

平成 28 年度

埼玉工業大学大学院 工学研究科

# 博士 研究 論文

新規機能性材料を用いた育毛剤の開発と皮膚改善  
への応用に関する研究

氏 名 安 鋼

指導教員名 巨 東英 教授

提出日 平成二十九年三月十七日

指導教員認印

# 目 次

第一章 緒論	1
1.1 研究背景	1
1.2 超微粒子の研究歴史	2
1.3 超微粒子の種類及び使用状況	5
1.4 ナノマテリアルの安全性問題	8
1.5 本研究の目的	11
1.6 論文構成	11
1.7 参考文献	12
第二章 磁性微粒子の合成	17
2.1 各種類のナノ素材	17
2.1.1 無機ナノ微粒子の合成	18
2.1.2 有機・高分子ナノ微粒子の合成	19
2.1.3 金属ナノ微粒子の合成	20
2.2 ナノ微粒子の合成理論	21
2.3 ナノ微粒子の合成法	24
2.4 液相からの粒子合成方法	26
2.5 磁性微粒子の作成	27
2.6 小括	28
2.7 参考文献	29
第三章 育毛成分のコーティングに関する検討	31
3.1 育毛剤の研究背景	31
3.2 育毛の基礎理論	34
3.3 育毛試験の目的	35
3.4 ナノ育毛剤試作品の作製	36

3.4.1	液相沈殿法によるマグネタイト超微粒子の調製	36
3.4.2	マグネタイト粒子表面のSiO <sub>2</sub> コーティング	36
3.4.3	マグネタイト粒子表面のMg(OH) <sub>2</sub> コーティング	38
3.4.4	育毛成分の選定	38
3.4.5	マグネタイト超微粒子表面の育毛剤のコーティング	40
3.5	育毛試験方法	42
3.5.1	C3H マウスによる育毛試験	42
3.5.2	毛乳頭細胞を用いた細胞増殖試験	42
3.5.3	三次元皮膚モデルによる安全性試験	42
3.6	解析装置の概要	44
3.6.1	TEM の原理及び測定方法	44
3.6.2	ZEECOM の原理及び測定方法	45
3.7	ナノ育毛剤試作品の評価	46
3.7.1	TEM によるSiO <sub>2</sub> をコーティングしたナノ育毛剤試作品の観察	46
3.7.2	ZEECOM によるゼータ電位の測定	47
3.7.3	SiO <sub>2</sub> をコーティングした育毛剤の実験結果	47
3.7.4	SiO <sub>2</sub> をコーティングした育毛剤使用後の毛根部の観察	49
3.7.5	SiO <sub>2</sub> をコーティングした育毛剤使用後マウス皮膚切片の観察	50
3.7.6	SiO <sub>2</sub> をコーティングした育毛剤を用いた毛乳頭細胞実験	50
3.7.7	マウス血液中におけるFe濃度分析	60
3.7.8	TEM によるMg(OH) <sub>2</sub> をコーティングしたナノ育毛剤試作品観察	61
3.7.9	EDS によるMg(OH) <sub>2</sub> をコーティングした試作品の評価	63
3.7.10	Mg(OH) <sub>2</sub> をコーティングした育毛剤の実験結果	64
3.7.11	Mg(OH) <sub>2</sub> をコーティングした育毛剤の安全性評価	65
3.8	ナノ育毛剤試作品の長期使用による評価	66
3.8.1	動物の長期使用による評価	66
3.8.2	材料と方法	66
3.8.3	HE 染色の観察結果	68
3.8.4	PAS 染色の観察結果	73

3.8.5 EDSによる皮膚中のマグネタイト粒子の確認結果	78
3.8.6 EDSによる肝臓のマグネタイト粒子の確認結果	79
3.8.7 EDSによる腎臓のマグネタイト粒子の確認結果	81
3.9 小括	84
3.10 参考文献	85
第四章 アトピー性皮膚炎の治療実験	87
4.1 アトピー性皮膚炎の治療背景	87
4.2 皮膚の構造及び物質浸透理論	92
4.2.1 皮膚構造	92
4.2.2 物質の透過経路	93
4.2.3 皮膚の透過限界	93
4.2.4 皮膚透過係数及び薬剤浸透の関係	94
4.3 ナノアトピー性皮膚炎治療薬剤試作品の作成及び観察	95
4.3.1 ナノアトピー性皮膚炎治療薬剤試作品の作成	95
4.3.2 TEMによるナノアトピー性皮膚炎治療薬剤の試作品の観察	95
4.4 アトピー性皮膚炎マウスモデル作成実験	96
4.4.1 アトピー性皮膚炎モデルマウスの作成実験	96
4.4.2 アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚切片の観察	96
4.5 治療実験と結果	98
4.5.1 治療実験	98
4.5.2 アトピー性皮膚炎マウスの外見観察	98
4.5.3 皮膚切片の観察	98
4.6 細胞安全実験結果	99
4.7 小括	101
4.8 参考文献	102
第五章 皮膚がん治療の検討	106
5.1 皮膚がんの研究背景	106

5.2 皮膚がんマウスモデルの作成	109
5.2.1 皮膚がんの研究歴史	109
5.2.2 皮膚がんの誘導操作	110
5.2.3 皮膚がんマウスモデルの作成	112
5.2.4 肉眼による症状確認	113
5.2.5 皮膚切片の観察による皮膚がんの確認	113
5.3 皮膚がんの治療結果の評価	115
5.4 ヒト皮膚がん細胞への影響検討	116
5.4.1 ヒト皮膚がん細胞の培養実験	116
5.4.2 磁性粒子の投与実験	117
5.4.3 ナノ治療薬剤の投与実験	118
5.4.4 デリバリシステムの応用	120
5.5 小括	121
5.6 参考文献	122

## 第六章 疎水化セルロースの特性および化粧品への応用 . . . . . 124

6.1 セルロース系増粘剤	124
6.2 新規疎水性セルロース	125
6.3 新規疎水性セルロースの特徴	127
6.3.1 HM- HPMC の増粘機構及び粘度特性	127
6.3.2 HM- HPMC の溶解方法及び注意点	129
6.4 HM- HPMC の毛髪に対する特性	129
6.4.1 HM-HPMC の性状及び感触評価	129
6.4.2 ダメージ毛への塗布時の観察	130
6.5 HM- HPMC の安定性及び頭皮刺激性	132
6.5.1 HM-HPMC の安定性	133
6.5.2 頭皮への刺激性	133
6.6 HM- HPMC のヘアトリートメントへの応用	134
6.6.1 処方評価及び官能確認	134

6.6.2 製造工程の注意点	137
6.7 育毛剤への応用	138
6.7.1 頭皮中の角質水分量の改善	138
6.7.2 毛髪の感触改善	140
6.7.3 頭皮の硬さ改善	141
6.8 小括	142
6.9 参考文献	143
第七章 結論及び考察	144
7.1 結論	144
7.2 考察	147
7.3 今後の課題及び今後の展望	154
7.4 参考文献	155
関連文献	157
謝辞	159

# 第一章 緒論

## 1.1 研究背景

ナノテクノロジーは、ナノメートルの単位で原子や分子の世界における制御技術である。近年では、ナノテクノロジーの進化や発展はかなり進み、微細な加工技術によって超大規模集積回路等の小型化を実現した。1990年代以来、インターネット情報技術は急速に進歩し、これらの技術進歩によって、物質の超微細構造を観察し、さらに制御することは非常に重要なことである。現在、ナノテクノロジーは、エレクトロニクス分野のみではなく、医療、バイオテクノロジー、新エネルギー、燃料電池、環境等の様々な分野においても幅広く応用されている。

マグネタイト微粒子は、化学的に安定で比較的大きな磁性を有する微粒子であることから、これまで磁気記録媒体、磁性流体、あるいは磁性トナーなど、さまざまな用途に広く利用されてきた<sup>1),2)</sup>。そのうち、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 等のマグネタイト微粒子は独特な性質を有し、その表面を自在に修飾することによって、バイオ医療分野での様々な実用の道が拓かれる<sup>3)</sup>。近年では、マグネタイト微粒子は、免疫分離の担体等への利用が報告されており、医療やバイオテクノロジーの分野における応用がかなり注目されている。1960年代から、マグネタイト微粒子の研究及び製造が行われており、しかし、研究の初期段階では、均一なマグネタイト微粒子が製造されることができなかった。その製造問題によってマグネタイト微粒子の応用が制限されていた。近年では、マグネタイト微粒子の製造技術の進歩と共に、均一なマグネタイト微粒子が製造されるようになるようになっている。

マグネタイト微粒子の応用範囲が広がることによって、新しいマグネタイト微粒子の特性が要求され、それに対応に適したマグネタイト微粒子の新規の製造方法の開発が実施されている。また、製造方法の進歩に伴い、優れた磁気特性及び良好な表面修飾の能力を有するマグネタイトナノ粒子は、医療分野の造影剤、ドラッグデリバリーシステム (DDS) などの医療分野での磁気制御に応用するため、開発されている。そのうち、バイオテクノロジー、医療産業ではドラッグデリバリーシステムの一つとして微粒子中へ薬物を包埋させたナノ粒子担体としてマグネタイトナノ粒子の研究開発が考案されている。

近年以来、ナノ技術は飛躍的な発展に伴い、薬物治療の分野においてもかなりの成

果が得られているが、未だに、薬剤の副作用による懸念があり、十分に薬剤の効果を発揮しにくい場合がある。ドラッグデリバリーシステムが最小限の薬剤使用によって最大な薬剤効果を発揮できる技術として非常に注目されている。

マグネタイト超微粒子の産業的な応用は、磁気性記録媒体をはじめ、医薬品、化粧品、バイオテクノロジー等の他分野に渡っている。小林らはマグネタイト超微粒子を用いた磁場誘導型温熱療法が開発されている<sup>4)5)6)</sup>。磁場誘導型温熱療法は新しいがん治療方法として注目されている。

マグネタイト超微粒子の透過性及び表面修飾等の特性を利用し、医療分野で疾病の治療だけでなく、医薬部外品や化粧品の分野においても活用できる。しかし、作用機構は未だに不明な点が多い。一方、ナノ微粒子は高い浸透効果によって、組織への刺激性及び炎症誘発等の安全性問題を起こす可能性があるという事例が報告されていた<sup>7)</sup>。マグネタイト超微粒子をはじめ、ナノマテリアルの有効性及び安全性に関する評価研究は非常に重要な課題である。本研究はマグネタイト超微粒子を用い、その表面に二酸化ケイ素、水酸化マグネシウム等の親水性膜をコーティングし、さらに外層に育毛剤成分、アトピー皮膚炎の治療薬、皮膚がんの治療薬等の治療成分をコーティングし、ナノ化薬剤を作成した。薬剤の効果及び安全性を評価した。

## 1.2 超微粒子の研究歴史

辞書によると、一般的な超微粒子の定義は、直径が微粒子(通常 $1\mu\text{m}$ 以上)よりもさらに小さい粒子のことである。超微粒子の流動性が高く、融点が下がり、表面積が大きく表面に活性があり、光学特性が変わるなど微粒子にない特性を有する粒子のことである<sup>8)</sup>。

日本での超微粒子の研究歴史によると、戦時、名古屋大学の上田良二教授が窒素状態において電球のフィラメントとタングステンのヒーターでの加熱により、蒸気状態のすずが超微粒子になることを発見した<sup>9)</sup>。ナノテクノロジーの最初の発表は、1959年、リチャードファインマン氏の発表に遡ることができる。その後、1961年、東京大学理学部教授の久保亮五氏が、金属の超微粒子では今までにない特徴を有する理論を提唱した<sup>10)</sup>。60年代の後半から同時の超微粒子の研究が始まった。1965年に田崎氏らによって超微粒子の磁性に関する研究が行われた。その頃から、超微粒子作製方法

が数多く提案され研究開発された<sup>11)</sup>。1970年代、磁性超微粒子を磁性記録素材として研究開発を実施した。

1981年、当時の科学技術庁により日本真空株式会社の林氏をリーダーとした「林超微粒子プロジェクト」を発足させた。このプロジェクトは、日本国の重要な国家政策として最初に実施されたプロジェクトである<sup>12)</sup>。21世紀に入ると、2000年、当時の米国クリントン大統領が「国家ナノテクノロジー・イニシアティブ (National Nanotechnology Initiative : NNI) (National Nanotechnology Initiative : NNI)」宣言を発表した<sup>13)</sup>。カーボンナノチューブ等の新しい材料工学の技術が日本で発明されていた。しかし、今後、米国はナノテクノロジーの研究技術で世界をリードするため、宣言を発表したと考えられる。

ナノテクノロジーは、新しい構造を有する物質を生成するために、100nm以下のサイズで物質制御の技術であると言われている。ナノサイズの物質制御による様々な新規の性質が発見されてきた。典型的な効果としては、超微粒子では原子数のうちで表面に出ている原子の数の割合が大きくなることによる表面効果などである。その他の性質として、超微粒子化による固体から液体に変化温度が減少することもある。これらのように粒子径が小さくなることによる現われる性質をサイズ効果と呼ばれている。

以上に述べたような特徴を有する超微粒子を代表としたナノテクノロジーは材料分野を始め、物質工学、生命科学、情報科学等の科学分野をベースとし、現在、ナノサイエンスの基礎となり、そして、物質工学、材料工学へと適用されることでナノテクノロジーが基盤技術として構築されていた。環境、医療、エネルギー、情報、電子等の分野においても、技術革新をもたらした<sup>14)</sup>。現在、カーボンブラック、酸化亜鉛、シリカ、酸化チタン等の主要なナノ微粒子素材が利用されている。その他、磁性微粒子は化粧品、医薬品等の多くの分野で使用されている。また、近年の研究は急速に発展し、今後、新しいナノ微粒子が開発され、様々な分野で応用されることが予想されている。

1898年、デンマークの **poulsen** は磁気記録用の磁性微粒子を作成した。1930年代では、日本の加藤、武井らによる酸化物の磁性を発見し、新規の作成方法を提案した<sup>15)</sup>。マグネタイト等の酸化鉄粒子をはじめの磁性微粒子の用途は非常に広く、特に

磁性記録媒体等に応用できる。また、磁性粒子の合成技術等を検討し、医薬品やバイオ分野で活用できる磁性粒子を用い、標的細胞への薬物輸送、体外診断用途等の検討も進めている。その他、化粧品業界において、酸化亜鉛、酸化チタン等の化粧品原料は、昔からメイクアップ製品、サンスクリーン製剤によく配合されている。これらの原料は、紫外線散乱効果は高いことが知られている。近年以来、散乱効果を向上させるため、ナノサイズの超微粒子（以下、ナノ微粒子と略する）が検討されていた。化粧品原料用のナノ微粒子素材は、酸化亜鉛、酸化チタン、シリカ、カーボンブラック等の成分が上げられる。化粧品分野で超微粒子の透過性、隠蔽性等の特徴を利用した応用が増えている。

ナノ微粒子成分は細胞間の隙間を透過し、皮膚深部まで浸透しやすくなり、皮膚深部まで送達することができる。メイクアップ製品において酸化チタン、シリコンをナノ素材の配合による滑り性及び肌なじみを改善し、また、酸化亜鉛超微粒子を吸着させ、自然な光沢感や透明感を実現することができる。サンスクリーン製剤では酸化チタン等の超微粒子成分の配合により、皮膚表面の乱反射を抑制し、皮膚表面の滑り性を改善し、そして、皮膚への密着性を向上し、被膜形成により顕著な紫外線防止効果が見られた。

ナノ微粒子は顕著な浸透効果を有する一方で、浸透力や触媒能力の高いの理由で遺伝毒性、発がん性、炎症誘発性等の安全性に関するトラブルを起こす懸念がある。現在、ナノ微粒子による健康被害を及ぼす報告は極めて少ない。しかし、ナノ微粒子は、小さい粒子径を有し、従来の素材と異なる特徴と機能により、人体への健康被害を及ぼす可能性がある。

ナノ微粒子成分は、化学物質として完全に既存であるが、粒子径が分子レベルに類似していることより、生体への反応性が顕著に向上されている。皮膚組織への透過性も上昇し、既存物質とは異なる安全性基準が必要であると考えられている。そのうち、本来不溶性の物質は、ナノ微粒子の粒子径にすることにより大きな溶解性を示す場合がある<sup>16)</sup>。皮膚に塗布されたナノ粒子が、「金属イオンの供給源」として持続的に金属イオンを溶出し、皮膚細胞に対して影響を及ぼすかもしれない<sup>17)</sup>。

化粧品業界では、ナノ微粒子の安全性を評価するため、日本化粧品工業連合会は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託調査研究「ナ

ノ原料を使用した化粧品の安全性評価システムに関する基礎調査」を調査依頼し、平成16年12月25日から平成17年3月18日の間実施した<sup>18)</sup>。しかし、ナノ微粒子の安全性評価の方法について未だに完全に確立されていないため、ナノ微粒子の安全性に関する明確な結論が出ていない。今後にも継続的にナノ微粒子の効果性、安全性に関するついで調査する必要があると思われる。

### 1.3 超微粒子の種類及び使用状況

一般的に、100nm以下の粒子を超微粒子（ナノ微粒子）と呼ばれている。100nmを境目として、従来の微粒子を持っていない新しい特性が付けられている。ナノ微粒子の一番の特徴として、粒子径が小さいため、表面積がかなり増加し、その表面効果がよく知られている。ナノ微粒子の粒子径は可視光の波長より短くなり、磁性体の磁区より小さくなる。100nmの粒子径の磁性ナノ微粒子では多磁区粒子から単磁区粒子になり、磁気特性が変化する<sup>19)</sup>。鉄のような金属は強磁性物質であるが、ナノ微粒子化することにより交換相互作用力は小さくなり、磁性モーメントは揃わなくなり、強磁性を示さなくなる<sup>20)</sup>。

超微粒子で一つ重要な因子は、素材粉末に比べて粒子内部に対する表面の寄与が非常に大きいことである。表面の非化学量論性、表面欠陥にトラップされた光励起キャリアにより微粒子の特性が変化する。微粒子は凝集しようとする傾向が非常に高く、吸着種に対する特異な親和性を持つことも予想される<sup>21)</sup>。ナノ微粒子の粒子径が小さくなることにより表面エネルギーは結合エネルギーと比較し、無視できない状態までになり、ナノ微粒子化と共に表面エネルギー効果として、蒸気圧や溶解度の増大、結晶変態の安定性、融点現象、焼結温度の低下がある<sup>22)</sup>。

主要なセラミックス超微粒子の種類はTable 1-1に示した通りである。

Table 1-1 セラミックス超微粒子の種類<sup>23)</sup>

分類	超微粒子材料	分類	超微粒子材料
セラミックス材料	シリカ 板状アルミナ 繊維状アルミナ ジルコニア Y-PSZ スピネル タルク ムライト コーージェライト 炭化ケイ素	レアアース	酸化イットリウム 酸化セリウム 酸化サマリウム 酸化ランタン 酸化タンタル 酸化テルビウム 酸化ユーロピウム 酸化ネオジム
		光学材料	酸化亜鉛 酸化チタン フッ化マグネシウム
有色顔料	ヘマタイト コバルトブルー コバルトバイオレット コバルトグリーン	導電材料	酸化スズ アンチモン含有酸化スズ (ATO) スズ含有酸化インジウム (ITO)
磁性材料	マグネタイト Mn-Znフェライト Ni-Znフェライト	電圧材料	チタン酸バリウム PT, PZT, PLZT

以上の表に示した超微粒子は、通常では100nmの粒径以下で、微粒子にない特性を持っている粒子のことである。様々な種類の超微粒子が合成されている。通常では、金ナノ粒子、白金ナノ粒子、銀ナノ粒子等の金属ナノ粒子、酸化チタンナノ微粒子、酸化鉄ナノ粒子、酸化亜鉛ナノ粒子、酸化珪素等の酸化物ナノ粒子、窒化珪素ナノ粒子等の窒化物ナノ粒子、ポリスチレンラテックスナノ粒子等のポリマーナノ粒子が存在している。超微粒子の特徴として、分散性、可視光透明性、結晶性が上げられる。

現在、ナノ材料の種類、使用状況、用途情報は、以下のTable 1-2に示した通りであった。

Table 1-2 ナノ材料の種類、使用状況、用途情報<sup>24)</sup>

ナノ材料の種類	国内使用量	主な用途	将来用途
---------	-------	------	------

	(2006年)		
フラーレン	約 2 トン	スポーツ用品：100%	燃料電池、バイオ医療、化粧品
単層カーボンナノチューブ	約 100kg	研究開発中：100%	高速動作トランジスタ、燃料電池
多層カーボンナノチューブ	約 60 トン	半導体トレイ：90%、その他：10%	導電ペースト、蓄電デバイス、燃料電池、医療等
銀＋無機微粒子	約 50 トン	日用品、食品密封容器	－
鉄	200～300トン	家電・電気電子製品	－
カーボンブラック	約 83 万トン	タイヤ：95%、顔料：4% 等	燃料電池・化粧品・タイヤ
二酸化チタン	約 1,250 トン	化粧品：60%、トナー：33%、自動車塗料：5%	化粧品拡大、トナー・ディスプレイ用、反射防止フィルム
酸化アルミニウム	約 700 トン	家電・電気電子製品	－
酸化セリウム	2～3 トン	半導体関連の研磨剤	－
酸化亜鉛	約 480トン	化粧品	透明導電膜利用
二酸化ケイ素	約 13,500トン	シリコンゴム、塗料	既存用途の成熟化
ポリスチレン	約 10 トン	ディスプレイの反射防止	－
ナノクレイ	約 250 トン	塗料、化粧品、医薬品、食品添加物、触媒等	－
顔料微粒子等	約 800 トン	インクジェット	－
アクリル微粒子	約 225 トン	化粧品、インクジェット	－
カーボンナノファイバー	60～70 トン	リチウムイオン電池	スポーツ、燃料電池
白金	約 0.09 トン	食品、化粧品、触媒	家電・電気電子製品

超微粒子の分散性について、均一に分散できることは重要である。分散性の悪い超微粒子は凝集しやすく、単独な一次粒子が小さいとは言え、凝集によって形成した2

次粒子の粒子径は大きくなり、超微粒子の特徴を発揮し難いである。そのため、長い時間にわたり、沈殿せずに均一に分散することは大きな特徴となっている。

酸化物超微粒子は金属超微粒子に比べて屈折率が小さく、散乱及び反射が小さいため、金属イオンの遷移吸収による可視部の着色を除いて透明にすることができる。可視光の波長よりさらに小さい超微粒子の散乱は、レーリー散乱が主体となり、この領域の散乱は、粒径が小さくなると急激に散乱が小さくなり透明性を増す。

ナノテクノロジーは、革新的な機能や用途、雇用拡大といった側面も含めて、エネルギー、環境、医学、通信、運輸等の様々な分野において今後の国民生活に便益をもたらすことが期待されているが、利用面での研究開発とともに社会受容性の向上を図ること、特にヒト及び動植物へのばく露が懸念される工業的使用を目的にして意図的に製造されるナノ粒子材料がヒト及び動植物に影響を及ぼすことのないよう、管理が適切に行われることが必要である<sup>25)</sup>。

#### 1.4 ナノマテリアルの安全性問題

ナノマテリアルの利用は素材、重量、体積などを変えず、より広い表面積を有することで小型化等の利点がある。特に、化学触媒効率を向上させるために表面積を大きくすることが最重要課題である。ナノマテリアルは、ウイルスと同程度のサイズであるため、細胞内まで浸透し、ナノサイズ化薬剤を利用し、ナノDDS医薬品と呼ばれる技術となっている。以上のようにナノマテリアルは、生活をより良くする新しい素材として様々な利点がある。化粧品や健康食品、バイオ関連等に用いられ、今後もその利用範囲・規模が拡大すると見込まれています。医療の分野でも、ナノマテリアルやその製造技術を利用し、新しい薬剤輸送の開発が進められている。ナノ技術の進歩は、さまざまな新しい素材をもたらし、生活をより便利にするが、しかし、人間や環境に対して必ずしも有益であるとは限らない。

下記のFig. 1-1に示した通り、皮膚ばく露を想定した体内での懸念される影響の模式図であるが、組織において、ナノ粒子沈着⇒酸化ストレスといった影響が懸念されている。(厚生労働省 (2008))

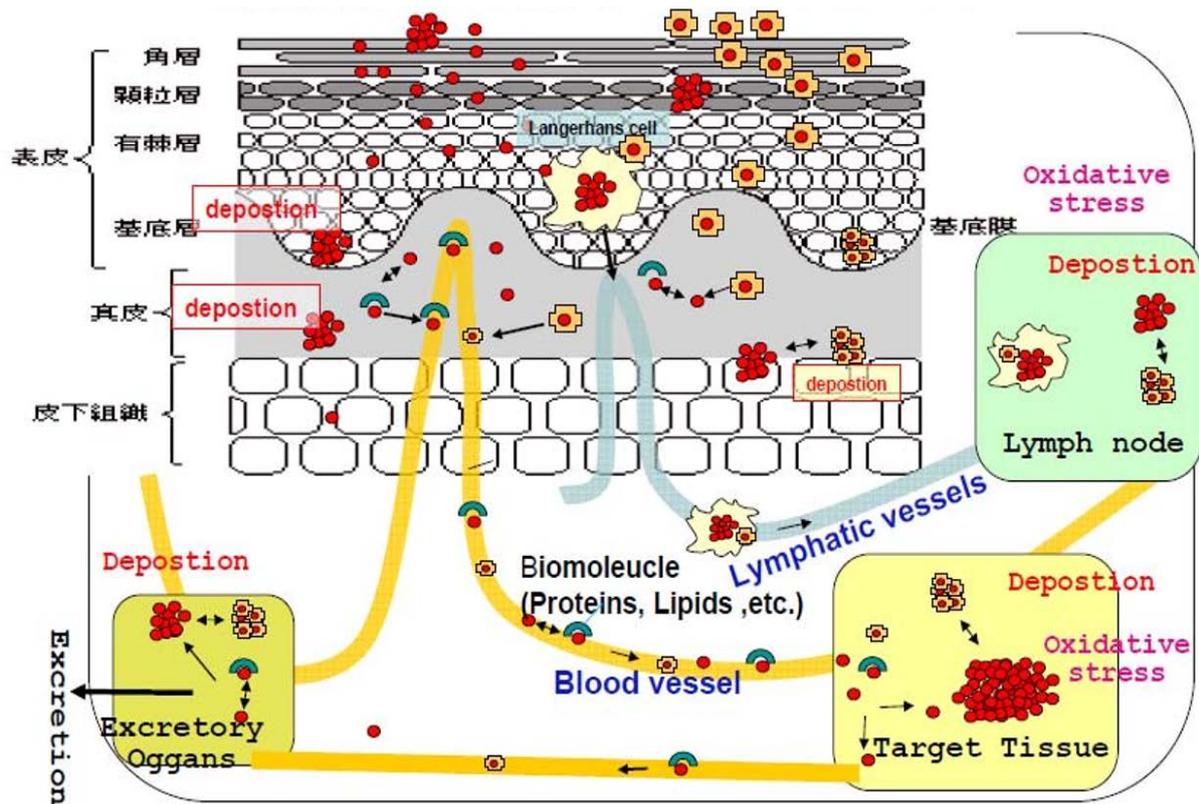


Fig. 1-1 懸念されるナノマテリアルの皮膚吸収—分布—蓄積<sup>26)</sup>

懸念されるナノマテリアルの皮膚吸収—分布—蓄積は厚生労働省第3回ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会、第3回ナノマテリアルの安全対策に関する検討会（第3回合同会合）資料から引用した<sup>27)</sup>。以上のFig. 1-1からナノ材料の毒性発現機序としては、酸化ストレス及び細胞障害を引き起こす可能性がある」と指摘した。

化粧品分野で焦点を当てる場合、ナノ素材も使用されている。化粧品に使用されているフラーレンに関しても顕著な障害の例は認められてはいないが、表皮の損傷部、目、口などから直接人体に入り込む可能性はあり、その無害性が証明されていない<sup>21)</sup>。そのほか、今までの研究成果によれば、症例が報告されている。例えば、日焼け止め等に使用される酸化亜鉛粒子からの亜鉛が皮膚内部までに浸透し、血液と尿中に観察されたことが報告されていた<sup>28)</sup>。さらに、ナノマテリアル化粧品を皮膚に塗布によりナノ粒子が人の皮膚の角質層を透過することが認められ、ナノ粒子の侵入によって人の免疫システムが影響を受ける可能性が認められた。特に表皮細胞に生じた傷やひびを通して、ナノ粒子の吸収が考えられるとした報告がある。細胞隙間に侵入したナノ粒子はより深部に進み、さらに皮膚に到達し、血液から吸収される可能性がある。

労働衛生分野において、施策のひとつに「ナノマテリアル安全対策調査業務」を立て、ナノ粒子の毒性メカニズム及び体内動態を解明することを中心として有害性の研究を行い、これへの安全対策を検討している。経済産業省は、ナノ技術開発を振興する立場で2005年に「ナノテクノロジー政策研究会」を設けた。さらに、2006年から「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」を施策として挙げ、ナノ粒子のリスク評価手法等の研究を実施し、リスク管理方策に関する検討を行い、産業技術総合開発機構（NEDO）に委託されて実施されていた。

ナノマテリアルの効果は顕著で、様々な分野で大きな期待がもたれている。しかし、人へのばく露、環境への放出がなされた後で、物質の負の性質が明らかになったときに、国や各企業は管理責任を明確にする必要があると考えられる。

このような観点から、ヨーロッパやアメリカでは、ナノマテリアルの開発と同時に社会的影響、安全、健康、環境等に与える影響の調査や研究が進められている。日本は、開発が先行する傾向があるが、最近、安全性に関する調査研究が開始している。2005年、国立環境研究所内にナノ粒子健康実験棟が完成し、ナノマテリアルの安全性に関する高度な実験を行えるようになっていた。それによって「環境中におけるナノ粒子等の体内動態と健康影響評価」（2010年終了）、「ナノマテリアルの毒性評価手法の開発と安全性に関する研究」（2011年開始）の2つの大きなプロジェクトが進められている。ナノマテリアルの生体影響に関する成果が発表されていた。例えば、吸入曝露実験に関する研究は、慢性的影響も調べられる大型の装置を用いた実験が行われています。細胞を用いた研究は動物実験の代替法としても注目されている。

現在、国内の研究機関だけでなく、海外との共同研究も積極的に行っている。ヨーロッパの研究グループ、北米を中心とする研究グループ、NanoBRIDGESやTITNTという国際コンソーシアムを立ち上げ、お互いに協力しながらナノマテリアルの安全性に関する意見交換や共同研究を行っている。ナノマテリアルの安全性についての調査研究は、日米欧の行政機関及び学術界、産業界において、国際的な取り組みも始まっている。

## 1.5 本研究の目的

本研究では共沈法を用い、PH を制御しながら同時に、塩化第二鉄[FeCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O]、塩化第三鉄[FeCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>O]の混合溶液と水酸化ナトリウム[NaOH]溶液が反応させ、マグネタイト超微粒子を合成した。漏斗を用いて吸引ろ過し、純水で洗浄して電解質(ナトリウムと塩素イオン)を除き、乾燥させ、マグネタイト超微粒子を合成した。その後、マグネタイト超微粒子をイオン交換水中に分散し、ケイ酸ナトリウム[Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>]と塩酸[HCl]を添加し、反応によりマグネタイト超微粒子の表面に SiO<sub>2</sub>をコーティングする。磁性微粒子に、水酸化マグネシウムを界面活性剤としてコーティングした。ナノ磁性粒子の表面にセファランチン、ニンジンエキス等の育毛剤の有効成分をコーティングし、ナノ育毛剤サンプルを作成した。

さらに、アトピー性皮膚炎の治療薬剤であるプレドニゾロンをコーティングし、アトピー性皮膚炎と皮膚ガンの治療薬剤試作品を作製した。治療実験、細胞安全実験、ヒト皮膚ガン細胞に対して実験を行い、作製したナノ治療薬剤試作品の治療効果を検証し、さらに外部磁石で薬剤を誘導できることを確認した。

また、以上の結果より、ナノ治療薬剤の経皮浸透経路等を研究し、さらにマグネタイト微粒子の浸透を考察し、この浸透機構の仮説を確立した。

## 1.6 論文構成

本論文は七章で構成されている。第一章では、研究背景、歴史、現在の研究状況、本研究の目的及び構成を述べた。第二章では、超微粒子の合成方法を述べた。主な参考文献は 29)、30)、31)、32)、33)、34)、35)である。第三章では、育毛成分を合成したマグネタイト超微粒子の表面にコーティングを説明し、TEM によるナノ育毛剤試作品を観察し、C3H マウスの背部を用い、発毛状況を観察した。また、皮膚の切片や毛根部の観察によりナノ育毛剤試作品は育毛効果を評価した。また、ヒト皮膚細胞由来の三次元皮膚モデルによる安全性試験を行い、安全性を確認した。主な参考文献は 36)、37)、38)、39)である。第四章では、治療薬剤であるプレドニゾロンをマグネタイト超微粒子の表面にコーティングし、ナノ治療薬剤試作品の作成を説明し、そして、TEM によるナノアトピー性皮膚炎治療薬剤を観察し、アトピー性皮膚炎に対する治療効果を確認した。また、ヒト皮膚細胞由来の三次元皮膚モデルによる安全性試験を行

い、安全性を確認した。主な参考文献は 40)、41)、42)、43)、44)、45)である。第五章では、ヌードマウスモデルを用い、0.3%の20-メチルコラントレン溶液を塗布し、皮膚扁平上皮がんを誘発させ、がん腫形成が確認された。皮膚扁平上皮がんモデルマウスの皮膚切片を観察した。磁性流体及び治療薬剤をコーティングした磁性流体を10日間で塗布したマウスの皮膚切片を作成し、3種類の異なる種類の磁性流体の塗布による皮膚がんに対する効果を確認し、さらに治療薬剤をコーティングした磁性治療剤による皮膚がんへの治療効果を確認した。また、ヒト皮膚がん細胞への影響を調べるため、磁性流体の投与実験を行った。ヒト皮膚ガン細胞に対して実験を行い、作製したナノ治療薬剤試作品の治療効果を検証し、さらに外部磁石で薬剤を誘導できることを確認した。主な参考文献は 46)、47)、48)、49)である。第六章では、新規疎水性セルロースの特徴を紹介し、毛髪に対して柔軟性、すべり性及び瑞々しさを付与する効果を検証し、育毛剤の開発分野での応用を述べた。主な参考文献は 50)、51)である。第七章では、以上の結果をまとめ、結論を総括し、さらに皮膚浸透の角度から考察した。主な参考文献は 52)、53)、54)、55)、56)である。

本論文において、液相共沈法によりマグネタイト超微粒子を合成し、マグネタイト超微粒子の表面に治療薬剤をコーティングし、育毛剤、アトピー皮膚炎治療剤及び皮膚がん治療薬剤への応用について検討した。その作用機構について仮説を確立したが、今後、薬剤の作用機構及びマグネタイト超微粒子の経皮透過、浸透、代謝に関する更なる研究が必要であると考えられる。

## 1.7 参考文献

### 参考文献

- 1) G. Cordova et al., *Nano Biomedicine and Engineering* ,2014, 6, 31.
- 2) S. F. Hasany et al, *Current Nanoscience* , 2013, 9, 561.
- 3) J. Xie and S. Jon: “Magnetic nanoparticle-based theranostics” , *Theranostics* 2012, 2, 122
- 4) Shinkai, M. , Yanase, M. , Honda, H. , Wakabayashi, T. , Yoshida, J. , and Kobayashi, T. , *Jpn. J. Cancer Res.* , 87, 1179-1183(1996)
- 5) Yanase, M. , Shinkai, M. , Honda, H. , Wakabayashi, T. , Yoshida, J. , and Kobayashi, T. ,

- Jpn. J. Cancer Res. , 88, 630-632 (1997)
- 6) Yanase, M. , Shinkai, M. , Honda, H. , Wakabayashi, T. , Yoshida, J. , and Kobayashi, T. ,  
Jpn. J. Cancer Res. , 89, 463-469 (1998)
- 7) 吉川友章ほか「研究開発 化粧品ナノマテリアルの安全評価の現状と技術的課題—  
安全なナノマテリアルの開発支援に向けて—」 『Cosmetic stage』 4 巻 4 号,  
2010. 2, pp. 45-46.
- 8) <http://www.weblio.jp/content/%E8%B6%85%E5%BE%AE%E7%B2%92%E5%AD%90>. Downlo  
aded 15, Dec. 2016.
- 9) 上田良二・紀本和男「陰極線廻折法による亜鉛煤の研究」『應用物理』第18巻, 第  
2-3号 (1949年)]。
- 10) R. Kubo, J. Phys. Soc. Jap., 17 (1962) 975-986
- 11) I. Nakatani, T. Furubayashi, T. Takahashi and H. Hanaoka, J. Magnetism and  
Magnetic Materials, 65 (1987) 261-264.
- 12) 独立行政法人 工業所有権情報 研修館 ナノ粒子製造技術 (2006) 6-7
- 13) 米国「国家ナノテクノロジー・イニシアティブ」戦略プラン
- 14) 国立研究開発法人科学技術振興機構 研究開発戦略センター 研究開発の俯瞰報告  
書 ナノテクノロジー・材料分野、P3 (2015年)
- 15) 加藤與五郎; 武井武 (1933). “酸化金属磁石に就て”. 工業化学雑誌 (社団法人  
日本化学会) **36** (4): 506-509.
- 16) Horie M, Nishio K, Fujita K, Kato H, Nakamura A, Kinugasa S, Endoh S, Miyauchi  
A, Yamamoto K, Murayama H, Niki E, Iwahashi H, Yoshida Y, Nakanishi J.:  
Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and  
subsequent Ni(II) release. Chem Res Toxicol., 22, 1415-1426, 2009.
- 17) 化粧品 向け ナノ粒子 の安全性評価を目的とした in vitro スクリーニングシス  
テムの構築. ー物理・化学的性状と安全性との関連、P158, 堀江佑範
- 18) 日本化粧品工業連合会『平成16年度「ナノ原料を使用した化粧品の安全性評価シ  
ステムに関する基礎調査」報告書』(NEDO 平成16年度委託調査研究) 2005. 3. 18.  
(<http://www.jcia.org/nano/nedo.pdf>)
- 19) 米 山 宏: 日本写真学会誌、半導体超微粒子の光化学特性 (1991)

- 20) 微粒子・ナノ粒子、P. 10, 高分子学会
- 21) 斉藤光正：ATO 超微粒子による透明熱線遮蔽材料，コンバーテック，25，7，p. 1-5  
(1997)
- 22) 小泉光恵：ナノマテリアル技術，P. 10
- 23) 住友大阪セメント（株）テクニカルレポート，1997，p. 47，（1997）
- 24) 「第 2 回ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に 関する検討会、第 2 回ナノマテリアルの安全対策に関する検討会（第 2 回合同会合）、資料 3：ナノマテリアルの用途・生産量調査結果報告」，P. 1-2
- 25) 平成 21 年度環境省「ナノ材料環境影響基礎調査検討会報告資料」
- 26) 厚生労働省、第 3 回ナノマテリアルの安全対策に関する検討会（「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価及び体内動態評価に関する基盤研究」、2008
- 27) 石原陽子「化粧品とナノ粒子の皮膚・人体への安全性」『Cosmetic stage』2 巻 2 号，2007. 12，p. 62.
- 28) Brian Gulson et al., “Dermal absorption of ZnO particles from sunscreens applied to humans at the beach, 2010. 2.  
(<http://realizebeauty.files.wordpress.com/2010/02/iconn2010-abstract-gulson1.pdf>. Downloaded 15, Dec. 2016
- 29) 加藤昭夫、陶山容子：表面化学 Vol. 8(1987)、No. 5p、316-324
- 30) 室井宗一：「超微粒子ポリマーの最先端技術」、pp. 1-97（1991）
- 31) 大塚研一：「気相法による金属超微粒子の製造とその特性と応用」、Vol. 5、No1、pp. 5（1990）
- 32) 無機系微粒子・超微粒子の技術と応用の最新動向、pp. 10-46、東レリサーチセンター（1994）
- 33) LaMer、 V. ; Dinegar、 R. J. Am. Chem. Soc. 1950、 72、 4847-4854
- 34) 片山晃男：成長抑制剤を使用した反応晶析法による硫酸鉛結晶の単分散微粒子生成手法の研究、3、2004
- 35) 内藤 牧男、棟方 裕一、牧野 尚夫、金村 聖志：電池製造・開発を支える粉体プロセス入門、2010

- 36) [https://www.dermatol.or.jp/uploads/uploads/files/guideline/1372913324\\_2.pdf](https://www.dermatol.or.jp/uploads/uploads/files/guideline/1372913324_2.pdf). Downloaded 25, Dec. 2016.
- 37) <http://ikumoukizoku.com>. Downloaded 15, Dec. 2016
- 38) 小友 進、日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 119、167～174 (2002)
- 39) 皮膚の科学 Cepharanthine の毛成長促進作用の検討、Vol. 4.、No2.、P99-103、(2005)
- 40) 古江増隆、佐伯秀久、古川福実ほか：日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2008 版、日皮会誌、2008；118:325-342.
- 41) 加藤則人、佐伯秀久、中原剛士ほか：日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2016版、日皮会誌、2016；126(2):121-155.
- 42) Eichenfield LF、 Tom WL、 Berger TG、 et al: Guideline of care for the management of atopic dermatitis. Section2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies、 J Am Acad Dermatol、 2014；71: 116—132.
- 43) <http://www.nice.org.uk/guidance/ta81/resources/guidance-frequency-of-application-of-topical-corticosteroids-for-atopic-eczema-pdf>. P. 33 — 37. Downloaded 15, Dec. 2016
- 44) [http://www.kao.com/jp/skincare/structure\\_06.html](http://www.kao.com/jp/skincare/structure_06.html). downloaded 15, Dec. 2016
- 45) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, Exp. Dermatol., 9. 165-169 (2000).
- 46) 清水 宏：新しい皮膚科学、第2版、425-426
- 47) Cook、 J. W.、 et al: The production of cancer by pure hydrocarbon、 Pro. Roy. Soc. London (B) 117 318、 1935
- 48) 本多 徹 誠:二種発癌性物質の単独並びに併用投与による造癌実験について、福岡医.臨時増刊:3823～3846、昭34.
- 49) 谷田 昌 溥: 20-メチルコラントレンによる実験的マウス皮膚癌の研究皮膚. 第2巻・第4号、456-458. 昭和35年10月
- 50) Klemm、 Dieter; Brigitte Heublein、 Hans-Peter Fink、 Andreas Bohn (2005). “Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material”. *ChemInform*

36 (36).

- 51) 齋藤 泉、池田かおり、竹原光教、高岸 靖、尾原 栄、武藤泰明、薬剤学、**52** (4)、  
272–279 (1992)
- 52) Scheplein R. J., *J. Invest. Dermatol.*, 45, 334–347 (1965)
- 53) 木村 恵理子: 微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価, P. 30
- 54) Prow TW(1), Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, Wurm EM, Yoong C,  
*Adv Drug Deliv Rev.* 2011 May 30;63(6):470–91, Nanoparticles and  
microparticles for skin drug delivery.
- 55) [https://www.aist-riss.jp/wp-content/uploads/2014/10/TiO2\\_201109201.pdf](https://www.aist-riss.jp/wp-content/uploads/2014/10/TiO2_201109201.pdf).  
Downloaded 24, Dec. 2016.
- 56) 井藤 彰: *Kagaku to Seibutsu* 53(2): 82–88, 機能性磁性ナノ粒子を用いたティッシュエンジニアリング技術 (2015)

## 第二章 磁性微粒子の合成

### 2.1 各種類のナノ素材

ナノ素材種類は多くあるが、一般的に無機ナノ素材、有機・高分子ナノ素材等がある。

下記の Table 2-1 に示した通り、各種類のナノ素材は広い分野で応用されている。ナノサイズにより素材の構造を制御することにより素材の強度、耐食性、光学特性などの物性を飛躍的に向上させることができる<sup>1)</sup>。

Table 2-1 各種類のナノ素材一覧表<sup>1)</sup>

	材料	応用分野
無機	ナノ粒子	可変波長発光体、化学反応触媒、光触媒、化粧品、導電ペースト、塗料
	ナノメタル	超耐蝕金属、高強度金属 ナノメタルインク、配線材料
	ナノガラス	高強度ガラスナノ光学材料 (回折格子、フォトニック結晶、ナノ導波路)
	カーボンナノチューブ	高強度材料、ディスプレイ、燃料電池、走査プローブ探針、電子デバイス、配線材料
	フラーレン	潤滑、光電変換材料、機能性添加物
	ナノポーラスマテリアル	触媒、分離膜フィルタ
	ナノセラミックス	生体適合医用材料
	スピンエレクトロニクスナノ材料	超高密度メモリ、スピントランジスタ、量子計算デバイス
有機 / 分子	ナノ高分子	超高強度プラスチック、構造色フィルム・繊維、高機能光学素材、コーティング
	dendリマー	ドラッグデリバリーシステム、光エネルギー変換
	ナノ液晶	省エネルギーディスプレイ、電子ペーパー
	分子磁性体・分子伝導体	有機 EL、分子デバイス
	分子記録材料	超高密度光ディスク
	自己組織材料・分子チューブ	ナノテンプレート、コーティング
バイオ	リポソーム・ベクシル	ドラッグデリバリーシステム
	DNA・タンパク	自己組織性テンプレート、人工酵素、センシング材料
	アクトミオシン系・べん毛モータータンパク	分子アクチータ、分子モーター

ナノ微粒子に限定すると、無機ナノ微粒子、有機・高分子ナノ微粒子、金属ナノ微

粒子等に分けられる。

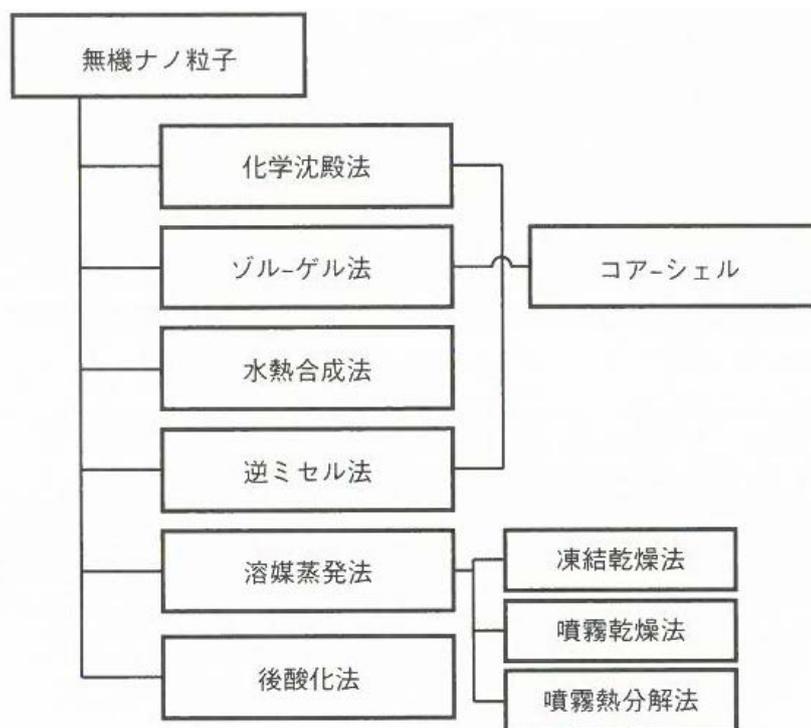
### 2.1.1 無機ナノ微粒子の合成

無機ナノ微粒子はバルク結晶とは異なる特異な性質を示すことが知られ、それらの性質はナノ構造に敏感である。そのため、精度良い構造で機能を高めた無機ナノ粒子を構成要素として巧妙に組織化されたナノシステムは、新材料創製につながると期待されている<sup>2)</sup>。

無機素材として、酸化鉄をはじめ、オキシ水酸化鉄等の酸化物ナノ粒子の構造及び用途を取り上げます。これらの物質には多くの多形がある点に気が付いた<sup>3)</sup>。無水酸化鉄はヘマタイト ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) と呼ばれ、普通の鉄鉱石で、赤色顔料として使用されている。また、マグネタイト (magnetite、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) は多くの磁性材料の作成の基礎物質である。酸化鉄はナノ粒子から構成されていることが多く、様々な粒径の酸化鉄粒子は、磁気記録材料、顔料、さらに薬剤の担体として使用されている。代表的な無機超微粒子の製造法は Table 2-2 に示した通りであった<sup>4)</sup>。

無機ナノ微粒子の従来の製造法は気相法で成長した無機ナノ粒子は殆どであるが、近年以来、技術の進歩により液相合成法は研究され、大きな成果が得られた。

Table 2-2 無機ナノ微粒子の合成法<sup>4)</sup>

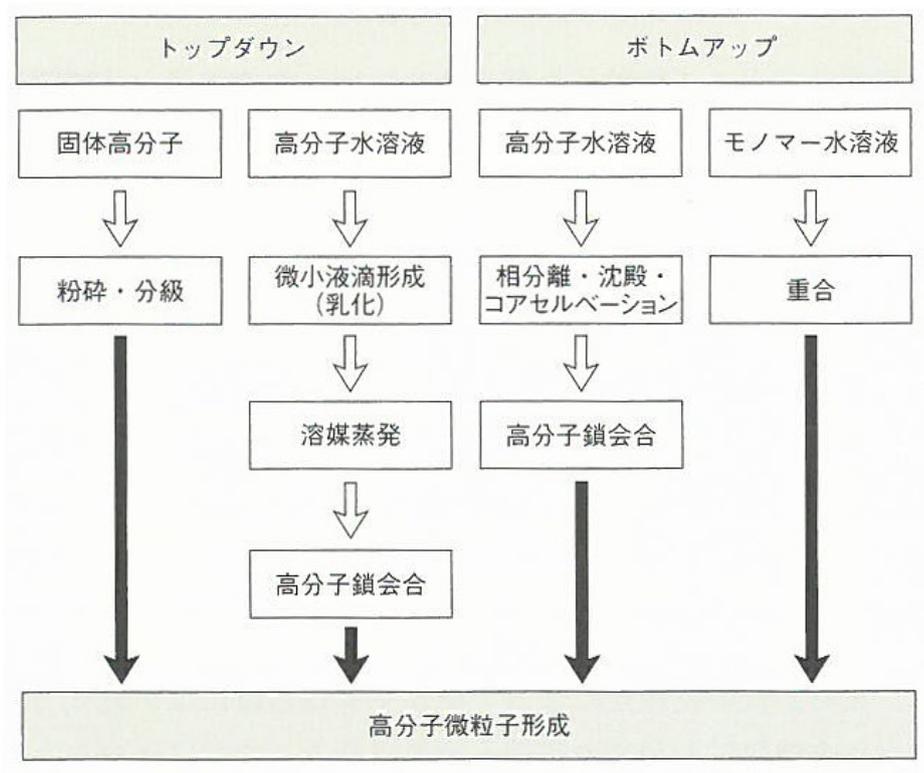


無機ナノ微粒子の主要な製造方法として、以上に示した通り、化学沈殿法、ゾール・ゲル法、水熱合成法、逆ミセル法、溶媒蒸発法、後酸化法などの方法が開発されている<sup>4)</sup>。

### 2.1.2 有機・高分子ナノ微粒子の合成

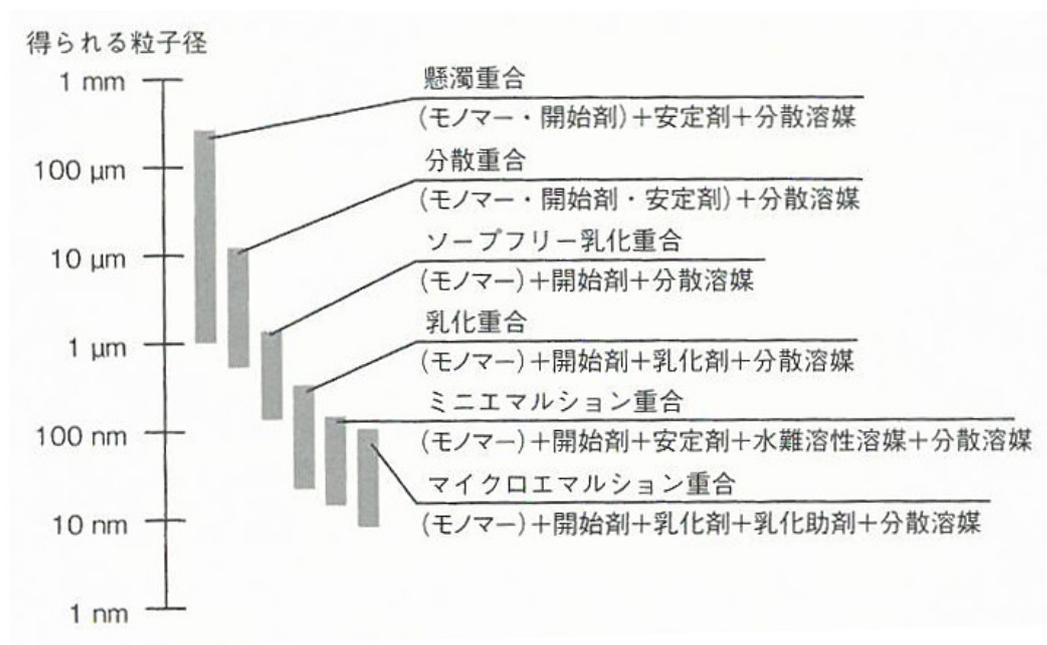
有機・合成高分子材料は多様な高分子材料素材として利用されている。有機系の微粒子は、例えばアクリル系ポリマー、シリコンポリマー、ポリアミド、ポリスチレン等がある。有機系の微粒子成分は、液晶ディスプレイ、導電性ポリマー等をはじめ、医療分野、環境、エネルギー関連での幅広い用途がある。特に、有機・高分子ナノ微粒子は優れた運動性、さらに表面修飾の制御し易いため、生体材料、化粧品、医療、バイオ等の多くの分野で幅広く応用されている。高分子超微粒子の通常の製造方法はトップダウン及びボトムアップである。有機・高分子ナノ微粒子の製造法は Table 2-3 に示した通りであった<sup>5)</sup>。

Table 2-3 トップダウン及びボトムアップアプローチによる高分子超微粒子の製造法<sup>5)</sup>



一般的に、有機・高分子ナノ微粒子はビニルモノマーの重合反応により製造されている。重合法で微粒子の製造は、懸濁重合、分散重合、ソープフリー乳化重合、乳化重合、ミニエマルジョン重合、マイクロエマルジョン重合などの重合法が使用されている。高分子超微粒子作成のための各種類の重合反応は Table 2-4 に示した通りである<sup>5)</sup>。

Table 2-4 高分子超微粒子作成のための各種類の重合反応<sup>5)</sup>



### 2.1.3 金属ナノ微粒子の合成

金属素材のナノ粒子ではナノ結晶合金、ナノ結晶シリコン、ナノ光触媒、ナノ金属クラスター、金属銀ナノワイヤ等の物質を含んでいる。1970年代以来、金属超微粒子の研究が非常に進んでおり、化学的、物理的な様々な方法での超微粒子の製造検討が行われていた。近年以来、金属ナノ粒子は多くの分野で注目されている。化学、電子をはじめ、バイオ、医療等の多くの研究分野など広い分野で応用されている。

金属ナノ微粒子の製造法は Table 2-3 に示した通りであった。金属ナノ微粒子の製造法としてボールミルでの粉碎法等の物理的な方法があるが、均一な粒子形成は難しく、また、より細かい粒径の金属ナノ微粒子の形成は非常の困難である。一方、化学法はより微細な粒径を形成できるため、細かい粒子径の金属ナノ微粒子の製造に用い

られている。

金属ナノ微粒子の製造法は Table 2-5 に示した通りである<sup>6)</sup>。

Table 2-5 金属ナノ微粒子の製造法<sup>6)</sup>

分類	製法	原理	特徴
気相法	物理的方法 不活性ガス中蒸発法	低圧不活性ガス中で金属を加熱し、蒸発凝縮させる。	高純度、粒度分布せまく制御性良。適用は広いが高融点金属難。
	物理的方法 プラズマ中蒸発法	金属粉末をプラズマ中に供給し、超高温蒸気とし冷却過程で金属超微粒子を生成させる。	粒度分布広く、制御性充分でない。広く適用できる。
	物理化学的方法 水素プラズマ反応法	アークプラズマにより活性化した水素を溶融金属と反応させ、溶融金属を強制蒸発、凝縮させる。	粒度分布広く制御性充分でない。生産速度が大きい。化合物粉も適用可能。
化学的方法	気相化学反応法	金属ハロゲン化物等を気相水素還元する。	粒度分布せまく、制御性良。ハロゲン除去が必要。適用が限定。
液相法	化学的方法 沈殿還元法	液相反応による沈殿を乾燥後ガス還元する。	母塩の粒度・形状の影響あり。二次凝集も可能性あり。
	化学的方法 還元析出法	溶媒中で金属塩を還元剤により、直接還元し、超微粉を析出させる。	粒度分布せまく、制御性良好。それぞれの金属に応じて還元剤の選択が必要。かなり限定される。

## 2.2 ナノ微粒子の合成理論

ナノ微粒子の製造方法は、原子レベルから合成するビルドアップ法と、固体細かく粉砕するブレイクダウン法の2種類に分けることができる。各種類の製造方法によってナノ微粒子の粒子径は影響を受けている<sup>7)8)</sup>。

ビルドアップは原子レベルの原料から化学反応を利用して粒子を製造する方法である。粒子径の調節は粒子生成段階で大きさも同時に制御する方法と、一度生成した粒子に原料をさらに供給して粒子を成長させる方法がある。粒子を生成させ、粒子径を制御する場所として、気体、液体、固体中のいずれにおいても実施できる<sup>7)</sup>。

ビルドアップ法は、原子同士は、流体中で拡散し、接触、衝突が起こり、化学反応や物理的な凝縮析出により粒子を産生する方法である。分子数が少ない段階では、集合と離散を反復し、クラスター状態と呼ばれている。凝集分子数の増加によってクラ

スターは安定化し、一定の粒子径以上になる場合、原子・分子が離散しない安定な「核」を形成した。一般的に微粒子の生成は核生成、成長に分けられる<sup>7)</sup>。

単分散粒子生成機構は、速度論をベースとし、平衡的に生成する組成、構造材料が、速度論制御できる。制御されるのは固相析出時、核生成と成長の過程を経て、一般的にLaMer model によってその生成機構が説明できる<sup>9)10)</sup>。

溶液系にモノマーを供給することでナノ粒子を析出させる場合を想定し、モノマーのさらなる供給によりモノマーの過飽和状態が形成されると、モノマー分子の衝突により幼核が生成する。幼核は不安定で体積増加によるエネルギーが表面エネルギーを上回ることができない、核生成が促進されない。幼核は再溶解して分子あるいはクラスターの状態に戻る。残りの一部は成長し、臨界半径と呼ばれるある粒径以上に成長すると粒子が安定な状態となり、再溶解しなくなり核生成が促進される。

生成した核は核成長段階に移行しモノマーを消費することで成長する。更に結晶が成長し、溶質が核として固相と見なせる様になった状態が核生成と呼ばれる<sup>11)12)</sup>。その一方で新たな核生成も起こるため、この核生成期では溶液中で核生成と結晶成長と同時に進行していることになる。過飽和域を脱すると核生成は停止し、既存核の成長が主として起こる成長期に入る<sup>12)</sup>。

以上の過程をLaMer modelといいナノ粒子の成長メカニズムの基礎となっている。Fig2-1はLaMer modelを示した<sup>10)</sup>。Cs は溶質のバルク濃度または固体の溶解度であり、C\*max および C\*min は不安定域の最大濃度および最小濃度を表す。領域Ⅰは不安定核の生成期、領域Ⅱは核生成期、領域Ⅲは核の成長期である<sup>9)10)</sup>。

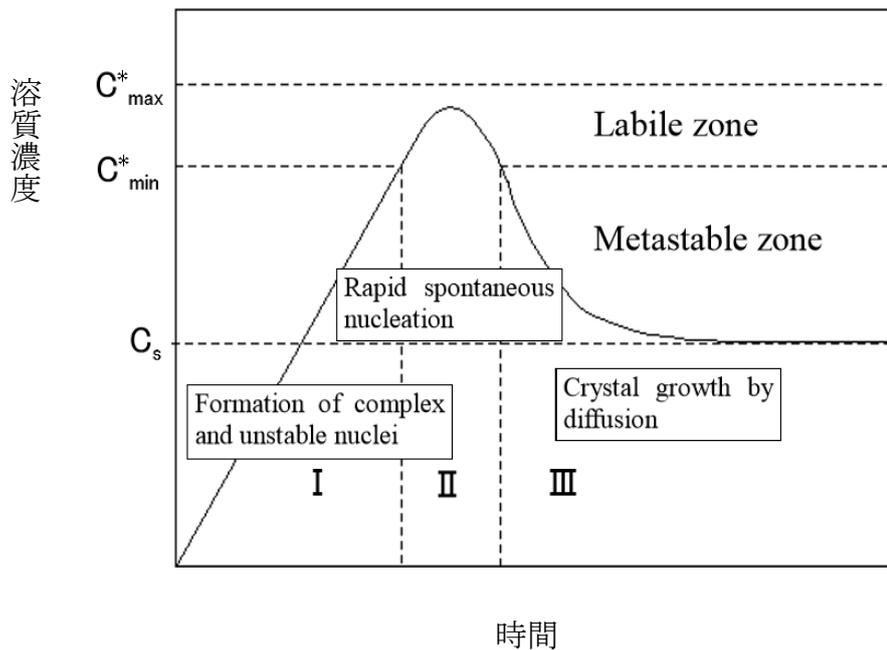


Fig. 2-1 LaMerモデルの模式図<sup>9)10)</sup>

粒子生成の段階では粒子径を調節できる。すなわち、核生成、成長段階を制御し、粒子生成場での原料量が一定の場合、内藤らの報告により、Fig2-1 (a) のように、核生成で多数粒子が生成されると、核を生成する原料が消費され、残った原料を粒子成長に使用できる原料の量は、核生成量が多いほど少なくなるため、粒子は成長できなくなる<sup>7)</sup>。

一方、核生成の濃度を抑えると、Fig2-2 (b) に示すように、粒子成長に使える原料の量が多く、原料の残留量は多くなり、そのため、大きな粒子を形成できる<sup>7)</sup>。

均一な粒子の作りには、核が生成場全体で同時に起き、次の成長段階に同時に移行する必要がある。成長段階にまでに新しい核生成を起こさないことが重要である。成長段階で核生成が発生すると、Fig2-2 (c) に示すように粒子径分布が発生することになる。実際に均一な粒子径が得られる製品は基本的に液相合成法に限られている<sup>7)</sup>。

粒子径が小さい程、少ない原料量で粒子が成長し、核生成の時間差によって、粒子径が不均一になり、粒子径の増加と共に、核生成の時間差による影響は小さくなり、粒子の均一性が増加される。以上の理由のため、核生成の時間制御は非常に重要な課題となっている。

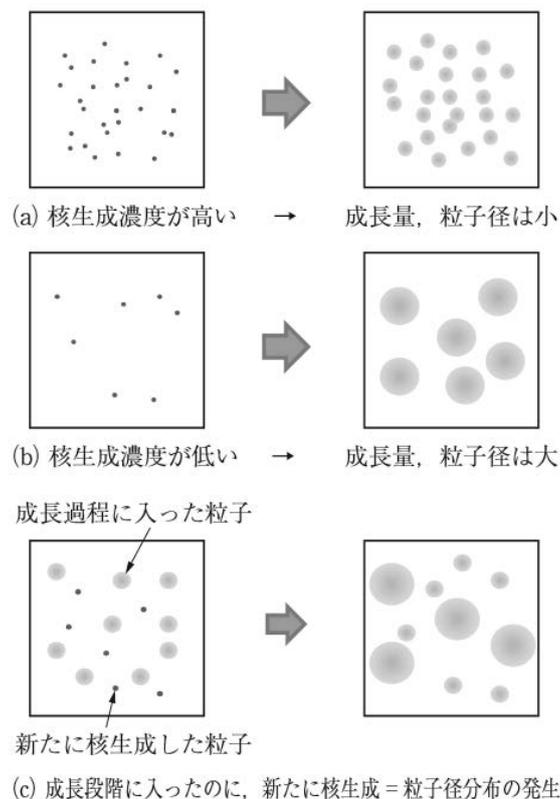


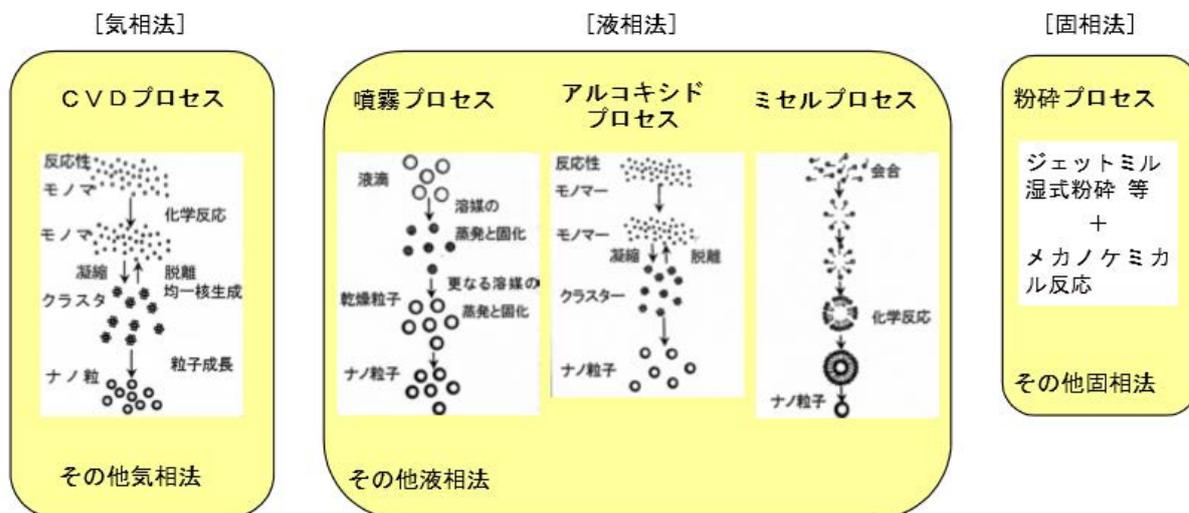
Fig. 2-2 核生成・成長条件による生成粒子の粒子径の変化<sup>7)</sup>

### 2.3 ナノ微粒子の合成法

ナノ超微粒子の製造方法は、粒子の作り方には、固相法、液相法、気相法の3つがある。固相法は大きな粒子に機械的なエネルギーを加えて粉砕しますが、粉砕ではサブミクロン(数百 nm)程度の大きさが限界と言われている。したがってナノ粒子は液相法もしくは気相法で一般的に作られる<sup>13)</sup>。

一般的にナノ微粒子の製造方法として、Table 2-4 に示した通りである<sup>14)</sup>。固相法による均一な粒子が得られることは困難であるため、超微粒子は気相法もしくは液相法等の化学的方法により製造される。液相法では、乾燥時に粒子を固く凝集させ、分散に大きなエネルギーが必要になるため、凝集させないことが最重要課題である。液相法は、工場での大量生産に優れているため、実際の工業生産に適している<sup>15)</sup>。

Table 2-4 ナノ微粒子の製造方法<sup>14)</sup>



超微粒子の化学的製造法は、化学反応を利用して物質の基本構成成分であるイオン、原子から核生成、成長の過程を経て、粒子をつくる方法である。化学的製造方法により、集積される原子やイオンの組合せによって多くの化合物粒子の製造ができ、また集積量の制御によって、理論的には任意の大きさの粒子を作成できる<sup>16)</sup>。

微粒子の製造法には化学的方法（気相法、液相法）と物理的方法がある。化学的製造法は、固相法、液相法および気相法に分けられるが、固相法の製造時の出発原料となる固相は液相法あるいは気相法で合成される。液相法で分子から核生成と成長によって粒子をつくり上げる方法で、生成条件のコントロールによって $1\mu\text{m}$ 以下の超微粒子作成が容易であり、粒径分布の制御も可能である。

歴史を遡ると、1980年代から、ナノ磁性粒子は基礎研究から臨床応用まで幅広く利用されている。特徴として、磁場操作することにより標的物質の輸送に非常に向き、幅広い分野で応用されている<sup>17)18)19)</sup>。バイオや医療分野において、優れる生体適応性を有するマグネタイト等のフェライト粒子が使用されている。その理由は、酸化鉄の化合物は高い生体安全性を有することである。さらにアルカリ溶液を用いた共沈法によりフェライトナノ粒子を容易に作成できる<sup>20)21)</sup>。

## 2.4 液相からの粒子合成方法

溶液プロセスは、溶液から粒子を生成させる方法である。通常、出発原料として金属塩溶液を用いている。液相法の特徴として、粒子径の制御が広範囲に可能となり、成分組成の制御は比較的容易である。液相合成法としては、液相還元法、ゾルゲル法、逆ミセル法、ホットソープ法、噴霧熱分解法、高温高圧（超臨界）水熱合成法などによるナノ粒子の合成法が研究された<sup>22)</sup>。

液相法は、溶液中の化学反応により結晶核を生成、成長させ、ついで乾燥、焼成の工程をとる。微粒子と超微粒子は、ほとんど同じ工程で作ることができるが、反応温度、濃度などの条件が異なる。超微粒子を作るには、各工程で粒成長を抑制し、製造条件を厳密に制御する必要がある。Fig. 2-3に示した通り、液相合成法の中で代表的プロセスは噴霧プロセス、アルコキシドプロセス、ミセルプロセスである。各プロセス共に核形成→成長（熟成）→停止の過程を経て、成長が無限に進むと、結晶は増大し、そのため、反応を停止させる必要がある<sup>23)</sup>。

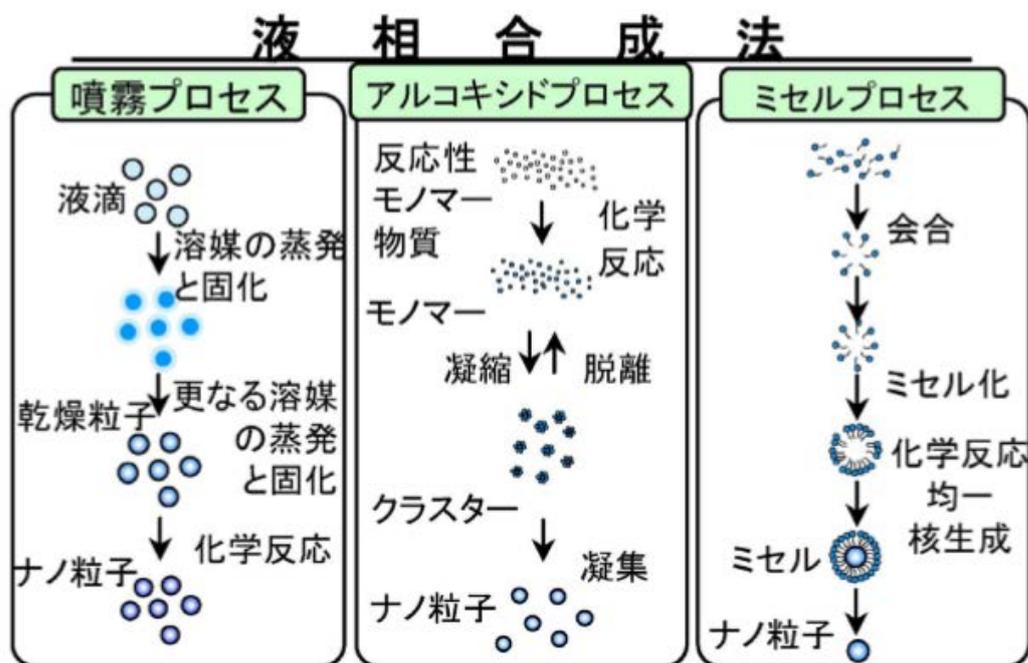


Fig. 2-3 液相合成法<sup>23)</sup>

噴霧プロセスでは、成分の蒸発がなければ粒子内の成分比は原溶液と同じであり、沈殿操作がないので複雑な多成分系の酸化物粉体が合成できる。そして、噴霧プロセ

スで得られる粒子の流動性が良好である。噴霧プロセスは、噴霧雰囲気温度によって分類されている。

アルコキシドプロセスは反応性モノマーで発生した化学反応により凝縮が発生し、クラスターを形成し、更なる凝集によりナノ粒子が生成されている。ミセルプロセスは溶液中のミセルの会合によりミセル化し、そして、化学反応により均一な核を形成し、最終的にナノ粒子を形成する。

近年以来、ナノ合成技術の進化により、液相合成法の主流は噴霧熱分解法及び高温高圧水熱合成法以外の手法である<sup>22)</sup>。液相から代表的なナノ微粒子の生成方法は、化学沈殿法、溶媒蒸発法が挙げられる。化学沈殿法のうちに、コロイド法、均一沈殿法、アルコキシド法、水熱合成法、マイクロエマルジョン法等が存在している。

均一沈殿法は、金属塩溶液にアンモニアや水酸化 Na 等の沈殿剤を添加し、沈殿剤の濃度が局部的に増加させ、沈殿が不純物を取り込みやすくなる。均一沈殿法では、溶液内の反応により沈殿剤を内部で生成させることにより、粒子の沈殿物を得る方法である。均一沈殿法では沈殿剤の局所的な不均一性を失い、沈殿反応が溶液全体にわたって均一に進行するため、不純物の少ない沈殿物を得られる。

水熱合成法は、塩と反応物質の水溶液を高温高圧条件下で処理することで、固体反応物質が溶解し互いに反応させ、水溶液の成分と反応することで生成物を得られる。多くの水熱反応は溶解-析出機構により進行し、高温高圧下で溶液内での核生成によって結晶成長する。得られた生成物は高い結晶性を有し、単結晶粒子の合成も可能である。そして、合成条件を制御することで粒子径や結晶形状を制御することもできる。

溶媒蒸発法は、溶液から溶媒を蒸発させて固体粒子を合成する方法である。凍結乾燥法、噴霧乾燥法、噴霧熱分解法等の方法がある<sup>24)</sup>。

## 2.5 磁性微粒子の作成

酸化鉄の種類によって様々な分野で応用されている。そのうち、最も重要な酸化鉄は $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (ヘマタイト) 及び Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (マグネタイト) である。

工業的な酸化鉄粒子の製造概略図は Fig. 2-4 に示した<sup>25)</sup>。通常の合成方法は硫酸第一鉄及びアルカリ剤を用い、中和反応を行い、中間生成物の Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (マグネタイト) もしくは針状の  $\alpha$ -FeOOH (ゲータイト) 粒子を得る。そして、得られた中間生成物

に熱処理を加えて  $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  粒子を得るものである。中間生成物で得られる  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子もしくは  $\alpha$ - $\text{FeOOH}$  粒子の大きさがおよそ最終 粒子の粒子径を決定する<sup>25)</sup>。

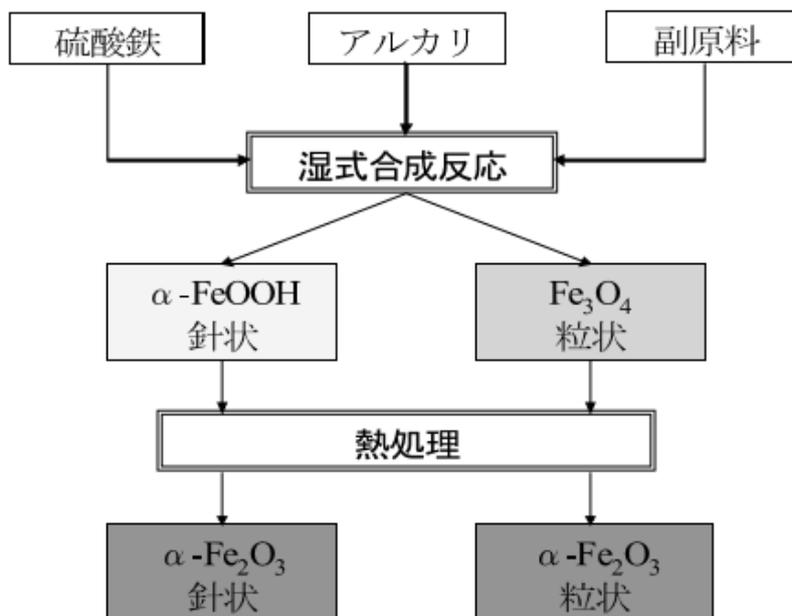


Fig. 2-4 酸化鉄の製造概略図<sup>25)26)</sup>

酸化鉄の中でマグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) は高い生体適合性を有し、また、粒子合成が簡便であり、粒子径の制御が容易であることから最適と考えられている<sup>27)28)29)</sup>。

共沈法でマグネタイト粒子の製造方法は Lefort によって報告されている<sup>30)31)</sup>。一般的に共沈法では、硫酸第一鉄と硫酸第二鉄をモル比  $m(=\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+})$  が 2 になるように秤量した後、無酸素水に溶解させ混合溶液を作成した。pH が 12 になるまで NaOH 水溶液を加え、共沈反応を行い、反応で得られた  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  微粒子は水洗、ろ過、乾燥の過程を経て、試験用原料として使用できる<sup>32)</sup>。

## 2.6 小括

本章では磁性超微粒子の作成用素材を説明し、超微粒子の歴史や変遷を述べ、超微粒子の作成方法を総括し、液相合成法の合成原理、核生成、Lamer モデル及び合成方法を説明し、共沈法によるナノ磁性微粒子の作成を述べた。

## 2.7 参考文献

- 1) <http://www.inpit.go.jp/blob/katsuyo/pdf/chart/fippan18.pdf>. P. 10,  
Downloaded 5, Feb. 2016
- 2) <http://www.chemistry.or.jp/division-topics/2014/04/post-7.html>.  
Downloaded 5, Feb. 2016
- 3) Cornell, R. M.; Schwertmann, U. The Iron Oxides: Structure Properties Occurrence, Uses, 1996, VCH, Germany.
- 4) 最先端システム：微粒子、ナノ粒子、高分子学会、P26-27
- 5) 最先端システム：微粒子、ナノ粒子、高分子学会、P36-37
- 6) 大塚研一：「気相法による金属超微粒子の製造とその特性と応用」、Vol. 5、No1、P5 (1990)
- 7) 内藤牧男等：入門粉体材料設計、第1章 粒子の基本設計、P1-2
- 8) 椿淳一郎、鈴木道隆、神田良照：”入門粒子・粉体工学”、P47、日刊工業新聞社(2002)
- 9) LaMer, V.; Dinegar, R. J. Am. Chem. Soc. 1950、72、4847-4854
- 10) 片山晃男：成長抑制剤を使用した反応晶析法による硫酸鉛結晶の単分散微粒子生成手法の研究、3、2004
- 11) J. W. Mullin、Crystallization、4th edition、Butterworth-Heinemann、Oxford、2001、pp. 181-189
- 12) 熊谷圭佑：「特異な形態を有する金銀ナノ粒子の成長プロセスおよび分光学的特性の解明とその応用に関する研究」、P9-10、2014
- 13) 渡辺 晃：特集／ナノパーティクルテクノロジー：応用・実用化への新展開、化学気相合成法による複合酸化物ナノ粒子の量産化と機能材料への応用、P33
- 14) <http://www.inpit.go.jp/blob/katsuyo/pdf/chart/fippan18.pdf>. P14, 2006,  
Downloaded 5, Feb. 2016
- 15) 斎藤 光正〈特集〉超微粒子に関する最近の動向、セラミックス超微粒子の特性と応用、VOL. 30, NO. 3. P36 (1998)
- 16) 加藤 昭夫、陶山 容子：表面化学 Vol. 8(1987)、No. 5, P316-324
- 17) U. O. Häfeli、G. J. Pauer. J. Magn. Mater. 194、76 (1999)
- 18) C. S. Lee、H. Lee、R. M. Westervelt、Appl. Phys. Let.、79、3308(2001)

- 19) R. E. Rosenweig, J. Mag. Mater. 252, 370 (2002)
- 20) E. V. Mielczarek, S. B. McGrayne, Iron, Nature's Universal Element, Rutgers Univ. Press, New Brunswick (2000)
- 21) T. Sueyoshi, H. Kanzaki: STUDY ON SURFACE PROPERTIES OF FERROMAGNETIC ULTRAFINE METAL PARTICLES USING ADSORPTION TECHNIQUES, ICF6., 948-951
- 22) 奥山 喜久夫: 特集/ナノ粒子材料の合成・分散・機能化技術と実用化への課題、P17, 2008
- 23) <http://www.inpit.go.jp/blob/katsuyo/pdf/chart/fippan18.pdf>. P17, 2006, Downloaded 5, Feb. 2016
- 24) 小泉光恵: ナノマテリアルの技術、17、2001
- 25) 林一之: 特集/ナノパーティクルテクノロジー: 新市場開拓と参入、顔料ナノ粒子の実用化と課題、P37-38, 2008
- 26) 内藤牧男等: 入門粉体材料設計、第1章 粒子の基本設計、P18
- 27) T. Hosono, H. Takahashi, Y. sato, K. Tohji, and B. Jeyadevan, :Water Dynamics: 4th International Workshop, Sendai, Japan, 2006 (AIP Conference Proceedings) 898, p. 135.
- 28) D. H. Kim, S. H. Lee, K. H. Im, K. N. Kim, K. M. Kim, I. B. Shim, M. H. Lee, Y. -K. Lee: Current Appl. Phys. 6S1 (2006) e242.
- 29) 須藤誠: マグネタイトナノ粒子の Néel および Brown 緩和による磁気発熱の評価, P61
- 30) T. E. Lefort, Direct catalytic oxidation of ethylene to ethylene oxide french patent, 729952&739562, (1931)
- 31) 田中俊行: バイオメディカル応用を目指した球形フェライトナノ粒子の粒径制御と大量合成法に関する研究、P14

## 第三章 育毛成分のコーティングに関する検討

### 3.1 育毛剤の研究背景

現代社会では、生活習慣やストレスによって薄毛に悩む患者が急速に増加しつつある。そのため、人々は毛髪に対する関心がかなり高まり、しかし、日本では1000万人以上を悩む脱毛症に関する系統的な基礎研究は不十分である。一方、市場では育毛剤、発毛剤、養毛剤等の製品の販売は非常に多い。しかし、作用機構は不明なものが多い。育毛剤の対象はかなり複雑であり、一般的に脱毛症患者は円形脱毛症、男性型脱毛症の場合が多い。日本皮膚医学会の報告によると、脱毛症は以下のTable 3-1に示した通りに分類できる。

Table 3-1 脱毛症の種類<sup>1)</sup>

脱毛の状態	病名
毛の脱落によるもの	円形脱毛症、トリコチロマニア、休止期脱毛、内分泌異常による脱毛、栄養障害による脱毛、皮膚感染症による脱毛、皮膚腫瘍による脱毛、瘢痕性脱毛、薬剤・化学物質による脱毛など
軟毛化によるもの	男性型脱毛症
毛の脆弱性によるもの	各種の毛髪奇形

円形脱毛症では、Fig. 3-1に示した通り、患者自身のリンパ球が毛包を攻撃し、発生部位の毛髪が完全に脱落し、毛包が縮んで休止期に入り、脱毛の原因になっている<sup>2)</sup>。現在、円形脱毛症は自己免疫病の1種類であることが分かった。円形脱毛症に対して色々な治療法が研究されていた。主な治療方法は、リンパ球の過剰反応の抑制によって治療する方法となっている。現在、ステロイド局所注射法、局所免疫法、偏光近赤外線照射療法、点滴静注ステロイドパルス療法等の治療方法が開発され、その治療方法として、社団法人日本皮膚科学会で制定した「円形脱毛症診療ガイドライン2010」に記載されている。

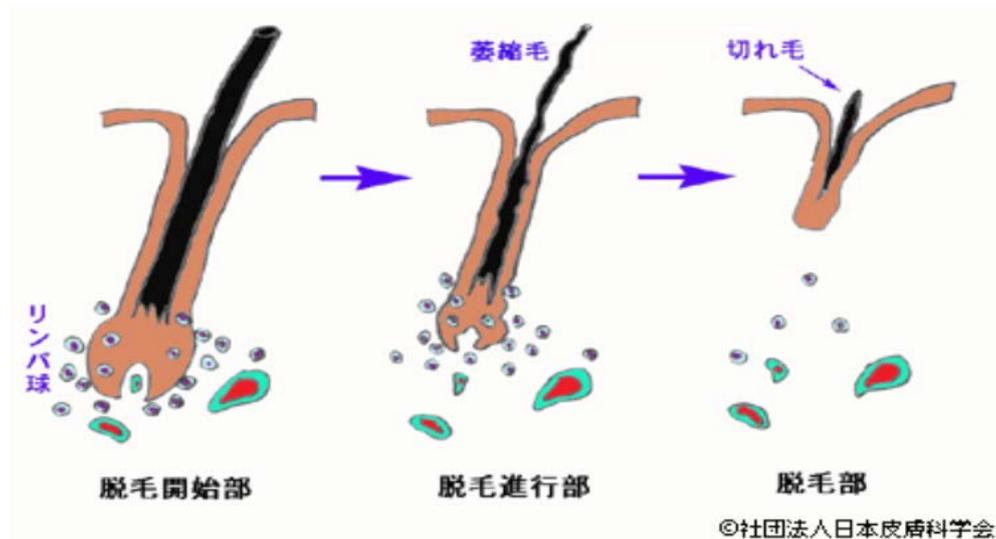


Fig. 3-1 円形脱毛症のメカニズム<sup>2)</sup>

上記の Fig. 3-1 に示した通り、円形脱毛症の患者は、自身のリンパ球による攻撃を受け、毛根部にダメージを与え、そして、ダメージ状態の進行によって毛根部が萎縮し、毛根部の栄養等を行き渡りにくくなり、最終的に脱毛まで進行する。

男性脱毛症の発生は男性ホルモンと深く関与している。男性ホルモンであるテストステロンの影響により毛根の成長期が短くなり、早い段階で休止期に入り、毛根のミニチュア化が進行し、硬毛は徐々に軟毛化され、最後、脱毛現象が発生している。その一連の発症原因は、テストステロンをジヒドロテストステロンまでに変換酵素が毛根に存在していることである。頭頂部等の部位に、ホルモンの受容体が毛包に存在し、毛乳頭細胞中のアンドロゲン受容体と関与し、毛乳頭細胞の増殖が抑制され、結果的に、成長期が短縮されていた。成長期の短縮は毛髪の成長途中で抜け、細い毛や短い毛の増加は初期の段階での典型的な症状である。

下記の Fig. 3-2 に男性型脱毛症のメカニズムを示した<sup>3)</sup>。青い矢印は毛包の毛周期を示した。男性型脱毛症では、成長期では毛包が完全に成長していないうちに退行期に入り、赤矢印に示した通り、毛根部のミニチュア化が見られ、脱毛の症状が見られる。

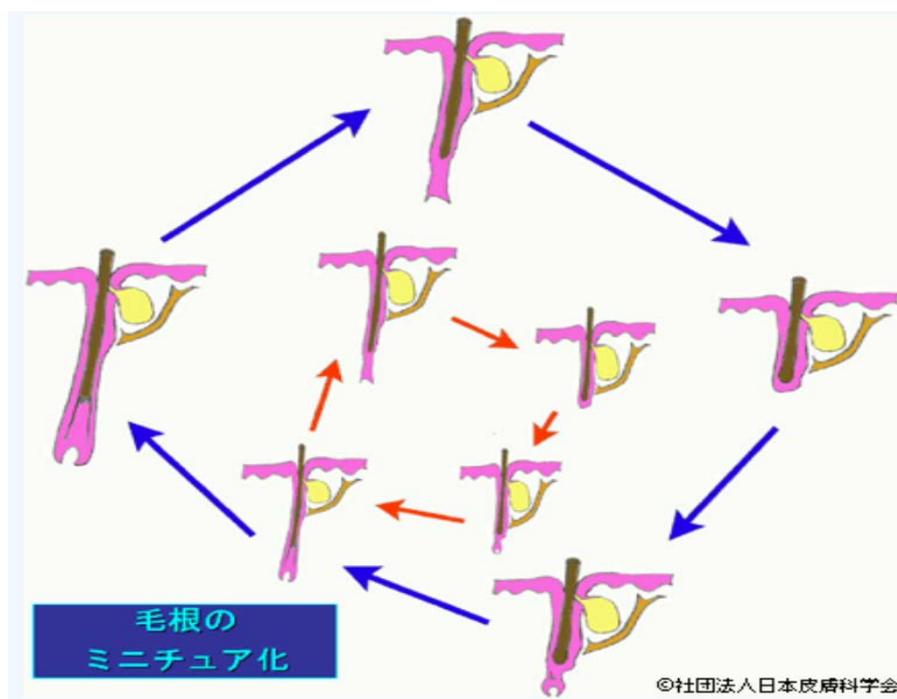


Fig. 3-2 男性型脱毛症のメカニズム<sup>3)</sup>

最近十数年から、男性脱毛症に対する科学的な研究が進み、2010年には日本皮膚科学会より、『男性型脱毛症診療ガイドライン』は制定された<sup>4)</sup>。

以上の説明した通り、男性型脱毛症の原因はかなり複雑である。一般的に以下の通りであった<sup>5)</sup>。

① ホルモンによる影響

男性の方が女性より男性ホルモンの影響を受けやすく、男性ホルモンが毛根の毛乳頭に作用した結果、毛髪が栄養失調で細くなり、脱毛の原因となっている。

② 頭皮緊張

年を重ねるとともに頭皮中のコラーゲンを失い、さらに、タンパクの変性が発生したことによって、固くなる症状が見られる。固くなった頭皮は、血液の循環を悪くし、毛包の栄養失調にも繋がり、脱毛の原因となると考えられる。

③ 老化

老人の毛髪が薄い原因は、細胞老化や動脈硬化などによる毛包が破壊されたことと考えられる。

④ ストレス

ストレスは血圧をコントロールしている自律神経を混乱させ、血管を収縮させ、血液の流れを悪くする。血行不良は髪を育てる毛母細胞へ十分な栄養が

行きわたりにくくなり、毛が細くなり、最終的に抜け毛の原因になっている。  
男性脱毛症の原因によって一般的に育毛剤の作用機構は以下の通りである。  
抗男性ホルモン剤等の薬剤は男性ホルモンによる脱毛の原因を抑制し、育毛効果を発揮できる。その他、ミノキシジル等の血管拡張剤は育毛剤として発売されていたが、本来、ミノキシジルは血管拡張剤の一種であり、アメリカで血圧を下げるための降圧剤として使用していたところ、副作用で毛が濃くなる例が出たという偶然の産物であった<sup>6)</sup>。ミノキシジルは血管平滑筋の細胞膜にある SUR に結合し<sup>7)</sup>、皮膚の血流を増加させる<sup>8)9)</sup>。男性型脱毛症の矮小化毛包改善効果は今までミノキシジル<sup>10)</sup>と抗男性ホルモン剤<sup>11)</sup>にしか報告されていなかった。近年、日本でも認可され、大正製薬株式会社よりリアップの商品名で販売されている。その他、一部の漢方植物をはじめ、様々な天然植物成分が育毛成分として利用されている。ニンジンエキス、桑白皮エキス<sup>12)13)14)</sup>、柿葉エキス<sup>15)16)</sup>、桐葉エキス<sup>17)18)19)</sup>、バンジロウ葉エキス<sup>20)</sup>等の植物エキス等の様々な成分が使用されている。

育毛剤は一般に、アルコール水溶液等の溶媒に各種の育毛成分、保湿剤、油分、香料、色素、可溶化剤などを添加した外用剤で、頭部に使用し、頭皮機能を正常化し、血液循環を改善しながら、毛乳頭細胞の活性機能を高めることにより、育毛促進及び 脱毛 防止の効果を有する外用剤である。一般に用いられているおもな有効成分は、血行促進剤、毛母細胞 賦活剤、抗炎症剤、ふけ・かゆみ抑制剤、保湿剤、頭皮の 浸透促進剤 等がある。市販の育毛剤は、一般的にセンブリエキス、ニンニクエキス、ニンジンエキス、ショウキョウチンキ等の血管拡張作用を有し、また、ヒノキチオール、ニンニクエキス、ニンジンエキスは毛根賦活作用があり、ショウキョウチンキ、トウガラシチンキは毛根刺激作用を有するため、育毛剤の成分としてしばしば使用されている<sup>20)</sup>。

また、育毛剤の配合成分の種類や配合量、効能効果の差異によって化粧品、医薬部外品、一般医薬品、医療用医薬品の4種類に分けられる<sup>21)</sup>。

### 3.2 育毛の基礎理論

抜け毛、薄毛は毛周期と非常に関係している。毛周期は Fig. 3-3 の通りに示し<sup>22)</sup>、毛周期は、成長期 (anagen)、退行期 (catagen)、休止期 (telogen) の順番で繰り返

返し移行する。

毛髪は数年間の成長を続け、その後 2 ～ 3 週間の期間にかけて退化に入り、数ヶ月間の休止期に入る。脱毛症に次の2つの現象が起きていることを示した。(1) 成長期期間が短いため毛包が充分成長しないまま退行期に移行し、毛包が矮小化することである。(2) 休止期に移行した毛包はなかなか成長期にならないことである<sup>23)</sup>。(2)の休止期停滞を改善しただけでは 顕著な臨床効果は現われず、(1)のヘアサイクルでの毛包矮小化を改善して初めて有効であることから重要な意味を持っている<sup>23)</sup>。

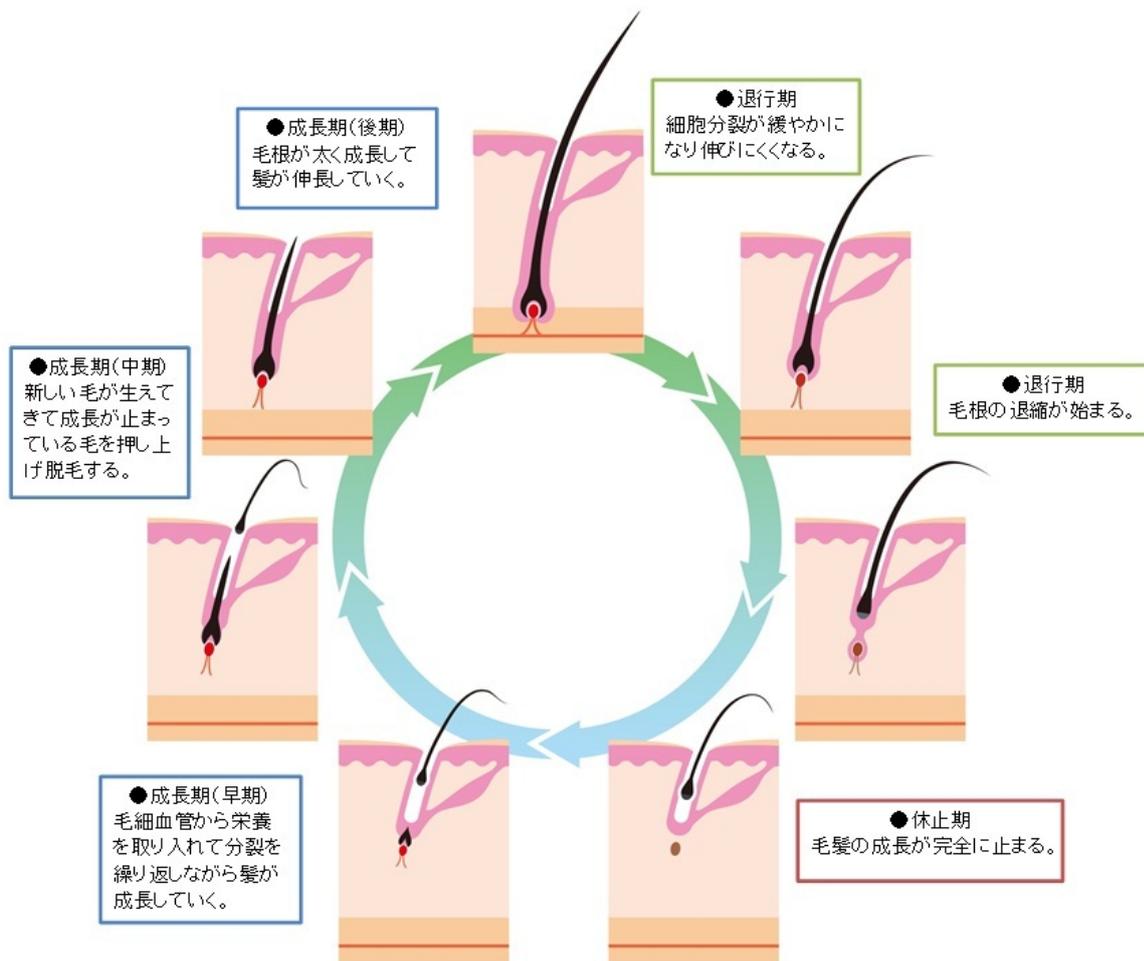


Fig. 3-3 毛髪周期図<sup>22)</sup>

### 3.3 育毛試験の目的

毛包深部へ育毛成分を送達され、毛乳頭に作用することによって育毛効果の発揮にとって最重要な課題である。育毛剤の性能は育毛成分の毛乳頭への送達能力によって決まるといっても過言ではない。通常の育毛剤では、育毛成分を水溶液、もしくはア

アルコール溶液等の溶媒に溶解させ、頭皮への塗布によって育毛成分を浸透させる機構になっている。しかし、人体の皮膚では頭皮の角質層は最も厚く、育毛成分の浸透性が比較的到低く、また、毛穴は、過酸化脂質や皮脂角栓によって閉塞している事が多く、育毛成分を単にアルコール水溶液に溶かした育毛剤を塗布しても毛乳頭まで有効成分を効果的に浸透させることは難しいである。頭皮への浸透性を改善する方法としてナノ微粒子を用いる方法が研究されている。

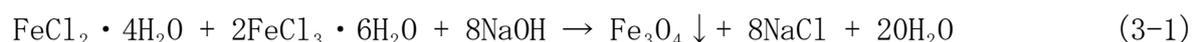
本研究ではナノ化マグネタイト微粒子を担体として使用し、マグネタイト微粒子の表面に育毛剤をコーティングしたナノ育毛剤試作品の育毛効果を調べた。

### 3.4 ナノ育毛剤試作品の作製

#### 3.4.1 液相沈殿法によるマグネタイト超微粒子の調製

磁性微粒子の製造法として、ゾルゲル法、超臨界水熱法、共沈法などが知られている。その中に、共沈法の制御が簡単、製造コストが安く、大量生産に向いている。従来の共沈法では、 $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ のモル比が1:2となるように調整した硫酸塩水溶液に過剰のアルカリ溶液を加えた後、60℃程度に加熱して超微粒子を成長させている。しかし、反応時の溶液のpH値が急激に12以上に上昇するため、鉄イオンが不均一状態になり、超微粒子の粒径が不均一、粒径を制御しにくい欠点があった。

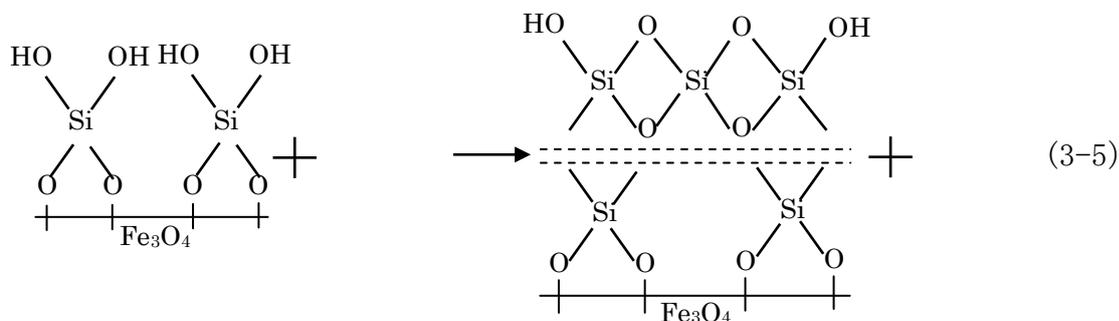
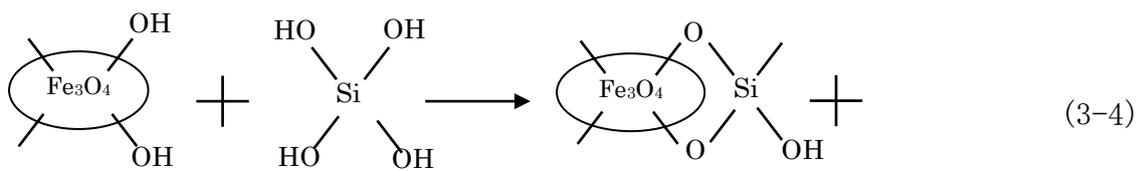
本研究のマグネタイト超微粒子の作製では、液相共沈法を用いる。反応は式(3-1)に示した。最初、塩化第二鉄( $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ) 19.89gと塩化第三鉄( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) 54gを200ml無酸素水に溶かした。水酸化ナトリウム(NaOH) 24gを200ml水中に溶かし、溶液を作成した。そして、塩化鉄混合溶液50mlに水酸化ナトリウム溶液約50mlを攪拌しながらPHが7.0付近で滴定した。これを10min攪拌して充分マグネタイトコロイドを生成させた。さらに、吸引漏斗を用いて吸引ろ過し、純水で洗浄して電解質(ナトリウムと塩素イオン)を除き、乾燥させるとマグネタイト超微粒子を合成した。



#### 3.4.2 マグネタイト粒子表面の $SiO_2$ コーティング

Fig. 3-4に示した通り、マグネタイト超微粒子を100mlイオン交換水中に分散し、定量のケイ酸ナトリウム[ $Na_2SiO_3$ ]と0.1mol/l塩酸[HCl]を添加し、pH7までに調整

し、超音波で 10 min 攪拌すると反応を十分進行させた。その反応は式 (3-2)、(3-3) に示した。ケイ酸ナトリウムと塩酸が反応してケイ酸を生成し、マグネタイト超微粒子表面に吸着している OH とケイ酸の脱水反応によって SiO<sub>2</sub> 単層膜を生成させた。その反応を継続的に進み、表面コーティング膜の厚さを調整することが出来ると思われる。マグネタイト超微粒子の表面に SiO<sub>2</sub> のコーティングメカニズムについては(3-4)、(3-5) に示した。最後、被膜外部を脱水させ、マグネタイト超微粒子の表面にネット構造の SiO<sub>2</sub> 層をコーティングすることができる。



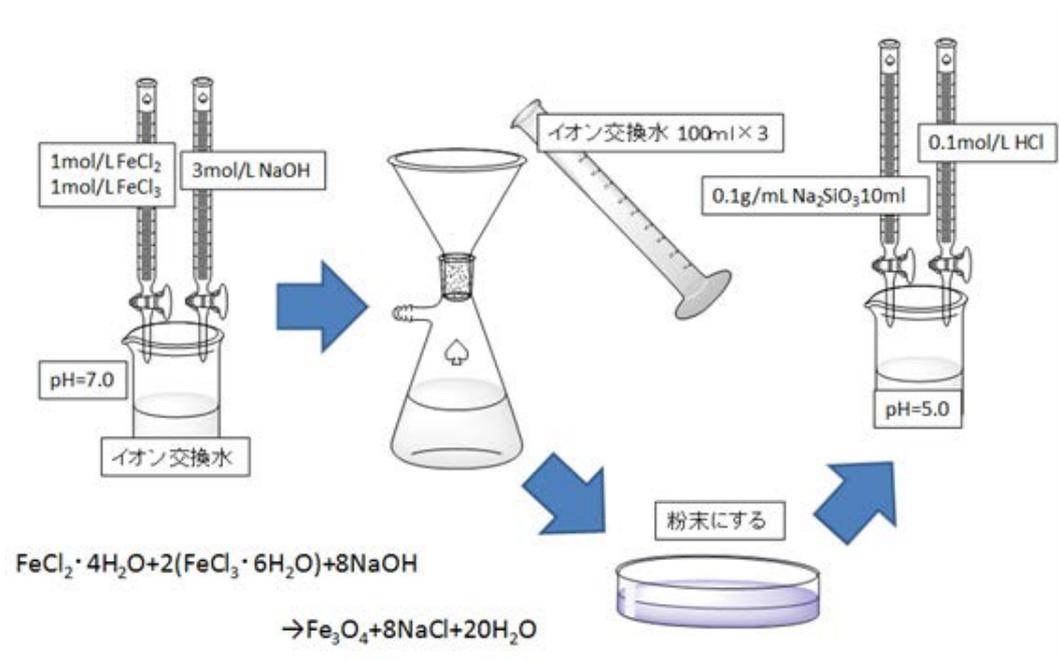


Fig.3-4 マグネタイト超微粒子の作成及び表面の SiO<sub>2</sub> コーティング

### 3. 4. 3 マグネタイト粒子表面の Mg(OH)<sub>2</sub> コーティング

Fig 3-5 に示した通り、前工程で作製した磁性流体に Mg(OH)<sub>2</sub>でのコーティングを施した。磁性流体 5.0 g に硫酸マグネシウム 0.4mol を 100ml 添加し攪拌を行った。次に、水酸化ナトリウム 0.1mol にて pH7 及び pH8 になるように pH 値を調節し、常温で一時間程の攪拌を行った。

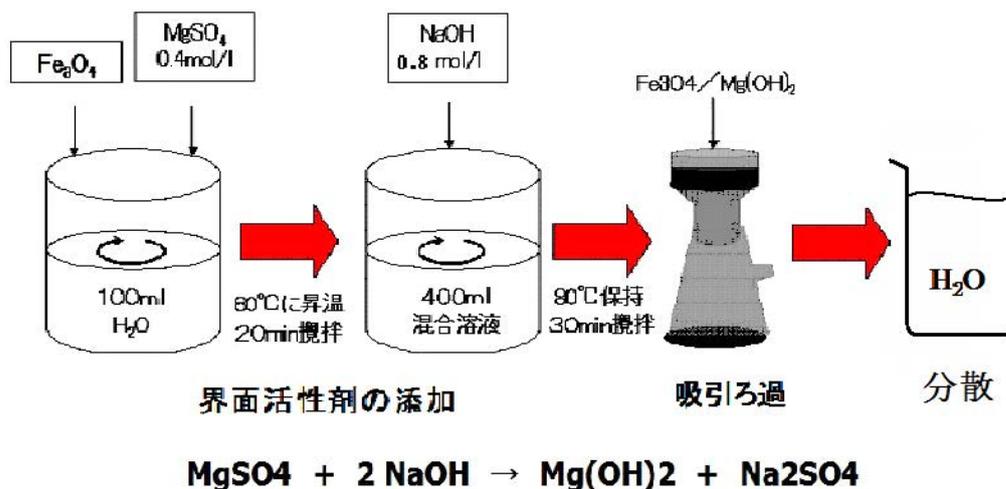


Fig. 3-5 マグネタイト超微粒子の作成及び表面の Mg(OH)<sub>2</sub> コーティング

### 3. 4. 4 育毛成分の選定

育毛成分の種類が多いが、日本国の医薬部外品の申請前例を有する成分を考える。

今回、HAR ニンジン抽出液、ニンジン抽出液 LA-20、ビスコチン（セファランチン）を候補として挙げられる。また、コントロールとしてミノキシジル、Tridil PDO（ミノキシジル類似品）として試験に入れた。

育毛において、毛乳頭細胞からの VEGF（血管内皮細胞増殖因子）の合成を亢進することは、毛細血管の形成を促進し毛球部への栄養供給を高めるほか、オートクリン的に毛乳頭細胞自身の増殖を促進し、毛乳頭を大きくすることで毛髪を太く育むことにつながり、ミノキシジルにこの効果があることが報告されていた。本試験では HAR ニンジン抽出液とニンジンエキス、ミノキシジルとその類似物質（Tridil PDO）の比較評価を行った。

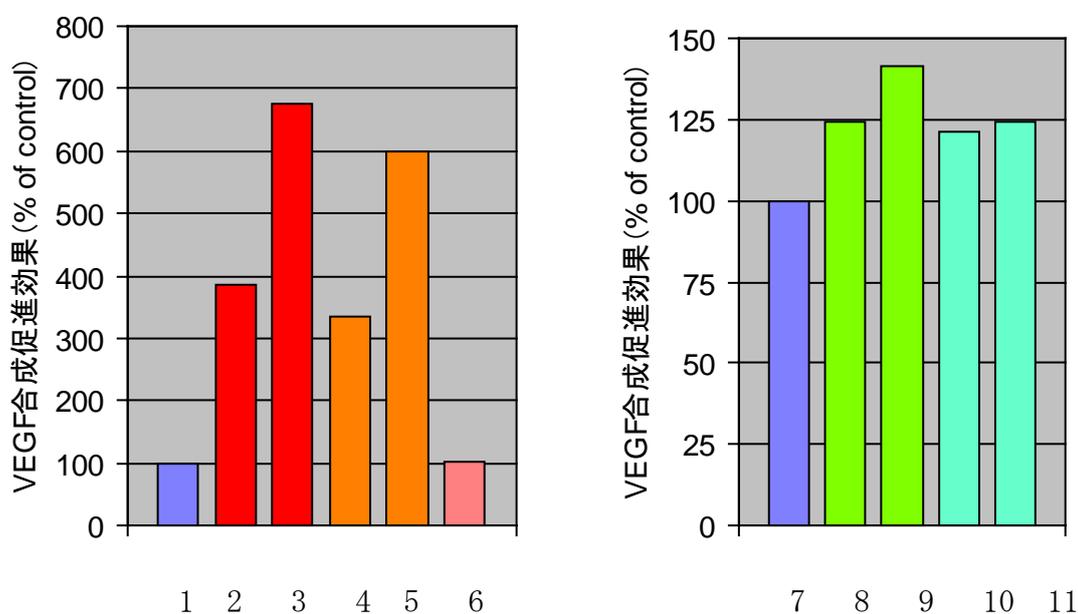


Fig. 3-6 VEGF 合成促進効果の結果

1: コントロール

2: 0.5% HAR ニンジン抽出液

3: 1% HAR ニンジン抽出液

4: 0.5% ニンジン抽出液 LA-20

5: 1% ニンジン抽出液 LA-20

6: 400ng/ml ビスコチン

7: コントロール

8: 100  $\mu$ M のミノキシジル

9: 200  $\mu$ M のミノキシジル

10: 100  $\mu$ M の Tridil PDO

11: 100  $\mu$ M の Tridil PDO

VEGF 合成促進効果の結果は、Fig. 3-6 の示した通りであった。

ミノキシジル及び類似品の育毛効果はやや低く、HAR ニンジンエキス類は比較的育毛効果が高いことを示した。

また、毛乳頭細胞の増殖の観点から、評価するため、ヒト毛乳頭細胞を用い、細胞増殖の評価を行った。

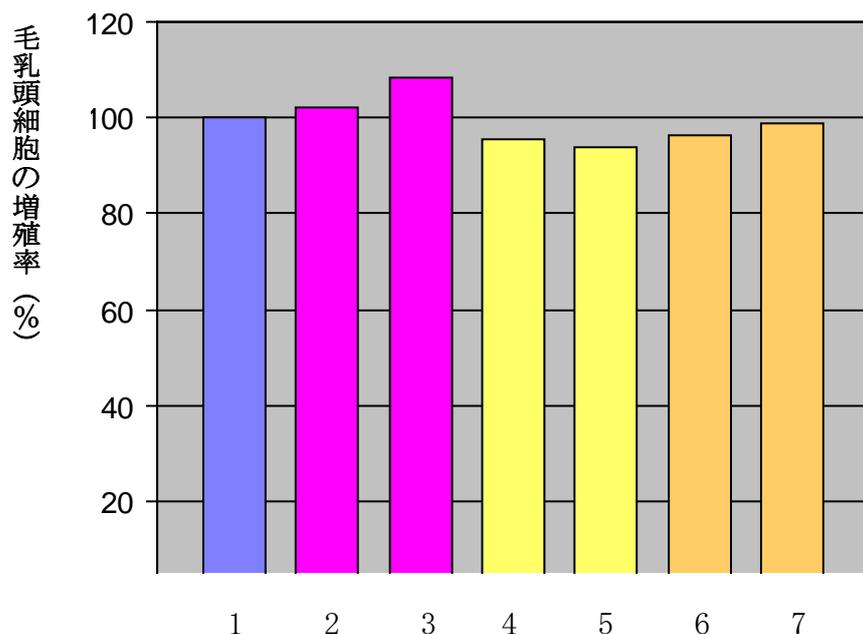


Fig. 3-7 ヒト毛乳頭細胞増殖の効果

1: コントロール

2: 200ng/ml ビオチン

3: 400ng/ml ビオチン

4: 200ng/ml HAR ニンジン抽出液

5: 400ng/ml HAR ニンジン抽出液

6: 0.5% HAR ニンジン抽出液

7: 1% HAR ニンジン抽出液

ヒト毛乳頭細胞増殖の効果は、Fig. 3-7 に示した通りであった。毛乳頭細胞の賦活作用についてビオチンの育毛効果が HAR ニンジン抽出液よりやや高いことを示した。

#### 3.4.5 マグネタイト超微粒子表面の育毛剤のコーティング

Fig. 3-8 に示した通り、育毛成分 A、B (A: セファランチン、B: HAR ニンジン抽出液) を合成したマグネタイト超微粒子の表面にコーティングし (詳細は企業との合同研究

のため省略)、育毛成分の異なるナノ育毛剤試作品 A・B を作製した。

セファランチンはタマサキツヅラフジという植物から抽出および精製して作成された成分である。主な薬理作用は生体膜安定化作用、副腎皮質ホルモン産生増加作用、円形脱毛症改善作用などの効果が報告されている。また、セファランチンによるマウスの背部毛の有意な毛成長促進作用を認め、毛乳頭細胞増殖促進傾向を認めたため、セファランチンは経皮的な毛成長促進作用を有することが明らかとなった<sup>24)</sup>。末梢血管拡張作用による毛成長促進だけでなく、毛乳頭細胞に直接作用する作用機転が存在する可能性も考えられる<sup>25)</sup>。

HAR ニンジン抽出液は、オタネニンジンの根を乾燥したものでサポニンなどを含有し、胃の衰弱による新陳代謝機能の改善、病弱者の胃部停滞感、消化不良、嘔吐、下痢、食欲不振に効果をあらわします。さらに疲労回復、作業能力増進、免疫機能亢進作用などがあるとされた。ニンジンエキスはダメージヘアにマイルド保護作用について報告されていた<sup>26)27)</sup>。Lee は毛髪の成長に対するニンジンの効果について報告されていた<sup>28)</sup>。

マグネタイト超微粒子を前章で説明した通りに作成した。さらに、育毛成分を合成したマグネタイト超微粒子の表面にコーティングし（詳細は企業との大学との合同研究のため省略)、育毛成分の異なるナノ育毛剤試作品 A、B を作製した。

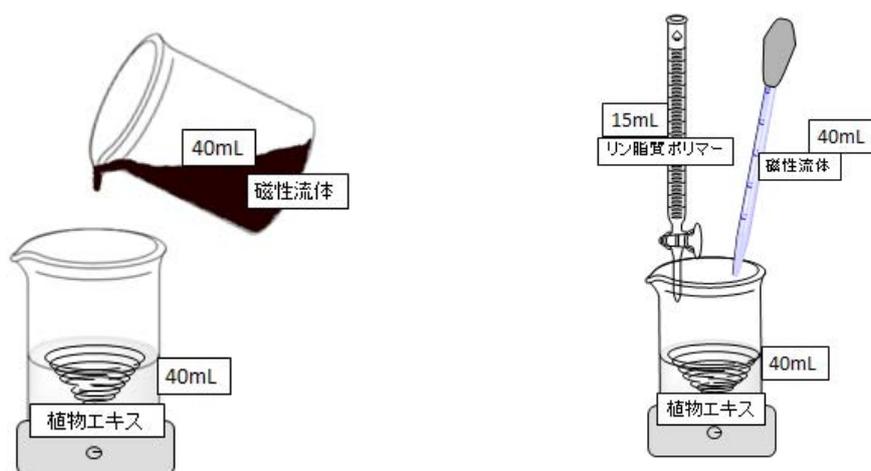


Fig. 3-8 育毛剤コーティングのイメージ図

### 3.5 育毛試験方法

#### 3.5.1 C3H マウスによる育毛試験

C3H マウスは、特定周齢において同調したヘアサイクルを有しているため、ヘアサイクルが休止期にある時に除毛処理すると均一にヘアサイクルを成長期に移行させることができる特徴を有している。毛周期が休止期にある7週齢雌のC3Hマウスの背部被毛を、動物用バリカンを用いて皮膚を傷つけないよう刈り取り、さらに市販の除毛クリームで完全に除毛し、背部を温水にてよく洗浄した。背部を脱毛した日から被験試料（ナノ育毛剤試作品A・B）を毎日各マウスに0.2mlずつ背部に塗布し、背部全体に薄く塗り広げ、30回ほど軽く指で叩くようにして浸透させた。又、陰性対象群として、背部に試料を塗布しないコントロールマウスのグループも観察した。実験には試料毎に別々のケージに入れた各3匹のマウスを使用し、尾部を油性マーカーで塗り分け、個体識別を行った。1週間毎に写真撮影を行い、発毛状況を観察した。

#### 3.5.2 毛乳頭細胞を用いた細胞増殖試験

正常ヒト毛乳頭細胞を25cm<sup>2</sup>フラスコで培養し、セミコンフルエントな状態になったら、継代培養を行った。フラスコ内の培地を抜き取り、0.02%EDTA溶液約10mlを加え、細胞をリンスし溶液を捨てた。0.25%トリプトシン/0.02%EDTA溶液を2ml加え、顕微鏡にて細胞を観察した。細胞が丸くなり、トリプトシンインヒビター溶液を約2ml加え、スツールピペットでペッティングして、細胞を剥がし、遠心管へ移した。フラスコに培地を約5ml加え、残った細胞を懸濁、回収し遠心管へ移した。約800rpmで1分間遠心した。上清を捨て、細胞沈査に既知量培地を加え、細胞をピペッティングで再浮遊させ、細胞数を測定した。12wellプレートを用意し、各wellに培地1mlを加え、毛乳頭細胞を $5 \times 10^2$  cell/ml播種した。そこにナノ育毛剤試作品A・Bを50  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、0.5  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/mlと添加し、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター下で培養した。コントロールとしてナノ育毛剤試作品を添加しないものも同様に培養した。培養したものを1日毎に撮影し、細胞の様子を観察した。

#### 3.5.3 三次元皮膚モデルによる安全性試験

EPISKIN 三次元皮膚モデルは、ヒト正常表皮細胞を重層培養したヒト三次元培養表皮

モデルである。主として実験動物による皮膚刺激性試験の代替材料として開発され、経済協力開発機構 (OECD) により適切な皮膚刺激性試験法のひとつとして認証されていた<sup>29)</sup>。ヒト細胞を使用しているため、動物実験と比較して変動が少なく、再現性の高い試験結果を得ることができる。本モデルは、MTT アッセイを用いて生細胞数を測定することによりさまざまな被験物質の毒性や刺激性評価に利用でき、さらに細胞が代謝活性を保持しているため、炎症性因子や細胞成長因子の産生量測定等の皮膚科学研究、薬理研究等に利用できる。

試験方法は Fig. 3-9 に示した通りであった。EPISKIN (成人ヒト表皮細胞のコラーゲン膜上で培養細胞モデル) を用い、新規 12well プレートを用意し、一番左の列に well あたり各 2ml の維持培地 (Maintenance medium) を添加した。ピンセットで EPISKIN を寒天培地から剥離し、モデルに付着した過剰な寒天培地を綿棒で除去した。あらかじめ維持培地を分注した各 well にモデルを移し換え、37°C にて 24 時間以上プレインキュベーションした。翌日、二番目の列に維持培地を 2ml ずつ分注し、マイクロピペットで試料を 10  $\mu$ l 正確に分取し、モデルに添加した後にチップの先端で均一に広げ、室温で正確に 15 分インキュベーションする。PBS で皮膚モデルを洗浄した。綿棒で余剰の PBS をふきとり、あらかじめ維持培地を分注した各 well にモデルを移し換えた。37°C にて 42 時間インキュベーションした。二日後、インキュベーションから取り出してすぐに、15 分程度ゆっくり振盪させた。三番目の列に MTT solution を 2ml ずつ分注し、過剰な維持培地をペーパータオルで吸い取り、モデルを三列目に移し換え、37°C にて 3 時間インキュベーション 1.5ml のエッペンチューブを用意し、acidic isopropanol を 500  $\mu$ l ずつ分注した。専用のパンチでモデルをはずし、メンブランと表皮をピンセットで剥がした。あらかじめ用意した acidic isopropanol 入りエッペンチューブにメンブランごと移し換えた。時々ボルテックスしながら、室温で 4 時間ブルーホルマザンの抽出を行った。抽出中はアルミホイルで遮光しておく。遠心して (500rpm) 不溶物を落とし、96well プレートを用意し、一つのモデルにつき 200  $\mu$ l  $\times$  2well ずつ分注した。一番左の列には、ブランクとして acidic isopropanol を 6well に分注し、そして、波長 550nm で吸光度を測定した。

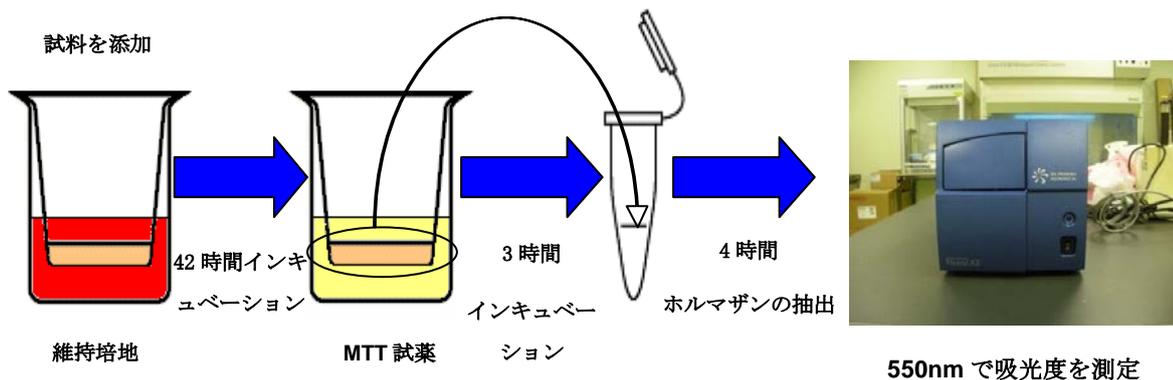


Fig. 3-9 三次元皮膚モデルによる安全性試験の評価

### 3.6 解析装置の概要

#### 3.6.1 TEM の原理及び測定方法

本研究では、ナノ微粒子の微細構造及びコーティングを観察するため、透過式電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope：以下 TEM と略記）を用い、ナノ微粒子の微細構造及びコーティング状態を観察した。

TEM の基本構造は Fig. 3-10 に示した通り<sup>30)</sup>、機器の上部に電子銃を設置し、電子銃から電子ビームを発生し、観察試料に高速の電子線を照射させ、試料を透過した電子ビームを対物レンズなどの電子レンズより拡大され、結像レンズの収束により下部の蛍光板に鮮明な映像が得られる。観察試料の構造及び成分の違いにより、電子密度が変化し、高い電子密度の視野は色濃くなり、一方、低い電子密度の視野は薄いなる傾向がある。

TEM を代表とした電子顕微鏡で使用の電子線波長は光より非常に短く、より高い分解能を有することにより微細な構造を観察できる。TEM は用途により、超高压電子顕微鏡（HVEM）、高分解能電子顕微鏡（HREM）、分析電子顕微鏡（AEM）などに分類され、原子レベルで素材の微細構造の解析を実現でき、幅広く利用されている。

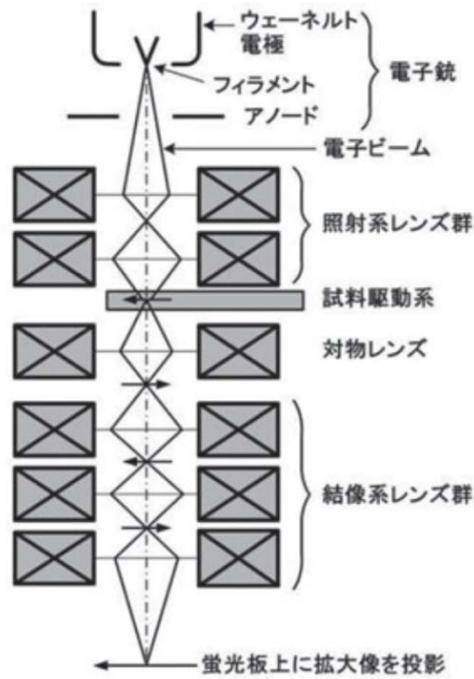


Fig. 3-10 TEM の基本構造 <sup>30)</sup>

### 3.6.2 ZEECOM の原理及び測定方法

ゼータ電位とは、一般的に「溶液中の微粒子の表面電位（表面電荷）」のように理解されているが、溶液中の微粒子の周りに形成する電気二重層中の、液体流動が起こり始める「すべり面」の電位として定義される。その原理はFig. 3-11 に示した通り <sup>31)</sup>、ゼロに近づくと、微粒子の相互の反発力は弱まると凝集し易くなる。「すべり面」とは、微粒子の周りに形成する「イオン固定層」と、その外側の「イオン拡散層」との間に存在すると便宜的に定義された境界のことで、固定層の外側からイオンを含む液体流動が起こることから、この境界の事を「すべり面」と呼んでいる。

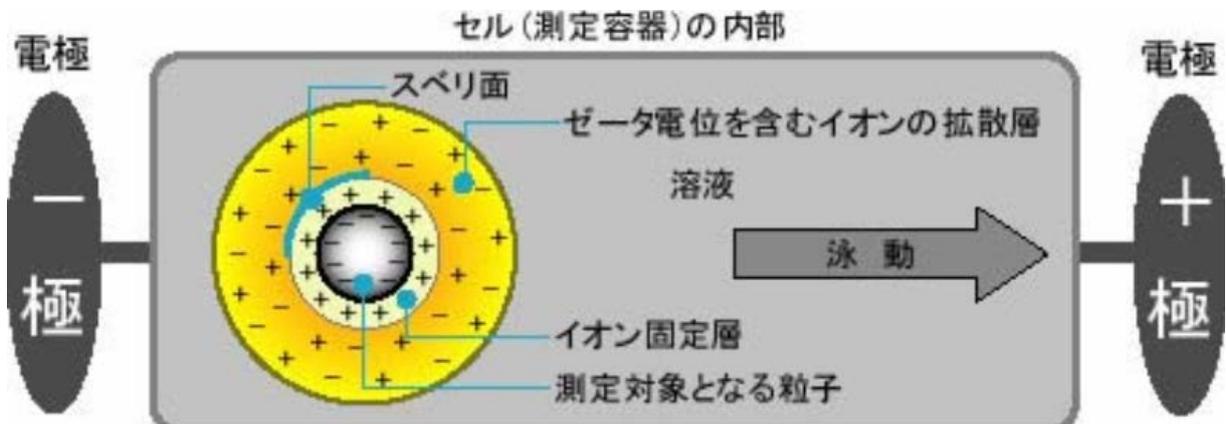


Fig. 3-11 ゼータ電位の原理 <sup>31)</sup>

液体に分散した微粒子は、自体のイオン性、双極子特性等により正又は負に帯電している。表面電荷を中和する量の反対電荷で囲まれ、固定層と拡散層から成る電気二重層を形成している。溶液中の粒子は個々に反対電荷の「イオン固定層」に囲まれ、外側には「イオン拡散層」が存在し、雲の様なエリアを形成している。そして、全体としては電氣的に中性となっている。コロイド溶液の左右に正と負の電圧を加えることにより微粒子の周りにおける対電荷のうちの流体的可動性の拡散層電荷は、液体と共に電極に引き寄せられる。流体的可動性の拡散層電荷が電極に引き寄せられることで生じる液体の流れの事を、電気浸透流という。結果は、粒子自体が電極に引き寄せられる方向とは逆の方向に流れることになる。微粒子表面で発生する電気浸透流の影響を受けながら、粒子が電極に引き寄せられる運動のことを、電気泳動と呼び、粒子の電気泳動速度から、ゼータ電位が算出される。

### 3.7 ナノ育毛剤試作品の評価

#### 3.7.1 TEMによるSiO<sub>2</sub>をコーティングしたナノ育毛剤試作品の観察

マグネタイト超微粒子の表面に育毛剤をコーティングしたナノ育毛剤試作品のTEM写真を Fig. 3-12 に示した通りであった。赤枠内の黒い部分は格子構造があるマグネタイト超微粒子であり、その直径はおおよそ10 nmであった。周りを覆う白い物質はコーティングした育毛剤であると思われる。また、Fig. 3-13 に示したEDS測定により、Si成分や育毛成分と思われる多数の成分が検出された。この結果は、マグネタイト超微粒子の表面に育毛剤がコーティングされたことを確認された。

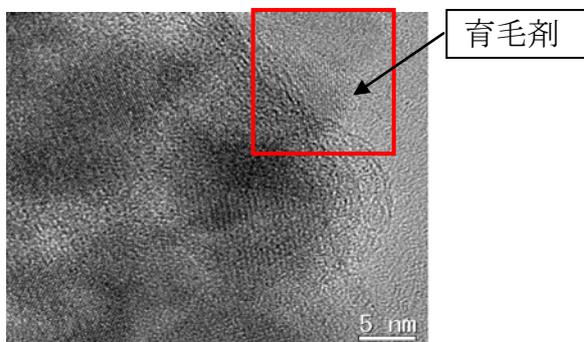


Fig. 3-12 育毛剤のTEM観察像

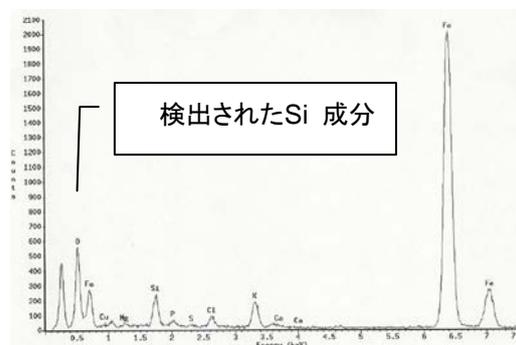


Fig. 3-13 育毛剤のEDS測定結果

### 3.7.2 ZECCOM によるゼータ電位の測定

SiO<sub>2</sub>をコーティングした複合微粒子を、イオン交換水中に分散して、ゼータ電位の測定を行った。ゼータ電位のヒストグラムは Fig. 3-14 に示した通りであった。微粒子の場合、ゼータ電位の絶対値の増加に伴い、粒子間の反発力が強くなり粒子の安定性は高くなる。一方、ゼータ電位がゼロに近づくことにより、粒子は凝集しやすくなる。そのため、ゼータ電位は分散された粒子の分散安定性の指標として用いられている。今回の測定結果から、ピークは-42.0~-44.0 と高い位置にあることが示された。バラつきも少ないことから、今回測定した試料は、安定性の高いものだといえる。

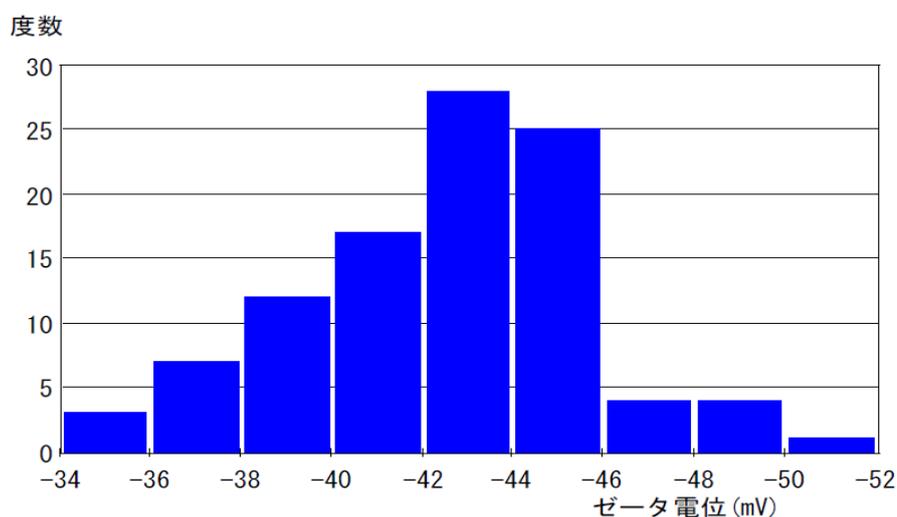


Fig. 3-14 ZECCOM によるゼータ電位の測定結果

### 3.7.3 SiO<sub>2</sub>をコーティングした育毛剤の実験結果

下記の Fig. 3-15~17 は、育毛実験において各グループのマウスの育毛状況を示した写真である。各グループのマウスとも発毛の前兆である皮膚の黒化が 10 日目に始まり、14 日目には背部の全範囲から発毛を確認出来た。17 日目で 50%程度、21 日目では、ほぼ完全に元の長さまで成長した。以上の通り、ナノ育毛剤試作品 A(セファランチン使用)、B (HAR ニンジンエキス使用) とコントロール (精製水塗布) において毛髪成長に一定な差異が見られた。又、Table 3-2 及び Fig. 3-18 に示した通り、ヒトの皮膚細胞を用いた安全性実験の結果にて各試料の細胞生存率は示した。また、試料

を塗布したいずれのマウス試験組からも皮膚への刺激性等の症状が観察されなかった。



Fig. 3-15 ナノ育毛剤Aを使用したマウスの育毛効果  
(左から1日目 7日目 21日目 21日目)



Fig. 3-16 ナノ育毛剤Bを使用したマウスの育毛効果  
(左から1日目 7日目 14日目 21日目)



Fig. 3-17 コントロールマウスの育毛効果  
(左から1日目 7日目 14日目 21日目)

Table 3-2 三次元皮膚モデルによる皮膚刺激性試験の結果

試験回数	精製水	ナノ育毛剤A	ナノ育毛剤B	5%SLS
1回目	100	90.4	102.3	3.9
2回目	100	93.4	118.3	4.8
3回目	100	98.4	108.4	5.2
平均値	100	94.1	109.7	4.6

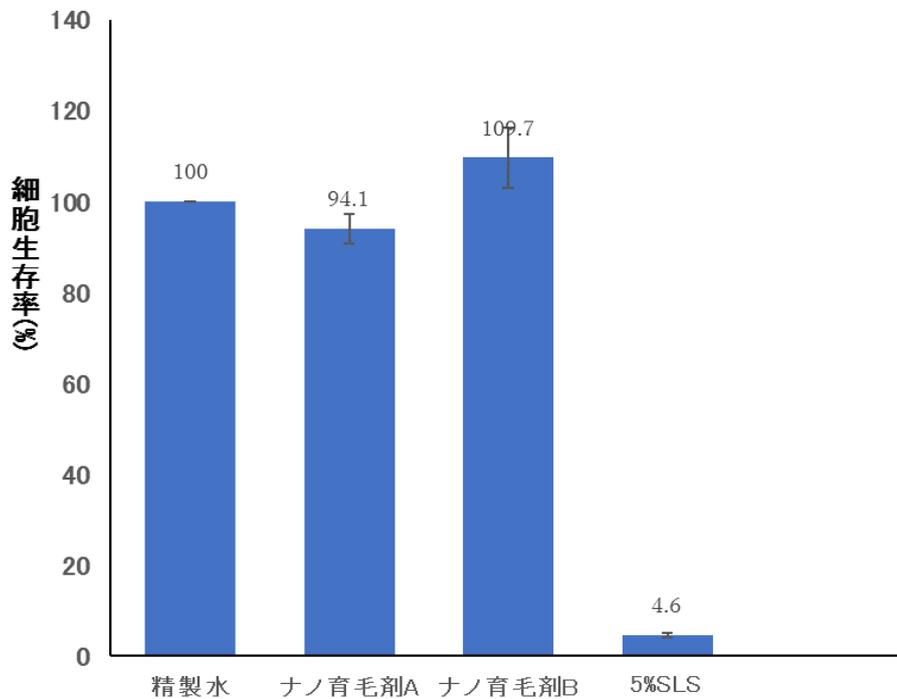
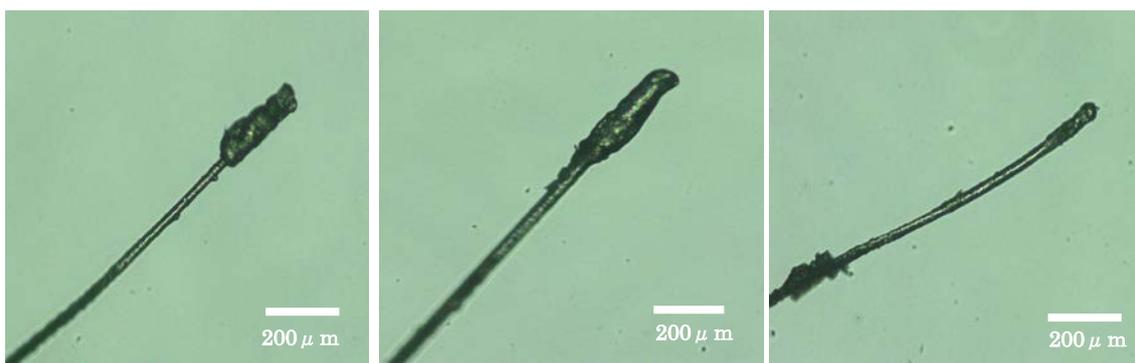


Fig. 3-18 三次元皮膚モデルによる皮膚刺激性試験の結果

### 3.7.4 SiO<sub>2</sub>をコーティングした育毛剤使用後の毛根部の観察

下記のFig. 3-19は、育毛実験後のマウスの毛根部を顕微鏡で観察したものである。コントロールのものは、成長が完了していないためか毛球部が細く、未発達であることが分かる。これと比べるとナノ育毛剤試作品 A・B はよく発達していることが分かる。



ナノ育毛剤試作品A      ナノ育毛剤試作品B      コントロール

Fig. 3-19 育毛実験後のマウス毛根部の拡大図

### 3.7.5 SiO<sub>2</sub>をコーティングした育毛剤使用後のマウス皮膚切片の観察

下記の Fig. 3-20 は、マウス皮膚の切片写真である。円形部分は毛球部と呼ばれる部分であり、切片の観察結果は光学顕微鏡による毛根部の観察と同様に、コントロールマウスに比べ、ナノ育毛剤 A・B を使用したマウスは毛球部が発達していることが確認できた。



ナノ育毛剤試作品A      ナノ育毛剤試作品B      コントロール

Fig. 3-20 育毛実験後のマウスの皮膚切片写真

### 3.7.6 SiO<sub>2</sub>をコーティングした育毛剤を用いた毛乳頭細胞実験

下記の Fig. 3-21~3-27 に示した通り、ナノ育毛剤試作品 A を異なる濃度で添加した時、正常ヒト毛乳頭細胞の増殖変化を顕微鏡で撮影した写真である。2日目の時点では、濃度違いによる差異が観察されなかった。しかし、3日目では、濃度違いによる毛乳頭の増殖差異が顕著に観察された。育毛剤試作品 A を、50 μg/ml、10 μg/ml、5 μg/ml を添加した試験組はコントロール組と比較し、顕著な差異が見られた。特に

10  $\mu$ g/ml 試験組の細胞成長は顕著である。3 日目では、細胞は非常に密集していることが観察された。4 日目になると、50  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml の試験組はコンフルエントな状態になり、毛乳頭細胞の過剰増殖が見られた。5 日目には細胞は死滅し、浮遊し始め、6 日目には完全に細胞が死滅したことが確認できた。コントロール組及びその他の濃度の試験組では、5 日目から細胞は死滅始め、6 日目には同じように細胞は死滅した。

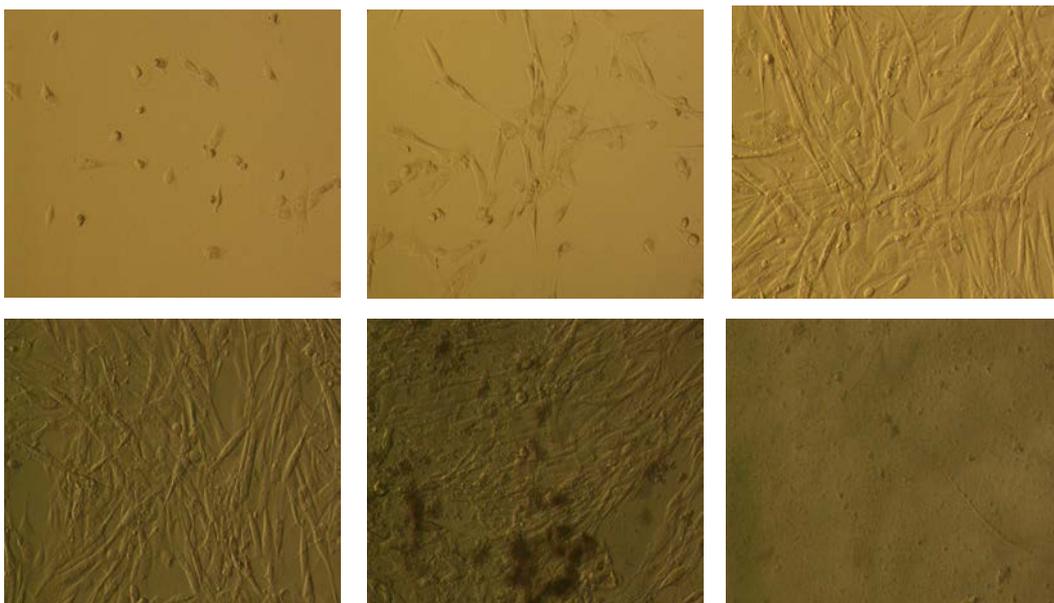


Fig. 3-22 ナノ育毛剤A 10  $\mu$ g/ml 添加  
(上左から 1 日目・2 日目・3 日目 下左から 4 日目・5 日目・6 日目)

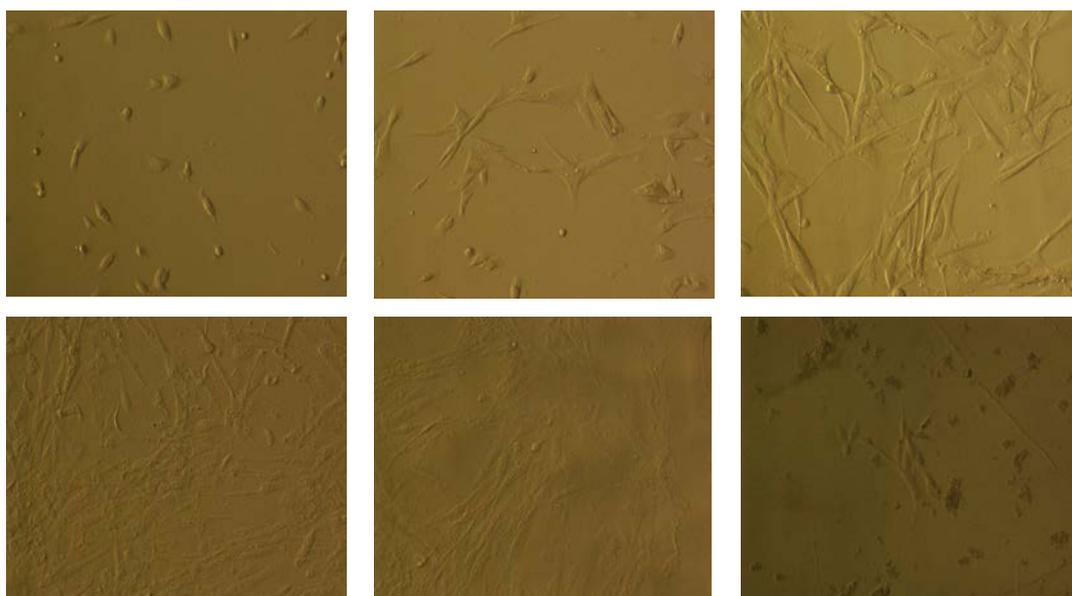


Fig. 3-23 ナノ育毛剤A 5  $\mu$ g/ml  
(上左から 1 日目・2 日目・3 日目 下左から 4 日目・5 日目・6 日目)

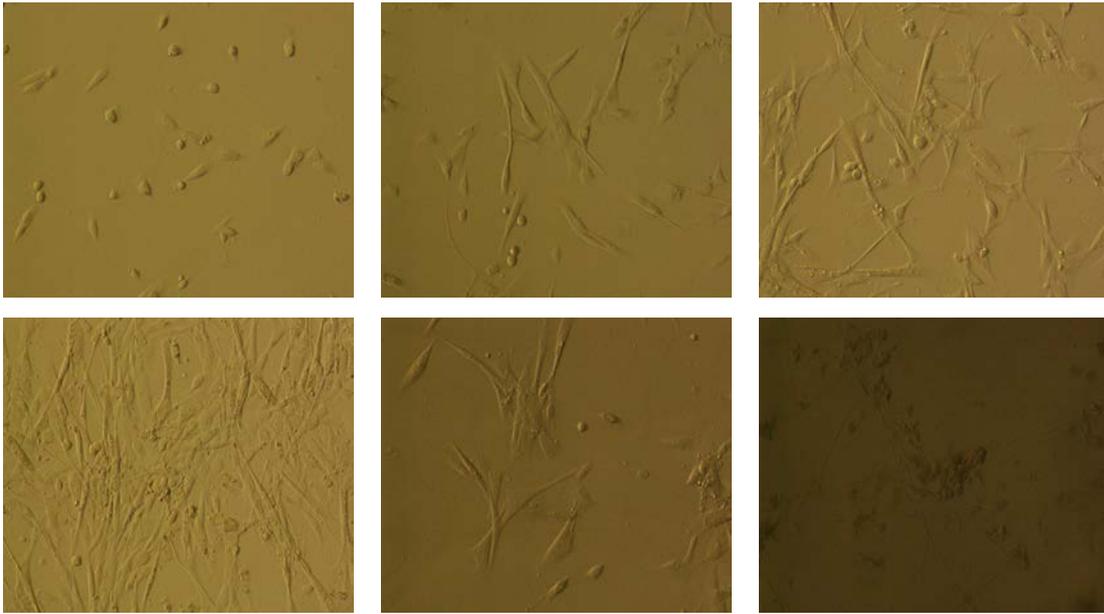


Fig. 3-24 ナノ育毛剤A 1 $\mu$ g/ml  
 (上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

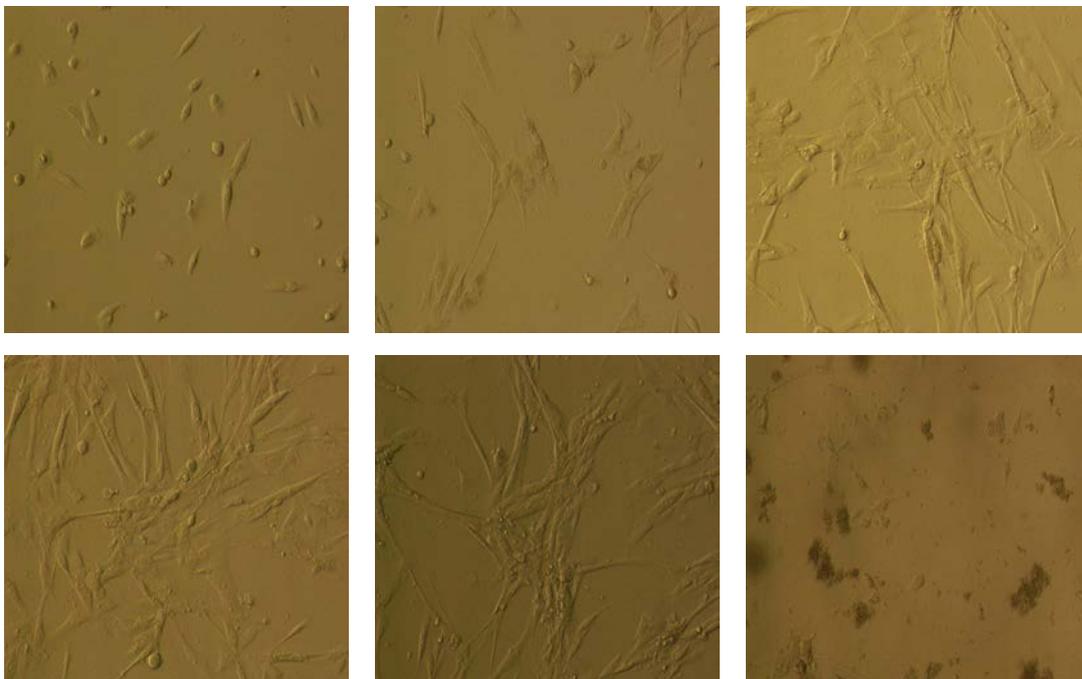


Fig. 3-25 ナノ育毛剤A 0.5 $\mu$ g/ml  
 (上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

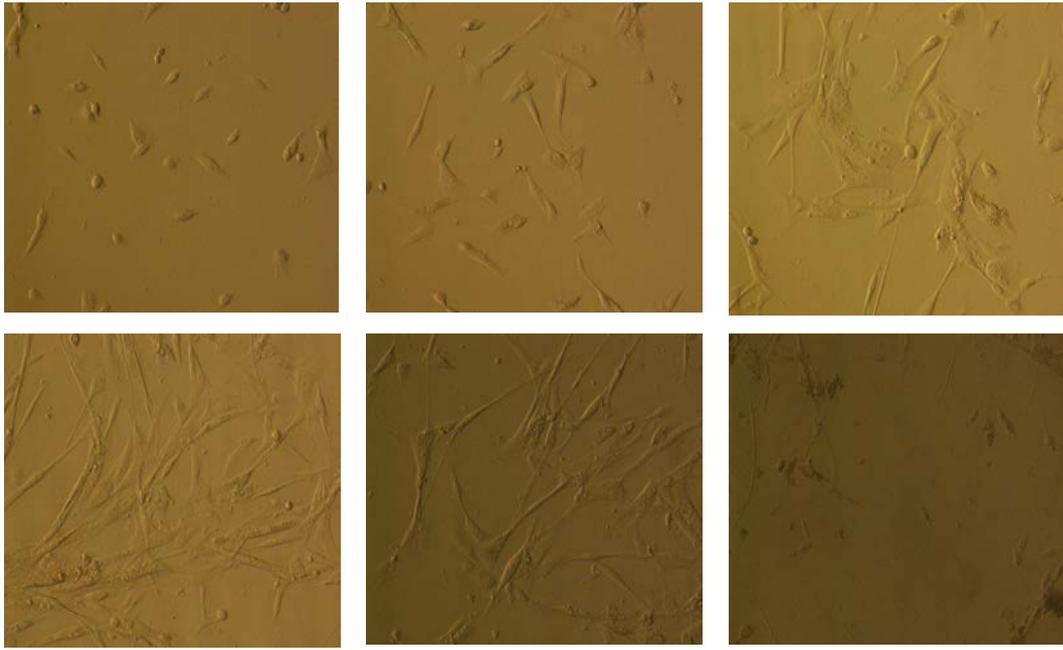


Fig. 3-26 ナノ育毛剤A 0.1  $\mu$ g/ml  
 (上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

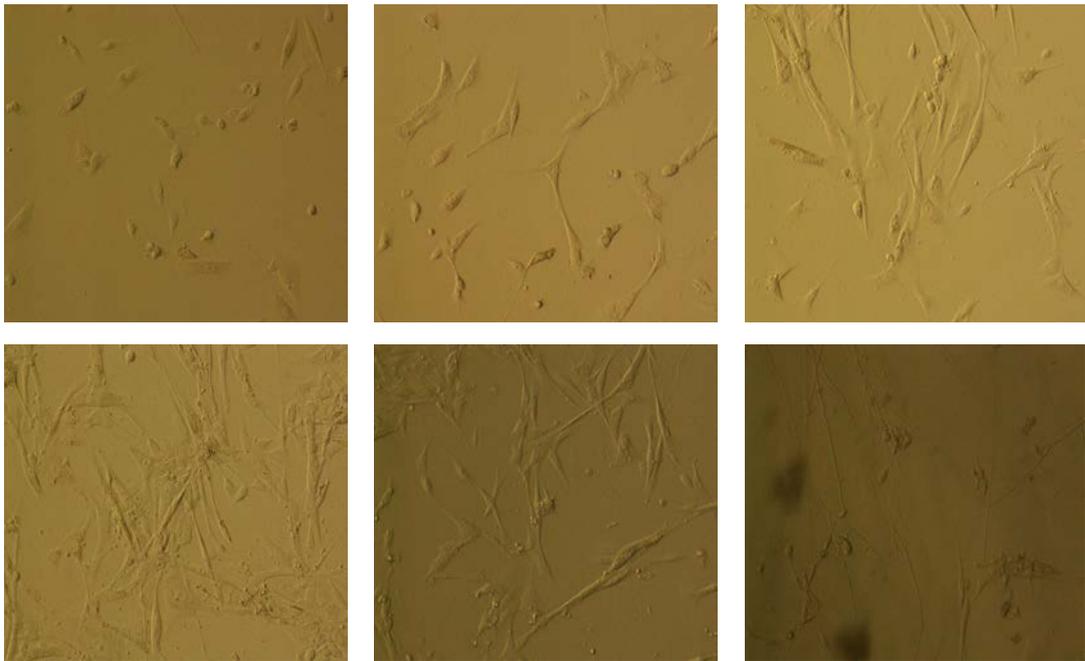


Fig. 3-27 コントロール  
 (上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

下記の Fig. 3-28～3-34 は、ナノ育毛剤試作品 B を異なる濃度で添加した時、正常ヒト毛乳頭細胞の増殖の変化を顕微鏡で撮影したものである。2日目では、50  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml 試験組は、他の濃度のものに比べ僅かな細胞増殖が観察された。

3日目では、その差異は顕著である。特に、ナノ育毛剤試作品Aの試験組と同様に、 $10\mu\text{g/ml}$ 試験組において細胞増殖は明らかである。コントロール組と比べ、両者において顕著な差異が見られた。その他の濃度では、コントロール組と顕著な差異が見られなかった。本試験では、ナノ育毛剤Aの試験時と異なり、4日目、5日目では細胞状態の変化は見られなかったが、6日目では、ナノ育毛剤Aの試験時と同様に、細胞は死滅した。

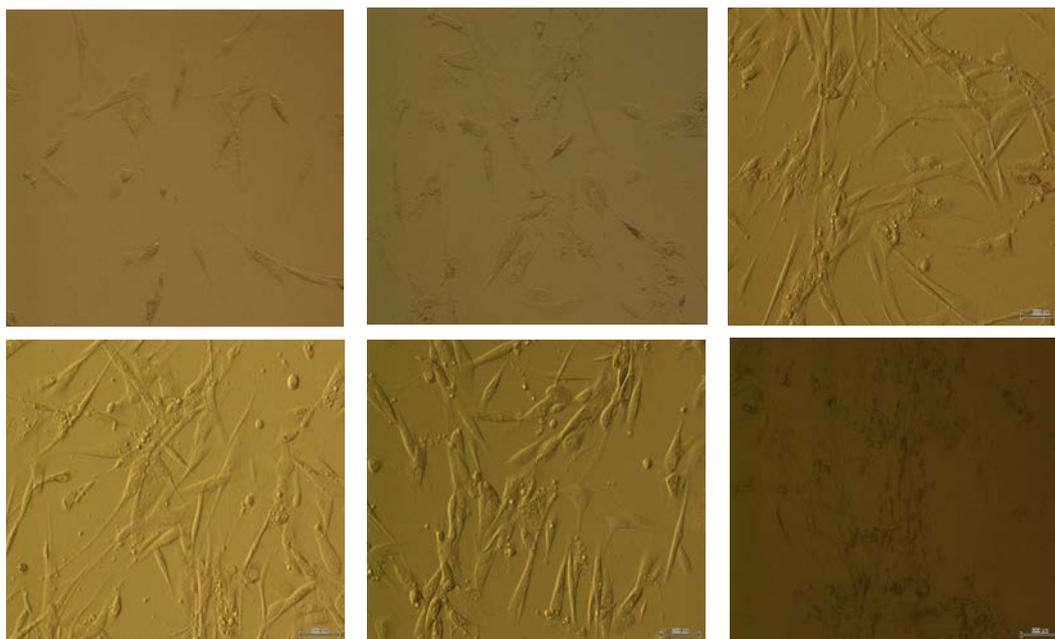


Fig. 3-28 ナノ育毛剤B  $50\mu\text{g/ml}$   
(上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

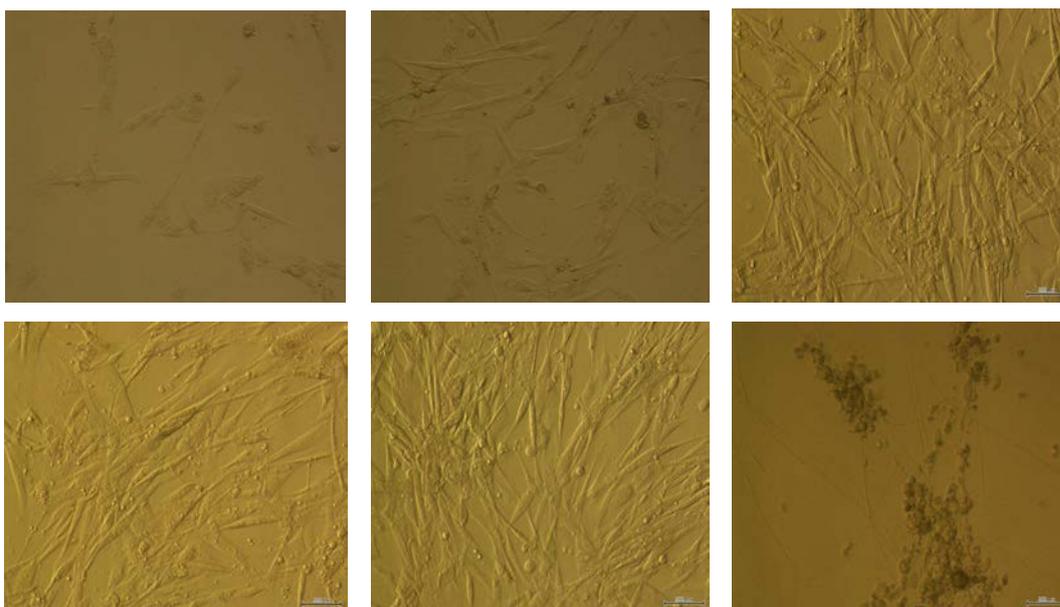


Fig. 3-29 ナノ育毛剤B  $10\mu\text{g/ml}$  添加  
(上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)



Fig. 3-30 ナノ育毛剤B 5  $\mu$ g/ml  
(上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)



Fig. 3-31 ナノ育毛剤B 1  $\mu$ g/ml  
(上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

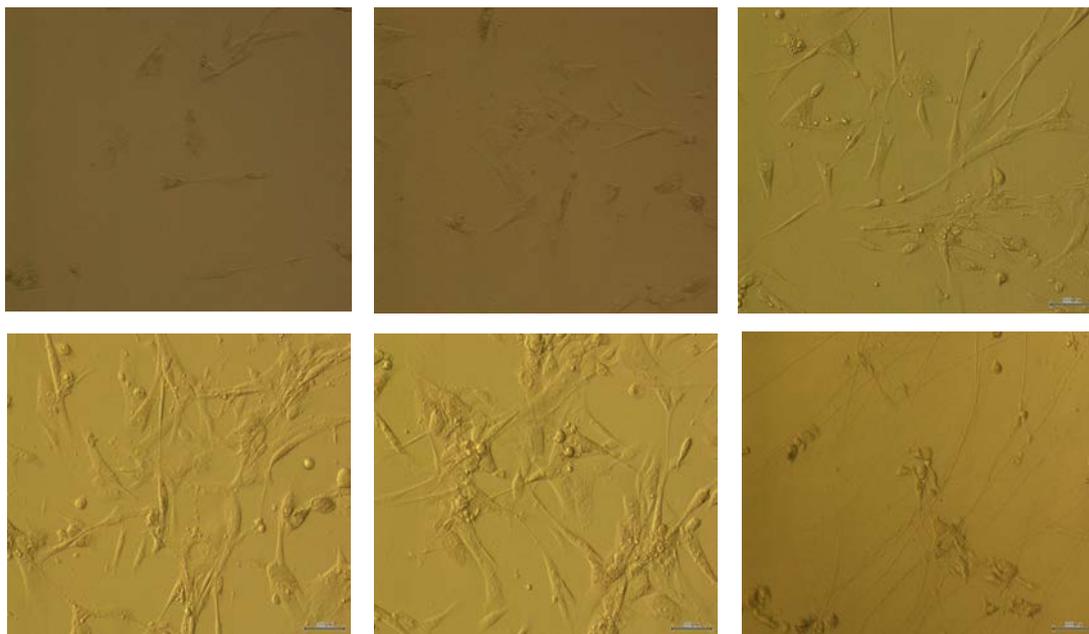


Fig. 3-32 ナノ育毛剤B 0.5  $\mu$ g/ml  
 (上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

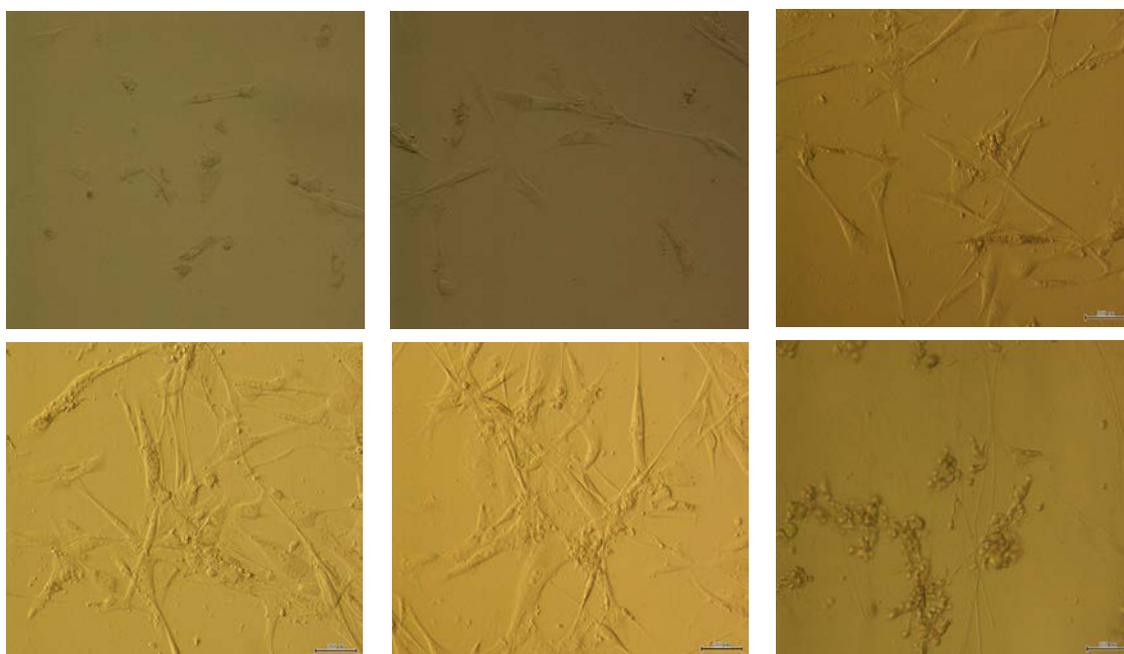


Fig. 3-33 ナノ育毛剤B 0.1  $\mu$ g/ml  
 (上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

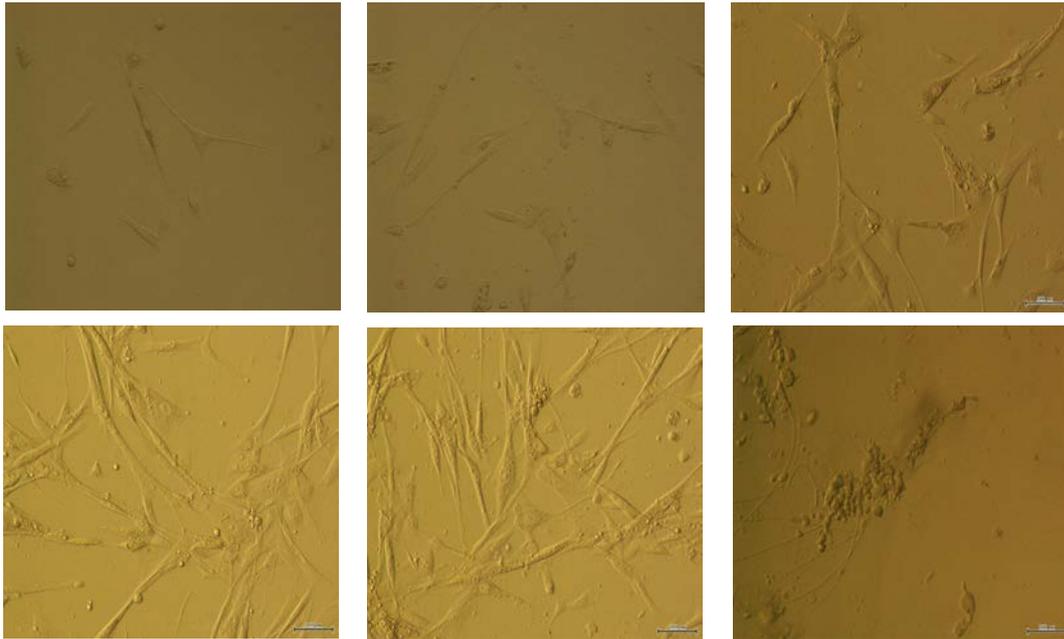


Fig. 3-34 コントロール  
 (上左から1日目・2日目・3日目 下左から4日目・5日目・6日目)

下記の Fig. 3-35～Fig. 3-45 に示した通り、ナノ育毛剤試作品 A、B に加え、市販の育毛剤（リアップ 5X）、磁性流体、植物エキス成分を毛乳頭細胞に添加し、細胞の増殖の変化を観察したものである。ナノ育毛剤試作品 A、B の増殖率が最も良好であり、次いで植物エキス、磁性流体、コントロール、市販の育毛剤（リアップ 5X）の順になっていた。市販育毛剤の増殖率が一番低い理由は恐らく育毛剤に含まれるアルコール成分によるものと思われる。本試験結果は、ナノ育毛剤試作品が育毛効果を有することを示した。

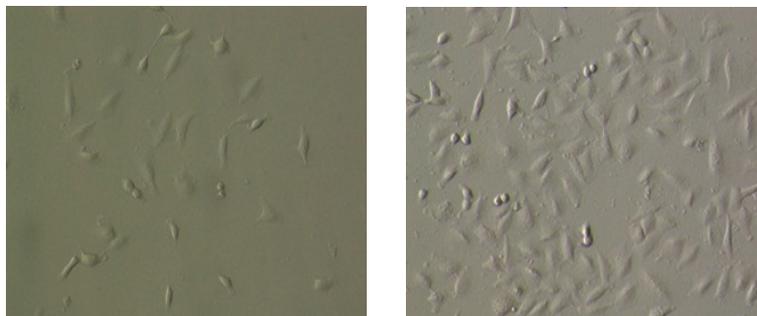


Fig. 3-35 ナノ育毛剤 A 10  $\mu$ g/ml 添加(左.1日目 右.3日目)

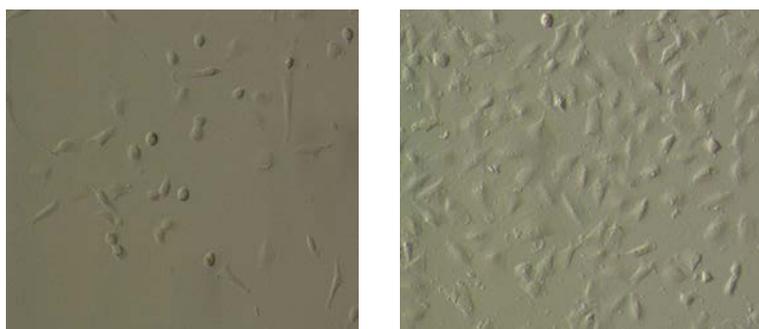


Fig. 3-36 ナノ育毛剤 A 5  $\mu$ g/ml 添加(左. 1日目 右. 3日目)

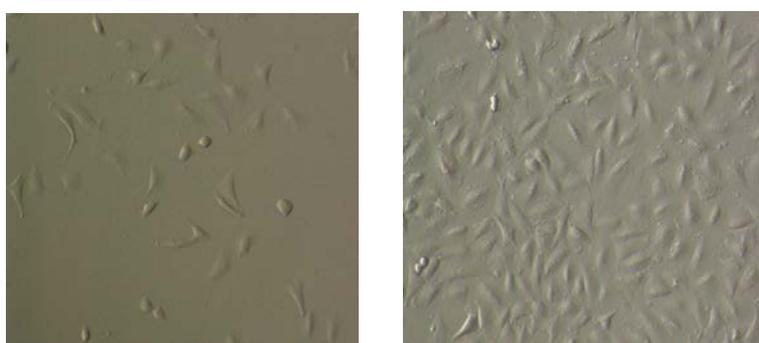


Fig. 3-37 ナノ育毛剤 B 10  $\mu$ g/ml 添加(左. 1日目 右. 3日目)

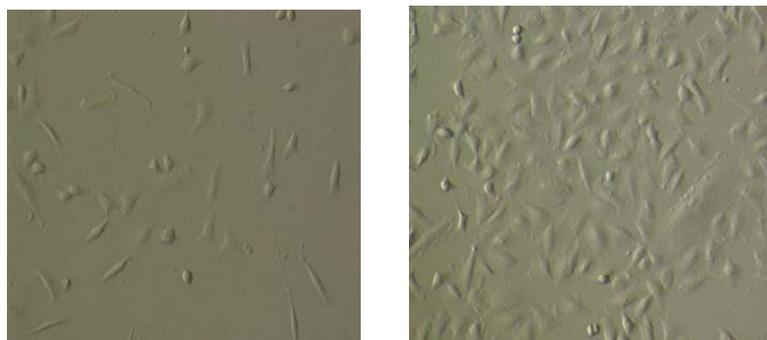


Fig. 3-38 ナノ育毛剤 B 5  $\mu$ g/ml 添加(左. 1日目 右. 3日目)

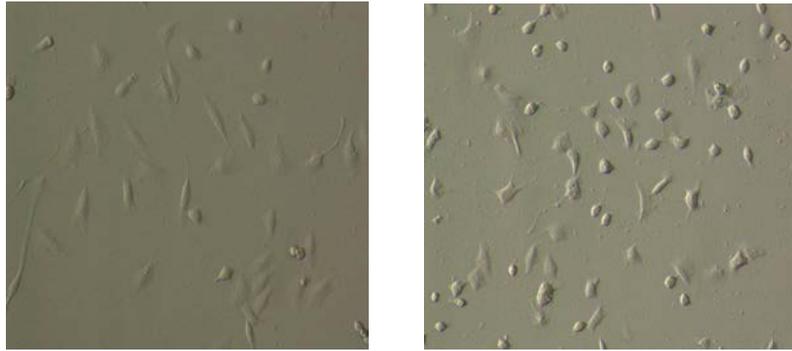


Fig. 3-39 市販の育毛剤 10  $\mu$ g/ml 添加(左.1日目 右.3日目)

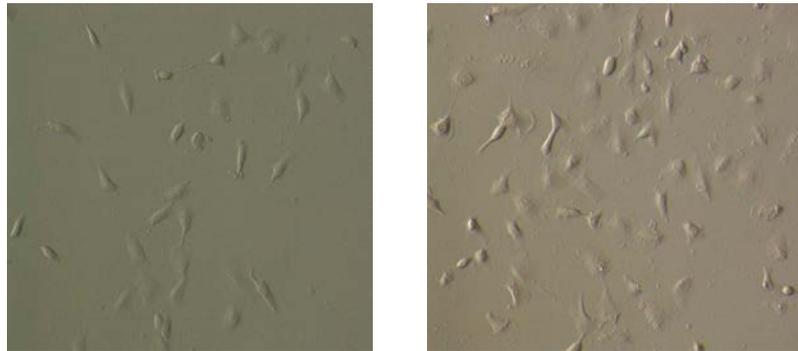


Fig. 3-40 市販の育毛剤 5  $\mu$ g/ml 添加(左.1日目 右.3日目)

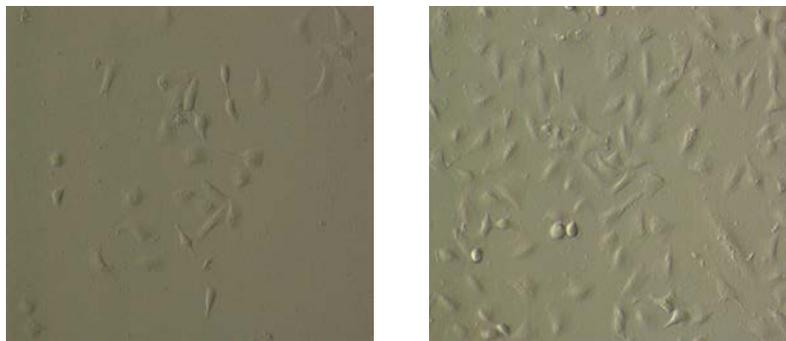


Fig. 3-41 植物エキス 10  $\mu$ g/ml 添加(左.1日目 右.3日目)

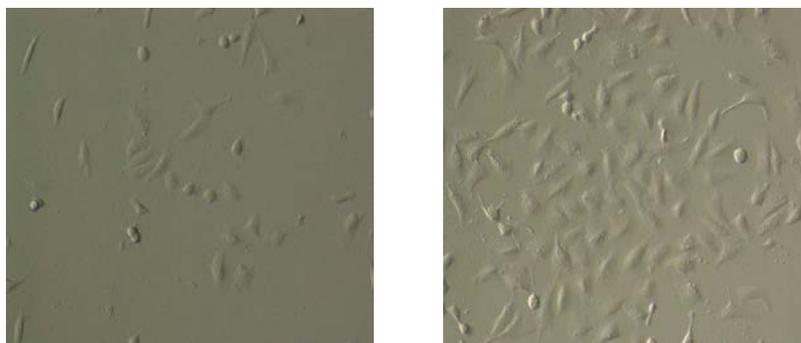


Fig. 3-42 植物エキス 5  $\mu$ g/ml 添加(左.1日目 右.3日目)

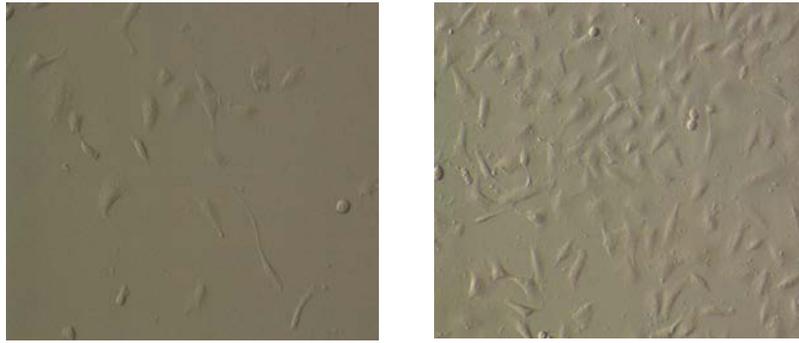


Fig. 3-43 磁性流体 10  $\mu$ g/ml 添加(左.1日目 右.3日目)

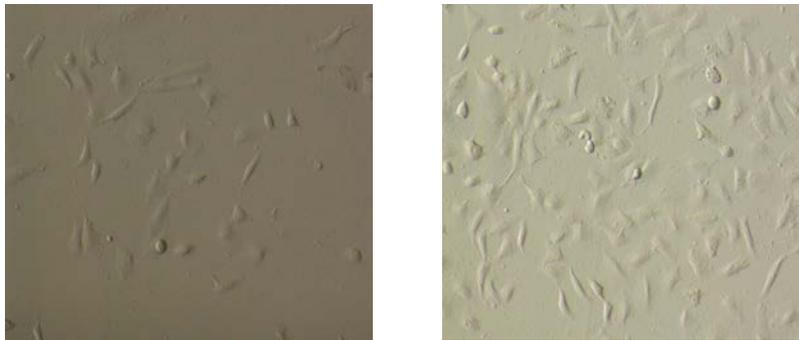


Fig. 3-44 磁性流体 5  $\mu$ g/ml 添加(左.1日目 右.3日目)

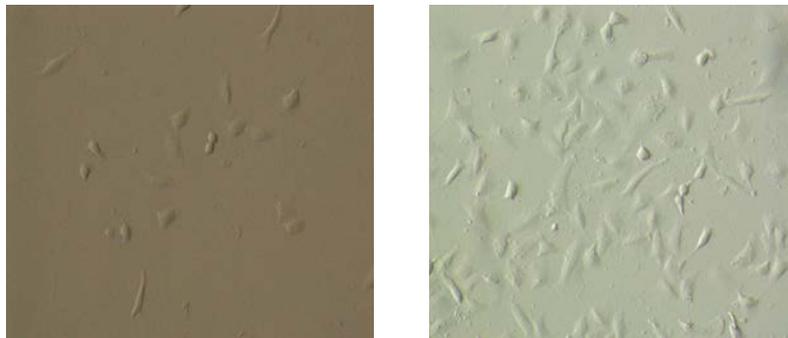


Fig. 3-45 コントロール (左.1日目 右.3日目)

### 3.7.7 マウス血液中における Fe 濃度分析

C3H マウスに対してコントロール組(水塗布)、市販品育毛剤塗布組(リアップ 5X)、ナノ育毛剤 A 塗布組を個々に1ヶ月間塗布し、その後、マウスの血液を採集し、マウス血液中の Fe 濃度を分析した。

Table. 3-3 マウス血液中における鉄濃度分析

実験組名称	鉄濃度 ( $\mu\text{g/dl}$ )
コントロール組	226
市販品育毛剤塗布組 (リアップ 5X)	233
ナノ育毛剤 A 塗布組	239

Table. 3-3 に示した通り、マウス血液中における鉄濃度分析は、異なる試料の塗布によるマウス血液中における鉄濃度の差異が見られなかった。

### 3.7.8 TEM による $\text{Mg}(\text{OH})_2$ をコーティングしたナノ育毛剤試作品の観察

TEM 観察結果は、Fig. 3-46、3-47 の通り、マグネタイト微粒子の表面に  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  コーティングされたことを示した。

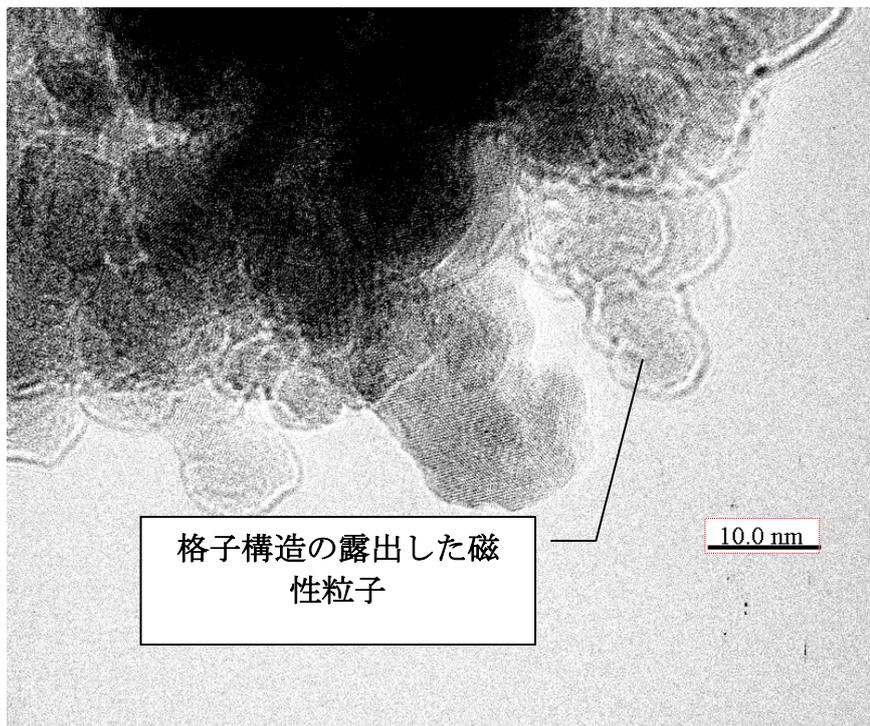


Fig. 3-46 TEM による  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg}(\text{OH})_2$  コーティングの観察 (pH7)

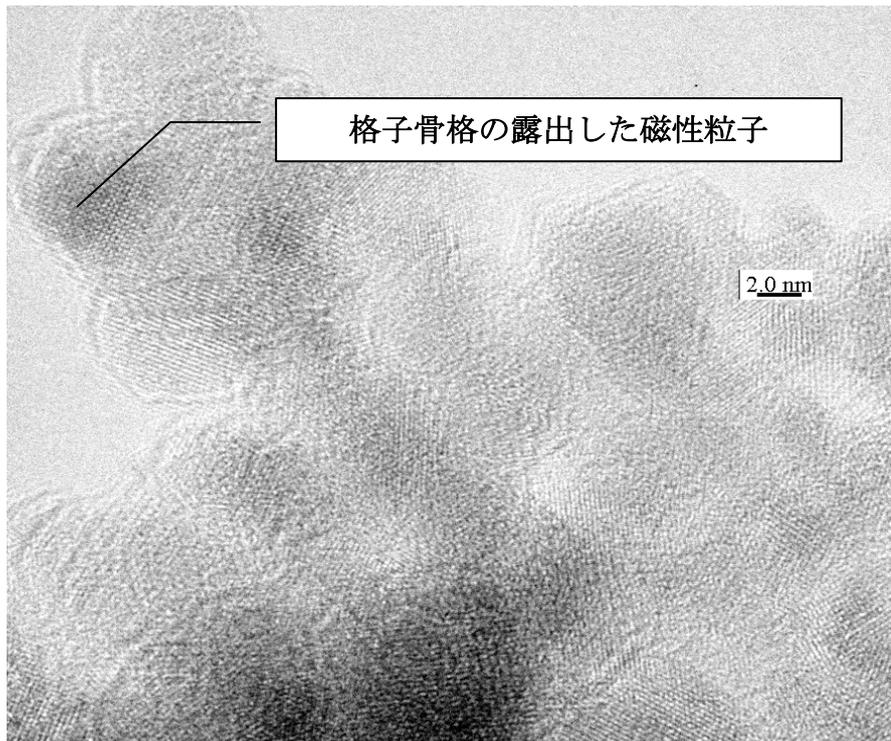


Fig. 3-47 TEMによる  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg}(\text{OH})_2$  コーティングの観察 (pH8)



Fig. 3-48 TEMによる  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  +薬剤コーティングの観察 (pH7)



Fig. 3-49 TEM による  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  +薬剤コーティングの観察 (pH8)

TEM 観察結果は、Fig. 3-48、3-49 マグネタイト微粒子の表面に薬剤コーティングされたことを示した。

### 3.7.9 EDS による $\text{Mg}(\text{OH})_2$ をコーティングした試作品の評価

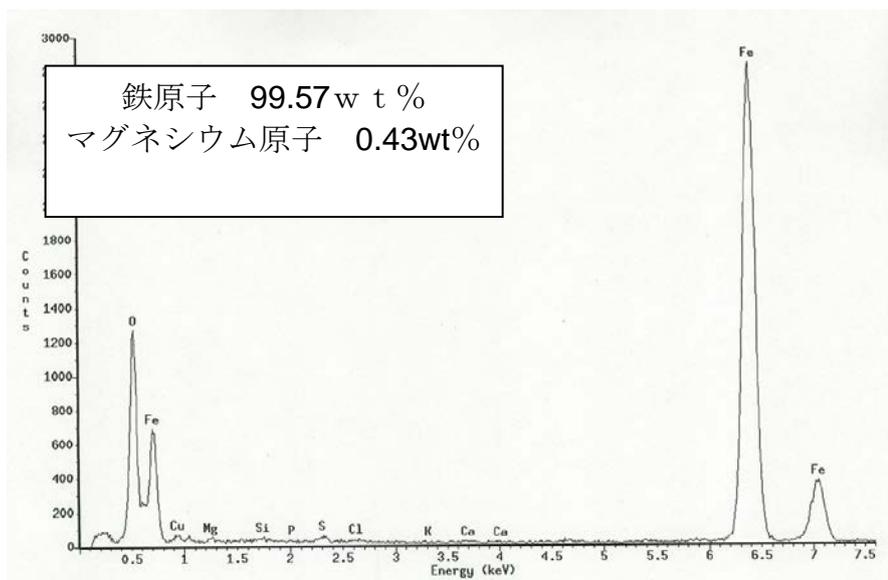


Fig. 3-50 EDS による  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  +薬剤コーティングの観察 (pH7)

Fig. 3-50 に示した EDS 測定結果は、鉄原子 99.57wt%、マグネシウム原子 0.43wt% であった。鉄原子に対してマグネシウム原子が極めて少なく、恐らく、ろ過工程で多くのマグネシウムの流出は原因であることと推測した。

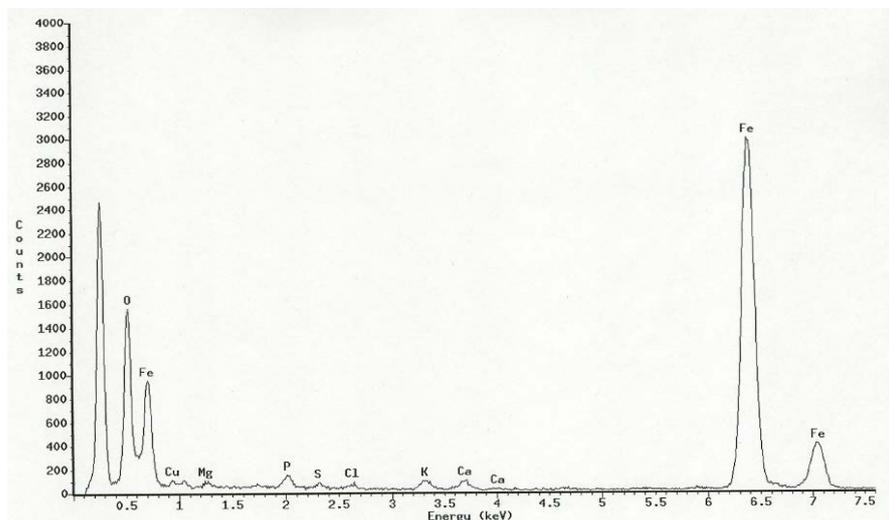
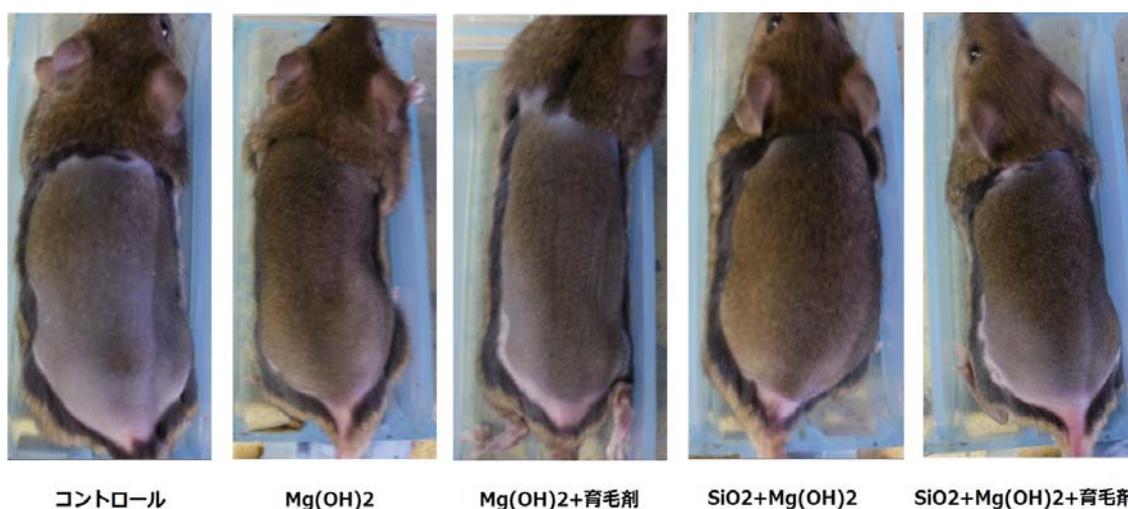


Fig. 3-51 EDS による  $Mg(OH)_2$  +薬剤コーティングの観察 (pH8)

Fig. 3-51 に示した通り、薬剤コーティングを行った磁性流体の結果は、鉄原子 99.20wt%、マグネシウム原子 0.80% であった。pH7 の条件よりマグネシウムの流出は減少した。

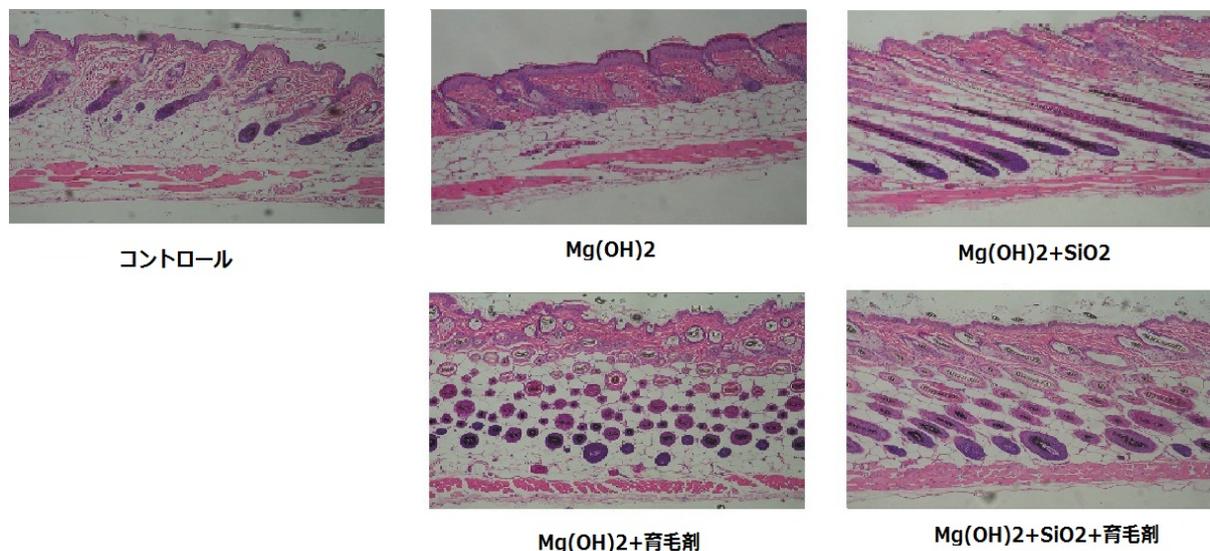
### 3.7.10 $Mg(OH)_2$ をコーティングした育毛剤の実験結果



## 14日目

Fig. 3-52  $Mg(OH)_2$  をコーティングした育毛剤の実験結果

Fig. 3-52 に示した通り、14 日目で SiO<sub>2</sub> コーティングの育毛剤は Mg(OH)<sub>2</sub> をコーティングした育毛剤より育毛効果が高い。



### 14日目

Fig. 3-53 Mg(OH)<sub>2</sub> をコーティングした育毛剤の切片写真

Fig. 3-53 に示した通り、14 日目で SiO<sub>2</sub> コーティングの育毛剤は Mg(OH)<sub>2</sub> より毛根の発達度合が高く、毛乳頭細胞の分化が観察されていた。

#### 3.7.11 Mg(OH)<sub>2</sub> をコーティングした育毛剤の安全性評価

Table 3-4 及び Fig. 3-54 に示した通り、ヒトの皮膚細胞を用いた安全性実験の結果にて各試料の細胞生存率は示した。Mg(OH)<sub>2</sub> は高い細胞生存率を示し、SiO<sub>2</sub> /Mg(OH)<sub>2</sub> よりやや細胞生存率が高い。Mg(OH)<sub>2</sub> 及び SiO<sub>2</sub> /Mg(OH)<sub>2</sub> は共に高い安全性を有することが確認された。また、各試料を塗布した各試験組のマウスにおいても皮膚への刺激性等の異常症状が観察されなかった。

Table 3-4 三次元皮膚モデルによる Mg(OH)<sub>2</sub> コーティングの安全性評価

試験回数	精製水	Mg(OH) <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> /Mg(OH) <sub>2</sub>	5%SLS
1 回目	100	77.3	73.8	4.1
2 回目	100	78.4	72.3	4.2
3 回目	100	80.3	70.2	3.8
平均値	100	78.7	72.1	4.0

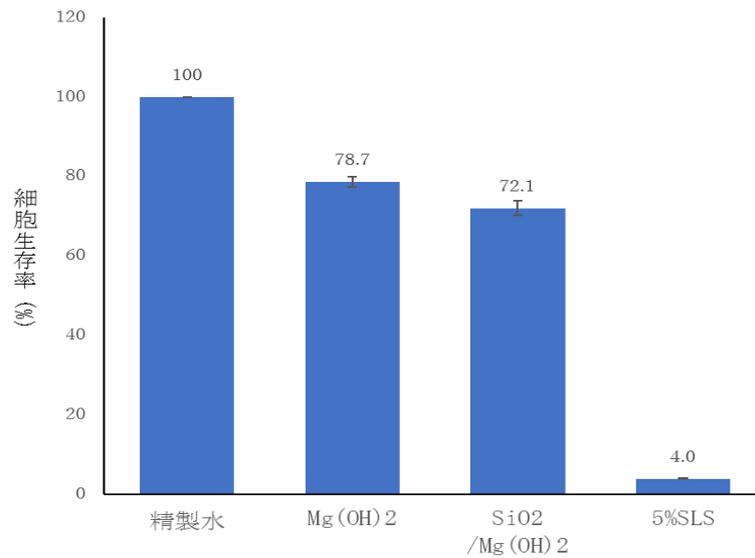


Fig. 3-54 三次元皮膚モデルによる Mg(OH)<sub>2</sub>コーティングの安全性評価の結果

### 3.8 ナノ育毛剤試作品の長期使用による評価

#### 3.8.1 動物の長期使用による評価

ナノ育毛剤の長期間使用による皮膚の形態学に対する影響を評価し、試験動物を用い、ナノ育毛剤の粒子局在、皮膚の形態学的な変化、さらに肝臓、腎臓等の臓器での蓄積性を検討した。

長期間暴露を研究するため、1ml/日の頻度でナノ育毛剤を試験動物の皮膚に9ヶ月間に塗布し、皮膚の表皮、毛包及び肝臓、腎臓を採取し、さらに、光学顕微鏡で暴露標本を観察した。

#### 3.8.2 材料と方法

##### (1) 試験動物

8週齢のC3Hマウス（メス）を用いた。実験直前に試験動物の背中（4cm×3cm）の毛をバリカンにより剃り、市販されている除毛クリームを塗り、除毛する。

本試験は埼玉工業大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

## (2) 経皮暴露試験

C3H マウスの背部皮膚に試験サンプルの塗布は毎日行い、マウスの背部に 1ml/1 回の頻度で試験サンプルを塗布した。試験組は未塗布組、ナノ磁性粒子のみ塗布組 (0.1%)、薬剤塗布組 (0.002%セファランチン)、ナノ育毛剤塗布組 (0.1%ナノ磁性粒子+0.002%セファランチンでコーティング) の 4 グループに分けた。1 グループは 5 匹である。経時変化を観察するため、暴露 9 ヶ月後、試験動物の皮膚組織、肝臓、腎臓を採取した。

## (3) HE 染色

試験で採取した暴露後の皮膚、肝臓及び腎臓を 4%中性ホルマリン溶液で標本を固定し、パラフィンで組織包埋を行い、ミクロトームで未染色のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

## (4) PAS 染色

試験で採取した暴露後の皮膚、肝臓及び腎臓を 4%中性ホルマリン溶液で標本を固定し、パラフィンで組織包埋を行い、ミクロトームで未染色のパラフィン切片を作成し、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色を行った。PAS 染色は主に組織における グリコーゲンの証明のために使用されている。過ヨウ素酸 はグルコース残基を選択的に酸化し、アルデヒド を生成し、シッフ 試薬によって赤紫色に変色する。PAS 染色は微量のグリコーゲンの検出は鋭敏であり、癌組織中にグリコーゲンの生成は急速に増加しているため、組織癌化の 1 つの判断基準として利用されている。

## (5) 光学顕微鏡の観察

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後もしくは PAS 染色後の切片を光学顕微鏡 (NIKON, ×100 倍、×400 倍) により観察し、暴露後の皮膚、肝臓及び腎臓においてナノ微粒子の蓄積の有無を観察し、さらに試験物質による組織に対する影響を調べた。

## (6) EDS 分析

試験で採取した暴露後の皮膚を 4%中性ホルマリン溶液で標本を固定し、皮膚組織中の

ナノ微粒子の残留性の有無を確認するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) のエネルギー分散型 X 線 (EDX) 分析装置を用い、皮膚組織中のマグネタイト微粒子の残留性を確認した。

### 3.8.3 HE 染色の観察結果

#### (1) 皮膚の表皮及び毛包の観察 (HE 染色)

下記の Fig. 3-55～Fig. 3-58 は各試験組 (未塗布、磁性流体のみ塗布、薬剤のみ塗布、ナノ育毛剤塗布) において皮膚組織の光学顕微鏡での観察結果であった。角質層や毛包漏斗部において黒いナノ磁性微粒子が観察されず、400 倍で拡大しても角質層や毛包漏斗部で黒いナノ磁性微粒子が観察されなかった。以上の結果は、ナノ磁性微粒子が角質層や毛包等の細胞領域まで侵入することがないことを示した。また、各試験組においても組織の異常が見られなかった。

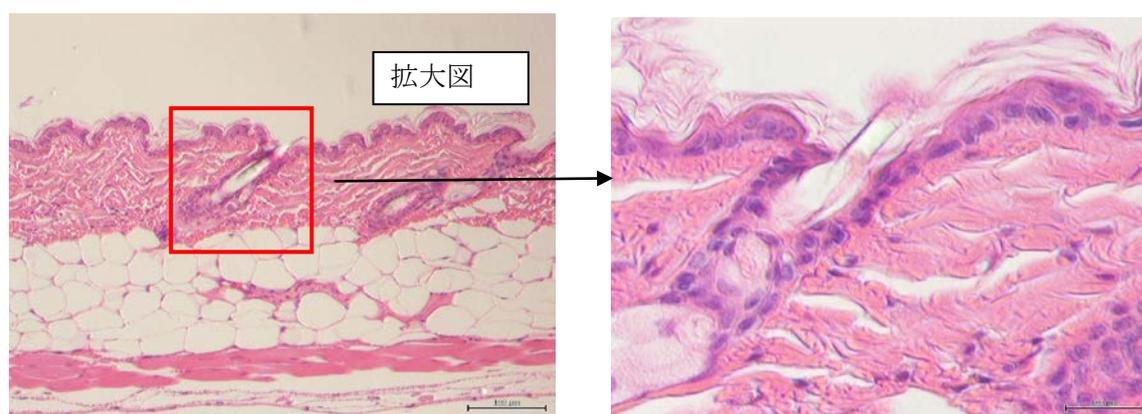


Fig. 3-55 未塗布 (100 倍)

未塗布 (400 倍)

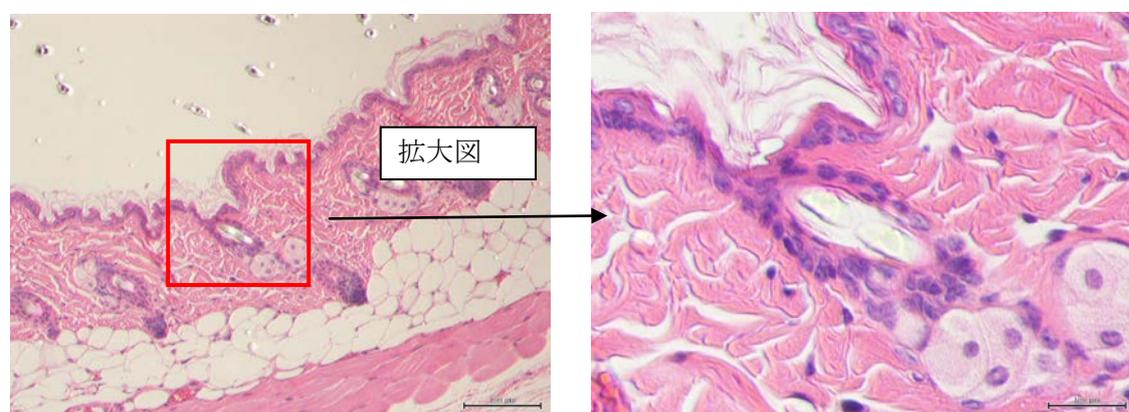


Fig. 3-56 磁性流体のみ塗布 (100 倍)

磁性流体のみ塗布 (400 倍)

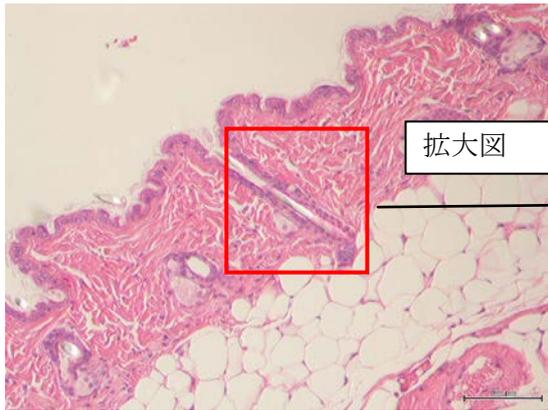
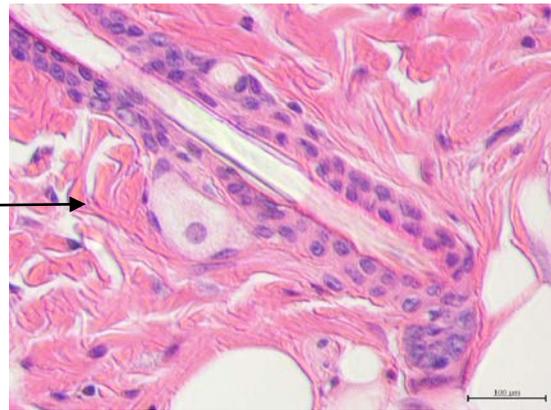


Fig. 3-57 薬品のみ塗布 (100倍)



薬品のみ塗布 (400倍)

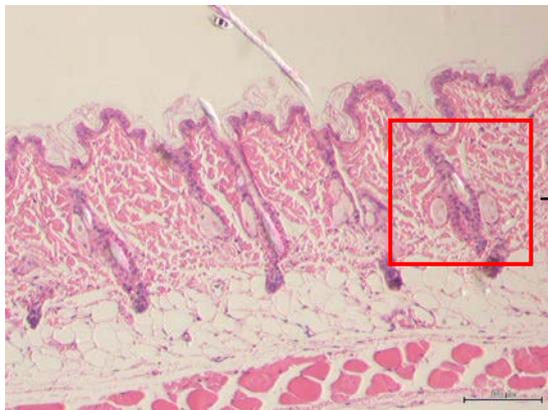
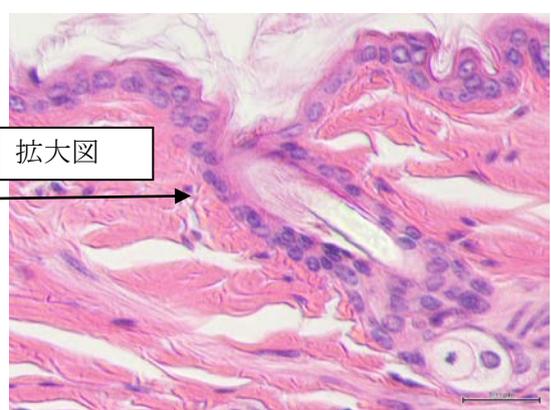


Fig. 3-58 ナノ育毛剤塗布 (100倍)



ナノ育毛剤塗布 (400倍)

## (2) 肝臓の観察(HE 染色)

下記の Fig. 3-59～Fig. 3-62 は各試験組（未塗布、磁性流体のみ塗布、薬剤のみ塗布、ナノ育毛剤塗布）において肝臓組織の光学顕微鏡での観察結果であった。肝臓組織において黒いナノ磁性微粒子が観察されず、400倍で拡大しても肝臓組織で黒いナノ磁性微粒子が観察されなかった。以上の結果は、ナノ磁性微粒子が肝臓組織等の細胞領域まで侵入することがないことを示した。また、各試験組においても組織の異常が見られなかった。

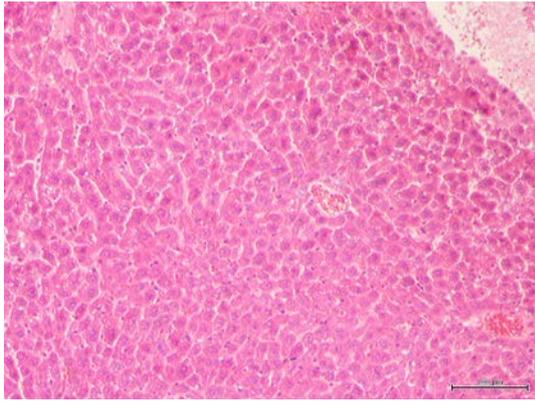
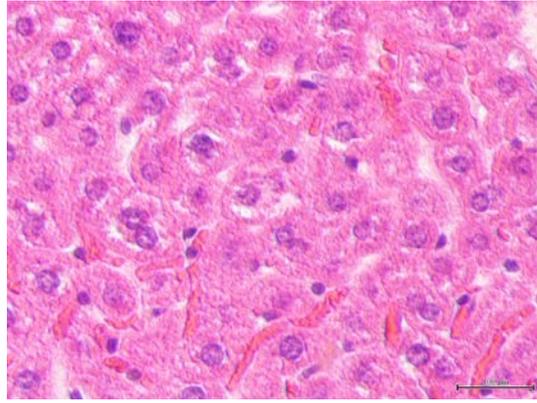


Fig. 3-59 未塗布 (100倍)



未塗布 (400倍)

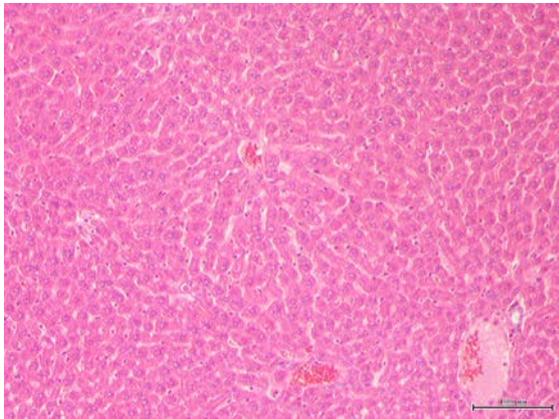
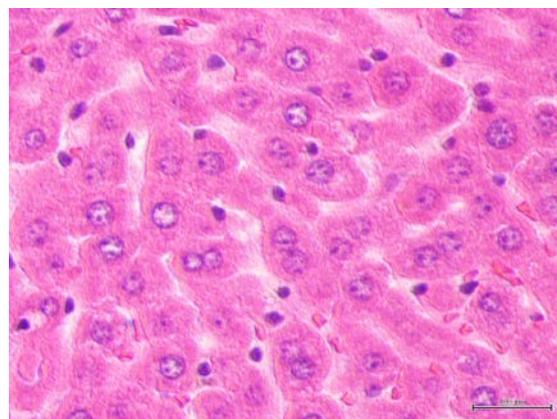


Fig. 3-60 磁性流体のみ塗布 (100倍)



磁性流体のみ塗布 (HE 染色 400倍)

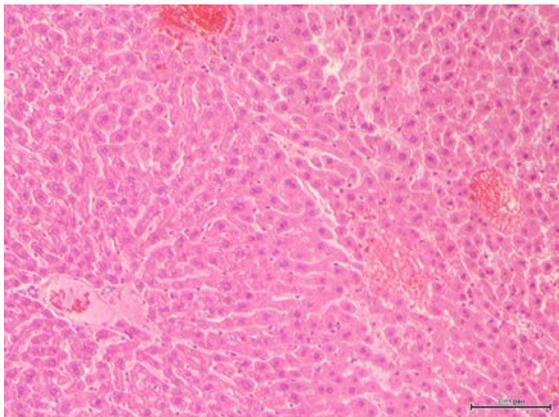
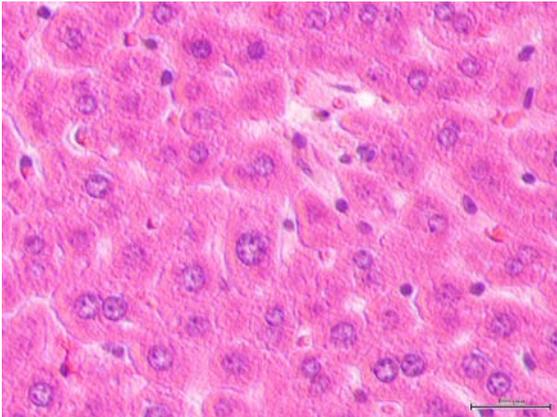


Fig. 3-61 薬品のみ塗布 (100倍)



薬品のみ塗布 (400倍)

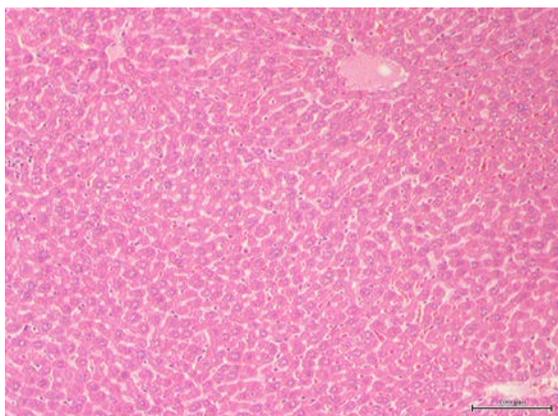
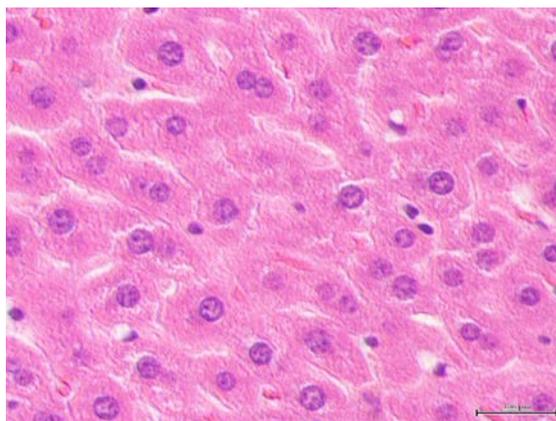


Fig. 3-62 ナノ育毛剤塗布 (100倍)



ナノ育毛剤塗布 (400倍)

### (3) 腎臓の観察(HE 染色)

下記の Fig. 3-63～Fig. 3-66 は各試験組（未塗布、磁性流体のみ塗布、薬剤のみ塗布、ナノ育毛剤塗布）において腎臓組織の光学顕微鏡での観察結果であった。腎臓組織において黒いナノ磁性微粒子が観察されず、400倍で拡大しても腎臓組織で黒いナノ磁性微粒子が観察されなかった。以上の結果は、ナノ磁性微粒子が腎臓組織等の細胞領域まで侵入することがないことを示した。また、各試験組においても組織の異常が見られなかった。

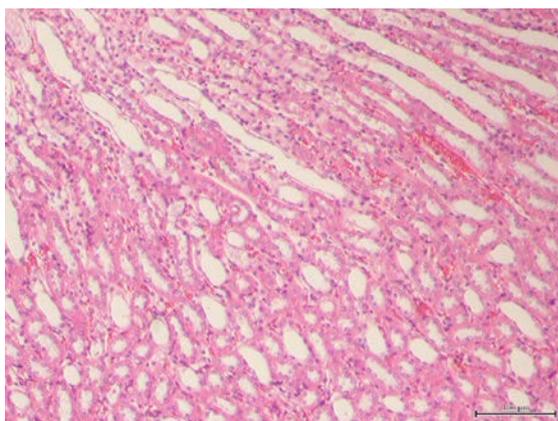
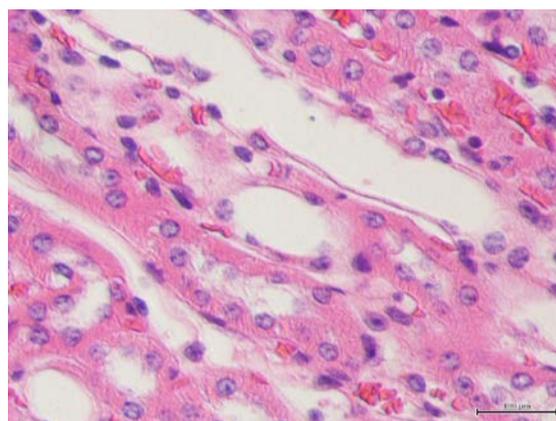


Fig. 3-63 未塗布 (100倍)



未塗布 (400倍)

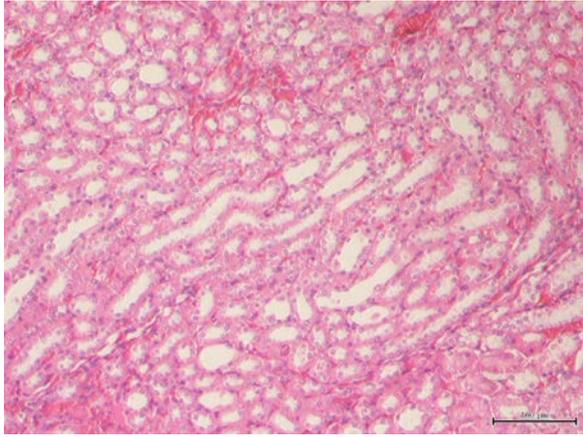
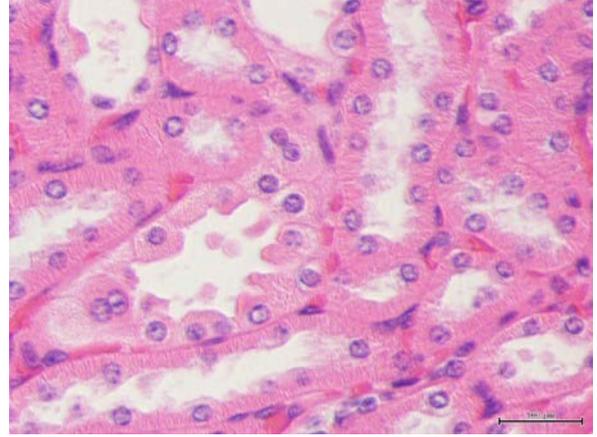


Fig. 3-64 磁性流体のみ塗布 (100倍)



磁性流体のみ塗布 (400倍)

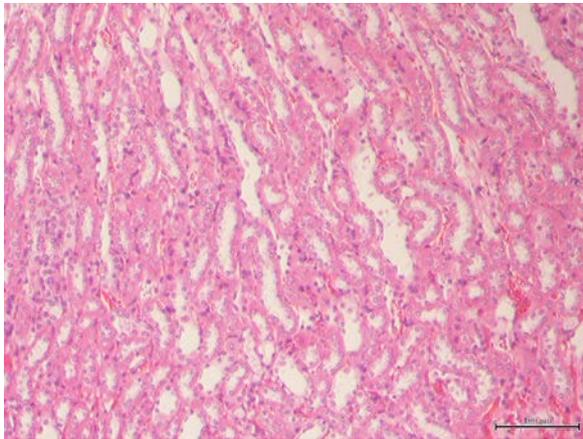
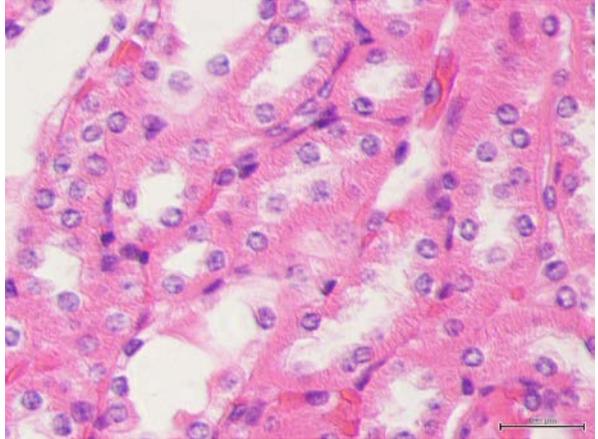


Fig. 3-65 薬品のみ塗布 (100倍)



薬品のみ塗布 (400倍)

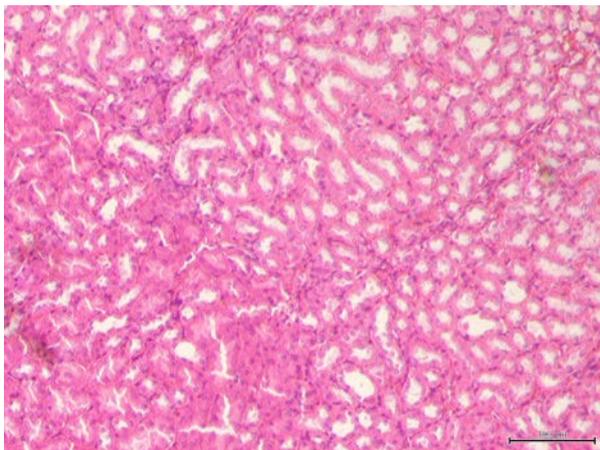
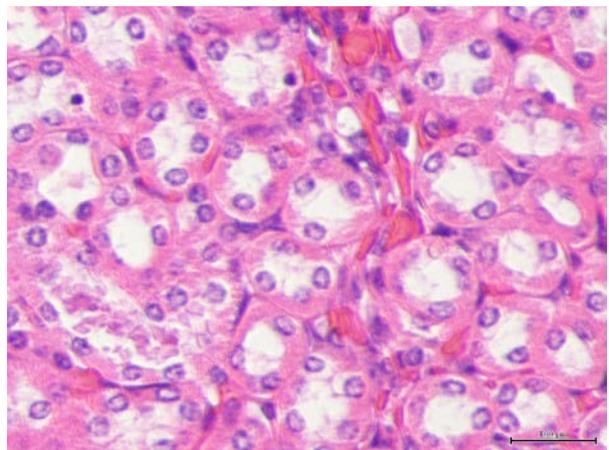


Fig. 3-66 ナノ育毛剤塗布 (100倍)



ナノ育毛剤塗布 (400倍)

### 3.8.4 PAS 染色の観察結果

#### (1) 皮膚の表皮及び毛包の観察(PAS 染色)

下記の Fig. 3-67～Fig. 3-70 は各試験組（未塗布、磁性流体のみ塗布、薬剤のみ塗布、ナノ育毛剤塗布）において皮膚組織の光学顕微鏡での観察結果であった。未塗布組と比較し、各試験組においても PAS 陽性反応の差異が観察されなかった。以上の結果は、各試験組の皮膚において癌化の特徴成分であるグリコーゲンの異常変化及びその他の病変がないことを示した。

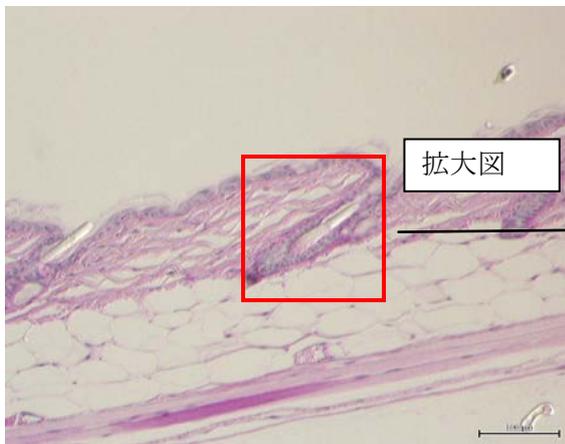


Fig. 3-67 未塗布 (100 倍)



未塗布 (400 倍)

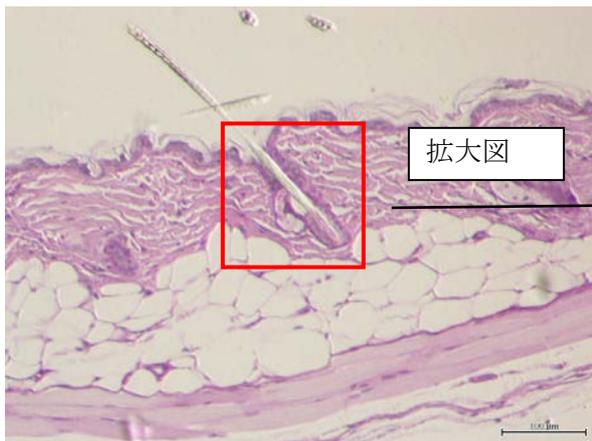
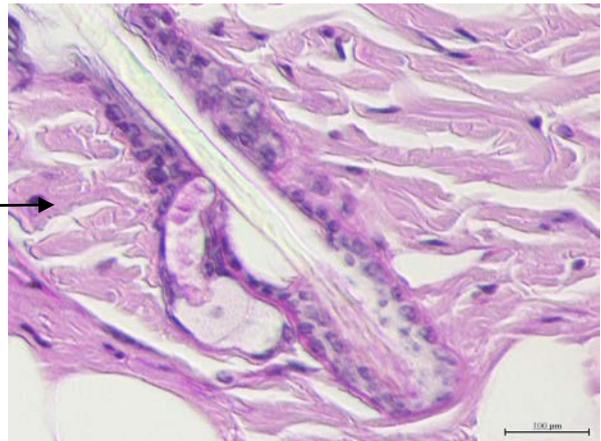


Fig. 3-68 磁性流体のみ塗布 (100 倍)



磁性流体のみ塗布 (400 倍)

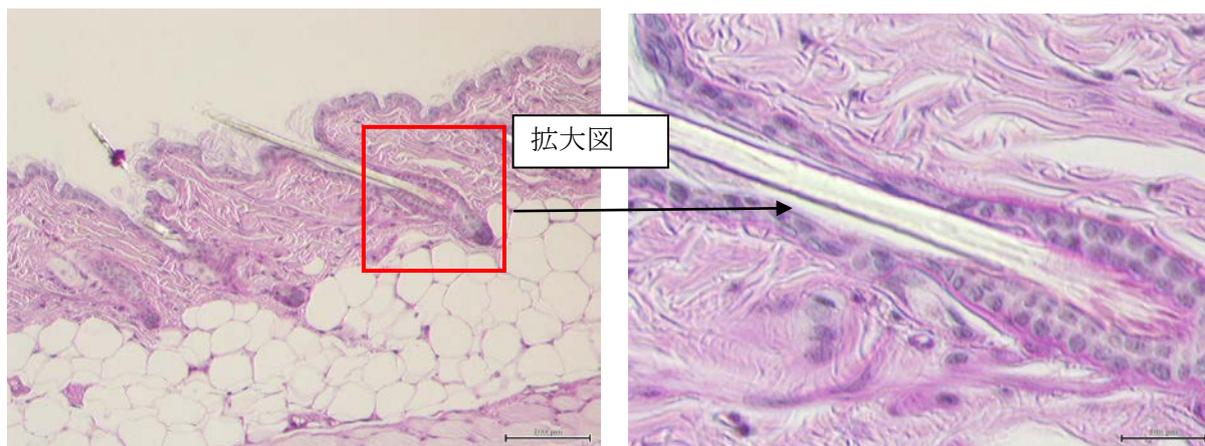


Fig. 3-69 薬品のみ塗布 (100 倍)

薬品のみ塗布 (400 倍)

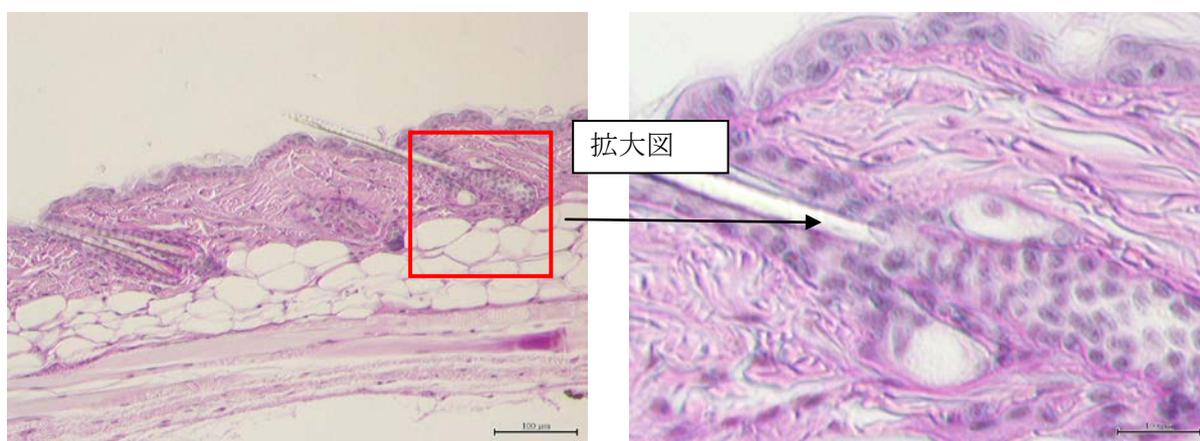


Fig. 3-70 ナノ育毛剤塗布 (100 倍)

ナノ育毛剤塗布 (400 倍)

## (2) 肝臓の観察(PAS 染色)

下記の Fig. 3-71～Fig. 3-74 は各試験組（未塗布、磁性流体のみ塗布、薬剤のみ塗布、ナノ育毛剤塗布）において肝臓組織の光学顕微鏡での観察結果であった。未塗布組と比較し、各試験組においても PAS 陽性反応の差異が観察されなかった。以上の結果は、各試験組の肝臓において癌化の特徴成分であるグリコーゲンの異常変化及びその他の病変がないことを示した。

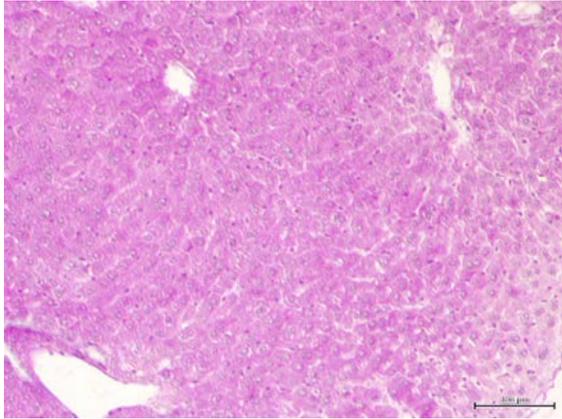
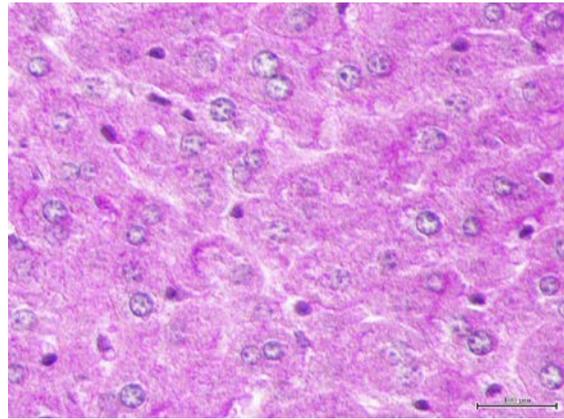


Fig. 3-71 未塗布 (100 倍)



未塗布 (400 倍)

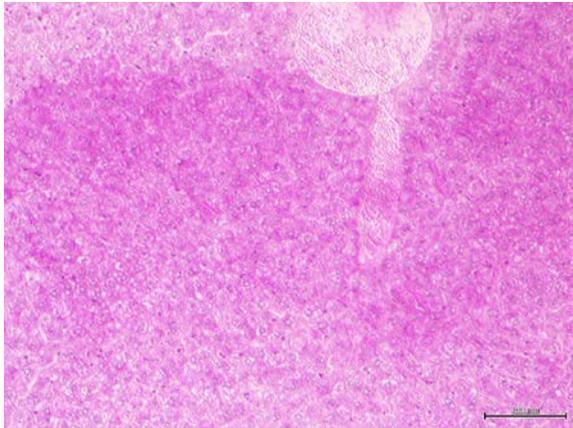
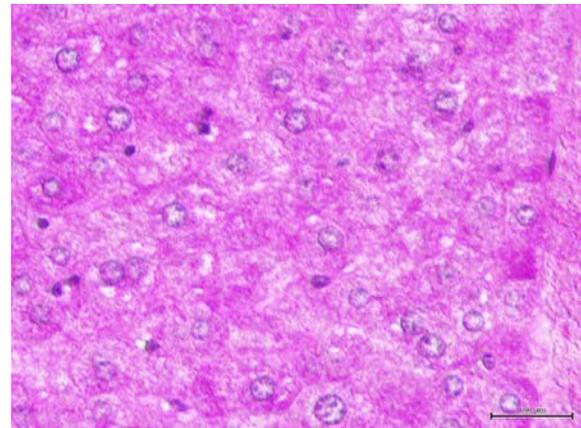


Fig. 3-72 磁性流体のみ塗布 (100 倍)



磁性流体のみ塗布 (400 倍)

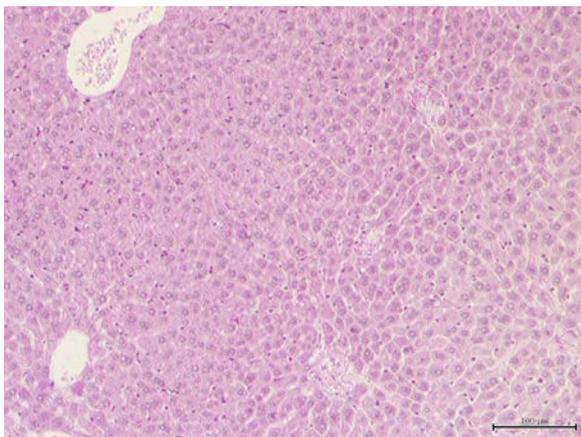
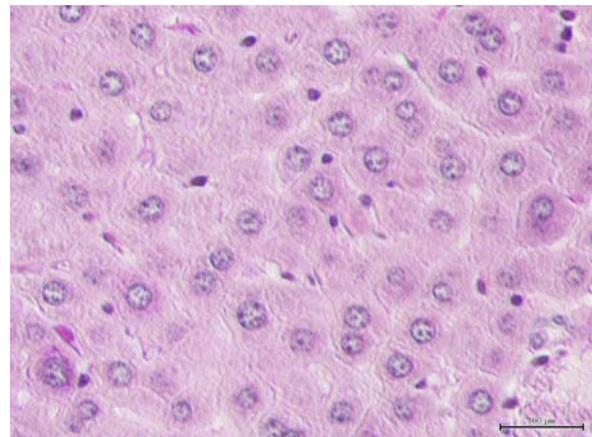


Fig. 3-73 薬品のみ塗布 (100 倍)



薬品のみ塗布 (400 倍)

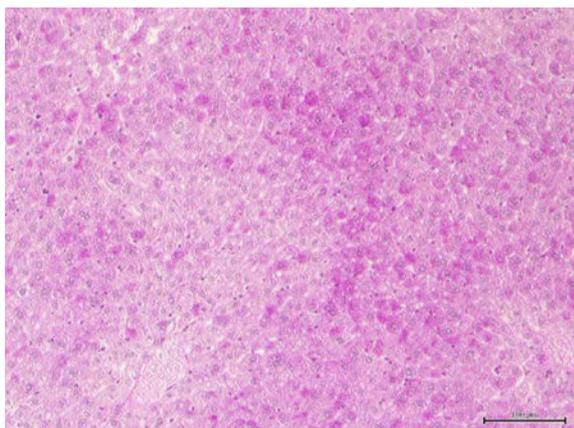
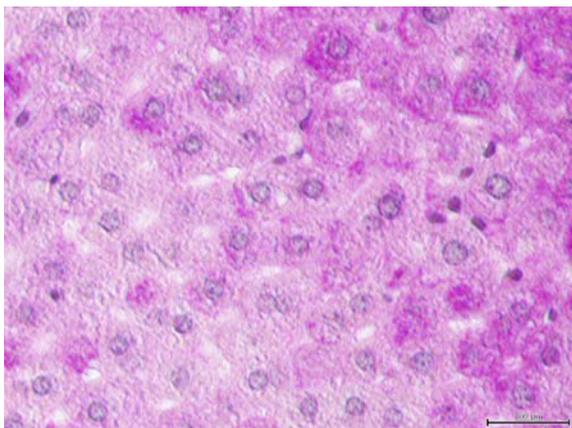


Fig. 3-74 ナノ育毛剤塗布 (100 倍)



ナノ育毛剤塗布 (400 倍)

### (3) 腎臓の観察(PAS 染色)

下記の Fig. 3-75～Fig. 3-78 は各試験組（未塗布、磁性流体のみ塗布、薬剤のみ塗布、ナノ育毛剤塗布）において腎臓組織の光学顕微鏡での観察結果であった。未塗布組と比較し、各試験組においても PAS 陽性反応の差異が観察されなかった。以上の結果は、各試験組の腎臓において癌化の特徴成分であるグリコーゲンの異常変化及びその他の病変がないことを示した。

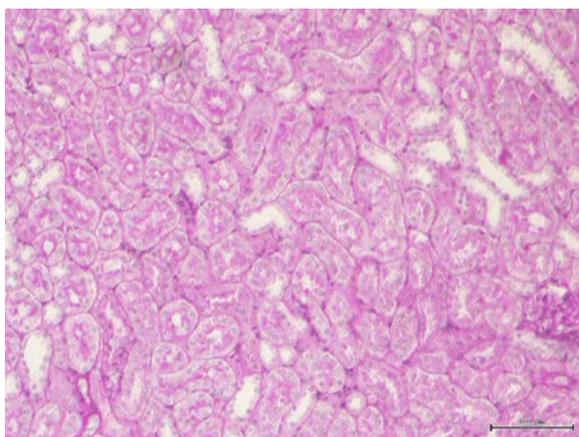
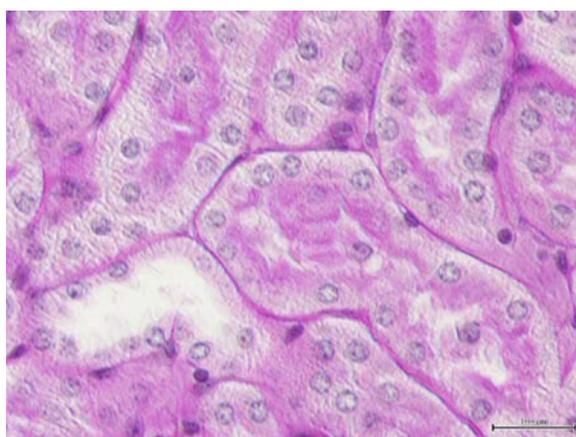


Fig. 3-75 未塗布 (100 倍)



未塗布 (400 倍)

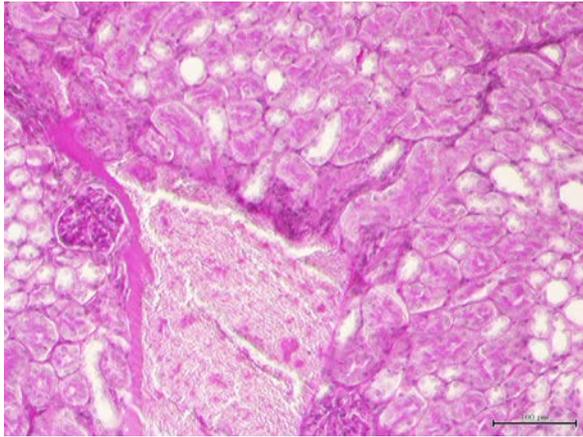
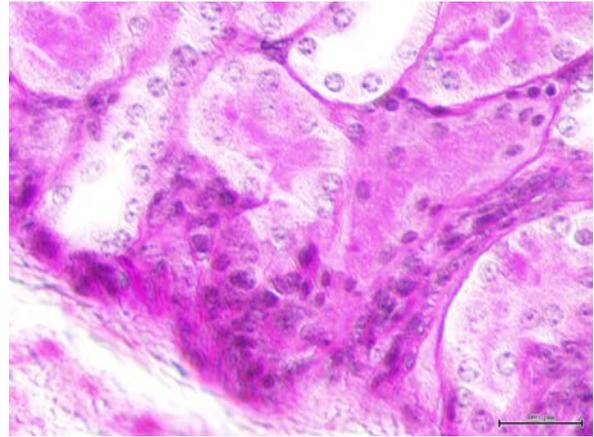


Fig. 3-76 磁性流体のみ塗布 (100 倍)



磁性流体のみ塗布 (400 倍)

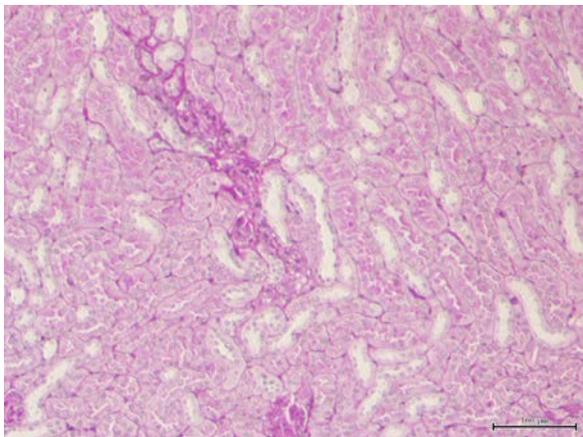
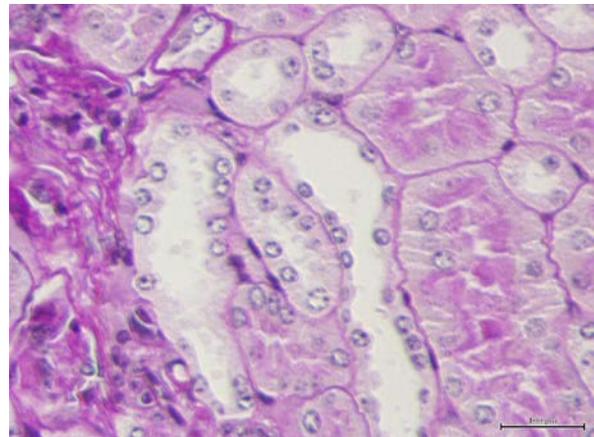


Fig. 3-77 薬品のみ塗布 (100 倍)



薬品のみ塗布 (400 倍)

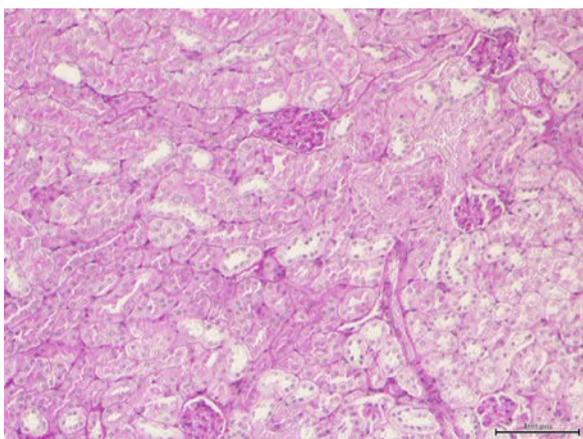
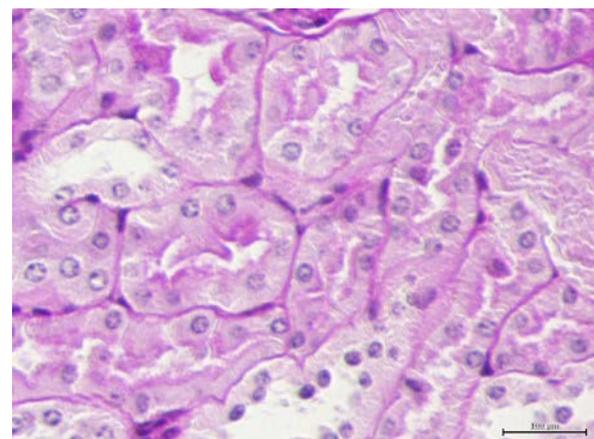


Fig. 3-78 ナノ育毛剤塗布 (100 倍)



ナノ育毛剤塗布 (400 倍)

### 3.8.5 EDS による皮膚中のマグネタイト粒子の確認結果

EDS（エネルギー分散型X線分光器）による元素分析方法は、電子顕微鏡による試料観察の時、電子線を物質に照射すると蛍光X線が発生し、元素固有の情報を分析できる方法である。各試験組においても、EDSでの元素分析の結果、C、O、Pt、Sが検出された。また、Ptは観察時の蒸着元素であり、マグネタイト微粒子に含まれているFeが検出されなかった。

以上の結果によって各試験組の皮膚においてマグネタイト微粒子が残留していないことが示唆されている。

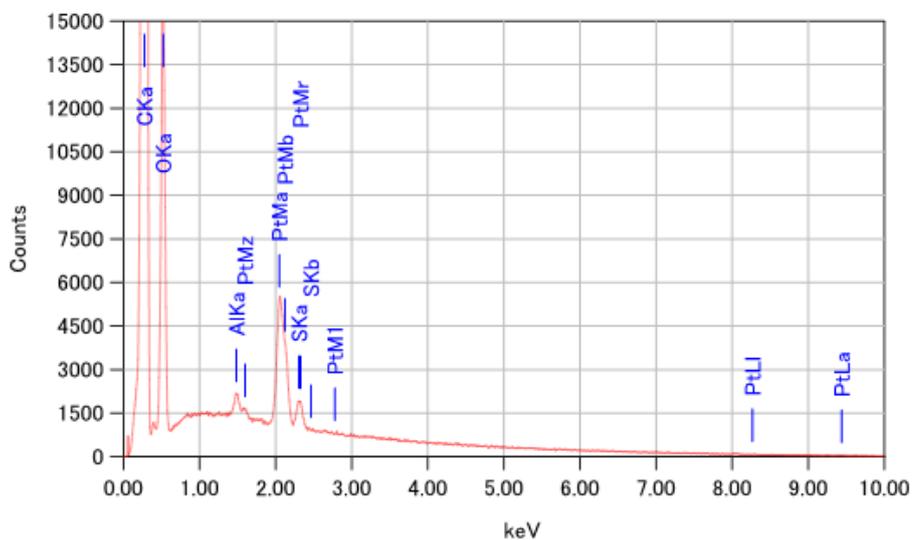


Fig. 3-79 EDS による未処理組の皮膚におけるマグネタイト粒子の確認結果

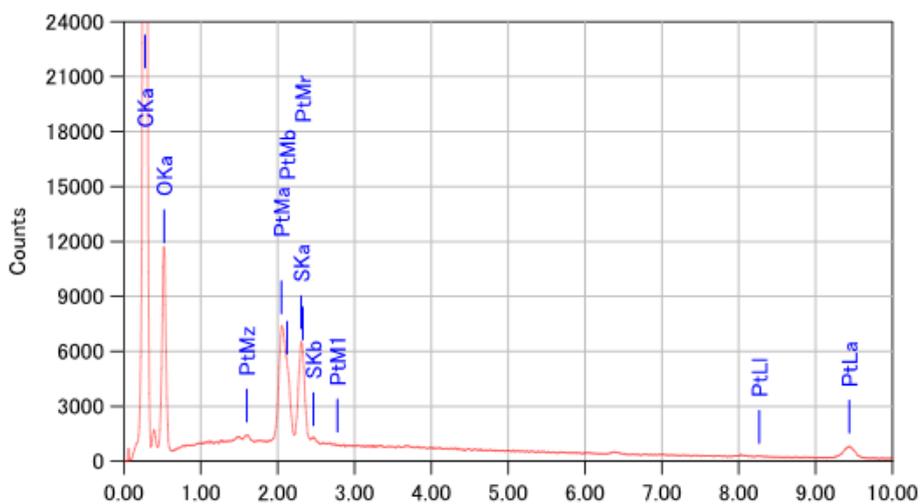


Fig. 3-80 EDS による磁性流体のみ塗布組の皮膚におけるマグネタイト粒子の確認結果

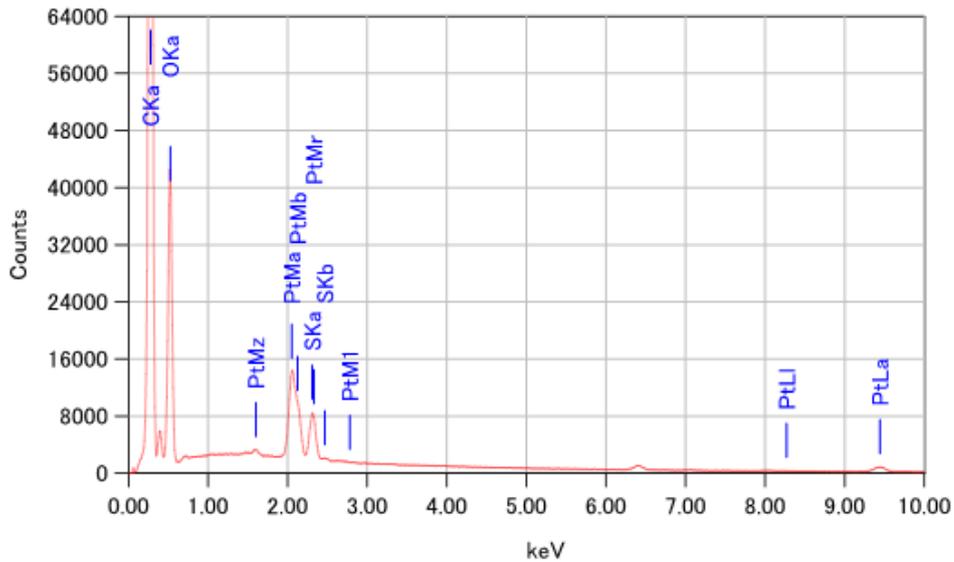


Fig. 3-81 EDS による薬品のみ塗布組の皮膚におけるマグネタイト粒子の確認結果

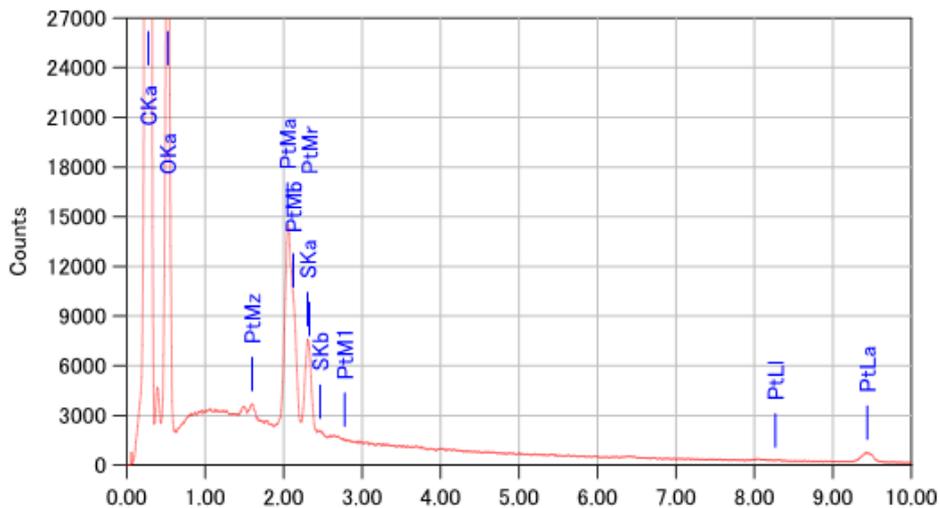


Fig. 3-82 EDS によるナノ育毛剤塗布組の皮膚におけるマグネタイト粒子の確認結果

### 3.8.6 EDS による肝臓のマグネタイト粒子の確認結果

各試験組においても、EDS（エネルギー分散型特性 X 線分析装置）での元素分析の結果、C、O、Pt、S が検出されました。Pt は観察時の蒸着元素であり、マグネタイト微粒子に含まれている Fe が検出されなかった。

以上の結果によって各試験組の肝臓においてマグネタイト微粒子が残留していないことが示唆されている。

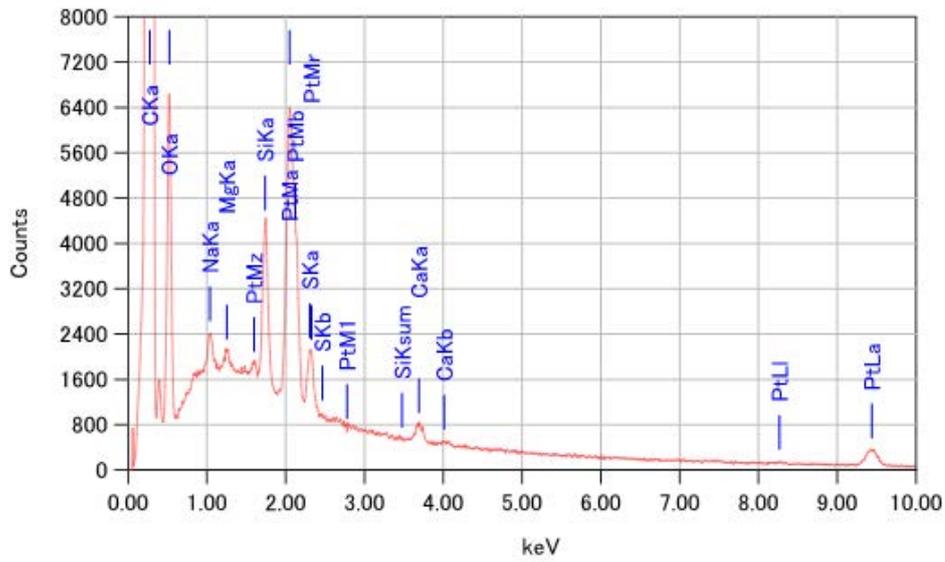


Fig. 3-83 EDS による未処理組の肝臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

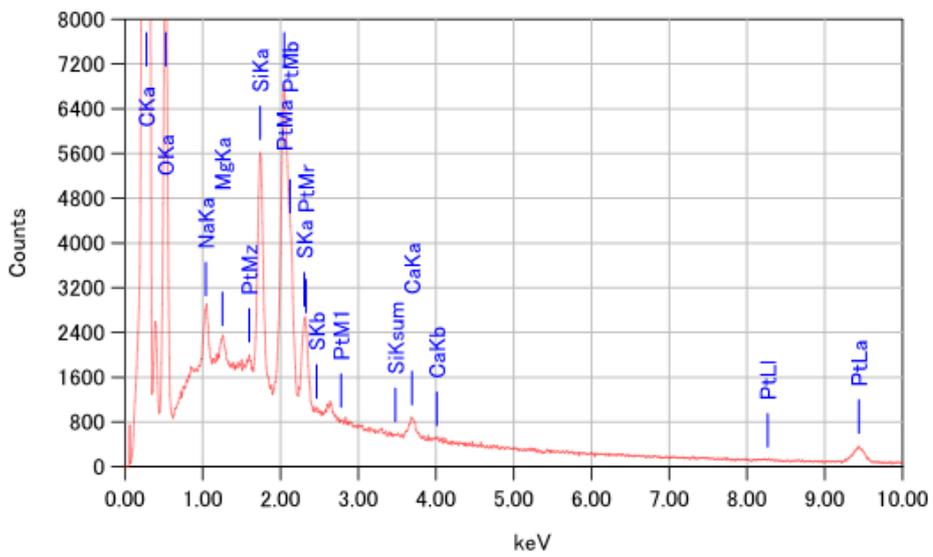


Fig. 3-84 EDS による磁性流体のみ塗布組の肝臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

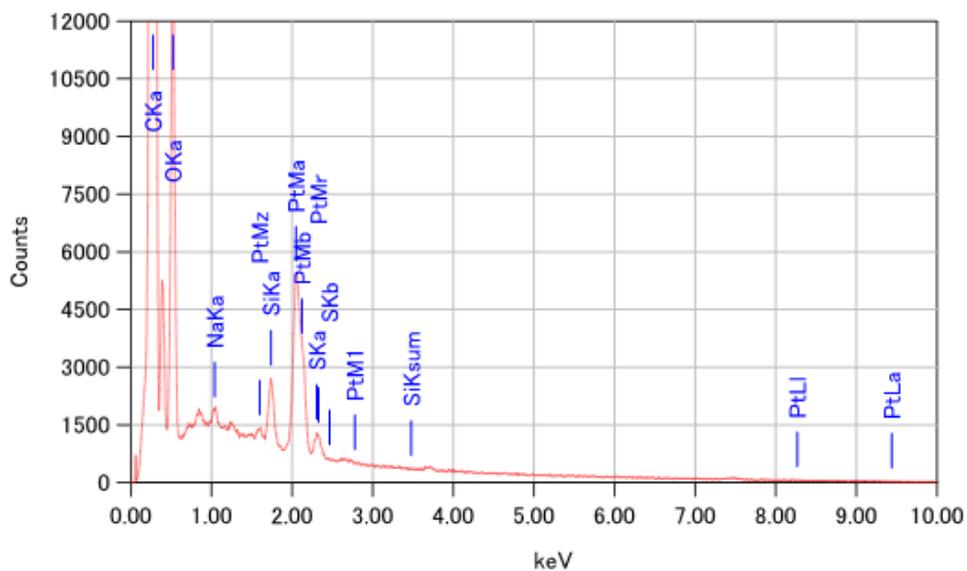


Fig. 3-85 EDS による薬品のみ塗布組の肝臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

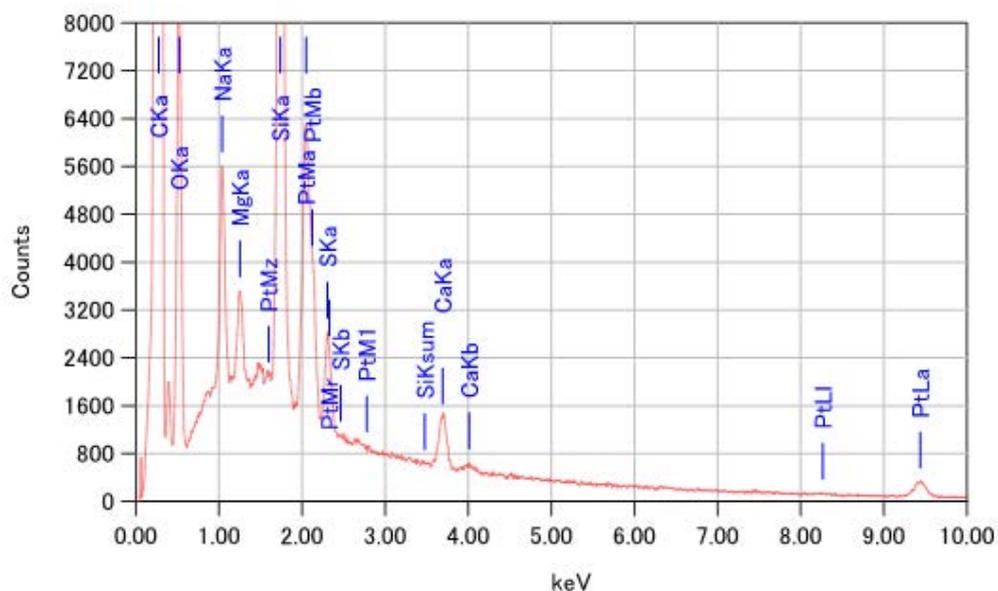


Fig. 3-86 EDS によるナノ育毛剤塗布組の肝臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

### 3. 8. 7 EDS による腎臓のマグネタイト粒子の確認結果

各試験組においても、EDS（エネルギー分散型特性 X 線分析装置）での元素分析の結果、C、O、Pt、S が検出されました。Pt は観察時の蒸着元素であり、マグネタイト微粒子に含まれている Fe が検出されなかった。

以上の結果によって各試験組の腎臓においてマグネタイト微粒子が残留していないことが示唆されている。

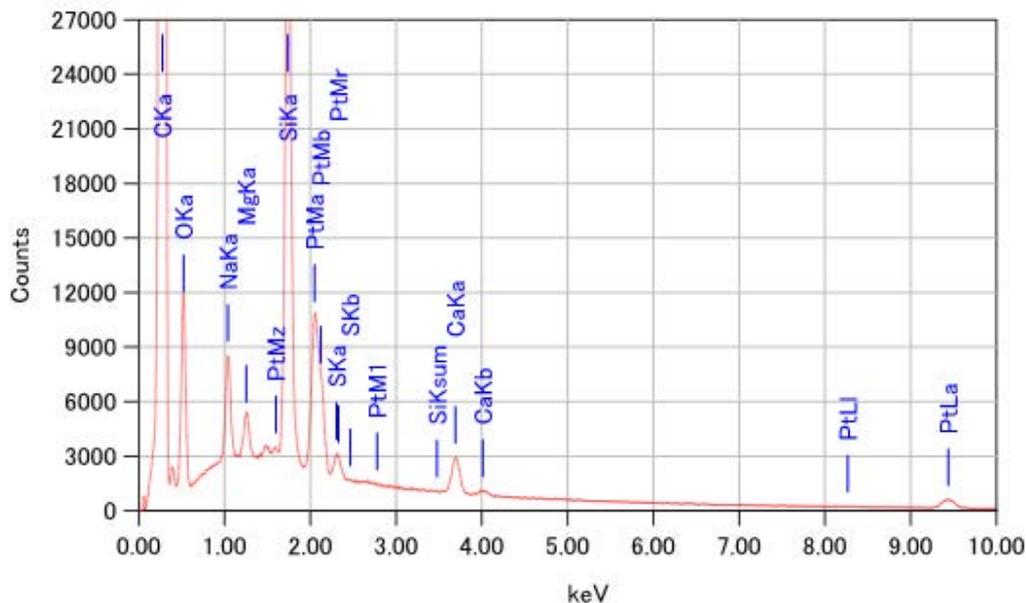


Fig. 3-87 EDS による未処理組の腎臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

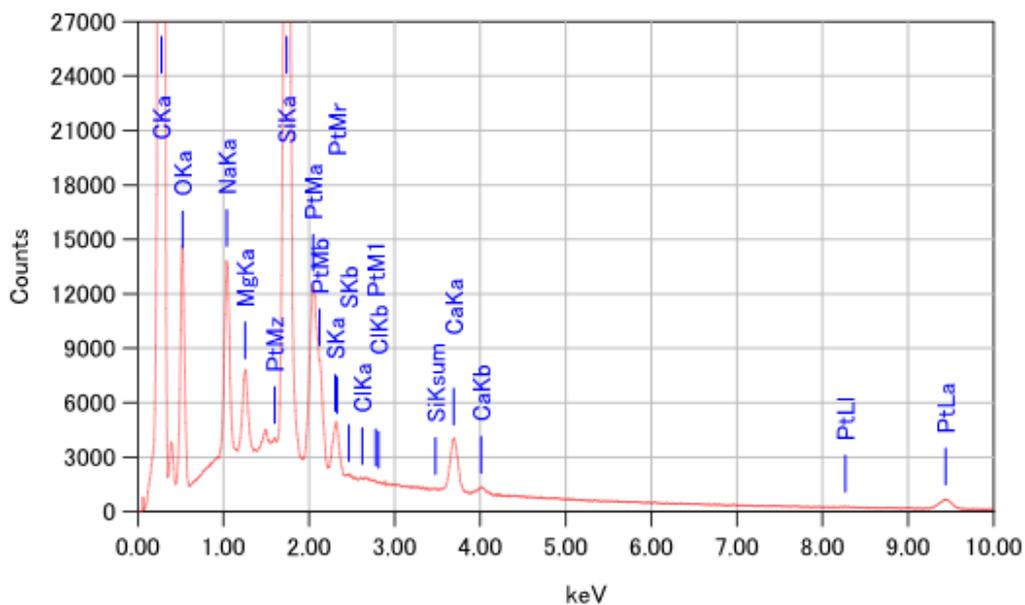


Fig. 3-88 EDS による磁性流体のみ塗布組の腎臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

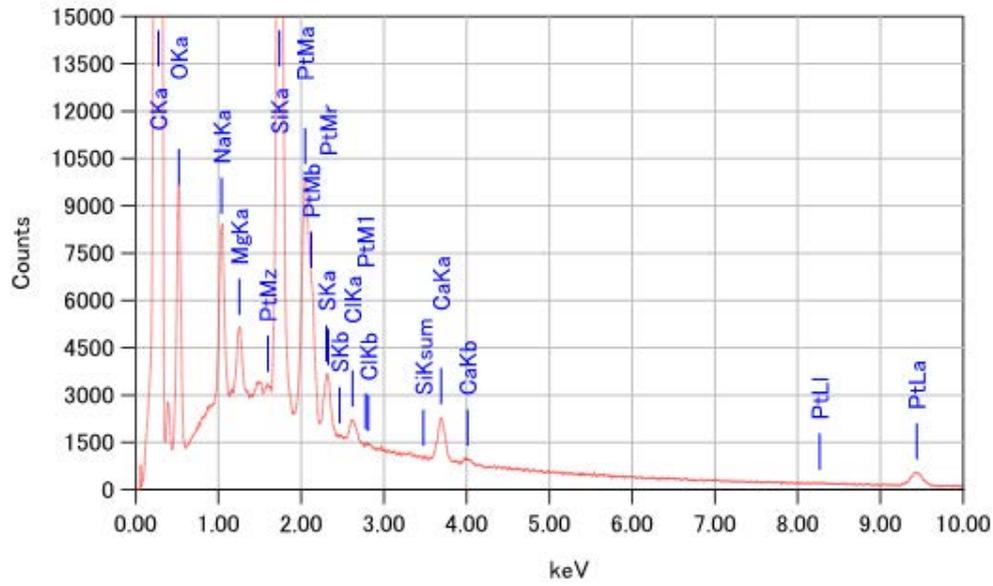


Fig. 3-89 EDS による薬品のみ塗布組の腎臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

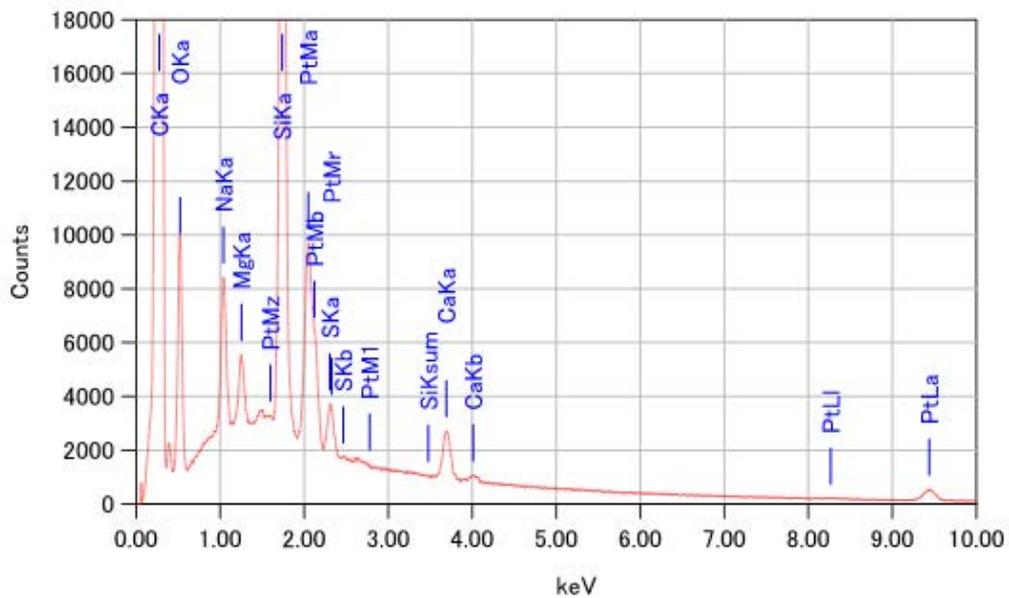


Fig. 3-90 EDS によるナノ育毛剤塗布組の腎臓におけるマグネタイト粒子の確認結果

### 3.9 小括

本章ではナノ育毛剤試作品の効果評価を行った。本章の内容は以下の通りに総括した。

- (1) 育毛実験の結果、肉眼では、一定の育毛効果を確認することができた。また、皮膚の切片や毛根部の観察結果は、ナノ育毛剤試作品は育毛効果を有することを示した。
- (2) 細胞安全実験 細胞安全実験の結果は、ナノ育毛剤試作品による細胞生存率が高く、皮膚に対して安全であることを示した。
- (3) 毛乳頭細胞実験 コントロールに比べ、ナノ育毛剤試作品 A、B を  $50\ \mu\text{g/ml}$ 、 $10\ \mu\text{g/ml}$ 、 $5\ \mu\text{g/ml}$  添加した試験組の増殖速度は速く、濃度の違いによる顕著な育毛効果を有することが確認された。
- (4) マウス血液中における Fe 濃度分析は、異なる試料の塗布によるマウス血液における Fe 濃度の差異が見られなかった。そのため、マグネタイト微粒子は皮膚の表面を透過し、血液中に侵入していないことを示した。
- (5) TEM 観察結果は、マグネタイト微粒子の表面に  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  コーティングされたことを示した。育毛効果について  $\text{SiO}_2$  コーティングの育毛剤は  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  より毛根の発達度が高く、毛乳頭細胞の分化が観察されていた。 $\text{Mg}(\text{OH})_2$  及び  $\text{SiO}_2$  / $\text{Mg}(\text{OH})_2$  は共に高い安全性を有することが確認できた。
- (6) 各試験組の長期間塗布試験の結果は、9 ヶ月で長期間塗布したマウスの皮膚、肝臓、腎臓組織においても黒いナノ磁性微粒子が観察されなかった。以上の結果は、ナノ磁性微粒子が腎臓組織等の細胞領域まで侵入することがないことを示した。また、各試験組においても組織の病理的な異常が見られなかった。
- (7) 各試験組においても、EDSでの元素分析の結果は、マグネタイト微粒子に含まれている Fe が検出されなかったことを示した。各試験組の皮膚、肝臓、腎臓においてマグネタイト微粒子が残留していないことが示唆されている。

### 3.10 参考文献

- 1) <https://www.dermatol.or.jp/qa/qa11/q03.html>. Downloaded 24, Dec. 2016.
- 2) <https://www.dermatol.or.jp/qa/qa11/q06.html>. Downloaded 24, Dec. 2016.
- 3) [https://www.dermatol.or.jp/uploads/uploads/files/guideline/1372913324\\_2.pdf](https://www.dermatol.or.jp/uploads/uploads/files/guideline/1372913324_2.pdf). Downloaded 25, Dec. 2016.
- 4) [https://www.dermatol.or.jp/uploads/uploads/files/guideline/1372913421\\_2.pdf](https://www.dermatol.or.jp/uploads/uploads/files/guideline/1372913421_2.pdf). Downloaded 25, Dec. 2016.
- 5) <http://www.haircare.gr.jp/dan.html>. Downloaded 15, Dec. 2016  
日本医学育毛協会 脱毛の症状と原因、治療法に関する資料
- 6) Freyburger WA, Weeks JR and Smits E: Hypotensive action of N, N-diallylmelamine (U-7720) in trained unanesthetized dogs. *Pharmacologist* 4, 165 (1962)
- 7) Sakita S, Kagoura M, Toyoda M and Morohashi M: The induction by minoxidil of fenestration in the perifollicular capillary wall. *Br J Dermatol* 140, 294296 (1999)
- 8) Humphrey SJ and Zins GR: Whole body and regional hemodynamic effects of minoxidil in the conscious dog. *J Cardiovascular Pharmacol* 6, 979988 (1984)
- 9) Hirkaler GM: Simultaneous two-probe laser doppler velocimetric assessment of topically applied drugs in rats. *J Pharmacol Methods* 21, 123127 1 (1989)
- 10) Uno H, Capas A and Brigham P: Action of topical minoxidil in the bald stump-tailed macaque. *J Am Acad Dermatol* 16, 657668 (1987)
- 11) Rhodes L, Happer J, Uno H, Gaito G, AudetteArruda J, Kurata S, Berman C, Primka R and Pikounis B: The effects of finasteride (Proscar) on hair growth, hair cycle stage, and serum testosterone and dihydrotestosterone in adult male and female Stumptail Macaques (*Macaca arctoides*). *J Clin Endocrinol Metab* 79, 991996 (1994)
- 12) 西日本皮膚科 58 (4)、619-624、『桑白皮エキスの実験的、臨床的育毛効果について』(1996)
- 13) 第96回日本皮膚科学会総会・学術大会発表、『桑白皮エキスによる男性型脱毛症

- 治療の留意点について』(1997)
- 14) FRAGRANCE JOURNAL 42(6)、33-37、『桑白皮エキスの育毛効果とまつ毛美容液への応用』(2014)
  - 15) 第11回日本臨床皮膚外科学会、『桑白皮エキス、柿葉エキスの実験的および臨床的育毛効果』(1994)
  - 16) 第48回日本皮膚科学会西部支部総会・学術大会、『柿葉抽出フラボノイド配糖体(ルチン・イソクエルシトリン etc.)の実験的・臨床育毛効果』(1996)
  - 17) 第65回日本皮膚科学会 東京支部学術大会、『桐葉エキスによる女性型脱毛症の治療経験』(2002)
  - 18) FRAGRANCE JOURNAL 31(2)、41-45、『桐葉エキスによる女性型脱毛症の治療』(特集：最近の脱毛・育毛メカニズム研究と育毛剤の開発動向、2003)
  - 19) 日本臨床皮膚外科学会誌 SKIN SURGERY 24(3)、141-151、『桐葉エキスの日本人の女性型脱毛症に対する育毛効果について』(2015)
  - 20) 新しい育毛剤の効果、Pharmaceutical Society of Japan, Vol. 25, No. 10(1989)
  - 21) 日本化粧品技術者会 化粧品用語集、育毛剤編
  - 22) <http://ikumoukizoku.com>. Downloaded 15, Dec. 2016
  - 23) 小友 進、日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 119、167~174 (2002)
  - 24) 皮膚の科学 Cepharanthine の毛成長促進作用の検討、Vol. 4.、No2.、P99-103、(2005)
  - 25) 園部勝也：西日本皮膚科別冊、『脱毛症におけるセファランチン液の効果』昭和53年発行
  - 26) John, C. Chang, Ginseng and Cosmetics C.&T., 92, 50(1977)
  - 27) Sarah, Harriman book of ginseng the root of heaven 23
  - 28) Lee, Y. K., JAP. Endocrine, 17, 82(1941)
  - 29) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method(2010)
  - 30) <http://www.jaima.or.jp/jp/basic/em/tem.html>. Downloaded 15, Dec. 2016
  - 31) [http://niton.com/product/zeecom\\_principle.htm](http://niton.com/product/zeecom_principle.htm). Downloaded 15, Dec. 2016

## 第四章 アトピー性皮膚炎の治療実験

### 4.1 アトピー性皮膚炎の治療背景

アトピー性皮膚炎の定義は、増悪・寛解を繰り返す、瘙痒のある湿疹を主な病変とする疾患である<sup>1)</sup>。日本皮膚科学会のアトピー性皮膚炎診断ガイドライン 2016 版によると、アトピー性皮膚炎の定義は以下の Table 4-1 に示した通りであった<sup>2)</sup>。

Table 4-1 アトピー性皮膚炎の定義・診断基準<sup>2)</sup>

<p><b>アトピー性皮膚炎の定義（概念）</b> アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、瘙痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ。アトピー素因：①家族歴・既往歴（気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患）、または②IgE抗体を産生しやすい素因。</p>	
<p><b>アトピー性皮膚炎の診断基準</b></p>	
<p>1. 瘙痒</p>	
<p>2. 特徴的皮疹と分布</p>	
<p>①皮疹は湿疹病変</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 急性病変：紅斑、湿潤性紅斑、丘疹、漿液性丘疹、鱗屑、痂皮</li> <li>• 慢性病変：浸潤性紅斑・苔癬化病変、痒疹、鱗屑、痂皮</li> </ul>	
<p>②分布</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 左右対側性</li> <li>好発部位：前額、眼周、口周・口唇、耳介周囲、頸部、四肢関節部、体幹</li> <li>• 参考となる年齢による特徴</li> <li>乳児期：頭、顔にはじまりしばしば体幹、四肢に下降。</li> <li>幼小児期：頸部、四肢関節部の病変。</li> <li>思春期・成人期：上半身（頭、頸、胸、背）に皮疹が強い傾向。</li> </ul>	
<p>3. 慢性・反復性経過（しばしば新旧の皮疹が混在する）</p>	
<p>：乳児では2カ月以上、その他では6カ月以上を慢性とする。</p>	
<p>上記1、2、および3の項目を満たすものを、症状の軽重を問わずアトピー性皮膚炎と診断する。そのほかは急性あるいは慢性の湿疹とし、年齢や経過を参考にして診断する。</p>	
<p><b>除外すべき診断（合併することはある）</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 接触皮膚炎</li> <li>• 脂漏性皮膚炎</li> <li>• 単純性痒疹</li> <li>• 疥癬</li> <li>• 汗疹</li> <li>• 魚鱗癬</li> <li>• 皮脂欠乏性湿疹</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 手湿疹（アトピー性皮膚炎以外の手湿疹を除外するため）</li> <li>• 皮膚リンパ腫</li> <li>• 乾癬</li> <li>• 免疫不全による疾患</li> <li>• 膠原病（SLE、皮膚筋炎）</li> <li>• ネザートン症候群</li> </ul>
<p><b>診断の参考項目</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 家族歴（気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎）</li> <li>• 合併症（気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎）</li> <li>• 毛孔一致性の丘疹による島肌様皮膚</li> <li>• 血清IgE値の上昇</li> </ul>	
<p><b>臨床型（幼小児期以降）</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 四肢屈側型</li> <li>• 四肢伸側型</li> <li>• 小児乾燥型</li> <li>• 頭・頸・上胸・背型</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 痒疹型</li> <li>• 全身型</li> <li>• これらが混在する症例も多い</li> </ul>
<p><b>重要な合併症</b></p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 眼症状（白内障、網膜剥離など）</li> <li>• とくに顔面の重症例</li> <li>• カボジ水疱様発疹症</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 伝染性軟属腫</li> <li>• 伝染性膿痂疹</li> </ul>

アトピー性皮膚炎は表皮、角層異常に関係する皮膚乾燥、バリア機能異常という皮膚の生理学的異常を伴い湿疹、皮膚炎の疾患である。アトピー性皮膚炎の病態は、皮膚バリア、アレルギー炎症、かゆみの3つの観点から考えると理解しやすい<sup>3)</sup>。健康

な皮膚では、表皮の皮脂、アミノ酸を主成分とした天然保湿因子、角質層の角質細胞間に細胞間脂質等の成分で皮膚を守り、バリア機能を発揮しているが、アトピー性皮膚炎の場合、病気によって天然保湿因子等の保湿成分がうまく作れないため、皮膚の保湿機能は低下し、外部からの様々な刺激を受け易くなり、皮膚の炎症、かゆみが発生する。健康皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚の比較図は下記の Fig. 4-1 の通りであった<sup>4)</sup>。

アトピー性皮膚では、抗原等の侵入によりアレルギーを起こしやすい状態となり、そして、細菌感染を起こし、アトピー性皮膚炎を悪化させる。皮膚中の水分は隙間から蒸発しやすいため、皮膚が乾燥肌になりやすいため、バリア機能障害がアトピー性皮膚炎の原因の一つである。

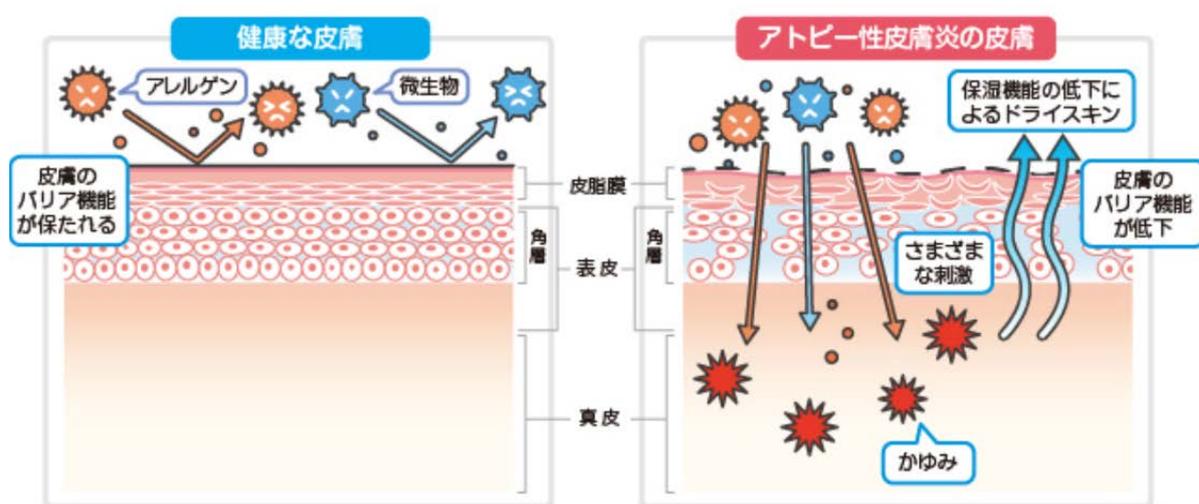


Fig. 4-1 健康皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚の比較図<sup>4)</sup>

皮膚バリア機能は、角層が主な役割を果たしている。セラミド等の細胞間脂質を主成分とする角層細胞は皮膚バリア機能の維持に非常に重要である。過去の研究では、過度乾燥などの外部要素との関与が知られている。しかし、最近の研究では、乾燥だけでなく、フィラグリン遺伝子変異のアトピー性皮膚炎発症への関与が注目されている<sup>5)</sup>。フィラグリンは、表皮細胞で産生される塩基性タンパク質の一種である。遊離のフィラグリンは角質細胞中のケラチン線維を凝集させ、その後、角質上部にアミノ酸に分解される。そのため、フィラグリンは皮膚の保湿に対して非常に重要な成分である。一部のアトピー性皮膚炎の患者では、皮膚でのインターロイキン (IL-4、IL-13 などのサイトカイン) によりフィラグリンの発現が低下している<sup>6)</sup>。

アトピー性皮膚炎の発症メカニズムの仮説として、秋山らは Fig. 4-2 に示した通りに提唱されていた<sup>7)</sup>。正常の角層は皮膚表面を保護し、アレルゲンによる侵入できなく、感作反応は発生しないが、フィラグリン変異により角層バリア機能の障害が生じ、アレルゲンは容易に侵入し、抗原提示細胞に提示され、感作反応が発生している。その結果は、アトピー性皮膚炎が発症し、喘息、アトピーマーチまでに進行していく<sup>7)</sup>。

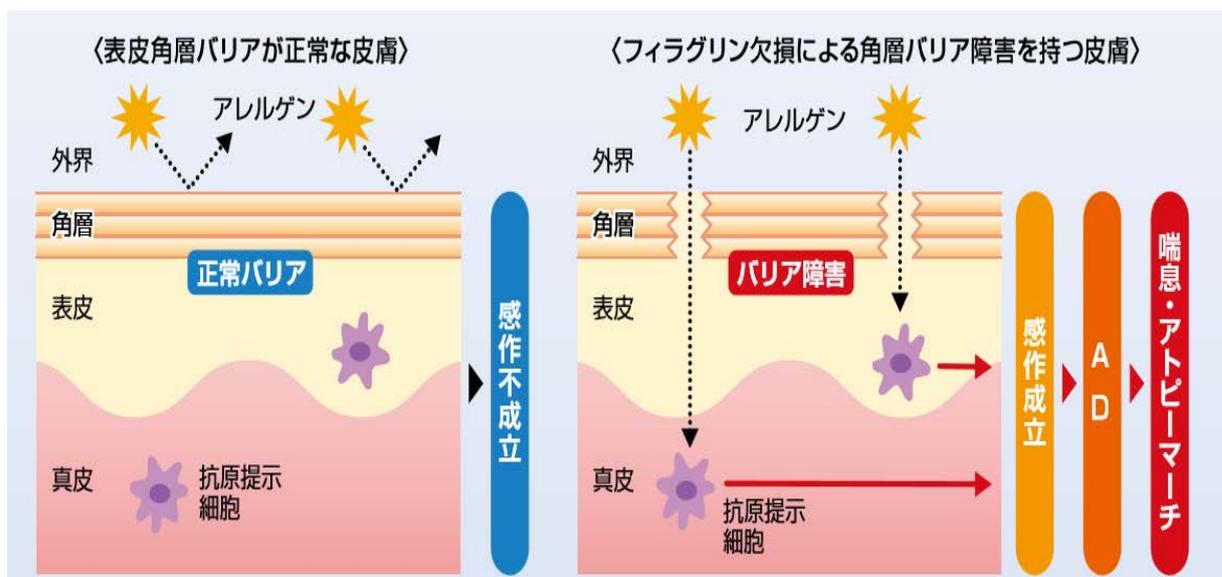


Fig. 4-2 アトピー性皮膚炎の発症メカニズムの仮説<sup>7)</sup>

皮膚バリア機能の低下は、抗原の皮膚への侵入しやすくなっている。アレルゲンは、タンパク抗原として作用するのみでなく、含まれるプロテアーゼによって Th2 型の免疫応答を誘導し、Th2 環境では、表皮からも産生される Th2 型ケモカインである TARC も産生される<sup>8)</sup>。

一般的に皮膚のかゆみを治療する際、抗ヒスタミン薬はよく使用されている。しかし、抗ヒスタミン薬はアトピー性皮膚炎で誘発したかゆみに対する治療効果はかなり異なる。近年の研究では、Th2 細胞が産生するサイトカイン IL-31 が痒疹を誘導することが報告された<sup>9)</sup>。かゆみの発生は、痒疹を伝達する C 線維の分布が表皮や角層まで伸び、痒みの発生に関与していると考えられている<sup>10)</sup>。

アトピー性皮膚炎の診断は、1994 年に制定された日本皮膚科学会「アトピー性皮膚炎の定義・診断基準」(2008 年改訂)に基づき、かゆみ、皮疹と分布、慢性・反復性経過の三つの基本項目を満たすものを、症状の軽重を問わずアトピー性皮膚炎と診断する規則が決められている<sup>11)</sup>。

アトピー性皮膚炎の炎症を鎮静するため、有効性と安全性が科学的に十分に検討さ

れている薬剤は、ステロイド外用薬がよく使用されている。下記の Table 4-2 の通りにステロイド外用薬のランク表が発表されていた<sup>12) 13) 14)</sup>。このランクを指標とし、症状の重症度に見合ったランクの薬剤を適切に選択し、必要な量を必要な期間、使用することが重要である。副作用として、強いステロイド外用薬の外用で一部の症例で副腎機能抑制が生じたとする報告があるが<sup>15) 16)</sup>、弱いステロイド外用薬の使用例では副腎機能抑制、成長障害などは認められていない<sup>17) 18)</sup>。

Table 4-2 ステロイド外用薬のランク<sup>12) 13) 14)</sup>

ストロングスト	0.05% クロベタゾールプロピオン酸エステル
ストロングスト	0.05% ジフロラゾン酢酸エステル
ベリーストロング	0.1% モメタゾンフランカルボン酸エステル
ベリーストロング	0.05% 酪酸プロピオン酸ベタメタゾン
ベリーストロング	0.05% フルオシノニド
ベリーストロング	0.064% ベタメタゾンジプロピオン酸エステル
ベリーストロング	0.1% 吉草酸ジフルコルトロン
ベリーストロング	0.1% 酪酸プロピオン酸ヒドロコルチゾン
ストロング	0.3% デプロドンプロピオン酸エステル
ストロング	0.1% プロピオン酸デキサメタゾン
ストロング	0.12% デキサメタゾン吉草酸エステル
ストロング	0.1% ハルシノニド
ストロング	0.12% ベタメタゾン吉草酸エステル
ストロング	0.025% フルオシノロンアセトニド
ミディアム	0.3% 吉草酸酢酸プレドニゾロン
ミディアム	0.1% トリアムシノロンアセトニド
ミディアム	0.1% アルクロメタゾンプロピオン酸エステル (
ミディアム	0.05% クロベタゾン酪酸エステル
ミディアム	0.1% ヒドロコルチゾン酪酸エステル
ミディアム	0.1% デキサメタゾン
ウィーク	0.5% プレドニゾロン

日本皮膚科学会より制定したアトピー性皮膚炎の定義・診断基準によると、アトピー

一性皮膚炎の治療手順は以下の Fig. 4-3 に示した通りである<sup>1)19)</sup>。最初に確実な診断及び重症度の評価の後、状況によって適切な治療を組み合わせる行うことが重要である。2008年に日本皮膚科学会よりアトピー性皮膚炎診療ガイドラインが作成され、さらに2016年で修正されている。この診療ガイドラインは標準的な検査・治療方法及びアトピー性皮膚炎の誘発の原因物質に関する詳細な説明を加え、日常診療において活用しやすく構成されている。アトピー性皮膚炎の診断、治療に対して重要な役割を果たしている。

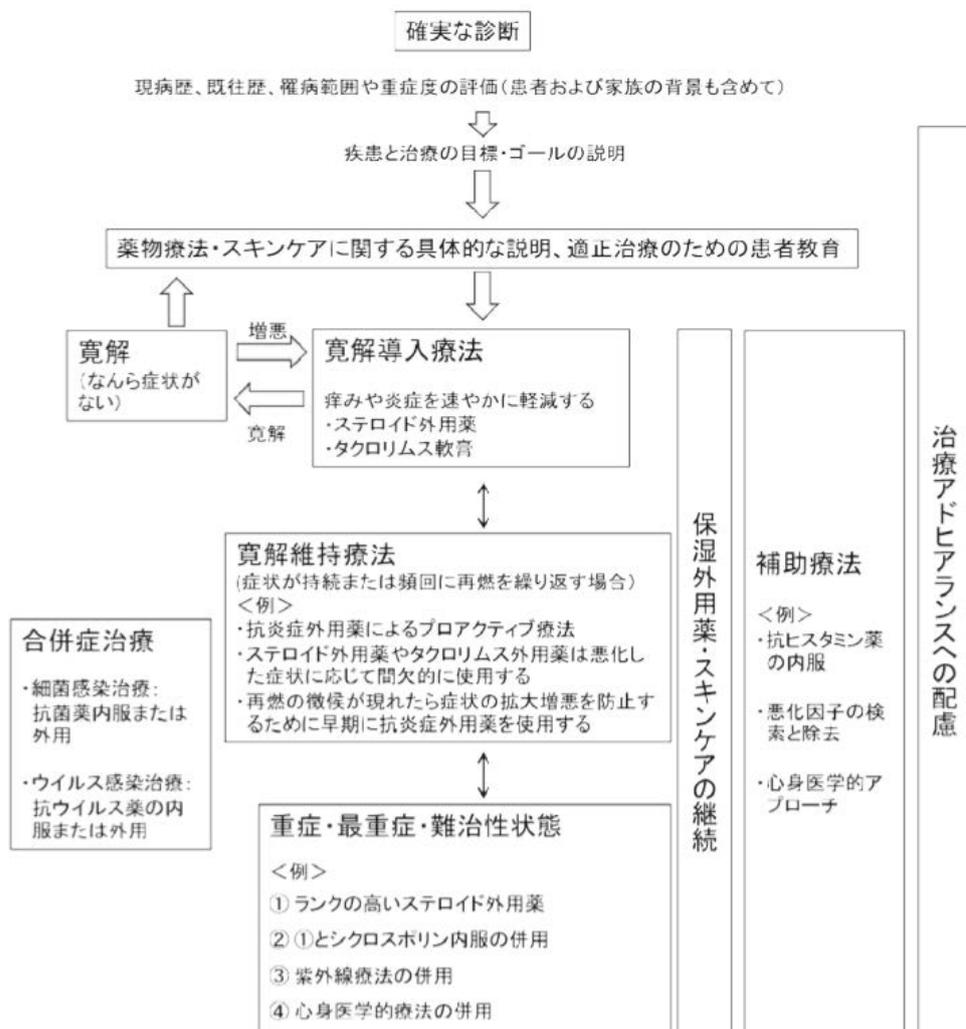


Fig. 4-3 アトピー性皮膚炎のアトピー性皮膚炎の診断治療アルゴリズム<sup>1)19)</sup>

本研究では、マグネタイトナノ微粒子を担体として使用し、マグネタイト微粒子表面に温和な治療効果を有する治療剤プレドニゾロンをコーティングしたナノ治療剤試作品を調製した。さらに、ナノ治療剤の治療効果を評価するため、アトピー性皮膚

炎モデルマウスを作成し、ナノ治療剤試作品の治療効果を評価した。さらに薬剤の浸透機構を解明するため、皮膚の基本構造まで調べ、物質の浸透理論の観点からナノ治療薬剤の浸透を考え、治療効果を考察した。

## 4.2 皮膚の構造及び物質浸透理論

### 4.2.1 皮膚の構造

花王社の資料によると、皮膚の構造はFig. 4-4 に示した通りである<sup>20)</sup>。

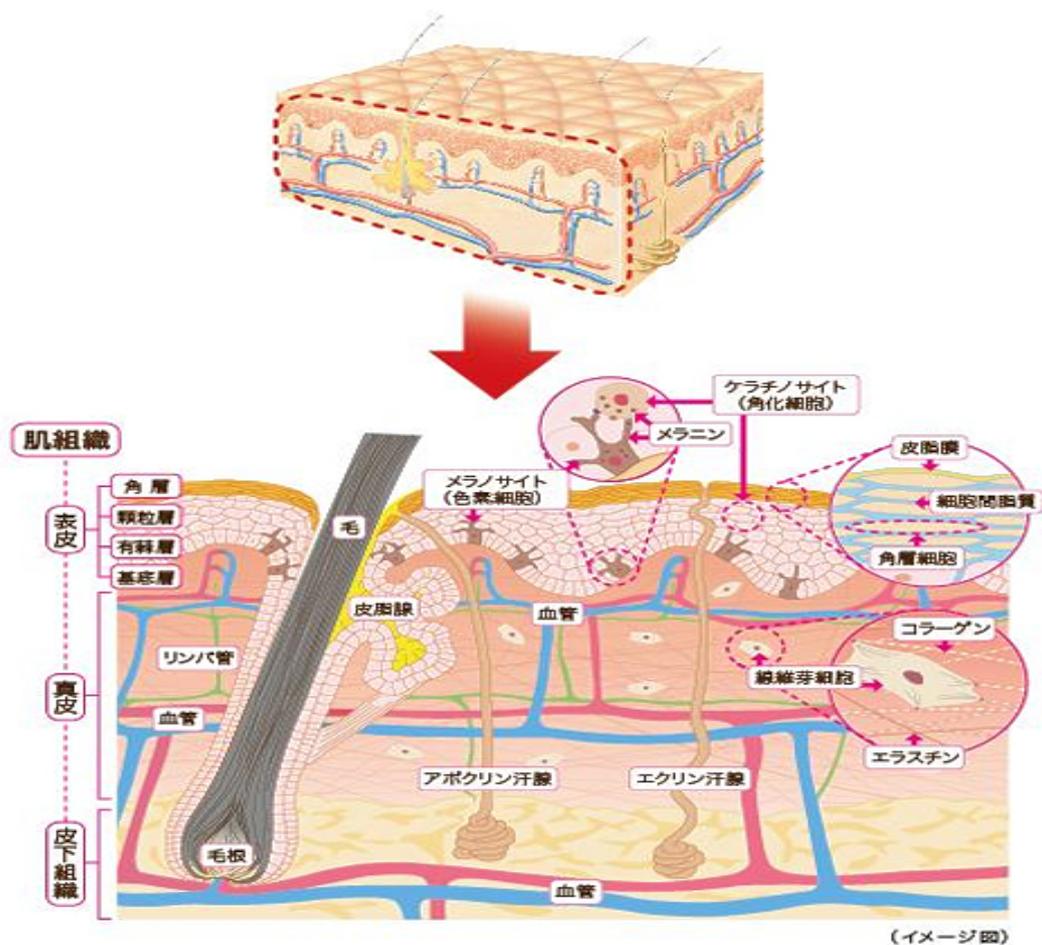


Fig. 4-4 皮膚の構造図

皮膚構造の定義は表皮(epidermis)、真皮(dermis; Corium)、皮下組織(hypodermis)の三層からの構成を指している<sup>21)</sup>。皮膚の役割は水分の喪失や透過の防止、体温調節、微生物や物理化学的な刺激から守り、感覚器としての働き等である<sup>22)</sup>。

皮膚構造皮膚は人体の最大の組織であり、表面積は 1.7m<sup>2</sup>に達し、表皮、真皮及び皮

下組織を合わせた皮膚の重さは、全体重の約 17%~19%まで占める<sup>23)</sup>。表皮は、角層 (corneous layer; Stratum corneum)、透明層 (shining layer; Stratum lucidum)、顆粒層 (granular layer; Stratum granulosum)、有棘層 (prickle-cell layer)、基底層 (base-cell layer) の 5 層から構成されている<sup>21)</sup>。角層構造は、軟ケラチン成分より構成されている。真皮は乳頭層 (papillary layer) と網状層 (reticular layer) から構成され、主要な成分はコラーゲンが約 70%、エラスチンが 0.6%~2.1%、ムコ多糖類が 0.1%~0.3%である<sup>21)</sup>。皮膚の付属器官として脂腺、汗腺、毛髪等があり、表皮、真皮、皮下脂肪には個々の役割があるが、皮膚の最大な機能は保護機能であり、その他、感覚作用、排泄作用、免疫器官等としての役割に加えられ、身体保護をはじめ、体温調節、皮脂分泌、呼吸、保湿等の多くの役割があり、人体では最大な器官である。

#### 4.2.2 物質の透過経路<sup>24)</sup>

Todoらの報告によると、物質を皮膚浸透の場合、主に3種類の浸透経路が知られている<sup>24)</sup>。第1種類は溶解拡散経路であり、表面膜に溶解できる物質が透過できる。第2種類は細孔経路となり、細孔サイズよりも小さな物質のみ透過できる。第3種類は溶解拡散経路と細孔経路の複合経路となっている。

毛孔は第2種類経路で細孔ルートと仮定できるが、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。ヒトの皮膚は複合膜と考え、皮膚を通した物質の透過は主に溶解・拡散現象であるため、膜に溶解する物質が皮膚を透過する<sup>25)</sup>。

#### 4.2.3 皮膚透過の分子量限界

薬剤投与の場合、どれぐらいに皮膚深部まで浸透できることは最重要な課題である。2000年、BOSらは物質の皮膚浸透を考えるうえで、500ダルトン透過限界論を提唱した<sup>26)</sup>。すなわち、皮膚の深部まで浸透するため、500以下の分子量は必要な条件になっている。

Ito A.らの研究報告では、Table 4-3に示した通り、限外ろ過膜の分離特性を調べるためのマーカー分子の分子量及び分子直径を示した<sup>27)28)</sup>。

成分名	分子量 (g/mol)	分子径 (nm)
スクロース	340	1.1
ラフィノース	590	1.3
ビタミンB12	1,360	1.7
インスリン	5,700	2.7
チトクロームC	13,400	3.8
ミオグロビン	17,000	4.0
ペプシン	35,000	5.0
オボアルブミン	43,000	5.6
アルドラーゼ	142,000	8.2
γ-グロブリン	150,000	8.4

Table 4-3 限外ろか膜の分離特性のマーカ分子量及び分子径<sup>27)28)</sup>

Table 4-3 に示した通り、分子量 590 ダルトンのラフィノースの直径は 1.0~1.3 nm である。また、一般的に皮膚を透過しないと言われているタンパクの場合、直径が 5~8 nm であるため、粒子径が 10~60 nm の化粧品や医薬部外品中に含まれるナノ粒子を含有する薬剤で皮膚に塗布しても、皮膚の深部までを浸透するとは考えられない<sup>28)</sup>。本研究で使用しているナノ治療薬剤の直径は数十 nm であるため、同様に皮膚深部まで微粒子が浸透して蓄積することは考えにくい。

#### 4.2.4 皮膚透過及び薬剤浸透の関係

皮膚局所の薬理効果は投与薬物の皮膚透過性と密接に関係している。皮膚透過パラメータである薬物の外用基剤から皮膚への分配性と皮膚中での拡散性及び有効性の発揮に対して重要である<sup>29)30)31)</sup>。

一方、ステロイド外用剤の使用は Goldman らによって酢酸コルチゾンで皮膚炎を始めた様々な皮膚病の治療において使用したことから始まり、多くのステロイド外用剤の皮膚炎の治療効果が観察されていた<sup>32-36)</sup>。

透過係数 (permeability coefficient) が皮膚浸透性の評価に用いられる。ヒト角層は部位によって異なるが、20 層の角質細胞層から構成され、Sugibayashi らの報告によると、角層は最外層から 1 日 1 層ずつ剥がれるため (落屑層の厚みを 1 μm とすると) 落屑速度は 1 μm/day、約  $1 \times 10^{-9}$  cm/s となる。物質の透過係数は落屑速

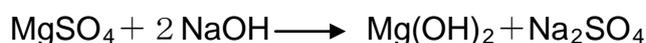
度より高くなければならない。すなわち、1日かかり、角層2層目直前に透過したとしても、物質が透過した部分が剥がれるため、角層下層に移行しない<sup>37)38)</sup>。

本研究での皮膚塗布の場合、 $1 \times 10^{-9}$  cm/s の透過係数を目指すべきであると考えている。マグネタイトナノ微粒子の浸透は皮膚の状況によって異なるが、アトピー皮膚炎の皮膚は健常皮膚よりやや傷やひびがあることが想定される。しかし、木村らの報告によると角質にひびが入って浸透したとしても生きた表皮や真皮まで拡散できないと推査された<sup>39)</sup>。そのため、マグネタイト微粒子は皮膚深部まで浸透できないことが示唆されている。

### 4.3 ナノアトピー性皮膚炎治療薬剤試作品の作成及び観察

#### 4.3.1 ナノアトピー性皮膚炎治療薬剤試作品の作成

前章の記載したマグネタイト磁性粒子の作成方法の通りに、マグネタイト磁性粒子を作製した。その後、10分間攪拌し、ろ過後、イオン交換水を加えて10分間超音波処理をすることにより、磁性流体を作製した。この磁性流体をそれぞれ60℃と80℃の温度で加熱攪拌しながら、 $MgSO_4$ を加え、さらにNaOHでそれぞれpH 10に調整して、磁性粒子表面に $Mg(OH)_2$ コーティングを施した。



そして、アトピー性皮膚炎の治療のため、治療薬剤0.5%プレドニゾロンをマグネタイト超微粒子の表面にコーティングし、ナノ治療剤試作品を作製した。

#### 4.3.2 TEMによるナノアトピー性皮膚炎治療薬剤の試作品の観察

マグネタイト超微粒子の表面にアトピー性皮膚炎治療薬剤プレドニゾロンをコーティングしたナノ薬剤試作品のTEM写真をFig. 4-5に示した通り、a)、b)、c)の赤枠内の黒い部分は格子構造があるマグネタイト超微粒子であり、粒子径は約10nmである。そして、その周りを覆う白い部分は治療薬剤プレドニゾロンである。また、このことから、マグネタイト超微粒子の表面に薬剤プレドニゾロンがコーティングされたことが確認された。

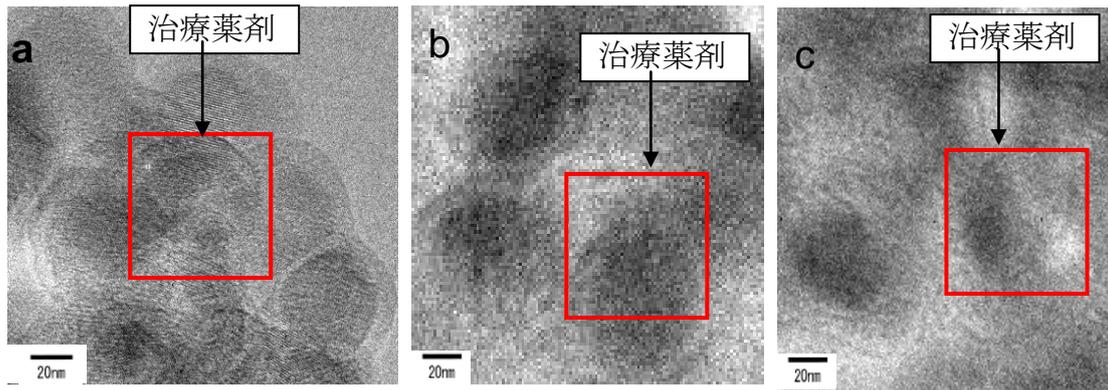


Fig. 4-5 ナノ治療薬剤試作品の TEM 像

#### 4.4 アトピー性皮膚炎マウスモデル作成実験

##### 4.4.1 アトピー性皮膚炎モデルマウスの作成実験

Fig. 4-6 は、8 匹のヌードマウスで五つのグループを分類でした。そのうち、1 匹はコントロールで何も塗布せず、1 匹はアトピーコントロールとして 1%の 2,4,6-Trinitrochlorobenzene アセトン溶液を 1 ヶ月に塗布した。

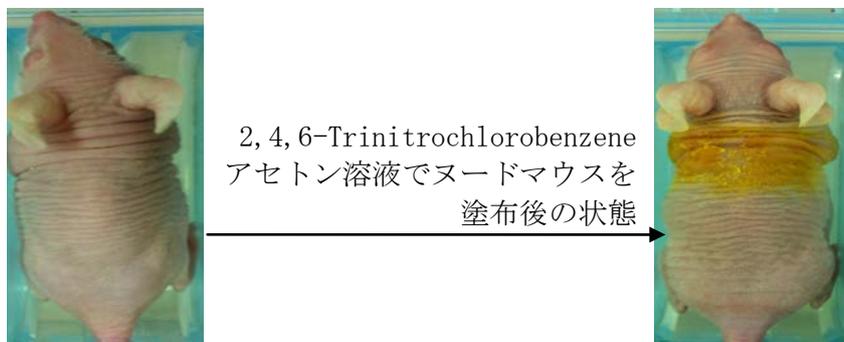


Fig. 4-6 1%の 2,4,6-Trinitrochlorobenzene アセトン溶液によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

##### 4.4.2 アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚切片の観察

Fig. 4-7 は、アトピー性皮膚炎モデルマウス皮膚の切片であった。本来、線維芽細胞は正常状態で楕円であり、高い細胞活性を有し、アトピー性皮膚炎の発生により、線維芽細胞は少なくなり、円形に変化したことが確認された。Fig. 4-8 に示した通り、20 日間の磁性流体塗布により線維芽細胞の数を増加させ、40 日間で磁性流体の塗布

により繊維細胞は楕円に回復したことが確認された。

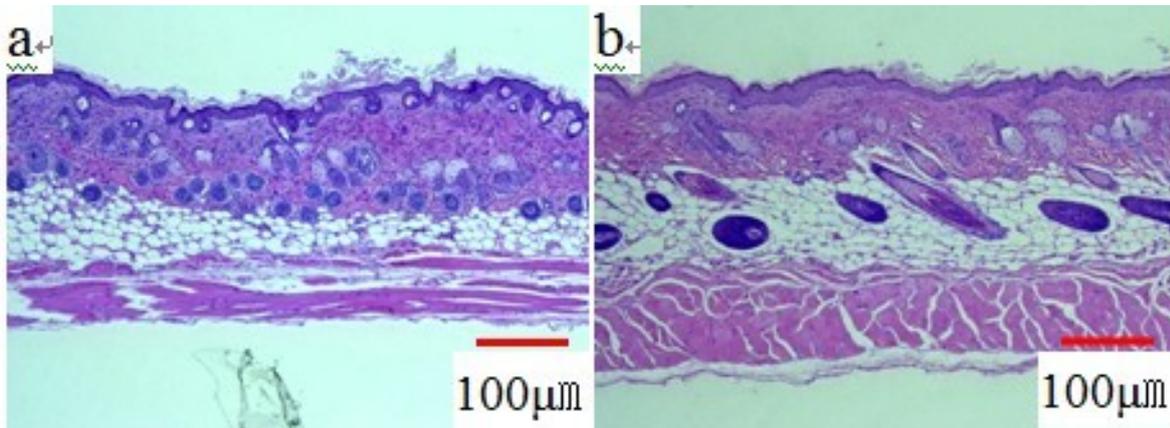


Fig. 4-7 アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚切片の観察

a : コントロール ; b : アトピー性皮膚炎コントロール

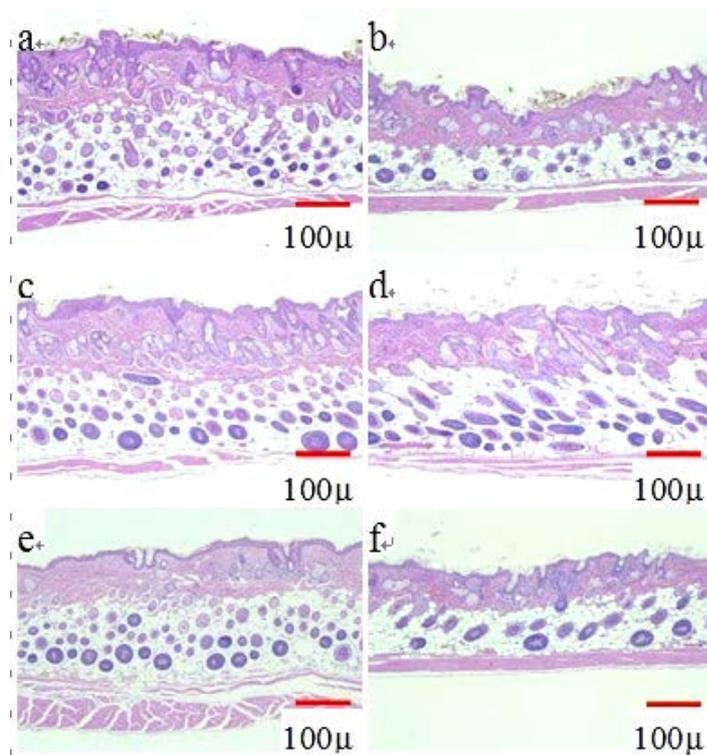


Fig. 4-8 アトピー性皮膚炎モデルマウス皮膚切片

a:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (20 日間) ; b:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (40 日間) c:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  (20 日間) ; d:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  (40 日間) ; e:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg}(\text{OH})_2$  (20 日間) ; f:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg}(\text{OH})_2$  (40 日間)

## 4.5 治療実験と結果

### 4.5.1 治療実験

12匹のヌードマウスで五つのグループを分類でした。そのうち、1匹はコントロール組として成分を塗布しない。1匹はアトピーコントロール組として継続的に1%の2,4,6-Trinitrochlorobenzene アセトン溶液を塗布した。そして、病状出たマウスの背中で分別0.5%プレドニソロン水溶液、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{drug}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{drug}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg}(\text{OH})_2/\text{drug}$ の試作品を塗布した。

### 4.5.2 アトピー性皮膚炎マウスの外見観察

マウス6匹1ヶ月を1%の2,4,6-Trinitrochlorobenzene アセトン溶液を塗布した。アトピー性皮膚炎モデル出たらその6匹マウスを3グループで組み分けた。三種類の磁性流体を用い、20日間と40日間でマウスに塗布した。

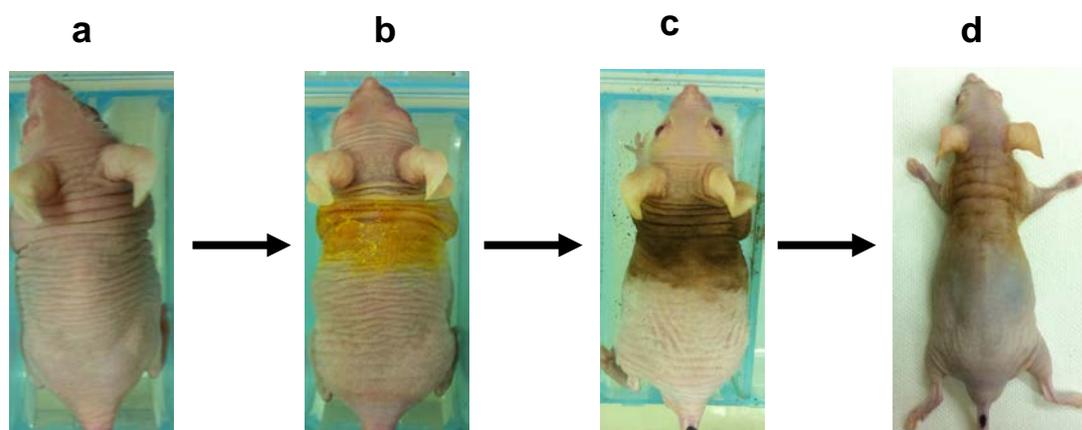


Fig. 4-9 アトピー性皮膚炎マウスの観察

a:塗布前; b:アトピー性皮膚炎; c:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{drug}$  塗布後; d:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{drug}$  20日塗布後

Fig. 4-9 に示した通り、治療薬剤  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{drug}$  試作品を塗布した後、皮膚状態は滑らかになるため、顕著に回復したことを確認した。

### 4.5.3 皮膚切片の観察

各組の治療薬剤試作品を塗布した後、切片を観察し、その結果は Fig. 4-10 に示し

た。

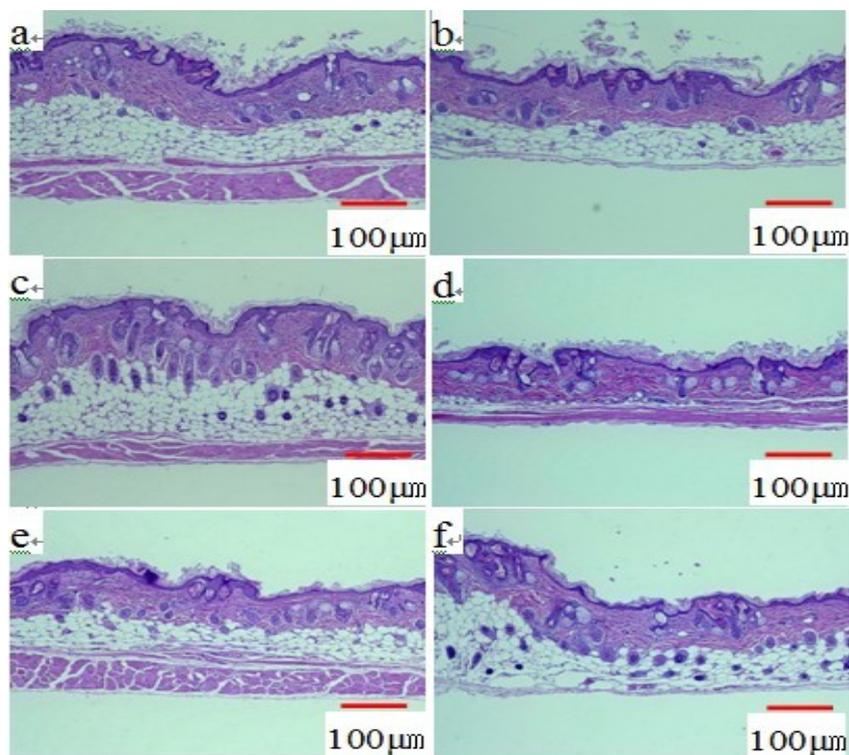


Fig. 4-10 アトピー性皮膚炎マウスの切片観察

a:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{drug}$  (10 日間) ; b:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{drug}$  (20 日間) c:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{drug}$  (10 日間) ;  
d:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{drug}$  (20 日間) ; e:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg}(\text{OH})_2/\text{drug}$  (10 日間) ; f:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg}(\text{OH})_2/\text{drug}$  (20 日間) ;

#### 4.6 細胞安全実験結果

Table 4-7、Table 4-8 は三次元皮膚モデルによる磁性微粒子の安全性試験結果を示した。50%以上の細胞生存率の達成は安全性試験の評価基準となっている。本試験では、細胞生存率の平均値は共に 70%以上であった。そのため、磁性流体および  $\text{SiO}_2$  と  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  コーティングした磁性流体は皮膚に対して共に安全であることが確認された。そして、治療薬剤プレドニゾロンをコーティングした磁性流体は皮膚安全実験を行った結果は、ヒト皮膚細胞に対しても安全であることを示した (Fig. 4-12、Fig. 4-13)。

Table 4-4 三次元皮膚モデルによる磁性微粒子の安全性試験結果

	精製水	Fe3O4	Fe3O4 /SiO2	Fe3O4 /Mg(OH)2	5%SLS
1回目	100	78.2	77.4	75.7	3.5
2回目	100	80.4	74.2	77.4	4.2
3回目	100	74.2	74.2	78.3	4.8
平均値	100	77.6	75.3	77.1	4.2

Table 4-5 三次元皮膚モデルによる治療薬剤の安全性試験結果

	精製水	Fe3O4/drug	Fe3O4 / SiO2/drug	Fe3O4 / Mg(OH)2/drug	5%SLS
1回目	100	74.2	73.5	73.2	3.4
2回目	100	78.4	72.4	76.4	4.5
3回目	100	75.3	70.8	78.4	4.3
平均値	100	76.0	72.2	76.0	4.1

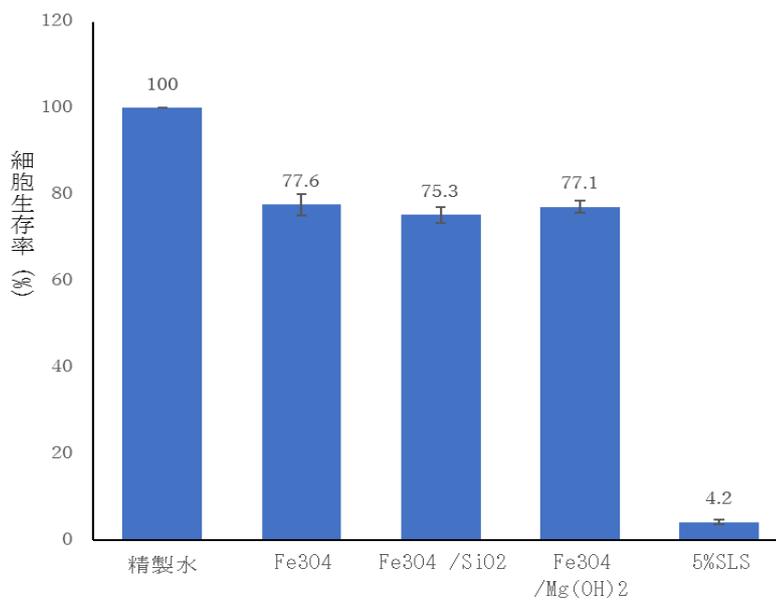


Fig. 4-11 三次元皮膚モデルによる磁性微粒子の安全性評価の結果

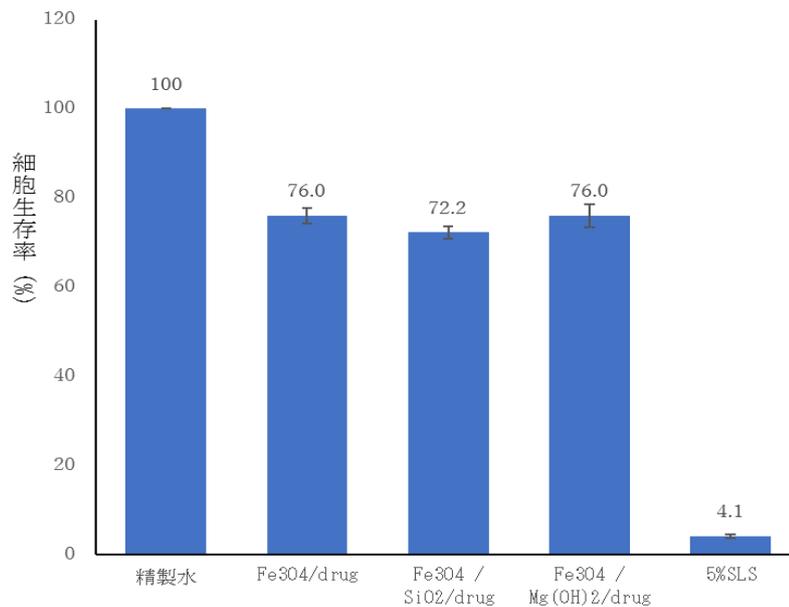


Fig. 4-12 三次元皮膚モデルによる治療薬剤の安全性評価の結果

#### 4.7 小括

本研究では、磁性微粒子の応用を目指し、皮膚安全実験の結果により、磁性流体は安全であることが確認されていた。また、アトピー性皮膚炎モデルマウスに対するナノ磁性流体を塗布し、皮膚表面状態及び切片観察により、皮膚炎病状の軽減が確認された。角質にひびが入って浸透したとしても担体であるマグネタイト微粒子は生きた表皮や真皮まで拡散できないため、マグネタイト微粒子は皮膚深部まで浸透できないことが示唆されている。

#### 4.8 参考文献

- 1) 古江増隆、佐伯秀久、古川福実ほか：日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2008版、日皮会誌、2008；118:325-342.
- 2) 加藤則人、佐伯秀久、中原剛士ほか：日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2016版、日皮会誌、2016；126(2):121-155.
- 3) Kabashima K: New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity、J Dermatol Sci、2013；70: 3—11.
- 4) <http://www.allergy-dsc.info/c2-3.html>. Downloaded 24, Dec. 2016
- 5) Palmer CN、Irvine AD、Terron-Kwiatkowski A、et al: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis、Nat Genet、2006；38: 441—446.
- 6) Howell MD、Kim BE、Gao P、et al: Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression、J Allergy Clin Immunol、2007；120: 150—155.
- 7) 秋山真志：日本医師会雑誌 2010；138(12)：2536-2537.
- 8) Saeki H、Tamaki K: Thymus and activation regulated chemokine (TARC) /CCL17 and skin diseases、J Dermatol Sci、2006；43: 75—84. 11) Dillon SR、Sprecher C、Hammond
- 9) Dillon SR、Sprecher C、Hammond A、et al: Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice、Nat Immunol、2004；5: 752—760.
- 10) Tominaga M、Takamori K: Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: therapeutic implications、J Dermatol、2014；41: 205—212.
- 11) 日本皮膚科学会:アトピー性皮膚炎の定義・診断基準、日皮会誌、1994；104: 1210.

- 12) Eichenfield LF, Tom WL, Berger TG, et al: Guideline of care for the management of atopic dermatitis. Section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies, *J Am Acad Dermatol*, 2014; 71: 116—132.
- 13) <http://www.nice.org.uk/guidance/ta81/resources/guidance-frequency-of-application-of-topical-corticosteroids-for-atopic-eczema-pdf>. P. 33 — 37. Downloaded 15, Dec. 2016
- 14) 古江増隆、佐伯秀久、古川福実ほか：日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン、日皮会誌：126 (2)、121-155、2016
- 15) Ellison JA, Patel L, Ray DW, David TJ, Clayton PE: Hypothalamic-pituitary-adrenal function and glucocorticoid sensitivity in atopic dermatitis, *Pediatrics*, 2000; 105: 794—799.
- 16) Schlessinger J, Miller B, Gilbert RD, Plott RT; Vanos Study Group: An open-label adrenal suppression study of 0.1% fluocinonide cream in pediatric patients with atopic dermatitis, *Arch Dermatol*, 2006; 142: 1568—1572.
- 17) Friedlander SF, Hebert AA, Allen DB; Fluticasone Pediatrics Safety Study Group: Safety of fluticasone propionate cream 0.05% for the treatment of severe and extensive atopic dermatitis in children as young as 3 months, *J Am Acad Dermatol*, 2002; 46: 387—393.
- 18) Hebert AA, Friedlander SF, Allen DB: Topical fluticasone propionate lotion does not cause HPA axis suppression, *J Pediatr*, 2006; 149: 378—382.
- 19) Ellis C, Luger T, Abeck D, et al: International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II (ICCAD II) : clinical update and current treatment strategies, *Br J Dermatol*, 2003; 148 ( Suppl. 63) : 3—10.
- 20) [http://www.kao.com/jp/skincare/structure\\_06.html](http://www.kao.com/jp/skincare/structure_06.html). downloaded 15, Dec. 2016
- 21) 形成外科手術書 基礎編 鬼塚卓彌
- 22) 『新しい皮膚科学第2版』

- 23) <http://www.anatomy.med.keio.ac.jp/funatoka/anatomy/Rauber-Kopsch/2-79.html>. Downloaded 15, Dec.2016
- 24) Todo H, Kimura E, Yasuno H, Tokudome Y, Hashimoto F, Ikarashi Y, Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 1394-1399 (2010).
- 25) 木村 恵理子、微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価.P.7 (2012)
- 26) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, 9. 165-169 (2000).
- 27) Ito A., [http://chemeng.in.coocan.jp/memb/m\\_mb4.html](http://chemeng.in.coocan.jp/memb/m_mb4.html), Chemical Engineering Department Tokyo Institute of Technology Web, Downloaded 15, Dec.2016
- 28) 木村 恵理子、微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価.P.10 (2012)
- 29) Scheuplein R. J., Mechanism of percutaneous absorption I, *J. Invest. Dermatol.*, 45, 334-346 (1965).
- 30) Scheuplein R. J., Mechanism of percutaneous absorption II, *J. Invest. Dermatol.*, 48, 79-88 (1967).
- 31) Scheuplein R. J., Blank I. H., Brauner G. J., Macfarlane D. J., Percutaneous absorption of steroids, *J. Invest. Dermatol.*, 52, 63-70 (1969).
- 32) Goldman L., Thompson R. G., Trice E. R., Cortisone acetate in skin disease, *A.M.A. Arch. Derm. Syphilol.*, 65, 177-186 (1952).
- 33) Sulzberger M. B., Witten V. H., The effect of topically applied compound F in selected dermatoses, *J. Invest. Dermat.*, 19, 101-102 (1952). 26
- 34) Wiedersberg S., Leopold C. S., Guy R. H., Bioavailability and bioequivalence of 94 topical glucocorticoids, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68, 453-466 (2008).
- 35) Pershing L. K., Silver B. S., Krueger G. G., Shah V. P., Skelley J. P., Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone

dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay, *Pharm. Res.*, 9, 45-51 (1992).

36) Hashiguchi T., Takada A., Ikesue A., Ohta J., Yamaguchi T., Yasutake T., Otagiri M., Evaluation of the topical delivery of a prednisolone derivative based upon percutaneous penetration kinetic analysis, *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 882-885 (1998).

37) Sugibayashi K., Margin of safety and exposure of nanomaterials used in cosmetics, *Fragrance Journal*, 36, 38-41 (2008).

38) 木村 恵理子、微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価. P. 8 (2012)

39) 木村 恵理子、微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価. P. 30 (2012)

## 第五章 皮膚がん治療の検討

### 5.1 皮膚がんの研究背景

皮膚がんは、皮膚に生じた 悪性新生物 の総称である。皮膚がんの種類は多く、主に有棘細胞癌、基底細胞癌、悪性黒色腫等が含まれている。その他、セザリイ症候群、日光角化症、ボーエン病、パージェット病等がある。

皮膚は表面から表皮、真皮、皮下組織の3つの部分に大きく分かれている。表面側から角質層、顆粒層、有棘層、基底層の4層に分け、表皮最下層である基底層は真皮と接し、その中に、毛細血管、神経、皮脂腺、汗腺等の組織が存在している。

Fig. 5-1 表皮の構造と細胞が示されている<sup>1)</sup>。有棘細胞癌は、表皮中間の有棘層を構成する細胞から発生するがんである。皮膚がんは、皮膚構成の細胞から発生するがんのことであり、発生場所、がん細胞の種類によって区別されている<sup>1)</sup>。

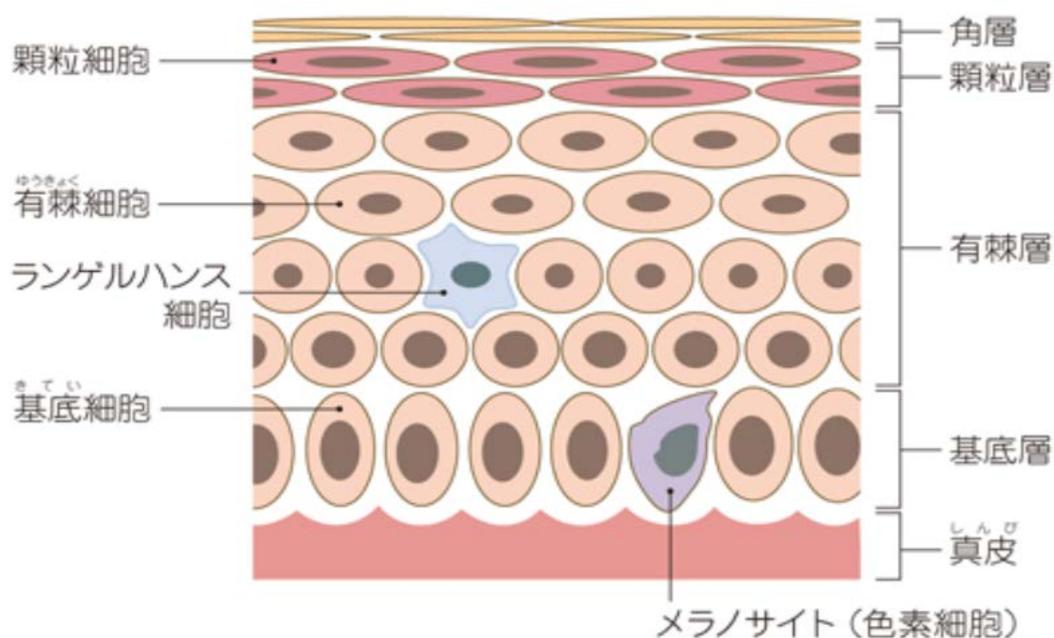


Fig. 5-1 表皮の構造と細胞<sup>1)</sup>

有棘細胞癌の誘因として一番に考えられるのは紫外線の関与である。特に中波長紫外線は皮膚がんの発生に大きな影響を与えている<sup>1)</sup>。有棘細胞癌の発生に強い相関因子は、紫外線に対する個人防御を反映できるスキン種類、日焼け、年齢等である<sup>2)</sup>。

日光紫外線への曝露で容易に日光皮膚炎を起こすが、色素沈着は起こりにくいスキ

ンタイプを持つ者は発症しやすい。水疱を起こすような強い日焼けを繰り返した者の方が有棘細胞癌を生じやすい<sup>3)</sup>。

その他に、外傷の癒痕、火傷等の治りにくい皮膚潰瘍、長期間で発生の褥瘡、放射線治療後に起こした慢性放射線皮膚炎、または化学物質の砒素化合物、タール類、鉱物油などが発生に関与する場合もある。

病理学的所見として、Fig. 5-2 の a)、b) に示した通りである。表皮基底膜を破壊し、浸潤性に肥厚した表皮内部に異常角化細胞が見られる<sup>4)</sup>。

典型的な場合は有棘細胞が癌化した癌細胞が認められ、胞巣構造を呈し、胞巣中心部は角質形成が観察された。癌真珠と言われ、角質形成程度により差異が見られ、角質形成が多い場合を高分化型扁平上皮癌、角質形成がない場合を低分化型扁平上皮癌と呼ばれている。

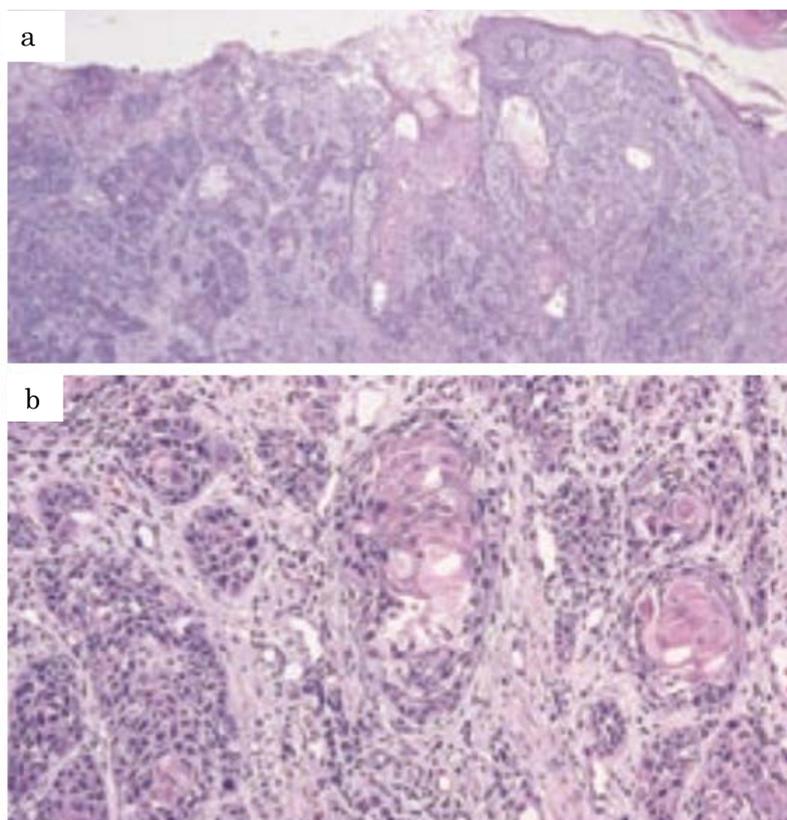


Fig. 5-2 有棘細胞癌の病理組織図<sup>4)</sup>

基底細胞癌は、毛包系由来の腫瘍として位置づけられている。基底細胞母斑症候群や色素性乾皮症、免疫不全の背景から生じることがあり、局所的要因としては放射線治療部位や熱傷癒痕なども発症母地となる<sup>5)</sup>。

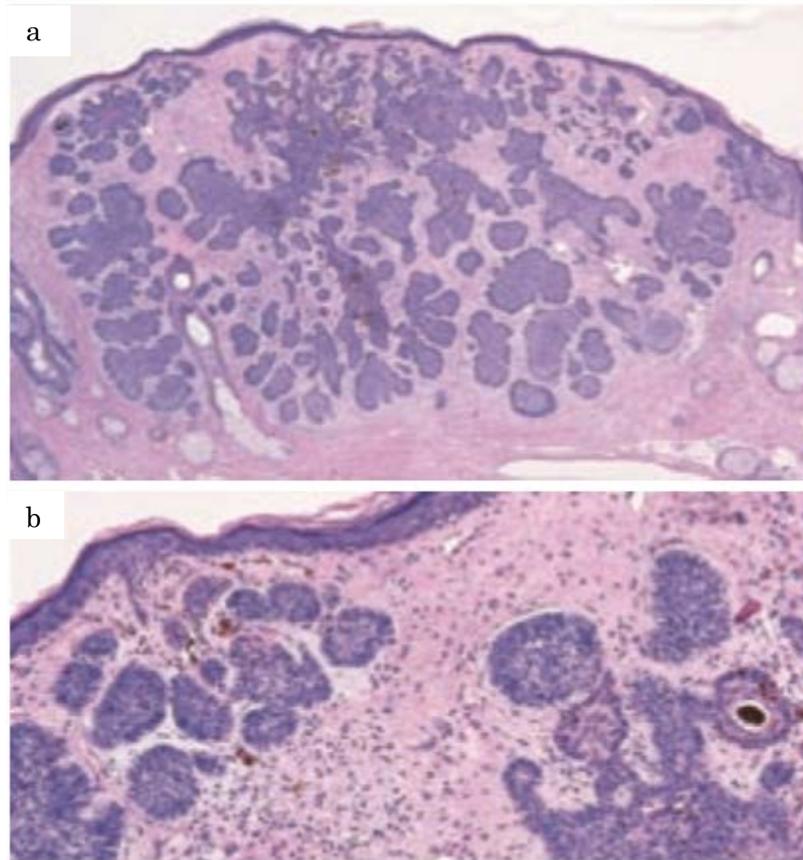


Fig. 5-3 基底細胞癌の病理組織図<sup>6)</sup>

基底細胞癌の病理所見として、Fig. 5-3 の a)、b)に示した通り、基底細胞に類似した腫瘍細胞は大きな楕円形の核を有し、細胞質に乏しく、基底層では柵状配列が観察され、周囲結合組織の増殖が見られた。腫瘍胞巣と結合組織との間に裂隙が見られ、また、表皮もしくは毛包から由来のメラノサイトを混じ、臨床的に黒色調となっている<sup>6)</sup>。Fig. 5-3 に示した通り、充実型、腺様型、角質型、囊腫型、茸状に突出する型等の多様な病理所見を呈する<sup>6)</sup>。

悪性黒色腫はメラノサイトが悪性化したと考えられている。悪性黒色腫の発生は、遺伝的背景と環境因子の両方が重要な役割を果たしている。白色人種の発生率は有色人種よりも数倍高く、紫外線の強い地域に住む白色人種の発生率がさらに高いという報告もあり、紫外線が関係している可能性がある<sup>7)</sup>。

悪性黒色腫の病型分類は、結節型、表在拡大型、末端黒子型、悪性黒子型の4病型に分類される。いずれも黒色で辺縁不鮮明、色調に濃淡のある病変である<sup>8)</sup>。

病理所見として、Fig. 5-5 の a)、b)、c)に示した通り。いずれの病型は、基本的に異型メラノサイトが表皮内、真皮に増殖し、細胞が癒合して境界不明瞭な大小さまざ

まの胞巣を形成し、各病型によって異型細胞の浸潤形式に特徴ある相違が見られる<sup>8)</sup>。

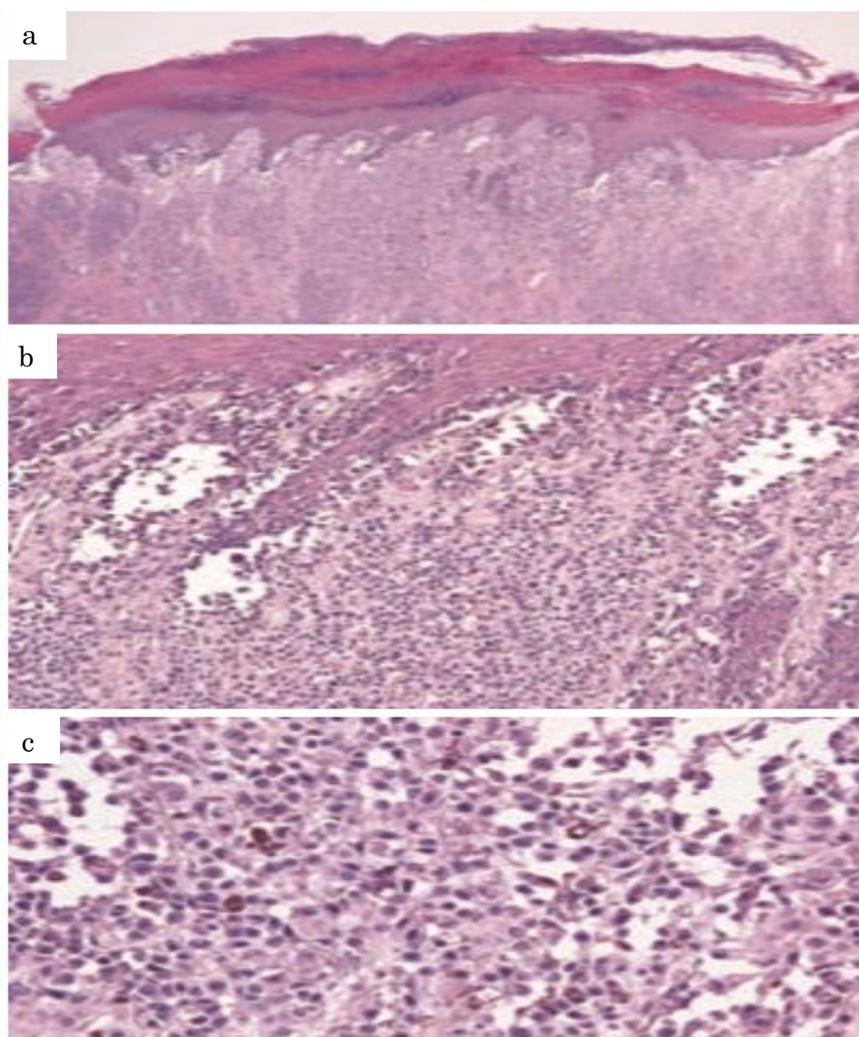


Fig. 5-4 悪性黒色腫の病理組織図<sup>8)</sup>

## 5.2 皮膚がんマウスモデルの作成

### 5.2.1 皮膚がんの研究歴史

イギリスの外科医 Percival Pott (1714 - 88) は 1775 年に煙突掃除人に陰嚢癌が多いこと、陰嚢が長い間すすにさらされているためではないかと記載した<sup>9)</sup>。その後、フィルヒョーは、『細胞病理学』で発癌の刺激説を立てた。1858 年、Virchow は「細胞に特定の刺激を受けると異型増殖が起り、腫瘍が発生する」という刺激説を提唱した。

日本では、1915 年、市川らが兎の耳を用い、コールタールでの反覆塗布により、皮膚がんを発生させた。その後、筒井らは同様の誘発実験をマウスの皮膚に行い、皮膚がんを発生させた<sup>10)</sup>。1934 年、Cook, Haslewood らは 20-メチルコラントレンが作成

させた<sup>11)12)</sup>、本多らの研究成果によると、20-メチルコラントレンは20数種類の成分に2番目の強力な成分である<sup>12)</sup>。20-メチルコラントレンの構造はFig. 5-5に示した通りである。

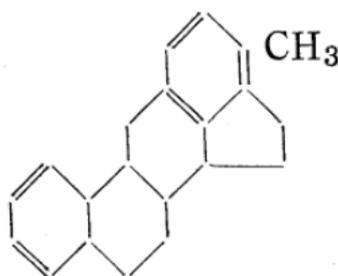


Fig. 5-5 20-メチルコラントレンの構造式

Simpson. らの蛍光顕微鏡による観察において、メチルコラントレンーベンゼール溶液をマウスの皮膚に塗布した場合、先ず皮脂腺から侵入して分解し毛嚢および角質層の脂肪に溶けて出て、一部のメチルコラントレンは真皮に入り内部から皮膚に影響を与え、皮膚がんを発生させると報告している<sup>12)13)</sup>。1930年、Warburg<sup>12)14)</sup>は癌組織が正常組織に比較して解糖作用が旺盛なことが発見された。その後、Boyland<sup>12)15)</sup>は、発がん物質の多くは核酸に作用すると記述していた。しかし、詳細な発がん機構は未だに完全に解明していない。

### 5.2.2 皮膚がんの誘導操作

皮膚癌誘発の研究は山極らがタール塗布によるうさぎの試験を行った。最初、脱毛が起り、慢性炎症、皮膚の肥厚化、乳頭腫形成、皮角形成を経て皮膚癌にまでに進行する。1960年、谷田らは20-メチルコラントレンによる実験的マウス皮膚癌の研究を行い、20-メチルコラントレンによるマウス皮膚癌の誘発過程の皮膚組織学的所見及び病理写真を以下の通りにまとめた<sup>16)17)</sup>。

Fig. 5-6に示した通り<sup>17)</sup>、マウスの正常皮膚は薄い角層と2~3層の細胞の表皮層から成り、基底層をなす細胞は円柱状であり、上層の細胞は扁平である。細胞の境界は明瞭であるが、真皮には多数の毛嚢の切断面が見られる。皮下組織は稀薄で、弾力線維は皮下結合織に微細な線維として僅かに存在する<sup>16)</sup>。

Fig. 5-7に示した通り<sup>17)</sup>、急性炎症期の皮膚では、真皮層の病理変化が強く、表皮層は肥厚し、毛嚢は拡大する。皮脂腺は萎縮している。真皮層では血管が拡充して主として多核白血球の細胞浸潤が顕著となっている<sup>16)</sup>。

Fig. 5-8 に示した通り<sup>17)</sup>、肥厚期では、表皮の肥厚が顕著になると共に、毛嚢に変化が起り、毛髪及び脂腺は消失している。表皮層はさらに肥厚している。基底細胞は正常な皮膚に比べ、表皮層に移行に従い、扁平状になっている<sup>16)</sup>。

Fig. 5-9 に示した通り<sup>17)</sup>、乳頭腫形成期になると表皮は、小豆のような突起を形成している。細い茎を持つ乳頭状に突出することが観察された。明らかに毛嚢細胞の増殖が観察されていた。乳頭腫の両側の皮膚は、表皮は 8~9 層から構成され、肥厚期における皮膚の所見と殆んど同じ変化を呈する。扁平化した細胞においては、顆粒状の塩基性色素に強く染まる変化が見られる。毛嚢変化が進んで形成された角質嚢胞があり、毛嚢における細胞の増殖様子は表皮での細胞増殖と同様である<sup>16)</sup>。

Fig. 5-10 に示した通り<sup>17)</sup>、癌性変化の軽い部位の組織学的に乳頭腫状の形態が保持し、浸潤性増殖が軽微であり、配列は不明瞭となり、細胞の角化現象が起り、癌真珠の形成が観察され、変性した弾力線維が認められる。基底膜は悪性度の高いものでは完全に破壊されて終わっている<sup>16)</sup>。

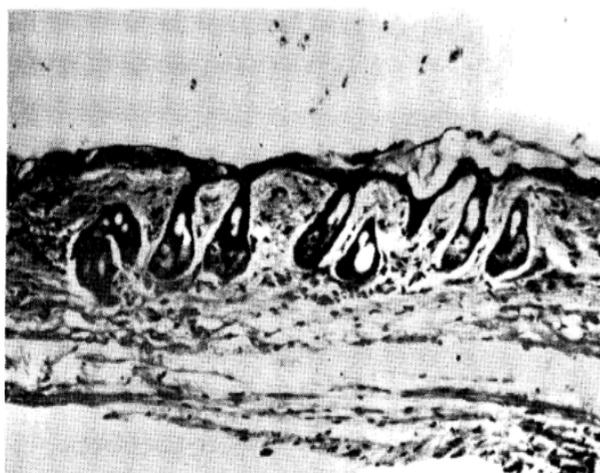


Fig. 5-6 正常マウスの皮膚<sup>17)</sup> (H. E. 染色)



Fig. 5-8 急性炎症期の皮膚<sup>17)</sup> (H. E. 染色)

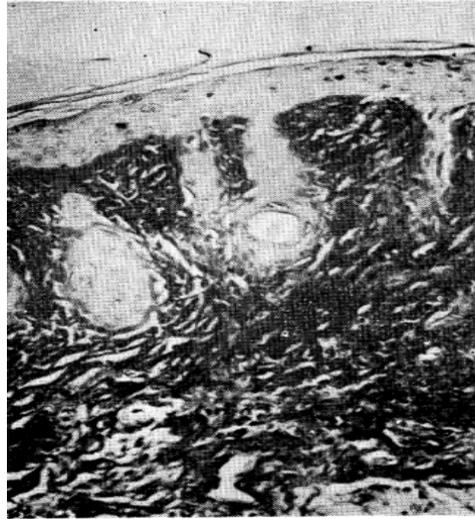


Fig. 5-9 肥厚期の皮膚<sup>17)</sup> (Elastic VanGieson 染色)

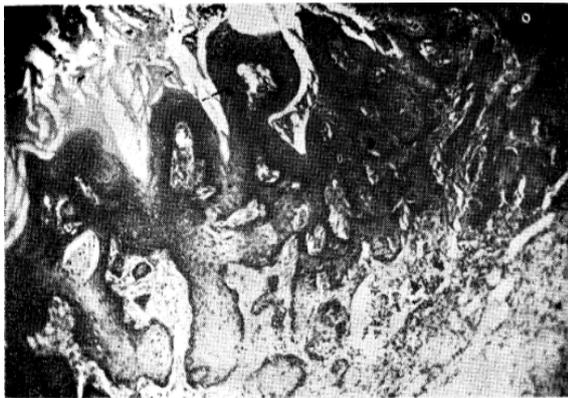


Fig. 5-10 乳頭腫<sup>17)</sup> (H. E. 染色)

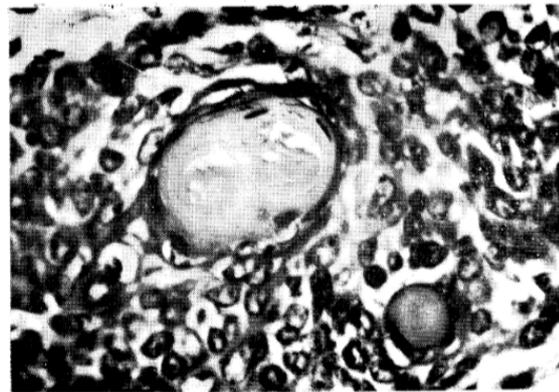


Fig. 5-11 皮膚癌<sup>17)</sup> (H. E. 染色)

### 5. 2. 3 皮膚がんマウスモデルの作成

本試験は、ヌードマウスモデルを用い、0.3%の20-メチルコラントレン溶液を塗布し、皮膚扁平上皮がんを誘発させた。Fig. 5-12a は通常状態のヌードマウスモデルの写真であった。Fig. 5-12b は1ヶ月0.3%の20-メチルコラントレン溶液塗布後のヌードマウスモデルの写真であった。Fig. 5-12c は、皮膚扁平上皮がんの誘発後、皮膚切片採取前の写真であった。

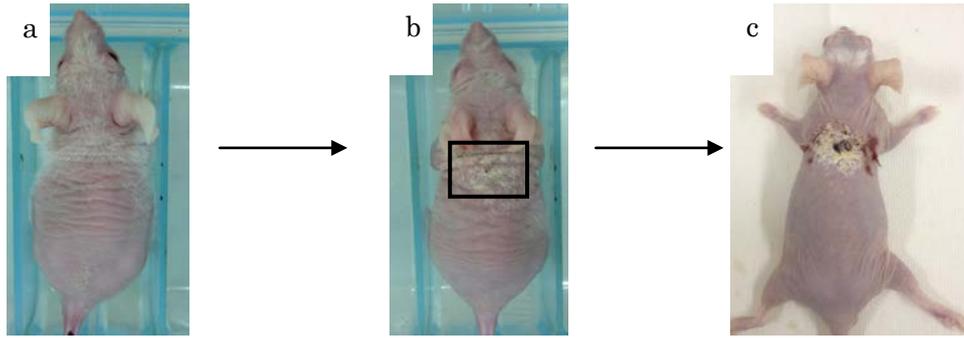


Fig. 5-12 皮膚扁平上皮がんモデルマウスの誘発試験

#### 5.2.4 肉眼による症状確認

試験開始2日後、急性炎症のような症状が見られ、塗布部位の皮膚は発赤した。試験開始3日後、一部の脱毛が見られ、軽度な皮膚浮腫が観察された。実験開始2週間後、完全な脱毛症状及び典型的な皮膚肥厚等の症状が観察されていた。皮膚の色は灰色に変化し、皮膚がかなり乾燥していた。試験開始3週間後、顕著な落屑症状が見られ、皮膚肥厚になり、皮膚表面に波状のものが観察されていた。さらに乳頭腫潰瘍が観察され、米粒までの大きさに発育した。がん腫形成されたマウスは、急激に衰弱となり、棘細胞がんの皮膚の周辺部は高く隆起していた。

本試験の結果は谷田らの研究報告とほぼ一致していた。すなわち、発がん過程の肉眼的な変化は急性炎症期、皮膚肥厚脱毛期、乳頭腫潰瘍形成期、がん腫形成期の4段階に分けられている。

#### 5.2.5 皮膚切片の観察による皮膚がんの確認

組織化学的研究は昔からヨード澱粉反応等が知られ、グリコーゲンの検出、ペルオキシダーゼ反応などの方法が発表され、Lison<sup>18)</sup> (1936)は最初に組織学の基礎を築いた。その以来、技術の進歩が盛んでいる。本研究では、固定液として4%ホルマリンを使用した。包埋は硬パラフィンを用い、行った。そして、パラフィン用マイクロトームで普通の薄切法にて5 $\mu$ mの厚さに切り、ヘマトキシリンエオジン重染色法、PAS染色法を行った。その後、病理組織学的変化を観察するうえで状況を確認した。PAS染色はわずかなグリコーゲンの検出に一番精密な染色法である。皮膚の肥厚期ではグリコーゲン増加、表皮の細胞質内が発見された。皮膚がん組織においては、糖類代謝の異常のため、グリコーゲンは増量することが観察される。

Fig. 5-13 はヘマトキシリン・エオシン染色した誘発皮膚がんマウスの組織であった。皮膚細胞は異常に増殖し、組織の変異を確認できた。また、Fig. 5-14 に示した図は PAS 染色したがん細胞の切片であった。細胞の形状は異常になり、皮膚がんの発生が確認できた。

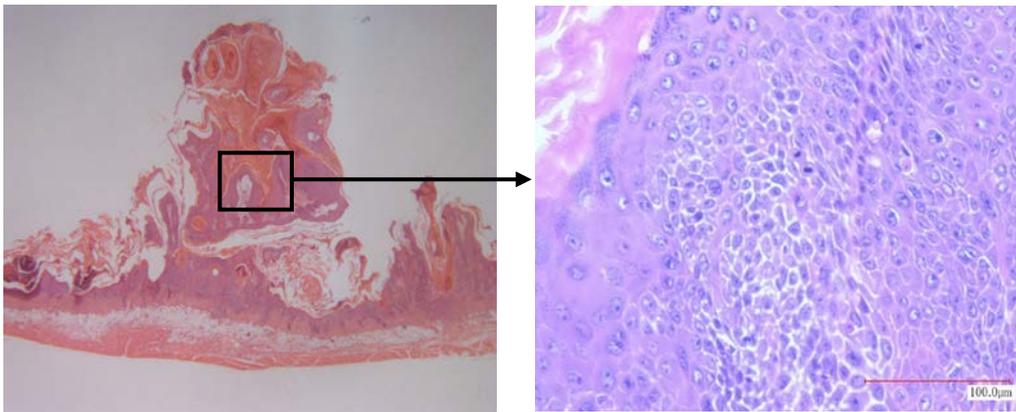


Fig. 5-13 HE 染色による誘発皮膚がんマウスの組織の観察

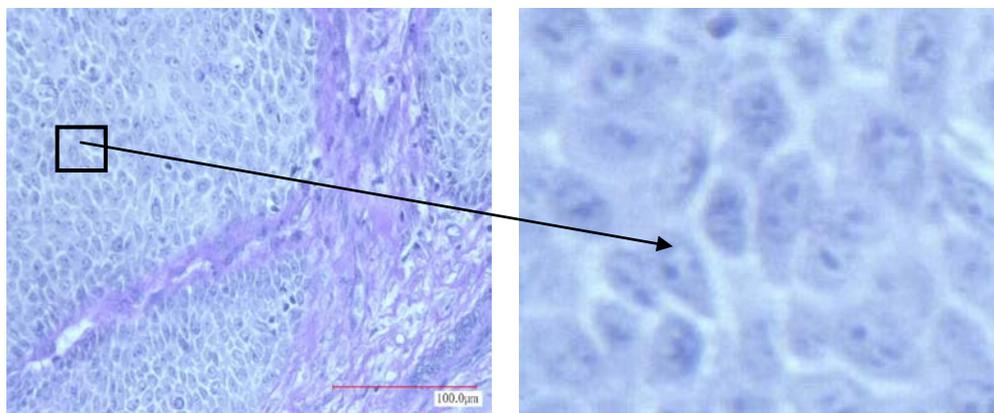


Fig. 5-14 PAS 染色による誘発皮膚がんマウスの組織の観察

### 5.3 皮膚がんの治療結果の評価

0.3%の20-メチルコラントレン溶液を毎日塗布し、皮膚がんの病状が観察された後、3種類の磁性流体および治療薬剤をコーティングした磁性流体を皮膚がんマウスモデルの背中に塗布した。10日間の実験を行った後、皮膚がんマウスモデル背中の皮膚を採取し、切片を観察した。

Fig. 5-15 に示すように、皮膚がんを誘発したマウスの皮膚は悪性腫瘍の状態が確認された。治療薬剤を10日間で塗布し、マウス皮膚の切片を観察した。コントロールモデルより、表皮層の肥厚化の状態が改善され、また、真皮の細胞浸潤に肥胖細胞の混在状況が改善され、腫瘍状態は軽減であったことを示した。

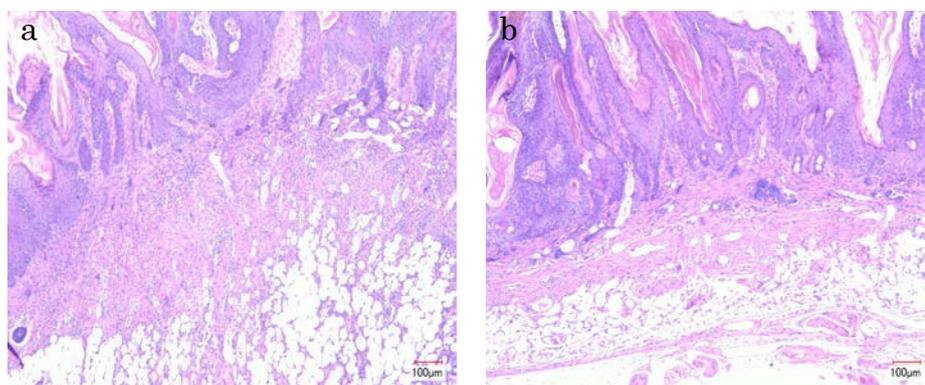


Fig. 5-15 誘発皮膚がんマウスの組織の切片

a: コントロール (10 日間) ; b: 治療薬剤ブレオマイシンのコントロール (10 日間)

Fig. 5-16 は磁性流体および治療薬剤ブレオマイシンをコーティングした磁性流体を10日間で塗布したマウスモデル背中の切片である。3種類の異なる種類の磁性流体を塗布した結果、皮膚の腫瘍状態にはコントロール組の状態を維持したことが確認できた。また、薬剤ブレオマイシンをコーティングした治療薬剤を塗布した結果、皮膚状態は顕著に回復したことが確認された。組織学的に、脂肪層は薄くなり、表皮層の肥厚化状態が顕著に改善され、症状は軽減したことが確認されていた。薬剤ブレオマイシンのコントロール組より、薬剤ブレオマイシンのコーティング組の回復効果の方が高いことが確認された。結果から、治療薬剤をコーティングした磁性流体は優れた治療効果を持つことが確認されていた。

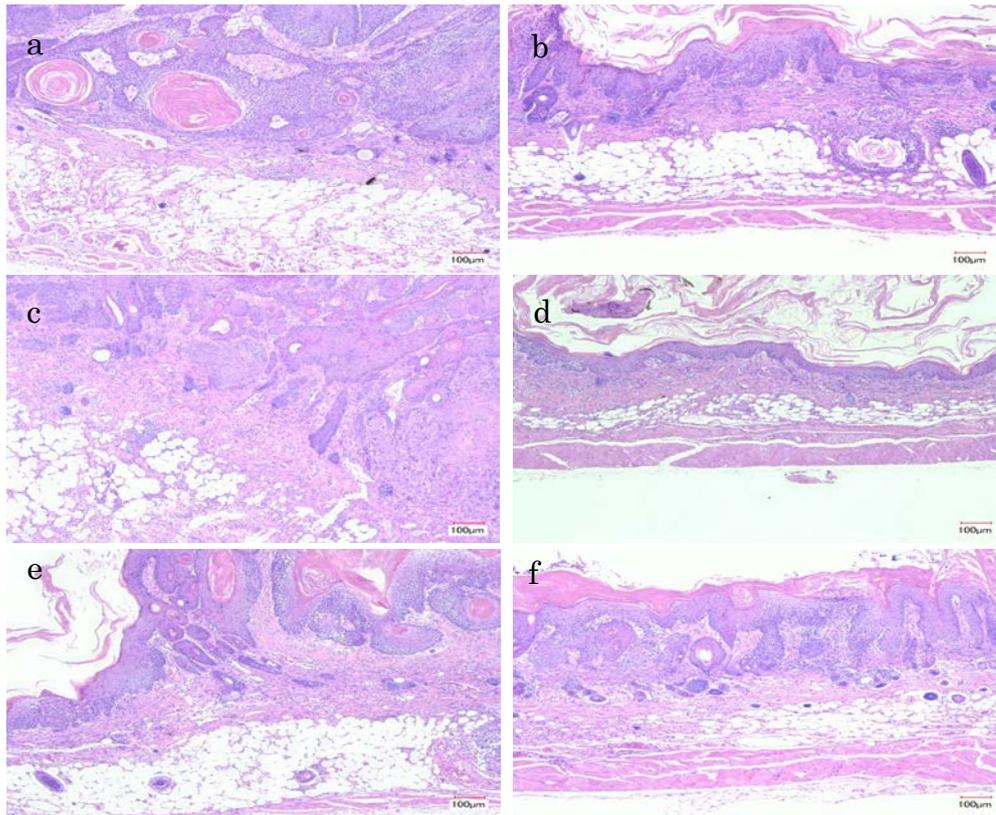


Fig. 5-16 誘発皮膚がんマウスの治療後の組織切片

a:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (10 日間) ; b:  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{drug}$  (10 日間) c:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{SiO}_2$  (10 日間) ;  
d:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{SiO}_2 / \text{drug}$  (10 日間) ; e:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{Mg}(\text{OH})_2$  (10 日間) ; f:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{Mg}(\text{OH})_2$   
/drug (10 日間)

## 5.4 ヒト皮膚がん細胞への影響検討

### 5.4.1 ヒト皮膚がん細胞の培養実験

ヒト皮膚がん細胞を  $25\text{cm}^2$  フラスコで培養し、細胞がセミコンフルエントな状態で、継代培養を行った。フラスコ内の培地を抜き取り、10%EDTA 溶液約 10ml を加え、細胞をリンスし、溶液を捨てた。0.25%トリプトシン/0.02%EDTA 溶液を 2ml 加え、顕微鏡にて細胞を観察した。細胞が円形であることを確認し、トリプトシンインヒビター溶液を約 2ml 加え、パスツールピペットでペッティングし、細胞を剥がし、遠心管へ移した。フラスコに培地を約 10ml 加え、残った細胞を懸濁させ、回収し遠心管へ移した。遠心分離機で約 1000rpm で 3 分間遠心し、上清を捨て、遠心管に既知量培地を加えた。細胞をピペッティングで再浮遊させ、細胞数を測定した。フラスコを用意し、

培地 10ml を加え、皮膚がん細胞を  $2 \times 10^4$  cell/ml 播種した。Fig. 5-17 に示した通り、1 日目で細胞は培養液の中に、分散していることが分かった。7 日目に細胞がフラスコ中にコンフルエントな状態になっていたため、ヒト皮膚がん細胞の治療実験は 7 日間に培養した。

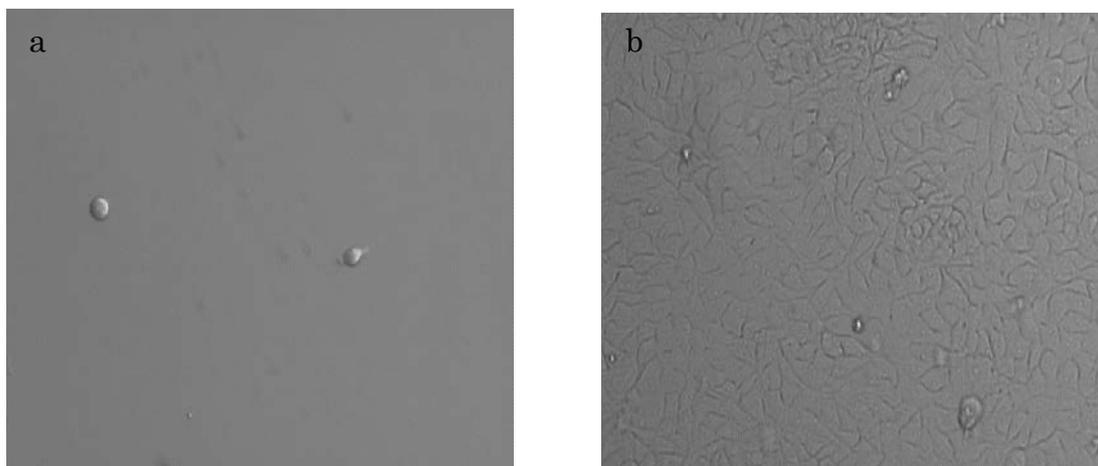


Fig. 5-17 ヒト皮膚がん細胞の観察 (a: 1 日目; b: 7 日目)

#### 5. 4. 2 磁性粒子の投与実験

磁性粒子及び  $\text{SiO}_2$  と  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  コーティングした磁性粒子をヒト皮膚がん細胞に投与し、1 日目では、各組においても僅かながん細胞しか観察されなかった。7 日目まで細胞培養の結果は Fig. 5-18 に示した通りである。磁性流体及び  $\text{SiO}_2$  と  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  コーティングした磁性粒子の各組において正常な細胞増殖が観察された。

以上の結果は、各試験組の 3 種類の磁性粒子は共に安全であることを示した。近年以来、磁性粒子は、磁性特性、生物学的適合性、高い安全性等の特性により、医療やバイオ分野での関心が高まっている。特にアルカリ溶液を用いた共沈法によるナノ粒子の調製法が報告されていたことは、ナノサイズの微粒子が大量に製造できるようになってきた<sup>19)20)</sup>。また、粒径の制御、単分散性、構造に関する磁性粒子の品質が著しく改善された。そのため、磁性粒子は医薬品、バイオの分野で薬剤送達の担体や検査試薬剤等において幅広く応用されている。以上の投与試験から、磁性粒子は治療薬剤の担体としてがん細胞の治療への応用は可能であることが確認された。

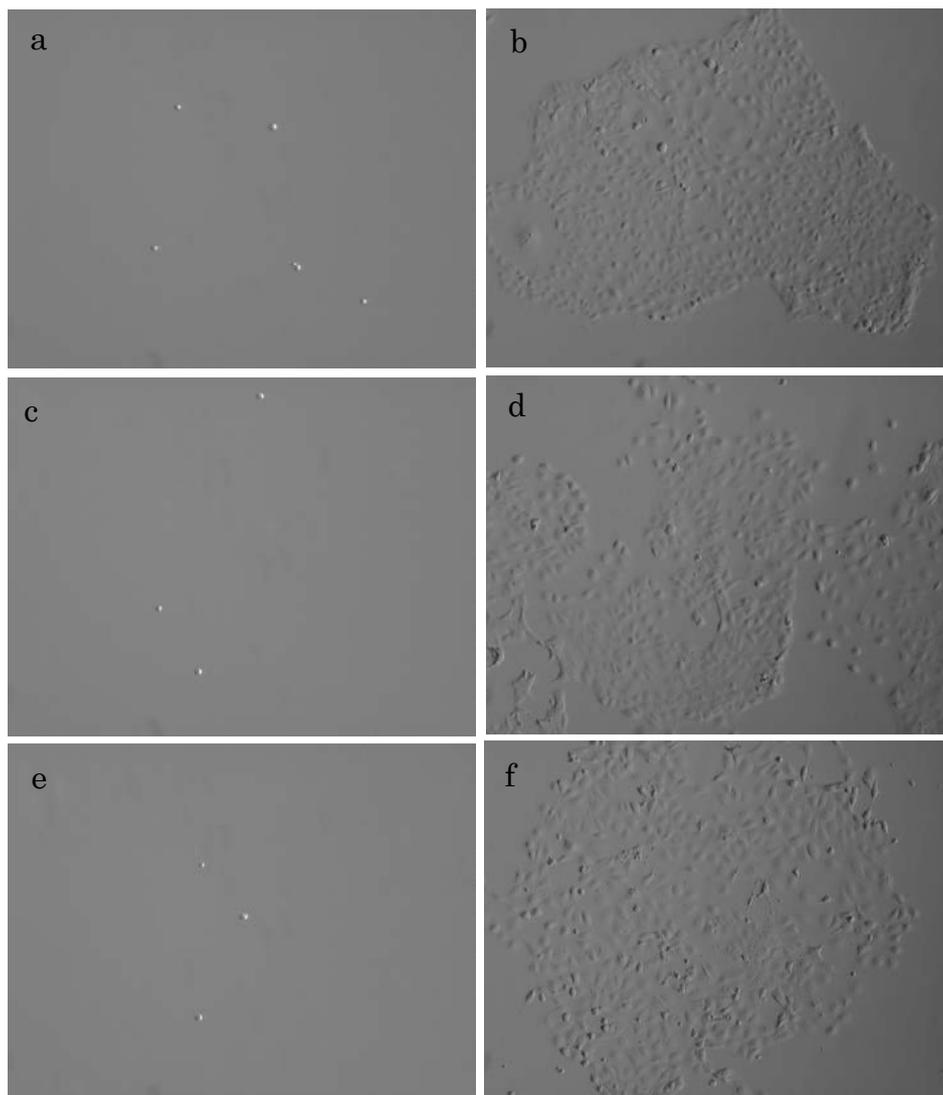


Fig. 5-18 磁性流体によるヒト皮膚がん細胞への影響

a:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (1日目) ; b:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (7日目) c:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{SiO}_2$  (1日目) ; d:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{SiO}_2$  (7日目) ; e:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{Mg}(\text{OH})_2$  (1日目) ; f:  $\text{Fe}_3\text{O}_4 / \text{Mg}(\text{OH})_2$  (7日目)

#### 5. 4. 3 ナノ治療薬剤の投与実験

ナノ治療薬剤をヒトがん細胞の中に投与し、ヒトがん細胞の状態を観察した。コントロールの細胞は健康に増殖し、七日間でフラスコの中に充満した。治療薬剤としてブレオマイシン が使用されていた。ブレオマイシンは、1966年に梅沢浜夫博士によって開発された抗がん剤であり、福岡県の土壌から分離された放射菌を培養して得られた抗生物質で、今でも多くのがんに対して活用されている。ブレオマイシンはがん細胞のDNAの2本鎖を切断するほか、がん細胞の中で金属イオンと結びついて活性酸

素（フリーラジカル）を発生させ、それによってDNAに損傷を与えるという作用も持ち、抗がん剤につきものの骨髄抑制があまり見られない点が大きな特徴である。一般的に皮膚がんの治療薬として使用されている。

Fig. 5-19 はナノ治療薬剤の投与実験によりナノ治療薬剤の治療効果を示した。治療薬剤コントロールは細胞の増殖を抑制し、コントロール組より細胞の数は顕著に減少したことが分かった。また、ナノ治療薬剤を投与した結果、細胞の数が減少し、治療効果が顕著であった。

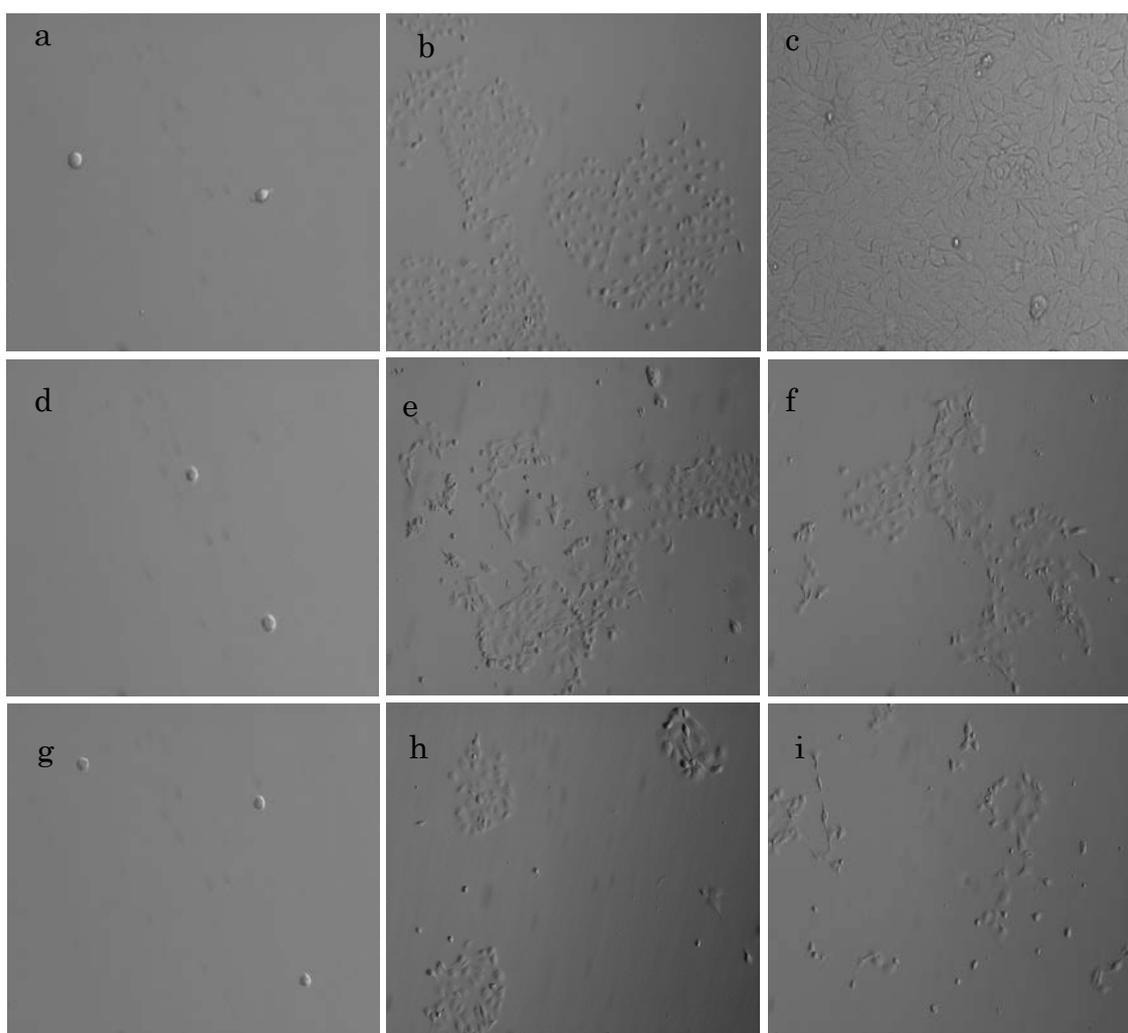


Fig. 5-19 ナノ治療薬剤によるヒト皮膚がん細胞への影響

a: コントロール（1日目）；b: コントロール（3日目）c: コントロール（7日目）；  
d: 治療薬剤コントロール（1日目）；e: 治療薬剤コントロール（3日目）；f: 治療薬剤コントロール（7日目）；g: ナノ治療薬剤（1日目）；h: ナノ治療薬剤（3日目）；  
i: ナノ治療薬剤（7日目）

#### 5.4.4 デリバリシステムの応用

ヒト皮膚がん細胞の分布状況は Fig. 5-20 に示した。磁性流体をヒト皮膚がん細胞に投与した。Fig. 5-20a に示した通り、細胞は均一に分布したことが確認できた。磁場を加えた後、細胞は磁場の中に集中し、磁性流体によるデリバリの効果があることを判明した。その結果は Fig. 5-20b に示した。磁性流体はデリバリシステムの応用を検討した。

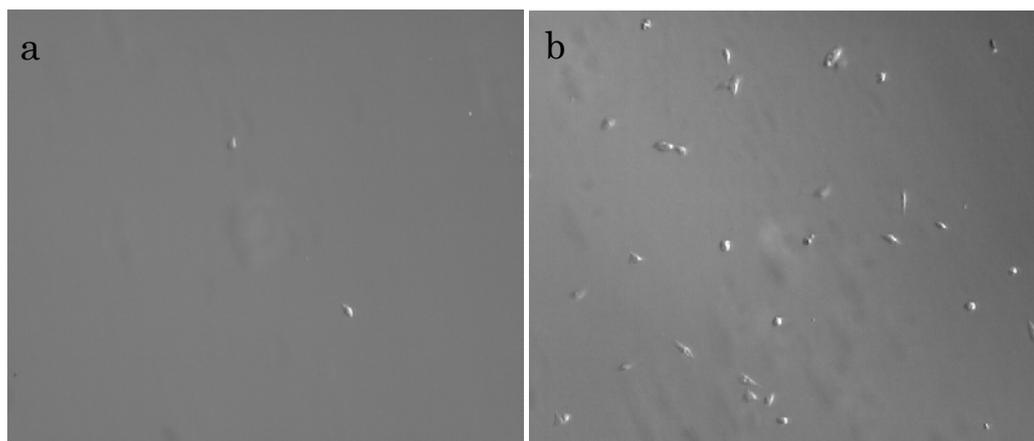


Fig. 5-20 ヒト皮膚がん細胞の分布図(a:磁場なし; b:磁場あり)

また、ナノ治療薬剤を投与した細胞の増殖状況を観察し、磁場なしと磁場加えた治療効果の比較を Fig. 5-21 に示した。磁場なしの場合、ナノ治療薬剤はヒト皮膚がん細胞の増殖が抑制されたが、フラスコの中に分散するため、がん細胞がある程度存在したことが分かった。磁場を加えた場合、ナノ治療薬剤を集中し、がん細胞への抑制効果が明らかに向上したことが確認された。磁性粒子単独の場合、細胞成長を抑制することが観察されなかった。しかし、培養時間の経過と共に、ナノ微粒子の表面に薬剤のコーティングにより、治療薬剤の浸透や薬剤効果の発揮を促進すること考えられる。以上の結果、ナノ治療薬剤はデリバリシステムとして実現できたことが考える。

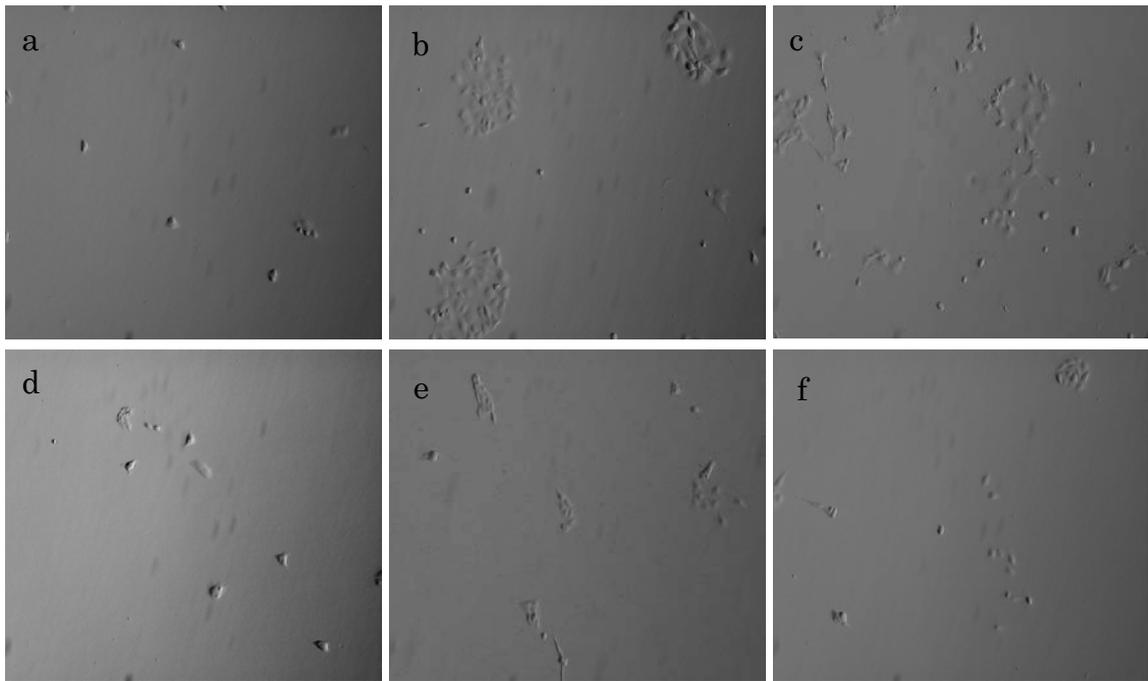


Fig. 5-21 磁場によるヒト皮膚がん細胞への影響

磁場なし：a: ナノ治療薬剤（1日目）；b: ナノ治療薬剤（3日目）c: ナノ治療薬剤（7日目）；

磁場付け：d: ナノ治療薬剤（1日目）；e: ナノ治療薬剤（3日目）f: ナノ治療薬剤（7日目）

## 5.5 小括

本研究では、ナノ治療薬剤を用い、皮膚がんマウスモデルに塗布し、染色切片を観察した。治療薬剤コントロールは細胞の増殖を抑制し、コントロール組より細胞の数は顕著に減少したことが分かった。また、ナノ治療薬剤を投与した結果、細胞の数が減少し、治療効果が顕著であった。ヒト皮膚がん細胞の治療実験結果により、デリバリシステムとして、磁場を加えたナノ治療薬剤の治療効果を向上したことが確認された。

## 5.6 参考文献

- 1) <http://ganjoho.jp/public/cancer/squamous/index.html>. Downloaded 24, Dec. 2016
- 2) English DR, Armstrong BK, Kricger A, et al: Case-control study of sun exposure and squamous cell carcinoma of the skin, *Int J Cancer*, 1998; 77: 347-353.
- 3) [http://jsco-cpg.jp/guideline/21\\_2.html#cq01\\_01](http://jsco-cpg.jp/guideline/21_2.html#cq01_01). Downloaded 24, Dec. 2016
- 4) 清水 宏 : 新しい皮膚科学、第 2 版、425-426
- 5) <http://www.gan-pro.com/public/cancer/skin.html>. Downloaded 24, Dec, 2016
- 6) 清水 宏 : 新しい皮膚科学、第 2 版、424
- 7) <http://ganjoho.jp/public/cancer/melanoma>. Downloaded 24, Dec. 2016
- 8) 清水 宏 : 新しい皮膚科学、第 2 版、457-460
- 9) 谷 田 昌 溥: 20-メチルコラントレンによる実験的マウス皮膚癌の研究皮膚. 第 2 巻・第 4 号、450. 昭和 35 年 10 月
- 10) 筒 井 秀 二 郎: マ ウ ス に 於 け る 人 工 的 表 皮 癌 に つ い て、癌、12 巻:111、大 7.
- 11) Cook、 J. W.、 et al: The production of cancer by pure hydrocarbon、 Pro. Roy. Soc. London (B) 117 318、 1935
- 12) 谷 田 昌 溥: 20-メチルコラントレンによる実験的マウス皮膚癌の研究皮膚. 第 2 巻・第 4 号、451. 昭和 35 年 10 月
- 13) Simpson, W. L. and Cramer, W. : Mast cells in experimental skin carcinogenesis, *Cancer. Res.* 4: 601-616, 1944.
- 14) Warburg、 O. : The Metabolism of Tumors、 Canstable and Co: London. 1930.
- 15) Boyland、 E. : Chemical carcinogenesis and experimental chemotherapy of cancer、 *Yale. J. Biol. Med.* 20: 321、 1948.
- 16) 谷 田 昌 溥: 20-メチルコラントレンによる実験的マウス皮膚癌の研究皮膚. 第 2 巻・第 4 号、456-458. 昭和 35 年 10 月
- 17) 谷 田 昌 溥: 20-メチルコラントレンによる実験的マウス皮膚癌の研究皮膚. 第 2 巻・第 4 号、466-472. 昭和 35 年 10 月
- 18) Lison、 L. 今泉正訳、組織化学および細胞化学、理論と方法、1. 東 京、白水社、

1954.

19) J. Le Fort, C. R. Acad, Sci. Paris, 34, 488 (1852).

20) E. V. Mielczarek, S. B. McGrayne, "Iron, Natures Universal Element", Rutgers Univ. Press, new Brunswick (2000).

## 第六章 疎水化セルロースの特性及び育毛剤への応用

### 6.1 セルロース系増粘剤

増粘剤は、基になる液体に添加混合することにより、粘度を増大させる作用を有する物質であり、主に分子量の大きい高分子物質の仲間がそれに当たる<sup>1)</sup>。増粘剤としては主に水溶性高分子が用いられ有機系と無機系に分けられる。有機系は、天然高分子、半合成高分子、合成高分子に分類され、昔は天然ガム類を代表とした天然高分子が主流であったが、安定性や粘度変動、微生物による汚染等の品質安定性の点から半合成高分子及び合成高分子はよく使用されるようになってきた。代表的な増粘剤としては、微生物由来の天然高分子物キサントガムと植物由来のマンナンやペクチン、半合成高分子ではセルロース系のカルボキシメチルセルロースナトリウム、合成高分子ではビニル系のカルボキシポリマー、ポリビニルアルコールなどがある。無機系では粘土鉱物の一種であるペントナイトなどが代表的である。

そのうち、セルロース系増粘剤は一般的に使用されている増粘剤になっており、様々な誘導体が開発されている。自然界で植物が生息しているが、植物はすべてセルロースと呼ばれる天然高分子を主要な構成成分として含んでいる。セルロースは植物細胞を覆う細胞壁や繊維質を構成し、植物を形作る上で重要な成分となっている。Fig. 6-1 に示した通り、セルロースは多数のグルコース分子がグリコシド結合により、直鎖状に重合した天然高分子である。しかし、セルロースは構成単位であるグルコースとは異なる性質を示している。

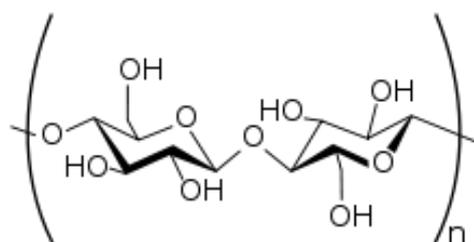


Fig. 6-1 セルロースの構造式

セルロースは、1838年にフランスの生化学者アンセルム・ペイアンによって発見されていた。1991年、日本人研究者小林四郎によって、セルラーゼを利用した酵素触媒重合により初めて人工合成に成功した<sup>2)</sup>。

セルロースの主要な誘導体として、ニトロセルロース、アセチルセルロース、セ

ルロースエーテルが知られている。そのうち、カルボキシメチルセルロース（CMC）がセルロースエーテルの一種として、増粘用原料として種々の用途に使われている。セルロースエーテルはセルロースに含まれるヒドロキシ基をエーテルに変換したものである。セルロースは自然界に存在する高分子であり、一般的な溶媒である水には不溶であるが、一部の有機溶媒には溶解する。その理由は、セルロースの構成単位であるグルコース環にヒドロキシ基が存在し、隣接するヒドロキシ基との間に水素結合を生じて結晶化するために水和を阻害するからである。植物繊維の主成分で水に溶けないが、分子の一部を入れ換え、水に溶けるセルロース誘導体として製品化することになり、分子をさまざまな官能基の置き換えることで、色々な性質を持つ製品の開発できた。セルロース誘導体は増粘、粘度調節、乳化安定、接着等の様々な効果を有する。その用途も多岐にわたり、化粧品、医薬品をはじめ、様々な分野において活躍している。

## 6.2 新規疎水性セルロース

セルロース誘導体はその特性に応じて、粘性調整、増粘、ゲル化、分散安定、保水、乳化安定、接着、フィルム形成と化粧品の様々な分野に応用されている。特に粘性調整、増粘、ゲル化という分野においては、代表的な増粘剤であるカルボマーが使用出来ない系（カチオン性成分との配合等）で、HPC（ヒドロキシプロピルセルロース）やHEC（ヒドロキシエチルセルロース）が一番よく使用されている。しかし、これらのセルロース誘導体では分子量の関係から増粘効果に制限があり、狙い粘度を得るためにかなりの量を添加する必要がある。またカルボマーに比べ調製した溶液のチキソトロピック性に劣り、化粧品の使用感という点に関しては満足のものではなかった。

これに対し、セルロース誘導体にC12~18等の疎水基を導入し、増粘性と使用感を改善する試みがなされている。例えば、HECにC12~16までの疎水基を導入し（以下HM-HECと表記する）それをシャンプーに使用することが報告されている<sup>3)</sup>。

HM-HECは、変性前の原料として低分子量のHECを使用していることと比較的疎水基の置換度を高く設計していることより、増粘剤というよりは界面活性剤として評価されている。

新規疎水性セルロースは、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）を疎水化（ステアリル化）したセルロース誘導体である（Fig. 6-2）。医薬品、化粧品に配合することは多く、従来のセルロース誘導体より以下の特徴を有する。

その特徴は、粘性の飛躍的な向上、使用感の改善（伸びの良さ、ベタツキ改善）、乳化製品の安定化、薬物の安定化である。以上の利点を有するため、新規疎水性セルロースは化粧品、医薬品分野で幅広く応用される。

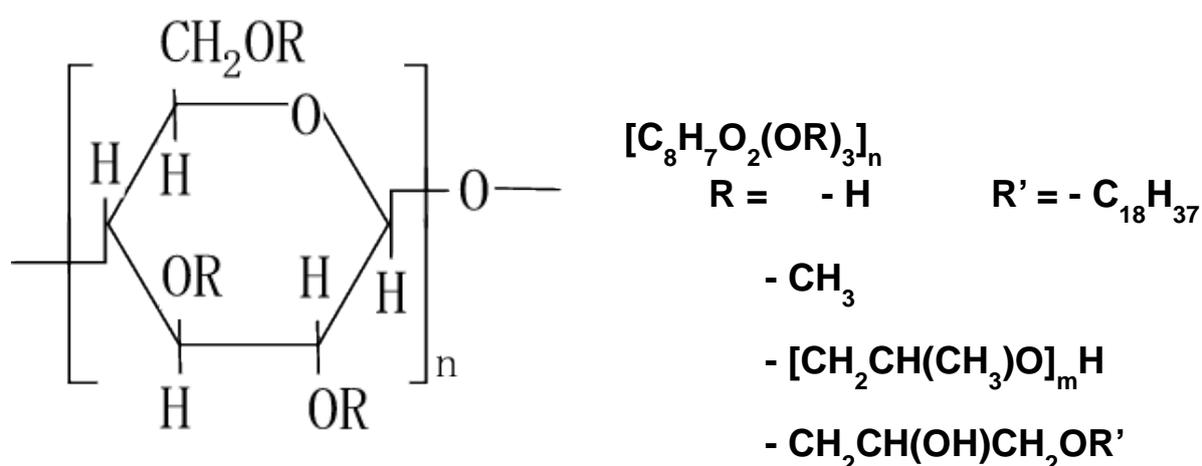


Fig. 6-2 新規疎水性セルロースの構造式<sup>4)</sup>

また、高分子量のセルロース誘導体に疎水基を導入し医薬用のゲル化剤として活用する研究も報告されている<sup>5)</sup>。ここではセルロース誘導体として高分子量の HPMC（ヒドロキシプロピルメチルセルロース）を用い、それに C18 の疎水基を導入し疎水化 HPMC（以下 HM- HPMC と表記する）を合成し評価している。HM- HPMC とその原料である HPMC の水溶液の極限粘度とみかけ粘度をそれぞれ測定し比較したところ、純粋な高分子の大きさを示す極限粘度には差がみられなかったのに対し、測定する系での高分子の広がりや高分子同士の相互作用に影響するみかけ粘度では HM- HPMC の方が顕著に高い値を示した。このことより HM-HPMC の増粘効果は、疎水基同士が水中で会合し分子間でネットワークを形成しているためと論じている。またこのようなネットワークを持つことにより、カルボマーと同様のチキソトロピックな流動性を示している。

HM- HPMC は化粧品表示名称「ステアロキシヒドロキシプロピルメチルセルロース」として市販されており、スキンケア、ヘアケアを始め様々な化粧品分野に活用され始

めている。

### 6.3 新規疎水性セルロースの特徴

#### 6.3.1 HM- HPMC の増粘機構及び粘度特性

Fig. 6-3 に示した通り、一般的なセルロース誘導体は主鎖の絡みつきだけで粘性を出すことになっているが、HM- HPMC は疎水基（ステアシル基）が分子間で会合し粘度が飛躍的に向上させ、ゲルの感触はゼリー状である<sup>6)</sup>。

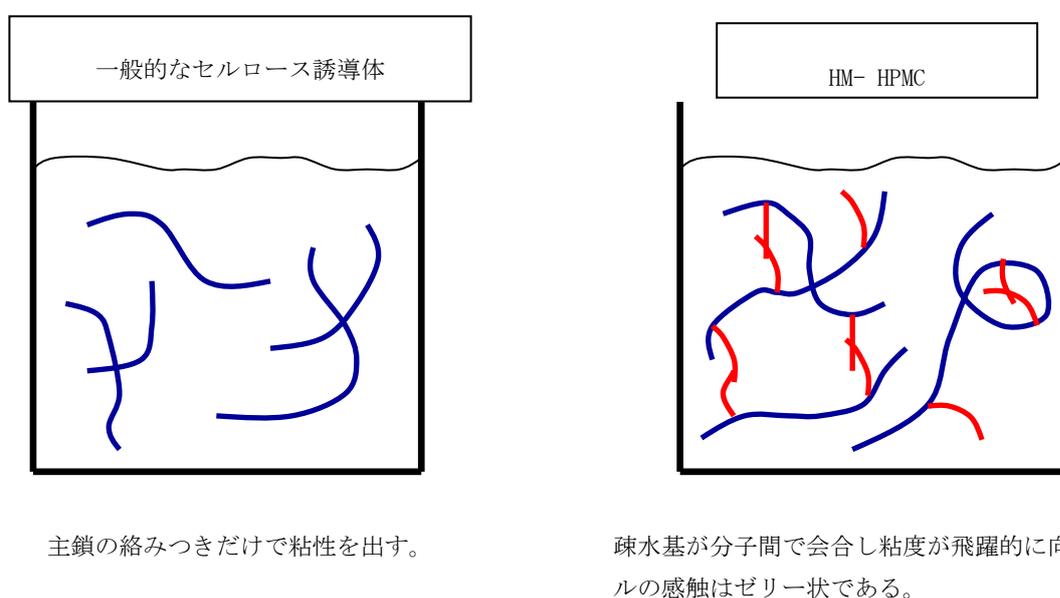


Fig. 6-3 HM- HPMC の溶解機構<sup>6)</sup>

HM- HPMC とその原料である HPMC 水溶液の添加量と粘度の関係を示した<sup>7)</sup> (Fig. 6-4)。HM- HPMC と HPMC は高分子主鎖の長さに大きな差はないにもかかわらず、増粘効果において HM- HPMC にかかなりの優位性が見られた。

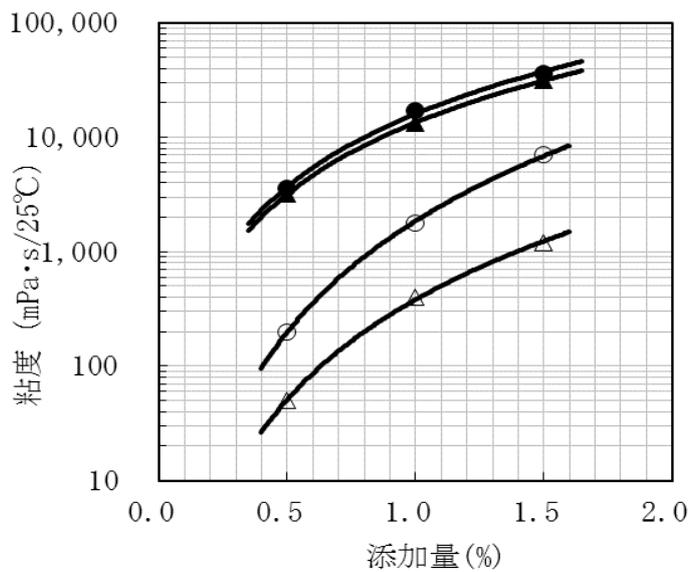


Fig. 6-4 セルロース誘導体 添加量と粘度<sup>7)</sup>

B型粘度計 6rpm (25°C)

○ HPMC (粘度グレード100,000)      △ HPMC (粘度グレード10,000)

● HM-HPMC (粘度グレード100,000使用)

▲ HM-HPMC (粘度グレード10,000使用)

また、同様にこの2種の水溶液のずり速度と粘度の関係を測定した (Fig. 6-5)。HPMCに比べ HM-HPMC は、ずり速度の増加と共にみかけ粘度の低下が大きく、よりチキソトロピックな水溶液を作ることが分かった。以上のことより、HM-HPMC を化粧品に増粘剤として用いた場合、より少量の添加量で使用感の良い製剤を調製することが可能になると考えられる。

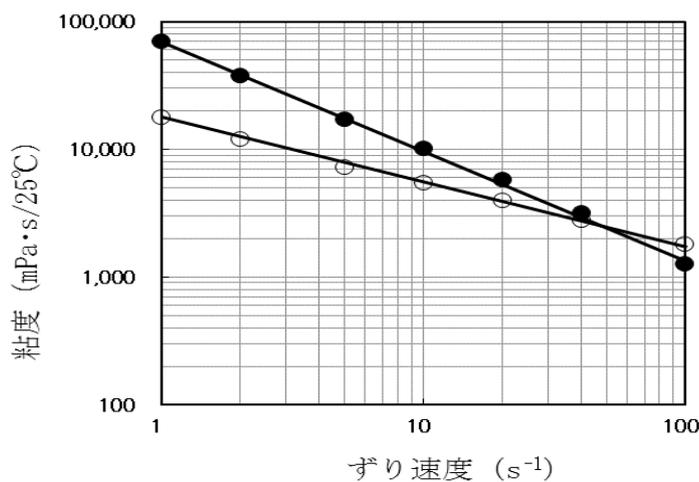


Fig. 7-5 セルロース誘導体 ずり速度と粘度<sup>8)</sup>

E型粘度計 (25°C) セルロース誘導体添加量 1.0%

○ HPMC (粘度グレード100,000)

● HM-HPMC (粘度グレード100,000使用)

### 6.3.2 HM- HPMC の溶解方法及び注意点

HM- HPMC は熱水不溶の性質を利用し、溶解方法は Fig. 7-6 に示した通りであった。実生産を想定するにあたり、HM-HPMC を配合する場合の注意点を述べる。HEC や HPC は常温で溶解可能な増粘剤が流通しているが、HM-HPMC では常温で水に添加するとままこを形成しやすく溶解が困難である。一度溶解しない温度 (75~80℃) に水を加熱してから添加・分散させ、更に完全溶解させるには 25℃まで冷却する必要があるため、生産工程に当該作業時間を加算しなければならない。

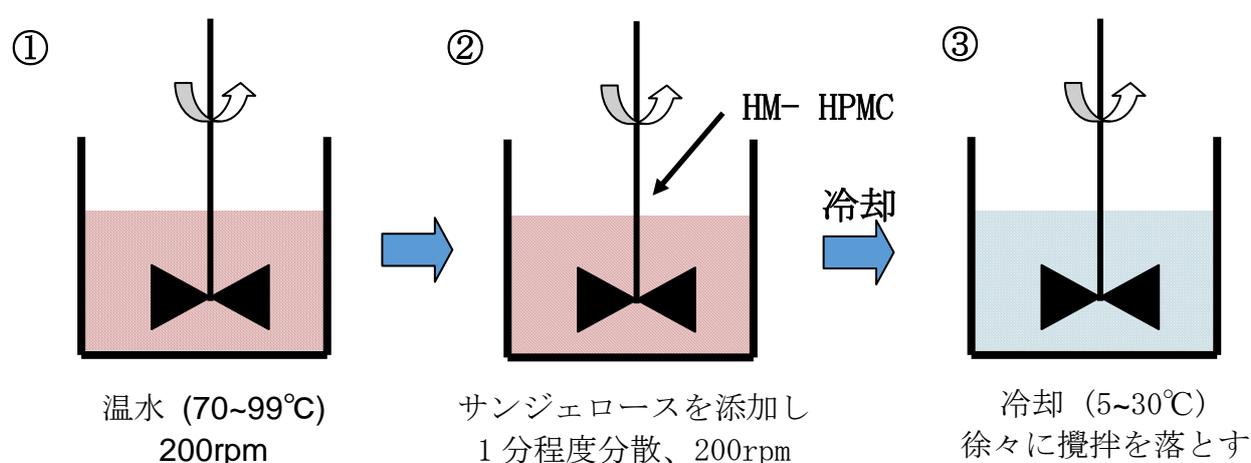


Fig. 6-6 HM- HPMC の溶解方法<sup>9)</sup>

## 6.4 HM- HPMC の毛髪に対する特性

### 6.4.1 HM-HPMC の性状及び感触評価

1%水溶液の外観は淡黄色透明なジェル状である。ジェルの性状は弾力感を持ちながら硬くならず、手の平での伸びが良好である。優れる弾力感があるから、毛髪や頭皮のマッサージ用素材として利用できる。

感触評価の方法として以下の通りであった。1%HM-HPM 水溶液及びその他増粘剤水溶液を作製し、20代から50代のミドルダメージの被験者10名に全頭40gを塗布し室温で5分間放置した後水洗し、ドライヤーで仕上げる。湿時及び乾燥時における官能評価を5段階評価 (Table 6-1) で実施した。

Table 6-1 官能評価の評価基準

点数	毛髪上での伸び	毛髪の柔軟性	毛髪のすべり性	毛髪の瑞々しさ
5点	良い	柔らかい	良い	良い
4点	やや良い	やや柔らかい	やや良い	やや良い
3点	普通	普通	普通	普通
2点	やや悪い	やや硬い	やや悪い	やや悪い
1点	悪い	硬い	悪い	悪い

評価結果は、湿時、乾燥時共に HM- HPMC は良好な伸びを示し、独特なジェル特性により優れた使用感が得られた。更に、疎水基が毛髪表面を疎水化することにより、毛髪に対し高い柔軟性、自然なすべり性及び瑞々しさを付与する効果があることが認められた (Table 6-2、Table 6-3)。

Table 6-2 湿時の使用感及び毛髪の感触評価の結果

増粘剤の種類	柔軟性	すべり性	瑞々しさ
1% HM-HPMC	4.3	4.6	4.3
1% HEC	2.4	2.4	2.9
1% 高重合度 PEG	4.0	1.4	1.4
1% グアーガム	2.4	2.6	3.0
1% カラギーナン	3.0	2.6	3.0
1% こんにゃくマンナン	3.1	3.0	3.0

Table 7-3 乾燥時の毛髪の感触評価の結果

増粘剤の種類	柔軟性	すべり性	瑞々しさ
1% HM-HPMC	4.6	4.6	3.6
1% HEC	1.4	2.9	1.4
1% 高重合度 PEG	1.4	1.4	1.4
1% グアーガム	3.0	3.0	2.7
1% カラギーナン	3.1	3.0	2.7
1% こんにゃくマンナン	3.0	3.0	2.6

#### 6.4.2 ダメージ毛への塗布時の観察

以下の通り処理した中国人毛を走査型電子顕微鏡 (日本電子 TSM-6701F) で観察した。

ダメージ毛の処理方法：10%過酸化水素水と10%アンモニア水（1：1）を50分間ブリーチ処理し、その後水洗し、ドライヤーで乾燥した（Fig. 6-7）。

HM-HPMC 処理：上記ダメージ毛に対し適量の1%HM-HPMC水溶液を均一に塗布し、その後水洗し、ドライヤーにて乾燥した（Fig. 6-8）。

官能試験の結果と相応するように、HM-HPMCで処理をした毛髪は表面状態は顕著に改善し、健康毛と比較しても大きく遜色しないことが確認できた（Fig. 6-9）。

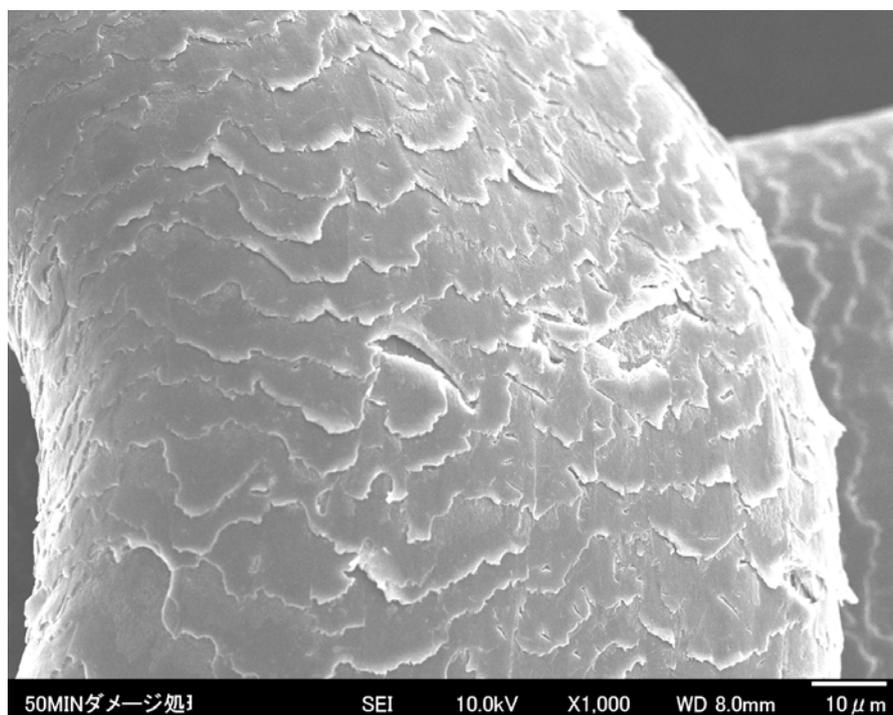


Fig. 6-7 ダメージ毛の電子顕微鏡者写真

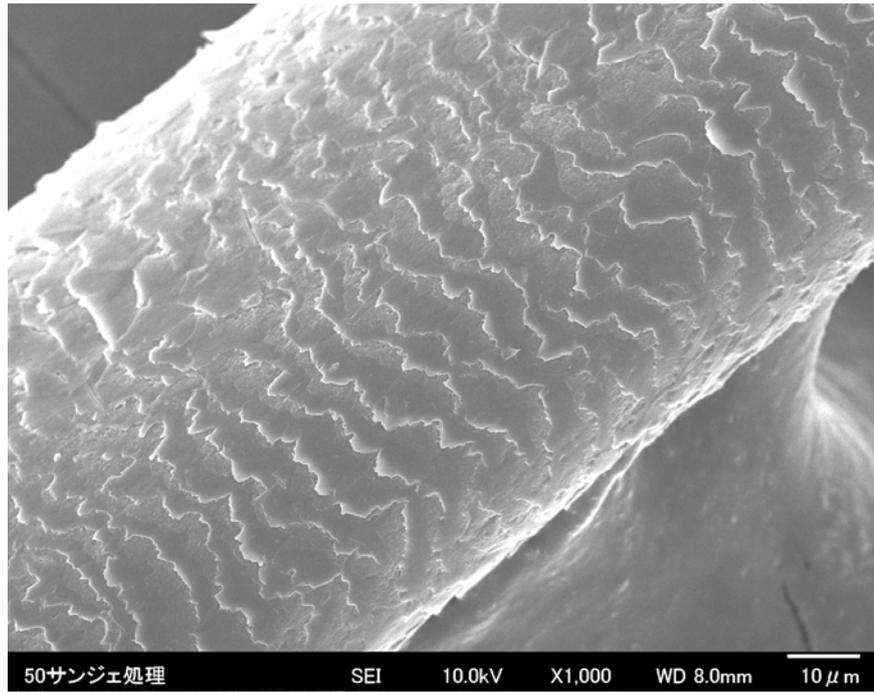


Fig. 6-8 HM-HPMC で処理したダメージ毛の電子顕微鏡者写真

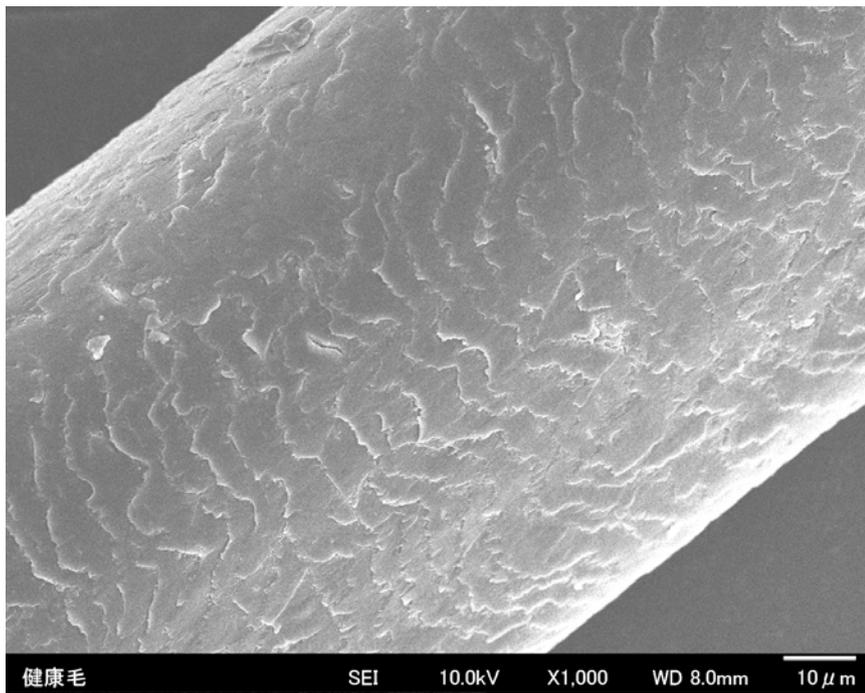


Fig. 6-9 健康毛の電子顕微鏡者写真

## 6.5 HM- HPMC の安定性及び頭皮刺激性

### 6.5.1 HM-HPMC の安定性

製品の安定性向上等の目的で複数の増粘剤を併用する場合があるが、HM-HPMC と他の増粘剤とを併用する場合には、水への溶解性に影響を受けることがあるため注意して処方設計を行う必要がある。特にグアーガム、H E Cなどと併用する場合には、経時的に分離する事例が見られたので製品の安定性試験は慎重に行うことが望ましい。また高級アルコール、グリセリンなどの多価アルコール成分や特定の防腐剤と併用する場合には、分離したり粘度が低下したりするケースがあり十分に注意して配合を決定する必要がある。

### 6.5.2 頭皮への刺激性

HM-HPMC の頭皮への刺激性を確認するために、パッチテストを実施した。テスト方法は以下の通りであった。上腕部内側にフィンチャンバーで 24hr の閉塞パッチテストを実施した。

試験検体：

- ① 1.2%HM-HPMC 水溶液
- ② 精製水（ネガティブコントロール）
- ③ 0.5%ラウリル硫酸ナトリウム（ポジティブコントロール）

判定方法：肉眼判定で、2 時間後、24 時間後の反応を見る。

計算方法：以下の数式(1)の通り、2 時間後と 24 時間後の皮膚反応の内大きい数値の総和を被験者数にて除した値を皮膚刺激指数 (P. I. I.) で算出した。

$$\text{皮膚刺激指数} = \frac{\Sigma (\text{2hr と 24hr の皮膚反応の内大きい数値})}{\text{症例数}} \quad (1)$$

評価基準は、下記の表に示した刺激性の評価を安全性評価区分として点数化した (Table 6-4)。

Table 6-4 刺激性指数と安全性評価区分

刺激性指数 (P. I. I.)	安全性区分
0～0.5	無刺激
0.5～2.0	軽度の刺激
2.0～5.0	同等度の刺激
5.0～6.0	強度の刺激
6.0～8.0	腐食性

安全性評価結果は、HM-HPMC の安全性評価区分が無刺激物であり、頭皮への刺激性は問題ないと判断した (Table 6-5)。

Table 6-5 刺激性の評価結果

判定時間	1.2% HM-HPMC	精製水	0.5% ラウリル硫酸 Na
2 時間後	0.0	0.0	0.6
12 時間後	0.1	0.0	0.8

## 6.6 HM- HPMC のヘアトリートメントへの応用

### 6.6.1 処方評価及び官能確認

以上のような機能や性能が期待される HM-HPMC をトリートメントへ応用した際の操作性・感触・問題点等について他の高分子増粘剤との比較を含め報告した。

アニオン性ポリマーとカチオン性活性剤のイオンコンプレックスによる不溶性生成物を形成する 2 剤式トリートメントの処方系で検討を行った (Table 6-6)。1 剤にはアニオンポリマーとしてポリグルタミン酸を配合した。また増粘剤として高分子ポリマーを使用し、毛髪に塗布しやすい粘度になるように調整した。2 剤には 1 剤と混合することによりイオンコンプレックスを形成させる目的でカチオン活性剤主体のクリームを調整した。

Table 6-6 ヘアトリートメント 1 剤、2 剤 評価処方

&lt;1 剤&gt;

成分名	1-A	1-B	1-C
HM-HPMC	0.50	—	—
HPC	—	1.10	—
HEC	—	—	1.00
ポリグルタミン酸	0.55	0.55	0.55
パラベン	0.22	0.22	0.22
精製水	残量	残量	残量
粘度 (mPa・s)	16、700	17、200	16、300

&lt;2 剤&gt;

成分名	配合量
塩化ステアリルトリメチルアンモニウム	2.00
セチルアルコール	5.00
ミスチリン酸イソプロピル	4.50
精製水	残量

Table 6-6 ヘアトリートメントの評価処方で作成した試作品を用い、増粘剤の違いによる感触面への影響を官能試験により評価した (Table 6-7)

Table 6-7 トリートメントの官能評価結果

&lt;湿時の官能評価結果&gt;

処方番号	伸び (作業性)	柔軟性	すべり性
1-A	1.3	3.5	3.8
1-B	3.0	2.7	2.5
1-C	3.6	2.5	2.1

＜乾燥時の官能評価結果＞

処方番号	柔軟性	すべり性	瑞々しさ
1-A	3.5	4.2	3.8
1-B	2.3	2.7	2.1
1-C	2.0	2.5	1.9

HM-HPMC は少量の添加で他の2種の増粘剤と同等な粘度にすることが可能であった。また感触では他の2種の増粘剤と比較し、湿時においてはすべり性が高く毛髪が硬くなりにくい点が優れており、乾燥時においては、すべり性が高く柔軟性・保湿性に優れた質感が付与できることが分かった。ただし、トリートメントという製品の性質上（ハケ塗り）、このままではゲル強度が高過ぎて毛髪に展延する際の作業性及び塗布時の伸びに問題が残ったが、乳化物を併用することによりゲル強度が下げることが可能になり改善することが出来た。また、乳化物の併用によりその特徴であるエモリエント性を付与することも可能となった。一例を下記の Table 6-8 の通りであり、その官能評価結果を Table 6-9 に示した。このエモリエント性の付与については他の2種の増粘剤では安定性の面から実現が困難であったので、HM-HPMC の大きな特徴の一つであるといえる。

Table 6-8 乳化系との併用処方例

成分名	配合量
HM-HPMC	0.40
ポリグルタミン酸	0.05
セチルアルコール	2.00
ベヘニルアルコール	1.00
オクチルドデカノール	2.00
エチルヘキサン酸セチル	5.00
トリステアリン酸デカグリセリル	0.80
ポリオキシエチレンセチルエーテル (30E0)	1.20
精製水	残量

Table 6-9 乳化系を配合したトリートメントの官能評価結果

## &lt;湿時の官能評価結果&gt;

処方番号	伸び (作業性)	柔軟性	すべり性
1-A'	3.7	3.5	4.2

## &lt;乾燥時の官能評価結果&gt;

処方番号	柔軟性	すべり性	瑞々しさ
1-A'	3.5	4.2	3.8

## 6.6.2 製造工程の注意点

HM- HPMC を添加する前に他の水溶性の高い成分が存在すると完全溶解しなくなることもあるため、今回の実施例のように乳化工程を加える場合は、増粘剤溶解工程のための過熱冷却を実施するのとは別に乳化調整のための加熱冷却工程が加わり作業が煩雑になることも考慮する必要がある。工程の違いによる仕上がりの違いを以下の通りに示した。前記の Table 6-8 に示した処方例の製造工程による仕上がりの違いは以下の通りであった。

A 相 : HM- HPMC、精製水 (配合量の 50%)

B 相 : セチルアルコール、ベヘニルアルコール、オクチルドデカノール、エチルヘキサン酸セチル、トリステアリン酸デカグリセリル、ポリオキシエチレンセチルエーテル (30E. 0.)

C 相 : ポリグルタミン酸

## &lt;製造方法 1 &gt;

- ① A 相の調整 : 80℃に加熱した精製水を攪拌しながら、HM- HPMC を投入し分散させる→25℃まで冷却し、HM- HPMC を溶解させる。
- ② 別タンクにて 80℃に加熱した B 相をホモミキサーで攪拌し、乳化後ホモミキサーを停止、パドルミクサーで攪拌しながら、A 相で使用した残りの精製水を 80℃に加熱したものを徐々に加える。
- ③ ホモミキサーを停止し、調製した A 相をこれに②に加えて十分混合し、25℃まで冷却する。
- ④ 冷却後 C 相を加え、評価用クリームを得た。

## <製造方法 2 >

① 上記「製造方法 1」での A 相の調整方法を変更。HM- HPMC を 80℃分散後の 25℃冷却工程を省略。(80℃のまま、工程③で添加)

②、③、④は「製造方法 1」に同じ。

## <結果>

「製造方法 1」で調製したものはややゲル強度のあるクリームとなった。一方、「製造方法 2」で調製したものは、HM- HPMC が未溶解のまま沈殿した。

以上、考慮すべき点はいくつかあるが、トリートメントへ応用した際、ユニークな物性や感触面での特徴を兼ね備えた製品を設計することが可能である。

## 6.7 育毛剤への応用

### 6.7.1 頭皮中の角質水分量の改善

一般的に育毛剤において精製水、エタノール等の溶媒を主成分とするため、粘性が殆どなかった。その使用時、育毛剤の粘度は低く、垂れ落ちる傾向があり、使用感は非常に悪いことが知られている。ヒドロキシエチルセルロース等の通常の高分子増粘剤は配合している場合、増粘効果はあるが、毛髪保護、感触向上の機能があまり見られなかった。そこで、低濃度で非常に高い増粘効果を示す HM- HPMC は、自然な毛髪の質感を維持したまま粘度を容易に調整することができ育毛剤への配合は有用であると考えられる。

また、頭皮の角層水分量は顔面と比べ、少ないことが知られている。そのため、頭皮のバリアー機能が低く、肌荒れしやすい状態であると考えられる。HM- HPMC は単なる増粘剤としての機能だけでなく、頭皮表面に保護膜を形成し、頭皮の過剰の水分蒸発や乾燥を防げる。本研究では、Table 6-10 の育毛剤の処方例に示した通りにサンプルを調製し、健常者 10 人に試験対象とし、頭頂部を 3 等分に分け、個々の部位に 1 日 1 回 1ml の精製水、育毛剤 1-D、育毛剤 1-E を塗布し、1 ヶ月後に頭頂部の部位の角質水分量をコルネオメーター Corneometer CM825 で測定した。その結果は、Fig. 6-10 の通りに示した。HM-HPMC の配合は、顕著に頭皮の角層水分量の蒸散を抑え、角質水分量は高いことを示した。

Table 6-10 育毛剤の処方例

成分名	1-D	1-E
HM-HPMC	—	0.15
黒酸化鉄	0.1	0.1
セファランチン	0.002	0.002
ニンジンエキス	0.5	0.5
グリチルリチン酸ジカリウム	0.1	0.1
ポリクオタニウム-61 等	0.08	0.08
エタノール	10	10
フェノキシエタノール	0.1	0.1
メチルパラベン	0.2	0.2
プロピルパラベン	0.02	0.02
精製水	残量	残量
粘度 (mPa・s)	52	560

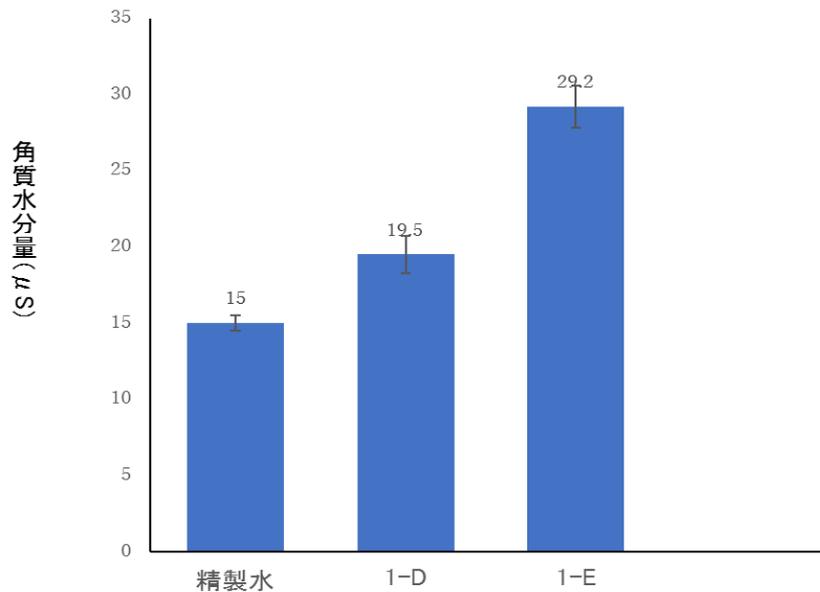


Fig. 6-10 HM-HPMC の有無による頭皮の角層水分量の変化

### 6.7.2 毛髪の感触改善

さらに、育毛剤使用時、育毛効果だけではなく、毛髪に程良い質感の付与も大事である。疎水化セルロース HM- HPMC 毛髪を保護し良好な感触を付与する効果も期待される。毛髪表面を覆うキューティクルの最表面にはF層と呼ばれる脂質層が存在し毛髪表面を疎水化すると共に、この中に含まれる 18-メチルエイコサン酸が毛髪表面のなめらかな感触を付与する機能を有している。カラーやパーマなど化学処理を繰り返した毛髪は、表面に存在していた疎水性膜のF層の一部もしくは全体が欠失してしまい親水化される。このように毛髪表面が親水化されることにより洗髪時にキシミが生じたり乾燥時に毛先の絡まりを生じさせたりする。HM- HPMC は、その親水性部分がF層の親水化されたダメージ部分に親和し、一方の疎水性の長鎖アルキル基により毛髪部分が疎水化されることによって摩擦抵抗が低減し、指の通りを良くすると共に毛髪表面がなめらかになる等の効果が期待される。上記の Table 6-1 官能評価の評価基準を基き、Table 6-10 育毛剤の処方例の湿時及び乾燥時の感触を評価した (n=10)。

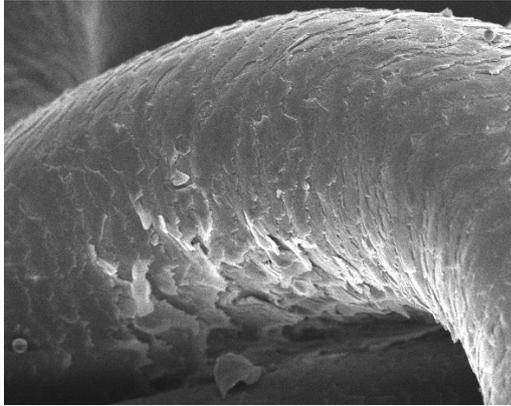
Table 6-11 湿時の使用感及び毛髪の感触評価の結果

塗布サンプル名	柔軟性	すべり性
精製水	2.4	2.7
1-D	2.5	2.8
1-E	4.1	4.3

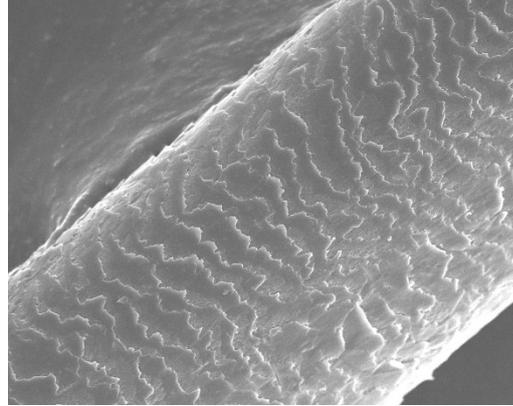
Table 6-12 乾燥時の毛髪の感触評価の結果

塗布サンプル名	柔軟性	すべり性	瑞々しさ
精製水	3.0	2.6	2.8
1-D	3.1	2.8	2.9
1-E	4.2	4.3	4.5

HM-HPMC の配合は、湿時及び乾燥の柔軟性、すべり性及び瑞々しさは共に優れており、乾燥時においては、優れた瑞々しさを付与できることが確認された。育毛剤の開発では、頭皮の角質水分量の向上だけでなく、毛髪の質感向上に対して非常に重要であることを示した。



1-D 使用後の電子顕微鏡写真



1-E 使用後の電子顕微鏡写真

Fig. 6-11 HM-HPMC の有無による毛髪表面状態の変化

Fig. 6-11 に示した通り、1-E 使用後、HM-HPMC はダメージ毛髪の表面を保護し、毛髪表面のキューティクルを整え、浮き上がりや剥がれを抑制できる。

### 6.7.3 頭皮の硬さ改善

薄毛の原因は「頭皮の硬さ」と密接に関係し、薄毛患者の頭皮の方が硬い傾向があることが分かった。

本研究では、Table 6-10 の育毛剤の処方例に示した通りにサンプルを調製し、健常人 10 人に試験対象とし、頭頂部を 3 等分に分け、個々の部位に 1 日 1 回 1ml の精製水、育毛剤 1-D、育毛剤 1-E を塗布し、1 ヶ月後に頭頂部の部位の角質水分量を 30 分馴化後 (25°C40%R. H.)、粘弾性測定機 (Vesmeter E-100HB (株)ウェイブサイバー製) で頭皮の硬度を測定した。

その結果は、Fig. 6-10 の通りに示した。HM-HPMC の配合結果は、顕著に頭皮の硬さを抑えることを示した。

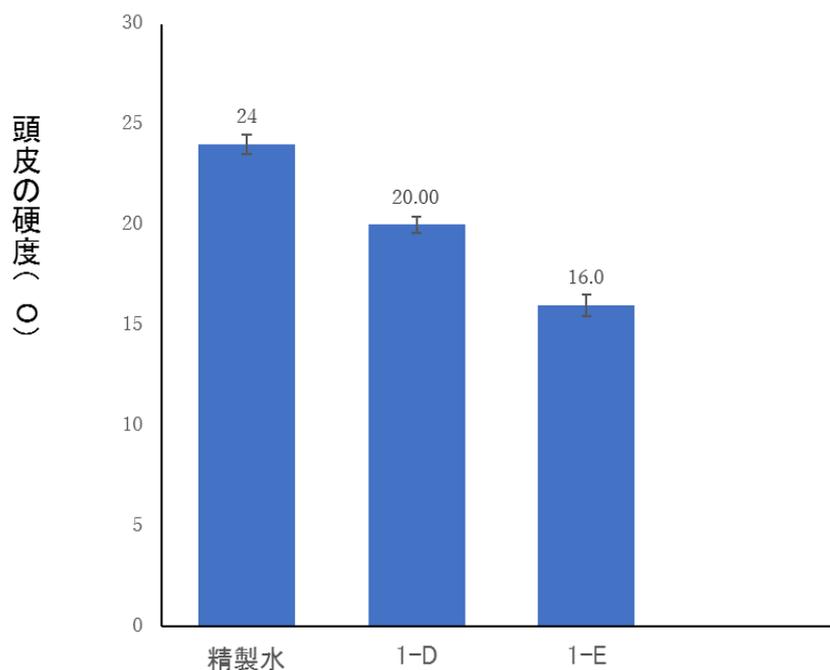


Fig. 6-12 HM-HPMCの有無による頭皮の硬さ変化

## 6.8 小括

これまで化粧品の増粘剤としてはカルボマーが主流であった。また、カルボマーの使えない系では、各種セルロース誘導体や天然高分子が使用されてきたが、その増粘性だけでなく使用感にも満足出来るものは少なかった。HM-HPMCの配合は、顕著に頭皮の角層水分量の蒸散を抑え、角質水分量は高いことを示した。また、HM-HPMCはダメージ毛髪の表面を保護し、毛髪表面のキューティクルを整え、浮き上がりや剥がれを抑制できる。さらに薄毛の原因である「頭皮の硬さ」を顕著に改善することができることが示されていた。

今回ヘアケア製品へ検討したHM-HPMCは、単なる増粘性が良いというだけでなく、その構造から様々な機能が付与されることが分かった。前章で記述した新規ナノ育毛剤の増粘や質感向上の成分だけでなく、頭皮の角質水分量や硬さの改善等の機能を有し、育毛剤処方の添加成分として使用することができると考えており、今後、さらにナノ育毛剤の増粘剤、質感向上剤として製品か向け、実際の処方検討に対して期待される原料であると考えられる。

## 6.9 参考文献

- 1) <http://www.juntsu.co.jp/qa/qa1105.php>. Downloaded 15, Dec. 2016
- 2) Klemm, Dieter; Brigitte Heublein, Hans-Peter Fink, Andreas Bohn (2005).  
“Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material”.  
*ChemInform* 36 (36).
- 3) 特公平 1-28042 号公報
- 4) <http://www.daido-chem.co.jp/lifesience/pdf/sange.pdf>. P. 2, Downloaded  
15, Dec. 2016
- 5) 齋藤 泉、池田かおり、竹原光教、高岸 靖、尾原 栄、武藤泰明、*薬剤学*、**52** (4)、  
272–279 (1992)
- 6) 大同化成株式会社、「疎水化セルロースエーテル「サンジェロース<sup>®</sup>」による温度  
感受性ゲルのご紹介」、P. 10, 2015
- 7) <http://www.daido-chem.co.jp/lifesience/pdf/sange.pdf>. P. 11, Downloaded  
15, Dec. 2016
- 8) <http://www.daido-chem.co.jp/lifesience/pdf/sange.pdf>. P. 13, Downloaded  
15, Dec. 2016
- 9) 大同化成株式会社、「疎水化セルロースエーテル「サンジェロース<sup>®</sup>」による温度  
感受性ゲルのご紹介」、P. 7, 2015

## 第七章 結論及び考察

### 7.1 結論

本研究では、液相共沈法を用い、マグネタイト超微粒子を合成した。ケイ酸ナトリウムと塩酸と反応させ、ケイ酸を生成させる。そして、マグネタイト超微粒子表面に吸着している OH<sup>-</sup>とケイ酸の脱水反応によって SiO<sub>2</sub>単層膜を生成させ、膜の外部を脱水させ、マグネタイト超微粒子の表面にネット構造の SiO<sub>2</sub>層をコーティングした。

また、Mg(OH)<sub>2</sub>でコーティングの場合、前工程で作製した磁性流体に硫酸マグネシウムを添加しながら、攪拌し、pH7 もしくは pH8 に維持するように、水酸化ナトリウム溶液で滴定しながら、Mg(OH)<sub>2</sub>でのコーティングを施した。さらに、マグネタイト超微粒子を用い、育毛剤成分、アトピー性皮膚炎治療成分及びヒト皮膚がんの治療薬剤をコーティングし、治療効果を評価した。さらに、育毛剤処方検討のため、疎水性セルロース HM- HPMC の特性及び育毛剤への応用を述べ、以下の各章で得られた結果を総括した。

#### (1) 育毛剤への応用及び評価

育毛成分 A、B (A: セファランチン、B: HAR ニンジン抽出液) を合成したマグネタイト超微粒子の表面にコーティングし、育毛成分の異なるナノ育毛剤試作品 A・B を作製した。TEM によるナノ育毛剤試作品を観察した。観察結果は、マグネタイト超微粒子の表面に育毛剤がコーティングされたことを示した。そして、ZECCOM によるゼータ電位の測定結果は、優れる分散性を有することを示した。毛周期が休止期にある 7 週齢雌の C3H マウスの背部にし、毎日試作品を塗布し、写真撮影を行い、発毛状況を観察した。また、皮膚の切片や毛根部の観察結果は、ナノ育毛剤試作品は育毛効果を有することを示した。さらに、毛乳頭細胞を用いた細胞増殖試験を行い、ナノ育毛剤試作品 A・B を 50 μg/ml、10 μg/ml、5 μg/ml、1 μg/ml、0.5 μg/ml、0.1 μg/ml と添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター下で培養した。培養したものを 1 日毎に撮影し、細胞の様子を観察した。コントロール組に比べ、特に、10 μg/ml のナノ育毛剤試作品 A、B 添加した試験組の増殖速度は一番速く、濃度の違いによる顕著な育毛効果を有することが確認された。ヒト皮膚細胞由来の三次元皮膚モデルによる安全性試験の結果は、細胞生存率が高く、皮膚に対して安全であることを示した。

また、長期間使用による皮膚の形態学の観察結果は、ナノ育毛剤長期間使用組の皮膚、肝臓、腎臓において残留のナノ微粒子が観察されないことを示した。さらに、HE染色及びPAS染色の結果は、ナノ育毛剤長期間使用組の皮膚、肝臓、腎臓において組織の異常がないことを示した。以上の結果は、ナノ育毛剤は安全かつ、ナノ微粒子の残留性ないことを示唆している。

## (2) アトピー性皮膚炎治療薬剤への応用及び評価

0.5%治療薬剤であるプレドニゾロンをマグネタイト超微粒子の表面にコーティングし、ナノ治療剤試作品を作製した。そして、TEMによるナノアトピー性皮膚炎治療薬剤を観察した。観察結果は、マグネタイト超微粒子の表面に薬剤がコーティングされたことを示した。さらに、アトピー性皮膚炎に対する治療効果を確認するため、2,4,6-Trinitrochlorobenzene アセトン溶液での皮膚塗布により、アトピー性皮膚炎モデルマウスを作成した。アトピー性皮膚炎マウスでは、線維芽細胞は少なくなり、円形に変化したことが確認されていた。治療薬剤  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{drug}$  (プレドニゾロン) 試作品を塗布した後、皮膚状態は滑らかになるため、顕著に回復したことを確認した。治療薬剤をコーティングした磁性流体での三次元皮膚安全実験の結果は、ヒト皮膚細胞に対して安全であることを示した。

## (3) 皮膚がん治療薬剤への応用及び評価

本試験は、ヌードマウスモデルを用い、0.3%の20-メチルコラントレン溶液を塗布し、皮膚扁平上皮がんを誘発させた。試験開始後、急性炎症のような症状が見られ、軽度な皮膚浮腫、落屑症状、皮膚肥厚、乳頭腫潰瘍等の症状が観察され、がん腫形成が確認された。皮膚扁平上皮がんモデルマウスの皮膚切片の観察結果は、皮膚細胞が異常に増殖し、組織変異であることを示した。

磁性流体及び治療薬剤をコーティングした磁性流体を10日間で塗布したマウスの皮膚切片を作成した。3種類の異なる種類の磁性流体を塗布した結果、皮膚の腫瘍状態にはコントロール組の状態を維持したことが確認できた。また、薬剤をコーティングした磁性流体を塗布した結果は、皮膚がんの状態は顕著に回復したことを示した。特に皮膚の脂肪層は薄くなり、表皮層の肥厚化状態が顕著に改善され、症状は軽減し

たことが確認されていた。さらに、薬剤コントロールのマウスモデルより、薬剤コーティング組の回復効果の方が高いことが確認された。この結果から、治療薬剤をコーティングした磁性流体は優れた治療効果を持つことが確認されていた。治療薬剤をコーティングした磁性流体は優れた治療効果を持つことが確認されていた。

また、ヒト皮膚がん細胞への影響を調べるため、磁性流体の投与実験を行った。磁性流体の投与実験結果は3種類の磁性流体が安全であることを示した。磁性流体は治療薬剤の担体としてがん細胞の治療への応用が可能である。ブレオマイシンをコーティングしたナノ治療薬剤の投与結果は、がん細胞の数が顕著に減少し、治療効果は顕著であった。

#### (4) 新規疎水性セルロースの化粧品への応用

セルロース誘導体はその特性に応じて、粘性調整、増粘、ゲル化、分散安定、保水、乳化安定、接着、フィルム形成と化粧品の様々な分野に応用されている。新規疎水性セルロースは、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を疎水化 (ステアリル化) したセルロース誘導体である。一般のセルロース誘導体より粘性の飛躍的な向上、使用感の改善、乳化製品の安定化、薬物の安定化などの特徴を有する。化粧品に増粘剤として用いた場合、より少量の添加量で使用感の良い製剤を調製することが可能になると考えられる。また、優れる弾力感があるから、毛髪や頭皮のマッサージ用素材として利用できる。さらに、疎水基が毛髪表面を疎水化することにより、毛髪に対し高い柔軟性、自然なすべり性及び瑞々しさを付与する効果があることが認められた。HM-HPMC の配合は、顕著に頭皮の角層水分量の蒸散を抑え、角質水分量は高いことを示した。また、HM-HPMC はダメージ毛髪の表面を保護し、毛髪表面のキューティクルを整え、浮き上がりや剥がれを抑制できる。さらに薄毛の原因である「頭皮の硬さ」を顕著に改善することができることが示されていた。今後、育毛剤での処方への応用が期待されている。

本論文において、液相共沈法によりマグネタイト超微粒子を合成し、マグネタイト超微粒子の表面に治療薬剤をコーティングし、育毛剤、アトピー皮膚炎治療剤及び皮膚がん治療薬剤への応用について検討した。その作用機構について仮説を確立したが、今後、薬剤の作用機構及びマグネタイト超微粒子の経皮透過、浸透、代謝に関する更

なる研究が必要であると考えられる。

## 7.2 考察

本研究では、マグネタイト超微粒子の表面に治療薬剤のコーティングにより育毛剤、アトピー皮膚炎治療剤及び皮膚がん治療薬剤においても顕著な浸透促進効果が見られた。辻本らの研究により比表面積は急増し、体積が微小化するため、生体膜との相互作用が高まり、粘膜への滞留性や付着性が増強され浸透性も増すことが確認されていた<sup>1)</sup>。そのため、吸収部位で薬物濃度が高まり、さらに表面のリン脂質構造により徐放効果も加わって薬物の吸収性も向上させた。結果的に治療効果を向上できたと考えられている。

化粧品で一番使用量の多いナノマテリアルは、酸化チタン、微粒子酸化亜鉛である。ナノ粒子の浸透経路として、様々な経路が挙げられるが、化粧品の曝露を考えると、経皮曝露が最も重要である。化粧品や医薬部外品で連用塗布により、ナノ粒子の皮膚曝露による人体に対する影響は非常に重要視され、ナノ粒子の皮膚浸透の可能性及び浸透ルートの解明はかなり重要な課題であると考えられる。

化学物の皮膚浸透経路の模式図は Fig.7-1 に示した通りである。1965年、Schepelinらの報告によると、皮膚透過経路は角質細胞間、細胞内を経由する角質経路と毛嚢、汗腺を経由する付属器官経路から構成されている<sup>2)3)</sup>。角質経路は全体面積を占め、脂溶性低分子は主な透過経路になっている<sup>3)</sup>。角質細胞間脂質を経由した経路は角質浸透の主要な経路であり、付属器官は全体の面積の 0.1%しか占めていないが、角質浸透性の低い物質の主要な浸透経路になり、毛穴のルートは非常に重要であることが報告されていた<sup>3)4)</sup>。

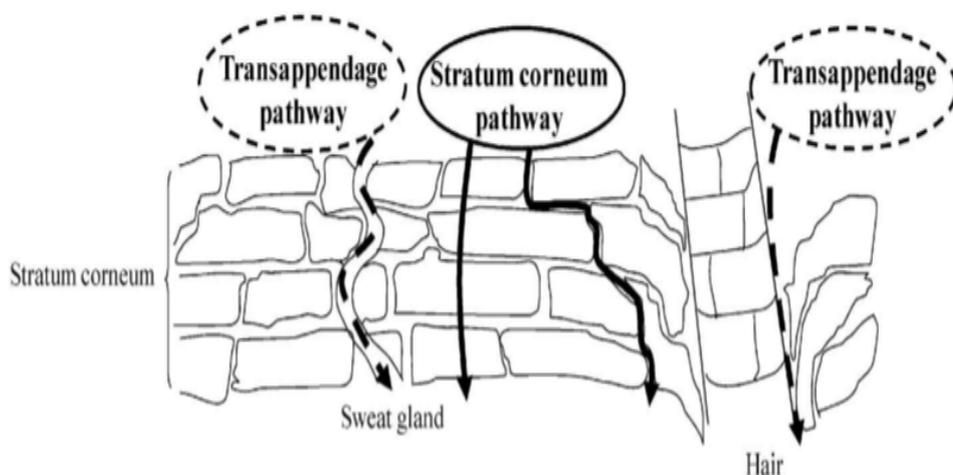


Fig.7-1 化合物の皮膚浸透経路<sup>3)</sup>

Scheplein らの報告とかなり類似し、杉林らは皮膚浸透の経路のイメージは以下の Fig.7-2 の通りであることを提唱した<sup>5)</sup>。

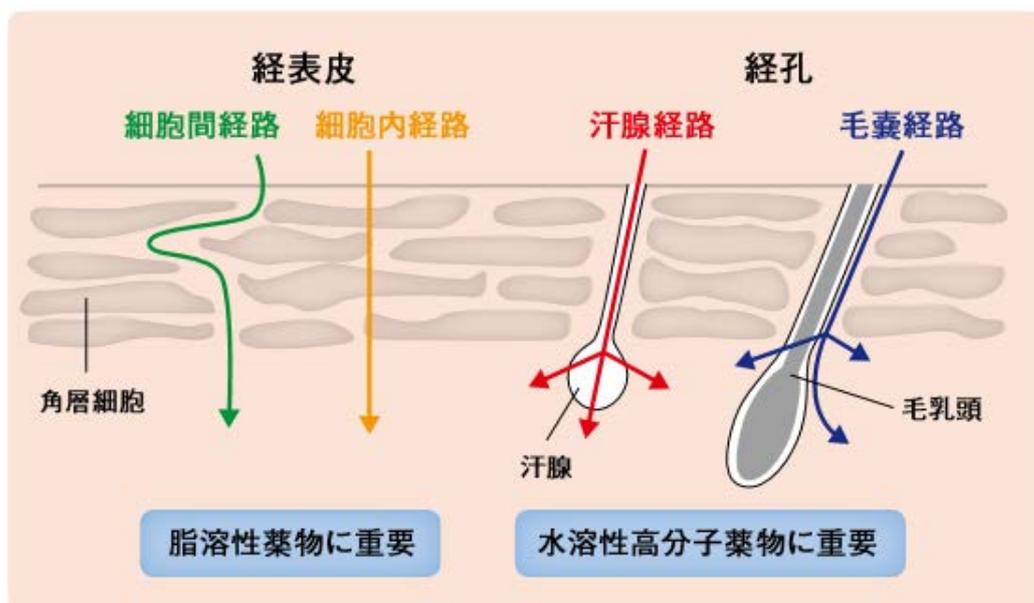


Fig.7-2 薬物の経皮吸収経路<sup>5)</sup>

- 1.角質層を通した浸透
- 2.毛嚢及び皮脂線を通した浸透
- 3.汗腺経路を通した浸透

前章で既に述べた通り、分子量 590 ダルトンのラフィノースの直径は 1.3nm であ

り、また、皮膚を透過しないとされた小さいタンパクの直径は **8.4nm** である。そのサイズはいずれにしても **10nm** 以下のレベルとなっている<sup>6)7)</sup>。一方、本研究の使用していたマグネタイト超微粒子の粒子径は数十 **nm** となっているため、皮膚に使用しても皮膚への浸透することはできないと考えている。

また、Kimura らの研究では、直径 **50nm** 程度の酸化チタン微粒子は角質層を除去した **Stripped skin** も透過しなかったという報告があった<sup>8)</sup>。ナノ素材を正常皮膚に適用する場合は安全であると考えられる。

本研究の使用していたマグネタイト超微粒子は皮膚の細胞膜に対して溶解性を有しないため、細孔浸透によって皮膚へ浸透の際に皮膚を透過するが、その他の場合には毛穴から皮膚を透過しないことと考え、3次元皮膚モデルによる安全性試験の結果も、マグネタイト超微粒子が安全であることを示唆した。

仮に、マグネタイト超微粒子毛嚢及び皮脂線、汗腺から浸透する場合、真皮部以下の毛細血管まで入り、血液中の鉄濃度に影響を与え、しかし、本研究では、未処理のコントロール組と比較して、ナノ育毛剤塗布組は顕著な **Fe** 濃度の差異が見られなかったため、いずれにしても皮膚からマグネタイト超微粒子は皮膚の内部まで侵入することがないことを示した。

また、Kimura らの研究では、直径 **50nm** 程度の酸化チタン微粒子は角質層を除去した **Stripped skin** も透過しなかったという報告があった<sup>8)</sup>。そのため、直接に角質層を通した浸透は考えにくい

マグネタイト超微粒子の浸透経路の仮説として、

1. 角質層を通した浸透は分子量等の関係によって考えにくい
2. 毛嚢及び皮脂線を通した浸透及び汗腺を通した浸透の可能性はあるが、皮膚の切片写真及び血液分析の結果は、マグネタイト超微粒子は皮膚の内部まで浸透していないことを示した。

以上の結果から、マグネタイト超微粒子の浸透経路として、角質層から直接に浸透することが困難であるが、毛嚢及び皮脂線を通した浸透及び汗腺を通した浸透もしくは汗腺から侵入する可能性があるが、最終的に何らかの原因によってマグネタイト超微粒子は皮膚の深部の真皮層以下に浸透できないと考えられる。

Alvarez らの報告によると 100 nm 程度の蛍光ナノ粒子は毛 囊等の付属器官への侵入が観察された<sup>9)</sup>。

また、Kimura らの報告では、サンスクリーン剤の使用後、皮膚表面を電子顕微鏡で観察した結果は Fig.7-4 に示した通りである。サンスクリーン剤適用後の皮膚表面の SEM 画像を示した。その結果は、酸化チタンは皮溝部に集積していること、また、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確認できた<sup>10)</sup>。

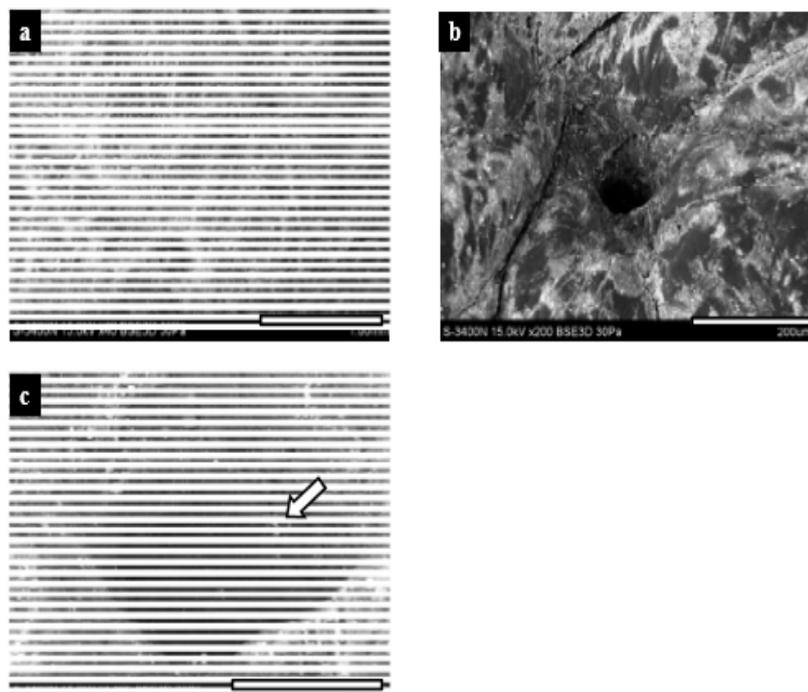


Fig.7-3 サンスクリーン剤適用後の皮膚表面の SEM 画像<sup>10)</sup>

矢印は微粒子が毛嚢での蓄積を示した。

不溶解性のナノ粒子は健常皮膚でも毛孔や汗腺のような細孔部分に集積し、毛嚢や汗腺などの深部まで侵入する可能性があると思われる。Kimura らの報告により、可溶性モデル蛍光高分子として分子サイズの異なる fluorescein isothiocyanate-dextran を用い、皮膚透過性と分子サイズの間関係を調査した。Fig. 7-4 に示した通り、酸化チタンは皮膚表面の皮溝部に集積し、毛髪表面及び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確認された<sup>3)</sup>。

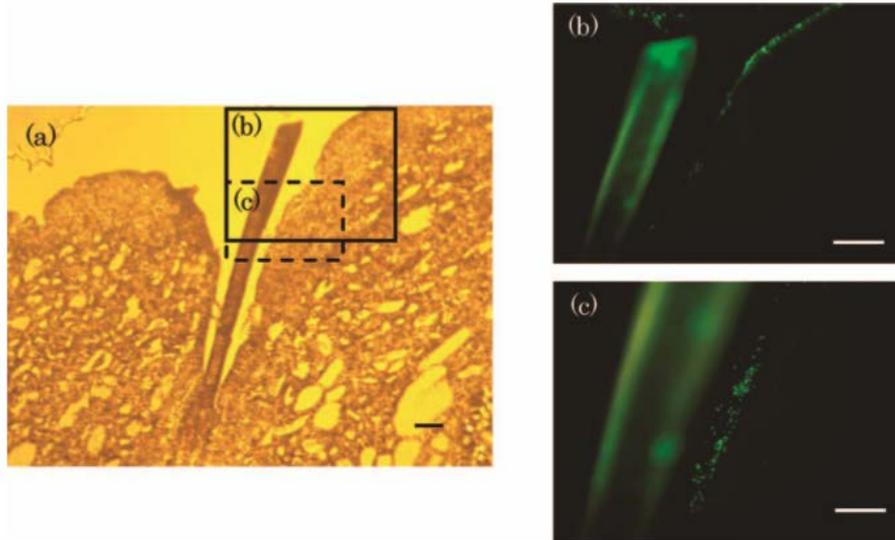


Fig.7-4 蛍光高分子 fluorescein isothiocyanate-dextran の塗布 12 時間後の写真<sup>3)</sup>

また、Prow らの報告によると、Fig.7-5 に示した通り、ナノ粒子を使用する場合、皮溝及び毛囊ロート部のような深い溝部分に集積していると考えられる<sup>11)</sup>。

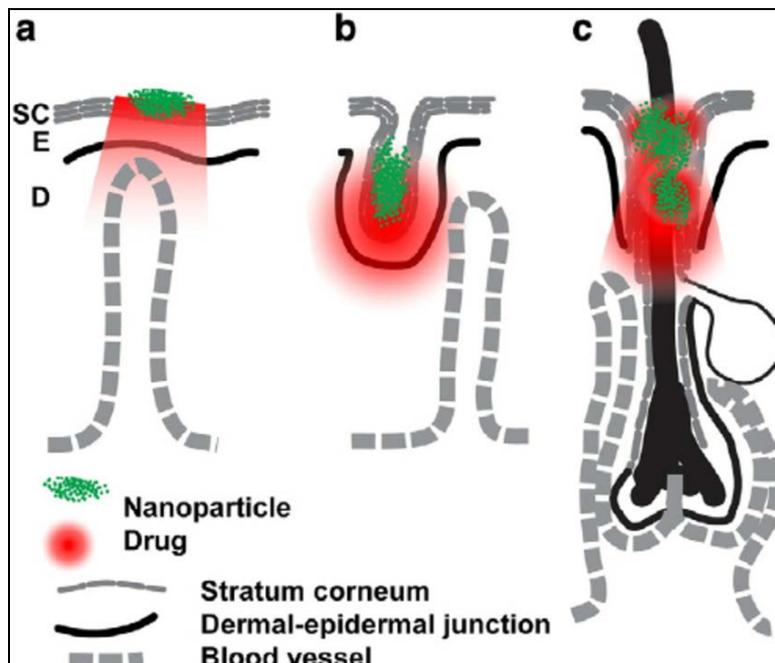


Fig.7-5 ナノ粒子と薬剤の浸透図<sup>11)</sup>

NEDO（国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構）プロジェクトである「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」の課題の1つとして、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構は、鳥取大学医学部感覚運動医学講座皮膚病態学分野山元研究室に「ナノ粒子の急性単回経皮暴露試験ならびに長期経皮暴露試験」を依頼した。検討対象は、市販品のサンスクリーンに広く使用されている二酸化チタンナノ粒子である。研究内容は二酸化チタンナノ微粒子の皮膚への影響を評価する手法の開発を目的とした。

足立、山元らの報告によると、4時間  $\text{TiO}_2$  暴露試験の結果は、Fig. 7-6 に示した通りであった。 $\text{TiO}_2$  暴露組において黄褐色の粒状物質が観察された。角質の上層に存在していることが見られたが、角質層の下部まで浸透していない。また、Fig. 7-7 に示した通り、毛包漏斗部に粒状物質が存在していることが観察された。しかし、表皮や毛包までに浸透していなかった<sup>12)</sup>。さらに FITC 蛍光修飾  $\text{TiO}_2$  暴露の結果は Fig. 7-8 に示した通り、表皮、毛包、真皮において蛍光信号が観察されていなかった<sup>12)</sup>。

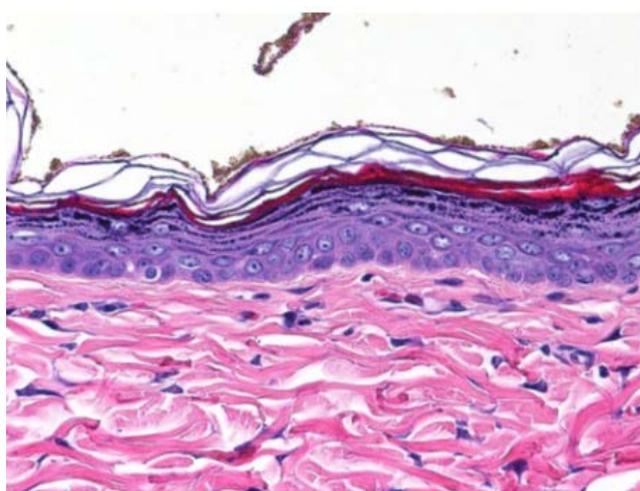


Fig. 7-6  $\text{TiO}_2$ の角質浸透図<sup>12)</sup> (400倍)

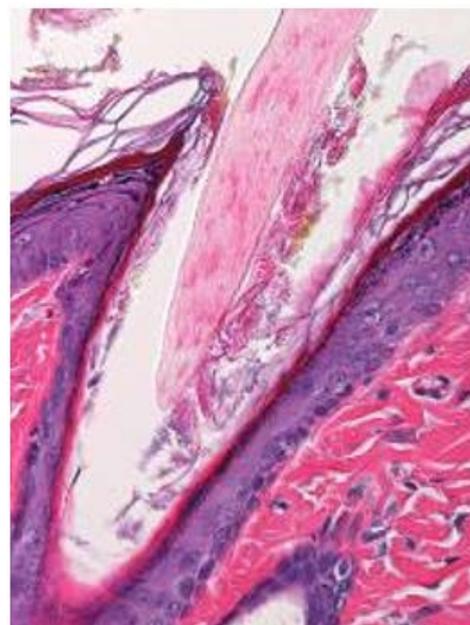
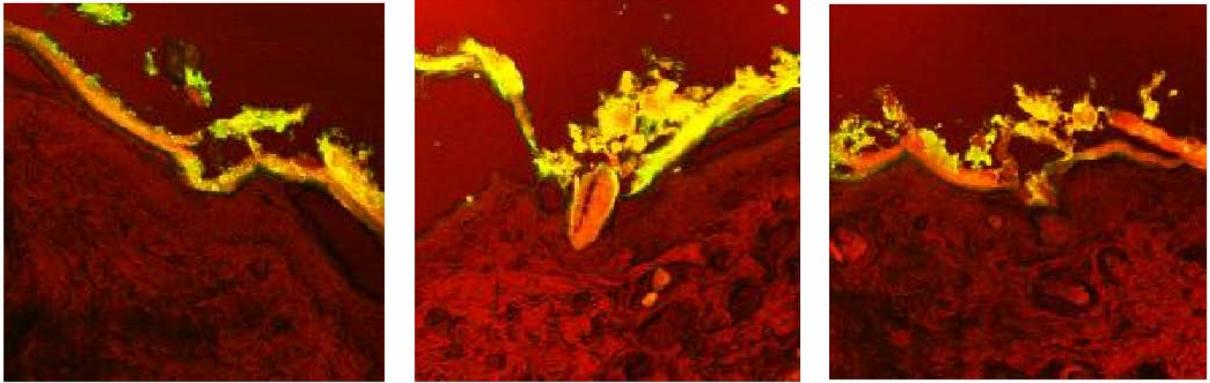


Fig. 7-7  $\text{TiO}_2$ の毛包浸透図<sup>12)</sup> (400倍)



毛包間表皮

毛包漏斗部

毛包開口部

Fig. 7-8 蛍光標識後共焦点レーザー顕微鏡の観察<sup>12)</sup>

本研究では、皮膚切片においてマグネタイト超微粒子が観察されなかった。また、肝臓、腎臓の組織切片においてもマグネタイト超微粒子が観察されなかった。本研究の結果は、マグネタイト超微粒子が皮膚の深部まで蓄積していないことを示した。おそらく、薬剤放出後、マグネタイト超微粒子が皮膚表面もしくは毛包漏斗部に存在し、その後、マグネタイト超微粒子の凝集によりサイズは多くなり、流れて、皮膚の深部もしくは毛包漏斗部に蓄積していないことが推測されている。

また、本研究のナノ育毛剤をはじめた製剤の放出メカニズムは以下の Fig. 7-9 の通りに考えられる。育毛剤を塗布すると、表面のリン脂質ポリマーは両親媒性を有し、生体膜の類似構造を呈する。疎水性部位は皮膚表面の塗布により表面構造が剥離され、有効成分を放出しやすく、さらに、そのリン脂質ポリマーは徐放作用を有し、徐々に成分を深部まで浸透させる。また、放出したマグネタイト超微粒子は角質層の表面もしくは毛嚢上部の部位に引っかかることによって皮膚内部に到達しないが、育毛成分が放出され、毛根の深部まで浸透し、作用できると考えられる。

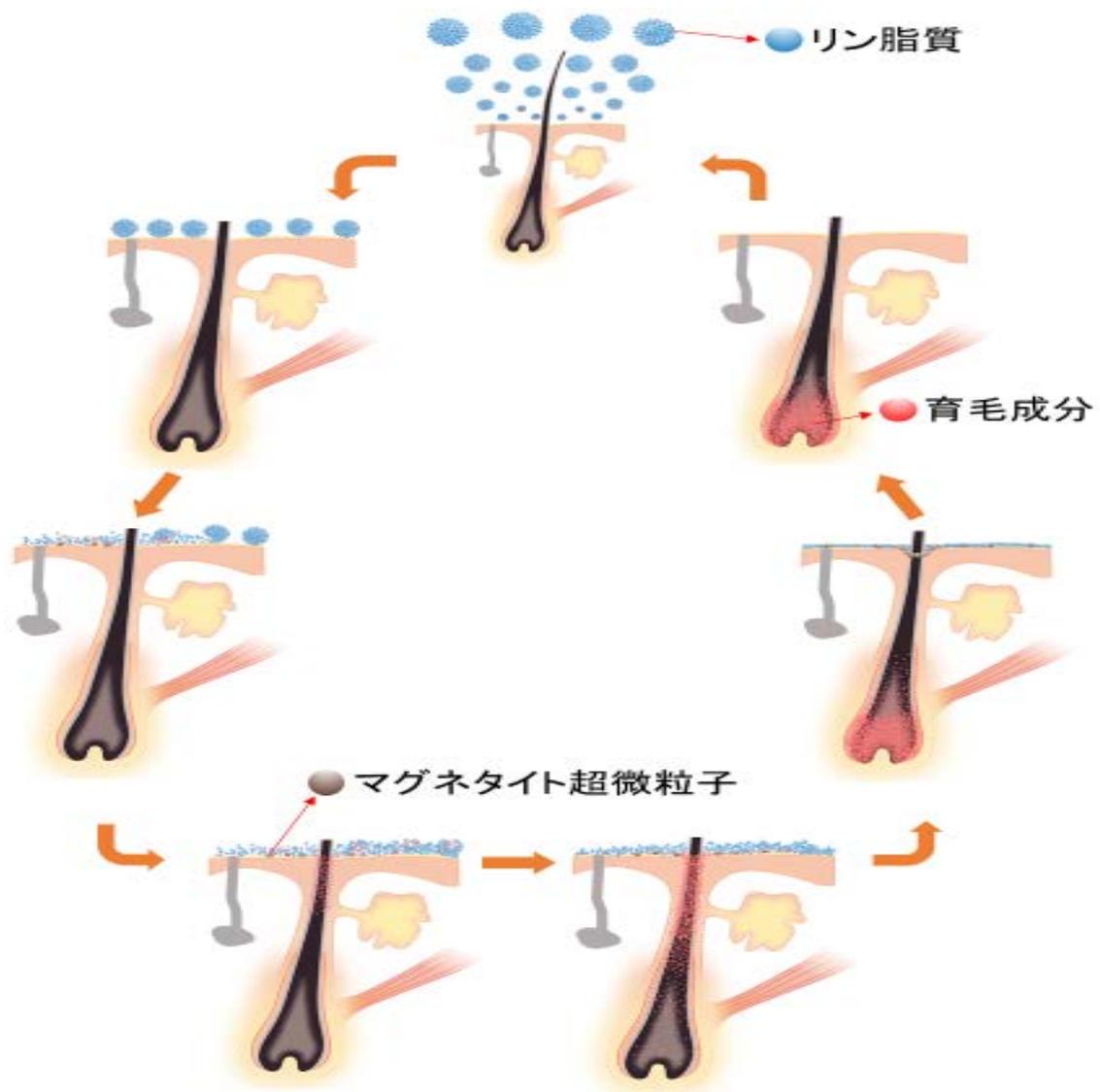


Fig. 7-9 マグネタイト微粒子にコーティングした薬剤の浸透イメージ図

### 7.3 今後の課題及び今後の展望

安定的な工場製造を実現するため、自動滴定装置による安定的なマグネタイト超微粒子の製造検討は非常に重要である。また、大量製造の場合、すなわち、スケールアップの際、安定に製造できる条件検討は大事である。また、実際、育毛剤等の製品にあたって、基材に適している処方開発は重要な課題である。

磁性微粒子の表面に成分でコーティングした磁性複合粒子は、表面に有効成分を固

定できるため、薬物の担体、診断薬として医学やバイオ分野での幅広い応用が期待されている<sup>13)</sup>。

本研究の成果は、将来的に安全性の高いマグネタイト超微粒子の開発及び外用製剤用の画期的な **DDS** 担体として優れる優位性があり、特に磁性誘導性の利用はかなり注目され、例えば、外部磁場による磁気超微粒子-リポソーム複合体からの薬剤の放出等が考案され、結果は、外部から振動磁場を与えるとリポソーム内部に含まれる薬剤の放出が可能になった。また、標的部位を磁気標識で磁力による細胞の遠隔操作が可能となり、機能性磁性ナノ粒子で標的細胞を磁気標識して磁気操作によるティッシュエンジニアリング技術として用いる **Mag-TE** (**Magnetic force-based tissue engineering**) 法の開発を行うことも可能となっている<sup>14)</sup>。今後、安心してマグネタイト超微粒子を使用できるナノテクノロジーのさらなる発展が期待されている。

#### 7.4 参考文献

- 1) 辻本 広行: 粉砕 No. 53, ナノ・微粒子設計による **DDS** 製剤, 医療デバイス等への応用 (2010)
- 2) Scheplein R. J., J. Invest. Dermatol., 45, 334-347 (1965)
- 3) Kimura, Todo, Sugibayashi, Yakugaku Zasshi 132(3) 320-322 (2012)
- 4) Baroli B., Ennas M. G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., Lopez-Quintela M. A., J. Invest. Dermatol., 127, 1701-1712 (2007)
- 5) [http://www.torii.co.jp/hifu/gakujutsu/gakkai\\_kirokushu/140426/pdf/seminar\\_koen01.pdf](http://www.torii.co.jp/hifu/gakujutsu/gakkai_kirokushu/140426/pdf/seminar_koen01.pdf). Downloaded 5, Feb. 2017.
- 6) 木村 恵理子: 微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価, P. 10
- 7) [http://chemeng.in.coocan.jp/memb/m\\_mb4.html](http://chemeng.in.coocan.jp/memb/m_mb4.html). Downloaded 15, Nov. 2017.
- 8) 木村 恵理子: 微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価, P. 30
- 9) Alvarez-Román R., Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H., Fessi H., Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. J. Control. Release, 99, 53-62 (2004). 21
- 10) 木村 恵理子: 微粒子酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価, P. 33

- 11) Prow TW(1), Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, Wurm EM, Yoong C, Adv Drug Deliv Rev. 2011 May 30;63(6):470-91, Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery.
- 12) [https://www.aist-riss.jp/wp-content/uploads/2014/10/TiO2\\_201109201.pdf](https://www.aist-riss.jp/wp-content/uploads/2014/10/TiO2_201109201.pdf). P. 242-243 Downloaded 24, Dec. 2016.
- 13) T.Sasaki, N. Iwasaki, K. Kohno, M. Kishimoto, T. Majima, S. Nishimura, A. Minami, Magnetic nanoparticles for improving cell invasion in tissue engineering, J. Biomed. master. Res. Part A, 86A(4), 969 (2007)
- 14) 井藤 彰: Kagaku to Seibutsu 53(2): 82-88, 機能性磁性ナノ粒子を用いたティッシュエンジニアリング技術 (2015)

## 本研究の一部を発表した研究論文及び業績一覧

1. 著者名：北村 孝普、安 鋼、清水 良訓、島本 敏夫  
論文名：疎水化セルロース増粘剤の特性とヘアケア製品への応用  
学協会誌名：FRAGRAN JOURNAL (2007年7月号)  
最初と最後のページ：P72-77  
発表西暦年：2007年7月
2. 著者名：G. An, Dong Ying Ju, Pei Bian, T. Kumazawa, M. Okasabe  
論文名：Bio-medicine Coating on Surface of Magnetic Nanoparticles and Its Safety Evaluation  
学協会誌名：Materials Science Forum (Volumes 675-677)  
最初と最後のページ：P303-306  
発表西暦年：2011年2月
3. 著者名：G. An, D. Y. Ju, T. Kumazawa, M. Okasabe  
論文名：Coating of MgO and Bio-medicine on Surface of Magnetic Nanoparticles  
学協会誌名：Advanced Materials Research (Volumes 317-319)  
最初と最後のページ：P460-463  
発表西暦年：2011年8月
4. 著者名：G. An, P. Ma, D. Y. Ju, T. Kumazawa  
論文名：Study on the Application of Magnetic Nanoparticles as Drug Delivery Particles on the Atopic Dermatitis  
学協会誌名：Materials Science Forum, Vol. 750  
最初と最後のページ：P180-183  
発表西暦年：2013年3月

5. 著者名 : G. An, D. Y. Ju, T. Kumazawa

論文名 : Evaluation of the Influence on the Living Body as a New  
Transdermal Therapeutic System Magnetic Nanoparticles

学協会誌名 : Materials Science Forum, Vol. 833

最初と最後のページ : P75-78

発表西暦年 : 2015 年 11 月

## 謝 辞

本研究は、埼玉工業大学大学院工学研究科巨研究室において行われた研究成果をまとめたものであります。本研究に際し終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました埼玉工業大学大学院工学研究科先端材料工学教育研究分野巨東英教授、ならびに熊澤隆教授に厚く御礼申し上げます。ご指導戴くとともに、暖かい激励を頂きました。ここに心から感謝を申し上げます。さらに、論文の査読をして頂いた埼玉工業大学丹羽修教授、石川正英教授、古谷清蔵准教授の諸先生に深謝致します。

最後に、本研究の実施に御協力いただきました埼玉工業大学知能材料加工研究室長 壁氏、馬萍氏をはじめとする関係諸氏に感謝致します。