

表4. 各種金属酸化物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) TiO₂-B

Concentration (μg/ml)	Sensitizing chemical	RFI (%)		Viability (%)
		CD54	CD86	
0	—	—	—	92.7
1	—	176	101	92.7
10	—	121	76	92.4
100	—	141	67	91.5
0	NiSO ₄	860	110	73.2
1	NiSO ₄	687	83	72.6
10	NiSO ₄	939	76	68.7
100	NiSO ₄	712	63	72.7

(b) Fe₂O₃

Concentration (μg/ml)	Sensitizing chemical	RFI (%)		Viability (%)
		CD54	CD86	
0	—	—	—	96.7
1	—	85	74	96.4
10	—	80	78	96.8
0	NiSO ₄	328	130	87.9
1	NiSO ₄	340	143	88.9
10	NiSO ₄	259	105	92.1

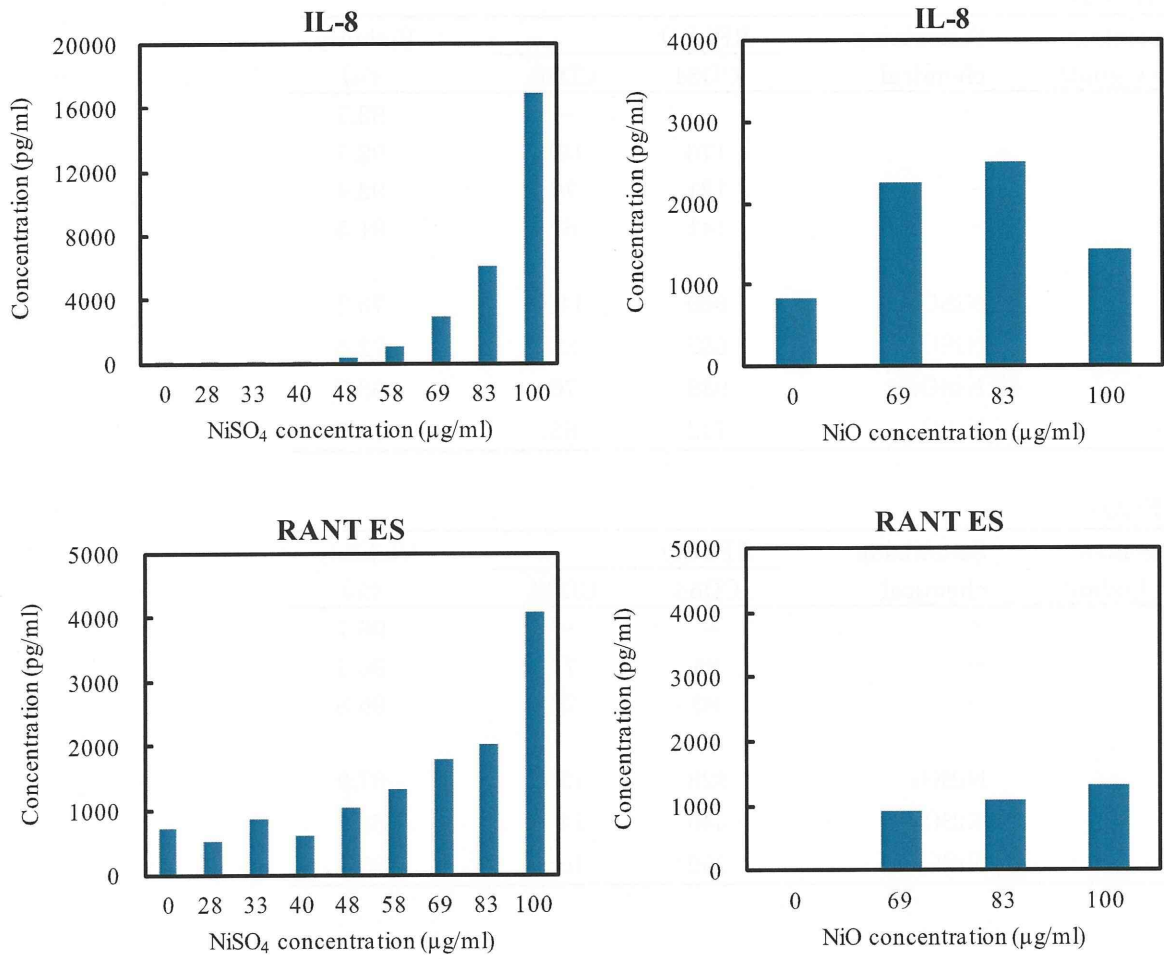


図3. 硫酸ニッケル (NiSO₄) 及び酸化ニッケル (NiO) による THP-1 細胞からのサイトカイン産生

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、化粧品など様々な分野に応用され、新たな産業の発展に重要な新素材である。その中でも、化粧品に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、直接皮膚に塗布して使用されている。

ナノ粒子の皮膚適用後の皮膚移行性や皮内分布に関する報告は多く存在しており、画像解析結果より、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、毛包に集積したナノ粒子の皮内移行ルートや毛包内動態については十分にわかっていない。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、ナノ粒子の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知られている。しかしながら、角層は凸部である皮丘と凹部である皮溝があるため、主に毛孔や皮溝などの凹部に分布する物質の評価には、テープが凹部に届かないために正しい皮内動態評価ができない可能性がある。よって、ナノ粒子の安全性評価を行うためには、*in vitro*皮膚透過性試験やテープストリッピング法などの試験方法を組み合わせた評価だけでなく、未だ十分に検討が進んでいない毛包内の物質動態を明らかにする必要がある。今年度は、上記問題を解決するために、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すための検討を行った。

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。現在、本テクノロジーを利用して様々なナノマテリアルが製造され、医薬品、食品、化粧品、化成品など、様々な分野の商品が販売されている。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、ナノマテリアル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。また、ナノマテリアルは、非意図的に生成されるナノ粒子（非意図的ナノ粒子）と産業従事者が目的を持って生産するナノ粒子（工業ナノ粒子）に分けることができ、非意図的ナノ粒子には、森林火災や火山の噴火による灰、ディーゼル排出の粒子などがある。一方、工業ナノ粒子は生体内で溶解し分解されやすいものと、不溶性で分解されにくいものに分類され、前者の例としてリポソーム、ニオソームなどが、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知られている。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。

Table 1 に主なナノマテリアルの国内年間使用量を示す。カーボンナノチューブが最も使用量が多く、次いで、シリカ、酸化チタンの順である。この中でも、主な用途が化粧品である微粒子酸化チタンはヒトが曝露する機会が最も多い物質で

あることが考えられる。

微粒子酸化チタンを含む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。また、塗布量は微量でも使用頻度が高いため、毎回洗浄し皮膚から取り除くものであっても皮膚に残る可能性も考えられる。よって、経皮曝露による安全性を考えることが大変重要である。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。しかしながら、微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛の健常皮膚を用いた透過性試験では、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。ナノ物質の皮膚適用後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、それらは主に、画像解析のみを用いた報告である。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の報告がなされているが、集積したナノ物質が毛包から皮内への移行性などの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、物質の皮内暴露時間や暴露濃度を評価する必要があり、画像観察結果からはこれらの情報を得ることは不可能である。そのため、ナノ物質の安全性を正しく評価するため、皮内動態を速度論にて解析する必要がある。

昨年度までの研究結果にて、ナノ粒子は健全なバリアを有する皮膚を透過しないこと、また、ナノ粒子は、皮膚を貫通した穴を介した時のみ皮膚を透過することが分かった。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（毛嚢プラグギング）の確立を目指した。また、ナノ酸化チタン（TiO₂）粒子を含むサンスクリーン剤を適用し、TiO₂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。

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の2つある⁹⁾。角層実質ルートは物質の主な透過経路である。一方、付属器官ルートは皮膚全体の面積の0.1%であるため、付属器官からの物質透過の寄与は小さいと考えられる。しかし、高分子やイオン性物質などは付属器官を介した透過寄与を考慮する必要がある。また、このルートからナノ粒子が浸透しやすいとの報告がある。

B-2 物質を透過させる膜について：

物質を透過させる膜には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。例としては角質層の代替膜としてよく用いられるシリコン膜が挙げられる。2つ目は細孔透過膜であり、細孔よりも小さな物質は透過する

ことができる。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。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。

C. 理論

膜における位置 x 、時間 t の薬物濃度 $C_{membrane}$ は、Fick の第2法則から以下のように表される。

$$\frac{\partial C_{membrane}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{membrane}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 D は膜中の薬物拡散係数を示す。

本実験での初期（すなわち透過実験直後）条件および境界条件は以下ようになる。

本実験での初期（すなわち透過実験直後）条件および境界条件は以下ようになる。

$$t = 0 \quad \begin{aligned} x = 0, C_{membrane} &= KCd \\ x = L_{tot}, C_{membrane} &= 0 \end{aligned}$$

$$t > 0$$

$$x = 0, C_{membrane} = KCd \quad \text{および} \quad \frac{dCd}{dt} = D \frac{dC_{membrane}}{dx}$$

$$x = L_{tot}, \frac{dC_{membrane}}{dt} = D \frac{dC_{membrane}}{dx} \quad (2)$$

ここで、 L_{tot} は膜の厚み、 K はドナー側から寒天ゲル膜への分配係数、 Cd は透過実験終了後直後のドナー側の薬物濃度、 $C_{membrane}$ は膜中の薬物濃度を示す。位置 x 、時間 t での $C_{membrane}$ は、式 (1)、初期条件および境界条件 (式 (2)) によって算出される。また、Fick の第 2 法則は差分法により、式 (3)、(4) に変換できる。

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{i,j+1} - C_{i,j}) \quad (3)$$

$$\frac{d^2 C_{i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{i-1,j} - 2C_{i,j} + C_{i+1,j}) \quad (4)$$

ここで、 $C_{i,j}$ は膜中における i 番目の位置の j 番目の時間を表す。 Δx は $x_{i+1} - x_i$ を表し、 Δt は $t_{j+1} - t_j$ を表す。式 (3)、(4) を式 (1) に代入すると式 (5) となる。

$$C_{membrane_{i,j+1}} = rDC_{membrane_{i-1,j}} + (1 - 2rD)C_{membrane_{i,j}} + rDC_{membrane_{i+1,j}} \quad (5)$$

ここで、 r は $\Delta t / \Delta x^2$ を示す。式 (2) および式 (5) に算出した D と K を代入し、表計算ソフト Microsoft® Excel を用いて寒天ゲル膜中 FD-4 濃度を算出した。なお、計算では $D \cdot \Delta t / \Delta x^2$ が 0.5 以下になるように Δt および Δx を設定した。

C. 研究方法

C-1 試薬：

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, M.W.: 4 kDa) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。ポンドアロニアルファ® ゼリー状およびポンドアロ

ニアルファ® 一般用はコニシ株式会社 (大阪、日本) から購入した。Super Lube® Silicone Dielectric Grease は Synco Chemical Co., Ltd. (Bohemia, NY, U.S.A.) から購入した。反射型レプリカ採取用シリコーン ASB-01-W は株式会社アサヒテクノラボ (横浜、神奈川、日本) から購入した。Silicone Sealant は東洋紡績株式会社 (大阪、日本) から購入した。ナフロン® 9400 はニチアス株式会社 (下関、山口、日本) から購入した。Nile red は Polysciences, Inc. (Warrington, PA, U.S.A.) から購入した。三元豚の耳 (ブタ耳介) は株式会社埼玉実験動物供給所 (杉戸、埼玉、日本) から購入した。また、サンスクリーン剤は市販のものを購入し利用した。

C-2. 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

ブタ耳から耳介外部皮膚を摘出し、これに市販サンスクリーン剤を 2 mg/cm^2 塗布した。その後、走査型電子顕微鏡 (SEM、S-3400N、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京、日本) により皮膚表面を観察した。また、元素マッピング (EDX、X-Max50、株式会社堀場製作所、京都、日本) より微粒子酸化チタンと微粒子酸化亜鉛の皮膚分布を確認した。この実験でブタ皮膚を使用した理由は、皮膚の構造がヒトと類似しており、毛孔がヘアレスラットよりも大きく観察しやすく表面分布の評価によく使われているためである。

C-3. 毛嚢プラグギング処理

キャピラリーピストン (CP10, Gilson, Inc., Middleton, WI, U.S.A) のピストン (太さ: 0.5 mm、長さ: 4.0 cm) を用いて、実体顕微鏡 (SZ61, オリンパス株式会社、東京、日本) 観察下にて、ピストン先端に少量の毛嚢プラグギング剤を取り、摘出したブタ耳皮膚の毛嚢開口部に毛嚢プラグギング剤の表面積が約 0.5 mm² になるように塗布を施し、毛嚢プラグギング処理皮膚とした。

C-4. *In vitro* 皮膚透過実験

毛嚢プラグギング処理または未処理皮膚の角層側を上にして縦型拡散セル (有効透過面積 1.77 cm²) にセットした。角層側に pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) を 0.8 mL、真皮側にも PBS を約 6 mL 適用し、自家蛍光の影響を除くため 1 時間の水和を行った。その後、角層側の PBS を除去し、5 mM に調製した FD-4 を 0.8 mL 適用し 12 時間の皮膚透過実験を行った。実験中、セル内の温度は 32°C に保ち、真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL サンプルングを行い、その都度、同量の PBS を補充した。得られたサンプル中の FD-4 は蛍光分光光度計を用いて測定した。

C-5. 薬物の定量法

皮膚透過実験より得られたサンプル溶液は、遠心分離 (CT15RE、日立工機株式会社、東京、日本) (15,000 rpm, 5 min, 40°C) 後、サンプル溶液の上清中の FD-4 を蛍光分光光度計 (RF-5300PC, 株式会社島津製

作所、京都、日本) により、励起波長 490 nm、蛍光波長 520 nm で測定した。

C-6. 毛嚢プラグギング剤を塗布した面積の算出

実体顕微鏡デジタルカメラ (DP21, オリンパス株式会社) により、皮膚透過実験終了後の皮膚角層側を撮影・保存 (カメラアタプタ倍率 0.48、対物レンズ倍率 0.67) し、顕微鏡デジタルカメラの Standalone System (多角形の面積測定) を用いて皮膚に塗布されている毛嚢プラグギング剤の面積を測定した。毛嚢プラグギング処理を施した皮膚の透過実験における有効透過面積は、縦型拡散セル (6 mL) の有効透過面積 (1.77 cm²) から、測定した毛嚢プラグギング剤の面積を差し引いて算出した。

C-7. 毛嚢プラグギングを施した皮膚組織観察

皮膚透過実験終了後の毛嚢プラグギング処理および未処理皮膚を縦型拡散セルから取り外し、表面を精製水で軽く洗浄した。摘出した皮膚はフェザー剃刃 S 両刃 (フェザー安全剃刃株式会社、大阪、日本) を用いて約 0.2 mm の厚さに切り、川本法用凍結包埋剤 (SCEM、ライカマイクロシステムズ、東京、日本) で包埋し、ドライアイスを入れたイソペンタン中で速やかに凍結させた。その後クライオスタット (CM3050S、ライカマイクロシステムズ、東京、日本) を用いて、垂直方向の皮膚凍結切片 (厚さ 6 μm) を作成した。作製した皮膚凍結切片は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM、FV-1000、オ

リンパス株式会社、東京、日本) を用いて観察した。このときの CLSM の条件は、波長を 473 nm および 559 nm、Laser power を 1%、HV を 595 V、Gain を 1.125 x、Off set をゼロに設定した。

C-8. 画像観察による物質の皮内動態解析

i) CLSM 観察用ゲル膜の鋳型作製

Figure 1 に CLSM を用いて観察する寒天ゲル膜を作製するための鋳型を示す。厚さ 1.0 mm のシリコーンゴムシートに、ゲル溶液を流し込むための幅 0.8 mm の穴を作製した。

ii) ホモジネート用ゲル膜の鋳型作製

寒天ゲル膜のホモジネートを、蛍光光度計 (RF-5300PC、島津製作所株式会社、京都、日本) を用いて測定するにあたり、ホモジナイズするゲル膜を作製するための鋳型を厚さ 2.0 mm シリコーンゴムシートに直径 6.0 mm の穴を開け作製した。

Figure 2 に作製した鋳型を示す。

iii) CLSM での検量線作製用ゲル膜の調製

寒天粉末 0.5 g に種々濃度 (2.50、3.75、12.5、22.5、25.0 μ g/mL) の FD-4 溶液を加え、全量を 10 mL とした。また、コントロールとして、寒天粉末 0.5 g に pH7.4 リン酸緩衝液 (PBS) を加え、全量を 10 mL とした。その後、ホットプレートスターラー (RSH-1DR、アズワン株式会社、大阪、日本) にて加熱攪拌 (130°C、200 rpm) し、5% 寒天溶液を作製した。Figure 1 に示した鋳型に種々濃度 FD-4 含有寒天溶液を流し、Fig. 3 に示すように、上下からシリコーンゴムシートで挟み、室温で放

置した。冷めて固まった後、上下に置いたシリコーンゴムシートを外し、1 種類の濃度につき 4 枚寒天ゲルを取り出し、検量線用寒天ゲル膜とした。

iv) 蛍光光度計でのホモジネート測定用寒天ゲル膜の調製

寒天ゲル膜中の FD-4 濃度を蛍光光度計で測定するため、Fig. 2 に示した直径 6 mm の穴を有する鋳型に種々濃度 FD-4 含有寒天溶液を流した。その後、Fig. 3 に示すように、上下からシリコーンゴムシートで挟み、室温で放置した。冷めて固まった後、上下に置いたシリコーンゴムシートを外し、寒天ゲルを取り出し、ホモジナイズ用の寒天ゲル膜とした。これらをマイクロチューブ用ホモジナイザー

(RNase-Free Pellet Pestle Grinders, Kontes, NJ, U.S.A.) でホモジナイズし、遠心分離を行い、ホモジネートの上清を蛍光光度計にて測定した。

v) CLSM を用いた寒天ゲル膜観察手順と CLSM の条件設定

1 種類の濃度につき寒天ゲル膜切片を 4 枚作製し、スライドガラスに四角形状に並べた。熱による寒天ゲル膜の変性防止と屈折率の差を小さくし、画質を上げるためにシリコーンイマージョンオイルを垂らし、カバーガラスを載せ、CLSM にて観察を行った。このときの CLSM の条件は、Laser power を 5%、HV を 595 V、Gain を 1.125 x、Off set をゼロとした。

vi) 蛍光強度の算出方法

CLSM より得られた膜の画像 1 枚につき蛍光強度を算出するための解析ポイントを 45 (3×15) 個プロットし、各プロットの蛍光強度を測定した。また、得られた全プロットの蛍光強度の平均値を算出した。Figure 4 にプロットの例を示す。また、PBS のみを溶媒とした寒天ゲル膜の画像から得られる蛍光強度をコントロールとし、種々 FD-4 含有寒天ゲル膜から得られた蛍光強度から差し引いた。コントロールを引いた蛍光強度を各 FD-4 濃度の蛍光強度とした。

D. 研究結果および考察

D-1. サンスクリーン剤の皮膚表面分布

Figures 5、6 にサンスクリーン剤適用後の皮膚表面の SEM 画像を示す。それぞれの図のバーの目盛りは Fig. 5a では 1.0 mm、b では 200 μm、c では 50 μm であり、Fig. 5a から c の順に倍率が増えている。図中の白色ドットはサンスクリーン剤を示す。Fig. 5a と b からサンスクリーン剤は皮溝部に集積していること、また、Fig. 5c から毛嚢ロート部にサンスクリーン剤の凝集粒子があることが分かる。

Figure 6 にサンスクリーン剤適用後の皮膚表面の SEM 画像の元素マッピング像を示す。Fig. 6a は SEM 像である。なお、Fig. 6a-f は毛嚢を含む同一部位を示す。Fig. 6b の炭素 (C) 分布を示す紅色部分は Fig. 6a の SEM 画像の黒色部分と一致する。これらの部分はサンスクリーン剤に起因する微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛が少ない部位である。一方、Fig. 6c、d で示したそれぞれチタン (Ti) と亜鉛 (Zn) の分布は共に似ていて、かつ、SEM 画像

の白色部分と一致する。すなわち、これらの領域はサンスクリーン剤中の微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛の集積部位である。これは、Ti や Zn の分布が C の分布 (Fig. 6b の黒色部分) とはまったく異なることによっても確認できる。さらに、Merg 像(C+Ti)と(C+Zn) (Fig. 6e, f) より、微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛は皮溝そして毛嚢ロート部のように皮膚表面の深い溝の部分に集積していると考えられた。

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微粒子酸化チタンや微粒子酸化亜鉛は、皮膚適用後皮溝や毛孔周辺に分布する傾向がみられた。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することが推測された。今までにもナノ粒子は皮膚を透過しないものの、選択的に毛嚢中に侵入すると報告されているが、本研究の結果はそれらの報告と一致している。

また、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が、角層は凸部である皮丘と凹部である皮溝があるため、Figs. 5, 6 の結果から明らかなように主に毛孔や皮溝などの凹部に分布するナノ粒子の評価には、テープが凹部に届かないために正しい評価ができない可能性が示唆された。よって、テープストリッピング法によるナノ粒子の皮内動態解析はナノ粒子の皮膚 (角層) 中濃度を正しく評価できないと考えられた。

D-2. 毛嚢プラグング剤処理後の皮膚

表面観察

Figure 7 に毛嚢プラグギング処理した皮膚に水を一定時間適用後の皮膚表面観察画像を示す。毛嚢プラグギング剤の塗布部位がわかるように、シリコン系グーリースおよび接着剤からなる毛嚢プラグギング剤中に赤色蛍光マーカである Nile red を含有させた。Figure 7 の結果より、毛嚢プラグギング剤は、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ることが分かった。この結果から、経毛嚢ルートを介して侵入する薬物の皮膚透過性や浸透性を抑えることが可能であると考えられた。

D-3. 蛍光マーカの皮内分布観察

Figure 8 に毛嚢プラグギング処理した皮膚に一定時間 FD-4 を適用し、FD-4 を皮膚表面から丁寧に洗い流した後の皮膚組織の切片画像を CLSM にて観察した結果を示す。毛嚢プラグギ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 (Fig. 8a, b)。一方、毛嚢プラグギング処理をした皮膚の毛嚢開口部ではプラグギング剤に含有させた Nile red 由来の赤色蛍光が確認できたが、FD-4 由来の緑色蛍光は確認できなかった (Fig. 8c, d, e and f)。このことから、皮膚に毛嚢プラグギングを施すことで、FD-4 の毛嚢を介した皮膚透過が抑制できると考えられた。

D-4. プラグギング処理を施した皮膚を介した物質透過性

Figure 9 に毛嚢プラグギング処理および未処理皮膚を介した FD-4 の透過プロ

ファイルを示す。毛嚢プラグギ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グギング処理した皮膚に比べて高かった。また、毛嚢プラグギ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。この結果より、毛嚢プラグギング処理は、水溶性高分子物質の皮膚透過を低下させることが分かった。また、毛嚢プラグギ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、プラグギ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、プラグギング処理は水溶性高分子物質などの経毛嚢ルートを介し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可能であることが分かった。

Figure 10 にプラグギング未処理皮膚を介した FD-4 の累積透過量とプラグギング処理した皮膚を介した FD-4 の累積透過量の差をプラグギング処理数で除した結果を示す。得られた値より、毛嚢 1 個あたりの FD-4 の透過プロファイルを算出できる。Figure 10 の結果より、プラグギング処理数が 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、毛嚢プラグギ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。毛嚢プラグギング処理数 10 個の毛嚢 1 個あたりの FD-4 の皮膚透過量が他の条件よりばらついた原因として、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および毛嚢開口部の大きさなどが異なるためだと考えられた。

Figure 11 に FD-4 の皮膚透過性と毛嚢プ

ラッキング数の関係を示す。毛嚢プラグギ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。良好な相関が得られたことより、物質の皮膚透過経路を角層経路と経付属器官経路に区別して評価できると考えられた。

毛嚢プラグギング法により、毛嚢を介して皮内に浸透する物質の評価が可能であることが分かった。毛嚢プラグギング法、テープストリッピング法および SEM 画像観察を組み合わせることで、TiO₂ などのナノ物質の皮膚浸透性が評価可能となるかもしれない。

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の報告がなされているが、集積したナノ物質の毛包から皮内への移行性や移行ルートに関しては十分にわかっていない。そこで、次に、毛嚢内に移行したナノ物質の皮内移行ルートや毛嚢からの物質拡散性を明らかとすることを目的とし、画像観察による皮内動態解析法の確立を試みた。

D-5. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた皮膚中濃度解析

Figures 12、13 に FD-4 の透過プロファイルおよび、数学的解析により算出した concentration-distance profile をそれぞれ示す。寒天膜を介した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分かった。次に、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 profile を比較した。

Figure 14 に示した結果から明らかなように、concentration-distance プロファイルはほぼ共に一致した。したがって、共焦点レーザー顕微鏡を用いた場合で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。

E. 結論

ナノ粒子を含む化粧品及び医薬品部外品の安全性及び品質確保をするためには、ナノ粒子の皮内動態を明らかにする必要がある。しかしながら、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。また、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。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 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、東京、2011 年 5 月
- 2) 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、千葉、2011 年 10 月

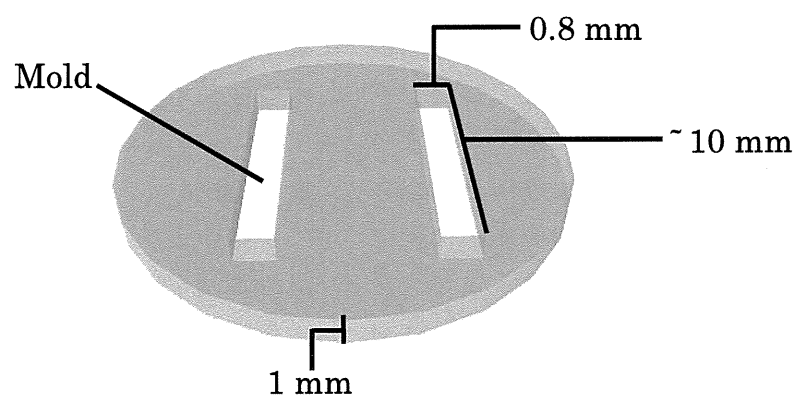


Fig. 1 Silicone rubber mold.

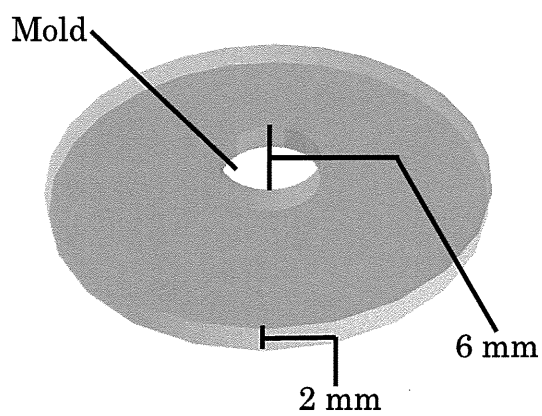


Fig. 2 Silicone rubber mold.

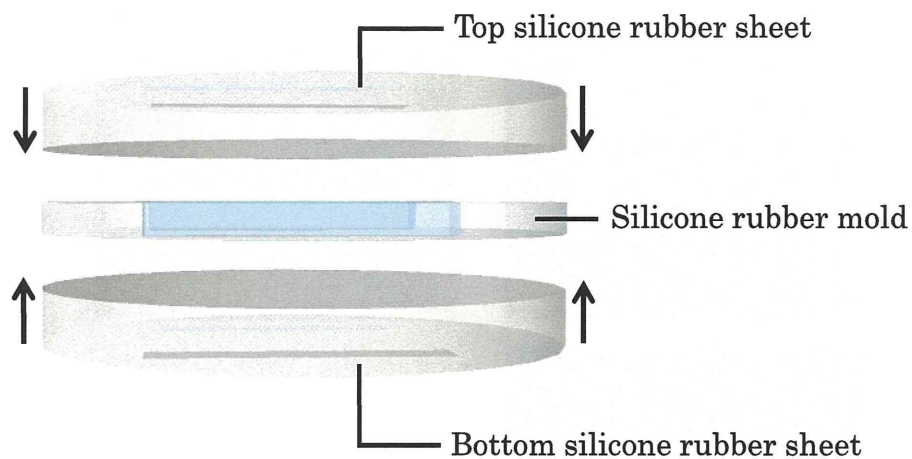


Fig. 3 Set up for preparation of agar gel sheet. Silicone rubber mold was clipped by silicone rubber sheets.

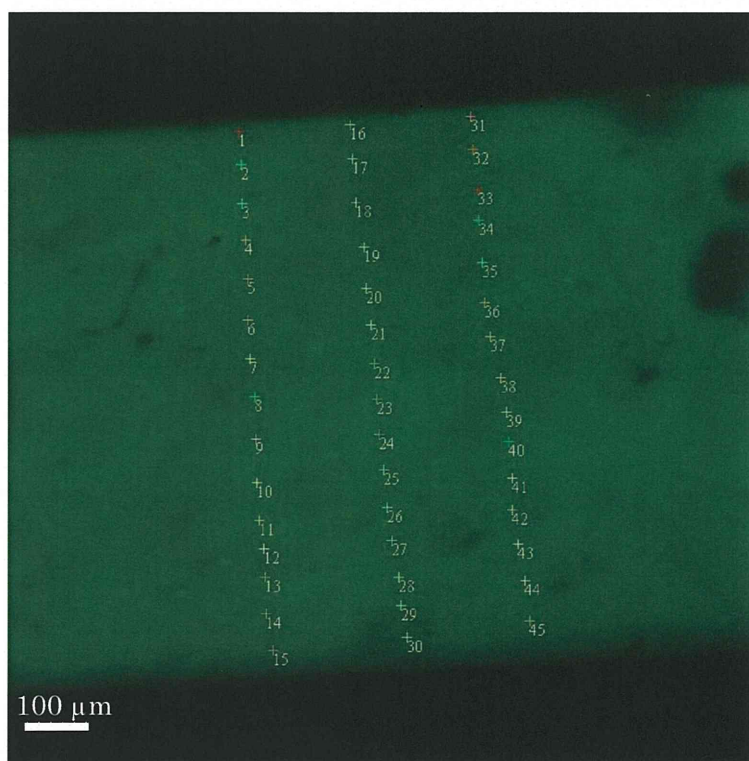


Fig. 4 Example of CLSM observation image of agar gel containing FD-4.

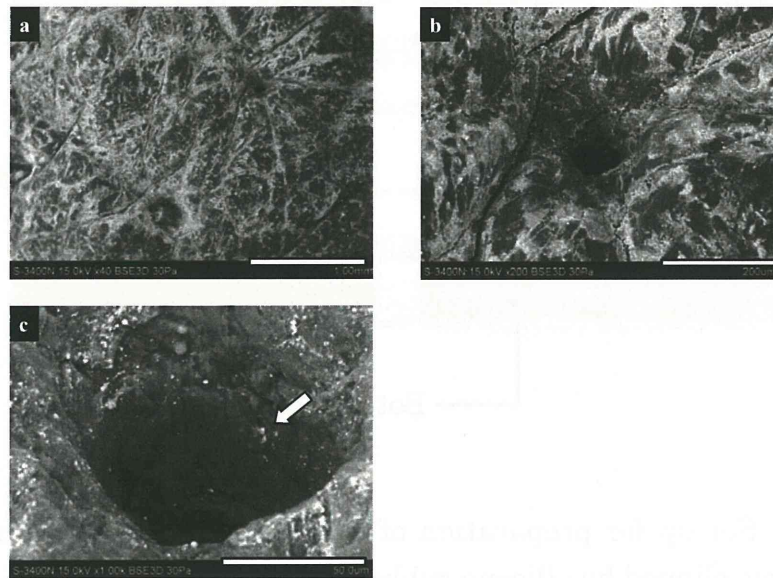


Fig. 5 SEM images of porcine skin surface after application of marketed sunscreen. Arrow shows aggregated nanoparticles irrupt into hair follicle. Each white bar represents 1.0 mm (a), 200 μm (b), 50 μm (c).

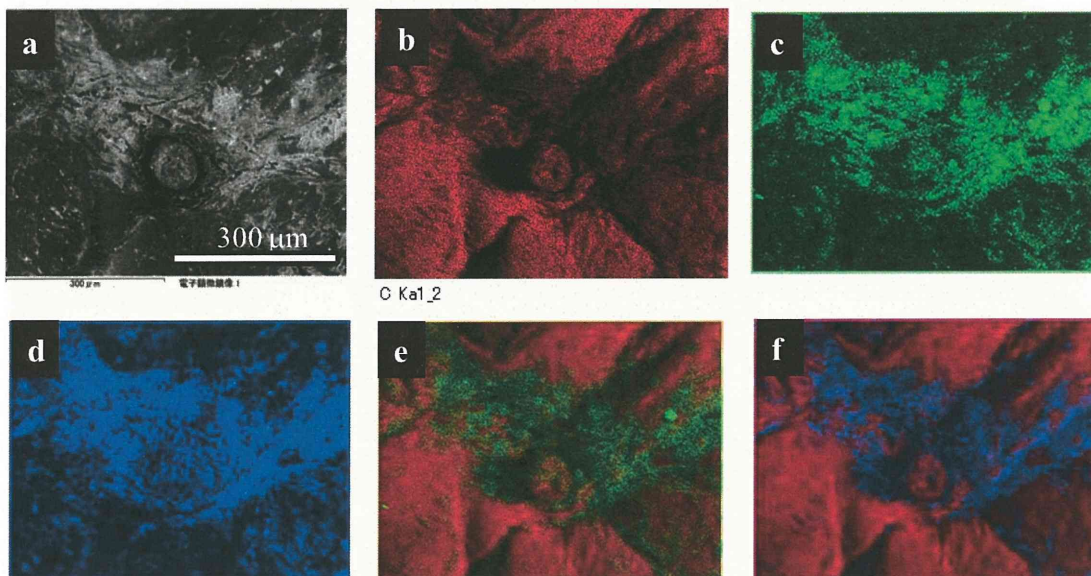


Fig. 6 SEM-EDX elemental mapping images of porcine skin surface after application of marketed sunscreen (a) original SEM image, (b) carbon mapping, (c) titanium mapping, (d) zinc mapping, (e) merged carbon and titanium mapping, (f) merged carbon and zinc mappings. The bar represents 300 μm .

Table 1 ナノマテリアルの国内年間使用量

物質名	国内使用量	主な用途
カーボンブラック	100 万 t	タイヤ、自動車部品
シリカ	13,500 t	インク、合成ゴム、タイヤ
酸化チタン	1,250 t	化粧品、光触媒
酸化亜鉛	480 t	化粧品
カーボンナノチューブ	60 t	電子材料
フラーレン	2 t	スポーツ用品

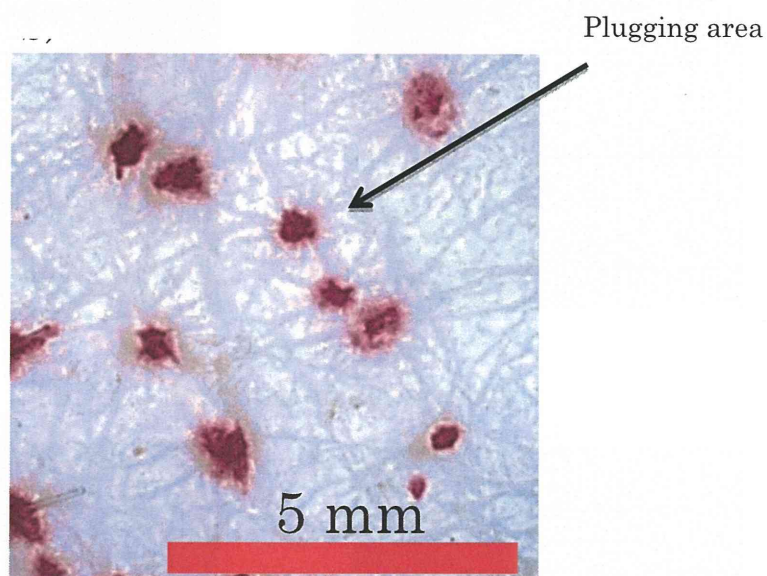


Fig. 7 Observation of plugging hair follicles skin after treatment.

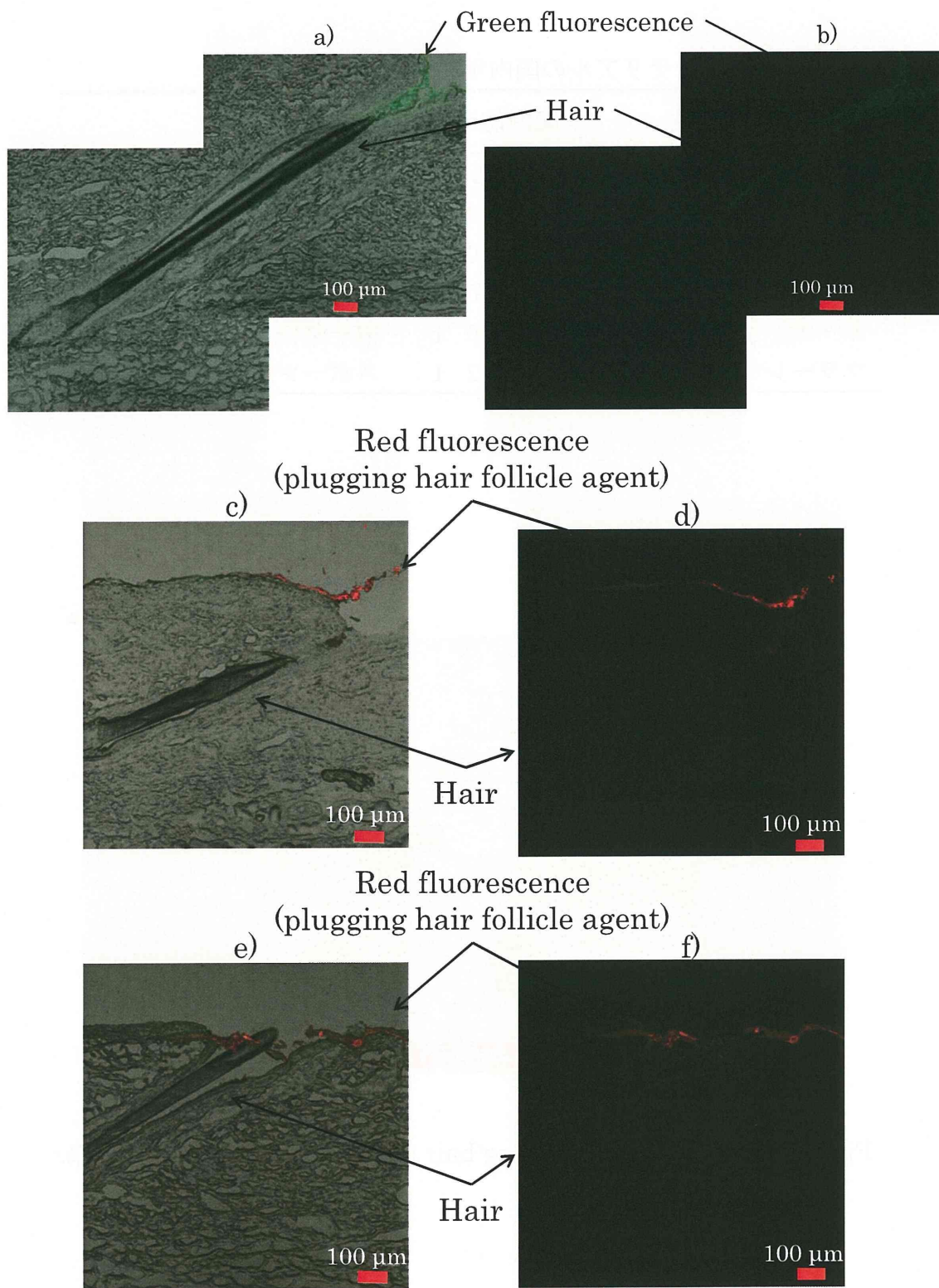


Fig. 8 Observation of fluorescence distribution in skin by CLMS
 Non-plugging skin (a: merged image, b: fluorescence image)
 Plugging hair follicles skin (c, e: merged image, d, f: fluorescence image)

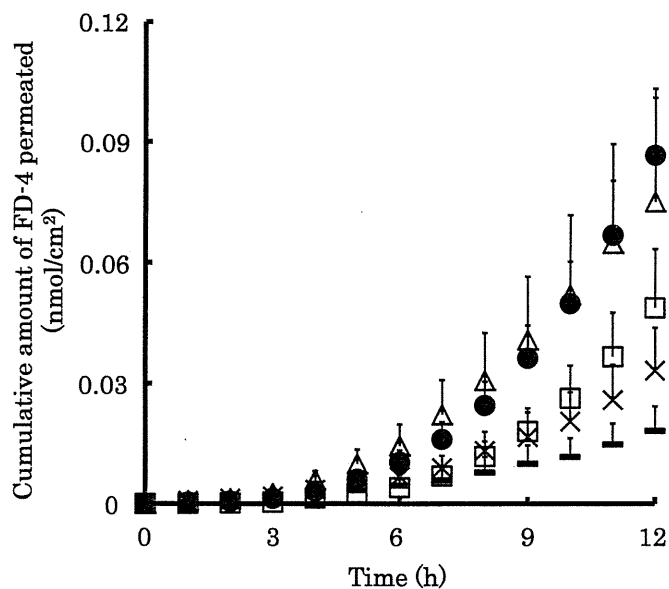


Fig. 9 Time course of the cumulative amount of FD-4 permeated through plugging hair follicles skin Symbols: non-plugging skin (●), 10 (Δ), 20 (□), 30 (×) and 40 hair follicles plugging skin (-). Data are shown as the mean + S.E..

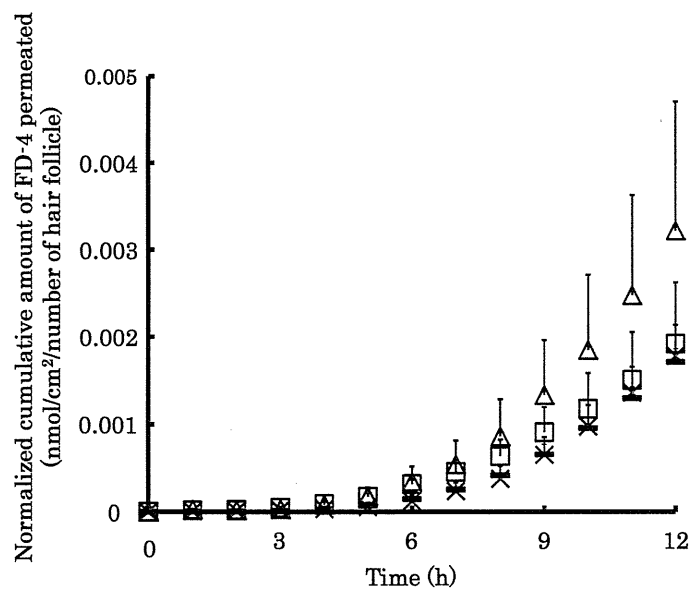


Fig. 10 Time course of the normalized cumulative amount of FD-4 permeated through plugging hair follicles skin Symbols: 10 (Δ), 20 (□), 30 (×) and 40 hair follicles plugging skin (-). Data are shown as the mean + S.E..

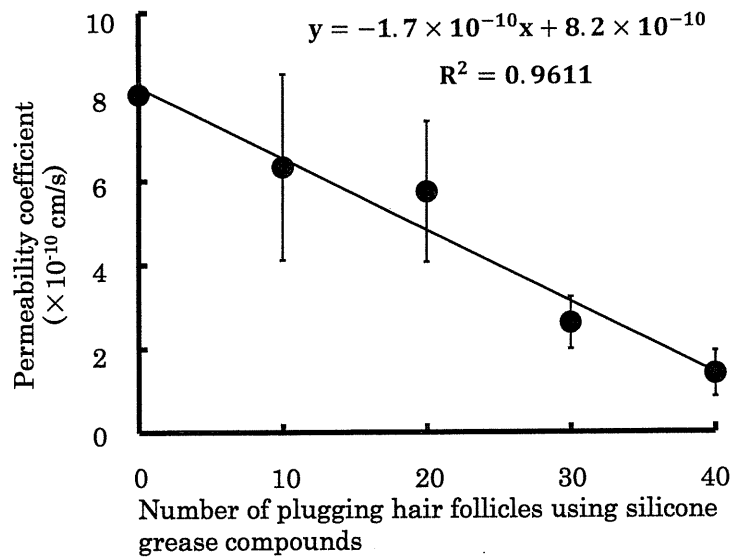


Fig. 11 Relationship between permeability coefficient and number of plugging hair follicles using silicone grease compound Data are shown as the mean \pm S.E..

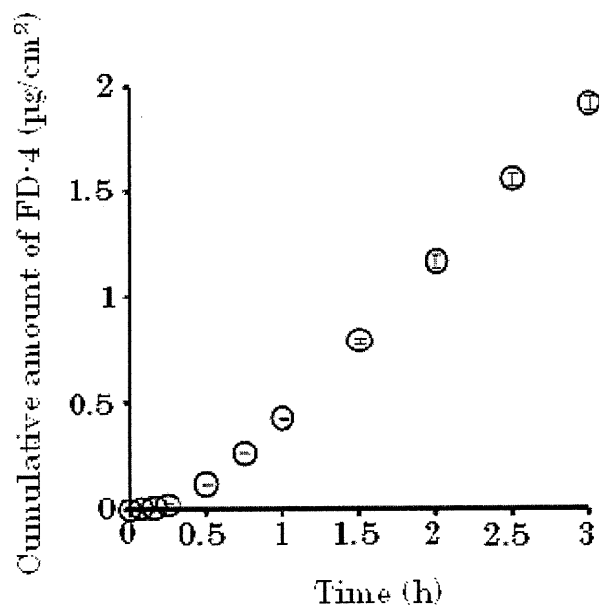


Fig. 12 Time course of cumulative amount of FD-4 permeated through 5% agar gel. Each point is the mean \pm S.E. (n = 3).

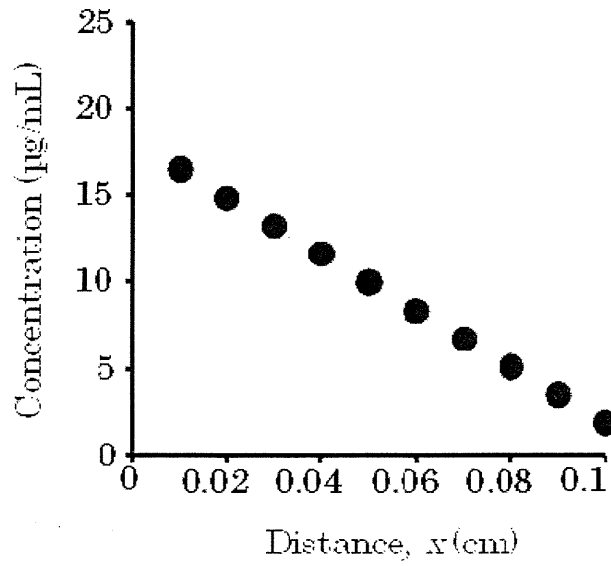


Fig. 13 Concentration-distance profile of FD-4 that calculated by difference method

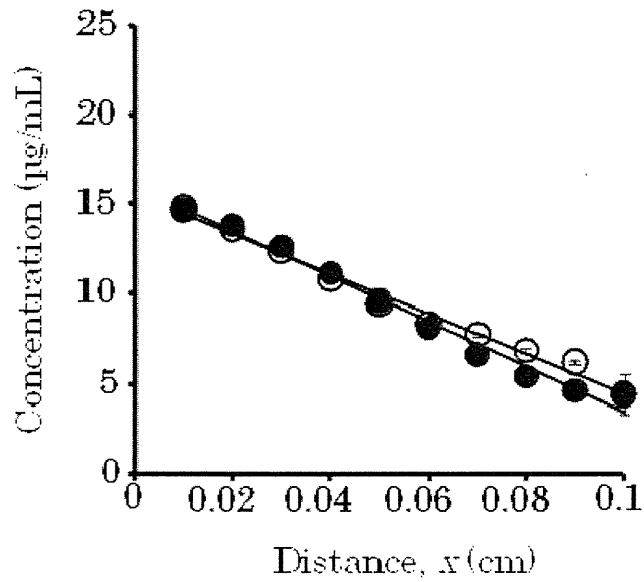


Fig. 14 Comparison between observed and theoretical concentration-distance profiles.

Symbols: \circ : observe values were obtained from image analysis, \bullet : theoretical values were obtained from the mathematical method.

