

reading of this manuscript. This work is supported by a Grant-in-Aid for Cancer Research and Grants-in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

This study was partially supported by a consignment expense for the Molecular Imaging Program on 'Research Base for PET Diagnosis' from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- 1 Hino O, Kobayashi E, Nishizawa M *et al*. Renal carcinogenesis in the Eker rat. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; **121**: 602-5.
- 2 Yamashita Y, Yokoyama M, Kobayashi E, Takai S, Hino O. Mapping and determination of the cDNA sequence of the Erc gene preferentially expressed in renal cell carcinoma in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat model. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 134-40.
- 3 Robinson BW, Creaney J, Lake R *et al*. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003; **362**: 1612-6.
- 4 Scholler N, Fu N, Yang Y *et al*. Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 11531-6.
- 5 Robinson BW, Creaney J, Lake R *et al*. Soluble mesothelin-related protein-A blood test for mesothelioma. *Lung Cancer* 2005; **49**: S109-11.
- 6 Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3937-42.
- 7 Onda M, Willingham M, Nagata S *et al*. New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, Western blotting, and ELISA. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 5840-6.
- 8 Hassan R, Remaley AT, Sampson ML *et al*. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 447-53.
- 9 Shiomi K, Miyamoto H, Segawa T *et al*. A novel ELISA system for detection of a 'N-ERC/Mesothelin' in the sera of mesothelioma patients. *Cancer Sci* 2006; **97**: 928-32.
- 10 Maeda M, Hino O. Molecular tumor markers for asbestos-related mesothelioma: serum diagnostic markers. *Pathol Int* 2006; **56**: 649-54.
- 11 Hino O, Shiomi K, Maeda M. Diagnostic biomarker of asbestos-related mesothelioma: Example of translational research. *Cancer Sci* 2007; **98**: 1147-51.
- 12 Nakaishi M, Kajino K, Ikesue M *et al*. Establishment of the enzyme-linked immunosorbent assay system to detect the amino terminal secretory form of rat Erc/Mesothelin. *Cancer Sci* 2007; **98**: 659-64.
- 13 Kuwahara M, Takeda M, Takeuchi Y, Kuwahara M, Harada T, Maita K. Transforming growth factor beta production by spontaneous malignant mesothelioma cell lines derived from Fisher 344 rats. *Virchows Arch* 2001; **438**: 492-7.
- 14 Tsuchiya H, Tsuchiya Y, Kobayashi T, Kikuchi Y, Hino O. Isolation of genes differentially expressed between the Yoshida sarcoma and long-survival Yoshida sarcoma variants: origin of Yoshida sarcoma revisited. *Jpn J Cancer Res* 1994; **85**: 1099-104.
- 15 Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 136-40.

Original Article

Establishment of novel mAb to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers

Kiyoshi Ishikawa,¹ Tatsuya Segawa,¹ Yoshiaki Hagiwara,^{1,2} Masahiro Maeda,¹ Masaaki Abe² and Okio Hino²

¹Immuno-biological Laboratories, Takasakishi, Gunma and ²Department of Pathology and Oncology, Juntendo University School of Medicine, Hongo, Tokyo, Japan

Malignant mesothelioma is a highly aggressive tumor of the serosal cavity that arises from the mesothelial cells of the pleura, peritoneum, or pericardium. The immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma from biopsy or surgically resected specimens has been actively pursued, using markers such as mesothelin. Several markers have indeed been helpful for confirming the diagnosis of mesothelioma and distinguishing between mesothelioma and adenocarcinoma. The authors have developed a novel mAb to human C-ERC/mesothelin, which performed well when used in western blotting, fluorescence-activated cell sorting, immunocytochemistry and immunohistochemistry, and which therefore will be useful in studying the molecular biology of mesothelin, in addition to improving the diagnosis and therapy of mesothelin-expressing cancers.

Key words: diagnosis, ERC/mesothelin, malignant mesothelioma, monoclonal antibody

Mesothelioma is an aggressive tumor arising from the serosal surface, such as the pleural and peritoneum, and it has a dismal prognosis.¹ Several recent studies have described the safe utilization of aggressive multimodality therapy and have found evidence for the effectiveness of combination chemotherapy regimens using pemetrexed and cisplatin.^{2–4} The prognosis after this type of therapy, however, remains poor.

A study by Sugarbaker *et al.* reporting a 5 year survival of 40% for selected patients following trimodality therapy, demonstrated that early diagnosis is vital to improve the prognosis.² In light of the difficulty, however, of making an early

diagnosis of mesothelioma using current diagnostic imaging techniques, the identification of tumor markers for mesothelioma is needed urgently.^{5–7} While no reliable serum marker for mesothelioma has yet been found, Robinson *et al.* have recently proposed a soluble mesothelin-related protein as a candidate.¹

Previously, we discovered the renal carcinoma gene *ERC*, which we found was expressed highly in renal cancers in the Eker rat.⁸ Furthermore, we subsequently confirmed that the *ERC* gene is a homolog of the human mesothelin gene, a gene expressed strongly in normal mesothelial cells, mesothelioma, non-mucinous ovarian carcinomas and pancreatic ductal adenocarcinomas.^{9,10} The human mesothelin gene codes for several proteins. Its primary product is a 71 kDa precursor protein, which is cleaved physiologically by a furin-like protease into a 40 kDa C-terminal fragment, C-ERC/mesothelin, which remains membrane-bound, and a 31 kDa N-terminal fragment, N-ERC/mesothelin, which is secreted into the blood.¹¹ The resultant C-terminal 40 kDa fragment is classified as a mesothelin, and its presence in the serum has been reported as a useful tumor marker in mesothelioma patients.¹² In contrast, the N-terminal 31 kDa fragment, which is a secreted protein and has been cloned as a megakaryocyte-potential factor, has been reported as a useful tumor marker for mesothelioma or any other cancer.⁶

In the present study we report on the establishment of a novel mAb for human C-ERC/mesothelin. This antibody should be useful in studying the molecular biology of mesothelin, and also improve the diagnosis of and therapy for mesothelin-expressing cancers.

MATERIALS AND METHODS

Human subjects

Our study for the tumor marker of mesothelioma was approved by the Institutional Review Board of Juntendo

Correspondence: Okio Hino, MD, PhD, Department of Pathology and Oncology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Tokyo 113-8421, Japan. Email: ohino@juntendo.ac.jp

Received 25 July 2008. Accepted for publication 3 November 2008.

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Japanese Society of Pathology

University School of Medicine, its hospital, and Immunobiological Laboratories. Patients gave their signed informed consent.

Cell lines

The mesothelioma cell lines, NCI-H226 and MESO-4 were obtained from Dr Usami.¹³ These were maintained in TIL media supplemented with 10% fetal bovine serum.

Generation of a human C-ERC/mesothelin-GST fusion protein by *Escherichia coli*

The human *C-ERC/mesothelin* cDNA was cloned from the total RNA of the human cervical carcinoma cell line HeLaS3 using polymerase chain reaction. Primers used were as follows: forward, 5'-GGAGTGGAGAAGACAGCCTGT-3'; reverse, 5'-GCCCTGTAGCCCCAGCCC-3'. cDNA for human *C-ERC/mesothelin* was inserted between the EcoRI and XhoI into pGEX-6P (GE-Healthcare Bio-sciences, Piscataway, NJ, USA). The C-ERC/mesothelin-GST fusion protein was directed into the periplasm of *E. coli*. The fusion protein was purified with Glutathione Sepharose 4B Beads (GE-Healthcare Bio-sciences). The purified proteins were quantified using Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and checked on sodium dodecylsulfate (SDS)-PAGE. The purity of the bacterial C-ERC/mesothelin was >95%.

Immunization and cell fusion

Female mice (6–8 weeks old; BALB/c, Charles River, Japan) were immunized four to six times weekly with human C-ERC/mesothelin-GST fusion protein (50 µg/mouse) and one boost was given with the fusion proteins i.p. before fusion. The spleen was harvested 84–90 h after the last boost and fused with X63-Ag8.653 myeloma cells.

Screening with enzyme immunoassay on human C-ERC/mesothelin-GST fusion protein

Screening for hybridomas was performed with an enzyme immunoassay (EIA). Nunc Immuno plates (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) were coated with the fusion protein (50 ng/well in 0.1 mol/L carbonate buffer, pH 9.5) and incubated overnight at 4°C. Plates were then blocked with blocking buffer (PBS with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% sodium azide) overnight at 4°C and washed with a washing buffer (PBS with 0.05% Tween20). The plates were incubated with the hybridoma

supernatant for 1 h at 37°C. After washing with the washing buffer, the plates were incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody in washing buffer. Finally, the plates were washed again with the washing buffer and hydrogen peroxide/o-phenylenediamine was added to each well. The color was allowed to develop for 15 min at room temperature and the reaction was stopped by the addition of a stop solution (1 N sulfuric acid). The plates were read at 490 nm using an automated plate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA). The selected hybridomas were grown in a Celline flask (Integra Bioscience, Chur, Switzerland). The cell culture supernatant was affinity-purified with affinity column chromatography using Protein A column (GE-Healthcare Bio-sciences).

Epitope mapping of the anti-human C-ERC/mesothelin mouse mAb

For the determination of the epitope of the anti-human C-ERC/mesothelin mouse mAb, we produced the C-ERC/mesothelin-GST fusion protein in four different molecular sizes by cutting a human *C-ERC/mesothelin* gene into four 200 bp fragments. The fusion proteins were analyzed on western blot for epitope mapping.

Western blot

Cell lysates of the human mesothelioma cell line or C-ERC/mesothelin-GST fusion protein for epitope mapping were separated on 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions. Proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). After blocking with a blocking solution (PBS with 3% non-fat dried milk, 1% BSA and 0.05% Tween20), the membrane was incubated with 1 µg/mL of each mAb overnight at 4°C, followed by a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody. Proteins were visualized with an ECL detection system (GE-Healthcare Bio-sciences).

Fluorescence-activated cell sorting

Cultured cells (2×10^5) were dissociated with dissociation buffer. Each sample was washed twice in fluorescence-activated cell sorter (FACS) buffer (PBS with 5% BSA, 0.1% sodium azide). An anti-human C-ERC/mesothelin mouse mAb was added to the cells and incubated for 30 min at 4°C. Cells were then washed with FACS buffer, and incubated with 2 µg/mL Alexa 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) for 30 min at 4°C. Finally, cells

were washed with FACS buffer and analyzed on a FACScan system (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Immunocytochemistry

Cultured cells or cells derived from the ascites were smeared on coverslips and air-dried for 30 min. Coverslips were fixed with cold acetone for 10 min at room temperature followed by 1% paraformaldehyde for 5 min at 4°C. Non-specific binding sites were blocked by incubating with 5% normal goat serum in PBS for 15 min at room temperature. The coverslips were incubated with the primary antibodies (2 µg/mL) for 1 h at room temperature. After washing with PBS, the coverslips were incubated with Envision+ (DakoCytomation, Kyoto, Japan), followed by detection of peroxidase with diaminobenzidine-peroxide substrate solution. The sections were counterstained with hematoxylin.

Immunohistochemistry

Formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue sections from patients with mesothelioma were evaluated for C-ERC/mesothelin expression. The sections were deparaffinized in xylene, followed by graded ethanol hydration into water. The sections were heated in Target Retrieval Solution, 10 mmol/L citrate buffer (pH 6.0) (DakoCytomation), for antigen retrieval. The sections were then incubated with the primary antibodies (1 µg/mL) overnight at 4°C. After washing with the washing buffer, the sections were incubated with Envision (DakoCytomation), followed by detection of peroxidase with diaminobenzidine-peroxide substrate solution. The sections were counterstained with hematoxylin.

RESULTS

Generation of recombinant human C-ERC/mesothelin-GST fusion protein with *E. coli* and establishment of new mAb for human C-ERC/mesothelin

To establish new mAb for human C-ERC/mesothelin, we generated a human C-ERC/mesothelin-GST fusion protein using *E. coli*. The fusion proteins were used for immunization and screening for the hybridoma supernatant with an EIA. Finally, eight clones were identified that reacted selectively with the fusion protein coated to plates. The specificity of the anti-human C-ERC/mesothelin mAb was determined immunohistochemically with the section from mesothelioma patients, the results of which showed that one clone from among the eight clones, 22A31, had a high affinity for human

C-ERC/mesothelin. In these studies, we compared them with a commercially available mAb, 5B2 (Novocastra, Newcastle, UK), and found them to be useful in western blotting, FACS, immunocytochemistry and immunohistochemistry for human C-ERC/mesothelin.

Epitope mapping of clone 22A31, the anti-human C-ERC/mesothelin mAb

To determine the epitope of the anti-human C-ERC/mesothelin mAb, clone 22A31, we prepared four different molecular sizes of the C-ERC/mesothelin-GST fusion protein by cutting a human C-ERC/mesothelin gene into four 200 bp fragments. The fusion proteins were analyzed on western blot for epitope mapping. As a result (Fig. 1), we confirmed that the epitope 22A31 was on the N-terminal portion of C-ERC/mesothelin.

Western blot

The expression of human C-ERC/mesothelin in mesothelioma cell lines was analyzed on western blot (Fig. 2). This antibody detected one major product in the lysate of the

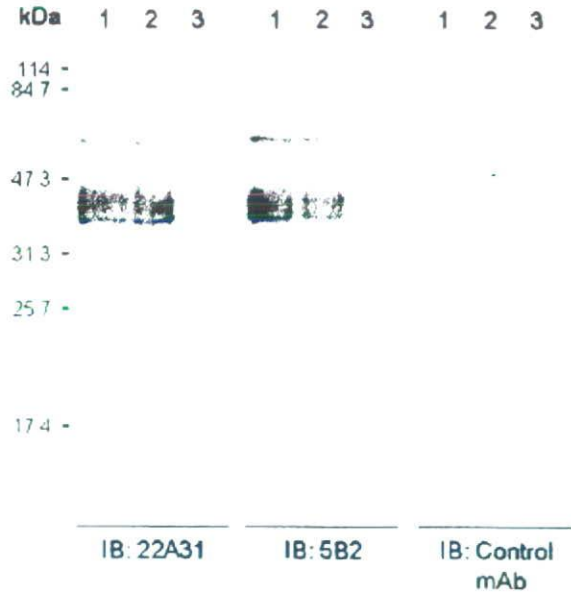


Figure 2 Western blot analysis of the clone 22A31. This antibody (1 µg/mL) detected one major product in the cell lysates of human mesothelioma cell lines, NCI-H226 (lane 1) and MESO-4 (lane 2). Control mAb did not react to the mesothelioma cell lines. Lane 3, control ERC/mesothelin-negative cell line.

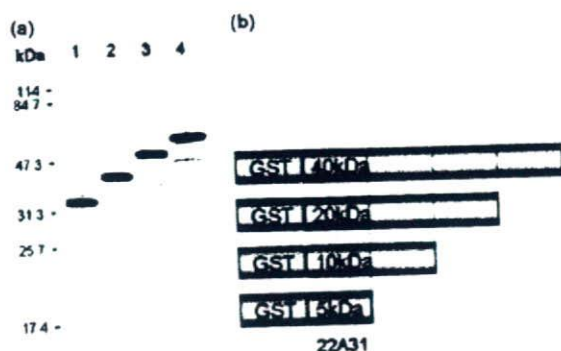


Figure 1 Epitope mapping of the clone 22A31. The epitope was on the N-terminal portion of C-ERC/mesothelin. (a) Western blot analysis for epitope mapping of (b) C-ERC/mesothelin-GST fusion protein in four different molecular sizes, which were produced by cutting a human C-ERC/mesothelin gene into four 200 bp fragments. This indicates that the clone 22A31 reacted against every fragment. This indicates that the epitope of 22A31 was on the N-terminal portion of C-ERC/Mesothelin. Lane 1, GST-C-ERC/mesothelin (5 kDa); lane 2, GST-C-ERC/mesothelin (10 kDa); lane 3, GST-C-ERC/mesothelin (20 kDa); lane 4, GST-C-ERC/mesothelin (40 kDa).

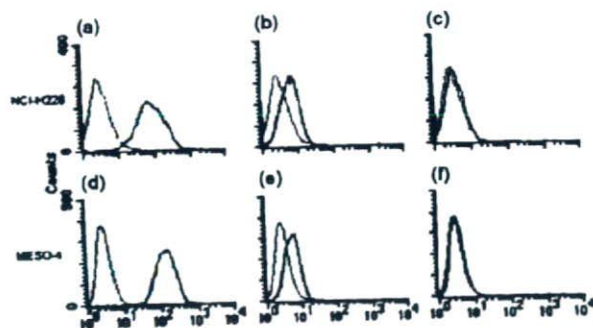


Figure 3 Fluorescence-activated cell sorting of the (a,d) clone 22A31. This antibody (2 µg/mL) bound to NCI-H226 and MESO-4. (c,f) Control mAb did not react to the mesothelioma cell lines. (b,e) 5B2.

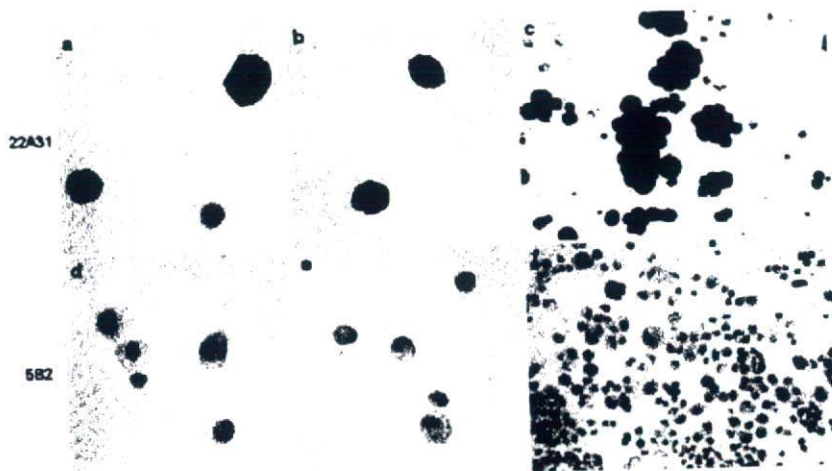


Figure 4 Immunocytochemistry of the clone 22A31. Positive staining was observed in the membranes of human mesothelioma cell lines (a) NCI-H226, (b) MESO-4 and (c) pleural effusion smears obtained from a mesothelioma patient. (d-f) No staining was seen with 5B2. The coverslips were incubated with the primary antibodies (2 µg/mL).

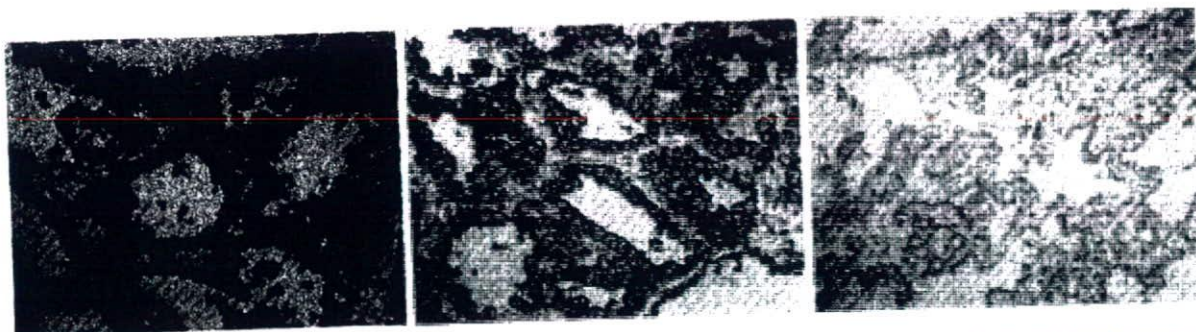


Figure 5 Immunohistochemistry of (a) clone 22A31. This antibody (1 µg/mL) strongly reacted to the mesothelioma cell membranes and reacted in a pattern that was comparable to (b) 5B2 (1:50 dilution). (c) Control mAb did not react to the specimens from malignant mesothelioma patients.

human mesothelioma cell lines, the molecular mass of which was approximately 40 kDa, similar to that of C-ERC/mesothelin. Control mAb did not react to mesothelioma cell lines.

Fluorescence-activated cell sorting

The clone 22A31 was tested on FACS for its ability to bind to the human mesothelioma cell lines. This antibody bound to the human mesothelioma cell lines but did not bind to the ERC/mesothelin-negative cell lines (data not shown). The data in Fig. 3 show that the clone 22A31 generated a large increase in fluorescence intensity compared with the cells incubated with the 5B2 anti-mesothelin mAb. Control mAb did not react to mesothelioma cell lines.

Immunocytochemistry

Immunocytochemical detection of C-ERC/mesothelin in smears of human mesothelioma cell lines, NCI-H226 and MESO-4, is shown in Fig. 4. Strongly positive staining was observed in membranes of these cells, which were reacted with the clone 22A31 (Fig. 4a,b). No staining was seen when the cells were incubated with the 5B2 anti-mesothelin mAb (Fig. 4d,e). The expression of C-ERC/mesothelin in pleural effusion smears obtained from malignant mesothelioma is shown in Fig. 4(c). Membranous expression was observed highly in the smears. The immunocytochemical signal was negative on smears when the 5B2 anti-mesothelin mAb was used (Fig. 4f).

Immunohistochemistry

Immunohistological localization of ERC/mesothelin in specimens from malignant mesothelioma patients using the anti-human C-ERC/mesothelin mouse mAb is shown in Fig. 5. This antibody reacted to the mesothelioma cell membranes with a pattern that was comparable to the 5B2 anti-mesothelin mAb. This suggests that our newly established antibody could be useful in the immunohistochemical diagnosis of mesothelioma. Control mAb did not react to the specimens from malignant mesothelioma patients.

DISCUSSION

Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma in pleural biopsy or surgically resected specimens has been actively pursued, using markers such as podoplanin, calretinin, WT-1, cytokeratin 5, thrombospondin, and mesothelin.

Some of these markers used singly and in combination have indeed been helpful for confirming the diagnosis of mesothelioma and distinguishing between mesothelioma and adenocarcinoma, which is one of the challenging problems for the surgical pathologist. In immunohistochemistry for mesothelin, the 5B2 anti-mesothelin mAb is commonly used. In the present study, however, 5B2 had weak or negative reactivity on human mesothelioma cell lines and pleural effusion smears obtained from malignant mesothelioma patients in both FACS and immunocytochemistry. Our newly established mAb 22A31 performed well when used for western blotting, FACS, immunocytochemistry and immunohistochemistry, and could thus be useful in the detection of C-ERC/mesothelin proteins for all types of immunological assay.

The detection of ERC/mesothelin expression on immunohistochemistry and/or immunocytochemistry is important clinically to diagnose patients who are eligible for any therapeutic strategy targeting mesothelin. In addition, the detection and quantification of serum ERC/mesothelin would be helpful for the diagnosis and follow up of patients with mesothelioma, and other mesothelin-expressing cancers.

In conclusion, we have established a new mAb for human C-ERC/mesothelin that performed well in all types of immunological assay. This antibody should be useful in studying the molecular biology of mesothelin, and could also improve the diagnosis of and therapy for mesothelin-expressing cancers.

REFERENCES

- 1 Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005; **366**: 397–408.
- 2 Sugarbaker DJ, Flores RM, Jaklitsch MT *et al.* Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type of malignant pleural mesothelioma: Results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **117**: 54–63.
- 3 Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J *et al.* Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant mesothelioma. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 2636–44.
- 4 Sugarbaker DJ, Jaklitsch MT, Bureno R *et al.* Prevention, early detection, and management of complications after 328 consecutive extrapleural pneumonectomies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; **128**: 138–46.
- 5 Maeda M, Hino O. Molecular tumor markers for asbestos-related mesothelioma: Serum diagnosis markers. *Pathol Int* 2006; **56**: 649–54.
- 6 Shiomi K, Miyamoto H, Segawa T *et al.* A novel ELISA system for detection of a N-ERC/Mesothelin in the sera of mesothelioma patients. *Cancer Sci* 2006; **97**: 928–32.
- 7 Hino O, Shiomi K, Maeda M. Diagnostic biomarkers of asbestos-related mesothelioma: Example of translational research. *Cancer Sci* 2007; **98**: 1147–51.
- 8 Hino O, Kobayashi E, Nishizawa M *et al.* Renal carcinogenesis in the Eker rat. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; **121**: 602–5.

- 9 Yamashita Y, Yokoyama M, Kobayashi E, Takai S, Hino O. Mapping and determination of the cDNA sequence of the Erc gene preferentially expressed in renal cell carcinoma in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat model. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 134–40.
- 10 Hino O. Multistep renal carcinogenesis in the Eker (Tsc 2 gene mutant) rat model. *Curr Mol Med* 2004; **4**: 807–11.
- 11 Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3937–42.
- 12 Hassan R, Remaley AT, Sampson ML *et al.* Detection and quantification of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 447–53.
- 13 Usami N, Fukui T, Kondo M *et al.* Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci* 2006; **97**: 387–94.

- 9 Yamashita Y, Yokoyama M, Kobayashi E, Takai S, Hino O. Mapping and determination of the cDNA sequence of the Erc gene preferentially expressed in renal cell carcinoma in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat model. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 134–40.
- 10 Hino O. Multistep renal carcinogenesis in the Eker (Tsc 2 gene mutant) rat model. *Curr Mol Med* 2004; **4**: 807–11.
- 11 Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3937–42.
- 12 Hassan R, Remaley AT, Sampson ML *et al.* Detection and quantification of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 447–53.
- 13 Usami N, Fukui T, Kondo M *et al.* Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci* 2006; **97**: 387–94.

ナノ粒子の有害性評価とリスク対策

技 術 情 報 協 会

執筆者紹介

- 大塚 研一 JFE テクノリサーチ(株) 技術情報事業部 客員研究員
.....(第5章1節[4], 第6章1節, 第6章2節)
- 石津 さおり (独)産業技術総合研究所 技術情報部門 主幹.....(第1章)
- 阿多 誠文 (独)産業技術総合研究所 技術情報部門 総括主幹 理学博士.....(第1章)
- 石原 陽子 久留米大学 医学部 公衆衛生学講座 教授 医学博士
.....(第2章1節[1], 第2章2節, 第5章1節[3])
- 西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長 薬学博士
.....(第2章1節[2], 第2章1節[3])
- 林 久人 秋田大学 名誉教授 理学博士
.....(第2章3節, 第3章4節, 第3章5節, 第3章6節)
- 天野 松男 天野労働衛生コンサルタント事務所 所長
.....(第3章1節, 第3章2節, 第3章3節)
- 森本 泰夫 産業医科大学 産業生態科学研究所 呼吸病態学 教授 医学博士
.....(第3章7節, 第4章2節[1])
- 田中 勇武 産業医科大学 産業生態科学研究所 労働衛生工学 教授 工学博士
.....(第3章7節, 第4章2節[1])
- 奥 健夫 滋賀県立大学 工学部 材料科学科 教授 工学博士.....(第4章1節[1])
- 大塚 祐二 (株)東レリサーチセンター 形態科学研究部 第1研究室 室長
.....(第4章1節[2])
- 鷲尾 一裕 (株)島津製作所 分析計測事業本部 応用技術部 主任技師
.....(第4章1節[3])
- 前田 米藏 九州大学 大学院 理学研究院 化学部門 教授 理学博士
.....(第4章1節[4])
- 井上 義雄 大阪大学 大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 助教
博士(工学).....(第4章1節[5](1))
- 齊藤 敬三 (独)産業技術総合研究所 産学官連携推進部門
産学官連携コーディネータ 工学博士(第4章1節[5](2))
- 綾 信博 (独)産業技術総合研究所 産学官連携推進部門 企業・大学連携室
総括主幹 工学博士.....(第4章1節[5](2))

[2] 食物摂取, 水の飲用

はじめに

最近では、ナノの大きさを持つ物質の特性を利用して、意図して摂取することを目的として製造された製品が出回り始めてきている。一方、摂取を積極的な目的としないまでも、食品などの口から体内に入るものの原材料の一部や包装材またはその原料にナノマテリアルが使用されている。これらの状況を考えると、今後、われわれの生活環境からナノ物質を口から摂取する機会が増加する可能性が高くなっていくと推測される。吸入や皮膚からの曝露に比べ、経口摂取の場合は、不特定多数の人たちが継続して曝露されることを想定しなければならず、配慮していかなければならない。

これらのナノマテリアルが口から入る場合には、吸入などの気道から入る場合や、皮膚の表面から取り込まれる場合と異なり、食品や水と同時に摂取され、その消化・吸収の過程と密接にかかわっており、直接表層の細胞と接する密度が少ないことが特徴の一つと考えられる。しかし、実際のところ、ナノ粒子が口から体内に入った場合の吸収や排泄等の挙動については、ほとんど情報がないのが現状である。これは、これまでは化学物質としての挙動の解析を中心として研究されてきた経緯が背景としてある。ナノ粒子は、粒子の大きさが極端に小さい物質であること、固有の化学的な性質に加え、単位重量あたりの表面積の大きさが異なること、表面電荷の異なることがあるなど、これまでの検討課題として考慮されてこなかった観点を考慮しなければならないであろう。すなわち、ナノマテリアルに関する課題が明らかとなってきた現時点で取り組みが始まったといってもよいであろう。このため、本稿では、現在得られている知見を概観した上で、課題を明らかとし、課題解明への取り組みをどのように考えていくべきかを整理したい。

1. 吸収機構の解明の課題

まず、ナノ粒子が超微粒子の形態で摂取されても、食品が消化される過程でどのような形態変化をとるか明らかとしなければならないであろう。ナノ粒子の表面状態や水への分散性を反映して、口腔、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸と消化管を通過する過程で、共存する食品などの変化、水分含量、消化管部位の相違などの環境の変化にしたがい、ナノ粒子のまま存在するのか、凝集体を形成するのか、凝集体としてどの部位で変化するのか、それぞれ状態が異なってくる。それにしがって吸収のされ方も異なってくるであろう。例えば、超微粒子の形態であれば細胞間を経て体内に入る可能性もある。凝集体の大きさによっては、細胞と接触して細胞内に入る可能

性もある。また、部位によってはマクロファージの貪食作用による取り込みが積極的に進む可能性もある。一方、粒子の大きさによっては、消化管表層部に沈着する程度にも差が出て、体内への取り込みが変わってくることもありうる。このように、経口からの摂取とはいえ様々な条件の違いが生じ、その結果、体内への取り込みのされ方も異なってくるのが予想される。経口摂取による吸収に関する検討は限られているが、これまで報告されている結果では、多くの場合、消化器管系では吸収されずに体内を通過し、排泄されている。放射性標識 (^{14}C) したフラーレンを環状付加反応させた極性トリメチレンメタンで水懸濁性にして、ラットに経口投与した結果では、48 時間内に糞便として 98% が排泄されている¹⁾。しかし、残りは尿中に排泄されてはいることから、極一部は吸収されて血液循環系で全身に回っている可能性を示唆している。また、静脈注射した場合は、急速に各種の臓器に分布し、血液-脳関門も通過できることが明らかとなった。1 週間後にも約 90% が体内にとどまり、経時的に異なるが、73~80% が肝臓に貯留していた。この場合には急性毒性は認められなかったと報告されている。この報告の他に、種々の側鎖を付加して水懸濁性を高めたフラーレン類を経口投与や静脈注射した研究が報告されている。個々の物質により結果は大きく異なっているが、静脈注入したフラーレン類は吸収されて各種の臓器に分布することが示されている。これらの結果から、消化管から体内に取り込まれたフラーレンはその代謝物を含め、急速に全身の組織に分布し、長期に保持されることが推測される。取り込みによる影響は、急性毒性は低いようではあるが、長期間蓄積することから、慢性毒性の影響が懸念される。体内の保持期間は誘導体の種類により異なるが、半減期が 7 時間程度²⁾ から 1 週間経過後もほとんど排泄されないものもあることが報告されている。体内に吸収されたフラーレン類の排泄は、腎臓を通して行われる例が報告されている^{2,3)}。我々の検討においても、暫定的な結果ではあるが、コーン油に溶解させたフラーレンを単回強制経口投与した場合に、大部分（少なくとも 85% 以上）が糞便中に排泄されたと算出され、消化管から体内に取り込まれにくい傾向が認められている（現在、詳細な検討中）。

2. ナノマテリアル取り込みの同定・定量方法の課題

次に、体内に取り込まれたかどうかを判定するためには、対象とするナノマテリアルを正確に同定・定量することが求められる。生体試料を扱う点から、物質単体としてではなく、多様な生体成分の夾雑物質の中から高感度を選択的に測定する方法が要求される。例えば、酸化チタン、白金、金や銀などの生体成分として存在量が少ない金属超微粒子は、誘導結合プラズマ質量分析装置による測定が有効である。この方法は、生体試料を灰化して、試料中に含まれる金属成分として同定・定量する方法であることより、精度や再現性が高く、単位重量あたりの濃度として

非常に低い濃度まで測定できる長所がある。しかし、生体試料に普遍的に存在量が多い金属には適用しにくく、生体内存在粒子径の大きさや細胞レベルの分布の状態までは明確にできないのが欠点である。この方法では、組織中の存在状態を同定するためには、電子顕微鏡を用いなければならない。カーボンナノチューブでは、透過型電子顕微鏡による同定方法が有効である。しかし、組織中の分布については多くの情報を得ることができるが、定量性に関しては課題が残っている。定量を行うためには、灰化した生体試料からカーボンナノチューブを効率よく分離・精製し、電子顕微鏡下で本数を目視で数える方法が可能と考え、現在検討中である。定量法については、開発・確立中であり、将来よい手法が提案されることもあるであろう。フラーレン類に関しては、特異波長における吸光度、および高速液体クロマトグラフィーの適用による定量が可能である。両方法は、単体の定性・定量には支障なく適用できるが、生体試料への適用については往々にして生体試料由来の物質が測定上の妨害となることが多く、前処理により夾雑物質の除去が必要なが多い。我々は、生体試料からトルエンで抽出して、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計で同定・定量する方法を確立して、高感度で選択性の高い測定法として提案している。この方法では、 n グラムレベルの検出が可能となっており、極微量のフラーレンの体内分布が解析可能である。フラーレン誘導体についても同様の方法が適用できると考えているが、個々の物質で確認をしなければならない。また、各々の代謝産物についての同定も同時に解析できる可能性が示されている。カーボンナノチューブやフラーレン類では、先に記述した報告にあるように、炭素原子の放射性同位体や安定同位体を用いて標識し、放射性標識を検出することで同定・定量する方法もある。この方法は、これまでの生化学的な手法として広く使用されてきた方法であり、生体試料を対象として研究では高感度で測定できる技術が確立しており、極微量の対象物質の全身分布を解析できる長所がある。また、代謝産物を含めた体内挙動を追跡研究できる可能性があることが優れている。しかし、この手法は、製造が高価で、製造技術的にも解決しなければならない点がある上、使用に関して、取り扱いに注意を要するなどの欠点がある。短期的な体内挙動の研究には非常に有効な手段ではあるが、長期的な観察を必要とする研究には課題がある。さらに、これまで報告されている結果から推測すると、修飾基が異なるだけでも吸収の挙動が異なる可能性が予想され、対象とする物質の検討を進める際には個々の物質ごとに標識物質を作製しなくてはならないかもしれない点が課題として残っている。ナノマテリアルに、後から蛍光物質や分析が容易な修飾基を化学的に修飾する手法も考えられるが、先に述べたように、構造や表面状態により挙動や作用が異なる可能性が残されている現在、修飾基を導入することで体内への吸収・代謝・蓄積・排泄等の挙動に変化をきたさないとの情報が得られるまでは、修飾した物質の挙動は元の物質と全く異なった挙動をしていると考えるべきであり、修飾した物質での評価を安易に元の物質の評価としないことが重要である。したがって、修飾基の導入は目的により考慮すべき

であろう。

繰り返しになるが、同定・定量法については、単純に重量を測定できるだけでなく、曝露溶液中の濃度、粒子もしくは凝集塊の粒度分布と数および表面積、生体内の状態、凝集塊の大きさ、粒子もしくは凝集塊の数、単位湿重量あたりの重さの評価、組織内の分布状態などの情報を可能な限り収集できる方法の組み合わせがとられるべきである。一方、スクリーニングやモニタリング手法としては、高感度ではあるが、迅速に結果を出すことができ、簡便で精度が高い方法を確立すべきである。

3. 実験動物による評価方法の課題

ナノマテリアルの吸収や生体内での挙動だけではなく、生体内物質との反応性についても不明な点が多い現在、より多くの物質に共通性の高い情報を得るために、個々の対象物質の特性に起因する性状や影響を調べることに加え、標準的な物質と手法による相互比較可能な情報の入手にも努めるべきである。そのためには、まず吸収の有無を正確に判定するために、最も吸収の可能性が高いと推測される手法の設定が必要となる。食品から吸収されることが予想される場合は食餌として、水から吸収されることが予想される場合は飲水で投与することが望ましい。この方法は長期的な曝露研究にとり最も優れた投与方法と考えられるが、短期的な曝露研究では投与量が限られ、たとえ吸収されても同定・定量できる濃度に達することができない危険性がある。したがって、短期的には強制的に胃に注入する方法で、吸収の有無や程度を評価する手法の選択も考慮しなければならない。次に、対象物質の分散剤の選択が課題となる。分散剤に関しても、標準化されておらず、現在検討が進められている。

例えば、実際の摂取状況を考慮してコーン油を代表とする食品中油脂、スクアラン、トルエン、キシレン、1-オクタノールなどの有機溶剤、1-メチル-2-ピロリドン、フォスファチジルセリンやフォスファチジルコリンなどの膜構成脂質、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンKなどの脂溶性生理活性物質等が候補として挙げられている。また、水に直接懸濁状態にさせる場合には、Tween20、Tween40、TritonX-100、NP-40などの生体に比較的毒性の低いと考えられる界面活性剤の使用による懸濁、リポタンパク質などの血液中成分と共存、膜構成成分によるリポソームの一部として構成させて懸濁させるなどの方法が検討されている。また、 γ -シクロデキストリンやポリビニルピロリドン等を対象物質の周囲に含接させる方法で、水に分散しやすい状態にする方法が提案されている。ここで注意しなくてはならないのは、使用する分散剤が毒性や影響を及ぼさない物質であるかその濃度でなければいけない。例えば、刺激性の強い物質を分散剤に使用すると、胃壁を荒らして吸収を促進するか、逆に吸収を阻害する結果を招くからである。この

観点から、これまで多くの化学物質の溶剤として使用されて情報の蓄積があるコーン油が、最優先の分散剤として検討されるべき候補であろう。

4. ナノマテリアルの吸収評価の課題

次に、物理的な性状の課題として、分散剤の種類、対象物質の種類により粒子径が異なることが想定されることから、投与する分散溶液中の対象物質の粒子径の分布の測定が必要である。粒子径に従いマクロファージの貪食作用などによる取り込み率が異なるとの報告があるのに対し、超微粒子の形状では消化管表面の細胞間から体内に浸入する可能性が示唆される結果も得られており、粒子径が吸収に影響すると考えられるため、投与時の粒子径分布についての情報が重要である。Janiらは、ヨウ素(125)で放射化標識した球状のポリスチレンをSW系雄ラット(平均体重200g)に1.25mg/kg/日で10日間強制経口投与した結果、50nmおよび100nmの粒子が34%と26%吸収されたと報告している。この研究で、50nmの粒子は約7%、100nmの粒子は約4%が、血液、肝臓、脾臓および骨髄に達していた。1000nmの粒子は0.8%が吸収されていたが、骨髄に達していなかった。3000nmの粒子は吸収されていなかった。300nm以上の粒子は血液中から検出されず、心臓や肺からも検出されなかった。これらの結果は、粒子径が吸収の程度と体内分布に影響を及ぼすことを示唆している⁴⁾。また、粒子径による吸収の相違に関して、150～500nmの酸化チタン粒子は吸収されて、血液から肝臓に達するとの報告がある⁵⁾。

おわりに

これまで、経口からのナノマテリアルの摂取に関して概観したが、非常に限られた情報があるのみである。ナノマテリアルに関する環境動態、生物に対する影響評価の取り組みが始まったところで、多くの課題が今後の検討にゆだねられているのが現状であることを理解していただけたら幸いである。ここ数年後の検討の結果、新しい知見が集積し、これまでの化学物質で行われてきた同一の方法論で取り組みを進めてよいのか、別の方法論の導入を行わなくてはならないのかを含め、ナノに関する研究評価の方向性が明らかとなってくると思われる。

文 献

- 1) Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S. and Ambe F. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. (1995) Chem. Biol., 2(6).

- 2) Rajagopalan P., Wudl F., Schinazi R. F. Boudinot, F. D. Pharmacokinetics of a water-soluble fulleren in rats. (1996) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(10), 2262-2265
- 3) Chen, H. H., Yu, C., Ueng, T. H., Chen, S., Chen, B. J., Huang, K. J. and Chiang, J. Y., Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C60 in rats. (1998) *Toxicol. Pathol.*, 26(1), 143-151
- 4) Jani, P., Halbert, G. W., Langridge, J. and Florence, A. T., Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. (1990) *J. Pharm. Pharmacol.*, 42(12), 821-826
- 5) Jani, P., McCarthy, D. E. and Florence, A. T., Titanium dioxide (rutile) oarticle uptake from tha rat GI tract andtranslocation to systematic organs after oral administration. (1994) *Int. J. Pharm.* 105, 157-168

[3] 皮膚接触

はじめに

ナノマテリアルの使用量の増加と使用範囲の拡大にともない、製造・使用工程の作業環境において作業従事者が非意図的に曝露する機会や、材料として含む製品から生活環境に放出されることにより多くの人々の曝露する機会が増加することが考えられる。しかし、これらの曝露の機会は、食品などを口から摂取や、皮膚から吸収される割合に比べ吸気からの曝露量が大きいと想像される。これに対して、皮膚からの吸収は、ナノマテリアルを含む製品に接触する機会や、意図的にナノマテリアルを添加した製品を塗布する場合を考慮しなければならない。

皮膚からの吸収や影響評価に関する知見は限られており、今後の検討課題となっている。これまでの検討では、すでに使用されている酸化チタンやカーボンナノチューブに関する報告例が多くなっている。本稿においても、これらの物質を中心に得られている知見を中心に課題を明らかとしていく。

1. ナノマテリアルの皮膚からの浸透

単層カーボンナノチューブを高濃度を含むフラーレン煤の健康影響を、40人のボランティアを対象としてパッチテストを実施した報告では、96時間後の皮膚刺激性およびアレルギー反応は陰性の結果であった。同一の試料を、4匹のウサギを用いて、改変ドレイズ法により、0.2mlの水に懸濁して眼に滴下し、24時間後、48時間後および72時間後の眼刺激性を観察した結果、異常は認められなかったと報告されている^{1,2)}。

日焼け止め製剤を連続塗布した後テープをはり、塗布部の角質層を剥ぎ取った後の皮膚の断面を組織学的観察し、日焼け止め製剤に含有している酸化チタンの浸透性を評価した結果、毛包脂腺開口部でのみ浸透が認められ、角質層の深部では認められなかったと報告している。しかし、毛包で検出された酸化チタンは塗布量の1%未満であった³⁾。これらの結果は、皮膚組織への酸化チタンの浸透は少ないと示唆している。

前述した3報に対して、豚の皮膚に、長さ45～150nm、幅17～35nmの酸化チタンを含む製品を塗布し8時間後、24時間後、48時間後の皮膚内部への浸透を、高エネルギーイオンプローブを用いて測定した研究では、顆粒層では検出されたが、その下の有棘層や毛嚢では検出下限値以下であったと報告されている⁴⁾。この結果からは、塗布した製品中の酸化チタンは細胞間を経て顆粒層に達したことが示唆される。

一方、微粒子化した3種の酸化チタン、I:20nm、立方晶、疎水性、II:100nm、針状、両親媒性、III:100nm、針状、親水性は、角質層の最も表面の部位にとどまり、深部まで達することはないとの報告もある⁵⁾。

相反する結果が報告されているのは、皮膚への曝露条件が異なるのに加え、対象とする酸化チタンの性質や形状が異なっていることが原因の一つであると推測される。酸化チタンの超微粒子は結晶形と大きさ、表面の処理の方法により浸透の程度は大きく変わるとの結果もあり(私信)、結論に至るには同一条件において系統立てた検討が必要である。

また、皮膚に塗布する酸化チタン微粒子の多くは、紫外線カットを使用目的とするものである。超微粒子としての挙動に加え、紫外線が照射された後の挙動や影響、製品中の表面処理剤の安定性、光エネルギーの吸収剤との化学反応生成物などに関して、総合的に評価しなければ添加されたナノマテリアルとしての酸化チタンを正しく理解できない点に留意すべきである。すなわち、超微粒子の酸化チタンの吸収の有無のみで健康影響を評価するのは十分とはいえない。また、皮膚表面は生理的に、順次、剥離していくものではあるので、沈着の程度、すなわち皮膚表層における生物学的半減期に関しても今後情報の集積が必要である。

2. ナノ物質の皮膚組織への影響

ナノマテリアルが皮膚表面に付着した後、体内に浸透していくか、表層部にとどまるかは、物質により異なる可能性があることもあり、包括的な結論が出るには至っていないので、ここでは皮膚表層に曝露した研究結果に関して概論する。

皮膚表層から体内に浸入した場合には、循環系に入る可能性もあり、体内への取り込み経路にかかわらず類似の挙動をとる可能性がある。ただし、皮膚深部までの皮膚領域に留まる場合には、貯留領域の組織に特異的な影響を及ぼす可能性もあるが、現時点では知見は極限られている。細胞レベルの共通した生理的な機能に及ぼす影響が、皮膚系の培養細胞を用いて調べられているが、皮膚細胞特有の性質を反映した取り込みや影響について評価を示すには至っていない。これは、曝露するナノ物質の純度、物理的および化学的性状、曝露方法、曝露する細胞の種類、培養系の単層培養と三次元培養など、考慮すべき要件が多岐にわたっていることによる。

マウスの背部の皮膚に、ベンゼンに溶解したフラレーン(200 μg)を塗布した結果、72時間後のDNA合成とオルニチン脱炭酸酵素活性には変化が認められなかった。7,12-ジメチルベンゾアントラセンにより発がん誘導させた(イニシエーション)皮膚に24時間反復塗布曝露した結果、皮膚腫瘍の発生は認められなかった。しかし、TPA(12-O-テトラデカノイルホルポール-13-アセテート)によりイニシエーションさせた場合は良性の皮膚腫瘍が発生した⁶⁾。この

結果は、フラーレンによる皮膚曝露の急性毒性は認められないながら、発がんプロモーション活性がある可能性を示唆している。

前述したように、皮膚に吸収された後、有害影響を及ぼす可能性が考えられるが体内に入った後は吸気を介して肺から取り込まれた影響と類似の作用を示すと考えられる。そこで、皮膚由来細胞を用いた *in vitro* 系による作用に関する報告例を示す。

ヒトの皮膚ケラチノサイト (HaCaT) および気管上皮細胞 (BEAS-2B) を用い、単層カーボンナノチューブを曝露した研究において、超微細構造と形態学的変化、細胞の結合性の喪失、アポトーシス、酸化ストレスの影響増加、過酸化物の蓄積、抗酸化剤の枯渇を引き起こした結果を報告している。さらに、マイクロアレイ解析により、酸化ストレスに関連する遺伝子の転写発現パターンの変化を誘導することを明らかにしている⁷⁾。これらの結果は、単層カーボンナノチューブが皮膚毒性を誘起し、酸化ストレスが細胞に傷害を及ぼす主要な原因であることを示唆している。しかし、カーボンナノチューブの有害影響は、含まれる不純物、幅や長さの形態、表面の状態に大きな影響を受けることを示唆する報告があり、製造方法、不純物の組成と含量、形態など、吸収と蓄積、体内移行に伴う分布、健康影響において、系統立てた評価をすることが重要である。

ヒト上皮ケラチノサイト (HEK) に 0.1, 0.2, 0.4mg/ml の多層カーボンナノチューブを 1, 2, 4, 12, 48 時間曝露させた研究では、透過型電子顕微鏡による観察で全ての曝露した細胞中に多層カーボンナノチューブが存在することを確認している。炎症性サイトカインの一種であるインターロイキン 8 が時間依存的に放出させていた結果を報告している⁸⁾。この結果は、前述の単層カーボンナノチューブの研究と同様の課題を有しているが、曝露することにより短期刺激応答反応が誘起されることを示唆しており、特に高濃度の職業曝露を防止することが重要であることを示唆している。

また、細胞内物質との反応性に関して、日焼け止め剤に含まれている表面処理をしているアナターゼ/ルチル型のチタン微粒子の存在下で、UVA および UVB を日光照射の想定で照射した研究において、DNA および RNA が部分的に切断を受け、ピリミジン塩基やプリン塩基は分解されて二酸化炭素とアンモニア、硝酸イオンに変化することが報告されている⁹⁾。

おわりに

皮膚については、経口や経気道の曝露経路と異なり、ナノマテリアルを含む製品を意図して使用することによる曝露があり、吸収および貯留としての生物学的半減期を明確に評価することが重要である。しかし、皮膚に対する評価についても、他の曝露経路と同様、検討の途についたところといえ、限られた情報が提供されているに過ぎない。

ナノ物質の形状や性状により得られる結果が異なる可能性があるため、系統立てた研究が進め

られることが望まれる。今後の取り組みに、大いに期待したい。

文 献

- 1) Huczko, A. and Lange, H. *Fullerene Science and Technology*, 9, 247-250, 2001
- 2) Huczko, A. and Lange, H. Calko, E., Grubek-Jaworska, H., Droszez, P. and Sogabe, T., *Proceeding-Electrochemical Society*, 2000-11, 271-274, 2000
- 3) Lendemann, J., Weigmann, H., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G. and Sterry, W., *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 12, 247-256, 1999
- 4) Menzel, F., Reinert, T., Vogt, J. and Butz, Z., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B219-220, 82-86, 2004
- 5) Schulz, J., Hohenberg, H., Pflucker, F., Gartner, E., Will, T., Pfeffer, S., Wepf, R., Wendel, V., Gers-Barlag, H. and Witter, K. P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54(1), S157-S163, 2002
- 6) Nelson, M. A., Domann, F. E., Bowden, G. T., Hooser, S. B., Fernando, Q. and Carter, D. E., *Toxicol. Ind. Health*, 9(4), 623-630, 1993
- 7) Shvedova, A. A., Kisin, E., Kashava, N., Murray, A. R., Gorelik, O., Arepalli, S., Gandelsman, V. Z. and Castranova, V., *Cytotoxic and Genotoxic Abstract of papers*, 227th ACS National Meeting, Anaheim, AC, United States, March 28-April 1, 2004, ppIEC-020
- 8) Monteiro-Riviere, N. A., Nemanich, R. J., Inmam, A. O., Wang, Y. Y. and Riviere, J. E., *Toxicicol. Lett.*, 155, 377-384, 2005
- 9) Hidaka, H., Horikoshi, S., Serpone, N. and Knowland, J., *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 111, 205-213, 1997