

銀ナノ粒子の生体影響解析

Analysis of the biological effects of silver nanoparticles

○三浦伸彦、小泉信滋 (労働安全衛生総合研究所)

(National Institute of Occupational Safety and Health)

【目的】 銀ナノ粒子は病原体やバクテリアに対して非常に毒性が高く、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。我が国における銀ナノ粒子に対する規制は皆無であり、製品広告を掲載したホームページ等には「無害」と明記されている。しかし銀ナノ粒子が生殖幹細胞や脳、肝臓由来の細胞に強力な毒性を示すという *in vitro* の報告¹⁾や、培養細胞で明らかな毒性が認められたとの情報がある。さらに、2006 年には米国環境保護局(EPA)が銀ナノ粒子の規制に乗り出し、銀ナノ粒子を活用した製品を販売する企業にその製品の安全性に関する科学的な証明の提出を義務付けている。銀ナノ粒子の生体影響は詳細に解析されていないことから、銀ナノ粒子の有害性の有無およびその作用標的をサーチする系の確立を試みた。

【方法】 ヒト由来 HeLa 細胞を銀ナノ粒子分散液 (粒径 5-10 nm、保護剤含有) で処理し (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。銀ナノ粒子ばく露による生体影響については、代表的なストレス応答タンパク質 (メタロチオネイン(MT)、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、熱ショックタンパク質 70 (HSP70)) の遺伝子発現変動を指標として評価した: 銀ナノ粒子添加 4 時間後に total RNA を抽出して逆転写反応により cDNA としたものを鋳型としてリアルタイム PCR 法によりそれぞれの mRNA 量を定量した。

【結果】 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 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でほぼ全ての細胞が死滅し、 IC_{50} は 90 $\mu\text{g/ml}$ であった。一方銀イオンとして硝酸銀(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 $\mu\text{g Ag/ml}$)、 IC_{50} は 15 $\mu\text{g Ag/ml}$ であった。代表的なストレス応答遺伝子である MT, HO-1, HSP70 遺伝子について銀ナノ粒子添加 4 時間後の遺伝子発現量を解析したところ、MT および HO-1 遺伝子は非添加群に比べて顕著な発現量増加を示し、細胞毒性の認められない 5 $\mu\text{g/ml}$ 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カドミウムとほぼ同程度であった。また HSP70 遺伝子も僅かながら発現量が上昇した。

【考察】 銀ナノ粒子が明らかな細胞毒性を引き起こすことを確認した。またストレス応答遺伝子の発現上昇が認められたが、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による生体影響として金属毒性、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。今後、これらの遺伝子に加えて炎症関連遺伝子や線維化に関わる遺伝子について発現変動を検討することにより銀ナノ粒子の作用標的を類推し、さらに肺由来細胞や皮膚由来細胞を用いることによりばく露形態に応じた毒性発現の違いについても検討を加える予定である。

1) Braydich-Stolle L et al (2005) *Toxicol Sci*, **88**, 412-419