

革新的技術/素材の恩恵を最大限に享受した豊かな社会の構築に向けて ～ナノマテリアルの安全性確保基盤の構築を例に～

研究ノート

吉川友章*, 吉岡靖雄**, 堤 康 央

Safety analysis of newly-created nanomaterials for developing safe
and convenience society based on innovative technologies.

Key Words : nanomaterial, nanotoxicology, safety science

はじめに

2000年1月に、当時の米国クリントン大統領が「国家ナノテクノロジー戦略 (NNI)」を発表し、大規模国家予算を投資したことが一つの起爆剤となり、ナノマテリアルの開発研究と生産、そして実用化が、国内外の産官学を問わず、多くの領域 (医療、情報、環境、エネルギーなど) で急速に進展した。ナノマテリアルとは、少なくとも一次元の大きさが100 nm以下で製造された超微細材料と定義されている (毛髪の太さ: 50 μ m の500分の1以下)。このナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ以上 (100 nm以上) の素材とは異なり、サイズ減少に伴う組織浸透性の増大や電子反応性の増大、重量あたりの表面積の増加などによって革新的機能を発揮する。そのため、種々の産業に革命を起こす夢の新素材になるものと期待されており、医薬品・食品・化粧品領域では、ナノシリカやナノ酸化チタン、フ

ラーレン、白金ナノコロイド、ナノシルバーなどが、必須素材として既に上市されている。

一方で、ナノマテリアルの物性 (サイズ、形状など) に起因した革新的機能が逆に、二面性を呈してしまい、サブミクロンサイズ以上の従来型素材では観察されない、特徴的な毒性、所謂、ナノトックス (NanoTox) を発現してしまうことが世界的に懸念されている。例えば、今後の詳細な検証が必要ではあるものの、ある種のカーボンナノチューブが、アスベストと同様に吸引曝露により悪性中皮腫を誘発し得ることが報告されている。そのため、経済協力開発機構 (OECD) と連携しつつ、欧米各国などはナノマテリアルの開発やその利用を規制しようとする動きを加速している。我が国でも厚労省や経産省、環境省、内閣府を中心にナノマテリアルの安全性評価研究が、今まさにスタートしたところであるが、知財技術立国を目指す我が国としては、ナノマテリアルの開発・実用化を闇雲に規制するのではなく、ナノテクノロジーの恩恵を社会が最大限に享受できるよう、ナノ産業の育成や発展を強力に支援しつつ、一方で責任ある先進国、そして健康立国として、ナノマテリアルの安全性を高度に保障し、ヒトの健康環境を確保していかなければならない。

本観点から、我々の研究室 (阪大院薬・毒性学分野) では、種々のナノマテリアルを用いた『難病や感染症に対する先端ナノ医薬』の開発など、ナノマテリアルを安全に、しかも有効活用していくための基盤技術の開発を推進すると共に、ナノマテリアルのヒト健康への影響を追求し、科学的根拠に基づいた安全性情報の集積と発信、および安全なナノマテリアルの開発支援を推進している (図1)。薬学における毒性学は、遺伝子や蛋白質、細胞、さらにはナノテクノロジーなどを有効活用した画期的バイオ医薬・先端ナノ医薬はもとより、化粧品・食品、さ



*Tomoaki YOSHIKAWA

1977年10月生
大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程
(2006年)
現在、大阪大学大学院 薬学研究科 毒性学分野 助教 博士 (薬学) 毒性学・蛋白質工学・免疫学
TEL : 06-6879-8233
FAX : 06-6879-8233
E-mail : tomoaki@phs.osaka-u.ac.jp



**Yasuo YOSHIOKA

1976年7月生
大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程
(2004年)
現在、大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター 特任講師 (常勤) 博士 (薬学) 毒性学・蛋白質工学・免疫学
TEL : 06-6879-8233
FAX : 06-6879-8233
E-mail : yasuo@phs.osaka-u.ac.jp

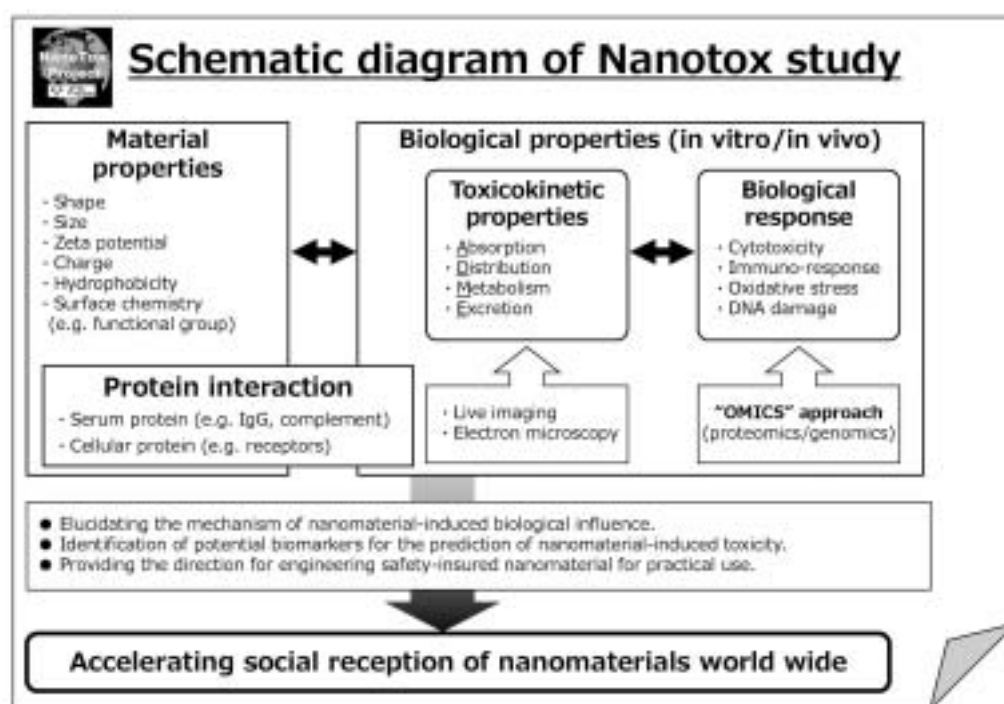


図1 研究戦略の概要

らには環境の安全性をも科学的に考究し、『ヒトにとって安全で安心な健康環境を確立する』ことを目指した学問と位置づけられる。昨今の薬・食・環境に対する不安の増大や健康への関心の高まりから、21世紀テクノロジー産物には、安全・安心であることがこれまで以上に強く求められ、安全科学とも言ふべき、薬学における毒性学への期待は益々加速を増しており、我々は、健全で活力に満ち溢れた社会の構築への貢献を目指した教育研究を実践している。本項では、こういった取り組みの中から、最も汎用されているナノマテリアルの一つである非晶質ナノシリカの安全性確保研究（我々は、安全なナノマテリアルの開発研究を推進する視点から Nano-Tox 研究ではなく、Nano Safety Science 研究と呼んでいる）について紹介させて頂く。

非晶質ナノシリカの物性・経皮吸収性との生体影響との関連評価

非晶質ナノシリカは、医薬品や食品、化粧品など、ヒトに直接適用する分野では、最も使用されている（図2）。ナノシリカの用途は非常に幅広く、ファンデーションなどの化粧品を中心に、直径100 nm以下の素材が汎用されている。ナノシリカは微小化すればするほど、使用感や透明性の向上といった様々

な有用機能が付与できるため、この数年でナノシリカのサイズダウンや分散性を向上する技術の開発が加速度的に進展しており、現在では、直径が2.5 nm程度のもの（所謂、サブナノサイズ）までも開発されつつある。一方で、先述したNanoToxに対する懸念の高まりを受けて、非晶質ナノシリカについても安全性の再評価が進められている。欧州化学物質生態毒性・毒性センターによれば、サブミクロンサイズ以上のシリカ（一次粒径は100 nm以下であっても、凝集体として、サブミクロンサイズ以上になるナノシリカを含む）の安全性に問題は無いと報告されている¹。しかし、この報告は、昨今の分散性に優れた100 nm以下のナノシリカの安全性を保証するものではない。特に、100 nm以下の分散性の高い素材に関しては、体内に吸収される可能性が世界的に懸念されており、この点に関する検討が急務となっている。

物質名	国内生産量	用途
カーボンナノチューブ	120-140 t	電子材料
カーボンブラック	80万 t	タイヤ、自動車部品等
二酸化チタン	1450 t	化粧品、光触媒等
フラーレン	2 t	化粧品、スポーツ用品等
酸化亜鉛	480 t	化粧品等
シリカ	9万 t	食品、化粧品、インク、合成ゴム、タイヤ等

図2 主なナノマテリアルの生産量と用途。
経済産業省のホームページから一部改変して転載。

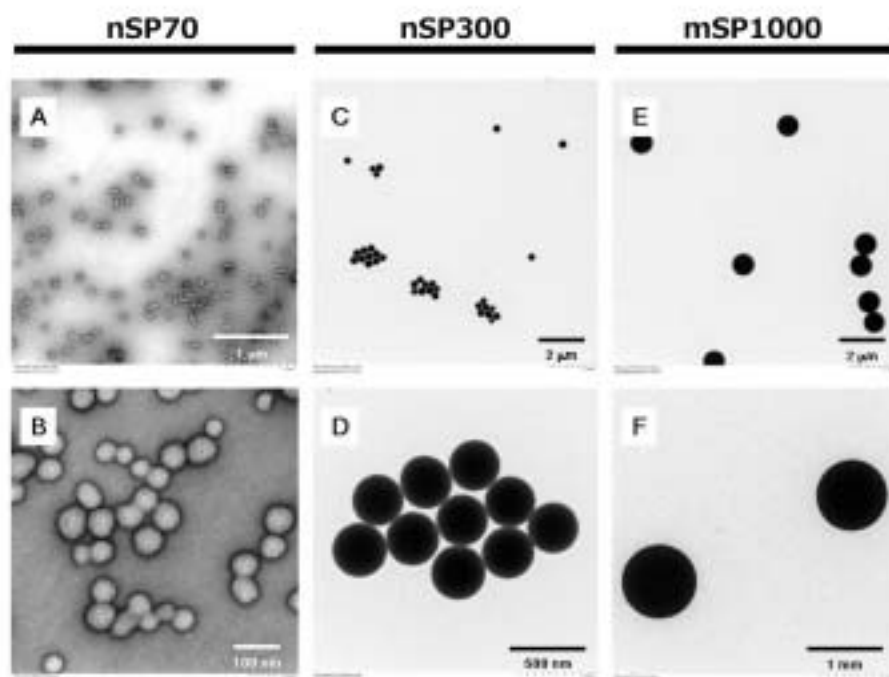


図3 非晶質シリカの電子顕微鏡写真.
(A and B) 直径 70 nm のシリカ (nSP70), (C and D) 直径 300 nm のシリカ (nSP300),
(E and F) 直径 1000 nm のシリカ (mSP1000).

そこで本研究では、まず、分散性が極めて高い表面未修飾非晶質ナノシリカを用いて、経皮吸収性・体内動態・細胞内動態と粒子サイズとの連関を検討した。筆者らは一次粒径が 70 nm (nSP70)、300 nm (nSP300)、1000 nm (mSP1000) のものを実験に用いている（現在は、30 nm、50 nm の nSP やサブナノサイズのものも使用しているが、これらに関しては今後、報告させて頂く。）。図3に表面未修飾のシリカの透過型電子顕微鏡 (TEM) 写真を示す。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/二次粒子径もカタログ値とほぼ同等であった。続いて、nSP70、nSP300、mSP1000 をマウス耳介に塗布した際の経皮吸収性を評価した。各シリカを BALB/c マウスに 5 日間あるいは 28 日間連続経皮塗布し、投与局所および所属リンパ節、主要組織の TEM 観察を行った。その結果、nSP70 が角質層を通過して表皮や真皮層にまで到達し、さらに興味深いことに、nSP70 塗布マウスの脳アストロサイト、脳血管内皮細胞内に nSP70 が移行することが明らかとなった（表1）。なお、著者らは、従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカである nSP300 や mSP1000 は、表皮層にすら到達しないこと（即ち、高度に安全であること）を確認している。

表1 nSP70 の生体内動態と生体影響。

局在	生体影響
皮膚*	表皮および真皮層にまで到達、皮膚バリアを透過した後には血中へ移行。
肝臓*	肝クッパー細胞や肝実質細胞に蓄積。急性肝毒性や肝実質細胞におけるDNA傷害を誘発。
脳*	経皮塗布後に脳に蓄積。脳細胞に対する増殖障害や脳内における炎症性サイトカイン産生を誘発。
脾臓*	炎症型脾臓である脾臓やリンパ節にも蓄積したことから、免疫学的な生体影響の誘発が懸念される。
子宮*	早産や胎児の発育障害を誘発。
胎児*	

本表で示した現象は nSP70 を曝露したマウスにおいてのみ観察された。また、これらの解析は nSP70 を経皮塗布 (a) あるいは尾静脈内投与 (b) したマウスを用いて実施した。

そこで次に、各ナノシリカを尾静脈内より投与したマウスを用いて、ナノシリカが全身循環した際の動態および生体影響を評価した。まず、種々の粒子径の非晶質ナノシリカの生体内動態を蛍光イメージングならびに TEM 解析により評価したところ、nSP300 と mSP1000 は胆嚢に局在し、一方で nSP70 は肝臓全体へ速やかに分布することが明らかとなった（表1、図4）。また、nSP300 と mSP1000 は、肝実質細胞には殆ど移行せず、一方で粒子径 70 nm 以下になると肝実質細胞へ移行し、最終的に核内にまで到達した。続いて、各シリカを 2 mg/head で

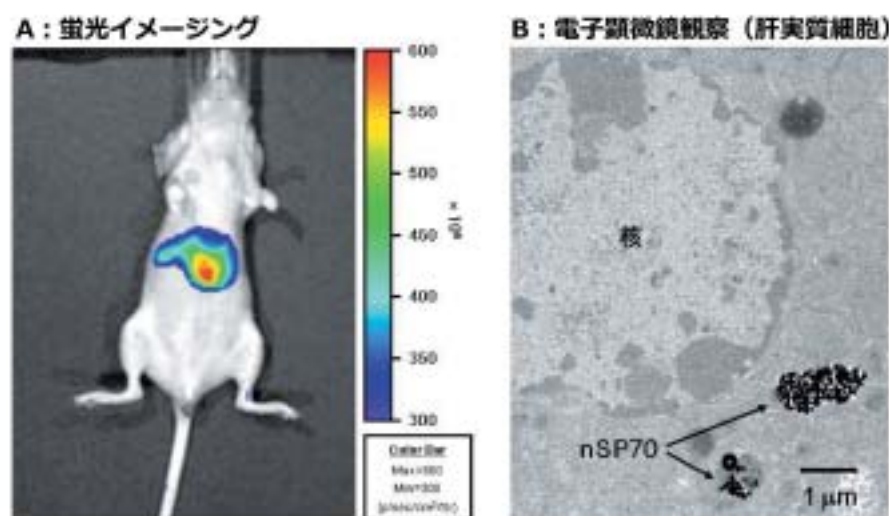


図4 nSP70の体内動態解析.
DY676で標識したnSP70 (7×10^{10} 個)をBALB/cマウス(雌, 8週齢)の尾静脈内より投与した。投与24時間後にXenogen IVIS 200を用いてnSP70の局在を蛍光イメージングにより解析した(A)。また、同様にnSP70を投与したマウスから肝臓を回収し、電子顕微鏡を用いてnSP70の肝臓内局在を観察した(B)。

尾静脈内投与した際の急性毒性試験を実施した。nSP300やmSP1000を静脈内投与したマウスにおいては急性毒性や肝毒性は全く認められなかったのに対して、nSP70投与マウスは投与後12時間以内に全例が死亡した(表2)。これらのマウスから回収した血液中の肝障害マーカーを測定したところ、100 nmを閾値に粒子サイズの減少により著しいASTやALTの産生上昇が認められた。これらの結果を重ね合わせると、急性毒性や肝障害性といった生体影響の違いは、非晶質ナノシリカの体内分布特性の差異に起因するものと考えられた。

表2 非晶質シリカの急性毒性試験。

群	生存率 (%)	ALT値 ^a (IU ^b /L)
コントロール	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

生存率は非晶質シリカ投与24時間後に評価した。
また、血漿中ALTレベルの測定は、非晶質シリカ投与6時間後に回収した血漿を用いて実施した。

a: Alanine aminotransferase

b: International Unit

*: $p < 0.01$ vs. Control (PBS) (ANOVA)

これまでに、直径が数百ナノメートルのナノ粒子が体内に侵入した後に脳内に蓄積する可能性がいくつか報告されているが²、非晶質ナノシリカの経皮塗布後の体内吸収性に関する検討は世界的に見ても報告はない。非晶質ナノシリカが非常に強固な皮膚角質バリアを通過して脳内に到達するという事実は非常に興味深く、少なくともこれらの事実は、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、ナノシリカの経肺・経口曝露後の安全性評価の重要性や、脳神経/免疫学的な安全性評価の必要性を示している。現在、著者らは安全性評価において最も重要な経皮吸収量(曝露量)の定量評価を進めると共に、皮膚透過機構の解析や皮膚局所における安全性評価を推進している。

おわりに

以上、本項では、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)のバルクマテリアルとは異なる性質を発揮することを実証した³⁻⁵。詳細は割愛したものの、我々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以下のサイズであっても表面修飾を最適化することで、

高度に安全性を確保し得ることを認めており、安全かつ有用なナノマテリアルを開発・実用化できることを実証している。今後のサブナノサイズの安全性評価は必須であるものの、このことは、表面性状制御をはじめとして適切な方策を講じることで、ヒトや環境の安全性を確保すると同時に、我々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、ナノとヒトが共存共栄できることを意味している。本稿では紙面の都合上、筆者らの知見の一例のみ紹介させて頂いたが、今後、こういった Nano Safety Science 研究を積み重ねることで、ヒトの健康環境を確保しつつ、産業界の発展にも寄

与出来るものと期待している。

参考文献

1. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, JACC Report, No. 51 (2006).
2. Wang J, et al, *Toxicology* **254**, 82-90 (2008).
3. Nabeshi H et al, *Pharmazie* **65**, 199-201 (2010).
4. 吉川友章ほか, コスメティックステージ **4**, 44-48 (2010).
5. 吉川友章ほか, ナノ材料のリスク評価と安全性対策 (フロンティア出版), 44-53 (2010).

