

マウスに経口投与した 放射性標識トルエンの生体内運命

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

藤 澤 邦 康

(平成元年11月30日受稿)

Key words : 放射性標識トルエン, 経口投与, 消化管吸収率, トルエン代謝物

緒 言

トルエンは現在そのほとんどが石油化学において生産され, 有機溶剤として塗料などに広く使用されている化学物質であり, グラビア印刷関係者にはトルエンに, また塗装作業従事者などはトルエンを含むシンナーに暴露される機会が多く, また嗜癖による乱用は社会的問題となっている¹⁾. トルエンの急性毒性としては麻酔作用を主とする中枢神経系に対する作用が強く, 生体に及ぼす影響が重要視される物質の一つである²⁾. トルエンの生体内動態についての研究は経気道吸入による研究は多く, Fabra ら³⁾, Carlsson ら³⁾ の報告がある. そして, 尿中の馬尿酸の濃度, 血液, 呼気中トルエン濃度の測定はトルエンの生物学的モニタリングに於ける暴露指標の対象となっている⁴⁾. 又, 尿中の馬尿酸の測定は有機溶剤中毒予防規定の改正⁵⁾ により定期的健康診断が義務づけられている.

一方, 緒方ら⁶⁾ によって, 1965年に水島海域で捕獲された油臭魚中に石油精製工場排水中のトルエンが存在することが見いだされた. また, 緒方ら⁷⁾ は A 重油懸濁海水中で飼育したメジナ, ウナギ肉の内, 着臭の見られなかった魚肉中にトルエン等の芳香族化合物の移行を認めた. これらのことから, トルエンが魚貝類より人体に取り込まれる可能性が考えられた.

しかしながら, 現在, 経口投与されたトルエンの生体内運命についての実験的研究は行なわれていない. 著者は石油による海洋汚染の指標化合物の一つであるトルエンに注目して, 経口

投与されたトルエンの消化管吸収とその後の生体内分布についての研究を行なった. 即ち, DD系マウスに放射性標識トルエンを経口投与して, 呼気中に排出されるトルエン, 血液, 臓器中のトルエンとその代謝物の時間に対する濃度を液体シンチレーションカウンターで測定し, トルエンの消化管吸収率, 生体内分布について調べ, その成績について検討した.

実験方法

1. 放射性標識トルエンの調整

メチル基を ¹⁴C で標識した 18.5 MBq (500 μCi/mg) の ¹⁴C-トルエン (Amersham 社製) をトルエン (試薬特級) で希釈, 0.925 MBq/ml (25 μCi/ml) としたものを原液として用いた.

2. マウスへの投与方法

¹⁴C-トルエン原液は, 原油中の含有量の多くかつ毒性の極めて低いパラフィン系炭化水素の n-ヘキサデカンで 0.23 MBq/ml (6.25 μCi/ml) で希釈し, dd-系雄マウス (25g) 1匹あたり 1.18 KBq/g 体重 (0.032 μCi/g 体重, トルエン 1.11 mg/g 体重) の ¹⁴C-トルエンをマウス用ゾンデで経口投与した. マウスは経口投与後, ただちに呼気, 尿, 糞の分別出来るメタボリズムケージ (Fig. 1) に 1匹ずつ入れて飼育した. ケージには活性炭中を通した空気をエアポンプで送ることにより, 呼気中に排出されるトルエンを特級トルエン中に流して捕集した. 捕集容器には特級トルエンを 10ml を入れ, この捕集容器の 6個連結したものを用いた. 又, 捕集中は捕集容器は水中で冷却し, 15分毎に交換した.

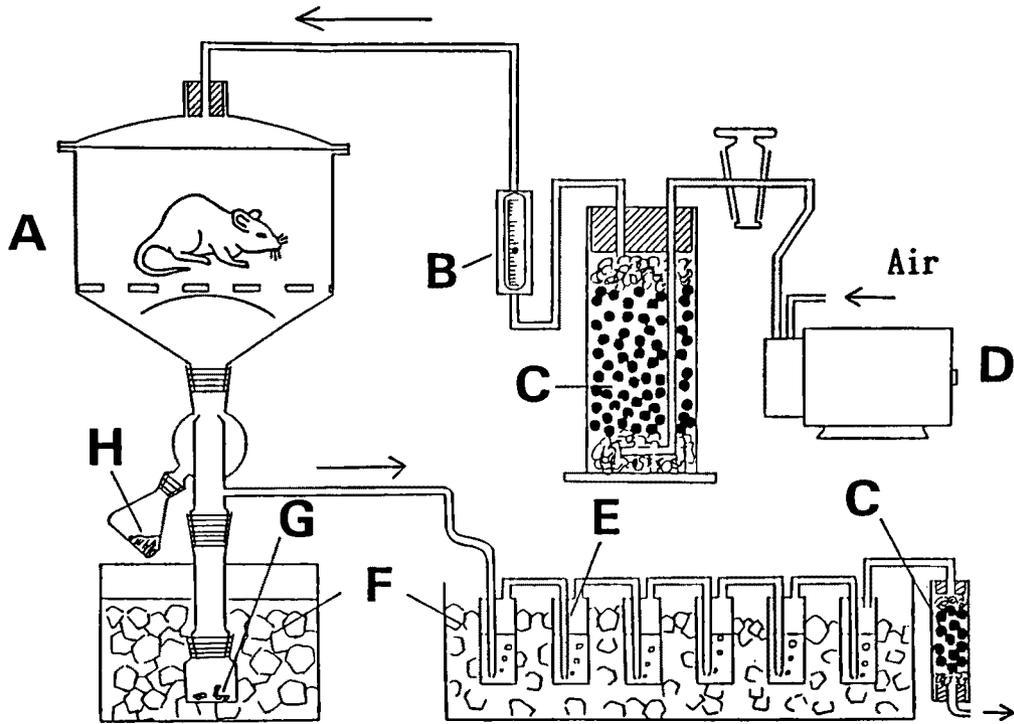


Fig. 1 Diagram of metabolism cage for mice

A: Cage B: Flow meter C: Activated charcoal D: Air pump
E: Toluene trap F: Ice G: Feces H: Urine

血中のトルエンとその代謝物測定のために、血液は経口投与後、1, 2, 5, 8時間後に眼窩静脈より採集した。臓器中のトルエンとその代謝物測定のために、経口投与3時間後、解剖して、血液、脂肪の一部、肝臓、腎臓、脳、をそれぞれ摘出した。又、トルエンの生体内分布測定のために、経口投与後、1, 3, 4, 8時間目に解剖して、血液、脂肪の一部、肝臓、腎臓、肺臓、脳、消化管に分離し、これらの臓器を取り除いた部分をカルカスとした。又、各飼育時間ごとに呼吸、尿、糞をそれぞれ集めた。

3. 液体シンチレーションカウンター測定前処理

液体シンチレーションカウンター測定の前処理操作は Fig. 2 のとおりである。すなわち、血液、組織、臓器および糞はそれぞれの1g 湿重量当たり、組織の溶解剤として2 N NaOH/エチルアルコール溶液 (エチルアルコール90%)

を5 ml を加え、スクリュウキャップ付試験管に入れて密閉し、50°C で2時間加熱溶解した。この溶解液の一部を0.5g 秤量して、総トルエン(トルエン+トルエン代謝物)の測定用試料とした。なお着色の見られた試料の溶解液は過酸化水素水を1滴 (0.05ml) 加えて脱色した。別の一部の溶解液 (pH 13-14) は0.5g を秤量して、これに2 N NaOH 水溶液 5 ml を加え、さらに特級トルエンを5 ml を加えて、激しく振盪し、2500rpm で15分間遠沈分離、上層の澄んだトルエン層のみを分取、溶解液中の未代謝のトルエンを抽出した。抽出操作を行なった後、このトルエン層に2 N NaOH 水溶液を5 ml 加えて洗浄を3回行なった。洗浄後、特級トルエンは抽出操作で生じた減量を補正するため秤量した。そして、これを未代謝のトルエンのための測定用試料とした。その後、バイアルビンに入れたそれぞれの試料にシンチレーターとしてアクア

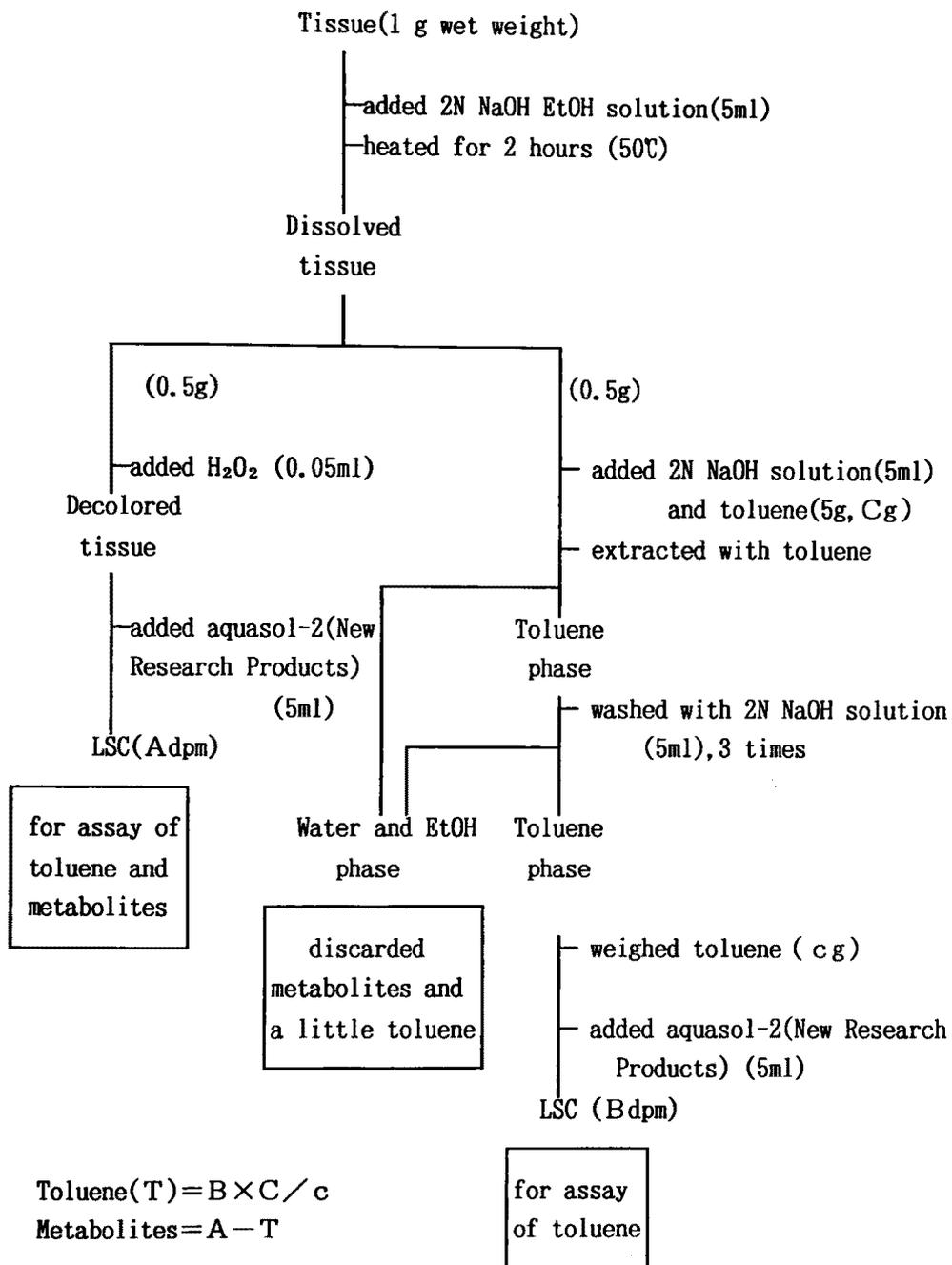


Fig. 2 Preparation of blood and solid organs for the determination of radioactivity by liquid scintillation counter(LSC)

ゾル-2 (New Research Products 製) を 5 ml づつ加えた。

4. 液体シンチレーションカウンター測定

放射能値の測定は液体シンチレーションカウンター (Aloka Co. 製) でそれぞれの試料につき10分間、1回測定した。

5. トルエン代謝物の算出

試料中のトルエン代謝物の算出は、試料中の総トルエン (トルエン+トルエン代謝物) の放射能値より未代謝のトルエンの放射能値を差し引いた値をトルエン代謝物の放射能値とした。そして、トルエン代謝物はこの放射能値を用い、トルエン換算量で表した。

6. 薄層クロマトグラフィー

血液の処理は Guertin and Gerarde の分析法³⁾ に準じて行なった。即ち、1 ml の血液に 0.2 N の塩酸を 5 ml、次いでシクロヘキサンを 2.5 ml 添加し、よく振盪後、10分間遠沈分離したシクロヘキサン層を減圧乾固して、残滓を少量のシクロヘキサンに溶解した。腎臓、肝臓はホモジナイズ後、0.5g 湿重量を秤量し、0.2N の塩酸を 10ml、次いでシクロヘキサンを 5 ml 添加し、よく振盪後、10分間遠沈分離し、シクロヘキサン層をピペットで分取、この操作をさらに 2 回行ない、シクロヘキサン層は合わせて 0.2N の塩酸 20ml で 3 回洗った。シクロヘキサン層を減圧乾固、以後の処理は血液と同様に行なった。

薄層クロマトグラフィーは上記で処理した血液、腎臓、肝臓の処理液を薄層プレート上にスポットし、あらかじめ用意しておいた安息香酸、馬尿酸をこれらのスポット上に重ねてスポットした。緒方らの方法²⁾により展開液 (トルエン: 氷酢酸: 水 = 150: 50: 2.5) で展開した。展開後、プレートを乾燥し、マンスルライト (254nm) で安息香酸、馬尿酸の領域を検出、これらの領域を掻き取って、その放射能値を測定した。

結 果

1. 血液、組織及び臓器からのトルエン回収率

血液、組織及び臓器に既知量の ¹⁴C-トルエンを添加して、Fig. 2 の方法に従って、トルエンの回収試験を行なった。即ち、血液、組織及び臓器に組織溶解剤を加え、加熱溶解した。この

Table 1 Recovery ¹⁴C-toluene added to blood and solid organs in two methods

Organ	Amount of ¹⁴ C-toluene added to organs (kBq ³⁾)	Direct method ¹⁾ (%)	Extracted method ²⁾ (%)
Blood	2.331	100.32 ± 3.10	98.84 ± 0.74
Liver	5.772	79.44 ± 0.52*	96.84 ± 1.02*
Kidneys	5.772	79.30 ± 0.45*	96.44 ± 1.05*
Lungs	2.331	102.13 ± 1.07	102.72 ± 4.32
Cerebrum	2.331	100.22 ± 1.31	101.23 ± 0.98
Adipose tissue	2.331	99.51 ± 0.31	103.78 ± 3.58
Digestive organs	5.772	80.74 ± 0.78*	91.99 ± 0.61*
Carcass ⁴⁾	23.125	102.41 ± 0.76	103.51 ± 4.93

(n=6, m ± SEM)

1) Direct method: radioactivity in dissolved organs were measured by liquid scintillation counter (LSC).

2) Extracted method: radioactivity in extract from dissolved organs by toluene were measured by LSC.

3) One micro-curie (μCi) is equivalent to 37 kilo-becquerel (kBq).

4) Carcass: mice after removal of internal organs.

* Significantly different from hypothesis (100%) at P < 0.05 (t test).

** Significantly different from direct and extracted method at P < 0.05 (t test).

溶解液の一部を直接、また別の一部を特級トルエンで抽出して、それぞれシンチレーターを加えて、液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果を Table 1 に示した。直接測定 (トルエン+トルエン代謝物を測定) によると肝臓、腎臓、消化管がそれぞれ 79.44、79.30、80.74% と低かったが、脳、肺臓、脂肪、血液、カルカスは 99.51—102.41% の値であった。一方、トルエン抽出測定 (トルエン測定) した場合、回収率は消化管が 91.99%、腎臓、肝臓が 96.44、96.84% とやや低い値を示し、血液、脳、肺臓、カルカスが 98.84—103.78% であった。

平均値の差の検定において、100% に対する有意差 (P < 0.05) を持っていた直接測定の消化管、肝臓、腎臓とトルエン抽出測定の消化管、肝臓、腎臓のみを回収率で補正した。又、二法の測定値間に有意差 (P < 0.05) の見られたのは同じく消化管、肝臓、腎臓であった。

2. トルエンの消化管吸収と排泄

マウスに ¹⁴C-トルエンを経口投与し、1, 3, 4, 8 時間後に解剖し、消化管、肝臓、腎臓、肺臓、脳と、また血液、脂肪の一部、そしてこれらの臓器を取り除いた部分 (カルカス)、さら

Table 2 Amounts of total toluene (toluene and its metabolites) contained in mouse solid organs, expired air, urine and in feces after ingestion of ^{14}C -toluene as time lapse.

Time*	1	3	4	8
Organs	Amounts of total toluene (mg)			
Digestive organs	15.788±0.733	6.606±0.191	4.180±0.248	0.315±0.056
Liver	0.806±0.036	0.465±0.004	0.313±0.022	0.105±0.002
Kidneys	0.339±0.004	0.220±0.004	0.130±0.008	0.090±0.002
Lungs	0.033±0.002	0.037±0.002	0.019±0.001	0.009±0.001
Carcass**	10.211±0.175	14.317±0.277	13.973±0.878	13.036±0.780
Expired air	1.575±0.045	6.153±0.356	8.297±0.187	9.091±0.054
Urine	—	0.670±0.119	2.790±0.020	4.856±0.117
Feces	—	—	—	0.038±0.019

(n=6, m±SEM)

* Time in hours after ingestion.

** Carcass : mice body after removal of internal organs.

Table 3 Percentage of radio-activity in the body absorbed from digestive tract, in urine and in expired air to ingested ^{14}C -toluene

Time ¹⁾	1	3	4	8
Organs and excreta	Percentage (%)			
Digestive organs	52.15±2.44	20.22±1.34	13.47±0.81	1.08±0.19
Absorbed from digestive tract	A 47.85±2.32 (t : -)	79.78±2.55 (t : -)	86.53±2.88 (w : -)	98.92±2.50 (w : -)
B	43.11±2.35	71.54±4.05	79.50±5.20	92.09±5.30
Mice body ²⁾	37.91±2.66	49.55±3.21	43.78±3.08	44.30±3.63
Expired air	5.20±0.21 (10.86±1.64)	19.83±1.62 (25.19±2.63)	26.74±0.85 (30.90±1.28)	31.15±0.26 (31.49±0.45)
Urine	—	2.16±0.54 (2.75±0.96)	8.99±0.09 (10.38±0.25)	16.64±0.57 (16.82±0.92)
Feces	—	—	—	0.13±0.11 (0.13±0.33)

(n=6, m±SEM)

A : Administrated amount - digestive organs - feces

B : Mice body + expired air + urine

1) Time in hours after ingestion

2) Mice body except digestive organs

- : Difference in A and B was not significant at $P < 0.05$ (t test, w : welch test)

Percentage of radio activity in expired air, urine and feces to B (radio-activity of toluene absorbed from digestive tract) were described parentheses.

に排泄された呼気, 糞, 尿中それぞれの総トルエン (トルエン+トルエン代謝物) を測定し, それぞれに含まれる総トルエン量を Table 2 に示した. 又, 消化管内残留量, 体内残留量 (消化管を除いたマウス), 呼気中排出量, 尿中及び

糞中排泄量を, またそれぞれの投与量に対する割合を以下の式により求め, Table 3 に示した.

トルエン投与量と消化管内残留量, 体内残留量 (消化管を除いたマウス), 呼気中排出量, 尿中糞中排泄量との関係は次式で表される.

$$T - \text{Dig} = \text{Abs. Body (Rem. Body + Exh. air + Exc. uri)}$$

…………(1) 投与後 8 時間まで
(本実験では)

$$T - \text{Dig} - \text{Exc. fec} = \text{Abs. Body (Rem. Body + Exh. air + Exc. uri)}$$

…………(2) 投与後 8 時間
(本実験では)

投与量 ; T 消化管内残留量 ; Dig
体内残留量 (消化管を除いたマウス) ; Rem. Body
呼気中排出量 ; Exh. air
尿中排泄量 ; Exc. uri
糞中排泄量 ; Exc. fec

投与後、短時間の場合は糞は消化管内に存在し、(1)式になり、時間の経過に伴い、(2)式で表される。しかしながら、糞中の総トルエン量は極めて少なかったことより、ほとんどは(1)式で表される。なお、消化管組織に含まれる総トル

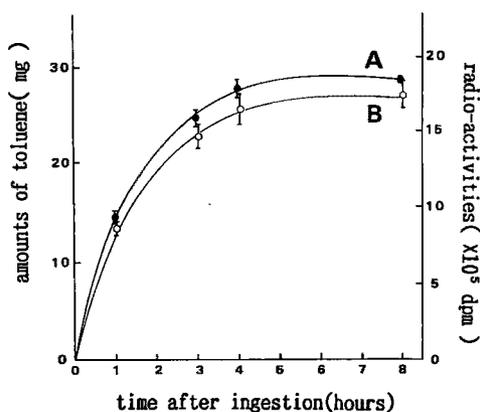


Fig. 3 Variation of amounts of radioactive toluene absorbed from digestive tract to mice body after ingestion of ¹⁴C-toluene as time lapse. (n=6, m±SEM)

Absorbed toluene was calculated from the next equations

$$A : T - \text{Dig} - \text{Exc. f}$$

B : Rem. body + Exh. air + Exc. uri
where T ; Ingested toluene Dig ;
residued in digestive organs Rem.
body ; Remained in body except diges-
tive organs Exh. air ; exhaled in
air Exc. uri ; excreted in urine
Exc. fec ; excreted in feces

エン量は吸収されたトルエンには含めていない。

消化管から吸収される総トルエン量は(1)または(2)式の両辺で表される。この二法で求めた時間に対する消化管吸収量を Fig. 3 に示した。左辺と右辺は等しいはずであるが、左辺の投与量から消化管内残留量と糞を引き去った値による吸収量の平均値は右辺の体内残留量と呼気中排出量と尿中排泄量を加えた値による吸収量の平均値よりやや大きい結果を示した。又、時間の経過に従って、右辺の値のバラツキがマウス個体間で大きくなった。これらの結果より、各測定時間における二法で求めた吸収量の分散に差があるかどうか F 検定し、1, 3 時間目の両群には有意差 (P<0.05) は認められなく、4, 8 時間目の両群には有意差が認められる結果を得た。次いで、両群の平均値に差があるかどうかについて、1, 3 時間目は両群の分散に差が見られなかったため、t 検定を行ない、平均値に有意差 (P<0.05) の認められない結果となった。4, 8 時間目は両群の分散に差が見られたため、Welch の検定を行ない、平均値に有意差 (P<0.05) は認められない結果を得た。消化管吸収量の(1), (2)式の両辺を用いて、投与量に対する消化管吸収率を次の(3)または(4)で表した。

$$(T - \text{Dig}) / T = (\text{Abs. Body}) / T$$

…………(3) 投与後 8 時間まで
(本実験では)

Table 4 The concentration of toluene and its metabolites in the blood and solid organs of mice after ingestion of ¹⁴C-toluene as time lapse.

Organs	Time*			
	1	3	4	8
Blood	187 ± 7	115 ± 6	117 ± 3	55 ± 4
Liver	574 ± 50	296 ± 7	228 ± 26	65 ± 6
Kidneys	755 ± 13	460 ± 11	436 ± 59	202 ± 4
Cerebrum	151 ± 6	99 ± 1	70 ± 10	25 ± 3
Lungs	181 ± 18	165 ± 12	122 ± 16	38 ± 1
Adipose tissue	702 ± 80	1557 ± 168	1368 ± 91	661 ± 11
Digestive organs	5031 ± 363	2892 ± 312	1423 ± 200	119 ± 37
Carcass**	407 ± 12	558 ± 24	545 ± 64	557 ± 62

(n=6, m±SEM)

* Time in hours after ingestion

** Carcass : mice body after removal of internal organs

$$(T-Dig-Exc. fec)/T = (Abs. Body)/T$$

……………(4) 投与後 8 時間
(本実験では)

消化管吸収率は(3), (4)式の左辺で求めた値(体内残留量+呼吸+尿)では, 1, 3, 4, 8 時間目でそれぞれ平均43.11, 71.54, 79.50, 92.09%となり, (5)式で求めた値(投与トルエン-消化管内-糞中)では, それぞれ47.85, 79.78, 86.53, 98.92%となった (Table 4).

また, 消化管より体内に吸収されたトルエンの内, 体内に残存している総トルエン (トルエン+トルエン代謝物) は 3 時間目で最高値を示したが, その後の減少は緩慢であった.

呼吸より排出されたトルエンは 1, 3, 4, 8 時間目で投与量のそれぞれ5.20, 19.83, 26.74, 31.15%, 吸収量(投与トルエン-消化管内-糞中)のそれぞれ10.86, 25.19, 30.90, 31.49%となった. また, 尿中へ排泄された総トルエン (トルエン+トルエン代謝物) 量は 3, 4, 8 時間目で投与量のそれぞれ2.16, 8.99, 16.64%,

吸収量のそれぞれ2.75, 10.38, 16.82%となった. 糞中へ排泄された総トルエン量は極めて少なく, 8 時間目に投与量の0.13%, 吸収量の0.13%だけであった.

3. 血液, 組織, 臓器中の放射能値の減衰

血液, 組織, 臓器中の放射能値より総トルエン (トルエン+トルエン代謝物) の濃度をトルエン換算値で求め, 血液, 組織, 臓器中の濃度を Table 4 に示した. これによると, 投与 1 時間後では消化管>腎臓>脂肪>肝臓>カルカス>肺臓>血液>脳の順に濃度は高く, 投与 3 時間後では消化管>脂肪>カルカス>腎臓>肝臓>肺臓>血液>脳の順に濃度は高くなり, 投与 4 時間後では消化管>脂肪>カルカス>腎臓>肝臓>血液>肺臓>脳の順に濃度は高くなり, さらに投与 8 時間後では脂肪>カルカス>腎臓>消化管>肝臓>血液>肺臓>脳の順に濃度は高くなった. 時間の経過に従って, 消化管の濃度は低くなり, 脂肪, カルカスの濃度が高

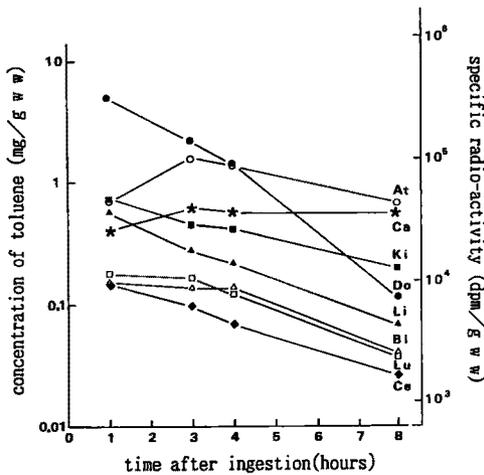


Fig. 4 Variation of concentration of toluene and its metabolites in blood and solid organs after ingestion of ¹⁴C-toluene as time lapse.

Ca ; carcass At ; adipose tissue
Ki ; kidneys Ce ; cerebrum
Lu ; lungs Li ; liver Bl ; blood
Do ; digestive organs

Table 5 Half-lives of toluene and its metabolites in blood and solid organs of mice after ingestion of ¹⁴C-toluene

Organs	Hours*		
	1-3**	3-4**	4-8**
Blood(1-3)	—	—	2.21
Liver(1)	1.92	3.42	2.24
Kidneys(1)	2.80	—	3.58
Cerebrum(1)	3.28	1.99	2.80
Lungs(1)	—	2.20	2.32
Adipose tissue(3)	—	5.38	3.81
Digestive organs(1)	1.73	1.49	1.11
Carcass(3)	—	9.12	—

* Time in hours after ingestion.

** Calculated from concentration at two sampling times.

*** Carcass : mice after removal of internal organs.

Calculation was based on the average of concentration at sampling time.

Time attained maximum concentration was written in parentheses.

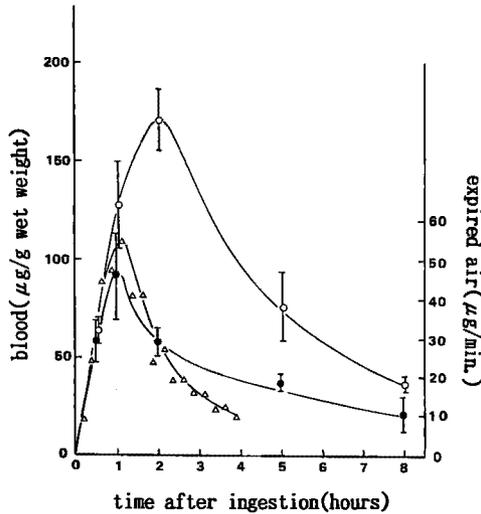


Fig. 5 The concentration of toluene and its metabolites in mice as a function of time after ingestion of ^{14}C -toluene ($n=6$, $m \pm \text{SEM}$)
 (●; toluene in blood, ○; metabolites in blood, △; toluene in expired air)

Table 6 Toluene exhaled from mice after ingestion of ^{14}C -toluene

Time* (minutes)	Exhaled rate of toluene ($\mu\text{g}/\text{min}$)
0- 15	8.00 \pm 1.48
15- 30	24.22 \pm 1.87
30- 45	44.39 \pm 11.19
45- 60	46.77 \pm 12.97
60- 75	54.62 \pm 14.32
75- 90	40.73 \pm 9.93
90-105	40.52 \pm 11.26
105-120	24.20 \pm 5.54
120-135	26.93 \pm 7.34
135-150	19.20 \pm 4.60
150-165	19.55 \pm 3.99
165-180	16.10 \pm 3.86
180-195	15.77 \pm 3.07
195-210	11.31 \pm 1.60
210-225	12.16 \pm 1.13
225-240	9.79 \pm 0.78

($n=6$, $m \pm \text{SEM}$)

* Time in hours after injection

くなっている。

又, Fig. 4 に血液, 組織, 臓器中の時間に対する濃度変化を示したが, 肝臓, 腎臓, 脳, 肺臓, 消化管, 血液が1時間目に最高濃度に達し, 脂肪, カルカスは3時間目に最高濃度に達した。

総トルエン (トルエン+トルエン代謝物) の生物学的半減期は最高濃度を示した時間以後の減少に移った, 初期の測定時間の濃度を用い, 半減期を算出した (Table 5)。これによると, カルカス>脂肪>脳>腎臓>肺臓>血液>肝臓>消化管の順に半減期は長い結果を得た。カルカス, 脂肪, 脳への蓄積性が高いことがうかがわれた。

4. 血中のトルエン, トルエン代謝物濃度の経時変化

マウスに ^{14}C -トルエン投与後, 血中のトルエンおよびトルエン代謝物濃度の経時変化を Fig. 5 に示した。

血中のトルエン濃度は60分の測定値が最高値を示し, その後指数関数的減少を示した。また血中のトルエンの半減期は95分を示した。

トルエン代謝物濃度は120分の測定値が最高値を示し, トルエン濃度の最高値に達する時間より遅れが見られた。そして, トルエン代謝物の半減期は155分という結果となった。

血中のトルエン濃度が最高値を示す60分の血中のトルエン濃度とトルエン代謝物の放射能比は1:1.38であるが, 120分では1:2.93とトルエンに比べて代謝物が多くなっている。

5. 呼気中トルエン濃度の経時変化

呼気中に排出されるトルエンの経時変化を Table 6 及び Fig. 5 に示した。呼気中に排出されるトルエン量は投与後, 60-75分の間に最高値を示し, その後指数関数的減少を示した。そして, 血中のトルエン濃度の最高値の見られた60分と時間的に対応, 共に60分頃に最高値を示した。また, 呼気中に排出されるトルエンの半減期は48分であった。血中のトルエンの半減期は上記のごとく95分であり, 呼気中に排出されるトルエンの半減期よりやや長い結果を示した。

6. トルエン及びトルエン代謝物の臓器分布

経口投与3時間後, 解剖し, 血液, 臓器中の

Table 7 The amounts of toluene and those of its metabolites in the blood and solid organs of mice after in ingestion of ^{14}C -toluene.

Organs	Liver	Kidneys	Cerebrum	Adipose tissue	Blood
Conc. of toluene	116.73 ±13.59	136.63 ±6.10	67.62 ±4.18	1560.43 ±210.42	66.41 ±3.96
Conc. of metabolites	179.13 ±30.19	321.01 ±13.55	34.42 ±5.57	ND	74.07 ±6.04

($\mu\text{g/g}$ wet weight, $n=6$, $m\pm\text{SEM}$)

Conc. : concentration

Specimens were taken 3 hours after ingestion

トルエン及びトルエン代謝物を分離して、それぞれの濃度を測定した。その結果を Table 7 に示した。

これによると、トルエン濃度は脂肪>腎臓>肝臓>脳>血液の順に高かった。そして、血液中のトルエン濃度と比較して、脂肪中は24.3倍と高く、腎臓中は2.0倍、肝臓中は1.8倍であり、脳は1.1倍であった。

一方、トルエン代謝物濃度は腎臓>肝臓>血液>脳の順に高く、脂肪中には検出されなかった。そして、血液中のトルエン代謝物濃度と比較して、腎臓中は3.3倍、肝臓中は1.6倍、脳は0.5倍であった。

7. 血液、肝臓、腎臓中の代謝物の同定

薄層クロマトグラフによって血液、肝臓、腎臓中の代謝物（安息香酸、馬尿酸）について調べた。

血液、肝臓、腎臓の薄層クロマトグラフ上の安息香酸と馬尿酸の領域の Rf 値はそれぞれ 0.71, 0.26 であった (Fig. 6)。

これらの領域の放射能値を測定した結果、血液と腎臓の安息香酸と馬尿酸の領域の放射能値が、また肝臓の安息香酸の領域の放射能値が計数されたが、肝臓の馬尿酸の領域の放射能値は対照の放射能値と同程度の値であった。すなわち、血液と腎臓には安息香酸と馬尿酸が存在、肝臓には安息香酸は存在するが、馬尿酸は存在しないか、非常に少ないことが定性的に認められた。しかし、放射能値はいずれも低く、代謝産物が十分に抽出されていないことが考えられ、今後この点については検討の必要がある。

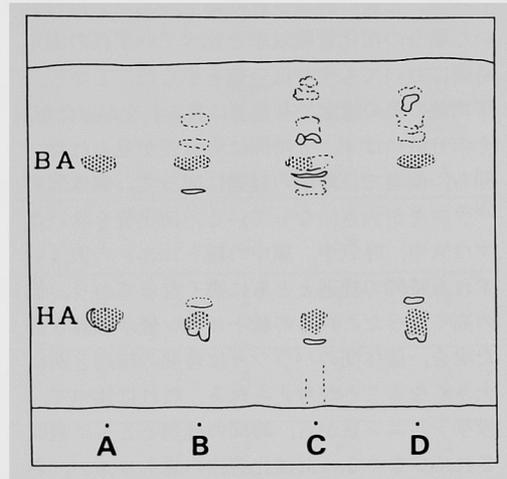


Fig. 6 Schema of thin-layer chromatograms of benzoic acid and hippuric acid in authentic samples(A) and extract in blood(B), liver(C) and kidneys(D) after ingestion of ^{14}C -toluene (BA : benzoic acid, HA : hippuric acid)

考 察

^{14}C -トルエン添加回収試験；実験に先立ち、液体シンチレーションカウンター測定のための前処理方法の検討を行い、トルエンは組織のホモジナイズ等の前処理において、気中へ飛散することが考えられたため、密閉容器内で臓器全体を可溶化することとした。この方法 (Fig. 2) による ^{14}C -トルエン添加回収試験では、組織を可溶化して直接測定（トルエン+トルエン代謝物を測定）する方法及び組織を可溶化した溶液中の ^{14}C -トルエンをトルエンで抽出して測定（トルエンを測定）する方法、いずれも消化管、肝臓、腎臓の回収率がやや低い結果を示した。また、直接測定法に比べて抽出法の回収率は良い結果を示した。直接測定法で用いた溶解液より抽出法で用いたトルエン抽出液の方がクリアであったことが、回収率が高い結果を示したものと考えた。

消化管吸収率；消化管を除いたマウス中の総トルエン（トルエン+トルエン代謝物）と呼気、尿中に排泄された総トルエンを加えた場合の消化管吸収率は投与トルエン量から消化管内の総

トルエンと糞に排泄された総トルエンを差し引いた場合の消化管吸収率と比べていずれの測定時間においてもやや低い値を示した。しかし、平均値の差の検定で有意差は見られなかったが、その分散には4, 8時間に有意差が見られた。即ち、前者では時間の経過に従って、個体間のバラツキが大きくなっている。消化管を除いたマウス中、呼気中、尿中の総トルエンの値はいずれも時間の経過とともに高くなっており、値の高くなったこれらの総トルエン値が加算された場合、個体間のバラツキは時間の経過と共に大きくなることが考えられる。これに比べて、投与トルエン量から、時間の経過とともに吸収されて少なくなった消化管内の総トルエン、さらに絶対量の少ない糞中の総トルエンを差し引いた場合、引き去る値が小さい故に、バラツキは小さくなったものと言える。二種の方法で求めた消化管吸収率のバラツキの原因として、解剖の際のトルエンの気中への飛散等が考えられる。

経気道からの吸収率について、Gerarde¹⁰⁾はヒトで約70%と推定しており、これと比べると消化管からの吸収量はより大きいものと言える。

トルエンの排泄；呼気中への排出量について、神谷¹¹⁾のトルエンをラットに腹腔内投与した成績と比較した。8時間での呼気中への排出量は経口投与では吸収量の31%であったが、ラットへの腹腔内投与6時間後では25%であり、ほぼ似た値を示していると言える。又、尿、糞からの排泄は尿からほとんどであり、糞からの排泄量は極めて少なかったこと、さらに8時間後の消化管内に残留している総トルエン量から考えても、糞からの排泄は少ないものと考えられる。

総トルエン（トルエン+トルエン代謝物）の体内分布；消化管より吸収されたトルエンの内、体内に残存している総トルエン（トルエン+トルエン代謝物）の血液、組織、臓器の濃度の経時変化について見ると、1時間目では消化管>腎臓>脂肪>肝臓>カルカス>肺臓>血液>脳の順に高かったが、8時間後には脂肪>カルカス>腎臓>消化管>肝臓>肺臓>血液>脳の順に高くなっており、時間の経過に従って、トルエンは消化管からの吸収されてカルカス、脂肪

に移行している。

総トルエンの体内分布とトルエン及びトルエン代謝物を分離した時のトルエン及びトルエン代謝物の体内分布について比較すると、3時間後のトルエン及びトルエン代謝物を分離した時、トルエンの濃度は脂肪>腎臓>肝臓>脳>血液であり、トルエン代謝物の濃度は腎臓>肝臓>血液>脳であり、総トルエン（トルエン+トルエン代謝物）の場合、カルカス、消化管、肺臓を除くと脂肪>腎臓>肝臓>血液>脳とトルエンとほぼ同様な結果を得た。

血液、臓器中のトルエン濃度の順は Carlsson³⁾、緒方¹²⁾、神谷¹³⁾のトルエンの成績、さらに高原¹⁴⁾の1, 1, 1-トリクロロエタン, 1, 1, 2-トリクロロエタン, 嶋田¹⁵⁾のモノクロロベンゼンのマウス暴露実験成績と同様な傾向を示した。即ち、マウス経口投与の総トルエン濃度はカルカスを除き、脂肪、腎臓、肝臓に比較的高く、肺臓、脳、血液に低かった。佐藤らは芳香族化合物¹⁶⁾、塩素化炭化水素¹⁷⁾の水、血液、油の空気に対する分配係数を測定、その結果より油/血液分配係数を求め、トルエン 94, 1, 1, 1-トリクロロエタン 108, 1, 1, 2-トリクロロエタン 59, モノクロロベンゼン 122の値を得ており、このことから、これらの化合物は脂肪に蓄積し易いことを示している。又、カルカスの8時間後の濃度が脂肪に次いで高かったことはカルカスの組成に脂肪のほとんどが含まれていること等が原因していると言えよう。

生物学的半減期；総トルエン（トルエン+トルエン代謝物）の生物学的半減期について、カルカスを除く、脂肪以下の半減期については、脂肪、脳の半減期が長い結果を得たが、参考のために Table 8 にマウスへの有機溶剤暴露試験での、高原¹⁴⁾の1, 1, 1-トリクロロエタン, 1, 1, 2-トリクロロエタン, 嶋田¹⁵⁾のモノクロロベンゼン, 後村ら¹⁸⁾のトリクロロエチレン, 神谷ら¹⁹⁾のp-キシレンの成績とトルエンの結果をそれぞれの半減期の長さを短い順に示した。これらの溶剤や投与法に差はあるが、いずれもそのほとんどが脂肪、脳の半減期が長く、トルエンの場合と一致した。

Table 8 Comparison of biological half-lives expressed as the order of aromatic and chlorinated hydrocarbons in blood and solid organs of mice

Compound	Conc.	Half-life phase	Measured time (hour)	Organs					
				Liver	Kidneys	Blood	Lungs	Cerebrum ^{a)}	Adipose ^{b)} tissue
Toluene	oral 1.11mg/g ww	first	max~3	1	4	2*	3	5	6
1, 1, 1-Tri chloroethane (Takahara ¹⁴⁾)	exposed 1016ppm	first	2	1	2	3	3	6	5
		second		1	2	3	6	5	4
1, 1, 2-Tri chloroethane (Takahara ¹⁴⁾)	exposed 1005ppm	first	2	1	4	2	3	5	6
		second		1	6	3	2	4	5
Monochlore benzene (Shimada ¹⁵⁾)	exposed 500ppm	first	2	1	4	2	6	3	5
		second		4	3	2	1	5	6
Trichloro ethylene (Atomura et al ¹⁶⁾)	exposed 500ppm	first	2	5	3	1	2	6	4
		second		3	1	2	5	6	4
p-Xylene (Kamiya et al ¹⁷⁾)	exposed 500ppm	first	2	2	5	4	3	1	6
		second		6	1	2	4	3	5
Mean	—	First	—	1.8	3.3	2.3	3.3	4.3	5.3

a) brain except toluene b) intraperitoneal fat except toluene and monochlorobenzene

* 4-8 hours

Max : Time attained maximum concentration

Numbers in the table show the order of biological half-life in the ascending order, 1, 2, 3, 4, 5 and 6

トルエンの脳での半減期が長かったこと、さらに、3時間後でのトルエン濃度の(脳/血液)比が1.1と1.0より大きかったことから考えて、経口投与においてもトルエンは低濃度ではあるが脳に蓄積することがうかがわれたことは注目される。

経口投与と腹腔内投与における呼気、血液中のトルエン及びその代謝物の比較；経口投与と腹腔内投与の呼気、血液中のトルエン及びその代謝物の分布の違いについて、神谷¹³⁾のマウスの腹腔内に¹⁴C-トルエンを投与した成績と比較検討した。

血中のトルエンは腹腔内投与では最高値は投与後45分に見られ、半減期は58分であった。一方、経口投与では血中のトルエンの最高値は投与後60分に見られ、半減期は95分であった。腹腔内投与に比べて経口投与では最高値の達する時間に15分の遅れが見られ、また、半減期は32分長かった。

呼気より排出されるトルエン量は腹腔内投与では呼気中トルエン濃度は35-45分後に最高値

があり、血中のトルエン濃度の最高値が45分となっているのに対応している。経口投与でも呼気中トルエン濃度は60-75分後に最高値となり、血中のトルエン濃度の最高値が60分となっているのに対応していた。

最高値に達する時間は経口投与では腹腔内投与に比べて、血中トルエン及び呼気中トルエン濃度、いずれも遅れている。経口投与での消化管吸収過程の存在が遅れの原因と考える。

呼気中トルエンの半減期は腹腔内投与では58分であり、血中のトルエン濃度の半減期の57分とよく対応している。経口投与での呼気中トルエンの半減期は48分であり、血中のトルエン濃度の半減期は95分であり、呼気に比べて血中の半減期が長い結果となった。経口投与の実験では血中のトルエンの測定は投与後、0.5, 1, 2, 5, 8時間であり、2-5, 5-8時間の測定間隔の粗さが原因していると考え、今後、血液の測定間隔をつめたサンプリングを行なう必要がある。

トルエン及びトルエン代謝物の臓器分布；経

Table 9 Comparison of distribution of toluene and its metabolites expressed as (conc. in solid organs/conc. in blood) ratio in solid organs, and (conc. of metabolites/conc. of toluene) ratio in blood and organs, 3 hours after oral and intraperitoneal administration of ^{14}C -toluene.

	Organs	Liver	Kidney	Cerebrum	Adipose tissue	Blood
Oral	Toluene*	3	2	4	1	—
	Toluene metabolites*	2	1	3	—	—
	Met./Tol.	3	1	4	—	2
Intraperitoneal (Kamiya ¹²⁾)	Toluene*	3	2	4	1	—
	Toluene metabolites*	2	1	3	—	—
	Met./Tol.	3	1	4	—	2

* (conc. in solid organs/ conc. in blood) ratio

Tol.: Toluene Met.: Metabolites

Numbers in the table show the order of ration in the descending order, 1, 2, 3 and 4.

口投与3時間後のトルエン濃度は脂肪>腎臓>肝臓>脳>血液の順であり、腹腔内投与3時間後では脂肪>腎臓>肝臓>血液>脳の順であり、血液、脳が逆転していることを除いてほぼ同様な結果を得た。また、トルエン代謝物は、腹腔内投与、経口投与共に腎臓>肝臓>血液>脳の順であり、脂肪にトルエンが高かった事実に対して、トルエン代謝物は脂肪に認められなかった。

腹腔内投与と経口投与のトルエン及びトルエン代謝物の臓器分布の違いについて検討するため、Table 9に両投与方法による3時間後の臓器中のトルエン及びトルエン代謝物の(臓器中濃度/血液中濃度)比、さらに両投与における血液、臓器中の(トルエン代謝物/トルエン)比の値の臓器間の大きさの順を示した。トルエンの(臓器中濃度/血液中濃度)比は、経口投与、腹腔内投与いずれも脂肪>腎臓>肝臓>脳の順に高く、トルエン代謝物の(臓器中濃度/血液中濃度)比も両投与ともトルエン代謝物の見られなかった脂肪を除いて、腎臓>肝臓>脳の順に高かった。又、経口投与、腹腔内投与の(トルエン代謝物/トルエン)比については、両投与とも脂肪を除いて、腎臓>血液>肝臓>脳の順に高く、いずれも、両投与方法による差は認め

られなかった。

血液、肝臓、腎臓のトルエン代謝物の同定；血液の薄層クロマトグラフの安息香酸と馬尿酸の領域の放射能値は血中の全トルエン代謝物の放射能値に比べてきわめて少なく、腎臓には血液と同様に安息香酸と馬尿酸が存在、肝臓には安息香酸は存在するが、馬尿酸は存在しないか非常に少ないという結果を得た。

血液のトルエン代謝物では池田²⁰⁾はトルエン投与前にphenobarbital (PB)を投与した場合には、ラットの血液中に安息香酸の増加を認めている。神谷¹³⁾はPBを投与しない条件下のマウスの血中に安息香酸が存在することを認めた。今回のマウスへの ^{14}C -トルエンの経口投与実験でも血液中に安息香酸と馬尿酸が存在することを認めた。さらに、腎臓中に安息香酸と馬尿酸、肝臓中に安息香酸の存在を認めた。しかし、計数された放射能値はいずれも低く、血液も含めて代謝物が十分に抽出されていないことが考えられ、今後この点については検討の必要がある。

結 論

^{14}C -トルエンを dd 系マウスに経口投与後、呼気中に排出されたトルエン及び血液中、臓器中のトルエンとトルエン代謝物の時間に対する濃度を測定し、液体シンチレーションカウンターで測定し、以下の成績を得た。

1. 経口投与後、1, 3, 4, 8時間後の消化管、肝臓、腎臓、脳、血液、脂肪、そしてマウスの臓器を取り除いた部分(カルカス)の総トルエン(トルエン+トルエン代謝物)の濃度は投与1時間後では消化管>腎臓>脂肪>肝臓>カルカス>肺臓>血液>脳の順に濃度は高く、投与8時間後では脂肪>カルカス>腎臓>消化管>肝臓>血液>肺臓>脳の順に高くなった。そして、肝臓、腎臓、脳、肺臓、消化管、血液は1時間目に最高濃度に達したが、脂肪、カルカスは3時間目に最高濃度に達し、その後、減少を示している。

2. 総トルエン(トルエン+トルエン代謝物)の最高濃度以降の減少に移った初期の測定時間の濃度を用い、半減期を求め、カルカス>脂肪>脳>腎臓>肺臓>血液>肝臓>消化管の順に半

減期は長かった。

3. ^{14}C -トルエンをマウスに経口投与8時間後、消化管を除いたマウス中の総トルエン（トルエン+トルエン代謝物）に呼気、尿、糞中に排泄された総トルエンを加えた場合の消化管吸収量は8時間後で投与量の92%という結果を得た。一方、投与トルエン量から消化管内と糞中の総トルエンを差し引いた場合の消化管吸収量は投与量の99%という結果を得た。消化管より吸収されたトルエンうち未代謝で呼気中に排出されるトルエンは8時間後で吸収量の31%であり、また尿からの排泄は18%であった。そして、糞からの排泄量は極めて少なかった。

4. 血中トルエン濃度は投与60分後に最高値に達し、半減期は95分であった。一方、代謝物は投与120分後に最高値に達し、半減期は155分

であった。

5. 呼気中のトルエンは、投与60—75分後に最高値に達し、血中トルエン濃度の最高値の得られた時間と一致した。また、半減期は48分であった。

6. 血液、臓器中のトルエン濃度はトルエン投与3時間後、脂肪>腎臓>肝臓>脳>血液の順に高かった。一方、トルエン代謝物濃度は、腎臓>肝臓>血液>脳の順に高く、脂肪には認められなかった。そして、脳と血液のトルエン濃度比は1.1であった。

7. 血液と腎臓には安息香酸と馬尿酸の存在、肝臓には安息香酸の存在が認められた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた緒方正名教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 緒方正名：トルエン障害に関する検討。産業医学 (1981) 23, 3—32.
- 2) Fabre R, Truhaut R, Laham S and Person M: Toxicological research on substitute solvents for benzene-II. Study of toluene. Arch Mal Prof Med Trav Secur Soc (1955) 16, 197—215.
- 3) Carlsson A and Lindqvist T: Exposure of animals and man to toluene. Scand J Work Environ Health (1977) 3, 135—143.
- 4) 緒方正名：生物学的暴露指標，ACGIH 発行，同文書院，東京 (1987) pp. 72—77.
- 5) 労働省令第23号：有機溶剤中毒予防規則の一部改正 (1989)
- 6) Ogata M and Miyake Y: Identification of substances in petroleum causing objectionable odour in fish. Water Res (1973) 7, 1493—1504.
- 7) Ogata M, Miyake Y and Fujisawa K: Oily smell and oil components in fish flesh reared in seawater containing heavy oil. Oil and Chemical Pollution (1986/87) 3, 329—341.
- 8) Guertin DL and Gerarde HW: Toxicological studies on hydrocarbons. IV. A method for the quantitative determination of benzene and certain alkylbenzene in blood. Arch Ind Health (1959) 20, 262—265.
- 9) Ogata M, Tomokuni K and Takatsuka Y: Quantitative determination in urine of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid, metabolites of toluene and m- or p-xylene. Br J Ind Med (1961) 26, 330—334.
- 10) Gerarde HW: Industrial hygiene and toxicology, edited by Patty FA, II, John Wiley and Sons, Inc. (1963) pp. 1226—1229.
- 11) 神谷次郎：芳香族有機溶剤の生体内運命 第3編 トルエン投与ラットにおけるトルエンの血中濃度及び呼気中排泄量の時間変動。岡山医誌 (1987) 99, 1647—1650.
- 12) Ogata M, Saeki T, Kira S, Hasegawa T and Watanabe S: Distribution of toluene in mouse tissue. Jpn J Ind Health (Sangyou Igaku) (1974) 16, 23—25.

- 13) 神谷次郎：芳香族有機溶剤の生体内運命 第4編 マウスに投与した放射性標識トルエンの臓器分布及び呼気排泄. 岡山医誌 (1987) **99**, 1651—1657.
- 14) 高原和夫：Trichloroethane 中毒に関する実験的研究 第1編 1, 1, 1-或は 1, 1, 2-trichloroethane 投与後の臓器組織内分布. 岡山医誌 (1986) **98**, 1079—1089.
- 15) 嶋田義弘：モノクロロベンゼン中毒に関する研究 第2編 モノクロロベンゼン暴露後のマウス臓器内分布. 岡山医誌 (1988) **100**, 135—146.
- 16) Sato A and Nakajima T: Partition coefficients of some aromatic hydrocarbons and ketones in water, blood and oil. *Br J Ind Med* (1979) **36**, 231—234.
- 17) Sato A and Nakajima T: A structure-activity relationship of some chlorinated hydrocarbons. *Arch Environ Health* (1979) **34**, 47—53.
- 18) 後村達也, 嶋田義弘, 緒方正名：有機溶剤の生体内運命に関する実験的研究. 産業衛生学会講演集 (1982)
- 19) 神谷次郎, 神谷弘祐, 嶋田義弘, 緒方正名：p-キシレン吸入後のマウス臓器内分布の経時変化. 産業衛生学会講演集 (1982) pp. 486—487, pp. 442—443.
- 20) Ikeda M and Ohtsuji H: Phenobarbital-induced protection against toxicity of toluene and benzene in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* (1971) **20**, 30—43.

**The fate of toluene and its metabolites in mice organs
after ingestion of ^{14}C -toluene**

Kuniyasu FUJISAWA

**Department of Public Health,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. M. Ogata)**

Mice ingested ^{14}C -toluene orally, and the radioactivities of toluene and its metabolites in the blood, organs, urine, feces and exhaled air were determined using liquid scintillation counter. Toluene absorbed from the digestive tract after 8 hours was calculated by the ratio of subtracted amounts in digestive organs and feces from ingested toluene to ingested toluene was 98.92% and the ratio of amounts in mice excepting digestive organs, expired air and urine to ingested toluene was 92.09%. The ratio of toluene in expired air to ingested toluene after 8 hours was 31.15%, and of toluene as urinary metabolites was 16.64%. The concentration of toluene in the blood attained its maximum 60 minutes after ingestion and decreased with a half-life of 95 minutes. Concentration of toluene metabolites in the blood attained its maximum 120 minutes after ingestion and decreased with a half-life of 155 minutes. Amount of toluene in the exhaled air attained its maximum 60-75 minutes after ingestion and decreased with a 48 minute half-life. The concentration of toluene in blood and organs 180 minutes after ingestion was, in decreasing order, adipose tissue, kidneys, liver, cerebrum, and blood and concentration of toluene metabolites was, in decreasing order, kidneys, liver, blood, cerebrum and adipose tissue. Metabolites in blood and kidneys were identified as benzoic acid and hippuric acid, respectively. The metabolites in the liver was solely benzoic acid.