3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン及びその類似化学構造を有する産業化学物質のDNA損傷性に関する研究 — γ H2AXを指標に評価したDNA損傷強度の違い—

豊岡達士^{*1}, 祁永剛^{*1,2}, 王瑞生^{*1}, 甲田茂樹^{*1}

MOCA（またはMBOCA）と呼ばれる3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンは、ウレタン樹脂の硬化剤として利用されているが、職業性膀胱がんを引き起こす可能性がある物質としても知られている。DNA損傷の生成は発がんにおける重要なファーストステップであり、MOCAがDNA損傷性を有することはこれまでの遺伝毒性試験の結果より明らかである。一方で、MOCAがDNA損傷の中でも最も重篤な損傷であり発がんと密接な関係があるDNA二本鎖切断を生成するか否かについては未だ不明である。また、MOCAの構造類似化合物であり、MOCAと同用途で使用されている4,4'-ジアミノジフェニルメタン、4,4'-ジアミノ-3,3'-ジメチルジフェニルメタン、4,4'-ジヒドロキシジフェニルメタンについて、そのDNA損傷誘導強度を同一試験系で比較検討している研究は存在しない。本研究では、MOCA及びその構造類似化合物3種の有害性をより的確に把握することを目的に、DNA二本鎖切断の生成指標として近年注目されているリン酸化ヒストンH2AX (γ H2AX)に着目し、MOCAのDNA二本鎖切断生成の可能性を検討すると共に、MOCA及びその構造類似化合物についてDNA損傷強度の比較を実施した。被験物質4種全てで、 γ H2AX誘導が認められたが、中でもMOCA及び4,4'-ジヒドロキシジフェニルメタンが特に強い γ H2AX誘導が観察された。本研究は、 γ H2AXを指標にMOCA及び構造類似化合物がDNA二本鎖切断を生成する可能性を示唆するとともに、その損傷誘導強度の違いを明らかにしたものである。本研究の知見は、化学物質のリスク評価に重要な情報を提供すると考えられる。

キーワード: 3,3'-dichloro-4,4'-diamino-diphenylmethane, 膀胱がん, DNA損傷, リン酸化ヒストンH2AX

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 (3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane) は、別名を4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン) (4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)) といい、MOCA（或いはMBOCA）と略される。MOCAは防水材、床材、舗装材等に含まれるウレタン樹脂の硬化剤として利用されている産業化学物質である¹⁾。一方で、MOCAはラット、マウス、イヌを用いた動物発がん試験において多臓器発がん性が確認されており、ヒトにおいては職業性ばく露による膀胱がんを引き起こす可能性がある物質として知られている^{1,2)}。我が国においてMOCAは、従前より特定化学物質障害予防規則の特定第2類物質、及び特別管理物質として管理されている。最近、職業性膀胱がんの発症が疑われる作業員の中でMOCAの取扱歴を有する者が存在することが明らかとなり³⁾、昨年、厚生労働省より改めてMOCAによる健康障害の防止対策の徹底について通知がなされた⁴⁾。

国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) では、MOCAの発がん性について、2010年に疫学的証拠は十分ではないものの、動物発がん

性試験および発がんメカニズムに関する証拠が十分であると、"グループ1分類 (ヒトに対する発がん性が認められる)" と結論している²⁾。上記、発がんメカニズムのひとつとして、DNA損傷の生成は発がんにおける重要なファーストステップとして知られている。MOCAの遺伝毒性 (DNA損傷性・変異原性) については、MOCAにばく露された作業員のリンパ球、膀胱剥離上皮細胞において、姉妹染色分体、小核、DNA付加体損傷が認められている^{4,5)}。また、in vivo (動物)・in vitro (細胞) 試験においても、ヒトと同様の各種遺伝毒性指標が陽性となっており、微生物を用いた変異原性試験 (Ames assay) も陽性である^{1,2)}。このように、MOCAが遺伝毒性を有することは明らかであると考えられる。一方、MOCAがDNA損傷の中でも最も重篤な損傷であり遺伝変異・発がんと密接な関係があるDNA二本鎖切断を生成するか否かについては未だ報告がなされていない。また、MOCAと類似の化学構造を有し、MOCAと同様にウレタンやエポキシ樹脂の硬化剤として産業利用されている複数の化学物質について、そのDNA損傷性を同一試験系同時実施により、MOCAと比較検討した研究はなされていない。

細胞内でゲノムDNAは球状のヒストン八量体タンパク質に巻きつく形で存在している。細胞内でDNA二本鎖切断が生成された際の細胞応答として、その切断部位を中心に、ヒストン八量体タンパク質の一部を構成するヒストンH2AXがリン酸化されることが知られている⁶⁾。リン酸化ヒストンH2AX (以下 γ H2AX) を指標とした、DNA二本鎖切断の検出は、従来からのDNA電気泳動法

原稿受付 2019年1月21日 (Received date: January 21, 2019)

原稿受理 2019年6月3日 (Accepted date: June 3, 2019)

J-STAGE Advance published date: June 25, 2019

*1 労働安全衛生総合研究所産業毒性・生体影響研究グループ

*2 北里大学大学院医療系研究科

連絡先: 〒214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾6-21-1

労働安全衛生総合研究所産業毒性・生体影響研究グループ 豊岡達士

E-mail: toyooka@h.jniosh.johas.go.jp

doi: 10.2486/josh.JOSH-2019-0008-TA

図1 被験物質の化学構造

よりも感度・精度共に高いことが報告されており^{7,8)}、近年、新しいDNA損傷マーカーとして各研究分野で注目されている⁹⁾。

本研究では、DNA損傷性の物質間比較を実施し、その有害性を的確に把握することを目的に、 γ H2AXを指標としてMOCAおよび、構造類似化合物である、4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MDA)、4,4'-ジアミノ-3,3'-ジメチルジフェニルメタン (MBT)、4,4'-ジヒドロキシジフェニルメタン (MDP) のDNA損傷性を検討した。なお、図1に示すように、これら化学物質は、メチル基(-CH₂-)を介して、それぞれオルトクロロアニリン、アニリン、オルトトルイジン、フェノールが2分子結合した構造となっている。MDA、MBT、及びMDPの発がん性、遺伝毒性情報は以下の通りである。MDAは、ラット及びマウスに発がん性(肝・甲状腺)が認められている¹⁰⁾。MDAの各種遺伝毒性試験(Ames試験、姉妹染色分体交換試験、小核試験、付加体形成試験等)結果は、概して陽性である(ただし、弱陽性とする結果が多い)¹⁰⁾。MBTは、ラット及びイヌにおいて、発がん性(肝・肺等)が認められているが、遺伝毒性試験の報告はみあたらない¹¹⁾。MDPは、Ames試験が実施されており、陰性結果である¹²⁾。発がん性試験は実施されていない。IARC発がん性評価においては、MBAおよびMBTはグループ2B(ヒトに対して発がん性がある可能性がある)^{10,11)}、MDPは評価されていない。

2 方法

1) 被験物質

3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA)、(>90.0%)、4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MDA) (>98.0%)、4,4'-ジアミノ-3,3'-ジメチルジフェニルメタン (MBT) (>97.0%)、4,4'-ジヒドロキシジフェニルメタン (MDP) (>99.0%) は東京化成工業株式会社から購入した。これら被験物質をDMSOに溶解、1Mストック溶液とし、使用するまで冷暗所に保管した。

2) 使用培養細胞株

ヒト尿管上皮細胞株1T1細胞は鰐淵英機教授(大阪市立大学)より分与された。1T1細胞はインキュベーター内(37℃、5% CO₂)で、Keratinocyte-SFM培地(ウシ脳下垂体抽出物、ヒト組換え上皮成長因子、抗生物質を含む)で維持した。実験3-4日前に24-well plateに細胞を播種した。

3) 化学物質の細胞への作用

被験物質を目的濃度(0.1-1.0 mM)となるように培地で調整し1T1細胞に添加(500 μ l/well)、インキュベーター内で24時間作用した。

4) 細胞生存率の測定

被験物質作用後の1T1細胞を回収し、トリパンブルー色素排除法により細胞生存率を決定した(n=4: 各作用濃度につき4 wellで試験)。データは平均値±標準偏差で示した。無処理細胞群と被験物質作用群でt検定を行い、p<0.05を有意とした(SPSS Statistics 24.0使用)。

5) γ H2AXの検出

被験物質作用後の1T1細胞を回収し、ウェスタンブロットティング法で γ H2AXの誘導量を調べた。図3では、4回の独立した実験におけるウェスタンブロットティング結果について、 γ H2AXのバンド黒化度をImage Jで定量した(NIH 1.38x使用)。被験物質による γ H2AX誘導を、無処理細胞におけるバンド黒化度に対する相対比としてactin発現量で補正し、グラフ化した(平均値±標準偏差で示す)。無処理細胞群と被験物質作用群でt検定を実施した(SPSS Statistics 24.0使用)。

3 結果

1) 被験物質の細胞毒性

図2に、被験物質を0.1-1 mMの濃度範囲で1T1細胞に作用させ、その24時間後に細胞生存率を測定した結果を示す。MOCAおよびMDPを作用させたものでは、作用濃度0.75 mMから顕微鏡下で細胞の形態に若干の変化がみられ(データ示さず)、細胞生存率が低下傾向にあった。両被験物質ともに作用濃度1 mMにおいて、20%前後の細胞死が観察された。一方で、MDAおよびMBTでは作用濃度1 mMにおいても細胞生存率には影響がみられなかった。なお、MDAおよびMBTにおいて、さらに高濃度(～10 mM)まで作用させた場合、MDAでは5 mMから細胞生存率の低下が観察されたが、MBTでは、10 mMにおいても細胞生存率には影響がなかった(データ示さず)。

図2 細胞生存率

図3 被験物質のγH2AX誘導強度

図4 MOCA及びMDP作用によるγH2AX誘導による濃度依存性

2) 被験物質によるリン酸化ヒストンH2AX誘導

ヒストンH2AXのリン酸化は、細胞死（アポトーシス）に伴うDNA鎖切断の生成においても誘導されることが知られている¹³⁾。発がんイニシエーションにおいては、細胞にDNA損傷が誘導されても、細胞が生存しているという条件が重要であるため、ここでは、1T1細胞の生存率に影響がなかった被験物質濃度0.5 mMを作用させ、ヒストンH2AXのリン酸化強度を比較した（図3）。無処理細胞に比すると、被験物質を作用させた場合、いずれもγH2AX誘導が観察されたが、特に、MOCAおよびMDPでは強いシグナルが検出された。なお、無処理細胞においても、細胞の呼吸によって発生する活性酸素種等により、DNA損傷生成し、γH2AXが誘導される（バックグラウンドレベル）。また、陽性コントロールとして使用したEtoposide (ETP: 0.03 mM) は抗がん剤の一種であり、トポイソメラーゼ II阻害を介してDNA二本鎖切断を生成することが知られている¹³⁾。

次に、γH2AXの強い誘導が観察されたMOCAおよびMDPについて、γH2AX誘導の作用濃度依存性を検討した（図4）。両物質共に0.1 mMから作用濃度依存的に明確なγH2AX誘導がみられた。なお、0.75 mM以上の作用濃度で検出されたγH2AX誘導にはアポトーシスに伴うγH2AX誘導が一部含まれていると考えられる。

4 考察

本研究では、γH2AXを指標に、MOCAおよびその構造類似化合物のDNA損傷強度をヒト尿管上皮細胞株1T1細胞において検討し、被験物質全てがγH2AXを誘導すること、中でもMOCAおよびMDPが特に強い誘導を示すことを明らかにした。γH2AXの誘導は、細胞にとって最も脅威となる損傷であるDNA二本鎖切断が生成されていることを示唆する。特に、がん関連遺伝子に、化学物質ばく露等外因的要因により繰り返しDNA二本鎖切断が誘導されると、遺伝子変異につながる修復ミスの頻度が高まると同時に、姉妹染色分体交換や小核形成等ゲノム不安定性の引き金となり、ひいては、細胞がん化に繋がるものと考えられる¹⁴⁾。実際に、職業性膀胱がん、p53遺伝子等のがん抑制遺伝子に突然変異が見つかっている^{15,16)}。

MOCAはIARC発がん性評価においてグループ1であり、これまでの遺伝毒性研究においても、DNA付加体や小核形成、姉妹染色分体交換を誘導することが報告されている。それゆえに、強いγH2AX誘導を示したことは納得できる結果である。また、我々はこれまでに、1,2-ジクロロプロパン、トリクロロエチレン、2,4-ジメチルアニリン等の産業化学物質のDNA損傷性を、γH2AXを指標に明らかにしてきたが、これら化学物質が同作用時間で明確なγH2AX誘導が観察されたのは1 mM以上であった¹⁷⁻¹⁹⁾。このことから、MOCAは、それらと比較して

も強いDNA損傷性を有するものと推測される。一方、過去の報告において、MOCA及びMDPの細胞毒性、または遺伝毒性作用が認められた濃度は、本研究に比べると低濃度である(0.1 mM以下; 主に肝細胞に対して)^{2, 12, 20)}。この理由としては試験に供した細胞種の違いに起因するもの(代謝能等)であると考えられる。本研究で使用した1T1細胞は、ラット尿管上皮細胞株(MYP3)と共に、化学物質の代謝、細胞毒性研究に使用されている細胞株である²¹⁻²³⁾。それゆえに基本的な代謝能は備わっていると推察されるが、被験物質の代謝に特に関与が強いと考えられる酵素の異種細胞間における発現量の違い等は未確認であるため、今後確認する必要がある。

MDPは、過去の研究において、肝細胞株(HepG2)、及び直腸細胞株(LS174T)に γ H2AX誘導を示すことが報告されている²⁰⁾。本研究の結果は、当該報告を支持するものであるが、MDPが1T1細胞においてMOCAと同等に γ H2AX誘導を示したことは予想外であり興味深い結果である。MDPは別名ビスフェノールFとしても知られている。ビスフェノールAは、かつて、プラスチックやエポキシ樹脂等の製造に広く使用されてきたが、内分泌攪乱作用を有する恐れがあり、その規制が厳しくなる一方で、ビスフェノールFが、ビスフェノールAの代替物質として各種産業で利用が増大している²⁴⁾。MDPは現時点では、発がん性試験が実施されていないが、MOCAと同等の発がんイニシエータである可能性を否定できない。今後詳細な検討が求められると同時に、国内外の動向を注視する必要がある。また、本研究ではMDA、MBTのDNA損傷性はMOCA、MDPと比べると低い結果となったが、動物に対する発がん性は認められているため^{10, 11)}、引き続きその使用にあたっては慎重な取り扱いが求められる。MDA、MBTのIARC発がん性評価はグループ2Bであるが、当該評価のグレードアップを視野に入れ、発がんメカニズムに関するさらなる研究が今後必要であると考えられる。

最後に、 γ H2AXの誘導メカニズムについて考察する。 γ H2AXは、当初、電離放射線により直接的にDNA二本鎖切断が生成された際に誘導される現象として発見された⁷⁾。その後の研究により、細胞に誘導される損傷が、一本鎖切断、DNA付加体、酸化的塩基損傷、クロスリンク等の二本鎖切断以外の損傷であっても、細胞内プロセス(損傷修復やDNA複製等)を経て、二次的に二本鎖切断が生成され、 γ H2AXが誘導されることが明らかとなっている²⁵⁾。これらのことを基に考えると、本研究で検討した化学物質は二次的にDNA二本鎖切断を誘導したものと推測される。例えばMOCAは、CYP2A6、CYP3A4によりN-oxidation(酸化的代謝)を受け、N-hydroxy-MOCAになると考えられており、このN-hydroxy-MOCAがDNAと付加体を形成することが報告されている^{26, 27)}。MDAにおいても、その構造は明らかになっていないがDNA-MDA付加体を形成するであろうことが報告されている²⁸⁾。従って、このような損傷が一次損傷と

して生成された後に、二本鎖切断に変換され、 γ H2AXの誘導に至ったのではないかと推測される。加えて、CYPが関与する代謝反応においては、代謝過程でしばしば活性酸素種が発生する^{29, 30)}。活性酸素種は反応性が高くDNAに酸化的損傷や一本鎖切断を誘導することが知られている。これら損傷も二次的な二本鎖切断の生成要因になると考えられる。これら詳細メカニズムの解明は今後の研究課題である。また、MBT、MDPについても、どのような代謝物がDNA損傷性を有するのかを今後の研究で詰めた上で、化学物質の構造に基づくDNA損傷性の違いについて議論していく必要がある。

5 まとめ

本研究では、新規DNA損傷マーカーである γ H2AXに着目し、MOCA及び構造類似化合物がDNA二本鎖切断を生成する可能性を示唆するとともに、その損傷誘導強度の違いを明らかにした。DNA損傷性の物質間比較は化学物質の有害性を的確に把握するために重要であり、本研究で得られた知見は、現場調査やリスク評価等において有用な情報を与えるものであると考えられる。

文 献

- 1) NTP. 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline). Report on Carcinogens, 11th ed. 2005.
- 2) IARC. 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline). IARC Monographs. 2010: 100F: 73-82.
- 3) 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-Roudoukijunkkyokuanzeniseibu-Kagakubushitsutaisakuka/doc1_1.pdf
- 4) 厚生労働省. 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン(MOCA)による健康障害の防止対策について. https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11305000-Roudoukijunkkyokuanzeniseibu-Kagakubushitsutaisakuka/doc2_1.pdf
- 5) Kaderlik KR, Talaska G, DeBord DG, Osorio AM, Kadlubar FE. 4,4'-Methylene-bis(2-chloroaniline)-DNA adduct analysis in human exfoliated urothelial cells by 32P-postlabeling. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1993; 2: 63-69.
- 6) Vaughan GT and Kenyon RS. Monitoring for occupational exposure to 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of haemoglobin adducts, blood, plasma and urine. J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 1996: 678: 197-204.
- 7) Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. 1998: 273: 5858-5868.
- 8) Toyooka T, Ishihama M, Ibuki Y. Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity. J. Invest. Dermatol. 2011: 131: 1313-1321.
- 9) Sedelnikova OA, Bonner WM. GammaH2AX in cancer

- cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle*. 2006; 5: 2909-2913.
- 10) IARC. 4,4'-methylenedianiline and its dihydrochloride. IARC Monographs. 1989; 39: 347-365.
 - 11) IARC. 4,4'-methylenebis (2-methylaniline). IARC Monographs. 1987; 4: 248.
 - 12) Cabaton N, Dumont C, Severin I, Perdu E, Zalko D, Cherkaoui-Malki M, Chagnon MC. Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl) methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*. 2009; 255, 15-24.
 - 13) Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 9390-9395.
 - 14) K.K. Khanna, S.P. Jackson. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet*. 2001; 27: 247-54.
 - 15) Esteve A, Sørle T, Martel-Planche G, Hollstein M, Kusters I, Lewalter J et al. Screening for p53 gene mutations in archived tumors of workers occupationally exposed to carcinogens: examples from analysis of bladder tumors. *J. Occup. Environ. Med*. 1995; 37:59-68.
 - 16) Sørle T, Martel-Planche G, Hainaut P, Lewalter J, Holm R, Børresen-Dale AL, Montesano R. Analysis of p53, p16MTS, p21WAF1 and H-ras in archived bladder tumours from workers exposed to aromatic amines. *Br. J. Cancer*. 1998; 77:1573-1579.
 - 17) Toyooka T, Yanagiba Y, Suda M, Ibuki Y, Wang RS. 1,2-Dichloropropane generates phosphorylated histone H2AX via cytochrome P450 2E1-mediated metabolism. *Toxicol. Lett*. 2017; 272:60-67.
 - 18) Toyooka T, Yanagiba Y, Ibuki Y, Wang RS. Trichloroethylene exposure results in the phosphorylation of histone H2AX in a human hepatic cell line through cytochrome P450 2E1-mediated oxidative stress. *J. Appl. Toxicol*. 2018; 38:1224-1232.
 - 19) Qi Y, Toyooka T, Kashiwagi H, Yanagiba Y, Koda S, Ohta H, Wang RS. 2,4-Dimethylaniline generates phosphorylated histone H2AX in human urothelial and hepatic cells through reactive oxygen species produced by cytochrome P450 2E1. *Arch. Toxicol*. 2018; 92: 3093-3101.
 - 20) Audebert M, Dolo L, Perdu E, Cravedi JP, Zalko D. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch Toxicol*. 2011; 85: 1463-73.
 - 21) Yokohira M, Arnold LL, Lautraite S, Sheets L, Wason S, Stahl B, Eigenberg D, Pennington KL, Kakiuchi-Kiyota S, Cohen SM. The effects of oral treatment with transfluthrin on the urothelium of rats and its metabolite, tetrafluorobenzoic acid on urothelial cells in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49:1215-23.
 - 22) Da Rocha MS, Arnold LL, Dodmane PR, Pennington KL, Qiu F, De Camargo JL, Cohen SM. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: in vivo, in vitro and molecular approaches. *Toxicology*. 2013; 314:238-46.
 - 23) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoacetoluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats. *Toxicol Sci*. 2019; doi: 10.1093/toxsci/kfz051
 - 24) Usman A, Ahmad M. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere*. 2016; 158: 131-142.
 - 25) Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2008; 12:957-967.
 - 26) Butler MA, Guengerich FP, Kadlubar FF. Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4'-methylenebis (2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Res*. 2008; 49: 25-31.
 - 27) Yun CH, Shimada T, Guengerich FP. Contributions of human liver cytochrome P450 enzymes to the N-oxidation of 4,4'-methylene-bis (2-chloroaniline). *Carcinogenesis*. 1992; 13: 217-222.
 - 28) Chou HC, Lang NP, Kadlubar FF. Metabolic activation of N-hydroxy arylamines and N-hydroxy hetero-cyclic amines by human sulfotransferase(s). *Cancer Res*. 1995; 55: 525-529.
 - 29) Yasui H, Hayashi S, Sakurai H. Possible involvement of singlet oxygen species as multiple oxidants in p450 catalytic reactions. *Drug Metab. Pharmacokinet*. 2005; 20: 1-13.
 - 30) Hryciay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*. 2015;74:35-84.

Study on genotoxicity of 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane and industrial chemicals having similar chemical structure

— Strength of genotoxicity evaluated by γ H2AX —

by

Tatsushi TOYOOKA^{*1}, Yonggang QI^{*1,2}, Rui-Sheng WANG^{*1}, and Shigeki KODA^{*1}

3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane (MOCA), an industrial chemical used as a curing agent for polyurethane pre-polymers, is known as a carcinogen that may cause occupational bladder cancer. Generation of DNA damage is a crucial first step in carcinogenesis, and it is clear from the previous studies that MOCA is genotoxic. On the other hand, it is still unknown whether MOCA produces a DNA double strand break, the most severe DNA damage closely related to carcinogenesis. In addition, there are no studies comparing genotoxicity between MOCA and the substances having similar chemical structures and using same application as MOCA. In this study, in order to grasp the hazard of chemical substances accurately, we carried out comparison of DNA damage properties among MOCA, 4,4'-diaminodiphenylmethane, 4,4'-diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane, and 4,4'-dihydroxydiphenylmethane using phosphorylated histone H2AX, having attracted attention in recent years as a biomarker of DNA double-strand breaks. We found that all four tested substances induced γ H2AX, and the induction was particularly strong in MOCA and 4,4'-dihydroxydiphenylmethane. The findings of this study are considered to provide important information for risk assessment of tested substances.

Key Words: 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethane, bladder cancer, DNA damage, phosphorylated histone H2AX

^{*1} Industrial Toxicology and Health Effects Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health

^{*2} Kitasato University Graduate School of Medical Sciences