

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

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授

## 研究要旨

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

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

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

以上より、増殖、酸化 DNA 損傷やケモカイン発現などの毒性所見は CNT の AOP の Key Event (KE)と考えられ、発がん機序への関与と発がん性短期予測指標への応用の可能性が示唆された。また変異シグネチャー解析では、化学発癌とは異なる CNT 特異的な変異シグネチャーが得られ、さらに Indel 解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行うことで、*in vitro*系開発にも応用しうる、発がん機序解明やリスク評価などに有用な情報が追加できるものと考えられる。

## 研究分担者

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

## A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多い。ナノマテリアルの一種で、炭素原子より構成されるカーボンナノチューブ(CNT)は難分解性であり、体内蓄積による持続的生体

反応により肺胞上皮や中皮に毒性および発がん性を誘発する。そのため、吸入暴露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。OECDでは、CNTを含むナノマテリアルの健康影響評価手法として吸入暴露試験を求めている。しかし、吸入暴露試験施設の稼働には高額な費用を要するため、今までに1物質(MWCNT-7)が日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)で試験されたのみである。申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)を用いた試験デザインを開発し、4種のMWCNTについて肺と胸膜中皮における障害性と発がん性を明らかにしてきた。さらにR2-5年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)においては、発がん性陽性MWCNTでは、活性化マクロファージ(M $\phi$ )によるケモカイン、活性酸素種(ROS)の産生と、肺胞上皮の増殖活性・酸化的DNA損傷の促進を投与後早期に検出し、CNT毒性のAdverse Outcome Pathway(AOP)として期待される。

健康影響評価の一つのエンドポイントとして、遺伝毒性は有用な指標となることが知られている。近年、次世代シーケンサー(NGS)によるノンバイアスかつグローバルなゲノム変異解析が進み、環境要因の暴露に固有の体細胞変異のパターン(変異シグネチャー)が存在することが明らかになってきた。さらに、この変異シグネチャー情報を用いることで、化学物質が誘発する毒性のAOPを得ることも可能であることが示されている。本研究では、TIPS投与により発がん性が未知の単層CNT(SWCNT)の肺・胸腔中皮発がん性の有無を明らかにし、発がん性の有無や程度を規定する毒性機序を詳細に解明する。それにより、これまでに得られたCNTのAOPの高精度化や新規AOPの樹立を試み、吸入暴露試験に代替しうるナノマテリアルの健康影響評価試験法の考案に活用することを目的とする。

本年度は、多層CNTs(MWCNT-7, MWCNT-N)とSWCNTのTIPS投与後、発がん期(104週)における肺と胸膜中皮の発がん性について解析し、亜急性期(4週)における酸化的DNA損傷、増殖活性や遺伝子発現変化との関連を解析する。またNGSによりCNT発がんに関与する変異シグネチャーを同定し、化学発がんと比較することにより、CNT発がん特異的に寄与する責任因子を推定する。これらによりCNTのAOPを構築し、有害性評価指標として応用可能で信頼の高いものを選出することを目標とし、*in vitro*試験法を含む短期・簡便な試験法における評価指標に利用できる成果体を得ることも目指す。

## B. 研究方法

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

MWCNT-7, MWCNT-NとSWCNTは、PFポリマー分散液に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12週齢雄性F344ラットに、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ合計投与量が0.1あるいは0.5mg/ラットとなるように8回TIPS投与する。対照群として、無処置(No treatment)およびPFポリマー液投与(対照、vehicle)群を設ける。以後無処置にて、投与終了後4週、13週、52週、および104週に剖検する。4週、13週は高用量の

みで、以降の52週および104週は低と高用量を観察する(1CNTにつき77匹設定：4週(10匹)、13週(7匹)、52週(10匹 $\times$ 2)、104週(20匹 $\times$ 2)。剖検時に胸腔内RPMI-640培地注入により胸腔洗浄液を採取し、遠心分離して炎症細胞やタンパク質(総タンパク、アルブミン)解析に供する(内木・津田)。イソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺する。右肺は4%緩衝パラホルムアルデヒドを気管より注入し、パラフィン包埋を用いて、M $\phi$ 局在(抗CD68抗体、BIO-RAD)、増殖活性(抗Ki67抗体、Abcam)の程度について免疫組織学的に解析する(内木)。また酸化ストレスは、酸化的DNA損傷により蓄積される8-OHdG、炎症関連DNA損傷マーカー8-nitrosoguanosine(8-NG)を指標として、ブアン固定パラフィン包埋肺標本を用いた免疫染色法(抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体、日本老化制御研究所)、anti-8-NG rabbit polyclonal抗体(1:20, 10 $\mu$ g/ml)、KMU-P01, Cosmo Bio Co. LTD)により定量解析をする(梯)。52週以降では、肺及び胸膜中皮の腫瘍性病変についても定量解析する。左肺は凍結し、RNA抽出(ISOGEN、ニッポンジーン)と定量的RT-PCRにより*Ccl*種、*Ii*種や*Tnf- $\alpha$* 等の炎症性サイトカイン発現を定量する(内木)。また凍結肺からはRIPA buffer(1 $\times$ )でタンパク抽出し、Bradford法を用いて濃度を測定する。40 $\mu$ gのタンパク質サンプルをアクリルアミドゲルに電気泳動し、ウェスタンブロット解析を行う。一次抗体には、以下に記載した抗体を記載した希釈濃度で使用する。Rabbit anti-Nrf2 phospho S40(SAB5701902, Sigma-Aldrich, 1:1000); rabbit anti-p62(1:1000, ab91526, Abcam); anti-iNOS/NOS mouse 抗体(1:2000, No. 610329, BD Transduction Laboratories)。

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

(1) *In vivo*試験と同様の方法で、発がん性陽性(MWCNT-7, MWCNT-N, MWCNT-B, DWCNT)、陰性(CNH)、未知(SWCNT)を被験CNTとしてTIPS投与し、4週後に肺組織を採取、凍結保存し、NGSを用いたRNAシーケンシング(RNA-seq)解析(マクロジェン)に用いる(内木)。CNTにより変化するトランスクリプトームについて、GO解析、パスウェイ解析を行う。

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

MWCNT-7をF344ラットにTIPS投与し、発生した肺がん及び中皮腫瘍サンプルを用いてMWCNTに由来する変異シグネチャーの同定を試みる。同時に、肺がんの陽性対照としてニトロソ化合物であるDHPN(N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine)をF344ラットに皮下投与して作成した肺腫瘍についても解析を行なう。MWCNT-7をTIPS投与し誘発した中皮腫のFFPEサンプルから腫瘍部分を削り取り、ゲノムDNAをtruXTRAC FFPE DNA microTUBE Kit(Covaris)を用いて抽出する。同一個体から非腫瘍部に相当する箇所も削り出し、同様にゲノムDNAを抽出する。抽出したゲノムDNAを次世代シーケンサー(NovaSeq)で全ゲノム解析を行い、腫瘍に検出される体細胞変異の解析を行う。一方、F344ラットにMWCNT-7またはDHPNを投与して得られた胸膜中皮腫及び肺癌は凍結サンプルよりDNAを抽出し、同様に全ゲノム解析を実施する。得られたデータから、Mutect(Ver2), Strelka(Ver2)を用いて変異検出を行い、SigProfilerExtractor(v.1.1.3)にて解析し、変異シグネチャーの抽出を行う(戸塚)。

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

マウスMφ細胞 (RAW264.7) に、CNTsを投与し (25-100 μg/ml) 48時間培養する。マウスMφ細胞の細胞生存率 (WST-1、ロッシェ)、産生される炎症性サイトカイン (定量的RT-PCR) を定量する (内木)。

(倫理面の配慮)

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアあるいはSPFエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており (医動20-028、医動23-047)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行う。

### C. 研究結果

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

##### (1)-1. CNTによる臓器重量の変化

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

##### (1)-2. CNTによる肺有害性の解析

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

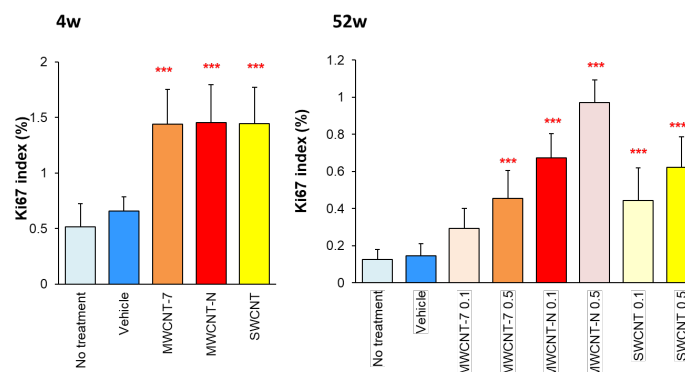


図1. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、\*\*\* $P < 0.001$  vs Vehicle.

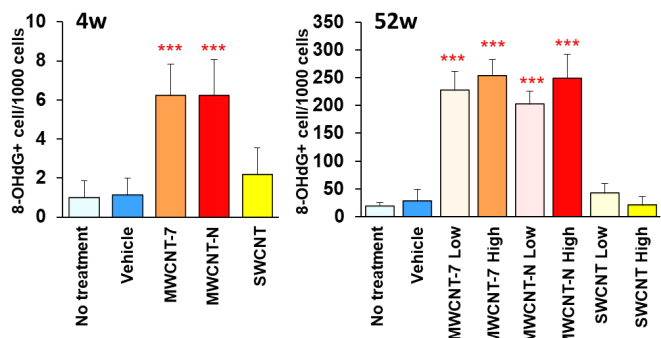


図2. CNT投与による肺胞上皮酸化的DNA損傷の変化 (8-OHdG免疫染色)、\*\*\* $P < 0.001$  vs Vehicle.

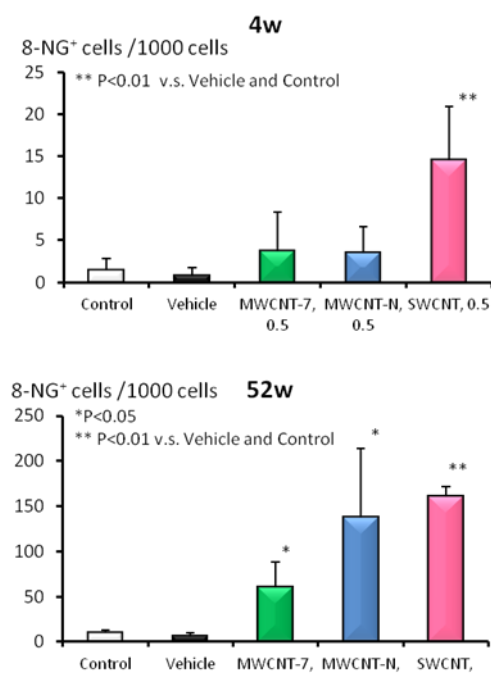


図3. CNT投与による肺胞上皮炎症関連DNA損傷の変化 (8-NG免疫染色)、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  vs Vehicle.

### (1)-3. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

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

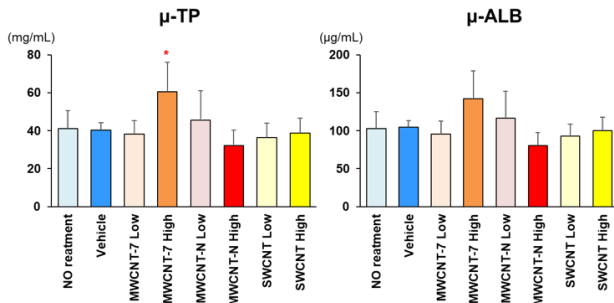


図4. CNT投与による胸腔洗浄液中総タンパクとアルブミン値の変化、\*P < 0.05 vs Vehicle.

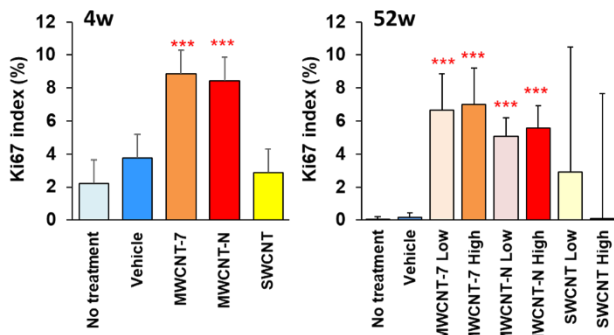


図5. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化(Ki67免疫染色)、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle

### (1)-4. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量

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

胸膜中皮腫の発生は、無処置群(0/17匹)、対照群(0/18

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

### (1)-5. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量

4、13、52週における肺のケモカインおよびサイトカイン mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR により解析した。いずれも同様の傾向で、4週の結果を示す(図6)。CNTs投与による遺伝子発現の増加傾向は見られ、肺発がん感受性の高いと考えられる MWCNT-N は、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl9*、*Tnf-α* および *Il-1β* で有意に上昇した。SWCNT では *Ccl2*、*Ccl3* で有意に上昇し、肺発がん性と相関を示した。

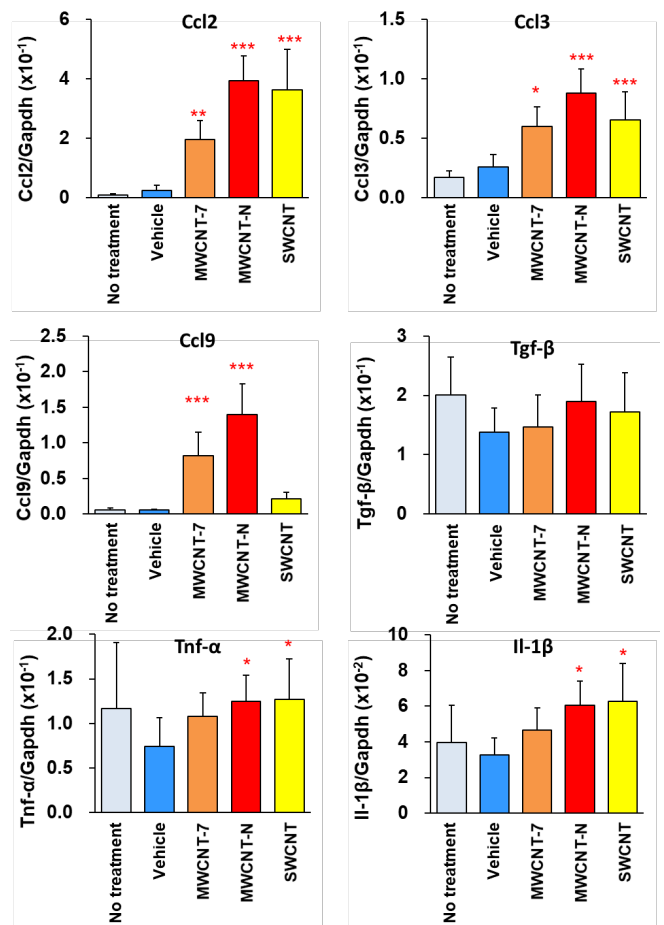


図6. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週(定量RT-PCR)、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

### (1)-6. 肺における遺伝子発現解析

TIPS 投与後4週の肺凍結サンプルを用いた RNA-seq 解析により、CNTにより変動する遺伝子群を解析した。その結果、対照群と比較してMWCNTsで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を586個、低下する遺伝子を150個得た。有意な変化が見られるパスウェイとして、Mφ由来のケモカイン、サイトカイン遺伝子、細胞周期関連遺伝子群が検出された。またIPAを用いてシグナルパスウェイ解析を行った結果、MWCNT-7およびMWCNT-N投与群のみにおいて、窒素および酸化ラジカルの産生、

p38MAPK シグナルや Rac シグナルの活性化が予測された一方、SWCNT 投与群ではMφによるフリーラジカルの誘導および p38/Rac1 の活性化が認められなかった。また、SWCNT 投与群ではオートファジーの活性化が予測された。

### (1)-7. 肺におけるタンパク発現解析

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

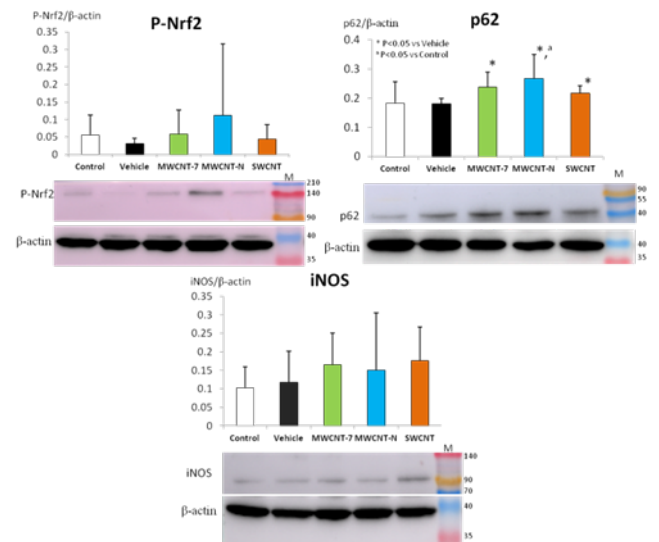


図7. CNT投与による肺タンパク発現量の変化、4週 (ウェスタンブロット)、\*P < 0.05 vs Vehicle.

### (2) *In vivo* 実験: CNTによる亜急性期遺伝子変化の解析

TIPS 投与後 4 週の肺凍結サンプルを用いた RNA-seq 解析により、実験(1)より発がん性の違いをもつCNTをさらに追加し、変動遺伝子を解析した。その結果、発がん陰性CNTと比較して、陽性CNTsで2倍以上に有意に上昇する遺伝子を75個、低下する遺伝子を27個得た。有意な変化が見られるパスウェイとして、ケモカイン、サイトカイン遺伝子などの炎症関連因子が検出された (図8、9)。

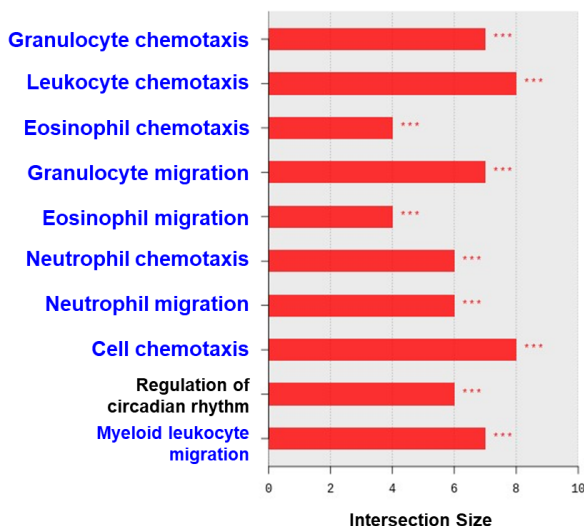


図8. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Biological Function)、4週、\*\*\*P < 0.001 vs Negative.

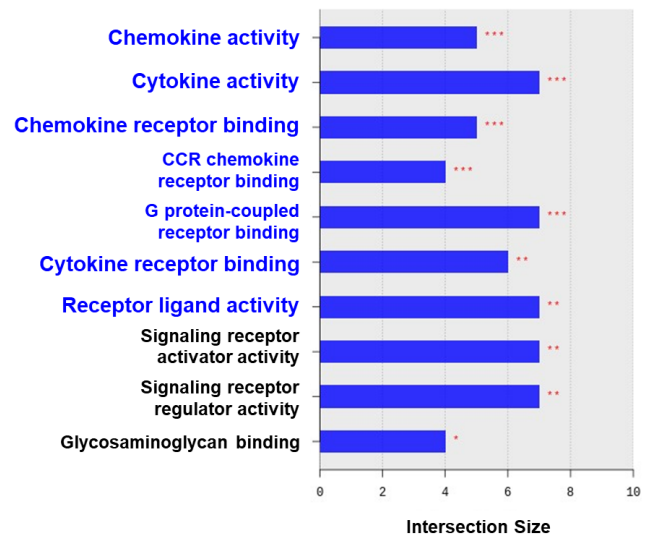


図9. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Molecular Function)、4週、\*\*\*P < 0.001 vs Negative.

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

ラットにMWCNT及びDHPNを投与し誘発した中皮腫/肺がん15検体 (MWCNT: 9検体、DHPN: 6検体) から抽出したDNAよりライブラリを調製し、イルミナ社のNovaSeq6000による全ゲノムシーケンシング (150bp Paired End) を行った。得られたゲノムデータを既存のラットゲノム配列 (rn6) にマップし、変異Caller (MuTect2およびStrelka) により体細胞変異の検出を行った。その結果を表1に示す。表1からわかるように、DHPNによる肺がんではMWCNT-7による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察されていることがわかった。さらに、SigProfilerExtractorで解析した結果3種類の変異シグネチャー (Rat\_SBS\_A~C) が同定された (図10)。このうち、Rat\_SBS\_A 及びBはC:G to T:A変異が顕著な特徴を持つ変異シグネチャーであった。また、各サンプルにおける変異数と3種類の変異シグネチャー分布について図11-1に示す。DHPNによる肺がんではMWCNT-7による中皮腫と比較して非常に多くの変異が観察され、同定された変異シグネチャーの分布も、全てのDHPNサンプルにおいてRat\_SBS\_A (黄緑色) が90%以上を占めていることがわかった。一方、MWCNT-7ではサンプル毎のばらつきが大きく、比較的多い変異数が観察されたサンプルでも16,000程度であり、化学発がん物質であるDHPNと比較しても圧倒的に少ない変異数であることがわかった。また、MWCNT-7では、9検体中7検体でRat\_SBS\_B (黄土色) が観察され、そのうち4検体でRat\_SBS\_Bの占める割合が多く、次いでRat\_SBS\_C (紫色) の占める割合が多いことがわかった (図11-2)。さらに、9検体中2検体では、Rat\_SBS\_Cのみが観察されていた。

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

表1. ラット肺がん及び中皮腫に検出された変異数.

これら変異シグネチャーと既存の変異シグネチャー (<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/sbs/>) との類似度について検討した結果を表2に示す。一般的に Cosine similarityは0.85以上で類似していると考えられていることから、Rat\_SBS\_Aは、アルキル化剤投与によるシグネチャーと類似していることがわかった。一方、Rat\_SBS\_B及びCは、Thiopurine chemotherapy, 5-メチルシトシンの脱アミノ化などによる自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似しているが、新規の変異シグネチャーである可能性も示唆された。また、Rat\_SBS\_Bはヒト中皮腫で比較的寄与が高い変異シグネチャーと類似することもわかった (Bueno et al, nat. genet. (2016)、図 12)。さらに、非常に多くの SNV 数 (15,000~16,000) が観察された2検体では、この Rat\_SBS\_B の寄与率が非常に高いが、変異数の少ない検体では Rat\_SBS\_C の寄与率が高かった (図 11-2)。

現在、MWCNT及び化学物質暴露による中皮腫及び肺がんの追加解析を行いつつ、Indel解析や変異のストランドバイアスなどの解析を行っている。

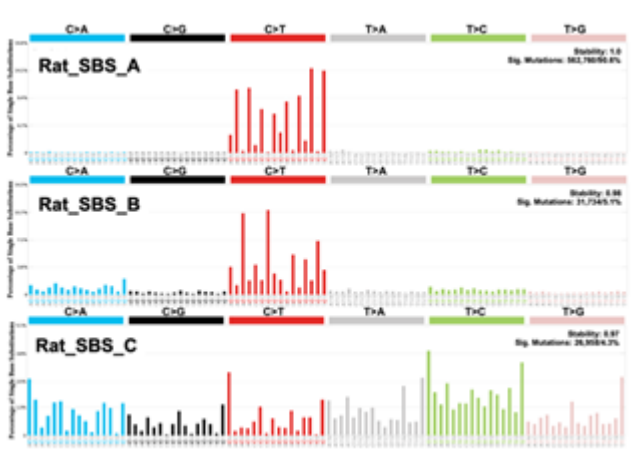


図 10. MWCNT/DHPN 暴露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定された変異シグネチャー.

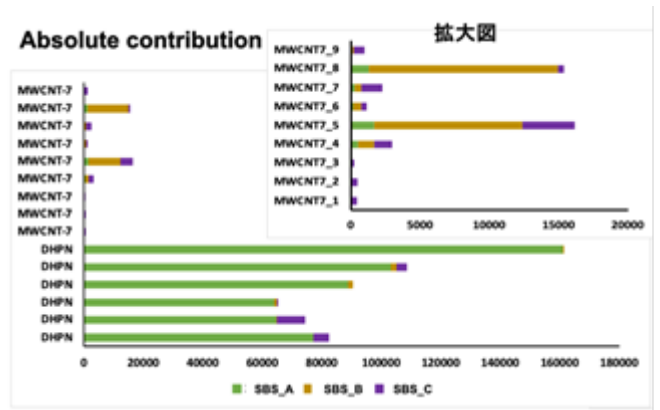


図 11-1. サンプル毎の変異数と3種類の変異シグネチャー分布.

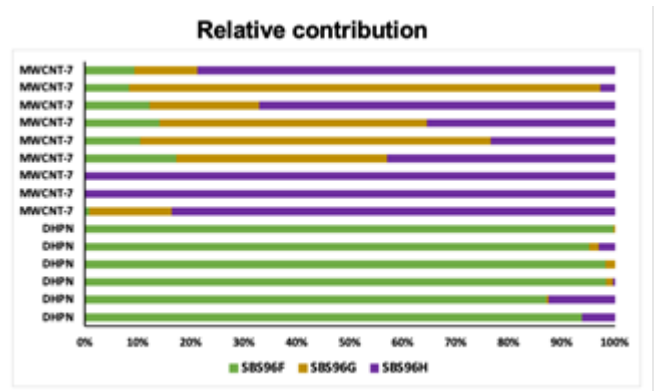


図 11-2. サンプル毎の3種類の変異シグネチャー分布割合.

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

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

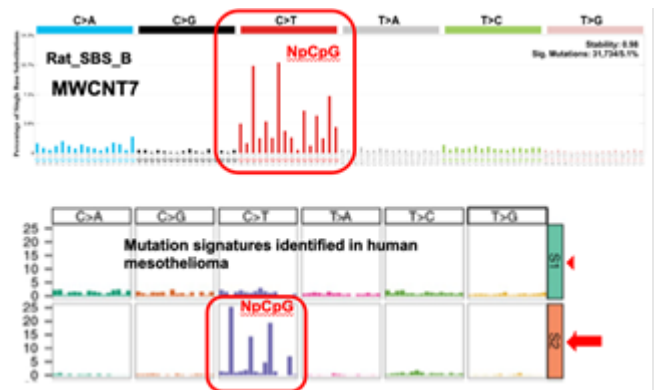


図 12. ヒト中皮腫を含む肺がんでは観察された変異シグネチャー.

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

マウスMφ細胞 (RAW264.7) にCNTsを投与し、細胞生存率を定量した。細胞生存率は各CNTs投与により有意に低下した (図13)。*In vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認めた *Ccl2* のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。*In vitro*においても、CNTs投与によりいずれも有意な発現上昇を認め、*in vivo*と類似した発現パターンと発がん性との相関を示した (図14)。

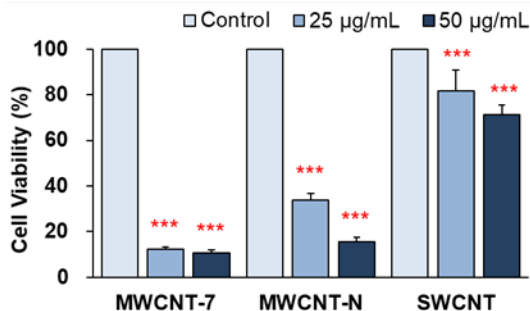


図13. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の細胞生存率の変化 (WST-1アッセイ)、\*\*\*P < 0.001 vs Control.

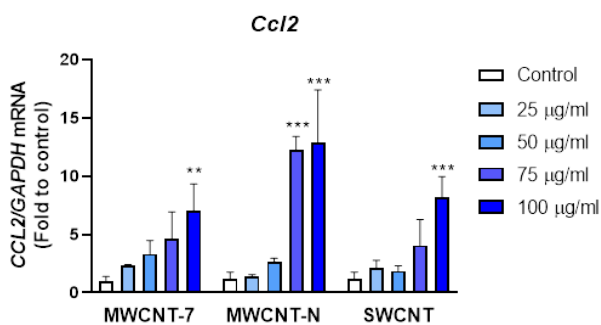


図14. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) の *Ccl2* 発現の変化 (定量RT-PCR)、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Control.

D. 考察

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

今年度は、発がん性未知のSWCNTと、陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nを同条件でTIPS投与することにより、層数、鉄含有量、形状などのCNTの物性の差異と肺、中皮に対する有害性の関連を明らかにすることとした。その結果、陽性対照のMWCNT-NおよびMWCNT-7に加えて、

SWCNTでは中皮に対する発がん性は陰性であったものの、肺発がん性陽性であることが新たに明らかになった (非公開データ)。肺胞上皮および中皮における細胞増殖活性とDNA損傷の増加がいずれの実験期間においても検出され、増殖活性マーカー (Ki67)と炎症関連DNA損傷マーカー (8-NG)の定量結果は、発がん性と相関しており、腫瘍発生前の短期試験によるCNTの有害性指標として有用である可能性が示唆された。遺伝子発現レベルでは、TIPS投与後早期および*in vitro*系においてケモカイン、特に*Ccl*種の発現変化が発がん性と相関する可能性が明らかになってきており、CNTのAOPとして重要かつ簡便なCNT有害性検出指標となりうることを示唆された。

DNAとROSの反応により形成される付加体である8-OHdGは、酸化的DNA損傷の良く知られたマーカーであり、多くの実験モデルにおいて発がん性に関与していることが知られている。8-OHdGは、突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となっている。組織中における実際の8-OHdGレベルは、ROSの産生とその修復の比率の変化により決定される。本試験において、MWCNT-7およびMWCNT-N投与による8-OHdGの蓄積は、肺気管支上皮と肺胞上皮とともに、多くの肺胞Mφに認められた。これらの所見から、肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生とDNA損傷は、肺胞Mφの増加によるROS放出の誘導と関連していることが考えられる。SWCNT投与群では有意な8-OHdG陽性肺胞上皮細胞の数を認められなかったが、8-NG陽性細胞の上昇が見られたことから、SWCNTが強い炎症を伴うDNAおよびRNAの8-NGが誘導することが認められた。また、SWCNT投与群では肺上皮細胞においてiNOS/NOSの発現上昇が観察され、オートファジーの誘導が予測できた。8-NGの形成がSWCNTの肺発がん性に関与している可能性が考えられる。

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

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

また、今回、比較的多くのSNV数が観察された検体では、アスベスト暴露の症例を含む99例のヒト中皮腫のデータから抽出された変異シグネチャーと類似するRat\_SBS\_Bの寄与率が非常に高かったことから、MWCNT暴露により誘発した中皮腫とヒト中皮腫の発生機序は類似していることが示唆された。現在のところ、これらシグネチャーは中皮腫に特徴的なものなのか、あるいは、アスベストやMWCNTのような繊維状の物質の暴露に特徴的なものかが不明であるが、さらに検体を追加して解析することで、この点も明らかになると考えている。現在、Indel解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行っている。得られるデータは発がん機序解明やリスク評価などに有用な情報となると思われる。

## E. 結論

肺発がん陽性対照である多層CNTs (MWCNT-7、MWCNT-N)と、未知のSWCNTのTIPS投与(0.1または0.5 mg/rat)による肺腫瘍性病変と増殖、酸化的DNA損傷について、亜急性(4週)、亜慢性(13週)、慢性(52週)、発がん(104週)期のサンプルを解析した。さらに、発がん性陽性(MWCNT-B, DWCNT)、陰性(CNH)を被験CNTとして追加し、亜急性期の遺伝子変化と発がん性の関連について、RNA-seqで解析した。その結果、MWCNT-7、MWCNT-Nに加えてSWCNTの肺発がん性が明らかになる一方で、SWCNTによる中皮発がん性は認めなかった。TIPS投与後早期に、肺胞上皮における増殖活性、炎症関連DNA損傷レベルとケモカイン発現の上昇を認めたことから、CNTの発がん機序にDNA損傷による細胞増殖の活性化が関与していると考えられる。*In vitro*試験では、Mφにおける酸化的ストレスやサイトカイン発現等、*in vivo*試験と同様にCNTにより変動する指標が得られており、今後は引き続き肺オルガノイドを用いて同様の解析をする。

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

れた。類似解析の結果から、Rat\_SBS\_B及びCは自然発生突然変異などのシグネチャーと比較的類似していたことから、MWCNT-7の発がん機序としては、DHPNのように直接的にDNAに作用して変異を導入するというよりはむしろ、MWCNT-7暴露による宿主側の2次的な反応などを介していることが示唆される。これまでの報告により、MWCNTなどのナノマテリアルによる変異誘発機序としては、宿主の炎症反応などが惹起されることが要因とされており、今回の変異シグネチャーの結果はそれをサポートするようなデータであると考えられる。また、今回、比較的多くのSNV数が観察された検体では、アスベスト暴露の症例を含む99例のヒト中皮腫のデータから抽出された変異シグネチャーと類似するRat\_SBS\_Bの寄与率が非常に高かったことから、MWCNT暴露により誘発した中皮腫とヒト中皮腫の発生機序は類似していることが示唆された。さらに、Indel解析や変異のストランドバイアス、ゲノム構造異常などの解析を行うことで、発がん機序解明やリスク評価などに有用な情報が得られると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Hori Y, Naitoh I, **Naiki-Ito A**, Kawai T, Yoshida M, Kato A, Kachi K, Sahashi H, Adachi A, Toyohara T, Kito Y, Yamamoto T, Takahashi S, Kataoka H. Incidence of pancreatic injury and pancreatitis in patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Clin Transl Gastroenterol*. 2023, in press.
- Nagai T, Kawai N, Gonda M, Iida K, Etani T, Kobayashi D, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Ando R, Yamaguchi S, Sugahara Y, Ueno S, Tsutsumiuchi K, Imae T, Yasui T. Role of HIKESHI on Hyperthermia for Castration-Resistant Prostate Cancer and Application of a Novel Magnetic Nanoparticle with Carbon Nanohorn for Magnetic Hyperthermia. *Pharmaceutics*. 15:626, 2023.
- Yamamoto Y, Hotta Y, Tomita N, **Naiki-Ito A**, Kitagawa A, Kuboshiki U, Hagita T, Noda M, Sanagawa A, Kataoka T, Kondo M, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K. Changes in zinc and manganese concentrations in cisplatin-induced acute kidney injury. *Biochem Biophys Rep*. 33:101422, 2023.
- Tomita N, Hotta Y, Ito H, **Naiki-Ito A**, Matsuta K, Yamamoto Y, Ohashi K, Hayakawa T, Sanagawa A, Horita Y, Kondo M, Kataoka T, Takahashi S, Sobue K, Kimura K. High preoperative serum strontium increase the risk of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Clin Exp Nephrol*. 27:382-391, 2023.
- Kachi K, Naitoh I, Ban T, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato A, Kito Y, Saito K, Matsuo Y, Kato H, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Notohara K, Kataoka H. A Case of Concomitant Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Potential Issue in the Diagnosis of Carcinoma by Endoscopic Ultrasound-guided Fine-needle Biopsy. *Intern Med*. 62:545-551, 2023.
- Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, **Totsuka Y**, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms



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

- 9月、横浜)
14. 小村理行、加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 腫瘍細胞および間質細胞に発現するテトラスパンインは乳癌の予後を予測する, 第82回日本癌学会学術総会 (2023年9月、横浜)
  15. 内木綾、加藤寛之、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 非アルコール性脂肪肝炎および肝線維化に対する lactoferrin の抑制効果, 第112回日本病理学会総会 (2023年4月、下関)
  16. 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. 膵癌における Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPYD)発現の意義, 第112回日本病理学会総会 (2023年4月、下関)
  17. 稲熊真悟、上木あかね、小村理行、加藤寛之、内木綾、高橋智. PD-L1 陽性大腸癌細胞は幹細胞様表現型を示し、特徴的な遺伝子発現、高悪性形質を示す, 第112回日本病理学会総会 (2023年4月、下関)
  18. 戸塚ゆかり. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価法 日本薬学会144年会 (2024年3月、横浜)
  19. 戸塚ゆかり. ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析, 日本酸化ストレス学会 (2023年12月、川崎)
  20. Totsuka Y. Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)
  21. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆかり. 加熱式タバコの遺伝毒性評価, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
  22. 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、戸塚ゆかり. アドバンストナノマテリアルのin vitro遺伝毒性評価, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
  23. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, Yukari Totsuka, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロラミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
  24. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、戸塚ゆかり. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバーアダクト探索, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
  25. 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、戸塚ゆかり. アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明, 第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
  26. Yukari Totsuka, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第82回日本癌学会学術総会 (2023年9月、横浜)
  27. Totsuka Y. Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023年9月、シカゴ・米国)
  28. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆかり. 加熱式タバコの遺伝毒性評価, がん予防学術大会2023 (2023年9月、金沢)
  29. 梯アンナ、西土井悠作、Qiu Guiyu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の解明, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
  30. Qiu Guiyu、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、梯アンナ、山本与毅、野浦郁恵、ワチラアルンウオン アルパマス、郭潤傑、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸 (DPAA) のラット妊娠期及び授乳期ばく露による次世代に対する発達神経毒性の検討, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
  31. 魏民、山本与毅、鈴木周五、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、郭潤傑、Guiyu Qiu、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱発がんにおける DNA メチル化異常, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
  32. 郭潤傑、魏民、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡正喜、鈴木周五、Guiyu Qiu、山本与毅、梯アンナ、鰐淵英機. 不死化ヒト膀胱上皮細胞を用いた三次元膀胱培養モデルの確立及びそれを用いたヒ素毒性評価, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
  33. 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂ギョク、芝野佳奈、梯アンナ、鰐淵英機. ジフェニルアルシン酸の経胎盤曝露によるF1マウス肝発がん機序にはDNAメチル化異常が関与する, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
  34. ワチラアルンウオン アルパマス、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、Qiu Guiyu、郭潤傑、梯アンナ、鰐淵英機. Toxicological Assessment of Dimethylarsinic Acid Using Humanized Liver Mice Model, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
  35. 野浦郁恵、鈴木周五、梯アンナ、魏民、藤岡正喜、ワチラアルンウオン アルパマス、井上健、鰐淵英機. 肺大細胞神経内分泌癌の新規バイオマーカー候補の検討, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)
  36. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Qiu Guiyu、Vachiraarunwon Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. NADPH酸化酵素阻害剤 apocynin による o-toluidine 誘発ラット膀胱増殖性 病変への抑制効果, 第113回日本病理学会総会 (2024年3月、名古屋)

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

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。