

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 QI YONGGANG



## 論 文 題 目

「Study on the genotoxicity of industrial compounds implicating the development of occupational bladder cancer」

(職業性膀胱がんの発生に関連する産業化学物質の遺伝毒性に関する研究)

指 導 教 授 承 認 印

堀口 真 園



**Study on the genotoxicity of industrial compounds implicating the development of  
occupational bladder cancer**

(職業性膀胱がんの発生に関連する産業化学物質の遺伝毒性に関する研究)

氏名：QI YONGGANG

【研究の背景と目的】最近、厚生労働省から、福井県の化学工場に従事していた労働者ら 10 名に、職業性膀胱がんの発生が認められることが報告された。この事例に対する疫学調査により、膀胱がんを発症した従業員らは、主にオルトトルイジン(OT)、パラトルイジン(PT)、アニリン(ANL)、2,4-ジメチルアニリン(DMA)、オルトアニシジン(ANS)、オルトクロロアニリン(OCA)の 6 種類の化学物質を取り扱っていたことが判明している。この 6 種類化学物質のうち、OT のみが国際がん研究機関(IARC)によって発がん性グループ 1 (ヒトへの発がん性が認められている)に分類されていること、及び、膀胱がんを発症した従業員全員が OT を取り扱っていた経歴があることから、OT が職業性膀胱がん発症の主要原因物質と示唆されている。しかしながら、OT 以外の化学物質が職業性膀胱がんの発症にどのような寄与があったのかは不明である。化学物質の DNA 損傷性は、がん原性評価に不可欠であるが、これらの化学物質に対して過去に実施されてきた各種 DNA 損傷性試験の結果は整合性がなく、化学物質間における DNA 損傷性の程度(強弱)についても不明な点が多い。本研究では、膀胱培養細胞モデルを用いて、これら化学物質の DNA 損傷性を、新規 DNA 損傷マーカーの一つであるリン酸化ヒストン H2AX( $\gamma$ -H2AX)を指標に比較検討した。

上記は、日本の化学工場で発生した膀胱がんの事例に着目し研究を実施したものであるが、海外に目を向けると、類似の事例が存在している。例えば、英国の一つの化学工場における事例では、上記 OT と ANL を含む、4 種類の化学物質(2-メルカプトベンゾチアゾール(MBT)、フェニルベーターナフチルアミン(PBNA)、OT、ANL)にばく露した従業員に膀胱がん発症リスクが高いことが報告されている。この 4 種類の化学物質においても、OT のみがヒト膀胱発がん物質であるが、この事例に対する疫学調査では、職業性膀胱がんによる超過死亡リスクは OT のばく露のみでは説明できないとし、MBT や PBNA のばく露も膀胱がんの発症に関与しているであろうとする仮説が提唱されている。そこで、本研究はこの疫学調査の結果を実験的に検証することを目的とし、ばく露があった 4 種類の化学物質の DNA 損傷誘導強度を $\gamma$ -H2AX を指標に検証し、中でも特に DNA 損傷性が高かった物質の損傷誘導メカニズムを解明した。

これまで、日本、及び、英国の化学工場で使用されていた化学物質による職業性膀胱がん事例に着目した。更に、膀胱がん発症の原因物質をより世界的にかつ一般的に使用されている物質に目を向けると、染毛剤による膀胱がん発生の報告が存在した。染毛剤は、現在、ごく一般的に使用されているが、特に美容師は、染毛剤の職業的使用、及び、個人的使用のため、一般公衆より染毛剤にばく露する機会が多いことが報告されている。美容師における膀胱がんリスクが高いことは、過去に IARC からも示されているが、最近の疫学研究では、膀胱がんリスクは低下し、むしろ皮膚がん(頭部・頸部)リスクの上昇を示唆する報告がなされている。そこで、美容師における皮膚がんリスクが上昇していることを着目し、その原因を解明することを目的に、染毛剤の重要な成分の一つとして使用されてきたオルトフェニレンジアミン(OPDA)を対象として、その皮膚吸収性及び DNA 損傷性を検討した。

【実験材料と方法】芳香族アミン類をはじめ膀胱がん関連物質の DNA 損傷性に関する検討では、ヒト膀胱上皮由来の 1T1 細胞、ヒト肝臓由来の WRL-68 細胞を使用した。DNA 損傷性の評価では、被検物質を培養細胞に各時間・各濃度で作用し、誘導された $\gamma$ -H2AX をウェスタンブロッティング法で検出した。DNA 損傷誘導メカニズムの解析では、代謝酵素阻害剤、apoptosis 阻害剤等を使用した実験、及び、細胞内活性酸素種 (ROS) 測定や抗酸化剤を使用した実験を実施した。OPDA の皮膚吸収性等に関する検討では、静置型フランツセル法を応用した手法で、三次元ヒト培養皮膚 (3D 皮膚)、及び、ヒト皮膚細胞株 HaCaT に、 $^{14}\text{C}$  ラベルした OPDA を作用し、既定時間における  $^{14}\text{C}$ -OPDA の存在場所を解析した。3D 皮膚、及び HaCaT 細胞における OPDA-DNA 付加体生成の検討については、 $^{14}\text{C}$ -OPDA を既定時間作用した後、DNA を抽出し、DNA と結合している  $^{14}\text{C}$ -OPDA の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定・評価した。

【結果と考察】福井県化学工場で使用されていた 6 種類の化学物質の遺伝毒性については、全ての物質で、 $\gamma$ -H2AX 誘導が確認されたが、その誘導強度には明確な違いがあり、DMA と OCA が非常に強く、次いで、OT が強かった。全体的な順番は、OCA $\approx$ DMA $>$ OT $>$ ANS $>$ PT $\approx$ ANL であった。DNA 電気泳動法において、DNA 二本鎖切断の形成も確認したところ、 $\gamma$ -H2AX の結果と一致するものであった。本検討により明らかとなった、DMA と OCA の DNA 損傷性が OT よりも強いという知見は興味深いものである。本事例の疫学調査では、OT が職業性膀胱がん発症の主要原因物質であると示唆されているが、DMA は膀胱がんを発症した 10 人中 9 人に使用が認められていることから、OT に加えて、DMA も膀胱がん発症に何らかの寄与があった可能性があると考えられる。また、最近では、Methylene-bis-ortho-chloroaniline (MOCA) による膀胱がん事例が国内で複数報告されているところであるが、OCA は MOCA 合成時の原材料としても使用されており、この事例における OCA の関与は今後精査されるべきであると考えられる。

英国の化学工場で使用されていた 4 種類の化学物質によって誘導された $\gamma$ -H2AX についても、誘導強度に明確な違いが見られ、MBT の DNA 損傷性は OT よりも顕著に強いことを明らかにした。本結果は、OT のみでは膀胱がんの超過死亡リスクを説明できず、MBT 等も、膀胱がんの発症に関与しているであろうとする疫学調査の仮説を一部支持するものと考えられる。さらに、DNA 損傷性が強かった MBT に焦点を当て、その DNA 損傷誘導メカニズムについて詳細に検討した。CYP2E1 阻害剤を用いた検討において、MBT によって誘導された $\gamma$ -H2AX は、阻害剤存在下で顕著に抑制された。ここで、MBT による $\gamma$ -H2AX 誘導経路は主に 2 通り考えられる。すなわち、① CYP2E1 による代謝では、その代謝過程で ROS が生成されることが知られているため、この ROS によって DNA が損傷される可能性；② CYP2E1 代謝により生じた反応性の高い中間代謝物質が DNA と付加体を形成する等、直接的に損傷が生じる可能性である。これらを検証するために、まず MBT 作用後の細胞内 ROS の量を測定した。その結果、MBT 作用により細胞内 ROS の量は顕著に増加していることが明らかとなった。この細胞内 ROS の増加は CYP2E1 阻害剤、及び、抗酸化剤によりほぼ完全に抑制された。これらの結果より、MBT の DNA 損傷誘導には、CYP2E1 を介した代謝過程で生成される ROS が主に関与していることが示唆された。一方で、抗酸化剤は MBT が誘導する $\gamma$ -H2AX を効果的に抑制したが、完全に抑制することはできなかった。ただし、過酸化水素によって誘導された $\gamma$ -H2AX は抗酸化剤により完全に抑制されたことより、MBT が $\gamma$ -H2AX を誘導する一部には、MBT の代謝活性物質の関与もあると考えられた。

染毛剤の重要な成分の一つとして使用されてきた OPDA の皮膚吸収性、及び、DNA 損傷性に関する検討では、まず、3D 皮膚に対する OPDA の吸収性を検証した。3D 皮膚に添加した  $^{14}\text{C}$ -OPDA は、添加量の約 1/3 が 1 時間以内に、そのほぼ全量が、24 時間以内に 3D 皮膚に吸収された。また、一度吸収された OPDA は、3D 皮膚を透過することはほとんど認められず、皮膚内に時間依存的に蓄積することが判明した。なお、比較対象とした  $^{14}\text{C}$ -Aniline では、高い皮膚透過性が認められている (8 時間で添加量の 80% 前後が 3D 皮膚を透過)。OPDA の DNA 損傷性に関する検討では、OPDA は、3D 皮膚、及び、HaCaT 細胞に、作用濃度依存的に  $\gamma\text{-H2AX}$  を誘導することが判明し、HaCaT 細胞では、実際に DNA 二本鎖切断の形成されていることも確認された。DNA 損傷誘導メカニズムの検討においては、細胞内 ROS 量の増加が認められおらず、各種抗酸化剤によっても  $\gamma\text{-H2AX}$  の誘導は抑制されなかった。一方で、3D 皮膚、及び HaCaT 細胞を  $^{14}\text{C}$ -OPDA で処理し、DNA 付加体形成の有無を検証したところ、 $^{14}\text{C}$ -OPDA が DNA に結合していることを示唆する結果が得られた。本研究の結果より、OPDA は皮膚吸収性が高いが、皮膚透過性が極めて低く、皮膚内に蓄積することが示唆された。また、皮膚内に蓄積した OPDA は、DNA 付加体損傷を形成し、 $\gamma\text{-H2AX}$  を誘導しているであろうことが示唆された。本検討で得られた知見は、OPDA を含む染毛剤は、皮膚がんリスクを上昇させる可能性があることを示すものであり、最近の美容師における皮膚がんリスクが高いことを報告する疫学研究の結果を一部裏付けるものであると考えられる。