

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

( H28-化学-若手-005 )

平成29年度 総括研究報告書

研究代表者 豊田 武士

平成 30 ( 2018 ) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告	
芳香族アミンの膀胱に対する <i>in vivo</i> 遺伝毒性および細胞動態の短期解析 豊田武士	----- 1
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 5

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**

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、芳香族アミン曝露初期における細胞および遺伝子発現動態への影響を明らかにすることを目的とする。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）を用いた前年度の解析により、*o*-トルイジンと *o*-アニシジンは膀胱粘膜における -H2AX 形成/Ki67 発現を増加させること、その粘膜傷害機序は互いに異なることが示された。平成 29 年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに 0.8% *o*-トルイジン、1% *o*-アニシジン、3%ウラシルおよび 0.05% BBN を 4 週間混餌または飲水投与し、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）について、膀胱粘膜における遺伝子発現解析を実施した。その結果、*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。両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。

**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）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（*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）のうち、平成 28 年度に実施したラットを用いた解析の結果、病理組織学的所見および -H2AX 形成/Ki67 発現の増加を誘導した *o*-トルイジンおよび *o*-アニシジンの 2 種を、平成 29 年度の解析対象として選択した。

6 週齢の雄 F344 ラットに、0.8% *o*-トルイジンおよび 1% *o*-アニシジンを 4 週間混餌投与した。また、無処置対照群に加え、遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 飲水投与群ならびに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併せて設置した。

4 週間の投与終了時に解剖し、膀胱粘膜を凍結採材後、

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) 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

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 投与群の膀胱粘膜から RNA を抽出し、細胞周期・DNA 損傷・Hedgehog 経路・クロマチン修飾・クロマチン再構築関連遺伝子の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 1-3)、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 4)。

投与群ごとの特徴として、*o*-アニシジン・BBN 投与群では多数の遺伝子発現変動がみられた一方で、*o*-トルイジン投与群では、投与 4 週時点での変動遺伝子数は比較的少なかった。また、ウラシル投与群では、発現増加だけでなく減少を示す遺伝子も、他群と比較して多数認められた。

クラスタグラム解析により、投与群の遺伝子発現パターンを各項目ごとに比較した結果、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。

### 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
		Ran	3.4492	Cdk6	3.6941
		Mki67	3.3044	Gadd45a	3.6498
		Cdkn1a	3.1574	Rad51	3.6291
		Cdkn2b	2.8373	Casp3	3.674
		Stmn1	2.8258	Aurka	3.2618
		Cdc25c	2.7323	Mad2l1	3.0412
		Chek1	2.7031	Cdc25c	2.9025
		Brc1	2.5573	Sifn1	2.7386
		Casp3	2.4995	Ran	2.6156
		Mcm4	2.4595	Stmn1	2.5857
		Rbl1	2.3768	Brc1	2.5816
		Mdm2	2.3554	Sesn2	2.5038
		Mcm2	2.3255	Tp63	2.379
		Gadd45a	2.1111	Rbl1	2.2704
		Ccne1	2.0031	Inha	2.2587
				Ccne1	2.2132
				Mcm4	2.1957
				Cdc7	2.1794
				Mcm2	2.1763
				Chek1	2.1297
				Tp53	2.125
				Ddit3	2.0508
				Gene Symbol	Fold Regulation
				Pmp22	-2.3033

図 1.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:対照群からの変動倍率。

### 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	Brc1	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
		Brc1	2.7656	Mpg	2.921
		Fen1	2.7045	Pcna	2.9036
		Ung	2.4439	Fancg	2.8416
		Mpg	2.4429	Pole	2.7097
		Rad51b	2.295	Chek1	2.6727
		Xrcc1	2.0896	Xrcc1	2.508
		Terf1	2.0808	Rad1	2.3492
		Csnk2a2	2.0531	Rad51c	2.3074
		Apex1	2.0253	Tp53	2.2557
				Mh3	2.2545
				Terf1	2.2321
				Rad18	2.1696
				Ddit3	2.1541
				Apex1	2.0734
				Rad50	2.0352
				Ung	2.0343
				Ercc1	2.0067
				Sumo1	2.0055
				Gene Symbol	Fold Regulation
				Mgmt	-4.0932
				Gadd45g	-2.7247

図 2.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:対照群からの変動倍率。



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  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair*, 61: 76-85, 2017

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

## 2. 学会発表

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 Pol 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 Pol 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

## 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					