

# 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 3 編

### ラットの *m*-,*p*-Xylene 代謝に及ぼす Phenobarbital の影響

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:** *m*-キシレン, *p*-キシレン, フェノバルビタール,  
尿中代謝産物, 薬物代謝酵素

#### 緒 言

芳香族化合物は、生体内で、肝臓のミクロゾーム分画に局在する薬物代謝酵素によって分解され、水溶性となって尿中に排泄される。したがって、これら芳香族化合物の体内への吸入量は、尿中の代謝産物量から推定することが可能で、これに関して、従来から多くの研究が行われている。筆者ら<sup>1)~3)</sup>も、これまで、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、種々の尿中代謝産物をより高精度で、かつ迅速に測定することを検討してきた。

一方、この薬物代謝酵素系の合成は、phenobarbital (PB と略す) をはじめ数100種にも及ぶ化合物によって誘導されることが明らかにされてきた<sup>4)5)</sup>。特に、PB による薬物代謝酵素活性の促進についての報告は多く、芳香族溶剤に関しても、Ikeda らによる benzene<sup>6)</sup>, toluene<sup>7)</sup>, styrene<sup>8)</sup> の代謝に及ぼす影響についての研究がみられる。このうち、benzene 核に methyl 基 1 個の側鎖を持つ toluene の代謝に関しては、PB 前処理により、特に、toluene から benzyl alcohol への酸化の過程が促進されることが確認されている<sup>6)</sup>。

そこで、toluene より更に methyl 基が1個多い xylene について、2 個の methyl 基中の 1 個が肝ミクロゾームの薬物代謝酵素により酸化されることを明らかにする研究の一環として、本研究に着手した。すなわち、*m*-xylene, *p*-xylene の代謝に及ぼす PB

前処理の影響を、ラットを用いて、これらの尿中代謝産物である、*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) を、HPLC により定量することにより検討した。

#### 実 験 方 法

##### 1. 実験動物

ラット (Wistar 系, ♀, 平均体重190 g, 生後7週) を1群5-6匹ずつ用いた。温度調節した飼育室内で、水と飼料 (オリエンタル固型飼料) を自由に与えて、1匹ずつラット代謝ケージ (シナノ製作所, SN-781) に入れて実験を行った。

##### 2. 処理方法

ラットに、前もって PB 10%液を純分換算で75mg/kg となるように (PB 群)、もしくは生理食塩水 2ml/kg を (対照群)、1日1回、24時間ごとに3日間<sup>9)</sup>腹腔内注射を行い、4日目に *m*-xylene 又は *p*-xylene を 4.667 mmole/kg あて腹腔内注射した。*m*-, *p*-xylene 注射後、4, 8, 12, 24, 48時間経過したときに、採尿容器中に溜った尿を採取した。

##### 3. *m*-MHA, *p*-MHA の定量

尿中 *m*-MHA, *p*-MHA は既報<sup>2)</sup>の方法で、尿から抽出後 phenacyl ester 化した後、高速液体クロマトグラフ (日立 633型) を用いて、充填剤: LiChrosorb SI 100 (Merck)、移動相: *n*-hexane/chloroform により測定した。

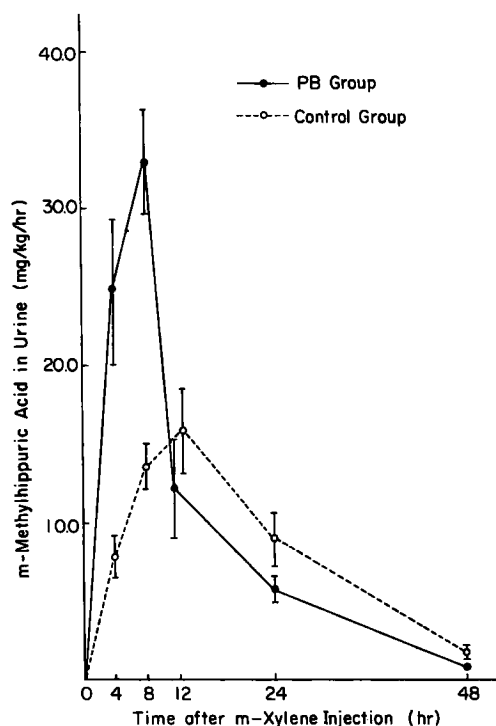


Fig. 1. Conversion of *m*-xylene to *m*-methylhippuric acid *in vivo*. Vertical lines indicate standard errors of the means.

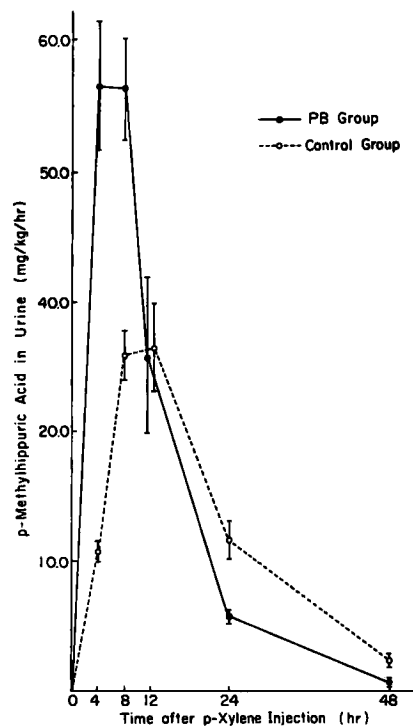


Fig. 2. Conversion of *p*-xylene to *p*-methylhippuric acid *in vivo*. Vertical lines indicate standard errors of the means.

Table Metabolic rates in each experimental group.  
(mean  $\pm$  S.E.M. of the results from 5 or 6 rats)

Group	Metabolic Rate (%)					
	0 - 4 hr	4 - 8 hr	8 - 12 hr	12 - 24 hr	24 - 48 hr	Total Excretion
<i>m</i> -Xylene Control	3.35 $\pm$ 0.66	6.07 $\pm$ 0.80	7.89 $\pm$ 1.07	14.20 $\pm$ 1.53	5.29 $\pm$ 1.29	36.80 $\pm$ 1.86
<i>m</i> -Xylene PB	11.05 $\pm$ 1.97*	14.78 $\pm$ 1.49**	5.46 $\pm$ 1.44	7.70 $\pm$ 1.28	2.43 $\pm$ 0.09	41.42 $\pm$ 2.95
<i>p</i> -Xylene Control	4.73 $\pm$ 0.39	11.47 $\pm$ 0.86	11.75 $\pm$ 1.52	15.41 $\pm$ 1.95	6.03 $\pm$ 1.36	49.40 $\pm$ 2.29
<i>p</i> -Xylene PB	20.63 $\pm$ 2.18**	20.54 $\pm$ 1.68**	11.46 $\pm$ 2.69	7.55 $\pm$ 0.70	1.97 $\pm$ 0.31	62.16 $\pm$ 5.37

$$\text{Metabolic rate (\%)} = \frac{\text{excreted } m\text{- (or } p\text{-)methylhippuric acid (mmole)}}{\text{administered } m\text{- (or } p\text{-)xylene (mmole)}} \times 100$$

\*\* highly significant ( $p < 0.01$ )

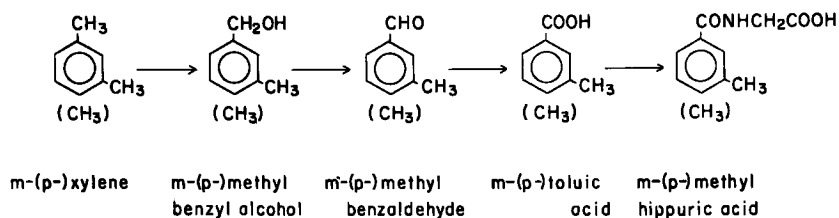
\* significant ( $0.01 < p < 0.05$ )

### 結果及び考察

*m*-xylene, *p*-xylene 投与後, 一定時間経過後の尿中 *m*-MHA, *p*-MHA 量を, 単位時間並びに体重 1 kg 当たりで表わすと Fig.1, Fig.2 となった。また, 投与した *m*-xylene, *p*-xylene (mmole) に対する尿中 *m*-

MHA, *p*-MHA 排泄量 (mmole) の比率 (代謝モル比, 百分率で表わす) を求め, PB 群と対照群との代謝モル比相互の有意差検定の結果を Table に示した。

*m*-xylene, *p*-xylene のヒトやラットにおける代謝経路は, Fig. 3<sup>10)11)</sup>のように, xylene の 3 種の異性体のうち, *m*-xylene, *p*-xylene は同様の過程をたど

Fig. 3. Metabolism of *m-(p)*-xylene<sup>10)11)</sup>.

ると考えられている。Ogata ら<sup>12)</sup>は、ヒトにおける *m*-xylene, *p*-xylene 暴露量 (気中濃度×暴露時間) と、一定条件のもとで採取、定量した尿中 *m*-MHA, *p*-MHA 量とは比例関係にあったことを報告し、その後に行われた多くの研究結果もこれを支持している。すなわち、体内に入った *m*-xylene, *p*-xylene はそれぞれ、ほぼ一定の割合で代謝・排泄されることから、*m*-xylene, *p*-xylene の代謝能を、これらの尿中代謝産物である *m*-MHA, *p*-MHA から推察することは妥当であると考えられる。そこで、PB の xylene 代謝に及ぼす影響を、xylene 投与後一定時間ごとに採尿して、尿中の代謝産物量を測定し、単位時間体重1kg当りの排泄量及び投与量に対する採尿時間ごとの排泄量のモル比で比較した。

その結果、*m*-xylene, *p*-xylene いずれの場合も PB 処理により *m*-MHA, *p*-MHA の排泄の促進が認められた。すなわち、*m*-xylene は PB 群では 4-8 時間尿において時間当たり排泄量が最大 ( $33.13 \pm 3.37 \text{ mg/kg/hr}$ , mean  $\pm$  S.E.M.) になるのに対して、対照群では、排泄量の最大は 8-12 時間 ( $15.88 \pm 2.82 \text{ mg/kg/hr}$ ) と遅れ、しかも極大値は、PB 群は対照群のその約 2 倍であった。また、*p*-xylene においても、時間当たり排泄量のピークは、PB 群では 0-4 時間 ( $46.52 \pm 4.91 \text{ mg/kg/hr}$ ) 及び 4-8 時間尿 ( $46.30 \pm 3.79 \text{ mg/kg/hr}$ ) にあるのに対して、対照群では 4-8 時間 ( $25.88 \pm 1.93 \text{ mg/kg/hr}$ ) 及び 8-12 時間尿 ( $26.50 \pm 3.43 \text{ mg/kg/hr}$ ) で、*m*-xylene の場合と同様に PB 処理による排泄の促進が認められた。これを代謝モル比でみると、*m*-xylene の場合、0-4 時間尿では、対照群の  $3.35 \pm 0.66\%$  に比べて PB 群では  $11.05 \pm 1.97\%$  ( $0.01 < p < 0.05$ )、4-8 時間尿では、対照群  $6.07 \pm 0.80\%$ 、PB 群  $14.78 \pm 1.49\%$  ( $p < 0.01$ ) と有意に大きく、*p*-xylene の場合も 0-4 時間尿で対照群  $4.73 \pm 0.39\%$ 、PB 群  $20.63 \pm 2.18\%$  ( $p < 0.01$ )、4-8 時間尿で対照群  $11.47 \pm 0.86\%$ 、PB 群  $20.54 \pm 1.68\%$  ( $p < 0.01$ ) と有意に大きく、*m*-

xylene, *p*-xylene 投与後 8 時間までは PB 処理による *m*-MHA, *p*-MHA の排泄の増加が認められた。このことは、xylene 投与に先立ってラットを PB で処理しておくことにより、肝臓における酸化酵素が誘導され、toluene で methyl 基酸化酵素によって toluene  $\rightarrow$  benzyl alcohol への転移が促進された報告<sup>6)</sup>と同様に、*m-(p)*-xylene  $\rightarrow$  *m-(p)*-methyl benzyl alcohol が促進されたものと考えられる。すなわち、xylene の methyl 基の酸化には、toluene の場合と同様、肝ミクロゾームの薬物代謝酵素が関与していることが推察される。しかし、xylene 投与後 48 時間の総排泄量代謝モル比では、*m*-xylene の場合 PB 群が  $41.42 \pm 2.95\%$ 、対照群が  $36.80 \pm 1.86\%$  で、両者間に統計学上の有意差は認められなかった。また、*p*-xylene においても PB 群  $62.16 \pm 5.37\%$ 、対照群  $49.40 \pm 2.29\%$  であったが、この両者間にも総排泄量代謝モル比の有意差は認められなかった。これらの結果から、PB で誘導される酸化酵素は代謝速度を増すうえに有効であるが、総代謝モル比の向上とはならないことが示唆され、このことは toluene の代謝においても認められている<sup>6)</sup>。

次に、*m*-xylene と *p*-xylene の代謝モル比を比較すると、特に、0-4、4-8 時間及び 48 時間総計の代謝モル比において *p*-xylene の方が *m*-xylene に比べて大きく (PB 群では 0-4、4-8、0-48 時間においてもともに  $0.01 < p < 0.05$  で *p*-xylene  $>$  *m*-xylene、対照群では 4-8、0-48 時間で  $p < 0.01$  で *p*-xylene  $>$  *m*-xylene)、*m*-xylene に比べ *p*-xylene の代謝の速度がやや速く、また代謝モル比も大きい傾向にあった。このことについては、先の、*m*-xylene, *p*-xylene の混合系をラットに腹腔内注射を行い、24 時間採取した尿中の *m*-MHA, *p*-MHA 量を測定した実験<sup>2)</sup>においても、*m*-xylene に比べ *p*-xylene の排泄モル比が大きいという結果と一致している。しかし、xylene 蒸気に暴露したヒトの場合には、*m*-xylene, *p*-xylene はほぼ同程度の排泄率を示しており<sup>12)13)</sup>、

この相違が投与方法の違いによるものか、動物差によるものか、あるいは定量方法によるものか等の検討が必要と思われる。Sédivec ら<sup>13)</sup>はヒトの場合の xylene 蒸気暴露 8 時間の実験を行い、最終的には両者の総排泄量は同じであったが、暴露開始後はじめの 2 時間では、*m*-xylene に比べ *p*-xylene の排泄率の方が高く、これは体内での酸化されやすさによるものであろうと考察している。

なお、これまで xylene の 3 種の異性体のうち、*o*-xylene は *m*-xylene、*p*-xylene と代謝経路が異なると考えられていた<sup>10)</sup>が、最近、筆者ら<sup>14)15)</sup>は、*o*-xylene を含む thinner に暴露したヒトの尿や、*o*-xylene を投与したラット尿の液体クロマトグラムから *o*-メチル馬尿酸 (*o*-methylhippuric acid, *o*-MHA と略す)と思われるピークを認め、また Sédivec ら<sup>13)</sup>は、*m*-xylene、*p*-xylene、*o*-xylene の等量混合気体に暴露したヒトの尿において、*m*-MHA、*p*-MHA、*o*-MHA がほぼ同じ割合で検出されたことを報告している。山崎ら<sup>16)</sup>も、*o*-xylene を腹腔内注射したラット尿から、量的には *o*-toluic acid glucuronide より少量であるが、*o*-MHA を検出しており、将来 *o*-xylene の代謝に関しても検討したい。

## 結 論

*m*-,*p*-xylene の代謝に及ぼす PB の影響をみるために、ラットにあらかじめ PB を 75mg/kg ずつ 1 日 1 回 3 日間腹腔内注射しておき、4 日目に *m*-xylene 又は *p*-xylene を 4.667 mmole/kg 腹腔内注射した。xylene 投与後、直ちに採尿を開始し、0-4、4-8、8-12、12-24、24-48 時間後の尿中の *m*-MHA、*p*-MHA を HPLC により測定し、PB の代りに生理食塩水を投与しておいた対照群と比較した。

その結果、*m*-xylene、*p*-xylene 投与後 0-4、4-8 時間後の尿において PB 群は対照群に比べ *m*-MHA、*p*-MHA 量が著しく多かった ( $p < 0.01$ )。このことから、*m*-,*p*-xylene の methyl 基の酸化には、肝ミクロゾームの薬物代謝酵素が関与していることが推察された。しかし、48 時間の総排泄量においては、投与した *m*-xylene、*p*-xylene 量に対する尿中 *m*-MHA、*p*-MHA のモル比は、PB 群と対照群の間に有意差は認められなかった。

終始、ご懇切なご指導を賜りました緒方正名教授に感謝します。

## 文 献

1. 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.
2. 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.
3. Ogata, M. and Sugihara, R.: High Performance Liquid Chromatographic Procedure for Quantitative Determination of Urinary Phenylglyoxylic, Mandelic and Hippuric Acids as Indices of Styrene Exposure. *Int. Arch. Occup. Envir. Hlth* 42, 11-19, 1978.
4. 佐藤 了: 薬物代謝—肝小胞体を中心として, 講談社, p. 126-129, 1973.
5. Conney, A.H.: Pharmacological Implications of Microsomal Enzyme Induction. *Pharmac. Rev.* 19, 317-366, 1967.
6. Ikeda, M. and Ohtsui, H.: Phenobarbital-Induced Protection against Toxicity of Toluene and Benzene in the Rat. *Toxic. appl. Pharmac.* 20, 30-43, 1971.
7. Ikeda, M., Ohtsui, H. and Imamura, T.: In vivo Suppression of Benzene and Styrene Oxidation by Co-administered Toluene in Rats and Effects of Phenobarbital. *Xenobiotica.* 2, 101-106, 1972.
8. Ohtsui, H. and Ikeda, M.: The Metabolism of Styrene in the Rat and the Stimulatory Effect of Phenobarbital. *Toxic. appl. Pharmac.* 18, 321-328, 1971.
9. 佐藤 了: 薬物代謝—肝小胞体を中心として, 講談社, p. 47, 1973.
10. Williams, R.T.: Detoxication Mechanisms, 2nd ed., Chapman and Hall, London, p. 194-196, 1959.

11. Laham, S.: Metabolism of Industrial Solvents. *Ind. Med.* **39**, 237-240, 1970.
12. Ogata, M., Tomokuni, K. and Takatsuka, Y.: Urinary excretion of hippuric acid and m- or p-methyl-hippuric 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.
13. Sédivec, V. and Flek, J.: The Absorption, Metabolism, and Excretion of Xylenes in Man. *Int. Arch. Occup. Envir. Hlth* **37**, 205-217, 1976.
14. 芳原達也, 杉原黎子, 緒方正名: 尿中 HA, m-, p-MHA の測定, 第52回日本産業衛生学会講演要旨集, p. 512, 1979.
15. Ogata, M., Yamazaki, Y., Meguro, T., Sugihara, R. and Shimada, Y.: Letter to the Editor. Quantitation of Urinary o-Xylene Metabolites in Rats and Human Beings by High Performance Liquid Chromatography. *Ind. Hlth* **17**, 63-65, 1979.
16. 山崎吉郎, 緒方正名: phenol および o-xylene の尿中代謝産物の高速液体クロマトグラム, 第51回日本産業衛生学会講演要旨集, p. 414, 1978.

High-performance liquid chromatographic studies  
of toluene and xylene poisoning

Part III: Effects of phenobarbital on metabolism of *m*-, *p*-xylene in rats

Reiko SUGIHARA

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. M. Ogata)

In order to estimate the influence of phenobarbital on the metabolism of *m*-, *p*-xylene, female Wistar rats were pretreated with intraperitoneal injection of sodium phenobarbital (75 mg per kg body weight) for 3 days (PB group). On the 4th day, 4.667 mmole per kg of *m*-xylene or *p*-xylene was injected intraperitoneally and urine samples were collected at 4 hour intervals thereafter. The urinary content of *m*-methylhippuric acid and *p*-methylhippuric acid was determined by high-performance liquid chromatography. Urinary excretion of *m*-methylhippuric acid or *p*-methylhippuric acid in the PB group was significantly higher than in the control group (pretreated with 2 ml per kg of normal saline instead of phenobarbital) at the 0 — 4 hour and 4 — 8 hour intervals ( $p < 0.01$ ). This suggests that oxidation of methyl groups of *m*- and *p*-xylenes can be performed by the microsomal drug metabolizing enzyme in liver. There was no significant difference between the PB and control groups in the amount of *m*-methylhippuric acid and *p*-methylhippuric acid excreted during the first 48 hours after administration.