

血液トルエン($\mu\text{g/l}$)

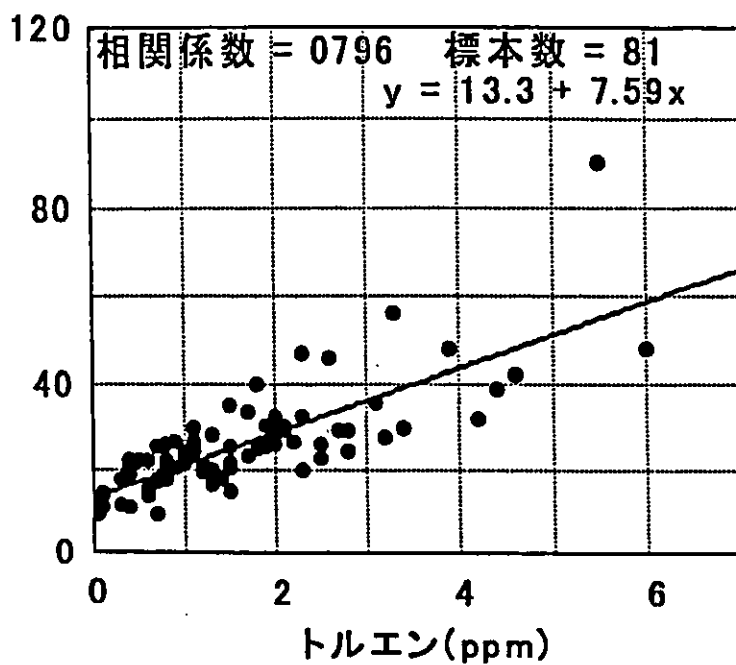
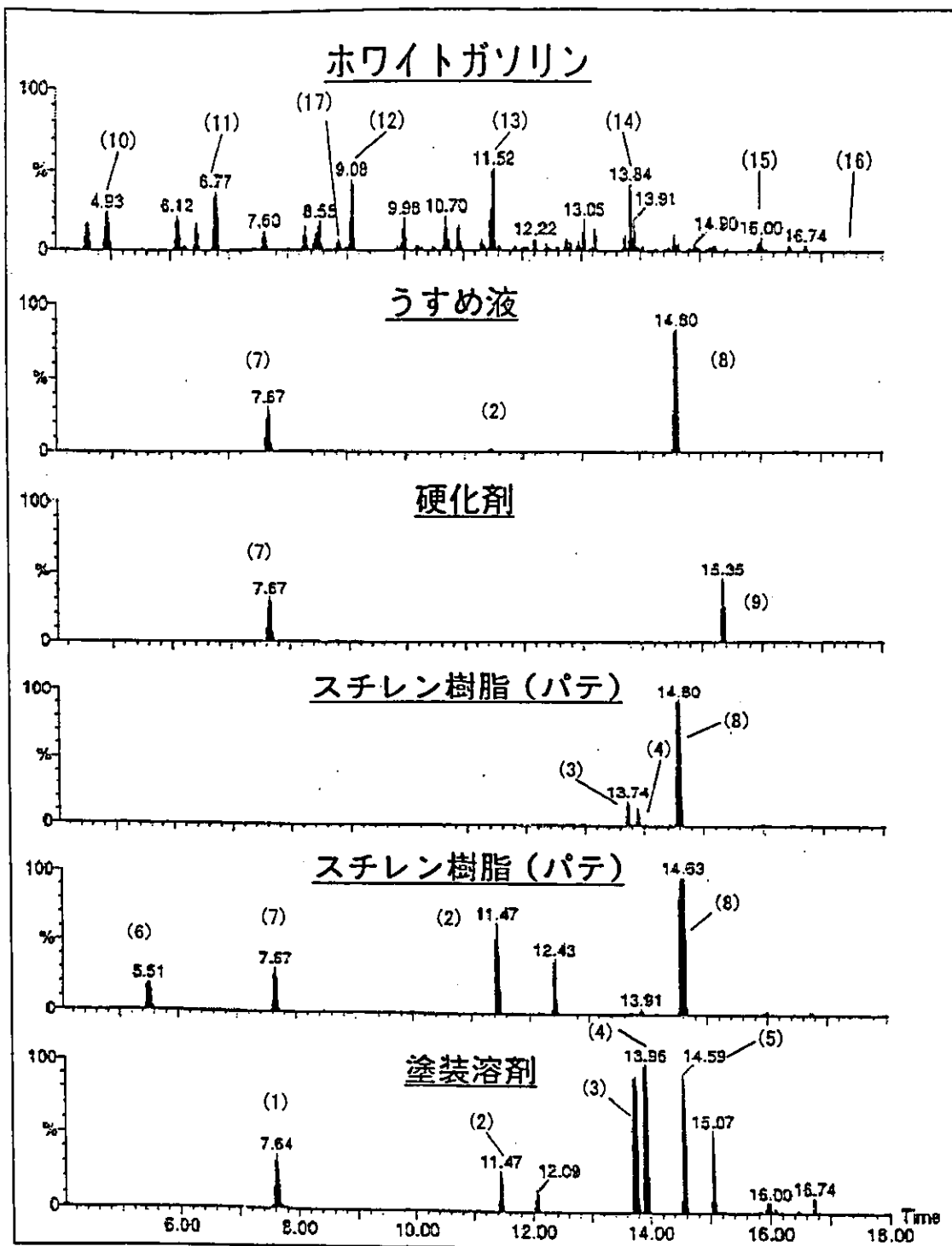


図1 血中トルエン濃度と個人暴露濃度との関係



- (1) MIBK、(2) トルエン、(3) エチルベンゼン、(4) m+p-キシレン、(5) o-キシレン、
 (6) アセトン、(7) 酢酸エチル、(8) スチレン、(9) シクロヘキサノン、
 (10) n-ペンタン、(11) n-ヘキサン、(12) n-ヘプタン、(13) n-オクタン、
 (14) n-ノナン、(15) n-デカン、(16) n-ウンデカン、(17) ベンゼン

図2 使用溶剤のGC-MSによる成分分析

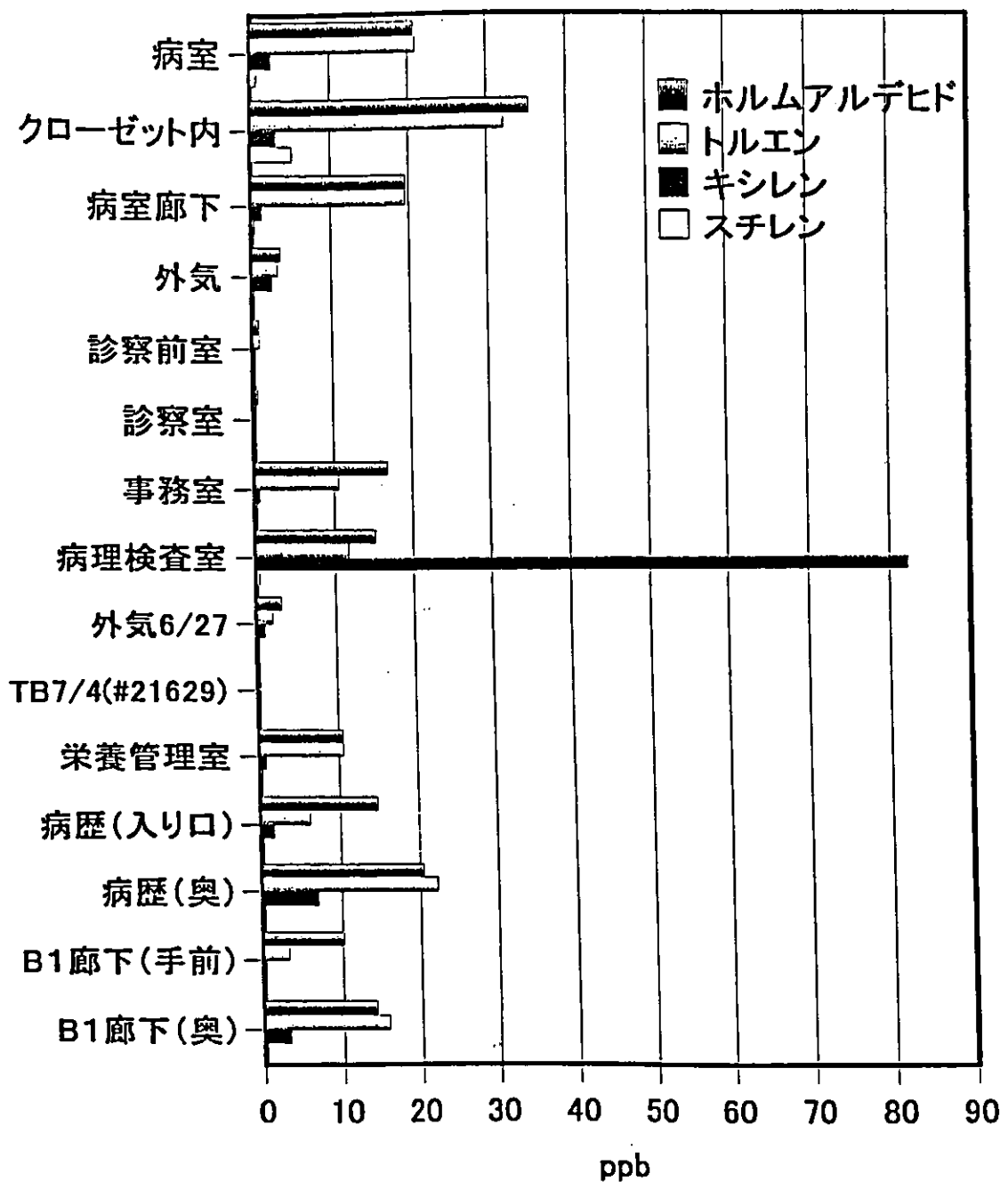


図3 各部屋のVOC濃度

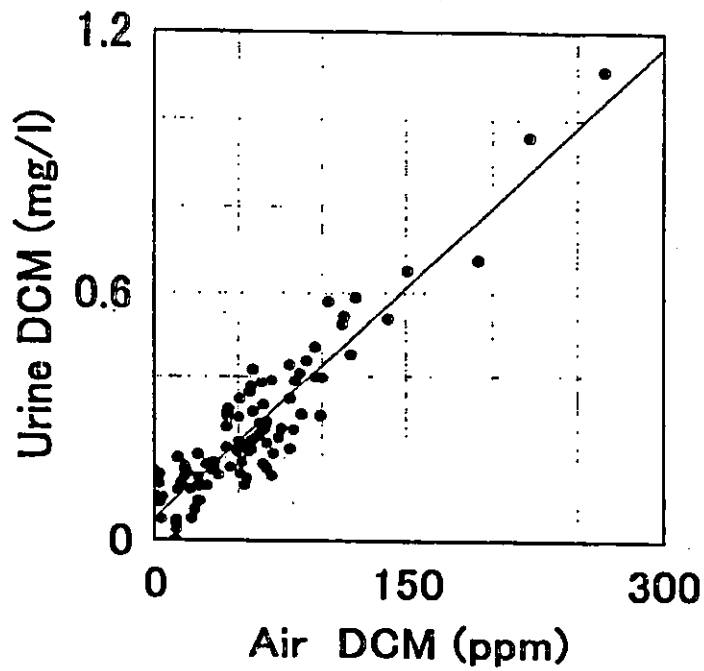


図4 尿中DCM濃度と個人曝露濃度との関係
 $y = 0.0037x + 0.00545$

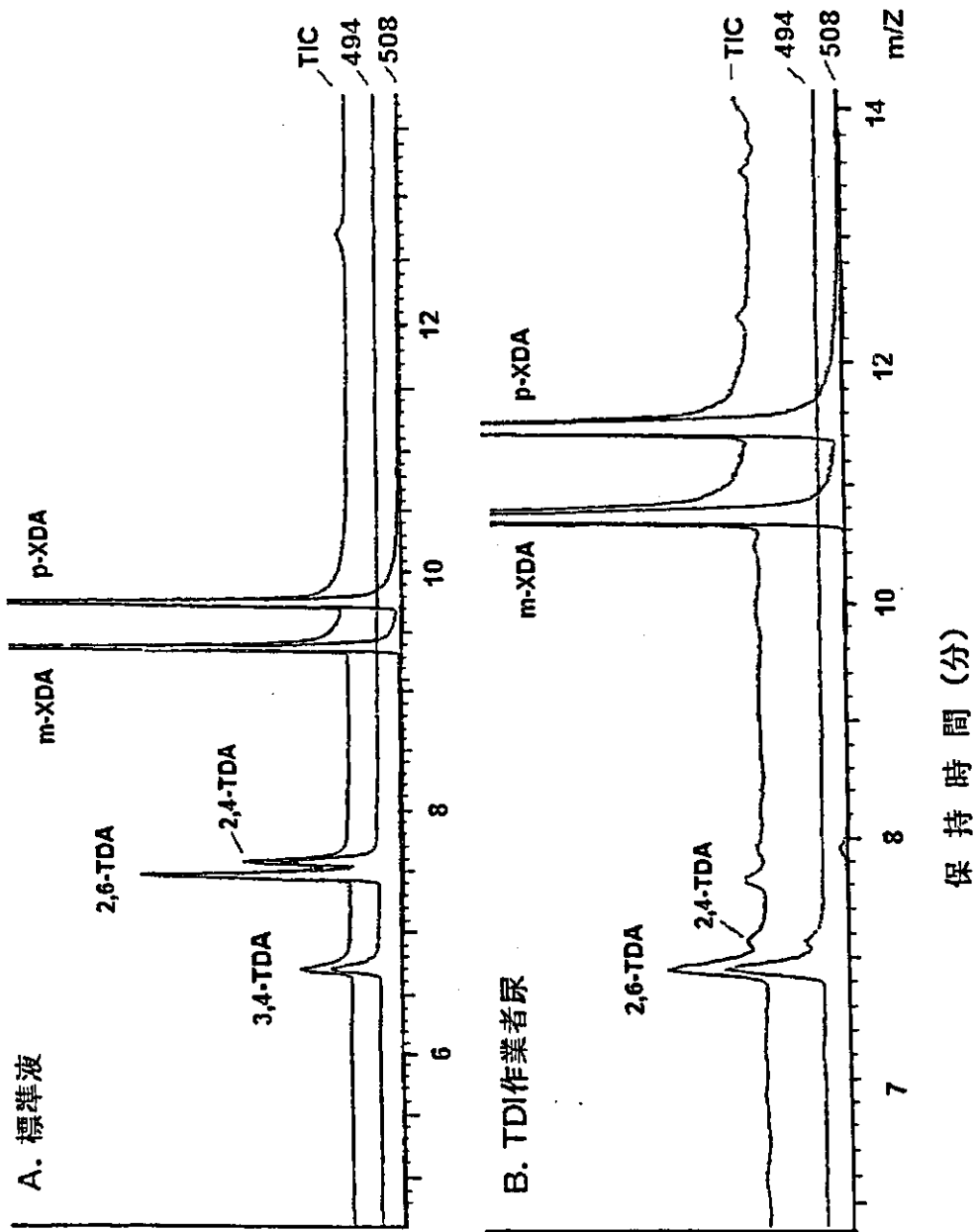


図5 TDA、XDAのHFBA誘導体のクロマトグラム

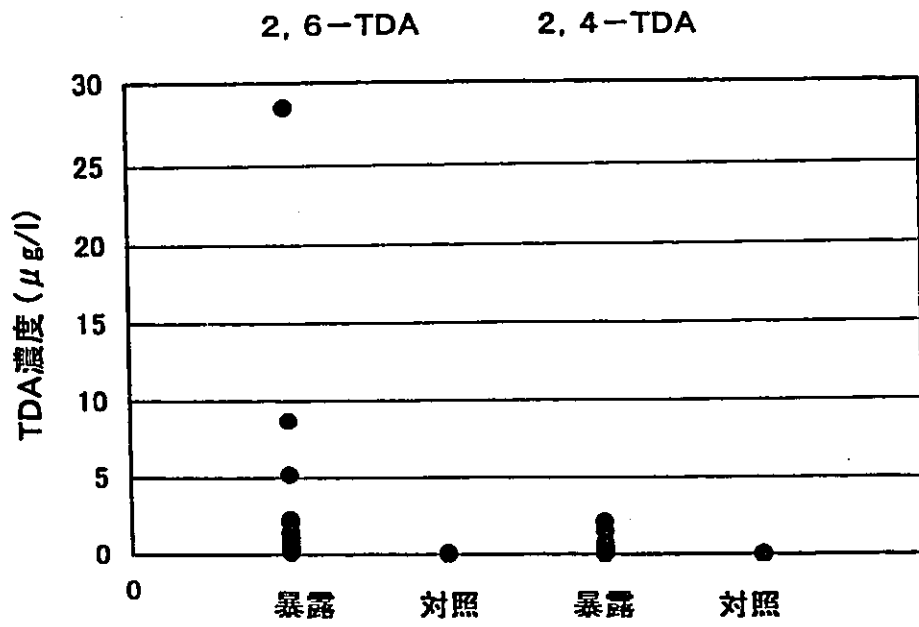


図6 TDI 暴露群と非暴露群の尿中 TDA 濃度

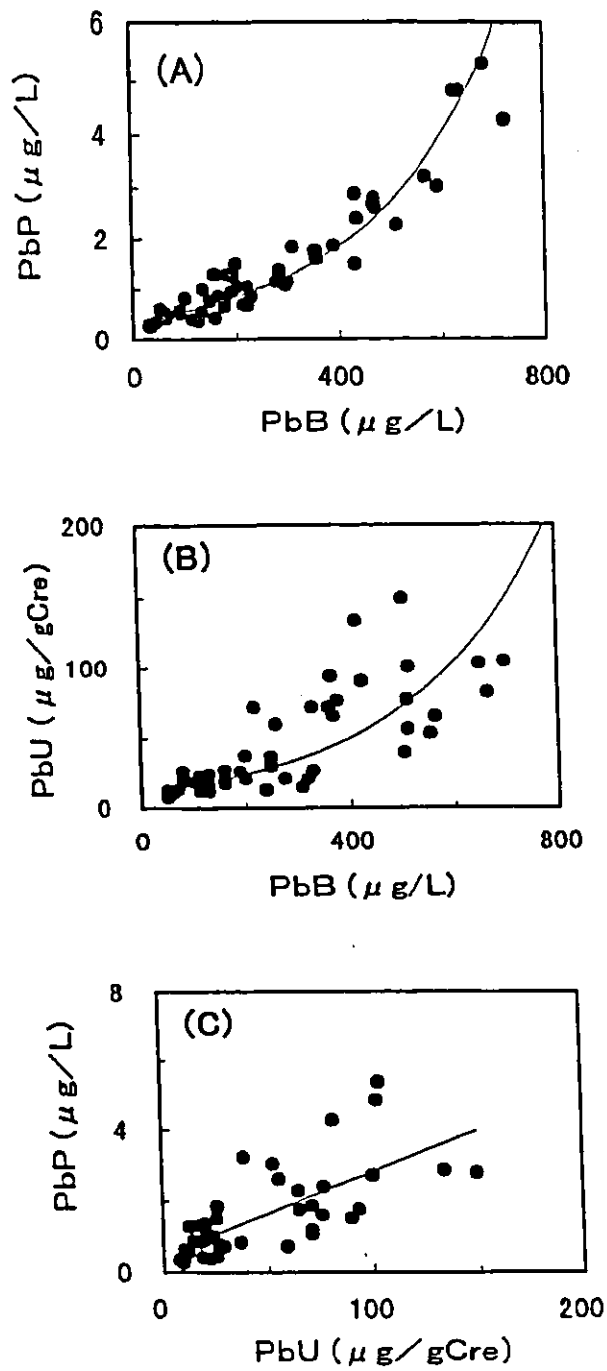


図7 ICP-MS 測定による3種の鉛暴露指標の関係

(A) $y = 0.392e^{0.0039x}$ ($r=0.933$, $n=53$)

(B) $y = 11.78e^{0.0035x}$ ($r=0.817$, $n=49$)

(C) $y = 0.219x + 0.781$ ($r=0.657$, $n=49$)

(2) 平成 15 年度

研究要旨

- ① 除草剤メコプロップ中毒患者についてメコプロップとその代謝物の尿・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、それぞれの尿中代謝物である t, t-ムコン酸 (ベンゼン)、ベンジ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-ヘキサンジ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、良好な作業環境にあることを明らかにした。
- ⑤ TDI 暴露ラットの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、CH₃-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は加水分解なしに測定可能であるため、TDI 作業者の生物学的モニタリングとしての有用性を検討する予定である。

A. 研究目的

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、マンガン作業者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。

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(MCPP)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。これら作業者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。MCPP 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、MCPP 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

MCPD 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が必要と考えられる。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) 低濃度ベンゼン、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。ベンゼン、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)、ベンジメルカプツール酸、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-ヘキサジオン (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が、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ジアミン (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が残る。

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、MCPP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・血清が経時的に5日間採取されており、MCPP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。

MCPP測定の前処理として、血清100 μ lに900 μ 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倍希釈し同じ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。濃度測定のための移動相として、通常は40%AN、0.1%酢酸混液(A液)を用い、流速は1ml/minとした。スペクトル分析のための移動相は25%AN、75%10mM NaH₂PO₄(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 μ 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ジエント溶出を行い、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ブリン酸(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 μ 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 μ 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ベ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 MnCl₂ 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。ゲルろ過の溶出では紫外部 (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) 低濃度ベンゼン、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 \pm 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ベンゼンについて、個人毎に曝露状況を調査し、同時にそれに対応したベ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ベンジ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、営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、加水分解なしではジクロロメタンによ

る抽出の際にエマルジョンとなるため、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)を床高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°C、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-TDAace₂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-ジアミノベンジル酸[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-DABAace₂(2,4-ジアセチルアミノベンジル酸)を濃塩酸で濃縮して得られた。2,4-DABAace₂は2,4-TDAace₂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Wister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, i. e. 0.1mmol/kg)またはDMSOに溶解した2,4-TDA(6.1mg/ml x 2ml/kg, i. e. 0.1mmol/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、残査を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, 5 μ

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、メタノールでグラジエントを行った(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 μ 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、残査を 500 μ 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

ール溶液を用い、B濃度をグラジエントした(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 μ m Polar-RP 80 A、150 x 2mm (Phenomenex) を使用した。サンプル量は 5 μ 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)でグラジエントした。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

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、ジクロロメタンで抽出した 2,4-TDA をヘpta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 μ m Polar-RP 80 A、150 x 4.6mm (Phenomenex) を使用した。サンプル量は 20 μ l、移動相は(A)0.1%酢酸水溶液、(B)0.1%酢酸メタノ scan mass の平均でマッチングし、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。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%10mMNa₂PO₄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]⁻)が検出され、ピーク a については [M+16]⁻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 であったが、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: Hepta P)、6C (ヘキサポルフィリン: Hexa P)、5C (ペンタポルフィリン: Penta P)、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 Penta P 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 ± 16.1 (範囲 7.5~83.7) $\mu\text{g/l}$ および 4.1 ± 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 ± 111.8 (範囲 10.3~551.7) $\mu\text{g/l}$ および 1.1 ± 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 ± 2.9 $\mu\text{g/gCre}$ および 8.4 ± 2.6 $\mu\text{g/gCre}$ 、 $p < 0.05$) (UK: 5.1 ± 2.3 $\mu\text{g/gCre}$ および 3.4 ± 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・尿中水銀との相関では、UK のみが血中・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) 低濃度ベンゼン、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、ベンゼンと n-ヘキサンであった。ベンゼ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。ベンゼン曝露濃度と 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)。回帰分析からはベンゼン濃度を 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ベンジルメルカプツール酸が、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-ヘキサジオン(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が、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ッシブサンプリング (y ppb) によったが、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カ所のパッ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 投与ラット尿は 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 のプロファイルを示し、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、尿中のほとんどすべ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-TDAace₂ 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-TDAace₂ 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-TDAace₂ 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も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 プロファイルである。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、CH₃-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-DABAace₂ 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) が 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-TDAace₂ が主要な代謝物として検出されるが、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 回抽出や誘導体化などの複雑な手法を要する。これまで (Osterloh ら、1983) の HPLC 法ではホモジ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が可能となった。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)法に加え、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の分子ベースピークの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定された。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が推測される。

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が、この方法はゴ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が、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ニダーゼ (NAG) がよく利用されているが、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。