

図5 NMAC, DMAC-OH とクロロギ酸ベンジルの反応

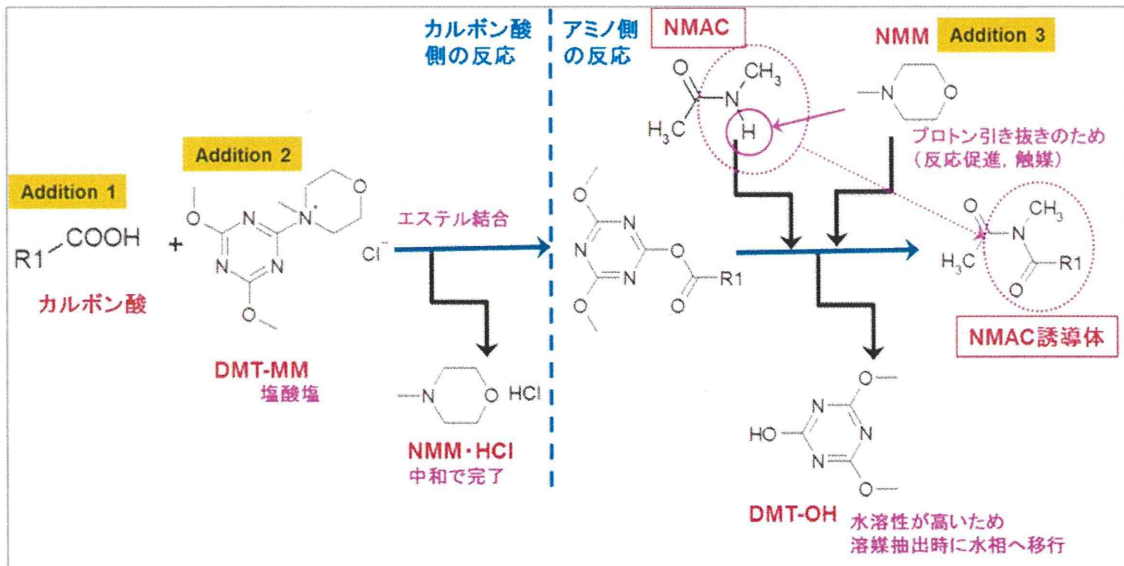


図6 NMAC と DMT-MM の反応

D. 考察

有機溶剤中毒予防規則の健康診断の生物学的モニタリング検査は、日本が初めて法規化し、政策として行われたものである。近年、化学物質管理のあり方として未規制化学物質においてもリスクアセスメントを利用した事業者の自主管理として、ばく露を評価し、化学物質のばく露の防止、低減措置を講ずることが求められている。実際に DMAC は規制のかかっている物質であるにも関わらず事業所の自主管理として半年で約 1800 件の測定がされており、産業界においても健康障害が懸念されている物質であると考えられる。

NMAC の測定分析法は 1974 年に Barnes らにより GC 法が報告され、ACGIH が勧告する BEIs はこの方法による定量が引用されており、以後の研究においてもこの手法がベースとなっている。すなわち、BEIs が占める尿中 NMAC 濃度は GC 注入口温度 200℃の測定分析法から算出された値である。しかし、Kawai らは DMAC-OH が GC の注入口温度によって熱分解し脱メチルし NMAC に変化することを報告した。DMAC と DMF にばく露された作業員の尿で GC 注入口の温度を変化させ (150–300℃) NMAC, NMF を定量し、それぞれ最大で約 50%, 10% 程度の誤差を報告している。DMF-OH および DMAC-OH の挙動は確認されていないが、これは注入口の熱によって代謝物である DMF-OH, DMAC-OH が熱分解し NMF, NMAC に変化していることを考察している。河合らの報告では作業員尿で脱メチルの変化は NMAC では 225℃, NMF では 250℃でプラトーとなっている。我々が昨

年行った DMAC-OH 水溶液を用いた変化率は、ほぼ一致した傾向であった。したがって、BEIs で示される測定法は注入口温度 200℃であり、施設間比較に参加した施設においても注入口温度が 250℃より低い場合は未変化体の DAMC-OH が含まれる可能性があり測定値に影響を及ぼすことが示唆された。

モニタリング指標には含有量が多く安定しているものが測定精度や感度の面から良いとされ、DMAC-OH をモニタリング指標にするのが適切であるが、標準品の市販がなく、合成が必要で測定が煩雑になる。また、最終代謝産物である AMMA についても標準品は市販されていないが、半減期が長く長期ばく露の指標として適切との報告もあり、DMF の代謝物である AMCC においては勧告値も設定されていることから AMMA をバイオマーカーとすることも検討できる。

今回の施設間差比較ではいずれの機関でも尿中 NMAC をバイオマーカーとし、GC 法で測定をおこなっていたが、低濃度域でのばらつきが大きく測定精度に問題があることが示唆された。生物学的モニタリング研究の目的は、体内に吸収された有害化学物質が、生体に及ぼす最少量、あるいは悪い影響を及ぼさない最大量を求めることであるため、DMAC は健康影響に関する疫学調査の報告も多くないことから、低濃度域まで精度よく測定することは重要である。

DMF, DMAC の混合ばく露では、GC 法において NMAC と NMF の分離が必要であるが、現在多く用いられている極性カラムではピークが近接していることから測定精度に欠けることも示唆された。NMAC

と NMF を分離させるためには中極性から無極性のカラムを使用しなければならないが、極性物質と中無極性カラムの組み合わせはピークがテーリングし、測定精度に影響を及ぼす可能性がある。また、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、水溶性が高いため溶媒抽出がしにくく、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、日常分析においての問題点がある。これらが低濃度域での測定誤差の原因になっていると考えられる。

これらの問題を解決するために誘導体化による手法を試みた。誘導体化とは、測定対象物の分子構造を変えることで、その物理化学的性質を変える手法である。今回は誘導体化することで極性基をふさぎ、①溶媒抽出が容易になる、②GC 注入口でのキャリーオーバーの防止、③他の成分との分離等の効果が見込まれる。しかしながら、水中（尿中）すなわち水リッチな状態で誘導体化が可能な試薬は少なく、可能な試薬としてクロロギ酸アルキル及び DMT-MM を用いて誘導体化を試みた。クロロギ酸アルキルはアルカリ水溶液中で 1 級 2 級アミンと短時間で反応し、水酸基とも反応する。今回用いた GC/MS のイオン化法が電子イオン化(EI)法で分子イオンの検出が難しく、誘導体の生成は確認できなかったが、化学イオン化(CI)法あるいは LC/MS の大気圧化学イオン化(APCI)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

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

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

該当なし

【目的】近年、半導体産業での低濃度作業環境におけるアルシン中毒が報告され、これはアルシンの経皮吸収による可能性がある。そこで、アルシン曝露の適切な生物学的モニタリング法の確立のための基礎データを得るために、マウスに経皮または全身アルシン曝露を行い溶血などの生体影響を検討するとともに、その機序解明のため *in vitro* 実験を行った。

【方法】ヒ素量として 0.5-5 mg の亜ヒ酸を中性 NaBH_4 で還元し、容積約 $2,500\text{cm}^3$ (2.5L) の曝露装置内に 40-300ppm のアルシンを発生させ、マウスに 5 分間曝露させた。なお、装置内アルシン濃度は北川式検知管で測定した。

【結果および考察】アルシン全身または経皮曝露本実験を実施した結果、約 300ppm 5 分間の単回全身曝露では曝露直後は溶血が認められなかったが、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徐々に進行することが明らかになった。約 300ppm 5 分間の経皮曝露では、極めて軽微な溶血であった。約 90ppm 5 分間の全身曝露を 12 時間のインターバルを経て計 4 回反復曝露した場合、4 回目曝露終了後 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に依存して溶血の増大が認められた。溶血した血漿を HPLC-ICP-MS 法で分析した結果、鉄結合蛋白質にヒ素の特異的な結合が見られ、ヘモグロビン(Hb)がヒ素結合標的的部位であることが示唆された。さらに、ヘム骨格部分ではなくグロビン蛋白部分にヒ素付加体が形成されている可能性も示唆された。一方、アルシンによる *in vitro* 曝露した血液試料でも溶血が見られ、酸素の存在でより強い溶血が認められた。以上、アルシン曝露による溶血は Hb-ヒ素付加体形成だけではなく、その後の酸素分子の関与が重要な役割を演じている可能性が推定された。

下田康代¹⁾、加藤孝一¹⁾、山野優子²⁾、畑 明寿³⁾、立川真理子¹⁾、圓藤陽子⁴⁾、圓藤吟史⁵⁾、山中健三¹⁾

¹⁾日本大薬、²⁾昭和大学、³⁾千葉科学大危機管理、⁴⁾関西労災病院、⁵⁾大阪市大院

日本薬学会第 133 年会、横浜、パシフィコ横浜

開催日：平成 25 年 3 月 27-30 日

発表日：平成 25 年 3 月 30 日 部 会：衛生薬学

発表形式：ポスター

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

尿中 N・メチルホルムアミドおよび N・メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果

市場正良 山本 忍 (佐賀大学社会医学)
天野 有康 中村 正 (江東微生物研究所)
労働衛生検査精度向上研究会

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。今回、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) の尿中代謝物 N・メチルホルムアミド (NMF) について、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えるべき 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機関の検査受託状況調査を実施したので報告する。

2. 試料および方法

今回実施したクロスチェックに参加した機関は NMF 8 施設、NMAC 6 施設である。試料は、NMF では標準水溶液 3 濃度、ばく露尿 4 濃度、非ばく露添加尿 3 濃度を、NMAC では、ばく露尿 2 濃度を用いた。5 施設が GC-NPD 法、3 施設が GC-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、定量に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。

3. 結果および考察

変動係数は NMF では、ばく露尿と水溶液の低濃度試料でそれぞれ 13.2, 19.1%、それ以外は、ばく露尿 5.5-8.5%、添加尿 5.1-7.5%、5.0-9.0%であった。NMAC は、低濃度試料で 24.4%、高濃度試料で 7.1%であった。DMF、DMAC の代謝では、中間代謝物である DMF-OH および DMAC-OH が、GC 注入口の熱によって熱分解し NMF、NMAC に変化していると考えられている。NMAC を注入口温度を変えて分析すると、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。

NMAC の検査受託状況は、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%であった。NMF 検体での NMAC 混合に関しては、NMF 検体数の 0.8%とわずかではあるが NMF のサンプルに NMAC ピークが確認された。

4. まとめ

クロスチェック結果は、低濃度でのばらつきがあった。注入口温度も測定精度に影響を及ぼすことが示唆された。NMAC 千件以上の受託があり、NMF との混合使用は少なかった。

