

化学イオン化(APCD)法によるイオン化であれば、分子イオンの確認ができる可能性もある。また、DMT-MMは脂肪酸のカルボキシル基を活性化させ NMACのアミノ基と反応する原理で生成された誘導体は脂肪酸が追加されるので溶媒抽出しやすいという利点がある。しかしながら、原因は不明であるが誘導体の生成を確認することができなかった。

さらに LC/UV, LC/MS による一斉分析を試みた。液体クロマトグラフィーは熱に不安定な物質の分析可能で、測定できる物質の範囲が広いのが特徴である。今回は汎用性の高い UV 検出器を最初に用いたが、検出波長が 190nm であったため、尿中の夾雑物の影響を強く受け分析には適さなかった。導入するサンプルの前段階の前処理で固相を用いて夾雑物の除去することで改善が得られるかもしれない。また、選択性の高い LC/MS を用いた検討では高極性物質に適したエレクトロスプレー(ESI)法を用いたが、代謝物の分子量が小さくイオン化にマトリックスの溶媒の影響を受けるため標準品のピーク特定に至っていない。

## E. 結論

①アルシン曝露により、*in vivo* 系においても Hb-As 付加体が生成することが明らかとなった。この Hb-As 付加体のモニタリングは、アルシン曝露によるリスク評価のための BM 法として有用であると思われる。一方で、アルシン曝露による溶血のメカニズムについては、Hb-As 付加体よりも、酸素分子に起因する複雑な要因の関与が推察された。また、経皮曝露影響は全身吸入曝露影響に比べて小さいと推察された。

②アルシン曝露による腎機能障害は、吸入により肺から吸収されたアルシンが溶血を引き起こし、溶血により放出された Hb が、腎臓の近位尿細管に蓄積したことにより引き起こされると推測した。

④未規制の有機溶剤である DMAC の生物学的モニタリング手法の開発を検討した。現行で用いられるガスクロマトグラフを用いた測定では文献調査や施設間差比較から低濃度域で測定精度に問題があることが示唆された。GC 法においてはこれらの問題点を解決できる手法がなかった。DMAC の尿中代謝を一斉に分析することができれば、生物学的モニタリングにおける適切なバイオマーカーの選択ができる。今後、さらに LC を用いた一斉分析の検討を継続し、測定方法を確立させたいと考える。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

尿中 N-メチルホルムアミド及び 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(投稿予定)

### 2. 学会発表

下田康代、加藤孝一、山野優子、畑明寿、立川真理子、圓藤陽子、圓藤吟史、山中健三、無機アルシンの溶血機序：ヘモグロビン-ヒ素付加体形成の可能性。日本薬学会第133年会 横浜市 2013年3月28-30日

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 N-メチル

アセトアミドのクロスチェック集計結果,  
第 40 回産業中毒・生物学的モニタリング  
研究会 平成 23 年 11 月 15, 16 日, 三崎

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24年度は、①マウスならびにマウス血液試料を用いたアルシン曝露による溶血機序ならびにヘモグロビン(Hb)との相互作用に関する検討、②マウスのアルシン全身曝露による溶血とそれにともなう腎毒性機序などを病理組織学的に明らかにした。

結果は、①*in vitro* 曝露したマウス血液試料では溶血作用を示し、グロビン蛋白部分でのHb-ヒ素(As)付加体形成の可能性が示唆された。Hb-As付加体は曝露後速やかに生成し、時間経過によりほとんど変化しなかった。マウスへの約300 ppm5分間全身曝露では顕著な溶血が認められ、*in vitro*系での結果と同様に、Hb-As付加体形成が観察されたが、約300 ppm 5分間の経皮曝露では溶血は認められず、血球中HbへのAs付加体形成も見られなかった。

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。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24年度は、アルシンの毒性のうち、*in vitro*での溶血機序ならびにヘモグロビン (Hb) との相互作用、*in vivo*での溶血とそれに伴う腎毒性の機序を病理組織学的に明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### ①アルシン曝露による溶血機序ならびにHbとの相互作用の検討

#### a. *in vitro* 曝露実験

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、これにヒ素分析法(ジエチルジチオカルバミン酸銀法:JIS K 0102)に準じて、2 mg 亜ヒ酸を塩酸と亜鉛末で還元して発生させたアルシンガスを 10 分間導入した。この血液試料の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 群について測定した。

また、アルシンを 2 分間曝露した血液試料について、コントロール、曝露直後、60-90 分間室温放置および空気置換後 60-90 分間室温放置した各群の上澄液の分光学的解析を行うとともに、血球 stroma または上澄液を、ゲル濾過カラム (Superdex™ 75 10/300GL, GL Healthcare) を用いた HPLC-ICP-MS で分析した。

#### b. *in vivo* アルシン曝露実験

Hos: HR-1 ヘアレスマウス(オス、5 週齢)に、ヒ素量として 5mg の無機 As を中性 NaBH<sub>4</sub> で還元してアクリル樹脂製曝露装置内(容積約 2.5 L)で発生させたアルシン(約 300 ppm)を、イソフルレン吸入麻酔下のマウスに 5 分間単回全身または経皮曝露、

また、約 90ppm アルシンを、12 時間の間隔をおいて計 4 回反復全身曝露した。装置内アルシン濃度は北川式検知管(No.121U、光明理化学工業)で測定した(図 1)。採血は、曝露後経時的に尾静脈より、または実験終了時に麻酔下心臓穿刺により行った。血液および遠心分離後(2000rpm、10min)得られた血漿部分について、吸光分析および HPLC-ICP-MS 分析を行った。

### ②アルシン曝露による溶血とそれとともなう腎毒性機序

5分間曝露後、曝露直後、3時間後に尾静脈よりヘパリン処理Ht管に血液を採取し、6時間後には心臓尖刺により採血した。得られた血液サンプルを用い、経時的にHtを測定し、曝露6時間後の血液は、ICP-MSで全血中のヒ素濃度の分析も行った。また6時間後には肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、中性ホルマリン固定した。

### ③ 病理組織学的検索

曝露後6時間後に得られた組織は、パラフィンブロック作成後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および、ヘモグロビン(Hb)免疫染色を行った。なお、免疫染色に使用した抗体は以下の通りである。一次抗体: Rabbit anti-mouse hemoglobin antibody (Cappel Lab., OH, USA)、二次抗体: His tofineR Simple Stain [mouse MAX-PO (Rabbit) (Nichirei Bioscience, Japan)

組織切片作製ならびに病理学的評価を行った。

(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

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。

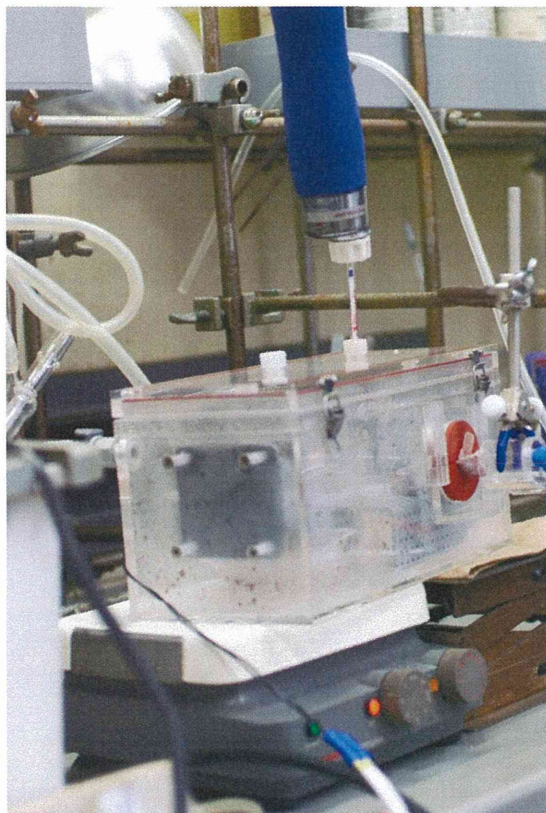


図1 曝露装置

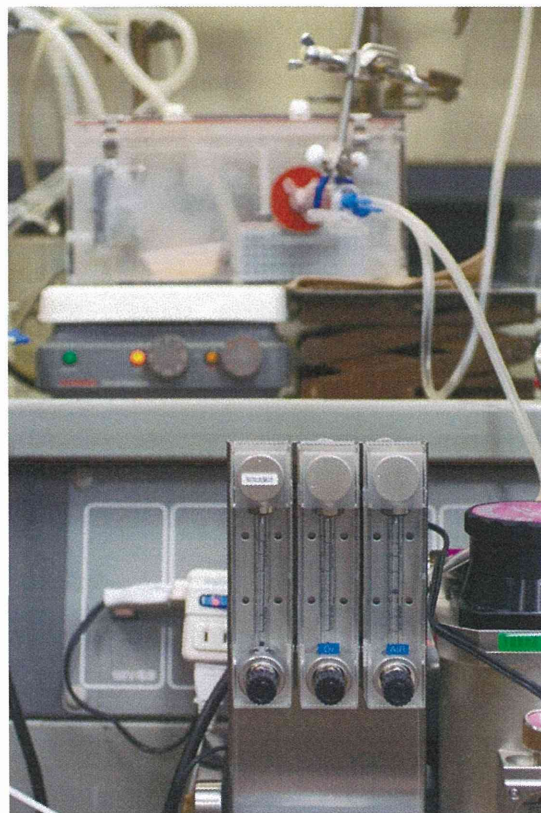


図2 曝露装置

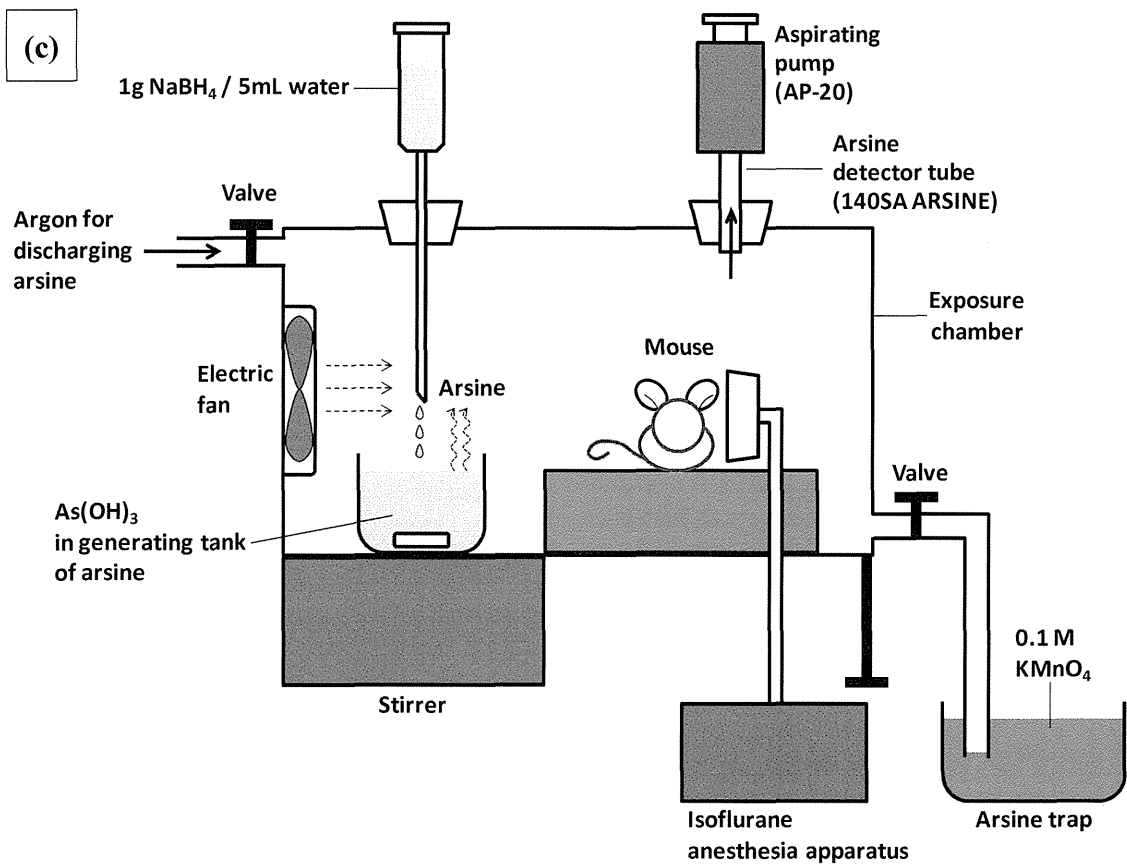


图3 曝露装置概略图

## C. 研究結果

### ①アルシン曝露による溶血機序ならびにHbとの相互作用の検討

#### a. *in vitro* 曝露実験

アルシン発生器内で発生させたアルシンをマウス血液試料に導入し、遠心分離後に得られた上澄液を図4に示す。コントロールと比較して曝露群では溶血の増大が認められたが、通常の曝露よりも通気を伴いながら曝露した直後の方が、さらに、曝露後90分間室温放置した方が、より強い溶血効果が認められた。また、同試料のスペクトル分析結果から、曝露群において、ヘム構造に反映するQバンド付近の吸収に変化は認められず、Soret帯付近に変化が見られたことから(図5)、少なくともグロビン蛋白にヒ素付加体が形成されている可能性が強くと示唆された。

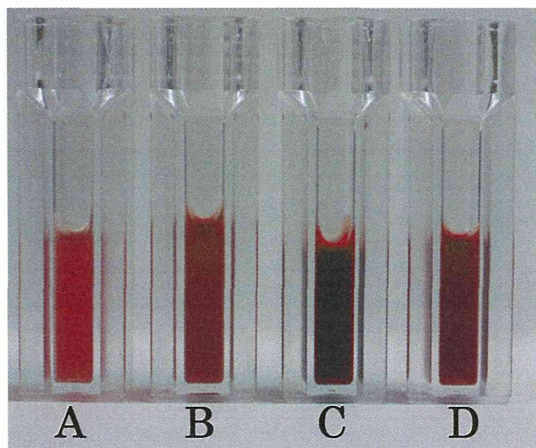


図4 アルシン曝露した溶血試料

A : コントロール、B : 曝露直後、C : 曝露後90分、D : 曝露直後(通気)

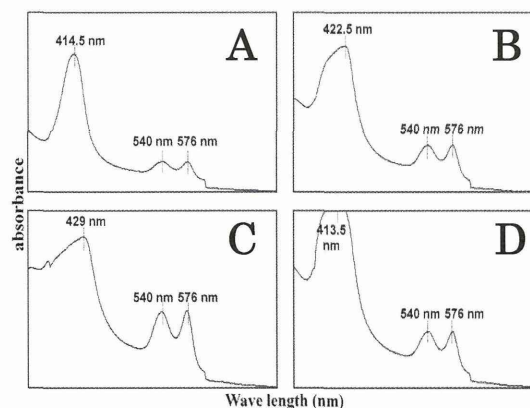


図5 溶血試料の吸光スペクトル

A : コントロール、B : 曝露直後、C : 曝露後90分、D : 曝露直後(通気)

また、アルシン曝露血液について血球stroma試料をHPLC-ICP-MSで分析したところ、Fe(m/z 57)に由来するHbの溶出ピーク位置にAs(m/z 75)のピークが検出され、Hb-As付加体の生成が示唆された。このピークは曝露後直ちに生成し(図6b)、時間経過による変化はほとんど見られなかった(図6c,d)。

さらに、アルシン曝露した血液の上澄液の吸収スペクトルを経時的に測定したところ、曝露後室温放置60分まで溶血は見られなかったが、90分では強い溶血が認められ、特に曝露後に空気置換した血液試料においてその効果が著しく認められた(図7、表1)。これらのことから、アルシン溶血機序においては酸素分子に起因する複雑な要因の関与が推察された。

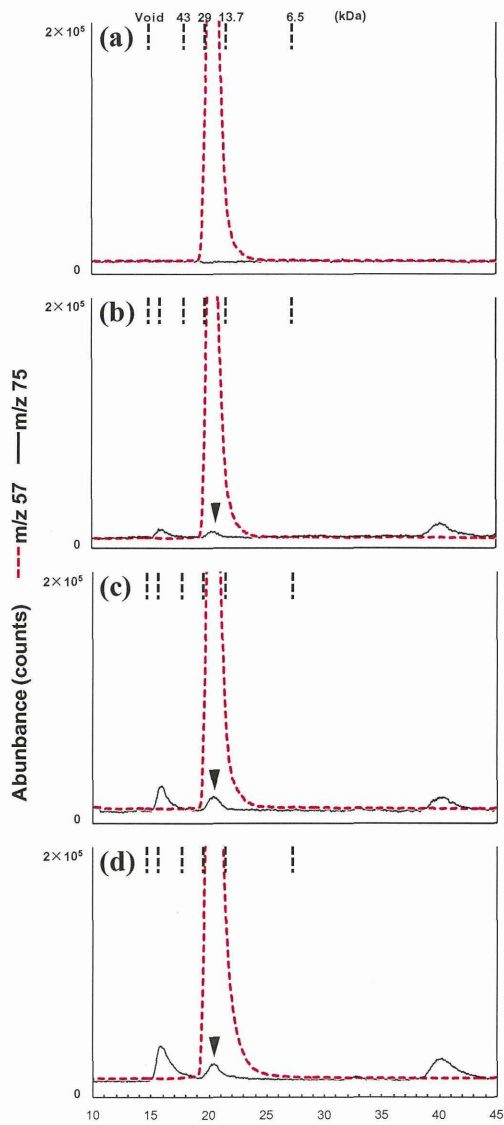


図6 アルシン曝露マウス血液から得られた血球stromaのHPLC-ICP-MSクロマトグラム  
(a)コントロール、(b)曝露直後、(c)曝露後60分、(d)曝露後90分

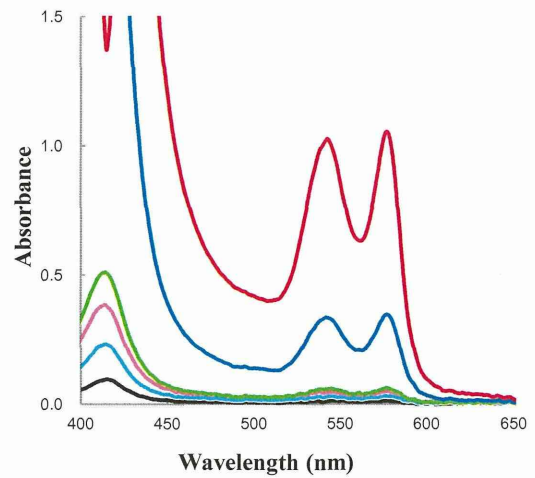


図7 アルシン曝露した血液の上澄液の吸収スペクトル

表1 アルシン曝露した血液の上澄液のピーク波長および吸光度

	ABS (波長 [nm])	
	Soret 帯	Q バンド
コントロール	0.097(415)	0.013(537), 0.013(576)
曝露直後	0.381(414)	0.044(538), 0.046(576)
曝露後 60min	0.228(415)	0.026(537), 0.028(576)
曝露後 60min (空気置換)	0.507(416)	0.055(539), 0.059(577)
曝露後 90min	—	0.330(543), 0.344(577)
曝露後 90min (空気置換)	—	1.022(542), 1.051(577)

#### b. *in vivo* 曝露実験

アルシン曝露マウスから採取した血液(血漿)をHPLC-ICP-MSで分析したところ、Hbの溶出ピーク位置にAsのピークも検出されたことから(図8)、*in vivo* においてもHb-As付加体が生成する可能性が示唆された。



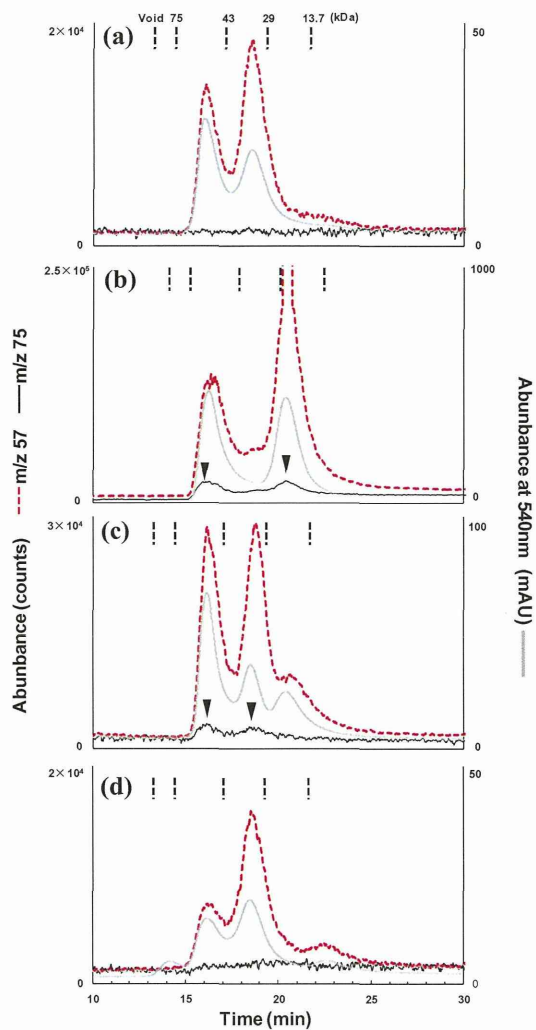


図8 アルシン曝露マウス血液(血漿)のHP LC-ICP-MSクロマトグラム

(a)コントロール、(b)単回全身曝露、(c)反復全身曝露、(d)単回経皮曝露

※(a)、(d)は全血、(b)、(c)は血漿を測定。

## ②アルシン曝露による溶血とそれにとまなう腎毒性機序の解明

病理組織学的検査では、経皮曝露マウスは各臓器とも変化が認められなかったが、全身吸入マウスには腎臓、肝臓および脾臓に変化がみられた。腎臓では、近位尿細管曲部の上皮の細胞質内にエオジン好性の球

状物質が多量に沈着し、尿細管の内腔にも貯留がみられた(図9)。同様に肝臓のクッパー細胞(図10)と脾臓の赤脾髄内の網内系細胞(図11)にも認められたが、沈着の程度は腎臓が最も顕著であった。エオジン好性物質はいずれの臓器もHb免疫染色に陽性であり、Hbの沈着(図12)であることが確認できた。なお、これらの臓器に壊死性の変化は認められなかった。また、肺組織には特に変化は認められなかった。なお、これらの結果をまとめたものを表1に示した。



図9 アルシン曝露マウスの腎臓組織(HE染色)

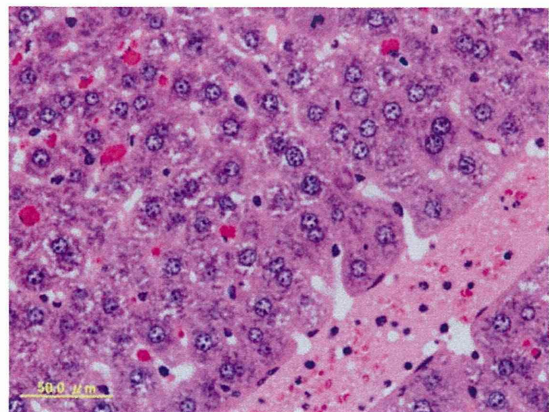


図10 アルシン曝露マウスの肝臓組織(HE染色)

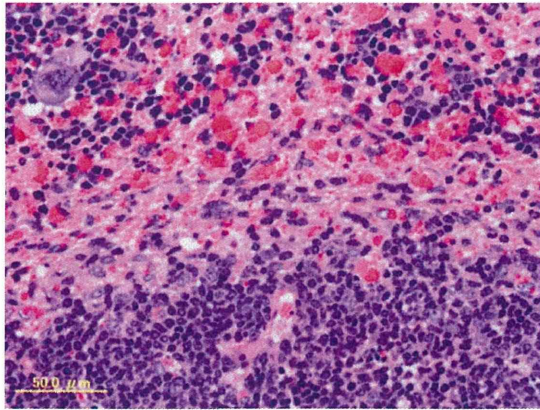


図11 アルシン曝露マウスの脾臓組織(HE染色)

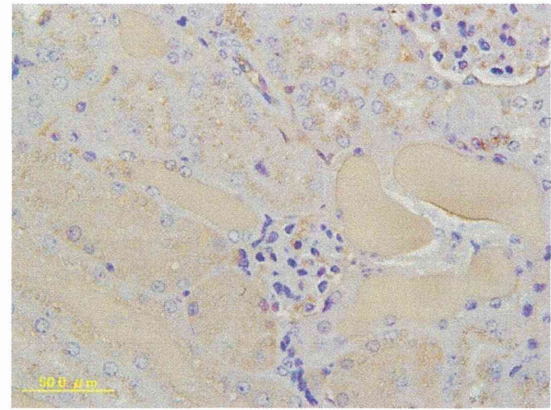


図12 アルシン曝露マウスの腎臓組織(Hb染色)

表 1. Histopathological findings observed in hairless mice exposed to arsine gas by whole-body or percutaneous-only route

Route of exposure	Control	Whole-body inhalation	Percutaneous-only
No. of animals examined	1	4	4
Kidney	NS		NS
Eosinophilic globules: proximal convoluted tubules		4 (3+)	
Eosinophilic casts: distal tubules		3 (+ ~ 2+)	
Eosinophilic casts: Henle's loops		2 (+)	
Liver	NS		NS
Eosinophilic Kupffer cells		4 (+ ~ 2+)	
Spleen	NS		NS
Eosinophilic globules: red pulp		4 (3+)	
Lung	NS	NS	NS

Note: Values indicate number of animals bearing lesions.

( ): Grade of histopathological findings (+: slight, 2+: moderate, 3+: severe)

NS: No significant change in all animals

## D. 考察

### ①アルシン曝露による溶血機序ならびにHbとの相互作用の検討

#### a. *in vitro* 曝露実験

アルシン曝露血液から得られた血球stroma試料のHPLC-ICP-MSで分析によりHb-As付加体の生成が示唆された(図6)。このピークは曝露後直ちに生成し、時間経過による変化はほとんど見られなかった。また、同試料のスペクトル分析結果より(図5-7)、曝露後室温放置60分まで溶血は見られなかったが、90分では強い溶血が認められ、特に曝露後に空気置換した場合においてその効果が著しく認められた。グロビン蛋白にヒ素付加体が形成されている可能性も強く示唆された。

これらのことから、血液へのアルシン曝露により速やかにHb-As付加体が生成するが、その溶血機序においては酸素分子に起因する複雑な要因の関与が推察された。

#### b. *in vivo* 曝露実験

アルシン曝露マウスの血液(血漿)のHPLC-ICP-MSで分析により、*in vivo*においてもHb-As付加体が生成する可能性が示唆された(図8)。*in vitro* 実験の結果と併せて、このHb-As付加体のモニタリングは、アルシン曝露によるリスク評価のためのBM法として有用であると思われる。

### ②アルシン曝露による溶血とそれともなう腎毒性機序の解明

腎臓、肝臓および脾臓においてHb陽性物質の沈着像が認められたことから、溶血により放出されたHbはこれらの臓器に沈着することが明らかになった。Hbの沈着は特に腎臓で顕著であり、腎臓の近位尿細管にHb

が蓄積した結果、腎機能障害を引き起こすものと推測されたが、溶血のメカニズムにもなう腎機能障害に関しては、その機構解明とともに更なる検討が必要となろう。

## E. 結論

①アルシン曝露により、*in vivo* 系においてもHb-As付加体が生成することが明らかとなった。このHb-As付加体のモニタリングは、アルシン曝露によるリスク評価のためのBM法として有用であると思われる。一方で、アルシン曝露による溶血のメカニズムについては、Hb-As付加体よりも、酸素分子に起因する複雑な要因の関与が推察された。また、経皮曝露影響は全身吸入曝露影響に比べて小さいと推察された。

②アルシン曝露による腎機能障害は、吸入により肺から吸収されたアルシンが溶血を引き起こし、溶血により放出されたHbが、腎臓の近位尿細管に蓄積したことにより引き起こされると推測した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

下田康代、加藤孝一、山野優子、畑明寿、立川真理子、圓藤陽子、圓藤吟史、山中健三、無機アルシンの溶血機序：ヘモグロビン-ヒ素付加体形成の可能性。日本薬学会第133年会 横浜市 2013年3月28-30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

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

全衛連の労働衛生検査精度向上研究会において、有機則の対象となっていない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、昨年引き続き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、平成24年4月から11月に1,812件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11.9%存在していた。これらは、昨年よりも高い数値である。

NMACクロスチェックとして、会員6機関に対し、ばく露尿3検体、添加尿1検体、標準液1検体の資料を配布した。測定方法を見ると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ので、不分離の影響を見るため今回はNMFとNMACの混合試料で行った。結果として、変動係数は、低濃度ばく露尿で14.5%、これ以外の試料では10%前後であり昨年より改善した。

NMAC分析では、GC注入口の熱によって代謝物であるDMAC-OHが熱分解しNMFに変化していることが分かったので、DMAC-OHとNMACを分離定量する方法として、GC-MSでの誘導体化測定をいくつか試みたが、確立できなかった。今後、LC-MSでの分離測定を検討していく。

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、ドイツ、英国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。

この研究においては、測定対象物質と測定法を確立し、参加機関における精度管理を実施し、精度管理の向上を目的とする。

※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，財団法人神奈川県予防医学協会，財団法人近畿エコサイエンス，中央労働災害防止協会労働衛生調査分析センター，関西労災病院中毒研究センター，パナソニック産業衛生科学センター，株式会社エスアールエル，株式会社江東微生物研究所，株式会社ビー・エム・エル，株式会社保健科学研究所，三菱化学メディエンス株式会社，全衛連事務局

## B. 研究方法

### 1. 文献調査

昨年に引き続き DMAC の尿中代謝物測定法，測定事例に関して文献調査を行った。文献検索サイト PubMed，医中誌 web，google scholar 等を用いて N,N-Dimethylacetamide(DMAC)，N-methylacetamide(NMAC)，urine，biological monitoring，exposure，workplace，occupational 等をキーワードとして，DMAC の生物学的モニタリング手法について国内・海外の文献を検索した。

### 2. 国内における DMAC 代謝物測定状況調査

昨年に引き続き NMAC 測定状況と濃度レベル調査を会員 7 機関に対し行った。

(図 1)

### 3. 現行測定手法での施設間差比較

現行測定手法による施設間差比較(クロスチェック)を実施した。クロスチェックの参加は佐賀大学を含め DMAC の測定実績のある 6 施設であった。

試料の調製は，江東微生物研究所が実施

し，試料は，ばく露尿 3 濃度(①,②,③)，非ばく露尿に標準水溶液を添加し 25mg/L に調製した添加尿，および 25mg/L に調製した標準水溶液を用いた。試料③，添加尿，水溶液は NMF,NMAC 混合試料である。試料はプラスチックチューブに分注後，凍結状態で各機関に郵送にて配布した。

### 4. 代謝物一斉測定手法の検討

1) クロロギ酸アルキルを用いた誘導体化  
精製水で 10 $\mu$ g/ml に調製した NMAC 300 $\mu$ l に 30 $\mu$ l のクロロギ酸アルキル 6 種類 (クロロギ酸メチル，エチル，ブチル，ヘキシル，フェニル，ベンジル) (東京化成工業，東京) をそれぞれ添加し，30 $\mu$ l のピリジン及び 300 $\mu$ l のノルマル・ヘキサンを加え 1 分間攪拌後，遠心 (3,000rpm，5min) しヘキサン層を GC/MS に注入した。

2) 4-(4,6-Dimethoxy[1,3,5]triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMT-MM)を用いた誘導体化

精製水で 10 $\mu$ g/ml に調製した NMAC 1000 $\mu$ l に 1000 $\mu$ g/ml の酢酸 50 $\mu$ l，5000 $\mu$ g/ml の DMT-MM (和光純薬工業，京都) 50 $\mu$ l，反応促進剤として 1000 $\mu$ g/ml の N-Methylmorpholine(NMM) 50 $\mu$ l を加え 60 $^{\circ}$ C で 1 時間放置した後，1ml のメタノールで希釈し GC/MS に注入した。

3) 高速液体クロマトグラフによる一斉分析

高速液体クロマトグラフによる尿中代謝物一斉分析のために紫外吸収(UV)検出器と質量分析計(MS)を用いて検討を行った。

## C. 研究結果

### 1. 文献調査

主な代謝物である DMAC-OH と NMAC(図2)の測定法に関する文献調査の結果を表1に示す。尿中 NMAC の測定にはガスクロマトグラフ (GC/FID, FTD, MS) 法が多く用いられている。NMAC が極性物質のため極性カラムの使用が多い。近年では DMAC の最終代謝物である AMMA を測定対象成分とする報告もある。AMMA は分子構造が大きく、極性物質であるため測定に高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いる方法が報告されている。また、いくつかの文献において、GC 注入口の熱によって DMAC-OH が脱メチルし NMAC に変換されることが報告されている。なお、AMMA, DMAC-OH 等は市販の標準品がなく試薬を合成して用いている。

各国の基準値を表2に示す。DMAC の職業的ばく露限界値は日本においては、日本産業衛生学会が 10ppm(36mg/m<sup>3</sup>) (皮) を勧告しており、米国の ACGIH は 10ppm(36mg/m<sup>3</sup>) (skin), Occupational Safety and Health Administration (OSHA) は Permissible Exposure Limit (PEL)として 10ppm(36mg/m<sup>3</sup>) (skin), National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) は Recommended Exposure Limit(REL)として 10ppm(35mg/m<sup>3</sup>) (skin), ドイツの Deutsche Forschungsgemeinschaft(DFG) は Maximum Concentration Values in the Workplace(MAKs) として 10ppm (36mg/m<sup>3</sup>) (skin), 英国の Health and Safety Executive (HSE) が Work Place Exposure Limit (WEL)として 10ppm

(36mg/m<sup>3</sup>)を勧告している。各国とも 10ppm である。20-25ppm の DMAC を反復してばく露された作業者に黄疸が起こったが、これは経皮吸収が一因との報告があり、経皮ばく露が防護されていれば 10ppm で肝障害や胎児への悪影響が防護できるとし、これが職業的ばく露限界値の根拠となり、勧告値または規制値とされている。

生物学的許容値は、日本においては勧告されておらず、米国の ACGIH が Biological Exposure Indices (BEI) として尿中 NMAC として週末の作業終了後の採尿で 30mg/g creatinine , ドイツの DFG が Biological Arbeitsstoff Toleranzwerte (BAT)として尿中 NMAC としてシフト後の採尿で 30mg/g creatinine, 英国の HSE が Biological monitoring guidance values (BMGVs) として尿中 NMAC としてシフト後の採尿で 100mmol/mol creatinine (64mg/g creatinine) を勧告している。

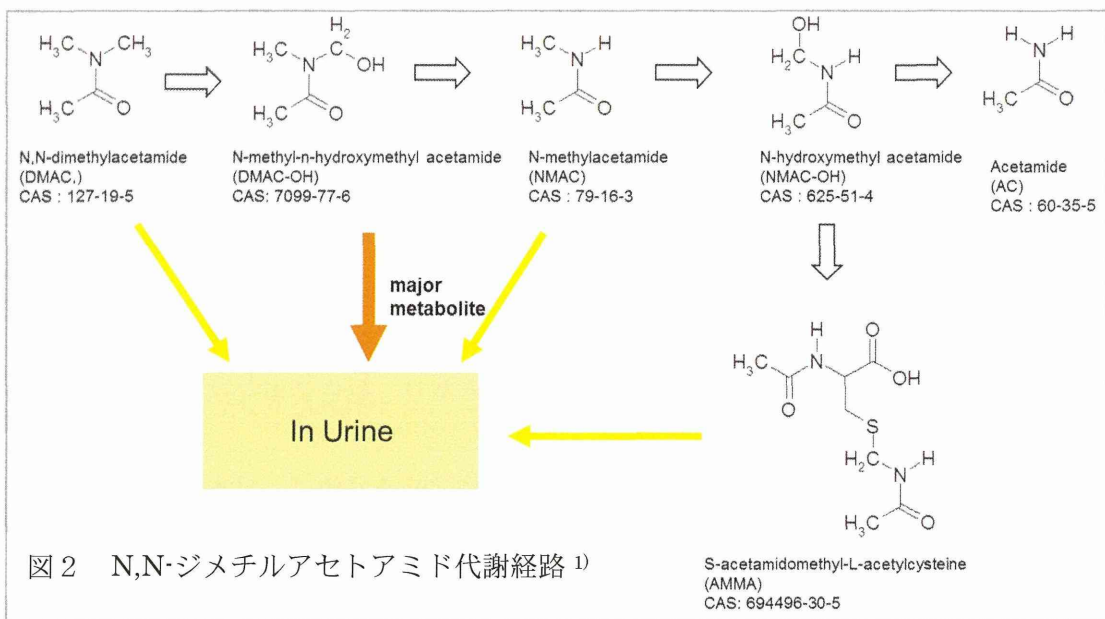


表1 文献調査結果

年	筆頭著者	測定対象成分	サンプル	分析機器	備考
1974	J.R.Barnes <sup>2)</sup>	NMAC, NMF	urine	GC-FID	ACGIH BEIs の ref.
1987	Paul J.A. Borm <sup>3)</sup>	NMAC	urine	GC-FID	
1997	T. Kawai <sup>4)</sup>	NMAC, NMF	urine	GC-FTD	注入口温度の影響を報告
2000	T. Nomiyama <sup>5)</sup>	NMAC	urine	GC-FTD	
2003	L Perbellini <sup>6)</sup>	DMAC, NMAC	urine	GC-MS	
2005	宮内博幸 <sup>7)</sup>	NMAC, NMF	urine	GC-MS	
2006	O. Doris <sup>8)</sup>	DMAC	plasma	LC-MS	
2010	P. Andrea <sup>9)</sup>	NMAC	urine	GC-MS	
		AMMA	urine	LC-MS	

表2 各国の環境濃度指針値と個人ばく露濃度指針値の比較

	日本		米国 <sup>1)</sup>	ドイツ <sup>10)</sup>	英国 <sup>11)</sup>
環境濃度指針値	管理濃度 (厚労省)	許容濃度 (産衛学会)	TLV-TWA (ACGIH)	MAK (DFG)	WEL (HSE)
	—	10 ppm (36mg/m <sup>3</sup> )	10 ppm (36mg/m <sup>3</sup> )	10 ppm (36mg/m <sup>3</sup> )	10ppm (36mg/m <sup>3</sup> )
個人ばく露濃度指針値	有機則 (厚労省)	生物学的ばく露指標 (産衛学会)	BEIs (ACGIH)	BAT (DFG)	BMGV (HSE)
	—	—	30 mg NMAC/g creatinine	30mg NMAC/g creatinine	100 mmol NMAC/mol creatinine



(参考文献)

- 1) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. (ACGIH): TLVs and BEIs 7th Edition Documentation CD-ROM N,N'-dimethylacetamide (DMAC) Recommended BEI, 2001
  - 2) J.R.BARNES and N.W.HENRY: The Determination of N-Methylformamide and N-Methylacetamide in Urine, AIHA journal:84-87,1974
  - 3) Paul J.A.Borm et al.: Environmental and Biological monitoring of workers Occupationally Exposure to Dimethylacetamide: J Occup Med: 29(11): 898-903, 1987
  - 4) 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
  - 5) T.Nomiyama et al.: Dermal absorption of N,N'-dimethylacetamide in human volunteers: Int Arch Occup Health: 73: 121-126, 2000
  - 6) L Perbellini et al.: Biological monitoring of occupational exposure to N,N'-dimethylacetamide with identification of a new metabolite: Occup Environ Med: 60(7): 746-751, 2003
  - 7) 宮内博幸他: ジメチルアセトアミド, ジメチルホルムアミド曝露作業者における時間断面研究 1. 個人曝露濃度と尿中代謝物の測定: 産衛誌: 47 巻: 850, 2005
  - 8) O.Doris et al.: Monitoring of N,N'-dimethylacetamide in children during i.v.-busulfan therapy by liquid chromatography-mass spectrometry: J Chromatogr B: 838: 129-134, 2006
  - 9) P.Andrea et al.: S-(acetamidomethyl) mercapturic acid (AMMA): A new biomarker for occupational exposure to N,N'-dimethylacetamide: J Chromatogr B: 878: 2515-2519, 2010
  - 10) Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): The MAK-collection Part IV: BAT Value Documentations, Vol.5, 2010
  - 11) 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'](http://www.hseni.gov.uk/eh40_2005.pdf#search='List of approved workplace exposure limits 2011'))
2. 国内における DMAC 代謝物測定状況調査
- 会員施設のうち、有機溶剤健診として 3 施設で NMAC の受託があり、平成 24 年 4 月から 11 月の受託件数は 1,812 件であった。そのうち、30mg/L 以上を示す検体数は、11.9%であった。昨年は、1,279 件で、30mg/L 以上を示す検体数は、7%であったことから、増加していた。
3. 現行測定手法での施設間差比較

測定実績のある5施設と佐賀大学を加えた6施設で施設間比較(クロスチェック)を行った。

いずれの機関もACGIHが勧告する尿中NMAC30mg/Lを指標に測定を実施している。各施設の分析条件を図3,表3に示す。

4施設がGC・高感度窒素リン検出器(NPD,FTD)法,2施設がGC・質量分析(MS)法であり,いずれの施設もNMAC,NMFともに同じ分析条件を用い,使用カラムは1施設を除いて極性カラム,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,4施設で行われ,注入口温度は,150℃から280℃であった。150℃の1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2施設を除いて近接していた。

各試料の施設別集計結果を図4に示した。参考として平成23年のばく露尿の結果も表示する。尿中NMACの変動係数(CV)は,平成23年は低濃度試料①で24.4%,高濃度試料②で7.1%であった。平成24年は,ばく露尿①14.5%,②8.5%,③11.5%,添加尿と水溶液はともに10.3%であった。

両年のクロスチェックでは低濃度の試料ではばらつきが大きくなる傾向があった。2年間の調査で前処理,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。24年ばく露尿③,添加尿,水溶液は,NMF,NMAC混合試料であったが,ピーク不分離等の影響はなかったようである。

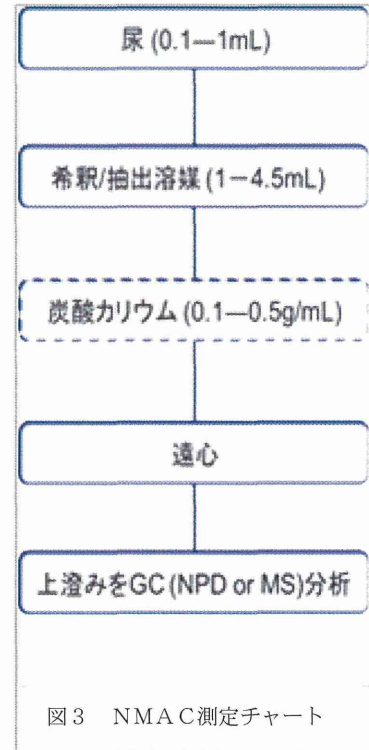
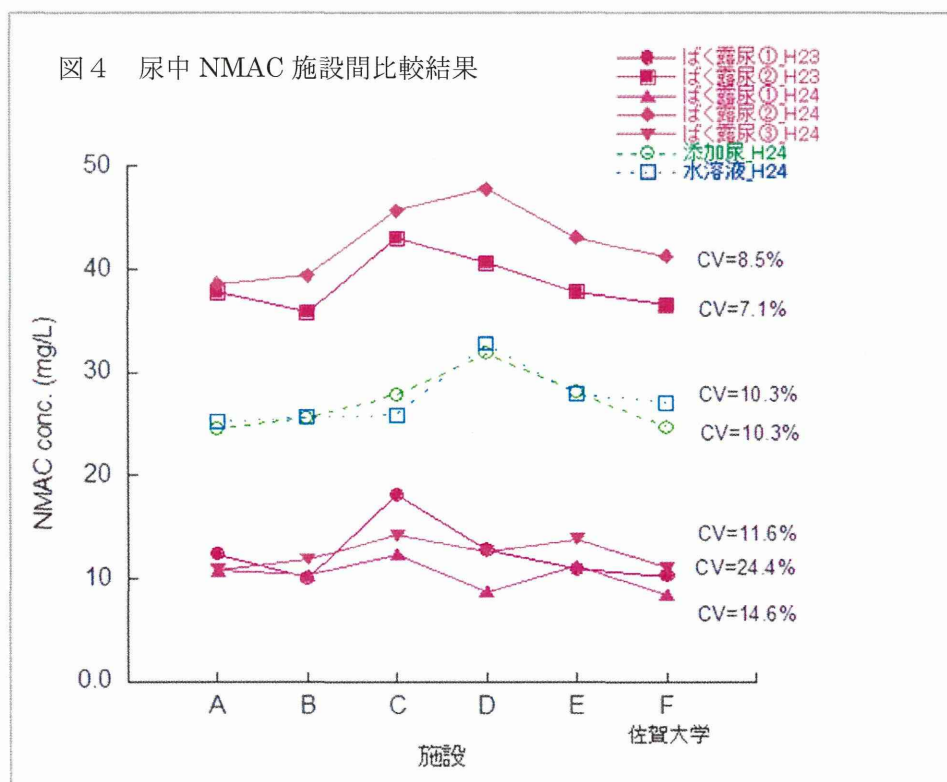


表3 前処理及び分析条件

		施設	A	B	C	D	E	F	
前処理	試料量(μL)		500	500	500	1000	500	300	
	炭酸カリウム処理		0.25-0.5g/mL	0.5g/mL	0.2g/mL	0.5g/mL	無	無	
	希釈溶媒		エタノール	エタノール	エタノール	エタノール	1,4-ジオキサン	メタノール	
	溶媒量(μL)		4500	5000	2000	2000	1000	2700	
	内部標準物質名		N,N-ジエチルホルムアミド'	キノリン	キノリン	キノリン	N,N-ジエチルホルムアミド'	N,N-ジエチルホルムアミド'	
分析方法	検出器		GC-NPD	GC-NPD	GC-MS	GC-NPD	GC-NPD	GC-MS	
測定条件	カラム (スベック)		Quadrex Methyl Silicone (0.32mm×50m, 1μm)	DB-WAX (0.25mm×60m, 0.25μm)	EC-WAX (0.25mm×30m, 0.25μm)	DB-WAX (0.25mm×30m, 0.5μm)	007-CW-25V (0.53mm×25m, 3μm)	HP-INNOWAX (0.25mm×30m, 0.25μm)	
	注入口温度(°C)		250	250	150	240	280	250	
	検出器温度(°C)		330	250	250	250	290	240	
	カラム温度		90°C(1min)-7°C/min-200°C(5min)	100°C(5min)-10°C/min-7.5°C/min-200°C(2min)	45°C(0min)-30°C/min-250°C(4.5min)	150°C(0min)-5°C/min-200°C(0min)	130°C(1min)-10°C/min-170°C(0min)	40°C(1min)-10°C/min-200°C(0min)	
	注入法		バルドスプリットレス	スプリット	スプリットレス	スプリット	スプリット	スプリット	
	試料注入量(μL)		2	2	1	1	1	1	
	キャリアーガス		He (3.0ml/min)	He (1.83ml/min)	He (2.0ml/min)	He (1.3ml/min)	He (15ml/min)	He (1.0ml/min)	
定量	I.S	R.Time (min)	12.4	20.85	5.5	10.80	2.5	11.35	
		R.Time (min)	7.8	13.61	4.5	5.91	4.2	13.58	
	NMF	定量下限(mg/L)	1	1.0	0.5	0.5	0.5以下	0.5	
		NMAC	R.Time (min)	11.39	13.37	5.9	5.7	4.1	13.47
			定量下限(mg/L)	1	0.5	0.5	0.5以下	0.5以下	0.5



#### 4. 代謝物一斉測定手法の検討

昨年の結果から GC 注入口温度の影響で代謝物の組成が変わることがわかったので、注入口温度の影響を受けない代謝物一斉測定法を検討した。まず誘導体化による一斉分析を考えた。アミノ基の誘導体化試薬としてはアシル化剤が用いられることが多いが、水がある状態では反応しない試薬が多く、一度無極性溶媒に抽出する操作が必要である。しかしながら NMAC は水溶性が高いため抽出は困難である。そこで、法中毒の代謝物測定で用いられた報告のあるクロロギ酸アルキルと水やプロトン性溶媒中でも使用可能な脱水縮合剤である DMT-MM を用いて検討した。

##### 1) クロロギ酸アルキルを用いた誘導体化

NMAC, DMAC-OH とクロロギ酸アルキルの反応を図 5 に示す。検討に用いたのは、クロロギ酸メチル, エチル, ブチル, ヘキシル, フェニル, ベンジルである。クロロギ酸フェニルは反応の段階で白色の固形物が析出したため、分析から除外した。クロロギ酸メチル, エチル, ブチルの 3 種類は誘導体らしいピークが検出されなかった。クロロギ酸ヘキシルおよびベンジルは誘導体らしきピークが確認されたが反応生成物の分子イオンが検出されず誘導体ピークかの同定ができなかった。

##### 2) 4-(4,6-Dimethoxy[1,3,5]triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMT-MM)を用いた誘導体化

NMAC と DMT-MM の反応を図 6 に示す。誘導体と思われるピークを確認することができなかった。反応の順番, 反応条件

(時間, 温度) を変えて行っても同様の結果であった。なお, 他のメチルアミンでは水中で反応していたが, NMF においては反応しなかった。

##### 3) 高速液体クロマトグラフによる一斉分析

UV 検出器においては精製水マトリックスの標準液試料は低波長(190nm)でピークが確認されたが, 尿マトリックスでは夾雑物が多いためバックグラウンドが高く明確なピークを得ることはできなかった。

MS においては代謝物の分子量が小さいためイオン化に夾雑物の影響が出やすく NMAC のピークの特定に至っていない。