

芳香族有機溶剤の生体内運命

第一編

トルエン及びm-キシレン投与ラットの尿中代謝産物の排泄

岡山大学医学部 公衆衛生学教室 (指導：緒方 正名教授)

神 谷 次 郎

(昭和62年9月9日受稿)

Key words : トルエン

m-キシレン

馬尿酸

m-メチル馬尿酸

高速液体クロマトグラフィー

緒 言

toluene は脂溶性、難水溶性 (溶解度は、0.47mg/ml・16℃) であり、その性質から作業現場で有機溶剤として、日常よく使われている。そして、シンナー、塗料、インクに多く含有される¹⁾。また、非職業的暴露としてはシンナー、ワニス、接着剤に含有されていてシンナー遊びやボンド遊びがある。

toluene の生体内運命に関して、主要な吸収経路は経気道であるが、経皮或いは経口吸収も存在する。又、排泄経路として、尿中代謝産物は馬尿酸 (HA) として約80%が排泄される。尿中の半減期は1~2時間であり24時間後に消失する。呼気には、5時間後までに吸収量の15~20%が未変化のまま呼出される^{2,3,4,5,6,7,8)}。

生体試料による暴露の評価に関しては、1984年、ACGIHは有機溶剤暴露の指標値 (指数) - 生物学的暴露指標値 biological exposure indices = BEI について詳細な説明と勧告⁹⁾を行った。許容濃度 (TLV) である100ppmのトルエン気中濃度に相当する尿中馬尿酸濃度を (2.5g馬尿酸/gクレアチニン) とした。

一方、トルエンの主な尿中代謝産物は馬尿酸 (hippuric acid : HA) である。トルエンは生体内で酸化され安息香酸となる。この安息香酸は肝臓で、CoA、ATPの存在下でグリシン抱合を受けて、馬尿酸として尿中に排泄される。この事実については数多くの文献がある^{10,11,12,13)}。同様に、m-キシレンは、2個のうち1個のメチル基が酸化されてm-トルイル酸となり、肝臓で、CoA、ATPの存在下でグリシン抱合を行ってm-メチル馬尿酸 (m-methylhippuric acid : m-MHA) として尿中へ排泄される¹⁴⁾。従って作業現場における作業者のトルエン、キシレンの平均吸入量を尿中HA、m-MHA排泄量から推定することが可能であると既に報告されている¹⁵⁾。しかしながら、個人の肝臓における解毒能力の差異によって生じる個体差があり、特に肝機能の低下した人については過少に評価されて誤差の原因を生ずる場合があると考えられる。

今回、著者は、投与されたトルエンの運命に関する、一連の実験的研究のうちで、高濃度のトルエン暴露においても、気中濃度と尿中馬尿酸濃度とに直線関係が成立するか否かを推定す

る目的で、まずトルエンの負荷量と生体の代謝能力との関係に注目した。そしてラットに各種の量のトルエンを注射して、尿中馬尿酸排泄量を定量して投与量との量・影響関係 [dose effect relationship (広義)] を検討した。又、トルエンと共に、遅乾性シンナー成分として広く用いられている *m*-キシレンを用いて、尿中 *m*-メチル馬尿酸 (*m*-MHA) 排泄量の定量を行い同様に量・影響関係の検討も行った。

実験材料と実験方法

I 実験動物

Wister系ラット(雌、平均体重230g)を温度調整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、一匹ずつ採尿ケージに入れて実験に用いた。

II 実験方法

①トルエン及び*m*-キシレンとそれぞれの尿中代謝産物との量・影響関係に関する実験:

(ラットへの投与)ラットを1群数匹としてトルエン或いは*m*-キシレンを1.025; 2.05; 4.1; 8.2 m moles/kgずつ各群のラットに腹腔内注射を行い、注射群とした。トルエン、*m*-キシレンを投与しない数匹を対照群とした。

②尿中代謝産物排泄の経日変動に関する実験

トルエン及び*m*-キシレンをそれぞれ1.5m moles/kgずつ腹腔内に注射し、経日的にそれぞれの尿中代謝産物量の変化を観察した。

③尿中HA及び*m*-MHAの定量法

緒方らの方法¹⁶⁾に従って高速液体クロマトグラフィーによって定量した。試料尿0.5mlを試験管に入れ、水0.5mlを内部標準として*o*-メチル馬尿酸(10mg/ml東京化成)を0.1mlを添加する。更に、塩酸を1滴ずつ加えpHを2とし食塩を約0.3g入れてよく混合した。次で10%メタノール含有エチルエーテル3mlを加えて振盪し、エーテル層を採集する。この抽出操作を2回くり返し、抽出液を合せそのうち3mlをとり、窒素ガス送風下に乾固した。残渣を0.5mlのメタノールで溶解し、高速液体クロマトグラフ(日立:635型)により分解定量を行った。測定条件は、充填剤:Nucleosil 5 C₁₈(Mucheray-Nagel)、カラム:4.0mm×150

mm, 移動相:メタノール/水/酢酸=20/80/0.2, 流量0.7ml/min, 圧力:110kg/cm₂, 検出器:UV254nmであった。

実験成績

1)トルエン及び*m*-キシレン投与時の尿中馬尿酸(HA)及び*m*-メチル馬尿酸(*m*-MHA)排泄量の経日変化

ラットにトルエン及び*m*-キシレンをそれぞれ1.5m moles/kgずつ腹腔内に投与した後の尿中HA, *m*-MHAの排泄量(m moles/kg/day)を[Fig 1 A, B]に示し、各日の排泄量の他に投与量(モル数)に対する代謝率を加えて総括した成績を[Table 1]に示す。また、HAについては投与前の平均HA量をさし引いた増加量について計算した。即ち、尿中HAの排泄は1日目が多く、その殆どが排泄され、次いで2日目に多く、3日目にほぼ正常に回復し

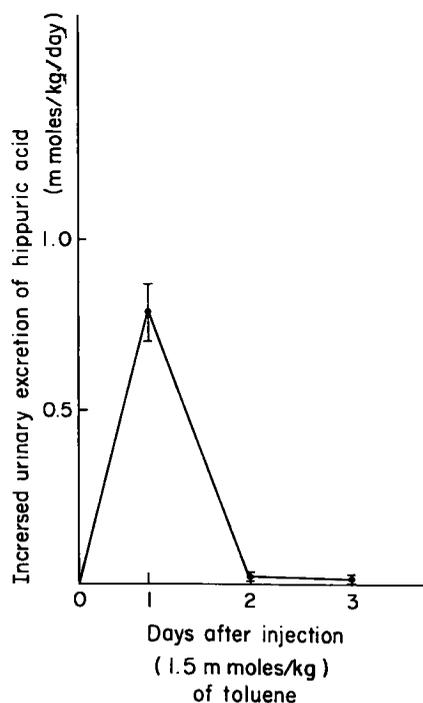


Fig. 1 - A Urinary excretion of hippuric acid in the urine of rat administered toluene. Excretion were expressed as m. moles per body weight (kg) per day. (mean \pm SEM)

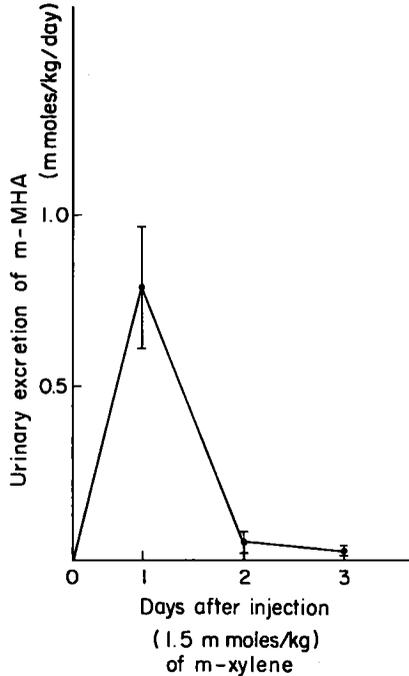


Fig. 1 - B Urinary excretion of m-methyl hippuric acid in the urine of rat administered m-xylene. Excretion was expressed as m.moles per body weight (kg) per day (mean ± SEM)

ていた。即ち1日目の増加 HA 排泄量は0.790 ± 0.080m moles/kg (3日間の総排泄量の96%), 2日目のそれは, 0.020 ± 0.004m moles/kg (3日間の総排泄量の2%), 3日目

Table 2 - A Urinary increased excretion and metabolic rate

dose of administration (m moles/kg)	increased excreted HA (m moles)	metabolic rate (%)
1.025	0.65 ± 0.13	63.41 ± 12.22
2.050	1.18 ± 0.17	57.70 ± 8.05
4.100	1.67 ± 0.66	40.61 ± 16.23
8.200	1.91 ± 0.36	23.34 ± 4.39

$$\text{metabolic rate (\%)} = \frac{\text{increased excreted HA (moles)}}{\text{administered toluene (moles)}} \times 100$$

Table 2 - B Urinary excretion and metabolic rate

dose of administration (m moles/kg)	excreted (m-MHA/m moles)	metabolic rate (%)
1.025	0.66 ± 0.23	64.71 ± 22.88
2.050	1.37 ± 0.31	54.80 ± 12.50
4.100	2.14 ± 0.89	52.26 ± 21.76
8.200	3.14 ± 0.46	38.24 ± 5.61

$$\text{metabolic rate (\%)} = \frac{\text{excreted m-MHA (moles)}}{\text{administered m-Xylene (moles)}} \times 100$$

のそれは, 0.015 ± 0.003m moles/kg (3日間の総排泄量の2%)であった。また, 尿中 m-MHA の排泄経過は, 尿中 HA の排泄と同様な経日変化を示した。即ち1日目が, 0.79 ± 0.18m moles/kg (3日間の総排泄量の90%)で尿中代謝産物の殆どが排泄され2日目のそれは, 0.05 ± 0.03m moles/kg (3日間の総排泄量の5%), 3日目のそれは, 0.03 ± 0.005m

Table 1 Urinary excretion rate of HA and m-MHA in the urine of rat administered toluene and m-xylene, respectively.

			24 h	48 h	72 h	Total
Toluene	1.5 m moles/kg	increased excreted HA (m moles)	0.790 ± 0.080	0.020 ± 0.004	0.015 ± 0.003	0.825 ± 0.073
		metabolic rate* (%)	53	1.3	1.0	55
m-Xylene	1.5 m moles/kg	excreted m-MHA (m moles)	0.79 ± 0.18	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.005	0.87 ± 0.165
		metabolic rate** (%)	53	3	2	58

$$* \text{ metabolic rate (\%)} = \frac{\text{increased excreted HA (moles)}}{\text{administered toluene (moles)}} \times 100$$

$$** \text{ metabolic rate (\%)} = \frac{\text{excreted m-MHA (moles)}}{\text{administered m-Xylene (moles)}} \times 100$$

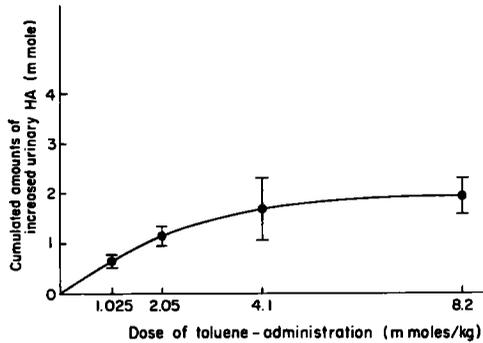


Fig. 2 - A Relationship between dose of toluene administered and cumulated amounts of excreted urinary HA.

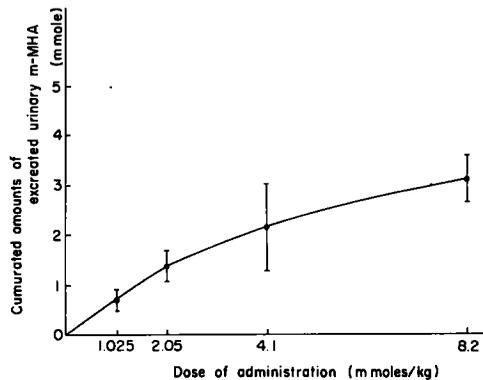


Fig. 2 - B Relationship between dose of m-xylene administered and cumulated amounts of excreted urinary m-MHA.

moles/kg (3日間の総排泄量の3%)であった。又、増加HA排泄量、m-MHA排泄量ともに4日目は殆ど0を示した。従って、HA、m-MHA量は、3日目までの排泄量を総排泄量とした。以後、これを総排泄量として用いる。

2) トルエン、及びm-キシレンの投与量と尿中代謝産物の排泄量との関係

前項の成績から、投与される3日目までに投与量の殆どが排泄されることが推定されたので、3日目までの累積排泄量を総排泄量の指標としてトルエン及びm-キシレンの投与量と総排泄量との関係を [Fig 2 A, B] に示した。次いで、代謝率の算出値を加えて総括したものを [Table 2 A, B] に示す。即ち、トルエン

投与量0~2.05m moles/kgまではトルエン投与量と尿中HAの増加量との間には、ほぼ比例関係が成立しているが、この範囲を越えるとこの直線関係の勾配が0~2.05m moles/kg投与に比べて穏やかになっている。また、m-キシレン投与ラットの投与量と排泄量との関係は [Fig. 2 - B] の示す如くであり、トルエンの場合とほぼ同様で、投与量0~2.05m moles/kgまではほぼ直線関係が認められた。

考 察

トルエン及びm-キシレンの生体内における主たる代謝経路^{17,18)}をFig 3, 4に示す。人においては、投与トルエンの約20%が呼気中に排泄され、約80%が馬尿酸として尿中へ排泄される。又、o-, m-, p-Cresolとして尿中へ排泄されるのは1%以下にすぎない。キシレンにおいては、生体に取り込まれた後、2個のメチル基のうち1個が酸化され、メチル安息香酸となり、グリシン抱合によりメチル馬尿酸として尿中へ排泄される。又、キシレノールとして排泄される量は2%以下にすぎない。

本実験では、ラットを用い、トルエン或いはm-キシレンの尿中代謝産物を測定し、生体内運命を追及した。

トルエン、m-キシレンをそれぞれ1.5m moles/kgずつ腹腔内投与した場合の尿中HA及びm-MHAとの排泄量の経日変化：

実験成績の項に示すように、ラットにおいて投与したトルエン又はm-キシレンは0-24時間に殆ど排泄されることが認められた。緒方ら¹³⁾のボランティアによる196ppm曝露後の尿中HA量の半減期は10時間であり、曝露26時間後ではほぼ平常値に回復しているという報告とほぼ一致を示した。

投与量と尿中代謝産物排泄量との関係；

人体負荷量と排泄量との関係について、池田はトリクロロエチレンでは気中濃度の200ppmまでは気中濃度と代謝濃度の間に直接関係があると認めた¹⁹⁾。一方、パークレンは、50ppmまでは両者の間に直接関係があるが、これを越えて、200ppmまでは明らかに気中濃度に対する排泄量の低下がみられると報告している。

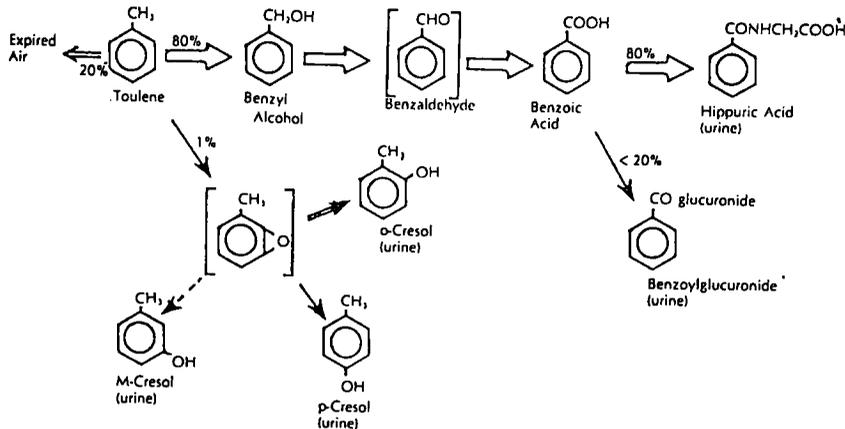


Fig. 3 Metabolic pathways of toluene.

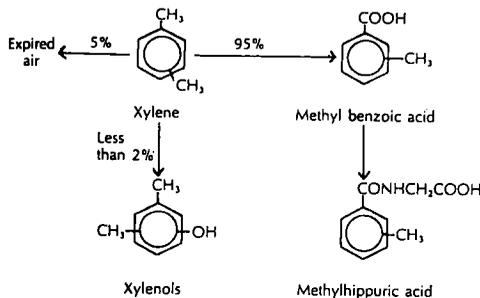


Fig. 4 Metabolic pathways of xylenes.

トルエンについては、その TLV は 100ppm である。そして緒方¹⁸⁾の人工暴露室の実験によって 200ppm までは、吸収量と HA 排泄量との間に直線関係を認めている。しかし、トルエン、m-キシレンの高濃度の暴露については報告されていない。200ppm/8 時間暴露の吸入量をラットの腹腔内の注射量に換算すると、人の体重 60kg と仮定して、0.71m moles/kg と算出される。今回の投与実験で、量・影響関係をたもつ限界量は上記よりラットでは、2.05m moles/kg を示した（一定濃度の長時間の吸入の場合との比較は完全ではないが、仮に計算した値）。ラットと人の代謝能力が同じと仮定すれば 2.05m moles/kg の限界値は 200ppm、0.71m moles/kg を越えていることとする。即ち、今回の実験より、トルエン、キシレンにおいても投与量が一定量を越えた場合には量・影

響関係の直線関係が成立しなくなり、肝（肝臓）における代謝速度（能力）が減少し、一定の限界があることが推定された。

この成績は、次報の四塩化炭素投与後のトルエン、m-キシレン代謝に関する検討の基礎的研究としても有効であった。

結 論

トルエン及び m-キシレンをラットの腹腔内に注射後の尿中代謝産物を測定し、以下の成績を得た。

1) トルエン及び m-キシレン投与時の尿中馬尿酸 (HA) 及び m-メチル馬尿酸 (m-MHA) 排泄量の経日変動について、

両代謝産物はともに、尿中排泄量の殆どが 1 日目に排泄され、又、3 日目にはほぼ投与前のレベルに回復した。投与暴露する尿中排泄率 (モル比) で、トルエンは 55±5.8%、m-キシレンは、56.93±24.45% を示した。

2) トルエンの投与量と尿中馬尿酸排泄量との関係について、

トルエン投与量 0~2.05mmoles/kg の範囲では、トルエン投与量と尿中馬尿酸の増加量との間には、ほぼ比例関係が成立していた。2.05m moles/kg を越えると両者間の勾配が 0~0.25mmoles/kg 投与に比べて緩やかになった。

3) m-キシレン投与ラットの投与量と尿中 m-MHA の排泄量の関係について、

トルエンのそれとほぼ等しく2.05 m moles/kgまでは直線関係を示し、それを越えると両者者の勾配が緩徐になった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただき

た緒方正名教授に深く感謝の意を表します。又、実験に御意見、御協力いただいた藤沢邦康氏に感謝の意を表します。

本論の要旨は、第53、54回日本産業衛生学会で発表した。

文 献

1. Williams RT : The metabolism of aromatic hydrocarbons (methyl benzenes), in *Detoxication Mechanisms* 2nd ed, Chapman and Hall, London (1959) pp194-196.
2. Gilette JR : Side chain oxidation of alkyl substituted ring compounds : I. Enzymatic oxidation of p-nitrotoluene. *J Biol Chem* (1959) 234,139-143.
3. Astrand I : Toluene exposure I, Concentration in alveolar air and blood at rest and during exercise. *Work-Environ Health* (1972) 9,119-130.
4. Bradodej Z : Beurteilung der Gefährdung durch Toluol in der Industrie Mittels der Hippursäure Bestimmung im Harn. *Arbeits Med Sozial Med Arbeitshug* (1968) 3, 254.
5. Srbova J and Teisinger J : On the metabolism of toluene. *Prac Lek.* (1953) 5,259-263.
6. Gerarde HW : *Toxicology and Biochemistry of Aromatic Hydrocarbons*. Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1960)pp141-150.
7. Srbova J and Teisinger J : Absorption and elimination of toluene in man. *Prac Lek.* (1952) 4,41-47.
8. Teisinger J and Srbova J : L'elimination de l'acide benzoique dans l'urine et son rapport avec la concentration maximum tolerable de toluene dans l'air. *Arch mal Prof Med Trav Secur Soc* (1955) 16,216-220.
9. ACGIH : Biological Exposure Indices Committee, Threshold limit value for chemical substance in the work environment and biological exposure indices with intended changes for 1984-1985.
10. 緒方正名 : トルエン障害に関する検討, *J Ind Health* (1981) 23, 3-32.
11. Patty FA : *Industrial Hygiene and Toxicology*. 2nd revised edition, Interscience, New York, (1962) pp1226-1241.
12. Ogata M, Sugiyama K and Morishita H : Studies on poisoning (IV), Toluene concentration in air and urinary hippuric acid measured by paper chromatography and mass screening examination method. *Acta Med Okayama* (1962) 16,283-292.
13. 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 vapors of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. *Br J Ind Med* (1970) 27,43-50.
14. Engstorm K, Husman K and Pfaffli P : Evaluation of occupational exposure to xylene by blood, exhaled and urine analysis, *Scand J Work Environ Health* (1978) 4, 114-121.
15. Gerarde HW : *Industrial Hygiene and Toxicology*, Patty ed, Interscience Publisher, New York (1962) pp1226-1234.
16. Ogata M and Taguchi T : Quantitative analysis of urinary glycine conjugates by high performance liquid chromatography : excretion of hippuric acid and methylhippuric acids in the urine of subjects exposed to vapours of toluene and xylenes, *Int Arch Occup Environ Health* (1986) 58,121-129.
17. ACGIH編, 緒方正名訳 : 生物学的暴露指標, 同文書院, 東京 (1987)pp72-77
18. ACGIH編, 緒方正名訳 : 生物学的暴露指標, 同文書院, 東京 (1987)pp85-87

19. Ikeda M, Ohtsuji T, Imamura T and Komoike Y : Urinary excretion of total trichloro-compounds, thicholroethanol and tricholrothylene and tetracholro-ethylene, Br J Ind Med (1972) 29, 328-333.

Fate of aromatic solvents in animals. I. Excretion of metabolites in the urine of rats administered toluene and m-xylene.

Jiroh KAMIYA

**Department of Public Health,
Okayama University Medical School.**

(Director: Prof. M. Ogata)

The metabolism of toluene and m-xylene, which were injected into rats, was studied. A linear relationship existed between the amount of toluene injected into rats and urinary HA in the range of over 0 to 2.05 mmoles/kg of toluene. The same relationship was noted with m-xylene. Amounts of HA and m-MHA excreted in urine decreased with the lapse of time from the 1st to 3rd day. The amounts recovered to the level before the injection on the 3rd day.