

201426013A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐渕 英機

平成27 (2015)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

鰐渕 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 -----13

鰐渕 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-----25

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 -----32

辻内 俊文（近畿大学理工学部 教授）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----37

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膀胱、肺などの臓器においてもさらに進める。本年度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確立

昨年度は、医薬品・化粧品などの抽出・精製・反応用溶剤として用いられる合成有機化合物であり、また水道水中に微量存在する 1,4-ジオキサンの 5000 ppm の用量において *in vivo* 変異原性および肝発がん性が陽性であることを明らかにした。これまでに、Ames 試験などの *in vitro* 変異原性試験で陰性で、*in vivo* 変異原性試験で陽性を示す物質は殆ど報告されていないため、本年度は 1,4-ジオキサンの遺伝毒性について再確認することを目的として 0 および 5000 ppm 投与群の *gpt* アッセイによる *in vivo* 変異原性の解析を再実施した。その結果、前年度の解析と同様に変異体頻度の有意な増加および変異スペクトラムのパターンが認められ、1,4-ジオキサンの変異原性を再確認することができた。また、*gpt delta* F344 ラットに 1,4-ジオキサンを 0, 0.2, 2.0, 20 ppm の用量で 16 週間飲水投与し、1,4-ジオキサンの低用量域における発がん性および変異原性を検討した。肝臓における遺伝子変異頻度および肝前がん病変の数は対照群と投与群の間に有意な差が認められなかったから、1,4-ジオキサンは低用量域において *in vivo* 変異原性および肝発がん性を有さないことが明らかになった。1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および肝発がん性に閾値が存在することが強く示唆された（鰐淵、魏）。

2. 細胞培養系を用いた食品中に含まれる化学物質の安全性評価系の開発

被検物質における発がん性を短期に検出する細胞培養系を確立し、食品添加物

として含まれる種々の化合物の安全性評価に応用することを目的とする。肝上皮細胞に肝発がんイニシエーターとプロモーターを短期処理し、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体 (LPA1, LPA2, LPA3) 遺伝子発現レベルを検索したところ、肝発がんイニシエーターとプロモーターでは異なる LPA 受容体発現が誘導された。細胞運動能は、肝発がんイニシエーターにより促進、肝発がんプロモーターにより抑制された。本研究結果より、肝上皮細胞を用いた細胞培養系が、肝発がんイニシエーター・プロモーター活性検索の実験系となりうる可能性が示唆された (辻内)。

研究分担者

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。

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肝以外にも、膀胱、肺、腎などの臓器においてもさらに進めた。

1,4-ジオキサンは医薬品・化粧品 (シャンプー) などの抽出・精製・反応用溶剤として用いられる合成有機化合物であり、浄水処理においては除去されないため、水道水にも微量ながら残留している。1,4-ジオキサンの遺伝毒性について *in vitro* 試験では、Ames 試験で陰性、姉妹染色分体交換試験では弱陽性が報告されており、*in vivo* 試験では小核試験陰性、伴性劣性致死試験陽性であり、弱い遺伝毒性作用を持つ可能性があると考えられる。昨年度実施した *gpt delta* F344 ラットを用いた *in vivo* 変異原性解析の結果、点突然変異を検出する *gpt assay* において、対照群と比較して 1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で有意な変異体頻度の増加および変異スペクトラムの変動が認められた。これまでに、Ames 試験などの *in vitro*

変異原性試験で陰性で、かつ *in vivo* 変異原性試験で陽性を示す物質は殆ど報告されていないため、得られた結果についてよく精査する必要がある。本年度はその再確認を目的として以降の試験を実施した。また、1,4-ジオキサンは微量ながらも水道水中に存在することから、低用量域における遺伝毒性および発がん性について早急に明らかとする必要がある。遺伝毒性の評価には *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性の解析を、発がん性については肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の評価を行い、1,4-ジオキサンの遺伝毒性および発がん閾値について評価・検討を行った。

加えて、細胞培養系を用いた食品中に含まれる化学物質の安全性評価系の確立を試みた。本年度の研究では、肝発がんイニシエーター・プロモーターを肝上皮細胞に処理し、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体遺伝子の発現パターンと細胞運動能を指標に、被検物質におけるイニシエーション・プロモーション活性を検討した。

B. 研究方法

1. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法を用いた 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性の検討

[実験 1]

昨年度に実施した 1,4-ジオキサンの 16 週間 *gpt delta* F344 ラット飲水

投与試験で得られた 0 および 5000 ppm 投与群の肝臓組織を用いて、点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイおよび *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を行い、変異頻度および変異スペクトラを検討した。

[実験 2]

5 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラット 20 匹を 4 群 5 匹ずつに分け、それぞれ 1,4-ジオキサンを 0, 0.2, 2.0, 20 ppm の濃度で飲水投与を 16 週間行った。投与終了後、点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイおよび *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を行い、肝臓における変異頻度および変異スペクトラを検討した。また、肝臓における GST-P 陽性細胞巢の発生および BrdU 標識率の評価定量的解析を行った。

2. 細胞培養系を用いた食品中に含まれる化学物質の安全性評価系の確立

培養細胞は、ラット肝上皮細胞 (WB-F344) を用い、10%FBS 含有 DMEM 培地にて 37°C・5%CO₂ の条件下で継代培養した。前処理として、細胞に肝発がんイニシエーターである N-nitrosodiethylamine (DEN) を、また肝発がんプロモーターである phenobarbital (PB)、okadaic acid (OA)、clofibrate を種々の濃度で 24 時間ごとに 2 回処理した。細胞運動能解析には Cell Culture Insert (8.0mm) を用いて、upper chamber には肝発がん物質で前処理した細胞を播き、lower chamber には 5%charcoal stripped FBS を加え、16 時間培養後に lower chamber に移動し

た細胞数をギムザ染色を行い計測した。さらに、LPA 遺伝子発現解析には、肝発がん物質で処理した細胞より RNA を抽出した後 cDNA を作製し、real-time RT-PCR 法にて遺伝子発現レベルを検索した。

3. 統計学的解析

統計学的解析は Statlight program (Yukms Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。2 群検定において、F 検定を用いて等分散性を評価した。等分散性であった場合は Student' s T 検定を、不等分散の場合は Welch' s T 検定を用いて評価を行った。多群の検定においては、各群の分散比を Bartlett 検定で検定し、等分散の場合は Dunnett 検定 (両側検定) により、不等分散の場合は Steel 検定により比較した。全ての平均値は Mean ± SD として表し、P < 0.05 以下のものを統計学的に有意であるとみなした。

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麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

1. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法を用いた 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性の検討

[実験 1]

gpt 遺伝子の変異体頻度は無処置群と

比較して、5000 ppm 投与群において有意な増加がみられた。さらに、*gpt* 遺伝子の変異頻度は A:T to G:C 変化において、無処置群と比較して、5000 ppm 投与群において有意な増加がみられた。さらに、モノクローナル変異を除いた変異頻度は無処置群と比較して 5000 ppm 投与群で有意な増加が確認された。

[実験 2]

飼育期間中における体重、摂餌量および飲水量について 1,4-ジオキサン投与による有意な差はみられなかった。最終体重、肝臓・腎臓・脾臓の絶対・相対重量について無処置群と比較して有意な変化はみられなかった。

肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢 (2 cell 以上) の面積あたりの数について定量的評価を行った結果、無処置群と比較して投与群で有意な変化は認められなかった。

点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイの結果、変異体頻度は無処置群と比較して、有意な差はみられなかった。また、*gpt* 遺伝子の各変異スペクトラムにおける変異頻度は無処置群と比較して、有意な差はみられなかった。

欠失変異を検出する Spi⁻アッセイにおいても、変異体頻度は、無処置群と比較して、投与群で有意な差は認められなかった。

2. 細胞培養系を用いた食品中に含まれる化学物質の安全性評価系の確立

DEN の処理により、LPA1 遺伝子発現は低下し、LPA3 遺伝子発現は有意に増加した。細胞運動能は DEN 処理によって有意な上昇がみられた。

PB 処理にて LPA1 遺伝子発現は有意に上昇し、LPA3 遺伝子発現は低下した。PB は細胞運動能を有意に低下させた。

OA ならびに clofibrate 処理によって、LPA1 遺伝子発現は有意に上昇するとともに細胞運動能は低下した。

DEN 処理によって上昇する細胞運動能は LPA3 ノックダウンによって抑制した。また、PB 処理によって低下する細胞運動能は LPA1 ノックダウンにより上昇した。

D. 考察

昨年度までに我々は 1,4-ジオキサンがラット肝臓において、5000 ppm 投与群において *in vivo* 変異原性を示すことを明らかにしている。Ames 試験などのような *in vitro* の変異原性試験は偽陽性・偽陰性になるものも多く、特異性が低いことがよく知られている。しかし、今回の 1,4-ジオキサンのような、*in vitro* 変異原性試験で陰性でかつ *in vivo* 変異原性試験で陽性を示す物質は殆ど報告されていないため、本年度ではその再現性の確保を目的として再度 1,4-ジオキサンのラット肝臓における *in vivo* 変異原性について点突然変異を検出する *gpt* アッセイを実施し、その変異頻度および変異スペクトラムについて解析を実施した。その結果、1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で変異原性を有することが再確認できた。また、

その変異スペクトラについても 5000 ppm 投与群有意な増加を示す変異スペクトラ (A:T to G:C 塩基置換)が存在することがあらためて確認できた。また、1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で得られた変異体にモノクローナルな遺伝子変化がみられたことから、昨年度報告における 1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で GST-P 陽性細胞巢の増加がみられたことと相関する結果が得られた。したがって、1,4-ジオキサンが 5000 ppm ではじめて *in vivo* 変異原性を示すこと、さらに 5000 ppm でモノクローナルな細胞増殖が生じることが確認できた。

gpt delta F344 ラットにおける 1,4-ジオキサンの低用量域における *in vivo* 変異原性および肝発がん性の検討において、肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢について評価した結果、無処置群と比較して有意な変化はみられなかった。また、*in vivo* 変異原性について評価した結果、*gpt* アッセイ、Spi⁻アッセイともに変異頻度の有意な変化はみられなかった。さらに *gpt* 遺伝子の変異スペクトラムについても 1,4-ジオキサン投与群特異的な変化はみられなかった。これまでの検討で 1,4-ジオキサンが 5000ppm の用量で *in vivo* 変異原性および肝発がん性を示すことが明らかになっている。本年度の結果から、低用量域では 1,4-ジオキサンが *in vivo* 変異原性および肝発がん性を示さないことが明らかとなった。したがって、1,4-ジオキサンの発がん性および変異原性には閾値が存在すること

が強く示唆された。今後 1,4-ジオキサンの代謝メカニズムや DNA 付加体形成能などについて検討する必要がある。

LPA 受容体を介する LPA シグナル伝達経路は、細胞増殖・形態形成、分化、運動、アポトーシスからの回避など様々な細胞生物学的応答を制御することが知られている。生理活性脂質である LPA をリガンドとする LPA 受容体は、これまでに LPA1~LPA6 が同定されている。これらの受容体の細胞機能は異なり、また細胞に応じた特異的な作用を呈する。これまでの研究で、肝上皮細胞 (WB-F344) において、LPA1 は細胞運動能を抑制し LPA3 は促進することが判明している。また、がん細胞を用いた研究においても、LPA 受容体を介する細胞内シグナルは、がん細胞の増殖、浸潤・転移、造腫瘍性、血管新生、抗がん剤抵抗性に関与することが報告されている。

被検物質におけるイニシエーション・プロモーション活性の有無を検索するためには、動物を用いた発がん実験がいまだ有用な検出系である。ヒト生体内で生じる発がん過程を傍証する上で、動物実験系は、動物そのものを使用すること、マーカーとなる病変発生までに時間を有すること、標本作製までの過程が煩雑であること、実験経費が高価なこと、など簡便な方法とは言えない。本研究では、肝発がんイニシエーション・プロモーション活性の判別にはおおよそ 2 日の実験時間で判定することができる。また、遺伝子発現調節機構のひとつに遺伝子プロ

モーター領域の DNA メチル化状態が遺伝子発現を調節することから、LPA シグナル伝達経路を指標とする肝上皮細胞を用いた肝発がんイニシエーション・プロモーション活性の検索のみならず DNA メチル化状態のスクリーニングへの応用が可能となるかもしれない。今後は、肝発がん作用判別の特異性を高めるために、肝発がん物質以外の他臓器に対する発がん物質も含めてさらなる検索が必要と考える。

E. 結論

本研究によって 1,4-ジオキサンが 5000 ppm で *in vivo* 変異原性を示すこと、さらにモノクローナルな細胞増殖がみられることがこれまでの報告と同様であることが再確認することができた。1,4-ジオキサンは高用量域において肝発がん性および変異原性を示すことが明らかになった。一方、*gpt delta* F344 ラットを用いた低用量域における評価で、1,4-ジオキサンの変異原性および肝発がん性には閾値が存在することが明らかとなった。今回得られた知見は、1,4-ジオキサンのリスク評価に寄与できるものと考えられる。

肝発がんイニシエーターは LPA3 遺伝子発現を上昇し、肝発がんプロモーターは LPA1 遺伝子発現を上昇することから、肝発がんイニシエーション・プロモーション活性の違いは異なる LPA 受容体遺伝子発現誘導が関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka M, Mun S, Harada A, Ohkawa Y, Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M, Iwao H. Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions. PLoS One, 9, e96785, 2014.
2. Yamada T, Wei M, Toyoda T, Yamano S, Wanibuchi H. Inhibitory effect of raphanobrassica on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. Food Chem Toxicol, 70, 107-113, 2014.
3. Tago Y, Fujii T, Wada J, Kato M, Wei M, Wanibuchi H, Kitano M. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing Phaffia rhodozyma extract. J Toxicol Sci, 39, 373-382, 2014.
4. Kakehashi A, Kato A, Ishii N, Wei M, Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H. Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling. PLoS One, 9, e113610, 2014.
5. Tanaka M, Yamaguchi M, Shiota M, Kawamoto Y, Takahashi K, Inagaki A, Osada-Oka M, Harada A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Iwao H, Ohkawa Y. Establishment of neutralizing rat monoclonal antibodies for fibroblast growth factor-2. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 33, 261-269, 2014.
6. Morisaki T, Yashiro M, Kakehashi A, Inagaki A, Kinoshita H, Fukuoka T, Kasashima H, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Muguruma K, Ohira M, Wanibuchi H, Hirakawa K. Comparative proteomics analysis of gastric cancer stem cells. PLoS One. 9(11):e110736. 2014.
7. Morimoto Y, Ishii S, Ishibashi J, Katoh K, Tsujiuchi T, Kagawa N, Fukushima N. Functional lysophosphatidic acid receptors expressed in Oryzias Latipes. Gene. 551, 189-200, 2014.
8. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cell motile and invasive activities of human sarcoma cell lines. Mol Cell Biochem. 393, 17-22, 2014.
9. Araki M, Kitayoshi M, Dong Y, Hirane M, Ozaki S, Mori S, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T.

- Inhibitory effects of lysophosphatidic acid receptor-5 on cellular functions of sarcoma cells. *Growth Factors*. 32, 117-122, 2014.
10. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cellular responses in mouse fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 446, 585-589, 2014.
 11. Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histol Histopathol*, 29, 313-321, 2014.
 12. Tsujiuchi T, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Diverse effects of LPA receptors on cell motile activities of cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 34, 201-204, 2014.
 13. Tanaka J, Yamaguchi K, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Seki Y, Tsujiuchi T, Murai A, Uemura T, Kawabata A. Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology*. 79, 112-118, 2014.
 14. Dong Y, Araki M, Hirane M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T. Effects of bisphenol A and 4-nonylphenol on cellular responses through the different induction of LPA receptors in liver epithelial WB-F344 cells. *J Recept Signal Transduct Res*, 34, 201-204, 2014.
 15. Tsujiuchi T, Nakae D, Konishi Y. Multi-step lung carcinogenesis model induced by oral administration of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 66, 81-88, 2014.
 16. Wakui S, Mutou T, Takahashi H, Ikegami M, Wanibuchi H, Fukushima S. Vascular endothelial growth factor mRNA levels as a biomarker for short-term N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced rat bladder carcinogenesis bioassay. *J Appl Toxicol*, 35, 181-190, 2015.
 17. Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Yamashita N, Nakamura Y, Shiota M, Tanaka M, Sano S, Osada-Oka M, Shimada K, Wanibuchi H, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Percutaneous Carbon Dioxide Treatment using a Gas Mist Generator Enhances the Collateral Blood Flow in the Ischemic Hindlimb. *J Atheroscler Thromb*, 22, 38-51, 2015.
 18. Kuwae Y, Kakehashi A, Wakasa K, Wei

- M, Yamano S, Ishii N, Ohsawa M, Wanibuchi H. Paraneoplastic MAGE-1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 44, 106-115, 2015.
19. Wei M, Xie Xiao-Li, Yamano S, Kakehashi A, Wanibuchi H. Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis. *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*, Vol 1, 253-260, 2015.
20. Gi M, Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Ishii N, Kakehashi A, Takeshita M, Wanibuchi H. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. *Toxicol Sci*, 2015 (in press).
21. Ishii S, Hirane M, Fukushima K, Tomimatsu A, Fukushima N, Tsujiuchi T. Diverse effects of LPA₄, LPA₅ and LPA₆ on the activation of tumor progression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 461, 59-64, 2014.
22. Ishii S, Hirane M, Kato S, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite effects of GPR120 and GPR40 on cell motile activity induced by ethionine in liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 456, 135-138, 2015.
23. Ishii S, Hirane M, Kitamura Y, Mori S, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Role of GPR120 in cell motile activity induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in liver epithelial WB-F344 cells. *Mol Cell Biochem*, 400, 145-151, 2015.
2. 学会発表
1. 山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、鰐 渕英機、マウス肺扁平上皮癌において気管支肺胞幹細胞がオリジンである可能性. 第 103 回日本病理学会総会, 広島 (2014 年 4 月)
2. 梯アンナ、桑江優子、石井真美、魏 民、鰐 渕英機、ヒト肝細胞癌における LC-MS/MS 及び *in vitro* 機能解析を用いた新規特異的候補分子ターゲットの検討. 第 103 回日本病理学会総会, 広島 (2014 年 4 月)
3. 三島胡桃、山野莊太郎、藤岡正喜、魏 民、鰐 渕英機、EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する. 第 103 回日本病理学会総会, 広島 (2014 年 4 月)
4. 福島昭治、魏 民、梯アンナ、鰐 渕英機、化学発がん物質のリスク評価における閾値問題. 第 41 回日本毒理学学会学術年会, 神戸 (2014 年 7 月)
5. 石井真美、梯アンナ、魏 民、佐谷

- 秀行、鰐渕英機、ヒト肝細胞癌組織における癌幹細胞マーカーとしてのCD44v9の検討. 第11回日本病理学会カンファレンス, 神戸 (2014年8月)
6. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、三島胡桃、鰐渕英機、ハムスターBOP二段階胆膵管発がんモデルを用いた1,2-dichloropropaneの発がん修飾作用の検討. 第29回発癌病理研究会, いわき (2014年9月)
 7. 三島胡桃、山野莊太郎、藤岡正喜、魏 民、下村衣里、鰐渕英機、EHEN誘発ラット腎発がんにおける発がん機序の解明 PI3K/Akt/mTOR signaling pathway 及び NADPH oxidaseの役割. 第29回発癌病理研究会, いわき (2014年9月)
 8. 山野莊太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏 民、鰐渕英機、腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 平成26年度がん若手研究者ワークショップ, 茅野 (2014年9月)
 9. 魏 民、下村衣里、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、石井真美、武下正憲、房 赫、鰐渕英機、ハムスター化学発がんモデルを用いた1,2-dichloropropaneの発がん修飾作用の検討. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014年9月)
 10. 石井真美、梯アンナ、桑江優子、大澤政彦、魏 民、鰐渕英機、ヒトNASH肝細胞癌におけるプロテオーム解析を用いた分枝メカニズムの検討. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014年9月)
 11. 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、梯アンナ、石井真美、下村衣里、三島胡桃、房 赫、鰐渕英機、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73回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014年9月)
 12. 梯アンナ、石井真美、桑江優子、房 赫、藤岡正喜、魏 民、鰐渕英機、ヒト肝細胞癌における新治療ターゲットの検索: CNPY2 及び CACHD1. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014年9月)
 13. Yamano S, Wei M, Fujioka M, Wanibuchi H, Cancer initiating cekk of lung squamous cell carcinoma in mice might be cerived from the bronchiolar alveolar stem cell. 39th EAMO Congress, Madrid, Spain (2014. Sep)
 14. 鰐渕英機、魏 民、ヒ素の発がん機序の解明. 第60回日本病理学会秋期特別総会, 浦添 (2014年11月)
 15. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、鰐渕英機、ハムスターBOP二段階胆膵管発がんモデルを用いた1,2-dichloropropane(1,2-DCP)の発がん修飾作用の検討. 第31回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会,

- 東京 (2015 年 1 月)
16. Anna Kakehashi, Naomi Ishii, Min Gi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, CNPY2 and CACHD1 as novel molecular markers of hepatocellular carcinoma. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 東京 (2015 年 1 月)
 17. 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、下村衣里、三島胡桃、鰐淵英機、非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がんメカニズムの検討. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 東京 (2015 年 1 月)
 18. 三島胡桃、山野莊太郎、魏 民、鰐淵英機、ラット同所同種移植による新規腎癌肺転移モデルの確立及び評価. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会, 東京 (2015 年 1 月)
 19. 山野莊太郎、三島胡桃、山田健二、平山幸良、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 平成 26 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 (2015 年 2 月)
 20. 平山幸良、山野莊太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、三島胡桃、鰐淵英機、肝微小環境が及ぼす転移性腎癌への影響. 平成 26 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 (2015 年 2 月)
 21. 三島胡桃、山野莊太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎細
 - 胞癌肺転移新規モデルの構築及び評価. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 大阪 (2015 年 2 月)
 22. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、鰐淵英機、1,2-DCP 投与によるハムスターおよびマウスの肝毒性メカニズムの検討. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 大阪 (2015 年 2 月)
 23. 福嶋伸之、田中亚以子、辻内俊文、岩森正男. 多価不飽和脂肪酸は活性酸素産生と MAP キナーゼ経路活性化を介して卵巣がん細胞死を引き起こす. (第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館 (京都府))
 24. 石井章一、森本祐司、石橋潤一、辻内俊文、加川尚、福嶋伸之. メダカ L P A 受容体遺伝子の発現と機能. (第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館 (京都府))
 25. 平根未来、董燕、朴木寛弥、辻内俊文. 化学発がん物質により誘発されるラット肝細胞運動能への LPA シグナル伝達経路の関与. (第 73 回日本癌学会総会. 2014 年 9 月 25 日~27 日. パシフィコ横浜. 神奈川県))
 26. 福嶋伸之、石井章一、森本祐司、石橋潤一、辻内俊文、加川尚. メダカ リゾホスファチジン酸受容体の発現と機能. (第 37 回日本神経科学大会 Neuro2014. 2014 年 9 月 11 日~13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県))

27. 石井章一、辻内俊文、加川尚、福嶋伸之. メダカLPA受容体遺伝子の発現と機能. (生体機能と創薬シンポジウム2014. 2014年8月28日-29日. 近畿大学. 大阪)

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

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 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

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。これまでに我々は医薬品・化粧品の抽出・精製・反応溶剤として用いられる1,4-ジオキサンについて、5000 ppm投与群において点突然変異頻度の増加および1,4-ジオキサン特異的な変異スペクトラムがみられること、さらにラット肝臓前がん病変マーカーであるGST-P陽性細胞巢の有意な増加が5000 ppm投与群でみられることを明らかにしている。しかし、1,4-ジオキサンは微量ながらも水道水中に存在することから、低用量域における遺伝毒性および発がん性について早急に明らかとする必要がある。そこで本年度は1,4-ジオキサンのラット肝臓に対する低用量域における影響について、*gpt delta F344* ラットを用いて1,4-ジオキサンを0, 0.2, 2.0, 20 ppmの用量で16週間飲水投与を行い、*in vivo* 変異原性およびGST-P陽性細胞巢の評価を行った。その結果、最終体重、肝臓重量、変異頻度およびGST-P陽性細胞の数に有意な差がみられないことが明らかとなった。以上のことから、1,4-ジオキサンは低用量域において*in vivo* 変異原性および肝発がん性を有さないことが明らかとなり、1,4-ジオキサンの*in vivo* 変異原性および肝発がん性に閾値が存在することが強く示唆された。

A. 研究目的

環境中には多くの発がん物質が存在し、ヒト発がんの主な原因となっている。中でも医薬品や化粧品、食品添加物などからの化学物質の曝露が問題となっている。しかし、発がん性試験はその時間的・費用的コストの問題から全ての化学物質に対応することが現実的に困難であり、また*in vitro* 試験系で得られた遺伝毒性の知見には偽陽性・偽陰性が混在する問題が存在する。したがって、短期間でかつ包括的に化学物質の変異原性および発がん性を評価可能な動物モデルの構築が待たれるところである。今回評価を行った1,4-ジオキサンは、医薬品・化粧品（シャンプー）などの抽出・精製・反応溶剤として用いられる合成有機化合物であ

り、浄水処理においては除去されないため、水道水にも残留している。1,4-ジオキサンの遺伝毒性について*in vitro* 試験では、Ames試験で陰性、姉妹染色分体交換試験では弱陽性が報告されており、*in vivo* 試験では小核試験陰性、伴性劣性致死試験陽性であり、弱い遺伝毒性作用を持つ可能性があると考えられる。また国際がん研究機関(IARC)では1,4-ジオキサンは「ヒトに対する発がん性の可能性あり(グループ2B)」と評価されている。

これまでに我々は1,4-ジオキサンの遺伝毒性について*gpt delta* ラットを用いた*in vivo* 評価系を実施し、5000ppm投与群で有意な変異頻度の増加を報告している。しかし、1,4-ジオキサンは微量ながらも水道水中に存在することから、低用

量域における遺伝毒性および発がん性について早急に明らかとする必要がある。遺伝毒性の評価には *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性の解析を、発がん性については肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の評価を行い、1, 4-ジオキサンの遺伝毒性および発がん閾値について評価・検討を行った。

B. 研究方法

1. 1, 4-ジオキサンの *gpt delta* F344 ラットにおける肝発がん性および変異原性の検討

[材料]

5 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラット 20 匹を 4 群 5 匹ずつに分け、それぞれ 1, 4-ジオキサンを 0, 0.2, 2.0, 20 ppm の濃度で飲水投与を 16 週間行った。なお、1, 4-ジオキサンは蒸留水で混和し、基礎試料として CE-2(日本チャールズリバー)を与えて試験に供した。なお、動物実験については、大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリエーションシステムの動物室にて、室内の環境条件は温度 22±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。また、紙の床敷を入れたプラスチック製ケージに、3 ないしは 2 匹に分けて飼育し、ケージおよびチップを週 1 回交換した。屠殺までの実験期間中は、体重、摂餌量、摂水量を週 1 回測定した。

飼育期間終了後、セボフルラン吸入麻酔下で安楽殺の後に剖検を実施し、肝臓・腎臓・脾臓の臓器重量を測定した。さらに肝臓は 3 切片を切り出してホルマリン固定を実施し、残りの外側右葉は以降の *in vivo* 変異原性解析のために凍結保存した。

[GST-P 陽性細胞の評価]

ホルマリン固定後の肝臓組織から 1 スライドあたり 3 切片ずつ用いて評価に供

した。GST-P 免疫組織化学染色標本は陽性細胞巢を構成する細胞が 2 個以上のものについて集計し、1 スライドあたりの個数で半定量的評価を行った。

[*in vivo* 変異原性解析]

得られた凍結肝より、genomic DNA を Transpack DNA isolation kit を用いて抽出を行った。*in vitro* パッケージングには、Transpack Packaging Extract を用いて、抽出した genomic DNA を用いてファージ粒子として回収した。

点突然変異を検出する *gpt* assay には Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株を用いて、回収ファージを混和し、37°C、20 分間静置、さらに 37°C、20 分間振とう後、大腸菌 YG6020 株に回収ファージを感染させた。ファージ感染後の 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 インキュベーターにて 72 時間培養を行い、*gpt* 遺伝子の不活化による変異体コロニーを得た。さらに、得られた変異体について 6-TG を含む M9 寒天培地および 6-TG を含む M9 寒天培地それぞれにスクレーピングを実施し、72 時間の培養後、6-TG を含む M9 寒天培地でコロニー形成がみられたものを *gpt* 変異体として以降の試験で取り扱った。また、感染ファージ由来のプラスミドによる総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。突然変異体頻度の算出については、得られた変異体数を総形質転換コロニー数で除することで算出した。

gpt 遺伝子変異体の変異スペクトラを評価するため、得られた変異体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 Tm 値 58°C、36 サイクルにて増幅した。PCR 反応には KOD plus neo (TOYOBO) を用いた。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' -CTATTGTAACCCGCTGAAG-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。

欠失変異を検出する Spi⁻ assay について、*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。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、λ トリプティケース寒天培地にまいて 37°C で一晚培養し、Spi⁻ 変異体プラークを得た。また、非溶原菌に感染させ、全ファージが溶菌してプラーク作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。

[統計学的解析]

剖検時における最終体重、肝臓の絶対重量および相対重量、GST-P 陽性細胞巢および変異体頻度および変異頻度について、統計学的解析を実施した。解析には Statlight program (Yukms Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、検定法については、F 検定を用いて等分散性を評価した。2 群検定において、等分散性であった場合

は Student' s T 検定を、分散にばらつきがみられた場合は Welch' s T 検定を用いて評価を行った。また、全ての平均値は Mean ± SD として表し、P < 0.05 以下のものを統計学的に有意であるとみなした。

2. 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麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

[一般状態]

飼育期間中における体重、摂餌量および飲水量について、1,4-ジオキサン投与による有意な差はみられなかった。剖検時における最終体重、肝臓・腎臓・脾臓の絶対・相対重量について Table. 1 に示す。最終体重、肝臓・腎臓・脾臓の絶対・相対重量について無処置群と比較して有意な変化はみられなかった。

[GST-P 陽性細胞巢の評価]

肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢 (2 cell 以上) の 1 スライドあたりの数について定量的評価を行った結果、無処置群と比較して有意な差はみられなかった (Table. 2)。

[*in vivo* 変異原性の解析]

点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイの結果を Table. 3 に示す。変異体頻度が無処置群では $8.0 \pm 3.2 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $11.1 \pm 8.1 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $7.5 \pm 3.2 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $9.8 \pm 7.5 (\times 10^{-6})$ であった。変異体頻度は、無処置群と比較して、有意な差はみられなかった。

また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラを Table 4 に示す。各変異頻度について、Transition 変化である G:C to A:T 変化は

無処置群では $1.7 \pm 1.2 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $2.2 \pm 2.5 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $3.0 \pm 1.4 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $3.3 \pm 2.7 (\times 10^{-6})$ 、A:T to G:C 変化は無処置群では $0.2 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $1.7 \pm 2.2 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $1.0 \pm 0.9 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では 0 であった。また、Transversion 変化である G:C to T:A 変化は無処置群では $0.5 \pm 0.7 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $0.6 \pm 0.9 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $0.5 \pm 0.7 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $1.2 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ 、G:C to C:G 変化は無処置群では $0.3 \pm 0.7 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $0.2 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $0.8 \pm 0.7 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $0.4 \pm 0.6 (\times 10^{-6})$ 、A:T to T:A 変化は無処置群では $0.2 \pm 0.7 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では 0、2.0 ppm 投与群では $0.3 \pm 0.7 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では 0、A:T to C:G 変化は無処置群では $1.1 \pm 1.0 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $0.2 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $0.2 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $0.2 \pm 0.4 (\times 10^{-6})$ であった。deletion において、1bp 欠失変化は無処置群では $0.9 \pm 0.9 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $1.0 \pm 1.3 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $0.2 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $0.4 \pm 0.6 (\times 10^{-6})$ 、2bp 以上の欠失変化は無処置群では 0、0.2 ppm 投与群では 0、2.0 ppm 投与群では 0、20 ppm 投与群では 0 であった。Insertion 変異は無処置群では $0.3 \pm 0.7 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では 0、2.0 ppm 投与群では 0、20 ppm 投与群では $0.2 \pm 0.4 (\times 10^{-6})$ であった。また、モノクローナル変異を除いた総変異頻度は無処置群では $5.2 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $5.2 \pm 2.1 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $5.8 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $5.4 \pm 0.8 (\times 10^{-6})$ であった。*gpt* 遺伝子

の各変異スペクトラムにおける変異頻度は無処置群と比較して、有意な差はみられなかった。

欠失変異を検出する Spi⁻アッセイの結果を Table.5 に示す。変異体頻度は無処置群では $4.4 \pm 3.4 (\times 10^{-6})$ 、0.2 ppm 投与群では $4.6 \pm 1.9 (\times 10^{-6})$ 、2.0 ppm 投与群では $4.9 \pm 2.1 (\times 10^{-6})$ 、20 ppm 投与群では $4.4 \pm 1.7 (\times 10^{-6})$ であった。変異体頻度は、無処置群と比較して、有意な差はみられなかった。

D. 考察

gpt delta F344 ラットにおける 1,4-ジオキサンの低用量域における *in vivo* 変異原性および肝発がん性の検討において、肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢 (2 cell 以上) について評価した結果、無処置群と比較して有意な変化はみられなかった。また、*in vivo* 変異原性について評価した結果、*gpt* アッセイ、Spi⁻アッセイともに変異頻度の有意な変化はみられなかった。さらに *gpt* 遺伝子の変異スペクトラムについても 1,4-ジオキサン投与群特異的な変化はみられなかった。以上の結果から、今回のような低用量域では 1,4-ジオキサンが *in vivo* 変異原性および肝発がん性を示さないことが明らかとなった。これまでの報告で 1,4-ジオキサンが 5000ppm 投与群で有意な GST-P 陽性細胞巢の数および変異頻度の増加がみられることがわかっている。したがって、1,4-ジオキサンの発がん性および変異原性には閾値が存在することが強く示唆された。

E. 結論

gpt delta F344 ラットを用いた低用量域における評価で、1,4-ジオキサンの変異原性および肝発がん性には閾値が存在することが明らかとなった。今回得られた知見は、1,4-ジオキサンのリスク評価

に寄与できるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka M, Mun S, Harada A, Ohkawa Y, Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M, Iwao H. Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions. *PLoS One*, 9, e96785, 2014.
2. Yamada T, Wei M, Toyoda T, Yamano S, Wanibuchi H. Inhibitory effect of raphanobrassica on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Food Chem Toxicol*, 70, 107-113, 2014.
3. Tago Y, Fujii T, Wada J, Kato M, Wei M, Wanibuchi H, Kitano M. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing *Phaffia rhodozyma* extract. *J Toxicol Sci*, 39, 373-382, 2014.
4. Kakehashi A, Kato A, Ishii N, Wei M, Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H. Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling. *PLoS One*, 9, e113610, 2014.
5. Tanaka M, Yamaguchi M, Shiota M, Kawamoto Y, Takahashi K, Inagaki A, Osada-Oka M, Harada A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Iwao H, Ohkawa Y. Establishment of neutralizing rat monoclonal antibodies for fibroblast growth factor-2. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 33, 261-269, 2014.
6. Morisaki T, Yashiro M, Kakehashi A, Inagaki A, Kinoshita H, Fukuoka T, Kasashima H, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Muguruma K, Ohira M, Wanibuchi H, Hirakawa K. Comparative proteomics analysis of gastric cancer stem cells. *PLoS One*. 9(11):e110736. 2014.
7. Wakui S, Mutou T, Takahashi H, Ikegami M, Wanibuchi H, Fukushima S. Vascular endothelial growth factor mRNA levels as a biomarker for short-term N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced rat bladder carcinogenesis bioassay. *J Appl Toxicol*, 35, 181-190, 2015.
8. Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Yamashita N, Nakamura Y, Shiota M, Tanaka M, Sano S, Osada-Oka M, Shimada K, Wanibuchi H, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Percutaneous Carbon Dioxide Treatment using a Gas Mist Generator Enhances the Collateral Blood Flow in the Ischemic Hindlimb. *J Atheroscler Thromb*, 22, 38-51, 2015.
9. Kuwae Y, Kakehashi A, Wakasa K, Wei M, Yamano S, Ishii N, Ohsawa M, Wanibuchi H. Paraneoplastic Ma Antigen-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 44, 106-115,

- 2015.
10. Wei M, Xie Xiao-Li, Yamano S, Kakehashi A, Wanibuchi H. Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis. *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*, Vol 1, 253-260, 2015.
 11. Gi M, Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Ishii N, Kakehashi A, Takeshita M, Wanibuchi H. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. *Toxicol Sci*, 2015 (in press).
2. 学会発表
1. 山野荘太郎、魏 民、藤岡正喜、鰐淵英機、マウス肺扁平上皮癌において気管支肺胞幹細胞がオリジンである可能性. 第 103 回日本病理学会総会, 広島 (2014 年 4 月)
 2. 梯アンナ、桑江優子、石井真美、魏 民、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌における LC-MS/MS 及び *in vitro* 機能解析を用いた新規特異的候補分子ターゲットの検討. 第 103 回日本病理学会総会, 広島 (2014 年 4 月)
 3. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する. 第 103 回日本病理学会総会, 広島 (2014 年 4 月)
 4. 福島昭治、魏 民、梯アンナ、鰐淵英機、化学発がん物質のリスク評価における閾値問題. 第 41 回日本毒理学学会学術年会, 神戸 (2014 年 7 月)
 5. 石井真美、梯アンナ、魏 民、佐谷秀行、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌組織における癌幹細胞マーカーとしての CD44v9 の検討. 第 11 回日本病理学会カンファレンス, 神戸 (2014 年 8 月)
 6. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、三島胡桃、鰐淵英機、ハムスターBOP 二段階胆膵管発がんモデルを用いた 1,2-dichloropropane の発がん修飾作用の検討. 第 29 回発癌病理研究会, いわき (2014 年 9 月)
 7. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、下村衣里、鰐淵英機、EHEN 誘発ラット腎発がんにおける発がん機序の解明 PI3K/Akt/mTOR signaling pathway 及び NADPH oxidase の役割. 第 29 回発癌病理研究会, いわき (2014 年 9 月)
 8. 山野荘太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ, 茅野 (2014 年 9 月)
 9. 魏 民、下村衣里、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、武下正憲、房 赫、鰐淵英機、ハムスター化学発がんモデルを用いた 1,2-dichloropropane の発がん修飾作用の検討. 第 73 回日本癌学会学術