

平成 30 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

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がん発生のメカニズムはいまだ明らかでない点が多く、本研究では①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、②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がんに関わる分子メカニズムの解明を目指す。①ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究に関して本年度は芳香族アミン取扱事業所で発生したヒト膀胱がん、比較対象として芳香族アミン類の暴露のない膀胱がんについて次世代シーケンサーを用いたがん関連遺伝子の変異解析を行ったが、両者の遺伝子変異には大きな違いは認められなかった。②動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価に関して本年度は AAOT の 2 段階膀胱発がん試験を施行した。6 週齢の F344 ラットに既知の膀胱発がん物質である BBN を 4 週間飲水投与後、AAOT を混餌で 0%、0.167%、0.5%、1.5%濃度で 36 週まで投与したところ、0.5%以上の AAOT 投与群では膀胱腫瘍の発生数、発生率が有意に増加していた。また、AAOT 投与群では、o-toluidine (OTD) が尿中 AAOT、OTD 代謝物よりも著明に高濃度で検出された。これらの結果から、AAOT が膀胱発がん促進作用を有すること、AAOT が既知の膀胱発がん物質である 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が高いことが明らかとなった。次年度以降は AAOT の詳細な発がんメカニズムについて検討を行う予定である。

研究協力者

魏民、行松直、奥野高裕 (大阪市立大学)、柳場由絵、須田恵、甲田茂樹 (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)

## A. 研究目的

芳香族アミンによる膀胱がん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がんについて、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

### ①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標本を作製して病理組織学的検討を行う。また、遺伝子を抽出し、次世代シーケンサー(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がんの遺伝子変異解析結果を、芳香族アミンの曝露がない膀胱がん症例や既存の膀胱癌変異遺伝子データベース(TCGA)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30年度は職業性膀胱がん7例と比較対象として芳香族アミン非暴露膀胱がん8例(病理学的進行度をマッチングした大阪市立大学附属病院の膀胱がん症例)を解析した。ニードルダイセクション法によってFFPEブロックの腫瘍部を切り出し、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN)を用いてDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析を行った。

### ②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。1および2は前年度までに解析を終了しており、平成30年度は3の2段階膀胱発がん試験を行った。

2段階膀胱発がん試験では6週齢の雄雌F344ラット162匹(雄81匹、雌81匹)を雄雌それぞれ4群ずつ、計8群に群分けした。既知の膀胱発がん物質であるN-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN)を4週間飲水投与し、1週間の休薬期間の後、AAOTを0%、0.167%、0.5%、1.5%濃度で31週間混餌投与し、解剖を行った(図1)。観察期間中には毎週飲水量、摂餌量、および体重を測定した。解剖時には膀胱を採取して重量を測定し、ホルマリン注入固定後に病理組織学的な検索を行った。

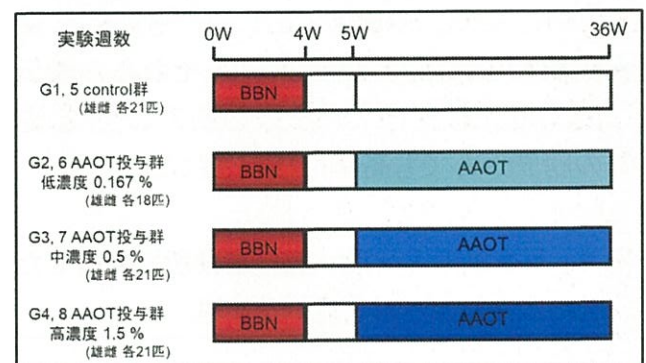


図1. AAOT 2段階膀胱発がん試験の実験プロトコール

### (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脱血による安楽死を施行している。

### C. 研究結果

#### ①ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究

同意を得られた職業性膀胱がん罹患患者 7 名の FFPE ブロックから 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が可能であった。比較対象としての芳香族アミン非暴露群の膀胱がん症例では全例で遺伝子変異解析が施行できた。芳香族アミン暴露群と非暴露群で変異の頻度が高かった遺伝子について、TCGA データベースで報告されている変異率を加えて表1に示す。芳香族アミン暴露群ではこれまで膀胱がんで変異率が高いと報告されている TP53 や FGFR3 などが全例で確認され、さらにこれまでの報告では変異率が低い FLT3、KDR、STK11、PDGFR、APC、ERBB4、RET など高率に変異が認められた。しかしながら、それらの遺伝子変異は比較対象である芳香族アミン非暴露群の膀胱がんでも高率に検出された。

表 1. 芳香族アミン取り扱い事業所で発生した膀胱がんで検出された遺伝子変異

	芳香族アミン 曝露群(n=6)	芳香族アミン 非曝露群(n=8)	TCGA2017 (n=412)
TP53	6 (100%)	7 (87.5%)	198 (48.1%)
FGFR3	6 (100%)	8 (100%)	58 (14.1%)
FLT3	6 (100%)	8 (100%)	10 (2.4%)
KDR	6 (100%)	8 (100%)	17 (4.1%)
STK11	6 (100%)	7 (87.5%)	0 (0%)
PDGFRA	6 (100%)	8 (100%)	15 (3.7%)
APC	6 (100%)	8 (100%)	25 (6.1%)
ERBB4	5 (83.3%)	6 (75%)	13 (3.2%)
RET	5 (83.3%)	7 (87.5%)	9 (2.2%)
CSF1R	4 (66.7%)	7 (87.5%)	11 (2.7%)
PIK3CK	3 (50%)	2 (25%)	91 (22.1%)
HRAS	3 (50%)	2 (25%)	18 (4.4%)
ALK	3 (50%)	2 (25%)	13 (3.2%)

#### ②動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

2 段階膀胱発がん試験の一般状態を表 2 に示す。体重は雄では AAOT1.5%投与群、雌では AAOT0.5%以上の投与群で有意な低下が認められた。飲水量や摂餌量は雄雌ともにコントロール群と AAOT 投与群で差はみられなかった。

36 週時のラット尿中の AAOT、o-toluidine(OTD)及び OTD 代謝物の濃度を表 3 に示す。AAOT 投与群では、OTD が AAOT、OTD 代謝物よりも著明に高濃度で検出された。AAOT 投与群では、濃度依存性に AAOT、OTD 及び OTD 代謝物いずれも濃度上昇が認められた。

膀胱断面の肉眼像を図 2 に示す。雄雌ともに AAOT 投与群では結節性病変や腫瘍性病変の数が増加しており、腫瘍径が増加していた。膀胱重量は雄雌ともに 0.5%以上の AAOT 投与群で有意に増加していた(図 3)。病理組織学的に検討し、PN hyperplasia、papilloma、urothelial carcinoma および papilloma と urothelial carcinoma を合わせて total tumor として分類した。病変それぞれの発生率や発生数を表 4 に示す。雄雌ともに 0.5%以上の AAOT 投与群で urothelial carcinoma の発生率が有意に増加しており、雄の 0.5%以上投与群と雌の 1.5%投与群で total tumor の発生率が有意に増加していた。また、雄の 1.5%投与群と雌の 0.5%以上投与群で urothelial carcinoma と total tumor の発生数が有意に増加していた。

表 2. AAOT 2 段階膀胱発がん試験 (一般状態)

Group	AAOT (%)	No. of rats	Final body weight (g)	Average food consumption (g/day/rat)	Average water consumption (g/day/rat)	Daily intake of AAOT (g/kg b.w./day)
<b>Male</b>						
G1	0	21	403.6 ± 19.5	14	19.4	0
G2	0.167	18	411.7 ± 19.1	14	19.8	0.07
G3	0.5	21	406.4 ± 14.1	14.2	19.8	0.21
G4	1.5	21	364.4* ± 14.3	14.1	19.2	0.65
<b>Female</b>						
G5	0	21	206.2 ± 8.3	9.1	14.6	0
G6	0.167	18	202.7 ± 8.2	9.2	15.4	0.08
G7	0.5	21	196.5* ± 6.5	9.1	14.8	0.25
G8	1.5	21	185.8* ± 5.4	8.4	14.6	0.71

Significant differences compared with the control group (\*p<0.05)

表 3. AAOT 2 段階膀胱発がん試験 (尿中代謝物)

Group	AAOT (%)	No. of rats	Urinary metabolites (µM)			
			AAOT <sup>a</sup>	OTD <sup>b</sup>	NAOTD <sup>c</sup>	4AMC <sup>d</sup>
<b>Male</b>						
G1	0	3	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
G2	0.167	3	2.7 ± 0.3	69.6 ± 38.3	9.0 ± 2.0	1.2 ± 0.2
G3	0.5	3	12.4 ± 5.1	392.7 ± 101.0	28.7 ± 7.5	18.1 ± 13.2
G4	1.5	3	57.6 ± 37.7	3749.6 ± 580.0	44.9 ± 8.6	163.7 ± 65.8
<b>Female</b>						
G5	0	5	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1
G6	0.167	3	1.6 ± 0.3	17.0 ± 13.9	4.0 ± 1.9	0.9 ± 1.6
G7	0.5	3	4.5 ± 1.1	106.8 ± 22.4	26.5 ± 6.0	13.5 ± 11.7
G8	1.5	5	24.6 ± 19.4	1191.1 ± 674.0	39.1 ± 15.5	78.9 ± 45.8

<sup>a</sup> acetoacetyl-toluidide  
<sup>b</sup> toluidide  
<sup>c</sup> N-acetyl-toluidide  
<sup>d</sup> 4-aminom-cresol

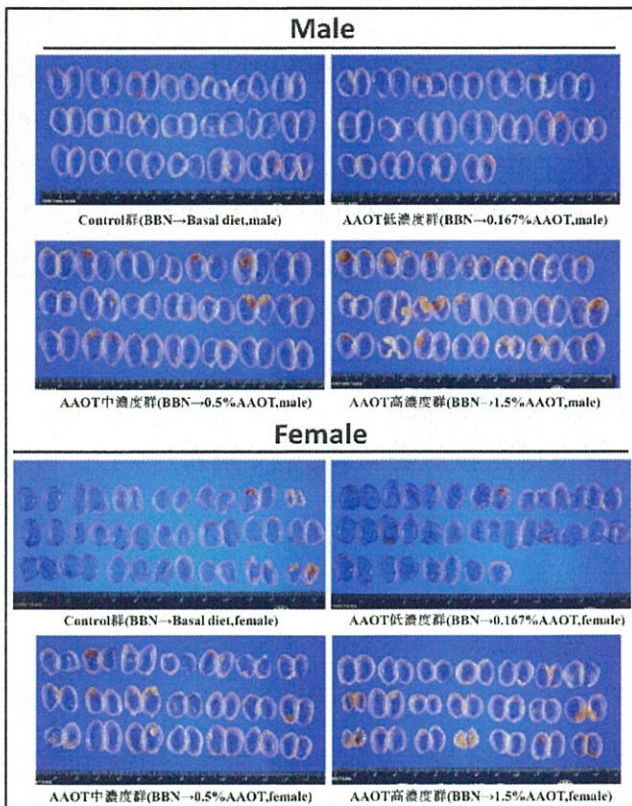


図 2. AAOT 2 段階膀胱発がん試験 (膀胱肉眼像)

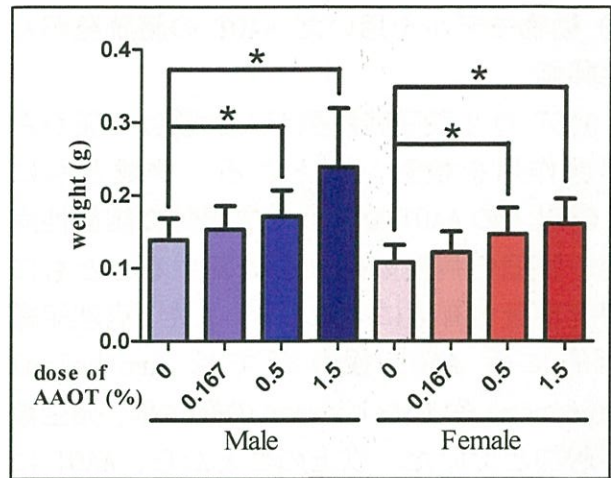


図 3. AAOT 2 段階膀胱発がん試験 (膀胱重量)

表 4. AAOT 2 段階膀胱発がん試験 (膀胱腫瘍の発生率、発生数)

Group	AAOT (%)	No. of rats	Incidence (%)				Multiplicity			
			PN hyperplasia	Papillomas	Urothelial carcinomas	Total tumors	PN hyperplasia	Papillomas	Urothelial carcinomas	Total tumors
<b>Male</b>										
G1	0	21	14 (66.7%)	8 (38.1%)	3 (14.3%)	10 (47.6%)	1.1 ± 1.1	0.5 ± 0.7	0.1 ± 0.4	0.6 ± 0.7
G2	0.17	18	17 (94.4%)*	11 (61.1%)	4 (22.2%)	13 (72.2%)	2.7 ± 1.7*	0.7 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.9 ± 0.8
G3	0.5	21	21 (100%)*	14 (66.7%)	10 (47.6%)*	18 (85.7%)*	3.0 ± 1.6**	0.8 ± 0.7	0.6 ± 0.8	1.4 ± 1.0
G4	1.5	21	21 (100%)*	20 (95.2%)*	18 (85.7%)*	21 (100%)*	5.4 ± 3.0**	2.0 ± 1.2**	1.2 ± 0.9**	3.2 ± 1.5**
<b>Female</b>										
G5	0	21	16 (76.2%)	5 (23.8%)	3 (14.3%)	7 (33.3%)	1.2 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.4	0.4 ± 0.6
G6	0.17	18	16 (88.9%)	8 (44.4%)	5 (27.8%)	11 (61.1%)	2.3 ± 2.1	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.7 ± 0.7
G7	0.5	21	21 (100%)*	8 (38.1%)	10 (47.6%)*	14 (66.7%)	3.5 ± 2.5**	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.6*	1.0 ± 1.0*
G8	1.5	21	21 (100%)*	11 (52.4%)	11 (52.4%)*	17 (81.0%)*	4.7 ± 3.0**	0.9 ± 1.0	0.5 ± 0.5*	1.4 ± 1.1**

Significant differences compared with the control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

#### D. 考察

##### ① ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究

次世代シーケンサーを用いた芳香族アミン暴露群の膀胱がんではこれまで変異率が高いと報告されている遺伝子に加え、変異率が低い複数の遺伝子にも変異が高率で認められた。しかしながら、それらの変異は芳香族アミン暴露のない膀胱がんと同程度に検出されたことから、芳香族アミン暴露による特徴的な変異は同定できなかった。今回用いた実験手法によって非特異的に検出されてしまう変異あるいは日本人特有の変異である可能性がある。来年度は、特異的な塩基変化や、変異数などより詳細な検討を行う予定である。

## ② 動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

AAOT の 2 段階膀胱発がん試験にて発がん促進作用を検討したところ、雄雌ともに 0.5%以上の AAOT 投与群で肉眼的に結節性病変や腫瘍性病変の増加を確認するとともに、膀胱重量が有意に増加した。また、病理組織学的にも AAOT 投与群では urothelial carcinoma や total tumor の発生率、発生数が増加していた。以上のことから、AAOT にはラット膀胱に対して発がん促進作用を有することが明らかとなった。また、AAOT 投与群では尿中 AAOT と比較し、OTD が著明に高濃度で検出され、OTD 代謝物も検出された。このことから AAOT が既知の膀胱発がん物質である 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が高い。

OTD の主な発がんメカニズムとして、OTD の代謝物である N-hydroxyl-OTD が膀胱上皮に DNA 付加体を形成し DNA 損傷を引き起こすこと<sup>1)</sup>、OTD の別の代謝物である N-acetyl-4-amino-m-cresol が膀胱上皮細胞増殖及び DNA 損傷を引き起こす活性酸素種を生成すること<sup>2)</sup>が知られている。

今回、AAOT 投与群の尿中代謝物に N-acetyl-o-toluidine と 4-amino-m-cresol が検出された。これらの代謝産物である N-acetyl-4-amino-m-cresol も尿中に検出され活性酸素種の産生が示唆される。このことから AAOT による膀胱発がんに関与していると考えられる。

今後、AAOT の膀胱発がんメカニズム、AAOT の代謝メカニズムについて更なる検討が必要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) DNA adducts of ortho-toluidine in human bladder. Bohm F, Schmid D, Denzinger S, Wieland W.F, and Richter E. Biomarkers. 2011; 16(2)、120-8.
- 2) Establishing a total allowable concentration of o-toluidine in drinking water incorporating early lifestage exposure and susceptibility. English J. C, Bhat V. S, Ball G. L, and McLellan C. J. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2012; 64(2)、264-84

## E. 結論

ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究では、芳香族アミン暴露群の膀胱がんに関与する遺伝子変異は認められなかった。

動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価では、AAOT はラット膀胱に対して発がん促進作用を有することが明らかとなった。AAOT が代謝され OTD が尿中に排泄されることが AAOT の毒性や膀胱発がん促進作用に関与している可能性が高い。

## 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

- 1) Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats. Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G、

Endo Y, Wanibuchi H. Toxicol Sci. in press. 2019.

## 2. 学会発表

1) 行松 直、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討. 第 35 回日本毒性病理学会総会、東京 (2019.1)

2) 奥野高裕、行松 直、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析. 第 18 回分子予防環境医学研究会大会、名古屋 (2019.01)

3) 奥野高裕、行松 直、藤岡正喜、梯アンナ、魏 民、神吉将之、鰐渕英機. Induction of cell proliferation and DNA damage by Acetoaceto-o-toluidide (AAOT) in the urinary bladder of rats. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018.9)

4) 行松 直、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、梯 アン ナ 、 鰐 渕 英 機 . o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討. 第 33 回発癌病理研究会、静岡 (2018.8)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
特になし

平成 30 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

芳香族アミン類取扱い作業等、経皮曝露を伴う健康リスク評価のあり方の検討

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**

芳香族アミン類取り扱い作業者の尿中ばく露評価用のマーカーを検討するため、前年度で確立した LC/MS/MS 法の条件で、オルト-トルイジン(OT)を含む数種類の芳香族アミン類を取り扱った作業者の尿サンプルの分析を試みた。また、最適な採尿タイミングを検討するため、ラットに背部皮膚に OT を塗布した後、血中、及び尿中における OT(未代謝体)とその代謝物の経時変化を解析した。作業員から採集したすべての尿から OT を含む 5 種類の芳香族アミン類(未代謝体)、またはその代謝物が検出され、その濃度は作業後のほうが高かった。本研究で検討した測定条件・方法は作業員の尿サンプルにも適用できることが確認され、また各物質のばく露マーカーの選択に有用な情報が得られた。OT のラット経皮ばく露実験から、OT の血中濃度は 4 時間、尿中濃度は 8 時間でピークに達し、16 時間後は著しく減少することが明らかとなった。本結果は、培養ヒト 3 次元皮膚モデルを用いた実験で明らかとなった芳香族アミン類の高い皮膚透過性が、動物実験においても裏付けられたものと考えられる。今年度の研究で得られた知見は芳香族アミン類の経皮を含むばく露に対する生物学的モニタリング手法の開発に寄与すると思われる。

**研究協力者**

小野真理子、柳場由絵、小林健一、須田 恵、豊岡達士

## A. 研究目的

福井県の事業所で、オルト-トルイジン(OT)を含む芳香族アミンを取り扱う作業従事者に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による現場調査の結果から、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報告された<sup>1)</sup>。この報告により、芳香族アミン類の皮膚吸収性の評価、代謝・体内動態の解明が重要であり、これらの物質に対する適切な生物学的モニタリング指標の開発が必要である。H28年度は、ヒト3次元皮膚モデルを用いて芳香族アミン類の皮膚透過性を比較検討した。H29年度は、動物にOTを皮下投与し、OT(未代謝体)およびその代謝物の測定方法の検討、経皮吸収後の体内動態について検討した。

今年度は、芳香族アミン類の経皮吸収を想定したばく露バイオマーカーの確立に資する知見を得ることを目的に、前年度の動物実験で確立した解析方法を利用し、作業員尿における芳香族アミン類およびその代謝物の測定方法を検討した。また、ラットにおけるOT経皮ばく露実験において、経皮投与後のOT及び代謝物の経時的変化についてより早いタイムポイントを加えて分析することで、経皮吸収の速さについて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 作業員尿における芳香族アミン類の分析方法の検討

OTを含む数種類の芳香族アミン類を使用し、これらが複合曝露する可能性のある工場で働く作業員12名と事務員1名から尿の提供を受けた(36検体)。LC/MS/MSにおける測定物質は、5種類(オルト-トルイジン(OT)、アニリン(ANL)、2,4-ジメチルアニリン(DMA)、アニシジン(ANS)、パラトルイジン(PT))の芳香族アミン類(未代謝体)、

およびこれらの代謝物の内、硫酸抱合やグルクロン酸抱合がされていない遊離の物質31種類に加え、タバコに含まれる2-ナフチルアミンと4-アミノビフェニル等、計34種類とした。

尿試料を二つに分け、分析する34種類の標準物質の混合液(アセトニトリルに溶解)を添加した尿試料と、アセトニトリルだけを添加した尿試料のそれぞれの濃度を測定した。添加した標準物質で算出したイオン化率を用いて、アセトニトリルを添加した試料中の各物質の含有量を求めた。

### 2. 経皮投与実験

実験動物(雄性F344ラット(8週齢))を用いて芳香族アミン類の経皮吸収後のオルト-トルイジン(OT)濃度の経時的変化を解析した。OTをPBSに希釈し4ml/kgの投与容量で使用した。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後、リント布(3cm×3cm)を適用した。0、50、150mg/kgの用量を滴下したリント布を非吸収性粘着シートにより背部に貼り付け、その上からプラスチックフィルムを胴体に巻き、リント布の上部に当たる位置に緩衝材(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で個飼いし、投与4時間、8時間、16時間後にイソフルラン吸入麻酔下で血液、肝臓、尿管、膀胱、適用部位(背部皮膚)を採材した。試料を前処理した後、前年度で確立したLC/MS/MS法を用いてOT及びその代謝物の定量分析を行った。

### (倫理面への配慮)

作業員の尿を分析するにあたり、慶應義塾大学および当研究所の倫理審査委員会による承認を受け、実験を実施した。また、動物実験については、当研究所の動物実験委員会の承



認を受け、動物実験指針に準拠して実験を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 作業尿における芳香族アミン類の分析方法の検討

OT(未代謝体)は1名(初日朝の時点の尿サンプル)を除き、すべての作業尿から検出された。また、OTの代謝物も検出された。PT自体はほとんどの検体で検出されていないが、PTの代謝物はすべての検体から検出された。ANL、ANS、DMAやこれらの代謝物はすべての検体から検出された。また、代謝物は朝の尿に比べ夕方方の尿で高くなる傾向が観察された。

#### 2. 経皮投与実験

血液中および投与部位(皮膚)のOT濃度(未代謝体)は4時間をピークであったが、16時間後には対照群と変わらない程度まで減少が観察された。一方、尿中OT濃度は8時間をピークとし、16時間後には対照群と変わらない程度まで減少していた(図1)。また、OTの代謝物についても同様の傾向が観察された。

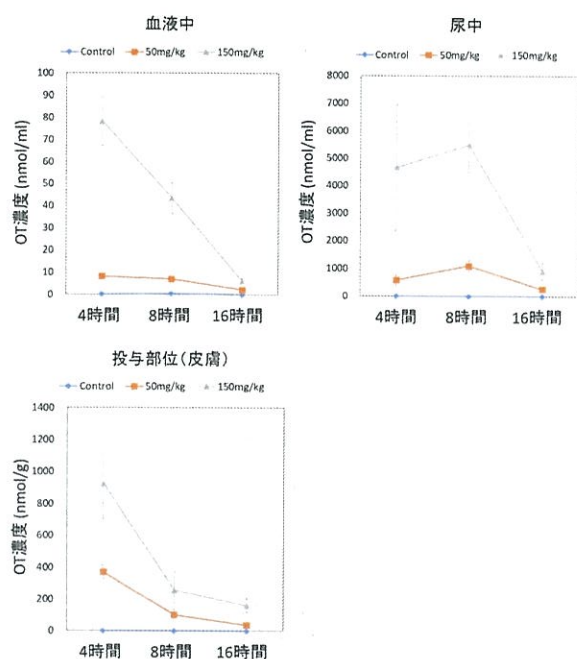


図1. OT塗布後の血液、尿及び塗布部位の皮膚における濃度の経時的変化

### D. 考察

作業尿の分析では、尿中のOT(未代謝体)と比較して尿中のOT代謝物量は微量であるため、ばく露を評価するには未代謝体のOTを測定することが重要と考えられる。一方で、我々のこれまでの研究で、強いDNA損傷性が示唆されたOT代謝物の一つである2-アミノ-m-クレゾール(2AMC)が作業尿でも検出可能であったことから、OTばく露影響指標として尿中2AMC濃度を測定することも意義が大きいかもしれない。DMAについては、尿中のDMA代謝物ではなく、ばく露評価には未代謝体のDMAを指標とすることが望ましいと結論された。しかし、DMAの代謝過程でDNA損傷を示す報告があることから、今後、代謝とDNA損傷性の観点からさらなる検討が必要である。ANL、PTについては未代謝体に比べ代謝物の方が安定的に検出されていたことから、これらの代謝物は、ばく露評価に有用な指標となることが示唆された。今後、代謝物の安定性を考慮した採尿のタイミング・採尿の回数などを検討し、最適なばく露マーカーを提案したいと考えている。

ラットを用いた経皮投与実験からは、OTは経皮投与後、速やかに経皮吸収され、投与後4時間から8時間までに投与したOTの大部分が尿中へと排泄されることが明らかとなった。これらの結果は、OTのばく露濃度を反映させた適切な生物学的モニタリングには、作業終了後比較的早いタイミングでの採尿が必要となる可能性が示唆される。

### E. 結論

本年度検討により、動物実験に応用してきたLC/MS/MSを用いた芳香族アミン類5種類

(OT、アニン ALN、DMA、ANS、PT)とその代謝物の分析方法は作業尿の測定に活用できることを見出した。また動物皮投与実験から、芳香族アミン類の非常に速い経皮吸収性という特徴が明らかとなった。本研究の知見は経皮ばく露を反映した生物学的モニタリング手法の開発に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-Roudoukijunkyokuanzeneseibu-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

論文:

Yonggang Qi, Tatsushi Toyooka, Kashiwagi Hiroki, Yukie Yanagiba, Hisayoshi Ohta, Shigeki Koda, Rui-sheng Wang (2018) 2, 4-Dimethylaniline generates phosphorylated histone H2AX in human urothelial and hepatic cells through reactive oxygen species produced by cytochrome P450 2E1. Arch Toxicol. 92, 3093-3101.

学会:

Yukie Yanagiba, Kenichi Kobayashi, Megumi Suda, Tatsushi Toyooka, Shigeki Koda, Rui-Sheng Wang (2018) Whole body autoradiography and urinary excretion of

ortho-toluidine after percutaneous administration to rats. 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, Book of Abstracts, p408.

豊岡達士、祁 永剛、柳場由絵、太田久吉、王 瑞生、甲田茂樹(2018) 職業性膀胱がん発生現場で使用されていた芳香族アミン 6 種の DNA 損傷性および DNA 損傷誘導メカニズムの検討. 第 45 回日本毒性学会、要旨集 p102.

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(2018) オルトレイジン単回経口投与時の尿中代謝物濃度の経時的変化. 第 91 回日本産業衛生学会、産業衛生学雑誌 60(Suppl.)、419.

小林健一、柳場由絵、須田 恵、豊岡達士、王 瑞生、甲田茂樹(2018) ラットへのオルトトルイジン経皮投与後の代謝及び遺伝毒性作用の検討. 第 45 回日本毒性学会、要旨集 p102.

祁永剛、豊岡達士、柳場由絵、太田久吉、王 瑞生 (2018) 2, 4-dimethylaniline shows genotoxicity via CYP2E1-mediated metabolism. 第 91 回日本産業衛生学会、産業衛生学雑誌 60(Suppl.)、400.

柳場由絵、小林健一、須田 恵、豊岡達士、王 瑞生、甲田茂樹(2018) ラット膀胱における ortho-Toluidine 皮下投与後の  $\gamma$ -H2AX の生成および強い遺伝毒性を有する可能性のある尿代謝産物の同定. 第46回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、要旨集 p27.

須田 恵、柳場由絵、小林健一、豊岡達士、王 瑞生、甲田茂樹(2018) オルトトルレイジンのラッ

トへの経皮投与後の体内動態. 第46回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、要旨集、p26.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
特に無し

分担研究報告書

化学防護手袋の  $\alpha$ -トルイジン透過性試験

研究分担者	和田 丈晴	一般財団法人化学物質評価研究機構
研究協力者	田中 茂	十文字学園女子大学大学院
	石井 聡子	一般財団法人化学物質評価研究機構

研究要旨

本研究の目的は、 $\alpha$ -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。

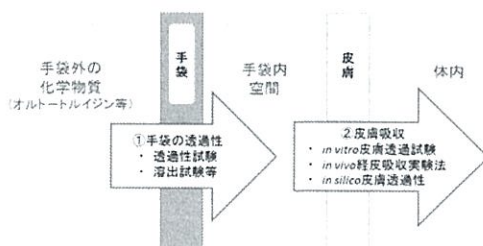
今後、OTD 曝露が大きかったと思われる反応工程での使用状況である OTD と有機溶剤の共存下における天然ゴム製手袋の透過時間の測定、OTD の透過しにくい素材の手袋の開発、および手袋内の簡易的な透過検知(廃棄の確認)等について研究を行いたいと考える。

## A. 研究目的

I. 化学防護手袋を着用した化学物質(オルトトルイジンを含む)取り扱い作業者のばく露評価

—オルトトルイジン等の化学物質の皮膚吸収量の推定—

化学防護手袋の外側にあるオルトトルイジン等の化学物質が経皮ばく露により体内へ取り込まれるには、図1に示す通り、①化学防護手袋を透過して汗中へ溶出し皮膚へ到達する、②皮膚と接触した化学物質が皮膚を介して体内へ吸収される、の2つのプロセスがある。1つ目のプロセスについては、オルトトルイジンに対して透過しにくい化学防護手袋を開発し、透過性試験を行い、使用条件等の検討を行っているところである。本検討では、2つ目のプロセスに関連して、オルトトルイジン等、安衛法表示・通知義務対象物質の皮膚吸収量を推定し、吸入ばく露量に比べて皮膚吸収量の大きな化学物質の特徴を整理することを目的とした。



また、化学防護手袋の種類は厚手手袋と薄手手袋に分けられる。厚手手袋は、多くの化学工場等での使用が中心であり、手袋の素材としてゴム製：天然ゴム、シリコンゴム、ニトリルゴム、ネオプレンゴム（クロロプレン）、フッ素ゴム、ポリウレタン、ブチル等とプラスチック製：ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリビニルアルコール、エチレンビニルアルコール共重合体（EVOH）、バリ

ア（ナイロン）等が市販されている。これらは①一般に定価1000円~45000円/双と高価であること、②事業場では劣化や作業性を重要視し、使用化学物質の透過時間のデータを考慮せず手袋を選定していることが多い、③支給した手袋は1~2か月/双程度、長期に使用して交換（廃棄）することが多い。一方、薄手手袋は多くの研究機関、大学等で主に使用されており、手袋の素材として、ゴム製：天然ゴム、ニトリル、クロロプレン等と、プラスチック製：ポリエチレン、ポリプロピレン等が市販されており、①10円~50円/双と安価、②透過データは無視して選定されており、③飛沫が付いたらそく交換するように使用されている。事業場、大学、研究機関等の手袋に対する要望をふまえ、薄手で多くの化学物質に対して透過しにくい手袋を開発することを目標に、素材の選定について検討を行った。

1) 厚手手袋の化学物質に対する公表されている透過データより、多くの化学物質に対して透過しにくい素材として、商品名シルバースールド(素材エチレンビニルアルコール共重合体(EVOH))と、商品名バリア(素材ポリアミド(ナイロン))の素材があげられた。

2) 1990年代オゾン層破壊物質として臭化メチル(沸点4℃、当時、日本での農薬としての使用量が第2位)が規制対象となり、農林水産省からの委託試験で、臭化メチルに対するフィルムの透過試験を行ったことがある。その結果、農家が使用していたフィルム(ポリエチレン)の臭化メチルに対する透過速度に対して、EVOH(クラレ製)、ナイロン(フランス製)、ポリ塩化ビニリデン(旭化成製)は、1/50から1/100のバリア性があることを報告した。

3) 食品包装材として使用されている素材としては、耐酸素透過の結果よりナイロン、EVOH、ポリ塩化ビニリデンが使用されていた。

これらの情報や結果より、ナイロン、EVOH とともに、近年、食品包装材等で使用されている PET (Polyethylene terephthalate ポリエチレンテレフタレート) が候補にあがり、これらの素材をもとに薄手手袋の開発を行い、一般の有機溶剤に対する透過試験を行った。

## B. 研究方法

### (1) オルトートルイジン等の化学物質の皮膚吸収量の推定

#### 1 対象物質

平成 31 年 3 月現在、安衛法表示・通知義務対象物質は合計 735 物質ある。本検討では、標準状態で液体である 348 物質を対象とした。

#### 2 皮膚からの吸収量の求め方

Fick 第一法則から誘導される式(a)を用いて、単位時間当たり単位面積の膜を通過する化学物質の量  $J_{\max}$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )を求めた。

$$J = K_p \times C_{\text{veh}} \dots\dots\dots(a)$$

J: 単位時間当たり単位面積の膜を通過する化学物質の量 ( $\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}$ )

$K_p$ : 皮膚透過係数 ( $\text{cm}/\text{h}$ )

$C_{\text{veh}}$ : 皮膚と接触する化学物質濃度( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )

上述の通り、J を計算するための重要なパラメータの 1 つが皮膚透過係数  $K_p$  である。 $K_p$  は、実測によって得ることができるが、予測値としてよく利用されるのが、皮膚透過係数予測式から求めた値である。皮膚透過係数予測式の一つである、次式(b)の Potts and Guy の予測式から皮膚透過係数  $K_p$  を求めた。

$$\text{Log } K_p = -2.7 + 0.71 \times \text{Log } K_{ow} - 0.0061 \times \text{MW} \dots\dots\dots(b)$$

$K_p$ : 皮膚透過係数 ( $\text{cm}/\text{h}$ )

Log  $K_{ow}$ : オクタノール/水分配係数 (単位なし)  
MW: 分子量 ( $\text{g}/\text{mol}$ )

また、式(b)に示す通り、 $K_p$  は Log  $K_{ow}$  と MW に基づいて計算される。Log  $K_{ow}$  の実測値が得られなかった場合、QSAR 予測モデルによる推定値を利用した。その他、(a)式の J を計算するための皮膚と接触する化学物質濃度は、飽和水溶解度とし、Log  $K_{ow}$  と同様に実験値が得られなかった場合は、推定値を利用した。

#### 皮膚からの吸収量

上記より求めた J に続いて、通常の皮膚吸収においては、定常状態になるまでに時間を要するが、安全側に立って最初から定常状態であると仮定し、ばく露時間 8 時間、ばく露面積(手の甲と手のひら)  $840 \text{ cm}^2$  とし、皮膚からの吸収量は、次式で求めた。

$$\text{皮膚からの吸収量} = J(\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}) \times 8(\text{h}) \times 840(\text{cm}^2)$$

#### 吸入ばく露量

吸入ばく露量は、8 時間の軽作業における呼吸量を  $10 \text{ m}^3$  とし、肺から吸入量の全量が体内に取り込まれたと仮定する。また、その労働者は ACGIH TLV に等しい当該物質にばく露されたと仮定し、次式で求めた。

$$\text{吸入ばく露量} = \text{ACGIH TLV}(\text{mg}/\text{m}^3) \times 10 \text{ m}^3$$

### 3 皮膚からの吸収量と吸入ばく露量の比較

上記の方法によって求めた皮膚吸収量と吸入ばく露量を比較し、皮膚吸収量が吸入ばく露量を上回る物質を抽出した。これらの物質の蒸

気圧と日産衛の皮表示や ACGIH の skin 表示の有無を調べた。

蒸気圧レベル	物質数
低 (<500Pa)	77
中 (500-25、000Pa)	54
高 (>25、000Pa)	16

(2) 化学物質

物質に対する耐透過性のある薄手手袋の開発と有機溶剤に対する透過試験

1) 厚手手袋の化学物質に対する公表されている透過データより、多くの化学物質に対して透過しにくい素材として、商品名シルバーシールド（素材エチレンビニルアルコール共重合体（EVOH））と、商品名バリア（素材ポリアミド（ナイロン））の素材があげられた。

2) 1990 年代オゾン層破壊物質として臭化メチル（沸点 4℃、当時、日本での農薬としての使用量が第 2 位）が規制対象となり、農林水産省からの委託試験で、臭化メチルに対するフィルムの透過試験を行ったことがある。その結果、農家が使用していたフィルム（ポリエチレン）の臭化メチルに対する透過速度に対して、EVOH（クラレ製）、ナイロン（フランス製）、ポリ塩化ビニリデン（旭化成製）は、1/50 から 1/100 のバリア性があることを報告した。

3) 食品包装材として使用されている素材としては、耐酸素透過の結果よりナイロン、EVOH、ポリ塩化ビニリデンが使用されていた。

これらの情報や結果より、ナイロン、EVOH とともに、近年、食品包装材等で使用されている PET（Polyethylene terephthalate ポリエチレンテレフタレート）が候補にあがり、これらの素材をもとに薄手手袋の開発

を行い、一般の有機溶剤に対する透過試験を行った。

### C. 研究結果

(1) オルトートルイジン等の化学物質の皮膚吸収量の推定

安衛法表示・通知義務対象物質のうち、標準状態で液体である 348 物質のうち、皮膚吸収量と吸入暴露量の両方を求めることができ、さらには、皮膚吸収量が吸入暴露量を上回った物質が 147 物質あった（表 1）。この中には、オルトートルイジンや N、N-ジメチルホルムアミドも含まれており、皮膚吸収量/吸入暴露量の大きい順で並べると、オルトートルイジンは 107 番目、N、N-ジメチルホルムアミドは 102 番目であった。

(2) 化学物質に対する耐透過性のある薄手手袋の開発と有機溶剤に対する透過試験

① 試験手袋：試験に使用した手袋は、A 社が製造した 3 種類の手袋（ナイロンポリ、EVOH ナイロンポリ（ナイロン+EVOH）、PET ナイロン（PET+ナイロン））である。

表 1 開発した薄手手袋

名称	従来呼び名	内容
ガードMN MCS製	ナイロンポリ (60μ)	NY-PE-LL
ガードMB MCS製	EVOH ナイロンポリ (60μ)	NY-EVOH-NY-PE-LL
ガードMH スター製	PET ナイロン (50μ)	PET-PE-NY-PE-LL

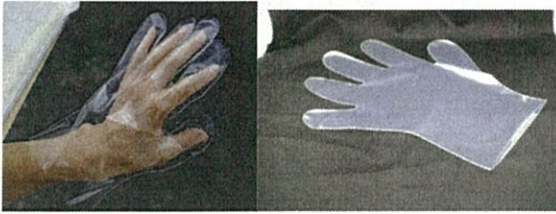
NY: ナイロン PE: ポリエチレン

LL: 変性ポリエチレン

EVOH: エチレンビニルアルコール共重合樹脂

PET: ポリエチレンテレフタレート

写1 試験で使用した手袋

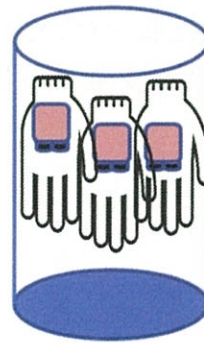


- ② 試験有機溶剤：トルエン：エタノール：酢酸エチル：n-ヘキサン：アセトン
- ③ 試験方法：JIST 8030:2015 「化学防護服—防護服材料の耐透過性試験」に記載された方法のうち、閉鎖回路系透過試験による方法を用いて試験を行った。本法では累積透過質量( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )として $0.1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ に達するまでの時間を求めた。試験は光イオン化型検出器 (PID) を用いたセンサ (理研計器製 Cub) を手袋内に入れ、袖口をシールして溶液内に入れ、閉鎖回路系にして、累積透過質量に達するまでの時間を求めた。

- ・ドラフトチャンバー内及び液相温度を $23^\circ\text{C}$ に設定した。
- ・試験手袋の中に、理研計器 (株) のPID式モニターCubを入れて、袖口をシーラーSURE社 NL-301Jを使用して密閉にした。
- ・3ℓのビーカーに試験溶剤1.5Lを投入し、試験手袋を挿入した時点を試験開始した。
- ・Cubは2秒ごとに手袋内の溶剤濃度のデータが入力され、累積透過質量 $0.1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ に達すると警報がなり測定終了とした。
- ・データをCub付属のソフトウェアを用いてデータを取り出し、図を作成するとともに $0.1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ に達した時間を求めた。

図2 手袋にCubを入れて袖口をシールした

図3 ビーカー内での実験装置の図

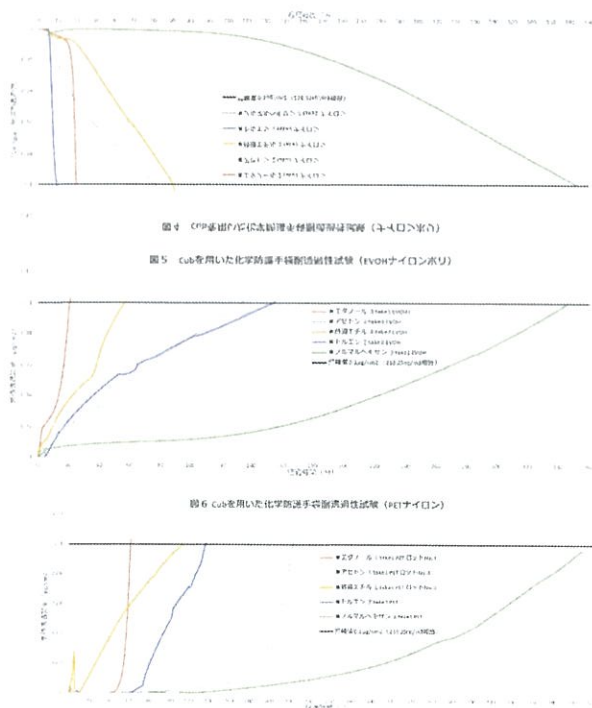


- ・Cubの警報点の設定値 (累積透過質量 $0.1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ におけるCub指示値の求め方)  
手袋体積： $400\text{cm}^3$   
手袋面積： $873\text{cm}^2$   
累積透過質量( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) = Cub 指示値( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) \* (1/1000) \* 手袋体積( $\text{cm}^3$ ) \* (1/手袋面積( $\text{cm}^2$ )) より、累積透過質量を $0.1\ \text{mg}/\text{cm}^2$ とすると、Cubの指示値は $218.25\ \text{mg}/\text{m}^3$ となる。
- ・Cub校正方法：  
Cub付属のキャリブレーションドッキングステーションを用い、背面にある挿入口のゼロガス (清浄な大気)、スパンガス (イソブチレンガス $100\text{ppm}$ ) をそれぞれ接続し校正を行った。
- ・Cubの洗浄：Cubのセンサ部分に清浄空気を流しセンサの洗浄を行い、指示値が0になったことを確認した。更に、Cub本体を洗浄容器内に入れ、容器の中に清浄空気を流して本体に付着した有機溶剤の洗浄を行った。Cubの指示値が0に近づくまで清浄空気を流し続けた。
- ・透過試験：Cubに測定対象ガスを選択、入力した後、手袋内に投入 (この際は電源



未投入)した。5分間静置した後、手袋入口から1cmの部分をシールド(シールド温度280℃)した。シールド後、電源スイッチONにし、指示値が安定(指示値20mg/m<sup>3</sup>未満)するまで静置した。そして、有機溶剤が入ったビーカー内に手袋ごと投入し、試験開始とした。指示値が218.25mg/m<sup>3</sup>に到達して警報が鳴った後、回収を行い、Cubをパソコンに接続し、データを取り出した。

試験結果を以下に図示する。



#### D. 考察

##### (1) オルトートルイジン等の化学物質の皮膚吸収量の推定

皮膚吸収量が吸入暴露量を上回った147物質について、蒸気圧レベルとACGIH Skin表示の有無で整理した結果を表2と表3に示す。

蒸気圧レベルは、低(<500 Pa)、中(500~25,000 Pa)、高(>25,000 Pa)の3つの区分とした結果、147物質のうち、蒸気圧レベル低、中、高に対して、各々、77物質、54物質、16物質が該当した。蒸気圧の低い物質がより多いことがわかる。なお、オルトトルイジンは蒸気圧レベル「低」に、N,N-ジメチルホルムアミドは蒸気圧レベル「中」に位置した。

表2 皮膚吸収量が吸入暴露量を上回った147物質の蒸気圧レベル

##### (2) 化学物質に対する耐透過性のある薄手手袋の開発と有機溶剤に対する透過試験

累積透過質量として0.1μg/cm<sup>2</sup>に達するまでの透過時間を表3に示す。

表3 累積透過質量(0.1μg/cm<sup>2</sup>)に達するまでの透過時間

有機溶剤	累積透過質量(0.1μg/cm <sup>2</sup> )に達した時間		
	ナイロンポリ	EVOHナイロンポリ	PETナイロンポリ
エタノール	18分	18分	60分
アセトン	57分	2時間09分	3時間39分
酢酸エチル	1時間10分	52分	1時間51分
トルエン	4分	2時間30分	2時間08分
ノルマルヘキサン	4時間40分	5時間42分	8時間以上

これより、3種類の素材において、エタノールの透過時間が他の有機溶剤に比べ短い結果であったこと、ナイロンポリにおいてトルエンに対する透過時間が短い結果であった。これらの有機溶剤に対する手袋の使用については考慮する必要があるが、その他の有機溶剤について概ね1時間を超える透過時間が得られ、薄手手袋としての使用が可能であると考えられる。

## E. 結論

皮膚吸収量が吸入暴露量を上回った 147 物質についての皮膚吸収性の推定の結果、ACGIH Skin 表示について、皮膚吸収量が吸入暴露量を上回った 147 物質のうち、ACGIH Skin 表示があるものは 84 物質、ないものは 63 物質となり、ACGIH Skin 表示がない、皮膚吸収に注意が必要だと考えられる物質が相当数あることがわかった (表 4)。

表 4 皮膚吸収量が吸入曝露量を上回った 147 物質の ACGIH Skin 表示の有無

ACGIH Skin 表示	物質数
あるもの	84

ないもの	63
------	----

## 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む) 特に無し

