



表 1：1 nm から 100 μm 以上までの範囲の粒子径測定法

化粧品などの複合基質中におけるナノ材料の特性解析は、ほとんどの場合ナノ材料とそれを取り巻く基質とを区別するのが容易でない、又はナノ材料の特性（凝集体状態、高分子コロナ、表面荷電など）が元の状態の特性と異なるため、一般的に元の状態のナノ材料の試験と比較してずっと多くの困難な問題を含む。食品や環境基質などの複合基質中におけるナノ材料の検出や特性解析は、これまでに複数のレビューにおいて取り組みがなされ（Hasselov et al. 2008; Tiede et al. 2008; Dudkiewicz et al. 2011）、それらのレビューではこの分野でさらに研究・開発が必要であることが強調されている。

ナノ材料が化粧品の一部であるならば、それらのナノ材料は多種多様な化学品や物質と接触することになる。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。ここでいう製品解析は、ナノサイズ以外の大きさの粒子も含む複雑な化学組成中でナノ材料の純然たる検出を指す。一方、製品中のナノ材料の定量情報も必要であるならば、製品解析は一定の製品中におけるナノ材料の検出だけではなく、定量（数、質量又は容量ごとのナノ粒子濃度）も意味する。

化粧品などの複合基質中でのシステマティックな方法論及び信頼性の高い工業ナノ粒子の検出や特性解析法は、一般的に開発段階又は原型的段階であり、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又は国際基準はない。したがって、成分である製造ナノ材料についての最終製品又はさらに中間製品の特性解析が重要と考えられるならば、適切な可能性のある分析法を解析し、最終的に新たな分析法の開発を促進する必要がある。

現在、任意の環境及び複雑な環境においてナノ材料の検出及び特性解析に利用可能な分析法はない。全測定法において、測定前にサンプルの調製が必要になる。調製には被分析物の希釈や、複合製品から分析対象となるナノ材料を抽出するための1段階以上の分離ステップが含まれる。そこで、複合基質中でのナノ粒子の分析を困難にする可能性のある多数の問題が持ち上がる。

- 分離及び/又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，かい離，...）に至る場合がある。
- 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。
- 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。
- 参照試験物質や代表的な試験物質がない。
- ナノ材料についての ICCR 基準に従って必要とされる天然のナノ粒子と工業ナノ粒子との間の鑑別。これは、意図せずに生成された製造ナノ材料や天然のナノ粒子（NP）の巨大な背景内での工業 NP のモニタリングと並行して実施する。
- サンプルが全配合物を代表するものか否かを定めるのが困難。

1~100 nm の範囲の粒子径及び粒子径分布の特性解析に取り組んでいる文献が多数ある。しかしこれらの分析法のほとんどは、単純な乾燥粉末や単純な水分散液（すなわち、さ

ほど多分散系ではない) などの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。現在、バルク材料の特性解析に関する既存のガイドラインがナノ材料に適用可能か否か、またどのように適用されるのかについての研究が複数存在する。

2009年現在、OECDは化学品の物理化学的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。2009年に、これらのガイドラインが製造ナノ材料の試験にも適用可能か否かについてレビューを行った(OECD 2009年)。この解析の結果、物理化学的的特性に関する試験ガイドライン(TG)22件中4件が製造ナノ材料に適用可能と考えられるが、特に粒子径分布/繊維長及び直径分布に関するTGは、ナノ粒子及びナノチューブやナノ繊維に適用可能にするために修正が必要である。粒子径分布を含む特性をカバーするナノ材料の物理化学的的特性解析のためのサンプル調製について、予備指針1件が現在利用可能である(OECD 2010年)。

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。この指針文書は、粒度分布(粒子径の測定)などの物理化学的的特性に関する推奨を含むが、水溶性、分配係数n-オクタノール/水オクタノールも関係している(欧州化学機関2012年)。この指針はサンプル調製を、ナノ材料の特性解析に成功するための最も重要な段階の1つと認識している。サンプル調製には調製法の設計時に考慮すべき多数の変数がある。サンプル調製に関する一般的な問題には、被験材料の保管や安定性及び被験基質の化学組成が含まれる。

該当する場合(ISO, ASTM), 粒子径(ISO, ASTM, CEN)や長さの試験にはいくつかの基準があるが、ナノ材料に適用するにはこれらの基準を見直す又は修正しなければ

ならない。例えば ISO 14887 : 2000 は、一般的に物質の粒子径分析のために種々の粉末/液体複合体から分析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 の欠如は科学コミュニティーで認識されており、科学文献にも広範囲のナノ材料についての推奨される分散手順が複数発表されている。そのような SOP の設定に関する複数のプロジェクトが、既に一定のナノ材料の試験についてのいくつかの標準手順を作成している [ (Krug 2011) などを参照のこと]。ナノ粒子の特性解析に関するこれらの SOP は合成後の特定のナノ材料に適用可能であるが、これらの発行はもっと複雑なサンプルについての SOP の作成に向けた重要な一歩である。しかし、それらの手順は検討中の被験物質に適切か否か、及び別個の物質の場合には修正が必要か否かを定めるために、慎重に検討すべきである。

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ヨネーション法 (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、以下に手短かに考察する。全分析法が何らかのサンプル調製を必要とする。

#### 5.2.1.1. 電子顕微鏡 (SEM, TEM)

電子顕微鏡に基づく分析法は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 (Dudkiewicz et al., 2011)。この問題は、水や溶媒含有材料の耐性を高めた「環境的」SEM/TEM システム (Lorenz et al., 2011) の使用により、又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 (Eskandar et al., 2009) 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。画像解析ソフトの進歩が粒子径測定自動化や、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 (Tiede et al., 2009)。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。

#### 5.2.1.2. 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 (Kaszuba et al., 2007)。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 (Calzolari et al., 2011)。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 (Berne and Pecora, 2000; Gun'ko et al., 2003)。実際問題として、これにより粒子径の分解能に制限が生じ、粒子径に 3~4 倍の差がある場合にのみ、所定のサンプルにおける信頼性の高い粒子の分離が達成可能である。DLS と上流遠心分離粒子径測定 (次項も参照のこと) 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 つの分析法である粒子追跡法 (PTA : まだ ICCR-5 報告書で考察されていない) 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。

### 5.2.1.3. 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。ICCR 基準に従ったナノ材料の関連する範囲において、2~3 nm より優れた正確度で粒子径を測定できる。さらに、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 (Carney et al., 2011)。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 (CPS と比較してずっと高価な AUC では測定可能)。

### 5.2.1.4. 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 NP 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 (Kammer et al., 2011)。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 NP-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 (Laera et al., 2011)。それでも、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信頼性が高くなる可能性がある。

### 5.2.2.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 NP 分析の初めての適用例を取り上げたレビュー (Blasco and Picò, 2011) , あるいはフィールドフローフラクシヨネーション法 (Kammer et al., 2011) , 粒子追跡法 (Gallego-Urrea et al., 2011) 及び電子顕微鏡 (Dudkiewicz et al., 2011) などの特定の分析法の使用に注目した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、これに関して日焼け止めローション中の二酸化チタンの粒子径分布を評価する初めての試みが発表された (Contado and Pagnoni, 2008; Samontha et al., 2011) 。

一般的に、複合混合物中における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。段階的アプローチの第1段階は、しばしばナノ材料を残りのサンプルから分離することであり、そのために先端的な分離法が必要となる。分離段階として現在利用可能な適切な方法には、FFF (Schimpf 2005) や遠心分離法がある。FFF 及び遠心分離法は実際に分析法群として言及される。例えば、FFF では電場、半透膜を通じた横断流動場又は遠心力場が利用可能性である。遠心分離は、例えば分析超遠心 (AU) を用いて (Mächtle and Börger 2006) , 又はもっと単純に、遠心沈降法 (CPS) を採用して (Mächtle and Börger 2006) 実施可能である。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かなければならず、後者は UV-VIS 検出器、DLS、ICP-MS、ラマン検出器又は他の種類の検出器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連結例として、FFF と ICP-MS の組み合わせ (Dubascoux et al. 2010) や FFF と DLS の組み合わせ (Calzolari et al. 2011) が報告されている。

事前に分離することなく（希釈した）複合基質（環境サンプル、生体サンプル又は食品サンプルなど）中でナノ粒子を検出することを目的とした分析法も開発されている（Farkas et al. 2011; Gallego-Urrea et al. 2011）。

ナノ材料の検出及び定量を目的とする全研究において、サンプル調製に関する標準操作手順書（SOP）及び標準測定試験実施計画書が不可欠である。サンプル調製は、主要特性解析及び「単独」又は複合基質中のナノ材料の特性解析に関連する。種々の共同研究プロジェクトや OECD（OECD 2010 年）などの国際機関内での経験、さらに一般的な科学コミュニティにおける経験からも、特にナノ材料を研究する時にはサンプル調製が非常に重要であること、及びこれらの試験実施計画書作成の問題点は一般的にまだ解決されていないことが非常に明白である。実際、使用する分析法に関わりなく、ナノ粒子径の適切な測定には通常、ナノ粒子が埋め込まれた基質の単純化が必要となる。この目的を達成するために 2 種のアプローチ、すなわち埋め込まれた基質から NP を抽出する、又は複合基質を除去する（又は少なくとも単純化する）のいずれが利用できる。いずれかのサンプル調製処置を利用するならば、その処置法が元来の粒子径分布を変えないよう制御する必要がある。

抽出の例について説明すると、溶解性の物質は、溶解性に関する項（5.3 項）に従って 1 種の溶媒又は溶媒混合物を用いて抽出される。不溶性の部分は、以前の ICCR 勧告に既に記載した種々の方法を用いて分析可能である。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の完全な評価を達成するのは非常に困難と考えられることを頭においておかなければならない。この場合、上述の段階的アプローチを用いて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の観察も可能である。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。



一方、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にも可能である。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。この観察のキーポイントは、有機相の存在を除去することである。最終製品中での観察の仕上げとして、関心粒子の元素組成の特性を解析する目的で、EDS（又はEELS）を用いていくつかの粒子を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通常の観察や特性解析を行うのは不可能である。したがって、代わりとなる有用な最終製品中のナノ材料の特性解析法は、最終製品中のナノ材料の同定及び直接特性解析法が利用可能になるまで、最終製品中の特定の原料の挙動のモデル化に基づくと考えられる。原料（成分）の特性解析はかなり直接的になってきていると期待されるが、単純な分散剤（水など）中における純粋な単分散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、特性が明らかにされた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較して異なるか否かについての示唆が得られる。

化学産業や化粧品産業用のナノ材料とみなされる成分に関する知識、及び全成分表示における対応する成分の表示は、配合の最終ステップで製品中のナノ成分として何が存在するかを大幅に明確化する。関連の顕微鏡法を用いた観察により、原料に応じた関心物質の存在が確認される。

### 5.3. 溶解性

本報告書の目的から、「不溶性」の定義及び考察は、ICCR4 報告書考察中の「溶解性及び安定性」で規定したものに限定する。

... ナノ材料は水及び生体基質中において不溶性であるべきである。例えば、新規及び新たに特定された健康リスクに関する科学委員会 (SCENIHR) は 2006 年 3 月の報告書において、多数のナノ材料が少なからぬ溶解性を示し、「これらの材料の生体系との相互作用はバルク化学薬品と十分に近く、十分に確立された毒性試験手順や方法の使用が正当化される」と述べている。ここにおいて「不溶性」は非制限下で不変の粒子径や形状を維持し、水溶液中においてイオン化型や分子形態に分解しない材料を指す。

この ICCR4 報告書の抜粋から、化粧品に含まれるナノ材料を説明する主要点は、

- 水や生体基質中において不溶性
- 非制限下で不変の粒子径や形状を維持する
- 水溶液中においてイオン化型や分子形態に分解しない

本指針についてのナノ材料の不溶性に関する考察は、配合剤中に存在する状態に限定し、人体への化粧品の塗布中又は塗布後は対象としない。さらに、ナノ材料の安定性及び残留性は、生体基質中での基準生体内残留性について考察する中で取り扱う。形状や粒子径の維持は溶解性に依存することも認識されているが、これについては適切な項で考察する。

#### 5.3.1. 用語の解説

用語「不溶性」は「非混和性」と区別すべきである。非混和性は、いずれの比率でも混和しない液体の性質を指す。それとは対照的に、不溶性は液体中に溶解しない固体を指す。

ICCR 特性解析の目的から、ナノ材料は液状化粧品中で不溶性又は非混和性でなければならない。そのため、固体ナノ材料はコロイド分散として、明確な固相及び液相に存在する。これは、粗粒子の懸濁液とは区別すべきである。一方、液状ナノ粒子は、液体（脂質及び水など）内の液分散を示すナノエマルジョンと呼ぶことができる。

### 5.3.2.溶解性に影響を及ぼす因子

ナノ材料の安定性や残留性及び形状や粒子径の維持に加えて、ナノ材料の溶解性は使用する溶媒、温度、pH、基質のイオン強度及び圧力に依存する。

化粧品は水性溶媒及び非水溶媒（芳香族アルコール、アルコール、エステル、グリコール及びケトンなどの有機溶媒及び油）の両方の基質から製造するため、化粧品中におけるナノ材料の溶解性を検討する際には、水性溶媒及び非水溶媒の両方を考慮すべきである。しばしば、コアナノ材料の溶解性を変化させる目的でコーティング（シェル又はキャップとも呼ばれる）を使用する。この場合、コーティングしたナノ材料の安定性が重要となる。温度は溶解性に影響を及ぼす重要な因子である。製品内に含まれる不溶性ナノ材料のみに注目して、化粧品の使用に対応する環境範囲内の狭い温度域（すなわち約 15~30°C の範囲）のみを考慮すべきである。溶解性に影響を及ぼすもう 1 つの因子として、市販製品の酸性度があるが、これは荷電ナノ材料のみに該当する。さらに、化粧品が圧縮ガスとして配合される場合にのみ（ヘアスプレーなど）、圧が重要となる。

化粧品の特性を変化させる製品補助剤が添加される場合もある。例えば、ナノ材料の溶解性や分散性を上昇させるために乳化剤、粘度を変化させるために高分子化合物などの増粘剤を添加する場合があります。また香料や顔料や pH 安定剤はすべて、最終製品内でナノ材料がどの程度可溶化するかに寄与すると考えられる。

### 5.3.3.溶媒

#### 5.3.3.1. 水溶解度

ICCR に関する特性解析の目的から、水ベースの化粧品中のナノ材料は水性化粧品中で不溶性又は非混和性でなければならない。そのため、ナノ材料はコロイド分散として固相及び液相とともに、又はナノエマルジョンとして 2 種の液相（脂質と水など）とともに存在する。

OECD 105 指針書 (OECD 1995 年) は、化学品の溶解性の評価に使用する方法について記載している。その定義に従って、物質の水溶解性は所定の温度における物質の飽和質量濃度であり、溶液量当たりの溶質質量として表す (kg/m<sup>3</sup> 又は g/L など)。ICCR の解釈に従って、定義によりナノ材料は不溶性の物質であり、したがって溶質における飽和質量濃度を上回る。予備試験は目視による沈殿物の外見に基づき、溶解性推定値を報告している。目視による溶解性<10~2 g/L の場合に、カラム溶出法を使用する。溶解性>10~2 g/L の場合には、フラスコ法が好ましい。

### 5.3.3.2. 水以外の溶解度

#### 5.3.3.2.1. 脂肪/油溶解度

化粧品はしばしば、脂肪/油ベースで配合される。これらの製品中に存在するナノ材料は標準脂肪基質中で混和性であってはならない。OECD 116 (OECD 1981 年) は、脂肪溶解性を化学的反応を引き起こすことなく液体脂肪 (油) と均一相を形成する物質の質量分率と定義している。再度になるが、ナノ材料のような不溶性材料はこの飽和質量濃度を上回る。HB 307 (NATEC 社, ドイツ) などの標準トリグリセリド混合物を溶媒として用いる場合もある。記載した方法はトリグリセリドと反応しない純粋物質にのみ適用可能である。基本的に、適切な分析法を用いて測定して飽和に達するまで脂肪標準に材料を添加する。

#### 5.3.3.2.2. アルコール溶解性

いくつかの種類 of 化粧品の種類はブタノール、イソプロパノール及びメタノールなどのアルコールベースの溶媒から構成される。アルコール溶解性は、アルコール対水中の物質の分配係数を測定することにより評価する。通常、オクタノールのような無極性の疎水性溶媒がこれらの試験に使用される標準的アルコールである。分配係数は、2種類の主として非混和性の溶媒から構成される2相系における溶解物質の平衡濃度の比と定義される。分配係数が高いほど、オクタノール中の溶解性が高い。したがって、アルコールベースの化粧品中のアルコール不溶性ナノ材料の分配係数は低い。この方法は、水溶解性及び液体 (脂肪/油) 溶解性の特性解析にも使用される。

#### 5.3.4. ナノ材料溶解性を測定する分析法

5.3.3項に列記した所定の分析を行った後に、水相及び非水相におけるナノ材料の含有量を定量する必要がある。ICCR5に複数の方法を記載した。そのためここでは詳細には示さない。検討した材料及び相に依存して、ICCR5に記載したほとんどすべての方法が採用可能である。いくつかの例では、前処理/調製ステップを必要とし、そのため複数の分析法の組み合わせも考慮すべきである。さらに、最も望ましい評価法は、ナノ材料の存在、状態（イオン化型、結晶状態など）及び比率の確認として2種以上の方法を含む。ここでは、試験設計中に重要と考えられるいくつかの他の重要な考察を記載する。

2種の一般的な戦略が採用可能である。一方の戦略は可溶性画分を測定することができ、不溶性ナノ材料の存在が推察可能であり、もう一方では不溶性ナノ材料を直接測定することができる。前者の場合、おそらくナノ材料の組成が既知であり、ナノ材料に独自の要素（すなわち、製品中における濃度が限定的）が比較的高い割合で存在するならば、この要素をナノ材料の存在の追跡に利用できる。存在するナノ材料の量がずっと少ない場合には、状況はもっと困難になる。その場合、使用する方法は材料の検出感度が十分に高い必要がある（特定のの方法の感度についてはICCR5を参照のこと）。

市販製品中のナノ材料の溶解性測定は、いずれのナノ材料の場合でも希釈効果が交絡を引き起こす可能性がある。すなわち、例えば生理食塩緩衝液で希釈した後に、ナノ材料の溶解特性が変化する可能性がある。したがって、選択した方法は、全最終製品を配合中に使用するのと同じ濃度で試験しなければならない。唯一の例外はナノ材料原料が利用可能な状況であり、市販製品由来のナノ材料を希釈した場合に、物理化学特性が変化しないことが経験的に立証されている。

#### 5.4. 生体基質中でのナノ材料の安定性及び残留性

ICCR は、ナノ材料は生体基質中で安定で、粒子径や形状が変化しないことが立証できなければならないと決定した。潜在的曝露条件下でナノ材料の挙動を評価することにより、ナノ材料の毒性の正確な評価が促進される。作業部会（WG）は、化粧品に使用さ

れるナノ材料の生体基質中での安定性の評価に一般的に受け入れ可能な方法はないことを明らかにした。しかし、この方法論の開発における指針を提示可能と思われる複数の研究が発表された。ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 又は RPMI 培地が、安定性試験にしばしば使用される (Wiogo, et. al., 2012; Ji, et.al. 2010; Perti-Fink, et.al.2008)。ナノ材料は培養培地中に添加した場合に凝集する傾向があるが、培地中に胎仔ウシ血清又はウシ血清アルブミンを添加すると、凝集が阻害される又は低下することが示された (Wiogo, et.al. 2012; Ji, et.al.2010)。したがって、in vivo 曝露を厳密にシミュレートする条件下では、ナノ材料の安定性は高くなる。培地中でのナノ材料の初期分散は、超音波処理 (Wiogo, et.al.2012; Ji, et.al. 2010) により調製した。粒子径安定性は DLS 又は他の適切な分析法で評価可能であり、粒子径の分析に時間枠を組み入れるべきである。何故なら、製品使用中の曝露を模倣するために生体基質中の粒子溶液における粒子径を時間経過に従ってモニタリングすることにより、ナノ材料の残留性に関する情報が得られる。ナノ材料の分散状態は塗布の経過に従って変化する場合があります、最初はうまく分散していたように見えた物質が短期間で凝集塊及び/又は凝集体を形成する機会を得る可能性がある。したがって、安定性試験の期間は、ナノ材料を含有する化粧品への曝露をシミュレートするものであるべきである。生体液中でのナノ材料の残留性は、製品の皮膚への塗布中にせん断力の影響も大きく受け、そのため安定性及び残留性の測定中に考慮すべきである。塗布中に製品にかかる力を模倣するために、初期の粒子径測定前にナノ材料を含有する生体液をせん断処理することが重要である。試験実施計画書を作成する際に、粒子径の測定前に溶液をかき混ぜる又は超音波処理するなどの単純な方法を考慮すべきである。

生体基質中での溶解性に影響を及ぼす因子にナノ材料の濃度がある。ナノ材料の濃度が高いほど、粒子同士が会合する傾向が高い。ナノ材料の安定性に影響を及ぼすもう 1 つの因子に、粒子の表面荷電 (ゼータ電位) がある。一般的に、ゼータ電位が大きいほど、分散が凝集塊や凝集体の形成に対抗する度合いが高く、したがってナノ材料の安定性は高くなる。

安定性評価の前に、化粧品中でのナノ材料の溶解性及び粒子径を明らかにしておくことを推奨する。そうすれば、生体基質への添加後の変化を示すのに、同一の方法が適合できる。さらに、粒子のイオン化特性を検討することにより、ナノ材料が生体基質中でかい離する傾向が評価できる。例えば、ナノ分散の可溶化画分中の可溶性亜鉛イオンの定量測定を用いて、損なわれていない酸化亜鉛ナノ材料の割合が推測可能である。

#### 5.5.化粧品中のナノ材料の分析に使用する標準参照物質

可能な場合及び該当する場合はいつでも、標準参照ナノ材料 (SRM) を採用して、化粧品中でのナノ材料の特性解析の助けとすべきである。SRM について広範囲に引用される定義は、国際標準化機構 (ISO) が提示した「測定プロセスにおける使用目的に適することが確認された、1 種以上の特性に関して十分に均一かつ安定な物質」である (ISO Guide 30:1992/Amd 1:2008)。通常、この物質は物理的、化学的及び/又は生物学的特性が徹底的に解析されている。SRM は純粋形態で、標準溶液/懸濁液として、及び/又は規定の基質内で存在する可能性がある。SRM は認定されていない (しかし均一性及び安定性は試験済み) 場合もあり、また認定済み (不確定要素及び方法論的トレーサビリティとともにパラメータが提示されている) の場合もある。

SRM は方法の検証、機器の較正、不確実性の測定、担当者のトレーニング、品質管理や品質保証、及び国際的及び研究室間の協力を重要な役割を果たす。[欧州認定機関協力機構 (EA) 2003 年]。

ナノ材料の特性解析に関する主な困難な問題は、製品基質内での関心ナノ粒子の認証である。特に顕微鏡や分析化学が関与する研究を実施する時には、他の製品成分がナノ材料の同定に交絡を引き起こす可能性があるため、これらの例では SRM の利用が最優先である。市販製品や複合配合物の研究においては、最終製品の製造に使用するナノ材料原料を研究に使用するのが最も望ましい。これらのナノ材料原料がない場合は、複数の

機関が SRM を供給している。<sup>iii</sup>これらの例として、NIST (ナノゴールド) , OECD スポンサーシッププログラム (ナノシルバー, ナノ酸化亜鉛, CNT) , ERM (欧州標準物質 : TiO<sub>2</sub>, ZnO, SiO, CeO<sub>2</sub>, Ag, MWCNT, ナノクレイ) , LGC 標準 (銀, 酸化セリウム, MWCNT, 非晶質シリカ, TiO<sub>2</sub>, ZnO) , Nanocomposix (Au, Ag, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Co, Cu, FeO<sub>2</sub> など) がある。

## 6. 結論

作業部会は、溶解性、生体基質における安定性及び残留性、及び最終製品における 1～100 nm の範囲の粒子径測定を特性解析する方法及び戦略を検討した報告書を ICCR に提出できて光栄である。

この報告書では、それらの基準の組入れに関してさらに明確化し正当性を示す。溶解性の測定について幾分か詳細に考察し、実際に使用されると考えられる多種の化粧品基質と一致する広範囲の溶媒を用いて溶解性を測定することが重要と結論付けている。

しかし「生体基質中での安定性及び残留性」の測定や「最終製品中での粒子径の測定」についての正確な分析法や詳細な推奨は提示できなかった。科学コミュニティでは現在、使用時点でのナノ材料の特性解析 (例えば皮膚への塗布後のローション中での安定性や残留性) や任意の複合基質中での粒子径分布の検出や測定についての方法論や戦略に取り組み始めており、最初の結果が確認された。作業部会では、そのような測定法は目標であるが、現在の先端科学や技術ではそのような測定法を開発するにはまだ不十分と考えている。

---

<sup>iii</sup> Additional information may be found at:

NIST Standard Reference Materials: <http://www.nist.gov/srm/index.cfm>

European Reference Materials: [http://www.erm-crm.org/ERM\\_products/Pages/index.aspx](http://www.erm-crm.org/ERM_products/Pages/index.aspx)

LGC Standards: <http://www.internano.org/content/view/499/251/>

Nanocomposix: <http://nanocomposix.com/products/silver/reference-materials>



したがって本報告書において、本作業部会は以下に示す点を考慮するよう推奨する。

- 測定したナノ粒子の粒子径は、選択した分析法に依存し、一次粒子、凝集体又は凝集塊の粒子径を反映すると考えられる。
- 多くの分析法が少なからぬサンプル調製を必要とし、その使用によりナノ構造にわずかな影響が及ぼされる場合がある。
- 製品の性質がナノ構造に影響を及ぼす。
- 製品中で安定な成分であっても、必ずしも生体基質と接触した際に安定とは限らない。
- 生体基質中でのナノ材料の挙動が、成分の毒性評価結果を解釈する上で助けとなる場合がある。
- 現在、段階的アプローチを使用し2種以上の方法を連続使用する複合混合物中でのナノ材料の特性解析法が、単一の分析法と比較して有望と思われる。
- 複合基質中でのナノ材料の挙動を理解するために、原料を用いたモデルが短期的に利用可能と考えられる。最終製品中でナノ材料を直接特性解析できるだけ十分に技術が進歩するまで、そのようなモデルが有用の可能性はある。
- 専門家は、科学的には正確であるが、化粧品使用に関連する条件から全く外れた報告書を作成しないよう十分に注意を払うべきである。

結論として、規制目的（すなわちラベル表示や通知など）でのナノ材料の評価や科学的  
安全性評価は、正確で化粧品の使用に関連するものであるよう努力すべきである。

## 7 参考文献

- Berne, B.J. and Pecora, R., 2000. Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics. Dover Publications, Mineola, N.Y., vii, 376 p. pp
- Blasco, C. and Picò, Y., 2011. Determining nanomaterials in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **30**(1): 84-99.
- Calzolari, L., Gilliland, D., Garcia, C.P. and Rossi, F., 2011. Separation and characterization of gold nanoparticle mixtures by flow-field-flow fractionation. *J Chromatogr A*, **1218**(27): 4234-9.
- Carney, R.P. et al., 2011. Determination of nanoparticle size distribution together with density or molecular weight by 2D analytical ultracentrifugation. *Nat Commun*, **2**: 335.
- Contado, C. and Pagnoni, A., 2008. TiO<sub>2</sub> in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical chemistry*, **80**(19): 7594-7608.
- Dubascoux, S., I. Le Hécho, et al. (2010). "Field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometer coupling: History, development and applications." *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **25**(5): 613.
- Dudkiewicz, A., K. Tiede, et al. (2011). "Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **30**(1): 28-43.
- European Chemicals Agency, (2008) Guidance for the implementation of REACH: Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7a: Endpoint specific guidance
- ECHA (2012) Guidance for the implementation of REACH: Guidance on information requirements and chemical safety assessment Appendix R7-1 Recommendations for nanomaterials applicable to Chapter R7a Endpoint specific guidance
- Eskandar, N. G., Simovic, S. and Prestidge, C. A., 2009. Chemical stability and phase distribution of all-trans-retinol in nanoparticle-coated emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* **376**: 186–194.
- European Commission (2009) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, OJ L 342, of 22.12.2009, p. 59, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:EN:PDF>
- European Co-operation for Accreditation, "The Selection and Use of Standard Reference Materials", Publication Reference EA04/14. June 13, 2003. <http://www.european-accreditation.org/n1/doc/ea-4-14.pdf>
- Farkas, J., H. Peter, et al. (2011). "Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine." *Environment International* **37**(6): 1057-1062.
- FDA (2004) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine (CVM) August 2004; Draft Guidance for Industry Waivers of In Vivo Demonstration of Bioequivalence of Animal Drugs in Soluble Powder Oral Dosage Form Products and Type A Medicated Articles.
- FDA (2011) Draft Guidance for Industry, "Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology", [http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm#\\_ftn1](http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm#_ftn1)

- Gallego-Urrea, J.A., Tuoriniemi, J. and Hassellqvist, M., 2011. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **30**(3): 473-483.
- Gun'ko, V.M., Klyueva, A.V., Levchuk, Y.N. and Leboda, R., 2003. Photon correlation spectroscopy investigations of proteins. *Adv Colloid Interface Sci*, **105**: 201-328.
- Hasselqvist, M., J. W. Readman, et al. (2008). "Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles." *Ecotoxicology* **17**(5): 344-361.
- Health Canada Guidance for Industry – Preparation of Veterinary Abbreviated New Drug Submissions – Generic Drugs' (Effective 2010/04/01)
- ICCR (2010) "Report of the ICCR Joint Ad Hoc Working Group on Nanotechnology in Cosmetic Products: Criteria and Methods of Detection – ICCR-4." Presented to ICCR at the 4th meeting of ICCR (ICCR-4) held July 14, 2010 in Toronto Canada.
- ICCR (2011) "Report of the Joint Regulator - Industry Ad Hoc Working Group: Currently Available Methods for Characterization of Nanomaterials". Presented to ICCR at the 5<sup>th</sup> meeting of ICCR (ICCR-5) held June 29, 2011 in Paris, France.
- ISO 229 WPMN Guidance Document – "Nanotechnologies — Guidance on physicochemical characterization manufactured nano-objects submitted for toxicological testing"
- ISPRA (2009) "Outcome of the International Workshop on Regulatory Issues regarding the Use of Nanotechnologies in Cosmetics", European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra (Italy), 8-9 July 2009. <http://www.fda.gov/InternationalPrograms/HarmonizationInitiatives/ucm193423.htm>
- Jensen, K. A., Y. Kembouche, et al. (2011). Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media. Copenhagen, The Nanogenotox Project Consortium.
- Ji, Z, Jin, X, George, S, Xia, T, Meng, H, Wang, X, Suarez, E, Zhang, H, Hoek, EM, Godwin, H, Nel, AE, Zink, JI, 2010. Dispersion and stability optimization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture media, *Environ Sci Technol*, **44**: 7309-14.
- Kammer, F.v.d., Legros, S., Hofmann, T., Larsen, E.H. and Loeschner, K., 2011. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **30**(3): 425-436.
- Kaszuba, M., Connah, M.T., McNeil-Watson, F.K. and Nobbmann, U., 2007. Resolving Concentrated Particle Size Mixtures Using Dynamic Light Scattering. *Particle & Particle Systems Characterization*, **24**(3): 159-162.
- Krug, H. (ed.), 2011. NANOMMUNE Quality Handbook: Standard Procedures for Nanoparticle Testing. [http://www.nanosafetycluster.eu/uploads/QUALITY\\_HANDBOOK/NANOMMUNE\\_QHB\\_FINAL\\_2011.pdf](http://www.nanosafetycluster.eu/uploads/QUALITY_HANDBOOK/NANOMMUNE_QHB_FINAL_2011.pdf)
- Laera, S. et al., 2011. Measuring protein structure and stability of protein-nanoparticle systems with synchrotron radiation circular dichroism. *Nano Lett*, **11**(10): 4480-4.
- Leo A, Hansch C, and Elkins D (1971). "Partition coefficients and their uses". *Chem Rev* **71** (6): 525–616.

- Lorenz, C. et al., 2011. Imaging and characterization of engineered nanoparticles in sunscreens by electron microscopy, under wet and dry conditions. *Int J Occup Environ Health*, **16**(4): 406-28.
- Mächtle, W. and L. Börger (2006). *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*. Berlin & Heidelberg, Springer Verlag.
- OECD (1995) Guideline for the Testing of Chemicals. OECD 105, Water Solubility.
- OECD (1981) Guideline for the Testing of Chemicals. OECD 116, "Fat Solubility of Solid and Liquid Substances"
- OECD (1989) Guideline for the Testing of Chemicals. OECD 117, "Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method"
- OECD (2009) Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. ENV/JM/MONO(2009)21. Paris 2009
- OECD (2010). Preliminary guidance notes on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. OECD (2009) Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. ENV/JM/MONO(2009)21. Paris 2009
- Petri-Fink, A, Steitz, B, Finka, A, Salaklang, J, Hofmann, H., (2008) Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies, *Eur J Pharm Biopharm*, **68**, 129-37.
- Reed et al (2012) *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**(1):93-99.
- Samontha, A., Shiowatana, J. and Siripinyanond, A., 2011. Particle size characterization of titanium dioxide in sunscreen products using sedimentation field-flow fractionation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399** (2): 973-978.
- SCCP (2007) Scientific Committee on Consumer Products; "Opinion on Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products", Adopted by the SCCP after the public consultation on the 14th plenary of 18 December 2007
- SCENIHR (2007) Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials, adopted this opinion at the 19th plenary on 21-22 June 2007.
- Schimpf, M. E. (2005). *Field-Flow Fractionation*. Analytical Instrumentation Handbook. J. Cazes. New York, Marcel Dekker.
- Tiede, K., A. B. A. Boxall, et al. (2008). "Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **25**(7): 795-821.
- Tiede, K., Tear, S.P., David, H. and Boxall, A.B., (2009). Imaging of engineered nanoparticles and their aggregates under fully liquid conditions in environmental matrices. *Water Res*, **43**(13): 3335-43.
- Wiogo, HT, Lim, M, Bulmus, V, Guitierrez, L, Woodward, RC, Amal, R, (2012). Insight into serum protein interactions with functionalized magnetic nanoparticles in biological media, *Langmuir*, **28**, 4346-56.