

表1 ナノシリカの皮内投与によるアトピー性皮膚炎様病態の悪化

Silica (nm) Dp	—	—	1,000	300	100	70	30
耳介部腫脹	—	+	+	+	+	+++	++++
痂皮形成	—	—	+	+	+++	+++	+++
表皮の肥厚	—	—	+	+++	+++	++	++
浮腫	—	—	—	+	+++	+++	+++
肥満細胞の 浸潤数	—	+	+	+	++	++	++

(文献<sup>6)</sup>の結果を要約)

ナノ安全科学研究が求められているといえよう。本稿では、最も広範、かつ多量に使用されるナノマテリアルの一つである非晶質ナノシリカに関して、アレルギー病態におけるハザードを同定したわれわれの検討を紹介させていただきたい。

#### 非晶質ナノシリカの皮内投与によるアトピー性皮膚炎様病態の悪化

非晶質ナノシリカは、固結防止や流動性の向上、使用感の改善のため、ファンデーションや乳液などの化粧品基材として、また、固結防止・流動化剤として食塩をはじめとした食品などにも広く使用されている<sup>9)</sup>。われわれはこれまでの検討の中で、少なくとも粒子径70 nmのナノシリカに関して、経口、経鼻ルートのみならず、最もバリアが強固とされる皮膚を介しても体内へ侵入することを明らかとしている<sup>4)5)</sup>。そこで、体内へ侵入したナノシリカが、一般的な粒子状物質の作用として懸念されるアレルギー疾患の悪化に影響を与える可能性をサブミクロンサイズのシリカと比較した。

本検討では、実験グレードの、30, 70, 100 nmのナノシリカ(順にnSP30, nSP70, nSP100)とともに、サブミクロンサイズの対照群として300, 1,000 nmのシリカ(順にnSP300, mSP1000)を用いた。また、ナノシリカが化粧品分野で汎用されていることをかんがみて、最も代表的な皮膚アレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎(AD)のモデルを用いた。本検討では、多くのアレルギーにおいて最も重要なアレルギーであるヤケヒョウダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*)の抽出蛋白(Dp)と各粒子径のシリカを混合し、連続皮内投与する

ことで、各粒子径のシリカがAD様病態へ与える影響を解析した<sup>6)</sup>。まず、各粒子径のシリカ投与が、AD様の皮膚病変に与える影響を、投与部位である耳介の腫脹、病理スコアとともに、肥満細胞の浸潤数を指標に評価した。その結果、サブミクロンサイズのシリカであるnSP300, mSP1000共投与群では、DpによるAD病態に顕著な影響は観察されなかった。一方で、100 nm以下のナノシリカ投与群では、全群で顕著な病変の悪化が観察された。また、その悪化は、投与したナノシリカのサイズの減少とともに増進されていた(表1)。したがって、特に100 nm以下のナノシリカは、過剰量が体内(皮膚内)へ侵入した場合には、アトピー病態を悪化させることが示された。また、100 nm以下で生じる顕著な病変の悪化は、粒子径の減少とともにより促進されることが明らかとなった。

AD病態は大きく、①アレルギー特異的なIgEとアレルギーの結合を介して引き起こされる外因性経路と、②細菌やアレルギーによる刺激、あるいは機械的な刺激により活性化されたケラチノサイトなどの上皮から誘導されたサイトカイン(IL-18, TSLP, 近年ではIL-33も報告)を契機としてAD病態が発症する内因性の経路により誘導される(抗原の存在が必須ではないことから自然型経路とも呼ばれる)<sup>7)9)</sup>。内因性の経路では、上皮由来のサイトカインが肥満細胞や、近年新たに報告された自然リンパ球などを直接活性化することで、抗原特異的IgE非依存的にADを誘導する。また、これらサイトカインの働きでポリクローナルなIgEの産生誘導や獲得免疫系が増強され、外因性の経路も増幅される。これらを踏まえて、ナノシリカ

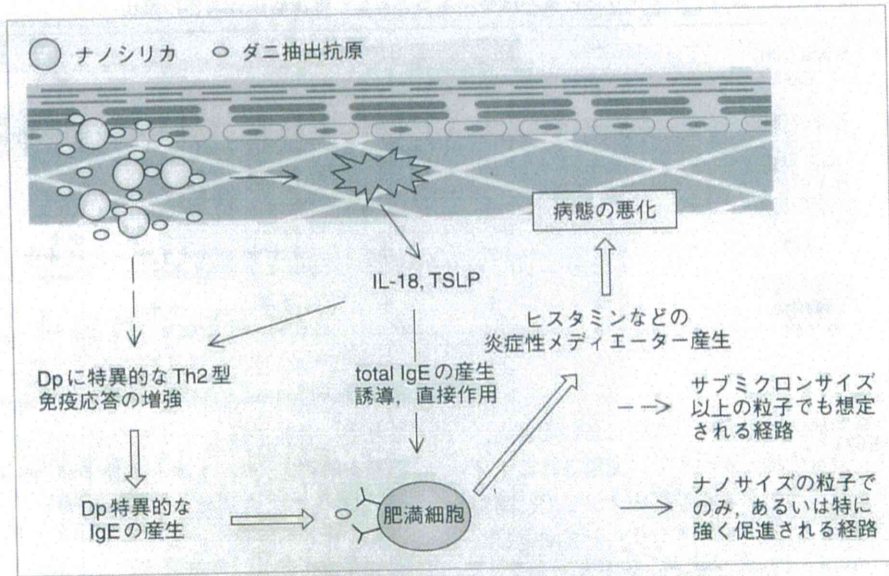


図1 ナノシリカの皮内投与によるアトピー性皮膚炎の悪化機構

によるAD病態の悪化が、どちらの経路に起因するのか、Dp特異的IgE, total IgE, IL-18, TSLPの発現を指標に解析した。まず、Dp特異的IgEとtotal IgEの産生を評価した。その結果、Dpを単独で投与した群と比較して、サブミクロンサイズのシリカやナノシリカを共投与した群では、いずれのIgE産生量も増加していた。一方で、Dp特異的IgEの産生上昇と比較して、total IgEの産生上昇はシリカの粒子径の減少ときわめて高い相関を示した( $R^2=0.98$ )。また、投与局所のIL-18とTSLPの産生量を評価したところ、IL-18の産生はシリカ共投与群で大きく上昇し、その上昇はtotal IgEの産生と同様に、シリカの粒子径の減少ときわめて高い相関を示していた( $R^2=0.91$ )。さらに、TSLPの産生は100 nm以下のナノシリカ投与群でのみ、Dp単独投与群よりも高い産生が観察された。すなわち、特にナノシリカ介在性の、粒子径の減少に依存するAD様病態の悪化は、内因性経路の増強が引き金となって引き起こされている可能性が示唆された(図1)。

#### 非晶質ナノシリカの 皮膚曝露によるIgG抑制作用と 経皮アレルギー感作の促進

これまで、冒頭で述べた環境中微粒子による

健康被害から、ナノマテリアルの安全性の多くは、吸入曝露の観点から検討されてきた。一方で昨今、小麦成分を含有する石鹸を使用したことで、小麦に対する食物アレルギーが誘導された事例にみられるように、特にアレルギーに関しては、皮膚という場が、皮膚のアレルギー疾患のみならず、喘息や食物アレルギーを含めた全身のアレルギー発症に重要であることが明らかとなってきている<sup>10)</sup>。本観点からわれわれは、ナノシリカが、特に化粧品などに用いられていることも加味し、前項で紹介した皮内投与のみならず、皮膚塗布した際にAD病態に与える影響も、前項同様のNC/Ngaマウスを用いたモデルにおいて評価している(Hirai T et al. 論文投稿中)。本検討の中で、少なくとも、ファンデーションなどを使用した場合におけるナノシリカ曝露量の100倍程度を皮膚塗布しても、Dp誘導性のAD様病態が悪化しないことを確認している。すなわち、皮膚バリア機能に障害を有している場合などに関しては別途検討を実施する必要があるものの(ドライスキンなど)、前項で紹介した、ナノシリカによるハザードは、現状のわれわれの生活においてただちに危惧する必要のあるものではないと考えられる。しかし、われわれはさまざまな製品から、ナノシリカを含めた多様

なナノマ  
続けるこ  
含めて、  
た上で請  
一方で  
化はひき  
れたアレ  
変動させ  
わち、ナ  
するアレ  
ものの、  
た、アレ  
あるいは  
り、IgE  
反応を抑  
ノシリカ  
マウスで  
する感  
したが  
スにお  
存する  
の結果、  
が示唆  
塗布に。  
ことに  
ては、I  
stat6を  
において  
いる<sup>12)</sup>。  
様病態  
塗布マ  
こされ  
また、  
カを塗  
したが  
ムをよ

表2 ナノシリカの投与経路と、共存する抗原に特異的な抗体産生が受ける影響

	皮内投与	経鼻投与	強制経口投与	皮膚塗布
Allergen-specific IgG	強く増強	効果は観察されず*	効果は観察されず	抑制*
Allergen-specific IgE	強く増強	増強	効果は観察されず	効果は観察されず

\* 抗原との組み合わせにより一部異なる効果も観察されている。

なナノマテリアルを、一生涯にわたって曝露し続けることを考えると、本ハザードとの関連を含めて、蓄積性などの動態情報を十分に収集した上で議論を深めていくことが重要であろう。

一方で、ナノシリカの塗布は、AD様病態の悪化はひき起こさなかったものの、ともに塗布されたアレルゲンに対する抗体産生のバランスを変動させる可能性が明らかとなっている。すなわち、ナノシリカを塗布したマウスでは、共存するアレルゲンに対するIgEの産生は変動しないものの、IgGの産生が抑制される現象が観察された。アレルゲン特異的IgGは、その競合的な作用、あるいは抑制性のレセプターを介した作用により、IgEとアレルゲンにより誘発されるアレルギー反応を抑制することが知られている<sup>14</sup>。事実、ナノシリカの塗布によりIgG産生のみが抑制されたマウスでは、IgE性のアナフィラキシー反応に対する感受性が亢進していることが観察された。したがって、ナノシリカの塗布は、NC/NgaマウスにおけるAD様病態を悪化させないものの、共存するアレルゲンに対するIgG産生を抑制し、その結果、IgE性のアレルギー感受性を高めることが示唆された。しかしこの事実は、ナノシリカ塗布によりAD様病態の悪化が観察されなかったことに反するように考えられる。この点に関しては、NC/NgaマウスにおけるAD様病態では、stat6をKOし、IgEが誘導されなくなった場合においても皮膚炎が観察されることが報告されている<sup>15</sup>。したがって、NC/NgaマウスにおけるAD様病態ではIgEの関与が低いために、ナノシリカ塗布マウスにおいて、AD様病態の悪化がひき起こされなかったものと考えられる。

また、このようなIgG抑制効果は、皮膚にシリカを塗布した場合にしか観察されなかった(表2)。したがって、ナノシリカによるIgG抑制メカニズムをより詳細に検討していくことで、皮膚とい

う場が、なぜアレルギー感作に重要な働きを示すのかを明らかにする手がかりになることが期待される。さらに、実際のアトピー性アレルギーの患者では、アレルゲンに対するIgE産生のみが高く、IgGの産生が弱い患者が多く観察される。したがって、皮膚を介するIgG抑制作用が、他のナノ微粒子でも誘導される普遍的な現象であれば、環境中の微粒子曝露によるアレルギー発症においても、このような現象がすでに多く発生している可能性を再考しなければならないであろう。一方で、最も重要なことであるが、ナノシリカの表面物性を変化させることで、IgG産生の抑制が誘導されないことも明らかとしており、安全なナノマテリアルの創製に資する基盤情報の収集も進行していることを申し添えたい。

## おわりに

近年、テレビや新聞などでもよくみかけるPM2.5は、環境中微粒子のうち、特に2.5 $\mu$ m以下のものを指し、日本においても規制の対象とされている。一方で、この環境基準は、2009年に環境省から導入されたばかりのものであり、それまではより大きな粒子を念頭に置いた基準しか存在しなかった。この点に関して、近年ではさらに、より小さなナノサイズの粒子こそが健康被害にかかわる活性本体なのではないかとの考えも広がってきている<sup>12)</sup>。今後、研究がさらに進むことで、環境基準が注目する粒子のサイズはさらに微小化し、PM0.1というナノサイズの環境中微粒子が規制される日も近いかもしれない。しかし、さまざまな粒子の混合体である環境中微粒子と違い、ナノマテリアルは単一の粒子として使用されることが多い。そのため、①サイズ、形状、表面性状など、どのような物性のものが、なぜ、どのようにしてハザードをひき起こすのかといったメカニズムとともに、②そのハザードは、どの程度の曝露量で誘発される

のかといった閾値を追及することで、われわれの生活を安全に、かつ豊かに維持していくことは十分に可能である。この点で、本稿で紹介させていただいた研究は、ナノシリカのハザードを同定したにすぎず、今まさに、ナノ安全科学研究のスタートラインに立ったばかりである。たとえPM0.1が規制される日が来ようと、環境中微粒子に倣って、ナノマテリアルの使用を一律に規制するような愚かな行為につながらないように、われわれはますます気を引き締めて研究を進めていかなければならない。また、本総説では、ナノシリカによるアジュバント作用を、アレルギー病態の誘導・悪化という負の側面から概説したが、ナノシリカの持つ強力なアジュバント作用は、ワクチンアジュバントとしての可能性を想起させるものでもある。特に、ナノシリカは、粒子状アジュバントの代表である Alum とは異なり、強力なクロスプレゼンテーション誘導能を有し、ウイルスの排除などに有効な細胞性免疫をも誘導可能であることをすでに見出している<sup>13)</sup>。今後、ナノシリカのアジュバント作用のメカニズム解明が進めば、逆にIgEを誘導しない、きわめて安全なアジュバントとして発展可能かもしれない。われわれのナノ安全科学研究が、安全だけでなく、より有効なナノマテリアルの開発につながっていくことを祈念して止まない。

謝辞：末筆ながら、本研究を推進するにあたり多くのご助言を頂いた、独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトの石井健先生に、心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 934.
- 2) McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, et al. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 2348.
- 3) Napierska D, Thomassen LC, Lison D, et al. The nanosilica hazard : another variable entity. *Part Fibre Toxicol* 2010 ; 7 : 39.

- 4) Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, et al. Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials* 2011 ; 32 : 2713.
- 5) Yoshida T, Yoshioka Y, Tochigi S, et al. Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic coagulation cascade and platelets in mice. *Part Fibre Toxicol* 2013 ; 10 : 41.
- 6) Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, et al. Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection. *Part Fibre Toxicol* 2012 ; 9 : 3.
- 7) Konishi H, Tsutsui H, Murakami T, et al. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 11340.
- 8) Yoo J, Omori M, Gyarmati D, et al. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med* 2005 ; 202 : 541.
- 9) Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, et al. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 13921.
- 10) Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, et al. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2008 ; 121 : 1203.
- 11) Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 833.
- 12) Yagi R, Nagai H, Iigo Y, et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J Immunol* 2002 ; 168 : 2020.
- 13) Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, et al. Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 ; 427 : 553.

## 特集I アレ

## ウイルス アレルギー

Key Words : virus, d  
asthma,

アレルギー性疾患  
吸入抗原に対するT  
病態とする。一方  
も頻度が高いもの  
吸器合胞体ウイルス  
RSV)などによる気  
ルスRNA、および  
RNAに対する自然  
系の初動機構であ  
まな修飾作用を介  
喘息の増悪をもた

## アレルギー性

アレルギー性疾患  
関与で知見が集積  
管支炎の主たる原因  
RSVはパラミキソ  
プを有するRNA  
節性の1本鎖RNA  
の小児が感染し  
院の50-90%を  
を占める。RSV新

\* Augmentation  
\*\* Koichiro MAT  
馬出3-1-1] ; Re  
Fukuoka 812-8

ファームテクジャパン 第30巻第6号 平成26年5月1日発行 (毎月1回1日発行)

# PHARM TECH JAPAN

Vol.30 No.6 May 2014



# 5

ファームテクジャパン

# 経皮曝露に着目した ナノマテリアルの安全性評価

Nano-Safety Science focused on transdermal exposure

大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野<sup>1)</sup>, 医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト<sup>2)</sup>,

大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター<sup>3)</sup>

東阪和馬<sup>1,2)</sup>, 吉岡靖雄<sup>1,2)</sup>, 堤 康央<sup>1,3)</sup>

KAZUMA HIGASHISAKA<sup>1,2)</sup>, YASUO YOSHIOKA<sup>1,2)</sup>, YASUO TSUTSUMI<sup>1,3)</sup>

Laboratory of Toxicology and Safety Science, Osaka University<sup>1)</sup>,

Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation<sup>2)</sup>,

The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University<sup>3)</sup>

## はじめに

ナノマテリアル(粒子径100nm以下)は原料が同じであっても、比表面積・強度・硬度・電子反応性などの点で、数百nm~数 $\mu$ mほどのサブミクロンサイズの従来素材と比較し優れた機能を発揮する。そのため、さまざまな産業に革命を起こす夢の新素材として世界的に期待されており、すでに多岐にわたる分野においてわれわれの生活に身近な製品に利用・配合されている<sup>1)</sup>。例えば、ファンデーションや制汗スプレーなどの化粧品に多用されているナノシリカは、サブミクロンサイズのシリカと比較して使用感や汗・皮脂の吸着作用の点で圧倒的に優れている。また、ナノ酸化チタンは白浮きしない日焼け止めの主成分として汎用されており、皮膚がんの発生頻度が高い欧米では圧倒的な使用量となっている。このように、ナノマテリアルはすでにわれわれの生活に欠かせないものとなっており、資源に乏しく、技術立国・知財立国としての地位を築かざるを得ない本邦にとって、ナノテクノロジーおよびその代表産物であるナノマテリアルは、まさに生命線といっても過言ではない。

一方で、ナノマテリアルの安全性が世界的に危惧されており、ナノマテリアルの物性によっては、人体にとって好ましくない影響を發揮してしまうものが存在することが指摘され始めている。先日、小麦に対する食物アレルギーが誘導された事例が世間を賑わせたように<sup>2)</sup>、薬・食・環境に対する安全への懸念や健康への関心が高まっていることを鑑みても、ナノマテリアルの安全性評価は

喫緊の課題である。とりわけ、ナノマテリアルの実用化に伴う意図的な経皮曝露機会の増加や、今後ますますその開発・実用化が進展することを考慮に入れ、経皮・経口曝露といった現実の曝露経路を加味した安全性評価が求められている。一般的に、経皮曝露する化学物質の安全性を評価するうえで重要な点は体内吸収性を精査することである。体内に吸収される物質は全身のあらゆる組織へ移行する可能性があるため、曝露局所のみではなく、全身を対象として生体影響を評価する必要がある。しかし、分子量500ダルトン以上の物質を透過させないともいわれる強固な皮膚バリア<sup>3)</sup>を、サブミクロンサイズ以上の粒子が突破することは困難であろうとの認識も相まって、これまで経皮曝露を介した微粒子の影響が語られることは非常に少なかった。したがって、経皮吸収性をはじめとする曝露実態・動態(体内吸収性・組織分布・代謝・排泄、蓄積性を含めたADME情報)と、ADME情報に基づいた毒性解析、いわゆる、ADMET解析を実施し、ナノマテリアルの物性-体内・細胞内動態(ADME)-安全性の連関を定量的に評価、理解することで、ナノマテリアルのリスク解析に資する情報を集積することが急務である。

一般に表皮は、外側角質層、有棘細胞層、基底細胞層により構成され、根底に存在する真皮のための極めて強固な防御層を形成している。また、最も表層に存在する角質層は脱核した表皮角化細胞の死細胞が膜状となって重層したものである。すなわち、①通常よりも厚い細胞膜が存在すること、②その内側に裏打ち構造が存在すること、また、③細胞の間隙が脂質で満たされていること

から、外部からの異物侵入の防御や体内の水分維持に働くバリア機能の高い細胞層である<sup>5)</sup>。これら角質層が存在することから、水溶性分子や分子量の大きい物質は生きた細胞層へ到達できないものと考えられている。さらに、表皮の顆粒層の細胞同士を密着させているタイトジャンクションは水分の蒸散を防ぐとともに、角質層をすり抜けた抗原タンパク質などが体内に侵入するのを防ぐ皮膚第二の物理的バリアとして機能する<sup>6)</sup>。したがって、健康皮膚にナノマテリアルを塗布しても、表皮や真皮にまで移行する可能性は低いとされてきたが、皮膚の屈曲伸展時や外傷から直接移行するという報告もある。量子ドット(QD)の皮膚透過性を、ラットを用いて検討した報告によると、膝を曲げた状態ではQDの皮膚内部への透過は認められなかったものの、角質層の表面に吸着するQD量が膝を曲げていない状態と比較し、増加傾向にあることが示されている。また、通常状態では認められなかったQDの透過が、ラットの皮膚に擦り傷をつけることで、皮膚角質層の深層にまで移行することが示されている<sup>7)</sup>。また、アトピー性皮膚炎などにより誘発されるドライスキン(角質層に含まれる水分量が減少して皮膚が乾燥した状態になる)や紫外線照射などをはじめとする損傷皮膚においても、皮膚バリアの低下が認められ、ナノマテリアルの皮膚透過性が增大すると考えられている<sup>8)</sup>。一例をあげると、紫外線の照射によりブタの皮膚に適用させた二酸化ナノチタン、および酸化ナノ亜鉛の角質層の透過が向上するなどの報告がされている<sup>9)</sup>。

このような背景のもとわれわれは、ヒトの健康確保を第一義的な目的とし、ナノマテリアルの安全性情報の収集を目的としたNano-Safety Science(ナノ安全科学)研究と、安全なものはその利用促進に、一方で、安全性に懸念があるものに関しては単に危険性を訴え規制するのではなく、安全性を担保したものに仕上げていくNano-Safety Design(ナノ最適デザイン)研究を両輪とした、独自のナノ安全性評価研究を推進している。本誌では、われわれの研究成果の中から、化粧品分野において化粧品基材としてすでに実用化されている非晶質ナノシリカを中心に、非晶質ナノシリカの経皮吸収性に関する検討とともに経皮ハザード同定の検討結果について一部を紹介したい。

## 1. ナノマテリアルの経皮吸収性評価

本検討では、実験用グレードである一次粒径が70nm

の非晶質ナノシリカ(nSP70)、および300nm、1,000nmの従来型非晶質シリカ(nSP300、mSP1000)を用いた。非晶質ナノシリカは粒子のサイズ・構造・表面性状の制御が容易であり、生体影響や体内動態に対する物性の影響を評価することが可能である。まず、各粒子の経皮吸収性を評価するにあたり、28日間の長期塗布における体内吸収性試験を実施した<sup>10)</sup>。BALB/cマウスの左右の耳介内側に250 $\mu$ g/ear(500 $\mu$ g/匹/day)でnSP70を4週間(週5日間)塗布した。最終塗布から24時間後に、塗布部位の皮膚、近傍のリンパ節、脳、肝臓を摘出し、透過型電子顕微鏡観察により、各粒子サイズの非晶質シリカの体内吸収性を評価した。その結果、nSP300やmSP1000は表皮にすら到達しない一方で、nSP70のみが極微量ではあるものの、角質層を通過する可能性を見出した。また、通過した粒子は表皮層に存在する角化細胞やランゲルハンス細胞の細胞内のみならず、真皮層の細胞においても認められ、さらには所属リンパ節にも移行する可能性が示された。次に、28日間の連続塗布後の肝臓および脳を解析したところ、肝臓内や大脳皮質、海馬においても、わずかではあるが、nSP70の移行が認められ、さらには、経皮吸収されて肝実質内へ移行したnSP70の一部が核やミトコンドリアの内部にまで局在することが明らかとなった。

前述したように、健康皮膚にナノマテリアルを塗布しても、表皮や真皮にまで移行する可能性は低いとされており、角質層の層数(厚さ)をはじめ、毛孔・汗孔の数・大きさなどが異なることで、経皮吸収性に変化が生じることが明らかとされている。したがって今後は、老若男女、健康人、病人を問わず、ナノマテリアルを曝露する側の皮膚状態を加味したADME情報を集積することが1つの課題であると考えられる(図1)。一方で近年、角質層に傷をつけ、表皮の中に存在するランゲルハンス細胞を刺激することで活性化したランゲルハンス細胞の樹状突起が伸び、角質層をすり抜けてきた抗原を捕捉することが報告されている<sup>11)</sup>。このことは化学物質や病原体の皮膚透過には、単に角質層を通過する経路のみならず、ランゲルハンス細胞の能動的な取り込み機構が働く経路も存在することを示唆するものである。すなわち、ナノマテリアルの経皮吸収性においても、本観点を鑑みた移行メカニズムの解明が重要であり、今後は透過型電子顕微鏡を用いた解析のみならず、暗視野顕微鏡を用いることで、経皮吸収されたナノマテリアルの皮膚構造内での局在について精査していく予定である。また、本検討は

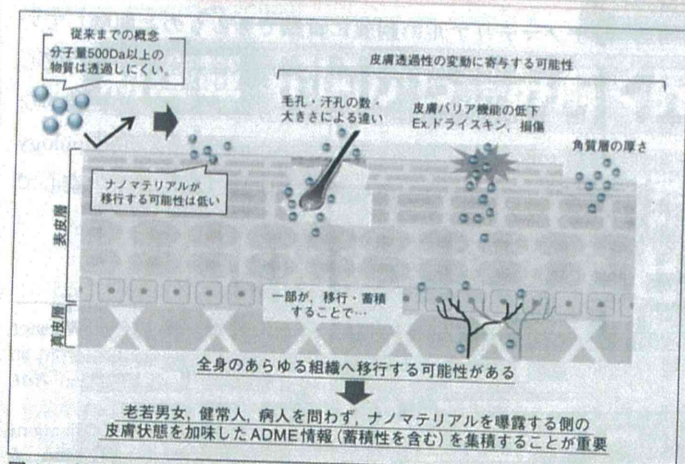


図1 ナノマテリアルの経皮吸収性

あくまで定性的な解析であり、安全性研究に必須である定量的な体内動態(曝露実態)情報に乏しいことから、今後は物性-曝露実態-安全性(毒性)の連関情報の収集に向けた定量的な検討を進める必要がある。

## 2. 非晶質ナノシリカがアトピー病態に及ぼす影響評価

非晶質シリカは100nm以下のナノサイズとなることで皮膚の物理バリアを突破し、ケラチノサイトのみならず、表皮のランゲルハンス細胞や所属リンパ節といった免疫応答に重要な細胞、組織に侵入することが明らかとなった。ケラチノサイトやランゲルハンス細胞などの皮膚の細胞は、生体防御機構の起点として働く細胞群であることを加味すると、非晶質ナノシリカの経皮曝露により皮膚免疫系が攪乱されている可能性が十分に考えられる。そこで次に、皮膚免疫系を起点とした非晶質ナノシリカの経皮ハザードを同定するために、代表的な皮膚免疫疾患であるアトピー性皮膚炎(AD)の悪化に対する非晶質シリカの影響について解析した<sup>12)</sup>。本検討では、ADの発症や悪化の原因の一つであると考えられるヤケヒョウダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*: Dp)の抽出抗原を曝露することで、AD様症状を発症するNC/Ngaマウスの皮内投与モデルを用いた。本モデルでは、AD病態が重症化することで、皮膚局所の腫脹、痂皮形成、表皮の肥厚や浮腫などが認められる。そこでまず、各非晶質シリカを投与した際の耳介部の腫脹を観察した。本検討では、非晶質シリカの粒子径と生体影響との連関を解析する目的で、上記までのnSP70、nSP300、mSP1000に加え、一次粒子径が30nm、100nmの非晶質ナノシリカ、nSP30、

nSP100を用いた。なお本検討では、ハザード同定を目的に皮内投与という非現実的な投与経路を用いるとともに、ヒトが曝露し得る約100倍の投与量(125  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )で各粒子を投与した。本検討の結果、nSP300およびmSP1000をDpと共投与した群では、ポジティブコントロールであるDp単独投与群と同程度の耳介部の腫脹傾向が認められた。一方で、100nm以下の非晶質ナノシリカ(nSP30、nSP70、nSP100)を適用したマウスの耳介では、Dp単独投与群よりも2~5倍ほど腫脹が増強していた。また、病理解析の結果、Dpと各粒子を投与することでADの代表的病変である痂皮形成、表皮の肥厚、炎症性細胞浸潤、浮腫が促進することが明らかとなった。特に痂皮形成、浮腫の促進は非晶質ナノシリカ(nSP30、nSP70、nSP100)投与群でのみ有意に増強されていた。以上の結果から、非晶質ナノシリカの共投与がDp誘発性のAD病態の悪化に寄与する可能性が示された。一方で、今回はあくまでADモデルマウスを用いた皮内投与の検討結果であるため、現在、現実的な経皮塗布モデルや通常マウスを用いた検討も実施し、詳細な情報を収集している。本検討の中で、少なくとも、ファンデーションなどを使用した場合における非晶質ナノシリカ曝露量の100倍程度を皮膚塗布しても、Dp誘発性のAD様病態が悪化しないことを確認している。すなわち、皮膚バリア機能に障害を有している場合などに関しては別途検討を実施する必要があるものの、本総説で紹介した非晶質ナノシリカによるハザードは、現状のわれわれの生活においてただちに危惧する必要のあるものではないと考えられる。しかし、われわれはさまざまな製品から、非晶質ナノシリカを含めた多様なナノマテリアルを一生涯にわたって曝露し続けることを考えると、本ハザードとの関連を含めて、蓄積性をはじめとする動態情報を十分に収集したうえで議論を深めていくことが重要であろう。したがって今後は、ナノマテリアルの粒子径以外の物性、例えば、表面性状や形状といった点を考慮し、AD病態の悪化と物性・動態との連関解析を図る必要がある。この点、すでに筆者らはnSP70の表面性状をカルボキシル基、あるいはアミノ基で修飾することで、ヒト皮膚角化細胞株に対するnSP70作用によるDNA障害、ROS産生を抑制し得ることなどを見出している<sup>13,14)</sup>。すなわち、これらの結果はnSP70の表面性状を制御することで、AD病態の悪化を軽減できる可能性を示すものであり、現在、安全なナノマテリアルの創製に資する基盤情報の収集につい



でも進行している。これらの結果を総合的に判断することで、非晶質ナノシリカとDpを経皮適用した際のハザード発現について、より慎重に考察する必要があると考えている。

## まとめ

本検討では、分散性に優れた実験用グレードの非晶質ナノシリカを用いた経皮吸収性試験を実施した。しかし、日本化粧品工業連合会によると、化粧品原料に適用されている多くのナノマテリアルは原料の保管段階あるいは製品への適用段階において、粒子が凝集状態で存在していると考えられている。これら凝集性については、ナノマテリアルの安全性評価研究を進めるうえで考慮すべき点であり、ナノマテリアルの安全性確保に向けては、実サンプルを用いた安全性評価が必須であるといえる。また近年では、ナノサイズのものばかりではなく、抗体や分子と同程度の大きさ(10nm以下)にまで制御されたナノマテリアル(われわれはこれら素材をサブナノマテリアルとして定義、提唱している)が開発されている。これらサブナノマテリアルは、いまだ定義そのものがないままではあるものの、ナノマテリアルとも異なる体内・細胞内動態を示すなどナノマテリアルと分子の特性を併せ持つ可能性が示されており、新たな素材として期待されている。これまでにわれわれも、サブナノマテリアルは、ナノマテリアル・従来型マテリアルとは異なる体内挙動を示し得ることなどを明らかとしている。すなわち今後、抗体や分子のサイズ領域の素材が加速度的に開発、実用化されることを鑑みると、ナノマテリアルのみならず、サブナノマテリアルを経皮曝露した際の体内吸収性をはじめとする体内動態解析が必要不可欠であると考えられる。さらに、動物愛護の観点からナノマテリアルの安全性評価においても、ヒト細胞株を用いた*in vitro*皮膚感作性試験法(human Cell Line Activation Test: h-CLAT)の開発、ヒト皮膚透過性に近いブタ皮膚を用いた*in vitro*透過性試験など動物実験に代わる代替法の確立、利用が重要となってくると考えられる。したがって、これら手法を応用することで、安全なナノマテリアルを効率よくスクリーニングし、ナノマテリアルの開発支援の一助となることを期待している。

今後、これら素材を物性・曝露実態情報・ハザード情報を体系的に整理して世間に発信していくことで、ナノマテリアルの安全使用のためのガイドライン策定や安全

なナノマテリアルの創製に貢献できるものと期待している。将来的に本研究成果が、国民や社会が安全かつ安心して、何よりも納得のうえでナノマテリアルの継続的な利用・社会受容を図るためのsustainable nanotechnologyの実現、ひいてはヒトの健康が確保された安全・安心で豊かな社会の実現につながることを祈念している。

## 参考文献

- 1) Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.*, **4**(10), 634-41 (2009)
- 2) Fakruddin M, Hossain Z, Afroz H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J. Nanobiotechnology*, **10**, 31 (2012)
- 3) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, et al. Rhinconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**(2), 531-3 e1-3 (2011)
- 4) Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, **9**(3), 165-9 (2000)
- 5) Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **121**(2), 231-41 (2003)
- 6) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.*, **156**(6), 1099-111 (2002)
- 7) Zhang LW, Monteiro-Riviere NA. Assessment of quantum dot penetration into intact, tape-stripped, abraded and flexed rat skin. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **21**(3), 166-80 (2008)
- 8) DeLouise LA. Applications of nanotechnology in dermatology. *J. Invest. Dermatol.*, **132**(3 Pt 2), 964-75 (2012)
- 9) Monteiro-Riviere NA, Wiench K, Landsiedel R, Schulte S, Inman AO, Riviere JE. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an *in vitro* and *in vivo* study. *Toxicol. Sci.*, **123**(1), 264-80 (2011)
- 10) Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Matsuo K, Arimori A, et al. Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials*, **32**(11), 2713-24 (2011)
- 11) Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.*, **206**(13), 2937-46 (2009)
- 12) Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Tochigi S, Ichihashi K, et al. Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection. *Part Fibre Toxicol.*, **9**, 3 (2012)
- 13) Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Hirai T, et al. Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res. Lett.*, **6**(1), 93 (2011)
- 14) Yoshida T, Yoshioka Y, Matsuyama K, Nakazato Y, Tochigi S, Hirai T, et al. Surface modification of amorphous nanosilica particles suppresses nanosilica-induced cytotoxicity, ROS generation, and DNA damage in various mammalian cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **427**(4), 748-52 (2012)

## ナノマテリアルの開発・安全性評価の up to date

吉岡 靖雄,<sup>\*,a,b</sup> 堤 康央<sup>a,c</sup>

## Recent Topics on Development of Nanomaterials and Nano-Safety Science

Yasuo Yoshioka<sup>\*,a,b</sup> and Yasuo Tsutsumi<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; <sup>b</sup>Laboratory of Biopharmaceutical Research, 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; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

20世紀以降、科学技術の発展を基盤として産業化／工業化が進展することで、大量生産、大量消費の社会を生み出し、われわれ人類の生活水準は格段に向上してきた。そして、21世紀における現在でも科学技術の発展は留まることなく、人類の生活の質の向上に向けて、様々なテクノロジーが開発されている。特に近年では、革新的なナノテクノロジーの進展も相俟って、ナノマテリアルの開発・実用化が世界的に進んでいる。昨今では、ライフイノベーションとグリーンイノベーションの推進に、ナノテクノロジー・ナノマテリアルが必須と位置付けられており、衣食住～環境まで、その使用範囲は拡大の一途をたどっている。わが国においては、飯島澄夫先生のカーボンナノチューブの発見に始まり、世界的にもナノマテリアルの開発・実用化の点でリードしており、知財技術立国として、有用機能を有するナノマテリアルが続々と産み出されている。薬学領域においても、ナノメディシンとも言うべき新たな治療戦略が提唱されているなど、薬物送達担体、イメージング素材、診断薬への応用など、まさに21世紀を担う薬学素材といっても過言ではない。一方で、ナノ化によって、安全性を運命づける『動態特性や効能・効果』が、同一素材であっても、従前のサブミクロンサイズ以上の素材や分子状素材と大き

く変動し得ること、そのうえ、粒子径・形状・表面性状・分散／凝集状態などによっても、ナノマテリアルに特有の性能が変動し得ることが理解されつつある。そのため、21世紀テクノロジー産物としてのナノマテリアルには、有用なのは当たり前で、圧倒的な付加価値として、安全・安心であることがこれまで以上に強く求められている。しかし、ナノマテリアルの安全性については、ハザード情報でさえまだまだ不十分であり、リスク解析に必須の曝露実態(動態(ADME): 吸収性、その後の分布、代謝、蓄積・排泄といった細胞内・体内挙動)情報に至っては皆無に等しい。さらに粒子径・形状・表面性状・分散／凝集状態などの物性・品質によっても、ナノマテリアルに特有の性能(有用性／有効性や安全性／毒性)が変動し得ることが理解されつつあるにもかかわらず、化審法などにおいても、ナノマテリアルにはほとんど言及しておらず、主としてナノマテリアルを構成する化学物質の構造式(物質名)で規制せざるを得ないのが現状である。一方で、わが国の圧倒的な強みである「有用なナノマテリアルの開発と実用化」を活かし、社会や産業界がその恩恵を最大限に享受していくことは、今後の最重要課題となっている。したがって、ナノマテリアルの安全性評価(ADMETの理解)と安全なナノマテリアルの利用促進、安全性に懸念が残るものは安全なもの仕立てあげていくことが、まさにキーポイントとなっており、ヒトの健康確保と社会受容の促進(ナノテクの社会還元)の両方が急がれている。

本観点から、日本薬学会第132年会において、産官学の多方面から、ナノマテリアルの使用規制を含

<sup>a</sup>大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野(〒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バイオ創薬プロジェクト(〒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1-6)

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

日本薬学会第133年会シンポジウム S30-304 序文