

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890090

研究課題名（和文） エチレンオキシド、プロピレンオキシドの生体影響解明のための疫学調査研究

研究課題名（英文） Basic research for biological monitoring in workers exposed to Ethylene oxide or Propylene oxide.

研究代表者

津田 洋子 (TSUDA YOKO)

信州大学・医学部・助手

研究者番号：80512904

研究成果の概要（和文）：

文化財等の病虫害防除に用いられるくん蒸であるプロピレンオキシド、エチレンオキシドの生物学的モニタリング手法の確立のために、尿中代謝物であるプロピレングリコールおよびエチレングリコールのヘッドスペース付き GC-MS を用いた分析方法を確立した。更に、ラットを用いてプロピレンオキシドの経口投与曝露実験を行い、尿中プロピレングリコールの濃度変化を測定するとともに、人のプロピレンオキシドに対する生物学的曝露指標を推定した。

研究成果の概要（英文）：

Propylene oxide (PO) or ethylene oxide (EO) are used at the fumigation. Biological monitoring for PO and EO is required in the workplace, and analytical methods of urinary propylene glycol and ethylene glycol were developed for biological monitoring indicator of PO and EO. To measure the variation of urinary propylene glycol, exposure experiment using rat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,190,000	357,000	1,547,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,530,000	759,000	3,289,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学

1. 研究開始当初の背景

プロピレンオキシド（以下 PO）およびエチレンオキシド（以下 EO）は、滅菌、文化財を病害虫から守るためのくん蒸、化学工業原料など様々な分野で使用されている。PO、EOの使用が増加している背景には、くん蒸に幅広く使用されていた臭化メチルがオゾン層破壊物として 2005 年から使用禁止となり、その代替物質として PO、EO の使用されている事が一因としてあげられる。

(1) PO に関する学術的背景

PO は米国の ACGIH で TLV-TWA が 2ppm、発がん分類は A3 であるものの日本国内において許容濃度の設定はなされていない。TLV-TWA 設定根拠は発がん性である。

PO はグルタチオン抱合と加水分解の 2 経路で代謝され、どちらの代謝経路が主であるか研究報告はないが、グルタチオン抱合の代謝経路は GSTT1 酵素の遺伝子型の影響を受けることが報告されている。

PO 曝露作業者の健康管理を行う際、個人曝露濃度測定は不可欠であり、それは可能であるものの、生物学的モニタリング手法が確立していない。生物学的モニタリング手法を確立するためには PO の主たる代謝経路を明確にすることが重要であり、PO のヒトへの生体影響を調査する為に必要不可欠である。また、健康管理は PO 特有の生体影響で管理する必要があるが、現状では一般定期健康診断における採血項目と尿検査項目にとどまっているのが現状である。

生物学的曝露指標に関して、既存報告よりグルタチオン抱合による尿中代謝産物、特に N-アセチル-S-ヒドロキシ-1-プロピルシステイン（以下 HPMA）の定量分析は LC-MS-MS で確立されているが、使用機器が高価である。GC-MS を用いた簡便かつ十分な感度を有する定量分析方は研究協力者により既に確立した。PO の加水分解による代謝産物であるプロピレングリコールは一般化学物質としての分析は広く行われているが、生物学的モニタリングとして尿中のプロピレングリコールを測定する際には、簡便かつ分析機器への汚染の少ない方法の確立が必要である。

(2) EO に関する学術的背景

平成 13 年、EO は特定化学物質等の第二类物質に追加され、管理濃度は 1ppm となった。米国の ACGIH の TLV-TWA は 1ppm、発がん分類は A2 であり、日本の許容濃度は 1ppm、発がん分類は第 1 群である。

EO は PO と同様の 2 つの代謝経路があり、グルタチオン抱合の代謝経路は GSTT1 酵素の遺伝子型の影響を受ける。代謝経路には種差も報告されており、マウス、ラットはグルタチオン抱合、ウサギ、イヌは加水分解の代謝経路が主である。ヒトについては主たる代謝経路に関する報告は無い。

グルタチオン抱合による代謝産物の定量分析方法は、特に N-アセチル-S-ヒドロキシエチルシステイン（以下 HEMA）について LC-MS-MS を用いた報告があるが、使用機器が高価であることから、研究協力者が既に確立している PO の尿中代謝産物である HPMA 測定方法を改良し GC-MS による定量分析を検討する。

EO 曝露作業者は半年毎に特殊健康診断を受けるが、EO の生物学的モニタリング手法が確立されていないことから EO 独自の健診項目はなく、一般定期健康診断における採血項目と尿検査項目にとどまっている。EO の生物学的モニタリング手法を確立するには曝露状況の把握と生物学的曝露指標を明確にする必要があり、更にヒトに対する EO の生体影響評価を行うことにより EO 曝露作業者の健康管理を適切に行うことが出来ると考えられる。

曝露作業者の健康管理に生物学的曝露指標として尿中代謝産物を用いる際には、遺伝子型の影響を受けない方法がより適している。本研究では尿中プロピレングリコールとエチレングリコールの分析方法を確立するとともに、実際に体内に取り込まれた EO、PO 曝露量を推定するために、尿中代謝産物を生物学的曝露指標とした生物学的モニタリング手法を確立することができれば、EO、PO 曝露作業者の健康管理の一助として有効である。

2. 研究の目的

本研究では、PO、EO の生物学的モニタリング手法の確立のために、(1)～(4)の項目について研究を行う。

- (1). PO の代謝産物であるプロピレングリコールの簡便かつ十分な感度を持つ分析方法の確立
- (2). EO の代謝産物について、適切な生物学的曝露指標とそれらの分析方法の確立
- (3). 動物実験による代謝経路と曝露指標の確立とヒトのPOに対する生物学的曝露指標を推定
- (4). EO 曝露作業者の曝露濃度と尿中代謝産物濃度の調査

3. 研究の方法

- (1) PO の代謝産物であるプロピレングリコールの分析方法の確立

尿中プロピレングリコールの分析においては、分析操作による回収率や分析機器の汚染を最小限にするために、尿に試薬を直接添加し、加温後のヘッドスペースガスをGC-MSで分析する方法を検討した。すなわち、尿もしくは標準液にボロネート誘導体試薬を加えたサンプルのヘッドスペースガスをGC-MSを用いて分析し、至適分析条件を検討した。

- (2) EO の代謝産物について、適切な生物学的曝露指標とそれらの分析方法の確立

GOの尿中代謝産物としてエチレングリコールとHPMAの分析方法を検討した。

尿中エチレングリコールについては、ポリエチレングリコールと同様にボロネート誘導体化後にヘッドスペース付きGC-MSで分析する方法を検討した。HEMAは共同研究者がHPMAについて確立した酢酸エチルで抽出後にトリメチルシリル化しGC-MSを用いて分析する方法を検討した。

- (3) 動物実験による代謝経路と曝露指標の確立とヒトのPOに対する生物学的曝露指標を推定

8週齢のF344雄ラットに、0、50、100 mg/KgのPO（コーンオイル混合）を腹腔内単回投与（1ml/rat）し（0mg/lはn=4、他はn=5）、代謝ゲージにて畜尿法により投与後3、6、9、12、24、36、48、60、72、84、96、120、144、168時間後の尿を採取、尿中プロピレングリコールを測定した。

尿中プロピレングリコールの分析は、尿50 μ lに1%*n*-ブチルボロン酸アセトン溶液200 μ lを加えた後すぐに密閉し、70 $^{\circ}$ Cに加温したヘッドスペースサンプラーにて30分加熱後、サンプル瓶のヘッドスペースガス1mlをGC-MSに注入し、分析を行った。また、尿中ポリエチレングリコール濃度が高濃度であると考えられるサンプルについては、

アセトンで5、10、20倍希釈し、同様の分析を行った。

- (4) EO 曝露作業者の曝露濃度と尿中代謝産物濃度の調査

EO 取扱作業者を対象としたEO 曝露濃度、尿中エチレングリコールおよびMPMA濃度の測定、生物学的曝露指標を検討した。

4. 研究成果

- (1) PO の代謝産物であるプロピレングリコールの分析方法の確立

プロピレングリコールは食品中にも含まれる一般的な化学物質であり、溶媒で抽出後にGC等へ直接資料を注入する分析方法は広く一般的に行われている。本研究のサンプルは尿中代謝物であることから、サンプル抽出作業による回収率の低下やサンプルを直接分析機器に注入することによる機器の汚染を可能な限り少なくするために、サンプルに直接試薬を添加して沸点の低い化合物を生成させ加温により気化させたのちガスを分析機器に導入させる方法、いわゆるヘッドスペースガスの分析を試みた。

既存の研究結果より、エチレングリコールをペンタフルオロボロン化合物でボロネート誘導体化し、直接サンプル注入法によりGC-MS-SIMで高感度分析する方法が確立されている。本研究では、プロピレングリコールにペンタフルオロボロン酸もしくは*n*-ブチルボロン酸1%アセトン溶液を添加し、加温後のヘッドスペースガスをGC-MSで分析した結果、*n*-ブチルボロン酸1%アセトン溶液を用いてプロピレングリコールをボロネート誘導体化する事により簡便に分析可能であることが分かった。

分析サンプルは、ヘッドスペースサンプラー用バイアル瓶（20ml）に尿50 μ lと1%*n*-ブチルボロン酸アセトン溶液200 μ lを入れて直後に密封した。サンプルを70 $^{\circ}$ Cのヘッドスペースサンプラーで30分加温し、ヘッドスペースガスをGC-MSへ1ml注入した。分析に用いたGC-MSはAgilent社製GC-6890N、MS-5973、キャピラリーカラムHP-5MS Phenyl Methyl Siloxane（30m \times 250 μ m \times 250 μ m）、ヘリウムガス流量1.0ml/minであり、インジェクション温度250 $^{\circ}$ C、カラム温度は70 \sim 310 $^{\circ}$ Cまでの昇温分析とした。

GC-MSのスキヤニングによりプロピレングリコールと*n*-ブチルボロン酸によるボロネート化合物はプロピレングリコール-*n*-ブチルボロネートであることをマスペクトルより確認し、より感度を上げるためのSIN分析では127m/sのマススペクトルを解析対象とする事が適していると分かった。

1~150mg/lのプロピレングリコール濃度で直線性が確認された。

(2) E0の代謝産物について、適切な生物学的曝露指標とそれらの分析方法の確立

E0の加水分解酵素に依る代謝過程ではエチレングリコールが生成されて尿中に多く排泄されることが報告されており、グルタチオン抱合による代謝過程ではHEMA最終生成物であり尿中へ排泄されることが報告されている。

エチレングリコールの分析方法は分析機器へ反応物質を直接導入する方法が多く報告されているが、本研究では尿中エチレングリコールの分析方法として(1)と同様にヘッドスペースガスをGC-MSに注入し分析する方法を模索した。既存報告を参照しボロネート誘導体化をペンタフルオロボロン酸およびn-ブチルボロン酸で行った結果、n-ブチルボロン酸を用いてボロネート誘導体化し、ヘッドスペースサンプラー付きGC-MSで分析する方法を確立した。分析方法はプロピレングリコールと同様である。反応生成物はエチレングリコール-n-ブチルボロネートであった。本研究で検討した分析方法ではGC-MSの連続分析が困難であり、1検体の分析は数分で終了したが分析機器の安定に1時間程度要したことから、今後更に改良が必要であると考えられた。

尿中HPMAの分析は、既にHPMAで確立されているトリメチルシリル化と同様の反応様式を用いることを予定したが、分析法は確立できなかった。

(3) 動物実験による代謝経路と曝露指標の確立とヒトのP0に対する生物学的曝露指標を推定

ラットの体重は毎日一定時間に計測し、投与時の体重は 182 ± 9 (163-194) g、採尿終了時(曝露7日後)の体重は 208 ± 9.2 (192-222) gであり、P0投与による体重増加への影響は見られなかった。

P0投与量は投与時の体重を基準とし、0、50、100mg/Kg体重になるように腹腔内に投与した。実際の平均投与量は0、53.0 (51.5-55.6)、103.9 (95.3-115.4) mg/Kgであった。薬剤投与量についてはLD50(経口)1140mg/Kgの1/10以下であり、投与後7日目までに下痢もしくは嘔吐、痙攣、急激な体重減少等が観察されなかった。

曝露前尿中プロピレングリコール濃度は 4.1 ± 1.4 (2.9-7.5) mg/lであり、曝露3時間後は0mg/Kg曝露は3.4、4.7、6.0mg/l (1匹は3時間後の尿は無し)、50、100mg/Kg曝露はそれぞれ 992.2 ± 160.7 (813.5-1220.1)、 1011.1 ± 308.3 (772.7-1467.6) mg/lであった。P0曝露群

は6時間後の尿中プロピレングリコール濃度に差が見られ、50、100mg/Kg曝露それぞれ 363 ± 108.8 (260.8-500.5)、 663.9 ± 183.9 (445.1-822.5) mg/lであったが、12時間後には 46.1 ± 31.7 (15.5-99.5)、 57.0 ± 31.0 (30.1-95.2) mg/lであり、大幅に減少しており、曝露濃度による差は見られなかった。尿中プロピレングリコール濃度の変化を図1および2に示した。

尿中HPMAの分析は期間中に分析を終了することができなかった。今後、分析を行ってゆく予定である。

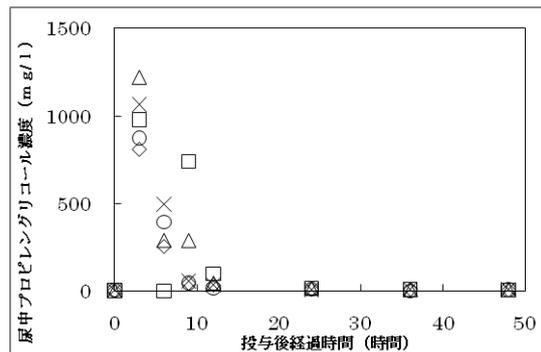


図1 尿中ポリエチレングリコールの推移 (50mg/Kg投与)

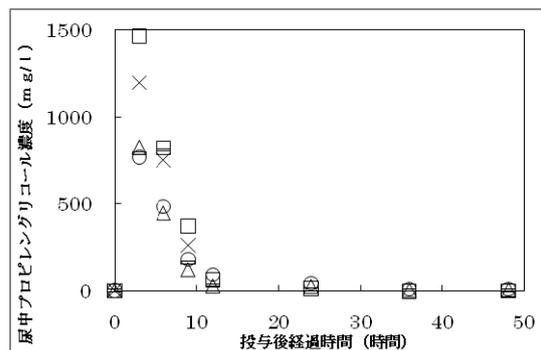


図2 尿中ポリエチレングリコールの推移 (100mg/Kg投与)

本研究の結果より、P0曝露により尿中プロピレングリコール濃度は上昇し、高濃度曝露では尿中プロピレングリコール濃度も高くなることは確認できたが、今後、尿量等を考慮した解析や、曝露濃度段階を増やして数を増やしてゆくことにより、曝露濃度と尿中プロピレングリコール濃度の関係がより明確になると思われた。

また、P0非曝露者の尿を本研究で確立した分析方法で測定した結果プロピレングリコールが検出されていることから、尿中プロピレングリコールの生物学的曝露指標としての評価を進める上では、P0非曝露者のバックグラウンド値についても検討を進めてゆくことが必要であると考えられた。

P0取扱作業者の疫学調査は事業場の経

営上の判断から、調査実施に及ばなかった。

(4) E0 曝露作業者の曝露濃度と尿中代謝産物濃度の調査

E0 取扱作業者の曝露濃度と尿中代謝物濃度調査は継続して検討中であるが、現時点でE0非曝露のヒトおよびラットの尿中にはエチレングリコールが一定量存在する事を確認し、今後濃度の確認を行っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 洋子 (TSUDA YOKO)
信州大学・医学部・助手
研究者番号：80512904

(4) 研究協力者

野見山 哲生 (NOMIYAMA TETSUO)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：70286441

塚原 照臣 (TSUKAHARA TERUOMI)
信州大学・医学部・講師
研究者番号：50377652