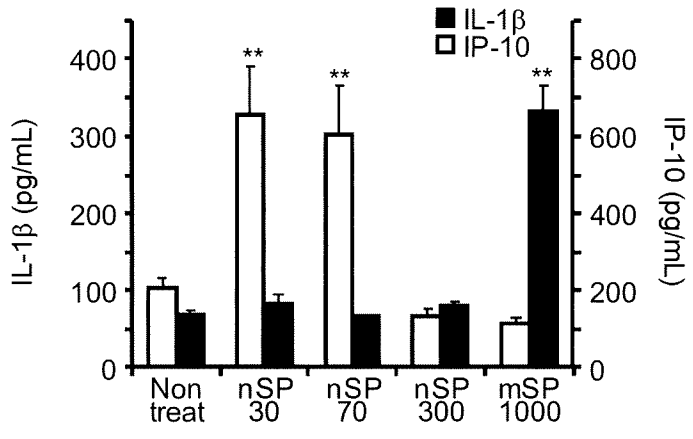


(A)



(B)

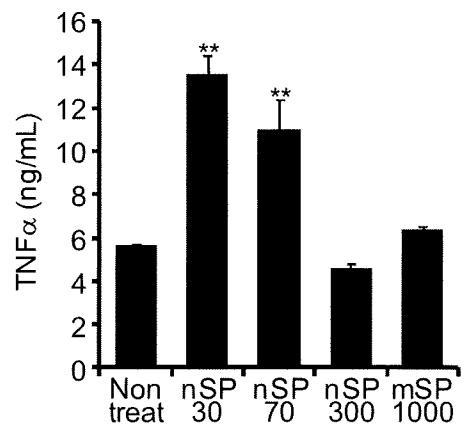


図 91. in vitro におけるシリカの粒子径と起炎性の連関

(A) THP-1 細胞、(B) RAW264.7 細胞を、粒子径 30、70、300、1000 nm のシリカ (100 μg/mL) 存在下で培養した。その後、上清を回収し、ELISA または Bio-Plex Suspension Array System にて、(A) IL-1β 及び IP-10、(B) TNFα の産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

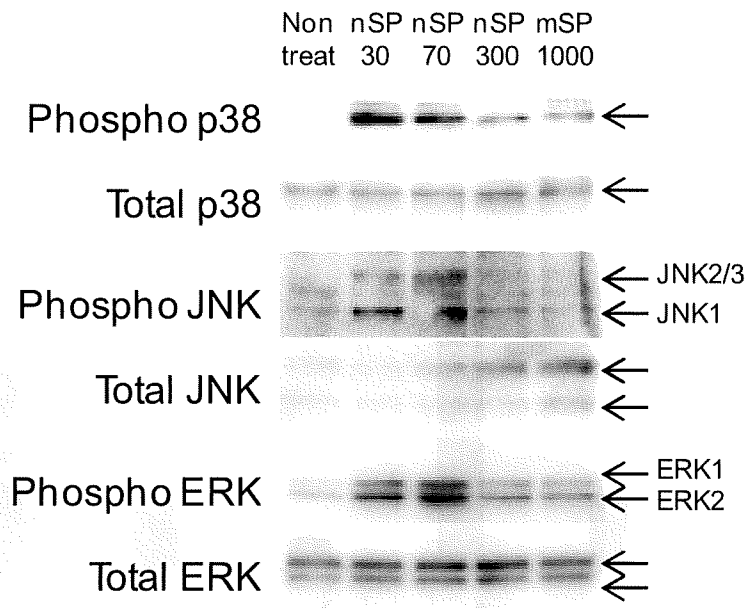


図 92. 粒子径の異なるシリカの MAPK 活性化能評価

RAW264.7 細胞を、粒子径 30、70、300、1000 nm のシリカ (100 μg/mL) 存在下で 4 時間培養した。その後、細胞破砕液を回収し、p38、JNK、ERK1/2 の総量及びリン酸化体量を Western Blot により半定量的に評価した。

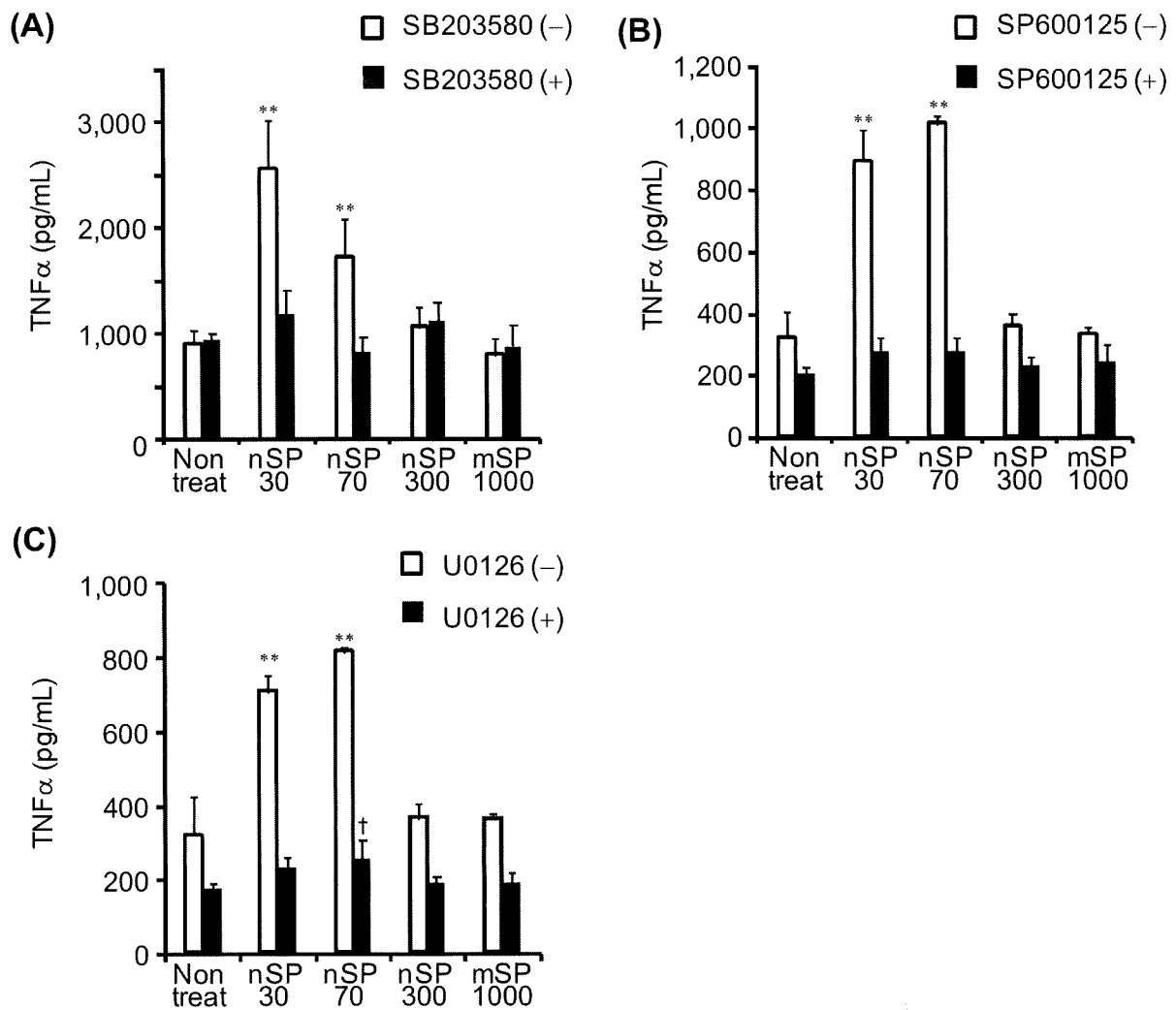


図 93. MAPK の阻害剤条件下での TNF $\alpha$  産生能評価

RAW264.7 細胞を、(A) p38 阻害剤、(B) JNK 阻害剤、(C) ERK1/2 阻害剤存在下で 2 時間培養した後に、各粒子径のシリカ (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とともに 4 時間培養した。その後、上清を回収し、ELISA にて TNF $\alpha$  産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

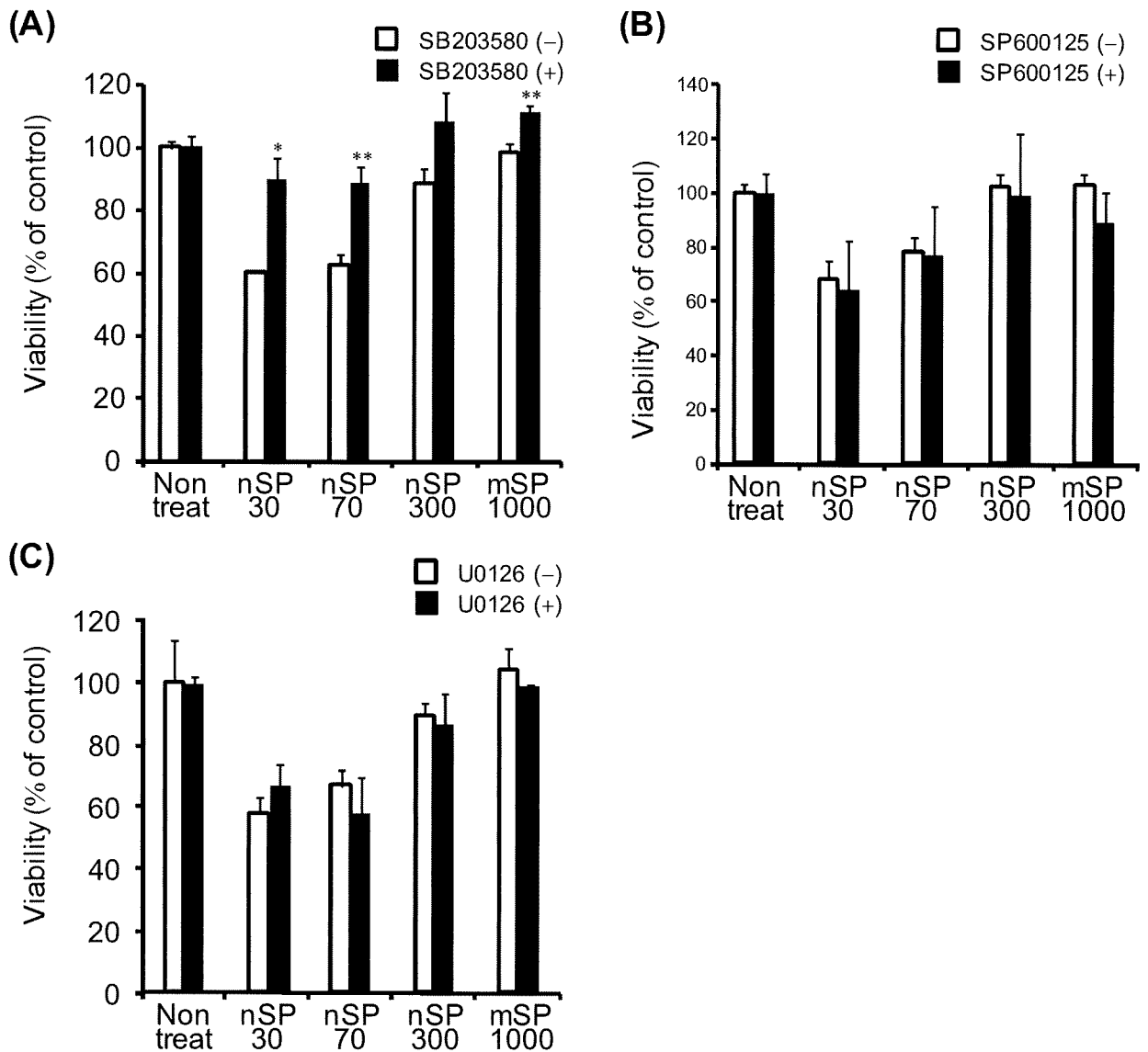


図 94. MAPK 阻害剤条件下での細胞傷害性評価

RAW264.7 細胞を、(A) p38 阻害剤、(B) JNK 阻害剤、(C) ERK1/2 阻害剤存在下で 2 時間培養した後に、各粒子径のシリカ (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とともに 12 時間培養した。その後、Methylene blue assay により細胞生存率を測定した。誤差範囲は S.D. 表記である。

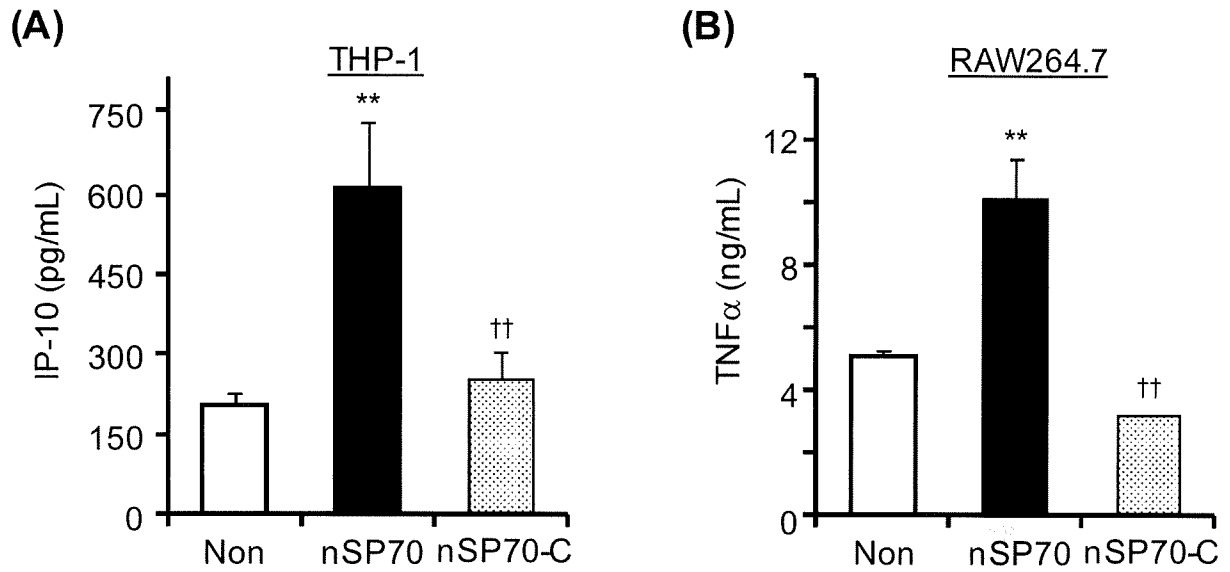


図 95. nSP70-C の起炎性評価

(A) THP-1 細胞、(B) RAW264.7 細胞を、nSP70、nSP70-C (100 μg/mL) 存在下で培養した。その後、上清を回収し、ELISA または Bio-Plex Suspension Array System にて (A) IP-10 及び (B) TNFα の産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

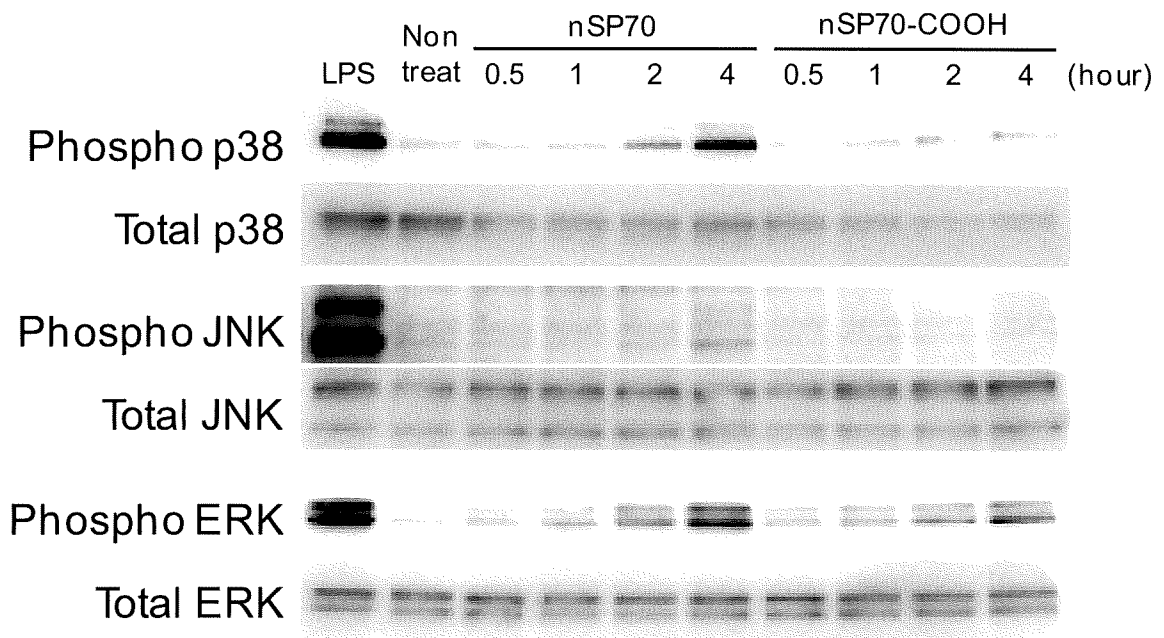


図 96. nSP70-C の MAPK 活性化能評価

RAW264.7 細胞を、nSP70、nSP70-C (100 μg/mL) 存在下で 4 時間培養した。その後、細胞破碎液を回収し、p38、JNK、ERK1/2 の総量及びリン酸化体量を Western Blot により半定量的に評価した。

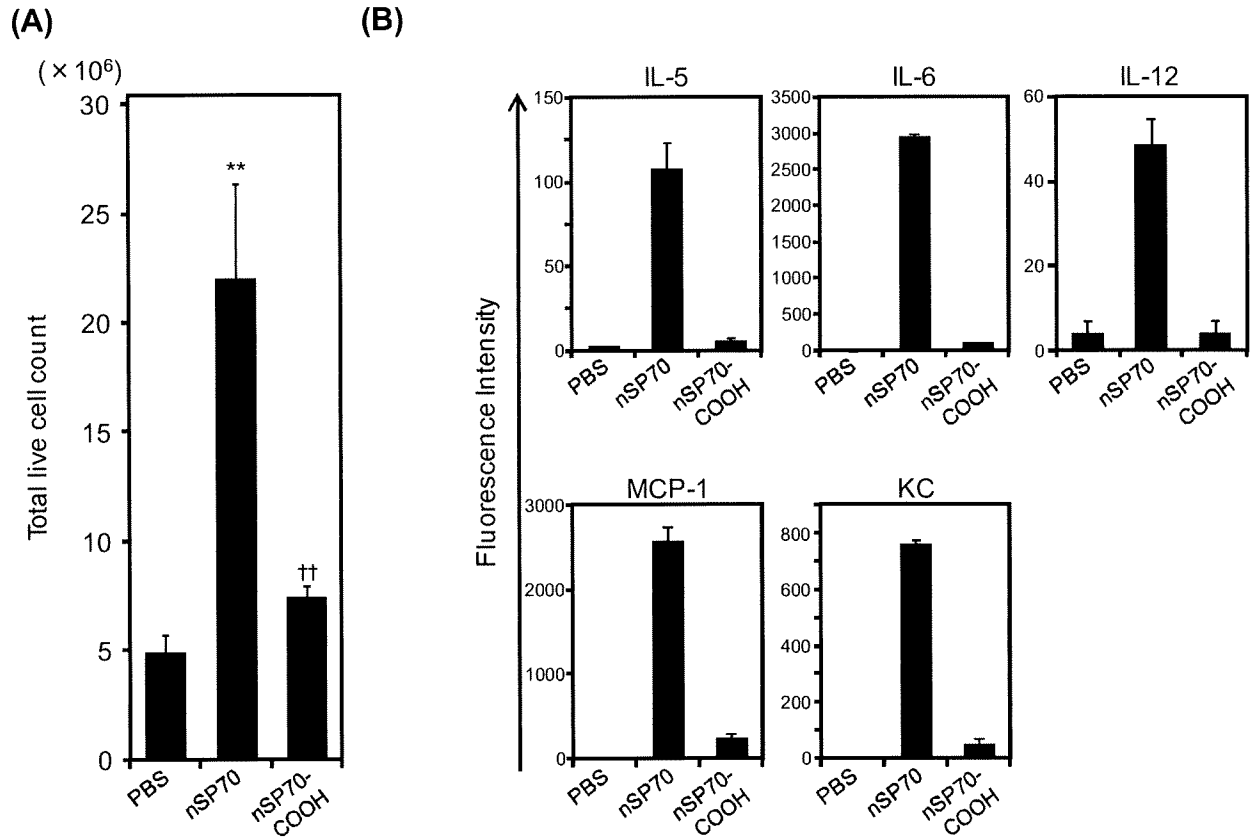


図 97. nSP70-C の in vivo における起炎性評価

BALB/c マウスに nSP70 または nSP70-C を 1 mg 腹腔内投与した。(A) 投与 24 時間後に腹腔内洗浄液を回収し、総細胞数を測定した。

(B) 投与 2 時間後の腹腔内洗浄液を回収し、Bio-Plex Suspension Array System にてサイトカインの産生量を評価した。誤差範囲は S.D.表記である。

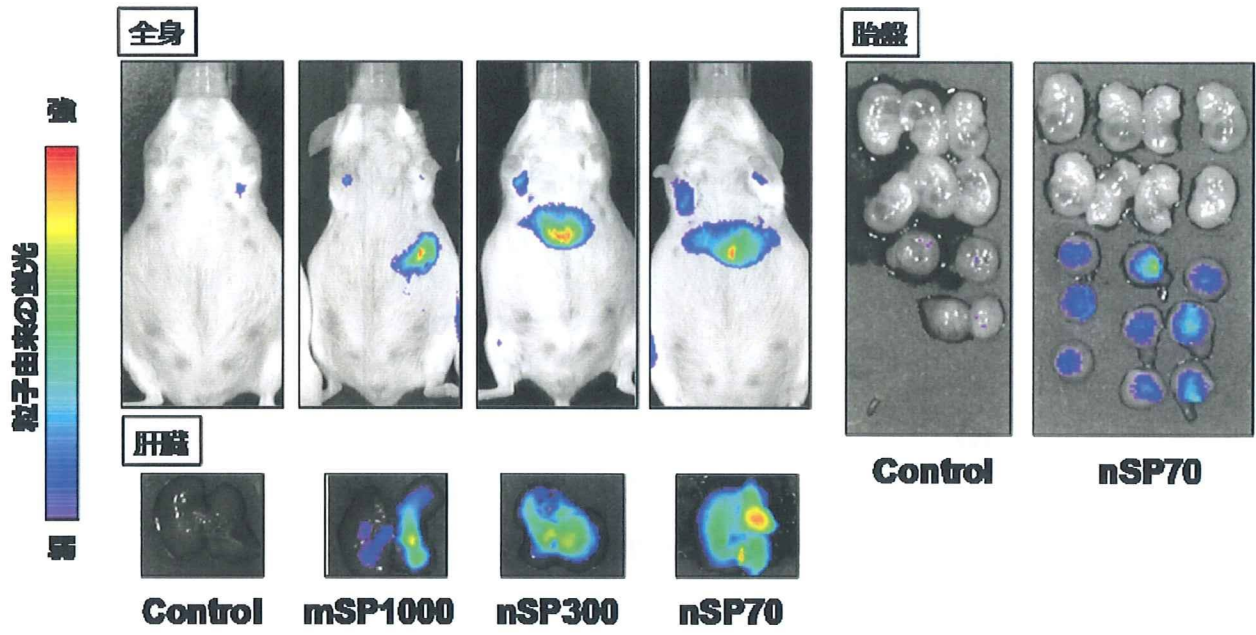


図98. 妊娠マウスにおけるナノシリカの体内動態(in vivo imaging)

蛍光修飾された各粒子径の非晶質シリカを、妊娠 16 日目のマウスに尾静脈内投与し、in vivo imaging により体内動態を観察した。その結果、すべての粒子において、肝臓で強い蛍光が観察され、肝臓への集積が認められた。一方で、nSP70 においてのみ、未処理群と比較して胎盤で強い蛍光が観察され、nSP70 は胎盤にまで移行することが示唆された。

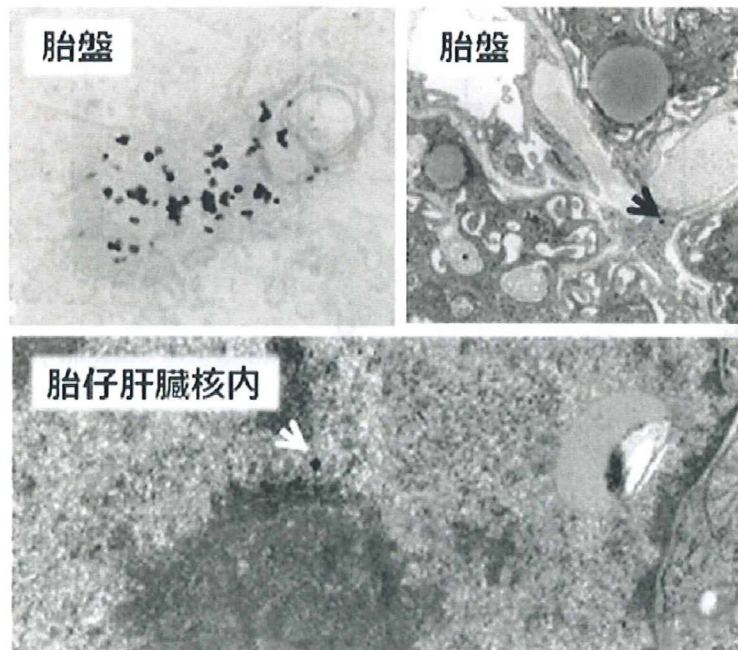


図99. 妊娠マウスにおけるナノシリカの体内動態

直径 70 nm のナノシリカ (nSP70) を妊娠マウスに尾静脈内より投与した際の体内分布を評価した。その結果、nSP70 は胎盤や胎児にまで到達していた。興味深いことに、nSP70 は胎児肝細胞の核内にまで侵入していた。

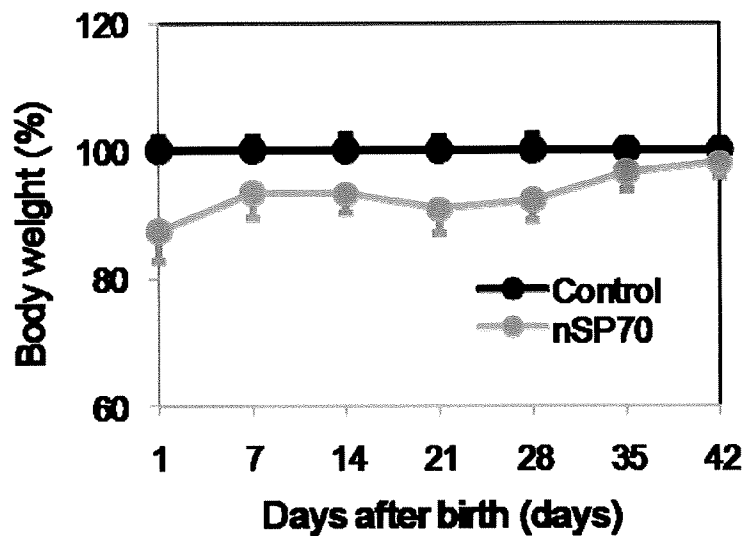


図100. ナノシリカ曝露の出生後における新生仔の体重変化

妊娠16日目のマウスにnSP70を投与し、出産後、新生仔の体重を経期的に測定した。その結果、nSP70投与群で、コントロール群と比較して新生児体重の著しい低下が観察された。出生後は、コントロール群とnSP70投与群は同等の体重増加を示し、6週齢の時点ではほぼ同じ体重であった。

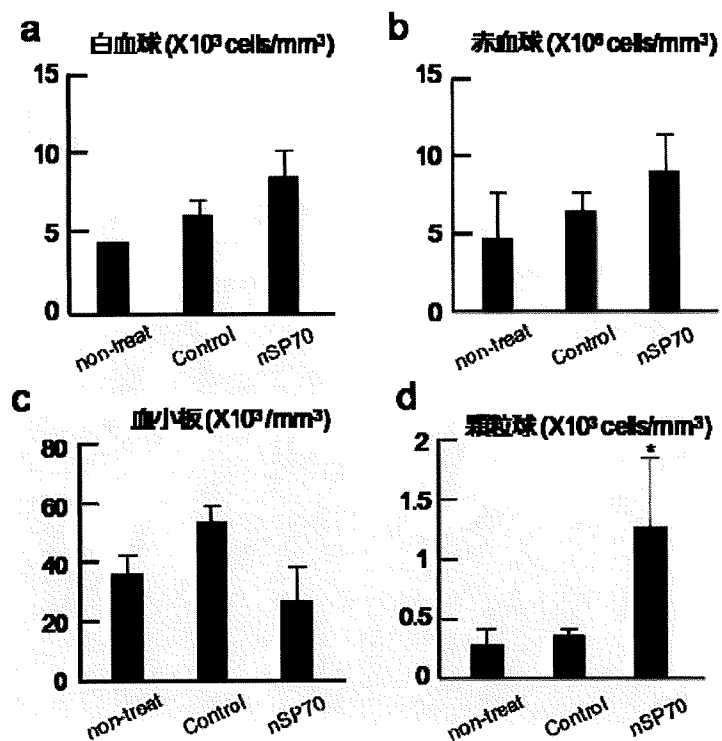


図101. ナノシリカ曝露の出生後における影響評価

妊娠16日目のマウスにnSP70を投与し、出産後、新生仔の6週齢時に解剖し、血球数を評価した。その結果、nSP70投与群で赤血球数、血小板量に変化が認められなかったのに対して、白血球数や顆粒球数がnSP70投与群で顕著に増加していた。

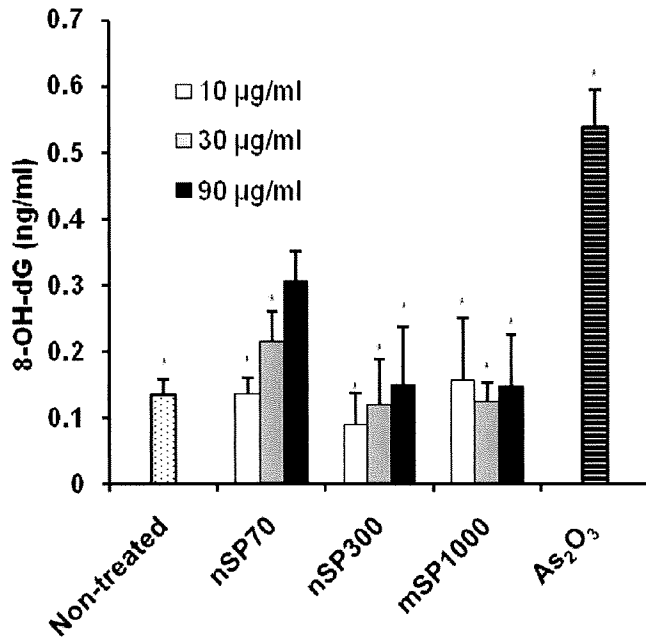


図 102. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞における DNA の酸化損傷の検出

種々の濃度のシリカ、あるいはポジティブコントロールとして三酸化ヒ素(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)を HaCaT 細胞に作用させ、3時間インキュベートした。その後、DNA を抽出・加水分解処理した後、ELISA 方を用いて 8-OHdG の含有量を測定した。\*P < 0.01 vs nSP70 (90 μg/ml)。

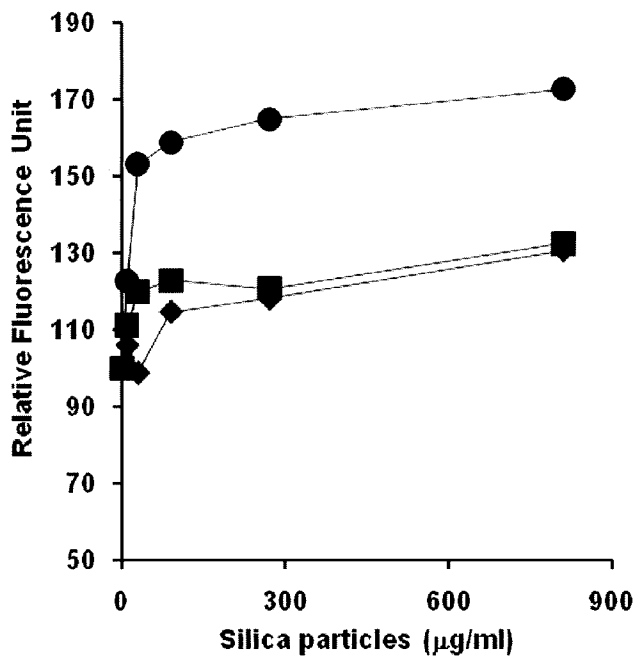


図 103. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞における ROS の産生

種々の濃度のシリカを HaCaT 細胞に作用させ、3時間インキュベートした。これらの細胞を回収・洗浄した後に細胞膜透過性 ROS 特異的プローブである DCFH-DA を添加して 30 分間反応させた。細胞を洗浄した後 DCFH 由来の蛍光 (励起波長: 485 nm、蛍光波長: 530 nm) を蛍光プレートリーダーを用いて測定した。



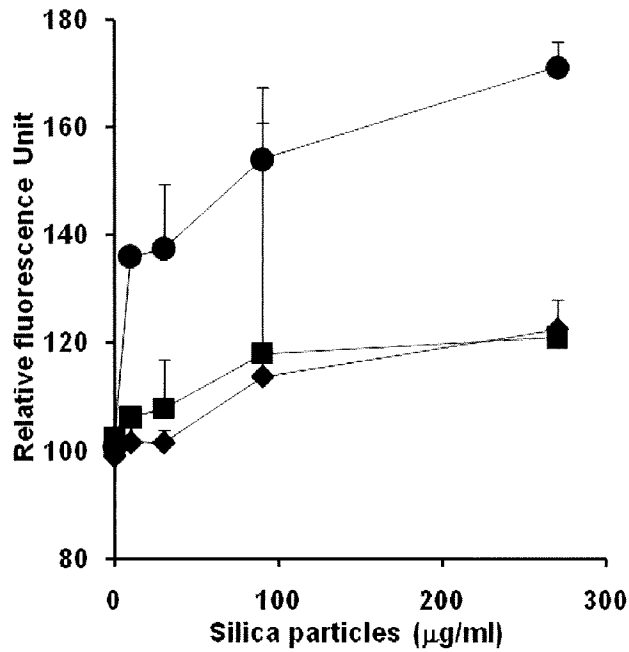


図 104. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞におけるヒドロキシルラジカルの産生

種々の濃度のシリカを HaCaT 細胞に作用させ、3 時間インキュベートした。これらの細胞を回収・洗浄した後に細胞膜透過性ヒドロキシルラジカル (OH) あるいは次亜塩素酸 (OCI) の特異的プローブである HPF を添加して 30 分間反応させた。細胞を洗浄した後 HPF 由来の蛍光 (励起波長: 485 nm、蛍光波長: 530 nm) を蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

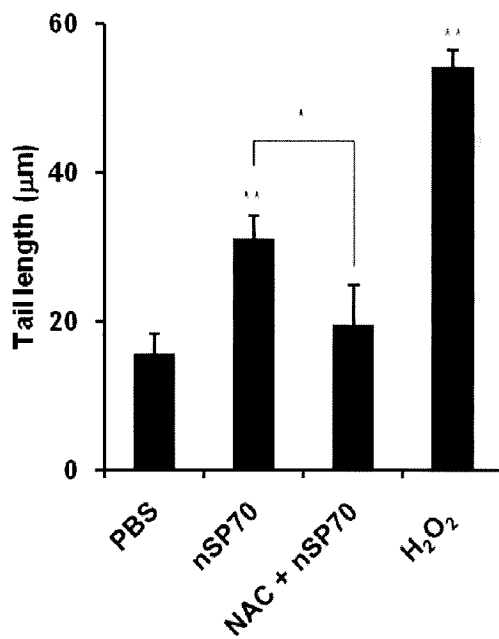


図 105. ナノシリカによる HaCaT 細胞の DNA 損傷発現に対する ROS 阻害剤の影響

HaCaT 細胞を 2 mM の N-アセチルシステイン (NAC) で 30 分間前処置した後に、90 µg/ml の nSP70 を添加し、3 時間後に細胞を回収した。ポジティブコントロールとして 0.2 mM の過酸化水素を用いた。ナノシリカ処置細胞の DNA 損傷の度合いをコメットアッセイにより検出し定量した。\*\* $P < 0.01$  vs PBS, \* $P < 0.01$  vs nSP70.

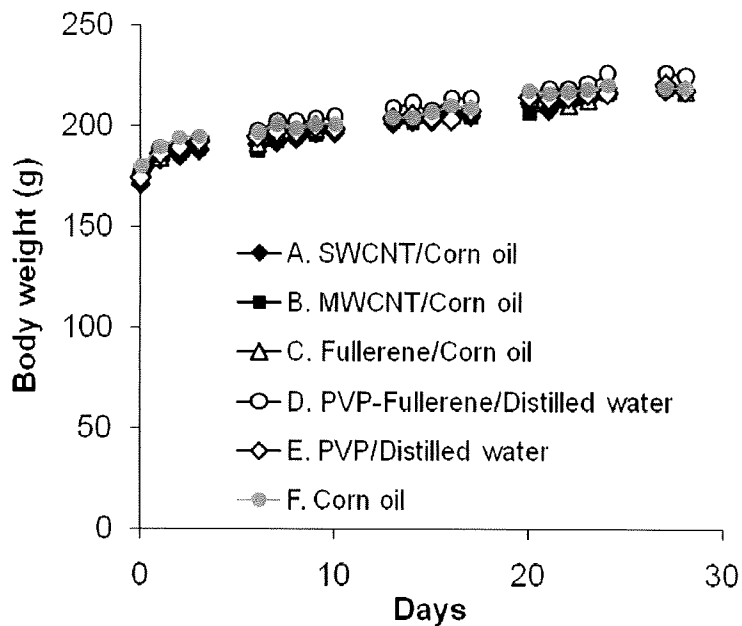


図 106. 反復投与経皮毒性 (28 日) 試験 (OECD TG410) におけるラットの体重変化。

A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、  
 B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、  
 C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、  
 D, PVP-Fullerene/Distilled water (10 mg/mouse/days)、  
 E, Corn oil (200  $\mu$ l/mouse/days)、  
 F, PVP/Distilled water (10 mg/mouse/days) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布し、塗布期間中の体重を測定した。

表 1. 反復投与経皮毒性 (28日) 試験 (OECD TG410) における塗布局所の所見。

	Day 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A. SWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. MWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Fullerene/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. PVP-Fullerene/ Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. PVP/Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Day 15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
A. SWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B. MWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C. Fullerene/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D. PVP-Fullerene/ Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E. PVP/Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F. Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : 異常なし

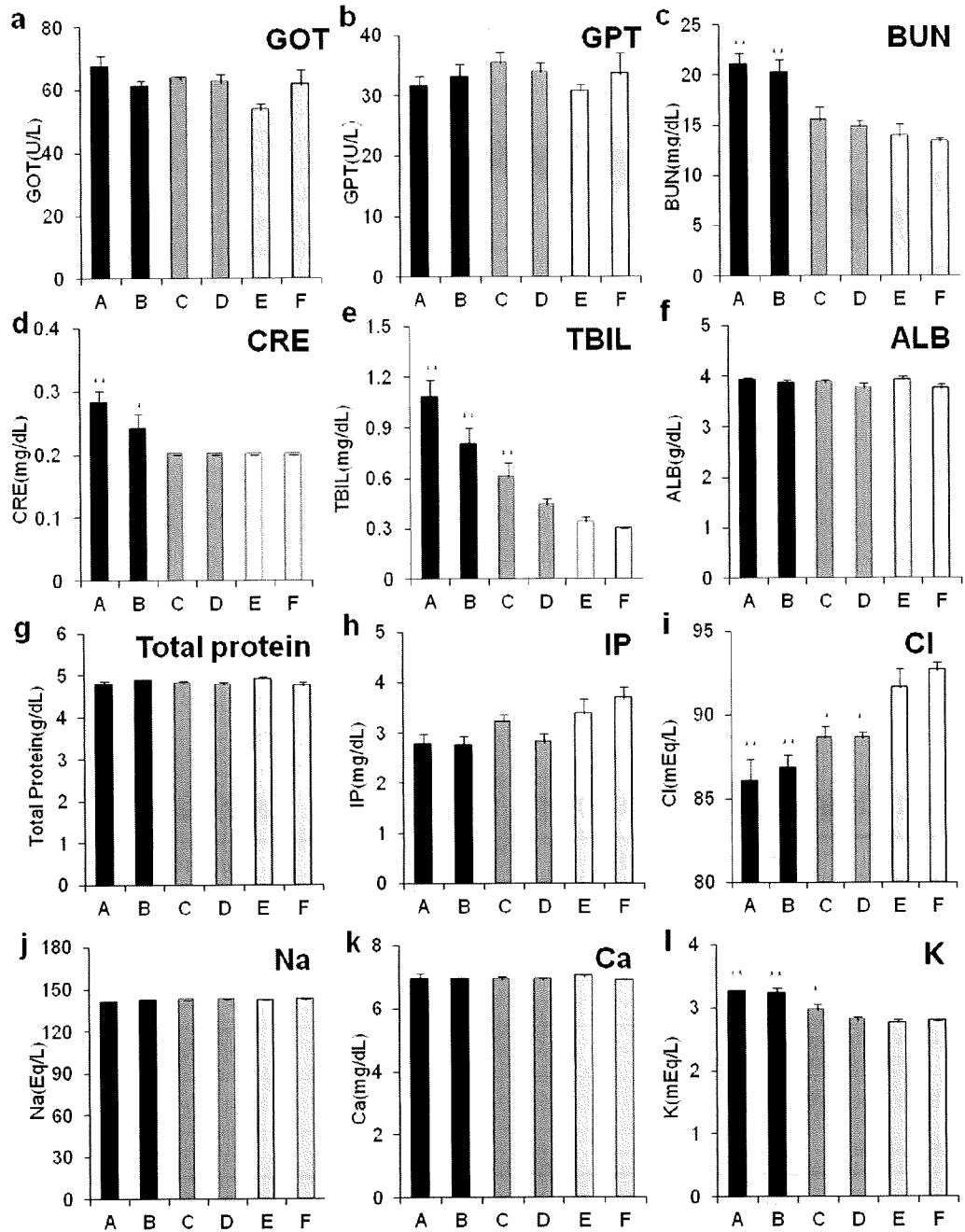


図 107. 反復投与経皮毒性 (28 日) 試験 (OECD TG410) における血液生化学検査

A, SWCNT/Corn oil (200 µg/mouse/days)、B, MWCNT/Corn oil (200 µg/mouse/days)、C, Fullerene/Corn oil (200 µg/mouse/days)、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10 mg/mouse/days)、E, Corn oil (200 µl/mouse/days)、F, PVP/Distilled water (10 mg/mouse/days) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて血液生化学検査 (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ (GPT)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、血清ビリルビン (TBIL)、アルブミン (ALB)、総タンパク量 (Total protein)、無機リン (IP)、塩素 (Cl)、ナトリウム (Na)、カルシウム (Ca)、カリウム (K)) を実施した。\*\*P < 0.01 vs E, \*P < 0.01 vs F

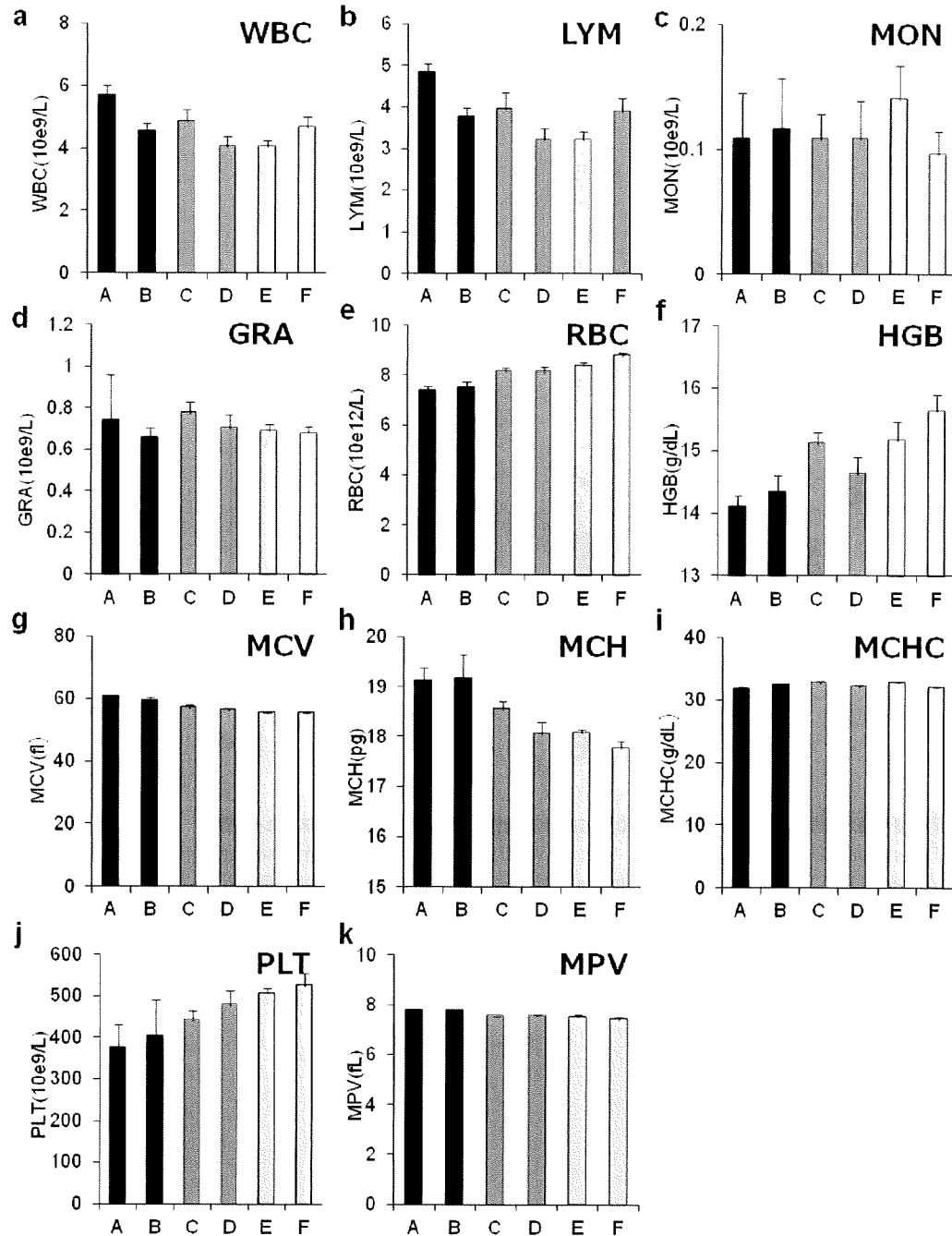


図 108. 反復投与経皮毒性 (28 日) 試験 (OECD TG410) における血液血球検査

A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10 mg/mouse/days)、E, Corn oil (200  $\mu$ l/mouse/days)、F, PVP/Distilled water (10 mg/mouse/days) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて血液血球検査 (総白血球数 (WBC)、リンパ球数 (LYM)、単球数 (MON)、顆粒球数 (GRA)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球 HGB 量 (MCH)、平均赤血球 HGB 濃 (MCHC)、血小板パーセント (PLT)、平均血小板容積 (MPV)) を実施した。

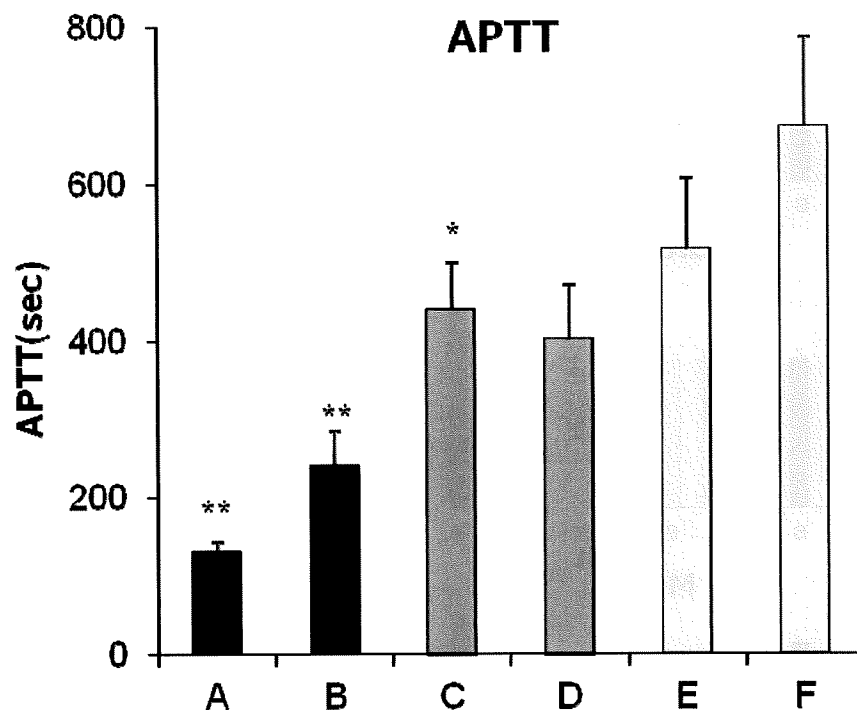


図 109. 反復投与経皮毒性試験 (OECD TG410) における活性化部分トロンボプラスチン時間  
 A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10 mg/mouse/days)、E, Corn oil (200  $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{days}$ )、F, PVP/Distilled water (10 mg/mouse/days) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。\*\* $P < 0.01$  vs E, \* $P < 0.01$  vs F

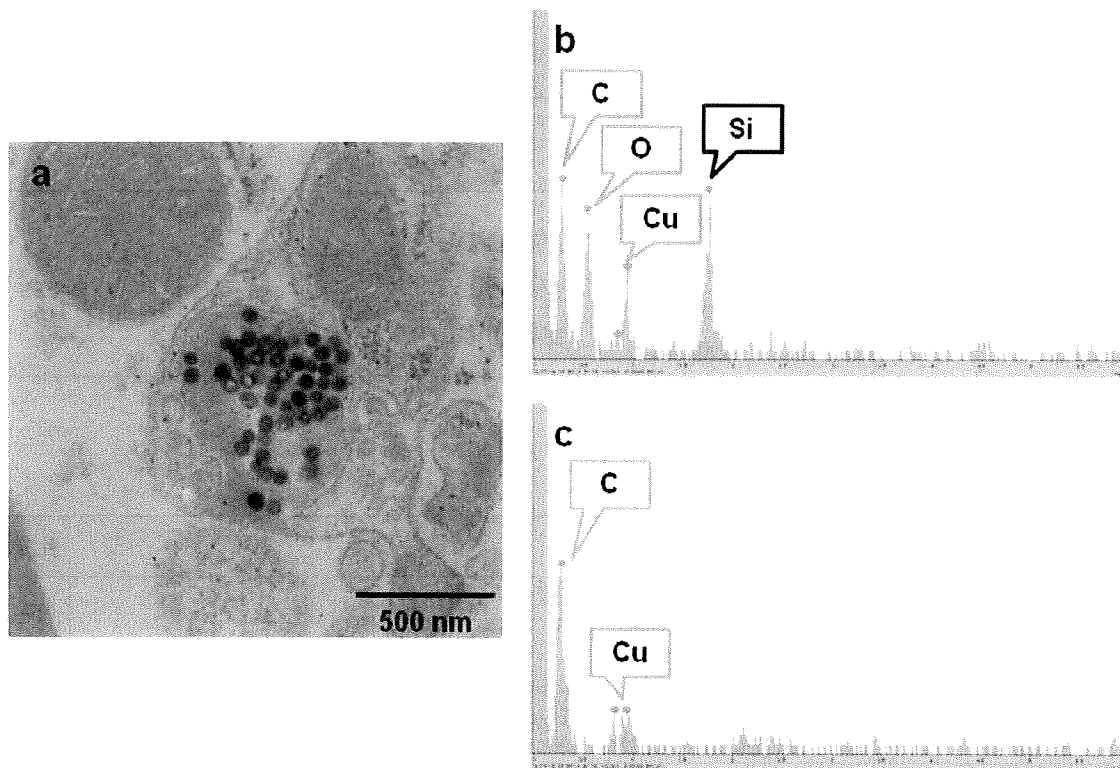


図 110. エネルギー分散型 X 線検出器付き透過型電子顕微鏡 (EDX-TEM) を用いたナノシリカの体内局在解析

BALB/c マウスに nSP70 を 2 mg/匹で尾静脈内投与し、5 時間後に肝臓を摘出し、2.5%グルタルアルデヒドで固定した。その後、洗浄・脱水・樹脂置換し、Epon-812 で包埋した。この組織ブロックを薄切し、得られた超薄切片をエネルギー分散型 X 線装置 (EDX) を装着した透過型電子顕微鏡 (TEM; 日立ハイテクノロジーズ) を用いて解析した。a, 肝クッパー細胞の透過型電子顕微鏡像、b, 粒子部分 (a の黒点部分) の EDX 分析スペクトル、c, バックグラウンドの EDX 分析スペクトル。C: 炭素、O: 酸素、Cu: 銅、Si: ケイ素。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央	非晶質ナノシリカの経皮吸収性/生体内動態と安全性との関連追求	巨理文夫 (北海道大学大学院歯学研究科)	ナノ材料のリスク評価と安全性対策	フロンティア出版	日本		In press

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morishige T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Nakagawa S. et al.	Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B	Biochem. Biophys. Res. Commun.		In press	
Morishige T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Nakagawa S. et al.	Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties.	Pharmazie.		In press	
Yamashita K., Yoshioka Y., Abe Y., Yoshikawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.	Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape.	Inflammation		In press	
Nabeshi H., Yoshikawa T., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Evaluation of Biological Influence of Nano-materials using Toxicokinetics and Toxicoproteomics.	Yakugaku Zasshi	130	465-470	2010
Nabeshi H., Yoshikawa T., Abe Y., Yoshioka Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. et al.	Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells.	Pharmazie.	65	199-201	2010
Nishimori H., Kondoh M., Yagi K. et al.	Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice.	Eur. J. Pharm. Bipharm.	72	626-629	2009

Nishimori H., Kondoh M., Yagi K. et al.	Silica nanoparticles as hepatotoxicants.	Eur. J. Pharm. Bipharm.	72	496-501	2009
Nishimori H., Kondoh M., Yagi K. et al.	Influence of 70-nm silica particles in mice with cisplatin or paraquat-induced toxicity.	Pharmazie	64	395-397	2009
Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshioka Y.	Evaluation of Biological Influence of Nano-materials using Toxicokinetic and Toxicoproteomic Approach.	Yakugaku Zasshi	128	1715-1725	2008
Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Application of nanomaterials for drug innovation and their risks.	Yakugaku Zasshi	128	1713-1714	2008
吉岡靖雄、吉川友章、角田慎一	医薬品・化粧品におけるナノマテリアルの安全性評価	Pharma-VISION	12	32-37	2009
吉川友章、吉岡靖雄、角田慎一、堤康央	化粧品ナノマテリアルの安全性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～	コスメティックステージ	4	44-48	2010



## トキシコキネティクス/トキシコプロテオミクスによるナノマテリアルの安全性評価

鍋師裕美,<sup>a,b</sup> 吉川友章,<sup>a,b</sup> 今澤孝喜,<sup>b</sup> 角田慎一,<sup>a,b,c</sup> 堤 康央<sup>\*a,b,c</sup>

## Safety Assessment of Nanomaterials Using Toxicokinetics and Toxicoproteome Analysis

Hiromi NABESHI,<sup>a,b</sup> Tomoaki YOSHIKAWA,<sup>a,b</sup> Takayoshi IMAZAWA,<sup>b</sup>  
Shin-ichi TSUNODA,<sup>a,b,c</sup> and Yasuo TSUTSUMI<sup>\*a,b,c</sup><sup>a</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, <sup>b</sup>National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, and <sup>c</sup>The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 31, 2009)

With recent development of the nanotechnology, nanomaterials have been successfully employed in various industrial applications such as medicine and cosmetics. Nanomaterials show the useful properties such as electronic reactivity and the tissue permeability that were not provided by micromaterials. Thus, nanomaterials are expected as innovative materials for the development of medicine and cosmetics. However, these innovative properties may show unknown biological responses that could not be detected by the conventional toxicity assay. For industrial development and affluent society establishment that enjoyed only a benefit of nanomaterials, it is urgent to gather information of the properties and the biological effects, and to establish the standard safety evaluation method of nanomaterials. So, we are analyzing association among property, biodistribution and biological effects of nanomaterials to search for the safety biomarker (functional-, molecular- and biochemical-biomarker) using nanosilicas (nSP) as a standard nanomaterial. Because nSP shows high uniform dispersibility and is already used in medicine, cosmetics and food additive, the results of this study are useful to extrapolate it to other nanomaterials and to make practicable as safety biomarker. In this report, we show the latest knowledge about the linkage information among property, biodistribution and biological effects of nSP by toxicokinetics and toxicoproteomics, and the search study of safety biomarker based on these basic information.

**Key words**—nanomaterial; toxicokinetics; toxicoproteomics; biomarker; nanosilica

## 1. はじめに

2000年1月に当時の米国大統領クリントンが、国家ナノテクノロジー戦略 (National Nanotechnology Initiative) を宣言し、ナノテクノロジー産業の開発を推進するために大規模な国家予算の投資を開始した。これが起爆剤となって、例えばカーボンナノチューブやフラーレンといった新たなナノマテリアルの開発や、ナノマテリアルを利用した製品開発が世界的に進展することとなった。このような世界的背景を受けてナノマテリアル産業の世界市場

は、20年後には年1兆ドルにも達すると予想されており、<sup>1)</sup> ナノマテリアル産業は、今後の世界経済を牽引し、人類に多大な恩恵をもたらす21世紀のコア産業となるものと期待されている。

数あるナノマテリアルの中でもナノシリカやナノ酸化チタンは、サイズ減少効果によってザラつきの軽減や吸湿性の向上、紫外線遮蔽能の向上といった有用な効果が得られることから、乳液やクリーム、日焼け止めなどの化粧品や食塩、ベーキングパウダー、シーズニングパウダーなどの食品に配合される素材として古くから利用されてきた。ナノシリカやナノ酸化チタンに代表されるナノマテリアルが化粧品関連産業だけでも世界で年間1000-2000トン以上も使用されていること、また新たなナノマテリアルが続々と開発されていることなどを鑑みると、<sup>2-4)</sup> 今やわれわれは製造現場や環境中に廃棄されたナノマテリアルへの非意図的な曝露や医薬品・化粧品・

<sup>a</sup>大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6), <sup>b</sup>独立行政法人医薬基盤研究所 (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8), <sup>c</sup>大阪大学臨床医工学融合研究教育センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

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

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS6で発表したものを中心に記述したものである。



食品を利用することによるナノマテリアルへの意図的な曝露を避け得ない状況にある。このような中、近年、トランスジェニックマウスなどを用いたナノマテリアルの安全性試験の結果、カーボンナノチューブがアスベスト様の発がんリスクを有するなど、人類の健康を確保する上で軽視できない事実が報告され、<sup>5-7)</sup> ナノマテリアルは、人類にとって有用な“光”の側面と、望ましくない“闇”の側面の二面性を持つ素材であることが世界的に認識されつつある。<sup>8,9)</sup> 先述したように、ナノマテリアルへの曝露を避け得ない現状から、世界的に、ナノマテリアルの闇の部分のみがクローズアップされつつあり、OECD との連携のもと、欧米各国を筆頭に、ナノマテリアルの安全性情報が不十分なまま、ナノマテリアルの開発や実用化を一時的に規制しようとする動きが顕在化している。このままでは科学的根拠に乏しいむやみな使用規制が施行されてしまい、ナノマテリアルの光の側面を享受した豊かな社会の構築や、ナノマテリアル産業を基盤とした産業発展が阻害されてしまいかねない。したがって、ナノマテリアルの安全性を科学的根拠に基づいて評価するとともに、これらの安全性評価によって得られる情報を基盤として安全なナノマテリアルを開発すること (NanoTox 研究) が喫緊の最重要課題となっている。

NanoTox 研究を行う上で考慮すべき点は、医薬品・化粧品・食品の場合、老若男女・妊婦・胎児・乳幼児・病人を問わず、あらゆる世代のヒトが一生に渡って曝露され続けることにある。そのため、ごくわずかでも吸収・蓄積され続けると、大きな安全性問題を招きかねない。周知の通り、どんな危険な物質も、曝露後、体内に吸収されない限り安全 (化粧品の場合で言うと、経皮吸収されない限り安全) である。すなわち、NanoTox 研究においては、ナノマテリアルが体内に吸収されるか否かを評価すること (動態解析) が最も重要かつ最優先の検討課題であると言っても過言ではない。しかし、NanoTox 研究の大部分は、ハザード評価 (毒性の有無) に偏重しているのが現状であり、最も肝心な体内吸収性や体内/細胞内動態に関する情報が圧倒的に不足している。これは、低分子量の化学物質の場合、一般に、曝露と吸収がニアリコールで捉えられているものの、ナノマテリアルの場合には曝露されても吸収されない、あるいは吸収される訳がないとの

前提で、その動態解析はほとんど検討されていない。そのため、NanoTox 研究は往々にして、非現実的な『実験のための実験』と批判される。このような現状であるにもかかわらず、ナノマテリアルの開発や実用化が規制されようとしていることをわれわれは強く危惧している。

そこで、われわれは、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性確保を目指して、①蛍光/電顕イメージングを活用したナノマテリアルの体内吸収性と体内/細胞内動態の解析、②既存の生化学バイオマーカーを活用した生体影響の解析 (ハザードの特定)、③プロテオミクスを活用した新規安全性バイオマーカーの探索と未知の生体影響の解析 (未知のハザードの特定)、を融合的に推進している (Fig. 1)。これら①-③の情報の連関からナノマテリアルの物性と安全性の因果関係を明確化することによって、最終的にナノマテリアルの安全性予測・有害性回避法の確立、さらには、有効かつ安全なナノマテリアル設計指針の策定につながるものと考えている。本稿では、ナノマテリアルの中でも生産量・使用量の点で最も汎用されている非晶質シリカの NanoTox 研究の現状を紹介する。

## 2. 非晶質ナノシリカの経皮吸収性及び体内動態の評価

非晶質シリカは、既に医薬品や化粧品、食品など、幅広い領域で使用されており、<sup>10-12)</sup> 現在使用されているもののほとんどがナノメートルサイズの人工合成物である。この非晶質ナノシリカは、年間1メガトン以上も生産され、その市場規模は3億1400万ドルにも及ぶなど、数あるナノマテリアルの中でも使用/消費量が極めて多い素材である。<sup>12)</sup> また従来品はアグリゲーションのため、実際の使用条件下ではサブミクロンサイズ以上であったが、微小化すればするほど、使用感や透明性、吸湿性の向上などの様々な有用機能が付与できるため、この数年でサイズダウンや分散性の向上が加速度的に進展しており、現在では、直径が2.5 nm のものまで開発されている。しかしながら、例えばわが国においては、従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカの安全性情報を基に、ナノシリカ (微粒二酸化ケイ素) を食品中に最大2%まで配合することが「食品、添加物等の規格基準 (厚生省告示第370号)」により許可されているものの、<sup>13)</sup> これらの規制は粒子サ



## Strategy of the safety assessment of Nanomaterials

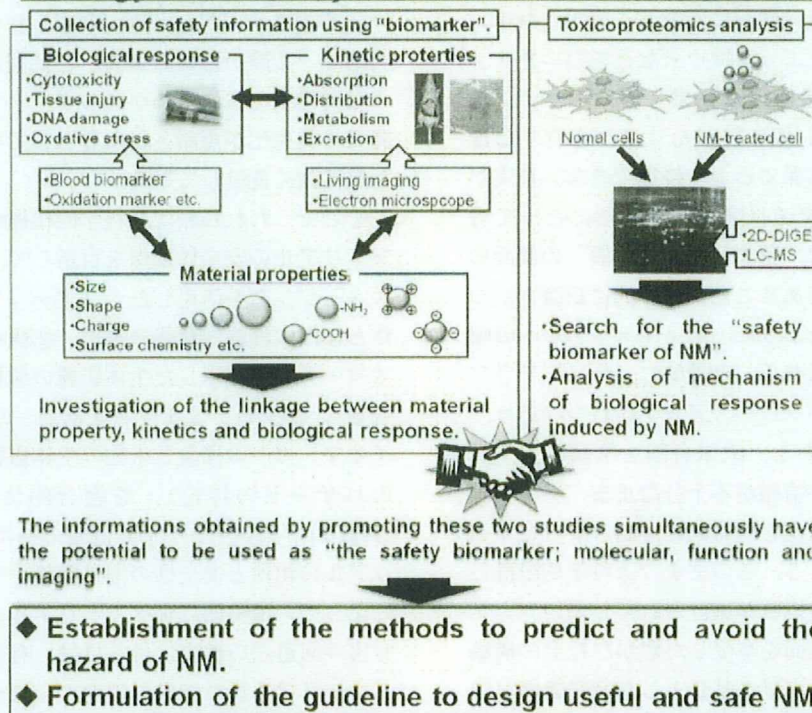


Fig. 1. Scheme of Our Safety Assessment of Nanomaterials

イズにまでは言及していない。つまり、ナノメートルサイズの非晶質シリカは適用範囲・生産量・ヒトの曝露機会が圧倒的に高い素材であるにもかかわらず、安全性が未知のまま使用されており、数あるナノマテリアルの中で最も安全性評価が急がれている素材に位置づけられる。そこで本研究では、これらの点を加味して非晶質ナノシリカの経皮吸収性/体内・細胞内動態を評価した。

まず、3次元培養皮膚を用い、分散性に優れた粒子サイズが70, 300, 1000 nmの蛍光標識非晶質シリカ(それぞれnSP70, nSP300, mSP1000)の経皮吸収性を評価したところ、nSP70のみが培養皮膚の深部にまで到達していた(未発表データ)。そこで次に、マウスを用いて*in vivo*での経皮吸収性及び体内/細胞内動態を透過型電子顕微鏡解析により評価した。各シリカをマウス耳介皮膚に3日間及び28日間連続塗布し、投与局所及び所属リンパ節、各主要組織の透過型電子顕微鏡観察を行った。その結果、表皮層に存在する角化細胞内(Fig. 2)、ランゲルハンス細胞内、神経や血管が豊富に存在する真皮層でnSP70の侵入が確認された。さらに、投

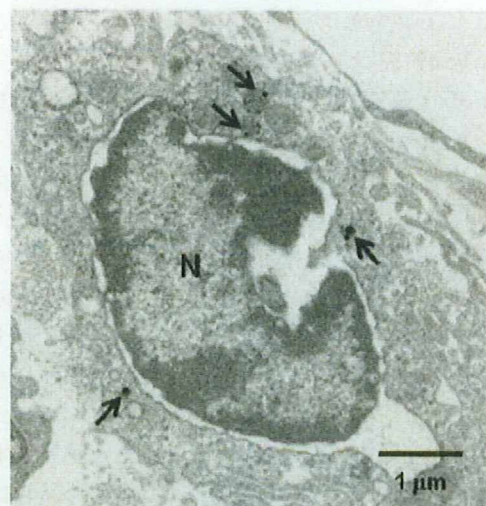


Fig. 2. TEM Observation of Skin from Dermal Administered Mice

nSP70 suspension supplemented (250 μg/ear/day) with 10% isopropyl myristate were applied to the inner side of both ears of HR-1 mice with or without 20 tape-stripping for 3 days. nSP70 were present in keratinocytes of nSP70-treated skin without tape-stripping. Arrows: nSP70, N: nucleus, Scale bars: 1 μm.

与部位近傍の所属リンパ節内にもnSP70の侵入する可能性を見い出している。以上の結果は、粒子サ



イズが 100 nm 以下のナノシリカの安全性を評価するに当たっては、経皮吸収され、全身分布する可能性があるため、投与局所のみならず全身レベルでの安全性評価（ハザード評価）をも実施する必要があることを示唆している。また 100 nm 以下のサイズのナノシリカが、①生体中で最も強固な異物バリアとして機能する皮膚をも通過する、②脳や免疫組織（リンパ節や脾臓など）に蓄積するという事実は、経皮安全性評価に加えてナノマテリアルを経肺・経口曝露した際の安全性評価や脳神経/免疫学的な安全性評価が必須であることを示唆している。

### 3. 非晶質ナノシリカを全身投与した際の安全性評価及び動態解析

ナノシリカが全身循環した際の生体影響及び体内/細胞内動態を評価するために、粒子サイズが 70, 100 (nSP100), 300, 1000 nm のシリカを BALB/c マウスに尾静脈内投与（2 mg/匹）した際の急性毒性試験を実施した。その結果、nSP70 あるいは nSP100 を投与した群では、投与 3 時間後から立毛や体温低下が生じ、nSP100 投与群では 40% のマウスが死亡、nSP70 投与群においては投与後 12 時間以内にすべてのマウスが死亡した（Table 1）。その一方で、nSP300 及び mSP1000 を投与したマウスには急性毒性の所見を全く認めていない。さらに、シリカ投与 6 時間後の血液を用いて血液生化学マーカーを測定したところ、nSP70 投与群において、肝傷害マーカーである Alanine aminotransferase (ALT)（Table 1）等の顕著な上昇が認められた。また、種々肝機能マーカーが nSP70 投与群で減少する傾向をも認めている。これらの結果は、粒子サイズが 100 nm 以下のナノシリカは全身分布した後に致死

毒性及び肝毒性が発現するリスクを孕んでいることを示すものである。

続いて、ナノシリカの肝毒性発現機序の解明を目的に、各ナノシリカをマウス尾静脈内より投与した際の体内動態を評価した。いずれのナノシリカを適用した群においても、肝臓において粒子由来の蛍光が検出され、投与後 48 時間に渡って蛍光が観察された。また、筆者らは、腸管や糞便中において粒子由来の蛍光が検出されることを見い出しており、これらの情報を総合すると、血中に侵入したナノシリカが胆汁排泄によって体外に排出されるものと予想された。続いて、ナノシリカ投与マウスから摘出した肝臓を用いてナノシリカの肝臓内局在を精査した。nSP70 は肝臓全体に分布していたのに対して、nSP300 及び mSP1000 投与マウスの肝臓では、胆のうにおいてのみ蛍光が検出された。これらの結果は、直径 100 nm 以下のナノシリカがサブミクロンサイズのシリカとは異なる体内/細胞内動態特性を発揮する可能性を示しており、ナノシリカの肝実質細胞蓄積性や核内蓄積性を反映した生体影響解析とそのメカニズムの解明がナノシリカの安全性を確保するに当たって必要不可欠であることが示された。

### 4. 皮膚角化細胞株を用いた *in vitro* におけるナノシリカの動態・細胞応答の解析

ここまでの検討結果から、直径 100 nm 以下の非晶質ナノシリカがマイクロメートルサイズの従来素材とは異なる動態特性を発揮し、NanoTox 研究においては、ナノマテリアルの動態情報を基盤とした安全性評価が極めて重要であることを明らかにした。そこで以降の検討では、特にナノシリカの細胞内動態特性に焦点を当てた安全性評価について紹介する。まず、ヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) を用いて、ナノシリカの細胞内局在を解析した。HaCaT 細胞に各粒子サイズのシリカを添加し、24 時間後の細胞を透過型電子顕微鏡にて観察した。nSP300 あるいは mSP1000 を適用したいずれの群においても、細胞内に侵入した像が認められた。nSP300 添加群ではオルガネラの形態異常などはみられなかったが、mSP1000 を添加した群においてリソソーム小胞の過形成を認めた。それに対して、nSP70 は細胞内に侵入するばかりか核膜を透過して核内に侵入していた。これらの事実は、直径 70 nm 以下の新素材と直径 300-数  $\mu\text{m}$  の従来までの素材が、細

Table 1. Survival Rate and Plasma ALT Activity of Mice that Injected Different Particle Size Silica Particles

Group	Survival rate (%)	ALT <sup>1</sup> (IU/l) <sup>2</sup>
Control	100	27.6 ± 2.13
nSP70	0	1640.4 ± 569.6 <sup>*</sup>
nSP100	60	71.6 ± 10.8
nSP300	100	35.0 ± 2.4
mSP1000	100	32.4 ± 2.59

Survival rate were expressed as a percentage of survival at 24 h after treatment of 2 mg/head silica particles to BALB/c mice ( $n=4$  or 5). Plasma ALT activity at 6 h after treatment is expressed as mean ± S.E. ( $n=8$ ). <sup>1</sup>: Alanine aminotransferase, <sup>2</sup>: International unit, \* Represents significant difference from the control group (Bonferroni,  $p<0.01$ ).