

Toluene 及び Xylene の中毒に関する 高速液体クロマトグラフィーによる研究

第 1 編

尿中代謝産物よりみた某造船所における Toluene, Xylene 暴露の実態

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 緒方正名教授)

杉 原 黎 子

(昭和54年10月13日受稿)

Key words: シンナー, キシレン, *m*-メチル馬尿酸,
p-メチル馬尿酸, 高速液体クロマトグラフィー

結 言

有機溶剤の暴露量を, 尿中の代謝産物から推定する試みが, 従来から広く行われている。塗装作業において使用される thinner としては, 即乾性の塗装には toluene が, 遅乾性のそれには xylene が主として用いられている¹⁾。体内に入った xylene については, *m*-xylene, *p*-xylene は, ヒトやラットでは, 生体内でそれらの大部分が代謝されて, 尿中に *m*-メチル馬尿酸 (*m*-methylhippuric acid, *m*-MHA と略す), *p*-メチル馬尿酸 (*p*-methylhippuric acid, *p*-MHA と略す) として排泄されることが明らかにされている。そして, *m*-xylene, *p*-xylene の暴露量は尿中の *m*-MHA, *p*-MHA 濃度から推定できる²⁾。また, toluene は生体内代謝の結果, 馬尿酸 (hippuric acid, HA と略す) として尿中に排泄され, 尿中の HA 濃度から, 食餌等に由来する HA 濃度 (正常値) を考慮したうえで, 暴露された toluene 量を推定することが可能である²⁾。

一方, 現在, xylene の許容濃度は *m*-xylene, *p*-xylene に分けないで定められている³⁾ が, Lazarew⁴⁾ によれば, *p*-xylene は, *m*-xylene に比べて急性毒性が強い。したがって, xylene の毒性について検討する際には, 両者を分離して測定する必要があるという見地から, 筆者ら⁵⁾は, 先に, 高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC と略す) によって尿中の *m*-MHA,

p-MHA 及び HA の分離定量を研究し, 更にラットに *m*-xylene, *p*-xylene 混合液を腹腔内投与したときの, 投与量と尿中に排泄された *m*-MHA, *p*-MHA 量とは良い対応を示すことを報告した。尿中の *m*-MHA, *p*-MHA 及び HA の分離定量に関しては, Caperos⁶⁾, Engström⁷⁾ の gas chromatography (GLC と略す) や, Sollenberg⁸⁾ の isotachopheretic analysis による研究が見られる。しかし, 実際に xylene を使用した作業場における作業者の尿中 *m*-MHA, *p*-MHA のそれぞれの定量に関して検討した例は未だ見当たらない。

そこで, 本報では, 某造船所で xylene を主成分とする thinner を用いた塗装作業従事者の尿の分析結果について報告する。

被験者及び実験方法

1. 被験者

某造船所の塗装作業従事者の中から, 健康な男性 4 名 (年齢: 23~25 才) を無作為に選び被験者とした。塗装作業は, i) 船底 (作業場は開放状態), ii) 船内 (上部解放状態), iii) 船内 (側部解放状態), iv) 船内 (ドアと窓のみ解放, 電動 1 馬力換気扇設置) の 4 箇所の作業場を適宜移動して行われた。塗装作業時間は, 1 日に, 午前中 1 時間 (10 時~11 時), 午後 1 時間 (14 時~15 時) の計 2 時間であり, 作業は毎週月曜日から金曜日までの 5 日間行われた。また, この時間内以外には溶剤に直接暴露される作業には

従事しなかった。作業からの採尿は、作業開始直前（8時）、昼休憩時（12時）、1日の全作業終了直後（17時）の3回行い、採尿後直ちに尿比重を測定した。なお、塗装作業時には防毒マスクの着用が義務づけられており、また、使用溶剤は、主としてthinner（ラバックスシンナー®）であった。

2. 測定方法

1) thinner の分析

使用した thinner は GLC を用いて分析を行い、その成分を確認した。

（分析条件）

カラム：ガラスカラム，3.0mmφ×2m，充填剤：Benton 34+DNP 5-5%，oven temp.：100℃，inj. temp.：140℃，carrier gas：N₂，40ml/min，機器：Hitachi 063，FID 付。

2) 尿中の *m*-MHA, *p*-MHA 及び HA の定量

尿中の *m*-MHA, *p*-MHA, HA 濃度は、次のような方法⁵⁾で、HPLC によって測定し、比重補正^{*}して求めた。

（尿の処理）

尿1.0mlに対して、内部標準物質として、mandelic acid (MA と略す) の水溶液 (10mg/ml) を0.1ml 加え、濃塩酸 1~2 滴を加えて酸性 (pH 2) とした後、methyl ethyl ketone (MEK と略す) 4 ml で2分間抽出を行った。抽出液は、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、その中から1.4ml を採り、これに phenacyl bromide の MEK 溶液 (50mg/ml) と triethylamine の MEK 混液 (50mg/ml) を0.3ml ずつ加え、50℃で2時間加熱処理して HPLC による定量に供した。

なお、加熱処理後の試料は加水分解を防ぐために無水硫酸ナトリウムを加えた。

（分析条件）

カラム：ステンレスカラム，4.0mmφ×30cm，充填剤：LiChrosorb SI 100，5μm (Merck)，移動相：*n*-hexane/chloroform (25/75)，流量：1.0ml/min，圧力：80kg/cm²，機器：Hitachi 633，UV 254 nm 付。

結果及び考察

1. 溶剤の分析

作業現場で使用された thinner は、GLC による分析の結果、Fig. 1 に示すように toluene (1.6%)，ethylbenzene (32.4%)，*m*-xylene (34.9%)，*p*-xylene (16.6%) 及び *o*-xylene (14.5%) を含むもの

脚注

$$* \text{比重補正值} = \text{測定値} \times \frac{0.024}{\text{被験尿の比重} - 1.000}$$

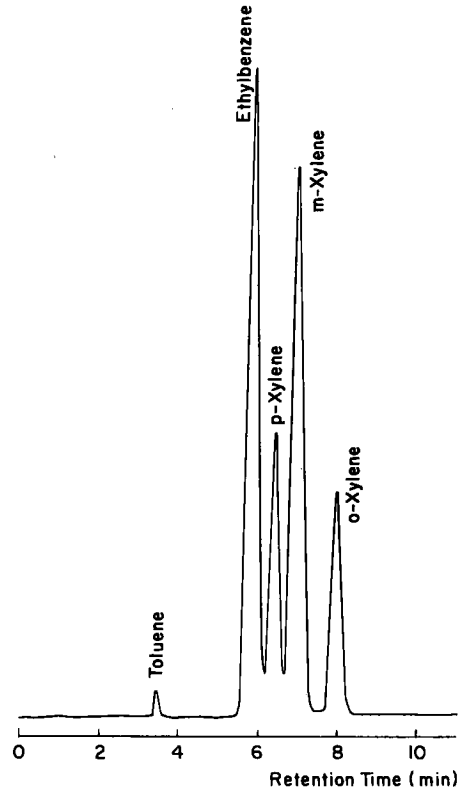


Fig. 1. Gas chromatogram of the thinner.

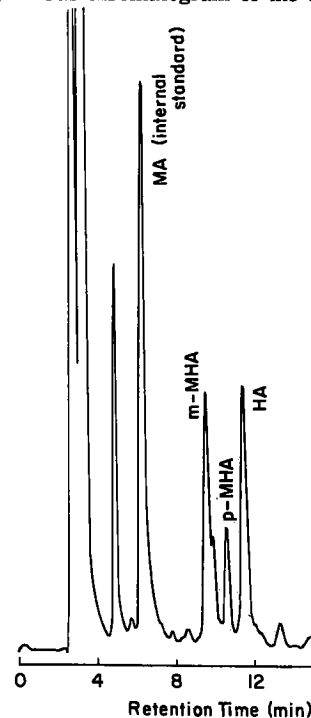


Fig. 2. Liquid chromatogram of the worker's urine.

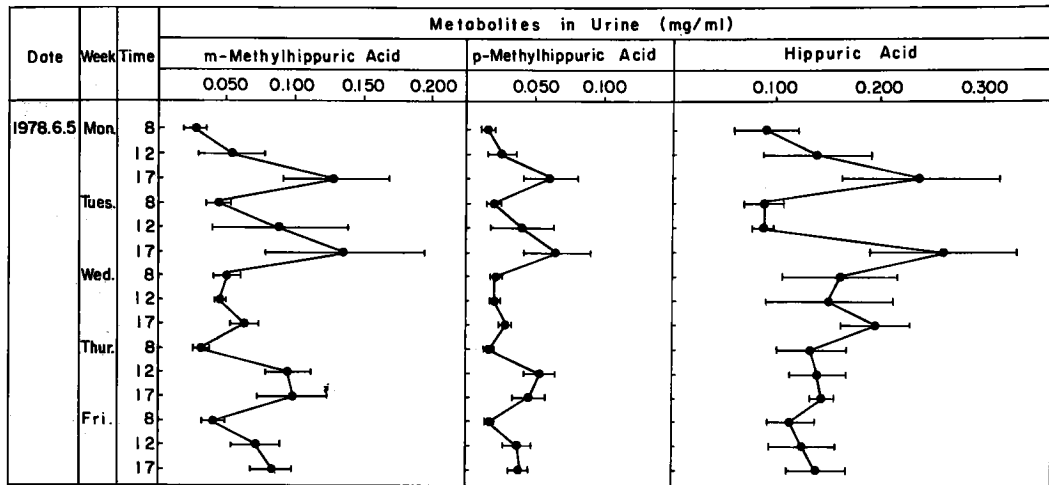


Fig. 3. Levels of *m*-methylhippuric acid, *p*-methylhippuric acid and hippuric acid in urines of workers after exposure to thinner containing *m*-xylene, *p*-xylene and toluene. Horizontal lines indicate standard errors of the means.

であった（成分は容量割合）。したがって、暴露者の尿中には、HA のほかに *m*-MHA, *p*-MHA の存在が予想された。

2. 作業者の尿中 *m*-MHA, *p*-MHA 及び HA 濃度
作業者の尿の液体クロマトグラムによれば、Fig. 2 に示すように、尿中代謝産物として *m*-MHA, *p*-MHA 及び HA の存在が認められた。

HPLC によって、4名の作業者の尿中 *m*-MHA, *p*-MHA, HA 濃度を、5日間の尿について測定した結果を Fig. 3 に示す。尿中の *p*-MHA 濃度に対する *m*-MHA 濃度の比は、平均2.34であり、使用した thinner 中の *m*-xylene/*p*-xylene の値（重量比）2.10 とほぼ一致している。このことは、先のラットに腹腔内注射した実験によって得られた結果⁵⁾と同様に、*m*-xylene と *p*-xylene の代謝間に競合はほとんどないことを示していると言える。

m-MHA, *p*-MHA, HA の1日における変動をみると、常に作業前の値が最も低く、昼と夕方の尿とでは、概ね塗装作業終了後の夕方の尿の値の方が高かった。これらの事実は、マスクを使用しているにもかかわらず、塗装作業に伴う溶剤暴露により、作業者が toluene, xylene を一部体内に取り込んでいることを示唆する。このことは、塗装作業者の健康管理に際しては、気中濃度の測定のみならず、作業者の尿中代謝産物をも定量し、それらの結果から、マスク装着の有無、吸収罐のガス吸着能などのマスク管

理、更には皮膚からの吸収の程度などを考慮する必要があると考えられる。なお、この尿中 *m*-MHA, *p*-MHA, HA 濃度を、Ogata ら²⁾のモデル実験から得られた、*m*-xylene, *p*-xylene, toluene 吸入量（気中濃度 ppm × 暴露時間 hr）とその尿中代謝産物（すなわち、*m*-MHA, *p*-MHA, HA）濃度との関係式にあてはめ、1日の平均吸入量を求めてみると、*m*-xylene は 7.88 (ppm × hr, 最高値 27.45), *p*-xylene は 4.87 (最高値 11.46), toluene は 5.68 (最高値 17.21) となった。作業場の気中濃度については、本実験期間中の塗装作業は4箇所の作業場を移動しながら行われたため、作業中の気中濃度を常時継続して測定することは困難であった。しかし、本実験と並行して、Norichika ら⁹⁾の方法を用いて4作業場における塗装作業中の溶剤気中濃度を一定時間ごとに測定した芳原ら¹⁰⁾の結果をもとにして、4作業場で平均的に作業したと仮定して、平均気中濃度を求めると、*m*-(*p*-)xylene 96.22 ppm, toluene 1.92 ppm であった。

筆者ら¹¹⁾が、健康人の尿について、HA の正常値を測定した際、それらの液体クロマトグラムには *m*-MHA, *p*-MHA のピークは認められなかったのに対して、今回の場合は、4名とも、作業前の朝の尿においても、*m*-MHA, *p*-MHA に相当するピークが常に見られた。このことは、前日あるいはそれ以前に体内に入った *m*-, *p*-xylene が残留していることを示唆する。しかし、週の初めと終りの尿中 *m*-MHA,

p-MHA 濃度に顕著な相違がみられなかったことから考えると、この残留はわずかでかつ累積性はほとんどないと考えられる。

HA の変動については、先に36人の健康人 (toluene 非暴露者) について、HPLC で測定した HA の平均値は0.222mg/ml、5%棄却限界の上限値は0.748 mg/mlであった¹¹⁾ことからみると、今回の HA 濃度の変動は主として食餌性のもと思われるが、一般に、朝の尿中 HA 濃度に比べて夕方の方が高い値を示しており、作業に用いた thinner によることも考えられる。

次に、前述した Ogata ら²⁾の実験式より求めた推定吸入量を ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) 勧告 (1976年)¹²⁾ の TLV-TWA (1日8時間1週間40時間の正規の労働時間中の時間加重平均濃度)、すなわち toluene 100 ppm, xylene 100 ppm と比較して、吸入量推定値/TWA¹³⁾ から恕限量を越えるか否かを調べた。その結果、4名の5日間の平均値は0.092(最高値0.127)となり、産業衛生上問題はないと考えられる。

本研究の目的の1つに、筆者らの考案した HPLC による *m*-MHA, *p*-MHA, HA の分離定量法⁵⁾ がヒトの尿にも適用することができるか否かを検討することであった。今回の実験の結果、xylene を用いた塗装作業者の尿中代謝産物は、本法により分離定量が可能であることがわかった。なお、今回の作業者の尿の液体クロマトグラム (Fig. 2) には、*o*-メチル馬尿酸 (*o*-methylhippuric acid, *o*-MHA と略す) と思われるピークが存在したが、今回の分析条件では分離が十分でなく、かつ微量であったため、本報では *o*-MHA についての言及は避けた。

結 論

造船所における塗装作業従事者4名の尿を1日3回(8時, 12時, 17時)、連続5日間採取し、HPLC によって、尿中 *m*-MHA, *p*-MHA, HA の定量を行った。その結果は、次のとおりである。

1. *m*-xylene, *p*-xylene を主成分とする thinner に暴露した後の尿中 *m*-MHA, *p*-MHA 及び HA は、尿から抽出後、phenacylester とし、固定相に silica gel, 移動相に *n*-hexane と chloroform の混液を用いる吸着液体クロマトグラフィーによって分離定量が可能であった。

2. 塗装作業者の尿中 *m*-MHA, *p*-MHA, HA 濃度は、朝就業直前の尿において最も低い値を示し、一般に、夕方作業終了時の尿の値が最も高く、防毒マスクを着装しているにもかかわらず、塗装作業による thinner の体内への侵入が推察された。

3. 正常尿には本来存在しない *m*-MHA, *p*-MHA が、作業者では、朝就業前の尿においても認められ、*m*-xylene, *p*-xylene の体内への残留が推察された。

本研究に際し、終始ご懇切なご指導を賜りました緒方正名教授に深謝します。また、作業現場における調査研究に、多くのご支援をくださいました作業場の皆様、当教室の芳原達也氏 (現、山口大学医学部講師)、則近和子氏に感謝します。

文 献

1. 大草 寛, 多田 治: 環境の有害物測定法, 労研出版部, p. 79-83, 1957.
2. Ogata, M., Tomokuni, K. and Takatsuka, Y.: Urinary excretion of hippuric acid and *m*- or *p*-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and *m*- or *p*-xylene as a test of exposure. *Br. J. ind. Med.* 27, 43-50, 1970.
3. 日本産業衛生学会: 許容濃度等の勧告 (1979), 産業医学, 21, 486-489, 1979.
4. Lazarew, N.W.: Über die Giftigkeit verschiedener Kohlenwasserstoffdämpfe. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 143, 223-233, 1929.
5. Sugihara, R. and Ogata, M.: Quantitation of Urinary *m*- and *p*-Methylhippuric Acids as Indices of *m*- and *p*-Xylene Exposure. *Int. Arch. Occup. Envir. Hlth* 41, 281-286, 1978.
6. Caperos, J.R. and Fernández, J.G.: Simultaneous determination of toluene and xylene metabolites in

- urine by gas chromatography. *Br. J. ind. Med.* **34**, 229-233, 1977.
7. Engström, K., Husman, K. and Rantanen, J.: Measurement of Toluene and Xylene Metabolites by Gas Chromatography. *Int. Arch. Occup. Envir. Hlth* **36**, 153-160, 1976.
 8. Sollenberg, J. and Baldesten, A.: Isotachophoretic Analysis of Mandelic Acid, Phenylglyoxylic Acid, Hippuric Acid and Methylhippuric Acid in Urine after Occupational Exposure to Styrene, Toluene and/or Xylene. *J. Chromat.* **132**, 469-476, 1977.
 9. Norichika, K., Kira, S. and Ogata, M.: Sampling and Analysis of Organic Solvent Vapours. With Special Reference to Sampling Tubes for a Short Time and for the Working Period. *Jap. J. Ind. Hlth* **21**, 264-268, 1979.
 10. 芳原達也, 則近和子, 松田 昭, 緒方正名: 有機溶剤取扱い作業者の健康管理, 第II報 某造船所における有機溶剤取扱い職場の作業環境, 岡山医学会雑誌, **90**, 1461-1465. 1978.
 11. Ogata, M., Sugihara, R. and Kira, S.: Quantitative Determination of Urinary Hippuric Acid and m- or p-Methylhippuric Acid as Indices of Toluene and m- or p-Xylene Exposure by High Performance Liquid Chromatography. *Int. Arch. Occup. Envir. Hlth* **39**, 199-206, 1977.
 12. 後藤 稠, 池田正之, 原 一郎: 産業中毒便覧, 医歯薬出版, p. 1384, 1392, 1977.
 13. ACGIH: Threshold limit values for 1964. *Envir. Hlth* **6**, 545, 1964.

**High-performance liquid chromatographic studies
of toluene and xylene poisoning**

**Part I: Workers' exposure to toluene and xylenes
estimated from metabolites in their urine in a shipyard**

Reiko SUGIHARA

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. M. Ogata)

In this paper, the author describes the determination of metabolites in the urine of shipyard workers exposed to thinner containing toluene and xylenes. Urine was taken from 4 healthy workers working at the same place, in the morning (a.m. 8:00), at noon (p.m. 0:00) and in the afternoon (p.m. 5:00), 3 times in a day for 5 consecutive days. Urinary metabolites, *i.e.*, *m*-methylhippuric acid, *p*-methylhippuric acid and hippuric acid, were determined by high-performance liquid chromatography. The results were: 1. *m*-Methylhippuric acid, *p*-methylhippuric acid and hippuric acid in the urine of painting workers could be determined by high-performance liquid chromatography following extraction and benzoxylation. The stationary phase used in this experiment was silica gel and the mobile phase was a mixture of *n*-hexane and chloroform. 2. Concentrations of urinary *m*- and *p*-methylhippuric acids and hippuric acid were lowest just before, and generally highest just after, work. These results suggest that the workers were inhaling the thinner vapor even though wearing gas masks. 3. Peaks of *m*- and *p*-methylhippuric acids occurred in the chromatogram of workers' urine collected before work in the morning, although there were no peaks in the chromatogram of normal urine. This indicates that *m*- and *p*-xylenes may still remain in the workers' bodies.