

表 2、肺における病理組織学的所見

Weeks	Treatment	No.	Histopathological findings of lung			
			Hyperplasia	Inflammatory hyperplasia	adenoma	lymphocyte (bronchus)
16	DHPN	6	6	2	3	3
16	Urethane	6	1	0	0	4
16	DMN	6	6	1	0	0
16	Benzo[a]pyrene	5	0	4	0	0
32	DHPN	5	5	0	3	5
32	Urethane	6	0	3	0	6
32	DMN	6	4	0	1	6
32	Benzo[a]pyrene	5	0	2	0	3

图 1、肉眼的肺所見 (16 週)

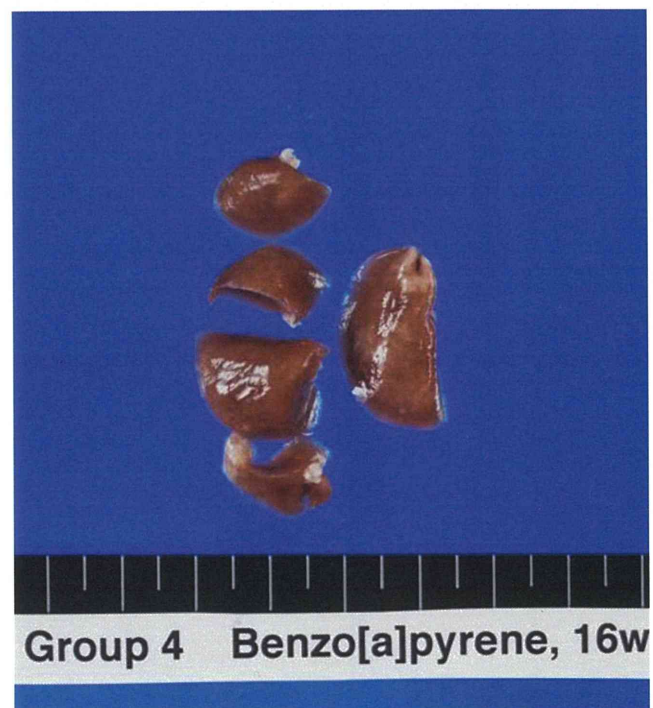
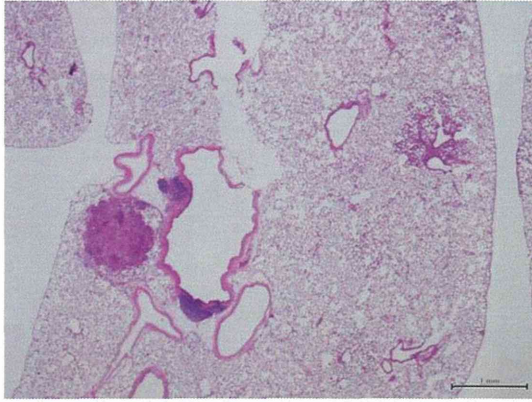




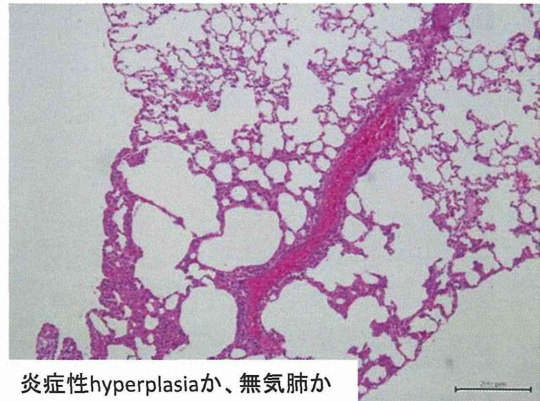
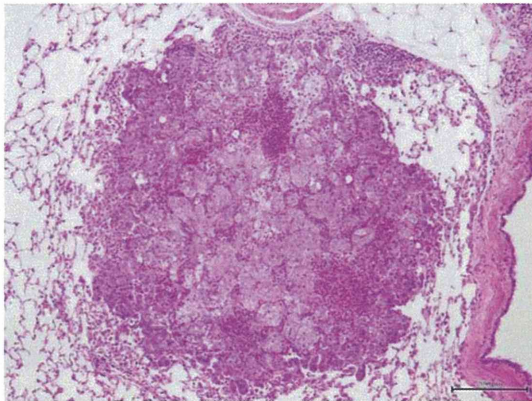
図 2、病理組織学的肺所見（16 週）



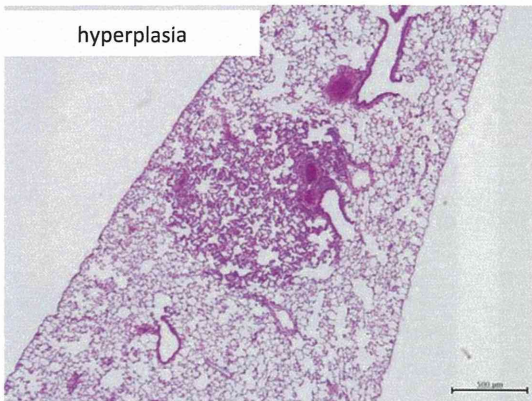
Group 1, DHPN 16w



Group 2, Urethane 16w

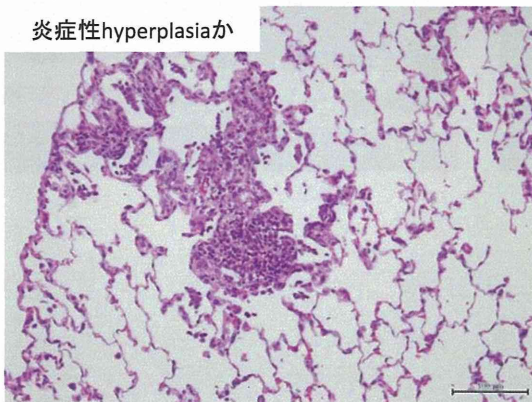
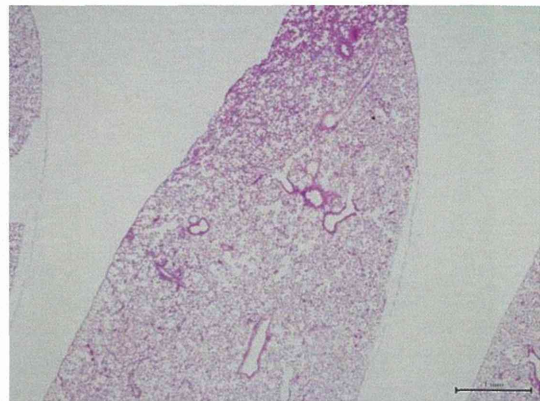


炎症性hyperplasiaか、無気肺か

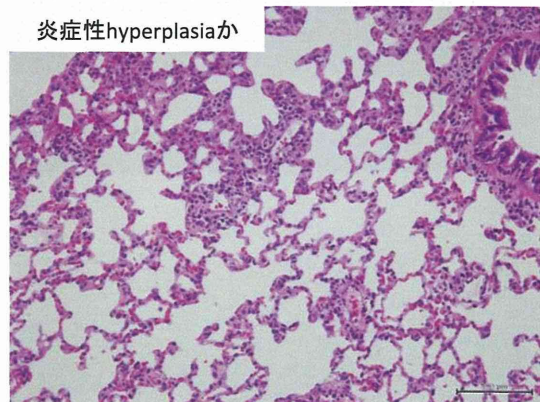


hyperplasia

Group 3, DMN 16w



炎症性hyperplasiaか



炎症性hyperplasiaか

Group 4, Benzo[a]pyrene 16w



图 3、肉眼的肺所見 (32 週)

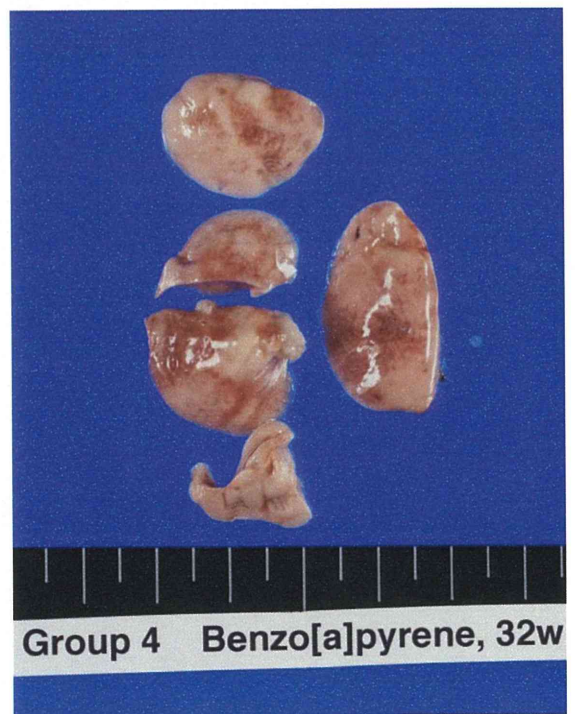
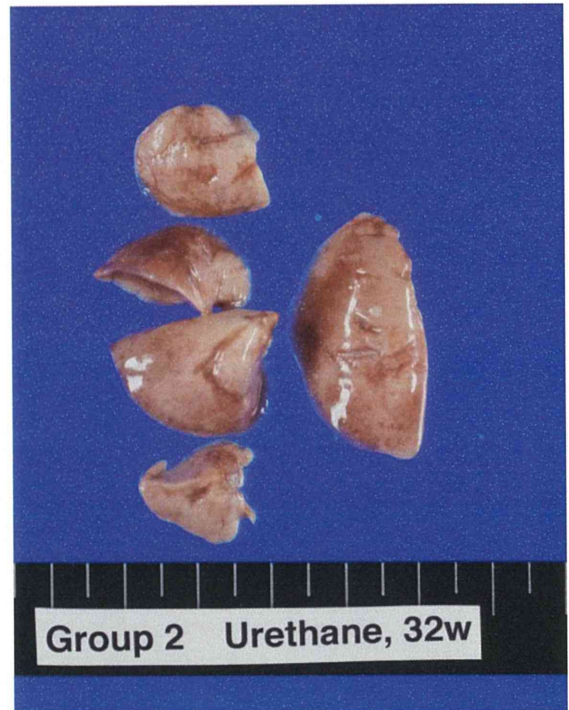
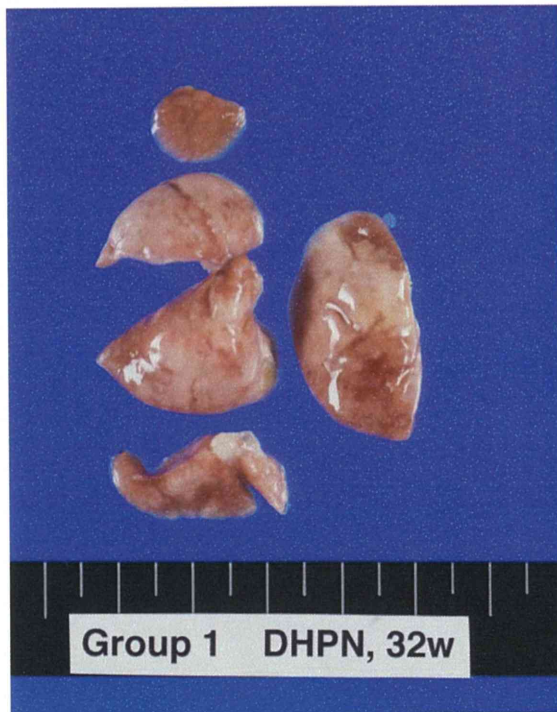
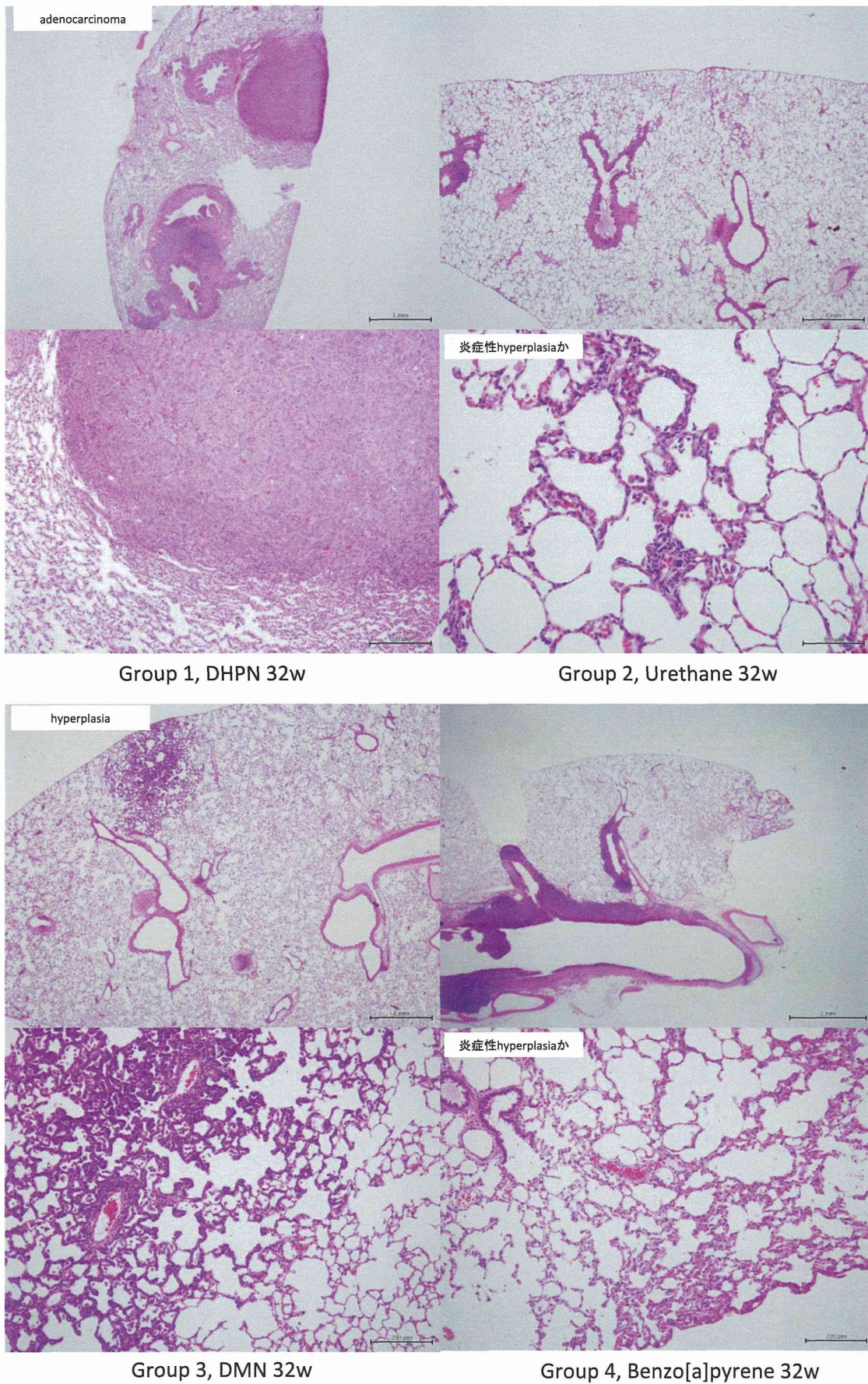




図 4、病理組織学的肺所見 (32 週)



化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究

分担研究者 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 研究員

研究要旨

前立腺発がんリスク評価のための短・中期発がんモデル樹立を目的にラットを用いて検討した。我々は以前に、前立腺発がん物質である PhIP, DMAB を投与したラットにおいて、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 発現が有意に上昇することを見いだした。一昨年と昨年度に渡り、前立腺発がん物質あるいは前立腺以外に標的性を示す発がん物質をラットに投与し、前立腺および他の臓器における発がん性の臓器特異性について、それぞれの臓器における $\gamma$ -H2AX, HMGB2, Ki-67 標識率を検討し、HMGB2, Ki-67 については、発がん標的臓器において有意な上昇を認め、前立腺を含む臓器特異的な発がん指標となり得ることを示した。今年度は、初期だけでなく腫瘍形成後の発がん後期においても発現が存在するかを検討した結果、PhIP および DMAB により発生した腫瘍で、HMGB2, Ki-67 標識率が周囲正常上皮よりも有意に高いことを示した。また、ヒト前立腺癌においても、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2, Ki-67 標識率の有意な上昇を確認した。一方、毒性や発がん性評価において経口投与が一般的であり、動物モデル開発には経口投与での評価が重要となる。今回用いている前立腺発癌物質 DMAB および MNU は別経路で投与されており、経口投与にした場合にも、発がん性が検出可能であるかを検討した。結果、一部標識率の差があるものの、全体としては投与方法の差よりもそれぞれの化学物質に特異的な標識率を示し、被験物質が経口投与で行った場合でも問題ないことを示した。

A. 研究目的

前立腺癌は世界的に男性癌の中で4番目に多い腫瘍で、日本でも2020年には肺癌について2番目の罹患率になると予測されており、増加率が一番高いがんである。前立腺がんの原因については未だ不明な点が多いが、食事要因がその発症に深く関与していることが示唆されている。前立腺がんの発症を予防するにはその発がん因子を同定して、それらの摂取を極力抑える事が重要であると考えられ、環境中の発がん因子を同定するための短・中期発がんモデルが必要である。

発がんモデルではがん、あるいは前がん病変を指標にする事が一般的であるが、ラットの前立腺がんモデルでは前がん病変を惹起するには30-40週、がんでは50-60週必要であり、多数の被検物質をスクリーニングするには効率的ではない。そこで、これらの病変を代替する分子・遺伝子群を抽出・同定し、これらを指標にした前立腺発がんモデルの樹立を試みた。

我々は一昨年度に、前立腺発がん物質である 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) および 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) で、発現上昇を認めた3つの遺伝子、リン酸化ヒストンH2AX ( $\gamma$ -H2AX)、High mobility group box 2 (HMGB2) および Ki-67 について、前立腺発がん物質に対する特異性を検討した

結果、HMGB2 および Ki-67 で比較的良好な結果が得られた。一方、 $\gamma$ -H2AX は標識率が0.02%と低いこともあり、解析範囲による値の変動が大きくなる恐れがあり、検出マーカーとして使用するには不相当である可能性が示唆された。

また、昨年度は上記の前立腺組織において発がん物質検出マーカーとして有益な遺伝子が他の臓器においても同様に用いることが可能であるかを、肝、腎および大腸組織において検討した結果、HMGB2 および Ki-67 標識率は肝、腎組織において比較的有益な結果を得た一方で、 $\gamma$ -H2AX 標識率は対照群で低いこともあり、有意な結果は少なかった。大腸組織においては、HMGB2 が対照群で標識率95%と高く使用困難で、Ki-67 および  $\gamma$ -H2AX いずれも他臓器に比べ良好な結果を得られなかった。

今年度は、これら3つの遺伝子発現について腫瘍性病変が形成された時期においても、上昇しているかをラット及びヒト前立腺腫瘍組織を用いて検討した。また、種々の化学物質の毒性変化を検討する場合、飲水、摂餌および胃内強制投与など、経口投与が主体であるが、DMAB や N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) については、それぞれ皮下や腹腔内投与による発がん試験が主体であり投与方法によっては、発がん性が確認出来ない可能性がある。そこで、等しい用量を別の経路で投与した際に、前立腺発癌に対する上記3つの遺伝



子の発現が同等であるかを検討した。

## B. 研究方法

6週齢 F344 雄ラットに、PhIP 100 mg/kg で週 2 回強制胃内投与を 10 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腫瘍において認められた腫瘍病変、6 週齢 F344 雄ラットに、DMAB 50 mg/kg で皮下に 2 週間に 1 回を 20 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腫瘍において認められた腫瘍病変およびヒト前立腺癌を含む前立腺組織について、免疫組織染色を行い、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

6 週齢 F344 雄ラットに、前立腺発がん物質である DMAB、MNU、前立腺以外の臓器に対する発がん物質として Dimethylnitrosamine (DMN) (標的臓器：肝、腎)、1,2-Dimethylhydrazine (DMH) (標的臓器：大腸) を単回投与した。投与経路は、それぞれ皮下投与 (DMAB, DMH) もしくは腹腔内投与 (MNU, DMN) とともに、すべての物質に対して胃内強制投与を用いた。投与 2 日後に前立腺、肝、腎、大腸を摘出し、ホルマリン固定および一部は凍結組織を採取した。免疫組織染色を行い、 $\gamma$ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。また、ヒト前立腺組織については、名古屋市立大学大学院医学研究科「ヒト遺伝子解析研究倫理審査委員会」で承認された症例を用いて検討し、個人情報保護についても十分に配慮した。

## C. 研究結果

PhIP および DMAB 誘発の前立腺腫瘍性病変において、HMGB2 および Ki-67 標識率は周囲正常前立腺上皮に比べ、有意に上昇した。一方、 $\gamma$ -H2AX 標識率は染色性に問題があり、正常上皮及び腫瘍性病変において差が見られなかった。ヒト前立腺組織においては、正常前立腺上皮に比べ、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 標識率いずれも腺癌で有意な上昇を認めるとともに、組織形態の指標である Gleason grade の上昇に比例して、各標識率の有意な上昇を確認した。

投与経路の違いによる各標識率の違いを検討した結果、一部で異なる標識率が存在するものの、総じて DMAB および MNU 投与による有意な上昇を投与経路に関わらず、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 いずれにおいても認められた。ただし、今回の結果では、Ki-67 標識率が他の 2 つに比べ有意差が乏しい結果だった。一方で、前立腺に標的性のない発がん物質 DMN、DMH いずれも投与方法にかかわらず、

対照群とほぼ同様の標識率だった。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

外国語論文

- 1) Sato, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Komiya, M., Long, N., Kato, H., Sagawa, H., Yamashita, Y., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol*, 27: 43-49, 2014.
- 2) Nakasuka, K., Ito, S., Miyata, K., Inomata, M., Yoshida, T., Tamai, N., Suzuki, S., Murakami, Y., Sato, K., Suzuki, S., Eishi, Y., Morimoto, S.: A case of idiopathic giant cell myocarditis with a past history of sarcoidosis. *J Card Cases*, 9: 35-39, 2014.
- 3) Dodmane, PR., Arnold, LL., Muirhead, DE., Suzuki, S., Yokohira, M., Pennington, KL., Dave, BJ., Lu, X., Le, XC., Cohen, SM.: Characterization of intracellular inclusions in the urothelium of mice exposed to inorganic arsenic. *Toxicol Sci*, 137: 36-46, 2014.
- 4) Oomura, M., Sakakibara, N., Suzuki, S., Wakita, A., Mori, Y., Kamimoto, K.: Intravascular lymphomatosis mimicking primary central nervous system lymphoma: A case report and literature review. *Case Rep Neurol*, 6: 101-108, 2014.
- 5) Arnold, LL., Suzuki, S., Yokohira, M., Kakiuchi-Kiyota, S., Pennington, KL., Cohen SM.: Time course of urothelial changes in rats and mice orally administered arsenite. *Toxicol Pathol*, 42: 855-862, 2014.
- 6) Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Kawai, N., Tozawa, K., Etani, T., Sato, S., Suzuki, S., Shirai, T., Kohri, K., Takahashi, S.: GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*, 35: 1962-1967, 2014.
- 7) Hachiya, K., Wakami, K., Tani, T., Yoshida, A., Suzuki, S., Suda, H., Ohte, N.: Double-valve replacement for mitral and aortic regurgitation in a patient with Libman-Sacks endocarditis. *Intern Med*, 53: 1769-1773, 2014.
- 8) Arima, H., Hirate, H., Sugiura, T., Suzuki, S., Takahashi, S., Sobue, K.: IV injection of polystyrene beads for mouse model of sepsis causes severe glomerular injury. *J Intensive*

Care, 2: 21, 2014.

- 9) Yamashita, Y., Nagasaka, T., Naiki-Ito, A., Sato, S., Suzuki, S., Toyokuni, S., Ito, M., Takahashi, S.: Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. Mod Pathol, 28: 111-117, 2015.
- 10) Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kuno, T., Punfa, W., Long, N., Kato, H., Inaguma, S., Komiya, M., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. J Toxicol Pathol, 28: 21-26, 2015.
- 11) 佐藤慎哉、鈴木周五、内木綾、白井智之、高橋智：前立腺癌に対する HDAC 阻害剤の予防および治療効果の検討. 泌尿器外科, 27 巻 8 号: 1217-1219, 2014.
- 12) 佐藤慎哉、内木綾、鈴木周五、高橋智：肝癌の危険因子と発癌機序. その他の化学物質発がん (アフラトキシン、ニトロソ化合物など). 日本臨床, 73 (増刊号 1) : 142-146, 2015.

## 2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月、広島.

- 2) 佐藤慎哉、鈴木周五、他、選択的 HDAC 阻害剤による前立腺癌増殖抑制効果の検討、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月、広島.
- 3) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月、横浜.
- 4) 鈴木周五、他、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2014 年 1 月、東京.
- 5) Suzuki, S. et al., Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis, SOT Annual Meeting, 2014 年 3 月、San Diego.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。



研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長  
研究協力者 豊田 武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

## 研究要旨

本研究は、短・中期に膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を検出できる指標の探索を目的としている。昨年度までに、DNA 二重鎖切断のマーカーである  $\gamma$ H2AX が、膀胱に対する遺伝毒性/発がん性の指標として利用し得る可能性が示唆された。平成 26 年度は、 $\gamma$ H2AX のマーカーとしての特異性を詳細に検討するため、前年度までの実験結果の定量的解析を行うとともに、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質を加えた追加の動物実験を実施した。6 週齢の雄 F344 ラット各群 10 匹に、0.025% 2-acetylaminofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.02%/0.01% dimethylarsinic acid (DMA)、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN) および 0.005% acrylamie (AA) を 4 週間飲水 (2-AAF/*p*-cresidine のみ混餌) 投与し、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖し、膀胱上皮での  $\gamma$ H2AX 発現を免疫組織化学的に検索した。4 週時点において、遺伝毒性膀胱発がん物質を投与した 4 群 (*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine;BBN, 2-nitroanisole;2-NA, 2-AAF, *p*-cresidine) すべてで  $\gamma$ H2AX 陽性細胞は有意に増加した。一方、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質では、3 群 (glycidol, DEN, AA) とともに  $\gamma$ H2AX 発現は変化しなかった。2 週間の休薬後、全群で  $\gamma$ H2AX 発現は減少したが、BBN, 2-NA, 2-AAF 群では対照群よりも有意に高い発現レベルを維持していた。以上の結果から、 $\gamma$ H2AX 免疫染色によって、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間 (4 週間) の投与で検出し得ることが示唆された。

## A. 研究目的

近年、発がん過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識されている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種である H2AX が速やかにリン酸化され、 $\gamma$ H2AX を形成する。がん化における  $\gamma$ H2AX の役割には不明な点が多く、中でも膀胱がんとの関連についての研究は非常に少ない。

本研究は、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を短・中期に検出できる指標の探索を目的としている。昨年度までに、遺伝毒性膀胱発がん物質 (BBN/2-NA) あるいは非遺伝毒性膀胱発がん物質 (メラミン/ウラシル) 等を投与したラット膀胱における  $\gamma$ H2AX 発現を、免疫組織化学的に検討した。その結果、BBN および 2-NA を 4 週間投与したラット膀胱上皮細胞には、 $\gamma$ H2AX の発現が高頻度に認められた一方、対照群にはほとんど観察されなかった。2 週間の休薬後、すべての群で  $\gamma$ H2AX 陽性細胞は減少したが、BBN および 2-NA 群では一定数の残存が認められた。以上の結果から、 $\gamma$ H2AX は膀胱に対する遺伝毒性/発がん性の指標として利用し得る可能性が示唆された。

平成 26 年度は、膀胱に対する遺伝毒性/発がん性検出指標としての  $\gamma$ H2AX の特異性を詳細に検討するため、前年度までの実験結果の定量的解析とともに、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質を加えた追加の動物実験を実施し、膀胱上皮細胞における  $\gamma$ H2AX および細

胞増殖マーカーとして Ki67 の発現を免疫組織化学的に検索した。

## B. 研究方法

6 週齢の雄 F344 ラットに、実験 1 (前年度までに実施) として 0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、2% 2,2-bis (bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3%メラミンおよび 3%ウラシルを、また実験 2 (今年度実施) として 0.025% 2-acetylaminofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.02% dimethylarsinic acid (DMA)、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN) および 0.005% acrylamie (AA) を 4 週間混餌 (BBN, DMA, glycidol, DEN, AA は飲水) 投与した。DMA 群において、投与 3 週目に毒性によると思われる死亡例が認められたため、最終週の投与濃度を 0.01%に変更した。各群 10 匹を用い、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮での  $\gamma$ H2AX および Ki67 の発現を免疫組織化学的に検索した。各個体あたり最低 3,000 個の膀胱上皮細胞を測定し、1,000 個あたりの  $\gamma$ H2AX/Ki67 陽性細胞数を算出した。さらに、cell population の解析として、基底層 (basal cell)、中間層 (intermediate cell) および表層 (umbrella cell) ごとの  $\gamma$ H2AX/Ki67 陽性細胞の割合についても併せて計測した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

### C. 研究結果

$\gamma$ H2AX は膀胱上皮細胞の核内にドット状の foci として観察された (図 1)。4 週間の投与終了時点において、膀胱上皮での  $\gamma$ H2AX 陽性細胞は対照群 (1,000 細胞あたり  $0.9 \pm 0.6$  個) と比較し、遺伝毒性膀胱発がん物質 (BBN, 2-NA, 2-AAF, *p*-cresidine) を投与した 4 群ではいずれも有意に増加した ( $49 \pm 11 \sim 111 \pm 37$ ) (図 2)。一方、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質 (glycidol, DEN, AA) では、3 群ともに  $\gamma$ H2AX 発現の変化は認められなかった ( $0.7 \pm 0.4 \sim 2.2 \pm 2.0$ )。2 週間の休薬後、すべての群で  $\gamma$ H2AX 発現は減少したが、遺伝毒性膀胱発がん物質のうち 3 種 (BBN, 2-NA, 2-AAF) の投与群では、対照群よりも有意に高い発現レベルを維持していた。Ki67 発現は遺伝毒性膀胱発がん物質を投与した 4 群、および PEITC (過形成誘発、遺伝毒性±)、メラミン/ウラシル (非遺伝毒性膀胱発がん物質) の 3 群で増加し、休薬後にはすべての群で対照群と同じレベルにまで低下した (図 3)。

cell population の解析では、4 週時点での  $\gamma$ H2AX/Ki67 陽性細胞はほとんどの群で basal cell の割合が高かったが、PEITC および BMP/DMA 群ではそれぞれ intermediate cell と umbrella cell の割合が高かった (図 4 および図 5)。休薬後、basal cell が減少し、intermediate/umbrella cell が増加する傾向が認められた。

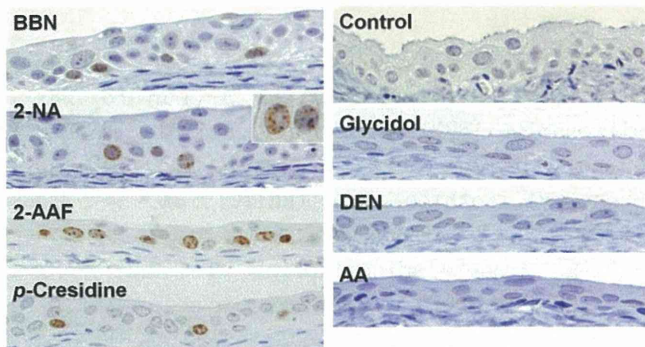


図 1. ラット膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ H2AX 発現

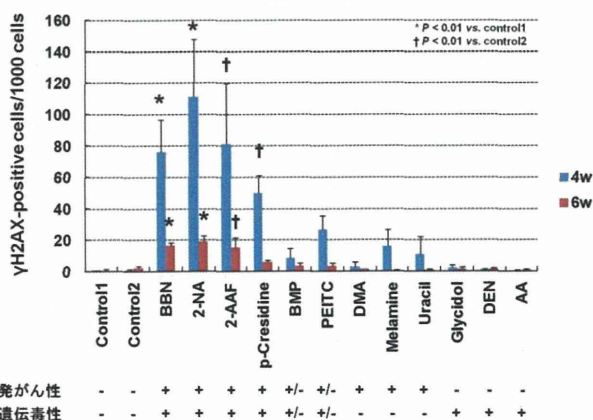


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ H2AX 陽性細胞

胞の定量解析

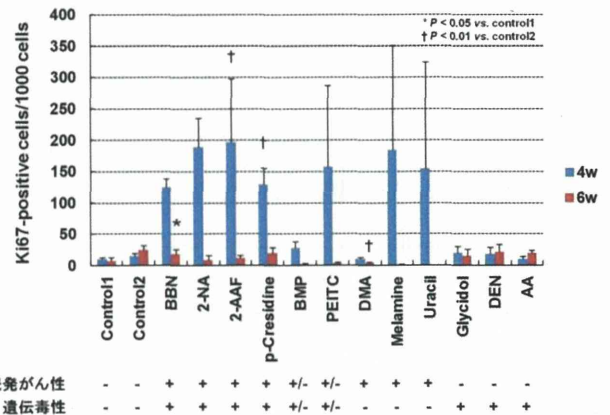


図 3. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析

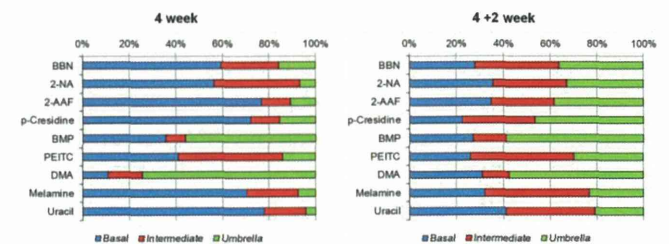


図 4.  $\gamma$ H2AX 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合

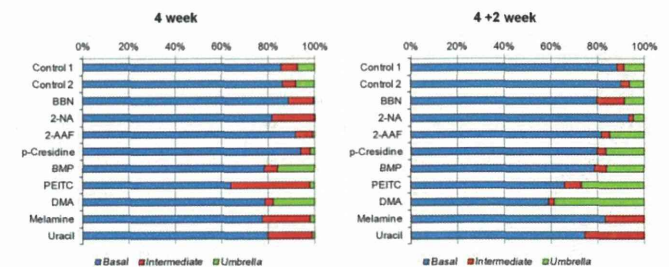


図 5. Ki67 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合

### D. 考察

ラット膀胱粘膜における  $\gamma$ H2AX 発現は遺伝毒性膀胱発がん物質 (BBN, 2-NA, 2-AAF, *p*-cresidine) の投与で有意に増加した一方、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質 (glycidol, DEN, AA) では変動がみられなかった。これらの結果から、 $\gamma$ H2AX は膀胱に対する遺伝毒性発がん物質の早期検出指標として有効である可能性が示唆された。

$\gamma$ H2AX 発現は 2 週間の休薬後にほとんどの群で減少し、DNA 修復の進行、またはアポトーシスによる除去が考えられた。陽性細胞の主体は intermediate/umbrella cell へとシフトし、basal cell の DNA 修復能が比較的高いか、損傷を残したまま分化を続けている可能性がある。

BBN/2-NA/2-AAF は休薬後も有意に高い  $\gamma$ H2AX 発現を維持していた。BBN と 2-NA は比較的短期間の投与で発がんに至ることから、休薬後に残存した DNA 損傷が後の発がんに寄与している可能性がある。*p*-cresidine



の2年間がん原性試験では、最初の膀胱腫瘍が検出されるまで51週を要しており、*p*-cresidineによる膀胱発がんには長期間の継続的な曝露が重要であるかもしれない。

BMP/DMA 群では、 $\gamma$ H2AX/Ki67 陽性細胞におけるumbrella cellの割合が高い傾向がみられた。両物質とも、発がん機序として酸化ストレスを介したDNA損傷が示唆されている。今回の結果は、BMP/DMAが誘導する早期の酸化ストレスに対し、umbrella cellの感受性が比較的高い可能性を示している。

PEITCは細胞内での活性酸素種の誘導を通じた、がん細胞の増殖抑制効果が期待されている一方、膀胱に対しては過形成を誘発し、長期投与では発がんにも至ることが報告されている。PEITC群の $\gamma$ H2AX/Ki67発現はintermediate cellに多く認められた。BMP/DMAとの異なる感受性については、過形成の存在が関与している可能性があるが、より詳細な検討が必要である。

メラミン/ウラシルは膀胱結石の物理的刺激による発がん機序で知られている。4週時には全例に結石の形成と過形成が認められ、Ki67発現はび漫性に増加した。一方、 $\gamma$ H2AX陽性細胞の分布は散発的で、局所における炎症や増殖活性の亢進を反映していると考えられた。

## E. 結論

本研究の結果から、 $\gamma$ H2AX免疫染色によって、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間(4週間)の投与で検出し得る可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 74: 68-75, 2014
- 2) Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Nishikawa A, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. *J Toxicol Sci*, 39: 109-119, 2014
- 3) Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Absence of *in vivo* genotoxicity of

3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4 week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Mutagenesis*, 29: 295-302, 2014

4) Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Absence of *in vivo* genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4 week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Mutagenesis*, 29: 295-302, 2014

5) Akagi J, Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Validation study of the combined repeated-dose toxicity and genotoxicity assay using *gpt* delta rats. *Cancer Sci*, in press

## 2. 学会発表

- 1) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、小川久美子. ラット膀胱に対する遺伝毒性および発がん性評価指標としての $\gamma$ H2AX. 第31回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2015年1月30日
- 2) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、小川久美子. ラット膀胱に対する遺伝毒性発がん物質検出指標としての $\gamma$ H2AX発現. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月26日
- 3) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、鈴木勇、平田直、小川久美子. ラット膀胱上皮細胞における $\gamma$ H2AX発現の検討. 第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月4日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野 ユニット長

### 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法 (DNA アダクトーム法) の構築に取り組んできた。これまでに、分析手法の構築や付加体同定に用いるデータベースの構築等を行い、ジクロロメタン及びジクロロプロパンの遺伝毒性評価を *in vivo* モデルを用いて行った。本研究では、非遺伝毒性発がん物質である 1,4-ジオキサン<sup>1</sup> の遺伝毒性の評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、LC-MS を用いたアダクトーム解析 (付加体の網羅的解析) により検討した。

1,4-ジオキサンはラットに肝臓がんを誘発することが知られている非遺伝毒性発がん物質であり、その発がんメカニズムについては未だ良くわかっていない。本研究では、1,4-ジオキサンをラットに投与し、肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。1,4-ジオキサンを 0, 20, 200 及び 5000 ppm の濃度で飲水投与した後、肝臓における DNA 付加体を質量分析機器を用いて解析した。その結果、1,4-ジオキサン投与により、付加体の総数は増加する傾向が観察されたが、必ずしも 1,4-ジオキサンの濃度とは相関しなかった。付加体の網羅解析により得られたデータの生物統計解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類されることがわかった。また、1,4-ジオキサンの投与に相関する付加体として、酸化ストレスや炎症由来の DNA 付加体を含む幾つかがスクリーニングされた。

### A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験 (変異原性試験)、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験 (染色体異常試験) などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考え。これまで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法 (アダクトーム法) を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめてきた。また、昨年度は確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、ヒトが曝露しうる化学物質が誘発する DNA 損傷性の評価ならびに新規 DNA 付加体の解析を行なった。今年度は、非遺伝毒性発がん物質のリスク評価をラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、DNA アダクトーム法で行う事の妥当性について検討した。

1,4-ジオキサンはラットに肝臓がんを誘発することが知られている非遺伝毒性発がん物質であり、その発がんメカニズムについては炎症が関与する事が示唆されているものの、未だ良くわかっていない。

本研究では、1,4-ジオキサンをラットに投与し、発がん標的臓器である肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。

### B. 研究方法

1,4-ジオキサンを 0, 20, 200 及び 5000 ppm の濃度で、雄性 F344 ラット (各群それぞれ 5 匹) に 16 週間飲水投与した後、肝臓を摘出し、DNA を抽出した。各種ヌクレアーゼにより DNA をモノヌクレオシドに分解し、DNA 付加体を質量分析機器を用いて解析した。得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、ジオキサン投与に相関する付加体の抽出を実施した。抽出した DNA 付加体の同定は、独自に構築した DNA 付加体データベースとの比較により行った。抽出した付加体の各サンプル中の存在量は、定量分析用の質量分析機器 (Waters Quattro Pt LC-MS/MS) により分析した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

### C. 研究結果

1,4-ジオキサンを投与したマウス肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった結果を図 1 に示す。溶媒対象と比較し、1,4-ジオキサン投与により、付加体の総数は増加する傾向が観察されたが、必ずしも 1,4-ジオキサンの濃度とは相関しなかった。更に、主成分 (PCA) 解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類され、1,4-ジオキサン投与に相関する付加体として、複数個の付加体が抽出された (図 2 及び 3)。このうち、1,4-ジオキサン



5000ppm投与群からは6つの特異的な付加体が検出された。検出された特異的な付加体の $m/z$ 値および溶出時間をDNA付加体データベースと比較した結果、炎症及び酸化ストレス由来の付加体であることが示唆された(表1)。

#### D. 考察

1,4-ジオキサンを投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、1,4-ジオキサン投与に相関するものとして、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よって1,4-ジオキサン投与により、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質1,4-ジオキサンの発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後、本解析で抽出された1,4-ジオキサンに相関する付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう事が必要である。更に、アダクトーム法の他の遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質のリスク評価への応用についても検討を行なう。

図1 1,4-ジオキサン投与群及びコントロール群のDNA付加体マップ

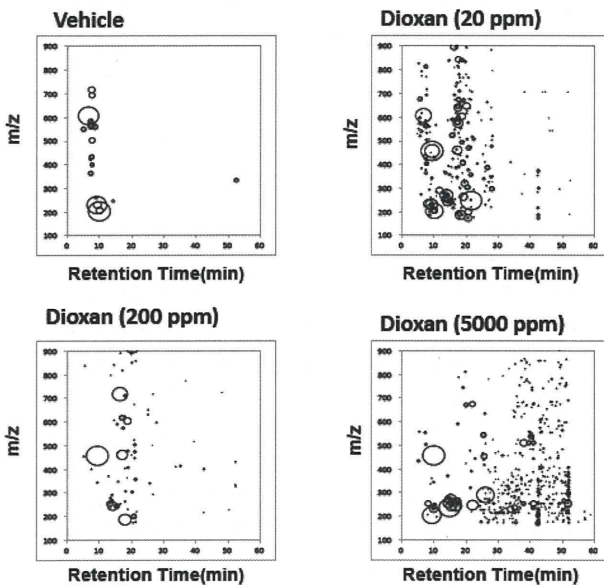


図2 PCA解析の結果

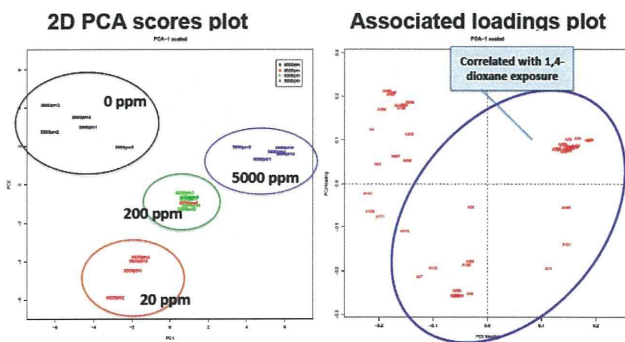


図3 PCA解析により抽出された付加体のヒートマップ

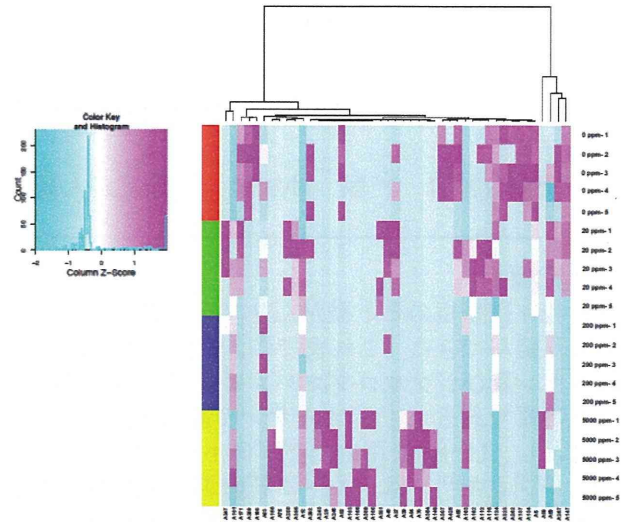


表1

Adducts	M/Z [M+H]	Comparing with DNA adduct database [M+H]	Derivation
A37	508.656	d(G[8-3]T), d(G[8-5m]T) [508.1792]	Oxidation (Cross-link)
A155	301.212	8-oxo-dG [301.1295 (+NH <sub>3</sub> )], propano-dC [301.1547 (+NH <sub>3</sub> )], Unknown adduct in model reaction [301.1379 (+NH <sub>3</sub> )], Oxidized Linoleic acid, [301.1279 (+NH <sub>3</sub> )], NH <sub>4</sub> Br, [301.1579 (+NH <sub>3</sub> )], MNU, [301.1789 (+NH <sub>3</sub> )], MNU]	Oxidation (ROS), acrolein, Alkylation
A183	273.129	Unknown adduct in model reaction [273.1459 (+NH <sub>3</sub> )], NaNO <sub>2</sub> ,	Inftammation
A243	339.142	Unknown adduct in model reaction [339.1348 (+Na), Oxidized arachidonic acid], [339.2148 (+Na), NaNO <sub>2</sub> ]	Inftammation
A354	674.728	Unknown adduct	-
A389	257.14	FodU [257.0773], O <sup>6</sup> -MedT [257.1137], Unknown adduct in model reaction [257.126, MNU], [257.1583 (+K), Oxidized DNA], [257.1379 (+NH <sub>3</sub> )], NH <sub>4</sub> Br]	Oxidation, Alkylation

#### E. 結論

1,4-ジオキサンをラットに投与し、肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。その結果、1,4-ジオキサン投与により、付加体の総数は増加する傾向が観察された。付加体の網羅解析により得られたデータの生物統計解析を行なったところ、1,4-ジオキサンの投与に相関する付加体として、酸化ストレスや炎症由来のDNA付加体を含む幾つかがスクリーニングされた。これらの結果から、1,4-ジオキサン投与により、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質1,4-ジオキサンの発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後は、本解析で抽出された1,4-ジオキサンに相関する付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性につい

でも検討を行なう事が必要である。更に、アダクトーム法の他の遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質のリスク評価への応用についても検討を行なう事が必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H. In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan. *Mutat Res.* 2014, 760:48-55.
2. Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. *Nanomaterials*, 2014, 4: 175-188.
3. Kochi T, Shimizu M, Totsuka Y, Shirakami Y, Nakanishi T, Watanabe T, Tanaka T, Nakagama H, Wakabayashi K, Moriwaki H. A novel aromatic mutagen, 5-amino-6-hydroxy-8*H*-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ), induces colonic preneoplastic lesions in mice. *Toxicology Reports* 2014, 1: 69-73.
4. Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H. Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med.* 2014, 75: 136-146.

### 2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里、中釜 斉、質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析により発がんに関わる DNA 付加体を探索する Exploration of DNA adducts contributing to cancer development using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 41 回毒性病理大会. 2014 年 7 月

2. 後藤正憲、戸塚ゆ加里、土原一哉、三牧幸代、尾島英知、柴田龍弘、落合淳志、中釜 斉 Analyses of genotoxicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane, being responsible for occupational bile duct cancer, 日本癌学会第 73 回大会. 2014 年 9 月
3. 椎崎 一宏、後藤 正憲、荒井 康仁、濱 奈津子、柴田 龍弘、中釜 斉、戸塚 ゆ加里, Identification of the location of DNA adducts within the genome, 日本癌学会第 73 回大会. 2014 年 9 月
4. 池田 茜、加藤 護、柴田龍弘、黒坂 功、林 櫻松、松島芳隆、遠藤 治、中釜 斉、戸塚ゆ加里、中国における食道癌発症要因の集学的アプローチによる解明、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
5. 後藤正憲、三牧幸代、久保正二、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里、職業性胆管癌及びジクロロプロパン曝露細胞の塩基置換シグネチャー解析、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
6. 椎崎 一宏、後藤 正憲、濱 奈津子、荒井 康仁、柴田 龍弘、中釜 斉、戸塚 ゆ加里、ゲノム中の DNA 修飾の単分子検出方法の検討、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
7. 秋元峻太郎、加藤 護、柴田龍弘、遠藤 治、魏 民、中釜 斉、鰐淵英機、福島昭治、戸塚ゆ加里、非遺伝毒性発がん物質、1,4-ジオキサン投与ラット肝臓における DNA 付加体の網羅解析、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書  
ヒストン修飾を指標とした *in vitro* 発がんリスク評価系の開発

研究分担者 伊吹 裕子 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科 教授

### 研究要旨

本研究ではヒストンの化学修飾に焦点をあてた新規 *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、最終的に本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系との対比検討を行うことにより、その有用性を確認することを目標としている。これまでに、中・短期動物発がん実験系において、各組織でヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) の検出が可能であることが示されている。これを発がんリスク評価系としてさらに推し進めるために、本年度は、 $\gamma$ -H2AX 検出における偽陽性検出の可能性を評価した。ヒト培養細胞を、界面活性剤処理、pH 変化、熱処理など、様々な条件で培養した。その結果、 $\gamma$ -H2AX は、DNA 損傷を誘導しない特定の界面活性剤で顕著に誘導されること、pH を酸性に傾けると誘導されることが判明した。また、細胞がアポトーシスを誘導した際も顕著なリン酸化が認められた。 $\gamma$ -H2AX は、高感度な DNA 損傷マーカーとして、化学物質による DNA 損傷性評価に使用されるが、これら DNA 損傷以外のいくつかの要因においても誘導されることも認識して  $\gamma$ -H2AX の誘導を評価する必要があることが示された。

### A. 研究目的

本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系において、化学物質を作用した動物の各組織でヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) の検出が可能であることが示されている。 $\gamma$ -H2AX は高感度な DNA 損傷マーカーであることは *in vitro* の実験で証明されているが、*in vivo* において  $\gamma$ -H2AX の検出を発がんリスクマーカーとして推し進めるためには、本来の化学物質による DNA 損傷を原因とする  $\gamma$ -H2AX の誘導と、偽陽性を含めたそれ以外の原因による誘導を区別して評価できるようにする必要がある。本年度は、DNA 損傷を原因としない  $\gamma$ -H2AX の誘導、並びに偽陽性検出の可能性について検討し、 $\gamma$ -H2AX の発がんリスクマーカーとしての評価とその注意事項について明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

ヒト培養細胞株 (A549 肺上皮細胞) に界面活性剤作用、熱ショック処理、pH 変化などを行い、一定時間で培養した後、Western blotting 及び免疫染色法により、 $\gamma$ -H2AX 誘導変化を解析した。

Western blotting: 細胞を回収後、ヒストンを抽出、12.5% ゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。1% skim milk/T-PBS 溶液で 1/2800 希釈した一次抗体 Rabbit anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG antibody (Merck Millipore. Co., USA)、二次抗体 Rabbit anti-IgG-HRP (Jackson Immuno Research Lab., USA) を反応後、ECL+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて検出した。

免疫染色法: 35mm ガラス底ディッシュに細胞を播種し、培養後、各種化学物質等を作用した。6%ホルマリンで固定、2% Triton X-100 で透過処理した後、

一次抗体 Mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG, (Millipore. Co., USA)、二次抗体 FITC conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., USA) をいずれも 1/200 希釈して使用した。蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus Co., Japan)、Axio vision Ver.2.05 (Carl Zeiss Co. Ltd., Germany) で撮影を行った。画像解析には Image J 1.46 (Broken Symmetry Software, USA) を使用した。

### C. 研究結果

過剰量の化学物質や熱など作用後、アポトーシスが誘導されると、顕著な  $\gamma$ -H2AX の誘導が認められた。免疫染色では、アポトーシスに移行すると考えられる細胞は、DNA 損傷に基づくリン酸化パターンとは明らかな違いを示した (Fig. 1)。

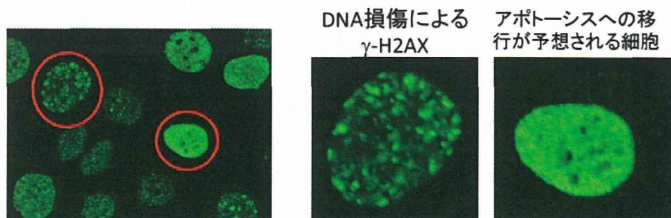


Fig. 1 アポトーシスによる  $\gamma$ -H2AX の誘導

DNA 損傷能を有しないとされる化学物質作用においても  $\gamma$ -H2AX の誘導が確認された。特に、界面活性剤によるリン酸化は顕著であった。Fig. 2 に各種界面活性剤による  $\gamma$ -H2AX の誘導を示す。Tween 20, Triton X, NP-40 いずれの界面活性剤においても、顕著な  $\gamma$ -H2AX の誘導が認められた。一方、同じ界面活性剤である SDS では、同様の  $\gamma$ -H2AX の誘導は認められなかった。

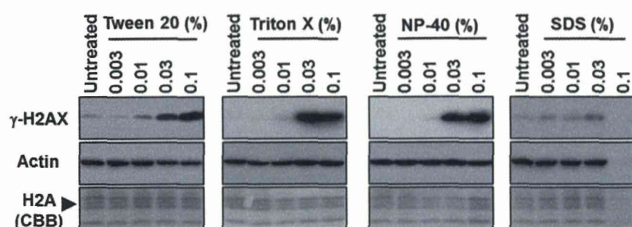


Fig. 2 各種界面活性剤による $\gamma$ -H2AXの誘導

また、 $\gamma$ -H2AXの誘導は、低pH処理においても誘導された。pHを4-5に調整すると、顕著な $\gamma$ -H2AXが認められたが、pHを高くした場合は誘導はわずかしか認められなかった (Fig. 3)。

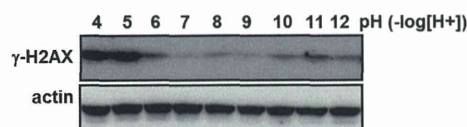


Fig. 3 pH変化による $\gamma$ -H2AXの誘導

#### D. 考察

$\gamma$ -H2AXの組織免疫染色の際、アポトーシスによるリン酸化と、DNA損傷やその他要因によるリン酸化を区別する必要があると考えられた。今回示した培養細胞の免疫染色のように、ヒストン染色パターンで区分ができるか否か、検討する必要がある。

また、DNA損傷能を有さないと報告されている化学物質においても顕著な $\gamma$ -H2AXが認められる場合があることが示された。界面活性剤は、遺伝毒性や発がんの報告は少なく、各種産業などで使用されている。Tween 20、Triton X、NP-40において、濃度依存的に $\gamma$ -H2AXが誘導されたのにもかかわらず、同じ界面活性剤であるSDSにおいて誘導されなかった理由については不明であるが、誘導メカニズムの解明においてヒントを与えるものとなると考えている。pHの変化による $\gamma$ -H2AX誘導についても同様に、その誘導メカニズムは不明である。

#### E. 結論

組織免疫染色におけるポジティブな $\gamma$ -H2AXのデータは、DNA損傷能を有する化学物質による作用以外に、幾つかの要因による誘導の可能性がある。組織免疫染色の際、それらを加味して、慎重に評価されるべきと考えられた。界面活性剤やpH変化により $\gamma$ -H2AXが誘導された機構については不明であり、今後解析していく予定である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- I. Yoshida and Y. Ibuki. Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. *Mutat. Res.-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 770, 9-18 (2014).
- T. Kubota, T. Toyooka, X. Zhao, Y. Ibuki. Phosphorylation of Histone H2AX Generated by Linear Alkylbenzene Sulfonates and its Suppression by UVB Exposure. *Photochem. Photobiol.* 90, 845-852 (2014).
- Y. Ibuki, T. Toyooka, X. Zhao, I. Yoshida. Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. *Carcinogenesis* 35(6), 1228-1237 (2014).

##### 2. 学会発表

- 伊吹裕子, 豊岡達士: 環境化学物質の光分解と遺伝毒性変化: リン酸化ヒストンH2AXを指標とした解析. 日本薬学会第134回年会 (熊本) 2014年3月
- Y. Ibuki, T. Toyooka, G. Yang, M. Matsushita: 17- $\beta$ -estradiol-induced hyperacetylation of histone H3 and change of sensitivity to UVB. The 11th Japan-China International Symposium on Health Sciences (Shizuoka) Nov. 2014.
- 楊光, 吉田唯真, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第27回変異原機構研究会 (愛知) 2014年6月.
- 伊吹裕子, Vivienne Reeve: 長波長紫外線UVA1によるヒストン修飾変化 第36回日本光医学・光生物学学会 (大阪) 2014年7月.
- 趙曉旭, 伊吹裕子: フローサイトメーターの側方散乱光とhistone H3リン酸化を指標とした銀ナノ粒子の生体影響評価手法の開発. 第43回日本環境変異原学会 (東京) 2014年12月.
- 楊光, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第43回日本環境変異原学会 (東京) 2014年12月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 特許取得  
なし
- 実用新案登録  
なし
- その他  
なし



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
塚本徹哉, 桐山諭 和, 立松 正衛	3. 胃癌ハイリス クの病理学的背景 - 発癌仮説, 前癌 病変, 前癌状態-	一瀬雅夫, 岡政志, 齋 藤博	胃癌リスクフ ァクターとリ スク診断 - とくにABC検 診の現状と問 題点の正しい 理解のために -	日本メデ ィカルセ ンター	東京	2014	29-37
Wei M, Xie Xiao-Li, Yamano S, Kakehashi A, Wanibuchi H	Isoleucine, leucine and their role in experimental models od bladder carcinogenesis.	Bendich, Adrianne	Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition	Humana Press		2015	253-260

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsukamoto, T., Tatematsu, M.	Role of Helicobacter pylori in Gastric Neoplasia.	Curr Infect Dis Rep	16	402	2014
Toyoda, T., Yamamoto, M., Takasu, S., Ogawa, K., Tatematsu, M., Tsukamoto, T..	Molecular mechanism of gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected rodent models.	Diseases	2	168-186	2014
Okochi-Takada, E., Hattori, N., Tsukamoto, T., Miyamoto, K., Ando, T., Ito, S., Yamamura, Y., Wakabayashi, M., Nobeyama, Y., Ushijima, T.	ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis.	Oncogene	33	2273-2278	2014
塚本徹哉, 桐山諭和, 柴田知行	【ヘリコバクター・ピロリ感染胃炎を診る、治す】 H. pylori胃炎除菌による胃内環境への影響 除菌による病理組織学的所見の変化.	臨床消化器内科	29	337-344	2014
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kakehashi A, Kato A, Ishii N, <u>Wei M</u> , Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H.	Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling.	PLoS One	9	e113610	2014
Kuwae Y, Kakehashi A, Wakakasa K, <u>Wei M</u> , Yamano S, Ishii N, Ohsawa M, Wanibuchi H.	Paraneoplastic Mucin-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.	Pancreas	44	106-115	2015
<u>Gi M</u> , 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	In press		2015
Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Niinomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K.	Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchioloalveolar hyperplasia in F344 rats.	Exp. Toxicol. Pathol.	65	925-932	2013
Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Niinomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K.	Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats.	J. Toxicol. Pathol.	27	175-182	2014
Toyoda T, Cho YM, Mizutani Y, Akagi J, <u>Ogawa K</u>	A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats	Food Chem Toxicol	74	68-75	2014