

ナノマテリアルの皮膚透過性・体内動態と急性毒性

角田 慎一

Transdermal Penetration and Biodistribution of Nanomaterials and Their Acute Toxicity *in Vivo*

Shin-ichi TSUNODA

*Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation,
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan*

(Received September 3, 2010)

Recently, the number of applications of nanomaterials in medicine, cosmetics and food to which we are directly exposed has been expanding rapidly. The safety of such nanomaterials has not been well assessed, because nanomaterials have been considered as safe as common larger sized materials which are known not to be absorbed by the body. Therefore, WHO and OECD are collecting safety information on nanomaterials with a view to regulation of their use. Although assessment of *in vivo* behaviors of nanomaterials, (*i.e.*, absorption and distribution, and correlation analysis with hazard information) is urgently needed, such research has not yet been undertaken. In this regard, using amorphous silica particles as model nanomaterials, we are starting to study safety, *in vivo* behavior and their correlation; silica particles are often used in cosmetics and foods and also, downsized particles are rapidly becoming available. In our study, we have found that silica particles below 100 nm in diameter show significantly different characteristics in *in vivo* behavior and biological effects *i.e.*, penetration through skin and distribution to brain. Here, I addressed the importance of studies in physicochemical characteristics, kinetic behaviors, and biological effects of nanomaterials below 100 nm in size, to ensure their safety.

Key words—nanomaterial; silica particle; nanosafety; nanotoxicity

1. はじめに

近年、ナノシリカやナノ酸化チタン、フラーレンといったナノマテリアルが化粧品を始めとする様々な製品・分野へ応用され、ナノマテリアル含有製品として既に上市されている。一方で近年、ナノマテリアルがナノサイズ特有の物性に起因する毒性 (NanoTox) を発揮することが報告されており、¹⁻⁵⁾ 欧米各国では、ナノマテリアルの使用規制が検討され始めた。国際機関である経済協力開発機構 OECD でも、ナノマテリアルの生体における動態解析や毒性、安全性評価のための国際基準の策定が開始されている。このようにナノマテリアルは、その有用性が大きく期待されると同時に、その安全性 (Nano Safety) の確保、及びリスクマネジメントが世界的

緊急課題となっている。

ナノマテリアルの安全性を皮膚に直接塗布される化粧品について考えた場合、一般にサブミクロン以上のサイズの粒子は皮膚の角質層や細胞間を通過できず、このような従来サイズのシリカや酸化チタン等の化粧品素材は基本的に、皮膚の表面で留まると考えられてきた。しかし昨今、これら素材をナノマテリアル化することで、化粧品の使用感や皮膚浸透性を向上させ得ることから、ナノマテリアルの機能を活用した様々な化粧品が開発され、製品化されるに至っている。しかしこれは同時に、ナノマテリアルが皮膚局所に留まるのみならず、皮膚を透過し、全身分布する可能性を懸念すべきことを意味している。これまでに、体内へのナノマテリアルの移行性や毒性に関して、量子ドットが皮膚を透過する可能性や、C60 フラーレンが体内に侵入した後、循環血中を介して脳組織に移行し、傷害性を示すことなどが報告されているが、^{6,7)} いまだ体系的な研究は乏しいのが現状である。したがって、ナノマテリアルの

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)

e-mail: tsunoda@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会 130 年会シンポジウム S18 で発表したものを中心に記述したものである。

社会受容の促進や国民の健康福祉の向上の観点からも、皮膚に曝露されたナノマテリアルのハザード解析・リスク評価は重要課題である。

このような状況を踏まえ、われわれのグループでは、ナノマテリアルに関する安全性評価・リスクマネジメントの確立を念頭に、特に化粧品材料等に既に汎用されているナノシリカについて、物性-動態-毒性の連関の解析を試みている。本稿では、これらナノマテリアルの安全性確保研究に対するわれわれのアプローチについて紹介させて頂きたい。

2. ナノシリカの皮膚透過性

近年、様々な素材の微小化が試みられており、特にナノサイズ（粒径 100 nm 以下）の酸化チタンや非晶質シリカは化粧品や食品添加物など、直接的に接触する領域での応用が進んでいる。これらナノマテリアルは、化合物組成は従来品と同じであることから、安全なものとして使用されているのが現状である。しかし、ナノサイズとなった物質は、サブミクロンサイズ（直径 100 nm 以上）、バルクサイズのマテリアルとは異なった、ナノマテリアル特有の物性と機能を発揮し得ることから、新たな物質としての安全性評価が必要と考えられる。そこで本研究では、粒径が約 70 nm, 300 nm の非晶質ナノシリカ（それぞれ nSP70, nSP300 と表記）、及び粒径が約 1000 nm のマイクロサイズのシリカ（mSP1000 と表記）を使用し、粒子サイズの違いによる体内挙動や生体影響の差異について解析を試みた (Fig. 1)。

まず、各サイズのシリカ懸濁液をマウスの皮膚に 3 日間連続塗布し、塗布局所を電子顕微鏡にて観察した。その結果、nSP70 は表皮層に存在する角化

細胞やランゲルハンス細胞のみならず、真皮層の細胞内にまで移行していた (Fig. 2)。また、近傍の所属リンパ節を観察したところ、リンパ球細胞内でも nSP70 の存在を確認できた。一方、nSP300 や mSP1000 の皮膚透過はほとんど観察されなかった。nSP70 が表皮層を透過して真皮層にまで到達したこと、また、投与部位の所属リンパ節内に nSP70 が到達していたことから、粒径がおよそ 100 nm 以下のナノシリカは、皮膚を透過し、真皮層内で発達した血管やリンパ管を介して全身に分布することが示唆された。すなわち、ナノシリカの安全性を担保するにあたっては、曝露局所における安全性評価だけでは不十分であり、全身レベルでの動態と生体影響の精査が必要であることが明らかとなった。

3. ナノシリカによる生体影響・急性毒性

上述のように、ナノサイズのシリカが皮膚を透過し得ることが明らかとなったことから、次に全身循環に移行した場合を想定し、ナノシリカをマウス尾静脈内投与した際の急性毒性を評価した (Fig. 3)。サブミクロンサイズの mSP1000, nSP300 を 2 mg/head 投与したマウスにおいては、マウスの生存率や行動変化は全く認められなかった。それに対して、nSP70 投与群では投与後 12 時間以内にすべてのマウスが死亡した。また、nSP70 投与による致死毒性は、投与量に依存して増大し、 IC_{50} は 0.9 mg/head であった。ナノシリカ投与マウスから 6 時間後に血液を回収し、血液生化学検査を実施した結果、nSP70 投与マウスにおいて、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH) といった細胞内酵素濃度が著しく上昇し、さらにコ

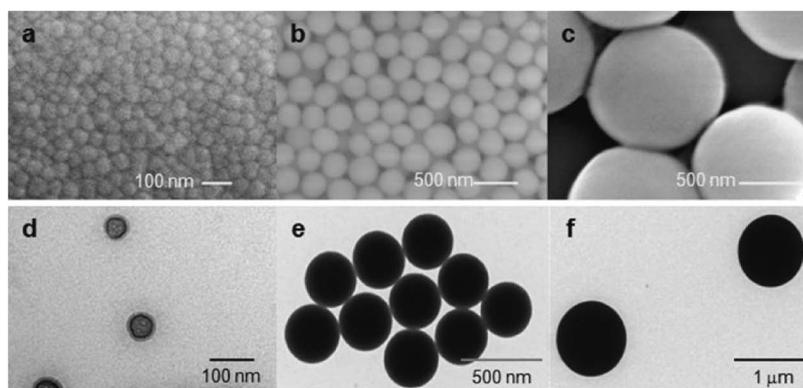


Fig. 1. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) Analysis of Silica Particles

SEM (a-c) and TEM (d-f) photomicrographs of silica particles used in this study: a, d, nSP70; b, e, nSP300; and c, f, mSP1000. Each type of sized silica particles had smooth surfaces and existed as scattered and spheroidal. Scale bars: a, d, 100 nm; b, c, e, 500 nm; and f, 1 μ m.

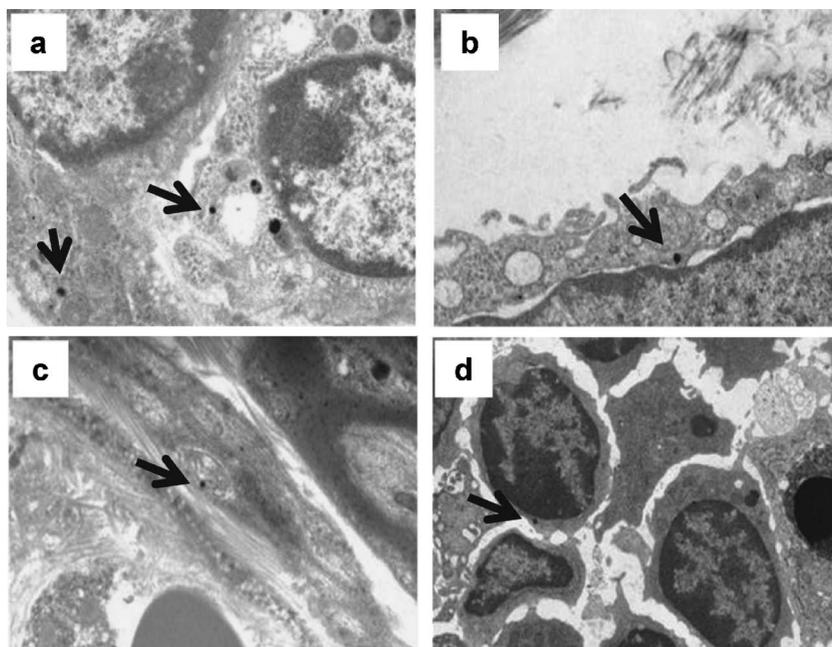


Fig. 2. TEM Analysis of Skin and Proximal Lymph Node after Dermal Exposure to Silica Particles

nSP70 particles (arrows) were observed in keratinocyte layer (a), langerhans cells (b), and dermis (c) of mouse after 3 days of topical application of nSP70. nSP70 were also detected in cervical lymph node cells (d).

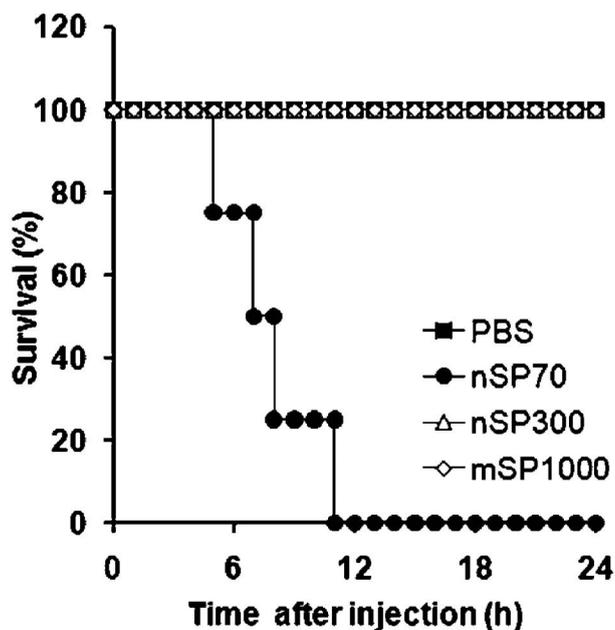


Fig. 3. Acute Toxicity in Mice after I.V. Injection of Different Sized Silica Particles

Survival of BALB/c mice (female, $n=4$ or 5) injected intravenously with 2 mg/head silica particles (nSP70, nSP300 and mSP1000) or PBS (control) was monitored for 24 h after injection.

レステロールやアルブミン濃度が有意に減少していた。また、ナノシリカを投与したマウスの肝臓及び脾臓の病理組織学的検査の結果、nSP70投与マウスの肝臓や脾臓において顕著な鬱血が認められた。

以上の結果から、ナノシリカの粒子径減少に伴って、静脈内投与時の急性毒性を発現する危険性が高まること、nSP70が全身血流に移行した場合、肝障害を始めとする急性毒性を誘発する可能性が明らかとなった。今後、曝露実態等を考慮することが必要であるが、本結果は、ナノマテリアルに対する新たな安全性評価の必要性を強く示唆するものである。

4. ナノシリカの体内動態

先の結果を踏まえ、次にシリカ粒子のサイズ微小化による毒性発現のメカニズム、及び安全性情報の収集を目的に、体内動態の解析を試みた。nSP70をマウスの耳の皮膚に3日間塗布し、各臓器・組織内におけるシリカ粒子の局在を観察した。その結果、皮膚を透過したnSP70が肝臓の実質細胞内でも観察された。さらに、28日間皮膚に塗布したところ、驚くべきことに、nSP70は脳血液関門を通過して、大脳皮質や海馬付近の細胞内にまで移行していることが判明した。すなわち、ナノシリカは粒子径が100 nm以下になると、体内のあらゆる組織の深部にまで移行し得ることが明らかとなった。

そこで次に、粒子サイズによる体内動態の違いをマクロなレベルで評価した。蛍光標識されたnSP70, nSP300をマウスに静脈内投与し、その後の体内分布を *in vivo* imaging system にて解析したと

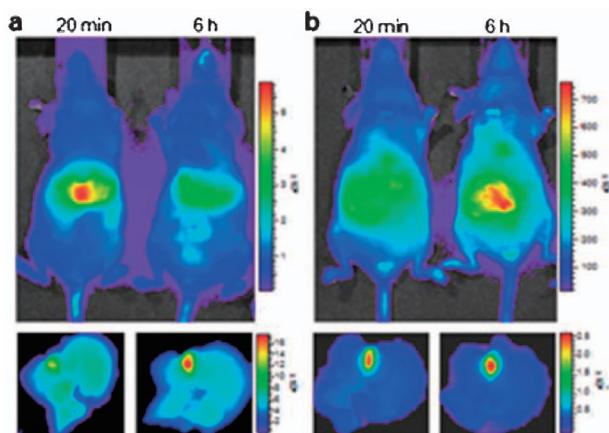


Fig. 4. Systemic Distribution of Silica Particles after I.V. Injection of Different Sized Silica Particles

Fluorescence images of live mice and excised liver from them were displayed. DY676-labeled silica particles (a, nSP70; b, nSP300) were intravenously injected (100 mg/kg) into female hairless mice. Twenty min and 6 h after injection, images were acquired using Xenogen IVIS 200 system.

ころ、いずれの粒子も大部分が速やかに肝臓に集積した (Fig. 4)。しかし、肝臓内での分布には粒径によって違いが認められ、nSP300 が胆嚢に移行する傾向にあったのに対し、nSP70 は肝臓全体に分布した。さらに、電子顕微鏡観察により肝組織内における粒子の局在を観察したところ、nSP300 の大部分は肝クッパー細胞に取り込まれ、肝実質細胞にはほとんど取り込まれていなかったのに対し、nSP70 の一部は肝クッパー細胞にも取り込まれていたものの、大部分は肝実質細胞内に局在していた。また、驚くべきことに nSP70 は肝実質細胞の核膜を通過して核内部にまで到達していることが判明した。

以上の結果をまとめると、nSP70 は、①皮膚を透過し、肝実質細胞内に移行する、②肝実質細胞では核内部にまで到達する、③脳血液関門を突破するなど、サブミクロンサイズのシリカ粒子ではみられなかった体内動態特性を示すことが明らかとなった。これらの結果と急性毒性試験の結果を考え合わせると、ナノシリカの組織分布や細胞内局在の差異が、nSP70 による急性毒性の発現と関連している可能性が考えられた。

5. 結論

本研究では種々物性のナノシリカの安全性評価のために基礎情報収集を実施し、粒径 70 nm のナノシリカ (nSP70) が、皮膚を透過して全身に移行し得ること、特に肝臓を中心とした臓器に分布し、急

性毒性を誘発し得ることを明らかとした。また体内動態の解析から、nSP70 が肝クッパー細胞のみならず肝実質細胞にまで到達し、細胞内の核膜を透過して核内までに侵入すること、脳血液関門を通過することなど、サブミクロン以上のサイズのシリカではみられない特徴的な動態特性を示すことが明らかとなった。より定量的な解析や曝露実態の評価、シリカ以外の各種ナノマテリアルでの検討が重要となってくるが、今後、続々と開発・実用化されるであろうナノマテリアルの安全性を確保するにあたっては、個々の物性と体内/細胞内動態特性を詳細に解析するとともに、これらの情報を毒性情報とを収集し、連関させることが極めて重要と考えられる。このようなアプローチから、化学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性評価、リスクマネジメントの確立が可能になるものと期待される。

謝辞 本研究は、鍋師裕美先生、栃木彩恵子氏、平井敏郎氏、近藤小百合氏を始めとする、独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトの皆様の協力を得てなされたものであり、ここに謝意を表します。また、電子顕微鏡観察についてご協力頂きました独立行政法人医薬基盤研究所共用機器実験室室長今澤孝喜先生に感謝申し上げます。なお本研究は、文部科学省科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金の支援を受けて実施したものです。

REFERENCES

- 1) 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).
- 2) 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., *Inflammation*, **33**, 276–280 (2010).
- 3) 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., *Phar-*

- mazie*, **65**, 199–201 (2010).
- 4) Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**, 496–501 (2009).
 - 5) Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**, 626–629 (2009).
 - 6) Mortensen L. J., Oberdorster G., Pentland A. P., Delouise L. A., *Nano Lett.*, **8**, 2779–2787 (2008).
 - 7) Oberdörster G., Elder A., Rinderknecht A., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 4996–5007 (2009).