

図 11. プロモータ試験：肺の肉眼像.

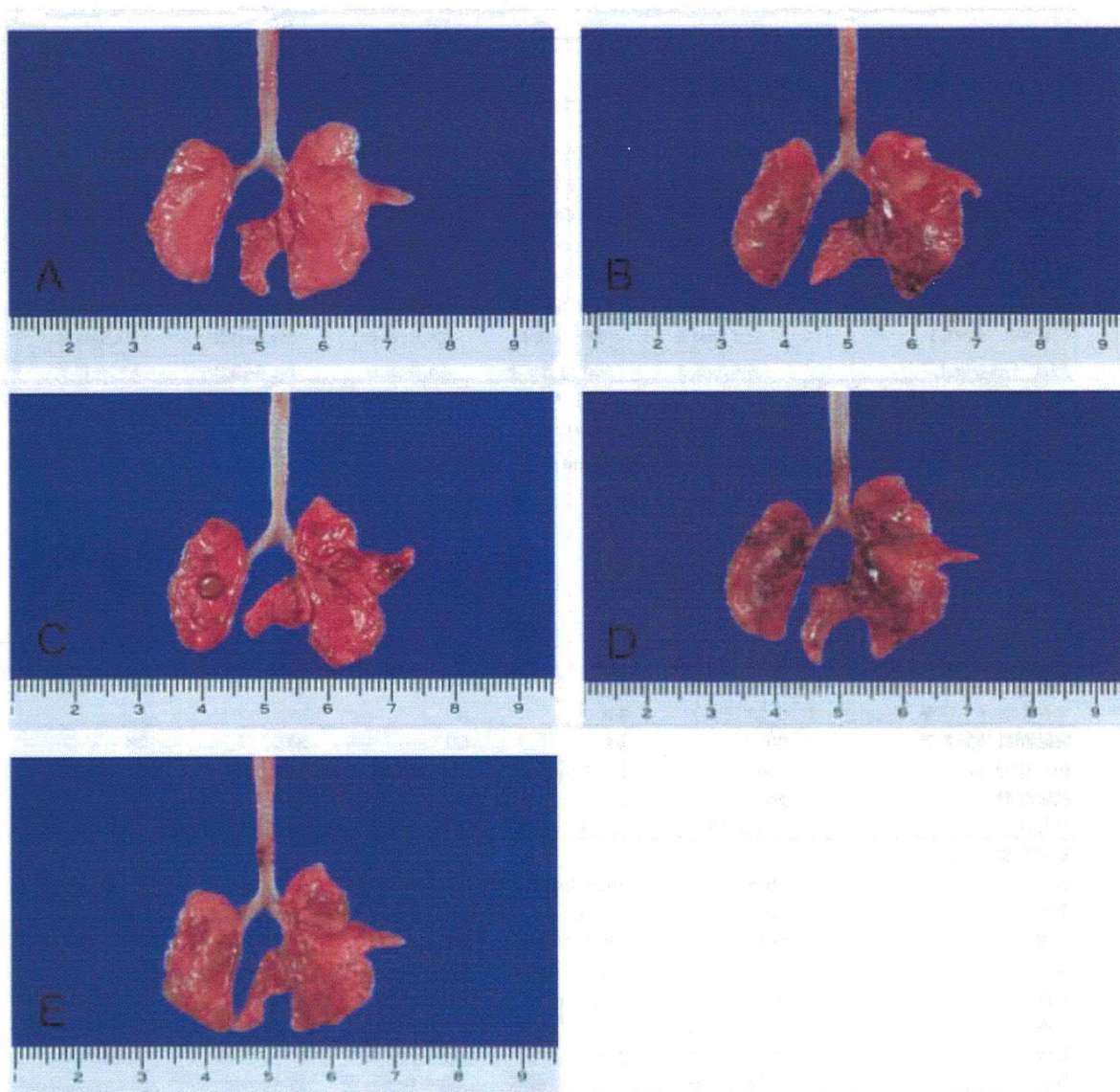


図 12.プロモータ試験：肺の結節数（平均値±標準偏差，A，結節< 3 mm；B，結節≥3 mm）.

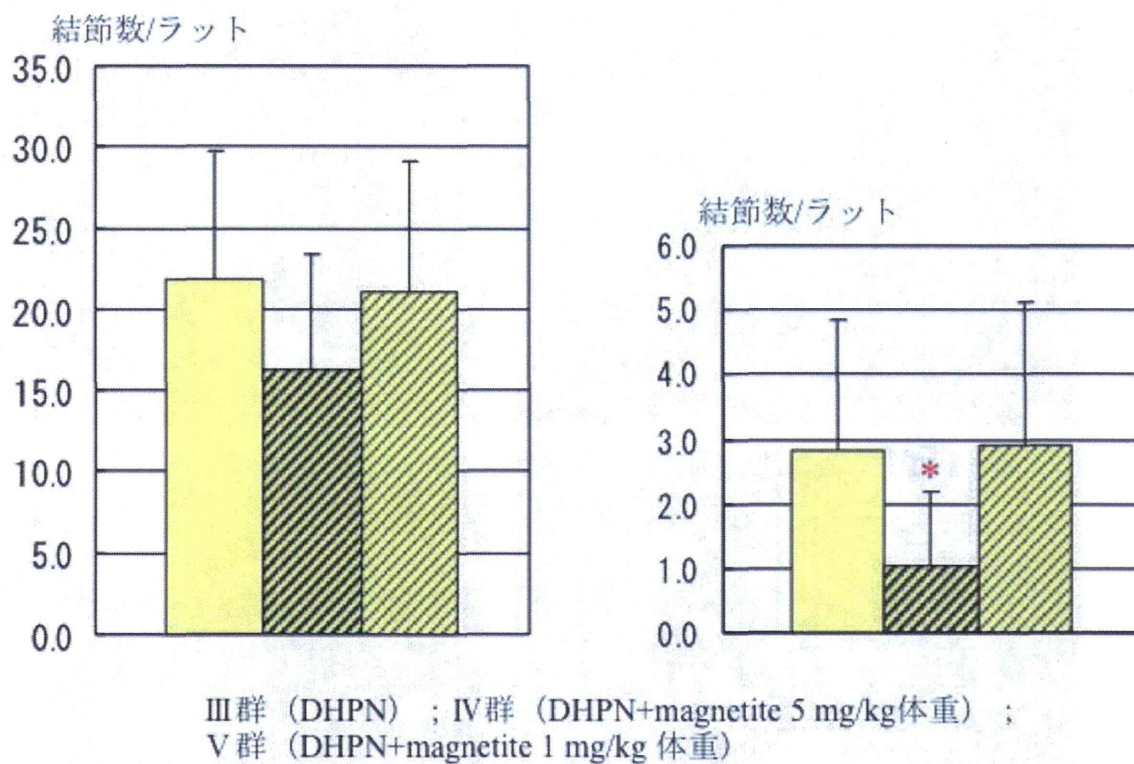


図 13. プロモータ試験：肺の病理組織像.

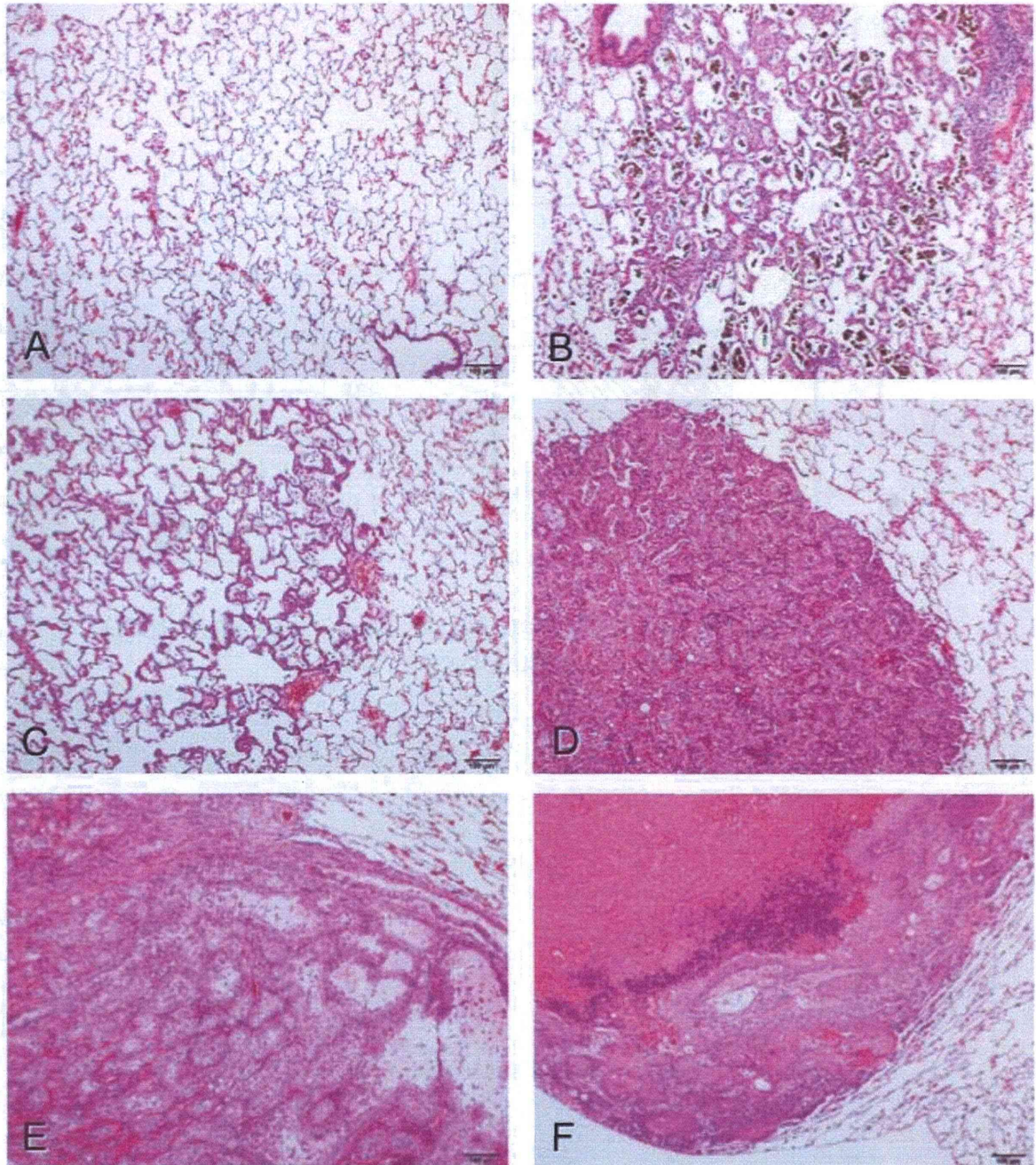


表 7. プロモータ試験：肺の増殖性病変の出現率及び出現数

群	I	II	III	IV	V
DHPN (%)	0	0	0.1	0.1	0.1
マグネタイト用量 (mg/kg 体重) (対照群)	0	5.0	0	5.0	1.0
試験匹数	20	19	18	19	18
肺胞上皮過形成					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (100%)	19 (100%)	18 (100%)
出現数 (数/ラット)	0	0	34.11 ± 7.14 ^a	39.95 ± 7.90	33.50 ± 6.91
腺腫					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (55.6%)	5 (26.3%)	9 (50.0%)
出現数 (数/ラット)	0	0	1.11 ± 1.13	0.47 ± 0.91	0.75 ± 0.97
腺癌					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (16.7%)	2 (10.5%)	4 (22.2%)
出現数 (数/ラット)	0	0	0.28 ± 0.75	0.11 ± 0.32	0.25 ± 0.55
総腫瘍 ^b					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (66.7%)	7 (36.8%)	11 (61.1%)
出現数 (数/ラット)	0	0	1.39 ± 1.20	0.58 ± 0.90 ^a	1.06 ± 1.06

^a腺腫+腺癌.

^b数値は平均値±標準偏差.

* III群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Dunnet's test) .

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

[目的]遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾をテーマに、細胞株を利用した *in vitro* 系での磁性体ナノ粒子の細胞毒性および遺伝毒性の解析する事を行ってきた。具体的には、(1)修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞・遺伝毒性の評価、(2)磁性体ナノ粒子の溶媒中における2次粒子径の評価を行った。[方法] アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145、PC-3、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP、ヒト肺癌細胞株 A549 を使用した。修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の培養液中の粒径分布の確認、同粒子の曝露した細胞における 8-OHdG 生成の定量、細胞生存率、活性酸素種(ROS)の測定、細胞周期、アポトーシス等の解析を行った。磁性体ナノ粒子の表面修飾はカルボキシル基修飾およびポリエチレンイミン(PEI)修飾を利用した。[結果] 非修飾磁性体ナノ粒子の曝露濃度依存的に 8-OHdG 生成の増加、ROS 産生の増加、細胞生存率の低下、apoptosis の誘導が認められた。しかし、曝露される細胞の種類によりその程度は異なる、すなわち細胞特異性があると考えられた。これらの結果はその細胞の抗酸化能、修復能が重要な役割を演じていると推察された。一方、非修飾磁性体ナノ粒子に比べ、カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子の曝露では、8-OHdG 生成の増加、ROS 産生の増加、細胞生存率の低下は軽減した。表面修飾も細胞への影響の重要な因子である事が判明した。一方、ポリエチレンイミン(PEI)修飾はカルボキシル基修飾と異なる結果を得た。総じて、修飾により磁性体ナノ粒子曝露による 8-OHdG 生成の増加、ROS 産生の増加、細胞生存率の低下は軽減化されるも、高濃度曝露ではその細胞毒性・遺伝毒性は認められた。表面修飾を行った磁性体ナノ粒子の溶媒（培養液、PBS、蒸留水）における分散能を検討したところ、表面修飾により分散能の安定性が高まる場合もあるが、溶媒、とくにウシ胎児血清等の成分に影響される事が認められた。

A. 研究目的

本研究分担者は、分担研究“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”のテーマをもとに、細胞株を利用した *in vitro* 系でのナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析およびその毒性発現機構の解明を目指し、またナノ粒子の表面修飾により細胞毒性・遺伝毒性への影響を評価してきた。分担研究は主として、(1)修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞・

遺伝毒性の評価、(2)異なる細胞種における磁性体ナノ粒子の細胞毒性の評価、(3)磁性体ナノ粒子の溶媒中における2次粒子径の評価を行った。これらの結果を用いる事により、毒性低減化を目指したナノ粒子の利用が目指すことができると考えられる。

B. 研究方法

1)使用細胞株と細胞培養について

アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145、PC-3、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP、ヒト肺癌細胞株 A549 を使用した。これら 4 細胞株は ATCC (American Type Culture Collection)より入手した。DU145、PC-3、LNCaP は RPMI 1640 培養液(10 %FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有)、A549 は F-12 Nutrient Mixture 培養液(10 %FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有)を用いて 37 °C、CO₂ 濃度 5 %加湿インキュベーターで培養した。

2)修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)について

対象とする磁性体ナノ粒子は Fe₃O₄(マグネタイト)で構成され、その一次粒径は約 10 nm である。Fe₃O₄ は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は γ -Fe₂O₃ 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。

同磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)は戸田工業株式会社より購入し、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ 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、磁性体ナノ粒子の凝集を取り除き使用した。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。また、カルボキシル基表面修飾磁性体ナノ粒子も同様に戸田工業から購入した。また、Sigma から購入した磁性体ナノ粒子に Polyethylenimine (PEI)をプロトコールに従い表面修飾を行い、利用した。

3) 8-OH-dG の定量化

遺伝毒性の評価の一つとして、8-OH-dG 生成がある。

細胞株を control(0 μ g/ml)、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/ml の各濃度で 72 時間磁性

体ナノ粒子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、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 °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で行われた。

4) 細胞生存率の測定

生細胞の細胞数の変化を測定するために本実験においては 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、色調の変化を示し、動物細胞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ことより、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 μ l/well ずつ添加した。37 °C、5 %CO₂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 Fe₃O₄ NPs の影響を考慮し、ALAMER BLUE 溶液の上澄みを 450 μ 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。抗酸化剤を用いた時の細胞の生存率を測定する場合は、磁性体ナノ粒子を曝露する 3 時間前に 10 mM の抗酸化剤の N-acetylcysteine (NAC)を添加した。

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

5- (and 6) -chloromethyl-2', 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate、acetyl ester CM-H₂DCFDA (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-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。

6) 細胞周期の解析

Flow cytometry (FCM)で DNA 量を測定する際、最も高頻度で使用される色素が 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、100 mm 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、磁性体ナノ粒子曝露を行った。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磁性体ナノ粒子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

本実験では、APOPercentage (APOPercentage Apoptosis Assay Kit、Biocolor 社)を用いた。

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、Fe₃O₄ 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)修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞・遺伝毒性の評価、(2)磁性体ナノ粒子の溶媒中における2次粒子径の評価の結果を簡単に示す。

(1)前立腺癌細胞株および肺癌細胞株における修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞・遺伝毒性の評価

(1-1) Fe_3O_4 NPs の培養液中の粒径分布

本研究で使用した磁性体ナノ粒子の1次粒子径のサイズは10 nmで、培養液中では200 nm前後(183.5 ± 26.2)であった。また、カルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子は100 nm前後(102.2 ± 32.0)になり、生体の組織液にも例えられる培養液中で、表面修飾が粒径分布に影響を与える事を確認した。

(1-2)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磁性体ナ

ノ粒子曝露1 $\mu\text{g/ml}$ から8-OHdGの生成を有意に認めるが、肺癌細胞株A549では磁性体ナノ粒子曝露10 $\mu\text{g/ml}$ で有意に増加した。前立腺癌細胞株は磁性体ナノ粒子曝露により有意に8-OHdGを生成する事を確認した。また、表面修飾する事により、DU145において8-OHdG生成を抑制する事を認めた。

(1-3)ROS生成の測定

A549細胞および前立腺癌細胞株DU145においても、10 $\mu\text{g/ml}$ 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。これらの結果より、磁性体ナノ粒子は細胞内にROS産生を誘導する事が確認された。表面修飾する事により、DU145において抑制する事を認めた。

(1-4)細胞生存率

前立腺癌細胞株DU145において(図6)、磁性体ナノ粒子の曝露量が増えるに従い、細胞生存率は低下し、100 $\mu\text{g/ml}$ 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。修飾された磁性体ナノ粒子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、非修飾磁性体ナノ粒子曝露時より減少の程度は小さい事を認めた。

(1-5)細胞周期およびapoptosisの解析

前立腺癌細胞株DU145に磁性体ナノ粒子を曝露し24時間後に、細胞周期の解析を行った。100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露の場合に、subG1期の細胞が増加している事が認められた。一方、APOPercentageでは、apoptosisが増加している事が認められた。磁性体ナノ粒子100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露の場合、apoptosisが誘導されている事が確認された。

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。

表面修飾の無い磁性体ナノ粒子は濃度依存的に 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。その要因として、細胞の抗酸化能、修復能が重要な因子と考えられる。また、表面修飾する事により、粒径分散のみならず、細胞毒性も制御できる可能性を認めた。

(2) 磁性体ナノ粒子の溶媒中における 2 次粒子径の評価

ナノ粒子の溶媒への分散はその表面修飾に大きく依存する。非修飾・カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子の 1 次粒子径のサイズは 10 nm である。磁性体ナノ粒子はウシ胎児血清を含む培養液中では凝集し、その 2 次粒子径は 200 nm 前後となり、磁性体ナノ粒子の濃度を上げる事により分散能は低下した。一方、ウシ胎児血清を含まない培養液においては、同粒子が濃度依存的に凝集する傾向が認められるが、その 2 次粒子径はウシ胎児血清の含まない培養液の場合に比べて、さらに大きくなる事を認めた。既に報告されているが、表面修飾のない磁性体ナノ粒子では、その分散能は濃度及び溶媒（ウシ胎児血清）に依存していることが判明した。ウシ胎児血清が存在する場合、タンパク質-F 磁性体ナノ粒子の相互作用により、逆に凝集に対して安定性をもたらされると考える。

カルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子は濃度依存的に凝集することはなく、2 次粒子径は 100 nm 前後であり、安定に分散されている事が認められた。加えて、ウシ胎児血清の含有に影響される事無く、安

定した分散が保たれている事も認められた。総体的に、表面修飾の有無、生体の組織液にも例えられる培養液中のウシ胎児血清の有無が磁性体ナノ粒子の分散に影響を与える事を確認した。

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).
- 6) 渡邊昌俊、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、栗岡大輔。前

- 立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果. 日本磁気学会第187回研究会資料, 7-11, (2012).
- 7) 栗岡大輔, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大樹, 渡邊昌俊. 前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果. 化学工業, 64(3), 67-73, (2013).
- 8) 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).
- 9) 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)
- 10) 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).
- 11) 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).
- (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、4.28-30 2011.
- (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、4.28-30 2011.
- (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、10.3-5 2011.
- (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、10.3-5 2011.
- (8) 土屋直人, 栗岡大輔, 緒方広子, 渡邊

2. 学会発表

昌俊、中釜齊. 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、10.3-5 2011.

(9) 加藤竜也、戸塚ゆ加里、石野孔祐、渡邊昌俊、若林敬二、中釜齊. 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、10.3-5 2011.

(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、10.3-5 2011.

(11) 渡邊昌俊、白石泰三. O-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、11.17-20 2011.

(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、9.14-16 2011.

(13) A. Sato, D. Kurioka, H. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota, M. Watanabe. Synergistic effect of magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells *in vitro*. No.784 AACR Chicago, IL., March 31-April 4, 2012,

(14) Y. Hamanaka, T. Nittami, T. Takezawa, M. Watanabe. Application of a culture model utilizing substrata made of tissue/organ sections for histopathology in cancer behavior diagnosis. No.26 A Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay. Tokyo, Japan, Dec. 10, 2012.

(15) T. Nittami, L. Speirs, J. Tucci, M. Watanabe, R.J. Seviour. False positive identification due to FISH probe hybridization to sites with single base deletions may overestimate the abundance of some

filamentous Bacterial morphotypes, including those belonging to the candidate division TM7. The 14th International symposium on Microbial Ecology (ISME14), Copenhagen, Denmark, Aug.19-24, 2012.

(16) 渡邊昌俊. 肝臓組織切片共培養における前立腺癌細胞 DU145 の挙動. 2-G-6 第 101 回日本病理学会総会、京王プラザ、4.26-28 2012.

(17) 渡邊昌俊、広川佳史、白石泰三. ヒト前立腺癌細胞における *plk2* 遺伝子の機能について. P1-PM-99 第 101 回日本病理学会総会、京王プラザ、4.26-28 2012.

(18) 上大介、高橋慎、豊田雅士、関澤隆一、松原弘明、渡邊昌俊、梅澤明弘、五條理志. : iPS 細胞の早期・効率的取得を目指したキャピラリー等電点電気泳動. 10264 第 11 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、6.12-14 2012.

(19) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊. 組織切片を利用した培養システムのがん研究への応用. 10264 第 31 回分子病理学研究会-恵那シンポジウム-、恵那峡グランドホテル、7.21-22 2012.

(20) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊. 組織切片基質での培養系における前立腺癌細胞の挙動について J-1056 第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌他、9.19-21 2012.

(21) 佐藤明子、諸橋彩香、岩崎有由美、石黒齊、植村博司、窪田吉信、渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子は前立腺癌に対するドセタキセルの効果を増強する. J-1125 第 71 回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌他、9.19-21 2012.

(22) 岡本大樹、深井瑛美、岩崎有由美、佐藤明子、白石泰三、河井伊一明、葛西宏、石黒齊、渡邊昌俊. J-1124 前立腺癌におけるカルボキシル基就職磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果. J-1124 第 71 回日

本癌学会学術総会、ロイトン札幌他、9.19-21 2012.

(23) 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, 渡辺昌俊. 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71回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌他、9.19-21 2012.

(24) 讚良茂浩, 菅原健太郎, 石黒斉, 白石泰三, 高木陽光, 古林直人, 渡辺昌俊. J-2143 前立腺がんの抗癌剤抵抗性への Plk2 遺伝子の関与について. J-2143 第71回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌他、9.19-21 2012.

(25) 工藤祐子, 原田博美, 藤森浩彰, 小泉史明, 田村研治, 渡辺昌俊, 益谷美都子. Dot-blot 法による薬力学的マーカーとしての PARP 活性測定系の基礎的検討. J-2403 第71回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌他、9.19-21 2012.

(26) 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. 潰瘍性大腸炎高齢発症例と NQO1 遺伝子多型との関連. 第51回日本消化器病学会大会、神戸国際会議場他、10.10-13 2012.

(27) 渡邊昌俊, 中野洋, 白石泰三. 病理組織片を用いた細胞培養法の応用. O-276 第59回日本臨床検査医学会学術集会、国立京都国際会館、11.29-12.2 2012.

(28) 栗岡大輔, 渡邊昌俊, 横田淳, 中釜斉, 土屋直人. p53 変異大腸がん細胞における NEK9 抑制を介した miR-22 増殖抑制機構. 2P-0289 第35回日本分子生物学年会、福岡国際会議場他、12.11-14 2012.

(29) 西田百代, 藤原優子, 渡邊昌俊, 横田淳, 中釜斉, 土屋直人. miR-101 による p53 経路

の選択的活性化機構. 2P-0292 第35回日本分子生物学年会、福岡国際会議場他、12.11-14、2012.

(30) 渡邊昌俊, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大機, 栗岡大輔. 前立腺がん化学療法に置ける磁性体ナノ粒子の効果. 日本磁気学会第187回研究会、中央大学駿河台記念館 H.24.12.7.

(31) 濱中弘, 岡本愛, 渡邊昌俊, 竹澤俊明. コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に再構築したヒト血管内皮組織シートのバリア機能. 29P2-am115 日本薬学会第133年会、パシフィコ横浜、3.27-30 2013.

(32) 工藤祐子, 原田博美, 藤森浩彰, 渡邊昌俊, 益谷美都子. 生体試料におけるヒト血管内皮組織シートのバリア機能. 29P2-am115 日本薬学会第133年会、パシフィコ横浜、3.27-30、2013.

(33) 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.

(34) 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.

(35) M. Watanabe, Y. Endo, D. Kurioka, A. Sato, A. Iwasaki, D. Okamoto, N. Watanabe. Nanomedicine in prostate cancer therapy (Invited), in the Symposia entitled "Genomics & Proteomics", 101st Indian Science Congress, Jammu, India, Feb.3-7, 2014.

(36) 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.
- (37)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.
- (38)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.
- (39) 佐藤明子, 堀恭樹, 森田駿, 菅原健太郎, 讚良茂浩, 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.
- (40) 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.
- (41)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との併用効果. E-1082 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、10.3-5 2013.
- (42) 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.
- (43) 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.
- (44) 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.
- (45)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.
- (46) 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 plk2 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.
- (47) 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.
- (48)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.
- (49) 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 回日本分子生物学会年會 12.3-6, 2013, 神戸.
- (50) 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 回日本分子生物学会年會、神戸、12.3-6 2013.

(51) 上大介, 木谷友哉, 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

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	Medimon d S.r.l.	Bolobna	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	Medimon d S.r.l.	Bolobna	2012	87-90
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、中島晴信、吉田仁、大嶋智子、大野浩之、上村仁、塩田寛子、菊地洋子、松岡厚子、西村哲治	有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるトリフェニル錫（TPT）及びトリブチル錫（TBT）の試験法改定に係わる検討	薬学雑誌	132	1197-1208	2012

Kawakami T, Isama K, Nishimura T	Survey of primary aromatic amines originating from azo dyes in commercial textile products in direct contact with skin and in commercial leather products in Japan	J. Environ. Chem.	22	197-204	2012
Kawakami T, Isama K, Nishimura T	Analysis of isothiazolinones and other preservatives in gel-products used for cooling in Japan	J. Environ. Chem.	22	205-211	2012
大嶋智子、河上強志、山野哲夫、尾崎麻子、清水充、伊佐間和郎	有害物質含有家庭用品規制法のトリフェニル錫 (TPT) およびトリブチル錫 (TBT) 分析法改定過程において観察された TPT の分解について	大阪市立環科研報告	74	17-22	2012
河上強志、伊佐間和郎、松岡厚子、西村哲治	防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎	J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.	6	339-350	2012
河上強志	フラーレンが植物による土壌中の疎水性化合物の吸収を促進させる？	ファルマシア	49	252	2013
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

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
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		
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
Xu M, Li J, Fujita D, Su H, Chen H, Hanagata N	Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interaction.	Scientific Reports	2	406	2012
Xu L, Li X, Takemura T, Hanagata N, Wu G, Chou LL	Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel.	Journal of Nanotechnology	10	16	2012
Zhuang F, Hanagata N	Synergic toxicity of solid particles and released zinc from zinc oxide nanoparticles to human lung epithelial cells.	Nano Biomedicine	4	85-97	2012
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 nanomaterials 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
伊佐間和郎、河上強志、西村哲治	乳幼児が誤飲する可能性のある金属製アクセサリからの有害 8 元素の溶出	薬学雑誌	132	959-968	2012
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		

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
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
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.	Journal of Toxicological Sciences	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.	Journal of Toxicological Sciences	37	177-189	2012
Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H	Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats.	Cancer Science	103	2045-2050	2012