

Fig.7 Relationship between UK and CPs

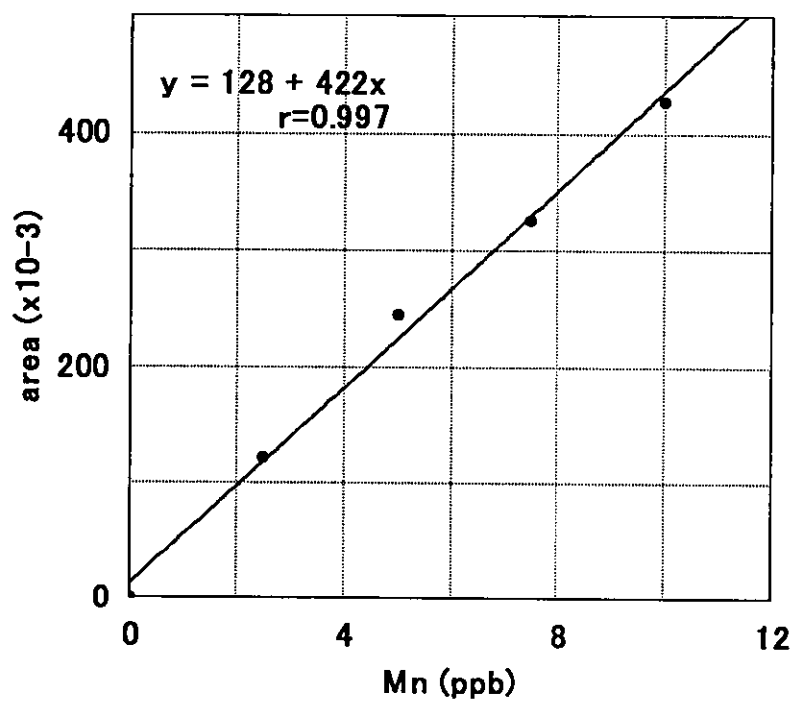


Fig. 8 Calibration curve for Mn

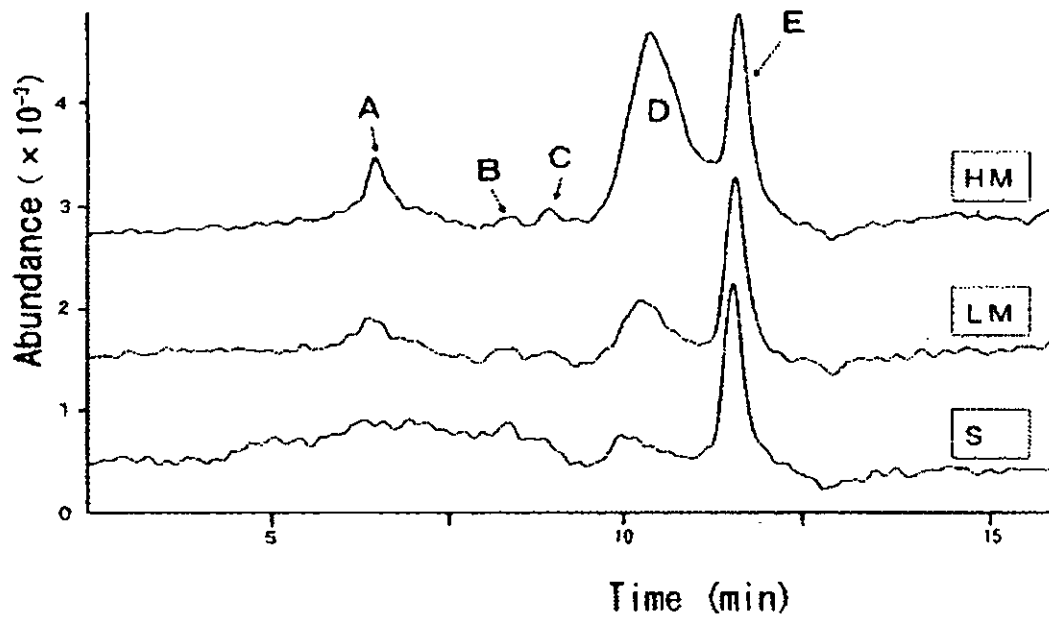


Fig. 9 Chromatographic profiles of Mn in blood

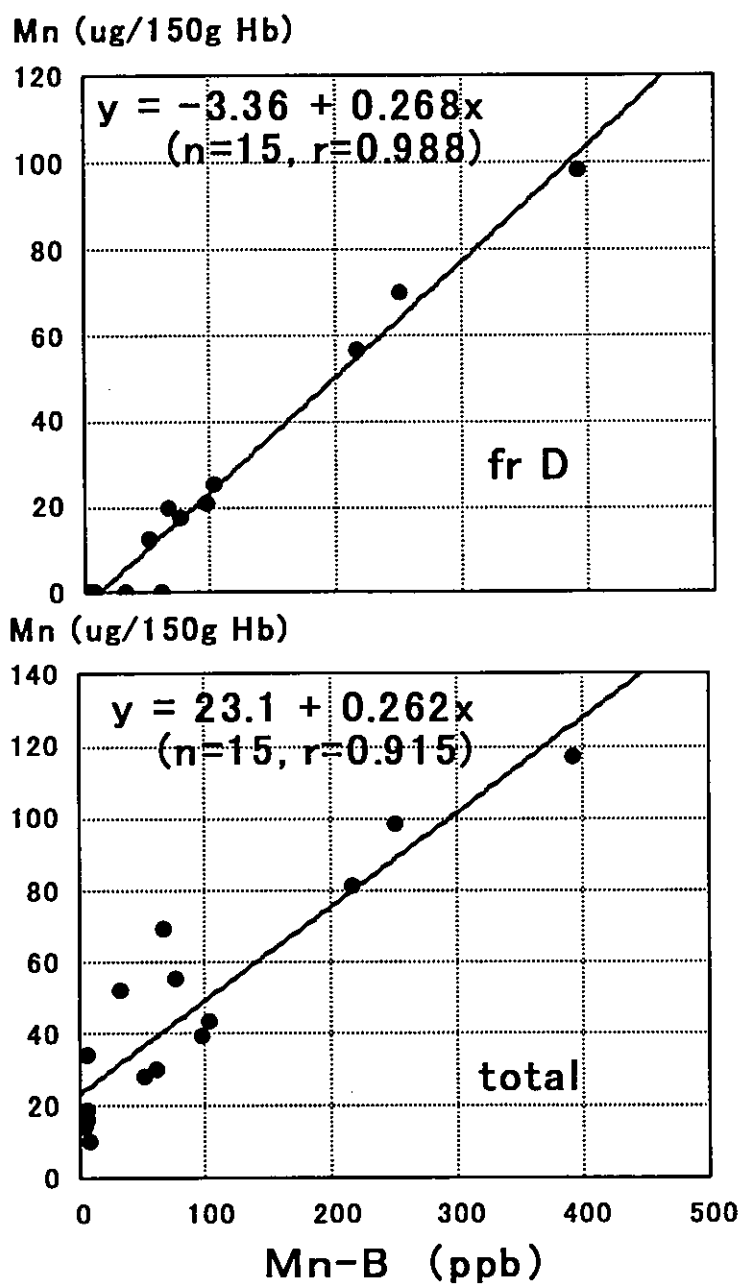


Fig. 10 Relationship between Mn-frD or Mn-total and Mn-B

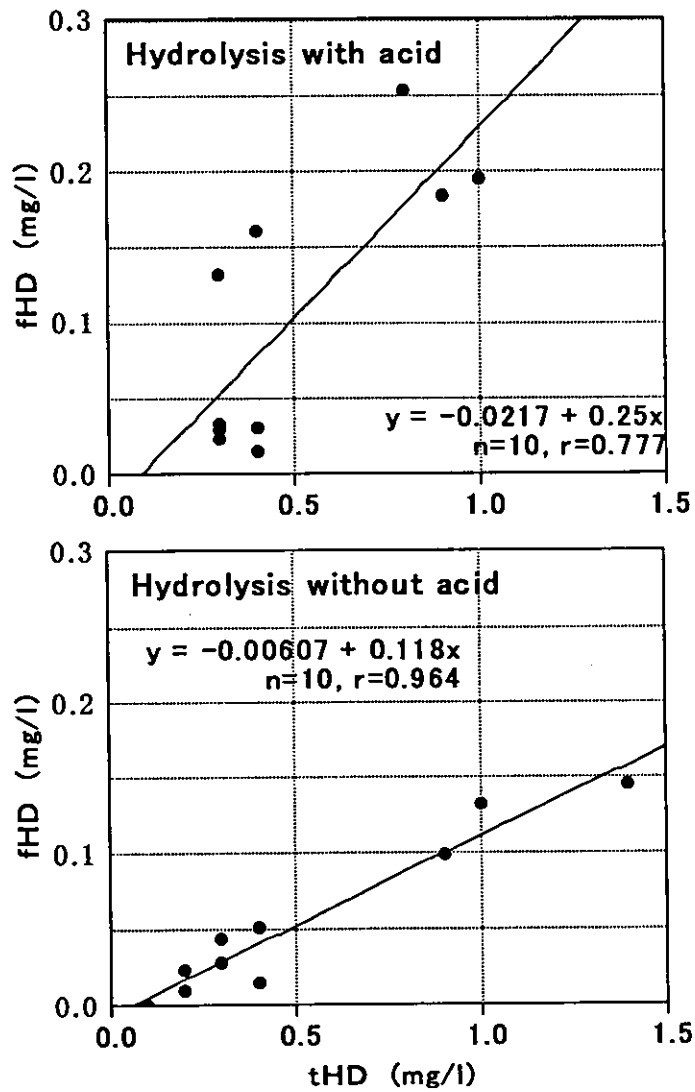


Fig.11 Relationship between fHD and tHD in hydrolysis with or without acid

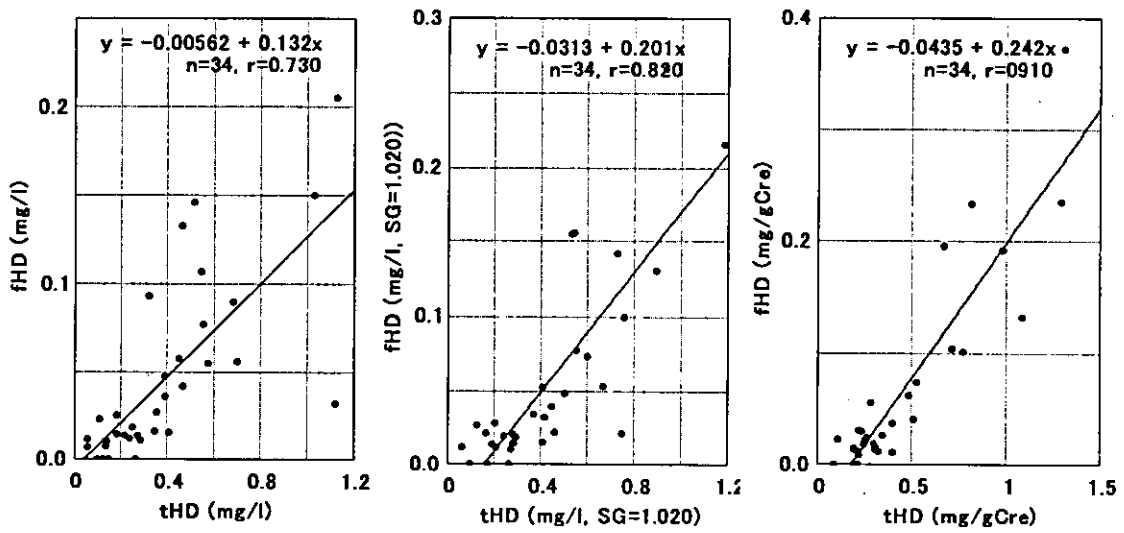


Fig.12 Relationships between fHD and tHD in various corrections

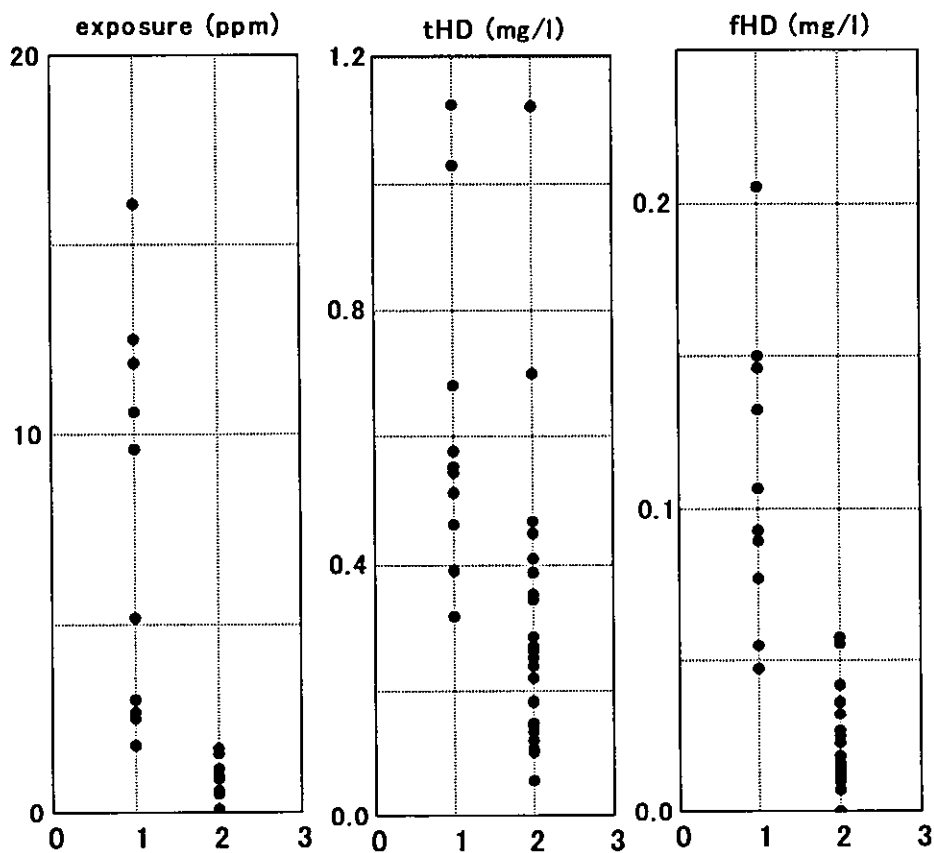


Fig.13 Comparison of personal exposure levels, tHD and fHD levels in two groups

1: Exposed group

2: Non-exposed group.

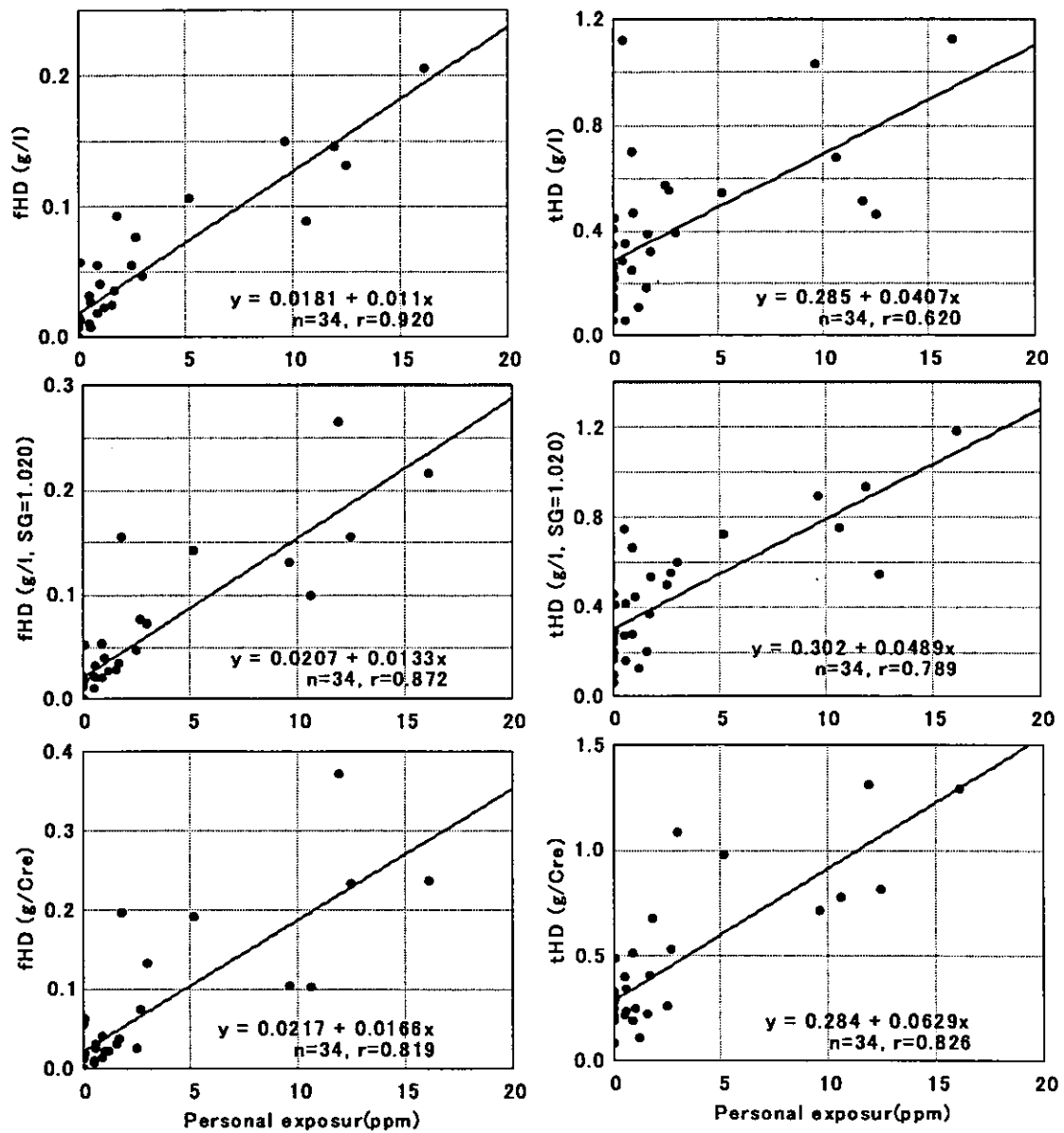


Fig.14 Relationships between personal exposure levels and fHD or tHD

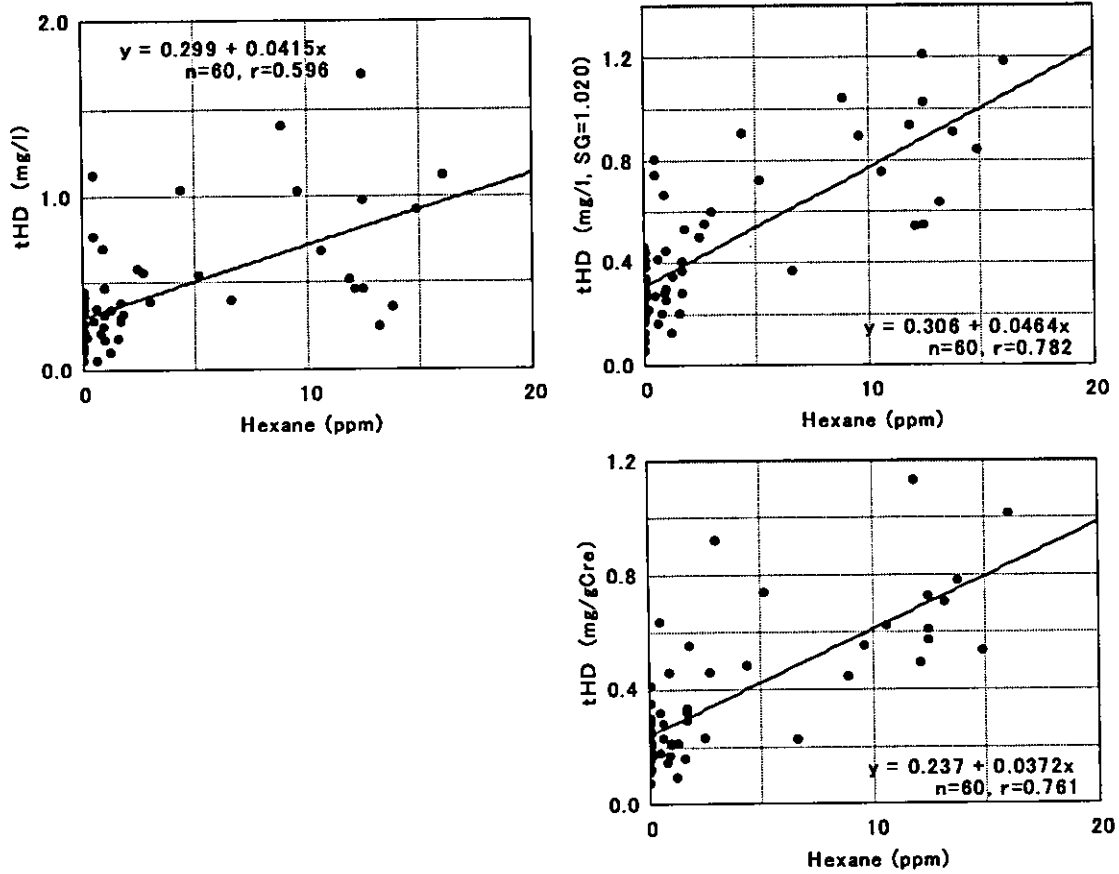


Fig.15 Relationship between tHD and personal exposure level

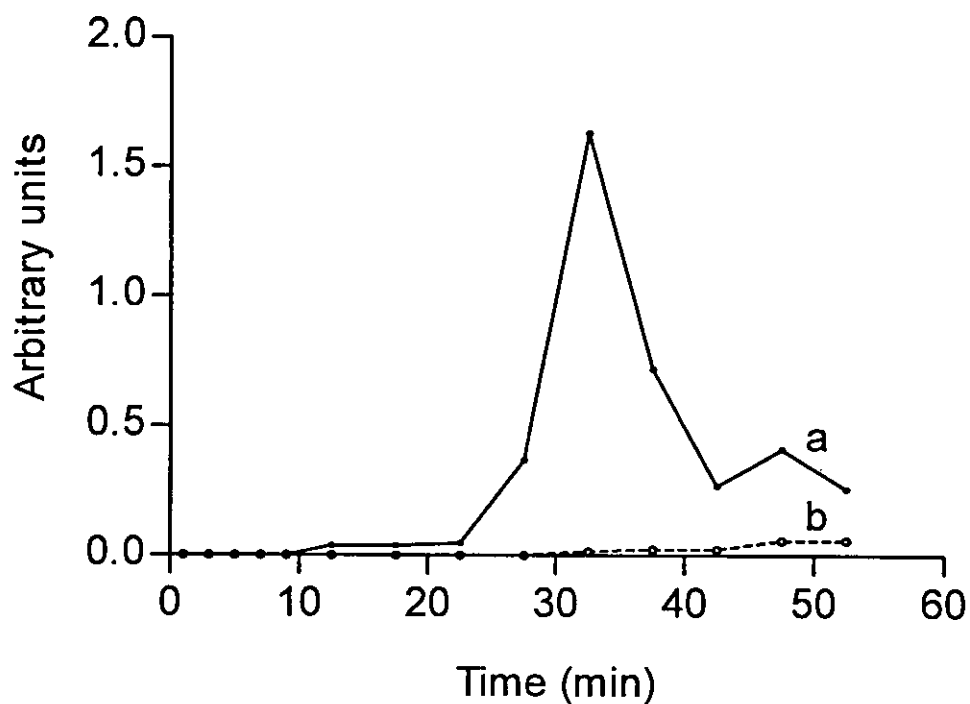


Fig. 16 HPLC fractionation of the urine of rats dosed intraperitoneally with 2,4-TDI, 0.10 mmol/kg: elution profile of total hydrolysable 2,4-TDA (a); elution profile of 2,4-TDA in non-hydrolyzed fractions (b)

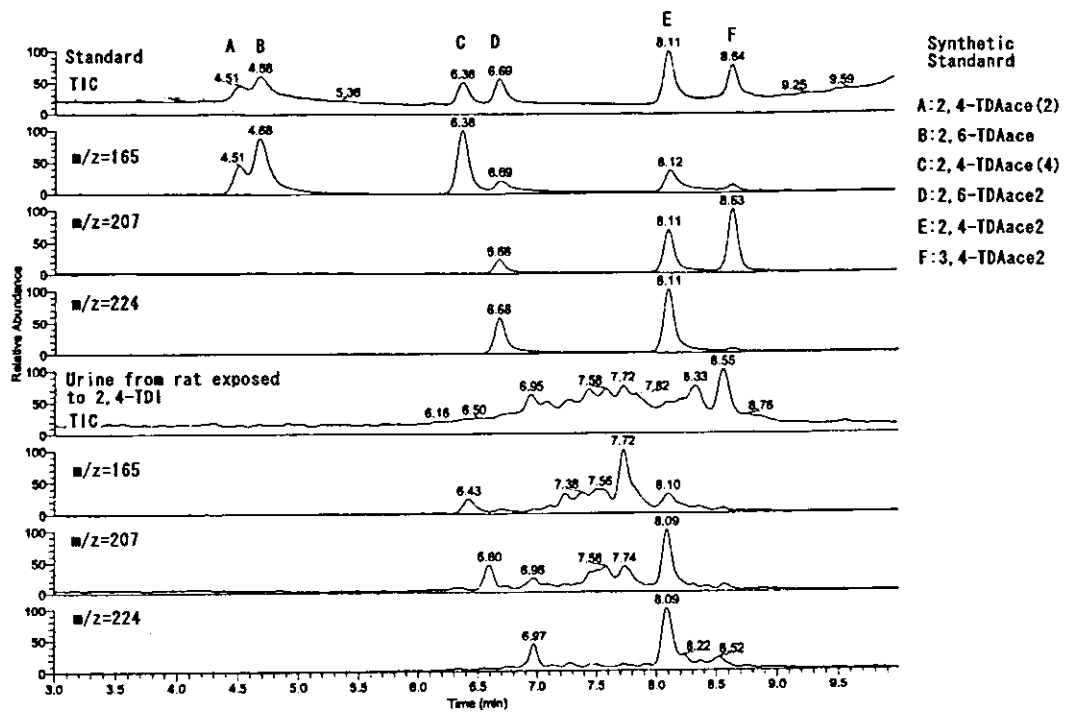


Fig. 17 LC-MS profiles of standard and urine from rat exposed to 2,4-TDI

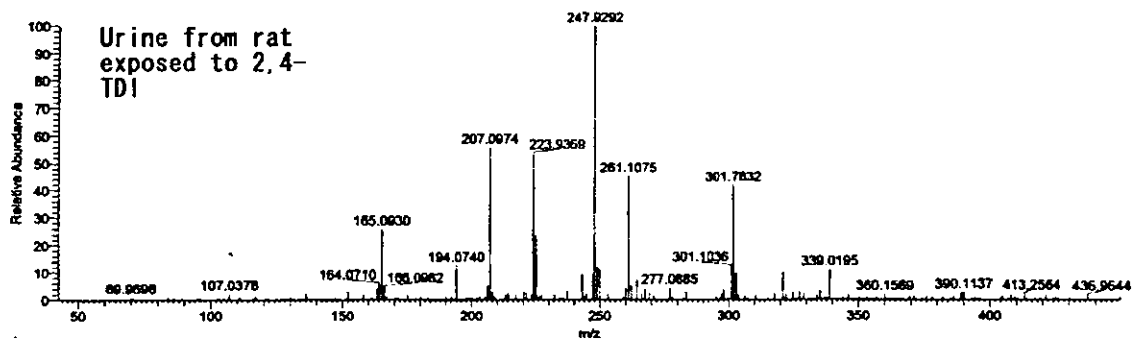
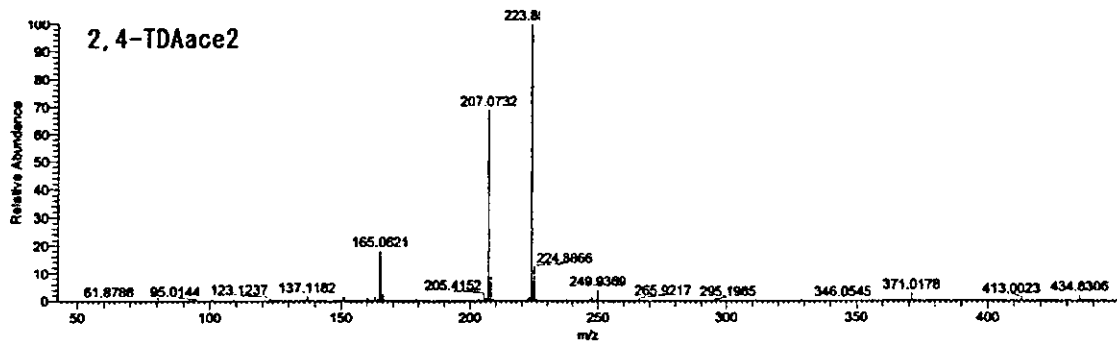


Fig.18 Mass spectra of standard 2,4-TDAace2 and rat urine peak in LC-MS

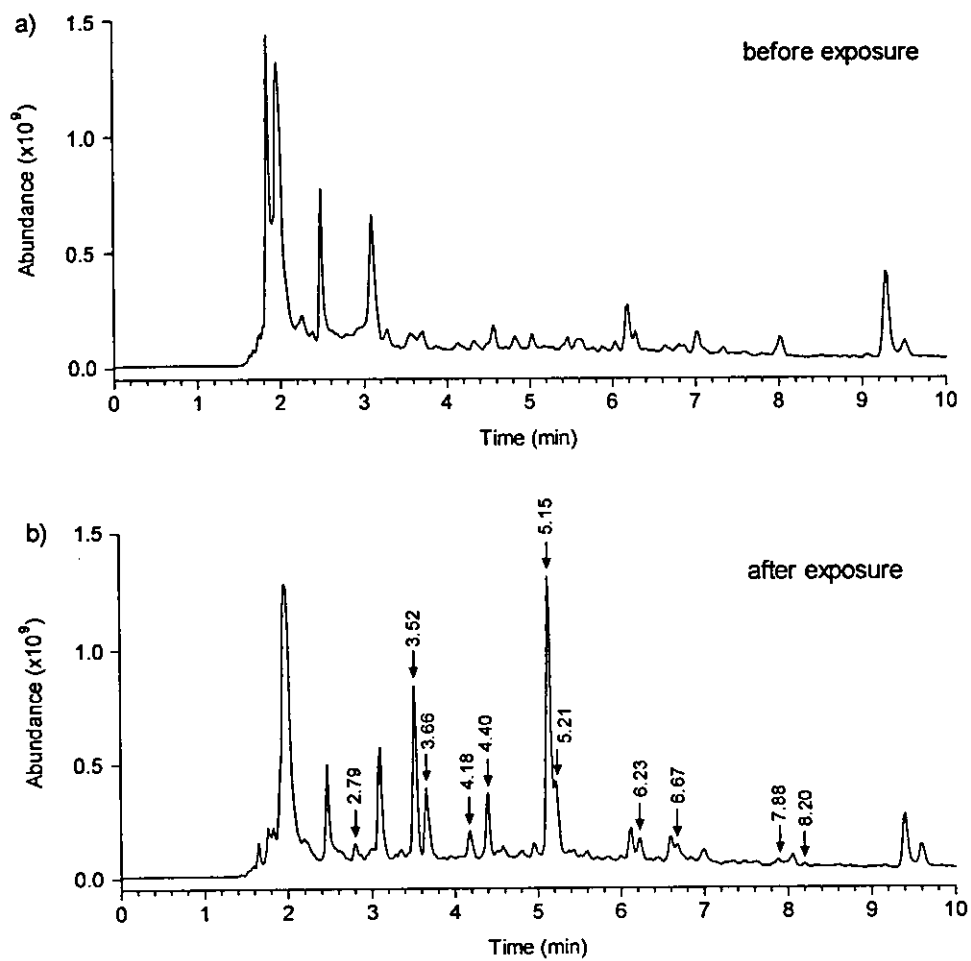


Fig. 19 LC-MS profiles of urine from rat before and after exposure to 2,4-TDA

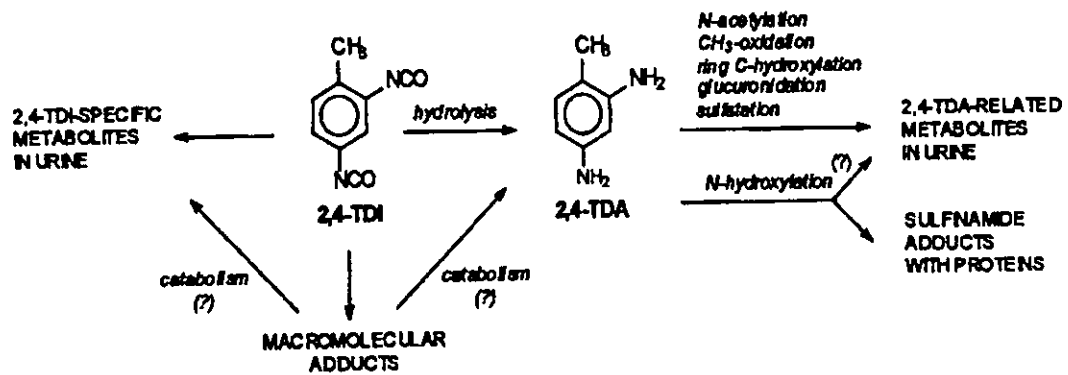


Fig. 20 Proposed metabolic scheme for 2,4-TDI and 2,4-TDA, and formulae of the 2,4-TDA-related metabolites

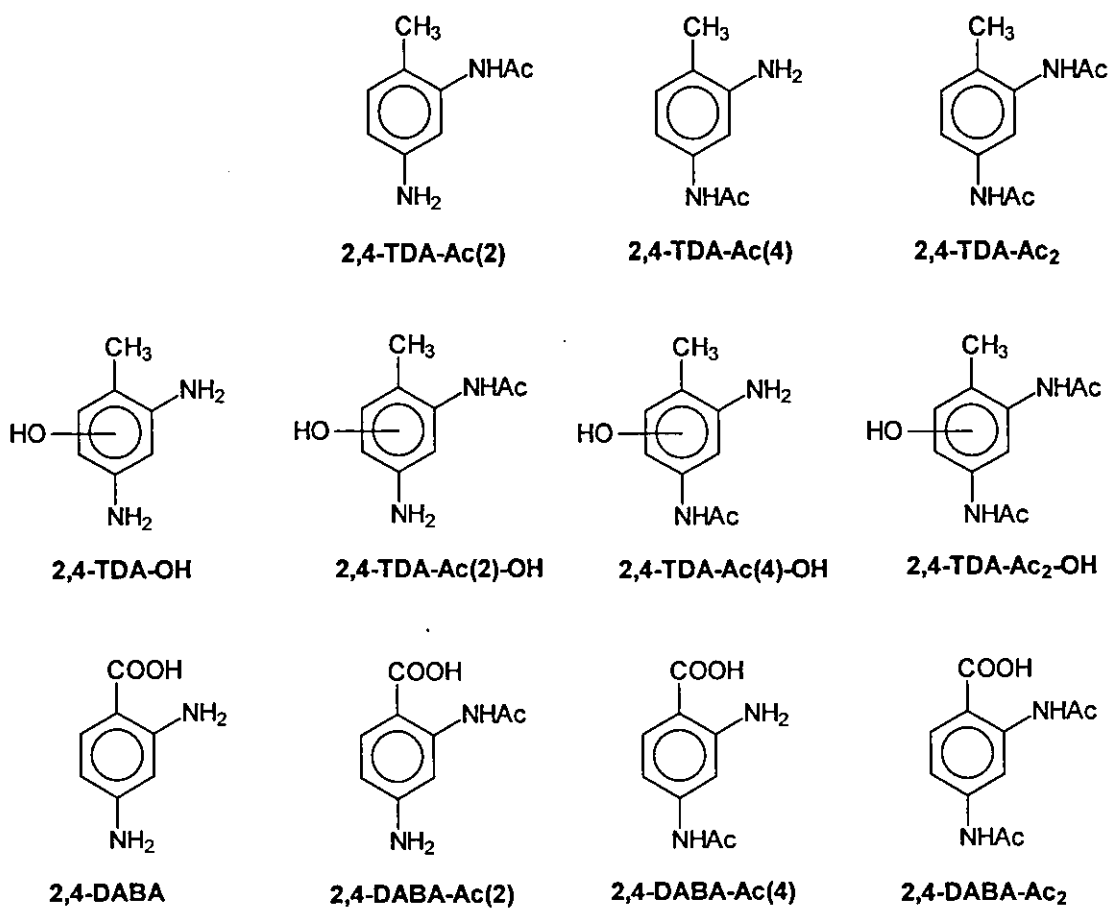


Fig. 21 Formulae of the 2,4-TDA-related metabolites

(3) 平成 16 年度

研究要旨

①尿中 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、内部標準物質に市販試薬を使用可能とした。本法を 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好な相関が得られた。さらに尿をクレアチニンや比重で補正することにより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 $31.6 \mu\text{g/gCre}$ と計算された。本法による 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。本法による MDI 作業者の生物学的モニタリングが可能である。血清中 MDA の半減期は尿中 MDA よりも長く、タンパク質に付加している可能性があり、過去の曝露の推定にも役立つ利点がある。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検討し、曝露を訴える患者尿に応用した。

A. 研究目的

- 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する。TDI 作業者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 濃度を求める。
- 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 に曝露した作業者に応用する。
- 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法を開発と検査希望の患者での測定、を目的とした。

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

TDI 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く、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 1 ml~3 ml 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 作業員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員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、個々の作業員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系農薬の代謝物 (ジアルキルリン酸) の微量測定法を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 作業員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、post-shift) に採取され、

測定まで 20°C 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。誘導体化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 μl の内部標準 (200 ppb 3,4-TDA) と 50 μl の HFBA を加え、 55°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 μl 程度にまで濃縮し、200 μl 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 μm) を使用し、サンプル 1 μl をスプリットレスモードで注入した。カラム温度は 100°C から 280°C まで $20^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 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°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 ($1.2 \times 10^{-3} \text{ Pa}$)、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 μm , 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 $10\text{-}40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 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℃で保存された。対照としてMDIの職業的暴露のない男性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℃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℃で2分間保持、280℃まで20℃/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℃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薫蒸剤(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する、②虫除けプレート(商品名バボナ、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する、であった。

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℃4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 of variation (CV) 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 (Fig2. 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 (Fig2. 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