

201326003A

平成25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25年度研究報告書

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

平成26年5月

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
研究代表者 圓藤吟史	
研究分担者 山中健三	
研究分担者 山野優子	
研究分担者 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(その2)	
マウス保存血へのアルシンin vitro曝露によるヘモグロビン付加体生成-----	10
研究代表者 圓藤吟史	
研究分担者 山中健三	
研究分担者 山野優子	
2. ジメチルアセトアミドのBMの検討-----	16
研究分担者 市場正良	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	34
Kato K, Yamanaka K, Shimoda Y, Yamano Y, Nagano K, Hata A, Endo Y, Tachikawa M, Endo G: Arsine toxicity is induced by inhalation but not by percutaneous exposure in hairless mice. <i>Toxicol Sci.</i> 2014; 39(2): 301-310	
市場正良, 山本 忍, 圓藤陽子: 微量金属の施設間クロスチェック. <i>労働衛生管理</i> 2014; 25(1): 30-34.	
圓藤吟史: 生物学的モニタリングの分布を明らかにする作業を. <i>労働衛生管理</i> 2014; 25(1): 2.	
山本 忍, 市場正良, 天野有康, 中村 正, 佐藤和也, 濱野和可子, 森浩司: 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(2). <i>労働衛生管理</i> 2013; 24(3): 48-52	
圓藤吟史: 平成24年度(第26回)労働衛生検査精度管理調査の実施結果について. <i>労働衛 生管理</i> . 2013; 24(3):16-24	

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
研究分担者	市場正良	佐賀大学医学部社会医学	教授

研究要旨

半導体などの製造に使用されているアルシンの急性毒性である溶血のメカニズムは明らかではない。そこで、マウス保存血を用いたアルシン曝露実験を行い Hb 付加体の検出を試みた。方法は、アルシンを曝露した雄性 ICR マウス保存血の血漿部分をサンプルとした。Hb 付加体の検出の前処理として、サンプルを 0.1%トリフルオロ酢酸で 5~100 倍に希釈し、マトリックスと混合してターゲットプレートにスポットした。分析はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計(MALDI-TOF-MS)で行い、得られたピークの分子量から付加体を推定した。その結果、アルシン曝露により通気の有無にかかわらず溶血が認められた。MALDI-TOF-MS の結果は、酸素の存在の有無にかかわらずアルシンに曝露したサンプルに分子量 15 kDa と 15.6 kDa の 2 本のピークが得られた。15kDa はグロビン α 鎖にヒ素(74.9)が結合したものであり、15.6kDa はグロビン α 鎖+ヘム(616.2)+ヒ素が結合したものと推測できた。

次に、全衛連の労働衛生検査精度向上研究会において、皮膚吸収がある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。昨年の研究から、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NMAC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、LC-MSMSでの分離測定を検討した。DMAC-OH,NMACの分離定量条件を、得ることができたが、AMMAは再現性に問題が残る。

A. 研究目的

昨年度の報告書に示したように、これまでマウスを用いたアルシン曝露実験により、激しい溶血並びにそれに伴うHt値の減少および近位尿細管へのヘモグロビン(Hb)陽性顆粒の沈着が確認された。また、化学物質の曝露評価にあたっては、一般的に個人曝露量の測定または作業環境測定が実施されるが、経皮吸収が想定される物質については、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。そこで、前年度に得られた*in vitro*でアルシンに曝露した保存血を用いて、溶血メカニズムの解明およびBM法の開発を目指した。

次に、産業界で使用される化学物質のリスク評価には個人ばく露濃度測定や作業環境測定が用いられる。しかし、経皮吸収が無視できない化学物質においては、化学物質の吸収量を正確に反映されないことから生物学的モニタリングによるばく露評価が必要とされている。近年、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)の代替品として使用されるN,N-ジメチルアセトアミド(DMAC)は、経皮吸収が指摘されている。そこで、DMACの生物学モニタリングのより適切な手法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

まず、前年度に得られた雄性ICRマウス由来のアルシン曝露保存血から血漿を分離し、曝露サンプルを2種類作製した。同様に2種類の対照サンプルを作製し、合計4種類のサンプルに対してMALDI-TOF-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計)を用いた分析を行った。

① 実験I : *in vitro*溶血サンプル作成

前年度の報告の通り、ヒ素分析法(ジエチルジチオカルバミン酸銀法: JIS K 0102)に準じて亜ヒ酸(ヒ素量として2 mg)を塩酸と亜鉛末で還元して発生させたアルシンに雄性ICRマウス保存血(日本生物材料センター)5 mlを10分間曝露した。曝露90分後に遠心分離して得られた血漿をサンプルとした(以下Exposed)。また、対照サンプルとして、無処置の保存血から分離した血漿(以下Cont. Pla)および血漿分離後の残渣血球に超純水を加えて溶血させ、遠心後の上清(以下Cont. Lys)の2種類を得た。

② 実験II : MALDI-TOF-MS分析

各々のサンプルを0.1%トリフルオロ酢酸で25~75倍に希釈し、シナピン酸のTA(アセトニトリル:0.1%トリフルオロ酢酸=1:2の混合溶液)飽和溶液と1:3の割合で混合し、1 µlをターゲットにスポットした。測定にあたっては、1サンプル当たりランダムに4,000か所を抽出し、1か所当たり10本のレーザーを照射した。得られたピークのm/z値から、付加体の分子量を推定した。

③ 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全衛連の労働衛生検査精度向上研究会会員7機関に対し行った。

※労働衛生検査精度向上研究会会員:

(財)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)エスアール

エル, (株) 江東微生物研究所, (株) ビー・エム・エル, (株) 保健科学研究所, 三菱化学メディエンス (株)

④ 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 NMAC の測定実績のある労働衛生検査精度向上研究会会員 5 機関である。

試料の調製は, (株) エスアールエルが実施し, 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④, および 25mg/L に調製した標準水溶液⑤を用いた。試料③, 添加尿④, 水溶液⑤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。

⑤ 代謝物一斉測定手法の検討

DMAC の尿中代謝物である N-メチルアセトアミド(NMAC)の測定法について、液体クロマトグラフ(LC)を用いた同時分析の検討を行った。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。DMAC-OH、AMMA は標準品が市販されていないため、東京化成工業株式会社に合成を依頼した。

(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。

C. 研究結果

① 実験I : *in vitro* 溶血サンプル作成

前年度の報告通り、Exposed サンプルについては明らかな溶血が認められたが、Cont.Lys についても同程度の溶血が観察された。Cont. Pla については溶血は認めなかった。

② 実験II : MALDI-TOF-MS分析

MALDI-TOF-MS によって得られたスペクトルを分析した結果、分子量 7.5, 7.8, 15.0, 15.6, 15.7 kDa にピークが認められた。このうち、15 kDa のピークについては三峰性(15-1, 15-2, 15-3)であることが明らかになった。また、30, 46, 61, 77 kDa にくつかのピークから構成されるピークのグループが認められた。同一グループ内におけるピーク間分子量の差は概ね 610 Da であった。

これらのうち、15-1, 15-3, 15.7 kDa のピークについては Exposed、つまりアルシン曝露サンプルでのみで認められることから、アルシン曝露特異的なピークであることが確認された。また、7.5, 7.8, 15-2 kDa のピークについては Exposed 以外にも Cont. Lys で認められることから、強い溶血に伴って出現するピークであることが示唆された。

③ 国内における DMAC 代謝物測定状況調査

有機溶剤健診として会員施設のうち 4 施設で NMAC 測定の受託があり、平成 24 年 10 月から平成 25 年 9 月の受託件数は 2,276 件であった。そのうち、30 mg/L 以上を示す検体数は、5.7%であった。ちなみに、ACGIH の BEI は 30 mg/Cr である。

④ 現行測定手法での施設間差比較

測定実績のある 5 施設で NMAC の施設間比較(クロスチェック)を行った。

4 施設が GC-高感度窒素リン検出器(NPD,FTD)法, 1 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 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 1 施設を除いて近接していた。

尿中 NMAC の変動係数(CV)は,低濃度試料①で 13.8%,中,高濃度試料②,③で 2.2, 6.0%であった。添加尿,水溶液は 7.7%であった。平成 24 年は,ばく露尿① 14.5%,②8.5%,③11.5%,添加尿と水溶液はともに 10.3%であったので,昨年より改善している。

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。3 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。

⑤代謝物一斉測定手法の検討

1) 汎用性の高い HPLC-UV を用いた検討

汎用性の高い HPLC-UV を用い,DMAC 代謝物の分離定量を試みた。カラムは一般的に用いられる C18 (ODS) カラムを用いた。DMF と DMAC, DMAC-OH, NMAC の分離定量を試みた。測定条件とクロマト

グラムを表 2 に示す。希釈溶媒が水の場合,DMAC, NMAC, DMF, NMF, DMAC-OH の分離は可能であったが,AMMA, AMCC は 5 分以降に検出された。希釈溶媒が尿の場合,ベースラインが高くなった。馬尿酸, m-馬尿酸との分離は可能であり,5 分以後に検出できる。UV190nm 以上の吸収波長だとベースラインが高くなりピークが特定できなかった。

2) LC/MSMS を用いた検討

LC/MSMS 分析においてはカラムの選定,移動相の分配が分離に影響を与えるため各種条件で検討を行った。

DMAC は親水性の高い物質であるため,一般的に使用される逆相モードでは保持が弱い。そこで,順相カラム(Inertsil Diol 2.1mmID 150mm, 5 μ m: GLサイエンス社製)および,親水性の固定相を使用し,移動相にアセトニトリル・水混液等を用いることができ,親水性の高い成分ほど保持が強いとされる親水性相互作用(HILIC)を利用した分析モードカラム(Inertsil Amide 2.1mmID,150mm, 3 μ m: GLサイエンス社製)を選択した。

D. 考察

先行研究により,分子量 10.0 kDa 以上にヒ素が結合した付加体があることが示唆されていた(Higashikawa ら, 2008)が,本研究ではアルシン曝露特異的なピークが 15 kDa に 2 つ, 15.7 kDa に 1 つ確認できた。

赤血球関連成分の予測分子量(グロビン α 鎖: 14,940~14,950 Da, β 鎖: 15,600~15,700 Da, ヘム: 616.2 Da, ヒ素: 74.92 Da)および前年度の報告(Soret 帯付近の

吸光スペクトルに変化が認められること)から、これらのピークは「グロビン α 鎖 + ヒ素」または「グロビン α 鎖 + ヘム + ヒ素」であると推測された。また、15.0 kDa にピークが2つ観察される理由は、ヒ素の結合部位が異なるためであると考えられた。

(Diol カラム)

C18 カラムと比較し保持は若干強くなったが、DMAC、NMAC は夾雑ピークと重なる保持時間であった。原因は不明であるが、DMAC-OH のピークは検出されなかった。

(Amide カラム)

C18 カラムと比較し保持は若干強くなったが、DMAC、NMAC は夾雑ピークと重なる保持時間であった。原因は不明であるが、DMAC-OH のピークは検出されなかった。

(MF カラム)

Diol、Amide カラムでは DMAC-OH のピークが検出されなかったため、DMF の代謝物を測定している論文で使用されていたカラム (CapcellPak MF SG 80 2.0mmID 150mm, 5 μ m : 資生堂社製) を用いた。

このカラムは粉体表面処理技術を応用することにより、ポリマーコート型充填剤 (カプセル) とすることで、シリカゲル系、ポリマー系それぞれの特長を併せた高性能充填剤、すなわち既存 ODS-シリカゲルの持つ耐圧性、耐溶媒性、高分離能をそのままに、耐アルカリ性を付与し耐久性を向上させたカラムである。汎用性の高い ODS に代表されるシリカゲル系の充填剤の欠点は、塩基性化合物はアルカリ性移動相溶媒で回収率が向上できるとされるが、シリカゲル系充填剤はアルカリ側で溶け出すため使用できないことである。

このカラムを用いて移動相溶媒をアセトニトリル、メタノールとしてそれぞれを検討した。

(Capcell Pak MFC18 カラム)

ピーク形状は DMAC については移動相がメタノールでテーリングがあり、アセトニトリルの方が良好なピーク形状であった。しかしながら、感度はメタノールの方が良い。AMMA は 10ppm(v/v)ではピークを特定することができず 100ppm(v/v)でも 10回以上繰返し分析しないとピークの再現性が得られなかった。

(尿で希釈した標準液とメタノールで希釈した標準液の違い)

DMAC、NMAC はメタノール希釈と尿希釈でピーク感度の違いはほぼなかったが、DMAC-OH では希釈溶媒の違いでピーク感度にも大きな違いがでた。したがって、検量線は尿希釈で書くことが必要である。DMAC-OH のピークの前に unknown ピークがあり低濃度域では定量誤差の要因となる恐れがある。AMMA は再現性が得られなかった。

(定量分析のための前処理)

統一した前処理法で検量線を作成し、精度向上研究会で実施したクロスチェック試料を用いて分析した。機関 A~D は従来より用いられている GC法で NMAC を定量分析し、佐賀大学は LCMS 法で DMAC-OH と NMAC の定量分析を行った。

ばく露尿において、各機関の GC 法による NMAC 濃度と佐賀大学による LC-MS 法による DMAC-OH と NMAC 合計濃度を比較すると、ばく露尿②は若干、値に差が出たが、ばく露尿①、③が機関 A~D の値の範囲内であることから、両方法で大きな差は見られなかった。

GC法による NMAC 濃度はばく露尿に含まれる DMAC-OH が NMAC に完全に変化していることが重要である。

DMAC は、有機則対象物質ではないが、企業の自主的な健康管理が行われている。その健診は、検査機関に依頼されている件数で年間 2000 件を超している。企業の自主的な管理活動を知ることができたが、高濃度暴露者がいることも事実である。また、現状のクロスチェックでは、低濃度試料に若干ばらつきがみられることが、3 年間の調査で確認できた。

このように NMAC の測定法は、現行で用いられる GC 法では低濃度域で測定精度に問題がある。昨年は、ガスクロマトグラフ法ではこの問題を解決することができなかつたため、液体クロマトグラフを用いた同時分析の検討を行った。DMAC は主に体内で、DMAC-OH、NMAC を経て NMAC-OH、AMMA、アセトアミドに代謝され、DMAC ばく露者の尿中には DMAC-OH と NMAC が多く排泄されると言われている。

これまで使用されてきた DMF は代謝の過程でイソシアン酸メチルが生成されるが DMAC はこれが生成されないため毒性が DMF と比較し低いとされている。

主な代謝物である DMAC-OH と NMAC の測定法に関する文献調査の結果では、尿中 NMAC の測定にはガスクロマトグラフ (GC/FID, FDT, NPD, MS) 法が多く用いられている。これは、分子量が比較的小さくその特性から GC 法が選択性が高いと考えられているためである。DMAC-OH に関する測定法は確立されていない。また、近年では DMAC および DMF の最終代謝物である AMMA, AMCC を測定対象成分としている報告もある。ACGIH は DMF のバイオマーカーとして半減期が比較的長い AMCC に対する BEIs 値も規定している。

AMMA、AMCC は分子構造が大きく、極性物質であるため測定に LC を用いる方法が報告されている。

このように DMAC は代謝物のどの成分を測定対象成分とするかで分析法が異なる。また、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おり、昨年の我々の研究でも確認した。

LC-MSMS による全代謝物の一斉分析を試みた。液体クロマトグラフィーは熱に不安定な物質が分析可能で、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つた。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/MSMS 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。NMAC, DMAC-OH の分離定量は、ある程度できたが、不明ピークの存在と AMMA のピーク特定に至っていない。

今後の課題は、夾雑ピークにより定量下限値が高いことから、夾雑ピークの除去 (例えば、固相を用いる等)、S/N 比を上げるための分析条件の再検討が必要である。また AMMA を再現性良く定量できる分析条件等の検討があがる。

E. 結論

雄性 ICR マウス由来保存血にアルシンを *in vitro* で曝露したところ、溶血が認められた。そして MALDI-TOF を用いた分析の結果、アルシン曝露によって生じるピークが 3

つ確認できた。これらはヒ素とヘモグロビンの構成要素であるグロビン α 鎖が結合した付加体であると推測され、付加体形成がアルシンによる溶血のメカニズムに強く関与することが示唆された。同時に、アルシンの曝露評価にあたっては、3つのピークの検出がBM法の候補となりうる可能性が示唆された。

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。現行のGCを利用したNMACの精度管理からは、低濃度試料に若干問題が残る。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。LC-MSMSによるDMAC-OH,NMACの分離定量条件を、得ることができたが、AMMAは再現性に問題が残る。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato K, Yamanaka K, Shimoda Y, Yamano Y, Nagano K, Hata A, Endo Y, Tachikawa M, Endo G. Arsine toxicity is induced by inhalation but not by percutaneous exposure in hairless mice. *J Toxicol Sci.* 2014;39(2):301-10.

山本 忍, 市場正良, 天野有康, 中村 正, 佐藤和也, 濱野和可子, 森浩司 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 (2), 労働衛生管理 24: 48-52, 2013

山本 忍, 市場正良, 佐藤和也, 濱野和可子, 森浩司 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 (3), 労働衛生管理 (in press)

2. 学会発表

山内武紀, 山野優子, 山中健三, 畑 明寿, 黒田嘉紀, 圓藤陽子, 圓藤吟史: マウス保存血へのアルシンin vitro曝露によるヘモグロビン付加体生成-2. 第86回日本産業衛生学会 松山市 2013年5月14-17日

山野優子, 長野嘉介, 山中健三, 畑 明寿, 中館俊夫, 圓藤陽子, 圓藤吟史. 発表標題: ヘアレスマウスを用いたアルシンの経皮および吸入曝露実験. 学会名: 第86回日本産業衛生学会 松山市 2013年5月14-17日

Yuko Yamano, Kasuke Nagano, Kenzo Yamanaka, Akihisa Hata, Toshio Nakadate, Yoko Endo, Ginji Endo: *In vivo* study of arsine exposure in hairless mice: percutaneous absorption vs. whole-body inhalation. *Environment and Health - Bridging South, North, East and West.* Basel, Switzerland, 2013年8月19-23日
Takenori Yamauchi, Yuko Yamano, Kenzo Yamanaka, Akihisa Hata, Yoshiki Kuroda, Yoko Endo, Ginji Endo: Possible Production of arsenic adduct due to the exposure of mouse preserved blood to arsine in vitro. *Environment and Health - Bridging South, North, East and West.* Basel, Switzerland, 2013年8月19-23日

山野優子, 長野嘉介, 山中健三, 畑 明寿, 中館俊夫, 圓藤陽子, 圓藤吟史: 発表標題:

アルシンは経皮吸収されるのか - ヘアレ
スマウスを用いた経皮および吸入曝露実験
- 第19回ヒ素シンポジウム 福岡市 2013
年11月16-17日

山内武紀, 山野優子, 山中健三, 畑 明寿,
黒田嘉紀, 圓藤陽子, 圓藤吟史: 発表標
題: アルシン曝露によるヘモグロビン付加
体生成-マウス保存血への *in vitro* アルシン
曝露 -第19回ヒ素シンポジウム 福岡市
2013年11月16-17日

山本 忍, 天野 有康, 中村 正, 濱野 和
可子, 森 浩司, 金村 茂, 廣瀬 隆穂,
木戸誠二郎, 錦織 千賀, 竹嶋 淳, 関
顯, 杉山 浩貴, 山内 恒幸, 圓藤 陽子,
市場 正良 N, N-ジメチルアセトアミドお
よび N, N-ジメチルホルムアミドの生物学的
モニタリング手法の施設間比較と問題点
第86回日本産業衛生学会 産衛誌55臨増,
447, 平成23年5月15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

1. アルシンの曝露評価に関する研究(その2)

マウス保存血へのアルシンin vitro曝露によるヘモグロビン付加体生成

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

半導体などの製造に使用されているアルシンの急性毒性である溶血のメカニズムは明らかではない。我々はすでにマウスへのアルシン曝露実験を行い、Ht 値の有意な減少および腎臓の近位尿細管のヘモグロビン（Hb）陽性顆粒の顕著な沈着を認め、激しい溶血が起きることを確認している。そこで溶血メカニズムを明らかにするために、マウス保存血を用いたアルシン曝露実験を行い Hb 付加体の検出を試みた。

方法としては、ヒ素量として 2 mg の亜ヒ酸から亜鉛還元により発生させたアルシンを雄性 ICR マウス保存血 5ml に 10 分間曝露し、90 分間放置後の血漿部分をサンプルとした。アルシン曝露時に合わせて空気導入（通気）したサンプルの血漿も得た。なお、無処理のマウス血漿をコントロールとした。Hb 付加体の検出の前処理として、サンプルを 0.1%トリフルオロ酢酸で 5~100 倍に希釈し、マトリックスと混合してターゲットプレートにスポットした。分析はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計(MALDI-TOF-MS)で行い、得られたピークの分子量から付加体を推定した。

その結果、アルシン曝露により、通気の有無にかかわらず溶血が認められた。

MALDI-TOF-MSの結果は、酸素の存在の有無にかかわらずアルシンに曝露したサンプルに特異的なピークが2本（分子量15 kDaと15.6 kDa）得られた。先行研究から分子量 10 kDa以上にヒ素が結合した付加体があることが示唆されている。本研究でも分子量15 kDaおよび15.6 kDaにピークが確認できた。15kDaはグロビン α 鎖にヒ素(74.9)が結合したものであり、15.6kDaはグロビン α 鎖+ヘム(616.2)+ヒ素が結合したものと推測できた。これらは、コントロール血漿にはなくアルシン曝露溶血サンプルにのみ認められたことから、アルシン曝露によって、ヒ素のグロビン α 鎖に特異的なHb付加体ができることが明らかとなった。

A. 研究目的

昨年度の報告書に示したように、これまでマウスを用いたアルシン曝露実験により、激しい溶血並びにそれに伴うHt値の減少および近位尿細管へのヘモグロビン(Hb)陽性顆粒の沈着が確認された。また、化学物質の曝露評価にあたっては、一般的に個人曝露量の測定または作業環境測定が実施されるが、経皮吸収が想定される物質については、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。そこで、前年度に得られた*in vitro*でアルシンに曝露した保存血を用いて、溶血メカニズムの解明およびBM法の開発を目指した。

B. 研究方法

まず、前年度に得られた雄性 ICR マウス由来のアルシン曝露保存血から血漿を分離し、曝露サンプルを 2 種類作製した。同様に 2 種類の対照サンプルを作製し、合計 4 種類のサンプルに対して MALDI-TOF-MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計) を用いた分析を行った。

① 実験I : *in vitro*溶血サンプル作成

前年度の報告の通り、ヒ素分析法(ジエチルジチオカルバミン酸銀法 : JIS K 0102) に準じて亜ヒ酸(ヒ素量として 2 mg) を塩酸と亜鉛末で還元して発生させたアルシンに雄性ICRマウス保存血(日本生物材料センター) 5 mlを10分間曝露した。曝露90分後に遠心分離して得られた血漿をサンプルとした(以下Exposed)。また、対照サンプルとして、無処置の保存血から分離した血漿(以下Cont. Pla) および血漿分離後の残渣

血球に超純水を加えて溶血させ、遠心後の上清(以下Cont. Lys)の2種類を得た。

② 実験II : MALDI-TOF-MS分析

各々のサンプルを 0.1%トリフルオロ酢酸で 25~75 倍に希釈し、シナピン酸の TA (アセトニトリル:0.1%トリフルオロ酢酸=1:2の混合溶液)飽和溶液と 1:3の割合で混合し、1 μ l をターゲットにスポットした。測定にあたっては、1 サンプル当たりランダムに 4,000 か所を抽出し、1 か所当たり 10 本のレーザーを照射した。得られたピークの m/z 値から、付加体の分子量を推定した。

(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。

C. 研究結果

① 実験I : *in vitro*溶血サンプル作成

前年度の報告通り、Exposed サンプルについては明らかな溶血が認められたが、Cont.Lysについても同程度の溶血が観察された。Cont. Plaについては溶血は認めなかった。

② 実験II : MALDI-TOF-MS分析

MALDI-TOF-MS によって得られたスペクトルを分析した結果、分子量 7.5, 7.8,

15.0, 15.6, 15.7 kDa にピークが認められた (図 1, 2)。このうち、15 kDa のピークについては三峰性 (15-1, 15-2, 15-3) であることが明らかになった (図 2)。また、30, 46, 61, 77 kDa にいくつかのピークから構成されるピークのグループが認められた (図 3)。同一グループ内におけるピーク間分子量の差は概ね 610 Da であった。

これらのうち、15-1, 15-3, 15.7 kDa のピークについては Exposed、つまりアルシン曝露サンプルでのみで認められることから、アルシン曝露特異的なピークであることが確認された。また、7.5, 7.8, 15-2 kDa のピークについては Exposed 以外にも Cont. Lys で認められることから、強い溶血に伴って出現するピークであることが示唆された (表 1)。

D. 考察

先行研究により、分子量 10.0 kDa 以上にヒ素が結合した付加体があることが示唆されていた (Higashikawa ら, 2008) が、本研究ではアルシン曝露特異的なピークが 15 kDa に 2 つ、15.7 kDa に 1 つ確認できた。

赤血球関連成分の予測分子量 (グロビン α 鎖 : 14,940~14,950 Da、 β 鎖 : 15,600~15,700 Da、ヘム : 616.2 Da、ヒ素 : 74.92 Da) および前年度の報告 (Soret 帯付近の吸光スペクトルに変化が認められること) から、これらのピークは「グロビン α 鎖 + ヒ素」または「グロビン α 鎖 + ヘム + ヒ素」であると推測された。また、15.0 kDa にピークが 2 つ観察される理由は、ヒ素の結合部位が異なるためであると考えられた。

E. 結論

雄性ICRマウス由来保存血にアルシンを *in vitro* で曝露したところ、溶血が認められた。そしてMALDI-TOFを用いた分析の結果、アルシン曝露によって生じるピークが3つ確認できた。これらはヒ素とヘモグロビンの構成要素であるグロビン α 鎖が結合した付加体であると推測され、付加体形成がアルシンによる溶血のメカニズムに強く関与することが示唆された。同時に、アルシンの曝露評価にあたっては、3つのピークの検出がBM法の候補となりうる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato K, Yamanaka K, Shimoda Y, Yamano Y, Nagano K, Hata A, Endo Y, Tachikawa M, Endo G. Arsine toxicity is induced by inhalation but not by percutaneous exposure in hairless mice. *J Toxicol Sci.* 2014;39(2):301-10.

2. 学会発表

山内武紀, 山野優子, 山中健三, 畑 明寿, 黒田嘉紀, 圓藤陽子, 圓藤吟史: マウス保存血へのアルシン *in vitro* 曝露によるヘモグロビン付加体生成-2. 第86回日本産業衛生学会 松山市 2013年5月14-17日

山野優子, 長野嘉介, 山中健三, 畑明寿, 中館俊夫, 圓藤陽子, 圓藤吟史. 発表標題: ヘアレスマウスを用いたアルシンの経皮および吸入曝露実験. 学会名: 第86回日本産業衛生学会 松山市 2013年5月14-17日

Yuko Yamano, Kasuke Nagano, Kenzo Yamanaka, Akihisa Hata, Toshio Nakadate, Yoko Endo, Ginji Endo: *In vivo* study of arsine exposure in hairless mice: percutaneous absorption vs. whole-body inhalation. Environment and Health – Bridging South, North, East and West. Basel, Switzerland, 2013年8月19-23日
Takenori Yamauchi, Yuko Yamano, Kenzo Yamanaka, Akihisa Hata, Yoshiki Kuroda, Yoko Endo, Ginji Endo: Possible Production of arsenic adduct due to the exposure of mouse preserved blood to arsine in vitro. Environment and Health – Bridging South, North, East and West. Basel, Switzerland, 2013年8月19-23日

該当なし
3.その他
該当なし

山野優子, 長野嘉介, 山中健三, 畑 明寿, 中館俊夫, 圓藤陽子, 圓藤吟史: 発表標題: アルシンは経皮吸収されるのか - ヘアレスマウスを用いた経皮および吸入曝露実験 - 第19回ヒ素シンポジウム 福岡市 2013年11月16-17日

山内武紀, 山野優子, 山中健三, 畑 明寿, 黒田嘉紀, 圓藤陽子, 圓藤吟史: 発表標題: アルシン曝露によるヘモグロビン付加体生成-マウス保存血への *in vitro* アルシン曝露 -第19回ヒ素シンポジウム 福岡市 2013年11月16-17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

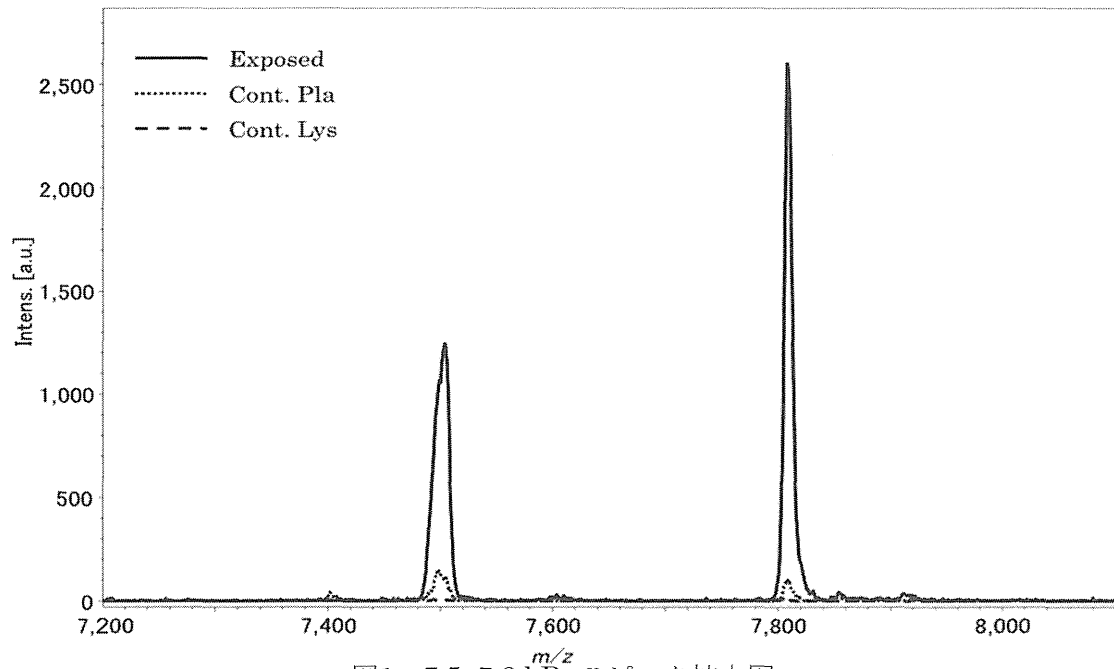


図1 7.5, 7.8 kDaのピーク拡大図

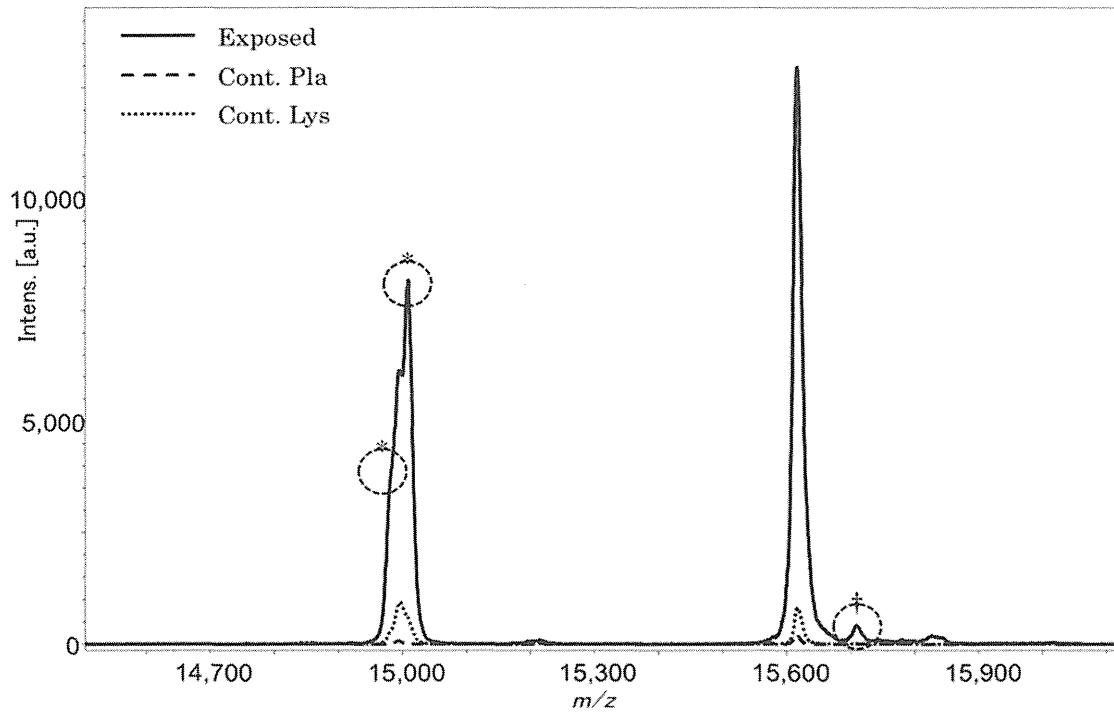


図2 15, 15.6, 15.7 kDaのピーク拡大図

15 KDaにおいてアルシン曝露のみで見られた2つのピーク (図中*印)

15.6KDaにおいてアルシン曝露で大きなピークが見られた。

15.7 KDaにおいてアルシン曝露のみで見られたピーク (図中†印)

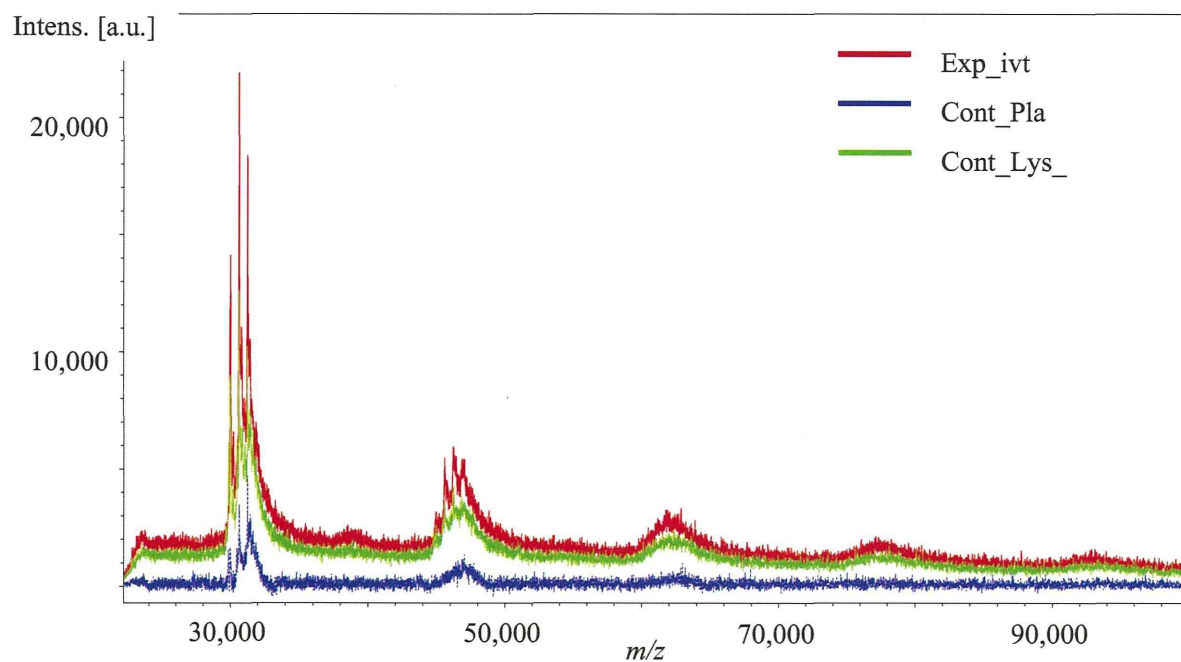


図3 30, 46, 61, 77 kDa のピークグループの拡大図
曝露群で特異的なピークは確認できなかった。

分子量 (kDa)	サンプル		
	Exposed	Cont. Pla	Cont. Lys
7.5	○		○
7.8	○		○
15-1	○		
15-2	○		○
15-3	○		
15.6	○	○	○
15.7	○		
30	○	○	○
46	○	○	○
61	○	○	○
77	○		○

表1 各サンプルにおいて観察されたピーク (○印)

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、一昨年、昨年に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4社が受託しており、平成24年10月から平成25年9月の1年間に、2,276件の測定が確認された。濃度レベルとして、30 mg/L以上の検体が5.7%存在していた。

NMACクロスチェックとして、会員5機関に対し、ばく露尿3検体、添加尿1検体、標準液1検体の試料を配布した。結果として、変動係数は、低濃度ばく露尿で13.8%、これ以外の試料では7%前後であり昨年より改善した。

昨年の研究から、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NMAC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、LC-MSMSでの分離測定を検討した。DMAC-OH,NMACの分離定量条件を、得ることができたが、AMMAは再現性に問題が残る。

A. 研究目的

産業界で使用される化学物質のリスク評価には個人ばく露濃度測定や作業環境測定が用いられる。しかし、経皮吸収が無視できない化学物質においては、化学物質の吸収量を正確に反映されないことから生物学的モニタリングによるばく露評価が必要とされている。近年、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)の代替品として使用される N,N-

ジメチルアセトアミド(DMAC)は、経皮吸収が指摘されている。そこで、DMACの生物学モニタリングのより適切な手法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 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

レベル調査を全衛連の労働衛生検査精度向上研究会会員 7 機関に対し行った。

※労働衛生検査精度向上研究会会員：

(財) 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) エスアールエル，(株) 江東微生物研究所，(株) ビー・エム・エル，(株) 保健科学研究所，三菱化学メディエンス (株)

2. 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 NMAC の測定実績のある労働衛生検査精度向上研究会会員 5 機関である。

試料の調製は，(株) エスアールエルが実施し，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④，および 25mg/L に調製した標準水溶液⑤を用いた。試料③，添加尿④，水溶液⑤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。

3. 代謝物一斉測定手法の検討

DMAC の尿中代謝物である N-メチルアセトアミド(NMAC)の測定法について、液体クロマトグラフ(LC)を用いた同時分析の検討を行った。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。DMAC-OH、AMMA は標準品が市販されていないため、東京化成工業株式会社に合成を依頼した。

C. 研究結果

1. 国内における DMAC 代謝物測定状況調査

有機溶剤健診として会員施設のうち 4 施設で NMAC 測定の受託があり，平成 24 年 10 月から平成 25 年 9 月の受託件数は 2,276 件であった。そのうち，30 mg/L 以上を示す検体数は，5.7%であった。ちなみに，ACGIH の BEI は 30 mg/Cr である。

2. 現行測定手法での施設間差比較

測定実績のある 5 施設で NMAC の施設間比較(クロスチェック)を行った。

各施設の分析条件を表 1 に示す。4 施設が GC-高感度窒素リン検出器 (NPD,FTD) 法，1 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 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 1 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 1 に示す。尿中 NMAC の変動係数 (CV) は，低濃度試料①で 13.8%，中，高濃度試料②，③で 2.2，6.0%であった。添加尿，水溶液は 7.7%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%であったので，昨年より改善している。

表1 前処理及び分析条件

施設		A	C	D	E	G	
前処理	試料量(μL)	500	500	500	1000	500	
	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	
	溶媒量(μL)	4500	5000	2000	2000	1000	
	炭酸カリウム処理(有/無)	0.5-1g	0.5g/mL	0.2g/mL	0.5g/mL	無	
	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	
分析方法	検出器	GC-NPD	GC-NPD	GC-MS	GC-NPD	GC-NPD	
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)	
	注入口温度(°C)	250	250	150	240	280	
	検出器温度(°C)	300	250	250	250	290	
	カラム温度	30°C(0min)-7°C/min-190°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)	
	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)	
	試料注入法	スプリット	スプリット	スプリットレス	スプリット	スプリット	
	試料注入量(μL)	2	2	1	1	1	
定量	I.S	R.Time (min)	15.265	21.17	7.5	10.80	2.5
		R.Time (min)	18.824	13.71	6.1	5.91	4.2
	NMF	定量下限(mg/L)	1	1.0	0.5	0.5	0.5以下
		R.Time (min)	18.824	13.61	6.0	5.7	4.1
	NM AC	定量下限(mg/L)	1	0.5	0.5	0.5以下	0.5以下

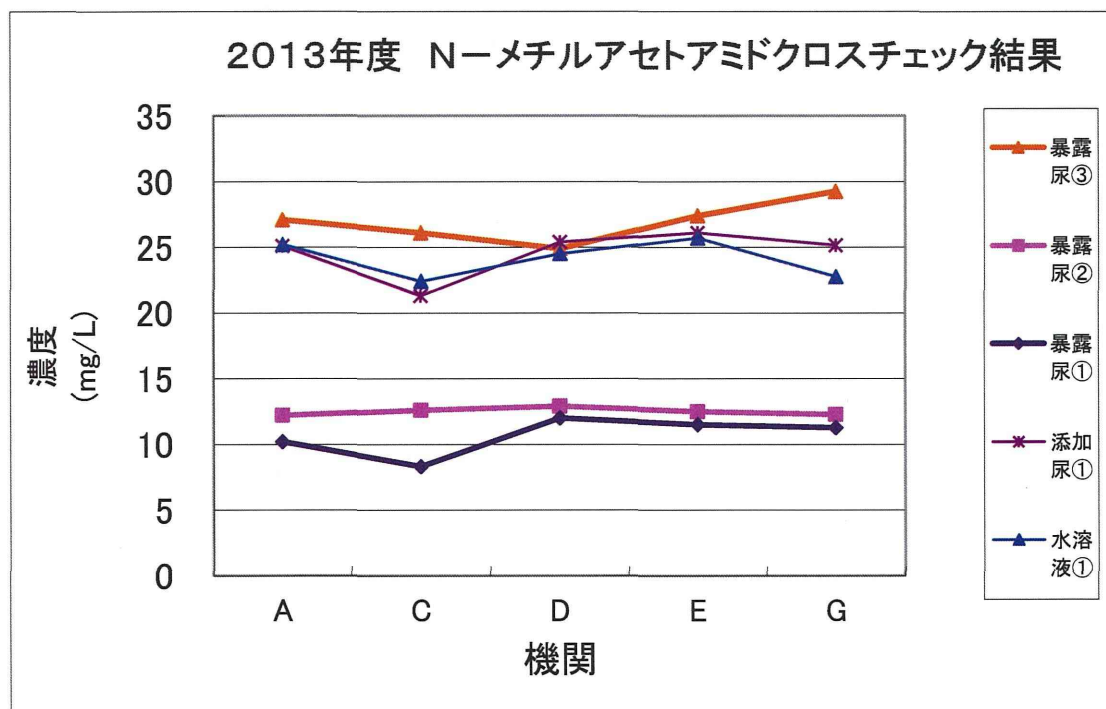


図1 5尿中 NMAC 施設間比較結果

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。3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。

3. 代謝物一斉測定手法の検討

1) 汎用性の高い HPLC-UV を用いた検討
汎用性の高い HPLC-UV を用い、DMAC 代謝物の分離定量を試みた。カラムは一般

的に用いられる C18 (ODS) カラムを用いた。DMF と DMAC, DMAC-OH, NMAC の分離定量を試みた。測定条件とクロマトグラムを表 2 に示す。希釈溶媒が水の場合、DMAC, NMAC, DMF, NMF, DMAC-OH の分離は可能であったが、AMMA、AMCC は 5 分以降に検出された。希釈溶媒が尿の場合、ベースラインが高くなった。馬尿酸、m-馬尿酸との分離は可能であり、5 分以後に検出できる。UV190nm 以上の吸収波長だとベースラインが高くなりピークが特定できなかった。

表 2 HPLC-UV の測定条件

装置	島津 Prominence UFLC
検出器	UV (190nm)
カラム	Shim-pack XR-ODS (3 mm ID, 75 mm)
カラム温度	40°C
移動相	A: 2 mM ぎ酸、B: アセトニトリル (A : B = 95 : 5)
流速	0.5 mL/min
注入量	5 μ L

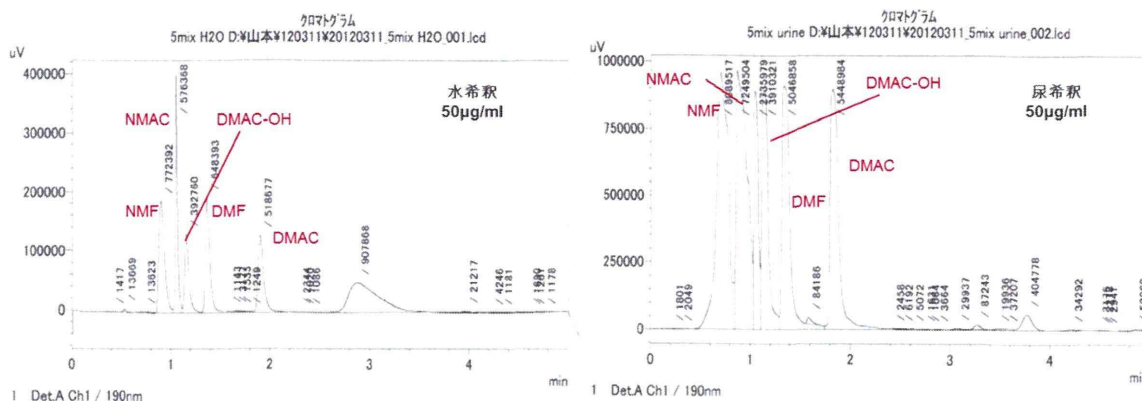


図 2 クロマトグラム