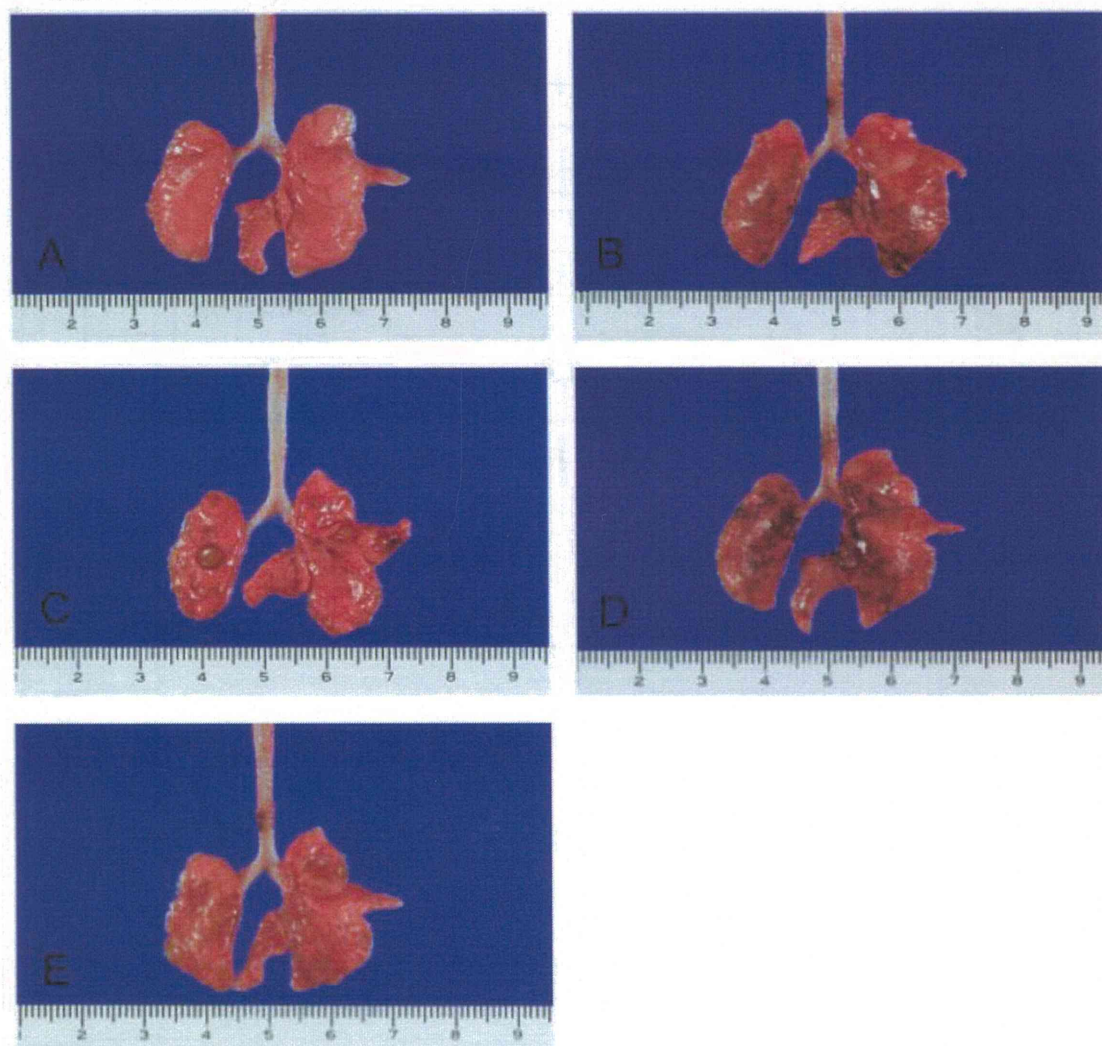


図3. 肺の肉眼像



- A, 対照群 (I群)
- B, マグネタイト 5 mg/kg 体重投与群 (II群)
- C, DHPN 投与群 (III群)
- D, DHPN+マグネタイト 5.0 mg/kg 体重投与群 (IV群)
- E, DHPN+マグネタイト 1.0 mg/kg 体重投与群 (V群)

図4. 肺の結節数（平均値±標準偏差, A, 結節<3 mm ; B, 結節≥3 mm）

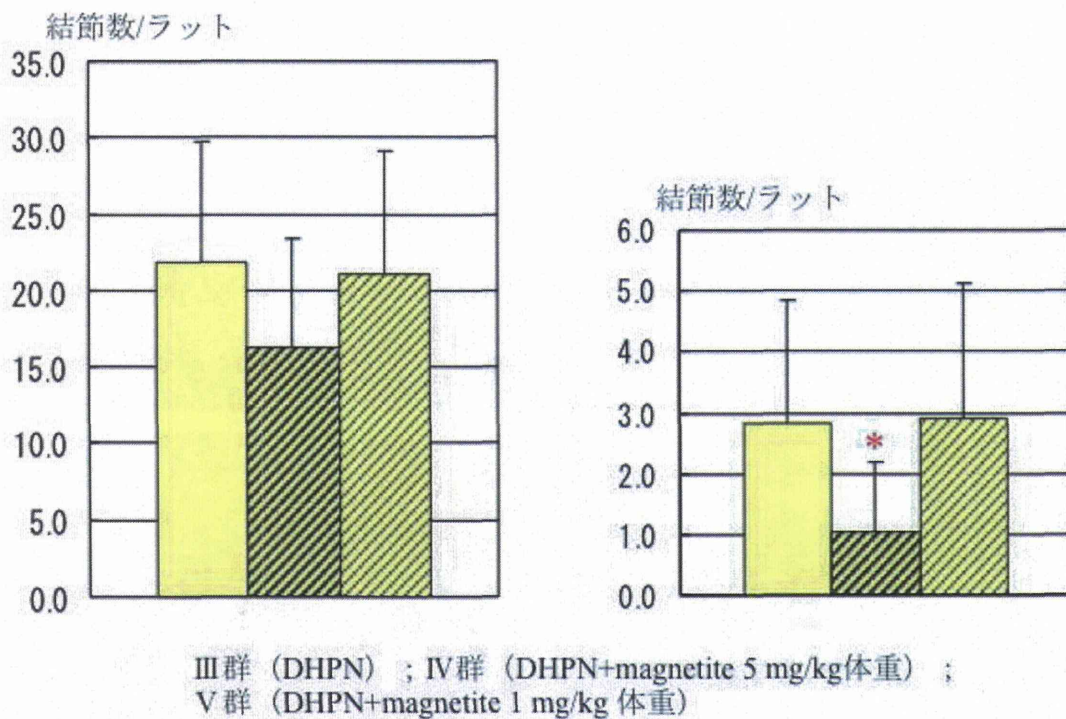
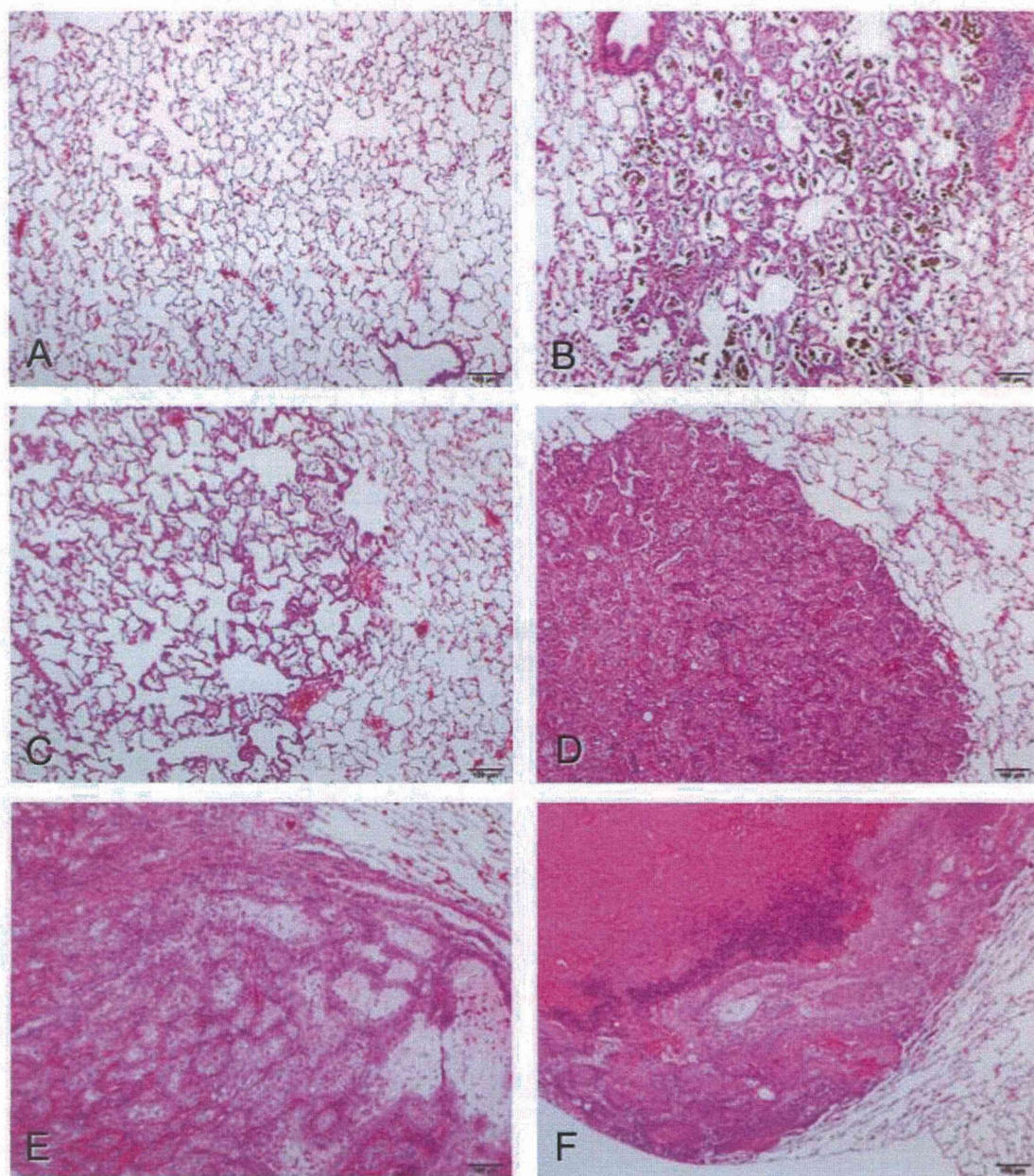


図 5. 肺の病理組織像



- A, 対照群 (I群)
- B, マグネタイト 5 mg/kg 体重投与群 (慢性炎症) (II群)
- C, DHPN 投与群 (肺胞上皮過形成) (III群)
- D, DHPN 投与群 (腺腫) (III群)
- E, DHPN+マグネタイト 1.0 mg/kg 体重投与群 (腺癌) (V群)
- F, DHPN+マグネタイト 1.0 mg/kg 体重投与群 (扁平上皮癌) (V群)

遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究

研究分担者 渡邊 昌俊 横浜国立大学 工学研究院 教授

研究要旨：細胞株を利用した *in vitro* 系で磁性体ナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) の細胞毒性および遺伝毒性の解析を行ってきた。本研究では、(1) ポリエチレンイミン(PEI)修飾ナノ粒子を利用した細胞毒性の解析、(2) A549 細胞に対して、磁性体ナノ粒子を曝露し、細胞毒性及び遺伝毒性を評価した。実験内容は、8-OHdG 生成の測定、細胞生存率、活性酸素種(ROS)の測定等の解析である。まず、PEI 表面修飾を行った磁性体ナノ粒子を前立腺癌細胞株 DU145 に曝露し、細胞毒性を評価した。PEI 表面修飾により 2 次粒子径が抑えられ、分散能の安定性が高まる事が確認された。また、活性酸素種(ROS)が抑えられたが、cell viability は低下傾向を示した事より、細胞に対して ROS 産生とは異なるメカニズムで影響を与える可能性が考えられた。肺癌細胞株 A549 に磁性体ナノ粒子を曝露した時に、濃度依存的に cell viability の低下傾向、ROS 産生の上昇、8-OHdG 生成の上昇を認めた。一方、細胞膜損傷は高濃度曝露(100 $\mu\text{g/ml}$)で始めて認められた。抗酸化関連遺伝子として、HO-1 遺伝子の発現は濃度依存的に上昇を認めた。これらの結果より、前立腺癌細胞株の挙動と異なり、細胞種により磁性体ナノ粒子に対する反応が異なると考えられた。

A. 研究目的

本研究分担者は、磁性体ナノ粒子の生体への影響を探るため、前立腺癌細胞株 (DU145, PC-3) および肺癌細胞株(A549) の *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析を行ってきた。同一粒子であっても、細胞株により細胞毒性および遺伝毒性の程度は異なり、それはナノ粒子の種類と細胞種の ROS 産生、代謝・修復機構の差異によるものと推測された。本研究では、今間での結果に基づき、分担研究使命“遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究”に沿った修飾ナノマテリアルを利用して細胞毒性および異なる細胞株における細胞毒性について解析を行った。

B. 研究方法

1)使用細胞株と細胞培養

本実験ではアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 および PC-3 および肺癌細胞株 A549 を使用した。ATCC (American Type Culture Collection)より入手した。DU145 は RPMI 1640 培養液(10%FBS、1% penicillin & streptomycin 含有)にて、A549 は F12 Nutrient Mixture 培養液にて 37 °C、CO₂ 濃度 5%加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用磁性体ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$)

使用した磁性体ナノ粒子の一次粒径は約 10 nm であり主成分は Fe_3O_4 (マグネタイト)で構成されている。 Fe_3O_4 は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ へ成分に変化があるがどちらの場合も磁性を示す酸化物である。

磁性体ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$)は戸田工業株

式会社および Sigma より購入し、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ で培養液に調整して、超音波破砕機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社) にて、分散処理を行い、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の凝集を取り除き使用した。

表面修飾に関しては、プロトコールに従いポリエチレンイミン(PEI)修飾を行った。PEI 修飾は陽イオン性界面活性剤で、遺伝子導入に利用される。

3) 溶液中における磁性体ナノ粒子の粒径分布の測定

細胞への磁性体ナノ粒子曝露前には、培養液中における磁性体ナノ粒子の大きさ、粒径の分布を濃厚系粒径アナライザー (Fiber-Optics Particle Analyzer FPAR-1000、大塚電子) にて測定を行った。

4) Cell viability の測定

生細胞の細胞数の変化を測定するために、ALAMER BLUE (Alamar Bioscience, Sacramento, California, USA) を用いた。ALAMER BLUE は酸化還元型の色素で、細胞の代謝活性に対応して、色調の変化を示すことから、動物細胞のほか、バクテリアなどの増殖及び生死の判別に利用されている。ALAMER BLUE が生存細胞のミトコンドリア電子伝達系において還元され、ホルマザンへ変化すると水溶液の呈色も変化するため、特定波長光(570 nm と 600 nm)の吸収が変化する。生存細胞数にほぼ比例して、ホルマザン形成が増加し比色法によって生細胞数を相対的に測定する。各細胞は 100 mm ディッシュであらかじめ培養した後、細胞密度が 1.0×10^4 cells/well となるように 24 well プレートに播種した。磁性体ナノ粒子曝露後に、培養液を取り除き、PBS を用いて細胞上に付着した磁性体ナノ粒子をウォッシュアウトする。そして、培養液で 10 倍希釈した ALAMER BLUE 溶液を 500 $\mu\text{l/well}$ ずつ添加した。37 $^\circ\text{C}$ 、5 % CO_2 加

湿インキュベーター内で 3 時間培養後、細胞内や細胞に付着した磁性体ナノ粒子の影響を考慮し、ALAMER BLUE 溶液の上澄みを 450 $\mu\text{l/well}$ ずつ別の 24 well plate に移し替えた。その後、分光光度計 (Viento XS、DS Pharma Biomedical Co., Ltd)により 570 nm と 600 nm の波長を測定し、生存率を求めた。

5) 細胞膜損傷評価

LDH (Lactate Dehydrogenase) は細胞膜の損傷に伴い細胞外に放出される。この LDH の活性を測定する。乳酸からピルビン酸への LDH による変換により、 NAD^+ が NADH/H^+ に還元され、触媒が H/H^+ を NADH/H^+ からテトラゾリウム塩 INT に転移し、ホルマザンに還元する。

LDH-Cytotoxicity assay kit (BIO Vision 社) を使用した。プロトコールに従い、細胞を 96 well に 1.5×10^4 cells/well で播種し、各曝露条件で 24h インキュベートし、分光光度計で 495nm の吸光度を測定した。

6) 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の測定

5- (and 6) -chloromethyl-2' , 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester CM- H_2DCFDA (Invitrogen 社) は、生細胞の細胞質で酸化されるまでは、細胞透過性の非蛍光物質で、生細胞に入ると二酢酸基が細胞内エステラーゼによって切断される。ROS が存在すると、還元された色素が酸化され、色素が蛍光を発する。励起光 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- H_2DCFDA の試薬を溶かし 10 μM に調整する。6 well plate の培地を吸引して、その well に PBS 1 ml に 10 μM に調整した試薬を 200 μl 加えた。その後 30 分インキュベートを行い、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。

7) 8-OH-dG の定量化

各細胞株を control(0 $\mu\text{g/ml}$)、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度で 72 時間磁性体 Fe_3O_4 NPs を曝露した後に細胞を回収した。回収した細胞から DNA Extraction WB Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japan)を用いて細胞中 DNA の核分画を採取した。その後、抽出した液体は nuclease P1 処理、alkaline phosphatase 処理を行い、Ultrafree-probind filter でろ過し、そのろ液を、UV、ECD を備えつけた HPLC カラム (32 $^{\circ}\text{C}$)に注ぎ込んだ。移動相は、8 %メタノール 10 mM リン酸緩衝液を用いた。この解析は、産業医科大学 葛西宏教授および河井一明准教授の協力のもとに行われた。

8) 抗酸化酵素遺伝子の発現

RT-PCR を用いて、抗酸化酵素遺伝子の発現を解析した。標的遺伝子は、heme oxygenase-1 (HO-1)とした。プロトコールに従い、各曝露条件の細胞から RNA 抽出、cDNA 合成、RT-PCR を行い、産物を泳動した。得られた電気泳動の画像を ImageJ で、Gels Analyze-Gel 解析を行って、PCR Products の蛍光度を算出し、解析を行った。(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・遺伝子解析研究に関する倫理指針(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) PEI 表面修飾の細胞への影響について
1-1) 培養液中における磁性体ナノ粒子の粒径分布：図 1 に示すように、PEI で表面修飾する事により、2 次粒子径は 133 nm 前後で、非修飾に比べて小さく、すなわち凝集しにくくなる事を確認出来た。

1-2) Cell viability : 非修飾・修飾磁性体ナノ粒子の DU145 細胞への曝露により、濃度依存的に低下するもコントロールとの比較において有意差は認められなかった。しかしながら、PEI 修飾磁性体ナノ粒子の方が低下の程度が大きくなるのを認めた(図 2)。

1-3) LDH 活性測定 : 非修飾磁性体ナノ粒子では、濃度依存的に上昇し、膜損傷が起きていると考えられた、一方、PEI 修飾磁性体ナノ粒子では、有意差は無いものの低下傾向を示した(図 3)。これは細胞分布等による assay 系でのエラーと考えられるが、再検が必要である。

1-4) ROS の測定 : 非修飾・修飾磁性体ナノ粒子の曝露により、濃度依存的に ROS 産生量は増加しますが、非修飾ナノ粒子曝露時の方がその上昇程度は大きい事を認めた(図 4)。

本研究では、PEI 表面修飾を磁性体ナノ粒子に施した。その結果、2 次粒子径は押さえられ、また細胞への取り込みが上昇した(data not shown)。また、ROS の産生を防止する事が出来なかったが、抑制傾向

を認めた。しかしながら、cell viability では濃度依存的低下を認め、ROS 産生とは別の機序が存在する可能性を認めた。これらの結果より、磁性体ナノ粒子の表面修飾により細胞毒性、遺伝毒性をコントロール出来る可能性が認められた。

2) A549 細胞株への磁性体ナノ粒子の影響

2-1) Cell viability の評価：磁性体ナノ粒子の濃度および曝露時間による影響を解析した。24、72 時間曝露のいずれも濃度依存的に減少するも、72 時間曝露 10 µg/ml および 100 µg/ml で有意差を認めた (図 5)。

2-2) LDH 活性測定：磁性体ナノ粒子 10 µg/ml 曝露時まではほとんど変化せずに、100 µg/ml 曝露時に有意に上昇を認めた (図 6)。

2-3) ROS の測定：磁性体ナノ粒子の曝露により、濃度依存的に ROS の産生を認め、10 µg/ml および 100 µg/ml 曝露時に有意差を認めた (図 7)。

2-4) DNA 酸化損傷マーカー [8-OHdG] 測定：この付加体は、濃度依存的に生成されるのを認め、10 µg/ml および 100 µg/ml 時に有意差を認めた (図 8)。

2-5) 抗酸化関連酵素遺伝子の発現解析：磁性体ナノ粒子の曝露濃度依存的に、HO-1 遺伝子の発現は上昇するのを認めた。しかし、12 時間に比べ、24 時間後にはその程度は低下するのを認めた (図 9)。

A549 細胞株は、肺癌由来の細胞株であるが、毒性病理学的に肺胞上皮に相当する細胞と考えられる。磁性体ナノ粒子の曝露実験に同細胞株を用いる事は、磁性体ナノ粒子の経気道的曝露を想定する *in vitro* モデルとなる。また、既に報告している前立腺癌細胞株との比較により、磁性体ナノ粒子に曝露される細胞により反応

が異なるのかどうかを明らかにする事が出来る。本研究で、磁性体ナノ粒子曝露時に、A549 細胞は濃度依的に cell viability や ROS 産生を認め、100 µg/ml の高濃度曝露時に顕著な反応を認めた。特に抗酸化関連酵素遺伝子の発現は 10 µg/ml まで誘導される形で上昇するも、逆に 100 µg/ml 時に低下を認めた。これは 100 µg/ml 未満の曝露時では、同細胞は抗酸化システムが機能し、磁性体ナノ粒子による ROS 産生などを抑制する傾向を示していると考ええる。また、前立腺癌細胞株 DU-145 では、比較的濃度から ROS 産生が上昇、8-OHdG の生成が顕著であり、恐らく抗酸化システムの機能の差によるものと考えられる。

これら実験結果より、*in vivo* 系を想定した *in vitro* 系の重要な要素として、細胞も考慮すべきであると考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) T.Kato, Y.Totsuka, K.Ishino, Y.Matsumoto, Y.Toda, D.Nakae, S.Goto, S.Masuda, S.Ogo, M.Kawanishi, T.Yagi, T.Matsuda, M.Watanabe, K.Wakabayashi. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay systems. *Nanotoxicology*, 7(4), 452-61, (2013).
- (2) A.Sato, N.Itcho, H.Ishiguro, D.Okamoto, N.Kobayashi, K.Kawai, H.Kasai, D.Kurioka, H.Uemura, Y.Kubota, M.Watanabe. Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. *Int. J. Nanomed.*, 8, 3151-60, (2013)
- (3) M.Watanabe, M.Yoneda, A.Morohashi, Y.Hori, D.Okamoto, A.Sato, D.Kurioka, T.Nittami, H.Hirokawa, T.Shiraishi, K.Kawai, H.Kasai and Y.Totsuka.

- Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14(8), 15546-60, (2013).
- (4) S.Ota, Y.Takahashi, A.Tomitaka, T.Yamada, D.Kami, M.Watanabe, Y.Takemura. Transfection efficiency influenced by aggregation of DNA/polyethylenimine max/magnetic nanoparticle complexes. *J. Nanopart. Res.*, 15, 1653-64, (2013).
2. 学会発表
- (1) M. Watanabe, A. Sato, D. Okamoto, D. Kurioka, H. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota. Synergistic effect of carboxyl-modified magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells in vitro No.784 AACR Washington, DC, April 6-10, 2013.
- (2) Y. Totsuka, K. Ishino, Y. Tada, D. Nakae, M. Watanabe, K. Wakabayashi Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in lungs of mice via inflammatory response. 6th Int. Symp. Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. Nagoya, Japan, Oct 28-31, 2013.
- (3) M. Watanabe, Y. Endo, D. Kurioka, A. Sato, A. Iwasaki, D. Okamoto, N. Watanabe. Nanomedicine in prostate cancer therapy (Invited), in the Symposia entitiled "Genomics & Proteomics-, 101st Indian Science Congress, Jammu, India, Feb.3-7, 2014.
- (4) 小坂俊仁、芳野純治、乾和郎、若林貴夫、小林隆、三好広尚、服部信幸、友松雄一郎、山本智支、成田賢生、鳥井淑敬、森智子、林 繁和、白石泰三、山本隆行、渡邊昌俊. 直腸型潰瘍性大腸炎と遺伝子多型との関連. 第 99 回日本消化器病学会総会 鹿児島、3.21-23 2013.
- (5) 渡邊昌俊. 組織切片共培養における前立腺癌細胞 DU145 と LNCaP の挙動. 3-G5-2 第 102 回日本病理学会総会 札幌、6.6-8, 2013.
- (6) 渡邊昌俊、竹村泰司. 医工連携の華：ナノメディシン. 第 36 回日本がん疫学・分子疫学研究会総会 シンポジウム 岐阜、6.20 2013.
- (7) 佐藤明子、堀恭樹、森田駿、菅原健太郎、讃良茂浩、新田見匡、竹澤俊明、渡邊昌俊. 組織切片担体と前立腺がん細胞株 DU-145 との相互作用について. J-3035 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5 2013.
- (8) 岡本大樹、古田奈緒、山口創、岩崎有由美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、渡邊昌俊. 前立腺癌細胞におけるカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果. P-2296 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5 2013.
- (9) 岩崎有由美、古田奈緒、山口創、岡本大樹、深井瑛美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、石黒斉、上村博司、窪田吉信、渡邊昌俊. 前立腺癌における磁性体ナノ粒子と各種化学療法の併用効果. E-1082 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5 2013.
- (10) 諸橋彩香、佐藤明子、岩崎有由美、河井一明、葛西宏、石黒斉、古林直人、渡邊昌俊. P-1309 磁性体ナノ粒子が曝露したがん細胞における抗酸化酵素遺伝子および活性酸素種酸性の変化について. J-1309 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5, 2013.
- (11) 堀恭樹、森田駿、新田見匡、遠藤宣広、石黒斉、上村博司、窪田吉信、渡邊昌俊. 脂肪細胞由来の液生因子の前立腺がん挙動への影響について. E-2100 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、

10.3-5 2013.

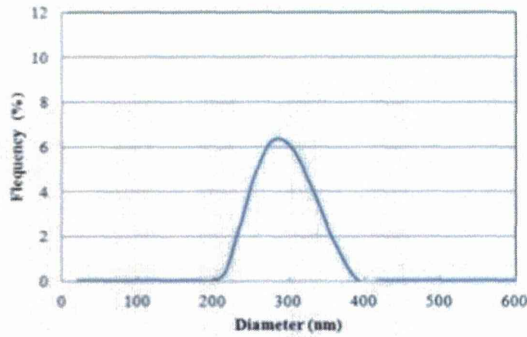
- (12) 落合雅子、渡邊昌俊、中釜斉、筆宝義隆.新規 ACF を用いた異型性病変の検出と大腸がん早期病変の連続的評価.J-2095 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5, 2013.
- (13) 戸塚ゆ加里、石野孔輔、中江大、渡邊昌俊、若林敬二、中釜斉. マグネタイトナノ粒子は炎症反応を介してマウス肺に遺伝毒性を誘発する. E-2105 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5 2013.
- (14) 讚良茂浩、菅原健太郎、堀恭樹、森田駿、栗岡大輔、新田見匡、高木陽光、渡邊昌俊. 前立腺がんスフェロイドの抗癌剤抵抗性への p1k2 遺伝子の関与について. E-3018 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5 2013.
- (15) 古田奈緒、山口創、岩崎有由美、岡本大樹、深井瑛美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、戸塚ゆ加里、渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子は高濃度曝露で A549 細胞における抗酸化システムを阻害し、細胞毒性をもたらす. P-3040 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜、10.3-5 2013.
- (16) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三.脂肪細胞由来液生因子の前立腺癌細胞

spheroid 形成への影響の基礎的解析.181 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 神戸、10.31-11.3 2014.

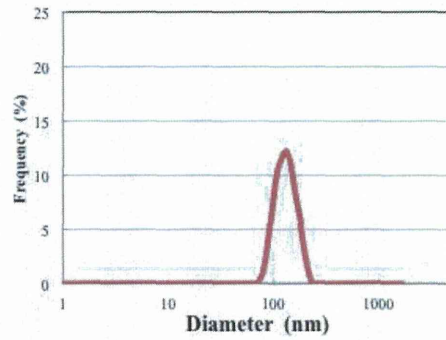
- (17) 栗岡大輔、渡邊昌俊、横田淳、中釜斉、土屋直人. マイクロ RNA 標的遺伝子スクリーニングによる p53 変異がん細胞の増殖制御因子の同定 1P-0276 第 36 回日本分子生物学年会 神戸、12.3-6 2013.
- (18) 藤原優子、西田百代、渡邊昌俊、河野隆志、中釜斉、土屋直人. がん抑制的 miR-101 による p53 依存的チェックポイントの活性化機構. 1P-0432 第 36 回日本分子生物学年会 神戸 12.3-6 2013.
- (19) 上大、木谷友、大多哲史、富田あさひ、渡邊昌俊、竹村泰司、五條理志. 磁性ナノ粒子を用いた ex vivo gene therapy の開発. O-3-2 第 13 回日本再生医療学会総会 京都、3.4-6 2014.

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

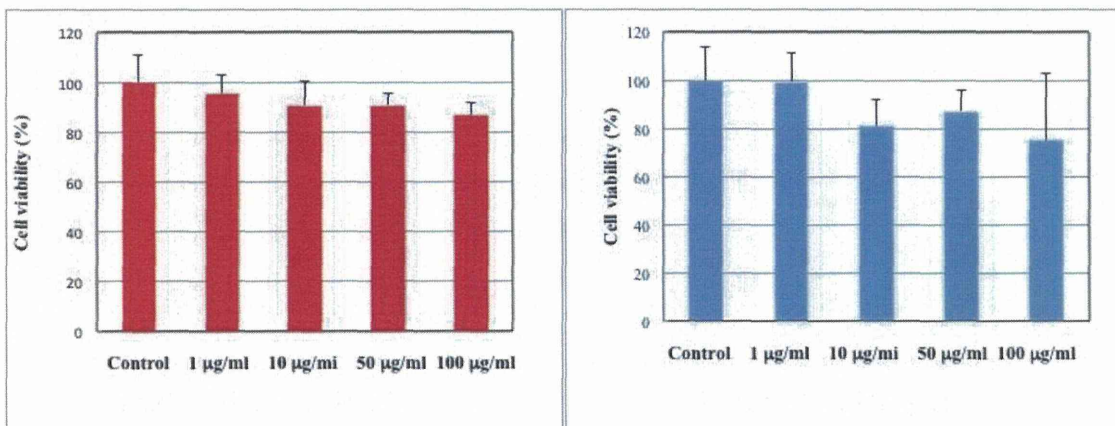


非修飾磁性体ナノ粒子



PEI 修飾磁性体ナノ粒子

図1. 培養液中の粒子径の分布



非修飾磁性体ナノ粒子

PEI 修飾磁性体ナノ粒子

図2. 非修飾・修飾磁性体ナノ粒子曝露時の Cell viability

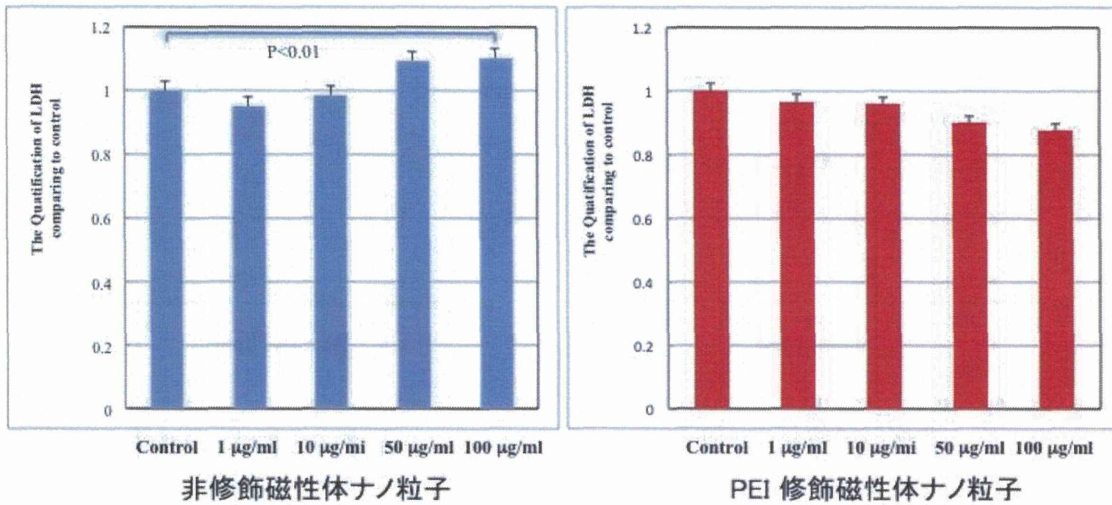


図3. 非修飾・修飾磁性体ナノ粒子曝露時のLDH活性測定

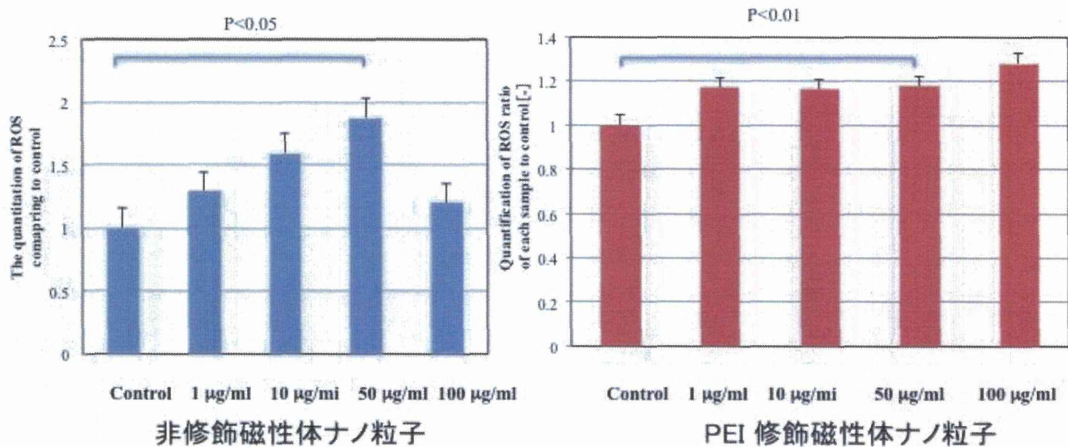


図4. 非修飾・修飾磁性体ナノ粒子曝露時のROS産生

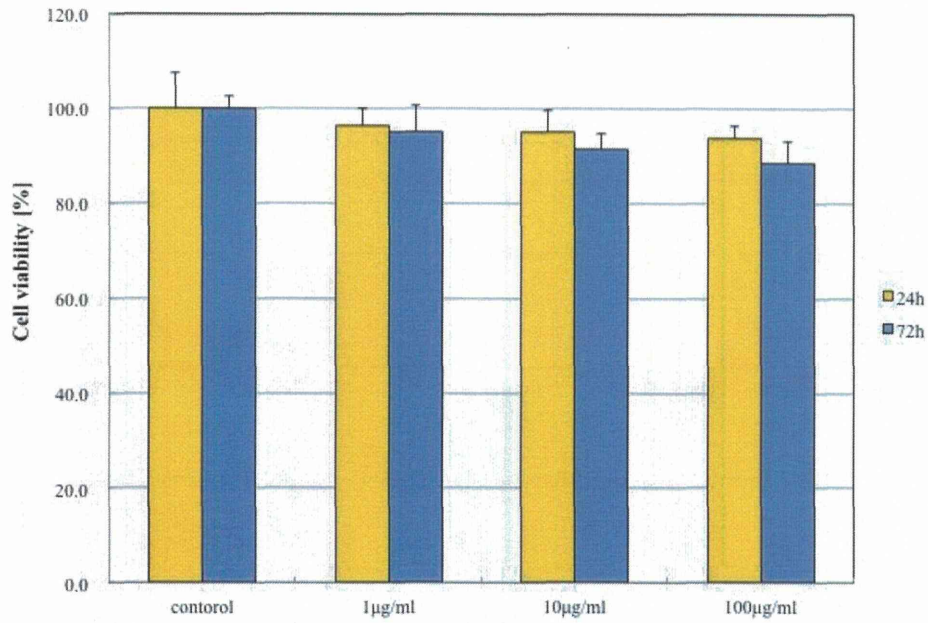


図5. 磁性体ナノ粒子曝露時のA549細胞の Cell viability

Ref.(3)より

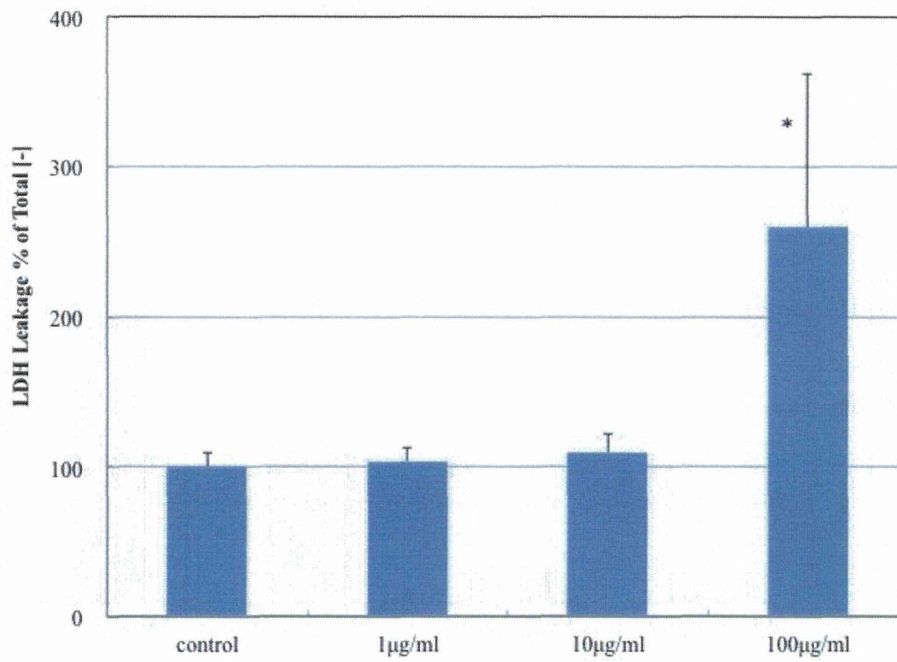


図6. 磁性体ナノ粒子曝露時のA549細胞の LDH活性測定

Ref.(3)より

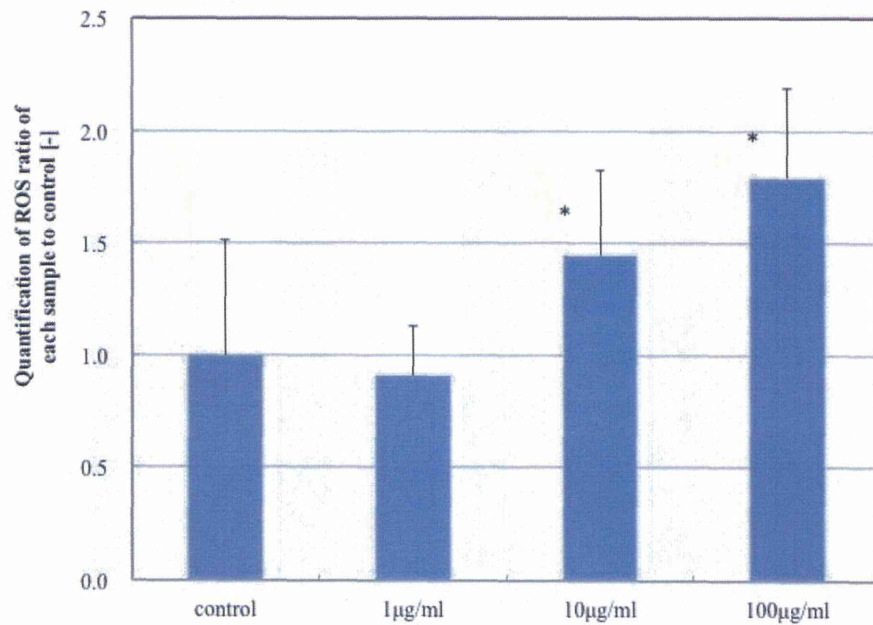


図7. 磁性体ナノ粒子曝露時のA549細胞のROS産生

Ref.(3)より

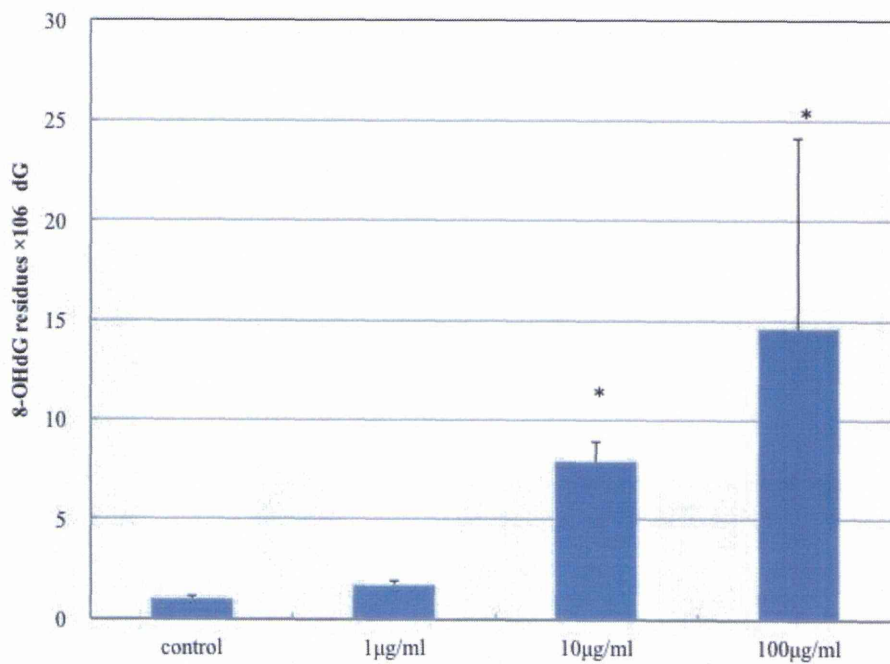


図8. 磁性体ナノ粒子曝露時のA549細胞の8-OHdG生成

Ref.(3)より

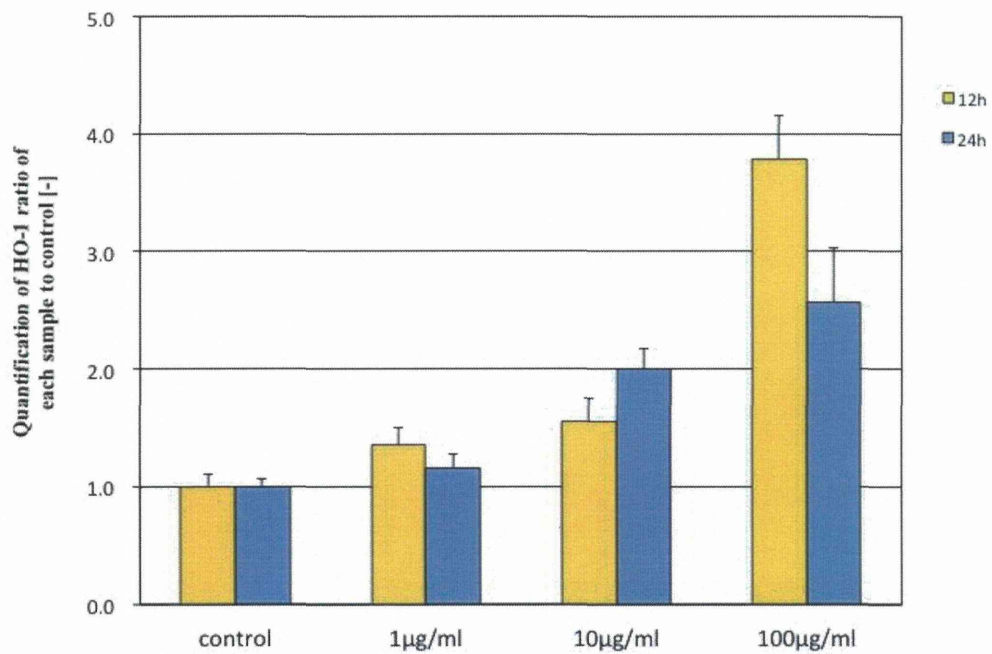


図9. 磁性体ナノ粒子曝露時のA549細胞のHO-1発現

Ref.(3)より

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
伊佐間和郎	金属系材料の細胞毒性の評価	佐藤章弘	埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件	技術情報協会	東京	2013	303-307

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
河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明	EU における繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴	国立衛研報	131	66-74	2013
Kitamura K, Maruyama K, Hamano S, Kishi T, Kawakami T, Takahashi Y, Onodera S	Effect of hypochlorite oxidation on cholinesterase-inhibition assay of acetonitrile extracts from fruits and vegetables for monitoring traces of organophosphate pesticides.	J. Toxicol. Sci.	39	71-81	2014
味村真弓、中島晴信、吉田仁、吉田俊明、河上強志、伊佐間和郎	有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス（2,3-ジブロムプロピル）ホスフェイト分析法の改定に向けた検討	薬学雑誌	134	259-268	2014
Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Miyajima A, Doi O	Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos.	J. Toxicol. Sci.	in press		

Li X, Xu L, Shao A, Wu G, Hanagata N	Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on primary Syrian hamster embryo (SHE) cells.	Journal of Nanotechnology and Nanoscience	13	161-170	2013
Xu M, Li J, Hanagata N, Su H, Chen H, Fujita D	Challenge to assess the toxic contribution of metal cation released from nanopaterials for nanotoxicity: a case of ZnO nanoparticles.	Nanoscale	5	4763-4769	2013
Hanagata N	Biological interpretation of the in vitro assessment of nanotoxicity.	Nano Biomedicine	5	1-10	2013
Zhang J, Zhu Y, Li J, Zhu M, Tao C, Hanagata N	Preparation and characterization of multifunctional magnetic mesoporous calcium silica materials.	Science and Technology of Advanced Materials	14	055009	2013
Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A	Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells	Journal of Biomedical Materials Research: Part A	101A	2573-2585	2013
Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A	A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration	Journal of Biomedical Materials Research: Part A	101A	2630-2643	2013
伊佐間和郎	ナノマテリアルの in vitro 安全性評価のための基礎研究—金属酸化物ナノ粒子に対する細胞応答—	薬学雑誌	6	in press	2014

Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, Niimi S	Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride	Journal of Biomedical Materials Research Part B	in press		
Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S	Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing	Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials	in press		
Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinai N, Masuda S	In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration.	Environ. Toxicol.	28	588-594	2013
Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H	Epidemiology of esophageal cancer between Japan and China.	J Epidemiol.	23	233-242	2013
Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K	Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems.	Nanotoxicology	7	452-461	2013
Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T	Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells.	J Toxicol Sci.	38	503-511	2013

Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Inomata A, Ogata A, Nakae D	Long-term pulmonary responses to quadweekly intermittent intratracheal spray instillations of magnetite (Fe ₃ O ₄) nanoparticles for 52 weeks in Fischer 344 rats	Journal of Toxicologic Pathology	26	393-403	2013
Nakagawa Y, Suzuki T, Nakajima K, Inomata A, Ogata A, Nakae D	Effects of N-acetyl-L-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes.	Archives of Toxicology	88	115-126	2014
Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M	Magnetic nanoparticles of Fe ₃ O ₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death.	Int. J. Nanomed.	8	3151-3160	2013
Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y	Effects of Fe ₃ O ₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells.	Int J Mol Sci.	14	15546-15560	2013
Ota S, Takahashi Y, Tomitaka A, Yamada T, Kami D, Watanabe M, Takemura Y	Transfection efficiency influenced by aggregation of DNA / polyethylenimine max / magnetic nanoparticle complexes.	J. Nanopart. Res.	15	1653-1664	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷