

厚生労働科学研究費補助金
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 16 年度 総括・分担研究報告書

	主任研究者	
独立行政法人労働者健康福祉機構	東京労災病院産業中毒センター	森田陽子
	分担研究者	
独立行政法人労働者健康福祉機構	東京労災病院産業中毒センター	圓藤陽子

平成 17 (2005) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
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 16 年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告書	
産業中毒の予防と分析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（森田陽子）	1
II. 分担研究報告書	
尿中ジフェニルアルシン酸の測定法の確立に関する研究（圓藤陽子）	24
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

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 森田陽子

(独) 労働者健康福祉機構・東京労災病院産業中毒センター

研究要旨

本研究では①尿中トルエンジアミン (TDA) の測定法を改善し、ルーチン分析可能な簡便・高感度な方法を確立した。分析に必要な尿量を 0.1ml、加水分解時間を 1.5 時間に減じ、内部標準物質には市販の試薬を用いた。この方法をトルエンジイソシアネート (TDI) 作業者に応用すると、作業後の尿中 TDA 濃度は TDI の個人曝露濃度と良く相関し、尿をクレアチニンや比重で補正することによりさらに相関の改善が認められた。本研究では 5ppb の 2,6-TDI 曝露に相当する尿中 2,6-TDA は 31.6 μ g/gCre と計算された。本測定法による TDI 作業者の生物学的モニタリングが可能であり、TDI による健康障害発症の予防にも有効であると考えられる。②血清中メチレンジアニリン (MDA) の測定について、0.1ml の血清を使用する簡便な方法を開発し、MDI に曝露した 3 名の作業者に応用した。血清中 MDA 濃度は対数的減少し、半減期は 16.9~42.5 日であった。本法は MDI 作業者の生物学的モニタリングに使用可能である。また、血清中 MDA の半減期は尿中 MDA よりも長いことから、過去の曝露の推定に役立つ可能性がある。③有機リン系農薬の曝露指標として、尿中代謝物であるジアルキルリン酸について、ジメチルリン酸、ジエチルリン酸、ジエチルチオリン酸およびジエチルジチオリン酸の測定法を開発し、有機リン農薬の曝露を訴える患者尿に応用した。

分担研究者 圓藤陽子

(独) 労働者健康福祉機構
東京労災病院産業中毒センター

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。当センターへも有機リン系殺虫剤などによる化学物質

過敏症の相談や受診・検査を希望者する人も多い。またイソシアネートなど産業界で広く使用されている感作性物質について、診断や治療に役立つ曝露指標の提供が求められることもある。これらの物質について、体内の超微量濃度を特定・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、ならびに感作性物質に曝露される作業員などにおいて、原因物質の超高感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てることができる。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①数 ppm 以下の低濃度有機溶剤曝露における血中有機溶剤濃度の有用性、新築医療機関における揮発性有機化合物濃度の測定、②尿中 DCM による曝露作業員の生物学的モニタリング③TDI 曝露作業員における尿中代謝物の測定法の確立、④ICP-MS による血漿鉛の測定法の開発と血中・尿中鉛濃度との関連、について研究を行った。

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の確立、②金属水銀作業員において尿中未知ポルフィリン分画の生物学的影響モニタリングへの応用、マンガ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の検討③有機溶剤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の検討、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の調査、⑤TDI 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。

第3(今)年度は、①尿中トルエンジアミン(TDA)の測定法を改善し、微量のサンプルによる簡便・高感度な測定法を確立した。その方法をTDI作業員の生物学的モニタリングに応用し、許容濃度

に対応するTDA濃度を求めた。②メチレンジフェニルイソシアネート(MDI)の曝露指標としての血清中メチレンジアニリン(MDA)の測定法を開発し、MDI曝露の疑いのある作業員に応用した。③有機リン系農薬の曝露指標としての尿中ジアルキルリン酸の測定法を開発し、検査を希望する患者について測定を行った。

1. 尿中TDA測定法の改善とTDI作業員の生物学的モニタリングへの応用

TDI (toluene diisocyanate) は重要な産業化学物質であり、ウレタンフォーム、エストラマー、塗料などの原料として広く使用されている。産業現場では2,6-TDIと2,4-TDIの20:80または35:65の比率で使用されることが多い。イソシアネート類は非常に反応性の高い物質で、生体分子のカルボキシル基やアミノ基に共有結合する。TDIによる職業的健康障害として、皮膚の炎症、結膜炎、上気道障害、アレルギー性喘息などが良く知られている。ACGIH (アメリカ労働衛生専門家会議) による2,4-TDIのTLV (Threshold Limit Value: 許容濃度) は0.005ppm、日本産業衛生学会のTDI (2,4-TDIと2,6-TDIの合計) の許容濃度も0.005ppmに設定されている。

近年TDIの尿中代謝産物であるトルエンジアミン (toluenediamine, TDA) の測定法がいくつか開発された。しかしTDAは生物学的曝露指標 (Biological Exposure index, BEI) としてはACGIHに採用されていない。これまで報告されたTDAの測定法は、尿の加水分解時間が長いこと、内部標準物質に高価な同位体物質を使用するなど、測定が容易でないために実際の作業員への適用が限られてきた。これらの方法は1ml~3mlの尿を必要とし、加水分解して得られた

TDA の抽出にトルエンを用いるものはほとんどであった。トルエンは他の有機溶剤に比べて TDA の抽出効率が低いという問題もあった。本研究では、短い加水分解時間で尿中 TDA を測定可能とする鋭敏で実用的な方法を開発し、TDI 作業者の生物学的モニタリングに応用した。

2. MDI 曝露の指標としての血清中 MDA の測定

メチレンジフェニルジイソシアネート (methylenediphenyl diisocyanate) は非常に反応性の高いイソシアネート基を有する化合物で、イソシアネート基の位置により異性体が存在する。産業分野で広く使用されているのは、4,4'-methylenediphenyl diisocyanate (以下 MDI と略) である。MDI はポリウレタン樹脂の原料であり、合成ゴム、塗料、接着剤、断熱材の現場発泡、岩盤固結剤など多岐の用途がある。MDI は粘膜への刺激性、アレルギー性を有し、産業衛生学会は気道感作性物質 (第 1 群) に指定しています。常温では固体であり、産業衛生学会の許容濃度は 0.05mg/m³ であり、これは ACGIH の TLV である 0.005ppm に相当する。MDI の生物学的モニタリングのために、血清または血漿中や尿中の代謝物であるメチレンジアニリン (4,4'-methylene dianiline、以下 MDA と略) の測定が試みられている。本研究では、MDA の簡便で迅速な測定法を開発し、MDI 曝露者の血清中 MDA の測定に応用した。

3. 有機リン系農薬の曝露指標としての尿中ジアルキルリン酸の測定

当センターにはさまざまな中毒の相談がよせられているが、中でも有機溶剤

や農薬を扱う作業者の化学物質過敏状態やアレルギーなどに関する問い合わせや受診が年々増加している。作業環境は各種規制や環境測定、健康診断の普及によって改善されているが、個々の作業者の過敏症やアレルギーの訴えはむしろ増加している。これらの訴えを客観的に診断するためには体内にとりこまれた原因物質またはその関連物質の高感度測定が要求される。これは従来の生物学的モニタリングの手法のみでは不可能であり、低濃度に対応した新たな手法の開発が必要となる。本研究は化学物質過敏症の原因の 1 つとされる有機リン剤およびその代謝物 (ジアルキルリン酸) の微量測定法の開発を行うとともに、過敏症やアレルギーの愁訴で受診した患者試料に応用することを目的とした。

B. 研究方法

1. 尿中 TDA 測定法の改善と TDI 作業者の生物学的モニタリングへの応用

対象者は楽器製造工場で TDI を使用する 18 名と、職業的な TDI 曝露のない非曝露対照者 20 名である。この工場で使用されている TDI の比率は 2,4-TDI と 2,6-TDI が 80:20 である。尿は作業の前後 (pre-shift と post-shift) に採取され、測定まで -20℃ で保存した。

TDA の標準品は東京化成工業の 2,6-TDA、2,4-TDA、3,4-TDA を用いた。誘導体試薬のヘプタフルオロ酪酸無水物 (heptafluoro-n-butyric anhydride, HFBA) も同様である。硫酸、水酸化ナトリウム、ジクロロメタン (DCM) は和光純薬工業の特級試薬を用いた。試薬の調整などには蒸留水または Milli-Q システム (Millipore) による純水を使用した。

ふたつき試験管中で 0.1ml の尿を

0.9mlの水で希釈し0.1mlの濃硫酸を加え、沸騰水中で1.5時間の加水分解を行った(11倍希釈、最終硫酸濃度1.8 mol/l)。比較のため、1ml尿に硫酸を加えた場合(1.1倍希釈)、加水分解時間を延長(16時間)した場合についても、以下は同様に処理した。尿の加水分解後に試験管を冷却し、0.7mlの8 mol/l水酸化ナトリウムとよく混和してアルカリ化し、2mlのDCMを加えて20分間振とう抽出した。3,000rpmで5分間遠心分離し、有機層を他のふたつき試験管に分取した。これに50 μ lの内部標準(200 ppb 3,4-TDA)と50 μ lのHFBAを加え、55 $^{\circ}$ C温浴中で1時間加熱し、TDAの誘導体化した。これに窒素ガスを吹きつけ20 μ l程度にまで濃縮し、200 μ lのトルエンに再溶解してGC-MS(GC-17A and QP-5050A, 島津)による測定に供した。

カラムはJ&W社のDB-1(30 m x 0.25 mm, 膜厚0.25 μ m)を使用し、サンプル1 μ lをスプリットレスモードで注入した。カラム温度は100 $^{\circ}$ Cから280 $^{\circ}$ Cまで20 $^{\circ}$ C/分で昇温した。キャリアガスはヘリウムを1.3ml/分で使用した。インターフェース温度は280 $^{\circ}$ Cである。測定は陰イオン化学イオン化法(negative ion chemical ionization: NCI)により選択イオン検出SIM(selective ion monitoring)を行った。TDAの誘導体としてm/z=494を測定した。反応ガスはイソブタン(1.2 x 10⁻³ Pa)、検出器ゲインは1.25 kVである。この条件ではイオン源の洗浄なしに200回以上の測定が可能である。

TDIの個人曝露濃度はOSHA(労働安全衛生庁 Occupational Safety and Health Administration)のNo22により測定した。サンプリングカセットに1-(2-pyridyl)piperadineを含浸したグラスファイバーフィルター(225-9002,

SKC, USA)を装着し、個人用ポンプ(GilAir, Gilian, USA)により1 ml/minの流速で4~6時間捕集した。サンプルは2 mlの90%アセトニトリル、10%ジメチルスルホキシド混液で1時間抽出し、ODSカラム(Symmetry C18, 3.9 mm x 150 mm, 5 μ m, Waters, USA)によりHPLC(高速液体クロマトグラフ)により分析した。誘導体は254nmで検出した(119UV/VIS, Gilson, France)。移動相は30%アセトニトリル、70%の10 mM酢酸アンモニウム混液で、流速1ml/minである。

2. MDI曝露の指標としての血清中MDAの測定

某病院から送付された作業員3名の血清についてMDAの測定を行った。作業員ら18名が隧道工事現場で作業を行っていたところ、3名に咳漱、呼吸困難、胸痛などの粘膜刺激症状と、四肢しびれ、下痢などの自律神経失調症状が発症した。3名はまず近医を受診し、後に某病院に転院となった。現場の作業状況と作業環境の調査が行われた結果、作業現場のMDI濃度は10-40 μ g/m³であった。地盤強化剤に含まれているMDIが症状の原因と考えられ、血清中の原因物質の測定が当センターへ依頼された。血清は測定まで-20 $^{\circ}$ Cで保存された。対照としてMDIの職業的曝露のない男性10名の血清についても測定を行った。

MDA、内部標準物質である3,4-TDA、誘導体化試薬のヘプタフルオロ酪酸無水物(HFBA)は東京化成工業から購入した。硫酸、水酸化ナトリウム、ジクロロメタン(DCM)、塩化ナトリウムは和光純薬工業の特級試薬を用いた。試薬の調整や前処置には蒸留水またはMilli-Qシステム(Millipore)による純水を使用した。

ふたつき試験管に0.1mlの血清をとり、0.9mlの水で希釈後に0.1mlの濃硫酸を加え、沸騰水中で1.5時間の加水分解を行った。加水分解後に試験管を冷却し、0.7mlの8 mol/l 水酸化ナトリウムとよく混和してアルカリ化し、2mlのDCMと約0.6gの塩化ナトリウムを加えて20分間振とう抽出した。3,000rpmで5分間遠心分離し、有機層を他のふたつき試験管に分取した。これに50 μ lの内部標準(200 ppb 3,4-TDA)と50 μ lのHFBAを加え、55 $^{\circ}$ C温浴中で1時間加熱し、TDAの誘導体化した。これに窒素ガスを吹きつけ20 μ l程度にまで濃縮し、200 μ lのトルエンに再溶解してGC-MS (GC-17A and QP-5050A, 島津)による測定に供した。

カラムはJ&W社のDB-1 (30 m x 0.25 mm, 膜厚0.25 μ m)を使用し、サンプル1 μ lをスプリットレスモードで注入した。カラム温度は100 $^{\circ}$ Cで2分間保持、280 $^{\circ}$ Cまで20 $^{\circ}$ C/分で昇温、5分間保持である。キャリアガスはヘリウムを1.3ml/分で使用した。インターフェース温度は280 $^{\circ}$ Cである。測定は陰イオン化学イオン化法(negative ion chemical ionization: NCI)により選択イオン検出SIM(selective ion monitoring)を行った。反応ガスはイソブタンである。MDA誘導体としてm/z=570を、TDA誘導体としてm/z=494を測定した。

3. 有機リン系農薬の曝露指標としての尿中ジアルキルリン酸の測定

有機リン系農薬による体調不良を訴えて当センターを受診し、検査を希望する人の尿検体について、本研究で開発した方法によるジアルキルリン酸の測定を行った。症例は①隣家で前年虫除けの蕪

蒸剤(ダイアジノン)を使用して以来体調不良となった。現在は使用していないが、その影響が体内に残っていないか心配であり検査を希望、②虫除けプレート(商品名バポナ、dichlorphos; 2,2-dichlorovinyl dimethylphosphate: DDVP)を部屋に設置したところ、めまい、眼のかすみなどの体調不良をきたし、治らないので検査を希望、である。

dimethyl phosphate (DMP)はAcros、diethyl phosphate (DEP)はAccu Standard、diethyldithio phosphate (DETP)およびdiethyldithio phosphate (DEDTP)はAldrich、dibutyl phosphate (DBP)はFulkaの標準品を用いた。誘導体化試薬のpentafluorobenzyl bromide(PFBBr)は東京化成工業から購入した。アセトニトリルはHPLC grade(和光純薬工業)を用いた。水はMilli-Qシステム(Millipore)による純水を使用した。

テフロンシールつきねじ口試験管に尿1mlをとり、内部標準物としてDBP溶液(20ppm)を50 μ l添加する。標準液としては純水1mlに混合標準液(DMP, DEP, DETP, DEDTP)を40 μ l(最高5 μ m)添加した。これらを凍結乾燥器で8時間乾燥し、アセトニトリル1mlを加えよく混合する。さらに60 $^{\circ}$ C4時間かけてPFBBrによる誘導体化反応を行った。反応後の上清をガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)による測定に供した。使用機器はQP-5050A(島津)、カラムはZP-5(30m L. x 0.32mm I.D., 1 μ m, Phenomenex)である。測定は陰イオン化学イオン化法(negative ion chemical ionization: NCI)により選択イオン検出(selective ion monitoring: SIM)で行った。反応ガスはイソブタンを使用した。また、同じサンプルについて高分解能GC-MS(MAT95XP, Thermo Finnigan)

による測定も行った。この測定にはカラム DB-5MS (30m L. x 0.25 mm I.D., 0.1 μ m, J&W) を使用し、perfluoro-kerosene をリファレンスガスとするロックマス法により NCI-SIM 検出を行った。反応ガスはイソブタンである。測定値のクロスチェックを目的としてドイツのエアランゲン大学が行う国際外部精度管理 (External intercomparison programme for toxicological analyses in biological materials) に参加した。

(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が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。

C. 結果

1. 尿中 TDA 測定法の改善と TDI 作業員の生物学的モニタリングへの応用

Fig. 1 に 3 種の TDA 誘導体のクロマトグラフを示す。3,4-TDA は内部標準物質、標準液の 2,6-および 2,4-TDA 濃度はそれぞれ 50 μ g/l である。作業員の 2,6-および 2,4-TDA 濃度は 29.1 と 3.2 μ g/l であるが、非曝露対照者では検出されない。2,6-TDA と 2,4-TDA の検量線は 400 μ g/l まで直線性を示し、検出限界は 0.1 μ g/l であった。対照群 (n=10) の尿に 100 μ g/l

相当の TDA を添加した場合の回収率は、2,6-TDA、2,4-TDA でそれぞれ 99.5 \pm 6.1%、102.6 \pm 5.1% であった。コントロール尿に 25 μ g/l 相当の 2,6-TDA および 2,4-TDA 標準液を添加した場合、10 回測定のコefficient はそれぞれ 5.7%、6.3% であった。

Table 2 は様々な加水分解条件 (尿希釈、加水分解時間) で得られる TDA の値について相関を調べたものである。これらの相関のいくつかは Fig. 2 にも示す。11 倍希釈した尿を用いた場合、1.5 時間の加水分解による TDA の値と 16 時間の加水分解による値との相関式の傾きから、前者は後者の約 46.1% となる (Fig. 2. A)。しかし 1.1 倍希釈の尿では 16 時間加水分解による TDA 値は 1.5 時間による値よりわずかに高いだけである (Fig. 2. B)。これは尿の希釈が TDA を生成する加水分解に何らかの影響を及ぼしていることを示している。同様な結果は 2,4-TDA の場合にもみられるが、その値は 2,6-TDA の約 1/10 である。以上の結果より、尿を 11 倍希釈することにより加水分解時間を短縮することができる。

11 倍希釈の尿を 1.5 時間加水分解した場合、作業後の尿中 TDA レベルは TDI 個人曝露濃度と良く相関する (Table 2)。TDI 曝露との相関においてどの TDA 値が優れているかを検討するため、気中 TDI 濃度 (x) と尿中 TDA 濃度 (y) の関係を補正の有無において検討した。2,6-TDA 濃度をクレアチニンまたは尿比重 (1.020) で補正した場合、気中 2,6-TDI 濃度との相関は改善される。しかし 2,4-TDI の場合は曝露濃度が低いために、補正を行っても 2,4-TDA との相関の改善はみられなかった。2,6-TDI の場合、クレアチニン補正した 2,6-TDA と最も高い相関を示した (Table 2、Fig. 3B)。作業前の尿中 TDA 濃度も TDI 個人曝露濃度と有意な相関を

示したが、その傾きは作業後の相関の場合の60から70%であった。2,4-TDA濃度は2,6-TDA濃度の約1/10以下であったが、両者は有意な相関を示した (Fig. 4)。

2. MDI 曝露の指標としての血清中MDAの測定

Fig.5にMDAと3,4-TDA誘導体のTIC (total ion chromatogram)を示す。標準物質の濃度は $5\mu\text{g/l}$ 、作業員血清の濃度は $0.67\mu\text{g/l}$ である。曝露のない対照者の血清中にはMDAは検出されなかった。

Fig.6にMDAの検量線である。水、血清の両者とも、MDA濃度 $200\mu\text{g/l}$ まで良好な直線性を示した。この検量線では血清についてのMDA回収率は平均98%であった。尿にMDAを添加した場合の検量線も、良好な直線性を示した。対照者10名の血清にそれぞれ $50\mu\text{g/l}$ 濃度になるようにMDAを添加したところ、回収率は $96.6\pm 10.9\%$ であった。特に回収率低い1名(73%)を除くと平均99.6%となった。よってMDAの測定は絶対検量線法でも可能と考えられる。対照者10名にはMDAは検出されなかった。

Fig.7(A)は作業員3名の血清中MDAの減衰曲線である。横軸は最初の採血日を1日とした日数の経過である。作業員A,B,Cの最初の検体中のMDA濃度は、それぞれ 0.67 、 0.33 、 $0.045\mu\text{g/l}$ であった。MDA濃度は対数的に減少し、相関係数は0.96超であった。作業員Aの回帰曲線においてMDA濃度を $y(\mu\text{g/l})$ 、経過日数を $x(\text{day})$ とすると、 $y=0.5057x e^{-0.0316}$ となる。この式から半減期を計算すると、21.9日であった。同様に、BにおけるMDAの半減期は16.9日、Cでは42.5日となった。

3. 有機リン系農薬の曝露指標としての尿中ジアルキルリン酸の測定

Fig. 8 および Fig. 9 に有機リン代謝物 (アルキルリン酸: 各 $200\mu\text{g/l}$) のクロマトグラフを示す。Fig. 8はQP-5050Aによる測定である。DMP、DEP、DETP、DEDTP、DBPの順に溶出し、それぞれについて、 $m/z=125, 153, 169, 185, 209$ (分子イオン) を選択測定した。Fig. 9はMAT95XPによるクロマトグラフである。アルキルリン酸の溶出順序は同じであり、それぞれ $m/z=306, 334, 350, 366, 390$ (誘導体の分子イオン) を選択測定した。両測定とも各ピークの分離は良好であり、QP-5050Aによる検出限界 (単位 $\mu\text{g/l}$) はDMP=3、DEP=1、DETP=0.6、DEDTP=0.6である。MAT95XPによるそれはDMP=0.6、DEP~DETPは0.15であり、後者の検出感度が優れていた。水および尿にアルキルリン酸を添加した場合、0~ $200\mu\text{g/l}$ 相当まで直線性が認められた。しかし添加物の種類や尿の違いにより回収率にばらつきがあるため、尿中濃度の測定は標準添加法により行った。この方法により国際的外部精度管理に参加し、測定結果は良好であるとの認定を受けた。この際に配布される尿試料には2種類の濃度のアルキルリン酸が含まれ、ある回の低濃度試料中のDMP、DEP、DETP、DEDTP濃度はそれぞれ、26.2, 14.1, 16.9, 11.5 ($\mu\text{g/l}$)、高濃度試料中のそれは149.1, 39.1, 37.7, 25.9 ($\mu\text{g/l}$)であった。

有機リン系農薬による体調不良を訴えて当センターを受診し、検査を希望する人の尿検体について、本研究で開発した方法によるジアルキルリン酸の測定を行った。症例①の代謝物である尿中DETP、②は同じくDMPの測定を行っ

たが、結果は検出限界以下であった。

D. 考察

1. 尿中 TDA 測定法の改善と TDI 作業者の生物学的モニタリングへの応用

本研究による TDA 測定法の改善点の一つは、測定に必要な尿量を 0.1ml まで減じたことである。従来の方法では 1 ml ~ 3 ml の尿を使用していた。この理由の一つは、加水分解された TDA の抽出効率を高めたことである。我々は TDA を誘導体化せずに測定できる LC-MS 法を検討した際に、DCM による TDA の抽出効率が従来使用されてきたトルエンに比べて非常に高いことを確認した (Sakai ら、2002)。2,6-TDA と 2,4-TDA の DCM による抽出率はそれぞれ 76.2% と 74.6% であり、トルエンによるそれは 27.1% および 26.9% であった。

これまで報告された GC-MS 法の多くは、内部標準物質として TDA の重水素同位体を必要としていた。この物質は一般に入手するには高価であり、TDI 曝露の生物学的モニタリングに TDA 測定を応用する際の問題の一つであった。今回の研究では重水素同位体を使用せずに 3,4-TDA を内部標準物質に使用した。

実用的にはすべてのサンプルを 16 時間加水分解することは難しい。このことも TDA による生物学的モニタリングがルーチンに行われていない理由の一つと考えられる。これまでの方法では 2.5 倍希釈の尿を 16 時間または一晩という長時間の加水分解を行っているものが多い。我々は 1.1 倍希釈の尿を用いた場合、加水分解による TDA の収率は 4 時間でプラトーに達し、10 時間以上ではむしろ低下することを確認した (Sakai ら 2002)。よって尿を希釈しない場合、加水分解時間

は 4 時間以下が適当である。一方、11 倍希釈の尿の場合、16 時間の加水分解で最高の収率を得られた。本研究において 1.5 時間の加水分解により得られる TDA 濃度は 16 時間の加水分解による値の半分以下であるが、両者は良く相関する。1.5 時間の加水分解によって得られた TDA の値は Fig. 2A の相関式によって変換できる。加水分解時間の短縮は多検体処理に適する。よって本研究では 11 倍希釈の尿を 1.5 時間加水分解する方法をルーチン化した。正確な TDA 濃度が知りたい時には 16 時間の加水分解を行うこともできる。しかし、TDI による健康障害を予防するために多くの作業者をモニターする場合、1.5 時間の加水分解で得られた値も十分利用可能である。

Maitre ら (1993) は TDI 濃度 (2,6-TDI と 2,4-TDI の合計) と TDA 濃度 (2,6-TDA と 2,4-TDA の合計) とが直線的に相関することを発表した。TDI 濃度は 9.5 から 94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (1.33~13.2ppb) であった。TDA 濃度は 6.5~31.7 $\mu\text{g}/\text{gCre}$ であり、38 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (5.34ppb) の TDI 濃度は 18 $\mu\text{g}/\text{gCre}$ の TDA 濃度に相当していた。しかしそのサンプル数は 9 であった。本研究では、Fig. 2B の相関式から 5.34ppb の 2,6-TDI に相当する 2,6-TDA 濃度は 33.8 $\mu\text{g}/\text{gCre}$ と計算される。曝露濃度が等しい場合、本研究で得られる TDA 濃度は Maitre による値の約 1.9 倍と高くなるが、この理由として、我々は 11 倍希釈尿を使用したことと、加水分解の酸濃度が高いために加水分解効率が高いことが考えられる。Maitre らは 1.28 倍希釈の尿を使用し、最終塩酸濃度 2.3mol/l で 2 時間の加水分解を行っている。またサンプル数が小さいことも関係している可能性がある。今後は我々や Maitre の研究よりも高曝露濃度において引き続き調査することが望ましい。

Brorsonら(1991)は2名のボランティアについてテストチャンバーによるTDI曝露実験を行った。TDI曝露濃度(x ppb)と尿中TDA濃度(y μ g/gCre)との相関は2,6-異性体については $y = 8.29x - 10.2$ ($n=6, r=0.942$)、2,4-同位体については $y = 3.97x - 1.33$ ($n=6, r=0.990$)であった。この曝露濃度と尿中代謝物との相関関係は、本研究のそれ、すなわち $y = 6.6x - 1.43$ ($n=18, r=0.905$)および $y = 3.19x + 0.385$ ($n=18, r=0.639$)に近似している (Table 2)。彼らの研究における曝露時間は4時間と短い、5ppbのTDI曝露に相当するTDA濃度は我々のそれと近い。この理由として、彼らは長時間(一晩)の加水分解を行っていることがある。

ACGIHおよび日本産業衛生学会はTDIのTLVを0.005ppmに設定している。TDIのTLVに相当するTDAレベル(生物学的許容値)を決定できれば、TDIによる健康障害を予防するために、複雑な手法を要するTDI測定の代わりに簡便な尿中TDA測定を用いることができる。TDA濃度による生物学的モニタリングは、気道、皮膚、消化管などを経るTDIの全取り込み量を推定するのに役立つ。また、症状が発症した時の気中TDI濃度が測定していなかった場合もTDAの測定によりTDI曝露を証明できる可能性がある。

Fig3.aの未補正の尿の場合、TDI曝露濃度から推定されるTDA濃度は広い範囲を持ち、特にTLVの5ppb以上でばらつきが大きい。Fig.3bの回帰式の信頼区間は小さく、TDI濃度からTDA濃度を推定するには尿をクレアチニン補正するのがよい。回帰式よりTLVレベルのTDI濃度(5ppb)に相当する2,6-TDAは31.6 μ g/gCreと計算される。TDAレベルと喘息との関係はアンケートや健康診断、IgEテスト、TDAおよびTDIの測定に

より検討中である。

本研究では、作業前のTDAレベルもTDIレベルと有意な相関を示したが、作業前の相関式の傾きは、作業後の場合の傾きの60-70%であった (Table 2)。これは各作業者が毎日一定してTDIに曝露しており、前日の作業によるTDAが作業前の尿中にも排泄されていることを示している。Tinnerbergら(1997)は弾性ウレタン製造工場における研究で、作業開始前の月曜日の朝の尿からも加水分解により相当量のTDAが検出されることを報告した。作業前のTDA濃度は作業日が続くにつれて次第に増加した。このことはTDAを生成する化合物が、アルブミンのようなタンパク質との付加体の形で体内に蓄積していくことを示唆している。Tinnerbergらの報告では、作業前の尿中2,6-TDA濃度は作業後のその約半分であり、本研究の知見と一致する。しかし、作業場の曝露濃度が日により一定でない場合、作業前のTDAと作業後のTDAの間に相関はみられないという。

本研究の対象工場では2,4-TDAと2,6-TDIの80:20の混合物を使用しているが、TDIの個人曝露濃度と尿中代謝物濃度共に、2,4-異性体は2,6-異性体の1/10以下であった。これは重合反応の際に2,4-TDIの反応性が高いためであり、重合反応の終了時に発生している主要な異性体は2,6-TDIである(Randoら1984)。2,4-TDAと2,6-TDIの80:20の混合物を使用する弾性ウレタン製造工場では、作業員の2,6-TDA濃度は2,4-TDA濃度の10倍以上である (Tinnerbergら1997)との報告とも合致する。

2. MDI曝露の指標としての血清中MDAの測定

血清MDAの測定法については、1 m

1の血清を加水分解し、内部標準物質としてMDAの重水素体を使用し、トルエンで抽出を行うという報告(Skarpingら1995)がある。誘導体化試薬はペンタフルオロプロピオン酸であった。その方法では標準物質の入手が一般的でなく、トルエンでは抽出効率が低い可能性がある。本研究では標準物質は市販の3,4-TDAを用い、測定に必要な血清量も少なくすることができた。

Skarpingらは呼吸困難と鼻粘膜炎を生じた1名のMDI作業者の血清中MDAを測定し、その半減期を21日と報告した。彼らは尿中MDAの半減期を70~80時間であると計算し、血清での半減期が長い原因としてタンパク質への付加をあげている。本研究では3名の作業者においてMDA測定を行い、半減期についてSkarpingらとほぼ一致する結果を得た。血清中MDAは尿中MDAよりも半減期が長いことから、曝露から時間が経過した場合でも曝露を推定できることがある。今後さらに例数を増やして検討を行う予定である。

3. 有機リン系農薬の曝露指標としての尿中ジアルキルリン酸の測定

有機リン化合物は農薬、防虫剤、防カビ剤として使用され、コリンエステラーゼ活性を阻害することにより神経毒性を発揮する。農薬使用者に中毒や体調不良を引き起こすことがあるだけでなく、住宅の防虫剤に用いられることによるシックハウス症候群や化学物質過敏症の原因ともなる。有機リン暴露の指標はコリンエステラーゼ活性の低下であるが、この活性は肝疾患、脾疾患などでも低下する。一方、有機リン化合物は代謝により解毒されるが、その経路にはP-O-aryl結合、P-S-aryl結合の加水分解によるアルキル

リン酸の生成がある。よって最近では有機リン化合物の特異的なモニタリング指標として、尿中代謝物であるジアルキルリン酸の測定が試みられている。しかしこの物質は濃度が低く測定が煩雑なため、日本には未だルーチンに測定できる施設は無い。本研究はこの測定法の実用化をめざすものである。海外においても測定可能な機関が少なく、内部標準物質、誘導体化法、検出法などの検討が続いている。本研究では実際に有機リン剤の影響を心配する患者の尿中代謝物の測定を行ったが、曝露から数ヶ月経過していたので既に排出されたと考えられ、検出限界以下であった。ジアルキルリン酸は速やかに排泄されるため、曝露当日の尿を入手することが望ましい。

厚生労働省の室内空気汚染の指針値では有機リン剤のうちクロルピリホス、ダイアジノンについて定められている。この2種の農薬は代謝によりDETPを生じる。本研究によりこれら代謝物の測定が可能となった。今後は、測定法の簡便化をめざすと共に、さらに2つの代謝物(dimethylthio phosphate, dimethyl-dithio phosphate: DMTP, DMDTP)についても測定を進める予定である。

E. 結論

尿中TDAの測定法を検討し、ルーチン分析可能な簡便で高感度な測定法に改善した。すなわち、分析に必要な尿量を0.1ml、加水分解時間を1.5時間に減じ、内部標準物質には市販の試薬を用いた。この方法をTDI作業者に応用したところ、作業後の尿中TDA濃度はTDIの個人曝露濃度と良く相関した。尿をクレアチニンや比重で補正した場合には、2,6-TDIの個人曝露濃度と尿中2,6-TDAとの相関に改善が見られた。しかし

2,4-TDI の場合は曝露濃度が 1/10 以下と低いために改善されなかった。作業後の 2,6-TDA 濃度と個人曝露濃度との相関式から、5ppb の TDI 曝露に相当する尿中 2,6-TDA は $31.6 \mu\text{g/gCre}$ と計算された。作業前の TDA 濃度も TDI の個人曝露濃度を有意な相関を示した。曝露濃度と尿中代謝物濃度共に 2,4-異性体は 2,6-異性体の 1/10 以下であったが、2,4-TDA と 2,6-TDA は有意な相関を示した。本測定法による TDI 作業者の生物学的モニタリングが可能であり、TDI による健康障害発症の予防にも有効であると考えられる。

血清中 MDA の測定について、内部標準物質に市販の試薬を用い、0.1ml の血清で測定可能な高感度測定法を開発し、MDI に暴露した作業者に応用した。

MDI による健康障害が疑われる 3 名の血清中 MDA 濃度は対数的に減少し、半減期は 16.9、21.9、42.5 日であった。本測定法は、MDI 作業者の生物学的モニタリングにも使用可能である。血清中 MDA の半減期の長さからタンパク質へ付加していることが考えられ、過去の曝露の推定にも役立つ可能性がある。

有機リン剤の代謝物であるジアルキルリン酸のうち、DMP、DEP、DETP、DEDTP の測定法を開発した。今後は残る 2 種 (DMTP、DMDTP) の測定を進め、測定法の簡便化もめざす予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(a) 学会誌など

1) Sakai T, Morita Y, Roh J, Kim H,

Kim Y. Improvement in the GC-MS method for determining urinary toluene-diamine and its application to the biological monitoring of workers exposed to toluene-diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health*, in press, 2005.

2) Morita Y, Sakai T, Park S.

Blood and urinary porphyrin levels in workers exposed to metallic mercury. *Porphyrins*, in press, 2005.

3) 坂井 公、中嶋義明、森田陽子、井上 修、村田勝敬、小野崎幾之助. 低濃度 n-ヘキサン曝露の指標としての遊離および総 2,5-ヘキサジオンの有用性. *日本職業・災害医学会会誌* 52:308-314, 2004.

4) 中村陽一、小倉英郎、坂井 公、森田陽子、西中川秀太 ほか. メチレンジフェニルイソシアネート曝露による急性呼吸器症状および慢性化学物質過敏症状を呈した 3 例に関する検討. *産業医学ジャーナル* 28: 19-23, 2005.

(b) 一般・啓蒙誌

1) 坂井 公、森田陽子. 化学物質の管理と健康障害の防止. *産業医の手引* (第 7 版). 2005 (印刷中)

2. 学会発表

1) Sakai T, Mraz J, Morita Y, Kim Y. LC/MS determination of specific adducts of 2,4- and 2,6- toluene diisocyanate (TDI) with globin and its application to biological monitoring of exposure to TDI. *The 6th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational & Environmental Health*, Heidelberg, 2004.9.

2) Morita Y, Sakai T, Nakamura Y,

- Manabe A, Yamanaka S, Kamada Y.
GC-MS determination of serum
4,4'-methylenedianiline (MDA) in
the workers exposed to
4,4'-methylenediphenyl diisocyanate
(MDI). The 6th International
Symposium on Biological
Monitoring in Occupational &
Environmental Health, Heidelberg,
2004.9.
- 3) 坂井 公、森田陽子、KimY. トルエン
ジイソシアネート作業者の生物学的
のモニタリング. 第 77 回日本産業衛
生学会、名古屋、2004.4
- 4) 森田陽子、坂井 公、中村陽一. メチ
レンジフェニルジイソシアネート曝
露の指標としての血清中メチレンジ
アニリンの測定. 第 77 回日本産業衛
生学会、名古屋、2004.4
- 5) 中村陽一、小倉英郎、森田陽子、坂井
公、西中川秀太. メチレンジフェニル
イソシアネート曝露による急性およ
び慢性症状を呈した 3 例に関する検
討. 第 77 回日本産業衛生学会、名古
屋、2004.4
- 6) 北村文彦、横山和仁、錦谷まりこ、
Woo KH、Lee BK、坂井 公、朴 商
会、朴 喜燦、佐藤 元、荒記俊一.
鉛の認知および臭覚機能への影響. 第
77 回日本産業衛生学会、名古屋、
2004.4
- 7) 中村陽一、三木真理、小倉英郎、真鍋
亜希子、坂井 公. メチレンジフェニ
ルジイソシアネート曝露による化学
物質過敏症が疑われた 3 例に関する
検討. 第 16 回日本アレルギー学会春
季臨床大会、前橋、2004.5
- 8) 森田陽子、坂井 公、圓藤陽子、中嶋
義明. 産業中毒センターへの問い合わ
せから明らかになった高濃度ジクロ
ロメタン曝露. 第 52 回日本職業・災
害医学会、岡山、2004.11
- 9) 坂井 公、森田陽子、村田勝敬、中
嶋義明、井上 修、小野崎幾之助、西
中川秀太. 低濃度有機溶剤曝露職場に
おける体調不良に関するアンケート
調査. 第 52 回日本職業・災害医学
会、岡山、2004.11
- 10) 圓藤陽子、竹中靖人、西中川秀太、
森田陽子、中嶋義明、坂井 公、圓藤
吟史. 医学部教員におけるホルムアル
デヒド曝露. 第 52 回日本職業・災害
医学会、岡山、2004.11
- 11) 中嶋義明、坂井 公、圓藤陽子、森
田陽子. ひ素系化学兵器の生物学的モ
ニタリングの検討. 第 52 回日本職業・
災害医学会、岡山、2004.11
- 12) 北村文彦、横山和仁、久永直見、森
田陽子、坂井 公、荒記俊一. 最近の
中毒外来から一鉛曝露者の報告. 第
52 回日本職業・災害医学会、岡山、
2004.11
- 13) 井上 修、葛西清美、森田陽子、坂
井 公. 仏壇漆器製造業とガソリンス
タンド従業員およびベンゼン非曝露
者の尿中 t,t-ムコン酸でみた職業別ベ
ンゼン曝露. 第 52 回日本職業・災害
医学会、岡山、2004.11
- H. 知的所有権の取得状況
- 該当するものなし.

Table 1. Correlation equation ($y = ax + b$) among TDA values (x and y) by various hydrolysis conditions (A, B and C)

	Urine used	Hydrolysis	a	b	r
2,6-TDA	Post-shift urine (n=18)	A	0.477	-0.313	0.984
		B	1.120	0.389	0.973
		C	0.395	0.138	0.942
	Pre-shift urine (n=18)	A	0.424	0.071	0.929
		B	1.120	-0.232	0.985
		C	0.353	0.735	0.879
	Both urine (n=36)	A	0.461	-0.247	0.966
		B	1.130	0.025	0.977
		C	0.381	0.360	0.923
2,4-TDA	Post-shift urine (n=18)	A	0.396	-0.072	0.839
		B	1.320	0.201	0.902
		C	0.307	-0.225	0.952
	Pre-shift urine (n=18)	A	0.326	-0.227	0.642
		B	0.430	0.285	0.683
		C	0.511	-0.547	0.633
	Both urine (n=36)	A	0.378	-0.193	0.778
		B	0.695	0.322	0.713
		C	0.360	-0.260	0.723

a: slop, b: intersects the y-axis, and r: correlation coefficient

x and y: TDA levels ($\mu\text{g/l}$)

A: 1.5 hours hydrolysis (y) vs 16 hours hydrolysis (x) with 11-fold diluted ur

B: 11-fold diluted (y) vs 1.1-fold diluted (x) with 1.5 hours hydrolysis urine

C: 1.5 hours hydrolysis of 1.1-fold diluted urine (y) vs 16 hours hydrolysis of 11-fold diluted urine (x)

Table 2. Correlation equation ($y = ax + b$) between urinary TDA levels (y) and personal exposure levels of TDI (x)

	Urine used	Correction	a	b	r
2,6-TDA vs 2,6-TDI (n=18)	Post-shift urine	A	10.160	-1.160	0.701
		B	6.600	-1.430	0.905
		C	8.130	-1.190	0.807
	Pre-shift urine (n=18)	A	6.090	-0.306	0.614
		B	4.930	-1.690	0.856
		C	5.920	-1.450	0.811
2,4-TDA vs 2,4-TDI (n=18)	Post-shift urine	A	8.330	0.231	0.835
		B	3.190	0.385	0.639
		C	5.340	0.334	0.782
	Pre-shift urine (n=18)	A	5.010	0.174	0.785
		B	2.900	0.124	0.847
		C	4.020	0.152	0.844

a: slop, b: intersects the y-axis, and r: correlation coefficient

x: personal exposure levels of TDI (ppb)

y: TDA levels in various correction of urine (A, B, and C) as follows:

A: No correction ($\mu\text{g/l}$)

B: Creatinine correction ($\mu\text{g/gCre}$)

C: Specific gravity (1.020) correction ($\mu\text{g/l}$).

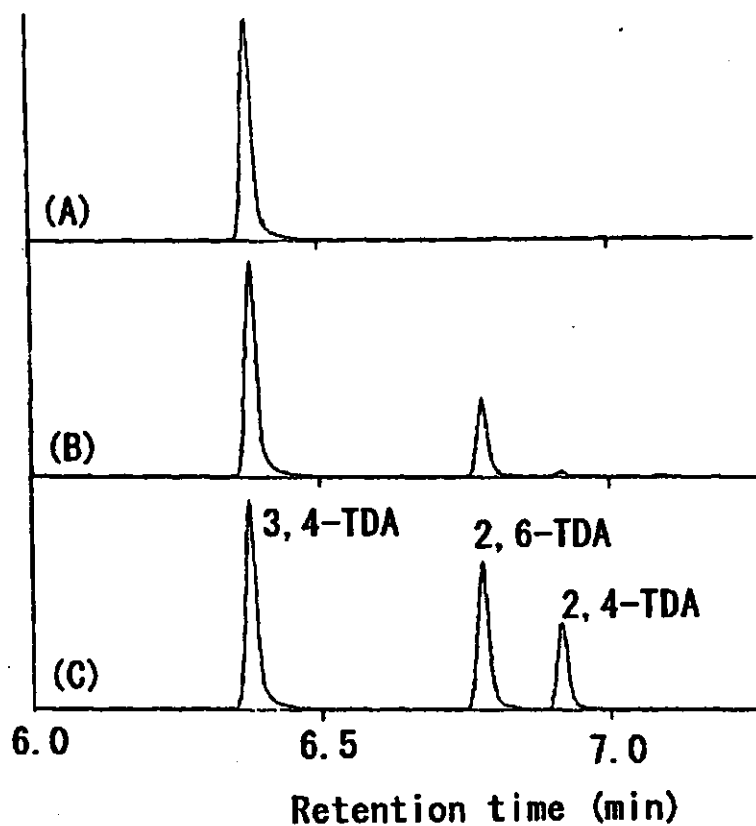


Fig. 1 Chromatographic separation of TDA isomers
(A) Control subjects, (B) TDI worker, (C) Standard TDIs.

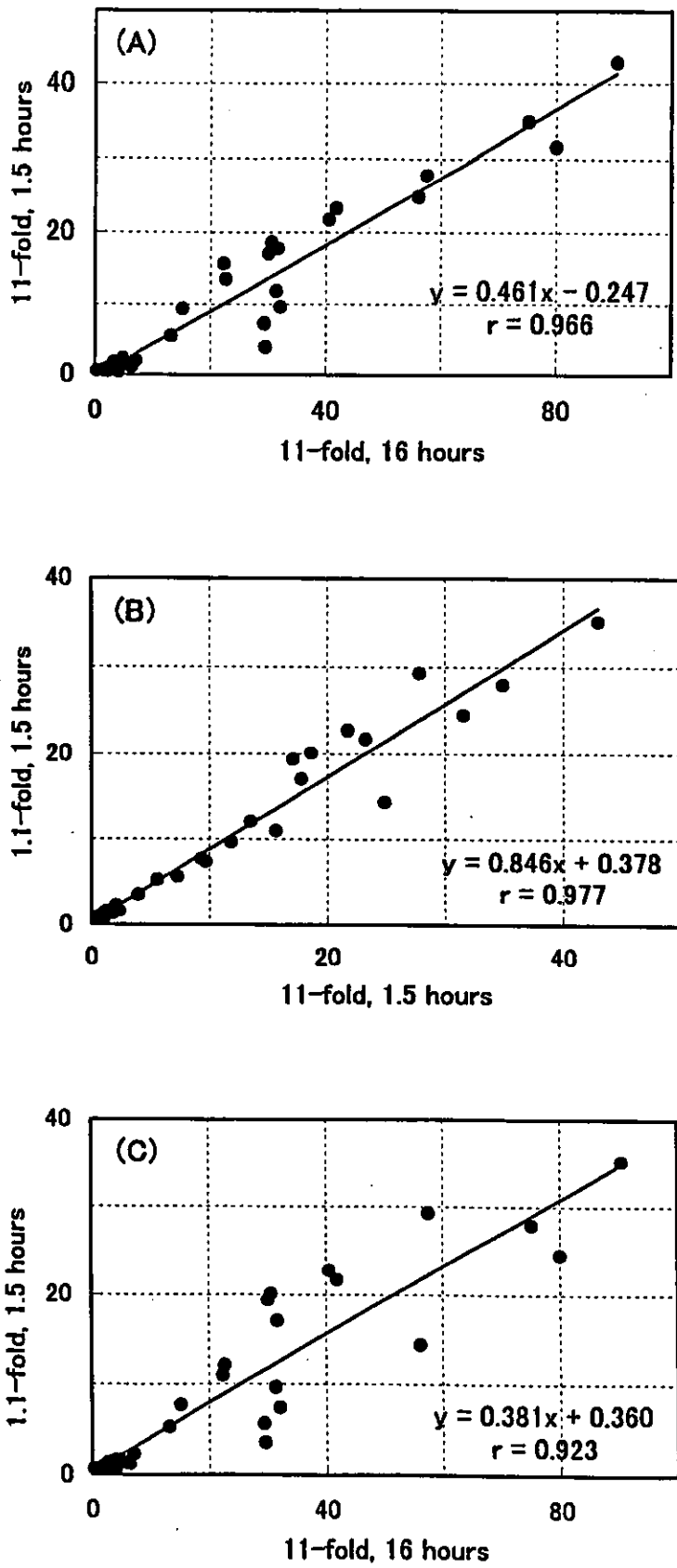


Fig. 2 Relationship between TDA values (x and y) by various hydrolysis conditions
 Both pre-shift and post-shift urine (n=36) was investigated together.

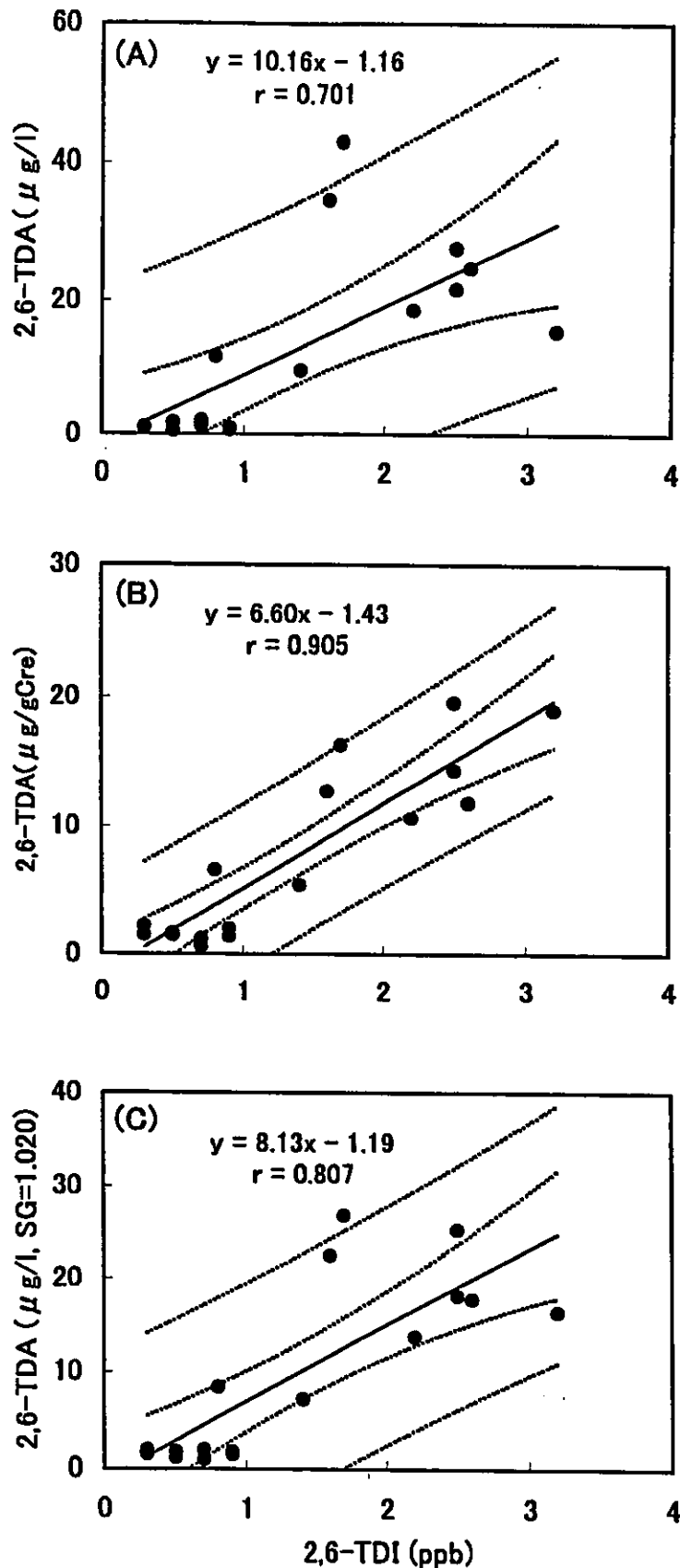


Fig. 3 Relationship between 2,6-TDA levels in post-urine (y) acquired by various corrections and personal exposure levels of 2,6-TDI (x) (n=18). Solid lines show regression lines. Curves (dotted lines) close to the regression lines show 95% confidence ranges of the regression line, and outermost curves (dotted line) indicate 95% predictive intervals of individual values.