

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

分担研究課題名：カーボンナノチューブによる肺内酸化ストレス解析

研究分担者 梯 アンナ 大阪公立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

本研究ではナノマテリアルの肺発がん性メカニズムについて検討し、肺発がんに関与する因子および発がん性機序を解明することを目的としている。実験1ではF344雄性ラット200匹を用いて実験開始時よりFullerene (FL)、Fullerene whisker (FLW)、MWCNT-7、MWCNT-Nを0.25および0.5 mg/ratの濃度でTIPS法を用いて投与し、投与開始104週間後にDNAの酸化的損傷マーカー、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)形成レベルを調べた。実験2ではF344雄性ラット320匹を用いてMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTを0.25および0.5 mg/ratの濃度でTIPS法を用いて投与し、実験開始4、13および52週間後に8-OHdGおよび8-nitrosoguanosine (8-NG)形成レベルを測定した。実験1ではラット肺における免疫染色を用いた解析ではMWCNT-7およびMWCNT-N投与したラット肺の肺胞上皮細胞、過形成および気管支において8-OHdG形成レベルの有意な上昇が認められた。肺の凍結サンプルを用いたELISA法解析では8-OHdG形成レベルはMWCNT-Nの高用量群でのみ、有意に誘導されていた。実験2では肺胞上皮および気管支上皮細胞においてMWCNT-7およびMWCNT-Nを4、13および52週間投与後では8-OHdG形成レベルの有意な上昇が認められた。また、13週目から炎症関連DNA損傷マーカー、8-NGの誘導が見られた。一方、SWCNT投与したラット肺上皮細胞において8-OHdGの有意な増加が見られなかったが、4週目から8-NG形成レベルの有意な上昇とiNOS/NOSの誘導が見出された。F344ラット肺においてMWCNT-7およびMWCNT-N投与群において核DNA 8-OHdGおよび8-NG形成レベルの強い増加が認められ、その二つのCNTの発がん機序に酸化的ストレスや8-OHdG/8-NG形成の誘導およびp38、Rac1およびNrf2の活性化が関与していることが明らかになった。一方、SWCNT投与により肺上皮細胞DNAおよびRNAの8-NGの有意な上昇が、SWCNTの肺発がん性機序の一つであると考えられる。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

実験2. F344雄性ラット320匹を用いて実験開始時より、MWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTを0.5 mg/ratの濃度でTIPS法を用いて8回投与した。

1. ラット肺からのDNAの抽出

ラット左肺サンプル(300 mg)からのDNAの抽出は、以前に報告されている方法を少し改良して行なった。簡略に記載すると、核のDNAは、細胞内小器官を溶かすために抗酸化剤NaI液を含むDNA Extractor WB kit (和光純薬工業(株))を用いて抽出した。更に、細胞溶解の段階における自己酸化を防止するため、deferoxamine mesylate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)を細胞溶解剤に添加した。DNAは、nuclease P1 (ヤマサ醤油(株)、千葉)とアルカリフォスファターゼ (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)によりデオキシヌクレオチドに断片化し、8-OHdG形成レベルはELISA法により測定した。

2. 8-OHdG形成の測定 (ELISA法)

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

2. 免疫組織化学的 8-OHdG 検査

実験1では右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色ABC法を用いて8-OHdGの形成レベルを解析した。肺のパラフィンブロックを3 μ mに薄切した。

切片は内因性ペルオキシダーゼをブロックするため0.3%水素水で処理した。馬血清で背景染色をブロッキング処理後、切片は抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体(1:100、日本老化制御研究所製、静岡、日本)をかけて4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。免疫染色キット(VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて2次抗体以降を行い、DAB(3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Dojindo Laboratories, 株式会社, 熊本, 日本)およびヘマトキシリンによる対比染色を実施した。

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

4. 免疫組織化学的8-nitroguanosine (8-NG)検査

実験2では右肺はブ α ン(Bouin's solution)で固定し免疫染色ABC法を用いて8-NG形成レベルを調べた。切片はanti-8-NG rabbit polyclonal抗体(1:20, 10 μ g/ml)、KMU-P01, Cosmo Bio Co. LTD, 東京、日本)をかけて4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。

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

ラット肺4%緩衝パラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片について、ABC法による免疫組織化学染色を実施した。マイクロウェーブ照射による抗原賦活化(クエン酸バッファー pH6)および3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。一次抗体として、anti-p38(phospho T180+Y182, 1:100, ab4822, Abcam, 東京, 日本); anti-Nrf2(phospho S40)(1:100, ab76026, Abcam, 東京, 日本), anti-p62(SQSTM1)(1:300, PM045, MBL, 東京, 日本); anti-iNOS/NOS mouse 抗体(1:100, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 東京, 日本); anti-COX2(1:200, aa 584-598, No. 160126, Cayman Chemical, MI, USA); anti-GRP78(78-kDa glucose-regulated protein, 1:250, ab21685, Abcam, 東京, 日本); anti-PERK(phospho T982)(protein kinase R(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase)(1:100, ab192559, Abcam, 東京, 日本); anti-Rac1/cdc42(phospho S71)(1:100, #2461, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) rabbit polyclonal抗体, anti-oxoguanine glycosylase 1(Ogg1)(1:50, sc-12075, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) goat polyclonal抗体を用い、4 $^{\circ}$ Cにて一晩反応させた。

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

投与開始4週間後のMWCNT-7, MWCNT-N, SWCNTおよび対処群の凍結したラット肺凍結サンプル(12)を用いて、RNAシークエンシング解析(MacroGen Japan Corp., 日本)を行い、トランスクリプトームの変化を調べた。ラットの肺の凍結サンプルを用いた。

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

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

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

蛋白濃度測定後にウェスタンブロットを行った。方法は、回収した蛋白をポリアクリルアミドゲルにて分離後、メンブレンに転写し抗体と反応させ目的とする蛋白を検出した。ポリアクリルアミドゲルは目的の蛋白の分子量に応じた7~15%の分離ゲルに4.5%の濃縮ゲルを重ねたものを使用し、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、目的とするタンパクに結合する一次抗体と4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。一次抗体には、以下に記載した抗体を記載した希釈濃度で使用した。Rabbit anti-Nrf2 phospho S40(SAB5701902, Sigma-Aldrich, 1:1000); rabbit anti-p62(1:1000, ab91526, Abcam, 東京, 日本); anti-iNOS/NOS mouse 抗体(1:2000, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 東京, 日本); anti-HIF1 mouse 抗体(1:200, No. MAB1935, R and D Systems Biotechnology, 東京, 日本)。

8. 統計処理—試験実施施設

対照群と各投与群との間の統計学的な有意差検定を行い、危険率5%($P<0.05$)又は1%($P<0.01$)のレベルで判定した。統計学的解析は、8-OHdGや8-NG形成レベル平均値の差について、5%有意水準で

Bartlett 法による等分散検定を行い、等分散の場合は、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を、不等分散の場合は、ノンパラメトリックの Bartlett's 法による両側検定を行った。

C. 研究結果

1. 実験 1

1-1. ラット肺における8-OHdG形成 (ELISA法で測定)

DNA中における8-OHdG形成の分析結果を 図1 に示した。ラット肺より抽出したDNAにおける8-OHdGは、0.5 mg/rat MWCNT-N群においてのみ、対照群値と比較して統計学的に有意な増加がみられた。他のナノマテリアルの投与群では8-OHdG形成の上昇が見られなかった。

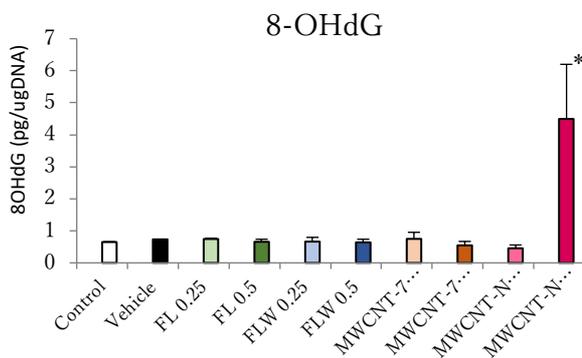


図1. ラット肺DNAの8-OHdG形成レベルの変更 (ELISA法)

1-2. ラット肺における8-OHdG形成レベル (免疫染色)

免疫染色を用いた解析結果を図2および3に示す。

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

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

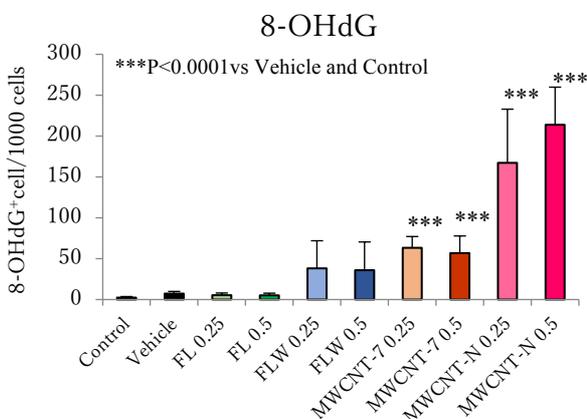


図2. 免疫染色で観察されたラット肺8-OHdG形成レベルの上昇

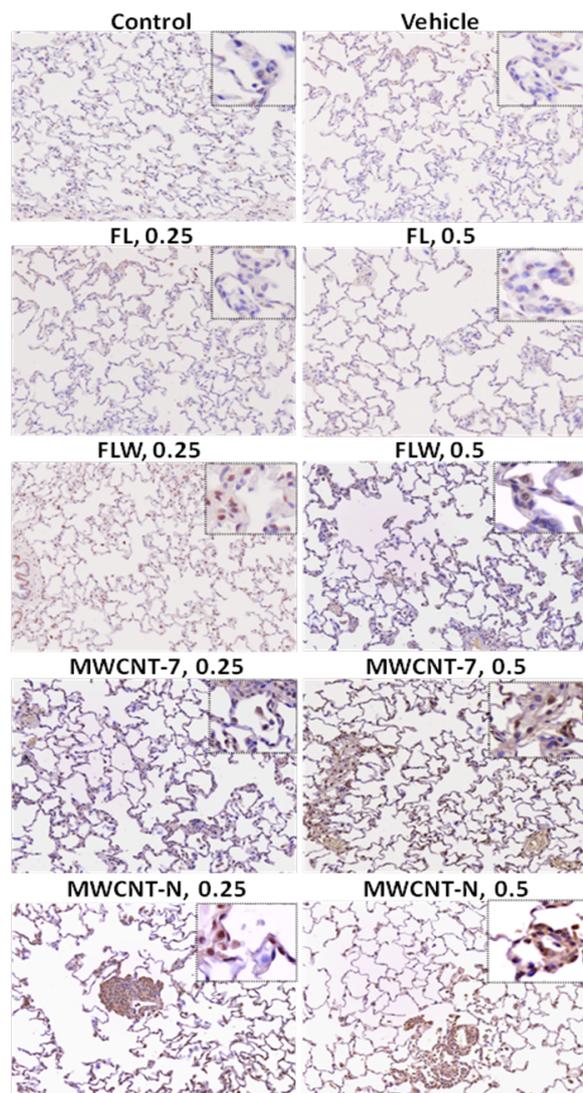


図3. 実験1における8-OHdG免疫染色の代表的な写真

2. 実験 2

2-1. ラット肺における8-OHdG形成レベル (免疫染色)

8-OHdG免疫染色を用いた解析結果を図4と図5に示す。0.5 mg/rat MWCNT-7およびMWCNT-N投与群のラット肺胞および気管支上皮細胞において、投与開始4、13および52週間後の8-OHdG陽性細胞数の有意な上昇が認められた (図4(A, B, C))。

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

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

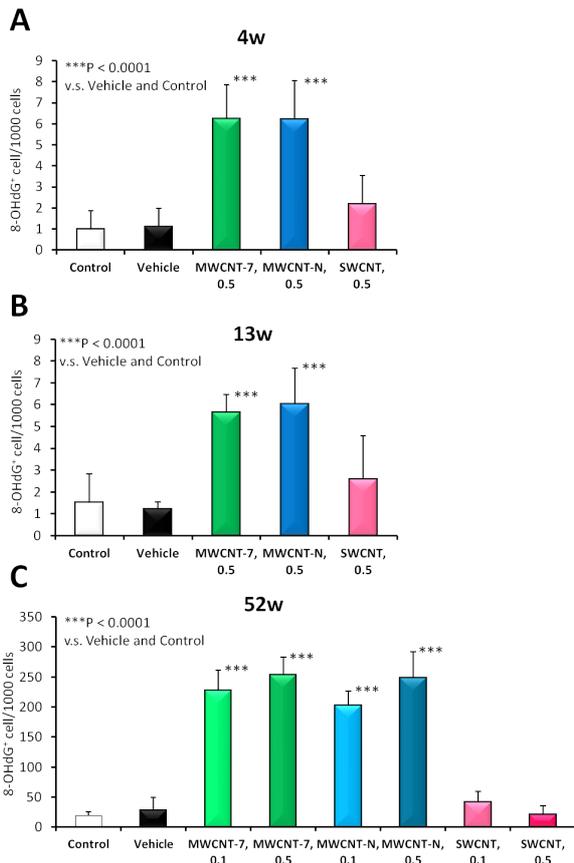


図4. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (A)、13週間 (B) および52週間後 (C) ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

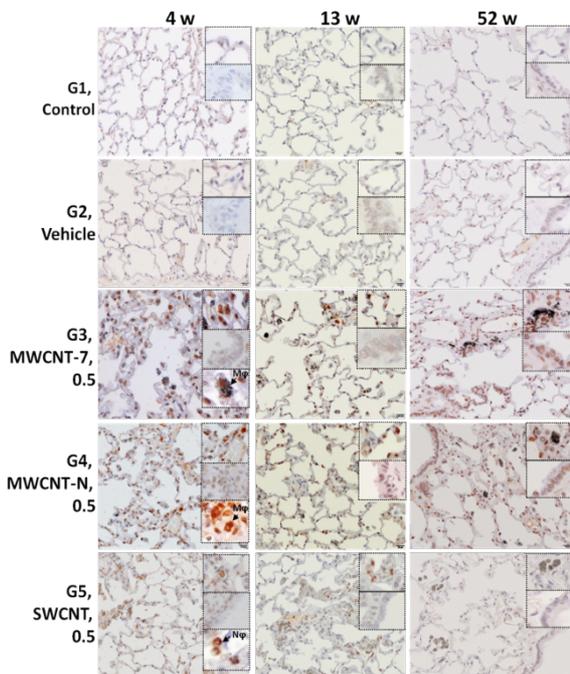


図5. 実験2における8-OHdG免疫染色の代表的な写真(4、13および52週間投与後)

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

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

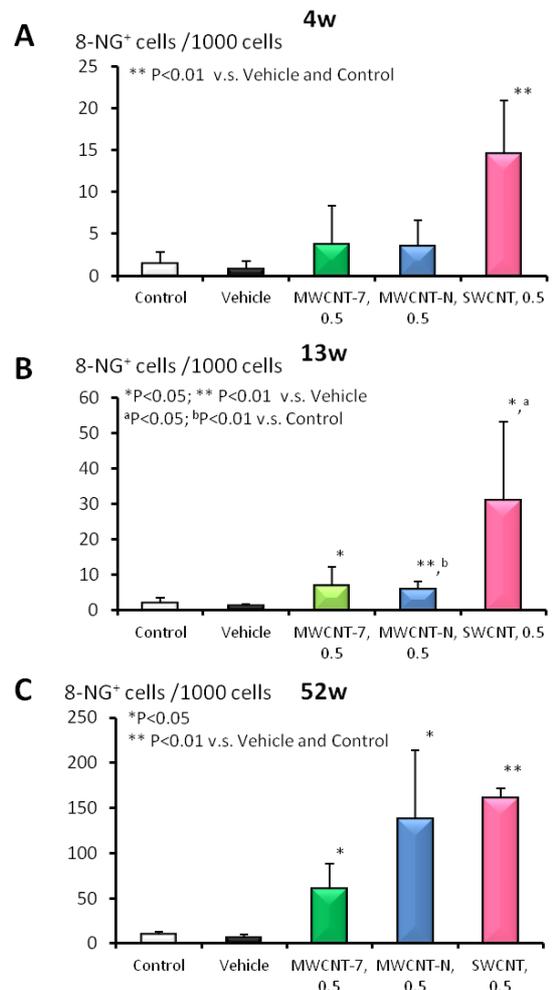


図6. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (A)、13週間 (B) および52週間後 (C) ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル

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

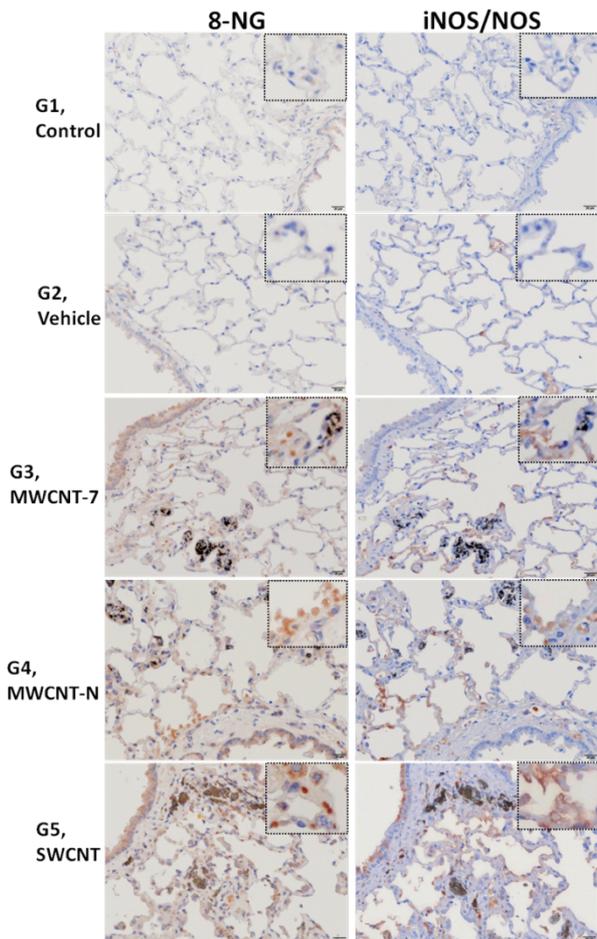


図7. 実験2における免疫染色で観察されたCNT投与の肺上皮細胞のDNAやRNAの8-NG形成レベルおよびiNOS/NOSの発現(52週間投与後)

2-3. RNAシーケンシング (RNA-Seq) および IPA によるシグナリング解析

実験2におけるナノマテリアル4週間投与後の肺組織のRNA-Seq解析し、IPAを用いてシグナリングパスウェー解析を行った。その結果、短期投与の場合には0.5 mg/rat MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群のみでは窒素および酸化ラジカルの産生、p38 および Racシグナリングの活性化が予測された。

RNA-Seq解析では0.5 mg/rat SWCNT短期投与後はMφによるフリーラジカルの誘導およびp38/Rac1の活性化が認められなかったが、オートファジーの活性化が予測された(表1)。

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

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

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

© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

2-4. ラット肺におけるP-p38、P-Rac1/Cdc42、P-Nrf2、p62、Ogg1およびCOX2の発現

実験2では0.5 mg/ratの量でMWCNT-7、MWCNT-N又はSWCNT 0.5mg/rat投与した群において、開始4および13週間後、ラット肺上皮細胞において8-OHdGの発現上昇とともに、細胞増殖マーカー(リン酸化p38(P-p38))およびリン酸化Rac1/cdc42(P-Rac1/cdc42)の高発現と酸化的ストレス・小胞体ストレスマーカー(p62)およびリン酸化(Ser40) Nrf2(P-Nrf2)の発現上昇が見られた(図8、9)。SWCNT短期や中期投与後、ラット肺上皮細胞においてP-p38、P-Nrf2の高い発現は見られなかったが、p62の発現が上昇していた(図9)。

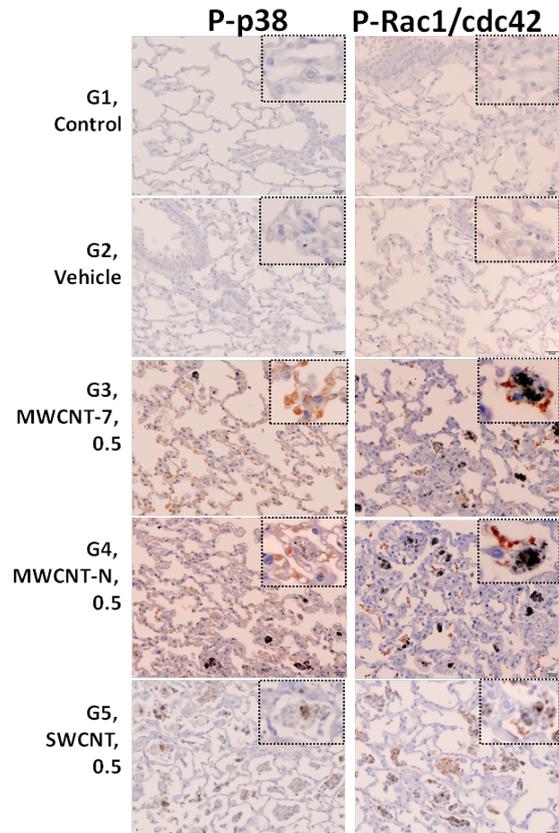


図8. 実験2におけるラット肺上皮細胞におけるP-p38およびP-Rac1/Cdc42の発現(4週間投与後)

また、Ogg1、P-PERKおよびGRP78の免疫染色を行い、全群のラット肺上皮細胞において染色が観察されて、CNTs群では対処群に比べて有意な変化が認められなかった。さらに、MWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNT投与後ラットの肺上皮細胞、Mφおよび好中球においてcyclooxygenase 2 (COX2)の高発現が観察された(図9)。

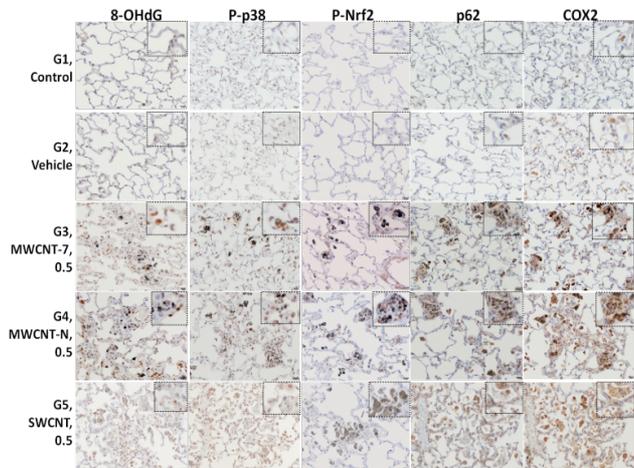


図9. 実験2における肺胞上皮細胞における8-OHdG, P-p38, P-Nrf2, p62およびCOX2の免疫染色の代表的な写真(13週間投与後)

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

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

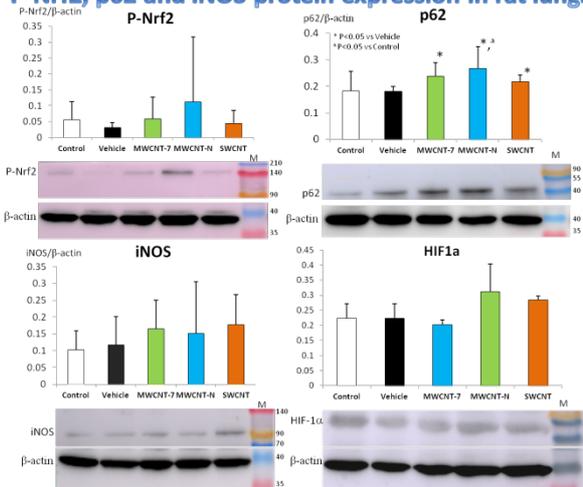


図10. 実験2におけるラット肺におけるP-Nrf2(S40)、p62、iNOS/NOSおよびHIF1αの発現(4週間投与後、n=5)

D. 考察

DNAとROS/RNS(活性酸素/窒素)の反応により形成される付加体である8-OHdGおよび8-NGは、酸化的/炎症的DNA損傷の良く知られたマーカーであり、多くの実

験モデルにおいて発がん性に関与していることが知られている。8-OHdG/8-NGは、突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となっている。組織中における実際の8-OHdGレベルは、ROSの産生とその修復の比率の変化により決定される。

実験1では、0.25および0.5 mg/ratの量でMWCNT-7又はMWCNT-Nを投与した群では、投与104週間後に肺腺がんの有意な発生が認められており、肺胞および気管支上皮DNA中における8-OHdG蓄積に関連していると考えられる。また、実験2では0.5 mg/ratの量でMWCNT-7又はMWCNT-N投与した群において、開始4、13および52週間後の8-OHdG陽性肺胞上皮細胞が増加するとともに、多くの8-OHdG陽性Mφ数の上昇が認められたことから、肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生とDNA損傷は、Mφの増加によるROS放出の誘導と関連していることが考えられる。肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生とDNA損傷(8-OHdG)は、Mφの増加によるROS放出の誘導と関連していることが考えられる。

実験2で観察されたMWCNT-7又はMWCNT-N投与後のラット肺上皮細胞の酸化的ストレス・小胞体ストレスおよび細胞増殖マーカーP-Nrf2、p62、P-p38およびP-Rac1/cdc42の誘導が8-OHdG形成レベルと相関し、高い値が見られた。SWCNTの短期投与後での場合はp38およびP-Rac1の有意な活性化が認められなかった。一方、iNOS/NOSおよびCOX2の発現が全CNT投与群のMφや好中球において上昇していた。

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Vachiraunwong A, Gi M, Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, **Kakehashi A**, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arc of Toxicol.* 2024, ahead of print.
2. Tagami M, Kasashima H, **Kakehashi A**, Yoshikawa A, Nishio M, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Yashiro

- M, Azumi A, Honda S. Stromal area differences with epithelial-mesenchymal transition gene changes in conjunctival and orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Front Oncol.* 14:1277749, 2024.
3. **Kakehashi A**, Suzuki S, Wanibuchi H. Recent Insights into the Biomarkers, Molecular Targets and Mechanisms of Non-Alcoholic Steatohepatitis- Driven Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*, 15:4566, 2023.
 4. Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, **Kakehashi A**, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 15:5274, 2023.
 5. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, **Kakehashi A**, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 14:36, 2023.
 6. Suzuki S, Gi M, Fujioka M, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicol Lett.* 384:128-135, 2023.
 7. Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, **Kakehashi A**, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology*. 488:153483, 2023.
 8. Nota T, Kageyama K, Yamamoto A, **Kakehashi A**, Yonezawa H, Jogo A, Sohawa E, Murai K, Ogawa S, Miki Y. Safety and Feasibility of Contrast-Enhanced Computed Tomography with a Nanoparticle Contrast Agent for Evaluation of Diethylnitrosamine-Induced Liver Tumors in a Rat Model. *Acad Radiol.* 30:30-39, 2023.
- ## 2. 学会発表
1. **梯アンナ**, 西土井悠作, Qiu Guiyu, 鈴木周五, 藤岡正喜, 魏民, 鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の解明, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 2. Qiu Guiyu, 魏民, 藤岡正喜, 鈴木周五, **梯アンナ**, 山本与毅, 野浦郁恵, ワチラアルンウオン アルパマス, 郭潤傑, 鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸 (DPAA) のラット妊娠期及び授乳期ばく露による次世代に対する発達神経毒性の検討, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 3. 魏民, 山本与毅, 鈴木周五, 藤岡正喜, ワチラアルンウオン アルパマス, 郭潤傑, Guiyu Qiu, **梯アンナ**, 鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱癌における DNA メチル化異常, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 4. 郭潤傑, 魏民, ワチラアルンウオン アルパマス, 藤岡正喜, 鈴木周五, Guiyu Qiu, 山本与毅, **梯アンナ**, 鰐淵英機. 不死化ヒト膀胱上皮細胞を用いた三次元膀胱培養モデルの確立及びそれを用いたヒ素毒性評価, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 5. 藤岡正喜, 魏民, 鈴木周五, 大石裕司, ワチラアルンウオン アルパマス, 邱桂ギョク, 芝野佳奈, **梯アンナ**, 鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸の経胎盤曝露による F1 マウス肝発がん機序には DNA メチル化異常が関与する, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 6. ワチラアルンウオン アルパマス, 魏民, 藤岡正喜, 鈴木周五, Qiu Guiyu, 郭潤傑, **梯アンナ**, 鰐淵英機. Toxicological Assessment of Dimethylarsinic Acid Using Humanized Liver Mice Model, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 7. 野浦郁恵, 鈴木周五, **梯アンナ**, 魏民, 藤岡正喜, ワチラアルンウオン アルパマス, 井上健, 鰐淵英機. 肺大細胞神経内分泌癌の新規バイオマーカー候補の検討, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 8. 鈴木周五, 魏民, 藤岡正喜, Qiu Guiyu, Vachiraarunwon Arpamas, **梯アンナ**, 鰐淵英機. NADPH 酸化酵素阻害剤 apocynin による o-toluidine 誘発ラット膀胱増殖性病変への抑制効果, 第 113 回日本病理学会総会 (2024 年 3 月, 名古屋)
 9. 藤岡正喜, 魏民, 鈴木周五, 大石裕司, **梯アンナ**, 鰐淵英機. Diphenylarsinic acid induced transplacental liver carcinogenesis via epigenetic alterations in F1 mice. 2023 年度文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会 (2024 年 2 月, 大津)
 10. **梯アンナ**, 西土井悠作, Guiyu Qiu, 鈴木周五, 藤岡正喜, Arpamas Vachiraarunwon, 魏民, 鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の検討及び発がん機序解明, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月, 東京)
 11. Gi M, Fujioka M, Shibano K, Qiu G, Vachiraarunwong A, Guo R, **Kakehashi A**, Suzuki S, Wanibuchi H. Development of an in vitro dosing assay for trans-tracheal intrapulmonary spraying administration of chemicals in rats, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月, 東京)
 12. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Suzuki S, Qiu G, Yamamoto T, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Development of a novel 3D urinary bladder mucosa model and evaluation of assessing arsenical toxicity, 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024 年 1 月, 東京)
 13. Fujioka M, Gi M, Suzuki S, Oishi Y, Vachiraarunwong A, Qiu G, Shibano K, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid induced

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし