

芳香族有機溶剤の生体内運命

第四編

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洩

岡山大学医学部 公衆衛生学教室 (主任: 緒方正名教授)

神 谷 次 郎

(昭和62年9月9日受稿)

Key words: ^{14}C ・トルエン

血中及び臓器中トルエン代謝産物

緒 言

トルエンの生体内分布の実験的研究に関しては多くの研究が行われている。Fabre ら¹⁾は1955年に、犬を用い、約6カ月間にわたるトルエンの繰り返し吸入暴露の後の臓器中トルエン濃度は副腎>小脳>大脳・骨髄>肝臓の順を示すことを報告している。一方、緒方ら²⁾は1974年に、トルエンをマウスの腹腔内に注射し、ガスクロマトグラフ法で臓器中トルエン量を測定した実験で、トルエンは脂肪組織への蓄積が最も多く、次いで肝臓>腎臓>脳の順に貯留するが、その時間減衰速度は脳が肝臓、腎臓より遅いことを述べ、更に放射性標識トルエンの腹腔内注射実験では、脳に血液中よりも高い放射能値が認められることを見出し、トルエンは容易に血液脳関門を通過することを報告した。又、Carlsson ら³⁾は1977年に、550ppm×1時間の条件で放射性的の標識トルエンを、1回ラットに吸入させた時の蓄積濃度は、脂肪組織>腎臓>副腎>肝臓>大脳の順であると報告している。著者は、トルエンの生体内運命の研究として、今回までに、投与トルエン濃度とその尿中代謝産物である馬尿酸との量・影響関係を調べ、次いで、馬尿酸を用いるトルエンの生物学的モニ

タリングの際の誤差因子として肝機能を取りあげ、四塩化炭素を投与した後の尿中代謝産物を検討した。また、トルエンの呼気中排出量の変動と血液中トルエン濃度の変動との時間的な併行関係をガスクロマトグラフ法で測定し検討してきた。今回、著者は①放射性標識トルエンを用いて血液中及び呼気中トルエン量の変動を更に詳細に検討し、②トルエンと代謝産物との血液中の時間経過及びトルエンの血球中・血漿中分布を調べ、③トルエンとその代謝産物の臓器分布について実験し、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とその調整;

500 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ の methyl- ^{14}C ・トルエン (Amersham社製) を希釈し、25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ としたものを用いた。

②呼気中トルエン量の経時的変化;

Fig. 1 に示すチャンパーに1匹あたり0.7 mg/g (0.021 $\mu\text{Ci}/\text{g}$ に相当) の ^{14}C 標識トルエンを腹腔内に注射し、呼気中の ^{14}C 標識トルエンを冷トルエン中に通過させて吸収させ、その radio activity を測定した。

③マウスの腹腔中に約0.7 mg/g の ^{14}C 標識ト

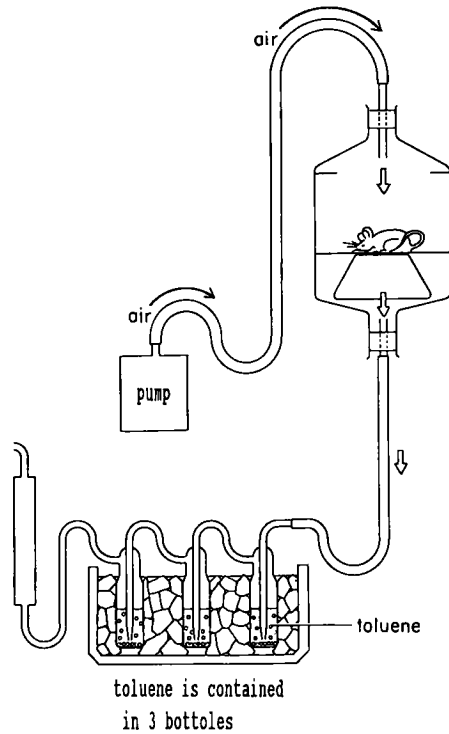


Fig. 1 Diagram of respiration chamber for mice.

ルエンを注射し、注射後、経時的に血液を眼静脈より採取し、血液中の ^{14}C 標識トルエンを非標識トルエンを用いて抽出し、その中の radio activity を測定した。

④トルエンの血球、血漿中分布；

マウスの腹腔に 0.7 mg/g の ^{14}C 標識トルエンを注射して、3時間後に採血し、血球と血漿とに分離し、それぞれから ^{14}C 標識トルエンを非標識トルエンを用いて抽出し、液体シンチレーションカウンターにより radio activity を求めた。

⑤トルエンの臓器分布；

マウスに 0.7 mg/g の ^{14}C -トルエン ($0.021\ \mu\text{ Ci/g}$ に相当)を腹腔内に注射し、投与3時間後に採血した後、解剖し、肝臓・腎臓・脳・脂肪を取り、それら組織中及び血液中のトルエン radio activity を測定した。又、トルエンの代謝産物を後述の方法で分離後、radio activity を液体シンチレーションカウンターにより求め、トルエン及び代謝産物の分布を調べた。

⑥血液、臓器中のトルエン及び代謝産物の定量；

血液及び臓器試料の一部に NaOH を一定量 (約 10 ml/g 湿重量) 加えてアルカリ性 (pH 13-14) とし、次に非標識トルエンを一定量 (約 5 ml) 加えてよく振とうした後、遠心分離した。この操作を2回行い、トルエン層中の放射能値を測定し、トルエン量とした。又、別に試料の一部をそのまま測定し、全放射能値 (トルエン量+代謝産物量) とした。そして、全放射能値よりトルエン量をひいたものを代謝産物量とした。

尚、これに先立って、放射性トルエンを投与しないマウスの血液、組織に既知量の放射性トルエンを加え、上記抽出操作を行い、回収率 $98.3\pm 4.11\%$ を得ている。又、測定時のクエンチングを防ぐため、NaOH を添加後数滴の H_2O_2 をいれ測定した。一方、酸でトルエンと代謝産物を抽出する方法については、血液のタンパクと結合した代謝産物が完全に抽出され難かった点から、この方法による代謝産物の定量は用いなかった。

⑦放射能活性・radio activity の測定；

^{14}C -トルエンを吸収させたトルエン液、あるいは臓器より非標識トルエンで抽出したトルエン層、代謝産物層に液体シンチレーターとしてアクアゾル (Aquasol-2; New Research Products製) を 5 ml 加えた後、液体シンチレーションカウンター (AlokaCo.製) で試料毎に10分間測定した。

⑧血液中の代謝産物の同定

a) 前処理；

Guertin and Gerade (1959)⁴⁾の分析法に準じて行った。即ち、 1 ml の血液に 0.2 N の HCL を 5 ml 、次いでサイクロヘキサンを 2.5 ml 添加し、よく振とう後、10分間遠心分離したヘキサン層を減圧乾固し、これを乾固前の量のヘキササンに溶解した。このようにして得たヘキササンを薄層に展開した。

b) 薄層クロマトグラフィー；

緒方ら⁵⁾の方法に準じて行った。注射3時間後の血液中の代謝産物を上記方法にて抽出した層に、あらかじめ用意した安息香酸及び馬尿酸の標品をまぜ、薄層上にスポットし、展開液 (ト

ルエン：氷酢酸：水=150：50：2.5弱)で展開した。その後、それぞれの標品が示す領域をかきとって、その放射能値を測定した。

実験成績

①血液中トルエンの経時変動；

血液中トルエンは腹腔内注射後45分で最高値を示し、その後は指数曲線的に減少し半減期45分を示した (Fig. 2 参照)。血液中の代謝産物については、現在 Phenobarbital を投与した場合に安息香酸が存在するが、非投与時には存在しないことが報告されている。しかし放射性標識トルエンを用いる今回の実験によって血液中に代謝産物の存在することが新しい知見として認められた。そして、血中代謝産物の上昇速度はトルエンより遅く、最高値は180分であった。従ってトルエンの最高値を示す注射45分後では血中のトルエン：代謝産物中のトルエンの放射能比は1：0.93を示すが、注射180分後では1：3.52とトルエンに比べて代謝産物が多量に存在することが明らかになった (Fig. 2)。

②呼気中トルエンの経時変動；

トルエン呼出速度曲線 (Fig. 3) では、注射45分後に最高値を示し、以後指数曲線的に減少している。排出曲線は血中トルエンの減衰曲線とよい対応を示しており、両者は共に45分で最高値を示した。また、呼気中トルエンの半減期は、55分で、上記の如く血液中半減期は45分

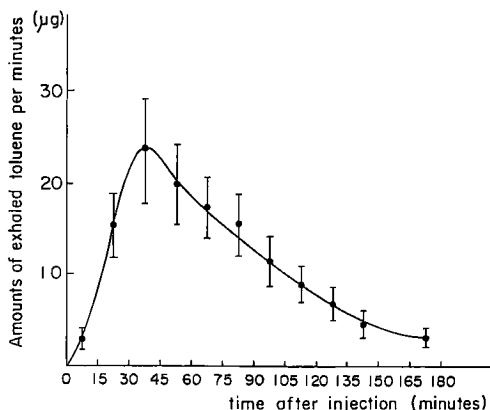


Fig. 3 The amounts of toluene in the expired air of mice as a function of the time elapsed after injection of ^{14}C -toluene. ($m \pm \text{SEM}$)

であった。従って呼気中トルエンは血中濃度の変動に従って排出されると考えられた。

次に [Table 1] に時間に伴うトルエンの呼出量を示し Fig. 4 に経時的に呼出量の投与量に対する比率で、その累積量を示している。そして投与3時間迄に、投与量の約10%が呼気中へ排出されたことが認められる。

③血液中トルエンの血球中、血漿中分布；

この点について現在までに研究は行われていないようである。今回の研究では、トルエン注射3時間後で、血球中に $12.10 \pm 3.36 \mu\text{g/ml}$ (wet weight $m \pm \text{SEM}$) に対し血漿中には

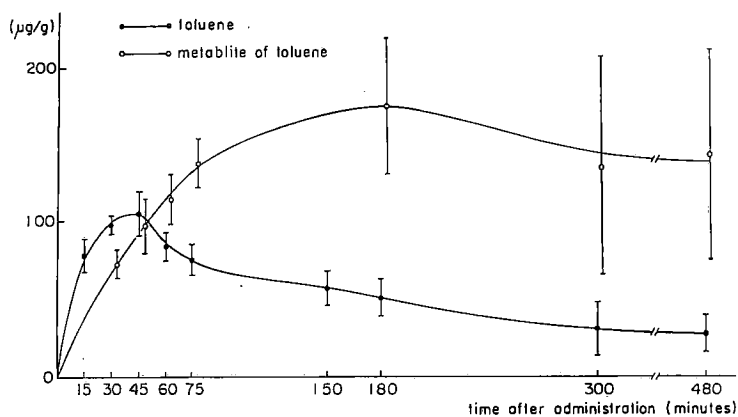


Fig. 2 Concentration of toluene and its metabolite in the blood of mice as a function of the time after injection.

Table. 1 Amounts of toluene exhaled from mice after intraperitoneal injection of ^{14}C -toluene

Time (minutes)	Exhalation of toluene per 15 min. (μg , $m \pm \text{SEM}$)
15	48 \pm 10
30	228 \pm 50
45	354 \pm 86
60	298 \pm 63
75	265 \pm 45
90	231 \pm 23
105	171 \pm 41
120	134 \pm 30
135	102 \pm 29
150	69 \pm 23
165	93 \pm 7
180	47 \pm 14

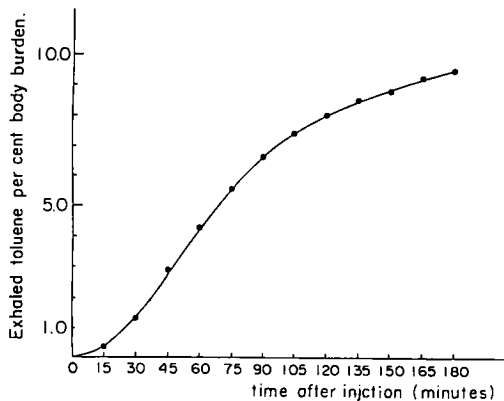


Fig. 4 Accumulation of toluene in the exhaled air of mice after intraperitoneal injection of ^{14}C -toluene.

Table. 2 The amounts of toluene and those of its metabolites in the blood and solid tissues of mice after intraperitoneal injection of ^{14}C -toluene, specimens were taken 3h. after injection

	Liver	Kidney	Cerebrum	Adipose tissue	Blood
Toluene	52.09 \pm 5.05	61.72 \pm 8.82	21.87 \pm 6.86	1888.67 \pm 607.31	29.36 \pm 11.61
Metabolite of toluene	70.84 \pm 17.43	195.63 \pm 20.70	19.35 \pm 9.19	N. D.	87.95 \pm 55.76

($\mu\text{g}/\text{g} \cdot \text{m} \pm \text{SEM}$)

27.49 \pm 4.09の濃度で存在し、各々の濃度比は1:2.3であり、トルエンは血漿中に多く存在することが分かった。同様にして代謝産物も血漿中に多く存在することがわかった。

④トルエンの臓器分布 (Table 2 参照) ;

^{14}C -トルエンを腹腔内投与3時間後に解剖し、各臓器中のトルエン濃度を調べた結果、トルエンは脂肪>腎臓>肝臓>血液>脳の順に高い濃度を示した。

⑤代謝産物の臓器分布 (Table 2 参照) ;

^{14}C -トルエンを腹腔内投与3時間後に解剖し、各臓器中の代謝産物濃度を調べた結果、代謝産物は腎臓>血液>肝臓の順に高い濃度を示し、脂肪には全くみられなかった。

⑥代謝産物の同定 ;

同定成績で、血液中の代謝産物について、投与180分後の血液において代謝物は安息香酸83%馬尿酸17%であることがわかった。

考 察

血液中トルエンの経時変動と血液中トルエン代謝産物について ;

血中トルエン量は、時間に対し、一次函数的に減少することを確認した。これに関し、中垣⁶⁾は、ラットの腹腔にトルエンを投与後の血中トルエンを、ガスクロマトグラフで分析した。その結果、トルエンの半減期50 mg/kg で1.3 hours, 100 mg/kg で1.9 hours, 200 mg/kg で2.4 hours であり、注射量の増加に伴い半減期の上昇の傾向を認めている。著者の実験では、血中と呼気中におけるトルエンの時間変動の比較をマウスを用いて行ったものであるが、トルエン700 mg/kg 投与の条件下では血中トルエン量の半減期は105分であった。

血中のトルエン代謝産物について池田⁷⁾は phenobarbital を投与したラットの血中には安息香酸は認められた。投与しない条件のマウスの血中には、それは detect されなかったと報告している。今回のマウスに放射性のトルエンを用いた実験では、phenobarbital を投与しないマウスの血中に代謝産物 (大部分は安息香酸で一部分は馬尿酸) が多量に存在することが新たに認められた。又腹腔内注射3時間後の血液中の代謝産物の成分については、緒方⁵⁾の方法を用いて薄層で同定したその結果、代謝産物の百分率は安息香酸83%馬尿酸17%を示した。しかしこれらの百分率の経時的変動については今後検討したいと考えている。

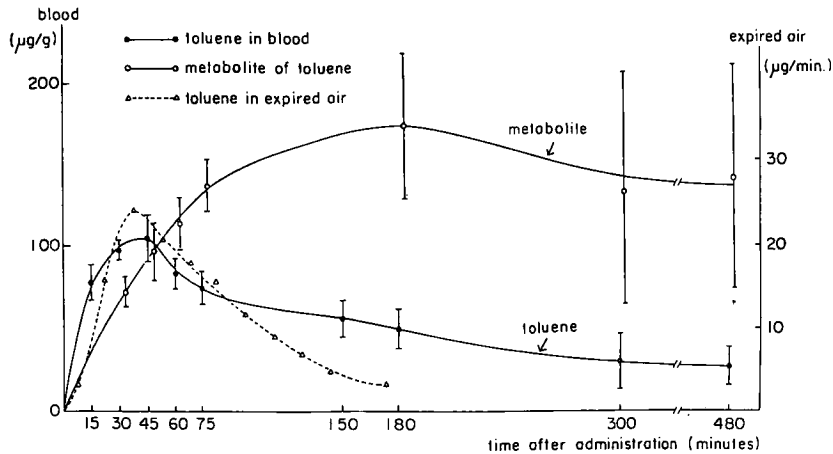


Fig. 5 The concentration of toluene and its metabolite of mice as a function of the time after injection of ^{14}C -toluene ($m \pm \text{SEM}$)

呼気中トルエンの経時変動；

呼気中トルエンの経時的排出曲線は、血液中トルエン濃度の経時的な変動曲線とほぼ平行 (Fig. 5 参照) し、血液中の濃度に従って排出されると考えられた。そして、投与45分後に呼気中にトルエン量は最高値を示した。杉原⁸⁾や著者の前報 (第3編) ガスクロマトグラフによるラットの成績では90~120分後に最高値があり、これに比べるとマウスではラットよりはやく最高値に達した。

血球・血漿中トルエン分布；

血球中より血漿中にトルエンが多くみられるのは、トルエンが血漿中の lipo-protein と結合し易いからとも考えられる。詳細については、今後 lipo-protein を分離後の測定により検討の必要があると考える。

トルエンの臓器分布；

Carlsson ら³⁾がラットに ^{14}C -トルエンを550ppm×1時間暴露させ、そのトルエン濃度は脂肪組織>肝臓>脳 の順であったと報告している。今回行った実験においても、トルエン濃度は脂肪組織が特に高く、次いで腎臓、肝臓、血液、脳という順に高く、上記の Carlsson の報告とほぼ一致していた。

結 論

^{14}C -トルエンをDD系マウスに腹腔内注射

後呼気中のトルエン量、血液中・臓器中のトルエン濃度を測定した放射能値より算出して以下の成績を得た。

- ①血中トルエン濃度は注射45分後に最高値を示した。そして、減衰の半減期は45分であった。一方、代謝産物は注射180分後に最高値を示し、その後徐々に減少した。
- ②呼気中トルエンは注射45分後に最高値を示し、又、減衰の半減期は55分であり血中トルエン濃度とよく平行していた。又注射180分後に投与トルエンの約10%が呼気中に排出された。
- ③注射180分後の血球中の血漿中におけるトルエンの濃度比は1:2.3を示した。
- ④トルエン投与180分後では、臓器中トルエン濃度は、脂肪組織>腎臓>肝臓>血液>脳 の順に高かった。一方において、臓器中代謝産物濃度は、腎臓>血液>肝臓の順に高かった。
- ⑤トルエン投与8時間で、血液中の代謝産物中の百分率は、安息香酸83%、馬尿酸17%を示した。

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。又、実験に御意見、御協力頂いた藤沢邦康氏に感謝の意を表します。

文 献

1. Fabre R, Truhaut, R., Laham, S. and Peron M. : Toxicological research on substitute solvents for benzene-11. Study of toluene. Arch Mal Prof (1955) 16, pp197-215.
2. Ogata M, Saeki T, Kira S, Hasegawa T and Wetanabe S : Distribution of toluene in mouse tissues, Jpn J Ind Health (Sangyo Igaku) (1974) 16, pp23-25.
3. Carlsson A and Lindqvist T : Exposure of animals and man to toluene, Scand J Work Environ Health, (1977) 3, pp135-143.
4. Guertin DL and Gerarde HW : Toxicological studies on hydrocarbons. IV A method for the quantitative determination of benzene and certain alkyl-benzenes in blood. Arch Ind Health (1959) 20, 262-265.
5. Ogata M and Nagao I : A new quantitative method of determining hippuric and methyl hippuric acid in the urine of workers after exposure to toluene and xylene. 産業医学 (1966) 9,
6. Kanagaki K, Tsuruta H and Arito H : Determination of toluene concentrations in blood intermittently sampled from jugular vein-catheterized rats, Ind Health (1982) 20, pp147-150.
7. Ikeda M and Ohtsuji H : phenobarbital-induced protection against toxicity of toluene and benzene in the rat. Toxicol Appl Pharmacol (1971) 20, pp30-43.
8. 杉原黎子 : 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, 岡山医学会雑誌 (1979) 91, 1433-1440.

Fate of aromatic solvents in animals. IV. Distribution of toluene in mouse organ and the exhaled air of mice intraperitoneally injected with ^{14}C -toluene.

Jiroh KAMIYA

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

Mice were injected with ^{14}C -toluene, and the radioactivity in the blood, exhaled air and organs was determined by liquid scintillation counter. The concentration of toluene in the blood attained a maximum 45 min. after the injection and decreased with a half life of 45 min. The amount of toluene in the exhaled air also attained a maximum 45 min. after the injection and decreased with a half life of 55 min. The exhalation curve of toluene paralleled the concentration curve of toluene in the blood. The ratio of the toluene concentration in red cells to that in plasma was 1:2.24. The concentration of toluene in the organs 180 min after the injection was in the decreasing order of adipose tissue > Kidney > liver > blood > brain. The fraction of the blood containing metabolite was applied to a thin layer plate and developed with toluene:acetic acid:water = 150:50:2.5. The radioactivity of benzoic and hippuric acids on the thin layer chromatogram of blood obtained 480 minutes after the injection was 83% and 17% of the total, respectively.