

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 2 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、膀胱に対する傷害性・発がん性を、病理組織学的検索および $\gamma$ -H2AX の免疫組織化学的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 2 年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに 5-ニトロ-オルト-トルイジン (PNOT)、3,3'-ジクロロベンジジン (DCB)、4-アミノアゾベンゼン (AAB)、4,4'-メチレンジアニリン (MDA)、4,4'-メチレンビス-2-クロロアニリン (MOCA)、およびアントラニル酸 (AA) を 4 週間混餌または飲水投与し、投与 2 日、1 週、2 週および 4 週時点で膀胱を採材した。病理組織学的検索の結果、被験物質のうち AAB・MDA は尿路上皮における空胞変性および単純過形成等の膀胱病変を誘発することが明らかとなった。 $\gamma$ -H2AX 免疫染色の結果、AAB は 2 週目以降、膀胱尿路上皮における $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の有意な増加を引き起こした。MDA 投与群においても、 $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の一過性の増加傾向が認められた。PNOT・DCB・MOCA・AA（いずれもラット膀胱に対して非発がん性）投与群には、膀胱病変および $\gamma$ -H2AX 形成増加は認められなかった。以上の結果から、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色によって芳香族アミンの潜在的な膀胱傷害性・発がん性を早期に検出し得ることが示された。

### 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（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）。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・分化関連遺伝子を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、病理組織学的検索ならびに $\gamma$ -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）：0.01% 5-ニトロ-オルト-トルイジン (PNOT)、0.1% 3,3'-ジクロロベンジジン (DCB)、0.5% 4-アミノアゾベンゼン (AAB)、0.08% 4,4'-メチレンジアニリン (MDA)、0.1% 4,4'-メチレンビス-2-クロロアニリン (MOCA)、1% アントラニル酸 (AA) を 4 週間混餌 (MDA のみ飲水) 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 $\gamma$ -H2AX 形成の定量解析を実施した。膀胱尿路上皮における $\gamma$ -H2AX 陽性細胞をカウントし、陽性率を対照群と比較した。

（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、AAB投与群の膀胱には、尿路上皮細胞の空胞変性、アポトーシスおよび単純過形成が認められ(図2A)、その頻度ならびに程度は経時的に増加した(表1)。MDA投与群では、投与2日目以降に膀胱間質の水腫、尿路上皮細胞の空胞変性および単純過形成が認められたが(図2B)、その頻度ならびに程度は1週目をピークとして次第に減衰した。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、AAB投与群の膀胱粘膜には、 $\gamma$ -H2AX陽性細胞の増加が認められた(図2C)。 $\gamma$ -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、AAB投与群では投与2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)。MDA投与群では投与1週目以降、統計学的有意差は伴わないものの、 $\gamma$ -H2AX陽性細胞の一過性の増加傾向が認められた。他の投与群ではいずれの時点においても、 $\gamma$ -H2AX形成の増加は認められなかった。

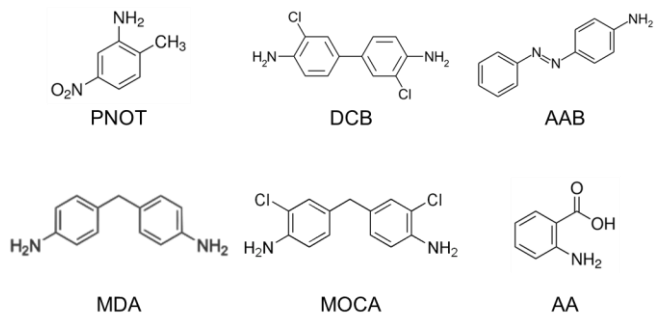


図1. 本年度の新規被験物質6種の構造式。

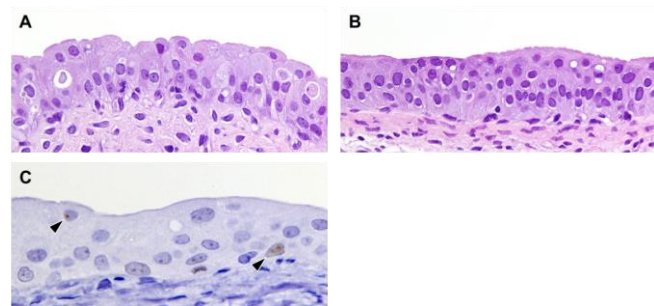


図2. ラット膀胱における病理組織学的変化および $\gamma$ -H2AX形成。A:尿路上皮細胞の空胞変性、アポトーシスおよび単純過形成(AAB投与群;4週)、B:尿路上皮細胞の空胞変性および単純過形成(MDA投与群;1週)、C: $\gamma$ -H2AX免疫染色(AAB投与群;4週)。 $\gamma$ -H2AX陽性細胞が散在する(矢頭)。

**TABLE. Histopathological evaluation in the urinary bladder of male F344 rats treated with aromatic amines**

Group	Findings	Day 2	Week 1	Week 2	Week 4
Control		-	-	-	-
0.01% PNOT	Mononuclear cell infiltration ( $\pm$ )	0	0	0	1
0.1% DCB		-	-	-	-
0.5% AAB	Mononuclear cell infiltration ( $\pm$ )	0	0	1	0
	Hemorrhage, focal	0	2	0	0
	Vacuolar degeneration ( $\pm$ , +, ++)	0	2 (2, 0, 0)	5** (2, 3, 0)	5** (0, 1, 4)
	Apoptosis ( $\pm$ , +, ++)	0	1 (1, 0, 0)	5** (3, 2, 0)	5** (0, 0, 5)
	Simple hyperplasia ( $\pm$ )	0	1	1	5**
0.08% MDA	Edema ( $\pm$ , +)	4* (4, 0)	4* (2, 2)	2 (0, 2)	1 (0, 1)
	Mononuclear cell infiltration (+)	0	0	1	0
	Hemorrhage, focal	0	1	0	0
	Vacuolar degeneration ( $\pm$ , +, ++)	4* (3, 1, 0)	4* (1, 2, 1)	3 (1, 2, 0)	1 (1, 0, 0)
	Simple hyperplasia ( $\pm$ , +, ++)	4* (4, 0, 0)	5** (3, 1, 1)	3 (2, 1, 0)	2 (2, 0, 0)
0.1% MOCA		-	-	-	-
1.0% AA		-	-	-	-

PNOT, 5-nitro-o-toluidine; DCB, 3,3'-dichlorobenzidine dihydrochloride; AAB, 4-aminoazobenzene hydrochloride; MDA, 4,4'-methylenedianiline; MOCA, 4,4'-methylenedianiline(2-chloroaniline); AA, anthranilic acid.  
 -: no significant lesions were observed.  $\pm$ , +, and ++: slight, mild, and moderate, respectively.  
 \* and \*\*: significantly different from control at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

表1. 芳香族アミン投与ラット膀胱における病理組織学的検索結果

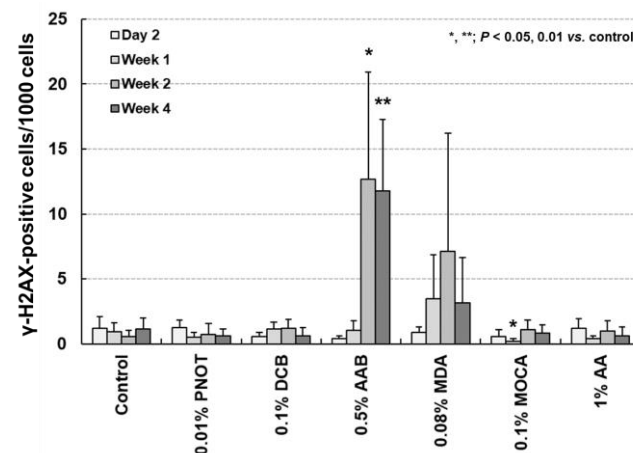


図3. 芳香族アミンを投与したラット膀胱粘膜上皮細胞における $\gamma$ -H2AX陽性細胞の定量解析(Student t-test)。

## D. 考察

令和2年度に検討した6種の芳香族アミンのうち、PNOT・DCB・MOCA・AA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形成の増加は認められなかった。これら4物質はいずれも過去のがん原性試験において、ラット膀胱に対して発がん性を示さないことが報告されている。この結果は、膀胱傷害性・発がん性の早期検出における、病理組織学的検索および $\gamma$ -H2AX免疫染色の特異性の高さを支持するものと考えられる。

一方で、AAB投与群で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が認められた。AABはラットに対し肝腫瘍を誘発することが報告されているが(IARC, 1975)、1940年代に実施された非常に古い実験に基づいており(Kirby & Peacock, 1947)、膀胱に対する詳細な影響については不明である。我々の結果は、AABが膀胱傷害性を示すことを明らかにするとともに、潜在的な発がん性を有する可能性を示唆するものであり、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

MDA投与群においても、AABと同様の膀胱傷害および $\gamma$ -H2AX陽性細胞の増加傾向が認められた。ラットを用いた2年間がん原性試験では、MDAは甲状腺の濾胞上皮

細胞癌および肝腫瘍を有意に増加させることが報告されている (IARC, 1986)。同試験における最高用量は 0.03% であり、本研究で膀胱傷害・ $\gamma$ -H2AX 形成の増加傾向を示した用量 (0.08%) の半量以下であった (NTP, 1983; Weisburger *et al.*, 1984)。我々は先行研究において、0.8% オルト-トルイジン投与群で観察された顕著な膀胱病変および  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の有意な増加は、半量の 0.4% 投与群ではいずれも観察されないことを報告している (Toyoda *et al.*, Arch Toxicol, 2019)。この結果は、膀胱粘膜上皮に傷害を及ぼし、DNA 損傷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。さらなる検討が必要ではあるが、高用量での投与が継続可能である場合、MDA はラット膀胱に対しても潜在的な発がん性を有する可能性があると考えられた。

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。今回、AAB・MDA 投与群の膀胱には出血・壊死等の急性病変は認められず、上皮細胞の空胞変性および単純過形成等、オルト-アニシジンに近い病変を呈することが明らかとなった。

AA は前年度までに検討した 2-aminobenzyl alcohol (ABA) および *N*-acetyl anthranilic acid (AAA) と同様にオルト-トルイジンの代謝物であり、CYP による酸化を受け ABA を経て生成され、AAA へと代謝される。ABA は  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の増加を引き起こす一方、AA およびその下流に位置する AAA は膀胱傷害や  $\gamma$ -H2AX 形成を誘導しなかった。これらの結果は、AA の生成がオルト-トルイジン代謝における解毒機構として重要であることを示唆すると考えられる。

## 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 AAB および MDA が、ラットに対して膀胱傷害性および  $\gamma$ -H2AX 形成の増加を示すことが明らかとなった。以上より、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色によって芳香族アミンの潜在的な膀胱傷害性・発がん性を早期に検出し得る可能性が示された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. *Arch Toxicol*, 95: 715-26, 2021
- 2) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T,

Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.  $\sigma$ -Anisidine dimer, 2-methoxy-*N*<sup>4</sup>-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 34: 912-9, 2021

3) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of  $\gamma$ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol*, 33: 279-85, 2020

4) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. A novel  $\sigma$ -toluidine metabolite in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 33: 1907-14, 2020

### 2. 学会発表

1) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、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  $\gamma$ -H2AX の応用可能性：用量相関性の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催 (2021 年 1 月)

2) 豊田武士、小川久美子. ラット膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)

3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラット膀胱傷害および遺伝子発現解析. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)

4) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、小川久美子. 非臨床試験における組織標本を用いた肝発がん物質早期スクリーニングのためのバイオマーカーの探索. 日本薬学会第 141 年会、Web 開催 (2021 年 3 月)

5) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子. ラット肝臓標本を用いた肝発がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催 (2021 年 1 月)

6) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之.  $\sigma$ -Anisidine 曝露ラット尿中代謝物の探索. 日本環境変異原学会第 49 回大会、Web 開催 (2020 年 11 月)

7) 赤木純一、豊田武士、小川久美子. 肝発がん物質投与ラット肝細胞における  $\gamma$ -H2AX 誘導と細胞増殖活性の相関. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)

8) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之.  $\sigma$ -Anisidine 曝露

ラット尿中代謝物の探索. がん予防学術大会 2020、  
Web 開催 (2020 年 9 月)

## H. 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