

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 食品栄養科学部 准教授

研究要旨

変異原性試験において、代謝物活性化によって陽性反応を示す化学物質が多く存在するが、変異原性陽性を示す多くの活性代謝物は、生体成分との高反応性ゆえ、その活性代謝物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、化学物質が代謝活性化される生成部位と発がんに寄与する作用部位は必ずしも同一ではないので、実際の病変部位などを含む生体試料を丁寧に分析することで、比較的安定に存在する活性分子を捕らえることができる可能性がある。つまり、このような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る。

一方、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みせつつある。我々は、こういった代謝物一斉分析法の高度化を目的として、様々な官能基に選択的な誘導体化試薬を用いた高精度化・高感度化を可能とする技術開発に取り組んできた。それゆえ、このような分析技術を発がん物質の活性代謝物分析に応用し、有害な化学物質の曝露リスクを正確に評価するシステムの開発を本申請研究の目的とする。

最近国内において、変異原性に代謝活性化を必要とする *o*-トルイジンなど芳香族アミン類への職業曝露に関連した、高頻度な膀胱がんの発生が報告された。このような背景から、*o*-トルイジンのような代謝活性化による発がん作用が強く懸念されている芳香族アミン類を本研究における試験化合物として優先的に採用し、化学物質の活性代謝物分析法の確立、*in vitro* 試験サンプルのDNAアダクトーム解析、化学物質曝露ラットを作成し、採取した生体試料を用いて確立した分析法の妥当性を評価する。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。

我々はこれまでに、特定の官能基特異的なプローブを用いて誘導体化し、LC-MS分析によって高感度・官能基選択的且つ網羅的な定量分析法の開発に取り組んできた(*J. Chrom. B*, 2015)。一方で、環境化学発がん物質の曝露評価法の開発と発がんリスク評価に関する研究において、DNAやタンパク質への付加修飾物の分析法を開発し、DNAアダクトーム分析技術も取得している。さらに、生活習慣病の発症に関わる腸内細菌代謝物を探索する目的で、生物活性試験と質量分析を基軸とする疾患モデル動物糞試料のノンターゲット分析から、病態の進行に影響する炎症誘導活性を有

する代謝物を複数同定してきた。

これらの分析技術を本申請研究へ集結・応用させることで、生体試料に含まれる代謝物をインタクトな状態で直接分析するだけでなく、代謝活性化反応で生成する水酸基、ケトン、アルデヒドなど官能基特異的プローブを駆使し、発がんに作用する活性代謝物を幅広く高感度に検出・同定できる可能性がある。

本申請研究では、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。

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、その詳細は不明である。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見せつつある。それゆえ本申請研究では、メタボロミクスの解析・分析技術を応用させ、*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

本申請研究では、職業性被ばくの問題が指摘されている *o*-トルイジンを含む芳香族アミン化合物 (*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、アニリンなど) を試験化合物として用い、活性代謝物の分析条件の最適化を行い、試験化合物曝露モデル動物の生体試料分析へ応用する。DNA アダクトーム解析と併せて、化学物質の有害性評価における活性代謝物分析の有用性を評価することを目的としている。

本年度はまず、各試験で用いる芳香族アミン化合物の濃度および処理時間の条件を検討する目的で、培養細胞を用い細胞毒性試験および解毒酵素誘導活性を検討した。用いた細胞株は、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) である。細胞毒性試験では、各培養細胞を 96 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$ /well で播種し一晚培養後、芳香族アミン化合物に曝露した。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。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  $8 \times 10^5$ /dish で播種し一晚培養後、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。

活性代謝物の LC-MS 分析について、本年度はまず *o*-トルイジンと S-9 mix 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*-トルイジンを 5 倍希釈した S-9 mix (染色体試験用凍結 S-9 MIX; キッコーマン) と 37°C で 3 時間反応させた (50  $\mu$ 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  $\mu$ l のメタノールに溶解させた。超純粋で 100 倍希釈後、10  $\mu$ 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 MicroTofQII を用いた。カラムは、Waters 社の Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ 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を行った。得られたMS イオンデータは、Reifycs社のMS データ専用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 S-9 mix との反応で特異的に生成した *o*-トルイジン代謝物の解析を行った。

DNA アダクトーム解析について、本年度はまず *o*-トルイジンあるいは S-9 mix で代謝させた *o*-トルイジンと calf thymus DNA との試験管内反応で生成する DNA 付加体について検討した。試料調製条件は、代謝物分析と同様に、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 20 mM *o*-トルイジンを 5 倍希釈した S-9 mix (染色体試験用凍結 S-9 MIX; キッコーマン) と 37°C で 3 時間反応させた (50  $\mu$ l)。反応後、1 mg/ml calf thymus DNA を 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ m (東ソー(株)、100  $\times$  内径 2.0 mm)、流速は 200  $\mu$ 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 MRM モードで  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (228~727)/ [M-116+H]<sup>+</sup> をモニターした。

#### 倫理面への配慮

次年度(平成 29 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

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*-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) に対して、1 mM までの濃度において強い細胞毒性は認められなかった。しかし、10 mM 芳香族アミン化合物曝露では、20-40% 程度の細胞生存率の低下が認められた。

解毒酵素の遺伝子発現誘導に関しては、特に、*o*-トルイジンによる *cyp1A1* 発現誘導活性が強く、1 mM の *o*-トルイジン曝露によって HepG2 細胞では 5.6 倍、T24 細胞では 3.9 倍の発現上昇が認められた。

LC-MS による代謝物分析においては、

o トルイジンのみ、 o トルイジン+S-9 mix、 S-9 mix のみの計 3 群 (各群 n=3) で分析を行い、 o トルイジン+S-9 mix で特異的に検出される化合物 (代謝物) を解析したところ、 $m/z$  150.0875 の化合物 が 7.08 分で検出された。精密質量より組成式および構造の推定を試みたが、化合物の同定には至っていない。

DNA アダクトーム解析の結果、o トルイジン付加体と予想される MS イオンピークは検出限界以下であった。

#### D. 考察

本年度は、o トルイジン活性代謝物を詳細に分析および解析する目的で、条件の最適化を行った。培養細胞を用いた検討より、芳香族アミン化合物は 1 mM と比較的高濃度の曝露によっても顕著な細胞毒性を示さないことが確認された。このことは、実験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からも、目的の活性代謝物を確実に検出する必要性を示唆している。また、代謝物および DNA 付加体の分析より、芳香族アミン化合物の膀胱発がん性を示唆する代謝物および DNA 付加体は現段階では未同定ではあるが、今度 LC-MS 分析の高感度を目的とした誘導体化法の最適化を行い、詳細な分析に取り組む予定である。

#### E. 結論

現在までに、試験管内反応では、DNA 付加体形成に寄与する代謝物は未同定ではあるが、今後分析法の最適

化と、培養細胞や生体試料を用いた予備的な検討より、芳香族アミン代謝物の分析法を確立し、実試料分析へ応用していく。さらに DNA アダクトーム解析の結果とあわせて、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必要がある。