

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）  
（H30-労働-一般-010）総括研究報告書

芳香族アミンの膀胱に対する傷害性および発がん性における構造特性の影響

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  
研究分担者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

### 研究要旨

本研究では、オルト-トルイジンと類似構造を有する複数の芳香族アミンをラットに短期間投与し、膀胱における細胞・遺伝子動態に及ぼす影響を、 $\gamma$ -H2AXをはじめとするDNA損傷・分化関連因子等の発現解析を通じて明らかにし、当該解析手法による包括的評価への応用について検討することを目的とする。平成30年度は、6週齢の雄F344ラットに1%4-クロロ-オルト-トルイジン(4-CT)、0.5%5-クロロ-オルト-トルイジン(5-CT)、0.5%オルト-アミノアゾトルエン(AAT)、1%2-アミノベンジルアルコール(ABA)、1%オルト-アセトトルイジン(*o*-AT)を4週間混餌投与し、投与2日、1週、2週および4週時点で膀胱を採材した。病理組織学的検索において、被験物質のうち5-CTを除く4物質(4-CT, AAT, ABA, *o*-AT)が膀胱病変を誘発することが明らかとなった。また、免疫組織化学的解析により、これら4物質はいずれも $\gamma$ -H2AXまたはKi67陽性細胞の有意な増加を引き起こした。一方、4-CTおよび*o*-ATがオルト-トルイジンに類似した膀胱粘膜の出血・壊死性病変を誘導したのに対して、AATおよびABAは軽度～中等度の単純過形成を引き起こし、粘膜傷害機序が互いに異なることが示唆された。今後、膀胱傷害性が認められた4物質について、膀胱粘膜におけるDNA修復・細胞周期・分化関連因子の遺伝子発現解析を実施する予定である。また、新たな類似構造物質によるデータ取得を継続し、膀胱傷害性および発がん性に関連する構造特性の推定を試みる。

### A．研究目的

芳香族アミンは染料・顔料の製造原料として汎用されるが、発がん性への懸念から各国で規制が進められている。平成27年には、芳香族アミンを取り扱う民間事業場において膀胱がんが多発した事案が報告されるなど、適正なリスク管理の重要性が改めて認識されている。膀胱発がん性を示す芳香族アミンには、定型的な*in vitro*遺伝毒性試験では陰性ながら、生体内でDNA損傷を誘発する可能性が示唆されるなど、発がん機序の本態がいまだ不明なものが多く含まれる。

我々は以前に、互いに類似した構造を持つ5種の芳香族アミンをラットに28日間経口投与し、膀胱粘膜における細胞・遺伝子動態への影響を検索した。その結果、膀胱発がん性が報告されているオルト-トルイジンおよびオルト-アニシジンの2種のみが、DNA損傷マーカーである $\gamma$ -H2AXの増加を誘導し、膀胱粘膜にDNA損傷を引き起こすことが示唆された。また遺伝子発現解析では、両物質はともに細胞周期・DNA損傷・分化関連遺伝子の特徴的に変動させることが明らかとなり、短期間の投与によって膀胱への傷害性および発がん性を検出し得る可能性が示された。投与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、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と考えられる。

本研究では、オルト-トルイジンと類似構造を有する複数の芳香族アミンをラットに投与し、膀胱における細胞・遺伝子動態に及ぼす影響を、 $\gamma$ -H2AXをはじめと

するDNA損傷・分化関連因子等の発現解析を通じて明らかにし、当該解析手法による包括的評価への応用について検討することを目的とする。

### B．研究方法

6週齢の雄F344ラットに、オルト-トルイジンに類似した構造を持つ芳香族アミン5種(図1): 1%4-クロロ-オルト-トルイジン(4-CT)、0.5%5-クロロ-オルト-トルイジン(5-CT)、0.5%オルト-アミノアゾトルエン(AAT)、1%2-アミノベンジルアルコール(ABA)、1%オルト-アセトトルイジン(*o*-AT)を4週間混餌投与した。各物質の投与濃度は、4週間の最大耐量として設定した。投与開始後2日、1週、2週および4週時点で解剖し、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 $\gamma$ -H2AX形成・Ki67発現解析を実施した。膀胱粘膜上皮における $\gamma$ -H2AX/Ki67陽性細胞をカウントし、陽性率を対照群と比較した。

(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

各種芳香族アミンをラットに4週間経口投与し、経時的に採取した膀胱における病理組織学的検索および

-H2AX 形成/Ki67 発現の解析により、被験物質による膀胱への傷害性および発がん性の有無について評価を行った。

投与 2 日目の時点では、いずれの投与群においても病理組織学的変化は認められなかった。投与 1 週目以降、4-CT および *o*-AT 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 2)。投与 1 週目の時点で、両群の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、上皮細胞の壊死脱落および間質結合組織・血管の壊死が広範囲に認められた。2 週から 4 週目にかけては、これら出血・壊死を伴う急性病変は局所的に残存した一方、粘膜上皮のび慢性単純過形成、単核細胞浸潤を特徴とする慢性炎症および間質における肉芽組織増生が顕著となった。

AAT および ABA 投与群では、1 週目以降の膀胱粘膜に軽微～軽度の単純過形成が認められた (図 3)。また、5-CT 投与群では、いずれの時点においても明らかな膀胱病変は観察されなかった。

膀胱粘膜上皮における -H2AX 形成および Ki67 発現について、免疫組織化学的手法による定量解析を実施した (図 4)。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、4-CT, AAT, ABA および *o*-AT 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 5)。これら 4 群に共通して、1 または 2 週目に -H2AX 陽性細胞の割合が最大となり、以後 4 週目にかけて漸減する傾向がみられた。

細胞増殖マーカーである Ki67 もほぼ同様の変化を示し、4-CT, AAT および *o*-AT 投与群において陽性細胞の割合が有意に増加した (図 6)。ABA 投与群では 1 週目に一過性の増加傾向がみられたものの、2 週目以降の陽性率は対照群と同じレベルであった。5-CT 投与群では、-H2AX/Ki67 いずれの増加も観察されなかった。

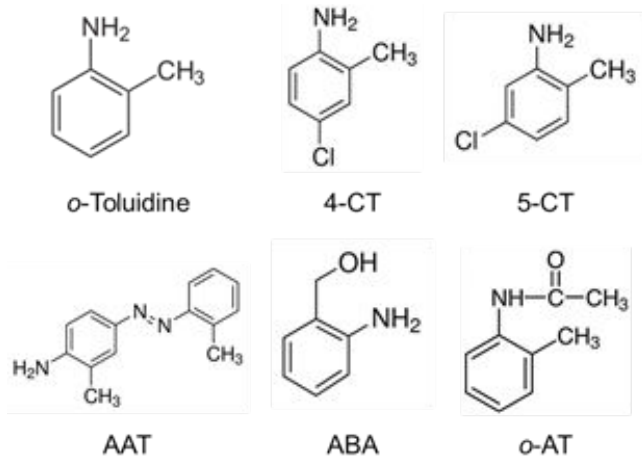


図 1. オルト-トルイジンおよび本研究における被験物質の構造式。

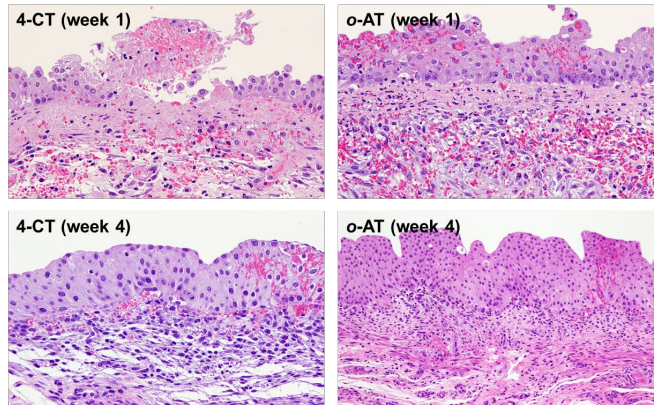


図 2. 4-CT および *o*-AT 投与群における膀胱病変。Week 1: 粘膜内出血、上皮細胞の壊死脱落および間質結合組織・血管の壊死。Week 4: び慢性単純過形成、単核細胞浸潤を特徴とする慢性炎症および間質における肉芽組織増生。

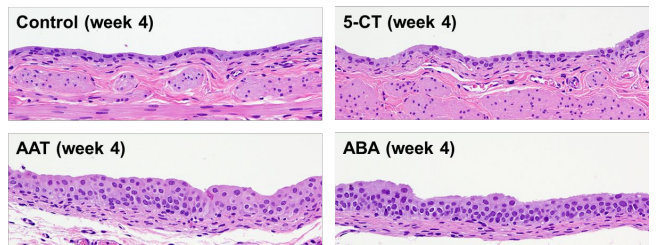


図 3. 対照群、5-CT、AAT および ABA 投与群における膀胱粘膜。AAT および ABA 投与群は、膀胱粘膜の軽微～軽度の単純過形成を示した。

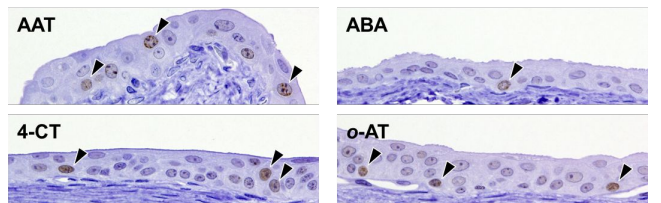


図 4. 投与 4 週目の膀胱における -H2AX 陽性細胞 (矢頭)。

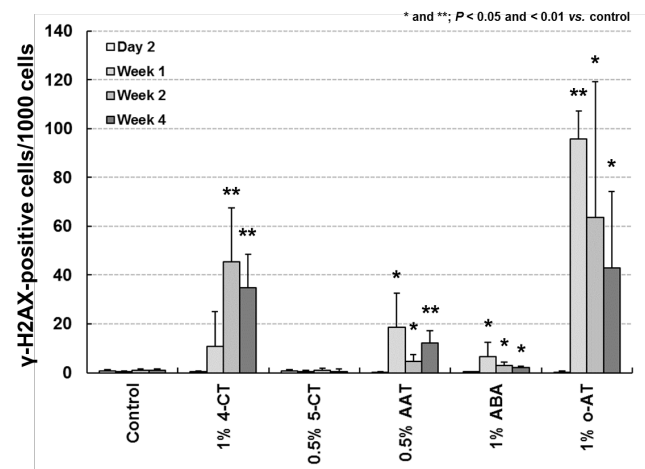


図 5. ラット膀胱粘膜上皮細胞における -H2AX 陽性細胞

胞の定量解析 (統計: Student *t*-test)

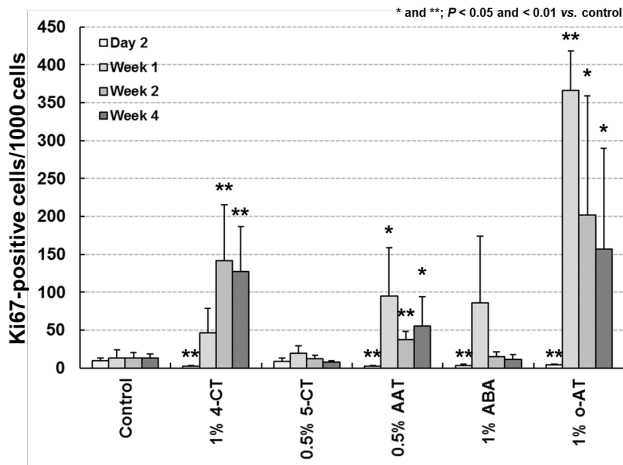


図 6. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析 (統計: Student *t*-test)

#### D. 考察

本研究で検討した 5 種の芳香族アミンのうち、5-CT 投与群の膀胱には、明らかな病理学的所見および -H2AX 形成/Ki67 発現の変化は認められなかった。一方、残る 4 物質 (4-CT, AAT, ABA, *o*-AT) は 4 週間の混餌投与により、過形成等の膀胱病変および -H2AX/Ki67 陽性細胞の増加を誘導することが明らかになった。

病理組織学的検索により、4-CT および *o*-AT はラット膀胱に対して、粘膜内出血等の急性傷害から慢性炎症および慢性過形成に至る、一連の病理学的変化を誘発することが明らかとなり、これはオルト-トルイジンによる膀胱病変の形成過程に類似していた。また、AAT および ABA 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、オルト-アニシジンによる病態と類似することが示された。

免疫染色によって、4-CT, AAT, ABA, *o*-AT はいずれも -H2AX 形成/Ki67 発現の増加を誘導し、膀胱粘膜に対して DNA 損傷/細胞増殖を誘導することが示唆された。陽性細胞率はいずれも 1-2 週目に最大となり、4 週目にかけてやや減少するパターンを示した。4-CT および *o*-AT については、病理所見の変化に対応している可能性が考えられた。

4-CT は国際がん研究機関 (IARC, 2010) による発がん性評価において、Group 2A (ヒトに対しておそらく発がん性がある) に分類されている。疫学調査では、4-CT への曝露と膀胱がんとの関連を示す結果が、小規模な研究ではあるが一部で得られている。一方、齧歯類を用いた発がん性試験では、4-CT はマウスにおいて血管系腫瘍を誘発するものの、ラットに対する発がん性は認められなかったと報告されている。4-CT 混餌投与による 2 件のラット発がん性試験における最高用量は、それぞれ 0.4% (SD 系、3 ヶ月目以降は 0.1% に減量) および 0.5% (F344 系) と、本研究 (1%) の半量以下であった (National Cancer Institute, 1979; Weisburger *et al.*, 1978)。我々は先行研究において、オルト-トルイジンを 0.8% または 0.4% の用量でラットに 4 週間混

餌投与した結果、0.8% 投与群で観察された顕著な膀胱病変および -H2AX/Ki67 陽性細胞の有意な増加は、いずれも 0.4% 投与群では観察されないことを明らかにした。この結果は、膀胱粘膜上皮に傷害を及ぼし、DNA 損傷/細胞増殖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を示唆している。本研究で認められた高用量 (1%) の 4-CT による膀胱粘膜傷害および -H2AX/Ki67 増加も、オルト-トルイジンと同様に、低用量 (0.5% 以下) では認められない可能性が考えられた。さらなる検証が必要ではあるが、高用量での投与が継続可能である場合、4-CT はラット膀胱に対しても潜在的な発がん性を有すると推定された。

5-CT は 4-CT と塩素の置換部位だけが異なる、極めて類似した構造を有しているが、5-CT 投与群にはいかなる膀胱病変も認められなかった。ABA および *o*-AT はいずれもオルト-トルイジンの代謝物であり、ABA は CYP による酸化を、*o*-AT は NAT による N-アセチル化を受けて生成される。いずれもこれまでに毒性影響を検討した報告はなく、本研究により両物質が膀胱傷害性を有することが初めて示され、またその機序は互いに異なる可能性が示唆された。また、AAT はラットに対し膀胱腫瘍を誘発することが報告されているが (IARC, 1975)、その詳細や機序は不明であった。今回の結果から、AAT の膀胱発がん機序はオルト-アニシジンと類似する可能性が示唆された。今後、膀胱粘膜における遺伝子発現動態をオルト-トルイジン等と比較することにより、これら芳香族アミンの膀胱傷害および発がん機序の一端を明らかにできると考えられる。

#### 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、4-CT (4-クロロ-オルト-トルイジン)、AAT (オルト-アミノアゾトルエン)、ABA (2-アミノベンジルアルコール) および *o*-AT (オルト-アセトトルイジン) はラット膀胱に対して膀胱傷害性を示すことが明らかとなり、膀胱発がん性を示す可能性が示唆された。一方で、膀胱粘膜傷害機序は 4-CT/*o*-AT および AAT/ABA の 2 グループで互いに異なることが示された。今後、これら 4 物質を投与した膀胱粘膜における遺伝子発現動態の解析を実施する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) **Toyoda T**, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, **Ogawa K**. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. *Arch Toxicol*, 93: 753-62, 2019
- 2) **Toyoda T**, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, **Ogawa K**. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. *J Toxicol Sci*, 43: 423-33, 2018
- 3) **Toyoda T**, Cho YM, Matsushita K, Tachibana S, Senuma M, Akagi J, **Ogawa K**. A 13-week subchronic

toxicity study of hexyl acetate in SD rats. *J Toxicol Pathol*, in press

4) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of  $\gamma$ -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. *J Appl Toxicol*, in press

5) Furihata C, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Mutat Res*, 834: 51-5, 2018

## 2. 学会発表

1) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . 膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2019 年 2 月 1 日

2) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . 膀胱発がん物質投与による  $\gamma$ -H2AX 形成の用量相関性及び経時的変化 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2019 年 2 月 1 日

3) 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. The 23rd Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka, 2018.11.16

4) 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. The 4th International Conference on Pharma-food General Information, Shizuoka, 2018.11.15

5) 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、京都、2018 年 11 月 2 日

6) 降旗千恵、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌 . RNA-Seq による 1,4-ジオキサン (DO) のラット肝臓における遺伝子発現プロフィール：遺伝毒性および

非遺伝毒性肝発がん物質との比較 . 日本環境変異原学会第 47 回大会、京都、2018 年 11 月 1 日

7) 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、大阪、2018 年 9 月 28 日

8) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子 . 幹細胞マーカー免疫染色による膀胱発がん物質の早期検出 . 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、2018 年 9 月 28 日

9) 豊田武士、山田貴宣、鈴木周五、松下幸平、曹永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、小川久美子 .  $\gamma$ -H2AX を指標とした化学物質の膀胱発がん性早期検出系の開発 . 第 33 回発癌病理研究会、御殿場、2018 年 8 月 31 日

10) 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、御殿場、2018 年 8 月 29 日

11) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、小川久美子 . 膀胱発がん性芳香族アミンの短期投与によるラット膀胱粘膜遺伝子発現動態への影響 . 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪、2018 年 7 月 19 日

12) 山田貴宣、豊田武士、曾根瑞季、鈴木周五、松下幸平、森川朋美、小川久美子 .  $\gamma$ -H2AX を指標とした膀胱発がん性の早期予測 - 追加の化学物質による検証 - . 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪、2018 年 7 月 18 日

13) 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 . がん予防学術大会 2018 高松、高松、2018 年 6 月 28 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