

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 30 年度 総括研究報告書

研究代表者 三好規之
平成31(2019)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。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ている。

本年度は、*o*-Tol 曝露(0.8% 飲水投与 2 日間)ラット尿のメタボロミクスより、複数の *o*-Tol 代謝物を検出することに成功し、その中でも *o*-Tol の 2 量体であるジアミン体 2-methyl-*N*⁴-(2-methylphenyl)-1,4-benzenediamine を生体試料から新規に検出・同定することに成功した。さらに、*o*-Tol 曝露(0.8% 飲水投与 2 日間)ラット肝のアダクトーム分析より、dG および dA にジアミン体が 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。また、培養細胞を用いた生物活性試験より、ジアミン体は非常に強力な細胞毒性と遺伝毒性を示すことを見出した。それゆえ、*o*-Tol の 2 量体化ジアミン体を介した 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プングのような分析・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。

昨年度までに、*in vitro* (試験管内) 反応より調製した試料を用いて代謝物分析法と DNA アダクトーム分析法の最適化を行ったので、本年度は *o*-Tol 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、*o*-Tol 曝露によって引き起こされる DNA 付加反応に関わる活性代謝物の探索同定を行った。

B. 研究方法

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.) に従い行った。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 × 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) に従い行った。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 × 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。

代謝物の LC-MS 分析

尿試料 (50 μl) に、150 μl 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 μl のメタノールに溶解させた。超純水で 10 倍希釈後、10 μl 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 μl (2.1×50 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。

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 によりヌクレオシドを調製し、LC-MS (HPLC; Prominence SHIMADZU、MS; Triple TOF 6600 AB-SCIEX) に供した。カラムは SynergiTM 2.5 μm Fusion-RP 100Å (Phenomenex 社、100 × 2.0 mm)、流速

は 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、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: 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 $\Delta 116$ をモニターした。

dG-C8-*o*-Tol 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 pyruvonnitrile 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) を用い、カラムは、TSKgel ODS-100V 5 μm (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、dG-C8-*o*-Tol 標準精製品とした。

細胞毒性試験

96 ウェルプレートに $2 \times 10^4/\text{well}$ 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 γH2AX 抗体 (Ser139)(20E3) Rabbit mAb (Alexa Fluor[®] 488 Conjugate) γH2AX 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

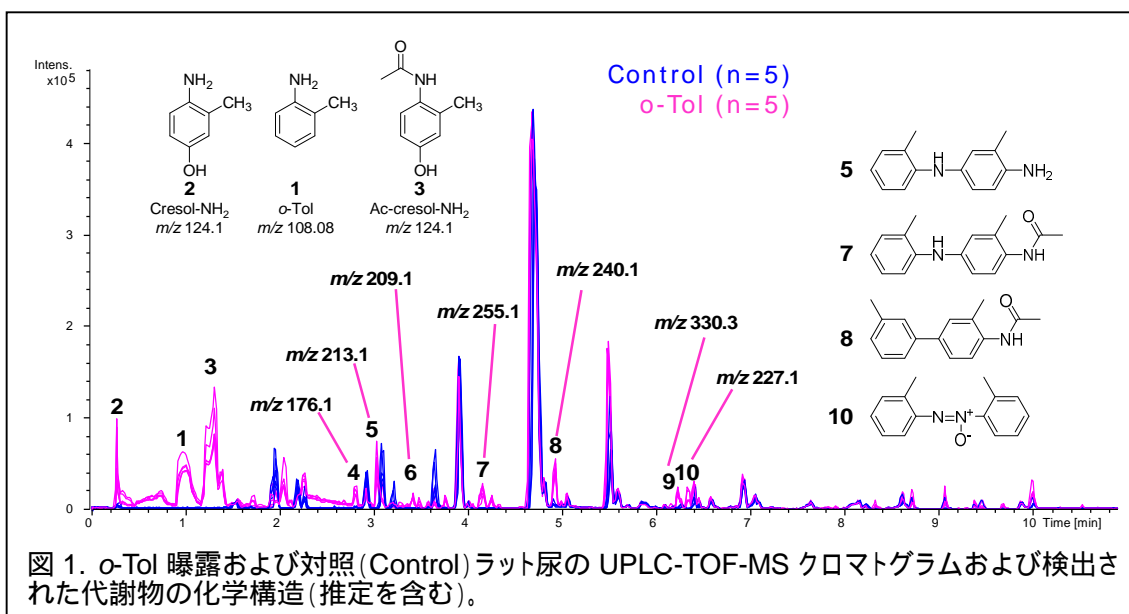
ラット尿中の代謝物分析

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。

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 1)。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

166.1) など主要代謝物が検出された(図 1)。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 1)。

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



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

分析の保持時間が異なった。そこで *o*-Tol が head-to-tail で二量体化したジアミ

ン体 (2-methyl-*N*⁴-(2-methylphenyl)-1,4-benzenediamine) 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 をジアミン体と同定した。なお、このジアミン体は、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、ジアミン体 5 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 2 に示す。図 2 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、

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 3)。これらの結果より、ピーク #119 および #110 は、*o*-Tol の 2 量体化であるジアミン体 5 が、dG および dA の C8 位あるいは *N*² 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。

ジアミン体 5 の生物活性試験

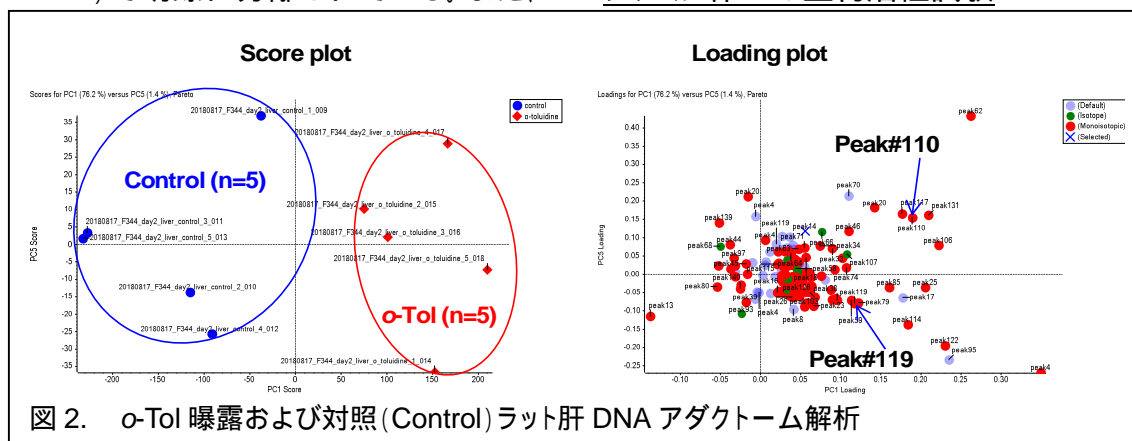
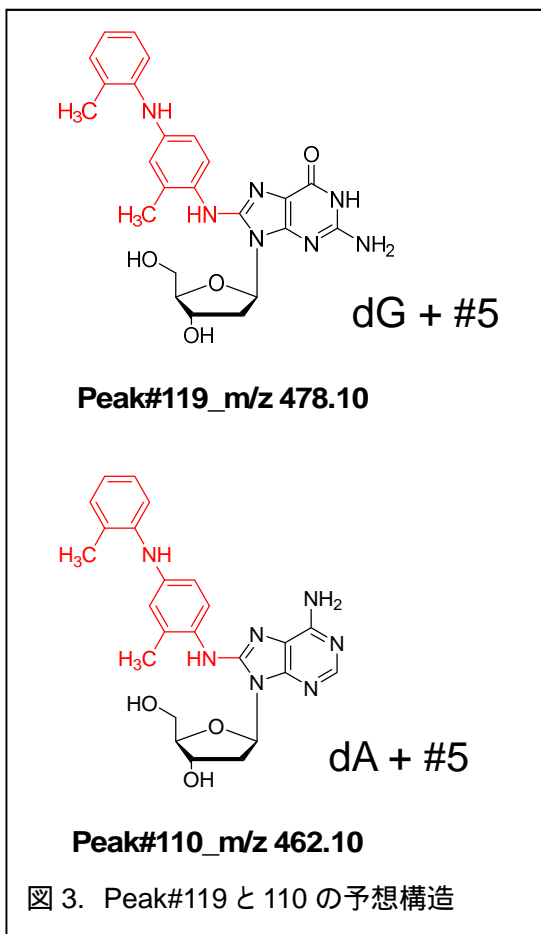


図 2. *o*-Tol 曝露および対照 (Control) ラット肝 DNA アダクトーム解析

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



今回の検討で生体試料より初めて検出されたジアミン体 5 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。ジアミン体 5 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、ジアミン体 5 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、ジアミン体 5 は 18.50 μ M 以下であった。さらに、10 mM の *o*-Tol と 100 μ M のジアミン体 5 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 損傷のマーカーである γ H2AX の

陽性率は、ジアミン体 5 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 代謝物であるジアミン体 5 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、ジアミン体 5 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 1)。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 で検出されたジアミン体 5 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。尿中ジアミ

ン体 5 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ジアミン体 5 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 1)。

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 にジアミン体 5 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、ジアミン体 5 が、dG および dA に結合する可能性が強く示唆された(図 2)。一方、今回の DNA アダクトーム解析では、ジアミン体 5 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。

生体内におけるジアミン体 5 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、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 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化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ジアミン体 5 を新規に検出・同定することに成功した。さらに、ジアミン体 5 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、ジアミン体 5 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.

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 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シ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 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

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

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, Wak bayashi K, Ogawa K.	γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two novel arharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline.	<i>J. Appl. Toxicol.</i>	38	537-543	2018
Hashidume T, Sa kano T, Mochizuk i A, Ito K, Ito S, Kawarasaki Y, Miyoshi N.	Identification of soybean peptide leginsulin variants in different cultivars and their insulin-like activities.	<i>Sci. Rep.</i>	8	16847	2018
Yagi M, Nakatsuj i Y, Maeda A, O ta H, Kamikubo R, Miyoshi N, Nantake. kamura Y, Akaga wa M.	Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake.	<i>PLoS One</i>	13	E0206748	2018
Yoshikawa Y, Ka tayanagi Y, Kami ya M, Yamamoto Y, Fukutomi R, I mai S, Miyoshi N, Ohashi N.	Tomato saponin supplementation ameliorates the development of experimental arthritis by regulating inflammatory responses.	<i>J. Funct. Food</i>	49	458-464	2018
Hashidume T, Sas aki K, Hirata J, Kato M, Yoshika wa Y, Iwasaki Y, Arai H, Miura S, Miyoshi N.	Effects of Sanyaku and Its Constituent Diosgenin on the fasted and postprandial hypertriglycerolemia in high-fat-diet-fed KK- A^y mice.	<i>J. Agric. Food</i>	66	9968-9975	2018
Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tan abe H, Miyoshi N, Nakamura Y.	Beneficial effects of green tea catechins on brain function.	<i>Molecules</i>	23	537-543	2018

平成31年 4月 12日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 静岡県立大学
 所属研究機関長 職名 学長
 氏名 鬼頭 宏



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院薬食生命科学総合学府・准教授
 (氏名・フリガナ) 三好 規之 (ミヨシ ノリユキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	静岡県立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。