

# P38 MAPK Signaling

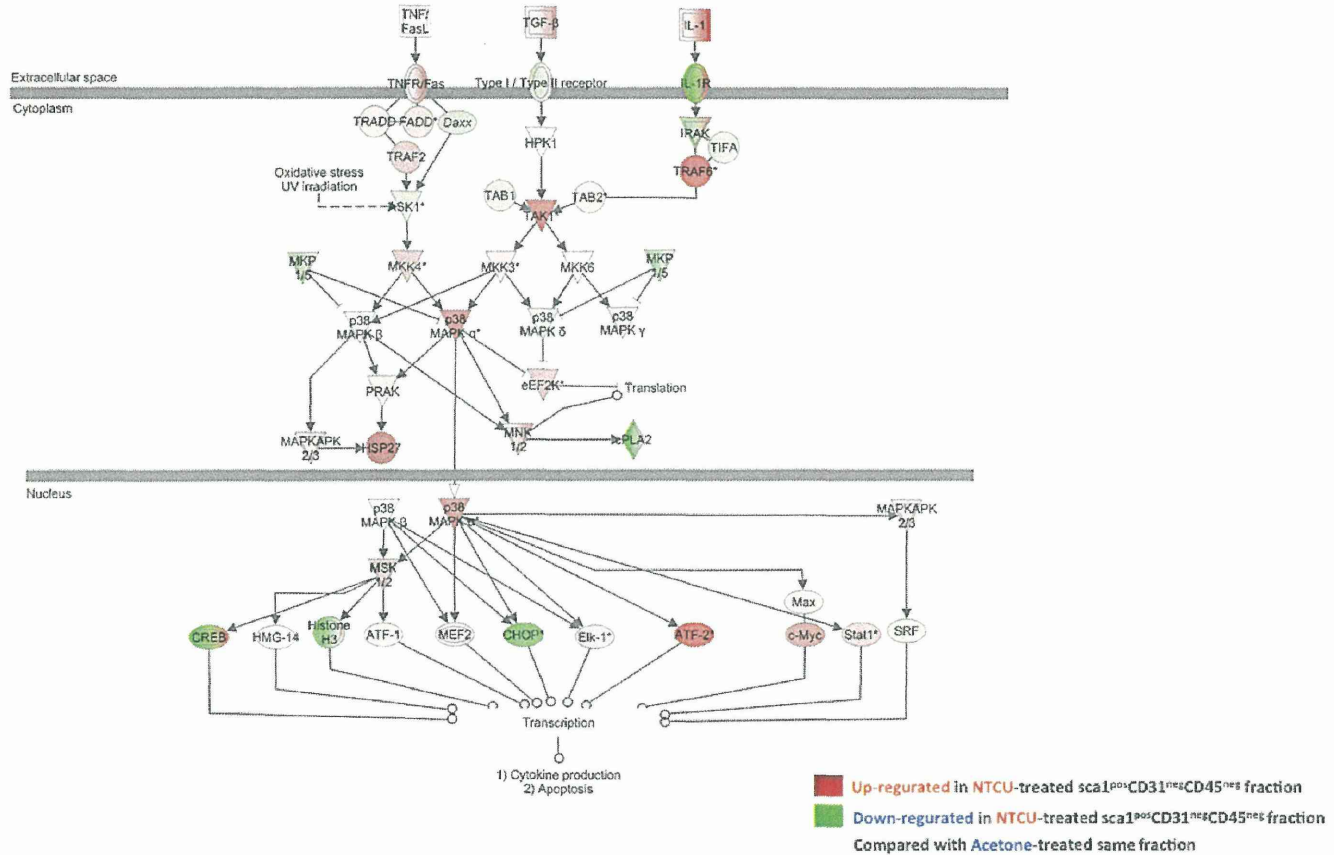


図2B. 気管支肺胞幹細胞 (BASC) における遺伝子発現

# PI3K Akt Signaling

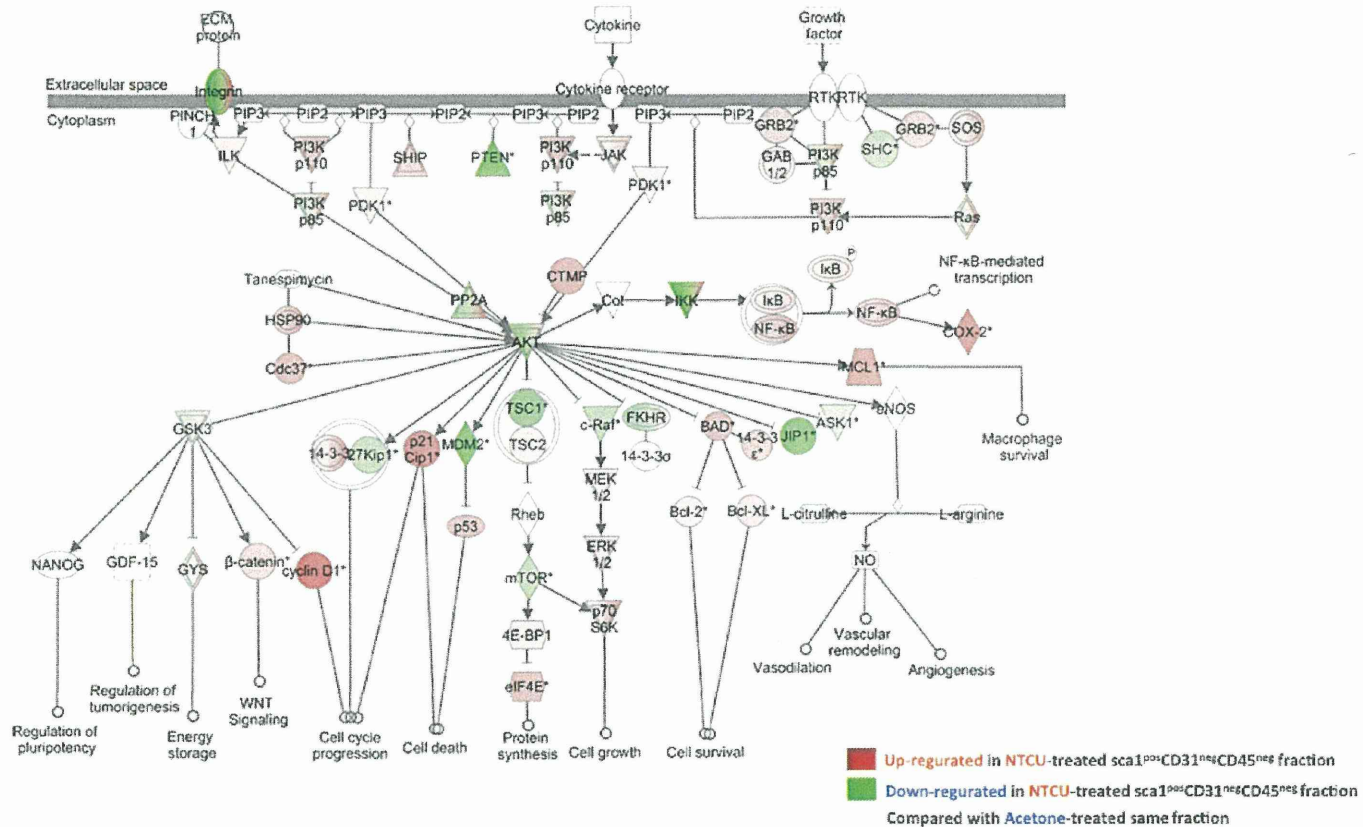


図2C. 気管支肺胞幹細胞(BASC)における遺伝子発現

# TGFβ Signaling

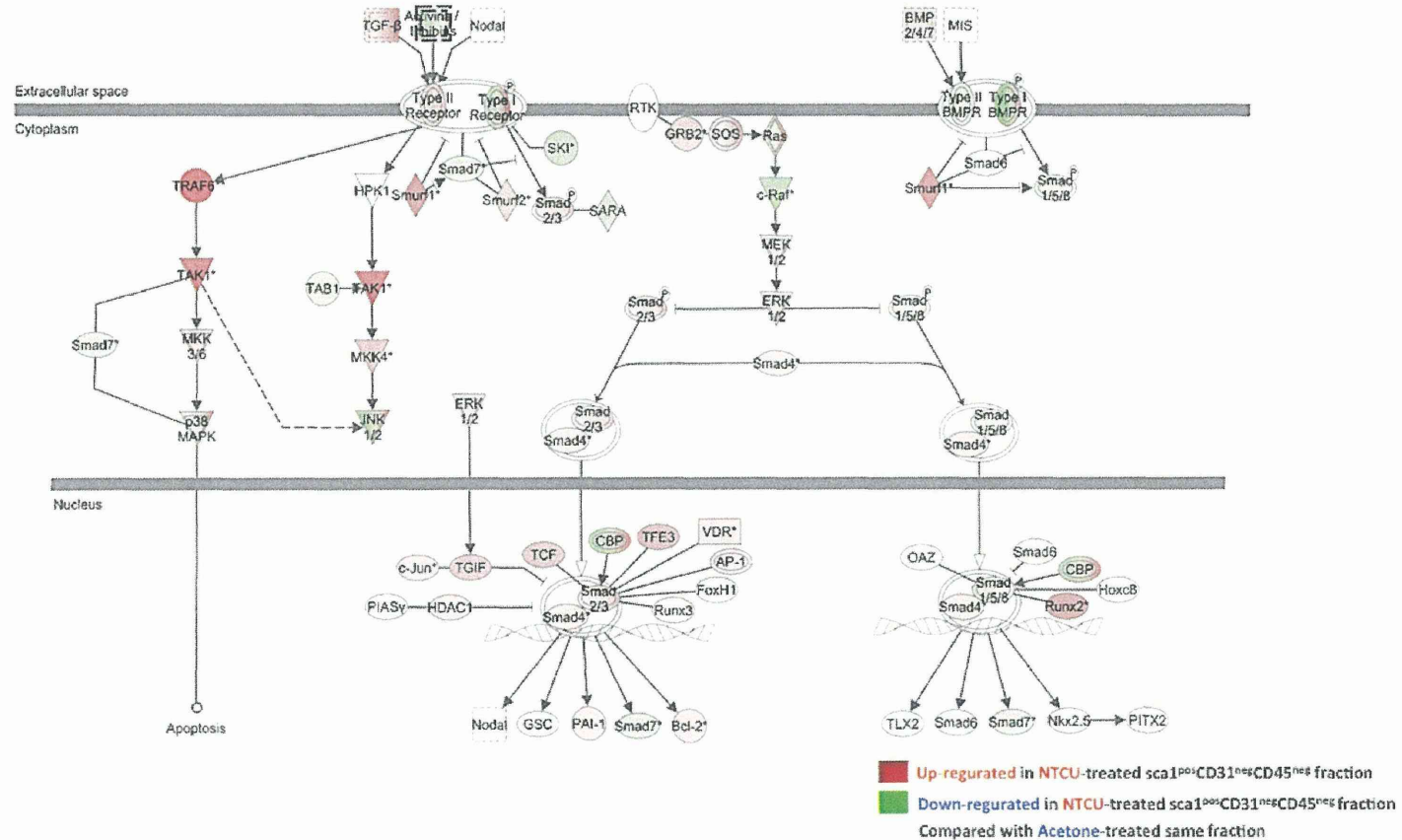


図2D. 気管支肺胞幹細胞(BASC)における遺伝子発現

Table.1  
 Packaging efficiency from liver and bladder mucosa

Organ	Exam number	Total population
Liver(10mg)	1	240,000
	2	230,000
	3	262,000
Bladder mucosa (Pool samples from two )	1	210,000
	2	225,000
	3	250,000

Table. 2  
Bisulfite-PCR primer

Name	Primer	Tm	Sequence	Product size	# of CpG
CNR1_1	Leftprimer	56.31	GATAGGGTTGGTTTTTTTAGTTTT	154	18
	Rightprimer	56.35	TAAACCTTTATCCTACCCTAACAAC		
CNR1_2	Leftprimer	54.69	ATAGGGTTGGTTTTTTTAGTTTT	153	18
	Rightprimer	56.35	TAAACCTTTATCCTACCCTAACAAC		
LOX_1	Leftprimer	59.92	GTTGTTTTTTTATTGGATTGTTGG	103	10
	Rightprimer	58.26	ACAAC TACAATTCTATCCCCTTCTC		
LOX_2	Leftprimer	59.23	TTGTTTTTTTATTGGATTGTTGG	102	10
	Rightprimer	58.26	ACAAC TACAATTCTATCCCCTTCTC		
LOX_3	Leftprimer	52.83	GAATTGTAGTTGTTTTAGAAAGAGTA	225	15
	Rightprimer	54.64	TCCTAAACTAAAAACAAAATCTACC		
LOX_4	Leftprimer	53.86	AGAATTGTAGTTGTTTTAGAAAGAGTA	226	15
	Rightprimer	54.64	TCCTAAACTAAAAACAAAATCTACC		
LOX_5	Leftprimer	59.28	TTGGGTGGTTTTAGATTATTGAGTT	117	12
	Rightprimer	55.44	CCACTAATCCAAATTAATTTCTC		
LOX_6	Leftprimer	59.46	GTGGTTGGGTGGTTTTAGATTATT	121	12
	Rightprimer	55.44	CCACTAATCCAAATTAATTTCTC		
BMF_1	Leftprimer	50.73	GATTTAATTTTGTGGTTTT	250	24
	Rightprimer	58.5	CCAAC TAAAAC TAAAAC TCCACTTAC		
BMF_2	Leftprimer	50.73	GATTTAATTTTGTGGTTTT	245	24
	Rightprimer	58.7	TTAAAAC TAAAAC TCCACTTACCATTAAT		

Table. 3  
Run summary of next generation sequencer

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	NOSM	1,466,462	770,402	23,180	63 bp
IonXpress_005 <sup>*</sup>	NOSM	4,298,809	3,059,166	50,811	84 bp
IonXpress_006 <sup>**</sup>	NOSM	6,707,914	4,654,442	80,858	82 bp

\* IonXpress\_005 : non-treatment group

\*\*IonXpress\_006 : 2-AAF treatment group

Table. 4  
Coverage summary of next generation sequencer

Target Regions (Amplicon region)

Sample name	G5	G6
Bases in target regions	598	598
Average base coverage depth	6,343.31	9,636.13
Uniformity of coverage	99.16%	99.33%
Coverage at 1x	100.00%	100.00%
Coverage at 20x	100.00%	100.00%
Coverage at 100x	99.83%	100.00%

Hotspot Regions (CpG site)

Sample name	G5	G6
Bases in target regions	55	55
Average base coverage depth	5,826.65	8,838.73
Uniformity of coverage	100.00%	100.00%
Coverage at 1x	100.00%	100.00%
Coverage at 20x	100.00%	100.00%
Coverage at 100x	100.00%	100.00%

Table. 5  
Ratio of methylation

CNR1

Chrom	Position	G5	G6
chr5	50425011	1.0	0.9
	50425019	0.5	0.3
	50425022	0.2	0.2
	50425024	0.6	0.7
	50425027	0.2	0.1
	50425033	0.1	0.1
	50425054	0.2	0.5
	50425056	0.1	0.1
	50425060	0.8	0.5
	50425063	0.2	0.2
	50425065	0.2	0.2
	50425067	0.3	0.2
	50425070	0.3	0.1
	50425081	0.2	0.1
	50425083	0.3	0.3
	50425097	0.2	0.2
	50425112	0.1	0.4
	50425115	0.2	0.3

LOX2

Chrom	Position	G5	G6
chr18	47906279	5.8	0.3
	47906289	14.0*	0.7
	47906295	0.9	0.2
	47906298	0.9	0.2
	47906307	0.3	0.3
	47906309	0.1	0.3
	47906311	0.5	0.1
	47906320	0.8	0.1
	47906325	4.7	0.5
	47906330	15.3*	0.2

LOX3

Chrom	Position	G5	G6
chr18	47906370	0.4	0.8
	47906379	4.9	99.7*
	47906384	0.2	0.3
	47906397	0.2	0.1
	47906402	0.0	0.0
	47906412	0.2	0.1
	47906422	0.2	0.1
	47906460	0.1	0.5
	47906462	0.2	0.3
	47906481	0.1	0.1
	47906500	0.1	0.2
	47906507	0.1	0.1
	47906518	2.4	0.3
	47906539	0.1	0.1
	47906543	0.3	0.1

LOX5

Chrom	Position	G5	G6
chr18	47905951	14.4*	0.1
	47905963	0.2	0.6
	47905966	1.9	0.1
	47905973	1.8	0.4
	47905978	9.2	0.1
	47905983	0.5	0.2
	47905985	15.0*	0.2
	47906001	30.0	57.1*
	47906004	9.3	0.1
	47906011	0.7	0.6
	47906014	0.1	0.1
	47906017	9.6	0.2

\*: >10% methylated



*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

本研究の目的は、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、かつ包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法の開発の一環として、*in vivo* 変異原性が検索可能な *gpt delta* ラットを用いた変異原性試験法の有用性を検討することである。本年度では、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* 変異原性を明らかにするために、新規に開発した微小組織の DNA 抽出法（鱈鰯分担報告書参照）を用いて点突然変異を検出する *gpt* アッセイおよび欠失変異を検出する Spi アッセイそれぞれ行った。また、プロポリスの *in vivo* 変異原性の評価には陽性対照群として膀胱発がん物質である N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) および陰性対照群として膀胱発がん促進物質である Sodium ascorbate をそれぞれ投与した群を設け試験に供した。その結果、コウジ酸投与による *gpt* 遺伝子の変異頻度 (*gpt* アッセイ) およびその変異スペクトラムおよび red/gam 遺伝子の変異頻度 (Spi アッセイ) はコウジ酸投与群と無処置群との間に有意な差は認められなかった。BBN 投与群では *gpt* アッセイおよび Spi アッセイともに変異頻度の有意な上昇が認められ、Sodium ascorbate 投与群では有意な変異頻度の変化は認められなかった。プロポリスは両アッセイともに陰性であった。以上からコウジ酸が甲状腺に対して、プロポリスが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。また、新たに開発した微小組織 DNA 抽出法が甲状腺・膀胱粘膜のような微小組織での変異原性評価に有用であることが確認された。

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。本研究では、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の開発の一環として、*in vivo* 変異原性が検索可能な *gpt delta* ラットを用いた多臓器発がん性試験法の変異原性評価における有用性を検討した。本年度では、甲状腺発がん促進物質であり、*in vivo* における遺伝毒性の有無が明らかでないコウジ酸の甲状腺における変異原性を明らかにするために、前年度に行った *gpt delta* ラット 18 週間発がん性試験で得られた甲状腺サンプルを用いた。甲状腺からの DNA 抽出については新たに開発した抽出法を用いて（鱈測分担報告書参照）、大腸菌 *gpt* 遺伝子を指標として点突然変異を検出する *gpt* アッセイ、λファージ red/gam 遺伝子を指標とし欠失変異を検出する Spi アッセイをそれぞれ行い、得られた *gpt* 変異体についてスペクトラム解析を行った。また、健康食品や化粧品の原料として使用されており、プロポリスの *in vivo* 変異原性について解析を行った。プロポリスはミツバチの巣の無菌状態を保つ物質であり、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用などさまざまな生理活性を有している。これまでの我々の研究でプロポリスが膀胱発がん促進作用を有することが明らかとなっているが、プロポリスの膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性の有無については報告されていない。プロポリスの *in vivo* 変異原性の有無を検討するため、*gpt delta* ラットを用いて解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. *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（前年度鱈測分担報告書参照）。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。

### 2. *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 genomic DNA 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（鱈測分担報告書参照）。

### 3. *gpt* および Spi-アッセイ

両アッセイに用いる genomic DNA については微量試料向けの抽出法（鱈測分担報告書参照）を用いて DNA を抽出した。

*in vitro* パッケージングには、Transpack Packaging Extract を用いて、抽出した DNA からトランスジーン  $\lambda$  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 日間培養を行い、*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 20min (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、 $\lambda$  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 456bp を含む 739bp 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' -GAGGCAGTGCCTAAAAGAC-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。

#### 4. 統計学的解析

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。

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

*gpt* アッセイの結果を Table 1 に示した。*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。

また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラを Table 2 に示した。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%、2bp 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アッセイの結果を Table 3 に示した。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。

#### 2. *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* アッセイの結果を Table 4 に示した。*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アッセイの結果を Table 5 に示した。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。

#### D. 考察

本研究では、これまで一般的に解析に用いることが困難であった微小组織における被検物質の *in vivo* 変異原性を、新たに開発した抽出法を用いて評価を行った。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。

#### E. 結論

コウジ酸は肝臓において変異原性を有さないことを我々はすでに明らかにしている（前年度魏報告書参照）。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示した。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。両試験共に、今回新たに開発した微量試料に対する抽出法（鰐淵分担報告書参照）を用いることで十分に評価が可能であることが確認できた。

## F. 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.

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.

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.

### 2. 学会発表

梯アンナ、謝 暁利、山野荘太郎、魏 民、鰐渕英機：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 31<sup>st</sup> 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、山野荘太郎、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)

山野荘太郎、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、山野荘太郎、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

回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

小松弘明、西山典利、山野荘太郎、花田庄司、井上英俊、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機 : プロテオーム解析による新規肺神経内分泌癌のバイオマーカー検索. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

桑江優子、梯アンナ、魏 民、若狭研一、鰐淵英機 : FFPE 標本を用いたヒト浸潤性膵管癌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)

岡部恭子、山野荘太郎、魏 民、加藤 実、田尻正喜、謝 暁利、鰐淵英機 : マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

梯アンナ、桑江優子、山野荘太郎、魏 民、謝 暁利、若狭研一、鰐淵英機 : ヒト幹細胞癌における特異的候補分子のピンポイントターゲティング. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

加藤 実、魏 民、田尻正喜、山野荘太郎、梯アンナ、仲谷達也、鰐淵英機 : Steroid Sulfatase は膀胱癌の予後予測因子である. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012 年 9 月)

魏 民、山野荘太郎、加藤 実、梯アン

ナ、神吉将之、謝 暁利、鰐淵英機：BBN 誘発マウス膀胱発がん過程におけるがん幹細胞関連タンパク質の発現。第 71 回日本癌学会学術総会，札幌（2012 年 9 月）

魏 民、山野荘太郎、加藤 実、藤岡正喜、梯アンナ、神吉将之、鰐淵英機：膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

神吉将之、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、鰐淵英機：ラットにおける非遺伝毒性肝発がん物質と毒性フェノタイプを予測できる遺伝子マーカーセットの探索。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

奥村真衣、魏 民、山野荘太郎、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、鰐淵英機：*gpt delta* ラットを用いた 2-AAF の肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

山野荘太郎、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、岡部恭子、武下正憲、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の cancer initiating cell としての可能性。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 2 月）

梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、魏 民、長野嘉介、福島昭治、鰐淵英機：ラット

における 2-エトキシ-2-メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

岡部恭子、山野荘太郎、魏 民、藤岡正喜、謝 暁利、串田昌彦、鰐淵英機：マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、岡部恭子、福永賢輝、謝 暁利、鰐淵英機：ラット膀胱発がん物質 DMA(V) の *in vivo* 変異原性の検討。第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 2 月）

魏 民、山野荘太郎、加藤 実、梯アンナ、鰐淵英機：膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討。平成 24 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ，大津（2013 年 2 月）

山野荘太郎、岡部恭子、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける NADPH oxidase 阻害による効果。平成 24 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ，大津（2013 年 2 月）

Yamano S, Wei M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H: Establishment of a novel mice model for lung squamous cell carcinoma. 9th



AACR-JCA Joint Conference, Maui,  
HI(2013年2月)

G. 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

Table.1  
*gpt* mutant frequencies in thyroid

Organ	Groups	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies ( $\times 10^5$ )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Mean $\pm$ SD
Thyroid	Non-treatment	611	3.70	2	0.54	0.75 $\pm$ 0.20
		612	3.41	2	0.59	
		613	4.09	4	0.98	
		621	3.36	2	0.60	
		622	3.17	3	0.95	
		623	3.53	3	0.85	
	2% Kojic acid	411	3.85	4	1.04	0.74 $\pm$ 0.25
		412	4.12	2	0.49	
		413	3.85	2	0.52	
		421	3.09	3	0.97	
		422	3.50	3	0.86	
		423	3.58	2	0.56	

Table.2  
*gpt* mutantion spectra in thyroid

	Non-treatment	2%kojic acid
Base substitution		
Transition		
G:C to A:T	5 ( 31% )	4 ( 25% )
A:T to G:C	1 ( 6% )	2 ( 13% )
Transversion		
G:C to T:A	5 ( 31% )	6 ( 38% )
G:C to C:G	1 ( 6% )	1 ( 6% )
A:T to T:A	2 ( 13% )	1 ( 6% )
A:T to C:G	0 ( 0% )	0 ( 0% )
deletion		
Single bp	1 ( 6% )	1 ( 6% )
Over 2bp	0 ( 0% )	0 ( 0% )
Insersion	1 ( 6% )	1 ( 6% )
Total	16 ( 100% )	16 ( 100% )

Table.3  
Spi<sup>r</sup> mutant frequencies in thyroid

Organ	Groups	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA ( $\times 10^5$ )	Plaques within XL-1 Blue MRA (P2)	Mutant Frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Mean $\pm$ SD
Thyroid	Non-treatment	611	4.20	2	0.48	0.65 $\pm$ 0.16
		612	3.78	2	0.53	
		613	4.32	3	0.69	
		621	3.83	3	0.78	
		622	3.60	2	0.56	
		623	4.57	4	0.88	
	2% Kojic acid	411	3.62	4	1.11	0.61 $\pm$ 0.27
		412	3.87	2	0.52	
		413	3.00	2	0.67	
		421	3.61	1	0.28	
		422	3.39	2	0.59	
		423	3.88	2	0.52	