

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

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

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

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

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

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

研究分担者

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

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に

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

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

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

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

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

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

1. Mφ細胞における毒性解析

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

2. 肺オルガノイドにおける毒性解析

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

や炎症性サイトカインのmRNA発現解析を行う(内木)。

(倫理面の配慮)

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

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

C. 研究結果

(1) *In vivo* 実験: CNTによる肺・中皮有害性の解析

(1)-1. CNTによる臓器重量の変化

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

(1)-2. CNTのTIPS投与による肺胞Mφ誘導と沈着

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

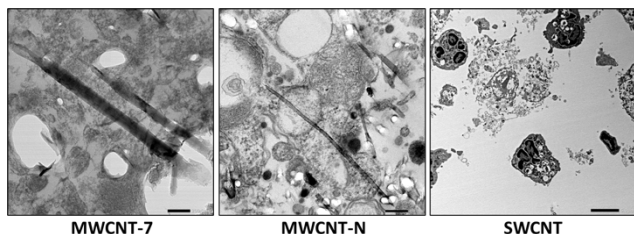


図1. 肺胞MφによるCNTの食食(TEM像)。

(1)-3. CNTによる肺有害性の解析

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

明らかな変化は見られなかった(図2-4)。

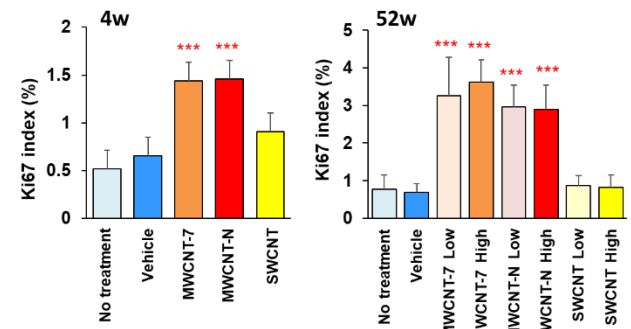


図2. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化(Ki67免疫染色)、***P<0.001 vs Vehicle.

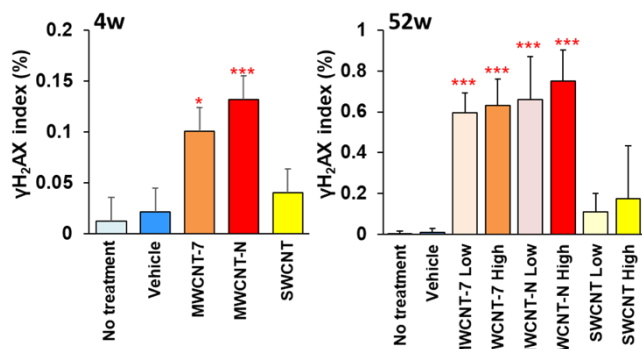


図3. CNT投与による肺胞上皮DNA障害の変化(γH2AX免疫染色)、*P<0.05、***P<0.001 vs Vehicle.

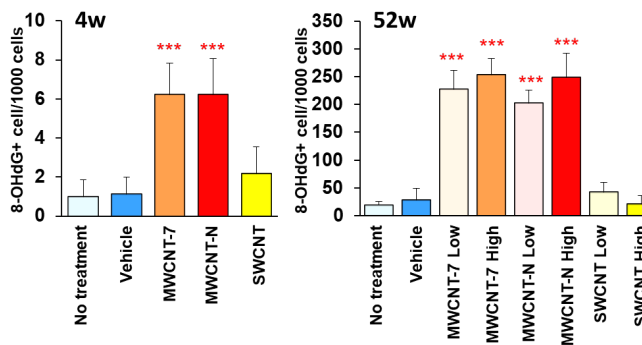


図4. CNT投与による肺胞上皮酸化的DNA損傷の変化(8-OHdG免疫染色)、***P<0.001 vs Vehicle.

(1)-4. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

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

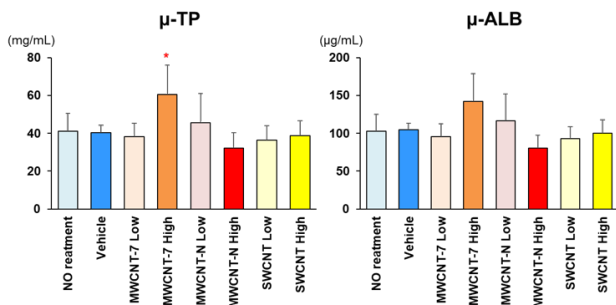


図5. CNT投与による胸腔洗浄液中総タンパクとアルブミン値の変化、*P < 0.05 vs Vehicle.

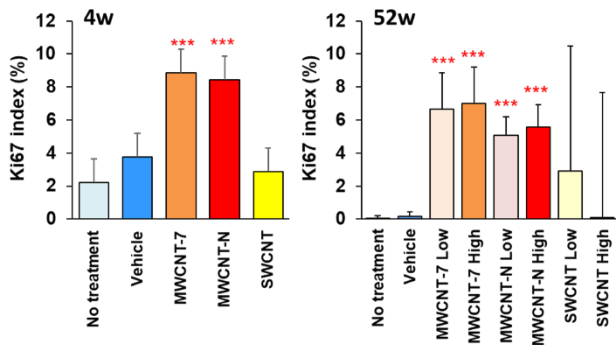


図6. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、***P < 0.001 vs Vehicle.

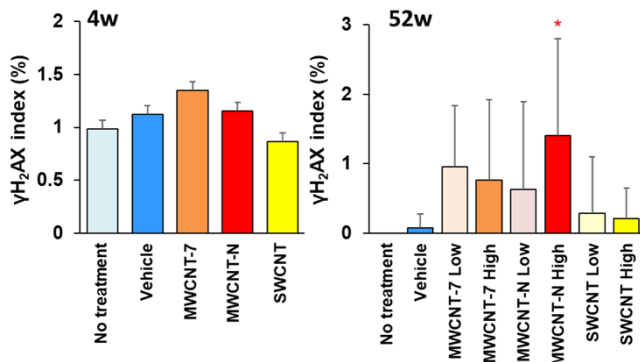


図7. CNT投与による心膜中皮細胞DNA障害の変化 (γH2AX免疫染色)、*P < 0.05 vs Vehicle.

(1)-5. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量

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

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

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

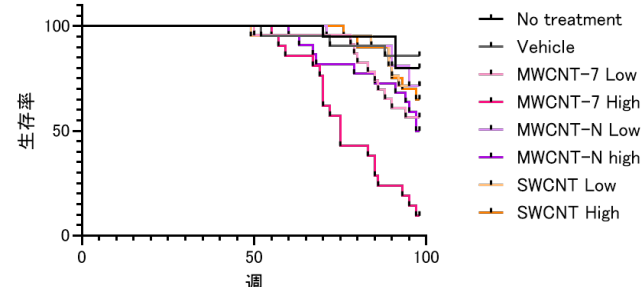


図8. CNT投与による生存率への影響.

(1)-6. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

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

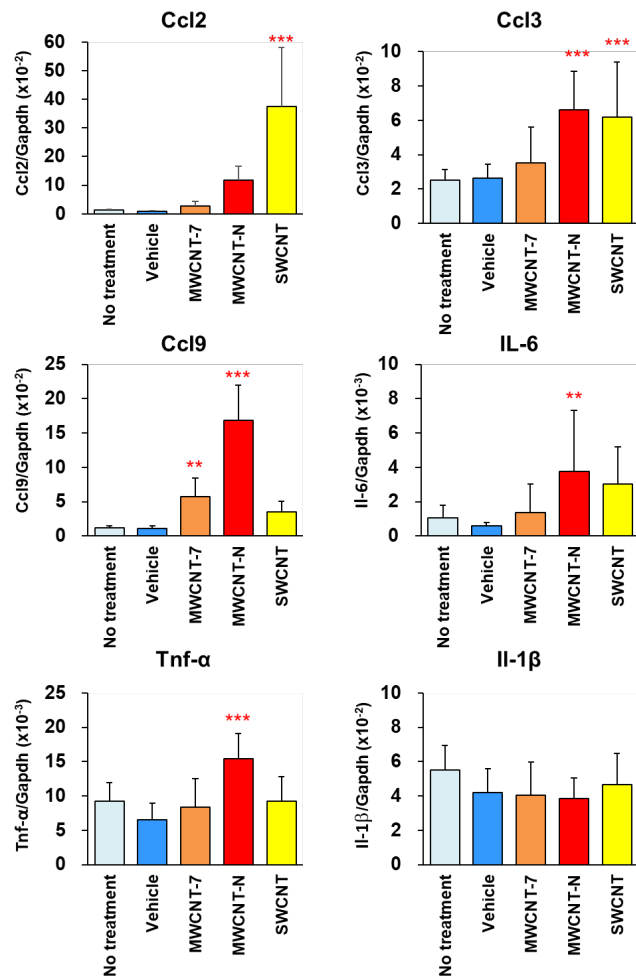


図9. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、52週 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs

Vehicle.

(1)-7. 肺における遺伝子発現解析

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

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

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

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

表1. 各サンプルに検出された変異数.

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

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

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



図10. MWCNT誘発中皮腫サンプルから同定された変異シグネチャー.

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

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

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

図11. 各変異シグネチャーの要因.

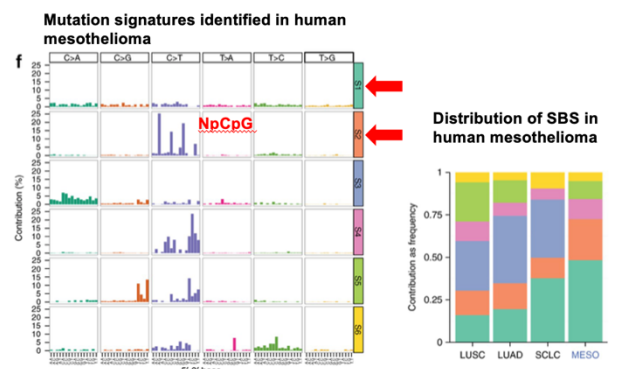


図12. ヒト中皮腫を含む肺がんを観察された変異シグネチャー.

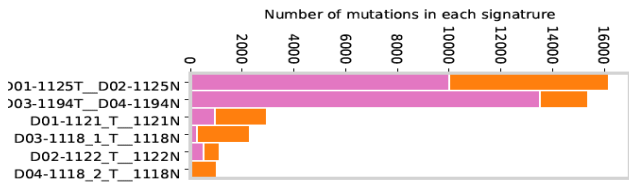


図13. ラット中皮腫サンプル内の各変異シグネチャーの分布。

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

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

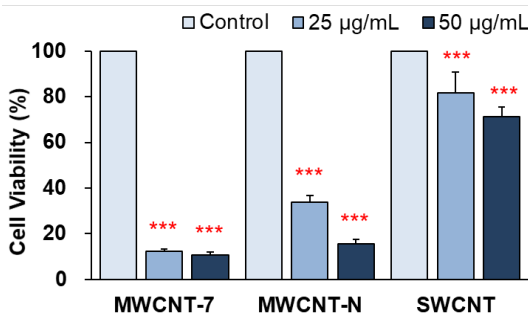


図14. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の細胞生存率の変化 (WST-1アッセイ)、***P < 0.001 vs Control.

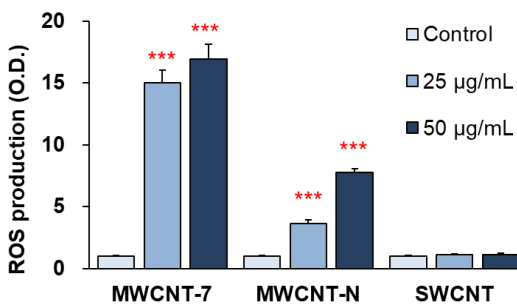


図15. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) のROS産生量の変化 (DCF-DAアッセイ)、***P < 0.001 vs Control.

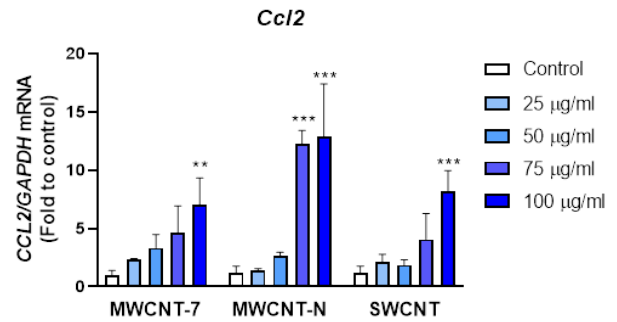


図16. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の*Ccl2*発現の変化 (定量RT-PCR)、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

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

D. 考察

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

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

発がん性を含めた有害性に関連することが示唆された。

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

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

江戸川区／ハイブリッド開催)

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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。