

Title	p-クロロニトロベンゼン曝露における生物学的モニタリング指標の確立
Author(s)	吉田, 俊明
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3075203
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

p-クロロニトロベンゼン曝露における
生物学的モニタリング指標の確立

吉 田 俊 明

p-クロロニトロベンゼン曝露における
生物学的モニタリング指標の確立

吉田 俊明

目 次

緒 論	1
本 論	7
第1章 <i>p</i> -クロロニトロベンゼンの尿中代謝物の同定	9
第1節 <i>p</i> -クロロニトロベンゼン急性中毒患者における尿中代謝物の同定	9
第2節 <i>p</i> -クロロアニリン急性中毒患者における尿中代謝物の同定	21
第3節 2,4-ジクロロアニリン、 <i>p</i> -クロロホルムアニリドの尿中への排泄	28
第4節 尿中 <i>p</i> -クロロオキザニリン酸の検出	37
第2章 <i>p</i> -クロロニトロベンゼンの代謝経路 ...	42
第1節 ラットにおける <i>p</i> -クロロニトロベンゼンの尿中代謝物の同定	42
第2節 ラットにおける <i>p</i> -クロロニトロベンゼンの代謝経路	48

第3章 血漿中 *p*-クロロニトロベンゼンおよびその
尿中代謝物の定量 52

第1節 血漿中 *p*-クロロニトロベンゼンの逆相高速液体クロ
マトグラフィーによる定量 52

第2節 尿中 *p*-クロロニトロベンゼンおよびその代謝物の逆
相高速液体クロマトグラフィーによる分離定量
..... 60

第4章 ヒトにおける *p*-クロロニトロベンゼン代謝
の薬物動力的解析 71

第1節 急性中毒患者における *p*-クロロアニリンの代謝
..... 71

第2節 急性中毒患者における *p*-クロロニトロベンゼンの代
謝 75

第5章 ラットにおける *p*-クロロニトロベンゼン代
謝の薬物動力的解析 83

結 論 97

謝 辞 101

引用文献 105

緒 論

産業現場では、現在約5万種類の化学物質が使用されており、しかもその種類は年々増加している[1]。これらの化学物質は各分野で様々な用途に使用されているが、これらの有用性とは裏腹に人体に対して有害作用を示すものも数多く存在する。産業現場では通常、化学物質が一般環境に比べてより高濃度かつ集中的に取り扱われることが多いため、その有害作用が典型的に現われることが多い。したがって、これら化学物質の製造作業や取り扱い作業に従事する労働者における健康障害を予防することは非常に重要な課題であり、労働安全衛生法に基づく有機溶剤中毒予防規則や特定化学物質等障害予防規則等で対象となっている化学物質を取り扱う労働者については、年2回の特殊健康診断の受診が義務づけられている。

有害化学物質を取り扱う労働者への健康影響を評価するためには、その化学物質への曝露状況を正確に把握する（モニタリング）必要がある。その方法として、作業現場における有害化学物質の濃度を測定し、評価する方法（外界モニタリング）と、化学物質取り扱い作業から得た生物学的試料（血液、尿、呼気、汗、唾液など）中の化学物質またはその代謝物を測定して体内に吸収された量を把握し、健康への影響を評価する方法（生物学的モニタリング）とがある。生物学的モニタリングでは、実際に体内に吸収された量を評価するため、外界モニタリングよりもより正確に健康に対する危険度を評価できるものと考えられている。生物学的モニタリングを確立するためには、曝露の指標となる物質が存在し、容易に得られる生物学的試料中にその指標物質が存在すること、また、その指標物質の信頼性の高い簡便な測定方法が存在すること、さらに、曝露量とその指標物質の間に量-反応関係が存在することなどが必要とされる。有害化学物質による曝露の際、その物質の血中濃度や呼気中濃度の測定により吸収量がモニタリングされる場合もあるが、サンプリングの容易さ、被検者に与える負担の軽さ等の点において、尿中に排泄される代謝物の測定による曝露量の把握がすぐれており、トルエンやn-ヘキサン等の8種の有機溶剤については、その尿中代謝物の測定が、特殊健康診断における検査項目の一つとして義務づけられている。尿中代謝物を曝露指標として用いる際、曝露物質の体内動態とその尿中代謝物に関する知見、指標となる代謝物の簡易で正確な定量法の開発等が不可欠であり、現在その曝露指標が確立されている化学物質は少ないが、今後、尿中代謝物を曝露指標に用いた、さらに多くの化学物質のモニタリング法の開発が期待される。

芳香族ニトロ、アミノ化合物は、主に染料、農薬および医薬品の原料や中間体として広く製造、使用されている。しかし、これら一群の化合物の中には、発癌性や遺伝毒性を有

するものも多く、また、その血液毒性作用によりヘモグロビンを酸素運搬能のないメトヘモグロビンに酸化するものも数多く存在する。主にアゾ染料や硫化染料の合成における中間体として古くから使用されている *p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) は、芳香族ニトロ、アミノ化合物の中でも特に強い血液毒性作用を有しているため、労働安全衛生法でも第2類特定化学物質に指定されており、取り扱いが規制されている。1991年における *p*-CNBの国内生産量は19,600トンであり[2]、主に染料合成工場等において高濃度かつ集中的に取り扱われているが、これら産業現場以外の環境大気中から検出された例も報告されている[3]。*p*-CNB曝露による急性中毒例は過去に多数報告されている[4-9]。主な急性中毒症状は、他の多くの芳香族ニトロ、アミノ化合物による中毒と同様に、メトヘモグロビン血症に基づくチアノーゼ、頭重、頭痛、めまい、悪心、嘔吐、倦怠、心悸亢進、呼吸困難等であり、重症では死亡するケースも観察されている。また、血液学的所見として、メトヘモグロビン量、Heinz小体、網状赤血球および白血球の増加、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少が観察されている。血中全ヘモグロビン量に対するメトヘモグロビン量の割合が20%以下では通常特別な症状は現われませんが、20~50%では、頭痛、めまい、頻脈および呼吸困難などの症状を呈し、60~70%以上では昏睡から死に至ると報告されている[10]。芳香族ニトロ、アミノ化合物の曝露の際、その体内での代謝により生じたN-ヒドロキシアミノ化合物がメトヘモグロビンの形成に関与していると考えられている[11-14]。また、動物実験による *p*-CNBの急性および慢性毒性試験の結果もいくつか報告されている。*p*-CNBのLD₅₀値は、ラット経口投与および腹腔内投与で420mg/kg、皮膚投与で16000mg/kg[15]、マウス経口投与では970mg/kg[16]と報告されている。*p*-CNBを種々の経路（経口[15,17]、吸入[18]、経皮[15]、腹腔[15,19]）から投与されたラットにおいて、ヒトの場合と同様に、メトヘモグロビン血症に基づくチアノーゼや血液学的所見が急性毒性作用として観察されている。また、2~4週間 *p*-CNBに曝露させたラットの亜慢性毒性試験では、上記の血液系への毒性作用のほかに脾臓、腎臓、肝臓および生殖器に変化が見られた。すなわち、脾臓のうっ血、肥大およびヘモシデリンの沈着、腎臓および肝臓重量の増加、睪丸の萎縮、輸精管の変性、副睪丸中の精子数の変化等が観察されている[20,21]。また、妊娠ラットへの曝露では、胎仔における骨格異常の奇形が有意に増加することが報告されている[22]。さらに、*p*-CNBは、Ames法による変異原性試験において陽性を示し[23,24]、マウスに血管腫や肝腫など発癌性を示した[25]。上記のごとく、*p*-CNBの急性および慢性曝露

は種々の臓器に様々な毒性作用を示すことが実証され、*p*-CNB取り扱い作業従事者におけるその曝露量のモニタリングは、産業衛生上非常に重要と考えられる。しかし、*p*-CNBの生物学的モニタリングの際に必要なとされる適切な曝露指標は過去において存在しない。

p-CNBを含む芳香族ニトロ、アミノ化合物による曝露の際、一般的に、比色法により定量された尿中ジアゾ反応陽性物質（DPM）が古くから曝露指標として用いられている[9, 11, 26-28]。DPMは、尿中に排泄された芳香族ニトロ、アミノ化合物の代謝物を加水分解後還元しニトロ化合物はすべてアミノ化合物とし、亜硝酸でジアゾ化したのちカップリング試薬で発色させ、標準物質との発色強度を比較して定量される[19]。すなわち、尿中に存在するニトロ基またはアミノ基を有する芳香族化合物の総量を測定する方法である。しかし、この測定法では、例えば*p*-クロロアニリンは*p*-アミノフェノールの約35倍の発色強度を示す[29]など、測定対象物質により発色強度が異なり、数種の代謝物を含む場合の標準物質の選択は困難である。また、DPMは、芳香族ニトロ、アミノ化合物に曝露されていない一般のヒトの尿からも検出される。その量は、摂取した薬品や食品により大きく影響されるため、その値の範囲は広く、曝露に基づくDPM量を計算する際に、生理値として差し引くDPM量を決定するのは一般的に困難である。たとえば、アセトアミノフェンやフェナセチン等のアニリン系の解熱剤服用者の尿に対しても陽性反応を示し、これらを服用した場合、曝露に基づく尿中代謝物を正確に測定すること不可能である。したがって、正確に曝露量をモニタリングするためには、個々の代謝物を分離定量し、最も適切な代謝物を曝露指標として用いる必要がある。

以上のような観点から、本研究では、*p*-CNB曝露の際、その尿中代謝物を曝露指標に用いた生物学的モニタリング法の開発を目的とし、以下の諸研究を行った。

第1章では、*p*-CNBによる急性中毒患者および*p*-CNBのニトロ基の還元体である*p*-クロロアニリンによる急性中毒患者から得た尿をガスクロマトグラフィー／質量分析（GC／MS）により分析し、ヒトにおける*p*-CNBの尿中代謝物の同定を試みた。

第2章では、第1章と同様にGC／MSにより、ラットにおける*p*-CNBの尿中代謝物の同定を試みた。さらに、同定された代謝物のうちの数種を投与したラットの尿中に排泄される代謝物を同様にGC／MSにより調べ、*p*-CNBの体内での代謝経路について検討した。

第3章では、第1章で同定された各尿中代謝物の逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による簡易で正確な分離定量法の開発を試みた。また、のちの第5章において、*p*-CNB投与ラットから経時的に採取した尿および血漿試料を用いてその代謝を動力学的に解析するため、HPLCによる血漿中*p*-CNBの定量法についても同様に検討した。

第4章では、*p*-CNBによる急性中毒患者から曝露事故後経時的に採取した尿を分析し、主要な代謝物の尿中排泄量の時間的推移を調べた。さらに、*p*-クロロアニリンによる急性中毒患者における各尿中代謝物の推移と比較し、ヒトにおける*p*-CNB代謝の薬物動力学的解析を試みた。

第5章では、既知量の*p*-CNBを投与したラットにおける血漿中*p*-CNBおよび各尿中代謝物の時間的推移を調べ、第4章と同様に、ラットにおける*p*-CNB代謝の薬物動力学的解析を試みた。さらに、第4章の結果とあわせ、*p*-CNB曝露の際の、その生物学的モニタリングにおける曝露指標について考察した。

本 論

第1章 *p*-クロロニトロベンゼンの尿中代謝物の同定

第1節 *p*-クロロニトロベンゼン急性中毒患者における尿中代謝物の同定

1. 緒言

p-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) (Fig. 1-1-1) は融点 82~84℃、沸点 242℃の常温、常圧で昇華性のある黄色の結晶であり、温アルコール、エーテル、二硫化炭素に可溶で、水には不溶の化合物である[30]。 *p*-CNB は、主にアゾ染料や硫化染料の合成における中間体として広く製造、使用されているが、強い血液毒性作用を有しており、ヒトや動物に対してメトヘモグロビン血症を引き起こすことが知られている[4-9, 11, 15, 17-19, 28, 31-36]。また、動物実験により *p*-CNB は、変異原性[23, 24]および発癌性[25]を有することが証明されている。したがって、 *p*-CNB 取り扱い作業において、その吸収量を把握することは重要と考えられる。有害化学物質の吸収量は、尿中に排泄されるその代謝物量によって評価される場合が多いが、 *p*-CNB の体内での代謝に関する研究は少なく、過去に、ウサギにおける尿中代謝物[37]、単離したラットの肝細胞による代謝[33]および酵母による代謝[38]を調べた報告など若干存在するに過ぎない。 *p*



Fig. 1-1-1. Chemical Structure of *p*-CNB.

-CNBを投与したウサギの尿中からは、2-アミノ-5-クロロフェノール(2-A-5-CP)、N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン(ANPC)、*p*-クロロアニリン(*p*-CA)および微量の2-クロロ-5-ニトロフェノール(2-C-5-NP)が検出されている。また、酵母における*p*-CNBの主要な代謝物は*p*-クロロアセトアニリド(*p*-CAA)および4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド(4-C-2-HAA)であり、単離したラットの肝細胞では*p*-CNBは*p*-CA、*p*-CAAおよびS-(4-ニトロフェニール)グルタチオンに代謝されると報告されている。また、ヒトにおける*p*-CNBの代謝に関しては明らかにされていない。

本節では、ヒトにおける*p*-CNBの尿中代謝物を明らかにするため、*p*-CNB急性中毒患者から得た尿を試料とし、ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)により尿中代謝物の同定を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物: *p*-CNB (純度99.7%:不純物として*m*-クロロニトロベンゼン(0.1%)および*o*-クロロニトロベンゼン(0.2%)を含む)、*p*-CAおよび*p*-ニトロチオフェノールは東京化成工業(東京)より購入した。2,4-ジクロロアニリン(2,4-DCA)、*p*-アミノフェノールおよび*p*-ヒドロキシアセトアニリドは和光純薬工業(大阪)より購入した。*p*-アミノチオフェノールおよび*p*-CAAはAldrich(Milwaukee, WI, USA)から、*p*-クロロチオフェノールはMerck(Darmstadt, Germany)からそれぞれ購入した。ANPC、N-(4-クロロフェニール)アセトヒドロキサム酸およびN-(4-クロロフェニール)グリコールヒドロキサム酸は東神合成工業(東京)より購入した。N-ニトロソメチルウレアは丸若化学工業(大阪)から購入した。*p*-クロロホルムアニリド(*p*-CFA)は、亀岡の方法[39]により*p*-CAから合成した。2-C-5-NPは、H. van Erpの方法[40]により、*o*-アニシジンから合成した。5-クロロ-2-ニトロフェノールは、H. H. Hodgsonらの方法[41]を用い*m*-クロロフェノールより合成した。2-A-5-CP、5-アミノ-2-クロロフェノールは、それぞれ5-クロロ-2-ニトロフェノール、2-C-5-NPからH. H. Hodgsonらの方法[42]を用い合成した。また、4-C-2-HAAは2-A-5-CPから、4-クロロ-3-ヒドロキシアセトアニリドは5-アミノ-2-クロロフェノールから、M. D. Corbettらの方法[38]によりそれぞれ合成した。合成された各化合物は、GC

／MS、検出器に水素炎イオン化検出器（F I D）を用いたガスクロマトグラフィー（G C）および融点測定により、代謝物の同定および定量のための標準物質として使用可能であることを確認した。他の試薬はすべて、和光純薬工業製、関東化学（東京）製または米山薬品工業（大阪）製の特級を用いた。実験に使用した水は、すべてイオン交換水を蒸留したものである。

中毒事故の概要：1984年7月大阪南港において、11名の港湾労働者がp-CNBによる急性中毒をきたした。p-CNBの入った紙袋を網状のモッコに手積みし、揚貨装置を用いて吊上げて船に積荷する際、その紙袋が破れ、作業者の上方からp-CNBが降ってくる事が再三あった。このため、作業者の衣服や皮膚にp-CNBが付着したが、労働者の多くは、そのまま放置し、作業を続けた。作業中または作業終了後、気分が悪くなり、病院を訪れ入院した。11名の入院期間は、短い者で2日、症状の重い者で約1ヶ月であった。この間、メトヘモグロビン血症にもとづく頭重、めまい、動悸、嘔吐、チアノーゼ等が中毒症状として観察された。p-CNBは、事故の状況とその物理化学的性質、すなわち、その昇華性と脂溶性により、主として肺と皮膚の二つの経路より吸収されたものと考えられた。入院期間中の各患者の尿を経時的に採取した。事故後9日間は排尿ごとに、その後は24時間間隔で採尿した。分析までの期間、尿試料10mlに1規定塩酸1mlを加え、-80℃において凍結保存した。

分析試料の調製：11名の中毒患者のうち比較的中毒症状の重かった8名の患者（入院期間5～29日）から中毒事故発生後最初に得られた尿を試料として用いた。また、4名の非曝露者（健常者）から得た尿を対照に使用した。患者尿は遠沈（2000×g、15分）後その上清を以下の2通りに処理した。

酸加水分解 尿3mlに濃塩酸0.3mlを加え、沸騰湯浴上で1時間加熱し、放冷後、2本のスクリー管に1mlずつ分注した。それぞれ、5規定塩酸または5規定水酸化ナトリウム水溶液でpH1およびpH10に調整したのち、ジエチルエーテル1mlを加えて30分間振とう抽出を行い、試料とした（以下各試料をA-pH1およびA-pH10とする）。

非加水分解 尿を2本のスクリー管に1mlずつ分注し、それぞれpH1およびpH10に調整後、エーテル抽出を行い試料を得た（以下各試料をN-pH1およびN-pH10とする）。

対照尿についても同様に処理し、試料を得た。

試料のメチル化が必要な場合は、N-ニトロソメチルウレアから発生させたジアゾメタンで試料の一部をメチル化した。

ガスクロマトグラフ/質量分析計と分析条件：ガスクロマトグラフにはヒューレットパッカード製5710A、質量分析計にはJEOL製JMA-3500型マスタータ分析システムを連結したJEOL製JMS-DX300を用いた。分析カラムには、5%-フェニールメチルシリコンまたはポリエチレングリコールを固定相液体とする化学結合型キャピラリーカラムを用い、Table 1-1-1に示した3種の条件（Condition-1、Condition-

Table 1-1-1. Analytical Conditions for GC/MS.

Analytical Condition	Condition-1	Condition-2	Condition-3
Capillary column	25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu, Kyoto)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked polyethyleneglycol (Shimadzu)
Column oven temperature	Programmed from 80 to 220°C at 4°C/min	Programmed from 110 to 220°C at 4°C/min and kept for 4 min at the initial temperature	Programmed from 80 to 220°C at 16°C/min and kept for 20 min at the final temperature
Injection port temperature	250°C	250°C	250°C
Separator temperature	260°C	260°C	260°C
Ion source temperature	220°C	220°C	220°C

The other conditions were as follows: injection mode into the gas chromatograph, splitless; carrier gas, helium; column pressure, 0.2 kg/cm²; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μ A; accelerating voltage, 3.0 kV; scanning, 1 to 300 a.m.u. for 1 s. The samples were determined by GC/MS under three different analysis conditions (Condition-1, Condition-2 and Condition-3).

2および Condition-3) で各試料を分析した。各試料はガスクロマトグラフ/質量分析計に $2 \mu\text{l}$ ずつ注入した。各代謝物の保持時間およびマススペクトルを、ジエチルエーテルに溶かした標準物質のそれと比較してそれぞれ同定した。

3. 結果

8名の患者のうち最も多量の *p*-CNBを吸収したと推定される患者から得た尿試料 (A-pH 1、A-pH 10、N-pH 1およびN-pH 10) を Condition-1の分析条件を

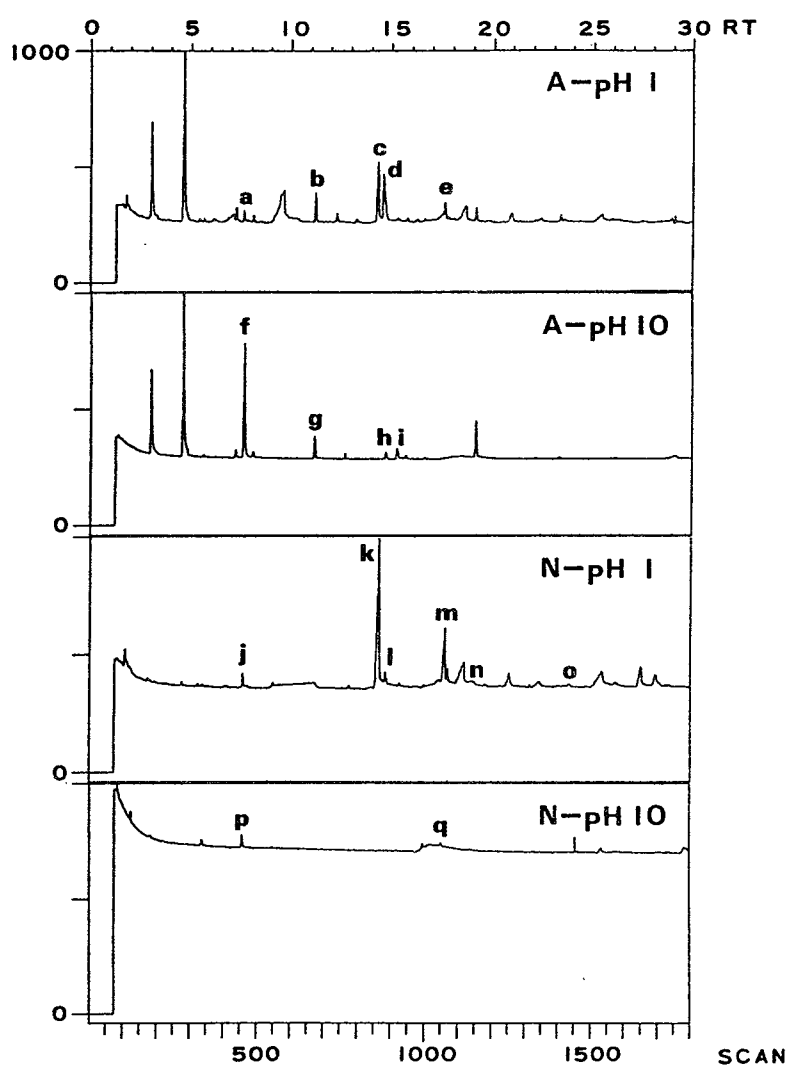


Fig. 1-1-2. Typical Total Ion Chromatograms of Urine Samples of Subjects Acutely Poisoned with *p*-CNB by GC/MS under Condition-1.

用いたGC/MSにより測定した際のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 1-1-2に示した。a~qの各ピークは、対照尿からは検出されなかったため、*p*-CNBの代謝物のピークであると考えられた。A-pH1からは5種（a、b、c、d、e）、A-pH10からは4種（f、g、h、i）、N-pH1からは6種（j、k、l、m、n、o）、N-pH10からは2種（p、q）の代謝物が検出された。同じ条件で測定したときの標準物質のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 1-1-3に示した。このときの各標準物質の保持時間を Table 1-1-2に示した。代謝物a~qの保持時間は、それぞれ以下のごとく各標準物質の保持時間と一致した。代謝物a、f、jおよびpと*p*-CA、bおよ

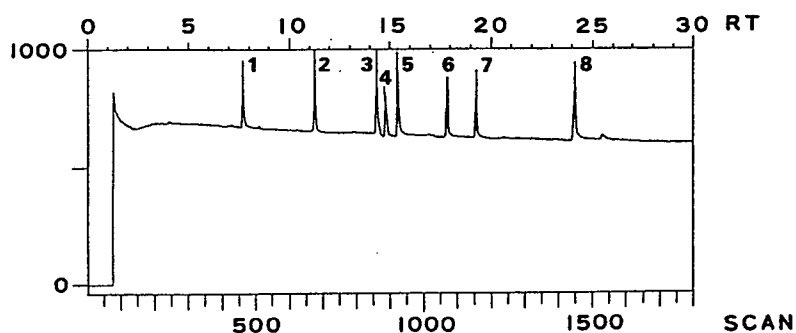
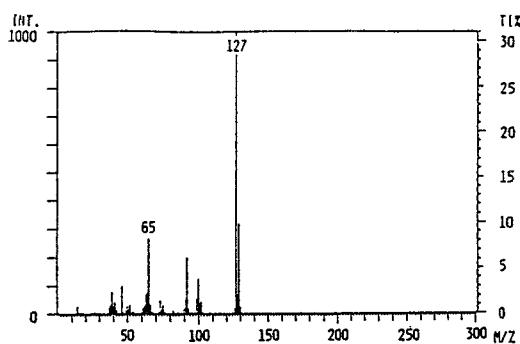


Fig. 1-1-3. Total Ion Chromatogram of Authentic Standards of *p*-CNB Metabolites Determined by GC/MS under Condition-1. Peak 1, *p*-CA (10 $\mu\text{g/ml}$); peak 2, 2,4-DCA (10 $\mu\text{g/ml}$); peak 3, ANPC (104 $\mu\text{g/ml}$); peak 4, 2-C-5-NP (21 $\mu\text{g/ml}$); peak 5, 2-A-5-CP (36 $\mu\text{g/ml}$); peak 6, *p*-CFA (10 $\mu\text{g/ml}$); peak 7, *p*-CAA (10 $\mu\text{g/ml}$); peak 8, 4-C-2-HAA (21 $\mu\text{g/ml}$).

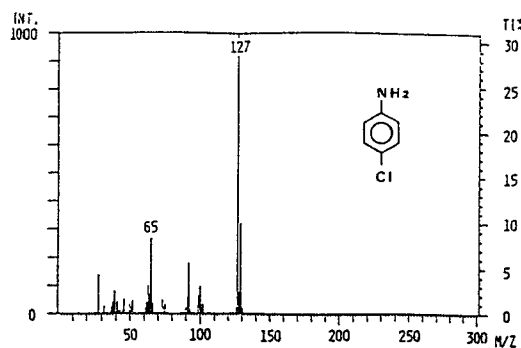
Table 1-1-2. Retention Times (Rt) of Authentic Standards of *p*-CNB Metabolites by GC/MS under Each Type of Analytical Conditions.

Analytical conditions	Rt values (min)		
	Condition-1	Condition-2	Condition-3
<i>p</i> -CA	7.7	4.9	8.7
2,4-DCA	11.2	8.0	9.4
ANPC	14.3	10.9	11.9*
2-C-5-NP	14.6	11.2	18.5
2-A-5-CP	15.3	11.8	9.7*
<i>p</i> -CFA	17.8	14.1	22.2
<i>p</i> -CAA	19.1	15.5	20.9
4-C-2-HAA	24.0	20.5	17.1*

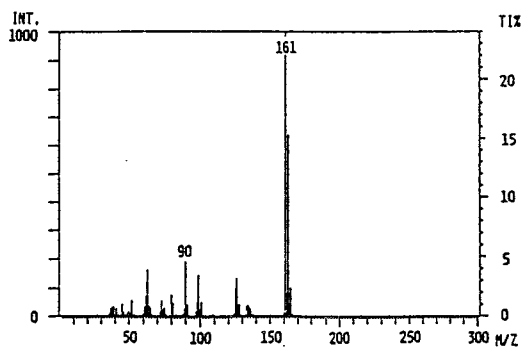
*: Compound was methylated prior to GC/MS analysis.



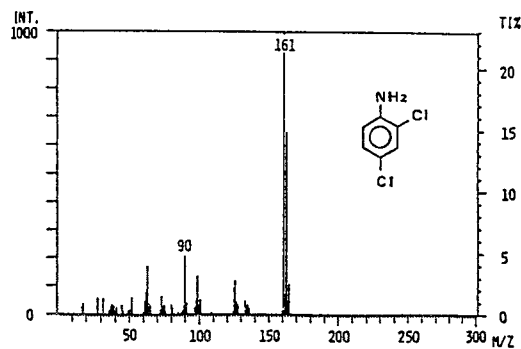
peaks a, f, j and p



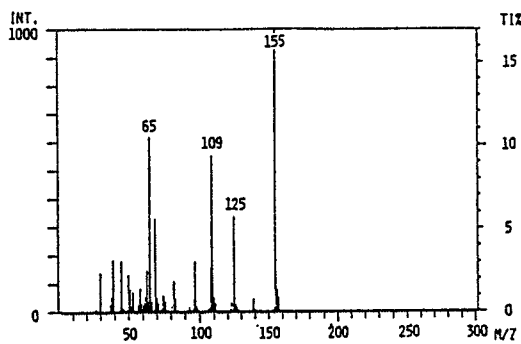
p-CA ([M]: 127)



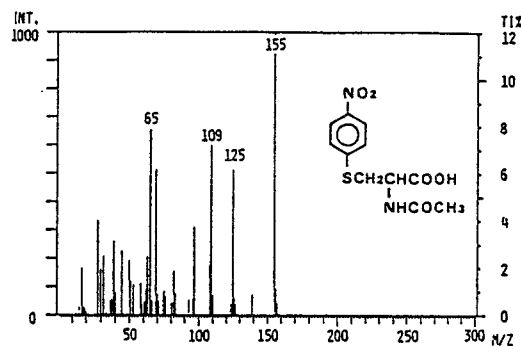
peaks b and g



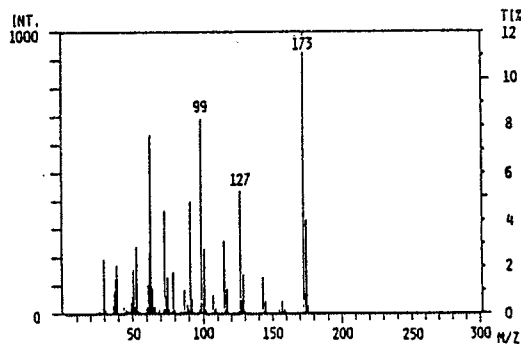
2,4-DCA ([M]: 161)



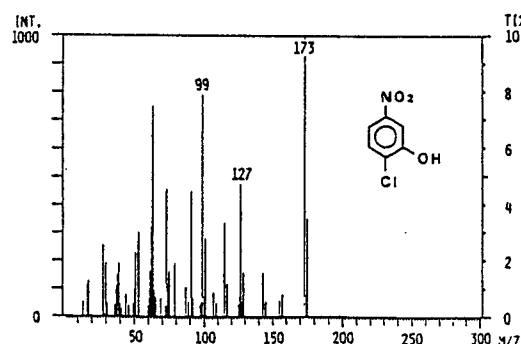
peaks c and k



ANPC ([M]: 284)



peaks d, h and l



2-C-5-NP ([M]: 173)

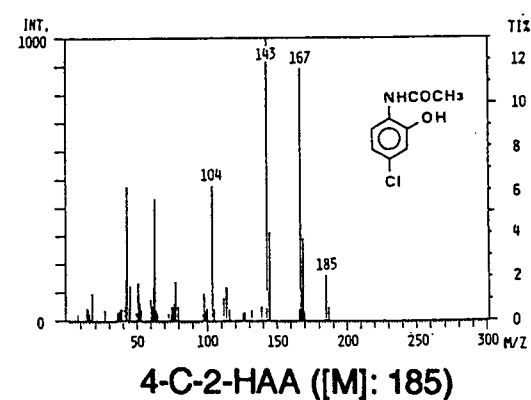
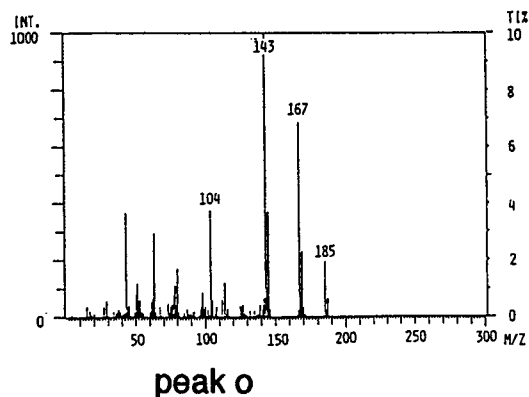
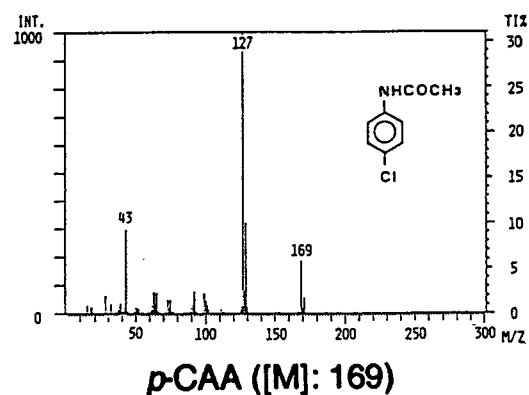
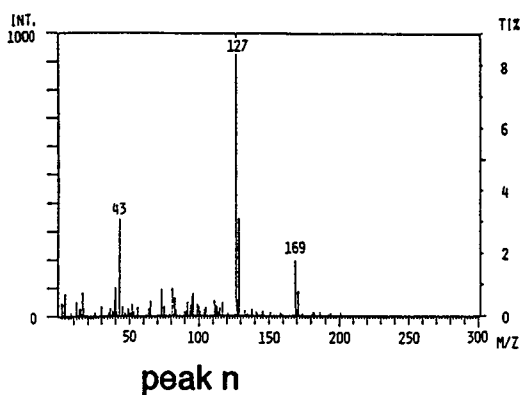
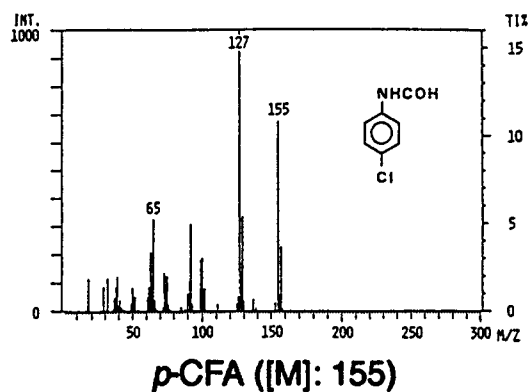
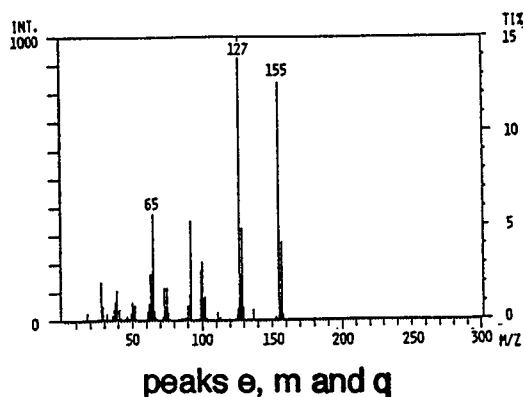
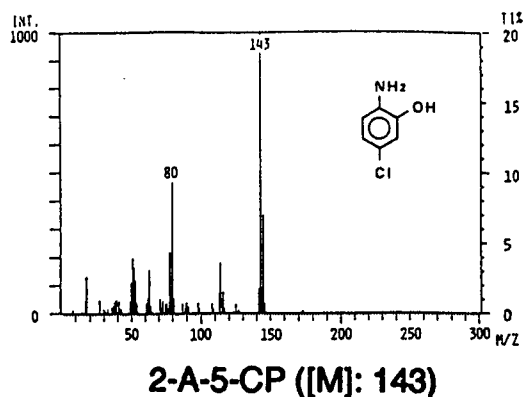
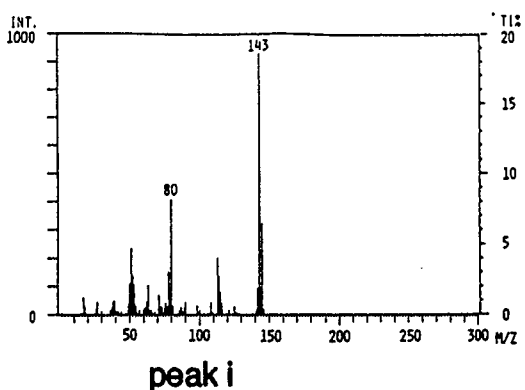


Fig. 1-1-4. Mass Spectra of Metabolites Isolated from Urine of Subjects Poisoned by *p*-CNB (left) and of Standards Exhibiting the Same Retention Times as the Metabolites (right) by GC/MS under Condition-1.

びgと2,4-DCA、cおよびkとANPC、d、hおよびlと2-C-5-NP、iと2-A-5-CP、e、mおよびqとp-CFA、nとp-CAA、oと4-C-2-HAA。各代謝物のマススペクトルを、それぞれ同じ保持時間を示す各標準物質のマススペクトルと比較し、Fig. 1-1-4に示した。各代謝物のマススペクトルは、対応する各標準物質のそれとよく一致した。すなわち、p-CNBによる急性中毒患者の尿をCondition-1の分析条件を用いたGC/MSにより測定した際、8種の標準物質と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す代謝物が検出された。

さらに、Condition-2、Condition-3の分析条件により、尿試料中の代謝物および標準物質を同様に測定し、両者の保持時間とマススペクトルを比較した。各条件により測定された標準物質の保持時間をTable 1-1-2に示した。分析カラムにポリエチレングリコールタイプのカラムを用いた場合（Condition-3）、ANPC、2-A-5-CPおよび4-C-2-HAAは極性が強く、このままではカラムの液相に結合し、検出することができないため、メチル化したのち分析した。Condition-2およびCondition-3の条件により分析した際、上記の8種の標準物質と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す代謝物が同じ患者の尿試料から検出された。

以上の結果から、Fig. 1-1-2中に検出された各代謝物は以下のごとく同定された。

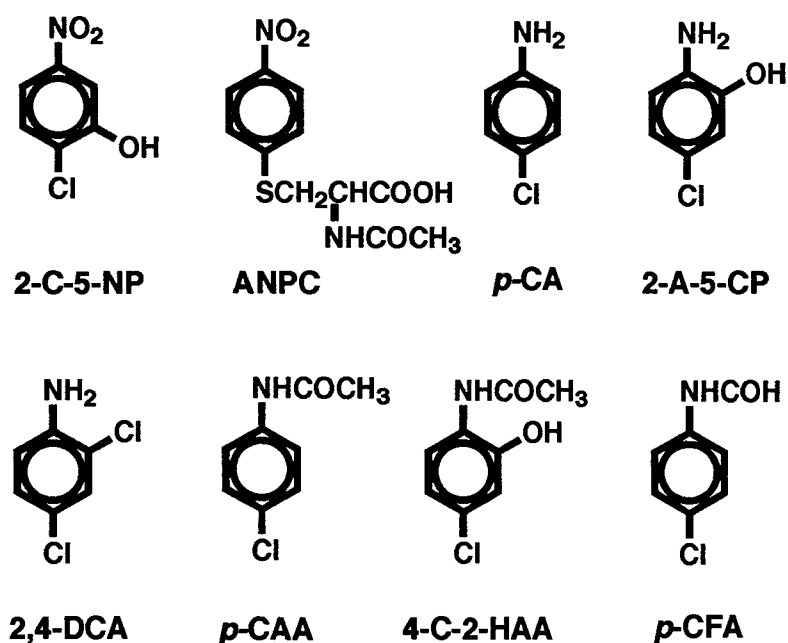


Fig. 1-1-5. p-CNB Metabolites Identified in Urine of Subjects Suffering from Acute Poisoning.

a、f、j および p は *p*-CA、b および g は 2,4-DCA、c および k は ANPC、d、h および l は 2-C-5-NP、i は 2-A-5-CP、e、m および q は *p*-CFA、n は *p*-CAA、o は 4-C-2-HAA。患者の尿中から検出されたこれらの代謝物を Fig. 1-1-5 にまとめて示した。

p-CAA および 4-C-2-HAA は、他の 7 名の中毒患者の尿試料からは検出されなかった。これら 2 物質を除く残りの 6 種の代謝物は、8 名の患者全員の尿中から検出された。

一方、標準物質 *p*-CNB、*p*-アミノチオフェノール、*p*-クロロチオフェノール、5-クロロ-2-ニトロフェノール、*p*-アミノフェノール、*p*-ヒドロキシアセトアニリド、5-アミノ-2-クロロフェノール、4-クロロ-3-ヒドロキシアセトアニリド、N-(4-クロロフェニール)アセトヒドロキサム酸および N-(4-クロロフェニール)グリコールヒドロキサム酸と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す物質はどの尿試料からも検出されなかった。

4. 考察

曝露物質 *p*-CNB は患者の尿中から検出されなかったため、吸収された *p*-CNB は、尿中へはすべて代謝されたのち排泄されると考えられた。

p-CA、2-C-5-NP および 2-A-5-CP は、加水分解試料中から多く検出されたため、これらの代謝物は主に抱合体として尿中に排泄されると考えられた。芳香環の水酸化は、一般的に、芳香族塩素化合物では塩素基のオルト位またはパラ位に、また、芳香族ニトロ化合物ではニトロ基のメタ位に起こる。2-C-5-NP は検出されたが、5-クロロ-2-ニトロフェノールは検出されなかった。また、5-アミノ-2-クロロフェノールは検出されなかった。したがって、*p*-CNB のニトロ基のオルト位や *p*-CA のアミノ基のメタ位の水酸化反応、2-C-5-NP のニトロ基の還元反応は、ヒトではほとんど起こらないと考えられた。

N-アセチル抱合体は、イヌやキツネを除く哺乳動物における芳香族アミノ化合物の尿中代謝物としてよく知られている[43-46]。本節において、*p*-CA と 2-A-5-CP の N-アセチル抱合体、すなわち、*p*-CAA と 4-C-2-HAA が、8 名の中毒患者のうち最も多量の *p*-CNB を吸収したと推定される 1 名からのみ、しかも極微量検出されたに過ぎ

なかった。したがって、*p*-CNBの代謝により生じた*p*-CAや2-A-5-CPのような芳香族塩素化アミノ化合物のN-アセチル化反応は、ヒトでは比較的弱いと推察された。

4-クロロ-3-ヒドロキシアセトアニリドおよび4-ヒドロキシアセトアニリドは、ラットの肝臓ミクロゾーム酵素による*p*-CAAの代謝により生じることが報告されている[47]。また、Corbettら[38]は、酵母により*p*-CNBが*p*-アミノフェノールと4-ヒドロキシアセトアニリドに代謝されることを報告している。しかし、本節において、これら3種の代謝物は、*p*-CNBによる急性中毒患者の尿中から検出されなかった。また、*p*-CAAは、*p*-CNBから極微量しか生成されなかった。したがって、*p*-CAおよび*p*-CAAにおける塩素基の水酸基による置換反応や*p*-CAAのアセトアミノ基のメタ位における水酸化反応は、ヒトにおける*p*-CNBの代謝経路として重要ではないと考えられた。

芳香族ニトロソ化合物は、ある種の微生物あるいはラットの肝臓ホモジネート中の、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、トランスケトラーゼにより、それぞれアセチル-ヒドロキサム酸類、グリコリール-ヒドロキサム酸類に代謝されることがCorbettらにより実証された[48-51]。しかし、*p*-CNBの還元により生じる*p*-クロロニトロソベンゼンから生成されると推定されるこれらの化合物、すなわちN-(4-クロロフェニール)アセトヒドロキサム酸およびN-(4-クロロフェニール)グリコールヒドロキサム酸は、患者の尿中からは検出されなかった。

メルカプツール酸は、芳香族ハロゲン化炭化水素や芳香族ニトロ化合物に曝露されたラット、ウサギ、イヌ、ヒトなどの哺乳動物の尿中に排泄されることがよく知られている[37, 45, 52-54]。Brayら[37]は、メルカプツール酸の一種であるANPCを、*p*-CNBを投与したウサギの尿中から検出している。本節においても、8名の中毒患者全員の尿からANPCが、試料N-pH1のトータルイオンクロマトグラム上で大きなピークとして検出された。したがって、吸収された*p*-CNBのかなりの量は、*p*-CNBの塩素基の置換を伴うグルタチオン抱合を受け、その後メルカプツール酸となり尿中へ排泄されるものと考えられた。

Bettsら[55, 56]は、クロロニトロベンゼン類のニトロ基とグルタチオンとの置換反応によりメルカプツール酸が生成されることを報告している。彼らは、2, 3, 6-トリクロロニトロベンゼン、2, 4, 6-トリクロロニトロベンゼン、2, 3, 4, 6-テトラクロロニトロベンゼンおよびペンタクロロニトロベンゼンを投与したウサギの尿中より、それぞれ

N-アセチル-S-(2,3,6-トリクロロフェニール)-L-システイン、N-アセチル-S-(2,4,6-トリクロロフェニール)-L-システイン、N-アセチル-S-(2,3,4,6-テトラクロロフェニール)-L-システインおよびN-アセチル-S-(ペンタクロロフェニール)-L-システインを検出している。p-CNB急性中毒患者の尿中から検出されたANPCは、そのマススペクトルにおいて分子イオンピーク(M/Z 284)は検出されず(Fig. 1-1-4)、p-ニトロチオフェノールと同じマススペクトルおよび同じ保持時間を示した。したがって、ANPCは、分析時ガスクロマトグラフの試料注入口で熱分解され、p-ニトロチオフェノールを生じるものと考えられた。同様に、N-アセチル-S-(4-クロロフェニール)-L-システインおよびN-アセチル-S-(4-アミノフェニール)-L-システインの排泄を想定し、これらの熱分解により生じると推定されるp-クロロチオフェノールおよびp-アミノチオフェノールの同定を試みた。しかし、患者の尿中からはいずれの物質も検出されなかった。したがって、p-CNBのニトロ基とグルタチオンとの置換によるメルカプツール酸の生成、p-CNBの代謝により生じたp-CAからのメルカプツール酸の生成、およびANPCのニトロ基の還元は、いずれもヒトではほとんど起こらないと考えられた。

患者の尿中より検出されたp-CFAおよび2,4-DCAは、それぞれ、p-CAのN-ホルミル抱合体、p-CAの芳香環の塩素置換体とみなすことができる。しかし、これらの代謝物は、過去のウサギ[37]、単離したラットの肝細胞[33]および酵母[38]におけるp-CNBの代謝物として検出されていない。化合物のホルミル抱合や塩素化反応は、ヒトにおける一般的な代謝経路としてあまり知られていない。これら2物質が真の代謝物か否かを、次節以降で検討した。

第2節 *p*-クロロアニリン急性中毒患者における尿中代謝物の同定

1. 緒言

p-クロロアニリン (*p*-CA) は、融点72.5℃、沸点232℃の常温、常圧で無色の柱状結晶であり、熱水およびほとんどの有機溶剤に可溶の化合物である[57]。*p*-CAは、主に染料や農薬の中間体として使用されている。体内に吸収されると*p*-CNBと同様にその急性毒性作用の一つとしてメトヘモグロビン血症を引き起こすことが知られており[58-61]、過去にいくつかの急性中毒事例が報告されている[62, 63]。*p*-CAのLD₅₀値は、ラット経口投与で368 mg/kg [64]、腹腔内投与では420 mg/kg [65]であり、マウスおよびラットを用いた実験では発癌性を有することも実証されている[66]。*p*-CAは多くの農薬 (monolinuron、monuron、buturon 等) の分解産物として生じるため、土中、植物および土壌菌等の微生物中での変化に関する研究は多い[67-74]。一方、哺乳動物における*p*-CAの代謝に関する報告は少なく、ウサギやイヌを用いた実験が若干あるにすぎない[58, 75, 76]。また、ヒトにおける代謝に関する報告は見あたらない。*p*-CAは、*p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) のニトロ基の還元体であり、第1節において*p*-CNBの代謝物の一種として*p*-CNBによる急性中毒患者の尿中より検出された物質である。

本節では、*p*-CNBの体内動態に関する研究の一環として、*p*-CAに曝露された急性中毒患者から得た尿を用い、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) によりヒトにおける*p*-CAの尿中代謝物の同定を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物: *p*-CA、*p*-CNB、2,4-ジクロロアニリン (2,4-DCA)、*p*-アミノチオフェノール、*p*-クロロアセトアニリド (*p*-CAA)、*p*-クロロチオフェノール、*N*-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン (ANPC)、*N*-ニトロソメチル

ウレア、*p*-クロロホルムアニリド (*p*-CFA)、2-クロロ-5-ニトロフェノール (2-C-5-NP)、5-クロロ-2-ニトロフェノール、2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP) および4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド (4-C-2-HAA) は、第1節で用いたものを使用した。

中毒事故の概要：1989年6月、合成化学工場に現場のアルバイトとして勤務する23歳の男性が *p*-CAによる急性中毒をきたした。患者は、*p*-CAの秤量作業中に、秤量用の分銅を *p*-CAの入った袋の中に落したため、*p*-CAの結晶をシートに広げ、その分銅を探す作業を行った。当日の作業終了後気分が悪くなり、病院へ入院した。患者の入院期間中4日間にわたり排尿ごとにその尿の一部を褐色びんに採取した。得た尿は-20℃に

Table 1-2-1. Analytical Conditions for GC/MS.

Analytical Condition	Condition-1	Condition-2	Condition-3
Capillary column	15 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked polyethyleneglycol (Shimadzu)
Column oven temperature	Programmed from 110 to 220°C at 8°C/min and kept for 8 min at the initial temperature and kept for 10 min at the final temperature	Programmed from 90 to 220°C at 4°C/min	Programmed from 90 to 220°C at 10°C/min and kept for 20 min at the final temperature
Injection port temperature	250°C	250°C	250°C
Separator temperature	260°C	260°C	260°C
Ion source temperature	200°C	200°C	200°C

The other conditions were as follows: injection mode into the gas chromatograph, splitless; carrier gas, helium; column pressure, 0.1 kg/cm²; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μ A; accelerating voltage, 3.0 kV; scanning, 1 to 300 a.m.u. for 1 s. The samples were determined by GC/MS under three different analysis conditions (Condition-1, Condition-2 and Condition-3).

において凍結保存した。

分析試料の調製：*p*-CAによる急性中毒患者から、事故発生後最初に得られた尿を試料として用いた。また、3名の非曝露者（健常者）から得た尿を対照として用いた。患者の尿を第1節と同様に処理し、4種の分析試料（A-pH1、A-pH10、N-pH1およびN-pH10）を得た。対照尿についても同様に処理し、試料を得た。試料のメチル化が必要な場合は、N-ニトロソメチルウレアから発生させたジアゾメタンで試料の一部をメチル化したのち分析した。

ガスクロマトグラフ／質量分析計と分析条件：第1節と同じ装置を用い、Table 1-2-1に示した3種の条件（Condition-1、Condition-2およびCondition-3）で各試料を分析した。各尿中代謝物の同定は、第1節と同様に、ジエチルエーテルに溶かした各標準物質の保持時間およびマススペクトルと比較して行なった。

3. 結果

p-CA急性中毒患者尿から調製された4種の試料を、Condition-1の分析条件を用いたGC/MSにより測定した際得られたトータルイオンクロマトグラムをFig. 1-2-1に示した。a～kの各ピークは、対照尿からは検出されなかったため、*p*-CAの代謝物のピークであると考えられた。A-pH1からは3種（a、b、c）、A-pH10からは3種（d、e、f）、N-pH1からは4種（g、h、i、j）、N-pH10からは1種（k）の代謝物が検出された。同じ条件で測定したときの標準物質のトータルイオンクロマトグラムをFig. 1-2-2に示した。代謝物a～kの保持時間およびマススペクトルは、それぞれ以下のごとく各標準物質の保持時間およびマススペクトルと一致した。代謝物a、d、gおよびkと*p*-CA、bおよびeと2,4-DCA、fと2-A-5-CP、cおよびhと*p*-CFA、iと*p*-CAA、jと4-C-2-HAA。すなわち、*p*-CAによる急性中毒患者の尿をCondition-1の分析条件を用いたGC/MSにより測定した際、6種の標準物質と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す代謝物が検出された。

さらに、Condition-2、Condition-3の分析条件により、尿試料中の代謝物および標準物質を同様に測定した際、上記の6種の標準物質と同じ保持時間および同じマススペク

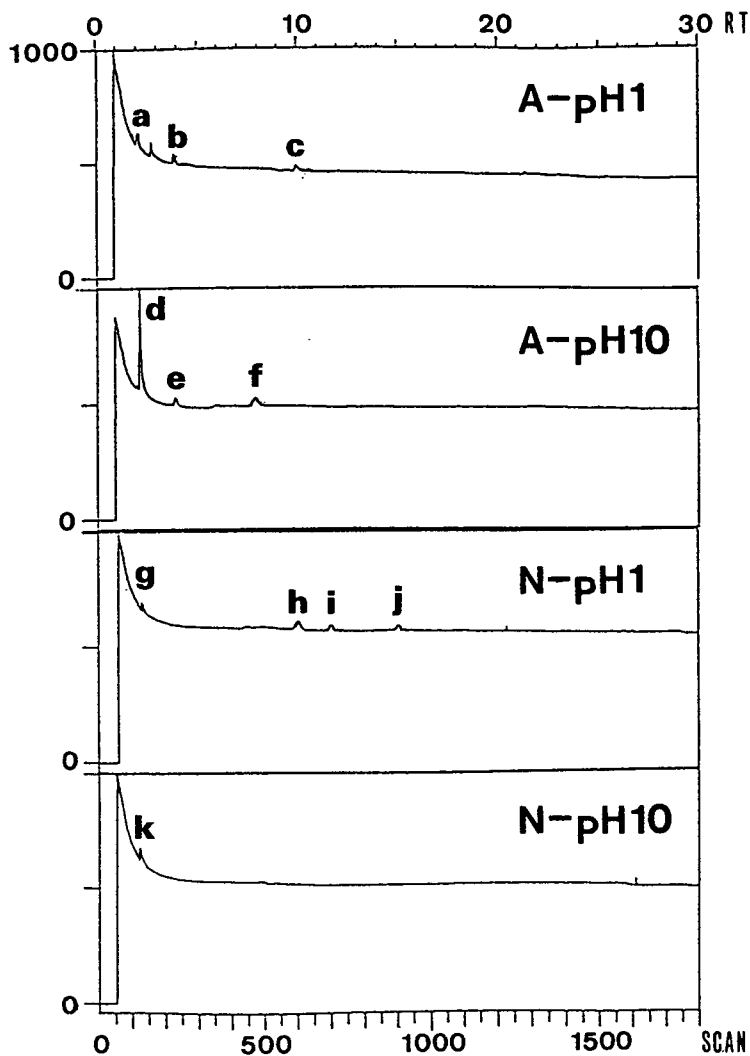


Fig. 1-2-1. Total Ion Chromatograms of Urine Samples of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CA by GC/MS under Condition-1.

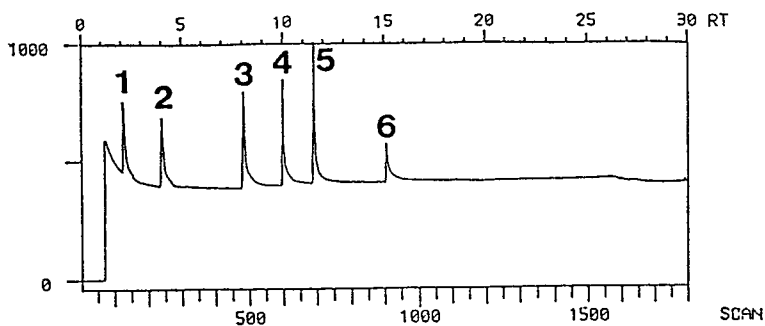


Fig. 1-2-2. Total Ion Chromatogram of Authentic Standards of *p*-CA Metabolites Determined by GC/MS under Condition-1.

Peak 1, *p*-CA (33 $\mu\text{g/ml}$); peak 2, 2,4-DCA (33 $\mu\text{g/ml}$); peak 3, 2-A-5-CP (129 $\mu\text{g/ml}$); peak 4, *p*-CFA (33 $\mu\text{g/ml}$); peak 5, *p*-CAA (33 $\mu\text{g/ml}$); peak 6, 4-C-2-HAA (23 $\mu\text{g/ml}$).

Table 1-2-2. Identification of Urinary *p*-CA Metabolites (a-k) Shown in Fig. 1-2-1.

Urine samples	A-pH1	A-pH10	N-pH1	N-pH10
<i>p</i> -CA	a	d	g	k
2,4-DCA	b	e	—	—
2-A-5-CP	—	f	—	—
<i>p</i> -CFA	c	—	h	—
<i>p</i> -CAA	—	—	i	—
4-C-2-HAA	—	—	j	—

a-k: metabolite peak in Fig. 1-2-1.
—: not detected.

トルを示す代謝物が各尿試料から検出された。

以上の結果から、Fig. 1-2-1中に検出された各代謝物をTable 1-2-2のごとく同定した。同定された6種の代謝物はいずれも第1節において*p*-CNB急性中毒患者の尿中から検出されたものであった（Fig. 1-1-5）。

一方、標準物質*p*-CNB、2-C-5-NP、ANPC、*p*-アミノチオフェノール、*p*-クロロチオフェノールおよび5-クロロ-2-ニトロフェノールと同じ保持時間および同じマススペクトルを示す物質はどの尿試料からも検出されなかった。

4. 考察

p-CAは、すべての試料から検出されたが、尿を加水分解した試料A-pH10から多く検出されたため、*p*-CAの大部分は何らかの抱合を受けて尿中に排泄されていると考えられた。加水分解試料から検出された2-A-5-CPは、*p*-CAの芳香環の水酸化体である。この酸化反応は体内での芳香族化合物の一般的な代謝経路として報告されており[45]、ウサギにおける*p*-CAの尿中代謝物としても同物質が報告されている[58]。2-A-5-CPは非加水分解試料からは検出されなかったため、大部分は抱合体として尿中に排泄されていると考えられた。

芳香族アミノ化合物は、ヒトを含む哺乳動物において、肝臓ミクロゾーム分画の薬物代謝酵素系によりヒドロキシアミノ化合物に酸化され、さらにニトロソ化合物に変化することが知られている[14, 77, 78]。イヌに静注された*p*-CAは、*p*-クロロニトロソベンゼン

に代謝されることが報告されている[75]。しかし、中毒患者の尿中からは *p*-CA の N-酸化体である *p*-CNB は検出されなかった。また、第 1 節において *p*-CNB の尿中代謝物として検出された 2-C-5-NP や ANPC のようなニトロ化合物も検出されなかった。一方、*p*-CA は体内でメトヘモグロビンを形成し、その形成には代謝物である *p*-クロロフェニールヒドロキシルアミンが関与していると考えられている[11]。したがって、体内で *p*-CA の N-酸化反応により生じたヒドロキシルアミノ体、ニトロソ体がさらにニトロ体へ酸化される反応は、ヒトでは弱いもしくは欠如していると推定された。したがって、第 1 節において *p*-CNB による急性中毒の際に検出されたアミノ化合物はすべて、*p*-CNB の還元により生じた *p*-CA がさらに代謝されて生成したものと示唆された。すなわち、*p*-CNB による急性中毒の際に検出された 2-A-5-CP は、*p*-CNB から 5-クロロ-2-ニトロフェノールを経て生じたものではなく、*p*-CA を経て生成されたものと推察された。また、同様に、*p*-CNB による中毒患者の尿中から検出された *p*-CFA および 2,4-DCA も、*p*-CNB の代謝により生じた *p*-CA からさらに代謝され生成したものと示唆された。

芳香族アミノ化合物の N-アセチル抱合は、イヌやキツネを除く哺乳動物において報告されている[43-46]。*p*-CA による中毒患者の尿中から *p*-CAA と 4-C-2-HAA の 2 種の N-アセチル化合物が非加水分解試料から検出されたが、いずれも痕跡量であり、ヒトにおける *p*-CA や 2-A-5-CP に対する N-アセチル抱合能は、他の哺乳動物に比べ低いと考えられた。

芳香族ハロゲン化炭化水素や芳香族ニトロ化合物を投与したラット、ウサギ、イヌ、ヒト等の哺乳動物の尿中にメルカプツール酸が排泄されることが知られている[37, 45, 52-54]。第 1 節において *p*-CNB による急性中毒患者の尿中からメルカプツール酸の一種である ANPC が検出されたが、この代謝物は、GC/MS による分析時ガスクロマトグラフの試料注入口で熱分解され、*p*-ニトロチオフェノールとして確認された。しかし、*p*-CA による中毒患者の尿中からは、*p*-ニトロチオフェノール、すなわち ANPC は検出されなかった。さらに、*p*-CA のアミノ基とグルタチオンとの置換反応により生じる N-アセチル-S-(4-クロロフェニール)-L-システインおよび *p*-CA の塩素基とグルタチオンとの置換反応により生じる N-アセチル-S-(4-アミノフェニール)-L-システインの尿中への排泄を想定し、同様にこれらの熱分解により生じると推定される *p*-クロロチオフェノールおよび *p*-アミノチオフェノールの同定を試みた。しかし、患者の尿中から

はいずれの物質も検出されなかった。したがって、ヒトでは *p*-CA からメルカプツール酸は形成されないか、または形成されにくいと考えられた。

第3節 2, 4-ジクロロアニリン、*p*-クロロホルムアニリドの尿中への排泄

1. 緒言

体内に吸収された薬物等の化学物質は、通常2段階の反応により代謝される。初めの第1段階では極性の高い官能基が分子内に導入される。さらに、第2段階の反応において、この極性化された化合物が生体内の基質と結合し、水溶性の抱合体となり、体外へ排泄される。第1段階の反応としては、酸化、還元および加水分解、第2段階の反応としては、グルクロン酸、硫酸、リン酸、グルタチオンおよび各種アミノ酸等による抱合、アセチル化およびメチル化等が知られている[46, 77, 79, 80]。

第1節および第2節において、それぞれ*p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB)、*p*-クロロアニリン (*p*-CA) による急性中毒患者における尿中代謝物をガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) により同定した。これらの患者の尿中から検出された代謝物のうち、2, 4-ジクロロアニリン (2, 4-DCA) および *p*-クロロホルムアニリド (*p*-CFA) は、それぞれ *p*-CA の芳香環の塩素置換体および *p*-CA のホルミル抱合体と見なすことができる。しかし、ヒトを含む哺乳動物において、生体内での塩素化反応やホルミル抱合は、薬物等化学物質の一般的な代謝経路としてほとんど報告されていない。

本節では、これら2物質が、体内での *p*-CA の代謝により生じたものなのか、尿試料の保存中やGC/MSによる同定の際の前処理の段階で生じたものなのかを検討した。

2. 材料および実験方法

化合物：2, 4-ジクロロニトロベンゼンは東京化成工業から、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用メタノールは Merck からそれぞれ購入した。*p*-CA、2, 4-DCA、*p*-CFA および 2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP) は、第1節で用いたものを使用した。

尿試料：p-CAによる急性中毒患者から、事故発生後最初に得られた尿を試料として用いた。また、3名の非曝露者（健常者）から得た尿を対照として用いた。

2,4-DCAおよびp-CFAの確認：中毒患者の尿中の2,4-DCAおよびp-CFAの確認は、GC/MSおよびHPLCにより行なった。

A. GC/MS

1) 試料の調製：患者の尿および対照尿を遠沈（2000×g、15分）後、その上清を2通り（①、②）に処理した。また、他のp-CA尿中代謝物が尿の保存中に2,4-DCA、p-CFAに変化するか否かを調べるため、p-CAの主要な尿中代謝物であるp-CAおよび2-A-5-CPを添加し分析までの期間凍結保存した対照尿を③のごとく処理した。

①非加水分解：尿1mlを5規定塩酸でpH1に調整後、エーテル1mlを加え30分間振とう抽出を行い試料を得た（N-pH1）。また、尿をpH調整せず（約pH6）に、そのままエーテルで抽出したもの（N）、0.2M-リン酸緩衝液1mlを加えてpH2に調整後エーテル1mlで抽出したもの（N-pH2）も試料とした。

②酸加水分解：尿1mlに10規定硫酸0.1mlを加え沸騰湯浴上で1時間加熱した後、5規定水酸化ナトリウム水溶液でpH1に調整後、エーテル1mlで同様に抽出し、試料を得た（H₂SO₄-pH1）。また、硫酸の代わりに10規定硝酸および10規定塩酸を用いて加水分解したものも試料とした（HNO₃-pH1、HCl-pH1）。

③p-CA、2-A-5-CPの対照尿への添加：対照尿にp-CAを加えて1mg/mlに調製し一昼夜室温に放置したのち、-20℃において分析までの期間凍結保存した。分析時解凍し、尿1mlに濃塩酸0.1mlを加え沸騰湯浴上で1時間加熱した。同様にpH1またはpH10に調整後エーテル抽出を行い試料を得た（CA-A-pH1、CA-A-pH10）。加水分解しないものについても同様に処理し、試料を得た（CA-N-pH1、CA-N-pH10）。また、p-CAの代わりに2-A-5-CPを対照尿に添加して1mg/mlに調製したものについても同様に処理し、試料を得た（ACP-A-pH1、ACP-A-pH10、ACP-N-pH1、ACP-N-pH10）。

2) 分析条件：第1節と同じ装置を用い、Table 1-3-1に示した3種の条件（Condition-1、Condition-2およびCondition-3）で各試料を分析した。2,4-DCA

Table 1-3-1. Analytical Conditions for GC/MS.

Analytical Condition	Condition-1	Condition-2	Condition-3
Capillary column	15 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu)		
Column oven temperature	Programmed from 110 to 220°C at 8°C/min and kept for 8 min at the initial temperature and kept for 10 min at the final temperature	Programmed from 110 to 190°C at 8°C/min and kept for 8 min at the initial temperature and kept for 10 min at the final temperature	Programmed from 110 to 140°C at 8°C/min and kept for 8 min at the initial temperature and kept for 10 min at the final temperature
Injection port temperature	250°C	200°C	150°C
Separator temperature	260°C	210°C	160°C
Ion source temperature	200°C	180°C	160°C

The other conditions were as follows: injection mode into the gas chromatograph, splitless; carrier gas, helium; column pressure, 0.1 kg/cm²; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μ A; accelerating voltage, 3.0 kV; scanning, 1 to 300 a.m.u. for 1 s. The samples were determined by GC/MS under three different analysis conditions (Condition-1, Condition-2 and Condition-3).

および *p*-CFA の検出は、第 1 節と同様に、ジエチルエーテルに溶かした各標準物質の保持時間およびマススペクトルと比較して行なった。

B. HPLC

1) 試料の調製：患者の尿および対照尿を以下の 2 通り (①、②) に処理した。

①酸加水分解：尿 1 ml と 10 規定塩酸 0.1 ml をスクリー管に加え、沸騰湯浴上で 1 時間加熱した。放冷後、5 規定水酸化ナトリウム水溶液 0.2 ml を加え中和した。遠沈 (2000 × *g*、15 分) 後、上清をアドバンテック PTFE タイプディスポーザブルシリンジフィルター (DISMIC-13jp、孔径 0.50 μ m、東洋濾紙、東京) によりろ過し、試料とした。

②非加水分解：尿 1 ml を無処理のまま同様にろ過し、試料とした。

2) 分析条件：装置は、日立製作所 (東京) 製 L-6200 型インテリジェントポンプ、L-4000 型 UV ディテクター、D-2500 型クロマトインテグレーターを連結して使用した。カラムにはリクロカート LiChrospher 100 RP-8 (250 mm × 4 mm I. D., 粒

子径10 μm) (以下RP-8と略) とガードカラム LiChrospher RP-18 (4 mm \times 4 mm I. D., 粒子径5 μm) を連結したリクロカート LiChrospher 100 RP-18(e) (125 mm \times 4 mm I. D., 粒子径5 μm) (以下RP-18と略) の2種を用いた (いずれも Merck 製)。分析条件を以下に示す。測定温度: 室温、検出波長: 240 nm、流速: 1 ml/min、移動相: (*p*-CFAの確認) カラムにRP-18を用いた場合は30%メタノール溶液、RP-8を用いた場合は20%メタノール溶液を使用した。(2,4-DCAの確認) いずれのカラムを用いた場合も40%メタノール溶液を使用した。注入量: 20 μl 。各物質の確認は、その保持時間を標準物質のそれと比較して行なった。

3. 結果

A. GC/MS

おのこの条件により分析した際、各試料からの2,4-DCAおよび*p*-CFAの検出の有無をそれぞれ Table 1-3-2、1-3-3に示した。各試料から検出された2,4-DCA、*p*-CFAの保持時間は、いずれの測定条件 (Condition-1、Condition-2およびCondition-3) においてもそれぞれ4.0~4.1分、10.0~10.1分であった。

1) 2,4-DCA

中毒患者尿の酸加水分解試料 (HCl-pH1、H₂SO₄-pH1およびHNO₃-pH1) のいずれからも2,4-DCAが検出された。N-pH1、N-pH2およびNからも2,4-DCAが検出されたが、酸加水分解試料に比べ少量であった。また、ガスクロマトグラフの試料注入口の温度を下げて分析しても2,4-DCAのピークの大きさはほとんど変わらなかった (Condition-2およびCondition-3)。同様に処理した対照尿試料からは2,4-DCAは全く検出されなかった。さらに、2,4-DCAは、CA-A-pH1、CA-A-pH10、CA-N-pH1、CA-N-pH10、ACP-A-pH1、ACP-A-pH10、ACP-N-pH1、ACP-N-pH10のいずれからも検出されなかった。また、エーテルに*p*-CAを溶かした標準溶液からも2,4-DCAおよびその酸化体である2,4-ジクロロニトロベンゼンは検出されなかった。

Table 1-3-2. Detection of 2,4-DCA from Each Sample by GC/MS under Three Different Analytical Conditions.

Sample	Condition-1	Condition-2	Condition-3
N-pH1	Δ	Δ	Δ
N-pH2	Δ	Δ	Δ
N	Δ	Δ	Δ
H ₂ SO ₄ -pH1	○	○	○
HNO ₃ -pH1	○	○	○
HCl-pH1	○	○	○
CA-A-pH1	x	x	x
CA-A-pH10	x	x	x
CA-N-pH1	x	x	x
CA-N-pH10	x	x	x
ACP-A-pH1	x	x	x
ACP-A-pH10	x	x	x
ACP-N-pH1	x	x	x
ACP-N-pH10	x	x	x

○ : detected, Δ : trace, x : not detected.

Table 1-3-3. Detection of *p*-CFA from Each Sample by GC/MS under Three Different Analytical Conditions.

Sample	Condition-1	Condition-2	Condition-3
N-pH1	○	Δ	x
N-pH2	○	Δ	x
N	x	x	x
H ₂ SO ₄ -pH1	○	Δ	x
HNO ₃ -pH1	○	x	x
HCl-pH1	○	Δ	x
CA-A-pH1	Δ	Δ	Δ
CA-A-pH10	x	x	x
CA-N-pH1	Δ	Δ	Δ
CA-N-pH10	x	x	x
ACP-A-pH1	x	x	x
ACP-A-pH10	x	x	x
ACP-N-pH1	x	x	x
ACP-N-pH10	x	x	x

○ : detected, Δ : trace, x : not detected.

2) *p*-CFA

Condition-1の条件により分析した際、*p*-CFAは、Nからは検出されなかったが、N-pH1およびN-pH2からは検出された。また、*p*-CFAは、酸加水分解試料、すなわちHC1-pH1、H₂SO₄-pH1およびHNO₃-pH1からも検出されたが、非加水分解試料から検出された量に比べ少なかった。ガスクロマトグラフの試料注入口温度を下げ、200℃にする（Condition-2）と、Condition-1の条件で分析した際検出された*p*-CFAはいずれの試料においても微量しか検出されず、さらに、150℃に下げる（Condition-3）と確認されなかった。同様に処理した対照尿試料からは、*p*-CFAは全く検出されなかった。CA-A-pH1およびCA-N-pH1から*p*-CFAが極微量検出された。しかし、これらの試料から検出された*p*-CFAの量は患者尿の場合とは異なり、試料注入口温度を下げてピークの大きさは変化しなかった。対照尿に2-A-5-CPを添加した試料およびエーテルに*p*-CAを溶かした標準溶液からは、*p*-CFAは検出されなかった。*p*-CFAをエーテルに溶かした標準溶液では、いずれの試料注入口温度においてもほぼ同じ大きさのピークが検出された。

B. HPLC

1) 2,4-DCA

カラムにRP-18を用いた際の2,4-DCA標準溶液、患者尿および対照尿試料のクロマトグラムをFig. 1-3-1に示した。2,4-DCAの保持時間は、27.2分であった。患者尿の加水分解試料から2,4-DCAと同じ保持時間を示すピークが検出されたが、患者尿の非加水分解試料および対照尿からは2,4-DCAは検出されなかった。さらに、RP-8をカラムに用いた場合、2,4-DCAの保持時間は、21.4分と少し早くなったが、RP-18を用いた場合と同様の結果が得られた。

2) *p*-CFA

Fig. 1-3-2に*p*-CFA標準溶液、患者尿および対照尿試料を、RP-18をカラムに用いて分析した際のクロマトグラムを示した。*p*-CFAの保持時間は17.6分であった。対照尿からは*p*-CFAは検出されず、患者尿からも*p*-CFAと同じ保持時間を示すピークは検出されなかった。同様に、カラムにRP-8を用いても、患者の尿から*p*-CFA（保持時間：33.5分）は検出されなかった。

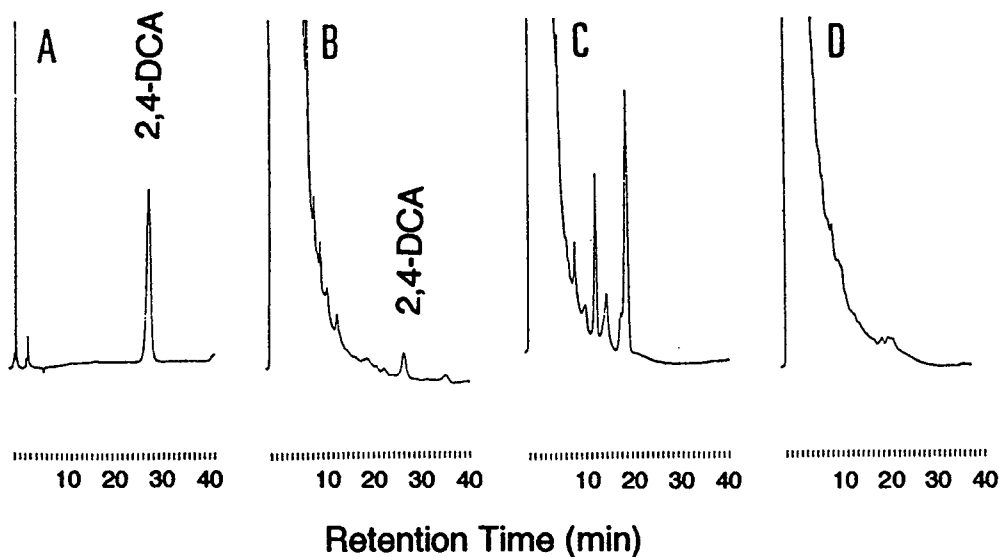


Fig. 1-3-1. HPLC Chromatograms of Standard Solution of 2,4-DCA (3.0 $\mu\text{g/ml}$) (A) and Urine Samples of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CA (B and C) and of a Volunteer not Exposed to *p*-CA (D).

B and D: The urine samples were hydrolyzed with conc. HCl, and the hydrolysates were injected into the chromatograph after neutralization. C: The urine sample was directly injected into the chromatograph.

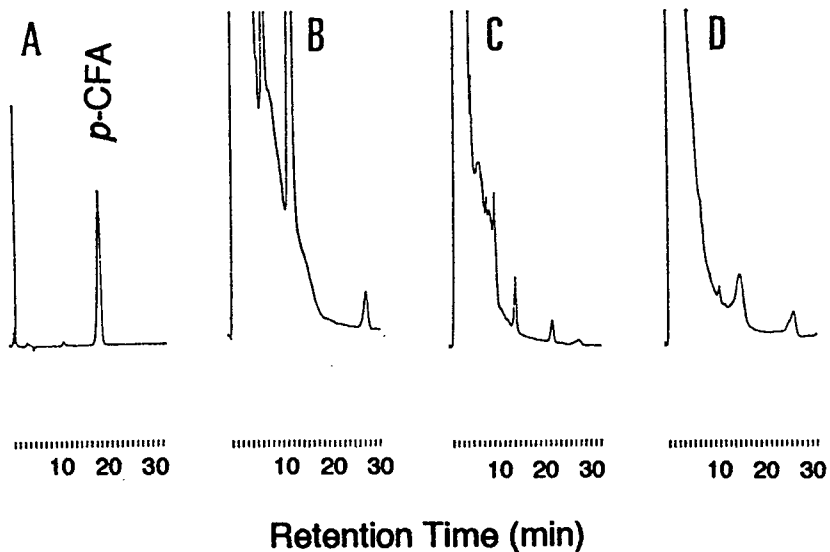


Fig. 1-3-2. HPLC Chromatograms of Standard Solution of *p*-CFA (1.5 $\mu\text{g/ml}$) (A) and Urine Samples of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CA (B and C) and of a Volunteer not Exposed to *p*-CA (D).

The urine samples (B, C and D) were prepared as shown in Fig. 1-3-1.

4. 考察

2, 4-DCAおよびp-CFAは対照尿からは検出されず、エーテルに溶かしたp-CA標準溶液からも検出されなかった。また、2, 4-ジクロロニトロベンゼンのような体内での代謝により2, 4-DCAを生じると推定される物質も標準物質p-CA中に不純物として含まれていないことを確認した。したがって、これらの2物質は、p-CAの曝露に関連する物質であると示唆された。

芳香環の核のハロゲン化は、化学的には通常、リン、ヨウ素、塩化第二鉄または塩化アルミニウム等を触媒とするハロゲン陽イオンの親電子置換反応により進行する。したがって、芳香核にアミノ基等の電子供与基が存在すれば、塩素との反応はアミノ基のオルト位またはパラ位において速やかに進行する[81]。また、収率は悪いが、フェノール類が三ハロゲン化リンまたは五ハロゲン化リンと化学的に反応して芳香族ハロゲン化合物を生成することが知られている[82]。しかし、2, 4-DCAは、p-CAまたは2-A-5-CPを対照尿に添加し分析までの期間凍結保存した試料からは検出されなかったため、患者尿の保存中に化学的に上記のような反応が進行してこれらの物質から生じたものではないと考えられた。また、GC/MSにおいて患者尿の非加水分解試料や、GC/MSのような高温での分析を必要としないHPLCによる分析においても2, 4-DCAは検出され、2, 4-DCAは、GC/MSによる分析時やその分析試料調製時の前処理の段階で生じたものではないと考えられた。尿の加水分解において、塩酸の代わりに硝酸または硫酸を用いてもほぼ同量の2, 4-DCAが検出されたため、第1節および第2節で加水分解に用いた塩酸の影響により生じたものでもないと考えられた。患者尿の非加水分解試料からも極微量の2, 4-DCAが検出されたが、酸加水分解試料から検出された量に比べ少なかった。以上の見解より、第1節および第2節において、それぞれp-CNB、p-CAによる急性中毒患者の尿中から検出された2, 4-DCAはp-CAの代謝物の一種であり、p-CAの核の塩素化反応により生じたものと考えられた。尿中へは大部分何らかの抱合体として排泄されているか、または尿中の他の成分と結合して存在すると考えられた。ヒトの多形核白血球中のミエロパーオキシダーゼ[83-89]は、菌類の一種 *Caldariomyces fumago* から単離されたクロロパーオキシダーゼ[90-96]と同様に、過酸化水素と塩素イオンの存在下酸性溶液中で、基質が塩素化される反応を触媒することが知られている。しかし、これらはいずれも *in vitro* での研究成果であり、*in vivo* の研究においては、2, 4-DCAのよう

な塩素化代謝物は、哺乳動物における一般的な外来異物の代謝物としてほとんど知られていない。したがって、ヒトを含む哺乳動物において、*in vivo* での珍しい代謝経路が存在することが示唆された。

p-CFAは*p*-CAのN-アシル化合物である。生体内の薬物代謝におけるアシル抱合は多くの場合アセチル抱合であるが、まれにイヌやラットにおいて芳香族アミノ化合物のホルミル化反応が起こることが知られている[46]。また、Freitagら[74]は土中に埋められた*p*-CAが一部*p*-CFAに変化することを報告している。本節では、これと同様の作用を有する菌等が尿の保存中に繁殖して、尿中に排泄された*p*-CAを基質として代謝し、*p*-CFAを生じるものと仮定した。事実、*p*-CAを溶かしたエーテル中からは*p*-CFAは検出されなかったが、*p*-CAを対照尿に添加し、一昼夜放置した後-20℃で分析までの期間凍結保存した試料からは*p*-CFAが極微量であるが検出された。この*p*-CFAのピークは、エーテルに溶かした*p*-CFAと同様にガスクロマトグラフの試料注入口温度にかかわらずほぼ同じ大きさであり、尿中で*p*-CAを基質とする反応が起こり、*p*-CFAを生じたものと推定された。一方、GC/MSにおいて試料注入口温度を250℃に設定した際中毒患者の尿中から検出された*p*-CFAのピークは、試料注入口温度を下げ150℃で分析すると消失した。さらに、GC/MSのような高温条件での分析を必要としないHPLCでは、標準物質*p*-CFAと同じ保持時間を示す代謝物は中毒患者の尿からは検出されなかった。したがって、代謝物として排泄された*p*-CAを基質とする反応が尿の保存中に起こり*p*-CFAを極微量生じる可能性もあるが、第1節および第2節でGC/MSにより、*p*-CNBおよび*p*-CAによる中毒患者の尿中から検出された*p*-CFAの大部分は、体内での代謝により*p*-CAから生じたある代謝物の熱分解により生成したものであると考えられた。*p*-CFAは、GC/MSにおいて酸性抽出試料からのみ検出されたため、この未知物質は酸性物質と推定された。

第4節 尿中 *p*-クロロオキザニリン酸の検出

1. 緒言

第1節で、*p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) による急性中毒患者の尿中から8種の代謝物をガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) により同定した。また、第2節では、*p*-CNBの代謝物の一種である *p*-クロロアニリン (*p*-CA) による急性中毒患者の尿中代謝物を同様に同定し、*p*-CNB中毒患者においても検出された6種の代謝物を尿中から検出した。また、両中毒患者の尿中から検出された *p*-クロロホルムアニリド (*p*-CFA) は、GC/MSによる分析の際 *p*-CAから生じたある代謝物の熱分解により生じたものであることを第3節で明らかにした。近年、Ehlhardt ら[97]は、*p*-CAを投与したラット、マウスおよびサル尿中より、投与物質である *p*-CA、*p*-クロロアセトアニリド (*p*-CAA)、2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP) および4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド (4-C-2-HAA) のほかに、Fig. 1-4-1に示した2種の代謝物、すなわち、*p*-クロロオキザニリン酸 (*p*-COA) と極微量の *p*-クロログリコールアニリド (*p*-CGA) を検出している。前4物質は、*p*-CNB急性中毒患者および *p*-CA急性中毒患者における尿中代謝物の一部としてすでに検出した。

本節では、*p*-CNBによる急性中毒患者の尿中から、すでに同定された8種の代謝物のほかに、*p*-COAおよび *p*-CGAが検出されるか否かをGC/MSにより確かめた。

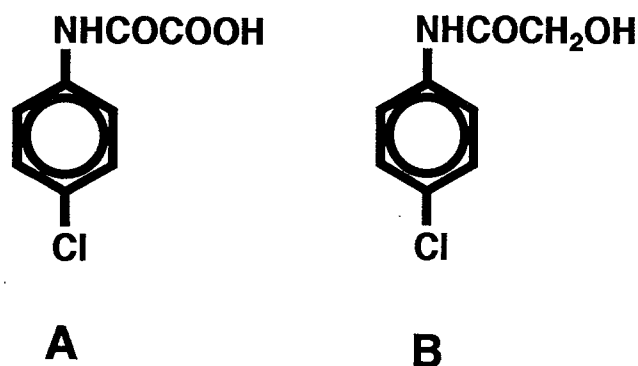


Fig. 1-4-1. Chemical Structures of *p*-COA (A) and *p*-CGA (B).

2. 材料および実験方法

化合物： *p*-COA および *p*-CGA は石津製薬（大阪）より購入した。*p*-CFA は第1節で用いたものを使用した。

分析試料の調製： *p*-CNB による8名の急性中毒患者から中毒事故発生後最初に得られた尿を試料として用いた。また、4名の非曝露者（健常者）から得た尿を対照として用いた。患者尿は遠沈（2000×*g*、15分）後その上清1mlをスクリー管に移し、5規定塩酸でpH1に調整した後、ジエチルエーテル1mlを加えて30分間振とう抽出を行い、試料とした。対照尿についても同様に操作し、試料を得た。

Table 1-4-1. Analytical Conditions for GC/MS.

Analytical Condition	Condition-1	Condition-2	Condition-3
Capillary column	25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked polyethyleneglycol (Shimadzu)
Column oven temperature	Programmed from 80 to 220°C at 4°C/min		Programmed from 80 to 220°C at 16°C/min and kept for 25 min at the final temperature
Injection port temperature	300°C	150°C	300°C
Separator temperature	260°C	260°C	260°C
Ion source temperature	220°C	220°C	220°C

The other conditions were as follows: injection mode into the gas chromatograph, splitless; carrier gas, helium; column pressure, 0.2 kg/cm²; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μ A; accelerating voltage, 3.0 kV; scanning, 1 to 300 a.m.u. for 1 s. The samples were determined by GC/MS under three different analysis conditions (Condition-1, Condition-2 and Condition-3).

ガスクロマトグラフ/質量分析計と分析条件：第1節と同じ装置を用い、Table 1-4-1に示した3種の条件（Condition-1、Condition-2およびCondition-3）で各試料を分析した。尿中の *p*-COA および *p*-CGA の検出は、第1節と同様にメタノールに溶かした各標準物質の保持時間およびマススペクトルと比較して行なった。

3. 結果

8名の患者のうち最も多量の *p*-CNB を吸収したと推定される患者から得た尿試料を、



Fig. 1-4-2. Typical Total Ion Chromatogram of a Urine Sample of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CNB by GC/MS under Condition-1.

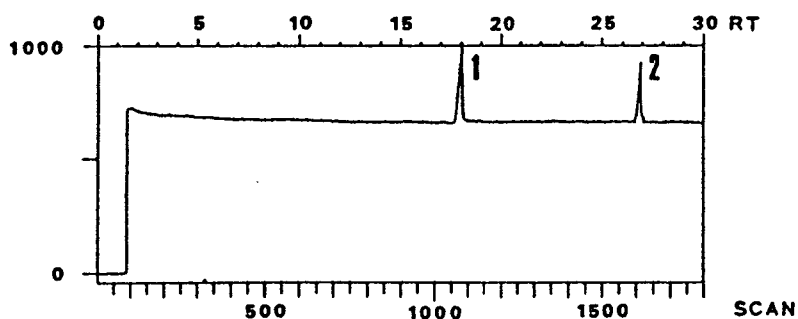


Fig. 1-4-3. Total Ion Chromatogram of Standard Solution with Dissolved *p*-COA (peak 1) and *p*-CGA (peak 2), 25 μ g/ml Each, Determined by GC/MS under Condition-1.

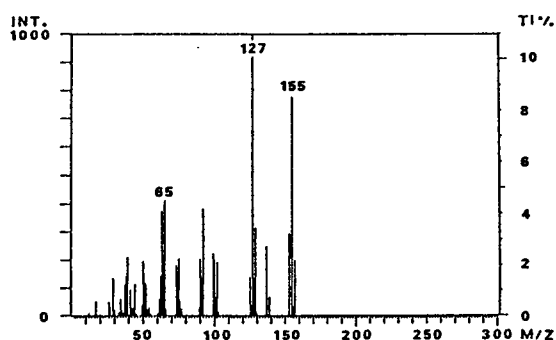


Fig. 1-4-4. Mass Spectrum of the Metabolite (peak I in Fig. 1-4-2) Isolated from Urine of a Subject Poisoned by *p*-CNB. Mass spectrum of *p*-COA standard (peak 1 in Fig. 1-4-3) was the same as this mass spectrum.

Condition-1の分析条件を用いたGC/MSにより測定した際のトータルイオンクロマトグラムをFig. 1-4-2に示した。また、同じ条件で測定した際の、*p*-COAおよび*p*-CGAの標準溶液のトータルイオンクロマトグラムをFig. 1-4-3に示した。Fig. 1-4-2におけるピークI（保持時間：18.1分）は、対照尿からは検出されなかった。このピークの保持時間およびマススペクトルはFig. 1-4-3に示した標準物質*p*-COAのピーク（ピーク1）の保持時間およびマススペクトルと一致した（Fig. 1-4-4）。さらに、Condition-3の分析条件により、同様に中毒患者尿および標準物質を分析した際、標準物質*p*-COAと同じ保持時間（22.4分）および同じマススペクトルを示す代謝物が患者の尿試料から検出された。したがって、Fig. 1-4-2中に検出されたピークIは、*p*-COAと同定した。*p*-COAは、中毒患者8名全員の尿中から検出された。検出された*p*-COAのマススペクトルではその分子イオンピーク（ M/Z 199）は検出されず（Fig. 1-4-4）、第1節において同患者の尿中より検出された*p*-CFAのマススペクトル（Fig. 1-1-4）と一致した。そこで、標準物質*p*-CFAをCondition-1およびCondition-3の条件により分析すると、その保持時間は、*p*-COAの保持時間と一致した。しかし、ガスクロマトグラフの試料注入口温度のみCondition-1（300℃）と異なるCondition-2（150℃）の条件により分析すると、中毒患者尿および標準物質*p*-COAにおいてこのピークは消失したが、標準物質*p*-CFAにおけるそのピークは、他の分析条件を用いた場合と同様に検出された。

一方、標準物質 *p*-CGA と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す物質は、いずれの分析条件を用いた際も、どの患者の尿試料からも検出されなかった。

4. 考察

以上の結果より、*p*-COA は、GC/MS による分析の際、試料注入口において 150℃～300℃ で *p*-CFA に熱分解されると考えられた。したがって、第1節、第2節において、それぞれ *p*-CNB 急性中毒患者および *p*-CA 急性中毒患者の尿中から、GC/MS により *p*-CFA として検出された物質、すなわち、第3節において考察された、ガスクロマトグラフの試料注入口での熱分解により *p*-CFA を生じる *p*-CA の酸性代謝物は、*p*-COA であると考えられた。

一方、*p*-CGA は、患者の尿中から検出されなかった。また、*p*-CA をラットに経口投与 (20 mg/kg) 後 24 時間内に尿中に排泄される *p*-CGA は極微量 (投与量の 0.5%) であると報告されている [97]。したがって、*p*-CGA は、ヒトにおける *p*-CNB の尿中代謝物として重要ではないと考えられた。

第2章 *p*-クロロニトロベンゼンの代謝経路

第1節 ラットにおける *p*-クロロニトロベンゼンの尿中代謝物の同定

1. 緒言

緒論でも記述したように、化学物質の曝露において、その吸収量を生物学的モニタリングにより評価するためには、その曝露を正確に反映する指標物質が必要である。指標物質は、できるだけ容易に得られる生物学的試料中に存在するものがよく、多くの場合、尿中に排泄されるその代謝物が指標として用いられる。尿中代謝物を指標物質として用いる際、用いる代謝物を選択する上で、曝露された化学物質の体内での動態に関する知見を得ることは重要である。

本章では *p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) の体内動態を調べるため、まず本節では、第1章の中毒患者の場合と同様にガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) により、ラットにおける *p*-CNB の尿中代謝物の同定を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物: *p*-CNB、*p*-クロロアニリン (*p*-CA)、2,4-ジクロロアニリン (2,4-DCA)、*p*-アミノフェノール、*p*-ヒドロキシアセトアニリド、*p*-アミノチオフェノール、*p*-クロロアセトアニリド (*p*-CAA)、*p*-クロロチオフェノール、*p*-クロロオキザニリン酸 (*p*-COA)、*p*-クロログリコールアニリド、*N*-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン (ANPC)、*N*-(4-クロロフェニール)アセトヒドロキサム酸、*N*-(4-クロロフェニール)グリコールヒドロキサム酸、*N*-ニトロソメチルウレア、2-クロロ-5-ニトロフェノール (2-C-5-NP)、5-クロロ-2-ニトロフェノール、2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP)、5-アミノ-2-クロロフェノー

ル、4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド（4-C-2-HAA）および4-クロロ-3-ヒドロキシアセトアニリドは、第1章で用いたものを使用した。

分析試料の調製：10週齢の Sprague-Dawley（SD）系雄性ラット（日本SLC、静岡）6匹（386±16g）の腹腔内にオリーブ油に溶かした *p*-CNB 100 mg/kg を1回投与した。投与後8～24時間に排泄された尿をステンレス製代謝ケージ（日本クレア製CL-0304型、大阪）を用いて採取し、6匹のラットから得られた尿は混ぜ合わせ試料とした。ラットは投与1週間前から一匹ずつ代謝ケージに入れて馴らせ、実験期間中餌（Laboratory Chow MF、オリエンタル酵母）および水は自由に摂取させた。*p*-CNB投与前24時間に得た尿を対照として用いた。*p*-CNB投与ラットから得た尿を第1章第1節と同様に処理し、4種の分析試料（A-pH1、A-pH10、N-pH1および

Table 2-1-1. Analytical Conditions for GC/MS.

Analytical Condition	Condition-1	Condition-2	Condition-3
Capillary column	20 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μ m film thickness cross-linked polyethyleneglycol (Shimadzu)
Column oven temperature	Programmed from 120 to 230°C at 8°C/min and kept for 8 min at the initial temperature	Programmed from 100 to 230°C at 4°C/min	Programmed from 120 to 230°C at 8°C/min and kept for 8 min at the initial temperature and kept for 15 min at the final temperature
Injection port temperature	250°C	250°C	250°C
Separator temperature	260°C	260°C	260°C
Ion source temperature	200°C	200°C	200°C

The other conditions were as follows: injection mode into the gas chromatograph, splitless; carrier gas, helium; column pressure, 0.1 kg/cm²; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μ A; accelerating voltage, 3.0 kV; scanning, 1 to 300 a.m.u. for 1 s. The samples were determined by GC/MS under three different analysis conditions (Condition-1, Condition-2 and Condition-3).

N-pH10)を得た。対照尿についても同様に処理し、試料を得た。試料のメチル化が必要な場合は、N-ニトロソメチルウレアから発生させたジアゾメタンで試料の一部をメチル化したのち、分析した。

ガスクロマトグラフ/質量分析計と分析条件：第1章第1節と同じ装置を用い、Table 2-1-1に示した3種の条件（Condition-1、Condition-2およびCondition-3）で各試料を分析した。各尿中代謝物の同定は、第1章第1節と同様に、ジエチルエーテルに溶かした各標準物質の保持時間およびマススペクトルと比較して行なった。

3. 結果

p-CNB投与ラット尿から調製された4種の試料を、Condition-1の分析条件を用いたGC/MSにより測定した際得られたトータルイオンクロマトグラムをFig. 2-1-1に示した。a~qの各ピークは、対照尿からは検出されなかったため、p-CNBの代謝物のピークであると考えられた。A-pH1からは5種（a、b、c、d、e）、A-pH10からは4種（f、g、h、i）、N-pH1からは7種（j、k、l、m、n、o、p）、N-pH10からは1種（q）の代謝物が検出された。同じ条件で測定したときの標準物質のトータルイオンクロマトグラムをFig. 2-1-2に示した。代謝物a~qの保持時間およびマススペクトルは、それぞれ以下のごとく各標準物質の保持時間およびマススペクトルと一致した。代謝物a、f、jおよびqとp-CA、kとp-CNB、bおよびgと2,4-DCA、cおよびlとANPC、d、hおよびmと2-C-5-NP、iと2-A-5-CP、eおよびnとp-COA、oとp-CAA、pと4-C-2-HAA。すなわち、p-CNBを投与したラットから得た尿をCondition-1の分析条件を用いたGC/MSにより測定した際、9種の標準物質と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す代謝物が検出された。

さらに、Condition-2、Condition-3の分析条件により、尿試料中の代謝物および標準物質を同様に測定した際、上記の9種の標準物質と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す代謝物が各尿試料から検出された。

以上の結果から、Fig. 2-1-1中に検出された各代謝物をTable 2-1-2のごとく同定した。同定された9物質のうち、投与物質であるp-CNBを除く8種の代謝物は、

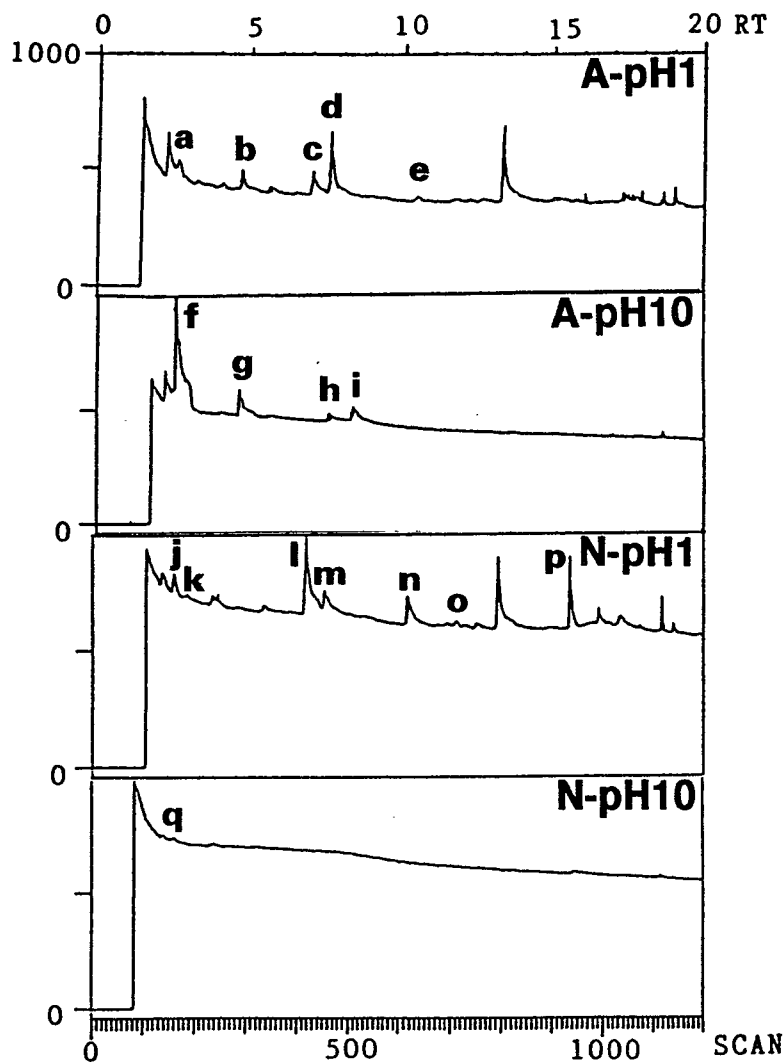


Fig. 2-1-1. Typical Total Ion Chromatograms of Urine Samples of Rats Administered *p*-CNB by GC/MS under Condition-1.

いずれも第1章において *p*-CNBによる急性中毒患者の尿中から検出されたものであった。

一方、標準物質 *p*-アミノチオフェノール、*p*-クロロチオフェノール、5-クロロ-2-ニトロフェノール、*p*-アミノフェノール、*p*-ヒドロキシアセトアニリド、5-アミノ-2-クロロフェノール、4-クロロ-3-ヒドロキシアセトアニリド、*p*-クロログリコールアニリド、N-(4-クロロフェニール)アセトヒドロキサム酸およびN-(4-クロロフェニール)グリコールヒドロキサム酸と同じ保持時間および同じマススペクトルを示す物質は、第1章の *p*-CNBによる中毒患者の場合と同様に、どの尿試料からも検出されなかった。

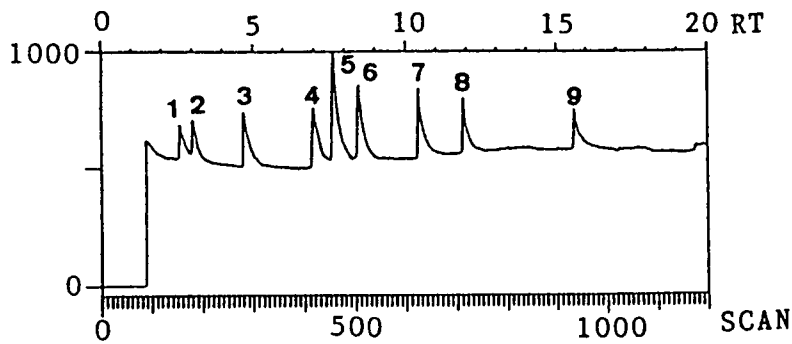


Fig. 2-1-2. Total Ion Chromatogram of Authentic Standards of *p*-CNB Metabolites Determined by GC/MS under Condition-1. Peak 1, *p*-CA (18 $\mu\text{g/ml}$); peak 2, *p*-CNB (36 $\mu\text{g/ml}$); peak 3, 2,4-DCA (36 $\mu\text{g/ml}$); peak 4, ANPC (290 $\mu\text{g/ml}$); peak 5, 2-C-5-NP (218 $\mu\text{g/ml}$); peak 6, 2-A-5-CP (218 $\mu\text{g/ml}$); peak 7, *p*-COA (73 $\mu\text{g/ml}$); peak 8, *p*-CAA (36 $\mu\text{g/ml}$); peak 9, 4-C-2-HAA (55 $\mu\text{g/ml}$).

Table 2-1-2. Identification of Urinary *p*-CNB Metabolites (a-q) Shown in Fig. 2-1-1.

Urine samples	A-pH1	A-pH10	N-pH1	N-pH10
<i>p</i> -CA	a	f	j	q
<i>p</i> -CNB	—	—	k	—
2,4-DCA	b	g	—	—
ANPC	c	—	l	—
2-C-5-NP	d	h	m	—
2-A-5-CP	—	i	—	—
<i>p</i> -COA	e	—	n	—
<i>p</i> -CAA	—	—	o	—
4-C-2-HAA	—	—	p	—

a-q: metabolite peak in Fig. 2-1-1.
—: not detected.

4. 考察

p-CNB投与ラットの尿中より、投与物質である *p*-CNBが検出されたが極微量であり、吸収された *p*-CNBは、尿中へは大部分代謝されたのち排泄されると考えられた。

芳香族ニトロ化合物のベンゼン核の水酸化反応やニトロ基の還元反応は、哺乳動物における一般的な代謝経路としてよく知られている[37, 45]。 *p*-CA、2-C-5-NPおよび

2-A-5-CPがこれらの代謝物として尿中から検出されたが、主として加水分解試料中から検出されたため、これらの代謝物は主に抱合体として尿中に排泄されると考えられた。

メルカプツール酸は、芳香族ハロゲン化炭化水素や芳香族ニトロ化合物に曝露されたラット、ウサギ、イヌ、ヒト等の哺乳動物の尿中に排泄されることがよく知られている [37, 45, 52-54]。本節においても、メルカプツール酸の一種であるANPCが、試料N-pH1のトータルイオンクロマトグラム上で大きなピークとして検出された (Fig. 2-1-1)。したがって、吸収された *p*-CNBのかなりの量は、*p*-CNBの塩素基の置換を伴うグルタチオン抱合を受け、その後メルカプツール酸となり尿中へ排泄されるものと考えられた。

2,4-DCAは、第1章において *p*-CNBおよび *p*-CAによる急性中毒患者の尿試料からも検出された代謝物である。2,4-DCAは、*p*-CNB投与ラットから得た尿を加水分解した試料からのみ検出されたため、ヒトの場合と同様に、尿中へは大部分何らかの抱合体として排泄されているか、または尿中の他の成分と結合して存在すると考えられた。

p-CNB投与ラットの尿中より、投与物質 *p*-CNBと8種の代謝物が検出された。*p*-CNBを除く8種の代謝物は、いずれも第1章において *p*-CNBによる急性中毒患者の尿から同定された代謝物であり、ラット、ヒト両者における *p*-CNBの尿中代謝物は完全に一致した。したがって、*p*-CNBは、両者において、同じ代謝を経て尿中へ排泄されると推定された。

第2節 ラットにおける *p*-クロロニトロベンゼンの代謝経路

1. 緒言

化学物質の曝露において、その化学物質の尿中代謝物から曝露量を評価するための指標となる代謝物を選択する際、曝露された物質の体内での代謝経路を明らかにすることは重要である。

第1章では、*p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) による急性中毒患者の尿中から8種の代謝物を検出した。また、本章第1節では、*p*-CNB投与ラットの尿中より、急性中毒患者と同じ8種の代謝物が検出され、*p*-CNBは、ヒト、ラット両者において、同じ代謝経路により尿中へ排泄されると推定された。

本節では、*p*-CNBの尿中代謝物である *p*-クロロアニリン (*p*-CA)、*p*-クロロアセトアニリド (*p*-CAA) または 2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP) を投与したラットにおいて、*p*-CNB投与の際尿中から検出された *p*-CNB および 8種の代謝物の検出を、それぞれガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) により試み、*p*-CNBの代謝経路について検討した。

2. 材料および実験方法

化合物：*p*-CNB、*p*-CA、2,4-ジクロロアニリン (2,4-DCA)、*p*-CAA、N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン (ANPC)、*p*-クロロオキザニリン酸 (*p*-COA)、2-クロロ-5-ニトロフェノール (2-C-5-NP)、2-A-5-CP および 4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド (4-C-2-HAA) は、第1章で用いたものを使用した。

分析試料の調製：9週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (日本クレア) (280~320 g) 3匹ずつ3群に分け、各群のラットの腹腔内にオリーブ油に溶かした *p*-CA、*p*-CAA または 2-A-5-CP 100 mg/kg を1回投与した。投与後24時間

内に排泄された尿を代謝ケージ（日本クレア製CL-0304型）を用いて採取し、同じ群のラットから得られた尿は混ぜ合わせ試料とした。ラットは投与1週間前から一匹ずつ代謝ケージに入れて馴らせ、実験期間中餌（Laboratory Chow MF、オリエンタル酵母）および水は自由に摂取させた。各物質の投与前24時間に得た尿を対照として用いた。各尿試料は遠沈（2000×g、15分）後、それぞれその上清を以下の3通りに処理し各代謝物の検出を試みた。

2-C-5-NPおよび2,4-DCAの検出 尿3mlに濃塩酸0.3mlを加え、沸騰湯浴上で1時間加熱し加水分解した。放冷後、その1mlをスクリー管に移し、5規定塩酸または5規定水酸化ナトリウム水溶液でpH1に調整したのち、ジエチルエーテル1mlを加えて30分間振とう抽出を行ない試料とした。

p-CAおよび2-A-5-CPの検出 上記の加水分解尿の1mlを別のスクリー管に移し、pH10に調整したのち、同様にジエチルエーテル1mlで抽出して試料とした。

p-CNB、ANPC、p-CAA、4-C-2-HAAおよびp-COAの検出 尿1mlを加水分解せずにpH1に調整後、同様にジエチルエーテル1mlで抽出して試料とした。

ガスクロマトグラフ／質量分析計と分析条件：第1章第1節と同じ装置を用い、第1章第4節において用いた分析条件（Table 1-4-1のCondition-1）で各試料を分析した。各尿中代謝物の検出は、第1章第1節と同様に、ジエチルエーテルに溶かした各標準物質の保持時間およびマススペクトルと比較して行なった。

3. 結果

p-CA、p-CAAまたは2-A-5-CPを投与された各ラットにおける尿中代謝物の分析結果をTable 2-2-1に示した。p-CA投与ラットおよびp-CAA投与ラットの尿中より同じ6種の代謝物、すなわち、p-CA、2,4-DCA、2-A-5-CP、p-CAA、4-C-2-HAAおよびp-COAが検出された。一方、2-A-5-CPを投与したラットの尿中からは4-C-2-HAAと投与物質2-A-5-CPの2物質のみが検出された。また、いずれの物質を投与した場合も、p-CNB、2-C-5-NPおよびANPCはラットの尿中から検出されなかった。

Table 2-2-1. Detection of Urinary Metabolites in Rats Treated Intraperitoneally with *p*-CA, 2-A-5-CP or *p*-CAA.

Dosed substances	Urinary metabolites								
	<i>p</i> -CNB	2-C-5-NP	ANPC	<i>p</i> -CA	2,4-DCA	2-A-5-CP	<i>p</i> -CAA	4-C-2-HAA	<i>p</i> -COA
<i>p</i> -CA	—	—	—	○	○	○	○	○	○
2-A-5-CP	—	—	—	—	—	○	—	○	—
<i>p</i> -CAA	—	—	—	○	○	○	○	○	○

○ : detected ; — : not detected.

4. 考察

p-CA投与ラットの尿から、*p*-CAAが検出され、*p*-CAA投与ラットの尿から、*p*-CAが検出された。また、Newell ら[98]は、*p*-CAAを投与したラットの尿中に*p*-CA、2-A-5-CP、4-C-2-HAAおよび投与物質*p*-CAAが排泄されることを報告している。したがって、ラット体内において、*p*-CAのアセチル化と*p*-CAAの脱アセチル化の可逆反応が起こることが示唆された。2-A-5-CPを投与したラットの尿からは4-C-2-HAAと投与物質2-A-5-CPの2物質しか検出されなかったため、2-A-5-CPの芳香環の還元反応による*p*-CAへの代謝は起こらないと考えられた。また、いずれの物質を投与した場合も、ニトロ化合物（*p*-CNB、2-C-5-NPおよびANPC）はラットの尿中から検出されず、*p*-CAのアミノ基の酸化による*p*-CNBの生成反応は、ラット体内では起こらないと考えられた。Ehlhardt ら[97]は、*p*-CAを投与したラット、マウスおよびサルの尿中から微量の*p*-クロログリコールアニリド（*p*-CGA）を検出している。また、Kiese ら[99]は、*p*-CAAを投与したウサギの尿中より、*p*-CGAおよび*p*-COAを検出しており、*p*-COAは、*p*-CAAの酸化により生じた*p*-CGAから生成すると報告している。したがって、本章第1節において*p*-CNB投与ラットの尿中からは、*p*-CGAは検出されなかったが、検出された*p*-COAは、*p*-CGAを経由し、*p*-CAAから生じたものと示唆された。以上の見解をもとに、ラットにおける*p*-CNBの代謝経路を Fig. 2-2-1 に示した。芳香環の水酸化反応は、芳香族化合物の代謝経路としてよく知られている[44]。*p*-CAAにおけるアセチルアミノ基、塩素基は共に、化学的にはオルト・パラ配向性基であるが、アセチルアミノ基のほうがよりそ

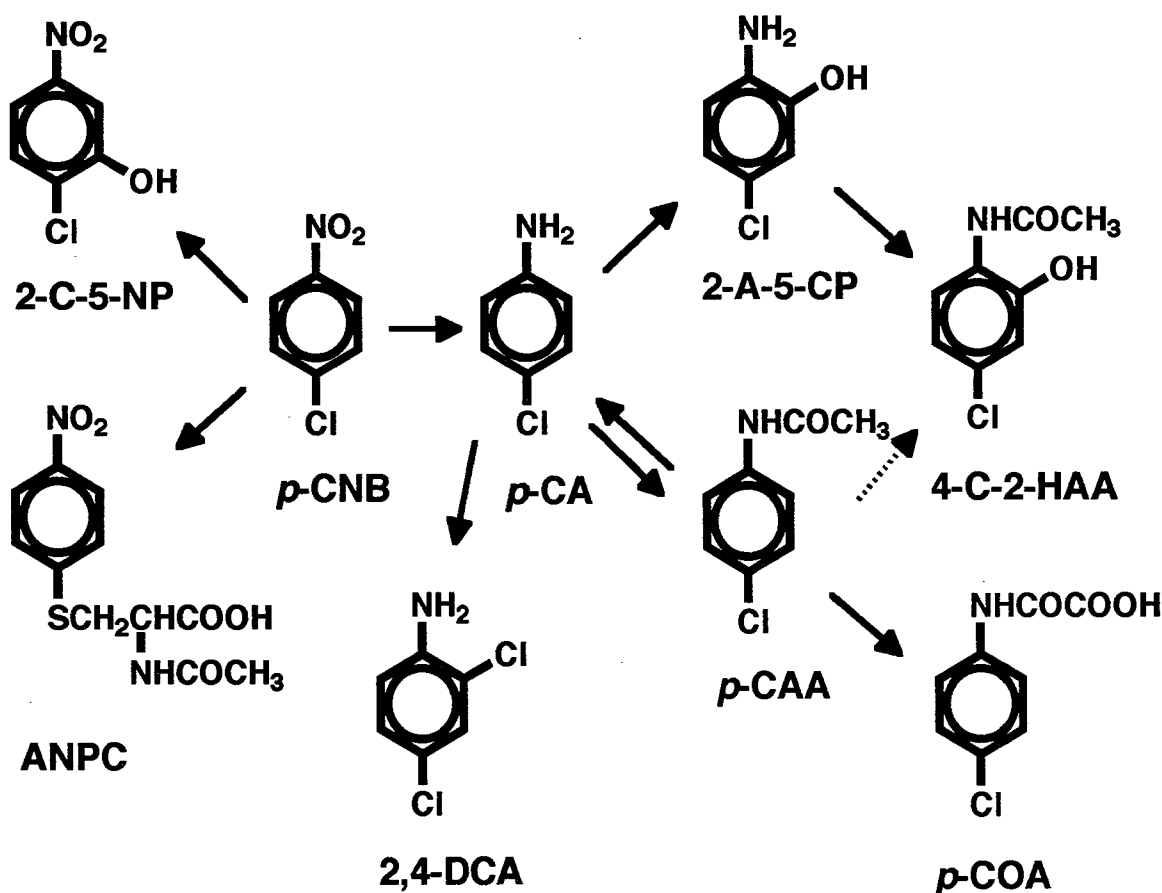


Fig. 2-2-1. Metabolic Pathway of *p*-CNB.

Dotted line: it was not clear whether 4-C-2-HAA was formed by hydroxylation of *p*-CAA.

の性質は強い。したがって、化学的には、*p*-CNB投与ラットにおいて検出された4-C-2-HAAの一部は、*p*-CAAのアセチルアミノ基のオルト位における酸化により生じた可能性もあるが、ラット体内でこの反応が起こるか否かは、明かではない。

本章第1節において、*p*-CNB急性中毒患者および*p*-CNB投与ラットの尿中代謝物は一致することを確認した。また、第1章第2節において同定した*p*-CNBの代謝物の一種である*p*-CAによる急性中毒患者の尿中代謝物は、本節で*p*-CA投与ラットにおいて同定された尿中代謝物と一致した。したがって、*p*-CNBは、ヒトにおいても Fig. 2-2-1に示したラットと同じ代謝を経て尿中に排泄されると考えられた。

第3章 血漿中 *p*-クロロニトロベンゼンおよびその尿中代謝物の定量

第1節 血漿中 *p*-クロロニトロベンゼンの逆相高速液体クロマトグラフィーによる定量

1. 緒言

緒論にも記述したように、*p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) は、血液毒性、変異原性、発癌性等様々な毒性を有しているため、*p*-CNBの製造作業や取り扱い作業に従事する労働者において、その曝露量を把握することは重要である。一般的に、有害化学物質の吸収量は、尿、血液、呼気、汗、唾液等の生物学的試料中のその化学物質またはその代謝物の定量により評価される。しかし、*p*-CNB等の工業薬品は、医薬品類とは異なり、本来意図的に体内へ取り込まれるものではないため、生物学的試料中の分析法に関する報告は少ない。

本研究の目的である *p*-CNB曝露における生物学的モニタリング指標を確立するためには、*p*-CNBの体内動態を明らかにする事は重要である。第5章において、*p*-CNB投与ラットから経時的に採取した尿および血漿試料を用いその代謝を動力学的に解析するため、本節では、少量の血液を用いた血漿中 *p*-CNBの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による簡易で正確な高感度定量法の開発を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物：内部標準物質 *p*-ブロモニトロベンゼン (*p*-BNB) およびヘパリンナトリウムは和光純薬工業から購入した。*p*-CNBおよびHPLC用メタノールは、第1章で用いたものを使用した。

液体クロマトグラフ：装置は、日立製作所製L-6200型インテリジェントポンプ、655A-52型カラムオープン、L-4000型UVディテクター、D-2500型クロマトインテグレーターを連結し、使用した。インジェクターは、Rheodyne 製50 μ lのサンプルループ付きの7125型クロマトグラフィックインジェクター（CA、USA）を用いた。

分析条件：移動相の水は、アドバンテックニトロセルロースメンブランフィルター（孔径0.45 μ m）（東洋濾紙）によりろ過して使用した。血漿中p-CNBは、ガードカラムLiChrospher RP-18(e)（4mm \times 4mm I. D., 粒子径5 μ m）を連結した分析カラムLiChrospher 100 RP-18(e)（125mm \times 4mm I. D., 粒子径5 μ m）（Merck）を用い、メタノール：水=45：55（v/v）の移動相で、流速 1ml/min、カラム温度30 $^{\circ}$ Cで溶出し、検出波長 280nmで測定した。試料50 μ lを装置に注入した。

標準溶液：p-CNBの標準物質をメタノールに溶かし、1mg/mlの液を調製した。この溶液は、4 $^{\circ}$ Cでの遮光保存では約1週間安定である。分析時、さらに、メタノールで希釈し、0.050、0.10、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0および100.0 μ g/mlの液を調製し、p-CNBの標準溶液とした。

内部標準溶液：内部標準物質p-BNBをメタノールに溶かし、1mg/mlの液を調製した。この溶液は、4 $^{\circ}$ Cでの遮光保存では約1週間安定である。分析時、さらに、メタノールで希釈し、10.0 μ g/mlの液を調製し、内部標準溶液とした。

動物および試料採取：p-CNB投与または無投与の9週齢のSprague-Dawley（SD）系雄性ラット（日本クレア）（310~335g）の血液を、無麻酔下、金武の方法[100]により鎖骨下静脈から採取し、試料に用いた。p-CNB投与ラットの血液は、オリーブ油に溶かしたp-CNB100mg/kgをラットの腹腔内に一回投与後得た。

分析試料の調製：あらかじめ少量のヘパリンナトリウムを加えた1.5ml用プラスチック製遠沈管（バイオプラスチック、大阪）に血液約0.15mlを採取したのち、直ちに遠沈（2000 \times g、15分）し血漿を分離した。得られた血漿50 μ lを別の遠沈管に

分取し、内部標準溶液およびメタノールをそれぞれ50 μ lずつ加え除蛋白した。混和後遠沈(3000 \times g、15分)し、その上清をアドバンテックPTFEタイプディスポースابلシリンジフィルター(DISMIC-13jp、孔径0.50 μ m、東洋濾紙)でろ過し、分析試料とした。

定量：各標準溶液(0.050~100.0 μ g/ml)を等量の内部標準溶液および等量の水で希釈し、その混液の50 μ lを装置に注入し、分析した。得られたクロマトグラムのp-CNBとp-BNBとのピーク面積の相対比から検量線を作成し、血漿試料中のp-CNB濃度を内部標準法により定量した。

回収率：ラットにp-CNBを投与後、適当な時間に採血し、種々の濃度(0.075~35.24 μ g/ml)のp-CNBを含む血漿試料を得た。これらの血漿試料に既知量(0.18~90.54 μ g/ml)のp-CNBを添加し、その回収率を調べた。

血漿中p-CNBの安定性：ラットにp-CNBを投与し、1時間後に採血した。遠沈後得られた血漿を25本の褐色のスクリーバイアルに0.1mlずつ分注した。そのうちの1本について、ただちにp-CNBを定量した。この濃度を保存0時間後におけるp-CNB濃度とした。残りのバイアル24本を、8本ずつ3群に分け、それぞれ、分析までの期間-20 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ Cおよび室温に保存し、1、3、5、8、11、15、21および30日後に各試料中のp-CNB量を測定した。

3. 結果および考察

分析試料の調製：血漿からのp-CNBの回収率をもとに、分析試料の調製法についていくつか検討した。HPLCによる血漿試料の分析の際、血漿蛋白の除去は不可欠である。まず、トリクロロ酢酸(TCA)による除蛋白を検討した。血漿の5分の1容量の10%(w/v)TCA溶液の添加により、99%以上の血漿蛋白を除くことが可能であると報告されている[101]。しかし、血漿へのTCAの添加により、p-CNBは消失し、p-CNBの血漿からの回収率は、血漿中p-CNB濃度5~100 μ g/mlにおいて約25%となり、十分な結果は得られなかった。そこで、沈澱試薬としての有機溶剤の添加、す

なわち、メタノール、エタノールおよびアセトニトリルの添加による除蛋白法について検討した。これら各沈澱試薬を、血漿の2倍容量添加するとほぼ完全に除蛋白することが可能であると報告されている[101]。いずれの沈澱試薬を用いた場合も *p*-CNB の血漿からの回収率はほぼ100%であった。したがって、ここでは、分析の際の移動相に使用されているメタノールを除蛋白剤として選択した。

内部標準として使用する化合物は、分析対象物質と化学的性質が類似しているものが望ましい。*p*-BNBは、用いた分析条件において、*p*-CNBおよび血漿中の他の成分との分離が良好であった。また、血漿からの *p*-BNBの回収率は、濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において99%以上であり、定量的再現性もすぐれていた。したがって、*p*-BNBを内部標準物質として選択した。

クロマトグラフィー：HPLCによる血漿試料中の *p*-CNBの分析の際の最適条件について検討した。45%メタノール溶液中での *p*-CNBの紫外部極大吸収波長 (λ_{max}) は、280 nmであった。*p*-CNBを含まない血漿から調製された試料の紫外部吸収は、240 nm以上の波長において、大幅に減少した。したがって、血漿中 *p*-CNBの測定は、波長280 nmにより行った。

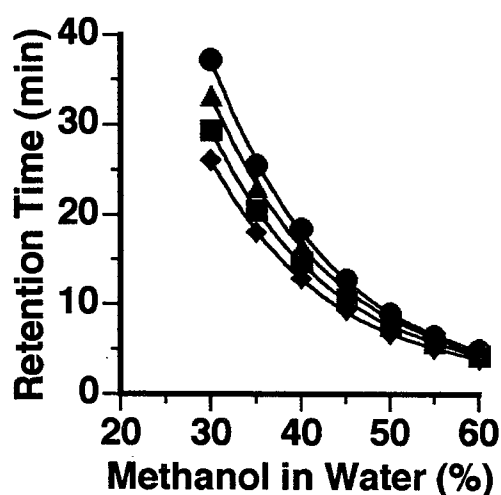


Fig. 3-1-1. Effect of Analytical Temperature and Mobile Phase Composition on Retention Time of *p*-CNB: (●) 30°C; (▲) 35°C; (■) 40°C; (◆) 45°C.

メタノールと水の混液を移動相に用い、*p*-CNBの保持時間およびピーク面積に及ぼす、移動相のpHの影響について検討した。メタノールと緩衝液の比率を一定（45：55, v/v）とし、50 mMのリン酸緩衝液（pH 2.1～7.0）によりpHを変化させた各移動相を用いて血漿中*p*-CNBを測定した。いずれの場合も、*p*-CNBの保持時間およびピーク面積は、ほぼ一定であり、移動相のpHは、*p*-CNBの保持時間およびピーク面積に影響を及ぼさなかった。したがって、最もシンプルな、リン酸塩を含まない蒸留水とメタノールの混液を移動相に用いた。

p-CNBの保持時間に及ぼす、移動相のメタノールと水の組成比および分析温度の影響について検討し、結果を Fig. 3-1-1 に示した。分析温度の上昇、移動相中のメタノール含量の増加に伴い、*p*-CNBの保持時間は短くなった。*p*-CNBを含まない血漿から調製された試料を同様に分析し、血漿成分のクロマトグラムに及ぼす移動相組成と分析温度の影響を調べた。大部分の血漿中成分は、いずれの分析条件においても比較的速やかに溶出された。*p*-CNBを、他の血漿中成分と分離させ、かつできるだけ速やかに溶出させる必要がある。本定量法では、45%メタノールを移動相に用い、カラム温度30℃で血漿中*p*-CNBを分析することとした。

以上の検討の結果選択された条件により、内部標準物質 *p*-BNB を添加した *p*-CNB

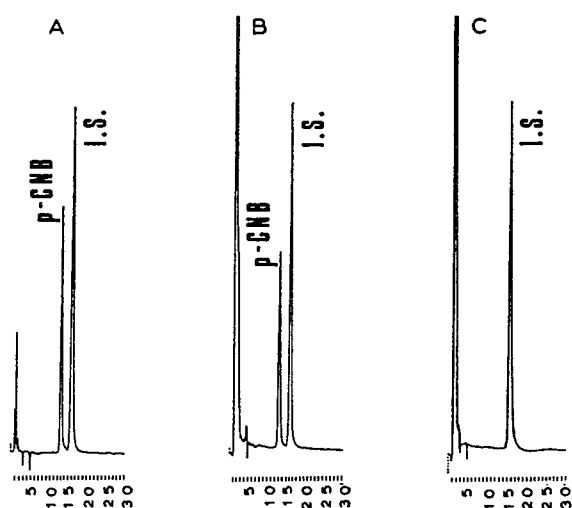


Fig. 3-1-2. Typical Chromatograms of Standard Solution of *p*-CNB (5 µg/ml) (A) and Plasma Samples of a Rat at 24 h after the Intraperitoneal Administration of 100 mg/kg *p*-CNB (concentration, 4.2 µg/ml) (B) and of a Control Rat (C).
I.S. = internal standard (*p*-BNB, 10 µg/ml).

標準溶液を分析した際のクロマトグラムを Fig. 3-1-2 Aに示した。p-CNBおよび p-BNBの保持時間は、それぞれ12.5分、15.5分であった。p-CNB投与ラットおよび無投与のラットから得た血漿試料のクロマトグラムをそれぞれ、Fig. 3-1-2 B、Cに示した。p-BNBの溶出後にはピークは検出されなかった。p-CNBの溶出される分画には他の血漿中成分による妨害ピークは観察されず、p-CNBと血漿成分との分離は良好であった。

定量：標準物質 p-CNBをメタノールに添加後得られた検量線の勾配は、p-CNBを血漿に添加後得られた検量線の勾配と一致した。したがって、メタノールに溶かした p-CNB溶液は、標準溶液として用いることができると考えられた。定量のための溶液は、p-CNBのメタノール標準溶液に等量の内部標準溶液と等量の水を加え調製した。得られた検量線は、p-CNB濃度0.05~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において直線性を示し、その相関係数は、0.9999 ($n=11$)であった。

精密性と正確性：本法における精密性と正確性は、種々の量の標準物質 p-CNBを添加

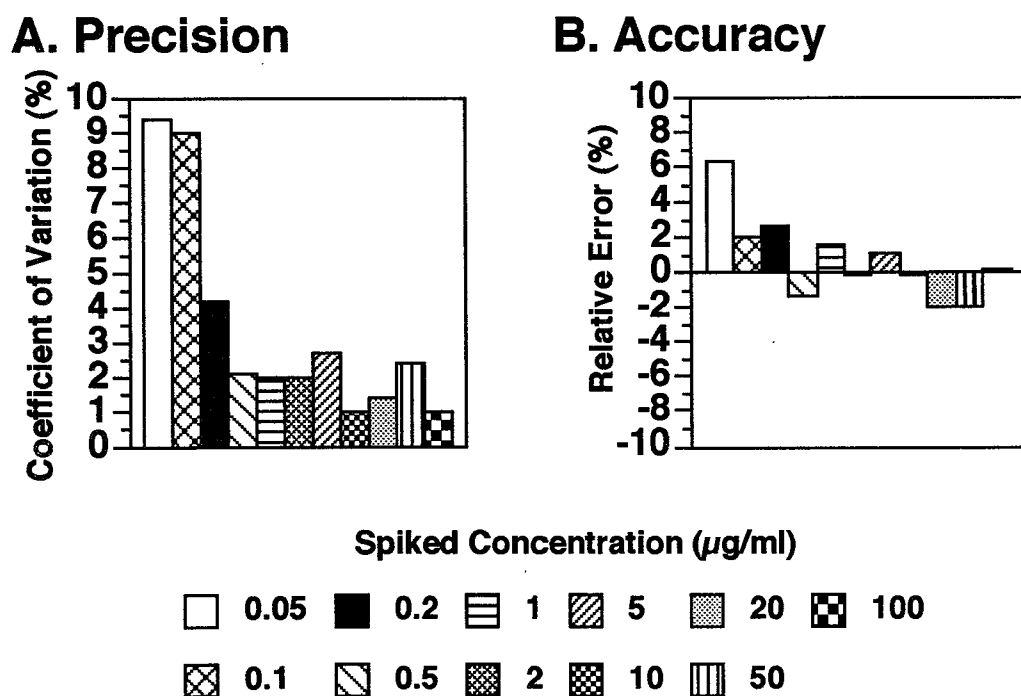


Fig. 3-1-3. Precision (A) and Accuracy (B) of the Method ($n=6$).

した血漿（0.050～100.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の繰り返し分析（ $n=6$ ）により調べ、結果を Fig. 3-1-3 に示した。定量法の精密性は6回の分析における変動係数（C. V. 値）により、正確性は相対誤差により評価した。変動係数は、試験された *p*-CNB 濃度範囲において10%以下であり、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の *p*-CNB 添加濃度では、5%以下であった。また、相対誤差は、いずれの *p*-CNB 添加濃度においても $\pm 7\%$ 以下であった。したがって、本定量法は、精密性、正確性においてすぐれた方法であり、血漿中 *p*-CNB 濃度0.05～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において定量可能であり、得られた分析結果は、十分信頼できるものと考えられた。

回収率：ラットに *p*-CNB を投与後得た種々の濃度（0.075～35.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の *p*-CNB を含む血漿試料に、既知量（0.18～90.54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の *p*-CNB を添加し、血漿からの *p*-CNB の回収率を調べた。結果を Table 3-1-1 に示した。試験された濃度範囲において、*p*-CNB の回収率は97～105%であり、本法における *p*-CNB の回収率はほぼ完全であると考えられた。

Table 3-1-1. Recovery of *p*-CNB from Plasma.

<i>p</i> -CNB concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ($n=3$)			Recovery (%)
Concentration spiked to plasma	Detected from plasma before spiking	Detected from plasma after spiking	
0.18	0.075	0.25	97.0
0.36	0.29	0.64	98.3
0.73	0.25	0.97	98.5
1.53	0.67	2.27	104.6
3.30	2.23	5.65	103.6
5.04	2.16	7.35	103.0
6.88	14.39	21.10	97.5
13.86	17.28	30.93	98.5
20.20	7.77	27.55	97.9
27.18	24.72	52.36	101.7
49.98	28.01	77.49	99.0
90.54	35.24	125.84	100.1

検出限界：本法における血漿中 *p*-CNB の検出限界は、S/N 比 2 : 1 で約 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

保存に対する安定性：-20°C、4°C および室温における血漿中 *p*-CNB の安定性を調べ、結果を Fig. 3-1-4 に示した。-20°C における凍結保存では、保存 1 カ月後でも血漿中 *p*-CNB の顕著な減少は見られなかった。一方、4°C および室温における保存でも血漿中 *p*-CNB は比較的安定であるが、保存後 1 カ月で、それぞれ、元の量の約 90% および 85% に減少した。したがって、血漿試料は、分析までの期間、-20°C で凍結保存するのが望ましいと考えられた。

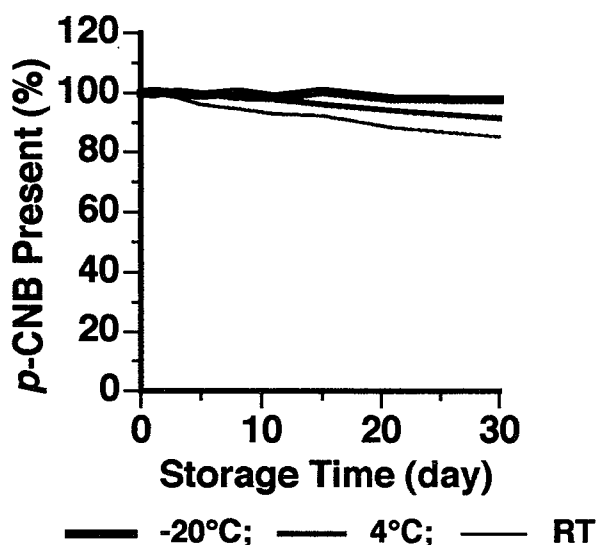


Fig. 3-1-4. Stability of *p*-CNB in Plasma at -20°C, 4°C and Room Temperature (RT).

p-CNB concentration just before storage (time zero) was set at 100% (ca. 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

本法は、血漿試料の前処理として内部標準物質を含んだメタノールによる除蛋白のみを必要とする非常に簡易な血漿中 *p*-CNB の定量法であり、*p*-CNB 取り扱い作業員や中毒患者等の曝露者から得た多数の血漿試料中の *p*-CNB の測定にも十分適用できるものと考えられた。また、本定量法では、血漿中 *p*-CNB の測定のために必要な血液量は微量 (約 0.15 ml) であり、連続的な採血を必要とする動物を用いた *in vivo* での動力学的研究にも適していると考えられた。

第2節 尿中 *p*-クロロニトロベンゼンおよびその代謝物の 逆相高速液体クロマトグラフィーによる分離定量

1. 緒言

有害化学物質の曝露の際、その物質の血中濃度や呼気中濃度の測定により吸収量がモニタリングされる場合もあるが、サンプリングの容易さ、被検者に与える負担の軽さ等の点において、尿中に排泄される代謝物の測定による曝露量の把握がすぐれている。しかし、*p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) 曝露の際のその代謝に関する研究は少なく、そのためその尿中代謝物の定量法に関する報告も数少ない。Corbett ら[38]は、*p*-CNBを含む溶液中で培養された酵母における代謝物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量法を開発した。また、Rickert ら[33]は、ラットから単離した肝細胞を放射性同位元素 (^{14}C) により標識した *p*-CNB とともにインキュベートした溶液中の代謝物を放射能検出器を用いた HPLC により測定している。これらの測定において、分析試料中の夾雑物質は比較的少なく、また HPLC による分析の際、代謝物は移動相にグラジェント溶媒システムを用いた系により溶出されている。したがって、これらの測定法は、多くの夾雑物質を含む尿試料中の代謝物の分析、また、曝露者におけるそのモニタリングのための多くの試料の分析には、いずれも適さないと考えられる。

本節では、*p*-CNB 取り扱い作業員や中毒患者等の曝露者におけるその曝露量を尿中に排泄されるその代謝物から評価するため、第1章で *p*-CNB 急性中毒患者の尿中から検出された8種の代謝物および *p*-CNB の HPLC による簡易で正確な分離定量法の開発を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物：*p*-CNB、*p*-クロロアニリン (*p*-CA)、2,4-ジクロロアニリン (2,4-DCA)、*p*-クロロアセトアニリド (*p*-CAA)、*p*-クロロオキザニリン酸 (*p*-COA)、N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン (ANPC)、2-クロ

ロ-5-ニトロフェノール (2-C-5-NP)、2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP)、4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド (4-C-2-HAA) および HPLC 用メタノールは、第1章で用いたものを使用した。

液体クロマトグラフ：本章第1節と同じ装置を用いた。ただし、インジェクターは、Rheodyne 製 20 μ l のサンプルループ付きの 7125 型クロマトグラフィックインジェクターを使用した。

分析条件：尿中 *p*-CNB およびその代謝物は、ガードカラム LiChrospher RP-Select B (4 mm \times 4 mm I. D., 粒子径 5 μ m) を連結した分析カラム LiChrospher RP-Select B (125 mm \times 4 mm I. D., 粒子径 5 μ m) (Merck) により分離し、UVディテクターで検出した。各代謝物は4群に分け、それぞれ Table 3-2-1 に示した移動相組成と検出波長の異なる4種の条件 (Condition-1、Condition-2、Condition-3 および Condition-4) により分析し定量した。移動相の水は、アドバンテックニトロセルロースメンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) (東洋濾紙) によりろ過して使用した。

Table 3-2-1. Analytical Conditions of Each Urinary Metabolite for HPLC.

Analytical condition	Urinary metabolite	Mobile phase	Detection wavelength
Condition-1	<i>p</i> -CNB 2,4-DCA	water - methanol (60:40, v/v)	250 nm
Condition-2	<i>p</i> -CA 2-C-5-NP 2-A-5-CP <i>p</i> -CAA 4-C-2-HAA	0.005 M phosphate buffer (pH 3.6) - methanol (76:24, v/v) containing 1.2 mM sodium 1-octanesulphonate	240 nm
Condition-3	ANPC	0.005 M phosphate buffer (pH 6.0) - methanol (80:20, v/v)	340 nm
Condition-4	<i>p</i> -COA	0.05 M phosphate buffer (pH 2.25) - methanol (73:27, v/v)	262 nm

The other conditions were as follows: flow rate of mobile phase, 1.0 ml/min; column temperature, 30°C; injection volume, 20 μ l.

標準溶液：各代謝物の標準物質、2,4-DCA、*p*-CA、2-C-5-NP、2-A-5-CP、4-C-2-HAA、*p*-CAA、ANPC、*p*-COAおよび*p*-CNBを、それぞれメタノールに溶かし、1mg/mlの液を調製した。さらに、それぞれメタノールで希釈し、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0および200.0 μ g/mlの液を調製し、各代謝物の標準溶液とした。

動物および試料採取：*p*-CNB投与または無投与の10週齢のSprague-Dawley (SD)系雄性ラット（日本SLCまたは日本クレア製）（300～380g）の尿を、代謝ケージ（日本クレア製CL-0304型）を用いて採取し、試料とした。得た尿試料は、遠沈（2000×g、15分）後、その上清を以下の実験に用いた。

分析試料の調製：代謝物の抱合体および非抱合体（遊離体）の両方を測定するため、代謝物の定量は、加水分解尿および非加水分解尿の両方について行った。

非抱合体 尿0.5mlに等量のメタノールを加え混和し、遠沈（3000×g、15分）後その上清をアドバンテックPTFEタイプディスポーザブルシリンジフィルター（DISMIC-13jp、孔径0.50 μ m、東洋濾紙）でろ過し、分析試料とした。

抱合体+非抱合体（*p*-CNB、2,4-DCA、*p*-CA、2-C-5-NPおよび2-A-5-CPの定量） 尿1mlに濃塩酸0.1mlを加え沸騰湯浴上で1時間加熱し、加水分解した。放冷後、5規定水酸化ナトリウム水溶液0.24mlを加え中和した。遠沈（3000×g、15分）後その上清0.5mlに等量のメタノールを加え、以下上記の非抱合体と同様に処理し、分析試料を得た。

定量：各代謝物の標準溶液（0.20～200.0 μ g/ml）を等量の水で希釈し、その混液の20 μ lを装置に注入し、分析した。得られたクロマトグラムにおけるピークの面積と標準溶液の濃度から、検量線を作成し、ピーク面積法により尿試料中の各代謝物の濃度を定量した。

回収率：*p*-CNBおよびその代謝物（2,4-DCA、*p*-CA、2-C-5-NPおよび2-A-5-CP）の非抱合体の加熱による消失、分解を調べるため、*p*-CNB無投与のラッ

トから得た尿にこれらの化合物の既知量（1.0、5.0、20.0および100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加後加熱し、その後の回収率を計算した。

中性尿および酸性尿中での *p*-CNB とその代謝物の安定性：

中性尿中での安定性 各代謝物の標準物質約1.0 mgをそれぞれ別々に、*p*-CNB無投与のラットから得た尿（pH 6~7）50 mlに加えた。各代謝物について尿試料を25本の褐色のスクリーバイアルに1 mlずつ分注した。そのうちの1本の定量を、各代謝物について直ちに行った。測定された濃度を各代謝物の保存0時間後における濃度とした。各代謝物について残りのバイアル24本を、8本ずつ3群に分け、それぞれ、分析までの期間-20℃、4℃および室温に保存し、1、2、4、7、11、16、21および30日後に各試料中の各代謝物を定量した。

酸性尿中での安定性 各代謝物の標準物質約1.0 mgをそれぞれ別々に、*p*-CNB無投与のラットから得た尿50 mlに加えた。各尿試料に1規定塩酸5 mlを加え酸性とした。以下、上記の中性尿試料と同様に処理した。分析の際は1規定水酸化ナトリウム水溶液で中和したのち定量した。

3. 結果および考察

クロマトグラフィー：*p*-CNBおよび2,4-DCAを添加したラットの尿および無添加の尿から調製された試料を Condition-1 の条件により分析した際のクロマトグラムをそれぞれ Fig. 3-2-1 AおよびBに示した。*p*-CNBおよび2,4-DCAの保持時間は、それぞれ12.5分、18.6分であった。同様に、*p*-CA、2-C-5-NP、2-A-5-CP、*p*-CAAおよび4-C-2-HAAを Condition-2 の条件により分析した際のクロマトグラムを Fig. 3-2-2に、ANPCを Condition-3 の条件により分析した際のクロマトグラムを Fig. 3-2-3にそれぞれ示した。また、Fig. 3-2-4は、*p*-COA標準溶液（A）、*p*-CNB投与ラット（B）および無投与のラット（C）から得られた尿試料を Condition-4 の条件により分析した際のクロマトグラムを示している。4-C-2-HAA、2-A-5-CP、*p*-CA、*p*-CAAおよび2-C-5-NPの保持時間は、それぞれ15.6分、17.4分、19.9分、27.4分および28.9分であった。同様に、ANPCの保持時間は5.8分、*p*-COAの保持時間は19.8分であった。いずれの分

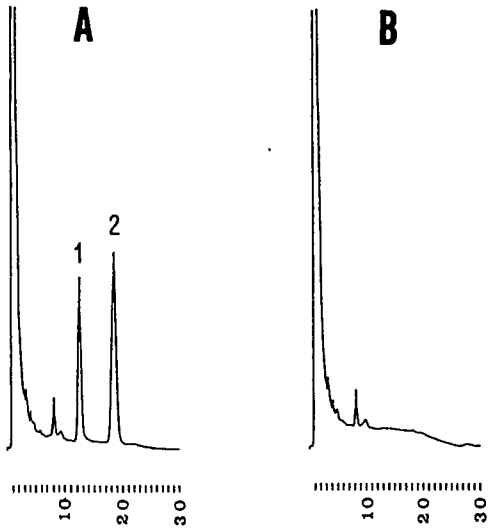


Fig. 3-2-1. Typical Chromatograms of a Sample Prepared from Rat Urine Spiked with *p*-CNB (1) and 2,4-DCA (2) (20 µg/ml each) (A) and a Control Urine Sample (B).

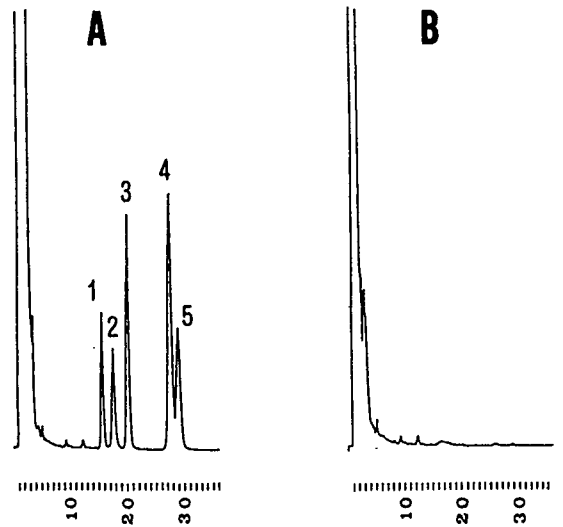


Fig. 3-2-2. Typical Chromatograms of a Sample Prepared from Rat Urine Spiked with 4-C-2-HAA (1), 2-A-5-CP (2), *p*-CA (3), *p*-CAA (4) and 2-C-5-NP (5) (20 µg/ml each) (A) and a Control Urine Sample (B).

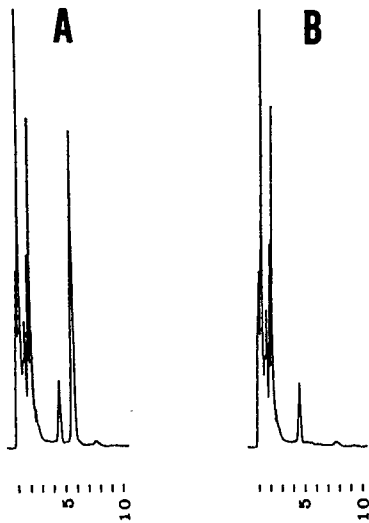


Fig. 3-2-3. Typical Chromatograms of a Sample Prepared from Rat Urine Spiked with ANPC (20 µg/ml) (A) and a Control Urine Sample (B).

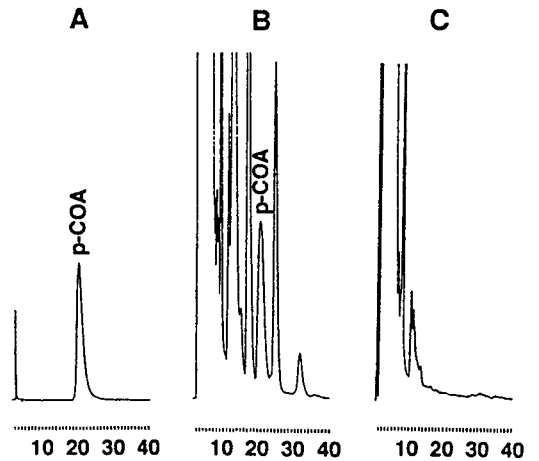
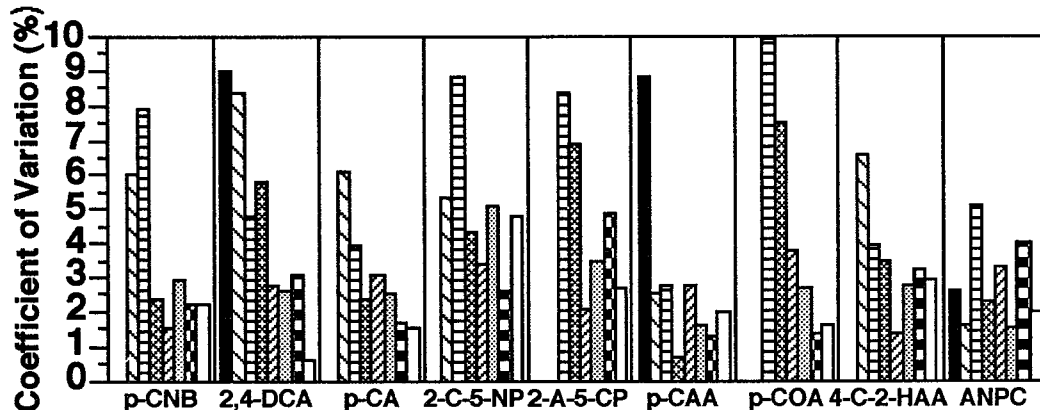


Fig. 3-2-4. Typical Chromatograms of Standard Solution of *p*-COA (20 µg/ml) (A) and Samples from Rat Urine Collected for 48 h after Intraperitoneal Administration of 100 mg/kg *p*-CNB (concentration, 22.2 µg/ml) (B) and from Control Rat Urine (C).

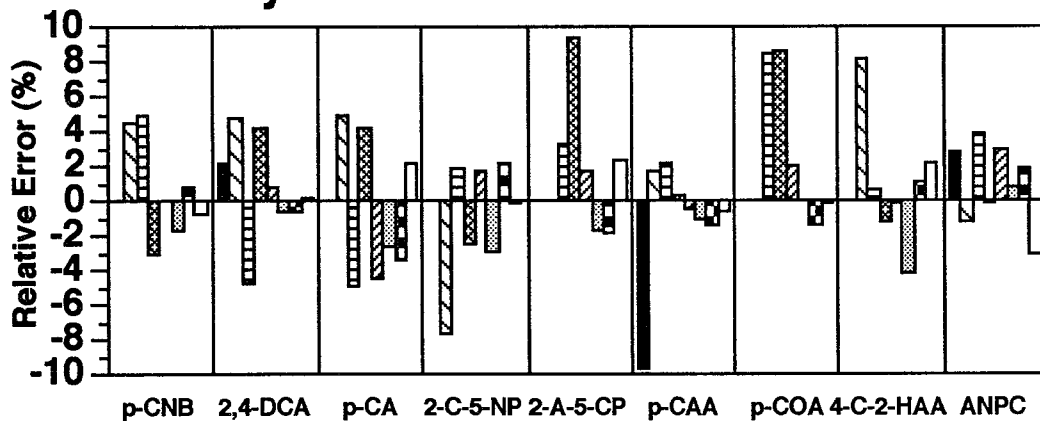
析条件においても、*p*-CNBおよび各代謝物の溶出される分画には、他の尿中成分による妨害ピークは観察されず、いずれの代謝物もその分離は良好であった。

定量：全ての代謝物において、その標準溶液と等量の水との混液から得られた検量線の勾配は、等量の尿との混液から得られた検量線の勾配と一致した。したがって、標準溶液と水との混液から得られた検量線を各代謝物の定量のために用いることができると考えられた。各代謝物の検量線はいずれも200 μg/ml以下の濃度において直線性を示し、そ

A. Precision



B. Accuracy



p-CNB Metabolite

Spiked Concentration (μg/ml)

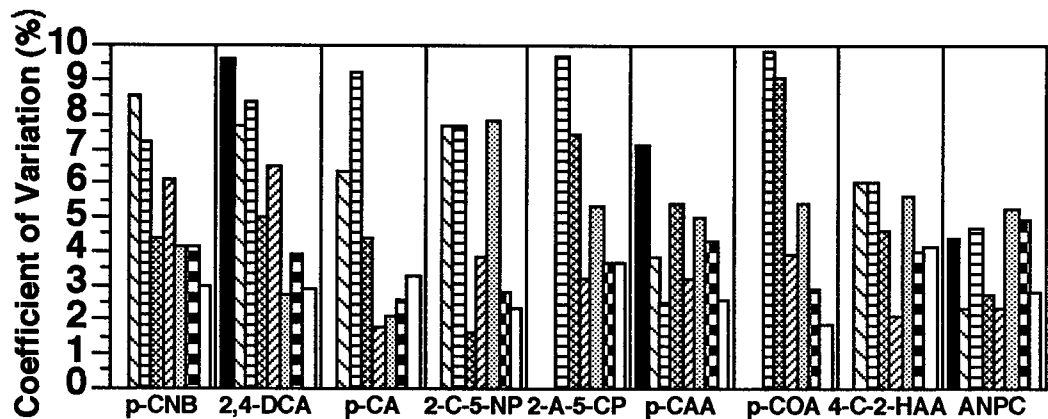


Fig. 3-2-5. Intra-day Precision (A) and Accuracy (B) of the Method (n = 6).

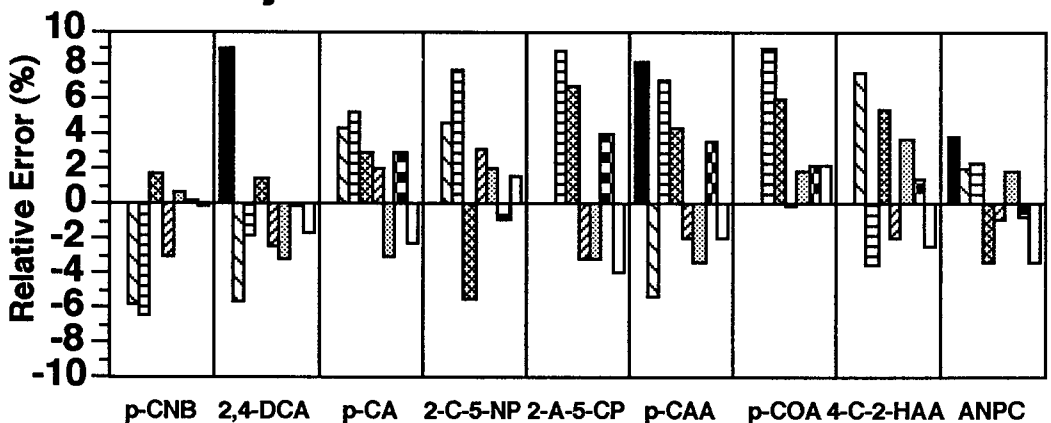
の相関係数は、いずれも0.9998 (n=10) 以上であった。

精密性と正確性：本法における精密性と正確性は、種々の量の各標準物質を添加した尿の繰り返し分析 (n=6) により調べた。2,4-DCA、*p*-CAAおよびANPCでは0.2~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の8種の濃度の各尿試料を調製した。同様に、*p*-CNB、*p*-CA、2-C-5-NPおよび4-C-2-HAAでは0.5~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の7種の濃度、2-A-5-CPおよび*p*-COAでは1.0~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の6種の濃度の各尿試料をそれぞれ

A. Precision



B. Accuracy



p-CNB Metabolite

Spiked Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)



Fig. 3-2-6. Inter-day Precision (A) and Accuracy (B) of the Method (n = 6).

れ調製した。Fig. 3-2-5は同一日の6回の繰り返し分析（日内再現性）の結果を、Fig. 3-2-6は異なる6日間の繰り返し分析（日間再現性）の結果をそれぞれ示している。定量法の精密性は6回の分析における変動係数（C.V.値）により、正確性は相対誤差により評価した。変動係数は、各化合物を低濃度含む試料ほど増加する傾向があるが、日内再現性、日間再現性の試験において、各化合物のどの添加濃度においても、10%以下であった。また、相対誤差も同様に、いずれも±10%以下であった。したがって、本法は、精密性、正確性においてすぐれた方法であり、いずれの代謝物も試験した濃度範囲において定量可能であり、得られた分析結果は、十分信頼できるものと考えられた。

回収率： *p*-CNBおよびその代謝物（2,4-DCA、*p*-CA、2-C-5-NPおよび2-A-5-CP）の抱合体を測定するため、尿に10分の1容量の濃塩酸を添加し、100℃で1時間加熱し、尿を加水分解した。さらに厳しい条件により、高濃度の代謝物を含む*p*-CNB投与ラットの尿を加水分解しても、上記の代謝物の遊離体は増加しなかったため、

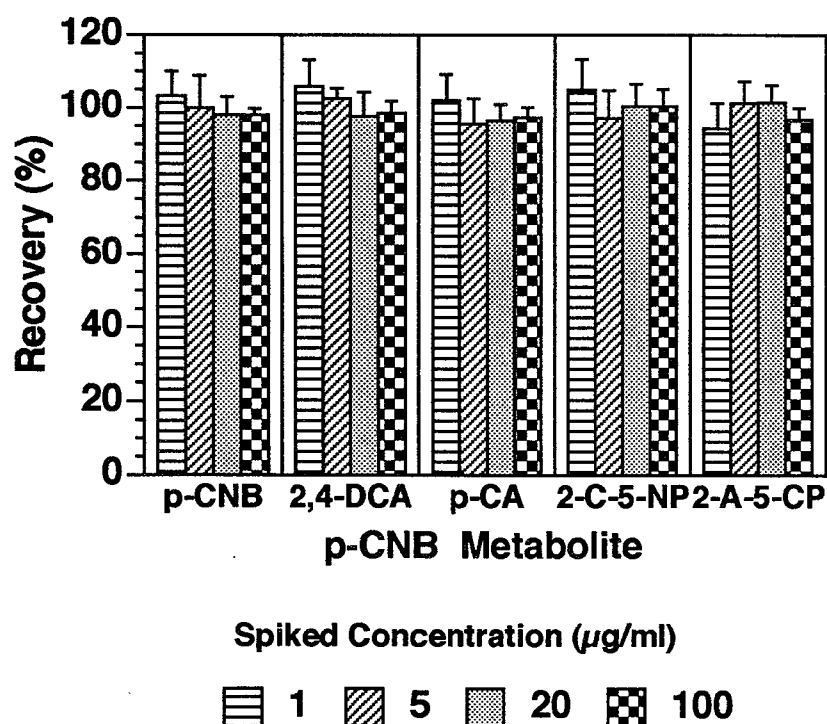


Fig. 3-2-7. Recoveries of *p*-CNB and Its Metabolites from Urine Heated for Hydrolysis. Values are means + S.D. (n = 6).

この条件により代謝物は完全に加水分解されると考えられた。これら代謝物の遊離体の加熱による分解、尿からの消失を調べるため、これら5物質の標準物質の既知量を添加した尿を100℃で1時間湯浴上で加熱し、加熱後の尿からの回収率を調べた。Fig. 3-2-7に結果を示した。5種の化合物の各添加濃度における回収率は、94～106%であり、各化合物の全試験濃度において、その標準偏差(n=6)はいずれも9%以下であった。したがって、これらの化合物は、用いた加水分解条件において、加熱に対して安定であると考えられた。

p-CNBおよびその8種の代謝物の非加水分解尿からの回収率は、上記の精密性と正確性の実験結果より、ほぼ完全であると考えられた。

検出限界：本法におけるp-CNBおよびその代謝物の非加水分解尿中での検出限界は、S/N比2:1で以下の通りであった。2,4-DCA、p-CAAおよびANPCは0.05 μg/ml、p-CNB、p-CA、2-C-5-NPおよび4-C-2-HAAは0.1 μg/ml、2-A-5-CPおよびp-CoAは0.2 μg/ml。

保存に対する安定性：中性尿および酸性尿中のp-CNBおよび代謝物の-20℃、4℃および室温における安定性を調べ、結果をFig. 3-2-8に示した。代謝物の大部分は、低温での保存ほど安定であった。p-CNB、2,4-DCAおよびp-CAは、酸性尿中で凍結(-20℃)保存するのが最も安定であった。しかし、この保存条件でも、1週間後および1カ月後のp-CNBの消失率は、それぞれ約10%および約45%であった。2-A-5-CPは、中性尿中での保存では、どの保存温度においても保存後急速に消失し、室温保存では、約2週間でほぼ完全に消失した。しかし、酸性尿中では比較的安定であった。2-C-5-NPおよびp-CoAは、いずれの保存条件においても1カ月間かなり安定であった。また、p-CAAおよび4-C-2-HAAは酸性尿中よりも中性尿中のほうがより安定であり、凍結した中性尿中では、約1カ月間顕著な消失は観察されなかった。一方、凍結した酸性尿中では、p-CAAおよび4-C-2-HAAは約1週間は比較的安定であるが、1カ月の保存では、それぞれその約20%、約30%が消失した。また、ANPCは、中性尿中での室温保存を除く他の保存条件では比較的安定であった。以上の結果より、尿試料は、分析までの期間酸性下-20℃で凍結保存するのが望ましいと考えられた。

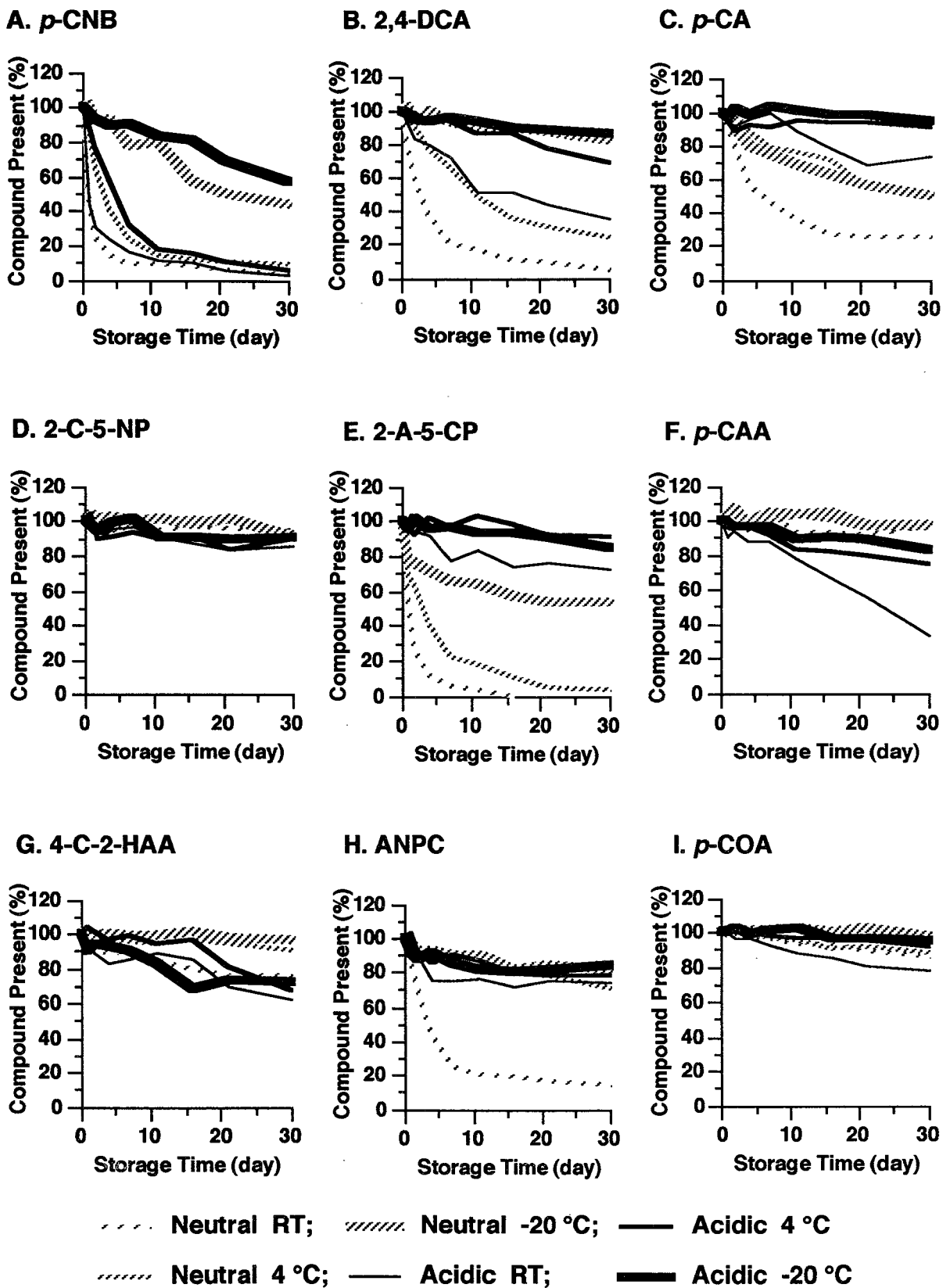


Fig. 3-2-8. Stabilities of *p*-CNB and Its Metabolites at -20°C, 4°C and Room Temperature (RT) in Acidic and Neutral Urine Samples. The concentration of each compound just before storage (time zero) was set at 100% (each compound, ca. 20 µg/ml).

ここに開発されたHPLCによる尿中*p*-CNBおよびその代謝物の定量法は、簡易で正確、精密な方法であり、*p*-CNB取り扱い作業員や中毒患者等の曝露者における尿中代謝物の測定に十分適用できるものと考えられた。

第4章 ヒトにおける *p*-クロロニトロベンゼン代謝 の薬物動力的解析

第1節 急性中毒患者における *p*-クロロアニリンの代謝

1. 緒言

p-クロロアニリン (*p*-CA) は、第1章第2節にも記述したとおり、*p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) のニトロ基の還元体であり、主として染料や農薬の中間体として使用されている。*p*-CA は、*p*-CNB と同様に血液毒性作用[58-61]や発癌性[66]を有することが知られている。しかし、ヒトにおけるその体内での動態は、明らかにされていない。

第1章において、*p*-CA による急性中毒患者における尿中代謝物を同定し、6種の代謝物を尿中より検出した。これらの代謝物は、いずれも、*p*-CNB の代謝物として、*p*-CNB による急性中毒患者の尿中から検出されたものであった。

本節では、*p*-CNB の体内動態解析の一環として、*p*-CNB の代謝物の一種である *p*-CA の代謝の薬物動力的解析を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物： *p*-CA、2,4-ジクロロアニリン (2,4-DCA)、2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用メタノールは、第1章で用いたものを使用した。

尿中代謝物の定量： 第1章第2節において記述した *p*-CA 急性中毒患者から、曝露事故後経時的に採取した尿を試料として用いた。第1章において同患者の尿中より同定された6種の代謝物のうち、*p*-クロロアセトアニリド (*p*-CAA) および *p*-クロロオキザニン酸 (*p*-COA) は *p*-CA、また、4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド (4-C

-2-HAA)は2-A-5-CPのそれぞれ抱合体とみなすことができる。また、p-CA、2-A-5-CPおよび2,4-DCAは、いずれも尿中には大部分抱合体として排泄されていることを第1章で確認した。したがって、本節では、患者の尿を加水分解し、p-CA、2-A-5-CPおよび2,4-DCAの3種の代謝物を、第3章第2節において開発したHPLC法により定量した。尿の濃淡を補正するため、定量値はすべてFolin-Wu法[102]により測定した尿中クレアチニン量で補正した。

代謝物の総排泄量および排泄量の半減期の算出：経時的に定量された各代謝物の推移を薬物動力学における2-コンパートメントモデルにあてはめ、各代謝物の総排泄量および排泄量の半減期を算出した。単位時間あたりの各代謝物の排泄量Cは、第1相、第2相の速度定数をそれぞれ α 、 β とすると次式で表わされる。

$$C = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t) \quad (1)$$

ここで、A、Bはそれぞれ第1相、第2相の初期排泄量である。代謝物の尿中排泄量の半減期 $t_{1/2}$ は、第1相、第2相それぞれ

$$t_{1/2}^1 = \ln 2 / \alpha \quad (2)$$

$$t_{1/2}^2 = \ln 2 / \beta \quad (3)$$

により得られる。(1)式を時間 t で $t=0$ から ∞ まで積分すると

$$T = A / \alpha + B / \beta \quad (4)$$

となり、総排泄量Tが得られる。総排泄量はヒトにおける1日クレアチニン尿中排泄量を1250mg[29]として計算した。

3. 結果

p-CAによる急性中毒患者における3種の尿中代謝物、p-CA、2-A-5-CPおよび2,4-DCAの時間的推移をFig. 4-1-1に示した。さらに、各代謝物の推移からおのおのの総排泄量および排泄量の半減期を算出した結果をTable 4-1-1に示した。各代謝物の尿中排泄量の半減期は、第1相、第2相それぞれ1.7~2.4時間、3.3~4.5時間であった。p-CA尿中代謝物の総量は、p-CA量に換算して454.6mgとなり、そのうちの約3分の2がp-CAとして排泄された。

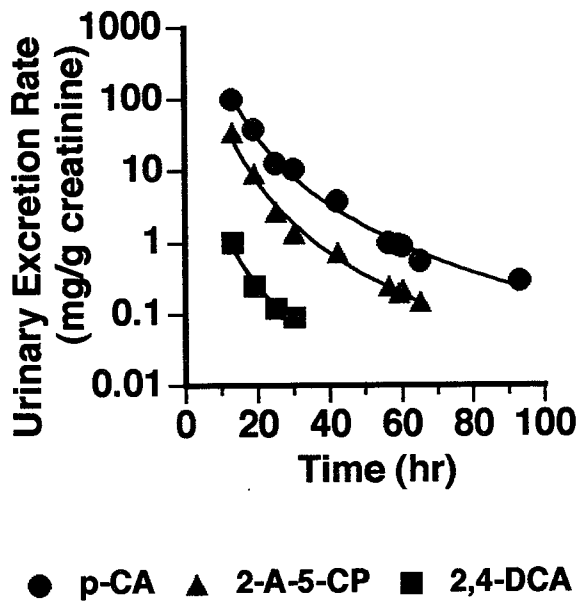


Fig. 4-1-1. Time Courses of Urinary Excretion Rates of *p*-CA Metabolites in a Subject.
 The abscissa shows the number of days from *p*-CA exposure.

Table 4-1-1. Total Amounts and Half-life Periods of Metabolites Excreted in Urine of a Subject Exposed to *p*-CA.

Metabolite	Excretion amount (mg) *	Half-life period (h)	
		Rapid phase	Slow phase
<i>p</i> -CA	294.7 (64.8)	2.4	4.5
2-A-5-CP	153.6 (33.8)	1.7	3.3
2,4-DCA	6.3 (1.4)	1.7	3.8
Total	454.6		

* : The values for each metabolite were calculated by assuming that 1250 mg creatinine per day was excreted in the urine of the subject and are shown as equivalent to the parent *p*-CA. Figure in the parentheses is the fraction of each metabolite against the total amount of three metabolites.

4. 考察

p-C A急性中毒患者の尿中より6種の代謝物が第1章で同定された。他の代謝物が尿中に存在する可能性もあるが、ヒトにおける尿中代謝物の大部分は、検出された6物質であると仮定し、さらに、1日クレアチニン排泄量を1250mgとすると、本症例における*p*-C A尿中代謝物の総量は、*p*-C Aに換算して約450mgであった。また、吸収された*p*-C Aの尿中への排泄率は不明であるが、代謝物はすべて尿中に排泄されると仮定すると、尿中に排泄される*p*-C Aの約34%が芳香環の水酸化を受け、約1%が芳香環の塩素化を受けると考えられる。これらはいずれも遊離の状態ではなく、大部分はさらにグルクロン酸や硫酸等の抱合を受けて排泄されるものと考えられた。残りの約65%が*p*-C Aとして尿中に排泄されるが、大部分は同様の抱合を受け、排泄されると考えられた。

p-C Aは、他の2種の代謝物よりも尿中排泄量の半減期が若干長かった。Fig. 2-2-1に示したように、*p*-C Aの代謝において体内で起こる*p*-C Aと*p*-C A Aとの可逆反応がこの原因の一つとして推定された。

第2節 急性中毒患者における *p*-クロロニトロベンゼンの代謝

1. 緒言

近年のコンピュータ技術の急速な進歩により、生物薬剤学や薬物動力学の分野において、投与された薬物等の体内動態（吸収、分布、代謝、排泄）を数学的に解明することが可能となった。

p-クロロニトロベンゼン（*p*-CNB）等の有害化学物質を取り扱う作業者において、その曝露量を尿中代謝物から把握するためには、その吸収から尿中排泄までの体内動態を明らかにすることは重要である。第1章において、*p*-CNB曝露の際、尿中に排泄される代謝物を同定し、また、第2章では*p*-CNBの代謝経路を明らかにした。

本節では、ヒトにおける*p*-CNBの体内動態に関する知見を得るため、*p*-CNBによる急性中毒患者から得た尿を試料とし、各尿中代謝物の時間的推移を調べ、この推移のコンパートメントモデル分析およびモーメント分析により、ヒトにおける*p*-CNBの代謝の薬物動力学的解析を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物：*p*-クロロアニリン（*p*-CA）、2,4-ジクロロアニリン（2,4-DCA）、*N*-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン（ANPC）、2-クロロ-5-ニトロフェノール（2-C-5-NP）、2-アミノ-5-クロロフェノール（2-A-5-CP）および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用メタノールは、第1章で用いたものを使用した。

尿中代謝物の定量：第1章第1節において記述した11名の*p*-CNB急性中毒患者のうち、曝露事故後長期間経時的に採尿できた6名の患者（23～51歳の男性）から得た尿を試料とした。6名の患者の入院期間とその間に得られた尿試料数を Table 4-2-1 に示した。第1章において、患者の尿中より同定された8種の代謝物のうち、主要な5種の

Table 4-2-1. Number of Urine Samples Collected from Each Subject and His Length of Hospitalization.

	U.A.	M.T.	S.K.	F.Y.	M.Y.	U.Y.
Number of samples	88	66	57	62	44	58
Length of hospitalization (days)	29	29	23	23	18	14

代謝物、すなわち、2-C-5-NP、2,4-DCA、*p*-CA、2-A-5-CPおよびANPCを、第3章第2節において開発したHPLC法により定量した。尿中2-C-5-NP、2,4-DCA、*p*-CAおよび2-A-5-CPは、遊離体とその抱合体の合計量を測定するため、加水分解後分析した。ANPCは、加水分解せずに分析した。尿の濃淡を補正するため、定量値はすべて Folin-Wu 法[102]により測定した尿中クレアチニン量で補正した。

コンパートメントモデル分析：第2章において *p*-CNBの代謝経路について検討し、*p*-CNBは Fig. 2-2-1に示した経路により尿中へ排泄されることを明らかにした。また、第1章では、中毒患者において、吸収された *p*-CNBは、尿中へは全て代謝されたのち排泄されること、*p*-CNBから生じた代謝物、2-C-5-NP、2,4-DCA、*p*-CA

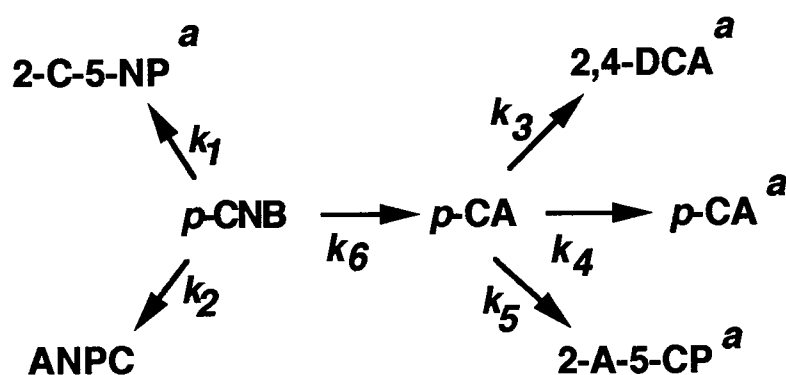


Fig. 4-2-1. A Model Metabolic Pathway of *p*-CNB for Estimation of Rate Constants in Transformation of *p*-CNB and Its Metabolites.

$k_1 - k_6$: rate constants in transformation. a : Most of the metabolite was in the conjugated form.

および2-A-5-CPは、主として抱合体として尿中に排泄されることを明らかにした。
p-クロロアセトアニリド (*p*-CAA) および *p*-クロロオキザニリン酸 (*p*-COA) は
p-CA、また、4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド (4-C-2-HAA) は2-A-
5-CPのそれぞれ抱合体の一種とみなすことができる。したがって、本節では、*p*-CNB
の代謝経路を Fig. 4-2-1のように単純化し、ヒトにおける *p*-CNBの代謝を薬物
動力学的に評価した。以下の3つの仮定のもと、*p*-CNBおよびその代謝物の変換にお
ける速度定数 ($k_1 \sim k_6$) を、パーソナルコンピュータ (NEC製98NOTE SX
/E、東京) を用い、山岡ら[103]により開発された非線形最小二乗法プログラムMUL
TI (RUNGE) により算出した。(1) *p*-CNBは、患者の体内に急速に吸収され
る。(2) 吸収された *p*-CNBは全て、Fig. 4-2-1の代謝経路により尿中へ排泄さ
れる。(3) *p*-CNBおよびその代謝物の消失過程は全て、線形1-コンパートメントモ
デルに適合する。実際には以下の微分方程式を解き、Fig. 4-2-1における $k_1 \sim k_6$
を算出した。

$$dX_{p\text{-CNB}}/dt = -(k_1 + k_2 + k_6) \times X_{p\text{-CNB}} \quad (1)$$

$$dX_{p\text{-CA}}/dt = k_6 \times X_{p\text{-CNB}} - (k_3 + k_4 + k_5) \times X_{p\text{-CA}} \quad (2)$$

$$dX_{2\text{-C-5-NP}'}/dt = k_1 \times X_{p\text{-CNB}} \quad (3)$$

$$dX_{\text{ANPC}'}/dt = k_2 \times X_{p\text{-CNB}} \quad (4)$$

$$dX_{2,4\text{-DCA}'}/dt = k_3 \times X_{p\text{-CA}} \quad (5)$$

$$dX_{p\text{-CA}'}/dt = k_4 \times X_{p\text{-CA}} \quad (6)$$

$$dX_{2\text{-A-5-CP}'}/dt = k_5 \times X_{p\text{-CA}} \quad (7)$$

ここで、 $X_{p\text{-CNB}}$ および $X_{p\text{-CA}}$ は、それぞれ体内の *p*-CNB および *p*-CA の量、また、 $X_{2\text{-C-5-NP}'}$ 、 $X_{\text{ANPC}'}$ 、 $X_{2,4\text{-DCA}'}$ 、 $X_{p\text{-CA}'}$ 、 $X_{2\text{-A-5-CP}'}$ は、それぞれ2-C-5-NP、
ANPC、2,4-DCA、*p*-CA および2-A-5-CPの尿中排泄量を示している。

モーメント分析：各代謝物の無限時間における累積尿中排泄量 (X^∞) および平均滞留時
間 (MRT) を山岡ら[104]により開発された、速度過程のモデル非依存的分析法である

モーメント分析により算出した。X[∞]およびMRTは、それぞれ0次モーメント、1次モーメントであり、次式で定義される。

$$X^{\infty} = \int_0^{\infty} (dX/dt) dt \quad (8)$$

$$MRT = \int_0^{\infty} t (dX/dt) dt / X^{\infty} \quad (9)$$

ここで、dX/dtは、尿中排泄速度-時間曲線を表わす関数である。各代謝物のMRT値は、p-CNBの吸収からその代謝物の排泄までに要する時間を表わしている。

X[∞]は、ヒトにおける1日クレアチニン尿中排泄量を1250mg[29]として計算した。

3. 結果

患者(U. A.)における各代謝物の尿中排泄速度および累積尿中排泄量の時間的推移をFig. 4-2-2に示した。各中毒患者における、各代謝物の尿中排泄速度-時間曲線から統計学的モーメントを算出し、結果をTable 4-2-2に示した。患者における5種の代謝物の尿中排泄量の合計量(総排泄量)は、179~1076mgであった。総排泄量に占める2-C-5-NPの排泄量の割合は、6名の平均値として、12.2%であった。同様に、ANPCは48.0%、2,4-DCAは1.2%、p-CAは29.9%、2-A-5-CPは8.7%を占めた。2-C-5-NPのMRT値の6名の平均は、6.7日であった。同様に、ANPCは7.0日、2,4-DCAは3.7日、p-CAは10.0日、2-A-5-CPは6.0日のMRT値を示した。

Fig. 4-2-1のp-CNBおよびその代謝物の変換における速度定数(k₁~k₆)の算出結果をTable 4-2-2に示した。

4. 考察

各p-CNB代謝物の尿中排泄速度は、片対数グラフ上で、測定期間中時間とともに直線的な減少を示したため、その推移は、1-コンパートメントモデルに適合するものと示唆された。p-CNB代謝物は患者の入院期間中を通じて尿中から検出されたため、p-CNBのヒト体内からの消失には、かなり長時間を要するものと考えられた。また、6名の

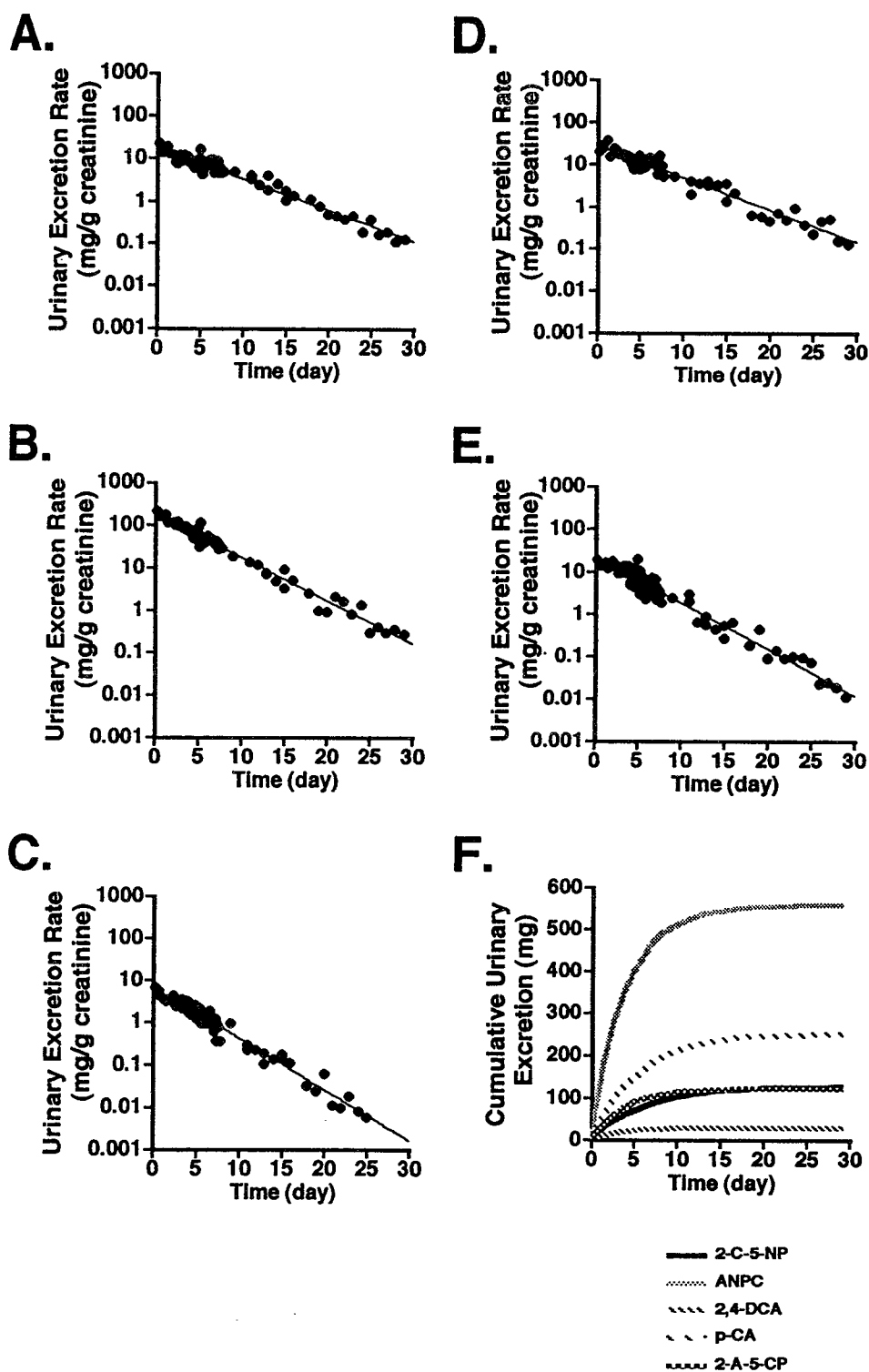


Fig. 4-2-2. Time Courses of Urinary Excretion Rates (A-E) and Cumulative Excretion Amounts (F) of *p*-CNB Metabolites in a Subject (U.A.).

The abscissa shows the number of days from *p*-CNB exposure. A, 2-C-5-NP; B, ANPC; C, 2,4-DCA; D, *p*-CA; E, 2-A-5-CP. For graph F, the values for the metabolites were calculated using the creatinine excretion amount of 1250 mg/day and are shown as equivalent to the parent *p*-CNB.

Table 4-2-2. Statistical Moments and Rate Constants of *p*-CNB Metabolites.

	U.A.	M.T.	S.K.	F.Y.	M.Y.	U.Y.	Mean ± S.D.
$X^{\infty}_{2-C-5-NP}$ ^a	124.3 (11.6)	90.8 (12.8)	46.8 (9.8)	74.7 (17.4)	57.8 (16.4)	9.4 (5.3)	67.3±39.3 (12.2±4.4)
X^{∞}_{ANPC} ^a	552.0 (51.3)	379.2 (53.3)	242.1 (50.8)	187.9 (43.9)	156.5 (44.5)	79.0 (44.2)	266.1±172.2 (48.0±4.3)
$X^{\infty}_{2,4-DCA}$ ^a	27.7 (2.6)	6.7 (0.9)	4.9 (1.0)	2.5 (0.6)	1.6 (0.5)	2.8 (1.6)	7.7±10.0 (1.2±0.8)
X^{∞}_{p-CA} ^a	251.0 (23.3)	186.5 (26.2)	129.8 (27.2)	130.9 (30.6)	112.6 (32.0)	72.0 (40.3)	147.1±62.8 (29.9±6.0)
$X^{\infty}_{2-A-5-CP}$ ^a	121.1 (11.3)	48.3 (6.8)	53.1 (11.1)	32.2 (7.5)	23.0 (6.5)	15.6 (8.7)	48.9±38.2 (8.7±2.1)
X^{∞}_{Total} ^a	1076.1	711.5	476.7	428.2	351.5	178.8	537.1±316.0
MRT _{2-C-5-NP} ^b	6.2	9.6	8.7	5.2	6.4	3.8	6.7±2.2
MRT _{ANPC} ^b	4.1	8.6	8.5	4.7	9.9	5.9	7.0±2.4
MRT _{2,4-DCA} ^b	3.7	4.3	3.4	3.0	5.1	2.8	3.7±0.9
MRT _{p-CA} ^b	5.7	18.0	11.0	5.6	12.8	7.0	10.0±4.9
MRT _{2-A-5-CP} ^b	4.1	7.2	8.8	4.4	7.5	4.2	6.0±2.0
k_1 ^c	0.025	0.015	0.013	0.037	0.022	0.015	0.021±0.009
k_2 ^c	0.129	0.062	0.064	0.094	0.049	0.096	0.082±0.030
k_3 ^c	0.140	0.081	0.396	0.053	0.047	0.515	0.205±0.200
k_4 ^c	1.066	0.857	4.456	2.142	3.244	9.388	3.526±3.175
k_5 ^c	0.587	0.424	2.138	0.598	0.939	2.552	1.206±0.907
k_6 ^c	0.090	0.031	0.047	0.082	0.040	0.109	0.067±0.031

^a : Cumulative urinary excretion amount (mg) at infinite time of each metabolite. The values for each metabolite were calculated by assuming that 1250 mg creatinine per day was excreted in the urine of the subjects and are shown as equivalent to the parent *p*-CNB. Figure in the parentheses is the fraction of each metabolite against the total amount of five metabolites ($X^{\infty}_{Metabolite}/X^{\infty}_{Total}$, %). ^b : Mean residence time (day) from exposure to urinary excretion of each metabolite. ^c : Rate constants (1/day) in metabolic pathway shown in Fig. 4-2-1.

患者における中毒症状や血液学的所見は入院期間の後半では正常レベルに回復したが、5種の代謝物は入院期間を通じてその尿中から検出された。したがって、*p*-CNB曝露による血液学的な変化が現れない曝露濃度、すなわち、低濃度の*p*-CNB曝露の際にも、尿中代謝物は定量可能であると考えられた。

Table 4-2-2に示したように、メルカプツール酸の一種であるANPCは、最も主要な*p*-CNB代謝物であり、患者の尿中から検出される全代謝物の約半分量を占めた。メルカプツール酸は、芳香族ハロゲン化炭化水素や芳香族ニトロ化合物に曝露されたウサ

ギ、ラット、イヌ、ヒト等の哺乳動物の尿中に排泄されることがよく知られている [37, 45, 52-54]。芳香族ハロゲン化炭化水素の一種であるクロルベンゼン取り扱い作業において、尿中に検出されるクロルベンゼン代謝物全量に占める4-クロロフェニールメルカプツール酸の割合は、0.4%であり非常に少ない[105]。また、芳香族ニトロ化合物の一種であるニトロベンゼン曝露者における主要な尿中代謝物は、*p*-ニトロフェノールと*p*-アミノフェノールであり[106, 107]、ニトロベンゼンを投与したウサギやモルモット [108]の尿中に検出される*p*-ニトロフェニールメルカプツール酸はニトロベンゼン曝露者の尿中からは検出されなかった。したがって、ヒト体内での*p*-CNBのグルタチオン抱合は、クロルベンゼンやニトロベンゼンのグルタチオン抱合よりも容易に起こるものと考えられた。患者における、アミノ化合物(2,4-DCA、*p*-CAおよび2-A-5-CP)の尿中排泄量は尿中に排泄される全代謝物の34~51%を占め、*p*-CNBのニトロ基の還元反応は、グルタチオン抱合によるメルカプツール酸の生成に次いで、重要な代謝経路と考えられた。*p*-CNBから生じた*p*-CAはさらに代謝され、その約75%は、N-抱合体(*p*-CAA、*p*-COA、グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体など)として尿中に排泄される。残りの*p*-CAは、2-A-5-CP(約22%)および2,4-DCA(約3%)に代謝される。本章第1節の*p*-CAによる急性中毒患者における主要な尿中代謝物は、*p*-CA、2-A-5-CPおよび2,4-DCAのいずれも抱合体であり、これらの排泄量の比は、*p*-CAに換算して、65:34:1(w/w)であった(Table 4-1-1)。本節で*p*-CNB中毒患者の尿中から検出されたこれら3種の代謝物の比は、*p*-CA:2-A-5-CP:2,4-DCA=75:22:3であり、概ね*p*-CA中毒患者における3種の排泄量の比と一致した。したがって、*p*-CNBから代謝されて生じた*p*-CAは、吸収された*p*-CAと同じ代謝を経て尿中に排泄されるものと考えられた。

コンパートメントモデル分析の結果、全ての患者において、 k_1 および k_6 の値は小さく、 k_4 と k_5 は比較的大きな値を示した(Table 4-2-2)。したがって、*p*-CNBのニトロ基の還元反応速度は遅いが、結果生じた*p*-CAは、比較的速くさらに代謝されると示唆された。*p*-CAのN-抱合反応は、特に速い反応であると考えられた。一方、*p*-CNBの核の水酸化反応速度は遅いと示唆された。

2,4-DCAのMRT値(平均3.7日)は、5種の代謝物中最も小さく、*p*-CAから生じた2,4-DCAの消失は、代謝物中最も速いと考えられた。一方、患者における*p*-

CAのMRT値は、平均10.0日であり、代謝物中最も長期間体内に滞留するものと考えられた。Fig. 2-2-1に示したように、*p*-CNBの代謝経路において体内で起こる*p*-CAと*p*-CAAとの可逆反応がその原因の一つと推定された。

p-CNBの還元体である*p*-CAによる急性中毒患者において、各代謝物の排泄量の半減期は、いずれも数時間であり（Table 4-1-1）、*p*-CNBは、*p*-CAよりも吸収後長期間体内に残留するものと考えられた。*p*-CAは*p*-CNBの代謝物の一種であり、*p*-CNBから*p*-CAへの代謝速度が遅いこと、また、*p*-CNBは*p*-CAよりも脂溶性が強いことなどがこの原因として推定された。このことは、アニリンがニトロベンゼンよりも速く体内から消失するという報告[19]と一致するものと考えられた。

6名の各中毒患者において、*p*-CNBおよびその代謝物の消失速度はかなり個人差があるが、5種の代謝物の尿中排泄量の比はほぼ一定すると考えられた。

第5章 ラットにおける *p*-クロロニトロベンゼン代謝 の薬物動力学的解析

1. 緒言

緒論でも記述したように、有害物質の曝露における生物学的モニタリング法を確立するためには、容易に得られる生物学的試料内に曝露の指標となる物質が存在し、また、その指標物質の信頼性の高い簡便な測定法が存在すること、さらに、その測定値が曝露量を正確に反映することが必要である。サンプリングの容易さや被検者に与える負担の軽さ等の点から、曝露物質の尿中代謝物が指標に使用される場合が多い。

p-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) の曝露をその尿中代謝物を用いた生物学的モニタリングにより評価するため、第1章から第4章において、ヒトにおける *p*-CNB の尿中代謝物を明らかにし、また、それら代謝物の分離定量法を開発した。さらに、*p*-CNB の代謝を薬物動力学的に解析した。

本章では、*p*-CNB およびその代謝物の代謝、排泄速度および尿中排泄量の、曝露量による変化、すなわち、量-反応関係を動物実験により調べた。種々の量の *p*-CNB を投与したラットにおける代謝を第4章第2節と同様に薬物動力学的に解析し、ヒトにおける結果とあわせ、*p*-CNB 曝露における生物学的モニタリング指標について考察した。

2. 材料および実験方法

化合物：*p*-CNB、*p*-クロロアニリン (*p*-CA)、2,4-ジクロロアニリン (2,4-DCA)、N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン (ANPC)、2-クロロ-5-ニトロフェノール (2-C-5-NP)、2-アミノ-5-クロロフェノール (2-A-5-CP) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用メタノールは、第1章で用いたものを使用した。

動物：Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットは、日本クレアから購入した。ラットは、実験前2週間ハンドリングし馴らし、10週齢 (367 ± 25 g、 $n = 30$) において実験に使用した。実験中、餌 (Laboratory Chow MF、オリエンタル酵母) および水は、自由に摂取させた。

採血と血漿中 *p*-CNB の定量：1群5匹のラットの腹腔内に、オリーブ油に溶かした *p*-CNB 30、100または333 mg/kg を一回投与した。投与後、1、4、8、25、32、49、73、97および122時間において、無麻酔下、金武の方法[100]により鎖骨下静脈より、約0.3 ml ずつ採血した。得た血液は直ちに遠沈し、血漿を分離した。第3章第1節で開発したHPLC法により血漿中 *p*-CNB を定量した。

採尿と尿中 *p*-CNB 代謝物の定量：実験前1週間1匹ずつ代謝ケージ (日本クレア製CL-0304型) で飼育し馴らした別の15匹 (1群5匹×3群) のラットの腹腔内に、オリーブ油に溶かした *p*-CNB 30、100または333 mg/kg を一回投与した。各ラットの尿は、投与後、8、25、49、73、97、122および169時間において採取した。採尿ごとに、ケージを水で洗浄し、洗浄液は尿に加え、尿量を測定した。第4章第2節の *p*-CNB 急性中毒患者において測定した5種の尿中代謝物 (2-C-5-NP、ANPC、2,4-DCA、*p*-CA および 2-A-5-CP) を、第3章第2節で開発したHPLC法により、同様に定量した。

コンパートメントモデル分析：第2章第1節において *p*-CNB 投与ラットにおける尿中代謝物を同定した際、ラットの尿中より検出された *p*-CNB の量は極微量であり、投与された *p*-CNB は、尿中へは大部分代謝されたのち排泄されると考えられた。したがって、血漿からの *p*-CNB の消失は主に代謝 (酵素反応) により進行し、その過程は、本節で試験した濃度範囲において飽和される可能性がある。一方、第4章第2節の *p*-CNB 急性中毒患者において、*p*-CNB およびその代謝物の代謝、尿中への排泄過程は、線形1-コンパートメントモデルに適合すると仮定し、*p*-CNB の動態を解析した。したがって、ここでは、ラットにおける *p*-CNB の動態を以下の2つのモデルを用いて評価した。

1. 非線形1-コンパートメントモデル

p-CNBの消失過程は、ミカエリス-メンテン式消失を伴う1-コンパートメントモデルに適合すると仮定した。すなわち、腹腔内に投与された*p*-CNBは、急速に全身に分布し、その消失は飽和過程を含むと仮定した。以下の2つの等式を、パーソナルコンピュータ(NEC製98NOTE SX/E)を用い、山岡ら[103]により開発された非線形最小二乗法プログラムMULTI(RUNGE)により解き、*p*-CNBの分布容積(V_d)、ミカエリス定数(K_M)および最大速度(V_{max})を算出した。

$$dC_{p\text{-CNB}}/dt = - (V_{max} / (K_M + C_{p\text{-CNB}})) \times C_{p\text{-CNB}} \quad (1)$$

$$C_{0p\text{-CNB}} = D / V_d \quad (2)$$

ここで、 $C_{p\text{-CNB}}$ は血漿中*p*-CNB濃度、 $C_{0p\text{-CNB}}$ は、血漿中*p*-CNBの初期濃度、 D は*p*-CNB投与量をそれぞれ表わしている。

2. 線形1-コンパートメントモデル

第2章において、ラットにおける*p*-CNBの代謝経路について検討し、*p*-CNBはFig. 2-2-1に示した経路により尿中へ排泄されることを明らかにした。また、投与された*p*-CNBは、尿中へは大部分代謝されたのち排泄されること、また、*p*-CNBから生じた代謝物、2-C-5-NP、2,4-DCA、*p*-CAおよび2-A-5-CPは、主とし

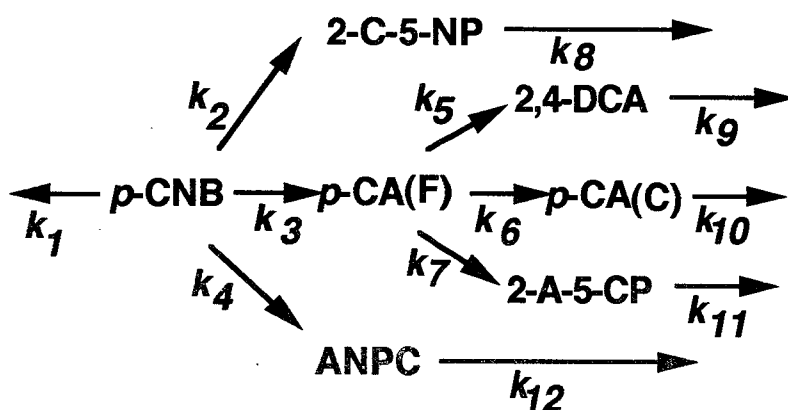


Fig. 5-1. A Model Metabolic Pathway of *p*-CNB for Estimation of Rate Constants in Transformation of *p*-CNB and Its Metabolites.

k_1 : rate constant for elimination other than urinary excretion. $k_2 - k_7$: metabolic rate constants. $k_8 - k_{12}$: urinary excretion rate constants. *p*-CA(F), *p*-CA (free form); *p*-CA(C), *p*-CA (conjugated form).

て抱合体として尿中に排泄されることを明らかにした。*p*-クロロアセトアニリド (*p*-CAA) および *p*-クロロオキザニリン酸 (*p*-COA) は *p*-CA、また、4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリド (4-C-2-HAA) は 2-A-5-CP のそれぞれ抱合体の一種とみなすことができる。したがって、本節では *p*-CNB の代謝経路を Fig. 5-1 のように単純化し、ラットにおける *p*-CNB の代謝を薬物動力学的に評価し、第4章で明らかにしたヒトにおける *p*-CNB の代謝と比較した。以下の5つの仮定のもと、おのおのの量の *p*-CNB を投与したラットにおいて、*p*-CNB およびその代謝物の変換における速度定数 ($k_1 \sim k_{12}$) を、第4章第2節と同様の手法により算出した。(1) 腹腔内に投与された *p*-CNB は、全て急速に全身に分布する。(2) *p*-CNB は、代謝と尿中排泄以外の2つ経路により消失する。(3) *p*-CNB から生じた代謝物は、全て尿中へ排泄される。(4) *p*-CNB の代謝および消失過程、生じた代謝物の尿中への排泄過程は、本来飽和過程を含んでいると考えられるが、全て線形1-コンパートメントモデルに適合する。(5) *p*-CA の遊離体の尿中への排泄量は無視できる。実際には、以下の微分方程式 ((3) ~ (14)) を解き、Fig. 5-1 の *p*-CNB およびその代謝物の消失における、*p*-CNB の尿排泄以外の経路からの消失速度定数 (k_1)、代謝速度定数 ($k_2 \sim k_7$) および尿中排泄速度定数 ($k_8 \sim k_{12}$) を算出した。

$$dC_{p\text{-CNB}}/dt = -(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) \times C_{p\text{-CNB}} \quad (3)$$

$$dX_{2\text{-C-5-NP}}/dt = k_2 \times C_{p\text{-CNB}} \times V_d - k_8 \times X_{2\text{-C-5-NP}} \quad (4)$$

$$dX_{p\text{-CA(F)}}/dt = k_3 \times C_{p\text{-CNB}} \times V_d - (k_5 + k_6 + k_7) \times X_{p\text{-CA(F)}} \quad (5)$$

$$dX_{\text{ANPC}}/dt = k_4 \times C_{p\text{-CNB}} \times V_d - k_{12} \times X_{\text{ANPC}} \quad (6)$$

$$dX_{2,4\text{-DCA}}/dt = k_5 \times X_{p\text{-CA(F)}} - k_9 \times X_{2,4\text{-DCA}} \quad (7)$$

$$dX_{p\text{-CA(C)}}/dt = k_6 \times X_{p\text{-CA(F)}} - k_{10} \times X_{p\text{-CA(C)}} \quad (8)$$

$$dX_{2\text{-A-5-CP}}/dt = k_7 \times X_{p\text{-CA(F)}} - k_{11} \times X_{2\text{-A-5-CP}} \quad (9)$$

$$dX_{2\text{-C-5-NP}'}/dt = k_8 \times X_{2\text{-C-5-NP}} \quad (10)$$

$$dX_{2,4\text{-DCA}'}/dt = k_9 \times X_{2,4\text{-DCA}} \quad (11)$$

$$dX_{p\text{-CA}'}/dt = k_{10} \times X_{p\text{-CA(C)}} \quad (12)$$

$$dX_{2\text{-A-5-CP}'}/dt = k_{11} \times X_{2\text{-A-5-CP}} \quad (13)$$

$$dX_{ANPC}' / dt = k_{12} \times X_{ANPC} \quad (14)$$

ここで、 C_{p-CNB} は血漿中 p -CNB濃度、 $X_{2-C-5-NP}$ 、 X_{ANPC} 、 $X_{2,4-DCA}$ 、 $X_{2-A-5-CP}$ 、 $X_{p-CA(F)}$ および $X_{p-CA(C)}$ は、それぞれ体内の2-C-5-NP、ANPC、2,4-DCA、2-A-5-CP、 p -CA（遊離体）および p -CA（抱合体： p -CAA、 p -COAおよびグルクロン酸および硫酸等のN-抱合体）の量、また、 $X_{2-C-5-NP}'$ 、 X_{ANPC}' 、 $X_{2,4-DCA}'$ 、 $X_{2-A-5-CP}'$ および X_{p-CA}' は、それぞれ各代謝物の尿中排泄量を示している。

モーメント分析： p -CNBの血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）および平均滞留時間（MRT）、各代謝物の無限時間における累積尿中排泄量（ X^∞ ）およびMRTを第4章第2節と同様の手法により算出した。AUCおよび X^∞ 、およびMRTは、それぞれ0次モーメント、1次モーメントであり、次式で定義される。

$$AUC = \int_0^\infty C_{p-CNB} dt \quad (15)$$

$$MRT_{p-CNB} = \int_0^\infty t C_{p-CNB} dt / AUC \quad (16)$$

$$X^\infty = \int_0^\infty (dX/dt) dt \quad (17)$$

$$MRT_{Metabolite} = \int_0^\infty t (dX/dt) dt / X^\infty \quad (18)$$

ここで、 C_{p-CNB} は血漿中 p -CNB濃度であり、 dX/dt は、代謝物の尿中排泄速度-時間曲線を表わす関数である。 p -CNBの全身クリアランス（CL）は、以下の等式により算出した。

$$CL = D / AUC \quad (19)$$

3. 結果

血漿中 p -CNB およびその尿中代謝物の時間推移：

30、100または333 mg/kgの p -CNBを腹腔内投与されたラットにおける血漿中 p -CNB濃度の時間推移を Fig. 5-2に片対数グラフで示した。同様に、各量の p -CNBを投与されたラットにおける5種の代謝物の累積尿中排泄量の時間推移を Fig. 5-3に示した。

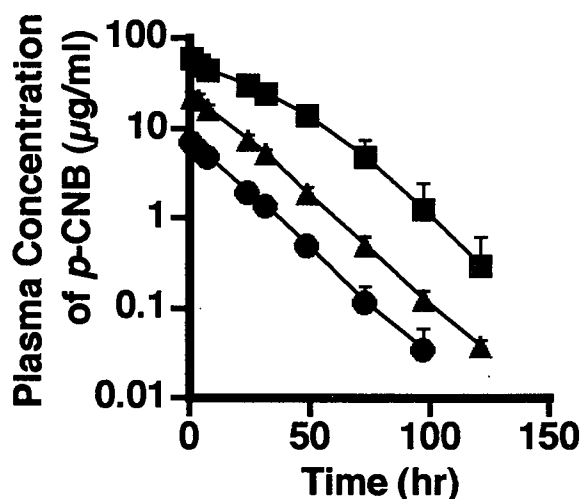


Fig. 5-2. Time Courses of *p*-CNB Concentration in Plasma of Rats after a 30 (●), 100 (▲) or 333 (■) mg/kg Intraperitoneal Injection. Each point and vertical bar represent mean \pm S.D. of five rats.

モーメント分析：

p-CNB 血漿中濃度-時間曲線および各代謝物の尿中排泄速度-時間曲線から統計学的モーメントを算出し、結果を Table 5-1 に示した。CL 値は、*p*-CNB 投与量 30 mg/kg では 213 ml/hr/kg、100 mg/kg では 198 ml/hr/kg、333 mg/kg では 174 ml/hr/kg であり、*p*-CNB 投与量の増加にともない減少した。尿中に排泄された 5 種の代謝物の合計量の投与量に対する割合 (F_{Total}) は、*p*-CNB 投与量の多少にかかわらずほぼ一定であった (61~66%)。 *p*-CNB 30 mg/kg の投与において、2-C-5-NP の尿中排泄量は、投与量の 10.5% を占めた。同様に、ANPC は 30.1%、2,4-DCA は 2.1%、*p*-CA は 9.1%、2-A-5-CA は 13.8% を占めた。尿中に排泄された ANPC およびアミノ化合物 (2,4-DCA + *p*-CA + 2-A-5-CP) の投与量に占める割合 (F_{ANPC} および $F_{2,4\text{-DCA}} + F_{p\text{-CA}} + F_{2\text{-A-5-CP}}$) は、いずれの *p*-CNB 投与量においてもほぼ一定であるが、投与量 333 mg/kg における 2-C-5-NP の尿中排泄量の投与量に占める割合 ($F_{2\text{-C-5-NP}}$) は、30 および 100 mg/kg 投与時の約半分であった。

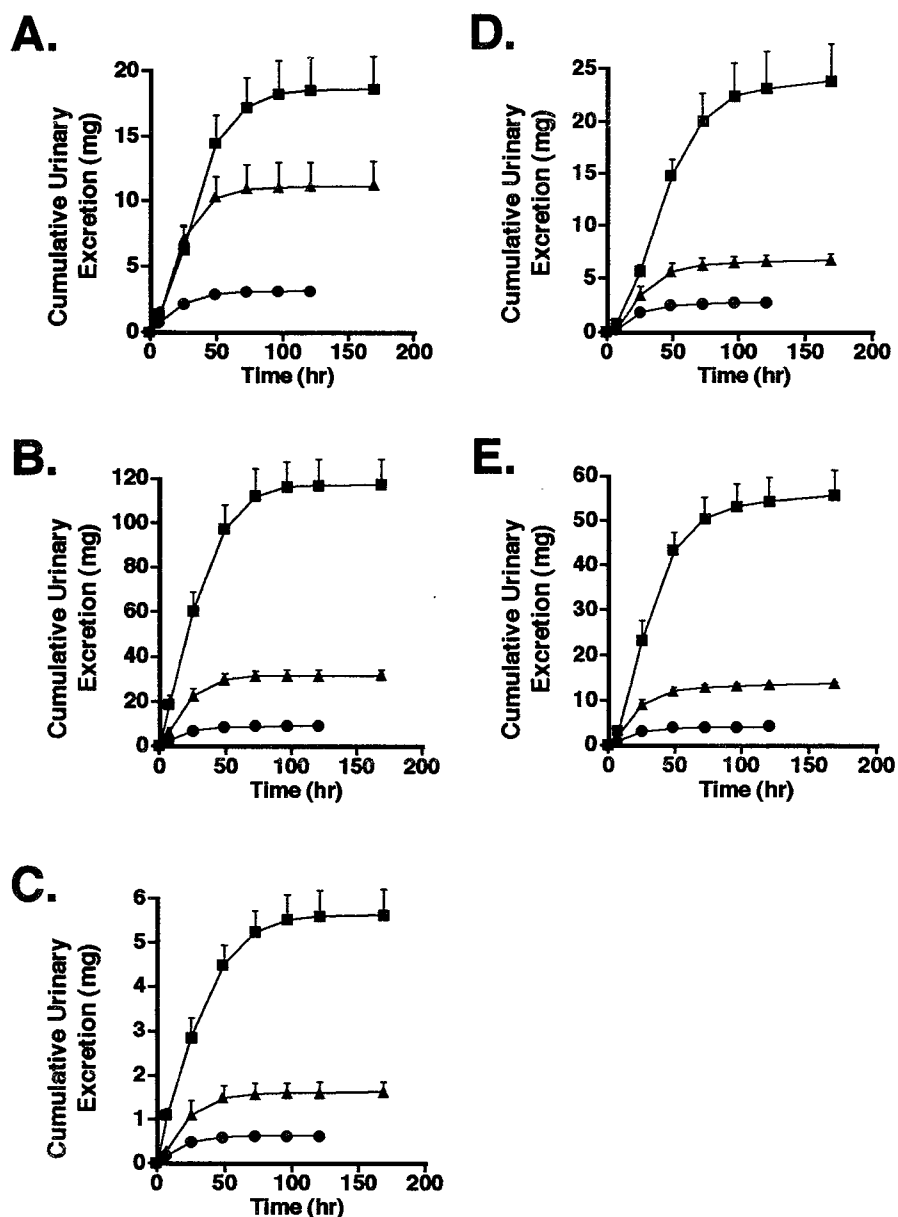


Fig. 5-3. Time Courses of Cumulative Urinary Excretion Amounts of *p*-CNB Metabolites in Rats after a 30 (●), 100 (▲), or 333 (■) mg/kg Intraperitoneal Injection.

Each point and vertical bar represent mean \pm S.D. of five rats. The values for the metabolites were converted to excretion amounts per 1 kg rat body weight and shown as amounts equivalent to the parent *p*-CNB. A, 2-C-5-NP; B, ANPC; C, 2,4-DCA; D, *p*-CA; E, 2-A-5-CP.

p-CNB 30 mg/kg 投与における、*p*-CNB の MRT 値は 17.4 時間であった。同様に、2-C-5-NP の MRT 値は 21.5 時間、ANPC では 18.5 時間、2,4-DCA では 19.9 時間、*p*-CA では 25.4 時間、2-A-5-CP では 21.0 時間であっ

Table 5-1. Statistical Moments of *p*-CNB and Its Metabolites.

	30 mg/kg	100mg/kg	333 mg/kg
CL ^a (ml/hr/kg)	213.2 (18.91)	197.9 (10.57)	173.9 (6.49)
F _{2-C-5-NP} ^b (%)	10.5 (0.61)	10.7 (1.84)	5.1 (0.29)
F _{ANPC} ^b	30.1 (1.50)	30.7 (2.57)	32.4 (2.04)
F _{2,4-DCA} ^b	2.1 (0.28)	1.6 (0.24)	1.5 (0.11)
F _{<i>p</i>-CA} ^b	9.1 (1.05)	6.4 (0.59)	6.6 (0.78)
F _{2-A-5-CP} ^b	13.8 (0.45)	13.2 (0.40)	15.2 (0.65)
F _{Total} ^b	65.6 (2.78)	62.6 (3.94)	60.7 (1.74)
MRT _{<i>p</i>-CNB} ^c (hr)	17.4 (2.03)	18.3 (1.17)	27.1 (4.88)
MRT _{2-C-5-NP} ^c	21.5 (1.91)	25.4 (1.31)	38.1 (1.39)
MRT _{ANPC} ^c	18.5 (2.28)	21.6 (2.44)	30.4 (2.59)
MRT _{2,4-DCA} ^c	19.9 (1.00)	24.0 (3.35)	33.1 (2.58)
MRT _{<i>p</i>-CA} ^c	25.4 (0.06)	32.6 (2.94)	48.4 (2.68)
MRT _{2-A-5-CP} ^c	21.0 (2.61)	27.7 (2.46)	38.6 (3.43)

The standard deviation is shown parentheses (n = 5).
^a : Systemic clearance of *p*-CNB. ^b : Fraction of each metabolite excreted in urine against the dose (X^{∞}/D).
The values were shown as amounts equivalent to the parent *p*-CNB. ^c : Mean residence time from administration of *p*-CNB to disappearance of *p*-CNB and each metabolite.

た。各代謝物のMRT値は、*p*-CNB投与量の増加に伴い増加した。

コンパートメントモデル分析：

1. 非線形1-コンパートメントモデル

Fig. 5-2に示したように、*p*-CNB 30および100 mg/kgの投与において、血漿中*p*-CNB濃度は1次指数関数的に減少したが、333 mg/kgの投与では、投与後初期の*p*-CNBの減少勾配は、30および100 mg/kg投与時よりも明らかに小さかった。したがって、各量の*p*-CNB投与後の血漿中*p*-CNB濃度の推移を、同時

にミカエリス-メンテン式消失過程を含む1-コンパートメントモデルに適合させ、等式(1)および(2)を解き、薬物動学的パラメーター(V_d , V_{max} および K_M)を算出した。 V_d , V_{max} および K_M の値は、それぞれ4180 ml/kg、5.2 μ g/ml/hrおよび80 μ g/mlであった。

2. 線形1-コンパートメントモデル

各量の *p*-CNBを投与したラットにおいて、*p*-CNBおよびその代謝物の変換における速度定数 (Fig. 5-1の $k_1 \sim k_{12}$) を算出し、結果を Table 5-2に示した。*p*-CNB 30 mg/kg投与時、*p*-CNBの2-C-5-NP (k_2)、*p*-CA (k_3) およびANPC (k_4) への代謝における速度定数は、それぞれ0.006、0.015および0.019 hr⁻¹であった。同様に、生じた *p*-CAの核の塩素化反応 (k_5)、N-抱合反応 (k_6) および核の水酸化反応 (k_7) における速度定数は、それぞれ0.025、0.114および0.169 hr⁻¹であった。さらに、生じた5種の代謝物、2-C-5-N

Table 5-2. Rate Constants for Metabolism of *p*-CNB.

	30 mg/kg	100 mg/kg	333 mg/kg
k_1^a (hr ⁻¹)	0.023	0.020	0.021
k_2^a	0.006	0.006	0.003
k_3^a	0.015	0.013	0.014
k_4^a	0.019	0.017	0.020
k_5^a	0.025	0.010	0.006
k_6^a	0.114	0.037	0.022
k_7^a	0.169	0.088	0.065
k_8^a	0.566	0.094	0.041
k_9^a	1.451	0.613	0.481
k_{10}^a	0.254	0.181	0.151
k_{11}^a	0.307	0.249	0.171
k_{12}^a	0.561	0.246	0.084

a : Rate constants in the metabolic pathway shown in Fig. 5-1.

P (k_8)、2,4-DCA (k_9)、*p*-CA (k_{10})、2-A-5-CP (k_{11}) および ANPC (k_{12}) の尿中排泄速度定数は、それぞれ0.566、1.451、0.254、0.307 および 0.561 hr^{-1} であった。*p*-CNBの尿中排泄以外の経路からの消失速度定数 (k_1) は、 0.023 hr^{-1} であった。 k_1 、 k_3 および k_4 を除く速度定数は、*p*-CNB投与量の増加に伴い減少した。

4. 考察

Fig. 5-2に示したように、*p*-CNB 333 mg/kg 投与における血漿中 *p*-CNB濃度の推移は、片対数グラフ上で直線的な減少を示さなかった。*p*-CNBのMRT値は、この投与量において明らかに増加した。また、CL値は、投与量の増加にともない減少した。したがって、*p*-CNBの血漿からの消失は、試験した投与量範囲において、非線形であると考えられた。したがって、血漿中 *p*-CNB濃度の推移をミカエリス-メンテン式消失を伴う1-コンパートメントモデルに適合させ、薬物動学的パラメーターを算出した。*p*-CNBの分布容積 (V_d) は 4180 ml/kg であり、明らかに 1000 ml/kg を超えており、*p*-CNBは特定の組織に高い親和性を有しているものと示唆された。*p*-CNBが脂溶性化合物であるという物理化学的性質が、大きな V_d 値を示す一つの原因として推定された。

一方、ラットにおける *p*-CNB代謝の薬物動学的解析を容易にし、第4章第2節で明らかにした *p*-CNB急性中毒患者における *p*-CNBの代謝と比較するため、ラットにおける *p*-CNBおよびその代謝物の消失過程は、線形1-コンパートメントモデルに適合すると仮定し、各 *p*-CNB投与量における、各消失過程の速度定数を算出した。 k_1 値は、*p*-CNB投与量にかかわらず一定であるため、試験された投与量の範囲において、尿中排泄以外の経路からの消失過程は線形である、すなわち、尿中排泄以外の経路からの *p*-CNB消失量は *p*-CNB投与量に比例すると考えられた。いずれの *p*-CNB投与量においても、尿中に排泄される *p*-CNB代謝物総量の投与量に対する割合は約3分の2であった。したがって、尿中排泄は、*p*-CNBの消失のための最も重要な経路であると考えられた。

p-CNBは3つの代謝経路、ニトロ基の還元、核の水酸化およびグルタチオン抱合を経て尿中に排泄される。グルタチオン抱合体は体内でさらに代謝され、尿中へはメルカプツール酸ANPCとして排泄される。ANPCの尿中排泄量は、いずれの*p*-CNB投与量においても投与量の約30%を占め、代謝物中最も多く尿中に排泄された (Table 5-1)。メルカプツール酸は、芳香族ハロゲン化炭化水素および芳香族ニトロ化合物に曝露されたウサギ、ラット、イヌおよびヒト等の哺乳動物の尿中に検出される[37, 45, 52-54]。*p*-CNBを投与したウサギにおいて、投与量に対するメルカプツール酸の尿中排泄量は7%であった[37]。また、単離したラットの肝細胞を*p*-CNBとともにインキュベートした溶液において、10%の*p*-CNBがメルカプツール酸の前駆物質であるS-(4-ニトロフェニル)-グルタチオンに代謝された[33]。ラットを用いた本 *in vivo* の研究において、メルカプツール酸の尿中排泄率は、上記のいずれの報告よりも多かった。ANPCは、ラットの尿中に排泄される*p*-CNB代謝物総量の約半分の量を占めた。この結果は、第4章第2節の*p*-CNB急性中毒患者における試験結果と一致した。さらに、*p*-CNB 30 mg/kgを投与したラットにおける2-C-5-NP、ANPCおよびアミノ化合物(2,4-DCA + *p*-CA + 2-A-5-CP)の累積尿中排泄量の比(16 : 46 : 38、w/w、*p*-CNB相当量)は、*p*-CNB急性中毒患者における結果(2-C-5-NP : ANPC : アミノ化合物 = 12 : 48 : 40)と一致した (Table 4-2-2)。ANPCおよびアミノ化合物の尿中排泄量の投与量に占める割合はいずれの*p*-CNB投与量においてもほぼ一定であり、いずれも*p*-CNB投与量に非依存的であるが、*p*-CNB投与量 333 mg/kgにおける2-C-5-NP排泄量の投与量に占める割合は、30および100 mg/kg投与時の約半分に減少した。同様に、 k_3 および k_4 の値は、いずれの*p*-CNB投与量においてもほぼ一定であるが、 k_2 の値は、333 mg/kg投与において減少した。したがって、*p*-CNBのニトロ基の還元反応(*p*-CAの生成)およびグルタチオン抱合反応(ANPCの生成)の過程は、*p*-CNB投与量 333 mg/kg以下において線形であるが、*p*-CNBの核の水酸化反応(2-C-5-NPの生成)の過程は、投与量 333 mg/kgにおいて非線形であると推察された。アミノ化合物の尿中排泄量は、いずれの*p*-CNB投与量においても投与量の21~25%を占め、*p*-CNBのニトロ基の還元反応は、グルタチオン抱合反応によるメルカプツール酸の生成に次いで、*p*-CNBの重要な代謝経路であると考えられた。*p*-CNBから生じた*p*-CAはさらに

代謝され、そのN-抱合体 (*p*-CAA、*p*-COA、グルクロン酸および硫酸抱合体等)、2-A-5-CPおよび2,4-DCAとして尿中に排泄される。これら3種の代謝物の累積尿中排泄量の比は、*p*-CNB 30 mg/kg投与において、*p*-CA : 2-A-5-CP : 2,4-DCA = 37 : 55 : 8であり、*p*-CNBによる急性中毒患者における結果 (*p*-CA : 2-A-5-CP : 2,4-DCA = 75 : 22 : 3) と一致しなかった。したがって、ラットでは、*p*-CAの核の水酸化反応はそのN-抱合反応よりも容易に起こり、ヒトでは逆にN-抱合反応のほうが容易に起こるものと示唆された。*p*-CAの代謝過程における速度定数 (k_5 、 k_6 および k_7) の値は、*p*-CNB投与量の増加にともない減少し、これらの代謝反応過程は、100 mg/kg以上の*p*-CNB投与量において非線形であると考えられた。

各代謝物の尿中排泄速度定数 ($k_8 \sim k_{12}$) は、いずれも*p*-CNB投与量の増加にともない減少し、これらの排泄過程はすべて、100 mg/kg以上の*p*-CNB投与量において非線形であると考えられた。いずれの*p*-CNB投与量においても、各代謝物の尿中排泄速度定数は、その代謝物の生成速度定数よりも明らかに大きかった。したがって、*p*-CNBの代謝および生じた*p*-CAの代謝は、これらから生じた代謝物の尿中排泄よりも時間を要するものと考えられた。さらに、いずれの*p*-CNB投与量においても、*p*-CAの代謝は、*p*-CAの生成よりも速やかに進行した ($k_5 + k_6 + k_7 > k_3$)。したがって、吸収された*p*-CNBの体内からの消失速度は、*p*-CNB自身の代謝および消失速度により決定されると考えられた。

ラットにおける各代謝物のMRT値は、*p*-CNB投与量の増加に伴い増加するが、いずれも*p*-CNB急性中毒患者におけるMRT値 (4~10日) よりも明らかに小さかった。*p*-CAのMRT値は、いずれの*p*-CNB投与量においても、5種の代謝物中最も大きく、代謝物中最も長期間体内に滞留するものと示唆された。この結果は、中毒患者における試験結果と同じであった。Fig. 2-2-1に示したように、*p*-CNBの代謝経路において体内で起こる*p*-CAと*p*-CAAとの可逆反応がその原因の一つと推定された。

第2章において、*p*-CNBは、ヒト、ラット、両者同じ代謝経路により尿中へ排泄されることを明らかにした。*p*-CNB投与ラットにおいて、ANPCは、最も多量に尿中へ排泄される*p*-CNB代謝物であり、尿中に排泄された全代謝物の約半分を占めた。

この結果は、第4章の *p*-CNBによる急性中毒患者における結果と一致した。さらに、試験した *p*-CNB投与量範囲（30～333 mg/kg）において、*p*-CNBのANPCへの代謝過程は線形であり、ANPCの尿中排泄量は、かなり広い *p*-CNB投与量範囲において、*p*-CNB投与量に比例すると考えられた。第3章で開発したHPLCによる *p*-CNB尿中代謝物の測定法において、ANPCは尿中濃度0.2 μg/ml以上で定量可能であった。第4章で *p*-CNB尿中代謝物の経時変化を調べた6名の中毒患者において、入院期間の後半では中毒症状や血液学的所見は正常レベルに回復したが、ANPCは、患者の入院期間を通じてその尿中から検出された。したがって、*p*-CNB曝露による血液学的な変化が現われない曝露濃度、すなわち、低濃度の *p*-CNB曝露の際にも、尿中ANPCは定量、検出可能であると判断される。したがって、尿中ANPCは、*p*-CNB中毒患者や取り扱い作業員等の急性および慢性曝露者における、*p*-CNB曝露のモニタリングの指標として適していると考えられた。

結 論

芳香族ニトロ、アミノ化合物は、主として染料、農薬および医薬品等の原料や中間体として広く製造、使用されているが、これら一群の化合物の中には発癌性、遺伝毒性作用および血液毒性作用を有するものも数多い。中でも主に染料の合成における中間体として古くから多量に使用されている *p*-クロロニトロベンゼン (*p*-CNB) は、特に強い血液毒性作用を有しているため、その製造作業や取り扱い作業に従事する労働者において、その吸収(曝露)量を把握することは、健康障害を予防するうえで非常に重要と考えられる。しかし、曝露された *p*-CNB のヒト体内での動態は明らかにされておらず、また、その曝露量を正確に把握する手法も確立されていない。本研究では、*p*-CNB 曝露の際、尿中に排泄されるその代謝物を曝露指標に用いたモニタリング法の開発を試み、以下の結論を得た。

1. *p*-CNB による曝露者における尿中代謝物を同定し、8種の代謝物、2-クロロ-5-ニトロフェノール、N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システイン、*p*-クロロアニリン、2-アミノ-5-クロロフェノール、2,4-ジクロロアニリン、*p*-クロロアセトアニリド、4-クロロ-2-ヒドロキシアセトアニリドおよび *p*-クロロオキザニリン酸を尿中より検出した。
2. ラットにおける *p*-CNB の代謝経路を明らかにした。*p*-CNB は、ヒトにおいても同じ代謝を経て尿中へ排泄されると推察された。
3. *p*-CNB 曝露者における尿中代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる簡易で正確な分離定量法を開発した。
4. ヒトにおける *p*-CNB の代謝を薬物動学的に解析した。N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システインは、最も多量に尿中へ排泄される代謝物であり、尿中から検出される全 *p*-CNB 代謝物の約半分を占めた。
5. ラットにおける *p*-CNB の代謝をヒトの場合と同様に解析した。尿中に排泄される *p*-CNB 代謝物総量の *p*-CNB 投与量に占める割合は約3分の2であり、尿中排泄は吸収された *p*-CNB の消失のための最も重要な経路であると考えられた。ヒトの場合と同様に、N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システインは、最も多量に尿中へ排泄される代謝物であり、尿中から検出される全 *p*-CNB 代謝物の約半分を占めた。また、その排泄量は、かなり広い *p*-CNB 曝露濃度範囲において *p*-CNB 曝露量に比例すると推定された。

6. 尿中N-アセチル-S-(4-ニトロフェニール)-L-システインは、*p*-CNB曝露における、その曝露のモニタリングの指標として適していると考えられた。

本研究の成果は、*p*-CNBの製造作業や取り扱い作業に従事する労働者において、*p*-CNBによる健康障害の予防に役立つものと考えられる。

謝 辭

本論文の作成にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学薬学部 西原 力教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、始終適切な御指導と御助力をいただきました大阪府立公衆衛生研究所労働衛生部 副部長 安藤 剛博士に心から感謝の意を表します。

p-クロロアニリンによる急性中毒患者における代謝に関する研究に際しまして、御助言、御助力をいただきました大阪府立公衆衛生研究所労働衛生部 平田 衛博士、同部 田淵武夫主任研究員ならびに宮島啓子主任研究員に感謝致します。また、患者からの尿試料を提供していただきました大阪大学医学部 坂井靖夫医師（当時 大阪府立病院）に厚く御礼申し上げます。

また、*p*-クロロニトロベンゼンによる中毒事故の際、入院期間中の患者の尿試料を提供していただきました大阪船員保険病院の諸先生方、関西医科大学 原 一郎元教授ならびに日本医科大学 南 正康教授に謹んで御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、種々御便宜を図っていただきました大阪大学薬学部環境代謝化学講座の方々に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行に際しまして御協力、御支持いただきました大阪府立公衆衛生研究所労働衛生部 原田七寛部長をはじめ部員の方々に対して感謝致します。

引用文献

1. 労働衛生のしおり. 平成5年度版 労働省労働基準局編, p. 42, 中央労働災害防止協会, 東京, 1993.
2. 12093の化学商品, p. 729-730, 化学工業日報社, 東京, 1993.
3. 化学物質と環境, p. 153-154, 環境庁環境保健部保健調査室, 東京, 1992.
4. H. Gerbis, *Samml. Vergiftungsf.* 3, **A228**, 125 (1932).
5. A. Renshaw and G. V. Ashcroft, *J. Ind. Hyg.*, **8**, 67 (1926).
6. 原一郎, 労働科学季報, **1**, 62 (1953).
7. 原一郎, 労働科学季報, **1**, 17 (1952).
8. 原一郎, 田中亮平, 東田敏夫, 労働科学季報, **4**, 73 (1955).
9. 田淵武夫, 原一郎, 南正康, 山城久和, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告労働衛生編, **23**, 25 (1985).
10. M. R. Harrison, *Anaesthesia*, **32**, 270 (1977).
11. A. L. Linch, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **35**, 426 (1974).
12. J. Lewalter and U. Korallus, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **56**, 179 (1985).
13. 吉村英敏, 毒性学. その生化学的側面, p. 225-238, 講談社, 東京, 1982.
14. 佐藤了, 薬物代謝. 肝小胞体を中心として, p. 152-228, 講談社, 東京, 1983.
15. M. Sziza and L. Magos, *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.*, **17**, 217 (1959).
16. N. M. Vasilenko and V. I. Zvezdai, *Gip. Tr. Prof. Zabol. No.*, **8**, 50, (1981).
17. T. Adamska, W. Senczuk, and A. Zawila, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **21**, 23 (1988).
18. Du Pont, Haskell Laboratory Report No. 751-81, Newark, Del., USA, 1981.
19. T. Watanabe, N. Ishihara, and M. Ikeda, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **37**, 157 (1976).
20. Du Pont, Haskell Laboratory Report No. 429-84, Newark, Del., USA, 1984.
21. R. S. Nair, F. R. Johannsen, G. J. Levinskas, and J. B. Terrill, *Fund. Appl. Toxicol.*, **6**, 618 (1986).
22. R. S. Nair, F. R. Johannsen, and R. E. Schroeder, In Toxicity of Nitroaromatic Compounds, edited by D. E. Rickert, p. 61, Hemisphere Publ. Corp., New York, USA, 1985.

23. M. Simizu, Y. Yasui, and N. Matsumoto, *Mutat. Res.*, **116**, 217 (1983).
24. S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, and E. Zeiger, *Environ. Mutag.*, **5**, Suppl. 1, 3 (1983).
25. E. K. Weisburger, A. B. Russfield, F. Homburger, J. H. Weisburger, E. Boger, C. G. van Dongen, and K. C. Chu, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **2**, 325 (1978).
26. M. Ikeda, T. Watanabe, I. Hara, T. Tabuchi, S. I. Nakamura, H. Kosaka, M. Minama, and Y. Sakurai, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **39**, 219 (1977).
27. 田淵武夫, 原一郎, 南正康, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告労働衛生編, **21**, 27 (1983).
28. M. Yoshida, M. Sunaga, and I. Hara, *Ind. Health*, **26**, 87 (1988).
29. 吉田俊明, 安藤剛, 田淵武夫, 杉本寛治, 大阪府立公衆衛生研究所研究報告労働衛生編, **25**, 1 (1987).
30. M. Windholz, S. Budavari, R. F. Blumetti, and E. S. Otterbein, *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Tenth Edition*, p. 302, Merck & Co., Inc., NJ, USA, 1983.
31. H. Hasegawa and M. Sato, *J. Biochem.*, **54**, 51 (1963).
32. S. Ishizu, M. Minami, and K. Yamamura, *Ind. Health*, **11**, 95 (1973).
33. D. E. Rickert and S. D. Held, *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 5 (1990).
34. W. F. Oettingen, *Poisoning. A guide to clinical diagnosis and treatment*, p. 309., Paul B. Hoeber, New York, USA, 1952.
35. R. T. Williams, *Detoxication Mechanisms. The metabolism and detoxication of drugs, toxic substances and other organic compounds*, p. 260, Chapman & Hall, London, 1959.
36. I. Pacseri, L. Magos, and I. A. Batskor, *Arch. Ind. Health*, **18**, 1 (1958).
37. H. G. Bray, S. P. James, and W. V. Thorpe, *Biochem. J.*, **64**, 38 (1956).
38. M. D. Corbett and B. R. Corbett, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 942 (1981).
39. 亀岡弘, 日本化学雑誌, **81**, 950 (1960).
40. H. van Erp, *J. Prakt. Chem.*, **127**, 20 (1930).
41. H. H. Hodgson and F. H. Moore, *J. Chem. Soc.*, **127**, 1599 (1925).
42. H. H. Hodgson and A. Kershaw, *J. Chem. Soc.*, 2703 (1928).

- 4 3. G. M. J. Lower and G. T. Bryan, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 1581 (1973).
- 4 4. R. T. Williams, Detoxication Mechanisms. The metabolism and detoxication of drugs, toxic substances and other organic compounds, p. 410-471, Chapman & Hall, London, 1959.
- 4 5. D. E. Rickert, *Drug Metabol. Rev.*, **18**, 23 (1987).
- 4 6. 麻生芳郎, 大森義仁監訳, ラデュ・マンデル・ウェイ 新しい薬物代謝学. 生体内運命と実験法のすべて, p. 137-191, 広川書店, 東京, 1974.
- 4 7. 吉村英敏, 毒性学. その生化学的側面, p. 24-39, 講談社, 東京, 1982.
- 4 8. M. D. Corbett, J. E. Cahoy, and B. R. Chipko, *J. National Cancer Institute*, **55**, 1247 (1975).
- 4 9. M. D. Corbett and B. R. Chipko, *Biochem. J.*, **165**, 263 (1977).
- 5 0. M. D. Corbett, B. R. Chipko, and J. H. Paul, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **1**, 259 (1978).
- 5 1. M. D. Corbett, D. G. Baden, and B. R. Chipko, *Bioorganic Chem.*, **8**, 227 (1979).
- 5 2. R. T. Williams, Detoxication Mechanisms. The metabolism and detoxication of drugs, toxic substances and other organic compounds, p. 205-206, Chapman & Hall, London, 1959.
- 5 3. O. Hernandez and J. R. Bend, Metabolism of epoxides. In *Metabolic Basis of Detoxication*, edited by W. B. Jakoby, J. R. Bend and J. Caldwell, p. 207-228, Academic Press, New York, 1982.
- 5 4. W. B. Jakoby and W. H. Habig, Glutathione transferases. In *Enzymatic Basis of Detoxication*, Vol. 2, edited by W. B. Jakoby, p. 63-94, Academic Press, New York, 1980.
- 5 5. J. J. Betts, S. P. James, and W. V. Thorpe, *Biochem. J.*, **61**, 611 (1955).
- 5 6. J. J. Betts, H. G. Bray, S. P. James, and W. V. Thorpe, *Biochem. J.*, **66**, 610 (1957).
- 5 7. M. Windholz, S. Budavari, R. F. Blumetti, and E. S. Otterbein, *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Tenth Edition*, p. 297, Merck & Co., Inc., NJ, USA, 1983.
- 5 8. L. A. Elson, A. Spinks, and M. M. Tottey, *Biochem. J.*, **42**, xliii (1948).

59. W.F. Oettingen, *Poisoning. A guide to clinical diagnosis and treatment*, p. 306., Paul B. Hoeber, New York, USA, 1952.
60. 後藤稠, 池田正之, 原一郎, *産業中毒便覧 増補版*, p. 1284-1285, 医歯薬出版, 東京, 1981.
61. D. K. Sekimpi and R. D. Jones, *Br. J. Ind. Med.*, **43**, 272 (1986).
62. Betke, *Veroff. aus dem Gebiete der Medizinalverwaltung*, **21**, 578 (1926).
63. M. Faivre, J. Armand, J. C. Evreux, G. Duvernail, and C. Colin, *Arch. Mal. Prof.*, **32**, 575 (1971).
64. G. D. Khamuev, *Chem. Abstr.*, **66**, 1236r (1967).
65. M. Sziza and L. Podhragyai, *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.*, **15**, 447 (1957).
66. National Toxicology Program (NTP), *Techn. Rep. Ser. No. 351*, 1989.
67. R. Bartha, H. A. B. Linke, and D. Pramer, *Science*, **161**, 582 (1968).
68. L. M. Bordeleau and R. Bartha, *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1873 (1972).
69. L. M. Bordeleau, J. D. Rosen, and R. Bartha, *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 573 (1972).
70. D. D. Kaufman, J. R. Plimmer, and U. I. Klingebiel, *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 127 (1973).
71. R. D. Minard, S. Russel, and J. M. Bollag, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 841 (1977).
72. C. T. Corke, N. J. Bunce, A. L. Beaumont, and R. L. Merrick, *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 644 (1979).
73. C. L. Fletcher and D. D. Kaufman, *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1127 (1979).
74. D. Freitag, I. Scheunert, W. Klein, and F. Korte, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 203 (1984).
75. M. Keise, *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Path Pharmacol*, **245**, 484 (1963).
76. J. W. Daly, G. Guroff, S. Udenfriend, and B. Witkop, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 31 (1968).
77. 佐藤哲男, 本山直樹監訳, *毒性生化学. 分子レベルからみた毒性の解析*, p. 62-100, ソフトサイエンス社, 東京, 1982.
78. 菅野三郎, 福井昭三, *薬毒物の衛生化学*, p. 1-20, 広川書店, 東京, 1984.

79. 北川晴雄, 毒性学, p. 57-75, 南江堂, 東京, 1986.
80. 北川晴雄, 花野学, 薬物代謝・薬物速度論, p. 13-27, 南江堂, 東京, 1985.
81. 木本正七郎, 千田重男, 最新有機薬品化学 第4改稿版, p. 1-8, 広川書店, 東京, 1982.
82. 中西香爾訳, ブルースター有機化学, p. 564-580, 東京化学同人, 東京, 1978.
83. M. B. Grisham, M. M. Jefferson, D. F. Melton, and E. L. Thomas, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10404 (1984).
84. J. K. Hurst, J. M. Albrich, T. R. Green, H. Rosen, and S. Klebanoff, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4812 (1984).
85. H. Sayo and M. Saito, *Xenobiotica*, **20**, 957 (1990).
86. J. P. Uetrecht and N. Zahid, *Chem. Res. Toxicol.*, **1**, 148 (1988).
87. J. P. Uetrecht and N. Zahid, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 218 (1991).
88. C. C. Winterbourn, *Biochimica et Biophysica Acta*, **840**, 204 (1985).
89. J. M. Zgliczy'nski and T. Stelmazy'nska, *European J. Biochem.*, **56**, 157 (1975).
90. L. P. Hager, D. R. Morris, F. S. Brown, and H. Eberwein, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1769 (1966).
91. J. A. Thomas, D. R. Morris, and L. P. Hager, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3135 (1970).
92. M. D. Corbett, B. R. Chipko, and A. O. Batchelor, *Biochem. J.*, **187**, 893 (1980).
93. P. L. Ashley and B. W. Griffin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 167 (1981).
94. H. Yamada, N. Itoh, and Y. Izumi, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11962 (1985).
95. N. Itoh, Y. Izumi, and H. Yamada, *Biochemistry*, **26**, 282 (1987).
96. P. F. Hollenberg, T. Rand-Meir, and L. P. Hager, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5816 (1974).
97. W. J. Ehlhardt and J. J. Howbert, *Drug Metab. Dispos.*, **19**, 366 (1991).
98. M. Newell, M. Argus, and F. E. Ray, *Biochem. Pharmacol.*, **5**, 30 (1960).
99. M. Kiese and W. Lenk, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1325 (1969).
100. 金武朝春, 日本細菌学雑誌, **37**, 943 (1982).
101. J. Blanchard, *J. Chromatogr.*, **226**, 455 (1981).
102. R. W. Bonsnes and H. H. Taussky, *J. Biol. Chem.*, **158**, 581 (1945).

- 1 0 3. K. Yamaoka and T. Nakagawa, *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 595 (1983).
- 1 0 4. K. Yamaoka, T. Nakagawa, and T. Uno, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **6**, 547 (1978).
- 1 0 5. M. Yoshida, M. Sunaga, and I. Hara, *Ind. Health*, **24**, 255 (1986).
- 1 0 6. J. K. Piotrowski, Phenol, aniline, and nitrobenzene. In *Biological Monitoring and Surveillance of Workers Exposed to Chemicals*, edited by A. Aitio, V. Riihimaki and H. Vainio, p. 165-175, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, USA, 1984.
- 1 0 7. V. Kunor, M. Kuzelova, and A. Popler, *Pracov. Lek.*, **25**, 234 (1973).
- 1 0 8. D. V. Parke, *Biochem. J.*, **62**, 339 (1956).

