

Ex vivo 及び in vivo における芳香族アミン類の皮膚透過性評価について

柳 場 由 絵^{*1,2}, 豊 岡 達 士^{*2}, 王 瑞 生^{*2}

国内の化学工場で発生した膀胱がん事例に関して、オルトトルイジン (OT) や 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA) を含む芳香族アミン類の経皮ばく露による可能性が関連づけられてきた。本研究では、ブタ皮膚を用い OT と MOCA の皮膚透過性について検討するとともに、動物を用い OT と MOCA の経皮ばく露後の血漿・尿中の濃度変化について検討を行った。実験①: Yucatan micropig から採取された皮膚を皮膚透過性実験に用いた。ブタ皮膚を拡散セルに装着後、¹⁴C 標識された OT または MOCA を添加し皮膚透過性実験を行った。試料添加後 1, 3, 6, 8, 24 時間後にレセプター液の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。実験②: 雄性 F344 ラット (7 週齢) を用い, OT, MOCA の投与液を塗布したリント布をラットの背中に貼り, ばく露後の血漿・尿中濃度について経時変化を観察した。OT と MOCA は, ともに皮膚浸透性が高いが, OT は皮膚浸透後速やかに血中へ移行し, 速やかに尿中へと排泄されることから, 皮膚吸収性が速い物質である。一方, MOCA は皮膚浸透性が速いものの, 血中への移行と尿中への排泄に時間がかかることから, 皮膚吸収性が遅い物質であることが明らかとなった。化学物質の皮膚吸収性に基づいた対策を取ることは, 経皮吸収が懸念される産業化学物質の適正な管理に有効な手段であると考えられる。

キーワード:オルトトルイジン, 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン, 芳香族アミン類, 経皮吸収, 皮膚透過, 皮膚浸透

1 はじめに

昨今, 我が国の化学工場において, オルトトルイジン (OT) 等, 芳香族アミン類を取り扱う労働者らに職業性膀胱がんの発生が相次ぎ社会的な問題となった。これらの事例は, 管理濃度や許容濃度を遵守していても, 皮膚から化学物質が取り込まれ健康障害が生じることがあるということを示すものである。これを契機に産業化学物質の経皮ばく露が注目を集めることになった。2015 年に判明した OT 等芳香族アミン類による事例では, 2012 年に OT は International Agency for Research on Cancer (IARC) 発がん性分類においてグループ 1 に分類されたため, ヒトに対する発がん性の証拠が十分に存在する。OT に焦点を当てたばく露経路の現場調査では, 作業者らは, 防じん防毒マスク, ゴム製手袋, 化学防護服を着用していた上, 作業環境の OT 気中濃度は平均 0.003 ppm と許容濃度 (1 ppm) よりも低い濃度であったが, 作業者らの尿中からは吸入ばく露では説明がつかない高濃度の OT 及びその代謝物が検出された¹⁾。さらに, ゴム手袋内側に OT の汚染があったことや, ヒアリング調査により, 夏場は半袖衣類での作業実態等も判明し, 本事例では, 経皮ばく露により相当量の OT が生体内に取り込まれたものと報告されている²⁾。また, OT と同様に, 2010 年に IARC 発がん性分類においてグループ 1 に分類された 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメ

タン (MOCA) による膀胱がん事例においても経皮ばく露の関与があったと考えられている。

また, 上半身に MOCA 溶解物を浴びた 30 歳の男性作業者の尿中 MOCA 濃度は, ばく露後 4 時間で最高値となり, その後 4 日間, 尿中から MOCA が低濃度で検出された報告がある³⁾。MOCA の特徴として, 体内蓄積性のある物質であると推察された。

OT や MOCA の事例では, 化学物質のばく露経路として, 経皮ばく露の寄与が大きいことが明らかになった。しかし, 産業化学物質の皮膚吸収性および皮膚透過性の程度や, 化学物質の物理化学的特徴に関する産業化学物質の経皮ばく露のリスク評価に必要な科学的知見が不足している。そこで, 我々は, 国内で問題になった OT と MOCA について, ブタ皮膚を用いた皮膚透過性と, in vivo での経時的な血漿中濃度変化および尿中濃度変化について検討を行った。なお, 本研究においては, 1) 皮膚に付着した化学物質が皮膚に侵入する状態を浸透 (penetration), 2) 浸透した物質が皮膚を通過することを透過 (permeation), 3) 浸透した物質が皮膚から全身循環に入ることを吸収 (absorption) として定義する⁴⁾。

2 方法

2.1. 化学物質

Ex vivo 皮膚透過性実験には ¹⁴C 標識された OT と MOCA を使用した。なお, OT に関しては American Radiolabeled Chemicals Inc. (Saint Louis, US) から購入し, MOCA については BlyChem Ltd. (Billingham, UK) に合成を依頼して用いた。In vivo 経皮ばく露実験に使用した OT (≥99.5%) はシグマアルドリッチジャパン (東京, 日本), MOCA (≥89.5%) は東京化成工業株

*1 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター
生体防御評価研究室

*2 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター
有害性評価研究部

連絡先: 〒214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾 6-21-1

柳場由絵 E-mail: yanagiba@h.jniosh.johas.go.jp

式会社（東京，日本），アセトン（試薬特級）は富士フィルム和光純薬工業（東京，日本）から購入した。血漿，尿サンプルの解析に使用したメタノール（LC/MS用），ギ酸（試薬特級）は富士フィルム和光純薬工業（東京，日本）から購入した。

2.2. Ex vivo 皮膚透過性実験

Yucatan micropig (YMP) から採取された皮膚を皮膚透過性実験に用いた。YMP 皮膚は 5 ヶ月齢の YMP から採取され、 -80°C で凍結保存されたスキンセットを日本チャールスリバーから購入し、皮膚は使用するまで -80°C で保存した。凍結された皮膚（背部）を室温で自然解凍し、皮下についている脂肪および肉片をはさみで取り除いた後、ヤスリを用いて真皮についた脂肪を除去した。皮膚透過性実験にはガラス製縦型拡散セル（有効面積 1.8cm^2 ）を使用した。縦型拡散セルのレセプター相にはカナマイシンを添加した PBS 約 9.5ml を 33°C に保ち、攪拌した。ドナー相には 0.2ml の試料を添加し、試料添加後 1, 3, 6, 8, 24 時間後にレセプター相を 0.2ml 採取して時間毎に採取したレセプター液の放射能を液体シンチレーションカウンターで計測した。また、皮膚浸透を確認するために 3 時間後の皮膚の放射能についても同様の測定を行った。添加試料は ^{14}C 標識された OT, MOCA をそれぞれ $0.1\mu\text{Ci}$ になるよう PBS に溶解し実験に使用した。

2.3. 経皮ばく露実験

経皮ばく露実験には日本チャールスリバーから購入した雄性 F344 ラットを使用して実験開始（開始時 7 週齢）まで 1 週間の馴化を行った。背部を剪毛，剃毛した後，OT (100 mg/kg bw)，MOCA (100 mg/kg bw) の用量で添加したリント布 ($3\text{cm} \times 3\text{cm}$) を 24 時間経皮ばく露した。各群 3 匹ずつ動物を使用して，溶媒には 80%アセトン PBS 溶液を用いた。ばく露開始より，尾から 1, 3, 6, 8, 24 時間後に採血を行った。背部のリント布はばく露開始 24 時間後に外した。採尿はばく露開始後に代謝ケージ内で行った。採尿区間は 0~24 時間，24~48 時間，48~72 時間とした。

本動物実験は労働安全衛生総合研究所実験動物委員会の承認を得て実施した。

2.4. LC-MS/MS 分析方法

血漿，尿サンプルの解析は LC-MS/MS で分析を行った。血漿は 4%リン酸水溶液と 1:1 で混合し，尿は 1000rpm 遠心分離後の上清と水を 1:1 で希釈し，Oasis PRiME HLB で固相抽出したものを分析用サンプルとした。液体クロマトグラフィは AcQuity H CLASS（日本ウォーターズ，東京，日本），カラムは ACQUITY BEH C_{18} , $1.7\mu\text{m}$, $2.1 \times 50\text{mm}$ (Waters, 東京, 日本) を用いた。移動相には A) 水+0.1%ギ酸, B) メタノール+0.1%ギ酸を使用し，グラジエント条件を表 1 に示す。検出器はタンデム型四重極質量分析装置 ZEVO TQD（日本ウォーターズ，東京，日本）を用いた。分析条件は Ionization mode: ESI+, Capillary voltage: 0.8kV , Probe temp: 450°C , Acquisition: Selected Ion Recording (SIR), Cone

表 1 LC グラジエント条件

Time (min)	Flow rate (ml/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.4	95	5	-
1.0	0.4	95	5	6
3.1	0.4	75	25	6
6.1	0.4	59	41	6
8.0	0.4	0	100	6
9.0	0.4	0	100	6
9.0	0.4	95	5	6
10.0	0.4	95	5	6

voltage: 15V とした。それぞれの m/z は，OT は 108, MOCA は 267 とした。

3 結果

3.1. Ex vivo 皮膚透過性実験

各被験物質のブタ皮膚透過率は，添加後 3 時間で OT は $3.9\% \pm 2.4\%$ ，8 時間で $18.6 \pm 9.1\%$ ，24 時間で $45.9 \pm 12.5\%$ ，MOCA は添加後 3 時間で $0.6\% \pm 0.38\%$ ，8 時間で $1.2 \pm 0.2\%$ ，24 時間で $3.5 \pm 0.9\%$ が皮膚を透過していることを確認した。また，添加後 3 時間の皮膚内の OT は $26.1 \pm 1.9\%$ ，MOCA は $57.8\% \pm 2.9\%$ であることを確認した。

3.2. 経皮ばく露後の血漿および尿中濃度変化

ラットを用いて OT, MOCA について経皮ばく露後の血漿中濃度変化および尿中濃度変化を観察した。OT, MOCA 経皮ばく露後にそれぞれの開始から OT は 5.1 時間後，MOCA は 6.8 時間後に最高濃度に達した（図 1）。

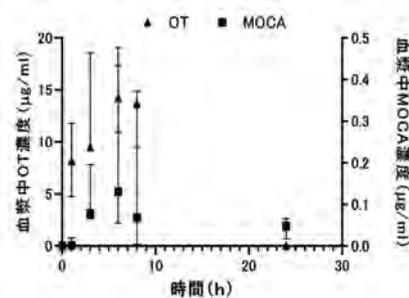


図 1. 経皮ばく露後の血漿中濃度変化

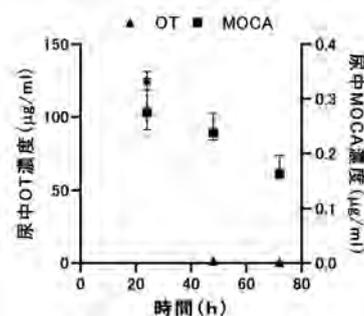


図 2. 経皮ばく露後の尿中濃度変化

また、経皮ばく露後の尿中濃度の解析から OT は速やかに尿中へ排泄されるが、MOCA の尿中排泄は遅いまたは少ないことを確認した (図 2)。

4 考察

OT と MOCA はともに皮膚浸透性が高いものの、皮膚透過性・吸収性が異なっていた。OT は皮膚浸透後速やかに血中へ移行して尿中へと排泄されるため皮膚吸収性が速い物質である。しかし、ex vivo および in vivo の結果から MOCA は皮膚の浸透は速いが、血中への移行と尿中への排泄に時間がかかることから皮膚吸収性が遅い物質であることが示唆された。

経皮吸収のある化学物質が皮膚に触れる際、化学物質は皮膚中に分配 (partition または distribution) して深部に浸透・吸収する。また、分配された化学物質は皮膚マトリックス中を拡散する。化学物質は濃度の高い方から低い方に移動するので、皮膚に分配された化学物質は次第に皮膚深部に移行して皮膚深部に移行した薬物の一部は皮膚中の毛細血管に吸収されて全身に移行する⁴⁾。オクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$) が 2 程度の化合物は、皮膚表面に取り込まれやすいため、これらの化合物は皮膚に吸収されやすいと考えられている⁵⁾。皮膚の一番上の角質層は親油性の層であるが、化学物質の吸収を妨げる最大のバリアとなる。そのため、化学物質の皮膚透過は親油性または $\log P_{ow}$ に比例して増加するが、逆 U 字型の関係で $\log P_{ow}$ が 3 以上に増加すると皮膚透過が低下する^{6,7)}。 $\log P_{ow}$ が 1.93 の methyl paraben は $\log P_{ow}$ が 2.81 の n-propyl paraben より高い透過性を示すが、 $\log P_{ow}$ が 3.53 である n-butyl paraben は透過性が低下する。さらに、 $\log P_{ow}$ が 4.1 の n-pentyl-paraben は、全層皮膚より角質層を取った皮膚の方が透過性は低くなる⁷⁾。したがって、 $\log P_{ow}$ の大きい物質は表皮と真皮での拡散性が低くなるため透過障壁として機能することが報告されている⁸⁾。また、肝臓ほど多くは無いが、皮膚にも代謝酵素が存在するため、皮膚内で代謝される場合がある^{8,9)}。皮膚には第 1 相と第 2 相の酵素が存在する。マーカー基質代謝によって測定される皮膚における第 1 相酵素 CYP450 活性は、肝臓での活性の 0~27%、第 2 相抱合酵素の一部の活性は肝臓の 0~50% であると報告されている^{6,10)}。

我々の実験では角質を除去していない全皮膚を使用しているため、 $\log P_{ow}$ が 3.9 である MOCA は、速やかに角質層に浸透して、時間とともに皮内に拡散すると考えられる。しかし、MOCA の親油性が高いことから、角質層以下 (表皮と真皮) での拡散が遅くなって皮膚透過性が低くなるのではないかと考察される。 $\log P_{ow}$ が 2 以上の化合物は、真皮の脂肪区画に蓄積する可能性が指摘されており、 $\log P_{ow}$ が 3.1 である Bisphenol-A (BPA) は親油性が高いため皮膚への浸透は速いものの、真皮への蓄積性が高くなると考えられている¹¹⁾。BPA と同程度の $\log P_{ow}$ である MOCA は、BPA と同様に真皮の区画に蓄積する可能性が推測される。一方、 $\log P_{ow}$ が 1.32

である OT は角質層への浸透が遅いが、MOCA に比べて、親油性が低いために角質層以下 (表皮/真皮) への拡散が速いと考えられる。したがって、in vivo での皮膚透過性が高くなったと推測される。角質層だけでなく、表皮と真皮が親油性化学物質の皮膚透過のバリアとして機能するため、 $\log P_{ow}$ の違いによって皮内での挙動が大きく異なって、その後の体内動態に影響を与えるのではないかと考察される。

職業上の経皮ばく露による取り込みは、労働者の総ばく露量に重要な役割を果たす可能性があり、多くの異なる状況やあらゆる種類の化学物質について発生する可能性が高い。化学物質の危険性に関する分析では、職業環境における経皮ばく露経路の重要性が認識されているが、皮膚ばく露の評価について規定することはできていない。米国労働安全衛生局 (OSHA) の 4,4'-Methylenedianiline (MDA) に関する基準は、多くの労働者にとって皮膚ばく露が圧倒的にばく露量に寄与することを認識しているが、ばく露限界を公布しているだけである^{12,13)}。また、新しい毒性情報とリスク評価手法の改良によって、多くの空気中ばく露限度値の引き下げが提案されているが、皮膚へのばく露を減らす努力を並行して行わなければ、経皮経路の相対的な重要性が大きくなる。OSHA はベンゼンの場合、空気中濃度が 10 ppm から 1 ppm に低下することで、米国のタイヤを製造に従事する労働者において、1 日当たりのばく露量に対する皮膚からの取り込みが 4% から 30% に増加すると推定している¹³⁾。気中と経皮の職業性ばく露を組み合わせることは、職場の危険性をより正確に評価し、ばく露される労働者の保護を強化する上で重要である。

ただし、化学物質の皮膚吸収性について実験的に毒性情報を集積することは非常に時間がかかる。構造活性相関等、in silico による毒性予測のための手段も開発が進んでいるものの、労働衛生におけるそれらの活用はまだ普及していないのが現状である。したがって、産業現場において、 $\log P_{ow}$ の値を用いて想定される皮膚吸収性に基づいた対策を取ることは、産業現場での労働者の健康障害の予防という観点から経皮吸収が懸念される化学物質の適正な管理に有効な手段であると考えられる。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 2016. 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
<https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11305000-Roudoukijunkyokuanzeniseibu-Kagakubushitsutaisakuka/0000126164.pdf>, (2023-08-29)
- 2) 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 orthotoluidine. J Occup Health. Jul 25 2018;60(4):307-311. doi: 10.1539/joh.2017-0220-OA.

- 3) Osorio AM, Clapp D, Ward E, Wilson HK, Cocker J. Biological monitoring of a worker acutely exposed to MBOCA. *American Journal of Industrial Medicine*. 1990;18(5):577-589. doi: 10.1002/ajim.4700180508.
- 4) 杉林堅次. 経皮吸収の原理・その実際・今後の期待, オレオサイエンス, 2017, Volume 17, Issue 11, 549-558. doi: 10.5650/oleoscience.17.549.
- 5) Armette Wilschut WFtB, Peter J. Robinson, Thomas E. McKone. Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models. *Chemosphere*. 1995;30(7):1277-1296.
- 6) Poet TS, McDougal JN. Skin absorption and human risk assessment. *Chem Biol Interact*. Apr 20 2002;140(1):19-34. doi: 10.1016/s0009-2797(02)00013-3.
- 7) Oshizaka T, Todo H, Sugibayashi K. Effect of direction (epidermis-to-dermis and dermis-to-epidermis) on the permeation of several chemical compounds through full-thickness skin and stripped skin. *Pharm Res*. Sep 2012;29(9):2477-88. doi: 10.1007/s11095-012-0777-6.
- 8) Yamaguchi K, Mitsui T, Aso Y, Sugibayashi K. Structure-permeability relationship analysis of the permeation barrier properties of the stratum corneum and viable epidermis/dermis of rat skin. *J Pharm Sci*. Oct 2008;97(10):4391-403. doi: 10.1002/jps.21330.
- 9) Boogaard PJ, Denneman MA, Van Sittert NJ. Dermal penetration and metabolism of five glycidyl ethers in human, rat and mouse skin. *Xenobiotica*. May 2000;30(5):469-83. doi:10.1080/004982500237488.
- 10) Baron JM, Holler D, Schiffer R, et al. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol*. Apr 2001;116(4):541-8. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01298.x.
- 11) Kaddar N, Harthé C, Déchaud H, Mappus E, Pugeat M. Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(8):471-3. doi: 10.1080/15287390801906824. PMID: 18338280.
- 12) Bos PM, Brouwer DH, Stevenson H, Boogaard PJ, de Kort WL, van Hemmen JJ. Proposal for the assessment of quantitative dermal exposure limits in occupational environments: Part 1. Development of a concept to derive a quantitative dermal occupational exposure limit. *Occup Environ Med*. Dec 1998;55(12):795-804. doi: 10.1136/oem.55.12.795.
- 13) Fenske RA, van Hemmen JJ. Occupational skin exposure to chemical substances: setting limits. *Ann Occup Hyg*. 1994 Aug;38(4):333-6. doi: 10.1093/annhyg/38.4.333-a. PMID: 7978958.