

1. 総合コメント：今回実施した調査すべての結果のまとめです。
2. 元気度チェックリスト判定：骨粗鬆症、糖尿病、血液ドロドロ、睡眠時無呼吸症候群、肝臓危険度、歯周病、仕事のストレス度についてコメントしてあります。
3. 骨密度の測定：超音波を使って骨密度を測定し、間接的に骨年齢を算出しています。近年、骨粗鬆症は骨の病気として一般に良く知られるようになりましたが、骨粗鬆は進行すると、腰椎や大腿骨頸部の骨折を引き起こす恐れがあります。女性・お年寄りだけの問題と思われがちですが、若い年代にも大いに関係のある症状と言う事が出来ます。今回の数値は、日本人の骨密度の平均からみて、同年代の人達と比較して何%くらいなのかで示してあります。また、10歳単位で、骨年齢も出してあります。骨年齢が自分の年齢より高かったり、また、骨密度が100%より低い人は、1日に30分から1時間の散歩などの軽い運動で骨に刺激を与えたり、バランスの良い食事、特にカルシウム、ビタミンDの多くふくまれる食品をとるようにしましょう。ビタミンDは骨を健康に保つ大切な成分です。ビタミンDは日光浴により体内でも作られます。
4. 血液、尿検査
  - 1) 過酸化脂質：動脈硬化やからだの老化と関係する、体の中にたまった「酸化ストレス」の指標です。値が多い方が酸化によるストレスがたまっているということです。
  - 2) 補体価(CH50)、A/G比：からだの免疫力の指標のひとつです。免疫関係の病気がある場合で異常値を示します。また、炎症がおきるとCH50は上昇してきます。しかし、この数値のみ標準値をわずかにはずれた程度では、特に心配する必要のないことも少なくありません。また、血液中の免疫グロブリンなどが著しく変化すると、A/G比が変化します。
  - 3) CRP：からだに炎症が潜んでいる場合に高値を示します。今回は通常病院で行われる検査とは異なり、「高感度CRP」と呼ばれる特殊な方法で測定しているため、風邪や軽度の体調不良による上昇がいつそうわかりやすいほか、動脈硬化症の新しい指標にもなることが最近言われるようになってきています。

## 資料 8-d

4) 膵臓の機能検査 (アミラーゼ) : 膵臓に炎症や腫瘍があると増加しますが、おたふく風邪のように唾液腺の炎症でも増加します。

- 5) 腫瘍マーカー : これまでがん検診を受けられていた方は、今回の腫瘍マーカーの結果にかかわらず、今年も同じようにがん検診を受けて下さい。

PSA : 前立腺ガンの腫瘍マーカーです。

CA19-9 : 膵臓ガンの腫瘍マーカーです。悪性疾患でなくても上昇する場合がありますが、高い数値の場合は精密検査をおすすめします。

CA125 : 主に婦人科疾患で上昇します。

TPA : いくつかの種類のがんで上昇することが知られています。しかし、CA125、TPA とともに、結果が正常値であったとしても、がんではないという指標にはなりません。

- 6) 性ホルモン (黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、テストステロン、エストラジオール) : 精巣、卵巣およびこれら生殖腺を支配する脳の下垂体機能をあらわします。検査を行う日によって数値が大きく変動する可能性があります。職場健康診断での正常値は存在しませんが、参考までに医療機関における標準値を記載しました。しかし、これは病気であるかの境目をあらかず数値ではなく、今回の皆様の検査結果では標準範囲をはずれていても気にする必要はありません。生殖腺の機能が低下すると、黄体化ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH) は増加しますが、女性では月経周期により大きく変動し、女性は閉経前後、男性は 50 歳ごろより数値が大きく増加するのは正常範囲の変化です。

5. 神経機能検査 : 今回、神経内科医による診察と、神経伝導速度検査を行い、あわせて判定しています。神経伝導速度は個人差が大きく、皮膚の温度によっても変動します。個人票のコメントをご参照下さい。

#### 資料 8-e

6. 精液検査：精液検査結果は個人差が大きく、また、同一の方でも検査を受ける日や体調、季節、心理的要因等によって大きく変動します。職場での正常値はありませんが、参考値として世界保健機構(WHO)の標準値を記します。ただし、これは子供ができるかできないかを区別する数字ではありません。また、標準値を下まわっても、生殖機能が低下していることをただちに意味するわけではありません。精子の形態については、測定機関によって評価方法が全く違いますので、他の医療機関における検査結果との比較はできません。

##### (標準値)

精液量：2.0 ml 以上、 pH：7.2 以上、精子濃度： $20 \times 10^6$ /ml 以上、

精子運動性・高速直進運動精子率：25%以上または「高速直進運動精子率と緩徐な直進運動精子率」の和が 50%以上、精子生存率：50%以上、精子形態：標準値未設定

7. 環境中化学物質濃度の測定：今回は、調査日 1 日のあなたの周りの空気中の化学物質濃度を示しています。今回の分析では、表に示した揮発性化学物質濃度が測定されています。有機溶剤を扱う職場でトルエンが最大  $66,759 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (18 ppm) 検出されていますが、職場の許容濃度を十分下回っていて、良好な作業環境であるといえます。これ以外に検出された化学物質はごく微量で、ほとんどの場合、通常の家での室内環境と大差ありませんでした。いずれの物質も、健康への影響という点で問題になるものはないと考えられます。

資料 9-a

氏名 殿

標準値をはずれた項目に関しては、赤矢印で示してあります。  
 一回だけの検査データですので、標準値をはずれたからといって即病気というわけではありません。  
 なお、検査の内容の詳細につきましては、別紙をご覧ください。  
 この検査結果に疑問がある方は、山野・上島またはかかりつけの医師までお問い合わせ下さい。

総合コメント

総合コメント

元気度チェックリスト判定

|            |               |
|------------|---------------|
| 骨粗しょう症     | 骨粗しょう症コメント    |
| 糖尿病        | 糖尿病コメント       |
| 血液どろどろチェック | 血液どろどろコメント    |
| 睡眠時無呼吸症候群  | 睡眠時無呼吸症候群コメント |
| 肝臓危険度      | 肝臓危険度コメント     |
| 歯周病        | 歯周病コメント       |
| 仕事のストレス度   | 仕事のストレス度コメント  |

骨密度

|     |         |
|-----|---------|
| 骨年齢 | 骨密度コメント |
|-----|---------|

血液検査

|                      |            |                         |   |
|----------------------|------------|-------------------------|---|
| 過酸化脂質<br>(デクミンナーLPO) | デクミナ       | ng/ml (参考標準値 0.0-1.3)   | 動脈硬化やからだの老化と関係する、体の中にたまった「酸化ストレス」です。  |
| 補体価 (CH50)           | 補体価補       | CH50/ml (標準値 25.0-48.0) | からだの免疫力です。  |
| A/G比                 | A/G A      | (標準値 1.2-2.0)           |   |
| 高感度CRP               | CRP C      | ng/ml (標準値 1500以下)      | 体に隠れた炎症がないかどうかの検査です。  |
| アミラーゼ                | アミラーゼ (ケア) | IU/l/37℃ (標準値 50-170)   | 膵臓の機能です。  |
| 前立腺腫瘍マーカー(PSA)       | PSA(R P    | ng/ml (標準値 4.0以下)       | 精巣の元気度です。<br>注意：これはがん検診に代わるものではなく、正常値であったとしても、がんでないという指標にはなりません。異常値がでた場合は、精密検査をおすすめします。 |
| 膵臓腫瘍マーカー(CA19-9)     | CA19 C     | U/ml (標準値 37以下)         |   |
| 黄体形成ホルモン(LH)         | LH(黄体 L    | mIU/ml (標準値 1.22-7.05)  | 脳の下垂体でつくられる精巣を調節するホルモンです。   |
| 卵巣刺激ホルモン(FSH)        | FSH(卵胞 F   | mIU/ml (標準値 2.00-8.30)  |   |
| テストステロン              | テストステ      | ng/ml (標準値 2.0-7.6)     | 精巣でつくられる男性ホルモンです。   |

資料 9-b

|   |  |
|---|--|
| 血中臭素イオン濃度 血中 血 $\mu\text{g/ml}$ (標準値 10以下)    | 体内に入った臭化メチルまたは臭素化合物濃度を示しています。飲料水や食物からも摂取されることがあります。10 $\mu\text{g/ml}$ 以下なら問題ありません。    |
| 尿中臭素イオン濃度 尿中 尿 $\mu\text{g/mgCRE}$ (標準値 20以下) | 体内に入った臭化メチルまたは臭素化合物濃度を示しています。飲料水や食物からも摂取されることがあります。20 $\mu\text{g/mgCRE}$ 以下なら問題ありません。 |

神経機能

|          |                      |                   |
|----------|----------------------|-------------------|
| 神経伝導速度   | 遠位潜時 遠位潜時 ミリ秒        | 運動神経伝導速度 運動神経 m/s |
|          | F波伝導速度 F波伝導速 m/s     | 感覚神経伝導速度 感覚神経 m/s |
| 神経内科診察判定 | 神経内科診察判定 (伝導速度は考慮せず) |                   |

前立腺・精液検査

|            |             |           |                              |
|------------|-------------|-----------|------------------------------|
| 精液量 ml     | pH pH       | 精子生存率 %   | 精子濃度 $\times 10^6/\text{ml}$ |
| 高速直進運動精子 % | 緩徐な直進運動精子 % | 非前進運動精子 % | 不動精子 %                       |
| 精子形態       | 正常 %        | 頭部異常 %    | 頸部異常 %                       |
|            | 尾部異常 %      | 細胞質小滴 %   | *合計は100%にならないことがあります。        |

環境中化学物質濃度 (バッチ結果)

ND:定量下限値未満

|                |                          |             |                   |
|----------------|--------------------------|-------------|-------------------|
| n-ヘキサン         | バッチ結果・ $\mu\text{g/m}^3$ | ベンゼン        | $\mu\text{g/m}^3$ |
| トルエン           | $\mu\text{g/m}^3$        | キシレン        | $\mu\text{g/m}^3$ |
| スチレン           | $\mu\text{g/m}^3$        | トリクロロエチレン   | $\mu\text{g/m}^3$ |
| テトラクロロエチレン     | $\mu\text{g/m}^3$        | クロロホルム      | $\mu\text{g/m}^3$ |
| 1,1,1-トリクロロエタン | $\mu\text{g/m}^3$        | 1,2-ジクロロエタン | $\mu\text{g/m}^3$ |
| 四塩化炭素          | $\mu\text{g/m}^3$        | p-ジクロロベンゼン  | $\mu\text{g/m}^3$ |
| 酢酸エチル          | $\mu\text{g/m}^3$        | 酢酸ブチル       | $\mu\text{g/m}^3$ |
| n-ブタノール        | $\mu\text{g/m}^3$        | メチルエチルケトン   | $\mu\text{g/m}^3$ |
| メチルイソブチルケトン    | $\mu\text{g/m}^3$        | 臭化メチル       | ppm               |

氏名 殿

標準値をはずれた項目に関しては、赤矢印で示してあります。  
 一回だけの検査データですので、標準値をはずれたからといって即病気というわけではありません。  
 なお、検査の内容の詳細につきましては、別紙をご覧ください。  
 この検査結果に疑問がある方は、山野・上島またはかかりつけの医師までお問い合わせ下さい。

総合コメント

|        |
|--------|
| 総合コメント |
|--------|

元気度チェックリスト判定

|            |               |
|------------|---------------|
| 骨粗しょう症     | 骨粗しょう症コメント    |
| 糖尿病        | 糖尿病コメント       |
| 血液どろどろチェック | 血液どろどろコメント    |
| 睡眠時無呼吸症候群  | 睡眠時無呼吸症候群コメント |
| 肝臓危険度      | 肝臓危険度コメント     |
| 歯周病        | 歯周病コメント       |
| 仕事のストレス度   | 仕事のストレス度コメント  |

骨密度

|     |         |
|-----|---------|
| 骨年齢 | 骨密度コメント |
|-----|---------|

血液検査

|                     |  |   |
|---------------------|--|---|
| 過酸化脂質<br>(デタミナーLPO) | デタミ ナg/ml (標準値 0.0-1.3)  | 動脈硬化やからだの老化と関係する、体の中にたまった「酸化ストレス」です。  |
| 補体価 (CH50)          | 補体価 補 CH50/ml (標準値 25.0-48.0)  | からだの免疫力です。  |
| A/G比                | A/G A/ (標準値 1.2-2.0)   |   |
| 高感度CRP              | CRP CR ng/ml (標準値 1500以下)  | 体に隠れた炎症がないかどうかの検査です。  |
| アミラーゼ               | アミラ-ア IU/l/37℃ (標準値 50-170)  | 膵臓の機能です。  |
| 子宮腫瘍マーカー(CA125)     | CA1 CA U/ml (標準値 35.0以下)   | 卵巣の元気度です。(注意：これはがん検診に代わるものではなく、正常値であったとしても、がんでないという指標にはなりません。異常値がでた場合は、精密検査をおすすめします。) |
| 卵巣腫瘍マーカー(TPA)       | TPA TP U/l (標準値 70以下)  |   |
| 黄体形成ホルモン<br>(LH)    | LH(黄体 L mIU/ml<br>(標準値 卵胞期 2.29-16.93<br>排卵期 2.92-51.27<br>黄体期 0.90-19.38<br>閉経後 87.36以下 ) | 脳の下垂体でつくられる卵巣機能を調節するホルモンです。<br>月経周期により標準値は異なります。                                      |
| 卵胞刺激ホルモン<br>(FSH)   | FSH(卵 F mIU/ml<br>(標準値 卵胞期 3.01-14.72<br>排卵期 3.21-16.60<br>黄体期 1.47-8.49<br>閉経後 157.79以下 ) |   |
| エストラジオール<br>(E2)    | エストラ エ pg/ml<br>(標準値 卵胞期(前期) 20-85<br>卵胞期(後期) 25-350<br>排卵期 50-550<br>黄体期 45-300)          | 卵巣でつくられる女性ホルモンです。<br>卵巣の状態をあらわします。  |

## II-2. 有機リン系殺虫剤

上島通浩、高木健次、柴田英治、上山 純、鈴木 隆佳、  
齋藤 勲、五藤雅博、市原 学、日比初紀、王 海欄、岡村 愛、  
内藤久雄、李チュルホ、大谷勝己、滝 賢一、深谷幸生、  
大村 実

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と  
内分泌かく乱作用検出のための新たなバイオマーカーの開発

一 ヒト尿中ジアルキルリン酸濃度測定条件の検討および  
血中コリンエステラーゼ活性に与える混合曝露の影響 一

分担研究者

高木 健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

研究協力者

上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

斎藤 勲 東海コープ事業連合商品安全検査センター

研究要旨

昨年、一昨年、GC/MS 法による有機リン系殺虫剤の尿中代謝物—4種類のジアルキルリン酸—分析測定確立のための基礎検討を行い改良を加えた。今年度はそれをふまえて、GC/MS による方法の精度を更に高める為の各種検討—誘導体化・液相及び固相抽出法の改良・回収率向上のための pH 調整・前処理における抗酸化剤添加等—を行い、改良・発展させてより精度の高い測定法を開発した。確立された本法を用いて一般健康人の尿を実際に測定し、一般環境中での有機リン系化合物の曝露を評価した。またラットを用い、有機リン系殺虫剤の複合毒性の面から、(有機リン系+有機リン系)及び(有機リン系+カーバメート系)による血液コリンエステラーゼ (ChE) 活性への影響および ChE と肥満との関連についての基礎検討を行った。

測定法の検討結果より、抗酸化剤としての二亜硫酸ナトリウムを尿に添加することで DMTP および DETP の分解を十分に抑えることができ、濃縮時の pH は6に合わせて行うのがもっとも回収がよいことが明らかになった。さらに、これらの条件下においてサンプルの安定性を調べたところ、フロリジル・PSA・無水硫酸ナトリウムによる固相抽出を行うことで、室温で30時間以上安定であることがわかった。また、以上の至適条件を用いて DMP、DEP、DMTP、DETP それぞれの検量線を作成したところ、いずれも  $R^2 > 0.99$  の寄与率を得ることができた。検出限界は、5mlの尿を使用した場合、DMP 0.3 $\mu$ g/L、DEP 0.1 $\mu$ g/L、DMTP



および DETP 0.1 $\mu$ g/L であり、これまでに報告されている測定法よりも優れた感度を達成することができた。

一般健常人の尿(23 検体)を本研究で確立した測定系で測定したところ、その平均値は、DMP 28.8 $\mu$ g/L、DEP 5.0 $\mu$ g/L、DMTP 16.1 $\mu$ g/L、DETP 3.4 $\mu$ g/L であった。これらの結果より、今回我々が確立した測定系は、迅速かつ高感度で再現性よく尿中 DAP を測定でき、一般環境中における有機リン系化合物のヒトへの曝露評価に十分に適用できる、優れた測定法であることが示唆された。

有機リン系殺虫剤（フェニトロチオン、ダイアジノン）のラットを用いた血液コリンエステラーゼ活性への影響については、急性中毒期における有機リン系+有機リン系および有機リン系+カーバメート系の混合薬剤による ChE への阻害では血漿コリンエステラーゼ（PchE）の方が敏感に作用し、低下も速やかで、低下も血球コリンエステラーゼ（AChE）より大きい結果を示した。短期（亜急性）中毒期および急性中毒回復期においては有機リン系+有機リン系および有機リン系+カーバメート系の混合薬剤による両者では血球 AChE の方が低下率が大きい。したがってこのような場合の診断的用途には血球 AChE の方が優れていると思われた。なおカーバメート系農薬 1 剤では ChE への阻害が認められなかった一方、カーバメート系+有機リン系の混合薬剤では ChE への相乗阻害が認められたが、例数がすくなく結論を出すまでいたっていない。今後さらなる詳細な実験を進める予定である。

有機リン系殺虫剤ラットを用いた肥満と血液コリンエステラーゼ活性への影響については、急性中毒期（～3 日目）では AChE および PChE で体型からの活性への影響はみられないが、短期中毒期（亜急性：2 週～3 週目）では正常体重のラットに比して肥満のラットでは AChE が高めに現れる傾向が得られた。

## I. GC/MS を用いた有機リン系化合物尿中代謝産物の高感度測定法の確立と一般健常人の尿中濃度

### A. 研究目的

我々はヒト尿を対象に迅速、高感度かつ再現性のよい尿中有機リン酸系代謝産物濃度測定法の確立を目指し、尿中 DAP の至適抽出法、およびガスクロマトグラフィー/質量分析計

(GC/MS)測定条件について各種検討を行い、さらに確立した測定系を用いて一般健常人の尿を実際に測定し、一般環境中での有機リン系化合物の曝露レベルのモニタリングを試みた。

### B. 研究方法

#### 1.材料

試薬

Dimethylphosphate

tetramethylammonium salt (DMP)

- 【林純薬工業】
- Diethyl phosphate (DEP)
- 【林純薬工業】
- Dimethylthiophosphate ammonium salt (DMTP)
- 【林純薬工業】
- Diethylthiophosphate ammonium salt (DETP)
- 【林純薬工業】
- Dibutylphosphate (DBP, 内部標準物質)
- 【関東化学】
- (以上の物質はすべてメタノールに溶解して使用した)
- $\alpha$ -Bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluene (PFBBr)
- 【林純薬工業】
- 塩化ナトリウム 【和光純薬工業】
- 無水硫酸ナトリウム
- 【和光純薬工業】
- 炭酸カリウム 【関東化学】
- ジエチルエーテル 【関東化学】
- acetonitril 【関東化学】
- n-hexane 【関東化学】
- toluene 【関東化学】
- acetone 【関東化学】
- Florisil PR 【和光純薬工業】
- BONDESIL-PSA 【GL science】
- Ascorbic acid 【関東化学】
- Sodium disulfite (SOD)
- 【関東化学】
- Pyrogallol 【米山薬品工業】

## 2. GC/MS システム(PerkinElmer 社製 Turbo Mass システム)

### • GC の条件

カラムは DB-5MS(30 m×0.25 mm、厚さ 1.0  $\mu$ m、J&W Scientific, Folsom, CA, USA)を使用した。温度条件は、70

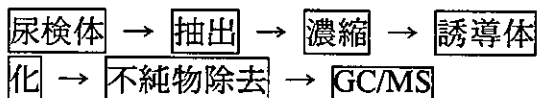
°C(1分)-5 °C/分で 220 °C まで上昇-15 °C/分で 280 °C まで上昇-280 °C (5分)、注入口:250 °C とし、キャリアガスはヘリウム(純度 99.999 %、流量は 1 ml/min)を用いた。注入量は 1  $\mu$ l とした。

### • MS の条件

イオン源:250 °C、電子イオン化(EI)法:70 eV、界面温度:300 °C とし、TIC (Total Ion Chromatogram)法および SIM (Selected Ion Monitoring)法で分析した。各 DAP の検出は、質量/電荷比(m/z) DMP:110、DEP:258、DMTP:110、DETP:213 で行った。

## 3. 至適条件の設定

基本的な測定系の流れは以下の通りである。



尿検体 5 ml に内部標準物質(I.S)である 1 mg/L DBP 溶液を 20  $\mu$ l、塩化ナトリウム 4 g、6 N 塩酸 1 ml、ジエチルエーテル/アセトニトリル(1:1 v/v) 5 ml を加え、5 分間攪拌した後、3000 g で 5 分間遠心(4 °C)を行い、上清を別のスクリー蓋付き試験管に移した。尿検体にもう一度ジエチルエーテル/アセトニトリル 5 ml を加えて同様に攪拌、遠心し、上清を 1 回目の上清と同じ試験管に移した。35 °C のヒートブロック上で窒素ガスを噴きつけ、蒸発乾固させた。乾固後、試験管にアセトニトリル 1 ml、PFBBr 50  $\mu$ l を

加えて恒温槽にて反応を行った。その後、蒸留水 4.5 ml、ヘキサン 4.5 ml を加えて攪拌、遠心し、上清（ヘキサン層）を別の試験管に移し、この操作を 2 回繰り返した。ヘキサンは窒素ガスを用いて蒸発乾固させた。残渣をトルエン 100  $\mu$ l で溶解し、GC/MS を用いて DAP 濃度を測定した。

### 1) 誘導体化時の温度および時間についての検討

DAP の誘導体化には PFBB<sub>r</sub> を用いた。PFBB<sub>r</sub> による誘導体化では、DMTP と DETP は室温あるいは高温において速やかに反応するが、DMP と DEP は高温で反応させる必要がある。反応溶媒であるアセトニトリルの沸点は 82  $^{\circ}$ C であるため、DAP を迅速に誘導体化させる温度として沸点にちかい 80  $^{\circ}$ C を用いて DAP の誘導体化産物の生成量と反応時間を検討した。1 mg/L DMP、DEP、DMTP、DETP、DBP を 50  $\mu$ l ずつスクリー蓋付き試験管にとり、PFBB<sub>r</sub> 50  $\mu$ l、アセトニトリル 1 ml、炭酸カリウム 20 mg を加えて、80  $^{\circ}$ C の恒温槽(0-180 分)にて誘導体化を行い、各 DAP を GC/MS を用いて測定した。

### 2) 抗酸化剤についての検討

DMTP および DETP は高温条件下で反応させると DMP および DEP に分解されやすいことは既に報告されており(図-1)、我々の予備検討からも 80  $^{\circ}$ C での誘導体化反応ではそれらの

分解が確認できている(図-4A)。そこで、この分解を防ぐべく各種抗酸化剤の DMTP および DETP の分解抑制効果について検討し、尿中 DAP 測定に至適な抗酸化剤を選定した。尿 5 ml に 1 mg/L DMTP および DETP を 50  $\mu$ l ずつ加えたものに、抗酸化剤として、アスコルビン酸、SOD および pyrogallol を 50 mg ずつ加え、以後、基本操作に基づいて偽 DMP および偽 DEP の産生量を比較することにより、抗酸化剤の効果について検討した。

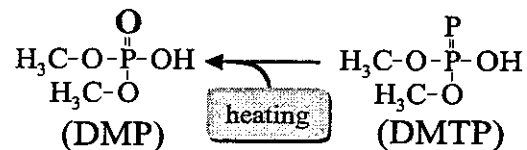


図-1 熱による DMTP から DMP への分解

### 3) 濃縮時の溶液 pH についての検討

尿 5 ml に 1 mg/L DMP および DEP を 50  $\mu$ l ずつ加えたもの、DMTP および DETP を 50  $\mu$ l ずつ加えたものを用いて検討を行った(DMTP および DETP の分解による偽 DMP および DEP の混入を避けるため)。抽出液の pH は濃縮前に添加する炭酸カリウムの量を変えて(0、5、10、15 および 20 mg)それぞれ(pH 2、3、4、6 および 8)に設定して、基本操作に基づき各 DAP を測定した。

### 4) 誘導体化後に行う精製操作のクロマトグラフおよび調整サンプルの安定性に対する効果

尿 5 ml に各 1 mg/L DAP を 50  $\mu$ l ずつ添加して、1)2)3)で得た至適条件下

で検体の前処理を施し、誘導体化後にカラム(図-2)を用いた精製過程を追加し、クロマトグラフおよびサンプルの安定性について比較検討した。

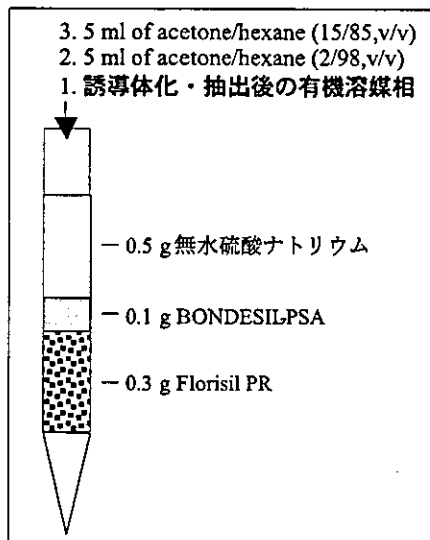


図-2 精製カラムの構成

誘導体化された各 DAP はヘキサンによって抽出された後、そのヘキサンをカラムに通すことにより吸着剤に保持される。次にアセトン/ヘキサン(2:98 v/v) 5 ml で不純物を溶出した後、アセトン/ヘキサン(15:85 v/v) 5 ml にて誘導体化された各 DAP を溶出して窒素ガスにて蒸発乾固を行いトルエン 100  $\mu$ l で溶解後、GC/MS にて分析を行った。これらのサンプルをサンプル調整 36 時間後まで経時的に分析し、クロマトグラフのピーク形状や各 DAP の安定性を観察し、カラム精製の効果について検討した。

#### 4. 再現性に関する検討

尿 5 ml に各 DAP を加え(1-500  $\mu$ g/L)、

以上からの検討から得られた至適条件を用いた DAP 測定系にて測定し検量線を作成した。また、尿 5 ml に各 DAP を 50  $\mu$ g/L となるように添加し、回収率、日内変動(n=6)および日差変動(n=5)について検討した。検出限界は signal-to-noise ratio=3 を用いて算出した。

#### 5. 一般健常人の尿中 DAP の測定

本研究で見出した至適尿 DAP 測定条件図-8 を用いて一般健常人の尿中 DAP を測定した。対象者は愛知県在住の一般成人男性(36.5 $\pm$ 11.1 歳; mean  $\pm$ SD) 23 名で、一時尿を採取し、得られた尿検体を 10 ml のポリプロピレンチューブ試験管に移し、尿中 DAP 分析まで-80  $^{\circ}$ C で保存した。対象者からは、有機リン系化合物尿中代謝産物測定に関する同意を得た。さらに本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会の審査で承認を得た。

#### 1. 尿 DAP 測定の至適化

##### 1) 誘導体化反応時の温度および時間に関する検討

多くの有機リン系化合物は尿中に DAP として排出されるが、通常、リン酸塩の形では極性が高く気化しないため GC/MS で測定できない。そこで、誘導体化処理を行うことによって気化しやすい化合物に変換してから GC/MS 測定に供する必要がある。誘導体化反応時間による各 DAP の peak-area は図-3 に示す通りである。チオリン酸型である DMTP および

DETP は誘導体化剤である PFBBr と瞬時に反応が起きていることがわかる。さらに各 DAP とともに反応開始 15 分後にはすでに誘導体化反応が最大に達している。反応開始 15 分以降、特に DAP の誘導体化物質の生成量に大きな変化はなかった。ゆえに、PFBBr を用いた DAP の誘導体化反応は 30 分間、80 °C でインキュベーションすることにより、効果的に行われていることが明らかとなり、この誘導体化反応条件を至適条件とした。

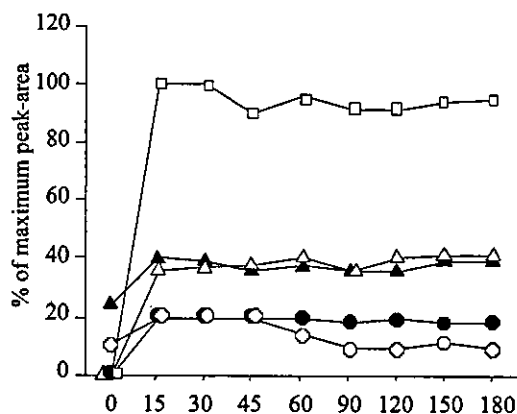


図-3 誘導体化反応時間による生成物量の変化

●:DMP,○:DMTP,△:DEP,▲:DETP,□:DBP

## 2) 抗酸化剤について

図-4A で示すように、DMTP、DETP のみを尿に添加し、抗酸化剤を添加していない測定系では DMP、DEP が多く検出されていることから DMTP、DETP から DMP、DEP に変換されていることがわかる。図-4B に示すように、アスコルビン酸および SOD を添加した測定系では DMTP および DETP

からの DMP、DEP の産生を抑制しているが、Pyrogallol にはその効果が見られなかった。また、アスコルビン酸を用いた測定系では GC/MS 分析におけるクロマトグラムに夾雑ピークが多く確認された (data not shown)。現時点ではアスコルビン酸を尿に添加することによりなぜ夾雑ピークが出現したかわからないが、既に報告されている論文でも同じような現象が発生している(Ueyama ら, 2003)。残念ながら、誘導体化時における DMTP、DETP から DMP、DEP への変換に関する検討を行った報告は非常に少ない。Hardt ら(2000)は、これらの変換は約 10 %であったと記載している。今回我々は抗酸化剤 SOD を事前に尿へ添加することにより、誘導体化時における DMTP、DETP から DMP、DEP への変換を 1 %以下に抑制することができた。ゆえに我々は SOD を尿中 DAP 測定法における至適抗酸化剤と判断し、以下の実験では 10 mg SOD/L of urine を用いることとした。

## 3) 濃縮時の溶液 pH について

抽出溶媒の pH を炭酸カリウム各種調整し、pH 6 で得られた peak-area を 100 %として、各 DAP の回収を比較した(図-5)。すべての DAP について、pH 2、pH 3、pH 4 のときは pH 6 および pH 8 と比べその peak-area は低値であり、溶媒の pH を調整することにより DAP の検出感度は変化すること

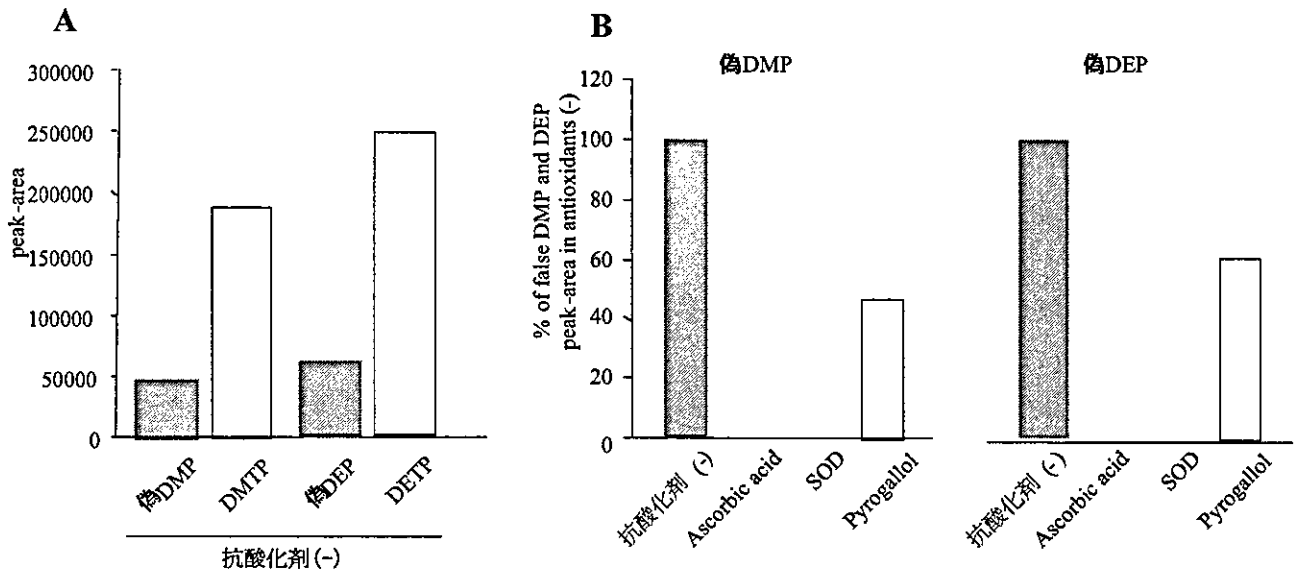


図-4 (A)誘導体化時における DMTP および DETP からの偽 DMP および偽 DEP 産生量 (n=3), (B) 偽 DMP および偽 DEP 産生量に対する各種抗酸化剤の効果(n=3)

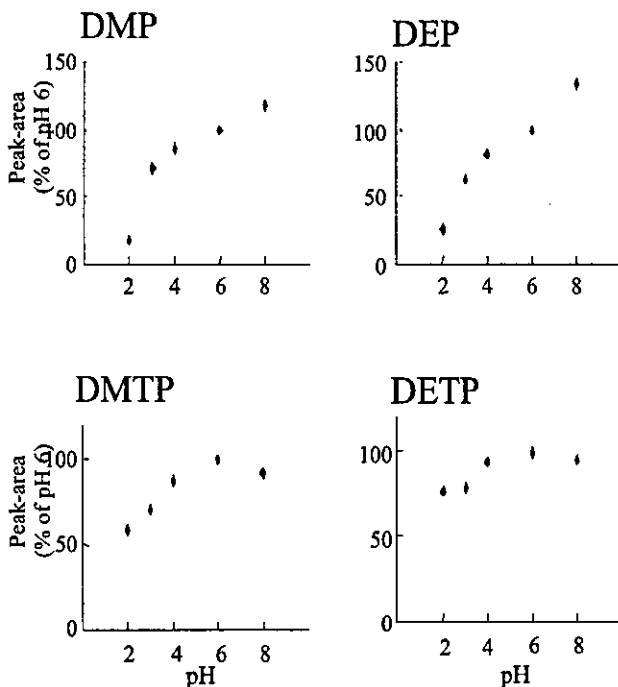


図-5 DAP 抽出溶媒 pHがおよぼす各 DAP 回収に対する影響(n=3)

が明らかとなった。抽出溶媒を pH 8 に調整した場合、DMP および DEP でその平均値は pH 6 よりも高値を示し

たが、DMTP および DETP では低値となる傾向があった。しかし、データには示していないが、pH 8 に調整した場合、各 DAP の回収の再現性が pH 6 に比し乏しいため、pH 6 が至適条件と設定した。これらの現象の原因は明らかにはできていないが、可能性としては各 DAP において pH 2 ではその回収が劇的に低値であることから、DAP の有する  $pK_a$  (pH 1-2)(Daughton ら, 1976)が関与している可能性が考えられるが、詳細は不明である。以後の実験において、窒素ガスにて濃縮される抽出溶媒は炭酸カリウム 15 mg の添加により pH 6 へ液性を調整することとした。

#### 4) 精製操作の効果について

各種 DAP を誘導体化しヘキサン抽出を施した後、調整サンプルの不純物を取り除くために各種吸着剤を用

いたカラム精製を行った。カラムには硫酸ナトリウム、弱陰イオン交換樹脂である PSA およびフロリジルを充填したものをを用い、脱水、未反応 PFBBr および脂質系の不純物除去を目指した。その結果、カラム精製を施したことによりそれまで出現していたクロマトグラフ中の未知ピークが激減し(data not shown)、基線の安定化も実現した。

尿中 DAP の安定性に関しては-80

°C で 12 ヶ月以上安定であることは報告されているが(Nutley ら, 1993)、調整サンプルの経時的安定性について検討した報告はほとんどないため、我々は調整サンプル中の各 DAP の安定性につ調整直後のものを 100 % として、サンプル調整 36 時間後までの変化を比較した(図-6)。カラム精製を施したものは、すべての DAP について室温において 36 時間以上安定であったが(CV %:1.7-3.1 %)、カラム精製

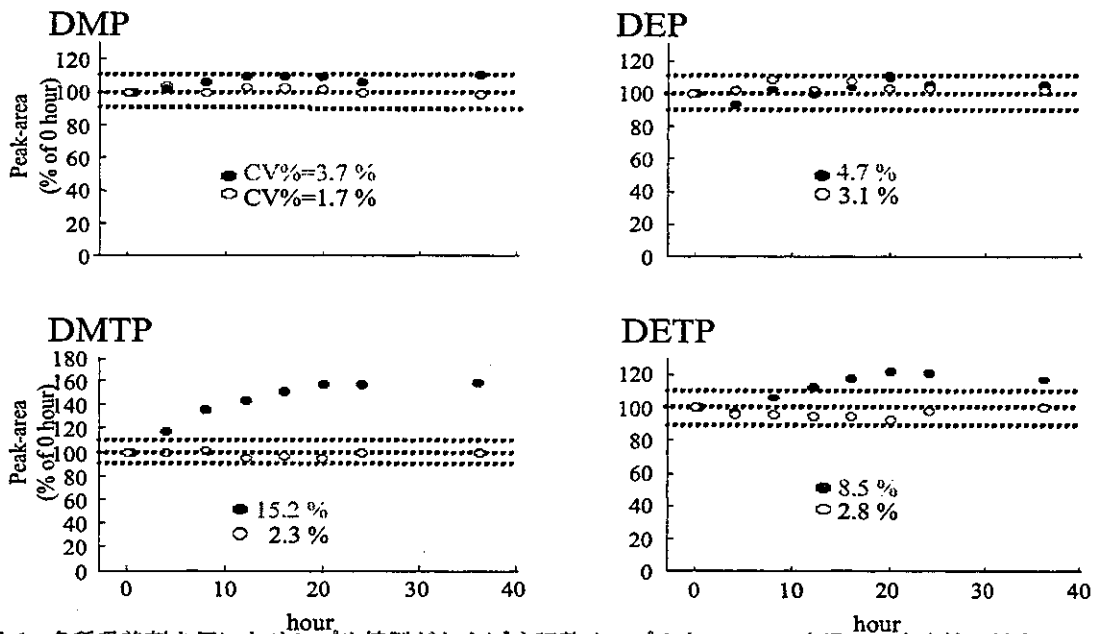


図-6 各種吸着剤を用いたサンプル精製がおよぼす調整サンプル中 DAP の室温での安定性に対する(n=3), 効果○;カラム精製あり●;カラム精製なし

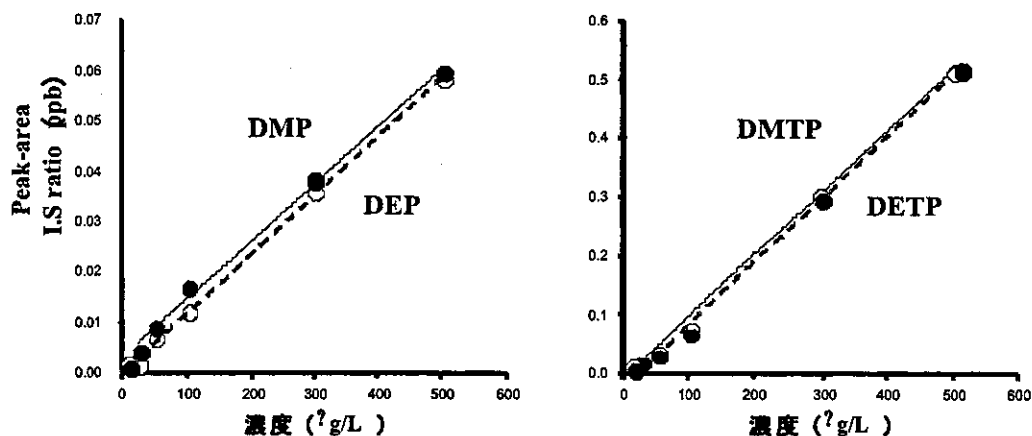
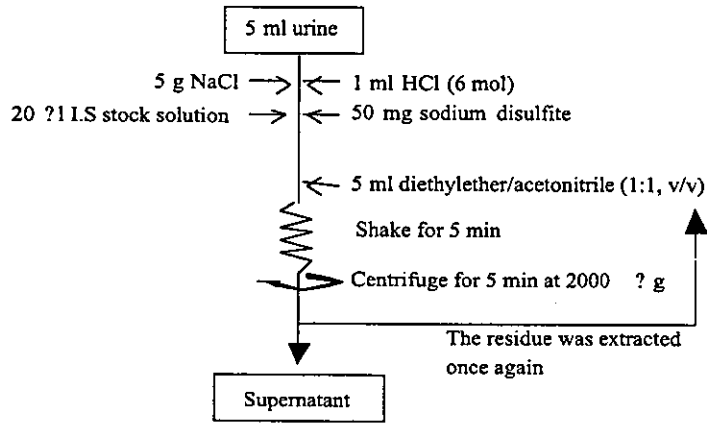
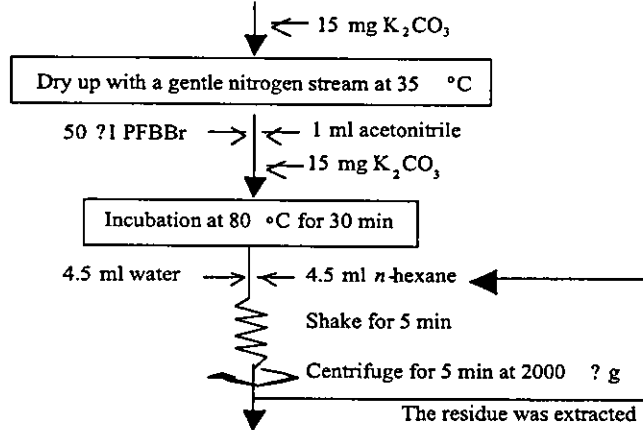


図-7 尿中に各種 DAP を添加した時の検量線

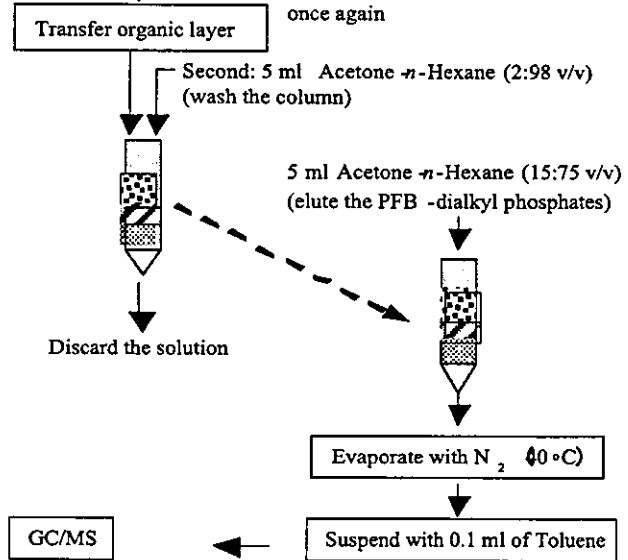
**1. Extraction**



**2. Derivatization**



**3. Clean-up**



**3. Measurement**

図-8 尿中 DAP 測定法のフローチャート



を施さない場合はDMTPおよびDETPで経時的な上昇がみられた(CV %:>8.5%)。さらにカラム操作を加えてクロマトグラフ中の夾雑ピークを減少させたことにより、GC/MS分析に費やす時間は既報と比較し飛躍的に短縮させることができた。以上の結果に加え、PFBBBrはDAPとの反応性はよいものの催涙性が強いいため、これを含む溶液は非常に取り扱い

にくく、さらにGC/MS機器装置にも悪影響を与えるということが既に報告されているため、PFBBBrも除去できるカラム精製は、サンプル調整中で有用な操作過程であることが示唆された。

5) 本測定法の精度に関して

各DAPの検量線(1-500 µg/L)を作成したところ、すべて良好な直線性を

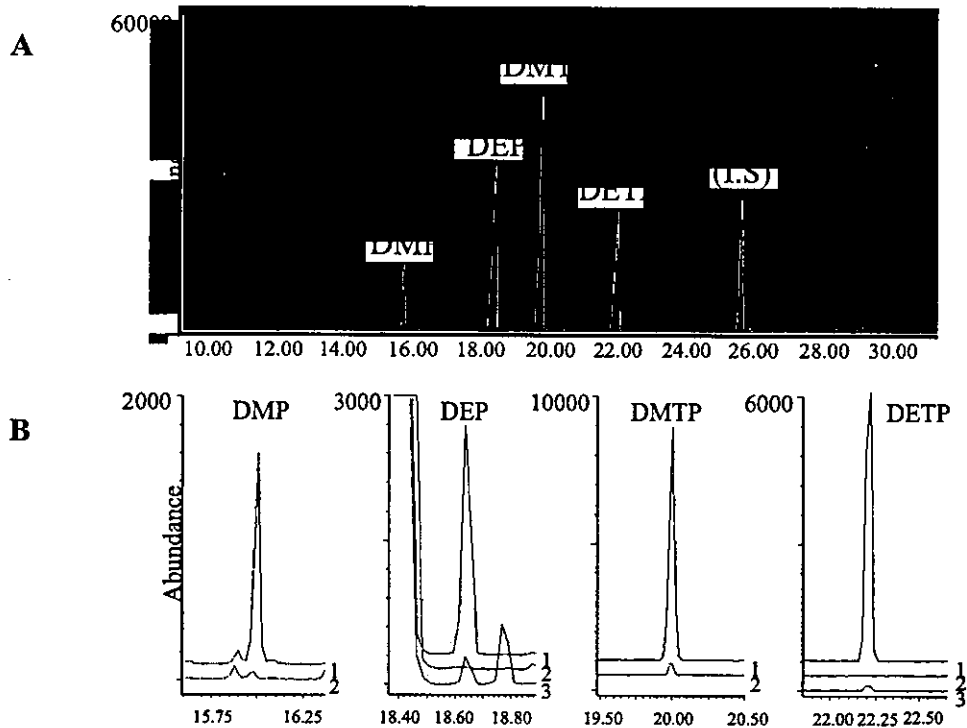


図-9 (A)尿中DAPを抽出・精製し、GC/MS TIC mode(m/z 80-350)で分析して得られた典型的なクロマトグラム (10mg DAP/L,urine), (B)SIM mode (m/z 110,258,110,213 および 335)を使用したクロマトグラム。

得ることができた(図-7)(Table 1)。検出限界(LOD)は、DMP:0.3 µg/L、DEP:0.05 µg/L、DMTP:0.1 µg/L および DETP:0.1 µg/L であった。日内変動(CV %)は、DMP:10.5、DEP:13.8、DMTP:10.0、DETP:8.4 であり、日差

変動(CV %)は、DMP:12.2、DEP:13.3、DMTP:9.2、DETP:14.2 であった。回収率(%)は、DMP:60.5、DEP:82.7、DMTP:91.4、DETP:92.4 であった。これらのまとめを Table 1 に示す。

Table 1. 本測定法による尿中AP測定における日内変動、日差変動、回収率および検量線

| Dialkyl phosphates | 日内変動<br>Pooled urine spiked<br>concentration 50 µg/L (n=6) |              | 日差変動<br>Pooled urine spiked<br>concentration 50 µg/L (n=5) | 検量線<br>(1, 5, 20, 60, 100, 300 and 500 µg/L) |                                |
|--------------------|--|--------------|--|--|--------------------------------|
|                    | Inprecision (%)  | Recovery (%) | Inprecision (%)  | Linear range<br>(µg/L)                       | Correlation<br>coefficient (r) |
| DMP                | 10.5   | 60.5         | 12.2   | 1-500  | 0.9533-0.9992                  |
| DEP                | 13.8   | 82.7         | 13.3   | 1-500  | 0.9968-0.9976                  |
| DMTP               | 10.0   | 91.4         | 9.2  | 1-500  | 0.9886-0.9992                  |
| DETP               | 8.4  | 92.4         | 14.2   | 1-500  | 0.9836-0.9974                  |

日内変動、日差変動および回収率のデータは既報(Hardt ら, 2000; Barr ら, 2004; Oglobline ら, 2001)と比較し、ほぼ同じか少し劣っている。しかし、他の GC/MS を使用した尿中 DAP 測定法よりもいずれの DAP 測定においても約 10 倍、検出感度を向上させることができた。これらの結果は、本測定の至適条件である抽出溶媒濃縮時における至適 pH を検討したこと、さらにカラム精製過程を加えることにより、夾雑ピークが減少し、さらにクロマトグラムの基線が劇的に安定化したことに起因すると考えられる。これまでの基礎的検討で得られ

た至適尿中 DAP 測定法の詳細を図-8 に示す。

## 2. 一般健常人の尿中 DAP 測定

本研究で検討した尿中 DAP 測定法を用いて、職業的に有機リン系化合物の曝露を受けていない一般健常人の尿(23 検体)を測定したところ、その平均値は、DMP:28.8 µg/L、DEP:5.0 µg/L、DMTP:16.1 µg/L、DETP:3.4 µg/L であった(Table 2)。尿中 DAP 測定における典型的なクロマトグラムを図-9 に示す。これらの結果より、我々は日頃から有機リン系化合物を体内に吸収していることが明らかとなっ

た。これらのデータは過去にイタリア(Aprea ら, 1996)、ドイツ(Hardt ら, 2000)、アメリカ(Barr ら, 2004)で報告されている値と類似しており、尿中 DAP の測定のみでは体内に吸収された化合物の同定や定量は困難であるが、日本においても同じような量の

有機リン系化合物の曝露が起こっていることがわかる。主な有機リン系化合物の吸収経路は明らかではないが、都心部では家庭で使用する殺虫剤や食事中から有機リン系化合物を摂取する可能性が高いという報告もある(Gunderson ら, 1995)。

Table 2. 職業的な有機リン系化合物の曝露を受けていない一般健康人男性 (23人) の尿中DAP濃度

| Dialkyl phosphates | Detection frequency (%) | Mean (? g/L of urine) | Median (? g/L of urine) | Maximum (? g/L of urine) |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| DMP                | 100                     | 28.8                  | 17.7                    | 127.0                    |
| DEP                | 87                      | 5.0                   | 1.0                     | 30.6                     |
| DMTP               | 89                      | 16.1                  | 1.2                     | 191                      |
| DETP               | 75                      | 3.4                   | 1.4                     | 32.7                     |

#### 結語

以上の結果より、我々が各種検討を施した dialkyl phosphate 測定法は迅速、高感度かつ精度よく尿中 DMP、DEP、DMTP および DETP の測定ができる優れた測定法であることが示唆された。

#### 展望

我々は今回確立した高感度尿中 DAP 測定法を用いて、有機リン系化合物の長期的な低曝露が及ぼす生体への影響に関する研究を進める予定である。また、ジクロロボス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンなどの有機リン系化合物を日常的に取り扱う作業者の曝露の実態

と健康状態の関係を明らかにすべく、それら曝露作業者の協力を得て尿中 DAP 測定も実施する予定である。

#### 文献

- Aprea, C. et al., *J. Anal. Toxicol.* **20** (1996), p. 559.
- Bardin, G. et al., *Arch. Intern. Med.* **154** (1994), p. 1433.
- Barr, B. et al., *Environ. Health. Perspect.* **112** (2004), p. 186.
- Bravo, R. et al., *J. Anal. Toxicol.* **26** (2002), p. 245.
- Daughton, G. et al., *J. Agric. Food. Chem.* **24** (1976), p. 236.
- Gunderson, L. et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **78** (1995), p. 1353.
- Hardt, J. and Angerer, J., *J. Anal. Toxicol.*

24 (2000), p. 678.  
Maroni, M. et al., *Toxicol. Lett.* **33** (1986),  
p. 115.  
Nutley, P. and Cocker, J., *Pest. Sci.* **38**  
(1993), p. 315.  
Oglobline, N. et al., *Analyst.* **126** (2001),  
p. 1037.  
Shafik, M. et al., *J. Agric. Food. Chem.*  
**19** (1971), p. 885.  
Steenland, K. et al., *Am. J. Public. Health.*  
**84** (1994), p. 731.  
Ueyama, J. et al., *J.Chromatogr. B.* **798**  
(2003), p. 35.

## II 有機リン系農薬の農薬毒性 —血液コリンエステラーゼ活性 への影響について—

### A. 研究目的

農薬の有用性は、害虫に対する選  
択毒性に基盤をおいて開発されたも  
のであるが、完全特異性・選択性を  
期待することは困難であり、一定量  
以上の暴露があった場合における人  
体への有害性は容易に考えられる所  
である。

今日使用されている農薬は、それ  
らの化学構造から4種類に大別され  
ている。

1. 有機リン剤 2. 有機塩素剤 3.  
有機フッ素剤 4. カーバメート剤

この内、有機リン剤とカーバメー  
ト剤の中毒時には脊椎動物のコリン  
エステラーゼ活性が阻害される事は  
周知の通りであり、コリンエステラ  
ーゼ活性の測定は農薬研究に欠かせ  
ない項目となっている。コリンエス  
テラーゼ (ChE) は、コリンエステル  
をコリンと有機酸に加水分解する酵  
素で、生体内には大別すると2種類  
があるとされる。1つは赤血球中に  
高濃度に分布するもので、アセチル  
コリン (ChE) をはじめごく少数のコリ  
ンエステルを基質とする酵素で、ア  
セチルコリンエステラーゼ (true-