

- thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology*. 79 (2014) 112-118.
53. 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* 2014 (34) 201-204.
 54. 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*. 2014(66)81-88.
 55. 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.
 56. 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.
 57. Kuwae Y, Kakehashi A, Wakasa K, Wei M, Yamano S, Ishii N, Ohsawa M, Wanibuchi H. Paraneoplastic Mucin Antigen-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 44, 106-115, 2015.
 58. 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.
 59. 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).
 60. Ishii S, Hirane M, Fukushima K, Tomimatsu A, Fukushima N, Tsujiuchi T. Diverse effects of LPA₁, LPA₅ and LPA₆ on the activation of tumor progression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 461 (2015)

61. 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 (2015) 135-138.
62. 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 (2015) 145-151.
2. 学会発表
1. 梯アンナ、謝 曉利、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）
2. 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)
3. 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）
4. 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）
5. 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）
6. 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）
7. 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）
8. 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）
9. 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回日本癌学会学

- 術総会, 札幌 (2012年9月)
10. 森崎珠美、八代正和、梯アンナ、福岡達成、青松直撥、長谷川毅、平川俊基、久保尚士、田中浩明、六車一哉、大平雅一、鰐淵英機、平川弘聖：癌幹細胞様 SP 細胞と低酸素細胞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)
 11. 小松弘明、西山典利、山野莊太郎、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)
 12. 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)
 13. 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：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)
 14. 梯アンナ、桑江優子、山野莊太郎、魏民、謝曉利、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)
 15. 加藤実、魏民、田尻正喜、山野莊太郎、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)
 16. 魏民、山野莊太郎、加藤実、梯アンナ、神吉将之、謝曉利、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)
 17. 塩田正之、田中昌子、高橋克之、鰐淵英機：新規 FGF-2 機能阻害抗体による内皮細胞の生存抑制効果. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012年9月)
 18. 鰐淵英機：膀胱癌の発症・進展におけるリスクファクターと機序. 第 246 回日本泌尿器科学会東北地方会, 福島 (2012年9月)
 19. 朴木寛弥、藤井宏真、城戸颯、塚本真治、辻内俊文. リゾフォスファチジン酸受容体阻害はヒト肉腫細胞の運動・浸潤能を抑制する. 第 71 回日本癌学会総会, 札幌 (2012年9月)
 20. 福嶋伸之、大久保慶、桑田聖平、辻内俊文、岩森正男. 卵巣がん細胞の生存および増殖に対する種々の脂肪酸の作用. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡 (2012年12月)
 21. 魏民、山野莊太郎、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)
 22. 神吉将之、魏民、梯アンナ、山野

- 莊太郎、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)
23. 奥村真衣、魏 民、山野莊太郎、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)
24. 山野莊太郎、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)
25. 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)
26. 岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、謝 曉利、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)
27. 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、福永賢輝、謝 曉利、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)
28. 山野莊太郎、鰐淵英機：NASH-肝細胞癌発症 STAM マウスにおける病態評価. 第 12 回分子予防環境医学研究会, つくば (2013 年 2 月)
29. 鰐淵英機：肺発がんモデルにおける組織幹細胞の役割. 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)
30. 魏 民、山野莊太郎、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)
31. 山野莊太郎、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)
32. 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)
33. Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Doi Y, Nagano K, Banton M, Nishimaki F, Wanibuchi H, Fukushima S: Ethyl *Tertiary*-Butyl

- Ether induces oxidative stress and 8-OHdG formation in the liver of F344 rats via activation of CAR, PXR and PPAR nuclear receptors. The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, Texas (2013年3月)
34. 鰐渕英機：膀胱癌の病理診断の基礎知識. 第101回泌尿器科学会総会「卒後教育プログラム」, 札幌 (2013年4月)
35. Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Wanibuchi H, Inaba M. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. the 50th ERA-EDTA Congress, Istanbul, Turkey (2013年5月)
36. 鰐渕英機, 桑江優子, 魏 民, 若狭研一, 梯アンナ：ヒト肝細胞癌における特異的候補分子の機能解析. 第102回日本病理学会総会, 札幌 (2013年6月)
37. 鰐渕英機, 魏 民, 梯アンナ, 山野莊太郎, 藤岡正喜：ヒ素発がん性の機序の解明. 第20回日本がん予防学会, 東京 (2013年7月)
38. 梯アンナ, 萩原昭裕, 今井則夫, 長野嘉介, 西牧富久美, 魏 民, 福島昭治, 鰐渕英機：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28回発癌病理研究会, 沖縄県南城市 (2013年8月)
39. 石井章一, 辻内俊文, 福嶋伸之. LPA1の変異は小胞体への蓄積と情報伝達の異常を生じる. 第86回日本生化学大会, 横浜 (2013年9月)
40. 福嶋伸之, 辻内俊文, 岩森正男. 脂肪酸による卵巣がん細胞 HNOA の細胞死抑制機構. 第86回日本生化学大会, 横浜 (2013年9月)
41. Okumura M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in F344 rats. The European Cancer Congress 2013, Amsterdam, the Netherlands (2013年9~10月)
42. 魏 民, 山野莊太郎, 藤岡正喜, 加藤 実, 武下正憲, 梯アンナ, 鰐渕英機：1, 2 - ジクロロプロパンのマウスおよびハムスターの肝臓における代謝および毒性発現機序の検討. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)
43. 藤岡正喜, 魏 民, 山野莊太郎, 奥村真衣, 下村衣里, 梯アンナ, 鰐渕英機：gpt delta ラットを用いた DMA (V), iAs (III) の変異原性および遺伝子変化の検討. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)
44. 梯アンナ, 桑江優子, 加藤 実, 山野莊太郎, 神吉将之, 魏 民, 若狭研一, 鰐渕英機：ヒト肝細胞癌における新規特異的候補分子ターゲットの機能解析. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013年10月)

45. 山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、三島胡桃、鰐淵英機：内因性 NADPH オキシダーゼインヒビターであるアポサイニンはラット腎臓がんにおいて発がん抑制作用を有する。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜（2013 年 10 月）
46. 奥村真衣、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：ラット中期多臓器発がん性試験法を用いた DPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討。第 72 回日本癌学会学術総会，横浜（2013 年 10 月）
47. Honoki K, Fujii H, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Receptor type-specific role of lysophosphatidic acid signaling for migration and invasion in sarcoma cells. 第 72 回日本癌学会総会，横浜（2013 年 10 月）
48. 鰐淵英機、奥村真衣、藤岡正喜、魏 民：多臓器発がん性試験法を用いたラットにおけるジフェニルアルシン酸の発がん性の検討。第 19 回ヒ素シンポジウム，福岡（2013 年 11 月）
49. Yamano S, Wei M, Wanibuchi H. Cancer initiating cell of lung squamous cell carcinoma in mice might be derived from of the bronchiolar alveolar stem cell. 第 18 回日韓がんワークショップ，岐阜（2013 年 11 月）
50. 魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、梯アンナ、下村衣里、神吉将之、鰐淵英機：シリアンハムスターにおける 1, 2 - dichrolopropan の強制経口投与による肝毒性とその発現機序の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
51. 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：肝臓がんにおける LC-MS/MS 及び *in vitro* 機能解析を用いた新規特異的候補分子の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会徳島（2014 年 1 月）
52. 山野莊太郎、尾崎清和、武田周二、串田昌彦、井澤武史、山手丈至、平田暁大、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：EHEN 投与ラットの前腸由来臓器への分化多能性を示す肝芽腫の一例。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
53. 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、下村衣里、三島胡桃、福永賢輝、鰐淵英機：ラット膀胱におけるプロポリスの発がん促進作用及びその機序の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
54. 奥村真衣、藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、三島胡桃、多胡善幸、鰐淵英機：ラット中期多臓器発がんモデルを用いた DPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
55. 三島胡桃、山野莊太郎、藤岡正喜、

- 魏 民、北野光昭、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 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
56. 下村衣里、藤岡正喜、魏 民、山野 荘太郎、梯アンナ、串田昌彦、鰐淵英機：DMA^v および iAs^{III} ラット膀胱、肝臓における変異原性の解析。第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会，徳島（2014 年 1 月）
57. 梯アンナ、魏 民、福島昭治、鰐淵英機：ラット肝発がんにおける Valerian の予防効果。第 13 回分子予防環境医学研究会，和歌山（2014 年 1～2 月）
58. 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 13 回分子予防環境医学研究会，和歌山（2014 年 1～2 月）
59. Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H: Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. 平成25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（2014年2月）
60. 山野荘太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける NADPH oxidase (NOX) の役割。平成25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（2014 年2月）
61. 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）
62. 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）
63. 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）
64. 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 回日本毒性学会学術年会，神戸（2014 年 7 月）
65. 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）
66. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野

- 荘太郎、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)
67. 三島胡桃、山野荘太郎、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)
68. 山野荘太郎、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)
69. 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)
70. 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)
71. 藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、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)
72. 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)
73. 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)
74. 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)
75. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、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)
76. 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)
77. 藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、下村衣里、三島胡桃、鰐渕英機: 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)
 78. 三島胡桃、山野莊太郎、魏 民、鰐渕英機: 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)
 79. 山野莊太郎、三島胡桃、山田健二、平山幸良、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「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)
 80. 平山幸良、山野莊太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、三島胡桃、鰐渕英機: 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)
 81. 三島胡桃、山野莊太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、鰐渕英機: 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)
 82. 下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野莊太郎、梯アンナ、鰐渕英機: 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) 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))
 83. 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 LPA 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))
 84. 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)
 85. 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))
 86. 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 鰐渕 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

我々は、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験法の汎用性を高めることを目的とし、これまで困難であった微量組織の変異原性解析を可能にする新たな抽出解析法を開発を行なった。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、採取の容易な肝臓や腎臓だけでなく、膀胱粘膜および甲状腺のような微小組織の変異原性を安定的に評価することが可能となったことで、我々のモデルの汎用性をさらに高めることができた。

また、本モデルを用いた化学物質の低用量域における変異原性および発がん性の評価においての有用性を示すために 1,4-ジオキサンについて評価・検討した結果、1,4-ジオキサンの変異原性および発がん性には実際的な閾値が存在することが示唆された。

膀胱発がん性の前がん病変マーカーの開発試験では、*oncomodulin* と *matrix metalloproteinase-3* を組み合わせて使用することにより、化学物質の膀胱発がん性を予測できる可能性が強く示唆された。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胞幹細胞領域にて、*Scal*, *CD133*, *CD44*, *c-kit*, *c-myc* および *klf4* 等幹細胞マーカーの発現上昇が認められた。さらに、*ERK 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、肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発に重要な知見を提供することができた。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試験で、非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂を投与したラット肝臓で発現低下がみられた遺伝子から、DNA メチル化異常候補遺伝子として 16 遺伝子を選定した。さらに、*de novo* メチル化に関与する *DNMT3b* およびヒストンの脱アセチル化を誘導する *HDAC* の発現減少が認められたことから、エピジェネティック修飾機構の異常が示唆された。

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において実験動物を用いた投与試験に 2 年間必要

であること、さらに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現実的に非常に困難なためである。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、F344 ラットおよび *in vivo* 変異原性を臓器特異的にかつ代謝能を反映して検索できる *gpt delta* 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。これまでに本モデルを用いて検索した被験物質は、肝発がん性を示しかつ *in vitro* 変異原性陰性のダンマル樹脂、*in vitro*・*in vivo* 変異原性陽性の IQ、*in vitro* 変異原性偽陽性であるコウジ酸の 3 物質で、これらはいずれも肝発がん促進作用陽性であること、さらに *gpt delta* ラット肝臓を用いた *in vivo* 変異原性は、ダンマル樹脂・IQ・コウジ酸でそれぞれ陰性、陽性、陰性であることを明らかとした。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コウジ酸が非遺伝毒性物質であることをはじめて明らかにし、この試験法の肝発がん性評価システムとしての有効性・有用性を証明した。

本研究では、包括的短期発がんリスク評価試験法が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、リスク評価システムにおいて本モデルが有用であることを示すデータを蓄積する。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臓

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る。これは *in vivo* 変異原性を解析する *gpt* アッセイにおいて一般的に用いられる genomic DNA 抽出法である Transpack DNA isolation kit を用いた DNA 抽出法はその genomic DNA 抽出精製過程でロスが生じやすく、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非常に大きく下げる要因となっている。そこで微量試料より *in vivo* 変異原性評価可能な収量が十分に得られ、かつフェノール、クロロホルムのようなファージへの形質転換を阻害しない安定的 genomic DNA 抽出技術を開発する。加えて、新たな DNA 抽出法の有用性を確認するため、各種被験物質(コウジ酸、プロポリス、BBN、sodium ascorbate)の微量試料中における *in vivo* 変異原性を評価した(魏分担報告書参照)。

これまでに包括的短期発がんリスク評価試験法を用いることでコウジ酸のように遺伝毒性が明らかでなかった物質の *in*

in vivo 変異原性を決定できることを示してきた。そこで *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、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、水道水にも残留している。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とから、1,4-ジオキサンの発がん性および変異原性について検討する必要がある。我々は *gpt delta* ラットを用いた検討結果、1,4-ジオキサンは高用量域において *in vivo* 変異原性陽性であることを明らかにした(魏分担報告書参照)。本研究ではF344ラット肝臓を用いて肝臓前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の定量的解析より1,4-ジオキサンの肝発がん性について検討をおこなった。さらに、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明らかにする必要があることから、種々の検討を実施した。

また、ラット腎発がん、マウス肺発がんおよびラット膀胱発がんモデルで得られた組織サンプルを用いて、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、DNAマイクロアレイやプロテオミクス解析などの遺伝子あるいはタンパク質の網羅的発現解析を実施し、さらにその発現パターンをコンピューター解析により発がんに関与するシグナルパスウェイ関連遺伝子・タンパク質の検索を実施することで新規前がん病変マーカーの同定を行い、得られた候補マーカーの有用性について種々の検討を行なった。

さらに、発がん過程におけるエピジェネティクス異常、特に遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化について評価・検討を行い、DNAメチル化異常を指標とする発がん性評価を試みる。本研究では被験物質としてこれまでに、我々が1年間慢性毒性試験および2年間発がん性試験においてラット肝発がん性を有すること(平成18-20年度厚生労働科学研究)、また *in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験で陰性であること(平成21-23年度厚生労働科学研究)を明らかにしているダンマル樹脂を用いて検討をおこなった。これまでの試験で得られた知見より、ダンマル樹脂が非遺伝毒性的な発がんメカニズムを介して肝発がん作用を示す可能性が考えられている。したがって、本研究ではダンマル樹脂投与による遺伝子発現変化についてDNAマイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現変化について評価・検討をおこない、得られた知見よりエピジェネティック修飾機構の関与の有

無について検索を行った。加えて、ダンマル樹脂誘発ラット肝発がん過程において、酸化ストレスの誘導の有無を検討した。

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 10mg に lysis buffer を加え、試料を粉碎した。13500rpm 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 1 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 λ 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

ッケージ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. 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 および 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 および 500 ppm 群の各群 5 個体から 10 μ m 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およ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 20 μ g 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 およ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) ソフトウェア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。

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 30 匹を用いて、NTCU 0.01 M/75 μ 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に興じた。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 および SPC 抗体を用いた気管支肺胞幹細胞 (BASC) の形態計測および、Ki67 および TUNEL 染色による細胞増殖能およ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、扁平上皮分化能および Rev1 発現を検討するため、BASC マーカーである Sca-1 と Ki67, p63 および 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、肺から血漿およ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/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 分インキュベーションを行った。その後、100 および 40 μm 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/100 μl に細胞濃度を調整し、Sca-1-FITC, CD45-PE および 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 分インキュベーション後、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および死細胞を除いた後、Pecam および CD45 が陰性の領域で、さらに Sca-1 陰性 (neg)、Sca-1 弱陽性 (dim) および 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 μg 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 およ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 Scf, CD133, CD44, c-kit, c-myc および 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。

4. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

[実験 1] マイクロアレイを用いた膀胱がんで異常発現する遺伝子の同定

発がん機序が異なると思われる膀胱発がん物質、すなわち、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 誘発ラット膀胱がんと、dimethylarsinic acid (DMA) 誘発ラットの膀胱がんに対し Affymetrix GeneChip を用いて遺伝子の mRNA 発現解析を行った。対照群としての同週齢の無処置ラット膀胱粘膜を用いた。

[実験 2] 膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子の同定

実験 1 で同定した膀胱がんで異常発現する遺伝子の中で BBN により誘発された早期増殖性病変においても過剰発現する遺伝子を同定し、膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子とした。実験は、6 週齢雄 F344 ラットに 0.05%BBN を 2、4、8 週投与し、リアルタイム RT-PCR をもち誘発した膀胱病変における mRNA 発現を検索した。

[実験 3] 他の膀胱発がん物質あるいは膀胱を標的にしない発がん物質を短期投与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

実験 2 で同定した 12 種類候補遺伝子に

ついて、7 種類の膀胱発がん物質 (BBN, DMA, 2-acetylaminofluorene, phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, sodium *ortho*-phenylphenate, uracil) および 3 種類の非膀胱発がん物質である (肝発がん物質 diethylnitrosamine、腎発がん物質 *N*-ethyl-*N*-hydroxyethyl nitrosamine および大腸発がん物質 1,2-dimethylhydrazine) をそれぞれ 4 週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

[実験 4] 膀胱発がん促進物質を短期投与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

Oncomodulin (OCM) と matrix metalloproteinase-3 (MMP3) について、膀胱発がん促進物質である Sodium ascorbate (NaAsc) および Propolis をそれぞれ 4 週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

5. 1, 4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性の検討

[材料]

3 週齢の雄性 F344 ラット 180 匹を 6 群 30 匹ずつに分け、それぞれ 1, 4-ジオキサンを 0, 2, 20, 200, 2000, 5000 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 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。

[GST-P 陽性細胞巢の評価]

試験期間終了後、麻酔下にて安楽殺を行い、肝臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定を行った。得られた肝臓組織から 1 スライドあたり 3 切片ずつ用いて評価を供した。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、肝臓切片の面積で除して定量的評価を行った。

[BrdU 標識率の評価]

肝臓における 1,4-ジオキサンの細胞増殖能を評価するために剖検の 1 時間前に生理食塩水で希釈した 40 mg/ml BrdU を 100 mg/kgB.W. の用量で腹腔内投与した。剖検後、BrdU について免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞の数を標本上の全肝細胞の数で除した標識率について定量的評価を行った。

6. 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。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' -ACAGGGTTTCGCTCAGTTTGC-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 T_m 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' -GAGGCAGTGCCTAAAAGAC -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⁻ 変異体ブランクを得た。また、非溶原菌に感染させ、全ファージが溶菌してブランク作ることにより回収ブランク数を求めた。突然変異体頻度は変異ブランク数を回収ファージ数で除して算出した。

7. 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

[検体]

5 週齢の雄性 F344 ラット 12 匹を 1 週間の馴化飼育後、6 匹ずつ 2 群に分け、それぞれにダンマル樹脂を 0, 2 % の濃度で混餌投与を 4 週間行った。

[サンプルの採取]

飼育期間終了後、麻酔下にて腹部大動脈切断による安楽殺を行い、直ちに肝臓

を採取して液体窒素で凍結させた。

[遺伝子網羅的発現量解析]

DNA メチル化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな修飾による遺伝子発現変化を評価するために、マイクロアレイによる遺伝子網羅的発現量解析を行い、得られたデータについて Ingenuity Pathway analysis (IPA) ソフトウェアを用いて遺伝子パスウェイ解析を行った。

[酸化ストレスの指標である 8-OHdG の定量的評価]

得られた凍結肝臓より DNA Extractor WB kit (Wako) を用いて、ビーズ破砕した凍結肝約 500mg から genomic DNA を抽出し、Nuclease P1 にて DNA を消化処理後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて 8-OHdG 値および dG 値の測定を行い、8-OHdG 値を dG 値で除して定量的評価に供した。

[定量的遺伝子発現量解析]

得られた凍結肝臓より Trizol (invitrogen) にて mRNA を抽出して 200 ng/ul に調整後、RT-for-PCR Kit (clontech) にて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を quantitative RT-PCR 法 (qPCR 法) にて P450 関連遺伝子 (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A1, 2B1, 2E1, 2A2, 2C2, 2C6, 2C7, 3A2, 3A3) の発現変動について検討した。なお、各種 CYPs 及び内在性コントロールとして使

用した b-actin および gapdh のプライマープローブは TaqMan Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems) を使用し、遺伝子発現量の定量的解析には standard curve 法を用いて検量線を作成し、相対的定量評価を行った。

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 の形質転換フェージ) が得られた (Table 1)。

2. 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。対照群および 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