

されていくのかといった動態の微量定量情報があまりにも乏しい。この点も、品質と絡めながら、早期にクリアにしていくことが望まれよう。言い換えれば、閾値や無毒性量など、安全を数値化していくことが急がれる。今回、表面性状や形状など物性の適切な制御により、安全性を高め得ることを紹介したが、未だ基礎情報は不足しており、引き続きナノ安全科学研究を推進していくことが必要不可欠である。また、物性制御により、ナノマテリアルの安全性が高度に担保されるメカニズムの解明が今後の課題であると考えられ、メカニズムに関する議論を深めることで、他のナノマテリアルにも適用可能な普遍性を持った安全性情報を提案可能になると期待される。すなわち、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、ヒト健康の確保と同時に、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ものと考えている。我が国は、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。従って、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を産み出すことが知財立国・技術立国としての我が国の進むべき道であると考えられる。今後、このようなナノ安全科学研究を

積み重ねることで、ヒトの健康環境を確保しつつ、ナノマテリアルを活用した豊かな社会が実現するものと期待している。

#### 参考文献

- [1] Morishige T, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 392, 160-165 (2010).
- [2] Yamashita K, et al. *Inflammation*, 33, 276-280 (2010).
- [3] Higashisaka K, et al. *Biomaterials*, 32, 3-9 (2011).
- [4] Nabeshi H, et al. *Nanoscale Res Lett*, 6, 464 (2011).
- [5] Nabeshi H, et al. *Nanoscale Res Lett*, 6, 93 (2011).
- [6] Nabeshi H, et al. *Biomaterials*, 32, 2713-2724 (2011).
- [7] Nabeshi H, et al. *Part Fibre Toxicol*, 8, 1 (2011).
- [8] Tsutsumi Y, et al. *Nat Nanotechnol*, 6, 755 (2011).
- [9] Yamashita K, et al. *Nat Nanotechnol*, 6, 321-328 (2011).
- [10] Yoshida T, et al. *Nanoscale Res Lett*, 6, 195 (2011).
- [11] Hirai T, et al. *Part Fibre Toxicol*, 9, 3 (2012).
- [12] Morishige T, et al. *Arch Toxicol*, 86, 1297-1307 (2012).
- [13] Morishita Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 420, 297-301 (2012).
- [14] Nabeshi H, et al. *Nanotechnology*, 23, 045101 (2012)

---

よしおか やすお Yoshioka Yasuo

つつみ やすお Tsutsumi Yasuo

有効かつ安全なナノマテリアルの開発に資する基盤情報の収集を試みている。

連絡先 〒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

電話 06-6879-8233

### 第3節 ナノ安全科学研究の最前線

#### はじめに

ナノマテリアルは、カーボンナノチューブやフラーレンのように、新たに考案・開発された素材と、非晶質ナノシリカやナノ酸化チタンのように古くから使用されていた素材を100 nm以下にまで微小化した素材に大別される。前者は主にその分子の微細構造に、後者は微小化に伴う界面効果・量子サイズ効果等に起因した、ナノマテリアル特有の機能を有している。即ち、従来のサブミクロンサイズ（数百 nm-数  $\mu\text{m}$ ）以上の素材は、細胞（10  $\mu\text{m}$ ）から細菌（1  $\mu\text{m}$ ）程度であるが、ウイルス（100 nm）より小さくなると、全く異なる性質を呈するようになるため、その機能をうまく活用すれば、様々な産業に革命を起こす夢の新素材となり得る。例えばカーボンナノチューブは、軽量ながら既存素材でははるかに及ばないほどの機械的強度を誇り、さらに合成過程で構造を制御することで、用途に合わせて物性を大きく変化させられるため、工業分野における応用の幅はまさに無限大である。また、酸化チタンはナノサイズになることで白色から透明になり、同時に高い紫外線遮蔽能を持つようになるため、白浮きしない日焼け止め素材として既に不動の地位を築いている<sup>1)</sup>。

このように、昨今では、抗体分子（10 nm）よりも小さなサブナノ素材までもが台頭してきているなど、ナノマテリアルの開発・利用が拡大の一途を辿る一方で、ナノマテリアルの有する革新的機能が逆に、未知の生体影響を誘発することへの懸念が広がっている。これを受けて、世界各国でナノマテリアルのハザード同定研究が一斉にスタートし、カーボンナノチューブをマウスに吸引曝露あるいは腹腔内投与することで中皮腫が誘導される可能性や、ナノ酸化チタンが発がん性や生殖・発生毒性を示す可能性など、ハザードに関する報告が相次いでいる<sup>2,3)</sup>。しかし、これら報告の大部分は、ハザード同定のために、過剰な投与量・投与期間で、強制的に体内曝露させたものも多い（現実には有り得ない投与経路・曝露機会）。即ち、実際の曝露経路を加味した検討や、体内吸収性、蓄積、排泄といった体内動態を追求した検討は殆ど皆無に等しく、そのうえ、ナノマテリアルの品質に着目した検討も無きに等しい。こういった現状を鑑みると、ハザード情報ですら不十分なうえ、曝露実態に関する情報は少なく、ハザードと曝露（量・時間）の積算に基づいて、ハザードが起りうる確率、所謂、リスクを解析・評価することは、まさに今後の緊急課題と言えよう。このように、ハザードに偏った情報ばかりが先行する中で、アメリカ国立労働安全衛生研究所（NIOSH）によるナノ酸化チタンの規制や、REACHに基づいた化粧品に含有されるナノマテリアルの成分表示義務など、既にナノマテリアルの規制や管理が開始されつつある<sup>4)</sup>。確かに、ヒト健康の確保が第一義的に重要であり、アスベストの二の舞にならぬように、迅速なリスク管理が求められてはいるものの、安全性を担保あるいは予測するための科学的かつ具体的な情報に乏しい状況下で規制や管理が先行すると、風評被害によって安全なナノマテリアルまでもが闇に葬られかねない（現状では、ハザード情報に基づいたハザード管理を行っているに過ぎない）。ナノマテリアルの恩恵を享受した豊かな社会の実現に向けて、また本邦が、技術立国・知財立国として在り続けるためにも、ヒト（製造現場、ユーザーなど）の健康確保や生態/生体系の保全を高度に達成しつつ、ナノマテリアルの不当な社会拒絶は絶対に避けなくてはならない。したがって、単にハザードを同定するだけでなく、曝露実態を加味したナノマテリアルの安全性情報を収集し、適切にリスクを解析・評価するための情報を危急に収集していくことが最優先課題である。その上で、現象論で議論するのではなく、科学的根拠に基づいてハザード発現メカニズムを明らかにすることで、安全なナノマテリアルを創製するための基盤情報を収集することが極めて重要であろう。

以上の背景を踏まえて我々は、ナノマテリアルのリスク解析と、安全なナノマテリアルの創製を目指した基盤情報の収集を二本柱とした、ナノ安全科学研究（Nano-Safety Science）を進めている。本総説では、先行して実施している非晶質ナノシリカを対象とした、ナノ安全科学研究の成果を紹介したい<sup>5-11)</sup>。

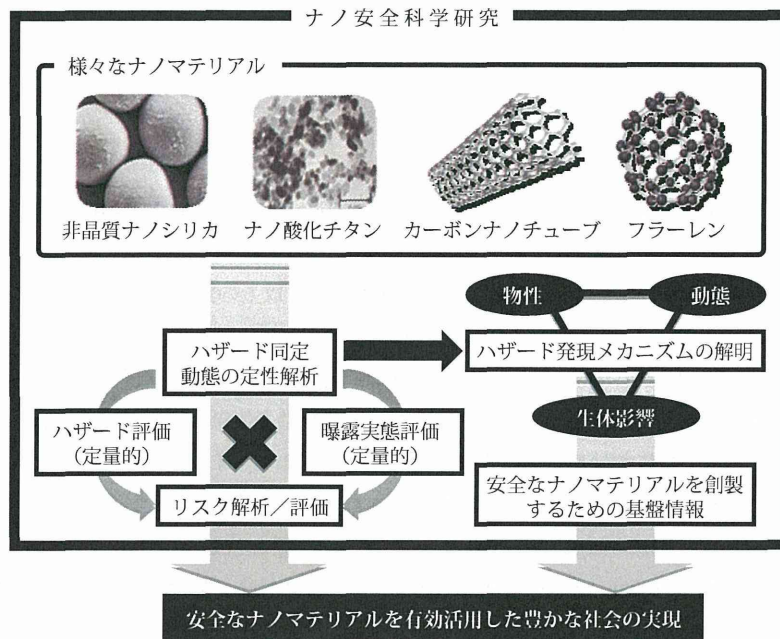


図1 ナノ安全科学研究の概略

## 1. 経口、経皮曝露を想定した検討

非晶質ナノシリカは、最も広範に、かつ多量に使用されているナノマテリアルの一つであり、例えば日焼け止めやファンデーションなどの化粧品基材、歯磨き粉や歯の充填剤、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、医療分野においては遺伝子送達キャリアなどのDDS素材としても期待されており、その安全性確保、さらには安全な非晶質ナノシリカの設計が急務となっている。そこで我々はまず、非晶質ナノシリカが既に食品、化粧品分野で実用化されていることを考慮して、経口投与、および経皮塗布による検討を実施した。なお、我々は、製造現場や環境中に放出された非晶質ナノシリカに対する、非意図的吸入曝露による影響についての解析も、鋭意進めているところである。

まず、一次粒径が70 nmの非晶質ナノシリカ(nSP70)を28日間連続でマウスに経口投与、あるいは経皮塗布し、体内吸収性を評価した。その結果、従来のサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカでは考えにくかったことではあるが、nSP70は腸管、並びに皮膚のバリアを突破し、いずれの経路においても体内に侵入することが明らかとなった。また、体内侵入後の局在を解析したところ、肝臓や脳などの遠隔部位を含めた、全身のあらゆる組織で粒子が観察された<sup>5)</sup>。以上の事実は、nSP70を経口、あるいは経皮から曝露することで、体内に吸収され、血流を通して全身組織に移行することを示唆している。したがって、nSP70の経口投与・経皮塗布の影響を解析するにあたって、曝露局所の影響だけでなく、全身を対象とした生体影響を評価する必要がある。しかし本検討時においては、体内吸収性を解析するために非常に高用量の投与であったにもかかわらず、生化学検査などの一般毒性学的解析においてはほとんど影響が認められなかった。したがって、nSP70の安全性に関して大きな懸念はないものの、今後、体内蓄積性を考慮し、より長期の検討などを実施する必要があると考えられる。一方で、曝露局所の影響を詳細に解析したところ、経口投与後の消化管においては異常所見が認められなかったが、経皮塗布後の皮膚局所においては、過剰量を塗布した検討ではあるものの、アポトーシス(プログラム細胞死)を起こした細胞数の増加が認められた。したがって、前述の通り、非晶質ナノシリカが化粧品基剤として多用されている現状を踏まえると、体内吸収量の定量的解析や、ハザード発現の閾値等をより詳細に解析し、リスク解析に向けた情報を引き続き収集する必要があると考えられる。さらに、ハザード発現メカニズムを詳細に解析することで、より安全な非晶質ナノシリカ開発に向けた具体的情報を収集することも重要であろう。

## 2. 非晶質ナノシリカが体内移行した際のハザード同定

前項の検討から、非晶質ナノシリカが経口・経皮曝露により体内に吸収され、全身組織に分布し得ることが明らかとなった。そのため、非晶質ナノシリカが血中移行し全身循環した際のハザード情報を収集することが必要不可欠となる。一方で元来、二酸化ケイ素から成る非晶質シリカ素材（サブミクロンサイズ以上のもの）は、生物学的に非活性であり、様々な製品における長年の使用実績から考えても極めて安全性の高い素材であると考えられている。そこで、非晶質ナノシリカが全身循環した際の局在・影響を、粒子径がそれぞれ 300nm (nSP300), 1000nm (mSP1000) の従来型の非晶質シリカと比較した。

まず、血中移行後の体内局在を詳細に解析するため、マウスの静脈内に nSP70, nSP300, mSP1000 を投与し、*in vivo* イメージングを実施した。その結果、いずれの粒子も肝臓に局在する傾向が認められるものの、nSP300, mSP1000 が胆嚢に集積したのに対して、nSP70 は胆嚢のみならず、肝臓全体にわたって集積している像が得られた。さらに、透過型電子顕微鏡を用いてより詳細に組織内局在を解析したところ、nSP300, mSP1000 が主に肝クッパー細胞（肝臓内の免疫担当細胞）内に取り込まれていたのに対し、nSP70 のみが肝実質細胞（肝臓固有の機能を担う細胞）内にまで侵入していることが明らかとなった。このことから、非晶質ナノシリカは、従来型非晶質シリカとは全身循環した際の体内局在が全く異なることが明らかとなった。

次に、実際に使用されている非晶質ナノシリカが様々な表面修飾を施されている場合があることを考慮し、nSP70 に加え、その表面がアミノ基、カルボキシル基で修飾された非晶質ナノシリカ (nSP70-N, nSP70-C) が全身循環した際の生体影響を解析した。その結果、nSP70-N, nSP70-C に関しては、静脈内に過剰量を投与するという極めて過激な実験系にもかかわらず、生化学検査、血球検査などの一般毒性学的視点からの解析においては目立った異常所見は観察されなかった。このことから、これら二つの性状の非晶質ナノシリカに関しては、特殊毒性などのより詳細な検討は必要ではあるものの、極めて安全性の高い素材であると考えられた。一方で、表面未修飾の nSP70 に関しては、マウスに対する肝毒性、血液凝固異常、および急性致死毒性が観察された<sup>5)</sup>。なお、サブミクロンサイズ以上の従来型非晶質シリカでは、これらハザードは観察されていない。したがって、多くの非晶質ナノシリカ素材に関しては安全であると考えられる一方で、特定の表面性状を持つものに関しては、従来型非晶質シリカにはないハザードを発現してしまう可能性が示された。今後、非晶質ナノシリカの表面性状と生体影響の連関をより詳細に解析していくことが、ハザード発現メカニズムの解明、および非晶質ナノシリカの安全性をより高度に担保することに繋がると考えられる。

我々は非晶質ナノシリカが全身循環した際の影響について、遺伝毒性、免疫毒性、生殖発生毒性など、特殊毒性学的な解析も鋭意進めており、本稿では生殖発生毒性の中でも、妊娠マウスを用いた検討について紹介する。妊娠マウスに過剰量の非晶質ナノシリカを尾静脈内投与し、各粒子の体内局在を解析したところ、3種類の非晶質ナノシリカはいずれも肝臓だけでなく、胎盤にも集積するとともに、血液胎盤関門を通過し胎仔にまで移行する様子が観察された。さらに、nSP70-N, および nSP70-C 投与群において異常が認められなかった一方で、nSP70 投与群のみで、胎仔死亡率の増加、および胎仔発育不全の誘発が認められた<sup>6)</sup>。なお、これら粒子の胎盤への集積や胎仔への移行、および胎仔への影響は、nSP300, および mSP1000 では認められていない。このことから、多くの非晶質ナノシリカ素材が、生殖発生毒性学的視点からも安全であるものの、一部の素材については注意を払う必要があることが示された。

以上の検討で見出された nSP70 のハザードは、尾静脈内投与という強制的な投与経路、かつ過剰量における検討ではあるものの、従来型非晶質シリカである nSP300, mSP1000 では認められなかったものであり、一部の非晶質ナノシリカが従来型の非晶質シリカとは異なる生体影響を誘発する可能性を示している。一方で nSP70-N, nSP70-C は、過剰量を静脈内に投与するという実験系にもかかわらず、目立ったハザードは認められなかったことから、これらは極めて安全性の高い素材であると考えられる。また、これらの知見は逆に、極一部の安全性に懸念のあるものに関しても、適切な表面修飾を施すことにより、安全性を担保できる可能性を示している。

### 3. ハザード発現メカニズムの解明に向けて

前項の検討において、表面性状の異なる3種類の非晶質ナノシリカのうち、nSP70のみがハザードを有することが明らかとなったため、現在、nSP70のハザード発現メカニズムの解明に向けて、粒子の体内動態や、細胞・蛋白との相互作用を詳細に解析している。ここではその一例として、培養細胞株を用いたnSP70のハザード発現メカニズムの解析について紹介する。

まず、nSP70、nSP70-C、nSP70-Nの細胞内動態、および細胞傷害性を解析したところ、nSP70-N、nSP70-Cが細胞外や細胞質内に留まっているのに対し、nSP70のみが細胞の核内にまで侵入している様子が観察され、さらに細胞傷害性が認められた<sup>5,7)</sup>。そこで、nSP70の細胞に対する影響を精査したところ、活性酸素種(ROS)の産生に起因するDNA傷害が生じることが明らかとなった<sup>8)</sup>。なお、nSP70-N、およびnSP70-Cは、ROS産生量の増大やDNA傷害も起こっていないことを確認している。

以上の検討から、nSP70の特殊な細胞内動態や、ROS産生、それに伴うDNA傷害や細胞死が、ハザード発現の一端に関与しているのではないかと考えられた。今後引き続き、nSP70のハザード発現メカニズムの解明を進めることが、非晶質ナノシリカの安全性を高度に担保するための基礎情報に繋がり、ひいては安全な非晶質ナノシリカの開発と普及に直結するものと考えられる。

### 4. 今後の展望

我々は、安全なナノ材料の創製に資する基盤情報の収集として、今回紹介した非晶質ナノシリカを用いた検討をはじめ、様々なナノ材料の物性と、あらゆる曝露経路における生体影響の連関を解析している。また品質(純度、凝集性を含む)についても、フォーカスした取組も必要となろう。今後は、その両輪としての適切なりスク解析に向けて、ハザード同定で得られた情報をもとに、吸収・分布・代謝・排泄といった動態(ADME)情報を定性・定量解析し、曝露実態を解明すると共に、定量的なハザード解析を推進し、リスク解析に資する情報の集積を図らねばならない。さらに、今後より詳細にナノ材料の安全性を評価していくにあたって、実際に使用されている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、それらの安全性についても鋭意評価しているところである。また、ナノ材料の安全な使用のためには、事前にナノ材料の安全性を診断できる評価系の構築が必要不可欠である。本観点から、ナノ材料の開発段階において簡便かつ迅速にその安全性を評価できる、安全性評価バイオマーカーの探索も試みている<sup>11)</sup>。このように、ナノ材料の安全性情報を収集するだけでなく、いかにして安全性を担保したナノ材料を開発・実用化していくのかを視野に入れた、ナノ安全科学研究を推進することで、ナノ産業の発展にも寄与できるものと期待している。

また、前述の通り近年、ナノ材料をさらに微小化し、様々な有用機能が飛躍的に向上した、サブナノ素材(粒子径10 nm以下)の開発が進展している。サブナノ素材は、抗体やアルブミンなどの生体内高分子と同程度の大きさであり、ナノ材料とも分子とも異なる特殊な体内動態を示すため、未知の生体影響を誘導する可能性が考えられる。この点について我々は、サブナノ素材がナノ材料と決定的に異なる生体影響を誘発しうることを明らかとしつつあり、既に安全性評価に向けた基礎情報の収集を開始している。

おわりに

本総説では、非晶質ナノシリカに関するナノ安全科学研究について紹介し、その中で、実験用グレードの非晶質シリカを用いた検討ではあるものの、多くの非晶質ナノシリカの安全性が高いと考えられること、一部の非晶質ナノシリカについては曝露経路を含めて詳細に安全性を検討していく必要があることを示した。昨今、ナノ材料の実用化は、まさにあらゆる分野において拡大の一途を辿っており(ナノ材料の世界市場が、2015年には250兆円にまで成長するとの見通しもある)、我々の豊かな生活の成立に、もはや必須のものとなっている。しかし、ナノ材料の物性・品質を評価・管理・保障し、安全・安心に製造・使用していくための規制・ガイドラインについては全く整備されてい

ないのが現状である。事実、本総説で示した、表面性状だけが異なる3種類の非晶質ナノシリカでさえ、誘発する生体影響は大きく異なっており、ナノマテリアルを構成する化学物質の構造式のみでの規制を試みる化審法や労働安全衛生法では、ナノマテリアルの安全性を適切に管理・保障することは到底できない。したがって我々は、ナノマテリアルの粒子径・形状・表面性状・分散/凝集状態などの物性が、体内動態・安全性に及ぼす影響を精査したうえで、純度といった一般化合物と同様の品質管理・保障は勿論のこと、ナノマテリアル特有の品質に応じた規制・ガイドライン策定に向けた取り組みを開始せねばならないであろう。末筆になるが、安全なナノマテリアルを有効活用した豊かな社会の実現に向けて、また本邦が、技術立国・知財立国として在り続けるためにも、ナノ安全科学研究を推進し、産官学の連携による適切なリスク管理とリスクコミュニケーションの実践、さらにはリスクリテラシーの向上により、ナノマテリアルへの社会の理解と受容の促進を図り、一方で有用性の確保や向上にチャレンジしていかなければならない。

#### 文 献

- 1) Napierska, D., *et al. Part. Fibre. Toxicol.* 7, 39 (2010)
- 2) Poland, C. A., *et al. Nat. Nanotechnol.* 3, 423-428 (2008)
- 3) Shimizu, M., *et al. Part. Fibre. Toxicol.* 6, 20 (2009)
- 4) Maynard, A. D., *et al. Nature* 475, 31 (2011)
- 5) Nabeshi, H., *et al. Biomaterials* 32, 2713-2724 (2011)
- 6) Yamashita, K., *et al. Nat. Nanotechnol.* 6, 321-328 (2011)
- 7) Nabeshi, H., *et al. Nanoscale Research Letters* 6, 93 (2011)
- 8) Nabeshi, H., *et al. Part. Fibre. Toxicol.* 8, 1 (2011)
- 9) Hirai, T., *et al. Part. Fibre. Toxicol.* 9, 3 (2012)
- 10) Yoshida, T., *et al. Nanoscale Research Letters* 6, 195 (2011)
- 11) Higashisaka, K., *et al. Biomaterials* 32, 3-9 (2011)

