

## 安全性確保を目指したナノマテリアルの生殖発生影響評価

山下 浩平, 吉岡 靖雄\*

## The Safety Assessment of Nanomaterials in Reproductive Developmental Field

Kohei Yamashita and Yasuo Yoshioka\*

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

(Received August 31, 2011)

A diverse array of nanomaterials (NMs) such as amorphous nanosilica and carbon nanotubes have become widespread in use due to the development of nanotechnology. NMs are already being applied in universal fields because they have unique physicochemical properties. On the other hand, the increasing use of NMs has raised public concern about their potential risks to human health. In particular, recent reports indicated that carbon nanotubes induced mesothelioma-like lesions in mice, in a way similar to those induced by crocidolite asbestos. However, current knowledge of the potential risk of nanomaterials is considered insufficient. Because NMs have the potential to improve the quality of human life, it is essential to ensure the safety of NMs and provide information for designing NMs with safety. Especially, few studies have examined the effect of NMs on maintenance of pregnancy. Similar to the cases of thalidomide, a lot of evidence shows that fetuses are affected more than adults by a variety of environmental toxins because of physiological immaturity. Therefore it is essential to examine the effect of NMs on fetuses and pregnancies. Here we introduce the potential risk of amorphous nanosilica, most widely used NMs in food and the cosmetics field, to induce fetotoxicity and useful information for developing NMs with safety.

**Key words**——nanomaterial; fetotoxicity; Nano-Safety Science; nanosilica

## 1. はじめに

近年、ナノシリカやナノ酸化チタン、フラーレンを始めとする種々のナノマテリアルが開発されている。既に多くのナノ製品が上市され、医薬品や化粧品、食品といった人体に直接適用する分野での実用化が進展している。国際標準化機構は、一次元の大きさが 100 nm 以下のものをナノマテリアルと定義づけており、組織浸透性・電子反応性などの点で、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは全く異なる画期的機能を発揮することから、種々の産業にパラダイムシフトを起こすものと期待されている。現在では、いわゆるサブナノ素材 (0.1–10 nm) も既に台頭してきており、今後も数多くの新規ナノマテリアルが開発されると期待されている。ナノマテリアル産業の世界市場は急成長を遂げており、20

年後には年間生産 1 兆ドルに達すると予想されている。このように、今やナノマテリアルは、世界経済の牽引役として人類に多大な恩恵をもたらす不可欠な存在になりつつある。

一方で、欧米各国を中心として、ナノマテリアル特有の革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期せぬ毒性を発現してしまうこと (NanoTox) が懸念されている。しかし、ナノマテリアル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。昨今の薬・食・環境に対する安全への懸念や健康への関心の高まりも相俟って、ナノテクノロジーやゲノム創薬・プロテオーム創薬といった 21 世紀テクノロジーにより産み出されてくる医薬品や種々化学物質には、安全・安心であることがこれまで以上に強く求められている。また、ナノマテリアルは、われわれの生活の質や産業を飛躍的に向上し得るため、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性情報を幅広く

\*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 1-6)

\*e-mail: yasuo@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。

収集し、これら情報を基盤としてナノマテリアルを有効かつ安全に使用していくこと、及び安全なナノマテリアルを開発していくことが必要不可欠である。

本観点からわれわれは、有効かつ安全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て、ナノマテリアルの物性—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 (Fig. 1)。具体的には、①ナノマテリアルの材質や粒子径、表面修飾といった物性評価、②ナノマテリアルの体内吸収性と体内/細胞内動態の解析、③ナノマテリアルの生体影響評価を実施し、ナノマテリアルの物性と安全性の因果関係を明確化することによって、最終的にナノマテリアルの安全性予測・有害性回避法の確立、さらには、有効かつ安全なナノマテリアルの設計に資する基礎情報となるものと考えている。

これらの検討を進める中で、われわれは既に、直径 100 nm 以下の非晶質ナノシリカが、経皮吸収され、全身に分布することを明らかにするとともに、遺伝毒性や肝毒性などを誘発し得ることを指摘している。以上の結果は、非晶質ナノシリカに曝露されることで、体内へと侵入した非晶質ナノシリカが生

殖器官・胎児へ移行した場合、催奇形性を始めとする予期せぬ生殖発生影響を発現し得る可能性をも示唆している。胎児や乳幼児は、血液脳関門や免疫系といった生体防御機構が未発達であるため、成人では影響が誘発されない量の曝露であっても大きな影響が及ぶ可能性がある。したがって今後は、過去のサリドマイドやメラミン問題等の惨劇を繰り返さないためにも、次世代影響を見据えた胎児に対する安全性、及び新生児の成長過程における影響を精査することが必要不可欠であり、無影響量や無毒性量を設定するなど、科学的根拠に基づいたリスク解析を推進する必要がある。しかしナノマテリアルの生殖組織への移行性やその生殖発生影響を検討した例は少ない。

そこで本総説では、ナノマテリアルの中でも生産量・使用量の点で最も汎用されている非晶質シリカの胎盤・胎児への移行性（曝露実態の解析）と生殖発生影響評価についてわれわれの最新の知見を紹介する。特に、最も重要な安全なナノマテリアルの開発に資する情報に関して、最後に言及したい。

## 2. 非晶質ナノシリカの体内動態評価

非晶質シリカは、既に医薬品や化粧品、食品など、幅広い領域で使用されており、現在使用されて

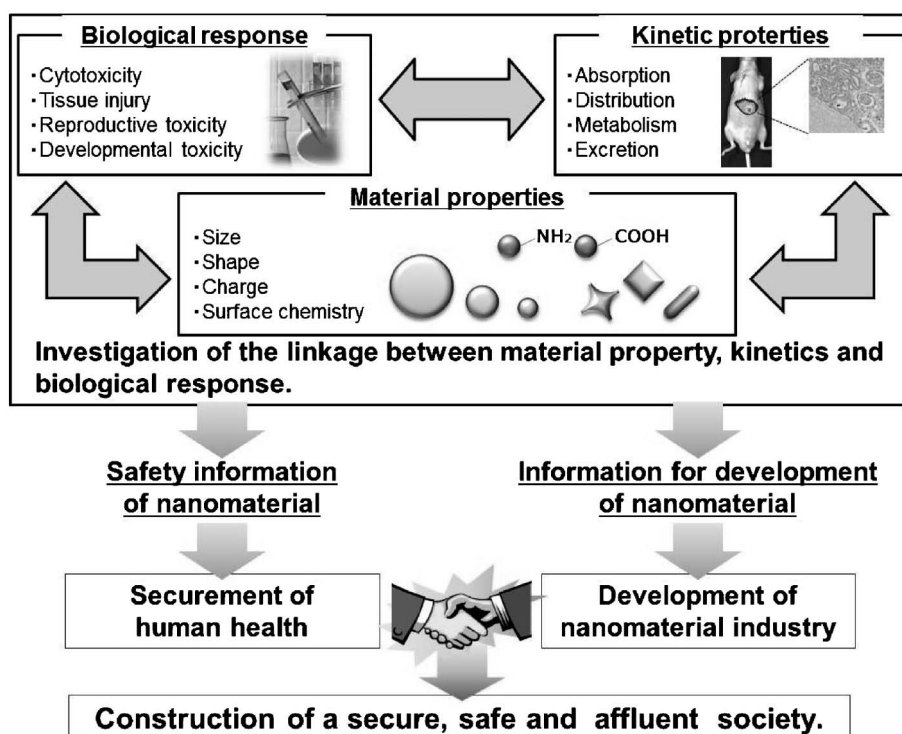


Fig. 1. Scheme of Our Safety Assessment of Nanomaterials

いるものの多くがナノサイズの人工合成物である。従来使用されていた非晶質シリカは凝集し易いため、実際の使用条件下ではサブミクロンサイズ以上であった。しかし、粒子の微小化に伴い、使用感や透明性、吸湿性の向上などの様々な有用機能が付与できることから、この数年でサイズダウンや分散性の向上が加速度的に進展しており、直径が 2.5 nm のものまで開発されている。現在、わが国において、非晶質シリカは、食品中に最大 2%、化粧品中には最大 20% も配合することが許可されている。この基準は、従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカの安全性情報を基として、経皮・経口投与により体内に移行しないであろうという、過去の知見に基づいて定められており、これらの規制は粒子サイズにまでは言及していない。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と位置づけられる。そこで本研究では、粒子径や表面修飾の異なる非晶質シリカを用いて、非晶質ナノシリカの物性・動態・生殖発生影響（生殖発生への安全性）の連関解析における基盤情報の集積を図った。

本検討には、粒子径が 1000 nm (mSP1000)、300 nm (nSP300) の従来から使用されてきたサブミクロンサイズの非晶質シリカ、及びナノサイズである粒子径が 70 nm (nSP70) の試薬グレードの非晶質ナノシリカを用いた。われわれはこれまでに、皮膚に塗布した非晶質ナノシリカが、角質層を通過し、表皮層にまで到達するとともに、全身血流にまで移行することを明らかとしている。そこで、各非晶質シリカを妊娠マウスに尾静脈内投与し、体内動態を透過型電子顕微鏡により評価した。その結果、mSP1000 や nSP300 は胎盤組織への移行が認められなかったのに対して、nSP70 は胎盤の栄養膜層や迷宮層部分に移行していることが確認された。さらに nSP70 投与群においてのみ、胎仔の脳や肝臓組織への移行が認められた。以上の結果より、nSP70 は血液胎盤関門を通過し、胎仔にまで移行することが明らかとなった (Fig. 2)。一般に血液胎盤関門は分子量 1000 以上の物質を受動的に通過させない。したがって、nSP70 の胎仔への移行にはなんらかの能動的な機構が関与していると考えられる。現在、胎盤や胎仔に移行する nSP70 の量を定量的に測定するとともに、移行した nSP70 の蓄積量・期間に関する詳細な情報収集を進めている。

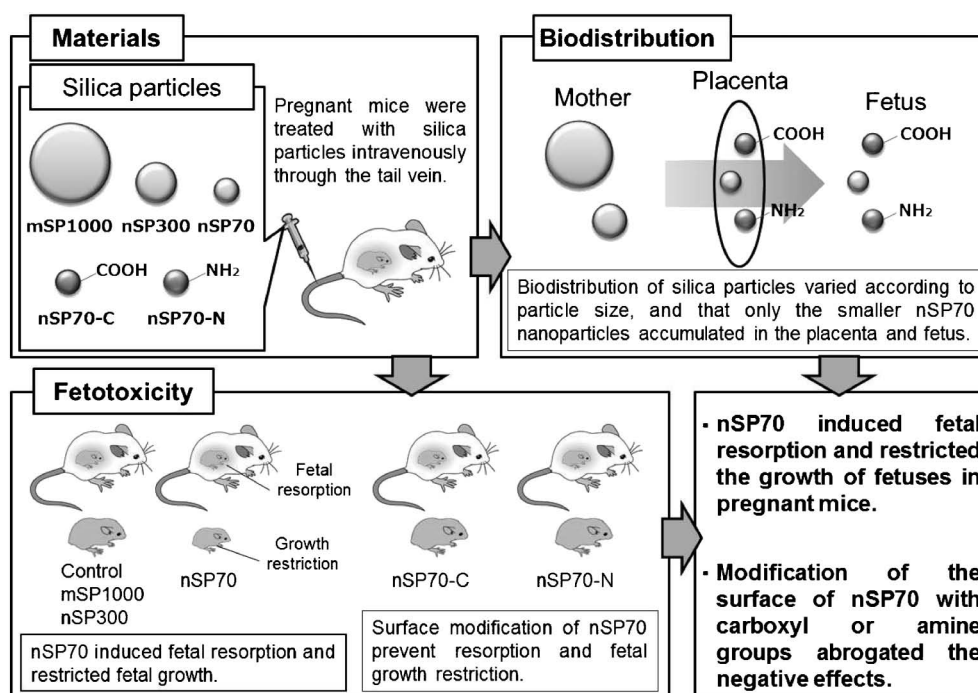


Fig. 2. Biodistribution and Fetotoxicity of Nanosilica Particles

### 3. 非晶質ナノシリカの胎仔への影響解析

われわれはこれまでに *in vitro* の検討から、nSP70 が細胞傷害性や DNA 傷害性を示すことを明らかにしている。したがって、胎盤・胎仔に nSP70 が移行することにより、胎盤組織に傷害を与え、妊娠の維持及び胎仔の発育に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、妊娠時の非晶質ナノシリカ曝露による母体・胎仔への影響を評価した。

ナノシリカが胎仔へ及ぼす影響を評価するため、妊娠後期のマウスに各粒子径の非晶質シリカ (mSP1000, nSP300, nSP70) を母体の尾静脈より過剰量投与し、非晶質シリカのハザード情報の収集を図った。なお、いずれの群においても、母体の肝障害マーカーや腎障害マーカー、心拍数などに影響を与えない投与量で投与している。出産直前に帝王切開により子宮を摘出し、子宮重量、胎仔数、吸収胎仔数を評価した結果、mSP1000, nSP300 投与群ではコントロール群と比較して変化は認められなかったが、nSP70 投与群では胎仔吸収率の増加が認められ、子宮重量も有意に低下していた。さらに、子宮を解剖し、胎仔を観察するとともに胎仔体重を比較した。その結果、mSP1000, nSP300 投与群ではコントロール群と比較して胎仔体重に変化は認められなかったが、nSP70 投与群では胎仔体重がコントロール群よりも 10% 以上減少し、胎仔発育不全が誘発されていることが明らかとなった (Fig. 2)。本結果から、過剰量の投与であるものの、nSP70 の投与により、胎仔吸収や胎仔発育不全が誘発される可能性が示された。

### 4. 表面修飾による非晶質ナノシリカの安全性確保

これまでにわれわれは、nSP70 の表面をカルボキシル基やアミノ基で修飾した表面修飾体 (nSP70-C, nSP70-N) を用いた検討において、表面修飾により体内動態や細胞内動態が変化すること、未修飾の nSP70 で認められた急性毒性が nSP70-C や nSP70-N では減弱することを明らかにしている。そこで、表面修飾非晶質シリカの胎仔に対する安全性を評価する目的で、nSP70-C, nSP70-N を妊娠マウスに投与し、胎仔吸収率や胎仔重量を測定した。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、極めて安全性に優れていることが判

明した。これは、表面修飾を施すことにより安全性を制御できることを意味しており、安全な nSP を創出できることを強く示唆する結果である。以上のように、100 nm よりも小さくなると、生体影響及び曝露実態とも大きく変動し、新たなリスクが生じ得ること、一方でこのリスクはコントロールできることが明らかとなった。今後、いかにして安全なナノマテリアル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、今後のナノマテリアルの安全性研究で最も重要な課題の 1 つであると考えている。

### 5. 非晶質ナノシリカの次世代影響評価

胎仔発育不全により、胎仔体重が胎齢に対する平均体重より大きく減少する疾患は、子宮内胎児発育遅延 (IUGR) と呼ばれており、近年増加傾向にある。さらに、疫学的調査から、IUGR が生活習慣病や統合失調症の罹患リスクを増加させることが明らかとなっている。したがって、妊娠時に非晶質ナノシリカに曝露されることで、妊娠・出産時のみならず、次世代にまで影響が及ぶ可能性が考えられる。

そこで、今後の非晶質ナノシリカの安全性評価においては、①早産、流産や催奇形性評価といった胎児毒性の評価、②母乳を介した胎児へのナノマテリアルの移行や育児行動に対する影響の評価、③網羅的行動解析による知能、運動に対する影響評価、④次世代のメタボリックシンドロームや精神疾患への罹患リスクに及ぼす影響評価、といった次世代への影響に着目する必要があると考えている (Fig. 3)。現在、妊娠時にナノマテリアルに曝露された仔を用いて、上記の検討を進めることで、ナノマテリアルが胎仔の発育に及ぼす影響だけでなく、成熟後の疾患リスクに及ぼす影響評価を試みている。

### 6. おわりに

本総説では、安全なナノマテリアルの開発支援に資する基礎情報の収集を目標とし、非晶質ナノシリカの物性—生体内動態—生殖発生影響の三者連関の解明を推進した。その結果、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とともに、生殖発生影響が高まる知見を先駆け明らかとした。本結果は、同一素材であっても粒子径等の物性によって体内動態や生体影響が大きく異なることを示しており、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

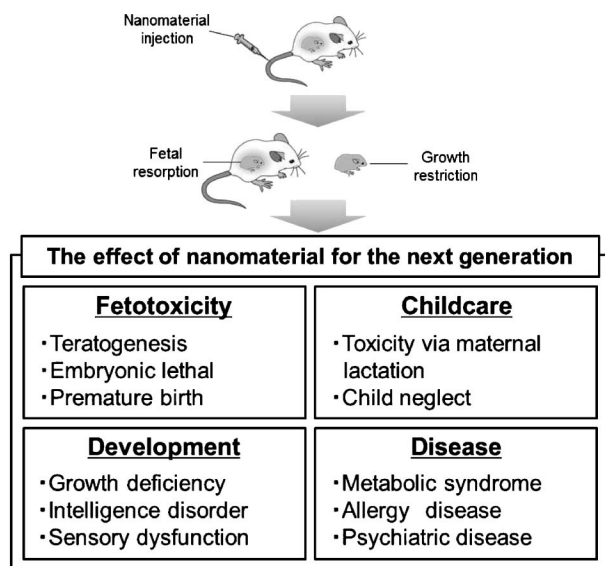


Fig. 3. Safety Assessment of Nanomaterials for Next Generation

アル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、ナノサイズの非晶質ナノシリカを用いる場合でも、表面修飾を施すことにより安全性を確保できる可能性があることを示した。今後、より詳細に物性—生体内動態—生殖発生影響の三者連関の情報を収集することで、例えば、「この物性のナノマテリアルは、こういった動態を示すため安全である」といった科学的根拠に基づいたリスク解析が可能となり、他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製に資する有用な情報を得

られるものと考えている。さらに、ナノマテリアルのリスク評価に向けて、ナノ製品中のナノマテリアル含有量や、曝露量・体内吸収量・蓄積性等の曝露実態を解明するとともに、曝露実態に即した投与ルートによる安全性情報を収集することが重要と考えられる。

このように、ナノマテリアルの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始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、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。本研究で得られた知見を基に、さらに Nano-Safety Science を推進することで、母体や胎児、乳幼児といった脆弱なライフステージを始めとする多くの人々の健康を確保し、ナノ産業界の発展に貢献することにより、ナノマテリアルの社会受容の促進が実現するものと期待している。

**謝辞**    本研究は、大阪大学薬学研究科毒性学分野の先生方や学生の皆さま、及び医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト（旧 創薬プロテオミクスプロジェクト）のスタッフ・学生の皆さまとともに推進したものです。この場をお借りして、心より御礼を申し上げます。また本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業などの支援を賜りました。ここに深謝申し上げます。