

201236006B(3/2)

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立とヒト健康影響情報の集積

平成 22～24 年度 総合研究報告書
(2/2)

研究代表者 堤 康央

平成 25 (2013) 年 5 月

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

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	亘理文夫 (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	2010	44-53
平井敏郎, 吉岡靖雄, 堤康央	ナノカーボンDDSの可能性と安全性.	永井恒治, 岡田弘晃	ドラッグデリバリーシステムの新展開Ⅱ -核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支えるDDS技術-	シーエムシー出版	日本	2011	242-247
市橋宏一, 平井敏郎, 吉岡靖雄, 堤康央	ナノ安全科学研究の最前線		世界の化学製品規制・ルールの解釈とその違反回避のための実務	株式会社技術情報協会	日本	2012	379-383
東阪和馬, 堤康央	ナノDDSの安全性評価・確保の現状と今後	中川晋作	DDSの人体・環境・ものづくりへの適用技術	BKC	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., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S..	Titanium dioxide induces different levels of IL-1 β production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B	Biochem. Biophys. Res. Commun.	392(2)	160-165	2010
Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells	Pharmazie	65(3)	199-201	2010
Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape.	Inflammation	33(4)	276-280	2010
Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.	The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture.	Biomaterials	31(26)	6833-6842	2010

Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.	Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties.	Pharmazie	65(8)	596-599	2010
Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y.	Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials.	Biomaterials	32(1)	3-9	2011
Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application.	Biomaterials	32(11)	2713-2724	2011
Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes.	Part. Fibre. Toxicol.	8	1	2011

Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y.	Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice.	Nature Nanotechnology	6(5)	321-328	2011
Li X., Kondoh M., Watari A., Hasezaki T., Isoda K., Tsutsumi Y., Yagi K.	Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice.	Pharmazie	66(4)	282-286	2011
Isoda K., Hasezaki T., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K.	Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury	Pharmazie	66(4)	278-281	2011
Nabeshi H., Yoshikawa T., Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages.	Nanoscale Res Lett	6	93-98	2011
Yoshida T., Yoshioka Y., Fujimura M., Yamashita K., Higashisaka K., Morishita Y., Kayamuro H., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Promotion of allergic immune responses by intranasally-administered nanosilica particles in mice.	Nanoscale Res Lett	6	195-200	2011

Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y.	Size-dependent immune-modulating effect of amorphous nanosilica particles.	Pharmazie	66	727-728	2011
Nabeshi H., Yoshikawa T., Akase T., Yoshida T., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Yamashita T., Higashisaka K., Morishita Y., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Effect of amorphous silica nanoparticles on in vitro RANKL-induced osteoclast differentiation in murine macrophages.	Nanoscale Res Lett	6	464-468	2011
Morishita Y., Yamashita K., Yoshikawa T., Terada Y., Nabeshi H., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y.	Detection of titanium dioxide particles on frozen tissue sections using synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis.	Pharmazie	65	808-809	2011
Hasezaki T., Isoda K., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K.	Hepatotoxicity of silica nanoparticles with a diameter of 100 nm.	Pharmazie	66	689-703	2011
Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Kondoh M., Yagi K., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Well-dispersed amorphous nanosilicas induce fatal toxicity and consumptive coagulopathy after systemic exposure.	Nanotechnol	23	1-8	2012

Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Ichihashi K., Uji M., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection.	Part Fibre Toxicol	9	3	2012
Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Narimatsu S., Yao X., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.	Suppression of nanosilica particle- induced inflammation by surface modification of the particles.	Arch Toxicol	86	1297-307	2012
Morishita Y., Yoshioka Y., Satoh H., Nojiri N., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Distribution and histological effects of intravenously administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	420	297-301	2012
Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y.	Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days.	Pharmazie	67	742-743	2012
Yoshida T., Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y.	Amorphous nanosilica particles induce ROS generation in Langerhans cells.	Pharmazie	67	740-741	2012
Nagano T., Yoshioka Y., Higashisaka K., Kunieda A., Hata K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Potential of acute-phase proteins as biomarkers for sub-nano platinum exposure.	Pharmazie.	67	958-959	2012

Hirai T., Yoshioka Y., Takahashi H., Ichihashi K., Yoshida T., Tochigi S., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	427	553-556	2012
Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Pan H., Ogura T., Nagano T., Kunieda A., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Hemopexin as biomarkers for analyzing the biological responses associated with exposure to silica nanoparticles.	Nanoscale Res. Lett.	7	1-9	2012
Yoshida T., Yoshioka Y., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Hirai T., Kondoh S., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Surface modification of amorphous nanosilica particles suppresses nanosilica-induced cytotoxicity, ROS generation, and DNA damage in various mammalian cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	427	748-752	2012
Yamashita K., Yoshioka Y., Pan H., Taira M., Ogura T., Nagano T., Aoyama M., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda SI., Aoshima H., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone e-wrapped fullerene C60 after oral administration.	Pharmazie.	68	54-7	2013
Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K.	Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice.	Pharmazie.	68	178-182	2013
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(4)	44-48	2010

Nabeshi H., Yoshikawa T., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Safety Assessment of Nanomaterials Using Toxicokinetics and Toxicoproteome Analysis.	Yakugaku Zasshi	130(4)	465-470	2010
堤 康央	ナノマテリアルのヒト健康への影響	阪大 NEWS LETTER	48 (6)	19	2010
吉川友章, 吉岡靖雄, 堤康央	革新的技術/素材の恩恵を最大限に享受した豊かな社会の構築に向けて ~ナノマテリアルの安全性確保基盤の構築を例に~	生産と技術	6(4)	52-56	2010
Yoshioka Y., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Nano-safety science for assuring the safety of nanomaterials.	Nippon Eiseigaku Zasshi	65(4)	487-492	2010
Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Recent topics of NanoTox studies for their safety - Foreword-.	Yakugaku Zasshi	131(2)	193-194	2011
Tsunoda S.	Transdermal penetration and biodistribution of nanomaterials and their acute toxicity in vivo.	Yakugaku Zasshi	131(2)	203-207	2011
Yoshikawa T.	Development of NanoSafety forecasting system from the viewpoint of nanomaterial-protein interaction.	Yakugaku Zasshi	131(2)	209-213	2011
Abe Y.	Safety studies of nanomaterials about intracellular distribution and genotoxicity.	Yakugaku Zasshi	131(2)	215-219	2011
Yoshioka Y.	NanoSafety studies of nanomaterials about biodistribution and immunotoxicity.	Yakugaku Zasshi	131(2)	221-224	2011

Nagano K.		Biodistribution of nanosilica particles in pregnant mice and the potential risk on the reproductive development.	Yakugaku Zasshi	131(2)	225-228	2011
Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.		Safety evaluation of study of nanomaterials aimed at the promotion of the social reception.	Gene. Environ. (Genes and Environment)	33	21-26	2011
鍋師裕美, 吉岡靖雄, 吉川友章, 堤 康央		食品分野におけるナノテクノロジーの安全性.	食品衛生研究	61	27-34	2011
東阪和馬, 堤 康央		ナノ安全科学研究の最前線.	月刊『化学』(株式会社化学同人)	66	72-73	2011
森下裕貴, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央		化粧品分野におけるナノマテリアルの安全性に関する国内外の報告.	コスメティックステージ	5	45-49	2011
Tsutsumi Y., Yoshioka Y.		Quantifying the biodistribution of nanoparticles.	Nat. Nanotechnol	6	755	2011
Yoshida T., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.		Relation analysis between intracellular distribution of nanomaterials, ROS generation and DNA damage.	Yakugaku Zasshi	132	295-300	2011
Yamashita T., Yamashita K., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y.		Carbon nanomaterials: efficacy and safety for nanomedicine.	Materials.	5	350-363	2012
永野貴士, 堤 康央, 吉岡靖雄		安全なナノマテリアルの開発に資するナノ安全科学研究の最前線	感染炎症免疫	42	72-74	2012
Yoshida T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.		The safety assessment of nanomaterials for development of nano-cosmetics.	Yakugaku Zasshi	132	1231-6	2012

吉岡靖雄, 堤 康央	ナノ安全科学研究の 最前線	CICSJ Bulletin		50-52	2012
Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Resent topics on development of nanomaterials and nano-safety science.	Yakugaku Zasshi	133	149-150	2013
Yoshioka Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Tsutsumi Y.	Recent topics about nano-safety science and its future.	Yakugaku Zasshi	133	169-74	2013

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連関追求

大阪大学 大学院 薬学研究科

吉川 友章

堤 康央

大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター

吉岡 靖雄

(独)医薬基盤研究所

角田 慎一

『ナノ材料のリスク評価と安全性対策』

2010年6月 フロンティア出版刊 抜刷

3 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

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

3.1 はじめに

近年のナノテクノロジーの発展も相俟って、ナノマテリアルを配合した化粧品や食品、医薬品など、数多くの製品が既に実用化・上市されている。ナノマテリアルは、特徴的な物性(サイズ減少効果など)によって、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる機能(組織浸透性、電氣的・磁氣的・光学的特性など)を発揮するため、種々の産業に革命を起こす新素材として、分野・領域横断的に期待されている。事実、化粧品関連産業だけでも、ナノシリカやナノ酸化チタンといったナノマテリアルが、世界で年間約 2000 トンも使用されていること、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、今やナノマテリアルは、産業界のみならず、我々の生活にも不可欠な素材となっている。視点を変えると、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とを示している。

一方で、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がアスベスト様の発がんリスクを有するなど、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^{1,2)}。そのため昨今では、ナノマテリアルはヒトにとって有用な“光”の側面と、望ましくない“闇”の側面を併せ持つこと、即ち、二面性を呈することが世界的に認識されつつある^{3~6)}。ナノマテリアルの開発や実用化は日進月歩の目覚ましい勢いで進展しているものの、残念ながら、ナノマテリアルの安全性研究は、殆ど省みられておらず、世界的にみても大きく立ち後れている。

そのため、最近になってようやく、世界経済協力機構(OECD)の主導のもと、ナノマテリアルの安全性確保や規制に向けたスポンサーシッププログラムが世界規模で開始された。本プログラムにおいて我が国は、日本国内産業で主要な位置を占めるナノマテリアルについて可能な限り多くの安全性情報の提示を求められているものの、我が国のナノマテリアルの安全性評価は、欧米各国に比べ、特に遅れている。また、NanoTox 研究を行ううえで考慮すべき点は、

* 1 Tomoaki YOSHIKAWA 大阪大学 大学院 薬学研究科 毒性学分野 助教

* 2 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

* 3 Shin-ichi TSUNODA (独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト サブプロジェクトリーダー

* 4 Yasuo TSUTSUMI 大阪大学 大学院 薬学研究科 毒性学分野 教授

例えば医薬品・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わたって曝露され続けることにある。そのため、ナノマテリアルがごく僅かでも体内に吸収され、長期にわたって蓄積され続けると、過去の多くの事例が物語っているように、安全性に大きな問題を招きかねない。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、肝心の“体内吸収性や体内/細胞内動態に関する情報”は、世界的に枯渇しており、まさに空洞化状態にある。これは、一般に低分子量の化学物質の場合は曝露と吸収がほぼ同義で捉えられているのに対して、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材で積み重ねられてきた知見に基づき、ナノマテリアルの場合でも曝露されても吸収されるはずがないだろうという誤った認識にも大きく影響されている。これは、一次粒径が 100 nm 以下であっても、多くのナノマテリアルは実用条件下で凝集体(あるいは成形)となり、その二次粒径がサブミクロンサイズになっていることに起因する。しかし昨今では、ナノマテリアルのナノメートル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“二次粒径もナノメートルサイズ”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、様々な分散状態を呈することに、我々は注意なくしてはいけない。即ち、このままでは、ナノマテリアルの体内吸収性/生体内動態に関する検討がなされぬまま、科学的根拠に乏しい使用規制がむやみに施行されてしまい、ナノマテリアルの有用性を享受した豊かな社会の構築や産業発展が阻害されてしまいかねない。従って、我が国の知的財産を確保しつつ、ヒトの健康を確保していくためには、ナノマテリアルの二面性(NanoTox)を解析・理解した上で、科学的根拠に基づいてナノマテリアルの安全性を確保することが急務となっており、本観点での NanoTox 研究は、2008 年 9 月にスイス(チューリッヒ)で開催された国際ナノ毒性会議でも明らかなように、国内外を問わず、皆無に等しい。

以上の背景を踏まえて筆者らは、最も汎用されているナノマテリアルの一つである非晶質ナノシリカの①体内吸収性と体内/細胞内動態の解析、②実験動物を用いたハザード評価、③ NanoTox 発現機構の解析を統合的に推進している(図 1)。これら①~③の情報の連関から、ナノマテリアルの物性(サイズ;二次粒径,表面電荷,親/疎水バランス,形状など)と安全性の因果関係を明確化することができれば、最終的にナノマテリアルの物性から安全性を予測する方法の確立や有効かつ安全なナノマテリアルの設計指針の策定に繋がり、安全なナノマテリアルの開発と実用化の支援、ヒトの健康環境の確保に貢献できるものと考えている。既に筆者らは、所謂サブミクロンサイズよりも小さな非晶質ナノシリカ(直径 100 nm 以下)が、経皮吸収性や体内/細胞内動態、種々安全性の点で、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは決定的に異なる特性を発揮することを見出している(表 1)¹⁹⁾。本稿では、この表 1の中から、非晶質ナノシリカの粒子サイズと動態(経皮吸収性や体内/細胞内動態)、安全性の連関に焦点を

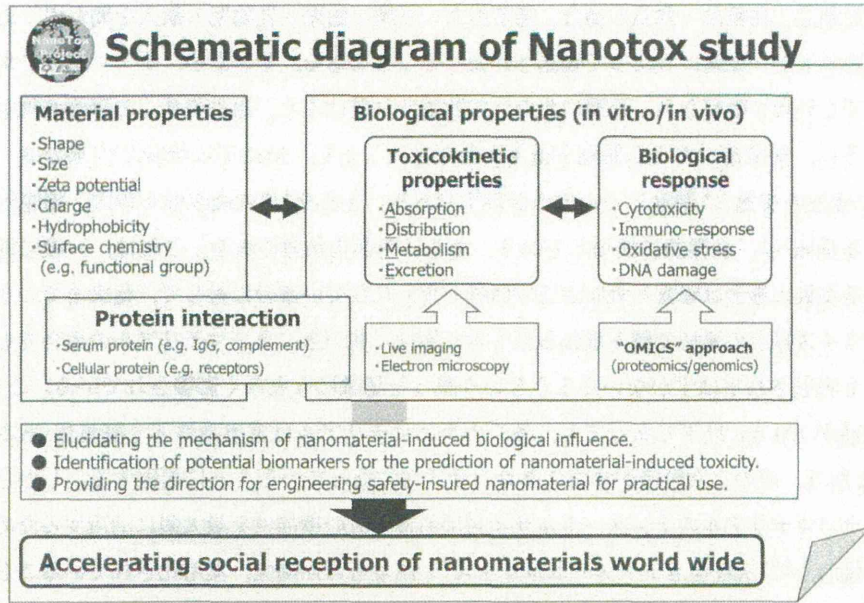


図1 NanoTox 研究戦略

表1 nSP70 の生体内 / 細胞内動態と生体影響

局在	生体影響
皮膚 ^a	表皮および真皮層にまで到達。皮膚バリアを透過した後血中へ移行。
肝臓 ^b	肝クッパー細胞や肝実質細胞に蓄積。急性肝毒性や肝実質細胞におけるDNA傷害を誘発。
<i>In vivo</i> 脳 ^{a, b}	経皮塗布後に脳に蓄積。脳細胞に対する増殖阻害や脳内における炎症性サイトカイン産生を誘発。
脾臓 ^b リンパ節 ^a	免疫担当組織である脾臓やリンパ節にも蓄積したことから、免疫学的な生体影響の誘発が懸念される。
子宮 ^b 胎児 ^b	早産や胎児の発育阻害を誘発。
<i>In vitro</i> 核 核小体	核膜透過性や核小体への蓄積性を示す。DNA傷害を誘発。

本表で示した現象はnSP70を曝露したマウスにおいてのみ観察された。また、これらの解析はnSP70を経皮塗布(a)あるいは尾静脈内投与(b)したマウスを用いて実施した。

絞って紹介する。

3.2 非晶質ナノシリカの物性と経皮吸収性との関連評価

非晶質ナノシリカは、数あるナノマテリアルの中でもカーボンブラックに次いで生産量が多

い素材であり、医薬品や食品、化粧品など、ヒトに直接適用する分野では、最も使用されている。ナノシリカの用途は非常に幅広く、ファンデーションやクリーム剤、乳液などの化粧品を中心に、直径 100 nm 以下の素材が汎用されている。さらに、歯磨き粉や歯の充填剤といった歯科治療用途、固結防止剤として食品中にも多く含まれており⁹⁾、非晶質ナノシリカの市場規模は 30 億ドルにも及ぶ。また、従来までのナノシリカは凝集性に富んでおり、実際の使用条件下ではサブミクロンサイズ以上の凝集塊を形成していた。しかし、ナノシリカは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、この数年でナノシリカのサイズダウンや分散性を向上する技術の開発が加速度的に進展しており、現在では、直径が 25 nm 程度のもので開発されつつある。一方で、先述した NanoTox に対する懸念の高まりを受けて、非晶質ナノシリカについても、身近な素材であるが故に安全性の再評価が進められている。2006 年の ECETOC (欧州化学物質生態毒性及び毒性センター) によれば、サブミクロンサイズ以上のシリカ(一次粒径は 100 nm 以下であっても、凝集体として、サブミクロンサイズ以上になるナノシリカを含む)の安全性に問題はないと報告されている¹⁰⁾。しかし、この報告は、昨今の分散性に優れた 100 nm 以下のナノシリカの安全性を保証するものではない。即ち、ナノマテリアル産業の将来を見据えると、より分散性が高く直径 100 nm 以下の素材を用いて、物性や動態、安全性の点におけるナノマテリアルとマイクロメートルサイズの素材の違いを明確化する必要があるものと考えられる。

先述したとおり、ナノマテリアルの安全性やリスクを評価するための第一歩は、経皮あるいは経口/経肺経路で曝露されたナノマテリアルが体内に吸収され、臓器蓄積性を示すか否かを検討することである。そこで本研究では、分散性が極めて高い表面未修飾非晶質ナノシリカを用いて、経皮吸収性・体内動態・細胞内動態と粒子サイズとの連関を検討した。筆者らは一次粒径が 70 nm (nSP70), 300 nm (nSP300), 1000 nm (mSP1000) のものを実験に用いている(現在は、30 nm, 50 nm の nSP も使用しているが、これらに関しては今後、報告させて頂く)。図 2 に表面未修飾のシリカの透過型電子顕微鏡(TEM)写真を示す。いずれの粒子も非常に滑らかな形状をした粒子であり、一次粒径もカタログ値とほぼ同等であった。また、動的光散乱法を用いて平均二次粒径を測定した場合でも、カタログ値とほぼ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。続いて、nSP70, nSP300, mSP1000 をマウス耳介に塗布した際の経皮吸収性を評価した。各シリカを BALB/c マウスに 5 日間あるいは 28 日間連続経皮塗布し、投与局所および所属リンパ節、主要組織の TEM 観察を行った。その結果、nSP70 が角質層を通過して表皮や真皮層にまで到達し、さらに興味深いことに、nSP70 塗布マウスの脳アストロサイト、脳血管内皮細胞内に nSP70 が蓄積することが明らかとなった(表 1)。なお、筆者らは、従来までのサブミクロンサイズ以上の

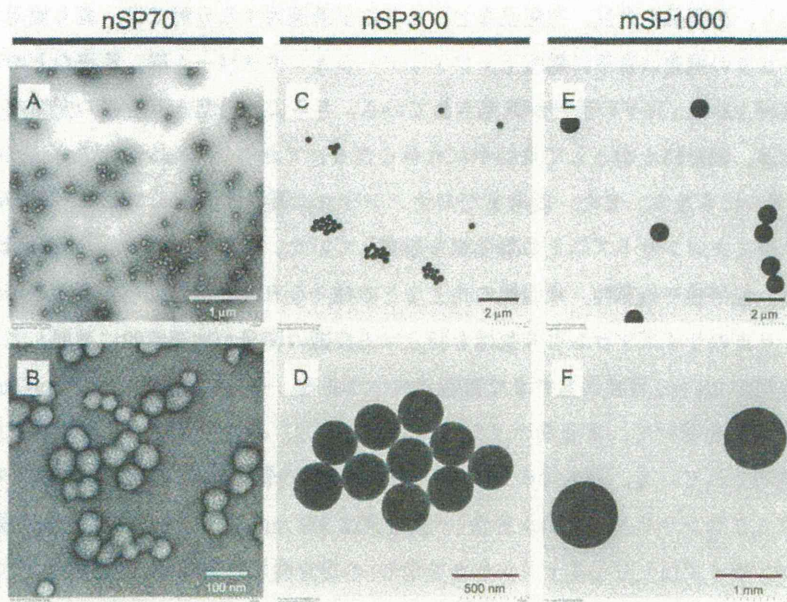


図2 非晶質シリカの電子顕微鏡写真

(A and B) 直径 70 nm のシリカ (nSP70), (C and D) 直径 300 nm のシリカ (nSP300), (E and F) 直径 1000 nm のシリカ (mSP1000).

シリカである nSP300 や mSP1000 は、表皮層にすら到達しないことを確認している。これまでも、直径が数百ナノメートルのナノ粒子が体内に侵入した後に脳内に蓄積する可能性がいくつか報告されている。例えば、Wang らは、鼻腔内投与したナノ酸化チタンが脳内に蓄積し、脳組織内での酸化ストレスや炎症の増悪を誘発することを報告している¹¹⁾。また、Takeda らは妊娠マウスに皮下投与した酸化チタンが胎仔の脳内に蓄積して脳細胞にアポトーシスを誘導することを報告している¹²⁾。しかしながら、非晶質ナノシリカが経皮塗布後に体内吸収性や脳内蓄積性に関する検討は世界的に見ても報告はない。非晶質ナノシリカが非常に強固な皮膚角質バリアを通過して脳内蓄積性を示すという事実は非常に興味深い結果であり、少なくともこれらの事実は、ナノシリカの経肺・経口曝露後の安全性評価の重要性や、脳神経/免疫学的な安全性評価の必要性を示している。現在、筆者らは安全性評価において最も重要な経皮吸収量(曝露量)の評価を進めると共に、皮膚透過機構の解析や皮膚局所における安全性評価を推進している。

3.3 非晶質ナノシリカの体内動態と急性毒性の評価

前項において分散性の高い非晶質ナノシリカが経皮吸収される可能性が示唆されたため、次

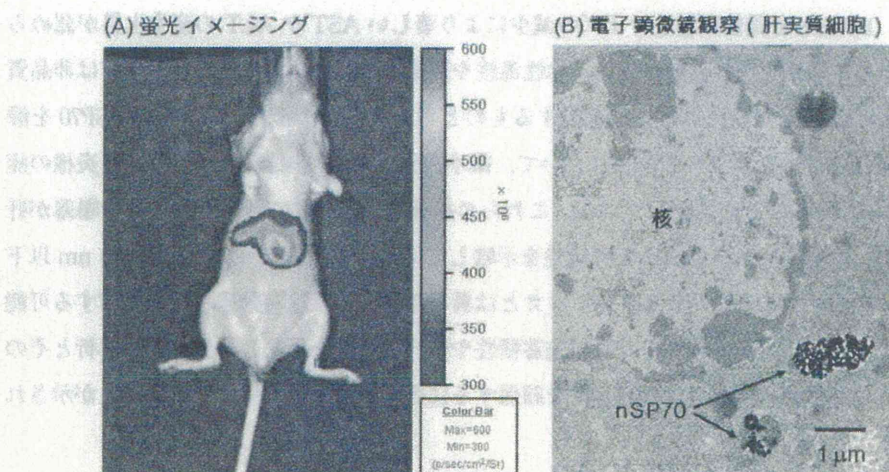


図3 nSP70の体内動態解析

DY676で標識したnSP70(7×10^{10} 個)をBALB/cマウス(雌, 8週齢)の尾静脈内より投与した。投与24時間後にXenogen IVIS 200を用いてnSP70の局在を蛍光イメージングにより解析した(A)。また, 同様にnSP70を投与したマウスから肝臓を回収し, 電子顕微鏡を用いてnSP70の肝臓内局在を観察した。

に各ナノシリカを尾静脈内より投与したマウスを用いてナノシリカが全身循環した際の動態および生体影響を評価した。まず, 種々の粒子径の非晶質ナノシリカの生体内動態を蛍光イメージングならびにTEM解析により評価したところ, nSP300とmSP1000は胆嚢に局在し, 一方でnSP70は肝臓全体へ速やかに分布することが明らかとなった(表1, 図3)。また, nSP300とmSP1000は, 肝実質細胞には殆ど移行せず, 一方で粒子径70 nm以下になると肝実質細胞へ移行し, 最終的に核内にまで到達

した。続いて, 各シリカを2 mg/headで尾静脈内投与した際の急性毒性試験を実施した。nSP300やmSP1000を静脈内投与したマウスにおいては急性毒性や肝毒性は全く認められなかったのに対して, nSP70投与マウスは投与後12時間以内に全例が死亡した(表2)。これらのマウスから回収した血液中の肝障害マーカーを測定し

表2 非晶質シリカの急性毒性試験

群	生存率(%)	ALT値 ^a (IU ^b /L)
コントロール	100	27.6 ± 21.3
nSP70	0	1640.4 ± 569.6*
nSP100	60	71.6 ± 10.8
nSP300	100	35.0 ± 2.4
mSP1000	100	32.4 ± 2.59

生存率は非晶質シリカ投与24時間後に評価した。また, 血漿中ALTレベルの測定は, 非晶質シリカ投与6時間後に回収した血漿を用いて実施した。

1: Alanine aminotransferase

2: International Unit

*: p<0.01 vs Control (PBS) (ANOVA)

たところ、100 nm を閾値に粒子サイズの減少により著しいASTやALTの産生上昇が認められた。これらの結果を重ね合わせると、急性毒性や肝障害性といった生体影響の違いは非晶質ナノシリカの体内分布特性の差異に起因するものと考えられた。また、筆者らはnSP70を静脈内より頻回投与したマウスの肝臓において、微小肉芽の形成や線維化といった“肝炎様の症状”が誘導され得ることを見出している。これらの結果は、nSP70に対する持続的な曝露が肝硬変や肝がんの発症リスクを高める可能性を示唆している。以上の知見は、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。

3.4 非晶質ナノシリカの細胞内動態と安全性との関連追求

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サブミクロンサイズの従来素材とは異なる動態特性を発揮し、ナノマテリアルの動態情報を基盤とした安全性評価がNanoTox研究において重要であることを明らかにした。そこで本項では、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TEMにて観察した。その結果、nSP300あるいはmSP1000を適用したいずれの群においても各シリカが細胞内に侵入した像が認められ、特にmSP1000を添加した群においては細菌感染時と同様の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(表1)。これらの事実は、直径が100 nm以下のナノマテリアルが従来までのマイクロメートルサイズのマテリアルとは異なる細胞内動態特性を示すことを裏づけている。即ち、ナノマテリアルの安全性を確保するに当たっては、細胞内取り込み経路や細胞内オルガネラへの到達性、およびその機構などの細胞内動態に関して精査し、それらの情報を基盤とした安全性評価が必須であり、特に今回使用したナノシリカの場合は核内移行特性を反映した遺伝子や核機能に対する影響の評価が必要であるものと考えられた。そこでまず、HaCaT細胞に対する細胞傷害性試験を行った(図4)。nSP70を作用させた群においては、ナノシリカの添加量依存的な細胞傷害性の増大を認めた。また、その効果は粒子径依存性が認められた。さらにコメットアッセイを用いてシリカ処理によるDNA損傷の有無を実施したところ、nSP70を適用した群においてのみ強力なDNA損傷効果が認められた(表1)。これらの結果は、nSPが粒子径の減少を反映して細胞傷害やDNA損傷を誘発し、発がんリスクを増大させ得ることを示している。今後は、nSP70の核内移行性