

謝 暁利、山野莊太郎、陳 慶義、梯アンナ、鰐淵英機：ラット膀胱発がん早期におけるインロイシンおよびロイシンの修飾作用の検討。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

多胡善幸、山野莊太郎、山田貴宣、串田昌彦、北野光昭、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮がんにおける二段階発がんモデルの開発。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

石井真美、魏 民、梯アンナ、仲谷慎也、森 聖、鰐淵英機：ラット多臓器発がんにおける糖尿病の影響。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

鰐淵英機、魏 民、多胡善幸、石井真美、謝 暁利、蟹江尚平：ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いた浸潤性膀胱がんモデルの開発。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

山田貴宣、魏 民、菅 直人、多胡善幸、山野莊太郎、鰐淵英機：DPAA 投与ラットの肝臓を用いたプロテオーム解析。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

山野莊太郎、梯アンナ、魏 民、多胡善幸、陳慶義、鰐淵英機：QSTAR Elite LC-MS/MS を用いたマウス肺腫瘍におけるプロテオーム解析。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、石井真美、北野光昭、鰐淵英機：MicroRNA-125b はラット膀胱発がんの早期マーカーとして有用である。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

菅 直人、金川明裕、山田貴宣、大保ゆみ、鰐淵英機：膀胱尿路上皮におけるジメチルモノチオアルシン酸の影響。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

丁 奎光、梯アンナ、今中麻幸代、山野莊太郎、魏 民、西山典利、鰐淵英機：QSTAR Elite LC-MS/MS を用いたヒト肺腺癌におけるプロテオーム解析。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

則座由依、梯アンナ、丁 奎光、林 修次、鰐淵英機：ラット炎症性大腸がんモデルにおけるプロポリスの修飾作用の検討。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜市（2009 年 10 月）

鰐淵英機：動物モデルを用いたヒ素の発がん性と発生機序の解明。第 15 回ヒ素シンポジウム、大阪市（2009 年 11 月）

山田貴宣、謝 暁利、魏 民、菅 直人、梯アンナ、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸による肝発がん促進作用の機序解明。第 15 回ヒ素シンポジウム、大阪市（2009 年 11 月）

菅 直人、謝 暁利、金川明裕、吉田 香、魏 民、圓藤吟史、鰐淵英機：膀胱尿路上皮におけるジメチルモノチオアルシン酸の影響。第 15 回ヒ素シンポジウム、大阪市（2009 年 11 月）

石井真美、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、仲谷慎也、鰐淵英機：2 型糖尿病自然発症ラットを用いた糖尿病の発がんに及ぼす影響の検討。第 26 回日本毒性病理学会、金沢市（2010 年 2 月）

山田貴宣、魏 民、菅 直人、金川明裕、林 修次、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸による肝発がん促進作用の機序解明。第 26 回日本毒性病理学会、金沢市（2010 年 2 月）

大保ゆみ、魏 民、山野莊太郎、北野光昭、星学、鰐淵英機：ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いた浸潤性膀胱がんモデルの開発。第 26 回日本毒性病理学会、金沢市（2010 年 2 月）

仲谷慎也、石井真美、山野莊太郎、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：2 型糖尿病モデルラットの糸球体を用いたプロテオーム解析。第 26 回日本毒性病理学会、金沢市（2010 年 2 月）

カン ジン ソック、鰐淵英機、福島昭治：Decrease of liver tumor formation in CYP2E1-null mice treated with diethylnitrosamine. 第 26 回日本毒性病理学会、金沢市（2010 年 2 月）

金川明裕、菅 直人、吉田 香、圓藤吟史、森聖、魏 民、鰐淵英機：ジメチルアルシン酸の代謝経路の解明。第 26 回日本毒性病理学会、

金沢市 (2010年2月)

山野荘太郎、梯アンナ、多胡善幸、山田貴宣、丁 奎光、魏 民、鰐淵英機：QSTAR Elite LC-MS/MSを用いたマウス肺腫瘍におけるプロテオーム解析。第26回日本毒性病理学会、金沢市 (2010年2月)

多胡善幸、山田貴宣、山野荘太郎、北野光昭、鰐淵英機：PJJ-34マウス肺扁平上皮がんに対する抑制作用の検討。第26回日本毒性病理学会、金沢市 (2010年2月)

則座由依、梯アンナ、山野荘太郎、大保ゆみ、蟹江尚平、鰐淵英機：ラット炎症性大腸がんモデルにおけるプロポリスの修飾作用の検討。第26回日本毒性病理学会、金沢市 (2010年2月)

謝 暁利、山野荘太郎、梯アンナ、則座由依、陳 慶義、鰐淵英機：Lack of effects of isoleucine and leucine at early stage of BBN-induced rat bladder carcinogenesis. 第26回日本毒性病理学会、金沢市 (2010年2月)

菅 直人、金川明裕、山田貴宣、吉田 香、圓藤吟史、魏 民、鰐淵英機：膀胱尿路上皮における dimethylmonothioarsinic acid の影響。第26回日本毒性病理学会、金沢市 (2010年2月)

魏 民、山野荘太郎、石井真美、梯アンナ、鰐淵英機：ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いた浸潤性膀胱がんモデルの開発。第99回日本病理学会総会、東京都 (2010年4月)

山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、魏 民、鰐淵英機：QSTAR Elite LC-MS/MSを用いたマウス肺腫瘍におけるプロテオーム解析。第99回日本病理学会総会、東京都 (2010年4月)

石井真美、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、若狭研一、鰐淵英機：ペリニ管癌の剖検例。第99回日本病理学会総会、東京都 (2010年4月)

魏 民、金川明裕、田尻正喜、山田貴宣、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機：ヒ素膀胱発がん原因物質の探索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の同定およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討。第25回発癌病理研究会、松島市 (2010年8月)

魏 民、石井真美、北野光昭、多胡善幸、福島昭治、鰐淵英機：IQの発がん性には実際的な閾値が存在する。第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

金川明裕、魏 民、田尻正喜、仲谷慎也、武下正憲、吉田 香、鰐淵英機：DMA<sup>V</sup>誘発ラット膀胱発癌における DMMTA<sup>V</sup>の役割。第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

梯 アンナ、石井真美、山野荘太郎、大保ゆみ、林 修次、鰐淵英機：マウス肝発がんにおけるプロテオーム解析を用いた新たなバイオマーカーの検討。第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

大保ゆみ、魏 民、山野荘太郎、謝 暁利、星学、神吉将之、鰐淵英機：gpt delta ratを用いたダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討。第69回日本癌学会学術総会、9月22-24日、大阪市 (2010年9月)

山田貴宣、魏 民、豊田武士、金川明裕、仲谷慎也、陳 慶義、鰐淵英機：ラファノブラシカにおけるピロリ菌感染胃炎の修飾作用。第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

花田庄司、梯アンナ、山野荘太郎、丁 奎光、魏 民、西山典利、鰐淵英機：質量分析に基づいた肺扁平上皮癌のプロテオーム特性。第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

山野荘太郎、梯アンナ、丁 奎光、花田庄司、蟹江尚平、鰐淵英機：NTCU誘発異型細気管支上皮細胞における細胞表面マーカーの同定。第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

丁 奎光、梯アンナ、山野荘太郎、花田庄司、魏 民、西山典利、鰐淵英機：ヒト肺腺癌の有用な新規腫瘍マーカーとしてのAGR2。第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年9月)

Rawiwan Wongpoomchai, Charatda Punvittayagul, Wilart Pompimom, Nirush Lertprasertsuke, Shoji Fukushima, Hideki Wanibuchi: Effect of pinocembrin isolated from *Boesenbergia pandurata* on the early stages of hepatocarcinogenesis in rat. 第69回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010年)

9月)

櫻井靖高、横井雅幸、塚本徹哉、立松正衛、魏民、鰐淵英機、花岡文雄：UVB 照射 DNA の損傷乗り越え複製における DNA ポリメラーゼイータとイオタの生体内での役割。第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市（2010 年 9 月）

鰐淵英機：ヒ素膀胱発がん原因物質の探索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の同定およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討。第 17 回岐山毒性病理セミナー、岐阜市（2010 年 10 月）

金川明裕、魏民、田尻正喜、吉田 香、圓藤吟史、鰐淵英機：DMA<sup>V</sup>誘発ラット膀胱発癌における DMMTA<sup>V</sup> の役割～代謝経路の解明及び、膀胱上皮細胞に与える影響の検討～。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

魏民、梯 アンナ、石井真美、北野光昭、福島昭治、鰐淵英機：IQ の低用量域における発がん性：閾値の存在。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

田尻正喜、魏民、梯 アンナ、山野荘太郎、加藤 実、鰐淵英機：Diphenylarsinic acid のラットにおける慢性毒性および発がん性の検討。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

多胡善幸、仲谷和記、魏民、山田貴宣、太田成男、中島裕司、鰐淵英機：水素水による TAA 誘発ラット肝線維化の抑制効果。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

仲谷慎也、山野荘太郎、梯 アンナ、金川明裕、花田庄司、石村栄治、鰐淵英機：糖尿病ラットの糸球体における細胞骨格関連蛋白の検討。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

武下正憲、山野荘太郎、梯 アンナ、石井真美、蟹江尚平、魏民、鰐淵英機：NASH-HCC 発症 STAM マウスにおける病理組織学的解析。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

謝 暁利、魏民、梯 アンナ、山田貴宣、大保ゆみ、林 修次、鰐淵英機：マウス二段階肝発がんモデルを用いた IQ の肝発がん性の検討。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

梯 アンナ、石井真美、山野荘太郎、魏民、神吉将之、鰐淵英機：マウス肝発がんにおける新規バイオマーカー候補分子の検討。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

大保ゆみ、魏民、田尻正喜、謝 暁利、増村健一、能美健彦、鰐淵英機：gpt delta rat を用いたダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

山田貴宣、魏民、豊田武士、金川明裕、仲谷慎也、星 学、鰐淵英機：新規野菜ラファノブラシカによるピロリ菌誘発胃炎の抑制。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

山野荘太郎、魏民、梯 アンナ、多胡善幸、丁 奎光、陳 慶義、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌の早期発癌過程における気管支肺胞幹細胞の関与。第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011 年 1 月）

山田貴宣、魏民、梯 アンナ、山野荘太郎、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸による肝発がん促進作用及びその機序。第 10 回分子予防環境医学研究会、京都市（2011 年 1 月）

金川明裕、魏民、吉田 香、圓藤吟史、鰐淵英機：ヒ素膀胱発がんの原因物質の探索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討。第 16 回ヒ素シンポジウム、旭川市（2011 年 2 月）

Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Fukushima S, Wanibuchi H. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21<sup>Cip/WAF1</sup>. AACR 102nd Annual Meeting 2011, Orlando(2011 年 4 月)

Tajiri M, Wei M, Obo Y, Ishii N, Yamano S,

Wanibuchi H. Examination of in vivo mutagenicity and carcinogenicity in the gpt delta rat with Dammer resin. AACR 102nd Annual Meeting 2011, Orlando(2011年4月)

小松弘明、丁 奎光、梯アンナ、花田庄司、魏民、西山典利、鰐淵英機：QSTAR Elite LC-MS/MSを用いたヒト肺腺癌におけるプロテオーム解析. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

魏 民、山野荘太郎、加藤実、梯アンナ、鰐淵英機：膀胱がん新規浸潤因子 Carbonic anhydrase 2の同定. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

加藤実、魏 民、山野荘太郎、仲谷慎也、梯アンナ、鰐淵英機：プロテオーム解析による膀胱癌バイオマーカーの検討. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

山野荘太郎、石井真美、魏 民、鰐淵英機：NASH-HCC 発症 STAM マウスにおける病理組織学的解析. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

田尻正喜、魏 民、金川明裕、謝 暁利、豊田武士、鰐淵英機：ピロリ菌誘発胃炎におけるラファノブラシカの修飾作用. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

花田庄司、魏 民、丁 奎光、梯アンナ、西山典利、鰐淵英機：肺扁平上皮癌におけるプロテオーム解析と臨床病理学的検討. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

xie xiaoli、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、金川明裕、田尻正喜、鰐淵英機：Promotion effects of IQ in a two-stage hepatocarcinogenesis model of B6C3F1 mice. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

仲谷慎也、魏 民、山野荘太郎、石井真美、梯アンナ、鰐淵英機：ヒト剖検例の単離糸球体を用いた糖尿病性腎症のプロテオーム解析. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Kakehashi A, Mori K, Inaba M, Wanibuchi H. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. the

XLVIII ERA-EDTA Congress, Prague(2011年6月)

魏 民、梯アンナ、福島昭治、鰐淵英機：遺伝子毒性発がん物質における閾値の存在. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会、横浜(2011年7月)

山野荘太郎、魏 民、鰐淵英機：肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の役割. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会、横浜(2011年7月)

山野荘太郎、魏 民、梯アンナ、鰐淵英機：肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の関与. 第26回発癌病理研究会、札幌(2011年8月)

加藤実、魏 民、山野荘太郎、鰐淵英機：DDX39の発現と膀胱癌の浸潤に関する検討. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋(2011年10月)

謝 暁利、魏 民、梯アンナ、田尻正喜、山野荘太郎、神吉将之、鰐淵英機：マウス肝発がんにおけるIQ促進作用のメカニズムの検討. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋(2011年10月)

小松弘明、西山典利、山野荘太郎、花田庄司、丁 奎光、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：肺大細胞神経内分泌癌(LCNEC)の新たなバイオマーカーの同定. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋(2011年10月)

鰐淵英機、魏 民：ヒ素ばく露と発がんリスクー動物モデルを用いた発がん機序の解明ー. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋(2011年10月)

山野荘太郎、魏 民、石井真美、梯アンナ、多胡善幸、謝 暁利、鰐淵英機：NASH関連肝癌発症モデルであるSTAMマウスの有用性評価. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋(2011年10月)

花田庄司、西山典利、山野荘太郎、小松弘明、丁 奎光、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：肺扁平上皮癌におけるプロテオーム解析と臨床病理学的検討. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋(2011年10月)

魏 民、山野莊太郎、加藤実、梯アンナ、多胡善幸、鰐淵英機：Carbonic anhydrase 2 は膀胱がんの新規浸潤関連因子である。第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、加藤実、田尻正喜、謝 曉利、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける新規バイオマーカーの同定。第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

田尻正喜、魏 民、岡部恭子、山野莊太郎、梯アンナ、神吉将之、鰐淵英機：コウジ酸および IQ の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討。第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

梯アンナ、石井真美、山野莊太郎、魏 民、岡部恭子、鰐淵英機：ヒト肝臓腫瘍の比較的プロテオーム解析及び新規バイオマーカー候補分子の検討。第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

Nakatani S, Ishimura E, Wei M, Mori K, Inaba M, Wanibuchi H. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy –Proteome analysis of isolated glomeruli from autopsy and immunochemical study--。American Society of Nephrology, Kidney Week 2011, Philadelphia (2011 年 11 月)

田尻正喜、魏 民、山野莊太郎、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸のラットにおける慢性毒性および発がん性の検討。第 17 回ヒ素シンポジウム、つくば（2011 年 11 月）

鰐淵英機、山野莊太郎：肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の関与。第 11 回分子予防環境医学研究会、倉敷（2012 年 1 月）

岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、田尻正喜、謝 曉利、神吉将之、北野光昭、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける新規バイオマーカーの同定。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

田尻正喜、魏 民、岡部恭子、山野莊太郎、福永賢輝、林修次、鰐淵英機：コウジ酸の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京

(2012 年 2 月)

Xiao-Li XIE、魏 民、梯アンナ、田尻正喜、岡部恭子、多胡善幸、鰐淵英機：マウス肝がんにおける IQ 促進作用のメカニズムの検討。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

神吉将之、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、鰐淵英機：非遺伝毒性肝発がん物質のラット肝臓における遺伝子発現解析。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

梯アンナ、山野莊太郎、魏 民、謝 曉利、武下正憲、串田昌彦、鰐淵英機：ヒト肝臓癌のプロテオーム解析を用いた新規バイオマーカー候補分子の検索。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

Hashimoto N, Yokohira M, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Uchino T, Tokunaga H, Imaida K. Comparison of nano- and micro-sized particles by three different route administrations using a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 rats. American Association for Cancer Research, 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009 (2009.04)

Kuno T, Yokohira M, Hashimoto N, Suzuki S, Saoo K, Imaida K. The establishment of a streptozocin-induced mouse pulmonary tumor model. American Association for Cancer Research, 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009 (2009.04)

橋本希、横平政直、久野壽也、橋本希、竿尾光祐、今井田克己、マウス胸膜中皮腫モデルの検討。第 98 回日本病理学会総会、京都（2009.05）

Hashimoto N, Yokohira M, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kinouchi S, Kuno T, Imaida K. Pleural mesothelial proliferating reaction by TISMO –possible animal model of mesothelioma-. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

Suzuki S, Yokohira M, Hashimoto N, Kuno T, Yamakawa K, Saoo K, Shiooka T, Imaida K. Overexpressions of liver CYP2A5 and MGMT by the combination treatments of MeIQx and NNK in A/J mice. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

Kuno T, Yokohira M, Suzuki S, Hashimoto N, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K. Modifying effects

of obesity and diabetes in the chemical-induced lung tumorigenesis on *db/db* and *ob/ob* female mice. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

Yamakawa K, Suzuki S, Yokohira M, Hashimoto N, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Aberrant expression of microRNA on NNK or MeIQx-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

鬼松幸子、船本康申、平口貴子、三谷由香利、山川けいこ、横平政直、今井田克己、大森正樹、竿尾光祐、術中迅速診断時に細胞診が有用であった angiomatous meningioma の一例、第 49 回日本臨床細胞学会秋季大会、神戸 (2010.11)

Kuno T, Yokohira M, Suzuki S, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano Y, Saoo K, Hara K, Imaida K, Modyfying effects of PPAR gamma agonist, Troglitazone in the chemically-induced lung tumorigenesis in A/J female mice, 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2010.9)

Yokohira M, Suzuki S, Imaida K, Samuel M. Cohen, 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2010.9)

Nakano Y, Hashimoto N, Yokohira M, Yamakawa K, Kuno T, Suzuki S, Saoo K, Shiooka T, Imaida K, Effect of chronic inflammation on DHPN lung carcinogenesis in F344 and SD rats, 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2010.9)

横平政直、山川けいこ、二宮英美子、中野裕子、井上達史、竿尾光祐、今井田克己、Wistar-Hannover GALAS ラットを用いた慢性毒性ならびに長期発がん性評価(キダチアロエ)、第 27 回日本毒性病理学会総会 (2011.1)

中野裕子、横平政直、橋本希、山川けいこ、井上達史、二宮英美子、竿尾光祐、今井田克己、ラット気管内投与による nicotine の毒性作用の検討、第 27 回日本毒性病理学会総会 (2011.1)

Yokohira M, Lora L. Arnold, Karen L. Pennington, Suzuki S, Kakiuchi-Kiyota S, Karen Herbin-Davis, David J. Thomas, Imaida K, Samuel M. Cohen, Severe urinary bladder cytotoxicity and regenerative hyperplasia with dose response

induced by arsenite in arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase knockout mice, 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2011.3)

Kishi S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Inoue T, Saoo K, Imaida K, The influences of EGFR, ER and PR to NNK-induced lung tumor growth in female A/J mice. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)

Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kishi S, Inoue T, Saoo K, Imaida K, The promotion effects of lung tumor by left pulmonary ligation in A/J mice. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)

Nakano Y, Hashimoto N, Yamakawa K, Inoue T, Ninomiya F, Kinouchi S, Hagiwara A, Yokohira M, Saoo K, Imaida K, Tumor promoting potential of dammer resin in a mediamterm multi-organ carcinogenesis bioassay model in F344 rats. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)

Inoue T, Nakano Y, Ninomiya F, Yamakawa K, Hashimoto N, Yokohira M, Imaida K, Modifying effects of antagonist of coagulation factor Xa on liver carcinogenesis. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)

横平政直、橋本希、中野裕子、山川けいこ、岸宗佑、二宮英美子、井上達史、竿尾光祐、今井田克己、胸腔内投与による針状微粒子 TISMO の影響、第 28 回日本毒性病理学会総会(2012.2)

中野裕子、横平政直、橋本希、山川けいこ、井上達史、岸宗佑、二宮英美子、竿尾光祐、今井田克己、DHPN 誘発肺腫瘍への慢性炎症の影響における系統差—F344 ラットおよび Wister-Hannover ラットの検討—、第 28 回日本毒性病理学会総会(2012.2)

Kishi S, Yokohira M, Hashimoto N, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Imaida K, Toxicity and mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) introduced into the left thoracic cavity in A/J female mice. 51<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2012.3)

Nakano Y, Hashimoto N, Yokohira M, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K, Differential effects of chronic inflammation on

DHPN lung carcinogenesis in F344,  
Wistar-Hannover and SD rats. 51<sup>th</sup> Anniversary  
Annual Meeting & ToxExpo (2012.3)

岡部恭子、藤井美奈子、林麻衣、西村和樹、朴  
木寛弥、辻内俊文：コリン欠乏アミノ酸食によ  
るラット肝発がん過程における Lpa3 遺伝子  
DNA メチル化異常. 第 69 回日本癌学会総会, 9  
月 22 日-24 日, 大阪, 2010.

朴木寛弥、辻内俊文：ニトロソ化合物によるラ  
ット肺・肝がん発生における Lpa5 遺伝子発現  
異常. 第 69 回日本癌学会総会, 9 月 22 日-24  
日, 大阪, 2010.

加藤紘平、奥村真衣、朴木寛弥、辻内俊文. ハム  
スター膵管癌培養細胞の悪性能獲得における  
LPA 受容体の関与第 70 回日本癌学会総会,  
10 月 3 日-5 日, 名古屋, 2011.

<その他>

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究  
総合分担研究報告書

短期発がんリスク評価試験法および新規前がん病変マーカーの開発に関する研究

研究分担者： 鱒 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

## 研究要旨

食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。現在の発がん性試験では、多数の動物を用いて長期間の観察が必要であることや、費用の面からも発がん性を検出できる化学物質数に限りがあるため、短期包括的発がん検出法の確立が急務となっている。一方、遺伝毒性に関しては、*in vitro* の変異原性試験により遺伝毒性の有無が決められてきたが、偽陽性になるものも多く、特異性が低いという点において現状の試験法では問題がある。本研究は、食品中の化学物質、特に食品添加物等の発がん性と遺伝毒性を短期間かつ包括的に検出可能な新しい発がんリスク評価法を確立することを目的とした。すなわち、*in vivo* 変異原性が検出可能な *gpt delta* ラットおよびマウスを用いて、二段階発がん性試験である短期多臓器発がん性試験法の開発を行った。イニシエート群では被験物質の発がん性を短期に検出でき、非イニシエート群では被験物質の *in vivo* 変異原性を評価できるシステムの開発が目的であった。さらに発がん性評価のための新規前がん病変マーカーの開発も併せて行った。本研究で得られた研究成果を以下にまとめる。

### 1. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法の開発

- ① ダンマル樹脂の 18 週間多臓器発がん性試験では、F344 系 *gpt delta* ラットに実験開始 4 週間にわたってイニシエーション処置として 5 種類の発がん物質、あるいは溶媒のみ (非イニシエーション群) を投与した。1 週間の休薬後、イニシエーション群にはダンマル樹脂を 0、0.03 および 2% の用量で、非イニシエーション群にはダンマル樹脂を 0 および 2% の用量で 13 週間 (90 日間) 混餌投与した。イニシエート群においては、前がん病変を指標とし、肝臓をはじめとする全身諸臓器に対するダンマル樹脂の発がん修飾作用を検討した。また、非イニシエート群においては、*in vivo* 変異原性試験である *gpt* および Spi アッセイを施行し、ダンマル樹脂の肝臓における変異原性を検討した (魏分担報告書参照)。その結果、2% 投与群で肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積ともに対照群 (0% 群) と比較して有意な高値を認めた。このことから、ダンマル樹脂が *gpt delta* ラットにおいて肝発がん促進作用を有することが明らかとなった。一方、甲状腺、肺、腎臓など他の臓器に対する発がん促進作用は認められなかった。これらの結果は、2 年間発がん性試験と一致した。*gpt delta* ラットを用いた本試験法は発がん物質の検出に有用であることが明らかとなった。
- ② コウジ酸および IQ の 18 週間多臓器発がん性試験では、F344 ラットに実験開始 4 週間にわたってイニシエーション処置として 5 種類の発がん物質を投与した。F344 系 *gpt delta* ラットを使用した非イニシエーション群には溶媒のみ投与した。1 週間の休薬後、各群に 2% コウジ酸あるいは 0.01% 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) を 13 週間混餌投与した。イニシエート群においては、コウジ酸および IQ の発がん性を検討した。非イニシエート群においては、*in vivo* 変異原性試験である *gpt* および Spi アッセイを施行し、ダンマル樹脂の肝臓における変異原性を検討した (魏分担報告書参照)。その結果、肝臓における GST-P 陽性細胞巢の数および面積が対照群に比較してコウジ酸および IQ 投与群で有意に増加したことから、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用が認められた。また、



大腸の前がん病変である aberrant crypt foci (ACF)が IQ 投与群で有意に増加したことから、IQ の大腸発がん促進作用が認められた。甲状腺ではコウジ酸投与群で甲状腺濾胞腺腫の有意に増加したことから、コウジ酸の甲状腺発がん促進作用が認められた。その他の臓器ではコウジ酸、IQ ともに有意な発がん促進作用は認められなかった。以上より、本試験法は多臓器発がん性試験法として有用であることが明らかとなった。

③ ラット腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発では、*N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) 単独および EHEN→KBrO<sub>3</sub> 誘発腎腫瘍のプロテオーム解析結果より、異型尿細管から全ての腎腫瘍にかけて高発現する S100A11 の同定に成功した。新規腎発がん前がん病変マーカーになり得る可能性が示唆された。加えて、腎腫瘍に高発現する GBP2 蛋白の同定に成功した。これらの蛋白が新規発がん性試験法の開発に有用となる可能性が考えられた。

## 2. 新規マウス発がんリスク評価試験法の開発

① B6C3F1 マウスを用いた肝二段階発がん性試験では、肝部分切除後 DEN を単回腹腔投与し、さらに→IQ 混餌投与することで IQ の肝発がん促進作用が認められ、新規マウス発がんリスク評価試験法の開発に成功した。

② ダンマル樹脂および IQ の C57BL/6J マウス肝二段階発がん試験では、2 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに DEN を単回腹腔内投与後、2%ダンマル樹脂および 300 ppm IQ を混餌投与した。22 週において、ダンマル樹脂および IQ ともに肝発がん促進作用は認められなかった。40 週においても、肝腫瘍の発生頻度および数の増加を認めず、ダンマル樹脂および IQ の肝発がん促進作用が認められなかった。したがって、この試験法は肝発がん物質検出法として不適切であることが判明した。

③ 扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定試験では、A/J マウスに NTCU を投与することにより誘発した肺扁平上皮がん及び周囲正常組織の凍結サンプルから、プロテオーム解析を行い、マーカー候補蛋白を選出した。その後、候補蛋白に対する抗体を用いた免疫染色を行い、正常部、扁平上皮化生及びがん部におけるその局在を確認した。プロテオーム解析の結果、315 種類の蛋白が同定された。そのうち、周囲正常組織と比較してがん部で有意に発現が上昇しているものが 66 種類、減少しているものが 60 種類、合計 126 種類であった。そのうち、cytokeratin 19 および YWHAZ が周囲正常組織で発現は認められなかったが、がん部及び扁平上皮化生において過剰発現が認められた。以上の結果より、CK19 及び YWHAZ は扁平上皮がんの早期検出マーカーとして有用である可能性が示唆された。さらに、扁平上皮化生が生じるより以前に、気管支肺胞幹細胞(BASC)が増生していることが明らかとなった。さらに、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有する気管支肺胞幹細胞の存在が認められたことにより発がん過程早期において BASC の関与が明らかとなり、早期検出マーカーとして、BASC における Rev1 蛋白の発現変化が指標となる可能性が示唆された

## A. 研究目的

環境中には多くの発がん物質が存在し、ヒト発がんの原因と目されており、食品を介しての化学物質曝露はそのなかでも大きな要因となっている。しかし、食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は動物試験だけでも 2 年間という長期的検討が必要であり、莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの食品添加物等に対応することが困難なためである。一方、遺伝毒性に関しては、*in vitro* の変異原性試験により遺伝毒性の有無が決められてき

たが、偽陽性になるものも多く、特異性が低いという点において現状の試験法では問題がある。本研究は、がんの一次予防を最終目標とし、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期的、かつ包括的に検出可能な新しい発がんリスク評価法を開発することを目的とした。

すなわち、*in vivo* 変異原性が検索可能な *gpt* delta ラットおよびマウスを用いて、二段階発がん性試験である短期多臓器発がん性試験法を開発を行った。具体的にイニシエート群では被験物質の発がん性を短期に検索でき、非イニシエート群では被験物質の *in vivo* 変異

原性を評価できるシステムの開発を目的とした。被検物質として、肝発がん性を示す3物質で、変異原性陰性のダンマル樹脂、変異原性陽性の2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)、そして *in vitro* 変異原性偽陽性であるコウジ酸を用いた。*gpt delta* および F344 ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験法により、遺伝毒性と発がん性の包括的検出を行った。

加えて、ダンマル樹脂およびIQについて、B6C3F1 および C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスにおける発がん性及び *in vivo* 変異原性を検討し、新規マウス発がんリスク評価試験法の開発も合わせて行った。

さらに、以上の発がん性試験に加えて、発がん性を検索できる新規早期前がん病変マーカー開発を目的とし、ラット腎発がんおよびマウス肺発がんの新規前がん病変マーカーの同定を行った。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

ダンマル樹脂粉末は、日本食品添加物協会により供与された。ダンマル樹脂はオリエンタルMF基礎飼料に規定量混ぜたものを検体として使用した。被験物質の飼料への添加、固化はオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。

コウジ酸は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、IQは株式会社ナード研究所 (Osaka, Japan) よりそれぞれ入手した。コウジ酸およびIQはオリエンタルMF基礎飼料に規定量混ぜたものを検体として使用した。被験物質の飼料への添加はオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。

### 2. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法の開発

#### 2.1. *gpt delta* ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験

##### [投与量の設定]

F344 ラットを用いたダンマル樹脂の2年間発がん試験の結果に基づいて、*gpt delta* ラットを用いた多臓器中期発がん性試験及び変異原性試験では発がん用量である2%と非発がん用

量である0.03%を設定した。

##### [試験プロトコル]

5週齢の *gpt delta* 雄ラット (F344系) 57匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、約一週間の馴化飼育の後、5群に分け、Figure 1に示す。実験デザインで動物実験を施行した。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24±2 度、湿度 50±10%、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物はプラスチックケージに3匹ずつ飼育し、ケージおよびチップを週1回交換した。1~3群に実験開始日に 100mg/kg b.w.

diethylnitrosamine(DEN, 東京化成, Cas No. 55-18-5)の腹腔内投与、第3、6、9、13日に20mg/kg b.w. N-methyl-N-nitrosourea(MNU, Sigima, Cas No. 684-93-5)の腹腔内投与、第16、20、23、27日に40mg/kg b.w. 1,2-dimethylhydrazine(DMH, Aldrich, Cas No. 306-37-6)の皮下投与を行った。さらに、それらと並行して第1~2週に0.05% N-butyl-N-(4-hydroxypropyl)nitrosamine(BBN, 東京化成, Cas No. 3817-11-6)を、第3~4週に0.1% dihydroxybutyl-di-N-propylnitrosamine (DHPN, ナカライ, Cas No. 53609-64-6)をそれぞれ飲水投与し(DMBDD処置)、イニシエーション処置とした。実験開始第6週目から1、4群には0%ダンマル樹脂を、3、5群には発がん用量である2%ダンマル樹脂を、2群には0.03%ダンマル樹脂をそれぞれ13週間、オリエンタルMF飼料中に混ぜて、それを自由に摂取させた。また、発がん物質投与以外の飲料水として、水道水を自由摂取させた。実験開始後18週に屠殺剖検し、1~3群においてはDMBDD標的臓器の病理組織学的検索を行い、4、5群においては、*gpt assay* および *Spi- assay* を行った。

##### [一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、週1回体重および摂餌量を測定した。1日あたりのダンマル樹脂摂取量(mg/kg/day)は、その結果より算出した。

##### [病理組織学的検査]

18週間の投与終了後に、全例を安楽死させて詳細な剖検を行った。DMBDD処置を行った1~3群において器官、臓器を採取し、二重線を付したのについて重量を測定した後、網掛けを付したものは凍結保存も行い、全てを10%中

性緩衝ホルマリン液により固定した。1~3 群において採取した器官、臓器は、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、前立腺、その他の肉眼的異常部位である。また、非 DMBDD 処置群である 4、5 群において器官、臓器を採取し、二重下線を付したのについて重量を測定した後、全て凍結保存を行った。肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸、大腸、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、唾液腺、精巣、精巣上体、その他の肉眼的異常部位である。また、肝臓及び腎臓を 10%中性緩衝ホルマリン液により固定を行った。

病理組織学的検索は、全動物について以下に示す器官、組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン/エオジン染色を施して鏡検した。該当する器官は、DMBDD 処置を行った 1~3 群において肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、前立腺、その他の肉眼的異常部位である。また、DMBDD 処置を行っていない 4、5 群においては、肝臓、腎臓、その他の肉眼的異常部位である。

#### [肝臓の免疫組織化学的検査]

肝臓の前がん病変マーカーである胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) を ABC 法にて免疫染色を行った。GST-P 陽性細胞巢の個数および面積を病理標本画像解析装置 IPAP-WIN [住化テクノサービス株式会社] を用いて計測し、肝臓切片 1cm<sup>2</sup> 当りの GST-P 陽性細胞巢 (直径 0.2mm 以上) の個数および面積を算出し、定量的解析を行った。

#### [統計学的解析]

体重、摂餌量、臓器重量、腫瘍および前がん病変の平均値について 1~3 群は bartlett 法による等分散検定を行った。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行い、不等分散の場合はノンパラメトリックの Steel 法による両側検定を行った。また、4、5 群においては F 検定による等分散検定を行った。等分散の場合は Student's t-test 検定を行い、不等分散の場合は Welch t-test 法による両側検定を行った。病理組織学的検査における発生頻度の差の検定については、Fisher の直接確率検定を行った。

## 2.2. コウジ酸および IQ の F344 ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験

#### [投与量の設定]

コウジ酸の投与用量は、F344 ラットの 55 週間慢性毒性試験の結果より、前がん病変の増加が認められた用量である 2% に設定した。

IQ の投与用量は、発がん用量である 0.01% を設定した。

#### [試験プロトコール]

5 週齢の雄性 F344 ラット 45 匹 (日本エスエルシー株式会社) および 5 週齢の雄性 *gpt delta* ラット 18 匹 (日本エスエルシー株式会社) を用いた。実験動物納入より 7 日間は、環境に適応させる期間とし、8 日目より実験を開始した。その間の飲料水は水道水とし、基礎飼料として MF 粉末 (オリエンタル酵母) を使用した。

実験プロトコールを Figure 2 に示す。動物を、第 1 群から第 3 群は F344 ラット 15 匹ずつ、第 3 群から第 6 群は *gpt delta* ラット 6 匹ずつ無作為に 6 群に分けて実験を行った。

DMBDD 処置および病理組織学的検査は、上述したダンマル樹脂の 18 週間多臓器発がん性試験と同様に行った。すなわち、実験開始後 4 週間は基礎飼料を与えた上で DMBDD 処置群である第 1 群から第 3 群に実験開始日に DEN を 100mg/kg の用量にて腹腔内投与、実験開始後 3、6、9、13 日に MNU を 20mg/kg b.w. の用量で腹腔内投与、実験開始後 16、20、23、27 日に DMH を 40mg/kg の用量で皮下投与を行った。投与物質の調整には大塚生食注 (株式会社大塚製薬工場, Tokushima, Japan) を用いた。さらに、それらと並行して実験開始後 1 から 2 週に 0.05% BBN を、第 3~4 週に 0.1% DHPN をそれぞれ飲水投与し、イニシエーション処置とした。一週間の休薬期間を置き、実験開始後 5 週目から第 3、6 群には 2% コウジ酸を、2、5 群には 0.01% IQ を、それぞれ 13 週間、オリエンタル MF 粉末飼料中に混ぜ自由に摂取させた。また、第 1、4 群には通常の MF 粉末飼料を自由に摂取させた。さらに、発がん物質投与以外の飲料水として、水道水を自由摂取させた。実験期間終了後、第 1 群から第 6 群のすべての動物においてジエチルエーテルで麻酔後屠殺した。第 1 から 3 群においては DMBDD 標的臓器の病理組織学的検索を行い、第 4 から 6 群においては、変異原性試験を行った (魏分担報告書参照)。

#### [統計学的解析]

腫瘍および前がん病変の平均値についてF検定による等分散検定を行った。等分散の場合はStudent's t-test 検定を行い、不等分散の場合はWelch t-test 法による両側検定を行った。病理組織学的検査における発生頻度の差の検定については、Fisherの直接確率検定を行った。

### 2.3 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

#### [検体]

雄性Wistarラット、6週齢、240匹を30匹ずつ8群に別け、全動物にEHENを500ppmの濃度で2週間飲水投与した。投与終了後、KBrO<sub>3</sub>を0, 0.02, 2, 8, 30, 125及び500ppmの濃度で2週間飲水投与し、実験終了後、腎のホルマリン固定パラフィン標本を作製し、病理組織学的解析に興じた。

#### [プロテオーム解析]

Liquid Tissue MS Protein Prep kitで処理したホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いて蛋白の抽出を行った。KBrO<sub>3</sub>が0及び500ppm群の各群5個体から10µmの厚みで10枚の連続切片を作成し、顕微鏡下で確認しながらニードルダイセクション法を用いて腫瘍部及び周囲正常組織をそれぞれサンプリングした。各腎腫瘍においては、直径1mm以上の大きさを有する腫瘍を、周囲正常組織においては、尿細管が豊富に存在する腎皮質部を肉眼的に確認しながらサンプリングした。これより得られたサンプルから、合計20µgの蛋白をバッチし、iTRAQ試薬でラベリングを行い、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pakカラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MSを用いて蛋白の網羅的発現解析を行った。

#### [バイオマーカー候補の選別]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software及びバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用であるIngenuity Pathway Analysis (IPA)を用いて腎腫瘍に特異的に発現する候補蛋白の選別を行った。特に、周辺正常組織と比較し、EHEN単独投与で誘発した腫瘍で1.5倍以上増加した蛋白から選別した。

#### [免疫組織学的解析]

選別したバイオマーカー候補に対し、パラフィ

ンブロックから作成した連続切片を用いて免疫染色を行い、その局在を確認した。

### 3. マウス発がんリスク評価試験法の開発

#### 3.1 IQのB6C3F1マウス肝二段階発がん性試験

6週齢の雄性B6C3F1マウスを10群に分けた。1-4群に2/3肝部分切除術(HP)を行い、1日後にDENを単回腹腔内投与し、1週間後からIQを0, 30, 100および300ppmの用量で混餌投与した。5-6群はHP後、DENを投与せずにIQを0, および300ppmの用量で混餌投与した。7-8群はHPをせずに、DEN投与後IQを0および300ppmの用量で混餌投与した。9-10群300ppm IQのみおよび無処置群であった。実験開始後8週および40週で肝臓における前がん病変および腫瘍の発生を検討した。

#### 3.2 ダンマル樹脂およびIQのC57BL/6Jマウス肝二段階発がん試験

2週齢の雄性C57BL/6JマウスにDENを単回腹腔内投与し、実験開始2週より基礎飼料、2%ダンマル樹脂および300ppm IQを混餌投与した。実験開始後22週および40週で肝臓における前がん病変および腫瘍の発生を検討した。

#### 3.3 マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

#### [検体]

6週齢A/J雌マウス70匹を用いて、NTCU 0.01 M/75µl acetone/mouseの用量で、週2回、合計18週間マウスの背中に滴下し、実験開始22週後に動物を屠殺し、肺を摘出し、各動物から凍結ブロック及びホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。

#### [Proteome analysis]

凍結ブロックから10µmの厚みで10枚の連続切片を作製し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション及びニードルダイセクション法を用いてがん部及び周囲正常組織それぞれをサンプリングした。がん組織からは、細気管支領域に発生した末梢型肺扁平上皮がんのみに限定し、主要な動静脈は混入しないよう気をつけ、周囲正常組織をサンプリングする際には、

気管、動静脈のみならず軟骨、脂肪、神経組織を混入しないよう十分気をつけ、肺末梢部から採材するようにした。これより得られたサンプルから合計 18 $\mu$ g の蛋白質をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリングして、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pak カラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MS (Applied Biosystems Japan)を用い蛋白の網羅的発現解析を行った。

#### [バイオマーカー候補の選別]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software 及びバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用である Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いてがん部に特異的な候補蛋白を選出した。

#### [免疫組織学的解析]

選別したバイオマーカー候補に対し、パラフィンブロックから作成した連続切片を用いて免疫染色を行い、その染色性及び局在を確認した。

### 3.4 マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

#### [検体]

6週齢 A/J 雌マウス 30匹を用いて、NTCU 0.01 M/75 $\mu$ l acetone/mouse の用量で、週 2回、合計 4週間マウスの背中に滴下し、実験開始 8週後に動物を屠殺した。そのうち、20匹は、フローサイトメトリー興じた。また、10匹は、肺を摘出し、各動物からホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。

#### [病理組織学的解析]

肺におけるホルマリン固定パラフィン包埋標本から連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色により形態学的解析、CC10 及び SPC 抗体を用いた気管支肺胞幹細胞 (BASC) の形態計測及び、Ki67 お及び TUNEL 染色による細胞増殖能及びアポトーシス能の検討を行った。扁平上皮分化マーカーである、CK5/6, CK14, CK19, podoplanin, p63 について検討した。また、BASC における細胞増殖能、扁平上皮分化能及び Rev1 発現を検討するため、BASC マーカーである Sca-1 と Ki67, p63 及び Rev1 の共発現を二重染色法により確認した。

#### [フローサイトメトリー]

##### 1 サンプル調整

まずマウスに対し 0.1 ml ヘパリンを投与し、血液凝固を抑制する前処置を行った。ジエチルエーテル麻酔下で、放血致死させた後、胸腔を開いた後に冷 PBS 10 ml を用いて右心室から灌流を行い、肺から血漿及び血球成分を可能な限り取り除いた。灌流後、すぐに dispase (50 IU/1 ml)と 1% LMP agarose を各 1 ml ずつ気管から注入し、on ice にて肺を固まらせた。その後、各肺葉を分離し、1 mm<sup>3</sup> 以下になるように細切を行った後、collagenase/dispase (最終濃度: 2 mg/ml)6 ml の中に入れて 37°C で 45 分インキュベートを行った。その後、100 及び 40 $\mu$ m のセルストレーナーを用いて凝集物を除去し、残存する赤血球を溶解した後、細胞数を測定した。

##### 2 細胞染色

1x10<sup>6</sup> 個/100 $\mu$ l に細胞濃度を調整し、Sca-1-FITC, CD45-PE 及び Pecam-PE の 3種類の抗体を用いてそれぞれ 1:100 の希釈濃度で on ice で 30 分インキュベート後、洗浄を行ってからフローサイトメトリーに興じた。また、フローサイトメトリーにかける 10 分前に 7AAD の染色を行い、死細胞の除去を行った。

##### 3 細胞分取

フローサイトメトリー (Aria II :BD) を用いてダブリングした細胞及び死細胞を除いた後、Pecam 及び CD45 が陰性の領域で、さらに Sca-1 陰性 (neg)、Sca-1 弱陽性 (dim)及び Sca-1 陽性 (pos)の 3つの分画から細胞を分取した。各分画からは、20万細胞以上を分取し、プロテオーム解析に興じた。

#### [プロテオーム解析]

フローサイトメトリーで分取した細胞を lysis buffer である T-PER を用いて蛋白を抽出し、以下の工程に興じた。これより得られたサンプルから各 4 $\mu$ g の蛋白質をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリング、もしくはラベリングなしで、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pak カラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MS (Applied Biosystems Japan)を用い蛋白の網羅的発現解析を行った。

#### [発現蛋白の検討]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software 及びバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用である Ingenuity

Pathway Analysis (IPA)を用いて sca-1 pos の分画に特異的に発現する蛋白を選出した。

#### 4. 倫理面への配慮

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないためにエーテル麻酔下にて実施した。

### C. 研究結果

#### 1. *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験

##### [一般状態]

実験期間中、全動物が生存した。ダンマル樹脂投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。

##### [体重]

実験期間中の各群における平均体重推移を Table 1 および Figure 3 に示した。DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、実験開始 7 週目以降に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (4、5 群) において、被験物質投与群の 5 群(2%投与群)で、実験開始 6、7 週目と 9 週目以降に 6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

最終体重は Table 2 に示した。DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (4、5 群) においても、被験物質投与群の 5 群(2%投与群)で、6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

##### [摂餌量および被験物質摂取量]

平均摂餌量を Table 3 および Figure 4 に示した。

DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の第 2 群(DMBDD→0.03%投与群)で、実験開始 2 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。また、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、実験開始 6、11、13、15~17 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。

非 DMBDD 処置群 (4、5 群) において、被

験物質投与群の第 5 群(2%投与群)で、実験開始 5、6、10~12、16 週目に 6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

実験期間中における 1 匹 1 日あたりの平均ダンマル樹脂摂取量を Table 4 に示した。ダンマル樹脂の摂取量はその投与量にほぼ関連した。

##### [飲水量]

平均飲水量を Table 5 および Figure 5 に示した。

DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、実験開始 16 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。

非 DMBDD 処置群 (4、5 群) において、被験物質投与群の第 5 群(2%投与群)で、実験開始 9 週目に 6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

##### [臓器重量]

各群の臓器の絶対重量および相対重量を Table 6 に示した。

肝臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、肝臓の相対重量にて有意な増加が認められた。また、非 DMBDD 処置群(4、5 群) では、被験物質投与群の 5 群(2%投与群)で、4 群 (0%) と比べて、肝臓の絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

腎臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、腎臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

脾臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。また、非 DMBDD 処置群(4、5 群) では、被験物質投与群の 5 群(2%投与群)で、4 群 (0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

心臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、心臓の絶対重量、相対重量ともに有意な減少が認められた。

精巣においては、非 DMBDD 処置群(4、5 群) で、被験物質投与群の 5 群(2%投与群)で、4 群

(0%)と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

#### [肝臓の GST-P 陽性細胞巢]

GST-P 陽性巢の単位面積あたりの発生個数および面積を Table 7 に示した。

DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群(DMBDD→2%投与群)で 1 群(DMBDD→0%)と比べて、発生個数、面積ともに有意な増加を認めた。

非 DMBDD 処置群 (4、5 群) においては、GST-P 陽性細胞巢が認められなかった。

#### [病理学的検査]

肝臓には腫瘍は認められなかった。

甲状腺の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれ Table 8 に示した。Follicular cell hyperplasia においては発生頻度が DMBDD 単独投与群で 100%、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 93.3%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 100% とほぼすべての動物で認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で  $3.1 \pm 2.2$ 、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $2.7 \pm 2.2$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $2.8 \pm 2.2$  認められた。Follicular cell adenoma においては DMBDD 単独投与群で 46.7%、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 33.3%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 40.0% の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で  $0.7 \pm 0.9$ 、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $0.5 \pm 0.7$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $0.5 \pm 0.6$  認められた。Follicular cell adenocarcinoma においては DMBDD 単独投与群で 26.7%、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 6.7%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 6.7% の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で  $0.3 \pm 0.5$ 、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $0.1 \pm 0.4$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $0.1 \pm 0.3$  認められた。また、Tumor (follicular cell adenoma + follicular cell adenocarcinoma) では DMBDD 単独投与群で 53.3%、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 40.0%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 46.7% の発生頻度で認められた。DMBDD 単独投与群で  $1.0 \pm 1.1$ 、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $0.5 \pm 0.7$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $0.5 \pm 0.7$  認められた。これらの甲状腺における病変の発生頻度および発生個数は DMBDD 処置単独投与群

と比較し、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群および DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

腎臓の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれ Table 9 に示した。Atypical tubule hyperplasia においては発生頻度が DMBDD 単独投与群で 73.3%、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 46.7%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 33.3% 認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で  $1.0 \pm 0.8$ 、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $0.6 \pm 0.7$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $0.4 \pm 0.6$  認められた。Renal cell papilloma においては DMBDD 単独投与群では認められなかったが、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 6.7%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 13.3% の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $0.1 \pm 0.3$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $0.1 \pm 0.4$  認められた。Nephroblastoma は DMBDD 単独投与群で 6.7% 認められたが、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群および DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で認められなかった。発生頻度は DMBDD 単独投与群で  $0.1 \pm 0.3$  認められた。Renal cell carcinoma においては DMBDD 単独投与群、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で認められなかった。また、Tumor (Renal cell papilloma + Renal cell carcinoma) では DMBDD 単独投与群では認められなかったが、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 6.7%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 13.3% の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $0.1 \pm 0.3$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $0.1 \pm 0.4$  認められた。これらの腎臓における病変の発生頻度および発生個数は DMBDD 処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群および DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

膀胱の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれ Table 10 に示した。PN hyperplasia においては発生頻度が DMBDD 単独投与群で 26.7%、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で 26.7%、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で 20.0% で認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で  $0.3 \pm 0.6$ 、DMBDD→0.03% ダンマル樹脂投与群で  $0.3 \pm 0.5$ 、DMBDD→2% ダンマル樹脂投与群で  $0.3 \pm 0.7$  認

められた。PapillomaにおいてはDMBDD単独投与群で6.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%認められ、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で $0.1\pm 0.3$ 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で $0.1\pm 0.3$ 認められた。Transitional cell adenocarcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で13.3%の発生頻度で認められたが、ダンマル樹脂投与群で認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で $0.1\pm 0.4$ 、認められた。また、Tumor (Papilloma+Transitional cell adenocarcinoma)ではDMBDD単独投与群で20.0%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%の発生頻度で認められたが、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で $0.2\pm 0.4$ 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で $0.1\pm 0.3$ 認められた。これらの膀胱における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

肺の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれTable 11に示した。Hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で100%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で100%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で100%とすべての動物で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で $29.1\pm 11.3$ 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で $20.2\pm 6.2$ 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で $24.6\pm 7.6$ 認められた。AdenomaにおいてはDMBDD単独投与群で40.0%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で33.3%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で $0.5\pm 0.8$ 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で $0.1\pm 0.3$ 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で $0.4\pm 0.6$ 認められた。CarcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で6.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で6.7%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で $0.1\pm 0.3$ 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で $0.1\pm 0.3$ 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で $0.1\pm 0.3$ 認められた。また、Tumor (Adenoma+Carcinoma)ではDMBDD単独投与群で46.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で13.3%、

DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で40.0%の発生頻度で認められた。DMBDD単独投与群で $0.6\pm 0.8$ 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で $0.1\pm 0.4$ 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で $0.5\pm 0.6$ 認められた。これらの肺における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

DMBDD 処置群 (第1から3群) においてACFの定量解析を行った結果をTable 12に示した。その発生個数においてDMBDD単独投与群で $337\pm 60.7$ 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で $324\pm 64.2$ 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で $396\pm 91.8$ 認められた。DMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群の1例(6.7%)においてTumor (Adenocarcinoma)を認めた。その発生頻度は $0.1\pm 0.3$ であった。

小腸において、DMBDD処置単独投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群において各1例(6.7%)ずつ、Tumor (Adenocarcinoma)を認めた。発生頻度はそれぞれ、DMBDD処置単独投与群で $0.1\pm 0.3$ 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で $0.1\pm 0.3$ であった。これら発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

## 1. コウジ酸およびIQのF344ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験

[一般状態]

実験期間中、第1群で1匹、第2群、第3群で各群2匹、DMBDD処理の影響により死亡した。Kojic acid、IQ投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。

実験期間中の各群における平均体重推移をTable 13およびFigure 6に示した。DMBDD処置群(第1~3群)において、被験物質投与群のDMBDD→2.0%Kojic acid投与群では、DMBDD単独処置群と比べて有意な体重の増加抑制が認められた。DMBDD→0.01%IQ投与群では、DMBDD単独処置群と比べて有意な差は認められなかった。非DMBDD処置群(第4~6群)において、被験物質投与群の2.0%Kojic acid投与



群では、無処置群と比べて有意な体重の増加抑制が認められた。0.01%IQ 単独投与群では、無処置群と比べて有意な差は認められなかった。

平均飲水量を Table 14 に示した。DMBDD 処置群 (第 1~3 群)において、被験物質投与群の DMBDD→0.01%IQ 投与群で、実験開始 3 週目に DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた。また、DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で、実験開始 7、9、11、12 週目に DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) において、被験物質投与群の 0.01%IQ 単独投与群で、実験開始 14、15、17、18 週目に無処置群と比べて、有意な減少が認められた。また、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、実験開始 3、4、15、18 週目に無処置群と比べて、有意な減少が認められた。

平均摂餌量を Table 15 に示した。DMBDD 処置群 (第 1~3 群) において、被験物質投与群の DMBDD→0.01%IQ 投与群で、実験開始 6 週目に DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) において、無処置群と比べて、有意な差は認められなかった。

実験期間中における 1 匹 1 日あたりの平均 IQ、Kojic acid 摂取量を Table 16 に示した。ラットにおける体重当たりの 1 日平均摂取量 (g/kg b.w./day) は、DMBDD→0.01%IQ 投与群では 0.049 g、0.01%IQ 単独投与群では 0.055g であった。DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群では 1.109 g、2.0%Kojic acid 単独投与群では 1.140g であった。これを体重 60kg のヒトにおいて換算して計算すると、1 日当たりに DMBDD→0.01%IQ 投与群では 2.94 g、0.01%IQ 単独投与群では 3.30g、DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群では 66.54 g、2.0%Kojic acid 単独投与群では 68.40g 摂取していることになった。

#### [最終体重と臓器重量]

最終体重は Table 17 に示した。DMBDD 処置群 (第 1~3 群) において、被験物質投与群の DMBDD→0.01%IQ 投与群で DMBDD 単独処置群と比べて、有意な差は認められなかった。DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた ( $p < 0.05$ )。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) において、被験物質投与群の 0.01%IQ 単独投与群で、無処置群と比べて、有意な差は認められなかった。2.0%Kojic acid 投与群で無処置群と比べて、

有意な減少が認められた ( $p < 0.05$ )。

各群の臓器の絶対重量および相対重量を Table 18 に示した。

肝臓においては、DMBDD 処置群 (第 1~3 群) で、被験物質投与群の DMBDD→0.01%IQ および 2.0%Kojic acid 投与群で、DMBDD 単独処置群と比べて、肝臓の絶対重量、相対重量にて有意な増加が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) では、被験物質投与群の 0.01%IQ および 2.0%Kojic acid 単独投与群で、無処置群と比べて、肝臓の絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

腎臓においては、DMBDD 処置群 (第 1~3 群) で、被験物質投与群の DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で、DMBDD 単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な減少が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) では、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な減少が認められた。

脾臓においては、DMBDD 処置群 (第 1~3 群) で、被験物質投与群の DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で、DMBDD 単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な減少が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) では、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

心臓においては、DMBDD 処置群 (第 1~3 群) で、被験物質投与群の DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で、DMBDD 単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な減少が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) では、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量にて有意な減少が認められた。

甲状腺においては、DMBDD 処置群 (第 1~3 群) で、被験物質投与群の DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で、DMBDD 単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な増加が認められた。また、非 DMBDD 処置群では、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

副腎においては、DMBDD 処置群 (第 1~3 群) で、被験物質投与群の DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で、DMBDD 単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な増加が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) では、被

験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

精巣においては、非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群)で、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量にて有意な減少、相対重量に有意な増加が認められた。

#### [GST-P 陽性細胞巢の定量解析]

GST-P 陽性巢 (直径 20 $\mu$ m 以上) の肝臓切片全体の面積に対する発生個数ならびに面積の結果を Table 19 に示した。DMBDD 処置群 (第 1~3 群)において、被験物質投与群の DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ および 2.0%Kojic acid 投与群で DMBDD 処置単独と比べて、肝臓の GST-P 陽性細胞巢の発生個数、面積ともに有意な増加を認めた。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群)において、直径 20 $\mu$ m 以上の GST-P 陽性細胞巢は認められなかった。

#### [病理学的検査]

肝臓には腫瘍は認められなかった。

甲状腺の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれ Table 20 に示した。Follicular cell hyperplasia においては発生頻度が DMBDD 単独投与群で 100%、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 100%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 100%とすべての動物で認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で 3.1  $\pm$  2.2、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 2.7  $\pm$  2.2、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 7.7  $\pm$  2.8 認められた。Follicular cell adenoma においては DMBDD 単独投与群で 46.7%、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 33.3%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 100%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で 0.7  $\pm$  0.9、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 0.5  $\pm$  0.7、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 5.7  $\pm$  2.6 認められた。Follicular cell adenocarcinoma においては DMBDD 単独投与群で 26.7%、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 6.7%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 14.2%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で 0.3  $\pm$  0.5、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 0.1  $\pm$  0.4、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 2.0  $\pm$  1.4 認められた。また、Total tumor (follicular cell adenoma + follicular cell adenocarcinoma) では DMBDD 単独投与群で 53.3%、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 40.0%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 100%の発生頻度で認められた。

DMBDD 単独投与群で 1.0  $\pm$  1.1、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 0.5  $\pm$  0.7、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 0.5  $\pm$  0.7 認められた。これらの甲状腺における病変の発生頻度および発生個数は DMBDD 処置単独投与群と比較し、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群において follicular cell adenoma の発生の有意な増加が認められた。

腎臓の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれ Table 21 に示した。Atypical tube hyperplasia においては発生頻度が DMBDD 単独投与群で 84.6%、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 53.8%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 35.7%認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で 1.0  $\pm$  0.8、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 0.6  $\pm$  0.7、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 0.4  $\pm$  0.6 認められた。Renal cell adenoma においては DMBDD 単独投与群では認められなかったが、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 7.6%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 15.4%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 0.1  $\pm$  0.3、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 0.1  $\pm$  0.4 認められた。Nephroblastoma は DMBDD 単独投与群で 7.6%認められたが、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群および DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で認められなかった。発生頻度は DMBDD 単独投与群で 0.1  $\pm$  0.3 認められた。Renal cell carcinoma においては DMBDD 単独投与群、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群いずれも認められなかった。また、Total tumor (Renal cell adenoma + Renal cell carcinoma) では DMBDD 単独投与群では認められなかったが、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 7.6%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 14.3%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 0.1  $\pm$  0.3、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 0.1  $\pm$  0.4 認められた。これらの腎臓における病変の発生頻度および発生個数は DMBDD 処置単独投与群と比較し、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群および DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

膀胱の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれ Table 22 に示した。PN hyperplasia においては発生頻度が DMBDD 単独投与群で 30.8%、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 30.8%、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で 21.4%認められた。発生個数については、DMBDD 単独投与群で 0.3  $\pm$  0.6、DMBDD  $\rightarrow$  0.01%IQ 投与群で 0.3  $\pm$  0.5、DMBDD  $\rightarrow$  2%コウジ酸投与群で

0.3±0.7認められた。PapillomaにおいてはDMBDD単独投与群で7.6%、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%認められ、DMBDD→2%コウジ酸投与群では認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で0.1±0.3、DMBDD→0.01%IQ投与群で0.1±0.3認められた。Transitional cell carcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で13.3%の発生頻度で認められたが、0.01%IQ投与群および2%コウジ酸投与群で認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で0.1±0.4、認められた。また、Total tumor (Papilloma+Transitional cell carcinoma)ではDMBDD単独投与群で20.0%、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%の発生頻度で認められたが、DMBDD→2%コウジ酸投与群では認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で0.2±0.4、DMBDD→0.01%IQ投与群で0.1±0.3認められた。これらの膀胱における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.01%IQ投与群およびDMBDD→2%コウジ酸投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

肺の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれTable 23に示した。Hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で100%、DMBDD→0.01%IQ投与群で100%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で100%とすべての動物で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で20.2±6.2、DMBDD→0.01%IQ投与群で29.1±11.3、DMBDD→2%コウジ酸投与群で25.4±7.6認められた。AdenomaにおいてはDMBDD単独投与群で7.6%、DMBDD→0.01%IQ投与群で46.2%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で14.3%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で0.1±0.3、DMBDD→0.01%IQ投与群で0.5±0.8、DMBDD→2%コウジ酸投与群で0.4±0.6認められた。AdenocarcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で7.6%、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%、DMBDD→2%コウジ酸投与群では認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で0.1±0.3、DMBDD→0.01%IQ投与群で0.1±0.3認められた。また、Total tumor (Adenoma+Adenocarcinoma)ではDMBDD単独投与群で13.3%、DMBDD→0.01%IQ投与群で53.8%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で14.3%の発生頻度で認められた。DMBDD単独投与群で0.2±0.4、DMBDD→0.01%IQ投与群で0.6±0.8、DMBDD→2%コウジ酸投与群で0.3±0.8認めら

れた。これらの肺における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.01%IQ投与群およびDMBDD→2%コウジ酸投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

DMBDD 処置群 (第 1 から 3 群) において ACF の定量解析を行った結果を Table 24 に示した。その発生個数において DMBDD 単独投与群で 100.7±11.3、DMBDD→0.01%IQ 投与群で 144±17.5、DMBDD→2%コウジ酸投与群で 119±14.4 認められた。DMBDD 処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.01%IQ 投与群において ACF の有意な増加が認められたが、DMBDD→2%コウジ酸投与群では有意な変化を認めなかった。

## 2. 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

腎腫瘍と周囲正常組織から蛋白の網羅的発現解析を行った結果、66%の信頼性で 600 種類の蛋白が同定された。そのうち、EHEN 単独投与群から採取した腎腫瘍と対応する周囲正常組織を比較した結果、319 種類の蛋白が有意に発現変動しており、発現上昇した蛋白が 135 種類、発現減少した蛋白が 184 種類であった。この中で、発現が 2.0 倍以上増加した蛋白は全部で 11 種類あり keratin 1 (3.5 倍)、carbonic anhydrase 3 (3.0 倍)及び vimentin (2.4 倍)等細胞質に局在する蛋白が多く検出されていた。

また、EHEN→KBrO<sub>3</sub> 投与群における腎腫瘍と周囲正常組織を比較した結果、322 種類の蛋白が有意に発現変動しており、発現上昇した蛋白が 150 種類、発現減少した蛋白が 172 種類であった。この中で、発現が 2.0 倍以上増加した蛋白は全部で 16 種類あり GSTM5 (3.2 倍)、crystallin alpha B (3.0 倍)、COX7A2 (2.8 倍)等細胞質に局在する蛋白が多く検出されていた。

そこで、EHEN 単独投与及び EHEN→KBrO<sub>3</sub> 複合投与の両方の腫瘍で発現増加した蛋白を選別するために、両方の腫瘍で共通して 2.0 倍以上発現上昇した蛋白に注目した結果、8 種類の蛋白が選別された。今回は、その中で良好な染色結果を得られた S100A11 に注目した。

S100A11 の免疫組織化学的解析の結果、正常の腎皮質における遠位尿細管で、弱陽性ながら陽性所見を認めたが、腎腫瘍の腫瘍細胞細胞質にて強陽性を示した(Figure 7)。またラット腎発がんでは主なフェノタイプである好塩基性腎腫瘍のみならずヒトで最も多い明細胞性腎腫瘍

においても陽性所見を認め、今回プロテオーム解析に興じた腎腫瘍サンプルでは、全例にて強陽性を示した。さらに同標本を検討した結果、腎発がんにおける前癌病変との報告がなされている異型尿細管や微小な腺腫においてもその強い発現が認められ、周囲尿細管に比較して高い染色強度を示した(Figure 8)。さらなるバイオマーカーを探索するため、EHEN 単独投与群における腎腫瘍と周囲正常組織を比較した結果に細注目し、1.5 倍以上発現上昇した蛋白に再注目した結果、新たに endoplasmic reticulum protein 29 (2.3 倍), diazepam binding inhibitor (2.0 倍), guanylate binding protein 2, GBP2 (1.9 倍), copine family member IX (1.9 倍), N-myc downstream regulated 1 (1.8 倍), prosaposin (1.8 倍), homer homolog 3 (1.6 倍)等が同定された。

今回は、その中で良好な染色結果を得られた GBP2 に注目した。GBP2 の免疫組織化学的解析の結果、正常の腎皮質における遠位尿細管で、弱陽性ながら陽性所見を認めたが、腎腫瘍の腫瘍細胞細胞質にて陽性を示した(Figure 9)。

#### 5. IQ の B6C3F1 マウス肝二段階発がん性試験

8 週ではいずれの群の肝臓においても変異細胞巣は認められなかった。40 週では、HP→DEN 群に比較して HP→DEN→300 ppm IQ 群で肝がんの発生頻度および数が有意に増加した(Figure 10)。一方、DEN→300 ppm IQ 群および 300 ppm IQ 単独群では腫瘍はみられなかった。以上より、B6C3F1 マウスを用いて肝発がん物質を検出するには HP→DEN→被検物質の投与が有用であることが考えられた

#### 4. ダンマル樹脂および IQ の C57BL/6J マウス肝二段階発がん性試験

22 週において、肝臓における変異細胞巣の総数は DEN 単独投与群に比較してダンマル樹脂および IQ 投与群で有意な差は認められなかった (Table 25)。なお、いずれの群においても肝腫瘍はみられなかった。40 週において、ダンマル樹脂投与群で、肝臓における肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群に比較して有意に減少した。また、IQ 投与群では肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群との間に有意な差は認められなかった

(Figure 11)。

#### 6. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

ProteinPilot software を用いて検出した蛋白を解析した結果、66%の信頼性で 315 種類の蛋白が検出された。さらになん部と周囲正常部での発現量を比較した結果、有意に発現が上昇したものが 66 種類、一方減少したものが 60 種類であった。有意に発現上昇した蛋白の中で、Fold change に注目し選別した結果、サイトケラチン (CK) 5 (14 倍)を筆頭に上位 10 位のうち、8 種類が CK であり、扁平上皮の分化マーカーとして用いられている CK5/6 や CK14 も検出された。また、GSTO1 (8 倍)や GSTA4 (6 倍)等、第 2 相の薬物代謝酵素も認められた (Table 26)。一方、発現の上位蛋白以外にも皮膚において幹細胞マーカーとしての報告がある CK19 や actin binding に関わる COTL1 が検出された。

次に、IPA を用いて検出した蛋白を解析した結果、がん関連のパスウェイで、中心に位置する YWHAZ と、先ほど検出した GSTO1 が認められた (Figure 12)。

以上より検出した COTL1, CK19, GSTO1 及び YWHAZ を新しいバイオマーカー候補として、免疫染色にてそれぞれの染色性及び局在を確認した。まず、肺の正常組織において特に、がんの起始細胞となり得る可能性が高いことからクララ細胞と肺胞 II 型細胞に注目し、それぞれの染色性を確認したところ、CK19 及び YWHAZ に関しては共に陰性であった。一方扁平上皮化生及びがん部では、4 種類の蛋白全てが検索した 8 個体全例にて陽性を示した (Figure 13, Table 27)。

さらに、NTCU 処置したマウスの肺について病理組織学的解析を行った結果、全例の呼吸細気管支において上皮の腫大、細胞質の腔胞化、核内の好酸性封入体様小体及び上皮の脱落等を主な所見とする異型細気管支を認めた (Figure 14)。一方で扁平上皮化生を始めとする扁平上皮系の病変を全例に認めなかった。次にこれら肺に対して細胞増殖能及びアポトーシス能を検討するため、Ki-67 及び TUNEL 染色を行った結果、溶媒対照群と比較し、有意な差は認めなかった。次にこの変化に対する BASC の関与を検討するため、肺胞 II 型上皮細胞のマーカーである SPC 及びクララ細胞のマーカーである CC10 を用いて 2 重染色を行った。その結