

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）  
令和元年度総括研究報告書

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（H30-労働-一般-010）

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。令和元年度は、6週齢の雄F344ラットに3,3'-ジメトキシベンジジン(DXB)、2,4-ジアミノアニソール、2,4-ジアミノトルエン、2-アミノ-*m*-クレゾール、4-アミノ-*m*-クレゾール、*N*-アセチルアントラニル酸を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・免疫組織化学的検索の結果、被験物質のうちDXBのみが軽微な膀胱病変、および $\gamma$ -H2AX陽性細胞の有意な増加を引き起こすことが明らかとなった。また、前年度の解析で膀胱傷害性を示した4物質（4-クロロ-オルト-トルイジン；4-CT、オルト-アミノアゾトルエン；AAT、2-アミノベンジルアルコール；ABA、オルト-アセトトルイジン；*o*-AT）について、膀胱がんとの関連が指摘される遺伝子群の発現解析を行った。その結果、DNA損傷・細胞周期関連遺伝子について、4-CTと*o*-AT、およびAATとABAがそれぞれ類似した発現プロファイルを示し、病理組織学所見の特徴と一致した傾向を示すことが明らかとなった。今後、新たな被験物質を追加し、本解析手法の包括的評価としての応用について検討するとともに、芳香族アミンによる膀胱傷害性と構造特性の関連について考察を加える予定である。

### 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例が報告されるなど、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。

我々は先行研究として、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形成の増加を誘導し、膀胱粘膜にDNA損傷を引き起こすことが示唆された。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。5種の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、包括的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（各群5匹）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6種（図1）：0.4%3,3'-ジメトキシベンジジン(DXB)、0.5%2,4-ジアミノアニソール(DAA)、0.1%2,4-ジアミノトルエン(DAT)、0.5%2-アミノ-*m*-クレゾール(2-AC)、0.3%4-アミノ-*m*-クレゾール(4-AC)、0.5%*N*-アセチルアントラニル酸(AAA)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形成の定量解析を実施した。膀胱粘膜上皮における $\gamma$ -H2AX陽性細胞をカウントし、陽性率を対照群と比較した。

また、前年度の解析で膀胱傷害性を示した4物質：0.5%または1%4-クロロ-オルト-トルイジン(4-CT)、0.25%オルト-アミノアゾトルエン(AAT)、0.5%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)を同様に4週間混餌投与し、膀胱がんとの関連が指摘される遺伝子群(DNA損傷および細胞周期；各84遺伝子)について、PCRアレイ(QIAGEN)を用いた発現解析を行った。0.5%/1%4-CT投与群および

対照群については、膀胱における  $\gamma$ -H2AX 形成の定量解析も併せて実施した。

(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

芳香族アミン 6 種をラットに 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  $\gamma$ -H2AX 形成の定量解析により、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 1 週目以降、DXB 投与群の膀胱には、尿路上皮細胞の空胞化および単純過形成が一部の個体に認められた(図 2A, B)。対照群および他の投与群では、いずれの時点においても膀胱病変は観察されなかった。

免疫組織化学的検索の結果、DXB 投与群の膀胱粘膜には  $\gamma$ -H2AX 形成の経時的な増加が認められた(図 2C, D)。

$\gamma$ -H2AX 陽性率の定量解析として、粘膜上皮細胞 1000 個あたりの  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数を計測した結果、DXB 投与群では投与 1 週目以降、対照群と比較して  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた(図 3)。他の投与群では、 $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の増加は観察されなかった。

前年度の検討で膀胱傷害性を示した 4 物質を対象に、4 週間経口投与後の膀胱粘膜から RNA を抽出し、細胞周期・DNA 損傷関連遺伝子の発現動態を PCR アレイにより解析した。その結果、いずれの項目についても、1% 4-CT と *o*-AT、および AAT と ABA がそれぞれ類似した発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

また、0.5% 4-CT および 1% 4-CT 投与群において、病理組織学的解析ならびに  $\gamma$ -H2AX 定量解析を実施した。1% 4-CT 投与群では出血・壊死や過形成等の病変が誘発されたのに対し、0.5% 4-CT 投与群には明らかな膀胱病変は認められなかった。同様に、1% 4-CT 投与群の膀胱には  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められたが、0.5% 4-CT 投与群における陽性率は対照群と同じレベルであった(図 4)。

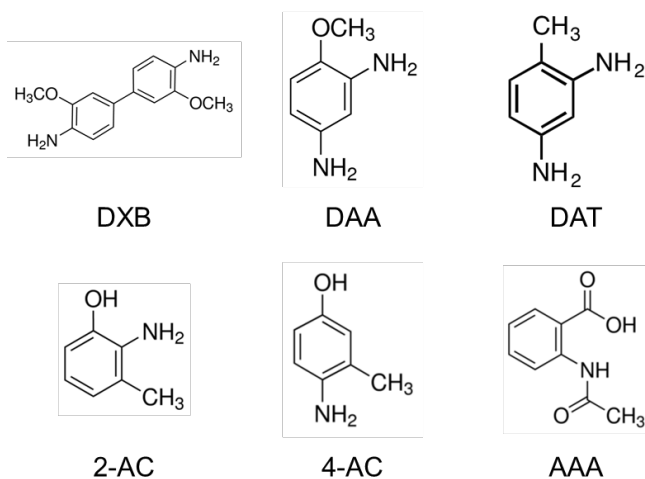


図 1. 本年度の新規被験物質 6 種の構造式。

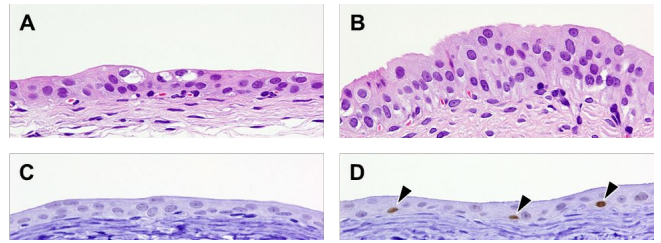


図 2. ラット膀胱における病理組織学的変化および  $\gamma$ -H2AX 形成(4 週時点)。A: 尿路上皮細胞の空胞化(DXB 投与群) B: 尿路上皮の単純過形成(DXB 投与群) C:  $\gamma$ -H2AX 免疫染色(対照群) D:  $\gamma$ -H2AX 免疫染色(DXB 投与群)。  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞が散在する(矢頭)。

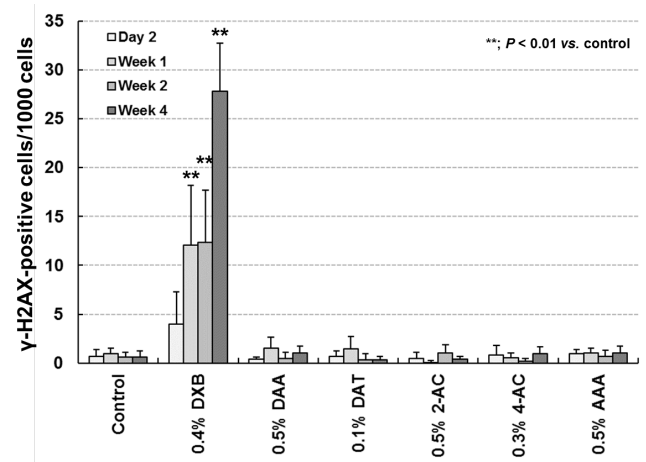


図 3. 芳香族アミンを投与したラット膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の定量解析(Student *t*-test)。

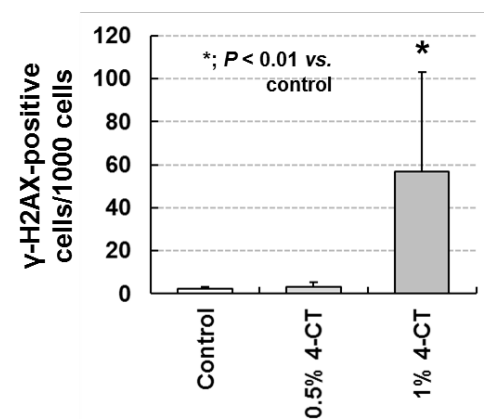


図 4. 0.5%または 1% 4-CT を投与したラット膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の定量解析(Student *t*-test)。

### D. 考察

令和元年度に検討した 6 種の芳香族アミンのうち、DXB は過形成等の膀胱病変および  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の有意な増加を誘導することが明らかになった。一方で、他の投与群の膀胱には、明らかな病理組織学的所見および  $\gamma$ -H2AX 形成の変化は認められなかった。

DXB 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, 1974) 詳細な膀胱傷害・発がん機序は不明であった。前年度までの検討から、芳香族アミンによる膀胱傷害は、オルト-トルイジン投与時にみられる出血・壊死等の急性傷害から慢性炎症を経て慢性過形成に至るタイプと、オルト-アニシジン投与群における壊死や重度の炎症を伴わず単純過形成を誘発するタイプの、大きく 2 型に分類し得ることが示唆されている。DXB 投与群の膀胱には出血・壊死等の急性病変は認められず、一部の個体に上皮細胞の空胞化および過形成がみられるなど、オルト-アニシジンに近い病変を呈した。-H2AX 陽性率についても、急性傷害期における一過性の増加が特徴であるオルト-トルイジンとは異なり、投与 2 日目以降経時的に増加するオルト-アニシジンと同様のパターンを示した。DXB はオルト-アニシジンがベンジジン転位により結合した構造を持ち、両物質による膀胱傷害機序の類似性と関連している可能性が示唆される。

遺伝子発現解析を実施した 4 物質の中で、4-CT と *o*-AT、AAT と ABA はそれぞれ類似した発現動態を示した。前年度に実施した病理組織学的検索により、4-CT・*o*-AT はオルト-トルイジン型、AAT・ABA はオルト-アニシジン型の病理所見を惹起することが明らかとなっている。4-CT と *o*-AT、AAT と ABA にみられた遺伝子発現パターンの類似は、膀胱傷害機序の特徴と一致しており、28 日間反復投与試験の膀胱を用いた本解析手法の有効性を裏付ける結果と考えられる。

4-CT は労働曝露と膀胱がんとの関連を示す疫学調査の結果が、小規模な研究ではあるが得られている (IARC, 2010)。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、本研究で膀胱傷害・-H2AX 形成の増加を示した用量 (1%) の半量以下であった (NTP, 1979; Weisburger *et al.*, 1978)。

我々は本研究において、上記の発がん性試験と同用量 (0.5%) の群では、1%投与群にみられた膀胱病変・-H2AX 陽性率増加が誘発されないことを確認した。これは先行研究におけるオルト-トルイジンでの結果、すなわち 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かったことと類似している。これらの結果は、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。別途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。

DAA および DAT は、それぞれオルト-アニシジンおよびオルト-トルイジンにメチル基が付加された構造を有しているが、いずれも膀胱病変・-H2AX 形成の増加を誘導しなかった。2-AC・4-AC・AAA はいずれもオルト-トルイジンの代謝物であり、2-AC・4-AC は CYP による

酸化を、AAA は *o*-AT または ABA を経て生成される。2-AC・4-AC はオルト-トルイジンの解毒機構に関与すると考えられており、本研究においても膀胱傷害性を示さなかった。一方、*o*-AT・ABA は前年度の検索において -H2AX 形成の増加を誘導することが示されているが、代謝経路の下流に位置する AAA は膀胱傷害や -H2AX 形成を誘導しなかった。これらの結果は、オルト-トルイジン類似物質による膀胱傷害と構造特性の関連を考察する上で、重要な知見になると期待される。

## E. 結論

本研究の結果から、検索した 6 種の芳香族アミンのうち、膀胱発がん性が報告されている DXB (3,3'-ジメトキシベンジジン) のみが、ラットに対して膀胱傷害性および -H2AX 形成の増加を示すことが明らかとなった。今後、新たな被験物質を追加し、本解析手法の包括的評価としての応用について検討するとともに、芳香族アミンによる膀胱傷害性と構造特性の関連について考察を加える予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose dependency of -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with genotoxic and nongenotoxic bladder carcinogens. *J Appl Toxicol*, in press
- 2) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Comprehensive expression analysis of mRNA and microRNA for investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy. *J Appl Toxicol*, in press
- 3) Furihata C, You X, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using FFPE RNA-Seq with 12 marker genes to evaluate genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Genes Environ*, 42: 15, 2020

### 2. 学会発表

- 1) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Mucosal damage and -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to that of *o*-toluidine. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020.3)
- 2) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤木純一、曹永晩、森川朋美、小川久美子 . 腎発がん物質早期検出指標としての -H2AX の応用可能性: 至適評価時点の検討 . 第 36 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020 年 2 月)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、小川久美子 . 病理学的手法による膀胱発がん性の早期検出および機序解明 . 第 2 回医薬品毒性機序研究会、川崎 (2020 年 1 月)
- 4) 豊田武士、山田貴宣、小川久美子 . オルト-トルイジン類似構造を有する芳香族アミンによるラット膀胱粘膜傷害および -H2AX 形成 . 第 78 回日本癌学

会学術総会、京都（2019年9月）

5) 豊田武士、山田貴宣、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。

-H2AXを指標とした膀胱発がん物質早期検出法。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）

6) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose- and time-dependent formation of -H2AX, a biomarker for early detection of bladder carcinogens, and its potential role in tumorigenesis in the rat urinary bladder. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020.3)

7) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、西川秋佳、小川久美子。肝発がん物質投与ラット肝臓における -H2AX 陽性細胞率の検討。第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2020年2月）

8) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子。BBN 誘発ラット膀胱発がん過程における Hepatocyte growth factor (HGF) の関与。第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2020年2月）

9) 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：DNA 付加体を形成する膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine 代謝物の分析、ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）

10) 降旗千恵、尤馨悦、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌。肝がん原物質 2-アセチルアミノフルオレンと *p*-クレシジンの遺伝毒性を FFPE-RNA-Seq で評価。ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）

11) 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 DNA 付加体および代謝物分析。第8回食品薬学シンポジウム、静岡（2019年10月）

12) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子。ラット膀胱発がん過程における -H2AX 及び膀胱発がん幹細胞マーカー陽性細胞の役割。第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）

13) 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。メタボローム解析による膀胱発がん性芳香族アミン化合物の活性代謝物の解明。第26回日本がん予防学会総会、札幌（2019年6月）

14) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子。BBN 誘発ラット膀胱発がん過程における -H2AX 形成及び膀胱発がん幹細胞マーカー発現の経時的変化。第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）

## 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