

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6年度 分担研究報告書

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

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

研究代表者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科 准教授

### 研究要旨

化学物質のナノサイズ化により、機能や特性が飛躍的に向上することから、ナノマテリアル(NM)の新素材としての使用や生産が増大する一方で、吸入暴露による毒性影響が懸念される。カーボンナノチューブ(CNT)のような不溶性繊維状NMは、長期体内残留性と慢性炎症の誘発性が指摘されている。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R2-6年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）においては、発がん性陽性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・胸腔中皮発がん性の有無を明らかにし、発がん性陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nと比較することにより、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MWCNTs(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。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。

その結果、MWCNTsにより投与4週間後から肺胞上皮の増殖(Ki67)、DNA損傷( $\gamma$ H2AX)、および*Ccl*種mRNA発現が有意に増加し、SWCNTではKi67、*Ccl*種mRNA発現の上昇を見た。104週における肺胞上皮腺癌の発生頻度は、MWCNT-N、SWCNT高用量群で有意に上昇した。胸膜中皮腫の発生頻度は、MWCNTs高用量群で有意に上昇したのに対し、SWCNTによる発生は認めなかった。4週サンプルを用いたRNA-seqによるGO解析では、CNTsに共通してM $\phi$ 由来のケモカイン、サイトカイン関連パスウェイが抽出され、それらのうち*Spp1*、*Ccl17*、*Mmp12*の10-100倍程度の大幅な発現上昇がqRT-PCRで確認された。一方、SWCNTのみで好中球関連パスウェイおよび遺伝子(*S100a8*)の発現上昇が観察された。マウスM $\phi$ 細胞(RAW264.7)にCNTsを投与したところ、肺発がん感受性と*Ccl*種mRNA発現量との間に相関傾向が認められた。中でもMWCNT-7およびMWCNT-Nでは、*Ccl2*のmRNA発現が濃度依存的に有意な上昇を示した。

以上より、新たにSWCNTの肺発がん性が明らかになり、増殖活性、炎症関連遺伝子発現などMWCNTsとSWCNTとで類似した毒性所見はCNTのAOPのKey Eventと考えられ、有害性短期予測指標への応用の可能性が示唆された。

### 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、吸入暴露試験施設稼働には高額な費用を要するため、今までに多層CNT(MWCNT)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。

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、MWCNTs (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と一致する、亜急性期 (4 週) を中心とした有害性指標を検討するため、病理学的解析、遺伝子解析を実施する。これにより 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

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。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、増殖活性 (抗Ki67抗体、Abcam) とDNA損傷 ( $\gamma$ H2AX抗体、CST) の程度について免疫組織学的に解析する。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) 後、定量的RT-PCRによる*Ccl*種、*Ii*種や*Tnf- $\alpha$* 等の炎症性ケモカイン、サイトカイン発現の定量や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。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 $\phi$ 細胞を用いたCNTによる毒性の解析

マウスM $\phi$ 細胞 (RAW264.7) に、CNTsを投与し48時間培養する。M $\phi$ 細胞から産生される炎症性サイトカイン (定量的RT-PCR) を定量する。

(倫理面の配慮)

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

おり (医動 20-028、医動 23-047)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行う。

## C. 研究結果

### (1) *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 (Ki67、 $\gamma$ H2AX)

4、13、52週において、増殖活性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、 $\gamma$ H2AX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。Ki67についてはSWCNTにおいても有意に増加したが、 $\gamma$ H2AX、8-OHdGの上昇は認めなかった (図1、2)。

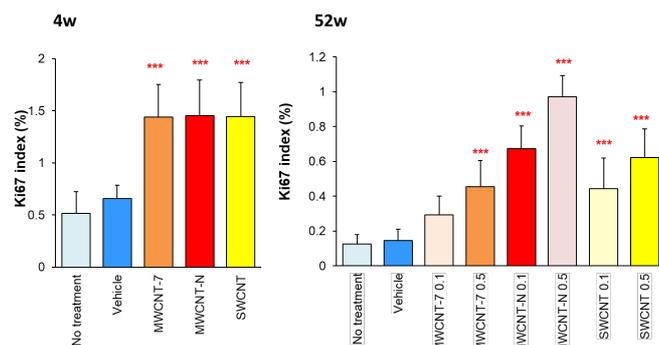


図1. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、\*\*\* $P < 0.001$  vs Vehicle.

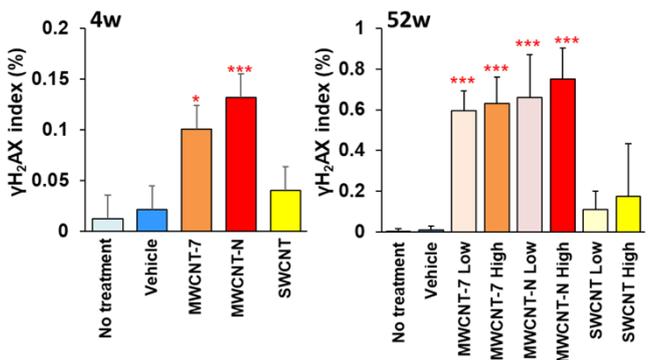


図2. CNT投与による肺胞上皮DNA損傷の変化 ( $\gamma$ H2AX免疫染色)、\*\*\* $P < 0.001$  vs Vehicle.

#### (1)-3. CNTによる胸膜中皮有害性の解析

胸腔洗浄液と心組織を用いて、胸膜中皮細胞の有害性を解析した。4週に採取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 ( $23.6 \pm 5.2$  mg/dl,  $66.5 \pm 12.2$   $\mu$ g/ml) と比較してMWCNT-7高用量群でいず

れも有意に上昇した ( $34.6 \pm 8.7$  mg/dl,  $P < 0.05$ ,  $86.0 \pm 19.0$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $P < 0.05$ )。心膜中皮細胞におけるKi67標識率は、4週、52週において対照群と比較してMWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に上昇し、SWCNT投与群では明らかな変化は見られなかった (図3)。一方、 $\gamma\text{H2AX}$ の標識率は、4週でCNT投与による明らかな変化はなく、52週ではMWCNTs群で上昇する傾向が見られ、MWCNT-N高用量群のみで有意な変化を認めた (図4)。

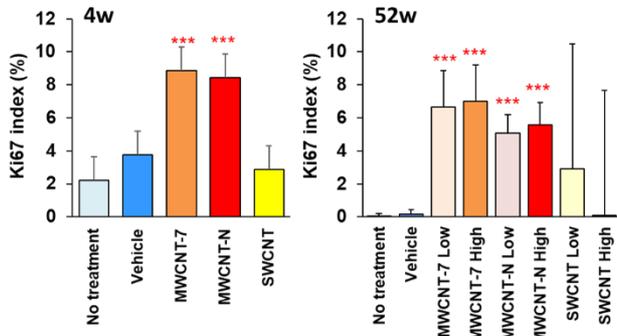


図3. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化 (Ki67免疫染色)、\*\*\* $P < 0.001$  vs Vehicle.

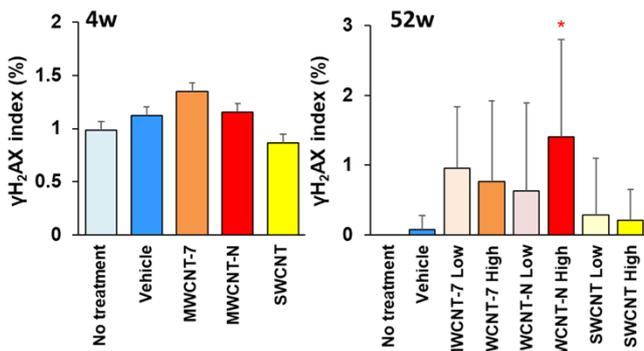


図4. CNT投与による心膜中皮細胞DNA損傷の変化 ( $\gamma\text{H2AX}$ 免疫染色)、\* $P < 0.05$  vs Vehicle.

#### (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。肺上皮腺腫及び腺癌の発生頻度についても、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 (2/21匹)、MWCNT-N

低用量群 (4/18匹)、MWCNT-N高用量群 (9/19匹,  $P < 0.01$ )、SWCNT低用量群 (2/18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、実験開始52週以降に、MWCNT-7、MWCNT-N投与群に観察され、途中死亡例が見られた (図5)。途中死亡例および最終解剖を含めた壁側胸膜中皮腫の発生頻度は、無処置群 (0/17匹)、対照群 (0/18匹)、MWCNT-7低用量群 (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 (7/19匹,  $P < 0.001$ )、SWCNT低用量群 (1/18匹)、SWCNT高用量群 (1/17匹)、臓側胸膜中皮腫の発生頻度は、無処置群 (0/17匹)、対照群 (0/18匹)、MWCNT-7低用量群 (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 (7/19匹,  $P < 0.001$ )、SWCNT低用量群 (0/18匹)、SWCNT高用量群 (0/17匹)、総計では、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)、いずれもMWCNT-7とMWCNT-Nの高用量群で有意な上昇を認めた。

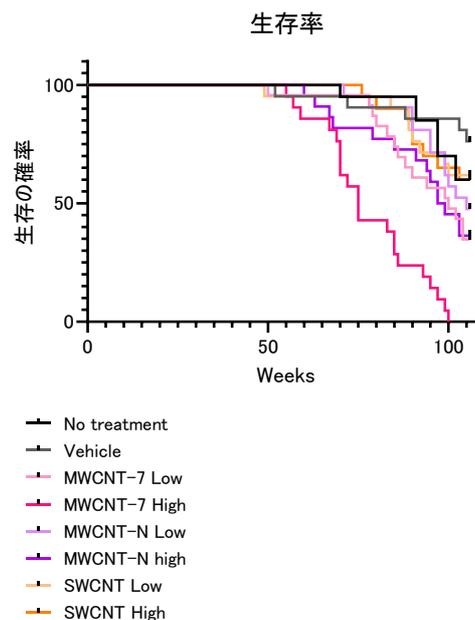


図5. CNT投与後のラット生存率.

#### (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)。肺発がん感受性の高いと考えられる MWCNT-N は、*Cc12*、*Cc13*、*Cc19*、*Tnfa* および *Il-1 $\beta$*  の発現が有意に上昇した。MWCNT-7 では *Cc12*、*Cc13*、*Cc19*、SWCNT では *Cc12*、*Cc13*、*Tnfa* および *Il-1 $\beta$*  の発現量が有意に上昇した。

#### (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MWCNTsに加えてSWCNTにおける肺発がん性が明らかになったことから、MWCNTsおよびSWCNTいずれにおいても安定的に発現し、いずれのCNT投与によっても発現上昇する遺伝子候補として、secreted phosphoprotein 1 (Spp1, NM\_012881)、C-C motif chemokine ligand 7 (Ccl7, NM\_001007612)、matrix metalloproteinase 12 (Mmp12, NM\_053963)を抽出した。さらにSWCNTのみで発現上昇する遺伝子候補としてS100 calcium binding protein A8 (S100a8, NM\_053822)を抽出し、mRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。その結果、Spp1、Ccl7、Mmp12の発現は、いずれもCNT投与により有意に発現上昇し、特にSpp1は、vehicle群と比較して、MWCNT-7群で38倍、MWCNT-N群で125倍、SWCNT群で66倍と大幅に上昇した。S100a8の発現は、MWCNTsで発現変化は見られず、SWCNTのみで有意に上昇した(図7、8)。またこの傾向は、13週の肺サンプルでも同様であった(図9)。

さらにMWCNTsとSWCNTを比較するために、GO解析を行った。有意な変化が見られるパスウェイとして、好中球の遊走、走化性などの好中球関連因子やケモカイン関連因子が検出された(図10、11)。

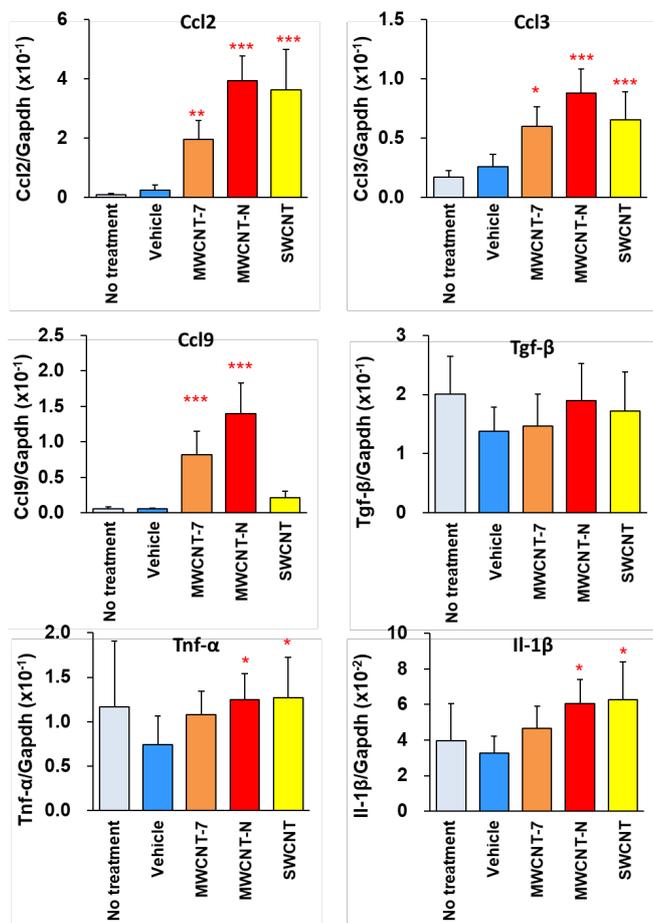


図6. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週(定量RT-PCR)、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

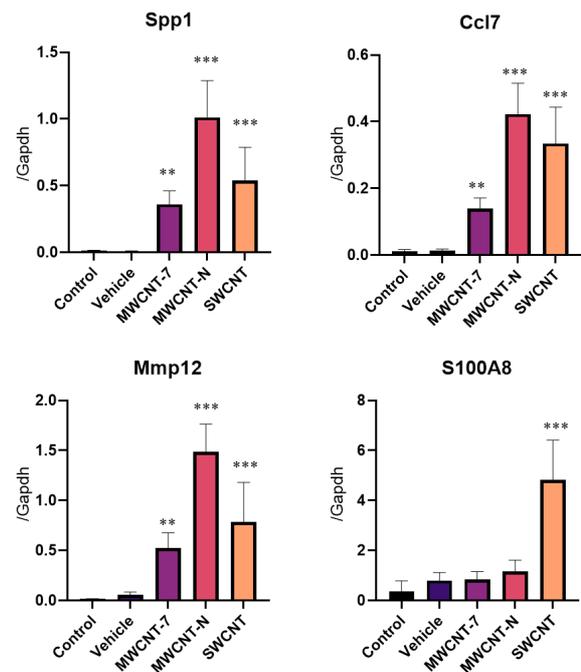


図7. CNT投与による肺mRNA発現量の変化、4週(定量RT-PCR)、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

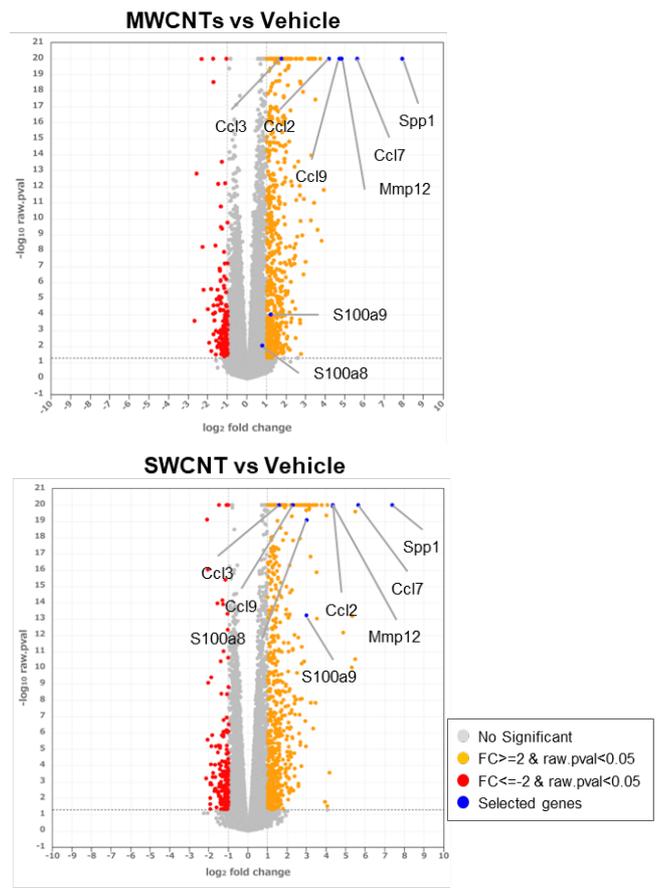


図8. CNT投与による肺mRNA発現量の変化。Volcano plot、上段: MWCNTs (MWCNT-7、MWCNT-N) vs Vehicle、下段: SWCNT vs Vehicle、4週 (RNA-seq)。

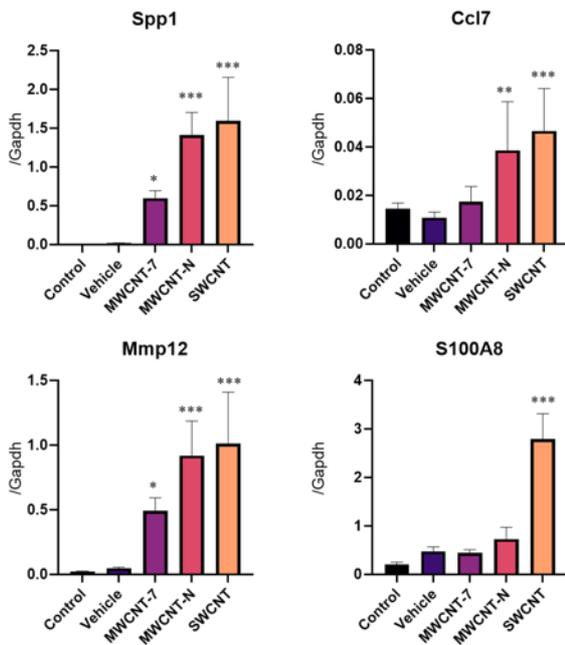


図9. CNT投与による肺mRNA発現量の変化、13週（定量RT-PCR）、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

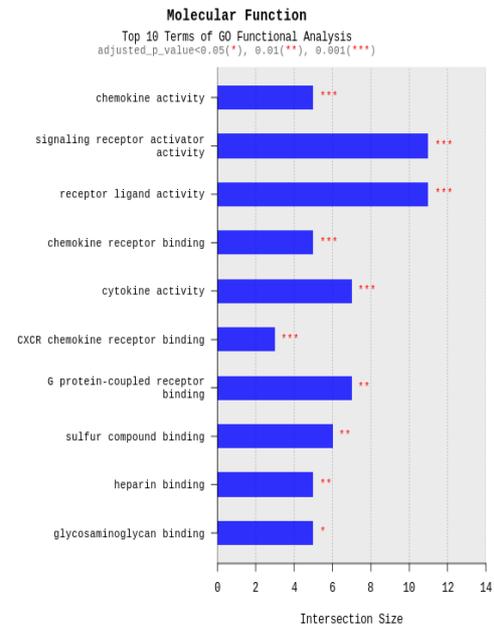


図11. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Molecular Function)、4週、\*\*\*P < 0.001、SWCNT vs MWCNTs.

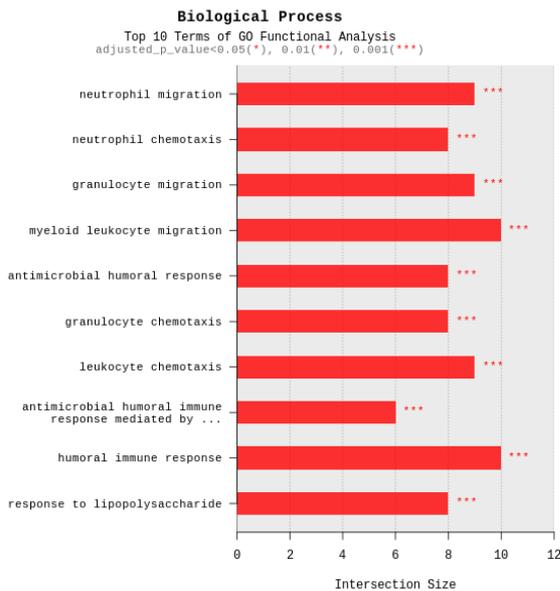


図10. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 (Biological Function)、4週、\*\*\*P < 0.001、SWCNT vs MWCNTs.

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

マウスMφ細胞 (RAW264.7) にCNTsを投与し、*in vivo*試験においてCNTs投与により発現高値を認めたCcl種のmRNA発現レベルを定量RT-PCRにより解析した。10 μg/mlの濃度では、肺発がん感受性の高いMWCNT-Nでは発現上昇傾向が見られたが、肺発がん性陽性(Positive)と陰性(Neg)で有意な変化は見られなかった(図12)。そこでMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTにおいて、さらに高濃度で投与した結果、濃度依存性に有意なCcl2発現の上昇を認めた(図13)。

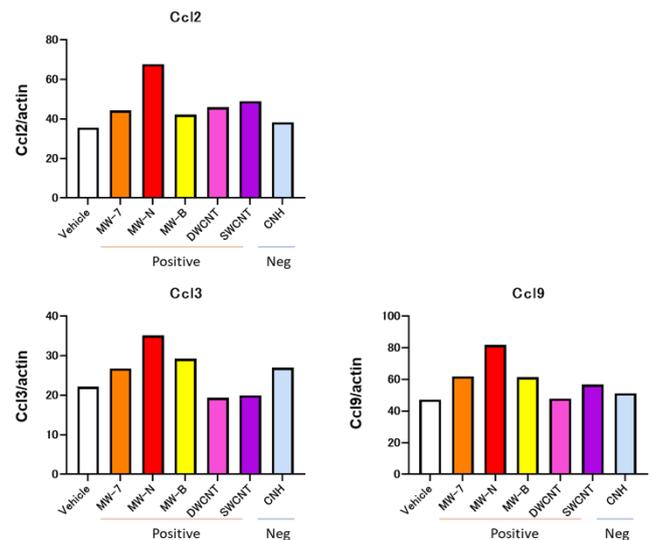


図12. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) のCcl種発現の変化 (定量RT-PCR)、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Vehicle.

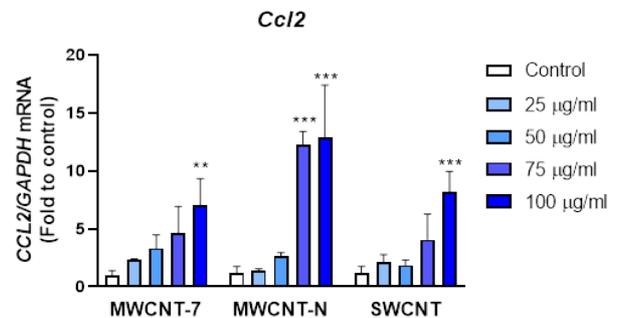


図13. CNT投与によるマウスMφ細胞 (RAW264.7) のCcl2発現の変化 (定量RT-PCR)、\*\*P < 0.01、\*\*\*P < 0.001 vs Control.

## D. 考察

TIPS法は、大規模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(論文作成中)。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)の定量結果は、発がん性と関連しており、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*CcI*種の発現変化が発がん性と関連する可能性が明らかになってきた。RNA-seqでは、*CcI*種よりCNTによる発現変動が大きい遺伝子が検出され(*Spp1*, *Cc12*, *Mmp12*)、CNTのAOPとして簡便なCNT有害性検出指標となりうるかどうか、*in vitro*系で検証中である。TIPS法で得たCNTのAOPがナノマテリアル全般に应用可能かについても今後検討していく必要がある。

## E. 結論

肺発がん陽性対照であるMWCNTs(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、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いことが明らかになった。TIPS投与後早期に、CNTsに共通して肺胞上皮における増殖活性、酸化DNA損傷、炎症関連DNA損傷レベルとMφや好中球に関連する遺伝子発現の上昇を認めたことから、CNTsの発がん機序に酸化的・炎症関連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。これらのTIPS法で得たCNTのAOPがナノマテリアル全般に应用可能かについても今後検討していく必要がある。*In vitro*試験では、*in vivo*試験と同様にMφにおけるCNTにより変動する指標が得られつつあるが、今年度*in vivo*で同定した発現誘導効率の高い遺伝子(*Spp1*, *Cc12*, *Mmp12*)を用いてさらに解析をする。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Naiki T, [Naiki-Ito A](#), Murakami A, Kato H, Sugiyama Y, Kawai T, Kato S, Etani T, Nagai T, Shimizu N, Morikawa T, Aoki M, Gonda M, Kuang X, Nagayasu Y, Hamamoto S, Yasui T, Takahashi S. Preliminary Evidence on Safety and Clinical Efficacy of Luteolin for Patients With Prostate Cancer Under Active Surveillance. *Prostate Cancer*. 2025:8165686, 2025.
2. Ahmed OHM, [Naiki-Ito A](#), Takahashi S, Alexander WT, Alexander DB, Tsuda H. A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung. *Nanomaterials (Basel)*. 15(3):168, 2025.
3. [Naiki-Ito A](#), Naiki T, Takahashi S. Exploring experimental models of prostate cancer in chemoprevention: Oxidative stress as a key pathway to translational research. *Pathol Int*. 75:131-144, 2025.
4. Matsumoto D, Naiki T, [Naiki-Ito A](#), Aoki M, Kato S, Morikawa T, Shimizu N, Gonda M, Umemoto Y, Yasui T. Efficacy of pembrolizumab plus lenvatinib as first-line treatment for metastatic renal cell carcinoma with multiple brain metastases. *IJU Case Rep*.8:5-9, 2024.
5. Sheema A.N, [Naiki-Ito A](#), Kakehashi A, Ahmed O.H.M, Alexander D.B, Alexander W.T, Numano T, Kato H, Goto Y, Takase H, Hirose A, Wakahara T, Miyazawa K, Takahashi S, Tsuda H. Fullerene and fullerene whisker are not carcinogenic to the lungs and pleura in rat long-term study after 2-week intra-tracheal intrapulmonary administration. *Arch Toxicol*. 98, 4143-4158, 2024.
6. [Naiki-Ito A](#), Yeewa R, Xiaochen K, Taychaworaditsakul W, Naiki T, Kato H, Nagayasu Y, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane insoluble fraction from purple rice extract improves steatohepatitis and fibrosis via inhibition of NF-κB and JNK signaling. *Food Funct*. 15:8562-8571, 2024.
7. Kato H, Sato M, [Naiki-Ito A](#), Inaguma S, Sano M, Komura M, Nagayasu Y, Xiaochen K, Kato A, Matsuo Y, Ijichi H, Takahashi S. The role of DPYD and the effects of DPYD suppressor luteolin combined with 5-FU in pancreatic cancer. *Cancer Med*. 13:e70124, 2024.
8. Isobe T, Naiki T, Sugiyama Y, [Naiki-Ito A](#), Nagai T, Etani T, Iida K, Noda Y, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Morikawa T, Banno R, Kubota H, Ando R, Kawai N, Yasui T. Experience and prognostic analysis with avelumab switch maintenance treatment in metastatic urothelial carcinoma. *Oncology*. 17:1-11, 2024.
9. Hori Y, Kawai T, [Naiki-Ito A](#), Naitoh I, Kato A, Kataoka H. Asymptomatic pancreatic enlargement without pancreatic enzyme elevation: a rare case of immune checkpoint inhibitor-associated pancreatitis. *Gastroenterol Rep*. 2024: 12, goae064, 2024.
10. 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. 15:e00667, 2024.

11. Morikawa T, Naiki T, Sugiyama Y, **Naiki-Ito A**, Nagai T, Etani T, Iida K, Isobe T, Noda Y, Shimizu N, Aoki M, Gonda M, Banno R, Kubota H, Ando R, Umamoto Y, Kawai N, Yasui T. C-reactive protein is a potential prognostic marker in patient with advanced or metastatic urothelial carcinoma treated with enfortumab vedotin: A multi-center retrospective study. *Cancers*. 16:1725, 2024.
12. Aoki M, Naiki T, **Naiki-Ito A**, Morikawa T, Matsuyama N, Torii K, Kato T, Maruyama T, Inaguma S, Yasui T. Successful treatment with enfortumab-vedotin of metastatic signet ring cell cancer expressing nectin-4 and originating from the bladder. *IJU Case Rep*. 7:110-114, 2024.
13. Morikawa T, Iwatsuki S, **Naiki-Ito A**, Gonda M, Taguchi K, Naiki T, Hamamoto S, Okada A, Yasui T. Urothelial carcinoma occurring in a defunctionalized bladder after urinary diversion due to the bladder exstrophy-epispadias complex. *IJU Case Rep*.

#### 学会発表

1. **内木綾**、梯アンナ、加藤寛之、津田洋幸、高橋 智. 多層および単層カーボンナノチューブの肺・胸膜発がん性の比較. 第41回日本毒性病理学会総会 (2025年1月、静岡)
2. Omnia Hosny, Dina Saleh, David Alexander, William Alexander, Hiroshi Takase, Akihiko Hirose, Jun Kanno, **Aya Naiki-Ito**, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda, Carbon Nano-Horns (CNH) and Carbon Nano-Brushes (CNB) do not induce lung cancer or pleural mesothelioma in the rat lung, 第41回日本毒性病理学会総会 (2025年1月、静岡)
3. 青木マリア、**内木綾**、加藤寛之、内木拓、清水伸彦、恵谷俊紀、安井孝周、高橋智. 前立腺癌に対するルチンの化学予防効果の検討、第31回日本がん予防学会総会 (2024年9月、徳島)
4. 内木拓、**内木綾**、青木マリア、清水伸彦、森川敏治、権田将一、梅本幸裕、高橋智、安井孝周. 天然フラボノイドのサプリメントを用いた前立腺癌に対する進展予防研究、第31回日本がん予防学会総会 (2024年9月、徳島)
5. Xiaochen Kuang、**内木綾**、加藤寛之、小村理行、高橋智. Chemopreventive effects of angiotensin II receptor blocker on rat non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis、第31回日本がん予防学会総会 (2024年9月、徳島)
6. **内木綾**、内木拓、村上明寛、加藤寛之、高橋智. 前立腺癌に対するルテオリンの有効性と安全性に関する臨床的評価、第83回日本癌学会学術総会 (2024年9月、福岡)
7. 村上明寛、**内木綾**、高橋智. 前立腺癌の増殖に対するルテオリン誘導 miRNA の役割、第83回日本癌学会学術総会 (2024年9月、福岡)
8. 小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高

橋智. CD81-expressing stromal cells attract T cells into tumor microenvironment in breast cancer, 第83回日本癌学会学術総会 (2024年9月、福岡)

9. Xiaochen Kuang、**内木綾**、小村理行、加藤寛之、高橋 智. Angiotensin II receptor blocker suppresses liver fibrosis and carcinogenesis in rat non-alcoholic steatohepatitis model, 第83回日本癌学会学術総会 (2024年9月、福岡)
10. 稲熊真悟、小村理行、王程博、加藤寛之、**内木綾**、高橋智. CD70 and POSTN co-expression predicts worse clinical outcomes in patients with colorectal cancer, 第83回日本癌学会学術総会 (2024年9月、福岡)
11. 王程博、小村理行、加藤寛之、**内木綾**、稲熊真悟、高橋智. Lack of SATB2, and HNF4A expression predicts worse clinical outcome in patients with colorectal cancer, 第83回日本癌学会学術総会 (2024年9月、福岡)
12. 加藤寛之、**内木綾**、小村理行、稲熊真悟、高橋 智. Phosphorylated and whole proteome analysis in pancreatitis mice model, 第83回日本癌学会学術総会 (2024年9月、福岡)

#### 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。