

201130013A

平成23年度厚生労働科学研究費補助金

労働安全衛生総合研究事業

リスク評価のためのバイオロジカル・モニタリング手法の開発に関する研究

平成23年度研究報告書

平成24年5月

| | | |
|-------|----|----|
| 主任研究者 | 圓藤 | 吟史 |
| 分担研究者 | 山中 | 健三 |
| | 山野 | 優子 |
| | 市場 | 正良 |

目 次

| | |
|------------------------------------|----|
| I. 総括研究報告 | |
| リスク評価のためのバイオロジカル・モニタリング手法の開発に関する研究 | 2 |
| 圓藤吟史 | |
| 山中健三 | |
| 山野優子 | |
| 市場正良 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. アルシンの曝露評価に関する研究 | 16 |
| 圓藤吟史 | |
| 山中健三 | |
| 山野優子 | |
| 2. ジメチルアセトアミドのBMの検討 | 27 |
| 市場正良 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 31 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 32 |

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

リスク評価のためのバイオロジカル・モニタリング手法の開発に関する研究

研究代表者 圓藤吟史 大阪市立大学大学院医学研究科産業医学 教授

研究要旨

経皮吸収が無視できない化学物質の曝露評価にはバイオロジカルモニタリング(BM)法による評価が必要とされる。近年、低濃度の作業環境におけるアルシン中毒や N,N-ジメチルアセトアミド(DMAC)中毒が報告され、これらには経皮吸収が関与している可能性がある。そこで、本研究は、アルシンおよび DMAC について、リスク評価に有用となる BM 法の開発を実施する。

アルシンについては、①適切かつ安定な濃度のアルシンガスを発生する装置を作製し、②マウス血液（保存血）試料を用いた *in vitro*曝露による影響、ならびに③マウスに経皮または全身曝露を行い、④溶血などの生体影響との量反応関係を明らかにした。

結果は、①0.5～5 mgのヒ素を中性NaBH₄で還元して、容積約2,500cm³(2.5L)の曝露装置内に40-300ppmのアルシンを発生させることができた。②*in vitro*アルシン曝露したマウス血液試料では溶血を示し、さらに血球ヘモグロビン(Hb)の蛋白部分へのヒ素付加体形成の可能性が示唆された。③マウスへのアルシン全身曝露予備実験を行った結果、200ppm5分間全身曝露では曝露直後から溶血が認められ、6時間ではヘマトクリット(Ht)値はコントロールの30%まで減少した。90～100ppm5分間曝露では曝露6時間後において僅かな溶血が、24時間後においては顕著な溶血が観察された。さらに40ppm5分間曝露においても曝露24時間後には同程度の溶血が見られた。一方、200ppmアルシン5分間曝露による経皮曝露予備実験では、軽微な溶血に止まった。以上の結果から、アルシン曝露本実験では40～>200ppm以上のアルシンへの5分間曝露を基本とした。④前項③の結果を踏まえて、アルシン全身または経皮曝露本実験を実施した。約300ppm5分間全身曝露では曝露直後から溶血が認められ、Ht値は3時間後に曝露前の30%、6時間後では16%にまで減少し、

溶血はアルシン曝露後速やかに進行することが窺われた。⑤約300 ppm5分間の経皮曝露では、極めて軽微な溶血であった。⑥約90 ppm5分間の4回反復曝露の場合、4回目曝露後12時間においてHt値は24.4%にまで減少し、アルシン曝露合計量と溶血作用の間に正の相関があった。⑦以上のマウスの臓器はホルマリン固定で保存しており、平成24年度に病理組織所見を得る予定である。

N,N-ジメチルアセトアミド (DMAC) については、皮膚吸収があることから、作業者の正確なばく露量を知るために生物学的モニタリングによる曝露評価を開発する。国内におけるN-メチルアセトアミド(NMAC)測定の実状を知るために、労働衛生検査精度向上研究会会員の検査機関に対し調査したところ、NMAC測定は3社が受託しており、年間1300件程度の測定が確認された。濃度レベルとして、ACGIHのBEIである30mg/Cr以上の検体が7%程度存在していた。また、DMACはN-ジメチルホルムアミド(DMF)の混合物として使用されている可能性があるため、DMF代謝物のN-メチルホルムアミド (NMF) 測定のカロマトグラムにNMACのピークが含まれているかどうか、も調査した。その結果、0.8%の検体にNMACピーク(3mg/l以上)が確認された。

クロスチェック予備調査として、会員6機関に対し曝露尿2検体のNMAC測定を行ったところ、変動係数(CV)は、低濃度試料で24.4%、高濃度試料で7.1%であった。NMFとNMACのリテンションタイムは各施設とも近接していた。

NMAC分析法の検討では、注入口の熱によって代謝物であるDMAC-OHが熱分解しNMFに変化しているとされる。注入口温度を変えて、DMAC-OHの変化量を調べたところ、注入口温度175℃でプラトーとなった。したがって、注入口温度150℃では未変化体のDMAC-OHも含まれることからNMAC測定値に影響を及ぼすことが示唆された。

以上のことから、代謝経路をふまえたBMとしての適切な測定対象物質はNMACかそれ以外かを検討し、測定法を開発する。それらの精度管理を行った上で、曝露作業者の尿中代謝物濃度測定を実施し、リスク評価に必要なBM法を確立する。

研究分担者

山中健三・

日本大学薬学部環境衛生学・教授

山野優子・

昭和大学医学部衛生学・准教授
市場正良・

佐賀大学医学部社会医学・教授

A. 研究目的

化学物質のリスク評価の柱である曝露評価には、個人曝露量の測定または作業環境測定が使われているが、経皮吸収が無視できない化学物質においては、これらは吸収量を正確に反映していないことから、バイオロジカルモニタリング(BM)法による曝露評価が必要とされる。特に近年、低濃度の作業環境におけるアルシン中毒や N,N-ジメチルアセトアミド(DMAC)中毒が報告され、これらには経皮吸収が関与している可能性がある。

(1) アルシン曝露実験

そこで、本研究は、アルシンについて、リスク評価に有用となるBM法の開発を実施する。

(2) DMACの適切なBM法の開発

次に、全衛連の労働衛生検査精度向上研究会において、BM法を開発できれば、全国の労働者のBMが可能となる。それ故、当該研究会の協力を得て、DMACの適切なBM法を開発する。DMACの生物学的許容値は米国と英国、ドイツの専門機関より勧告されているが、使われている測定法が古く、現在の方法では値が異なる可能性がある。また測定値が測定法や条件によ

って変動するであろう。リスク管理に用いるためには、代謝経路をふまえた測定対象物質の選択と測定法の吟味をする必要がある。測定対象物質と測定法を確立したうえで、参加機関における精度管理を実施する。

B. 研究方法

(1) アルシン曝露実験

イソフルラン吸入麻酔下において、ヘアレスマウス(Hos:HR-1)に対して、無機ヒ素を中性の NaBH_4 による還元で発生させたアルシニングガス(40—300 ppm)を全身及び経皮的に単回または反復曝露する。本実験は強制排気と除ガスができるドラフト内で行う。溶血をアルシン中毒の指標とし、血球、血清中の形態別ヒ素を経時的に測定することにより吸入または経皮吸収率を算出するとともに、アルシンの体内動態学的知見を得る。

① 予備実験I: *in vitro*溶血実験

ICR 雄性マウスの保存血(日本生物材料センター)を供試血液試料とした。

ヒ素分析法(ジエチルジチオカルバミン酸銀法: JIS K 0102)に準じて、2mg亜ヒ酸を塩酸と亜鉛末で還元しアルシニングガスを発生し、血液試料に10分間導入した。遠心分離後の上澄液を吸光分析用試料とした。上澄液の吸光度測定は、コントロールおよびアルシン曝露の直後、90分後、通気しながらの4群について、KR-PBSで50倍希釈して測定した。

② 予備実験: マウス曝露装置内でのアルシニングガスの発生

容積約 2.5L の曝露装置内で 5 mg、2 mg、0.5 mg の亜ヒ酸を中性 NaBH₄(1g)で還元しアルシンを発生させ、装置内アルシン濃度を北川式検知管で測定した。(図 1、図 2)

③ マウス予備実験 (単回曝露)

②項で述べた装置を用いて、ヒ素量として0.5、1.0、2.0、5 mgの亜ヒ酸を中性NaBH₄で還元してアルシンを発生させ、発生直後の容器中のアルシン濃度を北川式検知管で測定した。曝露時間は5分(約25°C)。その後、ヘパリン処理Ht毛細管(テルモ)へ尾静脈より採取した血液を経時的に導入し、Ht値を測定した。

④ アルシン曝露実験の方法

- ・マウス：Hos: HR-1 ヘアレスマウス、雄性、5週齢とした。コントロール1頭、アルシン曝露群は1群4頭とした。
- ・曝露装置容積：約 2.5 L
- ・ヒ素量として1または5 mgの亜ヒ酸を曝露装置内で中性 NaBH₄により還元してアルシンを発生させた。
- ・アルシン曝露はマウス1頭ずつイソフルラン麻酔下で全身ならびに頭部を除く全身(経皮吸収)を曝露装置内に入れ、アルシン発生後5分間曝露した。(図3)
- ・アルシン濃度測定：発生直後に北川式検知管で50mL採取。(25°Cで5-160ppmの範囲で測定可能)
- ・血液採取：経時的に尾静脈から、直接Ht毛細管(テルモ、ヘパリン処理済み)に採取し、Ht値を測定した。最終的にはイソフルラン麻酔下で

心臓により血液を採取し、全血ならびに遠心分離して得られた血漿を-80°Cで保存した。

- ・解剖により肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、中性ホルマリン固定した。
- ・組織切片作製ならびに病理学的評価は平成24年度に実施予定である。

(倫理面への配慮)

動物実験に関する倫理審査を日本大学において受け、承認された。

動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)」を遵守して実験を行った。

(2) DMACの適切なBM法の開発

DMACの国内での生産量、使用量、中毒事例、代謝、尿中代謝物測定法、測定事例に関して文献調査を行った。労働衛生検査精度向上研究会会員機関に対しクロスチェック予備調査を実施し、また現状のDMAC代謝物測定受託状況も調査した。

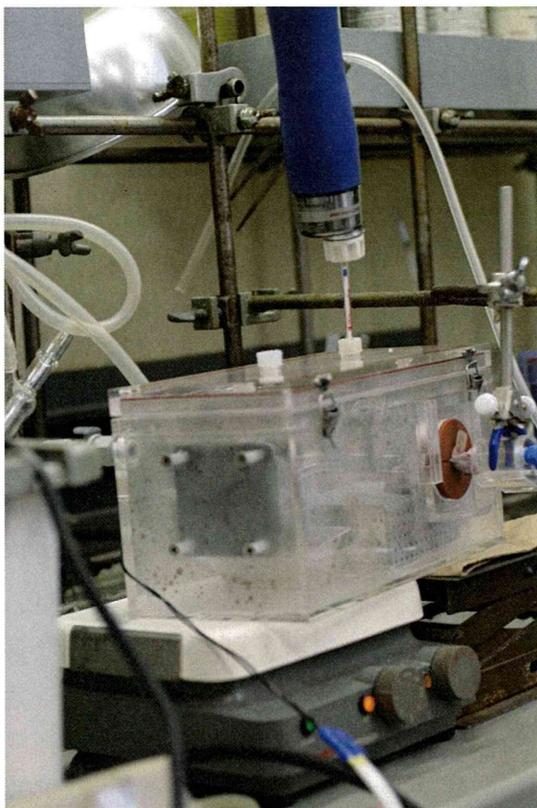


図1 曝露装置

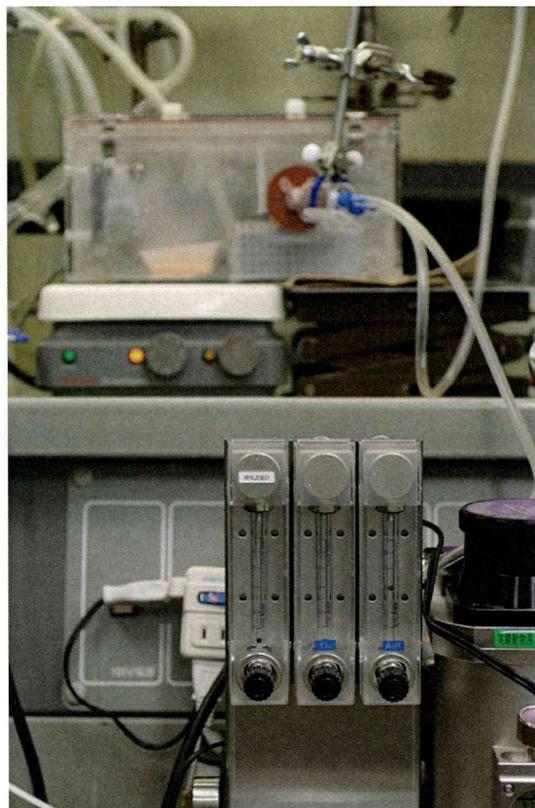


図2 曝露装置

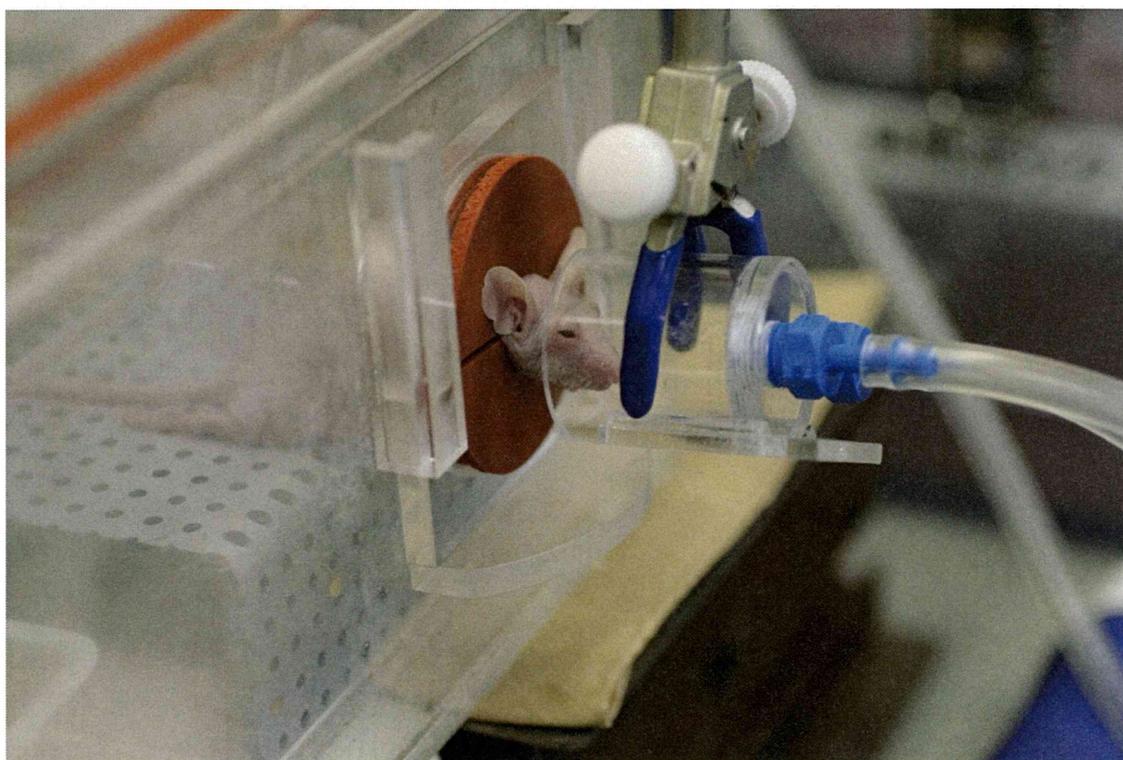


図3 麻酔下での曝露（経皮曝露）

C. 研究結果

(1) アルシン曝露実験

① 予備実験 (*in vitro*)

アルシンを曝露した血液試料は明らかに溶血による変色が見られ、変色は曝露直後よりも90分後の方が強く認められた。さらに空気に曝すことで速やかな変色影響が見られた (図4)。

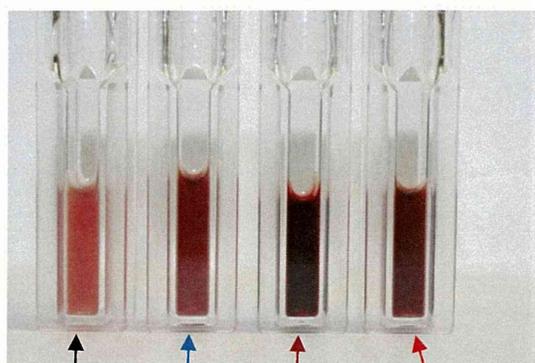


図4 アルシン曝露した溶血試料

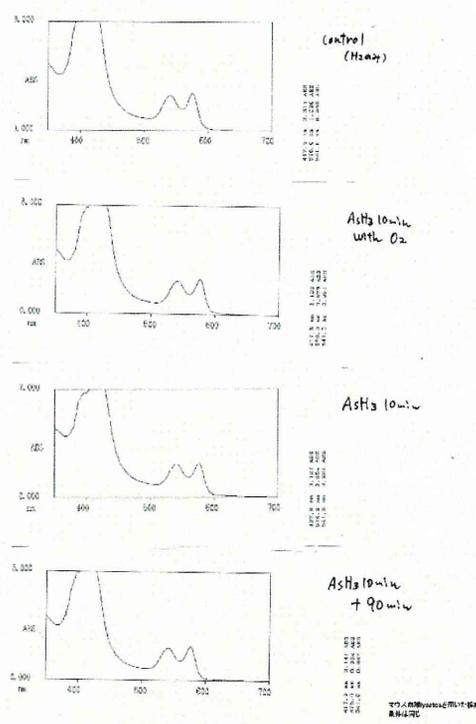


図5 溶血試料の吸光スペクトル

溶血試料の吸光スペクトルを測定した結果、ヘモグロビン (Hb) のヘム構造に反映するQバンドスペクトル付近の変化は認められず、Soret帯付近に変化が見られたことから、Hbのグロビン蛋白部分にアルシン付加体が形成されている可能性が示唆された (図5)。

② 予備実験：曝露装置内でのアルシンガスの発生

表1のような濃度が得られ、曝露後10分間はアルシン濃度は安定していることを確認できた。しかしながら、曝露装置内の湿度、温度等の僅かな変化で発生初期のアルシン濃度を一定に保つことが困難であることが判明した。そこで、装置内の発生初期アルシン濃度は各実験ごとに検知管で測定することとした。

表1 発生したアルシンガスの経時推移(ppm)

| min | 5 mg As | 2 mg As | 0.5 mg As |
|--------|---------|---------|-----------|
| 0min | 140 | 120 | 40 |
| 5min | 120 | 110 | 35 |
| 10min | 120 | 100 | 30 |
| 30min | 80 | 80 | 25 |
| 60min | 50 | 60 | 20 |
| 90min | 40 | | |
| 120min | 35 | 25 | 5 |
| 240min | 5 | | |

③ マウス予備実験I (単回全身曝露)

表2に発生直後の曝露容器内アルシン濃度、Ht値 (表3) ならびに溶血の程度 (図6および7) を示す。90-

100ppm曝露マウスは24時間後にHt値の減少が見られ、約1/2濃度の40ppmアルシン曝露マウスでも同様に24時間後にはHt値の減少が見られた。一方、200ppm曝露マウスでは、6時間後にHt値の顕著な減少が見られた。

溶血は、5 mg As (アルシン濃度200ppm)曝露マウスでは、直後に見られ、2 mg As (アルシン濃度100ppm)曝露マウスでは6時間後に認められた。

表2 発生直後のアルシン濃度

| As 量(mg) | アルシン濃度(ppm) | マウス体重(g) |
|----------|-------------|----------|
| 0.5 | 40 | 22 |
| 1 | 90 | 25 |
| 2 | 100 | 21 |
| 5 | 200 | 21 |

表3 Ht 値(%)

| アルシン曝露濃度 (ppm) | 曝露直後 | 3時間後 | 6時間後 | 24時間後 |
|----------------|------|------|------|-------|
| 0(control) | 50 | 54 | 54 | 47 |
| 40 | 49 | 55 | 49 | 39 |
| 90 | 51 | 50 | 48 | 38 |
| 100 | 54 | 49 | 48 | 34 |
| 200 | 40 | 39 | 7 | |

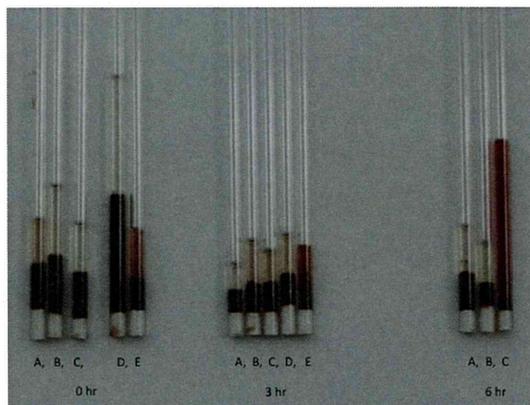


図6 1回全身曝露後のHt値の推移 (A: 0、B: 40、C: 90、D: 100、E: 200ppm アルシン曝露)

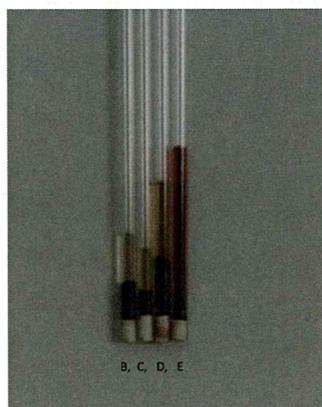


図7 単回全身曝露6h後のHt値 (B: 40、C: 90、D: 100、E: 200ppm アルシン曝露)

④ マウス予備実験II(単回経皮曝露)

Ht値でみると、6時間後にやや減少傾向がみられるものの、全身曝露に比べて極めて軽微であった。

⑤ マウス本実験I (単回全身および経皮曝露)

図8、図9に示すように、320ppmアルシンの単回全身曝露マウスでは目の周りが赤く、皮膚が紫色になってい

る。解剖所見では図10に示すように血尿が認められた。Ht値で見ると、3時間後には曝露前に比較して約30%に、6時間後では約16%まで減少し、溶血はアルシン曝露後も速やか進行することが窺われた(表5)。一方、310 ppmアルシン単回経皮曝露では6時間後においてもHt値の減少は認められなかった(表4)。



図8 320ppmアルシン単回全身曝露6時間後のマウス(手前)(目の周りが赤く、皮膚が紫色になっている)とコントロール(奥)



図9 320ppmアルシン単回全身曝露6時間後のマウス(右)(皮膚の色が紫色になっている)とコントロール(左)



図10 320ppmアルシン単回全身曝露6時間のマウス(血尿あり)

⑥ マウス本実験II(80-100ppmアルシン反復(計4回)全身曝露実験)

80-100ppmアルシンを約12時間のインターバルを経て計4回、反復全身曝露した結果のHt値を表6に示す。4回目曝露直後にHt値が約31.5%まで減少し、その12時間後では12.75%と大幅に減少した(表6)。その時のHt管に採取した血液を図11に示すが、血漿が紫色を呈し、明らかな溶血像を示している(図11)。解剖直前では皮膚の変色(黄疸)が認められ、目の上が赤い。(図12、図13)。解剖時、肉眼的血尿は認めない(図14)が、脾臓の黒色化が認められる。

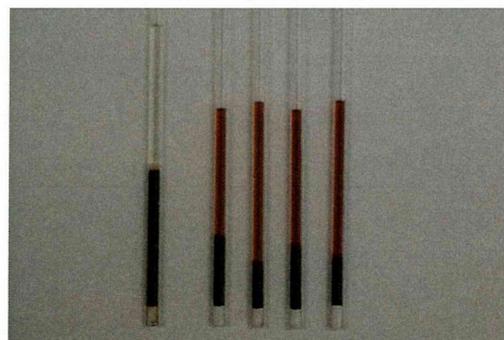


図11 アルシン4回曝露12時間後のHt管内の血液(左はCont、4本はアルシン曝露)



図12 アルシン4回反復曝露12時間後(解剖直前)黄疸と目の上が赤い



図14 アルシン4回曝露12時間後(解剖時)膀胱、血尿なし



図13 アルシン4回曝露12時間後(解剖直前)黄疸と目の上が赤い



図15 1 mgアルシン4回曝露12時間後(解剖時)脾臓の黒色化

表4 経皮曝露

| マウス# | 体重 (g) | アルシン濃度(ppm) | ヘマトクリット(%) | | |
|---------|--------|-------------|------------|------|------|
| | | | 曝露直後 | 3時間後 | 6時間後 |
| 1 | 22.56 | 320 | 55 | 51 | 49 |
| 2 | 23.09 | 300 | 49 | 50 | 50 |
| 3 | 22.80 | 320 | 46 | 50 | 48 |
| 4 | 22.50 | 300 | 50 | 49 | 47 |
| average | 22.74 | 310 | 50 | 50 | 48.5 |

表5 全身曝露

| マウス# | 体重 (g) | アルシン濃度(ppm) | ヘマトクリット(%) | | |
|---------|--------|-------------|------------|-------|------|
| | | | 曝露直後 | 3時間後 | 6時間後 |
| 1 | 22.72 | 320 | 53 | 15 | 8 |
| 2 | 22.36 | | 50 | 13 | 7 |
| 3 | 21.93 | | 52 | 19 | 8 |
| 4 | 20.47 | | 53 | 16 | 10 |
| average | 21.87 | 320 | 52 | 15.75 | 8.25 |

1mg iAsから発生させた無機アルシンの反復曝露実験(4回曝露 (インターバル約12時間) したのち12時後に解剖)

表6 全身曝露

| マウス# | 体重 (g) | アルシン濃度(ppm) | | | | 4回目曝露 12時間後 |
|---------|--------|------------------|-------|-----|------|-------------|
| | | 1回目 | 2回目 | 3回目 | 4回目 | |
| | | 80 | 80 | 100 | 80 | |
| | | 各曝露直後のヘマトクリット(%) | | | | |
| 1 | 22.18 | 52 | 50 | * | 38 | 12 |
| 2 | 20.77 | 53 | 48 | * | 25 | 13 |
| 3 | 22.36 | 53 | 49 | * | 35 | 12 |
| 4 | 19.67 | 51 | 48 | * | 28 | 14 |
| average | 21.25 | 52.25 | 48.75 | | 31.5 | 12.75 |

*3回目直後は測定していません。

表7 コントロール

| コントロールマウス | 体重 (g) | ヘマトクリット(%) |
|-----------|--------|------------|
| ① | | 56 |
| ② | | 49 |
| ③ | | 52 |
| average | 19.40 | 52.33 |

*3回尾静脈から採血、測定した。

(2) DMACの適切なBM法の開発

① 概要

DMAC, CAS番号: 127-19-5、分子量: 87.1、沸点165°C、比重0.94)

は、刺激性のある無色の液体で水によく混和する。アルキルアミド類の一つで、繊維、樹脂の溶剤、医薬品、写真薬などの各種反応溶剤として使用されており、日本における製造・輸入量は2008年において10,000~100,000tである。N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)と構造が類似し、同様の用途で使用されている。毒性もDMFと比較し低いとされているため、使用量が増加しており、国における化学物質のリスク評価推進事業で調査対象物質に挙げられている。DMACの職業性ば

く露による影響は、ウレタン繊維工場
でDMAC取り扱い作業員における急
性肝炎が報告されている。皮膚からも
吸収される。ヒトにおける発がん性は
分類できていない。許容濃度は、日本
産業衛生学会が10ppm (36 mg/m³)

(皮)を勧告しており、米国ACGIH
は10ppm (36 mg/m³) (skin)、
英国HSEが10ppm (36mg/m³)を勧告
している。DMACは主に体内で、N-
ヒドロキシメチル-N-メチルアセトア
ミド (DMAC-OH)、N-メチルアセト
アミド (NMAC)、N-ヒドロキシメチ
ルアセトアミド (NMAC-OH) を経て
S-アセトアミドメチル-L-アセチルシ
ステイン (AMMC) およびアセトアミ
ドに代謝され、DMACばく露者尿中
にはDMAC-OHとNMACが多く排泄さ
れるとされている。DMACはDMFと
同様に皮膚吸収があることから、作業
者の正確なばく露量を知るためには
生物学的モニタリングによるばく露
評価が重要となる。生物学的許容値は、
日本においては勧告されておらず、
ACGIHが尿中NMACとして週末の作
業終了後で30mg/g creatinine、HSE
が尿中NMACとして作業終了後で100
mmol/mol creatinineを勧告している。

② NMAC検査受託状況

労働衛生検査精度向上研究会会員
機関に対し調査したところ、NMAC測
定を各社合計で、年間1300件程度の受
託が確認された。濃度レベルとして、
ACGIHのBEIである30mg/Cr以上が
7%程度存在していた。また、DMAC
はDMFの混合物として使用されてい

る可能性がある。そこで、DMF健診で
の尿中NMF測定のカロマトグラムに
NMACのピークが含まれているかど
うか、その検体数の割合の調査を依頼
した。NMF検体数13, 878のうち、
0.8%とわずかではあるがNMFクロマ
トグラムにNMACピーク(3mg/l以上)
が確認された検体があった。

③ クロスチェック予備調査結果

NMACクロスチェック (暴露尿2試
料)は6施設が参加した。2試料の変動係
数 (CV) は、低濃度試料で24.4%、高
濃度試料で7.1%であった。測定方法は
各施設のNFM測定と同じ方法で実施
した。5施設がGC-高感度窒素リン検出
器 (NPD) 法、3施設がGC-質量分析
(MS) 法であり、使用カラムは極性
カラム、定量は内部標準法を採用して
いた。また、炭酸カリウム処理は、5
施設で行われ、注入口温度は、150℃
から280℃であった。150℃の2施設で
は、炭酸カリウム処理を行っていた。
NMFとNMACのリテンションタイム
は各施設とも近接していた。今回のク
ロスチェックは、NMAC単独の溶液を
用いたが、次回はNMFとの混合液を使
用しピークの近接による誤差がない
かを検討する。

D. 考察

(1) アルシン曝露実験

① 予備実験 (*in vitro*)

アルシンの*in vitro*曝露でHbの蛋
白部分における変性の可能性が示唆
されたことから、*in vivo*の研究と*in
vitro*の研究を比較研究することで、ヒ

素-Hbアダクトの研究など、曝露指標の研究に繋げることができると考えられる。

② 予備実験：アルシンの発生

ヒ素量として0、0.5、1.0、2.0、5.0 mg亜ヒ酸を曝露装置内で中性NaBH₄還元することで0-200ppmのアルシン濃度を安定的に作る事ができた。なお、湿度、温度等により発生時のアルシン濃度は異なることから、実験ごとにその濃度を測定することとした。

5 mg のヒ素が 100%アルシンに還元されたならば、その気中濃度は 651 ppm と算出される。(5 mg As/2.5 L = 2000 mg As/m³, Arsine MW = 77.93、1 mg/m³ = 0.313 ppm、1 ppm = 3.19 mg/m³, As MW = 74.92
 $2000 \times 77.93 / 74.92 \times 0.313 = 651$)
原料のヒ素の量を調整することで発生するアルシンの量をコントロールでき、しかも、10分程度ならば安定したアルシン濃度を維持することができた。

③ マウス予備実験 (単回曝露)

40ppmアルシンの5分間曝露で24時間後にHt値の減少が見られ、それ以上の濃度では、より強く、より早く、量反応関係を示す影響がみられた。このことから、アルシン中毒を発現させるためには40ppm以上のアルシン5分間曝露が曝露条件の基準として最適であると考えられた。

④ マウス本実験 (単回経皮および全身曝露実験)

平均320ppmアルシン5分間単回全

身曝露で、血尿を含め強く影響が認められた。一方、平均310ppmアルシン経皮曝露した場合は平均320ppmアルシン全身曝露より影響は少なく、経皮曝露の影響を評価するには不十分であった。血液中の病理組織学的所見ならびに血球、血清中の形態別ヒ素の測定結果から吸入(全身)または経皮吸収率を精査した上で検討したい。

⑤ 80-100ppmアルシンの反復 (計4回) 全身曝露実験

約90ppmアルシンの5分間反復(計4回)全身曝露で肉眼的血尿は認められないが、脾臓の黒色化が認められた。重度な溶血影響も認められた。

以上のことから、アルシンは、曝露直後の影響よりも、曝露終了後も赤血球あるいはHbに対して作用し、溶血をもたらすことが示唆された。

(2) DMACの適切なBM法の開発

NMAC測定値への影響要因

NMF分析では、注入口の熱によって代謝物であるDMF-OHが熱分解しNMFに変化しているとされている。DMACも同様に、注入口の熱によってDMAC-OHが熱分解し、NMACに変化していると考えられている。DMAC-OH5%水溶液を用いてGCの注入口温度を150-275℃に変化させ、DMAC-OHからNMACに変化した量を定量し、その変化率を求めた。その結果、注入口温度175℃でプラトーとなった。したがって、注入口温度150℃では未変化体のDMAC-OHも含まれることから測定値に影響を及ぼすことが示唆

された。

E. 結論

(1) アルシン曝露実験

- ① 無機ヒ素の中性 NaBH_4 還元により、アルシニングスを安定して発生させることができ、原料のヒ素の量を調整することで、一定の濃度のアルシンを作ることができた。
- ② マウスの *in vitro*、*in vivo*でのアルシン曝露により赤血球ならびにHbの変性が認められた。特にヒ素-Hbアダクト形成の有無はBM法の開発を可能とする。
- ③ アルシン曝露による溶血は曝露終了後も速やかに進行することが明らかになった。
- ④ 経皮曝露は全身曝露より弱く、経皮曝露の影響を評価するには更なる研究が求められた。

(2) DMACの適切なBM法の開発

以上のことから、代謝経路をふまえたBMとしての適切な測定対象物質はNMACかそれ以外かを検討し、測定法を開発する。それらの精度管理を行った上で、曝露作業者の尿中代謝物濃度測定を実施し、リスク評価に必要なBM法を確立する。

F. 健康危険情報

(1) アルシン曝露実験

アルシン曝露による溶血は曝露終了後も速やかに進行することが明らかになった。

アルシンは経皮曝露は全身曝露より弱く、経皮曝露の影響を評価するに

は更なる研究が求められた。

(2) DMACの適切なBM法の開発

DMACの代謝経路をふまえたBMとしての適切な測定対象物質はNMACかそれ以外か、さらなる検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hata A, Yamanaka K, Habib MA, Endo Y, Fujitani N, Endo G. Arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh. *Environ Health Prev Med*. 2012 May; 17 (3):235-45

山本忍、市場正良、天野有康、中村正：尿中 N-メチルホルムアミド及び尿中 N-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について。労働衛生管理 (in press)

2. 学会発表

Hata A, Yamanaka K, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G. Arsenic metabolism in human urine after ingestion of sashimi tuna fish. *International Society for Environmental Epidemiology (ISEE)*. Barcelona, Spain. Sep 13 -16, 2011.

Yamanaka K, Hata A, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G. A study of the extraction of

arsenic from seafood for
speciation analysis. International
Society for Trace Element
Research in Humans (ISTERH).
Antalya, Turkey, Oct 16-21, 2011
畑 明寿、山中健三、山野優子、圓藤
陽子、藤谷 登、圓藤吟史. マグロ摂
取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究.
第17 回ヒ素シンポジウム つくば市
2011年11 月19-20日

山中健三、下田康代、星井政志、加藤
孝一、立川真理子、畑明寿、圓藤陽
子、圓藤吟史. ジメチルチオアルシン
酸の毒性発現に係る代謝機構につい
て. 日本薬学会第132年会 札幌市
2012年3月28-31日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
分担研究報告書

1. アルシンの曝露評価に関する研究

研究主任者 圓藤吟史 大阪市立大学大学院医学研究科産業医学 教授
研究分担者 山中健三 日本大学薬学部環境衛生学 教授
研究分担者 山野優子 昭和大学医学部衛生学 准教授

研究要旨

経皮吸収が無視できない化学物質の曝露評価にはバイオロジカルモニタリング(BM)法による評価が必要とされる。近年、低濃度の作業環境におけるアルシン中毒が報告され、これには経皮吸収が関与している可能性がある。そこで、本研究は、アルシンについて、リスク評価に有用となるBM法の開発を実施する。

そのために平成23年度は、①適切かつ安定な濃度のアルシンガスを発生する装置を作製し、②マウス血液（保存血）試料を用いた*in vitro*での曝露による影響、ならびに③マウスに経皮または全身曝露を行い、④溶血などの生体影響との量反応関係を明らかにした。

結果は、①0.5～5 mgのヒ素を中性NaBH₄で還元して、容積約2,500cm³(2.5L)の曝露装置内に40-300ppmのアルシンを発生させることができた。②*in vitro*アルシン曝露したマウス血液試料では溶血を示し、さらに血球ヘモグロビン(Hb)の蛋白部分でのヒ素付加体形成の可能性が示唆された。③マウスへのアルシン全身曝露予備実験を行った結果、200ppm5分間全身曝露では曝露直後から溶血が認められ、6時間ではヘマトクリット(Ht)値はコントロールの30%まで減少した。90～100ppm5分間曝露では曝露6時間後において僅かな溶血が、24時間後においては顕著な溶血が観察された。さらに40ppm5分間曝露においても曝露24時間後には同程度の溶血が見られた。一方、200ppmアルシン5分間曝露による経皮曝露予備実験では、軽微な溶血に止まった。以上の結果から、アルシン曝露本実験では40～>200ppm以上のアルシンへの5分間曝露を基本とした。④前項③の結果を踏まえて、アルシン全身または経皮曝露本実験を実施した。約300ppm5分間全身曝露では曝露直後から溶血が認められ、Ht値は3時間後に曝露前の30%、6時間

後では16%にまで減少し、溶血はアルシン曝露後速やかに進行することが窺われた。⑤約300ppm5分間の経皮曝露では、極めて軽微な溶血であった。⑥約90ppm5分間の4回反復曝露の場合、4回目曝露後12時間においてHt値は24.4%にまで減少し、アルシン曝露合計量と溶血作用の間に正の相関があった。⑦以上のマウスの臓器はホルマリン固定で保存しており、平成24年度に病理組織所見を得る予定である。

A. 研究目的

化学物質のリスク評価の柱である曝露評価には、個人曝露量の測定または作業環境測定が使われているが、経皮吸収が無視できない化学物質においては、これらは吸収量を正確に反映していないことから、バイオロジカルモニタリング(BM)法による曝露評価が必要とされる。近年、低濃度の作業環境におけるアルシン中毒が報告され、これには経皮吸収が関与している可能性がある。

そこで、本研究は、アルシンについて、リスク評価に有用となるBM法の開発を実施する。

B. 研究方法

イソフルラン吸入麻酔下において、ヘアレスマウス(Hos:HR-1)に対して、無機ヒ素を中性 NaBH_4 による還元で発生させたアルシンガス (40—300 ppm) を全身及び経皮的に単回または反復曝露する。本実験は強制排気と除ガスができるドラフト内で行う。溶血をアルシン中毒の指標とし、血球、血清中の形態別ヒ素を経時的に測定することにより吸入または経皮吸収率を算出するとともに、アルシンの体内動態学的知見を得る。

⑦ 予備実験I: *in vitro*溶血実験

ICR 雄性マウスの保存血(日本生物材料センター)を供試血液試料とした。

ヒ素分析法(ジエチルジチオカルバミン酸銀法:JIS K 0102)に準じて、2mg亜ヒ酸を塩酸と亜鉛末で還元しアルシンガスを発生し、血液試料に10分間導入した。遠心分離後の上澄液を吸光分析用試料とした。上澄液の吸光度測定は、コントロールおよびアルシン曝露の直後、90分後、通気しながらの4群について、KR-PBSで50倍希釈して測定した。

⑧ 予備実験:マウス曝露装置内でのアルシンガスの発生

容積約 2.5L の曝露装置内で 5 mg、2 mg、0.5 mg の亜ヒ酸を中性 NaBH_4 (1g)で還元しアルシンを発生させ、装置内アルシン濃度を北川式検知管で測定した。(図1、図2)

⑨ マウス予備実験(単回曝露)

②項で述べた装置を用いて、ヒ素量として0.5、1.0、2.0、5 mgの亜ヒ酸を中性 NaBH_4 で還元してアルシンを発生させ、発生直後の容器中のアルシン濃度を北川式検知管で測定した。曝露時間は5分(約25°C)。その後、ヘパリン処理Ht毛細管(テルモ)へ尾静脈より採取した血液を経時的に導入し、Ht

値を測定した。

⑩ アルシン曝露実験の方法

- ・マウス：Hos: HR-1 ヘアレスマウス、雄性、5 週齢とした。コントロール 1 頭、アルシン曝露群は 1 群 4 頭とした。
- ・曝露装置容積：約 2.5 L
- ・ヒ素量として 1 または 5 mg の亜ヒ酸を曝露装置内で中性 NaBH_4 により還元してアルシンを発生させた。
- ・アルシン曝露はマウス 1 頭ずつイソフルラン麻酔下で全身ならびに頭部を除く全身（経皮吸収）を曝露装置内に入れ、アルシン発生後 5 分間曝露した。（図 3）
- ・アルシン濃度測定：発生直後に北川式検知管で 50mL 採取。（25°C で 5-160ppm の範囲で測定可能）
- ・血液採取：経時的に尾静脈から、直接 Ht 毛細管（テルモ、ヘパリン処理済み）に採取し、Ht 値を測定した。
最終的にはイソフルラン麻酔下で心臓により血液を採取し、全血ならびに遠心分離して得られた血漿を -80°C で保存した。
- ・解剖により肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、中性ホルマリン固定した。
- ・組織切片作製ならびに病理学的評価は平成 24 年度に実施予定である。

（倫理面への配慮）

動物実験に関する倫理審査を日本大学において受け、承認された。

動物の愛護及び管理に関する法律」、
「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、
「研究機関

等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）」を遵守して実験を行った。

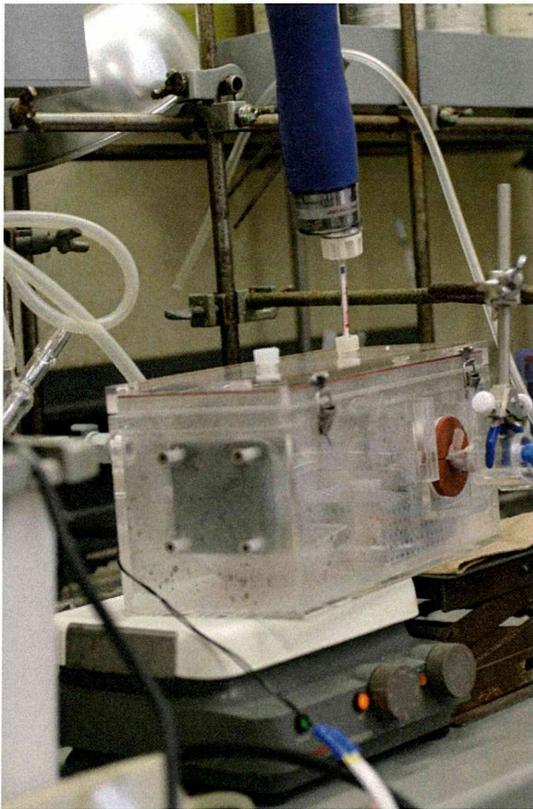


図1 曝露装置

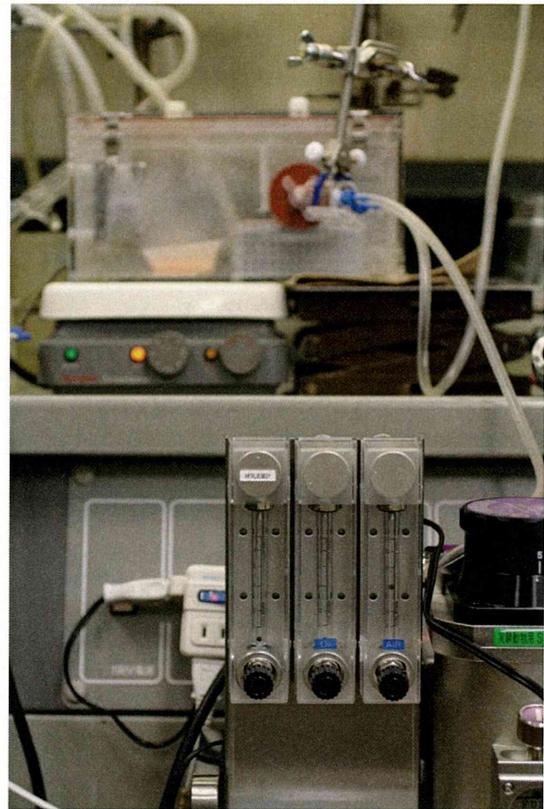


図2 曝露装置

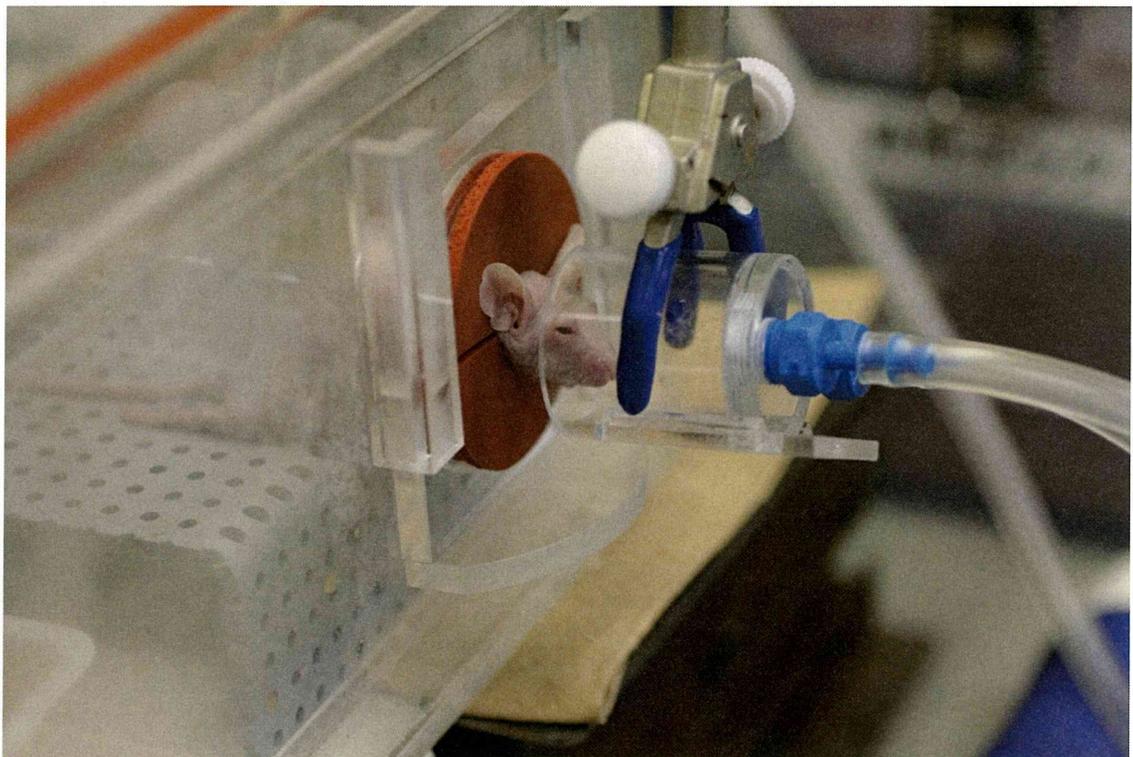


図3 麻酔下での曝露（経皮曝露）