

3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの DNA 酸化損傷に関する検討†

小林 沙穂*1, 柏木 裕 呂 樹*1, 小林 健 一*2

3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA) は、ウレタン樹脂の硬化剤等に利用されており、労働者の健康影響が懸念されている。MOCA の発がん過程には、肝臓をはじめとした各臓器で代謝される際に生じる活性酸素種 (ROS) や DNA 付加体による DNA 損傷が関係すると考えられているが、その中でも ROS によって引き起こされる DNA 酸化損傷である 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-オキシグアニン: 8-OHdG) は、高頻度に発生し DNA 複製時の G→T の点突然変異を誘発する。しかしながら実験動物において MOCA が 8-OHdG を誘発するか否かについて知見は少ない。本研究ではラットに MOCA 反復経口投与を行い、肝臓の病理及び 8-OHdG の生成レベルを検討した。その結果、病理所見では 50 mg/kg/日投与群において空胞変性が見られた。8-OHdG の反復経口投与においては、各群において差は認められなかった。以上から、少なくとも 8-OHdG は MOCA により誘発される発がんの主要原因ではないと考えられた。

キーワード: 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA), 発がん, 活性酸素種 (ROS), DNA 酸化損傷, 8-オキシグアニン (8-OHdG)

1 はじめに

3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA: 4,4'-methylenbis (2-chloroaniline)) (図 1A) は、芳香族アミン類の一種であり、ウレタン樹脂の硬化剤等に産業利用されている¹⁾。MOCA は、イヌで膀胱がん、マウス、ラット等のげっ歯類において肝臓がんや肺がんを引き起こすことが知られ、ヒトにおける膀胱がん事例も少数存在することから、国際がん研究機関により 2010 年にグループ 1 に引き上げられている¹⁾。さらに最近、我が国で、MOCA 取扱歴を有する労働者 (退職者を含む) の中に膀胱がんの発症例が見つかり²⁾、現在まで 17 名の膀胱がん事例が確認されている³⁾。このような背景から、MOCA ばく露による膀胱がん発症を予防するため、発がんメカニズムを解明することが喫緊の課題となっている。

MOCA は細菌を用いた遺伝毒性試験で肝臓抽出物 S9 存在下において、変異原性有りと報告が多数あることから^{1,4)}、肝臓をはじめとする各臓器における代謝が発がん過程において鍵を握ると考えられている。一般的に MOCA を含む芳香族アミン類は、シトクローム P450 (CYP) 等の代謝酵素の働きに伴い発生する活性酸素種 (ROS) 及び DNA 付加体により DNA 損傷が生じ、それ

が遺伝子突然変異を誘発し、がん化へ至ると考えられている (図 1B)⁵⁻⁷⁾。

DNA の酸化損傷には、ROS によって引き起こされる 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-オキシグアニン: 8-OHdG) が最もよく知られており、修復されずに DNA 上に残った場合、DNA 複製時に G→T の点突然変異を起こし発がんの原因となる⁸⁻⁹⁾。MOCA の発がん機序は、他の芳香族アミン類と同様、代謝に伴い発生する ROS が一部関与すると考えられているが、MOCA ばく露を受けた動物の組織において 8-OHdG 等の酸化的損傷を調べた研究は我々の知る限り存在しない。

本研究では、ラット経口反復ばく露により MOCA の発がんの標的臓器である肝臓における病理解析及び 8-OHdG レベルの測定を行った。

2 方法

1) 試薬

MOCA (純度>90.0%) は、東京化成工業から購入し、ジメチルスルホキシド (DMSO, 純度 99.0+%) は富士フイルム和光純薬より購入した。

2) 動物および飼育条件

雄 F344 ラットをジャクソン・ラボラトリー・ジャパンより購入、8 週齢にて実験に使用した。動物は室温 23 ± 1°C, 相対湿度 55 ± 5% の人工照明下 12 時間明 (8:00-20:00) 12 時間暗において、げっ歯類用固形飼料 (CE-2, 日本クレア) および水道水 (1mm のフィルターでろ過) を自由摂取させて飼育した。本実験は、独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所動物実験規程に準拠して実施した (承認番号: R03-02)。

3) 被験物質の調製、投与期間および投与方法

MOCA を DMSO にて超音波処理により溶解後、コーン油 (富士フイルム和光純薬) にて希釈した (DMSO の最終

† 本稿の一部は労働安全衛生研究, Vol.16, No.1, pp.45-49, (2023) の記述の一部を加筆修正し、まとめ直した内容である。

*1 元 独立行政法人労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター有害性評価研究部。

*2 独立行政法人労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター有害性評価研究部。

連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1

独立行政法人労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター有害性評価研究部 小林健一*

kobayasi@h.jniosh.johas.go.jp

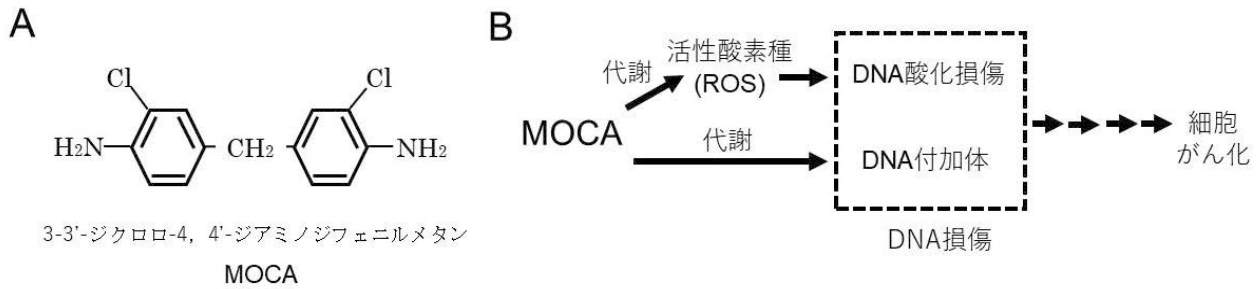


図1 MOCAの化学構造(A) および 提唱されている発がん機序(B)

濃度は4%)。対照群はコーン油(4%DMSO)を投与した。投与液は用時調製し、0.4, 2, 10, 50 mg/kg/日にて、週3回・2週間(計6回)の強制経口投与を行った(各群n=3)。投与容量は5 ml/kgとした。

すべての動物は投与終了日から3日後に体重を測定しイソフルラン麻酔下において、腹大静脈から全採血し、肝臓を摘出した。

4) 病理学的観察

肝臓は解剖時に一部切出し48時間10%中性緩衝ホルマリンにより浸漬固定した。水洗後、70%エタノールに置換した。自動包埋装置(Tissue-Tek VIP 5 Jr.)を用いパラフィンブロックを作製した。薄切切片(5mm)を作製した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、光学顕微鏡下にて写真撮影を行った。

5) 8-OHdGの染色及び定量化

自動免疫染色機(Leica BOND-MAX)で、熱処理及び脱パラフィン処理後、抗原賦活化(ER1, pH6.0, 10分)し、抗8-OHdG抗体(N45.1)¹⁰⁾を8,000倍希釈し反応させた。二次抗体はpolymer systemを使用し、ジアミノベンチジンにて発色後、ヘマトキシリン染色後に封入した。各検体に対し、対物レンズ×20で5視野を撮影しImageJでcolor deconvolutionによりジアミノベンチジン染色結果を抽出し、threshold 170としてそれ以上となる染色強度の領域の面積を測定した。撮影時は、肝小葉全体を評価できるようグリソン鞘の近傍から中心静脈の近傍までを収め、またアーチファクトを避けるため臓器の端部は避けた。結果は、平均±標準偏差で表示し、統計解析は、Graph Pad Prism9を用い、Kruskal-Wallis検定を行った。

3 結果

1) MOCA 経口投与におけるラットへの影響

ラットの剖検時体重は、対照群218±5g, 0.4 mg/kg/日投与群222±13g, 2 mg/kg/日投与群222±8g, 10 mg/kg/日投与群215±2g, 50 mg/kg/日投与群214±6gであり、いずれのばく露群も対照群と有意差は認められなかった。肝臓重量については、対照群9.1±0.2g, 0.4 mg/kg/日投与群9.2±0.6g, 2 mg/kg/日投与群8.8±0.7g, 10 mg/kg/日投与群9.0±0.3g, 50 mg/kg/日投与群9.3±0.9gでありいずれも対照群と比べて有意差は認められなかった。

2) 肝臓切片における病理的所見

対照群及び0.4, 2, 10mg/kg/日投与群においては、明らかな変化は認められなかった。しかしながら50 mg/kg/日投与群においては、3匹中全てに肝細胞肥大及び小葉び慢性の空胞変性が見られた(図2)。

3) 肝臓切片における8-OHdGの測定

対照群と比べ、0.4 mg/kg/日投与群においてやや減少したものの、2 mg/kg/日投与群, 10mg/kg/日投与群, 50mg/kg/日投与群では対照群と比べ増加傾向を示したが(図3)、いずれにも有意差は認められなかった(データ未掲載)。

4 考察

これまでChenらがMOCAを取り扱う労働者の尿中MOCA濃度と末梢血における8-OHdGの関連を調べ、その結果から両者に有意な相関関係はなかった¹²⁾。またChenらはその結果からMOCAによるDNA酸化損傷は発がん過程において大きな役割を果たさないと述べている。上記のような疫学研究は、労働者のばく露実態把握に重要な役割を果たすが、遺伝的背景の違いによる代謝酵素の発現量及び酵素活性の差異がMOCA代謝に影響し、毒性影響が変化する可能性も考えられる。MOCAの代謝に重要な役割を果たしている代謝酵素の1つであるCYP3A4の一塩基多型によりMOCAの毒性が変化する報告もある¹³⁾。

本研究では反復経口投与を行い、ラットにおけるMOCAのがん標的臓器である肝臓において病理解析及び8-OHdG生成レベルの測定を行った。その結果、空胞変性がみられた50 mg/kg/日投与群を含む全てのばく露群において8-OHdGの生成には有意な増加は認められなかった。ヒトとラットの種差におけるMOCA代謝の違い等(一例として、ヒトではN-アセチル化による代謝の関与が低い¹⁴⁾)が存在すると考えられるが、本研究結果は、上記Chenらの報告を支持する結果となっていた。

50 mg/kg/日投与群の全ての個体において、肝臓に空胞変性がみられた。これまで42日間及び2年間の混餌投与による発がん性試験でSDラットにおける空胞変性の報告がある¹⁵⁻¹⁶⁾。この所見は、細胞膜の代謝機能が関係すると言われており¹⁷⁾、本研究のラット末梢血リンパ球由来のRNAシーケンス解析において塩化物イオン交換に関連するClie2が発現増加した遺伝子群の最上位に検出され

ている（未発表データ）。そのことから、この病変には、細胞膜におけるイオンポンプの異常が関係していることも一つの可能性として考えられる。また、空胞変性の発生には、肝うっ血及び低酸素状態が関係するとの報告がある¹⁸⁾。そのため MOCA による脾腫や貧血症状¹⁾が本実験においてもあらわれ、肝臓を含む組織において低酸素状態であり（脾臓の体重あたりの相対重量が 50 mg/kg/日投与群のみ有意に増加）、これら症状が空胞変性の出現と関係している可能性も考えられる。

これまでげっ歯類で多くの発がん性試験が行われ、肝臓や肺における発がん性は明白であるものの¹⁾、現在まで MOCA によるがん発症メカニズムの詳細解明には至っていない。本研究では ROS の発生に伴い高頻度に発生し、かつ変異原性が高い 8-OHdG について、肝臓で調べた結果、50 mg/kg/日投与群において空胞変性が認められたが、8-OHdG の有意な増加は認められなかった。以上から本実験の結果からは、8-OHdG は、MOCA による発がんメカニズムの主原因ではないと推察された。我が国で発生した膀胱がん事例では、吸入ばく露の他に、経皮ばく露の可能性も指摘されている。今後、ばく露経路による毒性の違いに加え、酸化損傷以外の要因（DNA 付加体¹⁾や染色体異常¹⁾）と発がんとの関連について調べていく必要があると考えられる。

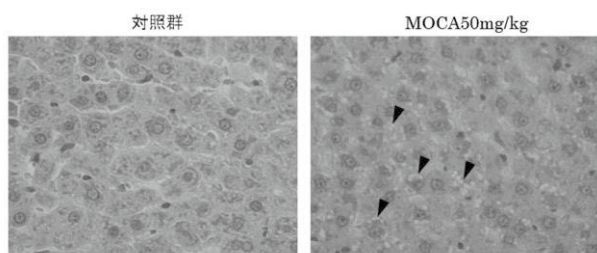


図2 対照群（左図）および 50mg/kg/日投与群（右図）における肝臓の HE 染色像，矢頭は空胞変性を示す。

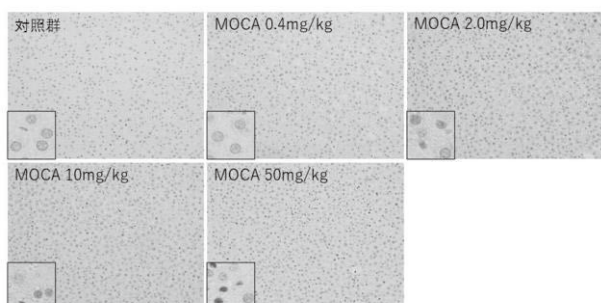


図3 肝臓における 8-OHdG の免疫組織学的染色像。各投与群の代表的な組織像を示す。各写真の左下枠内は拡大像を示す。

5 謝辞

肝臓の免疫染色にあたり、名古屋大学大学院医学系研究科生体反応病理学本岡大社助教及び豊國伸哉教授に協力を賜った。ここに謝意を表す。

参考文献

- 1) IARC. 4,4'-methylenebis (2-chloroaniline). IARC Monographs. 2010: 100F: 73–82.
<https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-9.pdf>
- 2) 厚生労働省. 化成品等を製造する事業場における膀胱がん発症事案について. https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11305000-Roudoukijunkyokuanzeniseibu-Kagakubushitsutaisakuka/doc1_1.pdf
- 3) 厚生労働省. MOCA による健康障害の防止対策の徹底について. <https://www.chimes.johas.go.jp/wp/wp-content/uploads/2018/10/20181019moca.pdf>
- 4) McQueen CA, Williams GM. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of 4,4'-methylene-dianiline and 4,4'-methylenebis-2-chloroaniline. *Mutat Res.* 1990 Sep;239(2):133-42.
- 5) IARC 4-aminobiphenyl. IARC Monographs. 2010: 100F: 41–52.
<https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-6.pdf>
- 6) Murata M, Tamura A, Tada M, Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic 4-aminobiphenyl. *Free Radic Biol Med.* 2001 Apr 1;30(7):765-73.
- 7) Ohnishi S, Murata M, Oikawa S, Totsuka Y, Takamura T, Wakabayashi K, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by an N-hydroxy metabolite of the mutagenic compound formed from norharman and aniline. *Mutat Res.* 2001 Jul 25;494(1-2):63-72.
- 8) Nakabeppu Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2014 Jul 15;15(7):12543-57.
- 9) Kino K, Hirao-Suzuki M, Morikawa M, Sakaga A, Miyazawa H. Generation, repair and replication of guanine oxidation products. *Genes Environ.* 2017 Aug 1;39:21.
- 10) Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest.* 1997 Mar;76(3):365-74. PMID: 9121119.
- 11) Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999 Feb; 49(2):91-102. doi: 10.1046/j.1440-1827.1999.00829.x. PMID: 10355961.
- 12) Chen HI, Liou SH, Ho SF, Wu KY, Sun CW, Chen MF, Cheng LC, Shih TS, Loh CH. Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG): influence of 4, 4'-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking.

- J Occup Health. 2007 Sep;49(5):389-98. doi: 10.1539/joh.49.389. PMID: 17951971.
- 13) Wang CC, Chen WL, Hsiung CN, Chiang ST, Wang YC, Loh CH, Lin IS, Chen HI, Liou SH. Effect of CYP3A4 genetic polymorphisms on the genotoxicity of 4,4'-methylene-bis-(2-chloroaniline)-exposed workers. *Occup Environ Med.* 2017 Jan;74(1):30-38.
 - 14) Cocker J, Boobis AR, Davies DS. Determination of the N-acetyl metabolites of 4,4'-methylene dianiline and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) in urine. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1988 Sep;17(3):161-7.
 - 15) Stula EF, Sherman H, Zapp JA Jr, Clayton JW Jr. Experimental neoplasia in rats from oral administration of 3,3'-dichlorobenzidine, 4,4'-methylene-bis-bis(2-chloroaniline), and 4,4'-methylene-bis(2-methylaniline). *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975 Jan;31(1):159-76.
 - 16) 化学物質点検推進連絡協議会 (2005) : 4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン)のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験. 化学物質毒性試験報告. 12: 188-202.
 - 17) 新毒性病理組織学. 日本毒性病理学会編 p225 (2017)
 - 18) 藤川行村. 肝細胞の空胞変性の発生原因に関する研究 II—人体剖検例についての検討. 肝臓 16 卷 2 号(1975)