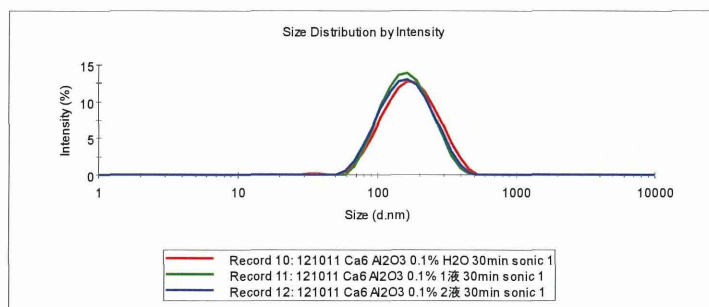
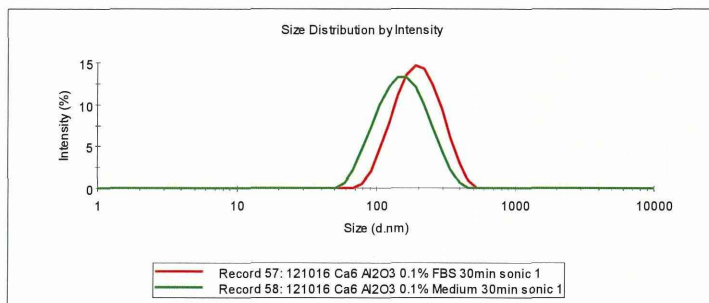


(a) アルミナ A-A

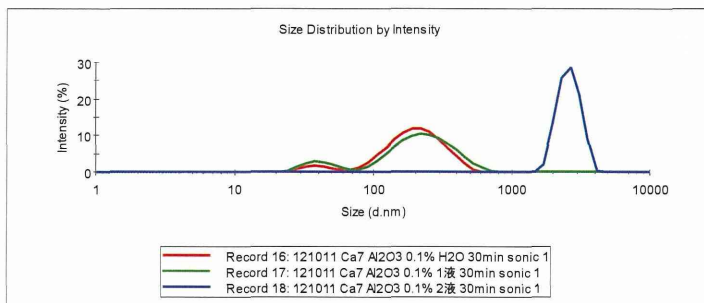


赤線＝水，緑＝人工胃液（1液），青＝人工腸液（2液）

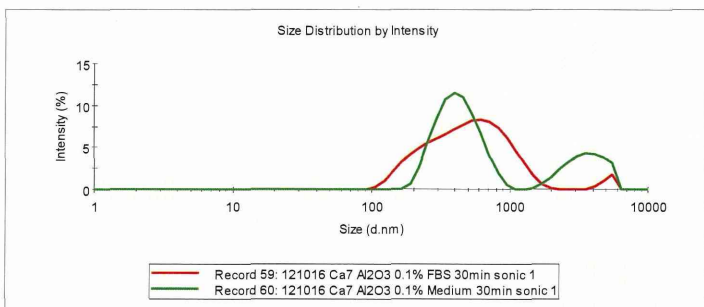


赤＝牛胎児血清，緑＝培養液

(b) アルミナ A-T



赤線＝水，緑＝人工胃液（1液），青＝人工腸液（2液）



赤＝牛胎児血清，緑＝培養液

図2. 各種溶媒に懸濁したアルミナ粒子の粒度分布

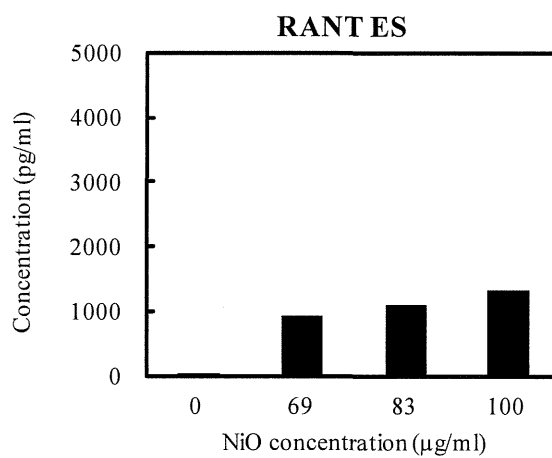
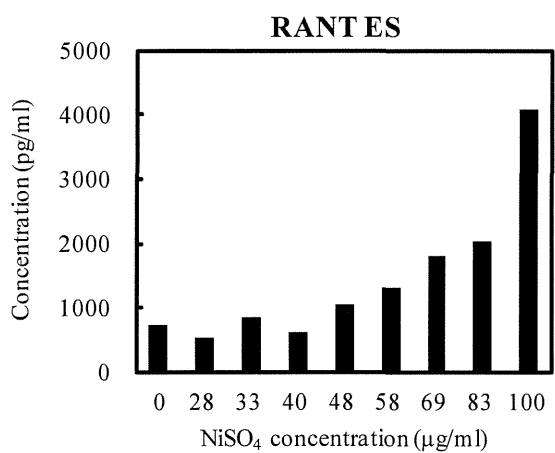
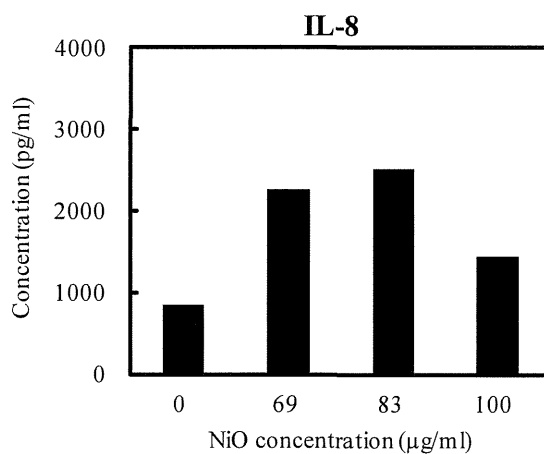
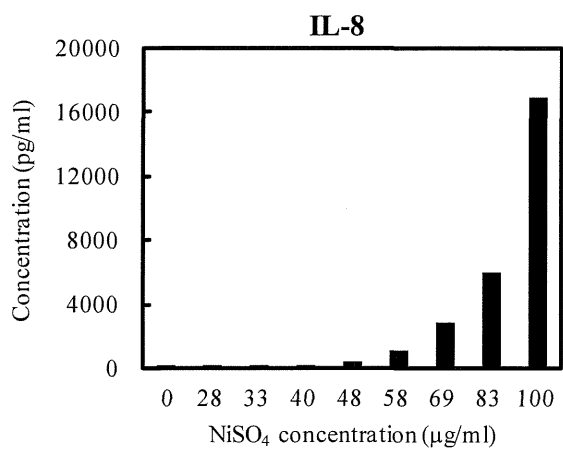


図3. 硫酸ニッケル (NiSO₄) 及び酸化ニッケル (NiO) による THP-1 細胞からのサイトカイン産生

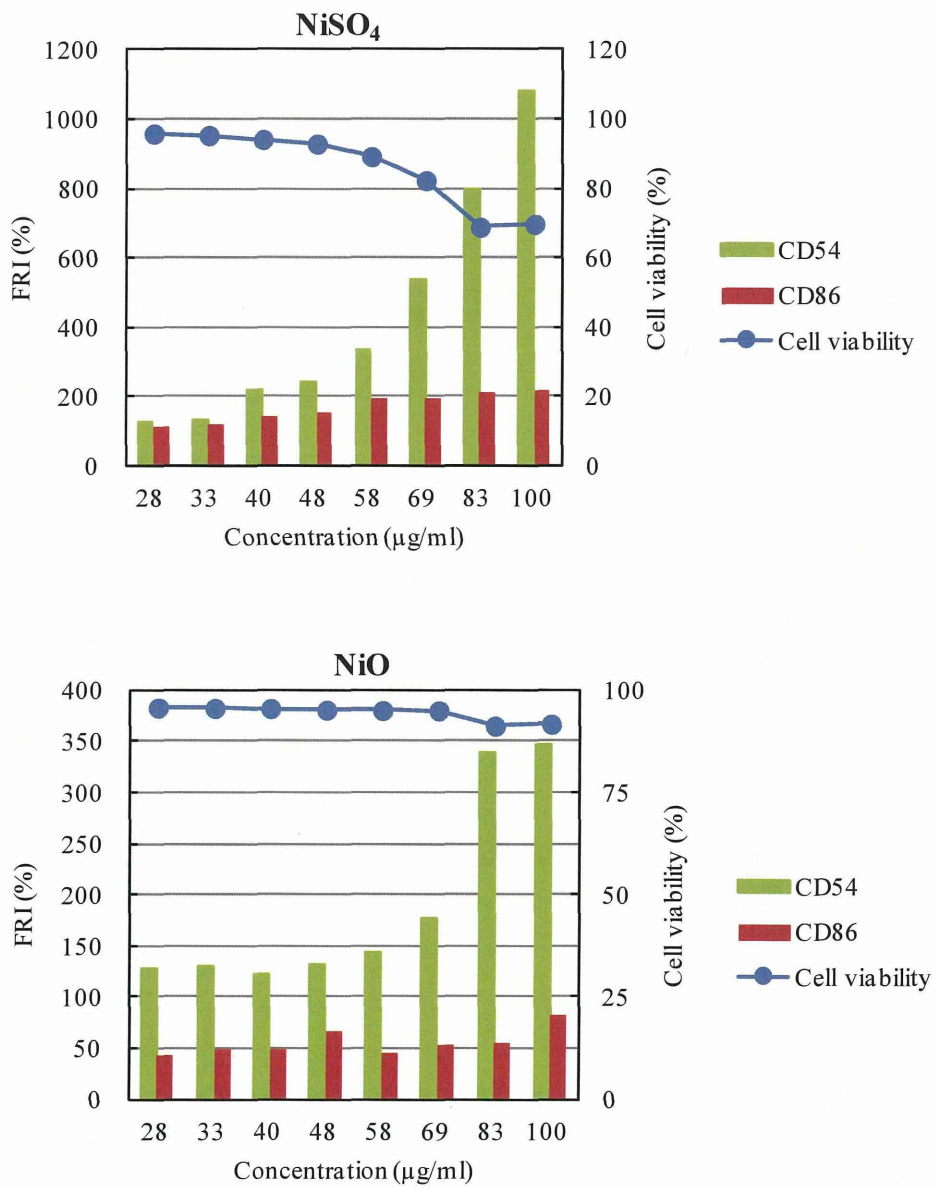


図 4. 硫酸ニッケル (NiSO₄) 及び酸化ニッケル (NiO) の h-CLAT 法による結果

表 4. 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

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

表 5. 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

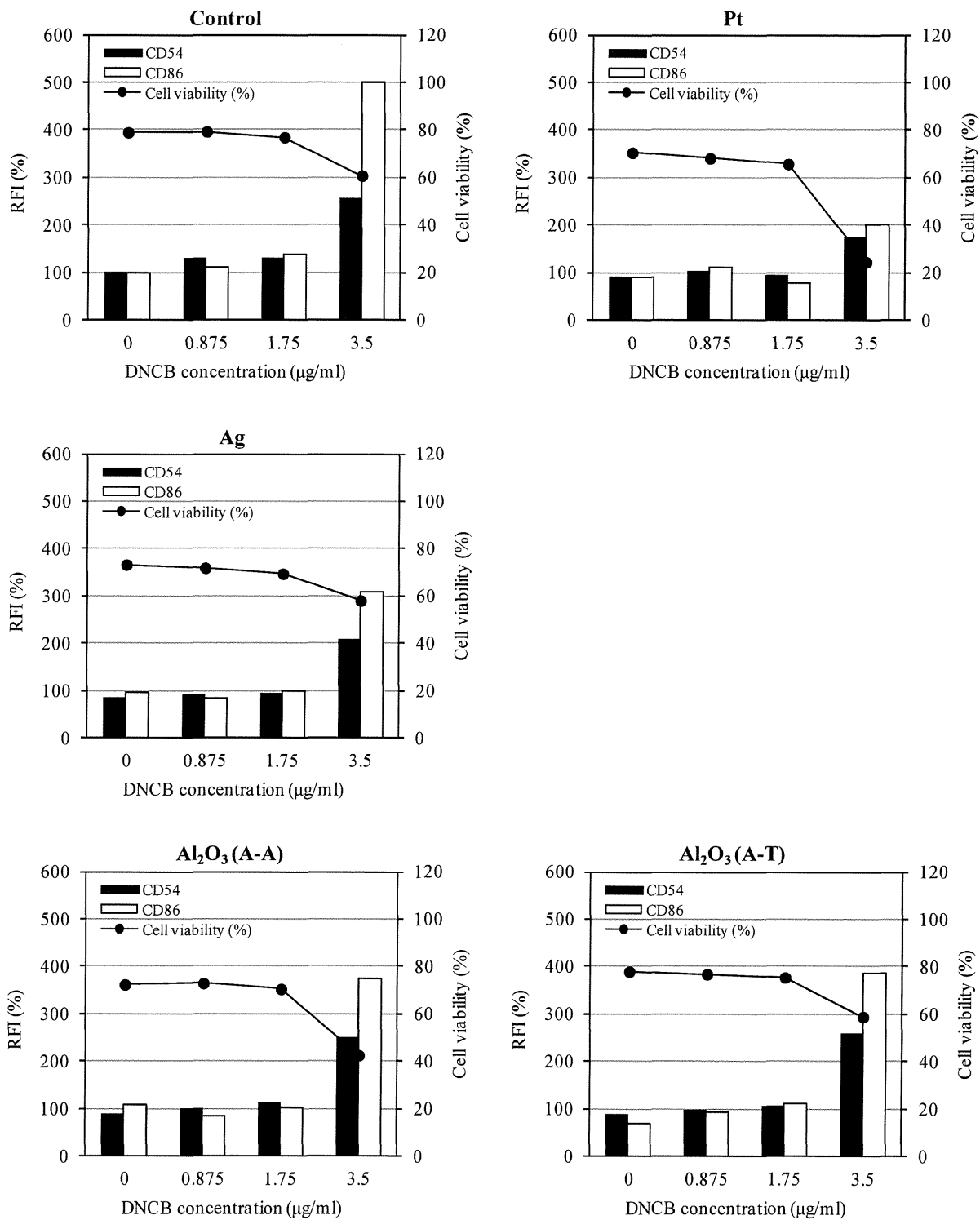


図5. THP-1 細胞の DNCB 適用時の表面抗原発現に及ぼす金属ナノ粒子曝露の影響

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 (H23-24)

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。

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画像解析結果より知られている。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。安全な化粧品の品質を確保するには、物理化学的に安定な製剤を調製するだけでなく、ナノ粒子そのものの皮内浸透性を評価する必要がある。そのためには、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。前述した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について調べ、ナノ粒子の皮内移行について考えた。

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。

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全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る。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。

そこで、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. 実験方法

B-1 理論：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。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える必要がある。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。

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であり、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。

B-2 物質の透過係数の算出法

物質は、皮膚（角層）中に生じる物質の濃度勾配に従って拡散・透過する。単位面積あたりの物質の皮膚透過速度 (dQ/dt) は、Fick の拡散式から定常状態時に導かれる (1)、(2) 式により表現される。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{C_d KD}{L} \quad \dots \dots (1)$$

$$P = \frac{KD}{L} \quad \dots \dots (2)$$

ここで、 C_d は適用物質濃度、 K は物質の皮膚/基剤分配係数、 D は物質の皮膚中拡散係数、 L は皮膚の厚み、 P は物質の透過係数である。一方、適用した物質の皮膚透過が一定時間経過後でも認められない場合は、適用物質濃度、レシーバー容量、有効透過面積、適用時間および各物質の定量限界濃度を用いて算出した。

$$P = \frac{C_{\min} V}{ATC_0} \quad \dots \dots (3)$$

ここで、 P は透過係数、 C_{\min} は定量限界濃度、 V はレシーバー容量、 A は有効透過面積、 T は適用時間、 C_0 は適用濃度を示す。

B-3 試薬

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran, average molecular weight, 3.38 kDa ; FD-4) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U. S. A.) より購入した。蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite® yellow green microspheres) (一次粒子径 ; 50 nm) は Polysciences Inc. (Warrington, PA, U.S.A.) から購入した。ボンドアロンアルファ®ゼリー状およびボンドアロンアルファ®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用いた。

B-4 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、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。

B-5 *In vitro* 皮膚透過性試験

1) 皮膚の処理法

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下、ヘアレスラット腹部を剃毛処理後、正中線を挟んで左右から2枚ずつ皮膚を摘出した。また、*stripped skin* の場合はセロハンテープ (セロテープ®、ニチバン株式会社、東京) で20回テープストリッピングを行い、角層を完全に除去した後摘出した。さらに、注射針 (テルモ注射針、またはテルモ歯科用注射針、テルモ株式会社、東京) により皮膚に貫通孔を形成させた *needle-punctured skin*、および剃刀 (フェザー剃刀 S 両刃、フェザー安全剃刀株式会社、大阪) で角層側に深さ約 0.5 mm の傷を2本つけた *razor-treated skin* を用いた。なお、*needle* 処理は皮膚を動物から摘出し、皮膚をセルにアロンアルファで固定した後、有効透過面積内の1ヶ所に20G、23G、27G、または30G注射針を先端から刺した。*Razor* 処理は割り箸で剃刀を挟み、刃の出ている部分を0.5 mmに調整し、その剃刀

を一定の力で左から右に引くことで有効透過面積内に2本の傷をつけた。なお、*razor* 処理および皮膚の摘出は麻酔下で行った。

2) Fluoresbrite 透過実験: 摘出した皮膚を *side by side* 型拡散セル (有効透過面積 0.95 cm²) に挟み、真皮 (レシーバー) 側に pH7.4 等張リン酸緩衝 (PBS) を 3.0 mL を適用した。レシーバー側から0時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を補充した。角層側には蛍光ポリスチレンビーズ (Fluoresbrite®) を 3.0 mL 適用した。実験中、セルの温度は 32°C に保ち、両セル内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラー (マルチスターラーM-1、アズワン株式会社、大阪) により 1,200 rpm で回転させることで攪拌した。レシーバー液から 0.5 mL 経時的にサンプリングし、その都度、同量の PBS を補充した。サンプル溶液中の蛍光ポリスチレンビーズ濃度は蛍光分光光度計 (RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都) を用いて測定 (励起波長: 441 nm、蛍光波長: 486 nm) した。

B-6 毛嚢プラグギング処理皮膚を用いた *In vitro* 皮膚透過実験

1) 皮膚の処理法: 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 mm^2 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。

2) 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 cm^2 ）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。

B-7 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）（ $15,000 \text{ rpm}$, 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。

B-8 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 cm^2 ）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。

B-9 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 $6 \mu\text{m}$ の垂直皮膚切片もしくは $8 \mu\text{m}$ の水平皮膚切片）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 $1.125 \times$ 、Off set をゼロに設定した。

C. 研究結果および考察

C-1 ナノ粒子の皮膚透過性

Figure 1a と b にヘアレスラット intact skin、stripped skin、razor-treated skin および needle-punctured skin を介した Fluoresbrite® の透過プロファイルを示す。Intact skin だけでなく皮膚透過の最大のバリアーといわれている角層を取り除いた stripped skin に 24 時間適用しても、

Fluoresbrite[®]は皮膚を透過しなかった (Fig. 1a)。さらに、大変興味深いことに、razorで皮膚を深く傷をつけても Fluoresbrite[®]の皮膚透過性は観察されなかった (Fig. 1a)。一方で、20 G から 30 G の注射針で皮膚を貫通させると、Fluoresbrite[®]はレーザー側に透過することを確認した (Fig. 1b)。また、図からわかるように、注射針の G (ゲージ) 数が小さくなるのに従い (注射針の径が大きくなるのに従い)、Fluoresbrite[®]の皮膚透過性が高くなることが分かった (Fig. 1b)。そこで、Fluoresbrite[®]透過量と注射針の外径および外径から求めた円の面積との関係を調べた。Fig. 1c より、注射針の外径が大きくなるに伴い、Fluoresbrite[®]の透過量が上昇する傾向がみられた。また、その形状は下に凸であった。Fig. 1d より明らかなように、Fluoresbrite[®]透過量は用いた注射針の外径円の面積にほぼ比例して増大することが分かった。

C-2 サンスクリーン剤の皮膚表面分布

Figures 2、3 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. 2a では 1.0 mm、b では 200 μm 、c では 50 μm であり、Fig. 2a 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. 2a 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. 2c 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 3 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. 3a は SEM 像である。なお、

Fig. 3a-f は毛嚢を含む同一部位を示す。Fig. 3b の炭素 (C) 分布を示す紅色部分は Fig. 3a 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. 3c, 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. 3b 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. 3e, 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. 2、3 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。

C-3 毛嚢プラグギング剤処理後の皮膚表面観察

Figure 4 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、シリコー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 4 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、経毛嚢ルートを通じ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。

C-4 蛍光マーカの皮内分布観察

Figure 5 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. 5a, 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ニールレッド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. 5c, 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。

C-5 プラグギング処理を施した皮膚を介した物質透過性

Figure 6 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可能であることが分かった。

Figure 7 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 7 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 8 に FD-4 の皮膚透過性と毛嚢プラグギ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。

Figure 9 に皮膚組織垂直切片を示す。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。また、カルセインは毛嚢バルジ部にも到達したことが確認された (Fig. 9a)。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ていることが確認された (Fig. 9b)。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。この結果は、Ogiso らが報告しているように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た。したがって、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。次に毛嚢周辺の蛍光物質分布を皮膚水平切片画像観察により確認した。Figure 10 に皮膚毛嚢開口部にのみカルセイン水溶液を適用し、経過 2 時間後の皮膚組織水平切片を示す。得られた結果より、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たことが確認された (Fig. 10a, b)。さらに、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 (Fig. 10c - f)。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。

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。

D. 総括

本研究では、物質の毛嚢内動態および毛嚢移行評価を行った。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とする必要があった。本年度の研究結果より、

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。

E. 研究発表

1. 学会発表

1. 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 年、10 月

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、東京、2011 年 5 月

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、千葉、2011 年 10 月

4. 木村 恵理子、高坂 美加、河野 雄一郎、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の安全性、日本薬剤学会 第 25 年会、P-79、徳島、2010 年 5 月

5. 河野 雄一郎、木村 恵理子、藤堂 浩明、五十嵐 良明、杉林 堅次、皮膚に暴露されるナノマテリアルの皮膚浸透の可能性；何コの粒子が皮膚に侵入・透過するか？、第 54 回日本薬学会関東支部大会、東京、2010 年 10 月

6. 高坂 美加、河野 雄一郎、木村 恵理子、藤堂 浩明、五十嵐 良明、杉林 堅次、微粒子酸化チタンの安全性評価、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月

7. 河野 雄一郎、高坂 美加、木村 恵理子、藤堂 浩明、五十嵐 良明、杉林 堅次、ナノ粒子の皮膚透過性評価、第 131 年会日本薬学会、静岡、2011 年 3 月

8. 木村 恵理子、河野 雄一郎、高坂 美加、藤堂 浩明、杉林 堅次、ナノ粒子の皮膚浸透性と安全性、日本薬学会 第 131 年会、静岡、2011 年 3 月

2. 論文発表

1) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F, Ikarashi Y., Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, *Bio. Pharm. Bull.*, **33**, 1394-1399 (2010).

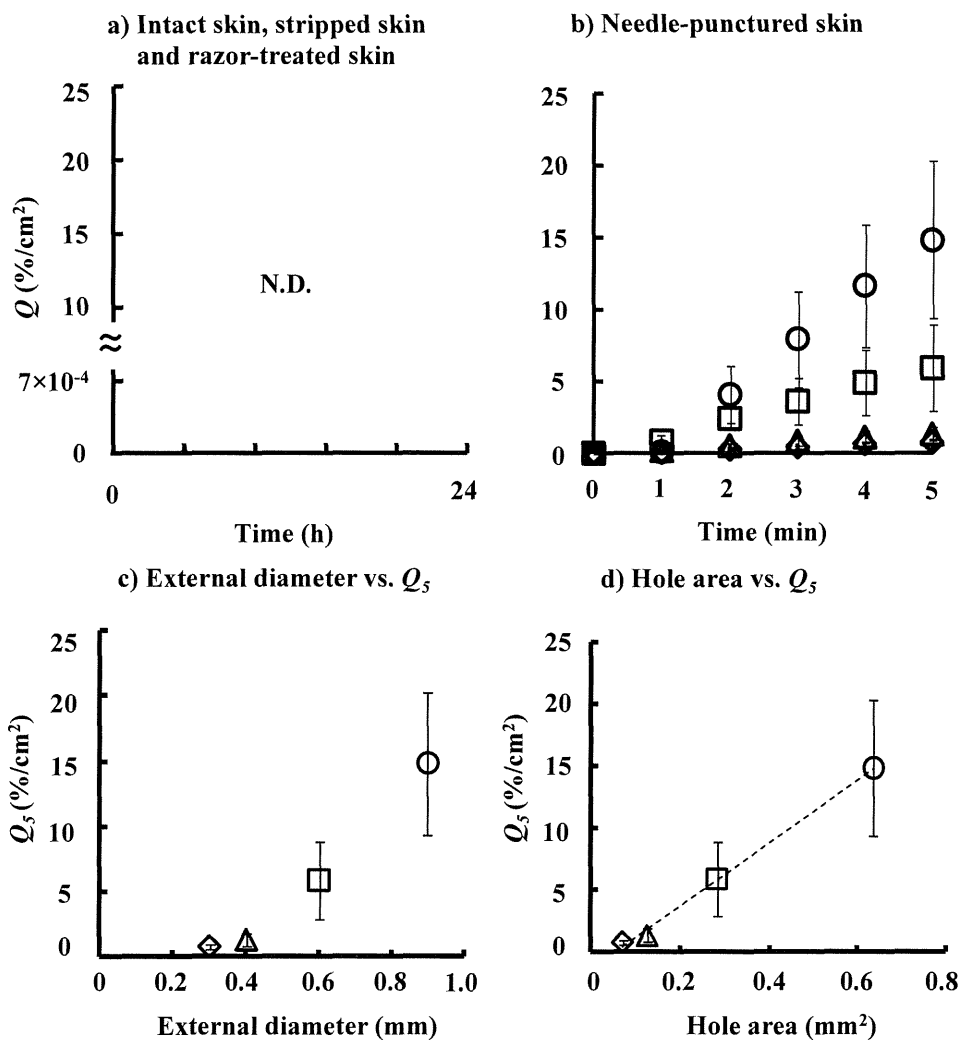


Fig. 1 Time course of changes in the cumulative fraction of Fluoresbrite® that permeated through intact skin, stripped skin and razor-treated skin (a) and needle-punctured skin (b). Relationship between area of needle-punctured hole and cumulative amount of Fluoresbrite® that through needle-punctured skin over 5 h (Q_5).

Symbols: ○; 20G needle (external diameter: 0.9 mm), □; 23G needle (0.6 mm), △; 27G needle (0.4 mm), ◇; 30G needle (0.3 mm).

Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3-4).

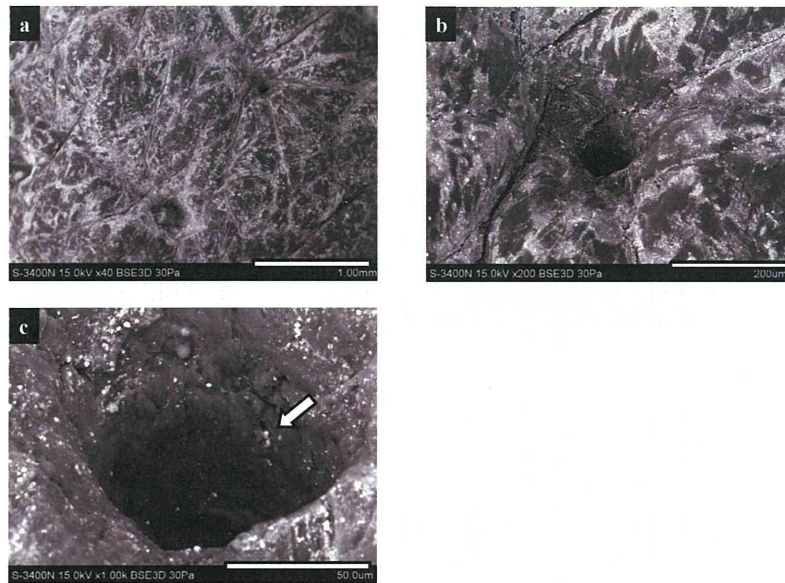


Fig. 2 SEM images of porcine skin surface after application of marketed sunscreen. Arrow shows aggregated nanoparticles irrupt into hair follicle. Each white bar represents 1.0 mm (a), 200 μm (b), 50 μm (c).

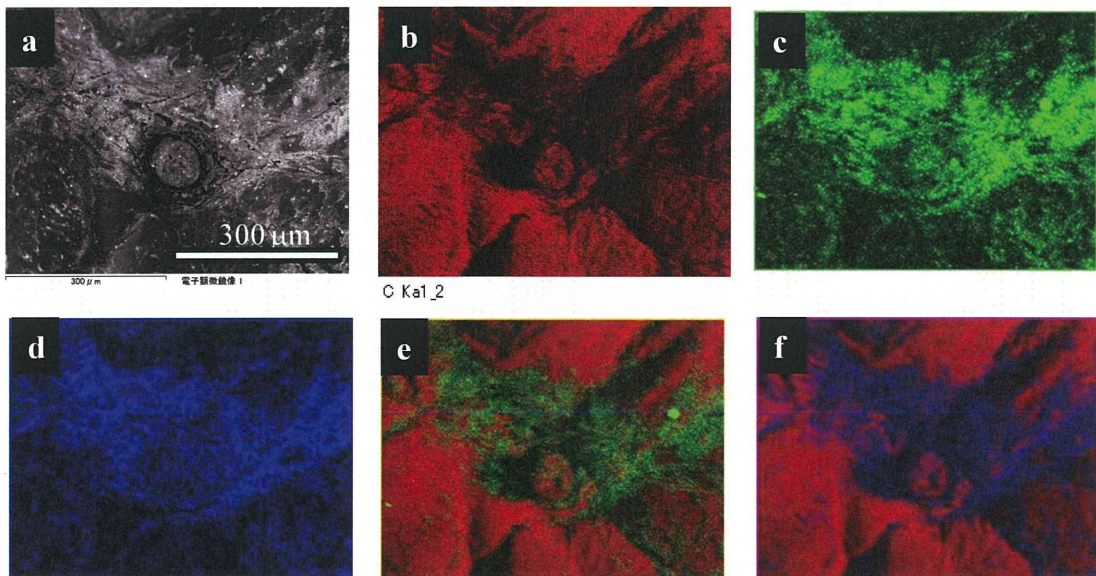


Fig. 3 SEM-EDX elemental mapping images of porcine skin surface after application of marketed sunscreen (a) original SEM image, (b) carbon mapping, (c) titanium mapping, (d) zinc mapping, (e) merged carbon and titanium mapping, (f) merged carbon and zinc mappings. The bar represents 300 μm .

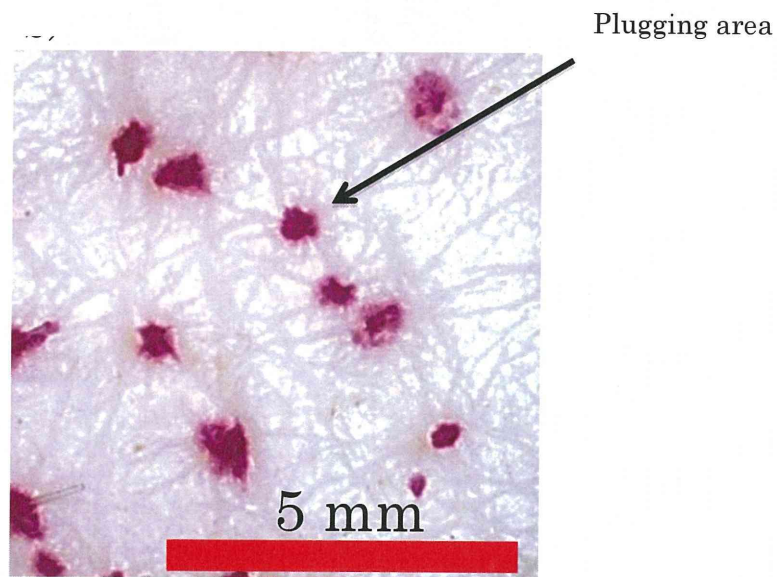


Fig. 4 Observation of plugging hair follicles skin after treatment.

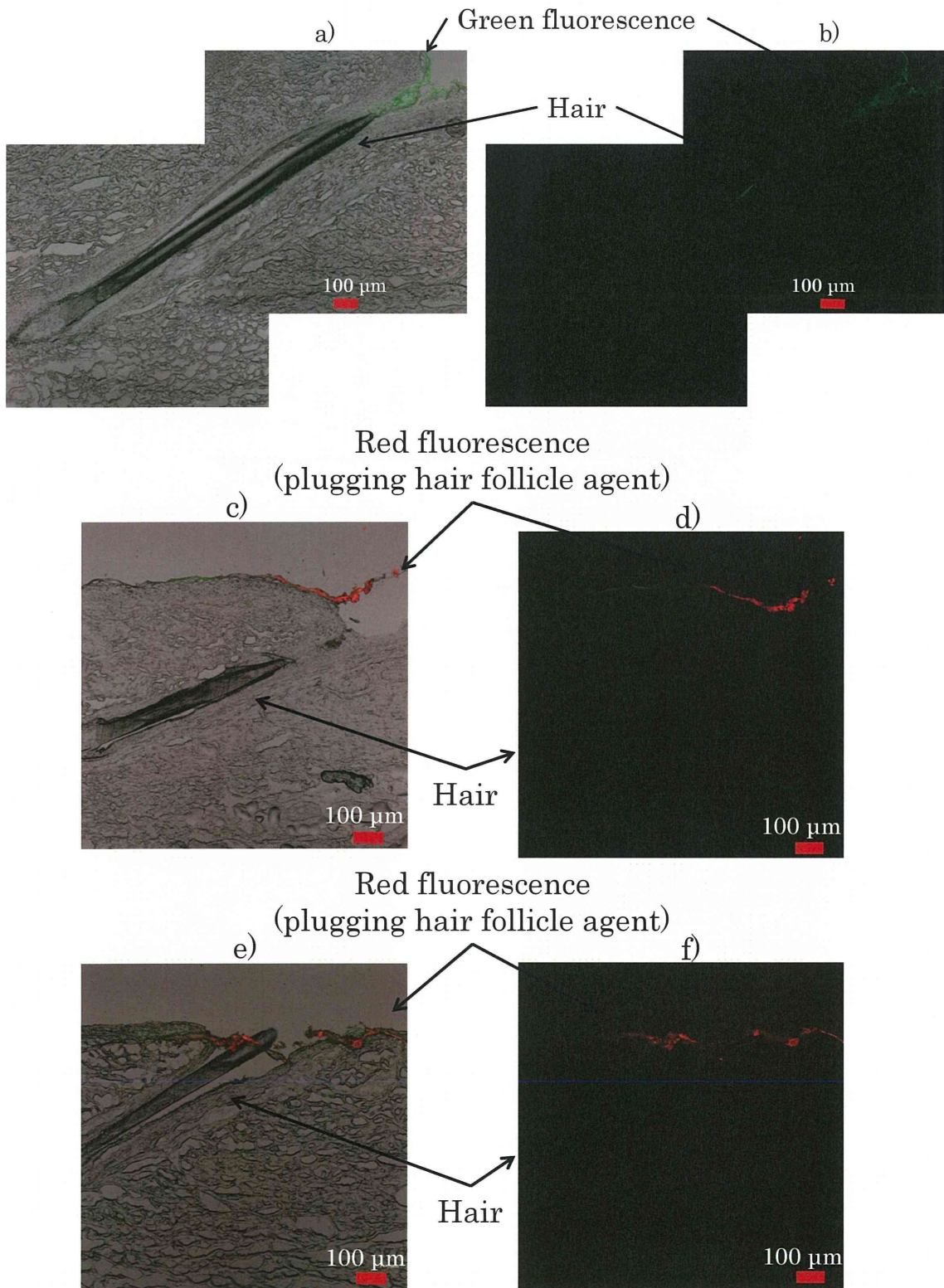


Fig. 5 Observation of fluorescence distribution in skin by CLMS
 Non-plugging skin (a: merged image, b: fluorescence image)
 Plugging hair follicles skin (c, e: merged image, d, f: fluorescence image)

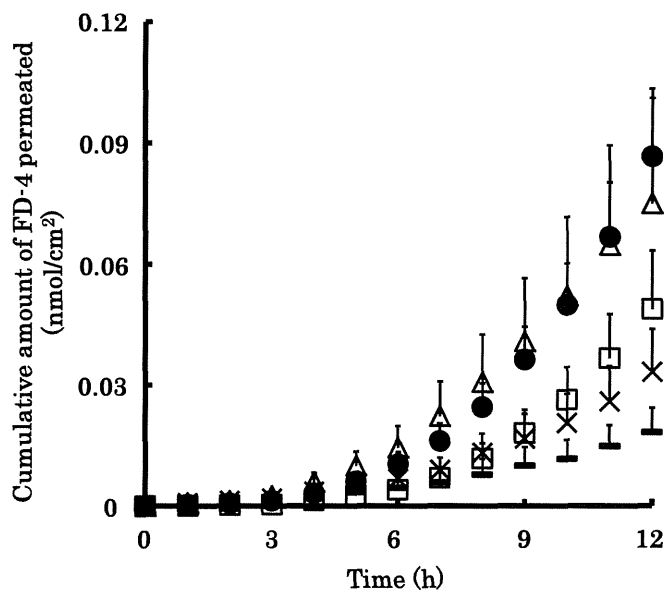


Fig. 6 Time course of the cumulative amount of FD-4 permeated through plugging hair follicles skin Symbols: non-plugging skin (●), 10 (Δ), 20 (□), 30 (×) and 40 hair follicles plugging skin (·). Data are shown as the mean + S.E..

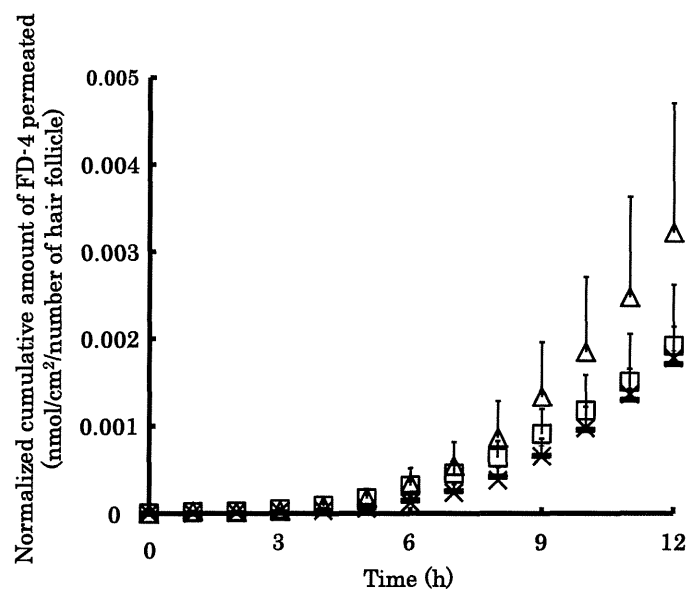


Fig. 7 Time course of the normalized cumulative amount of FD-4 permeated through plugging hair follicles skin Symbols: 10 (Δ), 20 (□), 30 (×) and 40 hair follicles plugging skin (·). Data are shown as the mean + S.E..

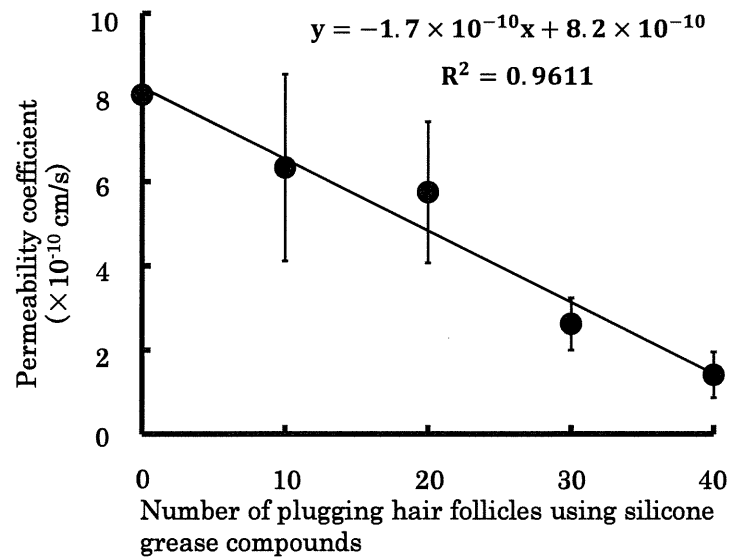


Fig. 8 Relationship between permeability coefficient and number of plugging hair follicles using silicone grease compound Data are shown as the mean \pm S.E..