

201235024B

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 23～24 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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. 分担総合研究報告

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 23
杉林 堅次

I. 総合研究報告

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)
平成 23 年度～24 年度 総合研究報告書

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

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る。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ることから、それらの品質及び安全性確保のためには、経皮曝露による健康影響を評価することが必要である。ナノ物質の安全性評価試験の検証のためにも、試験液中のナノ物質の存在状態を把握することが重要である。それぞれのナノ物質によって異なるが、高塩濃度及びタンパク質溶液と混和した場合には凝集し、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。特に、*in vitro* 試験では培地中での粒度分布を測定することが、サイズの効果を比較する上で重要である。化粧品規制協力国際会議ワーキンググループは、複雑な化粧品中のナノ物質のサイズの測定法について、現状適切な方法はないと報告している。

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。検討の結果、化粧品に使われている各種金属酸化物のナノ粒子では、化学物質の感作誘導反応の増強作用は認めなかった。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。

ナノ粒子そのものの皮内浸透性を評価するには、皮膚に塗布したナノ粒子の皮膚表面分布だけでなく、それらの皮内分布や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した。皮内（角層内）動態を解析する方法として、テープストリッピング法が知られているが、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、毛包内の物質動態を明らかにする必要がある。このため、角層もしくは毛嚢移行性および毛嚢内動態について調べた。ナノ物質の場合、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 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

ナノテクノロジーを利用した様々なナノ物質が製造され、医薬品、食品、化粧品、化成品など、様々な分野に応用されている。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とされ、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。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。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。

化粧品や医薬部外品は多種多様な成分からなり、製品中ではナノ物質はその影響で凝集し、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。口紅のように非意図的に経口摂取する化粧品もあり、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可能性がある。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、種々の溶媒に混和したときの粒度分布についても検討し、実際に製品等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、ナノ物質自体の皮膚に及ぼす作用だけでなく、他成分の生体影響に対する共存効果も検討する必要がある。化学物質の皮膚感作性を動物実験代替法の *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。本研究ではこれを利用して、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した。

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。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った。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、集積したナノ物質の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。本研究では、ナノ粒子の皮内浸透ルートについて調べ、ナノ粒子の皮内動態解析方法の確立を行った。

B. 研究方法

B-1. ナノ物質の分析及び暴露影響評価

各種ナノ物質及びその懸濁液は、ナノ物質の濃度として 0.01~1%になるように、水、生理食塩水、リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2)、人工腸液 (2 液, pH 6.8)、人工胃液 (1 液, pH 1.2)、1% 牛血清アルブミン (BSA) 溶液、1% BSA-PBS、FBS 及び培地 (FBS-RPMI) で希釈し超音波処理した後、動的光分散法で粒度分布を測定した。

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) または NiSO₄ 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。上記培養上清を回収し、ELISA キット等で IL-8 をはじめとするケモカインを定量した。

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た。化粧品中のナノ物質の粒子径測定に関する部分を調査した。

B-2. 微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

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塗布し、その後、走査型電子顕微鏡により皮膚表面を観察した。また、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の皮膚分布を確認した。

共焦点生体レーザー顕微鏡を用いて、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を適用した後、皮膚組織切片を作製し、顕微鏡観察を行った。

ブタ耳から、目視で皮膚表面に出ている毛幹を摘み、抜き取った。毛嚢プラグング処理または未処理皮膚について皮膚透過実験を行った。角層側を上にして縦型拡散セルにセットし FD-4 を適用し、経時的に 12 時間の透過量を測定した。

FD-4 の皮内動態を予想した寒天ゲル膜を用いて FD-4 のゲル内透過性を観察した。CLSM により得られた画像について蛍光強度を測定した。

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

シリカは人工胃液、人工腸液をはじめほとんどの媒体中でよく分散してナノサイズとなっているが、FBS 等タンパク質を含有する溶媒に希釈したとき凝集が起こった。酸化チタン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。表面処理しない場合より凝集しやすい傾向が認められた。酸化鉄は人工胃液では分布は変わらないものの、生理食塩水等に混和すると著しく凝集した。白金粒子の水懸濁液で、100 nm 以下のナノサイズの粒子の割合は 30%程度であった。白金粒子を人工胃液や人工腸液に懸濁すると著しく凝集した。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。Al-T は人工腸液、培地、血清に混和すると凝集した。

C-1-2. 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。NiO では IL-8 の産生量がコントロールの 3 倍以上となった。金属塩 AlCl₃、FeCl₃ 及び FeCl₂ で前処理しても IL-8 量は変化しなかった。

C-1-3. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

h-CLAT 法において陽性感作性物質の NiSO₄ は CD86 に比べて CD54 の発現量を著しく増加させた。NiO 粒子も NiSO₄ ほどではないが、CD54 の発現率を増加させた。THP-1 細胞を各金属酸化物で 24 時間前処理後、NiSO₄ または DNCB を加えて更に 24 時間培養し、CD54 及び CD86 発現量を調べた。SiO₂ 50 nm 100 µg/ml で前処理した細胞の DNCB に対する CD54 発現量は、前処理しないときの 4.5 倍となった。酸化チタン及び酸化鉄については CD86 及び CD54 の発現量を増加させることはなかった。これらで前処理した細胞の NiSO₄ の反応も前処理しなかった場合と差はなかった。

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-1-4. 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ライゼーション II 作業部会は、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として利用可能な国内または国際基準はない。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。複合混合物中のナノ物質のサイズ測定においては、サンプル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起因する多数の問題があるとした。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、方法として FFF や遠心分離法がある。いずれも検出/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。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必要もある。溶解性の物質は溶媒を用いて抽出し、不溶性部分を分析

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評価するのは非常に困難である。その場合、EDS (または EELS) を併用した電子顕微鏡を用いて化学組成を評価する。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 格子以上に広げることにも可能である。更に、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。

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

サンスクリーン剤適用後の皮膚表面の SEM の元素マッピングによって、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あることがわかった。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。

C-2-2. 毛嚢プラグニング剤処理後の蛍光マーカーの皮内分布観察

毛嚢プラグニング処理した皮膚に一定時間 FD-4 を適用し、組織の切片を CLSM にて観察した。毛嚢プラグニ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、毛嚢プラグニング処理をした皮膚の毛嚢開口部では緑色蛍光は確認できなかった。

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。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。

カルセイン適用 1 時間後は、カルセイン水溶液が毛嚢漏斗部に分布していることが確認された。カルセインは毛嚢バルジ部にも到達した。カルセイン適用 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。皮膚毛嚢開口部にのみカルセイン水溶液を適用し、2 時間後の皮膚組織水平切片では、皮膚表面から深さが 100 μm 付近ではカルセインが広く毛嚢を中心に拡散し、深さ 120~170 μm では、毛嚢外にもカルセインの分布が確認された。

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。シリカは各種媒体中でもほとんど粒子径及び粒度分布は変化せず、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、タンパク質含有溶液中では粒子径が大きくなり分布も広がった。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た。シリカを経口摂取したことを想定し、人工胃液や人工腸液中の粒度分布を測定したが、サイズは変化しなかった。しかしながら、生体内にはタンパク質が存在し、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、消化過程

で凝集が引き起こされると思われる。また、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。更に、*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た。TiO₂-SAS と TiO₂-B の比較により、酸化チタンの表面処理が安定した粒度分布に寄与することがわかった。経口摂取される際にも消化液や他の食品のタンパク質との混和により凝集し、ナノサイズで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。酸化鉄も同様に各種溶媒で希釈すると著しい凝集が起こった。人工胃液では、液の酸性により溶解が起こった可能性がある。

白金ナノコロイドは、メーカーによると粒子径は 2 nm のコロイド状態であるとされる。今回の市販白金粒子とは必ずしも特性が一致しないが、メーカーが謳うようなサイズでは存在しないかごくわずかと思われた。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。殺菌・抗菌・防臭剤として銀を利用した多くの製品があるが、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。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た。アルミナは研磨剤としてシリカやタルクと組み合わせる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。アルミナ粒子は表面コーティングが分散性に強く影響していると思われた。

THP-1 細胞に感作性物質を暴露したとき、検出されるケモカインは IL-8 及び RANTES であ

る。NiO ナノ粒子は IL-8 産生量を増加した。不溶ナノ粒子であっても感作を誘導する可能性があることがわかった。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 h-CLAT 法を用いて検討した。高濃度のシリカでは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。しかし h-CLAT には定量性がないこと、CD86 に影響しないことから、シリカの反応が増強作用とは明確に言う事はできなかった。酸化チタン、酸化鉄、白金、銀及びアルミナ粒子で前処理した細胞では細胞抗原の発現率の増加は認めなかった。以上のことから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い。

ナノ物質を含有する化粧品の安全性評価には、製剤内でナノサイズであることの確認が重要である。ICCR ワーキンググループは最新の文献調査から、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、定量的な判断はできないとしている。サンスクリーン剤を例にしても、ナノ物質として酸化チタンや酸化亜鉛等複数種類が含まれ、特定が困難である。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て、機器によっては抽出や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。

ヘアレスラットの角層を取り除いた皮膚あるいは深く傷つけても Fluoresbrite® は皮膚を透過しなかった。一方で、注射針で皮膚を貫通させると、径が大きくなるのに従い、外径円の面積にほぼ比例して Fluoresbrite® の皮膚透過性が増大した。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

囊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。

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、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。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。

毛嚢プラグング処理した皮膚では経毛嚢ルートを介する、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。毛嚢プラグ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。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と考えられた。毛嚢プラグング法により、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、ナノ物質の皮膚浸透性が評価可能となるかもしれない。

カルセインの皮膚適用後、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た。この結果は、外毛根鞘のバリア能が低いと考えられ、これに関係して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。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る。

本研究におけるこれまでの単純溶媒中での粒度分布の検討結果を見ると、化粧品製剤中でもナノ物質は凝集しほとんどナノサイズで存在していないと考えられる。また、ナノ物質の皮膚浸透、透過が困難であること、細胞機能への影響はほとんどなかったことから、ナノ物質を含む化粧品が、サイズに関連するような懸念を生じないと考えた。

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。

皮膚における細胞の抗原提示反応は酸化チタン、酸化鉄、白金、銀ナノ粒子の存在による増強はなかった。よって、化粧品に使われるナノ物質が皮膚免疫機能を増強してアレルギーを起こしやすくするような作用はないと考えられる。

ナノ粒子は毛嚢開口部に集積しやすく、皮内浸透ルートとして、毛嚢内物質動態を明らかにする必要があった。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。

ナノ物質を含有する化粧品の評価には、製剤内でナノサイズであることの確認が重要である。最新の文献を取りまとめた結果においても、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る。今後も技術情報を収集することが重要である。

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) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)

H. 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. 分担総合研究報告

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)
平成 23 年度～24 年度 分担総合研究報告書

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。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とも明確ではない。これを明確にするためには、試験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。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) のように高塩濃度であるもの、培地や血清等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がわかった。化粧品規制協力国際会議ワーキンググループが化粧品のような複雑なマトリックス中のナノ物質の特性解析法を取りまとめているが、現状、最終製品中のナノ物質のサイズの測定法については適切な方法はないとされた。しかし、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は重要である。

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。陽性対照となる酸化ニッケルでは CD54 発現率が増加した。しかし、化粧品に使われている各種金属酸化物のナノ粒子では、化学物質の感作誘導反応の増強作用は認めなかった。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。

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多種多様な成分からなり、製品中ではナノ物質はその影響で凝集し、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。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。口紅のように非意図的に経口摂取する化粧品もあり、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可能性がある。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、種々の溶媒に混和したときの粒度分布についても検討し、実際に製品等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、調査が必要である。

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、ナノ物質自体の皮膚に及ぼす作用だけでなく、他成分の生体影響に対する共存効果と言ったものについても検討する必要があるが、そうした研究はほとんど見当たらない。化粧品の安全性評価に動物を用いる実験は禁止方向にある。化学物質の皮膚感作性を動物実験代替法の *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。本研究ではこれを利用して、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した。

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 50 nm の粒子がエチレングリコール (EG) に懸濁したもの (SiO_2 50 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。酸化ニッケル (NiO 、一次粒子径 < 50 nm) は市販試薬を用いた。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。2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及び $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 及び 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。培養液として、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 0.01~1% 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 (2 液、pH 6.8)、人工胃液 (1 液、pH 1.2)、1% 牛血清アルブミン (BSA) 溶液、

1% BSA-PBS、FBS 及び培地 (FBS-RPMI, Medium) 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

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

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。また市販 ELISA キットで IL-8 を定量した。

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入手した。化粧品中のナノ物質の粒子径測定に関する部分を調査した。

C. 研究結果

1. 粒度分布

シリカ (SiO_2) の EG 懸濁液を水及び生理食塩水で希釈した時、それぞれ平均粒子径は 75 ~ 77 nm であった。シリカは人工胃液、人工腸液をはじめほとんどの媒体中で同様の粒子径を示し、FBS 等タンパク質を含有する溶媒に希釈したとき凝集が起こった (表 1)。一方 $\text{SiO}_2\text{-W}$ は、培地や FBS に混和すると著しく凝集した。

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。 $\text{TiO}_2\text{-B}$ はより凝集しやすい傾向が認められた (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)。

白金粒子の水懸濁液の平均粒子径は 138 nm で、100 nm 以下のナノサイズの粒子の割合は 30% 程度であった (図 1(a))。白金粒子を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))。比較として、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結果、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。上清に浮遊する粒子の平均粒子径は 270 nm とされたが、他の溶媒では更に凝集した (表 3)。

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 (図 2)。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. 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。NiO は IL-8 の産生量をコントロールの 3 倍以上増加した (図 3)。

各金属塩 AlCl₃、FeCl₃ 及び FeCl₂ での前処理をせずに DNCB を適用したときの IL-8 産生量と、前処理したときの量とはほとんど差がないか、むしろ低下した。

3. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

h-CLAT 法において陽性感作性物質の硫酸ニッケル (NiSO₄) は CD86 に比べて CD54 の発現量を著しく増加させた。酸化ニッケル (NiO) 粒子も NiSO₄ ほどではないが、CD54 の発現率を増加させた (図 4)。

THP-1 細胞を各金属酸化物で 24 時間前処理後、NiSO₄ または DNCB を加えて更に 24 時間培養し、CD54 及び CD86 発現量を調べた。SiO₂ 50 nm は CD54 発現量を 100 µg/ml で増加させ、これで前処理した細胞は DNCB に対する CD54 発現量を、前処理しないときに比べ 4.5 倍となった (表 4)。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 5)。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。

白金および銀粒子で処理した細胞の表面抗原発現率はむしろ低下した (図 5)。アルミナ (Al₂O₃) 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。

4. 化粧品中のナノ物質の粒子径測定に関する文献調査

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、段階的アプローチが有望である。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、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。

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必要もある。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、不溶性部分を分析する。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評価するのは非常に困難である。その場合、EDS (又は EELS) を併用した電子顕微鏡を用いて化学組成を評価する。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 格子上に広げることも可能である。

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。

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り、今後の研究開発が求められる。

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。試薬シリカ懸濁液は、各種媒体中でも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、胃や腸の消化液で処理された事を想定し粒度分布を測定したが、サイズは変化しなかった。しかしながら、消化段階では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れ、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 と TiO₂-B の比較により、表面処理が安定した粒度分布に寄与することがわかった。酸化チタンは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。その際にも消

化液や他の食品のタンパク質との混和により凝集し、ナノサイズで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。酸化鉄も同様に各種溶媒で希釈すると著しい凝集が起こった。人工胃液では、液の酸性により溶解が起こった可能性がある。

白金ナノコロイドは、メーカーによると粒子径は 2 nm のコロイド状態であるとされる。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。白金懸濁液では、メーカーが謳うようなサイズでは存在しないかごくわずかと思われた。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。

殺菌・抗菌・防臭剤として銀を利用した多くの製品があるが、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。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た。アルミナは研磨剤としてシリカやタルクと組み合わせる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。アルミナ粒子は表面コーティングが分散性に強く影響していると思われた。

THP-1 細胞に感作性物質を暴露したとき、検出されるケモカインは IL-8 及び RANTES である。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。NiO による IL-8 量は 2000 pg/mL 以上で、コントロールの 3 倍程度になった。ナノ粒子であっても感作を誘導する可能性があることがわかった。

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 h-CLAT 法を用いて検討した。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。DNCB による反応についても SiO₂ 前処理で CD54 を増加するが毒性も強くなっており、産生された IL-8 が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。h-CLAT には定量性がないこと、CD86 に影響しないことから、シリカの反応が増強作用とは明確に言う事はできなかった。

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。白金、銀及びアルミナ粒子で前処理した細胞でも同様であった。以上のことから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かった。

ナノ物質を含有する化粧品の安全性評価には、製剤内でナノサイズであることの確認が重要である。ICCR ワーキンググループは最新の文献調査から、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、ナノ物質としても酸化チタンや酸化亜鉛といった金属酸化物が複数種類含まれ、特定が困難である。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て、機器によっては抽出や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。本研究におけるこれまでの単純溶媒中での粒度分布の検討結果を見ると、化粧品製剤中でもナノ物質は凝集しほとんどナノサイズで存在していないと考えられる。また、これら使われている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、ナノ物質を含む化粧品が今回調べた皮膚感作性の増強に関して、サイズに関連するような懸念を生じないと考えた。

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。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。

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酸化チタン、酸化鉄、白金、銀ナノ粒子の存在による増強はなかった。よって、化粧品に使われるナノ物質が皮膚免疫機能を増強してアレルギーを起こしやすくするような作用はないと考えられる。

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。最新の文献を取りまとめた結果においても、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る。今後も技術情報を収集することが重要である。

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) 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)

H. 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

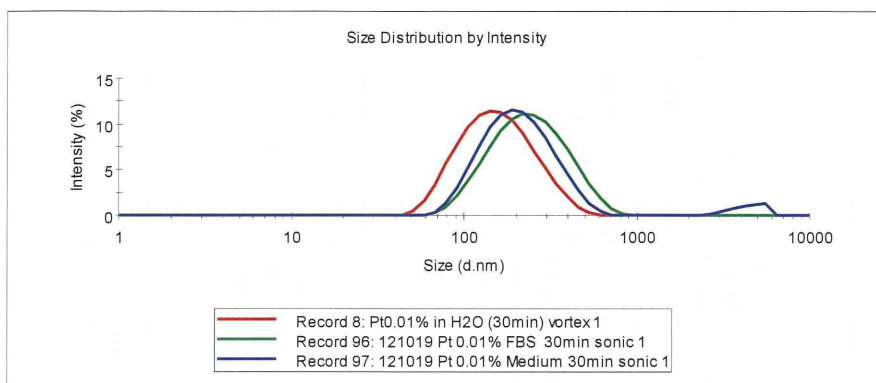
表2. 各種溶媒に懸濁した酸化チタン(TiO₂)及び酸化鉄(Fe₂O₃)の平均粒子径

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

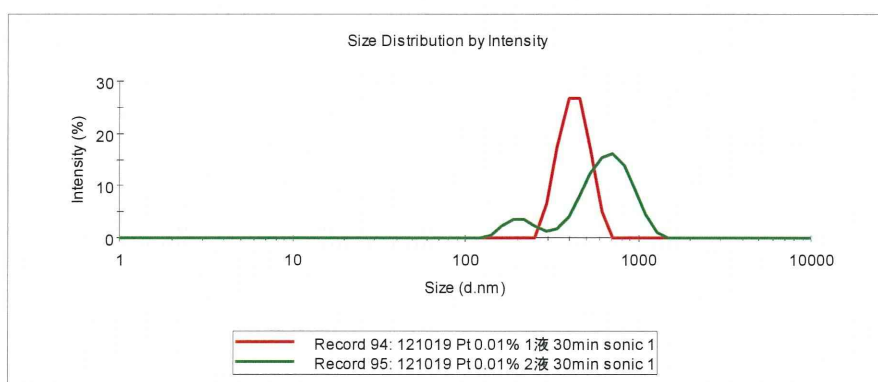
表3. 銀粒子を各種溶媒に懸濁した時に観察される平均粒子径

溶媒	平均粒子径(nm)	PdI
水	258	0.290
人工胃液(pH 2.1) 1液	461	0.456
人工腸液(pH 6.8) 2液	601	0.576
牛胎児血清(FBS)	221	0.450
培養液(10%FBS-RPMI1640)	205	0.331

(a) 水（赤）、血清（緑）および培養液（青）



(b) 人工胃液（1液，赤）及び人工腸液（2液，緑）



(c) 市販ボトル水

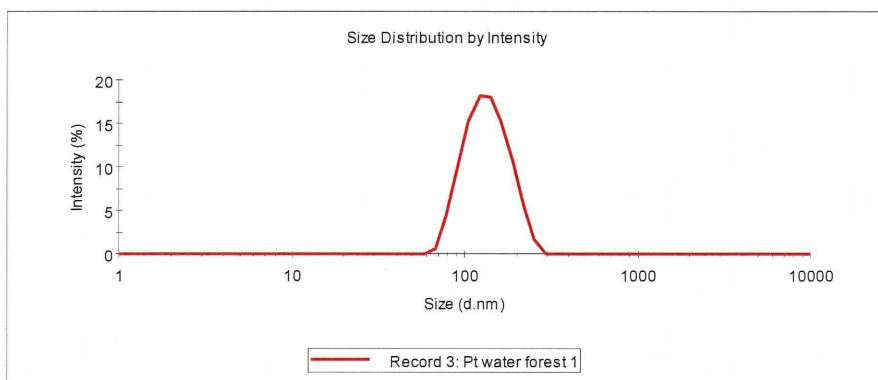


図 1. 各種溶媒に懸濁した白金粒子、及びプラチナナノコロイド配合市販ボトル水の粒度分布