

安全なナノ化粧品の開発に向けたナノマテリアルの安全性評価

吉田 徳幸,^a 吉岡 靖雄,^a 堤 康央^{*,a,b,c}

The Safety Assessment of Nanomaterials for Development of Nano-cosmetics

Tokuyuki Yoshida,^a Yasuo Yoshioka,^a and Yasuo Tsutsumi^{*,a,b,c}

^aLaboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences; ^bThe Center for Advanced Medical Engineering and Informatics (MEI Center), Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; and ^cLaboratory of Biopharmaceutical Research (LBR), National Institute of Biomedical Innovation (NiBio); 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan.

(Received July 30, 2012)

A diverse array of nanomaterials (NMs), such as amorphous nanosilica (nSP), carbon nanotubes and titanium dioxide, has become widespread in use due to the development of nanotechnology. NMs are already being applied in universal fields because they have unique physicochemical properties. On the other hands, the safety of NMs has not been well assessed, because NMs have been considered as safe as common larger sized materials which are known not to be absorbed by the body. Because NMs have the potential to improve the quality of human life, it is essential to ensure the safety of NMs and provide information for designing safer NMs. In this regard, we studied the biological distribution and hazard identification of nSP following dermal administration, because nSP is used NMs in the cosmetics field. In the future, our study would help to set the no observed adverse effect level (NOAEL) and acceptable daily intake (ADI), and be useful information for the safety/hazard assessment and evaluation.

Key words——nanomaterial; Nano-Safety Science; amorphous nanosilica

1. はじめに

近年の革新的ナノテクノロジーの発展により、少なくとも1次元の大きさが100 nmよりも小さいと定義されるナノマテリアルの開発が急速に進展している。ナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ以上(100 nm以上)の素材とは異なり、サイズの微小化による比表面積の増大を反映した結果、被覆率、吸水・吸脂性などが劇的に増大するため、化粧品・医薬品・食品など様々な分野の製品に実用化が進んでいる。特に化粧品分野においては、ナノマテリアルを製品に適用することによって、従来までの化粧品と比較して、使用感・美肌効果・紫

外線遮蔽効果の向上が実現された。例えば、代表的な化粧品素材として使用されてきたサブミクロンサイズの酸化チタンは、従来まで白色顔料として使用されていたが、ナノサイズまで微小化することで、使用感・紫外線遮蔽効果という新たな機能が付加され、日焼け止めやファンデーションにまで適用範囲は拡大している。このように、今やナノマテリアルは化粧品領域において必要不可欠な存在であり、今後も、いわゆるナノ化粧品としての使用拡大、さらにはより有用性の高い、革新的な化粧品開発への応用に期待は高まるばかりである。一方で昨今、食品・化粧品への安全・安心への希求も相俟って、化粧品中ナノマテリアルの安全性評価や更なる安全性の確保が待望されている。しかし、ナノマテリアルの物性・品質を評価・管理・保障し、安全・安心に製造・使用していくための規制・ガイドラインについては、ようやく整備されようとしているに過ぎない。特に、化審法や労働安全衛生法においては、ナノマテリアルを構成する化学物質の構造式のみで規制がなされる可能性もあり、粒子径・形状・表面性

The authors declare no conflict of interest.

^a大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野、^b同臨床医工学融合研究教育センター(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6)、^c独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8)

*e-mail: ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第132年会シンポジウムS01で発表したものを中心に記述したものである。

状・タンパク結合性・分散/凝集状態など、ナノマテリアルに特有の品質管理・保障の規制・ガイドライン策定には程遠いのが現状である。さらに現状では、ナノマテリアルの曝露状況が不明瞭なこともあり、本来ならば最も考慮すべき曝露経路を想定した安全性情報も不十分である。したがって、今後のナノマテリアルの安全性研究には、実際の曝露経路を加味したうえで、体内に吸収されるか否かを判別し、もし吸収されるのであれば、体内動態・蓄積性・排泄経路を含めた ADME 情報を正確に把握することが必要不可欠である。そのうえで、ナノマテリアルを従来素材とは別個の素材と捉え、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性情報を収集することが課題となっている。これら情報を基にリスク解析を実施し、ナノマテリアルの no observed adverse effect level (NOAEL；最大無毒性量) や acceptable daily intake (ADI；1日許容摂取量) の設定、ひいてはハザードを誘発しない安全なナノマテリアルの創製に資する基礎情報を収集することこそが重要である。本観点からわれわれは、ナノマテリアルの安全性評価と安全なナノマテリアルの利用促進、そして安全性に懸念がある場合には安全なナノマテリアルに仕立てあげることがを目的に、独自のナノ安全科学研究 (Nano-Safety Science 研究) を推進している (Fig. 1).¹⁻¹⁶⁾ われわれはこれまで、非晶質ナノシリカ、カーボンナノチューブ、酸化チタンなど、種々のナノマテリアルを対象として、素材

の物性 (サイズ、表面電荷、親/疎水バランス、形状など) と体内/細胞内動態、生体/細胞応答の連関解析を進めてきた。そこで本稿では、非晶質ナノシリカが生産量・使用量・用途の点で最もわれわれの生活に浸透していることを踏まえて、非晶質ナノシリカの経皮曝露後の体内吸収性とハザード解析の結果を紹介する。

2. 非晶質ナノシリカの経皮吸収性評価

非晶質ナノシリカは、印刷機のトナーなどに使用されているカーボンブラックについて使用量が多いナノマテリアルであり、国内生産量は約 20000 トン、世界での年間生産量は 1 メガトン以上であり、その市場規模は 3 億 1400 万ドルにも及ぶ。非晶質ナノシリカは、サイズを微小化するに伴い、使用感や透明性、吸湿性の向上など、化粧品品の有用性を格段に向上させる機能を付与することができるため、日焼け止めやファンデーションなどの化粧品基剤に実用化されている。¹⁷⁾ 一方で安全性に関しては、2006 年の欧州化学物質生態毒性・毒性センターによる報告では、従来までのサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカの安全性に問題はないとされている。¹⁸⁾ しかし、ナノマテリアルの動態特性を考慮すると、サブミクロンサイズの非晶質シリカに関する知見だけでは、非晶質ナノシリカの安全性を十分に確保できているとは言い難い。つまり、非晶質ナノシリカが化粧品や食品としてヒトへ常に曝露されている点を加味すると、非晶質ナノシリカは数あるナ

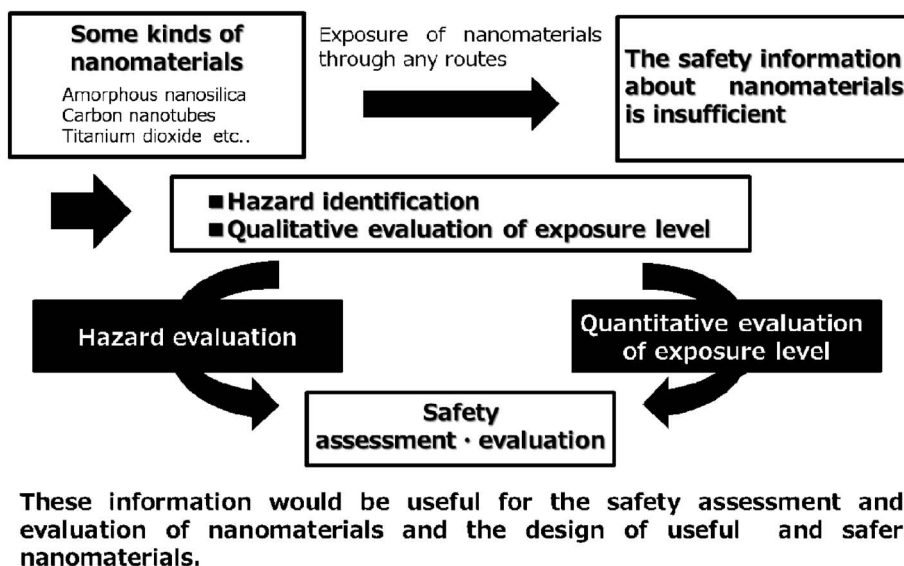


Fig. 1. Our Nano-Safety Science Study

ノマテリアルの中で最も安全性評価が急がれている素材であると言える。そこで本稿ではまず、非晶質ナノシリカの経皮吸収性/体内動態を定性的に評価した。

本検討では、1次粒子径が70 nmの実験用グレードの非晶質ナノシリカ（nSP70と表記）を対象に、マウスを用いて *in vivo* での経皮吸収性及び体内動態を透過型電子顕微鏡により解析した。⁹⁾ nSP70をマウス耳介皮膚に3日間及び28日間連続塗布し、投与局所及び所属リンパ節、各主要臓器におけるnSP70の局在を電子顕微鏡により観察した。その結果、表皮層に存在する角化細胞内、ランゲルハンス細胞内、神経や血管が豊富に存在する真皮層でnSP70の局在が観察された。さらに、投与局所近傍の所属リンパ節内や全身の主要臓器である脳や肝臓にもnSP70が認められた。以上の結果から、非晶質ナノシリカは生体内で最も強固な異物バリアである皮膚を透過し、脳や免疫組織に移行することが明らかとなった。この事実は、ナノマテリアルを化粧品に用いることにより、皮膚表面だけでなく、表皮や真皮にまで化粧品の美白効果や老化防止効果を発揮できるという、ナノマテリアルの有用性を示すものである。一方で、ナノマテリアルの経皮安全性評価においては、投与局所のみならず、脳や肝臓を始めとした全身レベルでの安全性評価の必要性も示唆している。特に角化細胞や表皮ランゲルハンス細胞などの皮膚の細胞は、生体防御機構の起点として働く細胞群であることを加味すると、非晶質ナノシリカの経皮曝露後のハザード解析を免疫学的観点から解析することは必要不可欠であり、次項で、非晶質ナノシリカの経皮吸収後の免疫系への影響についての知見を紹介したい。なお、上記の非晶質ナノシリカの経皮吸収性の結果はあくまでも定性的な評価によるものであり、今後、体内吸収量の定量的な解析が必須である。また、ヒトへの外挿性の観点から、よりヒトに近い皮膚を持つブタを用いた検討や、ヒトの皮膚を用いた *in vitro* での検討などが必要であると考えている。非晶質ナノシリカ以外のナノマテリアルの経皮塗布後の体内吸収性に関して、例えば非晶質ナノシリカと並んで化粧品中に既に使用されているナノ酸化チタンについて、マウスやブタを用いた検討が実施されている。¹⁹⁾ これらの検討では、ナノ酸化チタンは経皮適用しても体内吸収さ

れないとする報告が多数である。この原因の1つとして、われわれが検討に用いた非晶質ナノシリカは分散性が非常に高いが、一般に酸化チタンは凝集性が極めて高いことが知られており、上記の報告は凝集した素材の体内吸収性を評価している可能性がある。われわれの検討結果とこれら報告を加味して考察すると、今後のナノマテリアルの安全性研究には、ナノマテリアルの純度や分散/凝集状態といった、品質にも十分に考慮した解析を進める必要があらう。一方で、化粧品など、経皮適用される製品にナノマテリアルを応用する際に、ナノマテリアルの分散/凝集状態を適切に調整することにより、サンスクリーン、美白剤、アンチエイジング剤などの使用目的により、皮膚表面、表皮、真皮などの各ターゲット部位を狙ってナノマテリアルを送達し、効能を生じさせるという、有用性と安全性を具備した製品の開発が実現するかもしれない。

3. 非晶質ナノシリカのアトピー病態に及ぼす影響

経皮吸収性評価の結果を踏まえ、非晶質ナノシリカの経皮吸収後の免疫系への影響解析を試みるために、代表的な皮膚免疫疾患であるアトピー性皮膚炎（atopic dermatitis; AD）モデルマウスを用いて解析した。¹³⁾ 本検討では、ADの発症や悪化の原因の1つであると考えられるヤケヒョウダニ（*Dermatophagoides pteronyssinus*; Dp）の抽出抗原を曝露することにより、AD症状を発症するNC/Ngaマウスの皮内投与モデルを用いた。本モデルでは、AD病態が重症化することによって、皮膚局所の腫脹といったAD病態を生じる。本検討では、nSP70に加え、1次粒子径が30 nm, 100 nmの3種類の非晶質ナノシリカ（それぞれnSP30, nSP100と表記）、及び300 nm, 1000 nmの2種類の非晶質シリカ（それぞれnSP300, mSP1000と表記）を用いて、シリカとDpをともに皮内投与することで、シリカのサイズと生体影響の因果関係を解析した。なお本検討では、シリカのハザード発現を正確に把握するために、実際にヒトが経皮曝露し得る約100倍のシリカ量を用いた。まずはじめに、各検体を投与した際の耳介部を観察したところ、DpとともにnSP300, mSP1000を投与した群においては、Dp単独投与群と同程度の腫脹が観察された。一方で、nSP30, nSP70, nSP100を適用したマウスの耳介では、特に

腫れが増強していた。また、AD の代表的病変である痂皮形成、浮腫の促進は、nSP30, nSP70, nSP100 適用群でのみ有意に増強されていた。以上の結果をまとめると、100 nm 以下の非晶質ナノシリカを Dp と投与することによって、Dp 誘発性の AD 病態の進行を促進させる可能性が示された。一方で、今回はあくまで AD モデルマウスを用いた皮内投与の検討結果であるため、現在、現実的な経皮塗布モデルや通常マウスを用いた検討も実施し、詳細な情報を収集している。これらの結果を総合的に判断することで、非晶質ナノシリカと Dp を経皮適用した際のハザード発現について、より慎重に考察する必要があると考えている。

次に、安全な非晶質ナノシリカの創製に向けた基礎情報を収集する目的で、非晶質ナノシリカ介在性の AD 病態の促進機序の解明を試みた。一般に、かゆみを伴う AD 病態は、アレルゲン特異的な IgE が起点となり、肥満細胞上のレセプターに結合した抗原特異的 IgE の抗原との架橋反応を介し、かゆみの原因となるヒスタミンや各種炎症性サイトカインが産生され、結果的に AD 病態を発症する。²⁰⁾ 一方で近年、細菌感染やアレルゲンへの接触を介してケラチノサイトから産生される IL-18 や thymic stromal lymphopoietin (TSLP) などのサイトカインが、IgE 産生の中心を担う Th2 型の免疫応答を促進し、AD 病態の発症・悪化に関与する可能性が報告されている。^{21,22)} そこで、非晶質ナノシリカと Dp をともに皮内投与したマウスの、血中 Dp 特異的 IgE, Total IgE, 及び投与局所の IL-18, TSLP の発現を解析した。Dp 特異的 IgE と Total IgE の産生を評価したところ、Dp 単独投与群と比較して、非晶質ナノシリカを共投与した群において、特に顕著な産生増大が認められた。続いて、病態が進行している皮膚局所の IL-18 と TSLP の産生を評価した。その結果、Dp 単独投与群と比較して、粒子径の減少と比例して IL-18 の産生が増強され、TSLP の産生は 100 nm 以下の非晶質ナノシリカのみ増大した。以上の結果から、非晶質ナノシリカ介在性の AD 病態の促進には、IgE の産生上昇のみならず、IL-18 や TSLP の産生も寄与していることが示唆された。また、粒子径の減少と IL-18 産生経路の活性化が高く相関する傾向が認められた事実は、IL-18 産生経路に係わるメカニズムが、シリカのサイズを

認識する可能性を示す興味深い知見である。

4. おわりに

本稿では、非晶質ナノシリカを用いた検討を中心として、経皮曝露後のナノマテリアルが誘発する、従来までのサブミクロンサイズの素材とは異なる体内動態、AD 病態の促進に係わる情報の一部を紹介した。今後、無作用量や閾値の設定に加え、非晶質ナノシリカによるサイトカインの産生増強機序を明らかにする必要があるものの、本結果から、IL-18 や TSLP の産生を指標にナノマテリアルの安全性を予測・回避できるのみならず、粒子径を適切に制御することで安全なナノマテリアルの創製を実現できる可能性が示された。さらに今後は、ナノマテリアルの物性として粒子サイズ以外の、表面性状や形状・素材なども考慮し、非晶質ナノシリカの物性・動態とアトピー病態の促進の因果関係を精査する必要があるものの、安全かつ安心してナノマテリアルを化粧品分野に展開し得ることが判明した。既に筆者らは、尾静脈内投与モデルを用いた検討ではあるものの、表面性状を制御することで非晶質ナノシリカによる生殖発生毒性を回避できる可能性、¹¹⁾ 及び細胞レベルでの DNA 損傷発現や抗原処理過程の影響に関しても軽減できることを見い出している（未発表データ）。以上の事実を加味すると、本検討で認められた非晶質ナノシリカによる AD 病態の促進は、表面性状を制御するだけで回避できる可能性がある。さらに、ナノマテリアルの分散/凝集状態や純度といった品質情報をも考慮し、物性・品質-動態-生体影響の情報を考察することで、ナノマテリアル特有の物性・品質に応じた規制・ガイドラインの策定及び NOAEL や ADI の設定につながり、最終的には、有効かつ安全なナノマテリアルの開発に資する基盤情報になると期待している。なお、本稿では深く言及しなかったが、動物愛護の観点から、ナノマテリアルの安全性評価においても、化粧品分野で多用されるヒト細胞株活性化試験（human cell line activation test; h-CLAT）など、動物実験に替わる代替法の確立、利用が重要となってくるであろう。将来的に、筆者らの Nano-Safety Science 研究が、有効性と安全性を兼ね備えた高品質なナノ化粧品の開発の一助となり、人類の高質な生活の実現に貢献できることを期待している。

謝辞 本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究B一般、日本学術振興会科学研究費補助金(学術研究助成基金助成金)挑戦的萌芽研究、文部科学省地域科学技術振興施策知的クラスター創成事業、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業、厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業、厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業、環境省地球環境研究総合推進費、内閣府食品安全委員会食品健康影響評価技術研究、財団法人コスメトロジー研究振興財団、財団法人喫煙科学研究財団、財団法人武田科学振興財団、財団法人薬学研究奨励財団の支援を賜りました。ここに深謝申し上げます。また、本総説で紹介した研究内容は、大阪大学大学院薬学研究科 助教 吉川友章先生、国立医薬品食品衛生研究所 鍋師裕美先生、医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト プロジェクトリーダー 角田慎一先生、サブプロジェクトリーダー 鎌田春彦先生、プロジェクト研究員 阿部康弘先生、長野一也先生を始めとする多くの方々の連携によって得られた共同成果であり、この場をお借りして御礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Bio-materials*, **31**, 6833–6842 (2010).
- 2) Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Pharmazie*, **65**, 596–599 (2010).
- 3) Morishige T., Yoshioka Y., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **392**, 160–165 (2010).
- 4) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Pharmazie*, **65**, 199–201 (2010).
- 5) Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y., *Bio-materials*, **32**, 3–9 (2011).
- 6) Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y., *Pharmazie*, **66**, 727–728 (2011).
- 7) Morishita Y., Yamashita K., Yoshikawa T., Terada Y., Nabeshi H., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y., *Pharmazie*, **66**, 808–809 (2011).
- 8) Nabeshi H., Yoshikawa T., Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., *Nanoscale Res. Lett.*, **6**, 93 (2011).
- 9) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Bio-materials*, **32**, 2713–2724 (2011).
- 10) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Part. Fibre Toxicol.*, **8**, 1 (2011).
- 11) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y., *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 321–328 (2011).
- 12) Yoshida T., Yoshioka Y., Fujimura M., Yamashita K., Higashisaka K., Morishita Y., Kayamuro H., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., *Nanoscale Res. Lett.*, **6**, 195 (2011).
- 13) Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Ichihashi K., Uji M., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., *Part. Fibre Toxicol.*, **9**, 3 (2011).

- 14) Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Narimatsu S., Yao X., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Arch. Toxicol.*, **86**, 1297–1307 (2012).
- 15) Morishita Y., Yoshioka Y., Satoh H., Nojiri N., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **420**, 297–301 (2012).
- 16) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Kondoh M., Yagi K., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Nanotechnology*, **23**, 045101 (2012).
- 17) Napierska D., Thomassen L. C., Lison D., Martens J. A., Hoet P. H., *Part. Fibre Toxicol.*, **7**, 39 (2010).
- 18) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, JACC Report, No. 51, 2006.
- 19) Sadrieh N., Wokovich A. M., Gopee N. V., Zheng J., Haines D., Parmiter D., Siitonen P. H., Cozart C. R., Patri A. K., McNeil S. E., Howard P. C., Doub W. H., Buhse L. F., *Toxicol. Sci.* **115**, 156–166 (2010).
- 20) Yamashita H., Michibata Y., Mizukami H., Ogihara Y., Morita A., Nose M., *Exp. Dermatol.*, **14**, 438–444 (2005).
- 21) Konishi H., Tsutsui H., Murakami T., Yumikura-Futatsugi S., Yamanaka K., Tanaka M., Iwakura Y., Suzuki N., Takeda K., Akira S., Nakanishi K., Mizutani H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11340–11345 (2002).
- 22) Ziegler S. F., Artis D., *Nat. Immunol.*, **11**, 289–293 (2010).