

## 銀ナノ粒子の生体影響評価

○三浦伸彦、小泉信滋  
（（独）労働安全衛生総合研究所）

【目的】銀ナノ粒子は病原体やバクテリアに対して高い毒性を示し、抗菌剤や消臭剤としての使用が急速に高まっているナノ粒子であり、市場に出回っている 350 種類以上のナノ材料で最も一般的なものである。しかし銀ナノ粒子の生体影響は詳細に解析されていない。そこで銀ナノ粒子の有害性の有無および生体影響を類推するための基礎的検討を行った。

【方法】ヒト由来HeLa細胞に銀ナノ粒子分散液（粒径5-10 nm、保護剤含有）を添加し（最終濃度2-120  $\mu\text{g/ml}$ ）、添加24時間後の細胞生存率をAlamarBlue試薬を用いて測定した。アポトーシスの有無はAPOPercentageを用いて測定した。さらに銀ナノ粒子添加4時間後のメタロチオネイン-2A (MT-2A)、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、熱ショックタンパク質70 (HSP70)をコードする遺伝子の発現をリアルタイムPCR法で測定し、それらの変動を指標に銀ナノ粒子ばく露による生体影響を評価した。

【結果および考察】銀ナノ粒子添加24時間後の細胞生存率を調べたところ、120  $\mu\text{g Ag/ml}$ の濃度ではほぼ全ての細胞が死滅し、 $\text{IC}_{50}$ は92  $\mu\text{g Ag/ml}$ であった。一方銀イオンとして硝酸銀( $\text{AgNO}_3$ )を用い同様に細胞生存率を調べた結果、銀ナノ粒子よりも低濃度で全細胞の死滅が観察され(20  $\mu\text{g Ag/ml}$ )、 $\text{IC}_{50}$ は17  $\mu\text{g Ag/ml}$ であった。このことから銀ナノ粒子が明らかな細胞毒性を引き起こし、この細胞死を引き起こすメカニズムとしてアポトーシスに関わることが示された。さらに銀ナノ粒子添加によりMT-2A遺伝子およびHO-1遺伝子の発現量は非添加群に比べて顕著に増加し、細胞毒性の認められない5  $\mu\text{g Ag/ml}$ から濃度依存的に増加した。この増加はこれら遺伝子の強力な誘導剤であるCdとほぼ同程度であった。またHSP70遺伝子もわずかながら発現量が上昇した。それぞれの遺伝子産物の機能から類推すると、銀ナノ粒子が引き起こす効果として金属イオン、酸化ストレス、タンパク質変性が生じている可能性が考えられる。

### Analysis of the biological effects of nanosilver exposure

○Nobuhiko Miura and Shinji Koizumi (Nat. Inst. Occup. Safety and Health)

Nanosilver products, which are well known antimicrobial properties, have been used extensively as antibacterial agents and deodorants. Despite the widespread use of nanosilver products, relatively few studies have been undertaken to determine the biological effects of nanosilver exposure. Therefore we evaluated the toxicity of nanosilver and examined the influence on several gene expressions by nanosilver exposure. We observed apparent cytotoxicity in HeLa cells exposed to nanosilver (5-10 nm) or silver nitrate for 24 h. The  $\text{IC}_{50}$  values for nanosilver and silver nitrate were 92 and 17  $\mu\text{g Ag/ml}$ , respectively. Furthermore, nanosilver induced apoptosis in HeLa cells as well as silver nitrate. These results indicate nanosilver possesses obvious cytotoxic ability. To obtain the clue of mechanism of action, we examined expressions of typical stress genes coding for metallothionein-2A (MT-2A), heme oxygenase-1 (HO-1) and heat shock protein 70 (HSP70) after nanosilver exposure. Nanosilver induced MT-2A and HO-1 expressions, whose levels were similar to the levels induced by Cd, a strong inducer of these genes. The HSP70 expression was slightly increased by nanosilver. These results suggest the occurrence of metal ion, oxidative stress and protein denaturation by nanosilver exposure.