

## ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性

吉岡 靖雄

## NanoSafety Studies of Nanomaterials about Biodistribution and Immunotoxicity

Yasuo YOSHIOKA

*The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University,  
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan*

(Received September 3, 2010)

A diverse array of nanomaterials such as nanosilicas and carbon nanotubes are in widespread use due to the development of nanotechnology. Nanomaterials are already being applied in universal fields such as electronics, sunscreens, cosmetics, and medicine, because they have unique physicochemical properties such as high conductivity, strength, durability, and chemical reactivity. The advent of nanomaterials has also provided extraordinary opportunities for biomedical applications. However, the increasing use of nanomaterials has raised public concern about their potential risks to human health. In particular, recent reports have indicated that carbon nanotubes induced exaggerated inflammation and mesothelioma-like lesions in mice. However, few studies have examined the immunotoxicity of nanomaterials and it is essential to progress studies on the immunotoxicity of nanomaterials to ensure their safety. In this regard, we have attempted to elucidate the pharmacodynamics and immunotoxicity of nanomaterials, in order to develop novel safe nanomaterials and to establish scientifically based regulations. In this review, we would like to introduce our data on the immunotoxicity of nanosilicas, especially the relationship between physical properties (primary grain size, configuration and surface charge), pharmacodynamics of these materials, and their immunotoxicity. We consider that our study will improve the quality of human life by safely using nanomaterials, which can benefit society in general.

**Key words**—nanomaterial; NanoSafety; nanosilica; safety science

## 1. はじめに

ナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材にはない有用機能を発揮し得ることから、次世代を担う新規素材として注目されている。既に、工業用途はもちろんのこと、化粧品基材・食品添加物として実用化されつつあり、われわれの生活になくてはならない存在となっている。薬学領域においても技術革新をもたらす素材として注目され、カーボンナノチューブ・酸化チタン・非晶質ナノシリカ・フラーレンなどが、薬物の徐放化担体やターゲティング担体を始めとする新規ドラッグデリバリーシステム素材として開発が進められている。

一方で近年、ナノマテリアル特有の革新的機能

が、想定外の健康影響を発現してしまうことが懸念されている。<sup>1-3)</sup> 事実、ナノマテリアルが予期せぬ生体影響を発現することに対する懸念が世界的に高まっており、カーボンナノチューブや酸化チタンの発がん性・起炎性など、健康被害を示唆する研究報告が相ついでいる。<sup>4-6)</sup> 特に、生体に取り込まれた粒子状異物排除の根幹を担う免疫担当細胞が、ナノマテリアルを異物として認識した際に、過剰反応や機能不全を起こす可能性が報告されており、ナノマテリアルが未知の免疫攪乱作用を呈する危険性が指摘されている。<sup>5,6)</sup> これらは、ナノマテリアルへの長期・多量曝露が、炎症性疾患や自己免疫疾患、あるいは感染症罹患率の増大など、予期せぬ毒性を引き起こす可能性を示している。このような背景の下、ナノマテリアル産業発展のためにも、ナノマテリアルの安全性評価や安全なナノマテリアルの開発・実用化が急務となっているが、その体内動態・生体影響を始めとする安全性情報は世界的にも乏しく、現

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

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。

在はハザード情報のみが一人歩きしているのが現状である。したがって、ナノマテリアルを活用した豊かな社会の構築のためにも、今こそ、どの程度われわれはナノマテリアルに曝露されているのかといった曝露実態の解明や、生体内に取り込まれたナノマテリアルがどの程度組織に分布するのかといった定量的な体内動態評価、さらに、健康影響に及ぼす閾値追求など詳細な安全性評価が待望されている。

本観点からわれわれは、安全なナノマテリアルの創製に向けた基盤情報の収集、使用指針の策定に向け、ナノマテリアルの物性・体内動態・安全性の3者連関を解析することで、健康影響発現に及ぼす閾値の追求・安全なナノマテリアルの設計指針の構築を図ってきた。特に、免疫機能・免疫細胞に及ぼす影響を中心に検討し、免疫機能に及ぼす影響の少ないナノマテリアルの開発支援に資する基盤情報の収集を図ってきた。本稿では、ナノマテリアルの中でも最も汎用されているものの1つである非晶質ナノシリカの免疫毒性に焦点を絞り、われわれの取り組みを題材にナノマテリアルの安全性解析・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. 非晶質ナノシリカの体内動態の評価

非晶質ナノシリカの用途は非常に幅広く、日焼け止めやファンデーションなどの化粧品基材、歯磨き粉や歯の充填剤、さらには食品の固結防止・流動化剤などの食品添加物として利用されている。また、ナノシリカは食品中に最大2%、化粧品におおよそ20%程度が配合されており、既にわれわれの生活に必須となっている。さらに近年では、表面修飾や形状制御が施されたものなど、新たな機能性非晶質ナノシリカの開発が進められており、その使用量・適用範囲は増加の一途を辿っている。したがって、非晶質ナノシリカが環境中への流出や廃棄、非晶質ナノシリカ含有製品の使用により、生体が経口、経肺、経皮など、様々な経路で非晶質ナノシリカに、意図的・非意図的的な曝露を受ける機会が今後加速度的に増大していくことは想像に難くない。一方で、その安全性に関する検討は、他のナノマテリアルに比べて圧倒的に遅れているのが現状である。筆者らのグループではこれまでに、皮膚に塗布した非晶質ナノシリカが、角質層を通過し、表皮層にまで到達するとともに、全身血流に移行し得ることを明

らかとしている。そこで、非晶質ナノシリカの、血中移行後の体内動態を評価するため、粒子径の異なる非晶質シリカをマウスに静脈内投与し、リンパ節・脾臓など免疫組織への移行を透過型電子顕微鏡により評価した。本研究では、粒子径70 nmの非晶質ナノシリカ (nSP70) 及び、粒子径300 nm、1000 nmの従来型非晶質シリカ (nSP300, mSP1000) を用い検討した。その結果、nSP70のみ、リンパ節・脾臓のリンパ球や食食細胞であるマクロファージに多く取り込まれることが明らかとなった。また、一部細胞の核内にまで移行しているものも観察された。したがって、少なくともnSP70は免疫機能に影響を与えることが示唆された。現在は、経皮・経口・経鼻・経肺曝露により、nSP70が投与部位の免疫担当細胞に多く取り込まれることを明らかとしつつあり、今後より詳細な体内動態を明らかにできるものと考えている。

## 3. 非晶質ナノシリカの起炎性評価

次に、マウスを用いて非晶質シリカの起炎性について評価した。各粒子径の非晶質シリカをマウス腹腔内へと投与し、24時間後における腹腔内の総細胞数を起炎性の指標として評価した。その結果、nSP300, mSP1000投与群では細胞数の増大はほとんど観察されなかったのに対して、nSP70投与群においては、有意な細胞浸潤数の増大が認められるなど、ナノメートルサイズの非晶質ナノシリカは強い起炎性を有する可能性が示された。さらに、各非晶質シリカ投与2時間後における腹腔内のサイトカイン産生パターンを解析した結果、nSP70投与群では、炎症性サイトカインやケモカインの産生が認められた。以上の結果より、非晶質シリカは粒子径の減少に従って起炎性が上昇することが明らかとなった。しかし、本結果はあくまでも腹腔内への大量投与による検討であるため、今後、曝露実態を考慮した投与ルートや投与量での検討、さらには閾値の解明が必須であると考えられる。

## 4. 非晶質ナノシリカの炎症惹起メカニズムの解明

粒子状物質が生体内に取り込まれた場合、まず食食細胞であるマクロファージに認識されることで免疫応答が誘導される。そこで、代表的なマウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞を用いて非晶質シリカの起炎性を *in vitro* で評価した。RAW264.7

細胞に各非晶質シリカを作用させ、培養上清中に産生される腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) 量を ELISA により評価した。その結果, nSP300, mSP1000 作用群における TNF $\alpha$  の産生量は未処理群とほぼ同程度であったのに対し, nSP70 作用群では有意な TNF $\alpha$  の産生亢進が観察された。本結果より, nSP70 はマクロファージからの TNF $\alpha$  など炎症性サイトカインの産生を誘導することで, 炎症を惹起する可能性が示された。

次に, 非晶質ナノシリカによる TNF $\alpha$  の産生誘導メカニズムを解析した。細胞が外部からのストレスやサイトカイン刺激を受けると, MAPK ファミリーである p38, c-jun N-terminal kinase (JNK) 及び Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) がリン酸化を受けて活性化し, 炎症応答や細胞分化, 細胞死など, 多様な細胞応答に係わるシグナルを伝達することが知られている。そこで, RAW264.7 細胞に各粒子径の非晶質シリカを作用させ, 各 MAPK の活性化を評価した。その結果, nSP300, mSP1000 は, いずれの MAPK も活性化しなかったのに対して, nSP70 はすべての MAPK を強く活性化することが明らかとなった。そこで, 各 MAPK 阻害剤存在下で, nSP70 を RAW264.7 細胞に添加し, TNF $\alpha$  の産生量を ELISA により評価した。その結果, nSP70 単独で作用させた場合, 有意な TNF $\alpha$  の産生上昇が認められたのに対し, いずれの MAPK 阻害剤作用条件下においても, nSP70 による TNF $\alpha$  の産生は未処理群と同程度にまで抑制された。本結果は, nSP70 が p38, JNK, ERK1/2 すべての活性化を介して TNF $\alpha$  の産生を誘導することを示すものである (Fig. 1)。

##### 5. 起炎性の少ない安全なナノマテリアル開発に向けた取り組み

次に, 起炎性の少ない非晶質ナノシリカの開発に向けた基礎情報の集積を目的に, ナノシリカの表面修飾がその起炎性に与える影響を検討した。本検討では, nSP70 の表面をカルボキシル基で修飾した nSP70-C を用いて起炎性を評価した。まず RAW264.7 細胞を用いて, nSP70 及び nSP70-C の TNF $\alpha$  産生誘導能を比較した。その結果, nSP70 作用群では TNF $\alpha$  の産生量が増加するのに対し, nSP70-C 作用群では全く増加が認められなかった。また, RAW264.7 細胞における MAPK の活性化を評価し

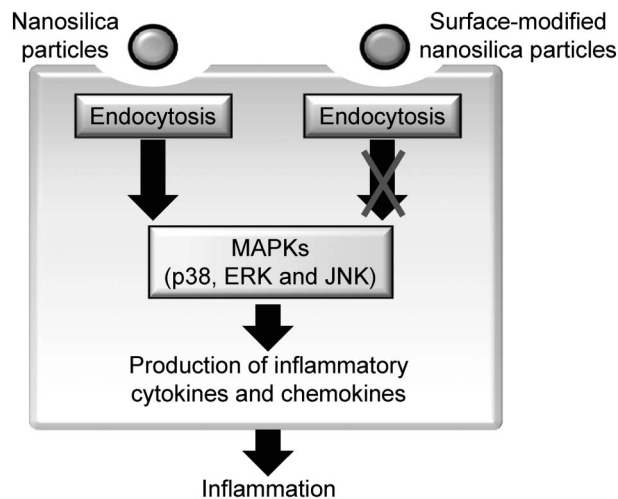


Fig. 1. Model of Nanosilica Particles-induced Inflammatory Responses

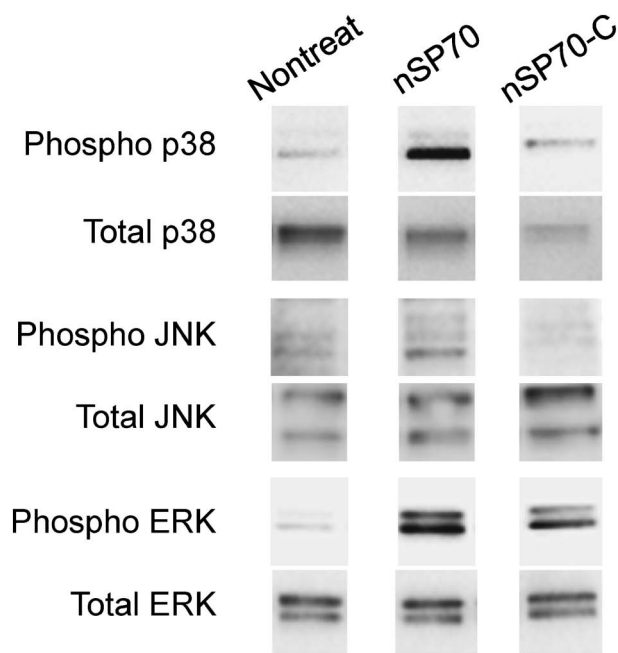


Fig. 2. Suppression of MAPKs Activation by Surface Modification

RAW264.7 cells were treated with 100  $\mu$ g/ml nSP70 or nSP70-C. The whole-cell lysate was analyzed by western blot for phosphorylated and non-phosphorylated p38 MAPK, JNK and ERK.

た結果, nSP70 作用群では, すべての MAPK が活性化されるのに対して, nSP70-C 作用群ではいずれの MAPK の活性化も認められなかった。したがって, nSP70 はカルボキシル基修飾によって, MAPK の活性化が強く抑えられた結果, TNF $\alpha$  の産生が大幅に減弱した可能性が示された (Fig. 2)。さらに, nSP70 及び nSP70-C をマウス腹腔内に投

与し、腹腔内の総細胞数を指標に起炎性を評価した。その結果、nSP70 投与群で腹腔内総細胞数が顕著に上昇するのに対し、nSP70-C 投与群は細胞数の上昇はほとんど認められず、未処理群との有意な差は認められなかった。以上の結果より、nSP70 の有する起炎性は、表面のカルボキシル基修飾によって抑制可能であることが判明した。

## 6. おわりに

現在、ナノマテリアルの生体影響に関する詳細な情報を可能な限り早急に収集する必要性が世界的に叫ばれており、経済協力開発機構 (OECD) では、2006 年から「工業ナノ材料作業部会」を設置し、安全性に対する論議を精力的に進めている。また、米国では米国環境保護庁や米国食品医薬品局が、日本では厚生労働省・経済産業省や環境省などが中心となり、ナノマテリアルの安全性に関する研究と情報収集・解析が精力的に推進されている。その一方で、ナノマテリアルは人類の QOL 向上に必須の新素材になる可能性を秘めているため、安全性に関するデータが不十分なまま施行されたむやみな規制によって、ナノマテリアルの社会受容が阻害され、ひいてはナノマテリアルによって得られるべき恩恵を闇に葬ることだけは避けねばならない。さらに、種々ナノマテリアル配合製品が既に実用化・販売され、ナノマテリアルの人体曝露を避け得ない現状では、危険性のみを闇雲に指摘するだけでは社会的混乱を招いてしまう。したがって、今後、ナノマテリアルが社会から受容され、人類の豊かな暮らしに貢献するためには、適切なリスクマネジメントの実施によって安全性を確保した上で、そのメリットを最大限に享受することが重要である。本研究では、非晶質ナノシリカを用い、粒子径と起炎性の連関を評価するとともに、炎症惹起メカニズムを明らかとした。さらに、最も重要なことであるが、適切な物性制御により起炎性を低減可能であることを明らかとした。すなわち、本研究は、単なるナノマテリアルの毒性研究 (NanoTox 研究) を目的としたものでなく、いかにして安全で安心、かつ有用なナノマテリアルを開発・実用化していくのかを視野に入れた

ナノマテリアルの安全科学研究 (Nano-Safety Science) を実施したものである。今後は、ナノマテリアルの曝露実態の解明、定量的な体内動態評価や健康影響に及ぼす閾値追求など詳細な安全性評価を推進するとともに、安全かつ有効なナノマテリアルの開発・実用化支援をより強力に推進することが必要不可欠と考えられる。これら Nano-Safety Science が、今後のより安全なナノマテリアルの創製・社会還元につながり、科学的根拠に基づいた情報発信・リスクコミュニケーションにより、リスクリテラシーが高まり、安全で安心な社会の構築などに貢献し得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薬剤学分野教授中川晋作先生、同分野准教授岡田直貴先生、同分野助教向洋平先生、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を始めとする多くの先生方のご指導の下、遂行されたものであり、この場をお借りして御礼を申し上げます。また当該研究の推進に尽力してくれた学生諸氏に感謝申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Service R. F., *Science*, **304**, 1732–1734 (2004).
- 2) Kagan V. E., Bayir H., Shvedova A. A., *Nanomedicine.*, **1**, 313–316 (2005).
- 3) Zhao Y., Xing G., Chai Z., *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 191–192 (2008).
- 4) Takagi A., Hirose A., Nishimura T., Fukumori N., Ogata A., Ohashi N., Kitajima S., Kanno J., *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 105–116 (2008).
- 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) Morishige T., Yoshioka Y., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **392**, 160–165 (2010).