

C. 研究結果

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)。

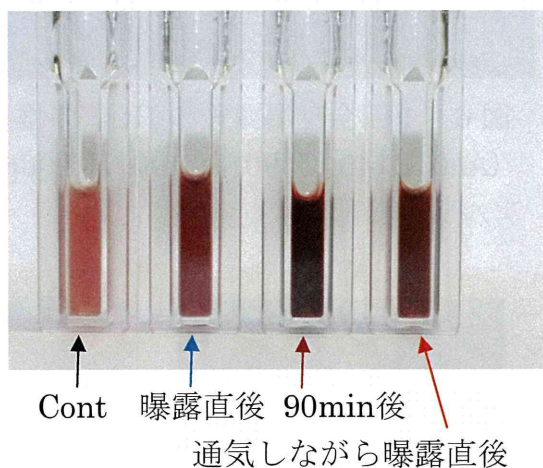


図4 アルシン曝露した溶血試料

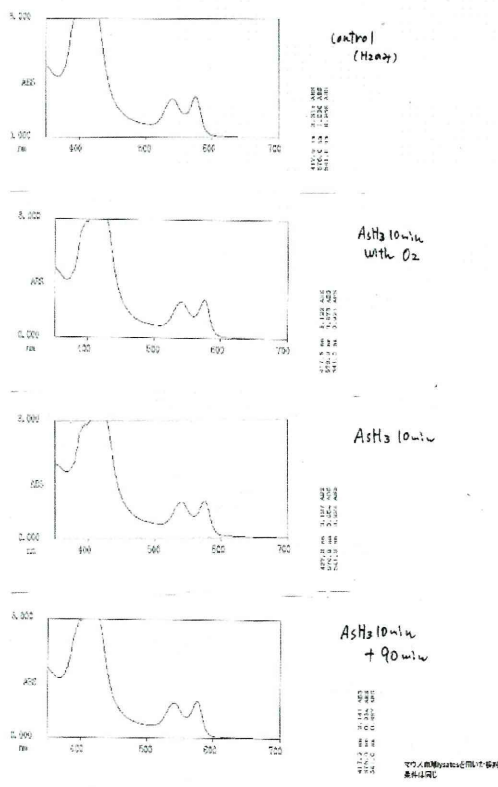


図5 溶血試料の吸光スペクトル

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た。しかも曝露後10分間はアルシン濃度が安定していた。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	

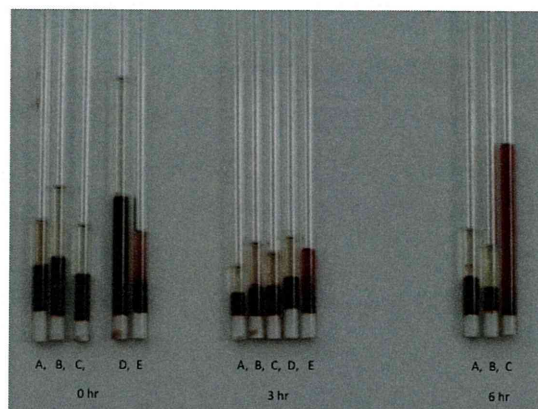


図6 1回全身曝露後のHt値の推移 (A: 0、B: 40、C: 90、D: 100、E: 200ppmアルシン曝露)

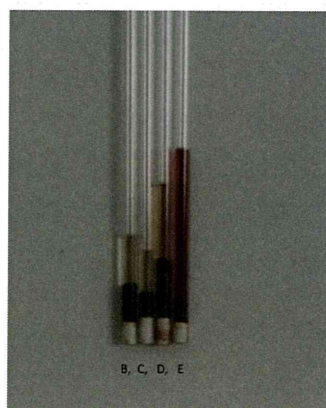


図7 単回全身曝露6h後のHt値 (B: 40、C: 90、D: 100、E: 200ppmアルシン曝露)

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値でみると、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(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)。

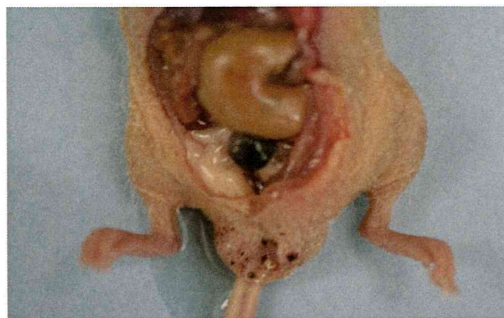


図10 320ppmアルシン単回全身曝露6時間のマウス(血尿あり)



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)

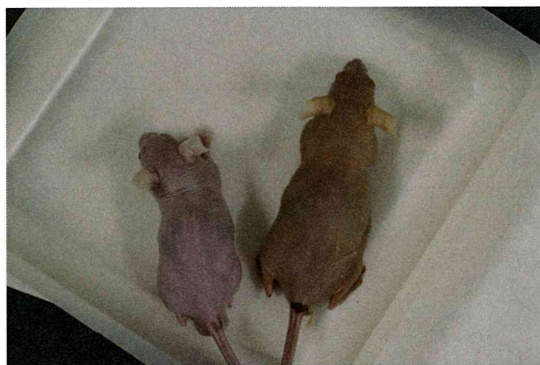


図9 320ppmアルシン単回全身曝露6時間後のマウス(右)(皮膚の色が紫色になっている)とコントロール(左)

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。

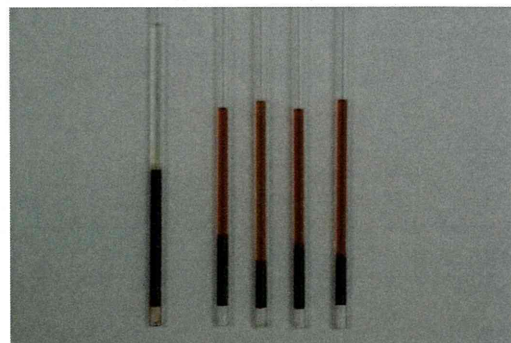


図11 アルシン4回曝露12時間後のHt管内の血液(左はCont、4本はアルシン曝露)



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。

D. 考察

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：アルシンガスの発生

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のNaBH₄により還元することで0-200 ppm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。

E. 結論

- ① 無機ヒ素の中性NaBH₄還元により、アルシンガ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。

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

該当なし

3. その他

2. 学会発表

該当なし

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. マグロ撰
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 2
012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

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

2. ジメチルアセトアミドのBMの検討

研究分担者 市場正良 佐賀大学医学部社会医学教授

研究要旨

全衛連の労働衛生精度向上研究会において、N,N-ジメチルアセトアミド（DMAC）ばく露の生物学的モニタリング法（BM法）を開発し、全国の労働者のBM体制を作ることを目的とする。DMACはN,N-ジメチルホルムアミド（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。DMACの生物学的許容値はN-メチルアセトアミド（NMAC）として欧米より勧告されているが、測定法が古く、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などをする必要がある。

国内におけるNMAC測定の実状を知るために、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（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機関に対し暴露尿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。

A. 研究目的

全衛連の労働衛生検査精度向上研究会において、生物学的モニタリング法（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、N,N-ジメチルアセトアミド（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

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。

C. 研究結果

(1) 概要

N,N-ジメチルアセトアミド（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のDMAC取り扱い作業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（36mg/m³）（皮）を勧告しており、米国ACGIHは10ppm（36mg/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測定のクロマトグラムに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) 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

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。

G. 研究発表

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)

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

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	17(3)	235-45	2012
山本忍、市場正良、天野有康、中村正	労働衛生検査精度向上研究会活動報告	労働衛生管理	(in press)		

31P1-pm033

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

○山中 健三¹, 下田 康代¹, 星井 政志¹, 加藤 孝一¹, 立川 眞理子¹, 畑 明寿², 圓藤 陽子³, 圓藤 吟史⁴ (¹日本大薬, ²千葉科学大危機管理, ³関西労災病産中研セ, ⁴大阪市大院医)

【目的】ヒ素代謝物の中で強い毒性が疑われているジメチルモノチオアルシン酸[DMTA, (CH₃)₂As(S)OH]に関して、ジメチルアルシン酸[DMA, (CH₃)₂As(O)OH]からの代謝生成機構および毒性発現機構の一端を昨年の本大会で報告した。しかしながら、細胞毒性および染色体異常に関する報告はあるが、いまだその詳細は検討されていない。そこで今回、DMTA の代謝活性化ならびに毒性発現機序をさらに明らかにするため、微生物を用いた復帰突然変異原性試験等を実施するとともに、DMTA 毒性発現に係る代謝物の分析を行った。

【方法】無水DMTA はFricke らの報告(Chem Res Toxicol, 2005)に従い合成した。DMTA の毒性はV79 細胞を用いたWST-1 法による細胞毒性試験、染色体異常試験、ならびにネズミチフス菌等を用いた復帰突然変異原性試験により評価した。さらに、DMTA 曝露したV79 細胞の培養液中のDMTA 代謝物をHPLC-ICP-MS ならびにFID-GC を用いて分析した。

【結果および考察】V79 細胞を用いた細胞毒性試験ならびに染色体異常試験において、DMTA の毒性はGSH の存在で増強され、GC 分析により硫化水素イオンがDMTAの代謝物として検出された。一方、これまでに、多くのヒ素化合物が細菌を用いた復帰変異原性に対して陰性と結論づけられてきたが、DMTA はS-9(+)で有意な陽性結果を示した。加えて、V79 細胞の培養液からは未知の含硫ヒ素化合物が検出された。以上の結果から、DMTA の遺伝毒性は代謝過程で生成する3 価ジメチルヒ素のみならず未知の含硫ヒ素化合物が関与する可能性が示唆された。

労働衛生検査精度向上研究会活動報告

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

労働衛生検査精度向上研究会

山本 忍 市場 正良 佐賀大学医学部

天野 有康 中村 正 (株) 江東微生物研究所

1. はじめに

労働衛生検査精度向上研究会では、特殊健康診断項目の精度向上および測定法の標準化等を目的として活動を続けている。分析の信頼性を確保・維持するため、各施設では精度管理が日常的に行われている。施設内部での精度管理は、一般に管理用試料や標準物質を利用して実施される。一方、他施設との分析値の整合性を確認する、あるいは外部に対して分析値を保証するための外部精度管理は、技能試験又は施設間精度管理に参加するのが通常である。今回、全国労働衛生団体連合会が実施する労働衛生検査精度管理調査の対象項目となっていない N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) の尿中代謝物である N-メチルホルムアミド (NMF) について、施設間差の確認のために平成 23 年度に実施したクロスチェックの結果について報告する。また、DMF に類似した物質として今後ばく露評価を考慮すべき N,N-ジメチルアセトアミド (DMAC) の尿中代謝物である N-メチルアセトアミド (NMAC) について、精度管理の予備的検討と会員施設の検査受託状況調査を実施したので報告する。

N,N-ジメチルホルムアミド (DMF, CAS 番号: 68-12-2, 分子量: 73.09, 沸点 153°C, 比重 0.95) は、わずかにアミン臭のある無色透明の液体で水に可溶性有機溶剤である。人工皮革やウレタン系合成皮革, スパンデックス繊維, 有機合成用溶剤等として使用されており、日本における生産量は 2005 年で推定 50,000t とされる¹⁾。DMF の職業性ばく露による影響は、高濃度では急性中毒を起こし、低濃度の長期ばく露によって胃・肝・腎の障害を起こす²⁾。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 (30mg/m³) (皮) を勧告しており²⁾、作業環境測定における管理濃度は 10ppm である。諸外国では、米国 ACGIH が 10ppm (30mg/m³) (skin)³⁾、英国 Health and Safety Executive (HSE) が 5ppm (15mg/m³)⁴⁾としている。DMF は主に体内で、N-ヒドロキシメチル-N-メチルホルムアミド (DMF-OH), NMF を経て N-アセチル-S-(N-メチルカルバモイル)システイン (AMCC), N-ヒドロキシメチルホルムアミド (NMF-OH), ホルムアミドに代謝され (図 1), 主に DMF-OH と NMF として尿に排泄される³⁾。皮膚吸収もあることから、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 Biological Exposure Indices (BEI) は、日本においては勧告されていないが、有機溶剤中毒予防規則では、分布 1, 2, 3 の区分として、尿中

NMF10mg/L, 40mg/L が使用される。ACGIH は尿中 NMF を作業終了後に 15mg/L とし、他に週末の作業後で尿中 AMCC が 40mg/L を勧告している³⁾。

N,N-ジメチルアセトアミド (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¹⁾、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⁵⁾。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⁷⁾。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 (36mg/m³) (皮) を勧告しており²⁾、米国 ACGIH は 10ppm (36mg/m³) (skin)³⁾、英国 HSE が 10ppm (36mg/m³)⁴⁾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)、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 (図 2)、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³⁾。DMAC は DMF と同様に皮膚吸収があることから、作業員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 creatinine³⁾、HSE が尿中 NMAC として作業終了後で 100mmol/mol creatinine⁴⁾を勧告している。

2. 試料および方法

(1) クロスチェック

今回実施したクロスチェックの参加は NMF 8 施設、NMAC 6 施設である。結果の取りまとめは佐賀大学で行なった。

試料の調製は、(株) 江東微生物研究所が実施し、NMF は、5, 20, 50mg/L に調製した標準水溶液 3 濃度、非ばく露尿に標準水溶液を添加し 5, 20, 50mg/L に調製した添加尿 3 濃度、ばく露尿 4 濃度を用いた。NMAC は、ばく露尿 2 濃度を用いた。各試料はプラスチックチューブに分注後、凍結状態で各施設に郵送した。

各尿中代謝物の測定方法は各施設の通常の方法で実施した。前処理のフローチャートを図 3 に示す。各施設の分析条件を表 1 に示す。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、いずれの施設も NMAC, NMF とともに同じ分析条件を用い、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°C から 280°C であった。150°C の 2 施設では、炭酸カリウム処理を行っていた。

(2) 測定値に影響をあたえる要因の検討

①検量線マトリックスの影響

尿及び精製水それぞれ 180 μ l に、0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml に調製した NMF, NMAC 混合水溶液を 20 μ l 添加し、内標準物質 (N,N-ジエチルアセトアミド) を含有 (4.5 μ g/ml) した 1.8ml のメタノールで希釈した。遠心 (3,000rpm, 5min) 後、上澄みを GC/MS で分析し、尿及び精製水それぞれのピーク面積を比較した。測定分析条件は佐賀大学の条件を用いた。尿は非ばく露者尿を用いた。

②NMAC における GC 注入口温度の影響

精製水で 100 μ g/ml に調製した DMAC-OH および NMAC 100 μ l をそれぞれ内標準物質 (N,N-ジエチルアセトアミド) を含有 (4.5 μ g/ml) した 0.9ml のメタノールで希釈した。これを GC の注入口温度を 150–275°C に変化させ分析した。NMAC のピーク面積から、DMAC-OH から NMAC に変化した量を定量し、その変化率を求めた。測定分析条件は佐賀大学の条件を用いた。DMAC-OH は、東京化成で合成した。

(3) NMAC 受託状況

会員施設の NMAC 測定の年間受託件数と濃度レベルの報告を依頼した。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、尿中 NMF 測定のクロマトグラムに NMAC のピークが含まれているかどうか、NMAC のピークが認められる検体数の割合の調査を依頼した。

3. 結果および考察

(1) クロスチェック結果

各試料の施設別集計結果を表 2 に示した。変動係数 (CV) は NMF において、ばく露尿と水溶液の低濃度試料でそれぞれ 13.2, 19.1% と 10% を超え、それ以外の試料はばく露尿 5.5–8.5%, 添加尿 5.1–7.5%, 水溶液 5.0–9.0% であった。NMAC においては、低濃度試料で 24.4%, 高濃度試料で 7.1% であった。

今回のクロスチェックでは低濃度のサンプルにおいてバラつきが大きくなる傾向があり、前年度においても同様の傾向は見られたが CV10% を超える試料はなかった。前年度から前処理、分析条件を大きく変更した施設はなかったことから、日常の測定分析において高濃度試料では比較的精度よく測定分析できているものの、低濃度試料では何かしらの要因により測定値に影響を与える可能性が示唆された。

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、NMF, NMAC それぞれ単独の溶液を用いたが、次回は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。

(2) 測定値への影響要因

尿試料の測定の際、検量線に水試料を用いる時はマトリックスの影響がないことを事前に確認する必要がある。したがって、尿マトリックスによる検量線と水（精製水）マトリックスの検量線の違いを比較した。結果を図4に示す。NMFの傾き0.99、NMACの傾き1.00と良好な値となり、尿と水のマトリックスの違いによる影響はないと考えられた。しかしながら低濃度でのバラつきが大きく、測定値に影響を及ぼす可能性が示唆された。

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。一方DMAC-OHの挙動は十分に確認されていないが、DMF-OHと同様に、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。注入口温度の影響の検討では、Kawaiら⁶⁾がDMFとDMACにばく露された作業者の尿の測定において、GC注入口の温度を150–300℃に変化させ、NMF、NMACを定量しているが、それぞれ最大で約50%、30%程度の誤差を生じている。しかしながら、ACGIHのBEIが示すNMAC濃度は注入口温度150℃の測定分析法から算出された値である^{3, 7)}。今回我々が行った注入口温度によるDMAC-OHからNMACへの変化率を図4に示す。DMAC-OH5%水溶液を用いて河合らと同様の実験をおこなった。その結果、注入口温度175℃でプラトーとなった。河合らは225℃でプラトーとなっていることからマトリックスによる違いは見られたもののほぼ一致した傾向であった。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。

また、NMFおよびNMACはアミノ基を持つため、GC注入口やライナーに吸着しキャリーオーバーによる感度低下や、希釈による前処理ではサンプル中の水分量が多くカラムダメージがある等、ルーチン分析においての問題点が考えられる。したがって、これらの諸問題を精査し測定分析を行うことも必要である。

(3) NMAC 検査受託状況

有機溶剤健診として会員施設のうち3施設で受託があり、年間受託件数は1,279件であった。そのうち、30mg/L以上を示す検体数は、7%程度であった。

DMF健診におけるDMAC混合に関しては、NMF検体数13,878のうち、0.8%とわずかなではあるがNMFのサンプルにNMACピーク(3mg/l以上)が確認されたサンプルがあった。

4. まとめ

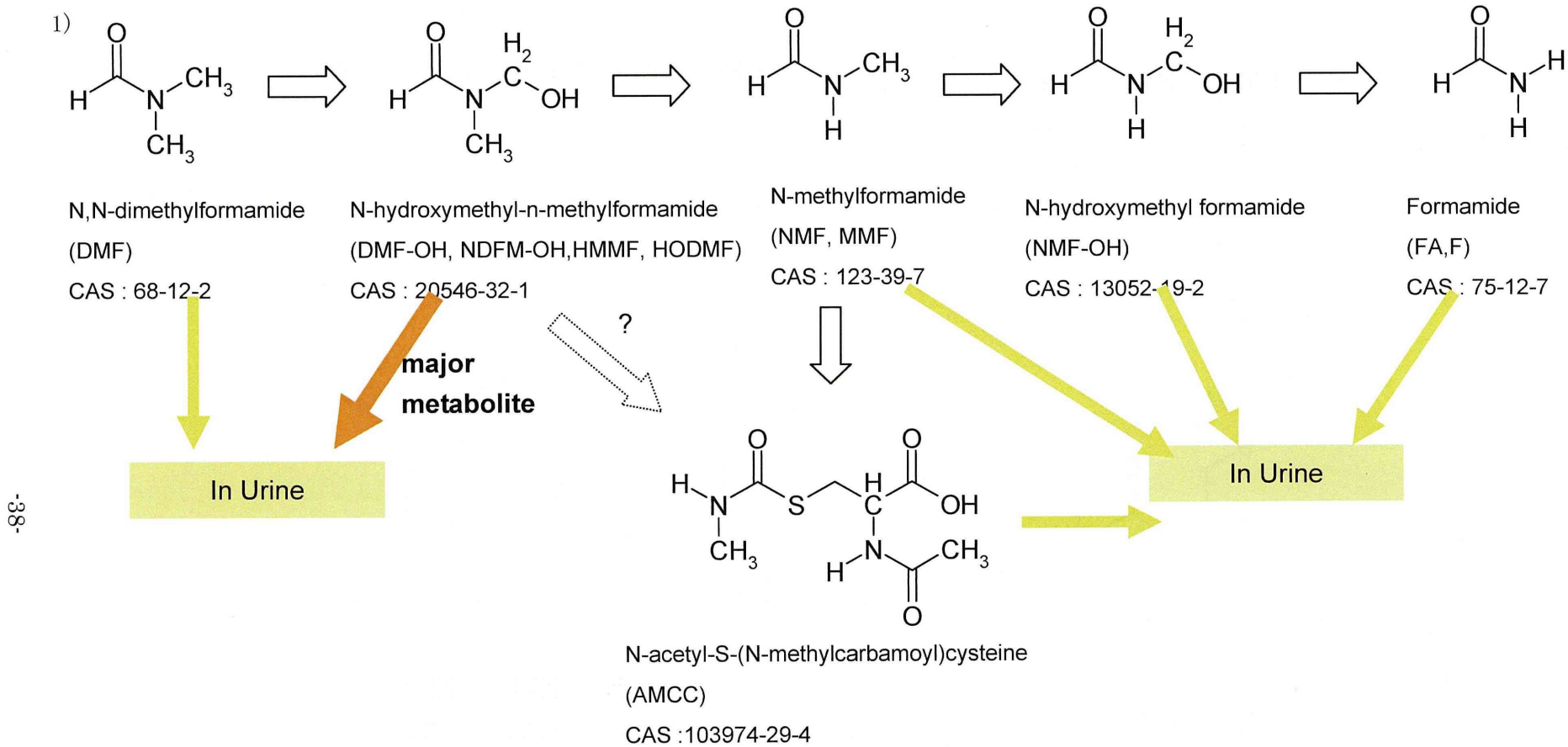
クロスチェック、検量線および注入口温度の影響の結果から低濃度でのバラつきが測定精度に影響を及ぼすことが示唆された。今回は検量線における尿マトリックスおよび注入口温度についてのみの確認となったが、キャリーオーバーの影響や前処理における炭酸カリウムの有無など種々の要因が絡んでおり、明確な原因を突き止めることはできていない。

したがって、これらの問題を1つずつ丁寧に解決していく必要があると言える。

<参考文献>

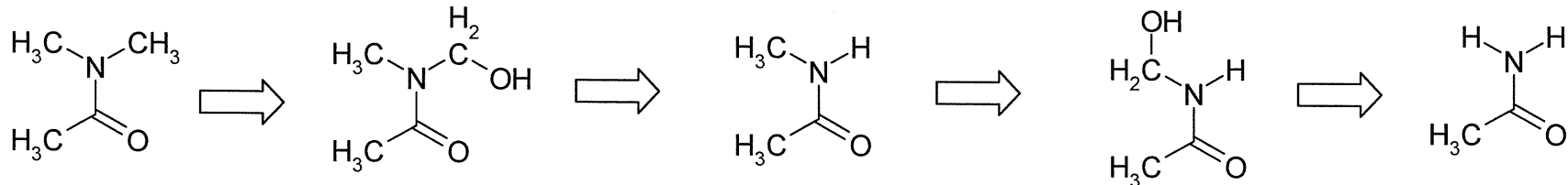
- 1) 化学工業日報：2011年度版 15911の化学商品：518-519, 2011
- 2) 日本産業衛生学会：許容濃度提案理由書集
- 3) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. (ACGIH): 2011 TLVs and BEIs with 7th Edition Documentation, 2011
- 4) Health and Safety Executive (HSE)：EH40/2005 List of approved workplace exposure limits, 2011 (http://www.hseni.gov.uk/eh40_2005.pdf#search='List of approved workplace exposure limits 2011')
- 5) 経済産業省：化学物質の製造・輸入量に関する実態調査（平成19年度実績）結果概要報告（確報）, 2009
(<http://www.meti.go.jp/statistics/sei/kagaku/result-2/h19kakuho.html>)
- 6) T Kawai et al.: Separate determination by gas-chromatography of dimethylformamide, dimethylacetamide, monomethylformamide and monomethylacetamide in urine for biological monitoring, J Occup Health: 39:113-118, 1997
- 7) J.R.Barnes and N.W.Henry: The determination of N-methylformamide and N-methylacetamide in urine, AIHA journal: 84-87, 1974

※ 労働衛生検査精度向上研究会会員：佐賀大学医学部 市場 正良，（財）神奈川県予防医学協会 石渡 和男，（財）近畿エコサイエンス 廣瀬 隆穂，中央労働災害防止協会労働衛生調査分析センター 山内 恒幸，関西労災病院中毒研究センター，圓藤 陽子，パナソニック産業衛生科学センター 城山 康，（株）エスアールエル 森 浩司，金村 茂，濱野 和可子，（株）江東微生物研究所 天野 有康，中村 正，（株）ビー・エム・エル 木戸誠二郎，（株）保健科学研究所 関 顯，杉山 浩貴，三菱化学メディエンス（株） 竹嶋 淳，錦織 千賀，全衛連事務局 國吉 克正



ACGIH Documentation-BEIs 2001

図 1 N,N-ジメチルホルムアミド代謝経路



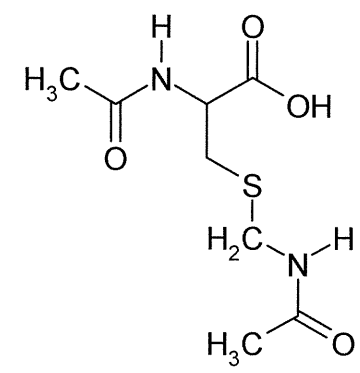
N,N-dimethylacetamide
(DMAC, DMA)
CAS : 127-19-5

N-methyl-n-hydroxymethyl acetamide
N-hydroxymethyl-n-methylacetamide
(DMAC-OH, HMMAC)
CAS: 7099-77-6(東京化成)

N-methylacetamide
(NMAC, MMA, NMA, MMAC)
CAS : 79-16-3

N-hydroxymethyl acetamide
(NMAC-OH, HMAC)
CAS : 625-51-4

Acetamide
(AC)
CAS : 60-35-5



S-(Acetamidomethyl)mercapturic acid
S-acetamidomethyl-L-acetylcysteine
(AMMA)
CAS: 694496-30-5(東京化成)

ACGIH Documentation-BEIs 2011

図 2 N,N-ジメチルアセトアミド代謝経路