

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10451

研究課題名(和文) 経皮暴露評価のための尿中芳香族アミン類のハイスループット分析法の開発

研究課題名(英文) Development of high-throughput analytical method for urinary aromatic amines for dermal exposure assessment

研究代表者

長尾 正崇 (Nagao, Masataka)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：80227991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では、芳香族アミンとしてアニリン、トルイジン(o-, m-, p-)、アニシジン(o-, m-, p-)、ナフチルアミン、4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン(MBOCA))を、代謝物としてアミノフェノール(o-, m-, p-)をモデル化合物として用いた。尿中の芳香族アミンはアルカリ抽出後、抽出溶液内でトリフルオロアセチル化することが、尿中の代謝物は尿に直接酸無水物とアルカリ水溶液を加えることでアミノ基と水酸基を同時にアシル化した後に有機溶媒で抽出することが可能となった。本法により、抽出溶媒を濃縮・乾燥することなく、簡便に芳香族アミンやその代謝物の分析が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果では、健康被害をもたらす恐れのある芳香族アミンの代表であるアニリンの簡便なるガスクロマトグラフ/質量分析法が構築できた。有害性の指摘されている芳香族アミンは多岐にわたり、適正なる分析機器あるいは手法を選択した網羅的な芳香族アミン類のスクリーニング法の開発は喫緊の課題であると指摘されている。本研究成果は、有害な芳香族アミンや代謝物のスクリーニング分析にも応用可能であり、健康被害を未然に防止できるような検査法の整備を加速させ、健康被害を引き起こす化学物質を網羅的に分析できる方法の構築・整備に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, aniline, toluidine (o-, m-, p-), anisidine (o-, m-, p-), naphthylamine, and 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) (MBOCA) were used as model compounds for aromatic amines, and amino phenols (o-, m-, p-) as metabolites. Aromatic amines in urine were trifluoroacetylated in the extraction solution after alkaline extraction, while metabolites in urine were directly acylated with acid anhydride and alkaline solution to simultaneously derivatize amino and hydroxyl groups before extraction with an organic solvent. With this method, it was possible to analyze aromatic amines and their metabolites easily without evaporation and drying. In the future, it is expected that this method will also be used for the analysis of similar compounds.

研究分野：法医学

キーワード：労働衛生 分析化学 リスクアセスメント 芳香族アミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年、福井県内にある化学染料工場で勤務する作業者に膀胱がんが多発している事例が報告され、原料として取り扱っていた芳香族アミンによる健康被害が大きな社会問題となっている。また、2016年6月に施行された改正労働安全衛生法では、673物質の化学物質にリスクアセスメント実施を義務付けられたが、作業環境中の化学物質濃度(空気中の濃度)や個人曝露量の測定の義務付けであり、必ずしも個々人の体内摂取量との相関は無い。作業者の健康被害を正確に把握するには、実際に体内に取り込まれた化学物質のモニタリングが不可欠である。幾つかの化学物質については尿中の分析法が報告されているが、健康被害を未然に防止できるような検査法の整備は未完成である。さらに、作業者個々人や職場管理者が、職場で取り扱っている原料の構成まで把握していることは稀であるため、健康被害を引き起こす化学物質を網羅的に分析できる方法の構築・整備が急務とされている。

現在、有害性が指摘されている芳香族アミンは多岐にわたり、その芳香族アミンの物理化学的特性を明らかにし、適正なる分析機器あるいは手法を選択した網羅的な芳香族アミン類のスクリーニング法の開発は喫緊の課題である。また、職人芸的要素を排除し、どこの施設でも分析可能で施設間誤差のない高精度な方法の構築も不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、上記の課題を解決し、健康被害を及ぼす可能性の高い芳香族アミンを対象とした尿中からの簡便な前処理法を用いつつ高感度・高精度な分析法を開発し、高度な分析技術や知識を持たない分析者でも正確な定量値の得られる実施可能なスクリーニング系を構築する。また、将来的には健康診断項目に追加しても対応可能なように多検体処理法も念頭に置き、その開発に挑む。

3. 研究の方法

健康被害を及ぼす可能性の高い芳香族アミン9種(アニリン、トルイジン(o-, m-, p-)、アニシジン(o-, m-, p-)、ナフチルアミン、4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン(MBOCA))を対象とし、尿中からの高感度なガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)を使用したスクリーニング法を構築する。また、アニリンの代謝物であるアミノフェノール(o-, m-, p-)をモデル化合物とし、尿中代謝物の高感度なGC/MS分析法を構築する。

4. 研究成果

(1) 芳香族アミンの分析法の構築

1) 誘導体化の検討

アニリンなどの芳香族アミンをGCMSで分析するには、注入口や分析カラム内の活性点やシラノール基との相互作用で分析精度の低下が指摘されている。その問題点を回避するには、アミン専用の分析カラムを用いることも報告されているが、本研究では、汎用性を考慮して一般的な分析カラムで分析できるようにアミノ基を保護する誘導体化法について検討を行った。アミノ基の誘導体化法は大きく二つの手法に分けられ、一つは検査試料から抽出精製した後、誘導体化する方法、もう一つは検査試料中で誘導体化した後、誘導体化物を抽出精製する方法である。抽出後に誘導体化する試薬としては、酸無水物+ピリジンやN-メチル-ビス(トリフルオロアセトアミド)(MBTFA)によるアシル化、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(MSTFA)によるシリル化が汎用される。シリル化は、誘導体化前に十分な脱水や乾固が必要など水分に対して敏感であり、誘導体化後も不安定なこともあることが多いため、抽出後にアシル化する方法を検討した。また、試料中で誘導体化できる試薬としては、塩化ギ酸アルキルが知られている。

誘導体化剤の検討

抽出後に誘導体化する試薬としてMBTFAを、試料中で誘導体化できる試薬として塩化ギ酸プロピルに注目して誘導体化剤の検討を行った(図1)。

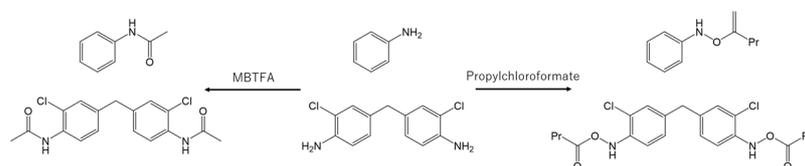


図1 MBTFA および塩化ギ酸プロピルによる反応機構

各種芳香族アミンを添加した有機溶剤にMSBFAを添加し、GCMSで分析した結果、各種芳香族アミンのトリフルオロアセチル(TFA)誘導体が形成されていた(図2)。また、各種芳香族アミンを添加した水溶液に水酸化ナトリウムと塩化ギ酸プロピルを添加し、酢酸エチルで抽出した有機層をGCMSで分析した結果、各種芳香族アミンのプロポキシアミド誘導体が形成されていた(図2)。一級アミンは弱アルカリの条件で反応していたが、MBOCAなどの二級アミンは強ア

ルカリの条件が必要であった（図2 黄色枠および赤枠）。強アルカリの条件で反応させると、一部の一級アミンが遊離体のままで検出された（図2 青枠）ことから、これら同時誘導体化は困難と判断し、以降の実験では、MBTFA によるアシル化を採用することとした。

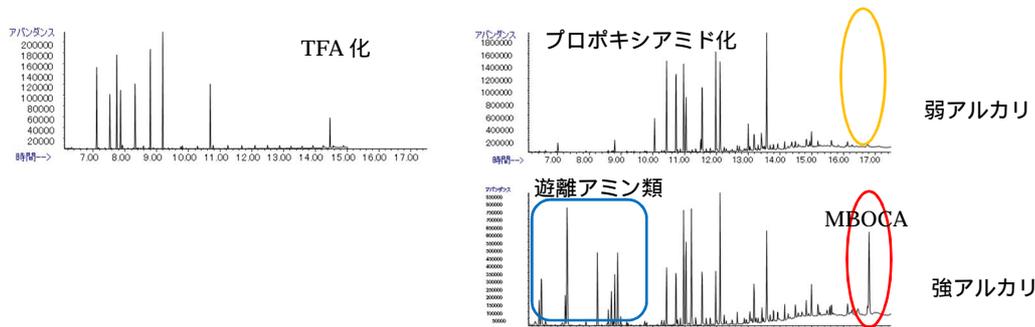


図2 各種芳香族アミンを添加し TFA 化およびプロポキシアミド化して GCMS で分析した結果

MBTFA の添加量

MBTFA の至適添加量を設定するため、1~20 μ L 添加して各芳香族アミン類の TFA 誘導体の生成量をモニタリングした。その結果（図3）いずれの芳香族アミンも 2 μ L 以上の添加で定常状態に達した。

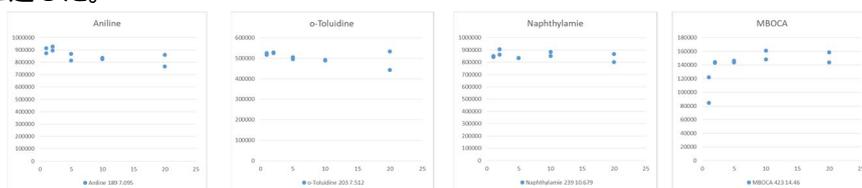


図3 MBTFA の添加量と TFA 化物の生成量

2) 抽出溶媒の検討

尿に添加した芳香族アミンを種々の有機溶媒（ヘキサン、トルエン、ジクロロメタン、酢酸エチル）で抽出し、MBTFA を添加して TFA 誘導体とした後に GCMS で分析した結果（図4）抽出に用いる有機溶媒の種類で回収率に差が確認された。ヘキサンを用いた場合は p-トルイジンの回収率が悪く、酢酸エチルを用いた場合には MBOCA の回収率が悪かった。トルエンおよびジクロロメタンで良好な結果が得られ、80~100%の回収率が得られ、これ以降の実験には、抽出溶媒としてはジクロロメタンを用いることとした。

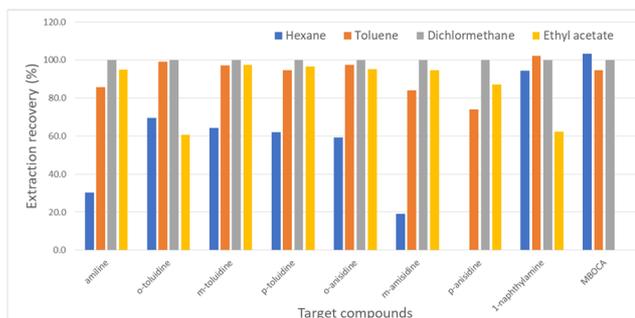


図4 抽出溶媒の違いによる芳香族アミンの回収率

3) バリデーション

芳香族アミンを種々の濃度で添加した尿 1mL に水酸化ナトリウム 0.3mL を添加して混和し、ジクロロメタン 0.4mL で抽出し、遠心分離する。下層のジクロロメタン 0.2mL に MBTFA 2 μ L を添加して TFA 誘導体とした後に GCMS で分析した。その結果（表1）0.001~2 μ g/mL の範囲で良好な直線性（ $r > 0.98$ ）が確認された。また、尿に異なる3濃度（0.01, 0.1, 1.0 μ g/mL）で添加して日内変動を確認した結果、0.82~9.78%（0.01 μ g/mL）1.29~10.4%（0.1 μ g/mL）1.00~5.26%（1.0 μ g/mL）の範囲で再現性が確認された。

表1 尿中各芳香族アミンのバリデーション結果

Name	LOD (μ g/mL)	Calibration Range (μ g/mL)	Calibration curve	Correlation coefficient
Aniline	0.001	0.001~2.0	$y = 0.0076x - 0.0342$	0.999
o-Toluidine	0.002	0.002~2.0	$y = 0.0050x - 0.0282$	0.999
m-Toluidine	0.001	0.001~2.0	$y = 0.0087x - 0.0542$	0.999
p-Toluidine	0.001	0.001~2.0	$y = 0.0054x - 0.0335$	0.996
o-Anisidine	0.001	0.001~2.0	$y = 0.0055x - 0.0236$	0.999
m-Anisidine	0.001	0.001~2.0	$y = 0.0088x - 0.0055$	0.999
p-Anisidine	0.001	0.001~2.0	$y = 0.0087x - 0.0774$	0.996
Naphthylamine	0.005	0.010~2.0	$y = 0.0095x + 0.2004$	0.999
MBOCA	0.005	0.010~2.0	$y = 0.0022x - 0.0578$	0.995

x: concentration of target (μ g/mL), y: peak area ratio of target to IS

4) MonoSpin による芳香族アミン類の抽出

芳香族アミン類を添加した尿 0.5mL に水酸化ナトリウム 0.15mL を添加して混和し、MonoSpinC18 に付加する。MonoSpinC18 は事前にメタノール 0.3mL および水 0.3mL で洗浄・活性化を行う。試料溶液を入れた MonoSpin を 3,000 rpm で 2 分間遠心分離して芳香族アミン類をカラムに保持させる。ジクロロメタンおよびメチル-*tert*-ブチルエーテル(MTBE) 0.2mL で抽出し、MBTFA 2 μ L を添加して TFA 誘導体とした後に GCMS で分析した。MTBE で溶出した場合、MBOCA が溶出されず、溶出溶媒としてはジクロロメタンが適していた。芳香族アミン類の保持・回収率は 20~100% と大きな差こそあれ、許容濃度の 1/10 程度の尿中濃度まで定量可能となった。

(2) 芳香族アミンの代謝物分析法の構築

芳香族アミンは体内に取り込まれると、アセチル化や酸化(水酸化)された後にグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けて尿中へ排泄される。そこで芳香族アミンの代謝物であるアミノフェノール類をモデル化合物とし、尿中代謝物の GCMS 分析法を検討した。

これらの代謝物を GCMS で分析するには、同一分子内のアミノ基と水酸基を誘導体化する必要がある。これらの誘導体化法としては、N-アシル化と O-TMS 化が一般的であるが、O-TMS 化するには精製・抽出後に濃縮乾固して水分を除去する必要がある。しかし、アミノフェノール類は蒸気圧が低く、濃縮乾固時に揮散することが懸念される。誘導体化剤の検討や誘導体化の順番を変えたりするなど種々の条件を検討した結果、無水酢酸を使用して試料中でアミノフェノール類のアミノ基と水酸基を同時にアセチル化出来ることが判明した(図5)。そこで、アセチル化による分析法を詳細に検討した。

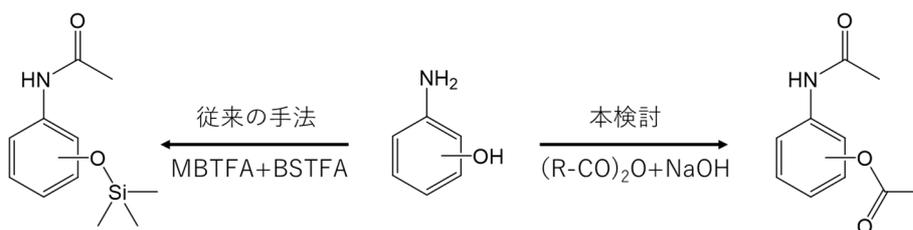


図5 本検討で用いる試料溶液中でのジアセチル化法

1) 無水酢酸とアルカリ溶液添加量の検討

アセチル化には、添加する酸無水物とアルカリの量比が重要な要因となるため、添加する無水酢酸と水酸化ナトリウム(1M)の量比を変化させて最適な誘導体化に必要な量比を検討した。その結果、無水酢酸 50 μ L と水酸化ナトリウム 100 μ L で最適な誘導体化生成率が確認できた(図6)。

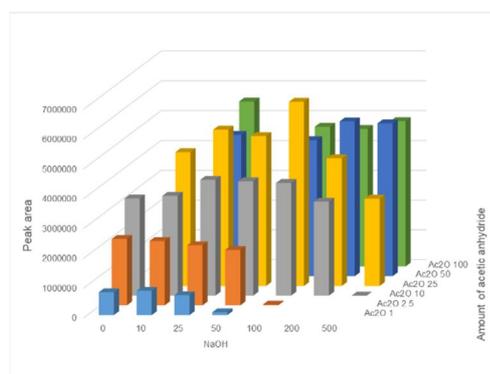


図6 無水酢酸と水酸化ナトリウムの組み合わせによるジアセチル体生成量

2) 誘導体化剤の検討

当初、無水酢酸を使用したアセチル化で分析法の検討を行っていたが、アニリンの代謝物として N-アセチル-*p*-アミノフェノールが尿中に排泄されることが判明し、無水酢酸を用いたアセチル化では同じ代謝物の *p*-アミノフェノールと区別が困難であった。そこで、無水酢酸- d_6 を誘導体化剤とすることで、N-アセチル-O-アセチル- d_3 -*p*-アミノフェノールと N,O-ジアセチル- d_6 -*p*-アミノフェノールとなり、区別可能になると想定した(図7)。しかし、両者の GCMS スペクトルを比較すると、ベースピークイオンの m/z に 2Da しか差が出ず、質量数で区別することは困難であった。

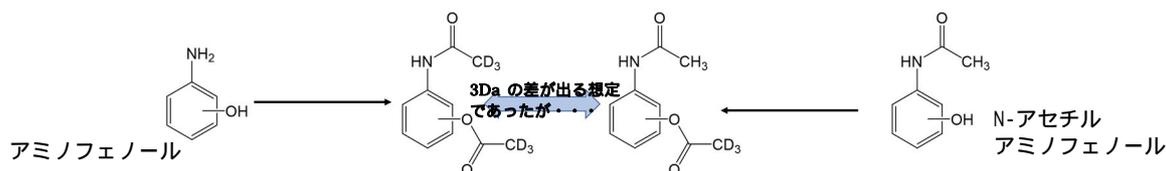


図7 アミノフェノールとアセトアミドフェノールの無水酢酸- d_6 によるアセチル化

MS で区別することを目的に、酸無水物として無水プロピオン酸を用いてプロピル化を検討したところ、ベースピークイオンの m/z は同じ 109 であるが、溶出時間の差が 0.3 分と離れていることから N-アセチル-*p*-アミノフェノールと *p*-アミノフェノールとの区別が可能になった。

3) 誘導体化剤の添加量

本誘導体化には、添加する酸無水物とアルカリの量比が重要な要因となる。添加する無水プロピオン酸と水酸化ナトリウム (1M) の量を変化させて最適な誘導体化に必要な量比を検討した結果 (図 8)、無水プロピオン酸 50 μL と水酸化ナトリウム (1M) 200 μL で最適な誘導体化生成が確認できた。

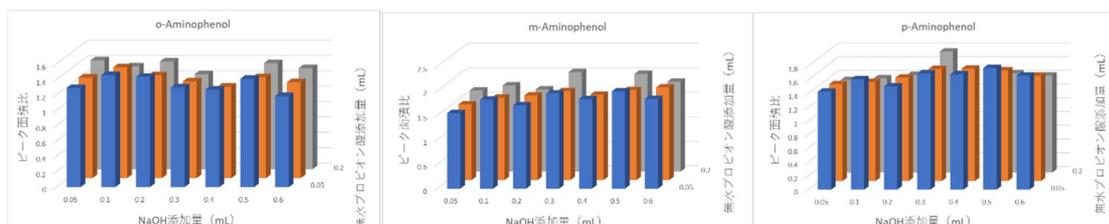


図 8 無水プロピオン酸と水酸化ナトリウムの組み合わせによるジプロピオン体生成量

4) 抽出溶媒の検討

尿に添加したアミノフェノール (*o*-, *m*-, *p*-) をプロピオン化し、種々の有機溶媒 (ヘキサン、シクロヘキサン、トルエン、ジクロロメタン、酢酸エチル、メチル *t*-ブチルエーテル) で抽出した後に GCMS で分析した結果、ジクロロメタンで良好な結果が得られ、80%以上の回収率が得られた (図 9)。

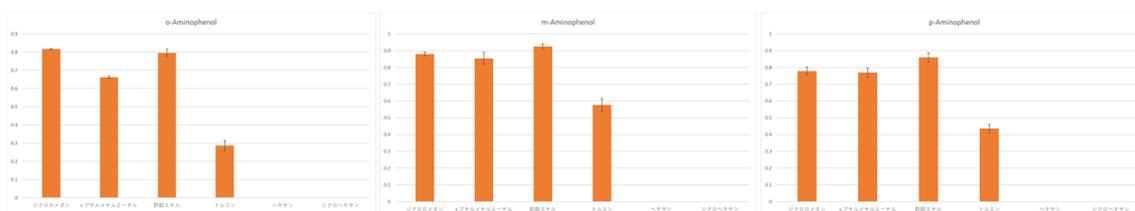


図 9 抽出溶媒の違いによるアミノフェノールのジアシル体の回収率

5) バリデーション

尿に添加したアミノフェノール (*o*-, *m*-, *p*-) を種々の濃度で添加し、プロピオン誘導体をジクロロメタンで抽出した後に GCMS で分析した結果、0.01 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性 ($r > 0.98$) が確認された。また、尿に異なる 3 濃度 (0.05, 0.5, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で添加して日内変動を確認した結果、1.7 ~ 4.2% (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1.7 ~ 2.5% (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1.9 ~ 3.9% (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の範囲で再現性が確認された (表 2)。

表 2 尿中アミノフェノール類分析におけるバリデーション結果

Name	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Calibration Range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Calibration curve	Correlation coefficient
<i>o</i> -Aminophenol	0.010	0.020 ~ 10	$y = 0.0795x - 0.0112$	0.996
<i>m</i> -Aminophenol	0.010	0.010 ~ 10	$y = 0.1324x - 0.0065$	0.999
<i>p</i> -Aminophenol	0.010	0.020 ~ 10	$y = 0.1454x - 0.0020$	0.999

x: concentration of target ($\mu\text{g}/\text{mL}$), y: peak area ratio of target to IS

本検討により、尿中の芳香族アミン (アニリン、トルイジン (*o*-, *m*-, *p*-)、アニシジン (*o*-, *m*-, *p*-)、ナフチルアミン、4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン (MBOCA)) および代謝物の簡便な分析法が確立できた。本成果は、他の芳香族アミンや代謝物の分析にも応用可能であり、健康被害を未然に防止できるような検査法の整備を加速させ、健康被害を引き起こす化学物質を網羅的に分析できる方法の構築・整備に貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奈女良 昭 (Namera Akira) (30284186)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関