

ナノマテリアルと生体高分子との相互作用解析に着目した NanoSafety 予測法の開発

吉川 友章

Development of NanoSafety Forecasting System from the Viewpoint of Nanomaterial-protein Interaction

Tomoaki YOSHIKAWA

Department of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received September 3, 2010)

With recent developments in nanotechnology, nanomaterials have been successfully employed in various industrial applications such as medicine and cosmetics. Nanomaterials demonstrate useful properties such as electronic reactivity and tissue permeability that are absent in micromaterials. Thus, it is anticipated that nanomaterials will be developed as innovative materials in medicine and the cosmetics industry. However, these innovative properties may be accompanied by unknown biological responses that could not have been detected by conventional toxicity assays. To promote industrial development and to establish an affluent society that enjoys only the benefits of nanomaterials, we urgently need to gather information on the properties and biological effects of nanomaterials, and to establish appropriate standard safety evaluation methods. We are therefore analyzing the association of nanomaterial interactions with macromolecules (proteins, DNA *etc.*) and biodistribution using nanosilicas (nSP) as a standard nanomaterial. The results of this study are useful for extrapolation to other nanomaterials and to establish practicable strategies for the development of prediction methods for nanomaterials.

Key words—nanomaterial; nanosilica; safety science; nanosafety

1. はじめに

近年のナノテクノロジーの発展も相まって、化粧品や食品、医薬品など、ナノマテリアルを配合した数多くの製品が既に実用化・上市されている。ナノマテリアルは、特徴的な物性(サイズ減少効果など)によって、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる機能(組織浸透性、電氣的・磁氣的・光学的特性など)を発揮するため、種々の産業に革命を起こす新素材として、分野・領域横断的に期待されている。事実、化粧品関連産業だけでも、ナノシリカやナノ酸化チタンといったナノマテリアルが、世界で年間約 2000 トンも使用されていること、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、今やナノマテリアルは、産業

界のみならず、われわれの生活にも不可欠な素材となっている。視点を変えると、われわれは既に、製造現場や環境中に放出されたナノマテリアルに対する非意図的な曝露に加え、医薬品・化粧品・食品中のナノマテリアルに対する意図的な曝露を避け得ないことを示している。

一方で、近年、遺伝子改変マウスなどを用いた安全性試験から、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、ヒトの健康を確保する上で軽視できない事実が続々と報告され、ナノマテリアルが予測し難い生体影響(NanoTox)を誘発する可能性が世界的に懸念され始めている。そのため昨今では、ナノマテリアルはヒトにとって有用な“光”の側面と、望ましくない“闇”の側面を併せ持つこと、すなわち、二面性を呈することが世界的に認識されつつある。¹⁻⁴⁾ ナノマテリアルの開発や実用化は日進月歩の目覚ましい勢いで進展しているもの、残念ながら、ナノマテリアルの安全性(Nanosafety)研究は、ほとんど省みられておらず、

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)

e-mail: tomoaki@phs.osaka-u.ac.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。

世界的にみても大きく立ち遅れている。そのため、最近になってようやく、世界経済協力機構 (OECD) の主導の下、ナノマテリアルの安全性確保や規制に向けたスポンサーシッププログラムが世界規模で開始された。本プログラムにおいてわが国は、日本国内産業で主要な位置を占めるナノマテリアルについて可能な限り多くの安全性情報の提示を求められているものの、わが国の Nanosafety 評価は、欧米各国に比べ、特に遅れている。また、Nanosafety 評価を行う上で考慮すべき点は、例えば医薬品・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。しかし、Nanosafety 評価の大部分はハザード評価 (毒性の有無、いわゆる、Hazard Identification) に偏重しているのが現状であり、肝心の“体内吸収性や体内/細胞内動態に関する情報 (いわゆる、Exposure Assessment)” は、世界的に枯渇しており、まさに空洞化状態にあり、先日開催された国際毒性会議 (IUTox 2010) や国際ナノ毒性会議 (NanoTox 2010) でもこの点が強く指摘された。すなわち、このままでは、ナノマテリアルの体内吸収性/生体内動態に関する検討がなされぬまま、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、ナノマテリアルの有用性を享受した豊かな社会の構築や産業発展が阻害されてしまいかねない。したがって、わが国の知的財産を確保しつつ、ヒトの健康を確保していくためには、ナノマテリアルの二面性を解析・理解した上で、科学的根拠に基づいてナノマテリアルの安全性を確保することが急務となっている。

以上の背景を踏まえて筆者らは、最も汎用されているナノマテリアルの 1 つである非晶質ナノシリカ (nSP) の①体内吸収性と体内/細胞内動態の解析、②実験動物を用いたハザード評価、③NanoTox 発現機構の解析を統合的に推進している。これら①-③の情報の連関から、ナノマテリアルの物性 (サイズ; 二次粒径, 表面電荷, 親/疎水バランス, 形状など) と安全性の因果関係を明確化することができれば、最終的にナノマテリアルの物性から安全性を予測する方法の確立や有効かつ安全なナノマテリアルの設計指針の策定につながり、安全なナノマテリアルの開発と実用化の支援、ヒトの健康環境の確保に貢献できるものと考えている。既に筆者らは、い

わゆるサブミクロンサイズよりも小さな非晶質ナノシリカ (直径 100 nm 以下) が、経皮吸収性や体内/細胞内動態、種々安全性の点で、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは決定的に異なる特性を発揮し、経皮吸収されたのちに血液中に移行することを見い出している (角田らの稿を参照)。本稿では、この中から、非晶質ナノシリカの粒子サイズと急性毒性・肝毒性発現との連関に焦点を絞って紹介させて頂き、各方面の先生方からご意見・ご批判を仰ぎたい。

2. 生体高分子との相互作用に着目した nSP の急性毒性・肝毒性発現機構の追求

上述したとおり、これまでに筆者らのグループでは、直径 100 nm 以下の微小な nSP は物性によっては体内の深部にまで侵入する可能性があり、血中に移行した nSP が急性致死毒性を誘発することを見い出している (角田らの稿を参照)。これらの有害事象が発現するメカニズムを解析することによって、安全な nSP を設計する指針の策定や Nanosafety 予測法を開発する上で極めて有用な知見を提供できるものと考えられる。一般に、体内に侵入したナノマテリアルは、第一に血液・粘液・胃液・汗/皮脂といった体液中に豊富に存在するタンパク質や脂質、糖質、遺伝子のような生体高分子に接触するものと考えられる。例えば、血液中にはアルブミン (Alb) やイムノグロブリン (IgG)、血液凝固因子、サイトカイン、脂質や糖質といった種々の生体高分子が存在しており、血中に侵入したナノマテリアルはこれらの分子と相互作用するであろう。さらに、ナノマテリアルは受容体や細胞膜脂質/糖鎖といった細胞膜上の高分子、核内受容体や細胞内輸送関連分子、遺伝子といった細胞内の高分子に対しても特異的あるいは非特異的に相互作用する可能性がある。細胞内外の高分子とナノマテリアルとの相互作用は、ナノマテリアルの体内侵入性や滞留性、生体内/細胞内動態、シグナル伝達や細胞分化といっ



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。2006 年同大学博士後期課程修了 (薬学博士)。大阪大学大学院薬学研究科特任研究員、細菌医薬基盤研究所特任研究員、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を経て、2009 年 4 月より同研究科毒理学分野助教。

た生体恒常性に影響し、NanoToxの起点となり得る非常に重要な現象であると考えられる。以上の観点から、本研究ではnSPを用いて、Nanosafety評価におけるナノマテリアルと生体高分子間との相互作用の重要性を検証するとともに、主要な血中タンパク質の1つである血液凝固因子とナノマテリアルとの相互作用の視点からnSPの急性毒性・肝毒性発現機構の追求を試みた。

まず、ウェスタンブロットティング(WB)によりnSP表面への生体高分子の結合性を評価した(Table 1; 未発表データ)。直径が70 nmで表面未修飾のnSP(nSP70)、表面がカルボキシル基あるいはアミノ基で修飾されたnSP(直径70 nm, それぞれnSP70-CあるいはnSP70-N)を10%のマウス血清を含むPBSに懸濁・インキュベートした。遠心分離により回収した各nSPに10% SDSを加えて乖離させたタンパク質溶液をWBに供した。本溶液中に含まれるAlb, IgG, フィブロネクチン(FN), 補体C3タンパク質(C3)をWBにより検出したところ、nSP70にはIgG, FN, C3がほとんど結合しないこと、nSP70-Cに対してのみC3が結合することが明らかとなった。以上の結果は、粒子物性によって結合するタンパク質が異なることを示し、

Table 1. Interaction of Serum Proteins and Nanosilicas

	Albumin	IgG	Fibronectin	Complement C3
nSP70 ^a	+	-	-	-
nSP70-C ^b	+	+	+	+
nSP70-N ^c	+	+	+	-

Nanosilicas were incubated with mouse serum at room temperature. Nanosilicas were collected by ultra centrifugation (40000×g, 15 min) and washed twice with PBS. The interaction of serum proteins (albumin, IgG, fibronectin and complement C3) and nanosilicas were analyzed by western-blotting. ^a unmodified nanosilicas with a diameter 70 nm; ^b the nSP70 surface modified with carboxyl residue; ^c the nSP70 surface modified with amine residue.

nSPと血清中タンパク質との結合性がNanoToxの発現に関与する可能性を示唆するものである。

これらの結果を踏まえて以降の検討では、主要な血中タンパク質の1つである血液凝固因子とnSPとの相互作用に着目して、nSP70によって誘発される急性致死毒性発現機構の解析を試みた。一般に、血液凝固経路には、傷害を受けた組織から血中に漏出する組織因子(Tissue Factor)を起点とする外因性凝固経路と、コラーゲンやガラスといった異物表面とXII因子との相互作用や活性化血小板由来のリン脂質によって活性化される内因性凝固経路の2つが存在することが知られている。周知の通り、こういった血液凝固系は生体恒常性維持に必須の役割を果たす重要な生体システムであるが、一度破綻すると血栓症や血友病のような様々な病態の発症につながる。特に、血液凝固系が全身的かつ持続的に活性化されることによって生ずる播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation: DIC)のような病態は微小血栓の多発や消費性血液凝固障害を呈し、短時間で死に至る重篤な病態につながることを知られている。われわれは、①nSP70投与マウスにおいて、脾臓や肝臓のうっ血、組織からの出血症状などの血液凝固異常の所見が認められたこと(Fig. 1; 未発表データ)、②nSP70投与マウスが投与後短時間で死に至ること、さらに、③シリカがガラスと同様に血液凝固経路の活性化因子であること、などの情報を総合的に考察し、nSP70がなんらかの相互作用を介して内因性血液凝固経路を活性化し、これが起点となってDIC様の症状が誘発されることが、nSPの粒子径依存的急性致死毒性につながったものと考えた。

そこでまず、nSP70誘発致死毒性の発現における血液凝固の関与を調べるために、抗凝固剤(ヘパリン)を前投与したマウスを用いて急性毒性試験を

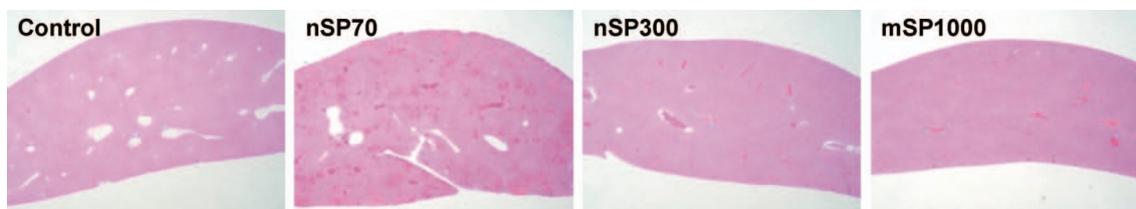


Fig. 1. Characterization of Liver Histopathology in Nanosilica-injected Mouse

Two milligram of nSP70, nSP300 and mSP1000 were intravenously injected to BALB/c mice (female, 8 weeks). After 4-6 h, livers were dissected from silica-injected mouse and were used to histopathological characterization after hematoxylin-eosin staining.

行ったところ、ヘパリンの前投与によって nSP70 誘発急性致死毒性が完全に阻害されることが明らかになった (data not shown). 続いて、nSP70 投与マウスを用いて典型的な DIC 症状である消費性凝固障害 (血小板数減少, 血液凝固遅延など) を評価した. その結果, 直径 300 nm 以上の nSP を投与したマウスにおいては消費性凝固障害が認められなかったのに対して, nSP70 投与マウスでは血中血小板数の著しい減少や血液凝固時間の有意な延長が認められ, これらの効果は DIC 誘発剤として知られる LPS 投与群を有意に上回るものであった. 以上の結果は, nSP70 投与による急性致死毒性が DIC 様症状の誘発によるものであることを示唆すること, また, これらの現象が 100 nm 以下の nSP に特徴的なものであることを示している. 現在, nSP の急性毒性における外因性血液凝固系の関与を調べるとともに, nSP と血液凝固因子との結合性の解析を進めている.

以上, 本研究では Nanosafety 評価におけるナノマテリアル-生体高分子間相互作用の重要性を示し, これらの視点が nSP70 誘発性急性致死毒性発現機構を解析するにあたって極めて有用なアプローチになり得ることを示した. 現在, nSP のみならず, シリカの表面修飾体, さらには酸化チタンやフラーレン, カーボンナノチューブを始めとする種々のナノマテリアルの免疫応答・細胞分化・生体/細胞内輸送といった生体応答に与える影響やナノマテリアルの生体/細胞内動態を, ナノマテリアル-生体高分子間相互作用の視点から解析するとともに, ナノマテリアルと常在菌 (皮膚常在菌や腸内細菌) との相互作用の観点から Nanosafety 評価を進めている.^{5,6)} 今回の nSP の解析例にみられるように, ナノマテリアル特有の物性-動態-安全性連関を, ナノマテリアルと相互作用する特定の分子から解析・説明することは NanoTox に対してより明確で分かり易い科学的根拠を与えるものと考えられる. したがって, ナノマテリアル-生体高分子間相互作用を指標にした Nanosafety 評価研究は, 一般消費者-行政担当者-安全性評価研究者間のリスクコミュニケーションやナノマテリアルの使用規制や設計指針の策定を容易化し, これらを基盤とすることで将来的にはナノマテリアルの安全性確保に適うリスクマネジメントの実現につながるものと期待している.

3. おわりに

米国では「国家ナノテクノロジー戦略 (National Nanotechnology Initiative)」の中で, 既にナノテクノロジー応用製品の開発のみならず, NanoTox にも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) を頂点とする研究機関が Nanosafety 評価を統括するなどの対策がとられている. それに対して, わが国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ものの, 「闇」の部分とも言えるナノマテリアルのリスク評価に関する情報開示は極めて少なく, わが国の Nanosafety 評価は欧米諸国に比べると圧倒的に立ち遅れている. したがって, これまでほとんど検討されていなかったナノマテリアルの体内吸収性やハザードの明確化及びメカニズムの解明を積極的に推進するとともに, これらの現象をナノマテリアルの体内/細胞内動態の観点から考察することによって, 安全なナノマテリアルの開発と実用化の支援, ナノマテリアルのメリットを最大限に享受した豊かな社会の確立が実現でき, 先進国・技術立国・知財立国としてのわが国の国際貢献に寄与できるものと考えられる.

詳細は割愛したものの, われわれの検討からサブミクロンサイズ以上のシリカ (凝集体を含む) は安全性に優れていること, また 100 nm 以下のナノサイズであっても表面修飾を最適化することで安全性を確保し得ることを認めている. このことは, ヒトや環境の安全を確保すると同時に, われわれがナノテクノロジーの恩恵を享受しつつ, ナノ産業界の発展も達成できることを意味している. 本稿では誌面の都合上, 筆者らの知見の一例のみ紹介させて頂いたが, 今後, 10 nm 以下のサブナノサイズの素材をも対象とした詳細な Nanosafety 評価を積み重ねることで, ヒトの健康環境を確保しつつ, 産業界も発展するものと期待している.

謝辞 本研究は, 大阪大学薬学研究科毒性学分野教授・独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトチーフリーダー 堤 康央先生, 大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野講師伊藤徳夫先生, 大阪大学大学院薬学研究科特任助教鍋師裕美先生との共同研究の成果であり, また当該研究の成果は大阪大学薬学研究科毒性学分野の学生諸氏の激的な取り

組みの賜ものであり、この場をお借りして御礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kane A. B., Hurt R. H., *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 378–379 (2008).
- 2) Kostarelos K., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 774–776 (2008).
- 3) Zhao Y., Xing G., Chai Z., *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 191–192 (2008).
- 4) Service R. F., *Science*, **304**, 1732–1734 (2004).
- 5) Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshioka Y., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1715–1725 (2008).
- 6) 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., *Pharmazie*, **65**, 199–201 (2010).