

201235024A

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 24 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 25 (2013) 年 3 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. 分担研究報告

1. ナノ物質の分析及び暴露影響評価 . . . . . 9  
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 . . . . . 63  
杉林 堅次

# I. 総括研究報告

平成 24 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 部長

### 研究要旨

化粧品及び医薬部外品の主たる使用は皮膚への塗布であり、それらの品質及び安全性確保には経皮曝露評価が重要である。化粧品や医薬部外品に用いられるナノ物質は原料製剤あるいは最終製品中で凝集し粒子サイズが変化している可能性がある。よって動物あるいは細胞を用いた試験結果が粒子サイズに関連したものかどうか評価するためには、適用した試験液の物理化学的なデータが必要である。本年度は白金、銀、及びアルミナ粒子を取り上げた。白金粒子の一次粒子径は数 nm と謳われているが、水に懸濁したとき平均粒子径は 100 nm を超えた。アルミナの懸濁液はその粒子の表面処理状態によって各種溶媒中での凝集度が変化した。一次粒子径はナノサイズであるが、製剤あるいは製品化の段階、あるいは生体内で消化あるいは血液循環過程で凝集し、ナノサイズの影響を生じる可能性は少ないと思われた。皮膚感作性物質に対する抗原提示細胞の反応性は白金、銀ナノ粒子の共存下で影響なかった。イオン化が予想される物については金属塩を用いて検討したが、同様に反応性の変化はなかった。以上のことから、これらナノ物質に皮膚感作誘導を増強する作用はないと考えた。ナノ物質を含有する化粧品の安全性と品質確保のためには、製剤中のナノ粒子のサイズを確認することが重要である。しかし現状、化粧品中のナノ物質の測定法に適切な方法はないとされており、化粧品に含有されるナノ物質のサイズに関連する影響を明らかにすることは極めて困難であるが、今後も情報収集が望まれる。

皮膚に塗布したナノ材料は皮溝や毛嚢開口部などに集積しやすいこと、及び物質の皮膚浸透・透過性は溶解・拡散モデルでのみ表すことができることを報告してきた。本年度は、皮膚に塗布したナノ物質の毛嚢内動態および毛嚢移行評価を行った。物質の毛嚢移行性は毛穴の開口部面積と関係があることが示されたことから、脱毛時には毛嚢内へのナノ粒子の侵入が示唆された。研究の結果、高分子水溶性物質は毛嚢移行後に分配・拡散して皮内へ浸透することが明らかとなったが、ナノ物質の場合においては、皮膚組織への分配が著しく低いことから、皮膚炎症などによる毛嚢内バリア機能の低下や遊走細胞などによる貪食が認められない限り、生きた表皮・真皮内へのナノ粒子の移行は困難であると考えられた。

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 部長  
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

化粧品及び医薬部外品は主に皮膚に使用することから、経皮暴露による影響を考慮する必要である。すなわち、ナノ物質の材質とサイズに関連した健康影響の有無を評価することである。化粧品や医薬部外品は多種多様な成分を製剤としたものであり、製品中では他成分の影響でナノ物質が凝集して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。更に、口紅のように経口摂取される化粧品もあり、ナノ物質が体液や生体タンパク質と相互作用することによって粒度分布が変化する可能性もある。したがって、ナノ物質を配合した化粧品や医薬部外品の安全性評価は、ナノ物質の皮膚機能への影響と製剤中のナノ物質の存在状態の把握が重要と考えられる。

本研究では、化学物質の皮膚感作性誘導反応に対するナノ物質の増強効果について検討している。動物実験代替法である h-CLAT を利用して、ナノ物質と化学物質アレルゲンとの複合影響を評価した。本年度は、銀、白金、アルミナ等について検討を加えた。ナノ物質を種々の媒体に懸濁して粒度分布を測定し、製剤あるいは生体内における存在状態について予想した。

日米欧州カナダからなる化粧品規制協力国際会議 (ICCR) はナノ物質について議論しているが、ナノ物質の特性を明確にすることが重要とし、作業部会を立ち上げている。そこでは、化粧品分野でのナノ物質の定義が決められ、これを明確にする基準や技術的方法を上げている。本年度作業部会は、ナノ物質の特性解析として、技術的方法に関する文献を調査し、製剤中のナノ物質の測定法等に関して取りまとめた。そこで、ナノ物質の製剤中のサイズ測定法に関する部分について説明を加えた。

物質の皮膚透過ルートとして角層を介する経角層ルートと毛嚢や汗腺などの付属器官を介する経付属器官ルートがある。毛嚢などを介する経付属器官ルートは皮膚表面積に対して約 0.1%程度であり、多くの物質の皮膚透過経路としてこのルートは無視されてきたが、近年、経付属器官ルートがイオン性物質や水溶性高分子物質の主な皮膚透過ルートとして、外毛根鞘や脆弱な角層バリアを有する毛嚢バルジ部が注目され始めている。物質の毛嚢を介する透過量を評価するため水溶性高分子物質を用いて予備検討を行ったところ、脱毛処理を施すことで水溶性高分子の毛嚢透過量が著しく増大することがわかった。これにより、ナノ化粧品の毛嚢内移行性が増大する可能性が考えられた。そこで、本研究では、脱毛処理後の物質の皮膚透過性を調べた。また、毛嚢に移行した物質の毛嚢内動態を明らかとするためには、毛嚢開口部へ微量の物質送達が必要となる。そこで、毛嚢開口部へのみ物質を微量適用し、水溶性高分子物質の毛嚢内動態評価システムの確立を行った。

予備検討の結果より、脱毛処理より増加した透過量は毛嚢を介した物質透過量と考えることができた。しかしながら、物理化学的性質の異なる物質の皮膚透過性に及ぼす脱毛処理の影響や物質透過性に及ぼす脱毛本数の影響などは分かっていない。そこで先ず、難皮膚透過性の水溶性蛍光物質であるカルセイン適用後の毛嚢内分布について脱毛処理および脱毛未処理皮膚を用いて調べた。次に、脂溶性モデル物質であるフルルビプロフェン、水溶性モデル物質として硝酸イソソルビド、フルオレセインナトリウムおよび分子量の異なる fluorescein isothiocyanate-dextran (FDs) を用いて物理化学

的性質の異なる物質の皮膚透過性に及ぼす脱毛処理の影響を調べた。脱毛本数の異なる皮膚を介した物質透過量の算出を試みた。脱毛による物質の経毛嚢ルートへの送達促進の有無はナノ化粧品の安全性を確保する上で重要な情報と成りうる。

## 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

白金、銀及びアルミナ（酸化アルミニウム Al-A 及び AL-T）を入手した。ナノ物質は水、生理食塩水（saline）、リン酸緩衝液（PBS、pH 7.2）、人工胃液（pH 1.2、1 液）、人工腸液（pH 6.8、2 液）、牛胎児血清（FBS）及び 10%FBS 含有 RPMI1640 培養液（FBS-RPMI, Medium）で希釈し、超音波処理した後、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 細胞浮遊液に細胞毒性を示さない濃度で各ナノ物質を添加し 24 時間培養した。次に、感作性物質 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、生細胞の細胞表面抗原 CD54 及び CD86 発現率と対照群に対する相対蛍光強度（relative fluorescence intensity, RFI）を求めた。

#### B-1-3. ケモカイン産生

上記培養上清を回収し、ELISA により IL-8 産生量を測定した。

#### B-1-4. 化粧品中ナノ物質の粒子径測定に関する文献調査

化粧品規制協力国際会議（ICCR）ナノマテリアルキャラクタライゼーション II 作業部会が 2012 年に取りまとめた文書を入手し、化粧品中のナノ物質の粒子径測定に関する部分を解説した。

### 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. 試薬及び実験材料

Isosorbide-5-mononitrate (ISMN)、Calcein disodium (Calcein-Na)、フルルビプロフェン (FP)、Fluorescein sodium (FL-Na)、Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4、FD-10、FD-20) を用いた。

#### B-2-2. 皮膚の摘出および脱毛処理と表面観察

三元豚の耳（ブタ耳）は真皮側の脂肪を取り除き、毛抜き用ピンセットを用いて目視で角層を傷つけないように皮膚表面に出ている毛幹の下部 1/3 部分を摘み、毛（20 本～60 本）を抜き取った。共焦点生体レーザー顕微鏡を用いて波長 830 nm で毛嚢開口部を観察し、毛嚢開口部および毛幹の直径を測定した。また、脱毛および脱毛未処理皮膚にカルセイン水溶液（10 mM、1 mL）を適用し、直後に、適用溶液を回収し、皮膚を包埋し、凍結させた。皮膚組織切片を作製し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて波長 473 nm で観察した。なお、皮膚表面の毛穴および毛幹の半径は Vivascope® にて観察し画像解析ソフト（Viva Scan）を用いて測定した。

#### B-2-3. in vitro 皮膚透過実験

ブタ耳皮膚は、角層を上向け縦型拡散セル（有効透過面積 3.14 cm<sup>2</sup>）にセットした。表皮側に 1 mL、真皮側に 18 mL の phosphate buffered saline (PBS、pH7.4) を適用し、1 時間放置後、表皮側から PBS を回収し、真皮側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を真皮側に補充した。表皮側には PBS に溶解させた種々物質（10 mM FP、500 mM ISMN、1mM FL-Na、1 mM FD-4、1 mM FD-10、1 mM FD-20）の水溶液を 1 mL 適用した。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 サンプリングを行い、その都度、同量の PBS を補充した。得られたサンプル中の物質濃度は HPLC および蛍光分

光光度計を用いて測定した。単位面積あたりの物質の皮膚透過速度は、Fick の拡散式から求めた。

#### B-2-4. 有意差検定

脱毛本数の異なる場合の毛嚢一本あたりの透過量の検定には、ノンパラメトリック検定である Kruskal Wallis H-test により行った。脱毛する毛幹が太い群と細い群間の皮膚透過量の違いの検定は Unpaired t-test により行った。危険率 5%未満を有意と判定した。

### 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

白金粒子を水に懸濁させ、超音波処理した時平均粒子径は 138 nm で、30%程度が 100 nm 以下であった。血清あるいは培養液に懸濁すると若干サイズの大きい方に移動し、人工胃液や人工腸液に懸濁すると著しく凝集した。プラチナナノコロイドを配合と謳うボトル水の粒度分布は、調製した白金粒子懸濁液のものと大きな差はなかった。銀粒子は水に懸濁すると直ぐに凝集塊として沈降した。アルミナ粒子 Al-A を水に懸濁した時の平均粒子径は 156 nm であり、人工胃液及び人工腸液等に懸濁させた時でもほとんど変化しなかった。アルミナ粒子 Al-T の一次粒子径は Al-A よりも小さいが、水に懸濁した時は同程度の平均粒子径が得られた。人工腸液中では著しく大きな粒子径が得られ、培地中や血清に混和した時も凝集した。

##### C-1-2. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

白金、銀及びアルミナ (A-A 及び A-T) 粒子は 100 µg/ml で細胞生存率の低下は認めなかった。白金粒子で前処理した THP-1 細胞の DNCB による CD54 及び CD86 表面抗原発現率は、白金粒子の代わりに培地で前処理した場合 (コントロール) に比べて低下した。銀で前処理した場合も同様に低下した。アルミナについても、前処理した細胞の DNCB に対する CD54 及び CD86 発現量は変化しなかった。

##### C-1-3. ケモカイン産生

AlCl<sub>3</sub>、FeCl<sub>3</sub> 及び FeCl<sub>2</sub> を細胞毒性を示さなかった 100 µg/ml で細胞に曝露し、24 時間後、最終濃度 3.5 µg/ml となるよう DNCB を加えて更に 24 時間培養した。培養上清中 L-8 濃度は、金属塩での前処理をせずに DNCB を適用したときの IL-8 産生量に比べて、ほとんど差はないか、むしろ低下した。

#### C-1-4. 化粧品中のナノ物質の粒子径測定に関する文献調査

化粧品規制協力国際会議 (ICCR) ナノマテリアルキャラクターライゼーション II 作業部会作成文書を翻訳した。ここでは、不溶性の成分で意図的に製造され、最終製品中で (縦、横、高さのうち) 1 方向又は複数方向の寸法が 1~100 nm の範囲内で、生体基質中で十分に安定で残留するため生物系と相互作用する可能性がある化粧品に使用される物質をナノ成分と見なし、ナノ材料の溶解性、生体基質中での安定性及び残留性、及び最終製品における 1~100 nm の範囲の粒子径測定の基準を明確に定義するための技術的方法や問題点を示した。

化粧品などの複合基質中でのナノ粒子の特性解析法は開発段階であり、利用可能な国内または国際基準はない。測定においてサンプルの調製が必要になるが、製品の希釈や対象ナノ材料を抽出する分離ステップによりナノ粒子の分析を困難にする多数の問題があるとした。現在最も広範囲に使用されているナノ粒子の粒子径測定法は電子顕微鏡 (SEM, TEM), 光散乱 (DLS, PTA), 遠心分離 (CPS, AUC) 及びフィールドフローフラクシオネーション法 (FFF) である。それらの分析法について、複合基質中でのナノ材料への適用可能性に関して示した。しかし、これらの方法論を用いても複合基質中のナノ材料の直接的な観察や特性解析を行うのは不可能であるとし、更に情報収集が必要であるとされている。

#### 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. 毛嚢の形状

ランダムに選択した毛幹 6 本の平均直径 (67.0  $\mu\text{m}$ ) は皮膚表面の毛穴の平均直径 (134  $\mu\text{m}$ ) の半分程度であった。毛幹の平均断面積は皮膚表面の毛穴の平均面積の約 1/3 であった。

### C-2-2. 蛍光マーカの皮膚分布

脱毛未処理皮膚の場合は、毛嚢漏斗部分にカルセイン由来の強い蛍光が認められたが、脱毛処理皮膚では、毛嚢漏斗部から毛嚢深部にかけてカルセイン由来の蛍光が確認された。脱毛未処理の毛嚢漏斗部の開口径は 93.76  $\mu\text{m}$  であるのに対し脱毛処理皮膚では 188.9  $\mu\text{m}$  であり、脱毛処理により毛嚢漏斗部の開口径が約 2 倍大きく開いたことが確認された。

次に、脱毛未処理毛嚢開口部だけにカルセイン水溶液を適用した。適用 1 時間後は、カルセイン水溶液が毛嚢漏斗部に分布し、毛嚢バルジ部にも到達したことが確認された。6 時間後は、カルセインが毛嚢漏斗部だけでなく、毛嚢深部にある毛根にも分布していることが確認された。また、カルセイン 6 時間適用後の皮内分布は角層が染まっていないにもかかわらず、カルセイン由来の蛍光が皮内に多く認められた。カルセインは、皮膚表面から深さが 100  $\mu\text{m}$  付近では広く毛嚢を中心に拡散したことが確認された。さらに、深さ 120~170  $\mu\text{m}$  では、毛嚢外にもカルセインの分布が確認された。

### C-2-3. In vitro 皮膚透過性試験

脂溶性薬物の FP や水溶性低分子薬物の ISMN は 20 本脱毛処理を行っても透過量に大きな差が見られなかった。一方、分子量が 500 Da 付近もしくはそれ以上の水溶性薬物である FL-Na、FD-4、FD-10 および FD-20 では 20 本脱毛処理皮膚を介した 12 時間目の累積透過量は、脱毛未処理皮膚と比べ、それぞれ 2.5 倍、2.8 倍、2.8 倍、2.7 倍と高い値を示した。

得られた透過プロファイルより、種々皮膚透過パラメーターを算出した。脱毛処理皮膚を介した FP および ISMN の透過係数 (P)、分配係数 (K) および拡散係数 (D) は、脱毛未処理皮膚を介した各パラメーターと比べ差が見られなかった。一方、脱毛処理皮膚を介した

FL-Na、FD-4、FD-10、FD-20 の P、K および D をみると、脱毛未処理皮膚を介した各パラメーターと比べ P と K が増大した。脱毛処理により増加した薬物の P と K は脱毛未処理皮膚の P と K に比べ、約 2 倍増大した。脱毛処理により皮膚表面の毛穴の直径比は約 2 倍に拡大した結果とほぼ一致した。

FD-4 の皮膚透過量は、脱毛未処理皮膚を介した透過量に対し、20 本脱毛時には 2.90 倍、30 本脱毛時には 3.98 倍、40 本脱毛時には 6.86 倍、50 本脱毛時には 7.70 倍、60 本脱毛時には 7.38 倍であった。10 本から 40 本脱毛までは脱毛本数の増加に伴い flux も増大した。一方、50 および 60 本脱毛処理では累積透過量は増加するものの flux はほぼ同じとなった。40 本脱毛の 1 本当りりの皮膚透過量は高い傾向にあったが、脱毛本数の異なる他の 1 本当りりの皮膚透過量と比べ有意な差が見られなかった ( $P > 0.05$ )。20~60 本の脱毛処理では、毛嚢脱毛本数の違いによる薬物皮膚透過性に有意な差は認められなかったものの、毛嚢を介した薬物透過量は一定の値とならなかった。

脱毛 20 本の毛幹太さが FD-4 の皮膚透過に及ぼす影響について調べた。平均毛幹が太い毛 (117.7  $\mu\text{m}$ ) を中心に脱毛処理した皮膚を用いた FD-4 の皮膚透過量は、平均毛幹が細い毛 (61.6  $\mu\text{m}$ ) を中心に脱毛処理した場合の約 1.3 倍になり、有意な差が認められた ( $P < 0.05$ )。しかし、脱毛した毛幹の平均太さには 2 倍の差があるにもかかわらず、薬物の皮膚透過係数および分配係数と一致しなかった。

## D. 考察

白金ナノコロイドは、抗酸化作用を有する成分として化粧品や食品に添加されている。化粧品成分として用いられる白金ナノコロイドは、粒子径は 2 nm、コロイド状態で水溶液となっているとされる。銀に殺菌力があることは古くから知られ、化粧品では銀含有ゼオライトのデオドラント製品への配合が良く知られている。アルミナは研磨剤としてシリカやタルクと組



み合わせて洗顔料のスクラブ剤の原料となる。水に不溶の白色顔料として、ファンデーションやフェイスパウダー、口紅などに使われる。また食品容器のフィルム等に用いられており、劣化によって食品に混入する可能性がある。

白金粒子は水に懸濁したとき一定量がナノサイズにあるが、白金ナノコロイド製造会社等が謳うような数 nm サイズの白金粒子は製品中では存在しないかごくわずかと思われた。白金粒子を血清や培養液に懸濁すると若干サイズの大きな方に粒度分布が移動し、ナノサイズの粒子の割合はわずかとなった。人工胃液や人工腸液に懸濁すると著しく凝集することから、経口摂取されても消化過程でほとんど凝集し、ナノサイズとして効果は生じないと思われた。銀粒子は直ぐに凝集塊として沈降した。水懸濁液では 270 nm 付近にピークを有する粒度分布が得られるが、沈降した残りの上清の像と考えられる。人工胃液や人工腸液では更に凝集し、血清中でも同様の分布であった。体内に侵入した場合、銀ナノ粒子は直ぐに凝集し、ナノサイズでの影響はほとんど見られないと思われる。銀についてサイズの効果を試験するためには懸濁液の調製から工夫する必要がある。アルミナ粒子は表面コーティングなどが分散性に強く影響していると思われた。今回試験したナノ粒子はいずれも化粧品原料として使われているものではないため、材質が一緒だとしても必ずしも特性が一致しない可能性があり、各溶媒中での粒度分布については参考として捉えるべきである。

ナノ物質に曝露された時に化学物質による皮膚感作性反応が増強されるかどうか検討した。白金、銀及びアルミナ粒子で前処理した細胞の反応性はいずれも低下した。昨年度までに、酸化チタン及び酸化鉄について試験を行っているが、同様に反応性の増加は認めていない。よって、*in vitro* 試験では、白金、銀、アルミナのようなナノ物質については化学物質の皮膚感作誘導反応性を増強しないと判断した。これら金属ナノ粒子に経皮曝露されたとしても、

皮膚における感作性物質に対する反応性は影響を受けない、すなわちアレルギーが起こりやすくなるとは考えられない。

*In vitro* 試験系ではサイズの影響を見ることは、懸濁する溶媒によって凝集したり、粒子分布が変化したりすることから難しい。細胞培養液中ではナノサイズの物がなないため反応性が出なかった可能性もある。しかし、溶解が予想され毒性も知られる金属イオンに作用がなかったことから、粒子自体がそうした曝露経路では増強効果を有しないことを示唆する。これまでの単純溶媒中での粒度分布の結果、金属酸化物の高濃度懸濁液の曝露によって細胞機能への影響はほとんどなかったことから、化粧品に含まれるナノ物質がサイズに依存した皮膚機能への影響を起こすことはないと思われる。

ナノ物質の粒子径測定法に関しては、電子顕微鏡、光動的散乱法等があるがいずれも単純な媒体中のナノ物質に限られていること、定量的な判断はできないとされている。サンスクリーン剤を例にとると、酸化チタンや酸化亜鉛といったナノ物質が複数種類含まれ、多種多成分の混合物であるため、1つを特定して粒度分布を測定することはできない。これらのナノ物質が製剤中に高濃度に含まれていることも関係し、機器によっては希釈操作をする必要があり、元の製剤中とは異なった形態を観察している可能性もある。これらを解決する適切な方法は現状ないとされており、今後も技術情報を収集することが重要である。

皮膚に塗布したナノ物質の毛嚢内動態および毛嚢移行評価を行った。蛍光色素カルセインを用いた試験では、脱毛未処理皮膚の場合は、毛嚢漏斗部分に強い蛍光が、脱毛処理皮膚では、毛嚢漏斗部から毛嚢深部にかけてカルセイン由来の蛍光が確認された。脱毛未処理毛嚢内の物質動態を検討したところ、カルセインが毛嚢漏斗部だけでなく、毛嚢深部にある毛根にも分布していることが確認された。また、角層が染まっていないにもかかわらず、カルセイン由来の蛍光が皮内に多く認

められた。この結果は、外毛根鞘のバリア能が低いことに関係していると考えられ、毛嚢に移行した水溶性物質は外毛根鞘を介して皮内へ浸透する可能性が示唆された。さらに皮膚表面から深さ 120~170  $\mu\text{m}$  では、毛嚢外にもカルセインの分布が確認された。これらの結果より毛嚢に移行した水溶性物質は比較的浅い外毛根鞘より皮内へ移行する可能性が示唆された。しかし、皮膚浸透性は、溶解・拡散モデルで表すことができることから、ナノ粒子の構成成分が皮膚へ分配しない限り、ナノ素材が皮膚浸透・透過することは困難であると考えられた。

In vitro 皮膚透過性試験の結果、脂溶性薬物の FP や水溶性低分子薬物の ISMN は脱毛処理を行っても透過量に大きな差が見られなかったが、分子量が 500 Da 付近もしくはそれ以上の水溶性薬物では高い値を示した。脱毛処理皮膚を介した FL-Na、FD-4、FD-10、FD-20 の透過係数 (P)、分配係数 (K) および拡散係数 (D) は、脱毛未処理皮膚を介した各パラメーターと比べ P と K が約 2 倍増大した。脱毛処理は水溶性高分子薬物の分配性増大と関連した。脱毛処理により皮膚表面の毛穴の直径比は約 2 倍に拡大した結果とほぼ一致することから、皮膚表面の毛穴の面積は、毛嚢ルートを主な経皮透過ルートとする水溶性高分子薬物の皮膚透過性に強い関係性があると示唆された。

20~60 本の脱毛処理では、毛嚢脱毛本数の違いによる薬物皮膚透過性に有意な差は認められず、毛嚢を介した薬物透過量は一定の値とならなかった。平均毛幹が太い毛を中心に脱毛処理した皮膚を用いた FD-4 の皮膚透過量は、平均毛幹が細い毛を中心に脱毛処理した場合の約 1.3 倍になり、これらには有意な差が認められた。毛幹の平均太さには 2 倍の差があるにもかかわらず、薬物の皮膚透過係数および分配係数と一致しなかった。これは毛嚢を介する薬物の皮膚透過は毛幹の太さだけでなく、hair cycle、脱毛により生じた毛嚢部分の組織変化

やモデル薬物自体の物理的性質などが影響を及ぼしているためと考えられた。

皮膚/基剤分配係数の増加比は水溶性物質の分子量にかかわらず一定であり、脱毛処理により増加した皮膚表面の毛穴の直径比と一致した。また、脱毛する際に毛幹の太さによって物質の皮膚透過量が左右されることから、毛幹の太さが脱毛処理部の毛嚢を介した物質の透過量と関係することが分かった。このことから皮膚表面の毛穴の面積もしくは毛幹の太さは水溶性物質の皮膚透過性と強く関係することが示唆された。

以上の結果より、毛嚢を水で満たされた細孔透過ルートと仮定すると、ナノ粒子は脱毛により容易に毛嚢内に移行する可能性が示唆された。また、本手法は毛嚢への物質移行量を評価可能な新規実験方法となる可能性が示唆された。

## E. 結論

白金、銀、アルミナ粒子はそれぞれ懸濁する溶媒によって粒度分布が変化した。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、サイズの影響を評価できる可能性は少ないと思われた。現状、最終製品中のナノ物質の存在状態を解析する適切な測定法はないとされている。皮膚感作性物質に対する抗原提示細胞の反応は今回試験したナノ粒子の共存下では影響を受けなかった。これらナノ物質に皮膚感作誘導を増強する作用はないと考えた。

物質の毛嚢移行性は毛穴の開口部面積と関係があることが示されたことから、脱毛時には毛嚢内へのナノ粒子の侵入が示唆された。高分子水溶性物質は毛嚢移行後に分配・拡散して皮内へ浸透するが、ナノ物質の場合においては、皮膚組織への分配が著しく低く、皮膚炎症などによる毛嚢内バリア機能の低下や遊走細胞などによる貪食が認められない限り、生きた表皮・真皮内へのナノ粒子の移行は困難であると考えられた。

## 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. ICP-MS  
によるカーボンナノマテリアルの金属の分析.  
第 39 回日本トキシコロジー学会学術年会  
(2012. 7)

2) 正木涼介、藤堂浩明、杉林堅次. 画像解析  
による化学物質の生きた表皮・真皮中における  
concentration-distance profile 評価法の確立.  
第 56 回日本薬学会関東支部大会 (2012.10)

## 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 24 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 部長

## 研究要旨

化粧品及び医薬部外品の主たる使用は皮膚への塗布であり、それらの品質及び安全性確保には経皮曝露評価が重要である。化粧品等に使用されるナノ物質として白金、銀、及びアルミナ粒子を取り上げ、皮膚の感作性物質に対する反応性に影響を及ぼすかどうか検討した。水に懸濁した白金粒子は一定量が 100 nm 以下のナノサイズで存在し、ボトル水でも同様の粒度分布をしていることがわかった。白金粒子の一次粒子径は数 nm と謳われているが、ある程度凝集しているものと考えられる。また人工胃液、人工腸液あるいは細胞培養液中では更に凝集した。銀は化粧品において他の担体に吸着させて使うとされており、銀粒子でなくこうした実態に沿った検討が必要であった。アルミナ懸濁液はその粒子の表面処理状態によって各種溶媒中での凝集度が変化し、化粧品に使われる粒子の特定も影響評価に重要な調査と考えた。いずれも一次粒子径がナノサイズであるが、製剤あるいは製品化の段階、あるいは生体内で消化あるいは血液循環過程でほとんどが凝集し、ナノサイズでの影響は生じる可能性は少ないと思われた。ナノ物質の皮膚感作性誘導反応への影響を *in vitro* 試験系で調べた。皮膚における細胞の抗原提示反応は白金、銀ナノ粒子の存在による増強はなかった。イオン化が予想される物については金属塩を用いて検討したが、反応性の変化はなかった。以上のことから、これらナノ物質に皮膚感作誘導を増強する作用はないと考えた。ナノ物質を含有する化粧品の安全性と品質確保のためには、製剤内でナノサイズであることの確認が重要である。化粧品中のナノ物質の特性解析法として化粧品規制協力国際会議ワーキンググループが取りまとめた文書を翻訳した。現状、最終製品中のナノ物質の測定法については適切な方法はないとされていた。化粧品製剤として含有するナノ物質のサイズに関連する影響を明らかにすることは極めて困難であるが、今後もナノ物質に関する物理化学的及び生物学的な技術情報を収集することが重要である。

### A. 研究目的

化粧品や医薬部外品では数十 nm の、いわゆるナノサイズの酸化チタン、酸化亜鉛及びシリカ等の微粒子が添加されている。近年ナノ物質の安全性が懸念されているが、化粧品及び医薬部外品は主に皮膚に使用することから、経皮曝露による影響を考慮する必要がある。また、ナ

ノ物質の健康影響を評価することは、その材質とサイズに依存しているかどうかを明らかにすることである。化粧品や医薬部外品は多種多様な成分を製剤としたものであり、製品中では他成分の影響でナノ物質が凝集して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。製品によっては界面活性剤等により分散し

ている可能性もあるが、実際の製品のナノ物質のサイズを測定した研究はほとんど報告されておらず、よくわかっていない。更に、口紅のように経口摂取される化粧品もあり、含まれていたナノ物質が体液や生体タンパク質と相互作用することによって粒度分布が変化し、結果としてナノ物質のサイズ影響を見ていない可能性もある。したがって、ナノ物質を配合した化粧品や医薬部外品の安全性評価は、ナノ物質の皮膚機能への影響と製剤中のナノ物質の存在状態の把握が重要と考えられる。また、ナノ物質単独の作用だけでなく、他成分との複合曝露による作用についても検討する必要がある。

本研究では昨年度以来、化学物質の皮膚感作性誘導反応に対するナノ物質の増強効果について検討している。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* の動物実験代替法である *h*-CLAT を利用して、ナノ物質と化学物質アレルゲンとの複合影響を評価した。本年度は、銀、白金、アルミナ等について検討を加えた。ナノ物質を種々の媒体に懸濁して粒度分布を測定し、製剤あるいは生体内における存在状態について予想した。

日米欧州カナダからなる化粧品規制協力国際会議 (ICCR) はナノ物質について議論しているが、ナノ物質の特性を明確にすることが重要とし、作業部会を立ち上げている。そこでは、化粧品分野でのナノ物質の定義が決められ、これを明確にする基準や技術的方法を上げている。本年度作業部会は、ナノ物質の特性解析として、技術的方法に関する文献を調査し、製剤中のナノ物質の測定法等に関して取りまとめた。本研究では、この報告書を翻訳し、ナノ物質の製剤中のサイズ測定法に関する部分について説明を加えた。

## B. 研究方法

### 1. 材料及び試薬

白金 (Pt) および銀 (Ag) 粒子は Aldrich 社から購入した。白金粒子の一次粒子径は電子顕微鏡 (TEM) 観察で 50 nm 以下とされてい

る。銀粒子の粒子径は 100 nm 以下で、極性溶媒分散用に表面が有機コーティングされている。アルミナ (酸化アルミニウム) は懸濁液を入手した。Al-A (50%, 一次粒子径 45 nm) は Alfa Aesar 社より、Al-T (10%, 一次粒子径 10~20 nm) は TECNAN 社から購入した。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。AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 及び FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 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 0.1~1%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)、牛胎児血清 (FBS) 及び 10% FBS 含有 RPMI1640 培養液 (FBS-RPMI, Medium) で希釈した。Vortex mixture で 1 分間攪拌し 30 分間超音波処理した後、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) を用いた粒度分布を測定した。

### 4. 細胞表面抗原の解析

白金及び銀粒子は 10 mg/ml となるように水に懸濁して 10 分間超音波処理した後、培養液で希釈し指定濃度に調整した。アルミナ懸濁液 (100 mg/ml) は 10 分間超音波処理した後、上記同様に培養液で希釈した。

24 穴プレートの各穴に、THP-1 細胞浮遊液 (2.0×10<sup>6</sup> cells) 500 µl 入れ、各ナノ物質が 0、1、10 及び 100 µg/ml の最終濃度となるように懸濁液 250 µl を添加し 24 時間培養した。次に、感作性物質の 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 溶液 250 µl 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 µl 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 µl、FITC 標識抗 CD54 抗体 (clone 6.5B5, DAKO 社) 3 µl または isotype control として FITC 標識マウス IgG1 (clone DAK-G01, Dako 社) 3 µl 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 µl に再懸濁し propidium iodide (PI) 25 µg/ml を 10 µl 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。

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

## 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。市販 ELISA キットを用いて、上清中の IL-8 量を測定した。

## 6. 化粧品中ナノ物質の粒子径測定に関する文献調査

化粧品規制協力国際会議 (ICCR) ナノマテリアルキャラクタライゼーション II 作業部会が 2012 年に取りまとめた文書を入手し翻訳した。化粧品中のナノ物質の粒子径測定に関する部分を解説した。

## C. 研究結果

### 1. 粒度分布

白金粒子濃度として 0.01% となるよう水を加えて懸濁させたところ、平均粒子径は 160 nm であった。超音波処理すると 138 nm と若干小さくなり、100 nm 以下の割合は 30% 程度であった (図 1(a))。白金粒子を血清あるいは培養液に懸濁したとき、水に懸濁した時より粒度分布は若干サイズの大きい方に移動した。人工胃液や人工腸液に懸濁すると著しく凝集し、それぞれの平均粒子径は 860 nm (PdI 0.646)、732 nm (PdI 0.550) であった (図 1(b))。プラチナナノコロイドを配合と謳うボトル水の粒度分布を測定した。製品で観察された粒度分布は、調製した白金粒子懸濁液のものと大きな差はなかった (図 1(c))。

銀粒子は水に懸濁すると直ぐに凝集塊として沈降した。この懸濁液を 30 分間超音波処理すると 270 nm 付近にピークを有する粒度分布が得られるが、ほとんど沈降しており、上清に浮遊する一部の粒子像である。人工胃液や人工腸液では更に凝集し、血清中でも同様の分布であった (表 1)。培地に懸濁した場合、粒子径は水と変わらないが、粒度分布の幅は広がった (図 2)。

アルミナ粒子 Al-A を各種溶媒に懸濁したときの粒子径を表 2 に示した。水に懸濁した時の平均粒子径は 156 nm であり、人工胃液及び人工腸液等に懸濁させた時でもほとんど変化しなかった (図 3)。Al-T の一次粒子径は Al-A よりも小さいが、水に懸濁した時は同程度の平均粒子径が得られた。人工腸液中では著しく大きな粒子径が得られ、培地中や血清に混和した時も凝集した。

### 2. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

白金粒子を 100 µg/ml (試験した最高濃度) で適用したとき、THP-1 細胞の生存率は 98% であった。銀及びアルミナ (A-A 及び A-T) についても白金と同濃度で細胞生存率の低下は認めなかった。

THP-1 細胞を白金粒子と 24 時間前培養した後、種々の濃度の DNCB 溶液を添加し、更に 24 時間培養した。培養終了後、h-CLAT 法に準

じて操作し、生細胞の CD54 及び CD86 抗原の発現増加率を求めた。白金粒子で処理した細胞について DNCB による CD54 及び CD86 表面抗原発現率は、白金粒子の代わりに培地で前処理した場合（コントロール）に比べて低下した（図 4）。

銀で前処理した THP-1 細胞の DNCB 適用時の CD54 及び CD86 発現率は、コントロールの DNCB 適用時の発現率と比べて、いずれの DNCB 濃度においても低下した。

アルミナ（ $Al_2O_3$ ）についても、前述のナノ物質と同様に、これらで前処理した細胞の DNCB に対する CD54 及び CD86 発現量は変化しなかった。

### 3. ケモカイン産生

金属塩の感作誘導反応の増強効果を、IL-8 を指標に調べた。細胞毒性を示さなかった 100  $\mu\text{g/ml}$  で各金属塩  $AlCl_3$ 、 $FeCl_3$  及び  $FeCl_2$  を細胞に曝露し、24 時間後、最終濃度 3.5  $\mu\text{g/ml}$  となるよう DNCB を加えて更に 24 時間培養した。培養上清を回収し、IL-8 濃度を ELISA で求めた。2 回繰り返し実験をし、その平均値と標準偏差を図 5 に示した。金属塩での前処理をせずに DNCB を適用したときの IL-8 産生量に比べて、金属塩前処理したときの量とほとんど差はないか、むしろ低下した。

## 4. 化粧品中のナノ物質の粒子径測定に関する文献調査

### 4-1. 粒子径の特性解析概論

化粧品規制協力国際会議（ICCR）ナノマテリアルキャラクターイゼーション II 作業部会作成文書を翻訳したものを別添で示した。

作業部会は、規制目的から化粧品に使用される特定の材料を「ナノ材料」とみなすべきか否かの評価の助けとなる基準を特定し推奨することを目的に設立されている。作業部会はまずナノ材料の基準を、「化粧品規制協力国際会議の目的のため、不溶性の成分で意図的に製造され、最終製品中で（縦、横、高さのうち）1 方向又は複数方向の寸法が 1~100 nm の範囲内で、生体基質中で十分に安定で残留するため生

物系と相互作用する可能性がある化粧品に使用される物質をナノ成分と見なす。」と定義した。次に、ナノ材料の特性解析に現在利用可能な方法を提示し、特定されたパラメータの最も重要な特性解析法の概論を示した。更に、方法論に関する理解を促進するために、基準の意味及び目的を明確化することが重要と考え、本文書を作成した。ナノ材料の溶解性、生体基質中での安定性及び残留性、及び最終製品における 1~100 nm の範囲の粒子径測定の基準を明確に定義するための技術的方法や問題点を示した。ここでは、最終製品（すなわち、複合基質中）における 1~100 nm の範囲の粒子径測定に関する部分を示す。

「ナノメートル、nm」は化学的測定単位として極めて正確に定義されているにもかかわらず、その生理的有意性は明確とは言えない。実際に、特にナノテクノロジーに起因するリスクは確定されておらず、粒子径自体が毒性の指標になることはない。粒子径により生物学的活性が明確に制限されることを裏付けるエビデンスはない。付録 1 に列記した定義の多くは、ナノスケールの概念に厳格な粒子径限界を設けておらず、作業部会は、粒子径を概算値とすべきであることとした。

ナノ材料の特性解析法の再現性及び正確度は多数のパラメータに大きく依存する。異なった測定法を用いて得た結果を直接比較することはできない。一連の測定において同一の測定法を使用したとしても、サンプル調製における標準操作手順を確立し、従う必要がある。しかし標準操作手順が存在する例は少数である。既存の参照ナノ材料の例として、米国立標準技術研究所（NIST）の金ナノ粒子（RM 8011, RM 8012, RM 8013）及び欧州委員会 JRC のシリカナノ粒子（ERM-FD100, ERM-FD304）があり、これらは粒子径値が認定されている。

製造時点の粒子径がナノスケールの範囲内に入っているものの、サンプル中ではナノスケール外となる小粒子、凝集塊または凝集体となり、この凝集塊が実際に存在する最小の粒子と



なるものがある。凝集塊と凝集体の定義は以下のとおり別である。凝集塊：強く結合した又は融合した粒子から構成され、その結果外表面積は、個々の成分から算出した総表面積と比較して有意に小さい。凝集体：ゆるやかに結合した粒子又は凝集塊又はそれらの混合物から構成され、その結果外表面積は、個々の成分の表面積の合計値と同等である。凝集塊をばらばらにするのに必要な力は化粧品の製造中に又はこれらの製品を皮膚に塗布した場合に通常かかる力よりずっと大きい。したがって、特定のサンプルで報告されている粒子径は、測定法が成分であるナノ粒子を測定しているのか、凝集塊及び/又は凝集体の径を測定しているのかによって異なる場合がある。また、測定値はサンプルをどのように調製したかにも依存する。結果を比較するためには、同一の測定法及び同一のサンプル調製法を用いて測定する必要がある。

作業部会は、製造段階や販売段階などではなく、可能な限り使用段階の粒子径を反映する特性解析法の選択を確立することが重要と考えた。化粧品は一般的に複雑な組成を持ち、ナノ材料は1成分に過ぎない。そのため、ナノ材料は製品中の他の成分と相互作用し、ナノ材料の存在について一定の製品を解析するのは困難な課題となる。化粧品などの複合基質中でのナノ粒子の特性解析法は開発段階であり、化粧品におけるナノ材料の粒子径測定に利用可能な国内または国際基準はない。

測定においてサンプルの調製が必要になるが、製品の希釈や対象ナノ材料を抽出する分離ステップによりナノ粒子の分析を困難にする多数の問題が持ち上がる。(1) 分離及び/または抽出プロセスそのものがナノ材料を変化させる可能性があり、分析アーチファクト(凝集, 乖離, …)に至る場合がある。(2) サンプル調製についての標準操作手順書(SOP)が存在せず、したがって高い再現性で被験項目を調製するのが困難。(3) 複合基質中におけるナノ材料の標準的分析法や検証済みの分析法がない。(4) 参照試験物質や代表的な試験物

質がない。(5) 天然のナノ粒子と工業ナノ粒子との間の鑑別。意図せずに生成された製造ナノ材料や天然のナノ粒子の中の工業ナノ粒子のモニタリングと並行して実施する。(6) サンプルが全配合物を代表するものか否かを決めるのが困難。

1~100 nm の範囲の粒子径及び粒子径分布の解析に関する文献は多数ある。しかしこれらのほとんどは、単純な乾燥粉末や単純な水分散液など非常に特異的な条件下で適用可能である。それらの条件下では、粒子径の特性解析に使用可能な指針が多数ある。OECD は化学品の物理化学的特性解析試験について 22 件のガイドラインを発行しているが、2009 年に、これらが工業ナノ材料にも適用可能か否かについてレビューした。その結果、4 件が適用可能と考えられたが、特に粒子径分布/繊維長及び直径分布に関する TG は修正が必要である。サンプル調製については、予備指針 1 件が現在利用可能である。

欧州化学機関(ECHA)は、欧州化学品規制 REACH (化学品の登録, 評価及び承認) 下で、情報要件及び化学品の化学的安全性評価に関するナノ材料特異的指針文書を発行した。ISO、ASTM、CEN には粒子径や長さの試験に関する基準があるが、ナノ材料に適用するには見直し、または修正しなければならない。例えば ISO 14887 : 2000 は、物質の粒子径分析のために適切な分散系を調製する手順を概説している。サンプル調製及び分析に関する SOP の欠如は認識されており、広範囲のナノ材料に対して推奨される分散手順が複数報告されている。

現在最も広範囲に使用されているナノ粒子の粒子径測定法は電子顕微鏡(SEM, TEM), 光散乱(DLS, PTA), 遠心分離(CPS, AUC)及びフィールドフローフラクシオネーション法(FFF)である。それらの分析法について、複合基質中でのナノ材料への適用可能性に関して示す。全分析法とも何らかのサンプル調製を必要とする。

1) 電子顕微鏡(SEM, TEM)

おそらく最も正確な方法であるが、溶媒を除去しサンプルを表面に沈着させる必要があり、開始サンプルに関して乾燥中の凝集などにより、粒子径分布の測定にバイアスが生じる可能性がある。この問題は、水や溶媒含有材料の耐性を高めたシステムの使用により、または揮発性成分の蒸気圧を最小限にするためにサンプルを凍結した cryo-SEM の使用により抑制可能である。電子顕微鏡 (EM) 法は広範囲の物質及び粒子径に適用可能であり、種々の大きさや形状のナノ粒子混合物を含有するサンプルを取り扱うことができる。EM 法は時間のかかる操作や画像解析を必要とするが、画像解析ソフトの進歩が粒子径測定の自動化や、高分解能 EM 画像を使用した計数の助けとなる可能性がある。欠点として、EM は複雑でかなり高価な機器を使用し、専門の技術支援を必要とする。

## 2) 光散乱 (DLS, PTA)

光散乱法は液体サンプルに直接適用可能である。光散乱法は使用法が比較的簡単で、迅速かつ比較的 low コストである。ナノ材料の粒子径測定に最も広範囲に使用される光散乱法は動的光散乱 (DLS) であり、希釈溶液と濃縮溶液の両方に適用可能である。DLS は単分散ナノ粒子のサンプルを測定する際に優れた性能を示すが、種々の大きさの粒子を含有するサンプル、すなわち多分散サンプルの分析に使用する時には誤解を招く結果を示す恐れがある。その理由は、光分散法は異なった粒子径の粒子の分解能に限界があることにある。すなわち、その感度は比較的大きな粒子に対して強いバイアスがかかり、大きな粒子中に存在する比較的小さな粒子を検出できない。DLS と上流遠心分離粒子径測定とを併用することにより、この問題を克服可能である。この分析法では、遠心分離による粒子の分離が分離前ステップの機能を果たし、その後動的光散乱による個々の溶出画分の分析の信頼性が高くなる。

もう 1 つの粒子追跡法 (PTA) は、ビデオカメラ付きの光学顕微鏡を用いて、迅速に移動する粒子又は凝集塊により散乱した光の正確な

位置を観測する。適切な時間経過にわたり集団における統計学的に有意な粒子の動きを評価すると、Stokes-Einstein 式を用いて信頼性の高い粒子数/粒子径分布の計数統計を得ることが可能になる。欠点は (i) 画像解析にオペレータがかなりの量の入力を行う必要があること、及び (ii) 検出可能な最小粒子径に本質的限界があること (材料に依存して >20~50 nm) である。

## 3) 遠心分離 (CPS, AUC, XDC)

遠心分離法は、電子顕微鏡の低コスト代替法である。種々の粒子径の混合物を扱う場合には、遠心分離法は電子顕微鏡や光散乱法と比較して有効性が高く、適切な分解能を示す。検出器はその視野を通過する所定の大きさの物質の量を定量測定できるように較正することが可能で、粒子は検出器を通過する前に大きさごとに分離される。欠点は、粒子密度に関する十分な知識がないと、遠心沈降データから粒子径を正確に計算できないことにある。この分析法は平均密度に依存するが、コアシェル粒子のような複合体構造ではその平均密度が常に明らかでないことから、複合体構造の測定は困難である。密度がわかっている一次粒子の場合であっても凝集塊の実効密度は異なり、粒子径の測定値に誤差が生じることから、凝集塊が形成されるサンプル中でもこの問題が重要になる。低密度粒子の例では、CPS は 20nm 未満の粒子は測定できない。

## 4) フィールドフローフラクシオネーション法 (FFF)

FFF はクロマトグラフィー法の 1 種であり、種々の大きさの粒子を含有する複合基質中でのナノ材料の分析に高い能力を示し、粒子径 1 nm までの小粒子を分離できる。ダイナミックレンジが高く、種々の成分の回収が可能であり、その後の分析に使用できる。FFF は、生体系の場合と同様の、例えばナノ粒子-蛋白複合体のようなナノ粒子の優れた特性解析を可能にする。FFF には光散乱法や遠心分離と同一の制限があり、同一の大きさのナノ粒子と凝集塊を区

別できず、また同一の平均流体力学直径を有する種々の形状の粒子を区別できない。FFF は、しばしば光散乱などの他の粒子径分析法と併用される。FFF と光散乱法を併用すると、粒子が種々の大きさの複合混合液中ではなくほぼ単分散粒子の溶液中に存在することが保証されるため、光散乱法による粒子径測定の高信頼性がある。

#### 4.2. 複合基質における適用

最近、一般的な食品などの複合基質中でのナノ粒子分析法に関するレビューが複数発表されている。FFF（場合によってはその他の分析法と併用して）は、最終製品中でのナノ材料の定量分析（粒子径及び粒子径分布）に有望と考えられ、日焼け止めローション中の酸化チタンの粒子径分布を評価する試みがされた。一般的に、複合混合物中のナノ材料の特性解析には、段階的アプローチを用いる分析法が単独の分析法と比較して有望と思われる。第1段階は、ナノ材料を残りのサンプルから分離することであり、そのための先端的な分離法が必要となる。分離方法としてFFFや遠心分離法がある。いずれの場合でも、分離ステップの後に検出/特性解析ステップが続き、後者はUV-VIS検出器、DLS、ICP-MS、ラマン検出器等を用いて実施可能である。ナノ材料の分離と検出/分析とを組み合わせたと例として、FFFとICP-MSやFFFとDLSの組み合わせが報告されている。

ナノ粒子を分析するには、基質からナノ粒子を抽出する、または複合基質を除去する（又は少なくとも単純化する）のいずれかを行う必要がある。溶解性の物質は1種の溶媒または混合溶媒を用いて抽出し、不溶性の部分进行分析する。しかしこの不溶性部分は多数の物質から構成され、種々の物質の粒子径を完全に評価するのは非常に困難である。この場合、不溶性画分の分析をさらに進めてもよい。その場合、電子顕微鏡を用いてナノ粒子の存在を特定する不溶性画分を観察する。電子顕微鏡とEDS（又はEELS）を併用して、これらのナノ粒子の化学組成を評価してもよい。

TEMを用いて、適切な有機溶媒中にサンプルを分散させてTEM格子状に広げることが可能である。これにより、格子状に存在する粒子の粒子径の評価が可能になる。この観察でのキーポイントは、有機相を除去することである。目的粒子の元素組成の特性を解析する目的で、EDS（又はEELS）を用いて同定することができる。それにより、酸化チタンのナノ粒子とマクロ粒子間の区別などが可能になる。

もう1つの困難な問題として、意図的に化粧品に加えた工業ナノ粒子と天然に存在するナノ粒子とを区別する必要がある。ほとんどの例では、粒子径の測定に使用する分析法では化学的同定に関する明確なデータを示すことはできない。この場合、工業ナノ粒子と天然に存在するナノ粒子とを区別するために、いくつかの他の分析法が必要となる。

現在の最先端科学をもってしても、現在利用可能な方法論を用いて複合基質中のナノ材料の直接的な観察や特性解析を行うのは不可能である。したがって、代わりとなる解析法は、最終製品中の特定の原料の挙動のモデルに基づくものと考えられる。原料（成分）の特性解析はかなり可能になってきているとされるが、水など単純な分散剤中の単分散のナノ材料の特性解析と比較すると、まだ多くの努力が必要である。さらに、ナノ材料とそれが含まれる化粧品の主成分との間の相互作用を分析すべきである。これにより、製品中の凝集塊/凝集体状態のナノ材料が原料の状態と比べて異なるか否かについて示唆が得られる。なお、ナノ材料成分に関する知識、及びその表示は、最終製品中での存在形態を明確にする上で重要である。

#### D. 考察

白金ナノコロイドは、抗酸化作用を有する成分として化粧品や食品に添加されている。化粧品成分として用いられる白金ナノコロイドは、ヘキサクロロ白金酸とポリアクリル酸ナトリウム原料にして作られ、白金の粒子径は2 nm、

コロイド状態で水溶液となっているとされる。したがって、今回の市販白金粒子とは必ずしも特性が一致しない可能性がある。白金粒子は水に懸濁したとき平均粒子径は 138 nm と、100 nm 以下の割合も 30%程度あった。このときの粒度分布は、プラチナナノコロイドの配合を謳うボトル水で観察された粒度分布と大きな差はなかったが、白金ナノコロイド製造会社等が謳うような数 nm サイズの白金粒子は製品中では存在しないかごくわずかと思われた。白金粒子を血清や培養液に懸濁すると若干サイズの大きな方に粒度分布が移動し、ナノサイズの粒子の割合はわずかとなった。人工胃液や人工腸液に懸濁すると著しく凝集することから、経口摂取されても消化過程でほとんど凝集し、ナノサイズとして効果は生じないと思われた。

銀に殺菌力があることは古くから知られている。殺菌・抗菌・防臭剤として銀を利用した多くの製品が製造されているが、その効果が溶出したイオンによるものか、ナノサイズによるものかははっきりしていない。化粧品では銀含有ゼオライトのデオドラント製品への配合が良く知られている。今回は銀ナノ粒子を用いており、化粧品に利用される形態とは異なるが、電気製品や家庭用品等の存在状態と一致する。銀粒子は直ぐに凝集塊として沈降した。水懸濁液では 270 nm 付近にピークを有する粒度分布が得られるが、沈降した残りの上清の像と考えられる。人工胃液や人工腸液では更に凝集し、血清中でも同様の分布であった。体内に侵入した場合、銀ナノ粒子は直ぐに凝集し、ナノサイズでの影響はほとんど見られないと思われる。銀についてサイズの効果を試験するためには懸濁液の調製から工夫する必要がある。

アルミナは研磨剤としてシリカやタルクと組み合わせて洗顔料のスクラブ剤の原料となる。水に不溶の白色顔料として、ファンデーションやフェイスパウダー、口紅などに使われる。また食品容器のフィルム等に用いられており、劣化によって食品に混入する可能性がある。アルミナ粒子を水に懸濁した時の平均粒子径は

約 150 nm であった。一方のアルミナ粒子は血清中でも粒子径はほとんど変化ないが、もう一方は溶媒が変化すると著しく凝集した。同じアルミナのナノ粒子であるが、表面コーティングなどが行われており、その性質が分散性に強く影響していると思われる。

化粧品に含まれるナノ物質の皮膚免疫機能に対する影響を調べた。ナノ物質に曝露された時に化学物質による皮膚感作性反応が増強されるかどうか *in vitro* 試験系で検討するため、各種ナノ物質で前処理した THP-1 細胞に対し DNCB を適用し、細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現率が增加するかどうかで判断した。

試験に用いた細胞毒性を示さない 100 µg/ml で白金、銀及びアルミナ粒子で前処理した細胞の DNCB 適用時の CD54 及び CD86 発現率は、コントロールの DNCB 適用時の発現率と比べて、いずれの DNCB 濃度においても低下した。昨年度までに、酸化チタン及び酸化鉄について試験を行っているが、同様に反応性の増加は認めていない。また金属酸化物が製品及び生体に適用したときに酸等により溶解することを想定し、イオン化が予想される金属の塩について、IL-8 産生量を指標に調べたが、金属塩での前処理をせずに DNCB を適用したときの IL-8 産生量に比べて、ほとんど差はないか、むしろ低下した。以上、*in vitro* 試験では、白金、銀、アルミナのようなナノ物質については化学物質の皮膚感作誘導反応性を増強しないと判断した。これら金属ナノ粒子に経皮曝露されたとしても、皮膚における感作性物質に対する反応性は影響を受けない、すなわちアレルギーが起りやすくなるとは考えられなかった。

*In vitro* 試験系ではサイズの影響を見ることは、懸濁する溶媒によって凝集したり、粒子分布が変化したりすることから難しいと思われる。今回試験した金属ナノ粒子は水に懸濁した時 100 nm 以下のサイズのものが一定数存在するが、細胞培養液中ではわずかとなった。ナノサイズの物がないために反応性が出なかった可能性もあるが、溶解が予想され毒性も知られる