

令和 元 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

我々は、これまでに職業性膀胱がんの発生現場で使用されていたオルト-トルイジン(OT)等5種類の芳香族アミン類の経皮吸収や体内動態、尿中代謝物の測定条件の検討を行なうとともに、今後の産業化学物質の皮膚透過性試験モデルとして三次元ヒト培養皮膚モデル応用に関する検討を行ってきた。最終年度では、これまでの実験・解析系をベースに、さらなる補強的、応用的検討である以下①-③の検討を実施した。①三次元ヒト培養皮膚モデルにおける物質透過に関する特性を詳細に把握するための補強的検討。②正常皮膚動物におけるOTの経皮吸収、体内動態、尿中の代謝物解析(損傷皮膚動物における検討は実施済)③現場作業者の尿サンプルを用いた、尿中バイオマーカーの開発に関する検討。本研究では、これら、芳香族アミン類の経皮吸収性から、代謝・体内動態、毒性、バイオモニタリング指標開発まで一貫した検討は実施し、芳香族アミン類等の経皮ばく露によるリスク評価を実施するための基盤を築くことを目的とした。

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⁾。このことは、OT 等芳香族アミン類が経皮吸収され健康障害を引き起こしたことを意味するものである。一方で、芳香族アミン類の経皮吸収性、代謝・体内動態、毒性等についての一貫した検討は不足している。今後、経皮吸収によるリスク評価を実施するために、皮膚吸収性の評価法の構築、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。

我々は、これまでに、「芳香族アミン類の経皮吸収性に関する検討」として、ヒト3次元皮膚モデルを用いて OT 等の芳香族アミンの皮膚透過性が非常に高いこと、また、損傷皮膚動物(ラット)を使用したオートラジオグラフィ法によってOT 経皮ばく露後の体内動態を明らかにした。「代謝・体内動態、毒性等に関する検討」では、動物(ラット)を用いた皮膚投与法の検討、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を明らかにした。さらに、「生物学的モニタリング手法の開発」に関して、LC/MS/MS法において、OT、ジメチルアニリン(DMA)、アニリン(ANL)、オルト-アニシジン(OAS)、パラ-トルイジン(PT)の5物質及びその代謝物の分析方法を確立した。

最終年度では、これまでの実験・解析系をベースに、さらなる補強的、応用的検討である以下①-③の検討を実施した。①三次元ヒト培養皮膚モデルにおける物質透過に関する特性を詳細に把握するための補強的検討。②正常皮膚動物における OT の経皮吸収、体内動態、尿中の代謝物解析③現場作業者の尿サン

ルを用いた、尿中バイオマーカーの開発に関する検討。

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-Roudoukijunkyokuanzeneiseibu-Kagakubushitsutaisakuka/0000126164.pdf>)

B. 研究方法

① 三次元ヒト培養皮膚モデルにおける物質透過に関する特性を詳細に把握するための補強的検討

放射性^[14C]ラベルしたアニリン(ANL)を用い、皮膚透過率に対する作用濃度依存性、及び、滴下量依存性を次の条件で検討した。なお、^[14C] ANL の原液は 0.1mCi (dissolved in ETOH)であり、条件に応じてPBSで希釈して使用した。(1) 三次元培養皮膚への滴下量を200 μ l一定とし、濃度を0.01~1 μ Ci/200 μ lの範囲で変化させる(2) 濃度を一定(0.1 μ Ci/200 μ l)にし、滴下量を25-800 μ lの範囲で変化させる(多滴下量ほど、^[14C] ANL 分子数は増える)(3) 滴下量25-800 μ lの範囲で変化させ、各滴下量に含まれる^[14C]ANL 分子数を0.1 μ Ciと一定にする(少滴下量ほど濃度が高くなる)

② 正常皮膚動物におけるOTの経皮吸収、体内動態、尿中の代謝物解析

ラットの背部をバリカンおよびシェーバーで剪毛・剃毛し(正常皮膚)、^[14C]OT を50mg/712kBq/4ml/kgの用量でリント布を介して経皮ばく露した(リント布貼付法)(投与用量は体重から算出)。ばく露時間(リント布貼付時

間)は、8 時間、または 24 時間とし、ばく露終了後、リント布を剥離しエタノールで湿らせた脱脂綿を用いて投与部位に残った投与液を拭きとり、オートラジオグラフィに供する切片を作製した。なお、切片は 1 匹につき3面(左面、左傍正中面、正中面)とし、厚さ40 μm とした。血液、肝臓、腎臓、膀胱における ^{14}C OT 放射能濃度(Counts/ mm^2)をイメージングアナライザーによる全身オートラジオグラフィによって算出した。また、正常皮膚動物における尿中の代謝物の解析として、同様に剪毛・剃毛したラットの背部にリント布貼付法によって ^{14}C OT を経皮ばく露し、代謝ケージ内で 24 時間後まで尿を採取した。ラジオクロマトグラフィー(LC/MS)を用いて、ラット尿中(2 群 0-24 h)の OT 代謝物の解析を行なった。

③現場作業者の尿サンプルを用いた、尿中バイオマーカーの開発に関する検討

尿中バイオマーカーの開発にあたって、測定法の信頼性を担保するために、測定値の変動を把握する必要がある。芳香族アミン類取り扱い作業者の尿合計 49 サンプルについて、17 試料は採取から11、12、15か月目、32試料は採取後1、3、5か月目にそれぞれ 1 回(1 試料辺り 3 回)の分析をし、測定値の変動係数(CV 値)が機器による誤差範囲内に収まるか否かを確認した。また、OT の代謝物として我々が注目している 4-アミノメタクレゾール(4AMC)と 2-アミノメタクレゾール(2AMC)について、OT の肝臓での代謝だけではなく、尿路系の代謝においても生じる可能性があるかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

3D 皮膚の実験については、特になし。動物実験は動物実験委員会の承認を受けて行った。作業者の尿試料の解析は倫理委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

① 三次元ヒト培養皮膚の物質透過に関する補強的検討

研究方法①に示す(1)-(3)を実施したところ、次のことが明らかになった(図示せず)。(i) 滴下溶液体積が一定であれば、ANL 分子数によらず、透過率はほぼ一定である。(ii) ANL 分子数が一定であれば、滴下溶液体積が増えるにつれ、透過率は低く算出される。(iii)滴下溶液体積が増えるにつれ、カップ内の ANL 分子数が増えるため、透過率は、低く算出される(分母が大きくなるため)。

② 正常皮膚動物におけるOTの経皮吸収、体内動態、尿中の代謝物解析

正常皮膚ラットに ^{14}C OT をリント布貼付法により、経皮ばく露した結果、貼付 8 時間後では腎臓、膀胱、24 時間後では膀胱で高い放射能濃度が検出された(表 1)。また、24 時間でばく露量の 81.3%が排泄されていた。

表 1.正常皮膚ラットにおける ^{14}C OT 経皮ばく露後の組織中放射能濃度

組織	濃度 ($\mu\text{g eq./g}$)	
	8 h	24 h
血液	BLQ	BLQ
肝臓	12.324	BLQ
腎臓	80.180	BLQ
膀胱	28.639	12.374

BLQ: BLQ: 定量下限未満

ラット尿の代謝物として、ヒドロキシル化、硫酸抱合された ^{14}C OT が 44.8%、アセチル化、ヒドロキシル化、硫酸抱合、グルクロン酸抱合された ^{14}C OT が 4.8%、アセチル化、ヒドロキシル化、グルクロン酸抱合された ^{14}C OT が 2.2%検出された。未変化 ^{14}C OT は 33.7%であった(図 2, 表 2)。

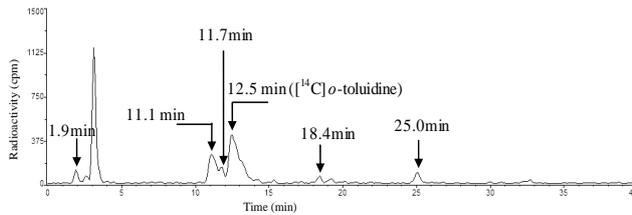


図 2. 正常皮膚ラットにおける¹⁴C OT 経皮ばく露後の尿中¹⁴C OT 及びその代謝物の解析

表 2. 正常皮膚ラットにおける¹⁴C OT 経皮ばく露後の尿中¹⁴C OT 代謝物の解析

Retention time of the radioactive peak (min)	Composition ratio of total radioactivity (%)	Accurate mass (m/z)		Mass shift (Da)	Estimated formula	Estimated transformation
		Observed	Theoretical			
1.9	3.6	NE				
3.1	32.2	204.0303	204.0325	95.9501	C ₈ H ₉ NO ₂ S	Hydroxylation and Sulfation
11.1	12.6	204.0304	204.0325	95.9502	C ₈ H ₉ NO ₂ S	Hydroxylation and Sulfation
11.7	4.8	246.0418	246.0431	137.9616	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂ S	Acetylation, Hydroxylation and Sulfation
		342.1145	342.1183	234.0343	C ₁₂ H ₁₇ NO ₄	Acetylation, Hydroxylation and Glucuronidation
12.5	33.7	108.0802	108.0808	0.0000	C ₈ H ₉ N	Unchanged
18.4	2.2	342.1169	342.1183	234.0367	C ₁₂ H ₁₇ NO ₄	Acetylation, Hydroxylation and Glucuronidation
25.0	3.9	NE				
Others	7.0					

NE: Not estimated

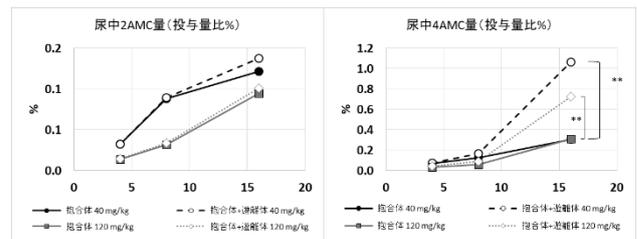
*Mass shift represents the difference between observed accurate mass of the o-toluidine and metabolites.

③現場作業者の尿サンプルを用いた、尿中バイオマーカーの開発に関する検討
 作業者の尿ではOTの添加回収率が21-83%となり、尿におけるマトリックス効果による変動は非常に大きいことが示された。

測定値の誤差(ばらつき)の原因は、分注器や分注の手技によるばらつき、分析機器に由来する注入や検出器の揺らぎによるばらつき、分析時のベースラインの変動によるピークの読取りのばらつきが挙げられ、これらは独立した要因である。分注器等のばらつきは実測で1-2%、分析機器に由来するばらつきは公称でCV5%以下、分析時のベースラインの変動によるピークの読取りのばらつきは定量下限値を20%のばらつきと定義されるため、これらを足し合わせたものが誤差の期待値となる。定量下限値-定量下限値×5未満(26-10%が誤差の期待値)、定量下限値×5以上(誤差の期待値10%以内)として濃度をクラス分けし、各試料の

CV値のクラスごとの平均を求めると、前者が17.2%、後者が7.4%となり、誤差は期待値通りであった。

動物の尿中4AMCと2AMCについて抱合体と抱合体+遊離体を比較した結果、16時間後の尿中4AMCでは有意に(p<0.01)遊離体が増加した。また、2AMCについては、有意差はなかったが同様の傾向を示した。



D. 考察

三次元ヒト培養皮膚の物質透過に関する補強的検討において、滴下溶液の量(体積)は、透過率に大きく影響することが明らかになった。滴下量が多くなるにつれて各時間における透過率が低下したのは、PBS溶液中のANLが三次元培養皮膚に接触する(または取り込まれる)機会が減少したからではないかと考えられる。つまり、溶液体積が過剰になると過小評価につながることを意味している。実験条件としては、三次元皮膚に対して、被験物質を含む溶液が薄く行き渡る状態がよいと考えられた(100-200μlが適当)(皮膚単位面積当たりの透過速度を算出する際にも理解しやすい)。

正常皮膚動物におけるOTの経皮吸収、体内動態、尿中の代謝物解析において、OTは経皮ばく露後24時間以内に投与量の約80%が排泄されており、蓄積性は少ないことが推察された。また、尿中代謝物の解析から、OTの約50%は代謝物として排泄され、約45%がヒドロキシル化、硫酸抱合として検出されていることから、OTの代謝にはヒドロキシル化や硫酸抱合による代謝の寄与が大きいと推測される。

現場作業者の尿サンプルを用いた、尿中バイオマーカーの開発に関する検討について、GC/MS や UV 法等で内部標準を用いずに外部標準で分析を行うには、プールされた標準尿を使用して一律の回収率補正をすることが多いが、LC/MS/MS 法では、尿ごとの回収率の変動が大きいと、標準尿を用いた一律の回収率補正は推定ばく露量の過小評価に繋がる可能性がある。その点、今回使用した LC/MS/MS による分析方法は変動誤差が期待値の範囲内であったので、生物学的モニタリングの任に十分堪え得ると思われた。変動誤差が期待値の範囲内ということは1-5か月の間 OT は安定であることを示唆しているものであると考えられた。(貯蔵用の OT のアセトニトリル溶液は2年安定)。また、動物実験の加水分解尿試料の結果から、16 時間後に 4AMC や 2AMC の遊離体が増加していることが示めされ、尿路系で OT が代謝されている可能性が示唆された。

E. 結論

最終年度におけるそれぞれの検討により、以下の研究成果を得ることができた。三次元ヒト培養皮膚の物質透過に関する補強的検討では、より適切に物質皮膚透過性を評価できる条件を見出した。また、正常皮膚動物における OT の経皮吸収、体内動態、尿中の代謝物解析では、OT は投与後速やかに腎臓や膀胱へと移行し、他臓器における蓄積性は少ないことが示された一方、膀胱には代謝物を含む OT がばく露 24 時間後でも存在し、他臓器に比べ、膀胱がんに関連する代謝物(ヒドロキシル化や硫酸抱合体)が、比較的長時間、膀胱内に存在する可能性が明らかになった。さらに、現場作業者の尿サンプルを用いた、尿中バイオマーカーの開発に関する検討から、作業員尿試料の分析については、含有量が多く、安定度

が高い尿中の未変化体の OT は生物学的モニタリングの指標として最適であることが明らかになった(但し、16 時間後では尿路系で代謝されてしまう可能性があることから、作業終了後に採尿することが望ましい)。

本研究で得られた知見は、今後、芳香族アミン類等の産業化学物質の経皮吸収によるリスク評価系を構築する上で重要な礎となると考えられる。

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

論文発表:

Qi Y, Toyooka T, Nie J, Ohta H, Koda S and Wang RS (2020) Comparative γ -H2AX analysis for assessment of the genotoxicity of six aromatic amines implicated in bladder cancer in human urothelial cell line. *Toxicology In Vitro, in press*
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104880>

豊岡達士, 祁 永剛, 王 瑞生, 甲田茂樹 (2019) 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノ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. 労働安全衛生研究. 12巻 2号, p113-118.

小林健一, 柳場由絵 (2019) 産業化学物質のマウス経皮ばく露方法の検討. 労働安全衛生研究. 12巻 3号, p195-198.

学会発表:

須田 恵, 柳場由絵, 豊岡達士, 王 瑞生, 甲

田茂樹(2019)オルト-トルイジン作業者の尿中芳香族アミン類とその代謝物の分析. 第 92 回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 61 (Suppl.), p330. N-G29-10 2019 年 5 月

豊岡達士, 祁 永剛, 太田久吉, 甲田茂樹, 王 瑞 生 (2019) 3,3'-dichloro-4,4'-diaminodiphenylmethan 及び類似構造物質の DNA 損傷性に関する研究. 第 92 回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 60 (Suppl.), 400. 2019 年 5 月

柳場由絵, 小林健一, 豊岡達士, 祁永剛, 須田恵, 王瑞生 甲田茂樹, (2019) 2,4-ジメチルアニリンの経皮吸収、体内分布及び DNA 損傷性についての検討. 第46回日本毒性学会要旨集 p305. 2019 年 7 月

柏木裕呂樹, 豊岡達士, 王 瑞生, 甲田茂樹 (2019) オルトトルイジン及び 4-クロロオルトトルイジンの DNA 損傷性に関する比較検討. 第47 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 要旨集 p16. 2019 年 10 月

豊岡達士, 柏木裕呂樹, 柳場由絵, 祁 永剛, 王 瑞生, 甲田茂樹 (2019) ヒト三次元培養皮膚を用いた芳香族アミン類の皮膚透過性に関する研究. 第47 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 要旨集 p17. 2019 年 10 月

王 瑞生, 祁 永剛, 豊岡達士, 甲田茂樹 (2019) 膀胱発がんに寄与する可能性がある芳

香族アミン類等の遺伝毒性に関する検討. 第 47 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 要旨集 p15. 2019 年 10 月

Rui-Sheng Wang, Tatsushi Toyooka, Yonggang Qi, Yukie Yanagiba, and Megumi Suda (2019) 2,4-Dimethylaniline May Contribute to the Occurrence of Bladder Cancer among Workers in a Chemical Factory. 55th Eurotox Congress, Toxicology Letters, 314S1, S230.

Hiroki Kashiwagi, Tatsushi Toyooka, Shigeki Koda, Rui-Sheng Wang (2019) Study on DNA damage property of 4-Chloro-o-toluidine. The 6th Asian Congress on Environmental Mutagen and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Abstract p.190.

Yonggang Qi, Tatsushi Toyooka, Hyogo Horiguchi, Shigeki Koda, Rui-Sheng Wang (2019) Comparative γ -H2AX analysis for assessment of the genotoxicity of four chemicals implicated in bladder cancer. The 6th Asian Congress on Environmental Mutagen and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Abstract p.192.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
特になし

