

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発 (23KD1002)

令和5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内木 綾

令和6(2024)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発 1
名古屋市立大学 大学院 医学研究科 / 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
名古屋市立大学 大学院 医学研究科 / 内木 綾 12

2. 次世代シーケンサー(NGS)によるゲノム変異解析
日本大学 薬学部 / 戸塚 ゆ加里 18

3. カーボンナノチューブによる肺内酸化ストレス解析
大阪公立大学 大学院 医学研究科 / 梯 アンナ 22

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
名古屋市立大学 大学院 医学研究科 / 津田 洋幸 30

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 32

研究課題名：ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する短期経気管肺内噴霧暴露評価系
および *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

化学物質のナノサイズ化により、機能や特性が飛躍的に向上することから、ナノマテリアル(NM)の新素材としての使用や生産が増大する一方で、吸入暴露による毒性影響が懸念される。カーボンナノチューブ(CNT)のような不溶性繊維状 NM は、長期間体内に蓄積され持続的な炎症を誘発する。従って NM の吸入暴露による実用的な健康影響評価手法の開発は極めて重要である。申請者らはこれまでに、大規模施設と高額費用を要する吸入暴露試験を代替しうる NM の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を用いた試験デザインを開発し、吸入暴露試験で発がん性が見出された多層 CNT(MWCNT)-7 を含めた 4 種の MWCNT について、肺・胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにした。さらに R2-5 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）においては、発がん性陽性 MWCNT では、活性化マクロファージ(M ϕ)によるケモカイン、活性酸素種(ROS)の産生と、肺胞上皮の増殖活性・酸化 DNA 損傷の促進を投与後早期に検出し、CNT 毒性の Adverse Outcome Pathway (AOP)と期待される。本研究では、TIPS 投与により発がん性が未知の単層 CNT (SWCNT) の肺・胸膜中皮発がん性の有無を明らかにし、発がん性の有無や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 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。

肺発がん陽性対照である多層 CNTs (MWCNT-7、MWCNT-N)と、SWCNT の TIPS 投与(0.1 または 0.5 mg/rat)による肺腫瘍性病変と増殖、酸化 DNA 損傷について、亜急性(4 週)、亜慢性(13 週)、慢性(52 週)、発がん(104 週)期のサンプルを解析した。さらに、発がん性陽性(MWCNT-B、DWCNT)、陰性(CNH)を被験 CNT として追加し、亜急性期の遺伝子変化と発がん性の関連について、RNA シーケンシング(RNA-seq)で解析した。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、MWCNT または DHPN 暴露のラット中皮腫/肺腫瘍 15 サンプルからゲノム DNA を抽出し、NGS 解析による WGS 解析を行った。

その結果、MWCNTs、SWCNT により、投与 4 週後から肺胞上皮の増殖(Ki67)、炎症関連 DNA 損傷(8-nitrosoguanosine, 8-NG) マーカー、*Ccl* 種の mRNA 発現は有意に増加した。104 週における肺胞上皮腺癌の発生は、MWCNT-N、SWCNT、MWCNT-7 群で観察された。胸膜中皮腫の発生は、MWCNTs で認められた。さらに亜急性期の RNA-seq 解析による発がん性陽性、陰性 CNT の比較では、発がん性陽性群において複数の炎症関連パスウェイが抽出された。NMF 解析の結果から、検出された SNV の数は DHPN で 60,000~160,000 程度、MWCNT-7 では 250~16,000 程度と、暴露した化学物質で大きく異なることがわかった。変異シグネチャー解析の結果から、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)といずれの変異パターンもまんべんなく検出される Rat_SBS_C が同定された。全ての DHPN サンプルにおいて Rat_SBS_A が 90%以上を占めていることから、Rat_SBS_A が DHPN に由来するシグネチャーであると同定した。一方、MWCNT-7 では、Rat_SBS_B 及び Rat_SBS_C がメジャーなシグネチャーであり、これら 2 種の変異シグネチャーが MWCNT-7 に由来することが示唆された。Rat_SBS_B 及び C は自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7 の発がんメカニズムとして、宿主側の 2 次的反応などを介することが示唆された。また、MWCNT-7 暴露において比較的多くの SNV 数が観察された検体では、Rat_SBS_B の寄与率が非常に高く、アスベスト暴露の症例を含むヒト中皮腫データから抽出された変異シグネチャーの報告と類似したことから、MWCNT 暴露ラット発癌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。

以上より、増殖、酸化 DNA 損傷やケモカイン発現などの毒性所見は 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。また変異シグネチャー解析では、化学発癌とは異なる CNT 特異的な変異シグネチャーが得られ、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、*in vitro*系開発にも応用しうる、発がん機序解明やリスク評価などに有用な情報が追加できるものと考えられる。

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 准教授
 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。さらにR2-5年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)においては、発がん性陽性MWCNTでは、活性化マクロファージ(M ϕ)によるケモカイン、活性酸素種(ROS)の産生と、肺胞上皮の増殖活性・酸化的DNA損傷の促進を投与後早期に検出し、CNT毒性のAdverse Outcome Pathway(AOP)として期待される。

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AOPを得ることも可能であることが示されている。本研究では、TIPS投与により発がん性が未知の単層CNT(SWCNT)の肺・胸腔中皮発がん性の有無を明らかにし、発がん性の有無や程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより、これまでに得られたCNTのAOPの高精度化や新規AOPの樹立を試み、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。

本年度は、多層CNTs(MWCNT-7, MWCNT-N)とSWCNTのTIPS投与後、発がん期(104週)における肺と胸膜中皮の発がん性について解析し、亜急性期(4週)における酸化的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、化学発がんと比較することにより、CNT発がん特異的に寄与する責任因子を推定する。これらにより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し、*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 \times 2)、104週(20匹 \times 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、M ϕ 局在(抗CD68抗体、BIO-RAD)、増殖活性(抗Ki67抗体、Abcam)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、酸化的DNA損傷により蓄積される8-OHdG、炎症関連DNA損傷マーカー8-nitrosoguanosine(8-NG)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、日本老化制御研究所)、anti-8-NG rabbit polyclonal抗体(1:20, 10 μ g/ml)、KMU-P01, Cosmo Bio Co. LTD)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。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、*Ii*種や*Tnf- α* 等の炎症性サイトカイン発現を定量する(内木)。また凍結肺からはRIPA buffer(1 \times)でタンパク抽出し、Bradford法を用いて濃度を測定する。40 μ gのタンパク質サンプルをアクリルアミドゲルに電気泳動し、ウェスタンブロット解析を行う。一次抗体には、以下に記載した抗体を記載した希釈濃度で使用する。Rabbit anti-Nrf2 phospho S40(SAB5701902, Sigma-Aldrich, 1:1000); rabbit anti-p62(1:1000, ab91526, Abcam); anti-iNOS/NOS mouse 抗体(1:2000, No. 610329, BD Transduction Laboratories)。

(2) *In vivo* 実験：TIPS投与によるCNT負荷試験と亜急性期遺伝子変化の解析(津田、内木)

(1) *In vivo*試験と同様の方法で、発がん性陽性(MWCNT-7, MWCNT-N, MWCNT-B, DWCNT)、陰性(CNH)、未知(SWCNT)を被験CNTとしてTIPS投与し、4週後に肺組織を採取、凍結保存し、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う。

(3) *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をF344ラットにTIPS投与し、発生した肺がん及び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。同時に、肺がんの陽性対照としてニトロソ化合物であるDHPN(N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine)をF344ラットに皮下投与して作成した肺腫瘍についても解析を行なう。MWCNT-7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。一方、F344ラットにMWCNT-7またはDHPNを投与して得られた胸膜中皮腫及び肺癌は凍結サンプルよりDNAを抽出し、同様に全ゲノム解析を実施する。得られたデータから、Mutect(Ver2), Strelka(Ver2)を用いて変異検出を行い、SigProfilerExtractor(v.1.1.3)にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行う(戸塚)。

(4) *In vitro*実験：Mφ細胞を用いたCNTによる毒性の解析（内木）

マウスMφ細胞 (RAW264.7) に、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、ロッシェ)、産生される炎症性サイトカイン (定量的RT-PCR) を定量する (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、医動23-047)、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

104週の剖検時、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 (No treatment) 群 (絶対重量 1.5 ± 0.5 g) と対照 (vehicle) 群 (1.5 ± 0.1 g) で差は見られなかった。また、対照群と比較して、MWCNT-7 (低用量群 1.5 ± 0.1 g)、MWCNT-N (低用量群 1.8 ± 0.5 g、高用量群 1.9 ± 0.1 g)、SWCNT (低用量群 1.6 ± 0.3 g、高用量群 2.4 ± 0.7 g、 $P < 0.001$) で増加傾向を認め、SWCNT高用量群で有意に増加した。なお、MWCNT-7高用量群では、52週剖検以降全例が中皮腫発生で途中死亡したため、104週の解析は不能であった。

(1)-2. CNTによる肺有害性の解析

4、13、52週において、増殖活性と酸化あるいは炎症関連DNA損傷について定量解析を行った。比較のために4週、52週の結果とともに提示する。肺胞上皮細胞におけるKi67、8-OHdGおよび8-NG陽性細胞率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群において有意に上昇した。そのうち、Ki67および8-NGについては、SWCNTにおいても有意に増加した (図1-3)。

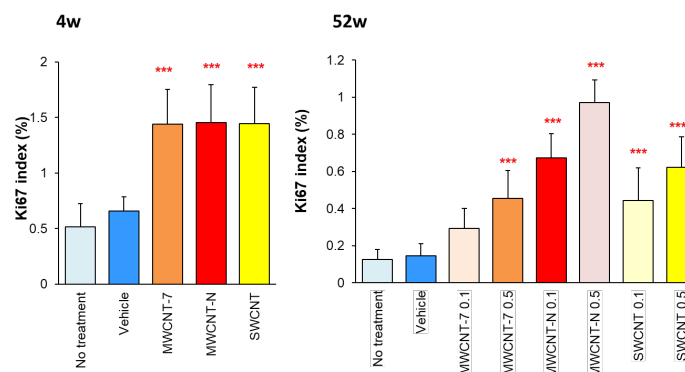


図1. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

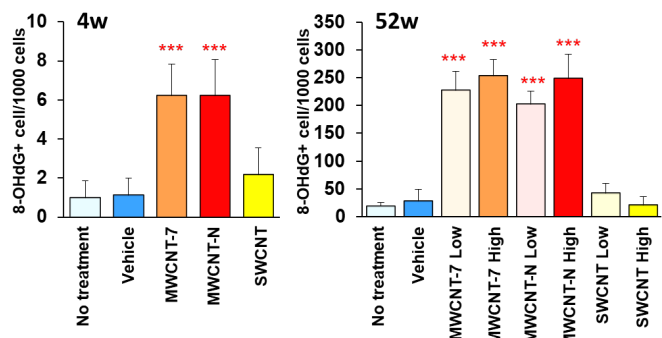


図2. CNT投与による肺胞上皮酸化DNA損傷の変化 (8-OHdG免疫染色)、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

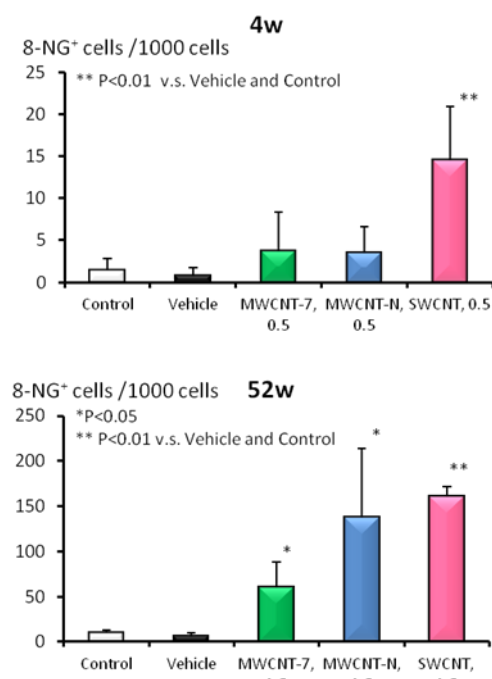


図3. CNT投与による肺胞上皮炎症関連DNA損傷の変化 (8-NG免疫染色)、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ vs Vehicle.

(1)-3. 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)。

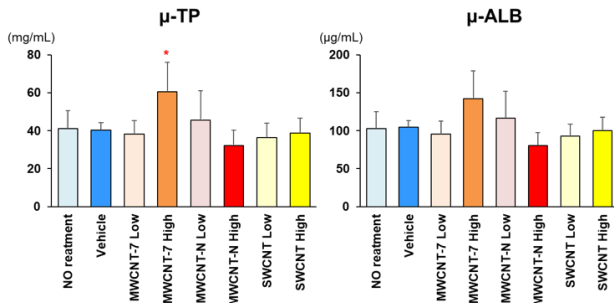


図4. CNT投与による胸腔洗浄液中総タンパクとアルブミン値の変化、*P < 0.05 vs Vehicle.

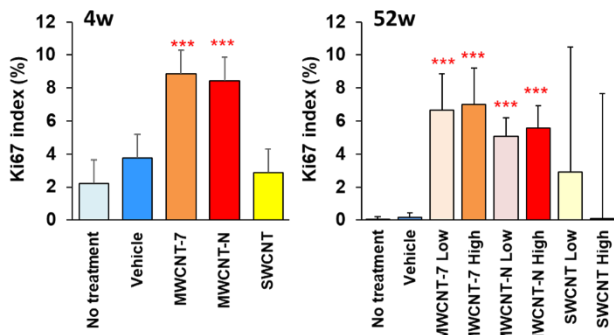


図5. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化(Ki67免疫染色)、***P < 0.001 vs Vehicle

(1)-4. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量

104週における肺胞上皮過形成の発生頻度は、無処置群(1/17匹)、対照群(3/18匹)、MWCNT-7低用量群(0/19匹)、MWCNT-7高用量群(1/21匹)、MWCNT-N低用量群(7/18匹)、MWCNT-N高用量群(6/19匹)、SWCNT低用量群(3/18匹)、SWCNT高用量群(3/17匹)であった。肺胞上皮腺腫の発生頻度は、無処置群(0/17匹)、対照群(0/18匹)、MWCNT-7低用量群(0/19匹)、MWCNT-7高用量群(1/21匹)、MWCNT-N低用量群(3/18匹)、MWCNT-N高用量群(3/19匹)、SWCNT低用量群(2/18匹)、SWCNT高用量群(0/17匹)であった。肺胞上皮腺癌の発生頻度は、無処置群(0/17匹)、対照群(1/18匹)、MWCNT-7低用量群(0/19匹)、MWCNT-7高用量群(1/21匹)、MWCNT-N低用量群(1/18匹)、MWCNT-N高用量群(6/19匹、P<0.05)、SWCNT低用量群(0/18匹)、SWCNT高用量群(11/17匹、P<0.001)で、MWCNT-NとSWCNTの高用量群で有意な上昇を認めた。

胸膜中皮腫の発生は、無処置群(0/17匹)、対照群(0/18

匹)、MWCNT-7低用量群(4/19匹)、MWCNT-7高用量群(20/21匹、P<0.001)、MWCNT-N低用量群(1/18匹)、MWCNT-N高用量群(8/19匹、P<0.001)、SWCNT低用量群(1/18匹)、SWCNT高用量群(1/17匹)で、MWCNT-7とMWCNT-Nの高用量群で有意な上昇を認めた。

(1)-5. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

4、13、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。いずれも同様の傾向で、4週の結果を示す(図6)。CNTs投与による遺伝子発現の増加傾向は見られ、肺発がん感受性の高いと考えられる MWCNT-N は、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl9*、*Tnf-α* および *Il-1β* で有意に上昇した。SWCNT では *Ccl2*、*Ccl3* で有意に上昇し、肺発がん性と相関を示した。

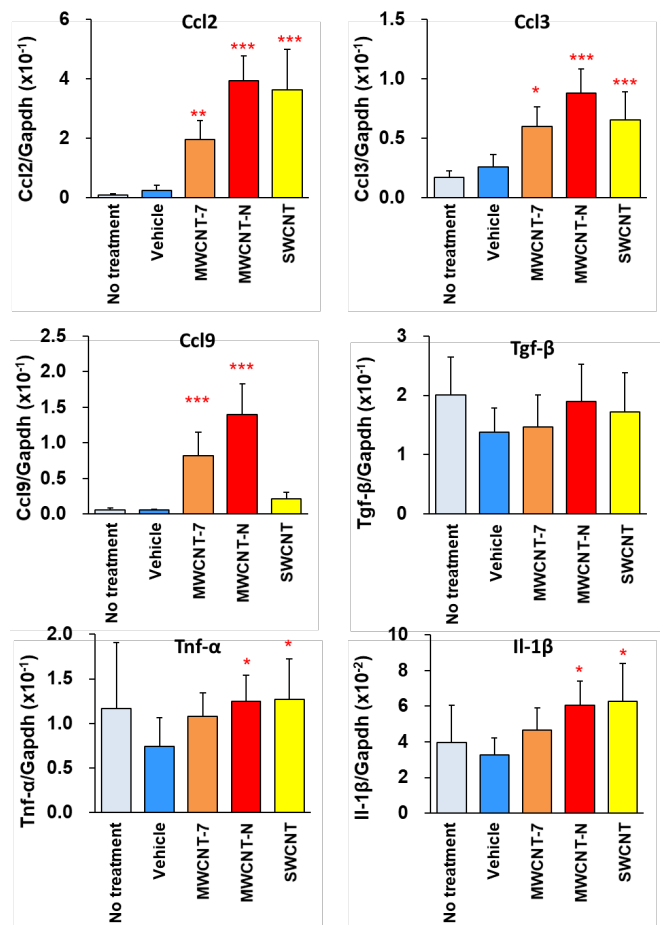


図6. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週(定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

(1)-6. 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。

(1)-7. 肺におけるタンパク発現解析

TIPS 投与後 4 週におけるウェスタンブロット解析では、MWCNT-7, MWCNT-N および SWCNT 投与群のラット肺組織において p62 の発現が有意に上昇していた (図 7)。また、P-Nrf2 の発現は p62 と同じ変化が示された。さらに、4 週間投与後、全投与群において iNOS/NOS の発現の増加傾向が認められた。

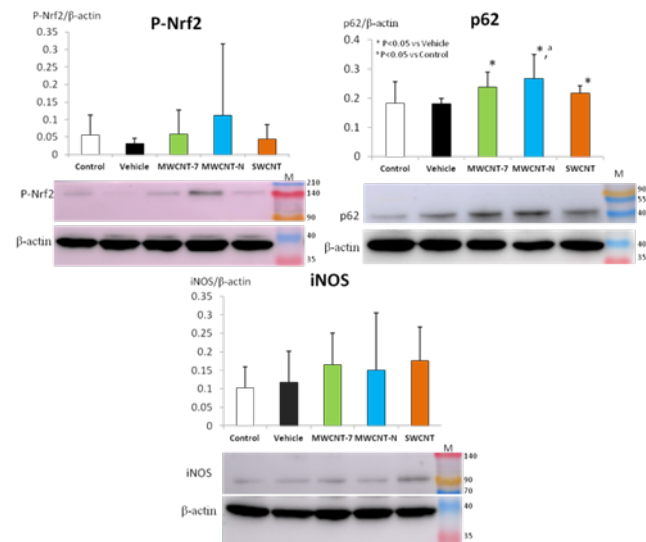


図7. CNT投与による肺タンパク発現量の変化、4週 (ウェスタンブロット)、*P < 0.05 vs Vehicle.

(2) *In vivo* 実験: CNTによる亜急性期遺伝子変化の解析

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、実験(1)より発がん性の違いをもつCNTをさらに追加し、変動遺伝子を解析した。その結果、発がん陰性CNTと比較して、陽性CNTsで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を75個、低下する遺伝子を27個得た。有意な変化が見られるパスウェイとして、ケモカイン、サイトカイン遺伝子などの炎症関連因子が検出された (図8、9)。

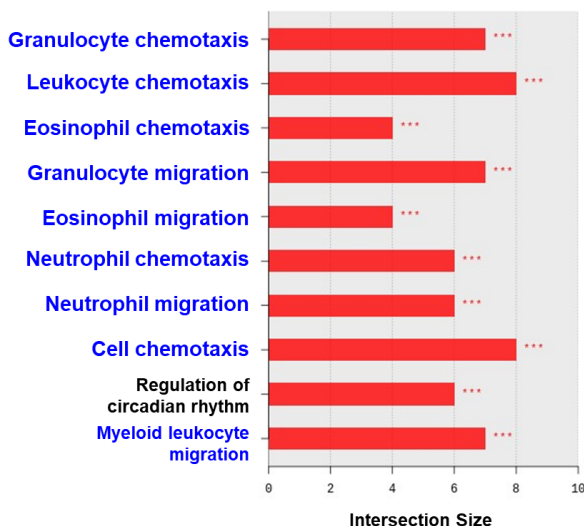


図8. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Biological Function)、4週、***P < 0.001 vs Negative.

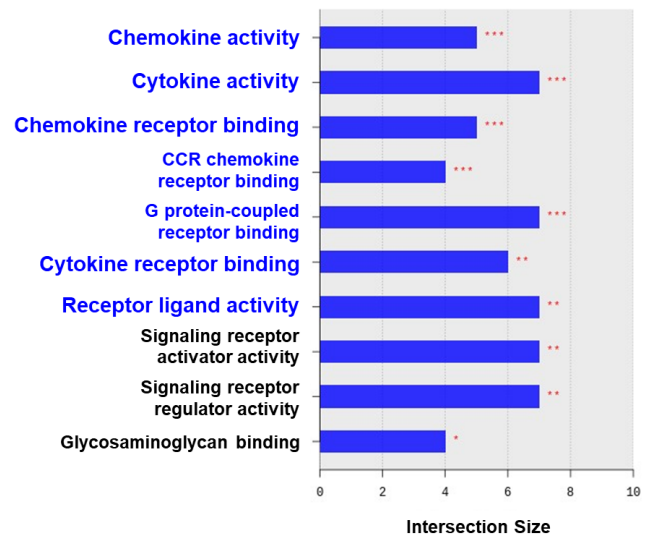


図9. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Molecular Function)、4週、***P < 0.001 vs Negative.

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

ラットにMWCNT及びDHPNを投与し誘発した中皮腫/肺がん15検体 (MWCNT: 9検体、DHPN: 6検体) から抽出したDNA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、変異Caller (MuTect2およびStrelka) により体細胞変異の検出を行った。その結果を表1に示す。表1からわかるように、DHPNによる肺がんではMWCNT-7による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察されていることがわかった。さらに、SigProfilerExtractorで解析した結果3種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_A~C) が同定された (図10)。このうち、Rat_SBS_A 及びBはC:G to T:A変異が顕著な特徴を持つ変異シグネチャーであった。また、各サンプルにおける変異数と3種類の変異シグネチャー分布について図11-1に示す。DHPNによる肺がんではMWCNT-7による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察され、同定された変異シグネチャーの分布も、全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A (黄緑色) が90%以上を占めていることがわかった。一方、MWCNT-7ではサンプル毎のばらつきが大きく、比較的多い変異数が観察されたサンプルでも16,000程度であり、化学発がん物質であるDHPNと比較しても圧倒的に少ない変異数であることがわかった。また、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat_SBS_B (黄土色) が観察され、そのうち4検体でRat_SBS_Bの占める割合が多く、次いでRat_SBS_C (紫色) の占める割合が多いことがわかった (図11-2)。さらに、9検体中2検体では、Rat_SBS_Cのみが観察されていた。

Chemicals	Tumor	Total Numbers of SNVs
DHPN	Lung	82176
DHPN	Lung	74235
DHPN	Lung	65035
DHPN	Lung	90249
DHPN	Lung	108435
DHPN	Lung	161228
MWCNT-7	Lung	431
MWCNT-7	Mesothelioma	462
MWCNT-7	Mesothelioma	255
MWCNT-7	Mesothelioma	2971
MWCNT-7	Mesothelioma	16162
MWCNT-7	Mesothelioma	1146
MWCNT-7	Mesothelioma	2287
MWCNT-7	Mesothelioma	15379
MWCNT-7	Mesothelioma	1001

表1. ラット肺がん及び中皮腫に検出された変異数.

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。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_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していることがわかった。一方、Rat_SBS_B及びCは、Thiopurine chemotherapy, 5-メチルシトシンの脱アミノ化などによる自然発生突然変異など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_B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することもわかった (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_B の寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体では Rat_SBS_C の寄与率が高かった (図 11-2)。

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。

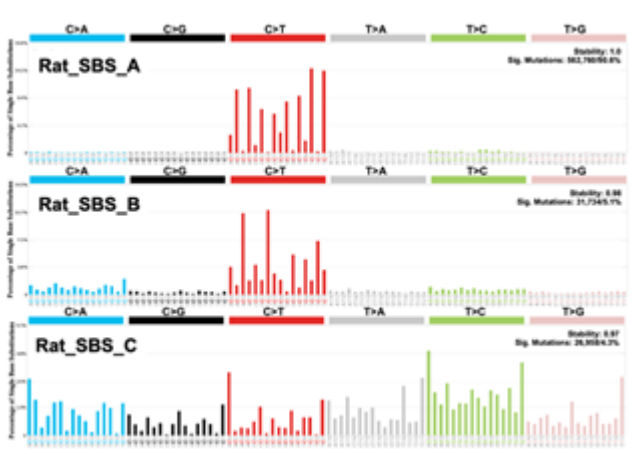


図 10. MWCNT/DHPN 暴露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定された変異シグネチャー.

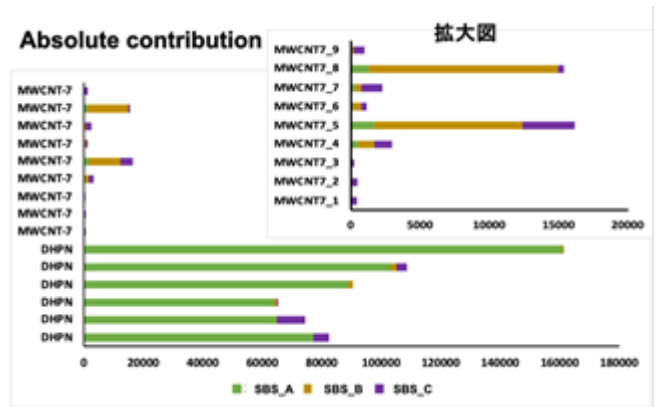


図 11-1. サンプル毎の変異数と3種類の変異シグネチャー分布.

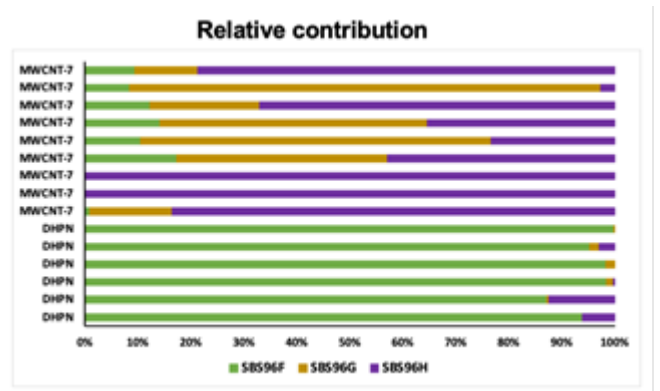


図 11-2. サンプル毎の3種類の変異シグネチャー分布割合.

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity	Etiology
RatSBS_A	DHPN	SBS11	0.97	Alkylating agents
RatSBS_B	MWCNT7	SBS1	0.81	Spontaneous or enzymatic deamination of 5-methylcytosine
		SBS87	0.82	
RatSBS_C	MWCNT7	SBS5	0.81	Clock-like

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及びその要因.

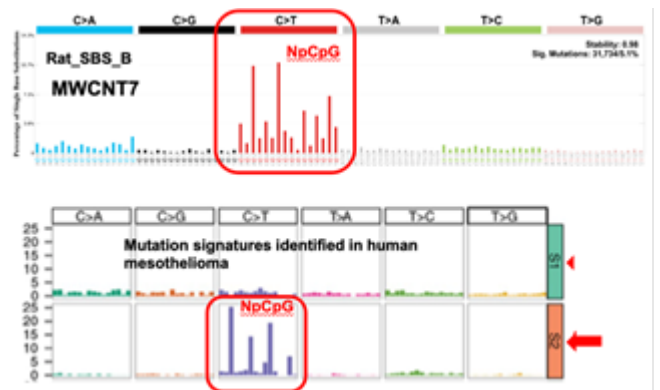


図 12. ヒト中皮腫を含む肺がんでは観察された変異シグネチャー.

(4) *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、細胞生存率を定量した。細胞生存率は各CNTs投与により有意に低下した (図13)。*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*と類似した発現パターンと発がん性との相関を示した (図14)。

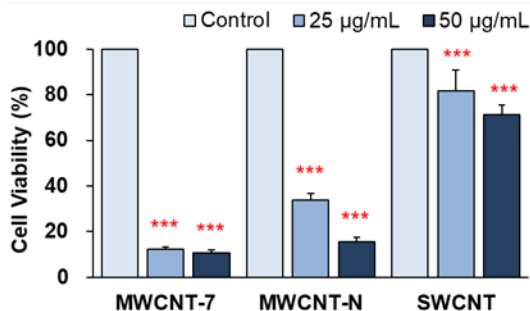


図13. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の細胞生存率の変化 (WST-1アッセイ)、***P < 0.001 vs Control.

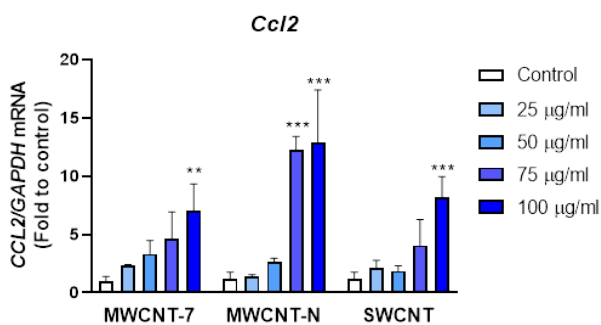


図14. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の *Ccl2* 発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

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が期待できる。

今年度は、発がん性未知の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。その結果、陽性対照のMWCNT-NおよびMWCNT-7に加えて、

SWCNTでは中皮に対する発がん性は陰性であったものの、肺発がん性陽性であることが新たに明らかになった (非公開データ)。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、増殖活性マーカー (Ki67)と炎症関連DNA損傷マーカー (8-NG)の定量結果は、発がん性と相関しており、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た。遺伝子発現レベルでは、TIPS投与後早期および*in vitro*系においてケモカイン、特に*Ccl*種の発現変化が発がん性と相関する可能性が明らかになってきており、CNTのAOPとして重要かつ簡便なCNT有害性検出指標となりうることを示唆された。

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。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Mφ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的ストレスの産生とDNA損傷は、肺胞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が、8-NG陽性細胞の上昇が見られたことから、SWCNTが強い炎症を伴うDNAおよびRNAの8-NGが誘導することが認められた。また、SWCNT投与群では肺上皮細胞においてiNOS/NOSの発現上昇が観察され、オートファジーの誘導が予測できた。8-NGの形成がSWCNTの肺発がん性に関与している可能性が考えられる。

MWCNTまたはDHPN暴露のラット中皮腫/肺腫瘍15サンプルからゲノム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DHPNでは60,000~160,000程度であり、MWCNT-7では250~16,000程度と暴露した化学物質で大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から、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)といずれの変異パターンもまんべんなく検出されるRat_SBS_Cが同定された。全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A (黄緑色)が90%以上を占めていることから、Rat_SBS_AがDHPNに由来するシグネチャーであると同定した。既存の変異シグネチャーとの類似解析の結果、Rat_SBS_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していた。DHPNはニトロソ化合物であるが、既存のアルキル化剤と同様にDNAのグアニン塩基にアルキル化付加体を形成し、これが高頻度にG to A (相補鎖だとC to T)の変異を導入していることが考えられる。一方、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat_SBS_Bが観察され、そのうち4検体でRat_SBS_Bの占める割合が多く、次いでRat_SBS_C (紫色)の占める割合が多いことがわかった。さらに、9検体中2検体では、Rat_SBS_Cのみが観察されていた。このことから、これら2種の変異シグネチャーがMWCNT-7に由来することが示唆された。類似解析の結果から、Rat_SBS_B及びCは自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、

MWCNT-7の発がん機序としては、DHPNのように直接的にDNAに作用して変異を導入するというよりはむしろ、MWCNT-7暴露による宿主側の2次的な反応などを介していることが示唆される。これまでの報告により、MWCNTなどのナノマテリアルによる変異誘発機序としては、宿主の炎症反応などが惹起されることが要因とされており、今回の変異シグネチャーの結果はそれをサポートするようなデータであると考えられる。一方、Rat_SBS_Cの割合が高く観察された検体は凍結サンプルからDNAを抽出したものであることから、組織の不均一性が影響している可能性も示唆された。

また、今回、比較的多くのSNV数が観察された検体では、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_B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機序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機序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

肺発がん陽性対照である多層CNTs (MWCNT-7、MWCNT-N)と、未知のSWCNTのTIPS投与(0.1または0.5 mg/rat)による肺腫瘍性病変と増殖、酸化的DNA損傷について、亜急性(4週)、亜慢性(13週)、慢性(52週)、発がん(104週)期のサンプルを解析した。さらに、発がん性陽性(MWCNT-B, DWCNT)、陰性(CNH)を被験CNTとして追加し、亜急性期の遺伝子変化と発がん性の関連について、RNA-seqで解析した。その結果、MWCNT-7、MWCNT-Nに加えてSWCNTの肺発がん性が明らかになる一方で、SWCNTによる中皮発がん性は認めなかった。TIPS投与後早期に、肺胞上皮における増殖活性、炎症関連DNA損傷レベルとケモカイン発現の上昇を認めたことから、CNTの発がん機序に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。*In vitro*試験では、Mφ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。

MWCNTまたはDHPN暴露のラット中皮腫/肺腫瘍について、NGS解析によるWGS解析を行った。その結果、検出されたCNTによるSNVの数はDHPNと大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から3つの変異シグネチャー(Rat_SBS_A, Rat_SBS_B, Rat_SBS_C)が同定された。全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A(黄緑色)が90%以上を占めていることから、Rat_SBS_AがDHPNに由来するシグネチャーであると同定した。一方、MWCNT-7では、Rat_SBS_B、次いでRat_SBS_C(紫色)の占める割合が多く、これら2種の変異シグネチャーがMWCNT-7に由来することが示唆さ

れた。類似解析の結果から、Rat_SBS_B及びCは自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7の発がん機序としては、DHPNのように直接的にDNAに作用して変異を導入するというよりはむしろ、MWCNT-7暴露による宿主側の2次的な反応などを介していることが示唆される。これまでの報告により、MWCNTなどのナノマテリアルによる変異誘発機序としては、宿主の炎症反応などが惹起されることが要因とされており、今回の変異シグネチャーの結果はそれをサポートするようなデータであると考えられる。また、今回、比較的多くのSNV数が観察された検体では、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_B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機序は類似していることが示唆された。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、発がん機序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

- Hori Y, Naitoh I, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Yoshida M, Kato A, Kachi K, Sahashi H, Adachi A, Toyohara T, Kito Y, Yamamoto T, Takahashi S, Kataoka H. Incidence of pancreatic injury and pancreatitis in patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Clin Transl Gastroenterol*. 2023, in press.
- Nagai T, Kawai N, Gonda M, Iida K, Etani T, Kobayashi D, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Ando R, Yamaguchi S, Sugahara Y, Ueno S, Tsutsumiuchi K, Imae T, Yasui T. Role of HIKESHI on Hyperthermia for Castration-Resistant Prostate Cancer and Application of a Novel Magnetic Nanoparticle with Carbon Nanohorn for Magnetic Hyperthermia. *Pharmaceutics*. 15:626, 2023.
- 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 Rep*. 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.
- Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, **Totsuka Y**, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms

- Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 14:36, 2024.
7. Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, **Kakehashi A**, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arc of Toxicol*. 2024, ahead of print.
 8. Tagami M, Kasashima H, **Kakehashi A**, Yoshikawa A, Nishio M, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Yashiro M, Azumi A, Honda S. Stromal area differences with epithelial-mesenchymal transition gene changes in conjunctival and orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Front Oncol*. 14:1277749, 2024.
 9. **Kakehashi A**, Suzuki S, Wanibuchi H. Recent Insights into the Biomarkers, Molecular Targets and Mechanisms of Non-Alcoholic Steatohepatitis- Driven Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*, 15:4566, 2023.
 10. Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, **Kakehashi A**, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 15:5274, 2023.
 11. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, **Kakehashi A**, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 14:36, 2023.
 12. Suzuki S, Gi M, Fujioka M, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicol Lett*. 384:128-135, 2023.
 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*. 488:153483, 2023.
 14. 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.
 15. Sultana N, Fukamachi K, Jiegou Xu, **Tsuda H**, Suzui M. mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). *Fundam Toxicol Sci*. 10:27-30, 2023.
 16. Sultana N, Fukamachi K, Roy DC, Jiegou Xu, **Tsuda H**, Suzui M. mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats. *Fundam Toxicol Sci*. 10:137-141, 2023.
2. 学会発表
1. **内木綾**、高橋智. モデル動物と臨床検体を用いた前立腺・肝発がんメカニズムの解析と予防研究、第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月、名古屋)
 2. 加藤寛之、佐藤 元紀、**内木綾**、小村理行、稲熊真悟、高橋智. プロテームによる膵炎発症膵癌における初期変化の解析、第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月、名古屋)
 3. 稲熊真悟、王 程博、小村理行、加藤寛之、**内木綾**、高橋智. CD70およびPD-L1は協調的に腫瘍浸潤・免疫逃避を促進し悪性胸膜中皮腫の予後を予測する、第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 4. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、**津田洋幸**、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lactoferrinの抑制効果、第40回日本毒性病理学会 (2024年1月、品川区)
 5. Xiaochen Kuang, **Aya Naiki-Ito**, Masayuki Komura, Hiroyuki Kato, Satoru Takahashi. Angiotensin-II receptor blocker suppresses liver injury and fibrosis in rat non-alcoholic steatohepatitis model, 第 40 回日本毒性病理学会ワークショップ(2024年1月、品川区)
 6. 加藤寛之、**内木綾**、小村理行、高橋智. マウス膵炎モデルを用いたプロテオーム解析による膵発癌メカニズムの検討、第 40 回日本毒性病理学会 (2024 年 1 月、品川区)
 7. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、高橋智. 非アルコール性脂肪肝炎および肝発がんに対する lactoferrin の化学予防効果の検討、第 30 回日本がん予防学術大会 (2023 年 9 月、金沢)
 8. **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とフラレンウィスカーの肺発がん性の解析、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 9. **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とフラレンウィスカーの肺発がん性の解析、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 10. Xiaochen Kuang, **Aya Naiki-Ito**, Masayuki Komura, Hiroyuki Kato, Satoru Takahashi. Chemopreventive effects of angiotensin-II receptor blocker on rat non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 11. 稲熊真悟、上木あかね、Chengbo Wang、小村理行、加藤寛之、**内木綾**、高橋智. CD70 および PD-L1 は協調的に腫瘍浸潤・免疫逃避を促進し悪性胸膜中皮腫患者の予後を悪化させる、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 12. Sheema Asraful Nahar, **Aya Naiki-Ito**, **Anna Kakehashi**, Hiroyuki Kato, **Hiroyuki Tsuda**, Satoru Takahashi. Evaluation of lung and mesothelial carcinogenicity of single-walled carbon nanotube in male Fischer 344 rats, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 13. 加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、小村理行、高橋智. 膵癌における 5-FU と luteolin の併用投与効果の検討、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年

- 9月、横浜)
14. 小村理行、加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 腫瘍細胞および間質細胞に発現するテトラスパンインは乳癌の予後を予測する, 第82回日本癌学会学術総会 (2023年9月、横浜)
 15. 内木綾、加藤寛之、小村理行、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 lactoferrin の抑制効果, 第112回日本病理学会総会 (2023年4月、下関)
 16. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 膵癌における Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPYD)発現の意義, 第112回日本病理学会総会 (2023年4月、下関)
 17. 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 陽性大腸癌細胞は幹細胞様表現型を示し、特徴的な遺伝子発現、高悪性形質を示す, 第112回日本病理学会総会 (2023年4月、下関)
 18. 戸塚ゆかり. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価法 日本薬学会144年会 (2024年3月、横浜)
 19. 戸塚ゆかり. ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析, 日本酸化ストレス学会 (2023年12月、川崎)
 20. Totsuka Y. Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)
 21. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆかり. 加熱式タバコの遺伝毒性評価, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
 22. 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、戸塚ゆかり. アドバンストナノマテリアルのin vitro遺伝毒性評価, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
 23. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, Yukari Totsuka, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロラミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
 24. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、戸塚ゆかり. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバーアダクト探索, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
 25. 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、戸塚ゆかり. アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
 26. Yukari Totsuka, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第82回日本癌学会学術総会 (2023年9月、横浜)
 27. Totsuka Y. Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023年9月、シカゴ・米国)
 28. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆかり. 加熱式タバコの遺伝毒性評価, がん予防学術大会2023 (2023年9月、金沢)
 29. 梯アンナ、西土井悠作、Qiu Guiyu、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明, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 30. Qiu Guiyu、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、梯アンナ、山本与毅、野浦郁恵、ワチラアルンウオン アルパマス、郭潤傑、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸 (DPAA) のラット妊娠期及び授乳期ばく露による次世代に対する発達神経毒性の検討, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 31. 魏民、山本与毅、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、郭潤傑、Guiyu Qiu、梯アンナ、鰐淵英機. 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113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 32. 郭潤傑、魏民、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡正喜、鈴木周五、Guiyu Qiu、山本与毅、梯アンナ、鰐淵英機. 不死化ヒト膀胱上皮細胞を用いた三次元膀胱培養モデルの確立及びそれを用いたヒ素毒性評価, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 33. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂ギョク、芝野佳奈、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸の経胎盤曝露によるF1マウス肝発がん機序にはDNAメチル化異常が関与する, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 34. ワチラアルンウオン アルパマス、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、Qiu Guiyu、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. Toxicological Assessment of Dimethylarsinic Acid Using Humanized Liver Mice Model, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 35. 野浦郁恵、鈴木周五、梯アンナ、魏民、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、井上健、鰐淵英機. 肺大細胞神経内分泌癌の新規バイオマーカー候補の検討, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
 36. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Qiu Guiyu、Vachiraarunwon Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. NADPH酸化酵素阻害剤 apocynin による o-toluidine 誘発ラット膀胱増殖性 病変への抑制効果, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)

37. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. Diphenylarsinic acid induced transplacental liver carcinogenesis via epigenetic alterations in F1 mice. 2023 年度文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会 (2024 年 2 月、大津)
38. 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu, 鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon, 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検討及び発がん機序解明、第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、品川区)
39. Gi M, Fujioka M, Shibano K, Qiu G, Vachiraarunwong A, Guo R, Kakehashi A, Suzuki S, Wanibuchi H. Development of an in vitro dosing assay for trans-tracheal intrapulmonary spraying administration of chemicals in rats, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、品川区)
40. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Suzuki S, Qiu G., Yamamoto T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Development of a novel 3D urinary bladder mucosa model and evaluation of assessing arsenical toxicity, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、品川区)
41. Fujioka M, Gi M, Suzuki S, Oishi Y, Vachiraarunwong A, Qiu G, Shibano K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid induced transplacental liver carcinogenesis via epigenetic changes in F1 mice, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、品川区)
42. Qiu G, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yamamoto T, Noura I, Vachiraarunwong A, Guo R, Wanibuchi H. Effect of diphenylarsinic acid on hippocampal neurogenesis in SD rats, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、品川区)
43. Vachiraarunwon Arpamas, 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂ギョク、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. Evaluating hepatic metabolism and carcinogenicity of dimethylarsinic acid using humanized liver mice model, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、品川区)
44. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon, 梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシンの経胎盤ばく露による肝発がんに関与する、第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、品川区)
45. Vachiraarunwong A, Pharapirom A, Wongpoomchai R, Gi M, Suzuki S, Kakehashi A, Fujioka M, Wanibuchi H. Glutelin hydrolysate of purple rice bran exhibited cancer chemopreventive activity against liver and colon carcinogenesis, がん予防学術大会 2023 (2023 年 9 月、金沢)
46. 梯アンナ、西土井悠作、Qiu Guiyu、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、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検討、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
47. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Shugo Suzuki, Kana Shibano, Guiya Qiu, Runjie Guo, Aroonrat Pharapirom, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Comparison of carcinogenicity of arsenicals on immortalized human bladder epithelial cells, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
48. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂ギョク、芝野佳奈、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシンの経胎盤ばく露マウスにおける肝発がん過程には DNA メチル化異常が関与する、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
49. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシンの経胎盤ばく露による肝発がんに関与する、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
50. 田上瑞記、笠島裕明、梯アンナ、吉川敦子、坂井淳、三澤宣彦、鰐淵英機、安積淳、八代正和、本田茂. 結膜 MALT リンパ腫と眼窩 MALT リンパ腫の遺伝子発現クラスターの比較、眼科臨床紀要会、眼科臨床紀要 (眼臨紀)、巻：16 号：5 ページ：391、JST 資料番号：Z0319C 講演・口頭 (2023 年 5 月)
51. Tsuda H. Carbon nanotubes (CNT), innovative materials of the 21st century: carcinogenicity evaluation of CNT with different wall structures, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023 年 11 月、東京)

G. 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5年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発（23KD1002）

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

化学物質のナノサイズ化により、機能や特性が飛躍的に向上することから、ナノマテリアル(NM)の新素材としての使用や生産が増大する一方で、吸入暴露による毒性影響が懸念される。カーボンナノチューブ(CNT)のような不溶性繊維状 NM は、長期間体内に蓄積され持続的な炎症を誘発する。従って NM の吸入暴露による実用的な健康影響評価手法の開発は極めて重要である。申請者らはこれまでに、大規模施設と高額費用を要する吸入暴露試験を代替しうる NM の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を用いた試験デザインを開発し、吸入暴露試験で発がん性が見出された多層 CNT(MWCNT)-7 を含めた4種のMWCNTについて、肺・胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにした。さらに R2-5 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）においては、発がん性陽性 MWCNT では、活性化マクロファージ(M ϕ)によるケモカイン、活性酸素種(ROS)の産生と、肺胞上皮の増殖活性・酸化的 DNA 損傷の促進を投与後早期に検出し、CNT 毒性の Adverse Outcome Pathway (AOP)と期待される。本研究では、TIPS 投与により発がん性が未知の単層 CNT (SWCNT) の肺・胸腔中皮発がん性の有無を明らかにし、発がん性の有無や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 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。

肺発がん陽性対照である多層 CNTs (MWCNT-7、MWCNT-N)と、SWCNT の TIPS 投与(0.1 または 0.5 mg/rat)による肺腫瘍性病変と増殖、酸化的 DNA 損傷について、亜急性(4週)、亜慢性(13週)、慢性(52週)、発がん(104週)期のサンプルを解析した。さらに、発がん性陽性(MWCNT-B, DWCNT)、陰性(CNH)を被験CNTとして追加し、亜急性期の遺伝子変化と発がん性の関連について、RNA シーケンシング(RNA-seq)で解析した。

その結果、MWCNTs、SWCNT により、投与4週後から肺胞上皮の増殖(Ki67)、*Ccl*種の mRNA 発現は有意に増加した。104週における肺胞上皮腺癌の発生は、MWCNT-N、SWCNT、MWCNT-7 群で観察された。胸膜中皮腫の発生は、MWCNTs で認めた。さらに亜急性期の RNA-seq 解析による発がん性陽性、陰性 CNT の比較では、発がん性陽性群において複数の炎症関連パスウェイが抽出された。

以上より、増殖、酸化的 DNA 損傷やケモカイン発現などの毒性所見は 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。

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。さらに R2-5 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）においては、発がん性陽性 MWCNT では、活性化マクロファージ(M ϕ)によるケモカイン、活

性酸素種(ROS)の産生と、肺胞上皮の増殖活性・酸化的 DNA 損傷の促進を投与後早期に検出し、CNT 毒性の Adverse Outcome Pathway (AOP)として期待される。

本研究では、TIPS 投与により発がん性が未知の単層 CNT (SWCNT) の肺・胸腔中皮発がん性の有無を明らかにし、発がん性の有無や程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより、これまでに得られた CNT の AOP の高精度化や新規 AOP の樹立を試み、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。

本年度は、多層 CNTs (MWCNT-7、MWCNT-N)と SWCNT の TIPS 投与後、発がん期(104週)における肺と胸膜中皮の発がん性について解析し、亜急性期(4週)における酸化的 DNA 損傷、増殖活性や遺伝子発現変化との関連を解析する。これにより 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し、*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 (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。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、増殖活性 (抗Ki67抗体、Abcam) の程度について免疫組織学的に解析する。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*Cc1*種、*I1*種や*Tn f-α*等の炎症性サイトカイン発現を定量する。

(2) *In vivo* 実験：TIPS投与によるCNT負荷試験と亜急性期遺伝子変化の解析

(1) *In vivo*試験と同様の方法で、発がん性陽性 (MWCNT-7, MWCNT-N, MWCNT-B, DWCNT)、陰性 (CNH)、未知 (SWCNT) を被験CNTとしてTIPS投与し、4週後に肺組織を採取、凍結保存し、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。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。

(3) *In vitro* 実験：Mφ細胞を用いたCNTによる毒性の解析

マウスMφ細胞 (RAW264.7) に、CNTsを投与し (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) を定量する (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、医動23-047)、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

104週の剖検時、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 (No treatment) 群 (絶対重量 1.5 ± 0.5 g) と対照 (vehicle) 群 (1.5 ± 0.1 g) で差は見られなかった。また、対照群と比較して、MWCNT-7 (低用量群 1.5 ± 0.1 g)、MWCNT-N (低用量群 1.8 ± 0.5 g、高用量群 1.9 ± 0.1 g)、SWCNT (低用量群 1.6 ± 0.3 g、高用量群 2.4 ± 0.7 g、 $P < 0.001$) で増加傾向を認め、SWCNT高用量群で有意に増加した。なお、MWCNT-7高用量群では、52週剖検以降全例が中皮腫発生で途中死亡したため、104週の解析は不能であった。

(1)-2. CNTによる肺有害性の解析

4、13、52週において、増殖活性について定量解析を行った。比較のために4週、52週の結果とともに提示する。肺胞上皮細胞におけるKi67陽性細胞率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群において有意に上昇し、SWCNTにおいても有意に増加した (図1)。

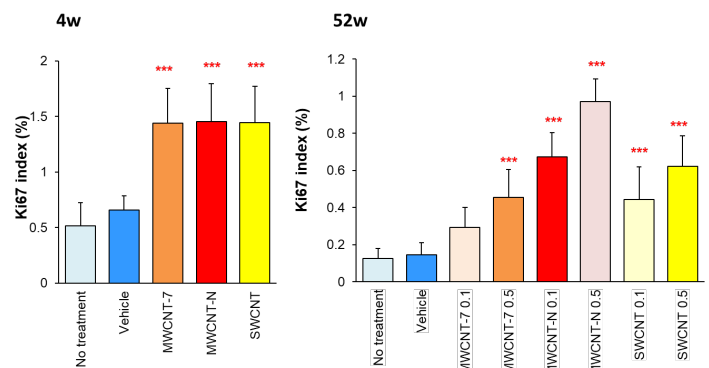


図1. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

(1)-3. 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2)。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3)。

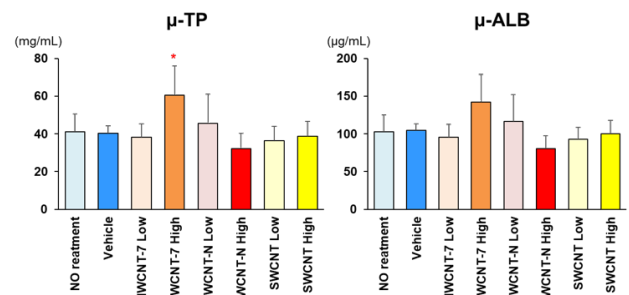


図2. CNT投与による胸腔洗浄液中総タンパクとアルブミン値の変化、* $P < 0.05$ vs Vehicle.

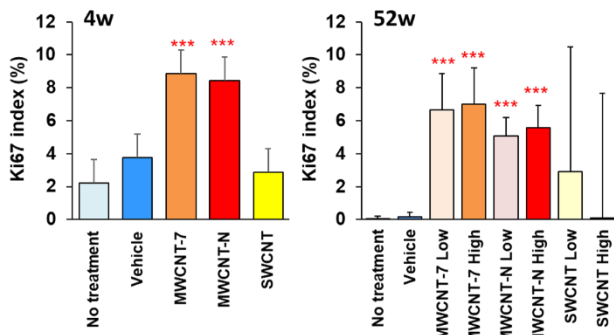


図3. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、***P < 0.001 vs Vehicle

(1)-4. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量

104週における肺胞上皮過形成の発生頻度は、無処置群 (1/17匹)、対照群 (3/18匹)、MWCNT-7低用量群 (0/19匹)、MWCNT-7高用量群 (1/21匹)、MWCNT-N低用量群 (7/18匹)、MWCNT-N高用量群 (6/19匹)、SWCNT低用量群 (3/18匹)、SWCNT高用量群 (3/17匹) であった。肺胞上皮腺腫の発生頻度は、無処置群 (0/17匹)、対照群 (0/18匹)、MWCNT-7低用量群 (0/19匹)、MWCNT-7高用量群 (1/21匹)、MWCNT-N低用量群 (3/18匹)、MWCNT-N高用量群 (3/19匹)、SWCNT低用量群 (2/18匹)、SWCNT高用量群 (0/17匹) であった。肺胞上皮腺癌の発生頻度は、無処置群 (0/17匹)、対照群 (1/18匹)、MWCNT-7低用量群 (0/19匹)、MWCNT-7高用量群 (1/21匹)、MWCNT-N低用量群 (1/18匹)、MWCNT-N高用量群 (6/19匹、P<0.05)、SWCNT低用量群 (0/18匹)、SWCNT高用量群 (11/17匹、P<0.001) で、MWCNT-NとSWCNTの高用量群で有意な上昇を認めた。

胸膜中皮腫の発生は、無処置群 (0/17匹)、対照群 (0/18匹)、MWCNT-7低用量群 (4/19匹)、MWCNT-7高用量群 (20/21匹、P<0.001)、MWCNT-N 低用量群 (1/18匹)、MWCNT-N 高用量群 (8/19匹、P<0.001)、SWCNT低用量群 (1/18匹)、SWCNT高用量群 (1/17匹) で、MWCNT-7とMWCNT-Nの高用量群で有意な上昇を認めた。

(1)-5. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

4、13、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。いずれも同様の傾向で、4週の結果を示す (図4)。CNTs 投与による遺伝子発現の増加傾向は見られ、肺発がん感受性の高いと考えられる MWCNT-N は、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl9*、*Tnf-α* および *Il-1β* で有意に上昇した。SWCNT では *Ccl2*、*Ccl3* で有意に上昇し、肺発がん性と相関を示した。

(1)-6. 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。

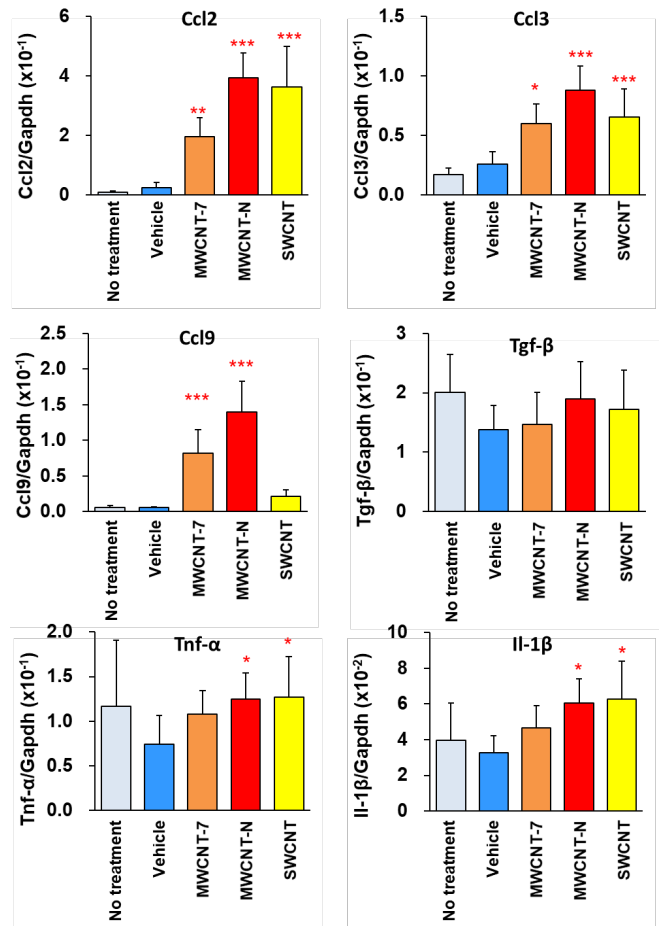


図4. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

(2) *In vivo* 実験: CNTによる亜急性期遺伝子変化の解析

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、実験(1)より発がん性の違いをもつCNTをさらに追加し、変動遺伝子を解析した。その結果、発がん陰性CNTと比較して、陽性CNTsで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を75個、低下する遺伝子を27個得た。有意な変化が見られるパスウェイとして、ケモカイン、サイトカイン遺伝子などの炎症関連因子が検出された (図5、6)。

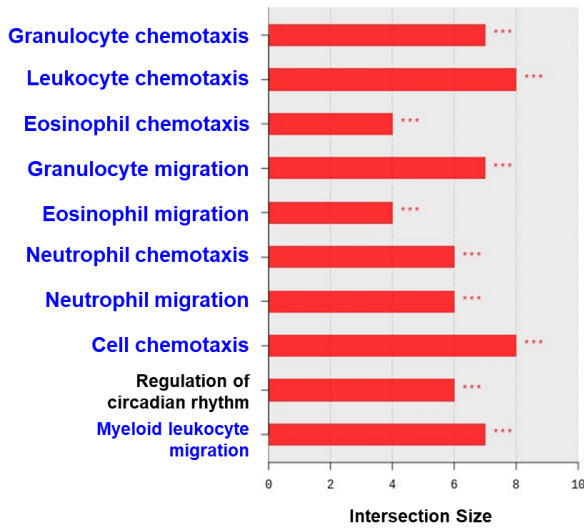


図5. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Biological Function)、4週、***P < 0.001 vs Negative.

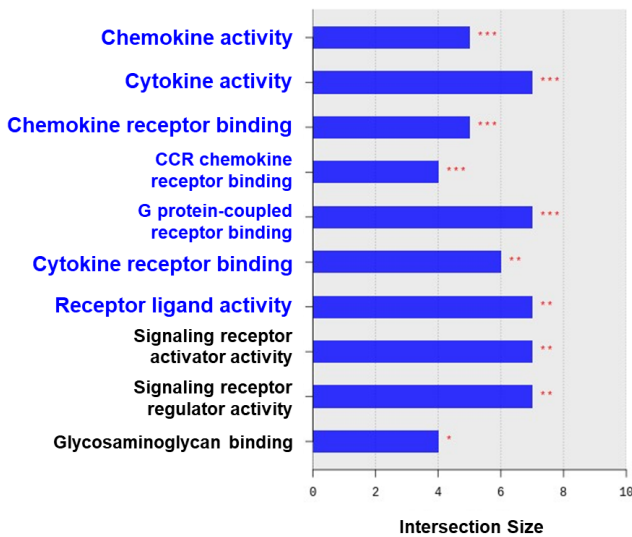


図6. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Molecular Function)、4週、***P < 0.001 vs Negative.

(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、細胞生存率を定量した。細胞生存率は各CNTs投与により有意に低下した (図7)。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と類似した発現パターンと発がん性との相関を示した (図8)。

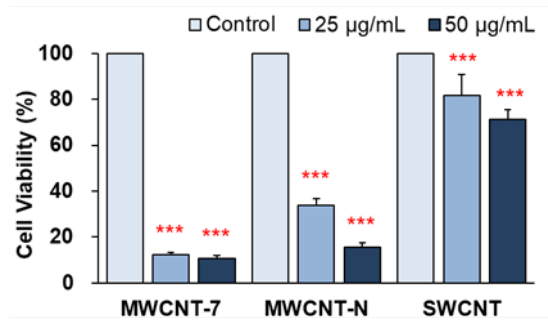


図7. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の細胞生存率の変化 (WST-1アッセイ)、***P < 0.001 vs Control.

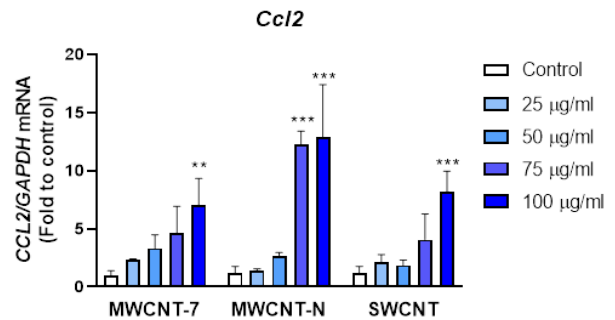


図8. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の*Ccl2*発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

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が期待できる。

今年度は、発がん性未知の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。その結果、陽性対照のMWCNT-NおよびMWCNT-7に加えて、SWCNTでは中皮に対する発がん性は陰性であったものの、肺発がん性陽性であることが新たに明らかになった (非公開データ)。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、増殖活性マーカー (Ki67)の定量結果は、発がん性と相関しており、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た。遺伝子発現レベルでは、TIPS投与後早期およびin vitro系においてケモカイン、特に*Ccl2*種の発現変化が発がん性と相関する可能性が明らかになってきており、CNTのAOPとして重要かつ簡便なCNT有害性検出

指標となりうることが示唆された。

E. 結論

肺がん陽性対照である多層CNTs (MWCNT-7、MWCNT-N) と、未知のSWCNTのTIPS投与(0.1または0.5 mg/rat)による肺腫瘍性病変と増殖、酸化的DNA損傷について、亜急性(4週)、亜慢性(13週)、慢性(52週)、発がん(104週)期のサンプルを解析した。さらに、発がん性陽性(MWCNT-B, DWCNT)、陰性(CNH)を被験CNTとして追加し、亜急性期の遺伝子変化と発がん性の関連について、RNA-seqで解析した。その結果、MWCNT-7、MWCNT-Nに加えてSWCNTの肺発がん性が明らかになる一方で、SWCNTによる中皮発がん性は認めなかった。TIPS投与後早期に、肺胞上皮における増殖活性、DNA損傷レベルとケモカイン発現の上昇を認めたことから、CNTの発がん機序に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。*In vitro*試験では、Mφ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. Hori Y, Naitoh I, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Yoshida M, Kato A, Kachi K, Sahashi H, Adachi A, Toyohara T, Kito Y, Yamamoto T, Takahashi S, Kataoka H. Incidence of pancreatic injury and pancreatitis in patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Clin Transl Gastroenterol*. 2023, in press.
2. Nagai T, Kawai N, Gonda M, Iida K, Etani T, Kobayashi D, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Ando R, Yamaguchi S, Sugahara Y, Ueno S, Tsutsumiuchi K, Imae T, Yasui T. Role of HIKESHI on Hyperthermia for Castration-Resistant Prostate Cancer and Application of a Novel Magnetic Nanoparticle with Carbon Nanohorn for Magnetic Hyperthermia. *Pharmaceutics*. 15:626, 2023.
3. 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 Rep*. 33:101422, 2023.
4. 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.
5. 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.

2. 学会発表

1. **内木綾**、高橋智. モデル動物と臨床検体を用いた前立腺・肝発がんメカニズムの解析と予防研究、第113回日本病理学会総会(2024年3月、名古屋)
2. 加藤寛之、佐藤元紀、**内木綾**、小村理行、稲熊真悟、高橋智. プロテームによる膵炎発症膵癌における初期変化の解析、第113回日本病理学会総会(2024年3月、名古屋)
3. 稲熊真悟、王程博、小村理行、加藤寛之、**内木綾**、高橋智. CD70およびPD-L1は協調的に腫瘍浸潤・免疫逃避を促進し悪性胸膜中皮腫の予後を予測する、第113回日本病理学会総会(2024年3月、名古屋)
4. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、**津田洋幸**、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lactoferrinの抑制効果、第40回日本毒性病理学会(2024年1月、品川区)
5. Xiaochen Kuang, **Aya Naiki-Ito**, Masayuki Komura, Hiroyuki Kato, Satoru Takahashi. Angiotensin-II receptor blocker suppresses liver injury and fibrosis in rat non-alcoholic steatohepatitis model, 第40回日本毒性病理学会ワークショップ(2024年1月、品川区)
6. 加藤寛之、**内木綾**、小村理行、高橋智. マウス膵炎モデルを用いたプロテオーム解析による膵発癌メカニズムの検討、第40回日本毒性病理学会(2024年1月、品川区)
7. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、高橋智. 非アルコール性脂肪肝炎および肝発がんに対するlactoferrinの化学予防効果の検討、第30回日本がん予防学術大会(2023年9月、石川)
8. **内木綾**、加藤寛之、**梯アテナ**、**津田洋幸**、高橋智. 多層カーボンナノチューブとフラーレンウィスカーの肺発がん性の解析、第82回日本癌学会学術総会(2023年9月、横浜)
9. **内木綾**、加藤寛之、**梯アテナ**、**津田洋幸**、高橋智. 多層カーボンナノチューブとフラーレンウィスカーの肺発がん性の解析、第82回日本癌学会学術総会(2023年9月、横浜)
10. Xiaochen Kuang, **Aya Naiki-Ito**, Masayuki Komura, Hiroyuki Kato, Satoru Takahashi. Chemopreventive effects of angiotensin-II receptor blocker on rat non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis, 第82回日本癌学会学術総会(2023年9月、横浜)
11. 稲熊真悟、上木あかね、Chengbo Wang、小村理行、加藤寛之、**内木綾**、高橋智. CD70 およびPD-L1 は協調的に腫瘍浸潤・免疫逃避を促進し悪性胸膜中皮腫患者の予後を悪化させる、第82回日本癌学会学術総会(2023年9月、横浜)
12. Sheema Asraful Nahar, **Aya Naiki-Ito**, **Anna Kakehashi**, Hiroyuki Kato, **Hiroyuki Tsuda**, Satoru Takahashi. Evaluation of lung and mesothelial carcinogenicity of single-walled carbon nanotube in male Fischer 344 rats, 第82回日本癌学会学術総会(2023年9月、横浜)

13. 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. 膵癌における 5-FU と luteolin の併用投与効果の検討, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
14. 小村理行、加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 腫瘍細胞および間質細胞に発現するテトラスパニンが乳癌の予後を予測する, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
15. 内木綾、加藤寛之、小村理行、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 lactoferrin の抑制効果, 第 112 回日本病理学会総会 (2023 年 4 月、下関)
16. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 膵癌における Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPYD)発現の意義, 第 112 回日本病理学会総会 (2023 年 4 月、下関)
17. 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 陽性大腸癌細胞は幹細胞様表現型を示し、特徴的な遺伝子発現、高悪性形質を示す, 第112回日本病理学会総会 (2023 年4月、下関)

G. 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。

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発（23KD1002）

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、吸入曝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、環境要因の曝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。今年度は MWCNT または DHPN 曝露のラット中皮腫/肺腫瘍 15 サンプルからゲノム 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 DHPN では 60,000～160,000 程度であり、MWCNT-7 では 250～16,000 程度と曝露した化学物質で大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から、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）といずれの変異パターンもまんべんなく検出される Rat_SBS_C が同定された。全ての DHPN サンプルにおいて Rat_SBS_A が 90%以上を占めていることから、Rat_SBS_A が DHPN に由来するシグネチャーであると同定した。一方、MWCNT-7 では、Rat_SBS_B 及び Rat_SBS_C がメジャーなシグネチャーであり、これら 2 種の変異シグネチャーが MWCNT-7 に由来することが示唆された。類似解析の結果から、Rat_SBS_B 及び C は自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7 の発がんメカニズムとしては、MWCNT-7 曝露による宿主側の 2 次的な反応などを介していることが示唆された。また、MWCNT-7 曝露において、比較的多くの SNV 数が観察された検体では、アスベスト曝露の症例を含む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変異シグネチャー（Rat_SBS_B）の寄与率が非常に高かったことから、MWCNT 曝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。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。

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、吸入曝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、環境要因の曝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-7 を SD 及び F344 ラットに経気管肺内噴霧（TIPS）投与を実施し、発生した肺がん及び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。同時に、肺がんの陽性対照としてニトロソ化合物である DHPN（N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine）を F344 ラットに皮下投与して作成した肺腫瘍についても解析を行なった。SD ラットに MWCNT-7 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。一方、F344 ラットに MWCNT-7 または DHPN を投与して得られた胸膜中皮腫及び中皮腫は凍結サンプルより DNA を抽出し、SD ラットサンプルと同様に全ゲノム解析を実施した。得られたデータから、Mutect（Ver2）、Strelka（Ver2）を用いて変異検出を行い、

SigProfilerExtractor (v. 1.1.3)にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行なった。

(倫理面の配慮)

該当なし

C. 研究結果

ラットに MWCNT 及び DHPN を投与し誘発した中皮腫/肺がん 15 検体 (MWCNT : 9 検体、DHPN:6 検体) から抽出した DNA 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。その結果を表 1 に示す。表 1 からわかるように、DHPN による肺がんでは MWCNT-7 による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察されていることがわかった。

表 1 ラット肺がん及び中皮腫に検出された変異数

Chemicals	Tumor	Total Numbers of SNVs
DHPN	Lung	82176
DHPN	Lung	74235
DHPN	Lung	65035
DHPN	Lung	90249
DHPN	Lung	108435
DHPN	Lung	161228
MWCNT-7	Lung	431
MWCNT-7	Mesothelioma	462
MWCNT-7	Mesothelioma	255
MWCNT-7	Mesothelioma	2971
MWCNT-7	Mesothelioma	16162
MWCNT-7	Mesothelioma	1146
MWCNT-7	Mesothelioma	2287
MWCNT-7	Mesothelioma	15379
MWCNT-7	Mesothelioma	1001

さらに、SigProfilerExtractor で解析した結果 3 種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_A~C) が同定された (図 1)。このうち、Rat_SBS_A 及び B は C:G to T:A 変異が顕著な特徴を持つ変異シグネチャーであった。

また、各サンプルにおける変異数と 3 種類の変異シグネチャー分布について図 2-1 に示す。図 2-1 からわかるように、DHPN による肺がんでは MWCNT-7 による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察され、同定された変異シグネチャーの分布も、全ての DHPN サンプルにおいて Rat_SBS_A (黄緑色) が 90% 以上を占めていることがわかった。一方、MWCNT-7 ではサンプル毎のばらつきが大きく、比較的多い変異数が観察されたサンプルでも 16,000 程度であり、化学発がん物質である DHPN と比較しても圧倒的に少ない変異数であることがわかった。また、MWCNT-7 では、9 検体中 7 検体で Rat_SBS_B (黄土色) が観察され、そのうち 4 検体で Rat_SBS_B の占める割合が多く、次いで Rat_SBS_C (紫色) の占める割合が多いことがわかった (図 2-2)。さらに、9 検体中 2 検体では、Rat_SBS_C のみが観察されていた。

図 1 MWCNT/DHPN 曝露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定された変異シグネチャー

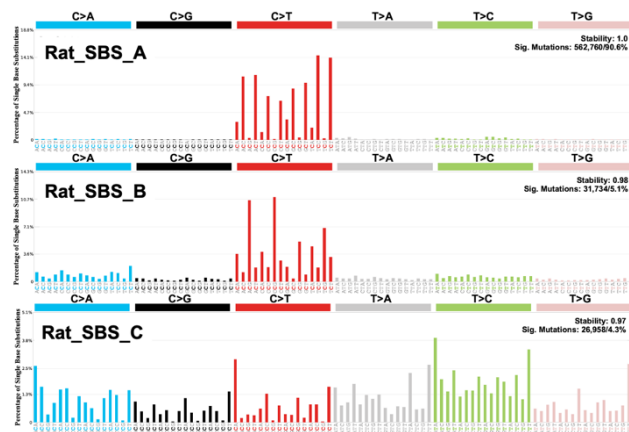


図 2-1 サンプル毎の変異数と 3 種類の変異シグネチャー分布

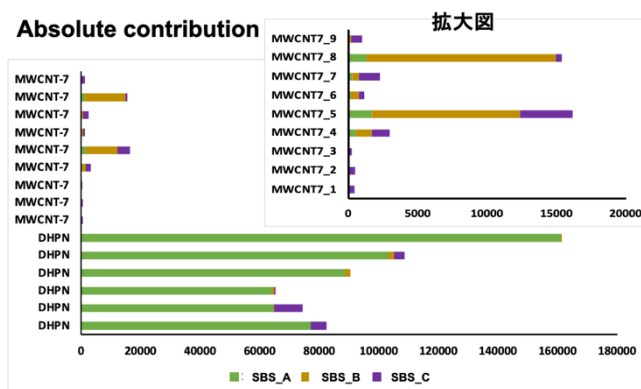
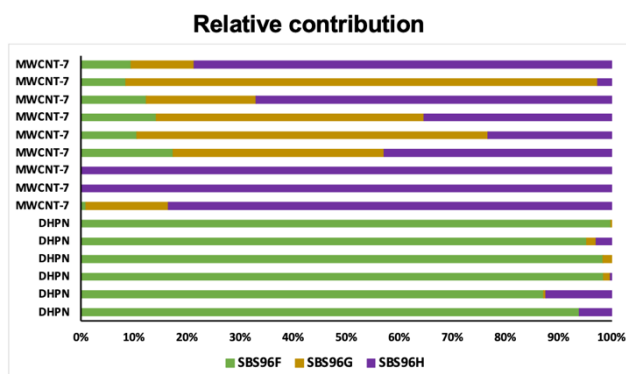


図 2-2 サンプル毎の 3 種類の変異シグネチャー分布割合



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及びその要因

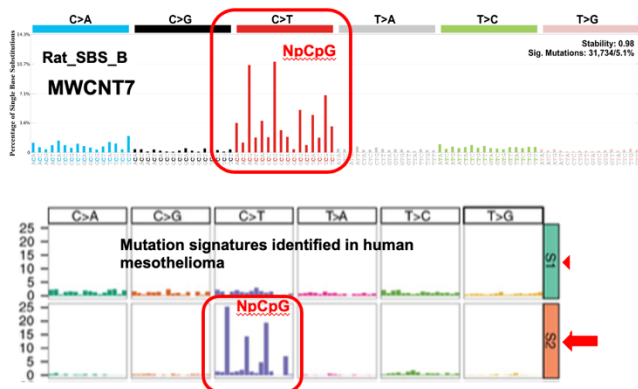
Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity	Etiology
RatSBS_A	DHPN	SBS11	0.97	Alkylating agents
RatSBS_B	MWCNT7	SBS1	0.81	Spontaneous or enzymatic deamination of 5-methylcytosine
		SBS87	0.82	Thiopurine chemotherapy treatment
RatSBS_C	MWCNT7	SBS5	0.81	Clock-like

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_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していることがわかった。一方、Rat_SBS_B及びCは、Thiopurine chemotherapy, 5-メチルシトシンの脱アミノ化などによる自然発生突然変異など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_B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することもわかった (Bueno et al, nat. genet. (2016)、図3)。

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_Bの寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体ではRat_SBS_Cの寄与率が高いことがわかった(図2-2)。

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



現在、MWCNT及び化学物質曝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またはDHPN曝露のラット中皮腫/肺腫瘍15サンプルからゲノム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DHPNでは60,000~160,000程度であり、MWCNT-7では250~16,000程度と曝露した化学物質で大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から、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)といずれの変異パターンもまんべんなく検出されるRat_SBS_Cが同定された。全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A(黄緑色)が90%以上を占めていることから、Rat_SBS_AがDHPNに由来するシグネチャーであると同定した。既存の変異シグネチャーとの類似解析の結果、Rat_SBS_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していた。DHPNはニトロソ化合物であるが、既存のアルキル化剤と同様にDNAのグアニン塩基にアルキル化付加体を形成し、これが高頻度にG to A(相補鎖だとC to T)の変異を導入していることが考えられる。一方、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat_SBS_Bが観察され、そのうち4検体でRat_SBS_Bの占める割合が多く、次いで

Rat_SBS_C(紫色)の占める割合が多いことがわかった。さらに、9検体中2検体では、Rat_SBS_Cのみが観察されていた。このことから、これら2種の変異シグネチャーがMWCNT-7に由来することが示唆された。類似解析の結果から、Rat_SBS_B及びCは自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7の発がんメカニズムとしては、DHPNのように直接的にDNAに作用して変異を導入するというよりはむしろ、MWCNT-7曝露による宿主側の2次的な反応などを介していることが示唆される。これまでの報告により、MWCNTなどのナノマテリアルによる変異誘発メカニズムとしては、宿主の炎症反応などが惹起されることが要因とされており、今回の変異シグネチャーの結果はそれをサポートするようなデータであると考えられる。一方、Rat_SBS_Cの割合が高く観察された検体は凍結サンプルからDNAを抽出したものであることから、組織の不均一性が影響している可能性も示唆された。また、今回、比較的多くのSNV数が観察された検体では、アスベスト曝露の症例を含む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_Bの寄与率が非常に高かったことから、MWCNT曝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曝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

MWCNTまたはDHPN曝露のラット中皮腫/肺腫瘍15サンプルからゲノム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DHPNでは60,000~160,000程度であり、MWCNT-7では250~16,000程度と曝露した化学物質で大きく異なることがわかった。また、変異シグネチャー解析の結果から、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)といずれの変異パターンもまんべんなく検出されるRat_SBS_Cが同定された。全てのDHPNサンプルにおいてRat_SBS_A(黄緑色)が90%以上を占めていることから、Rat_SBS_AがDHPNに由来するシグネチャーであると同定した。既存の変異シグネチャーとの類似解析の結果、Rat_SBS_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していた。DHPNはニトロソ化合物であるが、既存のアルキル化剤と同様にDNAのグアニン塩基にアルキル化付加体を形成し、これが高頻度にG to A(相補鎖だとC to T)の変異を導入していることが考えられる。一方、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat_SBS_Bが観察され、そのうち4検体でRat_SBS_Bの占める割合が多く、次いでRat_SBS_C(紫色)の占める割合が多いことがわかった。さらに、9検体中2検体では、Rat_SBS_Cのみが観察さ

れていた。このことから、これら2種の変異シグネチャーが MWCNT-7 に由来することが示唆された。類似解析の結果から、Rat_SBS_B 及びCは自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7 の発がんメカニズムとしては、DHPN のように直接的に DNA に作用して変異を導入するというよりはむしろ、MWCNT-7 曝露による宿主側の2次的な反応などを介していることが示唆される。これまでの報告により、MWCNT などのナノマテリアルによる変異誘発メカニズムとしては、宿主の炎症反応などが惹起されることが要因とされており、今回の変異シグネチャーの結果はそれをサポートするようなデータであると考えられる。また、今回、比較的多くの SNV 数が観察された検体では、アスベスト曝露の症例を含む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_B の寄与率が非常に高かったことから、MWCNT 曝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。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. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, **Totsuka Y**, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 14:36, 2024.

2. 学会発表

1. **戸塚ゆかり**. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価法 日本薬学会144年会 (2024年3月、横浜)
2. **戸塚ゆかり**. ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析、日本酸化ストレス学会 (2023年12月、川崎)
3. **Totsuka Y**. Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)
4. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆかり**. 加熱式タバコの遺伝

毒性評価、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)

5. 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、**戸塚ゆかり**. アドバンストナノマテリアルのin vitro遺伝毒性評価、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
6. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, **Yukari Totsuka**, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロラミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
7. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、**戸塚ゆかり**. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバーアダクト探索、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
8. 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、**戸塚ゆかり**. アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
9. **Yukari Totsuka**, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第82回日本癌学会学術総会 (2023年9月、横浜)
10. **Totsuka Y**. Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023年9月、シカゴ・米国)
11. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆかり**. 加熱式タバコの遺伝毒性評価、がん予防学術大会2023 (2023年9月、金沢)

G. 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。

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発（23KD1002）

分担研究課題名：カーボンナノチューブ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 准教授

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、13および52週間後に8-OHdGおよび8-nitrosoguanosine (8-NG)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では肺胞上皮および気管支上皮細胞において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認められた。また、13週目から炎症関連DNA損傷マーカー、8-NGの誘導が見られた。一方、SWCNT投与したラット肺上皮細胞において8-OHdGの有意な増加が見られなかったが、4週目から8-NG形成レベルの有意な上昇とiNOS/NOSの誘導が見出された。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および8-NG形成レベルの強い増加が認められ、その二つのCNTの発がん機序に酸化的ストレスや8-OHdG/8-NG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ことが明らかになった。一方、SWCNT投与により肺上皮細胞DNAおよびRNAの8-NGの有意な上昇が、SWCNTの肺発がん性機序の一つであると考えられる。

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0.5 mg/ratの濃度でTIPS法を用いて8回投与した。

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)を用いてマーカーの説明に従って8-OHdG形成レベルを測定した。

2. 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 で一晚反応させた。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 で一晚反応させた。

4. 免疫組織化学的 8-nitroguanosine (8-NG) 検査

実験 2 では右肺はブアン (Bouin's solution) で固定し免疫染色 ABC 法を用いて 8-NG 形成レベルを調べた。切片は anti-8-NG rabbit polyclonal 抗体 (1:20, 10 μ g/ml)、KMU-P01, Cosmo Bio Co. LTD、東京、日本) をかけて 4°C で一晚反応させた。

5. P-p38, P-Nrf2, p62, iNOS/NOS, COX2, GRP78, 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-Nrf2 (phospho S40) (1:100, ab76026, Abcam, 東京, 日本), anti-p62 (SQSTM1) (1:300, PM045, MBL, 東京, 日本); anti-iNOS/NOS mouse 抗体 (1:100, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 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-oxoguanine glycosylase 1 (Ogg1) (1:50, sc-12075, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) goat polyclonal 抗体を用い、4°C にて一晚反応させた。

6. 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 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。

7. ウェスタンブロットを用いた P-Nrf2, p62 および iNOS/NOS 蛋白の発現解析

RIPA buffer (1 \times) で筋伸展刺激群および対照群の筋管細胞をセルスクレーパーにて蛋白を回収した。回収した蛋白は Bradford 法を用いて濃度を測定した。測定は各サンプルを Duplicate で行い、各サンプルの蛋白濃度は濃度の異なるウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) (Sigma-Aldrich) の吸光度から作成した回帰式より算出した。

蛋白濃度測定後にウェスタンブロットを行った。方法は、回収した蛋白をポリアクリルアミドゲルにて分離後、メンブレンに転写し抗体と反応させ目的とする蛋白を検出した。ポリアクリルアミドゲルは目的の蛋白の分子量に応じた 7~15% の分離ゲルに 4.5% の濃縮ゲルを重層したものを使用し、蛋白は各サンプルを 40 μ g ロードして電気泳動した。また、分子量マーカーとして 3-Color Prestained XL-Ladder (APRO Co. 徳島, 日本) もロードした。電気泳動終了後、分離した蛋白を PVDF Hybond P 0.45 メンブレン (Amersham, Germany) に転写した。転写確認後、メンブレンを蒸留水および 0.1% の Tween_20 を含む Tris-buffered saline (1 \times TBS) (TBST) にて洗浄した。洗浄後、メンブレンは 5% のスキムミルクを含有した PBST で 1 時間室温にて緩やかに振盪を行い、抗体の非特異的な結合を回避した。その後、目的とするタンパクに結合する一次抗体と 4°C で一晚反応させた。一次抗体には、以下に記載した抗体を記載した希釈濃度で使用した。Rabbit anti-Nrf2 phospho S40 (SAB5701902, Sigma-Aldrich, 1:1000); rabbit anti-p62 (1:1000, ab91526, Abcam, 東京, 日本); anti-iNOS/NOS mouse 抗体 (1:2000, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 東京, 日本); anti-HIF1 mouse 抗体 (1:200, No. MAB1935, R and D Systems Biotechnology, 東京, 日本)。

8. 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 や 8-NG 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。

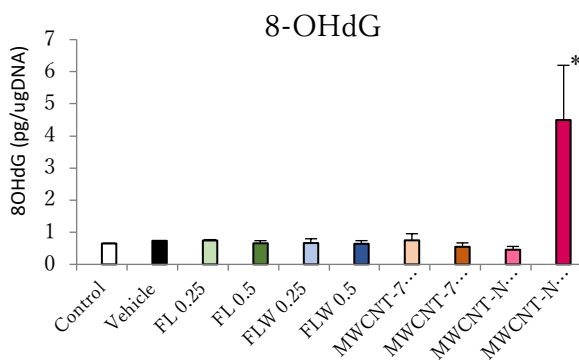


図1. ラット肺DNAの8-OHdG形成レベルの変更 (ELISA法)

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。

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)。

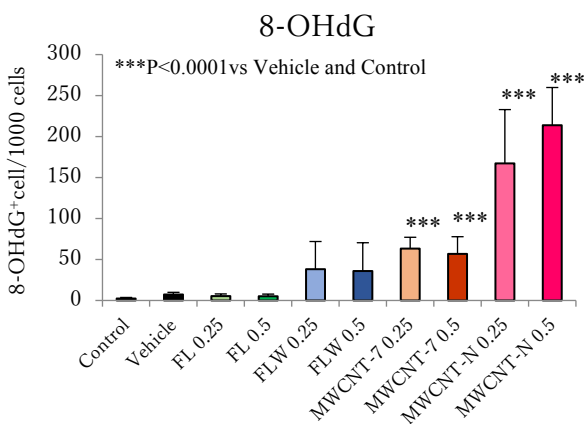


図2. 免疫染色で観察されたラット肺8-OHdG形成レベルの上昇

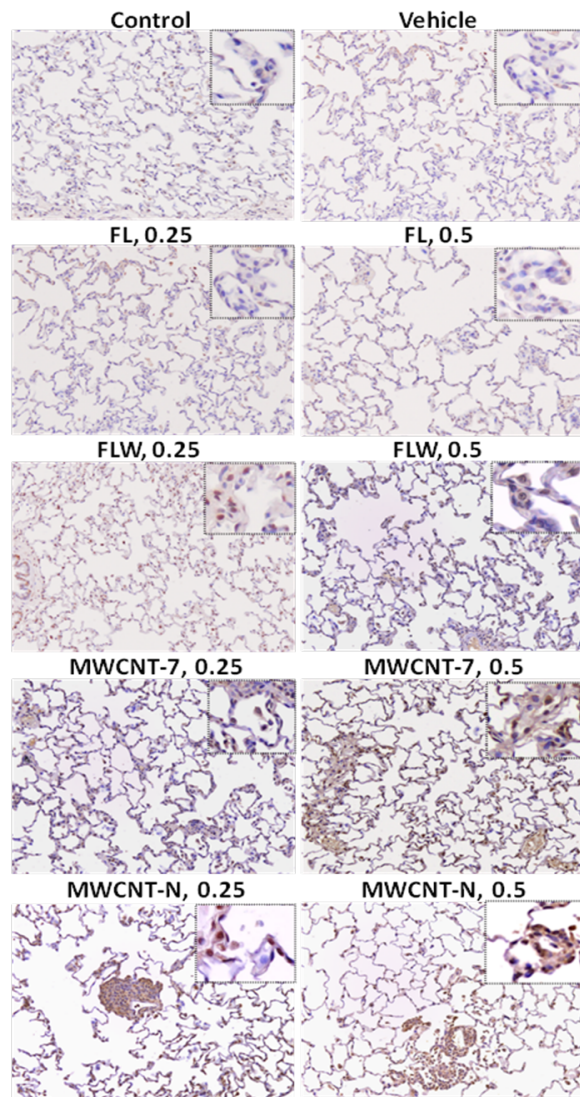


図3. 実験1における8-OHdG免疫染色の代表的な写真

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)

8-OHdG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。

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)。

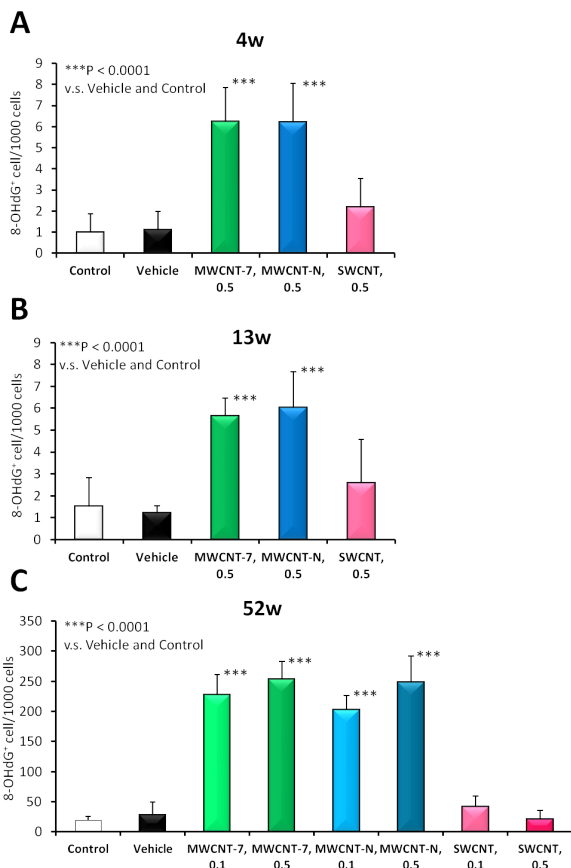


図4. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (A)、13週間 (B) および52週間後 (C) ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

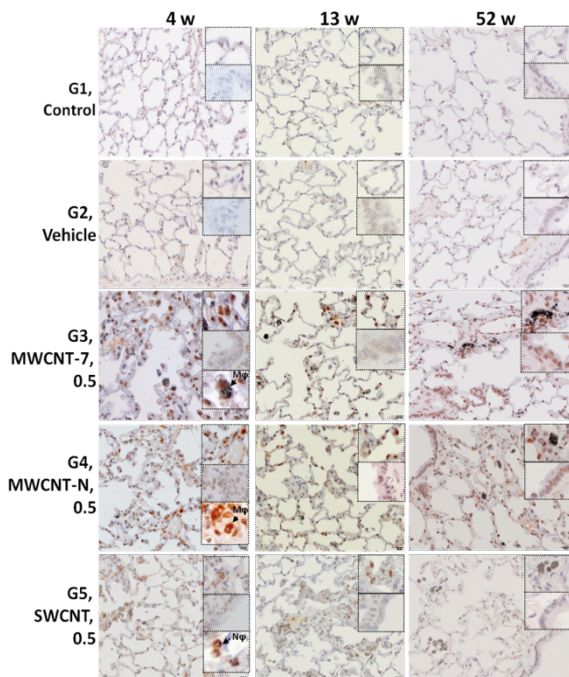


図5. 実験2における8-OHdG免疫染色の代表的な写真(4、13および52週間投与後)

2-2. ラット肺における8-NG形成レベルおよびiNOS/NOSの発現 (免疫染色)

8-NG免疫染色を用いた解析結果を図6と図7に示す。SWCNT投与群では13週目からラット8-NG陽性肺上皮細胞、Mφおよび好中球において投与開始4、13および52週間後の8-NG陽性細胞数(核、細胞質)の有意な上昇が認められた(図6(A, B, C)、図7)。肺に浸潤した多くの8-NG陽性マクロファージ(Mφ)や好中球(細胞質)が観察された(図7)。また、13週目からMWCNT-7およびMWCNT-N 0.5 mg/rat投与群のラット8-NG陽性肺上皮細胞の数が増加していた(図6、7)。

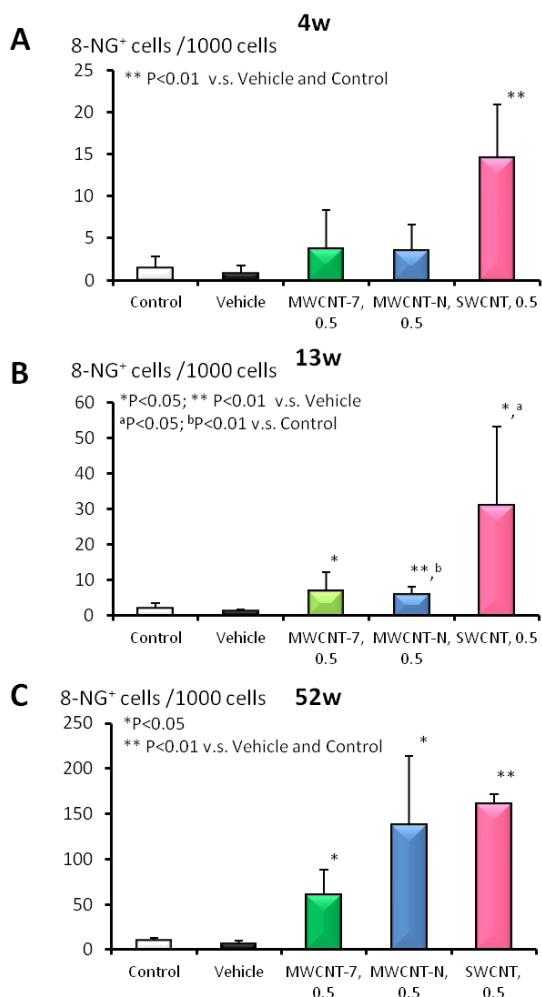


図6. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (A)、13週間 (B) および52週間後 (C) ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル

実験2ではSWCNT, MWCNT-7、又はMWCNT-N 0.5mg/rat投与した群のラット肺上皮細胞およびMφや好中球において、開始52週間後、ラット8-NGの発現上昇と関連し、nitric oxide (NO)産生酵素、iNOS/NOSの発現上昇が観察された(図7)。

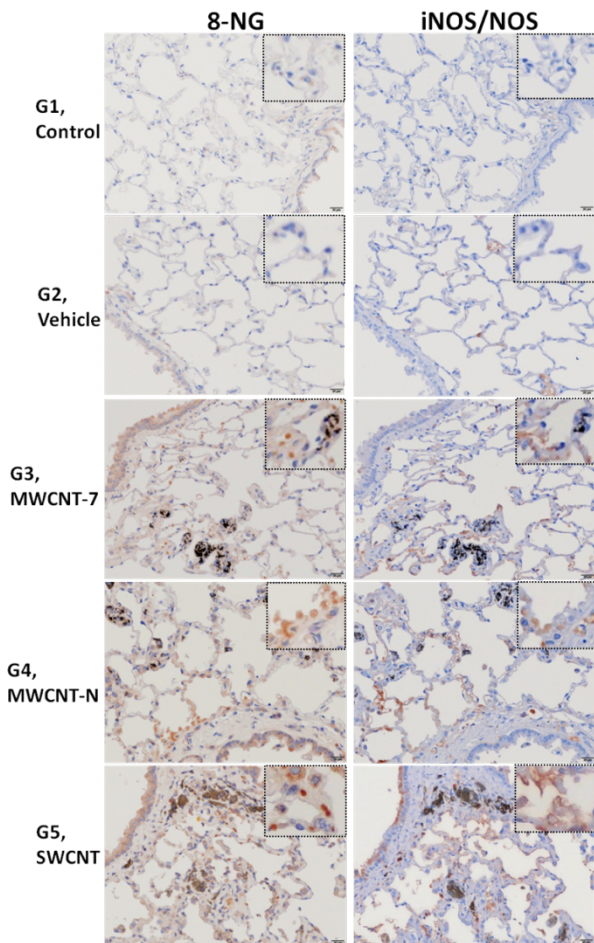


図7. 実験2における免疫染色で観察されたCNT投与の肺上皮細胞のDNAやRNAの8-NG形成レベルおよびiNOS/NOSの発現(52週間投与後)

2-3. RNAシーケンシング (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、短期投与の場合には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。

RNA-Seq解析では0.5 mg/rat SWCNT短期投与後は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が、オートファジーの活性化が予測された(表1)。

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

Canonical Pathways	MWCNT-7 0.5/ Vehicle	MWCNT-N 0.5 Vehicle	SWCNT/ 0.5/ Vehicle
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Mφ		2.18	1.90
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.

2-4. 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、MWCNT-N又はSWCNT 0.5mg/rat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8、9)。SWCNT短期や中期投与後、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が、p62の発現が上昇していた(図9)。

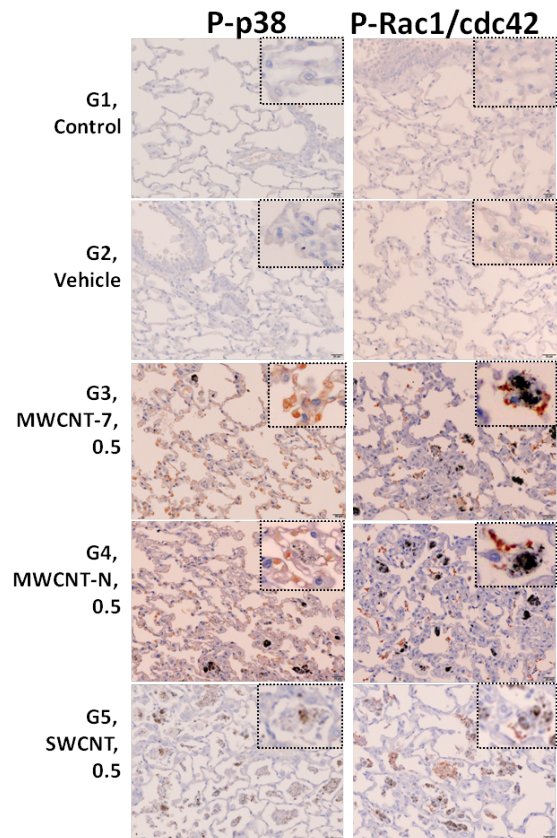


図8. 実験2におけるラット肺上皮細胞におけるP-p38およびP-Rac1/Cdc42の発現(4週間投与後)

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9)。

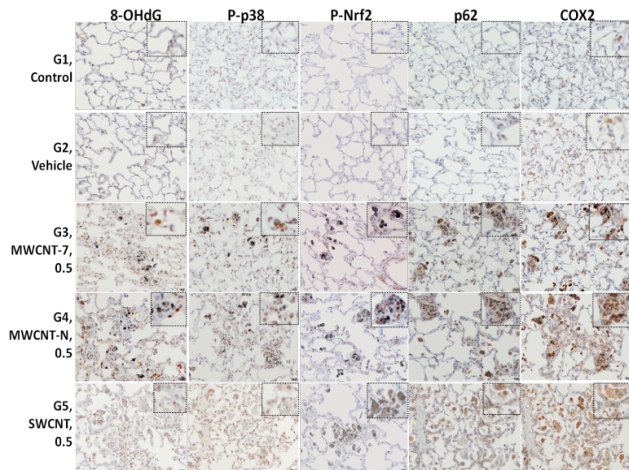


図9. 実験2における肺胞上皮細胞における8-OHdG, P-p38, P-Nrf2, p62 および COX2 の免疫染色の代表的な写真 (13 週間投与後)

ウェスタン・ブロットを用いた解析では、MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT 0.5mg/ml 投与群のラット肺組織において p62 の発現が有意に上昇していた(図10)。また、P-Nrf2 の発現は p62 と同じ変化が示された。さらに、4 週間投与後、全投与群において iNOS/NOS の発現と MWCNT-N および SWCNT 群において HIF1α の発現の増加傾向が認められた。

P-Nrf2, p62 and iNOS protein expression in rat lungs

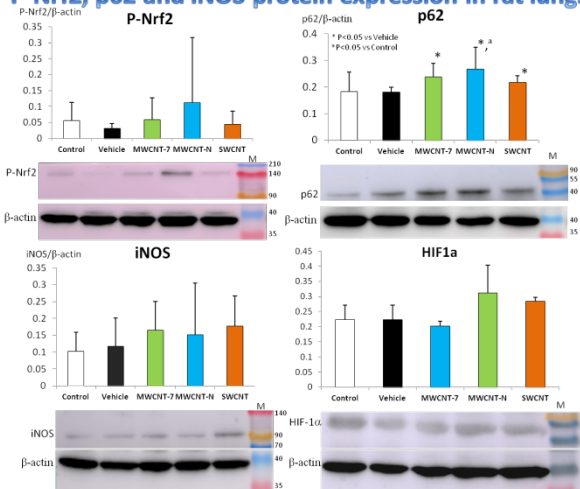


図10. 実験2におけるラット肺におけるP-Nrf2(S40)、p62、iNOS/NOS および HIF1α の発現(4 週間投与後、n=5)

D. 考察

DNA と ROS/RNS(活性酸素/窒素)の反応により形成される付加体である 8-OHdG および 8-NG は、酸化的/炎症的 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/8-NG 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。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 P-Nrf2、p62、P-p38 および P-Rac1/cdc42 の誘導が 8-OHdG 形成レベルと相関し、高い値が見られた。SWCNT の短期投与後での場合は p38 および P-Rac1 の有意な活性化が認められなかった。一方、iNOS/NOS および 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。

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が、8-NG 陽性細胞が見られたことから、SWCNT が強い炎症を伴う DNA および RNA の 8-NG が誘導することが認められた。また、SWCNT 投与群では肺上皮細胞において iNOS/NOS および p62 の発現上昇が観察され、オートファジーの障害や加速される細胞の老化が予測できた。8-NG の形成が SWCNT の肺発がん性に関与している可能性が考えられる。

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。また、SWCNT 投与群では、ラット肺上皮細胞の DNA や RNA において有意な 8-NG 上昇が認められた。MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT 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 (MWCNT) および 8-NG (SWCNT) 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. Vachiraunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, **Kakehashi A**, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arc of Toxicol.* 2024, ahead of print.
2. Tagami M, Kasashima H, **Kakehashi A**, Yoshikawa A, Nishio M, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Yashiro

- M, Azumi A, Honda S. Stromal area differences with epithelial-mesenchymal transition gene changes in conjunctival and orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Front Oncol.* 14:1277749, 2024.
3. **Kakehashi A**, Suzuki S, Wanibuchi H. Recent Insights into the Biomarkers, Molecular Targets and Mechanisms of Non-Alcoholic Steatohepatitis- Driven Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*, 15:4566, 2023.
 4. Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, **Kakehashi A**, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 15:5274, 2023.
 5. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, **Kakehashi A**, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 14:36, 2023.
 6. Suzuki S, Gi M, Fujioka M, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicol Lett.* 384:128-135, 2023.
 7. 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*. 488:153483, 2023.
 8. Nota T, Kageyama K, Yamamoto A, **Kakehashi A**, Yonezawa H, Jogo A, Sohawa 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.
- ## 2. 学会発表
1. **梯アンナ**, 西土井悠作, Qiu Guiyu, 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明, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 2. Qiu Guiyu, 魏民, 藤岡正喜, 鈴木周五, **梯アンナ**, 山本与毅, 野浦郁恵, ワチラアルンウオン アルパマス, 郭潤傑, 鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸 (DPAA) のラット妊娠期及び授乳期ばく露による次世代に対する発達神経毒性の検討, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 3. 魏民, 山本与毅, 鈴木周五, 藤岡正喜, ワチラアルンウオン アルパマス, 郭潤傑, Guiyu Qiu, **梯アンナ**, 鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱癌における DNA メチル化異常, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 4. 郭潤傑, 魏民, ワチラアルンウオン アルパマス, 藤岡正喜, 鈴木周五, Guiyu Qiu, 山本与毅, **梯アンナ**, 鰐淵英機. 不死化ヒト膀胱上皮細胞を用いた三次元膀胱培養モデルの確立及びそれを用いたヒ素毒性評価, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 5. 藤岡正喜, 魏民, 鈴木周五, 大石裕司, ワチラアルンウオン アルパマス, 邱桂ギョク, 芝野佳奈, **梯アンナ**, 鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸の経胎盤曝露による F1 マウス肝発がん機序には DNA メチル化異常が関与する, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 6. ワチラアルンウオン アルパマス, 魏民, 藤岡正喜, 鈴木周五, Qiu Guiyu, 郭潤傑, **梯アンナ**, 鰐淵英機. Toxicological Assessment of Dimethylarsinic Acid Using Humanized Liver Mice Model, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 7. 野浦郁恵, 鈴木周五, **梯アンナ**, 魏民, 藤岡正喜, ワチラアルンウオン アルパマス, 井上健, 鰐淵英機. 肺大細胞神経内分泌癌の新規バイオマーカー候補の検討, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 8. 鈴木周五, 魏民, 藤岡正喜, Qiu Guiyu, Vachiraarunwong Arpamas, **梯アンナ**, 鰐淵英機. NADPH 酸化酵素阻害剤 apocynin による o-toluidine 誘発ラット膀胱増殖性病変への抑制効果, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 9. 藤岡正喜, 魏民, 鈴木周五, 大石裕司, **梯アンナ**, 鰐淵英機. Diphenylarsinic acid induced transplacental liver carcinogenesis via epigenetic alterations in F1 mice. 2023 年度文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会 (2024 年 2 月, 大津)
 10. **梯アンナ**, 西土井悠作, Guiyu Qiu, 鈴木周五, 藤岡正喜, Arpamas Vachiraarunwong, 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検討及び発がん機序解明, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月, 東京)
 11. Gi M, Fujioka M, Shibano K, Qiu G, Vachiraarunwong A, Guo R, **Kakehashi A**, Suzuki S, Wanibuchi H. Development of an in vitro dosing assay for trans-tracheal intrapulmonary spraying administration of chemicals in rats, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月, 東京)
 12. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Suzuki S, Qiu G, Yamamoto T, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Development of a novel 3D urinary bladder mucosa model and evaluation of assessing arsenical toxicity, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月, 東京)
 13. Fujioka M, Gi M, Suzuki S, Oishi Y, Vachiraarunwong A, Qiu G, Shibano K, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid induced

- transplacental liver carcinogenesis via epigenetic changes in F1 mice, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、東京)
14. Qiu G, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, **Kakehashi A**, Yamamoto T, Noura I, Vachiraarunwong A, Guo R, Wanibuchi H. Effect of diphenylarsinic acid on hippocampal neurogenesis in SD rats, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、東京)
 15. Vachiraarunwon Arpamas, 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂ギョク、郭潤傑、**梯アンナ**、鰐渕英機. Evaluating hepatic metabolism and carcinogenicity of dimethylarsinic acid using humanized liver mice model, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、東京)
 16. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwon, **梯アンナ**、鰐渕英機. ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による肝発がん脂質代謝異常が関与する、第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月、東京)
 17. Vachiraarunwong A, Pharapirom A, Wongpoomchai R, Gi M, Suzuki S, **Kakehashi A**, Fujioka M, Wanibuchi H. Glutelin hydrolysate of purple rice bran exhibited cancer chemopreventive activity against liver and colon carcinogenesis, がん予防学術大会 2023 (2023 年 9 月、金沢)
 18. **梯アンナ**、西土井悠作、Qiu Guiyu、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、魏民、鰐渕英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の検討、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 19. Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Shugo Suzuki, Kana Shibano, Guiya Qiu, Runjie Guo, Aroonrat Pharapirom, **Anna Kakehashi**, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Comparison of carcinogenicity of arsenicals on immortalized human bladder epithelial cells, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 20. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂ギョク、芝野佳奈、**梯アンナ**、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸経胎盤ばく露マウスにおける肝発がん過程には DNA メチル化異常が関与する、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 21. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、**梯アンナ**、鰐渕英機. ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による肝発がん脂質代謝異常が関与する、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 22. 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とフラレーン
ウイスキーの肺発がん性の解析、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 23. シーマ・アシラフウル・ナハル、内木綾、**梯アンナ**、加藤寛之、津田洋幸、高橋智. 単層カーボンナノチューブの肺および中皮発がん性の解析、第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
 24. 田上瑞記、笠島裕明、**梯アンナ**、吉川敦子、坂井淳、三澤宣彦、鰐渕英機、安積淳、八代正和、本田茂. 結膜 MALT リンパ腫と眼窩 MALT リンパ腫の遺伝子発現クラスターの比較、眼科臨床紀要会、眼科臨床紀要 (眼臨紀)、巻：16 号：5 ページ：391、JST 資料番号：Z0319C 講演・口頭 (2023 年 5 月)

G. 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

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発（23KD1002）

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

1) 短期（6w）のプロトコルにおいて発がん性の観察されたカーボンナノチューブのMWCNT-7、MWCNT-N、MWCNT-B、DWCNT（TIPS投与・0.5mg/ラット、）の発がん関連因子のRNA microarray発現解析を実施した。
2) 長期投与（～104週）においては既知の肺発がん物質4種をTIPS投与した。2) ニトロサミンのDHPN（4回・計800mg/ラット）、タバコ煙ニトロサミンNNK（40mg）、MWCNT-N（1.5mg/ラット）、MWCNT-B投与（1.5mg/ラット）群の肺がん組織のDNA変異シグネチャー解析による遺伝子変化を分析による発がんに関わる遺伝子変化機序解析を行っている。その結果、MWCNTによる肺・胸膜中皮におけるRNA発現、DNAシグナチャー解析において、発がん性ニトロサミンとは全く異なる発がん経路が考えられた。

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/同時に胸膜中皮に発がん性のあることを明らかにしてきた。それらは体内に入ると分解されることなく異物として残留して沈着組織細胞に発がんさせる。このことは発がん性ニトロサミン類のように、生体内で代謝分解または活性化されて最終的にDNA障害をもたらすという従来の発がん物質とは全く異なる。すなわちMWCNTは生体内で分解する事なく長く残留して、残留部位に癌を発生させる。本研究ではMWCNTの発がん機序を明らかにして、その予測法を明らかにすることにある。

B. 研究方法

1) 短期（6w）実験のプロトコルにおいて既存の肺/胸膜中皮に発がん性の観察されたカーボンナノチューブのMWCNT-7、MWCNT-N、MWCNT-B、DWCNT（TIPS投与・0.5mg/ラット）及び既知の変異原性性肺発がんニトロサミンN-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine（DHPN）4000mg/kg投与ラットの発がん関連因子のRNA microarray発現解析を実施した。RNA Sequence heat MapではUp regulationはDown regulationの7.4倍以上（701/95）に対して4種のCNTでは2.7倍（75/27）を示し、絶対的、相対的に異なった発現パターンであった。

2) 長期実験（～104週）においてF344雄ラットに剛質線維（Rigid fiber）型のMWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）ともつれ型線維（Tangled fiber）のMWCNT-B（肺発癌性あり）を1回/週にて総投与量1.5mg/ラットを経気管内肺内噴霧（TIPS）投与し、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となるように週1回にて4週間（計4回）投与し、初回投与より52-104週にて終了した。

（倫理面の配慮）

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

1) 短期試験：肺発がん性においてニトロサミンのDHPNと4種のCNTではRNA Sequence heat Mapの発現は全く異なり、発がん機序が全く異なる可能性が示された。

2) 同様に肺発がん性ニトロサミンとMWCNTによって発生した肺がんのDNAシグナチャー解析ではCNTの肺発がんにかかる発がん機序は全く異なる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究によって、MWCNTの肺・胸膜中皮における発がん機序はニトロサミンとは全く異なる経路が明らかになりつつある。

E. 結論

MWCNTの発がん予防に新しい道を拓くことになる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sultana N, Fukamachi K, Jiegou Xu, **Tsuda H**, Suzui M. mRNA expression profile of cytokines in

rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). *Fundam Toxicol Sci.* 10:27-30, 2023.

2. Sultana N, Fukamachi K, Roy DC, Jiegou Xu, **Tsuda H**, Suzui M. mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats. *Fundam Toxicol Sci.* 10:137-141, 2023.

2. 学会発表

1. **Tsuda H**. Carbon nanotubes (CNT), innovative materials of the 21st century: carcinogenicity evaluation of CNT with different wall structures, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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
Hori Y, Naitoh I, Naiki-Ito A , Kawai T, Yoshida M, Kato A, Kachi K, Sahashi H, Adachi A, Toyohara T, Kito Y, Yamamoto T, Takahashi S, Kataoka H.	Incidence of pancreatic injury and pancreatitis in patients treated with immune checkpoint inhibitors.	Clin Transl Gastroenterol.		in press	2023
Nagai T, Kawai N, Gonda M, Iida K, Etani T, Kobayashi D, Naiki T, Naiki-Ito A , Ando R, Yamaguchi S, Sugahara Y, Ueno S, Tsutsumiuchi K, Imae T, Yasui T.	Role of HIKESHI on Hyperthermia for Castration-Resistant Prostate Cancer and Application of a Novel Magnetic Nanoparticle with Carbon Nanohorn for Magnetic Hyperthermia.	Pharmaceutics.	15	626	2023
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, <u>Naiki-Ito A</u> , 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
Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, <u>Totsuka Y</u> , Wanibuchi H.	Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis.	Biomolecules.	14	36	2024
Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, <u>Kakehashi A</u> , Shiota M, Wanibuchi H.	Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells.	Arc of Toxicol.		ahead of print	2024
Tagami M, Kasashima H, <u>Kakehashi A</u> , Yoshikawa A, Nishio M, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Yoshihiro M, Azumi A, Honda S.	Stromal area differences with epithelial-mesenchymal transition gene changes in conjunctival and orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.	Front Oncol.	14	1277749	2024
<u>Kakehashi A</u> , Suzuki S, Wanibuchi H.	Recent Insights into the Biomarkers, Molecular Targets and Mechanisms of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Driven Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Basel)	15	4566	2023
Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, <u>Kakehashi A</u> , Kato M, Uchida J, Wanibuchi H.	DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis.	Cancers (Basel).	15	5274	2023

Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A , Totsuka Y, Wanibuchi H.	Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis.	Biomolecules.	14	36	2023
Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A , Wanibuchi H.	Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway.	Toxicol Lett.	384	128-135	2023
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	153483	2023
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
Sultana N, Fukamachi K, Jiegou Xu, Tsuda H , Suzui M.	mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT).	Fundam Toxicol Sci	10	27-30	2023

Sultana N, Fukamachi K, Roy DC, Jiegou Xu, Tsuda H , Suzuki M.	mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats.	Fundam Toxicol Sci	10	137-141	2023
---	--	--------------------	----	---------	------

令和6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5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 ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する短期経気管肺内噴霧暴露評価系
および *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・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 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□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 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5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 ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する短期経気管肺内噴霧暴露評価系
および *in vitro* 予測手法の開発
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 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。

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 福島 伸一

次の職員の令和5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 ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する短期経気管肺内噴霧暴露評価系
および *in vitro* 予測手法の開発

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・准教授

(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6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5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 ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する短期経気管肺内噴霧暴露評価系
および *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。