

ることで、安全なナノマテリアルの開発と実用化を促進し、一方でヒトの健康環境を確保し得るものと

期待しており、本シンポジウムがその一助となったものと確信している。

## Review

# Safety Evaluation Study of Nanomaterials Aimed at Promoting Their Acceptance by Society

Hiromi Nabeshi<sup>1,2,4</sup>, Tomoaki Yoshikawa<sup>1,2</sup>, Yasuo Yoshioka<sup>2,3</sup> and Yasuo Tsutsumi<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan

<sup>3</sup>The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Osaka, Japan

(Received November 13, 2010; Revised December 20, 2010; Accepted December 27, 2010)

Currently, nanomaterials (NMs) with particle sizes below 100 nm have been successfully employed in various industrial applications in medicine, cosmetics and foods. On the other hand, NMs can also be problematic in terms of eliciting harmful effects as a result of their small size. However, biological and/or cellular responses to NMs are often inconsistent and even contradictory. In addition, relationships among the physicochemical properties, localization and biological responses of NMs are not yet well understood. In order to open new frontiers in the use of the safer NMs in the fields of medicine, cosmetics and foods, it is necessary to understand the detailed properties of NMs so that their safety can be predicted. In this review, we present some of our studies examining the cellular localization and cytotoxicity, including genotoxic effects of well-dispersed amorphous silica particles of diameters ranging from 70 nm to 1000 nm. Our results suggest that "well-dispersed" amorphous nanosilica of particle size 70 nm (nSP70) enters the nucleus and exhibits mutagenic activity related to ROS generation *in vitro*. Our data indicate that further studies of the relation between the physicochemical properties of, and the biological responses to NMs are needed to ensure the safety of these materials, and to promote their acceptance by society.

**Key words:** nanosilicas, genotoxicity, reactive oxygen species generation

## Introduction

In January 2000, US President Bill Clinton advocated for the National Nanotechnology Initiative (NNI) and began a massive investment in nanotechnology research and development. This US policy resulted in an explosion of research on the development of nanotechnology-based applications in wide-ranging fields, including information technology, energy and medicine. The recent development of nanoscale engineering represents a dynamic area of interdisciplinary research, incorporating nanomaterials (NMs) into a diverse product matrix, including diagnostics, food additives and cosmetics. Be-

cause amorphous silica nanoparticles (nSPs) and titanium oxide nanoparticles are colorless and reflect ultraviolet radiation more efficiently than micro-sized particles, nSPs and titanium oxide nanoparticles are already used as cosmetic vehicles or functional ingredients in many cosmetics such as foundation creams and sunscreens (1,2). An NM is defined as a substance that has at least one dimension of less than 100 nm in size. NMs can assume many different forms, such as tubes, rods, wires, spheres or particles. Because they exhibit unique physicochemical properties and innovative functions, the world market for NMs is expected to significantly increase during the next few years (3).

However, because NMs may possess novel properties, kinetics, and biological effects different from those of micro size bulk materials, their potential for harmful effects on humans is raising concerns about their safety. For example, exposure of cells or animals to carbon nanotubes, TiO<sub>2</sub> nanoparticles or silver nanoparticles have been reported to induce cytotoxicity and inflammation (4–16). However, other researchers have reported that carbon nanotubes and TiO<sub>2</sub> nanoparticles do not induce harmful effects (17–19). Thus, despite intensive research efforts, investigations of biological and/or cellular responses to NMs are often inconsistent and even contradictory. In addition, relationships among the physicochemical properties, absorbency, and localization of, and biological responses to NMs are not yet well understood. In order to ensure the safety of NMs and open new frontiers for the use of NMs in biological fields, it is necessary to gain a more complete understanding of NMs. For example, in order to build a comprehensive prediction system of the safety of NMs, it

<sup>4</sup>Correspondence to: Hiromi Nabeshi and Yasuo Tsutsumi, Department of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Tel: +81-6-6879-8233, Fax: +81-6-6879-8233, E-mail: nabeshi@phs.osaka-u.ac.jp and ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp

would be helpful to explore the detailed properties of NMs and the relationship among their physicochemical properties, absorbency, and localization, and the biological responses they elicit from the point of view of biosafety (Our strategy is summarized in Fig. 1).

### Physicochemical Properties of Various-sized Silica Particles

In this study, we used amorphous nanosilica particles (nSPs) as an example of an NM. nSPs are one of the most widely applied NMs, and are used in cosmetics and

food additives. nSPs also have great potential for use as diagnostic imaging agents, gene delivery carriers and cancer therapies (20–24). In addition, these NMs show overwhelmingly superior dispersibility as compared with carbon nanotubes, fullerene and nano-sized TiO<sub>2</sub>. Thus, these nSPs are ideally suited for determining how particle size influences cellular responses to NMs.

We first analyzed the physicochemical properties of commercially available silica particles of 70, 300 and 1000 nm in diameter (nSP70, nSP300 and mSP1000, respectively). Close examination of the silica particles of different particle sizes by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) revealed that all silica particles used in this study were smooth-surfaced spherical particles, and that the primary particle sizes were approximately uniform (Fig. 2). The mean size and the mean zeta potential of silica particles in a neutral solvent for each size category are also shown in Fig. 2. These results suggest that the silica particles used in this study remained as stable well-dispersed particles in solution, and did not form aggregates. Thus, these particles are ideally suited to evaluate whether their bio-distribution and biological effects depend on particle size.

#### Strategy of the safety assessment of Nanomaterials

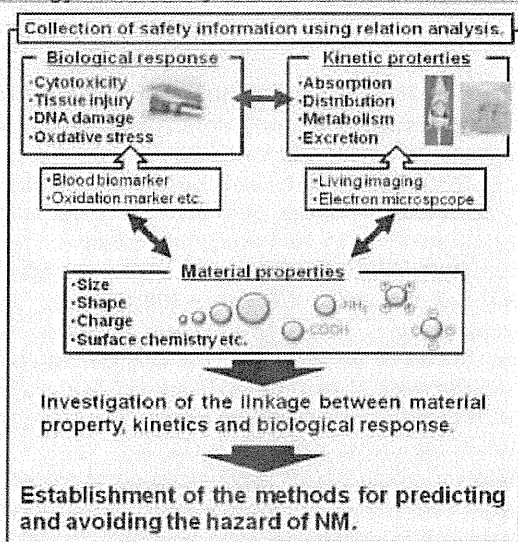


Fig. 1. Our strategy for the safety assessment of nanomaterials.

### Analysis of Intracellular Distribution of Silica Particles in Human Keratinocytes

It has been reported that NMs can enter the skin by transdermal exposure (25–27). These reports indicate the possibility that NMs enter and accumulate in the human body after dermal exposure over a relative long time period. Accordingly, in this study, we evaluated the intracellular distribution of, and cellular responses to silica particles in skin cells.

	Nanosilica		Conventional silica (over 100 nm)	
	nSP70	nSP300	mSP1000	
Size (nm)	70	300	1000	
SEM images				
Particle size in solution (nm)	69.4 ± 7.7	356 ± 14.6	1390 ± 92	
Surface charge (mV)	-57.1 ± 8.1	-63.0 ± 1.6	-82.1 ± 2.1	

Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) analysis, particle size and zeta potential of silica particles. SEM photomicrographs of silica particles used in this study; nSP70, nSP300 and mSP1000. Scale bars: 0.1 μm (nSP70) and 0.5 μm (nSP300 and mSP1000). Results are expressed as mean ± S.D. (n = 3).

Firstly, to determine the intracellular location of silica particles, we used TEM to examine HaCaT cells that were treated with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of nSP70, nSP300, or mSP1000. TEM examination revealed the presence of mSP1000 and nSP300 particles only in the endosome. Cells treated with mSP1000 were also found to contain a large number of lysosomes. In contrast, in nSP70-treated cells nSP70 particles were present in the cytoplasm as well as in the nucleus. Furthermore, nSP70 particles accumulated in the nucleolus. Recently, it has been reported that the intracellular localization of NMs may be linked to the induction of harmful effects. For example, the localization of silver nanoparticles in the nucleus and mitochondria may be related to mitochondrial dysfunction or oxidative stress (28). Thus, analysis of intracellular localization may provide important and useful information to predict nanotoxicity.

### Analysis of Cell-growth Inhibition and Genotoxicity Induced by Silica Particles

Next, we investigated the biological effects of nSPs. To this end, we assessed the effects of nSPs of various particle sizes on the proliferation of HaCaT cells. We found that cell proliferation was inhibited following treatment with nSP70 and nSP300 in a both dose- and size-dependent manner. The half maximal (50%) inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of nSP70 and nSP300 for cell proliferation was 323 and 3966  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. We were, however, unable to calculate the  $\text{IC}_{50}$  of mSP1000. Taken together, these results suggested that smaller sized silica particles inhibited the growth of HaCaT cells more strongly than the larger particles.

Based on evidence of nuclear entry of nSP70 *in vivo* and *in vitro*, we next evaluated the effects of nSPs on DNA damage. We used the comet assay to analyze DNA single strand breaks in nSP-treated HaCaT cells. As shown in Table 1, in cells treated with PBS (negative control) for 3 h, the average tail length was 23.3  $\mu\text{m}$ . In cells treated with 90  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of nSP70, nSP300, or mSP1000, the average tail lengths were 102.9  $\mu\text{m}$ , 30.5  $\mu\text{m}$ , and 22.5  $\mu\text{m}$ , respectively. The average tail lengths

**Table 1.** Detection of DNA strand breaks induced by treatment with silica particles using the comet assay

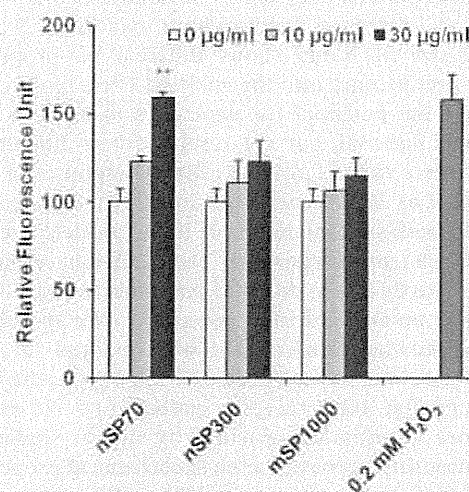
Concentration	Tail length ( $\mu\text{m}$ )		
		30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	90 $\mu\text{g}/\text{ml}$
PBS	23.3 $\pm$ 8.6	—	—
0.2 mM $\text{H}_2\text{O}_2$	64.5 $\pm$ 2.8	—	—
nSP70		99.9 $\pm$ 23.2*	102.9 $\pm$ 15.2*
nSP300		26.3 $\pm$ 4.6	30.5 $\pm$ 8.9
mSP1000		30.7 $\pm$ 9.5	22.5 $\pm$ 3.2

HaCaT cells were treated with test materials for 3 h. Data shown are mean  $\pm$  SD of at least 16 cells for each sample. \*Significant increase ( $P < 0.01$ ) compared with the negative control, PBS.

increased with decreasing size of the silica particles. The tail lengths found in the nSP70-treated cells were longer than those found in the positive control cells (0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  treated cells) (Table 1). These findings suggest the possibility that nSPs with particle sizes below 100 nm could induce mutations.

### Analysis of the Mechanism of Cell-growth Inhibition and Genotoxicity Induced by Silica Particles Focusing on Reactive Oxygen Species

Many reports have indicated that intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) is induced by various types of nanoparticles, such as carbon black, nano-sized  $\text{TiO}_2$  and nano-sized silver particles (28–41). Furthermore, it has recently been reported that crystalline silica induces intracellular ROS generation via NADPH oxidase activation following uptake by endocytosis (42,43). Based on these reports, ROS generation and DNA damage are obvious indicators for assessing the hazards posed by nSPs. Firstly, total intracellular ROS generation was measured in silica particle-treated HaCaT cells using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Fig. 3). Silica particles of all sizes were found to induce intracellular ROS generation in a dose-dependent fashion. However, ROS generation by nSP70 treatment was significantly greater compared with that generated by nSP300 and mSP1000 treatment at the same particle concentration. These results suggested that silica particle-induced intracellular ROS generation was significantly increased by decreasing the particle size to less than 100 nm. It is well-known that



**Fig. 3.** Detection of oxidative stress induced by silica particle treatment in HaCaT cells. Detection of total ROS and hydroxyl radicals induced by silica particle treatment in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with various concentrations of nSP70, nSP300, and mSP1000 for 3 h. 0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  were used as positive control. \*\* $P < 0.01$  vs PBS.

intracellular ROS induces oxidative DNA damage related to mutagenesis, carcinogenesis and the aging process (44–47). These results suggest the possibility that nSP70 may be genotoxic.

A number of mechanisms underlie the ability of nanoparticles to cause DNA damage. As mentioned above, a key mechanism that is often described is the ability of particles to cause the production of ROS (1,48). One possible mechanism of particle-mediated DNA damage is the ability of particles to stimulate target cells to produce oxidants/genotoxic compounds, e.g., by affecting mitochondrial electron transport, activation of NADPH oxidase, or inducing cytochrome P450 enzymes. Alternatively, the physical and chemical properties of the particles themselves may be sufficient to generate oxidants, thereby leading to DNA damage. In addition to the mechanism of DNA damage involving the generation of ROS, nanoparticles may gain direct access to DNA via nuclear transport. This seems very unlikely, however, given that the nuclear pore complex is less than 8 nm in diameter (49). Nonetheless, some studies have reported that nanoparticles such as silica nanoparticles (40–70 nm) (50) or silver nanoparticles (6–20 nm) can penetrate the nuclear membrane (28). A detailed analysis of the mechanism of DNA damage induced by nanoparticles is currently underway. This information will be a critical determinant in the design of safer nSPs and will provide valuable information for hazard assessment of nSPs.

## Conclusions

In this review, we report that compared with bulk material of particle sizes above the nanoscale (above 100 nm), “well-dispersed” amorphous nanosilica with a particle size of 70 nm shows different bio-properties with respect to entry into the nucleus. These bio-properties show the potential for nanosilica to act as a new functional material, but as a result of these differences, nSP70 exerts various adverse cellular responses in skin cells, such as ROS generation and DNA damage. By contrast, bulk-sized materials of larger particle size display a much reduced response. These different responses might be partly due to different mechanisms, such as intracellular uptake and ROS generation. We speculated that receptor-mediated uptake was involved in these phenomena, and set out to identify the physicochemical properties that affect receptor endocytosis. We expect that more information provided by further studies of the relationship between the physicochemical properties of, and biological responses to NMs will lead to an acceptance by society of the safety and usefulness of these materials. In addition, we believe a detailed analysis of nSP-internalization will be invaluable for both hazard assessment and the design of safe nSPs.

**Acknowledgement:** This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS). This study was also supported in part by Health Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; by Health Sciences Research Grants for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices from the Japan Health Sciences Foundation; by a Global Environment Research Fund from the Minister of the Environment; and by a the Knowledge Cluster Initiative; the Food Safety Commission; The Nagai Foundation Tokyo; The Cosmetology Research Foundation; The Smoking Research Foundation; and The Takeda Science Foundation.

## References

- 1 Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006; 311: 622–7.
- 2 SCENIHR. EU. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. European Commission, Health and Consumer Protection, Directorate Général, 28–29 September, 2005.
- 3 The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies, 2004; Chapter 4: p. 25–34. <http://www.nanotec.org.uk/report/chapter4.pdf>
- 4 Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, Asakura M, Takaya M, Toya T, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S. Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Ind Health*. 2010; 48: 783–95.
- 5 Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol*. 2009; 29: 330–7.
- 6 Geys J, Nemmar A, Verbeken E, Smolders E, Ratoai M, Hoylaerts MF, Nemery B, Hoet PH. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge. *Environ Health Perspect*. 2008;116: 1607–13.
- 7 Heng BC, Zhao X, Xiong S, Ng KW, Boey FY, Loo JS. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48: 1762–6.
- 8 Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, Kristl J. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Small*. 2010; 6: 1908–17.
- 9 Liu S, Xu L, Zhang T, Ren G, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology*. 2010; 267: 172–7.
- 10 Moos PJ, Chung K, Woessner D, Honegger M, Cutler NS, Veranth JM. ZnO particulate matter requires cell contact for toxicity in human colon cancer cells. *Chem Res Toxicol*. 2010; 23: 733–9.
- 11 Murray AR, Kisin E, Leonard SS, Young SH, Kommencni C, Kagan VE, Castranova V, Shvedova AA. Oxidative

- stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology*. 2009; 257: 161-71.
- 12 Park EJ, Kim H, Kim Y, Yi J, Choi K, Park K. Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 244: 226-33.
  - 13 Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*. 2008; 3: 423-8.
  - 14 Shin JA, Lee EJ, Seo SM, Kim HS, Kang JL, Park EM. Nanosized titanium dioxide enhanced inflammatory responses in the septic brain of mouse. *Neuroscience*. 2010; 165: 445-54.
  - 15 Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53<sup>+/-</sup> mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*. 2008; 33: 105-16.
  - 16 Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Morishita Y, Yoshida T, Fujimura M, Kayamuro H, Nabeshi H, Yamashita T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Kawai Y, Mayumi T, Yohikawa T, Itoh N, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. *Inflammation*. 2010; 33: 276-80.
  - 17 Chlopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Beguin F. *In vitro* studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon*. 2006; 44: 1106-11.
  - 18 Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Hohl D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ, Schins RP. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO<sub>2</sub>: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 222: 141-51.
  - 19 Thibodeau M, Giardina C, Hubbard AK. Silica-induced caspase activation in mouse alveolar macrophages is dependent upon mitochondrial integrity and aspartic proteolysis. *Toxicol Sci*. 2003; 76: 91-101.
  - 20 Bharali DJ, Klejbor I, Stachowiak EK, Dutta P, Roy I, Kaur N, Bergey EJ, Prasad PN, Stachowiak MK. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for *in vivo* gene delivery and expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 11539-44.
  - 21 Bottini M, D'Annibale F, Magrini A, Cerignoli F, Arimura Y, Dawson MI, Bergamaschi E, Rosato N, Bergamaschi A, Mustelin T. Quantum dot-doped silica nanoparticles as probes for targeting of T-lymphocytes. *Int J Nanomedicine*. 2007; 2: 227-33.
  - 22 Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 13549-54.
  - 23 Roy I, Ohulchanskyy TY, Bharali DJ, Pudavar HE, Mistretta RA, Kaur N, Prasad PN. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 279-84.
  - 24 Verraedt E, Pendela M, Adams E, Hoogmartens J, Martens JA. Controlled release of chlorhexidine from amorphous microporous silica. *J Control Release*. 2010; 142: 47-52.
  - 25 Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Boyenzi M, Maina G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*. 2009; 255: 33-7.
  - 26 Mortensen LJ, Oberdorster G, Pentland AP, Delouise LA. *In vivo* skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano Lett*. 2008; 8: 2779-87.
  - 27 Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD. Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett*. 2009; 191: 1-8.
  - 28 AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009; 3: 279-90.
  - 29 Eom HJ, Choi J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23: 1326-32.
  - 30 Fahmy B, Cormier SA. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23: 1365-71.
  - 31 Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Atrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*. 2009; 190: 156-62.
  - 32 Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, Billon-Galland MA, Fleury-Feith J, Moisan F, Pairon JC, Marano F. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*. 2009; 260: 142-9.
  - 33 Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009; 188: 112-8.
  - 34 Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23: 1076-84.
  - 35 Li KG, Chen JT, Bai SS, Wen X, Song SY, Yu Q, Li J, Wang YQ. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23: 1007-13.
  - 36 Liu S, Xu L, Zhang T, Ren G, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology*. 2010; 267: 172-7.
  - 37 Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U, Jahnhen-Dechent W. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*. 2009;

- 5: 2067-76.
- 38 Park EJ, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Lett.* 2009; 184: 18-25.
- 39 Wang F, Gao F, Lan M, Yuan H, Huang Y, Liu J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol In Vitro.* 2009; 23: 808-15.
- 40 Xia T, Kovoichich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JJ, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 2006; 6: 1794-807.
- 41 Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: O<sub>2</sub><sup>-•</sup> versus <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 12803-9.
- 42 Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008; 320: 674-7.
- 43 Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008; 9: 847-56.
- 44 Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science.* 1983; 221: 1256-64.
- 45 Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78: 7124-8.
- 46 Takeuchi T, Morimoto K. Crocidolite asbestos increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in cellular DNA of a human promyelocytic leukemia cell line, HL60. *Carcinogenesis* 1994; 15: 635-9.
- 47 Takeuchi T, Nakajima M, Morimoto K. Establishment of a human system that generates O<sub>2</sub><sup>-•</sup> and induces 8-hydroxydeoxyguanosine, typical of oxidative DNA damage, by a tumor promoter. *Cancer Res.* 1994; 54: 5837-40.
- 48 Schins RP. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol.* 2002; 14: 57-78.
- 49 Terry LJ, Shows EB, Wentz SR. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science.* 2007; 318: 1412-6.
- 50 Chen M, von Mikecz A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Exp Cell Res.* 2005; 305: 51-62.

# 食品分野におけるナノテクノロジーの 安全性

Safety of Nanotechnology in the Field of Foods

<sup>1)</sup> 大阪大学薬学研究科毒性学分野  
<sup>2)</sup> 独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロ  
ジェクト  
<sup>3)</sup> 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

鍋師裕美<sup>1,2)</sup>, 吉岡靖雄<sup>1,2,3)</sup>,  
吉川友章<sup>1,2)</sup>, 堤康央<sup>1,2,3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Toxicology and Safety Science, Graduate  
School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University  
<sup>2)</sup> Laboratory of Biopharmaceutical Research (LBR),  
National Institute of Biomedical Innovation (NiBio)  
<sup>3)</sup> The Center for Advanced Medical Engineering and  
Informatics

Hiromi NABESHI<sup>1,2)</sup>, Yasuo YOSHIOKA<sup>1,2,3)</sup>,  
Tomoaki YOSHIKAWA<sup>1,2)</sup>, Yasuo TSUTSUMI<sup>1,2,3)</sup>

## I はじめに

近年、ナノテクノロジーが劇的に進展したことによって、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、多くの領域で急速に進展している。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  $\mu\text{m}$  の1/500）。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等により、有用成分の吸収性、抗酸化効果や紫外線遮蔽効果といった有用機能が格段に向上しており、われわれの生活の質的向上に革命を起こすものと期待されている<sup>1-3)</sup>。

さらに最近では、タンパク質と同等のサイズ領域であるサブナノサイズ（10 nm以下）のナノマテリアルの開発・実用化も進んでおり、例えば、医薬品・食品・化粧品領域では、ナノサイズ・サ

ブナノサイズのシリカや酸化チタン、フラーレン、白金、銀等がすでに、必須素材として上市されている。食品分野においては、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や抗菌作用、抗酸化作用を利用して、ナノシリカやナノ銀、ナノ白金等のナノマテリアルが食品添加物や機能性成分として適用されつつある。また、食品ナノマテリアルの研究開発および実用化は急速に進展しており、2008年の米国食品医薬品局（FDA）の調査では、ナノマテリアル含有食品・飲料はすでに80品目を超えていることが報告されている。

一方で、例えば強い抗菌作用はわれわれの身体を構成する細胞の機能や常在菌のバランス等にも望ましくない影響を与えてしまい得る等、ナノマテリアルの物性（サイズ、形状等）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、特徴的なハザード（いわゆる、ナノ毒性；NanoTox）を発現してしまうことが世界的に懸



念され始めている。

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悪性中皮腫を誘発する可能性が報告されている（一方で、ある種のカーボンナノチューブは安全であることもわかっている）。すなわち、分散性（二次粒径）によっても、ナノマテリアルの安全性は大きく変動するため、イントララボ間・インターラボ間でのバリデーションが重要となるうえ（この点が非常に悩ましい）、同じ組成（化学構造式）でも安全性が異なることを意味しており、既存の化学物質の審査および製造などの規制に関する法律（化審法）等での規制は難しいのでは？と言われてしまう理由でもある。そのため、経済協力開発機構（OECD）と連携しつつ、欧米各国等はナノマテリアルの安全性情報の収集を推進している。わが国でも厚生労働省や経済産業省、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。

## II 安全性研究の現状

現状の安全性研究は、ナノマテリアルの腹腔内や静脈内への過剰量投与によるハザード評価が中心であり、実際の曝露実態を加味した投与量・投与経路での体内動態や細胞内動態を追求し、リスク（ハザードと曝露時間・量との積算）を解明しようとする研究は国内外を問わず、皆無に等しい。このように、実際の曝露実態を無視した一部のナノマテリアルの部分的なハザード情報が独り歩きし、闇雲な規制が施行されてしまうと、ナノマテリアルすべてが危険であるかのような風評が広がり、ナノマテリアルが社会から拒絶されかねない。ナノマテリアルを取り巻くこのような八方塞がりの状況を打開し、ナノマテリアルを活用した豊かな社会の構築と国民の健康確保を両立するためには、ナノマテリアルの曝露実態や曝露時

間、体内動態情報も加味した科学的根拠に基づいた安全性情報（リスク情報）の収集が不可欠である。特に、食品は年齢・性別・健康状態を問わずすべてのヒトが一生涯にわたって摂取するため、ナノマテリアル含有食品の安全性評価は喫緊の課題の1つとなっている。

しかし、化粧品や医薬品等と比べて、食品ナノマテリアルの安全性評価は立ち遅れているのが現状であり、腸管吸収性・体内移行性に関する情報すらほとんど得られていない。体内吸収性すら明らかでない状況では、食品ナノマテリアルについてはリスク解析の必要性すら不明である。すなわち、冷静に鑑みると、食品ナノマテリアルを経口摂取しても、体内に吸収されない限り安全であり、また吸収されたとしても速やかに排泄される、あるいは蓄積せずに代謝されるのであればリスクは低いものと予想されることから、食品ナノマテリアルの吸収・分布・蓄積・排泄を詳細に評価し、今後のリスク解析の必要性の是非を、今こそ追求することが最重要課題と考えられる。

本観点から筆者らは、安全かつ有用なナノマテリアル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・動態・生体影響の三者連関と、曝露実態を加味した安全性評価研究によるナノマテリアルの安全科学研究（Nano-Safety Science）を推進している（図1）。特に、食品ナノマテリアルについては、リスク解析の必要性を判断するため、食品中で利用されている非晶質ナノシリカやナノ白金、ナノ銀等に関して、体内吸収性さらには体内動態情報の収集を試みており、体内に吸収される素材についてはオルガネラ移行性等をはじめとする細胞内動態を精査している。本総説では、一般的な話および経口曝露後の安全性ではないものの、先行して研究成果が蓄積されつつある経皮曝露後の安全性に焦点を絞らせていただき、特に、試薬グレードの非晶質ナノシリカの

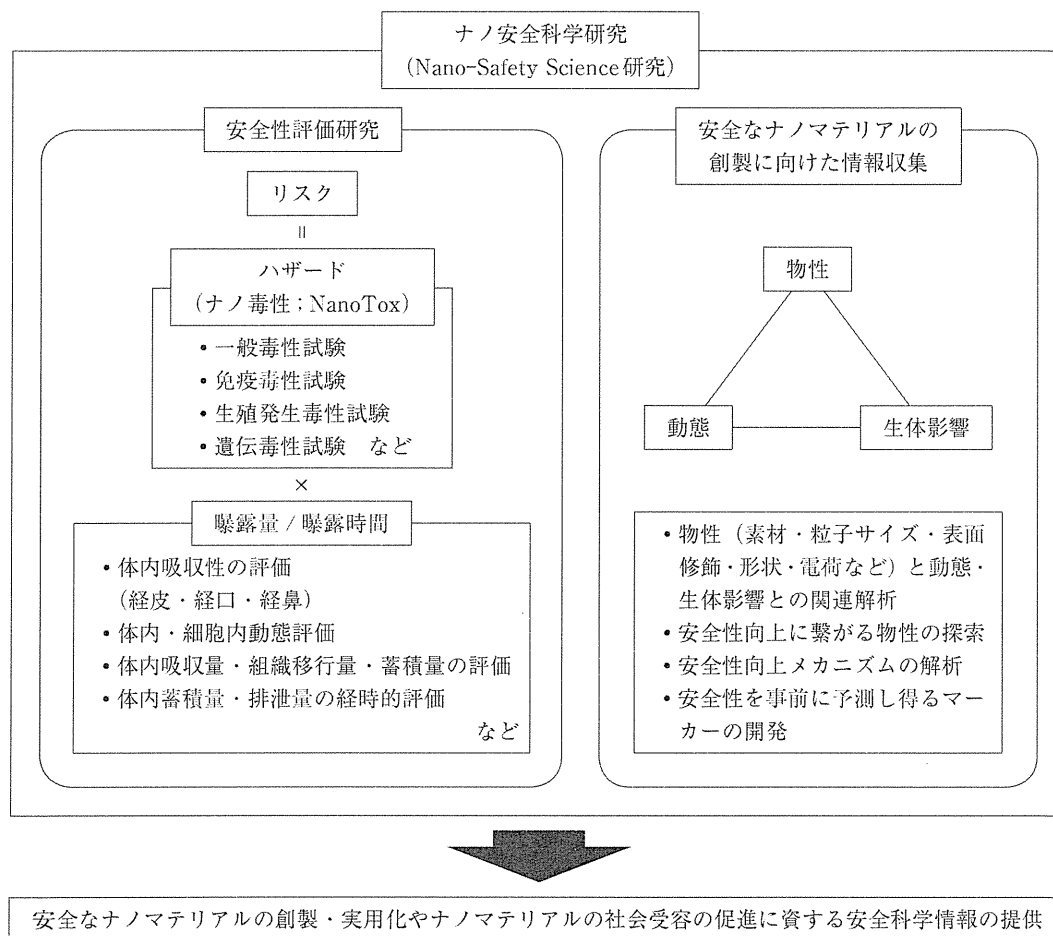


図1 ナノ安全科学研究の概略

体内動態評価を中心とした筆者らの取組みを紹介し、各方面の先生方からご意見・ご批判を仰ぎたい。

### Ⅲ 非晶質ナノシリカの体内吸収性評価

数あるナノマテリアルのなかでも非晶質ナノシリカ（以下、ナノシリカ）は人体に直接適用する製品（化粧品・食品・医薬品）において最も使用量が多い素材であり、2006年の国内年間使用量はおよそ13,500トン、世界での年間生産量は1メガトンを超える<sup>4-6)</sup>。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等の化粧品基材、歯磨き粉や歯の充填剤、さらには食品の固結防止剤として利用されている<sup>9)</sup>。ナノシリカは、食品衛生法により食品中に2%まで添加することが許可されているが、母乳代替食品および離乳食に使用してはならないという使用制限が規定されているのみで、その粒径や物性等に関する規定は存在していない。2009年に実施された日本食品添加物協会の調査によると、食品添加物として使用される非晶質シリカの一日摂取量は530 $\mu$ gであると推定されている。また、ナノシリカは微小化や高分散化することによって、被覆

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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>8)</sup>。

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、細胞質内のみに局在することを認めている<sup>9)</sup>。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<sup>9)</sup>。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負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<sup>10)</sup>。

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、試薬グレードの非品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., Kovoichich 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 Kazuma<sup>1</sup> Tsutsumi Yasuo<sup>1,2</sup>  
東阪 和馬<sup>1</sup>・堤 康央<sup>1,2</sup>

## Keyword

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<sup>1)</sup>。一次元が 100 nm 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<sup>2~11)</sup>。ここでは、非晶質ナノシリカの生殖発生毒性評価<sup>8)</sup>、ならびに、NM 曝露に対する安全性評価マーカーの探索<sup>9)</sup>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<sup>2,4,6~11)</sup>。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・胎仔に及ぼす影響の連関解析を実施した (図 2)<sup>8)</sup>。本検討では、粒子径 70 nm のナノシリカ (nSP70) と、粒子径 300, 1000 nm 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て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仔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

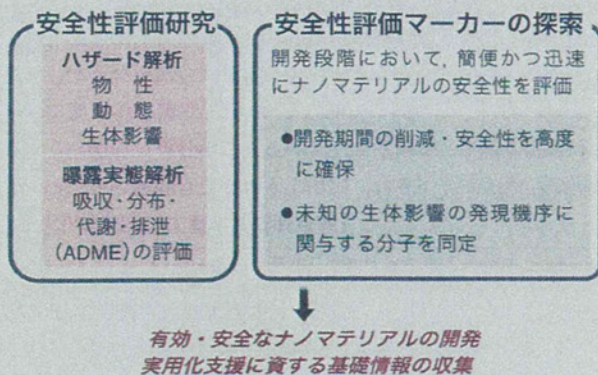


図 1 ナノ安全科学研究の目的



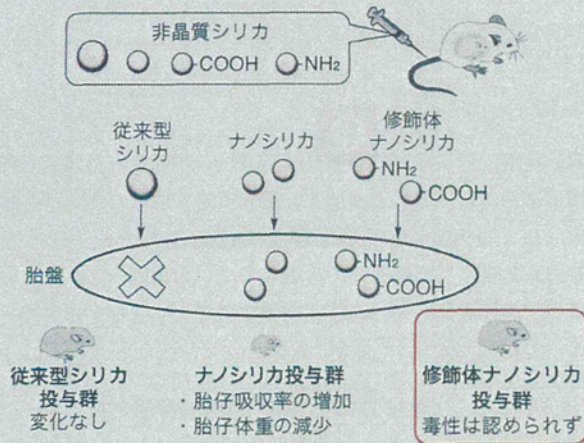


図2 ナノシリカの生殖発生毒性の評価

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<sup>8)</sup>。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の安全性を評価する安全性評価マーカーの開発を試みてきた<sup>9)</sup>。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

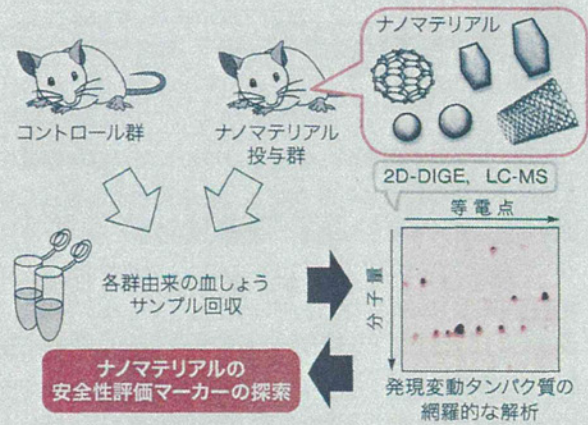


図3 安全性評価マーカーの探索

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<sup>9)</sup>。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。

【<sup>1)</sup>大阪大学大学院薬学研究科・

<sup>2)</sup>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<sup>1</sup>, 吉岡 靖雄<sup>1,2,3</sup>, 鍋師 裕美<sup>1</sup>, 吉川 友章<sup>1</sup>, 堤 康央<sup>1,2,3</sup>

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<sup>1-10)</sup>。

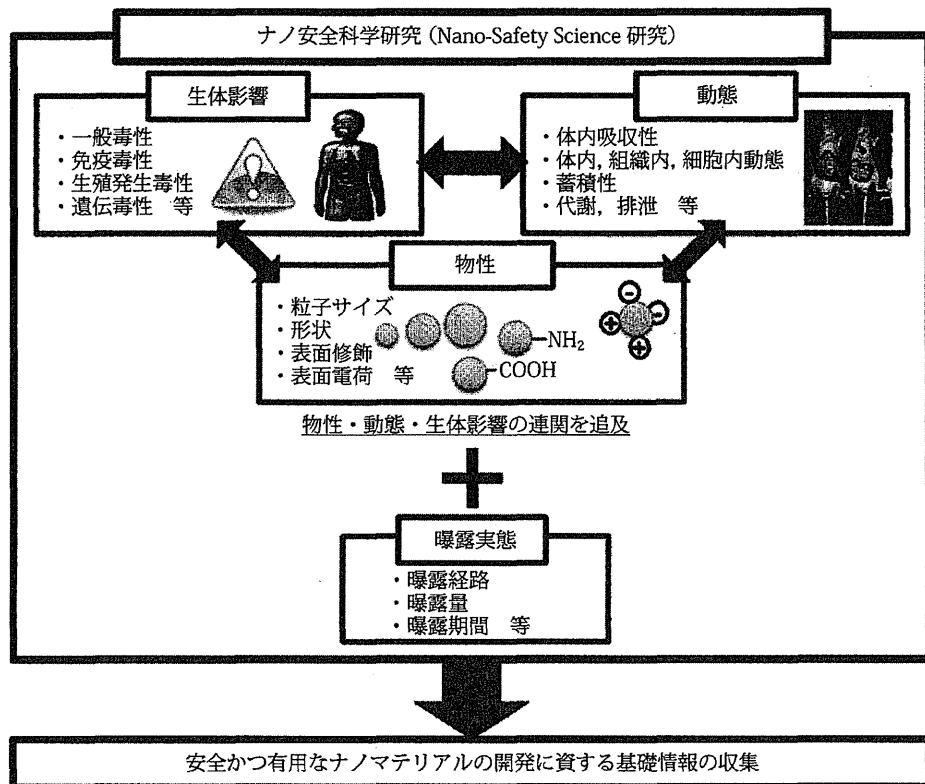


図1 ナノ安全科学研究の概略

## 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<sup>5)</sup>。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<sup>11)</sup>、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ふ、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

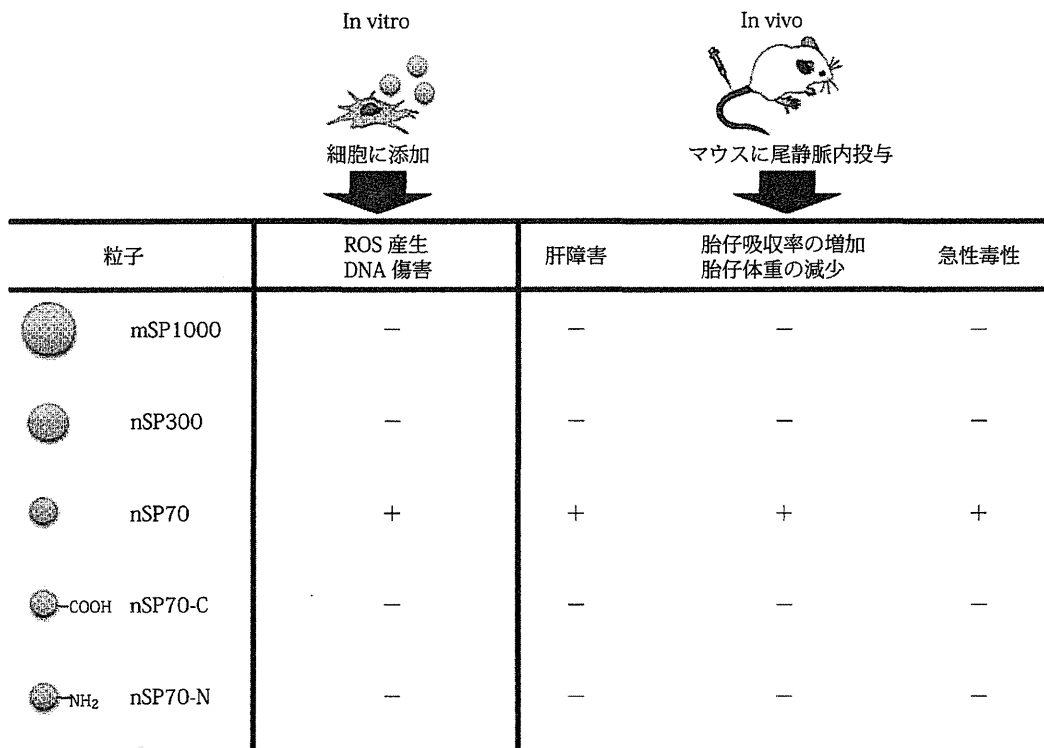


図2 非晶質ナノシリカのハザード評価