

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590754

研究課題名(和文) 分子疫学における環境発がん物質曝露および健康影響評価法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation of health effects and environmental carcinogens exposure in molecular epidemiology

研究代表者

山野 優子 (YAMANO, Yuko)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：30167580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境中の多環芳香族炭化水素類(PAHs)の曝露は、混合物曝露で発癌物質も多く含む。PAHsの発癌強度を反映した包括的な曝露マーカーを検出するため、製鉄工場作業員57名について横断面調査を行った。15種のPAHs個人曝露濃度の測定はGC-MSで、尿中代謝物の測定はHPLCとLC-MSMSで分析した。その結果、11尿中代謝物を特定することができ、総PAHs曝露濃度と尿中2OHナフタレンが最も良く相関したが、発癌性がある7物質の発癌強度と曝露濃度から算出した総和“発癌強度PAHs”との関係を見ると、尿中1OHピレンが最も発癌の強さを反映した曝露のバイオマーカーであることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are multiple compounds which include many carcinogens. We conducted a cross-sectional study in steel plant workers (n=57), to identify biomarkers that reflect the carcinogenicity of PAHs. Level of personal exposure to 15 PAHs was measured using GC-MS. Urinary metabolites analyzed using HPLC with a fluorescence detector and LC-MSMS. Eleven known urinary metabolites 1-, 2-hydroxy(OH)naphthalene, 2-OH fluorene, 1-, 2-, 3-, 9-OH phenanthrene, 1-OH pyrene, 3-OH benz[a]anthracene, 6-OH chrysene, 3-OH benzo[a]pyrene were detected. The highest correlation was between Total-PAHs and urinary 2-OH naphthalene. Among the detected urinary metabolites, 1-OH pyrene was found to have the greatest correlation with the "Sigma carcinogenic potency of PAHs" (sum of seven carcinogenic PAHs calculated from levels of personal PAHs and relative potency factors), indicating that urinary 1-OH pyrene was the most comprehensive carcinogenic biomarker of exposure to PAHs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境疫学 環境発がん物質 生物学的モニタリング 多環芳香族炭化水素類

1. 研究開始当初の背景

近年、我々を取り巻く化学物質は、産業現場ならずとも急激に増加し、低濃度・複合・長期曝露というように、曝露の質も変化してきた。それに伴い、曝露の個人差も反映するような DNA 付加体や酵素の多型等の研究も進み、バイオマーカーとしての利用が期待されている。しかし、バイオマーカーにはいくつかの課題が残されている。発がんとの関係の解明、低濃度レベルの内部曝露量を検出できる分析方法の確立、ヒトへの感受性の影響解明、あるいはバイオマーカーの適用の検証などである。

代表的な環境発がん物質である多環芳香族炭化水素類(以下 PAHs)は、2~6 環程度までが一般環境空気中にも低濃度に含まれている。また、石炭を低酸素状態で加熱処理をしてコークスにするコークス炉に係わる作業員および製鉄所内での種々の作業員は、PAHs を高濃度に長期間曝露を受けている。よって、製鉄所作業員集団は長期にわたる複数の化学発がん物質曝露のリスク評価の対象群と考えられ、我々は、すでにこれらの作業員からサンプリングした尿試料について複数の PAHs 代謝物の分析を実施しており、いくつかの個人曝露との関連を報告してきた。

2. 研究の目的

環境化学物質による発がんは、予防医学の重要なターゲットの一つであり、有効なバイオマーカーの開発が急務である。そこで、多種類の発がん物質に曝露されている職域を対象とし、曝露の程度を特に発がん性に注目して数量化し、尿中代謝物との関係を網羅的に解析しマーカーを抽出することで、発がんとの関連性の基礎データを示すことを目的とした。

従来、我々が進めてきた PAHs の代謝物測定では、複数種の代謝物が検出されていたが、まだ未知のピークがあり、それらが高濃度である可能性もあるので、その特定も含め検討することとした。

3. 研究の方法

(1)対象者は、製鉄工場で働く作業員(n=57)であり、横断面調査を実施した。このプラントは 1959 年より定期的に職場環境中の benzo[a]pyrene (B(a)P)をモニタリングしており、高い肺がんの相対リスクがあることも、以前の疫学的研究で実証されている。なお、全ての対象者からインフォームド・コンセントを得ている。

(2) PAHs 個人曝露のサンプリングは、8 日間・3 作業サイクル中の第 1 日目に行い、粒子状の PAHs 捕集のためのガラス繊維ろ紙と、気体状の PAHs 捕集のための XAD2 を連結したサンプラーを口元に近い位置に取り付け、午前 9 時から午後 3 時までの 6 時間の捕集とした。それぞれを溶媒で抽出し、Tjoe ら^(*)の方法で GC-MS で分析した。定量対象の PAHs は、米国 EPA の評価方法に準拠し、naphthalene、acenaphthylene、acenaphthene、fluorene、phenanthrene、anthracene、fluoranthene、pyrene、benz[a]anthracene、chrysene、benzo[b]fluoranthene、benzo[k]fluoranthene、benzo[e]pyrene、B(a)P、benzo[g,h,i]perylene の合計 15 成分とした。15 PAHs の定量下限値は 0.05 ng/m³であった。^(*) Tjoe Ny E et al. (1993) Am Ind Hyg Assoc J 54 (6):277-284

(3)尿のサンプリングは、8 日間・3 作業サイクル中の第 8 日目の朝に行い、分析まで -70 °C で保存し、原ら^(**)の方法を改変し、抱合体を切断するため β -glucuronidase で加水分解し、遠心分離してその上清を蛍光検出器をつけた HPLC または LC-MSMS で分析した。HPLC 条件は、移動層 A は 50 mM phosphate buffer (PH 6.9); 移動層 B は methanol で、A/B 組成は 45/55 から 20/80 の範囲でグラジエントをかけ、流速は 1.2 mL min⁻¹、カラムは C₁₈ (4.6 x 150 mm, Wakosil II), カラム温度は 40 °C で行った。尿中代謝物の定量下限は 0.05-0.1 ng/ml であった。なお、

尿濃度を正しく補正するために尿中クレアチニンを測定して算出した。

(**)Hara K et al. (1997) Sci Total Environ 199 (1-2):159-164

(4) “ 発がん強度 PAHs ” の算出法は、米国 EPA が示している B(a)P 換算係数を利用して計算した。すなわち、我々が測定した 15 種の個人曝露 PAHs のうち、その係数が示されている PAHs は 7 物質 (B(a)A、chrysene、B(a)P、fluoranthene、B(b)F、B(k)F、B(ghi)P) であり、各 PAHs 曝露濃度にそれぞれ係数を乗じて値を計算し、その総和を “ 発がん強度 PAHs ” とした。

4. 研究成果

(1) PAHs の個人曝露濃度の総和 (Total-PAHs) は、幾何平均値が $178.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (47.1-1329.5) であった。同 control 地区の stationary PAHs レベルは $2.6(1.5-5.7) \mu\text{g}/\text{m}^3$ であったことから、この作業者は高濃度の PAHs 曝露を受けていることがわかった。測定し得た 15 物質中では naphthalene が Total-PAHs の約 75% を占めていた。

(2) PAHs の尿中代謝物測定は、未知の代謝物は 3 ピーク解明できなかったが、全部で 11 代謝物 (1-OH naphthalene、2-OH naphthalene、2-OH fluorene、1-OH phenanthrene、2-OH phenanthrene、3-OH phenanthrene、9-OH phenanthrene、1-OH pyrene、6-OH chrysene、3-OH benzoanthracene、3-OH benzopyrene) を特定することができた (図 1)。

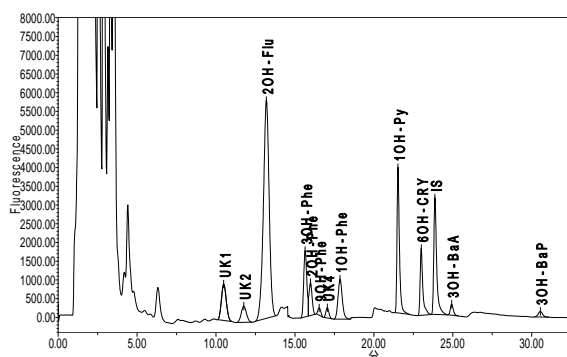


図 1 尿中代謝物クロマトグラム

濃度については、2-OH naphthalene は $60.98(14.78-568.98) \mu\text{mol}/\text{molCre}$ であり、1-OH pyrene は $3.90(0.66-16.89) \mu\text{mol}/\text{molCre}$ であった。また、1-OH naphthalene、2-OH naphthalene が尿中代謝物の総和 (Total-尿代謝物) ($137.85 \mu\text{mol}/\text{molCre}$) の約 70% を占め、次いで 2-OH fluorene が約 13%、OH phenanthrene 総和が約 8%、1-OH pyrene が約 3% の割合で検出された。

(3) 作業者の 50% 以上が検出された尿中代謝物とそれに対応する PAHs の個人曝露濃度との相関関係を表 1 に示した。naphthalene、fluorene、phenanthrene、pyrene がその尿中代謝物との間に有意な正の相関が認められた。また、Total-PAHs と各尿中代謝産物との関係をみると、2-OH naphthalene が最も良く相関しており ($Sr=0.716$)、ついで 2-OH fluorene が有意な相関を示した ($Sr=0.696$)。1-OH pyrene との相関も有意ではあったが、むしろ相関係数は低かった ($Sr=0.456$)。Total-PAHs および Total-尿代謝物との間にも相関がみられた ($Sr=0.680$)。

(4) “ 発がん強度 PAHs ” は、Total-PAHs および Total-尿代謝物とも有意な関係が認められなかった。しかし、各尿中代謝物との関係をみると、2-OH fluorene、3-OH phenanthrene、1-OH phenanthrene と有意な相関関係が見られた (表 1) が、特に 1-OH pyrene にもっともよい正の相関が見られた ($Sr=0.630$, $P<0.01$) (図 2)。

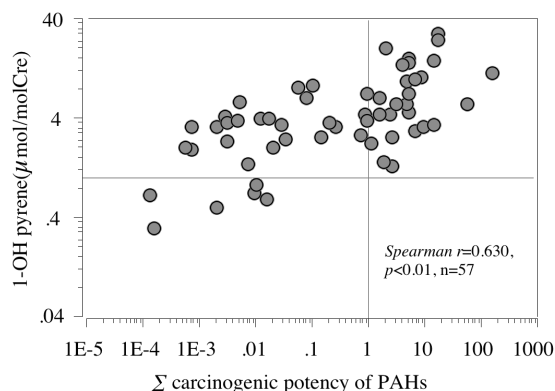


図 2 発がん強度 PAHs と尿中 1-OHpy との関係

表1 個人曝露濃度と尿中代謝物の関係 (Spearman順位相関 Sr)

Metabolites ($\mu\text{mol/mol Cre}$) PAHs ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1-OH naphthalene	2-OH naphthalene	2-OH fluorene	1-OH phenanthrene	3-OH phenanthrene	1-OH pyrene	Total urinary metabolites
Naphthalene	0.493	0.701	0.617	0.478	0.506	0.363	0.636
Fluorene	0.383	0.560	0.706	0.584	0.662	0.489	0.617
Phenanthrene	-	-	0.539	0.568	0.598	-	0.499
Pyrene	-	-	0.566	0.530	0.594	0.629	0.388
B(a)A	-	-	0.415	-	0.446	0.489	-
Chrysene	-	-	0.477	0.467	0.520	0.630	-
B(a)P	-	-	0.411	0.429	0.462	0.620	-
Total-PAHs	0.487	0.716	0.696	0.533	0.576	0.456	0.680
Σ Carcinogenesis potency PAHs	-	-	0.506	0.499	0.559	0.630	-

Only significant correlation coefficients are shown ($P < 0.01$)

“-“ not significant

Gray cells indicate urinary metabolite derived from the parental compound

(5) まとめとして、製鉄工場作業者を対象として、15種のPAHs曝露量を測定し、複数種のPAHs尿中代謝物を検出し、うち11種の代謝物を特定することができた。また、発がん強度を考慮した曝露量との関係では、尿中1-OH pyreneが最もよく相関していた。つまり、発がん性を反映したPAHs曝露の包括的なバイオマーカーとしては1-OH pyreneが有効であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Yuko YAMANO, Kunio HARA, Masayoshi ICHIBA, Tomoyuki HANAOKA, Guwei PAN and Toshio NAKADATE. Urinary 1-hydroxypyrene as a comprehensive carcinogenic biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a cross-sectional study of coke oven workers in China. Journal of the International Archives of Occupational and Environmental Health. 2013 [Online ahead of print]. DOI 10.1007/s00420-013-0913-6. 査読有.

[学会発表](計 3件)

多環芳香族炭化水素類のバイオマーカー

に関する研究 1: 発がん強度を考慮したバイオマーカー

山野優子、原 邦夫、市場正良、花岡知之、潘 国偉、中館俊夫

第87回 日本産業衛生学会 2014年05月21日～2014年05月24日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

多環芳香族炭化水素類のバイオマーカーに関する研究 2: 作業・保護具・生活習慣の影響

原 邦夫、山野優子、市場正良、花岡知之、潘 国偉、中館俊夫

第87回 日本産業衛生学会 2014年05月21日～2014年05月24日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

多環芳香族炭化水素類のバイオマーカーに関する研究 3: 尿中未変化体濃度

市場正良、山本 忍、山野優子、原 邦夫、宮崎博喜、松本明子、花岡知之、潘 国偉、中館俊夫

第 87 回 日本産業衛生学会 2014 年 05 月 21 日～2014 年 05 月 24 日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山野 優子 (YAMANO, Yuko)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号: 30167580

(2)連携研究者

原 邦夫 (HARA, Kunio)

帝京平成大学・地域医療学部・教授

研究者番号：40250047

市場 正良 (ICHIBA, Masayoshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：60184628