

厚生労働科学研究費補助金
労働安全衛生総合研究事業

オルト-トルイジン等芳香族アミンによる膀胱がんの原因解明と
予防に係る包括的研究

平成29年度～令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武林 亨

令和元年(2020)年 3月

目 次

I. 総括・分担研究報告

疫学アプローチによる原因物質絞込みと因果関係検証

..... 1

研究代表者 武林 亨

研究分担者 中野 真規子

II. 分担研究報告

1. 芳香族アミン取扱い作業歴のある集団における膀胱がんの標準化罹患比

..... 14

研究分担者 祖父江 友孝

2. 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

..... 31

研究分担者 鱈淵 英樹

3. 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

..... 37

研究分担者 甲田 茂樹

研究分担者 王 瑞生

4. 化学防護手袋のo-トルイジン透過性試験

..... 47

研究協力者 田中 茂

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成30年度～令和1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

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がんを主とした健康影響との関連を検討することである。主に①膀胱がん発生企業の協力可能な全従事者(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指標を以下、1)曝露推定量 A(各工程、曝露期間(年)×曝露頻度/月)、2)曝露推定量 A に取扱い濃度、接触面積を考慮した曝露推定量 B、3)曝露推定量 C(曝露推定量 A×ECETOC TRA を利用したリスク係数)で膀胱がん罹患群と非罹患群で比較検討した。結果は、すべて同じ工程で関連(罹患群では各芳香族アミンの中でOTは最も平均曝露推定量が高く、OTの総工程、洗浄工程、乾燥工程が最も膀胱がんに関連がある工程と推察)を認めため、最も簡易な計算式である曝露推定量 A を曝露指標に決定した。また、曝露推定量 A は、「芳香族アミン取扱い作業歴のある集団における膀胱がんの標準化罹患比」の曝露指標としても利用した。②パイロット調査をベースに、現従事者対象のコホート研究を継続して実施、③健康管理として特殊健康診断の項目および尿中核マトリックスプロテイン22(NMP-22)の検討を行った。コホート研究(平成29年4月から令和2年1月まで)の膀胱がん罹患者は2名で、その特性は平均年齢58歳、喫煙歴あり、平均OT曝露期間15.3年、OT曝露開始からの平均潜伏期間21.1年で、OT推定曝露量は100-300、ともに2,4-キシリジン(MX)、アニリン(AN)等の複合曝露があった。これまでの膀胱がん罹患者(10名)と同様で、芳香族アミン等(特に、MX、AN)に複合曝露のあるOT推定曝露量100以上のOT曝露者が、約20年の潜伏期間を経て発症した。また、罹患者2名は、いずれも診断前の特殊健康診断で膀胱がん関連所見を繰り返し認め、膀胱がん診断の契機となった1次健診項目は、尿沈渣による尿細胞診(パパニコラ法)classⅢであった。NMP-22の測定は、新規膀胱がん罹患者数が少なく、健診項目としての明確な有効性は示さなかったが、 $10 \leq \text{NMP-22} < 12 \text{ U/ml}$ (正常範囲内高値)は膀胱がんの臨床前期の所見なのか、さらなる検討が必要である。最終年度の特健康診断結果で現従事者の8%に尿潜血を認めた。特に血尿、膀胱炎の既往のある従事者は、今後も注意深い経過観察が必要である。最後に、OTの特健康診断の対象者の選定時:重量の<1%含有濃度の従事者の健診推奨の検討、製品の生体内代謝物(OTおよびOT代謝物)、複合曝露の影響については、今後に課題が残った。

研究協力者

大前和幸、永滝陽子、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がんについては、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¹⁾。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事者(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がんを主とした健康影響との関連を検討することである。

(1) パイロット調査のデータを利用して

1. 1 膀胱がん罹患者の自覚症状・既往歴に関する検討

曝露推定量の検討①

曝露推定量 A(各工程、曝露期間(年)×曝露頻度/月)

曝露推定量 B: 曝露推定量 A に取扱い濃度、接触面積を考慮

1. 2 OT 取扱い開始(1989-1999 年)した作業員に限定した検討

1. 3 全従事者を対象とした内部比較の検討

1. 4 曝露推定量の検討②

曝露推定量 C: 曝露推定量 A×ECETOC

TRA を利用したリスク係数*

*: より客観的なリスク係数として、ECETOC (European Centre of Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals; 欧州化学物質生態毒性・毒性センター) の開発した ECETOC TRA²⁾による吸入と経皮曝露推定値を利用したリスク係数を使用した。

(2) 現従事者を対象とした追跡調査

(3) 健康管理

特殊健康診断の健康項目、および尿中核マトリックスプロテイン 22(NMP-22)の評価

B. 研究方法

(1) 平成 28 年 1 月に膀胱がん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た。

製造工程は 4 工程(①反応工程(原料から)、②蒸留工程、③洗浄工程(ろ過含)、④乾燥工程(製品の袋詰め含))に分かれる。

1. 1 曝露推定量 A、B 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、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、膀胱がん等である。

1.2 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、膀胱がん罹患群の特性を検討した。

1.3 内的妥当性の検討

平成 28 年 1 月に膀胱がん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事者(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。

1.4 曝露推定量 C の検討

曝露推定量 C:各芳香族アミン、各工程:曝露期間(年)×曝露頻度/月××ECETOC TRA を利用したリスク係数

OT 等芳香族アミン取り扱い歴のある者(81 名)を対象とし、曝露推定量 C と膀胱がんとの関係を検討した。曝露者のうち製造以外(検査、設備環境、工務)の作業員(5 名)を除き、76 名で解析した。

曝露推定量 C は、プロセスカテゴリー、対象物

質の性状、発じん性または揮発性、換気条件、作業形態、作業時間、対象物質含有量、保護手袋の使用状況を入力し、吸入曝露推定値、経皮曝露推定値を算出し、有害性評価値と比較した リスク特性比-吸入(Risk

Characterisation Ratio - Long-term Inhalation)とリスク特性比-経皮(Risk

Characterisation Ratio -Long-term Dermal)からリスク特性値(Risk Characterisation Ratio - Long-term Total Exposure)を計算した。

有害性評価値は、日本産業衛生学会 OT の許容濃度 1ppm(4.4mg/m³)と、皮膚吸収はウサギの LD50 3250mg/kg の 1/100 の値である 3.25mg/kg/day を使用した。さらに、リスク特性比-吸入は、災害調査報告書¹⁾(平成 28 年 5 月)では、作業環境測定や個人ばく露測定結果から得られた最も高い値を許容濃度と比較しても遙かに下回る値であったため、吸入リスクは低いと判断し、リスク特性比-吸入に、0.053 (単位:ppm) (作業環境測定結果に記載のあるガス状オルト-トルイジンの最大値¹⁾)を乗じたリスク特性比-吸入(調整後)を計算し、リスク特性比-経皮と合計した値を、リスク係数として使用した。(表 1)

表 1 ECETOC TRA を利用したリスク係数

工程	リスク特性比-吸入	リスク特性比-経皮	リスク特性値	リスク特性比-吸入(調整後)	リスク係数
反応	2.13	4.22	6.35	0.11	4.33
蒸留	1.28	2.53	3.81	0.07	2.60
洗浄	2.03	8.70	10.73	0.11	8.81
乾燥	1.01	4.35	5.37	0.05	4.40

(2) 現従事者を対象とした追跡調査の内容は、以下である。

- 会社による特殊健康診断(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(NMP-22)

曝露指標は、過去曝露歴からの推定曝露量 A を用いた。

最終年度の特健康診断結果を芳香族アミン等曝露者(以下、曝露群)と非芳香族アミン等曝露者(以下、非曝露群)の 2 群に分け、有所見率について検討した。

統計手法は、膀胱がん罹患患者(以下、罹患群)と膀胱がん非罹患患者(以下、非罹患群)の 2 群に分け比較した。また、曝露群と非曝露群の 2 群に分け比較した。有意水準 5%、両側検定で Mann-Whitney の U 検定、 χ^2 検定、Fisher's exact test を行った。

(3) 健康管理

当該企業にて平成 29 年 4 月以降の膀胱がん罹患患者(2 名)の NMP-22 の推移、経時的な特殊健康診断結果から特徴を検討した。

(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

1.1 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、そのうち膀胱がんと診断された者は 10 名である。

対象者の特性を表 2 に示す。罹患群は、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 2 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 3 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 曝露推定量 A、B と膀胱がん

工程	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

1.2 OT 取扱い開始(1989-1999 年)した作業者に限定した検討

表 4、表 5 は、OT 取扱い開始(1989-1999 年)した作業員 36 名に限定し、非罹患群と罹患群の 2 群間で在職年数、年齢、喫煙歴、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、総 OT 工程、OT 洗浄工程、OT 乾燥工程でのみ有意差があった。

表 4 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
既往歴				
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/ 皮疹	2/25	8.0	3/9	33.3

**： p<0.01, *： p<0.05

表 5 OT 取扱い開始(1989-1999 年)の作業者に限定した曝露推定量 A と膀胱がん

	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

1.3 内的妥当性の検討

平成 28 年 1 月に膀胱がん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事者(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。

1.4 曝露推定量 C の検討

表 6 に、非罹患群と罹患群に分けて曝露推定量 A と曝露推定量 C 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)などの工程で比較検討した結果を示した。

表 6 膀胱がん非罹患群と罹患群における曝露推定量 A、C と工程の比較

	曝露推定量 A		曝露推定量 C	
	非罹患群 (n, 66)	罹患群 (n, 10)	非罹患群 (n, 66)	罹患群 (n, 10)
工程	平均値	平均値	平均値	平均値
総 OT	72.4	271.8**	416	1721**
反応	20.4	34.3	88	148
蒸留	7.5	5.3	19	14
洗浄	25.5	121.5**	225	1071**
乾燥	19.0	110.7**	84	488**
総 OA	29.3	60.6**	175	366**
反応	7.5	9.8	32	42
蒸留	2.2	1.3	6	3
洗浄	11.4	23.1*	100	204*
乾燥	8.3	26.4**	37	116**
総 MX	69.4	166.8**	400	1113**
反応	18.0	33.6	78	145
蒸留	7.3	6.1	19	16
洗浄	24.9	89.0**	219	784**
乾燥	19.1	38.1*	84	168*
総 PT	72.9	24.8	475	126
反応	21.8	2.0	94	9
蒸留	1.6	0.6	4	2
洗浄	36.0	4.0	317	35
乾燥	13.6	18.2	60	80
総 AN	82.9	177.4**	482	1095**
反応	21.1	27.1	91	117
蒸留	3.9	3.0	10	8
洗浄	28.4	72.7**	250	641**
乾燥	29.6	74.6**	130	329**
総 OCA	15.9	32.3**	94	208**
反応	3.4	3.5	15	15
蒸留	1.3	0.1	3	0
洗浄	6.1	15.0**	54	132**
乾燥	5.2	13.7**	23	61**

**： p<0.01, *： p<0.05

曝露推定量 A と曝露推定量 C に共通して 2 群間で有意差があった工程は、総 OT 工程、OT 洗浄工程、OT 乾燥工程、総 OA 工程、OA 洗浄工程、OA 乾燥工程、総 MX 工程、MX 洗浄工程、MX 乾燥工程、総 AN 工程、AN 洗浄工程、AN 乾燥工程、総 OCA 工程、OCA 洗浄工程、OCA 乾燥工程とすべて同様の工程で、PT 以外のすべての芳香族アミンの総工程、洗浄工程、乾燥工程であった。罹患群では各芳香族アミンの中で OT は最も平均曝露推定量が高く、次に MX、AN が高かった。

(2)平成 29 年 4 月から令和 2 年 1 月までの膀胱がん罹患者は 2 名(H29 年度 0 名、H30 年度 2 名、令和元年 0 名)だった。不同意、非曝露のため不参加、退職を除き、自記式健康調査票による自覚症状(ここ 1 カ月)は以下であった。

平成 29 年度は、140 名(のべ数)
 血尿 0/140、排尿時痛 2/140、残尿感 13/140 で、NMP22 高値(12.0>U/ml)は 5/140 で、内訳は膀胱がん既往者 2 名、膀胱がん既往歴のない者 3 名は 2 次健診で膀胱がんを否定された。

平成 30 年度は、163 名(のべ数)
 血尿 1/163、排尿時痛 1/163、残尿感 4/163 で、NMP-22 高値は 4/162 で、内訳は膀胱がん既往者 3 名で、膀胱がん既往歴のない者 1 名(図 7)であった。膀胱がん既往歴のない者 1 名は 2 次健診で膀胱がんを否定された。

令和 2 年度は、145 名(のべ数)
 血尿 1/145、排尿時痛 5/145、残尿感 14/145 で、NMP-22 高値は 0/145 で、膀胱がん既往者を除き全員正常範囲内であった。10 ≤ NMP-22 < 12 U/ml (正常範囲内高値)は 3/145 で、その内訳は OT 曝露推定量

200- < 300(非膀胱がん罹患)2 名、芳香族アミン等非曝露者 1 名であった。

図 7 NMP-22(正常範囲 < 12 U/ml) 測定値の推移(膀胱がん罹患者は除外)

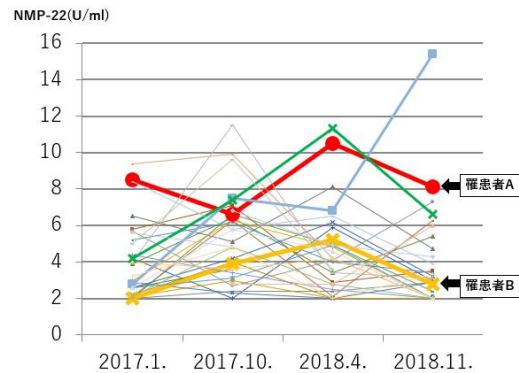


図 8(A 事業所)、図 9(B 事業所)は、最終年度の現従事者の特殊健康診断結果である(すべての膀胱がん罹患者を除外)。

図 8 A 事業所の特殊健康診断結果

	非曝露 A 群 (n=4)	曝露 A 群 (n=50)	p
年齢,平均(年)	44.0	46.4	0.61
従業年数,平均(年)	17.5	21.5	0.69
アミン曝露期間(年)	-	12.7	-
喫煙歴,n(%)	0(0)	36(72.0)	0.01
尿潜血(+ ≤),n(%)	1(25.0)	6(12.0)	0.44
尿沈渣(5 ≤),n(%)			
赤血球数	0(0)	4(8.0)	1.00
白血球数	0(0)	2(4.0)	1.00
扁平上皮数	0(0)	2(4.0)	1.00
硝子円柱数	0(0)	1(2.0)	1.00
尿細胞診,n(%)			
Class I	2(50.0)	7(14.0)	0.13
Class II	2(50.0)	43(86.0)	
Class III ≤	0(0)	0(0)	
NMP-22,平均(範囲)	3.3(2.0-	4.2(2.0-	0.41

	5.7)	11.9)	
OT 推定曝露量,n(%)			
0	—	6(12.0)	
0<-50	—	6(12.0)	
50<-100	—	10(20.0)	
100<-200	—	14(28.0)	
200<-300	—	8(16.0)	
300<-	—	6(12.0)	

非曝露 A 群と曝露 A 群の特性の比較では、2 群間に、年齢、従業年数に差はなかったが、曝露 A 群で喫煙歴が著明に高かった。一次健康診断の必須項目である尿潜血は 2 群間で明らかな差はなかった。また、一次健康診断時に医師が必要と認める場合に行う検査項目の尿沈渣、尿細胞診(パパニコラ法)は 2 群間で明らかな差は認めなかったが、曝露 A 群で尿中赤血球数(5 \leq /HPF:high power field) 4 名(8.0%)に、白血球数(5 \leq /HPF) 2 名(4.0%)に認めた。NMP-22(正常値<12 U/ml)は曝露 A 群の中に 10 \leq NMP-22<12 U/ml の正常範囲内高値を示す者が 2 名(OT 推定曝露 200- <300)いたが膀胱がんの診断はされなかった。

図 9 B 事業場の特殊健康診断結果

	非曝露 B 群 (n=37)	曝露 B 群 (n=48)	p
年齢,平均(年)	37.4	52.4	<0.001
従業年数,平均(年)	14.2	27.3	0.002
アミン曝露期間(年)	-	2.8	<0.001
喫煙歴,n(%)	26(72.2)	43(89.6)	0.048
尿潜血(+ \leq),n(%)	0(0)	4(8.3)	0.13
尿沈渣(5 \leq),n(%)			
赤血球数	2(5.4)	4(8.3)	0.69
白血球数	1(2.7)	1(2.1)	1.00
扁平上皮数	0(0)	0(0)	-

硝子円柱数	6(16.2)	9(18.8)	1.00
尿細胞診,n(%)			0.50
Class I	35(91.9)	45(85.4)	
Class II	4(8.1)	6(14.6)	
Class III \leq	0(0)	0(0)	
NMP-22,平均(範囲)	4.1(2.0-11.5)	3.7(2.0-9.7)	0.32
OT 推定曝露量,n(%)			
0	—	25(52.1)	
0<-50	—	12(25.0)	
50<-100	—	5(10.4)	
100<-200	—	6(12.5)	
200<-300	—	0(0)	
300<-	—	0(0)	

*:喫煙歴:n=36, 48 (非曝露 B 群、曝露 B 群)

非曝露 B 群と曝露 B 群の特性の比較では、曝露 B 群は、非曝露 B 群に比して、年齢が高く、従業年数が高く、喫煙率が高かった。一次健康診断の必須項目である尿潜血は曝露 B 群で 4 名(8.3%)であったが有意差はなかった。また、一次健康診断時に医師が必要と認める場合に行う検査項目の尿沈渣、尿細胞診(パパニコラ法)は 2 群間で明らかな差はなかった。NMP-22 は、非曝露 B 群の中に 10 \leq NMP-22<12 U/ml の正常範囲内高値を示す者がいたが膀胱がんの診断には至らなかった。

(3)

当該企業が平成 29 年 4 月以降に健診契機に膀胱がんと診断された 2 名は、ともに男性、平均年齢 58 歳、喫煙率(過去喫煙含)100%、平均 OT 曝露期間 15 年、作業内容は、ともに洗浄工程(ろ過含)と乾燥工程(製品の袋詰め含)のみに従事していた。OT 以外の芳香族アミンの芳香族アミンの曝露歴は、OA 1/2 名、MX 2/2 名、PT 1/2 名、AN 2/2 名、OCA 2/2

名であった。OT 曝露開始からの平均潜伏期間 21 年、膀胱炎の既往歴 2/2 名、過去の尿路系自覚症状は、血尿 2/2 名、排尿時痛 2/2 名、残尿感 2/2 名を認めた。

平成 29 年 4 月以降の診断までの平均観察期間 1.5 年、膀胱がん診断へ繋がった 1 次健診項目は、すべて尿沈渣による尿細胞診(パンパニコラ法)classⅢを指摘後、2 次健診による膀胱鏡検査、組織診により確定診断された。

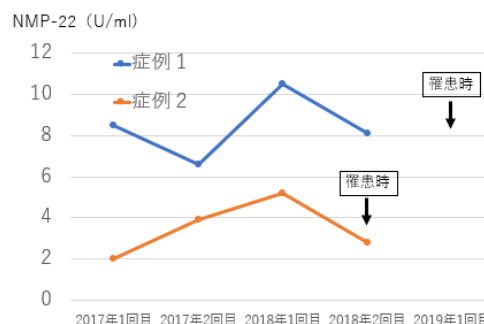
1 例目は、平成 29 年 4 月以降に特定健康診断を 7 回受診し(図 10)、尿細胞診 classⅢ(4 回目の健診、2 次健診で膀胱がんを否定)、一時的に $10 \leq \text{NMP-22} < 12 \text{ U/ml}$ の正常範囲内高値(5 回目の健診)を示し、最終的に尿細胞診 classⅢ(7 回目の健診)を示し、2 次健診で診断に至った。2 例目は、8 回受診し(図 10)、尿中赤血球数 1-4/HPF(1 回目の健診)、尿中白血球数 5-9/HPF(7、8 回目の健診)を繰り返し、尿細胞診 classⅢ(8 回目の健診)を示し、最終的に 2 次健診で診断に至った。2 症例とも診断前の健診で、軽度の尿中白血球数上昇、 $10 \leq \text{NMP-22} < 12 \text{ U/ml}$ の正常範囲内高値、尿細胞診 classⅢなど様々な膀胱がん関連所見を繰り返していた。(図 11)

図 10 罹患者の平成 29 年 4 月以降～診断に至るまで健診結果

症例	1	2
従業年数(年)	20.6	21.3
H29 年 4 月以降の観察期間(年)	1.4	1.7
罹患までの健診受診数	7	8
OT/OT 以外に関連する自他覚症状(回数)	0/0	0/0
有所見回数		
尿潜血(+ \leq)	0	0
尿沈渣(5 \leq)		
赤血球数	0	0

白血球数	0	2
扁平上皮数	0	0
硝子円柱数	0	1
尿細胞診 ClassⅢ \leq	2	2
NMP-22(診断時)	8.4	4.0

図 11 膀胱がん罹患までの NMP-22 の変化



D. 考察

(1)曝露推定量と膀胱がん罹患との関連

曝露推定量は、OT の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¹⁾、3つの計算式;①曝露推定量 A(各工程、曝露期間(年)×曝露頻度/月)、②曝露推定量 A に取扱い濃度、接触面積を考慮した曝露推定量 B、③曝露推定量 C(曝露推定量 A×ECETOC TRA を利用したリスク係数)で検討した結果、すべて同じ工程で関連を認めため、最も簡易な計算式である①曝露推定量 A を曝露指標とした。また、曝露推定量 A は、「芳香族アミン取扱い作業歴のある集団における膀胱がんの標準化罹患比」の曝露指標としても利用した。

罹患群では各芳香族アミンの中で OT は最も平均曝露推定量が高く、総 OT 工程、特に OT の洗浄・乾燥工程が最も膀胱がんに関連がある工程であると推察された。また、OT 取扱い開始(1989-1999 年)した作業者に限定し検討し

た場合も、同様で、総 OT 工程、OT 洗浄工程、OT 乾燥工程は、最も膀胱がんに関連があった。

洗浄・乾燥工程は OT 含有濃度が低く (OT 濃度 < 1.5%)、かつ高頻度接触の工程であったこと、製品の短期毒性試験で高濃度の製品が生体内で OT に変わる可能性が示唆されたことから³⁾、特定化学物質障害予防規則では、OT 等の特殊健康診断の実施対象者が重量の 1% を超えて含有する製剤その他の物の製造・取扱業務に常時従事している労働者⁴⁾であるが、特殊健康診断の対象者の選定には、1) 重量の < 1% 含有濃度の従事者の健診推奨の検討、2) 製品の生体内代謝物 (OT および OT 代謝物) を考慮しさらなる検討が必要である。MX (洗浄・乾燥工程)、AN (洗浄・乾燥工程) 等は、OT (洗浄・乾燥工程) の作業との重複作業でもあることから、複合曝露による影響も考慮を要する。

膀胱がんに関連のある症状とされる血尿⁵⁾は、本研究でも関連を認め、既往歴の膀胱炎も膀胱がん罹患者と関連を認めた。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。

(2) A 事業所の芳香族アミン等の曝露群 (曝露 A 群) は、B 事業場の芳香族アミン等の曝露群 (曝露 B 群) と比して OT 推定曝露量が高かった。

最終年度の特定健康診断結果は、曝露 A 群および曝露 B 群は、非曝露群と有意な所見の差は認めなかった。しかし、曝露群は、尿潜血を 12.0% (曝露 A 群)、8.3% (曝露 B 群)、尿沈渣の赤血球数 ($5 \leq /\text{HPF}$) の有所見を 8.0% (曝露 A 群)、8.3% (曝露 B 群) に認めていること、膀胱がん患者 (2 名) は、診断前健診で膀胱がん関連所見を繰り返し認めていたこと、血尿は膀胱がんに関連のある症状である⁵⁾ことから、特

殊健康診断および離職後は健康管理手帳 (「労働安全衛生法施行令の一部を改正する政令案要綱」及び「労働安全衛生規則の一部を改正する省令案要綱」厚生労働省発基安 0319 第 1 号 平成 31 年 3 月) を取得し、今後も継続した健診による注意深い観察が必要である。

平成 29 年 4 月以降に診断された膀胱がん罹患患者 2 名の特性は、平均年齢 58 歳、ともに喫煙者 (過去喫煙含)、平均 OT 曝露期間 15.3 年、OT 曝露開始からの平均潜伏期間 21.0 年で、OT 推定曝露量は $100 < 300$ 、ともに MX、AN 等の複合曝露があった。これまでの膀胱がん罹患患者 (10 名) と同様の特性 (平均年齢 56 歳、喫煙率 80%、平均 OT 曝露期間 16.5 年、OT 曝露開始からの平均潜伏期間 21.9 年、OT 推定曝露量 平均 274、範囲: $105 - 440$)⁶⁾ を示し、芳香族アミン等に複合曝露のある OT 推定曝露量 100 以上の OT 曝露者が、約 20 年の潜伏期間を経て発症していた。

(3) 健康管理

健康項目の評価

罹患患者の平成 29 年 4 月以降～診断に至るまで健診結果 (図 10) から、継続性のある健診が必要かつ重要である。また慢性尿路感染症は、膀胱がんのリスクをあげるという報告⁷⁾もあることから尿路系炎症・感染を示唆する尿中白血球数の上昇の存在も注視したい。

現在の特健康診断の一次健康診断の必須項目と医師が必要と認める場合に行う検査項目 (尿中 OT 量の測定、尿沈渣検鏡の検査、尿沈渣のパパニコラ法による細胞診の検査) がある。いずれの罹患患者の確定診断は、尿細胞診 class III を指摘後の 2 次健診による精査によるものであった。より早期の診断には検査が必要か否かを判断する「医師」の判断が重要である。一定の推定曝露量のある OT 取り扱い従

事者へは、1次健診で尿沈渣検鏡の検査、尿沈渣のパパニコラ法による細胞診をおこなうべきである。

本調査で特殊健康診断に追加測定した NMP-22 は、ベンジジンの特殊健康診断項目見直し案⁸⁾で一次健診項目に追加されている腫瘍マーカーである。罹患者 2 名は、ともに平成 29 年 1 月から 4 回の測定の中で高値 ($12 \leq$ U/ml) を示さなかった。しかし、1 名は、正常範囲内で上昇傾向を示し、一時的に正常範囲内高値 ($10 \leq$ NMP-22 < 12 U/ml) を示していた。健診項目としての NMP-22 の測定は、新規膀胱がん罹患者数が少ないため解釈に限界があるが、 $10 \text{ U/ml} \leq$ NMP-22 は膀胱がんの臨床前期の所見なのか、さらなる検討の必要がある。(図 11)

E. 結論

芳香族アミン等に複合曝露のある OT 推定曝露量 100 以上の OT 曝露者が、約 20 年という潜伏期間を経て発症していた。膀胱がんと関連のある症状は血尿、膀胱がんと関連のある既往歴の膀胱炎を認めた。芳香族アミン等の曝露歴のある現従事者は、最終年度の特健康診断結果で尿潜血を 8% に認めており、今後も本集団の注意深い経過観察が必要である。

F. 健康危険情報

記載事項なし

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; 60: 307-311.

Eitaki Y, Nakano M, Kawai T, Omae K, Takebayashi T. Biological monitoring of ortho-toluidine in urine pretreated by an enzymatic deconjugation method. J Occup Health. 2019;61:349-357.

Nakano M, Shinagawa T, Eitaki Y, Omae K, Takeuchi A, Iwasawa S, Fukai K, Yoshioka N, Tanaka S, Koda S, Sobue T, and Takebayashi T. Risk of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine and other aromatic amines. (投稿中)

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.

中野真規子。近年の職業がんをめぐる動向。産業医学ジャーナル。2019;42(6):8-11.

田中茂、岩澤聡子、寺内靖裕、中野真規子。化学物質の経皮吸収曝露防護のための化学防護手袋を学ぶ。産業医学ジャーナル。2019;42(1):61-67.

2. 学会発表

Nakano M, et al. Epidemic of bladder cancer: Ten cases in Japanese male workers exposed mainly to ortho-toluidine. The 26th International Symposium on Epidemiology in Occupational Health (EPICOH). 2017. 2017.8.28-31. Edinburgh, Scotland.

Nakano M, et al. Epidemic of bladder cancer in Japanese male workers exposed mainly to ortho-toluidine. The 27th International Symposium on Epidemiology in Occupational Health (EPICOH). 2019.4 (New Zealand,

Wellington)

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)

中野真規子. オルト-トルイジン曝露による膀胱癌発症(疫学研究より). 第 2 回学防護手袋研究会 2018 年 10 月(東京都中央区)

永滝陽子他. 酵素による脱抱合体反応を用いた尿中オルトトルイジン測定法の開発. 第 91 回日本産業衛生学会 2018 年 5 月(熊本県熊本市)

永滝陽子他. 脱抱合処理の有無と尿中オルトトルイジンおよび代謝物の濃度の比較. 第 92 回日本産業衛生学会 2019 年 5 月(愛知県名古屋)

中野真規子. オルト-トルイジン曝露による膀胱がん. 第 29 回 東京大学 環境安全研究センター シンポジウム. 2019.12.11

中野真規子他. オルト-トルイジン曝露作業者の時間断面研究. 第 93 回日本産業衛生学会 2020 年 5 月(北海道旭川市)

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)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. 平成 28 年 5 月. <https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11305000-Roudoukijunkyokuzenseiseibu-Kagakubushitsutaisakuka/0000126164.pdf>(令和 2 年 5 月 18 日アクセス可能)

2)European Centre For Ecotoxicology and toxicology of Chemicals (ECETOC). Targeted Risk Assessment (TRA).

<http://www.ecetoc.org/tools/targeted-risk-assessment-tra/>(令和 2 年 5 月 18 日アクセス可能)

3)鰐渕 英機. オルトトルイジン等の吸収・代謝に関する研究. 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. <https://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do?resrchNum=201822010A>(令和 2 年 5 月 18 日アクセス可能)

4)厚生労働省. オルト-トルイジンと MOCA の特殊健康診断について.

https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11200000-Roudoukijunkyoku/170301_02.pdf(令和 2 年 5 月 18 日アクセス可能)

5)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

6)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; 60: 307-311.

7)Akhtar, Saeed; Al-Shammari, Ahmad; Al-Abkal, Jarrah. Chronic urinary tract infection and bladder carcinoma risk: a meta-analysis of case-control and cohort studies. World

Journal of Urology. 2018;36:839-848.
<https://doi.org/10.1007/s00345-018-2206-x>
8) 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> (令和2年5月18日アクセス可能)

3. 【書籍、雑誌発表】

- ・田中茂:皮膚からの吸収・ばく露を防ぐ! オルト-トルイジンばく露による膀胱がん発生から学ぶ 中央労働災害防止協会 (2017)
- ・武林亨、田中茂、中野真規子、岩澤聡子:国内外の産業医学に関する文献紹介:化学物質の経皮吸収と職業がん、産業医学ジャーナル 41(2) 89-93 (2018)
- ・田中茂、宮内博幸、寺内靖裕、和田丈晴:共同シンポジウム 講演3 経皮ばく露防止のた

めの保護具(化学防護手袋)、労働衛生工学 57 12-21 (2018)

- ・田中茂:皮膚からの吸収・ばく露を防ぐ! 化学防護手袋の適正使用を学ぶ 中央労働災害防止協会 (2018)
- ・田中茂、岩澤聡子、寺内靖裕、中野真規子:産業医に役立つ最新の研究報告:化学物質の経皮吸収曝露防護のための化学防護手袋を学ぶ、産業医学ジャーナル 42(1) 61-67 (2019)
- ・田中茂:基礎と実践 安全衛生保護具の話 (1)化学物質の経皮ばく露を防ぐ化学防護手袋(前編)安全と健康 70(1) 55-57 (2019)
- ・田中茂:基礎と実践 安全衛生保護具

<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyo-Soumuka/0000089268.pdf> (令和2年5月18日アクセス可能)

平成 30 年度～令和 1 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)

芳香族アミン取扱い作業歴のある集団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某化学工場において、膀胱がんの多発事例が報告された。そこで今回の研究では、当該工場で芳香族アミンの取扱い歴のある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国民の人口データ・膀胱がん罹患データを用いて、芳香族アミン取扱い歴のある作業者を観察集団、国民を基準集団とした場合における、膀胱がんの標準化罹患比(SIR:Standardized Incidence Ratio)を算出した。

その結果、観察集団の標準化罹患比(罹患率が基準集団と等しい場合を 1 とする)は、61.0(95%信頼区間:32.1 - 106.1)と有意に高値であった。また、芳香族アミンの累積曝露量が多い集団ほど、標準化罹患比が大きい傾向が見られた。

今回の研究結果からは、芳香族アミンへの曝露が膀胱がんの発症に強く関与していたことが示唆された。ただし分析に用いたデータの都合上、膀胱がん罹患に対する寄与度を芳香族アミン別に分離して定量的に示すことは困難であった。

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;
現 日本生命保険相互会社)

A. 目的

2015 年、芳香族アミンを取り扱っていた某化学工場において、膀胱がんの多発事例が報告された¹⁾。しかしこの時点では、当該工場従業員の膀胱がん罹患率が、日本国民全体と比較してどの程度の水準であったのかについて、疫学的な検討はなされていなかった。

そこで我々は 2017 年度に、当該工場従業員の作業歴データ・膀胱がんの罹患データを用いて、国民に対する膀胱がんの標準化罹患比 (SIR: Standardized Incidence Ratio) を算出し、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²⁾。

しかし 2017 年度の研究では、対象とするデータの抽出方法 (実際には芳香族アミンを取り扱っていなかった従業員も分析対象に含まれていた) や、分析手法 (信頼性の低い“作業別曝露濃度”を累積曝露量の計算に取り入れていた)、潜伏期間の設定 (0 年/3 年/5 年と短期であった) などについて、改善の余地が存在していた。

よって 2018 年度は、当該工場で芳香族アミンを実際に取り扱っていた作業者のみを対象とした上で、信頼性の高い「従事年数×作業頻度」を推定曝露量とし、さらに潜伏期間を 0 年/5 年/10 年/15 年とした場合の SIR を算出した³⁾。

今年度の研究にあたっては、当該工場従業員の追跡調査データを更新し、観察期間の延長と、新たな膀胱がん罹患患者の発生を反映した。また、SIR の計算を更に精緻化するため、観察開始日を分析対象とする芳香族アミンの取扱い

開始日とし、当該芳香族アミンの取扱い作業に従事していなかった従業員は、その SIR 計算から除外することとした。

B. 研究方法

当該工場の従業員 (退職者を含む) に対して疫学調査を実施した慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室より、作業歴データの提供を受けた。

データ提供のあった従業員 120 名のうち、詳細な作業歴が不明であった 12 名、芳香族アミンの取扱い作業を行っていなかった 3 名、女性 7 名 (女性の膀胱がん罹患患者が 0 名であり、SIR 計算ができないため) を分析対象から除外した。

この結果、芳香族アミンの取扱い作業歴を確認できた男性 98 名が分析対象となった (図 1)。なお、対象者における膀胱がん罹患患者は 11 名であった。

SIR の算出においては、観察人年の計算が必要となる。今回の調査では、観察開始日を「分析対象とする芳香族アミン取扱い作業の開始日」、観察終了日を「膀胱がん罹患患者:膀胱がん診断日」「現職者 (24 名):2020 年 1 月 31 日」「生存を確認できた退職者 (55 名):最終生存確認日」「生存を確認できなかった退職者 (8 名):退職日」として人年計算を行った (総観察人年:2006.4 人年、観察期間中央値:20.8 年)。

芳香族アミン取扱い作業歴のデータには、従業員別・作業期間別の「取扱い物質」「作業工程」「作業頻度」の情報が含まれていた (表 1)。

「取扱い物質」は、オルト-トルイジン

(OT)、オルト-アニシジン(OA)、2,4-キシリジン(MX)、パラ-トルイジン(PT)、アニリン(AN)、オルト-クロロアニリン(OCA)、その他の7種類に分類されていた。

「作業工程」は、“反応”、“蒸留”、“濾過・洗浄”、“乾燥・袋詰め”の4種類に分類されていた。

「作業頻度」は、月間の平均作業日数が、“10日以上”、“2～9日”、“1～2日”、“1日未満”の4種類に分類されていた。

作業に従事した期間が同一であっても、実際に作業に従事した頻度によって曝露量が異なると考えられたため、月間の平均作業日数が10日以上であれば「10」、2～9日であれば「5」、1～2日であれば「1」、1日未満であれば「0」を、「作業頻度係数」として仮定した。そして、対象とする作業期間の「従事年数」と「作業頻度係数」の乗算値を、その期間における芳香族アミンの「曝露量」とした(同一期間中に複数の作業工程に従事していた場合は、それぞれの工程における「曝露量」を合算した)。

■曝露量計算の例(表1参照)

A氏の1988年1月～1989年12月(1年間)におけるOT(オルト-トルイジン)の月間の平均作業頻度は、反応工程が「10日以上」、蒸留工程が「1日未満」、濾過・洗浄工程が「2～9日」、乾燥・袋詰め工程が「1日未満」である。よって、この期間におけるOTの曝露量は、「 $1 \times (10+0+5+0)=15$ 」となる。

上記の計算で得られた曝露量を、観

察開始時点から加算していくことで、累積曝露量別の人年を得ることができる。今回の分析では、累積曝露量を「0(Reference)」「0超50未満」「50以上100未満」「100以上200未満」「200以上300未満」「300以上」の6グループに層別化した(ただし、曝露量の少なかったOCAは累積曝露量100以上を同一グループ、OAとPTは累積曝露量50以上を同一グループとした)。

また、芳香族アミンへの曝露から膀胱がんの発症までには一定の「潜伏期間」が存在することも考えられたため⁴⁻⁷⁾、今回の調査では、0年/5年/10年/15年の4パターンの「潜伏期間」を設定し、それぞれにおける曝露量を計算した。

以上の方法に基づき、観察集団における芳香族アミン別・潜伏期間別・累積曝露量別・年齢階級別の人年計算を行った。なお今回の調査では、観察開始日を分析対象の芳香族アミン取扱い開始日とし、当該芳香族アミンの取扱い作業に従事していなかった従業員は人年計算から除外したことから、分析の対象者数や観察人年は、対象とする芳香族アミンによって異なっている(表2)。

ところで、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。

今回の研究では、SIR計算における基準集団のデータとして、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「がん罹患データ」を用いた。具体的には、「地域がん登録による全国推計値

(～2013 年)」「地域がん登録による全国実測値(2014 年～2015 年)」「全国がん登録による全国実測値(2016 年)」の、膀胱がん罹患数データと総人口データ(いずれも男性のみ)を用いた⁸⁾。当該工場で発生した膀胱がんには上皮内癌の症例も含まれていたため、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。

なお、SIR 計算において正確を期すのであれば、観察集団の人年を暦年別に層別化した上で、基準集団の罹患率も暦年別のものを用いて計算を行うべきである。しかし、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～2016 年のデータ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かったことを鑑み(図 2)、基準集団の 2003 年～2016 年における膀胱がん罹患数・人口を合算して得られた年齢階級別の膀胱がん罹患率をもとに、SIR 計算を行うこととした。

SIR の計算と同時に、Mid-P exact test による 95%信頼区間の推定を行った。また、累積曝露量が多いグループほど SIR が高い傾向にあるか否かを判定するため、計算された芳香族アミン別・潜伏期間別・累積曝露量別の SIR について、Kendall 順位相関係数と、その P 値(有意水準 5%)を算出した。総計ソフトウェアは、OpenEpi Version 3.01 および EZR Version 1.41 を用いた^{9,10)}。

本研究は、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. 研究結果

表 3～9 に、芳香族アミン別・潜伏期間別・累積曝露量別の SIR と、Kendall 順位相関係数の計算結果を示す。

当該工場の芳香族アミン取扱い作業者全体における、一般国民に対する膀胱がんの SIR (罹患率が基準集団と等しい場合を1とする)は、61.0 (95%信頼区間:32.1 - 106.1)であった。

また、OT(潜伏期間:0 年/5 年/10 年)と AN(潜伏期間:5 年)において、累積曝露量が多い集団ほど SIR が大きい傾向(Kendall 順位相関係数が正、かつ P 値<0.05)が認められた。

D. 考察

芳香族アミン取扱い歴のある作業者集団の SIR が有意に高かったことと、一部の芳香族アミンにおいて累積曝露量が多い集団ほど SIR が大きい傾向が見られたことから、芳香族アミンへの曝露が、膀胱がんの罹患に強く関与していた可能性が示唆された。

研究の限界としては、今回の方法で算出した曝露量が、芳香族アミンという化学物質の“真の曝露量”を示していない点が挙げられる。今回示した曝露量は、作業の「従事年数」と「頻度」の乗算値、すなわち“作業回数”を意味しているに過ぎず、作業工程による曝露量の違いも考慮されていない。“真の曝露量”を算出するためには、作業者一人一人の芳香族アミン曝露量を、何らかの生化学検査等によって明らかにする必要がある。しかし本研究を行った時点では、芳香族

アミンの曝露量を正確に反映する検査は開発されておらず、“真の曝露量”を用いる分析は困難であったため、今回示した方法によって推計された曝露量を用いることとなった。

本研究のもう一つの限界として、「芳香族アミンの種類ごと」に、膀胱がん罹患への寄与度を分析できなかった点が挙げられる。今回の分析結果では、特定の潜伏期間設定時にオルト-トルイジン(OT)およびアニリン(AN)の累積曝露量が多いほど SIR が高い傾向が見られた。しかし本研究で用いた作業歴データによれば、同一の作業期間中に、複数種類の芳香族アミンに同時に曝露していた作業者が多く存在していたことが判明している。そのため、統計学的分析によって膀胱がん罹患に対する寄与度を芳香族アミンの種類別に分離し、定量的に示すことは困難であった。芳香族アミンの種類別の寄与度に関しては、混合曝露のない集団を対象とした疫学調査が別途必要と思われた。

E. 結論

芳香族アミン取扱い作業者を観察集団、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(SIR)は有意に高値であり、一部の芳香族アミンでは、累積曝露量が多い集団ほど SIR が大きい傾向が見られた。

この結果は、芳香族アミンへの曝露が膀胱がんの発症に強く関与していたことを示唆している。ただし、今回の分析方法は真の曝露量を反映しておらず、かつ多くの作業者が複数種類の芳香族アミ

ンに混合曝露していたため、膀胱がん罹患に対する寄与度を芳香族アミン別に分離して定量的に示すことは困難であった。

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. 災害調査報告書 A-2015-07 (一般公開版) 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. 平成 28 年 5 月.
2. 厚生労働科学研究費補助金 労働安全衛生総合研究事業. オルト-トルイジン等芳香族アミンによる膀胱がんの原因解明と予防に係る包括的研究. 平成 29 年度 総括・分担研究報告書分担研究報告書. 平成 30 (2018)年 3 月. 8-15 ページ.
3. 厚生労働科学研究費補助金 労働安全衛生総合研究事業. オルト-トルイジン等芳香族アミンによる膀胱がんの原因解明と予防に係る包括的研究. 平成 30 年度 総括・分担研究報告書分担研究報告書. 平成 31 (2019)年 3 月. 9-23 ページ.

4. 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.
5. Stasik MJ. Carcinomas of the urinary bladder in a 4-chloro-o-toluidine cohort. *Int Arch Occup Environ Health.* 1988;60(1):21-4.
6. 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.
7. 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.
8. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」(全国がん罹患モニタリング集計(MCIJ))
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/dl/index.html
(2020年2月20日アクセス可能)
9. 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 2020/2/20).
10. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Mar;48(3):452-8.

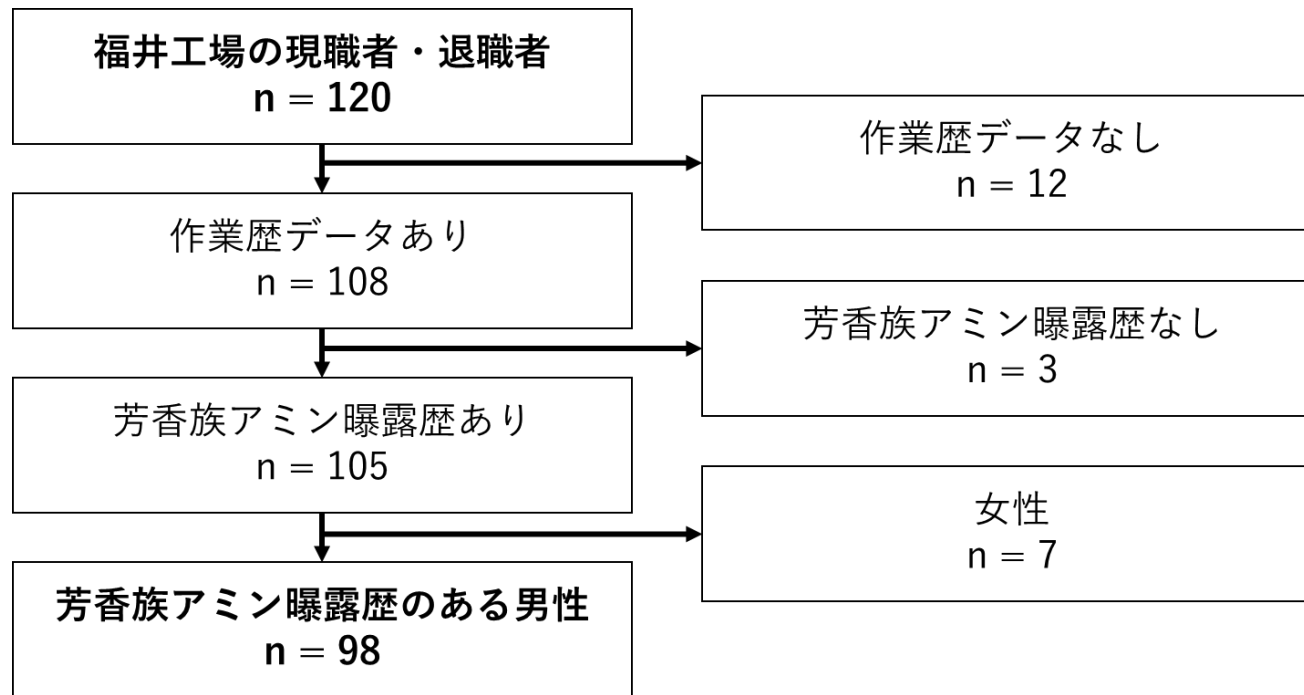


図1 分析対象の抽出

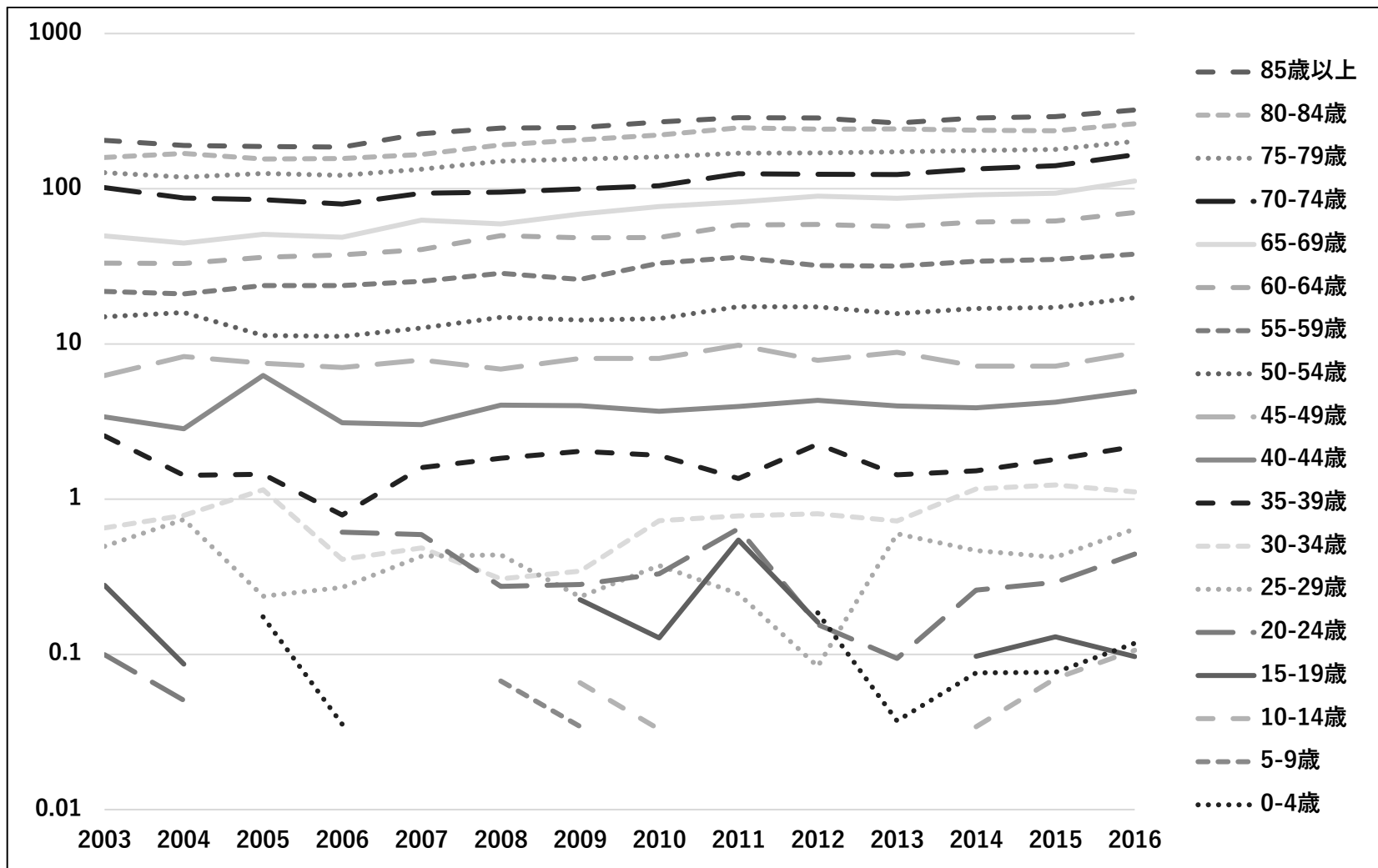


図2 日本国民の膀胱がん罹患率(10万対・男性・上皮内癌を含む)

表 2 対象とした芳香族アミン別の分析対象者数・観察人年

芳香族アミンの種類	対象者数	観察人年
いずれかの芳香族アミン	98	2006.4
オルト-トルイジン (OT)	94	1945.6
オルト-アニシジン (OA)	64	1113.5
2,4-キシリジン (MX)	92	1905.8
パラ-トルイジン (PT)	18	183.9
アニリン (AN)	95	1956.5
オルト-クロロアニリン (OCA)	78	1467.5

表 3 いずれかの芳香族アミンに曝露した集団における SIR

いずれかの芳香族アミン (n=98)	累積曝露量	観察人年	実罹患数	期待罹患数	SIR(基準=1)	95%信頼区間
	全て	2006.4	11	0.180	61.0	32.1 - 106.1

表 4 オルト-トルイジン(OT)に曝露した集団における SIR

OT (n=94)	累積曝露量	観察人年	実罹患数	期待罹患数	SIR(基準=1)	95%信頼区間
	全て	1945.6	11	0.180	61.3	32.2 - 106.5
潜伏期間 0年	0<-<50	1028.9	0	0.096	0	n/a
	50-<100	391.9	1	0.020	50.7	2.5 - 249.9
	100-<200	317.6	2	0.036	55.9	9.4 - 184.5
	200-<300	125.1	3	0.012	246.0	62.6 - 669.5
	300-	82.0	5	0.016	317.2	116.2 - 703.0
	Kendall 順位相関係数				1 (P=0.02)	
潜伏期間 5年	0	449.9	0	0.009	0	n/a
	0<-<50	834.8	0	0.095	0	n/a
	50-<100	305.0	1	0.020	50.4	2.5 - 248.5
	100-<200	238.3	5	0.036	139.8	51.2 - 310.0
	200-<300	74.7	1	0.009	110.5	5.5 - 544.8
	300-	42.8	4	0.011	374.2	118.9 - 902.7
Kendall 順位相関係数				0.83 (P=0.02)		
潜伏期間 10年	0	884.3	0	0.026	0	n/a
	0<-<50	631.6	0	0.089	0	n/a
	50-<100	217.6	1	0.020	49.8	2.5 - 245.4
	100-<200	153.3	6	0.032	187.7	76.1 - 390.4
	200-<300	38.5	3	0.007	430.3	109.5 - 1171.0
	300-	20.3	1	0.005	202.4	10.1 - 998.1
Kendall 順位相関係数				0.83 (P=0.02)		
潜伏期間 15年	0	1290.3	0	0.055	0	n/a
	0<-<50	424.2	0	0.079	0	n/a
	50-<100	130.5	6	0.019	320.5	129.9 - 666.7
	100-<200	75.1	3	0.022	138.3	35.2 - 376.3
	200-<300	13.4	2	0.002	963.1	161.5 - 3182.0
	300-	12.0	0	0.003	0	n/a
Kendall 順位相関係数				0.3 (P=0.42)		

表 5 オルト-アニシジン(OA)に曝露した集団における SIR

OA (n=64)	累積曝露量	観察人年	実罹患数	期待罹患数	SIR(基準=1)	95%信頼区間
	全て	1113.5	10	0.119	83.9	42.6 - 149.5
潜伏期間 0 年	0 < - <50	821.7	3	0.088	34.0	8.6 - 92.5
	50 - <100	258.6	7	0.027	262.1	114.6 - 518.5
	100 - <200	33.2	0	0.004	0	n/a
	Kendall 順位相関係数				-0.33 (P=1)	
潜伏期間 5 年	0	308.6	0	0.011	0	n/a
	0 < - <50	635.0	9	0.086	104.8	51.1 - 192.3
	50 - <100	141.8	1	0.019	53.9	2.7 - 265.9
	100 - <200	28.2	0	0.004	0	n/a
Kendall 順位相関係数				-0.18 (P=0.72)		
潜伏期間 10 年	0	576.6	2	0.026	76.0	12.7 - 251.1
	0 < - <50	421.8	7	0.074	95.1	41.6 - 188.2
	50 - <100	92.0	1	0.015	65.8	3.3 - 324.4
	100 - <200	23.2	0	0.004	0	n/a
Kendall 順位相関係数				-0.67 (P=0.33)		
潜伏期間 15 年	0	775.6	2	0.046	43.8	7.3 - 144.6
	0 < - <50	268.9	7	0.059	118.3	51.8 - 234.1
	50 - <100	50.8	1	0.010	96.0	4.8 - 473.7
	100 - <200	18.2	0	0.004	0	n/a
Kendall 順位相関係数				-0.33 (P=0.75)		

表 6 2,4-キシリジン(MX)に曝露した集団における SIR

MX (n=92)	累積曝露量	観察人年	実罹患数	期待罹患数	SIR(基準=1)	95%信頼区間
	全て	1905.8	11	0.176	62.4	32.8 - 108.5
潜伏期間 0 年	0< - <50	1047.2	0	0.096	0	n/a
	50 - <100	357.3	1	0.021	46.7	2.3 - 230.6
	100 - <200	348.8	4	0.038	104.2	33.1 - 251.3
	200 - <300	96.3	4	0.010	412.1	131.0 - 994.1
	300 -	56.2	2	0.011	187.8	31.5 - 620.5
	Kendall 順位相関係数				0.8 (P=0.08)	
潜伏期間 5 年	0	439.9	0	0.009	0	n/a
	0< - <50	858.1	0	0.095	0	n/a
	50 - <100	273.9	1	0.022	44.5	2.2 - 219.4
	100 - <200	249.0	6	0.036	168.2	68.2 - 349.9
	200 - <300	53.9	3	0.007	402.3	102.3 - 1095.0
	300 -	31.0	1	0.006	155.4	7.8 - 766.4
Kendall 順位相関係数				0.69 (P=0.06)		
潜伏期間 10 年	0	864.3	0	0.025	0	n/a
	0< - <50	661.2	0	0.091	0	n/a
	50 - <100	197.7	2	0.025	79.1	13.3 - 261.5
	100 - <200	139.1	7	0.027	254.6	111.3 - 503.6
	200 - <300	25.3	2	0.003	575.4	96.5 - 1901.0
	300 -	18.2	0	0.004	0	n/a
Kendall 順位相関係数				0.45 (P=0.23)		
潜伏期間 15 年	0	1262.5	0	0.052	0	n/a
	0< - <50	456.8	2	0.083	24.0	4.0 - 79.2
	50 - <100	101.5	4	0.021	186.1	59.1 - 448.9
	100 - <200	60.8	5	0.015	344.0	126.0 - 762.4
	200 - <300	13.6	0	0.001	0	n/a
	300 -	10.5	0	0.003	0	n/a
Kendall 順位相関係数				0 (P=1)		

表 7 パラ-トルイジン(PT)に曝露した集団における SIR

PT (n=18)	累積曝露量	観察人年	実罹患数	期待罹患数	SIR(基準=1)	95%信頼区間
	全て	183.9	3	0.014	211.8	53.9 - 576.3
潜伏期間 0 年	0 < - < 50	137.3	3	0.010	312.6	79.5 - 850.9
	50 - < 100	46.6	0	0.005	0	n/a
	Kendall 順位相関係数				-1 (P=1)	
	0	88.4	2	0.004	456.5	76.5 - 1508.0
潜伏期間 5 年	0 < - < 50	63.8	1	0.006	179.8	9.0 - 886.7
	50 - < 100	31.7	0	0.004	0	n/a
	Kendall 順位相関係数				-1 (P=0.33)	
	0	140.0	3	0.007	400.8	102.0 - 1091.0
潜伏期間 10 年	0 < - < 50	17.4	0	0.003	0	n/a
	50 - < 100	26.5	0	0.004	0	n/a
	Kendall 順位相関係数				-0.82 (P=0.22)	
	0	150.0	3	0.008	375.3	95.5 - 1021.0
潜伏期間 15 年	0 < - < 50	12.4	0	0.002	0	n/a
	50 - < 100	21.5	0	0.004	0	n/a
	Kendall 順位相関係数				-0.82 (P=0.22)	

表 8 アニリン(AN)に曝露した集団における SIR

AN (n=95)	累積曝露量	観察人年	実罹患数	期待罹患数	SIR(基準=1)	95%信頼区間
	全て	1956.5	11	0.177	62.1	32.7 - 108.0
潜伏期間 0年	0< - <50	975.1	0	0.091	0	n/a
	50 - <100	361.8	1	0.019	53.2	2.7 - 262.5
	100 - <200	378.0	5	0.040	126.5	46.4 - 280.4
	200 - <300	132.5	3	0.014	209.5	53.3 - 570.3
	300 -	109.1	2	0.013	149.3	25.0 - 493.3
	Kendall 順位相関係数				0.8 (P=0.08)	
潜伏期間 5年	0	455.6	0	0.009	0	n/a
	0< - <50	779.8	0	0.090	0	n/a
	50 - <100	293.1	2	0.020	99.6	16.7 - 329.2
	100 - <200	285.6	4	0.038	106.3	33.8 - 256.4
	200 - <300	83.4	3	0.012	240.9	61.3 - 655.6
	300 -	59.1	2	0.008	237.8	39.9 - 785.5
Kendall 順位相関係数				0.83 (P=0.02)		
潜伏期間 10年	0	885.7	0	0.025	0	n/a
	0< - <50	586.3	0	0.084	0	n/a
	50 - <100	226.3	3	0.023	132.4	33.7 - 360.4
	100 - <200	183.9	4	0.033	121.1	38.5 - 292.0
	200 - <300	56.8	4	0.008	479.3	152.3 - 1156.0
	300 -	17.5	0	0.004	0.0	n/a
Kendall 順位相関係数				0.3 (P=0.42)		
潜伏期間 15年	0	1294.9	0	0.053	0	n/a
	0< - <50	385.0	1	0.074	13.5	0.7 - 66.8
	50 - <100	151.5	3	0.022	133.6	34.0 - 363.6
	100 - <200	97.5	7	0.024	296.7	129.8 - 586.9
	200 - <300	16.1	0	0.001	0	n/a
	300 -	11.5	0	0.003	0	n/a
Kendall 順位相関係数				0 (P=1)		

表 9 オルト-クロロアニリン(OCA)に曝露した集団における SIR

OCA (n=78)	累積曝露量	観察人年	実罹患数	期待罹患数	SIR(基準=1)	95%信頼区間
	全て	1467.5	11	0.138	79.5	41.8 - 138.2
潜伏期間 0 年	0 < - <50	1194.5	8	0.111	71.9	33.4 - 136.5
	50 - <100	215.0	3	0.022	139.4	35.5 - 379.5
	100 - <200	58.0	0	0.006	0	n/a
	Kendall 順位相関係数				-0.33 (P=1)	
潜伏期間 5 年	0	370.7	0	0.009	0	n/a
	0 < - <50	912.2	9	0.107	84.5	41.2 - 155.1
	50 - <100	143.3	2	0.018	109.5	18.4 - 361.9
	100 - <200	41.4	0	0.005	0	n/a
Kendall 順位相関係数				0.18 (P=0.72)		
潜伏期間 10 年	0	707.5	0	0.022	0	n/a
	0 < - <50	635.0	10	0.097	103.6	52.6 - 184.6
	50 - <100	94.0	1	0.015	65.9	3.3 - 325.1
	100 - <200	31.0	0	0.005	0	n/a
Kendall 順位相関係数				-0.18 (P=0.72)		
潜伏期間 15 年	0	1002.1	0	0.043	0	n/a
	0 < - <50	390.4	10	0.080	125.1	63.6 - 223.0
	50 - <100	54.0	1	0.011	89.1	4.5 - 439.2
	100 - <200	21.0	0	0.004	0	n/a
Kendall 順位相関係数				-0.18 (P=0.72)		

平成 30 年度～令和 1 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 鰐渕 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、本研究では芳香族アミン取扱事業所で発生した職業性膀胱がん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がんに関わる分子メカニズムの解明を行った。芳香族アミン取扱事業所で発生した職業性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結果、TP53 や FGFR3 などが全例で認められ、さらにこれまでの報告では変異率が高くない FLT3、KDR、STK11、PDGFR、APC、ERBB4、RET なども高率に変異が認められた。ラットを用いた 36 週間二段階膀胱発がん試験では、AAOT が BBN 誘発ラット膀胱発がんに対して促進作用を有することを明らかにした。また、AAOT 投与時の尿中から AAOT および *o*-toluidine (OTD) などの 7 つの下流代謝物が検出され、OTD 濃度は AAOT 及び多の代謝物よりも少なくとも 10 倍以上高いことを明らかになった。さらに、4 週間短期試験において、AAOT 投与群では膀胱尿路上皮の細胞増殖活性亢進とともに、DNA 傷害の指標である γ -H2AX 形成の亢進を認めた。加えて、JUN とその下流にある「腫瘍の増生」関連遺伝子 (PTGS2、KDR、MMP2、DUSP1、EGR1、SERPINE1、TNC、および PLAU) の発現亢進が明らかになった。これらの結果から、AAOT が他の発がん性芳香族アミンと同様に、膀胱発がん性を有することが強く示唆された。その発がんメカニズムに JUN シグナリング伝達経路の活性化が関与していることが示唆された。さらに、尿中代謝物である OTD が AAOT 誘発膀胱発がんの鍵となる物質であることを示した。

研究協力者

魏民、行松直、鈴木周五 (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未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職業性膀胱がんについて、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ヒト膀胱がん組織を用いた臨床病理学研究

解析対象としてortho-toluidine (OTD)などの芳香族アミン取り扱い事業所で発生した職業性膀胱がん6例と、芳香族アミン非ばく露群8例(喫煙歴、性別、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)を用いた。ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本(FPPE)標本からDNA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した。また、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の結果を、芳香族アミンの曝露ない膀胱がん症例や、既存の膀胱がん遺伝子変異データベース(The Cancer Genome Atlas; 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の有無を検討した。

②動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

1) AAOT の投与用量を決定するためのラット短期毒性試験(4週間)

F344 ラットに AAOT を混餌で 0、1.5%、3%で4週間投与した後、膀胱について病理組織学的な検索及び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、o-toluidine (OTD)の濃度をクロマトグラフィにて測定した。

2) AAOT の膀胱発がん性を検討するためのラット二段階膀胱発がん試験(36週間)

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週間の休薬期間後、AAOTを0%、0.167%、0.5%、1.5%濃度で31週間混餌投与した。実験開始36週後に、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。

3) AAOT の膀胱発がんメカニズム解析(4週間)

6週齢の雄 F344 ラット 18 匹を 3 群に分けた。AAOT を 0%、0.167%、1.5%の濃度で4週間混餌投与し、解剖を行った。解剖時にラット膀胱上皮を採取し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を用いてマイクロアレイ解析を行った。対照群(0%)に対して1.5%投与群において発現が変動した遺伝子を選出し、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems) を用いてパスウェイ解析を行った。そこで得られた遺伝子ネットワークに関わる9つの遺伝子の発現をリアルタイムPCRにて評価した。また、解剖時に採取しホルマリン固定を行ったラット膀胱組織に対して JUN、prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2; COX2)の免疫染色を行った。

(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た。

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

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 などが全例で認められ、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、これらの

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%)

遺伝子の変異は、芳香族アミン非暴露群の膀胱がんでも高率に検出され、両群間に各遺伝子の変異頻度には有意な差は認められなかった。また、両群間で non-synonymous (非同義)、synonymous (同義)、合計の変異数はそれぞれ有意差を認めなかった。なお、単塩基変異

(SNV)の塩基スペクトラム解析の結果、置換を受けた塩基、置換された後の塩基についても両群間に有意差はみられなかった。

② 動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

1) AAOT の用量を決定するためのラット短期毒性試験 (発表論文 1 参照)

AAOT1.5%以上投与した群では膀胱尿路上皮の過形成とともに、DNA 傷害の指標である γ -H2AX 形成の亢進が認められた。AAOT を投与したラット尿中から 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、膀胱上皮細胞の増殖および DNA 傷害誘発に関与している可能性が示唆された。また、雌雄3%投与群いずれも10%以上の体重減少が観察されたことから、二段階膀胱発がん試験において、AAOT の最高用量を1.5%と設定した。

2) ラット二段階膀胱発がん試験 (発表論文 2 参照)

肉眼的に雄雌ともに AAOT 投与群では膀胱の腫瘍性病変の数及びサイズが増加していた (図 1)。膀胱を病理組織学的に検討した結果、(1) 雄ラットでは、1.5%群の乳頭腫の発生率と、0.5、1.5%群の尿路上皮癌および総腫瘍病変 (乳頭腫+尿路上皮癌)の発生率は、対照群と比較して有意に増加した。(2) 雌ラットでは、0.5、1.5%群の尿路上皮癌の発生率、1.5%群の総腫瘍病変の発生率は有意に増加した。(3) 総腫瘍病変の発生数は、雌ラットの 0.5、1.5%群と雌ラットの 1.5%群で有意に増加した。

36 週時の尿中 AAOT および代謝物を分析した結果、AAOT および 7 つの下流代謝物 (OTD、N-acetyl-OTD、4-amino-*m*-cresol、2-amino-*m*-cresol、2-aminobenzyl alcohol、Anthranilic acid、および N-acetyl anthranilic

acid)が検出された。これらの尿中代謝物は、AAOT 投与濃度依存性に増加した。OTDは主な代謝物であり、他の物質よりも少なくとも 10 倍以上高い濃度で存在することが明らかになった。

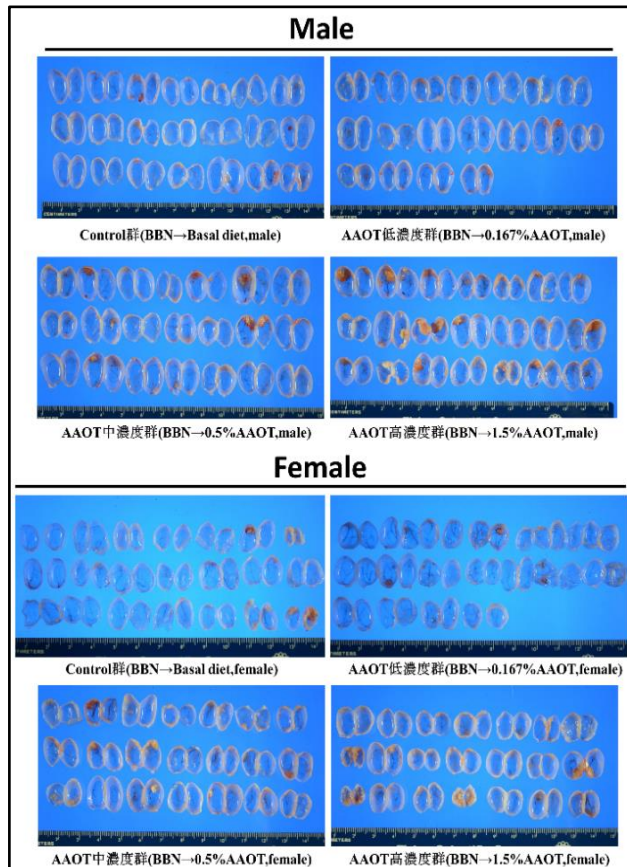


図 1. AAOT 二段階膀胱発がん試験(膀胱肉眼像)

3) AAOT の膀胱発がんメカニズム解析 (発論文 2 参照)

対照群と比較し、発がん促進用量である 1.5% 投与群の膀胱上皮において、94 個の発現変動遺伝子が認められた。そのうち 65 個は発現亢進しており、29 個は発現低下を認めた。これらの 94 個の発現変動遺伝子を用いた pathway 解析を行った結果、JUN を中心とした「腫瘍の増生」関連遺伝子 (PTGS2, KDR, MMP2, DUSP1, EGR1, SERPINE1, TNC 及び PLAU) の発現亢進を認めた(図 2)。

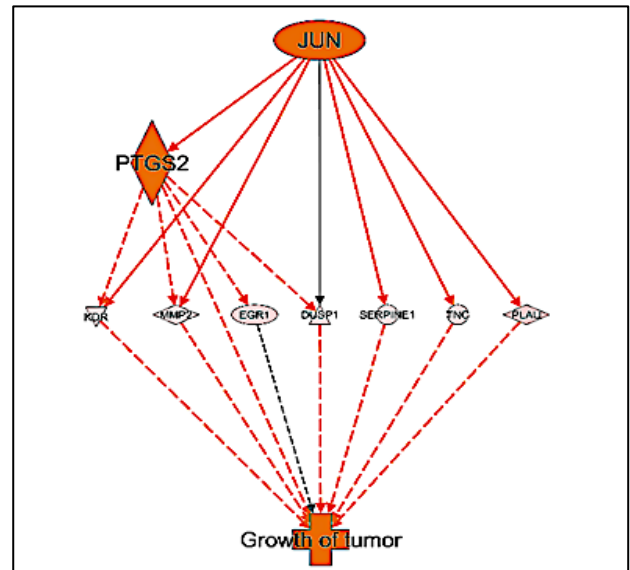


図 2. 「腫瘍の増生」関連遺伝子ネットワーク

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

膀胱がんリスクの主な原因として喫煙があり、膀胱がんの約半数に関与していると考えられている。喫煙による膀胱がんリスクの増加は、タバコの煙に含まれる既知の膀胱発がん物質である OTD、2-ナフチルアミン、4-アミノビフェニルなどの芳香族アミンのばく露が関与していると報告されている。今回の対照群である芳香族アミン非ばく露群の膀胱がん患者全員に喫煙歴がある。本研究の芳香族アミンばく露膀胱がん、非ばく露膀胱がんの遺伝子変異に有意差がない結果は、喫煙による膀胱がん発症にはタバコ煙中に存在する膀胱発がん物質である芳香族アミンが主に関与しているという考えを支持するものと考えられる。

② 動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

AAOT を単独投与したラット膀胱上皮を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現差異解析を行った結果、AAOT の膀胱発がんには JUN シグナリング伝達経路の活性化が関与してい

ることが示唆された。

E. 結論

芳香族アミン取扱事業所で発生した職業性膀胱がんを高頻度にがん関連遺伝子の変異が生じたことが明らかになった。

AAOT が他の発がん性芳香族アミンと同様に、膀胱発がん性を有することが強く示唆された。その発がんメカニズムには体内での代謝が重要で、発生した OTD が AAOT 誘発膀胱がんの鍵となる物質であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, and Wanibuchi H. Acetoaceto-*o*-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats. *Toxicol Sci.* 169: 456-464. 2019.
- 2) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, and Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-*o*-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Arch Toxicol.* 93: 3617-3631, 2019.

2. 学会発表

- 1) 行松直、魏民、梯アンナ、鈴木周五、鰐渕英機。ラットにおけるBBN誘発膀胱発がんに対する *o*-Acetoacetotoluidide の促進効果。第 36 回日本毒性病理学会総会、東京(2020年2月)
- 2) 鰐渕英機、魏民。芳香族アミンによる職業性膀胱がんに関する最新知見。第 78 回日本癌学会学術総会、京都(2019年9月)

- 3) 行松直、奥野高裕、魏民、梯アンナ、鰐渕英機。ラットにおけるBBN誘発膀胱発がんに対するアセトアセト-*o*-トルイジドの促進効果。第 78 回日本癌学会学術総会、京都(2019年9月)
- 4) 奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。Acetoaceto-*o*-toluidide はラット膀胱上皮の細胞増殖を促進し、発がん促進作用を示す。第 108 回日本病理学会総会、東京(2019年5月)
- 5) 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年1月)
- 6) 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年1月)
- 7) 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年9月)
- 8) 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年8月)
- 9) 熊田賢次、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐渕英機。*o*-Acetoacetotoluidide(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)
- 10) 鰐渕英機。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)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金(労働安全衛生総合研究事業、H29～31年度)

分担研究総括報告書

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

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、パラ-トルイジン、アニリン、2,4-ジメチルアニリン、オルト-アニシジンなどの芳香族アミン類の経皮吸収に関する情報、特に定量的評価に関する知見は不足しており、またこれら物質のばく露評価において、尿中のどの物質をどのようなタイミングでバイオマーカーとして分析すればよいのかよく分かっていない。本研究を通じて、我々は、簡便かつ定性・定量的にこれらの物質を含む産業化学物質の皮膚透過性を評価できる可能性がある評価法として、3次元培養ヒト皮膚に着目した検討を実施し、その基礎的評価法モデルを確立した。本モデルにおいて現場で使用されていた芳香族アミン類5種の皮膚透過性を評価したところ、いずれも皮膚透過性がよく知られているジメチルホルムアミドの皮膚透過速度よりも5倍程度速いであろうことが示され、芳香族アミン類5種の皮膚透過性は概して高いことが明らかになった。また、動物(ラット)経皮ばく露においてオルト-トルイジンの体内動態・代謝を検討した結果、オルト-トルイジンはばく露後、速やかに経皮吸収され、腎臓を経由して膀胱等に高濃度で移行し、8時間以内に投与量の大部分が尿中へと排出されることが判明した。尿中代謝物の分析では、ばく露したオルト-トルイジンの約50%が代謝され、その代謝物は主にヒドロキシル化や硫酸抱合物であり、比較的長時間にわたって膀胱内に存在することを明らかにした。さらに芳香族アミン類取り扱い作業者の生物学的モニタリング指標の開発では、LC/MS/MS法を用いた芳香族アミン類、及びその代謝物の分析条件を確立するとともに、作業者の尿サンプルの分析を実施し、各物質のばく露マーカーの選択に有用な情報を得ることができた。本研究で実施してきた、「芳香族アミン類の皮膚透過性評価モデルの開発」、「発がん性やばく露評価に必要な代謝・体内動態の解明」、「生物学的モニタリング用の尿中バイオマーカー開発」の一連の検討で得られた知見は、芳香族アミン類の経皮ばく露によるリスク評価を実施するための重要な基盤情報となると考えられる。

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

福井県にある化学工場で、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の気中濃度と作業者の尿中OT濃度に大きな乖離があることが認められた¹⁾。このことは、作業場における芳香族アミン類の気中濃度が許容濃度以下であっても、芳香族アミン類が経皮吸収され、重大な健康影響が発生しうることを意味するものである。一方で、芳香族アミン類の皮膚吸収性の評価法、代謝・体内動態、生物学的モニタリング手法に関する一連の知見は現状不足しており、これら知見を実験的に蓄積し、産業化学物質の経皮ばく露リスク評価システムを考案していくことが喫緊の課題である。

本分担研究では、以下大きく3点について検討を実施した。(1) ヒト3次元培養皮膚モデルを用いた産業化学物質の皮膚透過性評価システムの構築に関する検討:簡便な経皮透過性評価モデルを確立し、定性及び定量的に産業化学物質の経皮吸収性の評価を行う。(2) 実験動物を用いた経皮ばく露と体内動態・代謝に関する検討:実験動物を用いて、芳香族アミン類の経皮ばく露後における体内動態を解析し、生体影響指標、及びばく露評価指標の確立に必要なデータを収集する。(3) 生物学的モニタリング指標の開発に関する検討:動物実験、及び現場で採取した尿サンプルを用いて、芳香族アミン

類やその代謝物の分析条件を検討し、生物学的モニタリングの指標の確立に必要な情報を収集する。

これらの検討を通して、芳香族アミン類を含む産業化学物質の経皮ばく露リスク評価に資する知見を蓄積することを本研究の目的とした。

以下三つのサブテーマ:(1)ヒト3次元培養皮膚モデルを用いた産業化学物質の皮膚透過性評価システムの構築に関する検討 (2)実験動物を用いた経皮暴露と体内動態・代謝に関する検討 (3)生物学的モニタリング指標の開発に関する検討、それぞれについて報告する。なお、本研究で実施した動物実験は労働安全衛生総合研究所の動物実験委員会の承認を受けて、また、作業者の尿試料の解析は労働安全衛生総合研究所の研究倫理審査委員会の承認を受けて行った。

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>)

1. ヒト 3 次元培養皮膚モデルを用いた産業化学物質の皮膚透過性評価システムの構築に関する検討

ヒト 3 次元培養皮膚モデルは、ヒト皮膚に類似した構造をしており、基底層・有棘層・顆粒層・角質層を有するものである。図 1 に示すように、ヒト 3 次元培養皮膚が入った培養カップ(ドナー)を PBS で満たされたボトル(レセプター)に挿入、放射性¹⁴Cラベルされた OT、PT (パラトルイジン)、ANL (アニリン)、DMA (2,4-ジメチルアニリン)、ANS (アニシジン)を 0.1・Ci (3700 Bq)添加した後、経時的にレセプターボトルの PBS をサンプリングし、液体シンチレーションカウンター(LSC)で β 線カウントし透過量を定量した。なお、本実験では皮膚透過性が低いことが知られているトリチウムチミジン(3H-T)をネガティブコントロール、皮膚透過性が高いことが知られているジメチルホルムアミド (DMF)をポジティブコントロールとして同様の実験をした。また、各物質の添加量(約 10・M)では細胞毒性がないことを確認している。図 2 に示すように、各種芳香族アミン 5 種は添加後 8 時間以降いずれも

図 1. 培養ヒト 3 次元皮膚モデルを使用した皮膚透過性試験法の概略

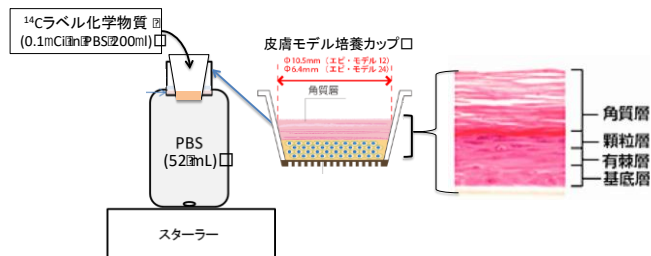


図 2. 各種芳香族アミンの皮膚透過性試験

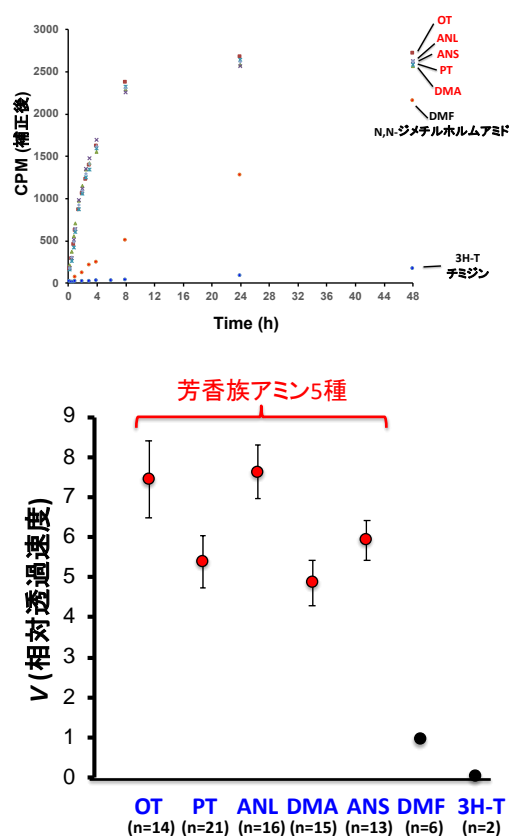


図 2. 各種芳香族アミンの相対透過速度

LSC による β 線カウント数がほぼプラトーに達しており、8 時間までに添加量のほぼ全量が透過していることが明らかとなった。一方で、高い皮膚透過性がこれまでの研究で認められている DMF については、確かにヒト 3 次元培養皮膚を透過しているものの、その速度は芳香族アミン類 5 種と比べると遅いものであった。また、ネガティブコントロールであるトリチウムチミジンは、培養ヒト 3 次元モデルを使用した本研究においても、ほとんど透過が観察されなかった。

次に、β 線カウント数増加の直線性が高い、作用 2 時間後までにおいて、各種芳香族アミンの初期透過速度に違い

があるのかを直線性が高い2時間までの各時間におけるβ線カウント数のプロットを1次関数で近似し、その傾きをもって相対的に評価した。図3に示すとおり、芳香族アミン類5種は、DMFと比べて5-7倍程度透過速度が速いことが示唆された。また、芳香族アミン類5種について、その透過速度は各物質で

異なる可能性があるが、これについては、さらなる検証が必要である。

他方、三次元ヒト培養皮膚を用いた皮膚透過性評価法をより強固にするために、三次元ヒト培養皮膚の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を実施した。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、滴下量依存性等を検討し、滴下溶液の量(体積)は、透過率に大きく影響すること、実験条件として、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こと等、より適切に物質皮膚の透過性を評価できる条件を見出した(詳細は令和元年度分担報告書参照)。

これら検討を通じ、培養ヒト3次元皮膚モデルを用いた評価系は、皮膚高透過性物質の選別等、スクリーニング目的で広く産業化学物質に応用できる可能性があると考えられた。

2. 実験動物を用いたオルトトルイジンの経皮ばく露と体内動態・代謝に関する検討

職業性膀胱がんの発生現場で使用されていた芳香族アミン類の一つであるオルトトルイジン(OT)について、OTの経皮ばく露方法の確立、ばく露後の体内動態、尿・血中におけるOT、及びその代謝物の分析条件の検討、膀胱等特定組織における遺伝毒性の検討等を実施し、OTの経皮吸収性、及びその影響を解明するとともに、他の芳香族アミン類にも応用できる動物経皮ばく露モデルの確立を目指し種々の検討を行なった。

経皮ばく露方法は試行錯誤を経てリント布貼付方として確立し、最終的に次のように、OTを経皮ばく露した。図4に示すように、雄性Crl:CD(SD)ラット(8週齢)の背部を剪毛および剃毛、アセトンにより脱脂し、ここに、PBS(4mL)で希釈



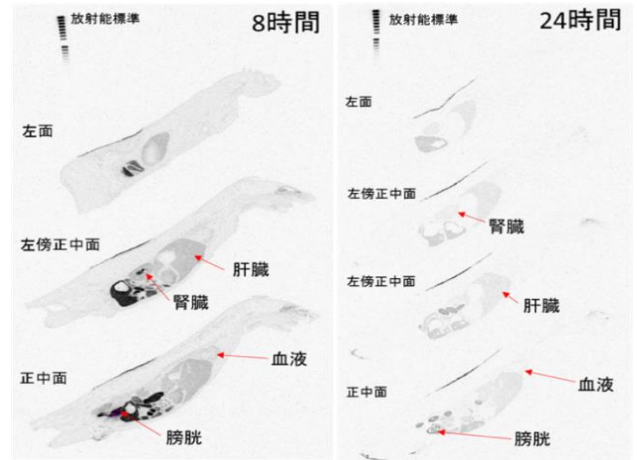
図4. リント布貼付経皮ばく露法
(麻酔下)



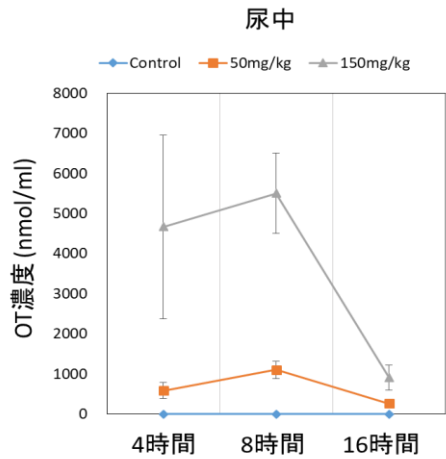
OT (450mg/kg)を塗布したリント布(3cmx3cm)を、イソフルラン麻酔下で非吸収性粘着シートにより貼付した(適用部位の四隅にフェルトペンで印を記した)。その上からプラスチックフィルムで胴体を巻き、リント布の上部にあたる位置に緩衝材(4cmx5cm)を貼り付けた。さらにその上から伸縮包帯で胴体を巻き、固定した。対照群には同量のPBSを同様に適用した。処置後の動物は代謝ケージに個飼し(図5)、投与16時間後に、血液、肝臓、尿管、膀胱、適用部位(皮膚)を採材した。尿は採材時に膀胱から穿刺し採取した。なお、本方法による経皮ばく露では、16時間後に至るまで、リント布が印を記した四隅の位置に固定されていた。

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、及びその代謝物である2-アミノ-m-クレゾール(2AMC)を解析した。ここで、2AMCを解析対象としたのは、我々の先行研究で、2AMCがヒト肝、及び膀胱上皮培養細胞で強いDNA損傷性を示すことを見出していたからである。血液中および投与部位(皮膚)におけるOT濃度(未代謝体)のピークは4時

間であり、16時間後には対照群と変わ



らない程度まで減少した。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た(図6)。また、2AMCについても同様の傾向が観察された。これら結

図5. 経皮ばく露後の代謝ケージに個飼したラット

図6. OT塗布後の尿中における濃度の経時的変化

果より、OTは経皮ばく露後、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。したがって、実際の労働者において、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を実施するには、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であろうと考えられた。

次に放射性同位元素 (^{14}C) で標識した OT を用い、全身オートラジオグラフィ法により、OT の吸収と分布を確認した。雄性 Crl:CD(SD)ラット(7 週齢)を用い、前述のリント布貼付法に準じて ^{14}C OT(50mg/1.30MBq/4ml/kg) を経皮ばく露した (ばく露時間:8 時間、24 時間)。ただし、本検討では、 ^{14}C OT の体内動態をより明確に把握するために、ばく露部位の皮膚をテープストリッピング法により損傷皮膚にして検討している。リント布貼したラットは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。ばく露終了後、全身オートラジオルミノグラムを作成した。

ばく露後 8 時間で腎臓、膀胱等に放射活性が高く、 ^{14}C OT がこれら臓器に移行していることが確認された(図 7)。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。

続いて、正常皮膚(テープストリッピングをしない)のラットにおいて、 ^{14}C OT (50mg/712kBq/4ml/kg) を同様にリント布貼付法により経皮ばく露し、その体内動態・代謝について検討した。

図 7. 雄ラットにおける ^{14}C OT 単回経皮ばく露後の全身オートラジオグラム

表 1. 非絶食下の雄ラットにおける ^{14}C OT 単回経皮投与後の尿中排泄率

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

ばく露後 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観察された(表 2)。また、正常皮膚ラットでは投与後から 24 時間で投与量の 81.3% が排泄されていた。

表 2. 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

ばく露後 24 時間までの尿を収集し、ラジオクロマトグラフィー (LC/MS)法により代謝物の解析を行なった。OT の代謝物として、ヒドロキシル化、硫酸抱合の OT が 44.8%、アセチル化、ヒドロキシル化、硫酸抱合、グルクロン酸抱合の

OT が 4.8%、アセチル化、ヒドロキシル化、グルクロン酸抱合の OT が 2.2%、未変化 OT は 33.7% 検出された。

OT はばく露後 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、オルトトルイジンの約 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、オルトトルイジン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た。この実験から、OT は投与後速やかに腎臓や膀胱へと移行し、臓器蓄積性は少ないであろうことが明らかになった。一方、膀胱では、24 時間後においても、OT 及びそのヒドロキシル化体や硫酸抱合体代謝物が検出され、他の組織に比べ、比較的長時間、膀胱内に留まる可能性が示唆された。

他方、我々は培養膀胱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おり、ラットにおいて OT を皮下投与した後 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ている (データ示さず)。

3. 生物学的モニタリング指標の開発に関する検討

芳香族アミン類及びその代謝物の分析条件の検討では、OT 及び文献に記述されていた入手可能な OT の代謝物 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 で検討した。さらに、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。その結果、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。本検討で 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、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、加水分解等の分析方法で検討する必要がある。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。

動物実験で確立した解析方法を基に、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。OTを含む数種類の芳香族アミン類を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名から尿を解析サンプルとした(36検体)。

LC/MS/MSにおける測定物質は、5種類 OT、ANL、DMA、ANS、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。その結果、OT(未代謝体)は1名(初日朝の時点の尿サンプル)を除き、すべての作業員尿から検出された。また、OTの代謝物も検出された。未代謝のPTはほとんどの検体で検出されなかったが、PTの代謝物の可能性が高い物質がすべての検体から検出された。ANL、ANS、DMA、及び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。

作業員尿の分析では、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)が作業員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と考えられた。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。

作業環境中の濃度の低減化から芳香族アミン類やその代謝物による生物学的モニタリングにはLC/MS/MSによる分析が妥当であると考え、分析上問題となるマトリックス効果を排除する方法を検討し、その開発した分析方法がヒトの尿試料の分析に十分耐えられるかどうかを確認した(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)。この解析では、新たに採取した現場作業員の尿を用い、芳香族アミン類取り扱い作業員の尿合計49サンプル(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)について、各試料とも分析する時期をずらして計3回の分析を実施

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。その結果、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。

OT の濃度カテゴリを測定下限値-測定下限値×5未満(変動誤差の期待値 25-9%: ベースラインの変動誤差と機器への注入誤差の和を変動誤差の期待値とする)と測定下限値×5以上(変動誤差の期待値 9%以内)とに分け、各試料の CV 値の平均を求めると、前者が 17.2%、後者が 7.4%となり、変動誤差は期待値通りであった。

GC/MS や UV 等で分析する場合に、内部標準を用いずに外部標準で分析を行う際には、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を使用する場合、尿ごとの回収率の変動が大きすぎるため、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示唆された。その点、我々が今回実施した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に十分堪え得ると考えられた。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。

研究業績

論文発表:

1. Qi Y, Toyooka T, Kashiwagi H, Yanagiba Y, Ohta H, Koda S, Wang RS (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.
2. 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>
3. 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.
4. 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:

1. 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.
2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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) o-トルイジン単回経口投与時の尿中代謝物濃度の経時的变化. 第91回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 60(Suppl.), 419.
 8. 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.
 9. 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 γ -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.
 10. 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.
 11. 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
12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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.
 17. Yonggang Qi, Tatsushi Toyooka, Hyogo Horiguchi, Shigeki Koda, Rui-Sheng Wang (2019) Comparative g-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.
 18. Yukie Yanagiba, Kenich Kobayashi, Megumi Suda, Tatsushi Toyooka, Shigeki Koda and Rui-Sheng Wang (2019) Tissue distribution and excretion of ortho-toluidine after percutaneous administration to rats. 8th Occupational and Environmental

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Eitaki Y, Nakano M, Kawai T, Omae K, Takebayashi T.	Biological monitoring of o-toluidine in urine pretreated by an enzymatic deconjugation method.	J Occup Health	61	349-357	2019
Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatsu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H.	Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats.	Toxicol Sci.	169	456-464	2019
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.	J Occup Health	60	307-311	2018
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	41	89-93	2018
中野真規子	近年の職業がんをめぐる動向	産業医学ジャーナル	42	89-93	2019
Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagibara Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, Wanibuchi H	Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats	Archives of Toxicology	93	3617-3631	2019

Qi Y , Toyooka T , Kashiwagi H , Yanagiba Y , Koda S , Ohta H , Wang S	2,4-Dimethylaniline generates phosphorylated histone H2AX in human urothelial and hepatic cells through reactive oxygen species produced by cytochrome P450 2E1	Archives of Toxicology	92	3093-3101	2018
Qi Y , Toyooka T , Kashiwagi H , Yanagiba Y , Koda S , Wang S	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	66		2020
小林 健一、柳場 由絵	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	195-198	2019
豊岡達士、祁永剛、王瑞 生、甲田茂樹*	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物質の DNA 損傷性に関する研究 - γ H2 AX を指標に評価した DNA 損傷強度の違い -	労働安全衛生研究	12	113-118	2019