

トキシコキネティクス／トキシコプロテオミクスによるナノマテリアルの安全性評価

鍋師裕美,^{a,b} 吉川友章,^{a,b} 今澤孝喜,^b 角田慎一,^{a,b,c} 堤 康央^{*,a,b,c}

Safety Assessment of Nanomaterials Using Toxicokinetics and Toxicoproteome Analysis

Hiromi NABESHI,^{a,b} Tomoaki YOSHIKAWA,^{a,b} Takayoshi IMAZAWA,^b
Shin-ichi TSUNODA,^{a,b,c} and Yasuo TSUTSUMI^{*,a,b,c}^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, ^bNational Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, and ^cThe Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 31, 2009)

With recent development of the nanotechnology, nanomaterials have been successfully employed in various industrial applications such as medicine and cosmetics. Nanomaterials show the useful properties such as electronic reactivity and the tissue permeability that were not provided by micromaterials. Thus, nanomaterials are expected as innovative materials for the development of medicine and cosmetics. However, these innovative properties may show unknown biological responses that could not be detected by the conventional toxicity assay. For industrial development and affluent society establishment that enjoyed only a benefit of nanomaterials, it is urgent to gather information of the properties and the biological effects, and to establish the standard safety evaluation method of nanomaterials. So, we are analyzing association among property, biodistribution and biological effects of nanomaterials to search for the safety biomarker (functional-, molecular- and biochemical-biomarker) using nanosilicas (nSP) as a standard nanomaterial. Because nSP shows high uniform dispersibility and is already used in medicine, cosmetics and food additive, the results of this study are useful to extrapolate it to other nanomaterials and to make practicable as safety biomarker. In this report, we show the latest knowledge about the linkage information among property, biodistribution and biological effects of nSP by toxicokinetics and toxicoproteomics, and the search study of safety biomarker based on these basic information.

Key words—nanomaterial; toxicokinetics; toxicoproteomics; biomarker; nanosilica

1. はじめに

2000年1月に当時の米国大統領クリントンが、国家ナノテクノロジー戦略 (National Nanotechnology Initiative) を宣言し、ナノテクノロジー産業の開発を推進するために大規模な国家予算の投資を開始した。これが起爆剤となって、例えばカーボンナノチューブやフラーレンといった新たなナノマテリアルの開発や、ナノマテリアルを利用した製品開発が世界的に進展することとなった。このような世界的背景を受けてナノマテリアル産業の世界市場

は、20年後には年1兆ドルにも達すると予想されており、¹⁾ ナノマテリアル産業は、今後の世界経済を牽引し、人類に多大な恩恵をもたらす21世紀のコア産業となるものと期待されている。

数あるナノマテリアルの中でもナノシリカやナノ酸化チタンは、サイズ減少効果によってザラつきの軽減や吸湿性の向上、紫外線遮蔽能の向上といった有用な効果が得られることから、乳液やクリーム、日焼け止めなどの化粧品や食塩、ベーキングパウダー、シーズニングパウダーなどの食品に配合される素材として古くから利用されてきた。ナノシリカやナノ酸化チタンに代表されるナノマテリアルが化粧品関連産業だけでも世界で年間1000–2000トン以上も使用されていること、また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、²⁻⁴⁾ 今やわれわれは製造現場や環境中に廃棄されたナノマテリアルへの非意図的な曝露や医薬品・化粧品・

^a大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6), ^b独立行政法人医薬基盤研究所 (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8), ^c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2-2)

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

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS6で発表したものを中心に記述したものである。

食品を利用することによるナノマテリアルへの意図的な曝露を避け得ない状況にある。このような中、近年、トランスジェニックマウスなどを用いたナノマテリアルの安全性試験の結果、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、人類の健康を確保する上で軽視できない事実が報告され、⁵⁻⁷⁾ ナノマテリアルは、人類にとって有用な“光”の側面と、望ましくない“闇”の側面の二面性を持つ素材であることが世界的に認識されつつある。^{8,9)} 先述したように、ナノマテリアルへの曝露を避け得ない現状から、世界的に、ナノマテリアルの闇の部分のみがクローズアップされつつあり、OECD との連携のもと、欧米各国を筆頭に、ナノマテリアルの安全性情報が不十分なまま、ナノマテリアルの開発や実用化を一時的に規制しようとする動きが顕在化している。このままでは科学的根拠に乏しいむやみな使用規制が施行されてしまい、ナノマテリアルの光の側面を享受した豊かな社会の構築や、ナノマテリアル産業を基盤とした産業発展が阻害されてしまいかねない。したがって、ナノマテリアルの安全性を科学的根拠に基づいて評価するとともに、これらの安全性評価によって得られる情報を基盤として安全なナノマテリアルを開発すること (NanoTox 研究) が喫緊の最重要課題となっている。

NanoTox 研究を行う上で考慮すべき点は、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渡って曝露され続けることにある。そのため、ごくわずかでも吸収・蓄積され続けると、大きな安全性問題を招きかねない。周知の通り、どんな危険な物質も、曝露後、体内に吸収されない限り安全 (化粧品の場合で言うと、経皮吸収されない限り安全) である。すなわち、NanoTox 研究においては、ナノマテリアルが体内に吸収されるか否かを評価すること (動態解析) が最も重要かつ最優先の検討課題であると言っても過言ではない。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、最も肝心な体内吸収性や体内/細胞内動態に関する情報が圧倒的に不足している。これは、低分子量の化学物質の場合、一般に、曝露と吸収がニアリコールで捉えられているものの、ナノマテリアルの場合には曝露されても吸収されない、あるいは吸収される訳がないとの

前提で、その動態解析はほとんど検討されていない。そのため、NanoTox 研究は往々にして、非現実的な『実験のための実験』と批判される。このような現状であるにもかかわらず、ナノマテリアルの開発や実用化が規制されようとしていることをわれわれは強く危惧している。

そこで、われわれは、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性確保を目指して、①蛍光/電顕イメージングを活用したナノマテリアルの体内吸収性と体内/細胞内動態の解析、②既存の生化学バイオマーカーを活用した生体影響の解析 (ハザードの特定)、③プロテオミクスを活用した新規安全性バイオマーカーの探索と未知の生体影響の解析 (未知のハザードの特定)、を融合的に推進している (Fig. 1)。これら①-③の情報に関連からナノマテリアルの物性と安全性の因果関係を明確化することによって、最終的にナノマテリアルの安全性予測・有害性回避法の確立、さらには、有効かつ安全なナノマテリアル設計指針の策定につながるものと考えている。本稿では、ナノマテリアルの中でも生産量・使用量の点で最も汎用されている非晶質シリカの NanoTox 研究の現状を紹介する。

2. 非晶質ナノシリカの経皮吸収性及び体内動態の評価

非晶質シリカは、既に医薬品や化粧品、食品など、幅広い領域で使用されており、¹⁰⁻¹²⁾ 現在使用されているもののほとんどがナノメートルサイズの人工合成物である。この非晶質ナノシリカは、年間1メガトン以上も生産され、その市場規模は3億1400万ドルにも及ぶなど、数あるナノマテリアルの中でも使用/消費量が極めて多い素材である。¹²⁾ また従来品はアグリゲーションのため、実際の使用条件下ではサブミクロンサイズ以上であったが、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、この数年でサイズダウンや分散性の向上が加速度的に進展しており、現在では、直径が2.5 nm のものまで開発されている。しかしながら、例えばわが国においては、従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカの安全性情報を基に、ナノシリカ (微粒二酸化ケイ素) を食品中に最大2%まで配合することが「食品、添加物等の規格基準 (厚生省告示第370号)」により許可されているものの、¹³⁾ これらの規制は粒子サ

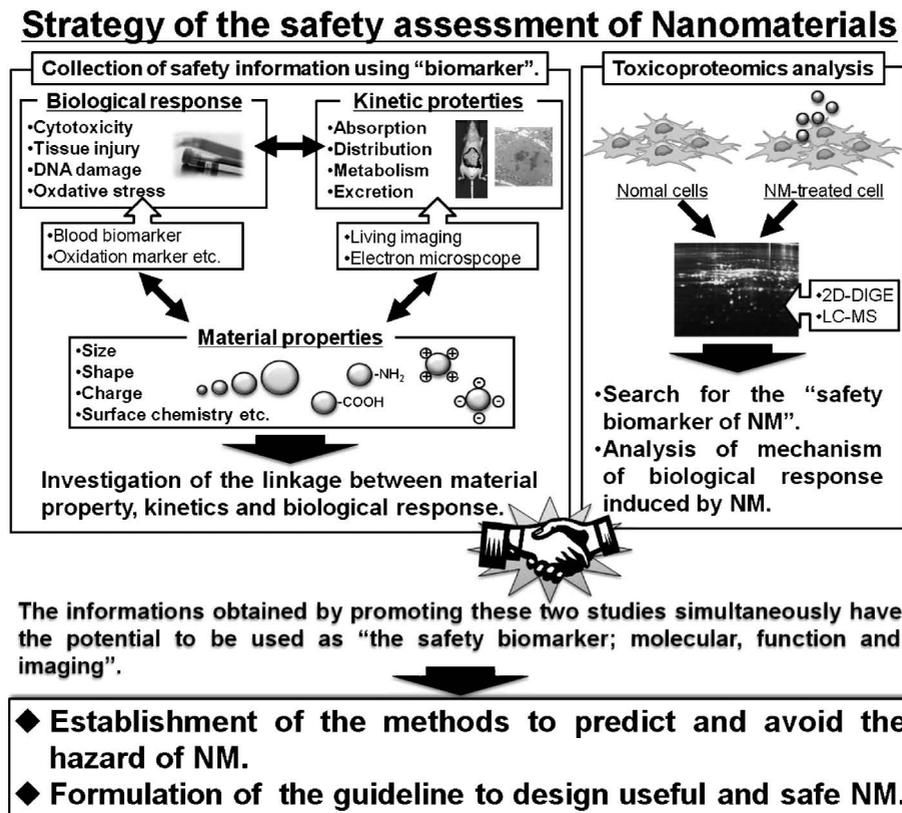


Fig. 1. Scheme of Our Safety Assessment of Nanomaterials

イズにまでは言及していない。つまり、ナノメートルサイズの非晶質シリカは適用範囲・生産量・ヒトの曝露機会が圧倒的に高い素材であるにもかかわらず、安全性が未知のまま使用されており、数あるナノマテリアルの中で最も安全性評価が急がれている素材に位置づけられる。そこで本研究では、これらの点を加味して非晶質ナノシリカの経皮吸収性/体内・細胞内動態を評価した。

まず、3次元培養皮膚を用い、分散性に優れた粒子サイズが70, 300, 1000 nmの蛍光標識非晶質シリカ（それぞれnSP70, nSP300, mSP1000）の経皮吸収性を評価したところ、nSP70のみが培養皮膚の深部にまで到達していた（未発表データ）。そこで次に、マウスを用いて *in vivo* での経皮吸収性及び体内/細胞内動態を透過型電子顕微鏡解析により評価した。各シリカをマウス耳介皮膚に3日間及び28日間連続塗布し、投与局所及び所属リンパ節、各主要組織の透過型電子顕微鏡観察を行った。その結果、表皮層に存在する角化細胞内（Fig. 2）、ランゲルハンス細胞内、神経や血管が豊富に存在する真皮層でnSP70の侵入が確認された。さらに、投

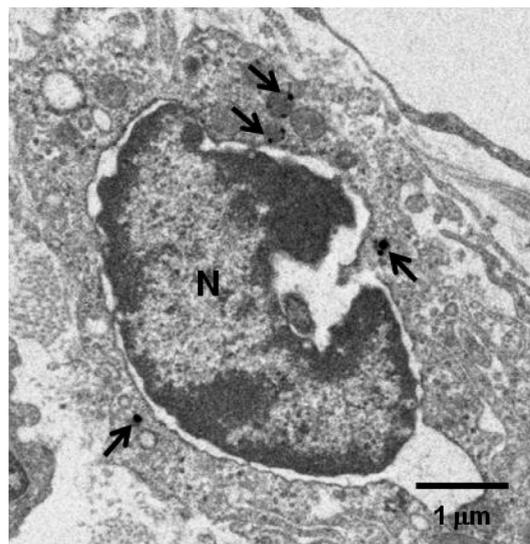


Fig. 2. TEM Observation of Skin from Dermal Administrated Mice

nSP70 suspension supplemented (250 $\mu\text{g}/\text{ear}/\text{day}$) with 10% isopropyl myristate were applied to the inner side of both ears of HR-1 mice with or without 20 tape-stripping for 3 days. nSP70 were present in keratinocytes of nSP70-treated skin without tape-stripping. Arrows: nSP70, N: nucleus, Scale bars: 1 μm .

与部位近傍の所属リンパ節内にもnSP70の侵入する可能性を見い出している。以上の結果は、粒子サ

イズが 100 nm 以下のナノシリカの安全性を評価するに当たっては、経皮吸収され、全身分布する可能性があるため、投与局所のみならず全身レベルでの安全性評価（ハザード評価）をも実施する必要があることを示唆している。また 100 nm 以下のサイズのナノシリカが、①生体中で最も強固な異物バリアとして機能する皮膚をも通過する、②脳や免疫組織（リンパ節や脾臓など）に蓄積するという事実は、経皮安全性評価に加えてナノマテリアルを経肺・経口曝露した際の安全性評価や脳神経/免疫学的な安全性評価が必須であることを示唆している。

3. 非晶質ナノシリカを全身投与した際の安全性評価及び動態解析

ナノシリカが全身循環した際の生体影響及び体内/細胞内動態を評価するために、粒子サイズが 70, 100 (nSP100), 300, 1000 nm のシリカを BALB/c マウスに尾静脈内投与 (2 mg/匹) した際の急性毒性試験を実施した。その結果、nSP70 あるいは nSP100 を投与した群では、投与 3 時間後から立毛や体温低下が生じ、nSP100 投与群では 40% のマウスが死亡、nSP70 投与群においては投与後 12 時間以内にすべてのマウスが死亡した (Table 1)。その一方で、nSP300 及び mSP1000 を投与したマウスには急性毒性の所見を全く認めていない。さらに、シリカ投与 6 時間後の血液を用いて血液生化学マーカーを測定したところ、nSP70 投与群において、肝傷害マーカーである Alanine aminotransferase (ALT) (Table 1) 等の顕著な上昇が認められた。また、種々肝機能マーカーが nSP70 投与群で減少する傾向をも認めている。これらの結果は、粒子サイズが 100 nm 以下のナノシリカは全身分布した後に致死

毒性及び肝毒性が発現するリスクを孕んでいることを示すものである。

続いて、ナノシリカの肝毒性発現機序の解明を目的に、各ナノシリカをマウス尾静脈内より投与した際の体内動態を評価した。いずれのナノシリカを適用した群においても、肝臓において粒子由来の蛍光が検出され、投与後 48 時間に渡って蛍光が観察された。また、筆者らは、腸管や糞便中において粒子由来の蛍光が検出されることを見い出しており、これらの情報を総合すると、血中に侵入したナノシリカが胆汁排泄によって体外に排出されるものと予想された。続いて、ナノシリカ投与マウスから摘出した肝臓を用いてナノシリカの肝臓内局在を精査した。nSP70 は肝臓全体に分布していたのに対して、nSP300 及び mSP1000 投与マウスの肝臓では、胆のうにおいてのみ蛍光が検出された。これらの結果は、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。

4. 皮膚角化細胞株を用いた *in vitro* におけるナノシリカの動態・細胞応答の解析

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マイクロメートルサイズの従来素材とは異なる動態特性を発揮し、NanoTox 研究においては、ナノマテリアルの動態情報を基盤とした安全性評価が極めて重要であることを明らかにした。そこで以降の検討では、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 時間後の細胞を透過型電子顕微鏡にて観察した。nSP300 あるいは mSP1000 を適用したいずれの群においても、細胞内に侵入した像が認められた。nSP300 添加群ではオルガネラの形態異常などはみられなかったが、mSP1000 を添加した群において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。これらの事実は、直径 70 nm 以下の新素材と直径 300-数 μm の従来までの素材が、細

Table 1. Survival Rate and Plasma ALT Activity of Mice that Injected Different Particle Size Silica Particles

Group	Survival rate (%)	ALT ¹ (IU/l) ²
Control	100	27.6 ± 2.13
nSP70	0	1640.4 ± 569.6*
nSP100	60	71.6 ± 10.8
nSP300	100	35.0 ± 2.4
mSP1000	100	32.4 ± 2.59

Survival rate were expressed as a percentage of survival at 24 h after treatment of 2 mg/head silica particles to BALB/c mice ($n=4$ or 5). Plasma ALT activity at 6 h after treatment is expressed as mean ± S.E. ($n=8$). ¹: Alanine aminotransferase, ²: International unit, * Represents significant difference from the control group (Bonferoni, $p<0.01$).

胞内局在の点において全く異なる性質を発揮することを裏付けるものである。したがって、非晶質ナノシリカの安全性を確保するに当たっては、従来までの安全性試験に加えて、遺伝子や核機能を指標とした評価を実施する必要があると考えられた。われわれは現在、ナノシリカの核内移行性と DNA 合成阻害、DNA 傷害の発現機構の解明を目指して、nSP70 曝露細胞の核分画をサンプルとしたプロテオーム解析を進めており (Fig. 3)、2次元ディファレンシャル電気泳動法を用いた解析結果から、添加するシリカの粒子サイズの違いによって、発現量が

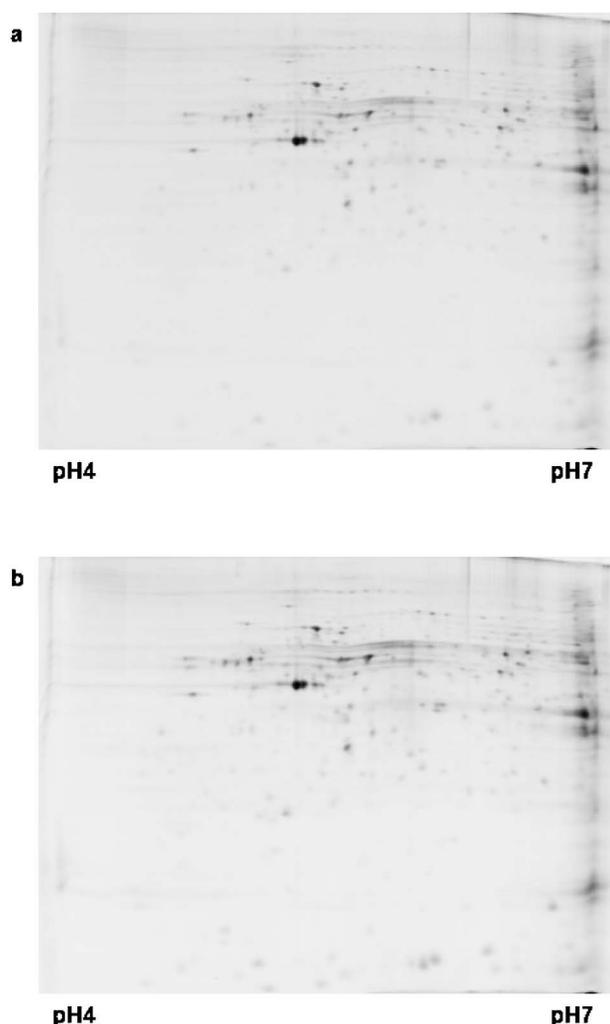


Fig. 3. 2D-DIGE Image of Fluorescently Labeled Nuclear Proteins from nSP70-treated HaCaT Cells

HaCaT cells were untreated or treated with nSP70 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. Proteins were labeled with Cy3 (untreated, a), Cy5 (nSP70-treated, b), and Cy2 (mixture of untreated and nSP70-treated as internal reference (data not shown)) and separated on pH 4–7 IPG strips in the first dimension. This procedure was followed by separation on 12.5% SDS-polyacrylamide gels in the second dimension, and the gels were scanned with a Typhoon Trio+ fluorescent scanner.

変動する多数の核内タンパク質を見い出している。

これらのタンパク質は、DNA 合成阻害や DNA 傷害の発現機序の解明に有用であることに加え、安全性を評価できるバイオマーカーとして活用できる可能性があることから、現在、質量分析による同定を試みているところである。以上の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有用な指針を与えるものと考えている。

5. おわりに

以上、各種バイオマーカーやイメージングを活用したトキシコキネティクス解析により、ナノメートルサイズ (100 nm 以下) の非晶質ナノシリカが、皮膚透過性や体内動態/生体影響の点においてサブミクロン以上のサイズ (数百 nm–数十 μm) の従来素材とは異なる性質を発揮することを実証した。これらの結果は、ナノマテリアルの安全性確保・社会受容促進を達成するためには、ナノマテリアルをマイクロマテリアルとは別個の新素材として捉え、体内移行性や組織浸透性/蓄積性などの動態をより慎重に解析する必要があることを示している。過去のアスベストの例では、アスベストの利用が始まって 40–50 年で、悪性中皮腫や肺がんなどの問題が明らかとなった。^{14–17)} われわれはこれを大いに反省し、ナノマテリアルの使用が拡大しつつある今こそ、科学的根拠に基づきつつ、ナノマテリアルの安全性対策を講じなければならない。現在、経済開発協力機構 (OECD) が世界規模でナノマテリアルの安全性評価ガイドラインの策定を進めており、ナノマテリアルの開発・実用化の規制に動いているが、ナノマテリアルが既にヒトの生活に密着していることや、ナノ産業の育成を考慮すると、慎重かつ適切な規制が不可欠であることは言うまでもない。現在、われわれは本稿で紹介したようなナノマテリアルのサイズに着目した検討のみではなく、表面性状や親/疎水バランス、形状と、動態や安全性との関連情報の収集、これらの情報を基盤としたナノマテリアルの安全性バイオマーカーの同定を推進している。将来的には、これらの研究を基盤として科学的根拠に基づいた安全なナノマテリアルの使用・設計指針の策定が実現す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、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 (No. 20015052)、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B 一般 (No. 21390046)、厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業 (No. H19-医薬一般-010)、厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究 (HS) 事業 (No. KHC1017)、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業：創薬バイオマーカー探索研究事業 (No. H21-バイオ-指定-005)、及び財団法人永井記念薬学国際交流財団の支援を受けて実施されたものです。ここに深謝申し上げます。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 堤 康央教授 (創薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト プロジェクトリーダーを併任) の統括の下、日本化粧品工業連合会、大阪大学大学院薬学研究科教授 八木清仁先生、中川晋作先生、吉岡靖雄先生、医薬基盤研究所の鎌田春彦先生、阿部康弘先生、長野一也先生を始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) Maynard A. D., "Nanotechnology: a Research Strategy for Addressing Risk," Project on Emerging Nanotechnologies, Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2006.
- 2) Nel A., Xia T., Madler L., Li N., *Science*, **311**, 622–627 (2006).
- 3) European Commission, Health and Consumer Protection, Directorate General, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), 2005: (<http://files.nanobio-raise.org/Downloads/scenih.pdf>), cited 26 January, 2010.
- 4) "Nanomanufacturing and the Industrial Application of Nanotechnologies, Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties," The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, London, 2004, pp. 25–34.
- 5) Poland C. A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A., Seaton A., Stone V., Brown S., Macnee W., Donaldson K., *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 423–428 (2008).
- 6) Takagi A., Hirose A., Nishimura T., Fukumori N., Ogata A., Ohashi N., Kitajima S., Kanno J., *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 105–116 (2008).
- 7) Wang J., Chen C., Liu Y., Jiao F., Li W., Lao F., Li Y., Li B., Ge C., Zhou G., Gao Y., Zhao Y., Chai Z., *Toxicol. Lett.*, **183**, 72–80 (2008).
- 8) Donaldson K., Stone V., Tran C. L., Kreyling W., Borm P. J., *Occup. Environ. Med.*, **61**, 727–728 (2004).
- 9) Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J., *Environ. Health Perspect.*, **113**, 823–839 (2005).
- 10) Evonik, Documents on Aerosil: (<http://www.aerosil.com/aerosil/en/industries/food/default>), cited 30 August, 2009.
- 11) International Risk Governance Council (IRGC), "A Report for IRGC Risk Governance of Nanotechnology Applications in Food and Cosmetics," (http://www.irgc.org/IMG/pdf/IRGC_Report_FINAL_For_Web.pdf), cited 26 January, 2010.
- 12) Merget R., Bauer T., Kupper H. U., Philippou S., Bauer H. D., Breitstadt R., Bruening T., *Arch. Toxicol.*, **75**, 625–634 (2002).
- 13) The Japan Food Chemical Research Foundation: (<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/a11c0985ea3cb14b492567ec002041df/8aa11687a2aaf0c4492570650018d5ba?OpenDocument>), cited 30 August, 2009.
- 14) Enterline P. E., Henderson V., *Arch. Environ. Health*, **27**, 312–317 (1973).
- 15) Luo S., Liu X., Mu S., Tsai S. P., Wen C. P., *Occup. Environ. Med.*, **60**, 35–42 (2003).
- 16) McDonald J. C., McDonald A. D., *Eur. Respir. J.*, **9**, 1932–1942 (1996).
- 17) Selikoff I. J., Lilis R., Nicholson W. J., *Ann. N Y Acad. Sci.*, **330**, 295–311 (1979).