

6. その他の影響

6-1) 化学分析による曝露指標

研究協力者 櫻田尚樹、嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部）

(1) 研究目的

低濃度のホルムアルデヒドに曝された際の曝露指標として生体試料中のホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度について高感度・簡便に測定する方法の開発を試みた。また、トルエン曝露により曝露指標としてトルエンの代謝物である尿中馬尿酸を測定して曝露の確認をおこなった。

(2) 研究方法

ホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体の定量法：

末梢血をヘパリン採血した後、生理食塩水で洗浄した後、CCl₄ を添加して遠心分離し debris を除去した洗浄赤血球に蒸留水を加えて溶血したものを測定試料とした（図 1）。

測定法の一つとしては、図 2 に示すように感度の高い蛍光検出器を用いた Peterson ら(1987)の方法に従い、反応試薬として cyclohexane-1,3-dione を用い、酢酸アンモニウム、塩酸混合溶液中で 90°C、15 分間反応させ、氷冷下で冷却後、遠心分離した試料を HPLC サンプルとして測定した。HPLC の測定条件は、カラム：Wakosil-(II)5C18、励起波長 370nm、測定蛍光波長 450nm、移動相：水/アセトニトリル=70/30 とした。

第 2 の方法として、チャンバー内濃度評価を行ったと同様に 2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride (DNPH) との反応による方法を試みた。すなわち溶血試料と DNPH を 60 °C 温浴中で 30 分間反応後、HPLC にて測定した。HPLC の測定条件は、カラム：Wakosil-(II)5C18、測定波長 360nm、移動相：0.2M 酢酸/アセトニトリル=35/65 とした（図 3）。さらに Dimedone (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione) による誘導體形成を行い、HPLC-蛍光分析法も試みた（図 4）。

尿中馬尿酸の定量法：

図 6 に示すように体内に吸収されたトルエンは、比較的短時間で代謝され水溶性の馬尿酸となり尿中に排泄される。そこで 10 週曝露終了直後および 11 週目の曝露開始前にマウス自然排尿をプールして測定サンプルとした。さらに 12 週最終曝露時に、曝露開始前（前日の曝露終了後 18 時間後）と曝露終了 30 分以内の自然排尿を各個体別に採取し測定サンプルとした。

各サンプルを 50%メタノールで 40 倍希釈し、高速液体クロマトグラフィ HPLC にて分離定量した。同時に尿中クレアチニン濃度を測定し、尿中馬尿酸濃度はクレアチニン補正值として評価した。

(3) 研究結果

ホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体の定量法：

第1の cyclohexane-1,3-dione を用いた反応系における測定の結果、図2に示すようにホルムアルデヒド、アセトアルデヒドのピークをきれいに分離可能であり、ヒトの血液サンプルでは、飲酒量に応じたアセトアルデヒドの検出が出来たが、ホルムアルデヒドに関しては、ブランクにおいても大きなピークが観察され 2000ppb までの曝露の影響を評価できなかった。そのため、他の方法を試みることにした。

第2の方法としてDNPHを用いた反応系を試みた。ホルムアルデヒド、あるいはアセトアルデヒドなどのその他のアルデヒド類のピークをきれいに分離できる条件を種々に検討し、図3に示した方法できれいに分離できることが確認された。この方法を用いてホルムアルデヒド濃度を測定すると、図に示す通り広範囲にわたって直線性を認め良好な結果が得られた。しかし、マウス血液中のホルムアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度を測定した結果、ホルムアルデヒド曝露による有意な増加は検出できなかった。

図4に示すようにDimedoneを用いた誘導体形成法により比較的安定した測定法を確立できた。その結果、図5に示すようにホルムアルデヒドの良好な分離が可能で安定性の高い測定法が確立できた。しかしこの方法でも一部のマウスの試料を測定したがホルムアルデヒド曝露による差は認められなかった。

尿中馬尿酸の定量法：

トルエンの尿中代謝産物である馬尿酸濃度は、10週、12週いずれも曝露直後は約6g/g creatinineを示し、一方前日の曝露終了から約18時間たった曝露開始直前の尿では約1g/g creatinine前後であった(図7)。

(4) 結論

ホルムアルデヒドの曝露指標として末梢血におけるヘモグロビン付加体の定量を試みた。種々の反応試薬を用いた測定系において検討した結果、ホルムアルデヒドのピークの分離定量が可能であったが、今回用いた2000ppb程度までの曝露域においては、曝露後の生体内における速やかな代謝の影響もあり、化学分析による曝露指標を得ることが困難であった。今後さらに検出方法を改良して検討を加えていく必要性が示唆された。一方、トルエンに関しては、産業現場でも幅広く使用され比較的高濃度での毒性は広く知られ、曝露指標としての尿中代謝産物・馬尿酸の測定もトルエン作業従事者には実施されている。今回、マウス尿中の馬尿酸を測定すると曝露直後には有意に高い濃度を示し、16時間後の翌日曝露直前の尿では低値に復していた。トルエンの代謝は図6、8に示すように大半が尿中に馬尿酸として代謝され排泄されることがわかっている。今回の実験でも曝露指標として尿中馬尿酸の増加が観察され、有効な経気道曝露が行われたことを示すとともに、速やかに代謝されていることが示された。

図1 ヘモグロビン付加体の測定方法

ヘパリン採血

遠心分離 (2800rpm, 6min)

生理食塩水を加え、遠心分離 (2000rpm, 5min)

× 3回

蒸留水で溶血、CCl₄添加遠心してdebris除去

高速遠心分離 (20,000 g, 4, 10min)

誘導体試薬と反応

図2 HPLCによるヘモグロビン付加体の測定

1. ヘパリン採血
2. 生食で洗浄、CCl₄添加遠心してdebris除去
3. 水を加え、溶血させ試料とした。

4. Petersonら(1987)の方法に従い測定。

反応試薬 : cyclohexane-1,3-dione 40mg

酢酸アンモニウム 10g

濃塩酸 3.2 ml

水 30 ml

試料 : 反応試薬=1:1で混合、90、15分

HPLC条件 : Wakosil-(II)5C18 (150mm x 4.6 mm, i.d)

励起波長370nm, 測定蛍光波長450nm

移動相 : 水 : アセトニトリル = 70 : 30

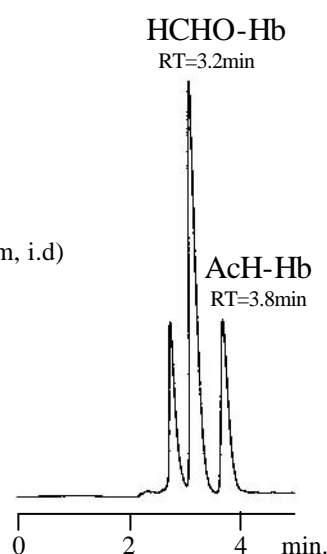
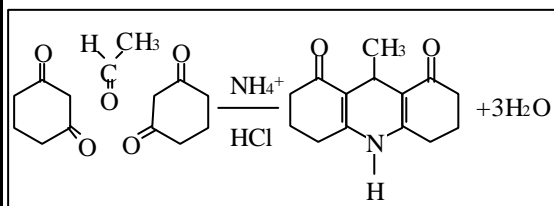


図3 HPLCによるヘモグロビン付加体の測定2

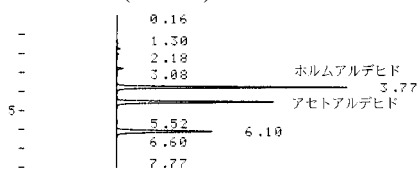
反応試薬：2,4-Dinitrophenyl hydrazine Hydrochloride (DNPH)

60、30分

HPLC条件：Wakosil-(II)5C18

測定波長360nm,

移動相：0.2M酢酸 / アセトニトリル
= 35 / 65



結果：全体で 51.1 ± 6.8 n mol/g Hb
濃度依存性は検出できず

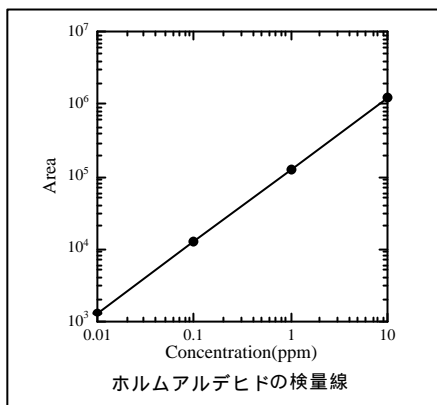
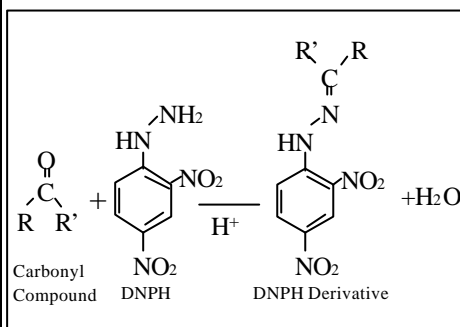


図4 HCHO-Hb測定方法 (Dimedone)

溶血させた血液
+ 反応試薬
沸騰水で反応

冷却
+ 酢酸添加

高速遠心分離 (15,000rpm、4、10min)

HPLC
反応試薬 5,5 dimethyl 1,3cyclohexanedione 0.15g
酢酸アンモニウム 12.5 g
酢酸 0.2ml
蒸留水で50mlにメスアップ

- HPLC条件 :Wakosil-(II)5C18 (250mm × 0.4mm, I.D.)
- 励起波長 :395nm, 測定蛍光波長 :460nm
- 移動相 水/アセトニトリル = 60/40 (v/v)

図5 HCHOの検量線と標準溶液のクロマトグラム

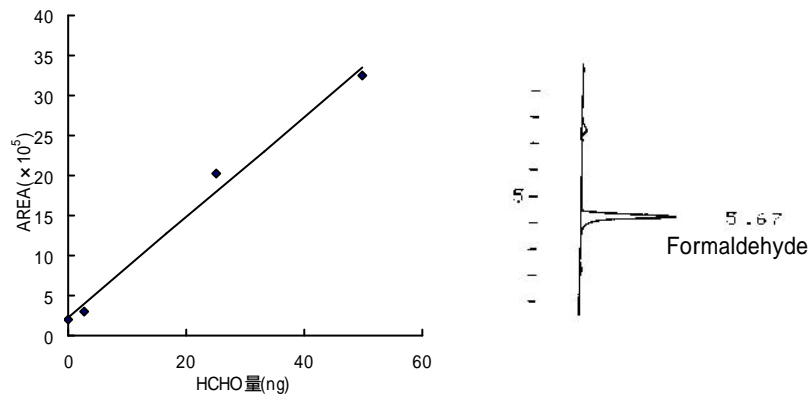
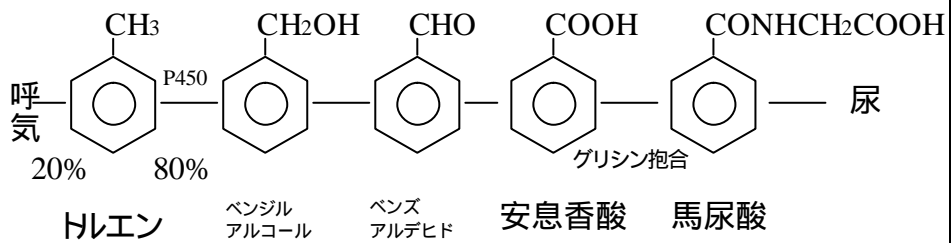


図6 トルエン代謝



安息香酸 :あんず、梅肉エキス、清涼飲料水などに含まれているので馬尿酸増加に注意 (ヒトの場合)

図7 マウス尿中馬尿酸濃度

(トルエン曝露 :50 ppm)

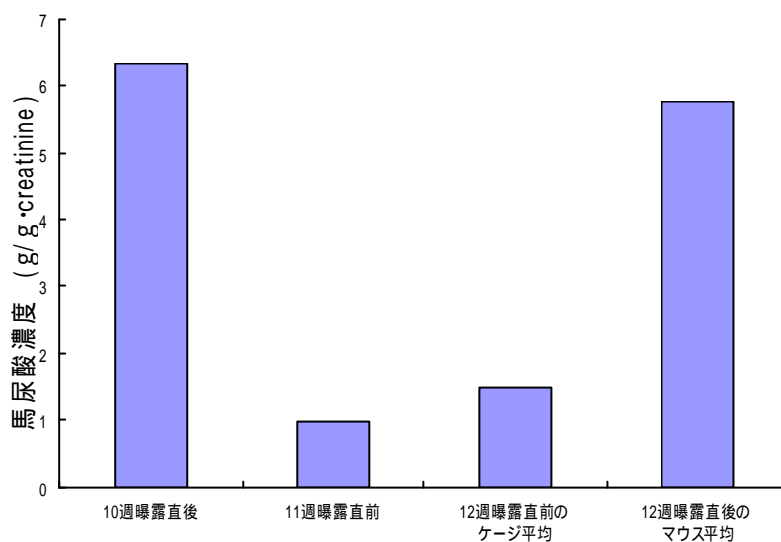


図8 トルエン (体内動態)

吸入曝露

吸入量の86～96%が吸収され、5時間以内に吸入量の15～20%が呼気中に未変化で排出

肺から完全にトルエンが除去されるのは24時間かかる

P450によりベンジルアルコールとo-クレゾール、p-クレゾールに代謝される。ベンジルアルコールは、アルコール脱水素酵素(ADH)、アルデヒド脱水素酵素の代謝を受け、安息香酸、最終的に馬尿酸になって尿中に排出

90%以上が馬尿酸に代謝

生物学的半減期は数時間(1～2時間)、馬尿酸は24時間以内に全て排出