

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（H28-化学-若手-005）総括研究報告書

芳香族アミンの膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性および細胞動態の短期解析

研究代表者 豊田 武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

本研究では、労働曝露による膀胱がん多発事例への関与が疑われる 5 種の芳香族アミンについて、安全性評価に資する毒性発現機序に関するデータ取得を目的とする。具体的には、被験物質をラットに経口投与し、膀胱上皮細胞に対する *in vivo* 遺伝毒性および細胞動態に及ぼす影響を、病理組織学的検索ならびに DNA 修復・細胞周期・分化関連因子の発現解析を通じて明らかにする。平成 28 年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに 0.4%/0.8% *o*-トルイジン、0.3%/1% *o*-アニシジン、0.4% 2,4-キシリジン、0.2% *p*-トルイジン、0.6% アニリンを 4 週間混餌投与し、投与 2 日、1 週、2 週、投与終了時および 2 週間休薬後の各時点で膀胱を採材した。病理組織学的検索において、0.8% *o*-トルイジン投与群の膀胱には粘膜内出血等の急性毒性から、びまん性の粘膜上皮過形成に至る経時的な病変の変化が認められた。膀胱上皮での H2AX (DNA 損傷マーカー) /Ki67 (細胞増殖関連因子) 発現を検索した結果、0.8% *o*-トルイジンと 1% *o*-アニシジン投与群では、H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、2,4-キシリジン、*p*-トルイジン、アニリン投与群では、明らかな膀胱病変および H2AX/Ki67 発現誘導は観察されなかった。以上の結果から、*o*-トルイジンおよび *o*-アニシジンによる膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性が示唆された一方、両者の膀胱粘膜傷害機序は異なる可能性が示された。今後、膀胱粘膜における DNA 修復・細胞周期関連因子の遺伝子発現解析を実施し、芳香族アミンによって誘発される細胞動態を明らかにする予定である。

A . 研究目的

近年、リン酸化ヒストンタンパク質の一種 H2AX が DNA 二重鎖切断の鋭敏な指標となることが示され、遺伝毒性試験から臨床診断まで幅広い分野での応用が期待されている。我々は以前に、遺伝毒性膀胱発がん物質はラット膀胱上皮細胞に H2AX 形成を強く誘導する一方、膀胱を標的とししない遺伝毒性発がん物質では対照群と同じレベルにとどまることを示し、H2AX を遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得ることを明らかにした。この試験系は 4 週間という短期の毒性試験で、通常の免疫組織化学的手法によって実施できることを特色とし、化学物質の効率的かつ迅速なリスク評価法と考えられる。

膀胱がんの原因物質には、染料・顔料の製造原料として汎用される芳香族アミン類が多く含まれ、平成 27 年 12 月に報告された民間事業場での膀胱がん多発事例にもその関与が疑われている。これらの芳香族アミンのうち、*o*-トルイジンと *o*-アニシジンは労働曝露によるヒト膀胱がんへの関与が以前から疑われ、特に前者について疫学調査や齧歯類を用いた発がん性試験が比較的多く報告されている。一方で、無毒性量を設定し得る適切な反復投与毒性試験は過去に実施されておらず、膀胱粘膜に対する傷害機序や発がん過程の詳細は不明なままとなっている。また、*o*-トルイジンと *o*-アニシジンはともに *in vitro* 遺伝毒性試験には陰性を示し、発がん過程における *in vivo* 遺伝毒性の関与も明らかではない。

本研究では、前述の事業場で扱われていた 5 種の芳香族アミン (*o*-トルイジン、*o*-アニシジン、2,4-キシリジン、*p*-トルイジン、アニリン) をラットに投与し、膀胱における病理組織学的検索ならびに H2AX をはじめとする毒性・発がん関連因子の発現解析を通じて、細胞動態への影響と毒性機序に関するデータの取得を目的とする。

平成 28 年度はラットへの被験物質投与と組織採材、病理組織学的検索および H2AX/Ki67 発現の解析を実施し、膀胱に対する毒性影響ならびに *in vivo* 遺伝毒性の評価を行った。平成 29 年度は、DNA 修復・細胞周期関連因子の遺伝子発現動態および膀胱上皮分化マーカーとの共発現を検索し、芳香族アミンによって誘発される膀胱粘膜の細胞動態を明らかにし、毒性機序とヒトへの外挿性を総合的に判断する予定である。

B . 研究方法

膀胱がん多発事例が報告された民間事業場で使用されていた 5 種の芳香族アミン (0.8% *o*-トルイジン、1% *o*-アニシジン、0.4% 2,4-キシリジン、0.2% *p*-トルイジン、0.6% アニリン) の塩酸塩を、6 週齢の雄 F344 ラットに 4 週間混餌投与した。各物質の投与濃度は、報告されている発がん性試験の用量に基づいて設定した。膀胱発がん性が知られている *o*-トルイジンおよび *o*-アニシジンについては、用量依存性を検討するため、濃度を下げた低用量群 (それぞれ 0.4%、0.3%) を設置した。また、無処置対照群に加え、陽性対照として遺伝

毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 飲水投与群を設置した。投与2日、1週間、2週間、投与終了時(4週間)および2週間の休薬後に解剖し、膀胱を含む発がん標的臓器(肝・腎・脾・甲状腺・肺)を採材した。

ホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、膀胱粘膜の病理組織学的検索および免疫組織化学的手法による H2AX/Ki67 発現解析を実施した。膀胱粘膜における H2AX/Ki67 陽性細胞をカウントし、陽性率を対照群と比較した。また、H2AX/Ki67 陽性細胞を、分化段階に基づいて基底細胞(basal cell)、中間細胞(intermediate cell)、表層細胞(umbrella cell)の三種に分類し、各被験物質および投与期間による差異について検討した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

0.8% *o*-トルイジン投与群の膀胱には、経時的な病理学的変化が認められた(図1)。投与2日目の時点で、膀胱粘膜は肉眼的に暗褐色を呈し、病理組織学的に粘膜内出血、粘膜下織の浮腫、および間質結合織・血管壊死が広範囲に認められた。1週目には、これら粘膜内出血を伴う急性炎症は散発的なものとなり、粘膜上皮の過形成、単核細胞浸潤を特徴とする慢性炎症および肉芽組織増生が病変の主体となった。2週目から4週目にかけては慢性炎症も消退傾向となり、粘膜上皮はび慢性過形成を呈し、結節性過形成を示す部位も散在していた。0.4% *o*-トルイジン投与群には、これらの膀胱病変は認められなかった。

o-アニシジン投与群では、1%投与群で2週目以降に粘膜の単純過形成がみられた一方(図2)、0.3%投与群には膀胱病変は認められなかった。また、2,4-キシリジン、*p*-トルイジン、アニリン投与群においても、明らかな膀胱病変は観察されなかった。

膀胱上皮での H2AX および Ki67 発現を免疫組織化学的に検索した(図3)。粘膜上皮細胞1000個あたりの H2AX 陽性細胞数を測定した結果、0.8% *o*-トルイジンおよび1% *o*-アニシジン投与群では、対照群と比較して H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた(図4)。1% *o*-アニシジン投与群では2日から4週にかけて経時的に増加したのに対し、0.8% *o*-トルイジン投与群では2日から1週にかけて一過性の上昇を示し、その発現パターンは異なっていた。0.4% *o*-トルイジンおよび0.3% *o*-アニシジン投与群では、H2AX 形成の有意な増加はみられなかった。

細胞増殖マーカーである Ki67 もほぼ同様の変化を示し、0.8% *o*-トルイジン(2日、1週)および1% *o*-アニシジン(2日から4週)投与群において陽性細胞の割合が有意に増加した一方、それぞれの低用量群では対照群と同じレベルであった(図5)。2,4-キシリジン、*p*-トルイジン、アニリン投与群では、H2AX/Ki67 いずれ

の発現増加も観察されなかった。

0.8% *o*-トルイジンおよび1% *o*-アニシジン投与群の H2AX/Ki67 陽性細胞を、分化段階に基づいて三種に分類した(図6)。その結果、いずれの群でも basal cell の割合が高かったが、0.8% *o*-トルイジン投与群では1週目以降、1% *o*-アニシジン/0.05% BBN 投与群では2週間の休薬後に、intermediate cell および umbrella cell の割合が上昇する傾向が認められた。

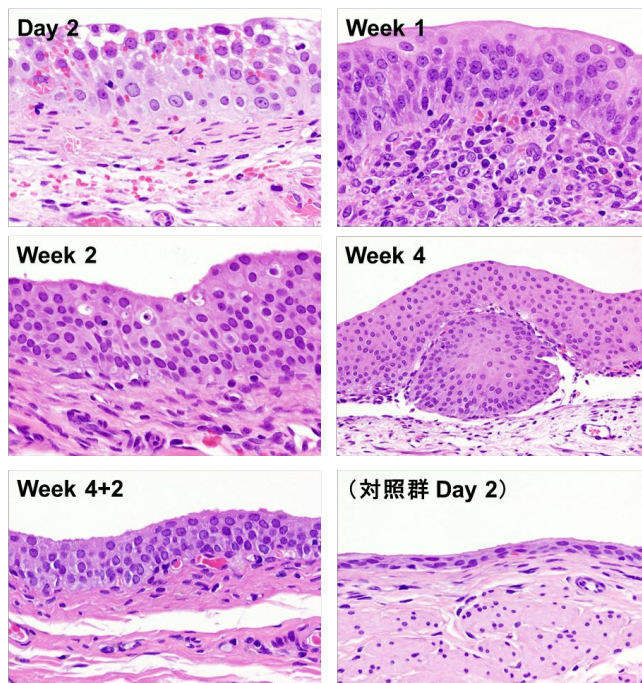


図1. 0.8% *o*-トルイジン投与群における膀胱病変の経時的変化。Day 2: 粘膜内出血、粘膜下織の浮腫、結合織・血管壊死。Week 1: 粘膜過形成と間質における単核細胞浸潤。Week 2: 炎症所見は散発的となり、粘膜上皮はび慢性に過形成を示す。Week 4: 結節性過形成が散在。Week 4+2: 単純過形成の残存。

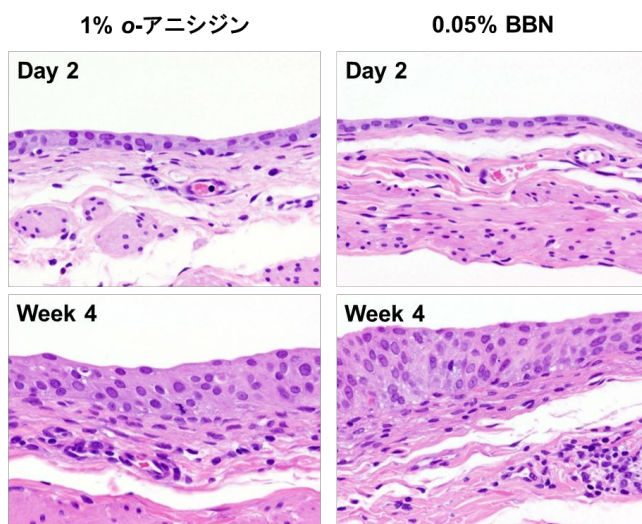


図2. 1% *o*-アニシジンおよび0.05% BBN 投与群における膀胱病変。Week 4: 両群ともに粘膜の単純過形成が認められ、BBN 投与群では間質への単核細胞浸潤がしば

しばみられる。

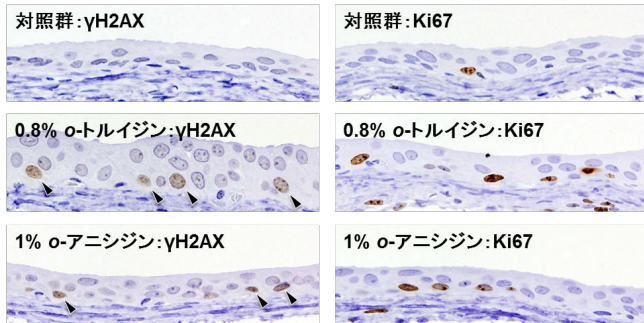


図 3. 投与 2 日目の膀胱における H2AX (左列: 矢頭) および Ki67 (右列) 発現。0.8% *o*-トルイジンおよび 1% *o*-アニシジン投与群では、H2AX/Ki67 陽性細胞数の増加が認められた。

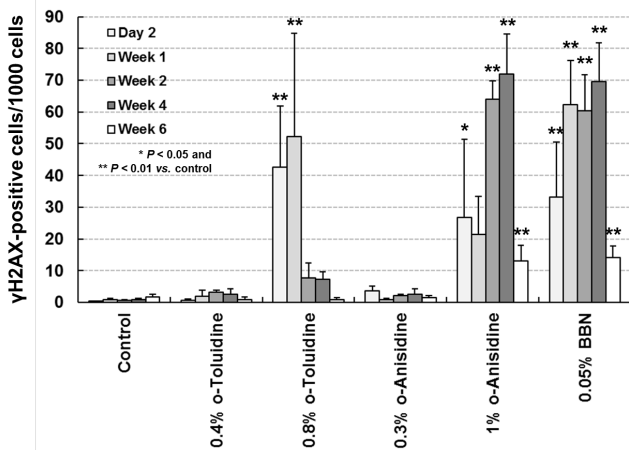


図 4. ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析。

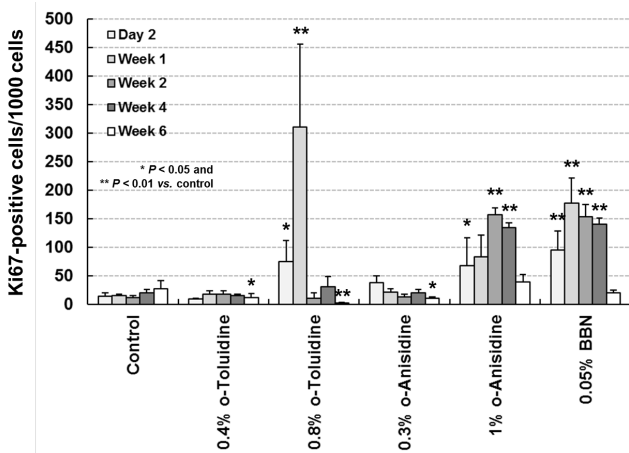


図 5. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析。

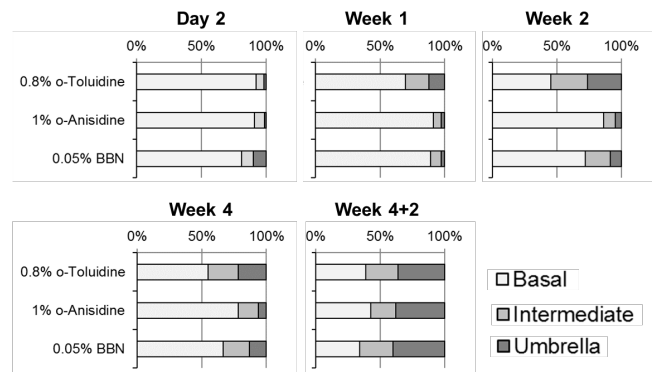


図 6. H2AX 陽性細胞における基底細胞 (basal)、中間細胞 (intermediate)、表層細胞 (umbrella) の割合。

D. 考察

本研究で検討した 5 種の芳香族アミンのうち、2,4-キシリジン、*p*-トルイジン、アニリン投与群の膀胱には、明らかな病理学的所見および H2AX/Ki67 発現の変化は認められなかった。一方、*o*-トルイジンと *o*-アニシジンは、4 週間の混餌投与により膀胱粘膜の過形成および H2AX/Ki67 陽性細胞の増加を誘導することが明らかになった。

o-トルイジンは IARC による評価で Group 1 (ヒトに対して発がん性がある) に分類されている。発がん性の有無を検討した長期試験については複数の報告があるが、膀胱病変を詳細に検索した反復投与毒性試験は過去に行われておらず、膀胱粘膜に対する傷害機序や発がん過程の詳細は不明なままであった。

本研究は、高用量 (塩酸塩 0.8%混餌投与: *o*-トルイジンとして 401 mg/kg 体重/日に相当) の *o*-トルイジンがラット膀胱に対して、粘膜内出血等の急性毒性から慢性炎症を経て慢性過形成に至る、経時的な病理学的変化を誘発することを明らかにした。これに対して、*o*-アニシジンは粘膜の単純過形成を引き起こしたものの壊死や重度の炎症は伴わず、遺伝毒性膀胱発がん物質として知られる BBN による病態と類似していた。ともに膀胱発がん性を示す *o*-トルイジンと *o*-アニシジンであるが、その粘膜傷害機序は互いに異なる可能性をこの結果は示している。

H2AX/Ki67 発現の定量解析によって、*o*-トルイジンと *o*-アニシジンはともに H2AX 陽性細胞の増加を誘導し、膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性を有する可能性が示唆された。しかし、*o*-アニシジン投与群では、H2AX/Ki67 はいずれも投与開始 2 日から 4 週目にかけて経時的な発現増加を示したのに対し、*o*-トルイジン投与群では 2 日目から 1 週目にかけて増加した後、2 週目に著しく減少するという特徴的な発現パターンを示すことが明らかとなった。前述の病理組織学的検索結果で示された、両物質の粘膜傷害機序の違いが反映されていると考えられる。

o-トルイジンと *o*-アニシジンによる膀胱病変および H2AX/Ki67 発現誘導の有意な増加は、いずれも低用量群では観察されず、濃度依存性は明瞭ではなかった。Short ら (*Fundam Appl Toxicol*, 1983) は、雄 F344 ラットに *o*-トルイジンを 225 mg/kg/day の用量で 20

日間強制経口投与した結果、膀胱にいかなる病変もみられなかったと報告している。本研究における0.4% *o*-トルイジン投与群での平均検体摂取量は227 mg/kg 体重/日であり、この報告とほぼ同じ水準であった。膀胱粘膜上皮に傷害を及ぼし、H2AX 発現を誘導する特定の代謝物（あるいは未変化体）が尿中に現れるための閾値が存在する可能性があり、リスク評価において留意すべき点になり得る。尿中代謝物の詳細な解析が、今後の課題になると考えられる。

E. 結論

本研究の結果から、検索した5種の芳香族アミンのうち、*o*-トルイジンおよび*o*-アニシジンはラット膀胱に対して *in vivo* 遺伝毒性を有する可能性が示唆された。一方で、病理組織学的検索により、両物質の膀胱粘膜傷害機序は互いに異なることが明らかとなった。今後、*o*-トルイジンおよび*o*-アニシジンによる膀胱粘膜の細胞動態について、遺伝子発現解析等の分子生物学的検討を交えて、さらに詳細に検討を加える予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Toyoda T**, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. 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
- 2) **Toyoda T**, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriyama Y, Nishikawa A, Ogawa K, 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
- 3) Hirata T, Cho YM, **Toyoda T**, Akagi J, Suzuki I, Nishikawa A, Ogawa K. 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*, 37: 683-691, 2017
- 4) Takeshima H, Niwa T, **Toyoda T**, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci*, 108: 316-321, 2017
- 5) Matsushita K, **Toyoda T**, Inoue K, Morikawa T, Sone M, Ogawa K. Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat. *J Toxicol Pathol*, 30: 57-62, 2017
- 6) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, **Toyoda T**, Akagi J, Nakamura Y, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K. Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. *J Appl Toxicol*, 37: 485-494, 2017
- 7) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, **Toyoda T**, Akagi J,

Nakamura Y, Park EY, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*, 29: 237-246, 2016

2. 学会発表

- 1) 曾根瑞季、**豊田武士**、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子. 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、名古屋、2016年6月29日
- 2) **豊田武士**、曹永晩、赤木純一、松下幸平、西川秋佳、小川久美子. 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、東京、2016年9月17日
- 3) 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、横浜、2016年10月6日
- 4) 赤木純一、横井雅幸、**豊田武士**、曹永晩、花岡文雄、小川久美子. 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、横浜、2016年10月8日
- 5) Akagi J, Yokoi M, **Toyoda T**, Cho YM, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Triple knockout mouse fibroblast cells defective for DNA polymerases δ , ϵ , and γ exhibit hypersensitivity to various genotoxic agents and increased activation of DNA damage responses. 10th 3R Symposium in Matsue, Matsue, 2016.11.13
- 6) **豊田武士**、鈴木周五、加藤寛之、曾根瑞季、松下幸平、曹永晩、赤木純一、井上薫、高橋智、西川秋佳、小川久美子. 遺伝毒性膀胱発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、大阪、2017年1月26日
- 7) 曾根瑞季、**豊田武士**、松下幸平、森川朋美、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子. 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、大阪、2017年1月26日
- 8) **Toyoda T**, Sone M, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. H2AX expression is a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rodents. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, 2017.3.14
- 9) Sone M, **Toyoda T**, Matsushita K, Morikawa T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. Detection of *in vivo* genotoxicity in rat liver and kidney using H2AX expression. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore,

2017.3.14

G.知的所有権の取得状況

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