

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(労働安全衛生総合研究事業)
総括・分担研究報告書

疫学アプローチによる原因物質絞込みと因果関係検証

研究代表者	武林 亨	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学 教授
研究分担者	中野真規子	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学 専任講師

研究要旨

本研究の目的は、オルト-トルイジン(以下、OT)および他の化学物質曝露と膀胱癌を主とした健康影響との関連を検討することである。今年度は、主に 膀胱がん発生企業の協力可能な全従業員(非曝露、異動・退職含)に平成 28 年度施行したパイロット調査の曝露歴から原因物質絞込むための曝露推定量の検討、パイロット調査をベースに、現従業員対象のコホート研究を実施した。今年度は、膀胱癌罹患者はなかった。OT 等の作業環境濃度および生物学的モニタリング値がないため、入社以来の曝露情報を各芳香族アミンで、4 工程毎に、曝露期間、取扱い頻度/月 を利用した曝露推定量 A、さらに、取扱い濃度、接触面積を追加した曝露推定量 B を検討した。曝露推定量 A、B 等を膀胱癌 罹患群・非罹患群で比較した結果、罹患群の OT 洗浄工程、OT 乾燥工程で有意に高い OT 曝露推定量を示し、最も膀胱癌と関連がある工程であると推察された。MX 洗浄工程、AN(洗浄工程、乾燥工程)については、OT(洗浄工程、乾燥工程)の作業との重複作業の可能性もあることから、さらなる検討を要する。また、膀胱癌と関連のある症状は血尿、膀胱癌と関連のある既往歴は膀胱炎を認めた。よって、OT 曝露(特に、洗浄工程、乾燥工程)があり、血尿、膀胱炎を認めた場合は、注意深い経過観察が必要である。

今後は、曝露推定量における、さらなるリスク係数の検討、および罹患者の追跡を行う。

研究協力者

大前和幸	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学
永滝陽子	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学
竹内文乃	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学
田中 茂	十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科

A. 研究目的

オルト-トルイジン(以下、OT)等芳香族アミン取扱い事業所で発生した膀胱癌については、国による調査が実施され、事案発生事業所での調査結果において、作業者が OT に経気道のみならず経皮からの曝露も示唆された。今後の対応として、「OT 等による膀胱がんの発症に関する調査研究の実施」が挙げられており、その因果関係(causality)を明らかにするとともに、適切な予防のあり方について明らかにすることが求められている。また、特定化学物質予防規則など改正(基発 1130 第 4 号)がされ、OT は特定化学物質第 2 類物質に指定、OT 取扱い作業員に対して特殊健康診断の実施等を事業主に義務(平成 29 年 1 月 1 日施行)付けられた。平成 28 年度に膀胱がん発生企業の協力可能な全従業員(非曝露、異動・退職含)から研究参加同意取得と、曝露歴把握、パイロット調査を実施した。これをベースに OT および他の化学物質曝露の原因物質絞込みと膀胱癌を主とした健康影響との関連を検討することである。

(1)全従業員を対象とした内部比較による膀胱がん罹患・がん発症前段階での自覚症状・既往歴に関する検討

(2)現従業員を対象とした追跡調査。

B. 研究方法

(1)2017 年 1 月に膀胱癌発生の集積がみられた事業所を全対象としたパイロット調査に協力可能かつ参加した作業員(106 名)のうち OT 等芳香族アミン(OT、パラ-トルイジン(PT)、アニリン(AN)、2,4-キシリジン(MX)、オルト-クロロアニリン(OCA)、オルト-アニシジン(OA))取り扱い歴のある者(75 名)を対象とした。協力者からは、研究に関する説明書を配布し、書面による同意を得た。

対象事業所は、OT を原料とし、原料に溶媒として有機溶剤を加えて、ジケテンを滴下しながら染料・顔料中間体を製造している。製造工程は 4 工程(

反応工程(原料から)、蒸留工程、洗浄工程(ろ過含)、乾燥工程(製品の袋詰め含)に分かれる。

a. 曝露推定量の検討

OT 等の作業環境濃度および生物学的モニタリング値が測定されていないため、入社以来の曝露情報を各芳香族アミンで、4 工程毎に、曝露期間(年)、取扱い頻度/月(4 群に分類:月平均 10 日以上、月平均 3~9 日以上、月平均 1~2 日以上、月平均 1 日未満)を利用し、取扱い頻度/月に準じて、10、5、1、0 を代用し重みをつけた。これらの作成した job-exposure matrix を用いて、曝露推定量 A、さらに、取扱い濃度(%)、接触面積(%)を追加した曝露推定量 B を検討した。

曝露推定量 A:各芳香族アミン、各工程:曝露期間(年)×曝露頻度/月

曝露推定量 B:各芳香族アミン、各工程:曝露推定量 A×取り扱い濃度(%) (工程別)×接触面積(%) (工程別)×100

アウトカムは、自覚症状、膀胱癌等である。。

b. 潜伏期間を考慮するために、75 名から OT 取扱い開始(1989-1999 年)した作業員 36 名に限定し曝露推定量 A を用いて検討した。

内的妥当性の検討として、2017 年 1 月に膀胱癌発生の集積が多くみられた事業所の会社に勤務歴のある全従業員(120 名)を対象とし、パイロット調査に参加した作業員と参加していない作業員間の年齢、在職年数、曝露推定量 A を比較した。

(2)現従業員を対象とした追跡調査の内容は、以下である。

OT の特殊健康診断対象者

- 会社による特殊健康診断(自他覚症状、尿潜血、尿沈渣、尿細胞診)
- 健康調査票(血尿などの自覚症状)
- 尿中腫瘍マーカー(NMP22)
- OT の特殊健康診断対象でない者
- 健康調査票(血尿などの自覚症状)
- 尿中腫瘍マーカー(NMP22)

統計手法は、膀胱癌罹患患者(罹患群)と膀胱癌非罹患患者(非罹患群)の2群に分け、有意水準5%、両側検定でMann-WhitneyのU検定、2検定、Fisher's exact testを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従い、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得た。協力者からは、研究に関する書面で説明後、書面による同意を得た。

C. 研究結果

(1) a. OT等の6種類の芳香族アミン取り扱い歴のある者(75名)を対象とし、そのうち膀胱癌と診断された者は10名である。

対象者の特性を表1に示す。膀胱癌罹患患者(罹患群)は、膀胱癌非罹患患者(非罹患群)よりも年齢が高かったが、在職年数と喫煙歴に有意な差はなかった。

表1 対象者の特性

	非罹患群(n, 65)	罹患群 (n, 10)
	平均値(範囲), 有所見数	平均値(範囲), 有所見数
年齢	49.2(19-70)	56.9*(44-72)
在職年数	21.9(1-38)	20.3(6-29)
喫煙	52(80%)	8(80%)

表2 曝露推定量 A、Bと膀胱癌

	曝露推定量 A		曝露推定量 B	
	非罹患群	罹患群	非罹患群	罹患群
工程	平均値	平均値	平均値	平均値
総 OT	96.1	266.6**	92.1	116.2
反応	27.5	30.6	81.7	90.8
蒸留	10.5	5.3	4.7	2.4
洗浄	29.6	120.8**	5.3	21.7**
乾燥	28.5	110**	0.3	1.2**
総 OA	46.4	60.6	40.3	34.1
反応	11.9	9.8	35.3	29.1
蒸留	4.8	1.3	2.2	0.6
洗浄	15.1	23.1	2.7	4.2
乾燥	14.6	26.4*	0.2	0.3*
総 MX	95	163.6*	84.2	109.2
反応	24.7	30.3	73.4	89.9
蒸留	10	6.5	4.5	2.9
洗浄	31.4	88.3**	5.6	15.9**
乾燥	28.5	38.6	0.3	0.4
総 PT	91.7	24.8	90.5	7.1
反応	27.2	2	80.9	5.9
蒸留	4.2	0.6	1.9	0.3
洗浄	41.7	4	7.5	0.7
乾燥	18.6	18.2	0.2	0.2
総 AN	104.6	174.4*	87.7	89
反応	26.5	24.8	78.6	73.8
蒸留	6	3	2.7	1.3
洗浄	32.6	72.7**	5.9	13.1**
乾燥	39.5	73.8*	0.4	0.8*
総 OCA	33.1	34.3	27.1	19.1
反応	7.9	5.5	23.4	16.2
蒸留	3.9	0.1	1.8	0
洗浄	9.6	15	1.7	2.7
乾燥	11.6	13.7	0.1	0.2

**：p<0.01, *：p<0.05

表 2 に、罹患群と非罹患群に分けて曝露推定量 A と曝露推定量 B を用いて総 OT (各 OT の反応工程、蒸留工程、洗浄工程、乾燥工程の総和) などの比較検討した結果を示す。

曝露推定量 A と曝露推定量 B に共通して有意差があった工程は、OT 洗浄工程、OT 乾燥工程、OA 乾燥工程、MX 洗浄工程、AN 洗浄工程、AN 乾燥工程であった。

曝露推定量 A のみで有意差があった工程は、総 OT 工程、総 MX 工程、総 AN 工程であった。

曝露推定量 B のみで有意差があった工程は、なかった。

表 3 OT 取扱い開始 (1989-1999 年) の作業者の特性

	非罹患群 (n,26)		罹患群 (n,10)	
	中央値, 有所見	最大 値,%	中央値, 有所見	最大 値,%
在職 年数	23.1	36.7	21.3	29.1
年齢	52.5	67.0	57	72.0
喫煙	4/26	84.6	8/10	80.0
既症状				
血尿	5/26	19.2	8/10**	80.0
排尿 時痛	5/25	20.0	5/10	50.0
残尿感	5/26	19.2	4/10	40.0
頻尿	13/26	50.0	5/10	50.0
既往歴				
膀胱炎	5/26	19.2	5/8*	62.5
尿管 結石	4/26	15.4	2/9	22.2
アトピー /皮膚疹	2/25	8.0	3/9	33.3

** : p<0.01, * : p<0.05

表 4 OT 取扱い開始 (1989-1999 年) の作業者に限定した曝露推定量 A と膀胱癌

	非罹患群 (n,26)	罹患群 (n,10)
工程	曝露推定量 A 中央値	曝露推定量 A 中央値
総 OT	137	279.8*
反応	45	0
蒸留	6.9	0
洗浄	39.3	132.4**
乾燥	37.1	115.4**
総 OA	48.5	53.8
反応	7.5	0
蒸留	0	0
洗浄	13.8	25.5
乾燥	19.2	27.9
総 MX	112.5	172.1
反応	34	0
蒸留	1.3	0
洗浄	30.4	88.3
乾燥	25.6	30
総 PT	4	0
反応	0	0
蒸留	0	0
洗浄	1.5	0
乾燥	0	0
総 AN	160	148.5
反応	23.1	5
蒸留	0.5	0
洗浄	37.5	55.1
乾燥	45	67.5
総 OCA	41.4	30.4
反応	4.9	0
蒸留	0	0
洗浄	4.9	14.5
乾燥	15	6.7

** : p<0.01, * : p<0.05

b. 表3、表4は、OT取扱い開始(1989-1999年)した作業員36名に限定して在職年数、年齢、喫煙歴、既症状、既往歴、曝露推定量Aを比較検討した結果を示す。罹患群では、血尿、膀胱炎が有意に高かった。一方、在職年数、年齢、喫煙歴に有意差は認めなかった。曝露推定量Aは、OT洗浄工程、OT乾燥工程でのみ有意差があった。

2017年1月に膀胱癌発生の集積が多くみられた事業所の会社に勤務歴のある全従業員(120名)を対象とし、パイロット調査に参加群と非参加群との比較では、年齢に差はなかった。非参加群の平均在職年数3.5年(中央値1.2年)と短期間で、在職年数10年以上の者は4名であった。

(2)不同意、非曝露のため不参加、退職を除き健康調査(のべ数:140名)をおこなった。

自覚症状(ここ1カ月)は、血尿 0/140、排尿時痛 2/140、残尿感 13/140であった。NMP22 高値(12.0>U/ml)は5/140で、その内訳は膀胱癌既往者2名、膀胱癌既往歴のない者3名は2次健診で膀胱癌を否定された。本年度研究期間中に膀胱癌と新たに診断された者はいなかった。

D. 考察

本年度研究期間中は、膀胱癌罹患者はなかった。曝露推定量は、OTに経気道のみならず経皮からの曝露も示唆されたことから、曝露推定量A(各工程、曝露期間(年)×曝露頻度/月)に取扱い濃度、接触面積を考慮した曝露推定量Bでも検討した。曝露推定量Bは、反応工程は取扱い濃度が高いが接触面積は狭く、一方、洗浄工程/乾燥工程は、取扱い濃度が極低いが接触面積は広いこと、工程による濃度が異なることによる作業員の取扱いに対する注意の違いは考慮されていないことなどから、反応工程の曝露推定量は過大評価し、洗浄工程/乾燥工程の曝露推定量は過小評価している可能

性がある。曝露推定量は、さらなるリスク係数の検討が必要である。

しかし、曝露推定量Aと曝露推定量Bに共通して有意差があり、かつOT取扱い開始(1989-1999年)した作業員に限定した曝露推定量Aでも有意差があったOT洗浄工程、OT乾燥工程は、最も膀胱癌と関連がある工程であると推察される。

曝露推定量Aと曝露推定量Bに共通して有意差があったMX洗浄工程、AN(洗浄工程、乾燥工程)については、OT(洗浄工程、乾燥工程)の作業との重複作業の可能性もあることから、さらなる検討を要する。

膀胱癌と関連のある症状は血尿¹⁾、膀胱癌と関連のある既往歴の膀胱炎を認めたことから、血尿、膀胱炎を認めた場合は注意深い経過観察が必要である。

内的妥当性の検討では、パイロット調査に非参加のうち健診対象とすべき者(在職年数10年以上)は4名で、注意すべき曝露者の多くはパイロット調査に参加していたことを確認した。

本調査で特殊健康診断に追加測定しているNMP22は、ベンジジンの特殊健診項目見直し案²⁾で一次健診項目に追加されている腫瘍マーカーであるが、本年度は罹患者を認めなかったことから、その有用性について今後も測定継続する。

E. 結論

OT曝露(特に、洗浄工程、乾燥工程)があり、血尿、膀胱炎を認めた場合は注意深い経過観察が必要である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakano M, Omae K, Takebayashi T, Tanaka S, Koda S. An epidemic of bladder cancer: ten cases of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine. Journal of Occupational Health. 2018 (in press)

武林亨、田中茂、中野真規子、岩澤聡子。化学物質の経皮吸収と職業がん。産業医学ジャーナル。2018;41:89-93.

2. 学会発表

The 26th International Symposium on Epidemiology in Occupational Health (EPICOH) . 2017.8月(英国 エジンバラ)

中野真規子：職業性オルト-トルイジン曝露により発生した膀胱癌：10例について、第45回日本産業衛生学会産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2017年10月(山形県鶴岡市)

中野真規子：職業性オルト-トルイジン曝露により発生した膀胱癌：10例について、第280回日本産業衛生学会関東地方会 2018年2月(埼玉県新座市市)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

記載事項なし

文献)

1) 日本泌尿器科学会.膀胱癌診療ガイドライン 2015年版.P9.医学図書出版株式会社.東京

2) 特殊健康診断の健診項目に関する調査研究委員会報告書(平成19年度報告書)

<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyo-Soumuka/0000089268.pdf>

(2018年4月12日アクセス可能)

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(労働安全衛生総合研究事業)
分担研究報告書

芳香族アミン取扱工場の作業者における膀胱がんの標準化罹患比

研究分担者

祖父江友孝（大阪大学大学院医学系研究科 社会医学講座 環境医学）

研究要旨

2015 年、芳香族アミンを取り扱っていた化学工場において、膀胱がんの多発事例が報告された。本調査では、当該工場作業者の作業歴データ・膀胱がん罹患データと、国立がん研究センターがん情報サービスが公開している日本全国の人口データ・膀胱がん罹患データを用いて、芳香族アミン取扱工場の作業者を観察集団、日本国民を基準集団とした場合の標準化罹患比(SIR: Standardized Incidence Ratio)を推計した。その結果、標準化罹患比(基準集団と等しい場合を 100 とする)は 3513(95%信頼区間: 1685 - 6460)と有意に高かった。ただし、曝露した化学物質の種類や曝露量によって、標準化罹患比がどの程度異なるのかを明らかにするためには、データの精緻化と更なる検討が必要である。

研究協力者

品川貴郁（大阪大学大学院医学系研究科 社会医学講座 環境医学）

A. 目的

2015 年、芳香族アミンを取り扱っていた化学工場において、膀胱がんの多発事例が報告された¹⁾。しかし、当該工場作業員の膀胱がん罹患率が、日本国民と比較してどの程度の水準であったのかについては、これまで疫学的な検討はなされていなかった。

そこで本調査では、芳香族アミンを取り扱っていた工場作業員の作業歴データ・膀胱がん罹患データを用いて、日本国民に対する膀胱がんの標準化罹患比 (SIR : Standardized Incidence Ratio) を推計し、芳香族アミン曝露と膀胱がん発症の関連性について検討した。

B. 方法

当該工場(A 工場および B 工場)作業員 189 名の作業歴と、10 名の膀胱がん罹患について、慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室よりデータの提供を受けた。作業員のうち、男性は 174 名、女性は 15 名であったが、女性作業員における膀胱がん罹患数が 0 名であり、SIR の計算が行えなかったことから、女性は分析対象から除外した。さらに、詳細な作業歴が不明であった 13 名、および、既に故人であり死亡日が不明であった 6 名も分析対象から除外し、最終的に 155 名(現職者:93 名、退職者:62 名、膀胱がん罹患数:10 名、男性のみ)を分析対象とした(図 1)。

SIR の推計では、分析対象における観察人年の計算が必要となる。そこで本調査では、観察開始日を「作業開始日」、観察終了日を「現職者:2017/9/8」「A 工場退職者:2017/1/18」「B 工場退職者:2017/1/17」「膀胱がん罹患患者:膀胱がん診断日」「故人:死

亡日」として人年計算を行った。その結果、総観察人年は 3,257 人年、観察期間中央値は 21.2 年となった。

芳香族アミン取扱作業歴データには、作業員別・作業期間別の「取扱物質」「作業工程」「作業頻度」の情報が含まれており、「取扱物質」は OT(オルト-トルイジン)、OA(オルト-アニシジン)、MX(2,4-キシリジン)、PT(パラ-トルイジン)、AN(アニリン)、OCA(オルト-クロロアニリン)、その他の 7 種類、「作業工程」は反応、蒸留、濾過・洗浄、乾燥・袋詰め、の 4 種類、「作業頻度」は月平均 10 日以上、月平均 2~9 日、月平均 1~2 日、月平均 1 日未満の 4 種類に分類されていた。

本調査では、芳香族アミンの累積曝露量によって膀胱がん罹患率が異なると予想されたため、入手したデータをもとに、作業員毎・作業期間毎の芳香族アミン曝露量の計算を試みた。具体的には、「濃度係数」と「頻度係数」を用意し、これらの係数と作業期間の乗算値を、人年あたりの芳香族アミン曝露量とした。すなわち、「頻度係数×濃度係数×(曝露日数÷365.24)」が、その作業員・作業期間における芳香族アミンの曝露量となる。「頻度係数」は月平均 10 日以上であれば 10、月平均 2~9 日であれば 5、月平均 1~2 日であれば 1、月平均 1 日未満であれば 0 とした。取扱物質については、「オルト-トルイジンのみ」と「全芳香族アミン合算」の 2 パターンについて、それぞれ曝露量計算を行った。

芳香族アミンへの曝露から膀胱がん発症までには、一定の潜伏期間が存在すると考えられたことから、これを考慮に入れた SIR 推計を行う必要があると考えられた。そこで

本調査では、先行研究に倣い潜伏期間を 0 年、3 年、5 年とし²⁾、それぞれで芳香族アミンへの曝露開始を潜伏期間分だけ遅らせたものとして曝露量推計を行った。

SIR は、観察集団の年齢階級別の観察人年に、基準集団の年齢階級別罹患率を乗算することで期待罹患数を算出し、観察集団の罹患数を期待罹患数で除算することで得られる。本調査では、SIR 推計における基準集団データとして、国立がん研究センターがん情報サービスが公開している「地域がん登録全国推計によるがん罹患データ」の、膀胱がん罹患数データおよび人口データ(いずれも男性のみ)を用いた³⁾。なお、当該工場で発生した膀胱がんには上皮内癌が含まれていたため、基準集団においても上皮内癌を含む膀胱がん罹患数を用いた。また、正確を期すのであれば観察集団の人年を暦年別に分け、暦年別の基準集団データを用いて SIR 推計を行うべきであるが、人年計算が煩雑になること、基準集団で上皮内癌を含む膀胱がん罹患数が 2003 年度分以降しか得られなかったこと、基準集団の年齢階級別膀胱がん罹患率は、暦年毎に大きく変化していないことから(図 2)、基準集団の 2003 年度以降の膀胱がん罹患数・人口をそれぞれ合算して年齢階級別の膀胱がん罹患率を算出し、この罹患率を用いて SIR の推計を行った。

SIR の推計に際しては、有意水準を 5%として、フィッシャーの正確確率検定による信頼区間の計算を行った。総計ソフトウェアは OpenEpi Version 3.01 を用いた⁴⁾。また、本調査は大阪大学医学部附属病院にて、観察研究倫理審査委員会の倫理審査を受け、承認を得ている。

C. 結果

当該工場作業員全体の SIR(基準集団と等しい場合を 100 とする)は 3513(95%信頼区間:1685 - 6460、以下同)であった。以下に、芳香族アミンの累積曝露量別 SIR の推計結果を示す。

オルト-トルイジン曝露のみを推計対象とし、潜伏期間を 0 年とした場合(表 1)

累積曝露量 0 の SIR は 0、累積曝露量 1 未満の SIR は 2514(304 - 9080)、累積曝露量 1 ~ 10 の SIR は 13323(1613 - 48130)、累積曝露量 10 ~ 100 の SIR は 9706(2644 - 24850)、累積曝露量 100 以上の SIR は 22797(2761 - 82350)であった。

オルト-トルイジン曝露のみを推計対象とし、潜伏期間を 3 年とした場合(表 2)

累積曝露量 0 の SIR は 0、累積曝露量 1 未満の SIR は 2547(308 - 9201)、累積曝露量 1 以上 10 未満の SIR は 14313(1733 - 51700)、累積曝露量 10 以上 100 未満の SIR は 10167(2770 - 26030)、累積曝露量 100 以上の SIR は 24627(2982 - 88960)であった。

オルト-トルイジン曝露のみを推計対象とし、潜伏期間を 5 年とした場合(表 3)

累積曝露量 0 の SIR は 0、累積曝露量 1 未満の SIR は 2584(313 - 9334)、累積曝露量 1 以上 10 未満の SIR は 14891(1803 - 53790)、累積曝露量 10 以上 100 未満の SIR は 10642(2900 - 27250)、累積曝露量 100 以上の SIR は 26775 (3242 - 96720)であった。

全芳香族アミンの合算曝露量を推計対象とし、潜伏期間を0年とした場合(表4)

累積曝露量0のSIRは0、累積曝露量1未満のSIRは0、累積曝露量1以上10未満のSIRは7632(1574 - 22300)、累積曝露量10以上100未満のSIRは7279(1983 - 18640)、累積曝露量100以上のSIRは4741(978 - 13850)であった。

全芳香族アミンの合算曝露量を推計対象とし、潜伏期間を3年とした場合(表5)

累積曝露量0のSIRは0、累積曝露量1未満のSIRは0、累積曝露量1以上10未満のSIRは10469(2852 - 26800)、累積曝露量10以上100未満のSIRは5344(1102 - 15620)、累積曝露量100以上のSIRは5151(1062 - 15050)であった。

全芳香族アミンの合算曝露量を推計対象とし、潜伏期間を5年とした場合(表6)

累積曝露量0のSIRは0、累積曝露量1未満のSIRは0、累積曝露量1以上10未満のSIRは10793(2941 - 27630)、累積曝露量10以上100未満のSIRは5239(1080 - 15310)、累積曝露量100以上のSIRは5580(1151 - 16310)であった。

D. 考察

芳香族アミン取扱工場の作業者全体を対象とした場合のSIRは3513(95%信頼区間: 1685 - 6460)と有意に高かったことから、芳香族アミンへの曝露が膀胱がんの罹患に影響を与えた可能性が示唆される。

オルト-トルイジンのみを対象とした場合、いずれの潜伏期間設定においても、累積曝露量が多いほどSIRが高い傾向が見られ、

全芳香族アミンの曝露量を合算した場合はその傾向が减弱していたことから、主にオルト-トルイジンへの曝露が膀胱がんの罹患に影響を及ぼした可能性が考えられる。しかし、今回の曝露量の計算方法では、濃度係数の使用によって「反応」工程での曝露を過大に評価していることも考えられ、累積曝露量別のSIRの計算結果については、妥当性に疑問が残る。

また、今回は潜伏期間を0年、3年、5年の設定としたが、芳香族アミン曝露から膀胱がん発症までにはそれ以上に長い時間がかかるとの報告もあることから⁵⁻⁸⁾、更に長い潜伏期間を設定した場合のSIR計算も必要と思われる。

加えて、今回の調査ではオルト-トルイジン以外の芳香族アミンの影響について詳細な分析を行えていない。作業歴データを見る限り、複数の化学物質を同時に使用していた作業者も多く、膀胱がん罹患への影響が化学物質間で交絡していることも考えられることから、化学物質ごとの分析にあたっては、その方法について慎重な検討が必要であろう。

E. 結論

芳香族アミン取扱工場の作業者を観察集団、日本国民を基準集団とした場合の膀胱がんの標準化罹患比は有意に高く、芳香族アミンへの曝露が膀胱がんの罹患に影響を及ぼした可能性が示唆された。曝露した化学物質の種類や累積曝露量によって、標準化罹患比がどの程度異なるのかを明らかにするためには、データの精緻化と更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究成果の発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

引用文献

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・福井県内の化学工場で発生した膀胱がんに関する災害・災害調査報告書・https://www.jniosh.go.jp/publication/pdf/saigai_houkoku_2016_01.pdf (2018 年 4 月 1 日アクセス可能)
2. Sobue T, Utada M, Makiuchi T, et al. Risk of bile duct cancer among printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. J Occup Health. 2015;57(3):230-6.
3. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」・地域がん登録全国推計によるがん罹患データ(1975 年～2013 年)・[https://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/dl/cancer_incidence\(1975-2013\).xls](https://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/dl/cancer_incidence(1975-2013).xls) (2018 年 4 月 1 日アクセス可能)
4. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 3.01.

http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm (Accessed 2018/04/01).

5. Rubino GF, Scansetti G, Piolatto G, et al. The carcinogenic effect of aromatic amines: an epidemiological study on the role of o-toluidine and 4,4'-methylene bis (2-methylaniline) in inducing bladder cancer in man. Environ Res. 1982 Apr;27(2):241-54.
6. Stasik MJ. Carcinomas of the urinary bladder in a 4-chloro-o-toluidine cohort. Int Arch Occup Environ Health. 1988;60(1):21-4.
7. Ward E, Carpenter A, Markowitz S, et al. Excess number of bladder cancers in workers exposed to ortho-toluidine and aniline. J Natl Cancer Inst. 1991 Apr 3;83(7):501-6.
8. Markowitz SB, Levin K. Continued epidemic of bladder cancer in workers exposed to ortho-toluidine in a chemical factory. J Occup Environ Med. 2004 Feb;46(2):154-60.

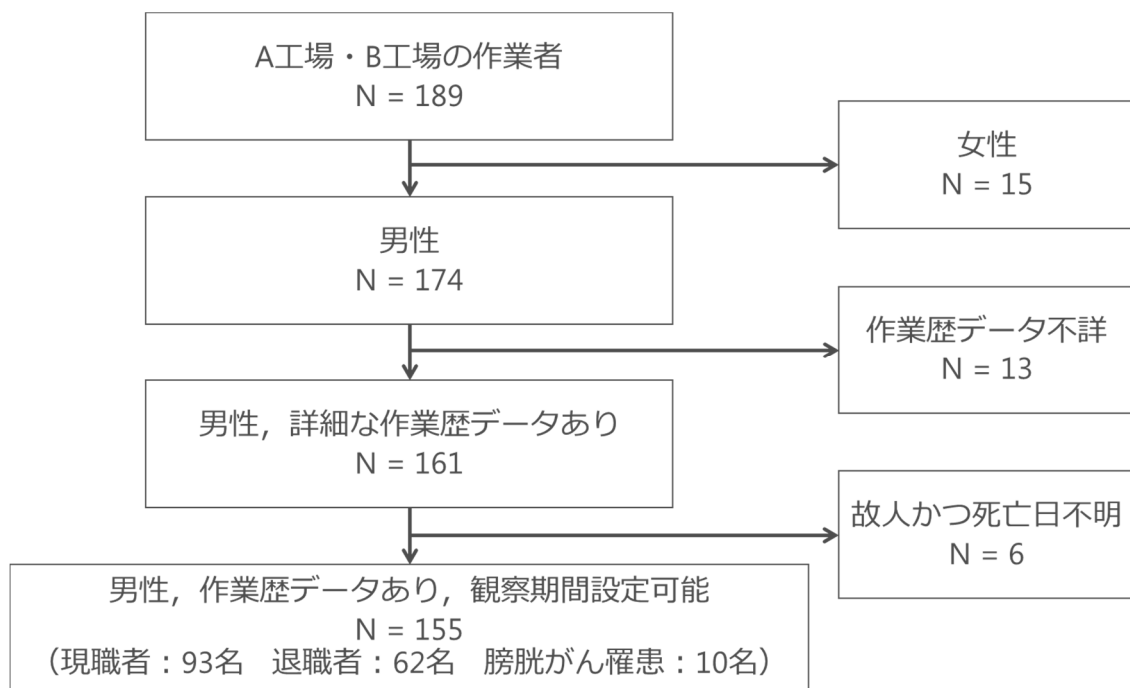


図1 分析対象

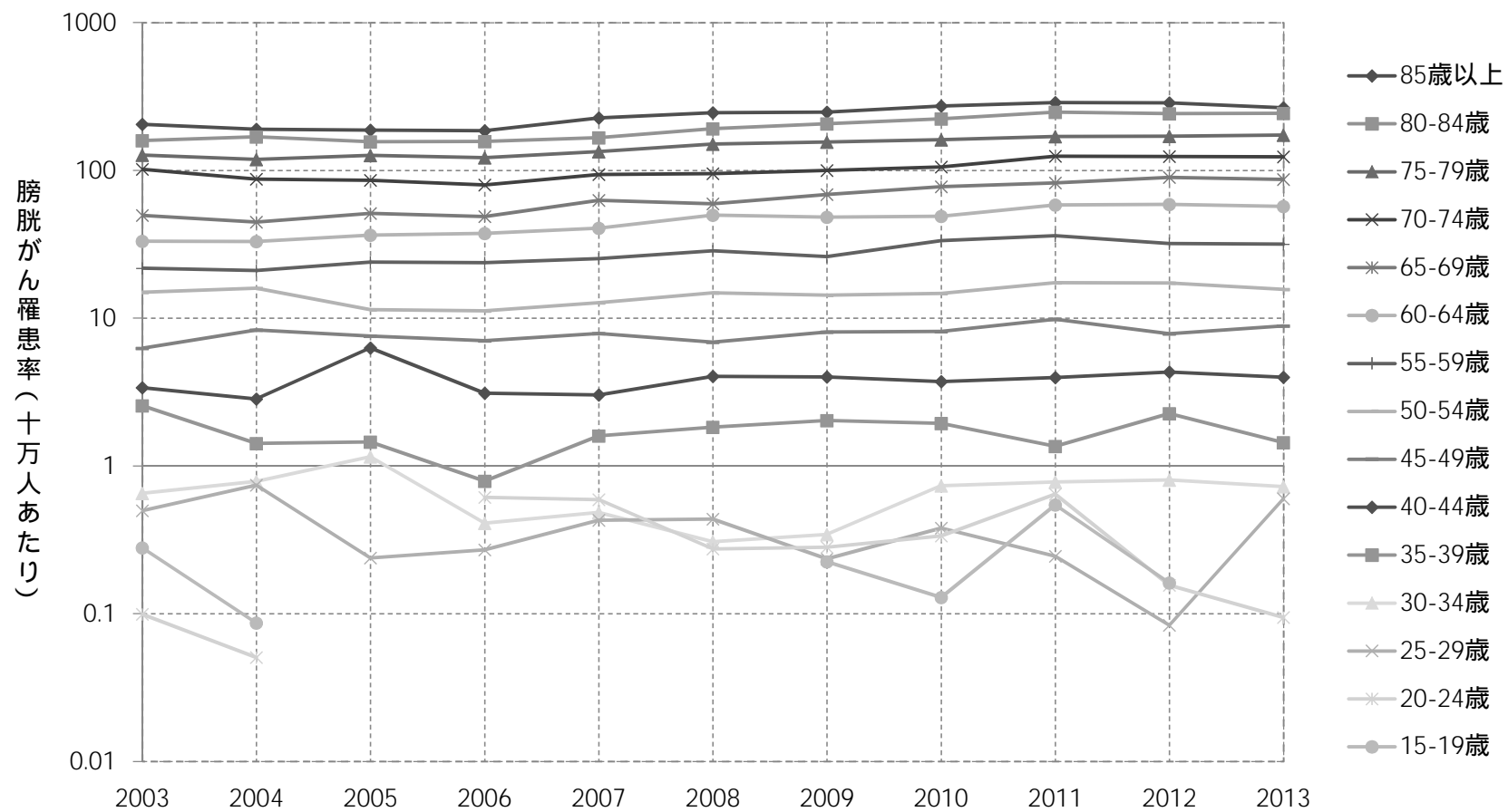


図2 膀胱がん罹患率（全国推計値、男性、上皮内癌含む）

表 1 オルト-トルイジン曝露のみを推計対象とし、潜伏期間を 0 年とした場合

累積曝露量	観察人年	期待罹患数	膀胱がん罹患数	SIR	95%信頼区間
0	1453	0.140	0	0	-
- 1	884	0.080	2	2514	304 - 9080
1 - 10	199	0.015	2	13323	1613 - 48130
10 - 100	583	0.041	4	9706	2644 - 24850
100 -	138	0.009	2	22797	2761 - 82350
作業者全体	3257	0.285	10	3513	1685 - 6460

SIR：標準化罹患比（基準集団と等しい場合を 100 とする）

表 2 オルト-トルイジン曝露のみを推計対象とし、潜伏期間を 3 年とした場合

累積曝露量	観察人年	期待罹患数	膀胱がん罹患数	SIR	95%信頼区間
0	1723	0.145	0	0	-
- 1	770	0.079	2	2547	308 - 9201
1 - 10	169	0.014	2	14313	1733 - 51700
10 - 100	488	0.039	4	10167	2770 - 26030
100 -	108	0.008	2	24627	2982 - 88960
作業者全体	3257	0.285	10	3513	1685 - 6460

表 3 オルト-トルイジン曝露のみを推計対象とし、潜伏期間を 5 年とした場合

累積曝露量	観察人年	期待罹患数	膀胱がん罹患数	SIR	95%信頼区間
0	1901	0.149	0	0	-
- 1	693	0.077	2	2584	313 - 9334
1 - 10	147	0.013	2	14891	1803 - 53790
10 - 100	428	0.038	4	10642	2900 - 27250
100 -	88	0.007	2	26775	3242 - 96720
作業者全体	3257	0.285	10	3513	1685 - 6460

表 4 全芳香族アミンの合算曝露量を推計対象とし、潜伏期間を 0 年とした場合

累積曝露量	観察人年	期待罹患数	膀胱がん罹患数	SIR	95%信頼区間
0	511	0.069	0	0	-
- 1	639	0.058	0	0	-
1 - 10	517	0.039	3	7632	1574 - 22300
10 - 100	711	0.055	4	7279	1983 - 18640
100 -	879	0.063	3	4741	978 - 13850
作業者全体	3257	0.285	10	3513	1685 - 6460

表 5 全芳香族アミンの合算曝露量を推計対象とし、潜伏期間を 3 年とした場合

累積曝露量	観察人年	期待罹患数	膀胱がん罹患数	SIR	95%信頼区間
0	897	0.074	0	0	-
- 1	573	0.058	0	0	-
1 - 10	435	0.038	4	10469	2852 - 26800
10 - 100	631	0.056	3	5344	1102 - 15620
100 -	720	0.058	3	5151	1062 - 15050
作業者全体	3257	0.285	10	3513	1685 - 6460

表 6 全芳香族アミンの合算曝露量を推計対象とし、潜伏期間を 5 年とした場合

累積曝露量	観察人年	期待罹患数	膀胱がん罹患数	SIR	95%信頼区間
0	1139	0.079	0	0	-
- 1	530	0.058	0	0	-
1 - 10	386	0.037	4	10793	2941 - 27630
10 - 100	573	0.057	3	5239	1080 - 15310
100 -	629	0.054	3	5580	1151 - 16310
作業者全体	3257	0.285	10	3513	1685 - 6460

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業補助金(厚生労働科学特別研究事業)
分担研究報告書

ヒト膀胱がんの臨床病理学研究と動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価
による発がん機序の解明

研究分担者 鰐淵英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 教授

研究要旨

芳香族アミンによる膀胱癌発生のメカニズムはいまだ明らかな点が多く、本研究では 芳香族アミン取扱事業所で発生したヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究と、動物モデルを用いた Acetoaceto-o-toluidide (AAOT)の膀胱発がん性評価を行い、ヒトと動物モデルの両面から発癌に関わる分子メカニズムの解明を目指す。 ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究では網羅的遺伝子解析とプロテオーム解析により、芳香族アミンによって発生する膀胱癌の特徴を明らかにする。平成 29 年度では患者本人から研究への同意を取得した上で腫瘍組織を実際に入手し DNA を抽出した。次年度以降に次世代シーケンスによる網羅的な遺伝子変異解析を行う予定である。 動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価では 1. in vitro における AAOT の代謝および毒性評価、2. AAOT の短期毒性試験、3. AAOT の 2 段階膀胱発がん試験を行う。平成 29 年度は in vitro における AAOT の毒性評価と AAOT の短期毒性試験を施行した。in vitro における AAOT の毒性評価では AAOT と o-Toluidine (OTD)の LD50 はそれぞれヒト膀胱上皮細胞で 1049、157 ppm であり、ラット膀胱上皮細胞で 874、257 ppm であり、AAOT の細胞毒性は OTD より低いと考えられた。AAOT の短期毒性試験では F344 ラットに AAOT を混餌 0、1.5 および 3%で 4 週間投与することで、AAOT 投与群では用量相関性に体重減少や肝臓や脾臓の重量増加が確認され、膀胱では用量相関性をもって上皮の過形成や細胞増殖活性の増加が認められた。また、投与 3 日後の雌ラットの尿中から高濃度の OTD が検出された。以上の結果から、高濃度の AAOT 投与では AAOT が生体内で OTD に変わることによって毒性を示す可能性が示唆された。次年度以降は AAOT の 2 段階膀胱発がん試験を行うとともに AAOT の代謝について検討を行う予定である。

研究協力者

魏 民、奥野高裕、行松 直(大阪市立大学)、竹内靖人(中央労働災害防止協会)

A. 研究目的

芳香族アミンによる膀胱癌発生のメカニズムはいまだ明らかでない点が多い。本研究では、芳香族アミン取扱事業所で発生した膀胱癌について、ヒト腫瘍検体と動物モデルの両面から解析し、Acetoaceto-o-toluidide (AAOT)の毒性について評価することで、発がんメカニズム解明とヒトへの外挿可能な動物モデルの開発を目指す。

B. 研究方法

ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究

膀胱がん発症患者の協力を得て、膀胱がんのホルマリン固定パラフィン包埋組織標本(FFPE)を収集する。FFPE から HE 標本作製して病理組織学的検討を行う。また、遺伝子を抽出し、次世代シーケンサ (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2)を用いて、50 種類の代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子について変異の有無を検索する。芳香族アミン取り扱い事業所で発生した膀胱癌の解析結果と、芳香族アミンの曝露なく発生した膀胱癌の解析結果、あるいは膀胱癌の遺伝子変異についての既存のデータベースとの比較を行うことで、芳香族アミン暴露によっておこる特徴的な遺伝子変異を明らかにする。

平成 29 年度は患者本人から研究への同意を取得した上で FFPE ブロックを実際に入手し、ニードルダイセクション法にて腫瘍部から QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN)を用いて、DNA を抽出した。同時にプロテオーム解析用の蛋白質を抽出する予定であったが、腫瘍組織が小さく、DNA と蛋白質の両者の抽出は困難であったことから、DNA の抽出を優先した。次年度に次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析を行う予定である。

動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

1. *in vitro* における AAOT の代謝および毒性評

価、2. AAOT の投与経路および用量を決定するための短期毒性試験、3. AAOT の膀胱発がん性を検討するための 2 段階膀胱発がん試験を行う。平成 29 年度は *in vitro* における AAOT の代謝および毒性評価の一部と AAOT の投与経路および用量を決定するための短期毒性試験を施行した。3 に関しては次年度に行う予定である。

1. *in vitro* における AAOT の代謝および毒性評価に関して、ヒト膀胱上皮細胞株(1T1)とラット膀胱上皮細胞株(MYP3)を用いて AAOT と o-Toluidine (OTD)の毒性を評価し、比較を行った。1.25%の DMSO に溶解した AAOT と OTD を添加した培地を用いてそれぞれの細胞を培養し(N=6)、48 時間後に Cell Counting Kit-8(同人化学研究所)を用いて、生細胞数を比較定量し、生存率を測定した。DMSO の濃度については 1.25%以下の濃度では細胞毒性が生じないことを確認している。

2. AAOT の投与経路および用量を決定するための短期毒性試験に関しては F344 ラットに AAOT を混餌で 0、1.5%、3%で投与し 4 週間飼育した後に、解剖を行った(N=6 or 7)。解剖時に肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定し、それらの臓器と膀胱をホルマリン固定し、FFPE ブロックを作成して、HE 染色を行い病理組織学的な評価を行った。膀胱については ki-67 の免疫染色を行い、陽性細胞数をカウントすることで、膀胱上皮の細胞増殖活性について検討した。また、AAOT 3%混餌投与 3 日後の雌ラットの尿を強制排尿にて回収し、尿中の AAOT、OTD の濃度をクロマトグラフィーにて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト組織標本を用いる研究であり、研究を実施するにあたり、大阪市立大学倫理委員会の承認を得ている(受付番号 3560)。また、動物実験に関しては大阪市立大学実験動物施設の承認を得ている。動物実験施設飼育規定を遵守し、動物愛護の精神で飼育するとともに、解剖に際しては苦痛を与えないように麻酔下で施行している。

C. 研究結果

ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究

同意を得られた7名の患者の膀胱癌 FFPE ブロックを入手し、DNAを抽出した。7例中6例で次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析に必要な200ng以上のDNAを回収できた。

動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

1. *in vitro* における AAOT の代謝および毒性評価では AAOT や OTD の添加によって、濃度依存性に細胞生存率の低下が認められ、AAOT と OTD の LD50 はそれぞれヒト膀胱上皮細胞で 1049、157 ppm であり、ラット膀胱上皮細胞で 874、257 ppm であった(図 1)。

2. AAOT の投与経路および用量を決定するための短期毒性試験に関しては、AAOT 投与群で濃度依存性に体重の減少が認められ、AAOT 3%投与群ではコントロール群と比べ、雄で 23%、雌で 10%の体重減少がみられた。また、AAOT 投与群では摂餌量や飲水量が低下する傾向があった(表 1)。AAOT 投与群では肝臓や腎臓の相対重量が濃度依存的に増加しており(表 2)、組織学的には肝臓

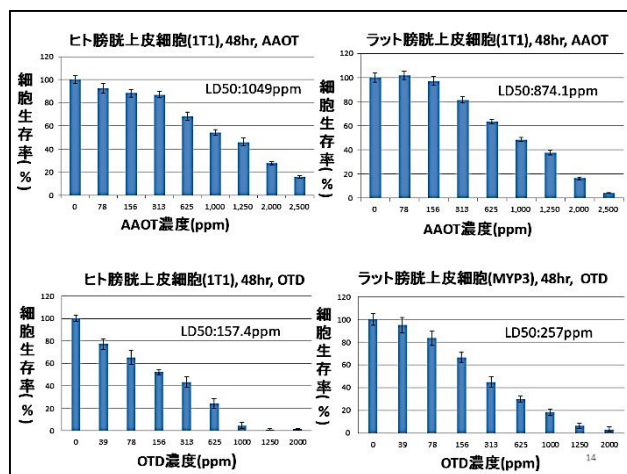


図 1. 培養細胞を用いた AAOT の細胞毒性

では肝細胞腫大や肝うっ血、軽度な胆汁、脾臓では脾うっ血が認められた。膀胱では AAOT 投与群で出血や炎症細胞浸潤、線維芽細胞の増生といっ

た膀胱炎の像が観察され、膀胱上皮は濃度依存的に過形成となり肥厚していた(図 2)。ki-67 の免疫染色では雄雌ともに AAOT 3%投与群の膀胱上皮における ki67 陽性細胞の割合は 10%程度であり、濃度依存性に増加していた(図 3)。また、AAOT 3%混餌投与 3 日後の雌ラット尿中の AAOT の濃度は 13.8 ± 12.2 ppm、OTD の濃度は 498.2 ± 239.4 ppm であった。

表 1. AAOT 短期毒性試験(一般状態)

male	No. of rats	Final BW (g)	Average Water consumption (g/rat/day)	Average Food consumption (g/rat/day)	Daily intake of AAOT (g/kgBW/day)
control	6	222.0 \pm 8.8	19.9	14.1	0.00
AAOT 1.5%	6	199.4 \pm 8.5*	19.8	13.5	1.25
AAOT 3%	7	171.5 \pm 10.2*	19.1	11.9	2.72
female					
control	6	144.0 \pm 3.4	17.3	10.8	0.00
AAOT 1.5%	6	134.3 \pm 4.3*	16.5	9.1	1.12
AAOT 3%	7	129.7 \pm 4.8*	14.6	8.6	2.33

*Significant different from controls at $p < 0.05$

表 2. AAOT 短期毒性試験(臓器重量)

male	No. of rats	Absolute weight(g)			Relative weight(%)		
		liver	spleen	kidney	liver	spleen	kidney
control	6	8.54 \pm 0.58	0.60 \pm 0.03	1.74 \pm 0.10	3.85 \pm 0.21	0.27 \pm 0.02	0.79 \pm 0.02
AAOT 1.5%	6	10.03 \pm 0.38*	1.05 \pm 0.06*	1.70 \pm 0.13	5.05 \pm 0.12*	0.53 \pm 0.03*	0.85 \pm 0.05*
AAOT 3%	7	9.43 \pm 0.67	1.25 \pm 0.18*	1.58 \pm 0.10*	5.42 \pm 0.14*	0.73 \pm 0.07*	0.92 \pm 0.04*
female							
control	6	5.47 \pm 0.09	0.43 \pm 0.02	1.20 \pm 0.02	3.80 \pm 0.11	0.30 \pm 0.02	0.83 \pm 0.01
AAOT 1.5%	6	5.99 \pm 0.40*	0.79 \pm 0.08*	1.14 \pm 0.07	4.46 \pm 0.17*	0.59 \pm 0.05*	0.85 \pm 0.03
AAOT 3%	7	6.15 \pm 0.53*	1.01 \pm 0.06*	1.13 \pm 0.09	4.77 \pm 0.24*	0.78 \pm 0.04*	0.87 \pm 0.04*

*Significant different from controls at $p < 0.05$

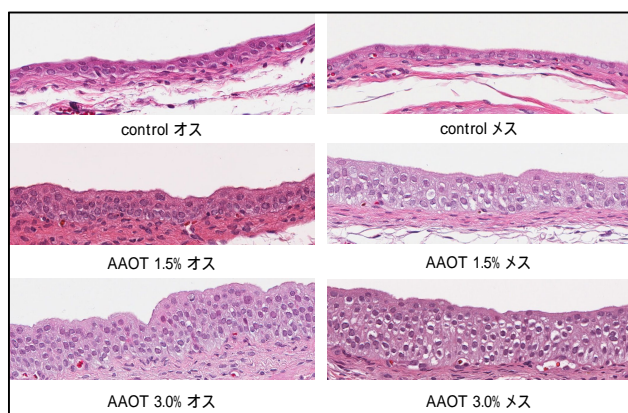


図2. AAOT 短期毒性試験(膀胱上皮)

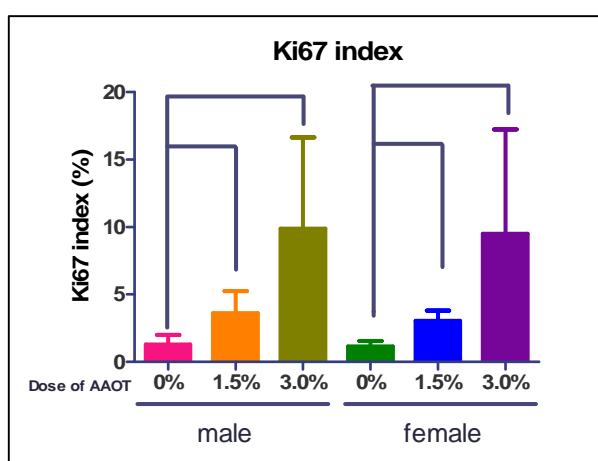


図3. 膀胱上皮細胞の ki-67 陽性率

D. 考察

in vitro における AAOT の毒性評価ではヒト膀胱上皮細胞株(1T1)とラット膀胱上皮細胞株(MYP3)を用いて細胞毒性を評価したところ、OTD と比べ AAOT の LD50 は低く、AAOT の細胞毒性は低いと考えられた。また、ヒト膀胱上皮細胞とラット膀胱上皮細胞の比較では、AAOT、OTD とともに LD50 に大きな差はなく、種差による感受性の違いはないと推察された。

AAOT の投与経路および用量を決定するための短期毒性試験に関しては、AAOT 投与群で体重減少、肝重量や脾重量の増加があり、AAOT は混餌 1.5% の濃度以上ではラットに毒性を示すものと考えられた。また、AAOT 投与群では膀胱上皮の過形

成、Ki67 陽性細胞数の増加が認められ、膀胱炎を背景として、膀胱上皮の増殖活性が増加していると推察された。AAOT 投与したラットの尿中では AAOT 濃度は低く、OTD 濃度が高くなっていたことから、AAOT が OTD に変わることで毒性を示している可能性が示唆された。AAOT が OTD に変わるメカニズムに関しては今後の検討課題であるが、AAOT に類似した構造を有する麻酔薬のプリロカインが肝酵素である carboxylesterase によって OTD に代謝されることが報告されており⁽¹⁾、AAOT も同様に肝酵素によって OTD に代謝される可能性がある。AAOT 3%混餌投与では 10～23%の体重減少が観察されたことから、2 段階膀胱発がん試験においては AAOT 3%混餌では毒性により死亡する可能性が考慮されるために、AAOT 1.5%を最高用量として発がん促進性を検討することが妥当と考えられた。

E. 結論

in vitro では AAOT の細胞毒性は OTD と比べ低いと考えられた。*in vivo* では AAOT は混餌 1.5%以上の投与でラットに毒性を示し、膀胱上皮細胞の増殖を誘発する。AAOT を投与したラット尿中では OTD が高濃度で検出されることから、AAOT は生体内で OTD に変換されることで、毒性や膀胱上皮細胞の増殖の誘発に関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Prilocaine- and lidocaine-induced methemoglobinemia is caused by human carboxylesterase-, CYP2E1-, and CYP3A4-mediated metabolic activation. Drug Metab Dispos. 2013 Jun;41(6):1220-30.

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci*, 108, 331-337, 2017.

Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 69, 1-7, 2017.

Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol*. 30, 39-45, 2017.

Kakehashi A, Stefanov VE, Ishii N, Okuno T, Fujii H, Kawai K, Kawada N, Wanibuchi H. Proteome Characteristics of Non-Alcoholic Steatohepatitis Liver Tissue and Associated Hepatocellular Carcinomas. *Int J Mol Sci*. 18, 2017.

Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Doi K, Okuno T, Kakehashi A, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J Toxicol Sci*. 42, 475-483, 2017.

Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, Wanibuchi H. Progression of Hepatic Adenoma to Carcinoma in *Ogg1* Mutant Mice

Induced by Phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;8541064, 2017.

Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of *Ogg1* Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 18, pii: E1801, 2017.

2. 学会発表

鰐淵英機. 芳香族アミンによる膀胱癌の臨床病理学的研究と AAOT の毒性、発がん性評価. 第 45 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、山形 (2017 年 10 月)

熊田賢次、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、行松 直、梯アンナ、鰐淵英機. O-Acetoacetoluidide(AAOT) の毒性影響の検討. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(労働安全衛生総合研究事業)
分担研究報告書

オルト-トルイジン等の吸収・代謝に関する研究

研究分担者 甲田茂樹 (独)労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所 所長代理
研究分担者 王 瑞生 (独)労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所 部長

研究要旨

職業性膀胱がんの発生現場で使用されたオルト-トルイジン(OT)などの5種類の芳香族アミン類について経皮吸収の情報、特に定量的評価に関する研究は見当たらない。我々は培養ヒト3次元皮膚モデルを用いて、5種類の芳香族アミン類の皮膚透過性の特性を解明した。H29年度はLC/MS/MS法を用いて生体試料中のOTやその代謝物の分析条件、貼付けたリント布を用いてラットの経皮ばく露方法を確立した。 $[^{14}\text{C}]$ OTを皮膚塗布8時間後に腎臓や膀胱において高い放射性物質の存在が検知され、24時間後にはかなり減少した。また、8時間までに塗布量の76%は尿中に排出された。一方、OTの皮下投与8時間後に尿中から遺伝毒性のある代謝物2AMC(2-amino-m-cresol)が検出され、血中や肝臓より高濃度であった。さらに膀胱組織においてはDNA損傷の上昇が観察された。一連の検討から、OTの経皮吸収性や遺伝毒性などが判明し、本法を今後の他の芳香族アミン類の解析モデルとして確立した。

研究協力者

小野真理子、豊岡達士、柳場由絵、小林健一、須田 恵

A. 研究目的

福井県の事業場で、オルト-トルイジン(OT)をはじめとした芳香族アミンを取り扱う作業に従事していた複数名の労働者が膀胱がんを発症した事案において、労働安全衛生総合研究所が現地調査を行った結果、OTについて、気中濃度レベルと尿中濃度レベルに大きな乖離があることが示唆されている¹⁾。このことより、皮膚吸収性の評価、代謝・体内動態の解明ならびに生物学的モニタリング手法の開発が喫緊の課題である。H28年度に我々は、ヒト3次元皮膚モデルを用いて、現場で使用していたOT等5種類の芳香族アミンの皮膚透過性の特性を解明した。H29年度はOTについて、尿や血液におけるOTやその代謝物の分析条件の検討、経皮吸収実験での皮膚投与法の検討、投与後の体内動態及び膀胱などの特定組織における遺伝毒性の検討などを行って、OTの経皮吸収性を解明するとともに、今後、他の芳香族アミン類を検討するためのモデルを確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. OTやその代謝物の分析条件の検討

OT及び文献に記述されて入手可能な代謝物 Anthranilic acid; ATA, N-Acetyl-o-toluidine; NAOTD, 4-Amino-m-cresol; 4AMC, 2-Amino-m-cresol; 2AMC, 2,2'-Azoxytoluene; AZT 等について、NIOSHのメソッド 8317 で記述される定量範囲(1.4-1200 ng/mL = 0.013-11.199 nmol/mL)をクリアできる分析条件をLC/MS/MSで検討し、さらに、血液、組織、尿における抽出方法の検討を行った。また、実際の生体試料への応用として、OTを投与したマウスの血液、肝臓及び尿を用いて分析法の確認を行った。

2. 経皮吸収実験法及び経皮塗布実験

実験動物を用いて芳香族アミン類の経皮吸収性を解析するため、まずは文献で報告された方法を参考に以下のように検討した。動物は雄性 Crl:CD(SD)ラット(8週齢)を用いた。被験物質の調製はo-トルイジンをPBSにて希釈し4mL/kgの容量にて投与した。対照群には同量のPBSを投与した。ラット背部を剪毛および剃毛し、アセトンにより脱脂した。リント布(3cm×3cm)を適用する位置をフェルトペンで四隅に印を記した。イソフルランで麻酔をした後、経皮投与液を0.450 mg/kgの用量で塗布したリント布を非吸収性粘着シートにより背部に貼付、その上からプラスチックフィルムで胴体を巻き、リント布の上部にあたる位置に緩衝材(4cm×5cm)を貼り付けた。さらにその上から伸縮包帯で胴体を巻き、固定した。処置後の動物は代謝ケージに個飼し(図1)、投与16時間後に、血液、肝臓、尿管、膀胱、適用部位(皮膚)を採材した。尿は採材時に膀胱から穿刺し採取した。



図1. 適用後の代謝ケージに個飼したラット

3. オートラジオグラフィー実験

放射性同位元素(^{14}C)で標識した被験物質を用いた場合、全身オートラジオグラフィー法で経時的に病理標本を作製して、被験物質の吸収と分布を確認することができる。この方法は被験物質の体内分布を観察するには最も適した方法である。H29年度はOTについて検

討した。雄性 CrI:CD(SD)ラット(7 週齢)を用い、イソフルラン麻酔下で背部を剪毛、毛剃毛し、テープストリッピング法により損傷皮膚とした。その後、 $[^{14}\text{C}]$ OT 経皮投与液を 50mg/1.30MBq/4ml/kg の用量で塗布したリント布を背部に貼付、8時間、24時間経皮投与した。投与終了後、リント布を剥離し、イソフルラン吸入麻酔下、炭酸ガスの過剰吸入により安楽死させ、全身オートラジオグラフィを作成した。投与後代謝ケージに収容し、採尿期間は投与開始後 0～4 時間、4～8 時間、8～24 時間の 3 時点とした。

4. 皮下注射実験

芳香族アミン類の体内動態を解析するため、吸収量が把握しやすい皮下投与法を用いて、投与後の血液や他の組織における OT やその代謝物の動態を測定した。同時に肝臓や膀胱組織における DNA 損傷も解析し、OT の体内動態との関連を検討した。雄性 F344 ラット(8 週齢)を用い、0、450 mg/kg の用量で単回皮下投与を行った。溶媒はコーン油とし、対照群には同等量のコーン油を投与した。投与 16 時間後に、血液、肝臓、膀胱を採材した。尿は採材時に膀胱から穿刺し採取した。血中、肝臓、尿中の OT および 2AMC は LC/MS/MS により解析を行った。膀胱においては DNA 損傷マーカーである $\gamma\text{-H2AX}$ をウェスタンブロッティング法により検出した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施にあたって、当研究所の動物実験委員会の承認を受け、動物実験指針に沿って実験を行った。

C. 研究結果

1. OT やその代謝物の分析条件の検討

まず、標準物質を用いて検討した結果、分析アプリケーションの組成を水、アセトニトリル、

ギ酸にすることで、OT の溶出、感度ともに十分な分析結果が得られた。また、尿の分析についてはダイレクト注入やアセトニトリル、アセトン水(アセトン 80%)、メタノール抽出などを検討し、それぞれの条件下での回収率を求めた。血液、肝臓などの生体試料については PCA による除タンパク及び炭酸カリウムによる中和で、回収率を改善することも判明した。以上種々の検討から、LC/MS/MS 法を用いて OT やその代謝物の分析条件を確立した。

2. 経皮吸収実験及び経皮塗布実験

この方法を用いたところ、経皮投与 16 時間後に至るまで、貼付けたリント布が印を記した四隅の位置に固定されていた(図 2)。採材した血液、肝臓、尿管、膀胱、皮膚、採材時に膀胱から穿刺し採取した尿中の OT および 2AMC は現在解析中である。



図 2. リント布が貼付部として印をした四隅に固定されていた様子(投与 16 時間後、麻酔下)

3. オートラジオグラフィー実験

投与後 8 時間で腎臓、膀胱等に放射活性が高く、それらの臓器に移行していることが観察

された(図 3)。一方、投与後 24 時間では 8 時間に比べると各臓器の分布濃度が減少していた。尿中排泄率からも投与後 0～8 時間の間で投与した OT 濃度の 76%が排泄されていた(表 1)。これらの結果から、OTは投与後、速やかに経皮吸収され、腎臓(腎盂)、膀胱等に高濃度で移行すること、また、8 時間以内に投与量の大部分が尿中へと排泄されることが明らかとなった。

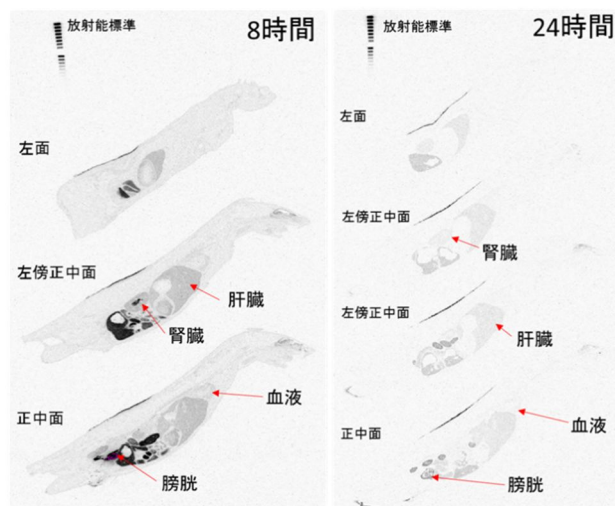


図 3. 雄性ラット $[^{14}\text{C}]$ o-トリレインを 50 mg/1.30 MBq/4 ml/kg の用量で単回経皮投与後の全身オートラジオグラム

表 1. 非絶食下の雄性ラット $[^{14}\text{C}]$ OT を 50 mg/1.30 MBq/4 ml/kg の用量で単回経皮投与後の尿中排泄率

採取期間	(% of dose)	
(h)	区間排泄率	累積排泄率
0～4	35	35
4～8	41	76
8～24	8.3	84.3

4. 皮下注射実験

血中、肝臓中、尿中の OT および 2-amino-*m*-cresol (2AMC) 濃度は、投与用

量を反映し 450mg/kg 群では対照群に比べ高値であった(表 2)。今回の採材時間においては、血中より尿中の濃度が著しく高く、皮下投与後 OT の代謝が進み膀胱内に移行したことを示唆する。また、膀胱では 450mg/kg 群で、対照群と比較して有意に高い γ -H2AX が検出された(図 4)。

表 2. OT を 450 mg/kg の用量で単回皮下投与 16 時間後の尿・血中の OT および 2AMC 濃度

血中		
	OT (nmol/ml)	2AMC (nmol/ml)
Control	0.051 \pm 0.0056	0.001 \pm 0.0006
OT 450mg/kg b.w.	1061.3 \pm 142.75	0.252 \pm 0.069
尿中		
	OT (nmol/ml)	2AMC (nmol/ml)
Control	0.195 \pm 0.084	0.0696 \pm 0.024
OT 450mg/kg b.w.	6711.6 \pm 2936.5	47.961 \pm 13.419

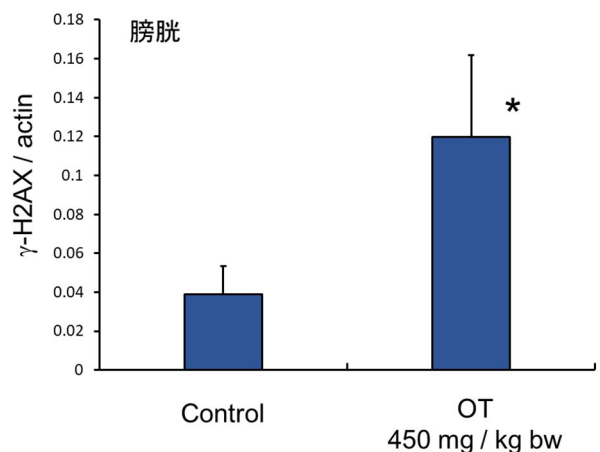


図 4. OT を 450 mg/kg の用量で単回皮下投与 16 時間後の膀胱における DNA 損傷誘導

D. 考察

LC/MS/MS 法を用いて、生体試料中の OT やその代謝物の測定について検討を行った結果、入手可能な 11 物質に関しては 1 物質を除き、残りすべての物質を分離分析できるようになった。個別の代謝物(4AMC)の測定は生体試料中の他の物質の影響を受けることが見られたが、血液処理の条件を改良することに

より改善された。代謝物の抱合体(硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体)については、市販の標準物質はないため、現在、加水分解等の分析方法を検討中である。

経皮吸収実験用の塗布方法を用いると、的確な用量の被験物質が成熟ラットに作用できることが確認できた。また、非吸収性フィルムに合わせてプラスチックフィルムを胴体に巻くことにより、密閉性が担保されているため、経気道経由の被験物質のばく露の可能性を除外できると考えられる。一匹当たりの処置時間がかかるので、一回の実験に 10 匹程度の準備が限界であった。今後さらに用量依存性、経時の変化を調べるための個体群も用意する必要があると考える。

体内動態については、OT 投与後、速やかに経皮吸収され、腎臓(腎盂)、膀胱等に高濃度で移行すること、また、8 時間以内に投与量の大部分が尿中へと排泄されることが明らかとなった。

我々は培養細胞を用いた検討において、OT 代謝物の中でも 2AMC が特に強い DNA 損傷性を示すことを既に明らかにしているが、本検討においては、ラットにおいて OT 皮下投与後 16 時間時点で、その 2AMC が膀胱内に高濃度で存在し、実際にその膀胱内で DNA 損傷が誘発されていることを明らかにした。

E. 結論

OT の経皮吸収性を検討するため、その皮膚ばく露方法を確立し、また皮膚経路での投与後の体内動態をおおむね解明することができた。また、OT 投与による動物膀胱組織における DNA 損傷誘導と、OT 代謝物の関与を初めて示した。本研究で得られたこれら知見は、OT の発がんメカニズム解明に大きく寄与するものであると考えられる。

参考文献

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. 災害調査報告書 A-2015-07: 福井県内の化学工場で発生した膀胱がんに関する災害調査. (<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11305000-Roudoukijunkyokuanzeniseibu-Kagakubushitsutaisakuka/0000126164.pdf>)

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

柳場由絵, 須田 恵, 豊岡達士, 小林健一, 王 瑞生, 甲田茂樹(2017) o-トルイジンの代謝経路および代謝酵素に関する検討. 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録集, p23.

須田 恵, 柳場由絵, 小林健一, 祁 永剛, 豊岡達士, 王 瑞生, 甲田茂樹(2017) 血液、組織、尿中の芳香族アミン類の分析方法の開発 -1. 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録集, p24.

Yonggang Qi, Tatsushi Toyooka, Hisayoshi Ohta, Rui-Sheng Wang (2017) 2,4-Dimethylaniline induces phosphorylated histone H2AX in human liver and bladder cell lines. 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録集, p25.

豊岡達士, 柳場由絵, 小林健一, 須田 恵, 王 瑞生, 甲田茂樹(2017) 三次元ヒト皮膚モデルを用いた芳香族アミン類の皮膚透過性に関する検討. 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録集, p26.

柳場由絵, 須田 恵, 豊岡達士, 小林健一, 王 瑞生, 甲田茂樹(2017))o-トルイジンの代謝への Cytochrome450 の作用について. 日衛誌第 73 巻, 第 88 回学術総会講演集, p56.

豊岡 達士, Yonggang QI, 柳場 由絵, 伊吹裕子, 太田 久吉, Rui-Sheng WANG (2017) 芳香族アミン5種によるヒト膀胱細胞におけるヒストン H2AXリン酸化誘導に関する研究, 第46回日本環境変異原学会, 抄録集, p24.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
特に無し

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業補助金(厚生労働科学特別研究事業)
分担研究報告書

化学防護手袋の o-トルイジン透過性試験

研究代表者	武林 亨	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学 教授
研究協力者	田中 茂	十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科 教授
研究協力者	和田丈晴	一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所 環境技術部技術課

研究要旨

本研究の目的は、o-トルイジン(以下、OTD)取扱い作業場における化学防護手袋(以下、手袋)の透過性能を確認し、OTD の経皮吸収曝露について予測するとともに、今後の経皮吸収による曝露を軽減するために、透過しにくい素材による手袋の選定と、現場での簡易的な透過検知(交換時期)を推定する手法の開発について検討することである。

今年度は、膀胱がんを発症した事業場で長期間使用してきた2種類の天然ゴム製手袋(手袋(a)は乾燥工程、手袋(b)は反応工程で主に使用)を対象に、OTD に対する透過時間の測定を行った。その結果、JIS 規格の基準である標準透過速度 $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ に達するまでの時間は手袋(a)で3回の平均 150 分(130 分～180 分)、手袋(b)で3回の平均 105 分(76 分～131 分)であった。当時、事業場における手袋の交換の指標は、手袋の透過時間(耐透過)を考慮されてなく、手袋が切れたり、穴があくなどの物性的な変化(耐劣化)であったため、手袋(a)は 16 日/人・双、手袋(b)は 42 日/人・双と、作業者は1双の手袋を長期間使用していたのが実態であった。すなわち、OTD 取扱い作業において作業者は天然ゴム製手袋を長い期間にわたり装着使用した結果、手袋表面に付着した OTD が透過により手袋内側に達し、手表面から経皮吸収により OTD に曝露したことが推察された。

今後、OTD 曝露が大きかったと思われる反応工程での使用状況である OTD と有機溶剤の共存下における天然ゴム製手袋の透過時間の測定、OTD の透過しにくい素材の手袋の開発、および手袋内の簡易的な透過検知(廃棄の確認)等について研究を行いたいと考える。

研究協力者

霜島雅明 一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所環境技術部技術課

A. 研究目的

o-トルイジン(以下、OTD)取扱い作業場で使用されていた2種類の天然ゴム製の化学防護手袋(以下、手袋)を対象に、OTD に対する透過時間の測定を行った。

B. 研究方法

手袋(a)の透過試験

a-1. 試験機関: 一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所

a-2. 試料:

天然ゴム手袋: サイズ L BP-421 オカモト株式会社 厚さ 0.62 ~ 0.70 mm

a-3. 対象試液 OTD (濃度>99%、東京化成工業製)

a-4. 試験方法

(1) 試験操作

JIS 規格¹⁾に従い、下記の手順に従って試験を実施した。試験状況の概要を図1に示す。

1) 試料の手首部分を試験片として切り取り、透過セルにセットし、槽内温度を 23℃ に設定した恒温槽に設置した。

2) 透過セルの気体側に純空気を 0.5 L/min で通気した。

3) 透過セルの液体側に対象試液を注入した。

4) 透過セルの気体側出口に接続した三方コックのバイパス側に TENAX 捕集管(TD Glass Tube Tenax TA 60/80, CAMSCO 製) 及び吸引ポンプ(pocket pump, SKC 製)を接続した。

5) 排出される空気中の OTD を 50 mL/min で 1 分間捕集した。捕集は対象試液の注入から 10 分間隔とした。

6) 排出空気を捕集した TENAX 捕集管を、加熱脱着装置付ガスクロマトグラフ質量分析計(TD-GCMS)に供し、OTD の透過量を測定した。

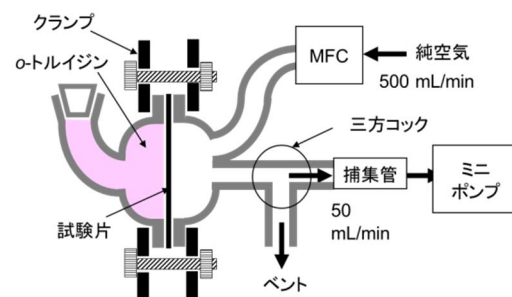


図1 試験状況概要

(2) TD-GC-MS 測定条件

加熱脱着装置: TD-100xr (Markes 製)

ガスクロマトグラフ質量分析計: 7890N + 5977

(Agilent Technologies 製)

試料注入法: スプリット(4 : 1)

捕集管加熱温度: 280 (10 min)

トラップ捕集温度: 5

トラップ加熱温度: 300 (10 min)

使用カラム: Equity-1 (内径 0.32 mm、長さ 60 m、膜厚 5.0 μm) (Supelco 製)

カラム温度: 40 (7 min) (3 /min) 100 (8 /min) 280 (10 min)

キャリアーガス: He (2 mL/min)

検出法: 選択イオン検出(SIM)法

測定イオン: 定量イオン m/z107

確認イオン m/z77

(3) 透過速度の算出及び評価

式(1)に従い、対象試液注入後の各時間における透過速度を算出した。

$$V = \frac{M}{A \times T} \quad \dots\dots (1)$$

V: 透過速度(μg/cm²/min)

M: OTD の透過量(μg)

A: 化学物質と接する試験片の面積= 18.8 cm²

T: ガス採取時間= 1 min

標準透過速度(破過基準)は $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ とし、これを超えた測定時間(経過時間)のひとつ前の測定時間を標準破過点検出時間(透過時間)とした。

手袋(b)の透過試験

b-1. 試験機関:TUV RHEINLAND JAPAN LTD.(テュフ・ラインランド・ジャパン(株))

手袋等の透過試験の検査機関に試験依頼した。

b-2. 試料:

天然ゴム手袋:作業短手袋3号 弘進株式会社 厚さ 0.90 mm

b-3. 対象試液OTD (濃度 >99.5%)

b-4. 試験方法

・試験前:48時間 温度 $26.5 \sim 27.5$ 、相対湿度 $45 \sim 55\%$ で放置

・試験は 27 で実施

・分析方法:ガスクロマトグラフ

・標準透過速度(破過基準): $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ に達した測定時間(経過時間)を標準破過点検出時間(透過時間)とした。

(倫理面への配慮)

本研究では個人を特定できるような情報は含まれていないため、倫理的配慮は不要と判断した。

C. 研究結果

(1)手袋(a)の透過試験結果

透過速度の経時変化を図2に、標準破過点検出時間を表1に示す。

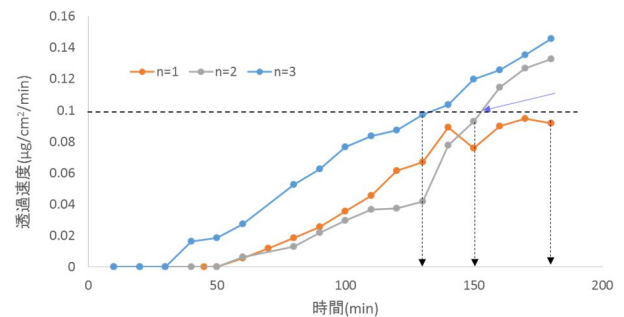


図2 手袋(a)における透過試験結果

表1 手袋(a)における標準破過点検出時間

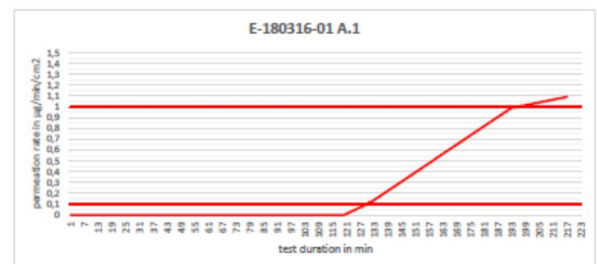
n	標準破過点検出時間 (min)
1	180*
2	150
3	130
平均	150

* 180 min においても標準透過速度に達しなかったため、180min を標準破過点検出時間とした。

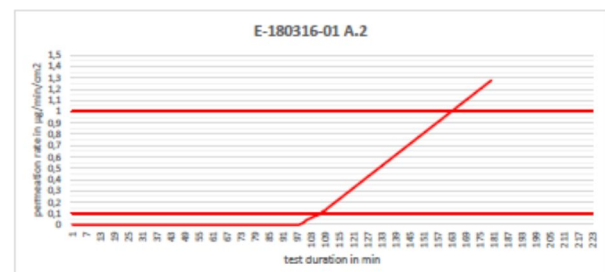
(2)手袋(b)の透過試験結果

透過速度の経時変化を図3に、標準破過点検出時間を表2に示す。

Permeationrate chart E-180316-01 A.1



Permeationrate chart E-180316-01 A.2



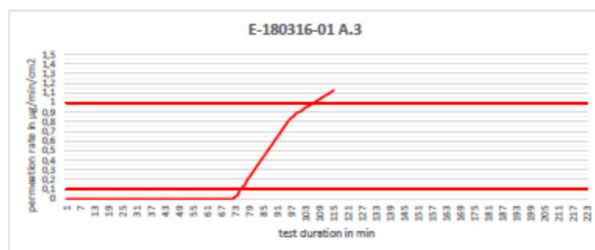


図3 手袋(b)の透過試験結果

表2 手袋(b)における標準破過点検出時間

N	標準破過点検出時間 (min)
1	131
2	108
3	76
平均	105

D. 考察

我が国では、戦前から化学防護手袋として天然ゴム製が使用され、戦後、石油化学の進歩により塩化ビニール製、ニトリル製等、新しい素材の手袋が開発されてきた²⁾。天然ゴム製手袋は丈夫で、比較的安価であること等より、現在でも多くの工場、化学実験を行っている研究所や大学において使用されている。

手袋の素材ごとに化学物質に対する透過時間が一覧になっている Quick Selection Guide to Chemical Protective Clothing³⁾を用いて、例えば有機溶剤中毒予防規則で規定している物質のうち、天然ゴム製手袋の透過試験が行われている38物質の透過時間は全て60分未満であった。また、特定化学物質障害予防規則で規定している化学物質のうち、天然ゴム製手袋の透過時間が得られている56物質のうち、50物質が60分未満であると記載されている。これらのことから、多くの化学物質に対する天然ゴム製手袋の透過時間は短い傾向であると

いえる。

今回の OTD に対する透過試験の結果より、手袋(a)の透過時間は3回の平均150分(130分～180分)であり、手袋(b)の透過時間は3回の平均105分(76分～131分)であった。手袋(b)の3回目の試験で透過時間76分と他の試験結果に比べ短い透過時間であったのは、溶着されている手袋の親指の部位を対象に透過試験を行ったことによる。このように溶着した接合部は OTD を透過しやすいことを示唆する結果であった。

手袋(a)は、主に乾燥工程(製品の袋詰め作業を含む)で、手袋(b)は、反応工程(原料から)で使用されていた。当時、事業場における手袋の交換時期は、手袋の透過時間(耐透過)を認識していなかったため、手袋が切れたり、穴があくなどの物性的な変化(耐劣化)を指標にしていた。そこで、手袋の使用期間(交換時期)について確認したところ、年間手袋購入数量と使用者数から計算で試算したところ、手袋(a)は約16日/人・双であり、手袋(b)は、約42日/人・双であり、作業者は1双の手袋を長期間使用していたことが推定された。

平成28年の災害調査報告書⁴⁾から、調査時に使用後の天然ゴム製手袋内側をメタノールで洗浄し、メタノールに溶解した OTD を分析した結果、6名の手袋内側から OTD が検出された。更に作業者の手袋内側の OTD 付着量と尿中代謝物の関連については例数が少なかったため、統計的な相関は得られなかったが、手袋を透過した OTD が経皮吸収曝露に影響していることが示唆された。

化学防護手袋の透過時間に与える因子(手袋の素材内を、化学物質(分子)の拡散に影響を与える因子)としては(1)手袋の素材(重要)(2)手袋の製法、素材への混合物 (3)手袋の素材の厚さ (4)手袋の使用において共存する

化学物質 (5)使用温度 (6)手袋と化学物質との接触時間等があげられる。

OTD を取り扱う作業において推奨する手袋(透過時間の長い手袋)として、NIOSH⁵⁾はブチル製、ポリビニルアルコール製、シルバーシールド (PE/EVOH/PE) を、Quick Selection Guide to Chemical Protective Clothing³⁾において OTD に対して 8 時間以上の透過時間を記載している素材は、ブチル製、バイトン製、バイトン/ブチルゴム製、シルバーシールドを、研究分担者(田中茂)が作成した化学防護手袋のためのケミカルインデックス⁶⁾ではブチル製、シルバーシールド、フッ素ゴム製が挙げられている。これらの手袋と共に、良好な透過性能を有する中敷きの手袋(EVOH 製、ポリアミド製など)を組み合わせる使用することにより、より OTD の経皮吸収を削減することが期待できると思われる。

更に、現場で使用している手袋の交換(廃棄)する時期を推定する試験として、作業後の手袋内の OTD 濃度の測定を、検知管やセンサー(PID,半導体)等の簡易測定器による使用が有効であると思われ、今後の研究に期待したい。

E. 結論

OTD 取扱い作業場で使用されていた 2 種類の天然ゴム製手袋を対象に、OTD に対する透過時間の測定を行い、手袋(a)の透過時間は平均 150 分(130 分～180 分)であり、手袋(b)は平均 105 分(76 分～131 分)であった。当時、手袋の交換は OTD の透過時間を考慮せず、手袋が切れたり、穴があく等の物性的な変化が起きるまで使用していた。すなわち、作業者は1双の手袋を長期間使用していたことにより、OTD が手袋内を透過して手袋内側に達し、手表面より経皮吸収が発生していたことが推察された。

今後、OTD 曝露が大きかったと予想される反応工程の使用状況である OTD と有機溶剤の共存下における天然ゴム製手袋の OTD の透過時間への影響、OTD に対して透過しにくい手袋素材の試験、および簡易的測定器を活用した OTD の透過による手袋の交換(廃棄)時期の推定等について研究を行いたいと考える。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

・和田丈晴、霜島雅明、田中茂:化学防護手袋の o-トルイジン透過性、第 45 回日本産業衛生学会産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2017 年 10 月(鶴岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし

