

Title	ナノマテリアルの経皮・口腔毒性に関する基礎情報の収集
Author(s)	赤瀬, 貴憲
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/55461
rights	© Nabeshi et al.
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

**ナノマテリアルの経皮・口腔毒性に
関する基礎情報の収集**

大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野
赤瀬 貴憲

2012 年度（平成 24 年度） 博士論文

博士論文題名

**ナノマテリアルの経皮・口腔毒性に
関する基礎情報の収集**

大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野
赤瀬 貴憲

目次

略語一覧	2
緒論	3
本論	
第一節 非晶質ナノシリカの安全な経皮適用に向けた基礎的検討	6
第二節 非晶質ナノシリカの安全な口腔内適用に向けた基礎的検討	12
総括	22
結論	24
謝辞	25
引用文献	26

略語一覽

ADI	. . .	acceptable daily intake
ALP	. . .	alkaline phosphatase
ATCC	. . .	American Type Culture Collection
DCFH-DA	. . .	2' 7' -dichlorofluorescein diacetate
DMEM	. . .	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	. . .	deoxyribonucleic acid
ELISA	. . .	enzyme-linked immunosorbent assay
HEPES	. . .	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
IL-1	. . .	Interleukin-1
IL-6	. . .	Interleukin-6
MEM	. . .	minimum essential media
mSP1000	. . .	amorphous silica particle with 1000 nm diameter
NADPH oxidase	. . .	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NOAEL	. . .	no observed adverse effect level
nSP300	. . .	amorphous silica particle with 300 nm diameter
nSP70	. . .	amorphous nanosilica particle with 70 nm diameter
Rac1	. . .	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANKL	. . .	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
ROS	. . .	reactive oxygen species
SCENHIR	. . .	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
TEM	. . .	transmission electron microscope
TRAP	. . .	tartrate-resistant acid phosphatase
TNF	. . .	tumor necrosis factor
TRAP	. . .	Tartrate-resistant acid phosphatase

緒論

近年のナノテクノロジーの発展に伴い、素材の大きさが100 nm以下のナノサイズに制御されたナノマテリアル、および10 nm以下に制御されたサブナノマテリアルの開発が急速に進展している。これらサブナノ素材を含むナノマテリアルは、その粒子径の減少に伴い、電氣的・磁氣的・光学的特性や組織浸透性などといった点において、従来までのサブミクロンサイズ（数百 nm-数 μm ）以上の素材とは異なる特徴的な機能を有する。これらナノマテリアル特有の機能を生かし、既に様々な産業領域において、ナノマテリアルを配合した数多くの製品が実用化・上市されている(1-5)。例えば、化粧品/香粧品産業においては、粒子径の微小化により得られる使用感や紫外線遮蔽能の向上といった利点から、非晶質ナノシリカやナノ酸化チタン、フラーレンが多くの製品に含有されている。化粧品/香粧品産業以外においても、白金ナノコロイド、ナノシルバー、カーボンナノチューブといった様々なナノマテリアルが医薬品・食品・工業製品として既に上市されるなど、ナノマテリアルは、化粧品・食品・医薬品から電子部品に至る、あらゆる産業において革命を起こし得る夢の素材として期待されている。米国では2000年当時の大統領であるビル・クリントン氏が、「国家ナノテクノロジー戦略（National Nanotechnology Initiative）」を宣言し、32億ドルにも及ぶ大規模な国家予算を投資したことから、ナノマテリアル産業の発展に対する今後の期待の大きさが伺える。これらの世界的情勢を背景に、ナノマテリアル産業の世界市場は現在でも急成長を遂げており、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存在になりつつある。このような状況のもと、昨今の国民の健康、および食品・香粧品への安全・安心の希求も相俟って、ナノマテリアルの安全性への関心が高まっている。すなわち、ナノマテリアルの安全・安心な製造と使用に向けた、ナノマテリアルの安全性を保証するガイドライン策定が待望されている。一方で、例えば、現在の化審法をナノマテリアルの規制に適用すると、ナノマテリアルを構成する化学物質の構造式のみで規制がなされる可能性もあり、粒子径、形状、表面性状、蛋白結合性、分散/凝集状態など、ナノマテリアルならではの物性・品質を管理、保証できない。従って、ナノマテリアルの安全性ガイドラインの策定にあたっては、ナノマテリアル特有の物性・品質を十分に考慮したうえで、ナノマテリアルの安全性情報を収集することが必要である。我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、まさに始まったところである。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ねばならない。

一般的に化学物質のリスク（起こりうる有害事象）は、ハザード（潜在的な有害性）と曝露量の積算として定義される。すなわち、いかに重篤なハザードを有する化学物質についても、曝露がゼロであれば、そのリスクはゼロと考察される。すなわち、ナノマテリアルの安全性評価においても、まずナノマテリアルを曝露した場合、どの経路からどのくらい曝露され、体内に吸収されるのかを、正確に把握する必要がある。しかし、ナノマテリアルの安全性評価研究の現状は、ナノマテリアルの曝露状況（製品に含有されている素材の情報や実際の含有量、ヒトの摂取量など）が不明瞭なこともあり、リスク解析に必須となる曝露量を初めとした、体内吸収性や体内動態などの曝露実態情報の収集は大きく立ち遅れている。このまま、リスク解析・評価の基盤となるナノマテリアルの体内吸収性/生体内動態に関する検討がなされずに、ハザード情報のみを頼りにナノマテリアルの安全性を判断してしまうと、適切な量・経路で使用すれば安全であるはずのナノマテリアルでさえも、ヒトにとって有害であると見なしてしまう可能性がある。ひいては、ナノマテリアルの有用性を享受した豊かな社会の構築や産業発展の阻害にまで繋がりがかねない。従って、今後のナノマテリアルの安全性研究には、実際の曝露経路を加味し、体内に吸収されるか否かをまず判別することが必要不可欠である。もし吸収されるのであれば、体内動態・蓄積性・排泄経路を含めた ADME 情報を正確に把握し、本情報を基にナノマテリアルが到達する組織を対象として、一般毒性、および遺伝毒性や免疫毒性といった特殊毒性まで、*in vivo/in vitro* を含めて多角的な視点からハザード情報を収集する必要がある。これら曝露実態情報とハザード情報について、ナノマテリアル特有の物性・品質（粒子径・形状・表面性状・蛋白結合性・分散/凝集状態）との関連を精査することが、ナノマテリアルの安全性評価に直結すると考えられる。そして、本情報をもとに、ナノマテリアルの NOAEL（最大無毒性量）や ADI（1 日許容摂取量）を設定することが、ナノマテリアルの安全性ガイドラインの策定に直結するであろう。加えて、単にリスク管理に当てはめて危険性が疑われるナノマテリアルを規制するのではなく、安全なものに仕立てあげ、有効活用に繋げていくための情報として活用することが、何よりも重要であろう。

本観点から筆者らのグループでは、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、安全なナノマテリアルの開発とその支援を推し進める 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(6-35)。本論文では、ナノマテリアルの中で、筆者らの生活に最も浸透している非晶質ナノシリカの安全性を、経皮/口腔曝露を想定し、独自のナノ安全科学的観点から解析した。特に、オーラルケア製品に、多く

のナノマテリアルが含有されているものの、口腔毒性に着目した研究は皆無に等しいことから、本取組は、パイロット研究として意義あるものと考えた。今後のさらなる情報蓄積が必須であるものの、ナノマテリアルの安全性確保のみならず、将来に渡ってナノマテリアルと共存し、社会受容の促進させるための Sustainable Nanotechnology に、今後、資する有用な知見を得たので、ここに博士論文として纏めた次第である。

本論

第一節 非晶質ナノシリカの安全な経皮適用に向けた基礎的検討

非晶質ナノシリカ（以降、ナノシリカと表記）を含め、多くのナノマテリアルが様々な製品に含有され、筆者らの生活に深く浸透している。その一方で、ナノマテリアルの画期的機能が逆に、未知の生体影響を誘発する可能性が懸念され始めている。例えば、カーボンナノチューブが、マウスモデルにおいてアスベストと同様に悪性中皮腫を誘発する可能性や、ナノ酸化チタンを経鼻曝露したマウス脳内で酸化ストレス応答が誘発される可能性など、各種ナノマテリアルによる生体影響に関して多くの報告がなされている(36, 37)。このように、ナノマテリアルのハザードに関する報告は集積されつつあるものの、ナノマテリアルの安全性評価において重要な体内吸収性や体内動態などの曝露実態についての情報は乏しいのが現状である。ナノシリカは、数あるナノマテリアルの中でも、印刷機のトナーなどに使用されているカーボンブラックに次いで使用量が多いナノマテリアルであり、国内生産量は約 20000 トン、世界での年間生産量は 1 メガトン以上であり、その市場規模は 3 億 1400 万ドルにも及ぶ。ナノシリカは、粒子径を微小化するに伴い、使用感や透明性、吸湿性の向上など、香粧品の有用性を格段に向上させる機能を付与することができるため、日焼け止めやファンデーションやクリーム、乳液などに約 20%程度配合されており、生体内の曝露量は極めて高いことが予想される。一方で安全性に関しては、2006 年の欧州化学物質生態毒性・毒性センターによる報告では、従来までのサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカ（以降、従来型シリカと表記）は、体内に吸収されないことを根拠に、安全性に問題は無いとされている。しかし、ナノマテリアルの動態特性を考慮せずに、サブミクロンサイズの従来型シリカに関する知見だけでは、ナノシリカの安全性を十分に確保できているとは言い難い。つまり、ナノシリカが香粧品や食品としてヒトへ常に曝露されている点を加味すると、ナノシリカは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であるといえる。そこで本節ではまず、実験グレードのナノシリカを用いて、経皮曝露後の皮膚組織における局在を評価することで、ナノマテリアルのリスク解析に必須の曝露実態情報の収集を図った。

【実験材料と方法】

非晶質シリカ

本検討では、各種蛍光色素標識体・表面修飾体入手できる Micromod 社 (Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany) の非晶質シリカを用いた。100 nm 以下のナノシリカとして、一次粒子サイズが 70 nm (以降、nSP70 と表記) の蛍光標識ナノシリカを使用し、対照として、300 nm、1000 nm (以降、nSP300、mSP1000 と表記) のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。なお、以後全ての検討において、使用直前に各粒子を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE, Osaka, Japan) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、粒子分散液の調製を行った。

非晶質シリカの皮膚組織における局在の解析

BALB/c マウス (雌性、6 週齢) の左右の耳介内側に nSP70 (25 mg/mL) あるいは超純水を 10 μ L /ear/day で 3 日間連続塗布した。最終塗布から 24 時間後に塗布部位の皮膚を摘出し、1 mm 角にカットした後、氷冷した 2.5% グルタルアルデヒド中で 2 時間固定した。固定液を廃棄し、冷 1% 四酸化オスミウム液を加えて氷冷しながら 1 時間振盪した後、固定を行った。続いて、濃度の異なるエタノール中で脱水した後、酸化プロピレンで置換し、Epon-812 樹脂 (TAAB laboratories, UK) で包埋した。作成したサンプルブロックをダイヤモンドナイフで薄切し、およそ 60 nm の超薄切片を作製した。この超薄切切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。その後、常法に従って超薄切片を作製し、無染色あるいは酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色を施した後に、透過型電子顕微鏡 H-7650 (Transmission electron microscopy : TEM ; HITACHI, Tokyo, Japan) にて観察した。

細胞培養

マウスランゲルハンス細胞株 (XS52 細胞) はマウス GM-CSF (2 ng/mL)、10% マウス皮膚由来線維芽細胞 (NS47 細胞) 培養上清、10% 非働化牛胎児血清、1% 非必須アミノ酸、1% L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、1% 2-メルカプトエタノール、10 mM HEPES 緩衝液、1% 抗生物質を含む RPMI-1640 培地 (ナカライテスク, Kyoto, Japan) を用いて、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下で培養した。

非晶質シリカ添加時の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の測定

ROS 量の評価には蛍光プローブである 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いた。DCFH-DA は、細胞内において ROS と反応して DCFH となり、蛍光を発する。 3×10^4 個の XS52 細胞を 96 プレートに予め播種し、24 時間後に種々の濃度に調製した nSP70、nSP300、mSP1000 を添加した。各シリカを添加して 3 時間後、phenol red free の RPMI-1640 培地（ナカライテスク、Kyoto、Japan）で 3 回洗浄操作を行い、 $10 \mu\text{M}$ に調製した DCFH-DA を含有した phenol red free の RPMI-1640 培地を添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。30 分培養後、DCFH の蛍光強度を励起波長 485 nm 、蛍光波長 530 nm で蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

統計解析

個々の実験ごとに、多重比較検定（Tukey 法）を行うことにより、nSP70 添加群に対する nSP300、mSP1000 添加群の統計的有意差を検定した。なお、解析ソフト（エクセル統計 2008, SSRI, Japan）を用い、統計的有意差は $p < 0.05$ の場合を有意であるとした。

【結果および考察】

本検討では、実験グレードの、1次粒子径が70 nmのナノシリカ（以降、nSP70と表記）および300 nm、1000 nmの従来型シリカ（以降、nSP300、mSP1000と表記）を用いた。これらシリカ分散液は、透過型電子顕微鏡（TEM）による観察により、粒子径の揃った球状の粒子であることを確認している。また、動的光散乱法を用いて超純水で希釈した各シリカ分散液の二次粒子径を測定したところ、いずれのシリカも単一のピークとして検出され、その平均粒子径は一次粒子径とほぼ同等であることも確認している(13)。まず、曝露情報を収集するために、nSP70を0.25 mg/dayでマウスに3日間経皮塗布し、nSP70の皮膚組織における局在を評価した。なお、現在、化粧品中には約20%の含量でナノシリカが含有されており、本検討で用いた投与濃度はヒトが1日で曝露する量の約200倍となる。3日間連続でnSP70をマウスの耳介部に塗布した後、塗布部位である耳介部、および塗布部位の所属リンパ節を回収し、電子顕微鏡により観察した。TEM観察の結果、表皮層に存在する角化細胞内、皮膚樹状細胞である表皮ランゲルハンス細胞内、神経や血管が豊富に存在する真皮層でnSP70の局在が観察された（Fig. 1）。さらに、投与局所近傍の所属リンパ節内や全身の主要臓器である脳や肝臓にもnSP70の局在が認められた。現在、nSP300、およびmSP1000についても解析を進めているが、その粒子径や皮膚組織の構造、従来までの報告を考慮すると、これら従来型シリカが吸収される可能性は、極めて低いものと考えられる。本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が、ナノシリカは生体内で最も強固な異物バリアである皮膚を透過し、脳や免疫組織に移行することが明らかとなった。この事実は、ナノマテリアルの経皮安全性評価においては、投与局所のみならず、脳や肝臓を初めとした全身レベルでの安全性評価の必要性も示唆している。特に、角化細胞や表皮ランゲルハンス細胞などの皮膚の細胞は、生体防御機構の起点として働く細胞群であることを加味すると、ナノシリカの経皮曝露後のハザードを免疫学的観点から解析することは必要不可欠であり、既に筆者らのグループでは、ナノシリカの経皮吸収後の免疫系への影響についての知見も見出している(18, 21, 26)。今後、ナノシリカの免疫系への影響について分子レベルまで詳細に解析を進めることができれば、ナノシリカを経皮ワクチンといった新規ナノ医薬品として応用できる可能性もある。今後の安全なナノマテリアルの開発とその支援を推し進める Nano-Safety Design (ナノ最適デザイン) 研究において、このようなベネフィット（有効活用）の観点からの解析も重要であろう。一方で、nSP70が表皮のランゲルハンス細胞内や、真皮層の細胞にまで局在していた点に関して、その侵入経路は未だ不明ではある。その点について、Mortensen らが興味深い知見を報告している。彼らは、直径100 nm以下の量子ドットの皮膚組織内局在を解析し、量子ドットが毛包を介し

て皮膚内に侵入する可能性を見出している(38)。従って、ナノシリカに関しても毛包介在性経路を含めて様々な視点から経皮吸収メカニズムを詳細に解析していく必要がある。

これまでに筆者らは、マウスランゲルハンス細胞株である XS52 細胞を用いた検討において、nSP70 が nSP300、mSP1000 と比較して、強い細胞傷害性を示すことを明らかにしている(6)。また、直径がサブミクロンサイズ以上の従来型シリカは、細胞質内にのみ局在が認められたのに対し、100 nm 以下のナノシリカは細胞質のみならず、核内にまで移行することを明らかにしている(13)。従って、Nano-Safety Design 研究の観点から、細胞傷害性や細胞内動態など、ナノシリカ特有の細胞影響メカニズムを解明することは極めて重要である。そこで筆者は、活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) 産生の観点から、ナノシリカが XS52 細胞に及ぼす影響を評価した。ROS は、生体内のエネルギー代謝や感染防御過程において発生する一連の活性分子種 (O_2^- 、 H_2O_2) であり、アポトーシスや DNA 損傷といった多くの細胞内ストレス応答に関与することが知られている(39)。従って、ROS 産生は、ナノシリカによる細胞傷害性誘発メカニズムの 1 つと予測される。nSP70、nSP300、mSP1000 を XS52 細胞に添加し、3 時間後の ROS 産生量を DCFH-DA を用いて測定した。その結果、全てのシリカ添加群において、作用濃度に依存した ROS 産生が認められた(Fig. 2)。特に nSP70 添加群では、nSP300、mSP1000 で ROS 産生が認められなかった低濃度添加時においても、コントロール群と比較して約 2 倍の ROS 産生が認められており、従来型シリカよりも高い ROS 誘導能を有することが明らかとなった。nSP70 が nSP300 や mSP1000 と比較して ROS 産生を誘導した要因の 1 つとして、粒子径の減少に伴い比表面積が増大し、細胞との接触頻度が増加したことが考えられる。本研究で用いたシリカは、nSP70、nSP300 および mSP1000 の比表面積はそれぞれ 43、10、 $3m^2/g$ であることから、nSP70 の比表面積は nSP300 の約 4 倍、mSP1000 の約 14 倍にもなる(12)。今後は、各シリカの表面積を合わせて同様の検証を実施することで、ROS 産生とシリカの表面積の関連を評価できると考えている。また、筆者らはこれまでに、ヒト皮膚角化細胞を用いた検討において、ナノシリカによる DNA 損傷には、ROS 産生が関与していることを見出している(12)。この事実を踏まえると、貪食能を有するランゲルハンス細胞においても同様に、エンドサイトーシスによる非晶質ナノシリカの細胞内取り込みを介した ROS 産生により、DNA 損傷などの細胞毒性を誘発していることが予想され、これが細胞傷害性の発現につながる可能性を考えている。ROS 産生と細胞応答性の関係について、未だ不明な点は多くあるが、近年、ROS 産生経路の一つである Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase) が、異物が細胞内に取り込まれる際にエンドソーム膜にリクルートされ、ROS 産生を通じて異物の除去に寄与することが明らかとなっている(40)。例えば、アスベストや結晶性シリカなどの

微粒子状の異物が炎症を引き起こす際に、これら微粒子が細胞に侵入することにより発現する NADPH oxidase の関与が報告され、これらの報告では NADPH oxidase から産生された ROS が NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NALP3) を活性化することが明らかとされている(41)。以上の点を踏まえると、ナノマテリアルによる細胞影響のメカニズムを解明するにあたっては、ROS 産生と細胞毒性の発現の関連について解析する必要がある。また、ランゲルハンス細胞や皮膚上皮細胞の ROS 産生を介して皮膚免疫系の攪乱が誘発されることも報告されており、この点も加味すると、非晶質ナノシリカが皮膚免疫系に対する影響も精査する必要があると考えている(42)。従って、ナノマテリアルの安全性評価にあたって、ROS を起点とした遺伝毒性や免疫毒性についても特に精査する必要があるものと考えられる。これらの事実から、ナノシリカに ROS 産生を誘導しない修飾を施すことが出来れば、Nano-Safety Design 研究の発展に資する重要な情報となるだろう。

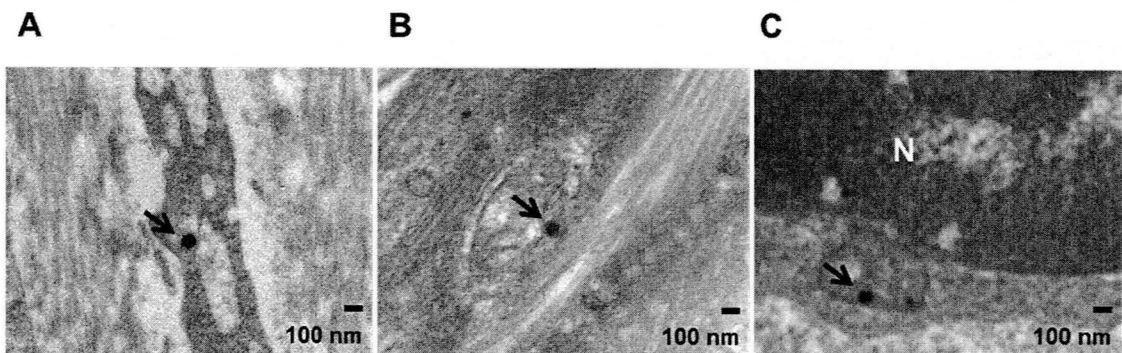


Figure 1. Transdermal absorption of nSP70 using the transmission electron microscopic analysis. TEM analysis of skin, lymph node samples from mice after 3-days of dermal exposure to nSP70. nSP70 (arrows) were present in the langerhans cells (A), dermis (B) and cervical lymph node (C). N: nucleus. Scale bars: 100 nm (A-C).

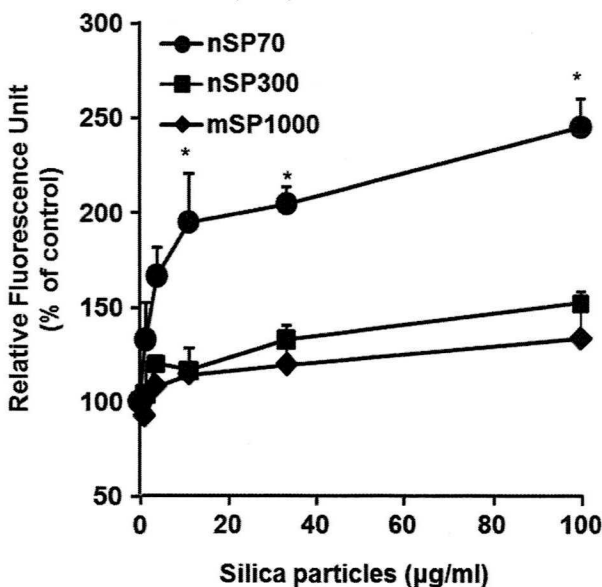


Figure 2. Reactive oxygen species (ROS) generation in silica particle-treated langerhans cells. Murine langerhans cell line (XS52 cells) was incubated with various concentrations of nSP70 (circles), nSP300 (squares), and mSP1000 (diamonds) for 3 hrs. Total ROS induced by silica particles were expressed as relative fluorescence units in the DCFH assay. Data are presented as means \pm SD (n = 4). * $P < 0.01$ v.s. same dose of nSP300 and mSP1000.

第二節 非晶質ナノシリカの安全な口腔内適用に向けた基礎的検討

オーラルケア領域においてナノシリカは、主に研磨剤として使用されており、歯磨き粉中に約 20%配合されていることが報告されている(43)。ナノシリカの添加により、研磨性が良くなり、歯表面の細菌付着が抑制できると共に、エナメル芽細胞の分化促進により歯の再生につながるなど、高機能性の歯磨き粉として注目されている(44, 45)。ヒトが持続的に歯磨き粉を使用することを考慮すると、口腔内に曝露されるナノシリカの量は極めて高用量であることが推察される。従って、オーラルケア製品中のナノシリカの安全使用に向け、口腔曝露を想定したナノシリカの安全性情報を収集する必要がある。

口腔内には、歯を支える骨として歯槽骨が存在している。歯槽骨と結合組織の境界には、骨代謝において中心的役割を担う骨芽細胞および破骨細胞が局在している。歯槽骨は、生体の骨組織と同様に、破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成でたえず分解と新生を繰り返しており、そのバランスによって骨量が決定される(46)。一方で、骨芽細胞や破骨細胞の分化に異常が起こると、骨代謝が崩れ、骨形成と骨吸収のバランスが維持できなくなり、骨組織の破壊が進行する。例えば歯周病においては、歯周病菌が歯肉に感染し炎症を誘発することで、骨吸収量が骨形成量を上回り骨量が減少する。そのため、歯槽骨によって歯を支えることができなくなり、最終的に抜歯せざるを得なくなる。近年、ヒトの口腔粘膜組織を用い、210 nm 程度の微粒子が、上皮組織を通過し、結合組織にまで移行することが報告された(47)。この報告を加味すると、100 nm 以下のナノシリカは上皮組織を浸透し、結合組織に接している歯槽骨にも影響を与える可能性が考えられる。以上の点を踏まえると、オーラルケア製品として使用されるナノシリカの安全性を確保するためには、ナノシリカの骨代謝へ及ぼす影響を評価する必要があると考えた。そこで本項では、骨代謝において重要な役割を果たす骨芽細胞および破骨細胞を対象に、ナノシリカによる細胞影響について基礎情報を収集した。

【実験材料と方法】

非晶質シリカ

前節に準じた。

細胞培養

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞は、宮原先生（富山医科薬科大学、現横浜薬科大学教授）から供与された。MC3T3-E1 細胞は、10%非働化 FBS、1% Antibiotic-Antimycotic Mix stock solution（GIBCO）を添加した α -Minimum Essential Media（MEM, GIBCO）を用いて 37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。RAW264.7 細胞（マウスマクロファージ細胞）株は、American Type Culture Collection 社（ATCC, Manassas, VA）から購入した。RAW264.7 細胞は、10%非働化 FBS、1% Antibiotic-Antimycotic Mix stock solution（GIBCO）を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM, Wako, Osaka, Japan）を用いて 37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。

細胞傷害性試験（WST-8 アッセイ）

MC3T3-E1 細胞および RAW264.7 細胞に対する非晶質シリカの細胞傷害性を WST-8 アッセイにより評価した。MC3T3-E1 細胞については、 5×10^3 cells となるように 96 穴プレートに播種した。24 時間後に nSP70、nSP300、mSP1000 を添加し、3 日間培養後、Cell Count Reagent SF（ナカライテスク）を各ウェルに 10 μ L ずつ添加した。その後 1 時間培養し、マイクロプレートリーダー（Mithras LB940, BERTHOLD）を用いて、吸収波長 450 nm、参照波長 650 nm で吸光度を測定した。RAW264.7 細胞については、 1.5×10^3 cells/well となるように 96 穴プレートに播種した。24 時間後に nSP70、nSP300、mSP1000 を添加し、5 日間培養後、Cell Count Reagent SF（ナカライテスク）を各ウェルに 10 μ L ずつ添加した。その後 1 時間培養し、マイクロプレートリーダー（Mithras LB940, BERTHOLD）を用いて、吸収波長 450 nm、参照波長 650 nm で吸光度を測定した。

Alkaline phosphatase（ALP）活性の測定および蛋白質濃度の測定

骨芽細胞の分化を Alkaline phosphatase（ALP）活性により評価した。MC3T3-E1 細胞を 10% FCS、1% Antibiotic-Antimycotic Mix stock solution を添加した α -Minimum Essential Media（MEM, GIBCO）に懸濁し、 3×10^4 cells ずつ、24 穴プレートに播種した。24 時間後に終濃度が 15 あるいは 45 μ g/mL となるように非晶質シリカを添加した。72 時

間後に、0.2% Triton X-100 により溶解させて、溶液を回収した。回収した 14000 rpm、5 分間遠心後、上清を回収し、試料とした。ALP 活性は ALP 活性キット (Wako) に従い、測定した。また試料中のたん白質濃度は、Protein Assay Bicinchoninate Kit (ナカライテスク) により測定し、たん白質濃度にて ALP 活性値を補正した。

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色および活性評価

マクロファージ細胞の破骨細胞への分化を、TRAP 染色および TRAP 活性により評価した。RAW264.7 細胞を 10% FCS、1% Antibiotic-Antimycotic Mix stock solution を添加したフェノールレッドフリーの α -Minimum Essential Media (MEM, GIBCO) に懸濁し、 2×10^4 cells ずつ、48 穴プレートに播種した。24 時間後に、破骨分化誘導因子である receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) を終濃度 30 ng/mL となるように添加、あるいは、培地のみを添加し、さらに終濃度が 10 μ g/mL となるように非晶質シリカを添加した。5 日間の培養後、細胞を TRAP/ alkaline phosphatase (ALP) stain kit (Wako) のプロトコルに従って染色した。染色後、TRAP 陽性の多核化細胞 (核が 3 個以上) を破骨細胞として、破骨細胞数を計測した。また、TRAP 活性は、10%ホルマリンで 10 分間、その後、95%エタノールで 1 分間インキュベートし、細胞を固定した。100 μ L の 10 mM 酒石酸ナトリウム、5 mM p-ニトロフェニルリン酸を含む 50 mM クエン酸バッファー (pH4.6) を加えて 1 時間インキュベート後、溶液を新しいプレートに 50 μ L ずつ移し、等量の 0.1 N NaOH を添加し、マイクロプレートリーダーで 410 nm の吸光度を測定した。

TNF- α 産生量の定量

RAW264.7 細胞を 10% FCS、1% Antibiotic-Antimycotic Mix stock solution を添加したフェノールレッドフリーの α -Minimum Essential Media (MEM, GIBCO) に懸濁し、 2×10^4 cells ずつ、48 穴プレートに播種した。24 時間後に終濃度が 10 μ g/mL となるように非晶質シリカを添加した。5 日間の培養後、培養上清中の TNF- α の産生量を ELISA キット (eBioscience, San Diego, CA) を用いて、添付のプロトコルに従い定量した。

統計解析

個々の実験ごとに、多重比較検定 (Tukey 法) を行うことにより、nSP70 添加群に対する nSP300、mSP1000 添加群の統計的有意差を検定した。なお、解析ソフト (エクセル統計 2008, SSRI, Japan) を用い、統計的有意差は $p < 0.05$ の場合を有意であるとした。

【結果および考察】

本検討では、前節と同様に、ナノシリカとして nSP70、従来型シリカとして nSP300、mSP1000 を用いて、骨芽細胞分化および、マクロファージ細胞の破骨細胞分化へ及ぼす影響を評価した。まず、各シリカが骨芽細胞の分化に与える影響を解析した。骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に各シリカを 3 日間作用させ、WST-8 アッセイにより細胞傷害性を評価した。その結果、いずれの作用濃度においても、全てのシリカで細胞生存率はコントロール群と同程度であった。従って、本検討で用いた作用濃度では、各シリカは MC3T3-E1 細胞に対して細胞傷害性を示さないことが明らかとなった (Fig.3)。次に、骨芽細胞分化の指標として汎用される Alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定することで、骨芽細胞分化へ及ぼす影響を評価した。なお、シリカの作用濃度は、WST-8 試験でいずれのシリカにおいても細胞傷害性の認められなかった 45、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。その結果、nSP70 作用群では ALP 活性はコントロール群と同程度であった。一方で、nSP300、mSP1000 作用群では、ALP 活性が有意に減少していた (Fig.4)。本結果から、細胞傷害性の認められない濃度において、ナノシリカは骨芽細胞分化に影響を与えない一方で、サブミクロンサイズの従来型シリカは骨芽細胞分化を阻害する可能性が示された。前項でも述べたように、これまで筆者らのグループでは、エンドサイトーシスによるシリカの細胞内取り込みを介した ROS 産生により、DNA 損傷を誘導することを明らかとしている(12)。ROS 産生と細胞傷害性の誘導は密接に関与していることが予想されるが、MC3T3-E1 細胞はマクロファージや樹状細胞などの貪食系細胞より貪食能が小さいため、これら貪食系細胞と比較してシリカ取り込み量が減少し、ROS の産生誘導が減弱した結果、細胞傷害性が認められなかったと考えられる。また、サブミクロンサイズの従来型シリカは骨芽細胞分化を阻害する可能性があるものの、その大きさを考慮すると、口腔粘膜の上皮細胞層を通過する可能性が低いことから、実際の生体内で骨芽細胞に与える影響は少ないと考えられる。今後は、口腔粘膜における動態について検討したうえで、骨芽細胞に与える影響をより詳細に考察する必要があると考えられる。一方で、口腔粘膜を通過することが予測されるナノシリカが、骨芽細胞の分化に影響を及ぼさなかった点に関しては、ナノシリカを適用した安全・安心かつ有効性の高いオーラルケア製品の開発に資する貴重な情報であると考えている。

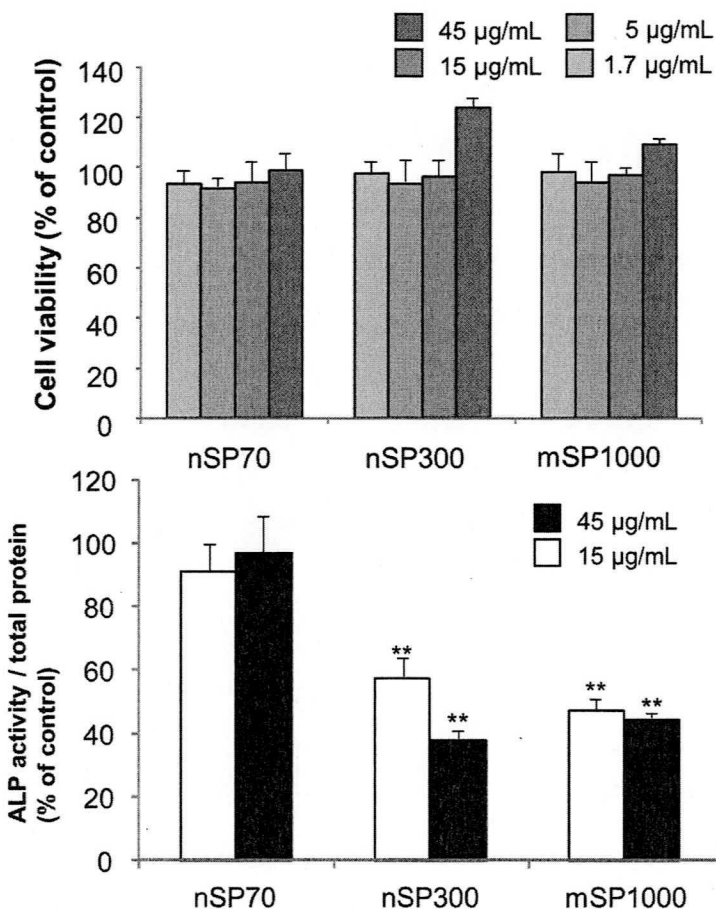


Figure 3. Cell viability of osteoblast additional silica particles. The cytotoxic effect of nSP70, nSP300 or mSP1000 on murine osteoblast cell line (MC3T3-E1 cells) after 3-d incubation was evaluated using the WST-8 assay. The percentage increase in cytotoxicity was calculated relative to the vehicle-treated control. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3).

Figure 4. Effect of silica particles on ALP activity in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were incubated with 45, 15 µg/ml silica particles for 3-days. ALP activity was assayed by measuring the transformation of *p*-nitrophenyl-phosphate into *p*-nitrophenol. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). ***P* < 0.01 v.s. vehicle-treated control.

破骨細胞は、免疫担当細胞であるマクロファージが骨芽細胞と相互作用して分化した細胞であり、特に Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) が破骨細胞分化の主要分子であることが知られている(48)。また、マクロファージから破骨細胞への分化過程には、TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインや、ROS が促進的に働くことも明らかとなっている(49-51)。また、筆者らのグループでは、ナノシリカがマクロファージ細胞に対して、炎症性サイトカイン産生や ROS 産生を誘導することを既に見出している(52)。以上の事実を踏まえると、ナノシリカがマクロファージの破骨細胞分化を過剰に誘導し、骨代謝の破綻を招いてしまう可能性が考えられる。そこで、マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いて、ナノシリカが破骨細胞への分化に与える影響を解析した。まず、各シリカの RAW264.7 細胞への細胞傷害性を WST-8 アッセイにより評価した。シリカ添加 5 日後の細胞傷害性を評価した結果、nSP300 および mSP1000 は、30 µg/mL の作用濃度では、細胞生存率はコントロール群と同等であることが明らかとなった。一方で、nSP70 は 10 µg/mL では細胞生存率がコントロール群と同等であるものの、30 µg/mL 作用濃度では、およそ 40%まで細胞生存率を低下させた (Fig.5)。すなわち本結果は、ナノサイズになると細胞傷害性が顕著に増大することを示すものであり、前述の ROS 産生増大などに起因している可能

性も考えられる。次に、各粒子径のシリカが RAW264.7 細胞の破骨細胞分化へ及ぼす影響を、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 活性を指標として評価した。なお、以後の実験におけるシリカの作用濃度は、WST-8 試験で細胞傷害性の認められなかった 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。まず、破骨細胞分化因子である RANKL とシリカの共存下で、TRAP 活性を解析した。その結果、RANKL と各シリカを共添加した場合には、TRAP 活性は RANKL 単独添加群とほぼ同等であり、シリカの粒子径の違いによる変化も観察されなかった (Fig. 6)。さらに、TRAP 染色陽性かつ多核化した(核が 3 つ以上)細胞を、分化後の破骨細胞として計数した。その結果、RANKL 単独添加群と比較して、RANKL/nSP70 共添加群では、破骨細胞数が多い傾向が認められたものの、いずれの粒子径のシリカを RANKL と共処置しても、破骨細胞数に有意な変化は認められなかった (Fig.7)。以上の結果から、RANKL 共存下において、少なくともマクロファージ細胞自体に傷害性を起こさない濃度では、シリカの粒子径に関わらず破骨細胞の分化に影響を及ぼさないことが推察された。破骨細胞分化においては、RANKL の刺激によって Rac1 を介して ROS が産生することが知られており(53)、ROS は破骨細胞分化において重要な因子であることが明らかとなっている。これまでに筆者らのグループでは、これまでの検討でナノシリカが ROS 産生や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を誘導することを見出している(52)。本検討では、RANKL 共存下では、シリカは破骨細胞分化に影響を及ぼさない可能性が推察されたが、筆者らのこれまでの結果を加味すると、単独で作用した場合、破骨細胞の分化誘導に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで次に、ナノシリカが RANKL 非共存下でマクロファージから破骨細胞への分化へ与える影響を検討した。なお、本検討においてもシリカ作用濃度は細胞傷害性の認められなかった 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で実施した。その結果、nSP70 作用群においてのみ、RANKL 添加時と比較して圧倒的に少ないものの、TRAP 活性の増加、多核化した TRAP 陽性細胞が認められた。すなわち、nSP70 により、わずかながら破骨細胞への分化が促進されることが示唆された (Fig. 8)。次に、nSP70 による破骨細胞分化の促進メカニズム解析の一環として、ROS 産生量を測定した結果、今回の作用濃度において、ROS の産生はほとんど認められず、nSP70 単独添加による破骨細胞の分化に ROS が関与している可能性は低いものと考えられた (data not shown)。そこで、破骨細胞分化を促進することが報告されている TNF- α の産生量を評価した。その結果、シリカの粒子径の減少に伴い、TNF- α の産生量の増加が認められた (Fig.9)。従って、nSP70 を作用させることで、RAW264.7 細胞が TNF- α を産生し、オートクライン的に作用し、破骨細胞への分化を促進している可能性が考えられた (Fig.10)。RANKL 非存在下において、TNF- α が破骨細胞分化を促進することは既に報告されている事実であるが(54)、TNF- α によって分化した破骨細胞は、それだけでは活性化しないことが知られている。すなわち、Nano-Safety-Design

研究の推進にあたり、今後は破骨細胞の活性化に関与する因子、例えば炎症性サイトカインのプロファイルなどを詳細に検討し、nSP70 単独添加による破骨細胞の分化促進メカニズムを精査する必要がある。

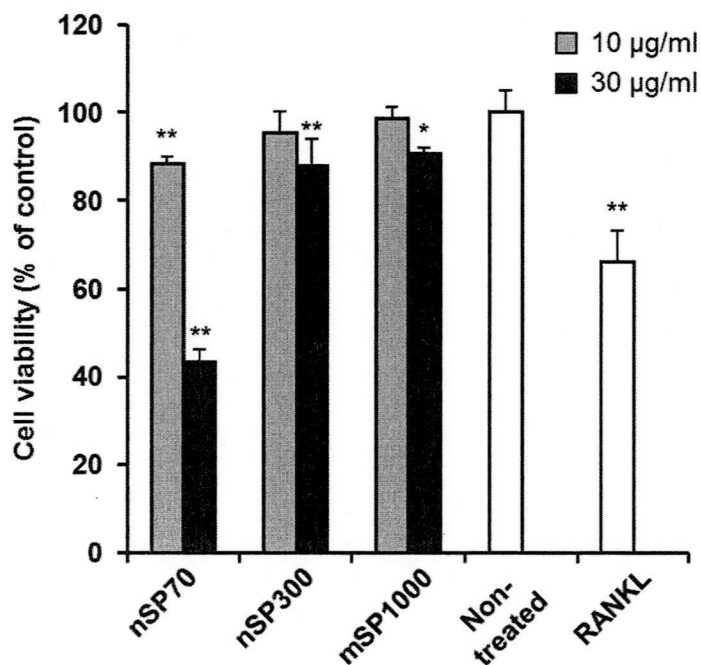


Figure 5. Cytotoxicity of silica particles on macrophages. The cytotoxic effect of nSP70, nSP300 or mSP1000 on murine macrophage cell line (RAW 264.7 cells) after 5-d incubation was evaluated using the WST-8 assay. The percentage increase in cytotoxicity was calculated relative to the vehicle-treated control. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). * P < 0.05, ** P < 0.01 v.s. vehicle-treated control.

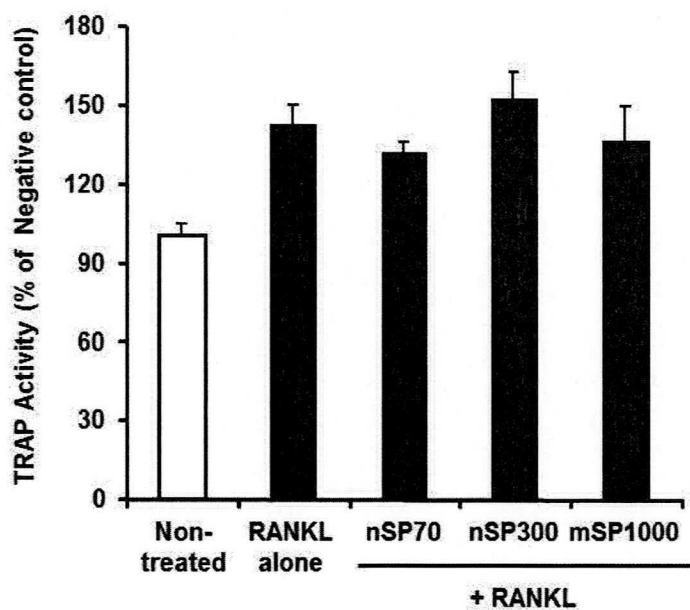


Figure 6. Effect of silica particles on the RANKL-induced TRAP activity in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with 10 µg/ml silica particles and 30 ng/ml RANKL for 5 days. TRAP activity was calculated relative to the Non-treated group (medium without RANKL). Data are expressed as the mean \pm SD (n=3).

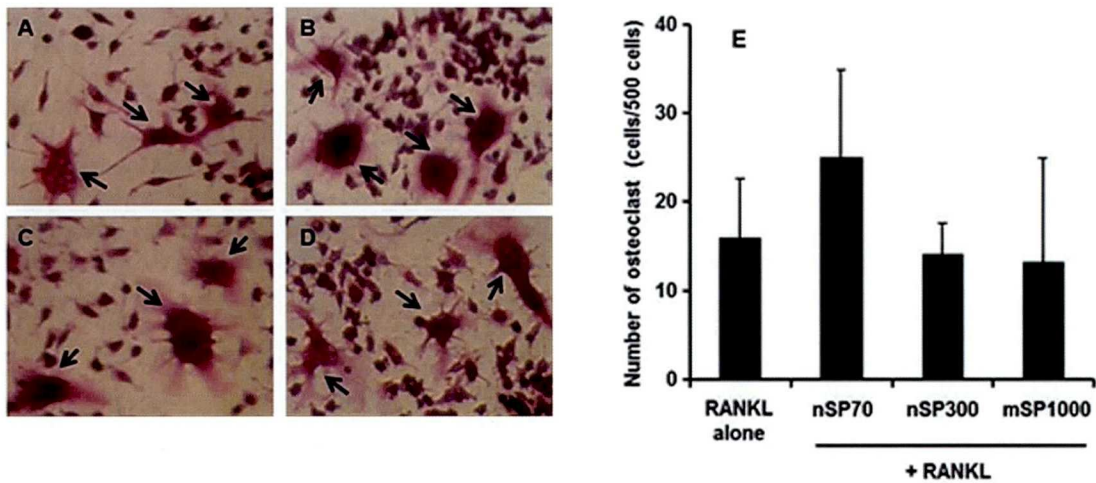


Figure 7. Effect of silica particles on the RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with 10 µg/ml silica particles and 30 ng/ml RANKL for 5 days. Osteoclast genesis was evaluated by TRAP staining. A: RANKL alone (30 ng/ml), B: nSP70 10 µg/ml with RANKL 30 ng/ml, C: nSP300 10 µg/ml with RANKL 30 ng/ml, D: mSP1000 10 µg/ml with RANKL 30 ng/ml. Arrows show osteoclast cells (TRAP-positive multi-nucleate cells (> 3 nuclei)). Magnifications of all photographs are ×400. E: The numbers of TRAP-positive multi-nucleate cells (> 3 nuclei) were counted as osteoclasts in three different areas. Data are expressed as the mean ± SD (n=3)

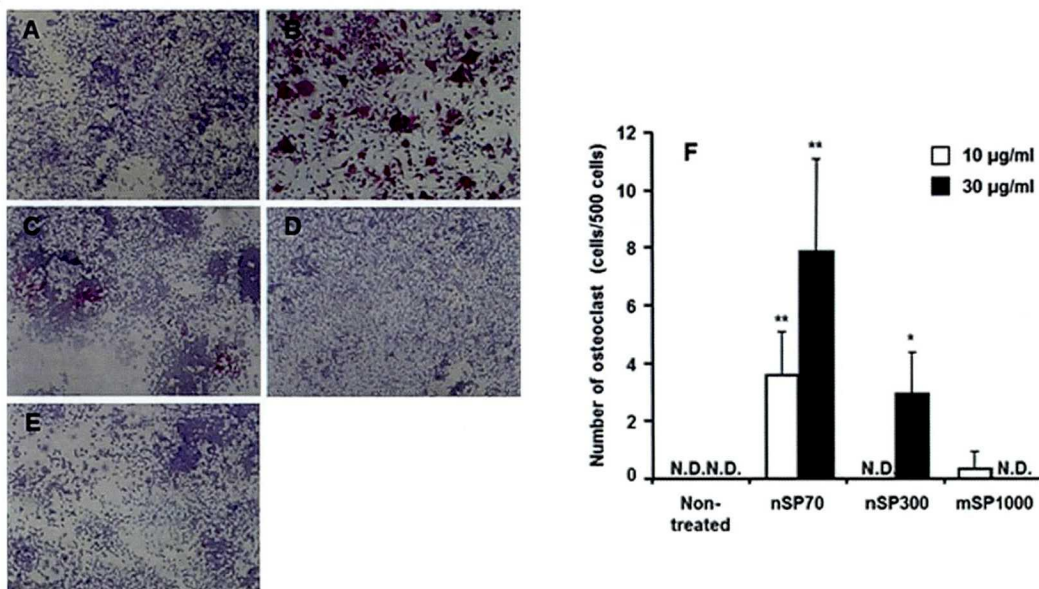


Figure 8. nSP-induced osteoclast differentiation without RANKL in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with SP or RANKL for 5 days. Osteoclast genesis was confirmed by TRAP staining. A: Non-treated, B: RANKL 30 ng/ml, C: nSP70 10 µg/ml, D: nSP300 10 µg/ml, E: mSP1000 10 µg/ml. F: The numbers of TRAP-positive multi-nucleate cells (> 3 nuclei) were counted as osteoclasts in three different areas. Data are expressed as the mean ± SD (n=3). ***P* < , **P* < 0.05 vs. Non-treated.

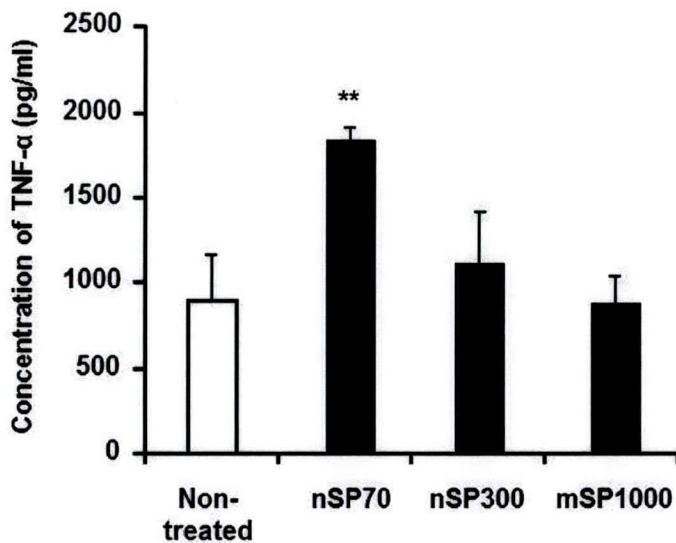


Figure 9. TNF- α production induced by silica particles in RAW264.7. RAW264.7 cells were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ silica particles for 5 days. The concentration of TNF- α in culture supernate were measured by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). ** $P < 0.01$ vs. Non-treated.

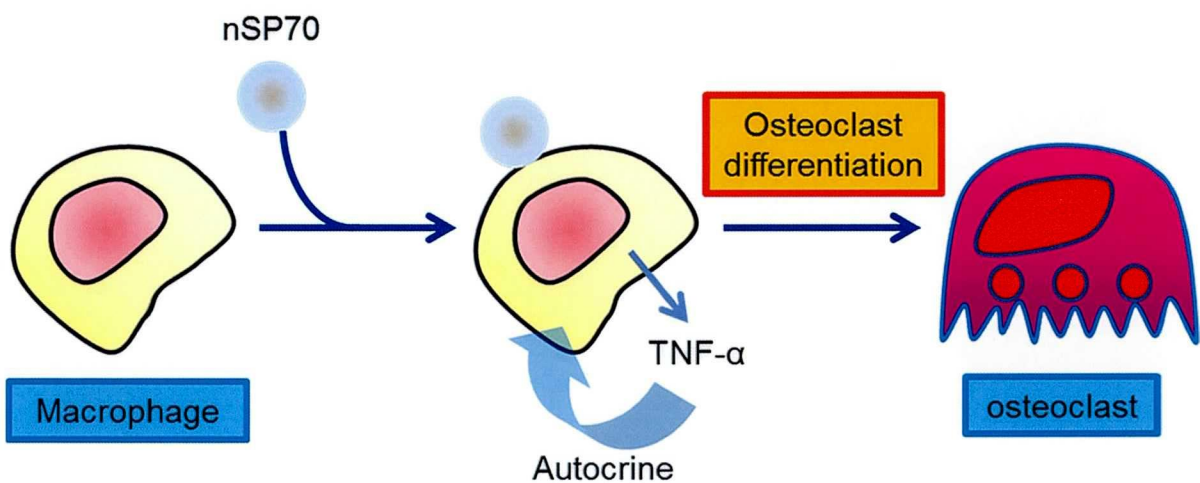


Figure 10. Mechanism of osteoclast differentiation by amorphous silica nanoparticles in murine macrophage.

インプラントの崩壊産物である粒子状物質が骨破壊を誘発してしまうという事実は、歯科領域では古くから報告されており、人工関節や歯科インプラント治療を行ううえでの大きな問題となっている。これは、粒子が貪食されることにより、TNF- α 、IL-1 や IL-6 などの破骨細胞分化を促進するサイトカインが放出されることによるものであると考えられている(55, 56)。また、マイクロサイズ(4~9 μm 程度)の粒子が骨髄細胞のRANKL 発現量や破骨分化関連遺伝子の発現を増加させることも報告されている(57, 58)。さらに、粒子径が数十~数百 μm より大きい粒子によるサイトカイン産生は、数 μm の粒子よりも低い傾向にあることも報告されている(59)。これらの報告から、マイクロメートルオーダーの粒子においては、粒子径の減少に伴って炎症反応が強く惹起され、サイトカインによる破骨細胞分化が促進されるものと考えられる。一方で、インプラント崩壊産物の粒子径が、数 μm 程度までの大きさであることから、ナノサイズの粒子を用いた検討はほとんどなされておらず、ナノマテリアルの骨への影響は不明であった。本検討で筆者らは、ナノサイズおよびサブミクロンサイズの従来型シリカを用いて、破骨細胞分化に及ぼす影響を評価し、破骨細胞分化誘導剤である RANKL 非共存下であるにも関わらず、100 nm 以下のナノシリカのみが、破骨細胞分化を促進することを初めて明らかとした。また、破骨細胞への分化過程における TNF- α 産生量が、サブミクロンサイズの従来型シリカと比較してナノシリカ添加群で高いことも見出し、RANKL 非共存下での破骨細胞分化に TNF- α が関与している可能性を明らかとした。筆者らは、これまでの検討からも、粒子径が小さいほど ROS 産生や TNF- α 産生が増加することを見出しており、その原因が細胞内移行経路の違いである可能性を明らかとしている(52)。すなわち、ナノシリカによる破骨細胞分化促進には粒子径が重要であり、特定の経路から細胞内に取り込まれることで、より強いサイトカインの産生やそれに起因する破骨細胞への分化が生じる可能性が考えられた。また、EU では既に、化粧品材料の動物を用いた安全性評価が禁止されており、今後、動物モデルを用いての安全性評価ができなくなる可能性がある。従って、*in vivo* においてナノシリカが骨代謝に及ぼす影響を評価し、今回の *in vitro* での結果との相関を評価することで、生体反応を反映した *in vitro* 評価系を構築していくことが重要である。今回は、単一の細胞を用いての *in vitro* 評価であり、実際に生体で曝露される場合においては、破骨細胞は骨芽細胞などの種々の細胞と共存して存在していることから、これらの細胞共存下では、別の反応を示す可能性も考えられる。事実、骨髄への粒子の刺激が RANKL の発現増加などを誘発するという報告もあることから(57)、共培養の系を用いるなどの検討を行い、生体反応を反映した *in vitro* 評価系を構築する必要がある。これらの検討によって、オーラルケア製品に適用可能な安全なナノマテリアルの評価系が構築され、迅速かつ高確度なナノマテリアルの安全性評価手法の確立に繋がるであろう。

総括

数あるナノマテリアルの中でも、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のひとつである。ナノシリカは微小化すればするほど、使用感や透明性の向上といった様々な有用機能が付与できるため、この数年でナノシリカのサイズダウンや分散性を向上する技術の開発が加速度的に進展している。現在では、直径が 2.5 nm 程度のいわゆるサブナノサイズのシリカまでも開発されつつあり、現在製品に使用されているナノシリカに関しても、今後より微小化したサイズのものに置き換わっていくことが強く予想される。一方で、現状ではナノメートルオーダー（数十 nm）のナノシリカでさえも、高度に安全性を保障するための情報は乏しく、今後ナノマテリアルを安全・安心して使用していくためにも、ナノシリカの安全性情報を収集することは急務である。そこで筆者は、粒子径が均一でかつ分散性に優れた、実験グレードの 1 次粒子径が 70 nm のナノシリカ（nSP70）を用いて、経皮曝露後の皮膚組織内局在を解析した。その結果、経皮塗布された nSP70 は最も強固なバリアである皮膚バリアを通過し、表皮・真皮の細胞内や近傍の所属リンパ節内に侵入し得ることを明らかとした。本結果は、ナノシリカの経皮曝露実態情報となる有用な知見となるのみならず、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も実験的に示すものである。今後は、ヒトへの外挿性の観点から、よりヒトに近い皮膚構造をもつブタを用いた検討や、ヒトの皮膚を用いた *in vitro* での検討などが必要であると考えている。また、口腔曝露を想定し、*in vitro* で骨代謝に及ぼす影響を解析したところ、ナノシリカは分化促進因子との共存下においては骨芽細胞および破骨細胞の分化過程には影響を及ぼさないものの、ナノシリカ単独で作用した際には、破骨細胞への分化を促進する可能性が示された。この結果は、これまでのナノマテリアルの安全性評価研究において全くの手つかずであった口腔組織への影響を解析し、骨形成への影響を明らかとした点で、極めて意義深いと考えられる。また、ナノシリカが骨吸収促進に影響を及ぼす可能性が低いという本結果は、高機能性の歯磨き粉や歯科材料として着目されているナノシリカの安全性を示す、重要な知見であると考えている。

本研究の成果は、ナノシリカの安全性を評価するにあたって、ナノシリカを従来型シリカとは別個の素材として捉えた新たな安全性評価の必要性を示唆する結果である。なお筆者らは、ナノシリカに関しては、アミノ基やカルボキシル基で表面を修飾することで安全性を飛躍的に向上させ得ることを認めており(14, 15, 60)、本情報は安全性が高度に保証されたナ

ノマテリアルの設計に資する、いわゆる Nano-Safety Design に向けた基盤情報となるであろう。また、近年の健康リスクに関する科学委員会(SCENHIR)によるナノ物質の定義に関する勧告では、粒子径だけでなく、比表面積や粒子数からナノマテリアルを定義するべきであると記載されている。そのため、現在は重量オーダーで評価することが主流であるが、今後は、比表面積や粒子数の観点からもナノマテリアルの安全性情報を収集し、表面積の影響が大きいと考えられる現象と取り込みや動態といった影響が少ないと考えられる現象について、区分して考察してゆく必要があるだろう。さらに、本検討で用いた分散性の高いナノシリカに限らず、今後のナノ安全性評価研究においては、凝集性の高いものや、既に実用化されているサンプルを用いて、ナノマテリアルの純度や分散/凝集状態といった品質にも十分に考慮した解析を進めることが重要であろう。事実、ナノマテリアルの体内吸収性評価にあたり、たとえ1次粒子径はナノサイズであっても、素材によって分散性が異なり凝集状態が変わることから、体内吸収性に違いがあることが判明している。しかし、分散性や凝集状態について詳細に考察されておらず、品質管理に向けた情報収集には程遠い。従って、今後、品質に考慮した解析を推進することで体内吸収性を初めとした曝露実態情報に新たな示唆を与えることができるであろう。さらに、化粧品など、経皮適用される製品や歯などの口腔組織に適用されるオーラルケア製品にナノマテリアルを応用する際に、ナノマテリアルの分散/凝集状態を適切に調整することにより、使用目的によって、皮膚表面、表皮、真皮、また歯や歯を支える歯槽骨など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う、有用性と安全性を具備した製品の開発が実現する可能性も考えられる。このように、今後の Nano-Safety Design 研究において、有効性（ベネフィット）の観点からの研究もナノマテリアルの安全・安心な利用促進に向けて必要であろう。これらの検討が、ナノマテリアルの安全性確保（Nano-Safety Science による成果）や安全なナノマテリアルの創製（Nano-Safety Design による成果）に資するのみならず、国民や社会が、安全かつ安心して、何よりも納得のうえで、ナノマテリアルの継続的な利用を可能にし、社会受容を図るための Sustainable Nanotechnology の発展に貢献することを祈念している。

結論

ナノマテリアルの安全性確保に向けて、本博士論文では、ナノマテリアルの経皮・口腔毒性に関する基礎情報を収集し、以下の結論を得た。

1. 直径 70 nm の表面未修飾ナノシリカ (nSP70) が生体で最も強固な皮膚バリアを透過して、表皮や真皮の細胞内に侵入することを示した。
2. ナノシリカは、サブミクロンサイズ以上の従来型シリカとは異なる ROS 誘導性を示すことを明らかにした。
3. ナノシリカが、MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化には影響しないことを明らかとした。
4. ナノシリカは、RANKL 存在下では RAW264.7 細胞の破骨細胞分化には影響しないものの、RANKL 非存在下において分化促進に働く可能性を明らかとした。

以上、本研究では、100 nm 以下のナノシリカが、経皮/口腔毒性の点において、サブミクロンサイズ (数百 nm~数十 μm) の従来型シリカとは異なる性質を発揮することを実証した。特に、オーラルケア製品に、多くのナノマテリアルが含有されているものの、口腔毒性に着目した研究は皆無に等しく、上記は、その先駆けとなる知見である。またナノシリカが骨吸収促進に影響を及ぼす可能性が低いという結果は、高機能性の歯磨き粉や歯科材料として着目されているナノシリカの安全性評価に有用な情報をもたらすことを示している。さらに、今回の破骨細胞および骨芽細胞を用いた試験方法は、*in vitro* での口腔における安全性評価の基盤に繋がると考えられる。今後は、本論文で得られた情報を基盤として、ナノマテリアルの安全性確保や社会受容が進展し、ナノマテリアルを活用した利便性の高い豊かな社会が構築されることを願っている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野・教授 堤 康央先生には御懇切な御指導、御鞭撻を賜ると共に、終始温かい御配慮を賜りました。ここに衷心より深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 准教授 吉岡靖雄先生、講師 伊藤徳夫先生、助教 東阪和馬先生、事務員 橋野修代さま、技術補助員 長橋里佐子さまに心より深謝致します。

さらに本研究において、貴重な御指導を頂きましたアステラス製薬株式会社 吉川友章先生、国立医薬品食品衛生研究所 鍋裕美先生、大阪大学大学院薬学研究科 吉田徳幸先生に心より御礼申し上げます。

また本研究に際し、温かい御指導と種々貴重な御助言を賜りました独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト 角田慎一先生(大阪大学大学院薬学研究科連携大学院医薬基盤科学分野 招聘准教授)、鎌田春彦先生、向 洋平先生、長野一也先生、井上雅己さま、森 功美子さま、國丸亜紀さま、Sanford Research/USD 阿部康弘先生、神戸学院大学薬学部 山下琢矢先生に心より御礼申し上げます。

加えて、本研究を遂行するにあたり、多大な御協力を頂きました、山下浩平修士、松山恵吾修士、仲里泰太郎修士、栃木彩恵子修士、平井敏郎修士、森下裕貴修士、宇治美由紀学士、高橋秀樹学士、三里一貴学士、市橋宏一学士、宇高麻子学士、森宣瑛学士、山口真奈美特別実習生に厚く御礼申し上げます。また研究生を送るにあたり、大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の院生・学生の皆さまに謹んで感謝致します。

本稿を纏めるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科 那須正夫先生、高木達也先生、平田收正先生に心より御礼申し上げます。

最後に、常に温かく見守り支えてくれた家族およびサンスター株式会社に万感の思いで感謝致します。

引用文献

1. OECD, *Nanotechnologies at the OECD*, (2008).
2. N. Sozer, J. L. Kokini, Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends Biotechnol* 27, 82 (Feb, 2009).
3. S. E. McNeil, Unique benefits of nanotechnology to drug delivery and diagnostics. *Methods Mol Biol* 697, 3 (2011).
4. S. Sonkaria, S. H. Ahn, V. Khare, Nanotechnology and its impact on food and nutrition: a review. *Recent Pat Food Nutr Agric* 4, 8 (Apr 1, 2012).
5. D. Knopp, D. Tang, R. Niessner, Review: bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal Chim Acta* 647, 14 (Aug 4, 2009).
6. H. Nabeshi *et al.*, Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie* 65, 199 (Mar, 2010).
7. H. Nabeshi, T. Yoshikawa, T. Imazawa, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, [Safety assessment of nanomaterials using toxicokinetics and toxicoproteome analysis]. *Yakugaku Zasshi* 130, 465 (Apr, 2010).
8. K. Yamashita *et al.*, Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. *Inflammation* 33, 276 (Aug, 2010).
9. T. Yoshida *et al.*, Urban aerosols induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation in vivo. *Biol Pharm Bull* 33, 780 (2010).
10. K. Higashisaka *et al.*, Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. *Biomaterials* 32, 3 (Jan, 2011).
11. T. Yoshida *et al.*, Potential adjuvant effect of intranasal urban aerosols in mice through induction of dendritic cell maturation. *Toxicol Lett* 199, 383 (Dec 15, 2010).
12. H. Nabeshi *et al.*, Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Part Fibre Toxicol* 8, 1 (2011).
13. H. Nabeshi *et al.*, Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials* 32, 2713 (Apr, 2011).
14. K. Yamashita *et al.*, Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol* 6, 321 (May, 2011).
15. H. Nabeshi *et al.*, Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett* 6, 93 (2011).
16. T. Yoshida *et al.*, Promotion of allergic immune responses by intranasally-administrated nanosilica particles in mice. *Nanoscale Res Lett* 6, 195 (2011).

17. H. Nabeshi *et al.*, Effect of amorphous silica nanoparticles on in vitro RANKL-induced osteoclast differentiation in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett* **6**, 464 (2011).
18. T. Hirai *et al.*, Size-dependent immune-modulating effect of amorphous nanosilica particles. *Pharmazie* **66**, 727 (Sep, 2011).
19. Y. Morishita *et al.*, Detection of titanium dioxide particles on frozen tissue sections using synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis. *Pharmazie* **66**, 808 (Oct, 2011).
20. H. Nabeshi *et al.*, Amorphous nanosilicas induce consumptive coagulopathy after systemic exposure. *Nanotechnology* **23**, 045101 (Feb 3, 2012).
21. T. Hirai *et al.*, Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection. *Part Fibre Toxicol* **9**, 3 (2012).
22. T. Yoshida, T. Yoshikawa, H. Nabeshi, Y. Tsutsumi, [Relation analysis between intracellular distribution of nanomaterials, ROS generation and DNA damage]. *Yakugaku Zasshi* **132**, 295 (2012).
23. Y. Morishita *et al.*, Distribution and histologic effects of intravenously administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice. *Biochem Biophys Res Commun* **420**, 297 (Apr 6, 2012).
24. T. Yoshida *et al.*, Amorphous nanosilica particles induce ROS generation in Langerhans cells. *Pharmazie* **67**, 740 (Aug, 2012).
25. T. Hirai *et al.*, Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days. *Pharmazie* **67**, 742 (Aug, 2012).
26. T. Hirai *et al.*, Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **427**, 553 (Oct 26, 2012).
27. K. Higashisaka *et al.*, Hemopexin as biomarkers for analyzing the biological responses associated with exposure to silica nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* **7**, 555 (2012).
28. T. Yoshida *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**, 748 (Nov 2, 2012).
29. T. Yoshida, Y. Yoshioka, Y. Tsutsumi, The Safety Assessment of Nanomaterials for Development of Nano-cosmetics. *Yakugaku Zasshi* **132**, 1231 (2012).
30. T. Nagano *et al.*, Potential of acute-phase proteins as biomarkers for sub-nano platinum exposure. *Pharmazie* **67**, 958 (Nov, 2012).
31. Y. Abe, [Safety studies of nanomaterials about intracellular distribution and genotoxicity]. *Yakugaku Zasshi* **131**, 215 (Feb, 2011).
32. K. Nagano, [Biodistribution of nanosilica particles in pregnant mice and the potential risk on the reproductive development]. *Yakugaku Zasshi* **131**, 225 (Feb, 2011).

33. S. Tsunoda, [Transdermal penetration and biodistribution of nanomaterials and their acute toxicity in vivo]. *Yakugaku Zasshi* 131, 203 (Feb, 2011).
34. Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, [Recent topics of nanotox studies for their safety. Foreword]. *Yakugaku Zasshi* 131, 193 (Feb, 2011).
35. Y. Yoshioka, [Nanosafety studies of nanomaterials about biodistribution and immunotoxicity]. *Yakugaku Zasshi* 131, 221 (Feb, 2011).
36. A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622 (Feb 3, 2006).
37. T. Xia *et al.*, Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano letters* 6, 1794 (Aug, 2006).
38. L. J. Mortensen, G. Oberdorster, A. P. Pentland, L. A. Delouise, In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano letters* 8, 2779 (Sep, 2008).
39. B. D'Autreaux, M. B. Toledano, ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 813 (Oct, 2007).
40. S. M. Beak, Y. S. Lee, J. A. Kim, NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor-kappaB in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie* 86, 425 (Jul, 2004).
41. S. L. Cassel *et al.*, The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9035 (Jul 1, 2008).
42. K. Hansen, B. T. Mossman, Generation of superoxide (O₂⁻) from alveolar macrophages exposed to asbestiform and nonfibrous particles. *Cancer Res* 47, 1681 (Mar 15, 1987).
43. 光井武夫, 新化粧品学. 南山堂, (2001).
44. R. M. Gaikwad, I. Sokolov, Silica nanoparticles to polish tooth surfaces for caries prevention. *Journal of dental research* 87, 980 (Oct, 2008).
45. W. E. Muller *et al.*, Morphogenetic activity of silica and bio-silica on the expression of genes controlling biomineralization using SaOS-2 cells. *Calcif Tissue Int* 81, 382 (Nov, 2007).
46. B. Couzinet, S. Brailly, P. Bouchard, G. Schaison, Progesterone stimulates luteinizing hormone secretion by acting directly on the pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 374 (Feb, 1992).
47. A. S. Holpuch *et al.*, Nanoparticles for local drug delivery to the oral mucosa: proof of principle studies. *Pharm Res* 27, 1224 (Jul, 2010).
48. N. H. Bell, RANK ligand and the regulation of skeletal remodeling. *J Clin Invest* 111, 1120 (Apr, 2003).

49. W. Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4828 (Jun, 1990).
50. H. Yoshida *et al.*, The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442 (May 31, 1990).
51. Y. Y. Kong *et al.*, OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315 (Jan 28, 1999).
52. T. Morishige *et al.*, Suppression of nanosilica particle-induced inflammation by surface modification of the particles. *Arch Toxicol* 86, 1297 (Aug, 2012).
53. N. K. Lee *et al.*, A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 106, 852 (Aug 1, 2005).
54. K. Kobayashi *et al.*, Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191, 275 (Jan 17, 2000).
55. D. W. Howie, D. R. Haynes, S. D. Rogers, M. A. McGee, M. J. Pearcy, The response to particulate debris. *Orthop Clin North Am* 24, 571 (Oct, 1993).
56. J. O. Galante, J. Lemons, M. Spector, P. D. Wilson, Jr., T. M. Wright, The biologic effects of implant materials. *J Orthop Res* 9, 760 (Sep, 1991).
57. D. P. Pioletti, A. Kottelat, The influence of wear particles in the expression of osteoclastogenesis factors by osteoblasts. *Biomaterials* 25, 5803 (Dec, 2004).
58. J. C. Clohisy, E. Frazier, T. Hirayama, Y. Abu-Amer, RANKL is an essential cytokine mediator of polymethylmethacrylate particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res* 21, 202 (Mar, 2003).
59. P. Laquerriere *et al.*, Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 24, 2739 (Jul, 2003).
60. T. Morishige *et al.*, The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1beta production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials* 31, 6833 (Sep, 2010).

