

研究課題名：芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発

研究代表者：鈴木周五

研究年度：令和2年度

研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱癌は社会的な問題の一つであり、最近でも福井県の化学工場において、*o*-toluidine (OTD) 等の芳香族アミンを取り扱う従事者から膀胱癌が発生しており、今後も類似の芳香族アミン類による職業膀胱癌発生の危険性が存在する可能性は高い。

我々は福井県の化学工場において取り扱いのあった acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) に着目して、その毒性や発がん性を検討した結果、動物実験により膀胱発がん促進作用を確認するとともに、尿中に OTD および OTD 代謝物を検出した。これらの結果は、AAOT が既知の膀胱発がん物質 OTD に代謝され尿中に排泄されることが、膀胱発がん促進作用に関与している可能性を示した。この結果は、化学物質の有害性評価において、異なる物質でも類似の代謝経路を通る化学物質が共通の有害性を持ち、包括的な評価手法を確立出来る可能性を示した。

そこで、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価できるかを検証するため、2つの課題「ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割」および「尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明」を設定し、それぞれ検討した。

研究方法

課題1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

ヒト化肝臓マウスを作成するため、Herpes simplex virus thymidine kinase 遺伝子を肝細胞特異的に発現する超免疫不全 NOD/scid-IL-2rgc (TK-NOG) マウスを交配により作出し、ガンシクロビル投与によりマウス肝細胞を選択的に破壊した後、脾臓門脈経由でヒト肝細胞を移植した。その際に、異なるロット (A細胞; 12歳由来、B細胞; 11ヶ月齢由来) のヒト肝細胞を移植した。また、作成したヒト化肝臓マウスおよび非移植群の F1-TKm30 マウス (野生型マウス) に、0.6% OTD を混餌投与した。屠殺・剖検時に肝臓および膀胱、尿、血清を採取し、病理組織学的解析を行った。

課題2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

6週齢 F344 雄ラットに、anilinium chloride (ANL)、*p*-toluidine hydrochloride (PT)、acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) および OTD を4週間投与する実験を行った。投与第4週目に新鮮尿を採取し、Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いて、尿中における芳香族アミンおよび代謝物を測定した。4週間後に屠殺・剖検し、肝臓および膀胱、血清を採取し、病理組織学的解析を行った。膀胱については、粘膜尿路上皮から RNA を抽出し、Microarray を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。また、粘膜尿

路上皮から DNA を抽出・精製を行った。

結論

課題 1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

改良型 TK-NOG マウスおよび 11 ヶ月齢由来ヒト肝細胞を用いて、ヒト肝細胞比率の高いヒト化肝臓マウス（平均 93.8%）の作成法が確立された。OTD を 4 週間投与した結果、OTD は野生型マウスよりもヒト化肝臓マウスで体重抑制などの毒性が強く認められた。しかし、いずれのマウス群においても OTD 投与によるマウス尿路上皮への影響について対照群との差は見られなかった。

課題 2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

4 種の芳香族アミンのうち、OTD および AAOT 投与群において尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めた。がんや細胞増殖に関わる遺伝子発現変動が、OTD および AAOT 投与群に共通して認められた。また、尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、膀胱に増殖性病変を示した OTD および AAOT 投与群において検出された主な尿中の芳香族アミンは OTD であった。膀胱尿路上皮への影響は、AAOT 群よりも OTD 群において強いことから、OTD 群で尿中濃度がより高い OTD や 4AMC、2AMC が、膀胱増殖性に対して影響がある代謝物である可能性が示された。以上より、OTD を主体とした芳香族アミンおよび代謝物が、ラット膀胱尿路上皮に発がん性影響を与えることが判明し、がんや細胞増殖に関わる遺伝子の発現変動が確認出来た。さらに、膀胱尿路上皮から、高分解能精密質量分析装置を用いた DNA 付加体の網羅的解析に用いる DNA を抽出・精製し、個体ごとに解析を実施できる DNA 量を抽出できた。

今後の展望

ヒト肝細胞比率の高いヒト化肝臓マウスを用いることで、ヒトにおける芳香族アミンの代謝を外挿する実験系を確立することが可能となったため、本年度行った OTD のヒト化肝臓マウスと野生型マウスの代謝物質の相違を検討するとともに、来年度以降は OTD に関連性の高い芳香族アミンや、ヒトで膀胱発がん性が疑われているものの、ラットやマウスいずれでも膀胱発がん性を示さない 4,4'-Methylenebis (2-chloroaniline) (MOCA) について検討する。また、ラットを用いた動物実験により、多数の芳香族アミン類について、その膀胱への発がん影響および尿中代謝物を検索することで、膀胱への発がん性を評価検討可能な試験法の確立を目指す。今後は OTD に関連性の高い芳香族アミンを主体に取り組む予定である。また、その発がん機序を解明することにより発がんリスク評価や安全性に繋がる。これらの成果を基に、国民を取り巻く生活環境内に存在し、職業的にも用いられる芳香族アミン類に対して、発がん性評価と国のがん予防施策に貢献し、社会への還元を目指す。