

# 化粧品向けナノ粒子の安全性評価を目的とした *in vitro*スクリーニングシステムの構築 —物理・化学的性状と安全性との関連—

産業医科大学産業生態科学研究所

堀江 祐範

Nanoparticles, particularly TiO<sub>2</sub>, ZnO and SiO<sub>2</sub> are frequently used for cosmetics such as foundation and sunscreen. Although the nanoparticles are useful materials for cosmetics, toxic effect are also reported. In the present study, cellular influences of TiO<sub>2</sub>, ZnO and SiO<sub>2</sub> nanoparticles were examined. ZnO nanoparticles showed strong cytotoxicity on human keratinocyte HaCaT cells. ZnO nanoparticles also caused oxidative stress, induction of cytokines and cell membrane damage. On the other hand, cellular effect of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles were small. Zn<sup>2+</sup> released from ZnO nanoparticles was most important factor for cytotoxicity of the ZnO nanoparticles. Gene expression of metallothionein (MT) was enhanced by ZnO nanoparticle exposure in HaCaT cells and 3D skin model. ZnO nanoparticles caused induction of cytokines on 3D skin models. These results suggest that ZnO nanoparticles have cytotoxic potential. And the MT gene expression may be promising biomarker for toxic effect of nanoparticles on cosmetics.

## 1. 緒言

ナノ粒子は、直径が1–100nmの範囲にある粒子と定義される (ISO/TS 27687:2008)。粒径が微小であるナノ粒子は光の散乱が小さく、ファンデーションや日焼け止めなどに配合し肌に塗布した場合に滑らかに肌になじみ、いわゆる粉っぽさを生じないことや、紫外線吸収効果など化粧品として有用な機能をもつ。ナノ粒子のなかでも、従来から化粧品材料として利用されてきた二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) や酸化亜鉛 (ZnO)、二酸化ケイ素 (SiO<sub>2</sub>) のナノ粒子は、さらなる機能付加の余地もある有望な化粧品材料である。一方で、ナノ粒子には毒性を含む生体影響も報告されている。ナノ粒子による生体影響を細胞レベルで見ると、多くの場合酸化ストレスを生じる。酸化ストレスにより細胞の抗酸化系が活性化されるが、抑制しきれない場合にはアポトーシスやネクローシスによる細胞死に至る。これらナノ粒子の細胞影響因子として、ナノ粒子からの金属イオンの溶出が最も重要である。ナノ粒子の特徴の一つに「溶けやすい」ことが挙げられる。従来不溶性とされてきた物質でも、ナノ粒子とすることで大きな溶解性を示す場合がある<sup>1)</sup>。例えば、皮膚に塗布されたナノ粒子が、「金属イオンの供給源」として持続的に金属イオンを溶出し、皮膚細胞に対して影響を及ぼすかもしれない。一方ですべてのナノ粒子が大きな溶解性を示すわけではなく、ナノダイヤモンドなど「溶けない」ナノ粒子の細胞影響は小さい<sup>2)</sup>。そこで、

ナノ粒子の生体影響においては、粒子投与による細胞応答と共に、溶解性の把握が重要である。化粧品におけるナノ粒子の利用では、皮膚への塗布が最も主要な曝露ルートである。皮膚は表皮のバリアが存在するが、ナノ粒子と細胞とが直接出会う機会が考えられることから、化粧品に利用されるナノ粒子の細胞影響の把握は、より有効な利用のために必須である。本研究では、化粧品に多く用いられるナノ粒子のうち、TiO<sub>2</sub>、ZnO、SiO<sub>2</sub>について特に溶解性に着目して細胞影響を検討した。さらに、皮膚3次元モデルを用い、より実際の皮膚に近い状態での実験も行い、ナノ粒子の影響を推測する有効なマーカーを検討した。

## 2. 実験

### 2.1 細胞および皮膚3次元モデル

ヒトケラチノサイト由来HaCaT細胞 (German Cancer Research Centerより入手) を用いた。HaCaT細胞は10% ウシ胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で、5% CO<sub>2</sub>条件下、37℃で培養した。コラーゲンビトリゲルはAGCテクノグラスから購入し、取扱説明書に従って片面にHaCaT細胞を10% FBS添加DMEM中、2×10<sup>5</sup>個/mlの濃度で植え、培養した。皮膚3次元モデルとして、EPI-200SITを倉敷紡績 (大阪) から購入し、取扱説明書に従い使用した。培地はEPI-100-NMM-SIT/Assay Medium (MatTek Corporation) を用いた。

### 2.2 ナノ粒子

本研究では5種類のナノ粒子を使用した。TiO<sub>2</sub>は水酸化アルミニウム (Al (OH)<sub>3</sub>) によって処理された化粧品グレードのルチル型ナノ粒子を用いた。また、ZnOナノ粒子を石原産業 (大阪) より購入した。SiO<sub>2</sub>コーティング ZnOナノ粒子は、昭和電工より購入した。SiO<sub>2</sub>ナノ粒子



Safety evaluation of nanoparticles used for cosmetics; Association of physical/chemical properties and safety

Masanori Horie

Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan

は電気化学工業より購入した。これらのナノ粒子の一次粒子径・比表面積等の物性を表1に示す。以下、各粒子は表1に示した略号で表記する。培養上清中の $Zn^{2+}$ 濃度は、先の報告<sup>3)</sup>と同様に2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol, disodium salt, dihydrate (5-Br-PAPS)を用いた比色法によって測定した。各培地中での溶解度の測定は以下の様に行った。ZnOおよびZnO-Sをそれぞれ1.0および10mg/mlの濃度で蒸留水、DMEM (FBSを含まない)、10% FBS添加DMEMおよびEPI-100-NMM-SIT/Assay Medium中に2分間の超音波処理後、37°Cで6時間保持した。その後、13000rpmで10分間の遠心後、上清をNanosep Centrifugal Devices 3K (Pall Life Sciences)を用いた限外ろ過によって粒子を除去した。通過液について、 $Zn^{2+}$ 濃度を測定した。先行研究により、本研究で用いたTiO<sub>2</sub>およびSiO<sub>2</sub>は培地中ではほとんど溶解しないことを確認している<sup>4)</sup>。

### 2.3 ナノ粒子分散液の調製

ナノ粒子は、使用前に180°C、2時間の乾熱滅菌を行った。マイクロプレート及びビトリゲルを用いた試験では、ナノ粒子粉末を、滅菌した50ml容ガラス瓶中、1.0mg/mlウシ血清アルブミン (BSA, ナカライテスク) 水溶液中に10mg/mlの濃度となるように懸濁し、超音波槽 (Bioruptor, コスモバイオ) 内で2分超音波処理を行って分散した。その後、10% FBS添加DMEMでマイクロプレート用は1.0mg/mlおよび0.1mg/ml、ビトリゲル用は1mg/3mlとなるように希釈した。ビトリゲル上部には300 $\mu$ l (約100 $\mu$ gのZnOとなる)、下部には2mlの分散液を投与した。皮膚3次元モデルによる試験では、ナノ粒子超音波処理後の分散液をPBSで10倍及び100倍希釈し、50 $\mu$ lずつ皮膚モデル上に添加した。また、粉体として10mgのナノ粒子を皮膚モデル上に添加し、37°Cで24時間培養した。

### 2.4 細胞膜損傷の測定

培養上清へのLDH漏出の測定により、細胞膜損傷を評

価した。12穴マルチウェルプレートに細胞を $2 \times 10^5$ 個/mlで植え、37°Cで一晩培養しウェル底面に接着させた。6時間および24時間培養した後に、上清を回収した。ビトリゲルでは、細胞側の培地を回収した。皮膚3次元モデルでも培養液を回収した。これらの培養液を13000rpm、5分の遠心し、大部分の粒子を除去したのち、LDH活性を測定した。LDH活性の測定は、細胞障害性検出キットPLUS (LDH) (ロシュダイアグノスティクス)を用い、プロトコルに従って行った。マイクロプレート、ビトリゲルによる試験では、漏出LDHは下記の式により算出した。

$$\text{細胞毒性 (\%)} = \frac{(\text{陽性対照の吸光度} - \text{陰性対照の吸光度})}{(\text{サンプルの吸光度} - \text{陰性対照の吸光度})}$$

ここで陰性対照は非投与細胞の吸光度、陽性対照はキット添付の細胞溶解液で強制的に溶解させた細胞の吸光度とする。皮膚3次元モデルではウサギ筋肉由来LDH (オリエンタル酵母) によって検量線を作成し、漏出したLDH活性を測定した。

### 2.5 細胞内ROSレベルの測定

細胞内ROSレベルの測定はDCFH法により行った。6穴マルチプレートまたはビトリゲル上に培養したHaCaT細胞の培養液をナノ粒子分散液に交換し、6時間および24時間培養した。その後分散液を除去し、10 $\mu$ Mの2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)を含むFBS非添加DMEMを1ml/well添加、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で30分インキュベートした。PBSで1回洗浄し、0.25%トリプシン処理により細胞を回収した。細胞をPBSで1回洗浄し、再度細胞を500 $\mu$ lのPBSに懸濁し、フローサイトメーター (ソニー EC 800セルアナライザー) で蛍光強度を測定した。

### 2.6 ヘムオキシゲナーゼ(HO-1)、メタロチオネイン(MT)およびサイトカインの測定

6穴マルチウェルプレートに細胞を $2 \times 10^5$ 個/mlで植え、37°Cで一晩培養しウェル底面に接着させた。培養上清をナ

表1 本研究に用いたナノ粒子の物性

本報告における略号	物質	組成式	表面処理	純度* (%)	一次粒子径* (nm)	比表面積* (m <sup>2</sup> /g)
TiO <sub>2</sub>	二酸化チタン	TiO <sub>2</sub>	Al(OH) <sub>3</sub>	96.3	30-50	37.1
ZnO	酸化亜鉛	ZnO	なし	97.4	21	49.6
ZnO-S			SiO <sub>2</sub>	ZnO: 80 SiO <sub>2</sub> : 20	25 (SiO <sub>2</sub> : 3)	ND
SiO <sub>2</sub>	二酸化ケイ素	SiO <sub>2</sub>	なし	ND	34	80

\*メーカー値による

ノ粒子分散液に交換し、24時間培養した後に上清を回収し Human IL-6およびIL-8 ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience) を用いて上清中のIL-6およびIL-8濃度をELISA法により測定した。細胞からは、RNeasy kit (キアゲン) を用いてRNAを抽出した。RNAはHigh Capacity cDNA Revers Transcription kit (Applied biosystems) によりcDNAとしたのち、TaqMan® Gene Expression Assays (Applied biosystems) を用いたりリアルタイムPCR法によりHO-1, MT, IL-6およびIL-8遺伝子の発現を解析した。標的遺伝子のTaqMan®プロブはApplied biosystemsから購入した。Assay IDを以下に示す。MT1H: Hs00823168\_g1, MT2A: Hs02379661\_g1, HO-1: Hs01110250\_m1, IL-6: Hs00985639\_m1, IL-8: Hs00174103\_m1, IL-1β: Hs01555410\_m1, IL-12B: Hs01011518\_m1。

### 3. 結果

#### 3.1 マルチウェルプレートによる試験

はじめに、マルチウェルプレート上に培養したHaCaT細胞を用いて試験を行った。

##### 3.1.1 細胞膜損傷

TiO<sub>2</sub>, ZnO, SiO<sub>2</sub> ナノ粒子を10および100μg/mlの濃度で培地に分散し、ヒトケラチノサイトHaCaT細胞に投与、6時間および24時間後に培養上清に漏出したLDH活性を測定した(図1)。細胞内酵素であるLDHの培養上清への漏出は、細胞膜の損傷を示唆する。この結果、投与6時間後では顕著な細胞膜の損傷は認められなかった。投与24時間後では、ZnOおよびZnO-Sで顕著な細胞膜の損傷が認められた。細胞内の全LDH活性を100%としたとき、24時間後においてTiO<sub>2</sub>投与群(100μg/ml)の培養上清中のLDH活性が3.0%であったのに対し、ZnO投与群では75.2%、ZnO-S投与群では85.3%であった。また、SiO<sub>2</sub>では21.9%であった。

#### 3.1.2 酸化ストレスの誘導

多くの場合、ナノ粒子の細胞影響には酸化ストレスが関与する<sup>5)</sup> ことから、ナノ粒子投与細胞における細胞内活性酸素種(ROS)を測定した(図2A)。投与6時間の細胞内ROSレベルは、100μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群において非投与細胞の1.6~2倍程度の上昇を示した。TiO<sub>2</sub>でも1.2倍程度の若干の上昇が認められた。SiO<sub>2</sub>投与細胞では、細胞内ROSレベルの上昇は認められなかった。一方、投与24時間後においては、いずれのナノ粒子でも細胞内ROSレベルの上昇は認められなかった(100μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群では、細胞の損傷が激しく、正確な測定を行うことができなかった)。さらに、ナノ粒子投与細胞におけるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の遺伝子発現レベルを検討した(図2B)。HO-1は抗酸化に機能する酵素で、その遺伝子発現はROS産生などの酸化ストレスに鋭敏に反応する。なお粒子投与24時間後のHO-1の発現レベルは、100μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群において著しく上昇した。遺伝子発現レベルはZnOで非投与細胞の64倍、ZnO-Sで215倍であった。一方、10μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群では、それぞれ1.3および1.2倍であった。SiO<sub>2</sub>ではいずれの濃度においても1.2倍程度の上昇が認められた。TiO<sub>2</sub>では発現上昇は認められなかった。ZnOによる細胞影響には、溶出したZn<sup>2+</sup>が関与しているとの報告があることから、水溶性のZnCl<sub>2</sub>を投与した細胞でもHO-1の発現レベルを検討した。この結果、濃度依存的なHO-1遺伝子の発現上昇が認められた。発現レベルは、Zn<sup>2+</sup>濃度として10、30および50μg/mlのとき、それぞれ非投与細胞の約16、46および31倍であった。

#### 3.1.3 サイトカイン産生

ナノ粒子投与細胞について、IL-1β, IL-8およびIL-12の遺伝子発現を検討した。IL-1β遺伝子の発現は、TiO<sub>2</sub>, ZnOおよびSiO<sub>2</sub>を投与した細胞で有意に増加した(図

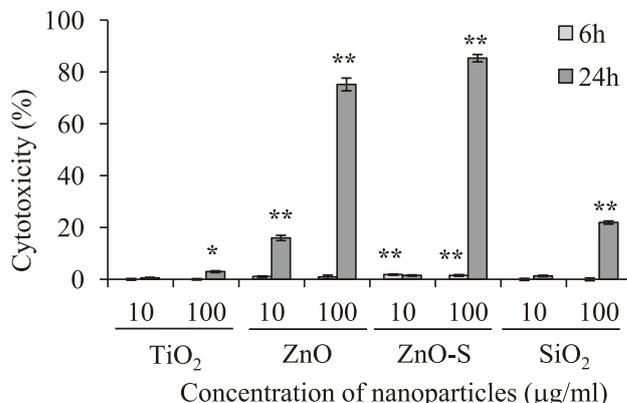


図1 ナノ粒子の細胞膜に対する影響  
各ナノ粒子を10および100μg/mlの濃度でHaCaT細胞に投与し、24時間後に培養上清中のLDH活性を測定した。\*p<0.05, \*\*p<0.01 (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

3A)。IL-8遺伝子の発現は、100 µg/mlのZnOおよびZnO-Sを投与した細胞でそれぞれ非投与細胞の3.6および4.8倍上昇した。TiO<sub>2</sub>およびSiO<sub>2</sub>ではIL-8遺伝子の発現上昇は見られなかった。IL-12の発現上昇はいずれのナノ粒子の投与によっても上昇しなかった。ZnCl<sub>2</sub>の投与では、Zn<sup>2+</sup>が10 µg/mlの濃度でIL-1β、IL-8、IL-12すべての遺伝子発現が上昇した。これらの遺伝子発現にZn<sup>2+</sup>濃度依存性は見られなかった。さらに、ELISA法により培養上清中のIL-8およびIL-1βタンパク質の濃度を測定したところ、ZnOおよびZnO-Sの投与により有意に上昇した(図3B)。また、上清中のIL-1βの濃度はいずれの投与群においても検出限界近くであり、ほとんど検出することができなかった。

### 3.1.4 亜鉛イオンの溶出

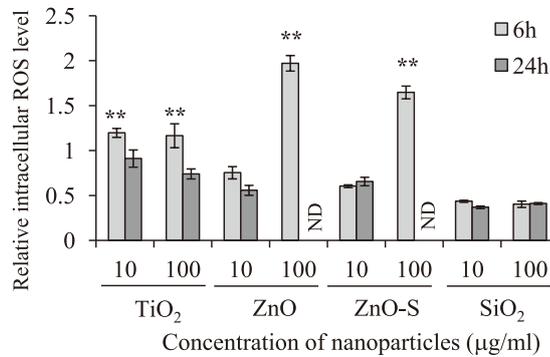
ZnOナノ粒子の細胞影響には、ZnOナノ粒子から溶出したZn<sup>2+</sup>が関与していることが知られている<sup>6)</sup>。ZnOおよびZnO-Sについて、蒸留水および本研究で用いた2種類の培地中でのZn<sup>2+</sup>の溶出を検討した。37℃で6時間保持した後、液中に溶出したZn<sup>2+</sup>濃度を測定したところ、液中のZn<sup>2+</sup>濃度は分散媒により著しく異なった(図4A)。蒸留水中よりも、培地中でより多くのZn<sup>2+</sup>が溶出した。

ZnOナノ粒子で強い細胞毒性が認められたことから、分散液中のZn<sup>2+</sup>濃度を測定した。その結果、細胞への投与24時間後の培養上清中でZn<sup>2+</sup>の溶出が認められた。ZnOおよびZnO-Sについて、培養上清中のZn<sup>2+</sup>濃度は、ZnO 10 µg/ml : 3.5 µg/ml、ZnO 100 µg/ml : 2.6 µg/ml、ZnO-S 10 µg/ml : 11.1 µg/ml、ZnO-S 100 µg/ml : 7.2 µg/mlであった。さらに、ナノ粒子投与細胞において、CuやCd、Znなどの金属イオンに反応し、金属毒性と酸化ストレスに働くメタロチオネイン1 (MT1) 遺伝子の発現を検討した(図4B)。この結果、ZnOおよびZnO-S投与細胞において有意なMT1の発現上昇を認めた。これらの結果は、ZnOおよびZnO-Sによる細胞影響が、Zn<sup>2+</sup>の溶出による可能性を示した。

### 3.2 ビトリゲル

試験に供したナノ粒子のうちZnOで強い細胞影響が認められたこと、また溶出したZn<sup>2+</sup>が細胞影響に関与していることが示唆されたことから、さらにZnOナノ粒子から溶出したZn<sup>2+</sup>が結合組織に浸透することによる影響を検討した。結合組織のモデルとしてコラーゲンビトリゲルを用いた。ビトリゲル上にHaCaT細胞を培養し、ビトリゲル

(A) 細胞内 ROS レベル



(B) HO-1 遺伝子発現

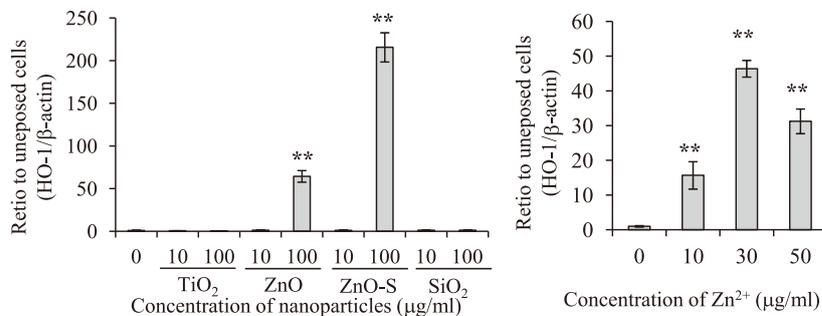
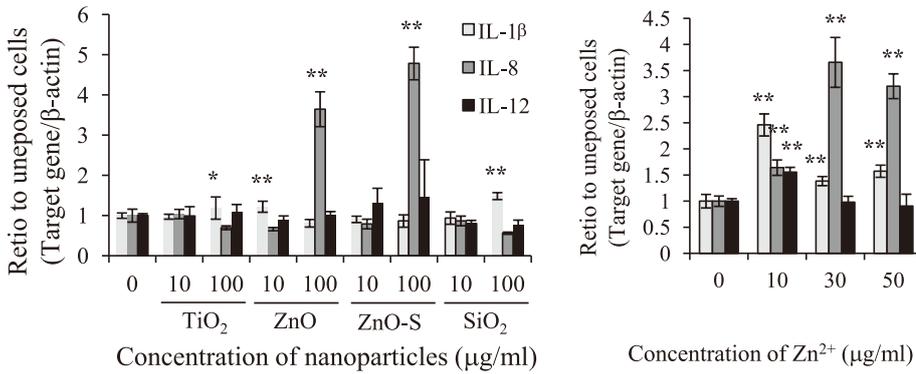


図2 ナノ粒子の細胞内酸化ストレスに対する影響

(A) 細胞内 ROS レベル。(B) HO-1 遺伝子発現。各ナノ粒子を 10 および 100 µg/ml の濃度で HaCaT 細胞に投与し、6 時間または 24 時間後に細胞内 ROS および HO-1 遺伝子発現を測定した。10, 30, 50 µg/ml の Zn<sup>2+</sup> を含む ZnCl<sub>2</sub> 溶液でも同様の試験を行った。値は非投与細胞を 1 としたときの相対値として示した。\*\*p<0.01 (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

(A) サイトカイン遺伝子発現



(B) 上清中 IL-8 タンパク質濃度

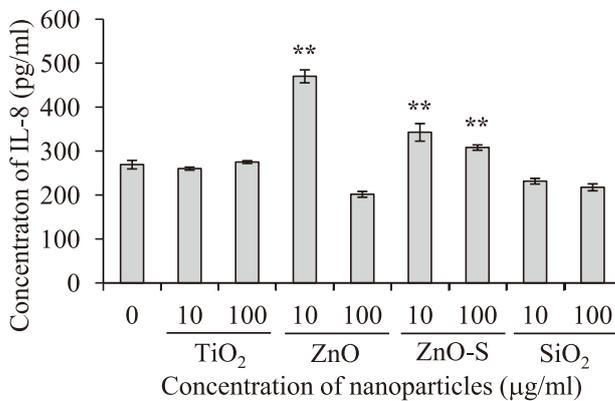


図3 ナノ粒子のサイトカイン遺伝子発現に対する影響

(A) サイトカイン遺伝子発現。(B) 培養上清中 IL-8 タンパク質濃度。各ナノ粒子を 10 および 100 $\mu$ g/ml の濃度で HaCaT 細胞に投与した。24 時間後に遺伝子発現及びタンパク質濃度を測定した。 $**p < 0.01$  (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

A

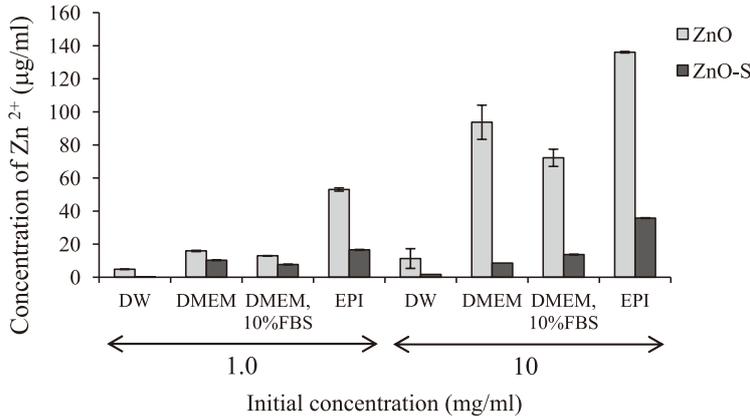
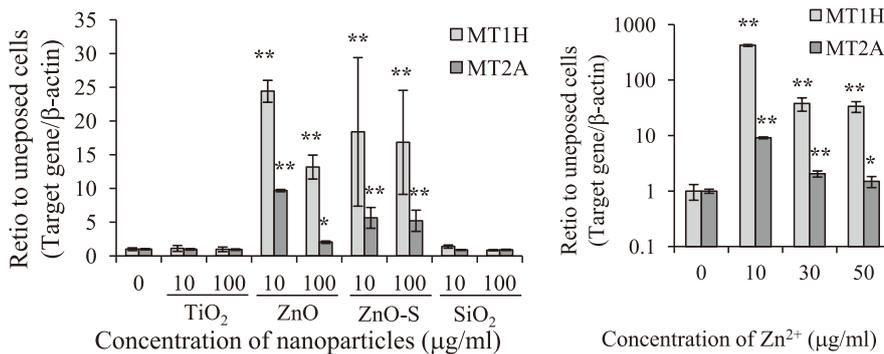


図4 ナノ粒子の細胞影響における亜鉛イオンの影響

(A) 酸化亜鉛ナノ粒子からの Zn<sup>2+</sup> の溶出。ZnO および ZnO-S をそれぞれ 1.0 および 10mg/ml の濃度で蒸留水 (DW)、DMEM (FBS を含まない)、10% FBS 添加 DMEM および EPI-100-NMM-SIT 培地中に分散し、37°C で 6 時間保持した後、液中に溶出した Zn<sup>2+</sup> 濃度を測定した。(B) ナノ粒子のメタロチオネイン遺伝子発現。各ナノ粒子を 10 および 100 $\mu$ g/ml の濃度で HaCaT 細胞に投与した。24 時間後に遺伝子発現及びタンパク質濃度を測定した。値は非投与細胞を 1 としたときの相対値として示した。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

B



ルの上部あるいは下部に ZnO 分散液を投与し、HaCaT 細胞に与える影響を検討した。投与の概要と略称を図 5 に示す。

### 3.2.1 亜鉛イオンの溶出

投与時の ZnO 分散液 (ZnO 濃度 1 mg/ 3 ml) 中の Zn<sup>2+</sup> 濃度は、9.0 μg/ml であった。ZnO/DMEM におけるビトリゲル上部及び下部の Zn<sup>2+</sup> 濃度は、それぞれ 4.1 μg/ml および 2.9 μg/ml であった。DMEM/ZnO では、ビトリゲル上部及び下部の Zn<sup>2+</sup> 濃度は、それぞれ 9.5 μg/ml および 7.6 μg/ml であった (図 6)。分散液投与 24 時間後の細胞内のメタロチオネイン遺伝子の発現は、MT1A、MT2A とともに ZnO/DMEM および DMEM/ZnO 双方で非投与細胞の約 3~6 および 10 倍に増加した (図 7)。

### 3.2.2 細胞膜損傷

ZnO/DMEM では培地への LDH 漏出は若干の増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。DMEM/ZnO では、培地中への LDH 漏出は有意に上昇した (図 8)。

### 3.2.3 酸化ストレス

ZnO 投与細胞の細胞内 ROS レベルは、24 時間後で非投与細胞に対し ZnO/DMEM で約 1.5 倍、DMEM/ZnO で約

4.7 倍増加した (図 9A)。HO-1 遺伝子の発現は ZnO/DMEM では非投与細胞に対し 1.6 倍上昇した有意差は認められなかった (図 9B)。DMEM/ZnO では非投与細胞に対し 85 倍上昇した。

### 3.2.4 サイトカイン

ZnO/DMEM および DMEM/ZnO 双方で培地中への IL-8 の分泌が認められた (図 10)。さらに、DMEM/ZnO では IL-6 の分泌も認められた。これらのサイトカインについて、

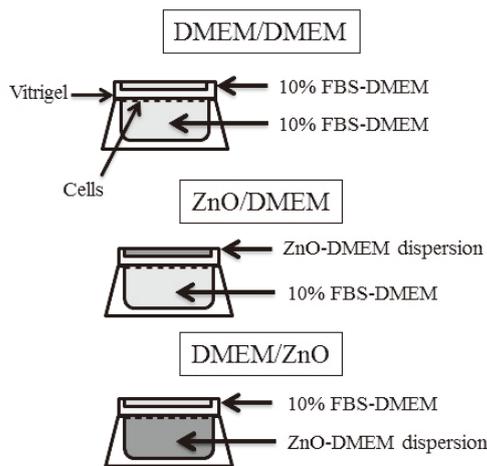


図 5 ビトリゲルを用いた ZnO ナノ粒子の投与実験の概要

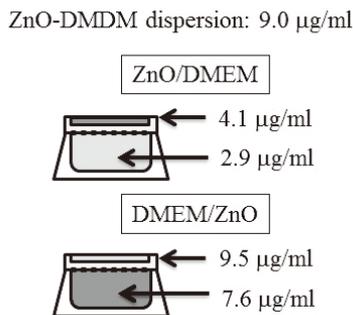
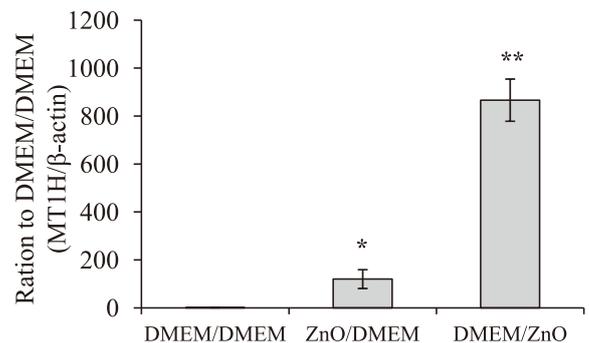
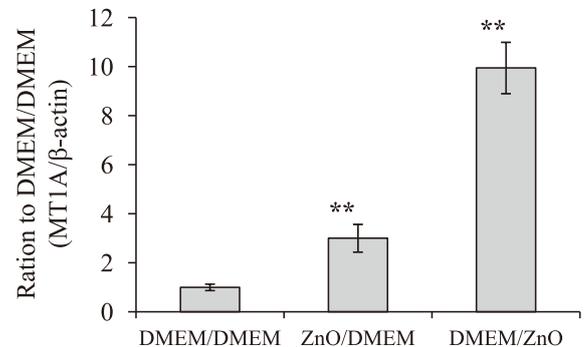


図 6 ZnO ナノ粒子を投与したビトリゲルにおける Zn<sup>2+</sup> 濃度

## MT1H



## MT1A



## MT2A

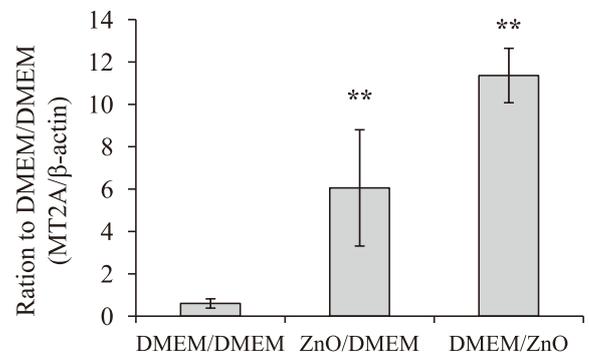


図 7 ナノ粒子のメタロチオネイン遺伝子発現に対する影響 (ビトリゲル) 投与 24 時間後に測定。\**p*<0.05, \*\**p*<0.01 (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

遺伝子発現を検討したところ、いずれも DMEM/ZnO で発現の上昇が認められた。ZnO/DMEM では発現の上昇は見られなかった。また、DMEM/ZnO では IL-1 $\beta$  および IL-12 遺伝子発現が有意に上昇した。

### 3.3 皮膚3次元モデル

ビトリゲルによる検討で、ZnO ナノ粒子から溶出した Zn<sup>2+</sup> が結合組織に浸透して下部の細胞に影響する事が示唆された。そこでさらにより実際に皮膚に近い3次元モデルを用いて検討を行った。対照として、溶解性を示さない TiO<sub>2</sub> でも試験を行った。

#### 3.3.1 亜鉛イオンの溶出

皮膚モデル上に投与した ZnO 分散液中の Zn<sup>2+</sup> 濃度は、ZnO 濃度が 0.1 および 1.0 mg/ml のとき、それぞれ 1.0 および 0.8  $\mu$ g/ml であった。培養液中の亜鉛イオンを測定したところ、ZnO 粉体を投与したものを除き、Zn<sup>2+</sup> は検出されなかった。ZnO 粉体を投与したモデルでは、培養液中に 4.9  $\mu$ g/ml の Zn<sup>2+</sup> が含まれていた。メタロチオネイン遺伝子発現を測定したところ、ZnO 分散液投与によって発現が上昇した (図 11)。

#### 3.3.2 細胞影響

ZnO および TiO<sub>2</sub> 分散液/粉体を皮膚 3 次元モデルに投与し、24 時間後に培養液中の LDH 活性を測定した。ZnO および TiO<sub>2</sub> 投与による培地中への LDH の漏出は認められなかった。酸化ストレス応答タンパク質 HO-1 遺伝子発現は、1.0 mg/ml の ZnO 分散液の投与によって非投与モデルに対し 1.6 倍程度上昇した (図 12A)。ZnO および TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の投与により、24 時間後の時点でのサイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12) 遺伝子発現の上昇は認められなかった (図 12B)。一方で、ZnO 粉体の投与により、24 時間後の培地中の IL-8 タンパク質濃度は有意に上昇した。また、ZnO および TiO<sub>2</sub> 粉体を投与し、24 時間後の培地中の IL-6 濃度も有意に上昇した (図 12C)。

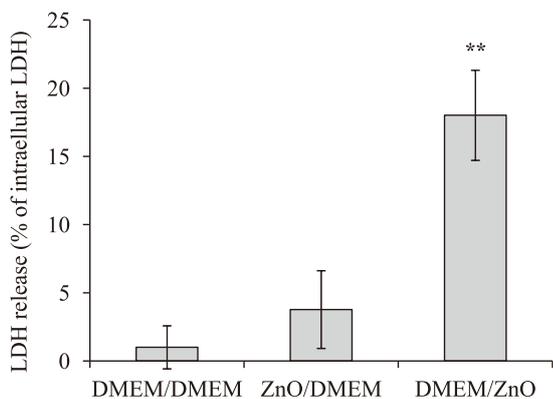
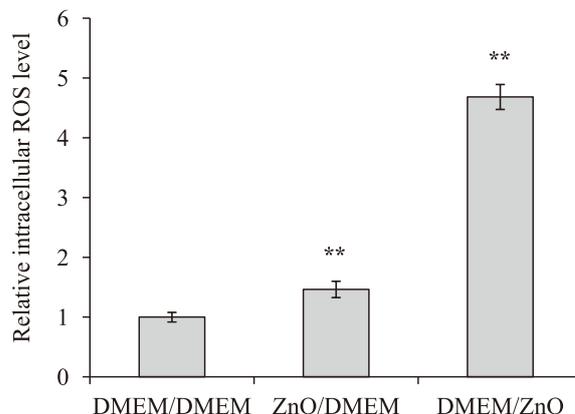


図 8 ZnO ナノ粒子の細胞膜に対する影響 (ビトリゲル) 投与 24 時間後に測定。\*\* $p < 0.01$  (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

## 4. 考察

本研究では、ナノ粒子のうち化粧品材料としてよく利用される TiO<sub>2</sub>、ZnO および SiO<sub>2</sub> の細胞及び皮膚モデルに対する影響を検討した。これらのナノ粒子のうち、ZnO ナノ粒子で強い細胞影響が認められた。一方で、TiO<sub>2</sub> および SiO<sub>2</sub> の細胞影響は小さかった。ZnO を含むいくつかの金属酸化物ナノ粒子については、これまでに細胞影響が報告されている<sup>4)</sup>。これら細胞影響を示す金属ナノ粒子の最も重要な影響因子として、金属イオンの溶出が挙げられる<sup>5)</sup>。従来不溶性として分類されていた物質でも、ナノ粒子では大きな溶解性を示す事がある。例えば、酸化ニッケル (NiO) は水に不溶とされているが、一部の NiO ナノ粒子は培地中で高い溶解性を示した<sup>1)</sup>。ZnO ナノ粒子も培地中に Zn<sup>2+</sup> を溶出し、細胞に強い酸化ストレスを引き起こすことで細胞死をもたらす<sup>4)</sup>。また、ラットに ZnO ナノ粒子を気管内注入した実験では、肺に酸化ストレスと炎症を引き起こしたが、このとき、Zn<sup>2+</sup> の溶出が重要であることが示唆さ

### A



### B

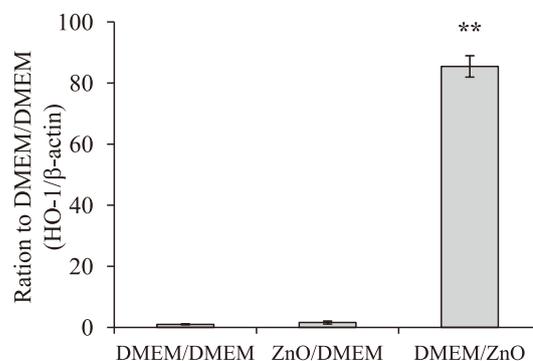


図 9 ZnO ナノ粒子の細胞内酸化ストレスに対する影響 (ビトリゲル)

(A) 細胞内 ROS レベル。(B) HO-1 遺伝子発現。投与 24 時間後に測定。値は非投与細胞を 1 としたときの相対値として示した。\*\* $p < 0.01$  (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

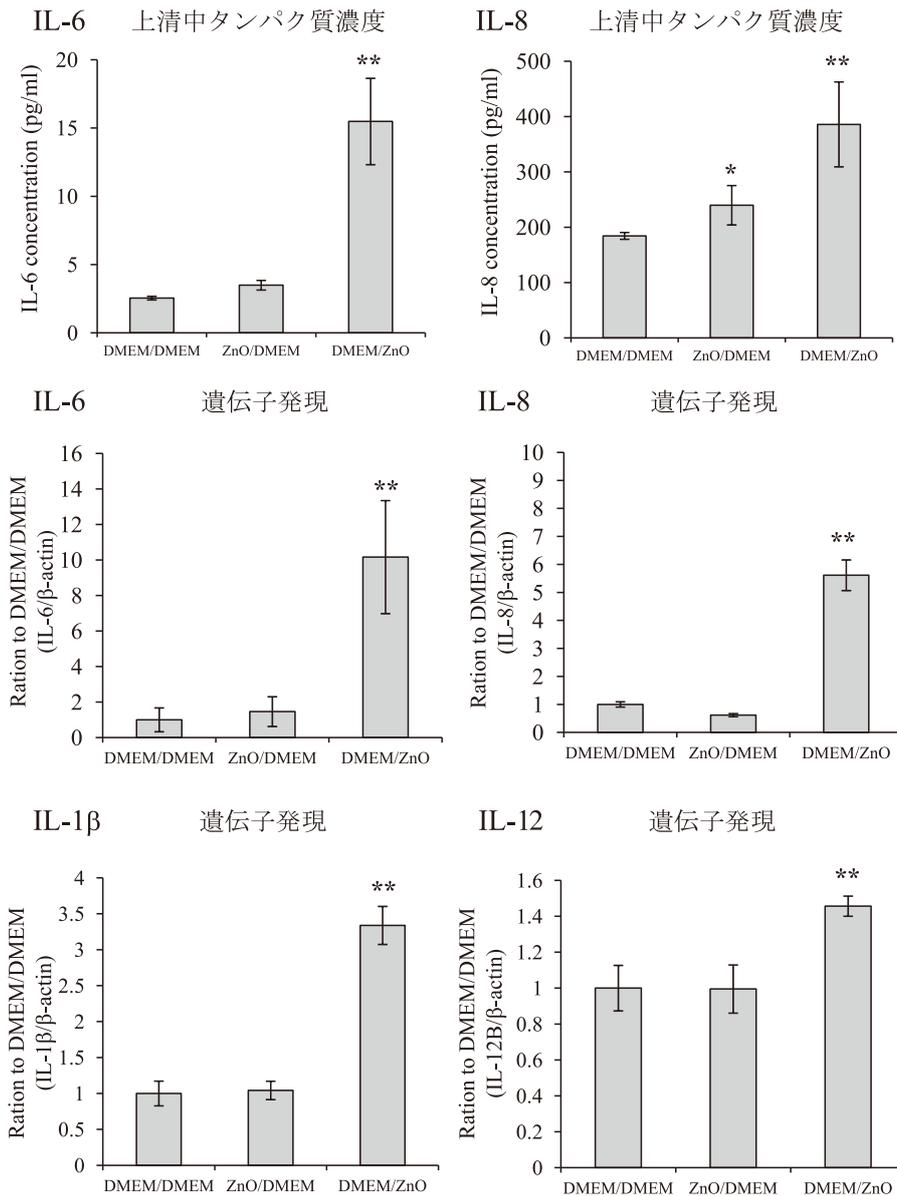


図10 ZnOナノ粒子のサイトカイン発現に対する影響 (ビトリゲル)  
 培養上清中サイトカインタンパク質濃度およびサイトカイン遺伝子発現。各ナノ粒子を10および100 $\mu$ g/mlの濃度でHaCaT細胞に24時間投与した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

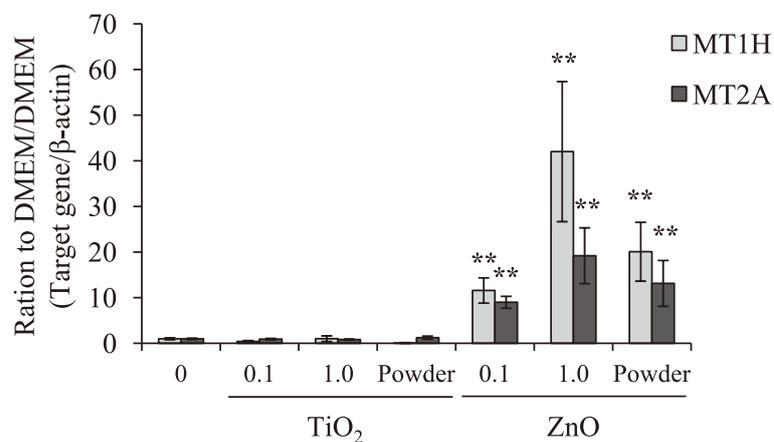
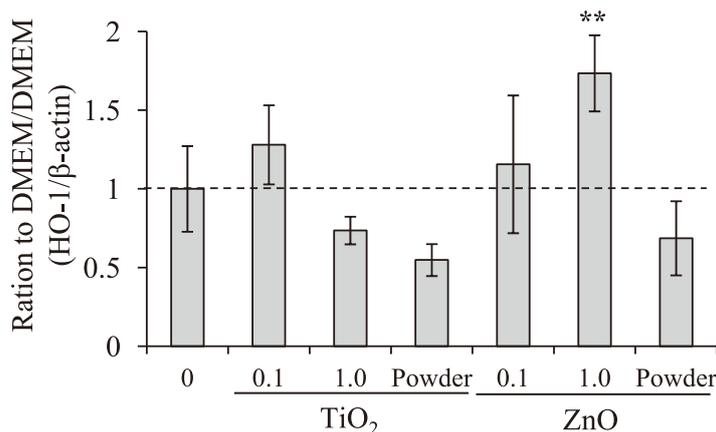


図11 ナノ粒子のメタロチオネイン遺伝子発現に対する影響 (皮膚3次元モデル)  
 投与24時間後に測定。\*\* $p < 0.01$  (vs 非投与モデル, ANOVA, Dunnett)

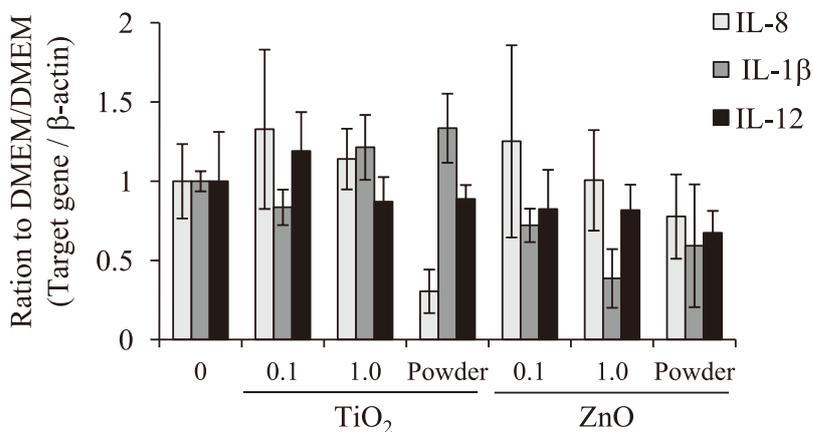
れている<sup>3)</sup>。TiO<sub>2</sub>ナノ粒子の分散液をラット皮膚に塗布し、皮下へのナノ粒子の移行を検討したところ、粒子は表皮を通過せず、皮下への移行は認められなかった<sup>6)</sup>。ナノ粒子は凝集体を形成しやすく、通常分散液中で数十～数百nmの二次粒子を形成しており、一次粒子が単独で存在することはきわめてまれである。化粧品に使用されるTiO<sub>2</sub>や

ZnO、SiO<sub>2</sub>ナノ粒子が粒子の状態で何層にも重なった細胞間を通過し、真皮にまで到達することはきわめて考えにくい。しかし一方で、ZnOから溶出したZn<sup>2+</sup>が表皮に浸透し、真皮に到達する可能性は否定できない。本研究で、ビトリゲルを用いた実験により、ビトリゲルによって隔てられ、ZnOナノ粒子と直接の接触がないHaCaT細胞で、細胞内

(A) HO-1 遺伝子発現



(B) サイトカイン遺伝子発現



(C) 上清中サイトカインタンパク質濃度

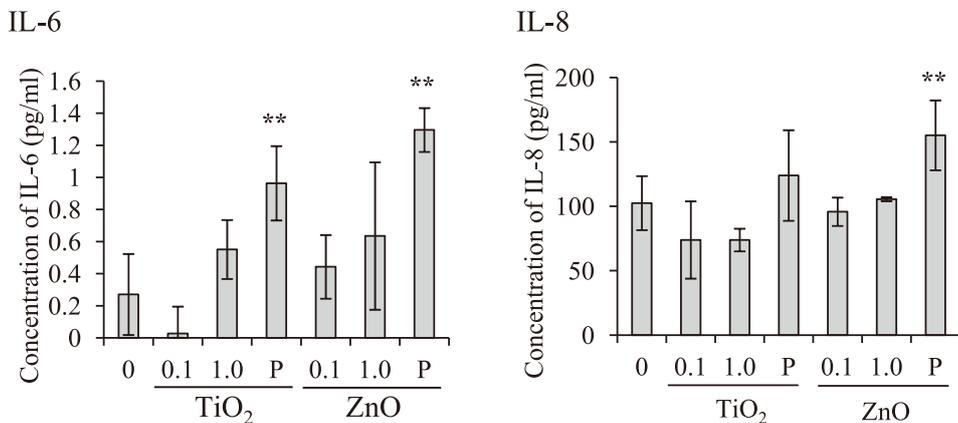


図12 ZnOナノ粒子のHO-1およびサイトカイン発現に対する影響(皮膚3次元モデル) 投与24時間後に測定。\*\**p* < 0.01 (vs 非投与モデル, ANOVA, Dunnett)

ROSの上昇と、メタロチオネインおよびIL-8遺伝子の発現上昇が認められた。また、メタロチオネイン遺伝子の発現上昇とサイトカインの誘導は、ZnOナノ粒子を投与した皮膚3次元モデルでも認められた。メタロチオネインは $Zn^{2+}$ を含む金属の存在によって発現が誘導される。B細胞の分化誘導因子であるIL-6は液性免疫に関わり、IL-8は好中球の走化性活性を示す代表的な炎症メディエーターである。また、IL-12はナイーブT細胞のTh1方向への分化に関与するが、 $Zn^{2+}$ による発現の上昇が認められた。これらの結果は、ZnOナノ粒子では分散液の塗布による粒子自体の皮膚への侵入はないものの、溶出した $Zn^{2+}$ が真皮にまで浸透し、上皮細胞に対して炎症誘発や酸化ストレスの誘導、アレルギー反応の惹起が生じる可能性を示唆する(図13)。本研究ではケラチノサイトであるHaCaT細胞および皮膚3次元モデル(ヒト正常表皮角化細胞により構成される)を使用した。金属酸化物ナノ粒子から溶出した金属イオンはランゲルハンス細胞を刺激し、アレルギー性皮膚炎を引き起こす可能性もある。ZnOなどの金属酸化物ナノ粒子からの金属の溶出は、分散媒により異なり、また皮膚への浸透の化学的な定量は困難である。メタロチオネインは $Zn^{2+}$ を含む金属イオンにより誘導され、本研究においても $Zn^{2+}$ の溶出に対し鋭敏な発現上昇を示した。また、影響が小さかった不溶性のTiO<sub>2</sub>ナノ粒子の投与では発現の上昇は認められなかった。ナノ粒子の毒性に金属イオンの溶出は密接に関連しており、これらの結果から、メタロチオネイン遺伝子の発現解析は、皮膚における金属酸化物ナノ粒子毒性を考慮する上で有効なマーカーとなり得る。ビトリゲルと皮膚上皮細胞を組み合わせ、メタロチオネインの遺伝子発現を解析することで、有害な可能性のあるナノ粒子を選別することが可能であろう。今後の課題として、アインザイムが存在するメタロチオネインの発現プロファイルを確立し検出精度を高めること、また溶出した金属イオンに対するランゲルハンス細胞の応答を検討することが重要である。

#### (引用文献)

- 1) Horie M, Nishio K, Fujita K, Kato H, Nakamura A, Kinugasa S, Endoh S, Miyauchi A, Yamamoto K, Murayama H, Niki E, Iwahashi H, Yoshida Y, Nakanishi J.: Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release. *Chem Res Toxicol.*, 22, 1415-1426, 2009.
- 2) Horie M, Komaba LK, Kato H, Nakamura A, Yamamoto K, Endoh S, Fujita K, Kinugasa S, Mizuno K, Hagihara Y, Yoshida Y, Iwahashi H.: Evaluation of cellular influences induced by stable nanodiamond dispersion; the cellular influences of nanodiamond are

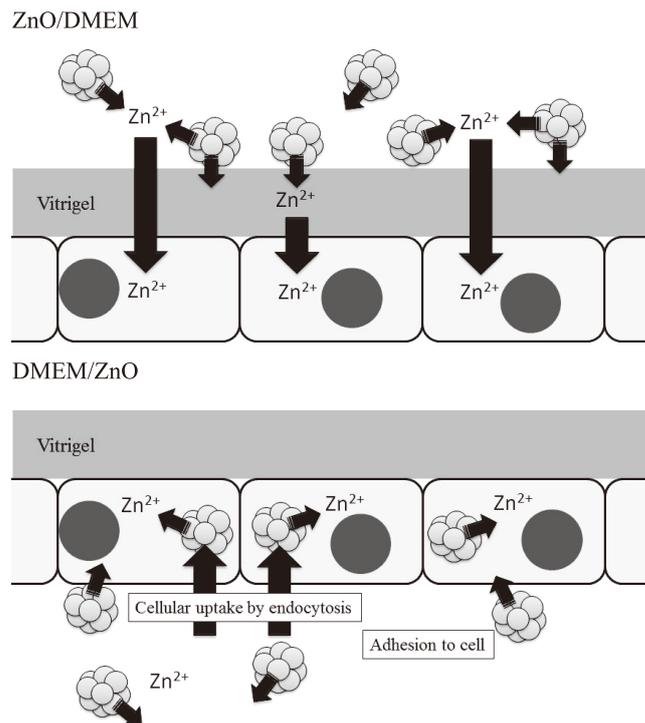


図13 ナノ粒子の皮膚に対する影響の概要  
化粧品へのナノ粒子の利用において、ZnOナノ粒子のように溶解性を示すナノ粒子では、溶解した金属イオンが皮膚に浸透して、サイトカイン遺伝子の発現を誘導することで炎症などを引き起こす可能性がある。

small. *Diam. Relat. Mater.*, 24, 15-24, 2012.

- 3) Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Maru J, Miyauchi A, Nakamura A, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H.: Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chem. Biol. Interact.*, 198, 29-37, 2012.
- 4) Horie M, Fujita K, Kato H, Endoh S, Nishio K, Komaba LK, Nakamura A, Miyauchi A, Kinugasa S, Hagihara Y, Niki E, Yoshida Y, Iwahashi H.: Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics.*, 4, 350-360, 2012.
- 5) Horie M, Kato H, Fujita K, Endoh S, Iwahashi H.: In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 605-619, 2012.
- 6) Adachi K, Yamada N, Yamamoto K, Yoshida Y, Yamamoto O.: In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. *Nanotoxicology.*, 4, 296-306, 2010.