

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）総合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

染料・顔料の原材料として汎用される芳香族アミンは多くの膀胱発がん物質を含むが、その毒性および発がん機序はほとんどわかっていない。本研究では、6週齢の雄 F344 ラットに5種の芳香族アミン（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日から4週および2週間休薬後にかけて経時的に膀胱を採材した。病理組織学的検索では、0.8% *o*-トルイジン投与群の膀胱にはヒトでの急性毒性に相当する出血性病変から、び慢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。膀胱上皮における -H2AX（DNA 損傷マーカー）形成を検索した結果、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 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*-アニシジンは膀胱に対して *in vivo* 遺伝毒性を示すことが明らかとなった一方、両者の膀胱粘膜傷害機序は異なる可能性が示された。膀胱粘膜の遺伝子発現解析では、*o*-アニシジンは遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN と近い発現パターンを示すこと、細胞周期・DNA 損傷・Hedgehog 経路関連遺伝子が *o*-トルイジン・*o*-アニシジンの曝露初期に特徴的に変動することが明らかとなった。被験物質は芳香族アミンとして基本的な構造を有することから、本研究の成果は芳香族アミン全般のリスク評価における基礎データとして活用し得る。

A . 研究目的

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。

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。

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）をラットに短期間投与し、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実施する。曝露初期における細胞動態への影響と毒性機序を明らかにし、芳香族アミンのリスク評価に資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 形成/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、膀胱がんとの関連が指摘される5項目の遺伝子群（細胞増殖・DNA 損傷・Hedgehog 経路・クロマチン修飾・クロマチン再構築関連因子）の発現動態を検索し、芳香族アミンへの曝露初期に生じる遺伝子動態の特徴を明らかにした。

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）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

膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 飲水投与群を、さらに遺伝子動態解析における対照群として、非遺伝毒性膀胱発がん物質である 3%ウラシル混餌投与群を設けた。

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 形成/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、その局在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。

遺伝子発現動態解析のため、投与終了時 (4 週) に対照群、0.8% *o*-トルイジン、1% *o*-アニシジン、3%ウラシル、0.05% BBN 投与群の膀胱粘膜上皮の一部を凍結採材し、RNA を抽出した。PCR アレイを用いて、膀胱がんとの関連が指摘される 5 項目 (細胞周期・DNA 損傷・Hedgehog 経路・クロマチン修飾・クロマチン再構築因子) 各 84 遺伝子について、RT-PCR 法による発現解析を行った。

(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程に基づき、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、粘膜上皮はびまん性過形成を呈し、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 形成および 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 形成/Ki67 発現いずれの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、その局在に基づいて三種に分類した (図 6)。その結果、いずれの群でも基底細胞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、中間細胞および表層細胞の割合が上昇する傾向が認められた。

対照群、0.8% *o*-トルイジン、1% *o*-アニシジン、3%ウラシル、0.05% BBN 投与群の膀胱粘膜上皮から RNA を抽出し、投与 4 週時点での遺伝子発現動態を解析した。その結果、検索した 5 項目の中で、細胞周期・DNA 損傷・Hedgehog 経路関連遺伝子では多数の発現変動がみられた一方 (図 7-9)、クロマチン修飾・クロマチン再構築関連因子の発現変動は比較的少なかった (図 10)。各項目のクラスターグラム解析では、5 項目すべてで *o*-アニシジンおよび BBN 投与群が発現パターンの類似したグループとして位置づけられた。

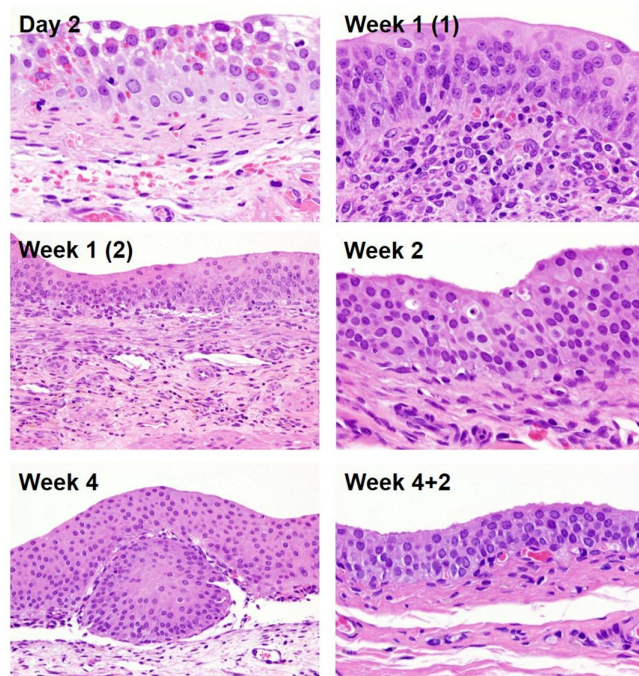


図 1. 0.8% *o*-トルイジン投与群における膀胱病変の経時的変化。Day 2: 粘膜内出血、粘膜下織の浮腫、結合織・血管壊死。Week 1 (1): 粘膜過形成と間質における単核細胞浸潤。Week 1 (2): 粘膜下織における肉芽組織増生。Week 2: 炎症所見は散発的となり、粘膜上皮はびまん性に過形成を示す。Week 4: 結節性過形成が散在。Week 4+2: 単純過形成の残存。

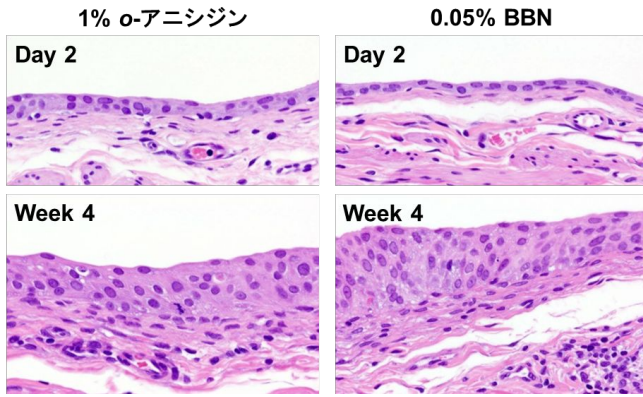


図2. 1% *o*-アニシジンおよび0.05% BBN 投与群における膀胱病変。Week 4: 両群ともに粘膜の単純過形成が認められ、BBN 投与群では間質への局所的な単核細胞浸潤がしばしばみられる。

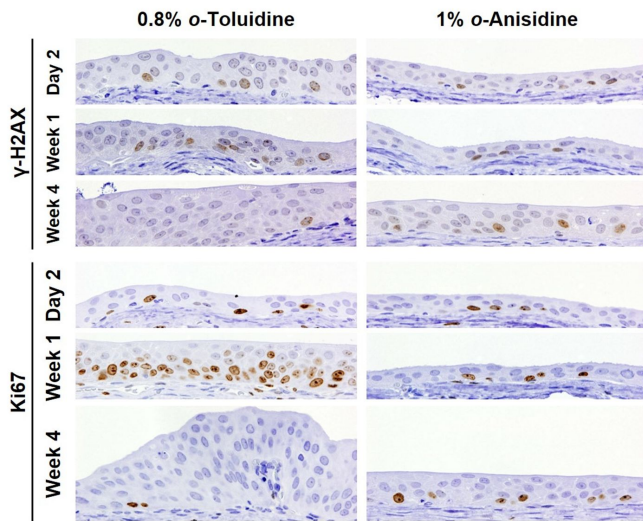


図3 投与2日、1週および4週目の膀胱における γ -H2AX 形成 (上段) および Ki67 発現 (下段)。0.8% *o*-トルイジン (左列) および 1% *o*-アニシジン (右列) 投与群では、 γ -H2AX/Ki67 陽性細胞数の増加が認められた。

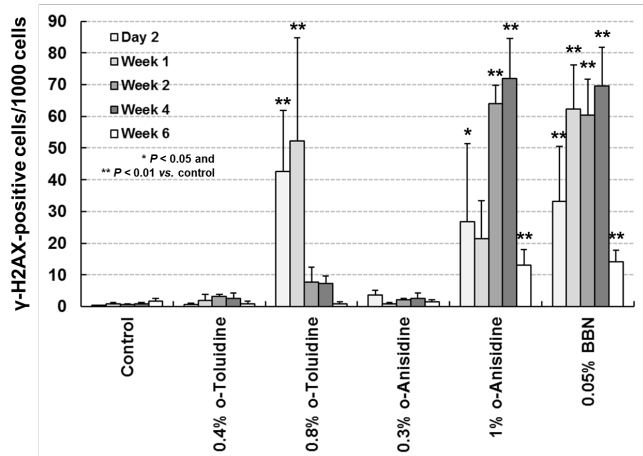


図4. ラット膀胱粘膜上皮細胞における γ -H2AX 陽性細胞の定量解析。0.8% *o*-トルイジン投与群では2日から

1 週にかけて一過性の増加がみられたのに対し、1% *o*-アニシジン投与群では4 週目まで経時的な増加を示した。

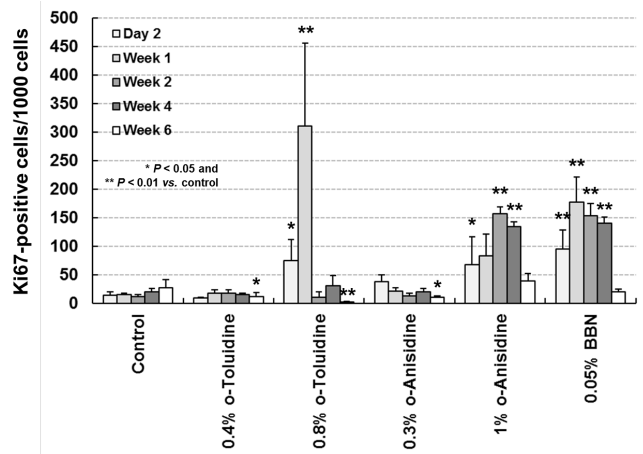


図5. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析。 γ -H2AX と同様に、0.8% *o*-トルイジン投与群では2日から1 週にかけての一過性増加が、1% *o*-アニシジン投与群では経時的な増加が認められた。

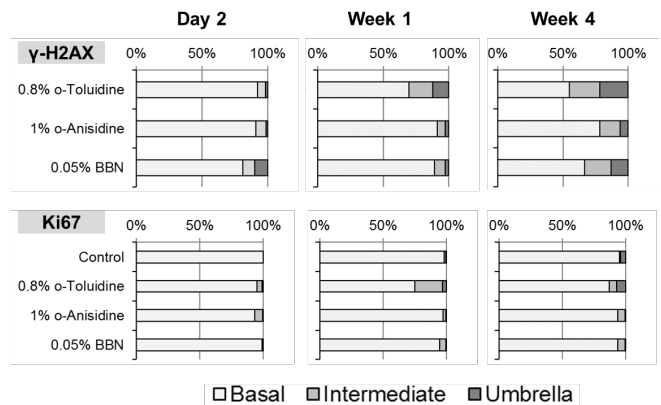


図6. γ -H2AX および Ki67 陽性細胞における基底細胞 (basal)、中間細胞 (intermediate)、表層細胞 (umbrella) の割合。陽性細胞はいずれも基底細胞に多く認められた。

細胞周期関連遺伝子

0.8% <i>o</i> -Toluidine		3% Uracil		0.05% BBN	
Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation
Cdc25b	2.55	Aurkb	16.6459	Aurkb	12.9658
Cdc6	2.3117	Ccna2	12.9826	Birc5	9.5839
Cdkn1a	2.2825	Birc5	11.5246	Cdc6	9.5716
Aurkb	2.124	Ccnb1	11.2972	Ccnf	9.2234
Cdkn2a	2.0676	Cdkn2a	10.6819	Ccna2	8.7876
Inha	2.0239	Ccnf	9.5239	Ccnb1	8.3157
		Ccnb2	9.363	Cdkn1a	8.0098
		Nek2	8.9246	Ccnb2	7.7265
		Cdk1	7.7991	Nek2	7.5415
		Cdc20	6.8316	Cdkn2a	6.3349
		Cdc6	6.2252	Cdkn2b	5.7094
		Mcm3	4.9818	Cdk1	5.3131
		Cdk6	4.807	Cdc20	5.2008
		Rad51	4.525	Mcm3	4.8831
		Aurka	4.3384	Mdm2	4.86
		Mad2l1	3.782	Mki67	3.8631
		Ccna2	3.4492	Ran	3.6941
		Mki67	3.3044	Gadd45a	3.6498
		Nek2	3.1574	Rad51	3.6291
		Cdkn1a	2.8373	Casp3	3.3674
		Ccnb1	2.8258	Aurka	3.2618
		Cdc25c	2.7323	Mad2l1	3.0412
		Chek1	2.7031	Cdc25c	2.9025
		Cdk1	2.5573	Slfn1	2.7386
		Casp3	2.4995	Ran	2.6156
		Cdc20	2.4595	Stmn1	2.5857
		Mcm4	2.4595	Brc1a	2.5816
		Rbl1	2.3768	Sesn2	2.5038
		Mdm2	2.3554	Tp63	2.379
		Mcm3	2.3255	Rbl1	2.2704
		Mki67	2.2814	Inha	2.2587
		Cdk6	2.2709	Ccne1	2.2132
		Gadd45a	2.7808	Mcm4	2.1957
		Aurka	2.3568	Cdc7	2.1794
		Cdc25c	2.3101	Mcm2	2.1763
		Mad2l1	2.3074	Chek1	2.1297
		Rad51	2.2441	Casp3	2.125
		Casp3	2.2164	Ddit3	2.0508
		Inha	2.1746		
		Slfn1	2.042		
		Brc1a	2.0161		
		Ran	2.0122		

図 7 投与 4 週時点での膀胱粘膜上皮における細胞周期関連遺伝子の発現動態。Gene Symbol: 遺伝子名、Fold Regulation: 対照群からの変動比率。

DNA 損傷関連遺伝子

0.8% <i>o</i> -Toluidine		3% Uracil		0.05% BBN	
Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation
Cdkn1a	2.7489	Exo1	12.6091	Exo1	11.3109
Exo1	2.1532	Pttg1	8.1628	Cdkn1a	8.3492
Bbc3	2.1299	Rad18	4.4356	Pttg1	7.6328
		Rad51	4.0131	Bbc3	5.0597
		Pcna	3.7238	Bard1	4.28
		Bbc3	3.311	Fancd2	3.6662
		Chek1	3.1824	Gadd45a	3.4779
		Fancd2	3.16	Brc1a	3.389
		Bard1	3.153	Rad51	3.3034
		Cdc25c	2.961	Fen1	3.1098
		Cdkn1a	2.9457	Cdc25c	2.9912
		Pole	2.837	Bax	2.9701
		Brc1a	2.7656	Mpg	2.921
		Fen1	2.7045	Pcna	2.9036
		Cdc25c	2.4245	Fancg	2.8416
		Bax	2.4156	Pole	2.7097
		Fen1	2.4107	Rad51b	2.6727
		Brc1a	2.1696	Xcc1	2.508
		Fancd2	2.1092	Rad1	2.3492
		Pcna	2.0764	Rad51c	2.3074
		Rad51	2.0476	Tp53	2.2557
				MLH3	2.2545
				Terf1	2.2321
				Rad18	2.1696
				Ddit3	2.1541
				Apex1	2.0734
				Rad50	2.0352
				Ung	2.0343
				Erec1	2.0067
				Sumo1	2.0055

図 8 投与 4 週時点での膀胱粘膜上皮における DNA 損傷関連遺伝子の発現動態。Gene Symbol: 遺伝子名、Fold Regulation: 対照群からの変動比率。

Hedgehog 経路関連遺伝子

0.8% <i>o</i> -Toluidine		3% Uracil		0.05% BBN	
Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation
Grem1	9.2735	Grem1	14.9735	Foxe1	19.024
Foxe1	3.6328	Wnt4	6.2645	Wif1	9.7145
Bmp5	3.3373	Wnt3a	5.2366	Grem1	6.2103
Runx2	3.15	Wif1	4.6596	Mdm2	4.8717
Wnt9b	2.5777	Wnt10a	4.2966	Runx2	4.2778
Wnt7b	2.2713	Wnt3	3.0541	Wnt10a	3.8353
Wnt2	2.197	Ctnnb1	2.4623	Wnt6	3.6272
Gli1	2.1351	Mdm2	2.3073	Wnt4	3.4773
Shh	2.0764	Bmp7	2.1417	Wnt9a	3.0007
Pdgfra	2.0038	Itih5	2.0205	Kctd11	2.6761
				Ctnnb1	2.4748
				Bmp5	2.4564
				Vegfa	2.3582
				Mtss1	2.3163
				Csnk1g1	2.1233
				Bmp4	2.0384

図 9 投与 4 週時点での膀胱粘膜上皮における Hedgehog 経路関連遺伝子の発現動態。Gene Symbol: 遺伝子名、Fold Regulation: 対照群からの変動比率。

クロマチン修飾関連遺伝子

0.8% <i>o</i> -Toluidine		3% Uracil		0.05% BBN	
Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation
Kat8	2.4696	Aurkb	4.9146	Aurkb	9.3248
		Kat8	2.2041	Aurka	2.9775
		Aurka	2.0871	Ciita	2.2076
		Ezh2	2.0078		

クロマチン再構築関連遺伝子

0.8% <i>o</i> -Toluidine		3% Uracil		0.05% BBN	
Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation	Gene Symbol	Fold Regulation
Arid1a	2.6556	Cbx2	2.7257	Baz1a	2.8832
		Nab2	2.4083	Pcgfb	2.5856
		Pcgfb	2.3451	Arid1a	2.5557
		Baz1a	2.2967	Cbx2	2.3553
		Ezh2	2.2532	Smarca5	2.3147
		Ing2	2.0112	Nab2	2.102
				Ing2	2.065

図 10 投与 4 週時点での膀胱粘膜上皮におけるクロマチン修飾・クロマチン再構築関連遺伝子の発現動態。Gene Symbol: 遺伝子名、Fold Regulation: 対照群からの変動比率。

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、明らかな病理組織学的所見および -H2AX 形成/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。*o*-トルイジンによる急性毒性症状としてヒトでは血尿が知られており、ヒトとラットで同様の機序による粘膜傷害が生じる可能性が示唆された。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ことをこの結果は示している。

-H2AX 形成/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* 遺伝毒性を有することが示唆された。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。

また、-H2AX 陽性細胞の局在解析により、*o*-トルイジンおよび *o*-アニシジンによる *in vivo* 遺伝毒性はいずれも基底細胞が主な標的であることが明らかとなった。基底層には膀胱粘膜の幹細胞が存在し、上皮の再生および膀胱がんの起源となることが報告されている (Papafotiou *et al.*, *Nat Commun*, 2016)。両物質による基底細胞への DNA 損傷が、後の発がんに寄与する可能性が考えられた。

o-トルイジンと *o*-アニシジンによる膀胱病変および -H2AX 形成/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 体重/日の用量で 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 形成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。

芳香族アミン曝露初期の膀胱における遺伝子発現動態を明らかにするため、膀胱がんへの関与が知られる 5 項目の遺伝子群について、PCR アレイによる発現解析を

行った。その結果、いずれの項目も *o*-アニシジンおよび BBN 投与群で近い発現パターンを示し、病理組織学的変化の類似と一致する結果となった。

細胞周期・DNA 損傷・Hedgehog 経路関連遺伝子では多数の発現変動がみられ、これらは膀胱発がん過程の初期に重要である可能性が示唆された。特に粘膜上皮の分化に関与する Hedgehog 経路関連遺伝子は、*o*-トルイジンおよび *o*-アニシジン投与群で発現上昇がみられる一方、非遺伝毒性膀胱発がん物質であるウラシル投与群では変化がない遺伝子が複数 (Foxe1, Bmp5, Runx2) 見出され、芳香族アミンによる膀胱発がんに重要な役割を果たしている可能性がある。一方、クロマチン修飾・クロマチン再構築関連因子の発現変動は比較的少なく、これらは膀胱発がん過程の後期に関与する可能性が考えられた。

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* 遺伝毒性を有すること、基底細胞がその主な標的となることが示された。一方、経時的な病理組織学的検索から、両者の膀胱粘膜傷害機序は異なることが明らかとなった。膀胱粘膜の遺伝子発現解析では、*o*-アニシジンは遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN と近い発現パターンを示すこと、細胞周期・DNA 損傷・Hedgehog 経路関連遺伝子が *o*-トルイジン・*o*-アニシジンの曝露初期に特徴的に変動することが示唆された。被験物質はいずれも芳香族アミンとして基本的な構造を有することから、本研究の成果は芳香族アミン全般のリスク評価における基礎データとして活用し得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

【平成 29 年度】

- 1) **Toyoda T**, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol*, 38: 537-543, 2018
- 2) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, **Toyoda T**, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol*, 31: 73-80, 2018
- 3) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, **Toyoda T**, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells. *Food Chem Toxicol*, 111: 295-301, 2018
- 4) Akagi J, Yokoi M, Cho YM, **Toyoda T**, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases , and to various genotoxic

compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair*, 61: 76-85, 2017

5) Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriya Y, **Toyoda T**, Cao X. Prevention of gastric cancer: Eradication of *Helicobacter pylori* and beyond. *Int J Mol Sci*, 18: 1699, 2017

【平成 28 年度】

6) **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

7) **Toyoda T**, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriya 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, **Toyoda T**, Akagi J, Nakamura Y, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shiota 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

12) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, **Toyoda T**, Akagi J, Nakamura Y, Park EY, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shiota 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

【平成 29 年度】

1) 赤木純一、曹永晩、**豊田武士**、水田保子、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子。ベンゾ[a]ピレン誘発がんに対する PoI の寄与の解析。日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 26 日

2) **Toyoda T**, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. -H2AX formation induced by

the bladder-carcinogenic aromatic amines *o*-toluidine and *o*-anisidine in the urinary bladder of rats. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2018.3.13

3) **豊田武士**、松下幸平、曹永晩、赤木純一、曾根瑞季、西川秋佳、小川久美子。-H2AX 免疫染色による膀胱発がんリスク早期検出法の開発。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 25 日

4) 曹永晩、水田保子、赤木純一、**豊田武士**、小川久美子。経皮曝露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシン B サブユニットのアジュバント作用。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 26 日

5) 山田貴宣、松下幸平、**豊田武士**、森川朋美、高橋美和、井上薫、小川久美子。ラットを用いたバニリンプロピレングリコールアセタール (バニリン PGA) の 90 日間亜慢性反復経口投与と毒性試験。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 25 日

6) 赤木純一、曹永晩、**豊田武士**、水田保子、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子。ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する PoI の寄与。2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月 7 日

7) Tajima Y, **Toyoda T**, Matsushita K, Hashidume T, Wakabayashi K, Miyoshi N. Analysis of genotoxic activities of urinary bladder carcinogenic aromatic amines. 12th International Conference on Environmental Mutagens, Incheon, 2017.11.15

8) 降旗千恵、鈴木孝昌、**豊田武士**、小川久美子。次世代シーケンス-Targeted mRNA Sequencing によるトキシコゲノミクス指標遺伝子の検証。日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日

9) 小川久美子、曹永晩、石井雄二、**豊田武士**。病理からみた遺伝毒性。日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日

10) **豊田武士**、三好規之、小川久美子。*o*-トルイジンおよび*o*-アニシジンはラット膀胱粘膜に H2AX 形成を誘導する。第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 29 日

11) 赤木純一、横井雅幸、曹永晩、**豊田武士**、大森治夫、花岡文雄、小川久美子。損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ イータ・イオタ・カッパ三重欠損細胞を用いた新規遺伝毒性試験法の研究。第 3 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、2017 年 9 月 16 日

12) **豊田武士**、松下幸平、森川朋美、小川久美子。芳香族アミン投与ラット膀胱粘膜における H2AX 発現。第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日

13) 曹永晩、赤木純一、水田保子、**豊田武士**、小川久美子。サイズによって異なるナノ銀の急性毒性。第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日

14) 野村幸世、**豊田武士**、長田梨比人、市田晃彦、

大津洋、石橋祐子、愛甲丞、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之。胃癌、膵癌早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明。第 26 回日本癌病態治療研究会、横浜、2017 年 6 月 2 日

15) 竹島秀幸、丹羽透、**豊田武士**、山下聡、牛島俊和。組織におけるエピゲノム傷害の程度は、発がん要因への曝露期間により決まる。第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2017 年 5 月 23 日【平成 28 年度】

16) 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

17) **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

18) 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

19) 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 β 、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

20) **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

21) 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

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