

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における
有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究 (20KD1003)

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内木 綾

令和5(2023)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書	
ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 <i>in vitro</i> 予測手法の開発	1
内木 綾	
II. 研究分担報告書	
1. カーボンナノチューブの肺・胸膜有害性の比較と有害性指標の検索	
内木 綾	11
2. 次世代シーケンサー (NGS) によるゲノム変異解析	
戸塚 ゆ加里	17
3. カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーによる肺内酸化ストレス解析	
梯 アンナ	23
4. 経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法によるカーボンナノチューブ有害性の解析	
津田 洋幸	30
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33

研究課題名：ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における
有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

ナノサイズの金属・カーボン・有機物粒子・繊維状物質は非常に安定であり、吸入されると組織・細胞に長期間沈着する。従来の化学物質が、物質自体の代謝変換によって障害や発がんを誘発するのとは異なり、ナノマテリアルの障害性及び発がん性には、不可逆的な蓄積とそれに対する慢性的な炎症や異物反応が関与する。申請者らはこれまでに、吸入暴露試験で発がん性を認めたMWCNT-7を含めた複数のカーボンナノチューブ(CNT)について、経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)を用いた肺および中皮発がん性の検出に成功した。本研究では、物性の異なるCNTsをモデル物質として、TIPS投与によるラット肺・胸腔中皮発がん性の有無、および発がん性の程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより求められたCNTのAdverse Outcome Pathway(AOP)を、吸入暴露試験に代替しうるナノマテリアルの健康影響評価試験法の考案に活用することを目的とする。

R2年度には肺発がん陽性対照である多層CNTs(MWCNT-7、MWCNT-N)と、肺発がん性未知のフラーレン(FL)、フラーレンウィスカー(FLW)のTIPS投与による肺腫瘍性病変と酸化的DNA損傷を解析した。MWCNT-7、MWCNT-N投与により肺腺癌が発生する条件において、FLおよびFLWでは肺腫瘍性病変は発生せず、肺発がん性を示さないことと、104週における肺発がん性と酸化的DNA損傷マーカー(8-OHdG)発現が相関することが明らかになった。R3年度からは、TIPS投与によるMWCNT-7、MWCNT-Nと肺発がん性未知の単層CNT(SWCNT)による*in vivo*肺、胸膜有害性・発がん性試験を開始した。これまでに、亜急性(4週)、亜慢性(13週)および慢性(52週)期の剖検が完了し、本年度は52週のサンプルを病理組織学的、生化学的に解析した。また、未知であるCNTによる体細胞変異のパターン(変異シグネチャー)を明らかにするために、ラットCNT誘発中皮腫FFPEサンプル6例について、次世代シーケンサー(NGS)による全ゲノム解析(WGS)を実施した。

その結果、MWCNTs投与により、肺胞上皮および心膜中皮における増殖(Ki67)、DNA損傷(γ H2AX)マーカーの標識率は有意に増加し、SWCNTでは変化を認めなかった。肺胞上皮における8-OHdG形成レベルは、MWCNTsのみで有意に上昇した。肺胞上皮過形成は、MWCNTs投与群で用量相関性に増加し、いずれも高用量群で有意な変化を認めた。肺胞上皮腺腫と腺癌は、MWCNT-Nのみで誘発され、SWCNTはいずれの病変も誘発しなかった。肺におけるKi67、 γ H2AXと8-OHdGの上昇、マクロファージ(M ϕ)活性化による*Ccl*種、*Tnf- α* 、*Il-6*等のサイトカイン、ケモカイン発現の増加はCNT投与後4-52週まで継続し、52週における肺増殖性病変の誘発頻度と相関した。以上より、これらの毒性所見はCNTのAOPのKey Event(KE)と考えられ、発がん機序への関与と発がん性短期予測指標への応用の可能性が示唆された。NMF解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー(Rat_SBS_A, Rat_SBS_B)が同定され、このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。

現在、*in vivo*試験は発がん期(104週)の最終剖検まで完了し、まもなく各CNTによる発がん性の結果が得られる。亜急性、亜慢性期の肺サンプルを用いたRNAシーケンシングデータ解析で、ケモカイン、サイトカインとともに、細胞周期、免疫応答遺伝子の発現上昇を認めており、最終的なCNT発がん性と照合することにより、有害性指標となりえる遺伝子候補が追求できると考える。また、変異シグネチャーに関しては、CNT誘発中皮腫および化学物質誘発肺がんを追加解析しており、CNT特異的な変異シグネチャーが得られる予定であり、発がんメカニズム解明や有害性評価などに有用な情報となると考えられる。

研究分担者

戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部 教授
梯 アンナ 大阪公立大学大学院医学研究科 講師
津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科
特任教授

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に

体内に取り込まれる物質は多い。ナノマテリアルの一種で、炭素原子より構成されるカーボンナノチューブ(CNT)は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応により肺胞上皮や中皮に毒性および発がん性を誘発する。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。OECDでは、CNTを含むナノマテリアルの健康影響評価手法として吸入暴露試験を求めている。しかし、吸入暴露試験施設の稼働には高額な費用を要するため、今

までに1物質(MWCNT-7)が日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)で試験されたのみである。申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)を用いた試験デザインを開発し、4種のMWCNTについて肺と胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにしてきた。

健康影響評価の一つのエンドポイントとして、遺伝毒性は有用な指標となることが知られている。近年、次世代シーケンサー(NGS)によるノンバイアスかつグローバルなゲノム変異解析が進み、環境要因の暴露に固有の体細胞変異のパターン(変異シグネチャー)が存在することが明らかになってきた。さらに、この変異シグネチャー情報を用いることで、化学物質が誘発する毒性のAdverse Outcome Pathway(AOP)を得ることも可能であることが示されている。

本年度は、多層CNTs(MWCNT-7, MWCNT-N)と単層CNT(SWCNT)のTIPS投与後慢性期(52週)における肺と胸膜中皮に対する障害性および発がん性について、酸化的DNA損傷、増殖活性や遺伝子発現変化との関連を解析する。またNGSによりCNT発がんに関与する変異シグネチャーを同定し、CNTの物性(層数、形状や鉄含有量)と照合することにより、発がんに寄与する責任因子を推定することが可能であると考えられる。また、同定した遺伝子変化の情報を用いて、CNTのAOPを構築し、有害性評価指標として応用可能で信頼の高いものを選出することを目標とする。また、TIPS投与後、発がん期に至る以前の亜急性・亜慢性期の非腫瘍部や*in vitro*投与においても検出することが可能なAOPは、*in vitro*試験法を含む短期・簡便な試験法における評価指標に利用できる可能性を含み、それらに言及する成果体を得ることも目指す。

B. 研究方法

(1) *In vivo* 実験: TIPS投与によるCNT負荷試験と有害性の解析(梯、津田、内木)

MWCNT-7、MWCNT-NとSWCNTは、PFポリマー分散液に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12週齢雄性F344ラットに、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ合計投与量が0.1あるいは0.5mg/ラットとなるように8回TIPS投与する。対照群として、無処置(No treatment)およびPFポリマー液投与(対照、vehicle)群を設ける。以後無処置にて、投与終了後4週、13週、52週、および104週に剖検する。4週、13週は高用量のみで、以降の52週および104週は低と高用量を観察する(1CNTにつき77匹設定: 4週(10匹)、13週(7匹)、52週(10匹×2)、104週(20匹×2)。剖検時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取し、遠心分離して炎症細胞やタンパク質(総タンパク、アルブミン)解析に供する(内木・津田)。イソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺する。右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドを気管より注入し、パラフィン包埋を用いて、マクロファージ(Mφ)局在(抗CD68抗体、BIO-RAD)、増殖活性(抗Ki67抗体、Abcam)、アポトーシス(TUNEL、タカラバイオ)やDNA損傷(抗γH2AX抗体、CST)の程度について免疫組織学的に解析する(内木)。また酸化ストレスは、ROSによるDNA損傷により蓄積される8-OHdGを指標として、ブアン固定パラ

フィン包埋肺標本を用いた免疫染色法(抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体、日本老化学研究所)により定量解析をする(梯)。52週以降では、肺及び胸膜中皮の腫瘍性病変についても定量解析する。右肺の一部から1-2mm角の組織片を切り出し、2%グルタルアルデヒドで固定し、透過電子顕微鏡(TEM)によるCNT観察に用いる。左肺は凍結し、RNA抽出(ISOGEN、ニッポンジーン)と定量的RT-PCRにより*Cc1*種、*I1*種や*Tnf-α*等の炎症性サイトカイン発現を定量する(内木)。さらにNGSを用いたRNAシーケンシング(RNA-seq)解析(マクロジェン)に用いる(内木)。CNTにより変化するトランスクリプトームについて、GO解析、パスウェイ解析を行った。

(2) *In vivo* 実験: NGSによるCNT変異シグネチャー解析(戸塚、内木)

MWCNT-7のTIPS投与により雄F344ラット胸膜に発生した、既存の中皮腫サンプルを用いて、MWCNTに由来する変異シグネチャーの同定を試みる。中皮腫のホルマリン固定パラフィン包埋(FPPE)サンプルを薄切片、組織像を確認し、腫瘍領域を選択する(内木)。腫瘍部分を削り取り、ゲノムDNAをtruXTRAC FPPE DNA microTUBE Kit(Covaris)を用いて抽出する(戸塚)。同一個体の非腫瘍部に相当する組織(心あるいは肝)からも同様にゲノムDNAを抽出する。抽出したゲノムDNAを用いて、NGS(NovaSeq)により全ゲノム解析を行い、腫瘍に検出される体細胞変異の解析を行う。得られたデータをNMF(Nonnegative Matrix Factorization; 非負値行列因子分解)にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行う(戸塚)。

本研究では、CNTによる肺発がん機序についての比較対照として、既知の発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine(DHPN)を4,000mg/kg、タバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)を200mg/kgの用量で、1回/週にて4週間(計4回)投与し、雄F344ラット肺に腫瘍を誘発する(津田、内木)。変異シグネチャーの解析方法が確立した後、得られた化学発癌による腫瘍組織と(1)のCNT誘発腫瘍組織を用いて解析する。

(3) *In vitro*実験: Mφ細胞と肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析(内木)

1. Mφ細胞における毒性解析

マウスMφ細胞(RAW264.7)に、(1)で用いたCNTsを投与し(25-100 μg/ml)、48時間培養する。マウスMφ細胞の細胞生存率(WST-1、ロッシュ)、産生される炎症性サイトカイン(定量的RT-PCR)やROS(DCF-DAアッセイ、サーモフィッシャーサイエンティフィック)を定量する(内木)。

2. 肺オルガノイドにおける毒性解析

本研究で用いる肺オルガノイドは、C57BL/6Jマウス肺から採取する。単層の嚢胞状を呈し幹細胞のほか線毛をもつような分化した細胞から構成される。このオルガノイド培養は、マトリゲル(Corning)コート上に、増殖因子含有培地に播種し、さらにマトリゲルを重層化することにより行う。この方法は、肺オルガノイドに対する被験物質の投与に制限をきたす可能性があるため、肺オルガノイドの至適培養条件を検討する(内木)。(3)-1のCNT処理マウスMφ細胞培養上清を、肺オルガノイドに48時間暴露する。細胞生存率

や炎症性サイトカインのmRNA発現解析を行う(内木)。

(倫理面の配慮)

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアあるいはSPFエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え

実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており(医動20-028)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行う。

C. 研究結果

(1) *In vivo* 実験: CNTによる肺・中皮有害性の解析

(1)-1. CNTによる臓器重量の変化

本年度は、CNTのTIPS投与後52週の剖検で得たサンプルの解析を行った。体重および肝、腎、心、脾の重量に群間差は認めなかった。肺重量は、無処置群(1.5±0.4g)と対照群(1.6±0.3g)に有意差は認めなかった。また対照群と比較して、MWCNT-7(低用量群1.4±0.2g、高用量群1.6±0.1g)は差を認めなかったが、MWCNT-N(低用量群1.4±0.1g、高用量群1.9±0.1g、 $P < 0.05$)、SWCNT(低用量群1.4±0.1g、高用量群2.1±0.3g、 $P < 0.001$)でMWCNT-NとSWCNTでは高用量群で有意に増加した。この傾向は、4、13週と同様であった。

(1)-2. CNTのTIPS投与による肺胞Mφ誘導と沈着

52週では4、13週と同様に、CD68免疫染色によりCNT投与による肺胞Mφの誘導が確認され、SWCNT投与群では好中球浸潤を高度に伴っていた。TEM観察において、肺胞MφによるMWCNTsの食食像が確認され、その線維径は、MWCNT-7(76.3±25.2nm)、MWCNT-N(46.6±11.7nm)であり、SWCNTは検出不可であった(図1、参考資料ではSWCNT線維径3nm)。

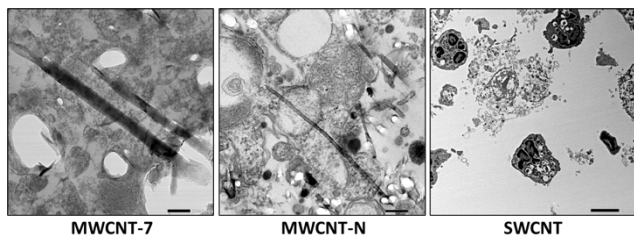


図1. 肺胞MφによるCNTの食食(TEM像)。

(1)-3. CNTによる肺有害性の解析

52週において、増殖活性、DNA損傷と酸化的DNA損傷について定量解析を行った。比較のために4週の結果とともに提示する。肺胞上皮細胞におけるKi67、 γ H2AX標識率と8-OHdG陽性細胞率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群のいずれの用量においても有意に上昇した。一方、SWCNTではいずれの用量においても

明らかな変化は見られなかった(図2-4)。

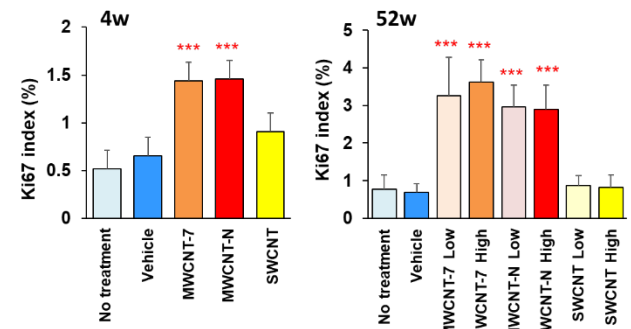


図2. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化(Ki67免疫染色)、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

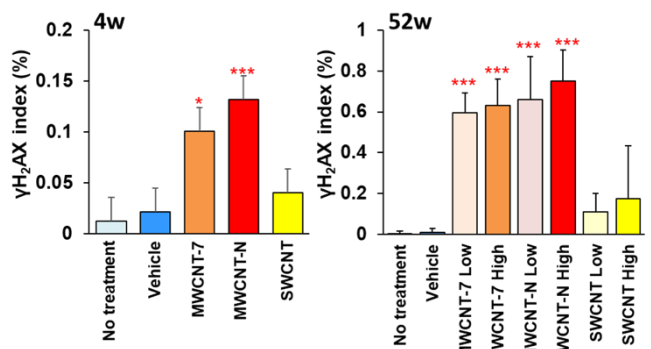


図3. CNT投与による肺胞上皮DNA障害の変化(γ H2AX免疫染色)、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

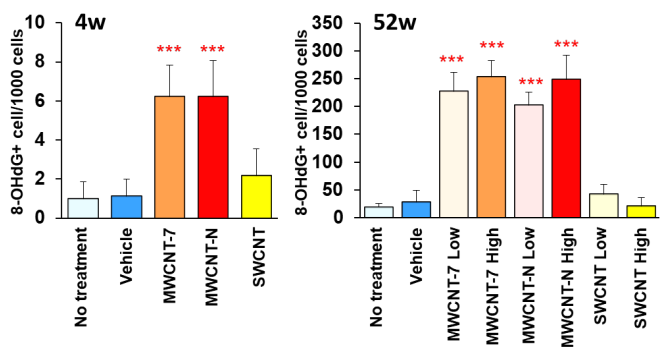


図4. CNT投与による肺胞上皮酸化的DNA損傷の変化(8-OHdG免疫染色)、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

(1)-4. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

52週に採取した胸腔洗浄液や心組織を用いて、胸膜中皮細胞の有害性を解析した。胸腔洗浄液中の総タンパクおよびアルブミン値は、対照群と比較して、MWCNT-7高用量群で上昇し、総タンパクにおいて有意な変化を示した(図5)。心膜中皮細胞におけるKi67標識率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に上昇し、SWCNTでは明らかな変化は見られなかった(図6)。 γ H2AX標識率もMWCNT投与群で上昇傾向を認め、MWCNT-N高用量群で有意な変化を認めた(図7)。

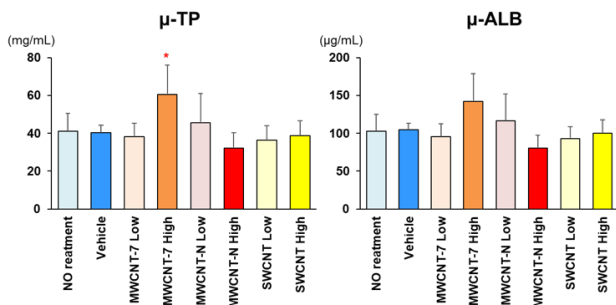


図5. CNT投与による胸腔洗浄液中総タンパクとアルブミン値の変化、*P < 0.05 vs Vehicle.

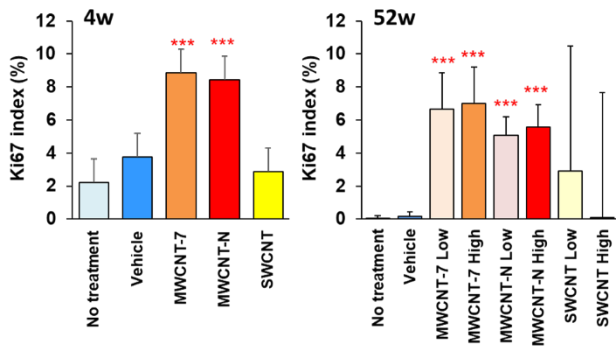


図6. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、***P < 0.001 vs Vehicle.

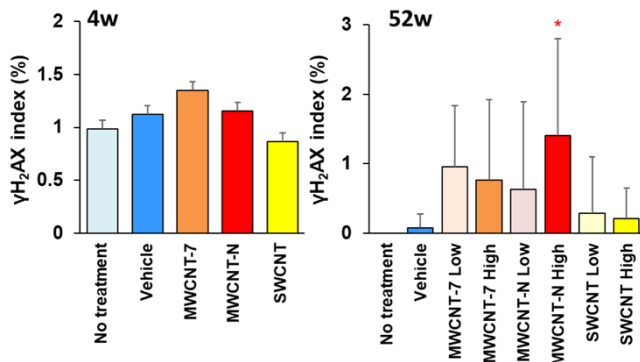


図7. CNT投与による心膜中皮細胞DNA障害の変化 (γH2AX免疫染色)、*P < 0.05 vs Vehicle.

(1)-5. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量

52週における肺胞上皮過形成の発生頻度は、無処置群 (0/10匹)、対照群 (0/10匹)、MWCNT-7低用量群 (1/10匹)、MWCNT-7高用量群 (5/10匹、P<0.01)、MWCNT-N低用量群 (2/10匹)、MWCNT-N高用量群 (6/10匹、P<0.001)、SWCNT低用量群 (0/10匹)、SWCNT高用量群 (0/10匹) で、MWCNT-7とMWCNT-Nの高用量群で有意な上昇を認めた。肺胞上皮腺腫は、MWCNT-Nの低・高用量群にのみ1例ずつ、肺胞上皮腺癌は、MWCNT-N高用量群にのみ1例発生した。

胸膜中皮腫の発生は、MWCNT-7高用量群のみに2例認められた。現在投与後約100週経過しており、52週剖検後の途中衰弱症例や死亡例を解析した結果、MWCNT-7低用量群 (1例)、MWCNT-7高用量群 (18例)、MWCNT-N低用量群 (1例)、MWCNT-N高用量群 (8例) に胸膜中皮腫

が発生し個体の死因となっていた (図8)。最終的な肺および中皮腫瘍発生頻度は、104週の解析結果と合わせて次年度以降に報告する予定である。腫瘍の新鮮検体から、凍結組織を採取しており、今後の遺伝子解析に用いる。

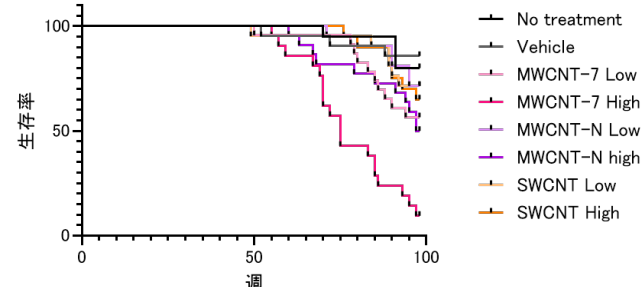


図8. CNT投与による生存率への影響.

(1)-6. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

52週における肺のケモカインおよびサイトカインmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した (図9)。CNTs投与による遺伝子発現の増加傾向は見られたが、MWCNT-7による有意な変化は*Ccl19*のみで認めた。一方、MWCNT-7よりも肺発がん感受性の高いと考えられるMWCNT-Nは、*Ccl13*、*Ccl19*、*Tnf-α*および*Il-6*で認めた。SWCNTでは*Ccl12*、*Ccl13*で有意に上昇し、*Ccl19*発現は変化しなかった。

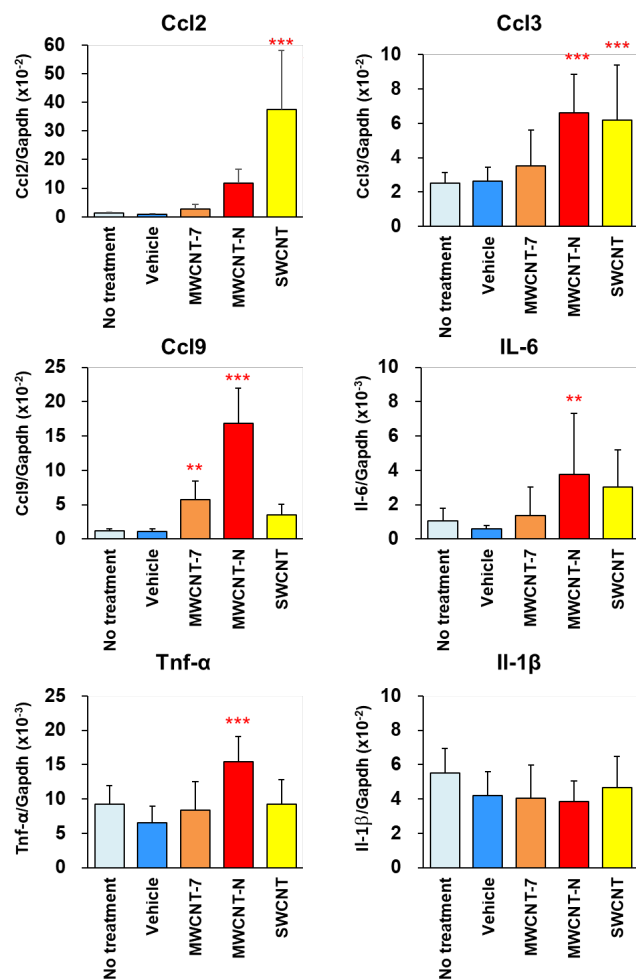


図9. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、52週 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs

Vehicle.

(1)-7. 肺における遺伝子発現解析

TIPS投与後4週の肺凍結サンプルを用いたRNA-seq解析により、CNTにより変動する遺伝子群を解析した。その結果、対照群と比較してMWCNTsで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を586個、低下する遺伝子を150個得た。有意な変化が見られるパスウェイとして、Mφ由来のケモカイン、サイトカイン遺伝子、細胞周期関連遺伝子群が検出された。またIPAを用いてシグナルパスウェイ解析を行った結果、MWCNT-7およびMWCNT-N投与群のみにおいて、窒素および酸化ラジカルの産生、p38MAPKシグナルやRacシグナルの活性化が予測された一方、SWCNT投与群ではMφによるフリーラジカルの誘導およびp38/Rac1の活性化が認められなかった。また、SWCNT投与群ではオートファジーの活性化が予測された。

(2) *In vivo* 実験：NGSによるCNT誘発中皮腫の全ゲノム解析

R2年度に検索に用いたホルマリン固定MWCNTs誘発肺腫瘍組織からは良質のゲノムDNAが得られず、NGS解析が不能であった。ホルマリン固定時間の長さがゲノムDNAの質に影響すると推測されたため、R3~4年度は固定時間がより短い既存組織を用いて、再度ゲノムDNAの抽出を試みた。雄F344ラットにMWCNT-7をTIPS投与し誘発した心膜中皮腫組織FFPEサンプル6検体から腫瘍と非腫瘍部分を分離して削り取り回収した。ゲノムDNAは、truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit (Covaris)を用いて抽出した。これらのサンプルよりライブラリを調製し、イルミナ社のNovaSeq6000による全ゲノムシーケンシング(150bp Paired End)を行った。得られたゲノムデータを既存のラットゲノム配列(rn6)にマップし、MuTect2により体細胞変異の検出を行った。検出されたSNVs(1塩基変異)について表1に示す。

Tumor	#SNVs
D01-1125T	16162
D03-1194T	15379
D01-1121_T	2971
D02-1122_T	1146
D03-1118_1_T	2287
D04-1118_2_T	1001

表1. 各サンプルに検出された変異数.

次にこれら変異データを元に NMF 解析により変異シグネチャーの抽出を行った。その結果、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー(Rat_SBS_A, Rat_SBS_B)が同定された(図10)。これら変異シグネチャーと既存の変異シグネチャーとの類似度について検討した結果を表2に示す。

一般的にCosine similarityは0.85以上で類似していると考えられていることから、Rat_SBS_Bは、Clock-like、Unknowのシグネチャーと類似していることがわかった。一方、Rat_SBS_Aは、Clock-like、Thiopurine

chemotherapyのシグネチャーと比較的類似しているが、新規の変異シグネチャーである可能性も示唆された。また、Rat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた(Bueno et al, nat. genet. (2016)、図12)。さらに、非常に多くのSNV数(15,000~16,000)が観察された2検体では、このRat_SBS_2の寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった(図13)。

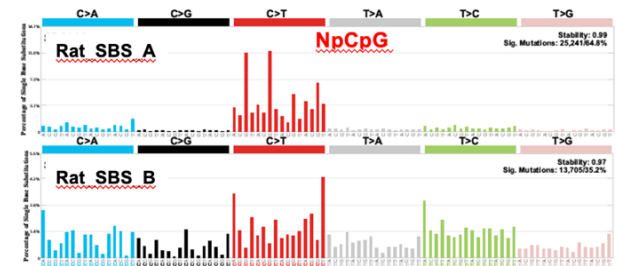


図10. MWCNT誘発中皮腫サンプルから同定された変異シグネチャー.

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
Rat SBS_A	MWCNT	SBS1	0.81
		SBS6	0.80
		SBS87	0.81
Rat SBS_B	MWCNT	SBS3	0.83
		SBS5	0.91
		SBS40	0.90
		SBS92	0.81

表2. ラット中皮腫より同定された変異シグネチャーと既存の変異シグネチャーとの類似性.

- SBS1; Clock-like**
- SBS6; Defective DNA MMR**
- SBS87; Thiopurine chemotherapy**
- SBS3; Defective HR-DDR**
- SBS5; Unknown (clock-like)**
- SBS40; Unknown**
- SBS92; Tobacco smoking**

図11. 各変異シグネチャーの要因.

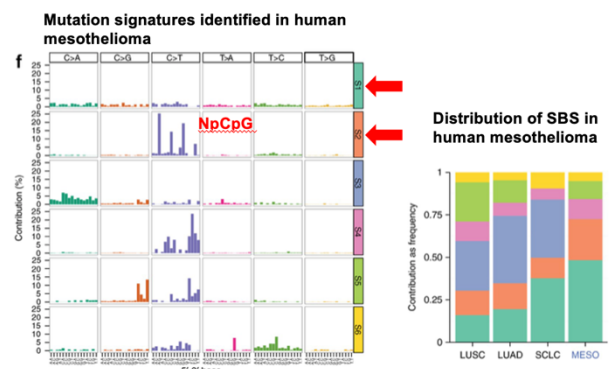


図12. ヒト中皮腫を含む肺がんを観察された変異シグネチャー.

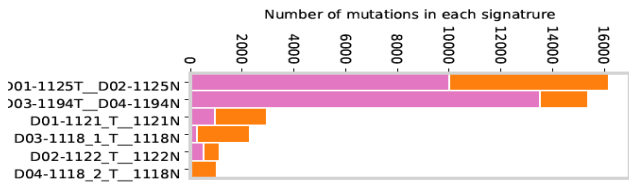


図13. ラット中皮腫サンプル内の各変異シグネチャーの分布。

(3) *In vitro*実験: Mφ細胞と肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

マウスMφ細胞 (RAW264.7) にCNTsを投与し、細胞生存率と活性酸素種(ROS)の産生量を定量した。細胞生存率は各CNTs投与により有意に低下し、MWCNT-7とMWCNT-Nではその程度が顕著であった(図14)。Mφ細胞中のROS産生は、MWCNT-7およびMWCNT-Nにより有意に増加し、特にMWCNT-7で高値を示した(図15)。一方で、SWCNTでは投与による変化は全く見られなかった。*In vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認めた*Ccl2*のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。*In vitro*においても、CNTs投与によりいずれも有意な発現上昇を認め、*in vivo*と類似したパターンを示した(図16)。

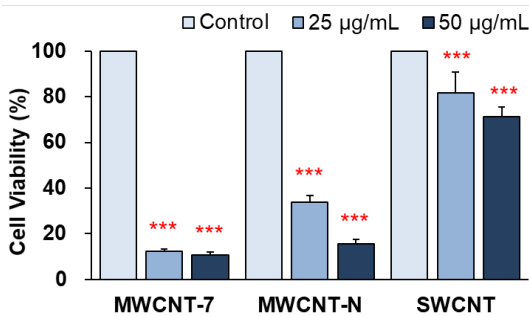


図14. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の細胞生存率の変化 (WST-1アッセイ)、***P < 0.001 vs Control.

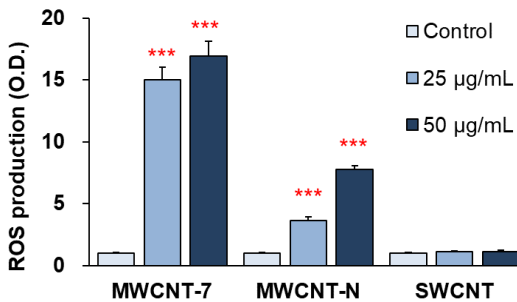


図15. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) のROS産生量の変化 (DCF-DAアッセイ)、***P < 0.001 vs Control.

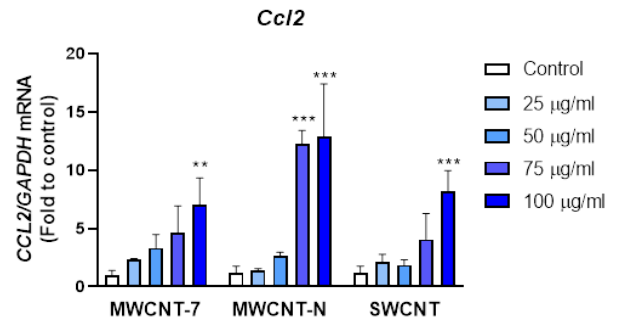


図16. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の*Ccl2*発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

次に、肺オルガノイドの培養条件を検討するために、以下の条件で培養を行った。①従来法: コーティングしたマトリゲル上にオルガノイドを播種し、さらにマトリゲルを重層化して培養する、②3次元回転培養法: 3次元回転培養装置を用いて、5%マトリゲル含有培養液中で培養する、③超低接着培養法: 超低結合の表面処理をされたフラスコあるいはプレートにより、5%マトリゲル含有培養液中で培養する。その結果、①従来法と比較して、②③はオルガノイドの生育状態が良好で、培養方法はより簡便であった。また①と比較して②③は高価なマトリゲル使用量が少なく、安価に暴露試験が実施できることがわかった。今後、CNTを暴露したMφ培養上清を、オルガノイドに投与し、肺オルガノイドの増殖活性やケモカイン発現を検証する。

D. 考察

TIPS法は、大規模な吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺、中皮毒性の評価が可能であり、2年間発がん性試験により複数のMWCNTsの発がん性が明らかになってきた。このことからTIPS法による投与手法と解析法を固定化することにより、得られた有害性指標を健康影響評価法の迅速化に活用することが可能になると考えられる。すなわち、安定した投与、解析手法により経時的に観察しCNTの有害性を正確に捉えることにより、CNTのAOPや発がん性に特異的で、有害性の評価指標として有用な遺伝子変化および遺伝子変異の抽出や毒性発現機構の解明を試みた。

R2年度は、CNTと同様に炭素原子から構成され、肺発がん性が未知のナノマテリアルであるフラーレン (FL) とフラーレンナノウィスカー (FLW) について、肺発がん性を示すMWCNT-7やMWCNT-Nを陽性対照に設定し、TIPS投与104週後の肺を解析した。その結果、FLとFLWはMWCNT-7やMWCNT-Nと異なり、肺発がん性を示さないことが明らかになった。急性期 (1週) では、MWCNT-7、MWCNT-NとFLWにおいて、肺好中球浸潤の誘導、有意な肺重量および肺胞Mφの増加を認めた一方、肺におけるROS蓄積は、MWCNT-7、MWCNT-Nでのみ認められた。また104週において、肺胞上皮の酸化損傷レベルはMWCNT-7、MWCNT-Nで高値を示し、FLやFLW投与群における変化は見られなかった。このことから、酸化ストレスの誘導やそれに伴うゲノム障害は、CNTの

発がん性を含めた有害性に関連することが示唆された。

R3-4年度はさらに、発がん性が未知のSWCNTと、陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nを同条件でTIPS投与することにより、層数、鉄含有量、形状などのCNTの物性の差異と肺、中皮に対する有害性の関連を明らかにすることとした。現在、亜急性期（4週）、亜慢性期（13週）、慢性期（52週）まで解析が完了しており、陽性対照のMWCNT-NおよびMWCNT-7投与による、肺胞上皮および中皮における細胞増殖活性とDNA損傷の増加がいずれの実験期間においても検出され、DNA損傷マーカー（ γ H2AX）と増殖活性マーカー（Ki67）は、腫瘍発生前の短期試験によるCNTの有害性指標として有用である可能性が示唆される。発がん期（104週）の腫瘍性病変の解析結果がまもなく得られ、有害性指標となりえる病理組織学的指標や遺伝子の候補が追求できると考える。M ϕ に対するCNT投与 *in vitro* 解析では、酸化ストレスやケモカイン発現等、*in vivo* 試験と同様に変動する指標が得られており、さらに *in vivo* 試験で有用であった指標について、CNT暴露による変化を解析していく。

DNAとROSの反応により形成される付加体である8-OHdGは、酸化DNA損傷の良く知られたマーカーであり、多くの実験モデルにおいて発がん性に関与していることが知られている。8-OHdGは、突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となっている。組織中における実際の8-OHdGレベルは、ROSの産生とその修復の比率の変化により決定される。本試験において、MWCNT-7およびMWCNT-N投与による8-OHdGの蓄積は、肺気管支上皮と肺胞上皮とともに、多くの肺胞M ϕ に認められた。これらの所見から、肺胞上皮細胞における酸化ストレスの産生とDNA損傷は、肺胞M ϕ の増加によるROS放出の誘導と関連していることが考えられる。SWCNT投与群では肺胞上皮や気管支上皮に有意な8-OHdG陽性細胞の数を認めなかったことから、SWCNTは強い酸化DNA損傷を誘発しないと考えられた。

これまでにCNTによる肺・中皮発癌における固有の体細胞変異パターンである変異シグネチャーは同定されておらず、CNTのAOPの策定に役立つ可能性がある。本年度は、MWCNT誘発ラット中皮腫6サンプル（FFPE）からゲノムDNAを抽出し、NGS解析によるWGS解析を行った。その結果、検出されたSNVの数は1,000~16,000くらいとサンプル毎に大きく異なることがわかった。また、NMJ解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー（Rat_SBS_A, Rat_SBS_B）が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数（15,000~16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。現在、MWCNT暴露を含む化学物質暴露による、中皮腫および肺がんの追加解析を実施している。これらの追加データにより、サンプルによるSNV数および変異シグネチャー分布の違いの要因についてより詳細な検討が可能となると思われる。今回、非常に多くのSNV数が観察された2検体では、アスベスト暴露の症例を含む99例のヒト中皮腫のデータから抽出された変異シグネチャーと類似するRat_SBS_Aの寄与率が非常に高かったことから、MWCNT暴露により誘発した中皮腫とヒト中皮腫の発生メカニズムは

類似していることが示唆された。現在のところ、これらシグネチャーは中皮腫に特徴的なものなのか、あるいは、アスベストやMWCNTのような繊維状の物質の暴露に特徴的なものが不明であるが、さらに検体を追加して解析することで、この点も明らかになると考える。

E. 結論

R2年度に行った104週TIPS試験では、FLおよびFLWは肺発がん性がないことが明らかとなり、MWCNT-7とMWCNT-Nの肺発がん性には、肺胞上皮核における8-OHdG発現レベルの上昇が関与していた。またR3-4年度は、同様にMWCNT-7、MWCNT-Nと肺発がん性が未知のSWCNTをTIPS投与し、慢性毒性（52週）まで解析した。その結果、MWCNT-7 及びMWCNT-N投与群では、104週と同様に、肺胞上皮の8-OHdG形成レベルの上昇が認められ、サイトカイン発現量や、増殖活性も相関して増加した。以上より、CNTの発がん機序に酸化DNA損傷による細胞増殖の活性化が関与していると考えられる。一方でSWCNT投与群ではそれらの変化はないか非常に少なかったことから、SWCNTによる有害性はないか少ないことが予測され、今後の解析が待たれる。*In vitro* 試験では、M ϕ における酸化ストレスやサイトカイン発現等、*in vivo* 試験と同様にCNTにより変動する指標が得られており、今後は引き続き肺オルガノイドを用いて同様の解析をする。

CNT発がんに関わる変異シグネチャーを同定するため、R2-3年度は、サンプル、DNA抽出やNGS解析の条件設定を行ってきた。R3-4年度は、ラットCNT誘発中皮腫FFPEサンプル6例について、NGSによるWGSを実施した。NMJ解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー（Rat_SBS_A, Rat_SBS_B）が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で2比較的高い寄与率が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数（15,000~16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。さらに、Indel解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行うことで、発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報が得られると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto Y, Hotta Y, Tomita N, **Naiiki-Ito A**, Kitagawa A, Kuboshiki U, Hagita T, Noda M, Sanagawa A, Kataoka T, Kondo M, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K. Changes in zinc and manganese concentrations in cisplatin-induced acute kidney injury. *Biochem Biophys Rep.* 33:101422, 2023.
2. Tomita N, Hotta Y, Ito H, **Naiiki-Ito A**, Matsuta K, Yamamoto Y, Ohashi K, Hayakawa T, Sanagawa A, Horita Y, Kondo M, Kataoka T, Takahashi S, Sobue K, Kimura K. High preoperative serum strontium increase the risk of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Clin Exp Nephrol.* 27:382-391, 2023.

3. Kachi K, Naitoh I, Ban T, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato A, Kito Y, Saito K, Matsuo Y, Kato H, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Notohara K, Kataoka H. A Case of Concomitant Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Potential Issue in the Diagnosis of Carcinoma by Endoscopic Ultrasound-guided Fine-needle Biopsy. *Intern Med.* 62:545-551, 2023.
 4. Naiki T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Komatsu H, Nishikawa R, Gonda M, Aoki M, Sugiyama Y, Tasaki Y, Yasui T. A case of metastatic treatment-emergent small cell/neuroendocrine prostate cancer with BRCA2 mutation diagnosed by liver biopsy. *IJU Case Rep.* 5:431-435, 2022.
 5. Tomiyama N, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Etani T, Gonda M, Aoki M, Morikawa T, Sugiyama Y, Yasui T. A rare case of long-term survival from metachronous bilateral adrenal metastasis of lung adenocarcinoma after combined surgical removal and immunochemotherapy. *IJU Case Rep.* 5:474-478, 2022.
 6. Noda Y, Naiki T, Sugiyama Y, Nagai T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Hamamoto S, Etani T, Iida K, Tomiyama N, Aoki M, Shimizu N, Moritoki Y, Akita H, Ando R, Kawai N, Yasui T. Survival Outcome after Reduced-Port Laparoscopic Radical Cystectomy for Bladder Cancer: Long-Term Follow-Up Analysis. *Oncology.* 100:429-438, 2022.
 7. Kato A, Naitoh I, **Naiki-Ito A**, Hayashi K, Okumura F, Fujita Y, Sano H, Nishi Y, Miyabe K, Inoue T, Hirano A, Takada H, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato H, Takahashi S, Kataoka H. Class III β -Tubulin Expression Is of Value in Selecting nab -Paclitaxel and Gemcitabine as First-Line Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 51:372-379, 2022.
 8. Tomita N, Hotta Y, **Naiki-Ito A**, Sanagawa A, Kataoka T, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K. Protective effects of tadalafil on damaged podocytes in an adriamycin-induced nephrotic syndrome model. *J Pharmacol Sci.* 149:53-59, 2022.
 9. Saleh DM, Luo S, Ahmed HM Omnia, Alexander DB, Alexander TW, Gunasekaran S, El-gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, El Hadi RHA, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Jiegou Xu, Suzuki S, **Naiki-ito A**, Takashi S, **Tsuda H**. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol.* 19:30, 2022.
 10. Aoyama Y, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, **Tsuda H**, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF- κ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients.* 14: 42, 2022.
 11. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, **Totsuka Y**, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol.* 35:1625-1630, 2022.
 12. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, **Totsuka Y**, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. *In Vivo.* 36:628-634, 2022.
 13. Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, **Kakehashi A**, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology.* 488:53483, 2023.
 14. Nota T, Kageyama K, Yamamoto A, **Kakehashi A**, Yonezawa H, Jogo A, Sohgo E, Murai K, Ogawa S, Miki Y. Safety and Feasibility of Contrast-Enhanced Computed Tomography with a Nanoparticle Contrast Agent for Evaluation of Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumors in a Rat Model. *Acad Radiol.* 30:30-39, 2023.
 15. Tagami M, **Kakehashi A**, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One.* 17: e0263895, 2022.
 16. Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, **Kakehashi A**, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci.* 113: 2642-2653, 2022.
 17. Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, **Kakehashi A**, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 35:247-254, 2022.
2. 学会発表
1. 内木綾、加藤寛之、梯アンナ、津田洋幸、高橋智. 多層カーボンナノチューブおよびフルーレンウィスカーの肺発がん性の比較、第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
 2. Sheema Asraful Nahar, **Ava Naiki-Ito**, Hiroyuki Kato, **Anna Kakehashi**, **Hiroyuki Tsuda**, Satoru Takahashi. The lung carcinogenicity of single-walled carbon nanotube in male Fischer 344 rats, 第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
 3. 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膀胱におけるLuteolinの5-FU併用投与による効果の検討とDPYD抑制効果の意義、第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
 4. Xiaochen Kuang, **Ava Naiki-Ito**, Masayuki Komura, Hiroyuki Kato, Satoru Takahashi. Chemopreventive effects of angiotensin- II receptor blocker on rat non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis, 第39回日本毒性病

- 理学学会 (2023年1月、江戸川区/ハイブリッド開催)
5. 内木綾、加藤寛之、小村理行、高橋智. ラット発がんモデルを基盤としたがんの発生と予防メカニズムの解析、第35回発癌病理研究会 (2022年11月、新潟)
 6. 内木綾、津田洋幸、高橋智. Identification of factors inducing multi-walled carbon nanotube carcinogenesis, 第81回日本癌学会学術総会シンポジウム (2022年9月、横浜)
 7. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. The role of dipyrimidine dehydrogenase in pancreatic cancer, 第81回日本癌学会学術総会 (2022年9月、横浜)
 8. 稲熊真悟、上木あかね、小村理行、加藤寛之、内木綾、高橋智. PD-L1-positive colon cancer cells harbor higher malignant potentials with “stem-like” immunophenotype, 第81回日本癌学会学術総会 (2022年9月、横浜)
 9. 内木綾、加藤寛之、小村理行、長野愛矢、稲熊真悟、高橋智. 非アルコール性脂肪肝炎および肝線維化に対する紫米抽出物の抑制効果、第111回日本病理学会総会 (2022年4月、神戸)
 10. 稲熊真悟、長野愛矢、上木あかね、小村理行、加藤寛之、内木綾、高橋智. PBKは大腸癌細胞の増殖を亢進させる一方でE-cadherinを安定化させその浸潤・遊走を抑制する、第111回日本病理学会総会 (2022年4月、神戸)
 11. Yukari Totsuka. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development, 12th AACR-JCA Joint Conference (2022年12月、ハワイ・米国)
 12. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、永井桃子、加藤護、松田知成. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、第35回発癌病理研究会 (2022年11月、新潟)
 13. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析、第51回環境変異原学会 (2022年11月、広島)
 14. 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜. DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価、第51回環境変異原学会 (2022年11月、広島)
 15. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、第1回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022年11月、東京)
 16. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護. Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 第81回日本癌学会学術総会シンポジウム (2022年9月、横浜)
 17. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues, 第81回日本癌学会学術総会 (2022年9月、横浜)
 18. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer, 第81回日本癌学会学術総会 (2022年9月、横浜)
 19. Yukari Totsuka. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer, 13th ICEM (2022年8月、オタワ・カナダ)
 20. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines, 13th ICEM (2022年8月、オタワ、カナダ)
 21. 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析、第29回日本がん予防学術大会 (2022年7月、京都)
 22. 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 細胞毒性を有するo-Toluidineとo-Anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する、第29回日本がん予防学術大会 (2022年7月、京都)
 23. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望、第49回日本毒性学会 (2022年6月、札幌)
 24. 戸塚ゆ加里. ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する、第95回日本薬理学会 (2022年3月、福岡)
 25. 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規in vitro生体模倣評価系の開発、日本薬学会第142年会 (2022年3月、Web開催)
 26. 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の解析、第39回日本毒性病理学会 (2023年1月、江戸川区/ハイブリッド開催)
 27. Guiyu Qiu, 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、芝野佳奈、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3の機能解明、第39回日本毒性病理学会 (2023年1月、江戸川区/ハイブリッド開催)
 28. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwong、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進、第39回日本毒性病理学会 (2023年1月、

江戸川区／ハイブリッド開催)

29. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めたo-toluidineの尿中代謝物による膀胱尿路上皮癌への影響、第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
30. 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、**梯アンナ**、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常、第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
31. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibuno, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, **Anna Kakehashi**, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells, 第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
32. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん、第81回日本癌学会学術総会（2022年9月、横浜）
33. 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、**梯アンナ**、山本与毅、邱桂ユウ. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱発がんにおける DNA メチル化異常、第 81 回日本癌学会学術総会（2022 年 9、横浜）
34. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱ケイギョク、**梯アンナ**、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進、第 81 回日本癌学会学術総会（2022 年 9 月、横浜）
35. 深町勝巳、尾崎智也、**津田洋幸**、酒々井眞澄. 膀胱癌の血清診断マーカーとしての LRG-1、第 39 回日本毒性病理学会（2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催）
36. Saleh D, Alexander TW, Alexander DB, Abdelgied M, El-gazzar AM, Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S, Takase H, **Naiki-Ito A**, Suzuki S, Gi M, Taquahashi, Y, Hirose A, Kanno J, Tsuruoka S, **Tsuda H**. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation, ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY (2022 年 9 月、マーストリヒト・オランダ)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和4年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における
有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発（20KD1003）

分担研究課題名：カーボンナノチューブの肺・胸膜有害性の比較と有害性指標の検索

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

ナノサイズの金属・カーボン・有機物粒子・繊維状物質は非常に安定であり、吸入された場合は組織・細胞に長期間沈着する。従来の化学物質が、物質自体の代謝変換によって障害や発がんを誘発するのとは異なり、ナノマテリアルの障害性及び発がん性には、不可逆的な蓄積とそれに対する慢性的な炎症や異物反応が関与する。申請者らはこれまでに、吸入暴露試験で発がん性を認めた MVCNT-7 を含めた複数のカーボンナノチューブ（CNT）について、経気管肺内噴霧投与方法（TIPS 法）を用いた肺および中皮発がん性の検出に成功した。本研究では、物性の異なる CNTs をモデル物質として、TIPS 投与によるラット肺・胸膜中皮発がん性の有無、および発がん性の程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより求められた CNT の Adverse Outcome Pathway (AOP) を、吸入暴露試験に代替しうるナノマテリアルの健康影響評価試験法の考案に活用することを目的として行う。TIPS 投与による多層 CNT (MWCNT-7, MWCNT-N) と肺発がん性未知の単層 CNT (SWCNT) による *in vivo* 肺、胸膜有害性・発がん性試験を開始し、経時的に、病理組織、酸化ストレスなど基本的な毒性について定量解析することとし、本年度は 52 週のサンプルを解析した。

その結果、MWCNTs 投与により、肺胞上皮および心膜中皮における増殖 (Ki67)、DNA 損傷 (γ H2AX) マーカーの標識率は有意に増加し、SWCNT では変化を認めなかった。肺胞上皮過形成は、MWCNTs 投与群で用量相関性に増加し、いずれも高用量群で有意な変化を認めた。肺胞上皮腺腫と腺癌は、MWCNT-N のみで誘発され、SWCNT はいずれの病変も誘発しなかった。肺における Ki67, γ H2AX の上昇、マクロファージ (M ϕ) 活性化による *Ccl* 種、*Tnf- α* 、*Il-6* 等のサイトカイン、ケモカイン発現の増加は CNT 投与後 4-52 週まで継続し、52 週における肺増殖性病変の誘発頻度と相関した。*In vitro* 試験では、M ϕ における酸化的ストレスやサイトカイン発現等、*in vivo* 試験と同様に CNT により変動する指標が得られている。以上より、これらの毒性所見は CNT の AOP の Key Event (KE) と考えられ、発がん機序への関与と発がん性短期予測指標への応用の可能性が示唆された。

現在、*in vivo* 試験は発がん期 (104 週) の最終剖検まで完了し、各 CNT による腫瘍性病変の形成について確定される予定である。亜急性、亜慢性期の肺サンプルを用いた RNA シーケンシングデータ解析で、ケモカイン、サイトカインとともに、細胞周期、免疫応答遺伝子の発現上昇を認めており、最終的な CNT 発がん性と照合することにより、有害性指標となりえる遺伝子候補が追求できると考える。

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。ナノマテリアルの一種で、炭素原子より構成されるカーボンナノチューブ (CNT) は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応により肺胞上皮や中皮に毒性および発がん性を誘発する。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。OECD では、CNT を含むナノマテリアルの健康影響評価手法として吸入暴露試験を求めている。しかし、吸入暴露試験施設の稼働には高額な費用を要するため、今までに 1 物質 (多層 CNT, MWCNT-7) が日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) で試験されたのみである。申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法 (TIPS 法) を用いた試験デザインを開発し、4 種の MWCNT について肺と胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにしてきた。しかしながら、CNT の発がん性を規定する Adverse Outcome Pathway (AOP) は明らかにされていない。

本年度は、多層 CNTs (MWCNT-7, MWCNT-N) と単層 CNT

(SWCNT) の TIPS 投与後慢性期 (52 週) における肺と胸膜中皮に対する障害性および発がん性について、DNA 損傷、増殖活性や遺伝子発現変化との関連を解析する。また NGS により同定した遺伝子変化の情報を用いて、CNT の AOP を構築し、有害性評価指標として応用可能で信頼の高いものを選出することを目標とする。また、TIPS 投与後、発がん期に至る以前の亜急性・亜慢性期の非腫瘍部や *in vitro* 投与においても検出することが可能な AOP は、*in vitro* 試験法を含む短期・簡便な試験法における評価指標に利用できる可能性を含み、それらに言及する成果体を得ることも目指す。

B. 研究方法

(1) *In vivo* 実験：TIPS 投与による CNT 負荷試験と有害性の解析

MWCNT-7、MWCNT-N と SWCNT は、PF ポリマー分散液に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12 週齢雄性 F344 ラットに、イソフルラン深麻酔下にて、

それぞれ合計投与量が0.1あるいは0.5mg/ラットとなるように8回TIPS投与する。対照群として、無処置およびPFポリマー液投与（対照）群を設ける。以後無処置にて、投与終了後4週、13週、52週、および104週に剖検する。4週、13週は高用量のみで、以降の52週および104週は低と高用量を観察する（1物質77匹：4週（10匹）、13週（7匹）、52週（10匹×2）、104週（20匹×2）。剖検時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取し、遠心分離して炎症細胞やタンパク質（総タンパク、アルブミン）解析に供する。イソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺して、肺の急性病変と発がんについて解析する。右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドを気管より注入し、パラフィン包埋を用いて、マクロファージ（Mφ）局在（抗CD68抗体、BIO-RAD）、増殖活性（抗Ki67抗体、Abcam）、DNA損傷（抗γH2AX抗体、CST）の程度について免疫組織学的に解析する。右肺の一部から1-2mm角の組織片を切り出し、2%グルタルアルデヒドで固定し、透過電子顕微鏡（TEM）によるCNT観察に用いる。52週以降では、肺及び胸膜中皮の腫瘍性病変についても定量解析する。左肺は凍結し、RNA抽出（ISOGEN、ニッポンジーン）と定量的RT-PCRによりCCL種、IL種等の炎症性サイトカイン発現を定量する。さらにNGSを用いたRNAシーケンシング解析（マクロジェン）に用いる。CNTにより変化するトランスクリプトームについて、GO解析、パスウェイ解析を行う。

(2) *In vitro*実験：Mφ細胞と肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

1. Mφ細胞における毒性解析

マウスMφ細胞（RAW264.7）に、(1)で用いたCNTsを投与し（25-100 μg/ml）、48時間培養する。マウスMφ細胞の細胞生存率（WST-1、ロッシュ）、産生される炎症性サイトカイン（定量的RT-PCR）やROS（DCF-DAアッセイ、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を定量する。

2. 肺オルガノイドにおける毒性解析

本研究で用いる肺オルガノイドは、C57BL/6Jマウス肺から採取する。単層の嚢胞状を呈し幹細胞のほか線毛をもつような分化した細胞から構成される。このオルガノイド培養は、マトリゲル（Corning）コート上に、増殖因子含有培地下に播種し、さらにマトリゲルを重層化することにより行う。この方法は、肺オルガノイドに対する被験物質の投与に制限をきたす可能性があるため、肺オルガノイドの至適培養条件を検討する。(2)-1のCNT処理マウスMφ細胞培養上清を、肺オルガノイドに48時間暴露する。細胞生存率や炎症性サイトカインのmRNA発現解析を行う。

（倫理面の配慮）

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアあるいはSPFエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え実験の審査を受け、承認されたうえで実施し

ており（医動20-028）、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行う。

C. 研究結果

(1) *In vivo* 実験：CNTによる肺・中皮有害性の解析
(1)-1. CNTによる臓器重量の変化

本年度は、CNTのTIPS投与後52週の剖検で得たサンプルの解析を行った。体重および肝、腎、心、脾の重量に群間差は認めなかった。肺重量は、無処置群（1.5±0.4g）と対照群（1.6±0.3g）に有意差は認めなかった。また対照群と比較して、MWCNT-7（低用量群1.4±0.2g、高用量群1.6±0.1g）は差を認めなかったが、MWCNT-N（低用量群1.4±0.1g、高用量群1.9±0.1g、P<0.05）、SWCNT（低用量群1.4±0.1g、高用量群2.1±0.3g、P<0.001）でMWCNT-NとSWCNTでは高用量群で有意に増加した。この傾向は、4、13週と同様であった。

(1)-2. CNTのTIPS投与による肺胞Mφ誘導と沈着

52週では4、13週と同様に、CD68免疫染色によりCNT投与による肺胞Mφの誘導が確認され、SWCNT投与群では好中球浸潤を高度に伴っていた。TEM観察において、CNTsの線維径は、MWCNT-7（76.3±25.2nm）、MWCNT-N（46.6±11.7nm）であり、SWCNTは検出不可であった（図1、参考資料では3nm）。

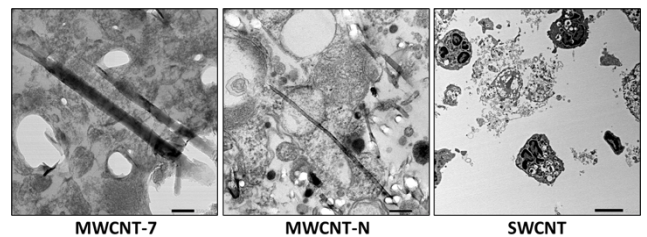


図1. 肺胞MφによるCNTの食食（TEM像）。

(1)-3. CNTによる肺有害性の解析

52週において、増殖活性、DNA損傷と酸化的DNA損傷について定量解析を行った。比較のために4週の結果とともに提示する。肺胞上皮細胞におけるKi67、γH2AX標識率と8-OHdG陽性細胞率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群のいずれの用量においても有意に上昇した。一方、SWCNTではいずれの用量においても明らかな変化は見られなかった（図2,3）。

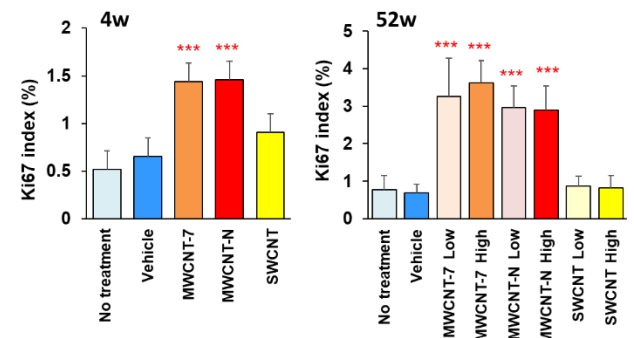


図2. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化（Ki67免疫染色）、***P < 0.001 vs Vehicle.

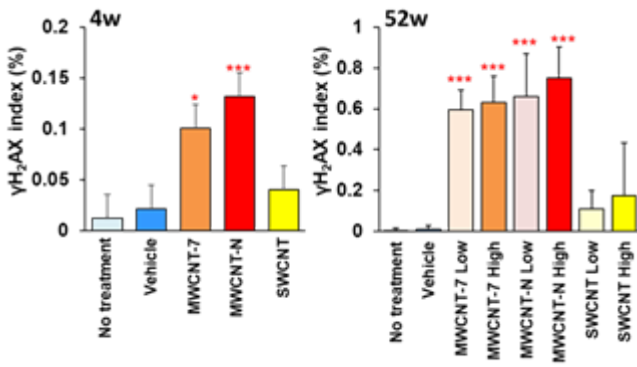


図3. CNT投与による肺胞上皮DNA障害の変化 (γH2AX免疫染色)、*P < 0.05、***P < 0.001 vs Vehicle.

(1)-4. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

52週に採取した胸腔洗浄液や心組織を用いて、胸膜中皮細胞の有害性を解析した。胸腔洗浄液中の総タンパクおよびアルブミン値は、対照群と比較して、MWCNT-7高用量群で上昇し、総タンパクにおいて有意な変化を示した(図4)。心膜中皮細胞におけるKi67標識率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に上昇し、SWCNTでは明らかな変化は見られなかった(図5)。γH2AX標識率もMWCNT投与群で上昇傾向を認め、MWCNT-N高用量群で有意な変化を認めた(図6)。

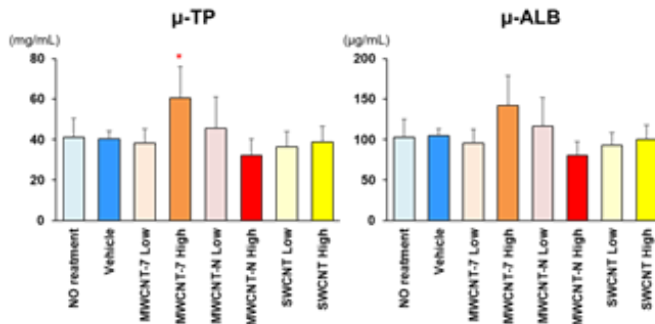


図4. CNT投与による胸腔洗浄液中総タンパクとアルブミン値の変化、*P < 0.05 vs Vehicle.

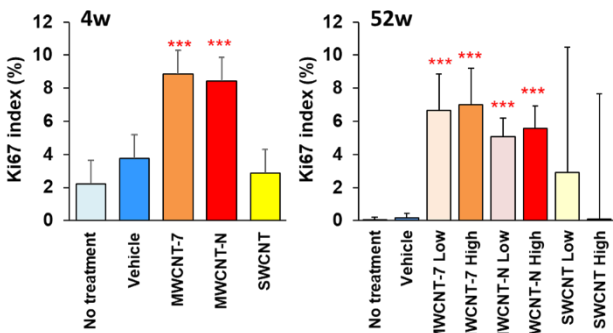


図5. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、***P < 0.001 vs Vehicle.

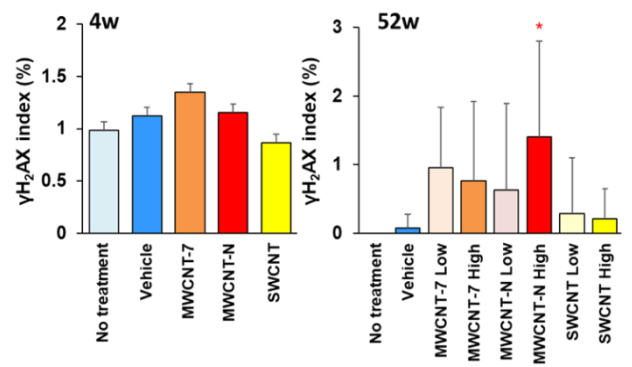


図6. CNT投与による心膜中皮細胞DNA障害の変化 (γH2AX免疫染色)、*P < 0.05 vs Vehicle.

(1)-5. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量

52週における肺胞上皮過形成の発生頻度は、無処置群 (0/10匹)、対照群 (0/10匹)、MWCNT-7低用量群 (1/10匹)、MWCNT-7高用量群 (5/10匹、P<0.01)、MWCNT-N低用量群 (2/10匹)、MWCNT-N高用量群 (6/10匹、P<0.001)、SWCNT低用量群 (0/10匹)、SWCNT高用量群 (0/10匹) で、MWCNT-7とMWCNT-Nの高用量群で有意な上昇を認めた。肺胞上皮腺腫は、MWCNT-Nの低・高用量群にのみ1例ずつ、肺胞上皮腺癌は、MWCNT-N高用量群にのみ1例発生した。

胸膜中皮腫の発生は、MWCNT-7高用量群のみに2例認めた。現在投与後約100週経過しており、52週剖検後の途中衰弱症例や死亡例を解析した結果、MWCNT-7低用量群 (1例)、MWCNT-7高用量群 (18例)、MWCNT-N低用量群 (1例)、MWCNT-N高用量群 (8例) に胸膜中皮腫が発生し個体の死因となっていた(図7)。現在、投与後104週の肺および中皮腫瘍発生頻度を解析中で、間もなく結果が得られる。腫瘍の新鮮検体から、凍結組織を採取しており、今後の遺伝子解析に用いる。

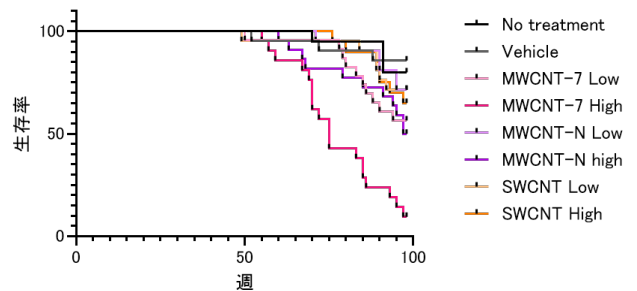


図7. CNT投与による生存率への影響。

(1)-6. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

52週における肺のケモカインおよびサイトカインmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した(図8)。CNTs投与による遺伝子発現の増加傾向は見られたが、MWCNT-7による有意な変化は*Cc19*のみで認めた。一方、MWCNT-7よりも肺発がん感受性の高いと考えられるMWCNT-Nは、*Cc13*、*Cc19*、*Tnfα*および*Il-6*で認めた。SWCNTでは*Cc12*、*Cc13*で有意に上昇し、*Cc19*発現は変化しなかった。

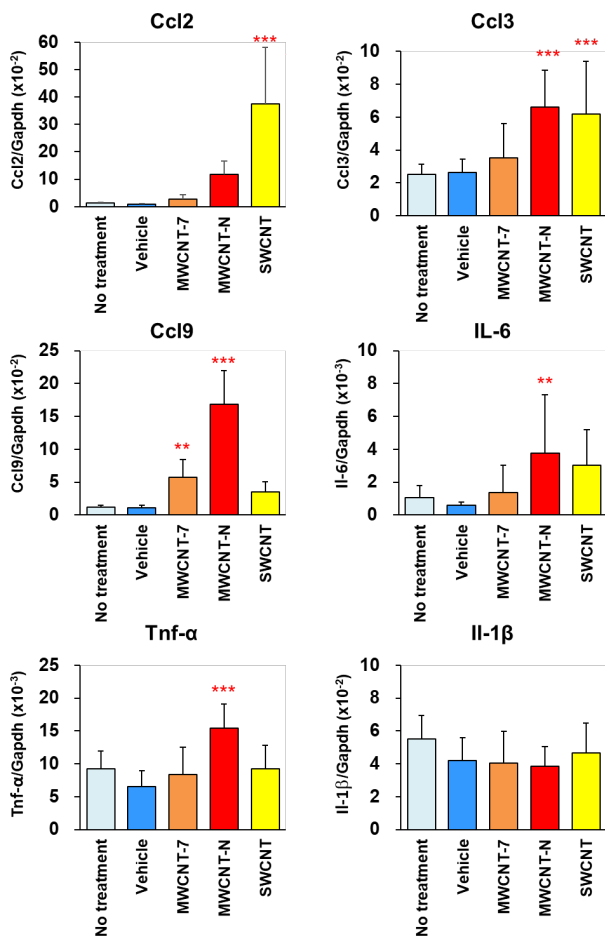


図8. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、52週（定量RT-PCR）、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

(2) *In vitro*実験：Mφ細胞と肺オルガノイドを用いたCNTによる毒性の解析

マウスMφ細胞（RAW264.7）にCNTsを投与し、細胞生存率と活性酸素種（ROS）の産生量を定量した。細胞生存率は各CNTs投与により有意に低下し、MWCNT-7とMWCNT-Nではその程度が顕著であった（図9）。Mφ細胞中のROS産生は、MWCNT-7およびMWCNT-Nにより有意に増加し、特にMWCNT-7で高値を示した（図10）。一方で、SWCNTでは投与による変化は全く見られなかった。*In vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認めたCcl2のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。*In vitro*においても、CNTs投与によりいずれも有意な発現上昇を認め、*in vivo*と類似したパターンを示した（図11）。

次に、肺オルガノイドの培養条件を検討するために、以下の条件で培養を行った。①従来法：コーティングしたマトリゲル上にオルガノイドを播種し、さらにマトリゲルを重層化して培養する、②3次元回転培養法：3次元回転培養装置を用いて、5%マトリゲル含有培養液中で培養する、③超低接着培養法：超低結合の表面処理をされたフラスコあるいはプレートにより、5%マトリゲル含有培養液中で培養する。その結果、①従来

法と比較して、②③はオルガノイドの生育状態が良好で、培養方法はより簡便であった。また①と比較して②③は高価なマトリゲル使用量が少なく、安価に暴露試験が実施できることがわかった。今後、CNTを暴露したMφ培養上清を、オルガノイドに投与し、肺オルガノイドの増殖活性やケモカイン発現を検証する。

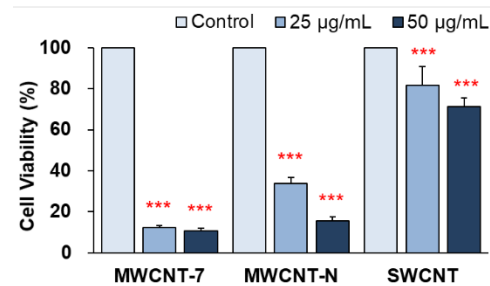


図9. CNT投与によるマウスMφ細胞RAW264.7の細胞生存率の変化（WST-1アッセイ）、***P < 0.001 vs Control.

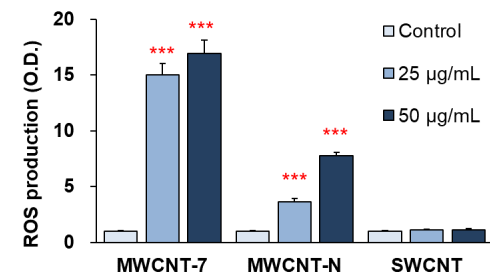


図10. CNT投与によるマウスMφ細胞（RAW264.7）のROS産生量の変化（DCF-DAアッセイ）、***P < 0.001 vs Control.

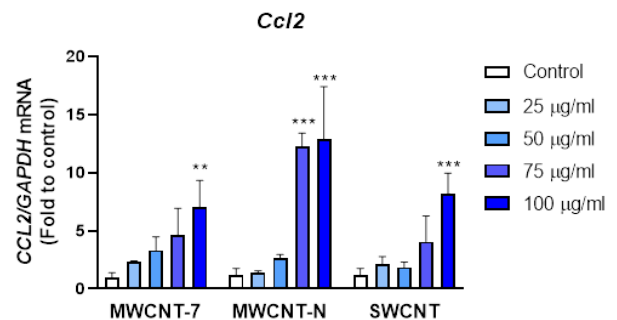


図11. CNT投与によるマウスMφ細胞（RAW264.7）のCcl2発現の変化（DCF-DAアッセイ）、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

D. 考察

TIPS法は、大規模な吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺、中皮毒性の評価が可能であり、2年間発がん性試験により複数のMWCNTsの発がん性が明らかになってきた。このことからTIPS法による投与手法と解析法を固定化することにより、得られた有害性指標を健康影響評価法の迅速化に活用することが可能になると考えられる。すなわち、安定した投与、解析手法により経時的に観察しCNTの有害性を正確に捉えることにより、CNTのAOPや発がん性に特異的で、有害性の評価指標として有用な遺伝子変化および遺伝子変異の抽出や毒性発現機構の解明を試みる。本

研究では、発がん性が未知のSWCNTと、陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nを同条件でTIPS投与することにより、層数、鉄含有量、形状などのCNTの物性の差異と肺、中皮に対する有害性の関連を明らかにすることとした。現在、亜急性期（4週）、亜慢性期（13週）、慢性期（52週）まで解析が完了しており、陽性対照のMWCNT-NおよびMWCNT-7投与による、肺胞上皮および中皮における細胞増殖活性とDNA損傷の増加がいずれの実験期間においても検出され、DNA損傷マーカー（ γ H2AX）と増殖活性マーカー（Ki67）は、腫瘍発生前の短期試験によるCNTの有害性指標として有用である可能性が示唆される。発がん期（104週）の腫瘍性病変の解析結果がまもなく得られ、有害性指標となりえる病理組織学的指標や遺伝子の候補が追求できると考える。

M ϕ に対するCNT投与*in vitro*解析では、酸化ストレスやCcI種等、*in vivo*試験と同様に変動する指標が得られており、生体の肺胞M ϕ と類似した環境を現わしているものと考えられる。本年度は、肺オルガノイド培養条件を検討し、マトリゲル重層下で培養する従来法と比較して、マトリゲル含有培地内で培養する手法の方が、CNT投与、共培養やオルガノイドからのRNA、タンパク抽出に適していることが示唆された。肺オルガノイド培養系においても、酸化ストレス、サイトカイン発現やNGSによるゲノム変化を解析し、特に*in vivo*で有用であった指標について、CNT暴露による変化を解析していく。

E. 結論

今年度は、MWCNT-7、MWCNT-Nと肺発がん性が未知のSWCNTをTIPS投与し、亜急性（4週）および亜慢性毒性（13週）、慢性毒性（52週）まで解析した。その結果MWCNT-7及びMWCNT-N投与群では、肺胞上皮の細胞増殖活性と酸化DNA損傷の増加が認められ、サイトカイン発現量も相関して増加した。以上より、CNTの発がん機序に酸化DNA損傷による細胞増殖の活性化が関与していると考えられる。一方でSWCNT投与群ではそれらの変化はないか非常に少なかったことから、SWCNTによる有害性はないか少ないことが予測され、今後の解析が待たれる。*In vitro*試験では、M ϕ における酸化ストレスやサイトカイン発現等、*in vivo*試験と同様にCNTにより変動する指標が得られており、今後は引き続き肺オルガノイドを用いて同様の解析をする。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto Y, Hotta Y, Tomita N, **Naiki-Ito A**, Kitagawa A, Kuboshiki U, Hagita T, Noda M, Sanagawa A, Kataoka T, Kondo M, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K. Changes in zinc and manganese concentrations in cisplatin-induced acute kidney injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 33:101422, 2023.
2. Tomita N, Hotta Y, Ito H, **Naiki-Ito A**, Matsuta K, Yamamoto Y, Ohashi K, Hayakawa T, Sanagawa A, Horita Y, Kondo M, Kataoka T, Takahashi S, Sobue K, Kimura K. High preoperative serum strontium increase the risk of acute kidney injury after

cardiopulmonary bypass. *Clin Exp Nephrol*. 27:382-391, 2023.

3. Kachi K, Naitoh I, Ban T, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato A, Kito Y, Saito K, Matsuo Y, Kato H, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Notohara K, Kataoka H. A Case of Concomitant Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Potential Issue in the Diagnosis of Carcinoma by Endoscopic Ultrasound-guided Fine-needle Biopsy. *Intern Med*. 62:545-551, 2023.
4. Naiki T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Komatsu H, Nishikawa R, Gonda M, Aoki M, Sugiyama Y, Tasaki Y, Yasui T. A case of metastatic treatment-emergent small cell/neuroendocrine prostate cancer with BRCA2 mutation diagnosed by liver biopsy. *IJU Case Rep*. 5:431-435, 2022.
5. Tomiyama N, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Etani T, Gonda M, Aoki M, Morikawa T, Sugiyama Y, Yasui T. A rare case of long-term survival from metachronous bilateral adrenal metastasis of lung adenocarcinoma after combined surgical removal and immunotherapy. *IJU Case Rep*. 5:474-478, 2022.
6. Noda Y, Naiki T, Sugiyama Y, Nagai T, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Hamamoto S, Etani T, Iida K, Tomiyama N, Aoki M, Shimizu N, Moritoki Y, Akita H, Ando R, Kawai N, Yasui T. Survival Outcome after Reduced-Port Laparoscopic Radical Cystectomy for Bladder Cancer: Long-Term Follow-Up Analysis. *Oncology*. 100:429-438, 2022.
7. Kato A, Naitoh I, **Naiki-Ito A**, Hayashi K, Okumura F, Fujita Y, Sano H, Nishi Y, Miyabe K, Inoue T, Hirano A, Takada H, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato H, Takahashi S, Kataoka H. Class III β -Tubulin Expression Is of Value in Selecting nab -Paclitaxel and Gemcitabine as First-Line Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 51:372-379, 2022.
8. Tomita N, Hotta Y, **Naiki-Ito A**, Sanagawa A, Kataoka T, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K. Protective effects of tadalafil on damaged podocytes in an adriamycin-induced nephrotic syndrome model. *J Pharmacol Sci*. 149:53-59, 2022.
9. Saleh DM, Luo S, Ahmed HM Omnia, Alexander DB, Alexander TW, Gunasekaran S, El-gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, El Hadi RHA, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Jiegou Xu, Suzuki S, **Naiki-Ito A**, Takashi S, **Tsuda H**. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. Part Fibre Toxicol. 19:30, 2022.
10. Aoyama Y, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, **Tsuda H**, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF- κ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. 14:42, 2022.

2. 学会発表

1. **内木綾**、加藤寛之、**梯アンナ**、**津田洋幸**、高橋智

多層カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーの肺発がん性の比較、第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）

2. Sheema Asraful Nahar, Aya Naiki-Ito, Hiroyuki Kato, Anna Kakehashi, Hiroyuki Tsuda, Satoru Takahashi. The lung carcinogenicity of single-walled carbon nanotube in male Fischer 344 rats, 第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
3. 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膵癌におけるLuteolinの5-FU併用投与による効果の検討とDPYD抑制効果の意義、第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
4. Xiaochen Kuang, Aya Naiki-Ito, Masayuki Komura, Hiroyuki Kato, Satoru Takahashi. Chemopreventive effects of angiotensin- II receptor blocker on rat non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis, 第39回日本毒性病理学会（2023年1月、江戸川区／ハイブリッド開催）
5. 内木綾、加藤寛之、小村理行、高橋智. ラット発がんモデルを基盤としたがんの発生と予防メカニズムの解析、第35回発癌病理研究会（2022年11月、新潟）
6. 内木綾、津田洋幸、高橋智. Identification of factors inducing multi-walled carbon nanotube carcinogenesis, 第81回日本癌学会学術総会シンポジウム（2022年9月、横浜）
7. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. The role of dipyrimidine dehydrogenase in pancreatic cancer, 第81回日本癌学会学術総会（2022年9月、横浜）
8. 稲熊真悟、上木あかね、小村理行、加藤寛之、内木綾、高橋智. PD-L1-positive colon cancer cells harbor higher malignant potentials with “stem-like” immunophenotype, 第81回日本癌学会学術総会（2022年9月、横浜）
9. 内木綾、加藤寛之、小村理行、長野愛矢、稲熊真悟、高橋智. 非アルコール性脂肪肝炎および肝線維化に対する紫米抽出物の抑制効果、第111回日本病理学会総会（2022年4月、神戸）
10. 稲熊真悟、長野愛矢、上木あかね、小村理行、加藤寛之、内木綾、高橋智. PBK は大腸癌細胞の増殖を亢進させる一方でE-cadherin を安定化させその浸潤・遊走を抑制する、第111回日本病理学会総会（2022年4月、神戸）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における
有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発（20KD1003）

分担研究課題名：次世代シーケンサー（NGS）によるゲノム変異解析

研究分担者 戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部 教授

研究要旨

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。カーボンナノチューブ（CNT）は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応が誘発される。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。健康影響評価の一つのエンドポイントとして、遺伝毒性は有用な指標となることが知られている。近年、次世代シーケンサー(NGS)によるノンバイアスかつグローバルなゲノム変異解析が進み、環境要因の暴露に固有の体細胞変異のパターン（変異シグネチャー）が存在することが明らかになってきた。さらに、この変異シグネチャー情報を用いることで、化学物質が誘発する毒性の Adverse Outcome Pathway (AOP)を得ることも可能であることが示されている。昨年度はまず、MWCNT 関連の既存腫瘍サンプル（FFPE）を用い、NGSによる体細胞変異解析を実施することとした。MWCNTをTIPS投与したラット肺の腫瘍および正常部分より Covaris社のキットである truXTRAC FFPE DNA microTUBE Kitを用いてDNAの抽出を試みたが、NGS解析が可能な、状態の良いゲノムDNAの抽出に至らなかった。今年度はホルマリンによる固定時間の短いCNT誘発ラット中皮腫のFFPEサンプルを用い、上記方法でDNAの抽出を行ない、NGSによる全ゲノム解析(WGS)を実施した。現在、までに6検体のWGS解析とそのデータを用いた変異シグネチャーの解析が終了している。その結果、検出されたSNVの数は1,000~16,000くらいとサンプル毎に大きく異なることがわかった。また、NMF解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー(Rat_SBS_A, Rat_SBS_B)が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数(15,000~16,000)が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。現在、MWCNT及び化学物質暴露による中皮腫及び肺がんの追加解析を行いつつ、Indel解析や変異のストランドバイアスなどの解析を行っている。本研究により得られるデータは、発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。カーボンナノチューブ（CNT）は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体反応が誘発される。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。

健康影響評価の一つのエンドポイントとして、遺伝毒性は有用な指標となることが知られている。近年、次世代シーケンサー(NGS)によるノンバイアスかつグローバルなゲノム変異解析が進み、環境要因の暴露に固有の体細胞変異のパターン（変異シグネチャー）が存在することが明らかになってきた。さらに、この変異シグネチャー情報を用いることで、化

学物質が誘発する毒性の Adverse Outcome Pathway (AOP)を得ることも可能であることが示されている。本研究の目的は複数種類のCNTによる遺伝毒性をNGSにより解析し、変異シグネチャーの同定とその情報を用いて各種CNT安全性の新規手法を構築し、OECD TGに提案できる評価法を開発するものである。

B. 研究方法

MWCNTをSDラットに経気管肺内噴霧(TIPS)投与を実施し、発生した中皮腫瘍サンプルを用いてMWCNTに由来する変異シグネチャーの同定を試みる。ラットにMWCNTをTIPS投与し誘発した中皮腫のFFPEサンプルから腫瘍部分を削り取り、ゲノムDNAをtruXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit (Covaris)を用

いて抽出する。同一個体から非腫瘍部に相当する箇所も削り出し、同様にゲノムDNAを抽出する。抽出したゲノムDNAを次世代シーケンサー (NovaSeq) で全ゲノム解析を行い、腫瘍に検出される体細胞変異の解析を行う。得られたデータをNMF (Nonnegative Matrix Factorization; 非負値行列因子分解) にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行う。

(倫理面の配慮)

該当なし

C. 研究結果

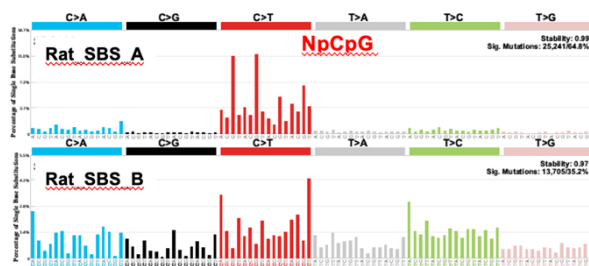
ラットにMWCNTをTIPS投与し誘発した中皮腫のFFPEサンプル6検体から腫瘍/非腫瘍部分を削り取り、ゲノムDNAをtruXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit (Covaris)を用いて抽出した。これらのサンプルよりライブラリを調製し、イルミナ社のNovaSeq6000による全ゲノムシーケンス (150bp Paired End)を行った。得られたゲノムデータを既存のラットゲノム配列 (rn6) にマップし、変異Caller (MuTect2およびStrelka)により体細胞変異の検出を行った。検出されたSNVs (1塩基変異) について表1に示す。

表1 各サンプルに検出された変異数

Tumor	#SNVs
D01-1125T	16162
D03-1194T	15379
D01-1121_T	2971
D02-1122_T	1146
D03-1118_1_T	2287
D04-1118_2_T	1001

次にこれら変異データを元にNMF解析により変異シグネチャーの抽出を行った。その結果、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー (Rat_SBS_A, Rat_SBS_B) が同定された (図1)。

図1 MWCNT暴露により誘発した中皮腫サンプルから同定された変異シグネチャー



これら変異シグネチャーと既存の変異シグネチャー

(<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/sbs/>) との類似度について検討した結果を表2に示す。

表2 ラット中皮腫より同定された変異シグネチャーと既存の変異シグネチャーとの類似性

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
Rat SBS_A	MWCNT	SBS1	0.81
		SBS6	0.80
		SBS87	0.81
Rat SBS_B	MWCNT	SBS3	0.83
		SBS5	0.91
		SBS40	0.90
		SBS92	0.81

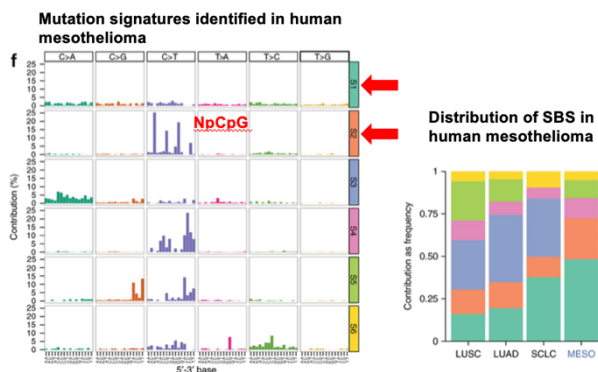
図2 各変異シグネチャーの要因

- SBS1; Clock-like**
- SBS6; Defective DNA MMR**
- SBS87; Thiopurine chemotherapy**
- SBS3; Defective HR-DDR**
- SBS5; Unknown (clock-like)**
- SBS40; Unknown**
- SBS92; Tobacco smoking**

一般的にCosine similarityは0.85以上で類似していると考えられていることから、Rat_SBS_Bは、Clock-like、Unknownのシグネチャーと類似していることがわかった。一方、Rat_SBS_Aは、Clock-like、Thiopurine chemotherapyのシグネチャーと比較的類似しているが、新規の変異シグネチャーである可能性も示唆された。

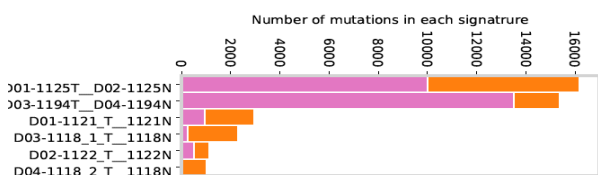
また、Rat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた (Bueno et al, nat. genet. (2016)、図3)。

図3 ヒト中皮腫を含む肺がんで観察された変異シグネチャー



さらに、非常に多くのSNV数（15,000～16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_2の寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった（図4）。

図4 ラット中皮腫サンプル内の各変異シグネチャーの分布



現在、MWCNT及び化学物質暴露による中皮腫及び肺がんの追加解析を行いつつ、Indel解析や変異のストランドバイアスなどの解析を行っている。

D. 考察

MWCNT暴露のラット中皮腫6サンプル（FFPE）からゲノムDNAを抽出し、NGS解析によるWGS解析を行った。その結果、検出されたSNVの数は1,000～16,000くらいとサンプル毎に大きく異なることがわかった。また、NMF解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー（Rat_SBS_A, Rat_SBS_B）が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数（15,000～16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。この、サンプルによるSNV数および変異シグネチャー分布の違いと病理組織像との間に何か関係がないかと調べてみたが、今回のラットサンプルはいずれも肉腫型で、1121の一部のみに上皮型配列が観察された。一方、1194と1125は肉腫型のな

かでも分裂像が多く細胞の多形性が強い（いわゆる悪性度高そうな）傾向がありそうだが、他のサンプルとの明らかな違いはなさそうとのことであった。現在、MWCNT暴露を含む化学物質暴露による、中皮腫および肺がんの追加解析を実施している。これらの追加データにより、サンプルによるSNV数および変異シグネチャー分布の違いの要因についてより詳細な検討が可能となると思われる。

また、今回、非常に多くのSNV数が観察された2検体では、アスベスト暴露の症例を含む99例のヒト中皮腫のデータから抽出された変異シグネチャーと類似するRat_SBS_Aの寄与率が非常に高かったことから、MWCNT暴露により誘発した中皮腫とヒト中皮腫の発生メカニズムは類似していることが示唆された。現在のところ、これらシグネチャーは中皮腫に特徴的なものなのか、あるいは、アスベストやMWCNTのような繊維状の物質の暴露に特徴的なものが不明であるが、さらに検体を追加して解析することで、この点も明らかになると考えている。現在、Indel解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行っている。得られるデータは発がんメカニズム解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

E. 結論

今年度はホルマリンによる固定時間の短いCNT誘発ラット中皮腫のFFPEサンプルを用い、NGSによる全ゲノム解析（WGS）を実施した。現在、までに6検体のWGS解析とそのデータを用いた変異シグネチャーの解析が終了している。その結果、検出されたSNVの数は1,000～16,000くらいとサンプル毎に大きく異なることがわかった。また、NMF解析の結果から、C:G to T:A変異が顕著な2つの変異シグネチャー（Rat_SBS_A, Rat_SBS_B）が同定された。このうちのRat_SBS_Aはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似していた。さらに、非常に多くのSNV数（15,000～16,000）が観察された2検体では、このRat_SBS_Aの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Bの寄与率が高いことがわかった。さらに、Indel解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行うことで、発がんメカニズム解明やリスク評価

などに有用な情報が得られると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol.* 35:1625-1630, 2022.
2. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. *In Vivo.* 36:628-634, 2022.
3. Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids. *Front Genet.* 12: 768781, 2021.
4. Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo.* 35:2107-2114, 2021
5. Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 34:912-919, 2021.
6. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.* 112, 7-15, 2021.
7. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I. U.S.-

Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77, 2021.

8. Totsuka Y Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 96:180-187, 2020.
9. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 33:1907-1914, 2020.
10. Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42:16, 2020.
11. Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 41:368-376, 2020.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、永井桃子、加藤 護。次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、日本薬学会第143年会（2023年3月、札幌）
2. 広田航太郎、山口大雅、小宮雅美、稲葉洋平、加藤孝一、戸塚ゆ加里。加熱式タバコの遺伝毒性評価、日本薬学会第143年会（2023年3月、札幌）
3. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里。マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築、日本薬学会第143年会（2023年3月、札幌）
4. Yukari Totsuka. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development, 12th AACR-JCA Joint Conference（2022年12月、ハワイ・米国）

5. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、永井桃子、加藤 護、松田知成. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、第 35 回発癌病理研究会 (2022 年 11 月、新潟)
6. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析、第 51 回環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
7. 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜. DNA 鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価、第 51 回環境変異原学会 (2022 年 11 月、広島)
8. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、第 1 回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022 年 11 月、東京)
9. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護. Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 第 81 回日本癌学会学術総会シンポジウム (2022 年 9 月、横浜)
10. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues, 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
11. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer, 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
12. Yukari Totsuka. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer, 13th ICEM (2022 年 8 月、オタワ・カナダ)
13. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines, 13th ICEM (2022 年 8 月、オタワ、カナダ)
14. 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析、第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月、京都)
15. 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. 細胞毒性を有する *o*-Toluidine と *o*-Anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する、第 29 回日本がん予防学術大会 (2022 年 7 月、京都)
16. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望、第 49 回日本毒性学会 (2022 年 6 月、札幌)
17. 戸塚ゆ加里. ゲノムおよび DNA 付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する、第 95 回日本薬理学会 (2022 年 3 月、福岡)
18. 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規 in vitro 生体模倣評価系の開発、日本薬学会第 142 年会 (2022 年 3 月、Web 開催)
19. 戸塚ゆ加里. 生体を模倣した in vitro 遺伝毒性評価、第 50 回環境変異原学会 (2021 年 11 月、横須賀)
20. 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development, 第 80 回日本癌学会学術総会 (2021 年 10 月、横浜/ハイブリッド開催)
21. 戸塚ゆ加里. DNA 付加体の網羅的解析手法 (DNA アダクトーム) の現状と将来展望、第 144 回日本薬理学会関東支部会 (2021 年 6 月 Web 開催)
22. 戸塚ゆ加里. 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (DNA アダクトーム) の現状と将来展望、第 81 回分析化学討論会 (2021 年 5 月、Web 開催)
23. 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望、第 12 回 JBF シンポジウム (2021 年 3 月、Web 開催)
24. 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望、第 37 回日本毒性病理学会 (2021 年 1 月、Web 開催)
25. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、がん予防学術大会 (2020 年 9 月、Web 開催)

26. 戸塚ゆ加里. Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach, 第 79 回癌学会 (2020 年 10 月、広島)
27. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによりがんの要因を解明する、第 2 回三陸包括的緩和医療研究会 (2020 年 10 月、Web 開催)
28. 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望、第 49 回環境変異原学会 (2020 年 9 月、静岡)
29. 戸塚ゆ加里. NGS によるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望、第 47 回日本毒性学会学術年会シンポジウム (2020 年 6 月、Web 開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における
有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発（20KD1003）

分担研究課題名：カーボンナノチューブおよびフラーレンウィスカーによる肺内酸化ストレス解析

研究分担者 梯 アンナ 大阪公立大学大学院医学研究科 講師

研究要旨

本研究ではナノマテリアルの肺発がん性メカニズムについて検討し、肺発がんに関する因子および発がん性機序を解明することを目的としている。実験1では F344 雄性ラット 200 匹を用いて実験開始時より Fullerene (FL)、Fullerene whisker (FLW)、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて投与し、投与開始 104 週間後に DNA の酸化的損傷マーカー、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 形成レベルを調べた。実験2では F344 雄性ラット 320 匹を用いて MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて投与し、実験開始 4 および 13 週間後に 8-OHdG 形成レベルを測定した。実験1ではラット肺における免疫染色を用いた解析では MWCNT-7 および MWCNT-N 投与したラット肺の肺胞上皮細胞、過形成および気管支において 8-OHdG 形成レベルの有意な上昇が認められた。肺の凍結サンプルを用いた ELISA 法解析では 8-OHdG 形成レベルは MWCNT-N の高用量群でのみ、有意に誘導されていた。実験2では肺胞上皮細胞において MWCNT-7 および MWCNT-N を 4、13 および 52 週間投与後では 8-OHdG 形成レベルの有意な上昇が本研究認められたが、SWCNT 投与群では有意な変化を見られなかった。したがって、F344 ラット肺において MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群において核 DNA 8-OHdG 形成レベルの強い増加が認められ、その二つの CNT において発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化的ストレスや 8-OHdG 形成の誘導および p38、Rac1 および Nrf2 の活性化が関与していると考えられる。SWCNT が強い酸化的 DNA 損傷を誘導されないことが明らかになった。

A. 研究目的

ナノマテリアルにはリスクと利益が存在し、そのリスクの程度を知ることが重要である。そのためには、毒性を検出する必要があり、吸入暴露試験の代替法は、検査に役立つと思われる。将来、ナノマテリアルの発がん性、特に CNT の発がん性が証明される場合、リスク評価の研究が必要となる。本実験では F344 ラットを用いて *in vivo* 系の実験ではナノマテリアルの発がん性メカニズムについて検討し、肺において発がんに関与する因子および発がん性機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

実験1. F344 雄性ラット 200 匹を用いて実験開始時より Fullerene (FL)、Fullerene whisker (FLW)、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて 8 回投与を行った。ラット肺における免疫染色法および Elisa 法を用いて、8-OHdG 形成レベルの変化を調べた。

実験2. F344 雄性ラット 320 匹を用いて実験開始時より、MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT を 0.1 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法を用いて 8 回投与した。投与開始 4 週間および 13 週間後にラット肺における免疫組織学的解析を用いて DNA 8-OHdG 形成レベルの変化を検討した。

1. ラット肺からの DNA の抽出

ラット左肺サンプル (300 mg) からの DNA の抽出は、以前に報告されている方法を少し改良して行なった。簡略に記載すると、核の DNA は、細胞内小器官を溶かすために抗酸化剤 NaI 液を含む DNA Extractor WB kit (和光純薬工業株) を用いて抽出した。更に、細胞溶解の段階における自己酸化を防止するため、deferoxamine mesylate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を細胞溶解剤に添加した。DNA は、nuclease P1 (ヤマサ醤油株、千葉) とアルカリフォスファターゼ (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) によりデオキシ

ヌクレオチドに断片化し、8-OHdG 形成レベルは ELISA 法により測定した。

2. 8-OHdG 形成の測定 (ELISA 法)

左肺から抽出した DNA サンプルにおける高感度 8-OHdG Check ELISA キット (日研ザイル株式会社 日本老化制御研究所、静岡、日本) を用いてメーカーの説明に従って 8-OHdG 形成レベルを測定した。

3. 免疫組織化学的 8-OHdG 検査

実験 1 では右肺は 4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色 ABC 法を用いて 8-OHdG の形成レベルを解析した。肺のパラフィンブロックを 3 μ m に薄切した。切片は内因性ペルオキシダーゼをブロックするため 0.3%水素水で処理した。馬血清で背景染色をブロッキング処理後、切片は抗 8-OHdG マウスモノクローナル抗体 (1:100、日本老化制御研究所製、静岡、日本) をかけて 4°C で一晩反応させた。免疫染色キット (VECTASTAIN Elite ABC kit、Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて 2 次抗体以降を行い、DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Dojindo Laboratories, 株式会社、熊本、日本) およびヘマトキシリンによる対比染色を実施した。

実験 2 では右肺はブアン (Bouin's solution) で固定し実験 1 と同様な免疫染色方法を用いて 8-OHdG 形成レベルを検討した。切片は抗 8-OHdG マウスモノクローナル抗体 (1:500、日本老化制御研究所製、静岡、日本) をかけて 4°C で一晩反応させた。

4. P-p38, p62, COX2, GRP78, P-Nrf2, Ogg1, P-PERK および GRP78 免疫組織化学的検討

ラット肺 4%緩衝パラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片について、ABC 法による免疫組織化学染色を実施した。マイクロウェーブ照射による抗原賦活化 (クエン酸バッファー pH 6) および 3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。一次抗体として、anti-p38 (phospho T180+Y182, 1:100, ab4822, Abcam, 東京、日本); anti-p62 (SQSTM1) (1:300, PM045, MBL, 東京、日本); anti-COX2 (1:200, aa 584-598, No. 160126, Cayman Chemical, MI, USA); anti-GRP78 (78-kDa glucose-regulated protein, 1:250, ab21685, Abcam, 東京、日本); anti-

PERK (phospho T982) (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) (1:100, ab192559, Abcam, 東京、日本); anti-Rac1/cdc42 (phospho S71) (1:100, #2461, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) rabbit polyclonal 抗体、anti-Nrf2 (phospho S40) (1:100, ab76026, Abcam, 東京、日本)、anti-oxoguanine glycosylase 1 (Ogg1) (1:50, sc-12075, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) goat polyclonal 抗体を用い、4°C にて一晩反応させた。

5. RNA シークエンシング (RNA-Seq) および Ingenuity pathway Analysis (IPA) を用いたシグナリング解析

投与開始 4 週間後の MWCNT-7, MWCNT-N, SWCNT FL 0.25 および 0.5 mg/rat 投与群では 8-OHdG 陽性細胞数は対照群値と同等であった。FLW 0.25 および 0.5 mg/rat 投与群では 8-OHdG 陽性細胞数の増加傾向が見られた (図 2, 3)。

および対処群の凍結したラット肺凍結サンプル (12) を用いて、RNA シークエンシング解析

(Macrogen Japan Corp., 日本) を行い、トランスクリプトームの変化を調べた。ラットの肺の凍結サンプルを用いた。

RNA-seq 解析によって対処群のラット肺に比して、過剰発現が確認された蛋白から、IPA (Ingenuity Systems, MountainView, CA, USA) を用いて機能解析、やシグナリング解析を行った。

6. 統計処理—試験実施施設

対照群と各投与群との間の統計学的な有意差検定を行い、危険率 5% ($P < 0.05$) 又は 1% ($P < 0.01$) のレベルで判定した。統計学的解析は、8-OHdG 形成レベル平均値の差について、5%有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行い、等分散の場合は、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を、不等分散の場合は、ノンパラメトリックの Bartlett's 法による両側検定を行った。

C. 研究結果

1. 実験 1

1-1. ラット肺における 8-OHdG 形成 (ELISA 法で測定)

DNA 中における 8-OHdG 形成の分析結果を図 1 に示した。ラット肺より抽出した DNA における 8-OHdG は、0.5 mg/rat MWCNT-N 群においてのみ、対

照群値と比較して統計学的に有意な増加がみられた。他のナノマテリアルの投与群では8-OHdG形成の上昇が見られなかった。

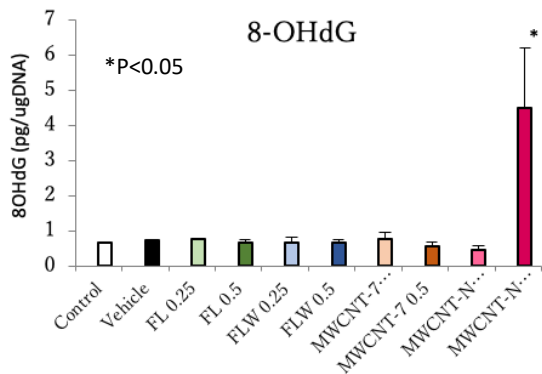


図1. ラット肺DNAの8-OHdG形成レベルの変更 (E LISA法)

1-2. ラット肺における8-OHdG形成レベル (免疫染色)

免疫染色を用いた解析結果を図2および3に示す。

0.25および0.5 mg/rat MWCNT-7およびMWCNT-Nを投与したラットの肺胞および気管支上皮細胞において、8-OHdG陽性細胞数の有意な増加が見られた。

2. 実験 2

2-1. ラット肺における8-OHdG形成レベル (免疫染色)

免疫染色を用いた解析結果を図4と図5に示す。

0.5 mg/rat MWCNT-7およびMWCNT-N投与群のラット肺胞および気管支上皮細胞において、投与開始4、13および52週間後の8-OHdG陽性細胞数の有意な上昇が認められた(図4(A, B, C))。

SWCNT 0.5 mg/rat投与群では第4、13および第52週に8-OHdG陽性細胞が観察されたが、無処置群と対処群に対して有意な増加は認められなかった。

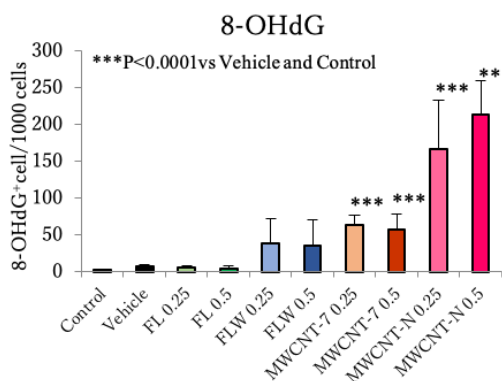


図2. 免疫染色で観察されたラット肺8-OHdG形成レベルの上昇

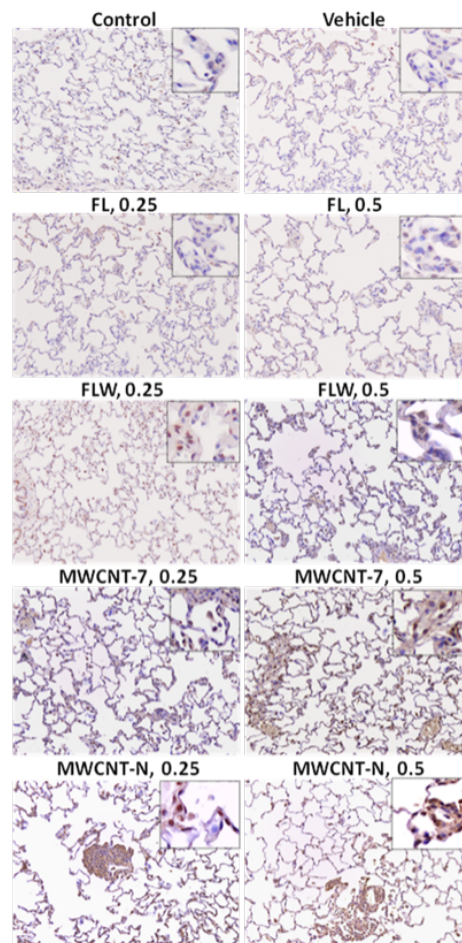


図3. 実験1における8-OHdG免疫染色の代表的な写真

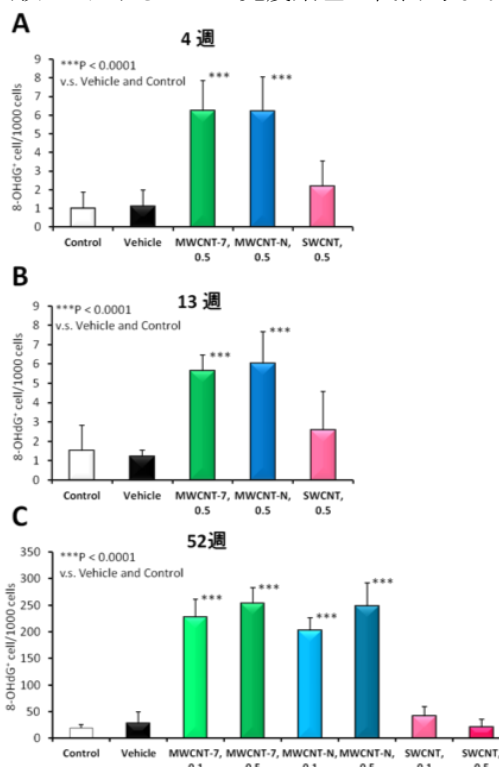


図4. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (A)、13週間 (B) および52週間後 (C) ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

52 週間後の 0.1 mg/rat MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では、ラット 8-OHdG 陽性肺胞上皮細胞の数が無処置群と対処群に対して有意に上昇していた。さらに、4、13 および 52 週間投与後、肺に浸潤した多くのマクロファージ(Mφ) (細胞質や核内)や好中球(核内)が 8-OHdG 陽性であった(図 5)。MWCNT-7 および MWCNT-N 投与後のラット肺に多くの 8-OHdG 陽性の Mφ が観察された。しかし、SWCNT 投与群では 8-OHdG 陽性の好中球が多く見られた(図 5)。

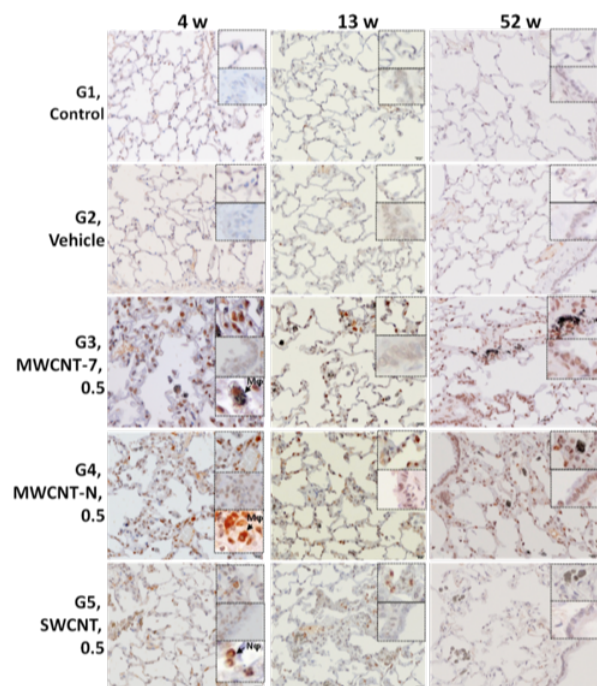


図 5. 実験 2 における 8-OHdG 免疫染色の代表的な写真(4、13 および 52 週間投与後)

2-2. RNA シークエンシング (RNA-Seq) および IPA によるシグナリング解析

実験 2 におけるナノマテリアル 4 週間投与後の肺組織の RNA-Seq 解析し、IPA を用いてシグナリングパスウェー解析を行った。その結果、0.5 mg/rat MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群のみでは窒素および酸化ラジカルの産生、p38 および Rac シグナリングの活性化が予測された。短期投与の場合は MWCNT-7 の影響が一番強く、一方、0.5 mg/rat SWCNT 投与群では Mφ によるフリーラジカルの誘導および p38/Rac1 の活性化が認められなかった。また、SWCNT 投与群ではオートファジーの活性化が予測された(表 1)。

	MWCNT-7 0.5/ Vehicle	MWCNT-N 0.5 Vehicle	SWCNT/ 0.5/ Vehicle
Canonical Pathways			
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Mφ	2.18	1.90	1.16
p38 MAPK Signaling	3.53	2.03	1.77
RAC Signaling	2.29	2.19	1.47
Autophagy	1.41	1.72	2.06

Data are z-score (z-score>2: activation)

© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

表 1. RNA-Seq 解析および IPA によるナノマテリアル 4 週間投与後のラット肺組織におけるシグナリングパスウェーの活性化

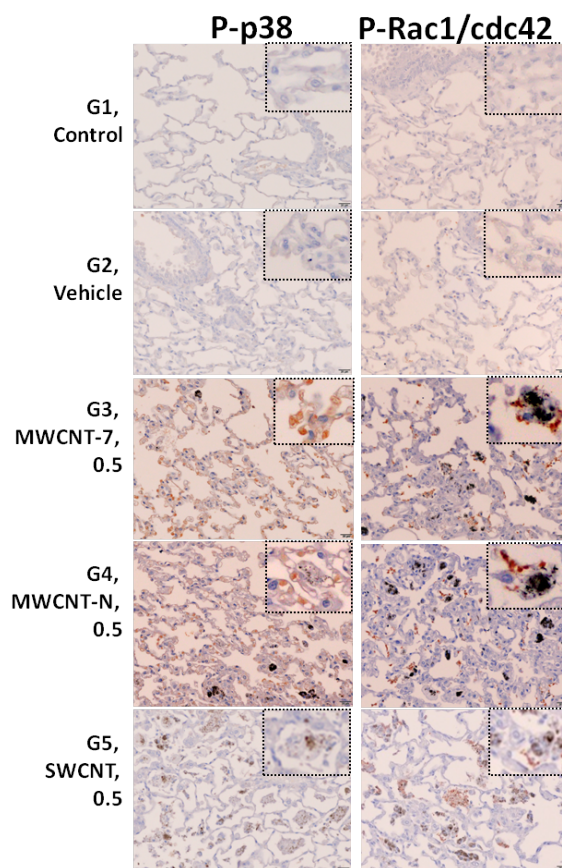


図 6. 実験 2 におけるラット肺胞上皮細胞における P-p38 および P-Rac1/Cdc42 の発現(4 週間投与後)

2-3. ラット肺における P-p38、P-Rac1/Cdc42、P-Nrf2、p62、Ogg1 および COX2 の発現

実験 2 では 0.5 mg/rat の量で MWCNT-7 又は MWCNT-N 投与した群において、開始 4 および 13 週間後、ラット肺上皮細胞において 8-OHdG の発現上昇とともに、細胞増殖マーカー(リン酸化

p38 (P-p38) およびリン酸化 Rac1/cdc42 (P-Rac1/cdc42) の高発現と酸化的ストレス・小胞体ストレスマーカー (p62) およびリン酸化 (Ser40) Nrf2 (P-Nrf2) の発現上昇が見られた (図 6、7)。SWCNT 群ではラット肺上皮細胞において P-p38、P-Nrf2 の高い発現が見られなかった。また、Ogg1、P-PERK および GRP78 の免疫染色を行い、全群のラット肺上皮細胞において染色が観察されて、CNTs 群では対処群に比べて有意な変化が認められなかった。さらに、MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT 投与後ラットの肺上皮細胞、Mφ および好中球において cyclooxygenase 2 (COX2) の高発現が観察された (図 7)。

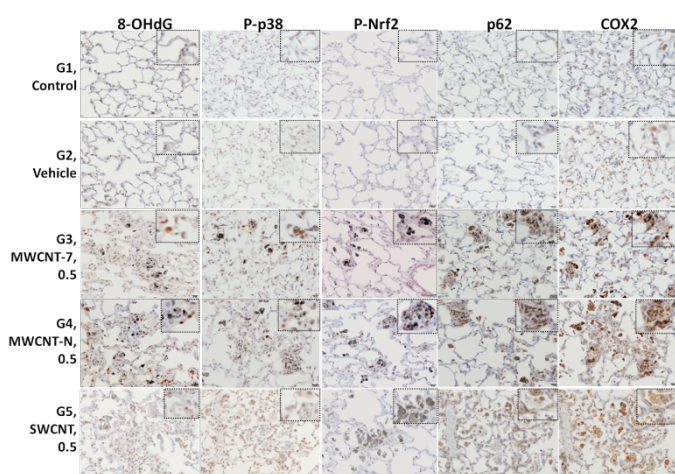


図 7. 実験 2 における肺胞上皮細胞における 8-OHdG, P-p38, P-Nrf2, p62 および COX2 の免疫染色の代表的な写真 (13 週間投与後)

D. 考察

DNA と ROS (活性酸素) の反応により形成される付加体である 8-OHdG は、酸化的 DNA 損傷の良く知られたマーカーであり、多くの実験モデルにおいて発がん性に関与していることが知られている。8-OHdG は、突然変異、特に G から T への塩基置換の原因となっている。組織中における実際の 8-OHdG レベルは、ROS の産生とその修復の比率の変化により決定される。

実験 1 では、0.25 および 0.5 mg/rat の量で MWCNT-7 又は MWCNT-N を投与した群では、投与 104 週間後に肺腺がんの有意な発生が認められており、肺胞および気管支上皮 DNA 中における 8-OHdG 蓄積に関連していると考えられる。また、実験 2 では 0.5 mg/rat の量で MWCNT-7 又は MWCNT-N 投与した群において、開始 4、13 および 52 週間後の 8-OHdG

陽性肺胞上皮細胞が増加するとともに、多くの 8-OHdG 陽性 Mφ 数の上昇が認められたことから、肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生と DNA 損傷は、Mφ の増加による ROS 放出の誘導と関連していることが考えられる。

SWCNT 投与群では有意な 8-OHdG 陽性肺胞上皮細胞の数を認められなかったことから、SWCNT が強い酸化的 DNA 損傷を引き起こさないと考えられた。肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生と DNA 損傷 (8-OHdG) は、Mφ の増加による ROS 放出の誘導と関連していることが考えられる。

実験 2 で観察された MWCNT-7 又は MWCNT-N 投与後のラット肺上皮細胞の酸化的ストレス・小胞体ストレスおよび細胞増殖マーカー (p62)、P-Nrf2、P-p38 および P-Rac1/cdc42 の誘導が 8-OHdG 形成レベルと相関し、MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では高い値が見られた。COX2 の発現が全 CNT 投与群の Mφ や好中球において上昇していた。しかしながら、SWCNT 投与後では p62 の誘導や p38 および P-Rac1 の活性化が認められなかった。一方、SWCNT 投与群ではオートファジーの誘導が予測できた。

E. 結論

F344 ラットの肺において MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では肺胞上皮および気管支上皮細胞の核 DNA 8-OHdG 形成レベルの強い上昇および p38/Rac1 および Nrf2 の活性化が認められた。しかし、SWCNT 投与群では有意な上昇が認められなかった。MWCNT-7 および MWCNT-N 投与 104 週間後に発がん性が見られたことから、その発がん機序に酸化的ストレスや 8-OHdG 形成の誘導が関与していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, **Kakehashi A**, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology*. 488:53483, 2023.
2. Nota T, Kageyama K, Yamamoto A, **Kakehashi A**, Yonezawa H, Jogo A, Sohga E, Murai K, Ogawa S, Miki Y. Safety and Feasibility of Contrast-Enhanced Computed Tomography with a

- Nanoparticle Contrast Agent for Evaluation of Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumors in a Rat Model. *Acad Radiol.* 30:30-39, 2023.
3. Tagami M, **Kakehashi A**, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One.* 17: e0263895, 2022.
 4. Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, **Kakehashi A**, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci.* 113: 2642-2653, 2022.
 5. Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, **Kakehashi A**, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 35:247-254, 2022.
2. 学会発表
1. **梯アンナ**、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膀胱癌の新規バイオマーカー候補の解析、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 2. Guiyu Qiu、**梯アンナ**、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、芝野佳奈、鰐淵英機. ヒト浸潤性膀胱癌における PRDX3 の機能解明、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 3. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwong、大石裕司、**梯アンナ**、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸 (DPAA) のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 4. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた o-toluidine の尿中代謝物による膀胱尿路上皮癌への影響、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 5. 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、**梯アンナ**、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおける DNA メチル化異常、第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 6. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibuno, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, **Anna Kakehashi**, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells, 第 39 回日本毒性病理学会 (2023 年 1 月、江戸川区／ハイブリッド開催)
 7. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん、第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
 8. 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、**梯アンナ**、山本与毅、邱桂ユウ. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおける DNA メチル化異常、第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
 9. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱ケイギョク、**梯アンナ**、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸 (DPAA) のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進、第 81 回日本癌学会学術総会 (2022 年 9 月、横浜)
 10. **梯アンナ**、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序の最近の洞察(シンポジウム)、第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
 11. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響および尿中代謝物との関係、第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
 12. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐淵英機. 1,4- ジオキサンの in vivo 変異原性および発がん性の定量解析. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
 13. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、**梯アンナ**、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物 DPAA のマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響およびその機序の検討、第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022

年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)

14. 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索、第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)
15. 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤 Acetazolamide の Wnt/ β カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果、第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022 年 1 月、神戸/ハイブリッド開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発（20KD1003）

分担研究課題名：経気管肺内噴霧投与（TIPS）法によるカーボンナノチューブ有害性の解析

研究分担者： 津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任教授

研究要旨

壁数が2～数十層以上の5種の多層壁カーボンナノチューブ（MWCNT）およびチタン酸カリウム線維には肺内投与によって、肺または胸膜中皮に発がん性のあることを明らかにしてきた。それらの大部分は異物として体内に長く肺内に残留するが代謝分解されることはない。一方、ニトロサミン類のような化学発癌物質は生体内で代謝活性化されて最終的にDNA障害をもたらす。MWCNTの発がんリスク評価をにおいて両者の発がん分子機序の差異を明らかにすることを目的とした。方法はF344雄ラットに剛質線維型（Rigid fibrous）のMWCNT-N（肺・胸膜中皮に発癌性あり）ともつれ線維型（Tangled）のMWCNT-B（肺のみに発癌性あり）を1回/週にて総投与量1.5mg/ラットを投与し、肺発がん機序についての比較対照として既知の肺発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kgおよびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）を200mg/kgとなるように1回/週にて4週間（計4回）投与した。これらの処置による肺発がんについてRNAマイクロアレイ発現解析、病理所見に関連する遺伝子変化、とくに腫瘍病変における標的シグネチャーを詳細に解析する。結果は国際的に通用するAdverse Outcome Pathway(AOP)を構築し、OECDナノマテリアル作業グループ(WPMN)に提案できる評価法の開発に資するデータの提示をめざす。現在DHPN、NNK、MWCNT-N、MWCNT-Bの肺胞上皮がんの発生が得られ、現在腫瘍におけるマイクロアレイ解析およびDNAシグネチャー解析を実施中である。

A. 研究目的

2層以上の多層壁カーボンナノチューブ（MWCNT）は、肺または胸膜中皮に発がん性のあることを明らかにしてきた。それらは肺内では異物として体内に残留するが代謝分解はされない。一方、ニトロサミン類のような化学発癌物質は生体内で代謝活性化されて最終産物がDNA障害をもたらす。MWCNTの発がんリスク評価をについて両者の発がん機序における遺伝子発現の差異を明らかにして、MWCNTの発がんの分子機序を明らかにする。

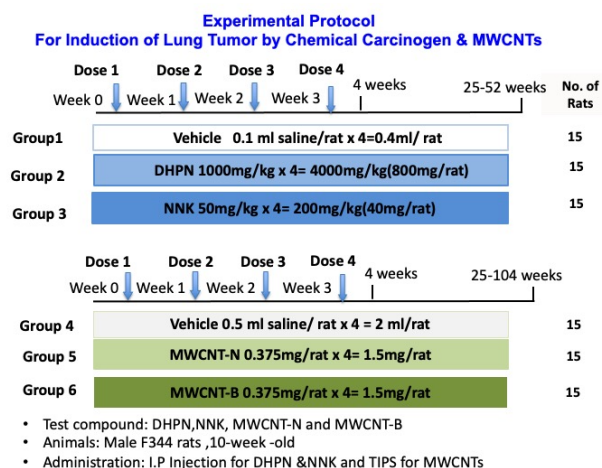
B. 研究方法

F344雄ラットを用いて肺に発がん標的性を示す2種のニトロソアミンと2種のMWCNTを経気管肺内噴霧投与（TIPS）したがんのDNA Signature解析剛質を含む形質特製（Phenotypic characteristics）について解析

する事を目的としている。MWCNTは、剛質針状（Rigid fiber）型のMWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）（Suzui, M, et al, 2016）と柔軟もつれ型線維（Tangled fiber）のMWCNT-B（肺発癌性あり）（Saleh, DM, 2020）を用いた。投与は、1回/週にて総投与量1.5mg/ラットを投与した。比較対照として既知の肺発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kg、およびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）を200mg/kgとなるように1回/週にて4週間（計4回）投与した。これらの処置による肺発がんについてRNAマイクロアレイ発現解析、病理所見に関連する遺伝子変化、とくに腫瘍病変における標的シグネチャーを詳細に解析する。結果は国際的に通用するAdverse Outcome Pathway(AOP)を構築し、OECDナノマテリアル作業グループ(WPMN)に提案

できる評価法開発に資するデータの提示を目差した。

実験デザイン図



(倫理面への配慮)

本研究における倫理面への配慮については「動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日、法律第105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)」を遵守するとともに、当該法令の規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる研究は行わない。

C. 研究結果

現在 100 週を経過した状態で全ての群において肺腫瘍が得られている。

1) DHPN による腫瘍 6 例

Adenocarcinoma 3 例

Squamous cell carcinoma 2 例

Adeno-squamous carcinoma 1 例

2) NNK による腫瘍 3 例

全て Adenocarcinoma

3) MWCNT-N(straight aggregates)による腫瘍 4 例

Adenocarcinoma 1 例

Mesothelioma 3 例

4) MWCNT-B(tangled aggregates)による腫瘍 2 例

Adenocarcinoma 1 例

Not identified 1 例

以下の試料についてシグネチャー解析が進行中であり、近々結果が得られる。

	Rat number	Pathologic diagnose (tube labeling)	Control tissue (tube labeling)
DHPN	32	Squamous Cell Carcinoma (T1)	Lung (2)
	40	Adeno - Carcinoma (T1)	Lung (2)
	49	S. C. Carcinoma (T1)	Lung (2)
	51	Combined S. C. Carcinoma+ Ad. Carcinoma (T1)	Lung (2)
	59	Ad. Carcinoma (T1)	Lung (2)
	60	Ad. Carcinoma (T1)	Lung (2)
NNK	64	Ad. Carcinoma (T1)	Lung (2) & Diaphragm (D)
	77	Ad. Carcinoma (T1)	Lung (2) & Diaphragm (D)
	79	Ad. Carcinoma (T1)	Lung (2) & Diaphragm (D)
MWCNT-N	118	Mesothelioma (T1)	Liver (L)
	119	Ad. Carcinoma (T1)	Liver (L)
	124	Mesothelioma (T2)	Liver (L)
	129	Mesothelioma (2)	Diaphragm (D)
MWCNT-B	139	Adeno - Carcinoma (T1, T2)	Liver (L)
	156	not identified yet (T1)	Liver (L)

D. 考察

MWCNT はそれ自体では殆ど分解される事はなく、肺胞内で主として Macrophage の phagocytosis 反応を主体とする異物反応誘引する。一方、ニトロサミンはそれら自体の代謝解毒反応物による DNA 障害が誘導されて起る発がん機序が明らかにされている。進行中のシグネチャー解析によって、MWCNT による DNA 傷害の解析によって、発がん機序の一端が明らかにされる。

E. 結論

MWCNT 自体は化学的に安定した物質なので生体内で代謝による活性化が行われて DNA 傷害物質となって発がんさせるニトロサミンとは別の発がん機序が明らかとなる可能性が期待される。従って、進行中の腫瘍における DNA シグネチャー解析、さらに初期における肺組織におけるマイクロアレイ解析による遺伝子レベルの変化の差異から新しい所見が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoyama Y, Naiki-Ito A (Corresponding), Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, **Tsuda H**, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin prevents hepatic injury

and fibrosis via the inhibition of NF- κ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. 14: 42, 2022.

2. Saleh DM, Luo S, Ahmed HM Omnia, Alexander DB, Alexander TW, Gunasekaran S, El-gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, El Hadi RHA, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Jiegou Xu, Suzuki S, Naiki-ito A, Takashi S, **Tsuda H**. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol*. 19:30, 2022.

2. 学会発表

1. Saleh D, Alexander TW, Alexander DB, Abdelgied M, El-gazzar AM, Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S, Takase H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Gi M, Taquahashi, Y, Hirose A, Kanno J, Tsuruoka S, **Tsuda H**. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation, ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY (2022年9月、マーストリヒト・オランダ)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

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
該当なし							

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
Yamamoto Y, Hotta Y, Tomita N, Naiki-Ito A , Kitagawa A, Kuboshiki U, Hagita T, Noda M, Sanagawa A, Kataoka T, Kondo M, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K.	Changes in zinc and manganese concentrations in cisplatin-induced acute kidney injury.	Biochem Biophys Res Commun.	33	101422	2023
Tomita N, Hotta Y, Ito H, Naiki-Ito A , Matsuta K, Yamamoto Y, Ohashi K, Hayakawa T, Sanagawa A, Horita Y, Kondo M, Kataoka T, Takahashi S, Sobue K, Kimura K.	High preoperative serum strontium increase the risk of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass.	Clin Exp Nephrol.	27	382-391	2023
Kachi K, Naitoh I, Ban T, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato A, Kito Y, Saito K, Matsuo Y, Kato H, Naiki-Ito A , Takahashi S, Notohara K, Kataoka H.	A Case of Concomitant Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Potential Issue in the Diagnosis of Carcinoma by Endoscopic Ultrasound-guided Fine-needle Biopsy.	Intern Med.	62	545-551	2023
Naiki T, Naiki-Ito A , Kawai T, Komatsu H, Nishikawa R, Gonda M, Aoki M, Sugiyama Y, Tasaki Y, Yasui T.	A case of metastatic treatment-emergent small cell/neuroendocrine prostate cancer with BRCA2 mutation diagnosed by liver biopsy.	IJU Case Rep.	5	431-435	2022

Tomiyama N, Naiki T, Naiki-Ito A , Kawai T, Etani T, Gonda M, Aoki M, Morikawa T, Sugiyama Y, Yasui T.	A rare case of long-term survival from metachronous bilateral adrenal metastasis of lung adenocarcinoma after combined surgical removal and immunochemotherapy.	IJU Case Rep.	5	474-478	2022
Noda Y, Naiki T, Sugiyama Y, Nagai T, Naiki-Ito A , Kawai T, Hamamoto S, Etani T, Iida K, Tomiyama N, Aoki M, Shimizu N, Moritoki Y, Akita H, Ando R, Kawai N, Yasui T.	Survival Outcome after Reduced-Port Laparoscopic Radical Cystectomy for Bladder Cancer: Long-Term Follow-Up Analysis.	Oncology.	100	429-438	2022
Kato A, Naitoh I, Naiki-Ito A , Hayashi K, Okumura F, Fujita Y, Sano H, Nishi Y, Miyabe K, Inoue T, Hirano A, Takada H, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato H, Takahashi S, Kataoka H.	Class III β -Tubulin Expression Is of Value in Selecting nab -Paclitaxel and Gemcitabine as First-Line Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer.	Pancreas.	51	372-379	2022
Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A , Sanagawa A, Kataoka T, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K.	Protective effects of tadalafil on damaged podocytes in an adriamycin-induced nephrotic syndrome model.	J Pharmacol Sci.	149	53-59	2022
Saleh DM, Luo S, Ahmed HM Omnia, Alexander DB, Alexander TW, Gunasekaran S, El-gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, El Hadi RHA, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Jiegou Xu, Suzuki S, Naiki-ito A , Takashi S, Tsuda H .	Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study.	Part Fibre Toxicol.	19	30	2022
Aoyama Y, Naiki-Ito A (Corresponding) , Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, Tsuda H , Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S.	Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF- κ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model.	Nutrients.	14	42	2022

Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y , Wakabayashi K, Miyoshi N.	Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism.	Chem Res Toxicol.	35	1625-1630	2022
Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiyama M, Hamoya T, Fuji G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y , Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M.	Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer.	In Vivo.	36	628-634	2022
Nota T, Kageyama K, Yamamoto A, Kakehashi A , Yonezawa H, Jogo A, Sohgawa E, Murai K, Ogawa S, Miki Y.	Safety and Feasibility of Contrast-Enhanced Computed Tomography with a Nanoparticle Contrast Agent for Evaluation of Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumors in a Rat Model.	Acad Radiol.	30	30-39	2023
Tagami M, Kakehashi A , Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S.	FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment.	PLoS One.	17	e0263895	2022
Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A , Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H.	The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling.	Cancer Sci.	113	2642-2653	2022
Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A , Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H.	Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung.	J Toxicol Pathol.	35	247-254	2022

令和5年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発
- 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究科・准教授
(氏名・フリガナ) 内木 綾・ナイキ アヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	名古屋市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2023年 3月 31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 日本大学薬学部

所属研究機関長 職名 学部長

氏名 鳥山 正晴

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 環境衛生学・教授

(氏名・フリガナ) 戸塚ゆ加里・トツカユカリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 大阪

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 西澤 良記

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大阪公立大学大学院医学研究科・講師
(氏名・フリガナ) 梯 アンナ (カケハシ アンナ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 in vitro 予測手法の開発

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究科・特任教授

(氏名・フリガナ) 津田 洋幸・ツダ ヒロユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	名古屋市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。