

P-069

Is titanium dioxide really safe? -Particle size-dependent induction of DNA damage-

Takeharu Amano, Tatsushi Toyooka, Yuko Ibuki
Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka

Titanium dioxide (TiO_2) is an important material used in a broad range of industries. As TiO_2 particles used in industries have recently become smaller as nanotechnology develops, problems specific to small size (nanotoxicity) are increasing. In this study, we examined DNA damage induced by different sizes of TiO_2 particles. Nano-sized TiO_2 particles significantly induced phosphorylation of Histone H2AX, which was recently identified as an early event after the induction of DNA damage (double strand breaks), in human alveolar epithelial cells (A549). On the other hand, the induction was small in micro-sized TiO_2 particles. In addition, TiO_2 nanoparticles made a lot of DNA fragmentation (detected using pulsed-field gel electrophoresis), compared with microparticles. Cell viability did not change 24h after treatment with both particles. These results indicated that nano-sized TiO_2 particles significantly induce DNA damage, which behavior is different from micro-sized TiO_2 particles.

二酸化チタンは本当に安全か？ - 粒子サイズによる DNA 損傷の相違 -

天野豪春, 豊岡達士, 伊吹裕子
静岡県立大学 環境科学研究所

近年のナノテクノロジーの発展は、多くの利便性をもたらすと考えられるが、一方でナノ粒子による生体影響が問題視され始めている。二酸化チタン(TiO_2)粒子は、化粧品等様々な分野で使用されており、安全性の高い物質であると認識されてきた。しかし、 TiO_2 作用により細胞内の活性酸素種量が増大し、炎症等が引き起こされるといった報告もある。加えて、近年商業的に用いられる粒子はナノサイズ化する傾向にあり、我々が日常的にナノ粒子に接する機会も増加していると考えられる。これらナノ粒子は生体内により取り込まれやすく、損傷を与えやすいと考えられることから、本研究では、マイクロサイズ粒子とナノサイズ粒子がもたらす DNA 損傷の相違を検討した。ヒト肺上皮細胞(A549)に暗下、 TiO_2 粒子を作用させたところ、DNA 損傷(主に DNA 二本鎖切断)の高感度マーカーとして注目されている Histone H2AX のリン酸化がマイクロサイズの TiO_2 粒子に比べ、ナノサイズの TiO_2 粒子ではより顕著に誘導された。また、そのリン酸化は作用時間が 8 時間を越えても継続的であり、24 時間作用後も認められた。加えて、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いて DNA 断片化の検出を行ったところ、マイクロサイズ粒子に比べ、ナノサイズ粒子作用ではより顕著な DNA 断片化が確認された。一方で作用後 24 時間における生存率測定を行ったところ、いずれの粒子サイズ、作用濃度においても生存率は顕著な減少を示さなかった。以上の結果により、生存率には影響を与えないような作用濃度においても、ナノサイズ粒子は DNA に損傷を与えることが明らかになった。

P-070

Cytotoxicity and genotoxicity of eleven size-different polystyrene particles

Atsuko Matsuoka, Yoshie Matsuda, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

Development in the field of nanotechnologies has brought nanomaterials (NMs) closer to us day by day and at the same time toxicological concerns of NMs have been growing. Therefore, we are trying to establish an in vitro screening system of NMs to evaluate their human safety. In the establishment, we have been trying to disperse NMs as homogeneously and small as possible in suspension for a biological test system. To evaluate the role of particle size in cytotoxicity tests (the colony formation assay) of NMs, we exposed Chinese hamster cells (CHL) to polystyrene (PS) spheres (Spherotech, Inc. USA) with defined diameters ranging from 100 nm to 9.2 μm .

We found that the 4.45- μm PS particles were most cytotoxic while sizes 100 and 200 nm showed no cytotoxicity up to 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The 5.26- μm particles were much less cytotoxic, although they precipitated and covered cells to the same extent as the 4.45- μm particles. In the chromosome aberration (CA) test, the 4.45- μm PS particles induced polyploidy in a mass concentration-dependent manner in 24- and 48-h treatments. The 5.26- μm PS particles induced polyploidy only at 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48 h. The CA test with the other sizes of particles is now ongoing. Relationships between particle size and cytotoxicity or genotoxicity will be discussed.

サイズ標準ポリスチレン粒子の細胞毒性および遺伝毒性

松岡厚子, 松田良枝, 伊佐間和郎, 土屋利江
国立医薬品食品衛生研究所・療品部

ナノ材料はその製造技術の発展とともに有用な材料が開発され、様々な分野での応用が実現している。同時に、ナノ材料がもつ従来にない物理化学的特性から、ヒトへの健康影響も未知の部分が多い。そこで、ナノ材料の安全性評価法を開発しているが、一般的には凝集体でしか入手できないナノ材料をいかに評価系で均一にかつより小さな凝集体、理想的には一次粒子のサイズまで分散させるかが評価系確立の鍵になると考えられる。そこで、従来から報告のある粒子サイズと細胞毒性の関係を、我々の使用予定の細胞で確認するために、以下の実験を実施した。平均粒子径 100 nm から 9.2 μm までの、11 種類のサイズのポリスチレン (PS) 粒子を用いて、その細胞毒性との関連を CHL 細胞で検討した。その結果、最も強い細胞毒性を示したのは粒子径 4.45 μm の粒子で、100 および 200 nm の PS 粒子は 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度まで処理しても細胞毒性を示さなかった。5.26 μm の粒子は、4.45 μm の粒子と同程度に沈殿し細胞を覆っていたにもかかわらず、その毒性はずっと低かった。最も毒性が強かった 4.45 μm の粒子について、染色体異常試験を行ったところ濃度依存的に数的異常(倍数体)を誘発した。5.26 μm 粒子は 48 時間処理の 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のみ、倍数体を誘発した。現在、他のサイズの粒子についても染色体異常試験を実施しているところであるが、粒子径と細胞毒性あるいは遺伝毒性との関係を明らかにしたいと考えている。