

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

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

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

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授

### 研究要旨

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

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

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

### A. 研究目的

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

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

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

### B. 研究方法

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

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

それぞれ合計投与量が0.1あるいは0.5mg/ラットとなるように8回TIPS投与する。対照群として、無処置およびPFポリマー液投与(対照)群を設ける。以後無処置にて、投与終了後4週、13週、52週、および104週に剖検する。4週、13週は高用量のみで、以降の52週および104週は低と高用量を観察する(1物質77匹:4週(10匹)、13週(7匹)、52週(10匹×2)、104週(20匹×2))。剖検時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取し、遠心分離して炎症細胞やタンパク質(総タンパク、アルブミン)解析に供する。イソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺して、肺の急性病変と発がんについて解析する。右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドを気管より注入し、パラフィン包埋を用いて、マクロファージ(M $\phi$ )局在(抗CD68抗体、BIO-RAD)、増殖活性(抗Ki67抗体、Abcam)、DNA損傷(抗 $\gamma$ H2AX抗体、CST)の程度について免疫組織学的に解析する。右肺の一部から1-2mm角の組織片を切り出し、2%グルタルアルデヒドで固定し、透過電子顕微鏡(TEM)によるCNT観察に用いる。52週以降では、肺及び胸膜中皮の腫瘍性病変についても定量解析する。左肺は凍結し、RNA抽出(ISOGEN、ニッポンジーン)と定量的RT-PCRによりCCL種、IL種等の炎症性サイトカイン発現を定量する。さらにNGSを用いたRNAシーケンシング解析(マクロジェン)に用いる。CNTにより変化するトランスクリプトームについて、GO解析、パスウェイ解析を行う。

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

### 1. M $\phi$ 細胞における毒性解析

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

### 2. 肺オルガノイドにおける毒性解析

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

(倫理面の配慮)

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

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

## C. 研究結果

### (1) *In vivo* 実験: CNTによる肺・中皮有害性の解析

#### (1)-1. CNTによる臓器重量の変化

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

#### (1)-2. CNTのTIPS投与による肺胞M $\phi$ 誘導と沈着

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

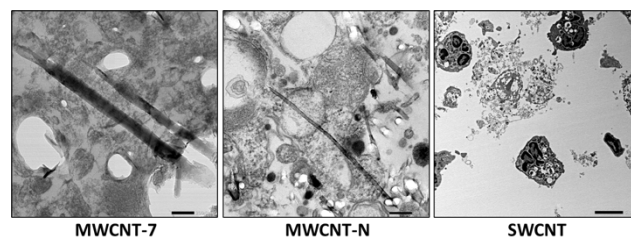


図1. 肺胞M $\phi$ によるCNTの食食(TEM像)。

#### (1)-3. CNTによる肺有害性の解析

52週において、増殖活性、DNA損傷と酸化的DNA損傷について定量解析を行った。比較のために4週の結果とともに提示する。肺胞上皮細胞におけるKi67、 $\gamma$ H2AX標識率と8-OHdG陽性細胞率は、対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群のいずれの用量においても有意に上昇した。一方、SWCNTではいずれの用量においても明らかな変化は見られなかった(図2,3)。

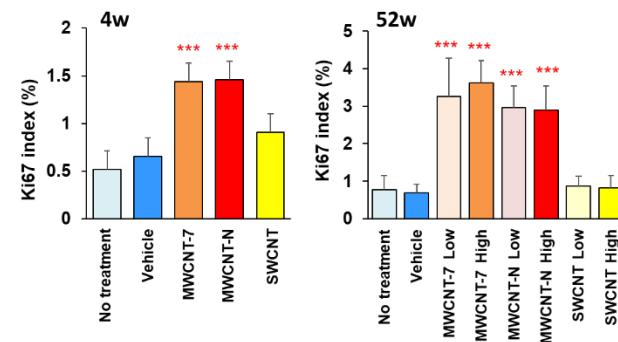


図2. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化(Ki67免疫染色)、\*\*\* $P < 0.001$  vs Vehicle.

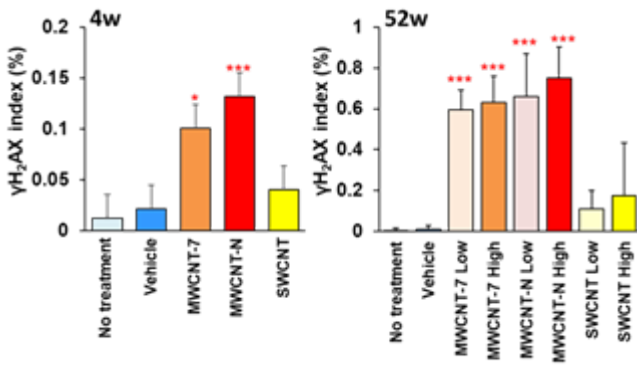


図3. CNT投与による肺胞上皮DNA障害の変化 (γH2AX免疫染色)、\*P < 0.05、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

(1)-4. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

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

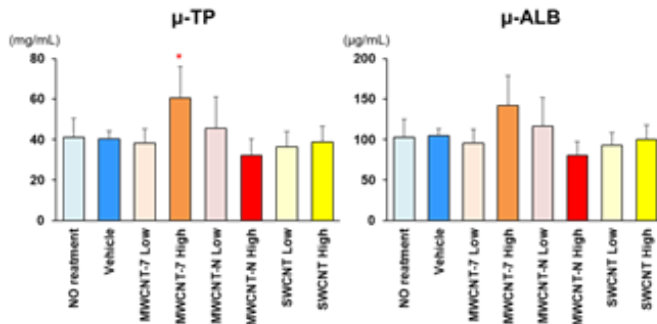


図4. CNT投与による胸腔洗浄液中総タンパクとアルブミン値の変化、\*P < 0.05 vs Vehicle.

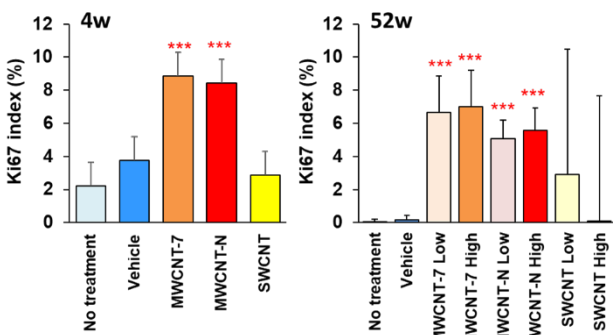


図5. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

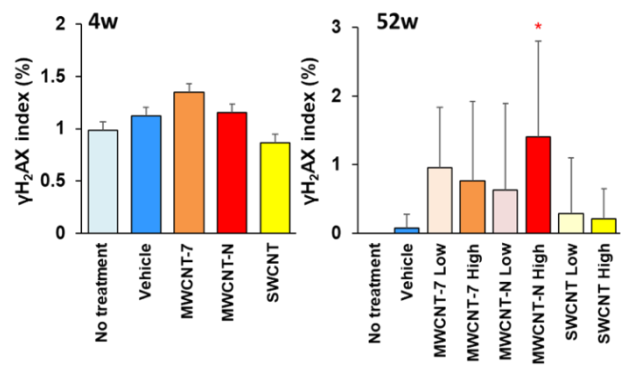


図6. CNT投与による心膜中皮細胞DNA障害の変化 (γH2AX免疫染色)、\*P < 0.05 vs Vehicle.

(1)-5. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量

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

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

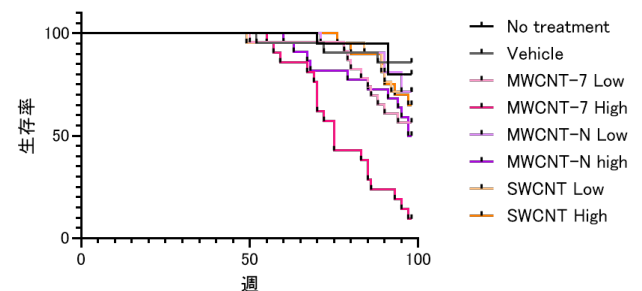


図7. CNT投与による生存率への影響。

(1)-6. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

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

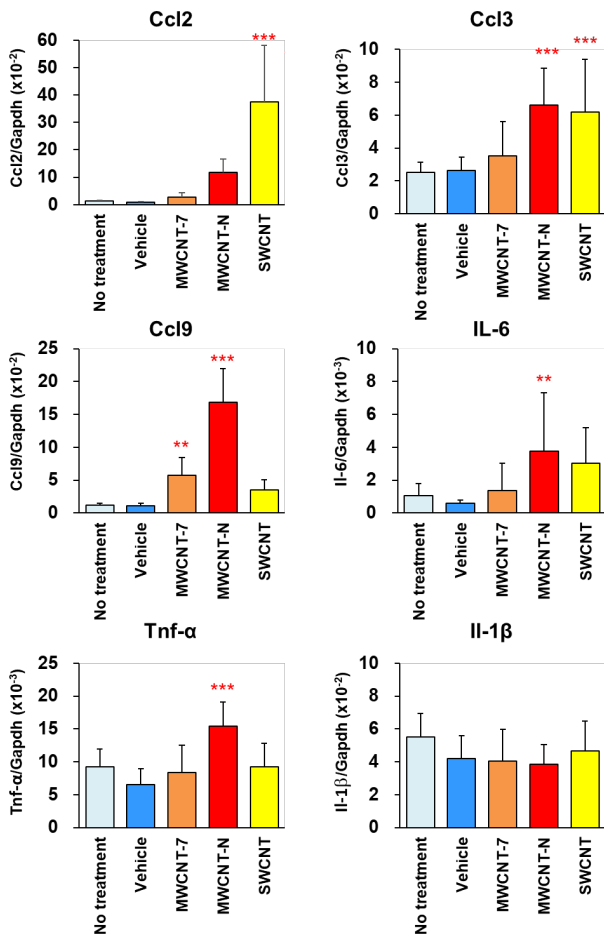


図8. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、52週（定量RT-PCR）、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

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

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

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

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

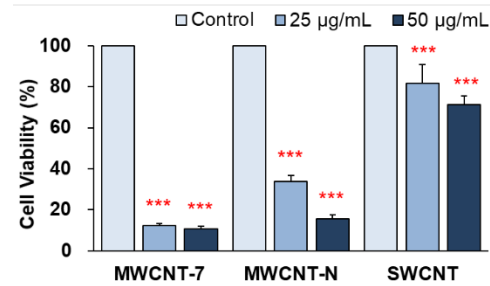


図9. CNT投与によるマウスMφ細胞RAW264.7の細胞生存率の変化（WST-1アッセイ）、\*\*\*P < 0.001 vs Control.

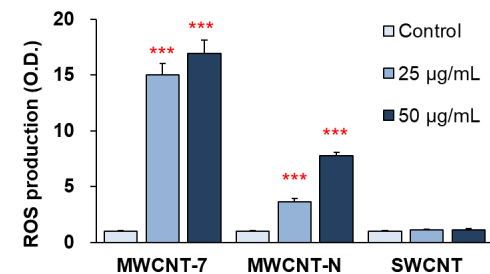


図10. CNT投与によるマウスMφ細胞（RAW264.7）のROS産生量の変化（DCF-DAアッセイ）、\*\*\*P < 0.001 vs Control.

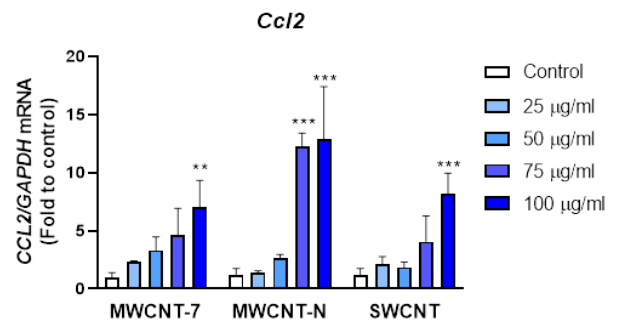


図11. CNT投与によるマウスMφ細胞（RAW264.7）の*Ccl2*発現の変化（DCF-DAアッセイ）、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Control.

### D. 考察

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

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

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

## E. 結論

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

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

### 2. 学会発表

1. **内木綾**、加藤寛之、**梯アンナ**、**津田洋幸**、高橋智

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

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

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。