

労働検査に関わる最近の話題
(生物学的モニタリング)

平成 22 年度 第 3 回 労働衛生検査精度向上研究会
平成 22 年 8 月 27 日、東京都南部労政会館にて
中央労働災害防止協会・大阪労働衛生総合センター
河合 俊夫

要約

日本国は世界に先駆けてリスクアセスメントの曝露手法として、生物学的モニタリング検査を採り入れた（平成元年）。平成 20 年にはこれら検査の見直しが行なわれ、その詳細が報告された。また ACGIH はトルエンの許容濃度を 20ppm に変更し、生物学的指標検査として尿中トルエン、*o*-クレゾール採用し、その値が提案されている。ヘキサンの曝露指標検査はフリーの 2,5-ヘキサンジオン（非加水分解）を測定することになっている。塩素系溶剤は総酸塩化物が曝露指標検査とされているがこの分析方法が吸光光度法から GC 法へと変化している。これらの変遷について述べる。

労働検査に関わる最近の話題 (生物学的モニタリング)

JISHA・大阪労働衛生総合センター

河合 俊夫(かわい としお)

2010. 8. 27

講演項目

1. 特殊健康診断の健診項目に関する調査研究、(生物学的モニタリング)
平成20年3月報告書から
2. トルエン曝露によるo-クレゾールの指標性
3. ノルマルヘキサン曝露による
2, 5 - ヘサンジオンの指標性
4. 塩素系溶剤としての総三塩化物と
トリクロロ酢酸

特殊健康診断の健診項目に関する調査研究(生物学的モニタリング)

はじめに

有力なばく露情報となる生物学的モニタリングに関しては、労働衛生学の分野において、国際的にも常に新しい知見が付け加わっていることから、一定の期間ごとに、特殊健診の項目として採用又は変更の必要性を検討することが望ましい。

生物学的モニタリング検査の採用条件

- 生物学的モニタリングは、作業者個人のばく露レベルの指標として高い精度を持っているので、下記の条件の内、少なくとも①、②、④の3つを満たすものについては健診項目として採用することが推奨される。ただし、必ず実施する健診項目として採用するには、以下の条件をすべて満たす必要がある。

採用条件を満たすには

- ① 作業に起因する生体内への取り込み量に定量的に対応する測定値が得られる
- ② 分析試料の採取、運搬などに特別の問題がない
- ③ 健康リスクの有無、又は程度を判断できる基準値がある
- ④ 生物学的モニタリングを追加することにより健康障害の予防をより確実に行える
- ⑤ 予想される健康障害予防の成果に比較して、手間や費用が大き過ぎない

医師の判断による実施条件

なお、これらの条件の全ては満たさないが、ばく露情報としての価値が認められ、健康障害の未然防止に有効と考えられる項目、すなわち①、②、④の3つの条件を満たすものは、医師の判断により実施する項目として採用することが望ましい。

生物学的モニタリング項目の追加

- 5つの条件に適合すると判断されたのは11物質であり、その内、9物質(トリクロロエチレン、キシレン、N,N-ジメチルホルムアミド、スチレン、テトラクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタン、トルエン、ノルマルヘキサン、鉛およびその化合物)は既に必須項目として採用されている。
- 他の2物質はカドミウムと3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンである。

⑤のみが△の項目

予想される健康障害予防の成果に比較して、手間や費用が大き過ぎない項目で△になっている検査

物質名	測定対象物質
アセトン	アセトン
エチレングリコールモノエチル エーテル	2-エトキシ酢酸
エチレングリコールモノエチル エーテルアセテート	2-エトキシ酢酸
エチレングリコールモノノルマル-ブチルエーテル	2-ブトキシ酢酸
エチレングリコールモノメチル エーテル	2-メトキシ酢酸
クロルベンゼン	4-クロルカテコール
酢酸メチル	メタノール
ジクロルメタン	ジクロルメタン
テトラヒドロフラン	テトラヒドロフラン
メタノール	メタノール

⑤のみが△の項目

物質名	測定対象物質
メチルイソブチルケトン	メチルイソブチルケトン
メチルエチルケトン	メチルエチルケトン
メチル-ノルマル-ブチルケトン	2,5-ヘキサジオン
四アルキル鉛	B 鉛
五酸化バナジウム	バナジウム
ニトログリコール	ニトログリコール
弗化水素	弗素
ベンゼン	フェニルメルカプトール酸
ペンタクロルフェノールおよびそのナトリウム塩	UBペンタクロルフェノール
マンガンおよびその化合物	U Bマンガン
アニリン	(パラ-アミノフェノール)

まとめ

- ⑤のみが△の項目(予想される健康障害予防の成果に比較して、手間や費用が大き過ぎないが問題である)は21物質あり、これらは多くの作業場で使用されている。
低コスト、分析の簡素化を考える必要がある。

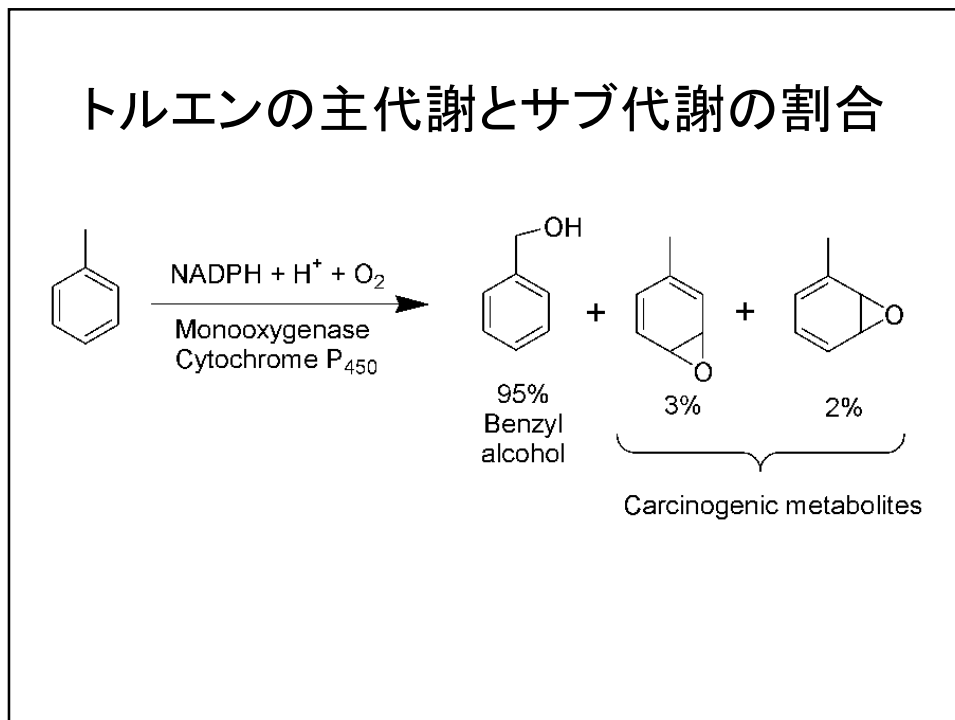
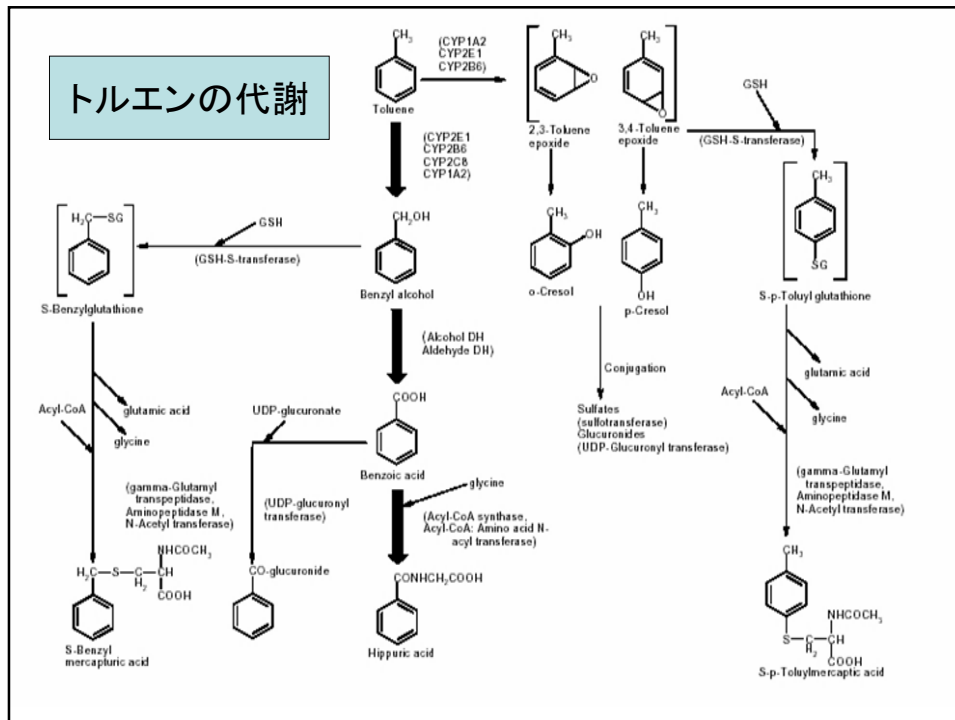
溶剤を測定する検査では採尿保存に簡易な方法が開発されている(Ind Health)。また分析方法も非常に簡単な方法が報告されている。

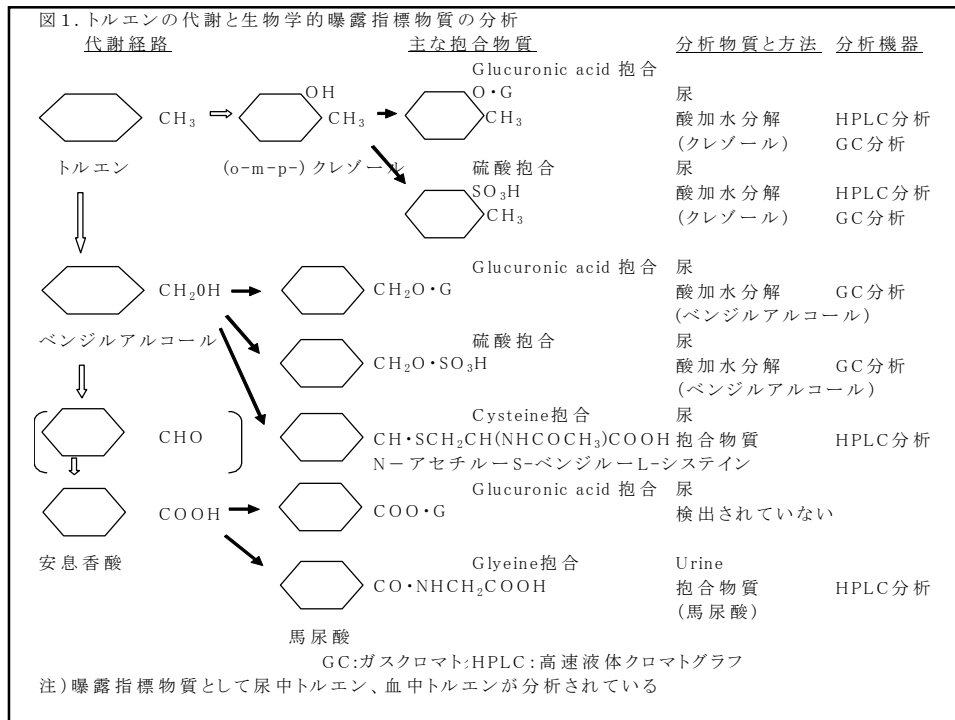
トルエン曝露によるo-クレゾールの指標性

- ACGIH 20ppm
- 許容濃度 50ppm
- 管理濃度 20ppm
- トルエンの生物学的モニタリング項目検査
尿中馬尿酸および2.5ヘキサンジオンなど8
種類は分布区分の見直しはされていない。

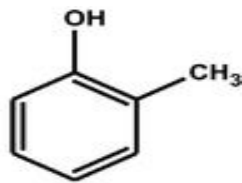
BEI, OEL, 分布区分とトルエン曝露濃度

- ACGIH TOLUENE 50ppm
 - o-Cresol 0.5 mg/L
 - Hippuric acid 1.6 g/g creatinine
 - Toluene in blood 0.05mg/L
 - (20ppm) Toluene in blood 0.02mg/L(週末シフト前)
 - o-Cresol 0.3 mg/g creatinine
 - Toluene in urine 0.03mg/L
- J Occup Health OEL TOLUENE 50ppm
 - Toluene in blood 0.06mg/L
 - Toluene in urine 0.06mg/L
- 分布区分 トルエン 100ppm
 - 尿中馬尿酸 <1g/L, 1< 超2.5, 2.5<

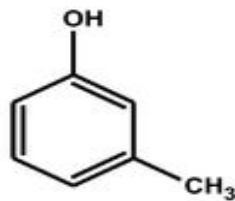




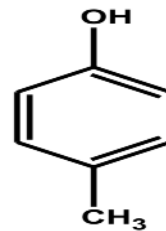
クレゾールの性質



o-クレゾール
(オルトクレゾール、
2-メチルフェノール)
融点 30 °C、
沸点 191-192 °C、
CAS登録番号
95-48-7



m-クレゾール
(メタクレゾール、
3-メチルフェノール)
融点 11-12 °C、
沸点 202 °C、
CAS登録番号
108-39-4



p-クレゾール
(メタクレゾール、
3-メチルフェノール)
融点 11-12 °C、
沸点 202 °C、
CAS登録番号
108-39-4

非曝露者の尿中
p-クレゾールの分布

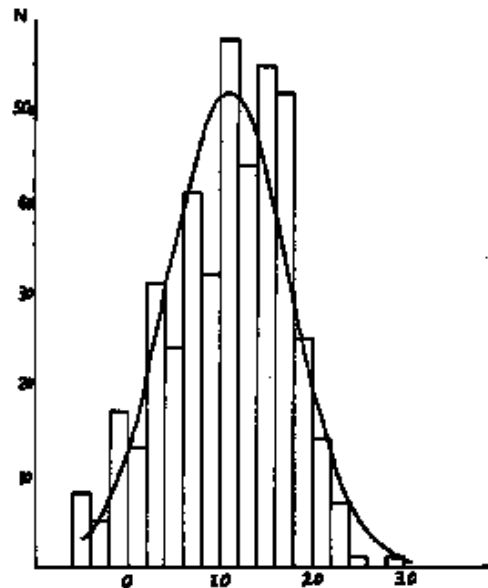


Fig. 3. Distribution of p-cresol in urins after logarithmic transformation
N=428, geometric mean=12.1 mg/l, upper limit (95%)=142 mg/l

クレゾールの分析方法

- 最も一般的に用いられる方法は、フレイムイオン化検出器付きガスクロマトグラフィー (GC-FID)、質量分光光度法ガスクロマトグラフィー (GC-MS)、高速液体ガスクロマトグラフィー (HPLC) がある。

クレゾールの代謝と排泄

- クレゾールの主な代謝経路は、グルクロン酸および無機硫酸塩との抱合である。そのほかにも、ベンゼン環のヒドロキシル化と側鎖の酸化を含む経路がある。体内からのクレゾールの主要な排出経路は、抱合体としての腎臓からの排泄である。

最近のトルエン曝露指標物質 と抱合

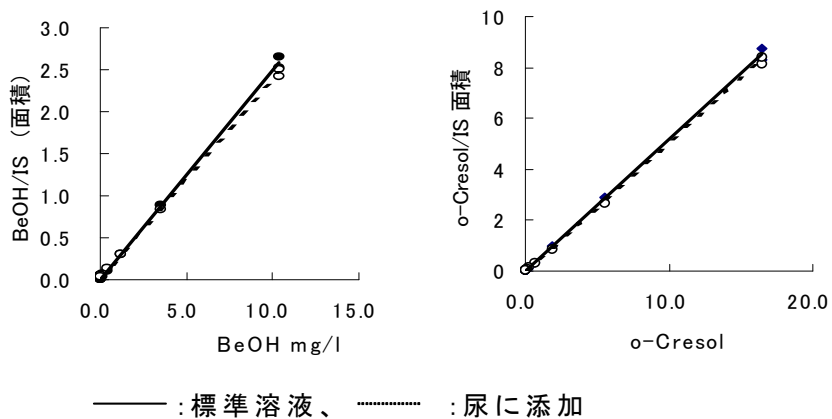
1. Freeトルエン
2. Glucuronic acid, Acid sulfate
.... クレゾール(o-Cresol)
.....ベンジルアルコール
3. Cysteine ...
N-Acetyl-S-Benzyl-Cysteine
4. Glycine ...馬尿酸

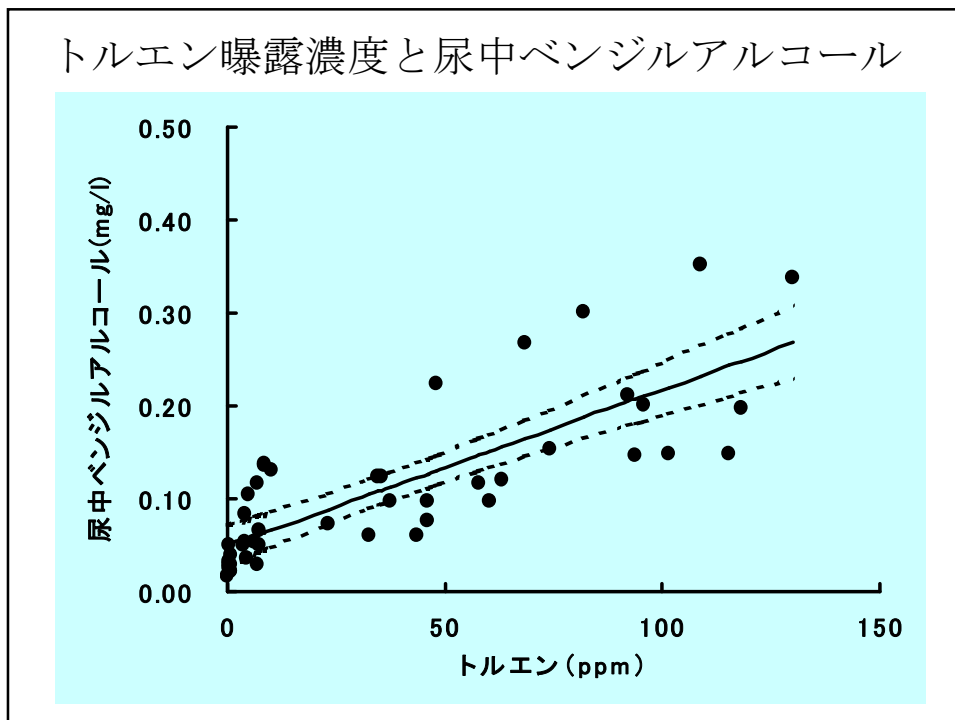
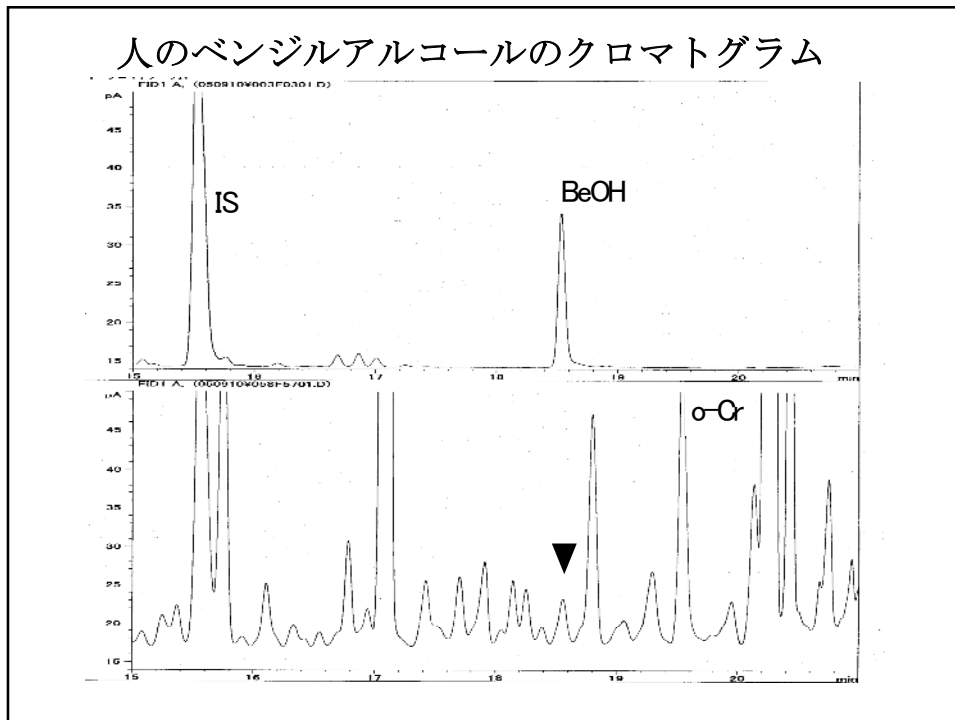
最近のトルエン指標物質の分析 方法

- ・ 尿中トルエン GC
- ・ 尿中馬尿酸 HPLC
- ・ 尿中クレゾール HPLC, GC
- ・ 尿中N-アセチルS-ベンジルシスチン
. . . . HPLC
- ・ ベンジルアルコール . . GC

検量線

ベンジルアルコール、オルトクレゾール





トルエン曝露と尿中馬尿酸、ベンジルアルコール、 オルトクレゾール、尿中トルエンの関係

回帰式と相関係数

	傾き	切片	相関
トルエンppm(X)とベンジルアルコール (Y)			
実測値 mg/l	0.0017	0.050	0.799
クレアチニン補正 mg/g Cr.	0.0006	0.054	0.560
尿比重補正mg/l	0.0006	0.041	0.701
トルエンppm(X)とオルトクレゾール (Y)			
酸加水 (実測値) mg/l	0.0232	0.007	0.899
トルエンppm(X)と馬尿酸 (Y)			
実測値 g/l	0.046	0.175	0.924
トルエンppm(X)とトルエン (Y)			
実測値 mg/l	0.0013	0.013	0.951

尿比重補正の尿比重は1.016で計算

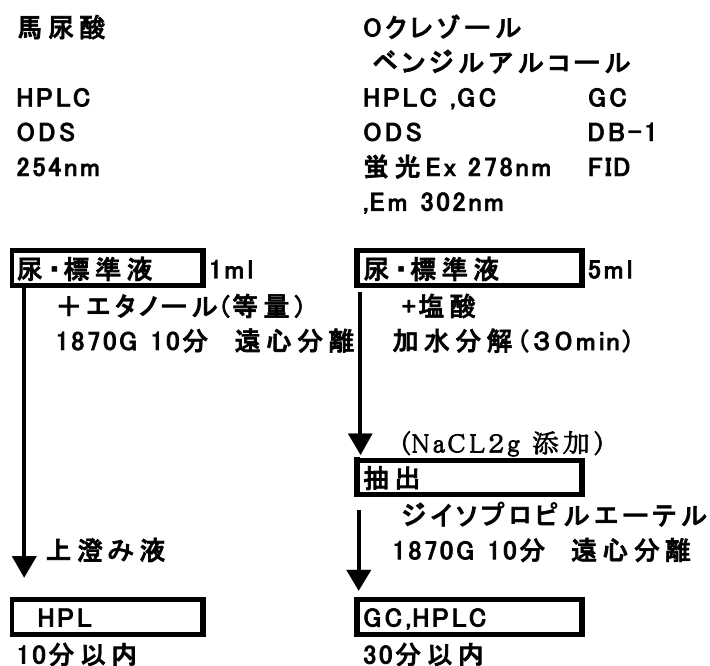
トルエン曝露濃度と尿中代謝物の排泄 割合の関係

物質	傾き	切片	傾き単位
尿中馬尿酸 (mM)	0.254	0.977	1
尿中オルトクレゾール (μ M)	0.215	0.063	1/1000
尿中ベンジルアルコール (μ M)	0.016	0.460	1/16000
尿中トルエン (μ M)	0.015	0.145	1/16000

トルエン20ppmに対応する 尿中オルトクレゾール、トルエン量

- 尿中o-クレゾールのクレアチニン補正では
 $Y=0.01X+0.02$ となる 20ppmを代入すると
0.22mg/g Crが得られる。
- 尿中トルエンでは0.039mg/Lとなる。
高濃度トルエン曝露を加えると高い相関係
数が得られる。その回帰式(前のスライド)か
ら計算すると
ACBIHのBEIによく一致する。

分析 方 の 例



オルトクレゾールの分析条件と分析方法

条件	GC	HPLC-UV	HPLC-FL
カラム	30m X 0.53mm Φ 膜厚 1 μm		300mm X 4.6mm Φ 粒径 5 μm
移動相	He 1kg/cm ² 5ml/min スプリット比 1:1		セトニトリル/水/酢酸 300/700/0.5 流量 0.8ml/min
カラム温度	90℃ 5℃/min 40℃/min	8min 120℃ 200℃	35℃
検出器	FID	UV 278nm	蛍光 EX 278nm Em 302nm
変動係数 (%)	標準液 1.5% 尿添加 2.0%	2.8% 4.6%	1.2% 0.9%
検出下限	0.1mg/L	0.1mg/L	0.01mg/L
直線範囲	<321mg/L	<321mg/L	<20mg/L
その他	ピーク多い 妨害あり	ピーク多い 妨害あり	ピーク少ない 妨害なし

尿5mlに塩酸2mlを加え沸騰水浴中30分加水分解
ジソプロピルエーテル2ml抽出

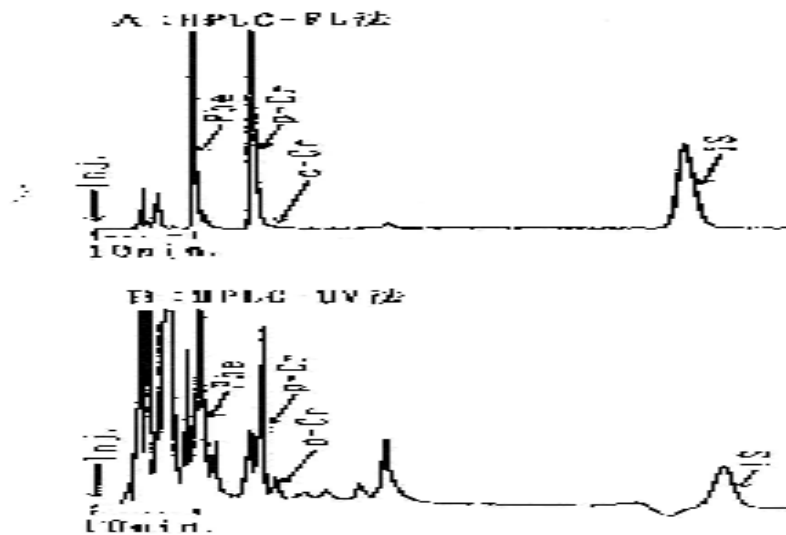


図1 非喫煙者尿のHPLC-FL法とHPLC-UV法による
o-クレゾールのプロファイル
(ISとして2,4,6-トリメチルフェノール)

分析 N-アセチル-S-ベンジル-L-システイン

HPLC

Rspak KC- 811 8.0 × 300mm(昭和 電工)

195 nm

尿・標準液 2ml

+蒸留水

+3, 5キシレノール・エタノール水溶液

48. 5%硫酸水溶液添加混合(10分以内)

7.8N 水酸化カリウム

↓
混和

抽出

エーテル・メタノール(9:1V/V)溶液添加(5分混合)

↓
0.2mlビタミンC水溶液(29g/dl)に有機層を移す↓
窒素ガス下、25°Cで0.2mlまで濃縮(5mlから)

HPLC

60分以内

シンナー依存者のHA等変化

- 測定値

入院約	HA	o - Cr	p - Cr	m - Cr
4時間、	21g/L,	28mg/L,	103mg/L,	5mg/L
32	8	7	85	3
48	4	2	25	1.2

HA, o - Cr、p - Cr、m-Crが排泄されている。
m-Crは本来は出来難いが非常に高濃度
では生成され、排泄される。

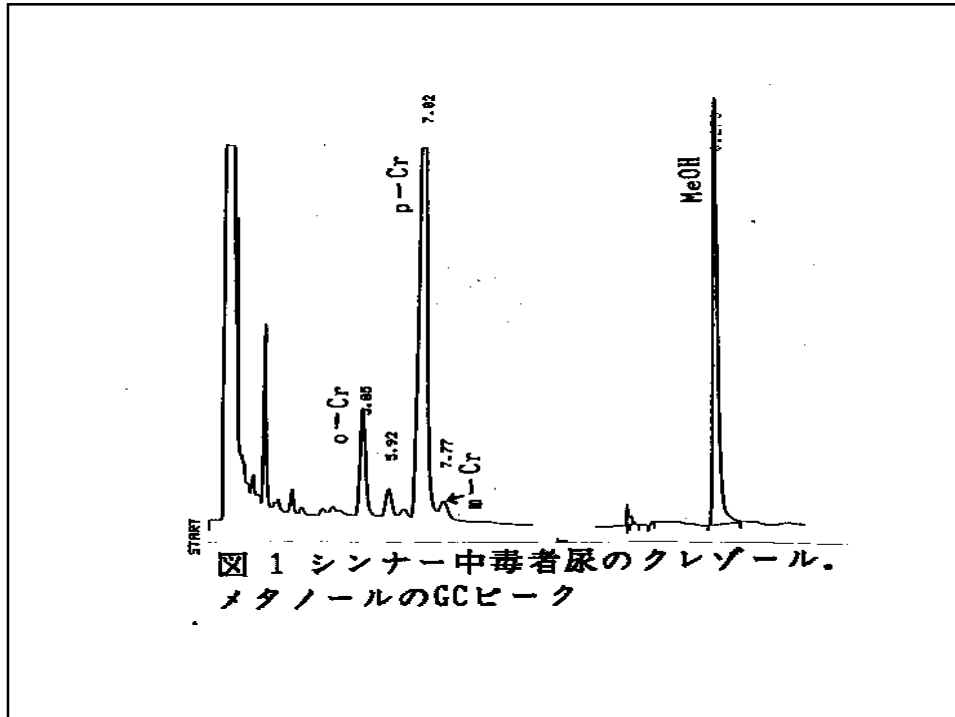


図 1 シンナー中毒者尿のクレゾール、メタノールのGCピーク

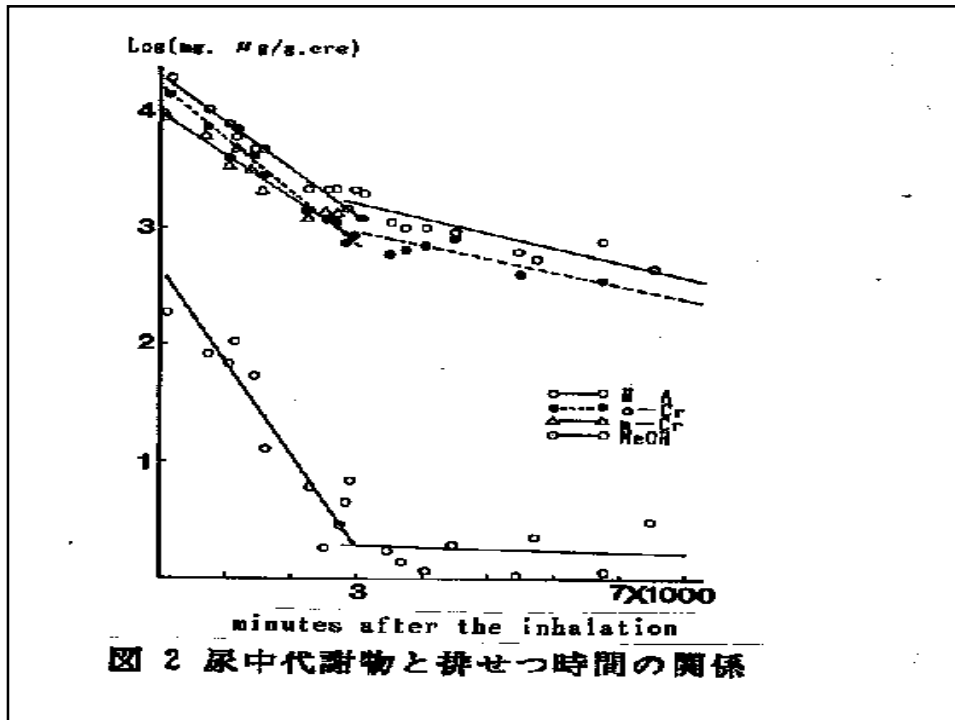


図 2 尿中代謝物と排泄時間の関係

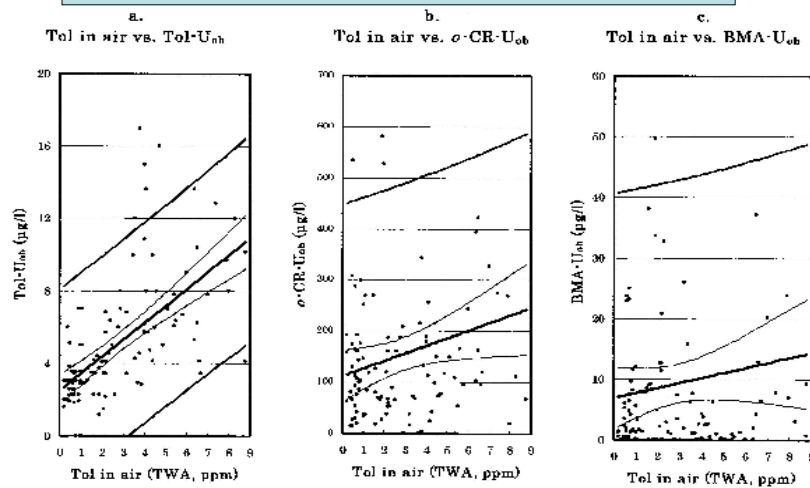
低濃度トルエン曝露に対する指標は

トルエン曝露濃度とo-クレゾール、HA、尿中トルエン

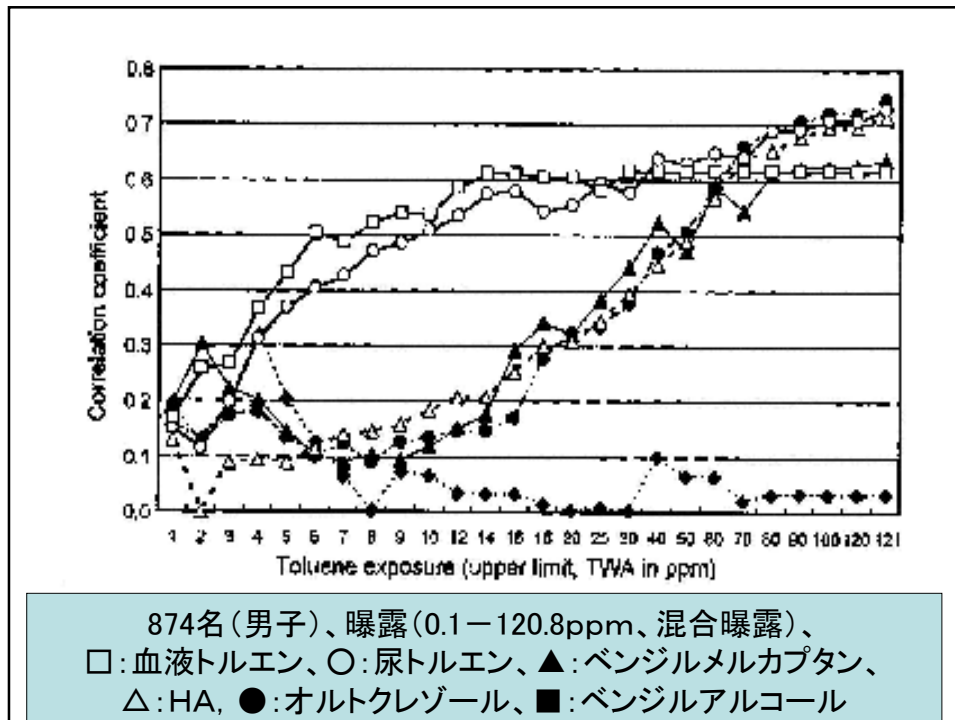
年	例数	最大ppm	相関係数		
			o-CR-U	HA-U	Tol-U
*2008	108	8.8	0.2	0.01	0.61
*1996	115	98	0.54	0.52	0.84
*2004	122	86.4	0.63	0.58	
*2007	122	120.8	0.81	0.85	0.83
*2007	100	43.2	0.6		0.84
1999	62	167	0.89	0.67	
*1994	969	550	0.7	0.73	
1992	58	132.3	0.57	0.37	
*1983	74	129	0.61	0.8	
1997	23	151	0.65	0.74	

* は日本人の書いた論文、

トルエン低濃度領域では？

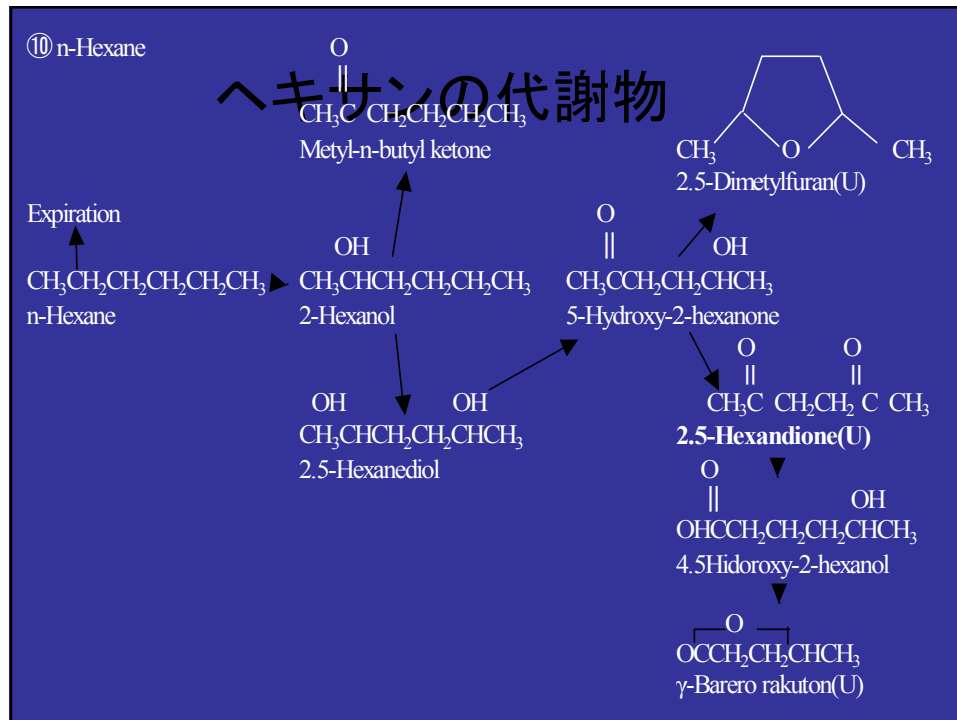


トルエン曝露108名、GM1.89ppm、最大8.8ppm、非曝露17名
(o-CR0.75mg/l GM,0.386mg/l MAX)



トルエン代謝物の挙動と 指標としての優れもの

- トルエンの代謝物であるHA, o-クレゾール、尿中N-アセチルS-ベンジルシスチンは曝露に対応して同じ割合で増加、挙動も同じである。
- 非代謝物である血中トルエン、尿中トルエンは同じ様に挙動する。
- 曝露評価としては低濃度に対応するのは代謝物より血中トルエン、尿中トルエンが優れている。



2.5-ヘキサンジオン(HD)の指標値

- ACGIH
 n - ヘキサン,メチルブチルケトンとも50 ppm
 2.5-ヘキサンジオン 0.4mg/L
 (非加水分解で行なう)
- 産業衛生学会
 n - ヘキサンは40 ppm
 加水分解 2.5-ヘキサンジオン 3mg/L・Cr
 非加水 2.5-ヘキサンジオン 0.3mg/L・Cr
- 分布区分 2mg/L 5mg/L

ヘキサンによる神経障害発生の機序 と生物マーカーに関する研究

- ヘキサンの末梢神経毒性の原因物質は2,5-ヘキサンジオン
(Graham1982)
- ヘキサンの末梢神経毒性の原因物質は2,5-ヘキサンジオンと考えられてきたが、2,5-ジメチルフランの関与も考慮する必要性を示した。
(厚生科学研究報告1996年)

2.5-ヘキサンジオン(HD)の分析

- 尿中HD分析は加水分解で行なう、非加水分解でおこなう。
- 尿中HDは抱合している？
抱合していると抱合をはずして分析する必要がある………
加水分解(酸による方法、酵素による方法、その他)
- Perbellini (1981)らは酵素加水分解と酸による加水分解を行い溶媒で抽出し、測定していた。

分析方法(前処理)

尿中2,5ヘキサジオン分析の前処理

非加水分解法

尿5ml

(10ml共抽試験管)

←ジクロロメタン 2ml

(内部標準 3メチルシクロヘキサノン・ジクロロメタン500ml中に3メチルシクロヘキサノン 10μl)

振とう抽出(30秒) [ハンドミキサー]

静置後

約20分間

(ジクロロメタン下層とよく分離させる)

→上層をアスピレーターでできるだけ取る

遠心 3000rpm × 30min

キャピラリーGC (PID) 2μl注入

尿中2,5ヘキサジオン分析の前処理

塩酸加水分解法

尿5ml

←HCl※250μl (pH約1となる)

加水分解(約100℃水浴槽30分間)

冷水中で室温まで冷やす

以後

非加水分解の前処理に準ずる

尿中2,5ヘキサジオン分析の前処理

酵素加水分解法

尿5ml

←1M酢酸buffer500μl (pH4.8)

←酵素 100μl

(β-グルクロンダーゼ-スルファターゼ)

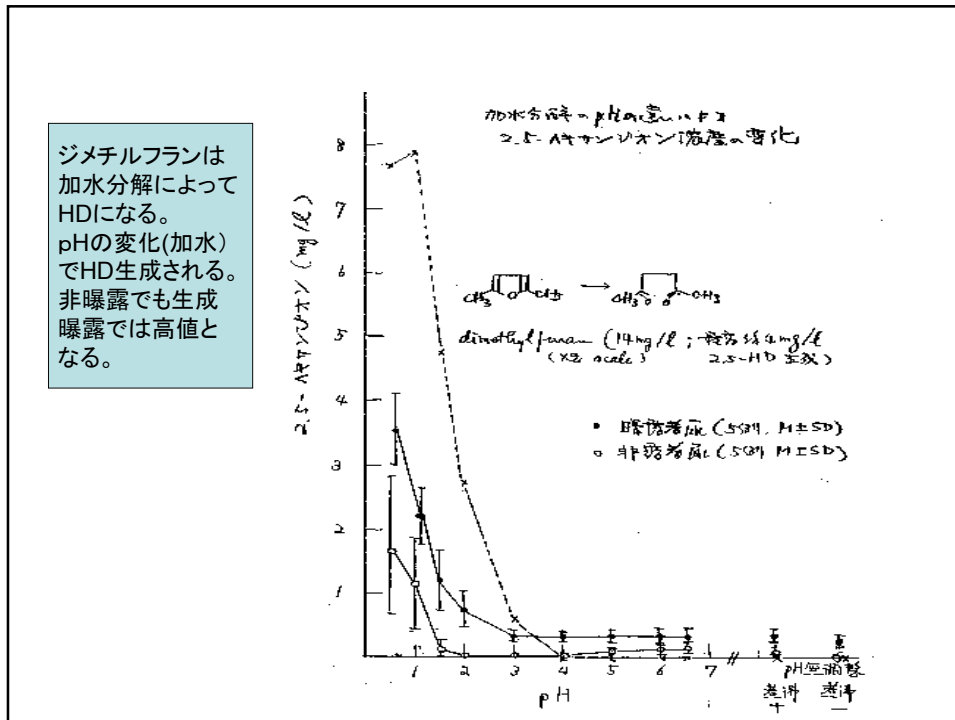
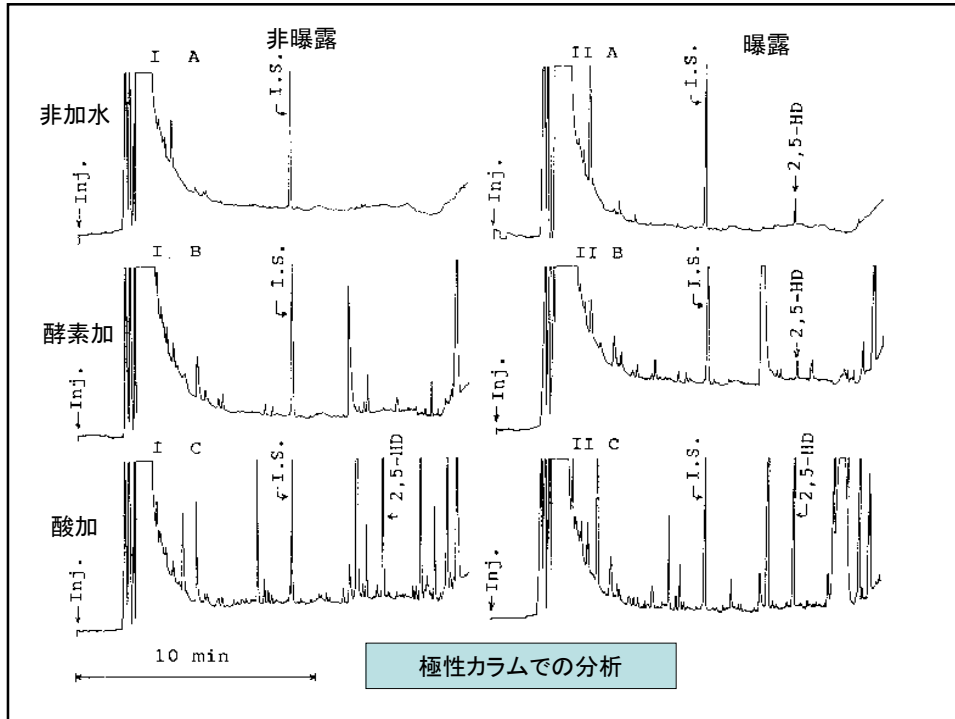
24時間反応(37℃ 高温槽)

以後

非加水分解の前処理に準ずる

※ 濃度HCl添加によるPH変化目安

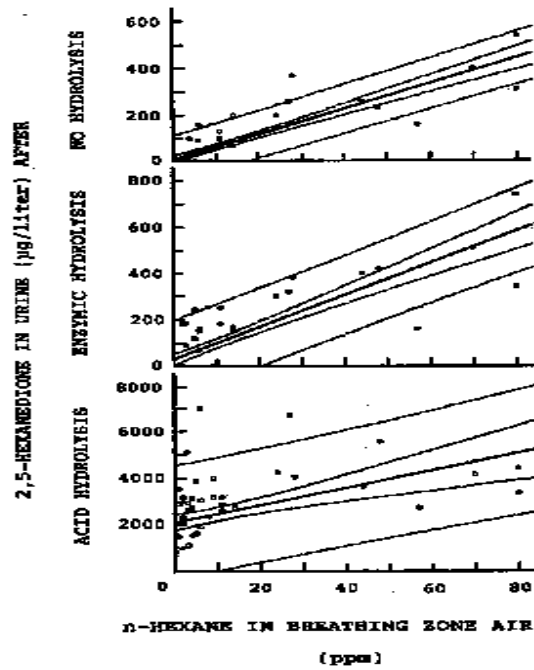
pH2	50μl
pH1.3	100μl
pH1.1	250μl
pH0.9	500μl
pH0.6	1000μl
pH0.4	1500μl



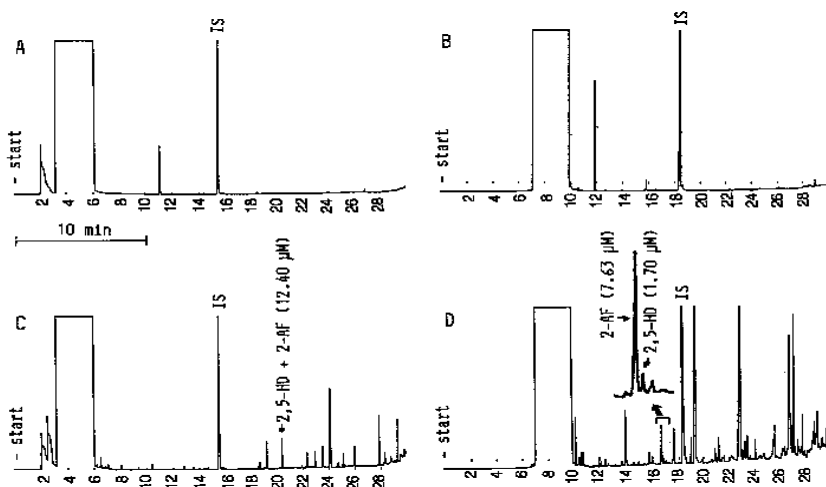
ジメチルフランは加水分解によってHDになる。pHの変化(加水)でHD生成される。非曝露でも生成曝露では高値となる。

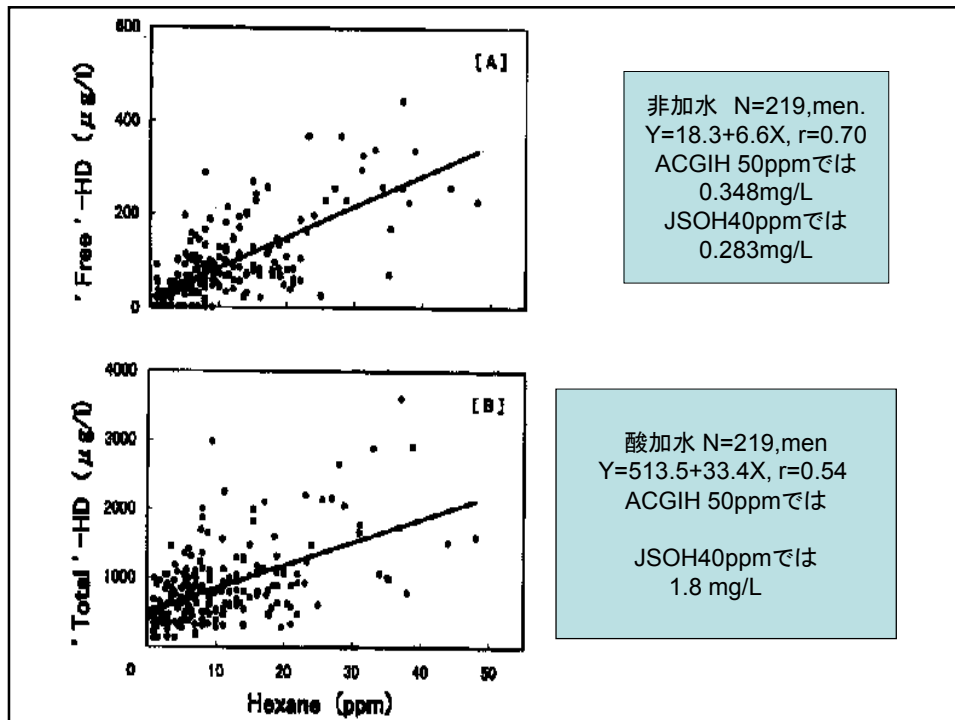
HDは抱合していない

- 非加水、
酵素加水、
酸加水の
比較。
非加水と
酵素加水
の回帰式
が同じ

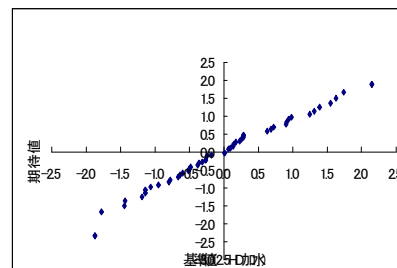
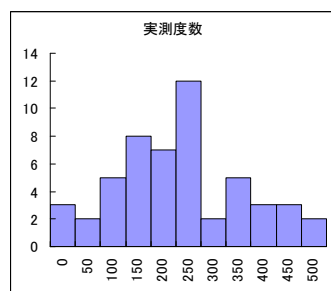


左極性カラム、右無極性カラム、上非加水、
下酸加水PH 0.3、非曝露尿
2AFが分析クロマトに影響(極性カラム)





非曝露者の加水分解値HD値



サンプル数	52
合計	13362
平均値	256.9615
最小値	10
最大値	541
分散	17415.61
標準偏差	131.9682
変動係数	0.518582

		A	B	C	D	E	F	G	H
		中災防	神奈川県予防医学	松下産業衛生科学	近畿エコサイエンス	SRL羽村	BML	保健科学	三菱メディアエンス
前処理	試料量 (mL)	2.5	5	1.5	5	0.5	1	1	1
	試薬名	塩酸	塩酸	塩酸	塩酸	塩酸	塩酸	塩酸	塩酸
	試薬量 (mL)	0.25	0.5	0.15	0.25	0.1	0.1	0.1	0.1
	反応条件	100°C 30min	100°C 30min	100°C 30min	100°C 30min	100°C 30min	100°C 30min	100°C 30min	100°C 30min
抽出	試薬名	ジクロロメタン	ジクロロメタン	ジクロロメタン	ジクロロメタン	エタノール	ジクロロメタン	ジクロロメタン	ジクロロメタン
	試薬量 (mL)	1	2	0.5	2	2	2	1	0.5
内部標準物質		3-メチルシクロヘキサノン	シクロヘキサノン	シクロヘキサノン	シクロヘキサノン	キリリン	3-メチルシクロヘキサノン	3-メチルシクロヘキサノン	シクロヘキサノン
測定条件	キャリアガス種類	He	He	He	He	He	He	He	He
	試料注入量(μL)	2	2	2	2	1	2	2	1
	スプリット/スプリットレス	スプリットレス	スプリットレス	スプリットレス	スプリットレス	スプリット	スプリット	スプリットレス	スプリット
	注入口温度(°C)	200	225	200	250	150	220	200	200
	カラムメーカー	HP	SUPELCO	J&W	J&W	GRACE	J&W	J&W	Agilent
	カラム名	HP-1	SPB-20	DB-1701	DB-1	EC TM -WAX	HP-5MS	DB-1701	HP-ULTRA2
	カラムサイズ	30m × 0.32mm	30m × 0.53mm	60m × 0.32mm	30m × 0.25mm	30m × 0.25mm	30m × 0.25mm	30m × 0.25mm	12.0m × 0.2mm
膜厚(μm)	0.25	1	1	1	0.25	0.25	0.25	0.33	
出	検出器	FID	FID	FID	FID	GC-MS	GC-MS	FID	FID
	検出器温度(°C)	250	250	260	250	250	230	250	250
定量	2,5-ヘキサシオン(分)	7.6	8.2	19.1	10.7	4.5	4.7	7.2	5.5
	内部標準リテンションタイム(分)	8.4	6.3	15.7	10	6.7	5.1	5.1	4.1
	計算方法	内部標準法	内部標準法	内部標準法	内部標準法	内部標準法	内部標準法	内部標準法	内部標準法

尿中トリクロロ酢酸、トリクロロエタノール、総三塩化物の分析

トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタンの溶剤の生物学的モニタリング検査は尿中トリクロロ酢酸、総三塩化物が検査項目とされている。これらの分析は現在でも吸光光度法が一部で使用されている。アルカリ性下でピリジンと反応し赤色を示し、藤原反応と言われ、特異的な反応であるゆえである。総三塩化物の測定はこの反応に由来している。最近ではヘッドスペースGC[検出器ECD]が用いられている。

尿中トリクロロ酢酸、トリクロロエタノール、 総三塩化物の分析の問題

ガスクロマトグラフ法はエステル化を行ないトリクロロ酢酸メチルエステルとしてECD検出器のついたヘッドスペースガスクロマトグラフで測定する。この時トリクロロエタノールも同時に分析されるが、抱合の切る条件の検討が必要である。おそらくエステル化剤と反応温度時間関係で抱合が切れると思われる。

トリクロロ酢酸 トリクロロエタノールの関係

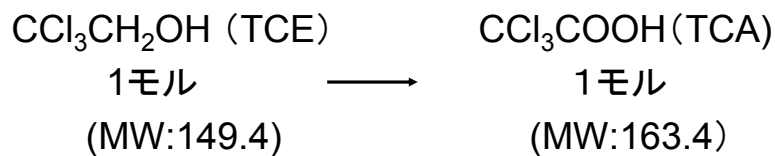
物質名	トリクロロ酢酸	トリクロロエタノール
トリクロロエチレン	10～30%	30～50% (抱合型)
テトラクロロエチレン	1～2%	—
1,1,1-トリクロロエタン	1～2%	2～5% (グルクロン抱合)

GC分析からの総三塩化物の計算

総三塩化物＝

トリクロロ酢酸＋トリクロロエタノールである。

総三塩化物はトリクロロ酢酸とトリクロロエタノールをクロム酸酸化でトリクロロ酢酸に変えて測定。そして分布値はこの値を用いている。



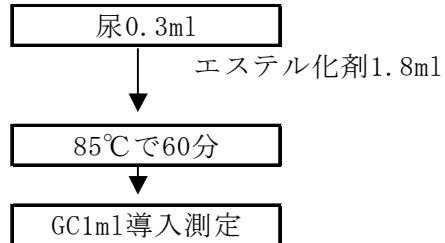
$$\text{TCA/TCE} = 163.4/149.4 = 1.093 \doteq 1.1$$

$$\text{TTC} = \text{TCA} + 1.1 \times \text{TCE}$$

GCを用いた尿中トリクロロ酢酸、トリクロロエタノールの新しい分析方法

最近 エステル化をおこなわずに直接尿をECD検出器のついたヘッドスペースガスクロマトグラフで測定する報告がある。この方法だと使用溶剤も同時に検出され、3種類の使用溶剤の分離曝露評価ができる可能性がある。

尿中トリクロロ酢酸、トリクロロエタノール、
ヘッドスペースガスクロマトグラフ
分析手順



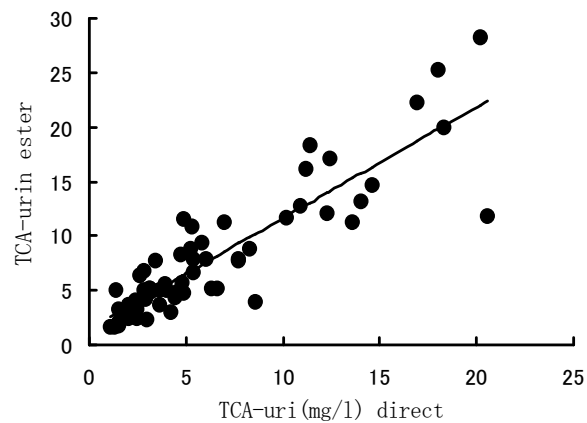
トリクロロ酢酸標準品は吸湿性があり、滴定により濃度を検定

カラム DB-1(J&W社製)径0.53mm 長さ30m 膜厚1.5 μ m

検出器 ECD 注入口温度 150 $^{\circ}$ C

検出器温度 300 $^{\circ}$ C

エステル化させずに
直接TCAの測定は可能である。



エステル化と直接方法比較

まとめ

- 労働衛生分野の生物学的検査はリスクアセスメントの曝露を評価する有用な手段である。
またこの検査は人への有害性を評価する、影響モニタリングとしてますます有用になる。

ありがとうございました。