

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

総括研究者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

### 研究要旨

化学物質は毎年新規に開発され、その一部は Ames 試験等の変異原試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの安全性の確認が必要であるものの、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難であるため、本研究では発がん性を検証するために病理組織診断法を利用した短・中期のバイオアッセイ系の開発を目的とした。臓器により、免疫組織化学法を含む病理組織学的に、微小の腫瘍性病変を特定できる解析法の検討を始めた(大腸・肺臓・肝臓)。他の臓器でも *in vitro* 系との組み合わせによる DNA 損傷依存的ヒストン修飾酵素である  $\gamma$ -H2AX を予測マーカーとした早期病巣の特定とその特徴解析を検討した。加えて、分担者間での多施設共同として動物臓器供与のシステムの構築に関して検討するために、評価マニュアルを作成し、今後そのマニュアルの有用性を検証していく予定である。

### A. 研究目的

本研究では、短・中期発がん予測バイオアッセイ系の開発と検証が目的である。結果としてガイドライン提唱を目指している。既にヨーロッパ・ユーロ圏の諸国での研究施設では、特に化粧品関連物質に関しては、法的に動物実験系ができなくなるため、代替実験法の開発が急がれ、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞での方法論は、生体での変化を確認することは困難である。そのため、動物モデルでの評価法はいまだに必要不可欠と考えられるが、国際的に動物試験に対する 3R (代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は、動物系実験を肯定的に考える我々研究者も当然考慮すべきものである。このため、腫瘍形成を正確に判定し得る病理組織学的な評価を基とした各臓器別の発がん試験として短・中期でのバイオアッセイ系の開発はその一つの解決策と考えている。実際、ヒトの場合においても各臓器のがんの早期発見がその治療と予後に重要な関与があることは周知の事実であり、実際、ヒトのがんの診断に病理組織診断が利用されるようになった 150 年ほどの間に、生検標本での病理診断技術の発達は、内視鏡的にも病変を認めない場合でも、ランダム生検により、病理組織学的に異型細胞の存在は重要な診断価値があり、その後の精査の対象となっている。しかるに、未知物質の発がん性試験には長期動物実験による肉眼的な腫瘍形成を指標としており、その観察される腫瘍の病理組織学的な検索はあくまでも腫瘍組織を確定するためのものであった。しかし、動物実験においても従前より前がん病変として種々の早期に発現する病巣の研究がなされてきた。その多くの研究は腫瘍発生機序の視点でのものであり、微小な病理組織での判定はなされていなかった。このため、本研究では、前がん病変とされてきたもの

のうち、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものは、その肉眼的な腫瘍形成に関わらず、腫瘍として認められるものを指標とする試験法の開発を目指すことにした。

加えて、動物使用数を減少させるためには、臓器専門性を有する多施設間での動物の共有システムの検討を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1) 多施設共同システム構築

分担者ごとに動物実験の対象臓器以外の臓器に関して、他施設で研究対象にする臓器を一定の固定・保存状態をするための共通プロトコルを代表者がまとめることにした。

#### 2) 中・短期バイオアッセイ系

##### 胃

ヒト胃癌において、術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy, NAC)の有無、胃型・腸型形質発現と  $\gamma$ -H2AX の発現を検討した。胃癌ブロックより直径 8mm のパンチ生検用器具を用いがん部分を採取し、合計 18 個の 10x2 組織アレイを作製した。それらを用いて、遺伝子損傷および修復のマーカーとして、 $\gamma$ -H2AX、activation-induced cytidine deaminase (AID)、p53、ATM (ataxia telangiectasia mutated)、Mre11(meiotic recombination 11)、NBS1 (Nijmegen breakage syndrome)、胃型腸型マーカーとして、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、CDX2 の発現を検討した。MUC5AC あるいは MUC6 陽性の腫瘍を胃型、MUC2 あるいは CD10 陽性のものを腸型、胃型(G)および腸型(I)マーカーのいずれもが陽性のものを胃腸混合型(GI)、いずれのマーカーも陰性のものをヌル型

(N)と判定した。 $\gamma$ -H2AX に関しては、Allred scoring system により Proportion score (PS) : 0 (陰性) 1 ( $\leq 1\%$ ) 2 (1- 10%) 3 (11- 33%) 4 (34- 66%) 5 (67- 100%陽性); Intensity score (IS) : 0 (陰性) 1 (弱陽性) 2 (中等度陽性) 3 (強陽性) にスコアリングし、PS と IS の積 > 5 を陽性とし、統計学的に解析した。他のマーカーは 0~3 の 4 段階にスコアリングした。

#### 大腸

4 週齢の F344 ラットに対し、発癌剤 azoxymethane (AOM; 15 mg/kg 体重) を投与して、40 週時での大腸発癌を誘発された大腸腫瘍を用いて、その杯細胞形成に関係する遺伝子と考えられている Klf4 の mRNA 発現を検討し、前がん病変にみられる粘液涸渇病巣 (mucin-depleted foci; MDF) の特性を検討した。

#### 肝臓

動物は 10 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラット 12 匹を用いた。実験開始時より無処置群、92 ppm dimethylarsinic acid (DMA) 飲水投与群の各群 6 匹ずつの 2 群に分けて 13 週まで飼育し、剖検を行った。なお、DMA の 92 ppm は膀胱発がん性、肝発がん促進作用を示した用量である。得られた肝臓より genomic DNA を抽出し、突然変異を検出する *gpt* assay および欠失変異を検出する Spi<sup>-</sup> assay をそれぞれ行い、DMA の *in vivo* 変異原性の有無について評価を行った。さらに *gpt* assay では得られた変異体について、キャピラリーシーケンサーでレポーター遺伝子である *gpt* 遺伝子の変異を同定し、そのスペクトラム解析を行った。

#### 肺臓

8 週齢の F344 ラット 46 匹を 4 群に分け、それぞれ 1 群 : 12 匹、2 群 : 13 匹、3 群 : 12 匹、4 群 : 13 匹とした。実験開始の 0 週目から発がん物質を投与した。1 群には水道水を溶媒とした 0.1%DHPN をラットの自由に 2 週間飲水投与し、2 群には urethane を 1g/kg body weight の用量 (10ml 生理的食塩水に 1g urethane の濃度で溶解) で 1 週間おきに合計 10 回腹腔内投与した。3 群では、実験開始時に 30mg/kg body weight の用量 (10ml 生理的食塩水に 30mg DMN の濃度で溶解) で単回の腹腔内投与を行った。4 群には実験開始時に benzo[a]pyrene を 20mg/kg body weight の用量 (10ml 生理的食塩水に 1g benzo[a]pyrene の濃度で溶解) で単回の気管内投与を行った。

肺では、肺内へのホルマリン注入固定と肺重量測定した。肝、膀胱、前立腺、胃、大腸については、本研究班の臓器取り扱いマニュアルに従って処理を行い、それぞれを分担研究者に送付した。

#### 膀胱

6 週齢の雄 F344 ラットに、0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、2% 2,2-bis(bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3% melamine、または 3% uracil を 4 週間混餌 (BBN のみ飲水) 投与した。

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、尿路上皮における H2AX および Ki67 の発現を免疫組織化学的に解析した。さらに、0.025% 2-acetamidofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.02%/0.01% dimethylarsenic acid (DMA)、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN)、または 0.005% acrylamide (AA) の投与実験 (2-AAF、*p*-cresidine のみ混餌、他は飲水投与) を同様に実施した。

#### 前立腺

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腹葉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腹葉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、H2AX、HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

### 3) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

#### 網羅的な DNA 付加体解析法

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。また、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。

#### ヒストン修飾を指標とした解析法

各種培養細胞に化学物質などを作用後、一定時間後のヒストン修飾変化をウエスタンブロット法で検出した。本年度は、DNA 損傷マーカーとして知られる H2AX (Ser139) に焦点を絞り検討した。また、蛍光免疫染色により、リン酸化パターンを解析した。

#### (倫理面への配慮)

全ての分担者の動物施設におけるの規程に基づいて、実験計画の許可とともに、遺伝子を利用する場合はそれぞれの施設での組み換え DNA 実験委員会の許可を得、厳正に動物愛護と倫理面を配慮した実験を施行した。また、胃と前立腺の検討ではヒト検体を検討したが、いずれもインフォームド・コンセントの得られた症例を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

## C. 研究結果

### 1) 多施設共同システム構築

上記の動物系実験をしている施設での専門臓器に関するの摘出とその保存と前がん病変同定の方法

プロトコールを PDF としてまとめた。

実際、今年度、香川大から肺臓モデル実験系と国立衛研の膀胱モデルで得られた種々の臓器を、マニュアルに沿って保存、搬送を試みた。

なお、琉球大へのホルマリン保存大腸は航空便では既存の宅配便では輸送できないことが判明した。但し、船便では可能であった。

現在、各施設での専門臓器での解析を実施中である。

## 2) 中・短期バイオアッセイ系

### 胃

組織アレイを作製したヒト胃癌のうち、140 例の進行胃癌を対象とした。そのうち NAC を施行していない症例が 79 例、NAC をした症例が 52 例であった。残りは未確認のため除外した。NAC なし症例の H2AX 陽性/陰性例比は、G 3/8, GI 1/22, I 3/27, GI 3/27, N 2/13、NAC あり症例では、G 3/10, GI 0/18, I 4/12, N 1/4 であった。NAC の有無による有意な差は確認できなかったが、NAC あり症例で 11.4%、NAC なし症例で 15.4%が H2AX 陽性であることが明らかとなった。ATM、Mre11 は全体に発現量が多く、NBS は逆に全体に発現量が少なく有意な差は得られなかった。現在、腫瘍全体でなく、H2AX 陽性局在部位について胃型腸型形質、細胞増殖能等との相関性について、検索中である。

### 大腸

33 個の大腸腫瘍から抽出した mRNA において、KLF4 発現 (GAPDH 遺伝子発現との比) は平均 0.79 であり、周辺の正常大腸粘膜の比の平均 2.15 と比べると有意な減少を認めた。前がん病変としての変異陰窩巢 (ACF) や MDF での発現を今後検討している。

### 肝臓

*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性解析の結果、肝臓において DMA が変異体頻度の有意な変化を誘発しないことが明らかとなった。また、*gpt* 変異体についてスペクトラム解析を行った結果、無処置群と比較して DMA 投与群で有意な変異スペクトラムが認められなかった。

### 肺臓

現在、実験は 16 週の解剖を終え、32 週に向けて実験は進行中である 16 週目における摘出肺の肉眼所見は、3 群 (DMN) を除くすべての群で、肺表面が粗造な印象であった。また、1 群 (DHPN) 2 群 (urethane) 3 群 (DMN) のいずれも、肺表面に小結節が認められた。組織学的には hyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltration が見られた。2 群 (urethane) では明らかな上皮増殖性病変は見られなかった。

### 膀胱

遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN および 2-NA を 4 週間投与したラット膀胱上皮には、H2AX の発現が基底細胞 (basal cell) を中心に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。細胞 1000 個あたりの H2AX 陽性細胞数 ( $\pm$  SD) は、BBN 群  $76 \pm 21$  および 2-NA 群  $111 \pm 37$  で、

対照群  $0.8 \pm 0.6$  と比較して有意に高かった。BMP および PEITC (過形成誘発、遺伝毒性  $\pm$ ) 群では、

H2AX 発現はそれぞれ表層細胞 (superficial cell) と中間細胞 (intermediate cell) に多い傾向を示し、陽性細胞数は  $8.3 \pm 6.6$  ならびに  $26 \pm 9.0$  であった。非遺伝毒性の膀胱発がん物質である melamine および uracil 群には局所的に H2AX 発現を示す部位がみられたが、陽性細胞の割合は遺伝毒性発がん物質と比較して低かった。2 週間の休薬後、すべての群で H2AX 発現は減少したものの、BBN および 2-NA 群では比較的多くの残存が認められた。Ki67 発現は、4 週時には BMP 群以外の各群で上昇し、休薬後には BBN 群を除いて対照群とほぼ同じレベルにまで低下した。現在、DEN および AA など膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質についても同様の解析を実施しており、H2AX による評価の臓器特異性を検証する予定である。

### 前立腺

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、 $\square$ -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、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。

## 3) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

### 網羅的な DNA 付加体解析法

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。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。

### ヒストン修飾を指標とした解析法

化学物質など作用後、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、それらは、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。DNA 損傷能を有さない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、熱などによるリン酸化は顕著であった。いずれも細胞周期依存性や活性酸素種生成を起因としておらず、通常の DNA 損傷に基づくリン酸化とは異なる機構で誘導

されたものと考えられた。

## D. 考察

前年度までの研究として、大腸と肺臓での早期がん病巣を特定できる中短期モデルの可能性が示唆されたため、今年度は、その2臓器に関しては標準的な検索法を目指し、各施設での標準的なプロトコールでのマニュアル作成をまとめ、多施設間での検討に入った。

大腸の前がん病変である ACF と MDF での粘液成分に關与する杯細胞発生に關与する(iPS 細胞作成にも必要な遺伝子でもあるが)Klf4 遺伝子の発現が大腸腫瘍で著明に抑制されている事実も今回確認できた。そのため、これらの早期の病理組織学的検索は発がん性試験として十分に利用できると考えられた。また、肺臓では免疫組織学的に Napsin A の染色性で発がん予測として役立つと考えられたが、現在、固定方法の標準化を施行している過程である。

肝臓では従来からの伊東モデルと加えて、変異原性・遺伝毒性を *in vivo* で確認できる *gpt-delta* ラットを利用することで、変異原性・発癌モデルとして利用できる可能性を示唆したが、経済的な側面での考慮が必要である。

胃・膀胱・前立腺での検討臓器では、今年度までの研究成果として *in vitro* 系での新規予測マーカーとして H2AX を検討し、H2AX 発現が、ヒトでの胃癌や前立腺癌での腫瘍マーカーとなる可能性やラットを用いた短期反復投与試験における遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標となる可能性が示唆されたものの、今後更なる検討が必要と思われる。

新規 *in vitro* 系での試験においては、付加体解析では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-ジオキサンに相關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必要がある。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。また、H2AX 発現に關する *in vitro* 系検討で DNA 損傷能を有さない化学物質においても顕著な H2AX が認められたことから、組織免疫染色におけるポジティブな H2AX のデータは、幾つかのアーティファクトの可能性を加味して、慎重に評価されるべきと考えられ、*in vivo* 系への応用の困難さが示された。

## E. 結論

動物を供する発がん試験における代替法の確立は化学物質のヒトへの安全性に対して重要である。しかし、動物実験に対する 3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は決して動物を使用しないということではないため、今回の研究目標はその精神に基づいて動物での発がん、すなわち、従来からの伊東法による肝臓モデルとともに、大腸と肺臓モデルでは腫瘍形成の有無を推測できるシステムの構築の確立が可能と位置づ

けることができると思われる。しかし、他の臓器での *in vitro* 系からの予測マーカーとして H2AX の有用性の検討は重要であると考えられるが、H2AX は、DNA 損傷以外にもいくつかの要因で誘導される可能性が考えられるので、それらを加味した評価も考慮する必要が出てきた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okochi-Takada E., Tsukamoto T. et al. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene* 33: 2273-2278, 2014.
- 2) Toyoda T., Tsukamoto T. et al. Molecular mechanism of gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected rodent models. *Diseases* 2: 168-186, 2014.
- 3) Tsukamoto T., Tatematsu M. Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Neoplasia. *Curr Infect Dis Rep* 16: 402, 2014.
- 4) 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. *臨牀消化器内科* 29: 337-344, 2014.
- 5) 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—. In: 一瀬雅夫, 岡政志, 齋藤博 編. *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* -. 東京: 日本メディカルセンター, 2014; 29-37.
- 6) Doguchi H., Yoshimi N. et al. The Enhancing Effects of Hyperbaric Oxygen in Mouse Skin Carcinogenesis. *J. Toxicol Pathol* 27: 67-72, 2014.
- 7) Morioka T., Yoshimi N. et al. Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in *Mih1*-deficient mice. *Cancer Sci*, 2015 in press.
- 8) Yamada T., Wei M. et al. Inhibitory effect of raphanobrassica on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Food Chem Toxicol* 70: 107-113, 2014.
- 9) Tago Y., Wei M. et al. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing *Phaffia rhodozyma* extract. *J Toxicol Sci*, 39, 373-382, 2014.
- 10) Kakehashi A., Wei M. et al. Valerian Inhibits Rat Hepatocarcinogenesis by Activating GABA(A) Receptor-Mediated Signaling. *PLoS One* 9(11):

- e113610, 2014.
- 11) Kuwae Y, Wei M. et al. Paraneoplastic Mucicopolysaccharide Antigen-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 44, 106-115, 2015.
  - 12) Wei M. et al. Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis. *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*, Vol 1, 253-260, 2015.
  - 13) Wei M. et al. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. *Toxicol Sci*, 2015 in press.
  - 14) Yokohira M. et al. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 66: 117-123, 2014.
  - 15) Yokohira M. et al. 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.
  - 16) Sato S., Suzuki S. et al. Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol* 27: 43-49, 2014.
  - 17) Nakasuka, K., Suzuki S. et al. A case of idiopathic giant cell myocarditis with a past history of sarcoidosis. *J Card Cases*, 9: 35-39, 2014.
  - 18) Dodmane, PR., Suzuki S. et al. Characterization of intracellular inclusions in the urothelium of mice exposed to inorganic arsenic. *Toxicol Sci*, 137: 36-46, 2014.
  - 19) Oomura, M., Suzuki S. et al. Intravascular lymphomatosis mimicking primary central nervous system lymphoma: A case report and literature review. *Case Rep Neurol*, 6: 101-108, 2014.
  - 20) Arnold, LL., Suzuki S. et al. Time course of urothelial changes in rats and mice orally administered arsenite. *Toxicol Pathol*, 42: 855-862, 2014.
  - 21) Naiki, T., Suzuki S. et al. GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. *Carcinogenesis* 35: 1962-1967, 2014.
  - 22) Hachiya, K., Suzuki S. et al. Double-valve replacement for mitral and aortic regurgitation in a patient with Libman-Sacks endocarditis. *Intern Med*, 53: 1769-1773, 2014.
  - 23) Arima, H., Suzuki S. et al. IV injection of polystyrene beads for mouse model of sepsis causes severe glomerular injury. *J Intensive Care*, 2: 21, 2014.
  - 24) Yamashita, Y., Suzuki S. et al. Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 28: 111-117, 2015.
  - 25) Suzuki S. et al. Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. *J Toxicol Pathol*, 28: 21-26, 2015.
  - 26) 佐藤慎哉、鈴木周五 他 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.
  - 27) 佐藤慎哉、鈴木周五 他 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.
  - 28) Toyoda T, Ogawa K. et al. A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 74: 68-75, 2014.
  - 29) Toyoda T, Ogawa K. et al. A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. *J Toxicol Sci*, 39: 109-119, 2014.
  - 30) Onami S, Ogawa K. et al. 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.
  - 31) Akagi J, Ogawa K. et al. Validation study of the combined repeated-dose toxicity and genotoxicity assay using *gpt* delta rats. *Cancer Sci*, 2015 in press
  - 32) Totsuka Y. et al. *In vivo* genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and L-tryptophan. *Mutat Res.*, 760: 48-55, 2014.
  - 33) Totsuka Y. et al. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. *Nanomaterials*, 4: 175-188, 2014.
  - 34) Kochi T, Totsuka Y. et al. 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*, 1: 69-73, 2014.
  - 35) Goto M, Totsuka Y. et al. Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with

exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med.*, 75: 136-146, 2014.

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

## 2. 学会発表

- 1) 桐山諭和、塚本徹哉 Expression of  $\gamma$ -H2AX in gastric carcinogenesis in human and rodent models. 第73回日本癌学会総会、2014年、横浜
- 2) Tsukamoto, T. et al. Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model. The 8<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, 2014, Fukuoka
- 3) Takamatsu, R. Yoshimi, N. et al. Okinawan herb, *Bidens pilosa*, induces apoptosis through up-regulation of death receptor 5 in human colon carcinoma cells. 第73回日本癌学会総会、2014年、横浜
- 4) 山野荘太郎、魏 民、他 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、2014年、広島
- 5) 梯アンナ、魏 民、他 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、2014年、広島
- 6) 三島胡桃、魏 民、他 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、2014年、広島
- 7) 福島昭治、魏 民、他 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、2014年、神戸
- 8) 石井真美、魏 民、他 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、2014年、神戸
- 9) 下村衣里、魏 民、他 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、2014年、いわき
- 10) 三島胡桃、魏 民、他 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、2014年、いわき
- 11) 山野荘太郎、魏 民、他 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、2014年、茅野
- 12) 魏 民、他 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、2014年、横浜
- 13) 石井真美、魏 民、他 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、2014年、横浜
- 14) 藤岡正喜、魏 民、他 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、2014年、横浜
- 15) 梯アンナ、魏 民、他 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、2014年、横浜
- 16) Yamano S, Wei M. et al. Cancer initiating cell of lung squamous cell carcinoma in mice might be derived from the bronchiolar alveolar stem cell. 39<sup>th</sup> EAMO Congress, 2014年、Madrid, Spain
- 17) 鰐淵英機、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、2014年、浦添
- 18) 下村衣里、魏 民、他 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、2014年、東京
- 19) Anna Kakehashi, Wei M. et al. 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、2015年、東京
- 20) 藤岡正喜、魏 民、他 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、1月29~30日、東京、2015。
- 21) 三島胡桃、魏 民、他 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、2015年、東京
- 22) 下村衣里、魏 民、他 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、2015年、東京
- 23) 山野荘太郎、魏 民、他 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、2015年、大津
- 24) 平山幸良、魏 民、他 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, 2015年、大津
- 25) 三島胡桃、魏 民、他 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, 2015年、大阪
- 26) 下村衣里魏 民、他 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, 2015年、大阪
- 27) 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、広島
- 28) 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、広島
- 29) 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、横浜
- 30) 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、東京
- 31) Suzuki, S. et al., Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis, SOT Annual Meeting, 2014年、San Diego, USA
- 32) 豊田武士、小川久美子、他 ラット膀胱上皮細胞における H2AX 発現の検討. 第 41 回日本毒性学会学術年会、2014年、神戸
- 33) 豊田武士、小川久美子、他 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 H2AX 発現. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 34) 豊田武士、小川久美子、他 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 H2AX. 第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2015年、東京
- 35) 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. 第 41 回毒性病理大会、2014年、神戸
- 36) 後藤正憲、戸塚ゆ加里、他 Analyses of genotoxicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane, being responsible for occupational bile duct cancer, 第 73 回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 37) 椎崎 一宏、戸塚ゆ加里、他 Identification of the location of DNA adducts within the genome, 第 73 回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 38) 池田 茜、戸塚ゆ加里、他 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、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 39) 後藤正憲、戸塚ゆ加里、他 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、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 40) 椎崎 一宏、戸塚ゆ加里、他 ゲノム中の DNA 修飾の単分子検出方法の検討、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 41) 秋元峻太郎、戸塚ゆ加里、他 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、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 42) 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. 第 134 回日本薬学会、2014年、熊本
- 43) Ibuki, T. et al. 17- $\beta$ -estradiol-induced hyperacetylation of histone H3 and change of sensitivity to UVB. The 11th Japan-China International Symposium on Health Sciences, 2014, Shizuoka
- 44) 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、2014年、東京
- 45) 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・光生物学会、2014年、大阪
- 46) 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、2014年、東京
- 47) 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、2014年、東京

## 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