

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）研究報告書

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

研究代表者 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危険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、行政的な化学物質の安全対策の観点において、本研究では化学物質の発がん性検証に病理組織診断法を利用する短・中期のバイオアッセイ系の開発を目的とした。大腸と肺臓モデルでの病理組織学的なバイオマーカーであるそれぞれ aberrant crypt foci (ACF) と NapsinA は、短・中期発がん予測モデルへ提唱できる準備が整ってきた。加えて、新たに DNA 損傷依存的ヒストン修飾蛋白である H2AX が膀胱癌の早期病巣同定の予測マーカーとして有用である可能性を見いだした。本年度は、本研究班で検討してきた多施設共同での動物臓器供与システムを利用して検討し、H2AX が他臓器においても発がん性化学物質暴露における早期マーカーとしての可能性を見いだした。また、新たに化学物質に暴露された動物系における発がん予測モデルを遺伝子マーカーの利用により超短期に検出できる可能性を認め、今後の検証の必要性をみた。さらに、マウス肝臓 DNA アダクトーム解析により遺伝性発がん物質と非遺伝性発がん物質を区別できる可能性が示唆された。

研究分担者	所属機関	職名
吉見 直己	琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学	教授
塚本 徹哉	藤田保健衛生大学・病理学	准教授
魏 民	大阪市立大学大学院医学研究科・分子病理学	准教授
横平 政直	香川大学医学部・病理学	准教授
小川 久美子	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター 病理部・実験病理学	部長
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
戸塚 ゆ加里	国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野	ユニット長
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

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る。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、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

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り、化学物質の安全評価の迅速化、高度化、標準化を目指している。特に発がん予測評価手法の標準化を目標とする。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

たもののうち、その肉眼的な腫瘍形成に拘わらず、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものを指標とする試験法の検証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、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

26年度に、多施設共同評価のために作成した動物処理マニュアルを作成し、毎年、一部修正を行った。多施設間で臓器を担当施設に搬送し、その分野での病理組織学的変化を呈する病変を検討し、種々の施設の専門臓器で発がん性を有する化学物質曝露で得られる非標的臓器の検討を多施設で実施した。また、28年度は特に、H2AXの種々の臓器での発現性が検討された。

2) 短・中期バイオアッセイ系

胃

1. ラット胃粘膜の実験系

吉見班多施設共同研究において採取したラット胃組織を用いて胃発がん性の検討を行った。利用されたラットは6週齢オスF344ラット、化学物質はN-methyl-N-nitrosourea (MNU), 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), dimethylnitrosamine (DMN), 1,2-dimethylhydrazine (DMH), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を検討した。MNU, MNNGは直接発がん物質であり、DMAB, DMN, DMH, PhIP, BOP, DMBAは間接発がん物質である。すなわち、15 mg/kg 体重 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、5 mg/kg 体重 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、10 mg/kg 体重 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)、5 mg/kg 体重 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を週5回×4週間強制胃内投与した。MNNGは直接発がん物質であり、DMAB, DMN, DMHは間接発がん物質である。また、対照群には水を投与した。実験第28日に屠殺し、胃組織を採取し、胃体部前庭部境界部の一部よりtotal RNAを抽出し、残りをホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。Hematoxylin eosin (HE)染色およびH2AX(抗rabbit polyclonal抗体、Cell Signaling Technology)免疫染色を施行し、胃底腺、幽門腺領域に関して、腺管あたりのH2AX陽性細胞数をカウントした。また、glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase (gapdh)を内部標準にヒストンH2AX(h2afx)、p53に反応する分子としてp21waf1、幽門腺領域のpepsinogenとしてpepsinogen c (pgc)、胃底腺領域のpepsinogenとしてpepsinogen a5 (pga5)の遺伝子発現の変化をSYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kits, QIAGEN)を用いて定量的RT-PCR法により検討した。数値はKruskal-Wallis testおよびDunn's multiple comparisons testにより統計学的に解析した。

2. ヒト胃がんの系

ヒト胃がん160例について、胃がんブロックより直径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5x2組織アレイを作製した。臨床病理学的因子、術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy, NAC)の有無、胃型・腸型形質発現、H2AX, p53, Ki-67の免疫組織学的発現との関係を検討した。H2AXは、腫瘍の10%以上が陽性の場合:high(正常)、10%未満の場合:low(異常:反応性低下)と判定した。p53は、正常組織と同様程度で増殖細胞で弱陽性のもの(腫瘍の5%未満)をscore 0、腫瘍の33%以下で陽性のものをscore 1、34-66%をscore 2、67%以上をscore 3Aとした。Ki-67値が高く強い増殖性を示すがp53染色性が見られないものはnonsense mutationやhomozygous deletionを考えscore 3Nとした。Score 0, 1をp53low(正常)、score 2, 3A, 3Nをp53high(異常:蓄積あるいは欠失)とした。Ki-67は、腫瘍の50%以上が陽性の場合:high、50%未満の場合:lowと判定した。以上について、予後との相関を検討した。

大腸

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

多施設共有システムを検討した。特に陽性像が得られた香川大の検体に関して、以下のごとく検討した。

肺臓発がんモデルに使用されるN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を飲料水として処理された30週の雄F344ラット大腸粘膜を観察した。

2. マウス二段階大腸発がんモデルでのACFとMDFの確認

5週齢の雄性ICRマウス21匹にazoxymethane(AOM; 10 mg/kg BW)を1回腹腔内投与し、その1週間後から1.5% dextran sulfate sodiumを7日間飲水投与した。実験開始から12週目に大腸を摘出し、前がん病変とされているaberrant crypt foci (ACF)およびmucon-depleted foci (MDF)の測定および3mm以上の隆起性病変について病理組織学的解析を行った。

3. 大腸粘膜における H2AX の発現変動

5週齢の雄 F344 ラット 18 匹に AOM (15 mg/kg BW) を腹腔内投与し、その 1 週間後に同量の AOM を再度腹腔内投与した。2 回目の投与から 3 日後、1 週後、2 週後にそれぞれ 6 匹ずつ屠殺し、大腸をホルマリン固定後、スイスロール状に包埋してパラフィン切片を作成した。H2AX 免疫染色 (抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology) を試行し、全長が確認できる crypt 内の細胞数をカウントし、その中の陽性細胞数をカウントして陽性率を算出した。

肝臓

1. DMA のラット肝臓における *in vivo* 変異原性の検討

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 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 はこれまでの報告で膀胱発がん性、肝発がん促進作用を示した用量である。また、動物は室温 23 ± 2 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、明期 12 時間の照明条件で飼育し、基礎飼料は MF pellet を与えた。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、ケージ及びチップを週 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。

gpt アッセイでは、肝臓凍結組織から RecoverEase™ DNA Isolation Kit を用いて genomic DNA を抽出した。*in vivo* パッケージングには、Transpack Packaging Extract を用いて、抽出した DNA からトランスジーン EG10 をファージ粒子として回収した。Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株の菌液に回収したファージを加え、37 °C で 20 分間静置後、同温度条件下で 20 分間振とうさせ回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。感染後の YG6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地には 37 °C 播種後に 2 日間培養を行い、*gpt* 遺伝子が不活化している変異体のコロニーを得た。また、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数は 6-TG を含まない M9 寒天培地に播種し生じたコロニー数によって求めた。突然変異数は、6-TG を含む寒天培地に播種し生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数で除して算出した。

Spi-アッセイでは、*in vivo* パッケージングによるファージ回収までの手法は *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 で 20 分間静置し回収したフ

ァージを P2 溶原菌に感染させた。その後、トリプティケース寒天培地に播種し 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。

gpt 遺伝子変異体の変異スペクトラを評価するため、得られた変異コロニーをコロニーダイレクト PCR 法によって、DNA フラグメントを増幅した。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。

2. H2AX のラットにおける遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性の検討

吉見班多施設で実施した 4 週間投与試験で得られた肝臓標本について免疫組織染色を行い、H2AX の標識率を検討した。試験プロトコールは以下の通りである。国立衛研・小川により実施された試験では、6 週齢の雄性 F344 ラットに 250 ppm 2-acetamidofluorene (2-AAF)、10,000 ppm *p*-cresidine、200 ppm DMA、400 ppm glycidol、10 ppm N-nitrosodiethylamine (DEN)、または 5 ppm acrylamide (AA) を 4 週間投与した。なお、投与方法は 2-AAF 及び *p*-cresidine は混餌投与、その他は飲水投与で実施した。名古屋市・鈴木により実施された試験では、6 週齢 F344 雄性ラットに、2 mg/kg dimethylnitrosamine (DMN)、5 mg/kg 7,12-dimethyl benz [a] anthracene (DMBA)、5 mg/kg methylnitrosourea (MNU)、または 5 mg/kg 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を 4 週間、週 5 回の強制胃内投与を行った。大阪市大・魏により実施した試験では、6 週齢 F344 雄性ラットに、2% ダンマル樹脂を 4 週間混餌投与した。

3. 超短期発がん性予測モデルの開発

公的データベースである Open TG-GATEs 遺伝子発現データベースを用いて、遺伝子マーカー群の探索と抽出を行った。約 150 化合物のうち既知の遺伝毒性肝発がん物質 (5 物質) についての遺伝子発現データがあり、これら 5 物質のラット単回投与 24 時間後で共通して発現変化を示す遺伝子群を探索した。

次に単回投与 24 時間後における抽出した遺伝子マーカー群の遺伝子発現データを使用し、遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質 (14 物質) を区別できる予測モデルの構築を行った。

肺臓

1. ラットとマウスでの NapsinA の発現性

8週齢のF344ラットと7週齢のA/Jマウスにおいて、前者にはN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN)とurethaneを、後者ではurethane, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), benzo[a]pyreneを16週から32週での肺組織を検討した。

2. H2AXの発現性

2006年～2014年に香川大で実施した6週齢または7週齢で開始したF344ラットによる実験の肺ブロック標本を用いて検討を行った。用いた肺ブロック材料は14実験群で、発がん物質はN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)、urethane, DMN, benzo[a]pyrene (B(a)P), NNKである。免疫組織学的にH2AXの染色を、抗体Phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody (Cell Signaling, MA, USA)を実施した。形態的に変化の見られない肺胞上皮について、細胞1000個以上あたりのH2AX陽性細胞数を計測し、その割合(%)を算出した。

膀胱

1. ラット及びマウスモデルのH2AX発現性

6週齢の雄F344ラットと6週齢の雄B6C3F1マウスに、0.05% BBN、0.6% 2-NA、0.025% 2-AAF、1% *p*-Cresidine、0.125% BMP、0.1% PEITC、0.01% DMA、0.45% Melamine、3% Uracil、0.04% Glycidol、0.001% DENおよび0.005% AAを4週間混餌または飲水投与し、投与終了時または2週間の休薬後に各群5匹を解剖し、膀胱上皮でのH2AX/Ki67発現を免疫組織化学的に検索した。

2. 他施設での膀胱組織での検討

多施設共同システムを利用して、名古屋市立大学(F344ラットに遺伝毒性発がん物質8種を週5日、4週間強制経口投与)および国立がん研究センター研究所(F344ラットにノルハルマン代謝物2種を4週間混餌投与)から提供された膀胱を用いて、H2AX/Ki67発現を検索した。

前立腺

6週齢F344雄ラットに、PhIP, BOP, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)を週に5回強制胃内投与し、4週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。肝臓、大腸、膀胱および血液を各分担研究者に要望された状態(凍結およびホルマリン固定)で送付した。前立腺組織については免疫組織染色を行い、

H2AX, HMGB2およびKi67の標識率を前立腺腹葉、側葉および背葉において検討した。

2) 新規in vitro発がん性予測試験

網羅的なDNA付加体解析法

雄性F344ラット(各群それぞれ5匹)にDEN(0.001%)、*o*-Tolidine-2HCl(0.015%)、COP(1.0%)、ENU(0.001%)、DEHP(1.2%)、DO(0.5%)を4週間飲水投与を行った後、肝臓を摘出した。DNAを抽出後、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解析により解析し、それぞれの化学物質投与に相関する付加体の抽出を実施した。

ヒストン修飾を指標とした評価法

1. 偽陽性-H2AX誘導とその機構の解析

ヒト培養細胞株(MCF7ヒト乳がん細胞)に界面活性剤(nonylphenol polyethoxylate(NPEO))、熱ストレス処理、pH変化などを行い、一定時間で培養した後、ウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法により、H2AX、deoxyribonuclease I(DNase I)、actin変化を免疫染色法により解析した。

2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾の解析法

Methylnitrosourea(MNU), 3,2'-dimethyl-4-amonobiphenyl(DMAB), dimethylnitrosamine(DMN), dimethylhydrazine(DMH)を4週間投与したF344ラットから採取した肝臓及び肺臓を多施設共有システムにより各市大から供給を受けた。他にも同システムから国立衛生試験所からも肝臓・肺臓組織を供与された。各組織50-80mgからヒストンを抽出し、ウェスタンブロット法により解析を行った。

倫理面への配慮

全ての分担者の動物施設においての規程に基づいて、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。特に動物試験における3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則を遵守した。

C. 研究結果

1) 多施設共同システム構築

図1のように、各施設でのマニュアル(図2、別掲)に沿う形で摘出された臓器を一部施設間ないし一方方向で搬送した。

図1 今回実施した多施設の相関図

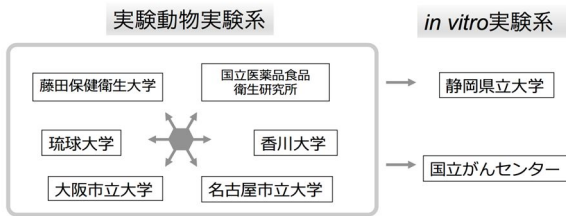
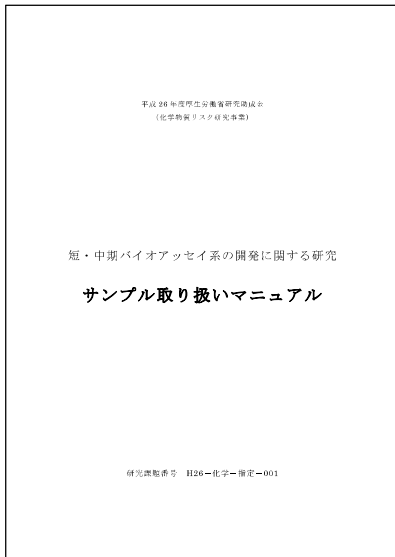


図2 マニュアル表紙



2) 短・中期バイオアッセイ系
胃

1. ラットの系

ラット胃底腺、幽門腺の増殖帯における1腺管あたりのH2AX陽性細胞数を計測した。Control群、PhIP群、BOP群、MNNG群、DMBA群それぞれで、幽門腺領域では、 2.57 ± 0.48 、 3.86 ± 0.38 、 2.73 ± 0.50 、 4.82 ± 0.55 、 3.33 ± 0.38 個/腺管 (mean \pm SD) と PhIP 群 ($P < 0.05$) で H2AX 陽性細胞数の有意な上昇があった。胃底腺領域では、 2.18 ± 0.25 、 4.12 ± 0.83 、 2.85 ± 0.44 、 3.28 ± 0.69 、 3.23 ± 0.42 個/腺管 (AVE \pm SD) と、PhIP 群と MNNG 群 ($P < 0.05$) で H2AX 陽性細胞数の有意な上昇が見られた。表層のアポトーシス細胞は、それぞれ、 0.18 ± 0.12 、 0.52 ± 0.50 、 0.23 ± 0.05 、 3.58 ± 1.30 、 0.28 ± 0.13 個と MNNG 群で有意な増加が見られた ($P < 0.005$)。

各種遺伝子発現の検討では、h2afx mRNA の発現は、Control 群を 0 とすると、DMAB ($\text{Log}_2 = -0.40 \pm 0.55$, NS)、MNU (-0.70 ± 0.39 ,

$P < 0.05$)、DMN (-0.59 ± 0.29 , $P < 0.05$)、DMH (-0.02 ± 0.39 , NS) 群であった。また、p21 mRNA の発現をみると Control 群 0 ± 0.30 に対して、それぞれ、 $\text{Log}_2 = 0.59 \pm 0.57$ (NS), 0.61 ± 0.28 ($P = 0.52$), 0.83 ± 0.60 ($P = 0.52$), 0.43 ± 0.92 (NS) と MNU、DMN 群での発現が上昇傾向にあった。また、PhIP ($\text{Log}_2 = -0.51 \pm 0.15$, $P < 0.01$)、BOP (-0.71 ± 0.58 , NS)、MNNG (-0.65 ± 0.44 , $P < 0.05$)、DMBA (-0.71 ± 0.22 , $P < 0.01$) 群と PhIP、DMBA で有意に低下した。また、p21 mRNA の発現をみると Control 群 0 ± 0.34 に対して、それぞれ、 $\text{Log}_2 = 0.18 \pm 0.43$, 0.39 ± 0.23 , 0.51 ± 0.22 , 0.13 ± 0.15 と MNNG 群での発現が有意に上昇した ($P < 0.05$)。Pepsinogen C および A については、各群で有意な変動は見られなかった。

2. ヒトの系

ヒト進行胃がん 137 例を用いて H2AX 発現と予後との相関を検討した。症例の年齢は 31 から 86 才 (中央値 66 才)、男女比 95:42 例。組織像は、分化型 75 例、未分化型 62 例。術前化学療法施行例 85 例、未施行例 52 例であった。

H2AX の発現と p53 の染色性を比較すると、p53 が正常 (low) のものでは H2AX low (反応性低下) が多く、p53 が異常のものでは H2AX high が比較的多かった ($P < 0.001$, Fisher's exact test)。H2AX と p53 の異常は比較的独立的に発生していると考えられた。

予後の検討では、H2AX low (反応性低下) と p53 high (異常: 蓄積あるいは欠失) の組み合わせが最も予後が悪かった (Log rank test, $P < 0.05$)。術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) の有無と H2AX 発現を比較した結果では、NAC 施行群で H2AX の発現反応がない群で予後が悪かった。また、Stage III の症例では H2AX suppressed (反応性低下) の方が expressed より予後が悪かった (Log rank test, $P < 0.05$)。

大腸

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

多施設共有システムにおける香川大の検体のうち、0.1%DHPN を 2 週間飲水投与した大腸粘膜に、ACF を 53.5 ± 18.3 を観察し、4 個以上の腺管を有するもの 24.7 ± 11.0 観察された。一部その組織像も確認したが、明らかな異型腺管増生を認め、微少腺腫と考えられ、対象物質の主なる標的臓器ではないために、顕在化しないまでも、物質の発がん性の可能性が示唆された。

2. マウス二段階大腸発がんモデルでの ACF と MDF の確認

マウスの系ではラットにおける MDF は確認できなかったが、ACF は確認できた。ACF は 23.8 ± 14.3 で、ラットでの同一発がん物質投与に対しての発生数は比較的少なかった。なお、12 週において、3mm 以上の隆起性病変のうち、9 個に異型腺管増生を認め、うち 8 個は高異型腺腫ないし高分化型管状腺癌を認め、3mm 未満の肉眼的に顕在化されていないより早期での病変の確認を要することを示唆した。

3. 大腸粘膜における H2AX の発現変動

F344 雄ラット大腸粘膜の H2AX 陽性率は、3 日後群で 1.66 ± 0.6 (対照群: 0.85 ± 0.3)、1 週後群で 0.13 ± 0.1 (対照群: 0.11 ± 0.1)、2 週後群で 0.08 ± 0.1 (対照群: 0.00 ± 0.2) であり、極めて早期での 3 日後群では増加傾向を認めた。

肝臓

1. DMA のラット肝臓における *in vivo* 変異原性の検討

点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイ及び欠失変異を評価する *Spi* アッセイの結果を図 3 に示す。DMA 投与ラット肝臓における *gpt* 遺伝子変異頻度及び *Spi* 変異体頻度は、無処置ラットと比較して、有意な変化はみられなかった。

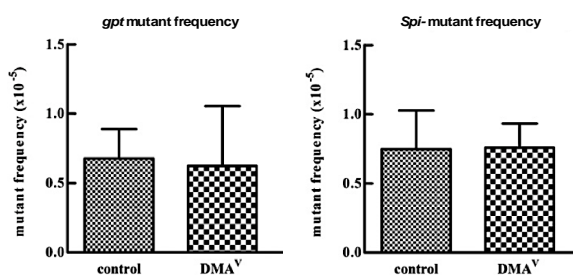


図 3 肝臓における *gpt* 遺伝子変異頻度及び *Spi* 変異体頻度

2. H2AX のラットにおける遺伝毒性肝発がん物質の早期検出マーカーとしての有用性の検討

肝臓における H2AX の標識率を検討した結果、遺伝毒性肝発がん物質投与群において、対照群と比較して 2-AAF 群で有意に増加したが、DEN 群と DMN 群では有意な増加は認められなかった (図 4)。遺伝毒性非肝発がん物質投与群において、p-cresidine 群、glycidol 群、AA 群、DMBA 群及び MNU 群で H2AX の標識率の有意な増加は認められなかったが、DMH 群では有

意に増加し、非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂及び非遺伝毒性非肝発がん物質である DMA を投与した肝臓には H2AX の標識率は対照群と有意な差はなかった (図 4)。

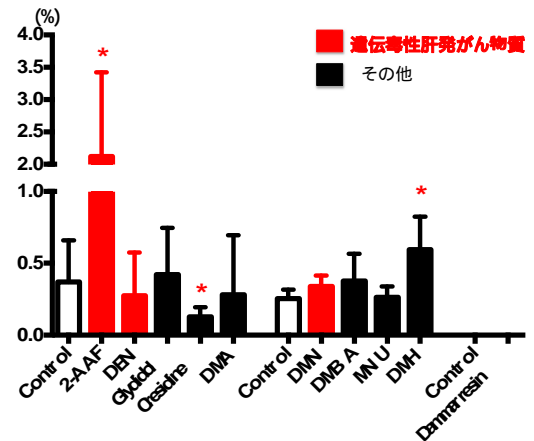


図 4 肝臓における H2AX の標識率

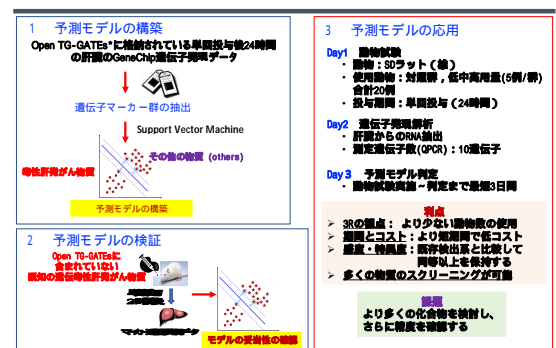
3. 超短期発がん性予測モデルの開発

計 10 遺伝子が抽出され、これらを次の予測モデル構築で使う遺伝子マーカー群として同定できた。

構築した予測モデルを用いて、Open TG-GATEs にある遺伝毒性肝発がん物質 (計 5 物質) とそれ以外の物質 (計 53 物質) について判定した結果、高い正答率 (91%) で遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を判別できることを確認した。予測モデルに当てはめた結果、全ての物質について陽性判定が得られ、単回投与 24 時間後の遺伝子マーカー群の遺伝子発現変化を測定し、構築した予測モデルを使うことで、遺伝毒性肝発がん物質を検出できる可能性が示唆された (図 5)。

図 5

遺伝毒性肝発がん物質検出予測モデル開発



*Open Toxicogenomics Project-Genomics Assisted Toxicity Evaluation Systems (TG-GATEs) 1500 以上の肝臓遺伝子発現データが提供されている

肺臓

1. ラットとマウスでの Napsin A の発現性

Napsin A の発現について、ラットでは、DHPN、DMN、Urethane 誘発の 16 週以降にみとめられる hyperplasia には Napsin A の壁内高発現が認められた。正常上皮の発現と比較して発現が上昇していた (図 6)。炎症性と思われる hyperplasia (Urethane、Benzo[a]pyrene 誘発) にも Napsin A の壁内発現が見られたが、正常上皮の発現と比べてコントラストは乏しかった。

マウスでは、同様に hyperplasia および adenoma において、Napsin A の肺胞壁内における高発現が確認された。この高発現は、正常肺胞壁と比較し、顕著に認められた。以上の所見はラットの肺過形成における Napsin A の陽性所見とほぼ同様の印象であった。

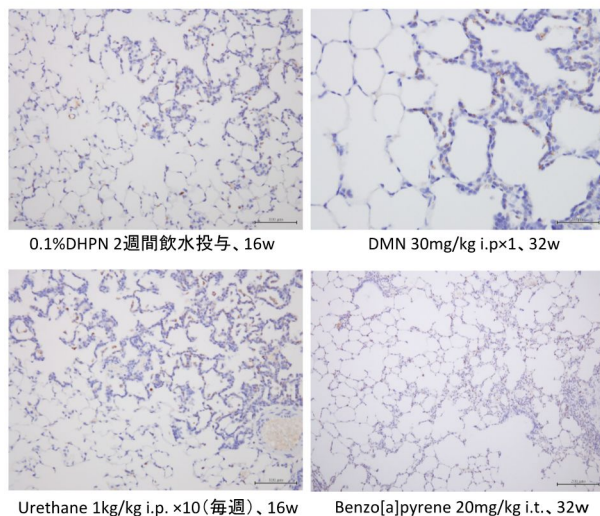


図 6 ラット肺過形成病変の Napsin A の発現

表 1 正常肺胞上皮における H2AX 発現率

実験群	化学物質名	H2AX 発現率(%, 週齢)
1	Untreated	1.4 ± 0.5 (13W)
2	Untreated	6.4 ± 2.8 (23W)
3	DHPN	24.6 ± 10.4 (16W)
3	urethane	21.6 ± 2.1 (16W)
3	DMN	25.7 ± 1.9 (16W)
3	B(a)P	22.4 ± 2.8 (16W)
4	DHPN	5.0 ± 2.4 (12W)
4	DHPN	7.5 ± 3.1 (16W)
4	DHPN	3.1 ± 4.1 (23W)
4	DHPN	3.7 ± 2.9 (30W)
5	NNK	1.4 ± 0.5 (12W)
5	NNK	4.1 ± 1.3 (16W)
5	NNK	2.3 ± 1.7 (23W)
5	NNK	1.9 ± 0.7 (30W)

2. H2AX の発現性

気管支肺胞腺腫においては、H2AX 発現細胞が多く認められた。一方、正常肺胞上皮については陽性細胞が散見されるのみであった。これらの陽性細胞数を集計したものが表 1 である。今回の 12 週以降の検討では、発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。一部の実験は経時的な変化を検討するものであり、DHPN 投与後、H2AX の経時的発現変化についての結果が期待された。しかしながら、その発現率に変化は認められなかった。また、実験ごとに、H2AX の発現に差が見られた。

膀胱

1. ラット及びマウスモデルの H2AX 発現性

遺伝毒性膀胱発がん物質 ((BBN, 2-NA, 2-AAF, *p*-cresidine)) を 4 週間投与したラット膀胱上皮細胞には、H2AX 陽性細胞が高頻度に認められた (図 7)。一方、対照群にはほとんど観察されなかった。一方、マウスにおいては 4 週時の検討において、遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN, 2-AAF、および *p*-Cresidine を投与したマウスでは、ラットと同様に H2AX の有意な発現上昇が認められた。一方、マウスに対し膀胱発がん性のない 2-NA, Glycidol, DEN および AA 投与群では、対照群と同じ発現レベルにとどまった。この結果から、H2AX は遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として、マウスモデルにおいても有効である可能性が示唆された。しかし、2-AAF 投与マウスにおける H2AX 陽性細胞は、ラットと異なり umbrella cell が主体で、Ki67 発現の上昇は伴わなかった。2-AAF 代謝における種差により、細胞傷害の標的が異なる可能性が考えられた。また、PEITC および Uracil 投与群においても、H2AX/Ki67 発現の有意な上昇が認められたことから、細胞増殖活性に伴う H2AX の誘導を考慮する必要があると思われる。

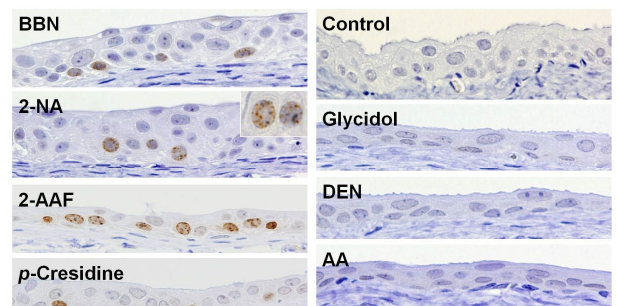


図 7 ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 発現

2. 他施設での膀胱組織での検討

名市大サンプル： H2AX 発現は DMAB および BOP 投与群で有意に増加し、MNU 投与群でも増加傾向が認められた。Ki67 陽性細胞の割合は、いずれの投与群でも対照群と有意な差はみられなかった。DMAB および BOP はそれぞれハムスターとラットへの皮下投与、BOP と MNU はカテーテルを用いたラット膀胱内投与による膀胱発がん性が報告されていることから、H2AX 発現は遺伝毒性物質による潜在的な膀胱発がん性の指標になり得る可能性が示された。国がんサンプル：4 週間の APNH (アニリンのノルハルマン代謝物) 投与により、膀胱粘膜での H2AX 発現は有意に増加した。2 週間の休薬後には減少したが、対照群よりも高いレベルを維持していた。AMPNH (o-トルイジンのノルハルマン代謝物) 投与群においても、統計学的有意差はないものの、H2AX 発現の増加傾向が認められ、6 週後の発現レベルは対照群よりも有意に高かった。AMPNH/APNH はともに、4 週時点での Ki67 発現を増加させた。APNH は遺伝毒性およびラット膀胱への発がん性が報告されており、遺伝毒性膀胱発がん物質検出指標としての H2AX の有用性を示唆する結果と考えられた。

前立腺

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、H2AX、HMGB2 および Ki-67 いずれにおいても認められた。

4 週間の経口投与実験において、PhIP 投与による H2AX の有意な標識率上昇は見られなかったものの、他は H2AX、HMGB2 および Ki67 いずれにおいても 2 日間投与と実験と同様の結果が得られた。特に HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質をいずれかの葉で有意な標識率上昇を認め、検出することが可能だった。

しかし、HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質によりいずれかの葉で有意な標識率上昇を認めた一方で、前立腺に標的性のない発がん物質についてはいずれも対照群と差がなかった。特に、皮下投与や腹腔内投与といった通常の前立腺発がんモデルで用いる投与方法ではなく、経口投与を用いても検出出来ることが確認された。また、各物質の投与濃度も Lethal Dose, 50% (LD50) の約 1/20 で用いており、これらの結果から、28 日間反復経口投与毒性試験で得られた前立腺組織において、HMGB2 および Ki67 の免疫組織化学染色による核陽性率が、前立腺特異的発がん物質の検出法として有用である可能性がある。

3) 新規 in vitro 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

各種化学物質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に示す。主成分 (PCA) 解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の 3 つのグループに分離されることがわかった (図 8)。一方、遺伝毒性発がん物質とコントロールとの比較では、肝発がん性の有無で 2 つのクラスターとして分離されることがわかった (図 9)。また、非遺伝毒性発がん物質の分離に寄与している DNA 付加体をデータベースとの比較により探索した結果、抽出された付加体は酸化ストレスに起因する付加体が多いことが推測された。現在、これら投与化学物質に由来する付加体以外の付加体の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索している。

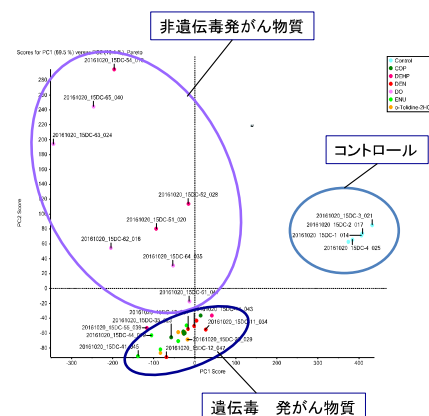


図 8 遺伝性および非遺伝性発がん物質のアダクトーム解析と PCA 解析

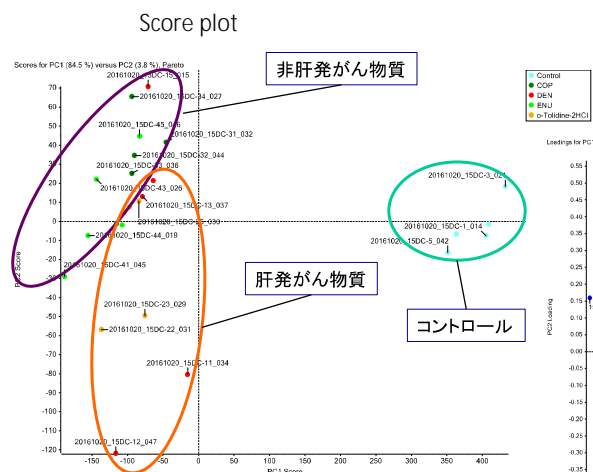


図 9 遺伝毒性発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価 (PCA 解析による)

ヒストン修飾を指標とした評価法

1. 偽陽性 γ -H2AX 誘導とその機構の解析

過剰量の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 γ -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。

陰イオン界面活性剤 (linear alkylbenzene sulfonates : LAS) 作用により、濃度依存的に γ -H2AX が誘導されることを明らかにし、その機構について検討してきた。本年度は、非イオン界面活性剤である NPEO による γ -H2AX の誘導とその機構について解析した。NPEO により γ -H2AX が誘導され、この誘導は、 ZnCl_2 や EGTA の前作用により阻害された (図 10)。一方、一般的な DNA 損傷剤である UVB や H_2O_2 による γ -H2AX は ZnCl_2 や EGTA では抑制されなかった。 ZnCl_2 や EGTA は、DNase I の阻害剤であることが知られている。そこで、DNase I の挙動を免疫蛍光染色法により確認したところ、通常細胞質に存在する DNase I が、NPEO 作用と共に核に移行すること、その際、 γ -H2AX が誘導されることが示された。同時に、細胞骨格を構成し、DNase I と共存しているアクチンの崩壊が観察された。

られたが、化学物質の肝発がん性や傷害性との相関は不明であった。今後、さらに化学物質の種類を増やして解析していくことが必要と考えられた。

肺では化学物質投与後のヒストン修飾変化がほとんど認められなかった。ヒストンアセチル化が肝臓の様には認められなかった理由としては、肺では化学物質が代謝されなかったことなどが関係している可能性がある。肺に標的のある化学物質を使用して検討することにより、臓器によるこれら修飾の差異の理由が明らかになる可能性がある。

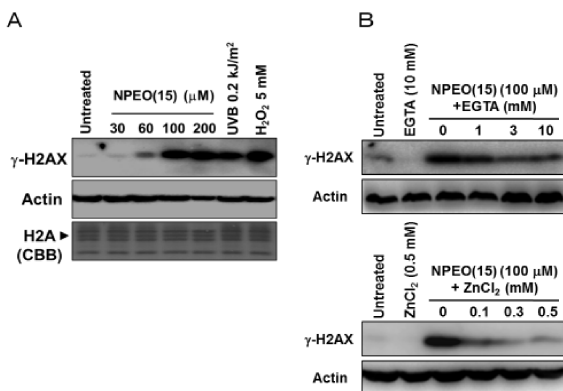


図 10 NPEO 作用後の γ -H2AX の誘導。 A: NPEO (1) 作用後、B: EGTA, ZnCl_2 による誘導阻害

2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

化学物質投与ラットから採取した肝臓からヒストンを抽出し、Western blotting により、 γ -H2AX、ヒストン H3 アセチル化 (global, K9, K14) の解析を行った。

肝臓において、 γ -H2AX、ヒストンアセチル化が観察された。しかしながら、 γ -H2AX は化学物質の種類に依存せず、全体的に高く、肝遺伝毒性を反映した結果とはならなかった。また、アセチル化においては、修飾部位により、上昇をさせる化学物質が異なった。DMN, DMH 投与により、ヒストン H3 アセチル化の変化が認め

D. 考察

2011年度からの6年間(実質5年間)に班全体で臓器特異的な発がん物質を含め50種類を越える化学物質を検討した成果を踏まえて、考察する。

前年度までに、多施設間共有システム構築のための共有臓器摘出できる動物処理マニュアル(図2)を作成し、実際に運用し、大腸の前がん病変であるACFや肺がんバイオマーカーであるNapsinA及びH2AXの発がんバイオマーカーとしての有用性について検討した。

本研究班で検討した化学物質でのACF発現を、改めて表2にまとめたが、大腸発がん物質に特異的に発現していることが判った。さらに、ACFと発がん性との関連やACFをバイオマーカーとした大腸発がん抑制に関する論文数は極めて多く(図11&12)、今回、多施設間での検討された物質のうち、上述のDHPN除き、大腸への発がん性を見いだしていない物質での発現は認めていない(表2)。ACF検出とその病理組織学的な検討は、毒性病理専門の技術を要するものの、大腸発がん物質の評価手法としてOECDガイドラインに提唱する必要性を有し、具体的な準備体制になったと考えられた。

表2 多施設由来の大腸(ラットおよびマウス)でのACFの発現度合い

標的臓器が検討臓器と一致する化学物質の陽性率	標的臓器が検討臓器と一致しない、ないし不明の化学物質の陽性率
2 / 2 (AOM & DMH)	1 / 33 (DHPN)

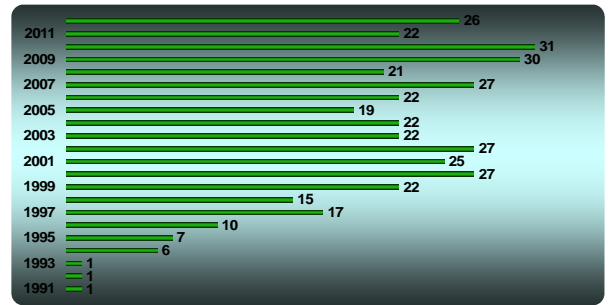


図12 ACFをバイオマーカーとした大腸発がん抑制に関する論文数の年次推移

肺がんモデルでは、ラットにおいてDHPN、DMN、Urethane誘発の過形成病変にはNapsinAの肺胞壁内における高発現が認められ、またマウスにおいてもUrethane, NNK, B[a]Pで誘発された過形成病変において、NapsinAの肺胞壁内における高発現が認められた。このため、図13のように、NapsinAの免疫組織化学による早期病変の同定により発がん性予測が可能と考えられ、今後、同様にガイドラインの設定に向けて多施設共同による研究の推進が必要であると考えられた。



図13 肺がんモデルにおけるNapsinA発現の予測

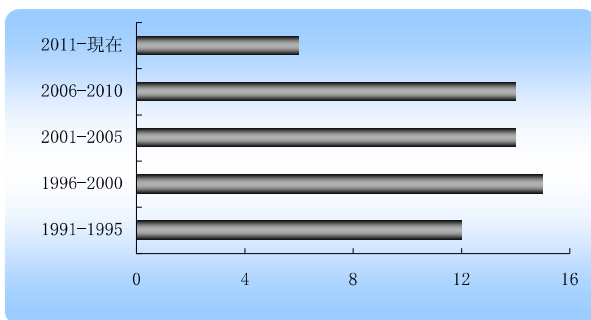


図11 ACFと大腸発がん性に関連する論文数の年次推移

本研究班のなかで、提唱された新規のバイオマーカー H2AX の発現を多施設共有システムの臓器を利用して検討し、その成果を表3にまとめた。当初、膀胱でその有用性が示され、論文化されたが、表3のように、膀胱以外の各臓器における早期発現を認め、発がん物質の標的臓器に必ずしも特異的に発現していないものの、H2AXの早期の発現は各臓器での発がん予測の可能性があるものと考えられ、今後の更なる検証が必要である。しかしながら、本研究班でのH2AXに関するin vitro系の実験成果から、遺伝毒性を呈する物質が関与するだけでなく、一部遺伝毒性を有しない物質でも、DNaseIが遊離することで、DNAを切断して誘導される可能性が示され、今後、こうした視点を踏まえた動物系での発

現解析も、新規マーカーとしての検証と平行して、実施する必要がある。

さらに、二つの化学物質暴露動物系を利用した迅速評価方法の新展開が示された。一つは肝臓担当者から、化学物質への動物暴露 24 時間後で、遺伝子マーカーの利用により発がん性予測の可能性を示すモデルが提唱された。今後、より多くの検証が必要と考えられるが、化学物質の評価手法の迅速化に貢献できる可能性が考えられた。二つ目として、肝臓における DNA 付加体の網羅的な解析により、遺伝毒性化学物質と非遺伝毒性化学物質を区別できる可能性を見いだした。両者ともに今後の検証研究が不可欠ではあるが、化学物質の評価手法の迅速化への新たな展開と期待される。

表 3 H2AX の各種臓器における発現のまとめ

検討臓器	検討臓器で H2AX 発現陽性を示す化学物質のうち、発がん標的臓器と一致する物質数	検討臓器が発がん標的臓器でない化学物質のうち、H2AX 発現陽性を示す物質数
胃	2 (MNU & MNNG) / 2	1 (PhIP) / 6
大腸	1 (AOM) / 1	not examined
肝臓	1 (2-AAF) / 3	1 (DMH) / 6
肺臓	5 (DHPN, urethane, DMN, B(a)P, NNK) / 5	not examined
膀胱	4 (BBN, 2-AAF, p-cresidine, uracil) / 4	0 / 7
前立腺	3 (DMAB, PhIP, MNU) / 4	0 / 4

E . 結論

今回、短・中期発がん性予測モデルとして、大腸発がん性に関しては前がん病変である ACF、肺発がん性には NapsinA が有用であり、さらに、H2AX が種々の臓器において、発がん物質による早期に誘導されるバイオマーカーとなり得ると考えられた。特に、従来からの顕在化による腫瘍形成を、個々の臓器別の毒性専門家による多施設共同型での病理組織学的な検索によって発がん性を予測する前がん病変のスクリーニングが可能である。結果として短・中期での発がん性予測は、動物実験に対する 3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)にも合致し、OECD ガイドラインとして推奨されると考えられた。そのためには、多施設共同システムの構築を含めた毒性病理学専門家集団の育成・確立も必要であると考えられる。

さらに、本班の本年度の新たな成果であるが、ふたつの化学物質の評価手法の迅速化への新たな展開の可能性も示された。この分野での次年度以降での新たな検証研究を要する。

F. 研究発表

1. 著書発表
 - 1) 塚本徹哉、基礎から学ぶ胃癌の病理：胃粘膜の正常構造・分化に基づいた胃生検診断(Group 分類)へのアプローチ、日本メディカルセンター、東京、2015
 - 2) Wei M, et al., Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis, Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition (Eds: Rajendram R et al.), Springer Science, New York, 253-260, 2015
 - 3) 高橋智、鈴木周五、他 前立腺がん化学予防の現状、菅原隆 編、次世代のがん治療薬・診断のための研究開発。pp27-31、技術情報協会、東京、2016.
 - 4) 吉見直己、他、小腸・大腸 毒性病理組織学(日本毒性病理学会編)、188-215, 西村書店、東京、2017
 - 5) Tsukamoto T., et al., Helicobacter, Laboratory Models for Foodborne Infections (Ed : Liu, D), CRC Press, London, in press
2. 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*, 145, 193-200, 2015.
 - 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*, 106: 529-541, 2015.
- 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.
- 39) Morioka T, Yoshimi N et al. Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in *Mih1*-deficient mice. *Cancer Sci*, 106: 217-226, 2015.
- 40) Cao D, Tsukamoto T et al. Canolol Inhibits Gastric Tumors Initiation and Progression through COX-2/PGE2 Pathway in K19-C2mE Transgenic Mice. *PLoS One*. 10: e0120938, 2015.
- 41) Tsukamoto H, Tsukamoto T et al. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 67: 271-277, 2015.
- 42) Cao D, Tsukamoto T et al. The Protective Effects of 18beta-Glycyrrhetic Acid on Helicobacter pylori-Infected Gastric Mucosa in Mongolian Gerbils. *Biomed Res Int*. 2016: 4943793, 2016.
- 43) Jiang J, Tsukamoto T et al. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Clin Exp Med*. 9: 2479-2485, 2016.

- 44) Kiriya Y, Tsukamoto T et al. Gastric-and-Intestinal Mixed Intestinal Metaplasia is Irreversible Point with Eradication of Helicobacter Pylori. *Open J Pathol.* 6: 93-104, 2016.
- 45) Toyoda T, Ogawa K, Tsukamoto T et al. Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter.* 21: 131-142, 2016.
- 46) Shimoda M, Tsukamoto T et al. Epithelial cell-derived α disintegrin and metalloproteinase-17 confers resistance to colonic inflammation through EGFR activation. *EBioMedicine.* 5: 114-124, 2016.
- 47) 塚本徹哉 他. 10. 胃癌と萎縮性胃炎, 腸上皮化生. I. 胃癌診療に必要な基礎知識. 特集: 胃癌の診療. *臨床消化器内科.* 30: 787-93, 2015.
- 48) Gi M et al. Modifying effects of 1,2-dichloropropane on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced cholangiocarcinogenesis in male Syrian hamsters. *J Toxicol Sci.* 40: 647-656, 2015.
- 49) Xie XL, Gi M et al. Ethanol-extracted propolis enhances BBN-initiated urinary bladder carcinogenesis via non-mutagenic mechanisms in rats. *Food Chem Toxicol.* 83: 193-200, 2015.
- 50) Gi M et al. Determination of hepatotoxicity and its Underlying metabolic basis of 1,2-dichloropropane in male syrian hamsters and B6C3F1 mice. *Toxicol Sci.* 145: 196-208, 2015.
- 51) Hayashi N, Suzuki S et al. A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages. *Mol Cancer Ther.* 14: 452-460, 2015.
- 52) Sagawa H, Suzuki S et al. Connexin 32 and luteolin play protective roles in nonalcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 36: 1539-1549, 2015.
- 53) Kato, A, Susuki, S et al. Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 and ERK1/2. *Oncotarget.* 6(40): 42963-42975, 2015.
- 54) Kato, H, Suzuki, S et al. Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget.* 7: 2009-2021, 2016.
- 55) 佐藤慎哉、鈴木周五 他 肝癌の危険因子と発がん機序. 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.
- 56) Toyoda T, Ogawa K et al. Early detection of genotoxic urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for γ -H2AX. *Toxicol Sci.* 148: 400-408, 2015.
- 57) Onami S, Ogawa K et al. Orally administered glycidol and its fatty acid esters as well as 3-MCPD fatty acid esters are metabolized to 3-MCPD in the F344 rat. *Regul Toxicol Pharmacol.* 73: 726-731, 2015.
- 58) Goto K, Ogawa K. Lanthanum deposition is frequently observed in the gastric mucosa of dialysis patients with lanthanum carbonate therapy: a clinicopathologic study of 13 cases, including 1 case of lanthanum granuloma in the colon and 2 nongranulomatous gastric cases. *Int J Surg Pathol.* 24: 89-92, 2016.
- 59) Ishino K, Totsuka Y et al. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 16: 3474-3492, 2015.
- 60) Komiya M, Totsuka Y et al. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 106: 1499-1505, 2015.
- 61) Zhao X, Ibuki Y et al. γ -H2AX induced by linear alkylbenzene sulfonates is due to deoxyribonuclease-1 translocation to the nucleus via actin disruption. *Mutat Res.* 777: 33-42, 2015.
- 62) Ibuki Y. et al. γ -H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Toxicol. in vitro.* 29: 1831-1838, 2015.
- 63) Zhao X, Ibuki Y et al. New mechanism of γ -H2AX generation: Surfactant-induced actin disruption causes deoxyribonuclease I translocation to the nucleus and forms DNA double-strand breaks. *Mutat Res.* 794: 1-7, 2015.
- 64) Cao D, Tsukamoto T, et al., The protective effects of 18beta-glycyrrhetic acid on Helicobacter pylori-infected gastric mucosa in Mongolian gerbils. *Biomed Res Int.* 2016: 4943793, 2016.
- 65) Cao D, Tsukamoto T, et al., 18beta-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1

- signaling. *Oncotarget*. 7: 71960-71973, 2016.
- 66) Jiang J, Tsukamoto T, et al., The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Clin Exp Med*. 9: 2479-2485, 2016.
 - 67) Kiriyama Y, Tsukamoto T, et al., Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia is irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori*. *Open J Pathol*. 6: 93-104, 2016.
 - 68) Shimoda M, Tsukamoto T, et al., Epithelial Cell-Derived a Disintegrin and Metalloproteinase-17 Confers Resistance to Colonic Inflammation Through EGFR Activation. *EBioMedicine*. 5: 114-124, 2016.
 - 69) Toyoda T, Tsukamoto T, et al., Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter*. 21: 131-142, 2016.
 - 70) Tsukamoto T, Kiriyama Y, Tatematsu M, Chapter 22. *Helicobacter*. In: Liu, D, ed. *Laboratory Models for Foodborne Infections*. London, UK: Taylor and Francis, CRC Press, 2017 (in press).
 - 71) Tachibana, H, Gi M, et al., Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, in press.
 - 72) Yamaguchi T, Gi M, et al., A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 69: 1-7, 2017.
 - 73) Hirayama Y, Gi M, et al., Anti-PD-L1 treatment enhances antitumor effect of everolimus in a mouse model of renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 107: 1736-1744, 2016.
 - 74) Kakehashi A, Gi M, et al., CD44 variant 9 is a potential biomarker of tumor initiating cells predicting survival outcome in hepatitis C virus-positive patients with resected hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 107: 609-18, 2016.
 - 75) Kanki M, Gi M, et al., Detection of non-genotoxic hepatocarcinogens and prediction of their mechanism of action in rats using gene marker sets. *J Toxicol Sci*. 41: 281-92, 2016.
 - 76) Kakehashi A, Gi M, et al., Ethanol-Extracted Brazilian Propolis Exerts Protective Effects on Tumorigenesis in Wistar Hannover Rats. *PLoS One*. 11: e0158654, 2016.
 - 77) Taya S, Gi M, et al., Preventive Effects of *Spirogyra neglecta* and a Polysaccharide Extract against Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis in Mice. *Asian Pac J Cancer Prev*. 17: 2235-45, 2016.
 - 78) Fukushima S, Gi M, et al., Qualitative and quantitative approaches in the dose-response assessment of genotoxic carcinogens. *Mutagenesis*. 31: 341-6, 2016.
 - 79) Yamano S, Gi M, et al., Role of deltaNp63(pos) CD44v(pos) cells in the development of N-nitroso-tris-chloroethylurea-induced peripheral-type mouse lung squamous cell carcinomas. *Cancer Sci*. 107: 123-32, 2016.
 - 80) Kato H, Suzuki S, et al., Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget*. 7: 2009-2021, 2016.
 - 81) Kuno T, Suzuki S, et al., Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients*. 8: 421, 2016.
 - 82) Sato S, Suzuki S, et al., Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Res*. 76: 4192-4204, 2016.
 - 83) Tanaka M, Suzuki S, et al., Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget*. 7: 47242-47251, 2016.
 - 84) Suzuki S, et al., Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 17: 2071, 2016.
 - 85) 鈴木周五、他：前立腺発癌と炎症. 別冊 BIO Clinica、5巻、84-88, 2016.
 - 86) Cho YM, Ogawa K, et al., Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water. *J Appl Toxicol*. in press
 - 87) Toyoda T, Ogawa K, et al., Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1,2-diol. *J Toxicol Sci*. 42: 1-11, 2017
 - 88) Toyoda T, Ogawa K, et al., Tatematsu M, Tsukamoto T. Anti-inflammatory effects of capsaicin and piperine on *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis in Mongolian gerbils. *Helicobacter*. 21: 131-142, 2016
 - 89) Hirata T, Ogawa K, et al., Lack of in vivo mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of gpt delta rats administered singly or in combination. *J Appl Toxicol*. in press
 - 90) Matsushita K, Ogawa K, et al., Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a

Wistar Hannover GALAS rat. J Toxicol Pathol, in press

- 91) Suzuki I, Ogawa K, et al., Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. J Appl Toxicol, in press
 - 92) Suzuki I, Ogawa K, et al., 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. J Toxicol Pathol. 29: 237-246, 2016
 - 93) Goto K, Ogawa K. Lanthanum deposition is frequently observed in the gastric mucosa of dialysis patients with Lanthanum carbonate therapy: A clinicopathologic study of 13 cases, including 1 case of lanthanum granuloma in the colon and 2 nongranulomatous gastric cases. Int J Surg Pathol. 24: 89-92, 2016
 - 94) Mimaki S, Totsuka Y, et al., Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. Carcinogenesis. 37: 817-26, 2016.
 - 95) Zhao X, Ibuki Y, et al., Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation of histone H2AX. J Photochem Photobiol B. 162: 213-222, 2016.
 - 96) 伊吹裕子, 化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性、Bio Clinica 31: 93-96, 2016.
3. 学会発表
- 1) 桐山諭和, 塚本徹哉 Expression of γ -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 8th 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 誘発ラット腎臓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 誘発ラット腎臓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 腎臓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 の肝臓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. 39th EAMO Congress, 2014年、Madrid, Spain
 - 17) 鵜淵英機, 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 非遺伝毒性肝臓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, 2015年、東京

- 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 二段階膵胆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- β -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
- 48) 渡慶次愛、吉見直己 他 沖縄産天然物質 A のマウス大腸発がんモデルにおける抑制効果 .第 32 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2016 年 1 月、高松
- 49) 塚本徹哉 他 ヒト胃発がん過程における形質変化と DNA 損傷マーカーの発現 .第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月、名古屋
- 50) Kiriya, Y, Tsukamoto, T. Histological irreversible point with eradication of *H. pylori*: Comparison of gastric and intestinal-metaplastic glands. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2015 年 10 月、名古屋
- 51) Kiriya Y, Tsukamoto T. Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia as an irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori* in the human

- stomach, AACR-JCA 10th Joint Conference, 2016, Lahaina, Hawaii, USA
- 52) 魏 民 他 ダンマル樹脂のF344 ラットを用いたがん原性試験：ダンマル樹脂はラット肝臓がん物質である。第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、名古屋
 - 53) 豊田武士、小川久美子 他 DNA二重鎖切断マーカー（H2AX）を指標とした遺伝毒性膀胱がん物質の早期検出。第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月、金沢
 - 54) 豊田武士、小川久美子 他 H2AX免疫染色による遺伝毒性膀胱がん物質の早期検出。第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、名古屋
 - 55) Toyoda T, Ogawa K et al. Expression of H2AX as a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rats. American Association for Cancer Research Annual Meeting. April, 2015, Philadelphia
 - 56) 曾根瑞季、小川久美子 他 H2AXを用いた遺伝毒性膀胱がん物質の早期検出系構築-マウスでの検討。第32回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2016年1月、高松
 - 57) 鈴木周五 他 Pioglitazoneによるラット前立腺がん抑制効果。第104回日本病理学会総会、2015年5月、名古屋
 - 58) 鈴木周五 他 Pioglitazoneによるラット前立腺がん抑制効果。第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、名古屋
 - 59) 内木綾、鈴木周五 他 ラット前立腺癌に対するルテオリンの化学予防・治療効果。第74回日本毒学会学術総会、2015年10月、名古屋
 - 60) 鈴木周五 他 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝臓がん抑制効果。第32回日本毒性病理学会総会および学術集会、2016年1月、高松
 - 61) 戸塚ゆ加里 他 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明。第42回日本毒性学会学術大会、2015年6月、金沢
 - 62) Totsuka Y et al. Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、名古屋
 - 63) 戸塚ゆ加里 ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析による発がん要因の探索。第44回日本環境変異原学会、2015年12月、福岡
 - 64) 秋場 望、戸塚ゆ加里 他 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響。第44回日本環境変異原学会、2015年12月、福岡
 - 65) Ibuki Y Histone modifications induced by chemicals and change of sensitivity to UV. 15th International Conference of Radiation Research (Kyoto), May 2015, Kyoto
 - 66) 豊岡達士、伊吹裕子 他 リン酸化ヒストン H2AX を指標とした化学物質遺伝毒性試験法構築に向け
た基礎的検討。第43回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2015年10月、南知多
 - 67) 楊光、伊吹裕子 タバコ副流煙暴露による紫外線DNA損傷修復の遅延とアルデヒド類の関連性。第44回日本環境変異原学会、2015年11月、福岡
 - 68) 荻野真宏、伊吹裕子 他 熱ストレスによるヒストン H2AX のリン酸化とその機構。第44回日本環境変異原学会、2015年11月、福岡
 - 69) 豊岡達士、伊吹裕子 他 リン酸化ヒストン H2AX を指標とした化学物質遺伝毒性評価手法構築に関する基礎的検討。第44回日本環境変異原学会。2015年11月、福岡
 - 70) 楊光、伊吹裕子 タバコ副流煙はヒト皮膚細胞の紫外線感受性を亢進させる。富士山麓アカデミック&サイエンスフェア、2015年12月、富士
 - 71) 荻野真宏、伊吹裕子 他 DNA損傷能を有さない熱ストレスがなぜ H2AX を誘導するか？。富士山麓アカデミック&サイエンスフェア、2015年12月、富士
 - 72) Nakachi S, Yoshimi N. 他: The Modifying Effects of the Extract from Okinawan Sweet Potato Leaves in Mouse Colon Carcinogenesis. AACR Annual Meeting 2016, 2016年4月、ニューオリンズ
 - 73) 鰐淵英機、魏 民、他。遺伝毒性・発がん性をスクリーニングする *in vivo* 短期検索法。第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月、名古屋
 - 74) 藤岡正喜、魏 民、他。非遺伝毒性ラット肝臓がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の検討。がん予防学術大会2016名古屋、2016年7月、名古屋
 - 75) 藤岡正喜、魏 民、他。ラット腎癌肺高転移株を用いた転移亢進に寄与する分子生物学的特性の検討。第13回日本病理学会カンファレンス、2016年7月、神戸
 - 76) 平山幸良、魏 民、他。mTOR 阻害剤 everolimus と抗 PD-L1 抗体の併用療法による抗腫瘍効果。第31回発癌病理研究会、2016年8月、長野
 - 77) 河内聡子、魏 民、他。1,2-DCP および DCM 複合曝露がマウス肝臓がんを促進する。第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
 - 78) 魏 民、辰己久美子、他。ハムスター二段階発がんモデルにおける1,2-DCPの発がん修飾作用。第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
 - 79) 岡田諭志、魏 民、他。EGFR・ALK陰性原発性肺腺癌を用いた網羅的リン酸化プロテオーム解析。第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
 - 80) 横平政直、他。A possible predictable marker, napsin A, for the tumorigenic potential of lung bronchio-alveolar hyperplasia in rodents. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
 - 81) 鈴木周五、他。NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝臓がん抑制効果。第105回日本病理学会総会、2016年5月、仙台
 - 82) 鈴木周五、他。NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝臓がん抑制効果。第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜

- 83) 加藤寛之、鈴木周五、他. 前立腺癌細胞株の同種同所移植モデルの確立. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 84) 鈴木周五、他. 前立腺癌がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立. 第33回日本毒性病理学会総会および学術集会、2017年1月、堺
- 85) 曾根瑞季、小川久美子、他. H2AXを指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット肝臓における検討 - . 第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月、名古屋
- 86) 豊田武士、小川久美子、他. 化学物質の膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性および発がん性の短期評価系開発. 第2回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2016年9月、東京
- 87) 桐山諭和、豊田武士、小川久美子、塚本徹哉. ヒト胃癌における -H2AX と p53 の免疫組織学的解析. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 88) 赤木純一、小川久美子、他. Pol γ 、Pol δ 、および Pol ϵ の欠損はさまざまな化学物質に対して異なる感受性を示し、遺伝毒性のスクリーニングに有用である. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 89) 豊田武士、鈴木周五、小川久美子、他. 遺伝毒性膀胱癌がん物質によるラット膀胱粘膜における H2AX 発現. 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017年1月、大阪
- 90) 曾根瑞季、小川久美子、他. H2AXを指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット腎臓における検討 - . 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017年1月、大阪
- 91) Totsuka Y, Lin Y, et al., Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 50th Anniversary Conference IARC, 2016年6月、リヨン
- 92) Totsuka Y, Watanabe M, et al., Development of a novel *in vitro* mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials, 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 2016年8月、コペンハーゲン
- 93) 戸塚ゆかり、林 櫻松、他. DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 94) 伴野 勸、戸塚ゆかり、他. 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 95) 三牧幸代、戸塚ゆかり、他. 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 96) 戸塚ゆかり. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索. 第59回日本放射線影響学会、2016年10月、広島
- 97) 佐藤 春菜、戸塚ゆかり、他. 多層カーボンナノチューブの繊維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば
- 98) 前迫裕也、戸塚ゆかり、他. 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析). 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば
- 99) 戸塚ゆかり、善家 茜、他. 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば
- 100) 楊光、伊吹裕子. たばこ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延. 日本光医学光生物学会第38回年会、2016年7月、京都
- 101) 楊光、伊吹裕子. タバコ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延とカルボニル類の関与. 第29回変異原機構研究会、2016年9月、京都
- 102) 趙曉旭、伊吹裕子. 各種金属ナノ粒子によるヒストン修飾変化とその誘導メカニズムの検討. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば
- 103) 楊光、伊吹裕子. 飽和/不飽和アルデヒド類によるヌクレオチド除去修復の阻害. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば

G. 知的財産権の出願・登録状況

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