

201132065A

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部外品の安全性
及び品質確保に関する研究

平成 23 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 24 (2012) 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関する研究・・・・・・・・・・1
五十嵐良明

II. 分担総合研究報告

1. ナノ物質の分析及び暴露評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19
杉林 堅次

I. 総括研究報告

平成 23 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部外品の安全性及び品質確保に
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、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。ナノサイズの微粒子は化粧品や医薬部外品に広く用いられているが、ナノ物質自身の安全性やこれを配合したときの品質変化については明確な結論は出ていない。ナノ物質は原料製剤あるいは最終製品中では凝集しサイズ変化している可能性がある。動物あるいは細胞を用いた試験でも、ナノ物質のサイズが影響しているかどうかを評価するには、調製した試験懸濁液の粒度分布を調べておく必要がある。本研究では、ナノ物質懸濁液の適用時のサイズ、体内吸収されたと仮定し消化管及び血液中でのサイズ変化に関する情報を得るため、種々の媒体で希釈して粒度分布を測定した。ナノ物質の材質及びその表面処理によって程度は異なるが、塩、血清及びタンパク質が入った溶液では凝集して平均粒子径が大きくなるものが多かった。このことは、一次粒子径がナノサイズであっても製剤、製品化の段階あるいは体内吸収されたときには凝集し、ナノサイズのまま存在する量は非常に少ないことを示唆する。

ナノ物質の免疫機能に対する影響を調べる目的で、化学物質による皮膚感作性の誘導反応をナノ粒子が増強するかどうか検討した。ナノ物質で前処理したヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に感作性物質を暴露して、細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現率を調べた。シリカで前処理した細胞では、皮膚感作性物質による CD54 発現率は若干増加したが、CD86 発現率は変化なかった。他の酸化チタン及び酸化鉄については明らかな感作誘導反応の増強作用は認めなかった。

ナノ粒子の安全性や品質を確保するには、物質の暴露時間や暴露濃度を評価する必要があるため、皮内分布だけでなく皮内動態の速度論解析が重要となる。皮膚に適用したナノ粒子は主に毛包開口部に集積することが知られている。しかしながら、毛包内動態については十分にわかっていない。皮膚局所製剤ガイドラインに示されているテープストリッピング法や *in vitro* 皮膚透過性試験は、毛包に集積したナノ粒子の皮内移行ルートや毛包内の物質動態を評価する方法としては十分ではない。本研究では、ナノ物質の角層もしくは毛嚢移行性の評価方法および毛嚢内動態を評価する方法の確立を目指し検討を行った。その結果、従来の評価方法だけでなく、毛嚢プラグング法や顕微鏡を併用した新規評価法の確立が必須と考えられた。

研究分担者

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
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

ナノテクノロジーは、ナノメートルサイズで物質の構造・配列を制御することで新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術とされ、その技術開発が活発に進められている。OECDはじめ各種ガイドラインでは、一般に一次元のいずれかのサイズが 100 nm 以下のものをナノ物質と定義している。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ため、ナノ物質の曝露経路や性質を考慮した安全性評価法の確立が望まれている。安全性評価の観点からは、生体内で溶解し分解されるナノ粒子は溶解物や代謝物の毒性を評価すること、生体内で分解されにくいナノ粒子はそれ自体の蓄積性や毒性を評価することが重要と考えられる。

化粧品や医薬部外品では数十 nm の酸化チタン、酸化亜鉛及びシリカの不溶性微粒子が機能性の向上に重要な役割を担っていることはよく知られている。製品中ではナノ物質は他成分の影響で凝集し、サブミクロン程度の大きさになっていること予想されるが、一方で界面活性剤によりナノサイズでよく分散している可能性もある。化粧品や医薬部外品を皮膚に擦り込み塗布する際には機械的な力がかかり、凝集体の再分散が起こる可能性もある。口紅のように非意図的に経口摂取される化粧品もあり、ナノ物質は体液や生体タンパク質と相互作用し粒度分布が変化すると思われる。したがって、ナノ物質を配合した化粧品や医薬部外品の品質及び安全性は、一般的な溶媒へのナノ物質の分散性だけでなく、他の化粧品成分あるいはタンパク質が共存したときの粒度分布についても検討しておく必要がある。

化粧品は連日皮膚に塗布するものであり、使用時に目、鼻、口などから直接体内に入る可能性が考えられる。塗布量は少なくとも使用頻度が高いため、毎回洗浄しても皮膚に微量残る可能性がある。一般に、経皮曝露後の化学物質の安全性は、皮膚透過試験によって皮膚透過量や

吸収量を定量的に測定することで評価される。しかし、健常皮膚を用いた透過性試験では、微粒子について定量的な評価が十分に行われていないのが現状である。ナノ物質が皮膚を介して皮内および体内へ移行するには、皮膚の最外層に位置する角層を突破する必要がある。もしくは、毛嚢、汗腺、および皮脂腺を介して皮内に侵入する必要がある。ナノ物質の皮膚移行性や皮内分布に関する報告は多く存在するが、主に、画像解析のみによる結果である。また、皮膚に適用したナノ物質は主に毛包開口部に集積するとされているが、集積したナノ物質の毛包から皮内への移行性など毛包内動態については十分にわかっていない。ナノ物質を含有する化粧品や医薬部外品の安全性や品質を確保するには、物質の皮内曝露時間や曝露濃度を評価する必要があるが、画像観察結果だけでなく、皮内動態を速度論にて解析する必要がある。

これまでの研究で、ナノ粒子は健常なバリアを有する皮膚を透過しないこと、また、皮膚を貫通した穴を介した時のみ皮膚を透過することを明らかにした。そこで、本年度は付属器官からのナノ粒子の皮内浸透性を評価する実験方法（毛嚢プラグging）の確立を目指した。また、酸化チタン (TiO_2) ナノ粒子を含むサンスクリーン剤を適用し、 TiO_2 の皮膚表面分布を観察し、ナノ粒子の皮膚表面での分散性についても調べた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による高分子物質の毛包内動態や皮内動態の解析方法の確立も併せて行った。

ナノ物質を配合した化粧品及び医薬部外品の安全性を考える上では、ナノ物質単独の皮膚機能に及ぼす作用だけでなく、他成分との複合効果についても検討する必要がある。本研究では、皮膚感作性反応に対するナノ物質の増強効果を明らかにする。既に、 TiO_2 及びシリカについては、マウスを用いた LLNA:DA 法による皮膚感作性については検討し、その一部のナノ物質についてはケモカイン産生能を調べてきた。ここでは、化学物質の感作誘導期の細胞表

面抗原の発現率を指標とした h-CLAT 法を利用して、ナノ物質、あるいはナノ物質と感作性物質との複合影響を評価した。

B. 研究方法

B-1. ナノ物質の分析及び暴露影響評価

B-1-1. 粒度分布の測定

ナノ物質は、水、生理食塩水 (saline)、リン酸緩衝液 (PBS、pH 7.2)、人工腸液 (pH 6.8)、人工胃液 (pH 1.2)、1% 牛血清アルブミン (BSA) 溶液、1% BSA-PBS、牛胎児血清 (FBS) 及び培地 (FBS-RPMI) で希釈し、攪拌後、動的光散乱法により粒度分布を測定した。

B-1-2. 細胞表面抗原の解析

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞浮遊液に各ナノ物質が 0、1、10 及び 100 $\mu\text{g/ml}$ の最終濃度となるように添加し 24 時間培養した。次に、感作性物質の硫酸ニッケル (NiSO_4) または 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 溶液を加え、更に 24 時間培養した。以下、h-CLAT 法のプロトコールに従って操作し、フローサイトメーターを用いて、10000 個の生細胞についての細胞表面抗原 CD54 及び CD86 発現率を相対蛍光強度 (relative fluorescence intensity, RFI) から求めた。

B-1-3. ケモカイン産生

上記で培養上清を回収し、BD Cytometric Bead Array (CBA) human chemokine kit (BD Biosciences 社) で処理し、IL-8、TNF、RANTES、MCP-1、MIG 及び IP-10 の含有量を BD FACSArray によって測定した。

B-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

B-2-1. 走査型電子顕微鏡および元素マッピングによる皮膚表面観察法

三元豚ブタ耳の耳介外部皮膚を摘出し、これに市販サンスクリーン剤を塗布し、走査型電子顕微鏡により皮膚表面を観察した。元素マッピングより微粒子酸化チタンと微粒子酸化亜

鉛を確認した。

B-2-2. In vitro 皮膚透過実験

ブタ耳皮膚の毛嚢開口部に毛嚢プラグニング剤を塗布した皮膚、または未処理皮膚を縦型拡散セルにセットした。角層側及び真皮側ともに pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) を適用し水和後、角層側に Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4、M.W.: 4 kDa) を適用し 12 時間の皮膚透過実験を行った。経時的に真皮側からサンプリングを行い、蛍光分光光度計を用いて FD-4 量の測定を行った。なお、実体顕微鏡デジタルカメラで撮影した写真を用いて皮膚に塗布されている毛嚢プラグニング剤の面積を測定し、縦型拡散セルの有効透過面積から差し引いて、有効透過面積を算出した。皮膚透過実験終了後の皮膚は薄切し、包埋、凍結後、切片を作成した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いて観察した。

B-2-3. 画像観察による皮内動態解析

厚さ 2.0 mm のシリコンゴムシートに直径 6.0 mm の穴を開けた鋳型に、種々の濃度の FD-4 含有寒天溶液を流した込み、室温で冷却固化し、寒天ゲル膜を作製した。これらはマイクロチューブ用ホモジナイザーで処理後、遠心し、上清の蛍光強度を測定した。また、CLSM を用いて寒天ゲル膜を観察した。

C. 研究結果

C-1. ナノ物質の分析及び暴露影響評価

C-1-1. 粒度分布

試薬シリカ (SiO_2) 懸濁液 (表示一次粒子径: 50 nm) は、人工胃液、人工腸液をはじめとして試験したほとんどの媒体中で一定の粒子径を保ち、FBS に懸濁したときのみ凝集が起こった。化成品シリカ懸濁液 $\text{SiO}_2\text{-W}$ は、培地と FBS に混和すると著しい凝集が認められた。

酸化チタン $\text{TiO}_2\text{-SAS}$ については人工胃液及び培地等のタンパク質含有溶媒で凝集が認められた。 $\text{TiO}_2\text{-B}$ は、 $\text{TiO}_2\text{-SAS}$ よりも凝集しやすかった。

酸化鉄 (Fe_2O_3) 懸濁液を水で希釈したとき

の平均粒子径は 90 nm で、人工胃液では分布は変わらないものの、生理食塩水等他の溶媒で希釈すると著しい凝集が起こった。

C-1-2. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

酸化ニッケル (NiO) 粒子は NiSO₄ ほどではないが、THP-1 細胞の CD54 の発現率を増加させた。SiO₂ 50 nm は CD86 発現量には影響しないが、CD54 発現量を 100 µg/ml でわずかに増加した。SiO₂ 50 nm で前処理した細胞における DNCB に対する CD54 発現量は、前処理しない細胞における発現量に比べ 4.5 倍となった。酸化チタン TiO₂-B 及び酸化鉄 (Fe₂O₃) については CD86 及び CD54 の発現量を増加させることはなく、NiSO₄ による反応に対しても影響なかった。

C-1-3. ケモカイン産生

NiSO₄ で産生量が増加したのは IL-8 及び RANTES であった。100 µg/mL で RANTES の産生量はコントロールの 5 倍程度、IL-8 はより著しい増加を示した。NiO は細胞毒性を示さない濃度の範囲内で、IL-8 の産生量をコントロールの 3 倍程度の 2000 pg/mL 以上まで増加した。

C-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

C-2-1. サンスクリーン剤の皮膚表面分布

皮膚に適用したサンスクリーン剤は皮溝部に集積し、毛嚢ロート部に凝集粒子が認められた。皮膚表面の SEM 画像の元素マッピングでは、チタン (Ti) と亜鉛 (Zn) はサンスクリーン剤中の酸化チタンや酸化亜鉛粒子の集積部位と一致した。すなわち、ナノ粒子は皮膚表面から少し低くなった部位に集積した。

C-2-2. プラッキング処理を施した皮膚を介した物質透過性

毛嚢プラッキング剤は、水を適用しても皮膚表面に広がることなく、毛嚢部分に留まっていた。毛嚢プラッキング未処理皮膚の毛嚢開口部および毛嚢深部では、FD-4 由来の緑色蛍光が確認できた。一方、毛嚢プラッキング処理をした皮膚の毛嚢開口部では FD-4 由来の緑色蛍光

は確認できなかった。毛嚢プラッキング剤は、毛嚢ルートを経た皮膚からの薬物の侵入を抑えることがわかった。

毛嚢プラッキング未処理皮膚を介した FD-4 の 12 時間の累積透過量は毛嚢プラッキング処理した皮膚に比べて高かった。また、毛嚢プラッキング処理数が増えるに伴い FD-4 の皮膚透過量は減少した。プラッキング処理数が 10 個の時は、他の処理個数と比較して高値を示したものの、毛嚢プラッキング処理数が異なる場合でも毛嚢 1 個あたりの FD-4 の皮膚透過量はほぼ同じ値を示した。毛嚢プラッキング数の増加とともに FD-4 の皮膚透過係数は減少し、その関係には良好な相関が得られた。

C-2-3. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた皮膚中濃度解析

寒天膜を介した FD-4 の透過プロファイルから得られたパラメータを用いることで、深さ方向の皮膚中濃度を数学的解析により予測した。次に、この皮膚中濃度予測値と共焦点レーザー顕微鏡を用いて算出した FD-4 の concentration-distance プロファイルを比較した結果、ほぼ一致した。

D. 考察

シリカ懸濁液は、各種媒体中でほとんど粒子径及び粒度分布は変化しないが、BSA 含有溶液、FBS 及び培地中では粒子径が大きくなった。ナノサイズのシリカ粒子を含有した口紅等を使用し経口摂取することを想定し、胃や腸の消化液中での粒度分布を測定したが、今回大きな変化は認めなかった。しかしながら、消化液には人工胃液や人工腸液とは異なり各種酵素としてタンパク質が共存する。先のタンパク質含有溶液の試験ではサイズの変化が認められることから、消化管でも酵素や他の食物成分により凝集が引き起こされると思われる。また、万が一吸収され血液に入ったとしても、FBS の例からわかるように著しい凝集が起こり、ナノサイズのまま体内分布することは困難と考えられた。また、培地に懸濁すると粒度分布が

変化することから、細胞培養試験で細かなサイズの差の影響を示すことは難しいと思われる。

酸化チタンは人工胃液及び培地等のタンパク質含有溶媒で凝集が認められた。酸化チタンは化粧品以外にも食品顔料や薬品賦形剤としても用いられており経口摂取されるが、胃中では消化液及び他の食品のタンパク質との混和により凝集し、ナノサイズのまま存在する割合は非常に少なくなると考えられる。また培地中での粒度分布の結果を見ると、適用した試験懸濁液中の粒子サイズが反応と関連しているか判断するのは難しいと思われる。酸化鉄は人工胃液で希釈しても変わらないものの、生理食塩水や人工腸液等他の溶媒で希釈すると著しい凝集が起り、体内で凝集体として存在分布すると考える。

サンスクリーン剤を塗布した皮膚表面の SEM 画像および元素マッピングから、サンスクリーン剤中の酸化チタンや酸化亜鉛ナノ粒子は、皮溝や毛孔周辺に、すなわち皮膚表面から少し低くなった部位に集積することがわかった。これまでもナノ粒子は皮膚を透過しないものの、毛嚢中に侵入すると報告されており、本研究の結果はそれらの報告と一致している。皮内（角層内）動態を解析する方法として、皮膚局所製剤ガイドラインに示されているテープストリッピング法が用いられる。角層は凸部である皮丘と凹部である皮溝があり、テープは凹部に届かないため、本法では、主に毛孔や皮溝などの凹部に分布するナノ粒子の皮膚（角層）中濃度を正しく評価できないと考えられた。

毛嚢プラグニング未処理皮膚を介した FD-4 の累積透過量は毛嚢プラグニング処理した皮膚に比べて高かった。また、毛嚢プラグニング処理数が増えるに伴い FD-4 の皮膚透過量は減少し、毛嚢プラグニング処理が水溶性高分子物質の皮膚透過を低下させることがわかった。一方、毛嚢プラグニング処理を施した皮膚を用いて低分子脂溶性物質の皮膚透過挙動を調べると、プラグニング処理の有無にかかわらず、薬物の皮膚透過挙動は一致した。この結果より、

プラグニング処理は水溶性高分子物質などの経毛嚢ルートを通じて皮内に侵入する物質の皮膚透過性を著しく抑えることがわかった。

毛嚢プラグニング処理数が異なる場合でも毛嚢 1 個あたりの FD-4 の皮膚透過量はほぼ同じ値を示した。しかし、実際の皮膚では、FD-4 の毛嚢を介した皮膚透過は毛嚢ごとに毛の長さや太さ、及び毛嚢開口部の大きさなどが異なるためばらつく原因となる。一方、毛嚢プラグニング数の増加とともに FD-4 の皮膚透過係数は減少し、良好な相関性が得られた。このことは、物質の皮膚透過経路を経角層経路と経付属器官経路に区別して評価できることを示唆する。毛嚢プラグニング法は毛嚢を介して皮内に浸透する物質の評価が可能であり、毛嚢プラグニング法、テープストリッピング法及び SEM 画像観察を組み合わせることで、ナノ物質の皮膚浸透性が評価可能となると思われる。

寒天膜を介した FD-4 の透過プロファイルから得られたパラメータを用いることで、深さ方向の皮膚中濃度が数学的解析により予測できることがわかった。皮膚中濃度予測値と共焦点レーザー顕微鏡を用いて算出した FD-4 の concentration-distance プロファイルはほぼ一致した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた場合も皮膚に適用した薬物の皮膚中濃度を測定できる可能性が示唆された。

CD54 は抗原提示細胞への T リンパ球接着を媒介に関与し、炎症性メディエーターによって発現が増強される。高濃度のシリカではわずかながら炎症性サイトカイン IL-8 の産生が増加し、試験物質の細胞毒性も増強されて CD54 の発現を増強させた可能性がある。CD86 も細胞活性化により発現し、T 細胞への抗原提示におけるインテグリンリガンド（補助刺激分子）として働く。感作性物質によって CD54 と CD86 の発現率は異なることが知られており、シリカが CD54 だけで CD86 を増加させない理由はわからない。異物に対する接着性がこの差に関与しているのかもしれない。酸化チタン及び酸化鉄については細胞表面抗原発現を増強するこ

とはなかった。

THP-1 細胞からの IL-8 産生は感作性評価に有用な指標とされる。NiO は IL-8 をコントロールの 3 倍程度に増加した。このことは、NiO ナノ粒子は感作誘導する可能性があることを示す。今後、ナノ物質で前処理した細胞における感作性物質によるケモカイン産生を検討し、細胞表面抗原発現率などの結果と付き合わせ、ナノ物質の免疫反応性の増強作用の有無、材質やサイズの差について確認する。

E. 結論

金属酸化物ナノ粒子は、リン酸緩衝液のように塩が添加したり、培地など血清やタンパク質が入った溶液で希釈したりすると凝集し、平均粒子径が大きくなるものが多かった。このことは、一次粒子径がナノサイズであっても、多くのナノ物質は製剤あるいは製品化の段階で凝集し、ナノサイズで存在する量は非常に少ないことを意味する。

ナノ粒子を含む化粧品及び医薬品部外品を皮膚に塗布すると、ナノ粒子は付属器官に集積しやすく、局所皮膚適用製剤のガイドラインに示されたテープストリッピング法だけではナノ粒子の角層内動態評価を評価できないと考えられた。毛嚢内から皮内への移行ルート、もしくは毛嚢内動態を評価するためには従来の評価方法だけでなく、毛嚢プラグギング法や顕微鏡を併用した新規評価法の確立が必須と考えられた。

化学物質による皮膚感作性の誘導をナノ粒子が増強するかどうか調べた。シリカ単独では細胞表面抗原の発現量に変化を及ぼさなかったが、シリカで前処理した細胞では皮膚感作性物質による CD54 の発現率が若干増加した。一方、酸化チタン及び酸化鉄について増強作用は認めなかった。ナノ物質の材質あるいは媒体中のサイズによって反応性が変化する可能性がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 五十嵐良明、内野 正、西村哲治. 酸化チタンナノ粒子の皮膚感作性に及ぼす影響. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7)
- 2) 木村恵理子、河野雄一郎、高坂美加、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はどこへ移行するのか? 第 26 回日本薬剤学会 (2011.5)
- 3) 正木涼介、石井宏、藤堂浩明、杉林堅次. 物質の皮膚中濃度-位置プロファイル評価法の確立. 第 55 回日本薬学会関東支部大会 (2011.10)

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

3. その他

なし

II. 分担研究報告

平成 23 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部外品の安全性及び品質確保に
関する研究

分担課題名：ナノ物質の分析及び暴露影響評価

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、いわゆるナノ物質は、既に化粧品や医薬部外品に広く用いられている。しかし、これらの粒子が原料製剤あるいは最終製品中でナノサイズのまま存在するかどうかは不明であり、ナノ物質の動物あるいは細胞を用いた安全性評価試験での結果が、ナノ物質のサイズに依存するものかどうかも明確ではない。これを明確にするためには、試験懸濁液、消化管及び血液中のナノ物質のサイズ等の情報を得ることが重要である。ナノ物質の適用時、細胞培養時及び体内吸収時の存在状態を予想するため、これらを模倣する各種溶媒にナノ物質を懸濁して粒度分布の変化を調べた。表面処理していない酸化チタンの懸濁液は水から他の溶媒に希釈するといずれも著しい凝集が起こった。それぞれのナノ物質によって凝集する媒体は異なるが、リン酸緩衝液 (PBS) のように塩が添加され、培地など血清やタンパク質が入った溶液では凝集して平均粒子径が大きくなるものが多かった。このことは、一次粒子径がナノサイズであっても製剤あるいは製品化の段階で凝集し、ナノサイズのまま存在する量は非常に少ないことを示唆する。また、*in vitro* 試験では培地中での粒度分布を測定することが、粒子径の効果を比較する上で重要であることを示している。

ナノ物質の免疫機能に対する影響を調べる目的で、化学物質による皮膚感作性の誘導反応をナノ粒子が増強するかどうか検討した。ナノ物質で前処理したヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に感作性物質を暴露して、細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現率を調べた。酸化ニッケルでは CD54 発現率が増加した。シリカ単独では細胞表面抗原の発現率に影響を及ぼさなかったが、一次粒子径 50 nm のシリカで前処理した細胞では、皮膚感作性物質による CD54 発現率は若干増加したが、CD86 発現率は変化なかった。他のサイズのシリカ、酸化チタン及び酸化鉄については増強作用は認めなかった。

A. 研究目的

OECD はじめ各種ガイドラインでは、一般に一次元のいずれかのサイズが 100 nm 以下のものをナノ物質と定義している。化粧品や医薬部外品では数十 nm の酸化チタン、酸化亜鉛及びシリカの不溶性微粒子が機能性の向上に重要な役割を担っていることはよく知られている。しかし、化粧品や医薬部外品は複数成分からなり、製品中ではナノ物質は他成分の影響で凝集し、サブミクロン程度の大きさになっていること予想される。一方で、エマルジョン等の作成のために加える界面活性剤により、ナノ物質が凝集せずに分散している可能性もある。化粧品や医薬部外品は皮膚に適用することが多く、皮膚に擦り込み塗布する際には機械的な力がかかり、凝集体の再分散が起こる可能性もある。また、口紅のように非意図的に経口摂取される化粧品もあり、そのナノ物質は体液や生体タンパク質と相互作用し粒度分布が変化すると思われる。したがって、ナノ物質を配合した化粧品や医薬部外品の品質及び安全性は、一般的な溶媒へのナノ物質の分散性だけでなく、他の化粧品成分あるいはタンパク質が共存したときの粒度分布についても検討し、実際に存在するサイズを知っておく必要がある。そのためには製剤中のナノ物質の存在状態を予想する分析法の確立及び市販製品の分析が望まれる。

ナノ物質を配合した化粧品及び医薬部外品の安全性を考える上では、ナノ物質単独の皮膚機能に及ぼす作用だけでなく、他成分との複合効果についても検討する必要があるが、こうした併用効果について検討した研究はほとんど見当たらない。本研究では、化学物質等による皮膚感作性反応に対するナノ物質の増強効果について検討する。化粧品の安全性評価に動物を用いる実験は禁止の方向にあることから、*in vitro* の動物実験代替法を積極的に活用し、その有用性を検討する。既に、酸化チタン及びシリカについては、マウスを用いた LLNA:DA 法による皮膚感作性については検討し、その一部

のナノ物質についてはケモカイン産生能を調べてきた。化学物質の皮膚感作性を *in vitro* で評価する方法としては、感作誘導期の細胞表面抗原の発現率を指標とした h-CLAT 法が確立されている。ここでは、h-CLAT を利用して、ナノ物質、あるいはナノ物質と化学物質アレルギーとの複合影響を評価する。

B. 研究方法

1. 材料及び試薬

試薬グレードのシリカ (SiO_2) として、平均一次粒子径 20, 50 及び 100 nm の粒子がエチレングリコール (EG) に懸濁したもの (SiO_2 20 nm, SiO_2 50 nm, SiO_2 100 nm) を用いた。化粧品原料グレード(化成品)のシリカとして、水に分散する弱アルカリ性の $\text{SiO}_2\text{-W}$ を用いた。酸化チタン (TiO_2) は、ルチル型で一次粒子径 35 nm、表面処理していない $\text{TiO}_2\text{-B}$ 及び表面処理した $\text{TiO}_2\text{-SAS}$ を用いた。これらの酸化チタンはビーズミル法で 5% 濃度で水に分散させた。酸化鉄 (Fe_2O_3) は一次粒子径 30 nm で、水分散したときの二次粒子径が 100 nm と表示される市販の試薬懸濁液を購入した。人工腸液 (pH 6.8) 及び人工胃液 (pH 1.2) は日本薬局方崩壊試験法に準拠して調製した。酸化ニッケル (NiO 、一次粒子径 < 50 nm) 及び硫酸ニッケル (NiSO_4) は市販試薬を用いた。

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、10% 牛胎児血清 (FBS) を、55 nmol/ml 2-mercaptoethanol 及び 1% antibiotic-antimycotic mixture (Invitrogen 社) を含有した RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) を用いて培養した。

3. 粒度分布の測定

ナノ物質及びその懸濁液は、ナノ物質の濃度として 0.1% になるように、水、生理食塩水 (saline)、リン酸緩衝液 (PBS、pH 7.2)、人工腸液 (pH 6.8)、人工胃液 (pH 1.2)、1% 牛血清アルブミン (BSA) 溶液、1%

BSA-PBS、FBS 及び FBS-RPMI で希釈した。Vortex mixture で 1 分間攪拌後、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) で粒度分布を測定した。

4. 細胞表面抗原の解析

24 穴プレートの各穴に、THP-1 細胞浮遊液 (2.0×10^6 cells) 500 μ l 入れ、各ナノ物質が 0、1、10 及び 100 μ g/ml の最終濃度となるように懸濁液 250 μ l を添加し 24 時間培養した。次に、感作性物質の硫酸ニッケル (NiSO_4) または 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 溶液 250 μ l を加え、更に 24 時間培養した。以下、h-CLAT 法のプロトコールに従った。4°C、280 G で 3 分間遠心して細胞を回収した。0.1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有 PBS (BSA-PBS) 1 ml を加え、4°C、700G で 3 分間遠心して洗浄する操作を 2 回行った後、0.01% globlins, Cohn fraction II, III (Sigma-Aldrich 社) - PBS 溶液を 600 μ l 加えて、氷上で 10 分間処理 (FcR ブロッキング) した。次にこれを 3 つに分け、それぞれに FITC 標識抗 CD86 抗体 (clone FUN-1, BD Pharmingen 社) 6 μ l、FITC 標識抗 CD54 抗体 (clone 6.5B5, DAKO 社) 3 μ l または isotype control として FITC 標識マウス IgG1 (clone DAK-G01, Dako 社) 3 μ l を入れ、暗所、氷上で 30 分間静置して染色した。細胞を 2 回洗浄後、BSA-PBS 400 μ l に再懸濁し propidium iodide (PI) 25 μ g/ml を 10 μ l 加えた。フローサイトメーターを用いて 10000 個の生細胞を測定し、次式より CD54 及び CD86 抗原の相対蛍光強度 (relative fluorescence intensity, RFI) を求めた。

$$\text{RFI}(\%) = \frac{\frac{\text{MFI of chemical - treated cells} - \text{MFI of chemical - treated isotype control cells}}{\text{MFI of vehicle control cells} - \text{MFI of vehicle isotype control cells}} \times 100$$

5. ケモカイン産生

上記で培養した細胞を遠心した上清を回収し、更に 10000 rpm で 10 分間遠心し上清を得

た。上清は BD Cytometric Bead Array (CBA) human chemokine kit (BD Biosciences 社) で処理し、IL-8、TNF、RANTES、MCP-1、MIG 及び IP-10 の含有量を BD FACSAarray によって測定した。

C. 研究結果

1. 粒度分布

シリカ (SiO_2) 懸濁液 (表示一次粒子径: 50 nm) を水及び生理食塩水を用いて希釈した時、それぞれ平均粒子径は 75~77 nm であった。この懸濁液は、人工胃液、人工腸液をはじめとして試験したほとんどの媒体中で一定の粒子径を保ち、FBS に懸濁したときのみ凝集が起こった (表 1)。

化成品シリカ懸濁液 SiO_2 -W は、培地と FBS に混和すると凝集が起こった。各溶媒で希釈したときの粒度分布を図 1 に示した。多くの溶媒で平均粒子径は 126~140 nm であったが、BSA 含有溶媒で粒度分布の広がり、FBS 及び FBS 含有 PBS で著しい凝集が認められた (表 1)。

酸化チタン TiO_2 -SAS については人工胃液及び培地等のタンパク質含有溶媒で凝集が認められた。 TiO_2 -B は、 TiO_2 -SAS よりも凝集しやすく、塩が入っただけで著しくサイズが大きくなった (表 2)。

酸化鉄 (Fe_2O_3) 懸濁液を水で希釈したときの平均粒子径は 90 nm と、表示と一致する値が得られた。人工胃液では分布は変わらないものの、生理食塩水等他の溶媒で希釈すると著しい凝集が起こった (表 2)。

2. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

感作性物質の硫酸ニッケル (NiSO_4) については、CD54 発現量を著しく増加させた。一方 CD86 発現に対する影響は CD54 ほど大きくはなかった。酸化ニッケル (NiO) 粒子は NiSO_4 ほどではないが、CD54 の発現率を増加させた (図 2)。

THP-1 細胞に各金属酸化物を 1~100 μ g/ml となるよう添加して 24 時間培養後、 NiSO_4 または DNCB を加えて更に 24 時間培養し、CD54

及び CD86 の発現量 (MFI) 及びコントロールに対する相対発現率 (RFI) を求めた。

SiO₂ 50 nm は CD86 発現量には影響しないが、CD54 発現量を 100 µg/ml でわずかに増加した。SiO₂ 50 nm で前処理した細胞における DNCB に対する CD54 発現量は、前処理しない細胞における発現量に比べ 4.5 倍となった。一方、SiO₂ 100 nm は CD86 及び CD54 の発現量には影響せず、DNCB または NiSO₄ による発現量の増加率に対しても変化させることはなかった (表 3)。

酸化チタン TiO₂-B 及び酸化鉄 (Fe₂O₃) については CD86 及び CD54 の発現量を増加させることはなく、NiSO₄ によるこれらの反応に対しても影響なかった (表 4)。

3. ケモカイン産生

NiO ナノ粒子及び NiSO₄ による THP-1 細胞からの 5 種のケモカイン産生量を比較した。NiSO₄ で産生量が増加したのは IL-8 及び RANTES であった。MIG は産生されず、MCP-1 及び IP-10 も定量限界レベルでの変化であった。NiSO₄ 100 µg/mL で RANTES の産生量はコントロールの 5 倍程度、IL-8 はより著しい増加を示した。NiO は細胞毒性を示さない濃度の範囲内で、IL-8 の産生量をコントロールの 3 倍程度の 2000 pg/mL 以上まで増加した (図 3)。

D. 考察

材質や一次粒子径の異なるナノ物質の各種媒体中での粒度分布を調べた。市販試薬のシリカ懸濁液は、各種媒体中でほとんど粒子径及び粒度分布は変化せず、*in vivo* 試験で動物に投与する試験液中ではナノサイズを維持すると考えられた。人工胃液あるいは人工腸液でも凝集や再分散は認めなかったが、BSA や FBS などを含む溶液では凝集した。化粧品に使用される SiO₂-W についても同様に、多くの溶媒の中では 140 nm 程度で保持されるが、BSA 含有溶液、FBS 及び培地中では粒子径が大きくなり分布も広がった。この凝集度は試薬シリカよりも著しかった。これらの結果は、シリカ懸濁液を皮

膚に塗布し、乾燥せずに存在するのであれば、ナノサイズの影響評価、例えば皮膚透過性に関する評価ができることを示している。シリカナノ物質を含有した口紅等を使用し経口摂取することを想定し、胃や腸の消化液中での粒度分布を測定したが、今回はサイズが変化することはないという結果が得られた。しかしながら、消化液には人工胃液や人工腸液とは異なり各種酵素としてタンパク質が共存する。タンパク質含有溶液の試験ではサイズの変化が認められることから、消化管でも酵素や他の食物成分により凝集が引き起こされると思われる。また、万が一吸収され血液中に入ったとしても、FBS の例からわかるように著しい凝集が起こり、ナノサイズのまま体内分布することは困難と考えられた。培地で懸濁すると粒度分布が変化することから、*in vitro* 試験系で比較的長い培養期間の試験ではサイズの細かな差の影響を示すことは難しいと思われる。

TiO₂-SAS は TiO₂-B よりも粒子サイズの変化が起こる溶媒の数は少なく、表面処理することによって安定した粒度分布が保たれることがわかった。TiO₂-SAS については、人工胃液及び培地等のタンパク質含有溶媒で凝集が認められた。酸化チタンは化粧品以外にも食品顔料や薬品賦形剤としても用いられ、経口摂取される。その際にも胃では消化液及び他の食品のタンパク質との混和により凝集し、ナノサイズのまま存在する割合は非常に少ないと考えられる。また培地中での粒度分布の結果を見ると、適用した試験懸濁液中の粒子サイズが反応と関連しているか判断するのは難しいと思われる。

酸化鉄の粒度分布は人工胃液で希釈しても変わらないものの、生理食塩水や人工腸液等他の溶媒で希釈すると著しい凝集が起こった。人工胃液での値は、液の酸性により溶解が起こった可能性がある。いずれにしても、酸化鉄はナノサイズでの影響を *in vitro* 試験系で見るとは困難で、体内でも一定の大きさの凝集体として存在分布すると思われる。

いずれのシリカも 100 $\mu\text{g/ml}$ で CD54 (ICAM-1) の蛍光強度の増加が認められ、特に、SiO₂ 50nm の増加率が多かった。SiO₂ 50nm の DNCB による反応について、CD86 は増加させないが、CD54 を濃度依存的に増加した。CD54 は抗原提示細胞への T リンパ球接着を媒介に関与し、炎症性メディエーターによって発現が増強される。高濃度のシリカではわずかながら炎症性サイトカイン IL-8 の産生が増加しており、これが CD54 の発現を増強させた可能性がある。化学物質の細胞毒性も増強されており、産生された炎症性サイトカインが CD54 の発現に影響したのではないかと考える。CD86 も細胞活性化により発現し、T 細胞への抗原提示におけるインテグリンリガンド(補助刺激分子)として働く。抗原提示能の増加として捉えるには CD54 よりも CD86 の発現の方が重要と思われる。アレルギー性物質によっても CD54 と CD86 の発現の増強率が異なることが知られているが、シリカが CD54 だけで CD86 を増加させない理由はわからない。異物に対する接着性がこの差に関与しているのかもしれない。

酸化チタン及び酸化鉄については、シリカのように細胞表面抗原発現を増強することはなかった。前述のように培地中のサイズは、シリカに比べて酸化チタンや酸化鉄では著しく大きくなっており、これらの材質の違いなのか、サイズの差なのか、今後他のナノ物質についても検討を進める必要がある。

THP-1 細胞にシリカを暴露したとき、検出されるサイトカイン/ケモカインは IL-8 及び RANTES であり、特に、IL-8 が感作性評価に有用な指標とされる。しかし、シリカによる産生量は、刺激性物質と同等程度であることを以前に報告し、感作性はないと判断した。Ni の塩は感作を引き起こすことが知られているが、Ni 酸化物のナノ粒子であった場合、感作誘導するかどうか、検討した。NiO ナノ粒子について THP-1 細胞からのケモカイン産生を NiSO₄ と比較した。NiSO₄ で産生量が増加したのは IL-8、RANTES 及び IP-10 であった。RANTES

の産生量は 100 $\mu\text{g/mL}$ でコントロールの 5 倍程度、IL-8 はより著しい増加を示した。NiO が細胞毒性を示さない濃度の範囲内で、IL-8 は 2000 pg/mL 以上まで増加し、コントロールの 3 倍程度になった。IL-8 産生は単球活性化によるものとする、Ni 酸化物のナノ粒子は感作を誘導する可能性がある。

今後、ナノ物質を他の感作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、細胞表面抗原発現率などの結果と付き合わせながら、免疫反応性の増強作用の有無を確認する予定である。

E. 結論

金属酸化物ナノ粒子は、リン酸緩衝液のように塩が添加したり、培地など血清やタンパク質が入った溶液で希釈したりすると凝集し、平均粒子径が大きくなるものがあった。このことは、一次粒子径がナノサイズであっても、多くのナノ物質は製剤あるいは製品化の段階で凝集し、ナノサイズで存在する量は非常に少ないことを意味する。また、*in vitro* 試験では培地中での粒度分布を測定することが、粒子径の効果を比較する上で重要であることが示唆された。

化学物質による皮膚感作性の誘導をナノ粒子が増強するかどうか、ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞の細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現率あるいはケモカイン産生を指標として調べた。NiO では細胞表面抗原の発現率の増加が認められ、NiSO₄ に比べると少ないものの感作誘導に関与する IL-8 の産生も認めた。シリカ単独では細胞表面抗原の発現量に変化を及ぼさなかったが、一定の大きさのシリカで前処理した細胞では皮膚感作性物質による CD54 の発現率が若干増加した。一方、酸化チタン及び酸化鉄について増強作用は認めなかった。ナノ物質の材質あるいは媒体中のサイズによって反応性が変化する可能性が示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 五十嵐良明、内野 正、西村哲治. 酸化チタンナノ粒子の皮膚感作性に及ぼす影響. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011. 7)

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

3. その他

なし

表1.各種溶媒に懸濁したシリカ(SiO₂)の平均粒子径

Solvent	SiO ₂ 50nm		SiO ₂ -W	
	Size (nm)	PdI	Size (nm)	PdI
水(water)	77	0.109	140	0.139
生理食塩水(saline)	75	0.066	133	0.140
リン酸緩衝液(PBS, pH 7.2)	77	0.063	138	0.143
人工胃液(pH 2.1)	78	0.062	136	0.142
人工腸液(pH 6.8)	75	0.042	137	0.124
1%牛血清アルブミン(BSA) in water	77	0.145	142	0.245
10% BSA in PBS	180	0.583	154	0.245
牛胎児血清(FBS)	168	0.488	274	0.528
培地(10% FBS in RPMI1640)	145	0.160	1350	0.687

表2. 各種溶媒に懸濁した酸化チタン(TiO₂)及び酸化鉄(Fe₂O₃)の平均粒子径

Solvent	TiO ₂ -SAS		TiO ₂ -B		Fe ₂ O ₃	
	Size (nm)	PdI	Size (nm)	PdI	Size (nm)	PdI
水(water)	81	0.144	87	0.159	90	0.294
生理食塩水(saline)	78	0.188	1720	0.506	1860	0.699
リン酸緩衝液(PBS, pH 7.2)	78	0.180	1686	0.385	4236	0.266
人工胃液(pH 2.1)	2134	0.510	3698	0.183	66	0.183
人工腸液(pH 6.8)	75	0.140	178	0.207	1522	0.394
1%牛血清アルブミン(BSA) in water	90	0.135	100	0.136	139	0.326
10% BSA in PBS	101	0.147	302	0.272	1184	0.555
牛胎児血清(FBS)	164	0.139	300	0.231	641	0.901
培地(10% FBS in RPMI1640)	287	0.297	725	0.250	1076	0.425

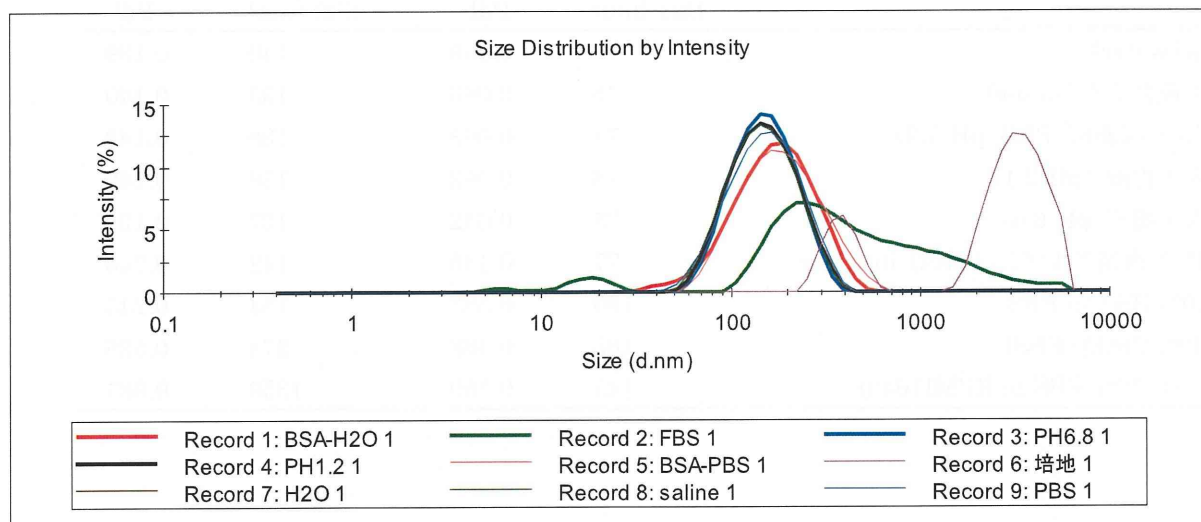


図1. 各種溶媒中のシリカ (SiO₂-W) の粒度分布

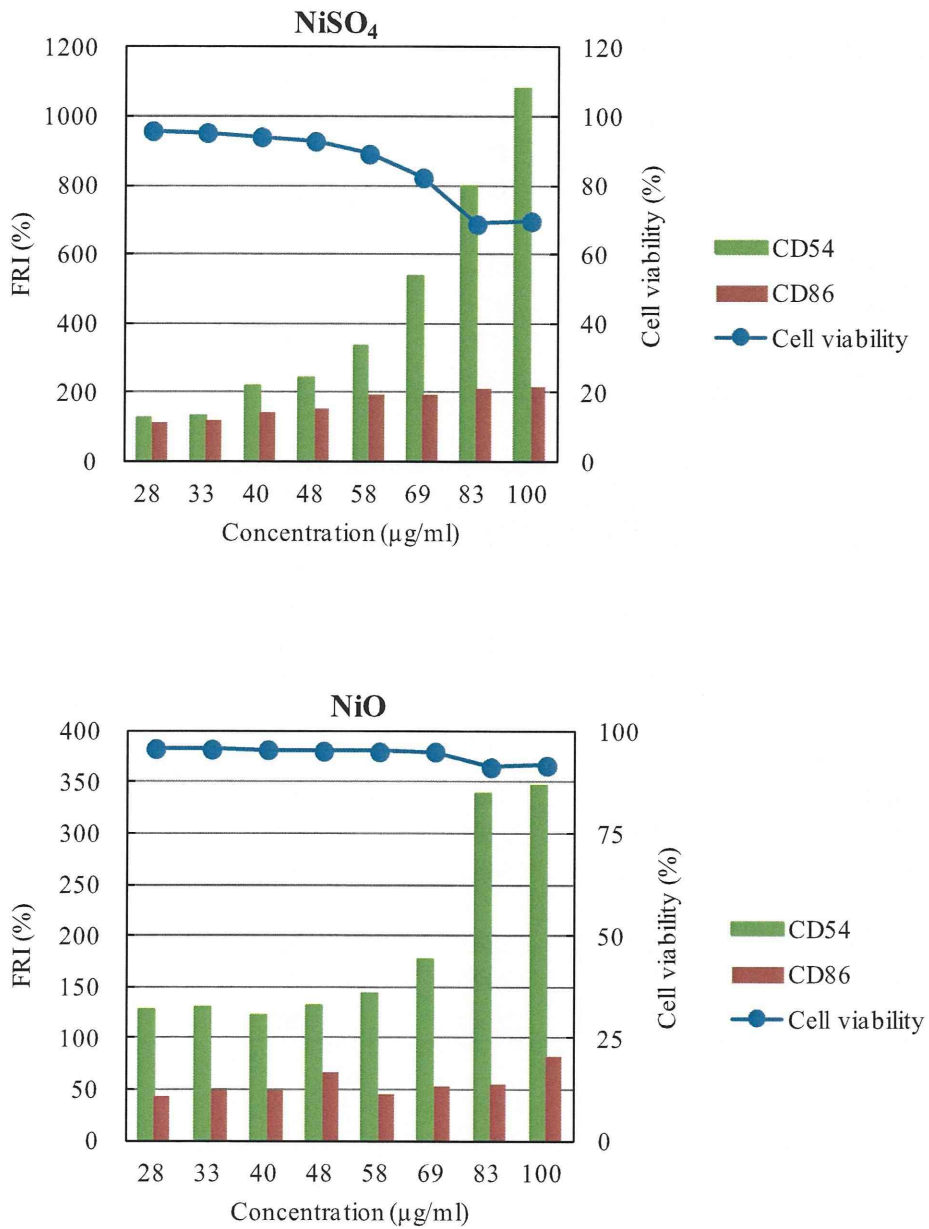


図 2. 硫酸ニッケル (NiSO₄) 及び酸化ニッケル (NiO) の h-CLAT 法による結果

表3. シリカで前処理した細胞の感作性物質に対する表面抗原発現率の変化

(a) SiO₂ 50 nm

Concentration (μg/ml)	Sensitizing chemical	RFI (%)		Viability (%)
		CD54	CD86	
0	—	—	—	94
1	—	112	99	94
10	—	98	88	94
100	—	314	68	91
0	DNCB	226	151	87
1	DNCB	284	197	82
10	DNCB	383	178	76
100	DNCB	1020	197	68

(b) SiO₂ 100 nm

Concentration (μg/ml)	Sensitizing chemical	RFI (%)		Viability (%)
		CD54	CD86	
0	—	—	—	97
1	—	102	110	96
10	—	114	103	97
100	—	151	113	97
0	DNCB	302	432	83
1	DNCB	263	249	84
10	DNCB	266	279	83
100	DNCB	345	358	81
0	NiSO ₄	590	186	66
1	NiSO ₄	587	262	66
10	NiSO ₄	588	284	63