

492-495 nm 蛍光波長 517-527 nm の波長で蛍光観察を行った。

6 well plate に細胞濃度が 1.0×10^5 cells/well になるように播種した。まず、PBS 8.54 ml に CM-H₂DCFDA の試薬を溶かし 10 μ M に調整する。6 well plate の培地を吸引して、その well に PBS 1ml に 10 μ M に調整した試薬を 200 μ l 加えた。その後 30 分インキュベーションを行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。

蛍光顕微鏡で撮影した画像を、Imaging Soft(Photoshop Elements 8 ;Adobe)を用いて、画像の輝度と細胞の接着の面積(Pixel 数)を求めて、定量化を行った。

6) 細胞周期の解析

細胞周期は DNA の合成を基準に分けられており、G1→S→G2/M と回転する。正常体細胞における基準 DNA 量を 2C と表すと、S 期において DNA 量は 2C から 4C まで増量する。よって、対数増殖期の培養細胞から得た DNA ヒストグラムにおいて、G0/G1 ピークチャンネルのほぼ 2 倍の位置に G2/M ピークがみられる。また、アポトーシスにより DNA の断片化が起こることで、G0/G1 ピークチャンネルよりも小さい位置にピークが見られる。これはアポトーシスの指標となり、subG1 期という。

現在、Flow cytometry (FCM)で DNA 量を測定する際、最も高頻度で使用されている色素が Propidium Iodide (PI) である。PI は二重鎖 DNA の塩基間に架橋的に結合することで、強い蛍光を発する。また、光に対する安定性は良好で、染色法も簡易的であるため、DNA 量測定に優れた蛍光色素である。

各細胞は、100mm ディッシュであらかじめ培養を行い、細胞密度が 1.0×10^6 cells/dish となるように 100 mm ディッシュに播種した。細胞接着後、Fe₃O₄NPs 曝露を行った。培養液を遠心分離して非接着細胞を回収した。また、氷上の PBS を用いて細

胞上に付着した Fe₃O₄NPs をウォッシュアウトし、Trypsin/ EDTA 1ml を用いて細胞を剥離して細胞を回収した。回収した全ての細胞を PBS で懸濁して細胞密度が 1.0×10^6 cells となるように調整してチューブに回収し、Cell-Based Assay Buffer(Cayman Chemical 社) 1 ml で 2 回細胞を洗浄した。その後 Cell-Based Assay Buffer 1 ml で細胞を懸濁し、ボルテックスを行なって細胞が単分散した状態で Cell Cycle Phase Determination fixative (Cayman Chemical 社) 1 ml を 1 滴ずつ加えて細胞を固定した。細胞を氷上で保存しながら、1 サンプルにつき Cell-Based Assay Buffer 500 μ l と RNase A Solution (Cayman Chemical 社) 10 μ l と Propidium Iodide Reagent (Cayman Chemical 社) 10 μ l を混合して調整し、Staining Buffer を作成した。細胞懸濁液を遠心分離してペレットのみの状態にして、Staining Buffer 500 μ l ずつ各サンプルに加えて暗所・室温で 30 分静置したのち、BD FACSCanto™ II フローサイトメーター(Becton Dickinson 社)での解析を行った。

7) Apoptosis の定量化

Apoptosis 細胞の割合を測定するために本実験においては APOPercentage (APOPercentage Apoptosis Assay Kit, Biocolor 社)を用いた。細胞膜は、埋め込まれたタンパク質やリン脂質で構成されている。リン脂質を構成する親水基と疎水基は、親水基は外側に疎水基は内側を向いて、脂質二重層と呼ばれる構造となっている。そして、その脂質の内側と外側は非対称である。この非対称な構成を維持するための機構の一つとして、アミノリン脂質に特異的なフリッパーゼと呼ばれる細胞膜脂質転位酵素で調整されている。

アポトーシスに関連した細胞では、フリッパーゼ ‘floppase’ と呼ばれる他の酵素の働きによって、フリッパーゼ制御が不活性

化する。フロッパーゼの活性化やフッリパーゼの抑制により、急激に細胞内のカルシウム濃度が上昇する。フロッパーゼの作用によって、内側と外側の間でリン脂質の分布が転移する。このことを flip-flop メカニズムと呼ばれている。この flip-flop メカニズムによりフォスファチジルセリンが外側に表出することで、フォスファチジルセリンと親和性の高い APOPercentage Dye が取り込まれる。一方で、flip-flop メカニズムが起こらない限り、Dye は細胞内に取り込まれない。

96 well plate に 0.4 %ゼラチンを 100 μ l 添加し、10 分後に取り除いた。そのプレートに細胞濃度が 2.5×10^3 cells/well になるように播種した。そして、 Fe_3O_4 NPs やドセタキセルなどを 100 μ l/well となるように処理を行った。測定日に、培地 100 μ l と APOPercentage Dye を 5 μ l 混合し添加した。そして 30 分インキュベート後に混合液を吸いとり、PBS 100 μ l でやさしく洗い、位相差顕微鏡で観察を行い、アポトーシスを起こしている細胞の割合を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は既に樹立された細胞株を用いる *in vitro* 実験である。用いる細胞の遺伝子情報を新たに解析する必要がある場合は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成 16 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守する。しかしながら、本研究では申請に該当する内容はなかった。また、遺伝子実験において、必要とする場合は本学組換え DNA 実験安全管理規則に従い行う。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」（基発第 0331013 号）に準じて、*in vitro* 実験を行った。ナノマテリアル保存及び実験等では液相で行われ、気相による実

験者の曝露は防止されている。

C. 研究結果

1) Fe_3O_4 NPs の培養液中の粒径分布

本研究では、ナノマテリアルの一つである Fe_3O_4 NPs (ナノ粒子) を、すなわち同一企業から Fe_3O_4 NPs とカルボキシル基で表面修飾された Fe_3O_4 NPs を対象としたこれらのナノ粒子の 1 次粒子径のサイズは 10 nm である。 Fe_3O_4 NPs は培養液中では 200 nm 前後 (183.5 ± 26.2) であり、sonication あるいは vortex により粒径分布は変動した (図 1)。また、カルボキシル基で修飾した Fe_3O_4 NPs は 100 nm 前後 (102.2 ± 32.0) になるも、一方では 6000 nm の μ レベルの凝集塊も認められた (図 2)。表面修飾により、生体の組織液にも例えられる培養液中で、粒径分布に影響を与える事を確認した。

2) 各種細胞株における 8-OHdG の生成

DU145 を含む前立腺癌細胞株は Fe_3O_4 NPs 曝露 1 μ g/ml から 8-OHdG の生成を有意に認めるが、肺癌細胞株 A549 では Fe_3O_4 NPs 曝露 100 μ g/ml で有意に増加した (図 3)。また、この Fe_3O_4 NPs は他のナノ粒子に比べて 8-OHdG の生成は有意に増加するのを認めた。前立腺癌細胞株は Fe_3O_4 NPs 曝露により有意に 8-OHdG を生成する事を確認した。

3) ROS 生成の測定

A549 細胞内の ROS の生成量について、定量化した結果を図 4 に示す。ROS の産生量を、control 時を 1.00 [-] として数値化を行った。10 μ g/ml 曝露時より有意に ROS 産生が確認された。また、前立腺癌細胞株 DU145 においても、同様に 10 μ g/ml 曝露時より有意に ROS 産生が確認され、抗酸化剤の添加により ROS 産生が抑制された (図 5)。これらの結果より、 Fe_3O_4 NP は細胞内に ROS 産生を誘導する事が確認された。

4) 細胞生存率

前立腺癌細胞株 DU145 において (図 6)、

Fe₃O₄NPs 曝露量が増えるに従い、細胞生存率は低下し、100 μg/ml 曝露時には有意に低下した。A549 細胞においても、同様の結果が認められたが、その低下は DU145 ほどの低下は認められなかった (図 7)。Fe₃O₄NPs は濃度依存的に細胞生存率を低下させたが、100 μg/ml 曝露時には有意な低下を認めた。

5) 細胞周期および apoptosis の解析

前立腺癌細胞株 DU145 に Fe₃O₄NPs を曝露し 24 時間後に、細胞周期の解析を行った。100 μg/ml 曝露の場合に、subG1 期の細胞が挿花している事が認められた (図 8)。一方、APOPercentage を用いて、apoptosis を可視化した (図 9)。明らかに apoptosis が増加している事が認められた。Fe₃O₄NPs 100 μg/ml 曝露の場合、apoptosis が誘導されている事が確認された。

表面修飾の無い Fe₃O₄NPs は濃度依存的に ROS 産生、細胞生存率の低下、apoptosis の誘導が認められた。しかし、細胞の種類によりその程度は変化する、すなわち細胞特異性があると考えられる。その細胞の抗酸化能、修復能が重要な因子と考えられる。

6) カルボキシル基で修飾された Fe₃O₄NPs 曝露時の細胞生存率

前立腺癌細胞株 DU145 にカルボキシル基で修飾された Fe₃O₄NPs 曝露時の細胞生存率を解析した。濃度依存的に細胞生存率は減少するも、非修飾 Fe₃O₄NPs 曝露時より減少の程度は小さい事を認めた。

この結果より、Fe₃O₄NPs の表面修飾により細胞毒性、遺伝毒性を低減させる可能性が認められた。カルボキシル基で修飾された Fe₃O₄NPs を用いて、8-OHdG 生成の測定、apoptosis の誘導等について引き続き解析を行って行く予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) D.Kami, S.Takeda, Y.Itakura, S.Gojo, M.Watanabe, and M.Toyoda. Application of the Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery. *Int. J. Mole. Sci.*, 12(6), 3705-3722, 2011.
 - 2) D.Kurioka, A.Takagi, M.Yoneda, Y.Hirokawa, T.Shiraishi, and M.Watanabe. Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutic J. *Cancer Sci and Ther*, 3(3), 60-65, 2011.
 - 3) D.Kami, S.Takeda, M.Hatsune, M.Toyoda, Y.Itakura, S.Gojo, S.Kyo, A.Umezawa, and M.Watanabe. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J. Artif. Organs*, 14(3), 215-222, 2011.
 - 4) 一町直樹, 栗岡大輔, 河井一明, 葛西宏, 松本幹治, 渡邊昌俊. 各種ナノ粒子の細胞への影響: 細胞特異性とその応用. *粉体工学会誌* 48(3),145-151, 2011.
 - 5) 一町直樹, 佐藤明子, 栗岡大輔, 米田操, 広川佳史, 白石泰三, 渡邊昌俊. 前立腺癌化学療法における磁性体ナノ粒子の併用効果の基礎研究 (総説) *泌尿器外科* 24(8), 1267-1269, 2011.
- #### 2. 学会発表
- 1) M.Watanabe, A.Takagi, Y.Hirokawa, and T.Shiraishi. 4275 A prostate cancer spheroid related gene and chemotherapy. (Proceedings, No.4275), 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orange Country Convention Center, Orland, Florida, USA, April 2-6, 2011.
 - 2) M.Watanabe, D. Kurioka, Y. Hamanaka, H. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota, and T. Shiraishi. C73 Tumor microenvironment

- and prostate cancer: Effects of adipocytes on prostate cancer development and progression. An AACR International Conference on New Horizons in Cancer Research: Biology to prevention to therapy. (Proceedings, C73, p179), Delhi, India, December 13-16, 2011.
- 3) M. Watanabe and N. Watanabe. Nanomedicine for targeted prostate cancer therapy. (Invited Lecture), INSA, Recent updates on mutation and cancer research. Chandigarh, India, December 18, 2011.
 - 4) 渡邊昌俊、広川佳史、白石泰三. 1-G-3 3次元培養におけるヒト前立腺癌細胞の抗癌剤抵抗性の獲得機構について. 第100回日本病理学会総会、パシフィコ横浜、H23. 4. 28-30.
 - 5) 渡邊昌俊. 1-G-25 動物組織切片を利用した前立腺癌細胞の挙動の解析. 第100回日本病理学会総会、パシフィコ横浜、H23. 4. 28-30.
 - 6) 佐藤明子、諸橋彩香、米田操、白石泰三、渡邊昌俊. J-1171 磁性体ナノ粒子の前立腺癌におけるドセタキセルによる治療への効果. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、H23. 10. 3-5.
 - 7) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊. P-1022 前立腺癌細胞と細胞切片基質の相互作用 第70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、H23. 10. 3-5.
 - 8) 土屋直人、栗岡大輔、緒方広子、渡邊昌俊、中釜斉. E-3023 がん抑制因子 miR-22 による、p53 非依存的細胞周期停止誘導機構. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、H23. 10. 3-5.
 - 9) 加藤竜也、戸塚ゆ加里、石野孔祐、渡邊昌俊、若林敬二、中釜斉. P-3089 原産地の異なるカオリンによって引き起こされる DNA 損傷性の違い. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、H23. 10. 3-5.
 - 10) 諸橋彩香、佐藤明子、河井一明、葛西宏、戸塚ゆ加里、渡邊昌俊. P-3091 磁性体ナノ粒子の A549 細胞株への影響. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、H23. 10. 3-5.
 - 11) 渡邊昌俊、白石泰三. 0-289 脂肪細胞由来液性因子の前立腺癌細胞への影響の基礎的解析. 第58回日本臨床検査医学会学術集会、岡山コンベンションセンター、H23. 11. 17-20.
 - 12) 渡邊昌俊. N305 腫瘍と腫瘍微小環境. 化学工学会第43回秋季大会シンポジウム、名古屋工業大学、H23. 9. 14-16.
3. その他
 - 1) 渡邊昌俊. 癌治療用組成物-抗癌剤の副作用の軽減と新しい集学的治療を目指して. 横浜国立大学・東海大学・横浜市立大学 新技術説明会. 科学技術振興機構 JST 東京別館ホール、H24. 1. 17.
 - 2) 渡邊昌俊. 抗がん効果、酸化鉄で増す. 日経産業新聞. H24. 2. 15.
- E. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 特に無し
 2. 実用新案登録
 - 特に無し
 3. その他
 - 特に無し

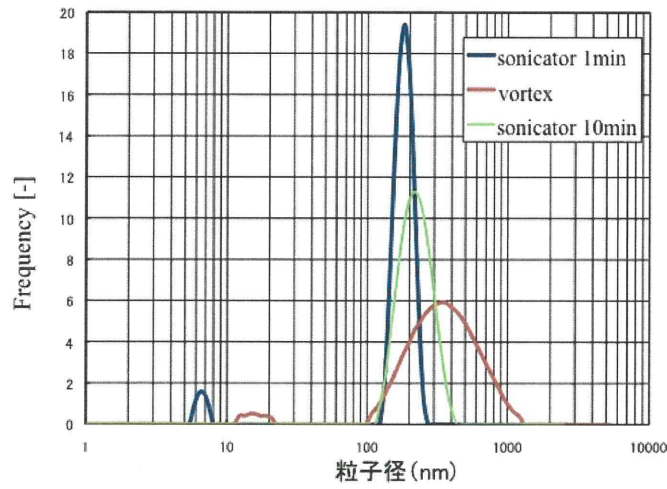


図 1 Fe₃O₄NPs の粒径分布

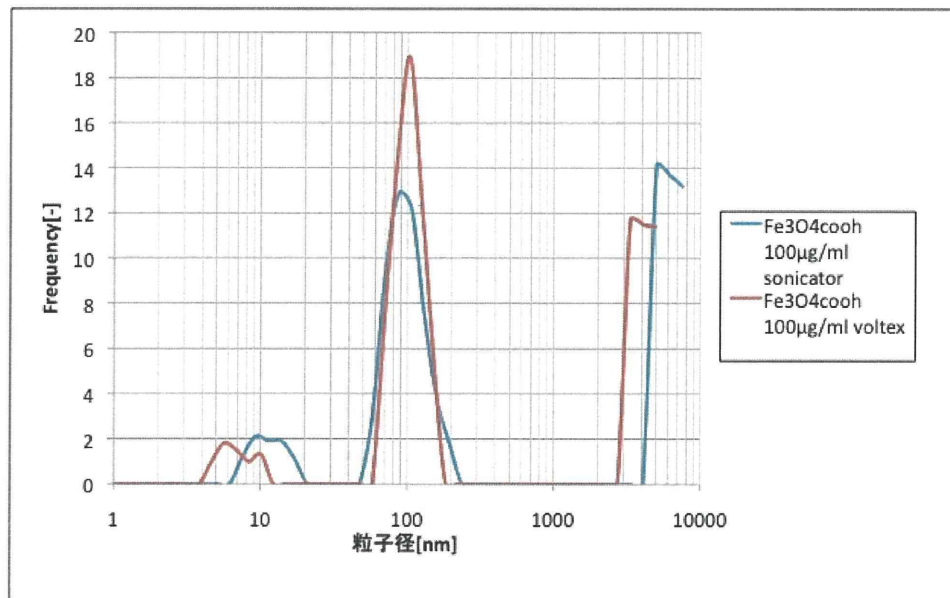


図 2 カルボキシル基修飾 Fe₃O₄NPs の粒径分布

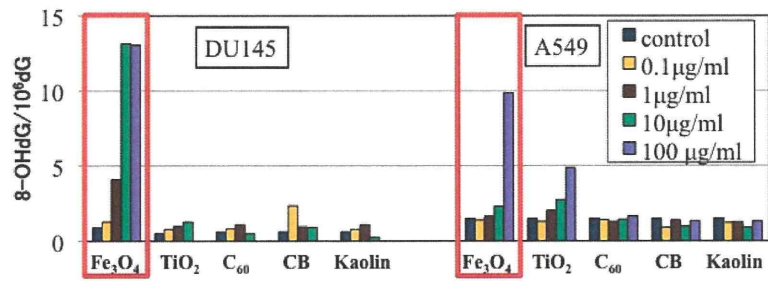


図 3 各種細胞株・各種ナノ粒子における 8-OHdG 生成

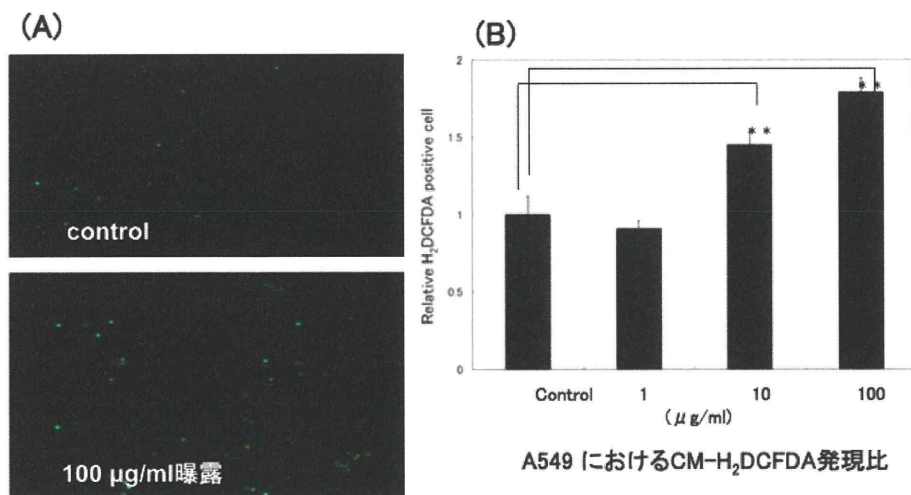


図 4 細胞内活性酸素種生成の測定

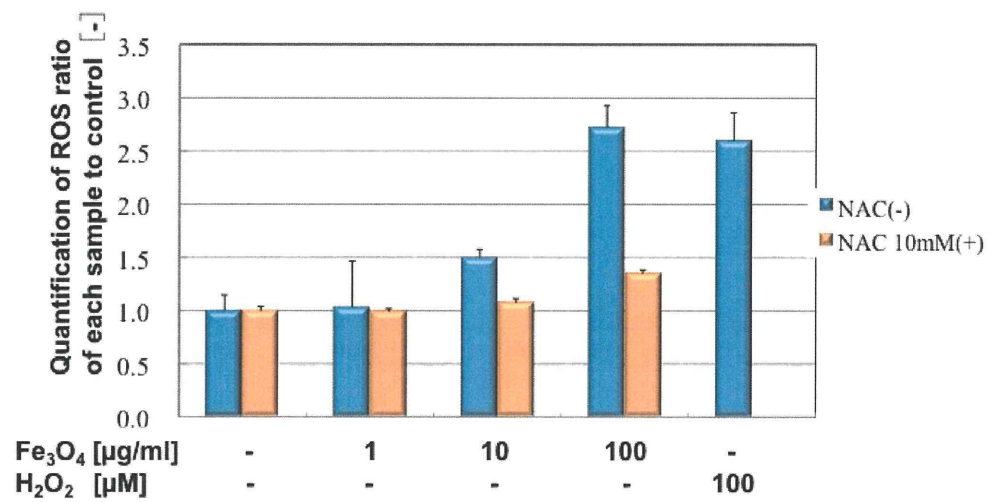


図 5 DU145 における活性酸素種の生成と抗酸化剤の効果

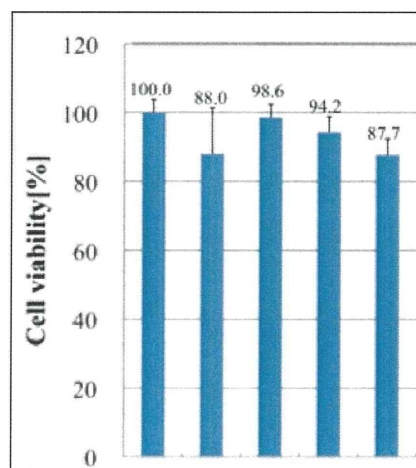


図 6 Fe₃O₄NPs 曝露後 24 時間における DU145 細胞生存率

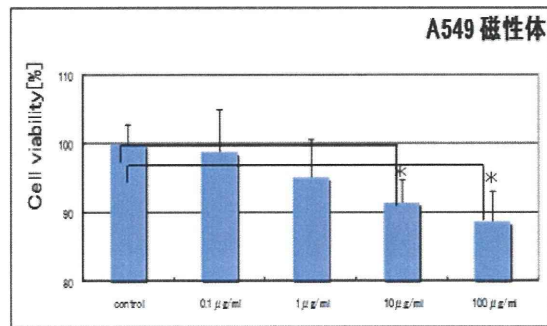


図 7 Fe₃O₄NPs 曝露後 24 時間における A549 細胞生存率

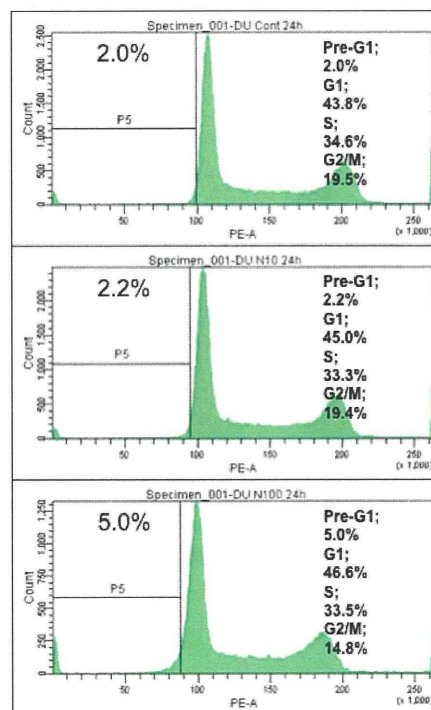


図 8 Fe₃O₄NPs 曝露後 24 時間における DU145 の細胞周期について

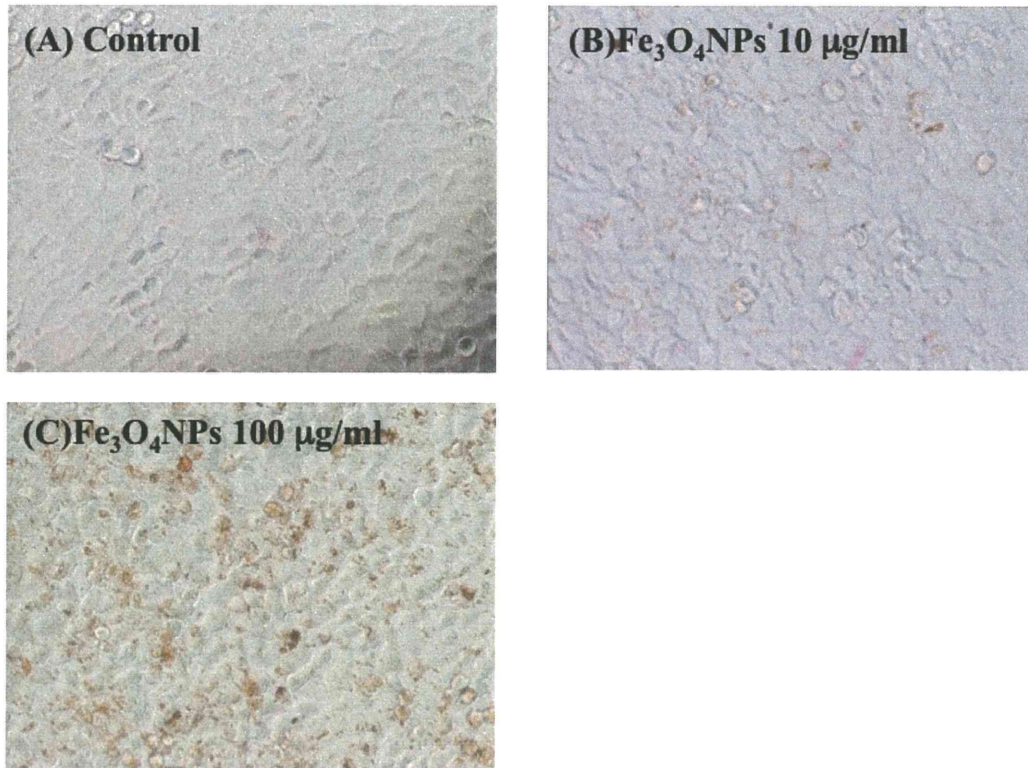


図 9 Fe₃O₄NPs 曝露後 24 時間における apoptosis について

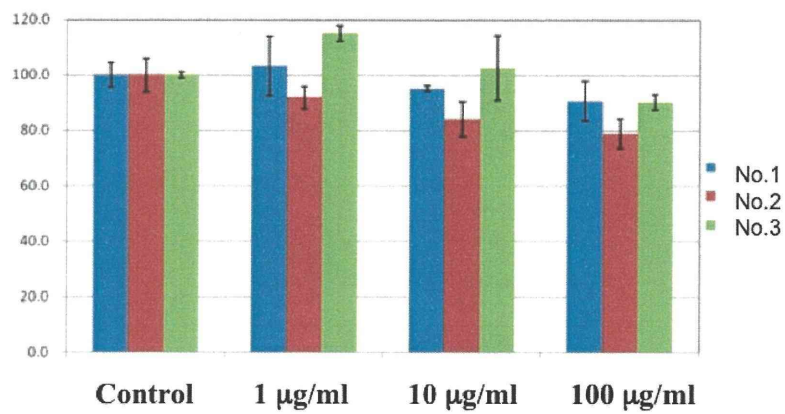


図 10 カルボキシル基修飾 Fe₃O₄NPs 曝露後 24 時間における DU145 細胞生存率

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Isama K, Kawakami T, Tsuchiya T, Matsuoka A	Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys		Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials	Medimond S.r.l.	Bologna	2012	57-60
Matsuoka A, Kodama Y, Yoshida M, Isama K, Inoue K, Kawakami T, Nishikawa A	Toxicological studies of nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide		Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials	Medimond S.r.l.	Bologna	2012	87-90

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Miyajima A, Sunouchi M, Goda Y	Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS.	Anal Bioanal Chem	400	165-174	2011
Hanagata N, Zhuang F, Connolly S, Li J, Ogawa N, Xu M	Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis.	ACS Nano	5(12)	9326-9338	2011

Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y	Induction of glandular stomach cancers in helicobacter pylori- infected mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile	Int J Cancer	130	259- 266	2012
Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Ishino K, Matsumoto Y, Goto S, Kawanishi M, Yagi T, Wakabayashi K,	In vitro and in vivo genotoxicity induced by fullerene (C60) and kaolin	Genes Environ.	33	14-20	2011
Wei M, Wanibuchi H, Nakae D, Tsuda H, Takahashi S, Hirose M, Totsuka Y, Tatematsu M, Fukushima S	Low-dose carcinogenicity of 2- amino-3-methylimidazo[4,5- f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21 ^{Cip/WAF1}	Cancer Sci.	102	88-94	2011
広瀬明彦、高木篤 也、西村哲治、津田 洋幸、坂本義光、小 縣昭夫、中江 大、 樋野興夫、菅野 純	ナノマテリアルの慢性影響研究 の重要性	薬学雑誌	131	195- 201	2011
Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A	Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice	J Toxicol Sci	37	81-89	2012
Yamaguchi A, Fujitani T, Ohyama K, Nakae D, Hirose A, Nishimura T, Ogata A	Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotube on immune and inflammatory responses in mice	J Toxicol Sci	37	177- 189	2012
Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M	Application of the Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery	Int. J. Mole. Sci.	12(6)	3705- 3722	2011

Kurioka D, Takagi A, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Watanabe M	Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutic	J Cancer Sci Ther	3(3)	60-65	2011
Kami D, Takeda S, Hatsune M, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, Umezawa A, Watanabe M	Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles.	J. Artif. Organs	14(3)	215-222	2011
一町直樹、栗岡大輔、河井一明、葛西宏、松本幹治、渡邊昌俊	各種ナノ粒子の細胞への影響：細胞特異性とその応用	粉体工学会誌	48(3)	145-151	2011
一町直樹、佐藤明子、栗岡大輔、米田操、広川佳史、白石泰三、渡邊昌俊	前立腺癌化学療法における磁性体ナノ粒子の併用効果の基礎研究（総説）	泌尿器外科	24(8)	1267-1269	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Osteoblast Compatibility of Calcium-Incorporated Ti-Zr-Nb Alloys

Isama K.,¹ Kawakami T.,¹ Tsuchiya T.,² and Matsuoka A.³

¹Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan, ²Medical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, Osaka 565-0871, Japan, and ³Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Ca was incorporated into the surface of the Ti-Zr-Nb alloys in the CaCl₂ treatment and Ca(OH)₂ treatment following the NaOH treatment. According to the XRF analysis, the larger amount of Ca was incorporated in the Ca(OH)₂ treatment than in the CaCl₂ treatment. The Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys were evaluated in the cytotoxicity and osteoblast compatibility *in vitro*. The untreated Ti-6Al-4V showed cytotoxicity, but Ti-Zr-Nb alloys did not show cytotoxicity with or without treatment. The Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys showed good osteoblast compatibility. In Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V, the Ca(OH)₂ treatment enhanced the osteoblastic differentiation than the CaCl₂ treatment.

Introduction

Ti alloys are used as materials of bone fixations and artificial joints in orthopedics. Ti-6Al-4V is used generally, but it is known that vanadium ions have strong cytotoxicity. We reported Nb ions promoted the differentiation of osteoblasts¹⁻³ and Ti-Zr-Nb alloys had good mechanical property and osteocompatibility *in vitro* and *in vivo*.^{4,5} On the other hand, the materials with a high apatite-forming ability in a simulated body fluid are expected to bond directly with the bone *in vivo*.⁶ Ti alloys which have been alkali- and heat-treated to improve the apatite-forming ability have been applied clinically. Furthermore, the Ca incorporation into the alkali-treated Ti alloys have been attempted to achieve an even higher apatite-forming ability. We examined the Ca incorporation into the Ti-Zr-Nb alloys and confirmed Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys had a high apatite-forming ability. In this study, we evaluated the cytotoxicity and osteoblast compatibility of the Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys.

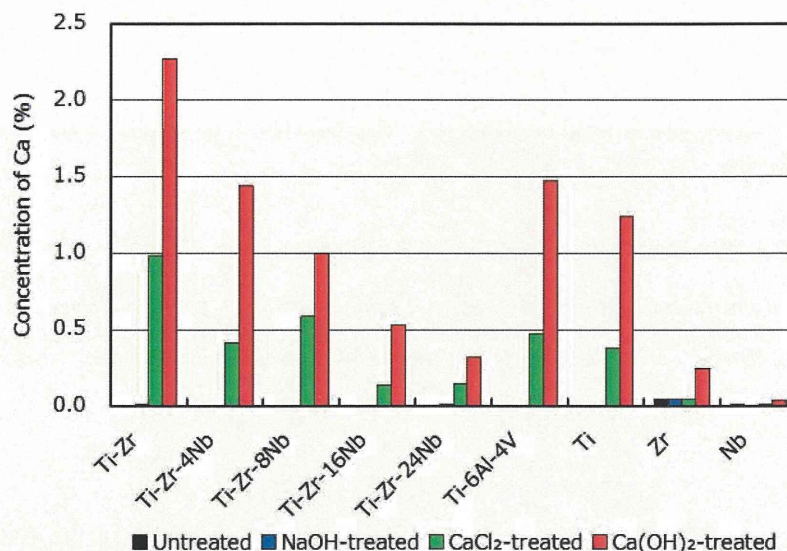


Fig. 1 Calcium amount of the surface of the samples by XRF using the fundamental parameter method.

Materials and Methods

Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, Ti-Zr-8Nb, Ti-Zr-16Nb and Ti-Zr-24Nb were used in this experiment. In addition, pure Ti, Zr and Nb were used as structural elements of the Ti-Zr-Nb alloys and Ti-6Al-4V was used as a comparison. All samples were 14.0 mm in diameter and 1.0 mm in thickness.

The samples were soaked in NaOH aqueous solution at 60°C for 24 hr (NaOH treatment). Subsequently, the NaOH-treated samples were soaked in CaCl₂ aqueous solution (CaCl₂ treatment) or Ca(OH)₂ aqueous solution (Ca(OH)₂ treatment) at 60°C for 24 hr. The Ca amount of the CaCl₂-treated and Ca(OH)₂-treated surfaces was measured by X-ray fluorescence spectrometry (XRF) using the fundamental parameter method.

The cytotoxicity of the samples was evaluated by the colony formation assay with direct contact using Chinese hamster lung fibroblast V79 cells.⁷ The osteoblast compatibility of the samples was evaluated with normal human osteoblasts (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) cultured in α -modified minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 5 mM disodium β -glycerophosphate. The osteoblast proliferation was estimated with the cell number measured by WST-8 assay.⁷ The osteoblastic differentiation was estimated with the alkaline phosphatase (ALP) activity measured using p-nitrophenylphosphate as a substrate.⁷

Results and Discussion

All Ti alloys and pure Ti incorporated almost double amount of Ca in the Ca(OH)₂ treatment compared with the CaCl₂ treatment. Particularly, Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti

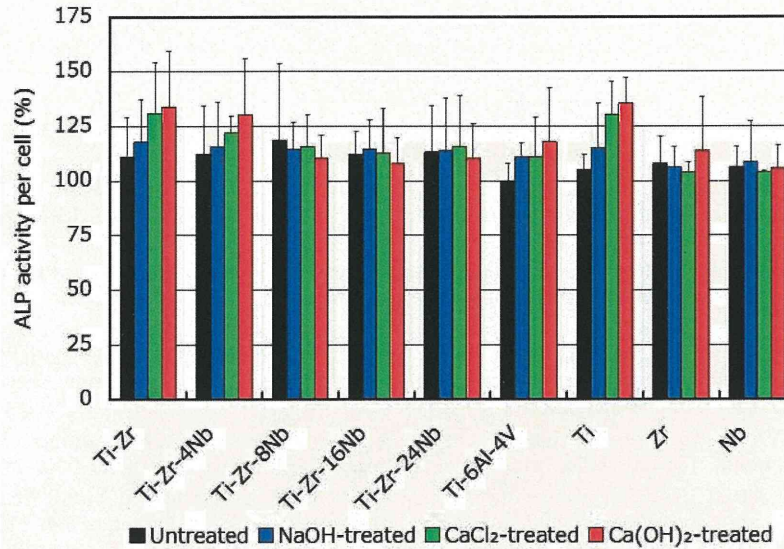


Fig. 2 Osteoblastic differentiation on the samples estimated with the ALP activity per cell measured using *p*-nitrophenylphosphate as a substrate.

and Ti-6Al-4V incorporated large amount of Ca. Pure Zr incorporated Ca only in the Ca(OH)₂ treatment, and pure Nb did not incorporate Ca in both treatments (Fig. 1).

The untreated Ti-6Al-4V showed cytotoxicity, but treated Ti-6Al-4V showed less cytotoxicity. Other samples did not show cytotoxicity with or without treatment. Compared with on the untreated Ti-6Al-4V, the cell number of osteoblasts increased on other samples. This result was supported by the cytotoxicity of the samples (data not shown).

The ALP activity of osteoblasts cultured on all other samples increased compared with on the untreated Ti-6Al-4V. Additionally, in Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V, the ALP activity of osteoblasts was promoted in order of by the NaOH, CaCl₂ and Ca(OH)₂ treatment (Fig. 2). In the previous study, the apatite-forming ability of Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V increased in order of by the NaOH, CaCl₂ and Ca(OH)₂ treatment. These results implied the osteoblastic differentiation was enhanced on the materials with a high apatite-forming ability.⁸

Conclusions

The Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys showed good osteoblast compatibility. In Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V, the Ca(OH)₂ treatment enhanced the osteoblastic differentiation than the CaCl₂ treatment. The large amount of Ca incorporation would induce good osteoblastic differentiation cultured on the materials.

Acknowledgment

This study was supported by the Health Labour Sciences Research Grant from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

References

1. ISAMA K. and TSUCHIYA T., Safety evaluation of metallic biocompatible materials by their effect on cell differentiation of human osteoblasts, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 121, 111-112, 2003.
2. TAMAI M. *et al.*, Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts, *Key Eng. Mater.*, 309-311, 97-100, 2006.
3. TAMAI M. *et al.*, Synthesis of a novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties, *J. Artif. Organs*, 10, 22-28, 2007.
4. KOBAYASHI E. *et al.*, Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials, *J. Biomed. Mater. Res.*, 29, 943-950, 1995.
5. TAKAHASHI M. *et al.*, Phase stability and mechanical properties of biomedical β type titanium-zirconium based alloys containing niobium, *J. Japan Inst. Metals*, 64, 1120-1126, 2000.
6. FUJIBAYASHI S. *et al.*, A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$ glasses, *Biomaterials*, 24, 1349-1356, 2003.
7. ISAMA K. *et al.*, Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells, *Mater. Trans.*, 43, 3155-3159, 2002.
8. ISAMA K. and TSUCHIYA T., Osteoblast differentiation and apatite formation on gamma-irradiated PLLA sheets, *Key Eng. Mater.*, 288-289, 409-412, 2005.

Toxicological Studies of Nano-Suspensions of Silica, Silver and Zinc Oxide

Matsuoka A.¹, Kodama Y.², Yoshida M.³, Isama K.⁴, Inoue K.³, Kawakami T.⁴, and Nishikawa A.³

¹Division of Medical Devices, ²Division of Cellular and Molecular Toxicology, ³Division of Pathology, and ⁴Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Summary

Nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide were subjected to the cytotoxicity test, the chromosomal aberration test, and the 13-week repeated dose test for their safety evaluation. Silver showed the strongest cytotoxicity among the three. Only zinc oxide induced chromosome aberrations. In the *in vivo* test, zinc oxide caused inhibition of the normal body weight increase, increase in the relative lung weight, and pulmonary fibrosis. We propose the three tests as a candidate of a primary screening test battery for safety evaluation of nanomaterials (NMs).

Introduction

Development in the field of nanotechnology has brought NMs closer to us day by day and at the same time toxicological concerns of NMs have been growing. NMs are expected for a variety of applications not only in industry, but also in the field of medicine such as drug delivery system, gene transfer vectors, and scaffold for cell culture in regenerative medicine. NMs are new materials with unknown characteristics and we need to consider the safety of their use. In the present study, we performed the *in vitro* and *in vivo* toxicological studies of three NMs to evaluate their safety.

Materials and Methods

A silica sol (amorphous SiO₂, 17.8%, particle size 10-20 nm) and zinc oxide (40% in water, NanoTek[®] ZH1121W, Alfa Aesar) were commercially available. Silver powder (Sigma-Aldrich, particle size <100 nm) was suspended in water by ultrasonics, filtered through a 0.45 µm PVDF filter, and then the concentration of silver in the filtrate was determined by capillary electrophoresis. Cytotoxicity of the NMs was determined by

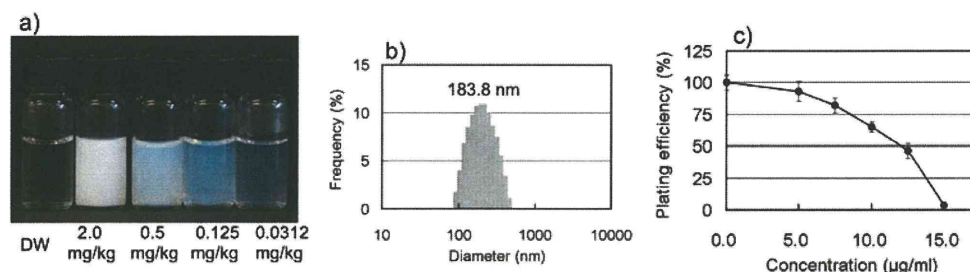


Fig. 1 Zinc oxide; a) Suspensions prepared for the each dose of the *in vivo* test, b) particle size distribution of the suspension, and c) the result of the cytotoxicity test in that CHL cells were treated with the suspension for six days. Values are expressed as mean \pm SD for four wells.

Table 1. Chromosome aberration test of zinc oxide

Treat- ment (h)	Mass conc. (µg/ml)	Polyploid (%)	Cells with chromosome aberrations (%)*					
			ctg	ctb	cte	csb	cse	total
24	0	1	0	1	0	0	0	1
	2.5	2	0	1	0	0	0	1
	5	1	1	0	0	0	0	1
	10	1	2	1	5	0	0	7
	20	1	3	14	32	0	0	38
48	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5	1	0	0	0	1	0	1
	5	3	0	0	0	0	0	0
	10	2	0	0	0	1	0	1
	20	5	4	9	7	0	0	17

*Structural chromosome aberrations: ctg, chromatid gaps; ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges.

Red figures indicate positive responses.

the colony formation assay using a Chinese hamster cell line CHL¹. The chromosome aberrations (CAs) were investigated in CHL cells treated with the NMs for 24 or 48 h¹. In the 13-week repeated dose test, six rats per group were intratracheally sprayed with the NMs in a 0.2 ml portion of test suspensions once a week for 13 weeks. One week after the last administration, rats were subjected to an autopsy and lungs were fixed for histopathological examinations. We used ANOVA to test the significance of differences between treated groups and their controls in data on body weight, relative organ weight, and hematology with post hoc comparisons made using the Dunnett test.

Results

The mean diameter of silica, silver, and zinc oxide in suspension was 54.2, 159.2, and 183.8 nm, respectively. The 50% growth inhibition concentra- tion of them was