

ナノマテリアルの細胞内動態と遺伝毒性

阿部 康弘

Safety Studies of Nanomaterials about Intracellular Distribution and Genotoxicity

Yasuhiro ABE

Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation,
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

(Received September 3, 2010)

Recently, nanomaterials (NMs) showing useful properties such as controlled release and tissue permeability have been developed for practical use as medicine and cosmetics. On the other hand, because NMs possess innovative properties, kinetics, and biological effects distinct from those of micro size bulk materials, the potential harmful effects of NMs on humans are raising concerns about their safety. Therefore, there is an urgent need for risk assessment of NMs. To achieve this, it is most important to analyze the relationship between physicochemical properties such as particle size and surface characteristics, cellular distribution and biological effects, allowing prediction and avoidance of risk in using NMs. However there is little information about association of nanomaterial properties with kinetics (exposure, absorption, distribution, and excretion). In this respect, we have not only collected hazard information on NMs but have also analyzed the linkage between silica particle size and their hazards. We have demonstrated that NM with a diameter of under 100 nm can penetrate the stratum corneum of mouse skin and are taken up by living cells such as keratinocytes and Langerhans cells. Additionally, NM taken up by cells entered the nucleus, indicating the risk of genotoxicity. In this review, we would like to discuss the relationship between particle size, intracellular distribution, and hazard effect.

Key words—nanomaterial; NanoSafety; nanosilica; safety science

1. はじめに

近年、わが国においては、徐放能や組織浸透・拡散能といった有用機能を発揮するナノマテリアルの開発と、これらの医薬品・食品・化粧品への導入・実用化が進展している。一方で欧米各国では、このようなナノマテリアル特有の物性に起因する革新的機能が逆に、ヒトの健康環境に負の影響（ナノ毒性；NanoTox）を及ぼす可能性を懸念し、ナノマテリアルの安全性評価（NanoSafety 評価）にも力を注ぎ始めている。^{1,2)} 事実、粒径 100 nm 以下のナノマテリアルが従来までのサブミクロンサイズ以上の素材（凝集体としてサブミクロンサイズ以上になるナノマテリアルを含む）とは異なった体内吸収性や体内動態を示すことが、少しずつ判明してきてい

る。例えば、筆者らの研究グループの検討においても、直径が 70 nm の非晶質ナノシリカを皮膚に曝露させた場合、角質バリアを通過して体内に吸収され得ることを見出ししている。同時に、直径が 300 nm, 1000 nm の非晶質シリカは皮膚角質バリアを通過しないことを確認しており、これらの結果は、ナノシリカは 100 nm 程度以下のサイズになると初めて経皮吸収性を発揮するようになり、体内曝露につながり得ることを示している。さらに体内に移行し、組織に分布したナノマテリアルは、最終的に組織細胞に取り込まれる可能性が考えられる。しかし、細胞内での動態に着目したナノマテリアルの安全性研究はほとんど報告されていない。

今やナノマテリアルは、化粧品材料や食品添加物を始めとして、既にわれわれヒトに直接適用される製品に使用されている。これらは、年齢や疾患の有無を問わず、あらゆるヒトが生涯に渡って使用・摂取し続けるものであることから、たとえわずかな量であっても、長期に渡って曝露することによって

独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト
(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8)

e-mail: yasuhiko@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会 130 年会シンポジウム S18 で発表されたものを中心に記述したものである。

健康に問題が生じる可能性が危惧される。そのため、ナノマテリアルの使用が増加しつつある今こそ、ナノマテリアルの詳細な安全性評価及び安全性確保に向けた取り組みが必要である。しかしながら、ナノマテリアルの安全性研究においては、いまだハザード情報が散在するばかりで、安全性評価指針の策定や安全なナノマテリアルの設計指針につながる情報の抽出には至っておらず、特にナノマテリアルの細胞内動態やオルガネラ蓄積性に関する情報は、ハザード情報ですら圧倒的に不足しているのが現状である。したがって、ヒトの健康環境を確保しつつナノマテリアルの恩恵を最大限に享受した豊かな社会を実現するためには、まずナノマテリアルと従来までのサブミクロンサイズ以上の素材との体内/細胞内動態や生体/細胞への影響における相違点を科学的根拠に基づいて明らかにすることが急務であり、それらの情報を基盤として、より具体的な安全性評価法を確立することが重要である。以上の観点から筆者らは、種々のナノマテリアルの中でも、生産量・使用量・用途の点で、最もわれわれの生活に浸透している非晶質ナノシリカをモデルナノマテリアルとして、素材の物性（サイズ、表面電荷、親/疎水バランス、形状など）が体内/細胞内動態や生体/細胞応答に与える影響の解析を進めている。これらナノマテリアルの物性-動態-安全性の関連情報を集積し、ナノマテリアルと従来の素材との違いを明確化するとともに、それらの因果関係を精査することによって、最終的にナノマテリアルの動態情報から安全性を評価する方法の確立、及び安全なナノマテリアルの開発と実用化の支援の実現につながるものと考えている。そこで本稿では、非晶質ナノシリカが多くの化粧品に既に使用されているという現状を踏まえて、皮膚細胞への影響を中心に検討を進め、特に、様々なサイズの非晶質シリカについて、細胞内動態や細胞への影響を解析した結果を紹介したい。

2. 非晶質ナノシリカの体内動態の評価

非晶質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などの化粧品基材、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。³⁾ また、ナノシリカは食品中に最大2%、化粧品におおよそ20%程度が配合されている。従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカに

ついで安全性評価は2006年の欧州化学物質生態毒性・毒性センターにより実施された。⁴⁾ その結果、サブミクロンサイズ以上のシリカ（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。しかし、筆者らは分散性の高い直径70 nmの非晶質ナノシリカが皮膚バリアを通過し肝臓にまで移行する可能性を示している（角田らの稿を参照）。したがって、細胞の大きさよりも小さな100 nm以下の非晶質ナノシリカが組織に曝露した際には、細胞内小器官といった深部にまで到達してしまうことが危惧される。細胞膜におけるデスレセプターの活性化や核におけるDNAの損傷などは、多くの細胞にアポトーシスを誘導することが知られているが、さらに近年、小胞体やミトコンドリアなど他の細胞内小器官での障害を発端としたストレス応答がアポトーシスの誘導につながり得ることが明らかとなりつつある。⁵⁾ そのため、化粧品素材として既に実用化されている非晶質ナノシリカをモデル粒子として用い、直径100 nm以下のナノシリカの細胞内における詳細な動態情報を収集し、細胞応答に与える影響との関連解析を進めることは急務であると言える。

そこで本研究ではまず、ヒト皮膚角化細胞株（HaCaT細胞）を用いて、粒子サイズが異なる非晶質シリカの細胞内動態-細胞影響に与える影響について検証を行った。粒子径が70 nm（nSP70）のナノシリカ、その対照として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それぞれHaCaT細胞と24時間共培養し、その増殖性を³Hチミジンの取り込みを指標に検証した [Fig. 1(A)]。その結果、いずれの粒子を作用させた場合においても粒子濃度依存的な細胞増殖抑制効果が認められ、その効果はnSP70添加群で最も強いことが判明した。さらに、ナノシリカの細胞膜に対する傷害性をLactate dehydrogenase (LDH) release assayにより評価したところ、細胞増殖試験のデータと相関して、粒子サイズの減少に伴い、細胞膜に対する傷害性が増大する傾向が認められた [Fig. 1(B)]。これらの結果から、非晶質ナノシリカとサブミクロンサイズ以上の従来型シリカとでは異なる細胞膜傷害性を示すこと、つまり粒子サイズが細胞に対する作用に大きく影響することが示された。続いて、非晶質シリカの粒子サイズが細

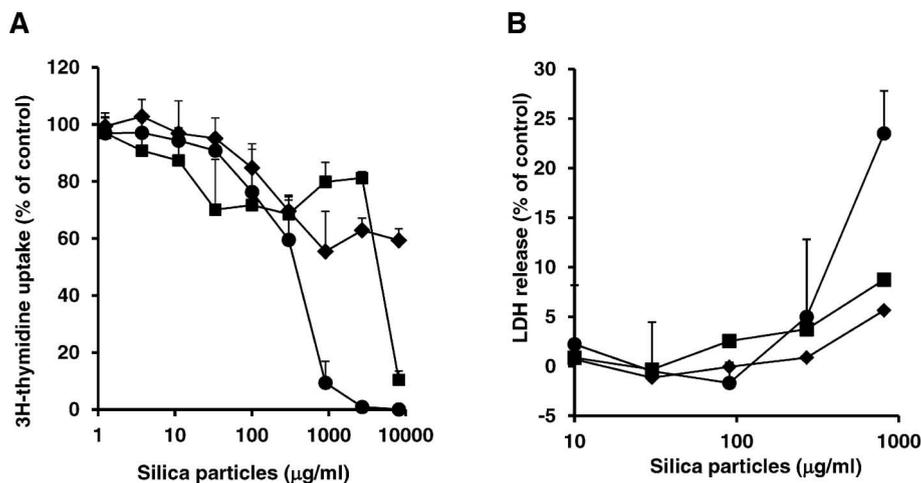


Fig. 1. Effect of Various Sized Silica Particles on Cell Proliferation

A) Proliferation of HaCaT cells following 24 h of incubation with the indicated concentrations of nSP70 (circles), nSP300 (squares) and mSP1000 (diamonds) were measured using the tritium thymidine uptake assay. B) Cellular membrane damage in HaCaT cells after incubation with nSP70 (circles), nSP300 (squares) and mSP1000 (diamonds) for 24 h was evaluated by the LDH release assay. The percentage cellular membrane damage was calculated relative to the negative (medium) controls. Each data point represents mean \pm S.D. ($n=3$).

胞反応性に影響を与える機構の解明を目指して、各粒子の細胞内局在を解析した。100 $\mu\text{g/ml}$ に調製した nSP70, nSP300, 及び mSP1000 のシリカを HaCaT 細胞に添加した後、24 時間後に透過型電子顕微鏡を用いて *in vitro* における細胞内取り込み、及び細胞内局在の解析を行った。その結果、従来型シリカである nSP300 あるいは mSP1000 を適用したいずれの群においても、各シリカが細胞内に侵入した像が認められた。また、mSP1000 添加群においては細胞内に侵入した粒子の周辺にリソソーム様小胞が過剰に形成する像が認められた。それに対して、nSP70 は、細胞内に侵入するだけでなく、その一部は核膜を通過して核内にまで侵入していた。さらに興味深いことに、核内に到達した nSP70 の大部分が核小体に集積している像が認められた。以上の結果より、非晶質シリカは、粒子径の違いによってその細胞内局在が大きく変動することが明らかとなった。特に、nSP70 が核内にまで移行するという特徴的な細胞内動態を示すことを加味すると、核機能や遺伝子に着目した安全性評価を行うことが必要であることが示された。

3. 非晶質シリカの変異原性試験及び遺伝子に与える影響の解析

細胞の核は、DNA や RNA の合成・保存の場であり、遺伝子の発現を調節することで細胞の恒常性を維持していることから、nSP70 が細胞に対して重大な影響を及ぼしてしまうことが懸念される。一

般的に、遺伝子に影響を及ぼす作用を有する物質(変異原)は、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) などの DNA にアルキル基を付加するアルキル化剤、⁶⁾ 抗がん剤のシスプラチンなど DNA 分子中の 2 個の塩基に結合し架橋構造を作る DNA 架橋剤など DNA に直接作用するものや、⁷⁾ 放射線のように細胞内に活性酸素種を引き起こし作用するものが挙げられる。nSP70 が細胞の核内にまで移行するという事実は、nSP70 が上記の変異原物質と同様に遺伝子に対して直接的あるいは間接的ななんらかの影響を及ぼす可能性が高いことを示唆している。そこで次に、このような動態情報を踏まえて、非晶質シリカの変異原性及び HaCaT 細胞の遺伝子に与える影響について検証した。まず、粒子径の異なる非晶質シリカの変異原性を検証するために、Ames 試験を行った。本検討では、塩基置換型突然変異を検出する TA100 株とフレームシフト型突然変異を検出する TA98 株の 2 菌株を用いて試験を行い、DMSO 添加群よりも 2 倍以上のコロニー増加が認められた群を陽性と判断した。その結果、TA98 株では、いずれのシリカを添加した群でも変異コロニーの出現は全く認められなかったのに対して、TA100 株では、粒子径が小さくなるほど、変異コロニー数の増加が認められた。これらの結果は Ames 試験において非晶質ナノシリカが塩基置換型突然変異を誘発することを示唆するものである。Ames 試験で陽性となった化合物でも発がん性試験

を行った際に陰性となる例も多く報告されていることから、⁸⁾ この結果がかならずしも発がん性につながるとは言えないが、これらの結果は、少なくとも非晶質シリカの粒子サイズが変異原性に影響を与え得ること、ナノマテリアルの安全性を解析するに当たっては凝集性などを考慮した物性情報の収集が不可欠であることを裏付けるものである。

続いて、コメントアッセイにより非晶質シリカの HaCaT 細胞における DNA 損傷性を評価した。nSP70, nSP300, mSP1000 を 30, 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、3 時間後に Tail length の値を指標に評価したところ、nSP300 と mSP1000 を添加した群では DNA 損傷は全く検出されなかった。一方、nSP70 添加群においては、陽性コントロールとして使用した過酸化水素添加群に匹敵するほどの DNA 損傷性の増大が認められた。この結果は、100 nm 以下のサイズの nSP70 のみが HaCaT 細胞に対して DNA 損傷を引き起こすことを示すものである。そこで次に、非晶質ナノシリカの安全性確保を目指して、ROS 産生の観点から HaCaT 細胞の DNA 損傷の発現メカニズムの解明を試みた。まず、HaCaT 細胞を用いて非晶質シリカ処理による ROS 産生の有無を検証した。nSP70, nSP300, mSP1000 を HaCaT 細胞に添加して 3 時間後の細胞内における ROS 量を DCFH-DA の蛍光量を指標に測定した。その結果、すべてのサイズの非晶質シリカを添加した群において ROS の産生が認められたが、特に nSP70 添加群において最も顕著な ROS 産生が認められた。コメントアッセイで用いたシリカと同じ濃度で、ROS 産生が起こっていることが確認されたことから、直径が 100 nm 以下になると ROS 依存的な DNA 損傷作用を発揮する可能性が考えられる。そこで、nSP70 による ROS 産生と DNA 損傷発現メカニズムとの関連について精査するために、抗酸化剤である *N*-アセチルシステイン (NAC) 存在下における nSP70 の DNA 損傷作用を評価した。NAC を前処理した HaCaT 細胞に対して、30 分後に nSP70 を添加し、コメントアッセイを行った。粒子添加 3 時間後に ROS 産生量を定量したところ、NAC を前処理した群では、PBS 添加群と同等の値にまで Tail Length の値の減少が認められた。抗酸化剤共存下で nSP70 依存的 DNA 損傷作用の抑制が認められたことから、nSP70 による DNA 損傷が

ROS を介して生ずることが裏付けられた。これまでも、フラレーンを用いた検討により ROS が細胞傷害性に関与する例や、酸化チタンが産生する ROS が p53 発現を誘導し最終的に DNA 損傷に関与する例が報告されており、これらの結果からも、nSP70 による DNA 損傷発現メカニズムには ROS が強く関与していることが示唆された。すなわち、nSP70 の ROS 産生や細胞内局在を制御することで、安全なナノマテリアルの創製が実現するものと考えられた。

4. おわりに

本研究では、最もわれわれの生活に浸透している非晶質ナノシリカの粒子サイズが細胞内動態-細胞応答に与える影響について連関解析を行った。その結果、70 nm の非晶質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細胞内局在・細胞応答を示す可能性を示した。このことは、非晶質ナノシリカの安全性評価を行う際には、第一に従来型シリカとは別個の素材として捉え独自の安全性評価を行う必要があることを裏付ける結果である。また、今回は DNA 損傷発現メカニズムに着目して解析を進めたが、現在、さらなる安全性情報の収集に向け、核内移行性という情報に基づいたプロテオミクス解析により、ナノシリカの曝露によって発現変動する核内タンパク質を多数見出ししている。これら発現変動タンパク質と核機能との連関解析によって、さらに詳細な粒子サイズ-細胞内動態-細胞応答情報を収集し得るもの、と考えている。今後、このような細胞内動態と安全性の連関解析を行うことにより、「細胞内動態を基盤とした非晶質ナノシリカの安全性評価法」を確立できるものと期待している。

さらに将来的には、細胞内動態のみならず生体内動態と安全性の連関解析を行うとともに、表面性状、表面電荷との連関解析を行うことを計画している。事実、筆者らは、表面物性を改良することで、非晶質ナノシリカによる DNA 損傷発現を抑制できることを見い出しており、この結果は表面物性が DNA 損傷発現メカニズムに与える影響を精査することにより、安全な非晶質ナノシリカの開発支援につながる有用なアプローチであることを実証するものである。このような、物性-動態-生体影響の連関解析を通じて、非晶質ナノシリカのみならず、あらゆるナノマテリアルに応用可能な安全性評価法を確

立し、安全設計指針の確立及びナノマテリアルの恩恵を最大限に享受した豊かな社会の実現につながることを強く祈念している。

謝辞 本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクトリーダー角田慎一先生、同サブリーダー鎌田春彦先生、同プロジェクト研究員長野一也先生を始めとする多くの先生方のご指導の下、鍋師裕美先生、松山恵吾氏、仲里泰太郎氏、有森亮裕氏、磯部将彰氏など、独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト・大阪大学薬学研究科医薬基盤科学分野の皆さまとの共同成果であり、この場をお借りして、御礼を申し上げます。また大阪大学大学院薬学研究科特任助教鍋師裕美先生の御協力に深謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Poland C. A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A., Seaton A., Stone V., Brown S., Macnee W., Donaldson K., *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 423–428 (2008).
- 2) Webster T. J., *Int. J. Nanomedicine*, **3**(2), i–ii (2008).
- 3) Merget R., Bauer T., Kupper H. U., Philippou S., Bauer H. D., Breitstadt R., Bruening T., *Arch. Toxicol.*, **75**, 625–634 (2002).
- 4) “JACC Report, Synthetic Amorphous Silica,” European Centre for Ecology and Toxicology of Chemicals, No. 51, 2006.
- 5) Ferri K. F., Kroemer G., *Nat. Cell. Biol.*, **3**, E255–E263 (2001).
- 6) Ohnishi J., Mizoguchi H., Takeno S., Ikeda M., *Mutat. Res.*, **649**, 239–244 (2008).
- 7) Damsma G. E., Alt A., Brueckner F., Carell T., Cramer P., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1127–1133 (2007).
- 8) Anderson D., Yu T. W., McGregor D. B., *Mutagenesis*, **13**, 539–555 (1998).