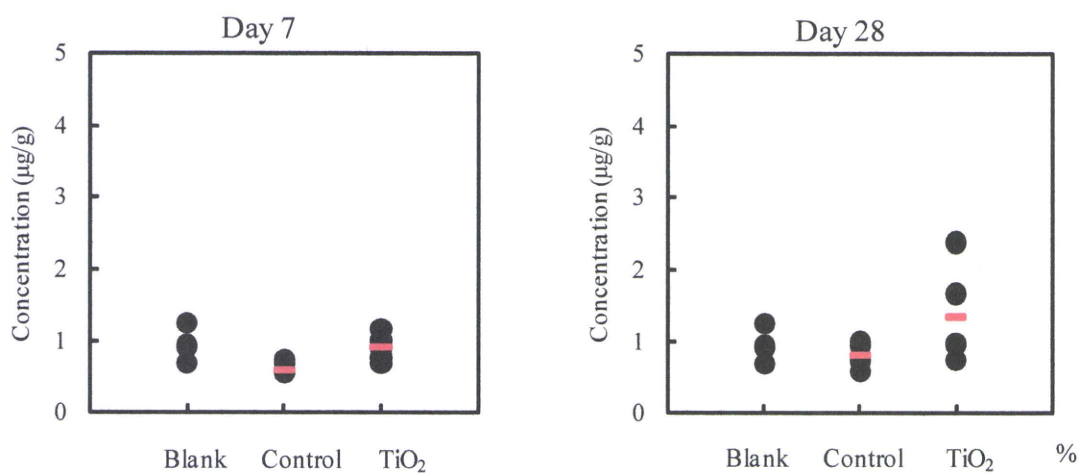
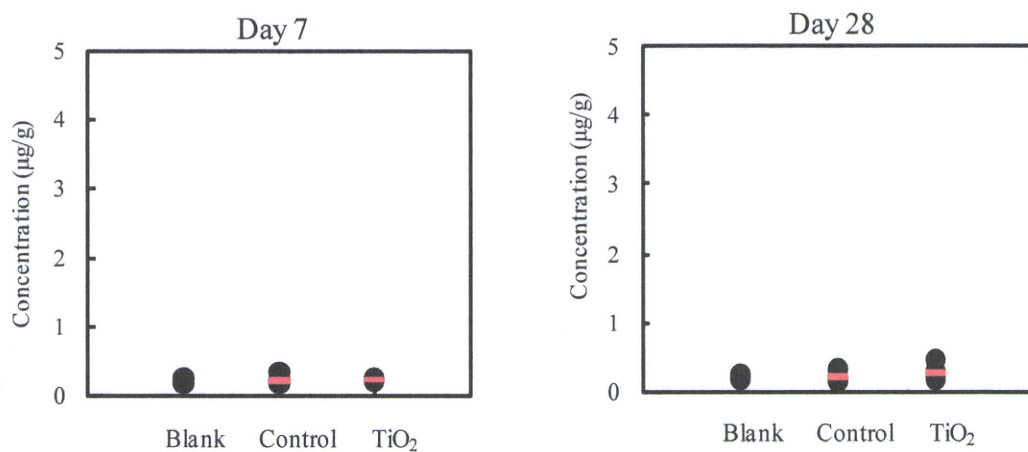


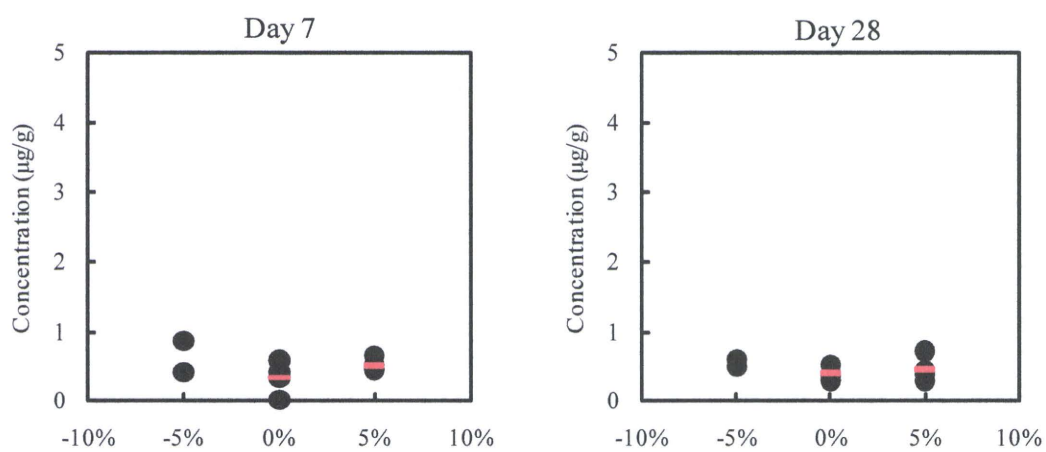
図 4. 酸化チタンを単回皮内投与したラットの臓器中チタン濃度



Kidney



Lung



Spleen

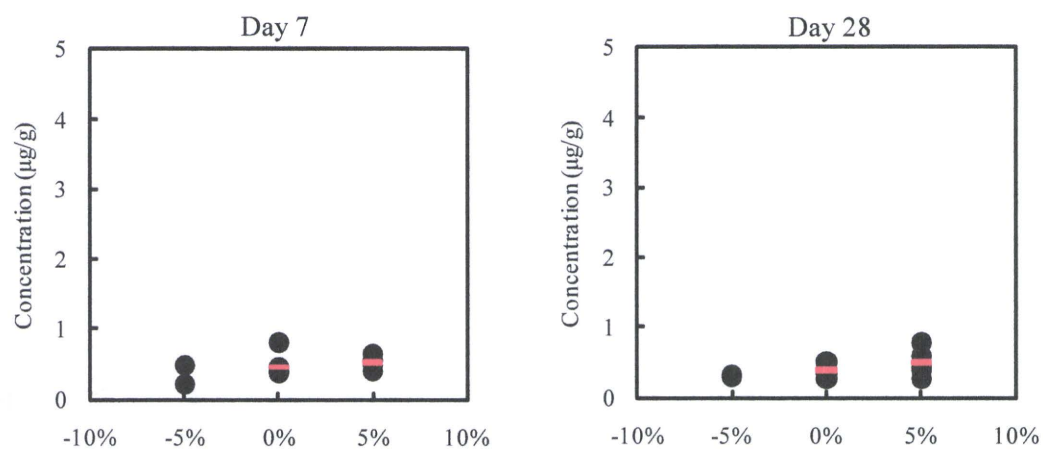
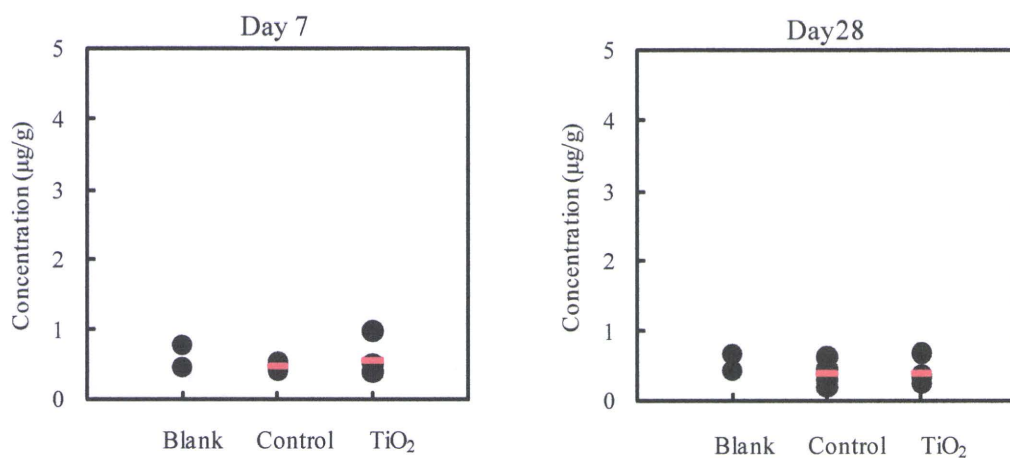
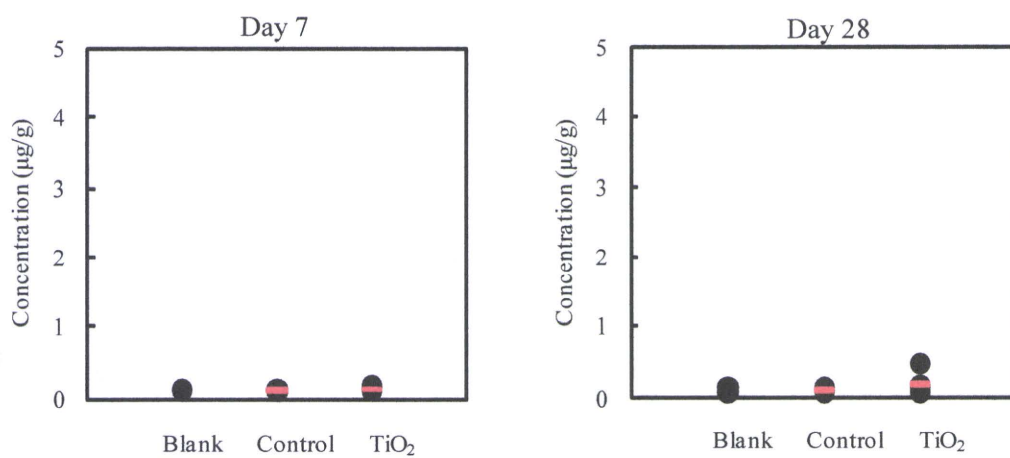


図4. 酸化チタンを単回皮内投与したラットの臓器中チタン濃度 (続き)

Brain



Blood



Serum

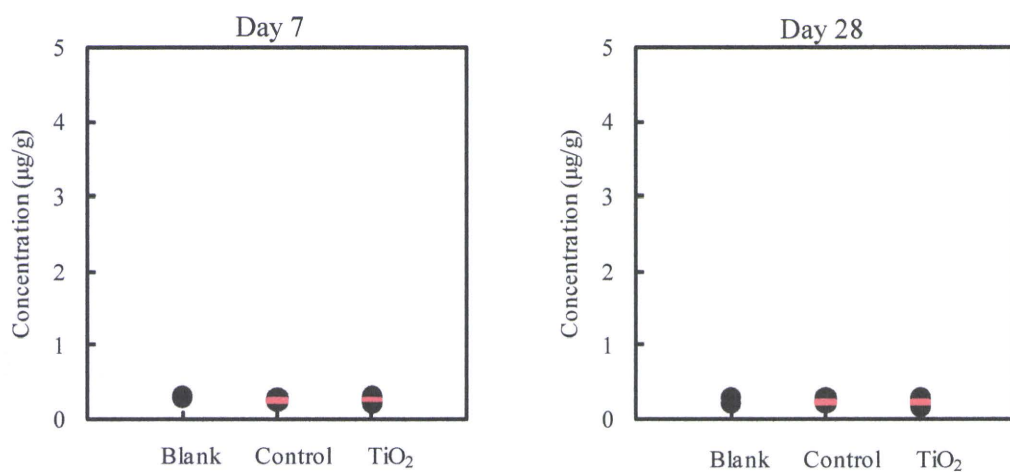


図 4. 酸化チタンを単回皮内投与したラットの臓器中チタン濃度 (続き)

表 6. 酸化チタンの LLNA-DA の結果

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

表 7. CA の感作性反応と酸化チタン共存の効果

(a) Experiment 1

| TiO <sub>2</sub> added | Chemical | Lymph node weight |      | ATP content    |      |
|------------------------|----------|-------------------|------|----------------|------|
|                        |          | (mg)              | SI   | (RLU)          | SI   |
| -                      | CA 0 %   | 5.6 ± 1.3         | -    | 33060 ± 7244   | -    |
|                        | CA 1 %   | 8.1 ± 0.6         | 1.44 | 62982 ± 13313  | 1.91 |
| MT-500B 5%             | CA 0 %   | 5.4 ± 0.4         | -    | 27579 ± 9102   | -    |
|                        | CA 1 %   | 8.3 ± 1.4         | 1.54 | 51239 ± 15965  | 1.86 |
|                        | CA 2.5 % | 13.6 ± 3.0        | 2.52 | 122197 ± 43577 | 4.43 |
|                        | CA 5 %   | 15.0 ± 1.6        | 2.77 | 156071 ± 20130 | 5.66 |
| AMT-600 5%             | CA 0 %   | 6.0 ± 0.7         | -    | 26213 ± 6706   | -    |
|                        | CA 1 %   | 8.9 ± 1.2         | 1.49 | 57831 ± 4940   | 2.21 |
|                        | CA 2.5 % | 14.0 ± 1.7        | 2.33 | 120065 ± 27679 | 4.58 |
|                        | CA 5 %   | 14.3 ± 1.4        | 2.38 | 113968 ± 26306 | 4.35 |

(b) Experiment 2

| TiO <sub>2</sub> added | Chemical | Lymph node weight |      | ATP content    |      |
|------------------------|----------|-------------------|------|----------------|------|
|                        |          | (mg)              | SI   | (RLU)          | SI   |
| -                      | CA 0 %   | 4.5 ± 0.4         | -    | 34899 ± 15361  | -    |
|                        | CA 1 %   | 6.2 ± 1.1         | 1.38 | 53051 ± 10367  | 1.52 |
|                        | CA 2.5 % | 8.2 ± 0.6         | 1.82 | 70737 ± 26583  | 2.03 |
|                        | CA 5 %   | 11.7 ± 1.9        | 2.59 | 123191 ± 6743  | 3.53 |
| SMT500SAS 5 %          | CA 0 %   | 4.9 ± 0.9         | -    | 38876 ± 10381  | -    |
|                        | CA 1 %   | 7.8 ± 3.4         | 1.59 | 100062 ± 15111 | 2.57 |
|                        | CA 2.5 % | 13.0 ± 2.7        | 2.67 | 161555 ± 42670 | 4.16 |
|                        | CA 5 %   | 16.8 ± 4.2        | 3.44 | 235904 ± 76655 | 6.07 |
| MT500B 5 %             | CA 0 %   | 4.4 ± 0.3         | -    | 30178 ± 5817   | -    |
|                        | CA 1 %   | 8.8 ± 0.9         | 2.01 | 65091 ± 24737  | 2.16 |
|                        | CA 2.5 % | 13.9 ± 2.2        | 3.18 | 145698 ± 53533 | 4.83 |
|                        | CA 5 %   | 14.2 ± 2.5        | 3.25 | 134890 ± 32500 | 4.47 |

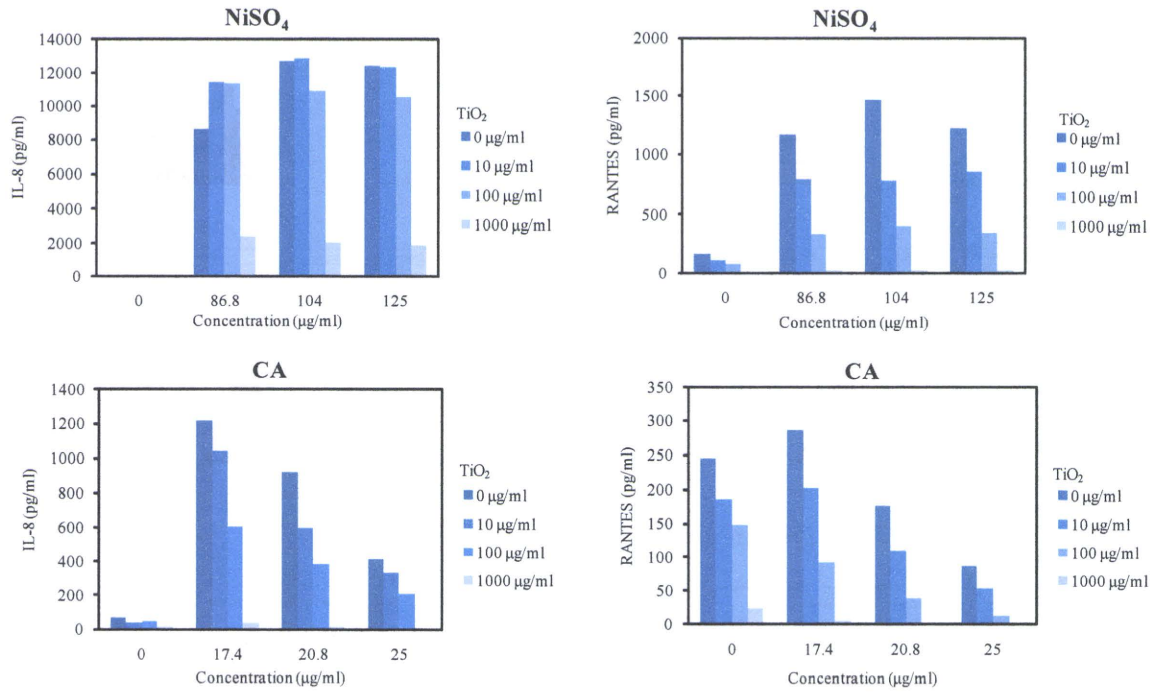


図 5. 酸化チタンが感作性物質の IL-8 及び RANTES 産生に及ぼす影響

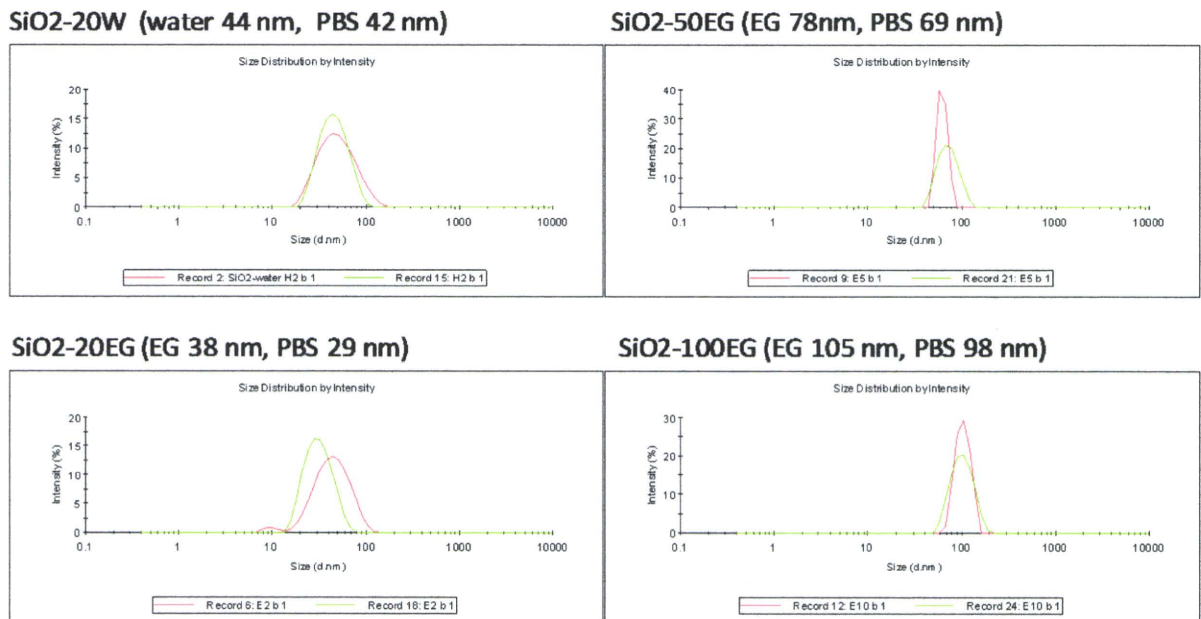


図 6. 各種媒体に希釈した試薬シリカ懸濁液の粒度分布

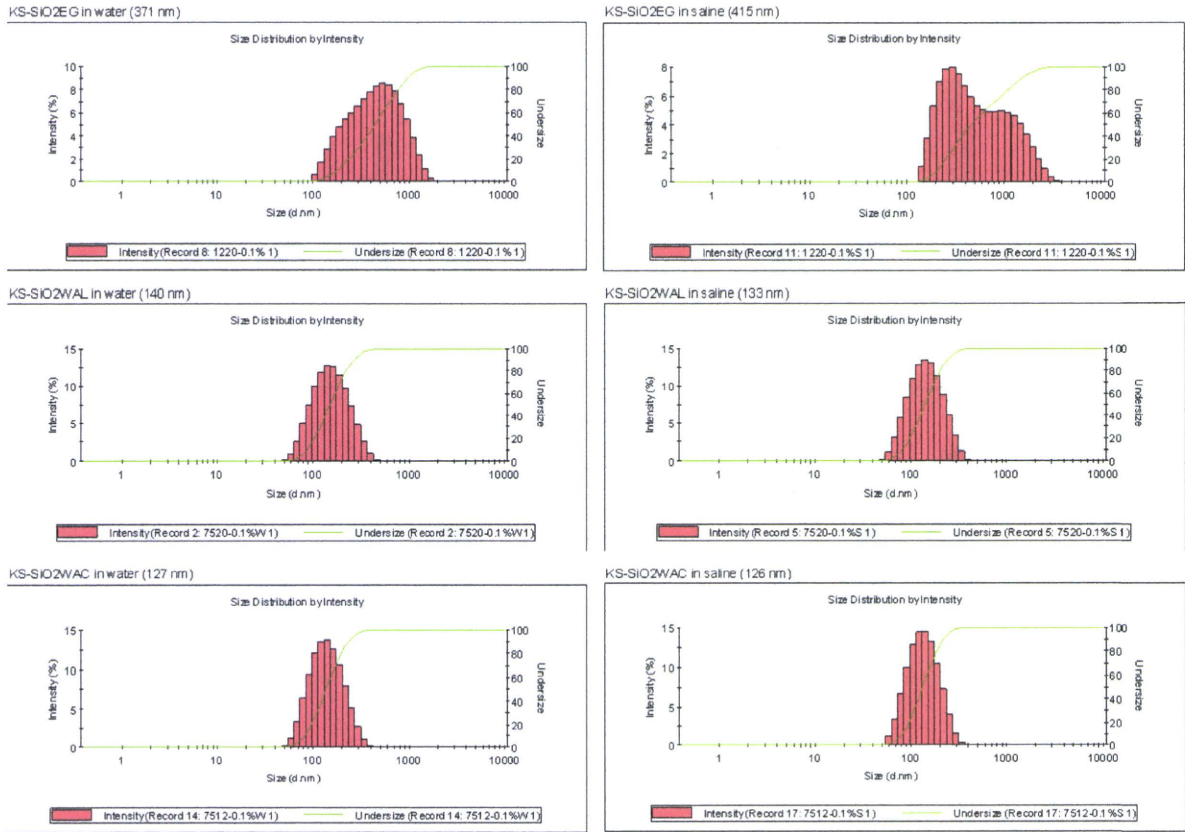


図 7. 各種化成品シリカ懸濁液を水または生理食塩水で希釈したときの粒度分布

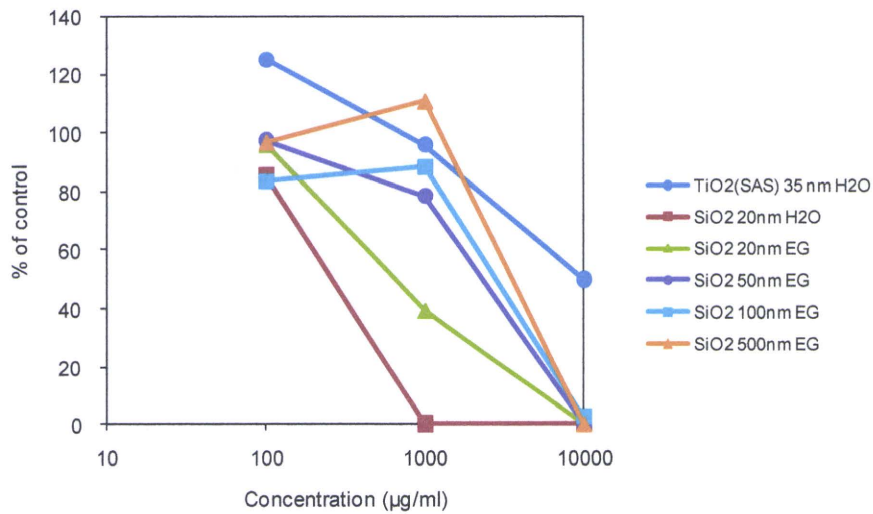


図 8. 試薬シリカの細胞毒性

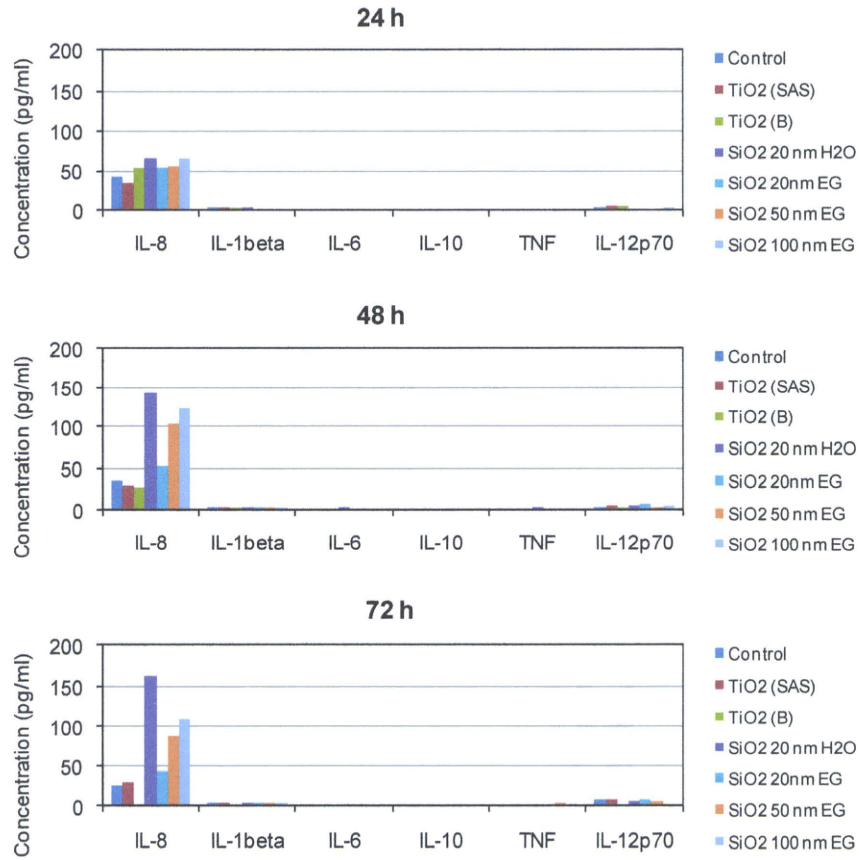


図 9. シリカの炎症性サイトカイン産生能



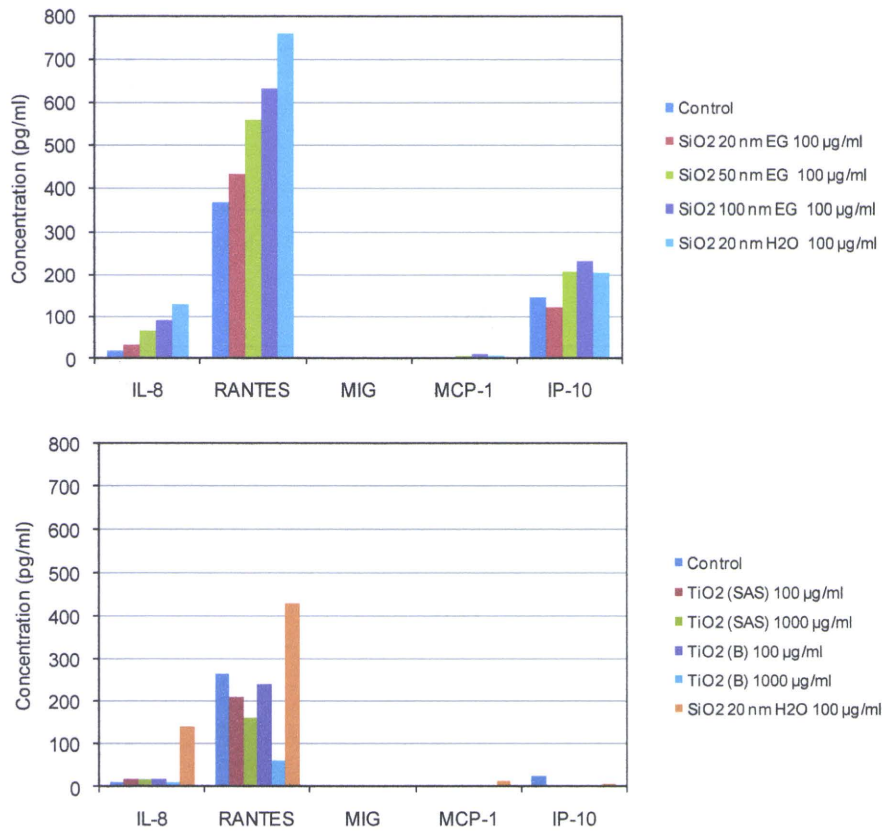


図 10. シリカのケモカイン産生能

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 総括報告書

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：急速な発展を遂げているナノテクノロジーは、様々な分野で利用されている。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品部外品にはナノ化技術により機能性を改善した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。しかし、皮膚に適用する化粧品や医薬品部外品に使用されているナノ物質の主たる曝露経路は皮膚であり、ヒト曝露後のナノ物質の安全性が懸念されている。しかしながら、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しては十分な検討が行われておらず、試験法の開発が急務とされている。そこで、本研究では、ナノ粒子の皮内動態を明らかとし、ナノ物質の皮膚曝露後の皮膚透過・浸透性評価の試験方法について検討した。

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。したがって、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。以上より、ナノ物質を含有する化粧品や医薬品部外品の安全性及び品質を確保するためには、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。

## A. 研究目的

様々な分野で研究・検討された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<sup>1)</sup>。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<sup>2),3)</sup>。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<sup>4),5)</sup>。

安全性の観点からナノマテリアルを分類すると、溶解し生体内で分解されやすいものと不溶性で生体内で分解されにくいものに分類される<sup>6)</sup>。前者の例としてリポソーム、ニオソームなどが挙げられ、これらではナノ粒子の溶解物や代謝物の毒性が懸念される。一方、後者の例としてカーボンナノチューブやアスベストなどが挙げられ、ナノ粒子自体の蓄積性や毒性が知られている。これらの分類に合わせた評価が必要になると考えられる。

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。ナノ粒子の曝露経路として、様々な経路が挙げられるが、化粧品や医薬部外品の曝露を考えると、経皮曝露が重要である。ナノ粒子の皮膚曝露による皮膚透過・浸透性は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<sup>7)</sup>の解明は急務であると考えられる。そこで、本研究では、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、さらに、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と蛍光標識したポリスチレンビーズ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 $\alpha$ 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。さらに、全身循環系へ移行した場合を想定し、静脈内投与後の体内分布についても評価した。

## 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<sup>7)</sup>。「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<sup>7),8)</sup>。

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ーン膜が挙げられる。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<sup>9)</sup>。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 $\mu\text{m}$ 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( $P_{\text{des}}$ )は1 $\mu\text{m}/\text{day}$ 、すなわち約 $1 \times 10^{-9}$  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<sup>10)</sup>、「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 $P_{\text{des}}$ の大小関係から、①

$P - P_{\text{des}} \gg 0$ 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  $P \approx P_{\text{des}}$ 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  $P - P_{\text{des}} \ll 0$ 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、レーザー容量、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。

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

ここで、 $P_c$ は計算より求められた最大透過係数、 $C_{\text{min}}$ は定量限界濃度、 $V$ はレーザー容量、 $A$ 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。

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

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  $\gamma$  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。白色ワセリンは小塚製薬株式会社 (東京) から購入した。1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) は東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。sodium dodecyl sulfate (SDS) と Sudan I は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。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/JLA-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。雄性モルモット (KwI:Hartley、体重 350-400 g) は埼玉実験動物供給所 (埼玉) から購入した。雄性マウス (ddY、体重 30 - 33g) は三共ラボサービス株式会社 (東京) 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」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