

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7年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 内木 綾

令和8(2026)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…………… 14

2. 次世代シーケンサー(NGS)によるゲノム変異解析

星薬科大学 薬学部 / 戸塚 ゆ加里…………… 22

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…………… 27

4. カーボンナノチューブおよび化学発癌物質誘発腫瘍モデルの作製

名古屋市立大学 大学院 医学研究科 / 津田 洋幸…………… 36

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 39

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)は難分解性で体内に蓄積し得ることから、肺胞上皮および胸膜中皮に毒性・発がん性を誘発する可能性がある。一方、OECDが求める吸入暴露試験は施設・費用面の制約が大きく、動物使用の削減(3R)を意識した、より実用的かつ効率的な評価体系の確立が課題である。そこで本研究は、大規模吸入施設を必要としない経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を基盤に、長期発がん性(104週)と整合する短期(4週・13週)および有害性指標 Adverse Outcome Pathway(AOP)の同定と、陰性CNTおよび化学発癌物質(DHPN/NNK)との比較による発がん機序を整理することで、将来的に *in vitro* 評価へ移行可能な *in vivo* 参照軸を提供し、OECD TG化に資する基盤データを構築することを目的とする。

本年度は、発がん性陽性対照(MWCNT-7、MWCNT-N)と発がん性が未知であったSWCNTを同条件でTIPS投与し、104週発がん性と短期(4週・13週)指標の対応を検討した。あわせて、Ki67、 γ H2AX、8-OHdG、8-NG等の病理・分子指標と炎症性遺伝子を用いて、腫瘍発生前段階のKey Event(KE)候補を評価し、発がん性陰性CNT、化学発癌物質との比較により発がん性と連結するKEの絞り込みを行った。さらに、投与後4週肺サンプルのRNA-seqに基づくGO/KEGG解析とqRT-PCRにより陽性CNTに特異的な経路および候補マーカーを抽出・検証し、加えてDHPN/NNKおよびCNT誘発腫瘍の全ゲノム解析を通じて、変異シグネチャーから遺伝毒性の質の差を比較した。

その結果、SWCNTは肺発がん性が陽性である一方、胸膜中皮腫誘発性は明確に支持されないという発がんプロファイルを示し、CNT種(物性)により標的臓器・機序が異なる可能性が示唆された。短期指標として、Ki67および γ H2AXは複数CNTで4週から上昇し13週まで持続し、腫瘍発生前のスクリーニング指標として有用であった。DNA損傷の質には差があり、8-OHdGはMWCNT群で上昇、8-NGはSWCNTで早期から持続増加するなど、ROS/RNSを介する傷害様式の違いが示された。炎症性遺伝子ではCc12/Cc13が共通して上昇し、Il1b/Tnfaは高発がん感受性群で持続上昇した。RNA-seqでは陽性CNTで炎症・自然免疫/異物応答経路が一貫して富化し、Spp1/Cc12/Mmp12が候補マーカーとして抽出・検証された。さらに全ゲノム解析では、DHPN/NNKでストランドバイアスが認められた一方、CNT由来では明確でなく、CNT発がんはDNA直接作用のみでは説明しにくい可能性が示唆された。

以上より、TIPS法により長期発がん性と短期KE候補を接続し、陰性物質・化学発癌物質との比較によりCNT発がんの機序像を具体化できた。本成果は、3Rの観点から本事業が最終的に目指す *in vitro* 評価手法の確立に対し、*in vitro*で測定すべき生体応答とKE候補マーカーを、長期発がん性に裏付けられた形で提示した点に意義がある。すなわち、TIPSにより得られた *in vivo* 参照軸は、*in vitro*系の妥当性確認と適用範囲の設定に不可欠であり、両者を整合化することで、動物試験を削減しつつリスク評価の信頼性を担保する標準化に繋がる。これらの研究成果は、2025年12月10日に開催された班会議内で班員およびオブザーバーにより議論され、評価指標の妥当性と標準化に向けた整理が行われた。足利班との意見交換では、本研究班 *in vivo*系で同定したマクロファージ/ケモカイン系指標が *in vitro*系でも再現されることが確認され、3Rを前提とする統合評価(スクリーニング・優先順位付け)の妥当性を補強した。以上より、本年度の成果は、ナノマテリアルのリスクアセスメントに資する短期評価枠組みの中核データとなり、OECD TG化に向けた基盤情報として位置づけられる。

研究分担者

戸塚 ゆ加里 星薬科大学薬学部 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種の多層(MW)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。本研究グループではこれまでに、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R2-6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MWCNTsによる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(4週)に検出し、CNT毒性のAdverse Outcome Pathway (AOP)として期待された。さらにR6年度は、単層(SW)CNTのTIPS投与後2年間の解析により、MWCNT-7およびMWCNT-Nが肺・胸膜発がんを発生させる条件において、SWCNTが肺発がん性を有し、胸膜発がん性は有さないことを初めて明らかにするとともに、投与後4週において、MWCNTと同様のAOPが観察されることを確認した。

健康影響評価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。これまでに得られたCNTのAOPとの相違を詳細にすることにより、AOPの高精度化や新規樹立を試み、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、MWCNTs (MWCNT-7, MWCNT-N)とSWCNTのTIPS投与後、発がん期(104週)における肺発がん性と一致する、亜急性期(4週)、亜慢性期(13週)に観察可能な有害性指標を選定するため、4、13週における各指標の経時的変化を病理学的解析、遺伝子解析により明らかにするとともに発がん性陰性物質における変動も確認する。また複数種類のCNTまたは既知の化学発癌物質による遺伝子発現変化および遺伝毒性をNGSにより解析し、変動パスウェイおよび変異シグネチャーを同定する。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やOECD TG/IATAに提案できる評価法を開発する。

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-1640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到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)、DNA損傷(γ H2AX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、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) (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による*Ccl*種、*Ii*種や*Tnf- α* 等の炎症性ケモカイン、サイトカイン発現の定量に用いる(内木)。

(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、梯、内木)

(1) *In vivo*試験と同様の方法で、肺発がん性陽性CNT (MWCNT-7, MWCNT-N, MWCNT-B, DWCNT, SWCNT)、最近長期試験において肺発がん性陰性を実証したCNT (CNH, CNB) (論文投稿中)を被験CNTとしてTIPS投与し、4週後に肺組織を採取し、免疫染色(梯)、NGSを用いたRNA-seq解析、定量的RT-PCR解析に用いる(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(内木・梯)。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-(methylnitrosamino)-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、CNTによる肺発がん機序との比較対照として用いる。

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

SWCNTおよびMWCNT-N/BをF344ラットにTIPS投与し、発生した肺がん及び中皮腫サンプルを用いてこれら化学物質に由来する変異シグネチャーの同定を試みる。変異シグネチャーの比較として、化学肺発がん物質であるDHPNおよびNNKによるラット肺がんについてもゲノム解析を実施した。中皮腫のFFPEサンプルから腫瘍部分を削り取り、中皮腫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-N/Bを投与して得られた胸膜中皮腫及び肺がん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48時間培養する。マウスMφ細胞から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)-1. CNTのTIPS投与による肺胞沈着と免疫細胞の反応

まず、R6年度までに明らかとなり、本研究の基盤となる2年間発がん性試験の結果を概説する。
胸膜中皮発がん：臓側および壁側胸膜における悪性中皮腫の発生率は、MWCNT-7およびMWCNT-Nの高用量群(0.5 mg/rat)において有意に増加した。一方、SWCNT投与群においても低用量・高用量群で各1例の発生が見られたが、統計学的な有意差は認められず、本試験においてSWCNTによる中皮腫誘発性は結論づけられなかった。
肺発がん：肺腺癌の発生率は、MWCNT-NおよびSWCNTの高用量群において有意に増加した。また、肺腫瘍全体(腺腫と腺癌の合計)の発生率においても、これら2群で有意な上昇が確認された。なお、既知の肺発がん物質であるMWCNT-7において有意な肺癌発生頻度の上昇が見られなかった要因は、中皮腫による早期死亡例が多発し、肺がん発生に必要な観察期間が十分に確保できなかったためと結論づけられた。

以上の発がんプロファイルの違いを踏まえ、CNT投与後の肺における沈着状況と免疫細胞の反応を検討した。4、13、52、104週の全観察期間を通じ、CD68免疫染色によりCNT投与群における肺胞Mφの集積が確認された。特にSWCNT投与群では、高度な好中球浸潤の併発が認められた(図1)。光顕およびSEM観察において、MWCNTs群では肺胞Mφによる食食像に加え、線維が細胞膜から突き刺さる「突出像」が確認された。対照的にSWCNT群では、Mφによる食食は確認されたものの、線維は細胞内に完全に内包されており、表面への露出は明らかではなかった。また同群では、Mφの崩壊に伴いSWCNTが肺胞内へ再

放出される像も観察された(図2)。

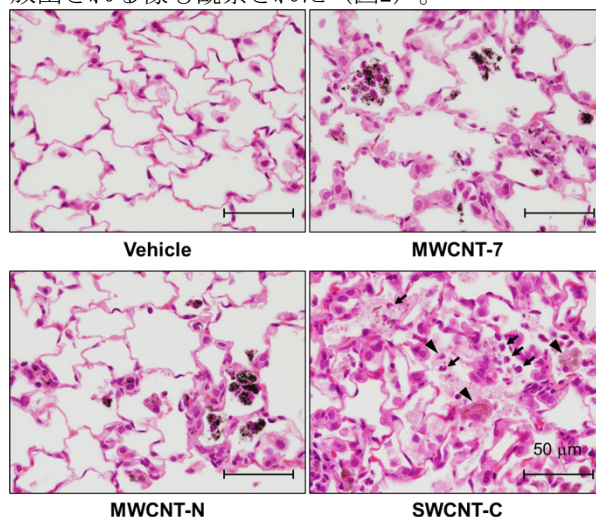


図1. 肺胞MφによるCNTの食食とSWCNTによる好中球遊走(HE像)。

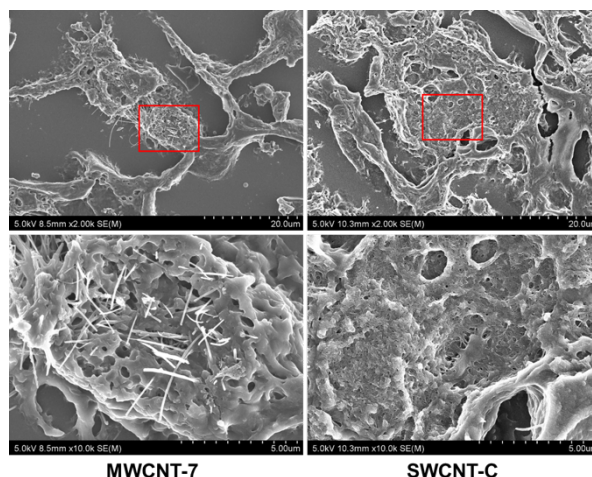


図2. 肺胞MφによるCNTの食食(SEM像)。

(1)-2. CNTによる肺有害性指標の動態解析(Ki67、 γ H2AX、8-OHdG、8-NG)

増殖活性およびDNA損傷指標について4週と13週の定量的比較を行ったところ、多くの指標で4週からの変化が持続していた。Ki67および γ H2AX陽性率は、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTのいずれの群においても、4週時点ですでに有意な上昇を示し、その傾向は13週まで持続した(図3、4)。酸化DNA損傷(8-OHdG)はMWCNT群特異的に上昇し、SWCNT群では有意な変化を認めなかった(図5)。他方、炎症関連DNA損傷(8-NG)については、SWCNT群では4週から継続して有意に増加した一方、MWCNT群では13週に至って有意な上昇が顕在化するという経時的な差異が認められた(図6)。

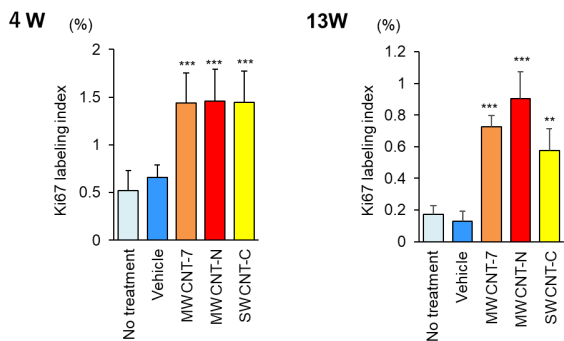


図3. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

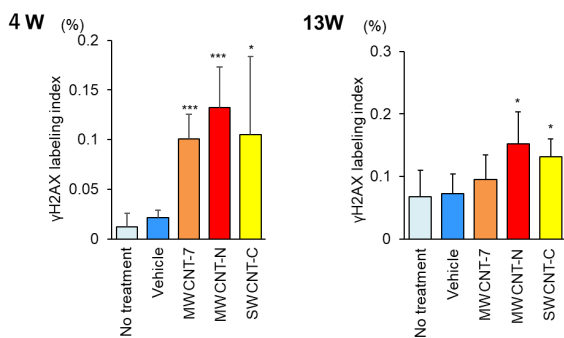


図4. CNT投与による肺胞上皮DNA損傷の変化 (γH2AX免疫染色)、*P < 0.05、***P < 0.001 vs Vehicle.

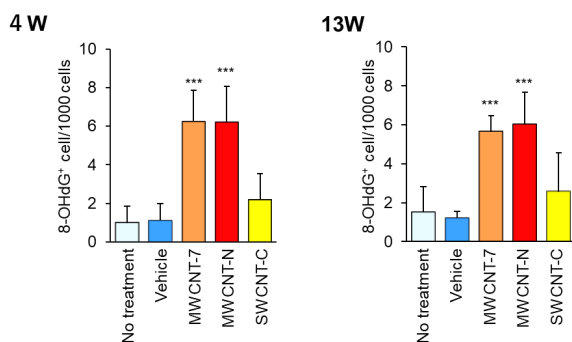


図5. CNT投与による肺胞上皮酸化的DNA損傷の変化 (8-OHdG免疫染色)、***P < 0.001 vs Vehicle

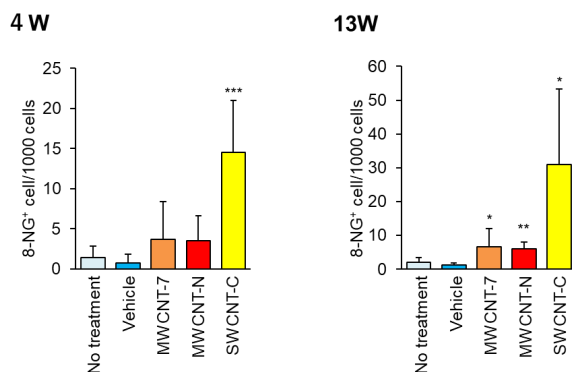


図6. CNT投与による肺胞上皮炎症関連DNA損傷の変化 (8-NG免疫染色)、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

(1)-3. CNTによるケモカイン、サイトカインmRNA発現の動態解析 (定量的RT-PCR)

4および13週における肺のケモカイン、サイトカインおよび炎症関連遺伝子のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した (図7, 8)。ケモカインCcl2およびCcl3の発現は、4週・13週の両時点において、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTの全投与群で一貫して有意に上昇した。Ccl9はMWCNTs群では両時点で、SWCNT群では13週時点で有意な上昇を示した。炎症性サイトカインについては、Il6が全投与群の4週時点で有意に上昇した。Il-1b、Tnfaは高発がん感受性であるMWCNT-NおよびSWCNT群において、4週・13週を通じて有意な上昇を認めた。すなわち、曝露早期からのCcl2/Ccl3の共通した上昇はCNTの発がん性の有無を鋭敏に捉えるスクリーニング指標として有用であり、さらにIl-1bやTnfa等の発現プロファイルは、MWCNT-NやSWCNTが示すより高い発がん性強度を反映する指標となり得ることが示唆された。

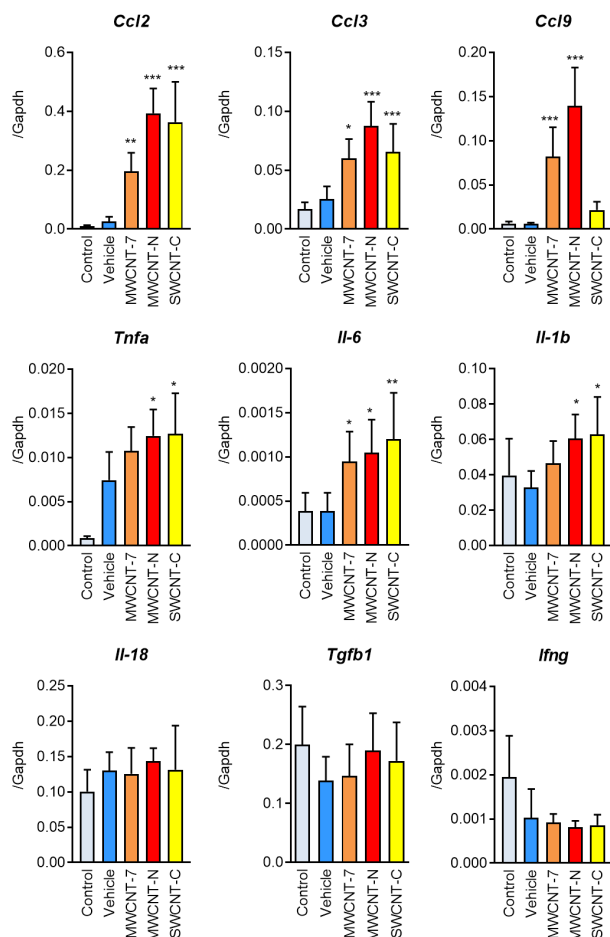


図7. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週 (定量RT-PCR)、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

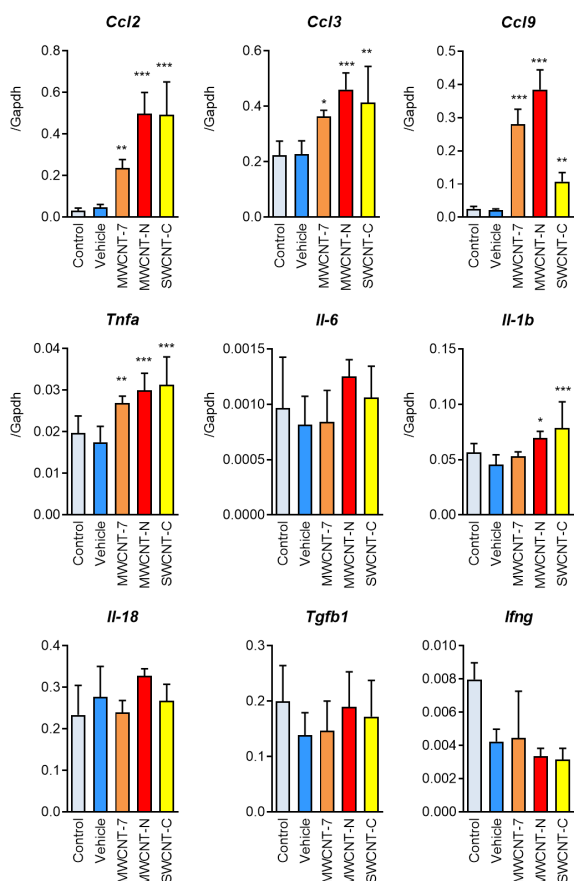


図8. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、13週（定量RT-PCR）、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

(2)-1. 発がん性陰性CNTにおける肺AOPの検証(8-OHdG、8-NG)

免疫染色による8-OHdGおよび8-NGの解析結果を図9-11に示す。ラット肺胞および気管支上皮細胞において、MWCNT-7投与群（1 mg/rat）では投与4週後に8-OHdG陽性細胞数の顕著な上昇が認められた。肺発がん性陰性CNT（CNB, CNH）投与群については、高用量（1 mg/rat）において統計学的有意な上昇を認めたものの、既知の発癌性陽性CNT、MWCNT-7群と比較してその程度は低く、低用量（0.5 mg/rat）では有意な変動は観察されなかった（図9、11）。一方、8-NGについては、MWCNT-7投与群でのみ有意な陽性細胞数の上昇が認められた。CNHおよびCNB投与群では、高用量（1 mg/rat）であっても肺胞および気管支上皮細胞における8-NG形成レベルに変化は見られず、MWCNT-7群はこれらと比較して有意な高値を示した（図10、11）。以上の結果より、発がん性物質（MWCNT-7）ではROSおよびRNSによるDNA損傷が確実に誘導されるのに対し、非発がん性物質ではその誘導能が限定的であることが示唆された。

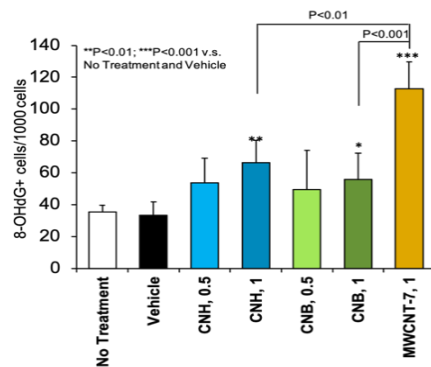


図9. 免疫染色で観察されたCNH、CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル。

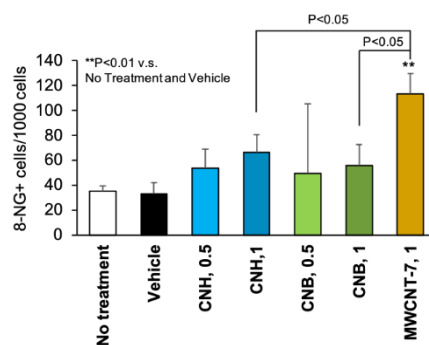


図10. 免疫染色で観察されたCNH、CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル。

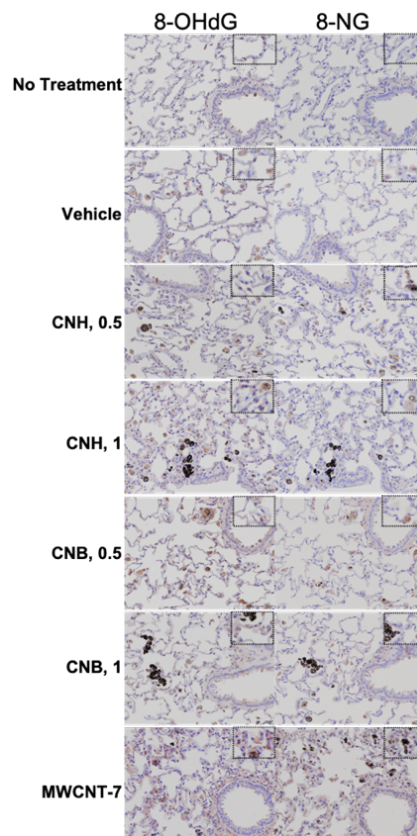


図11. 免疫染色で観察されたCNH、CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル。

(2)-2. 発がん性陰性CNT、既存化学発癌物質との網羅的遺伝子発現変化の比較(RNA-seq)

本研究グループの長期発がん性試験により肺腫瘍誘発性が確認されたCNTを肺発がん性陽性CNT (MWCNT-7、MWCNT-N、MWCNT-B、DWCNT、SWCNT) として用いた。また、長期試験で肺発がん性が認められていないCNT (CNH、CNB) を肺発がん性陰性CNTとして比較対象に用いた。TI PS投与後4週または化学発癌物質投与後4週の肺凍結サンプルを用いたRNA-seq解析により、発がん性陽性CNTにより変動する遺伝子群を解析した。まず発がん性陰性CNTと比較して発がん性陽性CNT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。GO解析では、発がん性陽性CNT群で優位に変動する遺伝子セットは、免疫・炎症応答、とくに白血球の遊走・走化性に関連する機能カテゴリに強く集約された(図12, 13)。KEGG解析では、発がん性陽性CNTで補体系/凝固系およびサイトカイン・ケモカインを中心とした炎症性ネットワークが優位に富化していた。加えて、細胞骨格調節やリソソーム、酸化的リン酸化などの経路も抽出され、炎症に伴う細胞機能変化・ストレス応答の関与が示唆された(図14)。GO解析とKEGG解析をまとめると、発がん性陽性CNTでは、免疫細胞の動員と炎症性シグナルの持続を基盤として、補体・凝固系を含む組織傷害・修復の反復や自然免疫の活性化が進行し、これに細胞機能・代謝の変化(細胞骨格、リソソーム、ミトコンドリア代謝など)が重なることで、腫瘍微小環境の形成や発がん過程に寄与する可能性が考えられた。

次に化学発癌物質DHPNと比較して発がん性陽性CNTで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を701個、低下する遺伝子を95個得た。GO解析では、骨髄系・好中球などの免疫細胞の活性化と動員、受容体リガンドを介したサイトカイン/ケモカインシグナルに強く富化した。また、エンドソーム・リソソーム系、NADPHオキシダーゼ複合体、細胞外小胞が上位に抽出され、異物処理・ROS関連経路を含む炎症性微小環境形成が関与する可能性が示された。KEGG解析では、発がん性陽性CNTはDHPNと比べて、炎症性サイトカイン/ケモカイン、補体・凝固、食食・リソソーム、NOD様受容体を軸とする 自然免疫・異物応答型の分子経路が強く富化しており、炎症性微小環境形成、すなわち非遺伝毒性寄りのプロモーション要素がメカニズムとして示唆された。

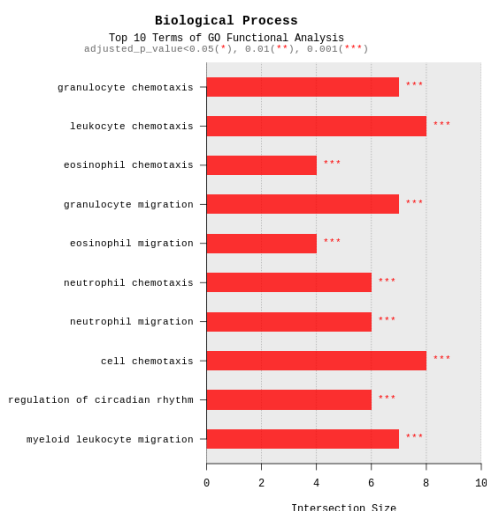


図 12. CNT 投与による RNA シーケンシング解析、GO エンリッチメント解析 (Biological Function)、4 週、***P < 0.001 発がん性陽性 CNT vs 発がん性陰性 CNT.

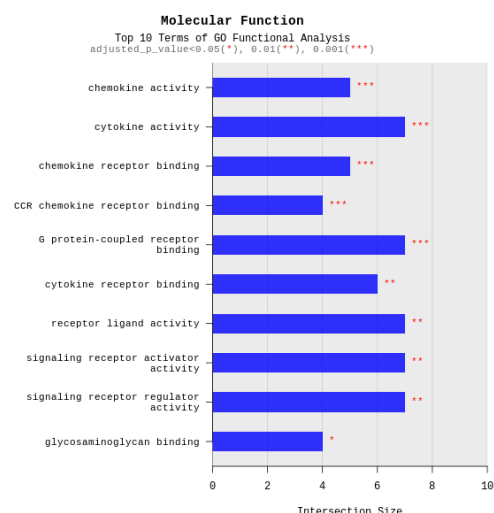


図13. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Molecular Function)、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

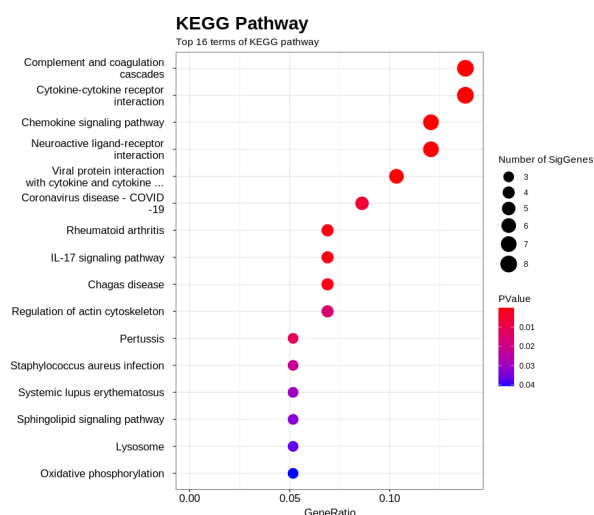


図14. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、KEGG解析、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

さらにCNT発がん性予測バイオマーカー候補を得るため、発がん性陰性CNTと比較して発がん性陽性CNTで有意に上昇する上位遺伝子群を抽出した(図15)。

Transcript_ID	Gene_Symbol	Description	Positive /Negative.fc
NM_012881	Spp1	secreted phosphoprotein 1	5.705335
NM_053963	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	5.557572
NM_001108643	Tem72	transmembrane protein 72	4.649582
NM_019224	Rgs9	regulator of G-protein signaling 9	4.033824
NM_001007612	Cc17	C-C motif chemokine ligand 7	3.966989
NM_001012357	Cc19	chemokine (C-C motif) ligand 9	3.706637
NM_001100990	Rspo3	Respondin 3	3.591108
NM_001107642	Tubb1	tubby like protein 1	3.435893
NM_013182	Mec5r	melanocortin 5 receptor	2.809814
NM_022214	Cxcl6	C-X-C motif chemokine ligand 6	2.773024
NM_031560	Ctsk	cathepsin K	2.748505
NM_031530	Ccl2	C-C motif chemokine ligand 2	2.742889

図15. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、TOP高発現遺伝子、発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

その結果、先に示したGO/KEGG結果と整合し、発がん性陽性CNTではマクロファージマーカー (Spp1、Mmp12)、ケモカイン群 (Ccl2、Ccl17、Ccl19、Cxcl16) の発現上昇が認められ、炎症性微小環境の形成が強く誘導されることが示された。

(2)-3. 発がん性陰性CNT、既存化学発癌物質との網羅的遺伝子発現変化の比較(定量的RT-PCR)

そこで、次にSpp1、Mmp12およびCcl2遺伝子発現について、定量的RT-PCRにて確認した。その結果、発がん性陽性CNTでは Spp1、Ccl2、Mmp12発現が誘導されることが確認された。これらは陰性CNTでは相対的に弱く、またDHPNでは同等の誘導が目立たない傾向を示したことから、CNT特有の炎症性微小環境形成と組織改変を反映する発がん性予測マーカー候補として有望であると考えられた(図16)。

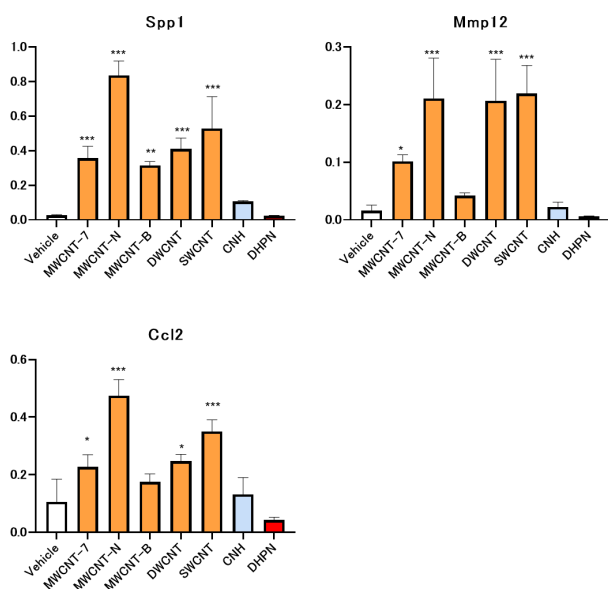


図16. 肺mRNA発現量の変化、4週 (定量RT-PCR)、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

(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DHPN、NNK、SWCNT、MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体 (DHPN: 12検体、NNK: 3検体、SWCNT: 7検体、MWCNT-7: 12検体、MWCNT-N: 4検体、MWCNT-B: 3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 (表1)。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 (StrelkaおよびMutect 2)により体細胞変異の検出を行った。さらに、SigProfilerExtractorで一塩基置換(SBS) 解析を実施した結果、7種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_A~G) が同定された (図17)。また、各サンプルにおける変異数と7種類の変異シグネチャー分布について図18に示す。図18からわかるように、強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察された。一方、SWCNTおよびMWCNT-7、-NまたはMWCNT-B暴露のラット中皮腫/肺腫瘍サンプルの結果では、検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で

比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~Cは DHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測できた。

表1 肺がん・中皮腫サンプルリスト

Chemical	Strain	Histology	Experimental Facilities	Normal
DHPN (N=12)	F344	Ad. Carcinoma (7), Adenoma (1), S. C. Carcinoma (3), Hyperplasia (2)	Dr. Tsuda Lab	Matched
NNK (N=3)	F344	Ad. Carcinoma (3)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-N (N=4)	F344	Mesothelioma (3), Ad. Carcinoma (1)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-B (N=3)	F344	Ad. Carcinoma (3)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-7 (N=5)	F344	Mesothelioma (3), Ad. Carcinoma (2)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-7 (N=7)	F344	Mesothelioma (6), Ad. Carcinoma (1)	Dr. Naiki Lab	Matched
SWCNT (N=7)	F344	Ad. Carcinoma (7)	Dr. Naiki Lab	Matched

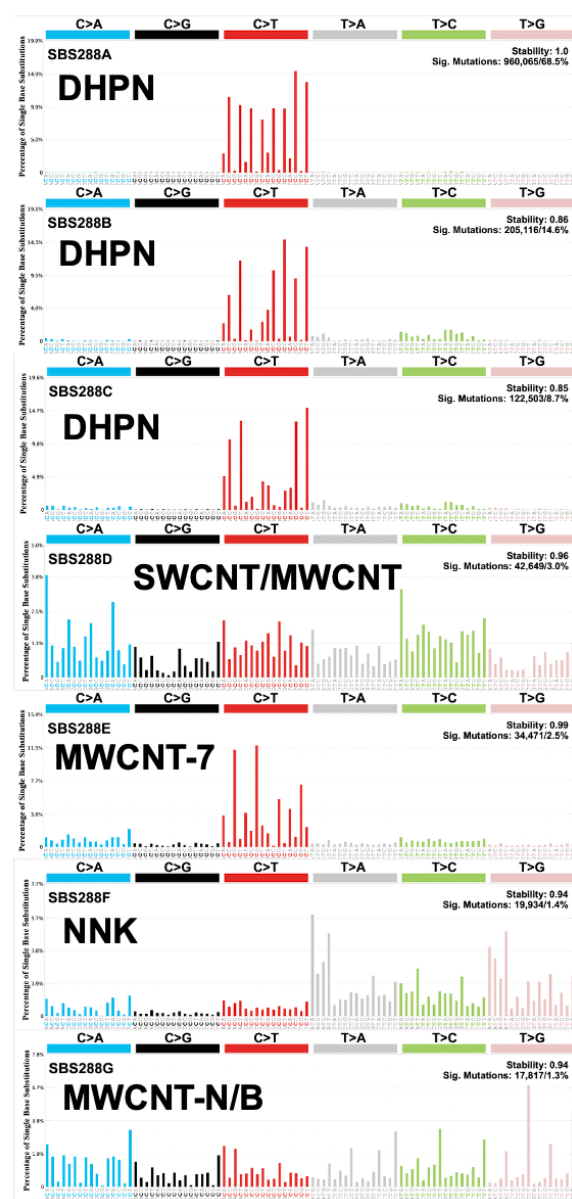


図17 ラット肺がん・中皮腫より抽出された変異シグネチャー

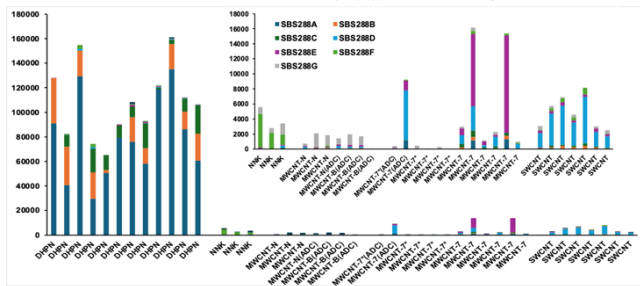


図18 サンプル毎の変異シグネチャー分布

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、DHPN 由来のシグネチャーである SBS_A~C はいずれも SBS11 (アルキル化剤由来) と酷似していることがわかった。MWCNT-7 に由来すると思われる SBS_E は SBS1 (5-meC の自発的脱アミノ化) および SBS87 (チオプロリンによる化学療法) と類似していた。それ以外のシグネチャーはいずれも新規の変異シグネチャーである可能性が示唆された (表2)。

表2 ラット SBS シグネチャーとヒト SBS シグネチャーの類似性解析

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
RatSBS_A	DHPN	SBS11 (Alkylation)	0.99
RatSBS_B	DHPN	SBS11 (Alkylation) SBS32 (Azathioprine)	0.84 0.80
RatSBS_C	DHPN	SBS11 (Alkylation) SBS32 (Azathioprine)	0.80 0.86
RatSBS_D	SWCNT	SBS3 (Defective homologous recombination-based DNA damage repair) SBS5 (Clock like)	0.80 0.78
RatSBS_E	MWCNT-7	SBS1 (Spontaneous deamination of 5-meC) SBS87 (Thiopurine chemotherapy)	0.85 0.84
RatSBS_F	NNK	SBS85 (Indirect effects of activated-AID)	0.68
RatSBS_G	MWCNT-N/B	SBS9 (Pol eta somatic hypermutation activity) SBS40b (Unknown)	0.77 0.70

また、SBS_A (DHPN 由来) の C to T 変異、SBS_F (NNK 由来) の T to A および T to G 変異に強いストランドバイアス (転写鎖と非転写鎖で MF が異なる現象) が観察された (図19)。ストランドバイアスが観察された場合には DNA 付加体が起因となり当該変異シグネチャーを形成することなどが知られており、この情報はこれから化学発がん物質による発がんメカニズムをサポートする結果であると考えられる。さらに、SBS_F は既報の NNK による変異シグネチャーパターンとも非常に良く似ていることもわかった。

一方、MWCNT/ SWCNT 由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNA への直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された (図20)。

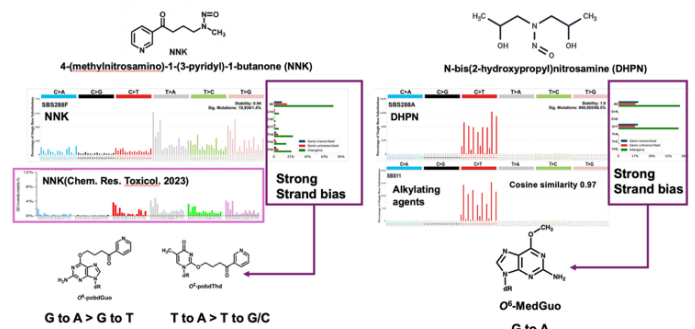


図19 化学発がん物質によるラット肺がんの変異シグネチャー

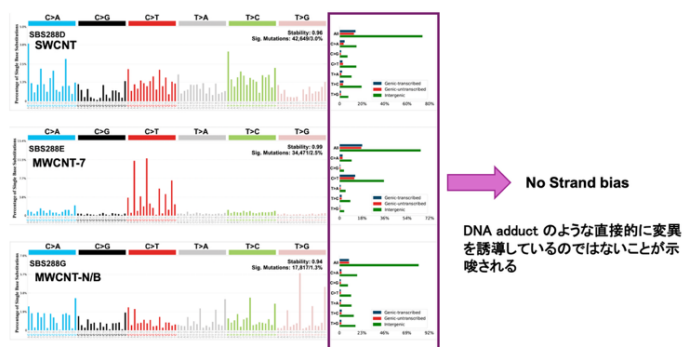
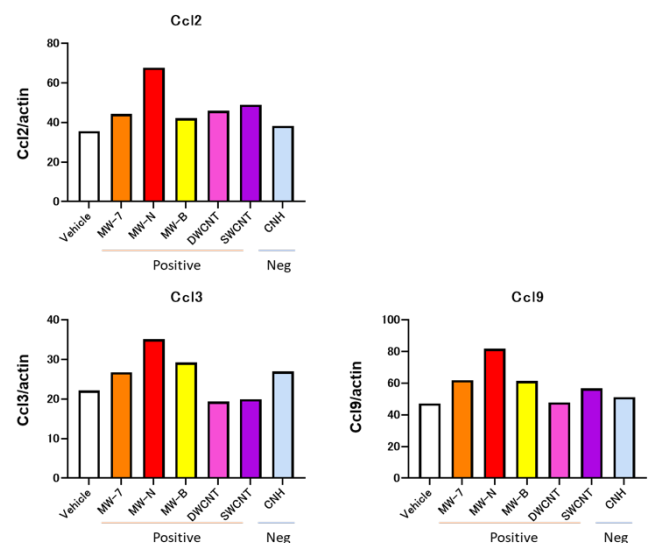


図20 CNTによるラット肺がん/中皮腫の変異シグネチャー

(4) *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、*in vivo* 試験においてCNTs投与により発現高値を認めた*Ccl*種の mRNA 発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。10 μg/ml の濃度では、肺発がん感受性の高いMWCNT-Nでは発現上昇傾向が見られたが、肺発がん性陽性 (Positive) と陰性 (Neg) で有意な変化は見られなかつ



た (図21)。そこでMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTにおいて、さらに高濃度で投与した結果、濃度依存性に有意

な*Ccl2*発現の上昇を認めた(図22)。
図21. CNT投与によるマウスMφ細胞(RAW264.7)の*Ccl1*種発現の変化(定量RT-PCR)、***P* < 0.01、****P* < 0.001 vs Vehicle.

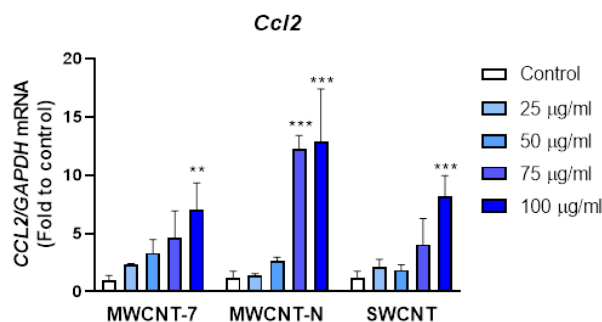


図22. CNT投与によるマウスMφ細胞(RAW264.7)の*Ccl2*発現の変化(定量RT-PCR)、***P* < 0.01、****P* < 0.001 vs Control.

D. 考察

TIPS法は、大規模吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺・胸膜中皮における毒性および発がん性評価を可能にする。複数のMWCNTで2年発がん性が示されてきた背景を踏まえると、投与・解析手順の標準化により、得られた有害性指標を迅速な健康影響評価へ展開できる可能性が高い。安定した投与手法、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。

本年度は、発がん性陽性対照(MWCNT-7、MWCNT-N)と発がん性が未知であったSWCNTを同条件でTIPS投与し、2年発がん性(104週)と整合する短期(4週、13週)指標の同定、および陰性CNT・化学発癌物質(DHPN/NNK)との機序比較を進めた。その結果、SWCNTは肺発がん性は陽性である一方、中皮発がん性は明確に支持されないという発がんプロファイルが得られ、物性差に基づく標的臓器差/機序差の存在が示唆された(論文投稿中)。短期指標として、肺胞上皮の増殖活性(Ki67)およびDNA損傷(γH2AX)が、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTいずれでも4週から上昇し、13週まで持続した。したがって、増殖活性(Ki67)およびDNA損傷(γH2AX)は、腫瘍発生前の短期試験における有害性スクリーニング指標として有用である可能性が高い。一方で酸化・炎症関連DNA損傷には物質差がみられた。酸化的DNA損傷(8-OHdG)はMWCNT群で上昇し、SWCNT群では有意な変動を示さなかったのに対し、炎症関連DNA損傷(8-NG)はSWCNT群で4週から持続的に増加し、MWCNT群では13週で顕在化するなど、時間軸・傷害様式の違いが示された。これらは、CNTの発がん機序が一様ではなく、MWCNT系では酸化ストレス(ROS)、SWCNT系では強い炎症(RNS)を介した傷害寄りの要素が強い可能性を示す。炎症性遺伝子応答として、*Ccl2*/*Ccl3*は4週・13週ともに広く上昇し、さらに*Il-1b*、*Tnfa*は高い肺発がん感受性を示す群(MWCNT-N、SWCNT)で持続的に上昇した。したがって、*Ccl2*、*Ccl3*はCNT曝露の早期反応を捉える共通指標とな

り得る一方、*Il-1b*、*Tnfa*等は発がん性強度を評価するAOPのKey Event (KE)候補という枠組みがより明確化した。

RNA-seqに基づくGO/KEGG解析では、複数の肺発がん性陽性CNTで、サイトカイン/ケモカインシグナル、免疫細胞(骨髄系・好中球/単球)の動員・活性化、補体系、食食・リソソーム系、NOD様受容体など、炎症・自然免疫/異物応答を中核とする経路が一貫して富化していた。これは、陽性CNTで観察された反応が単なる急性炎症ではなく、免疫細胞集積を伴う炎症の持続化と異物応答を反映している可能性を示している。これらの経路レベルの所見はqRT-PCRでも支持され、陽性CNTでは*Spp1*および*Ccl2*の誘導が顕著であった。*Spp1*および*Ccl2*はマクロファージを中心とした炎症性微小環境形成と免疫細胞リクルートに関与することから、短期段階で観察される炎症・DNA損傷・増殖応答を、腫瘍促進に繋がり得る微小環境変化として統合的に説明し得る。さらに、RNA-seq上位遺伝子として抽出される*Mmp12*は、慢性炎症下でのマクロファージ活性化と細胞外基質分解に関わり、CNT曝露による反応が炎症の惹起に留まらず、組織傷害・修復の反復およびリモデリングへ波及していることを示唆する。すなわち、発がん性陽性CNTでは免疫細胞動員・炎症と組織変化が重なった微小環境変化が、腫瘍促進に関与する可能性が推察された。またDHPNとの比較では、DHPNが変異原性を基盤とするモデルであるのに対し、CNTでは*Spp1*/*Ccl2*/*Mmp12*に代表される炎症・免疫細胞動員および組織リモデリング応答が顕著であり、発癌ドライバーの相違が示唆された。したがってCNT発癌は、DNA直接損傷に起点を置く機序のみでは説明しきれず、炎症の持続化と組織傷害・修復反復を介した非遺伝毒性寄りの腫瘍促進が主要な寄与要素である可能性がある。最終目標であるナノマテリアルのリスクアセスメントにおいては、腫瘍発生に加え、*Spp1*/*Ccl2*/*Mmp12*で捉えられる免疫細胞動員・炎症持続化・組織リモデリングをKE候補として位置づけることで、短期試験によるスクリーニングや用量反応評価へ展開できる可能性がある。

ラットにDHPN、NNK、SWCNT、MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体の全ゲノムシーケンスを行い、体細胞変異の検出を行った。さらに、SigProfilerExtractorで一塩基置換(SBS)解析を実施した結果、7種類の変異シグネチャー(Rat_SBS_A~G)を同定した。強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察されたが、それ以外のサンプルで検出された変異は非常に少なかった。SNV数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では少ない傾向が認められた。変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~CはDHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測した。

NNKやDHPN誘発の肺がんでは強いストランドバイアスが観察され、それぞれのDNA付加体の変異誘発と発がんに関わることが示唆されたが、MWCNT/SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された。さらに、シグネチャーのパターンがSWCNTとMWCNT-7で大きく異なることから、ナノマテリアル曝露における発がん機序がCNT間でも一部異なる可能性が示された。現在、これらゲノム解析データを用いて、2塩基置換(DBS)変異や挿入・欠失(ID)の解析を進めており、加えて同様の構造体であるアスベストによるヒト腫瘍で報告されているような構造異常(CV)の関与も視野に、MWCNTおよびSWCNTで同様の現象が観察され

るか検討を継続する。得られるデータは発がん機序解明およびリスク評価に資する重要な情報となる。

本年度の成果は、2025年12月10日に名古屋市立大学において、班会議を実施し共有、議論した。TIPS法により長期発がん性と短期のKE候補（増殖、DNA損傷、炎症性遺伝子応答）を対応づけし、さらに陰性物質・化学発癌物質との比較により、CNT発がんの機序像として、炎症・自然免疫／組織改変の寄与、直接遺伝毒性との差を具体化した点に意義がある。また、吸入暴露試験を代替する際に、気管内投与濃度は暴露環境濃度を反映することが重要で、本研究班のTIPS法で使用されたMWCNTの投与量は、吸入暴露試験の肺沈着量と同程度であることから、本法の結果からは一定の期待が持てる点と、再現性や実現可能性を高めていくことを確認した。

また、2025年7月9日、11月28日に国立医薬品食品衛生研究所で開催された足利班班会議に参加し（内木）、足利班および本研究班の研究成果の共有を行った。その結果、本研究班（*in vivo*）で同定したマクロファージ／ケモカイン系マーカーが、足利班の*in vitro*系試験においても再現されることが共有され、両班連携の意義が確認された。本研究班の*in vivo*参照軸に照らした相互確認により、候補マーカーの妥当性確認と標準化・効率化に向けた論点が整理された。さらに、TIPS法の標準化という観点からは、同じくTIPS法を用いた吸入毒性評価系の整備を進める高須班およびその前身研究班との情報共有を継続し、被験物質送達の妥当性、投与手順、評価指標の整合性について検討を進める必要がある。

なお、本研究で得られた長期発がん性に裏付けられた短期KE候補は、*in vitro*評価系の妥当性確認に用いる*in vivo*参照軸として重要である。今後、*in vitro*評価へ接続するためには、*in vivo*で抽出されたKE候補が培養系で再現されるかを確認するとともに、被験物質の分散条件、暴露濃度、暴露時間、細胞種・共培養条件など、評価系としての条件設定を整理する必要がある。これらの検討により、TIPS法で得られた*in vivo*知見を、3Rに資する短期・簡便な評価体系へ橋渡しでき、将来的にOECD TG/IATAへの接続を検討する上でも基盤情報となると考えられる。

E. 結論

TIPS法を用いて、CNTの長期発がん性（104週）と腫瘍発生前段階（4週・13週）で観察可能な指標を応用する評価枠組みを、本年度の検討により体系化した。発がん性陽性対照（MWCNT-7、MWCNT-N）と同条件でSWCNTを評価した結果、SWCNTは肺発がん性が陽性である一方、胸膜中皮腫誘発性は明確に支持されず、CNT種（物性）により標的臓器・機序が異なり得ることが示唆された。短期指標としてKi67およびγH2AXは複数CNTで上昇・持続し、8-OHdG（MWCNTで上昇）と8-NG（SWCNTで早期から持続増加）の差から、ROS/RNSを介する傷害様式の違いが明確となった。RNA-seqでは発がん性陽性CNTで炎症・自然免疫／異物応答経路が一貫して富化し、Spp1/Ccl12/Mmp12等が候補マーカーとして抽出・検証された。全ゲノム解析ではDHPN/NNKでストランドバイアスが観察されたのに対しCNT由来では明確でなく、CNT発がんはDNA直接作用のみでは説明しにくい可能性が示唆された。以上より、本年度は長期アウトカムに裏付けられた短期KE（増殖・DNA損傷・炎症／組織改変）と候補マーカーを整理し、3Rを意識した*in vitro*評価手法の妥当性確認に必要な*in vivo*参照軸を提示した。足利班との意見交換により*in vitro-in vivo*で共通指標が確認され、ナノマテリアルのリスクアセスメントおよびOECD TG化に資する基盤情報として位置づけられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Shimizu N, Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Sugiyama Y, Nagai T, Etani T, Morikawa T, Gonda M, Aoki M, Ishikawa D, Umemoto Y, Takahashi S, Yasui T. Establishment of a Patient - Derived Xenograft Model of a Testicular Yolk Sac Tumor. *Pathol Int.* in press.
- Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, **Kakehashi A**, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, **Naiki-Ito A**, **Tsuda H**, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials (Basel)*. 15(23):1806, 2025.
- Kawamura H, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kuang X, Murakami A, Komura M, Suzuki T, Kato H, Nagayasu Y, Matsuura K, Fujiwara K, Kataoka H, Takahashi S. Sacubitril/Valsartan Attenuates Inflammation and Fibrosis Associated With Decreased Integrin $\alpha 8$ and Inhibits Hepatocarcinogenesis in a Rat Model of Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2025, in press.
- Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, **Naiki-Ito A**, Abdallah S, **Tsuda H**. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol.* 2025, in press.
- Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, **Tsuda H**, **Naiki-Ito A (Corresponding)**. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials (Basel)*. 15(18):1402, 2025.
- Odagiri K, Mimura Y, Naiki T, Tasaki Y, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Etani T, Nagai T, Morikawa T, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Yasui T, Furukawa-Hibi Y. Efficacy and safety of anamorelin in patients with metastatic urothelial carcinoma receiving systemic chemotherapy: a randomized controlled study. *Oncologist*. 30(7):oyaf167, 2025.
- Kuang X, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kawamura H, Murakami A, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Takahashi S. Hepatic stellate cell inhibition by angiotensin II receptor blocker mitigates liver injury and fibrosis via NF- κ B-galectin-3 suppression in a rat nonalcoholic steatohepatitis model. *Arch Toxicol*. 99(8):3393-3412, 2025.
- Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Murakami A, Kato H, Sugiyama Y, Kawai T, Kato S, Etani T, Nagai T, Shimizu N, Morikawa T, Aoki M, Gonda M, Kuang X, Nagayasu Y, Hamamoto S, Yasui T, Takahashi S. Preliminary Evidence on Safety and Clinical Efficacy of Luteolin for Patients With Prostate Cancer Under Active Surveillance. *Prostate Cancer*. 2025:8165686, 2025.

9. Ahmed OHM, **Naiki-Ito A.**, Takahashi S, Alexander WT, Alexander DB, **Tsuda H.** A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung. *Nanomaterials* (Basel). 15(3):168, 2025.
 10. Yanase T, Naiki T, **Naiki-Ito A.**, Okawa R, Niwa S, Shimizu N, Hamamoto S, Fujii Y, Takahashi H, Yasui T. Efficacy of prostatectomy using a Retzius-sparing approach as an additional excision in anal canal carcinoma after brachytherapy for prostate adenocarcinoma. *IJU Case Rep.* 8(2):174-178, 2025.
 11. **Naiki-Ito A.**, Naiki T, Takahashi S. Exploring experimental models of prostate cancer in chemoprevention: Oxidative stress as a key pathway to translational research. *Pathol Int.* 75(3):131-144, 2025.
 12. Matsumoto D, Naiki T, **Naiki-Ito A.**, Aoki M, Kato S, Morikawa T, Shimizu N, Gonda M, Umemoto Y, Yasui T. Efficacy of pembrolizumab plus lenvatinib as first-line treatment for metastatic renal cell carcinoma with multiple brain metastases. *IJU Case Rep.* 8(1):5-9, 2025.
 13. Isobe T, Naiki T, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A.**, Nagai T, Etani T, Iida K, Noda Y, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Morikawa T, Banno R, Kubota H, Ando R, Kawai N, Yasui T. Experience and prognostic analysis with avelumab switch maintenance treatment in metastatic urothelial carcinoma. *Oncology.* 17:1-11, 2025.
 14. Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., **Totsuka Y.**, Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells, *Genes & Environ.*, 2025 in press.
 15. Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., **Totsuka Y.**, Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde, *Biomolecules.* 2025 15 (6): 878.
 16. **Kakehashi A.**, Suzuki S., Nishidoi Y., Hagihara A., Ikenaga H., Shiota M., Qiu G., Noura I., Kuwae Y., Vachiraarunwong A., Fujioka M., Gi M., Kawada N., and Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers.* 17(13):2212, 2025.
 17. Suzuki S., Gi M., Yanagiba Y., Yoneda N., Uehara S., Yokota Y., Noura I., Fujioka M., Vachiraarunwong A., **Kakehashi A.**, Koda S., Suemizu H., and Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol.* 38:59-67, 2025.
 18. Noura I., Suzuki S., Gi M., Fujioka M., Matsue T., **Kakehashi A.**, and Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol.* 38(2): 147-154, 2025.
 19. Fujioka M., Suzuki S., Gi M., Noura, I., Vachiraarunwong, A., **Kakehashi A.**, and Wanibuchi, H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol.* 38(2):161-165, 2025.
 20. Guo R., Gi M., Kiyono T., Vachiraarunwong A., Suzuki S., Fujioka M., Qiu G., Praseatsook, K., Kawamura, Y., **Kakehashi A.**, Noura I., Xie X., and Wanibuchi, H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics.* 13(10):828, 2025.
2. 学会発表
 1. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 前立腺癌に対するルテオリンの有効性に関する臨床的評価と miR-29 の役割、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 2. 加藤寛之、**内木綾**、小村理行、稲熊真悟、高橋智. マウス膀胱モデルのプロテオーム解析による膀胱・膀胱癌における Actinin-4 発現、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 3. 小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高橋智. CD81 発現間質細胞は浸潤性乳癌において腫瘍抑制的な微小環境を誘導する、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 4. 加藤寛之、**内木綾**、村上明寛、山内妙子、高橋智. 膀胱癌の起点となる慢性膀胱炎の初期変化の解明、第 38 回発癌病理研究会 (2025 年 8 月、九十九里、千葉)
 5. **内木綾**、河村逸外、Kuang Xiaochen、小村理行、加藤寛之、高橋智. モデル動物で探る MASH を基盤とした肝発がんの病態と予防の可能性、シンポジウム「動物モデルから得られた貴重な知見」、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 6. 内木拓、三村佳久、**内木綾**、恵谷俊紀、永井隆、森川敏治、清水伸彦、青木マリア、権田将一、安井孝周. 全身化学療法を受ける尿路上皮癌患者へのアナモレリンの有効性と安全性の検証、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 7. 森川敏治、**内木綾**、長安祐子、石川大樹、青木マリア、権田将一、清水伸彦、永井隆、恵谷俊紀、内木拓、河合憲康、安井孝周、高橋智. ラットにおける前立腺発癌に対する高脂肪食の促進効果の解析、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 8. 村上明寛、**内木綾**、加藤寛之、高橋智. ルテオリンによる microRNA 誘導と前立腺癌抑制機構の解明、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 9. **内木綾**、加藤寛之、**梯アンナ**、**津田洋幸**、高橋智. 単層カーボンナノチューブの肺発がん性と多層カーボンナノチューブとの比較評価、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 10. 村上明寛、**内木綾**、内木拓、加藤寛之、高橋智. 前立腺癌に対するルテオリン誘導 miRNA の影響、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 11. 小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高橋智. 乳癌細胞に発現する CD63 は腫瘍抑制性マクロファージを誘導することで転移を抑制す

- る、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
12. 王程博、小村理行、加藤寛之、長野愛矢、内木綾、稲熊真悟、高橋智。大腸がん腫瘍細胞およびがん関連線維芽細胞における CD99 発現とその意義、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 13. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智。膝炎・膝癌における Actinin-4 とリン酸化 Actinin-4(S160)発現と機能解析、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 14. 内木綾。病理研究者からみた癌取り扱い規約の意義と発展性、シンポジウム「必要なのか、取り扱い規約!」、第 71 回日本病理学会秋期特別総会 (2025 年 11 月、名古屋)
 15. 戸塚ゆかり、正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
 16. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆかり、末水洋志、In vitro薬剤誘発性リン脂質症評価におけるHepaSH細胞の有用性、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
 17. 宮崎飛翔、石ケ守里加子、長谷川晋也、藤岡正喜、加藤孝一、美谷島克宏、戸塚ゆかり、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規in vitro毒性試験法の開発、第38回発癌病理研究会 (2025年8月、九十九里、千葉)
 18. Yukari Totsuka, Momoko Nagai, Asmaa Elzawahari, Rikako Ishigamori, Shinya Hasegawa, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025 (2025年9月、ニューヨーク、米国)
 19. 戸塚ゆかり 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析、第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋)
 20. 小池遥己、小高和大、渋谷優空、関根 航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚ゆかり、有機フッ素化合物 (PFAS) の遺伝毒性評価 第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋)
 21. Yukari Totsuka, Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling, 第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
 22. 石ケ守里加子、大野彰子、戸塚ゆかり、マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの遺伝毒性評価、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
 23. 長谷川晋也、渡部光一、川口駿、垣内伸之、小川誠司、吉田健一、戸塚ゆかり、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
 24. Yukari Totsuka, Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from DNA Adduct and Mutation Profiling, 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (2025年10月、ソウル、韓国)
 25. 戸塚ゆかり、環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索とメカニズムの解明、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025年10月、大阪)
 26. 戸塚ゆかり、次世代シーケンサー (NGS) とアダクトーム解析を用いた遺伝毒性物質の探索と発がんメカニズムに関する研究、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 学会賞受賞講演 (2025年11月、静岡)
 27. 石ケ守里加子、大野彰子、戸塚ゆかり、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの包括的毒性評価、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
 28. 宮崎飛翔、石ケ守里加子、長谷川晋也、藤岡 正喜、加藤孝一、美谷島克宏、戸塚ゆかり、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
 29. 長谷川晋也、石ケ守里加子、大野麻理奈、吉田健一、垣内伸之、渡部光一、川口駿、小川誠司、戸塚ゆかり、ヒト胎児腎臓細胞株である 293FT 細胞を用いたError-corrected NGSによる化学物質の変異シグネチャー解析、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
 30. 戸塚ゆかり、オルガノイド技術を用いた環境化学物質の影響評価、日本学術会議主催学術フォーラム (2025年12月、東京)
 31. Vachiraarunwong, A., Fujioka, M., Suzuki, S., Guo, R., Qiu, G., Kawamura, Y., Noura, I., Kakehashi, A., Gi, M., Wanibuchi, H. Comparative evaluation of inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. 第 30 回ヒ素シンポジウム, 演題 7、大阪公立大学大学院医学研究科 (2025 年 12 月、大阪).
 32. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アテナ、鰐淵英機。動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について。日本産業衛生学会第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2025 年 10 月、大阪)
 33. Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Guo, R., Qiu, G., Noura, I., Kawamura, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Comparative hepatotoxicity of carboxylate and sulfonate per- and polyfluoroalkyl substances in immortalized human hepatocytes. 日本産業衛生学会第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025 年 10 月、大阪)
 34. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アテナ、ワシラルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、鰐淵英機。有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるラット海馬に及ぼす影響。メタルバイオサイエンス研究会 2025 (2025 年 10 月、東京)
 35. Kakehashi, A., Nishidoi, Y., Noura, I., Qiu, G., Vachiraarunwong, A., Fujioka, M., Gi, M., Wanibuchi, H., Suzuki, S. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Diagnosis and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. 第 84

回日本癌学会学術総会, P-3245 (2025 年 9 月、金沢)

36. Noura, I., Suzuki, S., Inoue, T., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Role of brain abundant membrane attached signal protein 1 (BASP1) in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung, 第 84 回日本癌学会学術総会, P-3316 (2025 年 9 月、金沢)
37. Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Guo, R., Qiu, G., Noura, I., Kawamura Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cell. 第 84 回日本癌学会学術総会, P-2005 (2025 年 9 月、金沢)
38. Guo, R., Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Qiu, G., Kawamura, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Early Gene Expression Alterations in DMH-Induced Rat Colon Carcinogenesis. 第 84 回日本癌学会学術総会, P-1009 (2025 年 9 月、金沢)
39. Fujioka, M., Suzuki, S., Gi, M., Vachiraarunwong, A., Guo, R., Kawamura, Y., Oishi, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Study of carcinogenesis by transplacental exposure to dimethylarsinic acid in F1 mice. 第 84 回日本癌学会学術総会, P-1037 (2025 年 9 月、金沢)
40. Vachiraarunwong, A., Praseatsook, K., Wongpoomchai, R., Suzuki, S., Kakehashi, A., Fujioka, M., Wanibuchi, H., Yodkeree, S., Gi, M. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae. P-30, 第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機、鈴木周五、ヒト浸潤性膵管癌における新規早

期診断マーカーとしての PRDX3 の検討及び発がん機序解明. P-7, 第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)

41. 梯アンナ、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機、鈴木周五. MAFLD/MASH 肝発がんマーカーや分子機序への最近の洞察. 第 38 回発癌病理研究会, 演題 2, (2025 年 8 月、千葉)
42. Vachiraarunwong Arpamas、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂ギョク、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、Praseatsook Kwanchanok、鰐淵英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 in vitro 毒性試験系の開発. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月沖縄)
43. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん, Occupational bladder cancer associated with aromatic amines exposure. SY6-3、第 114 回日本病理学会総会、(2025 年 4 月仙台)
44. Ahmed HM Omnia, Naiki-Ito A., Alexander DB., Takahashi S., Tsuda H. Comparative analysis of early pulmonary gene expression changes induced by carbon nanotubes and chemical carcinogens in rat lungs (第 42 回日本毒性病理学会学術集会 令和 8 年 1 月 21-22 日 名古屋)

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

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 7 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)は難分解性で体内に蓄積し得ることから、肺胞上皮および胸膜中皮に毒性・発がん性を誘発する可能性がある。一方、OECD が求める吸入暴露試験は施設・費用面の制約が大きく、動物使用の削減(3R)を意識した、より実用的かつ効率的な評価体系の確立が課題である。そこで本研究は、大規模吸入施設を必要としない経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を基盤に、長期発がん性(104週)と整合する短期(4週・13週)有害性指標およびAdverse Outcome Pathway(AOP)の同定と、陰性CNTおよび化学発癌物質(DHPN/NNK)との比較による発がん機序を整理することで、将来的に*in vitro*評価へ移行可能な*in vivo*参照軸を提供し、OECD TG化に資する基盤データを構築することを目的とする。

本年度は、発がん性陽性対照(MWCNT-7、MWCNT-N)と発がん性が未知であったSWCNTを同条件でTIPS投与し、104週発がん性と短期(4週・13週)指標の対応を検討した。あわせて、Ki67、 γ H2AX等の病理・分子指標と炎症性遺伝子を用いて、腫瘍発生前段階のKey Event(KE)候補を評価し、発がん性陰性CNT、化学発癌物質との比較により発がん性と連結するKEの絞り込みを行った。さらに、投与後4週肺サンプルのRNA-seqに基づくGO/KEGG解析とqRT-PCRにより陽性CNTに特異的な経路および候補マーカーを抽出・検証した。

その結果、SWCNTは肺発がん性が陽性である一方、胸膜中皮腫誘発性は明確に支持されないという発がんプロファイルを示し、CNT種(物性)により標的臓器・機序が異なる可能性が示唆された。短期指標として、Ki67および γ H2AXは複数CNTで4週から上昇し13週まで持続し、腫瘍発生前のスクリーニング指標として有用であった。炎症性遺伝子ではCcl2/Ccl3が共通して上昇し、Il-1b/Tnfaは高発がん感受性群で持続上昇した。RNA-seqでは陽性CNTで炎症・自然免疫/異物応答経路が一貫して富化し、Spp1/Ccl2/Mmp12が候補マーカーとして抽出・検証された。

以上より、本分担研究では、TIPS法によりCNTの長期発がん性と腫瘍発生前段階で検出可能な短期KE候補を対応づけた。SWCNTは肺発がん性を示す一方、本試験条件下では胸膜中皮腫誘発性は明確には支持されず、MWCNTとは異なる発がんプロファイルを示した。また、Ki67、 γ H2AX、Ccl2/Ccl3、Il-1b/Tnfa等は、CNTの発がん性や発がん感受性を反映する短期有害性指標として有用であると考えられた。さらに、発がん性陽性CNTと陰性CNTの比較解析により、Spp1、Ccl2、Mmp12等を候補マーカーとして抽出・検証した。これらの成果は、CNTの短期有害性評価および*in vitro*評価系で測定すべき反応の選定に資する*in vivo*参照軸となりうる。

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種の多層(MW)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。本研究グループではこれまでに、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R2-6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MWCNTsによる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(4週)に検出し、CNT毒性のAdverse Outcome Pathway(AOP)として期待された。さらにR6年度は、単層(SW)CNTのTIPS投与後2年間の解析により、MWCNT-7およびMWCNT-Nが肺・胸膜発がんを発生させる条件において、SWCNTが肺発がん性を有し、胸膜発がん性は有さないことを初めて明らかにするとともに、投与後4週において、MWCNTと同様のAOPが観察されることを確認した。

本年度は、MWCNTs(MWCNT-7、MWCNT-N)とSWCNTの

TIPS投与後、発がん期（104週）における肺発がん性と一致する、亜急性期（4週）、亜慢性期（13週）に観察可能な有害性指標を選定するため、4、13週における各指標の経時的変化を病理学的解析、遺伝子解析により明らかにするとともに発がん性陰性物質における変動も確認する。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やOECD TG/IATAに提案できる評価法を開発する。

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、肺内噴霧ゾンド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-1640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、Mφ局在（抗CD68抗体、BIO-RAD）、増殖活性（抗Ki67抗体、Abcam）、DNA損傷（ γ H2AX抗体、CST）の程度について免疫組織学的に解析する（内木）。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による*Ccl*種、*Ii*種や*Tnf- α* 等の炎症性ケモカイン、サイトカイン発現の定量に用いる。

(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、肺発がん性陽性CNT（MWCNT-7、MWCNT-N、MWCNT-B、DWCNT、SWCNT）、最近長期試験において肺発がん性陰性を実証したCNT（CNH、CNB）（論文投稿中）を被験CNTとしてTIPS投与し、4週後に肺組織を採取し、免疫染色、NGSを用いたRNA-seq解析、定量的RT-PCR解析に用いる。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。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-(methylnitrosamino)-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、CNTによる肺発がん機序との比較対照として用いる。

(3) *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48時間培養する。マウスMφ細胞から産生される炎症性サイトカイン（定量的RT-PCR）を定量する。

（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)-1. CNTのTIPS投与による肺胞沈着と免疫細胞の反応

まず、R6年度までに明らかとなり、本研究の基盤となる2年間発がん性試験の結果を概説する。胸膜中皮発がん：臓側および壁側胸膜における悪性中皮腫の発生率は、MWCNT-7およびMWCNT-Nの高用量群（0.5 mg/rat）において有意に増加した。一方、SWCNT投与群においても低用量・高用量群で各1例の発生が見られたが、統計学的な有意差は認められず、本試験においてSWCNTによる中皮腫誘発性は結論づけられなかった。肺発がん：肺腺癌の発生率は、MWCNT-NおよびSWCNTの高用量群において有意に増加した。また、肺腫瘍全体（腺腫と腺癌の合計）の発生率においても、これら2群で有意な上昇が確認された。なお、既知の肺発がん物質であるMWCNT-7において有意な肺癌発生頻度の上昇が見られなかった要因は、中皮腫による早期死亡例が多発し、肺がん発生に必要な観察期間が十分に確保できなかったためと結論づけられた。

以上の発がんプロファイルの違いを踏まえ、CNT投与後の肺における沈着状況と免疫細胞の反応を検討した。4、13、52、104週的全観察期間を通じ、CD68免疫染色によりCNT投与群における肺胞Mφの集積が確認された。特にSWCNT投与群では、高度な好中球浸潤の併発が認められた（図1）。光顕およびSEM観察において、MWCNTs群では肺胞Mφによる食食像に加え、線維が細胞膜から突き刺さる「突出像」が確認された。対照的にSWCNT群では、Mφによる食食は確認されたものの、線維は細胞内に完全に内包されており、表面への露出は明らかではなかった。また同群では、Mφの崩壊に伴いSWCNTが肺胞内へ再放出される像も観察された（図2）。

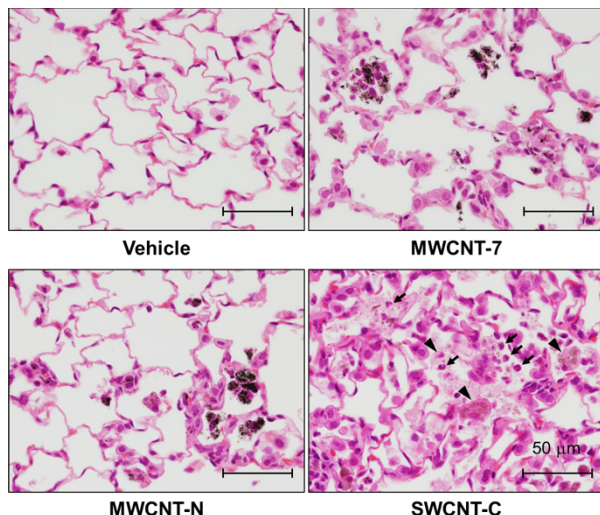


図1. 肺胞MφによるCNTの貪食とSWCNTによる好中球遊走 (HE像)。

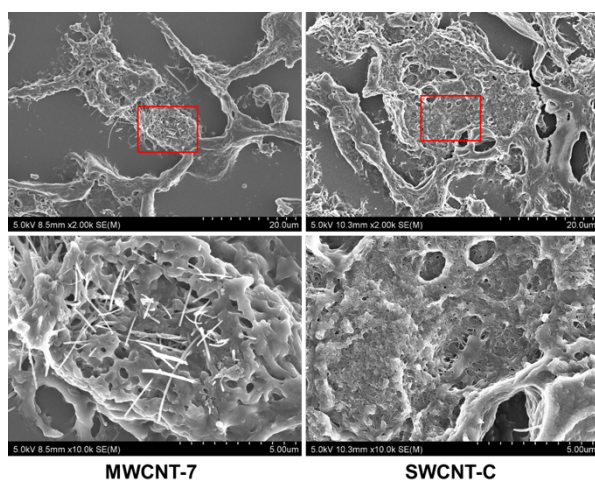


図2. 肺胞MφによるCNTの貪食 (SEM像)。

(1)-2. CNTによる肺有害性指標の動態解析 (Ki67、 γ H2AX)

増殖活性およびDNA損傷指標について4週と13週の定量的比較を行ったところ、多くの指標で4週からの変化が持続していた。Ki67および γ H2AX陽性率は、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTのいずれの群においても、4週時点ですでに有意な上昇を示し、その傾向は13週まで持続した (図3、4)。

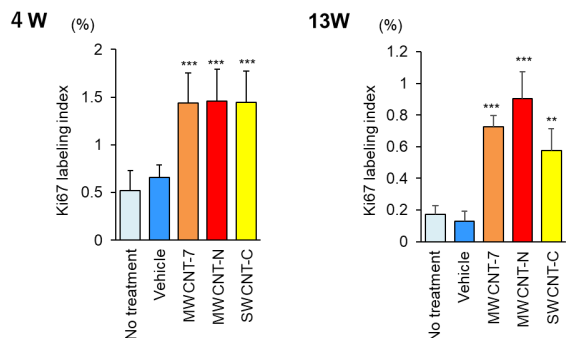


図3. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

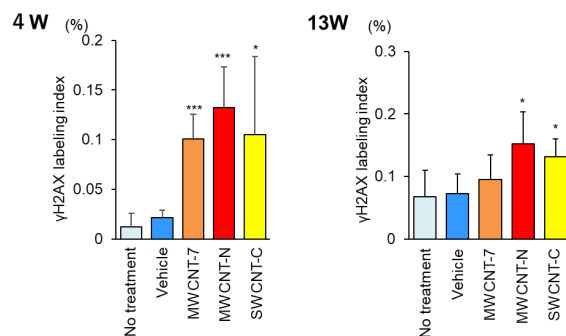


図4. CNT投与による肺胞上皮DNA損傷の変化 (γ H2AX免疫染色)、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ vs Vehicle.

(1)-3. CNTによるケモカイン、サイトカインmRNA発現の動態解析 (定量的RT-PCR)

4および13週における肺のケモカイン、サイトカインおよび炎症関連遺伝子のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した (図5, 6)。ケモカインCc12およびCc13の発現は、4週・13週の両時点において、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTの全投与群で一貫して有意に上昇した。Cc19はMWCNTs群では両時点で、SWCNT群では13週時点で有意な上昇を示した。炎症性サイトカインについては、Il6が全投与群の4週時点で有意に上昇した。Il-1b、Tnfaは高発がん感受性であるMWCNT-NおよびSWCNT群において、4週・13週を通じて有意な上昇を認めた。すなわち、曝露早期からのCc12/Cc13の共通した上昇はCNTの発がん性の有無を鋭敏に捉えるスクリーニング指標として有用であり、さらにIl-1bやTnfa等の発現プロファイルは、MWCNT-NやSWCNTが示すより高い発がん性強度を反映する指標となり得ることが示唆された。

(2)-1. 発がん性陰性CNT、既存化学発癌物質との網羅的遺伝子発現変化の比較 (RNA-seq)

本研究グループの長期発がん性試験により肺腫瘍誘発性が確認されたCNTを肺発がん性陽性CNT (MWCNT-7、MWCNT-N、MWCNT-B、DWCNT、SWCNT) として用いた。また、長期試験で肺発がん性が認められていないCNT (CNH、CNB) を肺発がん性陰性CNTとして比較対象に用いた。TIPS投与後4週または化学発癌物質投与後4週の肺凍結サンプルを用いたRNA-seq解析により、発がん性陽性CNTにより変動する遺伝子群を解析した。まず発がん性陰性CNTと比較して発がん性陽性CNT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。GO解析では、発がん性陽性CNT群で優位に変動する遺伝子セットは、免疫・炎症応答、とくに白血球の遊走・走化性に関連する機能カテゴリに強く集約された (図7, 8)。KEGG解析では、発がん性陽性CNTで補体系/凝固系およびサイトカイン・ケモカインを中心とした炎症性ネットワークが優位に富化していた。加えて、細胞骨格調節やリソソーム、酸化リン酸化などの経路も抽出され、炎症に伴う細胞機能変化・ストレス応答の関与が示唆された (図9)。GO解析とKEGG解析をまとめると、発がん性陽性CNTでは、免疫細胞の動員と炎症性シグナルの持続を基盤として、補体・凝固系を含む組織傷害・修復の反復や

自然免疫の活性化が進行し、これに細胞機能・代謝の変化（細胞骨格、リソソーム、ミトコンドリア代謝など）が重なることで、腫瘍微小環境の形成や発がん過程に寄与する可能性が考えられた。

次に化学発癌物質DHPNと比較して発がん性陽性CNTで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を701個、低下する遺伝子を95個得た。GO解析では、骨髄系・好中球などの免疫細胞の活性化と動員、受容体リガンドを介したサイトカイン／ケモカインシグナルに強く富化した。また、エンドソーム・リソソーム系、NADPHオキシダーゼ複合体、細胞外小胞が上位に抽出され、異物処理・ROS関連経路を含む炎症性微小環境形成が関与する可能性が示された。KEGG解析では、発がん性陽性CNTはDHPNと比べて、炎症性サイトカイン／ケモカイン、補体・凝固、食食ーリソソーム、NOD様受容体を軸とする 自然免疫・異物応答型の分子経路が強く富化しており、炎症性微小環境形成、すなわち非遺伝毒性寄りのプロモーション要素がメカニズムとして示唆された。

さらにCNT発がん性予測バイオマーカー候補を得るため、発がん性陰性CNTと比較して発がん性陽性CNTで有意に上昇する上位遺伝子群を抽出した(図10)。その結果、先に示したGO/KEGG結果と整合し、発がん性陽性CNTではマクロファージマーカー（Spp1、Mmp12）、ケモカイン群（Ccl2、Ccl17、Ccl19、Cxc16）の発現上昇が認められ、炎症性微小環境の形成が強く誘導されることが示された。

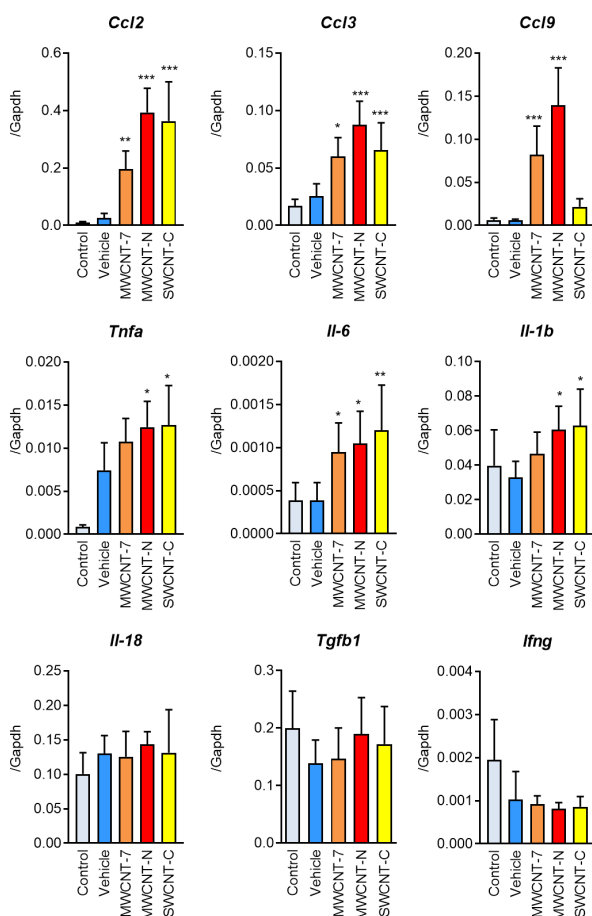


図5. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、

4週（定量RT-PCR）、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

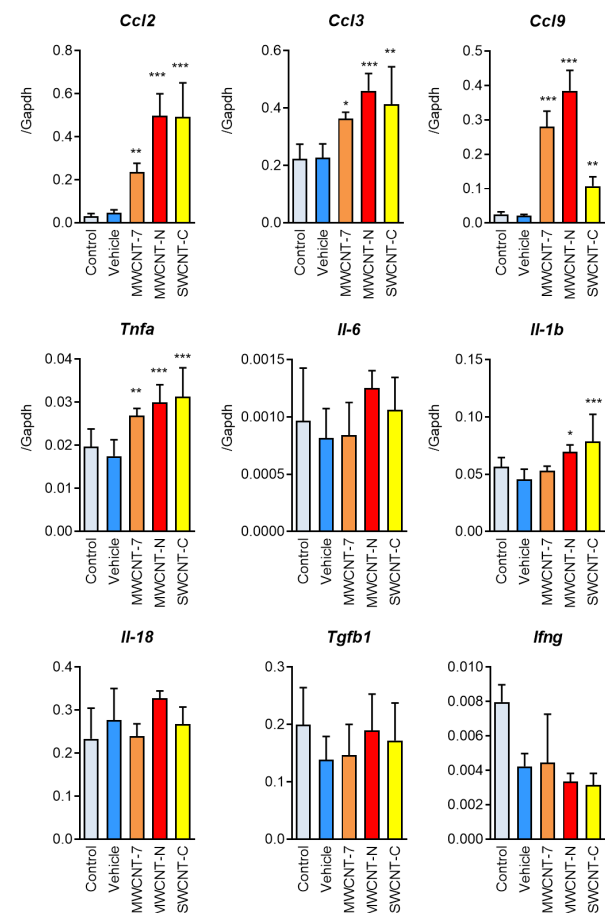


図6. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、13週（定量RT-PCR）、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

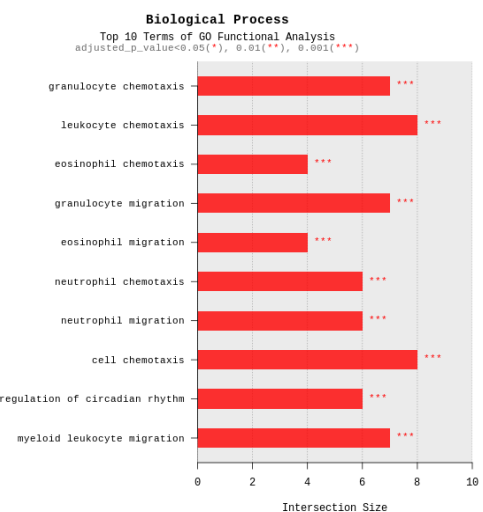


図7. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析（Biological Function）、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

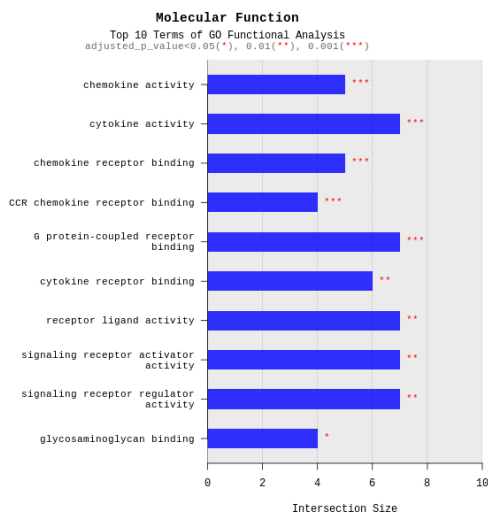


図8. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Molecular Function)、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

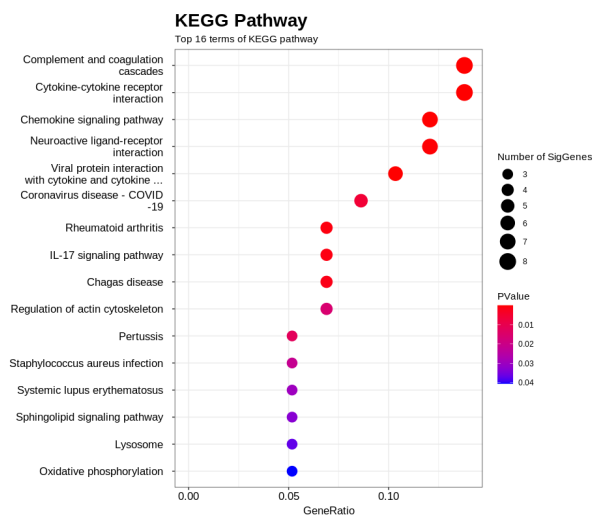


図9. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、KEGG解析、4週、***P < 0.001 発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

Transcript_ID	Gene_Symbol	Description	Positive/Negative.fc
NM_012881	Spp1	secreted phosphoprotein 1	5.705335
NM_053963	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	5.557572
NM_001108643	Tmem72	transmembrane protein 72	4.649582
NM_019224	Rgs9	regulator of G-protein signaling 9	4.033824
NM_001007612	Ccl7	C-C motif chemokine ligand 7	3.966989
NM_001012357	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	3.706637
NM_001100990	Rspo3	Respon din 3	3.591108
NM_001107642	Tubb1	tubulin like protein 1	3.435893
NM_013182	Mec5r	melanocortin 5 receptor	2.809814
NM_022214	Cxcl6	C-X-C motif chemokine ligand 6	2.773024
NM_031560	Ctsk	cathepsin K	2.748505
NM_031530	Ccl2	C-C motif chemokine ligand 2	2.742889

図10. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、TOP高発現遺伝子、発がん性陽性CNT vs 発がん性陰性CNT.

(2)-2. 発がん性陰性CNT、既存化学発癌物質との網羅的遺伝子発現変化の比較(定量的RT-PCR)

そこで、次にSpp1、Mmp12およびCcl2遺伝子発現につ

いて、定量的RT-PCRにて確認した。その結果、発がん性陽性CNTでは Spp1、Ccl2、Mmp12発現が誘導されることが確認された。これらは陰性CNTでは相対的に弱く、またDHPNでは同等の誘導が目立たない傾向を示したことから、CNT特有の炎症性微小環境形成と組織改変を反映する発がん性予測マーカー候補として有望であると考えられた(図11)。

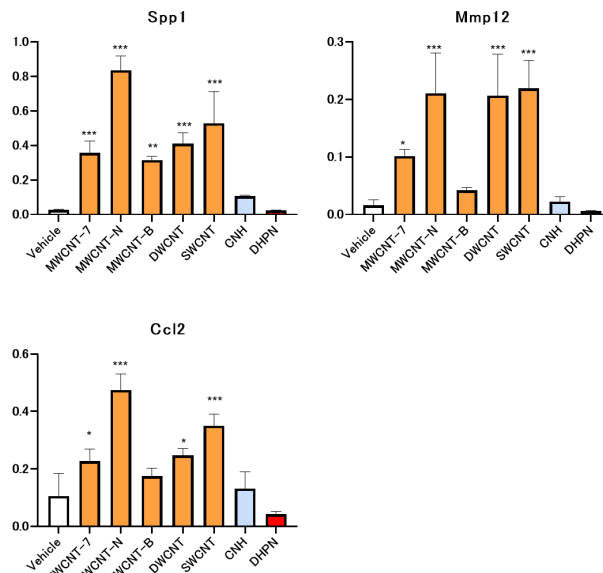


図11. 肺mRNA発現量の変化、4週 (定量RT-PCR)、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

(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、*in vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認めたCcl1種のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。10 μg/mlの濃度では、肺発がん感受性の高いMWCNT-Nでは発現上昇傾向が見られたが、肺発がん性陽性(Positive)と陰性(Neg)で有意な変化は見られなかった(図12)。そこでMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTにおいて、さらに高濃度で投与した結果、濃度依存性に有意なCcl2発現の上昇を認めた(図13)。

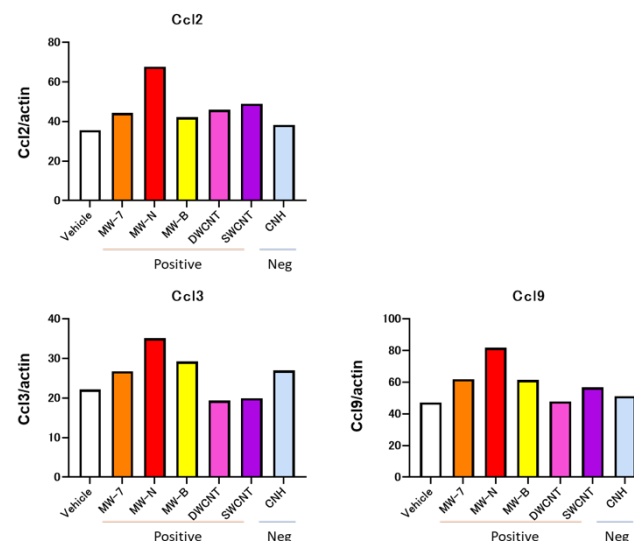


図12. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の*Ccl2* 発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

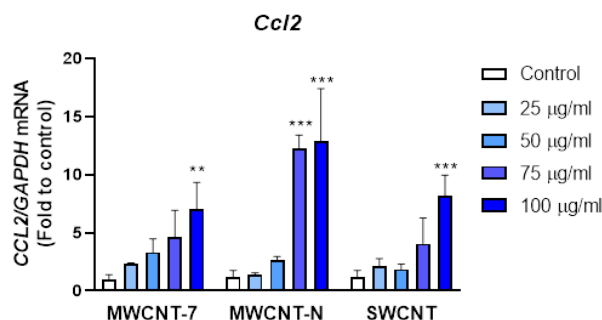


図13. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の*Ccl2* 発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

D. 考察

TIPS法は、大規模吸入暴露施設を必要とせず、ナノマテリアルの肺・胸膜中皮における毒性および発がん性評価を可能にする。複数のMWCNTで2年発がん性が示されてきた背景を踏まえると、投与・解析手順の標準化により、得られた有害性指標を迅速な健康影響評価へ展開できる可能性が高い。安定した投与手法、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。

本年度の解析では、SWCNTは肺発がん性を示す一方、本試験条件下では胸膜中皮腫誘発性は明確には支持されず、MWCNTとは異なる発がんプロファイルを示した。短期指標として、肺胞上皮の増殖活性 (Ki67) およびDNA損傷 (γH2AX) は、MWCNT-7、MWCNT-N、SWCNTのいずれにおいても4週から上昇し、13週まで持続した。したがって、Ki67およびγH2AXは、腫瘍発生前段階でCNT有害性を捉えるスクリーニング指標として有用である可能性が高い。また、炎症性遺伝子応答では、*Ccl2/Ccl3* が4週・13週を通じて広く上昇し、*Il-1b* および *Tnfa* はMWCNT-N、SWCNTなど高い肺発がん感受性を示す群で持続的に上昇した。これらの結果から、*Ccl2/Ccl3* はCNT曝露に共通する早期反応を反映し、*Il-1b/Tnfa* は発がん性の強度や持続的炎症を反映するKey Event (KE) 候補として位置づけられる。

RNA-seqに基づくGO/KEGG解析では、発がん性陽性CNTにおいて、サイトカイン/ケモカインシグナル、免疫細胞の動員・活性化、補体系、食食ーリソソーム系、NOD様受容体など、炎症・自然免疫/異物応答を中心とする経路が一貫して富化していた。これらの所見は、CNTによる反応が単なる一過性の急性炎症ではなく、免疫細胞集積を伴う持続的炎症および異物応答を反映している可能性を示すものである。さらに、qRT-PCRにより、*Spp1*、*Ccl2*、*Mmp12* の発現上昇が発がん性陽性CNTで確認された。*Spp1* および *Ccl2* はマクロファージを中心とした炎症性微小環境形成や免疫細胞リクルートに関与し、*Mmp12* は慢性炎症下でのマクロファージ活性化および組織リモデリングを反映する。したがって、これらの候補マーカーは、CNT曝露後早期に生じる炎症・組織改変反応を捉える短期KE候補として有用であると考えら

れる。

また、発がん性陰性CNTおよび化学発癌物質との比較により、発がん性陽性CNTでは、炎症・自然免疫応答、免疫細胞動員、食食ーリソソーム系、組織リモデリング関連経路が相対的に強く誘導されることが示された。これらの結果は、CNT発がんにおいて、DNAへの直接作用のみならず、マクロファージ/ケモカイン系を中心とした持続的炎症、組織傷害・修復反応の反復、および炎症性微小環境形成が重要である可能性を支持する。

本研究で得られた長期発がん性に裏付けられた短期KE候補は、*in vitro* 評価系の妥当性確認に用いる *in vivo* 参照軸として重要である。今後、*in vitro* 評価へ応用するためには、*in vivo* で抽出されたKE候補が培養系で再現されるかを確認するとともに、被験物質の分散条件、暴露濃度、暴露時間、細胞種・共培養条件など、評価系としての条件設定を整理する必要がある。これらの検討により、TIPS法で得られた *in vivo* 知見を、3Rに資する短期・簡便な評価体系へ橋渡しでき、将来的にOECD TG /IATAへの接続を検討する上でも基盤情報となると考えられる。

E. 結論

TIPS法を用いて、CNTの長期発がん性 (104週) と腫瘍発生前段階 (4週・13週) で観察可能な短期指標との対応を検討した。発がん性陽性対照であるMWCNT-7、MWCNT-Nと同条件でSWCNTを評価した結果、SWCNTは肺発がん性を示す一方、本試験条件下では胸膜中皮腫誘発性は明確には支持されず、CNT種により標的臓器や発がんプロファイルが異なる可能性が示された。短期指標として、Ki67およびγH2AXは複数CNTで上昇・持続し、*Ccl2/Ccl3*、*Il-1b/Tnfa* 等の炎症性遺伝子応答も発がん性や発がん感受性を反映する指標となり得ると考えられた。さらに、RNA-seqおよびqRT-PCR解析により、発がん性陽性CNTでは炎症・自然免疫/異物応答経路が一貫して富化し、*Spp1*、*Ccl2*、*Mmp12* 等が候補マーカーとして抽出・検証された。以上より、本分担研究では、CNTの長期発がん性に裏付けられた短期KE候補と候補マーカーを整理し、*in vitro* 評価系で測定すべき反応の選定に資する *in vivo* 参照軸を提示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Shimizu N, Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Sugiyama Y, Nagai T, Etani T, Morikawa T, Gonda M, Aoki M, Ishikawa D, Umemoto Y, Takahashi S, Yasui T. Establishment of a Patient - Derived Xenograft Model of a Testicular Yolk Sac Tumor. *Pathol Int.* in press.
- Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, **Kakehashi A**, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, **Naiki-Ito A**, **Tsuda H**, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials (Basel)*. 15(23):1806, 2025.
- Kawamura H, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kuang X, Murakami A, Komura M, Suzuki T, Kato H, Nagayasu Y, Matsuura K, Fujiwara K, Kataoka H, Takahashi S. Sacubitril/Valsartan Attenuates Inflammation and Fibrosis Associated With

- Decreased Integrin $\alpha 8$ and Inhibits Hepatocarcinogenesis in a Rat Model of Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2025, in press.
4. Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, **Naiki-Ito A**, Abdallah S, **Tsuda H**. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol.* 2025, in press.
 5. Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, **Tsuda H**, **Naiki-Ito A (Corresponding)**. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials (Basel).* 15(18):1402, 2025.
 6. Odagiri K, Mimura Y, Naiki T, Tasaki Y, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Etani T, Nagai T, Morikawa T, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Yasui T, Furukawa-Hibi Y. Efficacy and safety of anamorelin in patients with metastatic urothelial carcinoma receiving systemic chemotherapy: a randomized controlled study. *Oncologist.* 30(7):oyaf167, 2025.
 7. Kuang X, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Kawamura H, Murakami A, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Takahashi S. Hepatic stellate cell inhibition by angiotensin II receptor blocker mitigates liver injury and fibrosis via NF- κ B-galectin-3 suppression in a rat nonalcoholic steatohepatitis model. *Arch Toxicol.* 99(8):3393-3412, 2025.
 8. Naiki T, **Naiki-Ito A (Corresponding)**, Murakami A, Kato H, Sugiyama Y, Kawai T, Kato S, Etani T, Nagai T, Shimizu N, Morikawa T, Aoki M, Gonda M, Kuang X, Nagayasu Y, Hamamoto S, Yasui T, Takahashi S. Preliminary Evidence on Safety and Clinical Efficacy of Luteolin for Patients With Prostate Cancer Under Active Surveillance. *Prostate Cancer.* 2025:8165686, 2025.
 9. Ahmed OHM, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Alexander WT, Alexander DB, **Tsuda H**. A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung. *Nanomaterials (Basel).* 15(3):168, 2025.
 10. Yanase T, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Okawa R, Niwa S, Shimizu N, Hamamoto S, Fujii Y, Takahashi H, Yasui T. Efficacy of prostatectomy using a Retzius-sparing approach as an additional excision in anal canal carcinoma after brachytherapy for prostate adenocarcinoma. *IJU Case Rep.* 8(2):174-178, 2025.
 11. **Naiki-Ito A**, Naiki T, Takahashi S. Exploring experimental models of prostate cancer in chemoprevention: Oxidative stress as a key pathway to translational research. *Pathol Int.* 75(3):131-144, 2025.
 12. Matsumoto D, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Aoki M, Kato S, Morikawa T, Shimizu N, Gonda M, Umemoto Y, Yasui T. Efficacy of pembrolizumab plus lenvatinib as first-line treatment for metastatic renal cell carcinoma with multiple brain metastases. *IJU Case Rep.* 8(1):5-9, 2025.
 13. Isobe T, Naiki T, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Nagai T, Etani T, Iida K, Noda Y, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Morikawa T, Banno R, Kubota H, Ando R, Kawai N, Yasui T. Experience and prognostic analysis with avelumab switch maintenance treatment in metastatic urothelial carcinoma. *Oncology.* 17:1-11, 2025.
2. 学会発表
 1. **内木綾**、加藤寛之、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 前立腺癌に対するルテオリンの有効性に関する臨床的評価と miR-29 の役割、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 2. 加藤寛之、**内木綾**、小村理行、稲熊真悟、高橋智. マウス膵炎モデルのプロテオーム解析による膵炎・膵癌における Actinin-4 発現、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 3. 小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高橋智. CD81 発現間質細胞は浸潤性乳癌において腫瘍抑制的な微小環境を誘導する、第 114 回日本病理学会総会 (2025 年 4 月、仙台)
 4. 加藤寛之、**内木綾**、村上明寛、山内妙子、高橋智. 膵発癌の起点となる慢性膵炎の初期変化の解明、第 38 回発癌病理研究会 (2025 年 8 月、九十九里、千葉)
 5. **内木綾**、河村逸外、Kuang Xiaochen、小村理行、加藤寛之、高橋智. モデル動物で探る MASH を基盤とした肝発がんの病態と予防の可能性、シンポジウム「動物モデルから得られた貴重な知見」、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 6. 内木拓、三村佳久、**内木綾**、恵谷俊紀、永井隆、森川敏治、清水伸彦、青木マリア、権田将一、安井孝周. 全身化学療法を受ける尿路上皮癌患者へのアナモレリンの有効性と安全性の検証、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 7. 森川敏治、**内木綾**、長安祐子、石川大樹、青木マリア、権田将一、清水伸彦、永井隆、恵谷俊紀、内木拓、河合憲康、安井孝周、高橋智. ラットにおける前立腺発癌に対する高脂肪食の促進効果の解析、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 8. 村上明寛、**内木綾**、加藤寛之、高橋智. ルテオリンによる microRNA 誘導と前立腺癌抑制機構の解明、第 32 回日本がん予防学会総会 (2025 年 9 月、名古屋)
 9. **内木綾**、加藤寛之、**梯アンナ**、**津田洋幸**、高橋智. 単層カーボンナノチューブの肺発がん性と多層カーボンナノチューブとの比較評価、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 10. 村上明寛、**内木綾**、内木拓、加藤寛之、高橋智. 前立腺癌に対するルテオリン誘導 miRNA の影響、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
 11. 小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高橋智. 乳癌細胞に発現する CD63 は腫瘍抑制性マクロファージを誘導することで転移を抑制する、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、

金沢)

12. 王程博、小村理行、加藤寛之、長野愛矢、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 大腸がん腫瘍細胞およびがん関連線維芽細胞における CD99 発現とその意義、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
13. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 膵炎・膵癌における Actinin-4 とリン酸化 Actinin-4(S160)発現と機能解析、第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 年 9 月、金沢)
14. 内木綾. 病理研究者からみた癌取扱い規約の意義と発展性、シンポジウム「必要なのか、取り扱い規約!」、第 71 回日本病理学会秋期特別総会 (2025 年 11 月、名古屋)

15. Ahmed HM Omnia, Naiki-Ito A., Alexander DB., Takahashi S., Tsuda H. Comparative analysis of early pulmonary gene expression changes induced by carbon nanotubes and chemical carcinogens in rat lungs (第 42 回日本毒性病理学会学術集会 令和 8 年 1 月 21-22 日 名古屋)

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

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 星薬科大学薬学部 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。今年度はラットにDHPN, NNK, SWCNT, MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体の全ゲノムシーケンスを行ない、体細胞変異の検出を行った。さらに、SigProfilerExtractorで一塩基置換（SBS）解析を実施した結果、7種類の変異シグネチャー（Rat_SBS_A～G）を同定した。

強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察されたが、それ以外のサンプルで検出された変異は非常に少なかった。検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A～CはDHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測した。

NNKやDHPN誘発の肺がんでは強いストランドバイアスが観察され、それぞれのDNA付加体の変異誘発と発がんに関わることが示唆されたが、MWCNT/SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された。

また、抽出された変異シグネチャーのパターンはSWCNTとMWCNT-7とは大きく異なっており、これらナノマテリアル曝露における発がんのメカニズムが異なることが示唆された。

現在、これらゲノム解析データを用いて、2塩基置換（DBS）変異や挿入・欠失（ID）の解析を実施している。また、同様の構造体であるアスベストによるヒト肺がん・中皮腫では、特徴的なSBS変異シグネチャーは見つからず、むしろ大きな（染色体）構造変化が顕著であることが報告されている。MWCNTおよびSWCNTでも同様な現象が観察される可能性が考えられることから、構造異常（CV）についても解析を進める予定である。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。

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

SWCNT および MWCNT-N/B を F344 ラットに TIPS 投与し、発生した肺がん及び中皮腫サンプルを用いてこれら化学物質に由来する変異シグネチャーの同定を試みる。

変異シグネチャーの比較として、肺発がん物質であるDHPNおよびNNKによるラット肺がんについてもゲノム解析を実施した。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、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-N/BまたはDHPN, NNKを投与して得られた胸膜中皮腫及び肺がんは凍結サン

ブルより 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実施した。

(倫理面の配慮)
該当なし

C. 研究結果

ラットにDHPN, NNK, SWCNT, MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体 (DHPN: 12検体、NNK: 3検体、SWCNT: 7検体、MWCNT-7: 12検体、MWCNT-N: 4検体、MWCNT-B: 3検体、MWCNT-7: 1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 (表1)。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 (StrelkaおよびMutect 2) により体細胞変異の検出を行った。さらに、SigProfilerExtractorで一塩基置換 (SBS) 解析を実施した結果、7種類の変異シグネチャー (Rat_SBS_A~G) が同定された (図1)。

また、各サンプルにおける変異数と7種類の変異シグネチャー分布について図2に示す。図2からわかるように、強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察された。一方、SWCNTおよびMWCNT-7、-NまたはMWCNT-B暴露のラット中皮腫/肺腫瘍サンプルの結果では、検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~Cは DHPN由来、SBS_Dは SWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測できた。

表1 肺がん・中皮腫サンプルリスト

Chemical	Strain	Histology	Experimental Facilities	Normal
DHPN (N=12)	F344	Ad. Carcinoma (7), Adenoma (1), S. C. Carcinoma (3), Hyperplasia (2)	Dr. Tsuda Lab	Matched
NNK (N=3)	F344	Ad. Carcinoma (3)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-N (N=4)	F344	Mesothelioma (3), Ad. Carcinoma (1)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-B (N=3)	F344	Ad. Carcinoma (3)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-7 (N=5)	F344	Mesothelioma (3), Ad. Carcinoma (2)	Dr. Tsuda Lab	Matched
MWCNT-7 (N=7)	F344	Mesothelioma (6), Ad. Carcinoma (1)	Dr. Naiki Lab	Matched
SWCNT (N=7)	F344	Ad. Carcinoma (7)	Dr. Naiki Lab	Matched

図1 ラット肺がん・中皮腫より抽出された変異シグネチャー

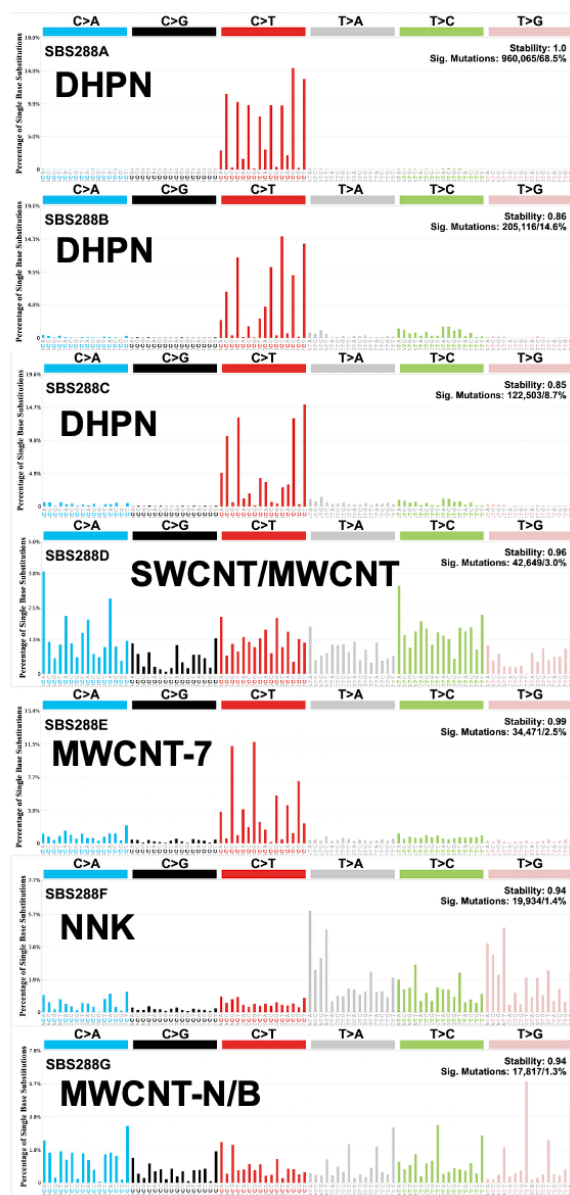
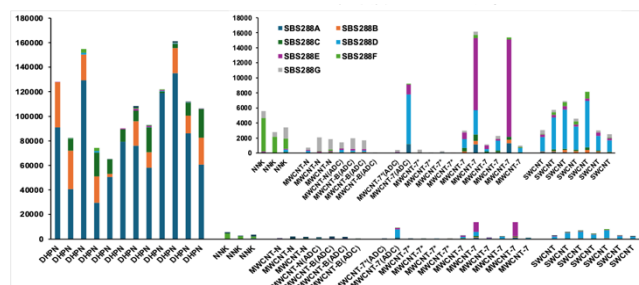


図2 サンプル毎の変異シグネチャー分布



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、DHPN由来のシグネチャーであるSBS_A~CはいずれもSBS11 (アルキル化剤由来) と酷似していることがわかった。MWCNT-7に由来すると思われるSBS_EはSBS1 (5-meCの自発的脱アミノ化) およ

びSBS87(チオプロリンによる化学療法)と類似していた。それ以外のシグネチャーはいずれも新規の変異シグネチャーである可能性が示唆された(表2)。

表2 ラットSBSシグネチャーとヒトSBSシグネチャーの類似性解析

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
RatSBS_A	DHPN	SBS11 (Alkylation)	0.99
RatSBS_B	DHPN	SBS11 (Alkylation) SBS32 (Azathioprine)	0.84 0.80
RatSBS_C	DHPN	SBS11 (Alkylation) SBS32 (Azathioprine)	0.80 0.86
RatSBS_D	SWCNT	SBS3 (Defective homologous recombination-based DNA damage repair) SBS5 (Clock like)	0.80 0.78
RatSBS_E	MWCNT-7	SBS1 (Spontaneous deamination of 5-meC) SBS7 (Thiopurine chemotherapy)	0.85 0.84
RatSBS_F	NNK	SBS85 (Indirect effects of activated-AID)	0.68
RatSBS_G	MWCNT-N/B	SBS9 (Pol eta somatic hypermutation activity) SBS40b (Unknown)	0.77 0.70

また、SBS_A (DHPN 由来) の C to T 変異、SBS_F (NNK 由来) の T to A および T to G 変異に強いストランドバイアス(転写鎖と非転写鎖でMFが異なる現象)が観察された(図3)。ストランドバイアスが観察された場合にはDNA付加体が起因となり当該変異シグネチャーを形成することなどが知られており、この情報はこれら化学発がん物質による発がんメカニズムをサポートする結果であると考えられる。さらに、SBS_Fは既報のNNKによる変異シグネチャーパターンとも非常に良く似ていることもわかった。

一方、MWCNT/ SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された(図4)。

図3 化学発がん物質によるラット肺がんの変異シグネチャー

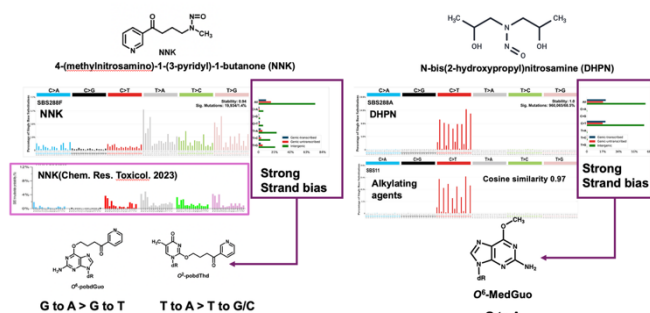
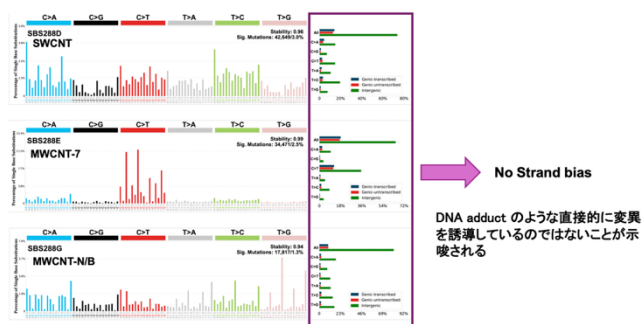


図4 CNTによるラット肺がん/中皮腫の変異シグネチャー



D. 考察

ラットにDHPN, NNK, SWCNT, MWCNT-7/-N/-Bを投与し誘発した肺がん/中皮腫41検体の全ゲノムシーケンスを行ない、体細胞変異の検出を行った。さらに、SigProfilerExtractorで一塩基置換(SBS)解析を実施した結果、7種類の変異シグネチャー(Rat_SBS_A~G)を同定した。

強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察されたが、それ以外のサンプルで検出された変異は非常に少なかった。検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~CはDHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測した。

NNKやDHPN誘発の肺がんでは強いストランドバイアスが観察され、それぞれのDNA付加体の変異誘発と発がんに関わることが示唆されたが、MWCNT/ SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された。

また、抽出された変異シグネチャーのパターンはSWCNTとMWCNT-7とは大きく異なっており、これらナノマテリアル暴露における発がんのメカニズムが異なることが示唆された。

現在、これらゲノム解析データを用いて、2塩基置換(DBS)変異や挿入・欠失(ID)の解析を実施している。

また、同様の構造体であるアスベストによるヒト肺がん・中皮腫では、特徴的なSBS変異シグネチャーは見つからず、むしろ大きな(染色体)構造変化が顕著であることが報告されている。MWCNTおよびSWCNTでも同様な現象が観察される可能性が考えられることから、構造異常(CV)についても解析を進める予定である。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

強力な肺発がん物質であるDHPNでは非常に多くの変異数が観察されたが、それ以外のサンプルで検出された変異は非常に少なかった。検出されたSNVの数はSWCNTおよびMWCNT-7暴露群で比較的多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では非常に少ないことがわかった。各サンプルにおけるこれら変異シグネチャーの分布割合から、SBS_A~CはDHPN由来、SBS_DはSWCNT/MWCNT由来、SBS_EはMWCNT-7由来、SBS_FはNNK由来、SBS_GはMWCNT-N/B由来であると推測した。

NNKやDHPN誘発の肺がんでは強いストランドバイアスが観察され、それぞれのDNA付加体の変異誘発と発がんに関わることが示唆されたが、MWCNT/ SWCNT由来の変異シグネチャーではストランドバイアスが観察されず、DNAへの直接的な作用を介した発がんメカニズムではないことが示唆された。

また、抽出された変異シグネチャーのパターンはSWCNTとMWCNT-7とは大きく異なっており、これらナノマテリアル暴露における発がんのメカニズムが異なることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., **Totsuka Y***, Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells, *Genes & Environ.*, 2025 48(1): 2.
2. Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., **Totsuka Y***, Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde, *Biomolecules*. 2025 15 (6): 878.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里 正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
2. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志、In vitro薬剤誘発性リン脂質症評価におけるHepaSH細胞の有用性、第52回日本毒性学会 (2025年7月、那覇、沖縄)
3. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 毒性試験法の開発、第38回発癌病理研究会 (2025年8月、九十九里、千葉)
4. Yukari Totsuka¹, Momoko Nagai², Asmaa Elzawahari², Rikako Ishigamori¹, Shinya Hasegawa¹, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025 (2025年9月、ニューヨーク、米国)
5. 戸塚ゆ加里 環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析、第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
6. 小池遥己、小高和大、渋谷優空、関根 航、茅野朋子、松本真理子、藤岡正喜、鈴木周五、魏民、戸塚ゆ加里、有機フッ素化合物 (PFAS) の遺伝毒性評価 第32回がん予防大会 (2025年9月、名古屋、愛知)
7. Yukari Totsuka, Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling, 第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
8. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの遺伝毒性評価、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
9. 長谷川晋也、渡部光一、川口駿、垣内伸之、小川誠司、吉田健一、戸塚ゆ加里、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会学術総会 (2025年9月、金沢)
10. Yukari Totsuka, Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from DNA Adduct and Mutation Profiling, 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (2025年10月、ソウル、韓国)
11. 戸塚ゆ加里、環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索とメカ

ニズムの解明、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025年10月、大阪)

12. 戸塚ゆ加里、次世代シーケンサー (NGS) とアダクトーム解析を用いた遺伝毒性物質の探索と発がんメカニズムに関する研究、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 学会賞受賞講演 (2025年11月、静岡)
13. 石ケ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの包括的毒性評価、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
14. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
15. 長谷川 晋也、石ケ守 里加子、大野 麻理奈、吉田 健一、垣内 伸之、渡部 光一、川口 駿、小川 誠司、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株である 293 FT 細胞を用いたError-corrected NGSによる化学物質の変異シグネチャー解析、第54回日本環境変異原ゲノム学会大会 (2025年11月、静岡)
16. 戸塚ゆ加里、オルガノイド技術を用いた環境化学物質の影響評価、日本学術会議主催学術フォーラム (2025年12月、六本木、東京)
17. 戸塚ゆ加里、ヒトへの外挿性を考慮した新規 *in vivo* 代替型遺伝毒性評価法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
18. 宮崎 飛翔、石ケ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、吉田 健一、大野 麻理奈、小川 誠司、垣内 伸之、川口 駿、渡部 光一、中馬 新一郎、加藤 孝一、美谷島 克宏、樋口 裕一郎、上原 正太郎、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
19. 今井正彦、小川心音、川西なつき、中山瑞穂、大島正伸、戸塚ゆ加里、大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
20. 小畑悠樹、上原正太郎、樋口裕一郎、戸塚ゆ加里、末水洋志、ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)
21. 長谷川晋也、石ケ守 里加子、高橋賢吾、遠藤瑞葵、戸塚ゆ加里、ヒト胎児腎臓細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価、日本薬学会第146年会 (2026年3月、大阪)

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（NM）の肺発がん性について検討し、発がんに関与する因子およびその機序を解明することを目的とした。

実験1では、F344 雄性ラット 200 匹を用い、フラーレン（FL）、フラーレンウィスカー（FLW）、多層カーボンナノチューブ（MWCNT-7, MWCNT-N）を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で、簡便な経気管肺内噴霧投与（TIPS）法により投与した。投与開始 104 週間後に DNA 酸化的損傷マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG）の形成レベルを解析した結果、MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群の肺胞上皮細胞および過形成病変において、8-OHdG 形成レベルの有意な上昇が認められた。

実験2では、F344 雄性ラット 320 匹を用い、MWCNT-7、MWCNT-N および単層 CNT（SWCNT）を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 投与し、4、13、52 週間後に 8-OHdG および 8-nitroguanosine（8-NG）の形成レベルを測定した。MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では、全期間において、マクロファージ（Mφ）由来の活性酸素・窒素種（ROS/RNS）に起因する肺胞上皮細胞の 8-OHdG/8-NG 形成レベルが有意に上昇していた。一方、SWCNT 投与群では、4 週目から Mφ や好中球（Nφ）由来の 8-NG 形成レベルの有意な上昇、または 8-OHdG の増加傾向と iNOS の誘導が見出された。RNA-Seq および IPA シグナリングパスウェー解析の結果、4 週間投与後の全 CNT 投与群において、ROS/RNS 産生、炎症調節因子、酸化的ストレス抵抗性、細胞増殖およびオートファジーに関与する TNFα、NFκB、RELA、p38、Rac1、Nrf2 シグナリングの活性化が認められた。さらに、リン酸化 NFκB（p65, Ser536）の核内過剰発現が認められ、細胞増殖の誘導に関連していた。以上のことから、NFκB の活性化が CNT の発がんに関与していると考えられた。

実験3では、カーボンナノホーン（CNH）、カーボンナノブラシ（CNB）および MWCNT-7 を 0.5 および 1 mg/rat の濃度で TIPS 投与し、6 週間後の 8-OHdG/8-NG 形成を測定した。CNH および CNB は F344 ラット肺において有意な発がん性を示さなかった。高用量（1 mg/rat）の CNH、CNB および MWCNT-7 群で 8-OHdG の有意な上昇が認められたが、CNH、CNB 群の上昇レベルは MWCNT-7 群と比較して有意に低かった。また、8-NG の有意な上昇は MWCNT-7 群のみで認められた。

結論として、F344 ラット肺において、MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT の発がん機序には、Mφ・Nφ 由来の ROS/RNS による上皮細胞の DNA 損傷（8-OHdG/8-NG）、および NFκB、p38、Rac1、Nrf2 シグナリングを介した細胞増殖、オートファジー、酸化的ストレス抵抗性の活性化が関連していることが明らかとなった。

A. 研究目的

ナノマテリアルには有用な利益がある一方でリスクも存在し、その程度を正しく評価することが重要である。リスク評価には毒性の検出が不可欠であり、吸入暴露試験の代替法は効率的な検査に有用と考えられる。特にカーボンナノチューブ（CNT）など、将来的に発がん性が証明される可能性のある材料については、詳細なリスク評価研究が必要となる。

本研究では、F344 ラットを用いた *in vivo* 試験により、ナノマテリアルの発がん性メカニズムを検討し、肺における発がん関連因子およびその発がん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、実験開始時にフラーレン（FL）、フラーレンウィスカー（FLW）、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS

法により計 8 回肺内投与した。投与終了後、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解析した。

実験2. F344 雄性ラット 320 匹を用い、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 法により計 8 回投与した。投与開始 4 週間および 13 週間後に、ラット肺の免疫組織学的解析を行い、DNA の 8-OHdG および 8-NG 形成レベルの変化を検討した。

実験3. F344 雄性ラット 142 匹を用い、実験開始時よりカーボンナノホーン（CNH）、カーボンナノブラシ（CNB）および MWCNT-7 を 0.5 および 1 mg/rat の濃度で TIPS 法により計 8 回投与した。投与開始 6 週間後に、ラット肺の免疫組織学的解析を用いて、8-OHdG および 8-NG 形成レベルの変化を調べた。

1. ラット肺からの DNA 抽出

ラット左肺サンプル（300 mg）からの DNA 抽出は、

既存の報告を一部改変して行った。

簡略に記載すると、核 DNA の抽出には、細胞内小器官を融解する抗酸化剤 NaI 液を含む「DNA Extractor WB kit」(和光純薬工業株式会社)を使用した。さらに、細胞溶解時の自己酸化を防止する目的で、溶解液に deferoxamine mesylate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を添加した。得られた DNA は、nuclease P1 (ヤマサ醤油株式会社) およびアルカリフォスファターゼ (Sigma Chemical) を用いてデオキシヌクレオシドに断片化し、8-OHdG の形成レベルを 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および実験3において、右肺を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。固定した肺組織はパラフィン包埋後、厚さ (3 μ m) の薄切切片を作製した。内因性ペルオキシダーゼをブロックするため、切片を0.3%過酸化水素水で処理した。馬血清にて非特異的応答をブロッキングした後、一次抗体として抗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、静岡、日本) を適用し、4℃で一晩反応させた。検出には免疫染色キット (VECTASTAIN Elite ABC kit、Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い、DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; 同仁化学研究所、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、右肺をブアン液 (Bouin's solution) で固定した。その後、実験1と同様の免疫染色法 (抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体、1:500) にて8-OHdGの形成レベルを検討した。

4. 免疫組織化学的8-nitroguanosine (8-NG) 染色

実験2では、摘出した右肺をブアン液を用いて固定した。8-NGの形成レベルは、ABC法 (avidin-biotinylated peroxidase complex method) を用いた免疫組織化学染色により解析した。切片は抗8-NGウサギポリクローナル抗体 (1:20、10 μ g/mL、KMU-P01、コスモ・バイオ株式会社、東京、日本) を用いて4℃で一晩反応させた。

実験3では、右肺を4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、実験2と同様の条件 (ABC法) で免疫組織化学染色を行い、8-NGの形成レベルを解析した。

5. 免疫組織化学的検討

ラット肺の4%パラホルムアルデヒド緩衝液固定パラフィン包埋切片を用い、ABC法による免疫組織化学染色を実施した。クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いたマイクロウェーブ照射による抗原賦活化、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

化処理を行った。

一次抗体には、anti-phospho-p38 (T180/Y182) (1:100, ab4822, Abcam, 東京)、anti-phospho-Nrf2 (S40) (1:100, ab76026, Abcam, 東京)、anti-phospho-NF- κ B p65 (S536) (1:100, #3031, Cell Signaling Technology, MA, USA)、anti-p62/SQSTM1 (1:300, PM045, MBL, 名古屋)、anti-iNOS/NOS2 (1:100, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 東京)、anti-COX2 (1:200, aa 584-598, No. 160126, Cayman Chemical, MI, USA)、anti-phospho-PERK (T982) (1:100, ab192559, Abcam, 東京)、anti-phospho-Rac1/Cdc42 (S71) (1:100, #2461, Cell Signaling Technology, MA, USA)、anti-OGG1 (1:50, sc-12075, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、およびanti-PCNA マウスモノクローナル抗体 (1:500, M0879, DAKO, 京都) を用い、4℃で一晩反応させた。

6. RNA シークエンシング (RNA-Seq) およびシグナリング解析

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, Mountain View, CA, USA)、またはKEGG Pathway Analysisを用いて機能解析、上流転写制御因子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蛋白の発現解析

RIPA buffer (1 $\times$) を用いてラット肺から蛋白を回収した。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%の濃縮ゲルを重ねたものを使用し、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、目的とする蛋白に結合する一次抗体と 4℃で一晩反応させた。使用した一次抗体と希釈倍率は以下の通りである。Rabbit anti-Nrf2 phospho S40 (SA B5701902, 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 Transduc

tion Laboratories, 東京, 日本); anti- NFkB mouse mAb (p65) (1:800, #6956, Cell Signaling Technology, MA, USA); anti-NFkB p65 (phospho-S536) rabbit mAb (1:700, #3031, Cell Signaling Technology, MA, USA); anti-STAT3 (phospho-Tyr705) rabbit mAb (1: 1000, #9145, Cell Signaling Technology, MA, USA); anti-Stat3 rabbit mAb (1: 1000, #30835, Cell Signaling Technology, MA, USA); β -actin (1:100,000, ab49900, Abcam, Japan)。

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的有意差検定を行い、危険率5% ($P<0.05$) 又は1% ($P<0.01$) を基準とした。8-OHdG及び8-NG形成レベルの平均値について、まず5%有意水準でBartlett法による等分散性の検定を行った。その結果、等分散の場合はパラメトリックなDunnettの多重比較検定を、不等分散の場合はノンパラメトリックなSteelの検定を用いた。

C. 研究結果

1. 実験1

1-1. ラット肺における8-OHdGの形成 (ELISA法で測定)
DNAの8-OHdG形成レベルの分析結果を図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。

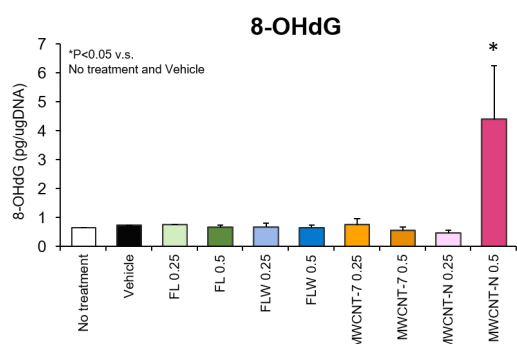


図1. ラット肺DNAにおける8-OHdG形成レベルの測定 (ELISA法)

1-2. ラット肺における8-OHdGの免疫組織学的検索

免疫染色の解析結果を図2および3に示す。MWCNT-7およびMWCNT-Nを0.25および0.5 mg/rat投与した群では、ラットの肺胞上皮細胞において8-OHdG陽性細胞数の有意な増加が認められた。一方、FLの0.25および0.5 mg/rat投与群における8-OHdG陽性細胞数は対照群と同等であったが、FLWの0.25および0.5 mg/rat投与群では増加傾向が見られた (図2, 3)。

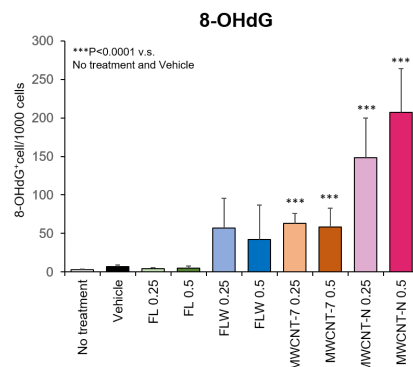


図2. 免疫染色により観察されたラット肺の8-OHdG形成レベル

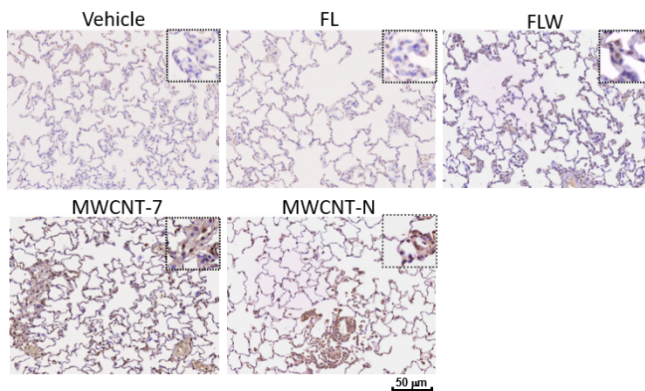


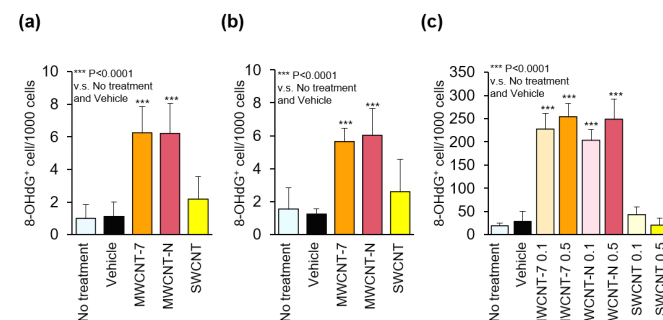
図3. 実験1における8-OHdG免疫染色の代表的な写真

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および図5に示す。0.5 mg/ratのMWCNT-7およびMWCNT-N投与群のラット肺胞上皮細胞において、投与開始4、13および52週間後に8-OHdG陽性細胞数の有意な増加が認められた (図4(a, b, c)、図5)。

一方、SWCNT 0.5 mg/rat投与群では第4、13週において8-OHdG陽性細胞数の上昇傾向が見られたが、第52週では無処置群および対照群と比較して有意な増加は



認められなかった (図4(a, b, c)、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

また、0.1 mg/ratのMWCNT-7およびMWCNT-Nを投与した52週間後において、ラット肺胞上皮細胞の8-OHdG陽性率は、無処置および対照群に対し有意に増加した。

一方、SWCNT群では有意な上昇は認められなかった(図4)。

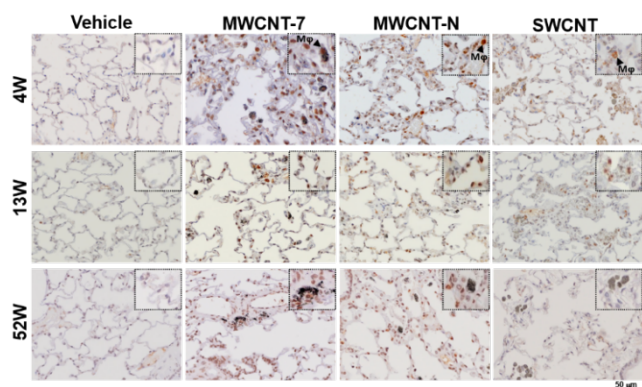


図5. 実験2における8-OHdG免疫染色の代表像(投与4、13、52週後)

MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT の4、13、52、104週間後、浸潤した多くの8-OHdG陽性マクロファージ(Mφ)(細胞質や核)や好中球(Nφ)(核)が観察され、その数が有意に増加していた(図5、6)。特に、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。SWCNT投与群では8-OHdG陽性MφやNφが多く見られた(図5)。

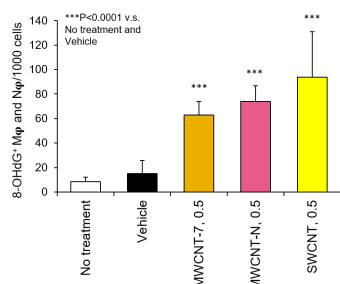


図6. 実験2におけるCNT 13週間投与後ラット肺の8-OHdG陽性マクロファージ(Mφ)と好中球(Nφ)数の上昇

2-2. ラット肺における8-NG形成レベルおよびiNOS/NOSとCOX2の発現(免疫染色)

肺に浸潤した多くの8-NG陽性MφやNφ(核と細胞質)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7、8)。

ラット肺における8-NG形成レベルおよびiNOS/COX-2の発現(免疫組織化学染色)解析結果を図7、図8および図9に示す。SWCNT投与群では、投与開始4、13、52週後の各時点において、ラットの8-NG陽性肺上皮細胞、マクロファージ(Mφ)および好中球(Nφ)数に有意な上昇が認められた(図7(a、b、c)、図8)。肺へ浸潤したMφおよびNφの核と細胞質において、顕著な8-NG陽性所見が観察された(図8)。また、13週目以降、MWCNT-7およびMWCNT-N 0.5 mg/rat投与群においても、8-NG陽性肺上皮細胞数の有意な増加が確認された(図7、8)

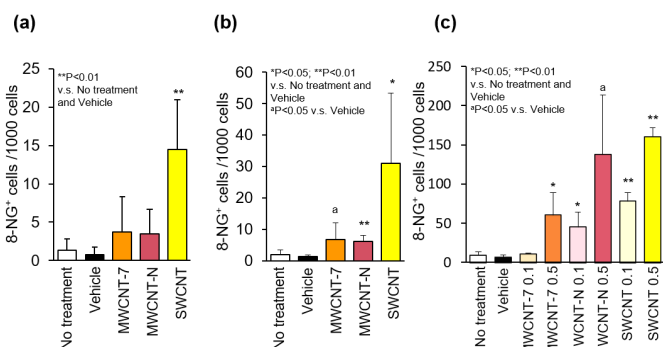


図7. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間(a)、13週間(b)および52週間後(c)ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル

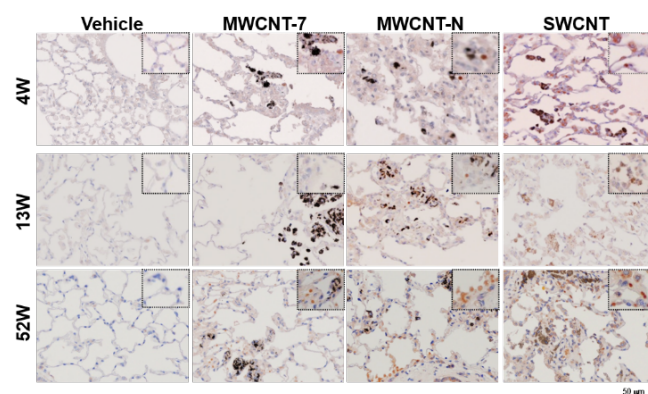


図8. 実験2における8-NG免疫染色の代表像(投与4、13、52週後)

実験2では、MWCNT-7、MWCNT-N、またはSWCNT(0.1 mg/ratまたは0.5 mg/rat)を投与したラットにおいて、投与開始4~52週間後、肺上皮細胞、マクロファージ(Mφ)、および好中球(Nφ)で8-NGの発現上昇が認められた。これは免疫染色およびウェスタンブロット(WB)解析により(4週)、NO産生酵素iNOS/NOSおよび炎症マーカーCOX2の発現増加と連動していた(図9)。

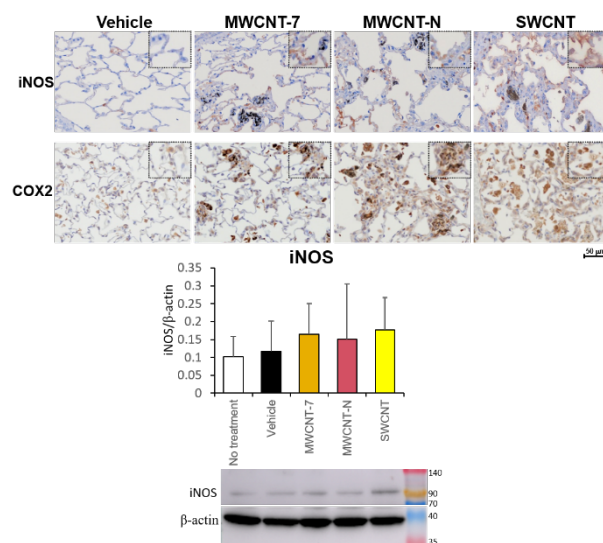


図9. ラット肺におけるiNOSおよびCOX-2の発現上昇(上段:13週間投与後の免疫染色、下段:4週間投与後のウェスタンブロット、n=5)

2-3. RNA シークエンシング (RNA-Seq) およびシグナリング解析

実験2におけるナノマテリアル4週間投与後のラット肺組織についてRNA-Seq解析を行い、IPAやKEGGを用いてシグナリングパスウェー解析を実施した。その結果、0.5 mg/ratのMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNT投与群では、ファゴソーム形成、オートファジー、G protein-coupled受容体 (GPCR) およびFAKシグナリングの活性化が認められた。また、MWCNT-7およびMWCNT-N投与群においてのみ、活性酸素 (ROS) 産生に起因するp38およびRacシグナリングの有意な活性化が予測された (表1)。

表 1. RNA-Seq 解析および IPA を用いたナノマテリアル投与ラット肺における活性化シグナルパスウェイの解析

Canonical Pathways	MWCNT-7 0.5/ Vehicle	MWCNT-N 0.5 Vehicle	SWCNT 0.5/ Vehicle
Phagosome formation	4.56	4.59	4.59
G protein-coupled receptor signaling	1.83	2.08	2.32
p38 MAPK Signaling	3.53	2.03	1.77
RAC Signaling	2.29	2.19	1.47
FAK signaling	2.99	3.26	3.26
Autophagy	1.41	1.72	2.06

Data are z-score (z-score>2: activation)
© 2000-2025 QIAGEN. All rights reserved.

表2. RNA-SeqおよびIPAを用いたナノマテリアル曝露ラット肺における活性化上流因子の解析

Regulators	MWCNT-7	MWCNT-N	SWCNT
Immune response			
TNF α	8.05	8.24	8.28
CSF2	8.00	8.16	8.16
CSF3	3.45	3.47	4.57
IL1A	5.55	5.85	5.85
IL1B	5.09	5.61	5.85
IL2	5.42	5.81	5.50
IL6	5.50	5.86	5.86
IL17A	3.90	4.11	4.11
IFNA4	1.94	2.36	3.16
IFNL1	3.65	5.22	5.70
IFNA2	4.00	5.51	5.92
IFNA8	N/A	2.43	2.61
IFNA21	N/A	2.41	2.59
IFNB1	0.64	2.79	2.50
IFNG	7.02	7.42	7.74
IRF3	2.35	4.34	4.61
IRF7	3.71	6.24	6.14
STAT1	3.26	4.23	3.87
STAT2	2.07	3.27	3.73
STAT3	3.94	3.94	4.22
TLR7	4.86	5.13	5.13
TLR4	4.72	4.92	4.92
EIF2AK2	2.81	4.29	4.79
TICAM1	5.03	5.48	5.75
MAVS	5.12	6.04	6.35
Cell proliferation, autophagy			
NFkB	5.33	5.87	6.20
RELA	3.25	3.98	4.27
IKBKE	2.93	3.23	3.51

Data are z-score (z-score>2: activation)
© 2000-2025 QIAGEN. All rights reserved.

実験2におけるIPAの上流調節因子解析により、0.5 mg/ratのMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTの4週間投与

群において、免疫反応関連因子 (TNF α 、CSF2、CSF3、interleukins (ILs)、interferons (INFs)、INF調節因子 (IRF3, 7)、Toll-like receptor 4, 7 (TLR4, TLR7)、転写因子STAT1, 2, 3、TICAM1、MAVS、EIF2AK2) の活性化が予測された (表1)。さらに、細胞増殖やオートファジーの調節因子であるNFkB、RELA、IKBKEの活性化も認められた。

2-4. ラット肺におけるP-p38、P-Rac1/Cdc42、P-NF κ B、PCNA、P-Nrf2およびp62の発現

実験2では0.5 mg/ratの量では肺中皮腫が発生したMWCNT-7、MWCNT-N投与群では、投与開始4および13週間後、ラット肺上皮細胞において高い8-OHdGの発現上昇とともに、細胞増殖調節因子 (リン酸化 p38 (P-p38)、リン酸化 Rac1/cdc42 (P-Rac1/cdc42)) が見られた (図10)。

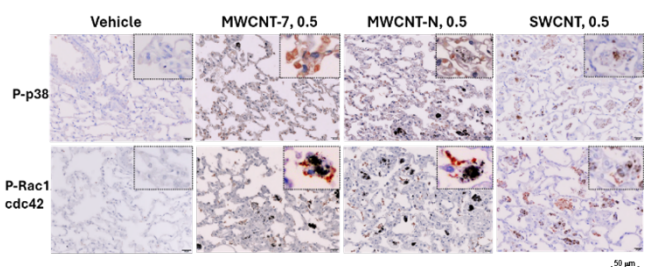


図 10. 実験2におけるCNT投与後ラット肺におけるP-p38およびP-Rac1の発現上昇

さらに、すべてのCNT投与群において、肺上皮細胞、過形成 (HPL)、腺癌 (AdCa)、および中皮腫 (Mesothelioma) 細胞の核におけるリン酸化NFkB (P-NFkB, p65, S536) および細胞増殖マーカーPCNAの発現が高いことが確認された (図11)。

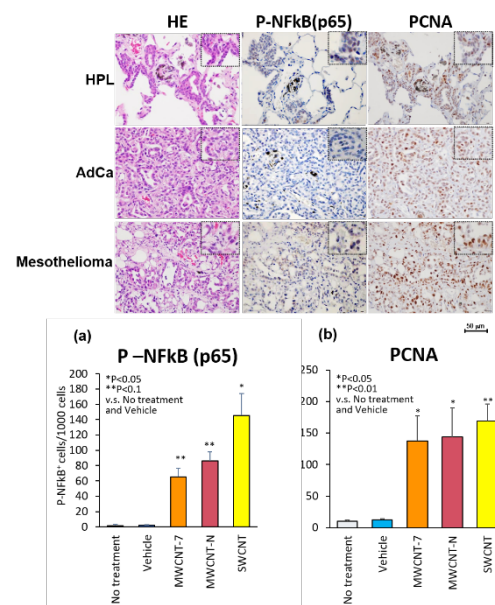


図 11. 実験2において、CNTを投与したラット肺上皮、過形成および腫瘍におけるP-NFkB (p65, S536) (a)およびPCNA (b)の発現

SWCNT短期や中期投与後、ラット肺上皮細胞においてP-NFkB、PCNA、p62発現の有意な上昇が観察された

(図11, 12)。ウェスタン・ブロットを用いた解析では、MWCNT-7投与群のラット肺組織においてNF- κ B (p65)の有意な発現上昇がみられ、MWCNT-N投与群においても同様の上昇傾向が示された(図12)。また、MWCNT投与群ではp-STAT3の発現が上昇傾向を示した。

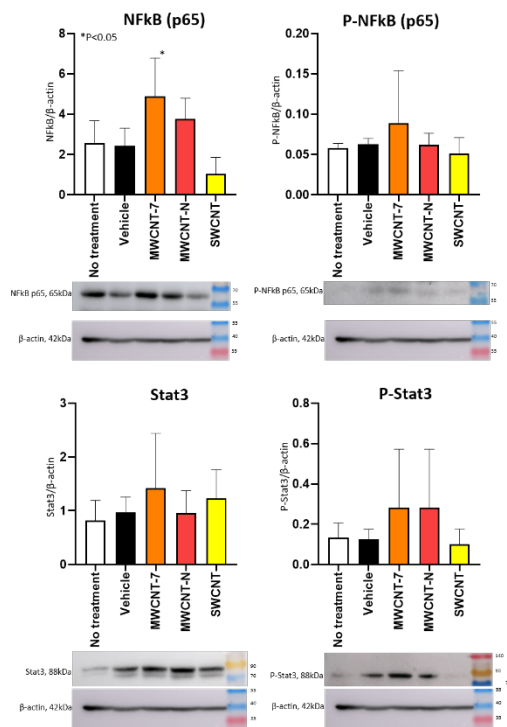


図12. 実験2ラット肺におけるNF- κ B (p65), P-NF κ B (p65), Stat3 およびP-Stat3 (S40)の発現 (WB, 4週間投与後, n=5)

ウェスタン・ブロット解析の結果、0.5 mg/ml の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た(図13)。また、MWCNT投与群ではP-Nrf2の発現もp62と同様に上昇した。

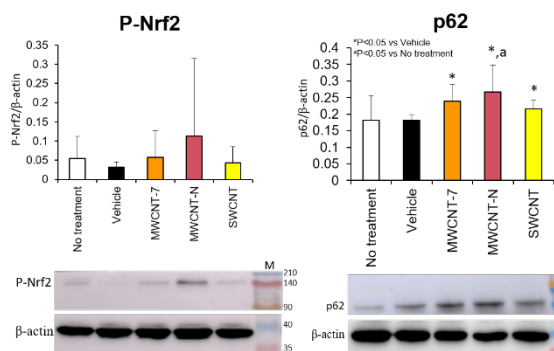


図13. ラット肺におけるP-Nrf2 (S40)およびp62の発現 (WB, 4週間投与後, n=5) (実験2)

また、8-OHdG修復酵素である oxoguanine glycosylase 1 (Ogg1)、P-PERK および GRP78 の免疫染色を行ったところ、全群のラット肺上皮において染色が観察されたが、CNTs 群では対照群に比べて有意な変化は認められなかった。

3. 実験3

3-1. ラット肺におけるCNH, CNBおよびMWCNT-7投与

後の8-OHdG形成レベル (免疫染色)

8-OHdG および 8-NG 免疫染色の解析結果を図14および図16に示す。MWCNT-7 1mg/ratを投与して6週間後のラット肺上皮細胞において、無処置群およびVehicle群と比較して8-OHdG陽性細胞数の有意な上昇が認められた(図13, 16)。

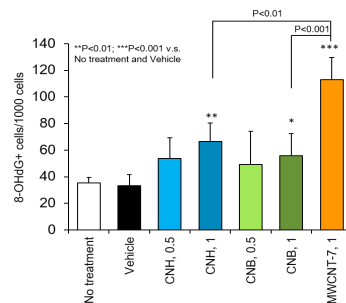


図14. 免疫染色で観察されたCNH, CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

CNHおよびCNB高容量(1 mg/rat)投与群ではラット肺上皮細胞において8-OHdG陽性細胞の数が有意に増加した(図14)。また、MWCNT-7投与群では8-OHdG形成レベルの上昇がCNHおよびCNB 1mg/rat投与群に比べて、有意に高い値を示した。

3-2. ラット肺における8-NG形成レベル (免疫染色)

8-NG免疫染色を用いた解析結果を図15および図16に示した。ラットの肺胞および気管支上皮細胞において、MWCNT-7を1 mg/ratで投与してから6週間後、無処置群およびVehicle群と比較して8-NG陽性細胞数が有意に増加していることが確認された(図15、図16)。

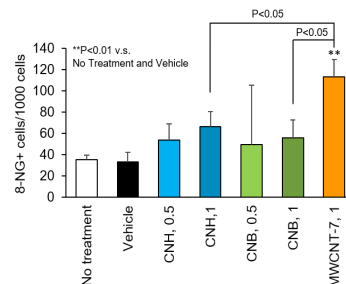


図15. 免疫染色で観察されたCNH, CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル

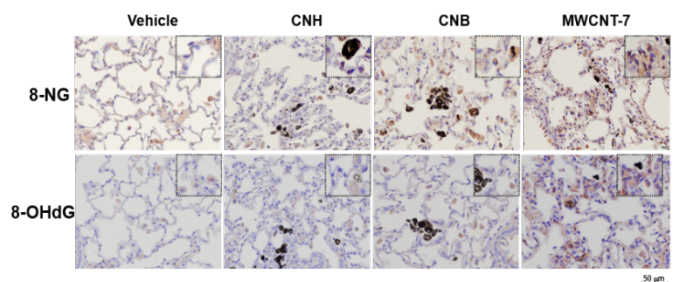


図16. 免疫染色で観察されたCNH, CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル
CNHおよびCNB投与群ではラット肺胞および気

管支上皮細胞において8-NG形成レベルの変化は見られなかった。MWCNT-7投与群では8-NG形成レベルの上昇がCNHおよびCNB 1 mg/rat投与群に比べて、有意上昇していた。

D. 考察

DNAとROS/RNS（活性酸素/窒素種）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損傷の指標として知られ、多くの実験モデルにおいて発がんに関与している。これらは突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となる。組織中における8-OHdGレベルは、ROSの産生と修復のバランスによって決定される。

実験1では、0.25および0.5 mg/ratのMWCNT-7またはMWCNT-Nを投与した群において、投与104週間後に肺腺がんの有意な発生が認められ、これは肺胞上皮DNA中における8-OHdGの蓄積に関連していると考えられる。

実験2では、0.1および0.5 mg/ratのMWCNT-7またはMWCNT-N投与群において、投与開始4、13および52週間後に8-OHdG陽性肺胞上皮細胞の大幅な増加と、8-OHdG陽性マクロファージ数の上昇が認められた。このことから、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、主にMφの増加に伴うROS放出の誘導に関連していると考えられる。さらに、MWCNT-7、MWCNT-N、またはSWCNT投与後のラット肺上皮や腫瘍細胞では、細胞増殖調節因子P-NFκBの核内過剰発現が観察された。また、MWCNT投与群では酸化的ストレス・小胞体ストレスマーカーやP-Nrf2、p62、P-p38、P-Rac1/cdc42の誘導が8-OHdG形成レベルと相関し、高い値を示した。SWCNTの短期投与ではp38およびP-Rac1の有意な活性化は認められなかったが、13週目以降は上昇した。一方、iNOSおよびCOX2の発現は、全CNT投与群のマクロファージや好中球において上昇していた。SWCNT投与群では有意な8-NG陽性細胞が観察され、強い炎症を伴う8-NGの形成が誘導された。また、同群では肺上皮細胞においてiNOSの発現上昇が認められた。全CNT投与群においてNFκBの活性化が認められ、細胞増殖との関連が示唆された。したがって、肺上皮細胞における8-NGの形成が、SWCNTの肺発がん性に関与していると考えられる。

実験3では、CNHとCNB(1mg/rat)において8-OHdG形成レベルの増加が認められたが、8-NGレベルの有意な上昇は見られなかった。また、MWCNT-7投与群の8-OHdG/8-NG形成レベルの上昇と比較して、CNH/CNB投与群のレベルは有意に低く、強い変化は観察されなかった。今後、CNH/CNBとSWCNT、MWCNTの発がん性とそのメカニズムについてさらなる検討が必要である。

E. 結論

F344ラットに対するMWCNT-7およびMWCNT-Nの投与群では、肺胞上皮細胞において、核DNAの8-OHdG形成レベルの強い上昇とともに、NFκB、p38/Rac1、Nrf2シグナル経路の活性化が認められた。また、SWCNT投与群では、ラット肺上皮細胞にて有意な8-NGの上昇を伴うNFκBの活性化が示された。これらCNT投与104週間後に発がんが見られたことから、その機序として、炎症細胞（マクロファージ、好中球）由来の活性酸素・窒素ラジカル（ROS/RNS）によるDNA損傷（8-OHdGおよび8-NGの形成）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. O Gi M., Suzuki S., Saleh D. M., Ahmed O. H. M., Alexander W. T., Fujioka M., Vachiraarunwong A., Guo R., Qiu G., Noura I., **Kakehashi A.**, Xie X. L., Tsuruoka S., Hirose A., Naiki-Ito A., Tsuda H., and Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials*, 15(23):1806, 2025.
2. **Kakehashi A.**, Suzuki S., Nishidoi Y., Hagihara A., Ikenaga H., Shiota M., Qiu G., Noura I., Kuwae Y., Vachiraarunwong A., Fujioka M., Gi M., Kawada N., and Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, 17(13):2212, 2025.
3. Suzuki S., Gi M., Yanagiba Y., Yoneda N., Uehara S., Yokota Y., Noura I., Fujioka M., Vachiraarunwong A., **Kakehashi A.**, Koda S., Suemizu H., and Wanibuchi H. (2025) Metabolism and effects of acetoaceto-otoluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*, 38:59-67, 2025.
4. Noura I., Suzuki S., Gi M., Fujioka M., Matsue T., **Kakehashi A.**, and Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*, 38(2): 147-154, 2025.
5. Fujioka M., Suzuki S., Gi M., Noura I., Vachiraarunwong A., **Kakehashi A.**, and Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*, 38(2):161-165, 2025.
6. Guo R., Gi M., Kiyono T., Vachiraarunwong A., Suzuki S., Fujioka M., Qiu G., Praseatsook K., Kawamura Y., **Kakehashi A.**, Noura I., Xie X., and Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*, 13(10):828, 2025.

2. 学会発表

1. 梯 アンナ、西土井 悠作、野浦 郁恵、邱 桂 鈺、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡 正 喜、魏 民、鰐淵 英機、鈴木 周五. 膀胱癌にお

- ける新規診断及び予後マーカーとして
 Peroxiredoxin 3 の検討. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-40、ウイנקあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
2. 藤岡 正喜、鈴木 周五、魏 民、ワシラアルンウオン アルパマス、野浦 郁恵、邱 桂鈺、河村 百合菜、大石 裕司、山口 貴嗣、梯 アンナ、鰐渕 英機有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による雄性仔 CD-1 マウスにおける肝発がん機序には DNA メチル化異常が関与する. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-42、ウイנקあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
 3. 河村 百合菜、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡 正喜、鈴木 周五、邱 桂鈺、郭 潤傑、野浦 郁恵、梯 アンナ、山口 貴嗣、鰐渕 英機、魏 民. 加熱タバコ製品 Ploom TECH+と 3R4F 標準タバコに 4 週間曝露したマウスの肺に対する毒性影響の比較分析. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-17、ウイנקあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
 4. 野浦 郁恵、鈴木 周五、魏 民、藤岡 正喜、松江 泰佑、梯 アンナ、鰐渕 英機. 加熱タバコ製品 Ploom TECH+と 3R4F 標準タバコに 4 週間曝露したマウスの肺に対する毒性影響の比較分析. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-16、ウイנקあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
 5. Vachiraarunwong, A., Fujioka, M., Suzuki, S., Guo, R., Qiu, G., Kawamura, Y., Noura, I., Kakehashi, A., Gi, M., Wanibuchi, H. Comparative evaluation of inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. 第 30 回ヒ素シンポジウム、演題 7、大阪公立大学大学院医学研究科 (2025 年 12 月 6~7 日).
 6. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について. 大阪、日本産業衛生学会第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2025 年 10 月 24~25 日)
 7. Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Guo, R., Qiu, G., Noura, I., Kawamura, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Comparative hepatotoxicity of carboxylate and sulfonate per- and polyfluoroalkyl substances in immortalized human hepatocytes. 大阪、日本産業衛生学会第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025 年 10 月 24~25 日)
 8. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、ワシラアルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるラット海馬に及ぼす影響. メタルバイオサイエンス研究会 2025、東京 (2025 年 10 月 22~23)
 9. Kakehashi, A., Nishidoi, Y., Noura, I., Qiu, G., Vachiraarunwong, A., Fujioka, M., Gi, M., Wanibuchi, H., Suzuki, S. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Diagnosis and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-3245, 金沢 (2025 年 9 月 25~27 日)
 10. Noura, I., Suzuki, S., Inoue, T., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Role of brain abundant membrane attached signal protein 1 (BASP1) in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung, 第 84 回日本癌学会学術総会、P-3316, 金沢 (2025 年 9 月 25~27 日)
 11. Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Guo, R., Qiu, G., Noura, I., Kawamura Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cell. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-2005, 金沢 (2025 年 9 月 25-27 日)
 12. Guo, R., Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Qiu, G., Kawamura, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Early Gene Expression Alterations in DMH-Induced Rat Colon Carcinogenesis. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-1009, 金沢 (2025 年 9 月 25-27 日)
 13. Fujioka, M., Suzuki, S., Gi, M., Vachiraarunwong, A., Guo, R., Kawamura, Y., Oishi, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Study of carcinogenesis by transplacental exposure to dimethylarsinic acid in F1 mice. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-1037, 金沢 (2025 年 9 月 25-27 日)
 14. Vachiraarunwong, A., Praseatsook, K., Wongpoomchai, R., Suzuki, S., Kakehashi, A., Fujioka, M., Wanibuchi, H., Yodkeree, S., Gi, M. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae. P-30, 名古屋市立大学桜山キャンパス (2025 年 9 月 12~13 日)
 15. 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五、ヒト浸潤性膵管癌における新規早期診断マーカーとしての PRDX3 の検討及び発がん機序解明. P-7, 名古屋市立大学桜山キャンパス (2025 年 9 月 12~13 日)
 16. 梯アンナ、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五. MAFLD/MASH 肝発がんマーカーや分子機序への最近の洞察. 第 38 回発癌病理研究会、演題 2, 国民宿舎サンライズ九十九里、千葉 (2025 年 8 月 20~22 日)
 17. Vachiraarunwong, A., 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂鈺、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、Praseatsook Kwanchanok、鰐渕 英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 in vitro 毒性試験系の開発. 宜野湾市、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月 2~4 日)
 18. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐渕英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん, Occupational bladder cancer associated with aromatic amines exposure. SY6-3, 第 114 回日本病理学会総会、宮城県 仙台市, 仙台国際センター (2025 年 4 月 17~19

日)

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

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7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および化学発癌物質誘発腫瘍モデルの作製

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

カーボンナノチューブ（CNT）の発がん機序を解明するため、CNT 誘発腫瘍と化学発癌物質誘発腫瘍を作製し、変異シグネチャーを比較した。F344 雄ラットに異なった DNA 障害をもたらすと考えられる 4 種類の発がん物質 MWCNT-N、MWCNT-B、DHPN、NNK を 4 週間 TIPS 投与し、2 年まで観察して発生した肺腫瘍および胸膜中皮腫を採取した。得られた腫瘍組織および同一個体の非腫瘍部組織は、病理組織学的に確認したうえで、DNA 抽出および変異シグネチャー解析に供した。解析の結果、CNT 誘発腫瘍では CNT 種に関連した SBS 変異シグネチャーの違いが認められた一方、明確なストランドバイアスは観察されなかった。また、CNT 誘発腫瘍に共通する明瞭な酸化ストレス由来の主要シグネチャーは認められなかった。これらの結果から、CNT 発がんは DHPN/NNK などの化学発癌物質による直接的 DNA 損傷を主因とする発がんとは異なる特徴を有する可能性が示された。

A. 研究目的

多層壁カーボンナノチューブ（MWCNT）は、肺および/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。それらは体内に入ると分解されることなく異物として長期に残留するため、沈着部位の組織に持続的な影響を及ぼし、腫瘍形成に関与すると考えられる。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。したがって、CNT 誘発腫瘍と化学発癌物質誘発腫瘍を比較・解析することにより、MWCNT の発がん機序の解明や、発がん予測法の開発に寄与できる。本研究では、MWCNT および化学発癌物質により誘発される肺腫瘍・胸膜中皮腫モデルを作製し、CNT 発がん機序の解析および予測法検討に用いる腫瘍・非腫瘍組織試料を整備することを目的とした。

B. 研究方法

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）を経気管内肺内噴霧（TIPS）投与し、比較対照として既知の肺発がんニトロサミン N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を 4000mg/kg および環境タバコ煙発癌物質 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) を 200mg/kg となるように週 1 回にて 4 週間（計 4 回）投与し（図 1）、生体内での動態、代謝機序の全く異なった物質による肺発がん機序の差異の有無について、発生した肺がんの DNA シグネチャー解析を実施した。

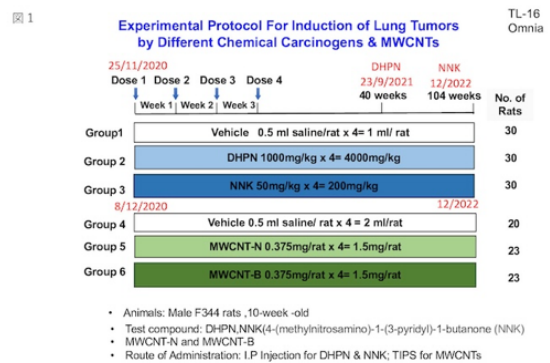


図 1. CNT および化学発癌物質による肺腫瘍・胸膜中皮腫誘発実験プロトコル

	Rat number	Pathologic diagnosis (tube labelling)	Control tissue (tube labelling)
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)

表 1. 変異シグネチャー解析対象とした肺腫瘍・中皮腫サンプル

(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

本分担研究では、MWCNT-N、MWCNT-B、DHPNおよびNNKを投与したラットを2年まで観察し、発生した肺腫瘍および胸膜中皮腫を採取した。得られた腫瘍組織および同一個体の非腫瘍部組織は、病理組織学的に確認したうえで、DNA抽出および変異シグネチャー解析に供した。解析対象とした肺腫瘍・中皮腫サンプルの概要(津田担当分)を表1に示す。

化学発癌物質投与群では、DHPN投与群から肺腺癌、扁平上皮癌検体が、NNK投与群からは肺腺癌が得られた。CNT投与群では、MWCNT-N投与群から中皮腫、肺腺癌が、MWCNT-B投与群からは肺腺癌が得られた。

班全体で得られたCNT誘発腫瘍を含む一塩基置換(SBS)変異シグネチャー解析では、複数のラットSBSシグネチャーが抽出された。これらのシグネチャーはCNT誘発腫瘍に共通して検出されたが、その寄与割合はCNT種により異なっていた。SWCNT関連腫瘍、MWCNT-7関連腫瘍、MWCNT-N関連腫瘍では、それぞれ優位となるSBSシグネチャーが異なる傾向を示し、肺腺癌と胸膜中皮腫という組織型の違いよりも、誘発に用いたCNT種との関連が強い傾向が認められた。

当初、CNTは生体内に長期残留し、慢性炎症や酸化ストレスを介して発がんに関与する可能性が想定されたため、酸化ストレスに直接対応する変異シグネチャーが主要な特徴として抽出されるかを検討した。しかし、CNT誘発腫瘍に共通する明瞭な酸化ストレス由来の主要シグネチャーは認められなかった。一方、MWCNT-7関連シグネチャーでは酸化塩基修復や細胞増殖・内因性DNA損傷と関連し得る成分が含まれ、SWCNT関連シグネチャーでは8-NG形成に伴う塩基置換と整合し得る変異傾向がみられた。

また、CNT誘発腫瘍で観察された変異シグネチャーには明確なストランドバイアスは認められなかった。

D. 考察

本分担研究では、MWCNT および化学発癌物質により誘発された肺腫瘍・胸膜中皮腫を採取し、変異シグネチャー解析に供する腫瘍・非腫瘍組織試料として用いた。これにより、CNT 誘発腫瘍と、DHPN および NNK に代表される化学発癌物質誘発腫瘍を比較するための動物実験基盤が得られた。

SBS 変異シグネチャー解析では、CNT 誘発腫瘍において、肺腺癌と胸膜中皮腫という組織型の違いよりも、誘発に用いた CNT 種との関連が強い傾向が認められた。このことは、CNT の物性や形状の違いが、腫瘍の発生部位だけでなく、腫瘍形成過程における DNA 損傷応答や炎症性微小環境の違いにも反映される可能性を示している。

一方、CNT 誘発腫瘍に共通する明瞭な酸化ストレス由来の主要シグネチャーは認められなかった。この結果は、酸化ストレスや炎症が CNT 発がんに関与しないことを意味するものではない。腫瘍組織で検出される変異シグネチャーは、腫瘍形成過程を経て残存した最終的なゲノム変化を反映するため、投与後早期に生じる炎症、酸化・炎症関連 DNA 損傷、細胞増殖、組織傷害・修復反応が、単一の明瞭な酸化ストレス由来シグネチャーとして検出されない可能性がある。したがって、CNT 発がん機序を理解するためには、腫瘍組織の変異シグネチャー解析に加え、投与後早期の非腫瘍組織における病理学的変化、DNA 損傷指標、炎症性遺伝子発現を統合して評価する必要があると考えられる。

また、CNT 誘発腫瘍では明確なストランドバイアスが認められなかったことから、DHPN や NNK のように DNA 付加体形成を介する直接的遺伝毒性を主因とする発がんとは異なる機序が関与すると考えられた。すなわち、CNT 発がんでは、沈着部位における長期残留、異物応答、炎症の持続化、DNA 損傷応答、組織傷害・修復反応の反復などが、腫瘍形成に関与している可能性がある。以上の結果は、腫瘍組織を用いた変異シグネチャー解析が、CNT 発がん機序を理解するための有用な手がかりとなることを示している。さらに、得られた知見を投与後早期の非腫瘍組織における DNA 損傷、炎症性応答、細胞増殖および遺伝子発現変化の解析と組み合わせることで、腫瘍発生前段階における発がん機序の推定や、有害性予測指標の検討に応用できる可能性がある。

E. 結論

本分担研究では、MWCNT および化学発癌物質により誘発される肺腫瘍・胸膜中皮腫を作製し、変異シグネチャー解析に供する腫瘍・非腫瘍組織試料として用いた。CNT 誘発腫瘍では、CNT 種に関連した SBS 変異シグネチャーの違いが認められた一方、明確なストランドバイアスは観察されなかった。これらの結果から、CNT 発がんは DHPN/NNK などの化学発癌物質による直接的 DNA 損傷を主因とする発がんとは異なる特徴を有する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ahmed HM Omnia, Naiki-Ito A., Takahashi S., Alexander TW., Alexander DB., **Tsuda H.** A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung, *Nanomaterials* 15, 168 (2025) <https://doi.org/10.3390/nano15030168>.
2. Ahmed HM Omnia, Dina M. Saleh., Alexander TW., Takase H., Taquahashi Y., Hojo M., Maeno A.,

- Fukamachi K., Gi M., Hirose A., Tsuruoka S., Takahashi S., **Tsuda H.**, Naiki-Ito A. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs, *Nanomaterials*, 2025, 15(18), 1402.
3. Dina M. Saleh., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Ogawa K., Gi M., Naiki-Ito A., Abdallah S., **Tsuda H.** Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *Journal of Applied Toxicology*, 2025; 0:1–14
 4. Gi M., Suzuki S., Dina M. Saleh., Ahmed HM Omnia, Alexander TW., Fujioka M., Vachiraarunwong A., Guo R., Qiu G., Noura I., Kakehashi A., Xie XL, Tsuruoka S., Hirose A., Naiki-Ito A., **Tsuda H.**, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct

Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials* 2025, 15(23), 1806.

2. 学会発表

1. Ahmed HM Omnia., Naiki-Ito A., Alexander DB., Takahashi S., **Tsuda H.** Comparative analysis of early pulmonary gene expression changes induced by carbon nanotubes and chemical carcinogens in rat lungs (第 42 回日本毒性病理学会学術集会 令和 8 年 1 月 21-22 日 名古屋)

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
Shimizu N, Naiki T, <u>Naiki-Ito A (Corresponding)</u> , Sugiyama Y, Nagai T, Etani T, Morikawa T, Gonda M, Aoki M, Ishikawa D, Umemoto Y, Takahashi S, Yasui T.	Establishment of a Patient - Derived Xenograft Model of a Testicular Yolk Sac Tumor.	Pathol Int.		in press	
Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Nourou I, <u>Kakehashi A</u> , Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, <u>Naiki-Ito A</u> , <u>Tsuda H</u> , Wanibuchi H.	Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways.	Nanomaterials (Basel)	15 (23)	1806	2025
Kawamura H, <u>Naiki-Ito A (Corresponding)</u> , Kuang X, Murakami A, Komura M, Suzuki T, Kato H, Nagayasu Y, Matsuura K, Fujiwara K, Kataoka H, Takahashi S.	Sacubitril/Valsartan Attenuates Inflammation and Fibrosis Associated With Decreased Integrin $\alpha 8$ and Inhibits Hepatocarcinogenesis in a Rat Model of Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis.	Hepatol Res.		in press	2025
Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, <u>Naiki-Ito A</u> , Abdallah S, <u>Tsuda H</u> .	Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment.	J Appl Toxicol.		in press	2025

Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Takahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukumachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, <u>Tsuda H, Naiki-Ito A (Corresponding)</u> .	Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs.	Nanomaterials (Basel)	15 (18)	1402	2025
Odagiri K, Mimura Y, Naiki T, Tasaki Y, Sugiyama Y, <u>Naiki-Ito A</u> , Etani T, Nagai T, Morikawa T, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Yasui T, Furukawa-Hibi Y.	Efficacy and safety of anamorelin in patients with metastatic urothelial carcinoma receiving systemic chemotherapy: a randomized controlled study.	Oncologist	30(7)	oyaf167	2025
Kuang X, <u>Naiki-Ito A (Corresponding)</u> , Kawamura H, Murakami A, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Takahashi S.	Hepatic stellate cell inhibition by angiotensin II receptor blocker mitigates liver injury and fibrosis via NF- κ B-galectin-3 suppression in a rat nonalcoholic steatohepatitis model.	Arch Toxicol.	99(8)	3393-3412	2025
Naiki T, <u>Naiki-Ito A (Corresponding)</u> , Murakami A, Kato H, Sugiyama Y, Kawai T, Kato S, Etani T, Nagai T, Shimizu N, Morikawa T, Aoki M, Gonda M, Kuang X, Nagayasu Y, Hamamoto S, Yasui T, Takahashi S.	Preliminary Evidence on Safety and Clinical Efficacy of Lutetol for Patients With Prostate Cancer Under Active Surveillance.	Prostate Cancer	2025	8165686	2025
Ahmed OHM, <u>Naiki-Ito A</u> , Takahashi S, Alexander WB, <u>Tsuda H</u> .	A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung.	Nanomaterials (Basel)	15(3)	168	2025
Yanase T, Naiki T, <u>Naiki-Ito A</u> , Okawa R, Niwa S, Shimizu N, Hamamoto S, Fujii Y, Takahashi H, Yasui T.	Efficacy of prostatectomy using a Retzius-sparing approach as an additional excision in a anal canal carcinoma after brachytherapy for prostate adenocarcinoma.	IJU Case Rep.	8(2)	174-178	2025

<u>Naiki-Ito A.</u> , Naiki T, Takahashi S.	Exploring experimental models of prostate cancer in chemoprevention: Oxidative stress as a key pathway to translational research.	Pathol Int.	75(3)	131-144	2025
Matsumoto D, Naiki T, <u>Naiki-Ito A.</u> , Aoki M, Kato S, Morikawa T, Shimizu N, Gonda M, Umemoto Y, Yasui T.	Efficacy of pembrolizumab plus lenvatinib as first-line treatment for metastatic renal cell carcinoma with multiple brain metastases.	IJU Case Rep.	8(1)	5-9	2025
Isobe T, Naiki T, Sugiyama Y, <u>Naiki-Ito A.</u> , Nagai T, Etani T, Iida K, Noda Y, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Morikawa T, Banno R, Kubota H, Ando R, Kawai N, Yasui T.	Experience and prognostic analysis with avelumab switch maintenance treatment in metastatic urothelial carcinoma.	Oncology	17	1-11	2025
Ishigamori R., Ohno A., Fukuhara K., Hasegawa S., <u>Totsuka Y.</u>	Genotoxicity Assessment of Mesoporous Silica and Graphene Oxide in GDL1 Cells	Genes & Environ.		In press	2025
Betsuyaku Y., Motohashi M., Sassa A., Takamura-Enya T., <u>Totsuka Y.</u>	Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde	Biomolecules	15(6)	878	2025
<u>Kakehashi A.</u> , Suzuki S., Nishidoi Y., Hagihara A., Ikenaga H., Shiota M., Qiu G., Noura I., Kuwae Y., Vachiraarunwong A., Fujioka M., Gi M., Kawada N., and Wanibuchi H.	The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.	Cancers	17(13)	2212	2025
Suzuki S., Gi M., Yanagiba Y., Yoneda N., Uehara S., Yokota Y., Noura I., Fujioka M., Vachiraarunwong A., <u>Kakehashi A.</u> , Koeda S., Suemizu H., and Wanibuchi H.	Metabolism and effects of acetaminophen and o-aceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice.	J Toxicol Pathol.	38	59-67	2025

Noura I., Suzuki S., Gi M., Fujioka M., Matsue T., <u>Kakehashi A.</u> , and Wanibuchi H.	Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes.	J Toxicol Pathol	38(2)	147-154	2025
Fujioka M., Suzuki S., Gi M., Noura I., Vachiraarunwong, A., <u>Kakehashi A.</u> , and Wanibuchi, H.	Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats.	J Toxicol Pathol.	38(2)	161-165	2025
Guo R., Gi M., Kiyono T., Vachiraarunwong A., Suzuki S., Fujioka M., Qiu G., Prasatsook, K., Kawamura, Y., <u>Kakehashi A.</u> , Noura I., Xie X., and Wanibuchi, H.	Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals.	Toxics	13 (10)	828	2025

令和 8 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 7 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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ ☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ ☒	☐		☐
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	☒ ☐	☒	名古屋市立大学	☐
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：)	☐ ☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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8年 4月 16日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職 名 学 長

氏 名 牛島 俊和

次の職員の令和7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) 薬学部・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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 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7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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 8 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 7 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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☒ 有 ☐ 無	☒	名古屋市立大学	☐
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：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関における C O I の管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由：)
当研究機関における C O I 委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関：)
当研究に係る C O I についての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由：)
当研究に係る C O I についての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (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。