

表8. 測定値の精密性および正確性 (n = 5)

SVOC	60 μ l添加		5.0 μ l添加	
	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
Triethyl phosphate	3.5	8.1	4.8	5.0
Dichlorvos	4.1	4.5	4.8	9.8
Tripropyl phosphate	2.4	9.4	4.1	0.3
Dimethyl phthalate	2.7	2.2	4.5	6.0
DEET	2.9	3.2	3.5	8.4
Diethyl phthalate	2.9	1.0	4.4	4.7
Propoxur	3.5	2.4	2.7	2.8
Fenobucarb	2.9	2.2	3.4	6.6
IPBC	6.0	2.7	5.5	57.7
Tributyl phosphate	3.1	3.9	3.7	7.4
Tripropyl isocyanurate	1.9	2.7	3.6	7.3
Tris(2-chloroethyl) phosphate	1.3	1.0	4.4	3.5
Metoxadiazone	3.3	2.1	3.0	10.5
Pentachlorophenol	2.6	13.4	10.3	78.6
Di-n-propyl phthalate	2.7	0.2	4.0	7.8
Chlorothalonil	1.8	18.9	2.3	13.7
Diazinon	3.7	1.5	3.2	6.2
サンプラス	4.2	1.4	2.2	50.5
Di-iso-butyl phthalate	3.5	1.6	3.8	7.9
IF-1000S	5.3	6.3	3.5	61.4
Dichlofenthion	1.9	1.0	3.8	7.4
Carbaryl	3.9	6.7	3.9	13.6
Chlorpyrifosmethyl	2.6	3.0	3.8	0.3
S-421	3.1	0.6	2.7	9.4
Fenitrothion	4.7	9.4	3.1	48.2
Dichlofluanid	2.8	46.2	6.3	46.8
Di-n-butyl phthalate	3.8	1.0	9.3	10.3
Malathion	2.3	7.2	2.7	5.0
Chlorpyrifos	3.3	0.1	3.5	8.2
Thiabendazole	9.7	26.9	9.6	56.9
TCMTB	8.6	4.2	8.5	71.4
Tetrachlorvinphos	4.7	4.9	6.2	1.3
Di-n-pentyl phthalate	2.0	6.3	2.7	11.9
Cyproconazol	3.9	0.6	8.2	10.3
Tris(1,3dichloro2propyl) phosphate	3.2	8.8	6.4	8.8
Benzylbutyl phthalate	3.6	8.8	4.7	1.1
Di-n-hexyl phthalate	3.3	6.9	4.3	4.4
Triphenyl phosphate	3.7	8.9	5.3	0.4
Piperonyl butoxide	4.7	6.3	4.9	52.8
Tris(2-butoxyethyl) phosphate	6.4	3.6	10.9	55.5
Di(2-ethylhexyl) adipate	3.7	8.8	6.6	0.8
Pyridaphenthion	4.9	10.9	9.8	56.6
Fenoxycarb	8.6	5.8	12.2	49.3
Bifenthrin	4.1	7.1	5.5	0.7
Tris(2-ethylhexyl) phosphate	5.8	3.5	11.6	55.1
Dicyclohexyl phthalate	4.2	5.1	5.0	2.5
Di-n-heptyl phthalate	5.4	5.8	8.3	5.0
Pyriproxyfen	6.2	6.6	10.0	33.4
Di(2-ethylhexyl) phthalate	6.2	6.5	9.2	10.5
Tricresyl phosphate ①	6.1	9.8	8.2	5.3
Tricresyl phosphate ②	7.4	8.4	8.7	11.6
Permethrin ①	7.2	7.5	8.6	39.2
Tricresyl phosphate ③	9.3	9.6	9.5	10.2
Permethrin ②	7.5	7.3	9.9	35.8
Tricresyl phosphate ④	8.5	12.0	5.0	0.2
Cyfluthrin ①	10.7	13.2	14.8	61.4
Cyfluthrin ②	10.7	11.0	18.8	63.6
Cyfluthrin ③	10.5	12.6	16.2	61.9
Cyfluthrin ④	10.2	6.4	21.5	63.8
Ethofenprox	9.5	6.1	10.6	19.4
Silafluofen	9.6	7.5	10.0	11.6
Deltamethrin ①	26.4	77.6	-	-
Deltamethrin ②	14.4	31.0	25.5	65.4

- : 検出されず

て使用した石英濾紙およびEmporeディスクによる採取が不十分であった。また、捕集されたThiabendazoleはアセトンによる捕集材からの脱着率が低かった。したがって、これらの分析には別の捕集材を用いた採取方法を検討することが必要であると考えられた。IPBC、Pentachlorophenol、Chlorothalonil、サンブラス、IF-1000S、Carbaryl、Fenitrothion、Dichlofluanid、TCMTB、Cyproconazol、Piperonyl butoxide、Tris (2-butoxyethyl) phosphate、Pyridaphenthion、Fenoxycarb、Tris (2-ethylhexyl) phosphate、Pyriproxyfen、Tricresyl phosphate、Permethrin、Cyfluthrin、Ethofenprox及びDeltamethrinの検量線の形状は直線的ではなく、2次関数的

であるためこれらの低濃度環境における分析の際は正確に定量できない。検量線の回帰式を2次曲線として算出して気中濃度を定量する必要があることが示唆された。上記のSVOCを除く33物質は、本分析法により概ね1~2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の空气中濃度において再現性よく定量することが可能であると考えられた。本法では低濃度のSVOCの分析を考慮し、流速5.0 L/minで24時間の捕集を行ったが、予想される空气中濃度により吸引速度および捕集時間を調整することが必要である。また、空气中のSVOCが高濃度であると予想された場合は、捕集した試料の処理において濃縮を行わずアセトン抽出液を直接分析することも必要と考えられる。

1-3. 生体試料中の有害化学物質の測定法の検討

毒性をもつ有害物質に曝露された場合、どの程度、生体にとりこまれたかを知る必要がある。尿や血液中の有害物質濃度の測定法に関しては、昨年度は、血液中の鉛、クロム、水銀について報告した。今年度は、1) 尿中の砒素、2) 血液中のシアン、3) 尿中の水銀、4) 血中のトルエンおよびキシレン、5) 血中のジクロロメタンおよびトリクロロエチレン、6) 有機溶剤の尿中代謝物 (①トルエン→馬尿酸、キシレン→メチル馬尿酸、スチレン→マンデル酸の同時測定、②トリクロロエチレン→トリクロロ酢酸およびトリクロロエタノール) の測定法について、添加実験などの結果を報告する。

1-3-1) 尿中ヒ素の測定法

日本での金属ヒ素の推定国内生産量は約 40 トン(2000年)であり、合金添加剤、医薬品・ヒ素化合物の原料および半導体製品等に使用されている。

これらのヒ素化合物のうち人に対して毒性が最も強いのは三価の無機ヒ素であり、そのほか五価無機ヒ素およびそれらの代謝物であるモノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸が知られている。また海産物はアルセノベタイン等の有機ヒ素化合物を含んでいるが、人に対して毒性はほとんどないといわれている。海産物由来のアルセノベタインはある種の海藻類や魚介類に多量に含まれており、魚介類の摂取が多い日本人は欧米人に比べ、一般に尿中総ヒ素濃度は高いといわれている。

従って、無機ヒ素暴露の毒性を評価するためにはアルセノベタインを除去し、無機ヒ素およびそれらの代謝物のみを測定する必要がある。また、健康危機管理に対応した分析では迅速に測定できることは勿論であるが、多くの機関で実施するためには特殊な機器あるいは装置を必要としない方法が望ましい。

ここでは簡便な抽出処理で尿中のアルセノベタインを除去し、無機ヒ素とそれらの代謝物のみをフレイムレス原子吸光法で測定する方法¹⁾について検討を行なった。

1. 方法

1-1. 機器および試薬類

島津原子吸光光度計(AA-6700)、グラフアイト炉(GFA-6500)およびオートサンプラー(ASC-6000)

ヒ素標準液(原子吸光用、和光純薬)、塩酸(有害金属測定用、和光純薬)、硝酸ニッケル(II)水溶液(10mg/ml、原子吸光用)、トルエン(残留農薬試験用、和光純薬)、ヨウ化カリウムおよびホスフィン酸ナトリウム(特級)、カコジル酸(ジメチルアルシン酸、SIGMA)、アルセノベタイン(Fluka)

1-2. 測定方法

- 1) 10ml の栓付試験管に尿 1ml および濃塩酸(37%) 3ml、3.5M ヨウ化カリウム水溶液 100 μ l、3M ホスフィン酸水溶液 0.5ml を加えて混和、さらにトルエン 2ml を加えて 5 分間振盪を行なった。
- 2) 3,000rpm、5 分間遠心をおこない、上部の溶媒層を別の栓付試験管に採り、さらにトルエン 2ml で抽出を行なった。
- 3) トルエン層(4ml)に 1mM 水酸化ナトリウム水溶液 1ml を加えて逆抽出し、精製水で 5 倍に希釈し、フレイムレス原子吸光光度計で測定した。
- 4) サンプル量は 30 μ l とし、マトリックスモディ

ファイアーとして硝酸ニッケル水溶液(100 μ g/ml)を 10 μ l 添加した。

なお、フレームレス原子吸光光度計の設定は表 1 に示した。

表 1. 原子吸光光度計の設定条件

波長	193.7nm
スリット	0.2
ランプ電流	10mA
キュベット	パイロ化ガラスファイトチューブ
バックグラウンド補正	D2 ランプ

温度	時間	加熱モード	感度	ガス流量
1	70	20 Step	Regular	0.5
2	95	40 Ramp	Regular	0.5
3	110	30 Ramp	Regular	0.5
4	450	20 Ramp	Regular	1.5
5	1100	7 Ramp	Regular	1.5
6	1100	10 Step	Regular	1.5
7	1100	3 Step	High	0
8	2700	3 Step	High	0

2. 結果および考察

1. ヒ素水溶液およびヒ素添加尿から作成した検量線の直線性

精製水および非喫煙者尿にヒ素保存液(5 μ g/ml)を添加し 0、25、50、75、100、125 μ g/l の溶液および尿を調製した。これらの試料を上記の方法で測定し、各々の検量線を作成した(図 1)。

ヒ素添加水溶液およびヒ素添加尿からの検量線はいずれも相関係数、 $r=0.997\sim 0.999$ の直線を示した。ヒ素水溶液では 125 μ g/l まで直線性を示したが、尿添加ヒ素溶液で直線性を示したのは 100 μ g/l の濃度までであった。健常者でも尿中ヒ素が存在しており、直線性を示す濃度を超えたと考えられた。また、両液での検量線の傾きが異なっており、検量線法で尿中ヒ素量を測定するには低濃度ヒ素の尿にヒ素標準液を添加した検量線を用いる必要があると考えられた。

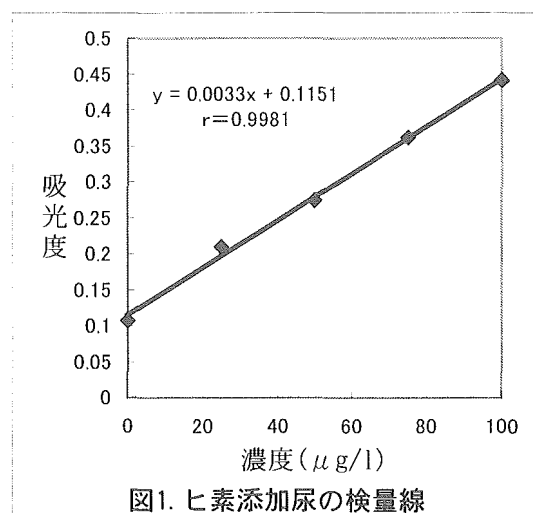


図1. ヒ素添加尿の検量線

2. ジメチルアルソンの回収試験

無機ヒ素のみでなく主要な代謝物であるジメチルアルシン酸(DMA)も確実に抽出できることを確認した。100 μ g/l のヒ素濃度に相当する DMA 水溶液を作成した。この溶液を抽出操作をせず直接原子吸光計で測定しヒ素濃度を確認したところ 99.7 μ g/dl であった。さらに尿にヒ素量として 50 μ g/dl 相当の DMA を添加し、抽出操作を行なった試料は 50.6 μ g/dl を示し、本法での回収率は 101.2% であった。

従って、本方法では DMA が確実に回収できることが示された。

3. アルセノベタインの回収試験

先にも述べたように、無機ヒ素の暴露量を正しく評価するためには、食品由来のアルセノベタイン(AsBe)を除外する必要がある。AsBe が抽出処理で除去できるかどうかを確認した。調製した AsBe 水溶液(As として 100 μ g/l)の直接測定は 94.0 μ g/l を示した。また、同濃度の AsBe 水溶液を抽出処理をした場合、検出濃度は 1.3 μ g/l であり、本方法ではほとんどの AsBe が抽出されることが確かめられた。

4. ヒ素化合物の混合溶液中での回収試験

精製水に 50 $\mu\text{g/l}$ の無機ヒ素(III)、DMA(As として 50 $\mu\text{g/l}$)および AsBe(As として 100 $\mu\text{g/l}$)を添加した試料では 102.7 $\mu\text{g/l}$ であり、無機ヒ素と DMA のみが測定できた。さらに、尿に DMA(As として 50 $\mu\text{g/l}$)および AsBe(As として 200 $\mu\text{g/l}$)を混和した試料の測定値は 52.1 $\mu\text{g/l}$ であり、AsBe は除外して測定できることが示された。

5. 非喫煙者の尿中ヒ素量

簡易標準添加法によって、非喫煙者(男性、5名)の尿中ヒ素量を測定した(表2)。尿比重の極端に低い尿を除くと 65.0~96.2 $\mu\text{g/l}$ であった。ヒ素を取り扱っていない工場労働者の正常値は全ヒ素量で 170 \pm 75.4、無機ヒ素とその代謝物のみでは 85.2 \pm 37.7 であり²⁾、本法での測定値は妥当な値であると考えられる。

表2. 健常者(非喫煙者)の尿中ヒ素濃度

	$\mu\text{g/l}$	尿比重
A	65.0	1.022
B	96.0	1.017
C	10.0	1.008
D	79.5	1.024
E	79.2	1.024

参考資料

- 1) L. Benramdane, M. Accominotti and J. J. Vallon.: Validated determination of total arsenic species of toxicological interest(arsenite, arsenate and their metabolites) by atomic absorption spectrometry after separation from dietary arsenic by liquid extraction : toxicological applications, *Analyst.*, 123, 1711-1715(1998)
- 2)山内 博: 無機ヒ素暴露の生物学的モニタリングに関する研究, *日本衛生学雑誌*, 49, 973-983(1995)

1-3-2) 血中シアンの測定法

シアン化合物はメッキをはじめ金の精錬、非鉄金属から銅・銀の抽出、金属の焼入れなど幅広く使われており、シアン化ナトリウムの生産量は約3万トン(平成12年)である。また、シアン化合物を用いた事件、事故がこれまでに報告されている。さらに、近年は難燃材の使用で建物の火災時にもシアンガスが発生し、消防士および火災被害者のシアン暴露が報告されている。

これらのシアン暴露事例に対応するため、ヘッドスペース-GC-MSによる血液中シアン濃度測定法を検討した。

1-1. 機器および試薬類

試薬

- ・KCN(特級、和光純薬); KCNは保存中に徐々に分解するため、標準液調製時に硝酸銀滴定法で濃度を確定する必要がある。
- ・0.1M水酸化ナトリウム水溶液
- ・50%リン酸水溶液
- ・内部標準液; トルエン-d₈ 2 μ lをアセトン10mlに溶解。

機器

- ・ターボマトリクス40型ヘッドスペースサンプラー(Perkin Elmer)
- ・ガスクロマトグラフ-マススペクトロメーター(GCMS-QP2010A、島津製作所)

1-2. 測定方法

1. 検量線の作成

- 1) KCNを0.1M水酸化ナトリウム溶液に溶解し、CNとして0、0.2、2.0、4.0、8.0 μ g/mlの標準溶液を作成した。各々の濃度の標準液0.5ml、精製水1.0mlおよび内部標準液10 μ lをヘッドスペース用バイア

ル瓶に入れ、すばやくフタをした。さらに、各々のバイアル瓶に注射器で50%リン酸溶液を0.4ml加えてよく攪拌した。なお、同濃度のサンプルを3本ずつ作成し測定を行なった。表1および図1にそれぞれ測定値および検量線を示した。

- 2) ヘパリン処理血液0.5ml、精製水1.0ml、KCN溶液(CNとして)、0、2.0、20.0、40.0および80.0 μ g/mlの0.1M水酸化ナトリウム溶液をそれぞれ50 μ l、内部標準液10 μ lをバイアル瓶に加えた。さらに、各々のバイアル瓶に注射器で50%リン酸を0.4ml加えてよく攪拌した。なお、同濃度のサンプルを3本ずつ作成し、測定した。表2および図2にそれぞれ測定値および検量線を示した。

2. 測定条件

ヘッドスペースサンプラー

- ・キャリアーガス: ヘリウム
- ・キャリアーガス圧力: 26.0 kPa
- ・保温時間: 30 min
- ・加圧時間: 5 min
- ・注入時間: 0.05 min
- ・オープン温度: 65 $^{\circ}$ C
- ・ニードル温度: 70 $^{\circ}$ C
- ・トランスファーライン温度: 75 $^{\circ}$ C
- ・サンプリング間隔: 10 min

ガスクロマトグラフ

- ・注入口温度: 150 $^{\circ}$ C
- ・カラム: J&W社製DB-WAX(長さ30m \times 内径0.32mm、膜厚0.25 μ m)
- ・カラムオープン温度: 40 $^{\circ}$ C
- ・インターフェイス温度: 150 $^{\circ}$ C

マススペクトロメータ

- ・イオン化方式: EI
- ・電子電圧: 70 eV

- ・電子電流：60 μ A
- ・イオン源温度：200 $^{\circ}$ C
- ・測定時間：3～5 min
- ・分析モード：SIM
- ・検出器電圧：1.15 kV
- ・サンプリングレート：0.2 sec

なお、定量用イオンおよび確認用イオンはそれぞれ 27 及び 26 とし、内部標準物質（トルエン-d8）の定量用イオンは 98 とした。

2. 結果および考察

x 軸に CN 濃度、y 軸に CN のピーク面積をトルエン-d8 のピーク面積で除した値(面積比)をプロットすると、図 1 に示すように、シアン水溶液からの標準曲線は濃度 8.0 μ g/ml までの直線が得られ、その傾きは $a = 0.0265$ 、相関係数 $r = 1.000$ であった。また表 1 に示したように各濃度の面積比の変動係数(CV)は 1.09～4.36 であった。

血液に添加した試料では、直線を示したのは添加濃度が 4.0 μ g/ml までで、8.0 μ g/ml の添加サンプルは直線に乗らなかった。直線部分では $a = 0.0204$ 、 $r = 0.9994$ であり、各面積比の変動係数も 6.1～10.0 であった。微量分析はできないが、事故等における血液中シアンの分析には十分使用できる方法であると考えられる。

表 1. CN 水溶液の測定結果

CN 濃度 (μ g/ml)	面積比*	CV (%)
0	0.00000	
0.8	0.02007	3.80
2.0	0.05261	4.36
4.0	0.10589	1.45
8.0	0.21387	1.09

* : CN の面積 \div IS の面積 (3 サンプルの平均)

表 2. CN 添加血液の測定結果

添加 CN 濃度 (μ g/ml)	面積比*	CV (%)
0	0.00052	6.19
0.8	0.01281	10.08
2.0	0.04167	4.48
4.0	0.08043	7.26
8.0	0.11721	6.94

* : CN の面積 \div IS の面積 (3 サンプルの平均)

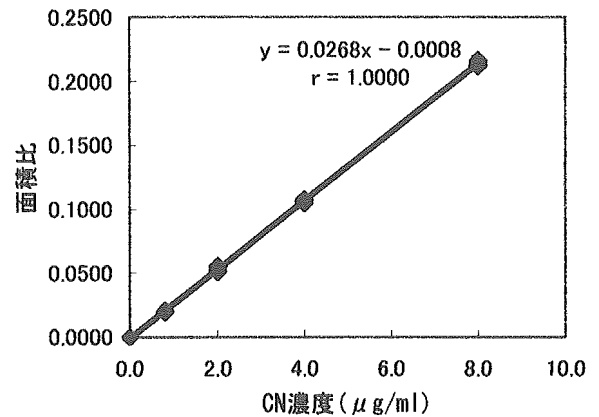


図1. KCN水溶液の検量線

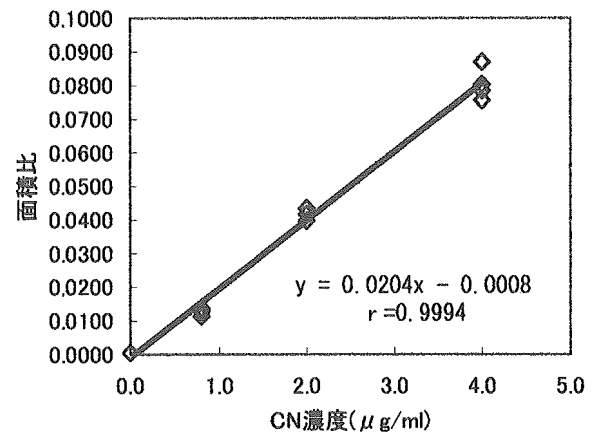


図2. KCN添加血液の検量線

I-3-3) 尿中水銀の測定法

-- 酸分解-還元気化法 --

1 装置

- ・試料分解部
テフロン製ルツボ (容量 75ml) および
ステンレスジャケット (SUS-304)
いずれもフロン工業製。
- ・還元気化装置 島津製 MVU-1A
- ・検出器 島津原子吸光光度計 AA6700
- ・定温乾燥器 ADVANTEC 製

2 試薬

- ・水銀標準液：塩化第2水銀 135.4mg を精製水に溶解し、硫酸 0.1ml を加えた後、精製水で 100ml とした。(1000ppm Hg)
- ・0.2%過マンガン酸カリウム-4N硫酸溶液：栓付メスシリンダーに精製水と硫酸 9ml を加えた後過マンガン酸カリウム 0.6g を溶解し、精製水で 300ml とした。

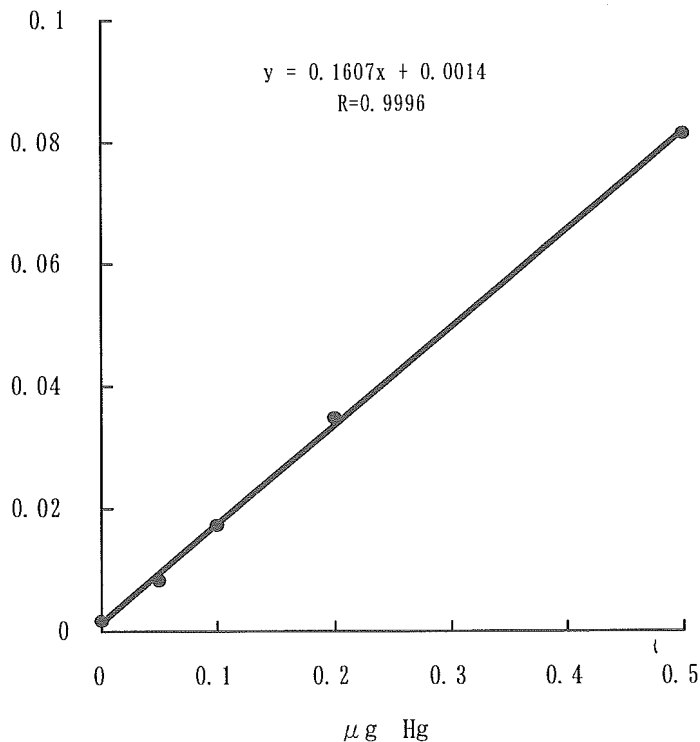


図1 水銀検量線

- ・塩化第1スズ溶液：ビーカーに塩酸 40ml を入れ、ホットスターラー上で塩化第1スズ 20g を除々に加え加温溶解した。冷後精製水で 200ml とした。
- ・10%塩酸ヒドロキシルアミン溶液
- ・硝酸、硫酸、塩酸は有害金属測定用を用い、その他の試薬はすべて特級を用いた。

3 分析操作

尿は健常人男性のスポット尿を採取し、試験まで-20℃で保存した。尿を室温に戻して 2ml をテフロン製るつぼにとり、硝酸 5ml を加えた後、るつぼをステンレスジャケットに入れ、乾燥器内で 130℃、90 分間加熱した。室温まで冷ました後、0.2%過マンガン酸カリウム-4N硫酸溶液 20ml で希釈して試験溶液とした。還元気化装置の反応槽に試験溶液を移し、精製水 130ml、10%塩酸ヒドロキシルアミン溶液 1ml を加えた。さらに塩化第1スズ溶液 4.5ml を素早く加えゴム栓をして内容液をバブリングして還元気化した水銀を原子吸光光度計に取り付けた石英セルに導き、波長 2537nm で吸光度を測定した。

4 検量線

0.2%過マンガン酸カリウム溶液 20ml に水銀標準液を直接添加し、還元気化して測定した検量線を図1に示した。水銀 0.05 ~ 0.5 μg の範囲内で良好な直線性を示した。日本人の尿中の平常値は 0.05 μg/2ml といわれ、この値は今回の検量線の下限值に相当する。

5 添加回収実験

室温に戻し混合した尿 2ml に水銀 0.05 μ g、および 0.1 μ g を添加して酸分解を行い、測定した 6 サンプルの結果を表 1 に示した。

表 1 尿への添加回収

	添加なし	0.05 μ g	0.10 μ g
1	0.003 μ g	0.052 μ g	0.104 μ g
2	0.002	0.053	0.092
3	0.000	0.046	0.090
4	0.004	0.052	0.086
5	0.001	0.052	0.104
6	0.000	0.053	0.097
平均	0.002	0.051	0.095
S. D.	0.0016	0.0026	0.0075

回収率は 0.05 μ g 添加では 100% (CV 5%)、0.1 μ g 添加では 95% (CV 8%) であった。また 5 名の尿中水銀濃度と各尿 2ml に 0.2 μ g を添加して測定した結果を表 2 に示した。5 名の平均濃度は 0.008 \pm 0.0080 μ g/2ml であった。これは暴露されていない男性 130 人の平均尿中濃度 2.33 \pm 1.50 μ g/l (0.005 μ g/2ml) とほぼ同じ濃度であった¹⁾。また水銀 0.2 μ g の添加回収率は 97.5% であった。

表 2 尿中水銀濃度と添加回収

	尿(2ml)のみ	0.2 μ g 添加
1	0.000 μ g	0.190 μ g
2	0.013	0.196
3	0.018	0.206
4	0.007	0.185
5	0.000	0.196
平均	0.008	0.195
S. D.	0.0080	0.0079

金属水銀は主に蒸気として肺から吸収され、ヒトの場合 1 回の呼吸で体内に残留する水銀

蒸気の割合は 61-88% といわれる。また皮膚からも吸収される。主な排泄経路は尿と糞便である。尿中水銀は個人差が大きく日間変動も著しいといわれる。近年、尿中水銀値を変動させる要因のひとつとして歯科用アマルガムによる暴露が考えられている²⁾。

水銀蒸気暴露後血液では 7 時間後にピークが見られ、尿では 10-20 日後ピークとなり徐々に排泄されること³⁾から、暴露後の早期の変化は血中濃度の測定が適当と考える。

文 献

- 1) Yukio Y. et al :Background Levels of Total Mercury Concentrations. Jpn J Ind Health 1994:66-69
- 2) Toxicology Today :71-78
- 3) Lars B. et al :Kinetics of Mercury in Blood and Urine after Brief Occupational Exposure.

I-3-4) 血中のトルエンおよびキシレン濃度の測定

1. 試薬

- ・トルエン
- ・*o*-キシレン
- ・*m*-キシレン
- ・*p*-キシレン
- ・d8-トルエン
- ・アセトン

2. 試薬の調整

- 1) 標準添加液：アセトン 10ml にトルエン、*o*-キシレン、*m*-キシレンおよび*p*-キシレンを各々2 μ l ずつ添加する。
- 2) 内部標準液：アセトン 10ml に d8-トルエン 2 μ l を添加する。

3. 採血

- 1) 被験者に検査の目的を説明し、同意が得られれば同意書に署名を受ける。
- 2) ヘパリン入り真空採血管により、血液 10ml を採取する。

4. 標準系列の作成

- 1) バイアルビン 4 本に各々血液 2ml を入れる。
- 2) 標準原液をそれぞれ 0, 5, 10, 20 μ l を添加する。
- 3) 内部標準液を各々 10 μ l ずつ添加する。

5. ヘッドスペース装置付ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

- 1) 測定条件を設定する (表 4-1 参照)。
- 2) バイアルビンをヘッドスペース装置に載せ、スタートする。

表 4-1. 測定条件の例

ヘッドスペース装置

- オープン温度 60°C
- ニードル温度 65°C
- トランスファ温度 70°C
- 保温時間 60 分
- 加圧時間 3 分
- 注入時間 0.05 分

ガスクロマトグラフ

- オープン温度 60°C
- 注入部温度 120°C
- カラム DB-1
- 内径 0.25mm
- 長さ 30m
- 膜厚 0.25mm

質量分析計

- イオン源温度 200°C
- インターフェース温度 180°C
- 検出器 SIM モード
- m/Z = 91, m/Z = 98, m/Z = 106

6. 検量線の作成と測定値の算出

- 1) d8-トルエンのピーク面積に対するトルエン、*o*-キシレン、*m*-キシレンおよび*p*-キシレンのピーク面積の比を算出する。
- 2) 横軸に血中濃度、縦軸に面積比とし、プロットして検量線を作成する。図 4-1 はトルエン曝露のない被験者の検量線、図 4-2 は *p*-キシレン曝露の無い被験者の検量線、図 4-3 は *o*-キシレン曝露の無い被験者の検量線である。
- 3) 検量線を外挿して横軸と交わる点の数値を読み取る。その値にマイナスを付け

た値が血中濃度となる。

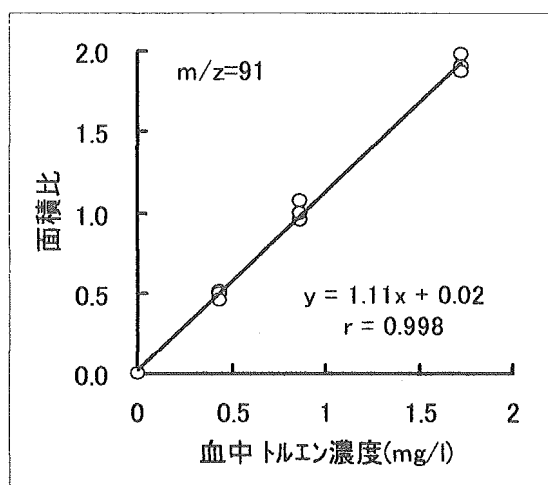


図 4-1. トルエン曝露の無い被験者の例

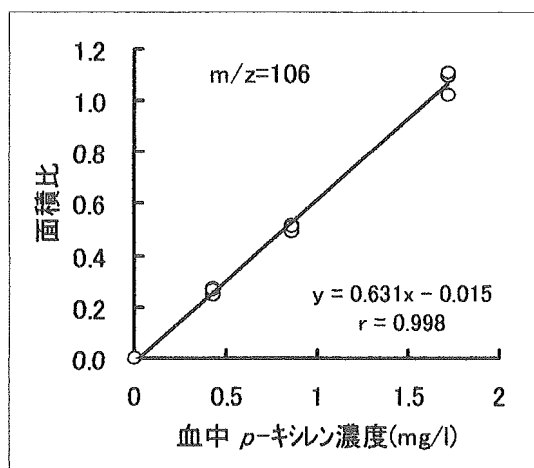


図 4-2. p-キシレン曝露の無い被験者の例

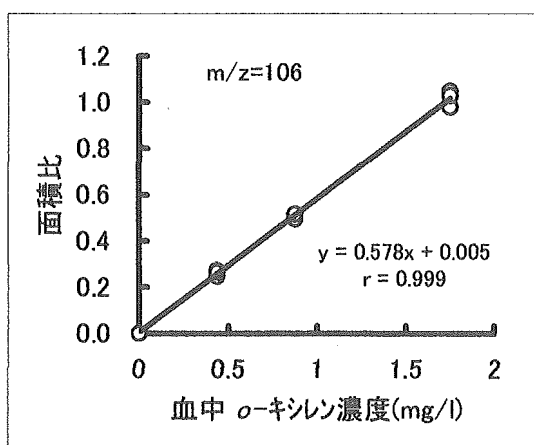


図 4-3. o-キシレン曝露の無い被験者の例

I-3-5) 血中のジクロロメタン およびトリクロロエチレンの測定

1. 試薬

- ・ジクロロメタン
- ・トリクロロエチレン
- ・d8-トルエン
- ・アセトン

2. 試薬の調整

- 1) 標準添加液：アセトン 10ml にジクロロメタンおよびトリクロロエチレンを各々 2 μ l ずつ添加する。
- 2) 内部標準液：アセトン 10ml に d8-トルエン 2 μ l を添加する。

3. 採血

- 1) 被験者に検査の目的を説明し、同意が得られれば同意書に署名を受ける。
- 2) ヘパリン入り真空採血管により、血液 10ml を採取する。

4. 標準系列の作成

- 1) バイアルビン 4 本に各々血液 2ml を入れる。
- 2) 標準添加液をそれぞれ 0, 5, 10, 20 μ l 添加する。
- 3) 内部標準液を各々 10 μ l ずつ添加する。

5. ヘッドスペース装置付ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

- 1) 測定条件を設定する (表 5-1 参照)。
- 2) バイアルビンをヘッドスペース装置に載せ、スタートする。

表 5-1. 測定条件の例

ヘッドスペース装置

オープン温度 50°C

ニードル温度 55°C

トランスファ温度 60°C

保温時間 60 分

加圧時間 3 分

注入時間 0.05 分

ガスクロマトグラフ

オープン温度 50°C

注入部温度 120°C

カラム DB-1

内径 0.25mm

長さ 30m

膜厚 0.25mm

質量分析計

イオン源温度 200°C

インターフェース温度 180°C

検出器 SIM モード

m/Z = 84, m/Z = 98,

m/Z = 130

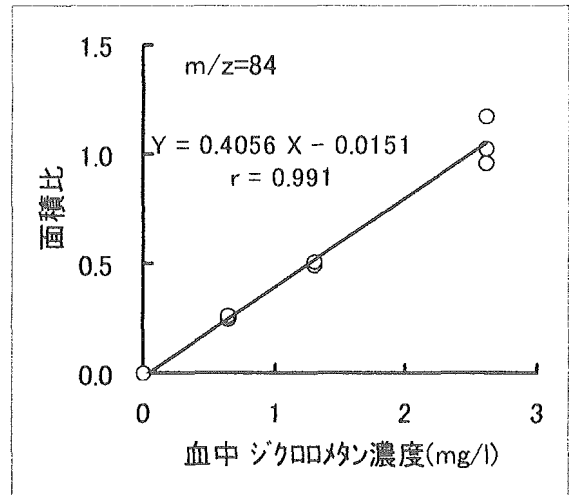


図 5-1. ジクロロメタン曝露の無い被験者の例

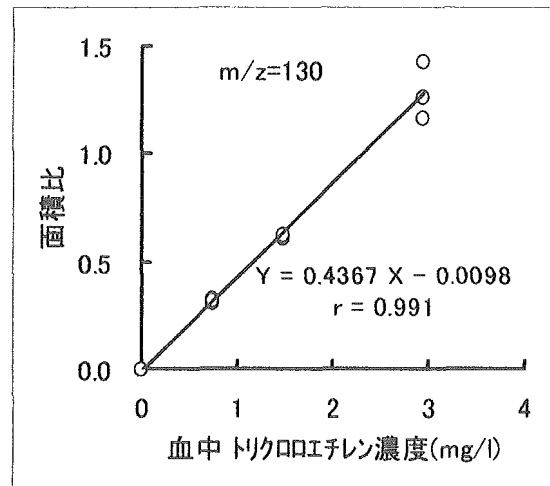


図 5-2. トリクロロエチレン曝露の無い被験者の例

6. 検量線の作成と測定値の算出

- 1) d8-トルエンのピーク面積に対するジクロロメタンおよびトリクロロエチレンのピーク面積の比を算出する。
- 2) 横軸に血中濃度、縦軸に面積比とし、プロットして検量線を作成する。図 5-1 にジクロロメタン曝露の無い被験者の事例を、図 5-2 にトリクロロエチレン曝露の無い被験者の事例を示す
- 3) 検量線を外挿して横軸と交わる点の数値を読み取る。曝露時には横軸とはマイナス側で交差するので、その値にマイナスを付けた値が血中濃度となる。

I-3-6) 有機溶剤の尿中代謝物の測定

有機溶剤による曝露の指標として、尿中代謝物、血中当該物質、呼気中当該物質などの測定が行われている。有機溶剤の中でもトルエンおよびキシレンは塗料や接着剤の溶剤として多量に使用されており、作業による中毒例や青少年のシンナー遊びによる中毒例が報告されている。スチレンはスチロール樹脂、FRPなどの原料として多く使用されている。また、トリクロロエチレンは金属の脱脂洗浄剤としてかつては多量に使用され、急性中毒例も多い。近年では地下水汚染などで問題となっている。

これらの物質による中毒事例としては次のような報告がある。①建築塗装従事者が事務所の壁を、ローラーを用いて塗装中、換気不良のため昏睡状態となった（溶剤としてトルエンおよびキシレンを使用；1988年）。②16歳の時からシンナー遊びを始めた女性が、19歳の時に体重減少と肝腎機能障害で入院。この時は速やかに回復したが、再びシンナー吸引を始め、下肢筋力低下とめまいを主訴に再び入院。1ヶ月間で6Lのシンナーを吸引したという（1992年）。③幼稚園児が自転車置き場に放置されていたジュース缶（シンナーが入っていた）を飲み、口腔内熱感を自覚、救急担送された（1991年）。④トリクロロエチレンによる金属の脱脂洗浄槽を清掃中の作業者が、槽内で意識を失い翌朝昏睡状態で発見されて、病院に搬送され一命をとりとめた。

ここではこれら有機溶剤の尿中代謝物の測定について述べる。

1. 尿中のトルエン、キシレン、スチレン代謝物（馬尿酸、メチル馬尿酸、マンデル酸）の同時測定法

(1) 概要

トルエン、キシレンおよびスチレンの尿中代謝物である馬尿酸、メチル馬尿酸およびマンデル酸は、高速液体クロマトグラフ

による同時測定が可能である。

なお、メチル馬尿酸にはオルソ体(o-)、メタ体(m-)およびパラ体(p-)の3つの異性体があるが、今回の方法ではメタ体とパラ体の分離はできない。しかし、産業界で使用されているキシレンの成分は大部分がメタ体であるのでわずかに含まれるパラ体はm-メチル馬尿酸として測定される。従って、メチル馬尿酸の値としてはオルソ体とメタ体を合計した値を用いる。

これらの代謝物の測定にはスポット尿を用いることが多いが、スポット尿の場合、尿自体の濃度がこれらの代謝物の濃度に反映するため、尿濃度に対する補正を行った方がよく、補正の方法としてはクレアチニン補正がよいとされている。クレアチニンを測定するために、溶離液にイオンペア試薬を加えてクレアチニンを分離して、上記3種類の代謝物に加えて尿中クレアチニンも同時に測定する方法について記す。

(2) 測定法

① 試薬

- a) 標準物質：馬尿酸、o-メチル馬尿酸、m-メチル馬尿酸、マンデル酸、クレアチニン
- b) りん酸二水素カリウム (KH_2PO_4)
- c) りん酸
- d) 1-デカンスルホン酸ナトリウム
[$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SO}_3\text{Na}$]
- e) アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ用）
- f) メタノール（高速液体クロマトグラフ用）

② 試薬の調整

a) 標準液

標準物質各 1g を量りとり、蒸留水に溶かし全量を 1000 ml とする

(1000mg/l)

b) 溶離液

- イ) リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)
2.7g とり、蒸留水に溶解して、全量を 1000ml とする。
- ロ) リン酸で pH を 3.3 に調整する。
- ハ) 1-デカンスルホン酸ナトリウム
0.37g 加え溶解する。
- ニ) メンブレンフィルター ($0.45\ \mu\text{m}$) で吸引ろ過する。
- ホ) 上記溶液 900ml にアセトニトリル 100ml 加えて攪拌し、超音波をかけて気泡を取り除く。

③ 機器

- a) 高速液体クロマトグラフ装置 (検出

器: 紫外分光光度検出器)

- b) pH メーター

- c) 微量高速遠心機

- d) 超音波発生機

④ 測定方法

- a) 採尿

仕事による 8 時間程度の曝露の場合には、終業時に採尿する。事故等による短時間の曝露の場合には曝露後出来るだけ早く採尿し、その後数時間経時的に採尿する。

その日に測定しない場合には冷凍保存する(凍結保存すれば長期間安定である)。

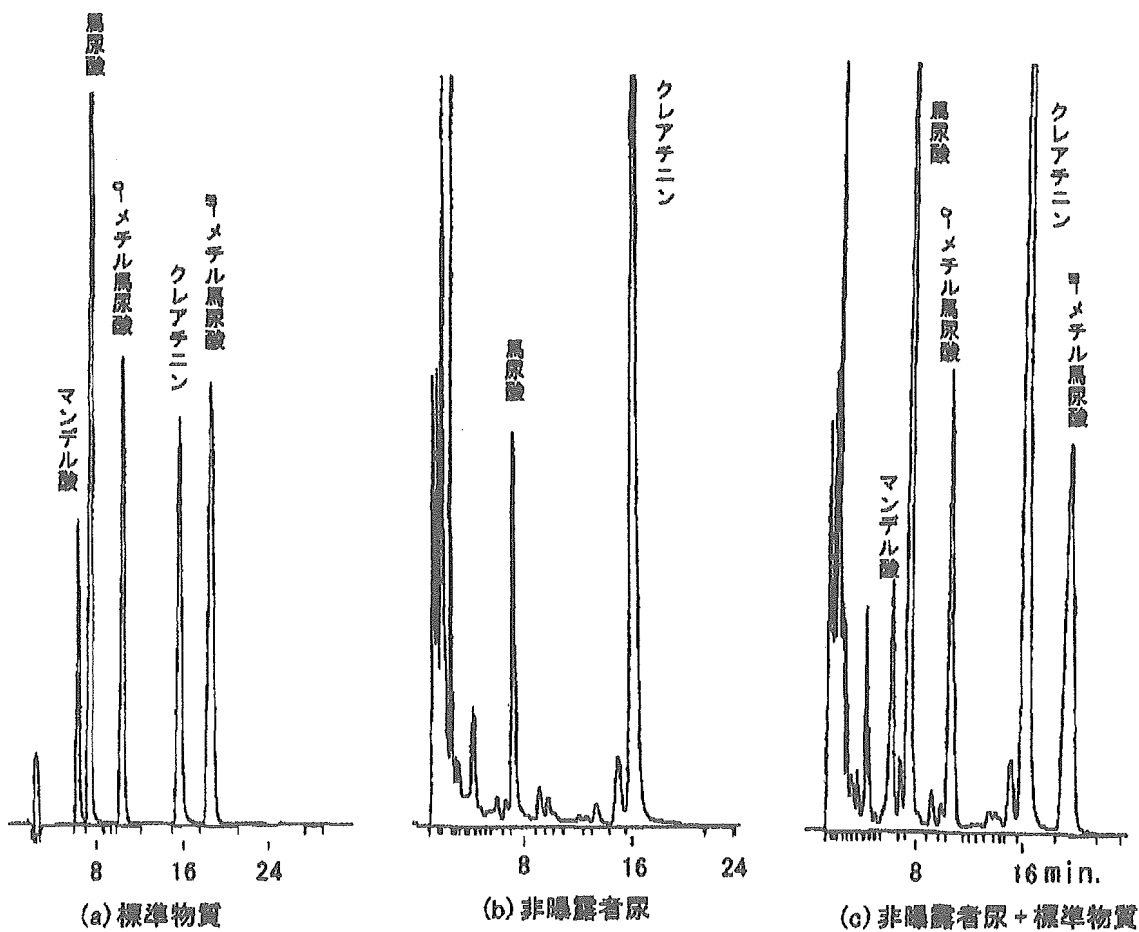


図1 マンデル酸、尿酸、o-メチル尿酸、クレアチニン、m-メチル尿酸のクロマトグラム

b) 前処理

イ)凍結尿の場合は37℃の温浴で解凍し、転倒混和する。

ロ)尿 100 μ l を小スピッツ (1.5ml) にとる。

ハ)メタノール 900 μ l を加え、転倒混和したのち、30分以上室温で放置する。

ニ)微量高速遠心機により 10,000rpm で10分遠沈する。

ホ)上清を別の容器に移し替え、20 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する。

ヘ)検量線用標準溶液は各々の標準溶液を段階希釈したものを同様に処理する。

c) 高速液体クロマトグラフ条件

イ)カラム:リクロスフィア 100 RP-18
カラム粒子径 5 μ m 長さ 250mm 内径 4mm。

ロ)ガードカラム:リクロスフィア 100 RP-18 プレカラム粒子径 5 μ m 長さ 4mm 内径 4mm。

ハ)カラム温度:40℃

ニ)流量:1ml/分

ホ)測定波長:225nm

ヘ)分析時間:25分

⑤ 測定に関する検討

a) 各物質のクロマトグラム

馬尿酸、*o*-メチル馬尿酸、*m*-メチル馬尿酸、マンデル酸およびクレアチニンを、それぞれ 1000mg/l 含む標準液、非曝露者尿および非曝露者尿に各物質を 1000mg/l 添加した場合のクロマトグラムを図1に示す。標準液における保持時間(Rt.)はマンデル酸が6.51分、馬尿酸が7.57分、*o*-メチル馬尿酸が10.56分、クレアチニンが15.80分、*m*-メチル馬尿酸が18.82分であった。

b) 検量線

上記②-a)によって作成した1000mg/lの標準液を希釈して、それぞれ200mg/l、500mg/lとし、上記の測定法に従って作成した検量線を図2に示す。いずれの物質もピーク面積との間に直線関係が認められた(1000mg/l以上は未検討)。

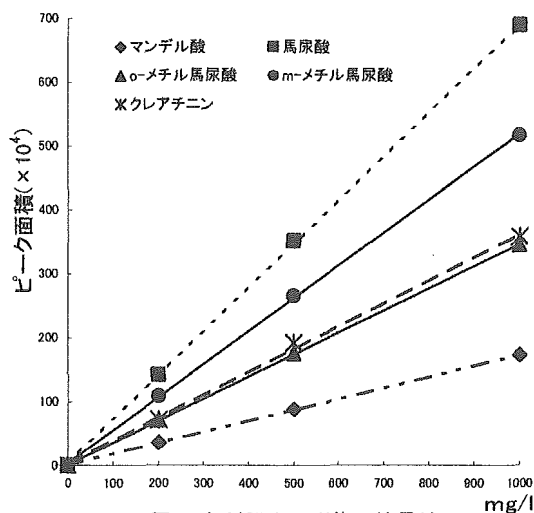


図2 各種尿中代謝物の検量線

c) 添加回収試験

それぞれ異なる非曝露者尿3検体を用いて、各物質の標準液を1000mg/l相当量添加し、上記の測定方法によって求めた回収率および変動係数(CV)を表1に示す。回収率は0.996~1.085、CVは2.51%~3.71%であり、いずれの物質についてもよい回収率が得られた。

表1 各物質の添加回収率
(添加量:1000mg/l相当)

尿中代謝物	回収率	CV(%)
馬尿酸	1.028	2.51
<i>o</i> -メチル馬尿酸	1.085	3.34
<i>m</i> -メチル馬尿酸	0.966	3.71
マンデル酸	1.082	3.10

⑥ 非曝露者レベルおよび有機溶剤曝露濃度との関係

a) 非曝露者レベル

マンデル酸およびメチル馬尿酸は有機溶剤非曝露者の尿中には存在しないが、馬尿酸は食事由来のものが尿中に排泄される。トルエン非曝露者 50 人より求めた尿中馬尿酸の非曝露者レベルを表 2 に示す。

表 2 尿中馬尿酸の非曝露者レベル

測定値	13~860mg/l
クレアチニン補正值	19~709mg/g クレアチニン

b) 有機溶剤曝露濃度との関係

i) トルエンの曝露濃度と尿中馬尿酸との関係

ビニルはきのも製造労働者 20 人より求めたトルエンの個人曝露濃度と就業時の尿中馬尿酸量との関係は図 3 の如くであった。

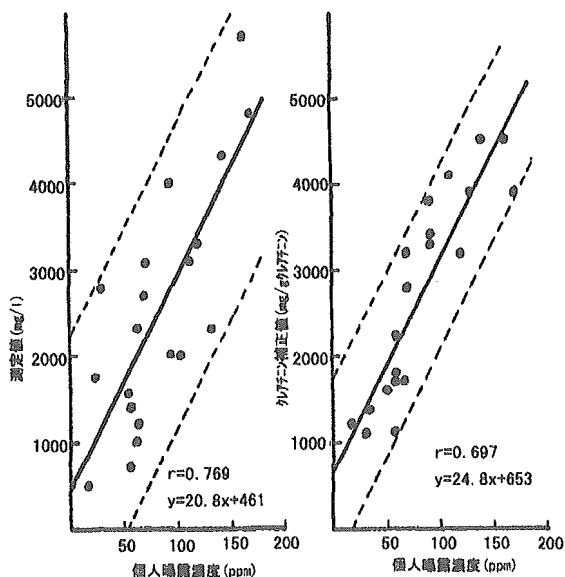


図 3 トルエン個人曝露濃度と尿中馬尿酸の関係

注：この図では尿中馬尿酸は BSC 法(比色法)で測定している。BSC 法(y)と HPLC 法(x)の間には $y=1.2x+524$ ($r=0.992$) の関係がある。

ii) キシレン曝露濃度と尿中メチル馬尿酸の関係

塗料工場労働者 13 人より求めたキシレンの個人曝露濃度と就業時の尿中メチル馬尿酸量との関係は図 4 の如くであった。

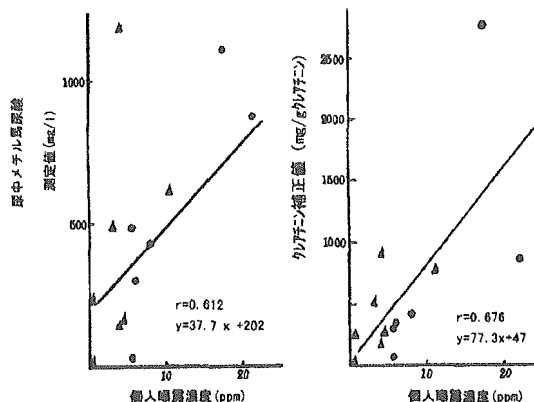


図 4 キシレン個人曝露濃度と尿中メチル馬尿酸の関係

iii) スチレン曝露濃度と尿中マンデル酸の関係

FRP 製造工場労働者延べ 30 人より求めたスチレンの個人曝露濃度と就業時の尿中マンデル酸量との関係は図 5 の如くであった。

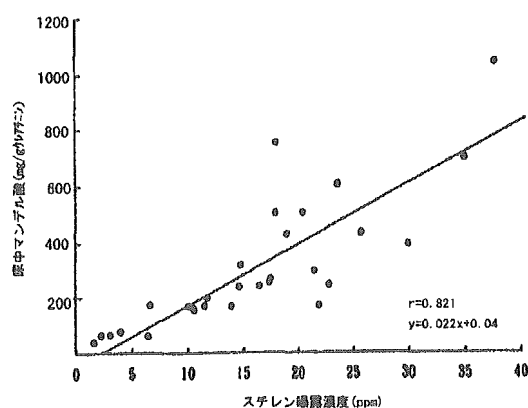


図 5 スチレン個人曝露濃度と尿中マンデル酸の関係

⑦ 測定結果の解釈上の留意点

a) バックグラウンドレベルの存在

尿中メチル馬尿酸および尿中マンデル酸

のバックグラウンドレベルはほとんど0であるが、馬尿酸は食事由来の尿中排泄があり、バックグラウンドが存在するため、非曝露者レベルを考慮しなければならない。

b)馬尿酸は総合感冒薬や清涼飲料水に含まれる安息香酸ナトリウムを多く摂取することにより尿中に大量に排泄されることがあるので、被験者にあらかじめそのことを確認することが必要である。

c)マンデル酸はスチレンの代謝物であると同時にエチルベンゼンの代謝物でもあるので解釈に注意が必要である。

d)馬尿酸、メチル馬尿酸、マンデル酸とも、生物学的半減期が数時間なので、採尿時期に注意が必要である。通常の仕事による曝露の場合は(一日8時間程度)、業務終了時に採尿する。短時間曝露の場合は、おおむね曝露2時間後に採尿するのがよい。

e)事故等緊急時で採尿時期を考慮できない場合には、なるべく早く採尿し、曝露の状況、採尿までの時間などを調べておくことが必要である。

f)上記の有機溶剤個人曝露濃度と尿中代謝物との関係(図3、図4、図5)は、通常の仕事による曝露における業務終了時尿との関係を示したものである。

g)血中、呼気中および尿中の有機溶剤そのものを測定し、可能であれば、現場の気中有機溶剤濃度も測定して、総合的に判断することが望ましい。

文献

- 1)中央労働災害防止協会編：有機溶剤作業者の健康管理のすすめ方(1983)
- 2)中央労働災害防止協会：わかりやすい生物学的モニタリングー有機溶剤編ー(1996)
- 3)日本産業衛生学会有機溶剤中毒研究会：有機溶剤中毒症例データベース第1集(1984)～第7集(2000)(CD-ROM

2000)

- 4)田淵武夫,林美代子,青野裕士,原一郎：ビニル履物製造作業の実態調査(2)溶剤曝露状況,第58回日本産業衛生学会講演集(1983)
- 5)田淵武夫,林美代子,小坂博,原一郎：有機溶剤曝露濃度と尿中代謝物量の関係,トルエンおよびキシレンについて,大阪府立公衛研所報,労働衛生編,第19号(1981)
- 6)田淵武夫,熊谷信二,松永一朗：FRP成形作業におけるスチレンおよびアセトン曝露と尿中代謝物の関係,第34回近畿産業衛生学会講演集(1994)
- 7)田淵武夫,吉田俊明,平田 衛：つやだし加工労働者におけるトルエン曝露による尿中馬尿酸レベル,大阪府立公衛研所報,労働衛生編,第28号(1990)

2. 尿中総三塩化物(トリクロル酢酸、トリクロルエタノール)の測定

(1) 概要

トリクロルエチレン、テトラクロルエチレン、1,1,1-トリクロルエタンに曝露されると、代謝産物として、尿中にトリクロル酢酸およびトリクロルエタノールが排泄される。両者をあわせて総三塩化物と呼ぶ。トリクロルエチレンなどの曝露評価には一般にトリクロル酢酸または総三塩化物が用いられている。しかし、トリクロルエタノールの半減期は短く数時間であるが、トリクロル酢酸の半減期は数十時間と長い。したがって、トリクロル酢酸およびトリクロルエタノールの両方を測定することが望ましい。曝露後短時間の場合には総三塩化物またはトリクロルエタノールで、曝露後長時間(数十時間～数日間)経過後であればトリクロル酢酸で曝露を評価することが可能である。

この場合も尿濃度による影響を除くためにクレアチニン補正することが望ましい。

(2) 測定法

① 試薬

- a) ピリジン(特級):開栓後古くなったものは盲検値を高くするので、使用時に開栓したものを使用する。
- b) 三酸化クロム
- c) 濃硝酸(特級)
- d) 水酸化カリウム(特級)
- e) トルエン(特級)
- f) トリクロル酢酸(特級)

② 試薬の調整

- a) 酸化剤: 8g の三酸化クロムを 5ml の蒸留水と 15ml の濃硝酸の混液に溶解する。
- b) 7.8N 水酸化カリウム: 水酸化カリウム 437.6g を 1ℓ の蒸留水に溶解する。
- c) 標準資料: トリクロル酢酸約 20g を蒸留水 1ℓ に溶解し、使用時に、力価既知の水酸化ナトリウム溶液で滴定し、正確な濃度を求める(トリクロル酢酸は潮解性が強いので重量を正確に計量することが困難である)。

③ 機器

- a) 試験管(直径 16mm, 長さ 175mm)
- b) 小試験管(16mm×105mm)
- c) 試験管ミキサー
- d) ガラス球(ラムネ玉で代用可)
- e) 恒温槽(100℃)
- f) 恒温槽(65℃)
- g) 氷水槽
- h) ピペット(安全ピペッター付き)
- i) 分光光度計

④ 測定

a) 総三塩化物の測定

- i) 尿 0.5ml を試験管にとる。
- ii) 酸化剤 0.5ml を加え試験管ミキサーで混合する。
- iii) ガラス玉で蓋をして、100℃の恒温槽(油浴または沸騰水中)で 15 分間加温する(酸化)。
- iv) 氷水槽で冷却する。
- v) 氷水中にて 7.8N 水酸化カリウム 2.5ml を加えアルカリ性とする(壁面に付着している酸化剤も中和する)。
- vi) ピリジン 5ml、トルエン 0.5ml を加え、試験管ミキサーで軽く混合する。
- vii) 再びガラス玉で蓋をして、65℃の恒温槽で 50 分間加温する(発色)。
- viii) 氷水槽で冷却する。
- ix) ピリジン層 3ml をとり、あらかじめ蒸留水 0.6ml を入れてある小試験管に入れ、よく混和する。
- x) 分光光度計で、530nm の吸光度を求める(吸光度は蒸留水と混和後 5~20 分に測定する)。

b) トリクロル酢酸の測定

i) の段階で尿 0.5ml を試験管にとった後、直ちに氷冷し、氷水中でまず 7.8N 水酸化カリウム 2.5ml を、次いで酸化剤 0.5ml を加え攪拌する。酸化の段階を経ずに、直ちに ii) の段階に入り、以下同様に操作する。

c) トリクロルエタノールの測定

総三塩化物量からトリクロル酢酸の量を引いてトリクロルエタノール量とする。

d) 検量線

滴定により標準液の正確なトリクロル酢酸濃度を求めた後、これを蒸留水で希釈して、10、30、50、80、100mg/l とし、上記 b) により発色させ、検量線とする（酸化の工程を行わなくてもよい）。これにより求めた検量線を図 1 に示す。

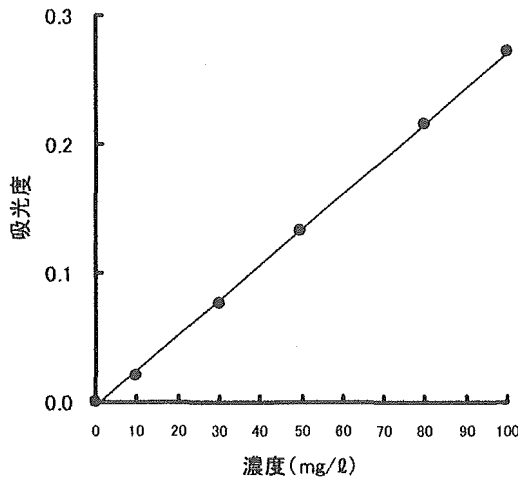


図1 尿中トリクロル酢酸の検量線

e) 測定上の注意

イ) 酸化液、水酸化カリウム溶液、ピリジンはいずれも皮膚につくと障害を起こすので、注意深く扱い、皮膚に付着した場合は直ちに水洗しなければならない。

ロ) ピリジンは悪臭が強く、毒性もあるので、操作は必ずドラフトチャンバー内で行わなければならない（分光光度計もドラフトチャンバー内に設置するか局所排気装置を設置する必要がある）。

⑤ トリクロルエチレン曝露と尿中代謝物

a) トリクロルエチレン個人曝露濃度と総三塩化物の関係

脱脂洗浄作業員などトリクロルエチレンを取り扱う労働者 10 人について求めた、トリクロルエチレン個人曝露濃度と尿中総

三塩化物の関係を図 2 に示す。総三塩化物のクレアチニン補正值においてよい相関関係が認められた。なお、トリクロルエタノールのクレアチニン補正值との間には $y=8.8x+69.2$ ($r=0.89$) の関係が認められた。

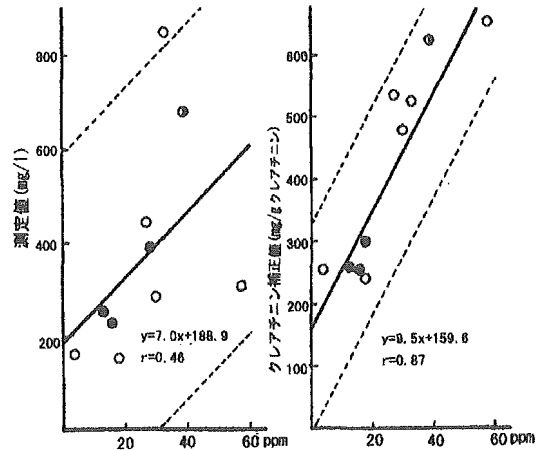


図2 トリクロルエチレン個人曝露濃度と尿中総三塩化物の関係

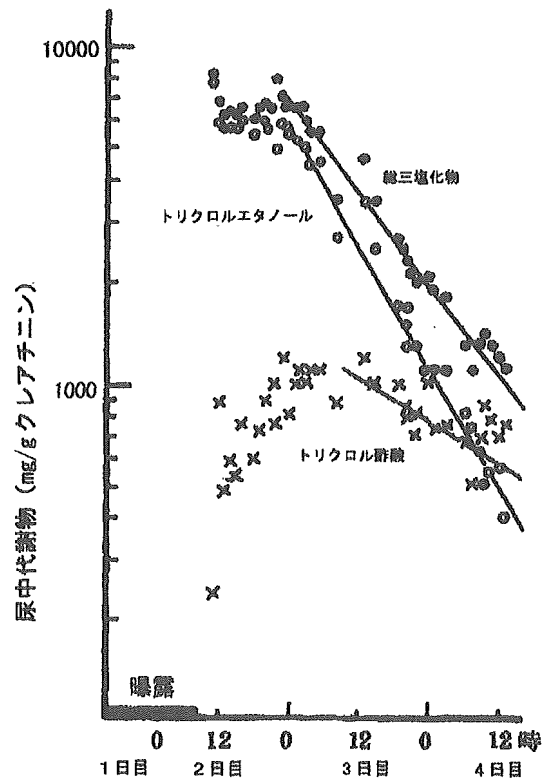


図3 トリクロルエチレン高濃度曝露後の尿中代謝物の経時変化

b) トリクロロエチレン曝露後のトリクロロ酢酸、トリクロロエタノール及び総三塩化物の経時変化

トリクロロエチレンの脱脂洗浄槽の清掃中に意識を失い、翌朝発見された事故例における尿中総三塩化物、トリクロロ酢酸、トリクロロエタノールのクレアチニン補正值の経時変化を図 3 に示す。クレアチニン補正值での生物学的半減期は、トリクロロエタノールが 9.9 時間、総三塩化物が 13.5 時間、トリクロロ酢酸が 45.1 時間であった。

文献

- 1) 労働省安全衛生部労働衛生課編：特殊健康診断検査法, 中央労働災害防止協会 (1970)
- 2) 田淵武夫, 林 美代子, 小阪 博, 平田 衛, 原 一郎：有機溶剤曝露濃度と尿中代謝物の関係—トリクロロエチレンについて—：大阪府立公衛研所報, 労働衛生編, 第 21 号 (1983)
- 3) 田淵武夫, 平田 衛, 原 一郎, 辻仲利政：急性トリクロロエチレン中毒の一事例, 大阪府立公衛研所報, 労働衛生編, 第 18 号 (1977)