

率や吸湿性の向上等のさまざまな有用機能が付与できるため、現在では、直径7 nm程度のサブナノサイズのものまで開発されつつある。一方で、先述したNanoToxに対する懸念の高まりを受けて、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）の安全性に問題はないと報告されている⁷⁾。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。

本観点から、筆者らは厚生労働省や内閣府食品安全委員会のご支援のもと、ナノマテリアルの経皮・経口吸収性ならびに安全なナノマテリアルの創出を目指したナノ安全科学研究に先駆けて着手している。本総説では、先行して実施しているナノシリカの経皮曝露後の体内吸収性、体内・細胞内動態の検討に焦点を絞り、ナノマテリアルの安全性評価研究における体内動態評価の重要性と有用性を紹介する。

本稿で紹介する非晶質ナノシリカのナノ安全科学研究では、試薬グレードの表面未修飾ナノシリカを用い、まず、経皮吸収性・体内動態・細胞内動態と粒径との連関を検討した。一次粒径が70 nm (nSP 70) のナノシリカ、300 nm (nSP 300)、1,000 nm (mSP 1000) の従来型非晶質シリカを経皮吸収性試験に用いた（現在は、30、50 nmのナノシリカ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、報告させていただく）。透過型電子顕微鏡（TEM）観察の結果、いずれの粒子も非常に滑らかな形状をした球形の粒子で

あり、一次粒径もカタログ値とほぼ同等であった。また、動的光散乱法を用いて平均二次粒径を測定した場合でも、カタログ値とほぼ同等の測定値が得られたことから、これらの粒子はきわめて分散性の高い粒子であることが明らかとなった。

続いて、nSP 70、nSP 300、mSP 1000をマウス耳介に塗布した際の経皮吸収性を評価した。各非晶質シリカを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、nSP 70が角質層を通過して表皮や真皮層にまで到達するとともに、脳アストロサイト、脳血管内皮細胞内にまで移行することが明らかとなった。なお、従来のサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカであるnSP 300やmSP 1000は、表皮層にすら到達しないことを確認している。以上の結果は、ナノシリカが最も強固なバリア機能を有する皮膚を通過し、全身に分布する可能性を示唆するものである。皮膚が外来異物の侵入を阻止するための強固なバリア機能を有するのに対し、腸管には栄養成分等を効率よく吸収するための異物取り込み機構が備わっていることから、経口投与においてもナノシリカが体内に吸収され、全身循環する可能性は十分に考えられる。

筆者らは現在、従来型のサブミクロンサイズ以上のシリカは、仮に経口曝露後、体内に吸収されても、門脈から肝臓、しかも胆嚢あるいはクッパー細胞に移行し、異物処理あるいは胆汁排泄され、その結果、高度に安全性が担保されること、一方でナノシリカの場合、体内吸収され、肝実質細胞や脾臓等、全身臓器に分布し得ることを見いだしており、移行量の定量化、蓄積性等を詳細に検討しているところである。いずれにしても、ナノマテリアルの経口曝露後動態およびこの経路で曝露した際のハザードは、まったく理解されていないと言っても過言ではなく、今後のリスク解析

研究の必要性すらわかっていない。Nano-Safety Science 研究はスタートしたばかりであり、近日中に、ヒト健康影響研究の必要性の有無や是非などが、次第に明らかになるものと考えている。

IV ナノシリカの体内/細胞内動態評価

前項の検討から、粒径の違いによって体内吸収性が変化することが明らかになった。さらに筆者らは、体内吸収性試験を通じて粒子が微小化することにつれて細胞レベル・オルガネラレベルでの動態が変化する可能性をも見いだしており、その一例を紹介する。

各非晶質シリカを尾静脈内より投与したマウスを用いて、ナノシリカの体内動態を評価した。その結果、nSP 300 と mSP 1000 は胆嚢に局在する一方で、nSP 70 は肝臓全体へ速やかに分布することが明らかとなった。また、nSP 300 と mSP 1000 は、肝実質細胞にはほとんど移行せず、ほとんどがクッパー細胞内に移行するのに対して、nSP 70 は肝実質細胞へ移行し、最終的に核内にまで到達することを見いだした⁸⁾。さらに、培養細胞株を用いて、ナノシリカの細胞内動態を解析したところ、nSP 300 や mSP 1000 は細胞内に移行するとともに、特に mSP 1000 は細菌感染時と同様のリソソーム小胞の過形成を誘導することが判明した。それに対して、nSP 70 は細胞内に移行するばかりか核膜を透過して核内に移行し、さらに核小体へ集積することが明らかとなった⁸⁾。

以上の結果は、体内に吸収され全身循環した場合においても、直径 100 nm 以下のナノシリカがサブミクロンサイズの従来素材とは異なる動態特性を発揮し、さらに細胞内動態特性も全く異なることを示している。本事実、ナノシリカがサブミクロンサイズの非晶質シリカとは異なる細胞応答や生体影響を誘発する可能性を意味するもので

ある。すなわち、ナノマテリアルの安全性を確保するに当たっては、体内吸収性、体内動態、細胞内動態（オルガネラへの到達性）を精査し、それらの情報を基盤とした安全性評価が必須であることを先駆けて実証するものである。

一方で本検討は、試薬グレードのナノシリカを過剰量投与した検討であるため、今後は、食品や化粧品に実際に使用されているナノシリカの体内吸収性や体内/細胞内動態、生体影響についても評価する必要があると考えられる。さらに、同一素材であっても粒径等の物性によって体内動態が大きく異なるという事実は、物質名のみで規制されている現在の化審法が、ナノマテリアルの規制には適していないことを示すといえる。なお、ナノマテリアルの動態や生体影響の発現には分散性等のサンプルの状態が大きく影響するため、イントララボ・インターラボ間でのバリデーション解析が重要となる。その点を筆者らは、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所にご協力いただき移行量の定量を含む動態解析のバリデーション解析を実施し、筆者らの成果の妥当性を科学的に確認している。

V 表面修飾ナノシリカの体内/細胞内動態および生体影響の評価

近年、分散性の向上や生体親和性を付与する目的で、種々の表面修飾を施したナノマテリアルの使用も開始されている。そこで、ナノシリカの体内/細胞内動態に与える表面特性の影響を明らかにする目的で、nSP 70 の表面をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾した nSP 70-N あるいは nSP 70-C を用いて細胞内動態を解析した。培養細胞株を用いた *in vitro* での細胞内動態解析の結果、表面修飾の有無や種類にかかわらず、いずれのナノシリカも細胞内に取り込まれることが明ら

かになった。また、nSP 70のみが細胞質に移行後、核膜を透過して核内にまで移行するのに対し、nSP 70-Nの多くが細胞膜表面に局在すること、nSP 70-Cは、細胞質内のみで局在することを認めている⁹⁾。本結果は、表面修飾の有無や修飾基の種類によって細胞内動態が大きく変化することを示しており、体内吸収性や体内動態も変化する可能性が考えられることから、現在、鋭意検討を進めている。

次に、表面修飾が細胞に与える影響を評価するため、細胞増殖能や細胞内活性酸素種（ROS）の産生能を評価した。その結果、過剰量のnSP 70作用によって認められた細胞増殖阻害やROS産生が、nSP 70-NおよびnSP 70-Cではまったく認められなかった⁹⁾。さらに、表面修飾が生体影響発現に与える影響を評価するため、マウスに静脈内投与後の急性毒性試験を実施した。その結果、通常の曝露ではありえない過剰量のnSP 70をマウスに静脈内投与した場合、コントロール群と比較して有意な肝障害マーカーの上昇、血小板数の減少、さらには血液凝固障害が引き起こされることが明らかとなった。一方で、nSP 70-NおよびnSP 70-Cを投与したマウスでは、過剰量のnSP 70の静脈内投与で初めて観察されるこれらの生体影響が全く誘導されないことを明らかとしている。以上の結果から、表面修飾によってナノシリカの細胞内動態や細胞応答・生体影響が大きく変化することが示唆された。

以上の結果で最も重要なことは、ナノシリカの表面性状を適切に制御することで、ナノシリカによって誘導される負の生体影響を回避できる点である。今後、表面物性の制御によって負の生体影響を減弱できるメカニズムを明らかにすることで、ほかのナノマテリアルにも適用可能な、安全なナノマテリアルの創出とその実用化支援に資する有用な情報を得られるものと考えている。すな

わち、安全なナノシリカの開発は、圧倒的な知財を産み出し、世界を大きくリード、貢献できること、ヒトや生体/生態系への安全性確保のみならず、ナノマテリアルの恩恵をヒトと社会が享受できることを意味しており、今後のNano-Safety Science研究の進捗が期待されるゆえんである。

VI 最近の動向

食品ナノマテリアルの利用の歴史は浅いものの、近年急速に研究開発が進んでいること、またNanoToxを発揮し得るという懸念から、その安全性について世界的に議論され始めている。例えば、FAO/WHOの専門家会議では、食品ナノマテリアルが社会に多大な利益をもたらす可能性があるとしたうえで、その応用については明確かつ国際的な定義の設定やリスク管理を助ける分類法の開発が必要であることを提言している。また、米国では2006年にナノテクノロジー調査特別委員会をFDA内に発足させており、ナノマテリアル含有食品の監視・管理のための技術や知見の強化と規制政策に対する課題を提起している。いずれの機関においても、ナノマテリアルが食品分野に大きな利益をもたらすという前提を持ちつつも、現状ではリスク評価のための技術や情報が不足しており、それらの技術開発や情報収集が重要であることを共通して述べている。

わが国においても、内閣府食品安全委員会が中心となって、安全性評価研究への取組みが開始されている。わが国におけるナノマテリアル含有食品の安全性評価の取り組むべき方向性として、わが国で利用されているナノマテリアル含有食品の分類を行うこと、既存の評価方法が適用可能かどうかを確認することが提示されている。そのうえで、ナノサイズに制御することによって生じる体内/細胞内動態や生体影響の変化を確認することが当面の課題として挙げられている¹⁰⁾。

これらの取組みは、ナノマテリアルに特化した具体的な検討ではなく、既存の化学物質関連規制の枠組みのなかでの安全性情報の収集が主要な目的である。一方で、多様な物性を有し、革新的な機能を発揮するナノマテリアル特有の影響に対して、既存の方法のみでは対応できない可能性から、ナノマテリアルに特化した新たな安全性評価法の開発も必要不可欠となっている。しかし、現状においては、安全性評価をする必要があるか否かを判断するための第一段階として、筆者らが実施しているような食品ナノマテリアルの体内吸収性や体内／細胞内動態に関する基礎情報の収集が急務である。その点を明らかにしたうえで、生体影響に関する情報と総合し、リスク管理が必要か否かを冷静に判断される必要がある。さらに、このような安全性評価研究に加え、安全なナノマテリアルの創製に有用な物性と動態・生体影響との関連情報の収集を含めた Nano-Safety Science 研究を推進することこそが、ナノマテリアルを活用した豊かな社会の構築、食品産業の発展と国民の健康確保を両立するための近道となるものと、筆者らは考えている。

Ⅶ おわりに

本稿では、試薬グレードの非晶質シリカを用いた検討ではあるものの、粒径が変化することによって体内／細胞内動態が変わり、その結果、ナノマテリアルと従来素材では、リスクも異なってくる可能性を明らかにした。一方で、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明らかとし、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。実用化されているナノマテリアルの多くに種々の表面修飾等が施されているという事実を踏まえて考えると、当然、それぞれの素材・物性のマテリアルに対する安全性評価が必要であるものの、実用化されている多くのナノマテリアルが安全に使用で

きるものと考えている。今後は、食品ナノマテリアルの含有量や摂取量、体内吸収量や蓄積性等の曝露実態を解明するとともに、経口投与によってさまざまなナノマテリアルの安全性情報を収集することが重要である。

また冒頭でも述べたように、タンパク質と同等のサイズであるサブナノマテリアルの開発・利用が進んでいることから、サブナノマテリアルについても体内／細胞内動態や生体影響を解析し、安全性情報を収集する必要がある。現在、筆者らも解析を進めているところである。そして、安全性情報を収集したうえで、安全性の高いものは実用化を推進し、安全性の低いものは表面性状制御をはじめとした適切な方策を講じて安全性を高めていくことで、人の健康の確保と同時に、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ものと考えている。わが国は、ナノマテリアル加工技術が世界で最も進歩しており、安全なものを先駆けて産み出す力を持っている。すなわち、有効でしかも安全という、圧倒的優位性をもったナノマテリアル・サブナノマテリアルを産み出すことが知財立国・技術立国としてのわが国の進むべき道であると考えられる。

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いただいたが、今後、このような Nano-Safety Science 研究を積み重ねることで、人の健康環境を確保しつつ、食品産業の発展にも寄与できるものと期待している。

謝 辞

本研究のうち、経皮・吸入曝露後動態およびハザード研究に関しては厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業(平成19および20年度)、経口曝露後動態に関しては内閣府食品安全委員会食品健康影響評価技術研究にサポートいただきました。ここに深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Borm P., Klaessig F. C., Landry T. D., Moudgil B., Pauluhn J., Thomas K., Trottier R., Wood S.: Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V : role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles, *Toxicol. Sci.*, **90**, 23-32 (2006)
- 2) Nel A., Xia T., Madler L., Li N.: Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science.*, **311**, 622-627 (2006)
- 3) Xia T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J. I., Wiesner M. R., Nel A. E.: Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm, *Nano Lett.*, **6**, 1794-1807 (2006)
- 4) Evonik : Evonik, Documents on Aerosil (2009)
- 5) IRGC : A report for IRGC risk governance of nanotechnology applications in food and cosmetics (2008)
- 6) Merget R., Bauer T., Kupper H. U., Philippou S., Bauer H. D., Breitstadt R., Bruening T.: Health hazards due to the inhalation of amorphous silica, *Arch. Toxicol.*, **75**, 625-634 (2002)
- 7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals : Synthetic amorphous silica, JACC Report., No.51 (2006)
- 8) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., *et al* : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application, *Biomaterials.*, **32**, 2713-2724 (2011)
- 9) Nabeshi H., Yoshikawa T., Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., *et al* : Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages, *Nanoscale Research Letters.*, **6** (93), (2011) in press.
- 10) 内閣府食品安全委員会 : 食品分野におけるナノテクノロジー利用の安全性評価情報に関する基礎的調査報告書. 平成 21 年度食品安全確保総合調査 (2010)

ナノ安全科学研究の最前線

Higashisaka Kazuma¹, Tsutsumi Yasuo^{1,2}
 東阪 和馬¹・堤 康央^{1,2}



NM (nanomaterial), ナノ安全科学研究(nano-safety science), 非晶質ナノシリカ(silica nanoparticles), 生殖発生毒性(fetotoxicity), 安全性評価マーカー (biomarker)

近年、医薬品や化粧品、食品といったヒトが直接曝露される領域で、非晶質ナノシリカなど、従来素材と比較して有用性が向上した、あるいは新たな機能を獲得したナノマテリアル(NM)の利用が急速に進んでいる¹⁾。一次元が100nm以下の素材であるNMは、従来までのサブミクロンサイズ以上(数百nm以上)の素材と比較して、粒子径の減少に伴う化学反応性や熱伝導性の向上といったさまざまな有用機能を発揮することから、いまや人類の生活や産業の発展に必須となっている。

一方で、NMがもつ革新的機能が、有用性のみならず、逆に生体に負の影響(ナノ毒性, NanoTox)を及ぼしてしまうことが懸念されはじめている。たとえば、カーボンナノチューブがアスベストと同様に悪性中皮腫や肺がんなどを誘発してしまう可能性などが指摘されている。しかし、NMが環境や人体へ及ぼすハザードについてすら十分に解明されておらず、ましてや時間的・量的な曝露実態(体内動態)に関してはほとんど情報がないのが現状であり、リスク解析や評価にはほど遠い。一方でNMは、われわれの生活の質や産業を飛躍的に向上しうするため、科学的根拠に基づいたNMの安全性情報を幅広く収集し、これら情報を基盤としてNMを有効かつ安全に使用していくこと、および安全なナノマテリアルの開発を支援していくことが必要不可欠である。

この観点から筆者らは、有効かつ安全なNMの開発と実用化支援に資する基礎情報の収集を目指して、物性(粒子サイズ、

表面修飾、形状など)・動態・生体影響(一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性など)の三者連関と、曝露実態を加味した安全性評価研究によるNMの安全科学研究(Nano-Safety Science, 図1参照)を推進している^{2~11)}。ここでは、非晶質ナノシリカの生殖発生毒性評価⁸⁾、ならびに、NM曝露に対する安全性評価マーカーの探索⁹⁾について紹介したい。

シリカの生殖発生毒性評価

二酸化ケイ素のナノ粒子であるナノシリカは、製造されているNMのなかでも人体に直接適用する製品において使用量が最も多い素材であり、ヒトへの曝露機会が高いNMの一つである。筆者らはこれまで、①経皮・経口・経鼻曝露により生体バリアを通過し、組織内、さらには全身血流内に移行すること、②全身投与することで急性毒性や重篤な肝障害などを引き起こすこと、などさまざまな知見を見いだしてきた^{2,4,6~11)}。しかし、前述のようにNMの安全性情報はいまだ十分ではなく、とくに特殊毒性に関する情報はほぼ皆無といっても過言ではない。なかでも、過去のダイオキシンやサリドマイドの例のように、生殖発生毒性は親から子へ、子から孫へと数世代にわたって毒性が継承されてしまう危険性を秘めており、過去の被害の惨劇を繰り返さないためにも次世代影響を見据えた安全性評価が必要不可欠となっている。

そこで筆者らは、ナノシリカが生殖発生に与える影響評価を目的に、ナノシリカの物性と、妊娠マウスにおける体内動態・胎身に及ぼす影響の連関解析を実施した(図2)⁸⁾。本検討では、粒子径70nmのナノシリカ(nSP70)と、粒子径300, 1000nmの従来型シリカ(それぞれnSP300, mSP1000)を用いた(すべて実験用グレード)。各シリカを妊娠マウスに尾静脈内投与し体内動態を評価した結果、nSP70のみが胎盤に集積するとともに、胎盤関門を通過し胎身にまで移行することを見いだした。また、ナノシリカを妊娠マウスに過剰量を静脈内投与してハザード同定を試みたところ、nSP70投与群では、胎仔吸収率の増加とともに、胎仔体重がコントロール群よりも10%以上減少するなど、胎仔発育不全を誘発していることが明らかとなった。一方、nSP300, mSP1000投与群ではコントロール群と変化は認められなかった。以上の結果から、ハザード解析で

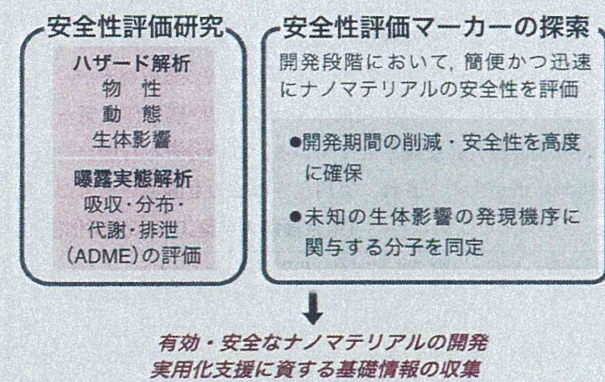


図1 ナノ安全科学研究の目的

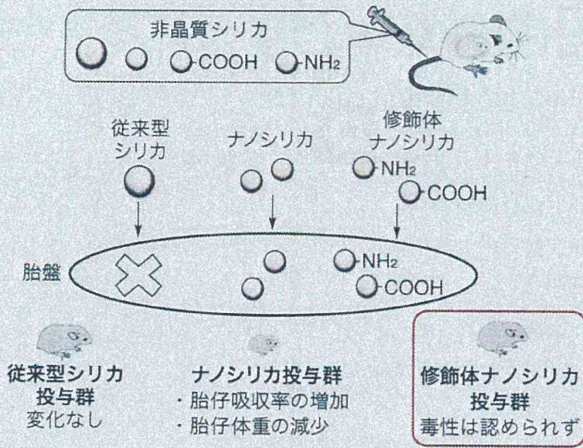


図2 ナノシリカの生殖発生毒性の評価

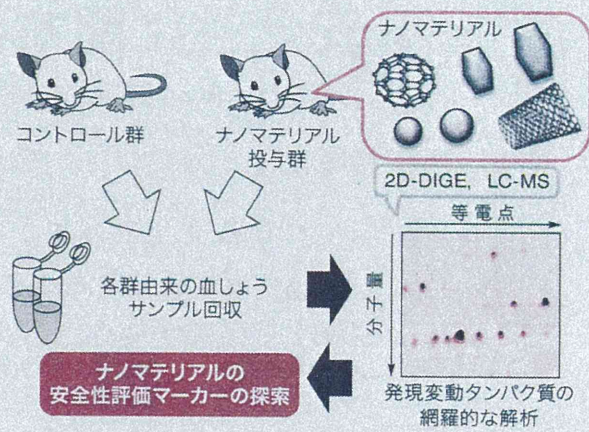


図3 安全性評価マーカーの探索

はあるものの、nSP70は胎仔吸収や胎仔発育不全を誘発する可能性が示された。

次に表面修飾がNMの安全性に及ぼす影響を評価した⁸⁾。ここでは、nSP70の表面がカルボキシ基、アミノ基で修飾されたnSP70-C、nSP70-Nを用いた。その結果、nSP70-C、nSP70-N投与群では、nSP70で認められた胎仔吸収や胎仔発育不全が一切認められず、きわめて安全性に優れていることが判明した。筆者らはすでに、nSP70により誘発される免疫毒性や急性毒性が、表面修飾により軽減可能であることも明らかにしており、今後、いかにして安全なNMを創製するかといったNano-Safety Scienceに関する情報をより多く収集することが、今後のNMの安全性研究で最も重要な課題の一つであると考えている。

NMの安全性評価マーカー探索

NMの安全な使用のためには、その安全性を事前に予測・診断できる評価系の構築が必要不可欠である。筆者らは、開発段階において簡便かつ迅速にNMの安全性を評価しうる安全性評価マーカーの開発を試みてきた⁹⁾。安全性評価マーカーは、NMの開発期間の削減に加え、その安全性を高度に確保すること、さらには、NM曝露による未知の生体影響の発現機序に関与する分子を同定することにつながり、安全性情報の集積や、安全なNMの開発・使用に貢献すると期待される。

そこで、ナノシリカ曝露後の血中での発現変動タンパク質

を、トキシコプロテオミクスを駆使して網羅的に評価したところ、ハプトグロビンやSAAをはじめとする急性期タンパク質が、ナノシリカ曝露により誘発される負の生体影響を予測する優れた安全性評価マーカーになりうる可能性を見いだした⁹⁾。今後、トキシコプロテオミクスにより見いだした候補タンパク質と、NM曝露により誘発されるさまざまな生体影響との関連を解析することで、より有用な安全性評価マーカーの開発とともに、生体影響発現メカニズムに関するさらなる情報収集に寄与できるものと確信している。

試薬グレードのシリカを用いた検討ではあるものの、粒子径の減少により体内動態が変化すること、生殖発生毒性が高まることを明らかにした。この結果は、物質名のみで規制されている現在の化審法が、NMの規制には適していないことを示唆するものである。一方で、表面修飾を最適化することで、高度に安全性を確保しうることを明らかとし、有効かつ安全なNMを開発できる(すべてのNMが危ないわけではなく、安全なものをつくれるという)ことも実証した。今後、生体影響を減弱できるメカニズムを明らかにすることで、ほかのNMにも適用可能な、安全なNMの創製とその実用化支援に資する有用な情報が得られると考えている。

¹⁾ 大阪大学大学院薬学研究科・

²⁾ 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター)

1) D. P. Cormode, P. A. Jarzyna, W. J. M. Mulder, Z. A. Fayad, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 329 (2010). 2) T. Morishige, Y. Yoshioka, H. Inakura, A. Tanabe, X. Yao, S. Narimatsu, Y. Monobe, T. Imazawa, S.-I. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Y. Mukai, N. Okada, S. Nakagawa, *Biomaterials*, **31**, 6833 (2010). 3) T. Morishige, Y. Yoshioka, A. Tanabe, X. Yao, S.-I. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Y. Mukai, N. Okada, S. Nakagawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **392**, 160 (2010). 4) H. Nabeshi et al., *Pharmazie*, **65**, 199 (2010). 5) K. Yamashita et al., *Inflammation*, **33**, 276 (2010). 6) H. Nabeshi et al., *Biomaterials*, **32**, 2713 (2011). 7) H. Nabeshi et al., *Part. Fibre. Toxicol.*, **8**, 1 (2011). 8) K. Yamashita et al., *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 321 (2011). 9) K. Higashisaka et al., *Biomaterials*, **32**, 3 (2011). 10) H. Nabeshi et al., *Nanoscale Res. Lett.*, **6**, 93 (2011). 11) T. Yoshida et al., *ibid.*, **6**, 195 (2011).

化粧品分野におけるナノマテリアルの 安全性に関する国内外の報告

Safety of nanomaterials in the field of perfumery and cosmetics

森下 裕貴¹, 吉岡 靖雄^{1,2,3}, 鍋師 裕美¹, 吉川 友章¹, 堤 康央^{1,2,3}

1: 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

2: 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

3: 独立行政法人医薬基盤研究所

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6 大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 堤 康央

Tel: 06-6879-8230, Fax: 06-6879-8234, E-mail: ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp

1 はじめに

近年、目覚ましい進歩を遂げているナノテクノロジーを活用し、少なくとも一次元の大きさが 100 nm 以下になるように製造された素材、いわゆるナノマテリアルの開発が盛んに行われている。ナノマテリアルは、組織浸透性、電気的・磁氣的・光学的特性等の点において、これまでの技術では成し得なかった機能向上や付加価値の可能性を提供する素材であり、既に我々が日常的に使用する様々な製品に利用されている。化粧品分野においても、ナノサイズに制御することによって発揮される高い吸湿性、紫外線遮蔽作用を利用して、ナノシリカやナノ酸化チタン等のナノマテリアルがファンデーションや日焼け止め化粧品に適用されている。また、高い抗酸化作用を利用し、フラベンが美白剤へ応用される等、ナノマテリアルを利用した新たな製品の開発は今後ますます進むと考えられる。しかし最近になって、ナノマテリアルの中には、人体にとって好ましくない影響を発揮してしまうものが存在することが指摘され始めており、ナノマテリアルの安全性評価を望む声が高まりつつある。こうした現状において、ナノマテリアルの製品応用の規制に向けた取り組みが世界的に始まっている。しかし、ナノマテリアルは従来までのバルクサイズの素材とは異なる生体影響を及ぼし得るため、化学物質の構成元素のみ

を考慮した、従来の化学物質審査規制法（化審法）による規制では、適切な基準によるナノマテリアルの安全性対策を推進できないことが問題となっている。科学的根拠のない不用意な安全性対策は消費者の不安を煽り、ナノマテリアル産業の発展阻害を招き、最終的に消費者がナノマテリアルによって得られる便益を十分に享受できなくなる恐れがある。すなわち、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性情報の収集が喫緊の課題となっている。このような背景から、経済協力開発機構(OECD)や国際標準化機構(ISO)といった国際機関は、本邦を含めた主要各国と連携してナノマテリアルの安全性情報の収集や安全性試験等を進めている。また、各国政府それぞれがナノマテリアルに特化した規制法の確立を目指し、ナノマテリアルの安全性情報を収集している状況である。本総説では、上記のような現状において、安全かつ有用なナノマテリアルの開発に資する基礎情報の収集を目指し、我々が推進している、物性・動態・生体影響の三者連関と、曝露実態を加味したナノ安全科学研究(Nano-Safety Science 研究)(図1)の最新の成果を中心に紹介し、最後に最も重要な安全なナノの開発およびその支援に資する情報に触れたい¹⁻¹⁰⁾。

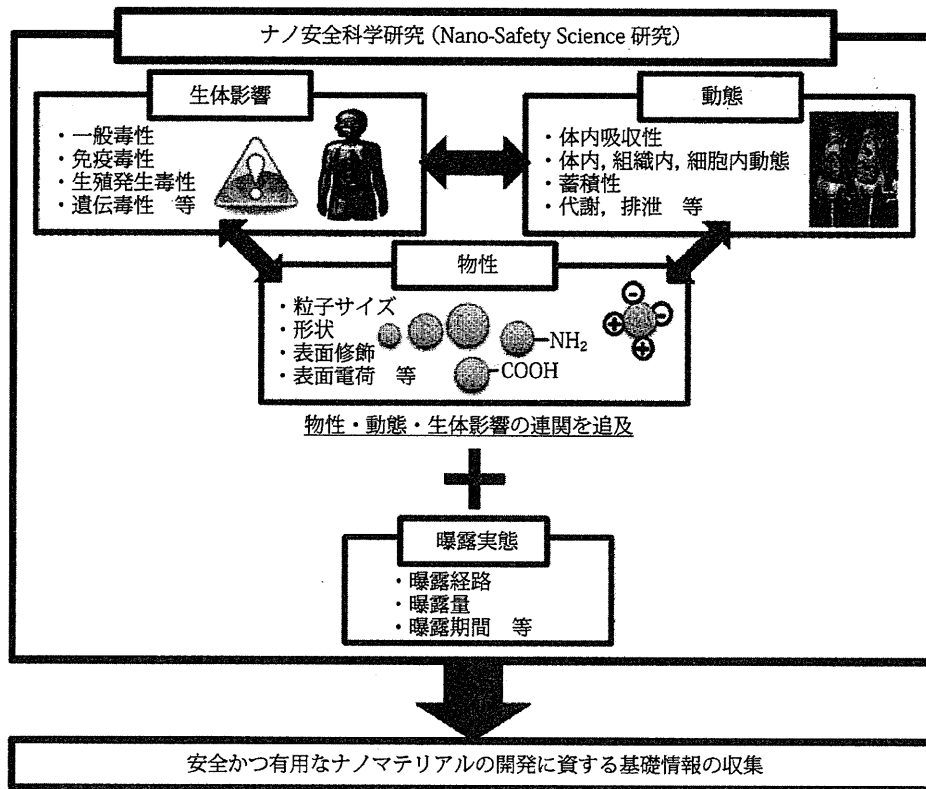


図1 ナノ安全科学研究の概略

2 ナノマテリアルの経皮吸収性

我々は、化粧品分野において化粧品基材として既に実用化されている、非晶質ナノシリカを中心に、安全なナノマテリアルの創出を目指したナノ安全科学研究を推進している。まず、実験用グレードのナノ粒子を用いた、非晶質ナノシリカの経皮吸収性評価に関して紹介したい。

本検討では、一次粒径が70 nm (nSP70) の非晶質ナノシリカ、300 nm (nSP300)、1000 nm (mSP1000) の従来型非晶質シリカを用いた。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察の結果、いずれの粒子も非常に滑らかな形状をした球形の粒子であり、一次粒径もカタログ値とほぼ同等であった。また、動的光散乱法を用いて平均二次粒径を測定した場合でも、カタログ値とほぼ同等の測定値が得られたことから、これらの粒子は極めて分散性の

高い粒子であると考えられる。次に、nSP70、nSP300、mSP1000 の経皮吸収性を検討するため、各粒子をマウス耳介に28日間連続で経皮塗布し、投与局所や各種臓器の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にまで到達すること、肝臓や脳内にまで移行することが明らかとなった。また、nSP300やmSP1000は、表皮にすら到達しないことが明らかとなった⁵⁾。このことは、ナノマテリアルを化粧品に用いることにより、皮膚表面だけでなく、表皮や真皮にまで、化粧品の美白効果や老化防止効果を発揮できるという、ナノマテリアルの有用性を示すものである。一方で、ナノマテリアルが体内に移行し得るということは、ナノマテリアルの体内での生体影響・安全性を精査する必要性を示している。こちらに関しては、次項で、ナノマテリアルの体内吸収後のハザード情報に関する我々の知見を紹介したい。なお、上記の非晶質ナノシリカの経皮吸収

性の結果はあくまでも定性的な評価によるものであり、今後、体内吸収量の定量的な解析が必須である。また、ヒトへの外挿性の観点から、よりヒトに近い皮膚をもつブタを用いた検討や、ヒトの皮膚を用いた *in vitro* での検討等が必要であると考えられる。

非晶質ナノシリカ以外のナノマテリアルの経皮塗布後の体内吸収性に関しては、例えば化粧品中の紫外線遮蔽剤として利用されているナノ酸化チタンは、マウスを用いた検討のみならず、ブタを用いた検討が実施されているが¹¹⁾、経皮適用後に体内吸収されないとする報告が多数である。この原因の一つとして、我々が検討に用いた非晶質ナノシリカは分散性が非常に高いが、一般に、酸化チタンは凝集性が極めて高いことが知られており、上記の報告は凝集した素材の体内吸収性を評価しているという可能性が考えられる。このことは、化粧品等、経皮適用される製品にナノマテリアルを応用する際には、ナノマテリアルの凝集状態に関わる表面性状や溶媒等を適切に調整することにより、サンスクリーン、美白剤、


アンチエイジング剤等の目的により、皮膚表面、表皮、真皮等の各ターゲット部位を狙ってナノマテリアルを送達し、効能を生じさせるという、有用性と安全性を具備した製品が開発可能であることを示していると考えられる。

3 ナノマテリアルのハザード情報とその回避策

我々は前項で紹介したような非晶質ナノシリカの体内吸収性の結果を受け、曝露局所である皮膚細胞を対象としたハザード情報、及び体内移行後のハザード情報を *in vivo* 及び *in vitro* の様々な試験により収集している。本項ではその一部を紹介したい(図2)。


まず、皮膚細胞を用いた *in vitro* でのハザード情報に関して紹介する。ヒト皮膚角化細胞を用いて、nSP70, nSP300, mSP1000 の細胞内動態を調べたところ、nSP300, mSP1000 がエンドソーム内に局在するのに対し、nSP70の一部は細胞質内もしくは核内にまで局

In vitro



細胞に添加

In vivo



マウスに尾静脈内投与






| 粒子 | ROS 産生 DNA 傷害 | 肝障害 | 胎仔吸収率の増加 胎仔体重の減少 | 急性毒性 |
|--|------------------|-----|---------------------|------|
|  mSP1000 | - | - | - | - |
|  nSP300 | - | - | - | - |
|  nSP70 | + | + | + | + |
|  -COOH nSP70-C | - | - | - | - |
|  -NH ₂ nSP70-N | - | - | - | - |

図2 非晶質ナノシリカのハザード評価

在することが明らかとなった⁵⁾。また、nSP70が細胞質内に侵入すると、活性酸素種（ROS）が産生され、それに起因すると考えられるDNA障害が生じ得ることを明らかとしている⁶⁾。

また、nSP70の体内移行後のハザード情報を、静脈内に過剰量のnSP70を投与することにより収集した。その結果、nSP70が血中移行後、肝臓から胎盤・胎仔に至るまで、全身臓器に分布し得ることが明らかとなった。また、分布した組織において、①肝障害が誘発されること、②胎盤傷害に起因すると考えられる、胎仔吸収率の増加や、胎仔体重の減少等が誘発されること、等が明らかとなった⁷⁾。上記の検討はあくまでも過剰量の静脈内投与によるハザード評価であるため、今後、実際の曝露量を加味した検討や経皮塗布による検討が必須ではあるが、以上の結果から、ナノサイズの非晶質シリカは従来のバルクサイズの非晶質シリカとは異なる体内動態を示すと共に、種々のハザードが増大する可能性が示された。

次に、こうして得られたハザード情報を指標に、安全なナノマテリアルに関する情報の収集に向けて、ナノマテリアルの表面修飾がその安全性に及ぼす影響を評価した。nSP70の表面がカルボキシル基、アミノ基で修飾されたnSP70-C、nSP70-Nのハザード情報を収集した。その結果、nSP70で認められたヒト皮膚角化細胞のROS産生、マウスの肝障害や胎仔吸収率の増加、胎仔体重の減少等が一切認められず、ハザードが減弱することを見出した⁷⁾。我々は既に、nSP70の表面修飾により、その細胞内動態が変わること⁹⁾、nSP70により誘発される免疫毒性や急性毒性等のハザードをも軽減可能であることを明らかとしており、表面修飾がナノマテリアルの安全性確保における優れたアプローチであることを認めている。

以上、ナノマテリアルは従来までのバルクサイズの素材とは異なる体内動態・生体影響を示し、新たなハザード/リスクが生じ得ること、そうした体内動態や生体影響はナノマテリアルの表面修飾等の物性を制御することにより調整可能であることを明らかとした。ナノマテリアルの中にも安全性が高いものとそうでないものがあることはよく知られているが、今後、安全なナノマ

テリアルを創製するための方法論といったNano-Safety Scienceに関する情報をより多く収集することが、ナノマテリアルの安全性研究の最重要課題の一つであると考えている。なお、現状において実用化されているナノマテリアルには各種の修飾が施されていると考えられるが、上記の知見から、実用化されているナノマテリアルの多くは安全性が高いと考察している。

このように、試薬グレードの多様なナノマテリアルを用いた検討により、有効かつ安全なナノマテリアルに関する基礎情報が収集できつつある。一方で、より詳細にナノマテリアルの安全性を評価するためには、実サンプルを用いた安全性評価が必須であることは言うまでもなく、我々は、企業からサンプルの提供を受け、それらの安全性を鋭意評価しているところである。本稿では紙面の都合上、我々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、ナノマテリアルを応用した、安心・安全な化粧品製品等の開発支援に尽くしていきたいと考えており、我々は安全性研究に加え、その有効活用研究にも積極的に取り組んでいる。

4 おわりに

本総説では、実験用グレードの非晶質シリカを用いた検討を中心として、ナノマテリアルが発揮する、従来までのバルクサイズの素材とは異なる体内動態や生体影響に関する情報の一部を紹介した。また、安全性の高いナノマテリアル開発に資する基盤情報として、ナノマテリアルの表面修飾を最適化することで、ナノマテリアルのハザードが減弱し、安全かつ有用なナノマテリアルを開発できることを示した。この安全なナノを開発できるという事実は、最も重要な知見であり、類を見ない、安全かつ有用なナノを我が国が開発し、他を圧倒する知財を確保できることを示しており、今後の進むべき道しるべと言えよう。なお、今回は深く取り上げなかったが、動物愛護の観点から、ナノマテリアルの安全性評価においても、化粧品分野でも多用されるヒト細胞株活性化試験（h-CLAT）等、動物実験に替わる代替法の確立、利用が重要となってくると考えられる。我々は、今後、

Nano-Safety Science 研究を更に推し進め、ナノマテリアルの物性と生体影響との連関を追及すると共に、表面修飾の制御によってハザードを減弱できるメカニズムを明らかとすることで、安全なナノマテリアルの創製に資する有用な情報を得られるものと考えている。そうして得られた知見が広く公表され、産業応用されることが、有用かつ安全なナノマテリアル製品の開発、引いてはナノマテリアル産業界の更なる発展に繋がると期待している。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業等の支援を受けて実施されたものです。この場をお借りして深謝申し上げます。

参考文献

- 1) Morishige, T. et al. *Biomaterials*, 31 (26) : 6833-42 (2010)
- 2) Morishige, T. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392 (2) : 160-5 (2010)
- 3) Nabeshi, H. et al. *Pharmazie*, 65 (3) : 199-201 (2010)
- 4) Yamashita, K. et al. *Inflammation*, 33 (4) : 276-80 (2010)
- 5) Nabeshi, H. et al. *Biomaterials*, 32 (11) : 2713-24 (2011)
- 6) Nabeshi, H. et al. *Part. Fibre. Toxicol.*, 8:1 (2011)
- 7) Yamashita, K. et al. *Nat. Nanotechnol.*, 6 (5) : 321-8 (2011)
- 8) Higashisaka, K. et al. *Biomaterials*, 32 (1) : 3-9 (2011)
- 9) Nabeshi H. et al. *Nanoscale Research Letters*, 6 (1) : 93 (2011)
- 10) Yoshida T. et al. *Nanoscale Research Letters*, 6 (1) : 195 (2011)
- 11) Sadrieh, N. et al. *Toxicol. Sci.*, 115 (1) : 156-66 (2010)

Quantifying the biodistribution of nanoparticles

To the Editor — Yamashita *et al.* (*Nature Nanotech.* **6**, 321–328; 2011) report that silica and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles with diameters of 70 nm and 35 nm, respectively, can cross the placental barrier in pregnant mice. Using transmission electron microscopy (TEM), the researchers claim that nanoparticles are found in the liver and brain of the fetus¹. Although TEM is useful for the qualitative examination of nanoparticles, it is not sensitive enough for studying the trans-placental transport of TiO₂ nanoparticles.

Assuming that the concentration of TiO₂ nanoparticles in the fetal liver is one nanogram per gram of liver (the density of liver is approximately 1.1 g cm⁻³) and that the mass of a 35 nm TiO₂ particle

is approximately 1×10^{-16} g (the density of rutile-TiO₂ is 4.3 g cm⁻³), on average, only one nanoparticle can theoretically be found in a 1 mm² section of liver tissue (an ultrathin section usually has a thickness of less than 100 nm). The TEM images collected by Yamashita *et al.* showed a dark electron-dense spot in a field size of $\sim 5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. Based on our estimation, on average, tens of thousands of such images need to be examined to find one TiO₂ nanoparticle. This means that the TEM results cannot firmly prove that nanoparticles were present in the fetal liver and brain, unless the concentration of nanoparticles in the fetal liver is several orders of magnitude higher than the hypothetical value of one nanogram per gram.

In conclusion, more suitable quantitative methods should be used to study the biodistribution of nanoparticles in pregnant mice. □

Xiao He¹, Zhiyong Zhang^{1*}, Jinsen Liu², Yuhui Ma¹, Peng Zhang¹, Yuanyuan Li¹, Zhenqiang Wu², Yuliang Zhao^{1*} and Zhifang Chai¹

¹CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, and Key Laboratory of Nuclear Analytical Techniques, Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China.

²School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641 China.

*e-mail: zhangzhy@ihep.ac.cn; zhaoyuliang@ihep.ac.cn

To the Editor — In general, transmission electron microscopy (TEM) and quantitative methods such as inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) are used to study the biodistribution of nanomaterials. For example, ICP-MS can detect the elements of nanomaterials and evaluate their biodistribution quantitatively. However, ICP-MS cannot distinguish between elements that are inherent to the nanomaterials and those that are cleaved or released from them. But, unlike ICP-MS, TEM can detect the presence of nanomaterials and identify their location within tissues and cells. Even though the TEM images in our study¹ provide only qualitative information, TEM is invaluable

for identifying the biodistribution of the silica and TiO₂ nanoparticles.

He *et al.*² correctly point out the detection limit of TEM and that only some silica and TiO₂ nanoparticles could be detected in the small section of the placental and fetal tissue in our study. However, through analysis of several hundreds of TEM sections, we confirmed that silica and TiO₂ nanoparticles did accumulate in both the placental and fetal tissues. The observations were not coincidental.

To study the biodistribution of nanomaterials quantitatively, methods such as ICP-MS should be used and, indeed quantitative biodistribution studies of silica and TiO₂ nanoparticles in the

mouse placenta and fetus are currently under way in our laboratory. □

References

1. K. Yamashita, *et al.* *Nature Nanotech.* **6**, 321–328 (2011).
2. He *et al.* *Nature Nanotech.* **6**, 755 (2011).

Yasuo Tsutsumi* and Yasuo Yoshioka on behalf of all the authors of ref. 1

Department of Toxicology and Safety Science, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan. The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

*e-mail: ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp

ナノマテリアルの細胞内移行性と ROS 産生/DNA 損傷との関連解析

吉田徳幸,^a 吉川友章,^{*a} 鍋師裕美,^a 堤 康央^{a,b,c}Relation Analysis between Intracellular Distribution of Nanomaterials,
ROS Generation and DNA DamageTokuyuki Yoshida,^a Tomoaki Yoshikawa,^{*a} Hiromi Nabeshi,^a and Yasuo Tsutsumi^{a,b,c}

^aLaboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ^bThe Center for Advanced Medical Engineering and Informatics (MEI Center); 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; and ^cLaboratory of Biopharmaceutical Research (LBR), National Institute of Biomedical Innovation (NiBio); 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan.

(Received August 31, 2011)

With recent development of nanotechnology, nanomaterials (NMs) have been developed with innovative function and expected to cause a paradigm shift in various industry such as cosmetics, medicine and food. NMs begin to establish firm position in Japan as base of various industrials, in fact, a part of them have been already applied to various products. On the other hand, it is suggested that these innovative properties may induce unknown biological responses. It is concerned about the effect of these innovative properties to human health. Based on these situations, to evaluate risk of NMs, it is started to collect information about safety of NMs (Nano Safety Science). With this in mind, we analyzed the relationship between particle size and the *in vitro* effect of amorphous nanosilica (nSP) using human keratinocyte cells (HaCaT). Our results indicate that exposure to nSP of 70 nm diameter (nSP70) induced an elevated level of reactive oxygen species (ROS), leading to DNA damage. On the other hand, a markedly reduced response was observed using submicron-sized silica particles. Next, we investigate relationship between endocytosis, generation of ROS and DNA damage using endocytosis inhibitor, cytochalasin D (CytoD). As result, CytoD-treatment reduced nSP70-mediated ROS generation and DNA damage. This suggested that endocytosis is involved in nSP70-mediated cellular effects. Thus, particle size affects amorphous silica-induced ROS generation and DNA damage in HaCaT cells. We believe that clarification of the endocytosis pathway of nSP will provide useful information for hazard identification as well as the design of safer forms of nSP.

Key words—nanomaterial; Nano Safety Science; amorphous nanosilica; ROS generation; DNA damage

1. はじめに

近年のナノテクノロジーの発展に伴い、少なくとも1次元の大きさが100 nm以下の素材、いわゆるナノマテリアルの開発が進んでいる。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、サイズの微小化により組織浸透・拡散能などの革新的な機能を有するこ

とが明らかとなっており、化粧品、医薬品、食品分野などの種々産業にパラダイムシフトを起こす新素材になるものと期待されている。ナノマテリアルは既に、知財立国を目指すわが国において各種産業を支える基盤としての確固たる地位を築き始めており、事実、その一部が配合された製品が既に実用化・上市されている。その一方で、このようなナノマテリアル特有の物性に起因する革新的機能が逆に、ヒトの健康環境に負の影響、いわゆるナノ毒性(NanoTox)を及ぼす可能性が懸念され始めている。^{1,2)}例えば、カーボンナノチューブが、マウスモデルにおいてアスベストと同様に悪性中皮腫発症の危険性を有すること、^{3,4)}ナノ酸化チタンを経鼻曝露したマウス脳内で酸化ストレス応答が誘発されるこ

^a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)、^b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2-2)、^c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: tomoaki@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第131年会シンポジウムGS03で発表したものを中心に記述したものである。

となど、⁵⁾ 各種ナノマテリアルのハザード情報が続々と報告されている。こうした中、ナノマテリアルの安全性評価に向けて、経済協力開発機構 (OECD) や国際標準化機構 (ISO) などの国際機関が中心となって、ナノマテリアルのリスク評価に必要な安全性に関する基礎情報の収集、いわゆるナノ安全科学研究 (Nano Safety Science 研究) が世界規模で推進されている。わが国においても、経済産業省や厚生労働省、環境省によってナノマテリアルの安全性情報の収集とその手法の開発が進められており、粒径 100 nm 以下のナノマテリアルが従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる体内吸収性や体内動態を示すことが、少しずつ判明してきている。筆者らの検討結果においても、直径が 100 nm 以下の非晶質ナノシリカが、①皮膚角質バリアを通過して体内に吸収され得る可能性、⁶⁾ ②妊娠マウスを用いた静脈内投与のモデルにおいて、胎盤を介して胎児の肝臓や脳に移行する可能性を見出ししている。⁷⁾ また、体内に移行し組織に分布したナノマテリアルは、最終的に組織細胞に取り込まれる可能性が考えられる。事実、筆者らのグループでは *in vitro* のモデルを用いた検討において、直径がサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカと 100 nm 以下の非晶質ナノシリカの細胞内局在を比較したところ、異なる局在を示すことを明らかとしている。^{6,8)} しかし、ナノマテリアルの細胞内局在を考慮した細胞応答の評価など、安全性評価に向けた情報は世界的にもいまだ不足している。

ナノマテリアルは、化粧品材料や食品添加物を始めとして、既に様々な分野でわれわれヒトに直接適用される製品に使用されている。この事実、年齢や疾患の有無を問わず、あらゆるヒトが一生に渡ってナノマテリアル含有製品を使用・摂取し得ることを示唆しており、たとえわずかな量であっても、長期に渡って曝露することによって健康に問題が生じる可能性が危惧される。したがって、ナノマテリアルの使用が増加しつつある今こそ、ナノマテリアルの安全確保、安全なナノマテリアルの開発を目指したナノ安全科学研究を推進せねばならない。しかしながら現状は、いまだ断片的なハザード情報が散在するのみで、安全性評価指針の策定や安全なナノマテリアルの設計指針につながる情報の抽出には至っておらず、ナノマテリアルの細胞毒性など現象論

のみが先行しており、詳細なメカニズムに関する検討は圧倒的に不足しているのが現状である。したがって、ヒトの健康を確保しつつナノマテリアルの恩恵を最大限に享受した豊かな社会の実現するためには、ナノマテリアルと従来までのサブミクロンサイズ以上の素材との体内/細胞内動態や生体/細胞への影響を比較検討し、相違点及びメカニズムを科学的根拠に基づいて明らかにすることが急務である。そして、それらの情報を基盤として、より具体的なナノマテリアルの安全性評価法を確立することが最重要課題である。以上の観点から筆者らは、種々のナノマテリアルの中でも、生産量・使用量・用途の点で、最もわれわれの生活に浸透している非晶質ナノシリカをモデルナノマテリアルとして、素材の物性 (サイズ、表面電荷、親/疎水バランス、形状など) が体内/細胞内動態や生体/細胞応答に与える影響の解析を進めている。^{6,12)} これらナノマテリアルの物性-動態-安全性の連関情報を集積し、それらの因果関係を精査することによって、最終的にナノマテリアルの動態情報から安全性を評価する方法の確立、及び安全なナノマテリアルの開発と実用化の支援の実現につながるものと考えている。本稿では、非晶質ナノシリカが多くのか化粧品に既に使用されているという現状を踏まえて、皮膚細胞への影響を中心に検討を進め、特に、様々なサイズの非晶質シリカについて、細胞内局在や細胞への影響を解析した結果を紹介する。

2. 非晶質ナノシリカによる DNA 損傷と ROS 産生の連関解析

非晶質ナノシリカは、数あるナノマテリアルの中でも極めて使用量が多く、国内生産量は約 20000 トン、世界での年間生産量は 1 メガトン以上であり、その市場規模は 3 億 1400 万ドルにも及ぶ。¹³⁾ 非晶質ナノシリカは、非常に幅広い産業分野で実用化されており、例えば、日焼け止めやファンデーションなどの化粧品基剤材、歯磨き粉や歯の充填剤、食品の固結防止剤に使用されている。¹³⁾ 一方で安全性に関しては、2006 年の欧州化学物質生態毒性・毒性センターの報告によると、従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカに問題はないとされているが、ナノシリカについての情報はほとんど皆無に等しい。つまり、ナノメートルサイズの非晶質シリカは適用範囲・生産量・ヒトの曝露機会が圧倒的に高い

素材であるにもかかわらず、安全性が未知のまま使用されており、数あるナノマテリアルの中で最も安全性評価が急がれている素材である。筆者らはこれまでの検討において、分散性の高い直径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) が皮膚バリアを通過し肝臓にまで移行する可能性を示している。⁶⁾ また、*in vitro* のモデルを用いた検討においても、直径がサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカは細胞質内へののみ局在が認められたのに対し、100 nm 以下の非晶質ナノシリカは細胞質のみならず、核内にまで移行していることが明らかとしている。^{6,8)} 以上の結果より、非晶質シリカは、粒子径の違いによってその細胞内局在が大きく変動することが明らかとなった。したがって、化粧品素材として既に使用され始めている非晶質ナノシリカをモデル粒子として用い、皮膚細胞を対象とした直径 100 nm 以下のナノシリカの細胞内における詳細な局在情報/細胞応答の連関情報を集積することは、ナノ安全科学研究において極めて重要であると言える。特に、nSP70 が核内にまで移行するという特徴的な細胞内動態を示すことを加味すると、核機能や遺伝子に着目した安全性評価を行うことが必要であることが強く示された。

そこで本検討では、非晶質ナノシリカの細胞内における局在情報/細胞応答について、ヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT 細胞) を用いて主に核機能や遺伝子に着目した検討を実施した。まず、コメットアッセイにより非晶質シリカの HaCaT 細胞における DNA 損傷性を評価した。nSP70, nSP300, mSP1000 を 30, 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、3 時間後に Tail length の値を指標に評価したところ、nSP300 と mSP1000 を添加した群では DNA 損傷は全く検出されなかった。一方、nSP70 添加群においては、陽性コントロールとして使用した過酸化水素添加群に匹敵するほどの DNA 損傷性の増大が認められた。この結果から、100 nm 以下のサイズの nSP70 のみが、HaCaT 細胞に対して DNA 損傷を引き起こすことが示された。そこで次に、非晶質ナノシリカによる安全性確保を目指して、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) 産生の観点から HaCaT 細胞の DNA 損傷の発現メカニズムの解明を試みた。まず、HaCaT 細胞を用いて非晶質シリカ処理による ROS 産生の有無を検証した。nSP70, nSP300,

mSP1000 を HaCaT 細胞に添加して 3 時間後の細胞内における ROS 量を DCFH-DA の蛍光量を指標に測定した。その結果、すべてのサイズの非晶質シリカを添加した群において ROS の産生が認められたが、特に nSP70 添加群において最も顕著な ROS 産生が認められた。コメットアッセイで用いたシリカと同じ濃度で、ROS 産生が起こっていることが確認されたことを踏まえると、直径が 100 nm 以下になると ROS 依存的な DNA 損傷作用を発揮する可能性が示唆された。そこで、nSP70 による ROS 産生と DNA 損傷発現メカニズムとの関連について精査するために、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) 存在下における nSP70 の DNA 損傷作用を評価した。NAC を前処理した HaCaT 細胞に対して、30 分後に nSP70 を添加し、コメットアッセイを行った。粒子添加 3 時間後に ROS 産生量を定量したところ、NAC を前処理した群では、PBS 添加群と同等の値にまで Tail Length の値の減少が認められた。抗酸化剤共存下で nSP70 依存的 DNA 損傷作用の抑制が認められたことから、nSP70 による DNA 損傷が ROS を介して生ずることが裏付けられた。すなわち、この事実を言い換えると、nSP70 の ROS 産生や細胞内局在を制御することで、安全なナノマテリアルの創製が実現するものと考えられた。

3. 非晶質ナノシリカの細胞内移行性と DNA 損傷/ROS 産生の連関解析

近年、細胞の ROS 産生経路の 1 つとして NADPH oxidase に注目が集まっている。¹⁴⁾ NADPH oxidase は異物が細胞内に取り込まれる際にエンドソーム膜にリクルートされ、ROS 産生を通じて異物の除去に寄与することが知られている。例えば、アスベストや結晶性シリカなどの微粒子状の異物が炎症を引き起こす際に、粒子が細胞に侵入することにより発現する NADPH oxidase の関与が報告され、これらの報告では NADPH oxidase から産生された ROS が NALP3 を活性化することが明らかとされている。¹⁵⁻¹⁷⁾ これらの知見から、nSP70 の細胞内移行後の ROS 産生や DNA 損傷に、NADPH oxidase が関与している可能性が考えられた。そこでまず、NADPH oxidase は、粒子が細胞に取り込まれる際にそのエンドソーム膜にリクルートされ、ROS 産生を通じて異物の除去に寄与することをふまえ、

nSP70 の ROS 産生/DNA 損傷発現メカニズムに対して細胞内移行が関与しているかについて精査した。アクチン重合を阻害して細胞の食能を阻害するサイトカラシン D (CytoD) を用いて、非晶質ナノシリカによる DNA 損傷性及び ROS 産生に対する細胞内移行の関与を検証した。あらかじめ播種しておいた HaCaT 細胞に CytoD を処置し、その後 CytoD 共存下で nSP70 を添加した。SP70 を添加した 3 時間後、ROS 産生は DCFH-DA の蛍光量を指標に測定し、DNA 損傷性はコメットアッセイを用いて解析した。その結果、CytoD を前処置することで、nSP70 による ROS 産生は PBS 添加群と同等の値にまで抑制され、さらに DNA 損傷性についても同様の傾向が認められた。以上の事実から、nSP70 による ROS 産生や DNA 損傷には、細胞内移行が必須であり、細胞内に移行した後の反応をより詳細に解析する必要性が示された。そこで次に、NADPH oxidase 阻害剤である Apocynin を用いて、NADPH oxidase と nSP70 による ROS 産生や DNA 損傷発現メカニズムとの関連を精査した。あらかじめ播種しておいた HaCaT 細胞に Apocynin を処置し、その後 Apocynin 共存下で nSP70 を添加した。nSP70 を添加した 3 時間後、ROS 産生は DCFH-DA の蛍光量を指標に測定し、DNA 損傷性はコメット

アッセイを用いて解析した。その結果、Apocynin を前処置した HaCaT 細胞においては、nSP70 に起因した ROS 産生の減弱が認められた。一方で、nSP70 による DNA 損傷性には有意な変化は認められなかった。以上の事実から、nSP70 による DNA 損傷の発現には NADPH oxidase の関与も一部あるとは考えられるものの、別の機構が強く関与していることが示された。これらの点を踏まえて、現在筆者らは DNA 損傷発現メカニズムに関して、以下の 3 つの観点から解析を進めている (Fig. 1)。1 つ目として、nSP70 によって産生された ROS がシグナル応答を誘導し、最終的に DNA 損傷を引き起こす経路である。ROS はこれまで、Akt/P13K や MAPK シグナルなど複数のシグナル応答に関与していることが報告されており、nSP70 の細胞内移行経路とそれぞれの応答を精査する必要がある。2 つ目は、nSP70 が細胞内に移行した後にミトコンドリアなどの細胞内小器官に移行し損傷を与えることにより、細胞内に ROS が産生され、その結果 DNA 損傷が引き起こされる経路である。特にミトコンドリアは ATP 産生の際に ROS を産生し、自身で産生した ROS が起因となりミトコンドリア自身の DNA 損傷が誘導されていることが知られている。¹⁸⁾ この点からも、nSP70 の細胞内局在と細胞内

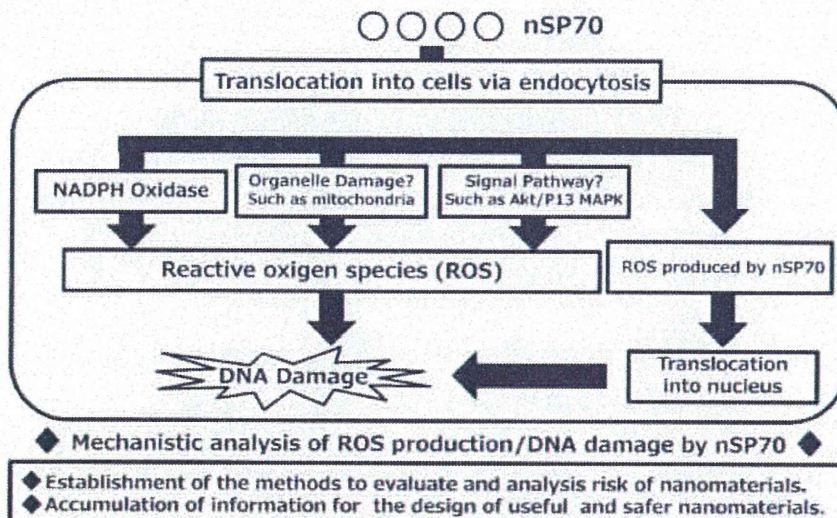


Fig. 1. Hypothesis of nSP70-mediated ROS Production Mechanism

Our results indicate that exposure to nSP70 induced an elevated level of ROS, leading to DNA damage. A markedly reduced response was observed using sub-micron-sized silica particles of 300 and 1000 nm diameter. In addition, cytochalasin D-treatment reduced nSP70-mediated ROS generation and DNA damage, suggesting that endocytosis is involved in nSP70-mediated cellular effects. Thus, particle size and internalization route, and physicochemical properties affect nSP70-induced ROS generation and DNA damage of HaCaT cells. We believe clarification of the endocytosis pathway of nSP will provide useful information for hazard assessment as well as the design of safer forms of nSPs.

小器官に与える影響を解析する必要がある。3つ目は、nSP70自身がROS産生能を有しており、nSP70が核内に移行することによりDNA損傷が引き起こされる経路である。ナノ酸化チタンなどは粒子自身がROSを産生し、抗菌作用やDNA損傷を発揮することが知られており¹⁹、筆者らも予備的な結果ではあるが、nSP70自身がROSを産生する可能性を見い出している。この点からも、nSP70の細胞内局在と細胞内小器官に与える影響を解析する必要がある。今後、それぞれ、細胞内移行経路、細胞内局在、核内移行経路といった細胞内局在の詳細な解析を通じて、DNA損傷発現/ROS産生メカニズムを明らかにする予定である。

4. おわりに

本研究では、最もわれわれの生活に浸透している非晶質ナノシリカの細胞内移行とDNA損傷発現/ROS産生について連関解析を行った。その結果、nSP70によるDNA損傷の誘導やROS産生には、細胞内移行が必須であり、また、nSP70によるDNA損傷発現には、NADPH oxidase以外の別の機構が関与していることが示された。これらの結果は、非晶質ナノシリカの安全性評価を行う際には、第一に従来型シリカとは別個の素材として捉え独自の安全性評価を行う必要があることを裏付けている。また、今回はDNA損傷発現/ROS産生メカニズムに着目して解析を進めたが、現在、核内移行性という情報に基づいたプロテオミクス解析により、ナノシリカの曝露によって発現変動する核内タンパク質を多数見い出している（未発表データ）。これら発現変動タンパク質と核機能との連関解析によって、細胞内移行と細胞応答の因果関係をより精査できるものと考えている。また、細胞内局在のみならず生体内動態と安全性の連関解析を行うとともに、表面物性（表面電荷など）との連関解析も進行している。既に筆者らは、表面物性を制御することで、非晶質ナノシリカによる生殖発生毒性を回避できる可能性⁷やDNA損傷発現に関しても同様に抑制できることを見い出している（未発表データ）。筆者らのナノ安全科学研究を基盤として、非晶質ナノシリカのみならず、あらゆるナノマテリアルに応用可能な安全性評価法を確立することで、科学的根拠に基づいた安全なナノマテリアルの使用・設計指針の策定が実現するものと期待している。

謝辞 本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究B一般（No. 21390046）、日本学術振興会科学研究費補助金（学術研究助成基金助成金）挑戦的萌芽研究（No. 23659078）、文部科学省地域科学技術振興施策知的クラスター創成事業、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業（No. H19-化学一般-005及びH22-化学一般-006）、厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業斉藤班（H20-子ども一般-002）、環境省地球環境研究総合推進費、内閣府食品安全委員会食品健康影響評価技術研究（No. 1005）、財団法人コスメトロジー研究振興財団、財団法人喫煙科学研究財団、財団法人武田科学振興財団の支援を賜りました。ここに深謝申し上げます。また、本総説で紹介した研究内容は、大阪大学大学院毒性学分野 堤 康央教授（徳医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト チーフプロジェクトリーダーを併任）の統括の下、日本化粧品工業連合会、大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任准教授 吉岡靖雄先生、大阪大学大学院薬学研究科 助教 吉川友章先生、特任助教 鍋師裕美先生、医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトプロジェクトリーダー 角田慎一先生、サブプロジェクトリーダー 鎌田春彦先生、プロジェクト研究員 阿部康弘先生、長野一也先生を始めとする多くの方々の連携によって得られた共同成果であり、この場をお借りして御礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Maynard A. D., Aitken R. J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdorster G., Philbert M. A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S. S., Tran L., Walker N. J., Warheit D. B., *Nature*, **444**, 267-269 (2006).
- 2) Schmidt C. W., *Environ. Health Perspect.*, **117**, A158-A161 (2009).
- 3) 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).
- 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) Wang J., Chen C., Liu Y., Jiao F., Li W., Lao F., Li Y., Li B., Ge C., Zhou G., Gao Y., *Tox-*

- icol. Lett.*, **183**, 72–80 (2008).
- 6) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., 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., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Bio-materials*, **32**, 2713–2724 (2011).
 - 7) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y., *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 321–328 (2011).
 - 8) 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 (2011).
 - 9) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Part. Fibre Toxicol.*, **8**, 1 (2011).
 - 10) Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Pharmazie*, **65**, 596–599 (2010).
 - 11) Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S., *Bio-materials*, **31**, 6833–6842 (2010).
 - 12) Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y., *Bio-materials*, **32**, 3–9 (2011).
 - 13) Merget R., Bauer T., Kupper H. U., Philippou S., Bauer H. D., Breitstadt R., Bruening T., *Arch. Toxicol.*, **75**, 625–634 (2011).
 - 14) Lynn S., Gurr J. R., Lai H. T., Jan K. Y., *Circ. Res.*, **86**, 514–519 (2000).
 - 15) Beak S. M., Lee Y. S., Kim J. A., *Biochimie*, **86**, 425–429 (2004).
 - 16) Cassel S. L., Eisenbarth S. C., Iyer S. S., Sandler J. J., Colegio O. R., Tephly L. A., Carter A. B., Rothman P. B., Flavell R. A., Sutterwala F. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9035–9040 (2008).
 - 17) Hansen K., Mossman B. T., *Cancer Res.*, **47**, 1681–1686 (1987).
 - 18) Indo H. P., Davidson M., Yen H. C., Suenaga S., Tomita K., Nishii T., Higuchi M., Koga Y., Ozawa T., Majima H. J., *Mitochondrion*, **7**, 106–118 (2007).
 - 19) Rachmilewitz E. A., Weizer-Stern O., Adamsky K., Amariglio N., Rechavi G., Breda L., Rivella S., Cabantchik Z. I., *Ann. NY Acad. Sci.*, **1054**, 118–123 (2005).

Review

Carbon Nanomaterials: Efficacy and Safety for Nanomedicine

Takuya Yamashita ^{1,2,†}, Kohei Yamashita ^{1,2,†}, Hiromi Nabeshi ^{1,2}, Tomoaki Yoshikawa ^{1,2},
Yasuo Yoshioka ^{1,2,3,*}, Shin-ichi Tsunoda ^{2,3,4} and Yasuo Tsutsumi ^{1,2,3,*}

¹ Laboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; E-Mails: t-yamashita@nibio.go.jp (T.Y.); yamasita@phs.osaka-u.ac.jp (K.Y.); nabeshi@phs.osaka-u.ac.jp (H.N.); tomoaki@phs.osaka-u.ac.jp (T.Y.)

² Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mail: tsunoda@nibio.go.jp

³ The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

⁴ Laboratory of Biomedical Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

† These authors contributed equally to the work.

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: yasuo@phs.osaka-u.ac.jp (Y.Y.); ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp (Y.T.); Tel.: +81-6-6879-8233; Fax: +81-6-6879-8233.

Received: 16 December 2011; in revised form: 11 February 2012 / Accepted: 15 February 2012 /

Published: 21 February 2012

Abstract: Carbon nanomaterials, including fullerenes, carbon nanohorns, and carbon nanotubes, are increasingly being used in various fields owing to these materials' unique, size-dependent functions and physicochemical properties. Recently, because of their high variability and stability, carbon nanomaterials have been explored as a novel tool for the delivery of therapeutic molecules including peptide and nucleic acid cancer drugs. However, insufficient information is available regarding the safety of carbon nanomaterials for human health, even though such information is vital for the development of safe and effective nanomedicine technologies. In this review, we discuss currently available information regarding the safety of carbon nanomaterials in nanomedicine applications, including information obtained from our own studies; and we discuss types of carbon nanomaterials that demonstrate particular promise for safe nanomedicine technologies.