

化粧品のナノテクノロジー安全性情報

【調査対象期間:2018.2.10-2018.3.31】

1. 国内行政動向

1-1. 厚生労働省

【2018/03/02】「平成 29 年度 第 5 回化学物質による労働者の健康障害防止措置に係る検討会」及び「第 2 回管理濃度等検討会」を合同開催します

<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000195714.html>

3 月 12 日に標記会合が開催される。議題は、

- 1.個別物質の管理濃度等の検討について
 - ・マンガンに関する管理濃度等について
- 2.平成 29 年度第 4 回化学物質による労働者の健康障害防止措置に係る検討会を受けた検討結果について(報告)
- 3.酸化チタン(IV)に係る健康障害防止措置の検討について<非公開>
 - ・日本酸化チタン工業会
- 4.その他
 - ・化学物質による労働者の健康障害防止措置に係る検討会及び管理濃度等検討会の今後のあり方について

[NITEケミマガより]

1-2. 経済産業省

特に動きなし

1-3. 環境省

特に動きなし

2. 国内外研究動向

2-1. 学会情報

1) 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2018.1.25-26)

前回報告においてタイトルのみ報告、今回シンポジウムについて要旨を報告

●シンポジウム2 第2日目 1月26日(金) 8:50~10:50

「ナノ化学物質の安全性評価と展望」

座長：酒々井眞澄（名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野）
串田 昌彦（住友化学株式会社 生物環境科学研究所）
演者：菅野 純（独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター）
広瀬 明彦（国立医薬品食品衛生研究所）
東阪 和馬（大阪大学大学院薬学研究科）
長崎 幸夫（筑波大学数理物質系 物質工学域
大学院人間総合科学研究科 フロンティア医科学 兼任）

SY2-1 ラットモデルによる大規模吸入試験での毒性影響評価／菅野 純

アスベストに代表される繊維発癌（肺癌や中皮腫）があるが、カーボンナノチューブの中には、これに該当する大きさと形状の粒子を含むものがある事から、まず腹腔内投与モデルにより、そして全身曝露吸入試験により、その癌原性が確認された。吸入毒性評価を行うために実施する実験動物を用いた全身曝露吸入試験は、設備、その運転、分散法の開発などの課題がある。一次粒子はナノサイズでも、二次粒子はマイクロメートルに及ぶ場合があり得ることから、吸入により誘発される毒性は、粒子の大きさや形によって呼吸器系内での到達部位が異なる点や、異物除去や炎症等の組織反応の主役であるマクロファージの反応様式が異なる点などにより、単純ではない。当演題では、日本バイオアッセイ研究センターにおいてラットを用いて実施した、多層カーボンナノチューブ(Mitsui MWNT-7)の2年間全身曝露吸入発がん性試験と関連短期曝露試験及び二酸化チタン(テイカ(株)AMT-600)の短期曝露試験から得られた肺を中心とした呼吸器所見が提示され、毒性発現機序についての考察が試みられた。

SY2-2 ナノ化学物質のリスク評価の国際動向と慢性試験の必要性／広瀬 明彦

我が国はOECD スポンサーシッププログラムの一環として、炭素系ナノマテリアルに関しての毒性情報の収集に貢献してきた。ナノチューブを中心に慢性投与研究が進められ、特に腹腔内投与試験では複数の種類のナノチューブについての中皮腫誘発性の比較検討が行われた結果、その強さは長い線維を多く含むナノチューブほど強くなることが示唆された。さらに、in vitro 系においてはTHP-1 細胞を用いた炎症性サイトカインの誘導による影響も同様の傾向が示された。これはfrustrated phagocytosis が発がん性の引き金になっていることを支持している。一方、MWNT-7 の吸入曝露試験では肺がんは認められたが中皮腫は観察されておらず、腹腔内投与の結果をそのまま外挿できない可能性がでてきた。他方で、気管内投与試験では、中皮腫と肺がんの両方を引き起こすことが示唆されているが、結論的には、MWNT-7 以外のナノチューブ曝露による肺組織に対する慢性影響を評価できるデータが不足している状況である。我が国はこれまでの国内研究の成果を生かすべく、短期間の気管内投与及び吸入試験によるin vivo 試験法の妥当性評価に関するプロジェクトを提案しており、これらの短期曝露による慢性影響を評価できる手法を確立するために、当面は更なる慢性影響のデータを蓄積する必要があると考えられる。

SY2-3 食品関連製品に含まれるナノ素材の安全性評価～ナノ安全科学研究からナノ最適デザイン研究へ～／東阪 和馬

ナノ粒子の代表例である銀ナノ粒子・白金ナノ粒子は、強い抗酸化作用や抗菌活性など、特有の性

能を有し、食品関連製品(サプリメント・食品添加物・食品用容器包装等)に幅広く実用化されているが、ナノ粒子のリスク解析に資する安全性情報を幅広く収集し、これら情報を基盤として、ナノ粒子の安全性の理解と確保が重要な課題であると考えられる。これまでに、食品添加物等として汎用されている非晶質ナノシリカや銀ナノ粒子を用いて、定性的・定量的に体内吸収性・組織移行性を解析することで、経口吸収されたナノ粒子が、胃や小腸などの消化管局所だけでなく、相当量が血中に移行することをはじめ、従来までのサブミクロンサイズ以上のものとは異なる体内動態を示すことを明らかとしてきた。さらに、ナノ粒子曝露後の一般毒性試験や特殊毒性試験を実施することで、従来素材と比較してより強いハザード(急性毒性、生殖毒性、免疫毒性など)を誘導し得ることを明らかとすると共に、安全性に懸念があるものに関しては、適切な表面修飾を施すことで、安全性を担保し得ることを見出してきた。本シンポジウムでは、最新の知見について紹介し、ナノ粒子の安全性評価の現状の課題と今後について議論したい。

SY2-4 抗酸化能を有するナノメディシンの開発／長崎 幸夫

活性酸素種を消去するために様々な抗酸化剤が開発されてきたが、これらは正常な細胞やその中のミトコンドリアに入り込み、電子伝達系を始め、重要なレドックス反応を阻害してしまうことが問題であった。我々はこれらの問題を解決するため、「高分子に抗酸化剤を共有結合でぶら下げる」という発案をし、分子をデザインした。分子のサイズを制御することにより強い抗酸化剤を有するにもかかわらず、生存に大切な細胞内レドックス反応を保護することが可能となり、副作用の少ない新しいナノメディシン(レドックスポリマー薬)としてはたらくことが確認された(レビューとしてYoshitomi ら、Adv. Health. Mat., 3, 1149 (2014))。

2) 日本薬学会第138年会(金沢)(2018.3.25~28)

ナノマテリアルに関連する演題として以下の演題があった。

【口頭発表】

28T-pm08S ナノ銀粒子曝露による神経細胞でのアミロイド β 発現増加とその誘導機序解明

○笠原 淳平¹, 東阪 和馬^{1,2}, 大須賀 絵理¹, 豊田 麻人¹, 長野 一也¹, 堤 康央^{1,3}(¹阪大院薬,² 阪大院医,³阪大MEIセ)

【背景・目的】様々な分野での応用が進められているナノマテリアル(NM)を、我々が吸入曝露する機会が増加するなかで、近年、NM が鼻腔から脳へ直接移行し得ることが報告されている。そのため、NM が脳神経系に対して予期せぬ影響をおよぼすことが危惧されているものの、脳神経系に対するハザード情報は不足しているのが現状である。この点、昨今の疫学研究において、環境中微粒子濃度が高い地域で生活していたヒトの脳内で、粒子状物質の凝集やアルツハイマー病の原因蛋白質の一つであると考えられるAmyloid β ($A\beta$)の発現増加が報告されており、現象論として、外因性微粒子の曝露と神経疾患の発症・悪化との連関が示唆されている。しかし、これら外因性微粒子が神経疾患の発症・悪化に関与するかを科学的に解析した研究は未だ乏しい。そこで本検討では、粒子径 10 nm のナノ銀粒子(nAg10)を用いて、ヒト神経芽細胞株(SH-SY5Y)における nAg10 曝露が、 $A\beta$ 発現におよぼす影響とその誘導機序の解明を試みた。【方法・結

果・考察]まず、Aβ 発現におよぼす影響を評価する目的で、SH-SY5Y に nAg10 を 72 時間曝露させた際の、培養上清中の Aβ 40 および Aβ 42 の発現量を解析した。その結果、nAg10 の用量依存的に Aβ 40、Aβ 42 の発現量が増加することが明らかとなった。そこで、nAg10 による Aβ 発現増加の誘導機序の解明を試みるため、Aβ の前駆体である APP の発現を解析したところ、nAg10 曝露群で APP の発現が増加することが示された。さらに、nAg10 の細胞内への取り込みとの連関について、取り込み阻害剤を用いて解析したところ、阻害剤を前処置することで APP 発現増加が抑制されることが示された。これらの結果から、nAg10 は細胞内に取り込まれた後、APP の発現増加を介して、Aβ 発現増加を誘導することが示唆された。現在、酸化ストレスや炎症経路の関与に着目し、nAg10 曝露による Aβ 発現増加の誘導機序の解明を進めている。

28T-pm09S 非晶質ナノシリカの事前投与による肝障害の増悪に関わる因子の同定に向けた検討
○衛藤 舜一¹、東阪 和馬^{1,2}、佐藤 建太¹、越田 葵¹、長野一也¹、堤 康央^{1,3}(¹阪大院薬、²阪大院医、³阪大MEIセ)

【背景・目的】少なくとも一次元が 100 nm 以下の微粒子であるナノマテリアル(NM)は、微小化に起因して組織浸透性や界面反応性の向上といった、革新的機能を有する。一方で、従来素材とは異なるハザードを呈してしまうことが危惧されており、有用かつ安全な NM の利用促進に向けては、ADME(吸収・分布・代謝・排泄)解析やハザード同定が喫緊の課題となっている。そのうえ、NM の使用量および使用用途は拡大の一端を辿っており、例えば、非晶質ナノシリカ(nSP)は、医薬品助剤や食品添加物として汎用されている。従って、我々はこれら NM に、日常的に曝露するものと考えられ、NM に複数回あるいは持続的に曝露する状況が想定されるものの、獲得免疫応答に着目したハザード同定は不十分である。このような背景のもと、昨年の本会では、①粒子径が 50 nm の nSP(nSP50)の事前投与により、nSP50誘導性の急性毒性のうち、肝障害が増悪すること、②この肝障害の増悪が免疫不全マウスを用いた検討では認められないことを報告し、獲得免疫を介したハザード解析の重要性を訴えた。そこで本検討では、この肝障害の増悪に関わる因子の絞り込みを試みた。【方法・結果・考察】本検討では、肝障害の増悪に関わる因子として、はじめに、抗体に焦点を当て、血清移入を用いた実験を行った。BALB/c マウスの耳介部に、PBS または nSP50 を、週 1 回、計 4 週にわたり、事前に皮内投与した。最終投与の1 週間後に事前投与を行ったマウス由来の血清を未処置のマウスに腹腔内投与し、その 24 時間後に尾静脈内より nSP50 を過剰量投与することで、急性毒性を誘導した。その結果、nSP50、あるいは PBS を前投与したマウスの血清を移入した群間において、肝障害マーカーである ALT、AST の増加は認められなかった。従って、nSP50誘導性の肝障害の増悪に関して、血清成分、つまり抗体は関与していないことが示唆された。そこで現在、nSP50 誘導性の肝障害の増悪に関わる因子として、T 細胞に着目し、中和抗体を用いた検討を進めている。

28U-am09S カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露により出生児の脳血管周囲病変で誘導される小胞体ストレス

○小野田 淳人^{1,2}、近藤 洋介³、宮崎 智³、武田 健⁴、梅澤 雅和⁵(¹東理大院薬、²学振DC、³東理大薬・生命、⁴山口東理大薬、⁵東理大総研院)【ポスター発表】

【背景・目的】大気環境中に浮遊する微小粒子 (PM2.5) の超微小画分であるナノ粒子の出生前曝露が引き起こす、発達神経毒性の評価とその機序の解明が求められている。先行研究により、ナノ粒子の胎児期曝露は児の脳血管周辺にアストログリオシスと β -sheet 含有率の高いタンパク質 (β -sheet rich protein) の増加を誘導することが明らかになった。本研究は、ナノ粒子の胎児期曝露によって生じる脳血管周辺の病態と β -sheet rich protein 増加の要因を明らかにすることを目的として行った。【方法】カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) を妊娠 5, 9 日目の ICR 系マウスに点鼻投与 (95, 73, 15, 2.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) し、6 週齢児の脳を摘出した。脳血管周囲病変を、網羅的遺伝子発現解析とタンパク質二次構造予測、免疫蛍光染色により解析した。【結果・考察】CB-NP の胎児期曝露によって発現亢進する遺伝子を精査した結果、19 の遺伝子が抽出された。この 19 遺伝子がコードするタンパク質に対し、EntrezProtein から得たアミノ酸配列情報をもとに、二次構造予測ツール (PSIPRED) を用いて、 β -sheet 含有率を算出した。結果、Robo4, Kdr, Flt1, Tie1 の 4 種が、 β/α 比 1 以上のタンパク質として抽出された。これらの発現分布を免疫蛍光染色で評価した結果、CB-NP の胎児期曝露による脳血管周辺での増加は認められなかった。次に、ナノ粒子とタンパク質の相互作用によって増加する β -sheet rich なタンパク質構造変化体に注目して解析を進めた。脳内において、タンパク質構造変化体は血管周辺に排出され、集積すると小胞体ストレスを誘導する。小胞体ストレスマーカーATF6 および CHOP は、CB-NP の胎児期曝露に起因するアストログリオシスの病変部において発現亢進していた。したがって、CB-NPの胎児期曝露による脳血管周辺での β -sheet rich protein の増加は、異常な構造変化体の集積であることが示唆され、それが小胞体ストレス誘導とアストログリオシスの要因となっている可能性が示された。

26PA-pm015 二酸化チタンナノ粒子による皮膚上皮細胞死誘導における紫外線照射 (UVA) の作用効果

池田 梨香子¹, 上村 菜月¹, 中島 優望¹, 古川 絢子¹, 樋口 善博¹ (1 鈴鹿医療大薬)

【目的】ナノ粒子二酸化チタン (TiO_2) は、被覆力に優れ、紫外線散乱効果も高いため、ファンデーションや日焼け止め製品に配合されており、一般的には安全とされている。しかし、その一方で、ナノ粒子 TiO_2 は細胞内に入り込み、弱い細胞死誘導 (細胞障害) を引き起こすことが報告されている。また、 TiO_2 は紫外線照射が加わることで細胞死誘導がより活性化される作用 (共同作用) が起こる可能性が考えられるが、明らかでない。そこで、 TiO_2 による皮膚上皮細胞の細胞死誘導における紫外線照射 (UVA) の効果を、さらに細胞死誘導過程での細胞内グルタチオン (GSH) 量の変動を合わせて検討した。【方法】市販 (MPT-429 石原産業) の TiO_2 を polyacrylic acid 存在下、150°C で処理したものを使用した。FRSK (ラット皮膚上皮細胞) を用い、0.2 mg/mL、0.8 mg/mL の 2 種類の TiO_2 濃度下で細胞を曝露させた。曝露させた後、致死線量の UVA (315~380 nm) 照射を行い、経時的に細胞死を MTT assay 測定で判定した。また、細胞内 GSH (グルタチオン) 量は、蛍光発光性試薬 ABD-F (4-fluoro-7-sulfamoylbenzofrazan) による HPLC で分離測定した。【結果】 TiO_2 曝露し、かつ UVA 照射したものは UVA 照射のみの対照群と比較して、6 時間後での細胞生存率は、59% (TiO_2 曝露量: 0.2 mg/mL) 及び 63% (0.8 mg/mL) であり、24 時間後では、それぞれ、54% 及び 57% と細胞生存率は低下した。また、細胞内 GSH 量は、UVA 照射のみの細胞と比較してどちらも約 50% 低下した。 TiO_2 単独でも、 TiO_2 曝露量濃度に依存して Control と比較して低下した。【結論】皮膚上皮細胞で

ある FRSK細胞 に TiO_2 を曝露しUVA 照射が加わると、 TiO_2 またはUVA 単独よりも細胞死誘導が起こり易くなる結果が認められ、 TiO_2 に UVA 作用が加わることにより細胞死誘導が増大する共同作用の生じることが明らかになった。

26PA-pm283S ヒアルロン酸ナノ粒子の皮膚浸透性とコラーゲン産生能の評価

○関田 真理絵¹, 徳留 嘉寛¹(¹城西大薬)

【目的】ヒアルロン酸(HA)は、皮膚において全身に存在する約50%を占め、肌の保水やクッションのような役割を持つ。また、紫外線の長期曝露などにより皮膚中のHA が減少する。それを補う目的で、現在多くの化粧品にHA が配合されているが、HA は高分子の水溶性多糖であるため、皮膚内に浸透しない。そこで皮膚浸透の向上を目的とし、ポリイオンコンプレックス法によりHA ナノ粒子(HANP)を調製し、物性および機能性の評価を行った。【方法】任意の比率で正電荷HA と負電荷HA を混合し、HANP 水溶液を調製したものおよびHANP 水溶液をPBS に加えたものの粒子径と多分散指数、ゼータ電位を測定した。機能性の評価として、ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)に対する細胞毒性試験と ELISA 法によるヒト I 型コラーゲンの定量を行った。皮膚中の HA を定量するため蛍光標識 HA(FL-HA)を作製し、縦型拡散セルを用いてマウス皮膚を介したFL-HANP の皮膚浸透性試験を行った。皮膚50%メタノール抽出液中のFL-HA はゲルろ過クロマトグラフィー(Ex:494nm, Em:521nm)にて定量した。【結果】正電荷と負電荷のHA が50%前後の割合のとき、粒子径が小さく安定なナノ粒子が得られた。HANP は生体内と近い極性で崩壊した。機能性評価では、細胞毒性は認められず、コラーゲン量は増加傾向が認められた。皮膚浸透性試験は現在検討中である。【考察】正電荷と負電荷のHA で粒子が作製できることが示された。PBS との混合試験よりHANP が皮膚内に入った時、HA は粒子ではなく単体で存在することが考えられた。機能性評価の結果から、HANP を皮膚中に送達させることで、皮膚中のコラーゲン量を増加させる可能性が示された。

26PA-pm357S 複数回の経口曝露に着目した非晶質ナノシリカの経口免疫寛容への影響評価

○越田 葵¹, 東阪 和馬^{1,2}, 衛藤 舜一¹, 佐藤 建太¹, 長野 一也¹, 堤 康央^{1,3}(¹阪大院薬, ²阪大院医, ³阪大MEIセ)

【背景・目的】ナノマテリアル(NM)は、少なくとも 1 次元が 100 nm 以下のサイズを持つ新しい素材であり、従来素材と比較し、透明感や界面反応性などが格段に向上することから、既に医薬品、化粧品、食品など、様々な分野で使用されている。特に、食品における NM の市場は年々増加しており、例えば、非晶質ナノシリカは固結防止剤として、食塩やインスタント食品をはじめとする多くの食品に使用されている。一方で近年、NM がその物性によっては、免疫攪乱を介したハザードを呈することが懸念されている。しかし、全身における免疫攪乱の報告はあるものの、非晶質ナノシリカの主要な曝露経路と考えられる経口曝露、ひいては腸管に着目した免疫攪乱の報告は乏しいのが現状である。腸管は全身とは異なり、多くの非自己成分と接触しており、独自の免疫システムを有している。中でも経口免疫寛容は、食物抗原などの外来抗原に対し寛容を誘導する唯一のシステムであることから、経口免疫寛容に着目した非晶質ナノシリカの安全性評価が喫緊の課題である。そこで本検討では、経口免疫寛容モデルマウスを用いて、非晶質ナノシリカが経口免疫寛容に与える影響を評価した。【方法・結果・考察】BALB/c マウスに、非晶質ナノシリカを鶏卵白アルブミン(OVA)と共

に 7 日間連日経口投与し、経口免疫寛容を誘導した。その後、1 週間間隔で 2 回、OVA を免疫賦活剤と共に腹腔内投与することで、OVA に対する免疫反応を誘導した。まず、非晶質ナノシリカが経口免疫寛容に与える影響を評価する目的で、最終投与の 1 週間後に回収した血液を用い、血中抗体価を測定したところ、OVA 単独投与群と比較し、非晶質ナノシリカと共投与した群において、OVA 特異的 IgG および IgE 量が増加していた。これより、非晶質ナノシリカが経口免疫寛容の成立を阻害することが示唆された。そこで現在、非晶質ナノシリカによる経口免疫寛容の破綻に、どういった免疫応答が関与するかを評価するため、摘出した脾細胞を OVA で再刺激した際のサイトカイン産生の測定を進めている。

26PA-pm371S ナノ白金粒子の細胞外への排出におけるエキソソームの関与

○飛島 匠¹、長野 一也¹、泉 雅大¹、岡田 桃子¹、石坂 拓也¹、田崎 一慶¹、原田 和生¹、平田 收正¹、浜崎 景²、稲寺 秀邦²、齋藤 滋^{2,3}、東阪 和馬^{1,4}、堤 康央^{1,5}(¹阪大院薬、²富山大院医、³富山大病院、⁴阪大院医、⁵阪大MEIセ)

【背景・目的】血液脳関門や血液精巣関門といった生体関門は、物質交換を制御し、異物の移行を厳密に制限することで、脳や精子などの保護に重要な役割を担っている。その一方で、当研究室ではこれまでに、先端素材として活用されているナノマテリアル(NM)の安全科学研究を推進する中で、マウスに尾静脈内投与した粒子径 5 nm のナノ白金粒子(nPt5)などが、生体関門を透過して、脳や精巣上体にまで移行することを明らかにしている[昨年の本会]。しかし、生体関門を透過するにあたって、nPt5 を取り込んだ細胞からどのように排泄されるのかといった機序は、未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、NM の生体関門透過機序の解明を目指し、過去に細胞中の老廃物の排出機構と考えられていたエキソソーム(Exo)に着目することで、nPt5 の細胞外への分泌/排出における関与を評価した。【方法・結果・考察】Exo の回収にあたって、汎用される遠心法では粒径によっては NM も一緒に沈降してしまうため、Exo マーカーとして知られる CD9 に対する抗体が固相化されたカラムに着目した。まず、細胞を培養した上清をカラムに通し、Western Blotting により Exo の回収を検証した。その結果、CD9 の発現が観察され、Exo が濃縮されていることが示された。そこで次に、実際にナノ白金粒子がExo により分泌/排出されていることを解析するため、nPt5 を取り込ませた細胞の培養上清から Exo 画分を回収し、白金量を誘導結合プラズマ質量分析法により定量した。その結果、カラムの洗浄液中からは白金が検出されず、溶出した Exo 画分のみから白金が検出された。したがって、nPt5 の細胞外への分泌/排泄に、Exoの機構を活用している可能性が示めされた。現在、電子顕微鏡を用い、nPt5 が Exo内に取り込まれていることや、NMの粒径がExo機構に与える影響を解析している。

26PA-pm372 ナノ白金曝露によるテストステロン産生量に与える影響評価

○岡田 桃子¹、長野 一也¹、泉 雅大¹、飛島 匠¹、石坂 拓也¹、田崎 一慶¹、原田 和生¹、平田 收正¹、浜崎 景²、稲寺 秀邦²、齋藤 滋^{2,3}、東阪 和馬^{1,4}、堤 康央^{1,5}(¹阪大院薬、²富山大院医、³富山大病院、⁴阪大院医、⁵阪大MEIセ)

【背景・目的】ナノマテリアル(NM)の安全科学研究の進展に伴って、生殖発生に与える影響も多く評価されている。例えば、当研究室においてもこれまで、ナノシリカやナノ酸化チタンを妊娠マウスに曝露させると、胎仔発育不全などを誘発させうることを明らかにしている。しかし、これらの研究は、雌に対する評価がほとんどで、雄に

着目した評価は不十分であるのが現状である。その点、我々は現在、食品・化粧品などに応用されているナノ白金(nPt)に着目した安全科学研究を進めており、雄マウスに経口投与した 5 nm の nPt(nPt5)は吸収され、肝臓や腎臓といった主要な組織のみならず、精巣にまで移行し得ることを明らかにしている[昨年の本会]。そこで本研究では、nPt5 の精巣に与える影響を評価すべく、主要な役割を担っているテストステロン(Tes)の産生量を解析した。【方法・結果・考察】nPt5 の Tes 産生への影響を評価するため、マウス精巣ライディッヒ細胞(TM3)に nPt5 を添加し、24 時間後に培養上清を回収した。Tes 量を定量したところ、control 群に比較して、nPt5 を添加した群で有意に Tes 量が減少した。そこで、Tes の産生が減少したメカニズムを明らかにする一環として、Tesの合成経路に着目した。先ほどと同様に、TM3 に nPt5 を添加し、その 24 時間後にmRNA を抽出して、Tes の合成に関わる酵素(StAR,CYP17A1)の発現量を比較解析した。その結果、StAR では nPt5 の添加による発現量に違いは認められなかったのに対し、CYP17A1 では有意に、その発現量が減少した。これらの結果から、nPt5 はTes 合成経路の CYP17A1 の発現を抑制することで、Tes 産生を低下させている可能性が考えられた。今後、メカニズムの詳細を追求するとともに、nPt5 を曝露した際の in vivo での Tes 産生に及ぼす影響を解析する予定である。

26PA-pm373S 粒子径の異なるナノ白金曝露による生殖組織への移行性と局在の評価

○泉 雅大¹、長野 一也¹、飛鳥 匠¹、岡田 桃子¹、石坂 拓也¹、原田 和生¹、平田 収正¹、浜崎 景²、稲寺 秀邦²、齋藤 滋^{2,3}、東阪 和馬^{1,4}、堤 康央^{1,5}(¹阪大院薬、²富山大院医、³富山大病院、⁴阪大院医、⁵阪大MEIセ)

【背景・目的】ナノマテリアル(NM)は、サイズの微小化により、組織浸透性といった機能が向上しており、既に幅広い領域で使用されている。一方で、NM は、従来の素材とは異なる体内動態などを示すことから、未知の生体影響を誘発し得ることが懸念されている。本観点から我々は、ナノ安全科学研究を推進するため、体内動態・物性・ハザードの多角的な連関を解析しており、粒子径が 5,30,70 nmのナノ白金(nPt5,30,70)は体内に吸収され、その中で最も吸収量の多かった nPt5は、肝や腎といった組織に加え、生殖に関わる精巣や精巣上体にまで移行することを報告した[昨年の本会]。しかし、粒子径による生殖組織への移行量の違いや、生殖組織における詳細な局在は未だ明らかでない。そこで本研究では、nPt5,30,70の生殖組織への移行量を比較解析すると共に、nPt5 の精子への移行性を解析した。【方法・結果・考察】粒子径の違いによる生殖組織への移行量を比較するため、雄性 BALB/c マウスに nPt5,30,70 を単回尾静脈内投与し、24 時間後の生殖組織(精巣/精巣上体)中の白金量を誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により評価した。その結果、いずれの投与群でも、精巣/精巣上体に白金が検出され、nPt30,70 も生殖組織にまで移行することが示された。また、その量を比較したところ、nPt5 投与群と比べ、nPt30,70 投与群は白金量が少なく、粒子径が小さいほど移行しやすいことが示唆された。さらに、生殖組織へ分布することを先行的に明らかにしている nPt5 の詳細な局在を解析するため、精子への移行性を評価した。精巣上体から回収した精子中の白金量を ICP-MS により解析した。結果、精子画分にも白金が検出され、nPt5 が精子にまで移行し得ることが明らかになった。現在、nPt5 の精子への取り込みや、各種 nPt による精巣・精子・次世代への影響を解析している。

26PA-pm374S 単一粒子 ICP-MS 法による血中銀ナノ粒子の存在量・様式同時解析の最適化

○石坂 拓也¹, 長野 一也¹, 田崎 一慶¹, 陶 紅¹, 泉 雅大¹, 岡田 桃子¹, 飛島 匠¹, 原田 和生¹, 平田 收正¹, 浜崎 景², 稲寺 秀邦², 齋藤 滋^{2,3}, 東阪 和馬^{1,4}, 堤 康央^{1,5}(¹阪大院薬, ²富山大院医, ³富山大病院, ⁴阪大院医, ⁵阪大MEIセ)

【背景・目的】ナノマテリアル(NM)の普及により、我々は様々な NM を意図的/非意図的に曝露する機会が増しており、今後も NM を持続的に活用し続けるためには、その安全性確保が重要課題である。このような背景から、NM のハザード同定が多方面で進められつつあるものの、曝露実態に基づいた NM のリスク評価は十分になされていないのが現状である。これは、曝露実態の解明に、生体中での存在量と様式(粒子/イオン状態など)を理解することが重要であるものの、両者を効率よく解析するための手法が不十分であることに起因している。この問題点を解決すべく、我々は、NM の存在量と様式の同時解析が可能な新規分析法: 単一粒子 ICP-MS 法の生体試料への応用を推進している。そこで本研究では、NM の曝露実態の解明を目指し、単一粒子 ICP-MS 法を用いて、血中銀ナノ粒子(nAg)の存在量・様式の同時解析について、最適化を試みた。【方法・結果・考察】血中 nAg の存在様式解析においては、nAg の存在様式を損なわずに血中夾雑物を除去する必要がある。そこで、夾雑物の分解を目的とし、酸溶媒(HCl/HNO₃)やアルカリ溶媒(NaOH/(CH₃)₄N⁺)を用いた検証を実施した。その結果、酸処理では、殆どの粒子がイオン化していたのに対し、アルカリ処理では、添加粒子と同等の粒子径(100 nm)で検出され、血中 nAg の分析には、アルカリ溶媒での前処理が適している可能性が示唆された。さらに、実際の研究スキームを鑑み、試料の保存環境における存在様式変化を検証した。nAgが添加されたマウス血液を冷蔵(4℃)と冷凍(-20℃)で2週間保存し、イオン化率を測定したところ、冷蔵条件では継時的にイオン化率が上昇し、2週間後には総量の 4%がイオン体として検出された。一方で、冷凍では継時的なイオン化は認められず、試料の冷凍により、存在様式を損なわない分析が可能であることが見出された。今後は、これらの検討をもとに、詳細な曝露実態解析を進める予定である。

26PA-pm375S 生体内に吸収された血中ナノマテリアルの存在量と様式の解析

○田崎 一慶¹, 長野 一也¹, 泉 雅大¹, 岡田 桃子¹, 飛島 匠¹, 原田 和生¹, 平田 收正¹, 浜崎 景², 稲寺 秀邦², 齋藤 滋^{2,3}, 東阪 和馬^{1,4}, 堤 康央^{1,5}(¹阪大院薬, ²富山大院医, ³富山大病院, ⁴阪大院医, ⁵阪大MEIセ)

【背景・目的】ナノマテリアル(NM)の開発普及の進展に伴い、様々な製品に NMが用いられるようになっており、安全性の確保に大きな関心を集めている。特に、食品添加材や包材として利用された NM は、直接的に生体内に吸収される可能性が高く、そのリスク評価が重要である。このような背景から、経口摂取された NMの量的な動態情報が収集されてきた。しかし、実際の生体内においては、曝露された粒子の存在様式(粒子径、粒子/イオン状態など)が変化していることが予想され、将来的な NM のリスク評価には、体内での存在量と様式を同時に理解することが重要であるものの、その解析基盤の構築が課題であった。本観点から我々はこれまでに、NM の存在量・様式の同時解析を可能とする「単一粒子(sp)-ICP-MS法」に着目し、その生体応用を推進してきた。そこで本研究では、sp-ICP-MS 法を用い、経口摂取された NM の存在量・様式の評価を試みた。【方法・結果・考察】本検討ではこれまでに、当研究室で量的な動態解析を進めてきた

粒子径 70 nm のナノ銀粒子(nAg)を用いて検証した。本粒子をマウスに経口投与(10 mg/kg)した後、経時的に採血し、血中 Ag 濃度と存在様式を解析した。まず、血中 Ag 量を定量した結果、Tmax・Cmax はそれぞれ 2 時間・28.0 ng/mL であった。そこで、投与後 2 時間と 8 時間の存在様式の推移を解析したところ、いずれの時間においても、検出された銀は殆どイオン体であることが示された。したがって、NM による生体応答を解明するためには、粒子を投与した際にも、その存在様式の変化を理解しながら解析する必要性が示唆された。今後は、この様式変化の詳細を明らかにすべく、消化管内の環境を模した系や腸管上皮細胞による腸管吸収モデルを用い、血中移行するまでの nAg の存在様式を検証する予定である。

26PA-pm387 PVP 修飾銀ナノ粒子の医薬品に対する安全性に関する検討

○望月 優摩¹, 小野 壮平¹, 磯田 勝広¹, 平 裕一郎¹, 平 郁子¹, 石田 功¹(¹帝京平成大薬)

【目的】銀ナノ粒子は、従来の素材にはない優れた性質を有する新しい素材として期待され、さまざまな用途に用いられている。しかしながら、その安全性に関する研究は少ない。今後のナノマテリアルの更なる発展には安全性の確立が必要です。そこで本研究では銀ナノ粒子に着目し、polyvinylpyrrolidone (PVP)を表面修飾した粒子径 10nm 銀ナノ粒子の安全性評価を行った。【方法】雄性 Balb/cマウスに粒子径 10nm の銀ナノ粒子(NSP10)、PVP 修飾した粒子径 10nm の銀ナノ粒子(PVP-NSP10)、粒子径 200nm の銀ナノ粒子(NSP200)を尾静脈投与し、24 時間後に心採血を行い AST と ALT を測定した。PVP-NSP10 を 1,2,3,4mg/kg の割合で尾静脈投与し、24 時間後に心採血を行い AST と ALT を測定した。NSP10 及び PVP-NSP10を尾静脈投与し、シスプラチン、四塩化炭素、パラコート、アセトアミノフェン、ストレプトマイシンをそれぞれ腹腔投与した。各投与24時間後に心採血を行いASTと ALT、BUN を測定した。【結果】PVP-NSP10 単独投与群、NSP200 単独投与群、パラコート、アセトアミノフェン、ストレプトマイシン単独投与群では AST と ALTの優位な上昇は認められなかった。また PVP-NSP10 の投与量を変化させても肝障害は認められなかった。NSP10 及び PVP-NSP10 とシスプラチンを併用した群ではAST と ALT の優位な上昇が認められた。NSP10 と四塩化炭素を併用した群は肝障害があったが、PVP-NSP10 との併用群では肝障害は誘導されなかった。【考察】PVP-NSP10 は NSP10 より単独投与では安全が高いと示唆された。しかし、PVP 修飾した銀ナノ粒子は薬物併用により肝障害が認められたことから、PVP 修飾の有無によって薬物相互作用によって誘導される傷害性が異なると考えられる。今後は、さらに多くの医薬品成分と化学物質との検討の必要があると考えられる。

26PA-pm426 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルに対する THP-1 の細胞応答

○宮島 敦子¹, 河上 強志¹, 小森谷 薫¹, 加藤 玲子¹, 葩島 由二¹, 伊佐間 和郎²(¹国立衛研, ²帝京平成大薬)

【目的】ナノマテリアルの生体影響には、化学組成に加えて、形状、粒子径、凝集状態、表面積、表面荷電など、様々な物理化学的要因が関与している。本研究では、物性の異なる ZnO ナノマテリアルを用い、物理化学的性質について明らかにすると同時に、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた in vitro 生体影響評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。【方法】物理化学的性質の異なる ZnO ナノマテリアル分散製品(Sigma-Aldrich 及びNanoTeK Alfa Aesar)を対象として、懸濁液中での平均粒子径、粒径

分布及びゼータ電位等を動的光散乱法にて測定した。ZnO ナノマテリアル懸濁液を THP-1 細胞に24 時間曝露後、フローサイトメータを用いて、細胞毒性及び細胞表面マーカー CD54及び CD86 の発現について検討した。さらに培養上清中のサイトカイン量を測定した。【結果・考察】2種類のZnOナノマテリアル分散製品の一次粒子径は、<35 nm(sigma),40 nm(alfa)で、水懸濁液中(10 mg/mL)での平均粒子径は、それぞれ 66, 165 nm、ゼータ電位は 44.9, -7.5 mV であった。THP-1 細胞に対する細胞毒性は、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強かった。ZnO は共に用量依存的に CD54 発現量を増加させ、ZnO処理により IL-8、IL-1 β 、TNF の産生が観察された。ZnO(sigma)と ZnO(alfa)では、ZnO(sigma)の方が、CD54 発現における相対蛍光強度が高く、サイトカイン産生も多かった。ZnO 処理後の THP-1 細胞をフローサイトメータで解析した結果、側方散乱光強度の変化が用量依存的に観察され、その変化は ZnO(sigma)処理細胞で大きかった。以上より、細胞内に取り込まれた ZnO 量と細胞毒性、免疫応答との間に関連があると考えられた。

28PA-am104 単層カーボンナノチューブがヒト肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性に及ぼす影響
○朝居 祐貴¹, 加藤 美紀¹, 社本 望¹, 浅倉 智貴¹, 灘井 雅行¹(¹名城大薬)

【目的】単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は、直径数 nm、長さ数 μ m の 6員環の網目状炭素からなる円筒状物質である。SWCNT は、その表面に薬物を結合させることができるため、drug delivery system の単体として臨床応用が期待されている。しかし、SWCNT が肝において多くの薬物の代謝を担う UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 活性に及ぼす影響は未解明である。そこで本研究では、SWCNTがヒト肝 UGT 活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、SWCNT による肝 UGT 活性の変動メカニズムについても検討を行った。【方法】ヒト肝、UGT1A1、UGT1A6 発現系マイクロソームは Corning より購入した。酵素反応溶液に最終濃度 0.1 mg/mLとなるように SWCNT を添加した。UGT1A1で触媒される β -エストラジオール 3-グルクロン酸抱合活性と UGT1A6 で触媒されるセロトニングルクロン酸抱合活性は、LC-MS/MS を用いて残存活性を算出した。SWCNT と UGT1A1 タンパク質の直接的な相互作用は、SWCNT-UGT1A1 複合体の形成を指標として、ウェスタンブロット法により評価した。【結果・考察】 β -エストラジオール 3-グルクロン酸抱合活性は、SWCNT により24%以下まで減少した。一方、セロトニングルクロン酸抱合活性は 64%まで減少した。また SWCNT は、UGT1A1 と UGT1A6 発現系マイクロソームでも肝マイクロソームと同様の阻害強度を示したことから、SWCNT が肝 UGT 活性に及ぼす影響は分子種により異なると考えられた。SWCNT と複合体を形成した UGT1A1 タンパク質量は 64%以上であったことから、SWCNT と UGT1A1 タンパク質の直接的な相互作用が認められた。従って、SWCNT は UGT1A1 タンパク質と直接相互作用することで、 β -エストラジオール 3-グルクロン酸抱合活性を阻害したと示唆された。

28PA-pm103 ナノ粒子の再分散に適した噴霧急速凍結乾燥微粒子の粉体特性
○奥田 知将¹, 山東 史佳¹, 岡本 浩一¹(¹名城大薬)

【目的】これまでに当研究室では、溶解後にナノ粒子を効率よく再分散可能な吸入粉末剤の創製に適した賦形剤と製造法について模索・検証し、トレハロース(Tre)とロイシン (Leu)の混合賦形剤を用いて噴霧急凍結乾燥 (SFD)法により粉末微粒子化することの有用性を見出した。本研究では、この条件で製造した粉末微粒子 (SFD 微粒子)の吸入剤応用に向けた粉体物性評価を行った。【方法】50 nmのポリスチレンナノ粒子

(NP)に Tre と Leu を任意の組成 (Tre/Leu =90/10、75/25、50/50 (w/w))で加えた試料溶液から、SFD 微粒子を製造した。SFD 微粒子の吸入特性は、アンダーセン型カスケードインパクターを用いて評価した。SFD 微粒子の結晶性は粉末 X 線回折 (PXRD)および示差走査熱量測定 (DSC)により評価した。PXRD については、37°Cの条件で相対湿度を 15%から 95%に加湿した際の経時変化についても検討した。NP の粒子径は動的光散乱法により測定した。【結果・考察】吸入特性評価の結果で、Leu の賦形剤含量が 10%から 50%に増加するに伴って、肺治療域到達性の指標値が 25%から 61%、肺深部送達性の指標値が 11%から 37%にそれぞれ増大した。一方、SFD 微粒子に占める NP の割合 (w/w)が 10%から 50%に増加すると、肺深部送達性の指標値が 23%から 12%に減少する傾向が見られたが、肺治療域到達性の指標値については 45%から 42%の変化でほぼ同値であった。PXRD と DSC の結果から、SFD 微粒子は賦形剤の組成に依らず全て非晶質構造を有することが示された。加湿による PXRD パターンの変化から、Leu の賦形剤含量の増加に伴って、SFD 微粒子の結晶転移が抑制される傾向が認められた。加湿評価後の SFD 微粒子を用いて再分散した NP の粒子径が加湿評価前の値よりも顕著に大きかったことから、SFD微粒子の非晶質構造がナノ粒子の再分散性に重要であることが示唆された。

2-2. 文献情報(主として、粧工連HP「技術情報」より)(公表日2018/2/10~2018/3/17まで)

1) 雌性アルビノウイスターラットにおける酸化マグネシウムナノ粒子及びマイクロ粒子の急性経口毒性試験

Acute Oral Toxicity Study of Magnesium Oxide Nanoparticles and Microparticles in Female Albino Wistar Rats

Regul Toxicol Pharm 90巻 170-184頁 2017年 Bhanuramya Mangalampalli et al (Indian Institute of Chemical Technology)

「緒言・目的」

ナノテクノロジーの進歩により、診断及び治療を目的としたナノデバイスを含むナノ医療が発展した。生物医学用途におけるナノ粒子(NP)使用の成功の鍵は、それらの製剤性の良好さ、生物学的媒体内でのコロイド安定性、内部移行効率及び低毒性である。従って、毒物学的プロファイリングは、NP及びマイクロ粒子(MP)のメカニズムを理解するために必要である。

酸化マグネシウム(MgO)NPは、合成の容易さ、化学的安定性及び独特な性質のため、科学的関心を広く集めている。従って、MgO NPの応用が増加するにつれ、それらのヒトに対する毒性影響も関心がもたれるべきである。本研究では雌性ウイスターラットを用い、MgO NPの毒性をMPと比較評価することを目的としている。

「方法・結果」

MgO粒子を経口投与した後、遺伝毒性、組織的、生化学的、抗酸化及び生体内分布パラメータを用いて毒性を評価した。結果、高用量のMgO NPの単回投与によって、有意な(p <0.01)DNA損傷と生化学的変化が認められた。抗酸化アッセイで、両粒子とも高用量における顕著な酸化ストレスを示した。毒物動態学的分析では、尿及び糞便の他、肝臓及び腎臓組織において有意なMgの蓄積が示された。

「結論・考察」

結論として、安全な曝露レベル及び高レベルのNP曝露後の健康への影響を実証するために、さらなるメカニズム研究が必要であるとしている。

2) 皮膚薬剤送達法設計のためのシリカナノ粒子及びサブマイクロ粒子の内在化及び毒性プロファイルの in vitro 評価

In Vitro Evaluation of the Internalization and Toxicological Profile of Silica Nanoparticles and Submicroparticles for the Design of Dermal Drug Delivery Strategies

J Appl Toxicol. 37巻 12号 1396-1407頁 2017年 Sara Vicente et al (SANOFI Research & Development,)

「緒言・目的」

薬剤送達法において、コロイド状シリカナノ粒子及びサブマイクロ粒子 (SiP) を使用することは非常に興味深い。筆者らは、真皮への薬剤送達の潜在的担体としてこれらのナノ物質の適合性に着目した。すなわち今回の研究では粒子サイズの異なるSiP(20、70、200及び500nm)を用い、ヒトケラチノサイト(K17)及びヒト真皮線維芽細胞(HDF)におけるin vitro毒性学的プロファイル、細胞への取り込み及び細胞内局在性の機能性研究を行った。

「方法・結果」

SiPの特徴として、細胞傷害性及び細胞内在化の点で強い細胞型依存性を観察することができた。一方、粒子サイズについては、最も毒性の強いSiPである超小型SiP (20nm)のみが関連していた。70、200及び500nmのSiPについては取り込み及び細胞内輸送の違いにより、K17及びHDFの異なる毒物学的プロファイルが決定された。さらに、これらの特徴により、異なる薬剤送達戦略をさらに規定することができる。従って、K17においてSiPを内在化するための主としたメカニズムは食作用であり、HDFにおいてはカベオラ介在性エンドサイトーシスであると考えられた。

「結論・考察」

これらの情報により、SiPを用いてタンパク質又は遺伝物質のような繊細な治療分子を低い毒性プロファイルを維持しながら送達する上では線維芽細胞が最適な標的であることが確かめられ、一方、ケラチノサイトはSiPにより薬剤放出を促進することが示唆された、としている。

3) 形質転換及び非形質転換のヒト乳房細胞株における塩化アルミニウム、ブチルパラベン又はフタル酸ジブチルの共存下での銀ナノ粒子曝露後の遺伝毒性影響

Genotoxic Effects in Transformed and Non-transformed Human Breast Cell Lines after Exposure to Silver Nanoparticles in Combination with Aluminium Chloride, Butylparaben or Di-n-butylphthalate

Toxicology in Vitro, 45巻 181-193頁 2017年 J. Roszak et al (ポーランド、ノーファー産業医学研究所)

「緒言・目的」

本研究ではクエン酸により安定化した銀ナノ粒子 (AgNP、15及び45nm、それぞれAg15及びAg45)と、これら銀ナノ粒子に塩化アルミニウム、ブチルパラベン及びフタル酸ジブチルを組み合わせヒト乳房細胞株 (MCF-10A、MCF-7、MDB-MB-231)に曝露した後の遺伝毒性効果を調べた。

「方法・結果」

23.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でAg15に24時間曝露したMCF-10A細胞では、コメットアッセイにおいて、DNA損傷(一重鎖切断:SSB)の統計的有意な増加が観察された。塩化アルミニウム、ブチルパラベン、フタル酸ジブチルの存在下では、遺伝毒性はコントロールのレベルまで低下した。MCF-7細胞では、Ag15の16.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での曝露後にSSBレベルの有意な増加が観察された。この効果もまた、3種類の試験化学物質の存在下で減少した。MDA-MB-231細胞では、SSBの有意な増加は観察されなかったが、AgNPと塩化アルミニウムとの組合せ曝露の後に、酸化的DNA損傷(Fpg酵素とのインキュベーション)のレベルの上昇が観察された。単一または併用処理のいずれの細胞株においても小核形成の増加はみられなかった。

「結論・考察」

消費者製品中に存在するアルミニウム塩、ブチルパラベン、フタル酸ジブチルと組み合わせ使用した場合、AgNPの遺伝毒性リスクは低くなることを示す結果を得た、としている。

4) 毒性水準下濃度のナノZnO及びナノTiO₂が分化したPC12細胞における神経突起伸長を抑制する
Sub-toxic Concentrations of Nano-ZnO and Nano-TiO₂ Suppress Neurite Outgrowth in Differentiated PC12 Cells

J. of Toxicological Science、42巻 6号 723-729頁 2017年 Tomohiko Irie et al (国衛研)

「緒言・目的」

ナノ物質は体外から脳を含む臓器に移動することができる。例えば、ナノZnOとナノTiO₂は、齧歯類の嗅覚経路を介して脳に移行し、脳に有害な影響を及ぼす可能性を有する。ナノZnOおよびナノTiO₂による神経細胞の生存率または神経細胞の興奮性への影響が研究されているが、神経細胞の分化および発達にどのように影響するかについては研究がなされていない。本論文では、神経細胞分化の評価に有用なモデル系であるPC12細胞の神経突起伸長へのナノZnO及びナノTiO₂の効果を調べた。

「方法・結果」

ナノZnO (1.0 × 10⁻⁴ ~ 1.0 × 10⁻¹ $\mu\text{g}/\text{mL}$) の7日間の曝露によって、分化したPC12細胞の神経突起の数、長さ及び分枝は有意に抑制されたが、細胞生存率は影響を受けなかった。ナノTiO₂ (1.0 × 10⁻³ ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の7日間の曝露によっても、神経突起の数及び長さは有意に阻害されたが、細胞毒性作用は示さなかった。

「結論・考察」

本研究の結果により、毒性水準下濃度のナノZnO及びナノTiO₂が、分化したPC12細胞における神経突起伸長を抑制することが実証された。

5) DNA依存性プロテインキナーゼはヒトがん細胞における銀ナノ粒子の抗がん特性を調節する

DNA-dependent Protein Kinase Modulates the Anti-cancer Properties of Silver Nanoparticles in Human Cancer Cells

Mut Res Gen Tox En 824巻 32-41頁 2017年 Hui Kheng Lim et al (シンガポール国立大学)

「緒言・目的」

銀ナノ粒子(Ag-np)は真核細胞に対して毒性を示すことが報告されている。一方、Ag-npの潜在的に有害な影響は、実験的治療において有利であり、それらは現在、抗がん剤の治療効果を高めるために使用されている。この研究では、おそらく正常及びがん細胞におけるDNA損傷及び修復に対する生理学的応答として、選択された用量でのAg-np処置により、DNA-dependent protein kinase(DNA-PKcs)およびJNK経路の活性化が引き起こされることを実証している。

「方法・結果」

Ag-npは、テロメアに位置するシエルテリン複合体及びテロメア長を破壊することによってテロメア動態を変化させた。Ag-npにより全体的なDNA損傷の指標である γ -H2AXフォーカス形成が誘導されたため、Ag-npの遺伝毒性効果はテロメアに限定されず、全ゲノムに及んでいた。DNA-PKcs活性の阻害により、Ag-npの細胞毒性に対するがん細胞の感受性が増大し、ヒトがん細胞のテロメアにおけるAg-npの傷害効果が実証された。DNA-PKcs阻害されたがん細胞をAg-np処理すると、JNK媒介性DNA修復の停止と広範なテロメアの損傷が生じ、結果としてより多くの細胞死がもたらされた。

「結論・考察」

この研究は、がん細胞におけるAg-np治療の抗増殖活性及び細胞毒性効果がDNA-PKcsの阻害によって達成され得ることを示唆している。

6) ヒト肝臓組織における酸化チタンナノ粒子の毒性の2段階モデル

A Two-step Model of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in Human Liver Tissue

Toxicology and Applied Pharmacology、334巻 47-54頁 2017年 T. Laomettachit et al (タイ、キングモンクット工科大学トンプリー校)

「緒言・目的」

生理学的薬物動態(PBPK)モデルと細胞応答モデルを含む2段階アプローチにより、ヒト肝臓に対する酸化チタンナノ粒子の毒性を調べた。

「方法・結果」

PBPKモデルは曝露後の人体に残っているナノ粒子の生体分布を予測し、特に肝臓組織での蓄積に注目している。細胞応答モデルはナノ粒子の細胞取り込みと細胞分裂による希釈の相互作用を通じたダイナミクスを考慮することにより、酸化チタンナノ粒子の蓄積の結果としての肝細胞死を予測する。結果は、低用量ナノ粒子からの組織損傷は再生細胞分裂のため無視できることを示唆するが、より高い用量では元の組織容積を回復するためにはより多くの細胞が細胞周期に関与する必要がある。

「結論・考察」

二つのモデルを組み合わせることにより、酸化チタンナノ粒子曝露後の肝細胞生存率及び細胞死を説明することが可能になる。

7) 薬剤学を基盤とした、ナノマテリアルの安全性評価研究

薬剤学、77巻 6号 287-291頁 2017年 長野 一也 他 (大阪大学)

「概要」

ナノ物質は幅広い分野で汎用されているものの、サイズの微小化により、有用性のみならず、生体に負の影響を及ぼすことが懸念されている。そのため、ナノ物質の安全性を評価したうえで、安全性を確保するための技術基盤の開発が世界的に求められている。

本稿では、1)ナノ物質の動態解析に基づく安全性評価と物性制御による安全性確保の例と、2)ナノ物質の存在量と存在様式の同時解析を可能とする技術基盤の開発について紹介している。

1)ナノ物質の動態解析に基づく安全性評価と物性制御による安全性確保

粒子径が70nmの非晶質ナノシリカ(nSP70)及び、粒子径300、1,000nmのサブミクロンサイズのシリカを用い、妊娠マウスに過剰量曝露させた際の各組織への移行性を電子顕微鏡観察によって評価した。その結果、いずれの粒子もその大部分が肝臓で検出されたものの、nSP70のみが胎盤のみならず、血液胎盤関門を突破し、胎仔の肝臓や脳へ移行することが示された。

ハザード同定を目的として、nSP70が胎盤・胎仔へ及ぼす影響を病理学的解析によって評価した。その結果、nSP70の胎盤に対する傷害性が観察された。また、死亡胎仔が増加し、それに伴って子宮重量が低下することを見出した。さらに、対照群と比較して、仔の重量が10%以上低下しており、胎仔発育不全を引き起こす可能性が示唆された。

安全なナノ物質を創製するための基盤情報を収集するため、ナノ物質の表面を修飾した際の動態と生体影響を評価した。その結果、nSP70の表面をアミノ基やカルボキシル基といった官能基で修飾すると、胎仔の死亡や発育不全が有意に抑制された。本知見は、表面修飾がナノ物質の安全性確保における優れたアプローチであることを示唆している。

2)ナノ物質の存在量と存在様式の同時解析を可能とする技術基盤の開発

ナノ物質の曝露実態・動態解析手法としては、透過型電子顕微鏡や誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)などが汎用されるものの、前者は定量解析、後者は存在様式の評価ができない欠点を有している。筆者らは、生体内でのナノ物質の存在量と存在様式の双方の解析が可能な手法として、1粒子ICP-MS法に着目して研究を進めている。

8) マウスにおける酸化亜鉛ナノ粒子によって誘導される肺疾患病理 —24時間及び28日間の追跡研究

Pulmonary Pathobiology Induced by Zinc Oxide Nanoparticles in Mice – A 24-Hour and 28-Day Follow-up Study

Toxicology and Applied Pharmacology、327巻 13-22頁 2017年 Hsiao-Chi Chuang et al (台湾、台北医学大学)

「緒言・目的」

吸入された酸化亜鉛ナノ粒子(ZnONP)は肺の肺胞領域で高い沈着速度を有している。しかし呼吸器系におけるZnONPの健康への悪影響は不明である。ここでは、ZnONPを気管内投与したマウスの呼吸器系の病理学的反応を、分子アプローチ及び画像(SPECTとCT)アプローチを組み合わせることで調査した。また、正常BEAS-2B細胞と腺がんA549細胞を用いてマウスでの結果を確認した。

「方法・結果」

まず雌のBALB/cマウスに20nm ZnONPを一連の用量で投与し、リン酸緩衝生理食塩水を対照とし、24時間及び28日間の追跡観察により比較した。電界放出型走査型電子顕微鏡とエネルギー分散型X線マイクロ分析法によりZnONPの特性を調べた。24時間後、投与されたZnONPは気管支肺胞洗浄液(BALF)中の乳酸デヒドロゲナーゼと肺組織中の8-ヒドロキシ2'-デオキシグアノシン、カスパーゼ3、p63腫瘍マーカーの有意な増加を引き起こした($p < 0.05$)。SPECTの分析によれば、気道炎症は上気道から下気道に用量依存的に存在していた。28日後、肺組織においてZnONPの曝露によりp63は有意に増加した($p < 0.05$)。CT観察により、肺の炎症性浸潤は主に二次気管支分岐の左右垂区域に発生していることが明らかとなった。BEAS-2B細胞ではZnONP処理により有意なp63の増加とTTF1レベルの低下が観察された($p < 0.05$)が、A549細胞では観察されなかった。

「結論・考察」

今回の結果により、局所の肺炎はZnONP曝露により引き起こされたことが示された。また、in vivoとin vitroでp63がZnONPの曝露により一貫して過剰発現することが示された。p63応答とZnONPに対する病理的応答についての知見は、肺毒性と修復の研究にとって重要である、としている。

9) 厚い皮膚の角層を越える金ナノ粒子の浸透

Penetration of gold nanoparticles across the stratum corneum layer of thick-Skin.

J Dermatol Sci. 89巻 2号 146-154頁 2018年2018 Feb;89(2):146-154 Raju G et al (インド、アムリータ・ビッシュワ・ビドゥヤピータム大学)

「緒言・目的」

経皮的に、手や足の裏など厚い皮膚に対する粒子の浸透は小径線維ニューロパチーのような疾患に対する薬物輸送としてとりわけ重要である。ナノ粒子による経皮の薬物輸送は多くの用途があるが、厚い皮膚に対しては浸透が明確ではない。この研究では角層を透過する金ナノ粒子の有効性に対する粒子サイズの影響について調査している。

「方法・結果」

ラットの後ろ足が金ナノ粒子の深さと分布を特徴付けられるのに用いられた。金ナノ粒子は主に 22 ± 3 , 105 ± 11 , 186 ± 20 nmの種々のサイズが用いられた。動物実験では、後ろ足皮膚が金ナノ粒子溶液に曝露されたラットから、血液中に金ナノ粒子が4日目に検出された。組織学的調査では、角層下の表皮に金ナノ粒子が認められたが組織反応は認められなかった。

「結論・考察」

厚い皮膚は、金ナノ粒子の浸透を許し循環系への金ナノ粒子の放出の貯蔵場所として働く、としている。

3. その他の動向

3-1. 海外ニュース

1) 【2018/02/07】 ECHA Weekly – 7 February 2018

https://echa.europa.eu/view-article/-/journal_content/title/echa-weekly-7-february-2018

ECHAは、ECHA Weekly(2月7日号)を発行した。内容は、

- ・[REACH2018]REACH2018委員会の動画を視聴可能
 - ・[REACH2018]以下の3つの実用的な事例についてEUの23言語で利用可能
 - (1)物質がポリマーかどうか判別する方法と関連する登録手順
 - (2)無機一成分物質を登録するための情報収集方法
 - (3)多成分又はUVCB物質を登録するための情報収集方法
 - ・[REACH]perfluorocarboxylic acids, their salts and related substancesの制限提案に対するコメントの募集
 - ・[REACH]ナノ物質に必要とされるREACH情報要件の改訂
 - ・[REACH]EUにおける化粧品に使用されるナノ物質のカタログの発行
 - ・[REACH]ELINCS番号を参照してList番号を更新
 - ・[CLP]2月1日に開催されたECHAワークショップのプレゼンテーション及びディスカッションの公開
 - ・[CLP]調和化された分類・表示の1つの新たな意図と5つの新たな提案
 - ・[PIC]PIC規則の下で輸出通知の対象となる化学物質と輸出が禁止されている物質のリストを改訂
- [みずほ総研ケミマガより]

2) 【2018/02/28】 ECHA Weekly – 28 February 2018

https://echa.europa.eu/view-article/-/journal_content/title/echa-weekly-28-february-20-1

ECHAは、ECHA Weekly(2月28日号)を発行した。内容は、

- ・[ECHA] ナノマテリアルについての研究話題に関する提案募集
- ・[ECHA] NGOとECHAのリスク評価と動物保護に関する議論
- ・[REACH2018] 物質情報交換フォーラム(SIEF)におけるコミュニケーション
- ・[REACH2018] 3月に2つのREACHウェビナーを開催
- ・[REACH2018] ECHAは2月23日までに6,875物質について16,175登録文書を受領
- ・[REACH2018] 先導登録者リストの更新
- ・[REACH] 物質評価に関する実践的な指針(登録者向けガイド)を公表
- ・[REACH] 三酸化クロムとトリクロロエチレンの使用許可
- ・[CLP] 2018年3月1日から一部の物質について調和化された分類及び表示を更新
- ・[CLP] 2020年以降の製品には新たな固有の成分識別子(UFI)を表示
- ・[サプライチェーン] 供給者が登録していない事前登録物質を使用しているか

[みずほ総研ケミマガより]

3) 【2018/03/13】 NIOSH Releases New Nanotechnology Workplace Design Recommendations

<https://www.cdc.gov/niosh/updates/upd-03-12-18.html>

米国疾病対策センター(CDC)の国立労働安全衛生研究所(NIOSH)は、職場においてナノマテリアルのばく露を防ぐためのナノマテリアルの取り扱い方法に関するガイドラインを公表した。

[みずほ総研ケミマガより]

4) 【2018/03/02】 Preliminary opinion open for comments on Styrene/Acrylates copolymer (nano) and Sodium styrene/Acrylates copolymer (nano) – deadline for comments: 11 May 2018

https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sc_cs_o_218.pdf

欧州委員会SCCSは、スチレン/アクリレートコポリマー(ナノ)およびナトリウムスチレン/アクリレートコポリマー(ナノ)の化粧品原料としての安全性について、コメントを募集している。コメントの提出期限は4月30日。

[みずほ総研ケミマガより]

5) 【2018/03/20】 Preliminary opinion open for comments on Colloidal Silver (nano) – deadline for comments: 15 May 2018

https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sc_cs_o_219.pdf

欧州委員会SCCSは、コロイドシルバー(ナノ)の化粧品原料としての安全性について、コメントを募集している。コメントの提出期限は5月15日。

[みずほ総研ケミマガより]

6) 【2018/03/23】 Publications in the Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials

・サイト

<http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm>

・No.85

[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)4&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)4&doclanguage=en)

OECDは、工業用ナノマテリアルに関するドキュメントNo.85を公表した。

WGコメント: ドキュメントNo.85のタイトルは以下のとおりであった。

EVALUATION OF IN VITRO METHODS FOR HUMAN HAZARD ASSESSMENT APPLIED IN THE OECD TESTING PROGRAMME FOR THE SAFETY OF MANUFACTURED NANOMATERIALS

3-2.国内ニュース

1) 【2018/03/08】 ナノテクノロジー・材料分野の研究開発戦略検討作業部会(第5回)の開催について

http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu2/093/kaisai/1402221.htm

3月16日に標記会合が開催される。議題は、

- 1.ナノテクノロジー・材料分野に関するヒアリング
- 2.研究開発戦略の方向性について
- 3.その他

[NITEケミマガより]

4. 今後の動向

1) 第43回日本香粧品学会

開催日:2018年6月29～30日(東京)

会頭:石河 晃(東邦大学)

ナノマテリアル関連として、以下の演題が報告される予定である。

P03 フラーレン誘導体の遺伝毒性及び細胞毒性の評価

○橋本亜紀子、高村岳樹(神奈川工科大・工・応用化学)

http://www.jcss.jp/event/43/43_prg.pdf

2) 第45回日本毒性学会学術年会

開催日:2018年7月18～20日(大阪)

年会長:務台 衛(田辺製薬株式会社)

一般演題の募集は3月16日に終了しているが、演題タイトルについてはまだ公開されていない。シンポジウム等については、下記の演題が予定されているため、本大会に向けて情報収集が必要と思われる。

・年会長招待講演

ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与(TIPIS)試験法の開発 津田 洋幸(名古屋市立大学)

・シンポジウム

実用化に呼応したナノマテリアルの有害性評価の進捗

<http://jsot2018.jp/index.html>