

トキシコキネティクス／トキシコプロテオーム解析による ナノマテリアルの生物学的影響評価

吉川 友章,^{*,a,b} 鍋師 裕美,^{a,c} 吉岡 靖雄^{a,d}

Evaluation of Biological Influence of Nano-materials using Toxicokinetic and Toxicoproteomic Approach

Tomoaki YOSHIKAWA,^{*,a,b} Hiromi NABESHI,^{a,c} and Yasuo YOSHIOKA^{a,d}

^aLaboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki City 567-0085, Japan, ^bThe Center for Advanced Research and Education in Drug Discovery and Development, ^cThe Department of Biomedical Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, and ^dThe Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received July 15, 2008)

The recent development of nanotechnology has facilitated a dramatic reduction in the size of materials. Nanomaterials are nanometer-sized materials with specific physicochemical properties that are different from those of the bulk material of the same composition. Such properties make them very attractive for cosmetic and medical applications. However, nanoparticles can act on living cells or bodies at the nano-level resulting in biologically undesirable as well as desirable effects. Thus, reduction in particle size from the micro- to nano-scale not only provides benefits to diverse scientific fields but also poses potential risks to the environment and to human health. Although significant resources are aimed at exploiting the desirable properties of nanoparticles for applications in medicine or cosmetics there are only limited attempts to evaluate potentially undesirable effects *in vivo*. Thus, there is a pressing need for a careful consideration of the benefits and side effects to the use of nanoparticles in medicine and cosmetics. In recent years, the majority of toxic biological response induced by nanomaterials (Nanotoxicity) has focused on cell culture systems. However, data from these studies will require verification from *in vivo* experiments using animals. An understanding of Toxicokinetics (the relationship between the physical properties of the nanomaterials and their *in vivo* behavior) would provide a basis for evaluating undesirable effects. Moreover, toxicoproteomics may identify predictive bio-markers for examining nanotoxicity. In this review article, we describe the assumptions and challenges in the field of nanotoxicity and describe advances for studying nanotoxicity of nanosilicas using toxicokinetics/toxicoproteomics both *in vivo* and *in vitro*.

Key words—nanomaterial; nanosilica; toxicokinetics; toxicoproteomics

1. 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す得るキーテクノロジーとして脚光を

浴びている。ナノテクノロジーを駆使して創製される新素材 (ナノマテリアル) は、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、現在、産官学連携の下でナノテクノロジーを活用した新規医薬／化粧品用素材の開発及び新用途探索が精力的に推進されている。医療分野では、既にナノスケールの酸化鉄粒子 (Super Paramagnetic Iron Oxide; SPIO) や半導体ナノ粒子 (Quantum Dot; QD) などを活用したイメージング診断技術の進展が目覚ましく、¹⁻⁵⁾ また、われわれの研究グループを含めた数多くの研究者によって各種ナノマテリアルを駆使したドラッグデリバリーシステムの開発なども精力的に進められている。⁶⁻⁹⁾ さらに、

^a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 (〒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附属創薬教育センター,

^c同医薬基盤科学分野, ^d大阪大学臨床医工学融合研究センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

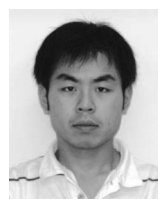
*e-mail: tomoaki@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム S32 で発表したものを中心に記述したものである。

化粧品に含まれる酸化チタンや酸化亜鉛、シリカといった無機顔料は、粒子の大きさが小さいほど機能性（透明感・使用性・紫外線防御能）が高まることが経験的に知られており、1960-70年代からナノサイズの無機顔料が既に化粧品に配合されてきた。このように、特に医薬・化粧品領域ではナノテクノロジーの急速な進歩に伴ってナノマテリアル含有製品の開発に一層拍車がかかっている。^{10,11)} その一方で、ナノマテリアルの生産増加においては他のすべての化学物質と同様に、生体影響を考慮する必要性が徐々に表面化しつつある。¹²⁾ しかしながら、こういったナノマテリアルの生体影響/毒性解析研究は途に就いたばかりであり、ナノマテリアルの人体に対する有害性に関する情報収集は世界的にみても圧倒的に立ち遅れているのが現状である。ナノ顔料配合化粧品が既に実用化・販売されていることに加え、国家レベルでナノマテリアルの産業応用が推進され、ナノマテリアルへの人体曝露を避け得ない状況にある現代では、特に人体に対するナノマテリアルの生物学的影響に関する評価及び情報収集と、それらの情報を基盤としたナノマテリアルのリスク予測法の開発が急務となっている。

ナノマテリアルとは、そもそもどのような“構造・性質”を持つ素材として定義されているのであろうか？ 種々の機関・報告で一定した見解が得られておらず、国際的に同意の得られた定義が存在していないのが現状であるが、少なくとも構造の面では“1つの次元の大きさが1-100 nmの素材”として幅広く定義することが多い。すなわち、一次元がナノスケール（他の二次元へ広がりをもつ）の材料は薄膜・塗膜、二次元がナノスケール（残る一次元へ広がりをもつ）の材料はナノワイヤやナノチューブ、三次元がナノスケールの材料はナノ粒子のことを指す。場合によっては、ナノ粒子を使用（投与）した時点で構成分子に分解する不安定なナノ粒子（リポソームやマイクロ・ナノ乳液）と、不溶性ナノ粒子（酸化チタン、フラーレン、QD）とに分類することや、定義上はナノマテリアルではないものの、ナノ粒子の“凝集体や塊”を互いにナノマテリアルがつながったナノ構造材料として定義することもある。一方で、性質の面では一次元以上の外形寸法あるいは内部構造がナノスケールであり、ナノ領域の寸法を有しない同じ組成の材料と比べて新規

な性質を有する材料であると定義されることが多い。一般に、ナノサイズの物質は従来までの物質と比べて、1) 電子状態、2) 化学的性質（表面積の増大など）、3) 力学的性質、4) 電気的性質、5) 磁気的性質、6) 光学的性質が変化する可能性が指摘されている。¹²⁻¹⁴⁾ 例えば、QDやSPIOはイメージング試薬として利用されているが、QDは粒子の大きさに応じて色調が変化すること、SPIOは超常磁性を発揮することなど、これらはナノサイズ特有の性質を利用した素材である。このように、ナノサイズのマテリアルは従来までのバルクサイズの素材にはない未知の特性を発揮する可能性を秘めており、こういったナノマテリアル特有の構造・性質が今までは想像もできなかった新たな医療/化粧品素材の創出や使用用途の開拓を期待させる所以である。しかしながら、逆にナノマテリアルのリスク評価の観点からみると、ナノマテリアルの個々の未知特性や凝集体・塊を形成した際の予測困難な性質変化は、リスク評価基準の作成（標準化）を妨げる主要因となっている。これらの背景から、国際標準化機構（ISO）においては、ナノマテリアルの国際標準化活動を促進するために技術委員会を設置するなど種々の取り組みを進めている。しかし、ナノマテリアルの構造・性質に関して詳細な情報が蓄積されていない現状において、むやみに標準化を推し進めることは、ナノマテリアルの危険性ばかりを浮き彫りにしてナノテクノロジーの社会からの拒絶を招く可能性があるため、その後の産業応用の阻害要因になり得ることも考慮すべきである。こういったナノマテリアルの物性/構造的な多様性は、ナノマテリアルの生物学的影響に単一の回答が存在しないことを意味しているかもしれない。しかし、産業界の未来を切り開く“光”となり得ると期待されているナノマテリアルを活用した豊かな社会を実現するためには、ナノマテリアルの安全性確保のためのリスク評



吉川友章

2003年大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程修了（真弓忠範教授）。2006年同大学博士後期課程修了（中川晋作教授）。大阪大学大学院薬学研究科特任研究員、独逸薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト特任研究員（堤康央リーダー）を経て、2008年より大阪大学大学院薬学研究科附属創薬教育センター特任助教（常勤）。

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融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のアプローチ

(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

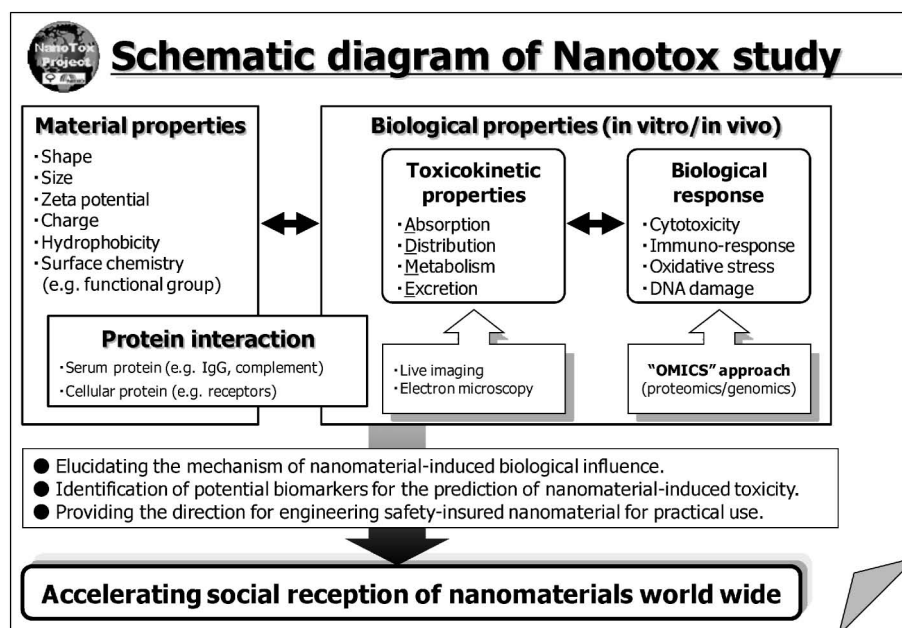


Fig. 1. Schematic Diagram of Our Nanotox Projects

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性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

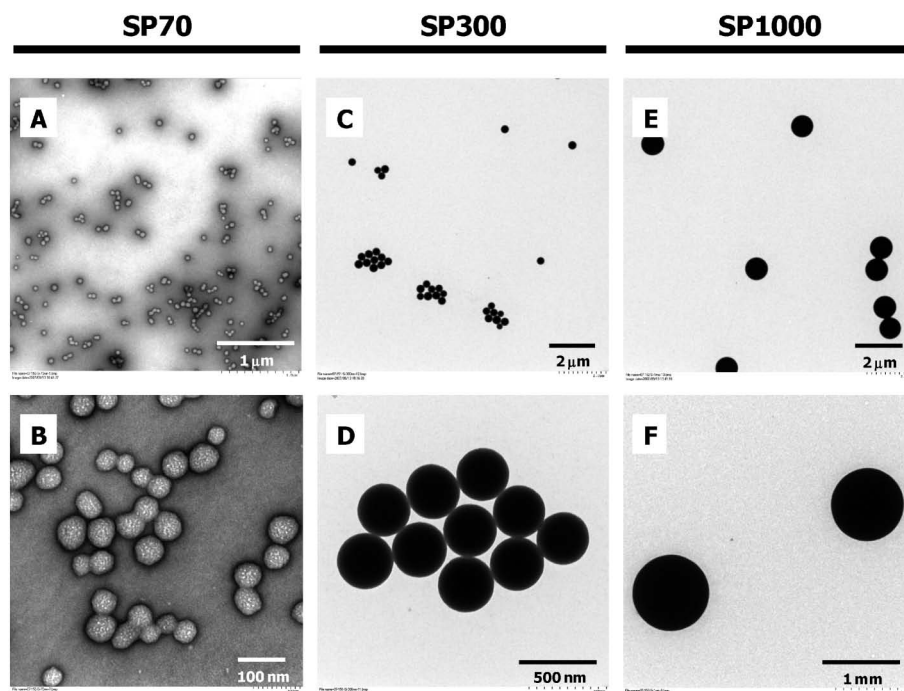


Fig. 2. Transmission Electron Micrographs of Nanosilicas

(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 Dehydrogease (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

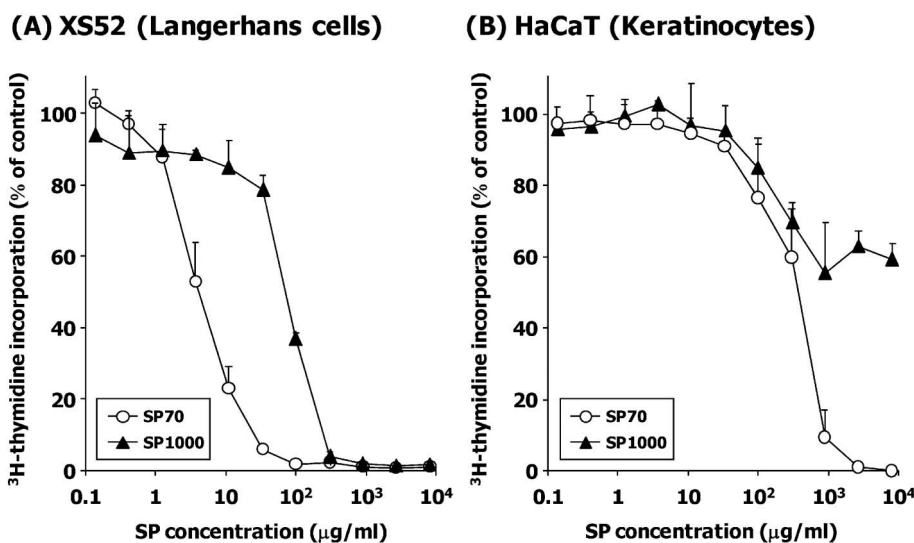


Fig. 3. The Effect of Nanosilica-treatment on Proliferation of XS52 (A) and HaCaT (B) Cells.

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 ± 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にしている。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 (外部暴露) 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 開発研究で明らかなように、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貪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、外部暴露量に加えて内部暴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 の大部分が核小体に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亜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* リスク評価を統合的に進めることで、未知の亜致死細胞毒性の推測/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関連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

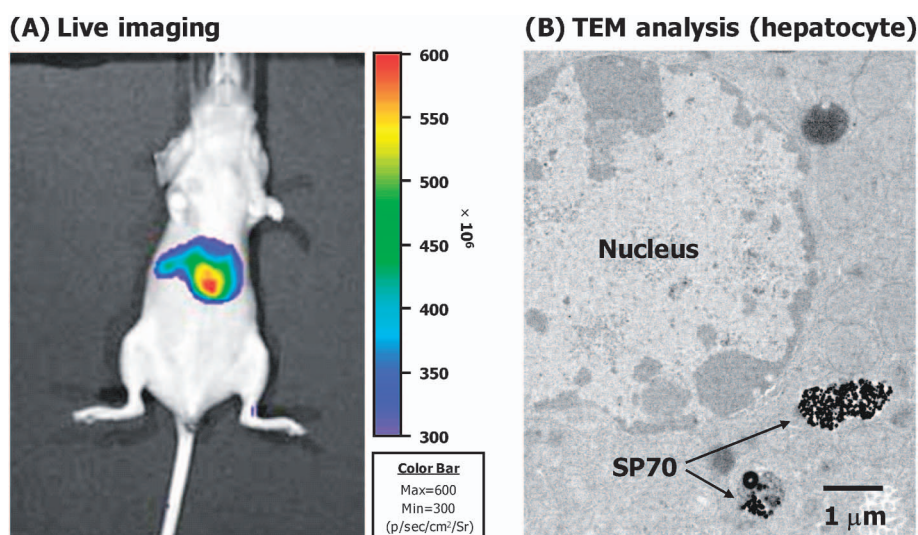


Fig. 4. Optical Live Imaging and Transmission Electron Microscopic Analysis of Fluorescent Labeled Nanosilicas in Mice

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生が指摘されている。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・憎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., *Nanomedical*, **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., Kovochich 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., Smaih 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).