

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
(総合)研究報告書

メタボロミクスを用いた膀胱発がん性芳香族アミン化合物の活性代謝物の解明
研究代表者 三好規之 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 准教授

研究要旨

平成 27 年、国内の事業場から、従業員に膀胱がんが高頻度に発症している状況について報告があった。膀胱がんを発症した労働者は、染料や顔料の製造過程で使用する中間体物質を扱う作業に従事しており、長期間・高濃度に芳香族アミン類に曝露されてきた職業性被ばくが指摘されている。芳香族アミンのうち発がんとの関連が最もよく研究されている *o*-トルイジン (*o*-Tol) は、国際がん研究機関 (IARC) が「ヒトに対して発がん性が認められる」Group 1 に分類する発がん物質である (IARC Monograph, 2010)。*o*-Tol は、様々な遺伝毒性試験で陽性を示す一方で、変異原性試験での陽性反応には代謝活性化を必要とするため、*o*-Tol の発がんメカニズムには、生体内で生成される活性代謝物に起因する DNA 損傷 (DNA 付加体形成) が関与していることが示唆されているが、その詳細は不明である。*o*-Tol のように、代謝物活性化によって変異原性試験などで陽性反応を示す代謝物 (活性代謝物) の多くは、生体成分との高反応性ゆえ、その本体を生体試料から正確に分析することは容易ではない。しかし、活性代謝物は病態の発症に直接的に作用する分子であるので疾患の発症メカニズム解明に重要であるだけでなく、化学物質の有害性を早期に且つ高精度に評価する優れたバイオマーカーになりうる。本研究では、DNA 付加体を網羅的に検出する DNA アダクトームの分析技術と、代謝物の網羅的分析法であるメタボローム解析技術を駆使し、*o*-Tol 活性代謝物と、その DNA 付加体の同定を目的として分析を行った。

o-Tol の S9 mix を用いた試験管内代謝や、calf thymus DNA との試験管内反応、さらに *o*-Tol 曝露 (0.8% 飲水投与 2 日間) ラット生体試料などを用い各種分析より、細胞毒性および遺伝毒性を示す *o*-Tol 代謝物の一つとして *o*-Tol の 2 量体である 2-methyl-*N*⁴-(2-methylphenyl)-1,4-benzenediamine (MMBD) を同定した。MMBD を生体試料から検出するのは新規である。それゆえ、*o*-Tol の 2 量体 MMBD を介した DNA 付加反応が DNA ダメージを引き起こし、*o*-Tol の膀胱発がんに影響を及ぼす新規メカニズムが示唆された。

このような、代謝活性化を必要とする発がん物質の代謝産物および DNA 付加体の網羅的分析を基軸とした探索的基盤研究を展開し、精度の高いリスク評価システム開発を行うことで、芳香族アミン類被ばくの原因究明と健康障害防止に貢献する。

A. 研究目的

化学物質の曝露によって生成されるDNA付加体は、変異原性や遺伝毒性を説明する要因の一つであり、多くは代謝活性化や内因性分子との複雑な化学反応を経るため、DNA付加体のほとんどは構造が未知・未同定である。それゆえ、DNA付加体形成に関わる代謝物を正確に把握することができれば、多くのDNA付加体の構造決定に大きく貢献する。さらに、それらの化合物が、発がん性に直接関わる重要な化合物であることを考慮すると、生体試料中の活性代謝物(あるいはその前駆体)を正確に定量することで、化学物質が将来引き起こす有害事象を早期に且つ正確に評価する最も優良な曝露マーカーとなる。しかし、活性代謝物の多くはバイオマトリックス中で化学的に不安定である故に、生体内で起こる複雑なイベントの中から正確に分析することが困難である。

近年、国内の事業場から、従業員に膀胱がんが高頻度に発症している状況について報告があった。膀胱がんを発症した労働者は、染料や顔料の製造過程で使用する中間体物質を扱う作業に従事しており、長期間・高濃度に芳香族アミン類に曝露されてきた職業性被ばくが指摘されている。芳香族アミンのうち発がんとの関連が最もよく研究されている*o*-トルイジン(*o*-Tol)は、国際がん研究機関(IARC)が「ヒトに対して発がん性が認められる Group 1」に分類する発がん物質である(IARC Monograph, 2010)。*o*-Tolは、様々な遺伝毒性試験で陽性を示す一方で、変異原性試験での陽性反応

には代謝活性化を必要とするため、*o*-Tolの発がんメカニズムには、生体内で生成される活性代謝物に起因するDNA損傷(DNA付加体形成)が関与していることが示唆されている。想定されているDNA付加体の候補は、グアニンのC8位に*o*-Tolが1分子付加したdG-C8-*o*-Tolである。しかし、ヒトや実験動物などの生体試料からdG-C8-*o*-Tolを直接検出した報告は無く、*o*-TolによるDNA付加反応および遺伝毒性・発がんメカニズムの詳細は未だ不明である。

上述したように近年では分析技術の進歩によって、生体試料中に含まれる様々な代謝物を一斉に分析し、その表現系を予測するメタボリックフェノタイピングのような分析・解析技術や研究分野が拡がりをみせつつある。それゆえ本申請研究では、メタボロミクス解析・分析技術を応用し、化学物質の有害性を正確に評価する診断法の開発を目的とした*o*-Tolのような代謝活性化を必要とする芳香族アミン発がん物質への曝露に対する精度の高いリスク評価システムの開発を行うことで、職業性被ばくの原因究明と健康障害防止に貢献する。

B. 研究方法

In vitro 代謝物の LC-MS 分析

o-TolとS9mixの試験管内反応で調製した反応液中の代謝物について分析を行った。反応条件は、100 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)中で20 mM *o*-Tolを5倍希釈したS9 mix(染色体試験用凍結S9 MIX;キッコーマン)と37°Cで3時間反応させた(50 μ l)。3倍量のメタノール添

加により抽出と除タンパクを行い、遠心後の上清をエバポレーターにより乾固させ 100 μ l のメタノールに溶解させた。超純粋で 100 倍希釈後、10 μ l を LC-MS にインジェクションした。LC-MS は Waters 社の Acquity UPLC および Bruker Daltonics 社 micrOTOF-QII を用いた。カラムは、Waters 社の Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 \times 50 mm) を使用した。流速は 0.4 ml/min、移動相 A 液は 0.1% formic acid (FA) in H₂O、B 液は 0.1% FA in MeCN を使い、0-3 分 B: 1%、17-20 分 B: 80%、20.1-25 分 B: 1% のリニアグラジエントで化合物の分離を行った。イオン源は ESI ポジティブモードで検出を行った。得られた MS イオンデータは、Reifycs 社の多変量解析ソフトウェア Signpost でピーク抽出を行い、Agilent 社の Mass Profiler Professional で S9 mix との反応で特異的に生成した *o*-Tol 代謝物の解析を行った。

3,3'-ジメチルベンジジン (DMB) の定量解析は、上記の条件で調製した試料を LC: 1200series、MS: G6410B Triple Quad を使い分析した。試料の注入量は 10 μ l、カラムは Waters Atlantis T3 3 μ m 2.1 \times 150mm を用いた。流速は 0.2 ml/min、A 液: 0.1% FA in H₂O、B 液: 0.1% FA in MeCN によるグラジエント方式で行った。グラジエント条件は、0 分で A 液 100%、B 液 0%、20 分で A 液 0%、B 液 100%、30 分で A 液 0%、B 液 100%、30.01 分で A 液 100%、B 液 0%、40 分で A 液 100%、B 液 0% とした。測定モードは MRM モードで行った。MRM 条件は m/z 213.1 \rightarrow 180.0 とした。DMB 標準

品 (東京化成工業株式会社) を用いた外部検量線により定量した。

In vitro DNA アダクトーム解析

o-tol-C8-dG 標準品は Beyerbach および Pasha らの方法に従って合成した (Biomarker, 1, 1996、Org. Chem., 2, 2006)。10 mmol 2-nitrotoluene (in 1 ml EtOH) に 12 mmol hydrazine sulfate、290 mg magnesium turnings、5 ml D.W. を加え、攪拌しながら 80°C で約 3 時間反応させた。TLC (hexane:EtOAc=9:1) で反応の進行を確認後、反応液を濾過した。回収した有機層に triethylamine (6 mmol) と tetrahydrofuran (15 ml) を加え、スターラーで攪拌しながら -50°C まで冷却し、6 mmol pyruvitrile を加え、-50°C で 40 分間反応させた。その後、2.5 mmol dG (1 水和物)、2.5 mmol triethylamine、30 ml D.W. を加え、室温で 21 時間反応させた。得られた反応液を diethyl ether (40 ml)、ethyl acetate (40 ml)、n-butanol (40 ml) で分配し、回収した n-butanol 層を減圧乾固した。得られた結晶を 4 ml MeOH に溶解し、遠心分離 (4°C、15000 rpm、10 min) 後、上清を新しいチューブに移し、HPLC による分取精製を行った。分取 HPLC は、LC-20AD (SHIMADZU 社) を使い、カラムは、TSKgel ODS-100V 5 μ m (東ソー (株) 4.6 mm I.D. \times 250 mm) を用いた。流速は 1 ml/min、A 液: 0.1% FA in H₂O、B 液: 0.1% FA in MeCN によるグラジエント方式で行った。グラジエント条件は、0 分で A 液 99%、B 液 1%、30 分で A 液 50%、B 液 50%、30.01 分で A 液 99%、B 液 1%、

40 分で A 液 99%、B 液 1%とした。254 nm に吸収を示す 18.5 分のピークを分取し、ESI+ m/z 328.1 を確認し、*o*-tol-C8-dG 標準精製品とした。

Calf thymus DNA を用いた試験管内反応での DNA 付加体形成は、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 20 mM *o*-Tol あるいは DMB を 5 倍希釈した S9 mix (染色体試験用凍結 S9 MIX; キッコーマン) と 37°C で 3 時間反応させ (50 μ l)、1 mg/ml calf thymus DNA を 50 μ l 添加し 37°C で 3 時間反応させた。反応後、20 mg/ml Proteinase K を 2 μ l 添加し 55°C で一晩反応させた。反応後、エタノール沈殿により DNA を回収し、micrococcal nuclease および phosphodiesterase により DNA をヌクレオチドに分解後、alkaline phosphatase によりヌクレオシドを調製し、LC-MS の MRM モードにより DNA 付加体を分析した。LC-MS は Agilent 社の HPLC: Agilent 1200, MS: G6410B Triple Quadrupole を用いた。カラムは TSK-GEL Super-ODS 2.3 μ m (東ソー(株)、100 \times 内径 2.0 mm)、流速は 200 μ L/min、移動相 A 液は 0.1%ギ酸を含む超純水、B 液は 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを用い、0 分 B: 1%、15-30 分 B: 80%、30.1-40 分 B: 1%のリニアグラジエントで化合物の分離を行った。測定モードは SRM モードで m/z [M+H]⁺ (228~727)/ [M-116+H]⁺ をモニターした。

ラットへの *o*-Tol 曝露実験

国立医薬品食品衛生研究所の豊田 武士博士との共同研究のもと F344 ラット (雄) 6 週齢に、水道水あるいは 0.8%の

o-Tol 塩酸塩を 2 日間、代謝ゲージにて 飲水投与 (自由摂取) し、尿を回収した (各群 n=5)。ラットを屠殺後、肝臓、膀胱、血液などを回収し、以下の分析に供した。

代謝物の合成

o-Tol の 2 量体であるアゾ体 (2,2'-dimethylazobenzene)、アゾキシ体 (2,2'-dimethylazoxybenzene)、ヒドラジン体 (2,2'-dimethylhydrazobenzene) の合成は、Pamar の方法 (*Orient. J. Chem.*, 2013, **29**, 969-74.) に従って行った。ナスフラスコに triethylammonium formate (7.5 mmol) をとり、methanol (7.5 ml) に溶かした 2-nitrotoluene (5 mmol)、magnesium turnings (6 mmol) を加え、攪拌しながら室温で 80 分反応させた。反応液を ethyl acetate (40 ml \times 3) で分配し、ethyl acetate 層を減圧乾固後シリカゲルクロマトグラフィーにて分離・精製を行った。

また、*o*-Tol の 2 量体であるジアミン体 (2-methyl-*N*⁴-(2-methylphenyl)-1,4-benzenediamine) の合成は、Jammi の報告 (*J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 1971-76) に従って行った。DMSO/*t*-BuOH 1:3 溶液 1 ml に CuO nanoparticles (5 mol %)、3-methyl-4-nitroaniline (1.2 mmol)、2-iodotoluene (1 mmol)、KOH (1.5 mmol) を加え、攪拌しながら 110°C で 24 時間反応させた。反応終了後、室温まで冷却し、ethyl acetate (15 ml \times 3) で分配し、得られた結晶をシリカゲルクロマトグラフィー法にて分画・精製を行った。得られたニトロ体 (3-methyl-4-nitro-*N*-(*o*-tolyl)aniline) を EtOH 20 ml に溶解、10% Pd/C を 100 mg 加えたのちに水素

置換し、24 時間反応させた。反応液はセライトろ過し、EtOH 層を減圧乾固した。

In vivo 代謝物の LC-MS 分析

尿試料 (50 μ l) に、150 μ l の diethyl ether を添加し代謝物の抽出と除タンパクを行い、遠心後の上清をエバポレーターにより乾固させ 50 μ l のメタノールに溶解させた。超純水で 10 倍希釈後、10 μ l を UPLC-TOF-MS にインジェクションした。UPLC-TOF-MS は Waters 社の Acquity UPLC および Bruker Daltonics 社 MicroTofQII を用いた。カラムは、Waters 社の Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ l (2.1 \times 50 mm) を使用した。流速は 0.4 ml/min、移動相 A 液は 0.1%ギ酸を含む超純水、B 液は 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを用い、0-3 分 B: 1%、17-20 分 B: 80%、20.1-25 分 B: 1%のリニアグラジエントで化合物の分離を行った。イオン源は ESI ポジティブモードで検出した。

In vivo DNA アダクトーム解析

ラット肝臓 (100 mg) からの DNA 抽出は、QIAGEN の Genra Puregene Tissue Kit を使用し、付属のプロトコールに従い抽出を行った。調製した DNA は、micrococcal nuclease および phosphodiesterase により DNA をヌクレオチドに分解後、alkaline phosphatase によりヌクレオチドを調製し、LC-MS (HPLC; Prominence SHIMADZU、MS; Triple TOF 6600 AB-SCIEX) に供した。カラムは Synergi™ 2.5 μ m Fusion-RP 100Å (Phenomenex 社、100 \times 2.0 mm)、流速は 400 μ L/min、移動相 A 液は 0.1%ギ酸を含む超純水、B 液は 0.1%ギ酸を含む

アセトニトリルを用い、0 分 B: 0%、10 分 B: 55%、15 分 B: 99%、15.01-25 分 B: 0% のリニアグラジエントで化合物の分離を行った。測定モードは neutral loss モードでデオキシリボースの脱離 Δ 116 をモニターした。

細胞毒性試験

96 ウェルプレートに 2×10^4 /well で播種した T24 細胞 (DMEM+10% FBS: 理研セルバンク)、TK6 細胞 (RPMI+10% HS: 京都大学武俊一先生より供与) へ *o*-Tol および代謝物を曝露した。24 時間培養後、アラマブルー試薬を加え、2 時間インキュベート後 560 nm の吸光度を測定し細胞生存率を求めた。

フローサイトメトリー

T24 細胞、TK6 細胞へ *o*-トルレイジンおよび代謝物を曝露し、4 時間後細胞を回収した。以降の操作は、CST ジャパン株式会社のフローサイトメトリー直接標識抗体用プロトコールに従い実施した。抗 γ H2AX 抗体 (Ser139)(20E3) Rabbit mAb (Alexa Fluor® 488 Conjugate) γ H2AX 陽性細胞をフローサイトメーター (AttuneNXT, Thermo) にて測定した。

倫理面への配慮

動物実験では、静岡県立大学および国立医薬品食品衛生研究所における動物実験に関する指針に従い各機関の倫理委員会の承諾を得て行なった。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理規定に十分配慮し、実験終了時の安楽死等において

も深麻酔下で苦痛に配慮した。

C. 研究結果

o-Tol の S9 mix 代謝物分析

LC-MSによる代謝物分析においては、① *o*-Tol のみ、② *o*-Tol+S9 mix、③ S9 mix のみの計3群(各群 n=3)で分析を行い、複数のピークが②の *o*-Tol+S9 mix で特異的な化合物(代謝物)として検出された(図1)。特に、保持時間1.5分~4分付近に検出された複数のピークは質

量電荷比が m/z 213.14~249.13 であり、*o*-Tol (m/z 108.10) の二量体化あるいはその酸化物であることが予想された。特にピーク6(RT=3.1分)の質量電荷比は m/z 213.1400 であり、その精密質量から組成式を $C_{14}H_{16}N_2$ と予測し、データベース検索より、3,3'-ジメチルベンジジン(DMB)であると予想した。それゆえ、DMB の標準品を用い分析したところ、DMB はピーク6よりも早くに溶出される RT=1.5分のピークと保持時間および精

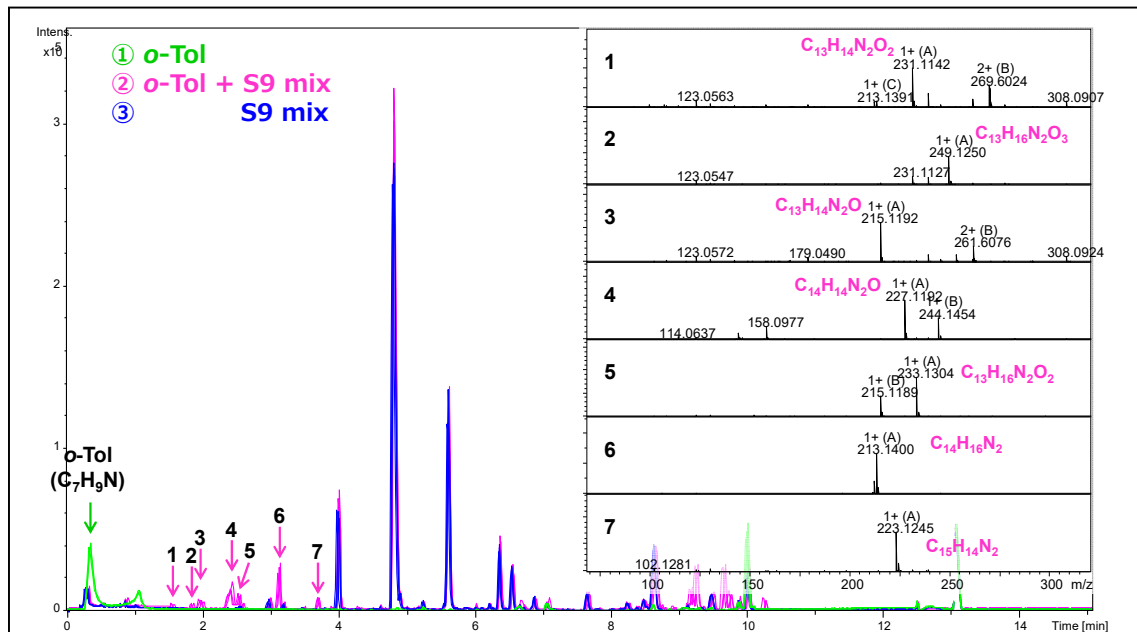


図1 *o*-Tol の S-9 mix 代謝物 LC-MS 分析で得られたクロマトグラム 右側は、ピーク1~7のMSスペクトルおよび組成式を示す。

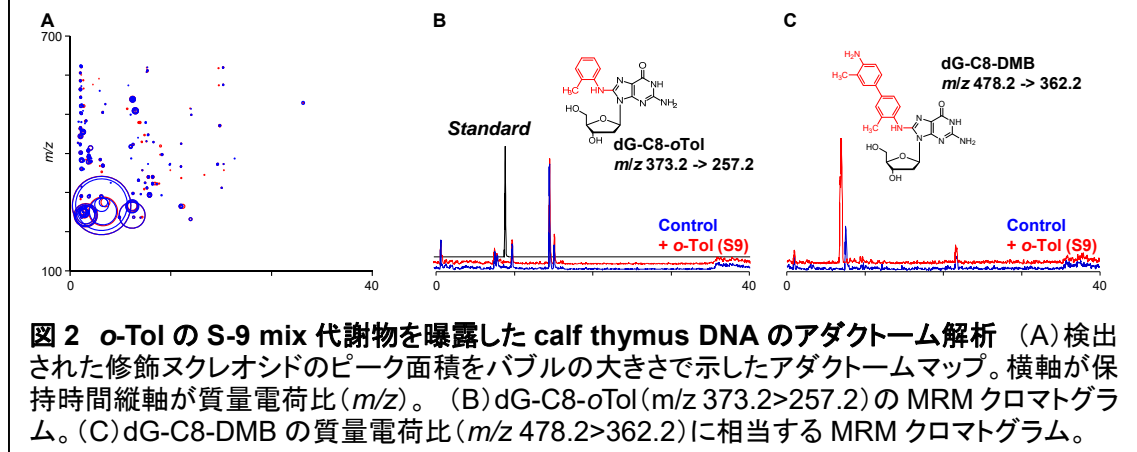


図2 *o*-Tol の S-9 mix 代謝物を曝露した calf thymus DNA のアダクトーム解析 (A) 検出された修飾ヌクレオシドのピーク面積をバブルの大きさで示したアダクトームマップ。横軸が保持時間縦軸が質量電荷比(m/z)。 (B) dG-C8-*o*Tol (m/z 373.2>257.2) のMRMクロマトグラム。 (C) dG-C8-DMBの質量電荷比(m/z 478.2>362.2)に相当するMRMクロマトグラム。

密質量が一致した。このことから、*o*-Tol は S-9 mix によって DMB に代謝変換されており、DMB の定量解析より 0.1% が変換されていることが示唆された。またピーク 6 は、*o*-Tol の 2 量体に相当する質量であることから、アミノ基同士で結合した 1,2-bis (2-methylphenyl) hydrazine あるいは、head-to-tail で二量体化した 2-methyl-*N*⁴-(2-methylphenyl)-1,4-benzenediamine (MMBD) である可能性が示唆された。またピーク 4 (RT=2.4 分) の質量電荷比は m/z 227.1192 であり、その精密質量から、組成式を C₁₄H₁₄N₂O と予測し、データベース検索より *o*-azoxytoluene であると予測した。

o-Tol-calf thymus DNA 付加体の分析

Calf thymus DNA を用いた試験管内反応から調製した試料の DNA アダクトーム解析を行ったところ、S9 mix で代謝させた *o*-Tol を曝露した calf thymus DNA において、予想されている付加体である *o*-tol-C8-dG (RT=9.0 分、 m/z 373.2 >

257.2) は検出限界以下であった (図 2B)。しかし、構造不明の複数の修飾ヌクレオシドが S9 mix で代謝させた *o*-Tol を曝露した calf thymus DNA 試料から検出された (図 2A)。その中でも特に、*o*-Tol の S-9 mix 代謝によって生成する *o*-Tol 2 量体が 1 分子 dG に付加した dG-(*o*-Tol)₂ の質量電荷比に相当する m/z 478.2>362.2 が、S9 mix で代謝させた *o*-Tol を曝露した calf thymus DNA 試料で顕著な増加を示した (図 2C)。

ラット尿中の代謝物分析

共同研究者である豊田武士博士 (国立医薬品食品衛生研究所) らの検討において、F344 ラット (雄) 6 週齢への *o*-Tol 曝露 (0.8% 飲水投与) 2 日後の膀胱で、DNA 損傷のマーカーである γ H2AX が有意に上昇することを見出されている。それゆえ、本研究ではまず、*o*-Tol 曝露 (0.8% 飲水投与) 2 日後の尿を分析し、DNA 付加反応に関わる *o*-Tol 代謝物を探索した。

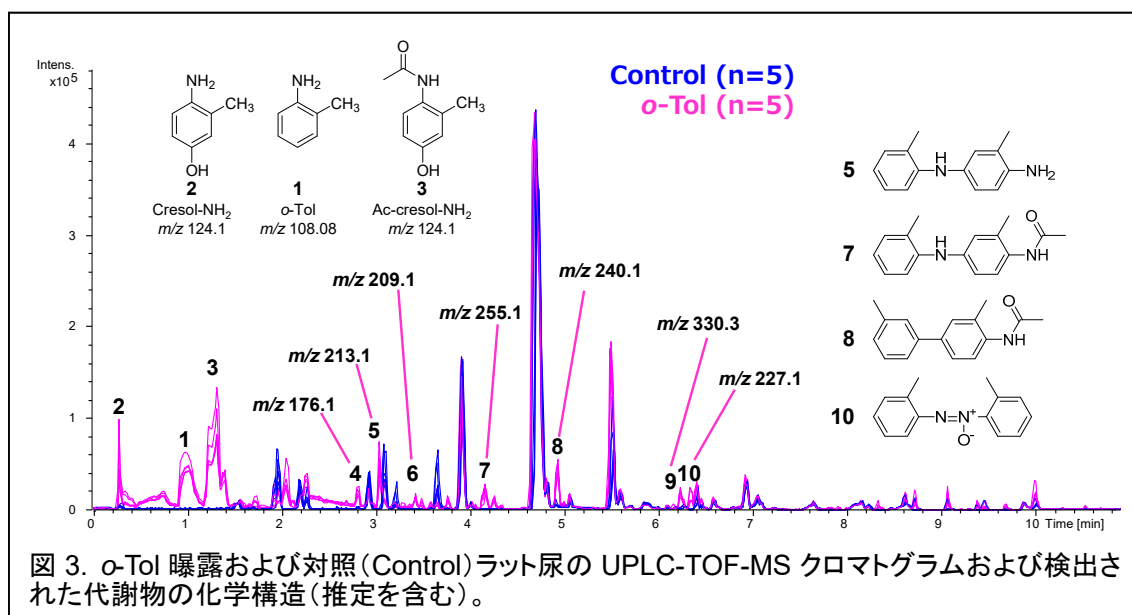


図 3. *o*-Tol 曝露および対照 (Control) ラット尿の UPLC-TOF-MS クロマトグラムおよび検出された代謝物の化学構造 (推定を含む)。

o-Tol 曝露 (0.8% 飲水投与) ラット尿および対照のコントロールラット (水道水投与) 尿より、代謝物を抽出し UPLC-TOF-MS にて分析したところ、*o*-Tol 曝露群で未修飾の *o*-Tol **1** (m/z 108.08) が検出された (図 3)。さらに、*o*-Tol が酸化された (O 付加) アミノクレゾール **2** (m/z 124.1)、アミノクレゾールがアセチル化されたアセチルアミノクレゾール **3** (m/z 166.1) など主要代謝物が検出された (図 3)。この 3 化合物以外にも、少なくとも 20 種以上のピークが *o*-Tol 群で特異的に検出された。これらは、その群特異性から *o*-Tol 由来の代謝物であることが推測された。*o*-Tol 群尿で特異的に検出されたこれら約 20 種類の代謝物のうち DNA と反応性を示す化合物を絞り込む目的で、*o*-Tol 曝露ラット尿を calf thymus DNA と反応させ、反応後の尿中に残存する代謝物を分析したところ、DNA との反応により消失あるいは減少した代謝物は、7 種類 (化合物 **4**~**10**) であった (図 3)。

そのなかでも化合物 **5** は、 m/z 213.1 であり、*o*-Tol の二量体であることが推測された。しかし化合物 **5** は、アミノ基同士が縮合したヒドラジン体 (2,2'-dimethylhydrazobenzene) あるいは、ヒド

ラジン体の分子内転移反応 (ベンチジン転移) により生成するベンチジン体 (3,3'-demethylbenzidine) とは UPLC-TOF-MS 分析の保持時間が異なった。そこで *o*-Tol が head-to-tail で二量体化した 2-methyl-*N*-(2-methylphenyl)-1,4-benzenediamine (MMBD) を新規に合成し分析したところ、化合物 **5** と保持時間、MS スペクトルが一致したことから、化合物 **5** を MMBD と同定した。なお、この MMBD は、生体試料からの検出が新規であり、発がん性を含む生理活性に関しても全く報告されていない。

化合物 **7** (m/z 255.1) は、MMBD のアセチル化体であり、化合物 **8** (m/z 240.1) は *o*-Tol 2 量体の脱アミノしたアセチル体であり、有名な膀胱発がん物質アミノビフェニル構造を部分的に含む可能性がある。さらに化合物 **10** は、*o*-Tol 2 量体化合物のアゾキシ体であることを標準品との比較より同定した。

ラット肝 DNA アダクトーム解析

o-Tol 曝露 (0.8% 飲水投与 2 日間) および対照ラットの肝臓 DNA のアダクトーム解析 (LC-MS) で検出されたピークの主成分分析の結果を図 4 に示す。図 4

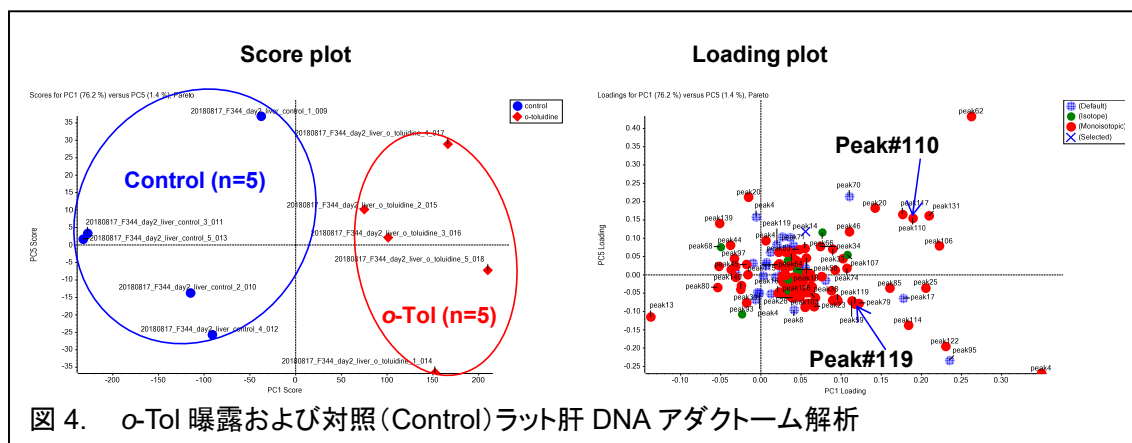


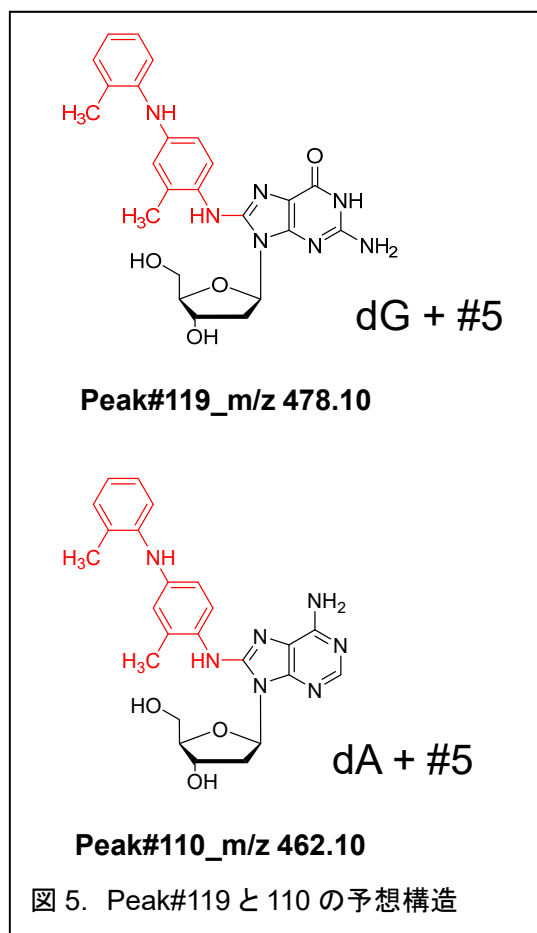
図 4. *o*-Tol 曝露および対照 (Control) ラット肝 DNA アダクトーム解析

の Score Plot の結果より、両群 (*o*-Tol 群と対照群) は、第一主成分軸 (寄与率 76.2%) で明瞭に分離されている。また、Loading plot 上で検出されたピークの多くが、Score Plot 上の *o*-Tol 群と同じく第一主成分軸の >0 (正の値) に分布していることから、*o*-Tol 群で特異的なピーク (DNA 付加体) が多く検出されていることが示唆された。*o*-Tol 群で検出された DNA 付加体の中でもピーク#119 および #110 は、MSMS スペクトルでそれぞれ *m/z* 152.1 および 136.1 が検出されたことより、それぞれ dG および dA の修飾体であることが示唆された。またピーク#119 (*m/z* 478.1) および #110 (*m/z* 462.1) の質量電荷比より、*o*-Tol 2 量体がそれぞれ dG および dA に 1 分子付加した質量に相当するピークであることが示唆された (図 5)。これらの結果より、ピーク#119 および #110 は、*o*-Tol の 2 量体化である MMBD が、dG および dA の C8 位あるいは N² 位に共有結合した修飾ヌクレオシドである可能性が示唆された。現在、これら付加体同定および定量のため標準品調製を行っている。

一方で、多くの論文で想定されている DNA 付加体候補の dG-C8-*o*-Tol は、今回の分析条件において検出限界以下であった。

MMBD の生物活性試験

今回の検討で生体試料より初めて検出された MMBD に関して、生物活性の論文報告がないことから、細胞毒性試験、 γ H2AX を指標とした遺伝毒性試験を実施し、*o*-Tol の各種活性と比較した。



MMBD は、哺乳動物由来の培養細胞に強い細胞毒性を示した。ヒト膀胱がん由来 T24 細胞に対する細胞毒性の IC₅₀ は、*o*-Tol が >1 mM であるのに対し、MMBD は ~0.5 mM であり、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞に対する細胞毒性の IC₅₀ は、*o*-Tol が 2.3 mM であるのに対し、MMBD は 18.50 μ M 以下であった。さらに、10 mM の *o*-Tol と 100 μ M の MMBD は TK6 細胞に対して同程度の細胞毒性を示すにもかかわらず、DNA 損傷のマーカである γ H2AX の陽性率は、MMBD 刺激 (100 μ M) 後のみ顕著な増加が検出された。以上より、ラット尿中で新規に検出された *o*-Tol 代謝物である MMBD は、*o*-Tol に比べて非常に強力な細胞毒性と遺伝毒性を示すことが示唆された。現在 Ames

試験を用いて、MMBD の変異原性を調べている。

D. 考察

o-Tol 曝露ラット尿中の代謝物分析より、未修飾の *o*-トルイジン **1** に加え、*o*-Tol の酸化体であるアミノクレゾール **2**、アミノクレゾールのアセチル化体であるアセチルアミノクレゾール **3** が主要な代謝物として検出された(図 3)。このことは、過去の報告(English *et al.* 2012、IARC 2000、Skipper *et al.* 2010、Son *et al.* 1980)をまとめた NTP レポート(2014)と一致する。NTP レポート(2014)では、~88 mg/kg の *o*-Tol 皮下投与後 6 時間の尿、あるいは 400 mg/kg の *o*-Tol 皮下投与後 24 時間の尿に未修飾の *o*-Tol **1** が 5%程度、アゾキシ体 **10** は 0.2%程度で検出されると報告されている。この NTP レポート(2014)と我々の今回の検討(0.8% 飲水投与 2 日間)では条件(投与量、サンプリング時間)が異なるが、我々の今回の検討において検出された未修飾の *o*-Tol **1** とアゾキシ体 **10** の存在比は NTP レポート(2014)と大きく異なる値ではない。このことは、今回の分析精度の妥当性を強く支持するものである。本分析条件下で、UPLC-TOF-MS で検出された MMBD のピークエリアは、*o*-Tol の~22%、アゾキシ体 **10** の約 3 倍であった。尿中 MMBD の定量分析が未遂のため詳細は不明であるが、今回の検討で比較的高濃度の MMBD が *o*-トルイジン曝露ラットの尿で検出されたことは、非常に興味深い知見である(図 3)。

さらに、今回の検討における肝 DNA ア

ダクトーム解析において、dG および dA に MMBD が 1 分子付加した質量に相当するピークが *o*-Tol 曝露群特異的に検出されたため、MMBD が、dG および dA に結合する可能性が強く示唆された(図 4)。一方、今回の DNA アダクトーム解析では、MMBD 付加体と想定されるピーク以外にも複数の修飾ヌクレオシドが *o*-Tol 曝露群特異的に検出されている。今後、これら修飾ヌクレオシドの詳細な解析を進めるとともに、*o*-Tol 曝露ラット膀胱のアダクトーム解析に取り組み、*o*-Tol 膀胱発がんメカニズムにおける DNA 修飾の影響を明らかにする。

生体内における MMBD の生成メカニズムや膀胱発がん性への影響は依然不明である。しかし、共同研究者である国立医薬品食品衛生研究所の豊田武士博士らの知見(膀胱がん発症が報告された事業所で扱われていた芳香族アミン化合物 *o*-Tol、*p*-Tol、キシリジン、アニリン、*o*-アニシジンのうち、ラットへの曝露実験で膀胱組織に強い γ H2AX 陽性反応を誘導したのは、*o*-Tol と *o*-アニシジンであった)と併せて考えると、①パラ位に立体障害がなく head-to-tail で 2 量体形成すること、また②オルト位の側鎖(*o*-Tol の場合メチル基、*o*-アニシジンの場合はメトキシ基)が二量体形成後の安定化および DNA との相互作用・親和性に重要であることが示唆された。そのため、先の共同研究で強い γ H2AX 誘導活性を示した *o*-アニシジンや膀胱発がん性を示さないアニリンなどの二量体形成に関わる構造活性相関について今後詳細に検討し、芳香族アミンの膀胱発がん性にお

ける二量体形成の役割を明らかにする必要がある。

E. 結論

本年度の検討より、*o*-Tol 曝露ラットの尿から MMBD を新規に検出・同定することに成功した。さらに、MMBD は、dG および dA に付加修飾し、非常に強力な細胞毒性と遺伝毒性を示す可能性が強く示唆された。それゆえ、従来より想定されていた dG-C8-*o*-Tol 形成を介した DNA ダメージとは異なり、MMBD を介した DNA ダメージが少なくとも *o*-Tol の膀胱発がんに影響を及ぼす可能性を新規に提出できた。今後、*o*-Tol 曝露ラットで検出されている他の代謝物と DNA 付加体を精査し、芳香族アミン類の有害性評価における代謝物レベル、低分子の化合物レベルの科学的エビデンスを蓄積する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hashidume T, Sakano T, Mochizuki A, Ito K, Ito S, Kawarasaki Y, Miyoshi N. Identification of soybean peptide leginsulin variants in different cultivars and their insulin-like activities. *Sci. Rep.*, (2018) **8**, 16847.

Yagi M, Nakatsuji Y, Maeda A, Ota H, Kamikubo R, Miyoshi N, Nakamura Y, Akagawa M. Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake. *PLoS One.*, (2018) **13**, e0206748.

Yoshikawa Y, Katayanagi Y, Kamiya M, Yamamoto Y, Fukutomi R, Imai S, Miyoshi N, Ohashi N. Tomato saponin supplementation ameliorates the development of experimental arthritis by regulating inflammatory responses. *J. Funct. Foods*, (2018) **49**, 458-464.

Hashidume T, Sasaki K, Hirata J, Kato M, Yoshikawa Y, Iwasaki Y, Arai H, Miura S,

Miyoshi N. Effects of Sanyaku and Its Constituent Diosgenin on the fasted and postprandial hypertriacylglycerolemia in high-fat-diet-fed KK-*A^y* mice. *J. Agric. Food. Chem.*, (2018) **66**, 9968-9975.

Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y. Beneficial effects of green tea catechins on brain function. *Molecules*, (2018) **23**, E1297.

Miyoshi N. Biochemical properties of cholesterol aldehyde secosterol and its derivatives. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, (2018) **62**, 107-114.

Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.*, (2018) **38**, 537-543.

Miyoshi N. Biochemical properties of cholesterol aldehyde secosterol and its derivatives. *J. Clin. Biochem. Nutr.* (2018) **62**, 107-114.

Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.* (2017) in press

Iwai K, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Fukutomi R, Asada K, Ohashi N. Effects of short-term intake of wheat bran with different particle sizes on the murine intestinal environment. *Food Sci. Tech. Res.* (2017) **23**, 733-42.

Inoue M, Senoo N, Sato T, Nishimura Y, Nakagawa T, Miyoshi N, Goda T, Morita A, Miura S. Effects of the dietary carbohydrate-fat ratio on plasma phosphatidylcholine profiles in human and mouse. *J. Nutr. Biochem.* (2017) **50**, 83-94.

Onuma W, Asai D, Tomono S, Miyamoto S, Fujii G, Hamoya T, Nagano A, Takahashi S, Masumori S, Miyoshi N, Wakabayashi K, Mutoh M. Anticarcinogenic effects of dried citrus peel in colorectal cancer due to inhibition of oxidative stress. *Nutr. Cancer* (2017) **69**, 855-861.

Nuka E, Tomono S, Ishisaka A, Kato Y, Miyoshi

N, Kawai Y. Metal-catalyzed oxidation of 2-alkenals generates genotoxic 4-oxo-2-alkenals during lipid peroxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) 80, 2007-13.

Hayakawa S, Saito K, Miyoshi N, Ohishi T, Oishi Y, Isemura M, Nakamura Y. Anti-cancer effects of green tea by either anti- or pro-oxidative mechanisms. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, (2016) 17, 1649-54.

Onuma W, Tomono S, Miyamoto S, Fujii G, Hamoya T, Fujimoto K, Miyoshi N, Fukai F, Wakabayashi K, Mutoh M. Irsogladine maleate, a gastric mucosal protectant, suppresses intestinal polyp development in Apc-mutant mice. *Oncotarget* (2016) 7, 8640-52.

Miyoshi N. Chemical alterations and regulations of biomolecules in lifestyle-related diseases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) 80, 1046-53.

Nakamura T, Miyoshi N, Ishii T, Nishikawa M, Ikushiro S, Watanabe T. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by quercetin and its analogs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) 80, 949-54.

2. 学会発表

加藤麻衣、橋詰力、庄司豊、庄司(加藤)久美子、五十嵐美樹、早川清雄、吉川悠子、三好規之「高脂肪食を摂取したNASH-肝発がんモデルマウス糞便中揮発性化合物の分析」第72回日本栄養・食糧学会大会 2018.5/11-13. 岡山

河合柚子、橋詰力、眞鍋康子、藤井宣晴、中村宜督、三好規之「食品因子 isothiocyanate 類が結合した炎症性サイトカイン MIF の機能解析」第72回日本栄養・食糧学会大会 2018.5/11-13. 岡山

豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子「膀胱がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物:ラットを用いた検討」第24回日本がん予防学会 2018.6/27-28. 高松

平山裕一郎、松崎信生、玉舟亮太、恒松雄太、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹、渡辺賢二「大腸がんリスク因子物質コリバクチンの生産菌検出に関する化学的研究」第24回日本がん予防学会 2018.6/27-28. 高松

三浦進司、妹尾奈波、梅林脩平、守田昭仁、

三好規之、亀井康富「転写共役因子 PGC-1 α によって制御される骨格筋リポクオリター」日本筋学会第4回学術集会 2018.8/10-11. 岡山

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、亀井康富、三浦進司「骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明」日本筋学会第4回学術集会 2018.8/10-11. 岡山

三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二「芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体」第33回発癌病理研究会 2018.8/29-30. 御殿場

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、吉田卓矢、守田昭仁、杉浦悠毅、井上菜穂子、亀井康富、三浦進司「骨格筋中リン脂質と骨格筋機能との関連の解明」第73回日本体力医学会大会 2018.9/7-9. 福井

吉川祐人、鈴木悠、橋詰力、高垣晶子、平山裕一郎、岸本真治、渡辺賢二、中村順行、原征彦、三好規之「ラット尿中の緑茶カテキン由来腸内細菌代謝物一斉分析」第23回日本フードファクター学会 2018.9/7-8. 京都

加藤麻衣、橋詰力、吉田卓矢、田村謙太郎、中村俊之、中村宜督、三好規之「自然薯および自然薯むかごにおける有効成分ジオスゲニンの定量分析」第23回日本フードファクター学会 2018.9/7-8. 京都

松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之「ApoE欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索」第23回日本フードファクター学会 2018.9/7-8. 京都

日高楓、横山大悟、田中航、鈴木悠、三好規之、吹井伸二、杉田卓也、日高健太、窄野昌信、榊原啓之「マンゴーに含まれる成分と抗酸化活性に及ぼす熟度の影響」第23回日本フードファクター学会 2018.9/7-8. 京都

平山裕一郎、田島悠也、恒松雄太、三好規之、若林敬二、渡辺賢二「検出困難な遺伝毒性物質コリバクチンを見出すためのDNA付加体の解析」日本生薬学会第65回大会 2018.9/16-17. 広島

豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子「芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階における遺伝子発現動態」第77回日本癌学会学術総会 2018.9/27-29. 大阪

松山弘希、田中航、鈴木悠、三好規之、松浦靖、柚木崎千鶴子、宮崎達雄、道本英之、窄野昌信、榊原啓之「ApoE欠損マウスを用いた天日干しダイコンの機能性の探索」平成30年

度 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会
2018.10/20-21. 宮崎

田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、
松下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加
里、若林敬二、三好規之 「膀胱発がん性
芳香族アミン *o*-toluidine の代謝物分析とDNA
付加体」日本環境変異原学会 第 47 回大会
2018.11/1-2. 京都

久富優太、小田美光、下原千晶、恒松雄太、
佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、
吉川悠子、八木孝司、梶村春彦、若林敬二、
渡辺賢二、川西優喜「コリバクチン産生大腸菌
の *in vitro* 遺伝毒性試験」日本環境変異原学
会 第 47 回大会 2018.11/1-2. 京都

Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T,
Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K,
Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.
Metabolomics and DNA adductome analysis of
urinary bladder carcinogen *o*-toluidine. ICPH
2018.11/15-16. Shizuoka

Kato M, Hashidume T, Yao I, Eto F, Yoshida T,
Tamura K, Miyoshi N. Quantitative LC-MS
analysis for a bioactive steroidal sapogenin
diosgenin in *Dioscorea japonica* and the bulbils
(*mukago*). ICPH 2018.11/15-16. Shizuoka

Yoshikawa Y, Suzuki Y, Hashidume T, Takagaki
A, Nakamura Y, Hara Y, Miyoshi N. Analytical
method for the intestinal microbial metabolites
of green tea catechin. ICPH 2018.11/15-16.
Shizuoka

Ohashi S, Hashidume T, Ishiduka N, Hayashi H,
Kawarasaki Y, Watanabe K, Yoshikawa Y,
Miyoshi N. Lipid A biosynthesis in *E. coli*
cultured in metal-depletion. ICPH 2018.11/15 -
16. Shizuoka

Hashidume T, Nagata A, Sato R, Miyoshi N.
Regulation of lipid profiles in liver of mouse fed
 β -conglycinin diet. ICPH 2018.11/15-16.
Shizuoka

Miyoshi N, Sasaki K, Hirata J, Kato M, Yao I,
Eto F, Yoshikawa Y, Iwasaki Y, Hashidume T,
Arai H, Miura S. Effects of sanyaku and
diosgenin on the fasted and postprandial
hypertriacylglycerolemia in high fat diet-fed
KK-A^y mice. 第 13 回日中健康科学シンポジ
ウム 2018.11/15-16. 日本平

Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T,
Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K,
Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Analysis
of DNA adduct formed by the reaction with

urinary bladdercarcinogen *o*-toluidine. 第 23 回
静岡健康・長寿学術フォーラム 2018.11/16-17.
Shizuoka

Kato M, Hashidume T, Yao I, Eto F, Yoshida T,
Tamura K, Miyoshi N. Quantitative LC-MS
analysis for a bioactive steroidal sapogenin
diosgenin in *Dioscorea japonica* and the bulbils
(*mukago*). 第 23 回静岡健康・長寿学術フォー
ラム 2018.11/16-17. Shizuoka

Yoshikawa Y, Suzuki Y, Hashidume T, Takagaki
A, Nakamura Y, Hara Y, Miyoshi N. A
consecutive ingestion of green tea extract
enhances the capacity of catechin metabolism.
第 23 回静岡健康・長寿学術フォーラム
2018.11/16-17. Shizuoka

Ohashi S, Hashidume T, Ishiduka N, Hayashi H,
Kawarasaki Y, Watanabe K, Yoshikawa Y,
Miyoshi N. Assay for proinflammatory activity
of structurally modified lipid A. 第 23 回静岡
健康・長寿学術フォーラム 2018.11/16-17.
Shizuoka

川上真由子、橋詰力、三好規之「キノコ抽出物
における骨格筋萎縮予防化合物の探索」第 41
回日本分子生物学会 2018.11/28-30. 横浜

橋詰力、永田光風、佐藤隆一郎、三好規之
「大豆タンパク質 β コングリシニン摂取時の脂
質組成解析」第 41 回日本分子生物学会
2018.11/28-30. 横浜

永田光風、橋詰力、伊藤圭、三浦進司、三好
規之「TRPA1・TRPM8 を介した脂質組成変動
によるロコモティブシンドローム予防法の検討」
第 41 回日本分子生物学会 2018.11/28-30. 横
浜

Kumiko Kato-Shoji, Noriyuki Miyoshi, Miki
Igarashi, John I. Risinger, Yutaka Shoji : Meta
analysis of gene transcripts from fatty livers and
liver cancers of C57BL6 mice identifies
potential drivers of HCC, AACR
2017(Washington DC), 2017 年 4 月 1-5 日

井上瑞樹、妹尾奈波、佐藤友紀、西村友里、
中川匠、三好規之、合田敏尚、守田昭仁、三
浦進司：炭水化物、脂質の摂取比率に応答
する血中 phosphatidylcholine 分子の発見, 第
59 回日本脂質生化学会(京都), 2017 年 6 月
4-8 日

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、
守田昭仁、三浦進司：骨格筋中のリン脂質
に結合する脂肪酸種は筋線維タイプによって
異なる, 第 59 回日本脂質生化学会(京都),
2017 年 6 月 4-8 日

井上瑞樹、佐藤友紀、妹尾奈波、西村友里、三好規之、合田敏尚、守田昭仁、三浦進司：長期的な脂質、炭水化物の摂取比率に応答する血中リン脂質 Long-term effects of carbohydrate/fat ratio in the diet on plasma phospholipid composition in mice and human, 第 71 回日本栄養・食糧学会大会(沖縄), 2017 年 5 月 19-21 日

梅林脩平、妹尾奈波、佐藤友紀、三好規之、守田昭仁、三浦進司：骨格筋中のリン脂質に結合する脂肪酸種は筋線維タイプによって異なる Phospholipid species in skeletal muscle are different between fast-twitch and slow-twitch fiber. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会(沖縄), 2017 年 5 月 19-21 日

Kumiko Kato-Shoji, Noriyuki Miyoshi, Miki Igarashi, Sumio Hayakawa, John I. Risinger and Yutaka Shoji : Identification of epigenetically regulated genes induced by maternal obesity, Frontiers in Reproductive Epigenetics symposium, (Grand Rapids, Michigan), 2017 年 5 月 12 日

恒松雄太、平山裕一郎、榎谷貴洋、松崎信生、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、若林敬二、武藤倫弘、村上晴香、宮地元彦、石川秀樹、渡辺賢二：腸内細菌叢を起源とする遺伝毒性物質コリバクチンの科学分析手法の確立と日本人コホートにおける発がんとの関連性の解析, 第 24 回日本がん予防学会(大阪), 2017 年 6 月 16-17 日

Umebayashi, S., Senoo, N., Sato, T., Miyoshi, N., Morita, A., Kamei, Y., and Miura, S. : Muscle fiber type-dependent differences in phospholipid fatty acid composition, Gordon Research Conferences: Lipids, Molecular & Cellular Biology of, (Waterville Valley, NH), 2017 年 7 月 30 日-8 月 4 日

Senoo, N., Miyoshi, N., Kobayashi, E., Morita, A., and Miura, S. : Changes in phospholipid acyl-chain compositions of skeletal muscle in response to nutritional starvation., Gordon Research Conferences: Lipids, Molecular & Cellular Biology of, (Waterville Valley, NH), 2017 年 7 月 30 日-8 月 4 日

Miura, S., Inoue, M., Senoo, N., Sato, T., Nishimura, Y., Nakagawa, T., Miyoshi, N., Goda, T., and Morita, A. : Effects of the dietary carbohydrate-fat ratio on plasma phosphatidylcholine profiles in human and mouse. Gordon Research Conferences: Lipids,

Molecular & Cellular Biology of, (Waterville Valley, NH), 2017 年 7 月 30 日-8 月 4 日

渡辺賢二、三好規之、若林敬二、武藤倫弘、石川秀樹：腸内細菌叢を起源とする遺伝毒性物質コリバクチンの科学分析手法の確立と日本人コホートにおける発がんとの関連性の解析, 第 76 回日本癌学会(横浜), 2017 年 9 月 28-30 日

豊田武士、三好規之、小川久美子：o-Toluidine and o-anisidine induce γ H2AX formation in the urinary bladder of rats o-トルイジンおよび o-アニシジンはラット膀胱粘膜に γ H2AX 形成を誘導する, 第 76 回日本癌学会(横浜), 2017 年 9 月 28-30 日

Yuto Yoshikawa, Tsutomu Hashidume, Akiko Takagaki, Noriyuki Miyoshi : Development of LC-MS method for target analysis of green tea catechin metabolites, ICPH 2017 (Quebec, Canada), 2017 年 10 月 3-6 日

Yuya Tajima, Takeshi Toyoda, Kohei Matsushita, Tsutomu Hashidume, Keiji Wakabayashi, Noriyuki Miyoshi : Analysis of genotoxic activities of urinary bladder carcinogenic aromatic amines, ICEM 2017(Incheon, Korea), 2017 年 11 月 12-16 日

橋詰力、伊藤圭祐、三浦進司、三好規之：温度感受性受容体シグナルを介した脂質組成変動機構解析, JSofF(藤沢), 2017 年 12 月 2-3 日

三浦進司、妹尾奈波、梅林脩平、守田昭仁、三好規之、亀井康富：転写共役因子 PGC-1 α によって制御される骨格筋リポクオリティー, 第 40 回日本分子生物学会(神戸), 2017 年 12 月 6-9 日

橋詰力、伊藤圭祐、三浦進司、三好規之：温度感受性受容体及び骨格筋中脂質によるロコモティブシンドローム予防機構解析, 第 40 回日本分子生物学会(神戸), 2017 年 12 月 6-9 日

大橋咲香、橋詰力、三好規之：グラム陰性菌リポ多糖構成分子 lipid A の LC-MS 分析法の開発, 第 40 回日本分子生物学会(神戸), 2017 年 12 月 6-9 日

吉川悠子、恒松雄太、松崎信生、平山裕一郎、佐藤道大、三好規之、岩下雄二、梶村春彦、若林敬二、渡辺賢二：大腸がん患者から分離された遺伝毒性物質コリバクチン陽性菌の解析, 第 91 回日本細菌学会総会(福岡),

2018年3月27-29日

Miura S, Senoo N, Miyoshi N, Goto-Inoue N, Minami K, Yoshimura R, Morita A, Sawada N, Matsuda J, Ogawa Y, Setou M, Kamei Y. PGC-1 α -mediated changes in phospholipid profiles of exercise-trained skeletal muscle. ASBMB 2016 2016.4.2-6. SanDiego.

Senoo N, Miyoshi N, Kobayashi E, Morita A, Kamei Y, Miura S. FOXO1-induced Atrophy Changes in Phospholipid Profiles of Skeletal Muscle. ASBMB 2016 2016.4.2-6. SanDiego.

三好規之、望月綾香、坂野太研「大豆ペプチド leginsulin のバリエーション解析と生理活性」第70回日本栄養・食糧学会大会 2016.5.13-15 神戸・西宮

井上瑞樹、佐藤友紀、妹尾奈波、西村友里、三好規之、守田昭仁、三浦進司「非アルコール性脂肪肝の食事要因を診断する新規マーカーの探索」第58回日本脂質生化学会大会 2016.6.9-10. 秋田

妹尾奈波、三好規之、井上菜穂子、守田昭仁、澤田直樹、松田潤一郎、小川佳宏、瀬藤光利、亀井康富、三浦進司「PGC-1 α を介した運動トレーニングによる骨格筋リン脂質分子種の変化」第58回日本脂質生化学会大会 2016.6.9-10. 秋田

三浦進司、妹尾奈波、三好規之、守田昭仁、亀井康富「FOXO1を介した筋萎縮時の骨格筋リン脂質分子種の変化」第58回日本脂質生化学会大会 2016.6.9-10. 秋田

伴野勸、山地太樹、岩崎基、成島大智、加藤護、戸塚ゆ加里、三好規之、大島寛史、今井俊夫「新規発がんリスクマーカー探索のための網羅的活性カルボニル化合物解析」第23回日本がん予防学会 2016.7.1-2. 名古屋

Miura S, Senoo N, Miyoshi N, Goto-Inoue N, Minami K, Yoshimura R, Morita A, Sawada N, Matsuda J, Ogawa Y, Setou M, Kamei, Y. PGC-1 α -mediated changes in phospholipid profiles of exercise-trained skeletal muscle. 57th International Conference on the Bioscience of Lipids. 2016.9.4-8. Chamonix Mont-Blanc, France.

Senoo N, Miyoshi N, Kobayashi E, Morita A, Kamei Y, Miura S. FOXO1-induced atrophy changes in phospholipid profiles of skeletal muscle. 57th International Conference on the Bioscience of Lipids. 2016.9.4-8. Chamonix

Mont-Blanc, France.

妹尾奈波、小林絵里、三好規之、森田昭仁、亀井康富、三浦進司「筋萎縮時の骨格筋リン脂質分子種変化へのFOXO1の関与」第71回日本体力医学会 2016.9.23-25. 岩手

八木美穂、仲辻友紀子、前田歩海、三好規之、中村宜督、赤川貢「Phenethyl isothiocyanateによるprotein tyrosine phosphatase 1Bの阻害を介したレプチンシグナル活性化作用の解析」第31回日本香辛料研究会 2016.10.8-9. 滋賀

伴野勸、山地太樹、岩崎基、成島大智、加藤護、戸塚ゆ加里、三好規之、今井俊夫「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 2016.10.6-8. 横浜

Yoshikawa Y, Nakamura Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Development of LC-MS analytical method for green tea catechin metabolites. The 3rd International Conference on Pharma and Food. 2016.11.16-18. Shizuoka.

Miyoshi N. Soybean peptide leginsulin homologues in different cultivars and their insulin-like activities. The 3rd International Conference on Pharma and Food. 2016.11.16-18. Shizuoka.

吉川祐人、中村順之、若林敬二、三好規之「緑茶カテキン腸内細菌代謝物のLC-MS分析法の開発」第21回日本フードファクター学会 2016.11.19-20. 富山

折原杏奈、尾崎順哉、島村裕子、三好規之、増田修一「ブドウ球菌毒素エンテロトキシン A 遺伝子の伝播機序の解明」第71回日本栄養食料学会中部支部大会 2016.11.29. 岐阜

井上瑞樹、佐藤友紀、妹尾奈波、西村友里、三好規之、合田敏尚、守田昭仁、三浦進司「長期的な脂質、炭水化物の摂取比率に応答する血中リン脂質」第71回日本栄養食料学会中部支部大会 2016.11.29. 岐阜

伊藤郁加、稲垣僚、島村裕子、三好規之、増田修一「グリシドール脂肪酸エステル食品中含有量及び生成メカニズムの解明」第71回日本栄養食料学会中部支部大会 2016.11.29. 岐阜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

別添3

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし