

体内動態を考慮する新たな毒性評価系の開発

小森喜久夫,^a 名田 順,^a 宮島翔太郎,^a 小野芳朗,^b 立間 徹,^a 酒井康行^{*,a,c}

Development of New Cytotoxicity Testing Systems that Include Toxicokinetic Processes

Kikuo KOMORI,^a Jun NADA,^a Shotaro MIYAJIMA,^a Yoshiro ONO,^b
Tetsu TATSUMA,^a and Yasuyuki SAKAI^{*,a,c}^aInstitute of Industrial Science, University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, Japan,^bFaculty of Environmental Science and Technology, University of Okayama, 3-1-1 Tsushimanaka,Okayama City 700-8530, Japan, and ^cCenter for Disease Biology and Integrative Medicine,
University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

(Received August 1, 2007)

Conventional *in vitro* cytotoxicity tests usually do not include toxicokinetic processes that affect final toxicity in the entire body. To overcome this limitation, we have been developing several types of new toxicity test systems and applying them to evaluate hazardous chemicals or environmental samples. In this review, we described two of these new systems; one is a batch-type gas exposure system based on air-liquid interface culture of lung epithelial cells, and the other is a simple double-layered coculture system incorporating permeation and biotransformation processes occurring in the small intestine. In addition, we introduce our latest approach toward further miniaturization of existing tests, that is, determination of minimum cell number necessary for obtaining physiologically-relevant tissue responses.

Key words—cytotoxicity test; toxicokinetic; inhalation toxicity; oral toxicity; miniaturization

1. はじめに

培養細胞を用いる *in vitro* 毒性評価系は、各種目的のための動物実験代替法として、その一層の利用が期待されている。従来の一層の一般的な *in vitro* 評価系では、マイクロウェルプレートなどに播種された標的細胞に種々の化学種を曝露し、その細胞から得られる応答から毒性を決定する。このような一般的な評価系では、例えば肝での代謝を再現するために、目的に応じて肝ホモジネートを添加するまでは行われることがあるものの、より一般的な動態プロセス—肺や小腸からの吸収率や代謝、臓器間の分配、排泄など—は評価結果に考慮されない。

筆者らは、日々実際に体内に摂取される大気・飲食物からのリスクを簡便かつ迅速に評価することを

想定して、個体での曝露プロセスや体内動態プロセスをできる限り模倣した *in vitro* 評価系を構築し、そこに種々の化学種を曝露したときの応答を観察してきた。本稿では、体外の物質が最初に曝露される肺と小腸に着目して、次の2種類の評価系を開発した。1つは、気液界面培養された肺上皮細胞へのガス状試料の直接曝露による毒性評価系、もう1つは、小腸の吸収及び代謝プロセスを考慮する簡便な二層培養法に基づく評価系である。これらの新規評価系は、既存の培養器を活用したものであり、今後は格段のマイクロ化・ハイスループット化が望まれる。このための基礎検討として、臓器と同様の生理学的な応答を得るために必要な最小の細胞集団（ミニ組織・臓器）の把握に関する研究の結果を紹介する。

2. 肺上皮気液界面培養モデルとガス状物質曝露デバイス

呼吸器官は、ガス交換と同時に、同じく大気中に存在する化学物質に曝露されたり、それを血液中に取り込んだりする。気体状の化学物質の呼吸器官への直接曝露による影響を評価するには、半透膜上に

^a東京大学生産技術研究所（〒153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1）、^b岡山大学環境理工学部環境デザイン工学科（〒700-8530 岡山市津島中 3-1-1）、^c東京大学医学系研究科疾患生命工学センター（〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1）

*e-mail: sakaiyas@iis.u-tokyo.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S45 で発表したものを中心に記述したものである。

培養された肺上皮細胞に、上側から空気を接触させ、下側からのみ培養液を供給する気液界面培養法¹⁾に基づく *in vitro* 肺臓器モデルを用いるのが適している。²⁾ そこで筆者らは、肺気道のモデル細胞であるヒト肺気道がん由来の Calu-3、及び肺胞上皮のモデル細胞であるヒト肺がん由来の A549 を用いて、肺モデルを構築した。また、その肺モデルに、ガス状の化学物質や実環境ガスなどを曝露するための小型バッチ式システムを開発し、その評価を行った。

まず、*in vivo* 様の構造をとる肺モデルを構築するために、市販の半透膜型培養器（カルチャーインサート）に Calu-3 又は A549 を播種し、気液界面培養を行った (Fig. 1(A))。その間、細胞接着に伴うタイトジャンクションを反映する経上皮電気抵抗 (Trans-epithelium electrical resistance; TEER) 値を測定したところ、培養時間に伴ってその値が上昇し、一定になった。最終的に、Calu-3 は重層の膜、A549 は単層の膜が得られた。つまり、用いた 2 種類の細胞はそれぞれの由来部位である気管支と肺胞の構造を反映しているものであった。³⁾ このことから両細胞について、カルチャーインサートの上側を空気と触れる体外側、下側を血液などの体内側とみなすことができると考えられた。また、*in vivo* の肺気道や肺胞上皮は、ミクロにはこれらの組織から分泌されるリン脂質のジパルミトイルフォスファチジルコリンなどの界面活性剤様物質の液層 (約 10 μm) によって被覆されており、このような状況も気液界面培養法にてある程度再現できることが知られている。^{4,5)} 本研究で構築した細胞膜の TEER が最終的に一定値を示したことから、界面活性剤様物質がある程度、分泌されているものと推測される。

次に、実際にガス状物質の毒性評価を行った。気液界面培養法を利用した従来のガス試料の毒性評価法は、ガス等の排出源に組み込まれたフロー系であり、これは排出源のガス評価に特化したものである。⁶⁾ 筆者らは、ガスバッグ等で、ヒトが実際に曝露される大気試料を様々な場所から採取し、多数の試料を簡便に評価する利用法を念頭におき、気液界面培養された Calu-3 及び A549 を設置できる、Fig. 2 のようなガラス製のバッチ式ガス曝露装置を開発した。そのガス曝露装置に、揮発性又は気体のモデル化学物質を曝露したときの細胞生存性試験を行っ

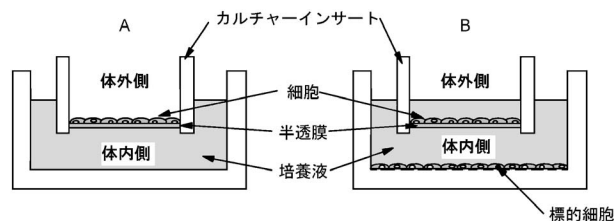


Fig. 1. Schematic Diagram of (A) Air-liquid Interface Culture System Using A549 and (B) Double-layered Coculture System Using Caco-2 and Target Cells

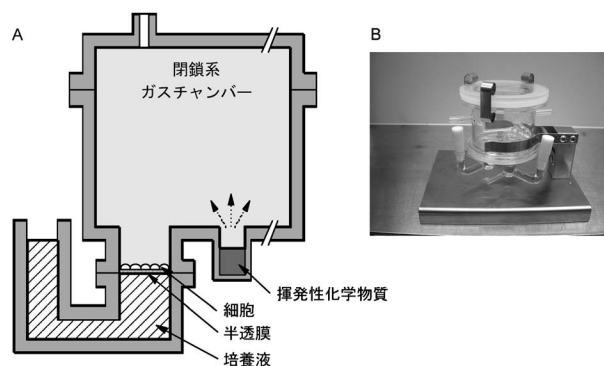


Fig. 2. (A) Image and (B) Photograph of the Gas Exposure System

た。ベンゼンやアセトン、トリクロロエチレンなどの揮発性有機物質を Calu-3 及び A549 に曝露したところ、それぞれの細胞の死滅が観察された。これは、上記の揮発性有機物質によって、細胞膜が破壊されることにより、細胞が壊死したものと推測される。⁷⁾ 上記の揮発性有機物質の Calu-3 と A549 に対する毒性を比較したところ、Calu-3 に比べて、A549 は 10-100 分の 1 の濃度で死滅していた。⁸⁾ このときの濃度は、マウスやラットなどの動物実験での急性毒性発現濃度とほぼ一致していた。このことから、もちろん開発した系では肺上皮のみへの障害しか観測できないが、少なくとも動物を用いる急性の吸入毒性試験の一部に代替できるものと考えている。揮発性の有機物質以外にも、気体の無機物質の毒性も調べた。ここでは、焼却炉等から主に排出される二酸化窒素 (NO_2) や二酸化硫黄 (SO_2)、一酸化炭素 (CO) を用いた。 NO_2 又は SO_2 ガスを A549 細胞が設置されたガス曝露装置に導入したところ、有機性ガスの場合と同様に、ラットでの急性毒性発現濃度とほぼ同等、若しくはそれ以下の値が得られた。これは、揮発性有機物質の場合と同様に、

NO₂ や SO₂ が細胞膜に損傷を与えているものと推測される。一方、CO (3000-100000 ppm) を曝露した場合、細胞はほとんど死滅しなかった。生体での CO に対する毒性の原因は一般的に、血液中のヘモグロビンに CO が結合することに基づく体内の酸素不足によるものであり、*in vitro* 評価系では直接的に細胞に障害を与えないことは妥当であった。いずれにしても、本システムを用いることにより、肺に直接損傷を与えるガスの急性毒性を見積もることは可能であった。

本ガス曝露システムを用いて、実際に人が暮らしている大気環境中の気体（環境ガス）や、最近問題視されているディーゼルエンジンから排出される粒子（Diesel Exhausted Particles; DEP）の毒性を調べた。前者では、建築廃材の焼却ガス、プラスチックゴミの焼却ガス、灯油の燃焼ガス、ガソリン自動車排ガス、国道1号線道路脇ガス、タバコの煙について調べたところ、タバコの煙では中程度の急性毒性が観測されたが、それ以外のガスではごくわずかな毒性が示されたに留まった。⁹⁾ 後者の DEP では、その粒子を気液界面培養された A549 細胞層表面に直接曝露し、48 時間培養したところ、曝露濃度（単位細胞層面積当たりの DEP 質量）の増加に伴って、A549 の死滅が観察された。¹⁰⁻¹²⁾ DEP 表面には一般的に、100 種類以上の有機分子が吸着していることが知られており、その一部は、発がん、¹³⁾ 気管支炎、ぜんそく、アレルギー反応の悪化などの肺のみの直接的悪影響¹⁴⁾のほか、体内に取り込まれたのちに、生殖異常¹⁵⁾などの間接的悪影響を及ぼすことが知られている。DEP 表面からそれら吸着物を有機溶媒で溶出除去したものを同様に曝露した場合は、毒性が検出されなかったことから、ここでは、肺に直接悪影響を及ぼす有機分子が DEP 表面から脱離し、それらが A549 に損傷を与えたものと推測される¹⁶⁾。

上記の検討結果から、開発したガス曝露装置は、肺を標的臓器とするようなガス状物質の急性毒性のための肺モデルとして十分に役立つものと推測される。しかしながら本システムを用いたガスの毒性評価では、細胞の生存率を指標とした場合には、少なくとも 24 時間のガス曝露を必要とする。作業現場の大気環境を調べたり、プラントからの排ガス毒性を把握したのちにその結果をプラントの運転条件に

すぐに活かしたり、といった実際の適用を想定すると、より短時間でガスの毒性を評価できるシステムが望まれる。筆者らは最近、極めて短時間でガス状試料の毒性を評価するために、水系試料の高感度迅速毒性検出法に利用されてきた発光性細菌を用いることで、約 15 分のガス曝露で動物実験の急性毒性発現濃度よりも 1-2 桁ほど、高感度に毒性を検出可能なシステムを開発しつつある。⁹⁾ なお、本システムは哺乳類細胞を用いておらず、本稿の趣旨と異なるため、詳細は割愛させて頂く。

3. 小腸モデルと標的臓器モデルの複合培養系

消化器官は、摂取された食物を消化し、栄養素を吸収する機能を持つ。筆者らは、経口的に体内に取り込まれた物質が、消化器官での吸収過程を経て、体内に及ぼす影響を評価するために、化学物質を直接的に標的細胞に負荷する評価系に、*in vitro* 消化器官モデルを組み込んだ、吸収率を考慮した複合評価系を提案している (Fig. 1(B))¹⁷⁾。本項では、*in vitro* 消化器官モデルによる吸収過程を考慮した複合培養評価系について述べる。

化学物質の吸収透過を、*in vitro* で評価できる消化器官モデルを構築するために、ヒト大腸がん由来細胞 Caco-2 を利用した。この細胞は、新規医薬品の吸収効果を調べるための基礎ツールとして薬学分野で広く利用されている。この細胞を、肺モデルで用いたものと同じカルチャーインサート上で培養すると、比較的均一な細胞層を形成することが知られており、カルチャーインサートの上側を内腔側（体外側）、下側を基底膜側（体内側）とする *in vitro* 小腸モデルとみなすことができる (Fig. 1(B))。*In vivo* 小腸上皮と比較して、形成した Caco-2 膜の細胞間結合は密であるため、親水性化学物質の透過を過小評価するという欠点を持つものの、親油性化学物質の透過はヒト小腸吸収率と相関性が高いことが知られている。¹⁸⁾ まず、Caco-2 層を介した種々の物質透過を 3 日まで検討した。その結果、既に多数報告されているように、化学物質を添加直後の膜透過係数は人体での吸収率と相関し、平衡時の濃度も内腔側と基底膜側は異なったものとなって長時間維持された。この理由は、人体に望ましくない化学物質を内腔側に逆輸送する極性輸送が起こっているためである、と推測される。いずれにしても、ここで決定された *in vitro* 吸収率は、それぞれの化学物質

の *in vivo* ヒト吸収率と良好な関係を示したことから、Caco-2 の下層で標的細胞を培養することで、腸管吸収率の補正を行った曝露が可能であることが明らかとなった。さらに、Caco-2 層の下側から逆方向の物質透過実験の結果と併せて解析すると、¹⁹⁾ どの物質についても Caco-2 の下側（基底膜側）から上側（内腔側）への能動的輸送の存在が示され、膜の上下で濃度差を保ったまま平衡に達する現象が理解できた。¹⁷⁾

次に、基底膜側に標的細胞としてヒト正常 2 倍体線維芽細胞 TIG-1 を設置し、人体の吸収率の異なる数種の化学物質を内腔側から Caco-2 に添加し、TIG-1 への増殖阻害を指標とした毒性評価を行った。Caco-2 と TIG-1 を組み合わせた複合培養系では、小腸での代謝や極性輸送を引き起こさない化学物質の 50% 増殖阻害濃度 ED₅₀ が、TIG-1 単一培養時に比べて、大きく高濃度側にシフトし、その違いの程度は上記の *in vitro* 吸収率の違いを反映していた。¹⁷⁾

一方、ある種の化学物質については、内腔側と基底膜側に分配された化学物質の総量と初期添加量とのマスバランスが取れないという現象が観察された。これは、小腸膜での代謝や極性輸送といった生物学的現象が関与している可能性があった。この点をさらに検討するため、小腸や肝臓のチトクローム P450 1A1/2 (CYP 1A1/2) を中心とする解毒メカニズムによって代謝活性化を受け初めて強い毒性が現れるベンゾ [a] ピレン (BaP) をモデル化学物質として、同様の検討を行った。²⁰⁾ 基底膜側には肝モデル細胞である Hep G2 を設置し、両組織の *in vivo* 高代謝機能を模倣するため、Caco-2 と Hep G2 の両細胞にあらかじめ 3-メチルコラントレンで CYP 1A1/2 を誘導した。このとき、Caco-2 の CYP 1A1/2 による代謝活性は、Hep G2 のものとはほぼ同等であった。内腔側に BaP を添加したところ、BaP のほとんどすべてが Caco-2 膜通過時に代謝され、代謝生成物は内腔側に逆輸送された。すなわち、本複合培養系では、代謝生成物が基底膜側にはほとんど検出されなかったことから、Hep G2 に対する毒性は検出されなかった。このことから、BaP の毒性は小腸膜のバリアー効果のために実際の曝露影響評価と比べて、極めて低くなるものと推察される。最近の *in vivo* 研究においても、小腸膜

障害時を除いて、BaP などの高脂質性の芳香族炭化水素類に対する急性毒性が極めて低いことが示されており、^{21,22)} 本研究結果と符合する。

上述したように、通常マルチウェルプレート培養器にて吸収過程を組み込んだ簡便複合培養評価系は、*in vivo* 毒性評価系に近い応答を得ることが期待される。また本評価系は、実際の小腸膜のバリアー効果を実験的に再現できたことから、*in vivo* 吸収率の不明な化学種や、環境試料や食品などの多種多様な化学種を含むサンプルを、一次スクリーニングできる簡便な評価系としても役立つものと考えられる。

4. マイクロ化の限界は？ —最少必要細胞数の評価—

上述してきた *in vitro* 臓器モデルによる評価系では、既存の培養器を利用してきた。しかしながら、限られた量のサンプルの計測や、貴重かつ生体外での増殖が不可能な細胞を用いることを想定すると、将来はできる限り小型化されたデバイスやシステムの開発が望まれる。臓器に似た生理学的応答を得るデバイスを開発するには、細胞が臓器として機能するための必要な個数をデバイスに組み込む必要がある。近年、デバイスの小型化という観点から、細胞を用いたマイクロ流体デバイスやアレイチップなどの開発が盛んであるものの、それらに組み込む細胞数の具体的な検討が行われていないのが実情である。例えば後者の細胞アレイチップでは、一度に大量の情報を得たいというニーズから研究が進められ、様々な微細加工技術を利用してアレイチップを作製しているものの、²³⁻²⁸⁾ その多くは細胞を単にライン状やドット状にアレイ化したのみである。そこで筆者らは、肝細胞を例に、チップ上に異なる個数の肝細胞集団を形成させ、それぞれの細胞集団の機能を調べることにより、臓器に近い応答が得られるのに必要な最少細胞数を調べている。

まず、異なる細胞数を固定化したアレイチップを作製するために、表面処理技術である光触媒リソグラフィ法²⁹⁻³¹⁾を用いて、基板表面に細胞を接着できる異なる面積の微小領域を構築し、その微小領域に細胞を固定化した。なお、光触媒リソグラフィ法とは、光触媒である酸化チタンにフォトマスクを介して紫外光を照射すると、紫外光の照射された酸化チタン表面からのみ活性酸素種が生成し、その活

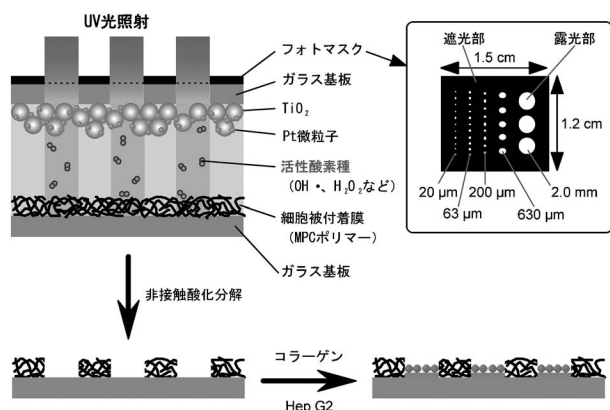


Fig. 3. Experimental Setup for Photocatalytic Lithography Based on Remote Oxidation and Schematic Illustration of Glass Surface Arrayed with Hep G2 Cell

性酸素種が気相を拡散して離れた場所にある有機物や無機物を酸化分解することによって、基板表面をパターニングする技術である (Fig. 3). Figure 3 に示したフォトマスク (大日本印刷提供) を用いて、細胞非付着性の 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマー^{32,33)} がコーティングしてあるガラス基板表面を光触媒リソグラフィー法で処理し、酸化分解された領域にのみコラーゲンを吸着させたのち、表面全体に、3 章の複合評価系でも用いた Hep G2 を播種したところ、フォトマスクと同様の形状に細胞を固定化かつアレイ化できた。このとき、それぞれの微小領域には、細胞が 1 個から約 10000 個、接着していた。

作製したチップを用いて、それぞれの細胞集団の、肝機能の指標となるアルブミン分泌やシトクロム P 450 1A1/2 (CYP 1A1/2) 活性を、種々の免疫染色法や蛍光標識法にて評価した。その結果、Hep G2 が約 1000 個以上の集団を形成したときに、約 100 個以下の集団と比べて、アルブミン分泌量及び CYP 1A1/2 活性の大幅な向上が観察された。またそれらは、約 1000 個以上の細胞集団において、細胞数当たりではほぼ一定値を示した。これは、約 1000 個以上集まった細胞集団では、隣り合う細胞の接着に伴い、共有できる情報伝達物質が高濃度化されたことや、オートクリンに効く Transforming Growth Factor (TGF) などのシグナル伝達物質が局所的に高濃度に維持されたことで、アルブミン分泌や CYP 1A1/2 などの肝機能に起因する転写因子 Hepatocyte Nuclear Factor (HNF-4) の発現が促進

されたものと推測される。インテグリンを介した細胞外マトリックス (ECM) による情報伝達によって、HNF-4 の発現が促進されることも考えられるが、本実験系では、細胞集団を形成する個数に問わず、すべての細胞は ECM の 1 つである type I コラーゲン上で存在しており、細胞から分泌・蓄積された ECM による HNF-4 発現の促進はほとんどないものと推察される。いずれにしても Hep G2 は、少なくとも 1000 個以上で集団形成すると、肝臓に近い機能を発現することが示唆された。この値は、96 ウェルプレートの 1 ウェル当たりの細胞数と比較すると、約 100 分の 1 に相当する。このことは、96 ウェルの 1 ウェルを 1/100 の細胞にしても同様の応答が得られること、それ以下では生理学的応答の取得は望めないことを示している。なお、Hep G2 はがん細胞としての側面を持つことから、それぞれの細胞集団での増殖活性を調べたところ、約 100 個以上の集団を形成したときに、細胞の増殖が活発になることが確認された。この背景には、Conditioned Medium 効果が考えられる。10 個以下の細胞集団が増殖するのに適切な培養液量を用いれば、TGF などによるオートクリン型シグナル伝達により、Hep G2 細胞は増殖することが考えられる。一方 100 個以上の細胞集団では、その細胞集団近傍で TGF などが高濃度に維持されるため、Conditioned Medium 効果に関係なく、細胞増殖が活発になったものと推察される。現在は、ラットの正常肝細胞を用いて、チップ上に細胞数の異なる二次元及び三次元で固定化したときのそれぞれの細胞集団の肝機能評価を行っている。特に、三次元で固定化された場合での必要最少となる細胞数は、二次元のもの比べてやや低くなることが期待される。

このように、少数の細胞をスポット・アレイ化する細胞チップを作製する上では、同様の検討を行い、目的に応じて最少の必要十分な細胞数を決定しておくことが必要であろう。また、細胞アレイチップに限らず、細胞を用いた小型のデバイスを構築する場合、生理学的応答の取得を目標とするならば、それぞれの組織・臓器に応じて、デバイス内に導入組織化する細胞数の検討を行っておく必要のあることが示された。

5. おわりに

ここで紹介した 2 つの評価系、「肺上皮気液界面

培養モデルとガス状物質曝露デバイス」と「小腸モデルと標的臓器モデルの複合培養系」は、化学種によってヒトが実際に曝露される状況を想定しているため、従来の *in vitro* 評価系とは異なり、実際のヒト個体への曝露プロセスや体内動態プロセスを考慮した評価を行えるものと期待される。今まで開発したこれらの評価系は、既存の培養器を用いたものであるため、マイクロ化は試みてこなかった。今後は、「マイクロ化の限界は？」での検討を基に、個体レベルでの動態プロセスを入れ込みながらも、より小型で使い易い評価デバイスを構築するというのが当面の目標になる。そのようなデバイスの究極の姿は、極限までマイクロ化した各臓器モデルを、血液循環を模倣した生理学的灌流回路で結合した「オンチップヒューマン」であろう。これについては、Shuler らのグループの精力的な研究があり、³⁴⁾ 筆者らの研究室でもより簡便なタイプのデバイスの開発に着手している。³⁵⁾

謝辞 本稿で紹介した研究の一部は、文部科学省主要5分野リーディングプロジェクト「一般・産業廃棄物・バイオマスの複合処理・再資源化」及び「個体・ガス状試料の安全性評価システムの開発」の援助により行われたものである。ここに深く御礼申し上げる。

REFERENCES

- 1) Voisin C., Aerts C., Tonnel A. B., Houdret J. L., Ramon P., *Pathol. Biol.*, **23**, 453-459 (1975).
- 2) Furuyama A., Mochitate K., *J. Cell Sci.*, **113**, 859-868 (2000).
- 3) Sakai Y., Tomita K., Suzuki M., Ono Y., Sakoda A., *AATEX*, **11**, 59-67 (2005).
- 4) Wright J. R., Wager R. E., Hawgood S., Dobbs L., Clements J. A., *J. Biol. Chem.*, **262**, 2888-2894 (1987).
- 5) Shen B. Q., Finkbeiner W. E., Wine J. J., Mrsny R. J., Widdicombe J. H., *Am. J. Physiol.*, **266**, L493-L501 (1994).
- 6) Knebel J. W., Ritter D., Aufderheide M., *Toxicol. in Vitro*, **16**, 185-192 (2002).
- 7) Fujita S., “Dokuseigaku—Seitai, Kankyo, Seitaikei—,” Asakura Publishing Co. Ltd., 1999 (Japanese text).
- 8) Takamura R., Sakai Y., *PETROTECH*, **28**, 322-326 (2005) (Japanese text).
- 9) Komori K., Murai K., Fujii T., Ono Y., Sakai Y., *Seisan Kenkyu*, **59**, 89-92 (2007) (Japanese text).
- 10) Shimizu K., Tomita K., Tsuru T., Sakai Y., Sakoda A., *Kankyo Kagakukaishi*, **15**, 425-431 (2002) (Japanese text).
- 11) Shimizu K., Tomita K., Sakai Y., Sakoda A., *Biosci. Bioind.*, **61**, 39-40 (2003) (Japanese text).
- 12) Shimizu K., Endo O., Goto S., Sakoda A., Ono Y., Sakai Y., *Biochem. Eng. J.*, **22**, 1-9 (2004).
- 13) Verheyen G. R., Nuijten J.-M., Hummelen P. V., Schoeters G. R., *Toxicol. in Vitro*, **18**, 377 (2004).
- 14) Siegel P. D., Saxena R. K., Saxena Q. B., Ma J. K. H., Ma J. Y. C., Yin X.-J., Castranova V., Al-Humadi N., Lewis D. M., *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **67**, 221-231 (2004).
- 15) Yoshida S., Sagai M., Oshio S., Umeda T., Ihara T., Sugamata M., Sugawara I., Takeda K., *Int. J. Androl.*, **22**, 307-315 (1999).
- 16) Ichinose T., Furuyama A., Sagai M., *Toxicology*, **99**, 153-167 (1995).
- 17) Sakai Y., Arai T., Sakoda A., Suzuki M., *AATEX*, **7**, 47-58 (2001).
- 18) Autursson P., Karlsson J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 880-885 (1991).
- 19) Gan L. S., Moseley M. A., Khosla B., Augstijns P. F., Bradshaw T. P., Hendren R. W., Thakker D. R., *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 344-349 (1996).
- 20) Choi S.-H., Nishikawa M., Sakoda A., Sakai Y., *Toxicol. in Vitro*, **18**, 393-402 (2004).
- 21) Foth H., Kahl R., Kahl G. F., *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 45-51 (1988).
- 22) Ramesh A., Inyang F., Hood D. B., Archibong A. E., Knuckles M. E., Nyanda A. M., *Exp. Toxicol. Pathol.*, **53**, 275-290 (2001).
- 23) Stenger D. A., Georger J. H., Dulcey C. S., Hickman J. J., Rudolph A. S., Nielsen T. B., McCort S. M., Calvert J. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8435-8442 (1992).
- 24) Kane R. S., Takayama S., Otsuni E., Inger D. E., Whitesides G. M., *Biomaterials*, **20**, 2363-2376 (1999).

- 25) Kaji H., Kanada M., Oyamatsu D., Matsue T., Nishizawa M., *Langmuir*, **20**, 16–19 (2004).
- 26) Nakanishi J., Kikuchi Y., Takarada T., Nakayama H., Yamaguchi K., Maeda M., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16324–16325 (2004).
- 27) Edahiro J., Sumaru K., Tada Y., Ohi K., Takagi T., Kameda M., Shinbo T., Kanamori T., Yoshimi Y., *Biomacromolecules*, **6**, 970–974 (2005).
- 28) Nakamura M., Kobayashi A., Takagi F., Watanabe A., Hiruma Y., Ohuchi K., Iwasaki Y., Horie M., Morita I., Takatani S., *Tissue Eng.*, **11**, 1658–1666 (2005).
- 29) Tatsuma T., Kubo W., Fujishima A., *Langmuir*, **18**, 9632–9634 (2002).
- 30) Kubo W., Tatsuma T., Fujishima A., Kobayashi H., *J. Phys. Chem. B*, **108**, 3004–3009 (2004).
- 31) Kubo W., Tatsuma T., *J. Mater. Chem.*, **15**, 3104–3108 (2005).
- 32) Ishihara K., Oshida H., Endo Y., Ueda T., Watanabe A., Nakabayashi N., *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 1543–1552 (1992).
- 33) Ishihara K., Nomura H., Mihara T., Kurita K., Iwasaki Y., Nakabayashi N., *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 323–330 (1998).
- 34) Shuler M. L., Ghanem A., Quick D., Wong M. C., Miller P., *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 45–60 (1996).
- 35) Nakayama H., Kimura H., Komori K., Fujii T., Sakai Y., *J. Robotics Mech.* (in press).