

分担課題: ナノマテリアルと流産

研究分担者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 教授

研究要旨

種々ナノマテリアルを配合した数多くの化粧品・食品が製造・実用化(上市)されており、我々は既に意図的・非意図的な曝露を避け得ない。一方で、ナノマテリアル特有の物性に起因した革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい毒性を発現してしまうことが世界的に危惧されており、早急な安全性評価とその確保が求められている。特に、過去の多くの事例にも窺られるように、胎児は生体防御機構が未発達であるため、早産・流産・催奇形性など、予期せぬ重篤な障害を引き起こしかねない。そのため、ナノマテリアルの安全性評価にあたり、胎盤・胎児への移行性や胎盤機能に及ぼす影響、さらには、早産・流産・催奇形性誘発の可能性について精査することは最重要課題の一つと位置づけられるものの、その取組は国内外を問わず、遅れている。以上の観点から本研究では、ナノマテリアルの安全性確保や安全なナノマテリアルの創出に資するリスク情報の集積を目的として、化粧品・食品の成分として既に上市されている非晶質ナノシリカを用い、母体・胎仔への影響に関するハザード評価を推進した。本研究では、実用化の現状を踏まえ、粒子径 70 nm、300 nm、1000 nm の非晶質シリカ(nSP70、nSP300、mSP1000)を用いた。過剰量を静脈内投与するハザード評価であるものの、粒子径 70 nm の非晶質シリカ(nSP70)が妊娠マウスに対して、流産や胎仔発育障害を誘発する可能性を明らかにした。一方で、nSP300 および mSP1000 投与群では、流産や胎仔発育障害などは全く認められなかった。以上の事実は、ナノマテリアルの場合、従来素材とは異なり、その実用化に際しては安全性評価が重要となることを示唆するものである。即ち、ナノマテリアルとの豊かな共存社会を構築するためには、今後は、ナノマテリアルの動態解析やヒトにおける疫学調査など、曝露実態の解明によるリスク評価を推進することで、安全かつ有用なナノマテリアルの創出に資する基盤情報を収集する必要があることが示唆された。

A. 研究目的

近年、産業利用を目的として開発・製造されるナノマテリアルおよびナノマテリアル利用製品の実用化が多様化・加速化している。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。このナノマテリアルは、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などにより、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、我々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。例えば、医薬品・食品・化粧品領域では、非晶質

ナノシリカやナノ酸化チタン、フラーレン、白金ナノコロイド、ナノシルバーなどが既に、必須素材として上市されており、次世代を担う新素材として期待されている。一方で、ナノマテリアルの物性(サイズ、形状など)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、特徴的な毒性、所謂、ナノトックス(NanoTox)を発現してしまうことが世界的に懸念されている。特に胎児や乳幼児は、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、成人では影響が見ら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。従って今後は、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管理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毒性を検討した例はほとんどない。

以上の観点から本研究では、ナノマテリアルの安全性確保・リスク管理に資する情報の集積を目的として、特に次世代影響(生殖発生毒性)に焦点を絞り、ナノマテリアルの母体・胎児への影響に関するハザード評価を試みた。また当該分担研究においては、研究の重要性和緊急性を鑑み、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業とは全く異なった視点で研究を実施しつつ、相互に連携、情報交換しつつ、研究の効率化を図った。

B. 研究方法

1) ナノシリカ・従来型シリカ: Micromod 社より購入した表面未修飾の非晶質ナノシリカ(直径 70 nm; nSP70)とサブミクロンサイズ以上の従来型シリカ(直径 300、1000 nm;それぞれ nSP300、mSP1000)を実験に供した。

2) ナノシリカの生殖発生毒性評価: 非晶質ナノシリカ・従来型シリカを妊娠 BALB/c マウスに 0.8、0.4、0.2 mg/mouse で妊娠 16、17 日目に 2 日間連続で尾静脈内投与した。シリカ最終投与 24 時間後に、子宮重量、吸収胎仔数、胎仔重量を測定した。

C. 研究結果

次項の考察にまとめて記載する。

D. 考察

本研究では、一次粒子径が 70 nm(nSP70)の非晶質ナノシリカを使用し、対照として、300 nm(nSP300)、1000 nm(mSP1000)のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを供した。非晶質ナノシリカ・従来型シリカの形状を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、いずれもカタログ値と同等の一次粒子径を持った表面が滑らかな球状の粒子であり、分散性に優れていた。

非晶質ナノシリカの妊娠マウスに対するハザード評価を推進する目的で、本研究では、過剰量を静脈内投与することでハザード同定を試みた。各粒子径の非晶質ナノシリカ・従来型シリカを妊娠マウスに 0.8 mg/mouse で投与し、子宮重量、吸収胎仔数を

評価した。その結果、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一方で、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(Fig. 1a-c)。本結果から、nSP70 投与により流産が誘発されることが示された。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、nSP300、mSP1000 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(Fig. 1d,e)。一方で、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、胎仔の発育不全を誘発していることが明らかとなった(Fig. 1d,e)。胎仔発育不全により、胎仔体重が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。IUGR は成長の遅延だけではなく、胎児の生命にも関わる疾患であり、IUGR 児のおおよそ 1/3 に分娩前の胎児仮死の兆候がみられ、場合によっては子宮内胎児死亡につながることもある。さらに IUGR は、ヒトにおいても出生後のアレルギー性疾患や生活習慣病のリスクファクターとなることが明らかとなっており、克服すべき重要疾患の一つである。前述した通り、本研究結果はあくまでも過剰量を静脈内投与した場合のハザード評価に過ぎない。従って今後は、経皮・経口投与など実際の曝露経路における検討や、曝露実態を考慮した投与量での評価など、より詳細な検討を進める必要があると考えられる。

次に、ハザード発現における閾値の設定を目的に、nSP70 を妊娠マウスに対して、妊娠 16、17 日目に 2 日間連続で 0.8、0.4、0.2 mg/mouse で投与し、子宮重量、吸収胎仔数、胎仔重量を評価した。その結果、0.4、0.2 mg/mouse 投与群においては、0.8 mg/mouse 投与群で認められた子宮重量・胎仔重量の減少および吸収胎仔数の増加が全く観察されなかった。以上の結果から、今後より詳細な検討が必須であるものの、nSP70 の流産・胎仔発育不全誘発などハザード発現には閾値が存在することが判明した。

E. 結論

本研究では、化粧品・食品などに含有されているナノマテリアルの安全性確保・リスク管理に資する情報の集積を目的として、特に流産・胎仔発育不全への影響を追求した。その結果、過剰量を静脈内投与するハザード評価であるものの、体内に侵入した非晶質ナノシリカは、流産・胎仔発育不全などのハ

ザードを発現し得ることなど、重要な知見を得た。今後は、ナノマテリアルの動態解析やヒトにおける疫学調査など曝露実態の解明によるリスク評価を推進することで、安全かつ有用なナノマテリアルの創製に資する基盤情報を収集する必要があることが示唆された。本研究成果は、ナノマテリアルの安全性評価、特に生殖発生毒性評価の重要性を世界に先駆け明らかとし、我が国の当該分野をリードする研究に発展している。また近未来的に環境省のエコチルプロジェクトとの連携を視野に入れている。

我が国でも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が、知財技術立国を目指す我が国としては、ナノマテリアルの開発・実用化を闇雲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、一方で責任ある先進国、そして健康立国として、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なければならない。従って、本研究成果を基盤として、ナノマテリアルの毒性研究(NanoTox 研究)ではなく、安全・安心かつ有用なナノマテリアルの開発と実用化支援の観点から、ナノマテリアルの安全科学研究(Nano Safety Science)を推進することが重要と考えている。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経皮吸収性/生体内動態と安全性との関連追求., ナノ材料のリスク評価と安全性対策, フロンティア出版, 44-53, 2010.
- 2) Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties. *Pharmazie*. 65(8):596-9, 2010.
- 3) 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. Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie*. 65(3):199-201, 2010.

- 4) 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. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. *Biomaterials*. 32(1):3-9, 2010.
- 5) 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. : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., *Nature Nanotechnology*, in press.

2. 学会発表

- 1) 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保を目指して. 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 岩手, 2009 年 7 月.
- 2) 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けた NanoTox 研究の最前線 (Overview). 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
- 3) 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 吉川友章, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 安全確保に向けた非晶質ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
- 4) 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保を目指して. 第 80 回日本衛生学会学術総会, 仙台, 2010 年 5 月.
- 5) 堤 康央: 安全なナノマテリアルの開発支援に向けた NanoTox 研究への取り組み. 平成 22 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム, 東京, 2010 年 5 月.
- 6) 堤 康央: ナノテクノロジーを活用した医療、化粧品、食品の安全性と今後の課題. 第 42 回大阪大学中之島講座「いまを読み解く - 医療・都市 -」『先端医療とその課題』, 大阪,

2010年10月.

- 7) 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 味村和哉, 柳原 格, 齋藤 滋, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの生殖発生への影響に関する基礎評価. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 沖縄, 2010年6月.
- 8) 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 藤村真穂, 潘 慧燕, 小椋健正, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて~非晶質ナノシリカの次世代への影響評価~. 第9回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム2010, 京都, 2010年10月.
- 9) 山下浩平, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: 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. 日本薬学会 第131年会, 静岡, 2011年3月.

国際学会発表

- 1) Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 2) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 3) Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany),

13-16 September, 2009.

- 4) Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The role of surface physicochemical properties. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 5) Yoshioka Y., Morishige T., Tanabe A., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Nanosilicas with different sizes and surface charges induce different profiles of cytokine production on macrophages. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 6) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Fujimura M., Morishita Y., Huiyan P., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Biodistribution and reproductive toxicity of nanosilica for ensuring the safety of nanomaterials. Society of Toxicology (SOT) 2011, Washington DC (USA), 6-10 March, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し。
2. 実用新案登録
該当無し。
3. その他
該当無し。

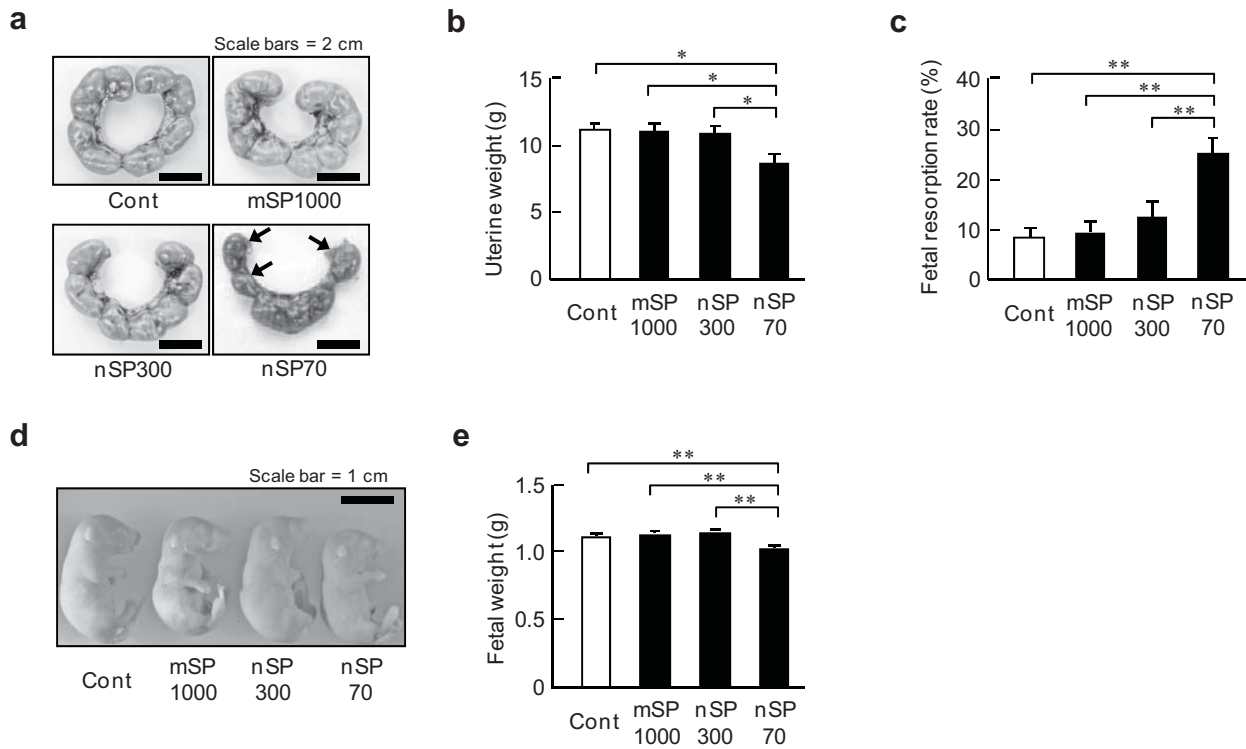


Figure 1. Pregnancy complications in nSP70-treated mice. Pregnant mice were treated with 0.8 mg/mouse nSP70, nSP300, mSP1000, or PBS (control) intravenously on two consecutive days, at GD16 and GD17. (a) Uteri from mice were excised at GD18. Uterine weights (b) and fetal resorption rates (c) were evaluated. Fetuses were excised from uteri (d). The fetal weights (e) were evaluated. All data represent means \pm SEM. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

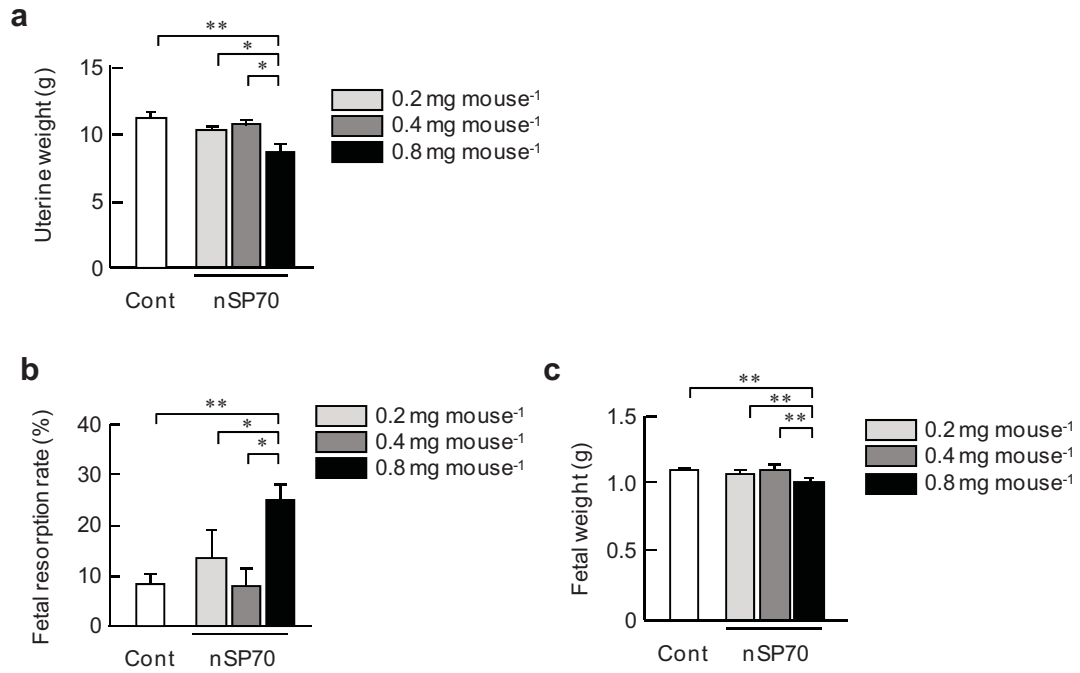


Figure 2. Dose-dependent toxicity of nSP70. Pregnant BALB/c mice were treated with 100 μ l of 0.2, 0.4, or 0.8 mg/mouse nSP70 or PBS (control) intravenously *via* tail vein on two consecutive days, at GD16 and GD17. At GD18, uterine weights (a), fetal resorption rates (b), and fetal weights (c) were evaluated. All data represent means \pm SEM. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., <u>Tsutsumi Y.</u> , Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.	Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties	Pharmazie	65(8)	596-9	2010
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., <u>Tsutsumi Y.</u>	Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells	Pharmazie	65(3)	199-201	2010
Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., <u>Tsutsumi Y.</u>	Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials	Biomaterials	32(1)	3-9	2010
吉川友章, 吉岡靖雄, <u>堤 康央</u>	非晶質ナノシリカの経皮吸収性/生体内動態と安全性との関連追求	ナノ材料のリスク評価と安全性対策		44-53	2010
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., <u>Saito S.</u> , <u>Tsutsumi Y.</u>	Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice.	Nature Nanotechnology			in press