

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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
(H28-化学-若手-006)

平成29年度 総括研究報告書

研究代表者 三好規之
平成30(2018)年 4月

目次

I. 総括研究報告	
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	
三好規之	1

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書

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。

一方、近年の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解析技術・研究分野が拡がりを見せつつある。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 のような代謝活性化により遺伝毒性を示す活性代謝物と、その DNA 付加体の同定を行った。

これまで(平成 28、29 年度)に行った解析より、*o*-Tol と S9 mix の試験管内反応より生成する代謝物の一つとして 3,3'-ジメチルベンジジン(DMB)を同定し、さらに *o*-Tol の S9 mix 代謝物を calf thymus DNA と試験管内で反応させることで、DMB がグアニンに結合した付加体に相当する質量電荷比を示す LC-MS のピークが顕著に増加することを明らかにした。現在、これらの知見を基に、培養細胞および実験動物から調製した試料を分析し、芳香族アミン化合物の遺伝毒性の化学的メカニズムを解明に取り組んでいる。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、職業性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*-トルイジンは、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*-トルイジン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、これまでに *o*-トルイジンの DNA 付加体を直接的に検出に成功した報告例はないため、その遺伝毒性に関わる DNA ダメージの化学的メカニズムは不明である。

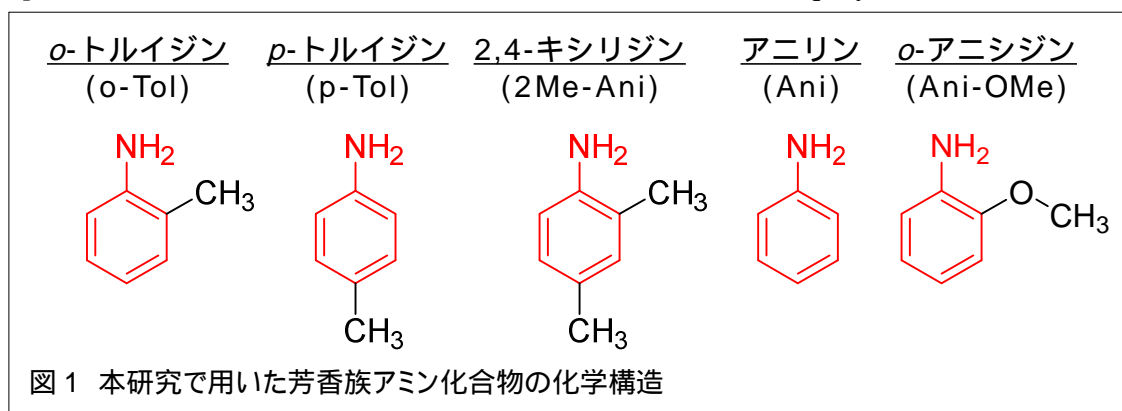
近年では分析技術の進歩によって、生体試料中に含まれる様々な代謝物を一斉に分析し、その表現系を予測するメタボリックフェノタイピングのような分析・解析技術や研究分野が拡がりを見せつつある。それゆえ本申請研究では、メタボロミクス解析・分析技術を応用させ、化学物質の有害性を正確に評価する診断法の開発を目的として、*in vitro* 試験サンプルを用いた化学物質の活性代謝物分析法の確立と DNA アダクトーム解析、化学物質曝露ラット生体試料を用いた代謝物分析、DNA アダクトーム解析を行い、化学物質の曝露によって引き起こされる遺伝毒性に関わるメタボリックプロファイルを明らかにする。*o*-トルイジンの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

細胞毒性試験、遺伝子発現解析

ヒト肝がん HepG2 細胞 (DMEM+10% FBS; 理研セルバンク) およびヒト膀胱がん T24 細胞 (MEM+10% FBS; 理研セルバンク) は、37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、各試験に用いた。細胞毒性試験では、各培養細胞を 96 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well で播種し一晩培養後、芳香族アミン化合物として図 1 に示す *o*-トルイジン (*o*-Tol)、*o*-アニシジン (Ani-OMe)、2,4-キシリジン (2Me-Ani)、*p*-トルイジン (*p*-Tol)、アニリン (Ani) に曝露した。24

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



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。解毒酵素誘導活性は、定量 PCR 法により遺伝子発現誘導活性を検討した。各培養細胞を 60 mm ディッシュに 8×10^5 cells/dish で播種し一晩培養後、芳香族アミン化合物に曝露した。24 時間培養後、抽出した RNA から cDNA を調製し、*cyp1A1*、*cyp1B1*、*cyp2B6*、*cyp2E1*、*gapdh* (内部標準) に対する定量 PCR を行った。

代謝物の LC-MS 分析

o-Tol と S9mix の試験管内反応で調製

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。

o-Tol から S9 mix の代謝によって生成する 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 を用い分析した。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 213.1 180.0 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。

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 mmolhydrazine 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 pyruvonnitrile を加え、-50°C で 40 分間反応させた。その後、2.5 mmoldG (1 水和物)、2.5 mmoltriethylamine、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) を用い、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 μm (東ソー(株)、100 \times 内径 2.0 mm)、流速は 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、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%のリニアグラジェ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 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (228~727)/ $[\text{M}-116+\text{H}]^+$ をモニターした。

倫理面への配慮

次年度(平成 30 年度)以降行う動物実験では、静岡県立大学における動物実験に関する指針 (Guidelines for the care and use of laboratory animals of the University of Shizuoka) に従い静岡県立大学倫理委員会の承諾を得て行なう。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する。

C. 研究結果

芳香族アミン化合物の細胞毒性

細胞毒性試験では、HepG2 および T24 いずれの細胞株においても、5 種類の芳香族アミン化合物 (*o*-Tol、Ani-OMe、2Me-Ani、*p*-Tol、Ani) に対して、0.1~10 mM の濃度において明確な濃度依存性は示さなかった。このことから、試験した芳香族アミン化合物は、0.1~10 mM の範囲において、細胞毒性ではなく、増殖抑制作用(約 30%)を示す可能性が示唆された(図 2)。

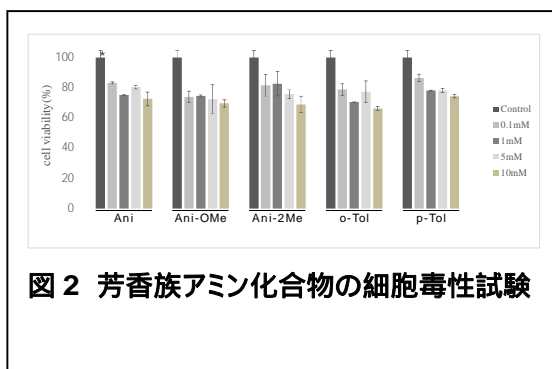


図 2 芳香族アミン化合物の細胞毒性試験

芳香族アミン化合物の解毒酵素誘導

解毒酵素の遺伝子発現誘導について 1 mM 曝露条件では Ani-OMe の活性が比較的強く、1 mM *o*-Tol による *cyp1A1* および *cyp1A2* の発現誘導は、それぞれ 3.6 および 2.6 倍(図 3)の発現上昇が認められた。

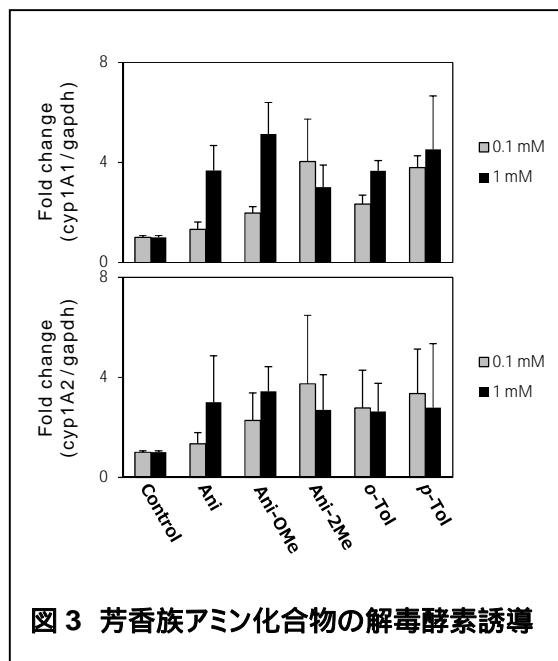


図 3 芳香族アミン化合物の解毒酵素誘導

o トルイジンの S-9 mix 代謝物分析

LC-MS による代謝物分析においては、*o*-Tol のみ、*o*-Tol+S9 mix、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 *o*-Tol+S9 mix で特異的な化合物(代謝物)として検出された(図 4)。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

その精密質量から、組成式を $C_{14}H_{14}N_2O$ と予測し、データベース検索より *o*-azoxytoluene であると予測した。それゆえ、ピーク 4、6 を含むその他のピークについて、構造解析を進めている。

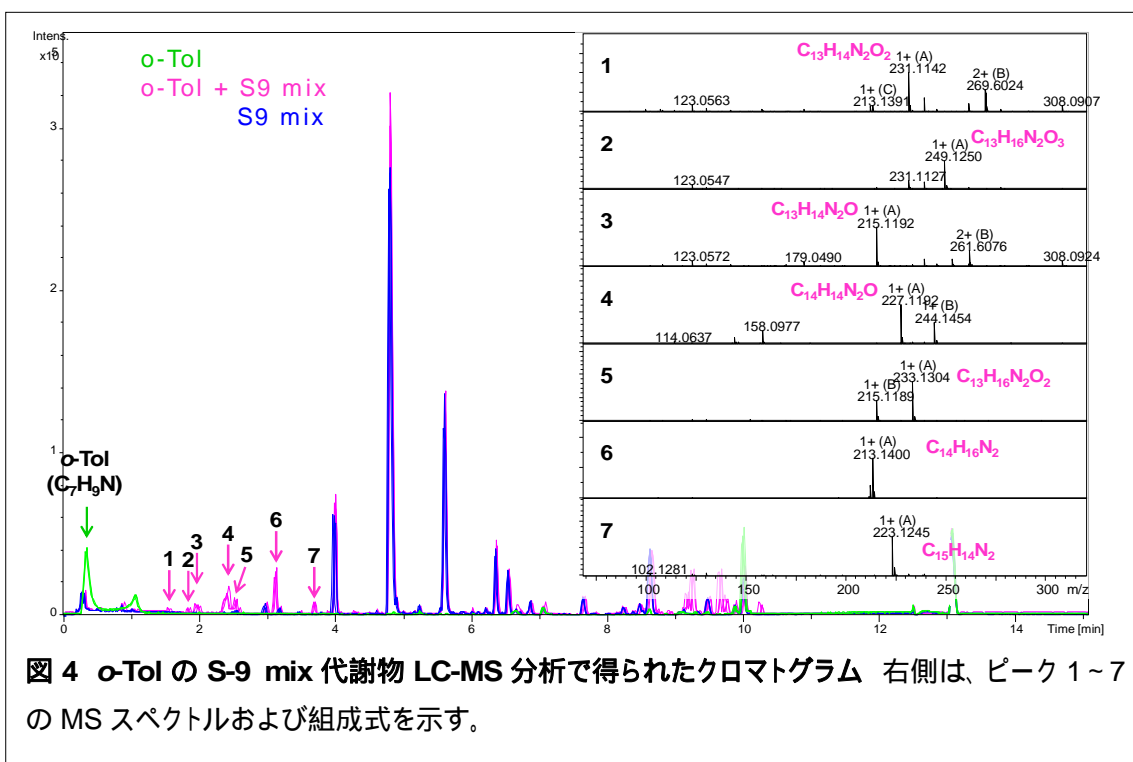


図 4 *o*-Tol の S-9 mix 代謝物 LC-MS 分析で得られたクロマトグラム 右側は、ピーク 1~7 の MS スペクトルおよび組成式を示す。

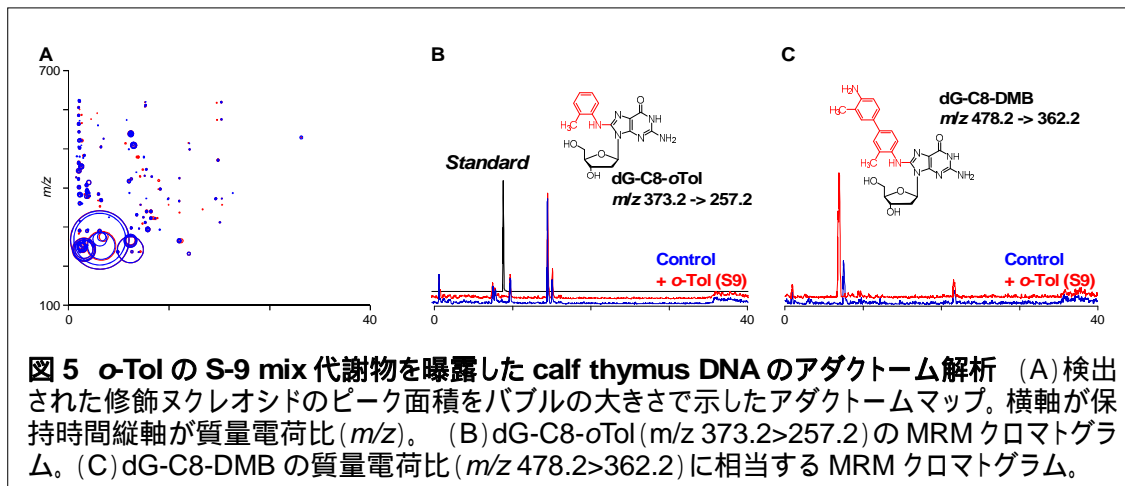
組成式を $C_{14}H_{16}N_2$ と予測し、データベース検索より、3,3'-ジメチルベンジジン (DMB) であると予想した。それゆえ、DMB の標準品を用い分析したところ、DMB はピーク 6 よりも早くに溶出される RT=1.5 分のピークと保持時間および精密質量が一致した。このことから、*o*-Tol は S-9 mix によって DMB に代謝変換されており、DMB の定量解析より 0.1% が変換されていることが示唆された。またピーク 6 は、*o*-Tol から DMB が生成される際 の 中間体 である 1,2-bis (2-methylphenyl) hydrazine 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、

o トルイジン-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 5B)。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 5A)。その中でも特に、*o*-Tol の S-9 mix 代謝によって生成する DMB が 1 分子 dG に付加した dG-DMB 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 5C)。その他、

cyp1A2 など Ah 受容体などの活性化を介して誘導される解毒酵素群を顕著に誘導していた。以上のことに加え、実験



S9 mix で代謝させた *o*-Tol を曝露した calf thymus DNA において顕著に増加したピークの一例として、 m/z 458.2>342.2 が 12.2 分に検出されている (図 5A)。修飾ヌクレオシドの構造については現時点では全く不明であるが、代謝物分析 (図 4) において検出されたピーク 5 ($C_{13}H_{16}N_2O_2$) が dC ($C_9H_{13}N_3O_4$) に付加した場合 [ピーク 5 + dC-2H+H]⁺ = m/z 458.2 が検出される。引き続き、代謝物と DNA 付加体を詳細に解析することで、*o*-Tol の遺伝毒性に寄与する活性代謝物と DNA 付加体の構造解析を行う。

D. 考察

o-Tol を含む芳香族アミン化合物は細胞毒性試験において、0.1 mM から 10 mM までの広範な濃度範囲で顕著な濃度依存性を示さなかったことから、何らかの DNA 障害に起因する増殖抑制が引き起こされている可能性が示唆された。また、qRT-PCR 解析より、芳香族アミン化合物は、特に 1 mM で cyp1A1 や

動物を用いた発がん実験等においても、かなりの高容量を長期間曝露しないと膀胱がんが認められないという知見や、職業曝露により膀胱発がんが頻発した国内の事業所においても労働者に対して長期間にわたる高濃度曝露が指摘されていることから、代謝物分析および DNA 付加体分析において数 mM から数十 mM レベルの芳香族アミンを S9mix で代謝させる条件で解析を行った。その結果、代謝物分析では、複数の代謝物を感度良く検出することに成功し、その中でも膀胱発がんとの関連が指摘されている化合物の一つである 3,3'-ジメチルベンジジン (DMB) を同定した。DMB は IARC monographs で group 2B に分類されている化合物である (1987, 29, Sup 7)。一方、メチル基を有さないベンジジン (BZ) は group 1 に分類されている化合物であり、ヒトに膀胱発がんを引き起こす発がん物質である。また、生体内代謝を受けて BZ を生成する色素化合物 (Direct Black 38, Direct Blue 6, Direct

Brown 95 など)については、これまで group 2B に分類されていたが、再考され 2012 年に group 1 に分類されている。DMB の発がん性に関する in vivo 試験では、F344 ラットに 14 ヶ月、飲水投与(0, 30, 70, 150 ppm)した結果、F344 ラットの性別によらず、肝臓、肺、小腸、大腸などで悪性腫瘍が形成されるなど、DMB が強い発がん性を示すことが報告されている (National Toxicology Program (NTP), 1991)。また、フレームシフト型の TA98 株に対するエームス試験では、DMB(S9+)は *o*-Tol(S9+)よりも約 5 倍程度強い変異原性を示すこと、さらに DMB のアセチル化体である AcDMB(S9+)は、*o*-Tol(S9+)の約 10 倍強い活性を示すことが報告されている (*Indust. Health*, **20**, 1982)。それゆえ、*o*-Tol の膀胱発がんメカニズムにおいて、DMB のみならず、AcDMB のような活性の強い代謝物についても今後注意深く生体試料を分析する必要がある。

E. 結論

本研究では、*o*-Tol の活性代謝物による DNA 付加体形成に寄与する代謝物として、DMB を同定した。一方、芳香族アミン化合物の職業曝露による膀胱発がんの事例と同様に、1,2-dichloropropane (1,2-DCP) への職業曝露による胆肝がんの発生が国内で報告されている。1,2-DCP の活性代謝物に関する最近の報告では、胆汁のメタボロミクス解析より 1,2-DCP のグルタチオン抱合体が胆肝がんの発生に関わる活性代謝物である可能性を示している (*Sci. Rep.* 2016)。そ

れゆえ、本研究においても、今後、これまでの試験管内反応より得られたデータを基に、*o*-Tol 曝露したラット尿および膀胱の分析を中心に、代謝物と DNA 付加体の同定、生成メカニズムの解明を行い、芳香族アミン類の有害性評価における科学的エビデンスを蓄積する。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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、脂質の摂取比率に应答する血中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应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ボクオリター，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

別添 3

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toyoda T, Totsuk a Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Waka bayashi K, Ogawa K.	γ -H2AX formation in t he urinary bladder of rl. rats treated with two no rharman derivatives obt ained from o-toluidine and aniline.	<i>J. Appl.Toxico</i>	印刷中	印刷中	2018
Miyoshi N.	Biochemical properties of cholesterol aldehyde secosterol and its deriva tives.	<i>J.Clin.Bioche m.Nutr.</i>	62 (2)	107-114	2018
Iwai K, Yoshikaw a Y, Miyoshi N, Fukutomi R, Asad a K, Ohashi N.	Effects of short-term int ake of wheat bran with different particle sizes on the murine intestinal environment.	<i>Food Sci. Tec h. Res.</i>	23	733-742	2017
Inoue M, Senoo N, Sato T, Nishi mura Y, Nakagaw a T, Miyoshi N, Goda T, Morita A, Miura S.	Effects of the dietary c arbohydrate-fat ratio on plasma phosphatidylch oline profiles in human and mouse.	<i>J. Nutr. Bioch em.</i>	50	83-94	2017
Onuma W, Asai D, Tomono S, Mi yamoto S, Fujii G, Hamoya T, No agano A, Takahase hi S, Masumori S, Miyoshi N, W akabayashi K, Mu toh M.	Anticarcinogenic effects of dried citrus peel in colorectal cancer due t No inhibition of oxidativ stress.	<i>Nutr. Cancer</i>	69 (6)	855-861	2017