

201234045A

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐淵 英機

平成25 (2013) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 ----1
鱧 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)

II. 分担研究報告

1. 新規前がん病変マーカーの開発に関する研究 -----22
鱧 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)
2. *gpt delta*ラットを用いた *in vivo*変異原性試験 -----47
魏 民 (大阪市立大学大学院医学研究科 准教授)
3. 遺伝子のメチル化異常に関する研究 -----61
辻内 俊文 (近畿大学工学部 教授)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----65

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）
平成24年度総括研究報告書

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

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

これまでに、我々は平成21-23年度厚生労働科学研究で、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において、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットと前がん病変を指標とした二段階発がん性試験を組み合わせた包括的短期発がんリスク評価試験法を開発した。本研究では、この試験法がリスク評価システムにおいて有用であることをさらに検証するため、肝臓、膀胱、甲状腺及び腎臓において発がん性・変異原性を有する食品添加物あるいは食品中化学物質についてできる限り多くの物質について検索し、データを蓄積する。また、短期に発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発を肺、腎、膀胱などの臓器においてもさらに進める。本年度では、*gpt delta* ラットを用いて *in vivo* 変異原性試験法の汎用性を高めるために、これまで困難であった微量組織からの変異原性解析を可能にする新規抽出解析法を開発を行った。また、それを用いて甲状腺発がん促進物質であるコウジ酸の甲状腺における *in vivo* 変異原性、および健康食品や化粧品の原料として広く使用されているプロポリスの膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性を検討した。さらに、腎発がんの尿中マーカーおよび肺扁平上皮がんマーカーの開発を行った。加えて、DNA メチル化異常を指標とする発がん性評価法を開発するために、肝発がん物質である 2-acetylamino fluorene (2-AAF) を投与した肝臓におけるメチル化異常について、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。本年度で得られた研究成果を以下にまとめる。

1. 微量試料における新たな DNA 抽出法の開発

従来の genomic DNA 抽出法に工夫、改良を加えて、パッケージング効率に影響するフェノール・クロロホルムを用いない、かつ微量試料においても十分な形質転換効率を得ることができる genomic DNA 抽出法を開発した（鰐淵）。さらに、本抽出法の有用性を確認するため、各種被験物質を用いて甲状腺および膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の解析を行った（魏）。その結果、膀胱粘膜における遺伝毒性物質である BBN、非遺伝毒性物質である Sodium ascorbate がそれぞれ陽性、陰性であることから、本改良法が微量試料からの変異原性試験に極めて有用であることが確認できた。さらに、コウジ酸が甲状腺に対して、プロポリスが膀

膀胱粘膜に対してそれぞれ変異原性を有さないことをはじめて明らかにした。我々が開発した *gpt delta* ラットを用いた発がん性・遺伝毒性の短期包括的評価モデルに本改良 DNA 抽出法を導入することによって、さらにモデルの汎用性を高めることができると考えられた。

2. 腎発がんの尿中マーカーの開発

N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) 単独および EHEN→KBrO₃ 誘発腎腫瘍のプロテオーム解析結果より、S100A11 蛋白を同定した。ラット尿サンプルより、担がん動物での尿中 S100A11 について検討した結果、対照群と比較し、有意な差は認められず、尿中マーカーとして有用性が低いことが明らかとなった (鰐淵)。

3. マウス肺扁平上皮がんマーカーの開発

マウス肺扁平上皮がん発がん機序の解析では、発がん過程早期において気管支肺泡幹細胞(BASC)の関与を明らかとしてきたが、遺伝子発現解析より NTCU 投与群の BASC 領域にて、Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc 及び klf4 等幹細胞マーカーの発現上昇が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、ERK MAPK, p38 MAPK, PI3K/Akt および TGF beta signaling pathway の関連遺伝子における発現上昇が認められた。これらのことより、発がん機序に即した分子生物学的に意義を有するマーカー開発を行う可能性を示した (鰐淵)。

4. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

2-AAF を投与したラット肝臓におけるメチル化異常を検討した結果、次世代シーケンサーを用いた検出法が従来法に比較してより詳細にかつ定量的に DNA メチル化パラメータを評価できること確認できた。今後、エピジェネティック異常の評価試験法開発に向けて、メチル化解析のようなその頻度が重要な解析においては次世代シーケンサーを用いることが重要であることが考えられた (鰐淵)。

5. 過酸化水素とエストロゲンを用いて LPA 受容体の発現パターンと細胞運動能に及ぼす影響を検索した結果、H₂O₂ とエストロゲン処理により、ラット肝上皮細胞 WB-F344 の細胞運動能上昇には LPA3 が、細胞運動能低下には LPA1 が関与することが明らかとなった (辻内)。

分担研究者

魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科

辻内 俊文 近畿大学理工学部

A. 研究目的

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 2 年間必要であり、その莫大な経費および多数

の動物数を要することから、多くの化学物質に対応することが困難なためである。これまでに、我々は平成 21-23 年度厚生労働科学研究で、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において、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットと F344 ラットを用いて、前がん病変を指標とした二段階発がん性試験である包括的短期発がんリスク評価試験法を開発した。検索した被験物質は、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 IQ、*in vitro* 変異原性偽陽性であるコウジ酸で、これらは開発した試験法では、いずれも肝発がん促進作用陽性であるが、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性は、それぞれ陰性、陽性、陰性となりこれまでの試験では変異原性偽陽性であるコウジ酸の *in vivo* 変異原性陰性が明らかになりこれが非遺伝毒性であることを初めて明らかにし、この試験法の肝発がん性評価システムとしての有効性を証明した。

本研究では、この試験法がリスク評価システムにおいて有用であることをさらに検証するため、肝臓、膀胱、甲状腺及び腎臓において発がん性・変異原性を有する食品添加物あるいは食品中化学物質についてできる限り多くの物質について検索し、データを蓄積する。また、短期に発がん性を検索できる前がん病変マーカーの開発を肝以外にも肺、胃、大腸、腎、膀胱などの臓器においてもさらに進める。

これまでの *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験法では、甲状腺や膀胱粘膜のような微小组織では変異原性解析が困難であった。現行の Transpack DNA isolation kit を用いた DNA 抽出法は、甲状腺や膀胱粘膜のような微量試料に対応していないため、変異原性解析に必要な genomic DNA を十分量得ることができない。また、古典的 genomic DNA 抽出法であるフェノール・クロロホルム DNA 抽出法は、十分な収量を得ることが可能であるが、その最終産物にフェノール・クロロホルムの残留が生じやすく、これらの残留がラムダファージへの形質転換効率を大きく下げる要因となっている。本年度は、微量試料における変異原性評価可能な収量を得られ、かつ形質転換を阻害しない安定的 genomic DNA 抽出技術の開発を目的とした。加えて、新たな DNA 抽出法の有用性を確認するため、甲状腺発がん促進物質であるコウジ酸の甲状腺における *in vivo* 変異原性、および健康食品や化粧品の原料として広く使用されているプロポリスの膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性を評価した。

また、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。

さらに、発がんにはメチル化異常が関与する場合も多く、食品中化学物質誘発の発がん性臓器におけるメチル化異常等を検索し、DNA メチル化異常を指標とする発がん性評価を試みる。本年度では、

次世代シーケンサーを用いて肝発がん物質である 2-AAF を投与した *gpt delta* ラット肝臓における DNA メチル化異常を検討した。

B. 研究方法

1. 微量試料からの DNA 抽出法の開発

[材料]

新規 DNA 抽出法の開発にあたり、以前に我々がダンマル樹脂の発がん性・遺伝毒性短期包括的評価モデルの有用性評価試験（前年度報告書参照）でサンプリングを行った膀胱および肝凍結試料を用いた。

[genomic DNA の抽出]

肝臓 10 mg に lysis buffer を加え、試料を粉砕した。13500 rpm にて 10 分間遠心を行い、上清を除去し、digestion buffer、RNase および Proteinase K を加え、55°C にて一時間インキュベーションを行った。Wide bore チップで粘性の高い沈殿物を回収して TE buffer で溶解し、以降の試験に供した。

[パッケージング効率の測定]

得られた genomic DNA 10 μ l を用いて Transpack packaging extract kit で *in vitro* packaging を行い、大腸菌株 (*E.coli.C*) の菌液に回収したファージを加え、37°C 20 min (静置) の後、回収ファージを大腸菌株に感染させた。感染後の菌液をスプレートにまいて 37°C で 1 日間培養を行い、感染ファージ由来の形質転換プラークを得た。形質転換数をパッケ

ーシング効率として評価を行った。

[膀胱粘膜を用いた新規 DNA 抽出法の確認]

膀胱粘膜について肝臓と同様に抽出を行い、パッケージング効率の測定を行った。なおその際、膀胱粘膜を 2 サンプル分バッチ処理して評価に供した。

2. *gpt delta* ラット甲状腺におけるコウジ酸の *in vivo* 変異原性の検討

6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに実験開始より第 5 週まで基礎飼料を与え、第 5 週よりコウジ酸をそれぞれ 0、2% 混餌投与し、第 18 週まで飼育後解剖屠殺した（前年度鰐淵分担報告書参照）。甲状腺における変異頻度について *gpt* アッセイ法を用いて検討し、併せて *gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行った。その際、甲状腺試料からの DNA 抽出には今回新たに開発した微量試料向けの抽出法を用いて試験に供した。

in vitro パッケージングには、Transpack Packaging Extract を用いて、抽出した DNA からトランスジェンズ EG10 をファージ粒子として回収した。Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株の菌液に回収したファージを加え、37°C 20min (静置) の後、37°C 20min (振とう) にて回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。感染後の YG6020 菌液を 6-Thioguanine(6-TG) と chloramphenicol(Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 2 日間培養行い、*gpt*

遺伝子が不活化による変異体コロニーを得た。また、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数は、6-TG を含まない M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数より求めた。突然変異数は、6-TG を含む寒天培地にまいて生じたコロニー数から求めた。

突然変異体頻度の算出については、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数で除することで得た。

Spiアッセイでは、*in vivo* パッケージングによりファージを回収するまでの手法は *gpt* アッセイと同様に行った。XL-1 Blue MRA P2(P2 溶原菌)に回収したファージを加え、37°C 20 min (静置)により回収したファージを P2 溶原菌に感染させた後、 λ トリプティケース寒天培地にまいて 37°Cで一晩培養し、Spi変異体プラークを得た。また、XL-1 Blue MRA(非溶原菌)に感染させ、全ファージが溶菌してプラークを形成することにより回収プラーク数を求めた。突然変異体頻度は変異プラーク数を回収ファージ数で除して算出した。

gpt 遺伝子変異体の変異スペクトラを評価するため、得られた変異コロニーをコロニーダイレクト PCR 法によって、DNA フラグメントを増幅した。プライマーは forward に primer 1; 5' -TACCACTTTATCCCGCGTCAGG-3'を、reverse に primer 2 ; 5' -ACAGGGTTTCGCTCAGGTTTGC-3'を使用して、サーマルサイクラーにて *gpt* 遺伝子の ORF 456 bp を含む 739 bp

の DNA フラグメントを増幅した。得られた PCR product を illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns にて精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用して、DNA サイクルシーケンスを行った。プライマーは forward に primer A; 5' -GAGGCAGTGCGTAAAAGAC-3' を、reverse に primer B ; 5' -CTATTGTAACCCGCCTGAAG-3'を使用して DNA サイクルシーケンスを行った。その後、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer で *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を行い、変異スペクトラについて解析を行った。

遺伝子の変異頻度について 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。

3. *gpt delta* ラット膀胱粘膜におけるプロポリスの *in vivo* 変異原性の検討

6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに基礎飼料、2.5%プロポリス混餌投与群、0.05% BBN 飲水投与群および 5.0% Sodium ascorbate 混餌投与群を設け、それぞれ実験開始から 13 週間投与し、実験開始後 13 週で膀胱粘膜における *gpt* および Spiアッセイを行った。併せて *gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行った。その際、膀胱粘膜からの genomic DNA の抽出には新たに開発した抽出法を用いて genomicDNA を抽出し、2 サンプル分

を1つにバッチ処理し、試験に供した。

4. 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 500 ppm の濃度で 2 週間飲水投与した。投与終了後、KBrO₃ を 0, 0.02, 2, 8, 30, 125 及び 500 ppm の濃度で 24 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。KBrO₃ が 0 及び 500 ppm 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。

[尿サンプルを用いた S100A11 の ELISA]

免疫染色にて同定された S100A11 蛋白について、尿中マーカーとしての有用性を検討するため、ELISA 法を用いて尿中の蛋白量を検討した。尿はサンプリング後、測定日までマイナス 80°C にて保存した。ELISA キットは USCN 社のラット用キット (sE90568Ra) を用いた。

5. 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/75µl 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および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 mm³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40µm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

1x10⁶個/100µl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4µg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。

[mRNA 発現解析]

フローサイトメトリーにて分取した細胞を、RNA 抽出キットである RNeasy Micro キット (Qiagen) を用いて、抽出した。これにより得られたサンプルより、既知肺幹細胞マーカーである Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc 及び klf4 について発現検討を行った。

[マイクロアレイ解析]

フローサイトメトリーにて分取した細胞を、RNA 抽出キットである RNeasy Micro キット (Qiagen) を用いて、抽出した。これより得られたサンプルより、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて比較検討した。Genespring ソフトウェアより同定された遺伝子の発現量データを取得したのち、IPA ソフトウェアを用いてパスウェイについて検討を行った。

6. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

[材料]

本研究には 6 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラットを用いた 2-AAF の肝中期発がん性評価試験で得られた、0 及び 50 ppm 単独投与群の凍結肝を用いた。genomic DNA の抽出にはフェノール・クロロホルム法を用いてアルコール精製した。Bisulfite 処理には Epitect Bisulfite kit をもちいてメチル化シトシン以外のシトシンをウラシルに変換した。

[標的遺伝子の選定・プライマー設計]

標的遺伝子の選択にはトキシコゲノミクスプロジェクトで得られたマイクロアレイデータ(2-AAF、28 日連続投与)を Ingenuity pathway analysis software にて解析を行い、細胞増殖関連遺伝子において発現低下が認められた 3 つの遺伝子 (BMF、CNR1、LOX) について遺伝子プロモーター領域のメチル化解析を行った。なお、メチル化解析にむけてのプライマー設計には Meth primer software を用いて増幅産物が 150~200 bp になるように設計した。

[PCR プロトコール]

テンプレート容量は 10 ng になるように調整し、AmpliTaq Gold をもちいて PCR 増幅を行った。その反応液の組成は 1 サンプルあたりテンプレート 1 μ l、10 \times AmpliTaq Gold buffer 1 μ l、dNTPs を 1 μ l、プライマーをそれぞれ 0.2 μ l、AmpliTaq Gold を 0.1 μ l 加え ddH₂O で

最終容量が 10 μ l になるように調整した。PCR 反応サイクルは 96°C 10 分間 denature したのち、96°C 30 秒、 T_m 値 30 秒、72°C 60 秒のサイクルを 46 サイクル行った。得られた PCR プロダクトを illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns にて精製し、以降の解析にそれぞれ供した。

[DNA クローン解析]

精製プロダクトを pTAC-1 に TA クローニングを行い、大腸菌コンピテントセル(DH5 α)に形質転換させて形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌を LB 培地に塗布し、37°C にて 16 時間培養を行い、得られたシングルコロニーをテンプレートとしたコロニーダイレクト PCR を行った。PCR プロダクトを illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns にて精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用して、DNA サイクルシーケンスを行った。プライマーは M13 プライマーを使用して DNA サイクルシーケンスを行った。その後、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer でシーケンス解析を行った。

[次世代シーケンス解析]

次世代シーケンス解析には Life technologies 社の Ion PGM を用いて行った。シーケンス解析に用いた reference データはラットの Rn5 データを参照し、variant call software を用いてデータ解析を行った。なお、リファレンスとの比

較において、リファレンスデータの CG 配列の C を Y に、それ以外の C を T に置き換え比較検討を行った。また CpG アイランドのメチル化率の算定には C read に対して C+T read を除して算定した。

7. DNA メチル化異常の短期検出系の開発

分担報告書参照(社内)

8. 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. 微量試料からの DNA 抽出法の開発

改良 DNA 抽出法で得られた genomic DNA は *in vitro* パッケージング操作を阻害する物質の混入がなく、またその収量は *in vivo* 変異原性解析に必要な量を十分に満たしていた。これを *in vitro* パッケージングし、そのパッケージング効率を計測した結果、変異原解析に必要な総形質転換数 (250,000 の形質転換ファージ) が得られた。

2. *gpt delta* ラット甲状腺におけるコウジ酸の *in vivo* 変異原性の検討

gpt 遺伝子の突然変異頻度が無処置群では $0.65 \pm 0.16 (\times 10^{-5})$ 、2.0%コウジ酸単独投与群では $0.61 \pm 0.27 (\times 10^{-5})$ であ

った。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度は、無処置群と比較し、2.0%コウジ酸投与群において有意な変化を認めなかった。

gpt 遺伝子の変異スペクトラを検討した結果、base substitution において、transition 変化である G:C to A:T 変化は無処置群では 31.3%、2%コウジ酸単独投与群では 25.0%、A:T to G:C 変化は無処置群では 6.3%、2%コウジ酸投与群では 12.5%であった。また、同じ Base substitution において transversion 変化である G:C to T:A 変化は無処置群では 31.3%、2%コウジ酸投与群では 37.5%、G:C to C:G 変化は無処置群では 6.3%、2%コウジ酸投与群では 6.3%、A:T to T:A 変化は無処置群では 12.5%、2%コウジ酸投与群では 6.3%、A:T to C:G 変化は両群共に認められなかった。deletion において、1bp 欠失変化は無処置群では 6.3%、2%コウジ酸投与群では 6.3%、2 bp 以上の欠失変化は両群共に認められなかった。挿入変異については両群共に 6.3%であった。これら変異スペクトラは無処置群と比較し、2%コウジ酸投与群において特異的な有意な変化を認めなかった。

Spi アッセイにおいては red/gam 遺伝子の突然変異体頻度が無処置群では $0.65 \pm 0.16 (\times 10^{-5})$ 、2%コウジ酸投与群では $0.61 \pm 0.27 (\times 10^{-5})$ であった。無処置群および 2%コウジ酸投与群において有意な変化を認めなかった。

3. *gpt delta* ラット膀胱粘膜におけるプロポリスの *in vivo* 変異原性の検討

gpt 遺伝子の突然変異頻度が無処置群で $0.53 \pm 0.11 (\times 10^{-5})$ 、0.05% BBN 投与群では $4.01 \pm 0.72 (\times 10^{-5})$ 、5.0% Sodium ascorbate 投与群では $0.63 \pm 0.45 (\times 10^{-5})$ 、2.5%プロポリス投与群では $0.58 \pm 0.24 (\times 10^{-5})$ であった。*gpt* 遺伝子の膀胱粘膜における突然変異頻度は、無処置群と比較して、0.05% BBN 投与群で有意に増加したが、Sodium ascorbate およびプロポリス投与群では有意な差は認められなかった。*gpt* 遺伝子の変異スペクトラの解析は現在進行中である。

Spi アッセイにおいては、red/gam 遺伝子の突然変異体頻度が無処置群で $0.49 \pm 0.19 (\times 10^{-5})$ 、0.05% BBN 投与群では $4.23 \pm 0.54 (\times 10^{-5})$ 、5.0% Sodium ascorbate 投与群では $0.51 \pm 0.24 (\times 10^{-5})$ 、2.5%プロポリス投与群では $0.41 \pm 0.10 (\times 10^{-5})$ であった。無処置群と比較して、0.05% BBN 投与群で有意に増加したが、Sodium ascorbate およびプロポリス投与群では有意な差は認められなかった。

4. 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

候補マーカーとして同定された S100A11 蛋白について ELISA 法を用いて尿サンプルの解析を行った。対照群及び EHEN 単独投与群と EHEN→KBrO₃ 投与群の中で、担がん動物の尿を用いて、S100A11 の発現量を比較検討した結果、いずれの群間においても有意な差を認めなかった。

5. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

肺扁平上皮がんモデルにおけるさらなる発がん機序解明のため、発がん過程早期に認められた気管支肺胞幹細胞 (BASC) における既知肺幹細胞マーカーにおける遺伝子発現量解析及び遺伝子発現における網羅的解析を行った。サンプリングとして、前年度同様フローサイトメトリーを用いて BASC が豊富に存在することが知られている $Sca-1^{pos}CD31^{neg}Pecam^{neg}$ の分画において溶媒対照群及び NTCU 投与群それぞれから分取した。既知遺伝子として、今回は *Sca1*, *CD133*, *CD44*, *c-kit*, *c-myc* 及び *klf4* に着目し、検討した結果、いずれのマーカーにおいても NTCU 投与群において、溶媒対照群と比較し増加を認めた。特に、*c-kit* 及び *c-myc* においては、それぞれ約 40 倍及び 10 倍と顕著に高い値を示した。これらのことから、NTCU 投与により増加した $Sca-1^{pos}CD31^{neg}Pecam^{neg}$ 分画での幹細胞マーカーの発現増加が認められた。

マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、IPA ソフトウェアを用いて種々の signaling pathway を検討した結果、ERK MAPK, PI3K/Akt 及び TGF beta signaling pathway の関連遺伝子における発現上昇が認められた。

6. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

Bisulfite PCR の結果、CNR1_1、

LOX_2、LOX_3、LOX_5 で十分な PCR プロダクトが得られたため、以降の解析に用いた。BMF では PCR プロダクトが得られなかった。DNA クローンをキャピラリーシーケンシングした結果、両遺伝子のメチル化頻度に 2-AAF 投与に伴う変動は認められず、またそのメチル化頻度は低かった。次世代シーケンスの結果、そのトータルリードは約 150,000 リード(12 Mbase)、平均リードは 80 bp であった。usable sequence 18%であるものの、トータルリード数が十分な数が得られているため、これ以降の解析も続行した。リファレンスデータとの一致度は 96.5%、マッピングされたリード数は無処置群で 45,593 read、2-AAF 投与群で 69,487 read であった。得られた read データを用いてメチル化率を算定した結果、今回評価した領域においては、メチル化異常は認められなかった。

7. DNA メチル化異常の短期検出系の開発

過酸化水素(H_2O_2)とエストロゲンを用いて LPA 受容体の発現パターンと細胞運動能に及ぼす影響を検索した。その結果、 H_2O_2 とエストロゲン処理により、WB-F344 細胞の細胞運動能上昇には LPA3 が、細胞運動能低下には LPA1 が関与することが明らかとなった。

D. 考察

今回新たに開発した微量試料 DNA 抽出法によってその収量は *gpt* アッセイを

行う上で必要な最低量を十分に満たし、またパッケージ反応を阻害する物質の混入もみられず、形質転換ファージの総数は 250,000 程度得られた。*gpt* アッセイ、*Spi* アッセイに最低限必要な形質転換ファージ数(200,000)を上回る形質転換ファージが得られたため、本抽出法は微量資料における変異原性の評価を行うことが可能であることが確認できた。

今回開発した DNA 抽出法の有用性を評価するため、各種被験物質を用いて甲状腺および膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の解析を行った。コウジ酸投与における甲状腺およびプロポリス投与における膀胱粘膜における *gpt* アッセイおよび *Spi* アッセイの結果、いずれのアッセイも陰性であった。これらのことより、コウジ酸およびプロポリスは *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなった。コウジ酸は復帰突然変異試験、染色体異常試験で陽性を示しているものの、*in vivo* 変異原性試験であるマウス小核試験において陰性を示している。本研究は今まで明らかでなかった甲状腺における遺伝毒性をコウジ酸が有していないことを初めて明らかにした。*gpt* 遺伝子の変異スペクトラ解析の結果、無処置群と比較してコウジ酸が甲状腺において有意な遺伝子変化を示さないことが明らかとなった。プロポリスの遺伝毒性については復帰突然変異試験および染色体異常試験で陽性であることが報告されているものの、マウス小核試験では陰性であることが報告されている。今回の結果はプロポリスが

膀胱粘膜において変異原性を有さないことを初めて明らかとし、その発がん促進メカニズムに非遺伝毒性メカニズムが関与していることが示唆された。

遺伝毒性発がん物質である BBN に関して、*gpt* アッセイにおける点突然変異の指標である *gpt* 遺伝子の突然変異体頻度は、無処置群と比較して、IQ 投与群において有意な増加が認められた。また、*Spi* アッセイにおける欠失変異の指標である *red/gam* 遺伝子の変異体頻度も無処置群と比較して、BBN 投与群において有意な増加が認められた。これらのことより、BBN は点突然変異および欠失変異の両方の変異を誘発することが明らかとなり、変異原性を有することが確認された。一方、膀胱発がん促進物質である Sodium ascorbate は両アッセイともに有意な増加が認められなかった。

腎発がんの前がん病変マーカーの開発試験で着目した S100A11 は、カルシウムバインディングプロテインの 1 種であり、細胞周期の調節や分化等細胞の発達に関与することが報告されている。さらに、前立腺を始め、種々のがんにおいてその異常発現が報告されており、細胞増殖の亢進に関与するとの報告がある。本実験では、S100A11 が前がん病変で発現上昇した際に尿中に流出する可能性を考え、本マーカーが非侵襲的に尿を用いて発がん性を検出できる尿中マーカーとしての有用性を検討した。結果は対照群の尿と比較し、腎細胞腫瘍担がん動物の尿で発現に差を認めなかったため、尿中マーカー

一としては適さないことが示唆された。

マウス肺扁平上皮がんの早期検出マーカーの実験では、発がん過程早期に気管支肺胞幹細胞 (BASC) の増生が関与することを明らかにしてきたが、本年度では遺伝子発現に着目し、Sca1, CD133, CD44, c-kit, c-myc 及び klf4 について検討した。いずれのマーカーにおいても既知肺幹細胞マーカーとして知られており、幹細胞能の亢進を検討するうえで有用なマーカーである。結果より特に顕著に発現上昇を示したマーカーとして、c-kit 及び c-myc が同定された。そのため、肺扁平上皮がんの発がん性の検討に有用である可能性が考えられた。また、マイクロアレイ解析の結果から IPA ソフトウェアを用いて、発現変動を示した遺伝子がどの signaling pathway に属するかを検討した。その結果、ERK MAPK, p38 MAP, PI3K/Akt および TGF beta signaling pathway の関連する遺伝子が多数同定され、多くの遺伝子で発現上昇していた。NTCU 投与群の BASC における細胞増殖能の増加や、幹細胞能の亢進においてこれらの signaling pathway の関与が示唆された。以上より、さらなる発がん機序解明がなされた。

エピジェネティクス解析の結果について、CNR1 および LOX における遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度は非常に低く、また 2-AAF 投与に伴うメチル化頻度の変動も認められなかったことから、これらの遺伝子の発現低下に遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が関与し

ていないことが示唆された。したがって、その発現異常にはメチル化以外のメカニズム(ジェネティックな異常やシグナル上流遺伝子の発現低下など)による可能性が考えられた。これまでメチル化解析には一般的に Bisulfite-PCR 後の産物を TA クローニングによってクローニング操作を行い、シングルコロニーを 10 個程度ピックアップしてキャピラリーシークエンス解析する。したがって、一つの遺伝子に対する DNA クローンの数が少ないため、その信頼性には以前から疑問が呈されていた。次世代シークエンサーを用いることで一つの遺伝子に対して評価する DNA クローンは今回の場合でも 45,000 ~69,000 read であったため、その絶対量によるメチル化パラメータの信頼性はこれまでの DNA クローニング法よりはるかに高い。なお、BMF については PCR 増幅産物が得られなかった。これは Bisulfite 処理に伴い、C が U に変換され DNA 配列が単調になるため、PCR 反応の特異性が失われている可能性があるためである。今後は Bisulfite 変換の影響を受けにくい領域について検討を行う必要がある。

H₂O₂ で処理したラット肝上皮細胞 WB-F344 の運動能は有意に上昇し、同時に LPA3 発現も増加することから、LPA3 発現と運動能上昇を示す化学物質には、がん細胞の増殖・浸潤・転移に対して促進的に作用する可能性が示唆された。

E. 結論

抽出過程でサンプルロスが少なく、また形質転換を阻害する化学物質の混入のない DNA 抽出法の開発に成功した。また、微小組織における変異原性解析において、新規 DNA 抽出法の有用性を確認することができた。膀胱粘膜や甲状腺のような微量組織においても変異原性の解析が可能になったことによって我々が開発した *gpt delta* ラットを用いた発がん性・遺伝毒性の短期包括的評価モデルに本改良 DNA 抽出法を導入することによって、採取の容易な肝臓や腎臓だけでなく、微小組織の変異原性を評価することが可能となり、さらに我々のモデルの汎用性を高めることができた。

これまでに、我々はコウジ酸が肝臓において変異原性を有さないことを明らかにしてきたが、本年度はさらに、発がん促進作用が確認されているが遺伝毒性の有無が明らかではない甲状腺において変異原性を有しないことを明らかにし、その発がん促進機序に遺伝毒性メカニズムを介さないことを強く示唆した。さらに、*gpt delta* ラットを用いたプロポリスの膀胱粘膜における変異原性を評価した結果、変異原性を有さないことがはじめて明らかとなった。

異型尿細管から腎腫瘍にかけて高発現が認められた新規前がん病変バイオマーカーである S100A11 については、組織マーカーとしては有用であるが、尿中マーカーとしては適さないことが示唆された。扁平上皮がん発がん機序の解析では、発がん過程早期において気管支肺胞幹細胞

(BASC)の関与を明らかとしてきたが、遺伝子発現解析より NTCU 投与群の BASC 領域にて、*Sca1*, *CD133*, *CD44*, *c-kit*, *c-myc* 及び *klf4* 等幹細胞マーカーの発現上昇が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、ERK MAPK, p38 MAP, PI3K/Akt および TGF beta signaling pathway の関連遺伝子における発現上昇が認められた。これらのことより、発がん機序に即した分子生物学的に意義を有するマーカー開発を行う可能性を示した。

次世代シーケンサーを用いてエピジェネティクス解析を行った結果、従来法に比較してより詳細にかつ定量的に DNA メチル化パラメータを評価できること確認できた。今後、エピジェネティック異常の評価試験法開発に向けて、メチル化解析のようなその頻度が重要な解析においては次世代シーケンサーを用いることが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato M, Wei M, Yamano S, Kakehashi A, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. DDX39 acts as a suppressor of invasion for bladder cancer. *Cancer Sci*, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.

Wei M, Kakehashi A, Yamano S,

Tamano S, Shirai T, Wanibuchi H, Fukushima S.: Lack of Hepatocarcinogenicity of Combinations of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats: Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol*, 25, 209-214, 2012.

Xie XL, Wei M, Yunoki T, Kakehashi A, Yamano S, Kato M, Wanibuchi H.: Long-term treatment with l-isoleucine or l-leucine in AIN-93G diet has promoting effects on rat bladder carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, 50, 3934-3940, 2012. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.063.

Xie XL, Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Okabe K, Tajiri M, Wanibuchi H.: Dammar resin, a non-mutagen, induces oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of *gpt* delta transgenic mouse which is different from a mutagen, 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline. *Mutat Res*, 748, 29-35, 2012.

Punvittayagul C, Pompimon W, Wanibuchi H, Fukushima S, Wongpoomchai R.: Effects of pinocembrin on the initiation and promotion stages of rat

hepatocarcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 2257-2261, 2012.

Chung K, Nishiyama N, Wanibuchi H, Yamano S, Hanada S, Wei M, Suehiro S, Kakehashi A.: AGR2 as a potential biomarker of human lung adenocarcinoma. *Osaka City Med J*, 58, 13-24, 2012.

山野荘太郎、魏 民、加藤 実、鰐渕英機：第2節 膀胱がんモデル動物。Animal models 疾患モデルの作成と利用：がん, 560-568, エル・アイ・シー, 2012.

加藤 実、魏 民、鰐渕英機：尿路上皮腫瘍の遺伝子異常と予後との関連。腫瘍病理識別診断アトラス腎盂・尿管・膀胱癌, 237-244, 文光堂, 2012.

鰐渕英機、山野荘太郎、魏 民：第5回肺がんモデル。細胞工学, 31, 1384-1389, 学研メディカル秀潤社, 2012.

Kawai K, Li YS, Song MF, Ootsuyama Y, Kakehashi A, Wanibuchi H, Ootsuyama A, Norimura T, Kasai H.: Methionine sulfoxide stimulates hepatocarcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse: Possible role of free radical-mediated DNA methylation. *Gene and Environment*, 34, 123-128, 2012.

Fukushima S, Wei M, Kakehashi A, Wanibuchi H.: Threshold for genotoxic carcinogens: The central concern in carcinogenic risk assessment. *Gene and Environment*, 34, 153-156, 2012.

Hoshi H, Sawada T, Uchida M, Iijima H, Kimura K, Hirakawa K, Wanibuchi H.: MUC5AC protects pancreatic cancer cells from TRAIL-induced death pathways. *Int J Oncol*, 42, 887-893, doi: 10.3892/ijo.2013.1760. 2013.

Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S.: Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep*, 3, 1224, doi: 10.1038/srep01224. 2013.

Shibata A, Tanabe E, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Hydrogen peroxide stimulates cell motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cell. *Biochem Biophys Res Commun.*, 433, 317-321, 2013.

Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Regulation of cell motile activity through the different induction of LPA receptors by estrogens in liver epithelial WB-F344 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 428, 105-109, 2012.

Yoshikawa K, Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Fukushima N, Tsujiuchi T. Involvement of oncogenic K-ras on cell migration stimulated by lysophosphatidic acid receptor-2 in pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res.* 319, 105-109, 2013.

Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Shibata A, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 suppresses cell migration activity of human sarcoma cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012. DOI: 10.3109/10799893.2012.738689.

Fukui R, Kato K, Okabe K, Kitayoshi M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of drug resistance by lysophosphatidic acid receptor-3 in mouse mammary tumor FM3A cells. *J Toxicol Pathol.* 25, 225-228, 2012.

Matunami M, Miki T, Nishiura K, Hayashi Y, Okawa Y, Nishikawa H, Sekiguchi F, Kubo L, Ozaki T, Tsujiuchi T, Kawabata A. Involvement of the endogenous hydrogen sulfide/Cav3.2 T-type Ca²⁺ channel pathway in cystitis-related bladder pain in mice. *Br J Pharmacol*. 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02060x

Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Tsujiuchi T, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y. Comparison of gene expression profiling in sarcoma and mesenchymal stem cells identifies tumorigenic pathways in chemically induced rat sarcoma model. *ISRN Oncol*. 2012 DOI: 10.5402/2012/909453.

Fukui R, Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Negative regulation of cell motile and invasive activities by lysophosphatidic acid receptor-3 in colon cancer HCT116 cells. *Tumor Biol*. 33, 1899-1905, 2012.

Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite roles of LPA₁ and LPA₃ on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol*. 33, 1739-1744, 2012.

Kitayoshi M, Fukui R, Tanabe E, Kato K, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Different effects on cell proliferation and migration abilities of endothelial cells by LPA₁ and LPA₃ in mammary tumor FM3A cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 32, 209-213, 2012.

Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E, Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA₁-expressing tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 422, 339-343, 2012.

Furuta D, Yamane M, Tsujiuchi T, Moriyama R, Fukushima N. Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA₃. *Mol Cell Neurosci*. 50, 21-34, 2012.

Kato K, Fukui R, Okabe K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Constitutively active lysophosphatidic acid receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 417, 790-793, 2012.

Okabe K, Hayashi M, Kato K, Okumura M, Fukui R, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T.

Lysophosphatidic acid receptor-3 increases tumorigenicity and aggressiveness of rat hepatoma RH7777 cells. *Mol. Carcinog.* 2012. DOI: 10.1002/mc.21851.

Hayashi M, Okabe K, Kato K, Okumura M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Different function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 316, 91-96, 2012.

2. 学会発表

梯アンナ、謝 暁利、山野莊太郎、魏 民、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討。第101回日本病理学会総会，東京（2012年4月）

Okabe K, Yamano S, Wei M, Kato M, Fujioka M, Xie X, Wanibuchi H. Identification of novel biomarkers of rat renal carcinogenesis. Society of Toxicologic Pathology 31st Annual Symposium, Boston(2012年6月)

Wanibuchi H, Wei M, Kakehashi A, Yamano S: Animal model for arsenic carcinogen. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 仙台（2012年7月）

藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、奥村真衣、鰐淵英機：*gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性の包括的リスク評価モデルの確立。第27回発癌病理研究会，伊豆（2012年8月）

鰐淵英機：*gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性の包括的リスク評価モデルの確立。第6回応用トキシコロジーリカレント講座，大阪（2012年9月）

田中昌子、高橋克之、鰐淵英機、塩田正之：癌のストレス応答を標的とした Hsc70 クライアントタンパク質のプロテオーム解析。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

高橋克之、田中昌子、鰐淵英機、塩田正之：抗癌剤耐性胃癌細胞を用いた Hsp72 クライアントタンパク質のプロテオーム解析。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

山野莊太郎、魏 民、田尻正喜、梯アンナ、岡部恭子、奥村真衣、多胡善幸、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌の発がん過程早期における気管支肺胞幹細胞の関与。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、奥村真衣、武下正憲、鰐淵英機：*gpt delta* ラットを用いた膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の評価法の確立。第71