

価指針の確立並びにリスク予測バイオマーカーの同定が最も重要な課題である。

このような背景の下、筆者らは特にファンデーション、クリーム、乳液、歯磨等の化粧品基材として汎用されているシリカを標準品として用いて、ナノマテリアルの生物学的影響評価に取り組んでいる。現在、ナノサイズのシリカ粒子を用いて、1) サイズ・形状・物性に関する情報収集、2) トキシコキネティクス(特に細胞内/生体内分布)情報の収集、3) *in vivo/in vitro* におけるリスク作用の特定及びリスク予測バイオマーカーの探索を統合的に推進している (Fig. 1)。将来的に各情報 [1]-3] の連関を詳細に把握することができれば、ナノマテリアルの生体影響評価手法並びにリスク予測法の開発が可能になるものと考えている。そこで本総説では、ナノマテリアルの生物学的影響評価におけるトキシコキネティクス解析の重要性を述べるとともに、ナノシリカを用いたわれわれの取り組みを題材にナノマテリアルの安全性評価研究の現状及び課題をご紹介させて頂き、各方面の先生方からご意見・ご批判を仰ぎたい。

2. ナノマテリアルのトキシコキネティクス解析の重要性

ナノマテリアルの生物学的影響評価は、物質の生体への影響を科学的に解析する毒性学的アプローチ

(Toxicology) を基盤として研究されている。周知の通り、Toxicology においては、投与(曝露)物質の用量依存性や用量相関性の概念を基本として毒性の出ない閾値を追求するとともに、物質の種類や物理的/化学的性質と毒性との関係や、生物体内で毒性が発現する機序などの解析が対象となる。また、その試験動物に固有の ADME (吸収, 移動, 代謝, 排出) や解毒機構の特性を加味して被験物質に対する全身曝露量を明らかにするトキシコキネティクス (Toxicokinetics) 解析も、得られた毒性所見のヒトへの外挿性を向上させるために必須の検討項目である。近年では、これらを基盤としたナノマテリアルの生物学的影響評価は、従来の Toxicology を模倣した形で推進されつつ、Nano-Toxicology (NanoTox) という新たな研究領域にまで発展している。しかしながら、ナノメートルサイズの素材は、組織、細胞、細胞小器官、さらには DNA やリボソームなどの構造体へと容易に浸透する可能性があるという見解が提示されており、筆者らは Nano-Tox 解析においては生体内/細胞内分布の評価に細心の注意を払わなければならないと考えている。また、こういったナノマテリアルの詳細なトキシコキネティクス (生体内/細胞内分布) 情報は、ナノマテリアルの生物学的影響の解析における重要な指針 (対象細胞の特定・リスク作用の推測指針) となる

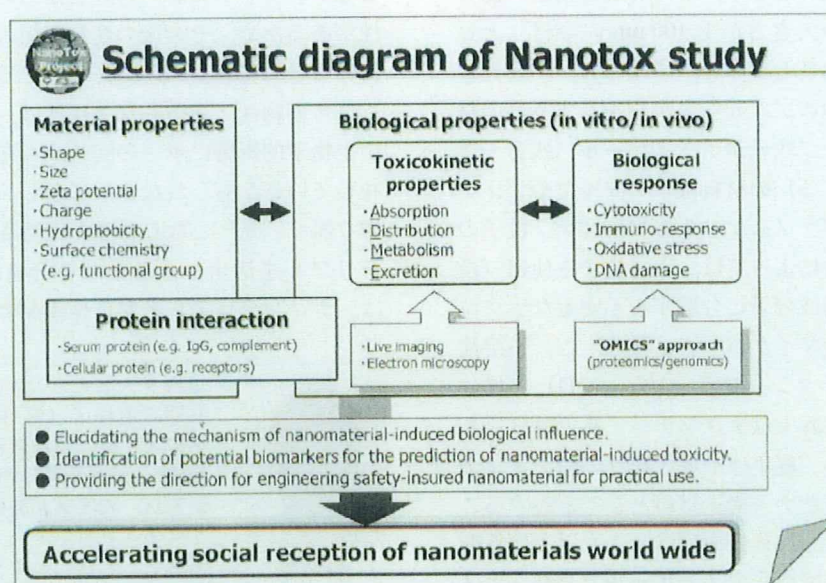


Fig. 1. Schematic Diagram of Our Nanotox Projects

ばかりでなく、ナノマテリアルを医療/化粧品基材として有効活用するための設計指針（体内動態制御によるリスク低減指針）にもなり得る。したがって、筆者らはナノマテリアルの物理的/構造的特性と体内/細胞内分布、生物学的影響との相関性に関する情報を収集・精査し、得られた所見・情報をより慎重に議論していく必要があると考えている。そこで以降の項目では、これらの背景を踏まえて筆者らのグループが取り組んでいるナノシリカの *in vitro/in vivo* における NanoTox 解析（物理的/構造的特性、細胞/生体内分布、生物学的影響に関する情報収集及び相関性の考察）並びにトキシコプロテオミクス（未知の生物学的影響解析並びにリスク予測マーカーの探索）について紹介する。

3. ナノシリカの形状/物性

一次粒子径がナノメートルサイズであるナノシリカは、少なくとも1970年代から化粧品に使用されており、2006年現在、本邦におけるナノシリカの年間使用量は13500トンにも及ぶ。シリカは製剤状の問題が少ないことから、化粧品用としては一般に表面処理を施していないものが汎用されているものの、化粧品原料としての機能性をさらに高めるために、表面処理（疎水化及び親水化など）されたもの

も使用されている。筆者らは Micromod Partikeltechnologie 社より市販されているシリカ粒子 (Sicastar™; SP) のうち、一次粒径が70 nm (SP70)、300 nm (SP300)、1000 nm (SP1000) のものを実験に用いている。Figure 2 に表面未修飾の SP の透過型電子顕微鏡写真を示す。SP70, SP300, SP1000 いずれの粒子も非常に滑らかな形状をした粒子であり、一次粒子径もカタログ値とほぼ同等であった。動的光散乱法を用いて平均二次粒子径を測定した場合でも、ほぼカタログ値と同等の測定値が得られたことから、これらの粒子は極めて分散性の高い粒子であることが明らかとなった。しかしながら、電子顕微鏡写真の結果から推察すると、粒子径が小さくなるほど複数の粒子が凝集する傾向が強いようである。したがって、少なくともわれわれが用いている SP は、粒子径が小さくなるにつれてその分散性が低下する傾向があることが示唆された。一般に、ナノ粒子は一次粒子径がナノメートルサイズであった場合にも、マイクロサイズの大きな凝集塊を形成することが知られており、筆者らが使用した SP も同様の傾向を示すことが明らかとなった。水溶液中における粒子状物質の分散性は、静電的反発力（水分子の表面吸着による水和斥力や分散剤の吸着による

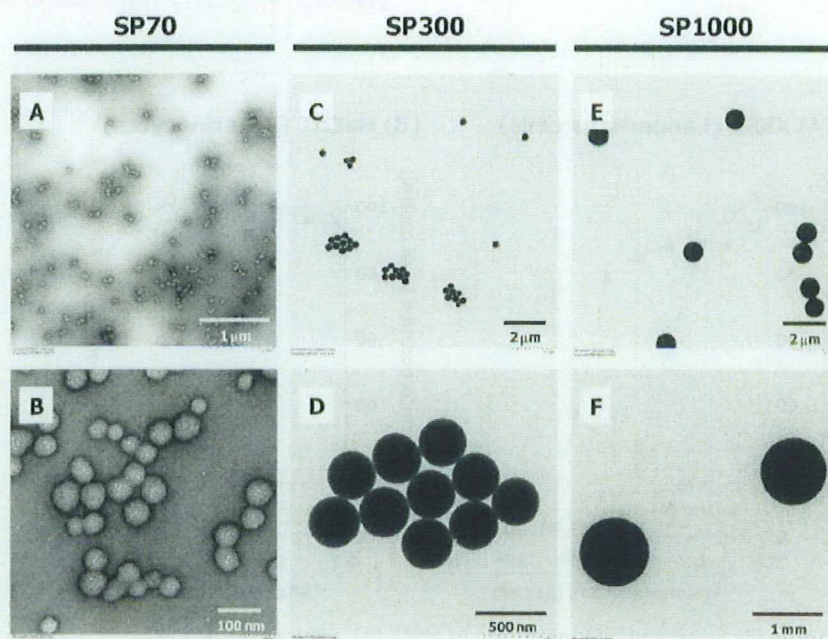


Fig. 2. Transmission Electron Micrographs of Nanosilicas

(A and B): 70 nm-nanosilica (SP70), (C and D): 300 nm-nanosilica (SP300), (E and F): 1000 nm-nanosilica (SP1000).

もの)によって維持されていると考えられている。実際に、ゾル・ゲル法で合成したシリカナノ粒子では、粒子径がナノサイズになると100 nm以上の粒子で観察される溶媒水分子が吸着して発生する水和斥力が消失することが報告されており、¹⁵⁾ われわれが使用したSPで観察された粒子径依存的凝集現象ともよく相関している。このような現象はシリカ粒子のみではなく、様々なナノマテリアルで観察されており、粒子径がナノサイズに近付くとサブミクロン以上の粒子とは異なる粒子表面特性、相互作用が発現し、凝集分散特性に特異挙動が現われるため、粒子表面の組成が同じであっても分散性が著しく低下してしまうものと推測されている。また、ナノサイズになるほど、平均粒子表面間距離が短くなるため粒子濃度を下げないと静電反発効果による立体障害効果が作用し難くなるという考え方もなされているようである。いずれにせよ、今回の結果からも、同じ素材のSPであってもナノサイズになればなるほど粒子表面の物性が変化する可能性が強く示唆され、次項から概説するような*in vitro*、*in vivo*における生物学的影響解析においても、生体内タンパク質や細胞表面あるいは分散剤等の物質との相互作用や、これらの物質が共存する状態での生体影響・分布を解析する必要があると考えられた。

4. ナノシリカの*in vitro*リスク評価(プロテオミクスを用いたリスク予測バイオマーカー探索への展開)

一般に、ある物質の生物学的影響や毒性を解析するための第一段階として*in vitro*培養系を用いた細胞毒性試験がしばしば選択される。動物実験と比較して、*in vitro*細胞培養系を用いた毒性評価はコストパフォーマンスや再現性といった点で優れている上、倫理的問題が少ないことなどから、ナノマテリアルの生物学的影響の解析においても*in vitro*細胞培養系を用いた毒性試験、特に細胞の生死/増殖の判定が第一選択として選択される傾向がある。そこでわれわれは、ヒトあるいはマウス由来の各種細胞株(抗原提示細胞、血管内皮細胞、皮膚角化細胞)を用いて表面未修飾のSP70, SP300, SP1000の細胞増殖に与える影響をトリチウムチミジンの取り込みを指標に評価した(Fig. 3)。その結果、いずれの細胞株を用いた場合でも、SP70添加群で最も強い細胞増殖阻害効果が認められ、粒子径が小さくなるほどSP添加による細胞増殖阻害効果は強くなる傾向が認められた。また、Lactate Dehydrogenase(LDH)法を用いてSPの細胞膜傷害性を評価したところ、細胞増殖試験のデータと相関して粒子径が小さいほど細胞膜傷害性が増大した。したがって、詳細なメカニズムは不明ではあるがSPは粒子径が

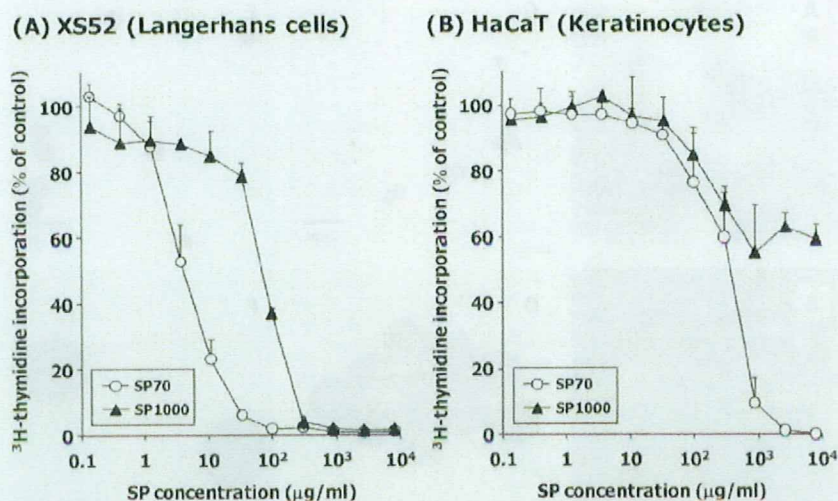


Fig. 3. The Effect of Nanosilica-treatment on Proliferation of XSS2 (A) and HaCaT (B) Cells.

Cells were treated with 70 nm- or 1000 nm-nanosilicas (designated SP70 and SP1000 respectively) at the concentration indicated or PBS for 24 h. The rate of proliferation was determined using the ³[H]-thymidine uptake assay. The data expressed as percent of control sample (PBS-treated cells) and represent mean \pm S.D. (n=3).

小さくなるほど細胞膜に対する傷害性が増大し、これが一因で細胞増殖阻害を引き起こす可能性が示された。筆者らのグループと同様に、様々な定量法を用いてナノマテリアル曝露後の細胞増殖試験が行われており、¹⁶⁾ その過程でいくつかの問題点が指摘され始めている。まず、ナノ粒子の細胞増殖試験を実施するに当たっては、対象物質の濃度設定に加えて、温度や pH、培養液中の栄養素や老廃物の変動に留意し、ナノ粒子特異的な細胞傷害性と、培養環境の変動による非特異的な傷害性とを明確に区別する必要がある。さらに、ナノ粒子は、色素への吸着性や酸化還元活性、光散乱性を示す場合があるため、得られたデータは慎重に解釈する必要がある。事実、われわれは SP の細胞増殖阻害効果を、WST 法、メチレンブルー法、などを用いて評価したが、メチレンブルー法を用いた場合でのみトリチウムチミジン法と相関した結果が得られた。のちに、SP 自身が WST の吸光度 (490 nm) に著しく影響を与えることが原因であると判明したため、ナノマテリアルの細胞増殖に与える影響を評価する際には、筆者らのグループでは、ナノマテリアルの影響を受け難い上に簡便・高感度なトリチウムチミジン法を一次スクリーニング法として採用することとしている。いずれにせよ、ナノマテリアルの細胞傷害性を評価するに当たっては、複数の実験系を用いて評価し、それらの結果を総合して慎重に解釈しなければならない。

ここまで述べてきたように、ナノマテリアルの細胞毒性試験は被験物質の曝露が細胞に対して“死”を引き起こすか否かという点に焦点をおいて進められている。しかしながら、ナノマテリアル曝露によって発現するアウトプットが細胞の生死のみで判定できるものではないということに留意すべきである。前述した通り、ナノマテリアルはナノサイズであるがゆえに、電子反応性の増大をはじめとする予期せぬ反応性を発現することが予測される。したがって、細胞の増殖能や細胞膜に対する障害以外の“亜致死的な生物学的影響”の解析が必要であろう。例えば、ナノマテリアル曝露によって細胞死ではなく、細胞老化現象が引き起こされた場合、細胞増殖能の評価のみではナノマテリアルの細胞老化という毒性を見逃すことになってしまう。これらの点を踏まえて、現在、ナノマテリアル曝露時の酸化ストレ

スや炎症反応 (サイトカイン産生)、さらには DNA 損傷に関する *in vitro* 試験が精力的に進められているものの、これらはあくまで研究者の予測の範囲内で生じる亜致死細胞毒性の検討に過ぎない。本観点から、筆者らはナノシリカ曝露によって誘起される細胞増殖阻害の誘導機序の解析、並びに未知の亜致死細胞毒性の特定を目指して、プロテオミクス及び細胞内局在解析を進めている。筆者らは、二次元ディファレンシャル電気泳動法 (2D-DIGE) を用いて SP70 あるいは SP1000 に 24 時間曝露したヒト皮膚角化細胞のタンパク質発現変動を解析したところ、未処理群と比較して SP 曝露特異的に発現変動するタンパク質が多数存在することを見出した。現在、質量分析計を用いてこれら変動タンパク質の同定及び細胞毒性との関連解析を進めている。さらに筆者らは、タンパク質発現の増加/低下に加えて、酸化やリン酸化といった翻訳後修飾変動の解析にも着手しており、既に酸化タンパク質検出系の確立に成功している。¹⁷⁾ 将来的には、これらの手法を組み合わせることでより詳細かつ確度の高いトキシコプロテオミクスを推進できるものと期待している。

現在までに実施されているナノマテリアルの *in vitro* リスク評価研究は、細胞増殖阻害をはじめとする生体影響とナノマテリアル添加量との用量依存性 (外部曝露) に関する検討を中心に進められている。しかしながら、従来の DDS 開発研究で明らかのように、微粒子状のマテリアルはエンドサイトーシスをはじめとする食食機構を介して細胞内に取り込まれるであろう。したがって、外部曝露量に加えて内部曝露量や細胞内動態などの *in vitro* トキシコキネティクス情報の収集が、ナノマテリアルの生体影響の特定やリスクマーカー探索、毒性発現機序の解析に有用な知見を与えるものと考えられる。本観点から筆者らは、*in vitro* トキシコキネティクス情報の収集を念頭に、電子顕微鏡を用いて *in vitro* における SP の細胞内局在解析を試みている。SP70 あるいは SP1000 を添加し、24 時間培養した皮膚角化細胞を透過型電子顕微鏡にて撮像したところ、いずれの群においても細胞内に多数の粒子が侵入した像が得られた (未発表データ)。SP1000 曝露群においては細胞内に侵入した粒子の周辺にリソソーム様小胞の異常発達が認められている。また、SP70 は

細胞質内に侵入するのみならず一部は核膜を通過して核内にまで到達していた。さらに驚くべきことに、核内に到達した SP70 の大部分が核小体へ集積することが明らかとなった。SP70 の核内到達機序や核内到達によって誘発される生物学的影響の詳細は不明であるが、少なくとも細胞増殖能になんらかの影響を与えている可能性がある。筆者らのグループ以外にも、Foley らによって水溶性フラーレンが容易に細胞膜を通過し、ミトコンドリアへの集積性を示すことが報告されており、¹⁸⁾ こういった *in vitro* トキシコキネティクス情報の収集は世界的にも注目されつつある。筆者らは、現在、SP70 曝露細胞の核分画を用いたプロテオミクスを進めており、核内タンパク質の発現/修飾変動情報を基に細胞増殖阻害との関連評価並びに未知の重致死性生物学的影響の特定を進めている。このように、ナノマテリアルの細胞内局在解析によって得られる局在部位/内部暴露量 (*in vitro* トキシコキネティクス) に関する情報は、より精密なトキシコプロテオミクスを実行する上で非常に有用な指針を与える極めて有効な手段になることが示された。以上、筆者らは上述した *in vitro* リスク評価を融合的に進めることで、未知の重致死性細胞毒性の推測/評価及び毒性発現機序の解析、リスク予測バイオマーカーの同定が可能になるのみならず、ナノマテリアルの有効活用法の探索及び安全性の高いマテリアルデザインが実現するものと期待している。

5. ナノシリカの *In vivo* リスク評価 (ナノマテリアルの *In vivo* トキシコキネティクス解析)

生体に適用したナノマテリアルの挙動は、1) 静脈、経皮、皮下 (皮内)、吸入、経口、腹腔のいずれかの経路を介して生体に吸収され、2) 体内のタンパク質や細胞と相互作用したのちに、3) そのままの形状、あるいは修飾・代謝されたのちに種々の組織へ分布するという運命を辿るものと推測され、これらの生体内挙動はナノマテリアルの直径・表面電荷・形状といった物性の影響を受けて様々に変動するものと考えられる。したがって、ナノマテリアルの *in vivo* リスク評価においては、単に毒性学的所見を収集するのではなく、これら 1)-3) のステップを考慮に入れたトキシコキネティクス情報を収集し、ナノマテリアルの物理学的パラメーター (粒子径・表面電荷・形状) との関連を解析することが必

要不可欠である。こういった *In vivo* トキシコキネティクス解析に関しては、ナノマテリアルの代表例である、フラーレンや QD、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) に関する報告例が多い。例えば、表面の修飾官能基の違いによって QD や SWCNT の体内吸収性や生体内挙動が変動する可能性、経口投与された QD は体内に吸収されず糞便とともに排出される可能性、が報告されている。¹⁹⁻²²⁾ しかしながら、ナノマテリアルの物性と生体動態、毒性学的所見に関する検討は個々に散在しているのが現状であり、特に全身レベルで各々の情報の連関を系統的に解析した例はほとんどない。

これらの点を踏まえて筆者らは、化粧品基材として汎用されている SP の毒性学的所見を収集するとともに、蛍光イメージングや電顕などを用いたキネティクス情報の収集を図っている (未発表データ)。まず、ヒト培養皮膚モデルを用いて表面未修飾の SP70, SP300, SP1000 の皮膚透過性を検討したところ、SP70 のみが培養皮膚を透過することが明らかとなった。また、筆者らは *in vivo* における皮膚透過性を検証するために、皮膚の厚さ・皮膚透過係数・組織学的所見などがヒトと酷似している実験ブタを用いて *in vivo* 皮膚透過性試験を実施している。予備試験として蛍光標識 SP70 を皮膚透過促進剤とともに大量頻回塗布した際の粒子の血中移行性を実施したところ、SP70 適用群の血液中においてのみ粒子由来の蛍光が血中で検出された。現在、SP70 の皮膚透過/血中移行性を直接的に証明するために免疫組織学解析や電子顕微鏡解析を進めている。そこで、これらの予備データを踏まえて、筆者らは、マウス静脈内投与モデルを用いて SP の急性毒性試験を実施した。2 mg の SP を単回投与したマウスの生存率を評価したところ、SP300, SP1000 投与マウスでは死亡例がみられなかったのに対して、SP70 を投与したマウスは投与後 12 時間以内に全例死亡した。SP70 投与 6 時間後に血液を回収して血清生化学検査を実施したところ、SP70 マウスでは投与粒子量依存的な肝障害マーカーの上昇や炎症性サイトカイン産生の上昇が認められた。さらに SP を 2 回/週で合計 8 回投与した際の慢性毒性を肝臓の病理組織学的解析により評価したところ、SP70 投与グループにおいてのみ肝線維化が認められた。これら急性/慢性的な毒性の詳細な発現機序は今の

ところ不明であるが、SP 投与により生じる肝障害や炎症性サイトカインの過剰産生などが複合的に関わっているものと考えられる。さらに、筆者らは SP の蛍光標識体を用いて電子顕微鏡や蛍光イメージング法による SP のトキシコキネティクス情報を収集した (Fig. 4)。マウス静脈内より投与した SP は、粒子径によらず速やかに肝臓に集積し、肝臓における粒子由来の蛍光は少なくとも 48 時間以上検出された。また、胆嚢や糞便中において粒子由来の蛍光が検出されたことから、血液中の SP は胆汁排泄によって体外に排出される可能性が示唆された。さらに、透過型電子顕微鏡を用いて肝臓における SP の局在を検討したところ、いずれの粒子も肝実質細胞並びに肝クッパー細胞内に取り込まれることが明らかとなった。肉眼的観察による所見では、粒子径が小さいほど肝クッパー細胞による取り込み粒子量が減少し、逆に肝実質細胞への取り込み量が増大する傾向が認められた。また、*in vitro* の細胞内局在解析と同様に、ごく少数の SP70 が核内にまで到達する現象を認めた。現在、筆者らは組織レベルでのプロテオミクスなどを用いて肝クッパー細胞や肝実質細胞への取り込み量や核内到達性といったトキシコキネティクス情報と急性/慢性的な有害性との関連を追求するとともに、表面電荷や修飾官能基といった異なる表面物性を有する SP の生物学的影

響解析を進めている。以上、筆者らは、実験ブタを用いて SP70 が皮膚を透過して血液中へ移行する可能性を示すとともに、マウスレベルで高用量の SP を静脈内に投与した際に肝障害や炎症性サイトカイン産生の増大、肝線維化などの有害事象を認めた。しかしながら、今回の検討結果はあくまで物理的な限界に近いほどの高用量を投与した際に認められたものであり、正常とはかけ離れた特殊な生理状態 (吸収・分布・代謝・排泄) であること、あくまで動物実験レベルで得られた結果でありヒトへの外挿については慎重かつ確かな評価が必要であること、などに留意しなければならない。少なくとも筆者らは、現在、こういった有害事象の発現を規定する粒子物性パラメータの特定や発現メカニズムの解析をはじめとする種々の検討を進めており、実験動物レベルではあるが今回得られた事象に科学的な考察を加えることによって、将来的にはナノマテリアルを安全に使用するための使用・設計指針の策定やリスク予測マーカーの同定の一助になるものと期待している。

6. ナノリスク評価の課題

ここまで述べてきた筆者らの研究をはじめとして、ナノマテリアルの有害事象の特定や細胞内/生体内レベルでの局在解析が盛んに行われているが、ナノマテリアルと生体内タンパク質との相互作用や

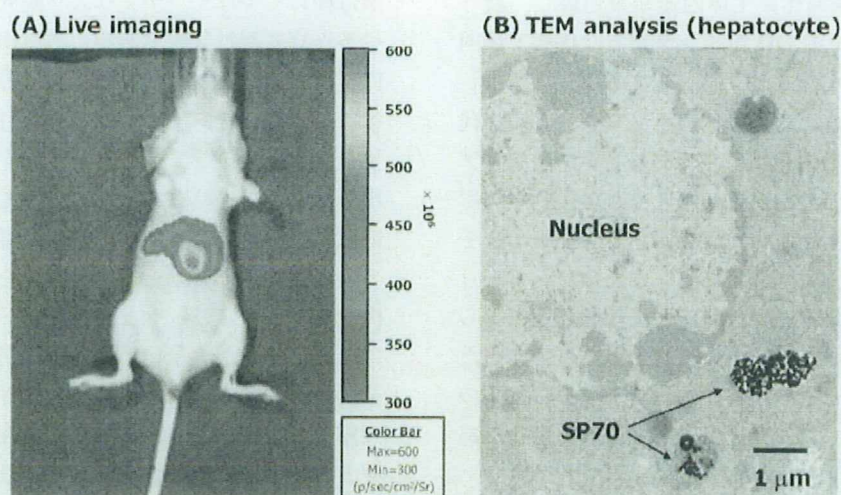


Fig. 4. Optical Live Imaging and Transmission Electron Microscopic Analysis of Fluorescent Labeled Nanosilicas in Mice
 DY676-labeled nanosilicas (70 nm in a diameter, 7×10^{10} particles) were intravenously injected into female nude mice. Two days after injection, optical images were acquired using a Xenogen IVIS 200 imaging system (A). The signal intensity in the region of interest is expressed as photons (p) per second (sec) per centimeter squared (cm^2) per steradian (sr) (a steradian is a unit of solid angle). After optical imaging, the liver was recovered from nanosilica-injected mice. Then, the liver-specimens were prepared and hepatocytes were examined under a transmission electron microscope (B). The scale bar indicates 1 μm .

ナノマテリアルの代謝と有害事象との連関など未知な部分が多く残されている。例えば、複数の研究者によってナノマテリアルのオプソニン化や血清中のタンパク質との相互作用が要因となり、ナノマテリアルの生体内挙動などが変動する可能性が指摘されている。²³⁻²⁶⁾ Lundqvist らはナノシリカと human carbonic anhydrase (HCA) との相互作用を詳細に解析しており、粒子表面の湾曲率が HCA の高次構造変化を引き起こすことを示している。また、血液中に存在するタンパク質の中でも補体やイムノグロブリンといった免疫反応性タンパク質とナノマテリアルとの結合可能性も示唆されている。²⁷⁾ 補体タンパク質やイムノグロブリンはマクロファージなどの抗原提示細胞や好中球、マスト細胞といった免疫細胞に対する免疫調節作用を有するため、こういった免疫関連タンパク質との相互作用がナノマテリアルの細胞内/生体内動態に与える影響を十分に考慮していく必要がある。これらの報告では、ナノマテリアルの投与（服用）が花粉症などのアレルギー疾患やリウマチをはじめとする自己免疫性疾患の発症・増悪を促進する可能性を指摘しているが、生体レベルでこれらの有害事象を実証するエビデンスは得られていない。一方で、生体内に到達したナノマテリアルの代謝に関する情報はほとんど得られておらず、ナノマテリアルの代謝経路及び代謝産物の有害性の情報収集も急務とされている。Fischer や Ballou らは、QD 誘導体の生体内運命を追跡し、投与1ヵ月後においても QD がインタクトな状態で体内に残存し続けることを報告しているが、²⁸⁾ フラーレン、ナノシリカなど、その他のナノマテリアルの代謝・排出に関する情報は皆無である。ナノマテリアルの代謝産物及び分解産物がなんらかの生物学的影響を発現する可能性は否定できない上、それらを予測することは非常に困難である。さらにナノマテリアルの代謝及び排泄経路の特定は、実験動物で得られた毒性学的解析結果を高確度にヒトへ外挿するための重要な指針となり得るため、ナノマテリアルの代謝解析研究は、今後の非常に重要な検討項目である。

ナノマテリアルと生体との相互作用は“未知”な部分がほとんどであるため、リスク評価において課題となる項目は、本項で述べたタンパク質との相互作用や代謝解析以外にも無数に存在する。しかしな

がら、先述したようにこの未知な部分こそナノマテリアルが現存する産業・医療に革命を起こし得ると言われる所以である。したがって、われわれはナノマテリアルが有用性と有害性という正と負の二面性を持つことを十分に理解した上で、有用性のみを最大限に有効活用する方策を講じていかなければならない。そのためには、ナノマテリアルによって引き起こされる有害事象の特定及び科学的考察が必須であり、筆者らの推進しているトキシコキネティクスやトキシコプロテオーム解析はこれらの研究を推進するに当たって重要な指針を与える非常に有効な手法であると考えられる。

7. おわりに

周知の通り、米国ではクリントン大統領時代の2000年に次世代産業のリーダーとしての地位を確固たるものとするべく、「国家ナノテクノロジー戦略 (National Nanotechnology Initiative)」が設定されているが、その中で既にナノリスクに着目して先進的な研究を命じている。また、英国においても英国学士院 (Royal Society: 日本の学術会議に相当) を頂点とする最高レベルの研究機関がナノリスク研究を統括するなどの対策が取られている。本邦のナノテクノロジーは、開発面では世界トップレベルであると言われ、その有用性・革新性・経済効果といった「光」の部分のみが取り上げられているが、「闇」の部分ともいえるリスク評価に関する情報開示は極めて少なく、ナノリスク研究は欧米諸国に比べると立ち遅れ気味である。あらゆる物事に光と闇は付きものであるが、闇の克服は容易ではなく楽観視はできないであろう。今こそわれわれは発想を転換し、ナノマテリアルを安全活用する方向性を見出し、出していかなければならない。例えば、医薬品開発研究に見られるように、副作用は避けられないという大前提の下で薬効と安全性評価を一体化した研究開発を進め、メリットとデメリットをバランスに掛けてメリットが大きい場合には実用化するという産業構造を模倣するのも1つの方向性である。本総説で紹介したナノシリカの核内到達性やフルラーレンのミトコンドリア集積性、ナノマテリアルの免疫調節作用は安全性を担保した上で有効活用すれば、新たな DDS や治療戦略として有効活用できる可能性を十分に秘めている。したがって、これまで検討されずにきたナノマテリアルの有害事象の明確化及びメ

カニズムの解明を積極的に推進し、ナノリスクの効果的な監視・防護措置を確立することによってナノマテリアルのメリットを最大限に利用していく必要があると筆者らは考える。こういったナノリスク研究は、ナノマテリアルが人類の健康や環境に悪影響を与えることなく、人類の福祉・産業発展に資するテクノロジーとして社会に受容されるために必須のプロセスであり、今回紹介した筆者らの検討はほんの一例であるが、こういった地道なナノリスク研究から得られるデータが蓄積されることによって、ナノリスク評価の標準化、効果的なリスク予測・防護法の確立、さらには安全なナノマテリアルの使用・設計指針の策定につながるものと期待している。

謝辞 本研究は、厚生労働科学研究費補助金：化学物質リスク研究事業の支援の下に遂行された研究である。また、本総説で紹介した研究内容は、独医薬基盤研究所 基盤的研究部 創薬プロテオミクスプロジェクト 堤 康央リーダー（大阪大学大学院毒性学分野 教授を併任）の統括の下、大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野教授 中川晋作先生、同助教 向 洋平先生、大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子科学分野教授 八木清仁先生、同准教授 近藤昌夫先生、同助教 磯田勝広先生をはじめとする多くの方々の連携によって得られた共同成果であり、この場をお借りして御礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Bulte J. W., Kraitchman D. L., *NMR Biomed.*, **17**, 484-499 (2004).
- 2) Gupta A. K., Naregalkar R. R., Vaidya V. D., Gupta M., *Nanomaterials*, **2**, 23-39 (2007).
- 3) Chan W. C., Maxwell D. J., Gao X., Bailey R. E., Han M., Nie S., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 40-46 (2002).
- 4) Bruchez Jr. M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P., *Science*, **281**, 2013-2016 (1998).
- 5) Agrawal A., Deo R., Wang G. D., Wang M. D., Nie S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 3298-3303 (2008).
- 6) Yoshikawa T., Okada N., Oda A., Matsuo K., Kayamuro H., Ishii Y., Yoshinaga T., Akagi T., Akashi M., Nakagawa S., *Vaccine*, **26**, 1303-1313 (2008).
- 7) Yoshikawa T., Okada N., Oda A., Matsuo K., Mukai Y., Yoshioka Y., Akagi T., Akashi M., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 408-413 (2008).
- 8) Sengupta S., Eavarone D., Capila I., Zhao G., Watson N., Kiziltepe T., Sasisekharan R., *Nature*, **436**, 568-572 (2005).
- 9) LaVan D. A., McGuire T., Langer R., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1184-1191 (2003).
- 10) Yamaguchi Y., Nakamura N., Nagasawa T., Kitagawa A., Matsumoto K., Soma Y., Matsuda T., Mizoguchi M., Igarashi R., *Pharmazie*, **61**, 117-121 (2006).
- 11) Hart J., Rival D., Terry N., Bonnet S., Buffevant C., Perrier E., *J. Cosmet. Sci.*, **57**, 185-186 (2006).
- 12) Borm P., Klaessig F. C., Landry T. D., Moudgil B., Pauluhn J., Thomas K., Trottier R., Wood S., *Toxicol. Sci.*, **90**, 23-32 (2006).
- 13) Nel A., Xia T., Madler L., Li N., *Science*, **311**, 622-627 (2006).
- 14) Xia T., Kovichich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J. I., Wiesner M. R., Nel A. E., *Nano Lett.*, **6**, 1794-1807 (2006).
- 15) Kamiya H., Mitsui M., Takano H., Miyazawa S., *J. Am. Ceramic Soc.*, **83**, 287-293 (2000).
- 16) Lewinski N., Colvin V., Drezek R., *Small*, **4**, 26-49 (2008).
- 17) Nabeshi H., Oikawa S., Inoue S., Nishino K., Kawanishi S., *Free Radic. Res.*, **40**, 1173-1181 (2006).
- 18) Foley S., Crowley C., Smaili M., Bonfils C., Erlanger B. F., Seta P., Larroque C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 116-119 (2002).
- 19) Cagle D. W., Kennel S. J., Mirzadeh S., Alford J. M., Wilson L. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 5182-5187 (1999).
- 20) Ryman-Rasmussen J. P., Riviere J. E., Monteiro-Riviere N. A., *Toxicol. Sci.*, **91**, 159-165 (2006).
- 21) Lee H. A., Imran M., Monteiro-Riviere N. A., Colvin V. L., Yu W. W., Riviere J. E., *Nano Lett.*, **7**, 2865-2870 (2007).
- 22) Singh R., Pantarotto D., Lacerda L., Pastorin G., Klumpp C., Prato M., Bianco A., Kostarelos K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,

- 103, 3357–3362 (2006).
- 23) Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B. H., *Langmuir*, **20**, 10639–10647 (2004).
- 24) Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K.A., Linse S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 2050–2055 (2007).
- 25) Cedervall T., Lynch I., Foy M., Berggard T., Donnelly S. C., Cagney G., Linse S., Dawson K. A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 5754–5756 (2007).
- 26) De M., You C. C., Srivastava S., Rotello V. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 10747–10753 (2007).
- 27) Reddy S. T., van der Vlies A. J., Simeoni E., Angeli V., Randolph G. J., O'Neil C. P., Lee L. K., Swartz M. A., Hubbell J. A., *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1159–1164 (2007).
- 28) Ballou B., Lagerholm B. C., Ernst L. A., Bruchez M. P., Waggoner A. S., *Bioconjug. Chem.*, **15**, 79–86 (2004).

ナノマテリアルの医薬品への展開とリスク

角田 慎一,^a 堤 康央^{*,a,b}

Application of Nanomaterials for Drug Innovation and Their Risks

Shin-ichi TSUNODA^a and Yasuo TSUTSUMI^{*,a,b}

^aLaboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki City 567-0085, Japan, and ^bDepartment of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

近年の物質化学や製造工学的技術の進歩により、様々なナノメートルサイズの物質(ナノマテリアル)の創製が可能となってきた。カーボンナノチューブやフラーレン、酸化チタンナノ粒子をはじめとする各種ナノマテリアルは既に実用化されていることは周知の通りである。これらナノマテリアルは、従来のバルクサイズ、あるいはマイクロメートルサイズのマテリアルと比べて同一化学組成であっても大きく異なった特性を発揮すること、すなわち物質がナノメートルサイズの粒子になると比表面積が増し、電子反応性や光・熱応答性の増大、遠赤外線(電子波)放出性や放電性の増大等の特性を発揮することから、機能性新素材として、現在、様々な分野での応用が試みられている。例えばナノ酸化チタンやナノシリカは、サンスクリーンやファンデーション等の化粧品配合成分として汎用され、カーボンナノチューブは自動車部品、導電性樹脂、半導体素材などへの応用が検討されている。また、各種ナノ粒子の生体内動態特性を有効利用したドラッグデリバリーシステム(DDS)など、医療分野への応用も大きく期待されている。

一方で、ナノマテリアルのヒト健康への影響など、予測できない負の側面が懸念され始めている。すなわち、ナノマテリアルに曝露されたのちの生体

内挙動や蓄積性、これら動態特性に基づいた毒性発現は、ほとんど解明されていないにも係わらず、実用化ばかり先行している現状が極めて危惧されており、安全性確保の観点から、ナノマテリアルの社会受容の促進に向けた取り組みが欧米を中心に最重要視されるようになってきている。既に様々なナノマテリアルが既実用化済みであり、意図的・非意図的暴露を避け得ないこと、また多くのハイテク産業の命運を担っているという視点からみれば、その安全性評価は、社会的影響力を持った緊急の課題と言える。欧米では、ICON(国際テクノロジー協議会)、米国標準化組織、欧州ナノテク戦略組織等において、ナノマテリアルのヒトにおける動態解析と毒性把握、品質・安全性に対する標準化及び品質評価、安全性評価(リスク評価)技術の確立、社会的・倫理的な管理策の確立と法的整備が進められており、わが国でも遅ればせながら厚生労働省を中心に、ナノマテリアルの安全対策に関する検討会が立ち上げられた。また、OECD工業ナノ材料部会を通じて、ナノマテリアルの厳格な安全性評価の開発を促進するため、ナノマテリアルのヒト健康及び環境の安全性等に関する国際協力が図られている。

さて本稿以下3編の総説は、日本薬学会第128年会で企画されたシンポジウム「ナノマテリアルの医薬品への展開とリスク」で御講演頂いた先生方に、講演内容に基づいて誌上シンポジウムとしてまとめて頂いたものである。吉岡先生にはナノマテリアルの物性と体内挙動の相関に着目した安全性評価研究について、津田先生、徳永先生、菅野先生にはカーボンナノチューブの発がん性に関する研究を、中川先生にはナノ粒子を用いたDDSの可能性について

^{*}徳医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト(〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-6-8)。^b大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野(〒565-0871 吹田市山田丘1-6)

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

日本薬学会第128年会シンポジウムS32序文

本シンポジウムのうち中川晋作氏の総説は、Vol. 128, No. 11, p1559に掲載。

執筆頂いた。本誌上シンポジウムが、安全を確保した上で、ナノマテリアルを産業や医用に有効活用し

ていく必要性を皆様にご理解頂く一助となれば幸いです。

薬学研究最前線

医薬品・化粧品におけるナノマテリアルの安全性評価

吉岡靖雄¹, 吉川友章^{2,3}, 角田慎一³

(1、大阪大学臨床医工学融合研究教育センター) (2、大阪大学大学院薬学研究科 附属創薬教育センター)

(3、(独) 医薬基盤研究所 基盤的研究部 創薬プロテオミクスプロジェクト)

はじめに

ナノテクノロジーは、物質を nm (ナノメートル) レベルで制御することにより、その物質の機能や特性を飛躍的に向上させることを目的とした超微細加工技術であり、近年、広範な産業技術分野に革新的発展をもたらし得るキーテクノロジーとして脚光を浴びている。ナノテクを駆使して創製されるナノマテリアル (1 次粒子径が 100 nm 以下) は、ナノサイズであるが故の、表面積・電子反応性・光反応性・熱反応性の増大や遠赤外線放出等に基づいた種々の有用機能を発揮し得るため、夢の万能素材として、各方面に様々な恩恵をもたらすものと期待されている。医療・化粧品開発分野においても技術革新をもたらす素材として注目され、酸化チタン・シリカ (SP)・フラーレンなどが新規医療/化粧品用素材として期待されるとともに、一部は既に汎用されている。しかしナノマテリアルは、従来までのマイクロサイズのマイクロマテリアルとは異なった体内動態/環境動態特性を有していることも相俟って、高

度な機能が逆に予想すらできないリスクを産み出し得る等、2 面性を呈してしまうことが危惧され始めている^{1,2}。上市されている化粧品の多くに、有効成分としてのナノマテリアルが含まれているように、ナノテクノロジー研究の多くは「実用化」ばかりが先行している現状を考えると、その安全性評価と確保に向けた研究は極めて社会的意義と影響力を持つものと考えられる。以上の背景から我々は、種々ナノマテリアルの刺激性・起炎性、免疫毒性、生殖毒性、遺伝毒性 (変異原性)、発がん性、発生毒性 (催奇性)、光毒性の評価およびその基盤技術の開発と共に、トキシコキネティクスやイメージング、トキシコプロテオミクス等を融合することで、安全性 (リスク) バイオマーカー (蛋白質・遺伝子) の探索と安全性予測・評価技術の確立、そして安全性に優れたナノマテリアルの開発支援を進めている (Figure 1)。本稿では、ナノマテリアルの安全性評価に関する現状と、我々の研究成果の一部を紹介する。

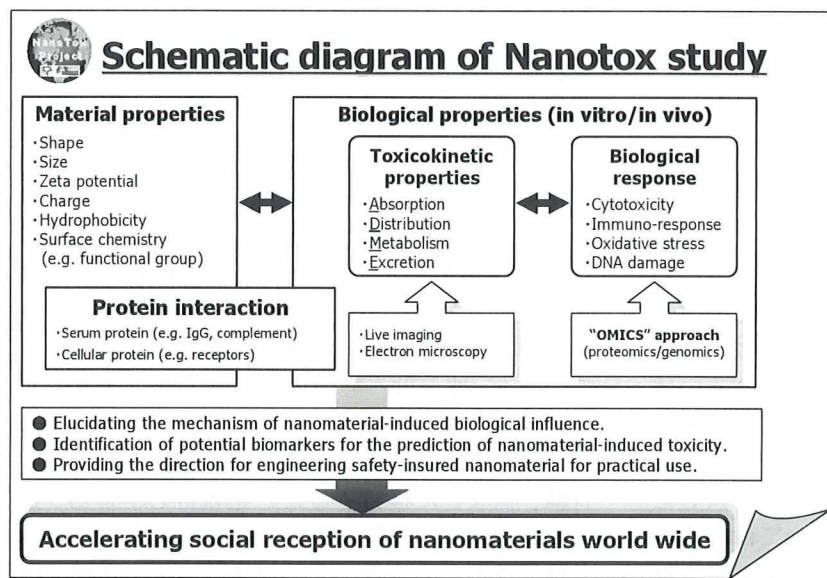


Figure 1. Schematic diagram of our Nanotox projects.

ナノシリカのin vitroリスク評価

ナノマテリアルのin vitro細胞傷害性及び起炎性に関しては、数多くの報告がなされている^{3,4}。一方で、これら作用は、ナノマテリアルの直径・表面電荷・形状といった物性により変動するものと考えられるが、その違いに着目した検討は少ない。そこで我々は、粒子径の違いがもたらす細胞傷害性・起炎性に関して、化粧品に汎用されるシリカを用いて検討した。一次粒子径がナノメートルサイズであるナノシリカは、1970年代から化粧品に使用されており、2006年現在、本邦におけるナノシリカの年間使用量は13,500トンにも及ぶ。シリカは製剤状の問題が少ないことから、化粧品用基材として汎用されており、ナノシリカを用いて収集した情報はナノマテリアルのサイズ依存的な有害性情報としてのみならず、既に市販されている実サンプルの有害性情報として極めて有用である。まず、一次粒径が70 nm (SP70)、300 nm (SP300)、1000 nm (SP1000)のシリカを用い、ヒトあるいはマウス由来の各種細胞株（食食細胞、血管内皮細胞、皮膚角化細胞）に対するSP70、SP300、SP1000の細胞傷害性を評価した。その結果、いずれの細胞株を用いた場合でも、SP70添加群でもっとも強い細胞傷害性が認められ、粒子径が小さくなるほどSP添加による細胞傷害性は強くなる傾向が認められた。更に、マクロファージ細胞株を用い、サイトカイン産生を指標に、粒子径の違いに起因する起炎性の違いに関して検討した。その結果、IL-6ほどの粒子径のSPも産生誘導しない一方で、SP70のみ有意なTNF産生を誘導することが明らかとなった。以上の結果から、シリカは粒子径の違いにより、異なる細胞傷害性・起炎性パターンを示すことが明らかとなった。また我々は、シリカの表面電荷の違いによっても、異なる細胞傷害性・起炎性を示すこと、更には酸化チタンにおいても同様の現象がみられることを明らかとしている。

次に、in vitroトキシコキネティクス情報の収集を念頭に、電子顕微鏡を用いてin vitroにおけるSPの細胞内局在解析を試みた。SP70あるいはSP1000を添加し、24時間培養した皮膚角化細胞を透過型電子顕微鏡にて撮像したところ、いずれの群においても細胞内に多数の粒子が侵入した像が得られた。SP1000曝露群においては細胞内に侵入した粒子の周辺にリソソーム様小胞の異常発達が認められていた。また、SP70は細胞質

内に侵入するのみならず一部は核膜を通過して核内にまで到達していた。さらに驚くべきことに、核内に到達したSP70の大部分が核小体へ集積することが明らかとなった。SP70の核内到達機序や核内到達によって誘発される生物学的影響の詳細は不明であるが、少なくとも細胞増殖能に何らかの影響を与えている可能性がある。筆者らのグループ以外にも、Foleyらによって水溶性フラーレンが容易に細胞膜を通過し、ミトコンドリアへの集積性を示すことが報告されており、こういったin vitroトキシコキネティクス情報の収集は世界的にも注目されつつある⁵。このように、ナノマテリアルの細胞内局在解析によって得られる局在部位/内部暴露量(in vitroトキシコキネティクス)に関する情報は、ナノマテリアルの有害性評価を進める上で、非常に有用な指針を与える極めて有効な手段になることが示された。

ナノシリカのin vivoリスク評価 (ナノマテリアルのin vivoトキシコキネティクス解析)

生体に適用したナノマテリアルの挙動は、①静脈、経皮、皮下(皮内)、吸入、経口、腹腔、のいずれかの経路を介して生体に吸収され、②体内のたんばく質や細胞と相互作用した後に、③そのままの形状、あるいは修飾・代謝された後に種々の組織へ分布する、という運命を辿るものと推測され、これらの生体内挙動はナノマテリアルの直径・表面電荷・形状といった物性により変動するものと考えられる。従って、ナノマテリアルのin vivoリスク評価においては、単に毒性学的所見を収集するのではなく、これら①～③のステップを考慮に入れたトキシコキネティクス情報を収集し、ナノマテリアルの物理学的パラメーター(粒子径・表面電荷・形状)との連関を解析することが必要不可欠である。例えば、Wangらは、顔料、食品や医薬品の添加剤や紫外線遮断剤として非常に注目されている酸化チタンを用いて、トキシコキネティクス情報に関して興味深い報告をしている⁶。彼らは、粒子径の異なる酸化チタンを経口投与後の体内動態を検討した結果、粒子径の違いにより体内分布が異なり、肝臓、肺、脾臓、腎臓、脳などに移行することを報告している。驚くべきことに、彼らの報告では酸化チタンが脳へも移行することが明らかとされている。詳細な機構は不明であり、今後より詳細な検討が必要では

あるものの、酸化チタンの粒子サイズの減少によって組織への浸透性が増大し、脳血液関門をも突破した可能性が考えられている。また、酸化チタンを経肺投与した場合にも、ナノサイズの酸化チタンはマイクロサイズの酸化チタンと比較して、肺に重篤な炎症を惹起することも示されている⁷。こういった粒子径の減少に依存した組織浸透性や起炎性の増大は、ナノマテリアルの“サイズ”が *in vivo* トキシコキネティクスを規定する非常に重要なパラメーターの一つであることを示しており、ナノマテリアルの物性と体内動態との関連情報の収集がナノ毒性研究において必要不可欠であることを裏付けるものである。しかしながら、ナノマテリアルの物性と生体内動態、毒性学的所見に関する検討は個々に散在しているに過ぎず、特に全身レベルで各々の情報の関連を体系的に解析した例は殆ど無いのが現状である。

これらの点を踏まえて我々は、SPの毒性学的所見を収集すると共に、蛍光イメージングや電顕などを用いたキネティクス情報の収集を図っている。まず、ヒト培養皮膚モデルを用いて表面未修飾のSP70、SP300、SP1000の皮膚透過性を検討したところ、SP70のみが培養皮膚を透過することが明らかとなった。また、*in vivo*における皮膚透過性を検証するために、皮膚の厚さ・皮膚透過係数・組織学的所見などがヒトと酷似している実験ブタを用いて *in vivo* 皮膚透過性試験を実施した。予備試験として蛍光標識SP70を皮膚透過促進剤と共に大量頻回塗布した際の粒子の血中移行性を実施したところ、SP70適用群の血液中においてのみ粒子由来の蛍光が血中で検出された。現在、SP70の皮膚透過/血中移行性を直接的に証明するために免疫組織学解析や電子顕微鏡解析を進めている。そこで、これらの予備データを踏まえて、SPを2回/週で合計8回投与した際の慢性毒性を肝臓の病理組織学的解析により評価したところ、SP70投与グループにおいてのみ肝線維化が認められた。これら急性/慢性的な毒性の詳細な発現機序は今のところ不明であるが、SP投与により生じる肝障害や炎症性サイトカインの過剰産生などが複合的に関わっているものと考えられる。さらに、SPの蛍光標識体を用いて電子顕微鏡や蛍光イメージング法によるSPのトキシコキネティクス情報を収集した。マウス静脈内より投与したSPは、粒子径に依らず速やかに肝臓に集積し、肝臓における粒子由来の

蛍光は少なくとも48時間以上検出された。また、胆嚢や糞便中において粒子由来の蛍光が検出されたことから、血液中のSPは胆汁排泄によって体外に排出される可能性が示唆された。しかしながら、今回の検討結果はあくまで物理学的な限界に近いほどの高用量を投与した際に認められたものであり、正常とはかけ離れた特殊な生理状態（吸収・分布・代謝・排泄）であること、あくまで動物実験レベルで得られた結果でありヒトへの外挿については慎重かつ的確な評価が必要であること、などに留意しなければならない。少なくとも我々は、現在、こういった有害事象の発現を規定する粒子物性パラメーターの特定や発現メカニズムの解析をはじめとする種々の検討を進めており、実験動物レベルではあるが今回得られた事象に科学的な考察を加えることによって、将来的にはナノマテリアルを安全に使用するための使用・設計指針の策定やリスク予測マーカーの同定の一助になるものと期待している。

ナノリスク評価の課題

ここまで述べてきた我々の研究をはじめとして、ナノマテリアルの有害事象の特定や細胞内/生体内レベルでの局在解析が盛んに行われているが、ナノマテリアルと生体内蛋白質との相互作用やナノマテリアルの代謝と有害事象との関連など未知な部分が多く残されている。例えば、複数の研究者によってナノマテリアルのオプソニン化や血清中のたんぱく質との相互作用が要因となり、ナノマテリアルの生体内挙動などが変動する可能性が指摘されている。Lundqvistらはナノシリカとhuman carbonic anhydrase (HCA)との相互作用を詳細に解析しており、粒子表面の湾曲率がHCAの高次構造変化を引き起こすことを示している⁸。また、血液中に存在する蛋白質の中でも補体やイムノグロブリンといった免疫反応性蛋白質とナノマテリアルとの結合可能性も示唆されている⁹。これらの報告では、ナノマテリアルの投与（服用）が花粉症などのアレルギー疾患やリウマチをはじめとする自己免疫性疾患の発症・増悪を促進する可能性を指摘しているが、生体レベルでこれらの有害事象を実証するエビデンスは得られていない。一方で、生体内に到達したナノマテリアルの代謝に関する情報はほとんど得られておらず、ナノマテリアルの代謝経

路および代謝産物の有害性の情報収集も急務とされている。Fischer や Ballou らは、Q ドット誘導体の生体内運命を追跡し、投与一ヶ月後においても Q ドットがインタクトな状態で体内に残存し続けることを報告しているが、フラーレン、ナノシリカ、などその他のナノマテリアルの代謝・排出に関する情報は皆無である¹⁰。ナノマテリアルの代謝産物および分解産物が何らかの生物学的影響を発現する可能性は否定できない上、それらを予測することは非常に困難である。さらにナノマテリアルの代謝および排泄経路の特定は、実験動物で得られた毒性学的解析結果を高確度ヒトへ外挿するための重要な指針となり得るため、ナノマテリアルの代謝解析研究は、今後の非常に重要な検討項目である。

おわりに

本邦のナノテクノロジーは、開発面では世界トップレベルであると言われ、その有用性・革新性・経済効果といった「光」の部分のみが取り上げられているが、「闇」の部分ともいえるリスク評価に関する情報開示は極めて少なく、ナノリスク研究は欧米諸国に比べると立ち遅れ気味である。あらゆる物事に光と闇は付きものであるが、闇の克服は容易ではなく楽観視はできないであろう。今こそ我々は発想を転換し、ナノマテリアルを安全活用する方向性を見出していかなければならない。例えば、医薬品開発研究に見られる

様に、副作用は避けられないという大前提の下で薬効と安全性評価を一体化した研究開発を進め、メリットとデメリットをバランスにかけてメリットが大きい場合には実用化するという産業構造を模倣するのも一つの方向性である。

こういったナノリスク研究は、ナノマテリアルが人類の健康や環境に悪影響を与えること無く、人類の福祉・産業発展に資するテクノロジーとして社会に受容されるために必須のプロセスであり、今回紹介した我々の検討はほんの一例であるが、こういった地道なナノリスク研究から得られるデータが蓄積されることによって、ナノリスク評価の標準化、効果的なリスク予測・防護法の確立、さらには安全なナノマテリアルの使用・設計指針の策定につながるものと期待している。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金：化学物質リスク研究事業の支援の下に遂行された研究である。また、本総説で紹介した研究内容は、大阪大学大学院毒性学分野 教授 堤 康央先生の統括の下、大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野教授 中川晋作先生、同助教 向 洋平先生、大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子科学分野教授 八木清仁先生、同准教授 近藤昌夫先生、同助教 磯田勝広先生、をはじめとする多くの方々との連携によって得られた共同成果であり、この場をお借りして御礼を申し上げます。

References

1. Stern, S. T. & McNeil, S. E. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol Sci* 101, 4-21 (2008).
2. Poland, C. A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 3, 423-8 (2008).
3. Yamawaki, H. & Iwai, N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1495-502 (2006).
4. Wang, J. J., Sanderson, B. J. & Wang, H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 628, 99-106 (2007).
5. Foley, S. et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 116-9 (2002).
6. Wang, J. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett* 168, 176-85 (2007).
7. Chen, H. W. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J* 20, 2393-5 (2006).
8. Lundqvist, M., Sethson, I. & Jonsson, B. H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir* 20, 10639-47 (2004).

9. Reddy, S. T. et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol* 25, 1159-64 (2007).
10. Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P. & Waggoner, A. S. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem* 15, 79-86 (2004).

連絡著者情報

吉岡 靖雄：特任講師（常勤）
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 1-6
(Phone) : 06-6879-8177
(Fax) : 06-6879-8179
(E-mail) : yasuo@phs.osaka-u.ac.jp

◆略歴◆ 吉岡 靖雄 (Yasuo YOSHIOKA)

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・特任講師（常勤）。2004年大阪大学大学院薬学系研究科博士課程修了。薬学博士。国立医薬品食品衛生研究所 研究員を経て、2006年より現職。

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～

吉川 友章^{1,2}, 吉岡 靖雄^{2,3}, 角田 慎一^{2,3,4}, 堤 康央^{1,2,3}

1: 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

2: 独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト

3: 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

4: 大阪大学連携大学院 医薬基盤科学分野

連絡先 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野, Tel/Fax: 06-6879-8233

1 はじめに

近年、ナノテクノロジーが劇的に進展したことによって、素材の物性を 100 nm 以下のサイズで精密製造した素材、いわゆるナノマテリアルの開発が盛んに行われている。少なくとも一次元の大きさが 100 nm 以下になるように製造されたナノマテリアルは、特徴的な物性（サイズ、形状、表面性状など）を有しており、組織浸透性、電氣的・磁氣的・光学的特性などの点において、これらの物性を反映した従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる新しい機能を発揮する。このことから、ナノマテリアルは、化粧品・食品・医薬品・電子部部分野をはじめとして、領域横断的に種々の産業に革命を起こす新素材になり得るものと期待されている。しかしながら、最近になってナノマテリアルの革新的機能が、逆に人体にとって好ましくない影響（NanoTox）を発揮する可能性が指摘され始めており、ナノマテリアルの安全性に対する不安が高まりつつある。化粧品関連産業だけを見ても、100 nm 以下の非晶質シリカ（ナノシリカ）や酸化チタン（ナノ酸化チタン）を配合した製品が既に実用化されていることや、化粧品用途の新たなナノマテリアルが続々と開発されつつあることなどを鑑み

ると、我々は既に、製造現場や環境中に放出されたナノマテリアルに対する非意図的な曝露に加え、医薬品・化粧品・食品中のナノマテリアルに対する意図的な曝露を避け得ない。このため、OECD や ISO といった国際機関は、本邦を含めた主要各国と連携してナノマテリアルの安全性情報の収集や安全性試験などを進めている。また、特に海外の事業者は、大手企業を中心にナノマテリアルの取り扱いに関する行動規範や技術指針の策定、安全性評価、情報発信などを自主的に進めている。しかしながら、現状では、ナノマテリアルによる人の健康や環境に対する影響、人の体内や環境中での挙動が十分には明らかになっていないため、各機関・企業による自主的なナノマテリアルの安全性対策活動が消費者の不安を無闇に煽ることになりかねない。このように、ナノマテリアルの安全性に関する科学的根拠が未解明な状況が続くことによって、ナノマテリアルの生産・利用の自粛やそれを反映したナノマテリアル産業の発展阻害を招き、最終的に消費者がナノマテリアルによって得られる便益を十分に享受できない恐れがある。そこで本稿では、ナノマテリアルの安全性評価に関する現状を概説し、安全なナノマテリアルを開発する上で解決すべき技術的課題について紹介する。

2 ナノマテリアルの安全性評価の現状と体内動態解析の重要性

ナノマテリアルは、明確かつ世界共通に定義されているわけではないが、“元素等を原材料として製造された固体状の材料であって、大きさを示す三次元のうち少なくとも一つの次元が1 nm ~ 100 nm である物質およびこれによって構成される凝集体”，と定義されることが多い。OECD や ISO 主導の下で実施されている現在のナノマテリアルの安全性評価研究においては、一次粒子径等の物性を意図的にナノサイズ（1 nm ~ 100 nm）に制御し、それによって特有の機能を発揮するナノマテリアルを対象としている。これら OECD 等による検討においては、特に、生産量が一定量以上であり、将来的に生産量が増加する可能性が高いと考えられているカーボンナノチューブ、カーボンブラック、酸化チタン、フラーレン、酸化亜鉛、非晶質ナノシリカなどに関する対応を重要視している。表1には、経済産業省による報告を元に主要なナノマテリアルの国内生産量と主な用途を一部改変して示した¹⁾。表1を見ても明らかのように、生産量ではカーボンブラックが圧倒的に多く、非晶質ナノシリカが数万トン、二酸化チタン、酸化亜鉛、カーボンナノチューブが数十トン~数百トンの生産量を誇り、フラーレンの年間生産量は数トン程度である。最も生産量が多いナノマテリアルであるカーボンブラックは、着色剤やゴムの補強剤などの幅広い製品に配合される主要な素材である。それに対して、非晶質ナノシリカ、酸化チタン、酸化亜鉛が、インクや合成ゴムのような産業製

品のみならず、化粧品や食品などの人体に直接適用する製品中に配合されている点は、安全性確保の優先順位を決定するに当たって極めて留意すべき特徴である。周知の通り、酸化チタンや酸化亜鉛、非晶質ナノシリカなどの微粒子素材は、それぞれ流動化剤や紫外線遮蔽剤（日焼け止め）として有用な機能を発揮し、化粧品の基材としては必要不可欠な素材である。当初は、これらの素材は数百 nm ~ 数十 μm の大きさを利用されていたようである。しかし、粒子の大きさをナノサイズにすることによって、これらの素材はサイズ減少効果に基づく使用感や透明性の向上効果、あるいは比表面積の増大による紫外線遮蔽能の増強効果などが得られるため、年を追う毎にサイズの微少化が進み、今や数 nm ~ 数十 nm の素材が実用化されている。これらの事から、ナノマテリアルが消費者の想像以上に我々の生活に密着した素材であること、特にナノマテリアルが人体に直接適用する製品に配合されている点は見逃せない事実である。このような状況の中、近年、遺伝子改変マウスなどを用いた安全性試験から、カーボンナノチューブ（CNT）がアスベスト様の発がん性を示す可能性があることなど、様々なナノマテリアルに関して、ヒトの健康を確保する上で軽視できない事実が続々と報告されている。以下に、電子部品等の新素材として期待されているカーボンナノチューブや、化粧品中の紫外線遮蔽剤として利用されている酸化チタンに関する安全性評価研究の一部を紹介する。

2008年にDonaldsonらは、CNTがアスベストと同様に中皮腫の発症の原因となり得るなど、遺伝毒性・発

表1 主なナノマテリアルの生産量と用途

経済産業省のホームページから一部改変して転載

物質名	国内生産量	用途
カーボンナノチューブ	120-140 t	電子材料
カーボンブラック	80 万 t	タイヤ、自動車部品等
二酸化チタン	1450 t	化粧品、光触媒等
フラーレン	2 t	化粧品、スポーツ用品等
酸化亜鉛	480 t	化粧品等
シリカ	9 万 t	食品、化粧品、インク、合成ゴム、タイヤ等

がん性を有している可能性を報告した²⁾。彼らは、長さの異なる多層CNTあるいはアスベストをマウスの中皮胸膜に投与したところ、長繊維状の多層CNT適用群においてはアスベストと同様に肺の自浄が効かず、炎症や組織傷害が認められたと報告している。彼らは、この報告の中で、今回のマウスモデルで認められた病変は中皮腫のような発がんに関与する可能性があると指摘している。実際、菅野らがMWCNTを癌抑制遺伝子(p53)ヘテロノックアウトマウスに腹腔内投与することによって中皮腫が誘発されることを報告している³⁾。その一方で、酸化チタンは、塗料、プラスチック、化粧品や食品など数多くの製品に配合される汎用性の高い素材である。化粧品の原料としての酸化チタンは、酸化亜鉛と同様に1970年代ころから使用されてきた素材として知られている。これらの素材は、表面被覆力や紫外線散乱効果に優れているため、主にファンデーションや日焼け止め製品に配合されている。近年のナノテクノロジーの発展も相まって、粒子サイズをより微小化する検討が進み、直径50 nm前後の酸化チタンや酸化亜鉛が化粧品に配合されるようになった。これらの素材を配合した日焼け止めは、塗布した際に肌が白浮きしにくく、使用感に優れた製品として非常に市場価値が高い。酸化チタンや酸化亜鉛は、粒子サイズをナノメートルサイズに微小化することによって透明性や機能を向上することが可能であるため、今後もより微小化した素材の開発が進むものと予想される。こうした中、2003年にNEWS WEEK誌にてナノメートルサイズの酸化チタンや酸化亜鉛を含有した日焼け止めの安全性を懸念する記事が掲載されたことを発端に、ナノマテリアル含有化粧品の安全性が社会的に取り立たされた。実際に多くの科学誌に、酸化チタンが細胞傷害性・起炎性を示すことや、経鼻投与後にマウスの脳に蓄積して酸化ストレス等を誘発することなどが報告されている⁴⁾。CNTや酸化チタンの安全性に関するこれらの報告は、確かにこれらのナノマテリアルがハザード(危害要因)になり得る可能性を示すものである。しかしながら、CNTの例を見ても明らかなように、高濃度直接曝露という非現実的な曝露経路による実験であることや、遺伝子欠損マウスを用いた検討であることなどから、ヒトへの外挿性などを含めて慎重に解釈すべ

きである。また、CNTや酸化チタン等を含めて、現状のナノマテリアルの安全性評価研究は、過剰な量の検体を適用して現象論的に示したに過ぎないため、これらの結果のみを材料に安全性を判断することは非常に困難である。

以上、CNTや酸化チタンを例にナノマテリアルの安全性評価の現状を紹介し、今後の安全性試験においては、検体の投与量や実験系についてより慎重に精査して現実的な試験系を適用する必要があること、現状の研究結果がハザード同定のみ偏重していることなどを述べた。周知の通り、ナノマテリアルを含む化学物質のリスクは、曝露とハザードの論理積で表される。すなわち、如何なる物質でも曝露されない限り、その物質のリスクは存在しない。ナノマテリアルの曝露を考えてみた場合、粒子サイズが微小化することによって組織浸透性が高まる可能性が指摘されていることから、肺や皮膚といった曝露局所のみならず、体内吸収された場合には血中に循環してあらゆる組織に直接的に曝露する可能性がある。従って、ナノマテリアルのリスクを評価するに当たっては、曝露局所や体内吸収性を含めた“曝露実態”の評価が必要不可欠である。例えば、化粧品工業連合会等の聞き取り調査によると、化粧品中に含まれているナノ酸化チタンや酸化亜鉛等に関しては、皮膚局所における安全性試験は既に実施されており、安全性が担保されているようである。また、経皮吸収性に関しては、ヒト三次元培養皮膚やブタを用いた実験が実施されており、これらの検討では経皮適用後に体内に吸収された事例は報告されていない。しかしながら、一般に酸化チタンや酸化亜鉛は凝集性が極めて高いことが知られており、これらの検討は数 μm サイズに凝集した素材の体内吸収性を評価した結果であると予想される。すなわち、ナノマテリアルの曝露実態評価の現状は、分散性が高いナノメートルサイズの素材に関する情報が世界的に見ても圧倒的に不足しているのが現状である。昨今では、ナノマテリアルのナノサイズであるが故の機能性を最大限に活用するため、分散性に優れた“二次粒子径もナノサイズ”であるものが開発、実用化されていること、また体内に侵入したナノマテリアルは体内成分と相互作用して様々な分散状態を呈する可能性が考えられるため、ナノマテリ

アルの体内吸収性を評価するに当たってはこれらの点に十分に注意して、分散性の高い検体を用いた解析が必要である。以上の知見を総合して、筆者らは安全なナノマテリアルの開発支援を目的として、エネルギー分散形X線元素分析装置や誘導結合プラズマ質量分析法などの微量元素分析装置を適用した種々ナノマテリアルの曝露実態（体内吸収性・体内動態・細胞内動態）の定量的解析を推進している。筆者らは、これらの検討を通じて、①我々が日常生活において曝されているナノマテリアルの量や、②曝露したナノマテリアルの体内吸収量などを定量化し、③ハザード発現との関係を精査している。将来的には、①②③の情報を基盤として、無作用量や無毒性量、一日最大許容量などをはじめとするナノマテリアルのリスク管理に必須の科学的根拠を提供できるものと期待している。

3 安全なナノマテリアルの設計に向けて

筆者らはこれまでに、表面修飾などの物性を最適化することでナノマテリアルの体内動態特性が劇的に変化し、安全性を高度に確保出来ることを見出している。これらの事実を踏まえて、筆者らは、安全なナノマテリアルの設計指針を策定するためには、ナノマテリアルの体内動態に関する定量的な情報の収集が必要不可欠であること、ならびに体内動態を規定するナノマテリアルの物性に関する詳細な情報の収集、さらにはこれらの連関情報を体系化して具体的な設計指針としてまとめる作業が必要であるものと考えている。しかしながら、世界的に見てもこれら三点に関する確度の高い情報は殆ど得られていないのが現状である。具体的には、ナノマテリアルの体内動態情報の定量化や、より多角的な物性情報の収集が、世界的に見ても圧倒的に不足している。筆者らは、こういったナノマテリアルの安全性確保における技術的ボトルネックの解決を目指して、顕微分析や電子スペクトル解析、X線分光解析をはじめとする様々な機器分析を活用したナノマテリアルの物性・体内動態評価を進めている。本稿では、紙面の都合上、ナノマテリアルの物性情報収集における原子間力顕微鏡の可能性について紹介する。

筆者らが明らかにしたように、ナノマテリアルの表面性状は安全性に著しく影響し、ナノマテリアル自身の力学的・熱的・電氣的・磁氣的・光学的な性質にも大きく影響するものと考えられる。すなわち、ナノマテリアル表面の微細構造（凹凸や微細孔など）や表面に露出した官能基や元素の特定は、安全なナノマテリアルを設計する上で極めて重要な情報になる。これらの情報を得る上で、筆者らは原子間力顕微鏡（Atomic force microscopy；AFM）や走査型トンネル顕微鏡（scanning tunneling microscopy；STM）が極めて強力なツールとなり得るものと考えている。走査型プローブ顕微鏡の一つであるAFMは、先端を鋭く加工した探針（プローブ）を使って、試料と探針の原子間に働く力（原子間力）を検出して画像を得る装置である。筆者らのこれまでの検討では、ナノマテリアルの一次粒子径や形状を評価するために電子顕微鏡を用いた解析を進めてきた。本解析法は、観察試料を作製するために物理的・化学的な前処理が必要であるため、生理的条件下での表面物性を観察することが出来ない点が問題であった。それに対して、AFMは、原理上、動作環境やサンプル表面物性への制約が殆どなく、プローブ先端とサンプル表面との相互作用が及ぶ条件であれば、気相中、液相中、真空中など種々の環境下で測定することができる。すなわち、AFMを用いることで、特定の生理的条件下を再現した解析が可能な点で電子顕微鏡とは異なる情報を得ることが出来る。また、AFMはナノスケールのイメージングのみではなく、弾性、摩擦力、分子間／分子内相互作用の強度といった対象試料の持つ様々な特性を定量的な情報として得ることが可能であり、これらの力学的情報もこれまでとは異なる視点の物性情報として有用である。一方でAFMは、測定に時間がかかることや、表面の形状は観察できるものの、原子・分子の種類を区別することができないため、全く無関係な不純物を観察してしまうことがあるなどいくつかの欠点を抱えており、これらの点は高精度の物性情報を得るために注意すべき点である。しかしながら、最近では元素に特有の力学的性質を利用することによって、試料表面に露出した化学種の官能基（疎水性のCH₃や親水性のCOOHなど）や原子を特定出来る新しい手法が開発されつつある⁵⁾。現在、筆者らはTEM、