

20031153

別添2

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究研究費補助金

労働安全衛生総合研究事業

産業中毒の予防と診断のための生体試料中有害物質及びその代謝物・付加体の

超微量分析手法の開発研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 坂井 公

平成16（2004）年4月

目次

I	総括研究報告書 産業中毒の予防と診断のための生体試料中有害物質及びその代謝物・付加体の 超微量分析手法の開発研究-----	1
	坂井 公 資料 (表1～6, 図1～21)	
II	研究成果の刊行に関する一覧表-----	50
III	研究成果の刊行物・別刷-----	51

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）  
総括研究報告書

産業中毒の予防と診断のための生体試料中有害物質及びその代謝物・付加体の  
超微量分析手法の開発研究

主任研究者 坂井 公 独立行政法人・東京労災病院産業中毒センター長

研究要旨

本研究では① 除草剤メコプロップ中毒患者でメコプロップとその代謝物について尿・血清中での測定法を確立した。HPLCにより分離したピークの吸収およびマススペクトル解析の結果より各成分を同定または推定した。これらの結果は中毒の病態解明に役立つほか、農薬作業者の健康管理にも利用可能な検査法となる。② 金属水銀作業者の生物学的影響指標として尿中の未知ポルフィリン分画が利用できることを明らかにした。マンガン（Mn）暴露については、血中での Mn 分子型について明らかにし、暴露指標としての利用可能性を明らかにした。③ 幾何平均が ppm 以下の低濃度有機溶剤作業場で有用な生物学的曝露モニタリング項目として尿中代謝物の t, t-ムコン酸（ヘンセン）、ヘンシルメルカプツール酸（トルエン）、総メチル馬尿酸（キシレン）が有用であることを明らかにした。また、20 ppm 以下のヘキサン曝露でも遊離および total 2,5-ヘキサンシオンが検査項目として利用できることを明らかにした。④ 新築棟における病理検査室のホルムアルデヒド濃度については、パッシブサンプリングとアクティブサンプリングとの間に良好な相関を得るとともに、おおむね良好な作業環境にあることを明らかにした。⑤ トルエンイソシアネート（TDI）暴露による尿中代謝物の検索を行った結果、TDI の代謝には N-acetylation のほか、CH<sub>3</sub>-oxidation、ring hydroxylation が関与していることが示唆された。これらの尿中代謝物そのものを容易に高感度測定する方法が可能となり、作業員での生物学的モニタリングとして利用できることを明らかにした。

## A 研究目的

産業中毒は科学技術の進歩に伴い多様な形態で発生し、微量の化学物質による健康影響に悩む人が多い。特に、ホルムアルデヒドや接着剤成分、有機リン系殺虫剤などによる化学物質過敏症に悩む相談や受診・検査を希望する人も多く、体内の超微量の有害物質を特定・分析する手法の開発研究が必要となっており、労働安全衛生総合研究事業の一つの課題と考えられる。

本研究の目的は新規多品種物質に慢性的に曝露される作業員や過敏症患者などにおいてその原因物質の超高度検出とその体内動態の解明を行い、健康障害の予防と治療に役立つ検査法を開発することである。本研究の成果は、産業現場における化学物質過敏症などの健康障害の診断と治療に役立つ情報を提供し、起因物質の曝露低減化に役立つものである。これは勤労者の快適作業環境の形成および有害物質取り扱い作業員の不安解消と健康問題解決に寄与し、勤労者の保健・医療の向上に貢献するものである。

本研究の初年度には数 ppm 以下から sub ppm レベルの低濃度揮発性有機化合物 (VOC) 曝露作業所にて調査し、尿中、血中 VOC の高感度測定法を開発した。また、新築医療機関における VOC 濃度の測定、有機リン作業員の尿中代謝物の測定法の開発、ppb レベルの TDI 曝露作業員における尿中代謝物を加水分解して高感度測定する方法を確立した。

本研究の第2年度は、①除草剤メコプロップ中毒患者において尿・血清中のメコプロップおよびその代謝物の測定法を確立し、

病態把握に役立てた。②重金属曝露に関連しては金属水銀作業員尿中で未知ポルフィリン分画を生物学的影響モニタリングに応用し、マンガンについては作業員の曝露評価を目的として血中濃度および分子型について検討した。③有機溶剤（ヘンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン）作業場で低濃度曝露に対応する生物学的モニタリング項目を明らかにした。④ホルムアルデヒド職場として新築の病理検査室の曝露状況を調査した。⑤イソシアネート類（トルエンシイソシアネート、TDI）の尿中代謝物の検索を行い加水分解なしに簡便に高感度測定する方法の確立を目指した。

### 1 除草剤メコプロップ中毒患者の血清および尿中濃度の測定法の開発

メコプロップ (MCP) はクロロフェノキシ系の除草剤であり、わが国ではゴルフ場や水田で広く使用されている。これら作業員の健康管理の目的で生物学的モニタリング手法の開発が急がれる。MCP の中毒症状としては、腹痛・嘔吐などの胃腸症状のほか、重症では横紋筋融解、腎不全、意識障害をきたし死亡する例が多く報告されている。今回、MCP を服用した中毒患者において血清および尿中濃度測定の依頼があり、HPLC（高速液体クロマトグラフ）および LC-MS（液体クロマトグラフ質量分析計）による MCP 及びその関連代謝物の同定と簡便な測定法の開発を行った。この方法はこの農薬を扱う農業従事者やゴルフ場従業員の健康管理を目的とする生物学的モニタリングとして利用可能である。

## 2 重金属曝露の影響および曝露指標の開発

### (1) 金属水銀曝露と血中および尿中ポルフィリン濃度との関連

光学機器メーカーなどで試験用測定機から発生する水銀 (Hg) の回収作業での曝露、水銀剤 (農薬) に汚染した土壌の改善作業に伴う曝露などについて、健康影響を心配して生体試料中の水銀の測定を希望する相談が産業中毒センターに相次いでいる。これに答えるため、ICP-MS (誘導結合プラズマ質量分析計) を用いて血中および尿中 Hg を簡便に測定する方法を確立するとともに、生体影響指標を開発することか必要と考えられる。本研究では血液および尿中 Hg を ICP-MS により簡便に測定する方法を開発し、それを蛍光灯工場の生物学的モニタリングに応用した。また、Hg の生体影響指標として尿中ポルフィリン排泄に注目して検討を行った。鉛曝露がポルフィン代謝に影響を及ぼすことは広く知られており、ガリウムなど他の重金属についても同様の報告がある。本研究では、金属 Hg 曝露が血中および尿中ポルフィリンへ及ぼす影響について検討し、その生物学的影響指標としての利用可能性を明らかにした。

### (2) 血中マンガンの化学型分析とその生物学的モニタリングへの利用可能性

マンガン (Mn) は必須微量元素の 1 つであり、長期経管栄養などにおいて Mn 摂取の過不足により欠乏症や過剰症が発生する。産業現場での経気道的な大量吸入は、神経疾患、精神疾患を主徴とするマンガン中毒を発症させる。血液や尿中マンガン濃度は

マンガンの曝露指標とされ、一般に原子吸光法により測定されているが、必須元素であるため体内でホメオスタシスが保たれており曝露を反映しないとの見解もある。本研究では曝露により特異的に増加する Mn 分子種を検索するため、血液中 Mn の分子量による分画を行った。この目的のために ICP-MS による血中全 Mn の測定とあわせてゲルろ過カラムを用いた HPLC とオンラインで ICP-MS 分析を行った。

## 3 低濃度有機溶剤曝露に利用できる曝露指標の開発

### (1) 低濃度ヘンセン、トルエン、キシレン曝露の指標

昨年度の調査で仏壇漆器製造業において低濃度の多種有機溶剤が使用されていることが明らかとなり、曝露指標として尿中有機溶剤を検討した。今年度の研究では低濃度曝露における生物学的モニタリングの指標として、尿中の溶剤代謝物について検討し個人曝露濃度との関係を明らかにすることを目的とした。ヘンセン、トルエン、キシレンの生物学的曝露指標として、それぞれ尿中 t, t-ムコン酸 (t, t-MA)、ヘンシルメルカプツール酸、総メチル馬尿酸について検討した。

### (2) 低濃度ヘキサン曝露の指標

ヘキサン曝露者の生物学的モニタリングとして 2,5-ヘキサンシオン (HD) の測定が行われている。有機溶剤中毒予防規則による HD の評価はヘキサン代謝物を酸加水分解して得られる total HD (tHD) を測定して行われるか、日本産業衛生学会は生物学

的許容値として酸加水分解なしで測定した free HD (fHD) の許容値も提案している。本研究では管理濃度以下の低濃度曝露作業者の生物学的モニタリングとして tHD と fHD の測定を行い、両測定値を比較し曝露評価としての有用性を検討した。

#### 4 新築棟病理検査室内の空气中ホルムアルデヒド濃度の検討

厚生労働省の職域における屋内空气中のホルムアルデヒド濃度低減のためのガイドライン (2002) では特定作業場のホルムアルデヒドの空气中濃度を 250 ppb 以下と定めている。しかし、これ以前に設計された旧来の病理検査室では指針値を上回る気中濃度が検出されるという報告が多い。本研究では、換気システムの改善が行われた当院新築棟内の病理検査室の空气中ホルムアルデヒド濃度と個人曝露濃度を明らかにする目的で調査し、旧棟の病理解剖作業中のホルムアルデヒド曝露と比較検討した。

#### 5 LC-MS による尿中 2,4-TDI および 2,4-TDA の代謝物の検索

TDI は活性のある化合物でポリウレタンの製造に使用される。最も一般的な産業原料は 2,4-TDI と 2,6-TDI の 4 : 1 の混合物である。この物質は低濃度 (0.05~0.1 ppm 程度) で眼、鼻、咽頭粘膜を刺激し、皮膚、気道に感作をおこす。より高濃度では流涙、粘膜の充血、痛み、炎症をおこし、角膜上

皮浮腫による一過性の視力障害、角膜炎も起こる。TDI は職業性の喘息や呼吸器障害を引き起こすことも多く、TDI の曝露モニタリングは産業保健サービスにおいて重要なものと考えられ、気中濃度の測定については様々な手法がある。他方、TDI の生物学的モニタリングとしては尿中に排泄されるトルエンシアミン (TDA) 抱合体を加水分解、アルカリ化し、トルエンで抽出して誘導体化後、GC-MS 測定する方法が報告されている。昨年度の研究ではこの方法に関して抽出溶剤の効率化と内部標準物質の簡便化を達成した。また、加水分解後に誘導体化せずに LC-MS 分析する方法も開発した。しかし、これらの方法でもなお長時間の加水分解の必要なことか残る。

今年度の研究では加水分解なしに直接尿中代謝物を LC-MS 分析する方法の確立をめざし、尿中代謝物の検索と同定を試みた。作業における TDI 代謝物の尿中濃度が非常に低いため、ラットに 2,4-TDI または 2,4-TDA を投与し、その尿中の代謝物のパターンを LC-MS により検討した。両者のプロフィールを比較することにより、2,4-TDI 投与ラットの尿中代謝物について 2,4-TDI 特異的なものと 2,4-TDA を経由して形成されるものを決定することができた。この研究により両者からいくつかの新しい代謝物が明らかになり、作業員においてもこれらの物質を LC-MS で特異的に検出することにより、加水分解なしに簡便な生物学的モニタリングを可能とすることをめざした。

## B 研究方法

### 1 除草剤メコプロップ中毒患者の血清および尿中濃度の測定法の開発

症例は30歳男性で、MCP Pを50g服用したが、家人が25分後に発見して嘔吐させ、1時間後に某病院に搬送されて治療が始められている。来院時に咽頭灼熱感があるが、びらんはなく、胸部X線写真や心電図に著変はなかった。入院直後からの尿・血清を経時的に5日間採取されており、MCP P濃度の測定が依頼された。胃洗浄、下剤・活性炭投与、輸液、尿のアルカリ化などの治療により良好な経過をとり、第8病日に退院となっている。

MCP P測定の前処理としては、血清100 $\mu$ lに900 $\mu$ lのアセトニトリル(AN)を加え除蛋白し、遠心上清を分析に供した。尿は蒸留水で50倍希釈し同しく遠心上清を使用した。HPLCにより濃度測定と吸収スペクトルの分析を、LC-MSによるマスマスペクトルの解析と構造確認・推定を行った。

HPLC分析にはLC10Aシリーズ(島津)を用い、カラムはPEGASIL ODS(センシユー科学)、カラム温度は40 $^{\circ}$ Cに設定した。通常の定量にはUV検出器(SPD-10A)を、スペクトル分析にはSPD-10MAを用いた。濃度測定の移動相として、通常は40%AN、0.1%酢酸混液(A液)を用い、流速は1ml/minとした。スペクトル分析の移動相は25%AN、75%10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(B液)であった。

LC-MS分析にはHPLCにHP1100(Hewlett Packard)とMSにLCQ(Finnigan)の組み合わせで行い、使用カラムはHPLCと同じ、移動相はA液、流速0.8ml/minであった。

試料のイオン化は大気圧化学イオン化(APCI)法により、Negative scan mode(m/z 50~500)で検出した。

### 2 重金属曝露の影響および曝露指標の開発

#### (1) 金属水銀曝露と血中および尿中ポルフィリン濃度との関連

対象は蛍光灯工場で金属水銀に曝露する作業員42名と非曝露者35名である。曝露群は真空排気装置と蛍光灯の2つの工程の現場作業員であり、非曝露群は職業的な水銀曝露のない非生産部門の健康対照群である。それぞれの健康診断時に得られたヘパリン血とスポット尿について測定を行った。血中および尿中水銀はICP-MS(HP4500、横河)により測定した。前処理法は、血液100 $\mu$ lを超純水で10倍に希釈溶血し、4mlの希釈液(EDTA、Triton-100、アンモニアを含有)で5倍希釈し、尿は直接希釈液で10倍希釈し、ICP-MSに導入した。尿中ポルフィリン(4カルボキシル~8カルボキシル、すなわちコプロ~ウロポルフィリン)は、は蛍光HPLC法により測定した。尿を等量の酢酸で希釈し、HPLC(LC-10Aシリーズ、島津)に注入した。HPLCの分離には逆相カラム(PEGASIL ODS, 6x150mm、センシユー科学)を用い、アセトニトリルによるグラシエント溶出を行い、励起波長は404nm、蛍光波長620nmで各種ポルフィリンを検出した。血中プロトポルフィリン(PP)と亜鉛プロトポルフィリン(ZP)、および尿中デルタアミノレフリン酸(ALA)についても、HPLC法(ともに坂井らの方法)により測定した。

(2) 血中マンガンの化学型分析とその生物学的モニタリングへの利用可能性

#### 1) ICP-MSによる全血マンガンの測定

全血中 Mn の測定は ICP-MS (HP4500、横河) によった。前処理は超純水で血液 100 $\mu$ l を 10 倍希釈して溶血し、さらに超音波破碎も行った。溶血後、4 ml の 1.5 N 硝酸または希釈液 (Triton X、EDTA、アンモニア含有) を添加し、100 $\mu$ l の内部標準液 (Bi、Tl、Ce 各 100 ppb) を添加した。ICP-MS の出力は 1.4 KW、アルゴンガス流量は 17.2 l/min、Mn は m/z 55 で測定した。外部精度管理のためにドイツのニュールンヘルクエアランゲン大学が行う国際的精度管理に参加した。本法による血中 Mn の測定は良好な結果であると認定されている。

#### 2) HPLC-ICP-MS による血中マンガンの化学型分析

対照 (S 群) および 2 濃度 (LM, HM 群) の MnCl<sub>2</sub> を腹腔投与した Sprague Dawley 系ラット (S 生食、LM 低濃度、10 mg/kg、HM 高濃度、20 mg/kg) より、麻酔後に心臓採血したヘパリン血を用いた。Mn の分画測定は、全血を純水で 10 倍希釈、凍結融解または超音波破碎により溶血してゲルろ過カラム (SEC250、Biorad) にて分子量による分画を行った。移動相は 50mM NaCl を含む 30mM トリス塩酸 buffer (pH 7.4) を使用し、流速は 1 ml/min とした。LC-ICP-MS 分析には HPLC に HP1100 (Hewlett Packard) との組み合わせで行い、検出は ICP-MS により m/z=55 でモニターした。ゲルろ過の溶出は紫外部 (280 nm) および可視部 (550 nm) によりタンパク質量をモニターした。これにより、試料中の Hb 濃度を測定して分画

中の Mn 濃度を補正した。Mn の検量線はカラムを使用しないで直接に ICP-MS に導入した Mn 溶液によって作成した。

#### 3 低濃度有機溶剤曝露に利用できる曝露指標の開発

##### (1) 低濃度ヘンゼン、トルエン、キシレン曝露の指標

対象者は仏壇漆器製造業における労働者 (男性 33 名および女性 29 名、年齢、47.5 ± 11.3 歳) であった。使用しているホワイトガソリンに含まれるヘンゼンについて、個人毎に曝露状況を調査し、同時にそれに対応したヘンゼン代謝物としての t, t-ムコン酸 (t, t-MA) の濃度を HPLC 法で測定した。トルエン、キシレンの尿中代謝物としてそれぞれ尿中ヘンシルメルカプツール酸、総メチル馬尿酸も HPLC 法により測定した。個人曝露濃度は活性炭入りサンプラーに吸着した有機溶剤を GC-MS 装置で測定した。尿の濃度補正には比重とクレアチニンを利用した。

##### (2) 低濃度ヘキサン曝露の指標

対象は仏壇・漆器作業に従事する作業場で、作業は、研磨、金箔張り、組み立て、宮業などに分かれていた。ヘキサンを扱う作業は金箔張りに限られ (ヘキサン曝露群)、他の作業 (ヘキサン非曝露群) では、吹き付け作業にキシレン、研磨にはスチレンが主に使用されていた。HD の測定は先に報告した酸加水分解法によるほか、酸加水分解なしに測定する方法を行い、酸添加の有無による測定への影響を比較した。酸無添加、加水分解なしではシクロロメタンによ

る抽出の際にエマルションとなるため、1 gの塩化ナトリウムを添加して遠心分離し、抽出した。ヘキサンの個人曝露濃度は活性炭入り個人サンプラーにより行った。

#### 4 新築棟病理検査室内の空气中ホルムアルデヒド濃度の検討

パッシブサンプリングとしては、病理検査室内の10カ所にDSD-DNPHサンプラー(Supelco)を床上1.2mの高さに設置し、室内空気を8時間捕集した。切り出し場付近の3カ所にはアクティブサンプラー(DNPH-浸透シリカゲル Sep-Pak サンプラー Waters)も併用し、空気を3 l/hで8時間採取し、得られた結果をパッシブサンプリングと比較した。個人曝露濃度測定の対象者は病理検査医1名、病理検査技師2名、対照として他の部署の医師1名、検査技師1名である。各人の上着のポケットにパッシブサンプラーを装着した。捕集時の室温は25℃、湿度は50%、捕集時間は8時間、病理解剖中の捕集時間は2時間であった。アルデヒド誘導体をANにより抽出し、HPLC(LC-10A シリーズ、島津)により分析した。

#### 5 LC-MS による尿中 2,4-TDI および 2,4-TDA の代謝物の検索

##### 1) 標準物質など

2,4-TDI(純度>98%)と2,4-TDA(純度>98%)はFlukaから購入した。2,4-TDAace(2), 2,4-TDAace(4)および2,4-TDAace<sub>2</sub>はGlinsukonらの方法により共同研究者のDr Mrazにより合成された。

即ち、2,4-シアミノヘンシル酸[2,4-DABA](free acid)はそのdihydrochloride塩酸塩から0.1M NaOHで遊離させ、2,4-DABA塩酸塩は2,4-DABAace<sub>2</sub>(2,4-シアセチルアミノヘンシル酸)を濃塩酸で濃縮して得られた。2,4-DABAace<sub>2</sub>は2,4-TDAace<sub>2</sub>を過マンガン酸カリで酸化して生成した。2,4-DABAace(4)と2,4-DABAace(2)は2,4-DABA(Free)を等モルの無水酢酸によりアセチル化し分取薄層クロマトグラフィーによって純化して得られた。他のすべての試薬や溶剤は分析グレードを用いた。

雄Wistarラット(350~430g)、3群(各2匹)を個別のガラス代謝ケージに入れて24時間尿を採取した(投与前24時間尿)。その後オリーブオイルに溶解した2,4-TDI(8.7mg/ml x 2ml/kg, 1e0.1mmol/kg)またはDMSOに溶解した2,4-TDA(6.1mg/ml x 2ml/kg, 1e0.1mmol/kg)、またはDMSO単独(2ml/kg)を腹腔内投与し、代謝ケージに戻した。水は自由摂取とした。24時間後にラットを取り出し、ケージを5~10mlの水でリンスして尿を完全に回収した(24時間尿)。これら採取した尿は分析まで凍結保存した。

##### 2) 尿試料の前処理

ラット尿2mlに冷アセトニトリル(AN)を8ml添加し、混合液をゆっくり攪拌し、1000gで3分間遠心した。透明な上層を取り出し真空エバポレーターで乾燥し、残渣を1mlの水に溶解した。2,4-TDI投与ラットの尿を前処理しさらにHPLCによりクリーンアップした。HPLCはLC-10Aシリーズ(島津)により、検出器にSPD-M10A、フラクションコレクターにFRC-10Aを用いた。カラムはPEGASIL ODS(150 x 10mm, 5μ

m、センシユー科学)を用いた。移動相は水/メタノールを用い、メタノールでグラシエントを行った(0分5%、10分5%、40分50%、45分80%、48分5%、60分で5%に戻る)。流速は2 ml/min、カラム温度40°Cである。溶出分画は最初の10分は2分間隔、その後は55分まで5分間隔で集めた。各分画から20  $\mu$  lをGC-MS(ガスクロマトグラフ質量分析計)で分析し、Total TDAを測定した。TDA分析後の各分画は全量冷却遠心により濃縮し、残渣を500  $\mu$  lの水に溶解してLC-MS分析に供した。

2,4-TDA投与またはDMSO単独投与ラットの尿についても同様処理して、上記同様にHPLCによりクリーンアップして分析に供した。

### 3) 尿中 total 2,4-TDA の測定

Total TDAはWilliamsらの方法を改良したMoritaらの方法によって測定した。この方法は尿を硫酸で加水分解し、アルカリ化後、シクロロメタンで抽出した2,4-TDAをヘプタフルオロ-n-酪酸無水物(HFBA)で誘導体化し、GC-MSでNCI分析した。

### 4) LC-MS 分析

使用機器はHPLCにHP1100(Hewlett Packard, USA)に接続したion trap型MSのLCQ(Finnigan)の組み合わせであり、検出はpositive APCI modeで行った。2,4-TDIと2,4-TDAの代謝物のプロフィールはそれぞれ2つの方法で測定した。

方法 I 分析カラムはSynergi 4  $\mu$  m Polar-RP 80A、150 x 4.6mm(Phenomenex)を使用した。サンプル量は20  $\mu$  l、移動相は(A)0.1%酢酸水溶液、(B)0.1%酢酸メタノール溶液を用い、B濃度をグラシエントした(0分は0%、18分までに80%、20分

まで8%保持、21分で0%に戻し、30分まで0%保持した)。流速は1 ml/min、カラム温度は25°C、検出レンジはm/z 50-500である。

方法 II Synergi 4  $\mu$  m Polar-RP 80A、150 x 2mm(Phenomenex)を使用した。サンプル量は5  $\mu$  l、移動相は(A)0.04%TFA(トリフルオロ酢酸)水溶液、(B)0.04%TFAのAN溶液で、(B)でグラシエントした。10分0%、18分80%、20分80%、21分で10%に戻し、30分まで10%で保持した。流速は0.25 ml/min、カラム温度30°C、検出範囲m/z 70-700である。

### 5) LC-MS データの解析

クリーンアップした尿のLC-MSクロマトグラムを0.5分間隔に分割した。同一ラットの投与前と後の尿のデータをfull scan massの平均でマソチンクし、スペクトルパターンの特徴的な相違を探索した。投与後の尿に検出されたスペクトルに存在するイオンは、投与前の尿には存在しないか非常に低レベルである。与えられたm/zでマススペクトルを比較した。投与前に比べ投与後尿にみられるピークにより代謝物の存在を確認した。

### (倫理面への配慮)

本研究において使用した生体試料(尿及び血液)は特殊健康診断の際に採取されたものである。採血・採尿に当たっては作業員個人に研究目的と個人情報の保護について十分に説明した。具体的には当該項目以外の目的に使用せず研究の終了後には試料を破棄すること、結果については個人の情報として公表されることなく不利益の生じないこと、採血による危険性のないこと

などを説明し、承諾の得られた対象者のみに限って試料の提供を受けた。動物実験に関しては「動物実験ガイドライン」を制定する施設にて動物愛護上の配慮を充分行い実施した。実験に使用する動物の数は可能

な限り少なくし、と殺は麻酔下で行った。従って、倫理面での問題が生じないと判断できる。

## C 結果

### 1 除草剤メコプロップ中毒患者の血清および尿中濃度の測定法の開発

Fig 1は、入院当初の尿と血清の HPLC によるクロマトグラフである。40%AN、0.1%酢酸混液(A液)を移動相とした場合、血清、尿ともに、MCPP の保持時間は約 20 分であった。25%AN、75%10mMNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 混液の場合は約 16 分に溶出した(データ示さず)。血清中には MCPP 以外に4本の未知のピーク(a~d)が認められ、尿中には a および c が認められた。このうち6.8分に溶出するピーク(a)は比較的高いピークであった。これらのピークは経時的に減少し、非曝露者尿中には認められないため、MCPP の代謝物または夾雑物である可能性が示唆された。

MCPP (e) とピーク a の UV スペクトルを測定すると、両者のスペクトルはほとんど一致し、230 および 280 nm に吸収極大を示した (Fig 2)。MCPP は 230 nm、290 nm のどちらの波長でも測定可能であるが、290 nm の方が妨害ピークが少ないため、ルーチンの測定には 290 nm を使用した。

Fig 3は入院当初の尿の LC-MS による測定結果を示す。上段はトータルイオンクロ

マトグラフ(TIC)とイオンクロマトグラフ、下段はそのスペクトルを示す。MCPP については水素のとれた質量数である m/z 213 ([M-H]<sup>-</sup>)が検出され、ピーク a については [M+16]<sup>-</sup>の質量数を示し、MCPP に酸素の付加したものである可能性が示唆された。

血清と水に添加した検量線では検出波長 230 nm、290 nm のいずれも良好な直線性 (MCPP 濃度 800 mg/l まで) を示した。検出下限は 0.1 mg/l、回収率は 87.5% (n=5) であった。尿の場合も同様であり、回収率はほぼ 100%となった。HPLC(UV)と LC-MS による測定値は血清中、尿中ともによく相関した。

Fig 4は入院中の血清および尿中 MCPP 濃度の推移を示す。入院当初の尿中および血清中 MCPP はそれぞれ 1050、522 mg/l であったか、両者ともに2相性の減衰を示し、5日後には痕跡レベルとなった。このグラフから第4回採血である約 15 時間後までを急速相、その後を緩徐相として回帰式により半減期を計算すると、血清では急速相で 3.9 時間、緩徐相で 18.1 時間、尿では同様に 7.4、43.6 時間となった。

### 2 重金属曝露の影響および曝露指標の開発

### (1) 金属 Hg 曝露と血中および尿中ポルフィリン濃度との関連

Fig 5にポルフィリンの標準液と Hg 曝露作業者の尿中ポルフィリンのクロマトを示す。今回の HPLC 分析の系では、8C (ウロポルフィリン UP)、7C (ヘプタポルフィリン HeptaP)、6C (ヘキサポルフィリン HexaP)、5C (ペンタポルフィリン PentaP)、4C (コプロポルフィリン CP、I と III) の順に完全に分離溶出された。これらのポルフィリンの他に、Tanaka らにより未知ポルフィリン分画 (Unknown UK) と報告されているピークが PentaP と CPI の間に観察された。この UK 濃度は CPIII を標準物質として計算した。

血中 Hg 濃度は曝露群、非曝露群でそれぞれ  $25.8 \pm 16.1$  (範囲 7.5~83.7)  $\mu\text{g/l}$  および  $4.1 \pm 2.0$  (0.9~9.5)  $\mu\text{g/l}$  であった。また尿中水銀濃度はそれぞれ  $135.7 \pm 111.8$  (範囲 10.3~551.7)  $\mu\text{g/l}$  および  $1.1 \pm 0.6$  (範囲 0.3~2.8)  $\mu\text{g/l}$  であった。

Table 1 は曝露群および非曝露群における各種ポルフィリン濃度の平均値の比較である。UP と UK では曝露群は非曝露群に比べて有意に高い値であった (UP  $9.7 \pm 2.9$   $\mu\text{g/gCre}$  および  $8.4 \pm 2.6$   $\mu\text{g/gCre}$ 、 $p < 0.05$ ) (UK  $5.1 \pm 2.3$   $\mu\text{g/gCre}$  および  $3.4 \pm 1.7$   $\mu\text{g/gCre}$ 、 $p < 0.01$ )。UK でより差が明確であり、他の尿中ポルフィリンでは有意差は認められなかった。血中 ZP、PP 濃度および尿中 ALA 濃度についても、曝露群と非曝露群の間に有意差はみられなかった。Table 2 は尿中および血中ポルフィリンと血中・尿中水銀との相関係数である。各種ポルフィリンと血中・尿中水銀との相関は、UK のみか血中・尿中水銀と有意な正の

相関を示した ( $r=0.407$  および  $0.451$ ) (Fig 6)。UK はまた、CPI および CPIII とも有意な正の相関を示した。(Fig 7、 $r=0.311$  および  $0.453$ )。

### (2) 血中マンガンの化学型分析とその生物学的モニタリングへの利用可能性

実験に用いた 3 群のラットの全血 Mn 濃度 (Mn-B) を Table 3 に示す。投与量に応じた血中 Mn 濃度の上昇が認められた。Fig 8 はカラムを使用しないで注入した Mn 溶液によって作成した Mn の検量線を示す。Fig 9 はヘパリン血液を用いて分析したクロマトグラフの例である。m/z 55 を用いて検出したとき、カラムからの溶出順に A~E の 5 本のピークが出現した。それぞれのピーク中の Mn 濃度 (E 分画を除く) を Table 3 に示す。ピーク E はカラムの溶出に用いた移動相によるピークと考えられた。Fig 10 に全血で測定した濃度 (Mn-B) と分画 D 及び total の Mn 濃度との相関を示す。このピーク D に検出される Mn 濃度が全血 Mn (Mn-B) と非常によく相関し ( $r=0.988$ )、溶出位置から比較的 low molecular weight の蛋白質に結合した Mn の可能性が高い。これが投与した Mn を反映する血液中の Mn の化学型の可能性が示唆された。投与群 (LM と HM) においては、分画 D に回収される Mn 量は平均で全血測定値の 56.5% であった。

### 3 低濃度有機溶剤曝露に利用できる曝露指標の開発

#### (1) 低濃度ヘンゼン、トルエン、キシレン曝露の指標

GC-MS で確認された気中溶剤は、トルエ

ン、キシレン、スチレン、ヘンセンと n-ヘキサンであった。ヘンセン曝露の幾何平均は 0.022 ppm、幾何標準偏差は 5.690 であった。他にトルエン、キシレン、スチレンの曝露があった。但し全て幾何平均で 1 ppm 以下であった。ヘンセン曝露濃度と t,t-ムロン酸(t,t-MA)の相関係数は 0.307~0.490 の範囲にあった (p<0.02)。回帰分析からはヘンセン濃度を x、t,t-MA を y とした場合、勾配は 350.7~411.5、切片は 276.6~395.3 の直線式が得られた。回帰と相関分析により、本調査の様な低濃度混合曝露下でも、トルエンの曝露指標として尿中ヘンシルメルカプツール酸か、キシレンでは尿中の総メチル馬尿酸が優れていることが示唆された。

#### (2) 低濃度ヘキサン曝露の指標

ヘキサンの代謝物である 2,5-ヘキサンシオン(HD)を加水分解なしで測定する方法では酸を添加すると無添加に比べ高い値を示す検体もあり、HD 以外の物質の測りこみのあることが考えられた (Fig. 11)。このため加水分解なしで測定する方法では酸を添加しないこととした。この方法で得られた fHD (y) 値と加水分解による tHD (x) との間には  $y = 0.132x - 0.00562$  (n=34, r=0.730) の関係が得られた (Fig. 12)。この相関は比重補正、クレアチニン補正の順に改善された。未補正の場合、ヘキサン曝露群のみでは  $y = 0.128x - 0.031$  (n=10, r=0.677)、非曝露群では  $y = 0.0467x + 0.0498$  (n=24, r=0.679) であった。ヘキサン曝露群と非曝露群の間にはヘキサン個人曝露濃度、tHD、fHD のいずれも有意差が認められた (Fig. 13)。tHD および fHD と

ヘキサン個人曝露濃度との間には良好な相関が認められ、前者では比重およびクレアチニン補正で相関の改善が認められるか、後者では改善は認められなかった (Fig. 14)。Fig. 15 は n=60 における tHD とヘキサン個人曝露濃度との関連である。

#### 4 新築棟病理検査室内の空气中ホルムアルデヒド濃度の検討

空气中ホルムアルデヒドの捕集はパノシブサンプリング (y ppb) によったか、3点についてアクティブサンプリング (x ppb) も行い比較した。両者は非常によく相関した ( $y = 1.15 \sim 7.31$ , n=3, r=0.999)。病理検査室内の 10カ所のパノシブサンプリングの結果、切り出し場の 1カ所で 282 ppb と指針値を上回ったが、他の 9箇所はすべて指針値以下であった。検査室内の業務時間中の個人曝露濃度では切り出し作業を行った技師 1名が 147.5 ppb とやや高値であったが指針値内であり他の技師 1名は 22 ppb、病理医は 21 ppb であった。旧棟の病理解剖室での作業時の個人曝露濃度は、技師 2名が 413 ppb と 711 ppb であり指針値を上回った。対照となる他部署の医師と検査技師の個人曝露濃度はそれぞれ 9 ppb、8 ppb であった。

#### 5 LC-MS による尿中 2,4-TDI および 2,4-TDA の代謝物の検索

合成標準品の LC-MS (方法 II) により得られるマススペクトルおよび MS/MS を Table 4 に示す。

2,4-TDA に水解される 2,4-TDI 代謝物の

HPLC プロフィール-----2,4-TDI 投与ラ  
ト尿は AN 抽出でクリーンアップし分取  
HPLC カラムで分画した。各分画の一部を硫  
酸で加熱し 2,4-TDA をその抱合体から遊離  
した。これを HFBA で誘導体化し、GC-MS-NCI  
検出した。 Fig 16 は分取 HPLC のプロフ  
ィールを示し、2,4-TDA に加水分解される  
代謝物の大部分が 25~55 分に溶出される  
ことを示す。一方、尿中のほとんどすへて  
の極性内因性化合物は 2~6 分に溶出した。  
よって 10 分後の分画をプールすること  
により 2,4-TDI の代謝物を極性物質からクリ  
ーンアップできる。このプール画分の LC-MS  
(方法 I) プロファイルを標準物質のそれ  
と合わせ Fig 17 に示す。2,4-TDAace(4)  
と 2,4-TDAace<sub>2</sub> が標準品と一致した。後者の  
マススペクトルを Fig 18 に示す。このス  
ペクトルで m/z 207 のピークは 2,4-TDAace<sub>2</sub>  
に由来するイオンで、m/z 224 は水付加イ  
オンとして検出された。この他に Table 5  
に示すようなイオンが検出され、  
2,4-TDAace<sub>2</sub> の他、monoacetylated TDA およ  
びその水酸化体、カルボキシル体の尿中排  
泄が推定された。

同様な手法で 2,4-TDA 投与の前後の尿に  
ついて代謝物の検索を行った。2,4-TDA  
を腹腔内に投与 (0.1 mmol/kg) したラ  
ットの投与前後の尿を集め、AN 抽出でクリ  
ーンアップし、HPLC で分画し、LC-MS の APCI モ  
ードで分析した (方法 II)。Fig 19 はラ  
ットに 2,4-TDA を投与した前後の尿の LC-MS

プロフィールである。投与後の尿には 11 個  
のピークが新たに認められた。そのうちの  
主要ピークの質量数と推定される化学構造  
式を Table 6 に示す。TDI 投与と同様な代  
謝物の尿中排泄のパターンが認められた。  
これらの推定代謝物より、生体内での TDI  
の代謝には N-acetylation のほか、  
CH<sub>3</sub>-oxidation、ring-hydroxylation が関与  
していることが推定される。

2,4-TDI 投与ラットの尿中代謝物のレ  
ベルは等モルの 2,4-TDA 投与ラットの尿中代  
謝物に比べて約 2 ケタ低い。投与前後の尿  
の TIC (m/z=50-500) では有意差は認めら  
れない。しかし体系的な分析では、S/N 比  
10 以下の非常に低いレベルであるが多くの  
代謝物が見つかった (データ示さず)。これ  
らの中で、2,4-TDAace(4)、2,4-TDAace(2)、  
2,4-DABAace<sub>2</sub> は合成標準物質により、また  
2,4-TDAace(2)-OH の存在も推定される。他  
の 2,4-TDA 関連の未確定の化合物は次のと  
おりである。すなわち、RT (保持時間) か  
7.08 (m/z297)、RT=7.56 (m/z326)、RT=8.16  
(m/z 321) である。RT が 7.69 (m/z 252)、  
8.83、9.41、10.39、9.55 は 2,4-TDA 投与  
後にはみられない。よってこれらは 2,4-TDI  
特異的な代謝物と考えられる。

2,4-TDI 投与ラット尿では LC-MS により  
2,4-TDAace<sub>2</sub> が主要な代謝物として検出さ  
れるか、その量は加水分解して測定される  
TDA の量に比べると 10%程度であり、上記  
以外の代謝物の存在も想定される。

## D 考察

### 1 除草剤メコプロップ中毒患者の血清および尿中濃度の測定法の開発

生体試料中のMCPPは一般にGCやHPLC(UV検出)により測定されている。GCは溶媒による2回抽出や誘導體化などの複雑な手法を要する。これまで(Osterlohら、1983)のHPLC法ではホモシナイズした試料を等量のAN/メタノール(2:1)混液と混合し、遠心上清をHPLC分析に用いている。検出限界は1mg/lであった。本研究では血清の場合ANで10倍希釈、尿は蒸留水で50倍希釈するのみで、簡便に上清を分析に供することか可能となった。検出限界も0.1mg/lと改善している。

本研究では中毒患者のMCPPピーク(Fig 1 e)と他のa~dのピークは時間経過とともに減少し、対照者では認められないことから、これらのピークはMCPP摂取に関連するもので、MCPPの代謝物か、農薬中の微量の不純物と推定した。本研究では我々はHPLC(UV検出)法の他に、新たにLC-MSを用いるMCPPの測定法も開発した。LC-MSによるMCPPの測定値はHPLCによるそれとよく相関した。LC-MS法によればピークaなどの未知の物質についても、マススペクトルによる化学構造の推定が可能である(Fig 3)。ピークaの分子ヘースピークのm/zは228.9であり、これは、MCPPの水酸化により酸素が付加されたものであると推測された。これを確定するため、現在、我々はこの化合物の合成を行っている。

加療によりMCPP濃度は2相性(急速相と

緩除相)の減衰を示した。血清および尿中MCPPの半減期は、急速相でそれぞれ3.9時間および7.4時間、緩除相で18.1時間および43.6時間であった。血清の急速相の半減期は、これまでの報告よりも早いものであった。Meulenbeltら(1988)は血清中MCPPの減衰は一次式に従い、半減期を17時間と報告している。摂取後3~4時間後の血清中MCPPレベルは298mg/lであり、その排泄は今回の結果よりも遅い。本研究で急速相での排泄が早い理由として治療に尿のアルカリ化が行われたことが考えられる。Prescottら(1979)のケースでは、入院時の血清MCPPレベルは751mg/lであり、尿のアルカリ化を行ったにもかかわらず、MCPPの半減期は約40時間という。この例でMCPPの排泄が非常に遅れた原因として、MCPP(20%)と2,4-D(10%)との混合摂取であったためとも考えられる。このケースでは、2,4-Dの腎クリアランスは尿のアルカリ化の期間中に増加し、血清中濃度は急速に低下した。MCPPと2,4-Dとの混合摂取に対し尿のアルカリ化を行ったケースレポートはもう1例(Berthelot-Moritzら、1997)あるが、その減衰曲線からの半減期も我々の半減期よりも長い。以上より他の農薬との混合摂取の場合、MCPP単独摂取とは異なり尿のアルカリ化を行った場合でもMCPPの排泄が遅延することか推測される。

今回は中毒患者の血清および尿中でMCPP測定法の開発を行ったか、この方法はコルフ場などの作業者においても健康管理のための生物学的モニタリングとして利用可能と考えられる。

### 2 重金属曝露の影響および曝露指標の開

発

### (1) 金属水銀曝露と血中および尿中ポルフィリン濃度との関連

尿中の未知ポルフィリン分画(UK)については Tanaka らの報告があり、UK は血中鉛濃度と有意な正の相関を示すと報告されている。コプロポルフィリン体は体内のヘム合成系への Pb の生体影響を示す指標と考えられ、尿中コプロポルフィリンの測定は鉛の検査項目として古くから使用されて来た。しかし近年の HPLC 法の開発により、尿中デルタアミノレブリン酸や血中亜鉛プロトポルフィリンの測定が簡便に精度よく測定が可能となったため、尿中コプロポルフィリンの測定は規則からも外されている。一方、HPLC によるコプロポルフィリンを含めた尿中ポルフィリンの一斉分析法の開発が、最近になり幾つか報告されている。今回、我々はこの一斉分析法を改善し、金属水銀 (Hg) に曝露する作業者に応用した結果、新規の尿中ポルフィリンが Hg 曝露の影響指標として利用出来ることを明らかにした。この新規のポルフィリン体は蛍光特性からポルフィリン体と考えられているか、正確な構造についてはこれから検討する必要がある。また、非曝露者でも微量検出されることから、その生物学的意義などについてもなお不明である。今後、この物質の本質を明らかにする必要がある。

Hg 曝露の生物学的影響指標としてはこれまで、Hg の腎機能への影響を示す指標として尿中の N-アセチルグルコサミンターゼ (NAG) がよく利用されているか、今回新たに Hg の作用としてヘム代謝系への影響が示唆される結果を得た。今後、新規の尿中ポル

フィリン体の排泄増加は Hg 曝露の影響指標として利用可能と考えられる。

### (2) 血中マンガンの化学型分析とその生物学的モニタリングへの利用可能性

Mn は必須元素の 1 つであり、多くの酵素成分として生体内で重要な働きをになっている。しかし、産業現場で経気道的に大量に吸入されると、神経疾患、精神疾患を主徴とするマンガン中毒が発生する。長期経管栄養などにおいて Mn 摂取の過不足により欠乏症や過剰症が発生する。血液や尿中 Mn 濃度はマンガンの曝露指標とされ、一般に原子吸光法により測定されているか、必須元素であるため体内でホメオスタシスが保たれており曝露を反映しないとの見解もある。本研究では曝露により特異的に増加する Mn 分子種の有無について検討するため、血液中 Mn の化学型別の分析を行った。この目的のために ICP-MS による血中全 Mn の測定とあわせてゲルろ過カラムを用いた HPLC とオンラインで ICP-MS 分析を行った (Fig 9)。

今回、ラットに投与した Mn はゲルろ過により血液中で 3~4 本のピークとして検出され、このうちピーク D に検出される Mn の濃度は投与量に依存して増加する Mn-B と非常によく相関 ( $r=0.988$ ) し、投与された Mn を反映する血液中の Mn の化学型である可能性が示唆された。その溶出位置からは低分子の蛋白質に結合した Mn の可能性が高く、投与された Mn の血中での形態はイオンではなく蛋白質と結合して存在することが明らかとなった。Fraction A、C、はそれぞれフェリチン、アルブミン、D はヘモグロビンよりやや低分子の蛋白質に相当する

と考えられる。今後はこれらのマンガン結合蛋白質の性状を明らかにし、Mn代謝と生体影響との関連について明らかにする必要がある。また、Mn曝露作業員あるいはMn中毒患者の症状との関連で血中Mn結合蛋白質について検討する必要があると考えられる。これによりMn曝露に特異的な生物学的モニタリング指標として利用可能性を明らかにできると考える。

### 3 低濃度有機溶剤曝露に利用できる曝露指標の開発

#### (1) 低濃度ヘンゼン、トルエン、キシレン曝露の指標

ヘンゼンは発がん性のある特定化学物質として管理されている。しかし、ヘンゼンは多くの化学工業品の合成原料であり、溶剤、洗浄剤、抽出剤に微量成分として含まれ、石油精製、ガソリンの使用に伴い環境中に放出される。環境基準値は1 ppbに設定されているが、一般環境中ではこれを上回ることもある。作業環境では管理濃度が10 ppm、発がんリスクは1 ppmで $10^{-3}$ とされている。ヘンゼン曝露の生物学的モニタリングとして、これまでは代謝物である尿中フェノールが測定されてきた。しかし、この物質には食物由来のものもあり、低濃度ヘンゼン曝露の指標としては対応出来ない。最近、ppmレベル以下のヘンゼン曝露に対応出来る代謝物としてt, t-MA、フェニルメルカプツール酸等が提案されている。今回の仏壇漆器製造業における作業現場では金箔貼りに使用されるホワイトガソリンに少量のヘンゼンが含まれていたか、作業場のヘンゼン濃度の幾何平均は0.022 ppm

程度であった。このような低濃度ヘンゼン曝露状況下でも、尿中t, t-MAはヘンゼンの曝露指標として有用( $p < 0.02$ )である事が分かった。

今回の作業所ではトルエン・キシレンは主として塗装現場で使用されていた。塗装現場のトルエン曝露濃度は平均5 ppm程度であり、最高でも9 ppm以下であった。このレベルのトルエン曝露では規則にある馬尿酸の検査は有効でない。本研究では、より低濃度のトルエン曝露にも対応出来る曝露指標として尿中ヘンシルメルカプツール酸が優れていることを示した。キシレンも塗装現場で使用されていたが、その曝露濃度の平均は1.5 ppm、最高で7.51 ppmであった。規則ではキシレンの代謝物としてメチル馬尿酸の測定が行われているか、この物質はキシレン以外からは生成しないため、今回のような低濃度キシレン曝露においても有効な曝露指標となった。

#### (2) 低濃度ヘキサン曝露の指標

今回調査した仏壇漆器製造業ではヘキサンは金箔貼りの工程で使用されるホワイトガソリンに含まれていた。この工程の平均曝露濃度は10 ppm程度であったが、一人(40 ppm)を除いて20 ppm以下であった。1人の作業員ではHDに比へ異常に高い個人曝露濃度が検出され、サンプラーの汚染などの原因が考えられるので今回の検討からは除いた。ヘキサンの管理濃度は50 ppm、許容濃度は40 ppmとされている。ヘキサンの代謝物の検査としては規則では尿を加水分解したtotalの2,5-ヘキサンシオン(tHD)の測定が行われている。この代謝物の分布は2および5 mg/lにより区分される。日本産

業衛生学会の2,5-ヘキサシオンの生物学的許容値は尿を加水分解した場合 (tHD) 3 mg/gCre、しない場合 (fHD) は 0.33 mg/gCre となっている。これらの濃度が許容濃度 40 ppm に対応するものとして設定されている。

Fig. 14 に示したように、今回の回帰式はいずれもよい相関係数 ( $r > 0.8$ ) を示していた。この回帰式から計算すると、tHD、fHD の許容濃度対応値はそれぞれ 2.8、0.9 mg/gCre となる。前者は日本産業衛生学会の生物学的許容値に近いが、後者はより高値となった。これは加水分解しない fHD では Cre 補正を行わない方が曝露濃度との相関が良好であったこと、今回の被験者の曝露濃度が許容濃度の半分以下という低濃度曝露であったことによるかも知れない。何れにせよ、許容濃度の半分以下という低濃度ヘキサシオン曝露でも tHD および fHD とも生物学的モニタリングとして有効であることが明らかとなった。また、加水分解した場合には Cre 補正が有効であるが、加水分解しない場合には Cre 補正によらない方が曝露指標として良いことが明らかになった。

#### 4 新築棟病理検査室内の空气中ホルムアルデヒド濃度の検討

事務所、住宅などの建材にはホルムアルデヒド-尿素断熱材が多く使用されており、近年では建材から発散する低濃度のホルムアルデヒドがシックオフィス、シックハウス症候群の原因物質の1つとして注目されている。このため厚生労働省は、過敏症予防のために室内空気汚染の指針値を作成し、ホルムアルデヒドは 80 ppb と定められた。これは日本産業衛生学会の許容濃度である

0.5 ppm よりもはるかに低い濃度である。

一方、ホルムアルデヒドには消毒剤、防腐剤などの用途があり、これらに関連する職場ではより高濃度の曝露があり得る。このため、“職域における室内空气中のホルムアルデヒド低減化のためのガイドライン”により、特定作業所における指針値は 250 ppb と定めている。病院の病理検査室もこの特定作業所に含まれる。他に合板製造、ボード製造、プレハブ住宅製造、木製家具製造なども特定作業所となりうる。

宇佐神ら(2002)は、病院の増改築移転前後で気中のホルムアルデヒド濃度と職員の自覚症状(のとかかわく、微熱がある、疲れやすいなど)の関連を調査し、25箇所での測定で最大値は  $32.64 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (25.63 ppb)、中央値  $19.85 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (15.88 ppb) で、ガイドラインである  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (80 ppb) より低濃度であり、特異的な自覚症状は見出せなかったとしている。一方、解剖実習室で個人曝露濃度と自覚症状の調査も行ったところ、実習中の個人曝露濃度(15名)の平均は  $3019.7 \pm 634.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $2415.8 \pm 507.6$  ppb) であり、特定作業所のガイドラインをもはるかに上回っていた。曝露濃度と自覚症状の変化との関連では、皮膚がかゆい、鼻がむずむずする、のどの痛みの3症状が有意な相関を示した。これらより強制排気設備などの環境改善の必要性を指摘している。

他の医療機関の病理検査室では切り出し室の8箇所の側定点のうち6箇所のホルムアルデヒド濃度が 0.22~0.27 ppm であり、他は 0.45 ppm、最高の1箇所では 1.56 ppm であったという報告がある(呉羽ら、2003)。ホルマリン固定された組織の切り出し場付

近の濃度は換気によりある程度抑えられていたが、切り出した組織の真空パックを保存する棚の濃度は最高であった。これによりパックからのホルムアルデヒドの漏洩の可能性を指摘している。

本研究においては新築棟の病理検査室内のホルムアルデヒドの調査を行った。今回の測定結果では、切り出し場の1ヵ所で282 ppbと指針値を上回ったが、他の場所ではいずれも指針値以下であった。業務時間中の個人曝露濃度でも最高値は切り出し作業を行った技師1名の147.5 ppbで指針値内であり、他の技師1名は22 ppb、病理医は21 ppbと非常に低かった。これは検査室の換気システムの改善と(10回/時間)、ホルムアルデヒドの発生源である切り出し場に近接して換気口を設置したため室内濃度を低く抑えられたと考えられる。このように、近年のホルムアルデヒド対策のとられた換気良好な作業場では指針値以下の濃度に保つことかできることが明らかになった。一方、本研究での旧棟の病理解剖室での作業時の個人曝露濃度は、技師2名が413 ppbと711 ppbであり指針値を上回る結果であったが、解剖室は今後新築される予定であり、換気回数・換気口の数・位置などについては従事者の健康管理の面からも十分な配慮が必要であると考えられる。

## 5 LC-MSによる尿中2,4-TDIおよび2,4-TDAの代謝物の検索

初年度の研究ではTDI作業者の尿中代謝物を加水分解して生じるTDAを測定する方法を確立したか、この方法は加水分解時間が長く、誘導体化反応が必要であるなど繁

雑な面がある。加水分解してTDAを生じる代謝物の本体についてはこれまで明らかでないが、生体内でのTDIの代謝とその排泄に関しては2,4-TDIを例にとるとFig. 20の様な経路か考えられる。体内に吸収されるTDIはグロヒンなど生体高分子と付加体を生ずる一方、その分解やTDIの直接的加水分解によりTDAを生ずる。このTDAはN-acetylation、CH<sub>3</sub>-oxidation、ring C-hydroxylation、グルクロン酸抱合、硫酸抱合などを受けて尿中に排泄されると考えられる。これ以外にTDIに特異な代謝によって生ずる代謝物も除外出来ない。これらの物質の例をFig. 21に示すが、この一部には加水分解されるとTDAを生ずるものがある。本研究は加水分解によりTDAを生ずる元の尿中代謝物を検索、確定し、それを加水分解なしにLC-MSなどにより簡便に測定して生物学的モニタリングに役立てようとするものである。

LC-MSまたはLC-MS<sup>2</sup>は複雑な混合物中の未知の化合物を同定するための有効な方法として最近利用出来るようになった。LC-MSでは様々な割合に含まれる多種類の化合物を同時分析可能であり、各化合物について特異性の高い質量スペクトルおよびその構造情報を得ることかできる。生物学的試料中の生体異物の分析は、一般的に分析対象をマトリックスから分離するため、クリーンアップの手法か含まれる。マトリックスはHPLCカラムやMS検出器に過剰な負荷を与える。本研究では、試験的にラット尿中のTDI/TDA代謝物のプロフィールを得るため、アルカリ性、酸性、様々な極性をもった物質、または非イオン性などの広範な性状の化合物を回収するために非選択的クリ

ーンアップ手法を開発しなくてはならなかった。この目的のためには水と混和しない溶剤との液/液抽出や、固層抽出は適さないので、二段階の比較的水溶性の物質を回収するクリーンアップ手法、即ち、AN抽出と分取逆相クロマトグラフを採用した。

最初にTDI/TDA投与ラット尿をANと混和した。サンプルは2層の液層を形成し、大部分の無機塩や尿素高極性の化合物（重量で60%に達する）は水層に残り、TDI/TDA代謝物は上層のAN層に回収された。ANは水と混和する液体であるため、層の分離はmlあたり50~200mgの塩を含むラット尿のような高濃度のサンプルのときのみ起こり、ヒト尿では起こらない。また、いくつかの極性代謝物は抽出されず水相にとどまる。それにもかかわらず、全2,4-TDAのAN層での回収率は90%以上である。AN抽出の有効性に加え、分取HPLCは優れたクリーンアップ手法によりTDI/TDA代謝物を極性マトリックスから非常に効果的に分離できた。

上記のクリーンアップ（前処理）の後、尿のLC-MS分析によって多くのTDI/TDA代謝物を明らかにした。そのうちいくつかは合成標準品によって同定された。APCI検出では特異的なionである $[M-OH]^+$ 、 $[M+H]^+$ 、 $[M+H_2O]^+$ 、 $[2M+H]^+$ を生成した（Table 5, 6, Fig 18, 19）。このようなイオンパターン（MS<sup>2</sup>を含む）は未知の化合物の分子量の推定において単独イオンによるよりも効果的である。もし単独イオンのみが検出される

ならば、それは $[M+H]^+$ と推定される（Table 5, 6）が、いくつかの既知の化合物中の最も豊富なイオンは $[M-OH]^+$ または $[M+H_2O]^+$ である。推定分子量が2,4-TDAの既知の代謝反応によって生成する推定化合物と対応するかを検討した。これらの反応による主なmassの増大はTable 4, 5, 6に示す。たとえば、180と222 amuの値は以前に同定された2,4-TDAace(4)-OH、2,4-TDAace<sub>2</sub>である。同様に、251と325のamuはそれぞれアセチル-2,4-シアミノ馬尿酸と、シヒトロキシ-2,4-シアセチル馬尿酸に対応する。比較的高濃度の反応性シイソシアネートやシアミンの投与が生体内物質の代謝に重要な影響をおよぼす可能性もある。

LC-MSによる2,4-TDA投与ラット尿の分析はこれまで幾つか報告されているが、今回の検討でもその代謝物の大部分を確認できた。いくつかのピークで本研究とこれまでの研究との相違はラットの系統と投与量の違いによるかもしれない。今回の前処理では強極性代謝物、すなわちグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体は大部分除かれている。本研究により2,4-TDIと2,4-TDA摂取による未知の代謝物群が発見されたか、これらの構造を明らかにし、代謝起源を説明することは今後の課題となる。今回、ラットにおいて推定した尿中代謝物のイオンをTDI作業者の尿についても検索して、生物学的曝露モニタリングとしての有効性を評価するための研究を次年度の計画としたい。