

化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する研究

分担研究者 中川 晋作 大阪大学 薬学研究科 薬剤学分野 教授

研究要旨

本研究は、近年注目を集めるナノサイズの化粧品材料の経皮におけるリスク(ナノリスク)を評価することで、これらを応用した化粧品の適正使用に対する情報収集を行うことを目的とする。その中で本年度は、多くの化粧品に含有されるナノシリカをモデルとし、その経皮、あるいは皮膚からの全身血中への移行評価に関する検討を行い、下記の結果を得た。

1. 70nm, 300nm, 1000nm という異なった粒子径を有するナノシリカの皮膚培養細胞に対する細胞傷害性を評価し、その傷害性に粒子径依存性を見出した。
2. ヒト3次元培養人工皮膚モデル(LSE)を用い、ナノシリカの透過性を評価したところ、300nm, 1000nmのナノシリカでは、透過は観察されなかったのに対し、70nmのナノシリカでのみ皮膚の透過が観察された。
3. ヒトの皮膚に構造が類似すると言われるブタを使用した21日間連続塗布実験を行い、ナノシリカの経皮透過特性を評価したところ、ヒト3次元培養人工皮膚モデルを用いた検討と同様に、70nmのナノシリカでのみ、血中への移行が観察された。

以上の結果より、ナノマテリアルは、70nmという微小サイズとなることで、皮膚を透過し、血中へ移行する可能性が示され、これによる生体への悪影響を検討する必要性が示された。

A. 研究目的

近年、吸湿性に優れテカリ防止などに使用されるシリカ、日焼け止めとしての酸化チタンなどの化粧品材料の有用性をさらに高めるため、これらをナノサイズにまで微細化した、ナノマテリアルを含有する化粧品に注目が集まっている。しかしながら、ナノマテリアルはその微小サイズゆえにマイクロマテリアルとは全く異なる生体内挙動を示すことが知られ、その生体に与える未知なるリスク(ナノリスク)の存在が危惧されている。とりわけ、これらを化粧品

品として使用する際には、皮膚は連日大量のナノマテリアルの暴露を受けていることとなるため、その経皮および生体に与えるナノリスクの評価ガイドラインの制定は急務である。本観点から我々は、粒子径の異なるナノシリカを用い、その経皮吸収性ならびに経皮に与える影響について解析することで、ナノリスク評価に有益な情報の収集を目的に実験を行うこととした。

B. 研究方法

B-1. 培養皮膚細胞株 (HaCaT) に対する細胞傷害性試験

96 穴プレートに HaCaT 細胞を 1.0×10^4 cells/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。段階希釈した 70nm ナノシリカ、300nm ナノシリカ、1000nm ナノシリカを細胞培養溶液に滴下し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。その後、 $[^3\text{H}]$ -thymidine cocktail (PerkinElmer, Inc., USA) $1 \mu\text{Ci}/20 \mu\text{L}$ で細胞培養培地に添加し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 6 時間培養した。Combi-12 Cell Harvester (Molecular Devices, USA) を用いて細胞をガラスフィルターに回収した後、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -thymidine 量を液体シンチレーションカウンター (Hewlett Packard, USA) を用いて測定した。細胞を完全に回収するため、1 度セルハーベスターを通した細胞培養プレートに 1 mM トリプシン/EDTA を加え、10 分間培養した後、再度セルハーベスター処理を行った。なお、細胞増殖率は PBS を添加した群の値をコントロール (100%) として算出した。

B-2. ヒト三次元培養皮膚 (LSE) を用いた皮膚透過実験

70nm ナノシリカ、300nm ナノシリカ、1000nm ナノシリカを 25 mg/mL に調製し、必要に応じてミリスチン酸イソプロピル (Nacalai Tesque Inc., JAPAN) を終濃度 5%となるように混合した。ドーナツ型のシリコンリング (TOYOBO Co. Ltd., JAPAN) にシリコンを薄く塗り、シリコン塗布面を下にして LSE (TOYOBO Co. Ltd., JAPAN) 中央部に接着させた。その後、6 穴アッセイトレイに 1.2 mL PBS を添加し、その上に LSE が乗っているトランスウェル (TOYOBO Co. Ltd., JAPAN) を移した。シリコンリング中央部へ各種ナノシリカを $100 \mu\text{L}$ 添加し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 9 時間培養した。その後、LSE が乗っているトランスウェルを 6 穴アッセイトレイからはずし、PBS で 3 回 wash することで LSE 表面に付着したナノシリカを完全に除去した。ナノシリカ塗布部の LSE をトランスウェルから 8mm ϕ バイオプシーパンチ (TOYOBO Co.

Ltd., JAPAN) を用いて回収した。そしてナノシリカの皮膚透過性を LSE、ならびにアッセイトレイに残存した PBS 溶液を用いて下記の検討により評価した。

B-2-1. 蛍光顕微鏡によるナノシリカの透過像観察

B-3 にて回収した LSE を O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical, JAPAN) に包埋した後、液体窒素にて急速冷凍した。これら凍結ブロックからクライオスタット (Leica Microsystems GmbH, Germany) を用いて $5 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。核染色、ならびにナノシリカの蛍光退色を防ぐために Prolong Gold anti-fade reagent with DAPI を用いてマウントすることで永久標本を作製し、蛍光顕微鏡 (BZ-8000 KEYENCE, Japan) を用いてナノシリカ由来の蛍光を観察した。

B-2-2. 皮膚モデル中のナノシリカの検出 (FCM)

B-2 にて回収した LSE をカミソリを用いて裁断した後、10 mL のコラゲナーゼ溶液中で、37°C で 30 分培養した。その後、細胞培養液をコラゲナーゼ溶液と等量加えた後、細胞懸濁液をセルストレイナー (BD Pharmingen, USA) に通した。回収された細胞懸濁液を微量高速低温遠心機 (MX-150; TOMY, Japan) を用いて 15000 rpm、10 分間遠心分離を行うことで、細胞を回収した。その後、残渣を Staining Buffer にて再懸濁した後、細胞に含まれる蛍光粒子を検出するため Flow cytometry 解析を行った。

B-2-3. ナノシリカの透過量測定

B-2 で得られたアッセイトレイに残存した PBS 溶液を $100 \mu\text{L}$ を回収し、96 穴ブラックプレートに添加した。SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices, USA) を用いて Ex: 488 nm、Em: 525 nm の条件で蛍光値を測定した。なお、B-1 の方法により作製した検量線に基づいて、PBS 中のナノシリカ濃度を算出した。

B-2-4. ナノシリカの濃度と蛍光値の検量線作成

蒸留水、PBS、細胞培養培地を用いて 70 nm ナノシリカ、300 nm ナノシリカ、1000 nm ナノシリカ

(Corefront Co., JAPAN) を 25 mg/mL に調製し、段階希釈を行った。それぞれ、100 μ L を 96 穴ブラックプレート (Nalge Nunc International, USA) に添加し、SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices, USA) を用いて蛍光値を測定した。なお、ローダミンラベルナノシリカは、Ex: 569 nm、Em: 585 nm の条件で、アミノフルオレセインラベルナノシリカは Ex: 488 nm、Em: 525 nm の条件で蛍光値を測定した。

B-3. プタを用いた血中移行性、ならびに皮膚・生体毒性に関する検討

70nm ナノシリカ、300nm ナノシリカ、1000nm ナノシリカを 25 mg/mL に調製し、必要に応じてミリスチン酸イソプロピル (Nacalai Tesque Inc., JAPAN) を終濃度 5% となるように混合した。体重 35 kg 付近の系統間三元交雑豚 (LWD; IVTeC Co., Ltd, JAPAN) の耳の内側に各種ナノシリカを 1 mL、21 日間連続塗布した。その後、系統間三元交雑豚を「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に基づいて安楽死させた後、血清、耳、肝臓を回収した。その後、回収した臓器を用いてナノシリカの皮膚透過性、ならびに生体への毒性を評価した。

B-3-1. 血液中に移行したナノシリカの定量

回収した血清を 300 μ L を回収し、96 穴ブラックプレート (Nunc) に添加した。SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices) を用いて Ex: 488 nm, Em: 525 nm の条件で蛍光値を測定した。なお、B-1 の方法により作製した検量線に基づいて、PBS 中のナノシリカ濃度を算出した。

B-3-2. 皮膚、肝臓切片の蛍光顕微鏡観察によるナノシリカの透過像観察

回収した耳、ならびに肝臓組織を 10%ホルマリンに浸漬して固定した。その後、固定された組織にパラフィン浸透させ、パラフィン浸透の終了した組織検体を熔融パラフィンとともに包埋皿に入れブロックを作製した。これら包埋されたブロックからクライオスタット (Leica Microsystems GmbH) を用い

て 4 μ m のパラフィン切片を作製した。4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; Invitrogen)を用いて核染色を行い、ナノシリカの蛍光退色を防ぐために Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) を用いてマウントすることで永久標本を作製した。その後、蛍光顕微鏡 (KEYENCE) を用いてナノシリカ由来の蛍光を観察した。

C. 研究結果

C-1. 培養皮膚細胞株 (HaCaT) に対する細胞傷害性試験

当初、培養皮膚細胞に対する細胞傷害性を評価するための系として、non-RI のバイアビリティ測定法である WST-8 assay、LDH-release assay により検討を行った。しかしながら、WST-8 assay、LDH-release assay の両者では、吸光度の値に、高濃度の粒子が影響を与えるという結果であった。そこで、吸光度ではなく、RI を使用する方法として、 $[^3\text{H}]$ -thymidine uptake assay を選択し、検討を行うこととした。

粒子径の異なるナノシリカ(70nm, 300nm, 1000nm)を細胞に作用させ、24 時間後の生存率を評価したところ、全ての群において、粒子量依存的な細胞傷害性が観察された (Fig.1)。しかしながら、その傷害の度合いは各群で異なっており、70nm > 300nm > 1000nm の順であった。本結果は、培養細胞に与える細胞傷害に対して、粒子径依存性が存在することを示唆するものと考えられる。

C-2. ヒト三次元培養皮膚 (LSE) を用いた皮膚透過実験

ヒト三次元培養皮膚(LSE)に対する皮膚透過試験は、70nm, 300nm, 1000nm の蛍光ナノシリカを皮膚上に添加し、以下の 3 項目について、評価を行った。LSE の形状・ならびに実験操作などについては、Fig.2 を参照のこと。①LSE の凍結切片を作製し、皮膚内部に含まれる蛍光ナノシリカを蛍光顕微鏡により観察する。②LSE を組織溶解剤で溶かし、単細胞を単離した後、細胞内に含まれる蛍光ナノシリカをフローサイトメトリーにより検出する。③LSE 下部へ透

過したナノシリカの量を、PBS中の蛍光強度を測定することにより概算する。

なお、本実験では、化粧品の基剤として用いられ、皮膚への化粧品の浸透性を高めるとされる、ミリスチン酸イソプロピル(IPM)を併用した群を取り、その影響についても評価した。

C-2-1. 蛍光顕微鏡によるナノシリカの透過像観察

回収したLSEの凍結切片を作製し、顕微鏡により観察した(Fig.3)。その結果、IPM非適用群では70nm, 300nm, 1000nm全ての群で、ナノシリカの透過像は観察されなかった。一方IPM適用群では、全ての群にて蛍光が観察された。これは、IPMが経皮吸収促進効果を示したものと考えられた。粒子径の違いによる局在の変化については、1000nm, 300nmの群では、主に蛍光は角質に留まり、皮膚深部まで到達したものは比較的少量であった。一方、70nmのナノシリカを作用させた群では、角質にほとんど蛍光は観察されず、主に皮膚深部に観察された。この実験に使用したナノ粒子の単位重量あたりの蛍光強度は、70nm : 300nm : 1000nm = 1 : 4 : 12であったことから、70nmナノシリカは効率よく皮膚を透過する可能性が示唆された。

C-2-2. 皮膚モデル中のナノシリカの検出 (FCM)

回収したLSEをコラゲナーゼ処理により溶解し、単細胞とした。その後、その細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、IPM作用群、未作用群ともに、十分な蛍光を観察することはできなかった(Fig.4)。これは、ローダミン標識したナノシリカの蛍光強度が弱く(Fig.6)、十分な感度を得られなかったこと、あるいは、細胞内に取り込まれたナノシリカは微量である可能性が考えられた。いずれにせよ、現段階では、ナノシリカの皮膚透過性をフローサイトメトリーで評価するのは、困難であると考えられた。

C-2-3. ナノシリカの透過量測定

LSEを透過したナノマテリアルは、下部のウェル内のPBS中に移行する。そこで、PBS中の蛍光強度

を測定することで、透過量を算出した(Fig.5)。なお、透過したナノシリカの量は、C-2-4で示す検量線(Fig.6)を用い、その蛍光強度から算出した。その結果、IPMの有無に関わらず、70nmのナノシリカでのLSEの透過が観察された。一方、300nm, 1000nmのナノシリカでは、全く透過は観察されなかった。今回の検討では、n=3で行ったものの、70nmシリカでも透過するものとししないものとの2パターンに別れた。これは、LSEのロットのばらつきによるものと考えられるが、少なくとも、300nm, 1000nmのもので透過が観察されなかったことを加味すると、70nmナノシリカは皮膚を透過する能力があるものと示唆される。なお、IPMの効果に関しては、今回の検討のみでは議論することができない。今後は、よりn数を増やした実験を行うことによって信頼性の高いデータを蓄積する予定である。

C-2-4. ナノシリカの濃度と蛍光値の検量線作成

ローダミン標識ナノシリカ、アミノフルオレセイン標識ナノシリカを段階希釈し、検量線を作成した。ローダミン標識のものは、蛍光強度が頭打ちになり、高い濃度の粒子を定量できない問題を有することがわかった。一方で、アミノフルオレセイン標識ナノシリカは、ナノシリカ量と蛍光強度に高い相関性を示し、モデルナノシリカとして適していることが示された。C-2-3, C-3-1におけるナノシリカの定量は、全てこの検量線に従い算出した。

C-3. ブタを用いた血中移行性、ならびに皮膚・生体毒性に関する検討

ヒトの皮膚と構造が類似すると考えられているブタの皮膚を用い、70nm, 300nm, 1000nmナノシリカのin vivo皮膚透過性を評価するため、ブタの耳に対し、21日間に渡り、1日1回の連続塗布を行った。21日後の塗布が完了したブタを解剖し、耳、血清、ならびに肝臓を回収し、以降の実験に供した。

C-3-1. 血液中に移行したナノシリカの定量

回収した血清を希釈し、その蛍光強度を測定することで、皮膚へ塗布したナノシリカの血中への移行

性を評価した(Fig. 7)。300nm, 1000nm のナノシリカを塗布したブタ血清からは、蛍光は検出されず、ナノシリカは血中まで到達できなかった可能性が示唆された。一方、70nm のナノシリカを塗布したブタ血清には、投与量の実に 1.7% が残存していることが明らかとなった。今回の実験では、21 日間連続塗布の後の血清を回収しているため、他の臓器への分布や生体からの排泄に関する情報は得られなかったが、少なくとも、皮膚に塗布されたナノシリカは、血中へ高い割合で移行することが明らかとなった。今後は、経日的に血清を回収するなどの実験を行うことにより、そのナノシリカの血中への移行、残存率などの詳細を評価する予定である。

C-3-2. 皮膚、肝臓切片の蛍光顕微鏡観察によるナノシリカの透過像観察

回収した耳、ならびに肝臓の組織切片を作製し、ナノシリカの局在を観察した。プレリミナリーな結果ではあるが、耳の切片では、70nm のナノシリカで強い蛍光が観察された。また、LSE の検討と一致して、皮膚深部まで到達していることが明らかとなった(Data not shown)。今後は、肝臓等の切片を詳細に観察することで、血中への移行後の、臓器分布、生体への影響を検討してゆきたい。

D. 考察

培養皮膚細胞株 HaCaT に対する細胞傷害性に粒子依存性が見られた原因を明らかとするためには、より詳細な検討を行う必要があるものと考えられる。これまで、培養皮膚細胞にナノマテリアルを加えると、一部の炎症性サイトカインが分泌される、という報告も存在する。今後は、ナノマテリアルの皮膚透過性だけでなく、皮膚自身に与える影響についても精査してゆく必要があるだろう。

今回の LSE ならびにブタの耳を用いた皮膚透過性試験では、70nm とはいえ巨大な粒子が皮膚を透過し、血中に移行するという極めて興味深い知見が得られた。これまで、疎水性が高い物質を除けば、「高分子量物質は、角質を透過することができない」というのが常識であったが、今回のナノシリカは、皮膚か

ら生体内へ侵入しえる可能性を有している。これは、塗布物質の量、投与回数などに起因する可能性も考えられるが、化粧品に用いられているナノマテリアルは、文字通り何年間にも渡り毎日連続の経皮投与されていることを考えると、今回の実験結果は非常に重要な情報を含んでいるものと考えられる。

今後は、その皮膚からの吸収経路の追跡だけでなく、その血中への移行性の経日変化などを検討することで、ナノマテリアルのリスク管理に重要な情報を集積する予定である。また、体内への侵入だけでなく、皮膚自身に与える影響も研究対象とし、その皮膚毒性、ならびに、サイトカイン産生変動なども検証してゆく予定である。

E. 結論

1. 70nm, 300nm, 1000nm という異なった粒子径を有するナノシリカの皮膚培養細胞に対する細胞傷害性を評価し、その傷害性に粒子径依存性を見出した。
2. ヒト 3 次元培養人工皮膚モデル(LSE)を用い、ナノシリカの透過性を評価したところ、300nm, 1000nm のナノシリカでは、透過は観察されなかったのに対し、70nm のナノシリカでのみ皮膚の透過が観察された。
3. ヒトの皮膚に構造が類似すると言われるブタを使用した 21 日間連続塗布実験を行い、ナノシリカの経皮透過特性を評価したところ、ヒト 3 次元培養人工皮膚モデルを用いた検討と同様に、70nm のナノシリカでのみ、血中への移行が観察された。

以上の結果より、ナノマテリアルは、70nm という微小サイズとなることで、皮膚を透過し、血中へ移行する可能性が示され、これによる生体への悪影響を検討する必要性が示された。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

・論文発表

該当事項なし

・学会発表

- 1) 亀井数正、向 洋平、小島拓記、吉川舞、角田慎一、堤 康央、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作 : 化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する基礎検討 (講演ハイライトに選定)、日本薬学会 128 年会、2008 年 3 月、横浜、発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得

該当事項なし

・実用新案登録

該当事項なし

I. 研究協力者

- 向 洋平 大阪大学大学院薬学研究科・特任助教
岡田 直貴 大阪大学大学院薬学研究科・講師
亀井 数正 大阪大学大学院薬学研究科・博士前期課程 2 年
吉川 舞 大阪大学大学院薬学研究科・博士前期課程 1 年
小島 拓記 大阪大学薬学部・4 年

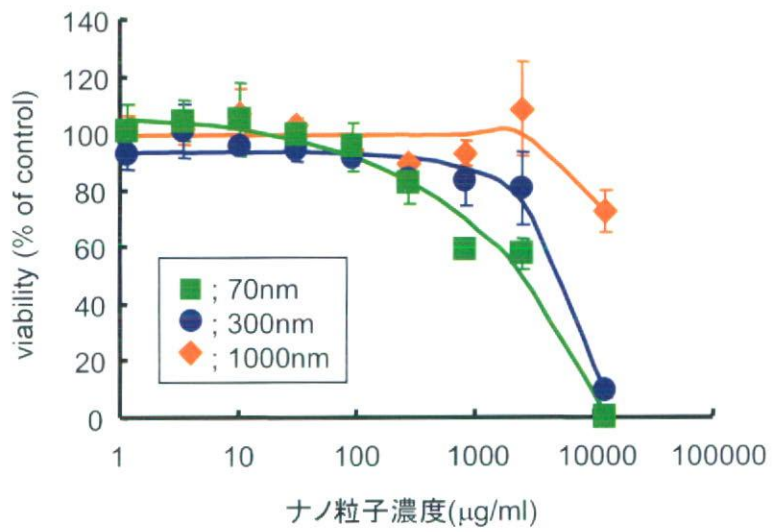
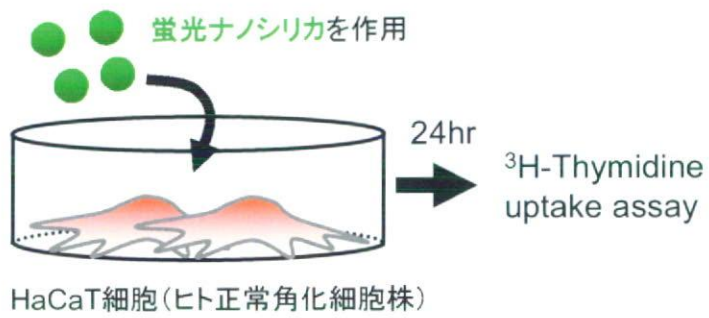


Fig.1

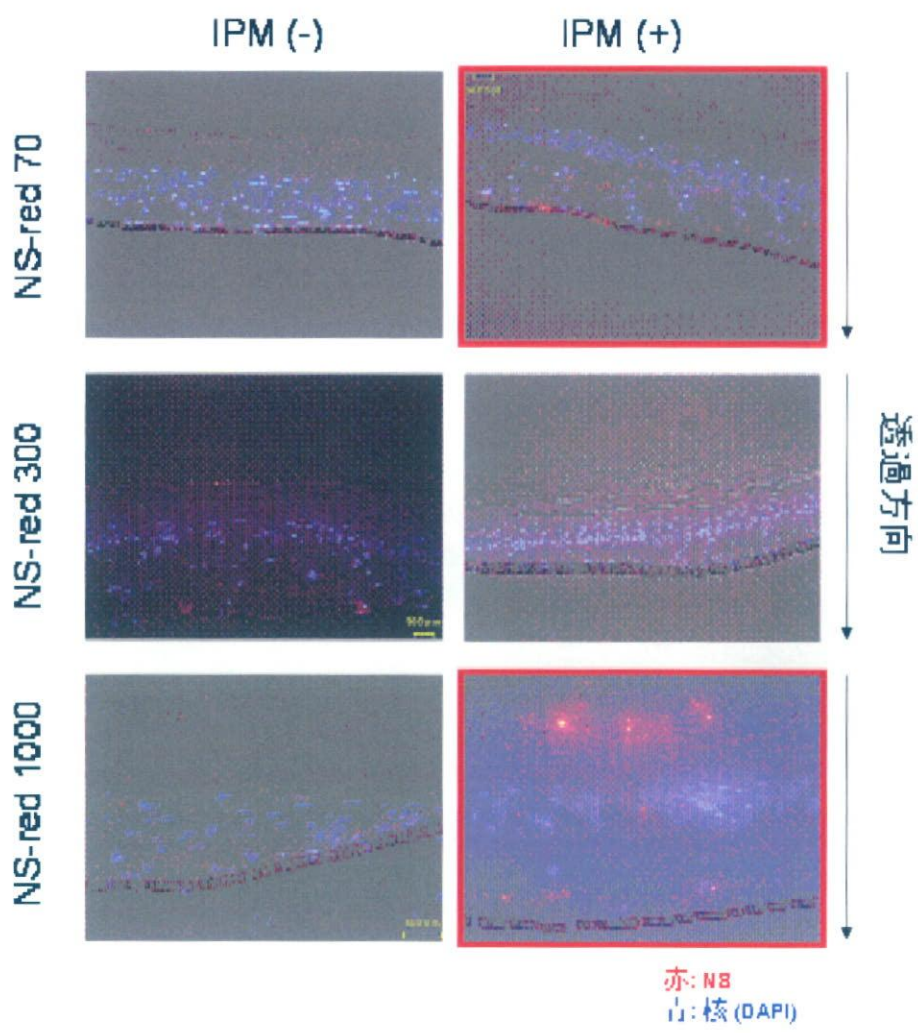


Fig.3

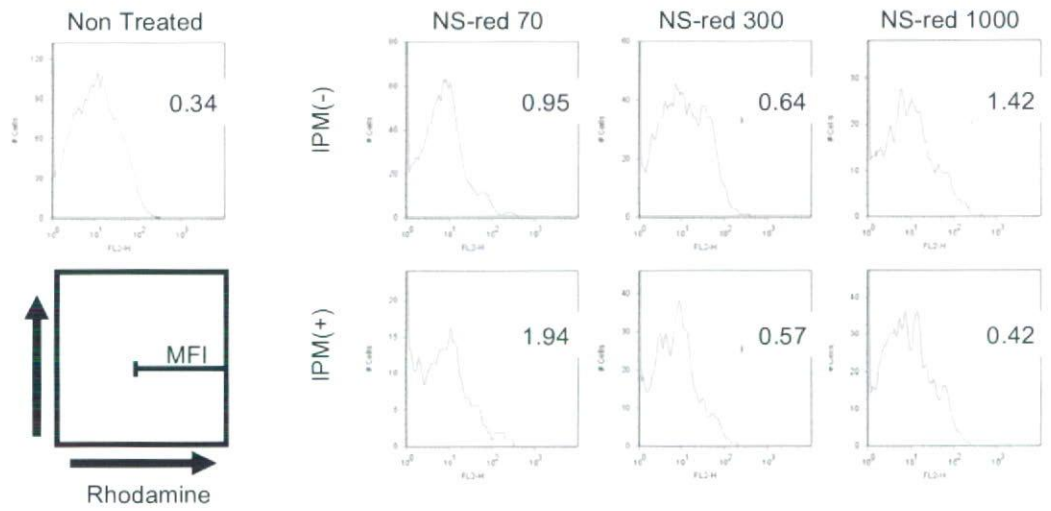


Fig.4

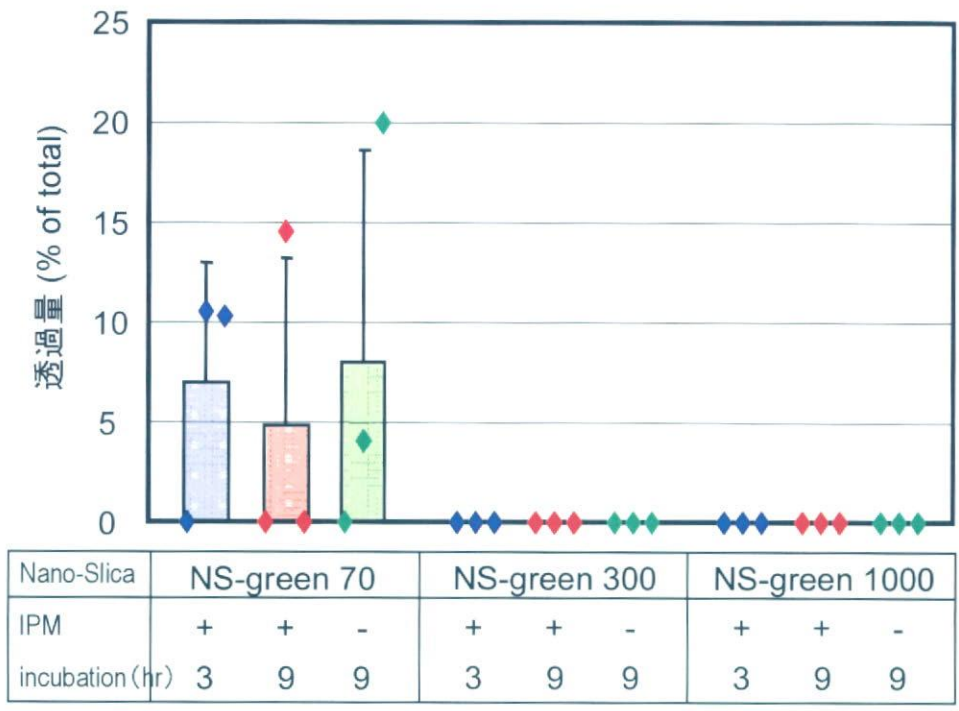


Fig.5

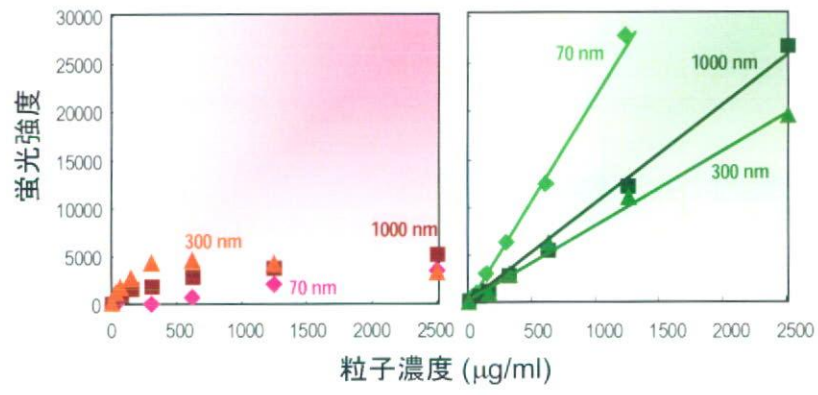
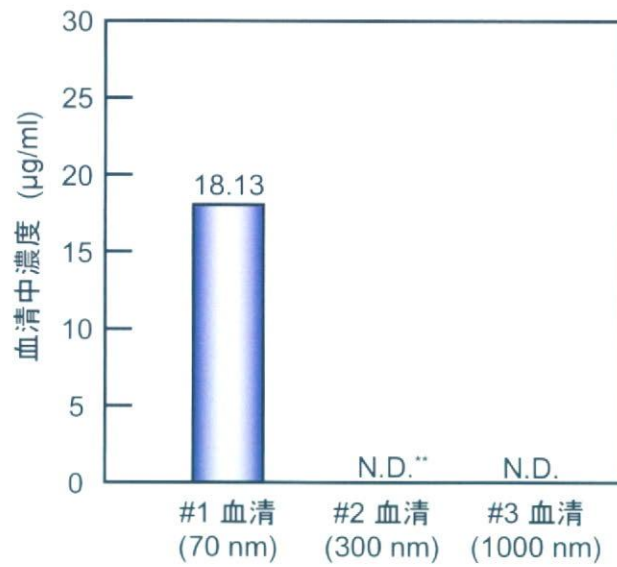
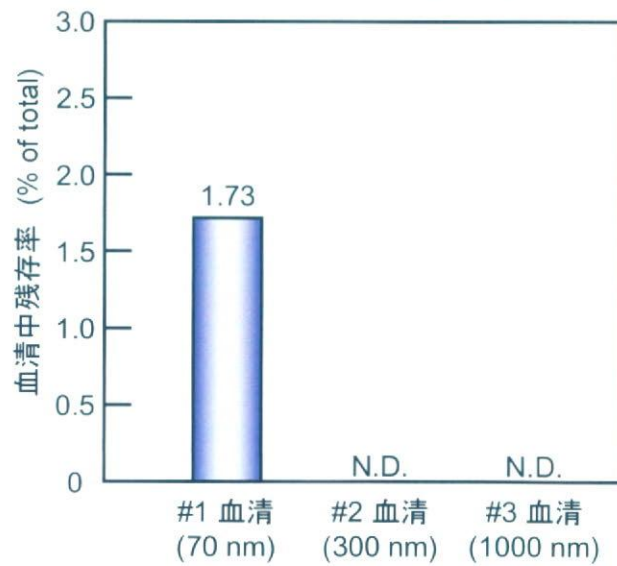


Fig.6

21日後に血中に残存するナノシリカ濃度



全投与量に対する21日後に血中に残存するナノシリカ量の割合*



* プタの全血清量は1.0 Lと概算した

** N.D. : Not Detectable

Fig.7