

Fig. 5. The role of autophagy in NALP3 inflammasome activation. Quality control of mitochondria is essential for cellular homeostasis, and this process is achieved through autophagy. When autophagy is inhibited, damaged mitochondria activate inflammasomes, resulting in exaggerated inflammation.

cells consists of the regulation of inflammation; therefore, decreased Treg cells induce exaggerated inflammation (Fig. 4). This inflammation induces Th1-type immunity, which subsequently induces rejection (Saito et al., 2007), inhibits the function of Treg cells (Yang et al., 2004), and induces endothelial dysfunction (Redman et al., 1999). Redman and Sargent (2010) proposed that the inflammatory drive of preeclampsia results from the three-way interactions among oxidative stress, ER stress and inflammatory responses. Inadequate autophagy of EVT may accelerate oxidative stress, ER stress and inflammation. Further studies are needed to clarify this hypothesis.

3. Conclusion

Autophagy plays an important role in trophoblast function under physiologically low oxygen conditions in normal pregnancy. Autophagy plays an important role in EVT invasion and vascular remodeling under a physiologically low oxygen concentration. Autophagy impaired by sENG may be involved in poor placentation due to impaired EVT invasion and poor vascular remodeling, systemic inflammation by activating inflammasome and induction of ER stress, and inadequate tolerance by reducing the pool of Treg cells in preeclampsia.

References

- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., Betz, A.G., 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 5, 266–271.
- Bildirici, I., Longtine, M.S., Chen, B., Nelson, D.M., 2012. Survival by self-destruction: a role for autophagy in the placenta? *Placenta* 33, 591–598.
- Broad, K.D., Keverne, E.B., 2011. Placental protection of the fetal brain during short-term food deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 15237–15241.
- Burton, G.J., Woods, A.W., Jauniaux, E., Kingdom, J.C., 2009. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 30, 473–482.
- Caniggia, I., Grisar-Graunsky, S., Kuliszewski, M., Post, M., Lye, S.J., 1999. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J. Clin. Invest.* 103, 1641–1650.
- Caniggia, I., Mostachfi, H., Winter, J., Gassmann, M., Lye, S.J., Kuliszewski, M., Post, M., 2000. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J. Clin. Invest.* 105, 577–587.
- Chang, Y.L., Wang, T.H., Chang, S.D., Chao, A.S., Hsieh, P.C., Wang, C.N., 2013. Increased autophagy in the placental territory of selective intrauterine growth-restricted monozygotic twins. *Prenat. Diagn.* 33, 187–190.
- Chen, B., Longtine, M.S., Nelson, D.M., 2012. Hypoxia induces autophagy in primary human trophoblasts. *Endocrinology* 153, 4946–4954.
- Curtis, S., Jones, C.J., Garrod, A., Hulme, C.H., Heazell, A.E., 2013. Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 26, 339–346.
- Farina, A., Sekizawa, A., De Sanctis, P., Purwosunu, Y., Okai, T., Cha, D.H., Kang, J.H., Vicenzi, C., Tempesta, A., Wibowo, N., Valvassori, L., Rizzo, N., 2008. Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks' gestation from women destined to develop preeclampsia. *Prenat. Diagn.* 28, 956–961.
- Fraser, R., Whitley, G.S., Johnstone, A.P., Host, A.J., Sebire, N.J., Thilaganathan, B., Cartwright, J.E., 2012. Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *J. Pathol.* 228, 322–332.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., Mandelboim, O., 2006. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* 12, 1065–1074.

- Hiby, S.E., Walker, J.J., O'Shaughnessy, K.M., Redman, C.W., Carrington, M., Trowsdale, J., Moffett, A., 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* 200, 957–965.
- Hung, T.H., Chen, S.F., Li, M.J., Yeh, Y.L., Hsieh, T.T., 2010. Differential effects of concomitant use of vitamins C and E on trophoblast apoptosis and autophagy between normoxia and hypoxia-reoxygenation. *PLoS One* 5, e12202.
- Hung, T.H., Chen, S.F., Lo, L.M., Li, M.J., Yeh, Y.L., Hsieh, T.T., 2012. Increased autophagy in placentas of intrauterine growth-restricted pregnancies. *PLoS One* 7, e40957.
- Ichimura, Y., Komatsu, M., 2011. Pathophysiological role of autophagy: lesson from autophagy-deficient mouse models. *Exp. Anim.* 60, 329–345.
- Juniaux, E., Watson, A., Burton, G., 2001. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184, 998–1003.
- Juniaux, E., Hempstock, J., Teng, C., Battaglia, F.C., Burton, G.J., 2005. Polyol concentrations in the fluid compartments of the human conceptus during the first trimester of pregnancy: maintenance of redox potential in a low oxygen environment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1171–1175.
- Jeyabalan, A., McGonigal, S., Gilmour, C., Hubel, C.A., Rajakumar, A., 2008. Circulating and placental endoglin concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta* 29, 555–563.
- Kadyrov, M., Schmitz, C., Black, S., Kaufmann, P., Huppertz, B., 2003. Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta* 24, 540–548.
- Kalkunte, S., Boij, R., Norris, W., Friedman, J., Lai, Z., Kurtis, J., Lim, K.H., Padbury, J.F., Matthiesen, L., Sharma, S., 2010. Sera from preeclampsia patients elicit symptoms of human disease in mice and provide a basis for an in vitro predictive assay. *Am. J. Pathol.* 177, 2387–2398.
- Kaufmann, P., Black, S., Huppertz, B., 2003. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.* 69, 1–7.
- Khong, T.Y., De Wolf, F., Robertson, W.B., Brosens, I., 1986. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93, 1049–1059.
- Lash, G.E., Bulmer, J.N., 2011. Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? *J. Reprod. Immunol.* 88, 156–164.
- Lash, G.E., Otun, H.A., Innes, B.A., Percival, K., Searle, R.F., Robson, S.C., Bulmer, J.N., 2010. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum. Reprod.* 25, 1137–1145.
- Lee, Y., Jung, J., Cho, K.J., Lee, S.K., Park, J.W., Oh, I.H., Kim, G.J., 2013. Increased SCF/c-kit by hypoxia promotes autophagy of human placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells via regulating the phosphorylation of mTOR. *J. Cell. Biochem.* 114, 79–88.
- Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F., Maynard, S.E., Sachs, B.P., Sibai, B.M., Epstein, F.H., Romero, R., Thadhani, R., Karumanchi, S.A., CPEP Study Group, 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355, 992–1005.
- Lyall, F., Simpson, H., Bulmer, J.N., Barber, A., Robson, S.C., 2001. Transforming growth factor- β expression in human placenta and placental bed in third trimester normal pregnancy preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am. J. Pathol.* 159, 1827–1838.
- Meekins, J.W., McLaughlin, P.J., West, D.C., McFadyen, I.R., Johnson, P.M., 1994. Endothelial cell activation by tumour necrosis factor- α (TNF- α) and the development of pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 110–114.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B., 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313–326.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 27, 107–132.
- Mulla, M.J., Myrtolli, K., Potter, J., Boeras, C., Kavathas, P.B., Sfakianaki, A.K., Tadesse, S., Norwitz, E.R., Guller, S., Abrahams, V.M., 2011. Uric acid induces trophoblast IL-1 β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 542–548.
- Nakashima, A., Yamanaka-Tatematsu, M., Fujita, N., Koizumi, K., Shima, T., Yoshida, T., Nikaido, T., Okamoto, A., Yoshimori, T., Saito, S., 2013. Impaired autophagy by soluble endoglin under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. *Autophagy* 9, 303–316.
- Naruse, K., Lash, G.E., Bulmer, J.N., Innes, B.A., Otun, H.A., Searle, R.F., Robson, S.C., 2009a. The urokinase plasminogen activator (uPA) system in uterine natural killer cells in the placental bed during early pregnancy. *Placenta* 30, 398–404.
- Naruse, K., Lash, G.E., Innes, B.A., Otun, H.A., Searle, R.F., Robson, S.C., Bulmer, J.N., 2009b. Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2 MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Hum. Reprod.* 24, 553–561.
- Oh, S.Y., Choi, S.J., Kim, K.H., Cho, E.Y., Kim, J.H., Roh, C.R., 2008. Autophagy-related proteins, LC3 and Beclin-1 in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *Reprod. Sci.* 15, 912–920.
- Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W.B., Brosens, I., 1980. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1, 3–19.
- Pursiheimo, J.P., Rantanen, K., Heikkinen, P.T., Johansen, T., Jaakkola, P.M., 2009. Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* 28, 334–344.
- Redman, C.W., Sargent, I.L., 2010. Immunology of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 534–543.
- Redman, C.W., Sacks, G.P., Sargent, I.L., 1999. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 499–506.
- Saito, S., Nakashima, A., 2013. The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia. *Placenta* 27, S79–S84.
- Saito, S., Umekage, H., Sakamoto, Y., Sakai, M., Tanebe, K., Sasaki, Y., Morikawa, H., 1999. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41, 297–306.
- Saito, S., Sakai, M., Sasaki, Y., Nakashima, A., Shiozaki, A., 2007. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 76, 30–39.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., Akira, S., 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456, 264–268.
- Samstein, R.M., Josefowicz, S.Z., Arvey, A., Treuting, P.M., Rudensky, A.Y., 2012. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150, 29–38.
- Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., Saito, S., 2004. Decidual and peripheral blood CD4+ CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 347–353.
- Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M., Ito, M., Shima, T., Shiozaki, A., Rolinski, J., Saito, S., 2007. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 139–145.
- Shen, Z.Y., Li, E.M., Lu, S.Q., Shen, J., Cai, Y.M., Wu, Y.E., Zheng, R.M., Tan, L.J., Xu, L.Y., 2008. Autophagic and apoptotic cell death in amniotic epithelial cells. *Placenta* 29, 956–961.
- Signorelli, P., Avagliano, L., Virgili, E., Gagliostro, V., Doi, P., Braidotti, P., Bulfamante, G.P., Ghidoni, R., Marconi, A.M., 2011. Autophagy in term normal human placentas. *Placenta* 32, 482–485.
- Smith, S.D., Dunk, C.E., Aplin, J.D., Harris, L.K., Jones, R.L., 2009. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am. J. Pathol.* 174, 1959–1971.
- Stark, J.M., 1993. Pre-eclampsia and cytokine induced oxidative stress. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 100, 105–109.
- Steegers, E.A., von Dadelszen, P., Duvetok, J.J., Pijnenborg, R., 2010. Preeclampsia. *Lancet* 376, 631–644.
- Stepan, H., Krämer, T., Faber, R., 2007. Maternal plasma concentrations of soluble endoglin in pregnancies with intrauterine growth restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2831–2834.
- Tuuli, M.G., Longtine, M.S., Nelson, D.M., 2011. Review: oxygen and trophoblast biology—a source of controversy. *Placenta* 32, S109–S118.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdoah, Y., Lim, K.H., Yuan, H.T., Libermann, T.A., Stillman, I.E., Roberts, D., D'Amore, P.A., Epstein, F.H., Sellke, F.W., Romero, R., Sukhatme, V.P., Letarte, M., Karumanchi, S.A., 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12, 642–649.
- Yang, Y., Huang, C.T., Huang, X., Pardoll, D.M., 2004. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat. Immunol.* 5, 508–515.

- Yoshizaki, T., Kusunoki, C., Kondo, M., Yasuda, M., Kume, S., Morino, K., Sekine, O., Ugi, S., Uzu, T., Nishio, Y., Kashiwagi, A., Maegawa, H., 2012. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 352–357.
- Zhou, Y., Damsky, C.H., Chiu, K., Roberts, J.M., Fisher, S.J., 1993. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J. Clin. Invest.* 91, 950–960.

アンチエイジング等
高機能化粧品開発を考える

Technology

経皮吸収性に着目した ナノマテリアルの安全性評価研究

大阪大学大学院 薬学研究科 毒理学分野¹⁾, 大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター²⁾,
医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト³⁾, 医薬基盤研究所 抗体スクリーニングプロジェクト⁴⁾

東阪和馬¹⁾, 吉岡靖雄^{1,2)}, 堤 康央^{1,2,3,4)}

KAZUMA HIGASHISAKA,

YASUO YOSHIOKA,

YASUO TSUTSUMI

1 ナノマテリアルの実用化

20世紀以降、科学技術の発展を基盤として産業化／工業化が進展することで、大量生産、大量消費の社会を生み出し、われわれ人類の生活水準は格段に向上してきた。そして、21世紀における現在でも科学技術の発展はとどまることなく、人類の生活の質の向上に向けて、さまざまなテクノロジーが開発されている。特に近年では、革新的なナノテクノロジーの進展も相まって、ナノマテリアルの開発・実用化が世界的に進んでいる。欧州委員会が発表する定義によると、「ナノマテリアル」とは、非結合状態、または強凝集体（アグリゲート）または弱凝集体（アグロメレート）であり、個数濃度のサイズ分布で50%以上の粒子について1つ以上の外径が1 nm から100nm のサイズ範囲である粒子を含む、自然の、または偶然にできた、または製造された材料を意味する¹⁾。例えば、カーボンナノチューブやフラーレンといった新素材や、ナノシリカやナノ酸化チタンなどの従来から使用されてきたサブミクロンサイズ（数百nm～数十 μ m）以上の素材を、直径100nm以下に微小化したものが開発されている。

ナノマテリアルは、その粒子径の微小化に伴い比表面積が劇的に増大した結果、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材に比べて、電気的・磁氣的・光学的特性や組織浸

透性などが飛躍的に向上する。そのため、これら特有の機能を活かし、すでに化粧品・医薬品・食品・電子部品など、さまざまな産業分野の製品に実用化されている。例えば、化粧品のファンデーションや紫外線遮蔽剤として利用されている非晶質ナノシリカ（以下、ナノシリカと表記）や酸化チタンは、粒子径を微小化することによって使用感や紫外線遮蔽能を向上させることが可能である。そのため、サンスクリーン、美白剤、アンチエイジング剤などの目的により、粒子径の微小化、および経皮適用製品への応用が一層進んでいる。

さらに近年では、ナノサイズのものばかりではなく、抗体や分子と同程度の大きさ（10nm以下）にまで制御されたナノマテリアル（われわれは、これら素材をサブナノマテリアルとして定義、提唱している）が開発されている。これらサブナノマテリアルは、いまだ定義そのものがないものではあるものの、ナノマテリアルとも異なる体内・細胞内動態を示すなど、ナノマテリアルと分子の特性を併せ持つ可能性が示されており、新たな素材として期待されている。すなわち、ナノマテリアルは高度な生活水準を誇る現代人にとって、もはや必要不可欠な存在となっており、今後も分野を問わずあらゆる領域で、その使用拡大やさらなる有効活用が期待されている。

2

ナノマテリアルの 安全性評価の必要性

近年、われわれの薬・食・環境に対する安全への懸念や健康への関心が年々高まりつつある。例えば、小麦加水分解物含有石鹼「茶のしずく石鹼」の事例にみられるように、皮膚における小麦抗原の非意図的な曝露により、重篤な食物アレルギーを発症することが先般世間を賑わせた²⁾。これは、ナノマテリアルの安全性評価においても、ナノマテリアルの実用化に伴う意図的な経皮曝露機会の増加や、今後ますますその開発・実用化が進展することを鑑みると、現実の曝露経路を加味した検討が必要不可欠であることを示唆するものといえる。

一般的に、経皮曝露する化学物質の安全性を評価するうえで重要な点は、体内吸収性を精査することである。体内に吸収される物質は、全身のあらゆる組織へ移行する可能性があるため、曝露局所のみではなく、全身を対象として生体影響を評価する必要がある。しかしながら、これまで経皮曝露を介した微粒子影響が語られることは非常に少なかった。これは、分子量500ダルトン以上の物質を透過させないといわれる強固な皮膚バリア³⁾を、サブミクロンサイズ以上の粒子が突破することは困難であろうとの認識によるものである。

一方で、ナノマテリアルが開発され、微粒子が皮膚を透過して体内に侵入することはないという従来の概念は覆されつつある。例えば、Rancanらは、粒子径の微小化に伴い、ナノシリカが経皮吸収され、体内に移行することを報告している⁴⁾。また、凝集性の高さから、皮膚を介して体内に侵入することはないといわれてきたナノ酸化チタンにおいても、そ

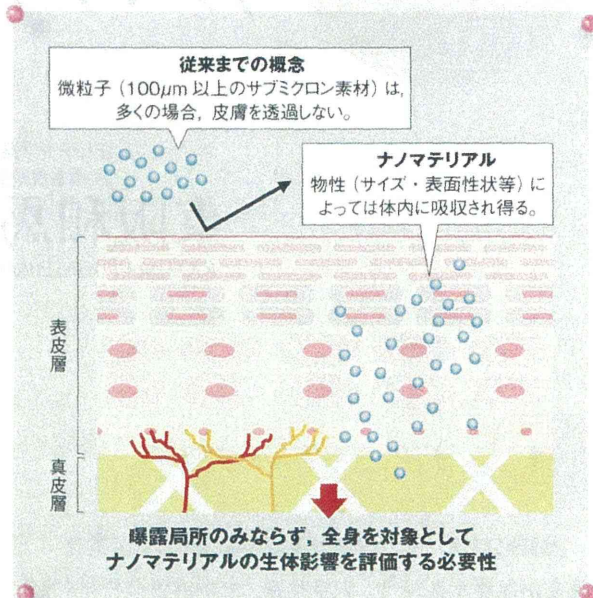


図1 安全なナノマテリアルの開発に向けた安全性評価の必要性

の物性によっては皮膚を介して体内に吸収される可能性が示されている^{5,6)}。このように、ナノマテリアルが体内に移行し得るという事実は、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(図1)。すなわち、ナノマテリアルが有する、粒子径・表面電荷などの物性や、体内吸収性・組織分布といった曝露実態・動態(蓄積性を含めたADME情報)と、ADME情報に基づいた毒性解析、いわゆるADMET解析を実施し、物性-体内・細胞内動態-安全性の連関を定量的に評価、理解することで、ナノマテリアルのリスク解析に資する情報を集積することが求められる。

このような観点からわれわれは、ヒトの健康確保を第一義的な目的とし、ナノマテリアルの安全性情報の収集を目的としたNano-Safety Science(ナノ安全科学)研究と、安全なものはその利用促進に、一方で安全性に懸念があるものに関しては単に危険性を訴え規制するのではなく、安全性を

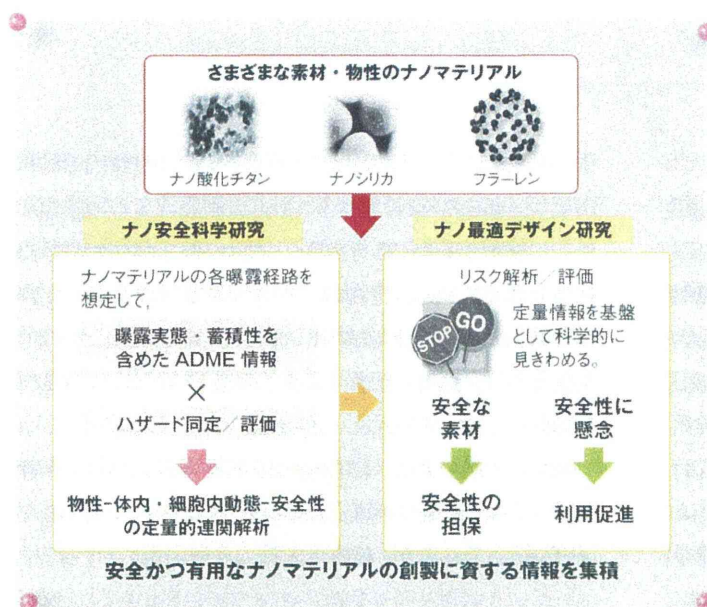


図2 ナノ安全科学研究の概要

担保したものに仕上げていく Nano-Safety Design (ナノ最適デザイン) 研究を両輪とした、独自のナノ安全性評価研究を推進している (図2)。本稿では、われわれの研究成果のなかから、化粧品分野において化粧品基材としてすでに実用化されている、ナノシリカを中心に、ナノシリカの経皮吸収性に関する検討とともに、曝露局所である皮膚細胞を対象としたハザード情報、および体内移行後のハザード情報について紹介する。

3 ナノシリカの経皮吸収性

本検討では、実験用グレードである、一次粒径が70nmのナノシリカ (nSP70)、および、300nm、1,000nmの従来型シリカ (nSP300、mSP1000) を用いた。まず、透過型電子顕微鏡 (TEM) により、各シリカの形状を観察したところ、粒

子径にかかわらず、表面の滑らかな球状の素材であることが示された。また、動的光散乱法を用いて平均二次粒径を測定したところ、いずれの粒子も単一のピークを示し、その値は TEM 解析の結果とほぼ同等の値を示したことから、これらの粒子の分散性が高いことが示された。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への移行性を TEM により観察した。その結果、nSP300やmSP1000は、表皮にすら到達しない一方で、nSP70のみが皮膚バリアを突破し、神経

や血管が豊富に存在する真皮層にまで侵入することが明らかとなった。さらに、nSP70は、投与局所近傍の所属リンパ節や脳組織へ移行することも見出した^{7,8)}。

これらの結果や、上述の報告などを踏まえると、ナノサイズにまで微小化された微粒子の中には、経皮的に吸収される粒子も存在することが示唆される。したがって今後、体内蓄積性・排泄などを考慮し、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。さらに、nSP70のみが皮膚バリアを突破するという可能性は、ナノマテリアルを化粧品に適用することで、皮膚表面のみならず、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と考えられる。すなわち、将来的に、ナノマテリアルの分散性・凝集状態などの物性や溶媒などを適切に制御し、各標的部位に効率的にナノマテリアルを送達することで、有用性と安全性を具備した新規経皮適用製品が開発可能であると期待される。

4 ナノシリカ曝露によるハザード同定

先述のように、われわれはナノ安全科学研究の一環から、ナノマテリアルの曝露実態情報に基づく、安全性評価を実施している。その検討のなかで、これまでに、多くのナノシリカ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、従来型シリカでは認められないハザードを発現してしまう可能性を見出してきた。ここでは、これら知見について、われわれの検討結果を踏まえて紹介したい。

前項において、nSP70のみが皮膚バリアを突破するという可能性を見出したことから、経皮吸収後のナノシリカの動態を精査するため、ヒト皮膚角化細胞を用い、nSP70、nSP300、mSP1000の細胞内動態を調べた。その結果、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在することが明らかとなった⁷⁾。さらに、大量に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 障害を生じる可能性が見出された⁹⁾。次に、実際に使用されているナノシリカがさまざま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、その表面をアミノ基やカルボキシル基で修飾したナノシリカ (nSP70-N、nSP70-C) を用い、先ほどと同様に細胞内動態を解析した。その結果、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た。また、nSP70作用群で認められた細胞傷害性や ROS の産生、DNA 障害は nSP70-N、nSP70-C 作用群では認められないことが

明らかとなった¹⁰⁾。したがって、現在、nSP70の核内・細胞内移行メカニズムを追究するとともに、細胞内での局在を定量的に解析することで、ハザード発現の機序解明に向けた検討を進めている。今後は、ナノシリカの表面性状と生体影響誘発との連関をより詳細に解析していくことで、ナノシリカの安全性を高度に担保するための基礎情報の集積につながるものと考えられる。

次に、上述のナノシリカの経皮吸収性評価における曝露局所の影響を詳細に解析したところ、皮膚バリアを突破したnSP70塗布群のみが、経皮塗布後の皮膚局所において、アポトーシスを誘発する可能性に注意する必要があることを明らかとした⁷⁾。一方で、本検討は過剰量を塗布した検討であることから、今後、ハザード発現の閾値を追究するなど、リスク解析に資する情報を集積していくことが必要不可欠であると考えられる。さらに、nSP70の経皮塗布の影響を解析するにあたっては、曝露局所の影響のみならず、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過剰量を投与したにもかかわらず、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。

また、われわれは、ナノシリカが全身循環した際の影響について、ハザード同定を目的に、各種一般毒性試験、特殊毒性試験を実施している。その結果、nSP70-N や nSP70-C など、表面修飾を施したナノシリカでは、各検討において、目立ったハザードは認められなかった。一方で、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、nSP70が、①消費性凝固障害を惹起し得ること¹¹⁾、②胎盤障害を誘発し、胎仔発育障害や流産を惹起し得ること¹²⁾、③経皮的に吸収させることで、アトピー性皮膚

炎の悪化などのアレルギー症状を誘発し得ること¹³⁾を認めている。なお、これらハザードは従来型シリカである nSP300, mSP1000では認められず、一部のナノシリカが従来型の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。

これら知見は、ナノシリカが、その物性によってはハザードの誘発に注意を払う必要がある一方で、逆に、表面性状を適切に制御することで、高度に安全性を担保できることを示唆するものである。今後は、各ナノシリカについて、体内吸収量の定量的解析や、ハザード発現の閾値などをより詳細に解析することで、リスク解析に資する情報を引き続き収集するとともに、ハザード発現メカニズムを詳細に解析することで、ナノ最適デザインに資する具体的情報を収集することが必要であると考えられる。

5 今後の課題

昨今、ナノマテリアルの実用化は、あらゆる分野において拡大の一途を辿っており（ナノマテリアルの世界市場が、2015年には250兆円にまで成長するとの見通しもある）、われわれの豊かな生活の成立にもはや必須のものとなっている。したがって、ナノマテリアルの安全・安心な使用に向けては、ナノマテリアルの安全性を保証するガイドラインの整備・策定が待望されている。ナノマテリアル特有の規制・ガイドラインの策定にあたり、ナノマテリアルの分散/凝集状態や純度といった品質情報と体内動態および安全性の関連について関心が高まっている。この点を考慮して、今後はナノマテリアルのこれら物性・品質情報と体内動態および安全性の関連を明確化することで、ナノマテリアル特有の物性・品質

に応じた規制・ガイドラインの策定に貢献できるであろう。知財技術立国を目指すわが国としては、ナノマテリアルの開発・実用化をやみくもに規制するのではなく、ナノテクノロジーの恩恵を社会が最大限に享受できるよう、ナノ産業の育成や発展を強力に支援しつつ、ナノマテリアルの安全性を高度に保障し、ヒトの健康環境を確保していかねばならない。

日本化粧品工業連合会によると、化粧品原料に適用されている多くのナノマテリアルは、製造工程では、いずれもナノサイズに分散している一方で、原料の保管段階あるいは製品への適用段階においては、粒子が凝集状態で存在していると考えられている。このことはナノマテリアルの安全性評価研究を進めるうえで考慮すべき点であり、ナノマテリアルの安全性確保に向けては、実サンプルを用いた安全性評価が必須であることはいうまでもない。この点われわれは、既実用化・実用化予定のナノマテリアルの安全性評価、さらには安全なナノマテリアルの開発支援をより一層加速させることを計画している。

また、今回は詳細には述べなかったが、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、今後、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。この点においてわれわれは、iPS細胞に加え、ES細胞を用いた *in vitro* におけるナノマテリアルの安全性予測（EST法）に向けた基礎情報の収集や基盤技術開発も試みている。今後、より詳細な検討が必要ではあるものの、これらEST法を用いることで、ナノマテリアルの安全性を精度よく予測・評価することが可能となり、安全なナノマテリアルを効率よくスクリーニングし、ナノマテリアルの開発支援の一助となることを期待している。



おわりに

本稿には、われわれが推進するナノ安全科学研究のなかから、実験用グレードのナノシリカを用いた検討を中心として、従来までのサブミクロンサイズの素材とは異なる、ナノマテリアルの体内動態や生体影響に関する情報の一部を紹介した。今後、さらに小さな「サブナノマテリアル(1~10nm)」の台頭、まさに、アルブミン~抗体のサイズ領域の素材が加速度的に開発、実用化されることを一層鑑み、ナノ安全科学研究をさらに推し進め、ナノマテリアルの物性と生体影響との連関を追究することで、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、ひいてはナノマテリアル産業界のさらなる発展につながると期待している。

参考文献

- 1) *Official Journal of the European Union*, L275/38-40(2011)
- 2) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, et al: Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, **127**(2), 531-3 e1-3(2011)
- 3) Bos JD, Meinardi MM: The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*, **9**(3), 165-169(2000)
- 4) Rancan F, Gao Q, Graf C, Troppens S, Hadam S, Hackbarth S, et al: Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS Nano*, **6**(8), 6829-6842(2012)
- 5) Wu J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, et al: Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett*, **191**(1), 1-8(2009)
- 6) Senzui M, Tamura T, Miura K, Ikarashi Y, Watanabe Y, Fujii M: Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *J Toxicol Sci*, **35**(1), 107-113(2010)
- 7) Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Matsuo K, Arimori A, et al: Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials*, **32**(11), 2713-2724(2011)
- 8) Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Akase T, Yoshioka Y, et al: Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days. *Pharmazie*, **67**(8), 742-743(2012)
- 9) Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Tochigi S, Kondoh S, et al: Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Part Fibre Toxicol*, **8**, 1(2011)
- 10) Yoshida T, Yoshioka Y, Matsuyama K, Nakazato Y, Tochigi S, Hirai T, et al: Surface modification of amorphous nanosilica particles suppresses nanosilica-induced cytotoxicity, ROS generation, and DNA damage in various mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **427**(4), 748-752(2012)
- 11) Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Arimori A, Isobe M, et al: Amorphous nanosilicas induce consumptive coagulopathy after systemic exposure. *Nanotechnology*, **23**(4), 045101(2012)
- 12) Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, et al: Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol*, **6**(5), 321-328(2011)
- 13) Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Tochigi S, Ichihashi K, et al: Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection. *Part Fibre Toxicol*, **9**, 3(2012)

