

# 経皮曝露されたナノ粒子の存在様式変化の理解と 毒性発現を適切に解析・予測するための試験法の提案

和歌山県立医科大学薬学部

長野 一也

To ensure the safe usage of silver nanoparticles (nAgs) in cosmetics, it is necessary to reveal the physical forms of nAgs inside the skin, as these forms may change during the process of percutaneous absorption. In this respect, we have previously established an analytical system based on single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS) to determine the physical forms of nAgs in the skin. Here, we analyzed the physical forms of nAgs inside the mouse skin. Furthermore, we tried to propose an appropriate test system, to understand the kinetics of nAgs after dermal exposure in a simple and detailed manner.

We evaluated the quantity as well as the physical forms of Ag in the epidermis and dermis of mice after exposing nAgs with 100 nm diameters (nAg100) or  $\text{Ag}^+$  to the skin. Sp-ICP-MS analysis indicated that nAg100 could be absorbed and distributed into the deeper layers in the ionized form, whereas  $\text{Ag}^+$  was absorbed and distributed without a change in physical forms. This data suggested that it is essential to consider the distribution and particle size of not only nAgs but also  $\text{Ag}^+$  released from nAgs into the skin, to understand the skin response following exposure of nAgs. Next, we focused on a three-dimensional skin culture model as an animal-substitute *in vitro* test system from the viewpoint of animal welfare, and analyzed the distribution of nAg100 (epidermal and dermal layer) and the amount and physical form of nAg100 in each layer. Sp-ICP-MS analysis showed that nAg100 could be also absorbed and distributed into the deeper layers in the ionized form, as well as *in vivo* studies. The data suggested that a three-dimensional skin culture model could be a useful *in vitro* test system for understanding the kinetics of nAgs after dermal exposure in a simple and detailed manner.

## 1. 緒言

ナノ粒子は、組織浸透性が高いことから、化粧品をはじめ、身の回りの製品に応用されている<sup>1)</sup>。一方で、ナノ粒子は、その微小さから、従来サイズの粒子とは異なる体内動態を示すため、皮膚内での炎症惹起をはじめ、様々な毒性発現が指摘されている<sup>2)</sup>。このような背景から、様々な素材・大きさのナノ粒子が、動物などに投与され、それぞれの毒性は、投与されたナノ粒子に起因しているとの考察が散見される。また、その機序解析を目的とした*in vitro*試験においても、*in vivo*で投与したナノ粒子をそのまま利用している実験が多く認められる。しかし、最近では、1) 抗菌スプレーなどに汎用される銀ナノ粒子が、生体内でイオン化されて粒子が小さくなることや<sup>3)</sup>、逆に、イオンから粒子が再形成されることが報告されており<sup>4)</sup>、必ずしも曝露されたナノ粒子自体が、毒性を発現させているとは限らないことがわかりつつある。そのため、*in vitro*試験において、*in vivo*で投与したナノ粒子をそのまま利用することは、真実と異なる現象を観察している可能性も考えられる。さらに重要なこととして、2) ナノ粒子が起因する生体

応答(毒性を含む)は、粒子の大きさや、粒子/イオンといった存在様式の違いによって異なることを見出しており<sup>5-7)</sup>、「投与・添加されたナノ粒子の物性」と「引き起こされる生体応答(毒性を含む)」の間がブラックボックスのままでは、ナノ粒子に起因する毒性を真に理解しえない。したがって、ナノ粒子含有製品の安全性担保には、ナノ粒子の存在様式を定量的に理解し、毒性を発現させている正体を理解したうえで、試験系を設定することが重要である(図1)。

しかし、ICP-MSや電子顕微鏡観察といった従来手法は、一長一短で、存在量と存在様式を同時評価できず、新たな技術基盤が求められていた(表1)。

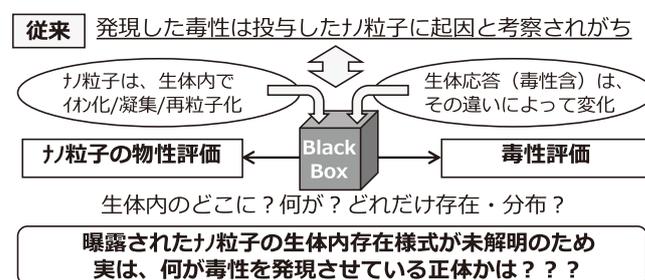


図1 ナノ粒子の毒性評価の概要図

表1 ナノ粒子の定量・定性評価するための手法

	存在量の解析 (定量解析)	存在様式の解析 (定性解析)
ICP-MS	○	X
電子顕微鏡観察	X	○
生体試料応用型1粒子ICP-MS	○	○



Understanding the change in physical forms of nanoparticles exposed dermally and proposing test methods for appropriate analysis and prediction of their toxicity

Kazuya Nagano

School of Pharmaceutical Sciences,  
Wakayama Medical University

本観点から、申請者はこれまでに、上記のブラックボックスを解き明かすことを目指し、生体試料の前処理を最適化することで、生体内でのナノ粒子の存在量と存在様式を解析可能な「生体試料応用型1粒子ICP-MS」を独自開発してきた<sup>8)</sup>。本技術を活用し、安全なナノ粒子含有化粧品などを開発するためには、①経皮曝露されたナノ粒子の存在様式が、皮膚内でどのように変化するかを立証し、②どういったナノ粒子が経皮曝露されると、どこに、何が、どれだけ分布するかを精査したうえで、③適切な試験系を設定することが求められる。

そこで本研究では、銀ナノ粒子をモデルに、皮膚内での存在様式変化を解析したうえで、3次元皮膚培養モデルなどを活用することにより、毒性発現を適切に理解・予測するための試験系の提示を目指す。

## 2. 方法

### 2.1. マウス皮膚に曝露された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

モデルナノ粒子として、100nmの銀ナノ粒子 (nAg100) を nanoComposix 社より購入し、実験に供した。硝酸銀を富士フィルム和光純薬より購入し、銀イオン (Ag<sup>+</sup>) を nAg100 の対照群として設定した。マウスは、ICRの雌 (8週齢) を日本SLCより購入した。皮膚組織の分画は、まず、テープストリッピングで角質層を採取し、表皮と真皮を Microwave 法 (200 W, 30 秒) にて分離した。各皮膚組織における銀の存在量については、ICP-MS法によって評価した。また、存在様式については、高効率に回収でき、存在様式を変化させることのない水酸化ナトリウムによる前処理で組織を可溶化し、生体試料応用型1粒子ICP-MSによって評価した<sup>8)</sup>。

### 2.2. 3次元皮膚培養モデルに添加された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

3次元皮膚培養モデル (表皮モデル: EPI-212) を、KURABOより購入した。nAg100の添加濃度を検証するため、3次元皮膚培養モデルに各種濃度 (3, 10, 30, 90 μg/mL) の nAg100 を添加し、24時間後、WST-8アッセイにより、3次元皮膚培養モデルに対する障害性を検証した。障害性が観察されなかった最大濃度 (90 μg/mL) の nAg100 を3次元皮膚培養モデルの上層に添加し、24時間後、サンプルを回収した。サンプルとしては、まず、3次元皮膚培養モデルの上層と下層の溶液をそれぞれ回収後、3次元皮膚培養細胞層に水酸化ナトリウムを添加・溶解させて回収した。回収したサンプル中の銀の存在量・存在様式は、2.1.と同様、それぞれICP-MS法と生体試料応用型1粒子ICP-MSによって評価した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. マウス皮膚に曝露された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

マウス皮膚に曝露された銀ナノ粒子の各層 (表皮層と真皮層) での存在量と存在様式変化を理解するため、100nmの銀ナノ粒子 (nAg100) と、その対照群として、銀イオン (Ag<sup>+</sup>) をマウス皮膚に塗布した。塗布5日後、皮膚組織の各層における存在量をICP-MS法で解析し、存在様式を生体試料応用型1粒子ICP-MS法で解析した。

その結果、いずれの曝露群においても、表皮と真皮で、銀が検出された (図2(a))。そこで、その存在様式を解析したところ、Ag<sup>+</sup>曝露群では、表皮・真皮ともに、そのほとんどが曝露させたAg<sup>+</sup>として検出された。その一方で、nAg100曝露群では、表皮・真皮ともに、曝露させた粒子のみならずイオンが約6:4の割合で検出された (図2(b))。また、その粒子径は、約80nmとイオン化に伴って小さくなっていることが示唆された (図2(c))。したがって、経

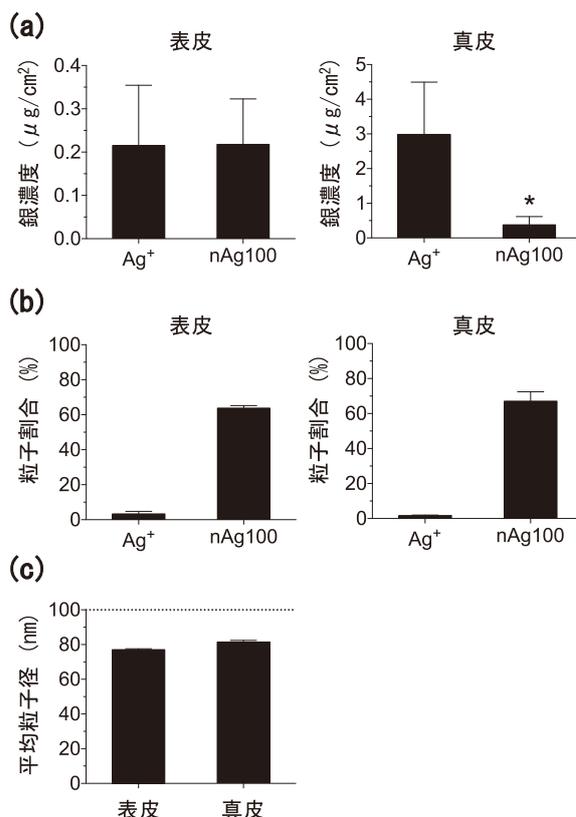


図2 マウス皮膚に塗布したnAg100とAg<sup>+</sup>の存在量・存在様式変化の解析  
マウス皮膚にnAg100とAg<sup>+</sup>を20 μg Ag/cm<sup>2</sup>で塗布し、5日後、表皮と真皮中のAgの存在量と存在様式を解析した。(a)は、表皮と真皮中に検出された銀濃度。(b)は、表皮と真皮中に検出された銀粒子の割合。(c)は、表皮と真皮で検出された粒子の平均粒子径。破線は、皮膚塗布時の粒子径。全データは平均値±S.E.で示した (n=3)。\* p<0.05 (Student's t-test)

皮吸収の過程でイオン化していることが示唆された。

以上から、マウス皮膚に曝露されたnAg100は、その吸収過程でイオン化し、表皮や真皮では、粒子とイオンが共存していることが明らかとなった。

### 3. 2. 3次元皮膚培養モデルに添加された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

nAg100のみならず、経皮曝露された各種ナノ粒子の動態(どこに、何が、どれだけ分布するのか)を詳細に理解するためには、簡便でハイスループットな評価系が必要である。そこで、動物愛護の観点からも、動物代替の*in vitro*試験法として、3次元皮膚培養モデルに着目した。本試験では、様々な3次元皮膚培養モデルの中から、表皮モデルを選択した。すなわち、3次元皮膚培養の上層・3次元皮膚培養の細胞層・3次元皮膚培養層の下層がそれぞれ、*in vivo*における皮膚表面・表皮内・真皮以降を再現しうると考えられた。

まず、3次元皮膚培養モデルにおいても、銀ナノ粒子が経皮吸収の過程でイオン化し、表皮や真皮では、粒子とイオンが共存していることを明らかにするため、nAg100をモデルに、3次元皮膚培養の上層・3次元皮膚培養の細胞層・3次元皮膚培養の下層における存在量と存在様式を解析した。最初に、nAg100の添加濃度を決定するため、各種濃度のnAg100を3次元皮膚培養層に添加し、その障害性をWST-8アッセイによって評価した。障害性が観察されなかった最大濃度(90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を決定したうえで、nAg100を3次元皮膚培養モデルの上層に添加し、24時間後、各層の銀の存在量と存在様式を解析した。

各層の銀の存在量をICP-MS法で評価したところ、いずれの層にも銀が検出され、真皮にまで浸透していることが示唆された。一方で、その量は、皮膚表面(3次元皮膚培養の上層)から、表皮(3次元皮膚培養の細胞層)、真皮以

降(3次元皮膚培養の下層)に進むにあたって、少なくなっており、皮膚バリアによって深部に向かって浸透する量は制限されていることが示唆された(図3(a))。次に、各層の銀の存在様式を生体試料応用型1粒子ICP-MS法で評価したところ、皮膚表面(3次元皮膚培養の上層)では、ほとんどが粒子であったのに対して、表皮(3次元皮膚培養の細胞層)、真皮(3次元皮膚培養の下層)と向かうにつれて、イオン割合が大きくなっており、nAg100は、イオン化しながら、浸透していることが示唆された(図3(b))。実際、各層で検出された粒子の大きさを検証すると、皮膚表面(3次元皮膚培養の上層)から、表皮(3次元皮膚培養の細胞層)、真皮(3次元皮膚培養の下層)へと向かうにつれて粒子径が小さくなっており、イオン化に伴って小さくなっていることが示唆された(図3(c))。

以上から、マウス皮膚のみならず、3次元皮膚培養モデルに添加されたnAg100も、その吸収過程でイオン化し、表皮や真皮では、粒子とイオンが共存していることが明らかとなった。そのため、3次元皮膚培養モデルは、経皮曝露された各種ナノ粒子の動態(どこに、何が、どれだけ分布するのか)を詳細かつ簡便に理解するための評価系になる可能性が示された。一方で、表皮や真皮に浸透する量や、イオン化の割合、粒子径の減少は、マウス皮膚と3次元皮膚培養モデルで乖離があった。これは、各種条件が異なるため、必然ではあるものの、ヒト皮膚での経皮吸収後の動態を理解・予測するために、まずは、ヒト皮膚を用いて検証したうえで、その結果に相応する3次元皮膚培養モデルの種類や条件を探っていくことで、動物代替の*in vitro*試験法になることが期待される。

## 4. 総括

本研究によって、nAg100が経皮曝露されても、皮膚組織内にはnAg100がそのまま存在しているとは限らず、経

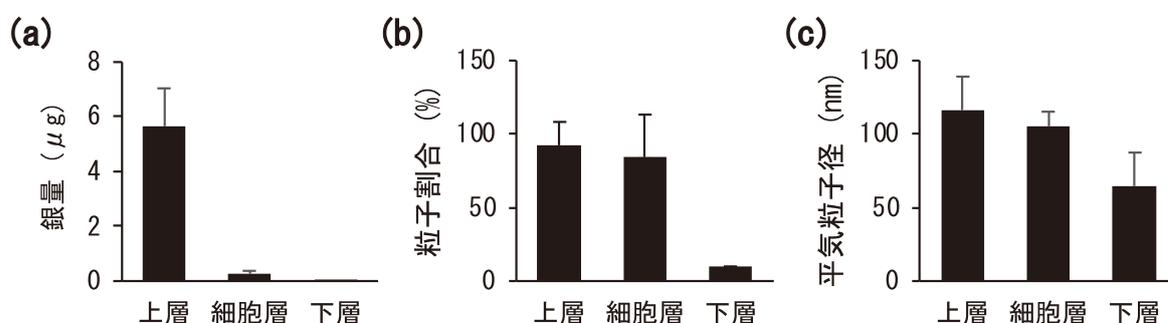


図3 3次元皮膚培養モデル(表皮モデル)に添加したnAg100の各層での存在量・存在様式の解析  
3次元皮膚培養モデル(表皮モデル)にnAg100を90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、24時間後、3次元皮膚培養の上層(皮膚表面に相当)、3次元皮膚培養の細胞層(表皮に相当)、3次元皮膚培養の下層(真皮以降に相当)のAgの存在量と存在様式を解析した。  
(a)は、各層に検出された銀量。(b)は、各層に検出された銀粒子の割合。(c)は、各層で検出された粒子の平均粒子径。  
全データは平均値 $\pm$ S.D.で示した(n=3)。

皮吸収後の毒性を適切に解析するためには、各皮膚組織中に存在する粒子とイオンの双方を考慮することの重要性が示された。また、存在量のみならず、存在様式を含めた動態を簡便に推測する手法として、3次元皮膚培養モデルの有用性を部分的に明らかにした。特に、3次元皮膚培養モデルは、本試験で利用した表皮モデルのほか、真皮モデルや、角層が未熟なタイプやバリア能が亢進したタイプなど、多種多様にラインナップされている。そのため、子どもの皮膚や皮膚疾患などによって角層が未熟な場合の評価も期待される。また、真皮に到達した粒子とイオンの影響を観察するには、*in vivo*での皮膚を利用するよりも、3次元皮膚培養された真皮モデルに直接、粒子・イオン単独もしくは双方を添加する方が、適切に真皮での応答を解析できる可能性も考えられる。

さらに本研究が進展することによって、将来的には、生体に曝露されたナノ粒子の運命から、毒性や機能を引き起こす正体を明らかにすることも夢ではなく、安全で有用なナノ粒子の設計やその利用方法も講じることが可能になるかもしれない。例えば、ナノ粒子から徐放されるイオンが毒性に関連する場合には、イオン化しにくい素材の利用や、イオン化させない設計・利用方法が理論的に構築可能である。また、逆に、イオンが機能に関連する場合には、粒子がイオン放出源のデリバリーキャリアとしてデザインすることも可能かもしれない。

以上は、新たな機能性化粧品を安全かつ合理的に開発することに直結するため、コスメトロジーの進展に大きな貢献が期待される。

#### (引用文献)

- 1) Dubey SK., Dey A., Singhvi G., Pandey MM., Singh V., Kesharwani P. : Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics., *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 214:112440 (2022).
- 2) Larese FF., D'Agostin F., Crosera M., Adami G., Renzi N., Bovenzi M., Maina G. : Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin., *Toxicology.* 255:33-7 (2009).
- 3) Park EJ., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K. : Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a trojan-horse type mechanism., *Toxicol. Vitro.* 24, 872-878 (2010).
- 4) Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam HR., Larsen EH. : Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre. Toxicol.* 8, 18 (2011).
- 5) Morishita Y., Yoshioka Y., Takimura Y., Shimizu Y., Namba Y., Nojiri N., Ishizaka T., Takao K., Yamashita F., Takuma K., Ago Y., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Saito S., Matsuda T., Hashida M., Miyakawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Distribution of silver nanoparticles to breast milk and their biological effects on breast-fed offspring mice., *ACS Nano.* 10 (9) : 8180-91 (2016).
- 6) Hirai T., Yoshioka Y., Izumi N., Ichihashi K., Handa T., Nishijima N., Uemura E., Sagami K., Takahashi H., Yamaguchi M., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Ishii K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Metal nanoparticles in the presence of lipopolysaccharides trigger the onset of metal allergy in mice., *Nat. Nanotechnol.*, 11 (9) : 808-816 (2016).
- 7) 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., *Nat. Nanotechnol.*, 6 (5) : 321-328 (2011).
- 8) Ishizaka T., Nagano K., Tasaki I., Tao H., Gao JQ., Harada K., Hirata K., Saito S., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Optimization and evaluation of pretreatment method for sp-ICP-MS to reveal the distribution of silver nanoparticles in the body., *Nanoscale Res. Lett.*, 14 (1) : 180 (2019).