

化粧品用無機ナノ材料の遺伝毒性作用の解明

大阪府立大学理学系研究科生物科学専攻分子細胞遺伝学分野

八木 孝司

Titanium dioxide (TiO₂) is widely used as an ultraviolet-scattering substance in cosmetics. Here, we investigated effects of particle sizes and surface modifications of TiO₂ NPs on their genotoxicity to human skin fibroblast and keratinocyte cells with the micronucleus (MN) assay. Induction of DNA strand breaks and reactive oxygen species (ROS) were also measured to elucidate the mechanism of the toxicity. Three types of TiO₂ NPs (35 nm and 1000 nm) with different surface coating (Al(OH)₃-coated-, Al(OH)₃/C₁₇H₃₅COOH-coated-, and plain-TiO₂ NPs) were examined. All TiO₂ NPs induced MN in both cells in a dose-dependent manner. Plain-TiO₂ NPs (35 nm) induced more MN, DNA-strand breaks and ROS than other two coated-TiO₂ NPs. Small TiO₂ NPs (35 nm, plain) were more genotoxic than large TiO₂ NPs (1000 nm, plain). The ROS production was closely correlated with the cellular uptake of the TiO₂ NPs. These results indicate that difference in a balance of the particle size and surface properties of TiO₂ NPs affects their cellular uptake, and causes different levels of genotoxicity.

1. 緒言

ナノサイズの微小粒子の毒性が懸念されている。これまで物質の毒性発現のメカニズムは、物質が生体高分子と相互作用する化学反応であったが、近年、生体分子との反応性のない無機物質であっても細胞毒性を持つことが報告され始めた。この毒性は物質の化学組成の他に、大きさや形状に依存する。一般の細胞の大きさは30 μm程度であり、1,000 nm以下の大きさの固体は細胞の貪食作用によって細胞に取り込まれる。たとえば直径約10~100 nmの銀粒子を細胞に曝露すると、銀粒子は容易に細胞に取り込まれてアポトーシスを起こす。この機構は短波長の可視光(またはUVA)との相互作用であることが明らかにされ、活性酸素分子種がDNA鎖を切断すると考えられている。また幅数 nm・長さ約100 nmの針状の多層カーボンナノチューブは暗所でも活性酸素分子種を介して細胞のDNA鎖を切断することが知られる。このメカニズムはアスベストの発癌メカニズムとの共通性で注目されている。

化粧品には多種類のナノサイズの物質が使用されている。たとえばカオリンは化粧品の基礎的成分、二酸化チタンや酸化亜鉛は紫外線防御剤として、マイカは光沢剤として使用される。さらにそれぞれが副成分によって種々の色彩を呈していたり、人工的に着色されたり、表面が親水加工や撥水加工されたりしている。これらのナノ粒子は化粧品によ

って直接皮膚の細胞に接触し、可視光線および近紫外光の曝露を受ける。

このような背景のもと、表面処理の異なる酸化チタンナノ粒子(TiO₂ NPs)を皮膚由来の2倍体培養角化細胞(keratinocyte)および線維芽細胞(fibroblast)に曝露し、遺伝毒性の有無を小核誘導試験によって調べた。またその毒性メカニズムを明らかにするためにDNA鎖切断と活性酸素誘導をそれぞれアルカリコメットアッセイと蛍光発光によって検出した。同様の方法で直径35 nmと1000 nmのTiO₂ NPs(表面無処理)の遺伝毒性を比較した。これらの結果、TiO₂ NPsの遺伝毒性の強さは、その細胞へ取り込み量に比例することが明らかとなった。

2. 実験

2.1. 材料

TiO₂ NPsは、直径35 nm、結晶構造はルチル型。粒子表面処理はAl(OH)₃(親水処理)、Al(OH)₃/ステアリン酸(撥水処理)、無処理の3種類である。比較対象として表面無処理の直径1,000 nm TiO₂ NPsも用いた。細胞はヒト健康人皮膚由来2倍体の角化細胞HEKnおよび線維芽細胞FJで、それぞれHumedia-KG2およびRPMI1640培地で、37℃、5%炭酸ガス条件で培養した。

2.2. 方法

細胞処理時のTiO₂ NPsの性質：培地に懸濁したTiO₂ NPsのゼータ電位を電気泳動光散乱法(レーザー Doppler法)、粒子径を動的な光散乱法(光子相関法)によって測定した。TiO₂をHEKn細胞とFJ細胞に処理し、6時間後の細胞の状態をレリーフコントラスト顕微鏡で観察した。小核の誘発：10⁵個の細胞を6 cm培養皿に播種し、上記3種類のTiO₂ NPsを0.1、1、10、100 μg/mLの濃度で6



Genotoxicity of inorganic nanomaterials used for cosmetics

Takashi Yagi

Laboratory of Molecular and Cellular Genetics, Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University

時間処理した。細胞を42時間培養後、カルノア固定し、低張処理後スライドガラスに滴下、アクリジンオレンジ染色し、蛍光顕微鏡で小核を有する細胞の割合を求めた。

DNA鎖の切断：10⁵個の細胞を6cm培養皿に播種し、上記3種類のTiO₂ NPsを10および100μg/mLの濃度で1時間処理した。細胞を剥離し、アルカリアガロースに包埋後スライドガラスに接着してアルカリ電気泳動した。細胞をサイバークリーン染色後、蛍光顕微鏡でコメットテールの大きさ(tail DNA)を測った。

活性酸素(ROS)の誘導：10⁵個の細胞を6cm培養皿に播種し、3種類のTiO₂ NPsを10および100μg/mLの濃度で1時間処理した。剥離した細胞をH2DCFDAで処理し、発生する蛍光をイメージングサイトメーターで測った。

TiO₂ NPsの細胞内取込：10⁵個の細胞を6cm培養皿に播種し、3種類のTiO₂ NPsを10および100μg/mLの濃度で1時間処理した。剥離した細胞をフローサイトメーターにかけてforward scatterとside scatterを測定し、後者をTiO₂ NPsの細胞内取込み量の指標とした。

3. 結果

3.1. 細胞処理時のTiO₂ NPsの性質

無血清Medium中のTiO₂ NPs懸濁液のゼータ電位と粒

子径DLSを動的光散乱法(光子相関法)を用いて測定した。これらの結果を表1にまとめた。

TiO₂ NPs処理後のHEKn細胞とFJ細胞をレリーフコントラスト顕微鏡で観察し、その写真を図1に示す。TiO₂ NPsが発する青い蛍光によって、TiO₂ NPsは35nm-表面無処理>35 nm-Al(OH)₃表面処理>35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理>1000nm-表面無処理の順に、細胞に多く付着している(または取り込まれている)ことがわかった。

3.2. 小核の誘発

角化細胞と線維芽細胞において、無処理でも小核は低頻度で発生したが、TiO₂ NPsを処理すると濃度に依存してより高頻度に小核を誘発した。図2に誘発された小核の例を示す。表面無処理の35 nm TiO₂ NPsは35 nm-表面無処理>35 nm-Al(OH)₃表面処理>35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理>1,000 nm-表面無処理の順に、より高頻度で小核を誘発した(図3)。

3.3. DNA鎖の切断(アルカリ性コメットアッセイ)

アルカリ性コメットアッセイの結果の一例を図4に示す。角化細胞においても線維芽細胞においても、表面処理の異

表1 TiO₂ NPsの物理的性質

| 表面修飾 | 表面特性 | 粒径 (nm) | DLS (nm) | ゼータ電位 (mV) |
|---|------|---------|--------------|------------|
| Al(OH) ₃ | 親水性 | 35 | 973.4±176.0 | -15.88 |
| Al(OH) ₃ /C ₁₇ H ₃₅ COOH | 撥水性 | 35 | 572.6±124.2 | -5.58 |
| Plain | 親水性 | 35 | 1291.3±218.9 | -7.77 |
| Plain | 親水性 | 1000 | 2149.8±382.1 | -11.06 |

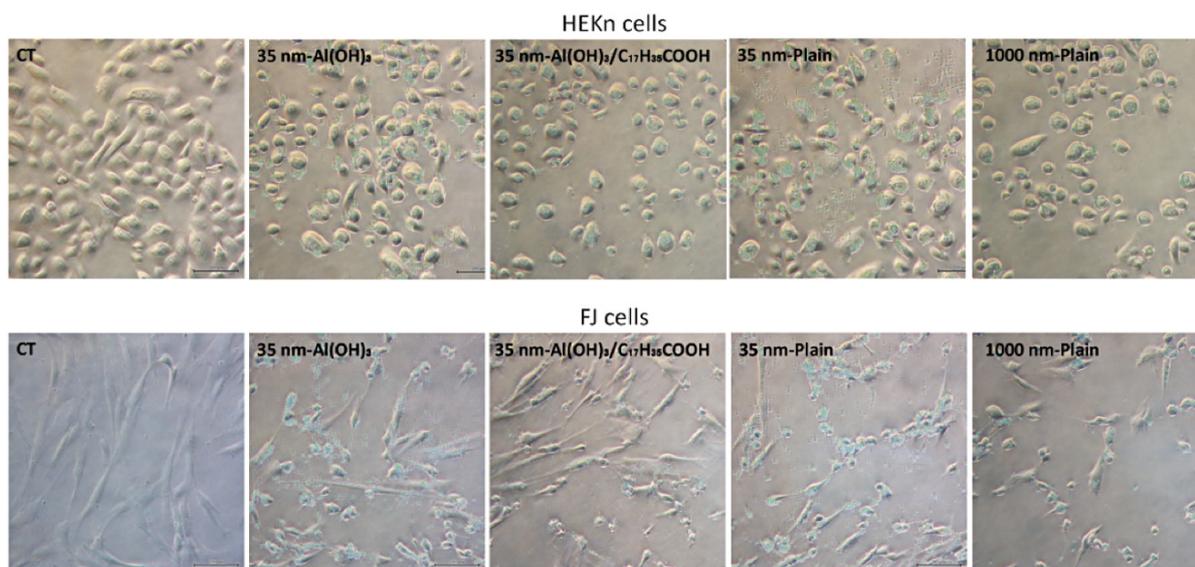


図1 TiO₂ NPs (100 μg/mL) 処理したHEKn、FJ細胞のレリーフコントラスト顕微鏡画像。TiO₂ NPsが青い蛍光を発している。

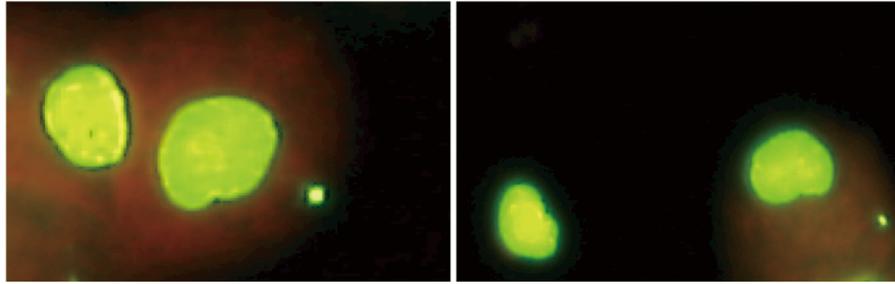


図2 TiO₂ NPsによって誘発された小核の例。細胞にTiO₂ NPs (35 nm-plain, 100 µg/mL)処理したHEKn (左)とFJ (右)細胞

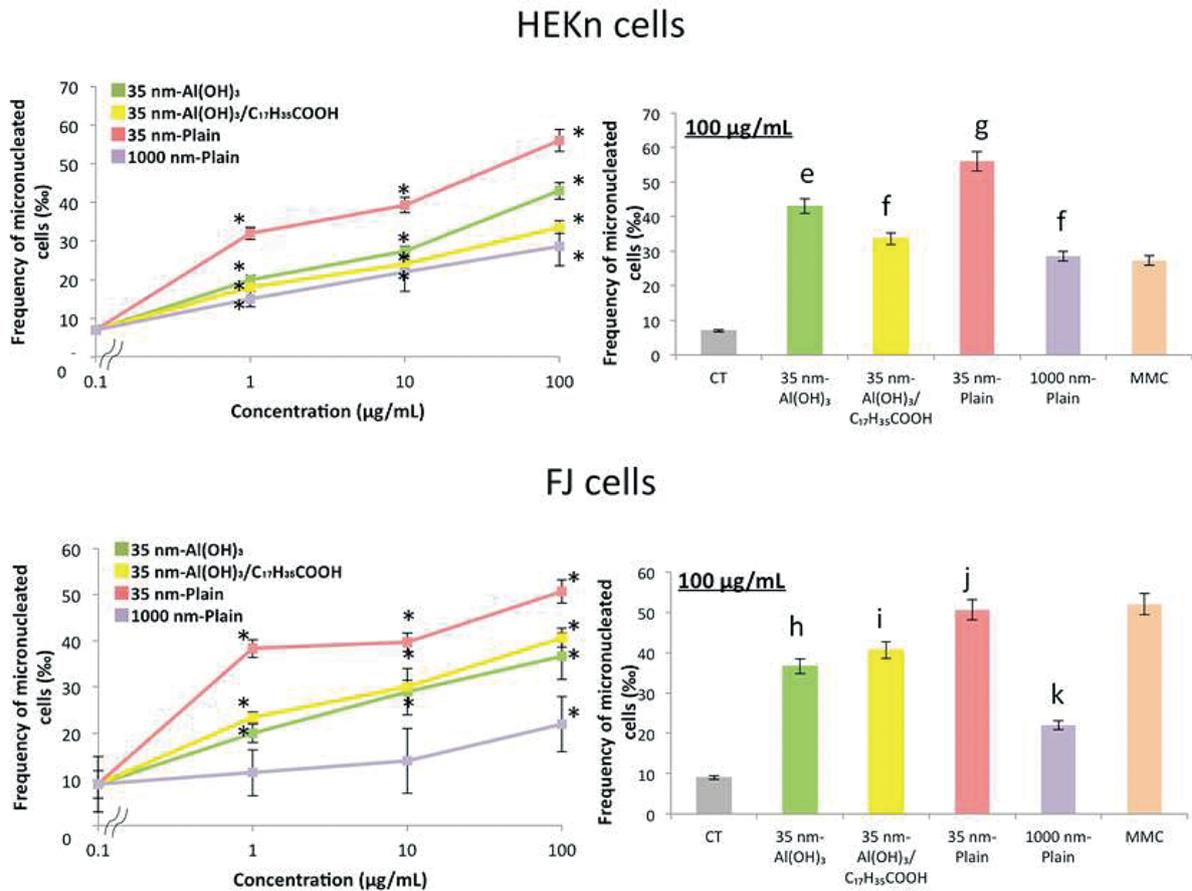


図3 角化細胞および線維芽細胞における、表面処理の異なる3種類のTiO₂ NPsによる小核誘発。3回の独立した観察の平均値 ±SDを表す。* 溶媒対照群と比較して有意差あり (p<0.01)、a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k 異文字間で有意差あり (p<0.01) (Tukey-Kramer法)。縦軸は観察した細胞1,000個あたりの小核保有細胞出現頻度を示す。CTは溶媒コントロール。MMCはマイトマイシンC (陽性コントロール)。

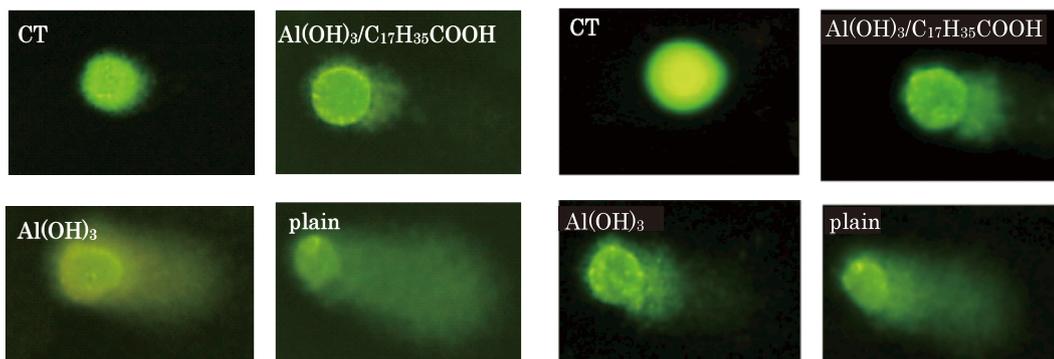


図4 アルカリ性コメットアッセイの例。左：角化細胞(HEKn)、右：線維芽細胞(FJ)

なる3種類のTiO₂ NPsは処理濃度に依存してより多くのDNA切断 (tail DNA) を引き起こした。TiO₂ NPsは35 nm-表面無処理 > 35 nm-Al(OH)₃ 表面処理 > 35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理 > 1,000 nm-表面無処理の順に、より多くのDNA切断を起こした(図5)。

3. 4. 活性酸素 (ROS) の誘導

Tali イメージングサイトメーターを用いた細胞内ROS誘導量測定の一例を図6に示す。H2DCFDAがROSによって酸化されDCFDAとなり蛍光を発する。角化細胞および線維芽細胞において、3種類のTiO₂ NPsは10および

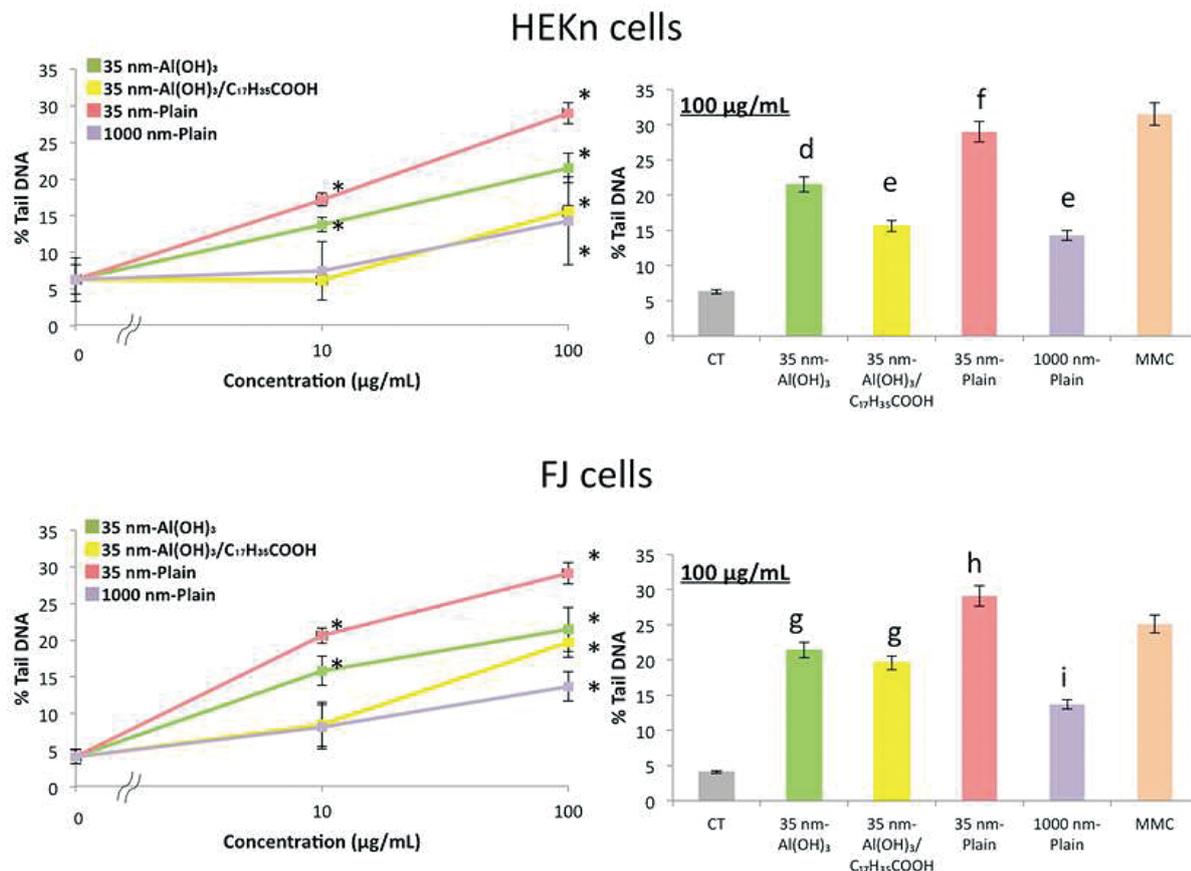


図5 角化細胞 (HEK293) および線維芽細胞 (FJ) における、アルカリ性コメットアッセイによって測定したTiO₂NPsによるDNA切断。独立した3回の% Tail DNAの平均値±SE。* 溶媒対照群と比較して有意差あり(p<0.01)、a, b, c, d, e, f, g, h, i 異文字間で有意差あり(p<0.01)。

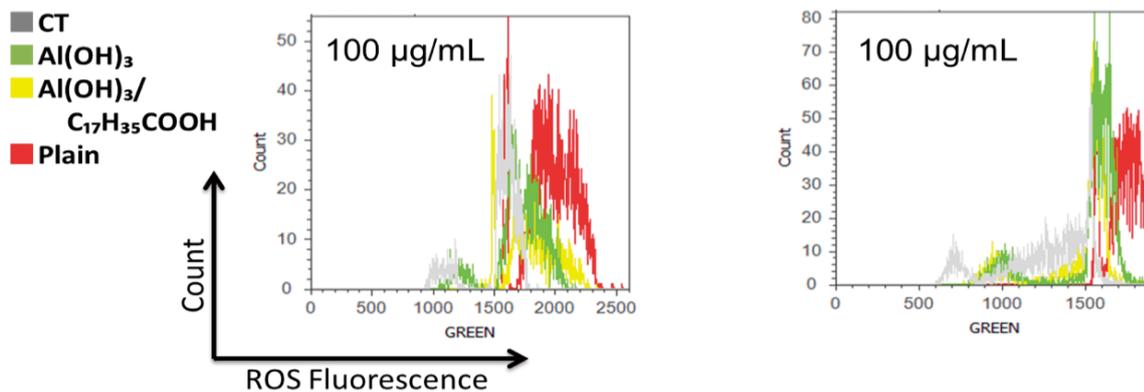


図6 角化細胞(HEK293) (左)および線維芽細胞(FJ) (右)におけるTiO₂ NPs100 µg/mL 処理後のROS 蛍光量

100 µg/mL 処理によって ROS を誘導することがわかった。TiO₂ NPs は 35 nm-表面無処理 > 35 nm-Al(OH)₃ 表面処理 > 35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理 > 1,000 nm-表面無処理の順に多くの ROS を誘導した(図7)。

3.5. TiO₂ NPs の細胞内取込

TiO₂ NPs を 10 および 100 µg/mL、1 時間処理後、フローサイトメーターを用いて forward scatter と side scatter を測定した(図8)。前者は細胞の大きさを反映する。後者は細胞内に取り込まれた TiO₂ NPs の量を反映する。全細胞数のうち赤の横線より上に分布している細胞の割合は、100 µg/mL TiO₂、35 nm-Al(OH)₃ 表面処理、35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理、35 nm-表面無処理、1,000 nm-表面無処理、溶媒対照の順に、HEKn 細胞では 63.0%、60.5%、90.0%、42.6%、9.2% であり、FJ 細胞では 86.1%、33.6%、91.0%、31.2%、0.3% であった。

すなわち、角化細胞および線維芽細胞において、表面無処理の TiO₂ NPs が最も取り込まれ、次いで Al(OH)₃ 処理が取り込まれやすく、Al(OH)₃/ステアリン酸処理は取り込まれにくいことがわかった。表面無処理の 1,000 nm TiO₂ NPs が最も取り込まれにくいことがわかった。

4. 考察

酸化チタンナノ粒子(TiO₂ NPs)は白色顔料や紫外線散乱剤として日焼け止め等の化粧品に使用されている。また、無機系・有機系の表面処理を施された TiO₂ NPs を含む化粧品もある。本研究では、表面処理の違いと遺伝毒性との関係を明らかにした。また同時に、表面無処理で直径が異なる 2 種類の TiO₂ NPs の遺伝毒性も比較した。化粧品が直接皮膚に接触することを考慮し、ヒト皮膚二倍体細胞(線維芽細胞および角化細胞)を用いて小核試験を行った。その結果、Al(OH)₃ 表面処理、Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理、表面無処理の、どの TiO₂ NPs (粒子径が 35 nm) も濃度依存的に小核を誘導した。特に表面無処理の粒子による小核誘発頻度が最も高かった。またアルカリコメットアッセイにより、表面無処理の TiO₂ NPs が最も DNA 鎖切断を誘発することがわかった。さらに、ROS 産生能を、蛍光試薬を用いて調べたところ、表面無処理の TiO₂ NPs が最も ROS を誘導した。NPs の小核誘発能、DNA 切断量、ROS 産生量と細胞への取り込み量の関係を調べた結果、それらに正の相関が見られた(図9)。

以上のことから、TiO₂ NPs のヒト皮膚二倍体細胞に対

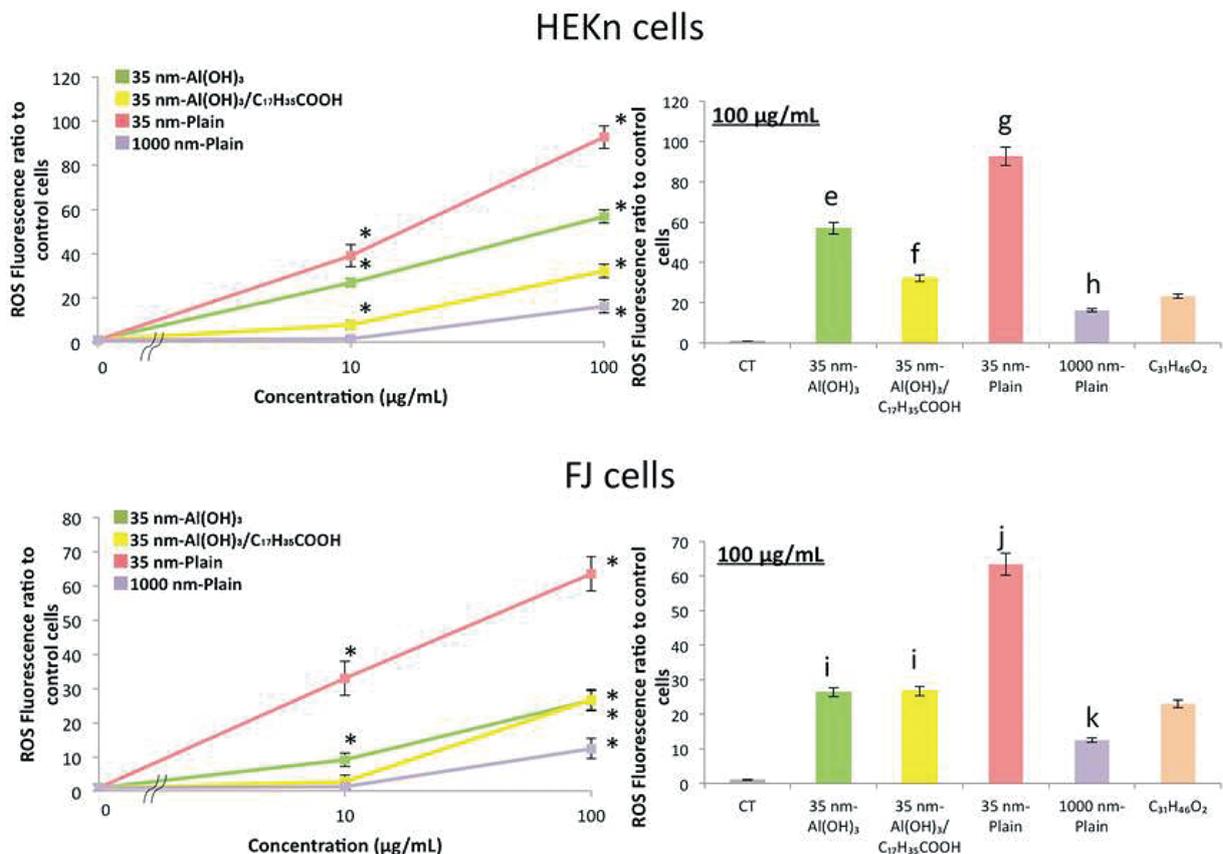


図7 角化細胞(HEKn)および線維芽細胞(FJ)における、TiO₂ NPs による細胞内 ROS 産生量。独立した 3 回の % Tail DNA の平均値 ±SE。* 溶媒対照群と比較して有意差あり (p<0.01)、a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k 異文字間で有意差あり (p<0.01)。縦軸はコントロールでの ROS 産生量を 1 としたときの相対値を示す。

する遺伝毒性の違いは、表面特性による細胞内への取り込まれやすさに起因することが示唆された。細胞は培養液中で負荷電していることから、TiO₂ NPsの細胞への取り込まれ易さは、粒子の親水性の他に、粒子表面電荷にも依存

すると考えられる。培養液 (pH 7) 中のTiO₂ NPs粒子のゼータ電位は親水性NPsで大きいことがわかり、TiO₂ NPsが凝集していることを示し、顕微鏡観察でもそのことがわかった。親水性で凝集性が高い35 nm NPsは多くのROS

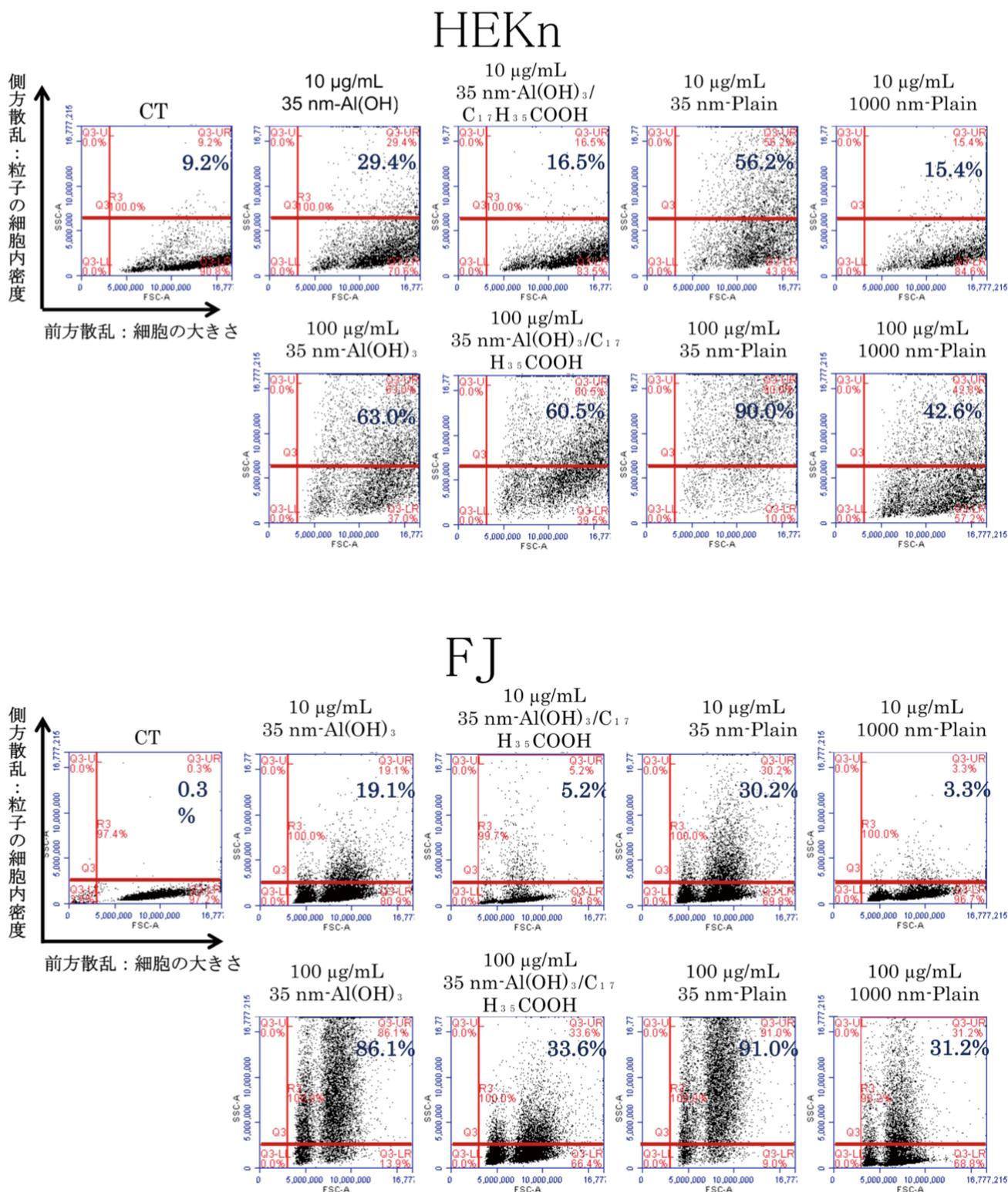


図8 フローサイトメーターによるTiO₂ NPsの細胞内取込量 (side scatter) の測定。上:角化細胞(HEK293)、下:線維芽細胞(FJ)

を産生し、DNA 損傷および小核を誘導していた。これは TiO₂ NPs が凝集することによって、細胞あたりの取り込み量が増え、細胞内 ROS 産生量とそれによる DNA 損傷量が増え、高頻度で小核を誘導すると説明できる。撥水性の NPs は凝集性が低く、細胞膜透過性も低いと考えられる。

1,000 nm NPs は 35 nm NPs と比べて、大きさの点で細胞膜透過性が低く、遺伝毒性が低いと考えられる。本研究結果から導かれる TiO₂ NPs の ROS を介した小核誘導のメカニズムを図 10 に示す。

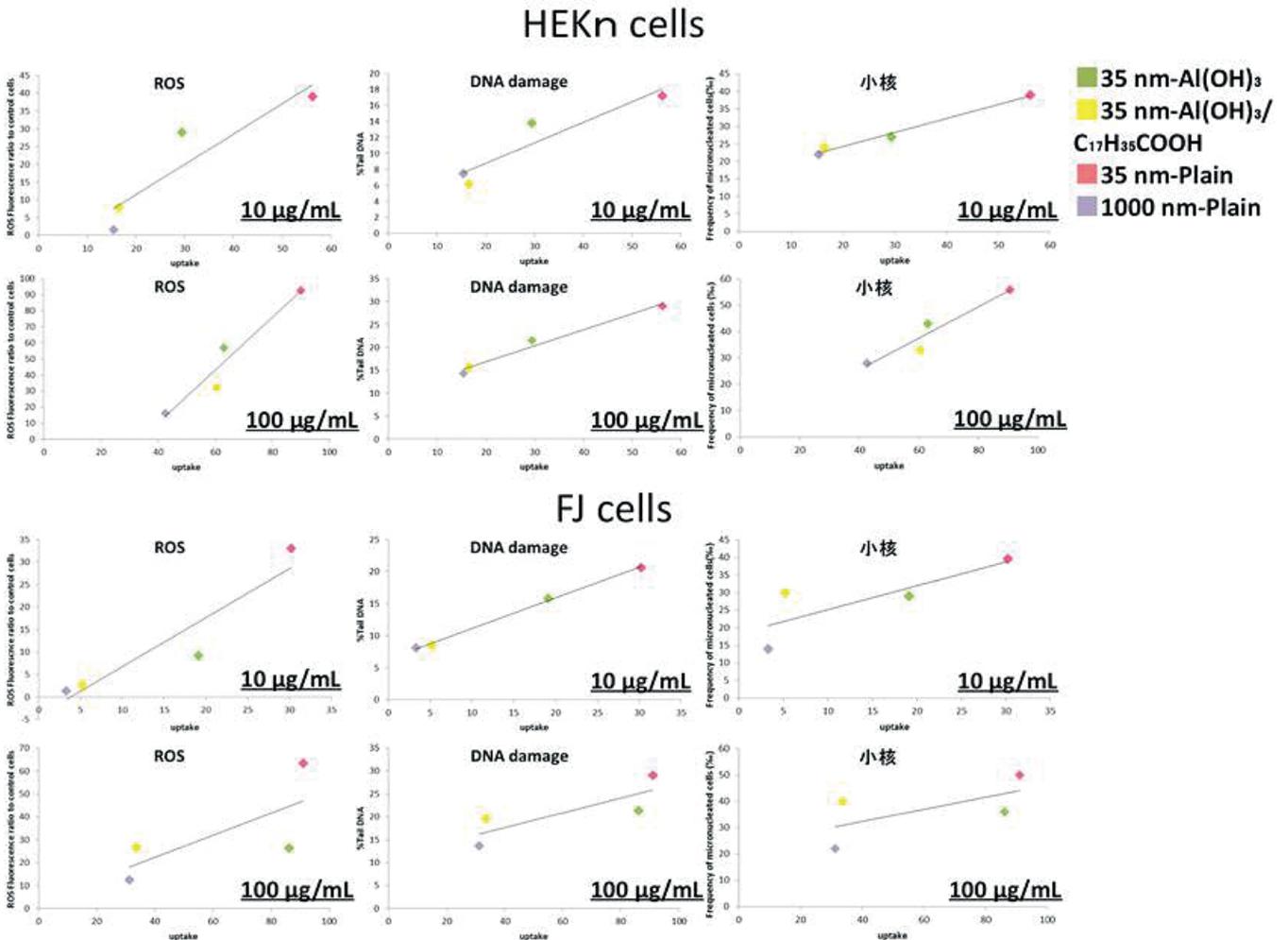


図9 TiO₂ NPs の ROS 産生量、DNA 損傷性、小核頻度と細胞への取り込み量との相関。上：角化細胞(HEK293)、下：線維芽細胞(FJ)

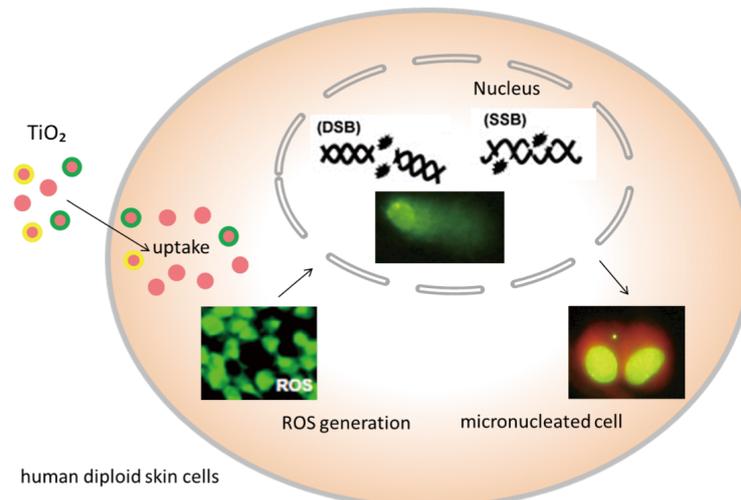


図 10 TiO₂ NPs による小核誘導のメカニズム