

図5. ロータロッドテストによる協調運動機能の評価ならびにホットプレートテストによる痛覚感受性の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後における(A)回転ロッドから落下するまでの時間、(B)熱に対する四肢の反応潜時を測定した。

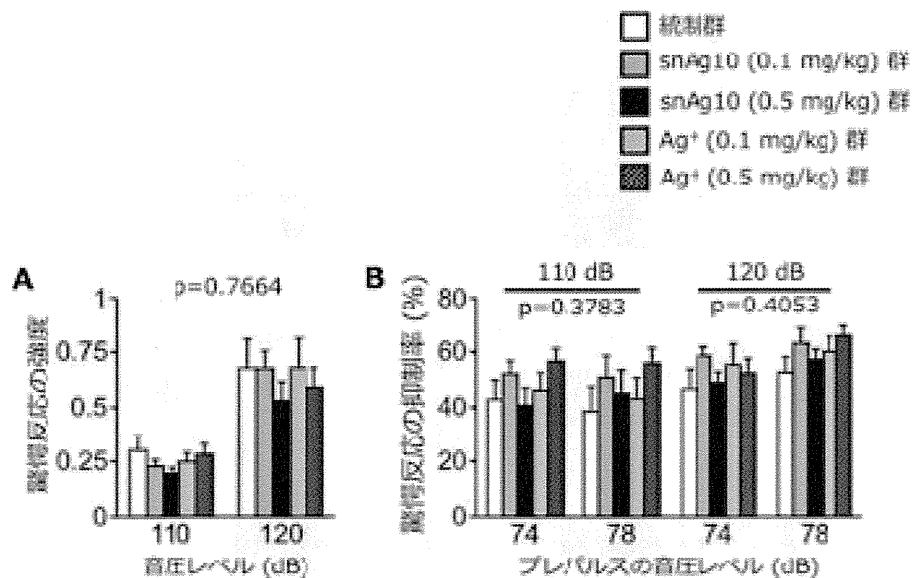


図6. 聴覚性驚愕反応およびプレパルス抑制の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後の(A) 聴覚性驚愕反応の強度、(B) プレパルスによる驚愕反応の抑制率を測定した。

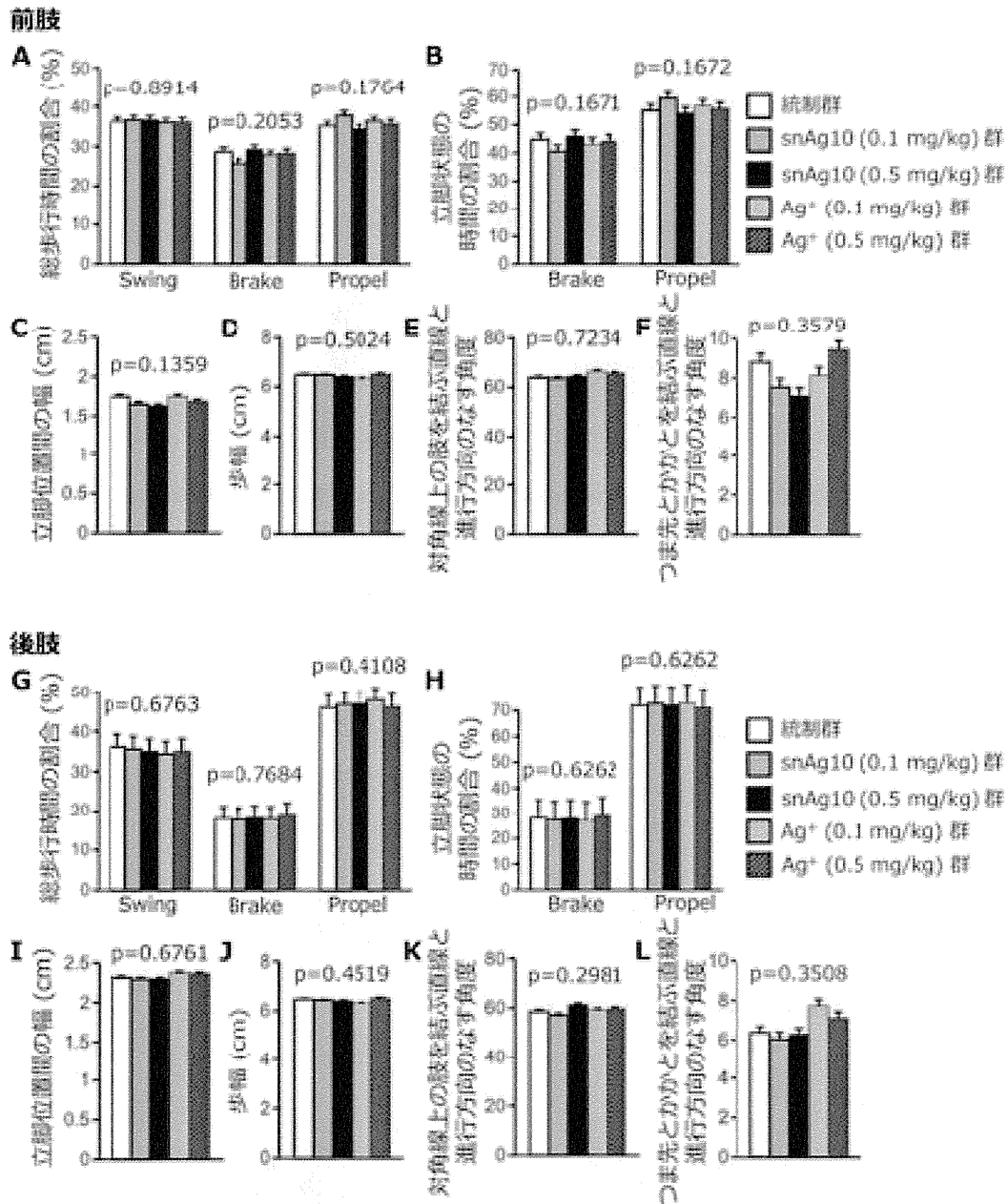


図7. 歩行の解析. 乳幼仔期(生後3週間)に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン(1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg)を摂取したBALB/c系の雄の成長後の歩行状態を解析した。前肢および後肢における(A, G)総歩行時間の割合、(B, H)各立脚状態を示した時間の割合、(C, I)立脚位置間の幅、(D, J)歩幅、(E, K)対角線上の肢を結ぶ直線と進行方向のなす角度、(F, L)つま先とかかとを結ぶ直線と進行方向のなす角度を測定した。

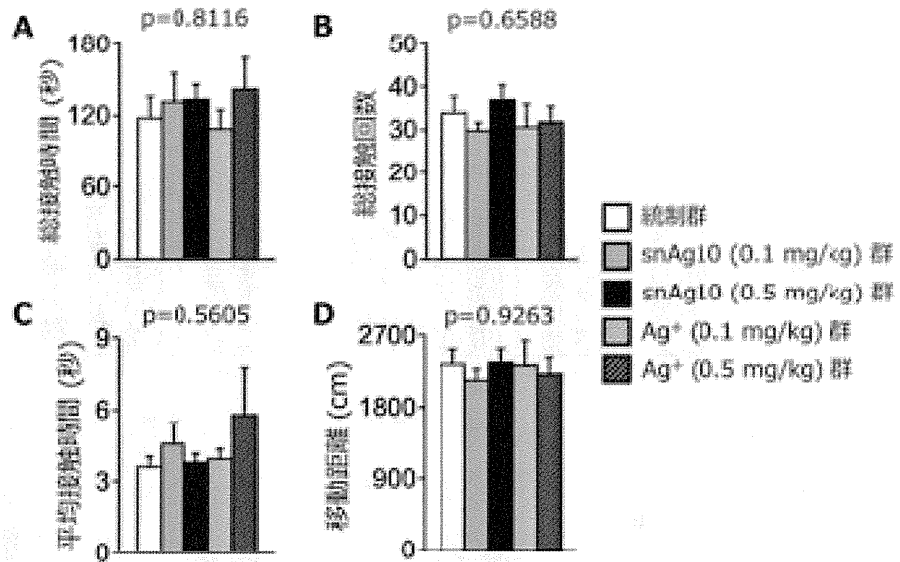
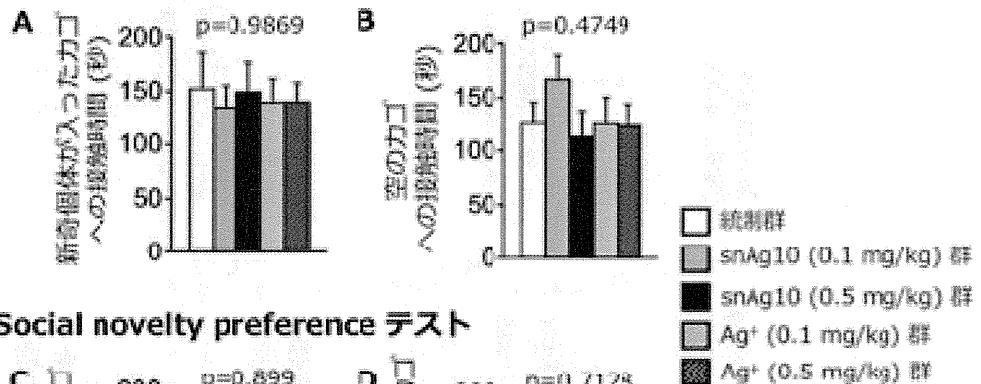


図8. 新奇環境下社会的行動テストによる社会的行動の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後の新奇環境下社会的行動テストにおける各個体との(A)総接触時間、(B)総接触回数、(C)平均接触時間、ならびに(D)移動距離を測定した(各群、n=8-10)。

Sociability テスト



Social novelty preference テスト

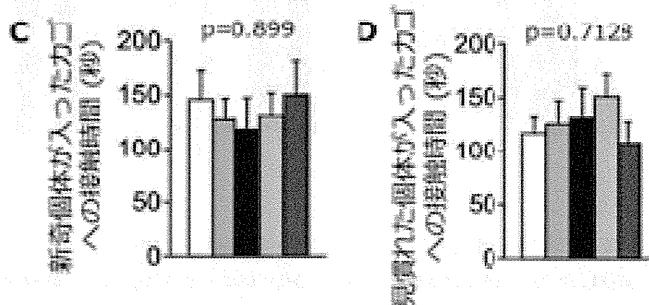


図9. Crawley版社会的行動テストによる社会的行動の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後における sociabilityテスト場面での(A)新奇個体が入ったカゴへの接触時間および(B)空のカゴへの接触時間を測定した(各群、n=16-20)。続いて、Social novelty preferenceテスト場面での(C)新奇個体が入ったカゴへの接触時間および(D)見慣れた個体が入ったカゴへの接触時間を測定した。

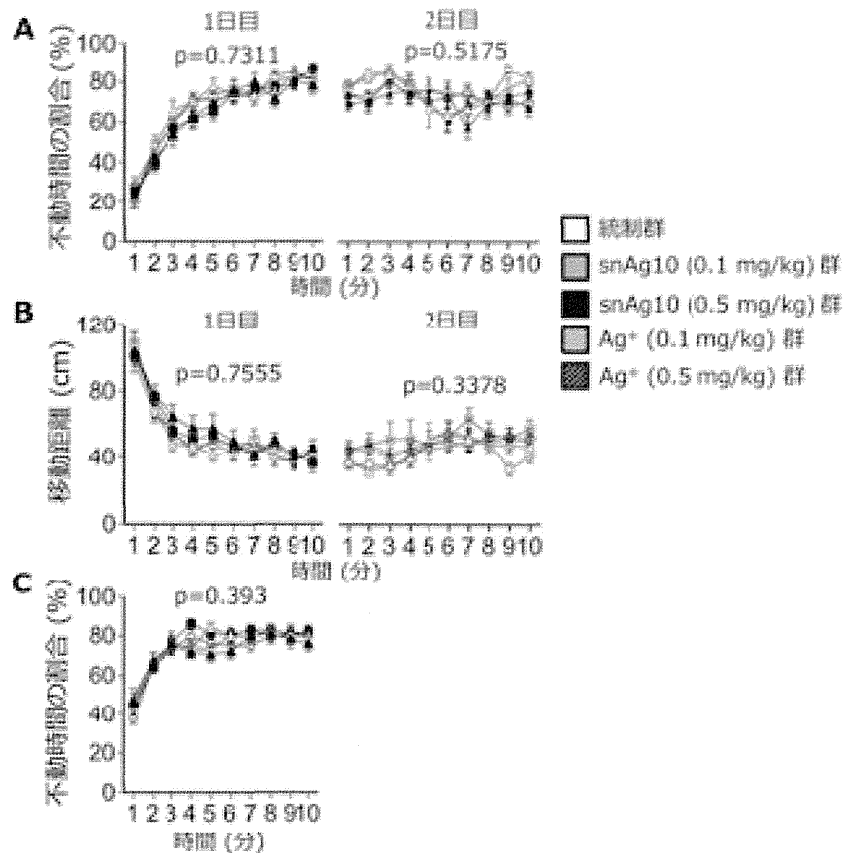


図10. ポーソルト強制水泳テストおよび尾懸垂テストによるうつ様行動の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後のポーソルト強制水泳テストにおける(A)不動時間の割合および(B)移動距離、尾懸垂テストでの(C)不動時間の割合を算出した(各群、n=16-20)。

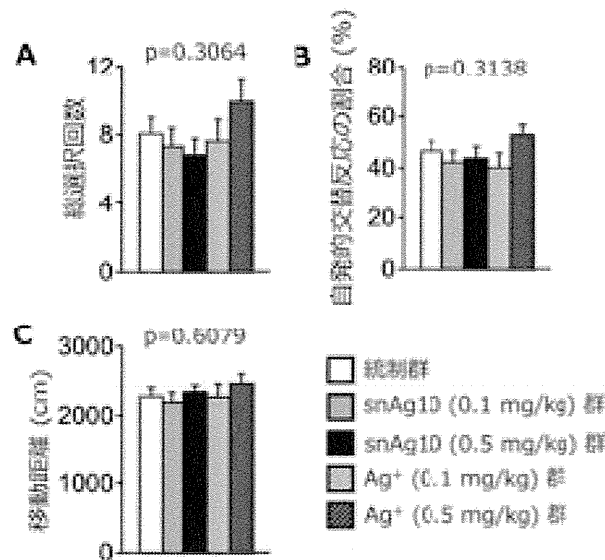


図11. Y字迷路テストによる作業記憶・固執傾向の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後のY字迷路テストにおける(A)総選択回数、(B)自発的交替反応の割合、(C)移動距離を測定した(各群、n=16-20)。

測定項目	テスト	nAg10	Ag ⁺
不安様行動 自発運動量	明暗選択テスト	=	=
	高架式十字迷路テスト	=	=
	オープンフィールドテスト	=	=
痛覚感受性	ホットプレートテスト	=	=
社会的行動	社会的行動テスト	=	=
	社会的行動テスト (Crawley version)	=	=
協調運動 運動学習	ロータロッドテスト	=	=
	歩行解析	=	=
筋力 うつ様行動	握力テスト	=	=
	ワイヤハンクテスト	=	=
	尾懸垂テスト	=	=
	ポーソルト強制水泳テスト	=	=
聴覚性驚愕反応 感覚運動統合制御	ブレバリス抑制テスト	=	=
記憶 固執傾向	Y迷路試験	=	=

= : 有意差なし (すべて $p > 0.05$)

表1. 乳幼仔期にサブナノ銀および銀イオンを摂取したマウスの成長後の行動の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雌の成長後の行動について網羅的行動テストバッテリーを用いて解析した結果をまとめた。

ナノ・サブナノ素材の一般毒性・免疫毒性評価とインターフェイス間バリエーション評価

研究分担者 桑形 麻樹子 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 毒性部病理学研究室

研究要旨

これまでに我々は各種ナノ素材（フラーレン、カーボンナノチューブ、白金、銀）の経皮曝露によるラットの生体への影響を評価してきた。ナノ白金は貼付部位に皮膚病変（痂皮、潰瘍）が認められたが、いずれの物質も 28 日間経皮投与により一般毒性学的影響は認められていない。また、粒子径 10-50 nm の表面未修飾のナノ銀（1-100 μ g/mL）を 28 日間経皮投与（6 時間/日）した結果においても、ICP-MS 分析により皮膚組織中にはナノ銀は検出されたが、血中では検出限界以下（0.05ppm 以下）であったことから、全身に移行してもごく微量であること、一般毒性学的な影響は認められないことを明らかにしている。

今回、さらに粒子径が小さい 5 および 10 nm の表面をクエン酸修飾したナノ銀（1 mg/mL）を 24 時間連続貼付し、皮膚内動態を ICP-MS 分析により検討した。さらに、体表皮脂や毛組織の密度がナノ素材の皮膚透過に影響を及ぼすのかを、2 系統のラット（SD 系ラットおよびヘアレスラット）を用いて比較した。その結果、両系ともにいずれの粒子径のナノ銀も皮膚に残留していたが、血液中は検出限界以下であった。体表皮脂の存在は皮膚中のナノ銀含有量に影響を及ぼさなかった。テープにより角質除去を試みたが、処理により皮膚に残留したナノ銀濃度にも差が認められなかった。陽性対照として設置した銀イオン群では、皮膚に銀イオンの残留が確認されたが、血液中は検出限界以下であった。

以上の結果から、クエン酸修飾した粒径 5 および 10 nm のナノ素材の銀を 24 時間ラット背部に経皮投与した結果、皮膚にはナノ銀は残留していたが、血液中は検出限界以下であることが確認された。また、体毛油脂除去はナノ銀の皮膚透過性には影響を及ぼさないことが確認された。角質除去による影響については、手技改良の必要性が残された。

A. 研究目的

経皮投与によるナノ銀の生体内分布を検討するために、粒径の異なる 2 種のナノ銀を 24 時間ラット背部皮膚に貼付し、皮膚および血液内のナノ銀の分布および皮膚の形態学的変化を調べた。

B. 研究方法

1. 被験物質および投与方法

被験物質は nanoComposix 社から購入した 5nm 径（Citrate Biopure™ Silver、1 mg/mL、Lot no. MGM2185）および 10 nm 径（Citrate Biopure™ Silver、1 mg/mL、Lot no. MGM1300）のクエン酸表面修飾したナノ素材の銀を用いた。また、対照群として被験物質の溶

媒である 2 mM クエン酸水を、陽性対照群として銀イオン液（0.1M 硝酸銀溶液を日局注射用水で希釈して、銀イオン濃度として 1 mg/mL に調製）を設定した。

ナノ銀の投与量は、入手検体をそのまま用いて 1 mg/mL とした。ナノ銀は投与直前まで 4℃にて保管し、ボルテックスミキサー（KMC-1300V、Vision Scientific.Co.LTD.）で 30 秒攪拌した後、直ちに投与に用いた。

投与は、化粧品、塗装、剥離した物質として経皮的に吸収された場合の毒性を検討するために背部に閉塞貼付した（経皮投与）。テガダーム（非吸収性フィルム）に 3x3 cm のリント布を置き、リント布上に被験物質を滴下（2 mL/kg 体重）し

た後、皮膚にリント布およびテガダームを貼付し、プラスチックラップを巻いて被覆固定した。その上に粘着フォームパットおよび伸縮性粘着包帯を巻き、固定した。

投与時間は 24 時間とし、翌日の午後に解剖した。なお、投与日の朝に背部をバリカンにて剪毛した後に体重を測定し、体重値を基に投与液量を算出して午後から投与した。

陽性対照群である銀イオン (Ag+) 群は、ナノ銀群と同様に投与した。

投与量および群構成は図 1 に示す。

2. 動物および飼育条件

動物は 6 週齢の雄 SD 系ラットおよびヘアレスラット (HWY/Slc, HL ラット) を購入し、温度 (21.0~25.0℃) および湿度 (40.0~75%)、換気回数 (約 15 回/時間)、明暗サイクル (7 時~19 時まで点灯) が統御された飼育室に金属製金網床ケージ (SD 系ラット) あるいは紙パルプチップ入りプラスチック製ケージ (HL ラット) にて個別に飼育し、固型飼料 (CE-2、日本クレア株) および水道水を自由に摂取させた。約 1 週間の検疫・馴化期間の後、検疫終了時の体重を基に 7 群に群分けした。投与開始時週齢は 7 週齢である。

3. 観察

動物は 24 時間の投与終了後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部側のみ包帯を切除し、腹部後大静脈から採血した。採血後、貼付部位を露出させ、蒸留水で湿らせたキムタオル、続いて乾いたキムタオルにて貼付部位を拭きとった。その後、主要な器官、組織の肉眼的観察を実施し、貼付部位皮膚は、病理組織学的検査および ICP-MS 分析用にそれぞれ保存した。対照群を除く各群 2 例について、ICP-MS 分析を実施し血液および皮膚中の被験物質の存在を確認した (日本食品分析センターにて実施)。なお、一部の動物については投与後のリント布、キムタオル中銀濃度についても分析した。皮膚について、ヘマト

キシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的に観察した。

体表皮脂や毛組織の密度がナノ素材の物質透過に影響を及ぼすのかを、毛組織が密な SD 系ラットと疎である HL ラットを用いて比較した。

(1) 体表皮脂による被験物質の透過性の影響を検討するために、両系の対照群、5 nm Ag および Ag+群を用いて、投与前に 70%アルコールにて貼付部位を清拭する動物 (各 2 例) を設けた。また、(2) 表皮 (角質層) に残存する被験物質の割合を検討するために、HL ラットの対照群、5 nm Ag 群および Ag+群を用いて、貼付後にテープ (粘着性伸縮包帯) にて 20 回貼付部位をタックして角質を除去する動物 (各 2 例) を設けた。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. 皮膚の病理組織学的検査

SD 系ラットと HL ラットの正常皮膚組織像を図 2 に示す。特徴として、毛根数は SD 系ラットの方が多く、表皮の厚さは HL ラットの方が厚い。また、HL ラットでは毛包の嚢胞や毛漏斗部の膿瘍がみられる。これらの正常像の特徴を留意して皮膚変化の評価をする必要がある。

24 時間貼付後の背部皮膚肉眼写真 (各群代表例) を図 3 に示した。いずれの群の貼付皮膚部位にはナノ銀および Ag+の 24 時間貼付による肉眼的変化はみられなかった。

病理組織学検査 (図 4) および組織写真 (各群代表例、図 5) の結果を示した。SD 系ラットにはいずれの群にも変化はみられなかった。HL ラットでは、表皮に嚢胞が対照群を含む全ての動物にみられ、そのうち対照群の 1 例および Ag+群の 2 例には鉍質沈着を伴っていた。また、表皮の過形成を伴った毛漏斗部の膿瘍が対照群の 1/2 例、5 nm Ag 群に 3/5 例、Ag+群に 2/5 例観察されたが対照群との間に程度の差はなく、ナノ銀および Ag+貼付による病理組織学的変化は観察

されなかった。

2. 組織中銀濃度 (ICP-MS 分析)

(1) 70%アルコールによる皮脂除去の影響

貼付前に 70%アルコールにより皮脂を除去してナノ銀を貼付した皮膚および未処理にて貼付した皮膚間には、皮膚に残留しているナノ銀に差はなかった (図 6)。また、血液中のナノ銀量はいずれの群も検出限界 (0.05 ppm) 以下であった。すなわち、アルコール前処理による皮脂除去によりナノ銀の皮膚内含量には差はなかった。また、いずれの群にも血液中のナノ銀含量は検出限界以下であった。

(2) タッピングによる角質除去の影響

貼付後にテープ (伸縮性包帯) を用いて 20 回皮膚表面を剥離した組織像を図 7 に示した。組織学的に顕著な差はなかった。

ICP-MS 分析の結果 (図 8)、タップテープにもナノ銀は検出されたが、角質除去をした皮膚および未処理の皮膚間にはナノ銀の分布に差はなかった。また、いずれの群にも血液中のナノ銀含量は検出限界以下であった。

本条件では角質剥離は不十分であると考えられた。より粘着度の強いテープの使用、回数の増加等、角質除去には手法検討の必要性が残された。

3. その他

今回、SD 系ラットに加え HL ラットを用いて、皮膚および血液サンプル以外に貼付に用いたリント布、余分なナノ銀を清拭した際に用いたキムワイプ、角質除去に用いたテープ中の銀含量を ICP-MS 分析にて解析し、皮膚内動態の検討を試みた。

HL ラットは遺伝性の皮膚形態学的変化 (嚢胞など) がみられることから、ナノ銀の皮膚含量に個体差が生じた。また、今回実施したテープによる角質除去は十分ではなく、ナノ銀が表皮に残留しているのか否かの評価はできなかった。

貼付に用いたリント布、余分なナノ銀を清拭し

た際に用いたキムワイプ中の銀含量を分析することにより皮膚内動態評価を予備的に試みたが、個体差が大きく、有用な結果は得られなかった。

E. 結論

本条件下では、5 nm および 10 nm のクエン酸表面修飾系のナノ銀 (100 mg/mL) の 24 時間経皮投与により、ナノ銀は生体内にはほとんど浸透せず (検出限界以下)、皮膚に残留していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

【総説・その他】

なし

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 0 件】

【国内学会発表 : 合計 0 件】

【国際学会発表 : 合計 0 件】

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当なし

② 実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

斉藤義明、熊谷文明 (一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所)

試験従事者

丸茂秀樹、臼見憲司、熊谷文明、野口聡、千坂亜希子、等々力舞、関剛之、松本亜紀、古谷真美、田面喜之、三枝克彦、稲田浩子、堀内伸二

(1) SD系ラット

群	投与物質	投与量 (mg/mL)	動物数	オプション
1 (対照群)	クエン酸水	0	3	アルコール前処理
2	5nmAg	1	4	
3	10nmAg	1	4	
4	Ag+	1	4	

(2) HLラット

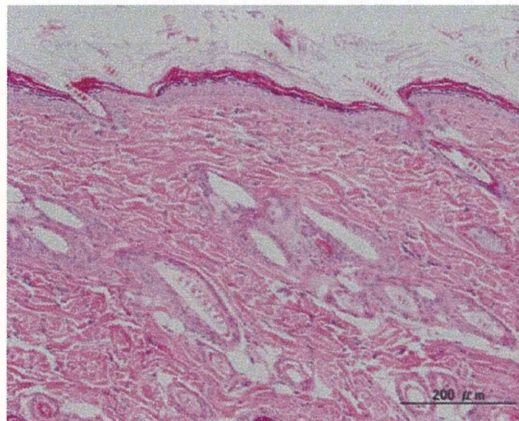
群	投与物質	投与量 (mg/mL)	動物数	オプション
5 (対照群)	クエン酸水	0	2	アルコール前処理 タッピング
6	5nmAg	1	5	
7	Ag+	1	5	

図 1. 群構成

SD ラットにてアルコール前処理は各群 2 例の動物を配した。

HL ラットでは、アルコール前処理をする動物は 6 および 7 群で各 1 例、タッピング処理は 5 群で 1 例、6 および 7 群で各 2 例の動物を配した。

(1) SD系ラット



(2) HLラット

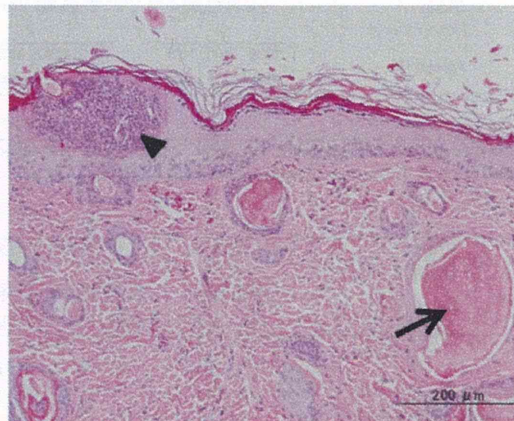
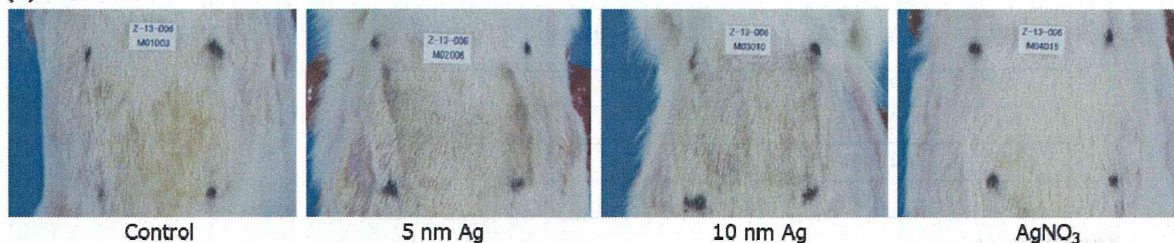


図 2. SD 系ラットとヘアレス(HL)ラットの皮膚比較(無処置動物)

毛根数は SD 系ラットの方が多く、表皮の厚さは HL ラットの方が厚い。また、HL ラットでは、毛包の囊胞(矢印)や毛漏斗部の膿瘍(矢頭)がみられる。

(1) SD系ラット



(2) HLラット



図 3. ナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付後の貼付部位皮膚

いずれの群にも貼付部位にはナノ銀および銀イオン貼付による肉眼的変化は観察されなかった。

(1) SDラット

Group	2 mM Citrate			5 nm Ag 1 mg/mL				10 nm Ag 1 mg/mL				AgNO ₃ 1 mg/mL			
Dose(mL/kg)	2			2				2				2			
Findings	M01	M01	M01	M02	M02	M02	M02	M03	M03	M03	M03	M04	M04	M04	M04
Animal No.	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012	013	014	015
Application site	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked
P : Non-graded change NE: Not examined M: Missing A: Autolysis

(2) HLラット

Group	2 mM Citrate		5 nm Ag 1 mg/mL					AgNO ₃ 1 mg/mL				
Dose(mL/kg)	2		2					2				
Findings	M05	M05	M05	M06	M06	M06	M06	M07	M07	M07	M07	M07
Animal No.	016	017	018	019	020	021	022	023	024	025	026	027
Application site												
Follicular cyst	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Mineralization, follicle	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-
Microabscess, follicular infundibulum, with epidermal hyperplasia	±	-	-	-	±	±	±	±	-	-	±	-

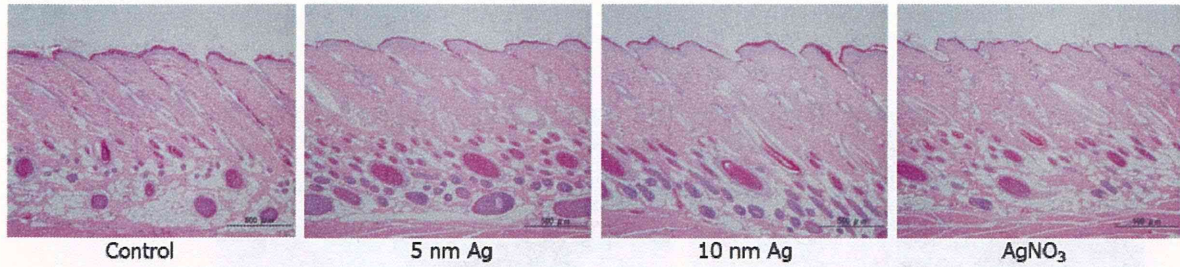
Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked
P : Non-graded change NE: Not examined M: Missing A: Autolysis

図 4. 貼付部位皮膚の病理組織学的変化

SD 系ラットにはいずれの群にも病理組織学的変化は観察されなかった。

HL ラットでは、表皮に嚢胞が対照群を含む全ての動物にみられ、一部の動物には鉍質沈着が伴っていた。また、表皮の過形成を伴った毛漏斗部の膿瘍が各群に観察された。しかし、対照群との間に程度の差はなかった。

(1) SD系ラット



(2) HLラット

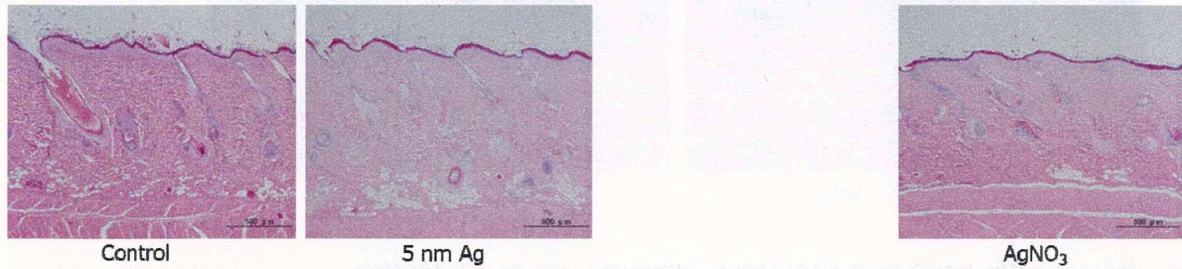


図 5. ナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付後の貼付部位皮膚組織写真

いずれの群の皮膚にもナノ銀および銀イオン貼付による組織学的変化は観察されなかった。



値 : ppm, ND: 検出限界 (0.05 ppm) 以下

図 6. アルコールによる皮脂除去によるナノ銀含有量の比較(ICP-MS 分析)

アルコール前処理の有無により皮膚中 Ag 含有量には差はなく、粒子の大きさにも皮膚残存性に顕著な差はなかった。HL ラットでは値のばらつきが大きかったが、皮膚構造 (スポットの存在) に起因した変化と考えられる。いずれの群も血液中の銀含有量は検出限界であった。

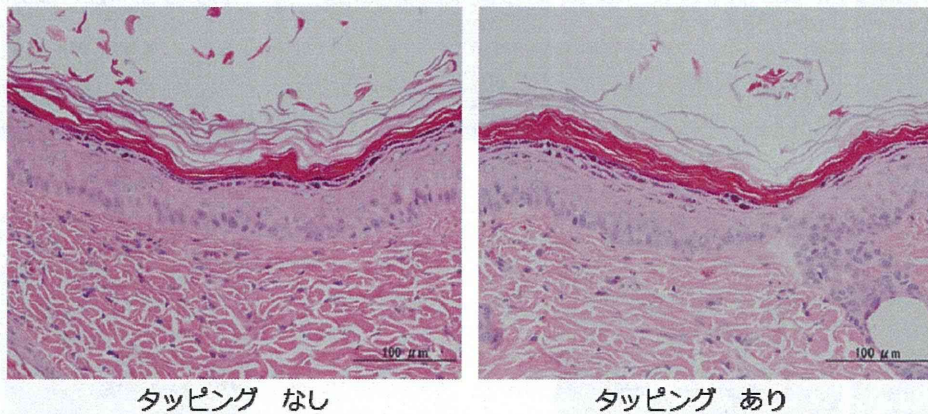


図 7. タッピングによる角質除去(貼付部位組織写真、HL ラット対照群)

テープ（伸縮性粘着包帯）を用いて 20 回表皮をタッピング（剥離）したが、組織学的には顕著な差は認められなかった。

	タッパ	リン塗布	キムタオル	皮膚	Tapテープ	血液
5nAg HL	なし	110	6.5	10		ND
5nAg HL	あり	370	7.7	9.7	5.9	ND
Ag+ HL	なし	61	9.4	27		ND
Ag+ HL	あり	69	6.5	32	9.3	ND

値：ppm, ND: 検出限界 (0.05 ppm) 以下

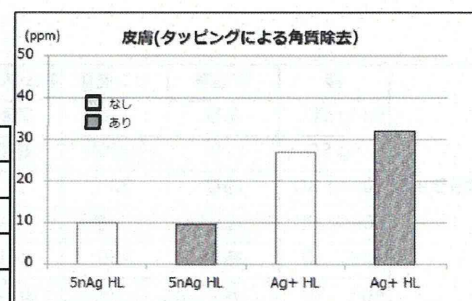


図 8. 角質除去による皮膚銀含有量の比較(ICP-MS 分析、HL ラット)

タッピング処理の有無により、皮膚中 Ag 含有量には差はかった。いずれの群も血液中の銀含有量は検出限界であった。

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
東 阪 和 馬, 堤 康 央	安全・安心な最先端医薬としてのDDS開発とレギュラトリーサイエンス-ナノDDSの安全性評価・確保の現状と今後.	寺田 弘, 中川 晋作, 辻 考三, 牧野 公子, 絹田 精鎮, 西野 敦.	応用が広がるDDS 人体環境から農業・家電まで	NTS出版	日本	2013	140-5

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
Yoshida T., Yoshioka Y., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Higashisaka K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic coagulation cascade and platelets in mice.	Part. Fibre. Toxicol.	10	41	2013
Nagano T., Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Liver-specific microRNAs as biomarkers of nanomaterial-induced liver damage.	Nanotechnology.	24	405102	2013
Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Yagi K.	Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice.	Nanoscale Res. Lett.	8	395	2013

Saito S., Nakashima A.	Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia	Placenta	34	79-84	2013
Saito S., Nakashima A.	A review of the mechanism for poor placentation in early-onset preeclampsia; the role of autophagy in trophoblast invasion and vascular remodeling	J Reprod Immunol	101-102	80-8	2014
東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤康央	経皮吸収性に着目したナノマテリアルの安全性評価研究.	コスメテックジャパン	3	945-50	2013

応用が広がる DDS

人体環境から農業・家電まで

編著 寺田 弘
中川 晋作
辻 孝三
牧野 公子
絹田 精鎮
西野 敦



NTS

安全・安心な最先端医薬としての DDS 開発とレギュラトリーサイエンス

1 ナノ DDS の安全性評価・確保の現状と今後

1. はじめに

近年のナノテクノロジー (Nanotechnology) の発展に伴い、フラーレンやナノ酸化チタンといったナノマテリアルの開発と実用化が世界的に進展している。このうち、フラーレン (C60) やカーボンナノチューブ (CNT) に関しては、日本が多くの物質特許、用途特許を保有しており、カーボン系ナノマテリアルに対する日本の期待は特に計り知れないものがある。最近では、安全性に懸念が残る CNT に代わる素材として、フラーレンを CNT 様に加工し、フラーレンナノウィスカーやフラーレンナノチューブといった鉄を含まないものまで、日本で開発されている。最近では、分子とナノマテリアルとのちょうど中間サイズ、大きさだけで見ると、アルブミンや抗体サイズのサブナノマテリアル (1 nm~10 nm の粒径) までが台頭し、分子の特性と粒子 (ナノマテリアル) の特性を併せ持ったものまでが実用化されつつある。一般に、少なくとも一次元が 100 nm 以下の素材であるナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ (数百 nm) 以上の素材と比較して、①粒子径の減少に伴う組織浸透性の増大、②従来素材とは異なる生体内動態、③比表面積増大による薬物吸着能の増大など、医薬品素材として革新的機能を発揮する。したがって、薬学・医学分野において、21 世紀産業の根幹を担う素材として期待され、ドラッグデリバリーシステム (薬物送達法・薬剤伝達法: DDS) への応用による、ナノ医薬 (ナノメディシン) ともいうべき新たな治療戦略への展開が図られている。たとえば、悪性腫瘍を標的とした「ナノリポソーム製剤」や「高分子ナノミセル」は、がん組織への薬物送達効率や標的組織へ

の浸透性、標的細胞内への導入効率などの点で、がん治療に劇的な革新をもたらすものと有望視されている。さらに、このナノ医薬の台頭は、従来までの低分子医薬品やサブミクロン素材では得られなかった画期的な薬理活性を発揮するナノ医薬品シーズとしても期待され、次世代医薬の筆頭として注目されている。すなわち、薬物担体 (ナノキャリア) としての展開のみならず、昨今では、主剤 (主薬) がナノマテリアルである、狭義のナノ医薬も開発が進んでいる (HIV や肝炎ウイルス、リウマチなどに対してフラーレンの応用が期待されている)。しかしながら、医薬品開発においては、製剤の物性・品質と安全性の担保が必要不可欠であることはいうまでもない。特に、iPS 細胞を含めた細胞医薬、抗体やサイトカインといったタンパク医薬、ナノ医薬、遺伝子・核酸医薬、もちろん、DDS 医薬といった最先端医薬品には有効なのは当たり前で、これまで以上に、品質の確かさや高度なまでの安全性が要求されてくる。この点、いわゆる、医薬品の承認・審査、レギュラトリーサイエンスの遅れも当然の課題ながら、ナノ医薬の根幹をなすナノマテリアルの定義すらいまだ曖昧であるとともに、物性・品質と有効性・安全性の連関評価もほとんど進展していない。そのため、ナノマテリアルの安全性評価研究は、世界的に見ても不十分であり、欧米ではナノマテリアルの影の部分 (ハザード) ばかりが注目され、その結果、残念なことに、光の部分であるナノ医薬品の開発が遅れてしまっている。周知のとおり、医薬品の安全性は、そのものが持つ毒性 (ハザード) と曝露される時間・量の積算 (リスク) によって運命づけられ (ハザードだけでは議論できない点にご留意頂きたい)、ベネフィットとの兼ね合いの中で、その実用化や利用方法が決まっていく。本観点から筆

2. ナノ DDS 医薬品開発の現状

者らは、ナノ医薬の開発を推進するべく、ナノマテリアル投与により誘発される生体影響とナノマテリアルの物性、細胞内・体内動態との連関を解析し、体系化 (Nano-Safety Science ; ナノ安全科学) していくことで、ナノ医薬の品質や有効性/安全性の担保など、Nano-Safety Design (ナノ最適デザイン) に適う基盤情報の収集を図っている (図1)。すなわち、ナノ医薬品の開発に向けては、単に細胞傷害性を検討して、安全性を議論するようなことはやめ、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性情報を幅広く収集し、これら情報を基盤として、有効かつ安全なナノマテリアルを設計していくことが今後のキーポイントとなろう。これが、Sustainable Nanotechnology とも呼ぶべき、次世代のナノ DDS 研究と位置づけられる。そこで本総説では、まだまだ世界的に未成熟ではあるが、ナノ医薬品開発の現状について紹介するとともに、ナノ医薬品の開発に必須であるナノマテリアルの安全性確保に向けてわれわれが推進しているナノ安全科学研究について、緒についたばかりの最新の知見に少し触れてみたい。

近年、医薬品や化粧品、食品といったヒトが直接曝露される領域で、非晶質ナノシリカなど、従来素材と比較して有用性が向上あるいは新たな機能を獲得したナノマテリアルの開発が急速に進んでおり、すでに実用化までもが世界的に進展している。一次元が 100 nm 以下の素材であるナノマテリアルは、サイズや形状、比表面積などの点で、従来までのサブミクロンサイズ以上 (数百 nm 以上) の素材とは一線を画した特徴的な物性を持ち、この特徴的な物性を反映して低分子化合物やタンパク質 (抗体・サイトカインなど) では得られなかった画期的な薬理活性を発揮するナノ医薬品シーズになるものと期待されている。蛇足ではあるが、いわゆる、サブナノ素材 (0.1~10 nm) もすでに台頭してきており、まさに目が離せなくなっている。これらナノマテリアルの画期的機能は、ナノ医薬としての主薬あるいはナノ添加剤としてだけではなく、薬物治療の最適化

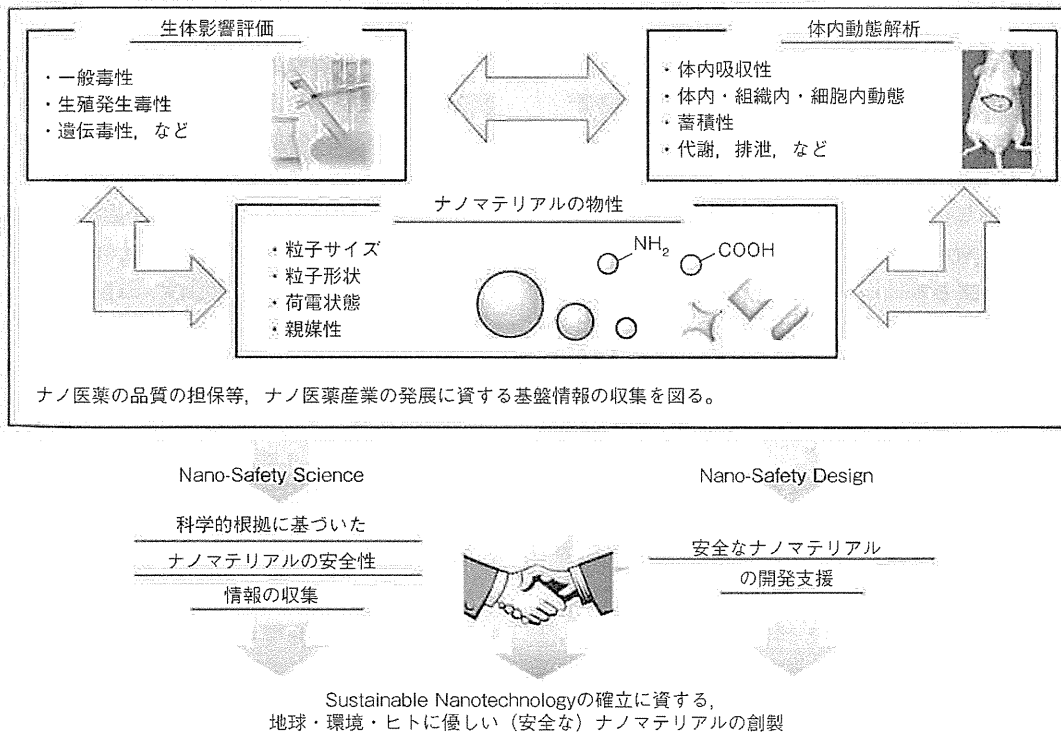


図1 ナノ安全科学研究

が
て
の
っ
と
れ
し
な
ん
し
な
と
も
サ
伝
先
上
れ
査
が
す
効
い
。
世
ア
の
品
曝
び
意
そ
筆

を目指した DDS への応用も期待されている。ナノマテリアルを薬物の送達物質(キャリア)として用いるナノ DDS 医薬品開発は、2000 年頃から急速に進展している。本国においては、日本発の医薬品向けのナノマテリアル開発を目指す「ナノメディスン・プロジェクト」を厚生労働省が指定型プロジェクトとして推進するなど、ナノ医薬品の開発・研究が進行している。

現在、日本では 10 製品のナノ DDS 医薬品が上市されており、用いられるナノ素材としては、主に、リポソームや水溶性高分子、高分子ミセルなどが挙げられる。これらのナノ素材は、①水溶性の高分子に薬物を化学的に結合させる方法、②高分子の集合体に薬物を包み込ませる方法、③脂質二重膜小胞に薬物を内包する方法、などにより薬物を標的部位へと到達させ、現在では主に抗がん剤に対する適用が進んでいる。さらに最近では、金属ナノ粒子のように古くから使用されていた素材を 100 nm 以下に微小化した素材や、フラーレンやカーボンナノチューブをはじめとするナノカーボン素材のように、新たに考案・開発された素材を応用したナノ医薬品の開発研究が進展しつつある。これらは、その調整の容易さや粒子表面修飾の多様性を有することから、各種リガンド・抗体を用いたターゲティング能の付加による治療効果増大・副作用低減を目指した試みも精力的になされている。今後、既存のナノ素材をより洗練させるだけではなく、新規ナノマテリアルの開発が進むことで、ナノ DDS 医薬品産業の目覚ましい発展が期待される。本稿では、紙面の都合上、新規ナノ DDS 医薬として期待されているナノカーボン素材について概説したい。

ナノカーボン素材は、炭素間結合を介す長い電子共役系を持つなど特殊な物性を有し、高い薬物保持能や生体内安定性、柔軟な構造(表面修飾の容易さ)といった、DDS 素材としてきわめて有望な性質を発揮する。そのため、前述したように、これらナノカーボン素材を用いた DDS 医薬の開発が注目を浴びており、その特性を活かした、低分子医薬、タンパク質医薬、核酸医薬の送達キャリアとしての開発が前臨床段階ではあるものの、世界中で進められている。たとえば、カーボンナノチューブ(直径は数 nm と細く、その長さはマイクロメートルからミリメートルまで多様に存在する)やカーボンナノホーン(直径 2~5 nm、長さが 40~50 nm のチューブ状

構造を示す)は、グラファイトからなるナノカーボン素材であり、薬物内包素材・ターゲティング素材として医療・薬学分野でその応用が期待されている。これらの素材は、いずれも内腔を持つ特殊な構造を有するため、表面だけではなくその内腔に薬物を保持させ、徐放化を試みる検討が進められている。湯田坂らは、カーボンナノホーンに内包されたシスプラチンが数十時間をかけて徐放され、顕著な抗がん作用を示すことを報告している¹⁾。このように、腫瘍組織、炎症組織や細胞内リソソームなど低 pH 環境において薬剤が放出されるといった DDS 機能を有するナノカーボン素材の開発も進められている。

ナノテクノロジー産物としてのフラーレン(直径 1 nm 程度)は、グラファイト、ダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同素体であり、その革新的有用機能を活用し、美白剤・老化防止剤などとして広く実用化されている。フラーレンは中空の球状構造を有するため、原子を内包することが可能であり、金属元素を内包したものは金属内包フラーレンと呼ばれる。これまでに、セシウムやガドリニウムなどを内包したフラーレンが得られており、MRI の造影剤などへの応用研究が進められている。また、ナノカーボン素材特有の長い電子共役系によって、光照射で励起され、活性酸素を効率よく発生する光増感物質としての性質を有することが知られている。この性質は、がんの光線力学的治療法、フォトダイナミックセラピーに応用することが可能であり、田畑らはこの性質を利用し、*in vivo* において顕著な腫瘍退縮効果が得られることを報告している²⁾。さらに、従来薬とは全く異なった作用点での抗ウイルス活性(酵素阻害活性)や抗菌活性、さらにはラジカルスポンジと呼ばれるほど圧倒的な抗炎症活性(抗酸化活性; 活性酸素・ラジカル消去活性)を有しており、活性酸素が原因となり発症・悪化する各種炎症性疾患への適用も進められている。この点において筆者らは、C60 フラーレンの修飾体が、炎症性腸疾患の代表的モデルマウスであるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルマウスに対し、顕著な治療効果を発揮可能であることを先駆けて明らかとしている。その詳細な作用機序については明らかとなっていないが、C60 フラーレンの修飾体が ROS などの酸化ストレス因子の産生、炎症性サイトカインの分泌を抑制する可能性を見出している。

現在、より有効な炎症性腸疾患治療薬の開発を目指し、腸管吸収性や体内動態について詳細に評価することで、腸管で最も効果を示す製剤形態などの有効性情報を収集するとともに、より高い抗酸化作用を有する他のフラレン誘導体の探索を推進している。

3. ナノマテリアルの安全性に関する懸念

このように、ナノ医薬品の開発研究は世界的にも盛んに進められているが、世界的に見てもナノ医薬品の成功例はきわめて少ない。ナノ医薬品におけるボトルネックは、ナノマテリアル特有の画期的な機能が、逆に、二面性を呈してしまい、予想外の部位で未知の副作用 (NanoTox) を発現する可能性を有することである。たとえば、先に紹介したカーボンナノチューブが、アスベストと同様に悪性中皮腫や肺がんなどを誘発してしまう可能性³⁾や、フラレンが体内に侵入した後、循環血中を介して脳組織へ移行し、障害性を示す可能性⁴⁾、などが指摘されている。しかしながら、ナノ医薬品の根幹をなすナノマテリアルの安全性評価研究に関して、現状では、細胞毒性や遺伝毒性といった一部のハザード研究しかされておらず、世界的に見ても不十分かつ科学的根拠に乏しいため、ナノ医薬品の開発が遅れている1つの要因となっている。本観点から筆者らは、これまでに、有効なナノ医薬品として応用可能なナノマテリアルのスクリーニングを実施するとともに、ナノマテリアルの有効性と物性、安全性との連関評価を推進してきた。たとえば、さまざまなナノマテリアルを用いたスクリーニングにより、細胞内への薬物送達キャリアとして期待される非晶質ナノシリカが、①抗体産生誘導能の強い表皮の樹状細胞サブセットに局在する傾向を持ち、さらにその活性化などを引き起こすこと⁵⁾、②経鼻投与することで抗原特異的免疫誘導能を示すこと⁶⁾から、ナノマテリアルの経皮抗原キャリア・経鼻粘膜ワクチンキャリアとしての可能性を有すること、などを見出してきた。さらに、これまでの検討から、ナノマテリアルは、従来までの低分子医薬品やサブミクロン素材とは決定的に異なる体内・細胞内動態特性を有することを明らかとしている。一方で、ナノマテリアルの体内・細胞内での動態特性や有効性・安全性は、①

粒子サイズ (一次粒子径、二次粒子径【分散・凝集】)、②粒子形状 (球状、針状など)、③荷電状態 (表面電荷)、④水溶性・脂溶性といった親媒性 (親水-疎水バランス) の4つのパラメータにより規定される⁷⁾などの知見を得ている。そこで、筆者らが推進してきたナノ安全科学研究の中から、非晶質ナノシリカを用いた先行研究について紹介したい。

非晶質ナノシリカ (微粒二酸化ケイ素) は、局法においては従来サイズの素材と区別なく収載されており、固結防止剤などの食品添加物として日本においてもすでに、食塩やインスタント食品をはじめとした多くの食品に使用されている。また、医薬品の助剤としてすでに汎用されているのみならず、遺伝子送達キャリアなどの DDS 素材としても期待され、その使用量・範囲の拡大は今後ますます進むと考えられる。筆者らはこれまでの検討から、粒子径 100 nm 以下の非晶質ナノシリカが、経皮・経口・経鼻投与により、生体バリアを通過し、組織内・全身血流内に移行すること、さらには、全身血流から選択的かつ効率よく胎盤に移行することを最初に見出した⁸⁾。また非晶質ナノシリカの粒子表面性状を制御することで、胎盤への移行性はそのままに、安全性を高度に確保できること、さらには胎盤組織内の各種細胞への選択性や核内・細胞質内といった細胞内局在性を制御できることを唯一認めている⁹⁾。本結果は、非晶質ナノシリカがこれまで送達不可能であった部位への薬物送達をも可能とする新規キャリアになり得ることを示すものであり、前述したように、筆者らも核酸送達キャリアやワクチンキャリアとしての適用を試み、興味深い知見を得つつある。そこで、粒子径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) と、対照群として粒子径 300, 1000 nm の従来型シリカ (nSP300, mSP1000)、さらには実際に使用されている非晶質ナノシリカがさまざまな表面修飾を施されている場合があることを考慮し、nSP70 の表面がアミノ基、カルボキシル基で修飾された非晶質ナノシリカ (nSP70-N, nSP70-C) を用い、物性と、体内動態・局在、ハザード発現との連関解析を実施した。なお、以後の検討では、試薬グレードの非晶質シリカを用い、各検討を実施した。各シリカを妊娠マウスに尾静脈内投与し体内動態・局在を透過型電子顕微鏡により定性的に評価した結果、nSP70 のみが胎盤に集積するとともに、血液胎盤関門を通過し胎仔にまで移行することを見出