別添３

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　総括研究報告書

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 R2-6 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、発がん性陽性 MWCNT により活性化マクロファージ(Mφ)によるケモカイン、活性酸素種の産生と、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。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SWCNT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により投与4週後から肺胞上皮の増殖（Ki67)、DNA損傷(γH2AX)、酸化的DNA損傷(8-OHdG)、炎症関連DNA損傷(8-nitrosoguanosine, 8-NG）マーカー、*Ccl*種mRNA発現が有意に増加し、SWCNTではKi67、8-NG、*Ccl*種mRNA発現の上昇を見た。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。RNA-seqによるGO解析では、CNTsに共通してMφ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*、*Ccl7*、*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。WGS 解析で観察されたSBS, DBS, ID変異数はSWCNTの方がMWCNT-N/Bよりも多かった。NMF解析により、C:G to T:A/A:T変異に特徴があるSBS_Aシグネチャーと T:A to G:C変異に特徴があるSBS_Bシグネチャーが抽出された。各サンプルにおけるSBS_A/Bの分布の割合から、SBS_Aは SWCNT由来、SBS_BはMWCNT-N/B由来であると推測できた。類似解析では、Rat_SBS_Bは新規のシグネチャーであり、Rat_SBS_AはSBS3, SBS5, SBS40と類似していた。SWCNT暴露群ではDBSが観察されたが、MWCNT-N/B暴露群では殆ど観察されなかった。また、ID解析の結果では、１塩基の欠失/挿入変異が優位である３種の IDシグネチャーが抽出され、このうち、 T/Aの連続６base以上の箇所で１塩基欠失/挿入変異が優位であるID_AシグネチャーはSWCNT由来、T/Aの連続６base以上の箇所で１塩基欠失/変異が優位である ID_BはMWCNT-M/B由来であることが推測された。このうち、ID_BはCOSMICデータのID2と類似していた。一方、MWCNT-7はすべての解析結果において、SWCNTと同様の傾向を示した。

以上より、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。現在 *in vivo* で高度の発現上昇を認めた *Spp1*、*Ccl7*、*Mmp12* について、*in vitro*（Mφ細胞）で検出可能か確認中である。一方、RNA-seqおよび変異シグネチャー解析では、SWCNT特異的な発がん機序も示唆された。これらの研究成果は、2024年11月11日に開催された班会議内で、班員、オブザーバー、厚労省化対室担当により議論された。

研究分担者

戸塚　ゆ加里　星薬科大学薬学部 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 R2-6 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 MWCNTs による活性化マクロファージ(Mφ)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)として期待された。

健康影響評価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、次世代シークエンサー(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 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。これまでに得られた CNT の AOP との相違を詳細にすることにより、AOP の高精度化や新規樹立を試み、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。また複数種類の CNT による遺伝毒性を NGS により解析し、変異シグネチャーを同定する。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や OECD TG に提案できる評価法を開発する。

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、Mφ局在（抗CD68抗体、BIO-RAD)、増殖活性（抗Ki67抗体、Abcam)、DNA損傷（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、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（1:20，10μg/ml）、KMU-P01, Cosmo Bio Co. LTD）、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）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による*Ccl*種、*Il*種や*Tnf-α*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（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（内木・梯）。また凍結肺からRIPA buffer（1×）でタンパク抽出し、Bradford法を用いて濃度を測定する。40μg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、ウエスタンブロット解析を行う（梯）。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：NGSによるCNT変異シグネチャー解析（戸塚、内木）

SWCNTおよびMWCNT-N/BをF344ラットにTIPS投与し、発生した肺がん及び中皮腫サンプルを用いてこれら化学物質に由来する変異シグネチャーの同定を試みる。中皮腫のFFPEサンプルから腫瘍部分を削り取り、中皮腫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を次世代シークエンサー(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-N/Bを投与して得られた胸膜中皮腫及び肺がん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）。

(3) *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48時間

培養する。マウスMφ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（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±0.5g）と対照（vehicle）群（1.5±0.1g）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±0.1g）、MWCNT-N（低用量群1.8±0.5g、高用量群1.9±0.1g）、SWCNT（低用量群1.6±0.3g、高用量群2.4±0.7g、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、γH2AX、8-OHdG)

4、13、52、104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、γH2AXおよび8-OHdG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、γH2AX 、8-OHdGの上昇は認めなかった（図1-4）。

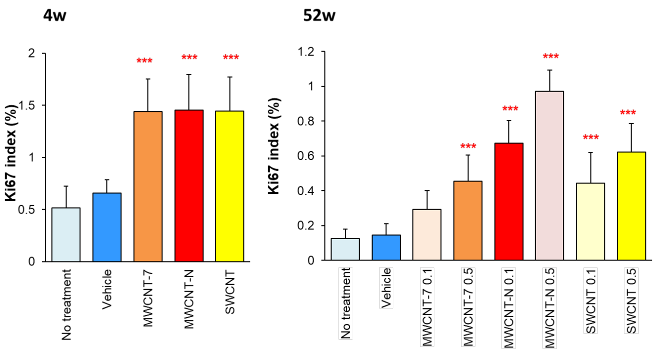

図1. CNT投与による肺胞上皮増殖活性の変化（Ki67免疫染色）、***P ＜ 0.001 vs Vehicle.

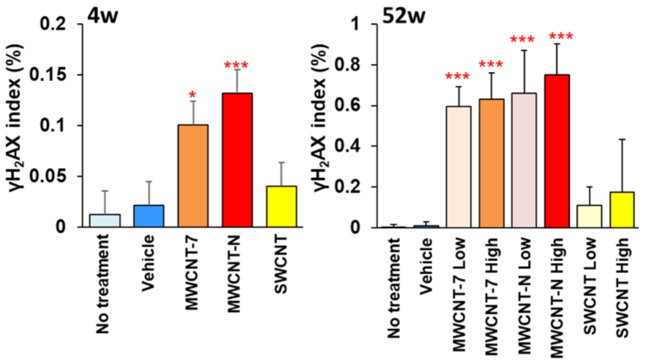

図2. CNT投与による肺胞上皮DNA損傷の変化（γH2AX免疫染色）、***P ＜ 0.001 vs Vehicle.

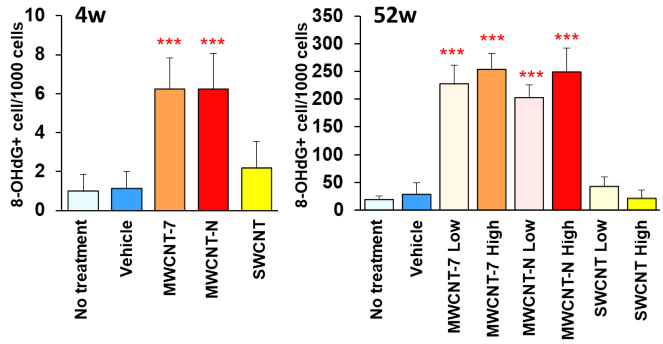

図3. CNT投与による肺胞上皮酸化的DNA損傷の変化（8-OHdG免疫染色）、***P ＜ 0.001 vs Vehicle.

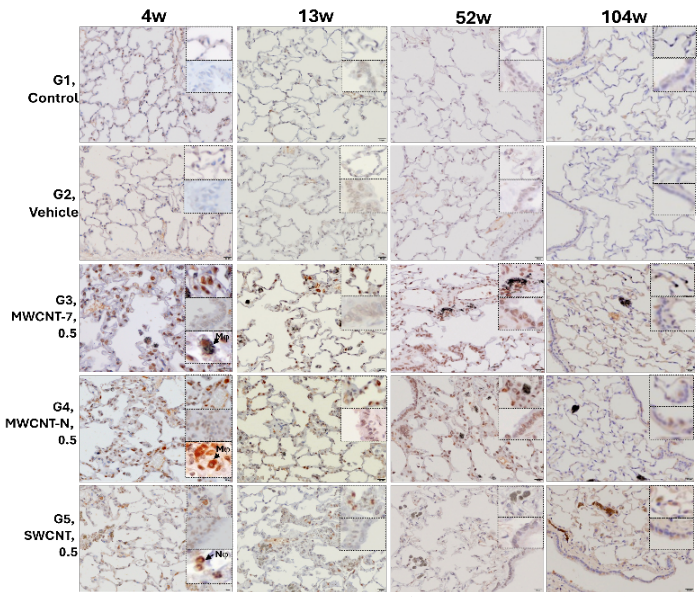

図4. 実験2における8-OHdG免疫染色の代表的な写真(4, 13, 52および104週).

さらに、MWCNT-7およびMWCNT-N およびSWCNTの4、13、52および104週間投与後、肺に浸潤した多くの8-OHdG陽性Mφ（細胞質や核内）や好中球（Nφ）（核内）が観察され、その数は、MWCNT-7およびMWCNT-N投与群で有意に増加していた（図3, 4）。詳細には、MWCNT-7およびMWCNT-N投与群では多くの8-OHdG陽性Mφが観察された一方、SWCNT投世群では8-OHdG陽性MφおよびNφが多く見られた（図5）。

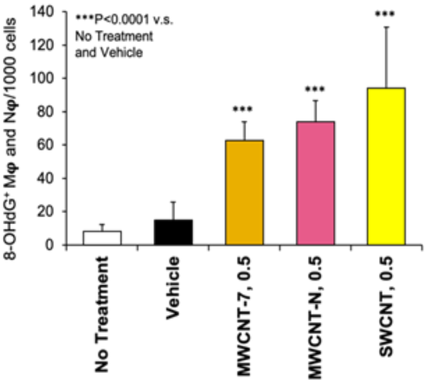

図5. CNT投与による8-OHdG陽性マクロファージ(Mφ)と好中球(Nφ)数の変化（13週）、
***P ＜ 0.0001 vs No treatment、Vehicle.

(1)-3. CNTによる肺有害性の解析(8-NG、iNOS、COX2)

8-NG免疫染色を用いた解析結果を図6に示す。SWCNT投与群では投与開始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、特にMφやNφ （核と細胞質)に多くの陽性像が観察された(図6)。また13週目からは、MWCNT-7およびMWCNT-N 0.5 mg/rat投与群においても8-NG陽性細胞数が増加していた(図6)。8-NG発現上昇と関連して、免疫染色およびウエスタンブロット解析においてnitric oxide (NO)産生酵素iNOS/NOSおよび炎症マーカーcyclooxygenase 2 (COX2)の発現上昇が観察された（図7)。

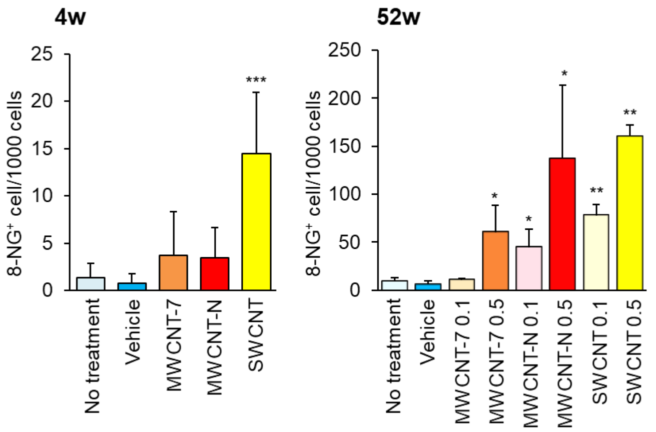

図6. CNT投与による肺胞上皮炎症関連DNA損傷の変化（8-NG免疫染色）、*P ＜ 0.05、**P ＜ 0.01 vs Vehicle.

(1)-4. CNTによる胸膜中皮有害性の解析（Ki67、γH2AX

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±5.2 mg/dl, 66.5±12.2 μg/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±8.7 mg/dl, P<0.05, 86.0±19.0 μg/ml, P<0.05)。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投与群では明らかな変化は見られなかった（図8）。一方、γH2AX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9）。

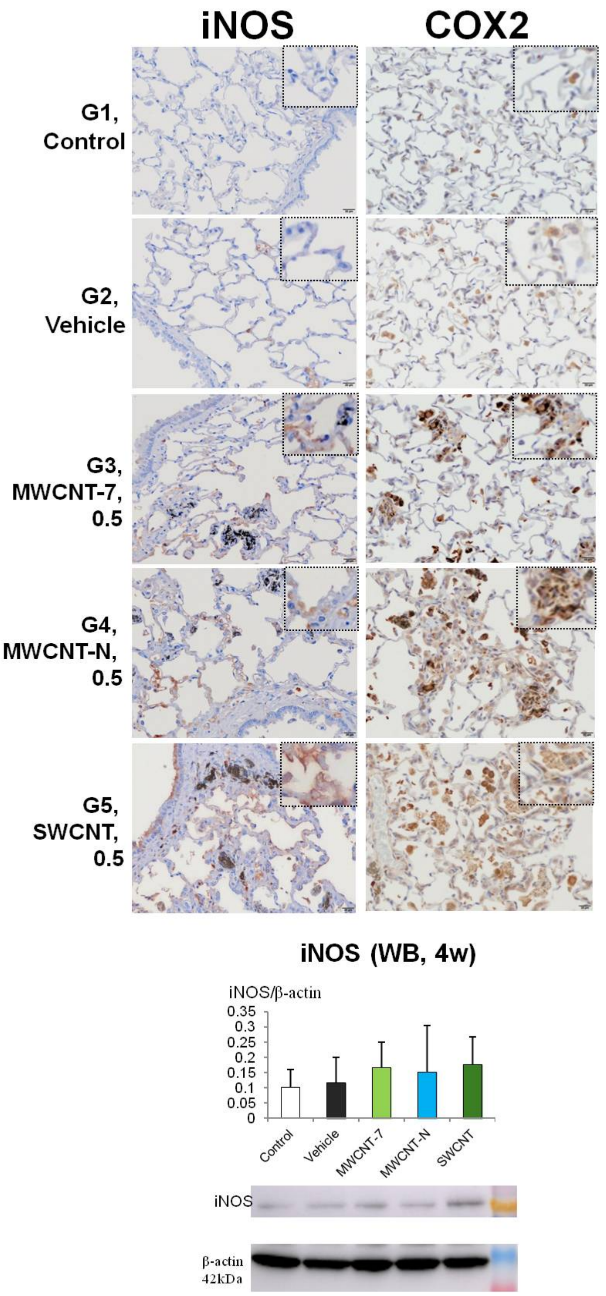

図7. CNT投与による肺iNOSおよびCOX2の発現上昇（免疫染色、13週；ウエスタンブロット、4週、n=5）.

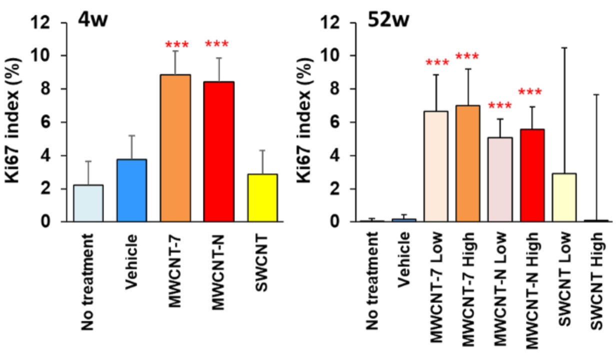

図8. CNT投与による心膜中皮細胞増殖活性の変化（Ki67免疫染色）、***P ＜ 0.001 vs Vehicle.

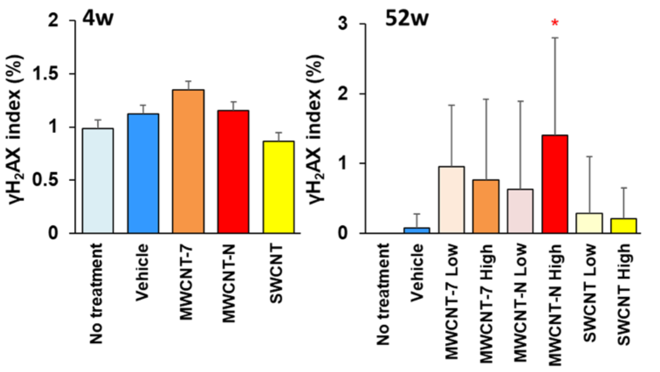

図9. CNT投与による心膜中皮細胞DNA損傷の変化(γH2AX免疫染色)、*P ＜ 0.05 vs Vehicle.

<u>(1)-5. 肺および胸膜中皮における増殖性病変の定量</u>

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高用量群群（6/19匹）、SWCNT低用量群（3/18匹）、SWCNT高用量群群（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高用量群群（3/19匹）、SWCNT低用量群（2/18匹）、SWCNT高用量群群（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高用量群群（6/19匹、P<0.05）、SWCNT低用量群（0/18匹）、SWCNT高用量群群（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。肺胞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高用量群群（9/19匹、P<0.01）、SWCNT低用量群（2/18匹）、SWCNT高用量群群（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10）。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高用量群群（7/19匹、P<0.001）、SWCNT低用量群（1/18匹）、SWCNT高用量群群（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。

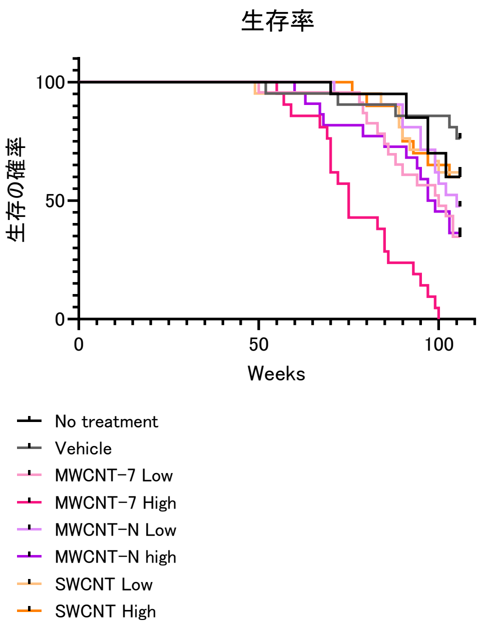

図10. CNT投与後のラット生存率.

<u>(1)-6. 肺におけるサイトカインmRNA発現の定量</u>

4、13、52 週における肺のケモカイン、サイトカイン mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR により解析した。いずれの期間でも同様の傾向で、4 週の結果を示す（図 11）。肺発がん感受性の高いと考えられる MWCNT-N は、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl9*、*Tnfα*および *Il-1β*の発現が有意に上昇した。MWCNT-7 では *Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl9*、SWCNT では *Ccl2*、*Ccl3*、*Tnfα*および *Il-1β*の発現量が有意に上昇した。

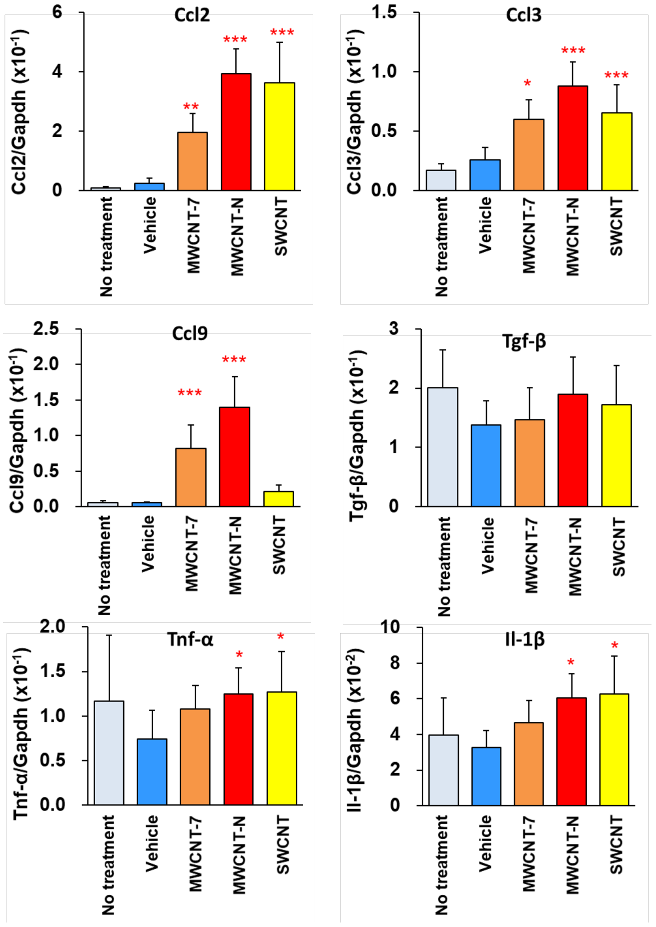

図11. CNT投与による肺サイトカインmRNA発現量の変化、4週（定量RT-RCR）、**P ＜ 0.01、***P ＜ 0.001 vs Vehicle.

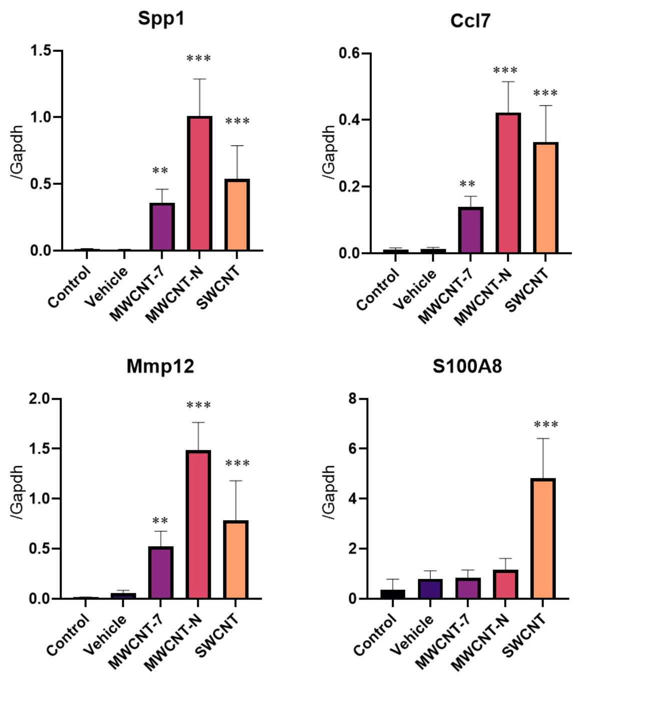

図12. CNT投与による肺mRNA発現量の変化、4週（定量RT-RCR）、**P ＜ 0.01、***P ＜ 0.001 vs Vehicle.

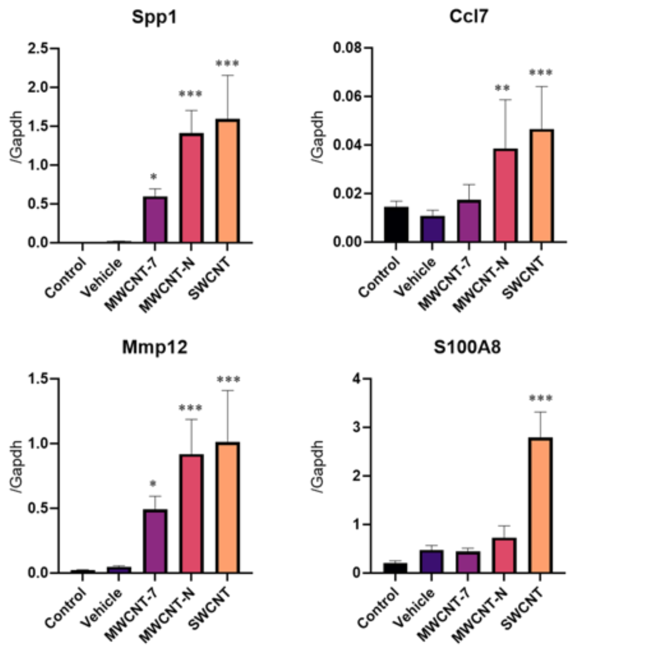

図13. CNT投与による肺mRNA発現量の変化、13週（定量RT-RCR）、*P ＜ 0.05、**P ＜ 0.01、***P ＜ 0.001 vs Vehicle.

(1)-7. 肺における遺伝子発現解析（RNA-seq）

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、MWCNT-N および SWCNT 投与群ではファゴソームの形成、オートファジー、G protein-coupled 受容体や FAK シグナリングの活性化が認められた一方、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。IPA の上流調節因子解析により 0.5 mg/rat MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT の 4 週間投与の場合は免疫反応関連因子、すなわち TNFα、CSF2、CSF3、多くの interleukins（ILs）および interferons（INFs）、INF 調節因子(IRF3,7), tall-like receptor 7,4 (TLR4, TLR7),転写因子 STAT1,2,3, TICAM 1、MAVS および EIF2AK2 の活性化や予測された（表 2）。さらに、細胞増殖やオートファジーの調節因子 NFkB, RELA, IKBKE およびの活性化を認められた。

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 metallopeptidase 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 12）。またこの傾向は、13 週の肺サンプルでも同様であった（図 13）。

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 14、15）。

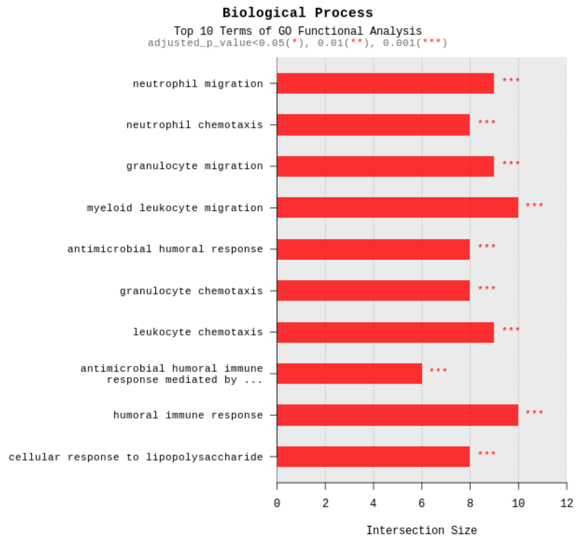

図 14. CNT 投与による RNA シーケンシング解析、GO エンリッチメント解析 （Biological Function）、4 週、***P ＜ 0.001 SWCNT vs MWCNTs.

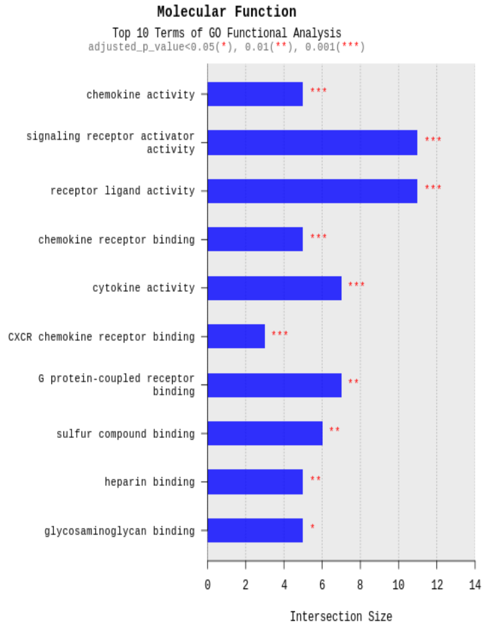

図15. CNT投与によるRNAシーケンシング解析、GOエンリッチメント解析 （Molecular Function）、4週、***P ＜ 0.001 SWCNT vs MWCNTs.

(1)-8. 肺におけるタンパク発現解析

TIPS 投与後 4 週におけるウエ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 16）。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。

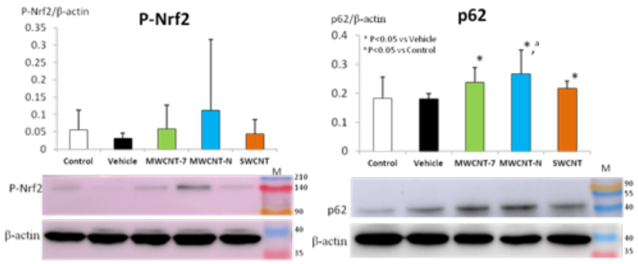

図16. CNT投与による肺タンパク発現量の変化、4週（ウエスタンブロット）、*P ＜ 0.05 vs Vehicle.

(2) *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SWCNT, MWCNT-N/Bを投与し誘発した中皮腫/肺がん15検体（SWCNT:7検体、MWCNT-N：4検体、MWCNT-B:3検体、MWCNT-7:1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クエンス(150bp Paired End)を行った（表1）。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 （Strelka)により体細胞変異の検出を行った。さらに、SigProfilerExtractorで一塩基置換(SBS) 解析を実施した結果、2種類の変異シグネチャー（Rat_SBS_AおよびB）が同定された（図17）。このうち、Rat_SBS_AはC:G to T:A/A:T変異に特徴があり、Rat_SBS_BはT:A to G:C変異に特徴がある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2種類の変異シグネチャー分布について図18に示す。図18からわかるように、SWCNTおよびMWCNT-7による中皮腫では、MWCNT-NおよびB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、全てのサンプルにおいてRat_SBS_A（ピンク色）が90%以上を占めていることがわかった。一方、MWCNT-NおよびBではSWCNTやMWCNT-7と比較しても圧倒的に少ない変異数であり、かつ全ての検体でRat_SBS_B（橙色）の占める割合が多いことがわかった（図18）。

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、SBS5およびSBS40（いずれも要因は不明）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は、新規の変異シグネチャーである可能性が示唆された（表2）。

Treatment	Tissue	Pathology
SWCNT	Lung/Liver	Adenocarcinoma
SWCNT	Lung/Liver	Adenocarcinoma
SWCNT	Lung/Liver	Adenocarcinoma
SWCNT	Lung/Liver	Adenocarcinoma
SWCNT	Lung/Liver	Adenocarcinoma
SWCNT	Lung/Liver	Adenocarcinoma
SWCNT	Lung/Liver	Adenocarcinoma
MWCNT-7	Lung/Liver	Adenocarcinoma
MWCNT-N	Lung/Liver	Mesothelioma
MWCNT-N	Lung/Liver	Adenocarcinoma
MWCNT-N	Lung/Liver	Mesothelioma
MWCNT-N	Lung/Diaphragm	Mesothelioma
MWCNT-B	Lung/Liver	Adenocarcinoma
MWCNT-B	Lung/Liver	Adenocarcinoma
MWCNT-B	Lung/Liver	Adenocarcinoma

表1.全ゲノム解析を行ったCNT投与ラット肺がん及び中皮腫.

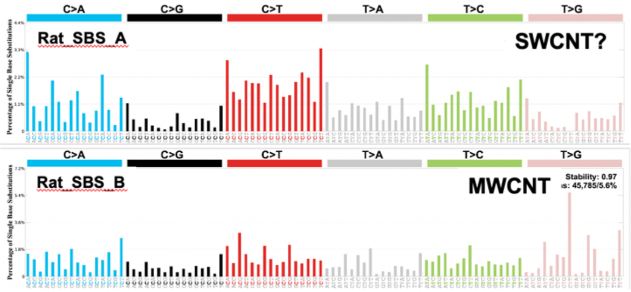

図17. SWCNT/MWCNT-NおよびB暴露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定されたSBS変異シグネチャー.

次に、2 塩基置換(DBS)および欠失変異（ID）についても同様に解析を実施した。その結果、SWCNT 暴露群では DBS が観察されたが、MWCNT-N/B 暴露群では殆ど観察されなかった（図 19-1）。また、2 種類の DBS シグネチャーが抽出されたが、いずれも既存の DBS シグネチャーとは類似せず、新規のシグネチャーであることがわかった（図 19-2）。

一方、挿入欠失変異（ID）解析の結果、１塩基の欠失/挿入変異が優位である3種のIDシグネチャーが抽出され、このうち、 T/Aの連続６base以上の箇所で１塩基欠失/挿入変異が優位であるID_AシグネチャーはSWCNT由来、T/Aの連続６base以上の箇所で１塩基欠失変異が優位であるID_BはMWCNT-M/B由来であることが推測された。このうち、ID_BはCOSMICデータのID2（DNA複製の際のSlippageにより導入される挿入欠失変異）と類似していた（図20-1,2,表3）。

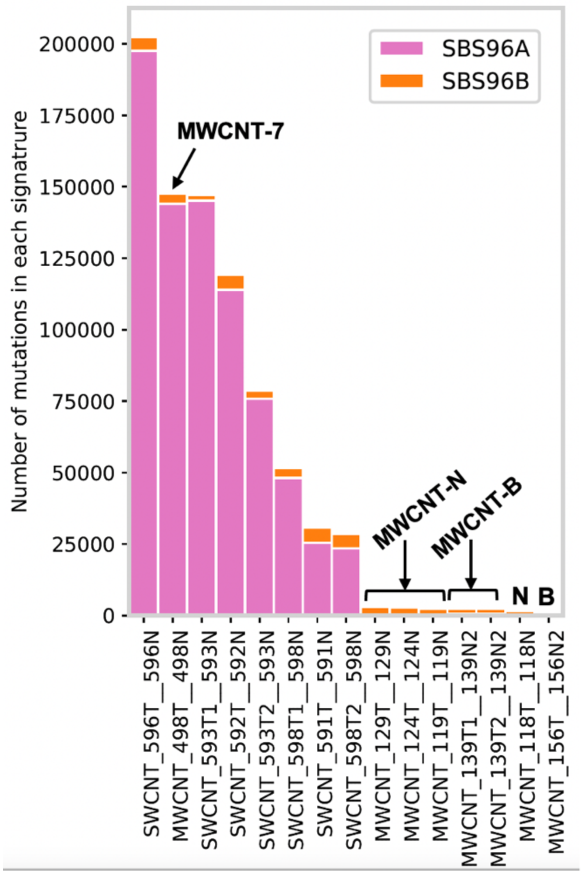

図 18. サンプル毎の SBS 変異数と 2 種類の変異シグネチャー分布.

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
Rat SBS_A	SWCNT	SBS3 SBS5 SBS40	0.80 0.86 0.87
Rat SBS_B	MWCNT	SBS3 SBS5 SBS9 SBS40	0.72 0.71 0.73 0.77

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.

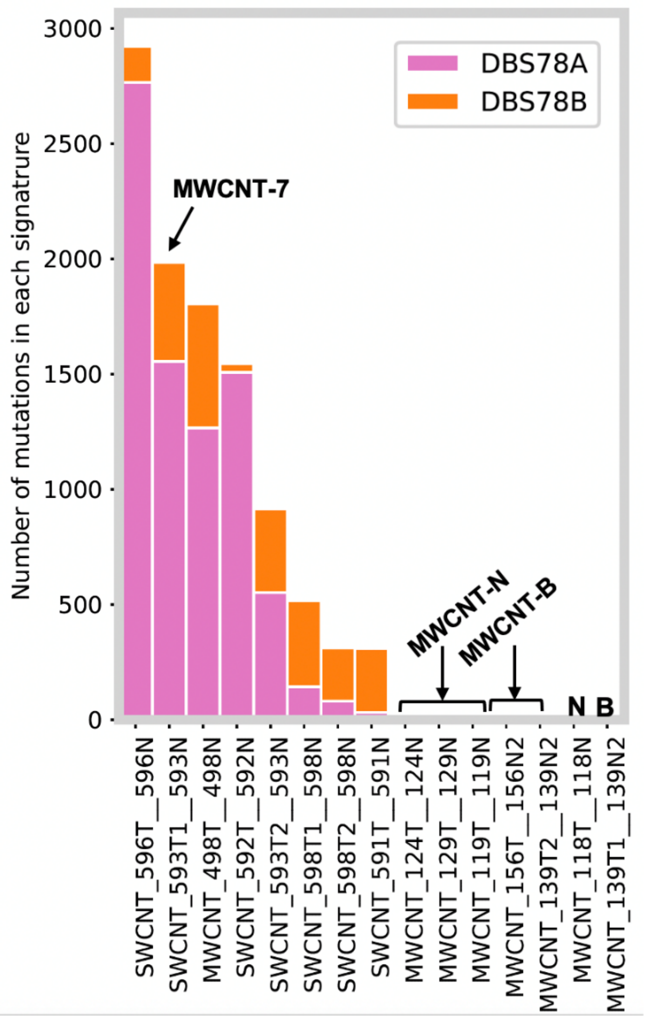

図 19-1. サンプル毎の DBS 変異数と 2 種類の変異シグネチャー分布.

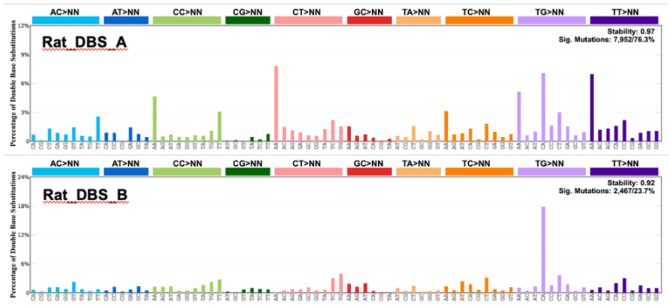

図 19-2. SWCNT/MWCNT-N および B 暴露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定された DBS 変異シグネチャー.

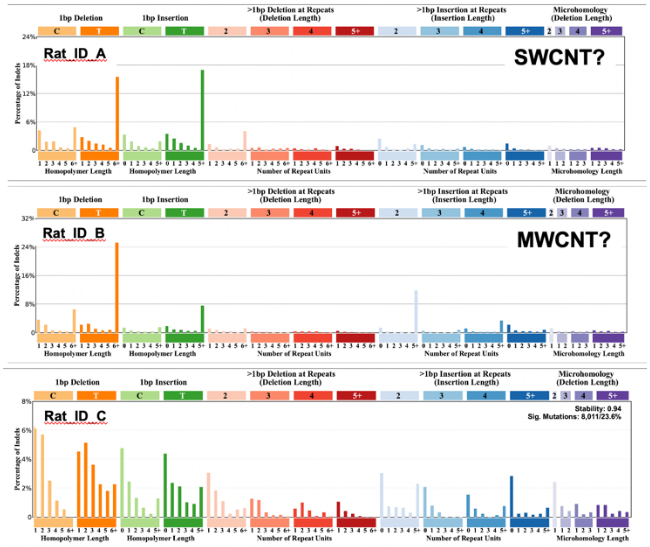

図 20-1. SWCNT/MWCNT-N および B 暴露により誘発した中皮腫/肺腫瘍サンプルから同定された ID 変異シグネチャー.

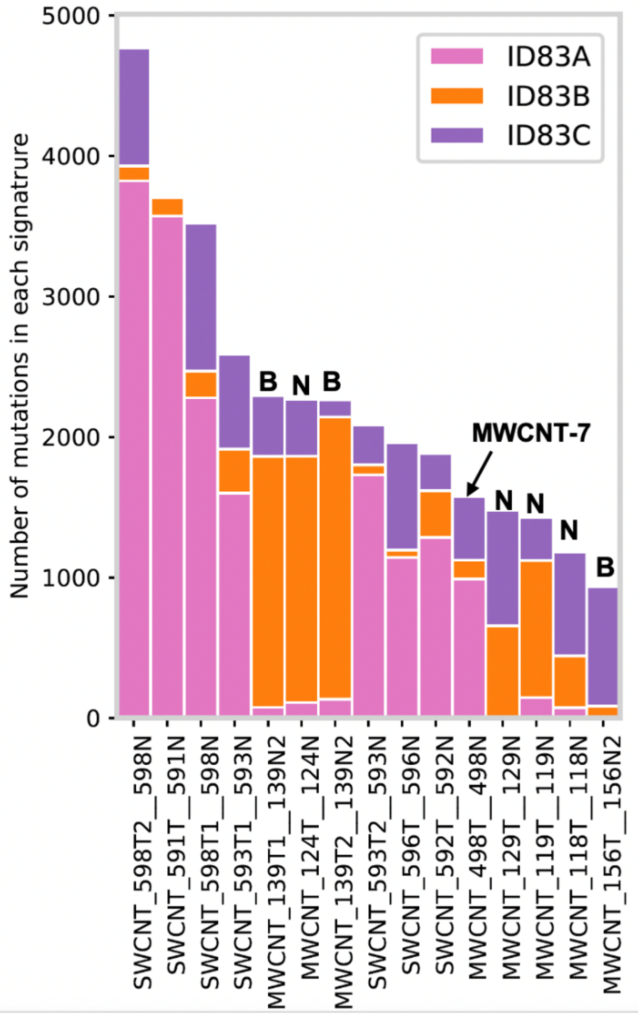

図 20-2. サンプル毎の ID 変異数と 3 種類の変異シグネチャー分布.

Rat signature	Associated chemical exposure	COSMIC signature best match	Cosine similarity
Rat ID_A	SWCNT	ID1	0.66
Rat ID_B	MWCNT	ID2	0.83
Rat ID_C	MWCNT	ID5	0.69

表3. 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.

(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。10μg/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21）。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22）。

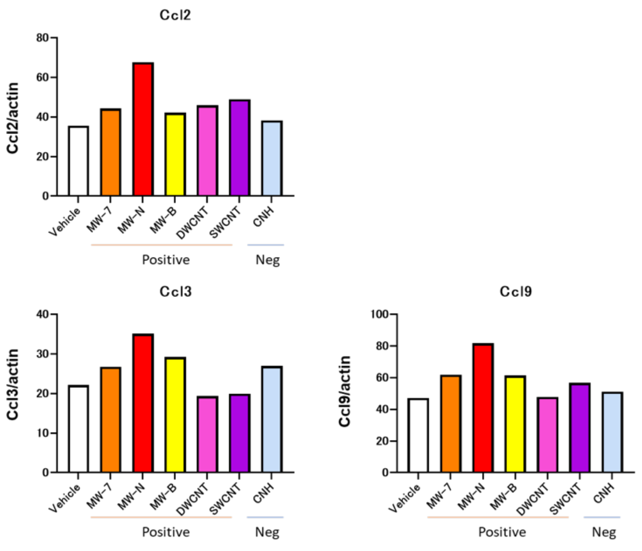

図21. CNT投与によるマウスMφ細胞（RAW264.7）の*Ccl*種発現の変化（定量RT-PCR）、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Vehicle.

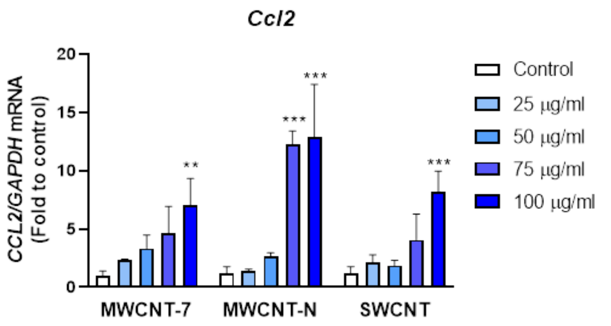

図22. CNT投与によるマウスMφ細胞（RAW264.7）の*Ccl2*発現の変化（定量RT-PCR）、**P < 0.01、***P < 0.001 vs Control.

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、安定した投与手法、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、有害性の評価指標に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、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、肺発がん性は陽性であることが新たに明らかになった(論文作成中)。CNTs投与による肺胞上皮、中皮細胞増殖活性の変化は、いずれの実験期間においても発がん性と相関しており、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た。一方肺の酸化的DNA損傷マーカー(8-OHdG)、炎症関連DNA損傷マーカー（8-NG)とDNA損傷マーカー(γH2AX)の定量結果は、MWCNTsとSWCNTで異なる傾向を示し、発がん機序の違いを表現している可能性が考えられた。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*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た。RNA-seqでは、*Ccl*種よりCNTによる発現変動が大きい遺伝子が検出され（*Spp1*、*Ccl2*、*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応用可能かについても今後検討していく必要がある。

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。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等の誘導が8-OHdG形成レベルと相関し、高値を示した。SWCNT投与群では有意な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が誘導することが示唆された。これは、RNA-seq解析において、SWCNTのみで好中球関連シグナルが誘導されることと一致していた。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、NFκBの活性化および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。

SWCNTおよびMWCNT-NまたはMWCNT-B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SWCNT暴露群で非常に多く、MWCNT-Nまたは-B暴露では少ないことがわかった。また、抽出された変異シグネチ

ャーのパターンはSWCNT/WWCNT-7とMWCNT-N/-Bでは大きく異なっており､これらナノマテリアル暴露における発がんのメカニズムが異なることが示唆された。なお、本結果はStrelka(Ver2)を用いて変異検出を行い、SigProfilerExtractor (v.1.1.3)にて解析したものであり、現在、Mutect 2でもゲノム変異解析を実施しており、これらのデータを統合することで､信憑性の高い結果が得られると考えている。また、昨年度までに解析したMWCNT-7暴露やその他の肺発がん物質(DHPN)の解析結果とも統合して変異シグネチャーの解析を実施し､発がんメカニズムの解明や人発がんにおける貢献度などについても検討する予定である。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。

今年度は､2024年11月11日に名古屋市立大学において､班員、小川久美子先生 (化学物質リスク研究事業の関連研究[毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究(22KD1003)]の研究代表者)､笠井辰也先生(吸入暴露試験の専門家)､行政を交えて本研究の成果を共有、議論した。吸入暴露試験を代替する際に､気管内投与濃度は暴露環境濃度を反映することが重要で､本研究班のTIPS法で使用されたMWCNTの投与量は、吸入暴露試験の肺沈着量と同程度であることから､本法の結果からは一定の期待が持てる点と、再現性や実現可能性を高めていくことを確認した。

また、2024年7月18日に、国立医薬品食品衛生研究所で開催された小川班班会議に参加し（内木、津田）、本研究班の研究成果の共有と化学物質の共通の投与法であるTIPS投与や、急性毒性、慢性毒性、発がん性について意見交換をした。

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､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、酸化的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応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*、*Ccl2*、*Mmp12*)を用いてさらに解析をする。

MWCNTまたはSWCNT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、観察されたSBS, DBS, ID変異数はSWCNTの方がMWCNT-N/Bよりも多かった。NMF解析により、C:G to T:A/A:T変異に特徴があるSBS_Aシグネチャーと T:A to G:C変異に特徴があるSBS_Bシグネチャーが抽出された。各サンプルにおけるSBS_A/Bの分布の割合から、SBS_Aは SWCNT由来、SBS_BはMWCNT-N/B由来であると推測できた。類似解析の結果から、Rat_SBS_Bは新規のシグネチャーであり、Rat_SBS_AはSBS3, SBS5, SBS40と類似していることがわかった。SWCNT暴露群ではDBSが観察されたが、MWCNT-N/B暴露群では殆ど観察されなかった。また、ID解析の結果では、1塩基の欠失/挿入変異が優位である3種のIDシグネチャーが抽出され、このうち、 T/Aの連続6base以上の箇所で１塩基欠失/挿入変異が優位であるID_AシグネチャーはSWCNT由来、T/Aの連続６base以上の箇所で１塩基欠失変異が優位であるID_BはMWCNT-M/B由来であることが推測された。このうち、ID_BはCOSMICデータのID2と類似していた。一方、MWCNT-7はすべての解析結果において、SWCNTと同様の傾向を示した。現在、Mutect 2でもゲノム変異解析を実施しており、これらのデータを統合することで､信憑性の高い結果が得られると考えている。また､MWCNT-7暴露やその他の肺発がん物質の解析結果とも統合して変異シグネチャーの解析を実施し、発がんメカニズムの解明や人発がんにおける貢献度などについても検討する予定である。

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. Experoence 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, Umemoto 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. 7:101-104, 2024.
14. Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, **Totsuka Y**. Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development. Int J Mol Sci. 25, 2024.
15. Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, **Totsuka Y**. Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. Oct;899:503821. 2024.
16. Imai T, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, **Totsuka Y**. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. J Toxicol Sci. 49(10):425-434, 2024.
17. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, **Kakehashi A**, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. J Toxicol Pathol. 38(1): 59-67 2024.
18. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. J Toxicol Pathol. 38(2), 147-154, 2024.
19. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, **Kakehashi A**, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. J Toxicol Pathol. 38(2):161-165, 2024.
20. 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.
21. 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. Arch Toxicol. 98(7):1-20, 2024.
22. Suzuki S, Gi M, Kobayashi T, Miyoshi N, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, **Kakehashi A**, Suemizu H, Wanibuchi H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis (2-chloroaniline) in humanized-liver mice. Toxicol Sci. 202(2):210–219, 2024.
23. **梯アンナ**. プロポリスの抗がん作用の解明. News Letter of Cancer Prevention Society of Japan. 第 115 巻, pp. ３, 2024.

2. 学会発表

1. **内木綾**、**梯アンナ**、加藤寛之、**津田洋幸**、髙橋智. 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、髙橋智. 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、髙橋智、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、髙橋智. 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、髙橋智. 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**、髙橋智. 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、髙橋智. 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、髙橋智. Angiotensin II receptor blocker suppresses liver fibrosis and carcinogenesis n 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、髙橋智. CD70 and POSTN co-expression predicts wprse clinical outcomes inpatients 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、髙橋智. 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、髙橋智. 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）
13. 戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた化学物質の遺伝毒性評価、第145年会日本薬学会（2025年3月、福岡）
14. 宮崎飛翔、藤岡正喜、鰐渕英機、美谷島克宏、石ケ守里加子、加藤孝一、戸塚ゆ加里. マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規毒性試験法の開発、第145年会日本薬学会（2025年3月、福岡）
15. 渡部浩平、下村航平、安藤彩花、佐藤玲香、鈴木千咲、武内まどか、三好規之、小林琢磨、戸塚ゆ加里、加藤孝一、中嶋順一. 二環芳香族アミンにおける遺伝毒性評価、第145年会日本薬学会（2025年3月、福岡）
16. 本橋実奈、高村岳樹、佐々彰、加藤孝一、中嶋順一、戸塚ゆ加里. 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145年会日本薬学会（2025年3月、福岡）
17. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri ZAVADIL、渡部浩平、戸塚ゆ加里. 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145年会日本薬学会（2025年3月、福岡）
18. 戸塚ゆ加里、石ケ守里加子、牛山明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子. 加熱タバコ製品の吸入暴露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会（2024 年 12 月、岡山）
19. 戸塚ゆ加里、永井桃子、加藤護. 次世代シークエンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会（2024 年 12 月、岡山）
20. 石ケ守里加子、柳澤萌、大野彰子、戸塚ゆ加里. マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストナノマテリアルの毒性評価、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会（2024 年 12 月、岡山）
21. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤護、魏民、鈴木周五、鰐渕英機、松田知成、戸塚ゆ加里. *N*—ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会（2024 年 12 月、岡山）
22. 渡部浩平、三好規之、戸塚ゆ加里. 二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会（2024 年 12 月、岡山）
23. 戸塚ゆ加里. オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第 85 回 MMS 秋の定例会（2024 年 12 月、岡山）
24. 戸塚ゆ加里. DNA 付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明、第 47 回日本分子生物学会年会（2024 年 11 月、福岡）
25. 戸塚ゆ加里. 環境要因による DNA 付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探索、環境エピゲノミクス研究会（EEG）2024 秋季ネットシンポジウム（2024 年 11 月、Web 開催）
26. 戸塚ゆ加里. DNA 付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明、アンチエイジング研究シンポジウム（2024 年 10 月、文京区）
27. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、煙山紀子、加藤護. Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products, 第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 9 月、福岡）
28. **Yukari Totsuka**. Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference,（2024 年 6 月、京都）
29. **Yukari Totsuka**. New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 第 42 回札幌国際がんシンポジウム（2024 年 6 月、札幌）
30. 戸塚ゆ加里. DNA 付加体研究の過去・現在・未来、令和 6 年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム（2024 年 6 月、港区）
31. **Anna Kakehashi**, Yusaku Nishidoi, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Ikue Noura, Vachiraarunwong Arpamas, Masaki Fujioka, Min Gi, Hideki Wanibuchi. PRDX3 as a novel biomarker of human invasive pancreatic ductal carcinoma, 第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 9 月、福岡）
32. Shugo Suzuki, Min Gi, Masaki Fujioka, Arpamas Vachiraarunwong, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi. Effects of apocynin, NADPH oxidase inhibitor, on o-toluidine-induced urinary bladder proliferation, 第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 9 月、福岡）
33. Ikue Noura, Shugo Suzuki, **Anna Kakehashi**, Takeshi Inoue, Hideki Wanibuchi. Examination of new biomarker candidates for large cell

neuroendocrine carcinoma of the lung, 第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 9 月、福岡）

34. Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Giuyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, Ikue Noura, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Evaluation of the Hepatocarcinogenic Potential of Dimethylarsinic Acid in Humanized-Liver Mice, 第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 9 月、福岡）
35. Guiyu Qiu, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi. Development of Rapid Models for Predicting Genotoxic Hepatocarcinogenicity in Rats, 第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 9 月、福岡）
36. Runjie Guo, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Kwanchanok Praseatsook, **Anna Kakehashi**, Hideki Wanibuchi. Role of Oncomodulin in N-butyl- N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis, 第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 9 月、福岡）
37. Ahmed HM Omnia, Dina M Saleh, Alexander DB, Alexander TW, Takase H, Takahashi S, Yudasaka M, Yuge R, **Tsuda H.** Assessment of Pulmonary Toxicity and Carcinogenicity of Carbon Nano-Horns (CNH) and Carbon Nano-Brushes (CNB) Using Intra Tracheal Instillation in the Rats, 第 51 回日本毒性学会学術年会（2024 年 7 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。