

有機溶剤の生物学的モニタリングのための 尿試料の保存と尿中濃度の補正について

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

田 口 豊 郁

(平成元年11月30日受稿)

Key words : 生物学的モニタリング, 尿中代謝産物, クレアチニン補正,
比重補正, 有機溶剤特殊健康診断

緒 言

トルエン, キシレン等の有機溶剤は, 産業現場で広く利用されている。有機溶剤に暴露されるとその種類によって尿中に各種代謝産物が排泄され, これらの尿中代謝産物の量から, 有機溶剤の暴露状況を評価することができる。このように生体試料 (尿, 血液, 呼気等) 中の有害物質, またはその代謝産物, あるいはその有害物質によって引き起こされた影響 (生化学的変化) の測定値から, 労働衛生管理のための予防的情報を得ることを生物学的モニタリングと呼んでいる¹⁾。さらに, 生物学的モニタリングは, dose-monitoring (有害物質の吸収量の評価) および effect-monitoring (有害物質による初期の生体影響の評価) に分けることができる。生物学的モニタリングは, 呼吸器系からの侵入だけではなく, 経皮, 経口等あらゆるルートからの暴露を評価の対象としている。

労働衛生管理を進展させるためには, 作業環境と作業者との関わりを明らかにすることが重要であるが, そのためには多くの情報が必要であることは言うまでもない。生物学的モニタリングによる情報は, 作業環境測定及び健康診断による情報とともに不可欠なものとする。

有機溶剤に対する生物学的モニタリングの生体試料として, 尿, 血液, 呼気等が利用できるが, 採取のしやすさ, 保存のしやすさから考えて, 尿が最も有効である。また, 一般に有機溶剤は, 尿中に代謝産物として排泄される割合が

多いので, 尿試料の測定値が暴露量の推定に有利である。

有機溶剤中毒予防規則の改正により, 有機溶剤特殊健康診断に尿中代謝産物の測定が採用され, 平成元年10月1日から施行されることとなった²⁾。作業環境管理などの労働衛生対策の進展により, 労働者の有害因子への暴露状況は, 高濃度暴露から, より低濃度暴露へと変化してきたため, 従来の検診項目では, 対応しきれなくなったのが現状であった。このため, 健康障害が発現する前段階に有害物による健康影響を把握する——① 有害物の体内摂取量の把握, ② 有害物質に対する生体反応の把握, ③ 有害物質による早期の健康障害の把握——という観点から今回の有機溶剤健康診断の改正となった。

尿中代謝産物測定の実施に当たって通達³⁾等が公表されているが, 実務上, 検討すべき問題点が多くあると考える。本研究では, 尿中代謝産物測定をより精密化し, 現場に適用できることを目的として, トルエン, キシレンおよびスチレン取扱作業者の尿中代謝産物を測定するために, ① 簡便かつ精度よく同時に測定できる高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) の開発, ② 尿試料の保存方法, ③ 尿中濃度の補正法——について検討を行った。

材 料 と 方 法

1. 高速液体クロマトグラフ(HPLC)による尿中代謝産物とクレアチニンの同時測定法

1) 試 薬

1-デカンスルホン酸ナトリウム(イオン対クロマトグラフ用, 東京化成), アセトニトリルおよびメタノール(液体クロマトグラフ用, 和光純薬), リン酸一カリウムおよびリン酸(特級, 和光純薬), 馬尿酸, メチル馬尿酸およびマンデル酸(東京化成), クレアチニン(和光純薬)を用いた。

2) HPLC 条件

カラム: ステンレス製 $\phi 4.6\text{mm} \times L150\text{mm}$, 充填剤: TSKgel ODS 80Tm $5\ \mu\text{m}$ (TOSOH製), 検出器: UV225nm (UV8010, TOSOH製), 流速: $0.7\text{ml}/\text{min}$, 圧: $100\text{kg}/\text{cm}^2$ (ポンプ; CCPM, TOSOH製), 注入量: $10\ \mu\text{l}$ (オートサンプラー; AS8000, TOSOH製), 移動相: 最適条件の検討の結果以下の移動相を使用した。

[$20\text{mM}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH3.3, リン酸で調整) + $3\text{mM}\ 1\text{-デカンスルホン酸ナトリウム}$]/ $\text{CH}_3\text{CN} = 85/15$ 。

3) 尿 試 料

トルエン, キシレンおよびエチルベンゼンを使用している塗料製造工場の作業者の作業直後尿を採取した。分析日まで冷凍保存した。

4) 尿の前処理

尿をメタノール+水(1+1)で100倍希釈し, 遠心分離(3000rpm×10分)後, その上清をHPLCに導入した。

2. ろ紙による保存および冷凍保存

ろ紙法の最適条件を決めるために標準物質である馬尿酸(HA), o-メチル馬尿酸(o-MHA), m-メチル馬尿酸(m-MHA), マンデル酸(MA)およびクレアチニンの水溶液および添加尿を用いて以下の検討を行った。

1) ろ紙の材質及び大きさ

吸水性のあるろ紙ということからペーパークロマトグラフ用ろ紙(東洋50)を使用することにした。また, 大きさについては, 保存の際にかさばらず, 扱い易いということで $10\text{mm} \times 50\text{mm}$ に決めた(図1)。

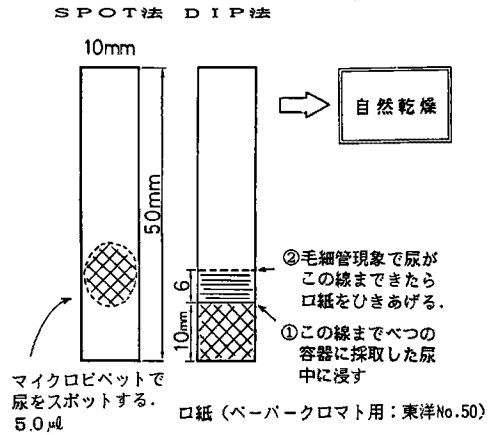


図1 ろ紙を用いた spot 法及び dip 法による尿試料の保存

2) 試料のろ紙への吸収方法⁴⁾

代謝産物濃度をクレアチニン補正濃度(g代謝産物/g・クレアチニン)で表現する場合, 代謝産物とクレアチニンの同時HPLC法を用いれば, ろ紙に吸収された尿量(体積)の違いは, 理論的には無視できるが, 吸収された尿量が余りに違いすぎると定量範囲や定量下限が試料ごとに大きく異なることになるので, 分析手法としては同程度の試料量が得られるようにすることが望ましい。したがって, 試料量のバラツキを小さくできる方法として① spot法および② dip法考案した。

① spot 法

マイクロピペットを用いて正確に尿 $50\ \mu\text{l}$ をろ紙に吸収させ, 乾燥後, アルミホイルで包み保存する(図1)。

② dip 法

ろ紙を下から10mmの位置まで尿中に侵し, 尿が毛細管現象で液面から6mm上昇したときにろ紙を引き上げる。spot法と同様乾燥後アルミホイルで包み保存する(図1)。

3) ろ紙の乾燥

考察で述べるようにろ紙中に水分があると細菌が繁殖し易いので十分に乾燥させる。すなわち, 室温で3~4時間放置するか, またはドライヤーで乾燥させた。

4) 目的物質のろ紙からの溶出

HA, MHA は、水に溶けにくいメタノールによく溶ける。一方、クレアチニンは水によく溶ける。これらを同時にろ紙から回収するために、メタノール+水(1+1)を抽出溶媒に選んだ(HA, MHA, MAおよびクレアチニンの標準液を調製する際に、各々10g/l程度の高濃度であってもメタノール+水(1+1)を用いると容易に溶かすことができる)。すなわち、ろ紙片を試験管に入れ、メタノール+水(1+1)5mlを加え、超音波洗浄器で15分間溶出させ、遠心分離(3000rpm×10分)後、その上清をHPLCに導入した。

5) 保存期間および保存温度

ろ紙の保存場所の温度条件として(1)室温(20-30℃)、(2)冷蔵(4℃:冷蔵庫)で回収率の経時変化および再現性を検討した。

6) 回収率および再現性の検討

有機溶剤の非暴露尿にMA, HA, o-MHA, m-MHAおよびクレアチニンを各々1g/lとなるように標準物質を添加した(以下添加尿という)。この添加尿をspot法およびdip法によりろ紙に吸収させ、室温で4時間風乾後各々をアルミホイルで包み、室温および冷蔵保存した。7, 14, 30日後、ろ紙を10ml試験管に採り、メタノール+水(1+1)5mlを加え、超音波洗浄器で15分間溶出し、遠心(3000rpm×10分)後、その上清10μlをHPLCに導入した。

7) ろ紙法の現場への適用

塗料製造工場(A工場)の作業員36人の尿(作業後尿、7月に採尿)を用いて、尿試料の保存——冷凍保存およびdip法によるろ紙保存——の有効性について検討した。

3. 尿中代謝産物濃度の補正

1) 有機溶剤作業員の尿中濃度の補正について

有機溶剤使用工場で、尿中代謝産物測定および個人暴露濃度測定を行い、尿中濃度の補正、データの取扱い方について検討した。

(1) 測定実施工場等

A工場……塗料製造工場(調合、混練、缶詰め作業)、①1987年12月に実施、測定作業員:男10人、年齢:40±11、②1988年7月に実施、測定作業員:男36人、年齢40±12

B工場……建築用ボード製造工場(接着剤塗布、接着作業)、1987年7月に実施、測定作業員:男12人、年齢:26.7±7.8

(2) 尿試料(測定対象物質:馬尿酸およびメチル馬尿酸)

AおよびB工場とも終末作業日の作業終了時にポリエチレン瓶に採取し、その場で尿比重を測定し、冷蔵運搬、分析日まで凍結保存した。

(3) 尿の分析:尿をメタノール+水(1+1)で100倍希釈し、高速液体クロマトグラフによる尿中代謝産物とクレアチニンの同時測定法を用いた。

(4) 個人暴露濃度測定:測定日の作業開始時から終了時まで、各作業員の襟元有機ガスモニター(プロテックG-AA型)を装着し、二硫化炭素で有機溶剤を脱着し、ガスクロマトグラフを用いて時間加重平均濃度を求めた。

2) 運動負荷による尿中馬尿酸濃度の変動

有機溶剤非暴露者の運動負荷前後の尿中HA濃度を測定し、運動前尿中HAの正常値と、運動後尿中のHA濃度を比較し、尿の濃淡による影響を小さくするための尿中濃度の補正法について検討した。

(1) 試料および測定方法

a) 試料:バレーボール部に所属する学生(女子、18-22歳、13人、有機溶剤の暴露はない)、バレーボールの練習(9:00-12:00、9月に実施)前後の尿を採取し、現場で尿比重を測定し、分析日まで冷凍保存した。

b) 尿中馬尿酸およびクレアチニンの測定:尿をメタノール+水(1+1)で100倍希釈し、HPLCで分析した。

3) 24時間尿とスポット尿の比較

有機溶剤非暴露者のスポット尿を24時間にわたり、採取し、尿比重、クレアチニン、馬尿酸等について、24時間尿値とスポット尿値を比較検討した。なお、24時間尿値は、各々のスポット尿値とその体積から計算で求めた。

結 果

1. HPLCによる尿中代謝産物とクレアチニンの同時測定法

クレアチニンのHPLCによる保持時間(Rt)

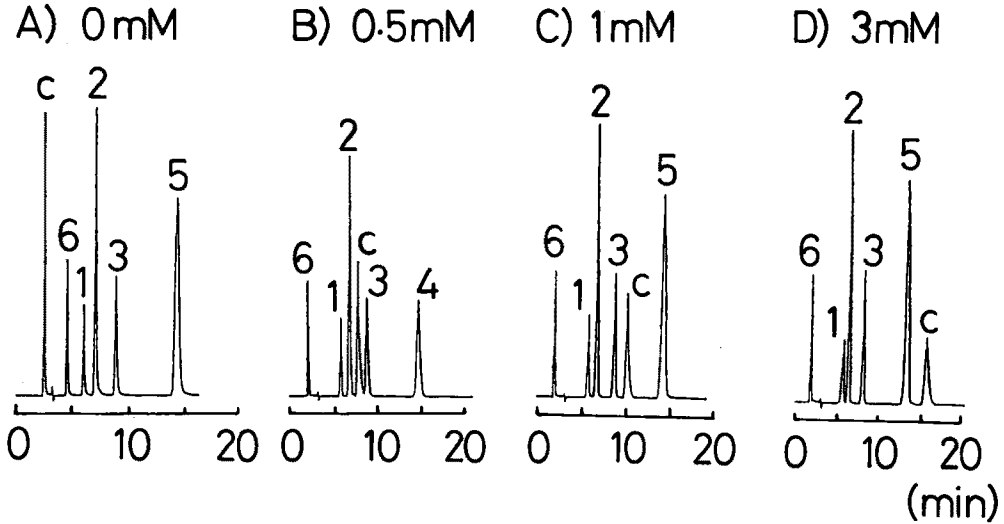


図2 イオン対濃度と高速液体クロマトグラム
 [イオン対濃度] A) : 0 mM, B) 0.5 mM, C) 1 mM, D) 3 mM, 1 : マンデル酸 (MA), 2 : 馬尿酸 (HA), 3 : o-メチル馬尿酸 (o-MHA), 4 : m-メチル馬尿酸 (m-MHA), 5 : (m+p)-メチル馬尿酸, 6 : フェニルグリオキシル酸 (PGA), C : クレアチニン

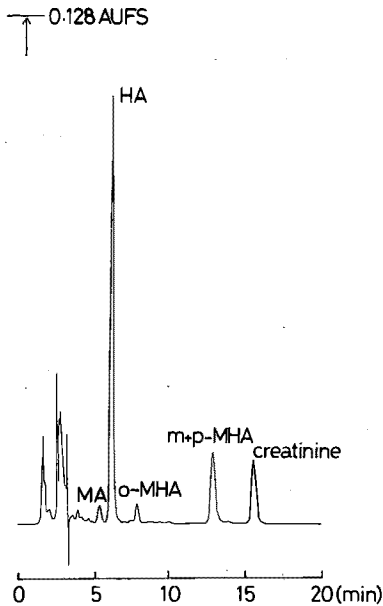


図3 有機溶剤暴露者尿の高速液体クロマトグラム
 [暴露濃度] トルエン : 70 ppm, o-キシレン : 6 ppm, m-キシレン : 25 ppm, p-キシレン : 10 ppm, エチルベンゼン : 15 ppm (8時間荷重平均濃度)
 [代謝産物濃度] MA : 0.22, HA : 1.7, o-MHA : 0.15, (m+p)-MHA : 0.56, クレアチニン : 0.83 g/l (作業直後尿)

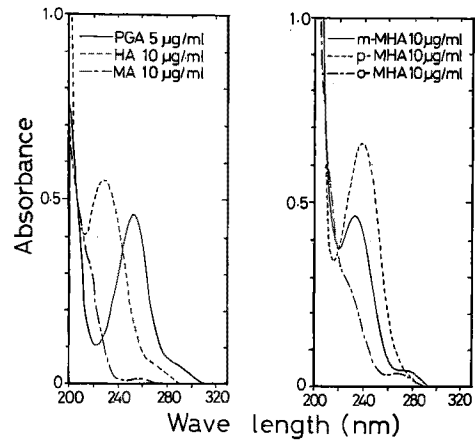


図4 有機溶剤の尿中代謝産物の紫外外部吸収スペクトル
 対照 : メタノール, セル : 石英製 10 mm × 10 mm

は、移動相に添加したイオン対濃度によって変化した。移動相の成分中、イオン対試薬(1-デカンサルホン酸ナトリウム)の濃度を0~3 mMと変化させ、他の HPLC 条件が同じ場合の HPLC クロマトグラムの変化を図2に示す。クレアチニンは、尿中に必ず存在するので、一番

表1 ロ紙による保存 (spot 法) : 回収率の経時変化

保存日数	マンデル酸	馬尿酸	o-メチル馬尿酸	m-メチル馬尿酸	クレアチニン
冷蔵保存					
オリジナル	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.01±0.018	1.00±0.018	1.02±0.016	1.02±0.013	1.01±0.021
14	1.01±0.007	1.01±0.007	1.01±0.006	1.00±0.006	1.00±0.005
30	0.99±0.005	0.99±0.009	1.02±0.009*	0.98±0.008*	0.98±0.010*
室温保存					
オリジナル	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.00±0.026	1.02±0.036	1.03±0.037	0.98±0.015	0.98±0.032
14	1.00±0.006	1.01±0.009	0.99±0.007	0.99±0.007	0.93±0.005***
30	0.98±0.009*	0.97±0.007**	0.95±0.005***	0.94±0.007***	0.84±0.013***

注 1) オリジナル濃度 (1 g/l) を1.00とした, (平均値±標準偏差, n=5)

2) オリジナル濃度と保存後の濃度の平均値を比較 (t 検定) したとき,

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001の危険率で有意差有り.

表2 ロ紙による保存 (dip 法) : 回収率の経時変化 (クレアチニン比)

保存日数	MA	HA	o-MHA	m-MHA
	クレアチニン	クレアチニン	クレアチニン	クレアチニン
冷蔵保存				
オリジナル	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.00±0.007	1.01±0.009	1.00±0.011	1.02±0.014
14	0.98±0.012	0.99±0.008	0.99±0.008	1.00±0.008
30	0.95±0.006***	0.98±0.006***	0.97±0.005***	1.01±0.005***
室温保存				
オリジナル	1.00	1.00	1.00	1.00
7	1.01±0.042	1.02±0.014	1.02±0.013	1.01±0.009
14	1.03±0.010**	1.06±0.009***	1.05±0.009***	1.08±0.008***
30	1.06±0.009***	1.09±0.009***	1.07±0.009***	1.12±0.005***

注 1) オリジナル濃度 (1 g/g・cre) を1.00とした, (平均値±標準偏差, n=5)

2) MA: マンデル酸, HA: 馬尿酸, MHA: メチル馬尿酸

3) オリジナル濃度と保存後の濃度の平均値を比較 (t 検定) したとき,

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001の危険率で有意差有り.

表3 ロ紙による保存 (spot 法, dip 法) : 60時間冷蔵保存後の変動係数 (CV%)

	MA	HA	o-MHA	m-MHA	クレアチニン
spot 法	2.1 (1.3)	2.1 (1.8)	2.4 (1.2)	2.0 (0.6)	2.0
dip 法	3.8 (2.2)	3.8 (2.2)	3.6 (2.2)	4.1 (2.1)	4.7

注) MA: マンデル酸, HA: 馬尿酸, MHA: メチル馬尿酸

(n=5)

(): クレアチニン補正值

表4 トルエンおよびキシレン暴露尿によるオリジナル濃度と保存後の測定値の相関および回帰式

	馬尿酸	メチル馬尿酸
冷凍保存 6 ヶ月	$r = 0.998 (0.996 - 0.999)$ $y = -0.011 + 1.002x$	$r = 0.996 (0.992 - 0.998)$ $y = 0.052 + 1.004x$
ろ紙保存 1 週間 (室温)	$r = 0.998 (0.996 - 0.999)$ $y = 0.004 + 0.957x$	$r = 0.997 (0.994 - 0.998)$ $y = -0.018 + 0.960x$
ろ紙保存 2 週間 (冷蔵)	$r = 0.997 (0.994 - 0.998)$ $y = 0.007 + 1.051x$	$r = 0.993 (0.986 - 0.996)$ $y = -0.035 + 1.014x$

注 1) x : オリジナル濃度 ($g/g \cdot cre$), y : 保存後の濃度 ($g/g \cdot cre$), $n=36$.

2) (-): 相関係数 r の95%信頼区間

最後にピークが出るようにすると分析の終了がわかりやすいということから、尿中代謝産物とクレアチニンの同時測定法として、この系では1-デカンサルホン酸ナトリウム濃度、3 mMを採用した。この方法による有機溶剤暴露者尿のHPLCクロマトグラムを図3に示す。この系では、m-MHAとp-MHAを分離することはできないが、測定波長を225nmにすると両者のモル感度が一致する⁹⁾ので(m+p)-MHAの総和として測定できた(図4. UVスペクトル参照)。また、クレアチニンの測定値について、本HPLC法と一般によく用いられているJaffe法を応用した自動分析器(日立726型)の結果を比較したところ、クレアチニン濃度0.5-4.0 g/lの範囲で、相関係数 $r=0.997$ 、回帰式 $y=0.029+1.00x$ ($n=36$, x : HPLC法, y : Jaffe法による自動分析器)であり、両測定値はよく一致した。

2. ろ紙による保存および冷凍保存

ろ紙保存: spot法での回収率を表1に示す。表中オリジナルと言うのは、ろ紙に吸収させずに尿をメタノール+水(1+1)で1/100に希釈し、直接HPLCで分析した値である。このオリジナル濃度を1として、回収率を求めた。その結果、室温保存で1週間、冷蔵保存で1ヵ月は、安定であった。クレアチニンは他の尿中代謝産物に比べて劣化しやすい傾向にあり、回収率が0.95以上あれば保存性がよいと判断すると室温保存での回収率が2週間以降で0.95以下と悪くなった。次にdip法の回収率の経時変化を表2に示す。dip法の場合、その操作上、ろ紙に吸収させた尿量がspot法に比べてばらつくので、クレアチニン比で表した。その結果は、spot法と

同様、室温保存で1週間、冷蔵保存で1ヵ月は安定であった。dip法で室温保存の場合、日数が経つにつれて回収率が上昇して100%を超えているのは、クレアチニンの分解が他の代謝産物より速いためであり、その結果、クレアチニン補正值(クレアチニンで割った値)としての回収率は高くなった。

さらに、60時間冷蔵保存後の測定値の再現性を変動係数%で表したものを表3に示す。spot法およびdip法とも $cv\% < 5\%$ のよい再現性であったが、各々の再現性は、クレアチニン比をとることによってさらに良くなった。

HAおよびMHAのオリジナル濃度と6ヵ月冷凍保存後、ろ紙保存1週間(室温)保存後および、ろ紙保存2週間(冷蔵)保存後の測定値を比較した。表4にこれらの相関および回帰直線の式を示す。ここでMHAは、o, m, p-MHAの合計である。何れも相関係数は0.99以上で、回帰直線は、ほぼ原点を通り、その傾きは 1.00 ± 0.05 であるので、何れもよい保存性を示した。

3. 尿中代謝産物濃度の補正

1) 有機溶剤作業者の尿中濃度の補正について
尿中代謝産物濃度、有機溶剤の個人暴露濃度、尿比重および尿中クレアチニン濃度の測定結果(平均値±標準偏差)を表5に示す。

尿比重、クレアチニンともその測定値は、7月実施のAおよびB工場の方が12月実施のA工場より有意に高かった。これは主として季節による尿量の違いによるものと考えられた。また、各々の工場でのHAおよびMHA濃度の変動係数($cv\%$)は、実測値より比重およびクレアチニン補正值の方が小さくなる傾向にあった

表5 有機溶剤使用工場での測定結果一覧表

	A 工場(12月)	A 工場(7月)	B 工場(7月)
尿 比 重	1.017±0.005	1.030±0.003	1.028±0.004
尿中クレアチニン(g/ℓ)	0.86±0.40	1.85±0.56	1.80±0.68
馬尿酸			
実 測 値(g/ℓ)	0.89±0.57(64)	1.18±0.62(53)	1.34±0.81(60)
比 重 補 正 値(g/ℓ)	0.96±0.52(54)	0.78±0.37(47)	0.98±0.61(63)
クレアチニン補正值(g/g・クレアチニン)	1.03±0.54(53)	0.66±0.33(50)	0.85±0.63(74)
メチル馬尿酸			
実 測 値(g/ℓ)	0.44±0.26(58)	0.91±0.71(78)	0.48±0.33(69)
比 重 補 正 値(g/ℓ)	0.50±0.23(47)	0.60±0.41(68)	0.34±0.20(60)
クレアチニン補正值(g/g・クレアチニン)	0.52±0.23(43)	0.51±0.34(67)	0.29±0.18(61)
トルエン個人暴露濃度(ppm)	27±21 (77)	15± 8 (53)	28±27 (98)
キシレン個人暴露濃度(ppm)	16± 9 (60)	14±11 (80)	11± 5 (49)

平均値±標準偏差 (cv%)

注 ***: p<0.001の危険率で平均値の差に有意差有り (t検定), -: p<0.05で, 有意差を認めない。

表6 個人暴露濃度と尿中代謝産物濃度の相関係数および回帰式

	トルエン (x), 馬尿酸 (y)		キシレン (x), メチル馬尿酸 (y)	
	相関係数	回帰式	相関係数	回帰式
A 工場(12月に実施)				
実 測 値	0.62 (0.01-0.90)	y=0.017x+0.43	0.86** (0.50-0.97)	y=0.024x+0.08
比重補正值	0.74* (0.20-0.93)	y=0.018x+0.47	0.93*** (0.74-0.98)	y=0.024x+0.13
クレアチニン補正值	0.92*** (0.67-0.98)	y=0.024x+0.38	0.94*** (0.77-0.99)	y=0.023x+0.16
A 工場(7月に実施)				
実 測 値	0.61*** (0.35-0.78)	y=0.049x+0.46	0.52** (0.23-0.72)	y=0.033x+0.45
比重補正值	0.69*** (0.47-0.83)	y=0.033x+0.30	0.56*** (0.28-0.75)	y=0.021x+0.31
クレアチニン補正值	0.76*** (0.58-0.87)	y=0.033x+0.18	0.72*** (0.51-0.85)	y=0.022x+0.20
B 工場(7月に実施)				
実 測 値	0.74** (0.28-0.92)	y=0.021x+0.73	0.84*** (0.50-0.95)	y=0.052x-0.08
比重補正值	0.84*** (0.51-0.95)	y=0.018x+0.45	0.86*** (0.56-0.96)	y=0.033x-0.01
クレアチニン補正值	0.85*** (0.54-0.96)	y=0.019x+0.30	0.79** (0.40-0.94)	y=0.026x-0.01

注 1) 実測値 (g/ℓ), 比重補正值 (g/ℓ:1.020), クレアチニン補正值 (g/g・cre)

2) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001の危険率で, xとyの間に相関関係有り(母相関係数ρ=0の検定).

3) (-): 相関係数の95%信頼区間。

(ただし, 7月実施のB工場のHAは除く)。

また, 個人暴露濃度と尿中代謝産物の相関係数およびその回帰式を表6に示す。トルエン: HA, キシレン: MHAとも相関係数は, 実測値より, 比重およびクレアチニン補正值の方がよ

り1に近い値となった。

2) 運動負荷による尿中馬尿酸濃度の変動

測定結果の一覧表を表7に示す。馬尿酸の実測値は, 運動後尿の方が運動前より高値であった。また, 比重値およびクレアチニン濃度も同

表 7 運動前後の尿の測定結果

	尿比重		クレアチニン		馬尿酸								
	前	後	前	後	A		B		C		馬尿酸比 (運動後/運動前)		
					前	後	前	後	前	後	A	B	C
平均値	1.029	1.031	1.842	2.747	0.243	0.322	0.168	0.212	0.139	0.123	1.42 ⁺⁺	1.35 ⁺	0.92
標準偏差	0.0026	0.0038	0.426	0.537	0.130	0.169	0.090	0.117	0.085	0.075	0.48	0.48	0.20
cv%	8.9	12.4	23.1	19.5	53.4	52.4	53.3	54.9	61.5	61.0	33.9	35.5	22.1

注 1) A:実測値 (g/l), B:比重補正值 (g/l:1.020), C:クレアチニン補正值 (g/g・cre), 前:運動前, 後:運動後
 2) 運動前後の測定値の平均値の差を比較 (対応のある場合の平均値の差の検定) をしたとき, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001の危険率で有意差有り.
 3) 運動前後の馬尿酸の実測値, 比重補正值およびクレアチニン補正值の比の平均値を 1 と比較 (t 検定) したとき, + : p<0.05, ++ : p<0.01の危険率で有意差有り.

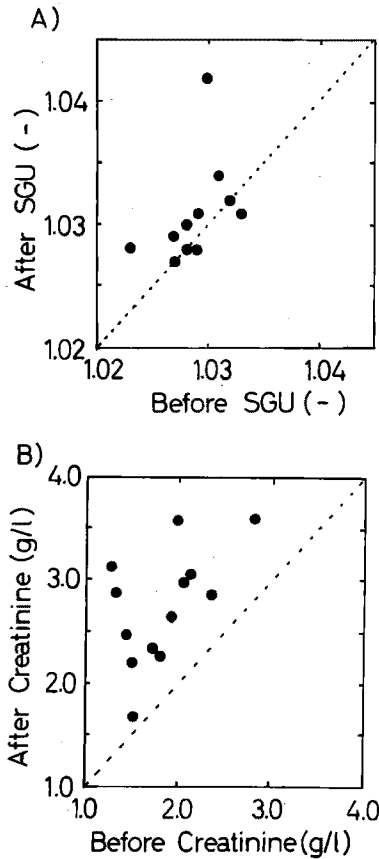


図 5 運動前後の尿比重とクレアチニン濃度の比較
 A) SGU (尿比重) の比較, B) クレアチニン濃度の比較

様に, 運動後の方が運動前より高値であった (図 5). 図 6 に HA 濃度の実測値, 比重補正值およびクレアチニン補正值の運動前後の比較を示す. HA の実測値のほとんどは, 対角線より上にプロットされた (図 6 A). すなわち, 各個人の HA 濃度は, 運動後に高くなっていった. 比重補正值でも対角線より上にプロットされているが, 対角線からの距離は, 全体的に, 実測値と比べて小さくなった (図 6 B). さらに, クレアチニン補正すると各々の点は, 対角線により近づいた (図 6 C). したがって, 運動前後の HA 濃度の変化は, クレアチニンおよび比重補正すると小さくなったが, 特に, クレアチニン補正の方が, その効果が大きであった.

3) 24時間尿とスポット尿の比較

24時間尿とスポット尿の比較を表 8 に示す. 比重, クレアチニンおよび HA とも 24時間尿とスポット尿の平均値はよく一致した. また, スポット尿中の HA 濃度の日内変動 (cv%) は, 実測値より比重補正值, クレアチニン補正值および排泄速度の方が小さくなった.

考 察

HPLC による尿中代謝産物とクレアチニンの同時測定法について: 生物学的モニタリングが衛生管理の一手法として定着しつつあり, 特に, トルエン, キシレン等の芳香族有機溶剤の

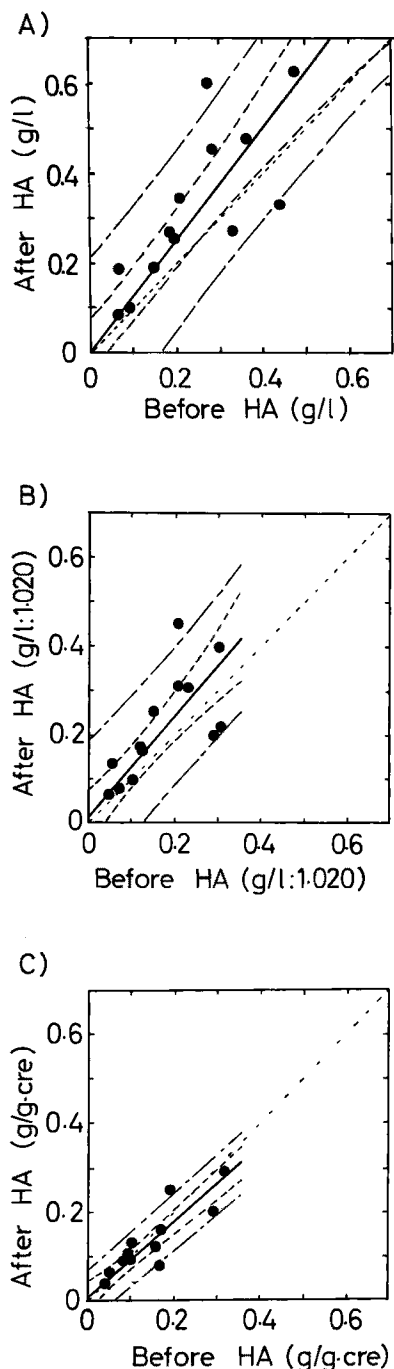


図6 運動前後の尿中馬尿酸濃度の比較
 A) 実測濃度の比較, B) 比重補正濃度(比重1.020で補正)の比較, C) クレアチニン補正濃度の比較

尿中代謝産物測定は、HPLC法(UV検出器付)の発展により、広く実用化されるようになってきた。尿中代謝産物濃度の表現方法として、実測値そのままではなく、尿の濃さ(尿量)による影響を補正するために比重補正やクレアチニン補正することが提案されている——ACGIHの生物学的暴露指標(BEI)では、多くの尿中暴露指標に対してクレアチニン補正を採用している⁹⁾。

通常、汎用されているODSカラムによる逆相分配クロマトグラフィーでは、クレアチニンは、保持時間(Rt)が短く尿中の他の多くの成分と重なってしまい、定量することは不可能であった。しかし、イオン対クロマトグラフィーを応用することによって、クレアチニンのRtを大きくすることができ、HA、MHA等の尿中代謝産物と同時に定量することができた。すなわち、クレアチニンのようなイオン性物質は、移動相中のイオン対試薬とイオン対を形成して、電氣的に中性となり、疎水性が増大して逆相用液相(ODS)に分配されるようになる。したがって、イオン対試薬の種類およびその濃度、pH等を調整することによって、そのRtを制御することができる。クレアチニンのような塩基性物質には、イオン対試薬として、アルキル硫酸塩または、アルキルスルホン酸塩を使用することが有効であった。

本HPLC法は、尿中代謝産物とクレアチニンを同時に求めることができる。尿中代謝産物をクレアチニン補正值で表す場合、尿中代謝産物(g/l)をクレアチニン(g/l)で割るので、体積(l)の項は消去される。したがって、試料の希釈誤差およびHPLCへの注入誤差が、無視できるので、精度よく尿中代謝産物のクレアチニン補正值を得ることができる。

ろ紙による保存および冷凍保存について：尿試料の保存に最も影響するのは、細菌等による分解である。細菌の働きや繁殖を抑えるために、①キシレン等を加えて表面に膜を作り、空気中からの落下細菌を防ぐ。②チモール等の防腐剤を加える。③塩酸、酢酸等を加えて酸性にする。④冷凍する。等の保存法が従来から行われてきた。試料中に何らかの試薬を加えると目的物または分析法によっては、後の分析に妨害となる

表 8 24時間尿とスポット尿の比較

	No. 1		No. 2	
	24時間尿	スポット尿(n=7)*	24時間尿	スポット尿(n=6)*
尿 量 (ℓ)	1.010	0.144±0.067 (47)	1.220	0.203±0.078 (38)
比 重	1.022	1.022±0.005 (20)	1.025	1.025±0.003 (12)
クレアチニン(g/ℓ)	0.956	1.036±0.512 (49)	1.391	1.387±0.258 (19)
HA実 測 値(g/ℓ)	0.329	0.366±0.226 (62)	0.228	0.221±0.131 (59)
HA比 重 補 正 値(g/ℓ (1.020))	0.301	0.310±0.136 (44)	0.183	0.169±0.081 (48)
HAクレアチニン補正値(g/g・cre)	0.345	0.353±0.116 (33)	0.164	0.151±0.065 (43)
HA排 泄 速 度(mg/min)	0.221	0.209±0.057 (28)	0.193	0.183±0.081 (44)

*スポット尿：平均値±標準偏差 (cv%)

ことがある。したがって、これらの中でも試料に何も加えなくてよい冷凍保存が最も実際的である。HA, MHA等の尿中代謝産物についても冷凍保存は非常に有効である。

一方、今回、開発したろ紙法では、尿をろ紙に吸収後、乾燥し、水分のない状態で保存する——尿中の揮発性の物質が保存できる——方法である。一般に、尿は放置しておくとも細菌が繁殖するが、尿がアルカリ性であれば細菌は繁殖し易い。尿を酸性にして保存するのはこのためである。尿中に多量に含まれているクレアチニンは分解するとアンモニアが発生し、尿はさらにアルカリ性に傾く。ろ紙中に水分が残っているとクレアチニンは分解し易い⁷⁾⁸⁾。したがって、ろ紙をよく乾燥させてから保存することが大切である。乾燥保存後のろ紙は、分析時にメタノール+水(1+1)で超音波洗浄器を用いて溶出させ、その上清を直接HPLCで分析した。

“HPLCによる尿中代謝産物とクレアチニンの同時測定法”を併用すれば精度よく代謝産物のクレアチニン補正値を得ることができた。

ろ紙保存法は次のような特長を有する。①保存の際に試薬等をまったく加えないので、後の分析で保存試薬の影響を考えなくてよい。②クレアチニンと同時に測定ができるので、簡便に代謝産物のクレアチニン補正値を得ることができる。③代謝産物濃度をクレアチニン補正値(代謝産物/クレアチニンの比)で表現する場合、本法では、同一クロマトグラムから代謝産物とク

レアチニンが求められるので、試料の希釈誤差およびHPLCの試料注入誤差が無視できる。④保存および分析のための操作が簡単であるので多検体を処理できる。さらに保存試料はかさばらないので多検体を一度に郵送することができ

る。

尿中代謝産物濃度の補正について：今回用いた“尿中代謝産物とクレアチニンの同時HPLC法”によって簡便かつ精度のよい尿中代謝産物のクレアチニン補正値を得ることができた。尿の濃淡の補正については、A工場(12月実施)の尿比重およびクレアチニン濃度は、7月実施のAおよびB工場のそれらより明らかに低値であった。この要因として、年齢、作業強度の差等種々の事が考えられるが、主として、季節による尿量の違い(発汗等の差異)によるものと考えられる。このように尿の濃さが種々の条件によって変動するので、この変動の影響をうけないように、尿中代謝産物の実測値は補正をする必要があると考えられる。AおよびB工場とも、各工場内の尿中代謝産物濃度のばらつきは、補正をした方が小さくなった。また、比重またはクレアチニンで補正した方が暴露濃度と尿中代謝産物の相関が良くなる傾向であった。この傾向は、クレアチニン補正の方が比重補正より顕著であった。したがって、現場のスポット尿に対して、クレアチニン補正は尿の濃淡の影響を小さくするのに有効な補正法と考えられる。

有機溶剤非暴露者の運動後尿は、運動前尿に

比べて、比重、クレアチニンおよびHAとも高値を示した。このことは、運動負荷によって(発汗等による)尿が濃縮されたためと考える。HAの測定値を正常値と比べる場合や、トルエン暴露の指標とする場合、実測値では尿の濃さの変動による影響をうけて評価できない。この尿の濃さによる影響を小さくするためには、濃度の補正が必要と考える。補正法として、比重補正およびクレアチニン補正が簡便で有効であったが、運動前後の尿中HA濃度を比べた場合、特に運動後尿のように高濃度に濃縮された尿(一般に尿比重1.030以上、クレアチニン濃度3 g/l以上)では、クレアチニン補正の方が比重補正よりその前後差が小さくなった。

一方、有機溶剤非暴露者個人の24時間尿とスポット尿のHA濃度を比較した場合、スポット尿中のHA濃度の日内変動(cv%)は比重補正及びクレアチニン補正することによって、小さくなった。

また、Alessio他⁹⁾はスポット尿に対する尿中濃度の補正法として、クレアチニンおよび比重補正は、すべての物質に適用できるものではないとしている。特に過度に希釈された尿(比重1.010以下、クレアチニン0.5 g/l以下)および過度に濃縮された尿(比重1.030以上、クレアチニン3 g/l以上)については、その測定値を採用せずに、再度採取しなおすことを提案している。また、Araki他¹⁰⁾はスポット尿の濃度の補正法として尿流量と尿中排出物質の逆相関関係から次式に示す“尿量補正法”を提案している。

尿量補正濃度 = $U \times V^b$, (U:尿流量 ml/min, b:物質毎の定数, V:当該物質の実測値 $\mu\text{g/ml}$)

Araki他による[b値]は、クレアチニンが0.67、HAが0.65で、非常に近い値であるので、HAについては、クレアチニン補正が有効と考えられる。MHAおよびMAについて、Araki他の報告中には[b値]の記載はないがいずれも、HAの[b値]に近い値と推定できる。クレアチニンと排泄機序が似ている物質、すなわち、主として、糸球体濾過により排泄される物質については、クレアチニン補正は、有効と考

えられる。一方、メタノールや窒素酸化物のように尿細管からの拡散によって排泄される物質についてはクレアチニン補正は適切ではない¹¹⁾。

結 論

生物学的モニタリングの際の尿の保存、運搬、尿量補正について検討した。特にトルエン、キシレン等の有機溶剤暴露に対する尿の取り扱いについて検討した。

1) 有機溶剤の尿中代謝産物(トルエン→HA; キシレン→MHA; スチレン→MA)と尿中クレアチニンを特別な前処理なしに同時に測定できる簡便かつ精度のよいHPLC法を開発した。この方法を用いると有機溶剤の尿中代謝産物のクレアチニン補正濃度を簡便かつ精度よく求めることができる。

2) 尿を凍結保存した場合、HA、MHAおよびクレアチニンは、6ヵ月間安定であった。

さらに、ろ紙を用いた尿の保存方法を開発した。ろ紙保存法と上述の“尿中代謝産物とクレアチニンのHPLCによる同時測定法”を組み合わせることにより、尿中代謝産物のクレアチニン補正濃度を簡便かつ精度よく求めることができた。

3) 有機溶剤使用工場での実測例では、作業強度、季節的変動等が尿中代謝産物濃度、尿比重およびクレアチニン濃度に大きく関与すると考えられた。したがって、尿の濃さの程度がHA、MHA等の尿中代謝物の評価に影響を与えることが考えられた。尿の濃縮の程度による影響を小さくするためには、比重補正およびクレアチニン補正が有効であった。

また、有機溶剤非暴露者尿中のHAについて、運動前後の差異を検討した結果、尿比重およびクレアチニン濃度は、運動前より運動後の方が有意に高くなった。これは、運動後には発汗等によって、尿が濃縮されたためと考えられた。この場合も比重補正およびクレアチニン補正をすると、HAの前後の濃度差は小さくなった。これらの事例から、作業現場で採取したスポット尿中の代謝産物濃度の実際的な表現法として、比重補正およびクレアチニン補正(g/g・creatinine)が有効であることがわかった。特に

運動後尿のように高度に濃縮された尿では、クレアチニン補正の方が比重補正より有効であった。さらに個人のスポット尿中のHA濃度の日内変動(cv%)は比重およびクレアチニン補正によって、小さくなった。

4) 総括として、生物学的モニタリングは、実用化の段階に入ってきたが、今回我々が開発したろ紙による保存法は、現場での生物学的モニタリングに大きく貢献できるものと考えられる。さらに現場でのスポット尿中濃度は補正する必要

があり、馬尿酸、メチル馬尿酸およびマンデル酸濃度の補正には、クレアチニン補正および比重補正が有効であると考えられる。

本研究の実施にあたり、御指導、御校閲を賜りました岡山大学医学部公衆衛生学教室、緒方正名教授に対し深く感謝の意を表します。

本論の要旨は、第61回日本産業衛生学会および第33回中四国合同産業衛生学会で発表した。

文 献

- 1) 緒方正名, 田口豊郁: 労働衛生管理における生物学的モニタリングの意義, トキシコロジーフォーラム (1988) 11(4), 333—344.
- 2) 労働省令第23号: 有機溶剤中毒予防規則の一部改正. (1989).
- 3) 労働省基発第463号: 有機溶剤中毒予防規則第29条及び鉛中毒予防規則第53条に規定する検査のための血液又は尿の採取時期及び保存方法並びに健康診断項目の省略について. (1989).
- 4) 緒方正名, 松田 昭: 尿微量蛋白の新定量法およびエネルギー代謝率と尿蛋白排泄量との関係. 労働科学 (1966) 42, 794—798.
- 5) Ogata M and Taguchi T: Quantitation of urinary metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene, benzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. Int Arch Occup Environ Health (1987) 59, 263—272.
- 6) American Conference of Governmental Industrial Hygienists: Threshold limit values and biological exposure indices for 1989—1990. ACGIH, Cincinnati, OH (1989).
- 7) 水田満里, 海佐裕幸: 神経芽細胞腫のマスクリーニングについて——湿ったろ紙尿の細菌汚染の問題点について——. 日公衛誌 (1988) 35(4), 179—183.
- 8) 今井準三, 田中久子他: 神経芽細胞腫のマスクリーニングにおけるろ紙尿のクレアチニン異常低下の解析. 日公衛誌 (1988) 35(9), 521—525.
- 9) Alessio L, Berlin A, Dell'Orto A, Toffoletto F, Ghezzi I: Reliability of urinary creatinine as a parameter used to adjust values of urinary biological indicators. Int Arch Occup Environ Health (1985) 55, 99—106.
- 10) Araki S, Aono H, Murata K: Adjustment of urinary concentration to urinary volume in relation to erythrocyte and plasma concentration: an evaluation of urinary heavy metals and organic substances. Arch Environ Health (1986) 47, 171—177.
- 11) American Conference of Governmental Industrial Hygienists: Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. ACGIH, Cincinnati, OH (1988).

**Storage of urine samples and correction for metabolite concentration
in urine for biological monitoring of organic solvents**

Toyohiro TAGUCHI

Department of Public Health,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. M. Ogata)

An attempt was made to establish a method for the direct determination of urinary concentration of creatinine, hippuric acid (HA), methylhippuric acids (MHA) and mandelic acid (MA) by high performance liquid chromatography (HPLC).

For assays of stored urine samples, urine was spotted on filter paper or filter paper was dipped in urine. The filter paper was dried and kept several weeks, and then MA, HA, o-MHA, (m+p)-MHA and creatinine in the filter paper were eluted with 50 vol% methanol, and their concentrations were determined by the HPLC method.

The correlation coefficient found between the concentration of organic solvents (toluene and xylene) in the air and of the metabolites (HA and MHA) in workers' urine, corrected for creatinine and/or specific gravity, was higher than that between the organic solvent concentrations and the uncorrected metabolite concentrations.

The ratio of HA concentration to creatinine concentration in the urine of students unexposed to toluene after physical exercise was similar to that before exercise.

Individual spot samples of urine of unexposed subjects were measured for HA over 24-hours at appropriate intervals. When HA in these specimens was calculated with correction for creatinine and/or specific gravity, the variation coefficient was reduced.

In cases of spot samples of workers' urine, correction for creatinine and/or specific gravity is practically useful in both individual and group urine analysis. Especially in over concentrated urine samples, satisfactory results can be obtained by correcting for creatinine rather than correcting for specific gravity.