

ヒトにおける Ethylbenzene の尿中代謝産物の 高速液体クロマトグラフによる定量

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

山 崎 吉 郎

（昭和59年2月27日受稿）

Key words : ethylbenzene, mandelic acid,
hippuric acid, phenylglyoxylic acid

緒 言

Ethylbenzene は主として styrene の中間体として大量に生産される他、溶剤、希釈剤としても使用されている。また市販 toluene にも一部含有されており、シンナー成分として用いられる場合もある。作業現場における中毒例は知られていないが¹⁾、1000 ppm の暴露では数秒間で眼を刺激し、2000 ppm では眼、鼻その他の粘膜の強い刺激により涙が流れ、やがて中枢神経症状をきたすことがわかっている²⁾。生体内への吸収は蒸気吸入による経気道侵入が主な暴露経路であり、経皮吸収は少ないと報告されている。

ethylbenzene の生体内代謝に関して Williams らはウサギの場合、主として hippuric acid (HA)、methylphenylcarbonylglucuronide が排泄され、両者で60~70%を占めると報告している³⁻⁶⁾。しかし ethylbenzene 投与の場合、尿中代謝産物は種族差が大きく、ヒトの代表数値にラットやウサギその他の分析値を参考にすることはできない。そのためヒトによる ethylbenzene の代謝実験が必要である。ヒトにおける代謝産物は ethylbenzene の酸化によって生ずる mandelic acid (MA) と phenylglyoxylic acid (PhGA) が主であり、同時に HA が増加すると報告されている⁷⁾。

実際作業中に ethylbenzene が暴露された場合にどのように尿中代謝産物が経時変化してゆくかを知り、主要な尿中代謝産物である MA, PhGA, HA の排出濃度を測定することにより、ethylbenzene 暴露量を推定できると思われる。

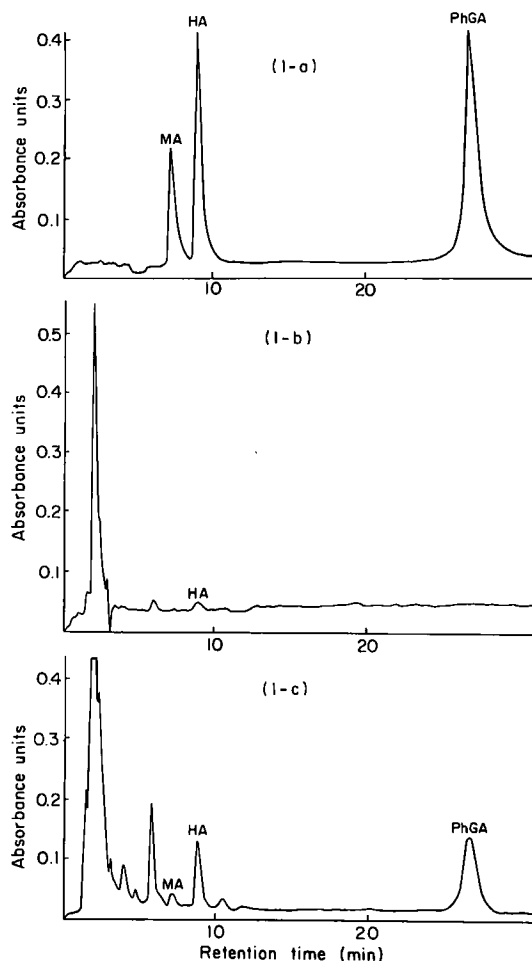


Fig 1 High performance liquid chromatograms of metabolites
(1-a) authentic samples (MA: 5 μ g, HA: 2 μ g, PhGA: 0.75 μ g)
(1-b) man urine before exposure
(1-c) man urine of 7 hours after ethylbenzene exposure

しかし作業現場においては、取扱い作業者はマスクを着用しており、作業者の実際の吸入量をモニタリングバッジ等で推定することは困難である。

本研究は個人吸入量を代謝産物より推定することを目的として ethylbenzene を一定時間暴露した後の尿中代謝産物について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて検討したものである。

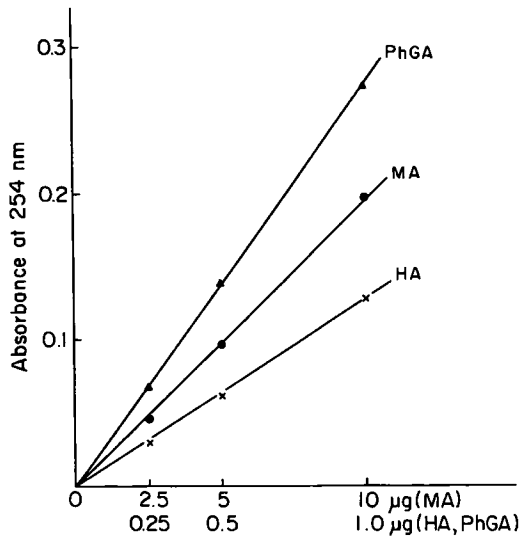


Fig 2 Calibration curves of mandelic acid, hippuric acid and phenylglyoxylic acid

実験方法

1. 暴露方法

暴露室内の ethylbenzene 蒸気濃度が一定になるように調整後、実験を開始した。15分ごとに室内の ethylbenzene 濃度を検知管で監視した。同時にバッジ型個人サンプラーおよびガスクロマトグラフィーにて室内の ethylbenzene を測定し濃度を確認した。室内温度25~27°C, 室内体積8 m³, 暴露時間3時間, 暴露者2名

2. 分析方法

ガスクロマトグラフィーによる分析

暴露室内から試料空気を採取し、ガスクロマトグラフィー (日立製, 163型) にて ethylbenzene を測定した。〔分析条件〕検出器: 水素炎イオン化型 (FID), カラム: 6 φ×3 φ, 2 m, 充填剤: PEG-20M (ガスクロ工業製), キャリアガス: 50~60 ml/min, 温度: 検出部150°C, カラム槽120°C

液体クロマトグラフィーによる分析

暴露開始直後, 1, 2, 3, 6, 9~24時間経過後の尿を直接 HPLC (635型日立高速液体クロマトグラフィー) に添加して測定した。試料尿は1.024に比重補正した。〔分析条件〕検出器: UV 254 nm, カラム: 4.0 mmφ×150 mm,

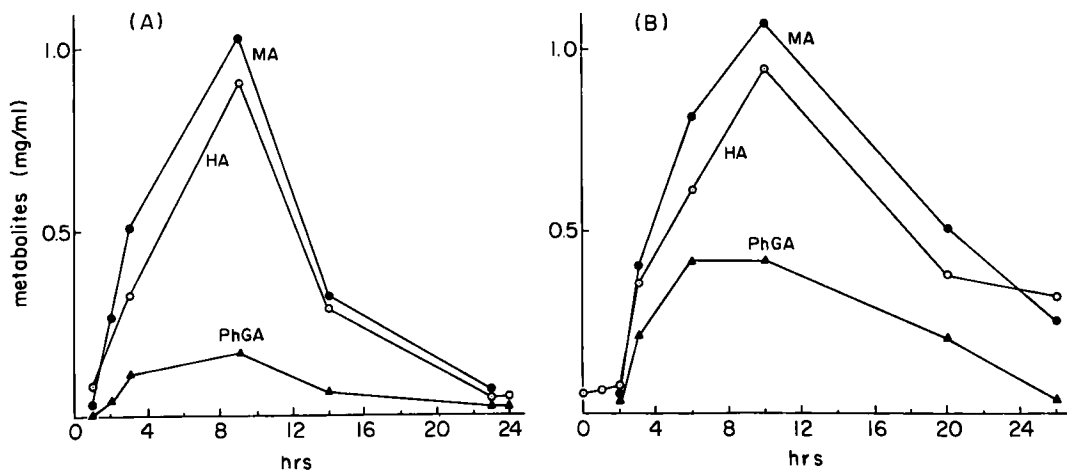


Fig 3 Changes in the corrected concentration to a urine density of 1.024
 ●—● : mandelic acid, ○—○ : hippuric acid
 ▲—▲ : phenylglyoxylic acid

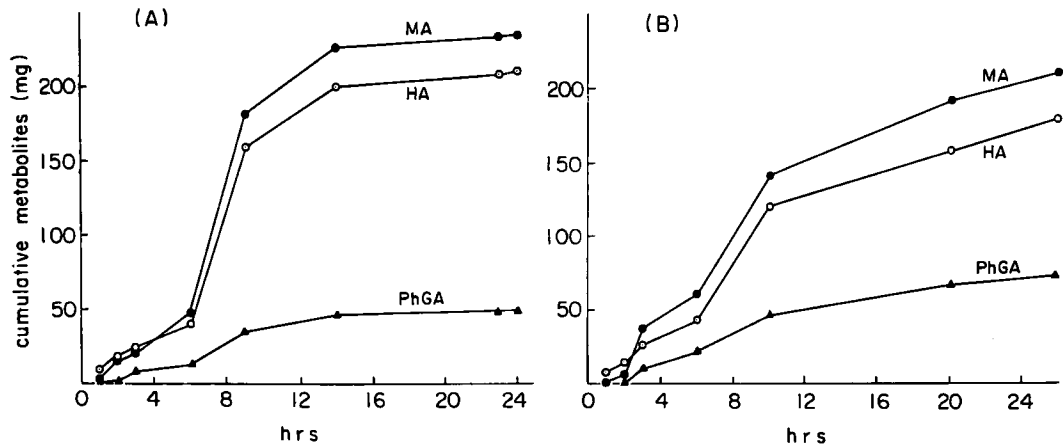


Fig 4 Cumulative metabolites in man urine after 65.0 ppm ethylbenzene exposure

充填剤：Nucleosil 5 C₁₈ (Machery Nagel),
 移動相：0.05 M tetra-n-butylammonium bromide 含有 H₂O/MeOH/AcOH (80/20/0.2)

結 果

ethylbenzene 暴露を3時間、25~27°C、暴露者2名で行なった。平均の室内気中濃度は65.0 ppmであった。Fig 1にHPLCのクロマトグラムを示した。(1-a)は標準物質のピークであり、MA, HA, PhGAはそれぞれ6, 8, 23分後に溶出された。(1-b)はethylbenzene暴露前の尿のクロマトグラムである。(1-c)は暴露後10時間尿のクロマトグラムであり、代謝産物 MA, HA, PhGAの各ピークが見られる。Fig 2に代謝産物 MA, HA, PhGAの検量線を示す。いずれも濃度とクロマトグラムのピーク高さの関係は直線性を示し定量性が認められた。

暴露者2例についてethylbenzene投与後、時間経過してからの尿中のMA, HA, PhGAをHPLCで定量した数値をFig 3に示す。重量比でMA, HA, PhGAの順に多い比率で排泄されている。MA, HAは9~10時間尿の値が最も高く、PhGAはそれよりも若干速く排泄されることがわかった。暴露者Aでは24時間尿においてほとんど正常値に戻っていた。しかし暴露者Bでは26時間尿においてもわずかにMA, HAの排泄が正常値よりも多かった。また暴露者AはBよりもPhGAの割合が低かった。そ

れゆえ個人差による影響が強いように思われた。65.0 ppm×3時間の暴露では、排泄されるMA, HA, PhGAのモル比率は平均値3.5:2.6:1.0であった。HAにおいても著しい増加が認められた。ethylbenzeneの代謝産物MA, HA, PhGAの尿中累積排泄曲線のグラフをFig 4に示した。両暴露者とも暴露開始後6~10時間において排泄率が最も高くなっている。

以上の実験結果からHPLC測定により、ethylbenzeneの代謝産物の定量が簡便化され暴露量を推定することができた。

考 察

近年多くの実験動物を使った有機溶剤の代謝実験が行なわれているが、実験データがヒトに応用できる場合は、生物学的モニタリングが可能である。著者らが以前行なった実験では、ラットにethylbenzeneの3 mMol/kg量を経口投与した場合、尿中代謝産物のモル比は、MA:HA:PhGA=1.1:4.6:1.0であった⁸⁾。今回行なったヒトでの実験結果に比較してラットはHAの排泄が著しいことがわかった。またヒトのethylbenzeneの代謝は、代謝産物においてWilliamsらが行なったウサギとは全く異なるが、ラットとは似ていることがわかった。

実際に有機溶剤使用環境中で作業する場合、作業環境の有機溶剤濃度と作業者の吸収量の関係が問題になる。作業環境における気中濃度が

常に一定値を示すとは限らないし、作業の仕方によっても吸入量は異なってくる。有機溶剤暴露量が多ければ、それだけ尿中代謝産物の濃度は高くなるため、作業における気中濃度と作業者の尿中代謝産物濃度との関係を知ることが適確な暴露評価になると思われる。

今回行なった ethylbenzene 65 ppm × 3 時間の暴露実験でのモル換算した体内吸入量を求める式を、体内吸入量 = 濃度 × 時間 × 分時換気量 × 吸収率 ÷ 106 として濃度 0.282 mg/l, 時間 180 分, 分時換気量 10.441/分 (1 回換気量 0.581 × 18), 吸収率 0.7 をあてはめると、ethylbenzene の体内吸収量は 3.50 mMol となる。暴露者の尿中代謝産物の排泄総量が平均 3.01 mMol であることから、ethylbenzene の総吸入量の 86.0% が尿中代謝産物として排泄されたことになる。

本実験によって HPLC による ethylbenzene 代謝産物の定量が簡便化できたが、MA, HA, PhGA の測定値に種族差および個体差によるひらきが若干みられることから、MA, HA, PhGA

をモル数の総量として吸入量を推定評価する必要があると思われた。

結 論

ヒトに 65.0 ppm × 3 時間の ethylbenzene 暴露を行ない HPLC で尿中代謝産物 mandelic acid, hippuric acid, phenylglyoxylic acid の定量を行なった。

1. 代謝産物の比率は MA > HA > PhGA の順に排泄された。
2. 各代謝産物の排泄率は暴露開始後 6 ~ 10 時間が最高であった。
3. MA, HA, PhGA の尿中総排泄モル比は 3.5 : 2.6 : 1.0 であった。
4. 高速液体クロマトグラフの使用により、他の方法よりも分析が簡便化できた。

本稿を終るにさいし、岡山大学医学部公衆衛生学教室緒方正名教授に、ご懇切ご丁寧なご指導をいただきましたことに深謝いたします。

文 献

1. Browning, E.: *Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents*, Elsevier, Amsterdam, p. 91, 1965.
2. Gerade, H.W.: *Toxicology and Biochemistry of Aromatic Hydrocarbons*, Elsevier, Amsterdam, p. 40, 1960.
3. Smith, J.N., Smithies, R.H. and Williams, R.T.: Detoxication. LV. Metabolism of alkylbenzenes. Glucuronic acid excretion following the administration of alkylbenzenes. *Biochem. J.* **56**, 317—320, 1954.
4. Smith, J.N., Smithies, R.H. and Williams, R.T.: Detoxication. LVI. Metabolism of alkylbenzenes. Stereochemical aspects of the biological hydroxylation to methylphenylcarbinol. *Biochem. J.* **56**, 320—323, 1954.
5. Williams, R.T., *Detoxication Mechanisms*, 2nd., Chapman and Hall, London, p. 196—199, 1959.
6. El Masry, A.M., Smith, J.N. and Williams, R.T.: Detoxication. LXIX. Metabolism of alkylbenzenes. n-propylbenzene and n-butylbenzene with further observation on ethylbenzene. *Biochem. J.* **64**, 50—53, 1956.
7. Bardodej, Zdenek and Bardodejova, Eva: Biotransformation of ethylbenzene, styrene, and α -methylstyrene in man.: *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **31**, 206—209, 1970.
8. 山崎吉郎, 橋本説郎, 田口豊郁, 緒方正名: 高速液体クロマトグラフ等によるエチルベンゼン等の尿中代謝産物の分析, 第56回日本産業衛生学会総会研究発表要旨集, 大阪, 200, 1983.

**The determination of urinary metabolites of ethylbenzene
in men by high performance liquid chromatography**

Yoshio YAMASAKI

Department of Public Health, Okayama University Medical School Okayama Japan

(Director: Prof. M. Ogata)

After two volunteers were exposed to 65.0 ppm ethylbenzene for 3 hours, the metabolites of ethylbenzene in their urine, mandelic acid(MA),hippuric acid(HA) and phenylglyoxylic acid(PhGA) were analyzed. The metabolites were excreted in the urine in the order of MA>HA>PhGA. The highest value of excretion of metabolites was observed six to ten hours after the beginning of exposure. MA/PhGA and HA/ PhGA mole ratios of total excretion in urine were 3.5 and 2.6, respectively.