The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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　*p*-クロロニトロベンゼンの尿中代謝物の同定 …… 9

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 …… 9

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 …… 21

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 …… 28

第4節　尿中*p*-クロロオキザニリン酸の検出 …… 37

第2章　*p*-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*p*-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*p*-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学的解析 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学的解析 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ず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者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ずくチアノーゼ、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ないが、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ＬＤ$_{50}$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、睾丸の萎縮、輸精管の変性、副睾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、曝露に基ずく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取り扱い作業者において、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（ＦＩＤ）を用いたガスクロマトグラフィー（ＧＣ）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ずく頭重、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。

<u>酸加水分解</u>　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本のスクリュー管に１ｍｌづつ分注した。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本のスクリュー管に１ｍｌづつ分注し、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型マスデ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 μm film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu, Kyoto)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μm 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/cm^2; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μA; 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２μ１づつ注入した。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-ｐＨ１、Ａ-ｐＨ１０、Ｎ-ｐＨ１およびＮ-ｐＨ１０）を Condition-１の分析条件を

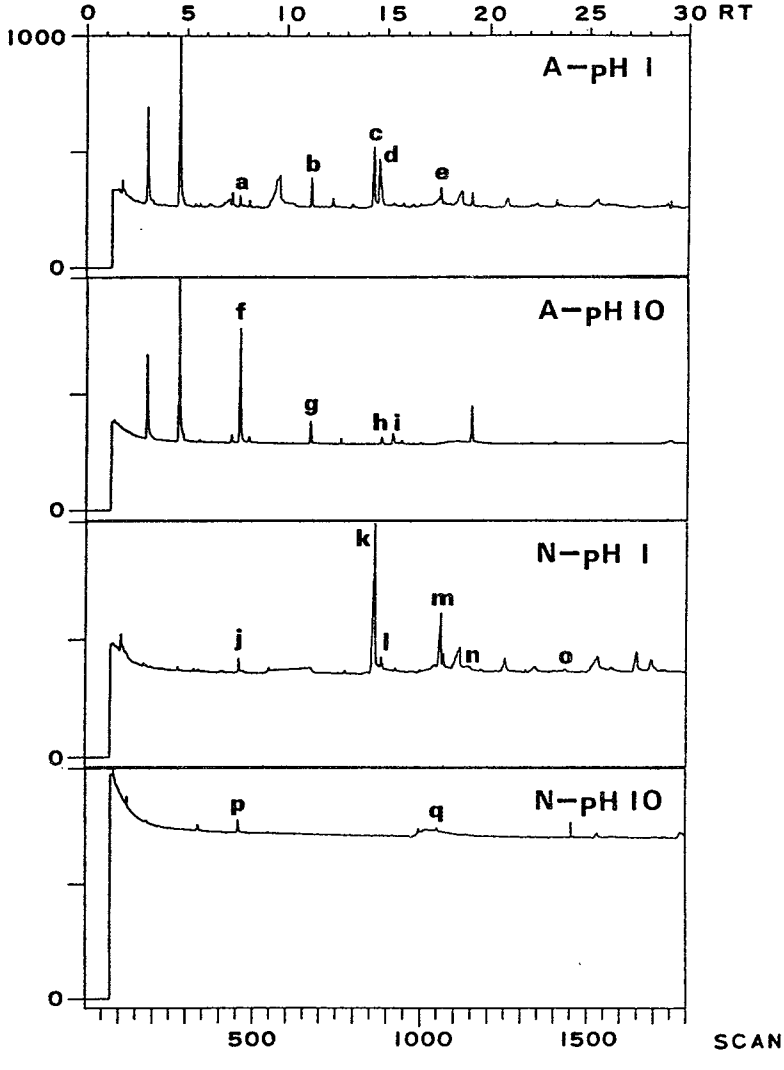


Fig. 1-1-2. Typical Total Ion Chromatograms of Urine Samples of Subjects Acutely Poisoned with *p*-CNB by GC/MS under Condition-1.

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

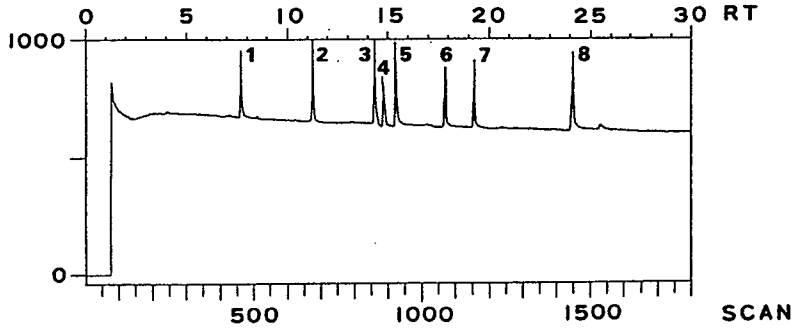
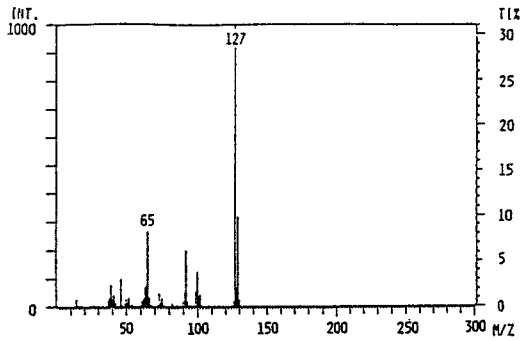


Fig. 1-1-3. Total Ion Chromatogram of Authentic Standards of *p*-CNB Metabolites Determined by GC/MS under Condition-1.
Peak 1, *p*-CA (10 μg/ml); peak 2, 2,4-DCA (10 μg/ml); peak 3, ANPC (104 μg/ml); peak 4, 2-C-5-NP (21 μg/ml); peak 5, 2-A-5-CP (36 μg/ml); peak 6, *p*-CFA (10 μg/ml); peak 7, *p*-CAA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

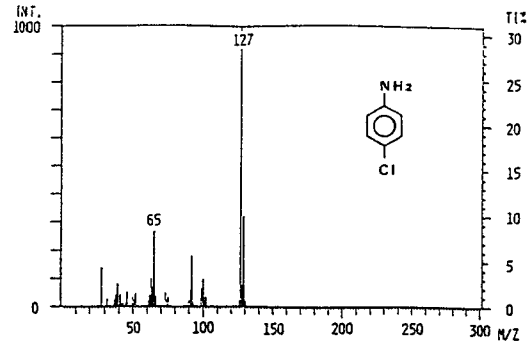
Table 1-1-2. Retention Times (Rt) of Authentic Standards of *p*-CNB Metabolites by GC/MS under Each Type of Analytical Conditions.

Analytical conditions	Rt values (min)		
	Condition-1	Condition-2	Condition-3
p-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 *
p-CFA	17.8	14.1	22.2
p-CAA	19.1	15.5	20.9
4-C-2-HAA	24.0	20.5	17.1 *

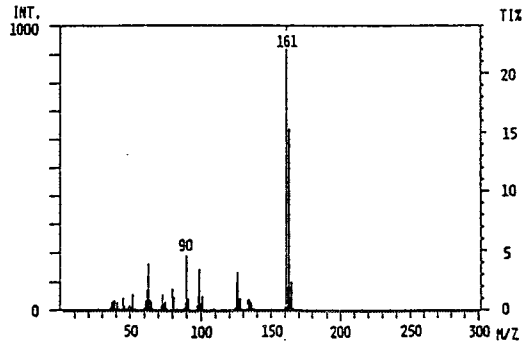
*: Compound was methylated prior to GC/MS analysis.



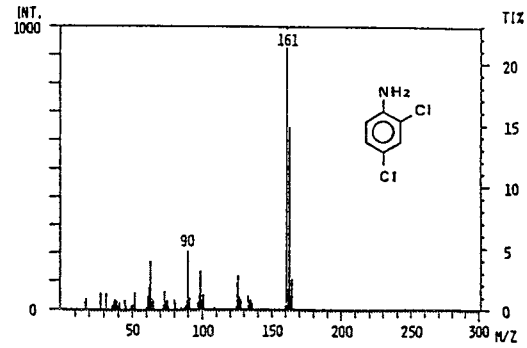
peaks a, f, j and p



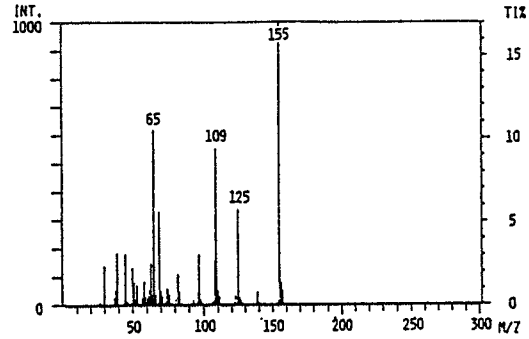
p-CA ([M]: 127)



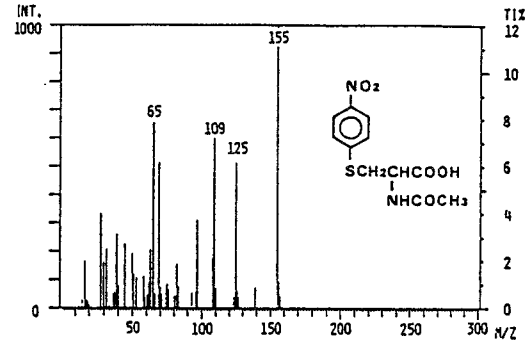
peaks b and g



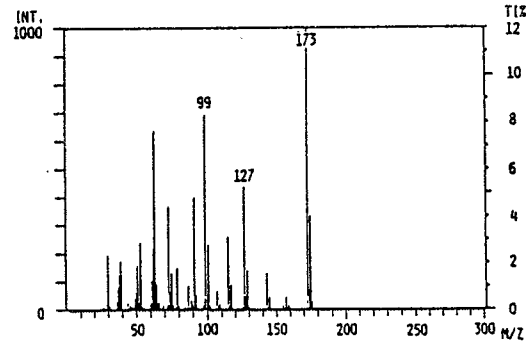
2,4-DCA ([M]: 161)



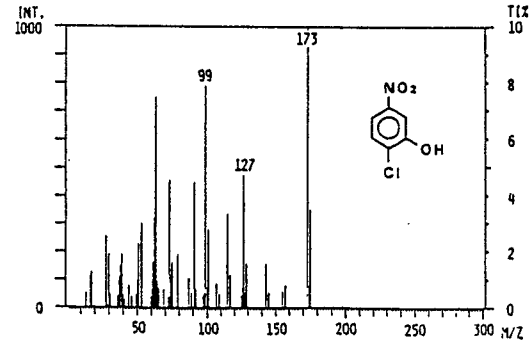
peaks c and k



ANPC ([M]: 284)



peaks d, h and l



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

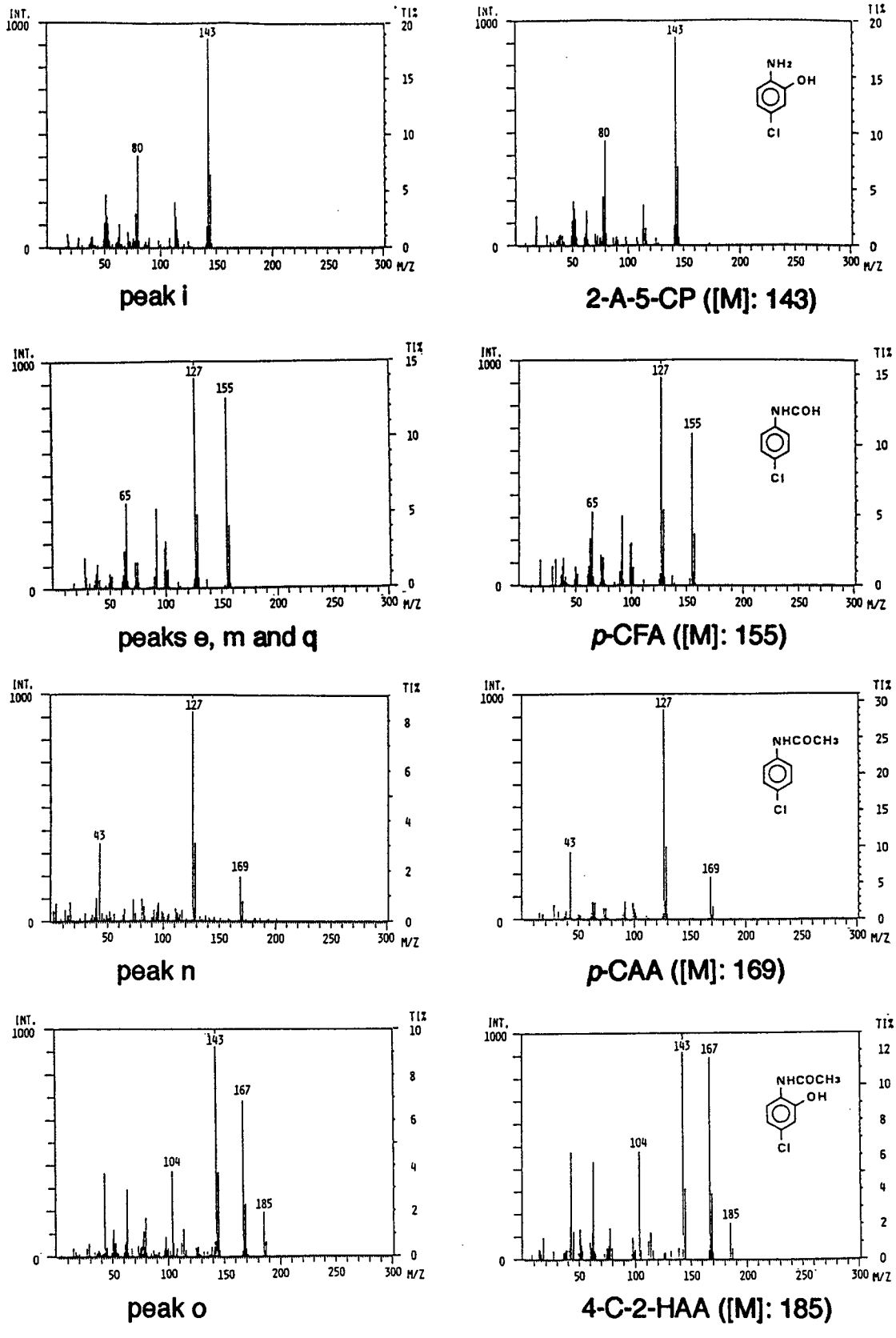


Fig. 1-1-4. Mass Spectra of Metabolites Isolated from Urine of Subjects Poisoned by *p*-CNB (left) and of Standards Exhibiting the Same Retention Times as the Metabolites (right) by GC/MS under Condition-1.

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。

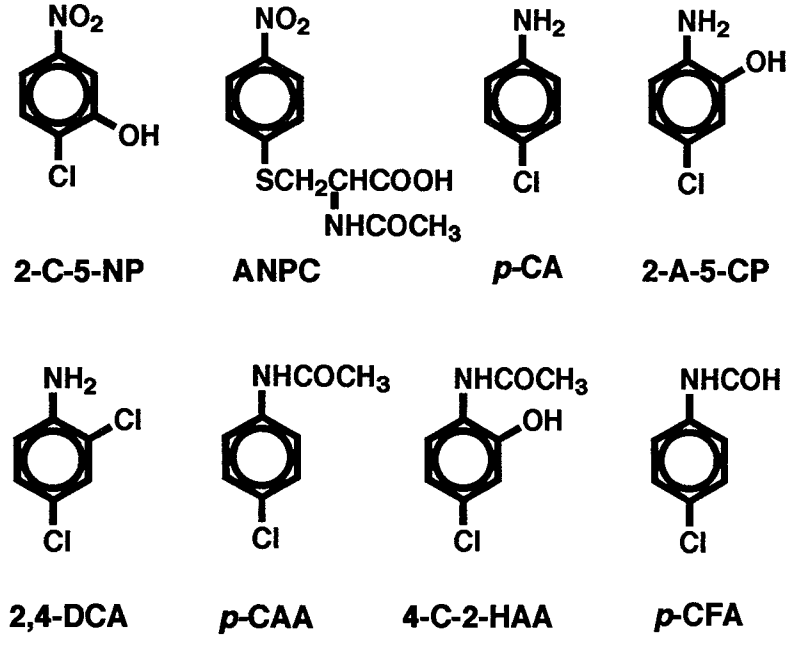


Fig. 1-1-5. *p*-CNB Metabolites Identified in Urine of Subjects Suffering from Acute Poisoning.

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ＬＤ$_{50}$値は、ラット経口投与で３６８ｍｇ／ｋｇ[64]、腹腔内投与では４２０ｍｇ／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 μm film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μm 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/cm^2; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μA; 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

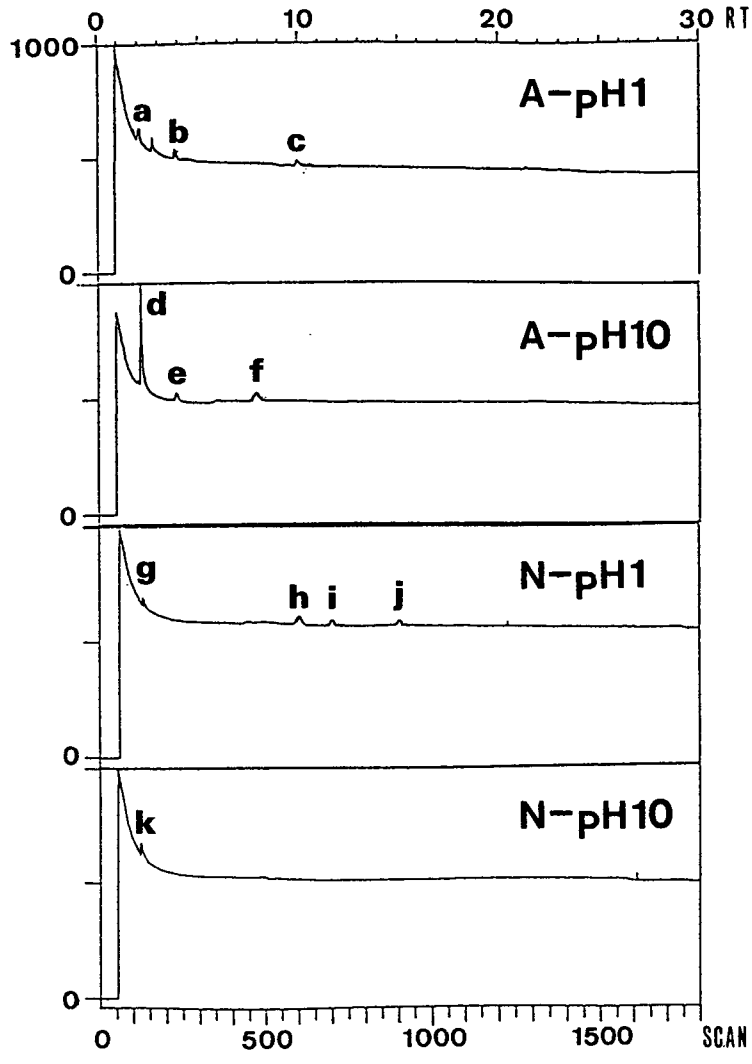


Fig. 1-2-1. Total Ion Chromatograms of Urine Samples of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CA by GC/MS under Condition-1.

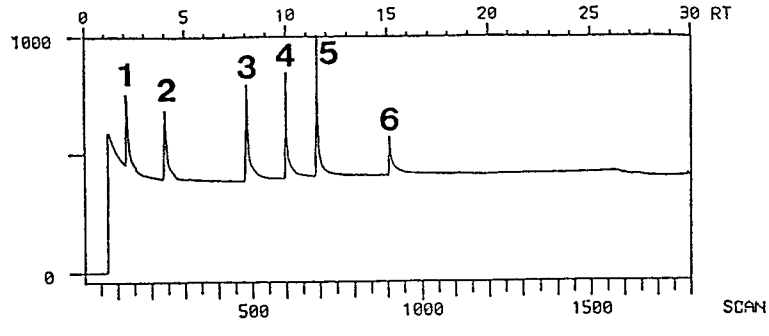


Fig. 1-2-2. Total Ion Chromatogram of Authentic Standards of *p*-CA Metabolites Determined by GC/MS under Condition-1.
Peak 1, *p*-CA (33 μg/ml); peak 2, 2,4-DCA (33 μg/ml); peak 3, 2-A-5-CP (129 μg/ml); peak 4, *p*-CFA (33 μg/ml); peak 5, *p*-CAA (33 μg/ml); peak 6, 4-C-2-HAA (23 μg/ml).

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
p-CA	a	d	g	k
2,4-DCA	b	e	—	—
2-A-5-CP	—	f	—	—
p-CFA	c	—	h	—
p-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、ヒトでは弱いか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（H_2SO_4-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（HNO_3-ｐＨ１、ＨＣｌ-ｐＨ１）。

③*p*-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 μm 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/cm^2; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μA; 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１ｍｌと１０規定塩酸０．１ｍｌをスクリュー管に加え、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０．２ｍｌ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タイプディスポーサブルシリンジフィルター（DISMIC-13jp、孔径０．５０μｍ、東洋濾紙、東京）によりろ過し、試料とした。

②非加水分解：尿１ｍｌ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（２５０ｍｍ×４ｍｍＩ．Ｄ.，粒

子径１０μm）（以下ＲＰ-８と略）とガードカラム LiChrospher RP-18（４mm×４mmＩ.Ｄ.,粒子径５μm）を連結したリクロカート LiChrospher 100 RP-18(e)（１２５mm×４mmＩ.Ｄ.,粒子径５μm）（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：２４０nm、流速：１ml／mim、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：２０μl。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

おのおの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、H_2SO_4-ｐＨ１およびHNO_3-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_2SO_4-pH1	O	O	O
HNO_3-pH1	O	O	O
HCl-pH1	O	O	O
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

O : 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	O	Δ	x
N-pH2	O	Δ	x
N	x	x	x
H_2SO_4-pH1	O	Δ	x
HNO_3-pH1	O	x	x
HCl-pH1	O	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

O : 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ＨＣｌ-ｐＨ１、H_2SO_4-ｐＨ１およびHNO_3-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も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。

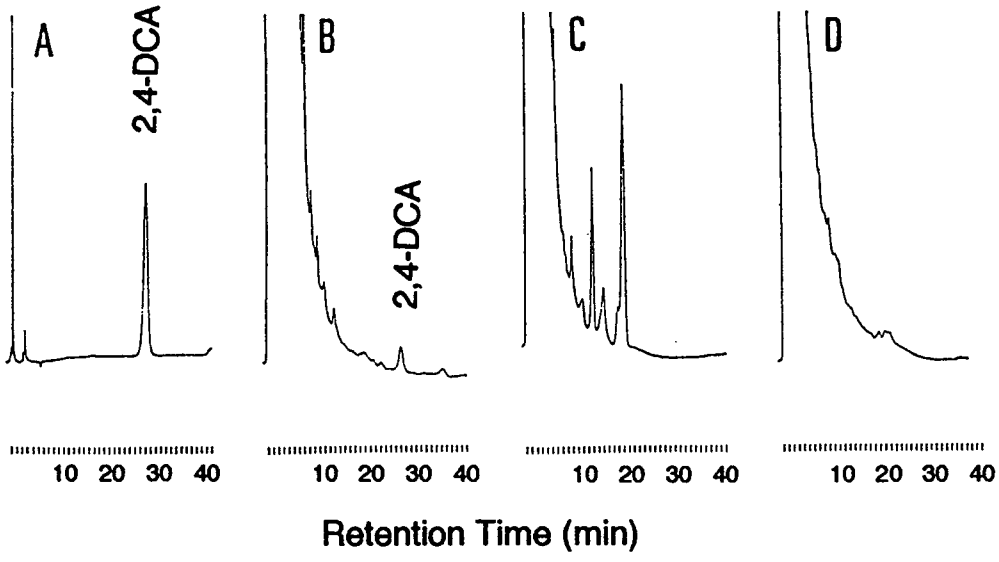


Fig. 1-3-1. HPLC Chromatograms of Standard Solution of 2,4-DCA (3.0 μg/ml) (A) and Urine Samples of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CA (B and C) and of a Volunteer not Exposed to *p*-CA (D).
B and D: The urine samples were hydrolyzed with conc. HCl, and the hydrolysates were injected into the chromatograph after neutralization. C: The urine sample was directly injected into the chromatograph.

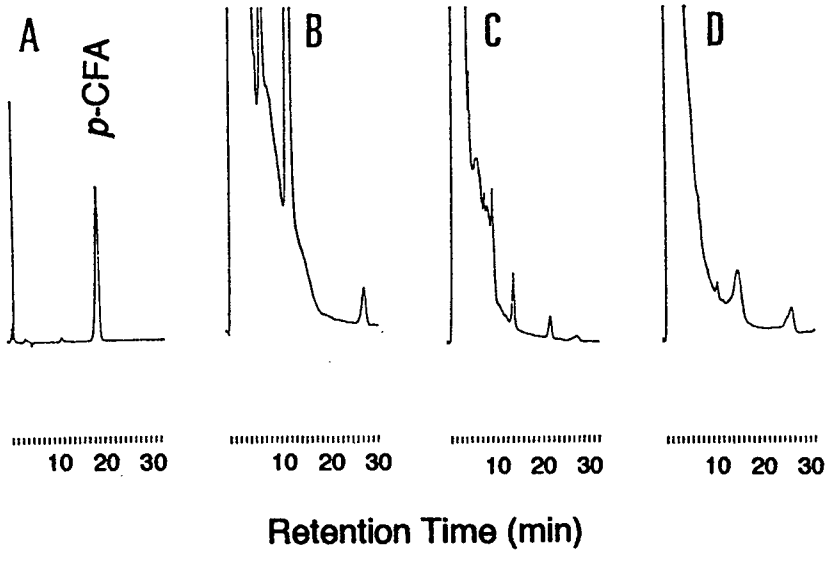


Fig. 1-3-2. HPLC Chromatograms of Standard Solution of *p*-CFA (1.5 μg/ml) (A) and Urine Samples of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CA (B and C) and of a Volunteer not Exposed to *p*-CA (D).
The urine samples (B, C and D) were prepared as shown in Fig. 1-3-1.

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、マウスおよびサルの尿中より、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。

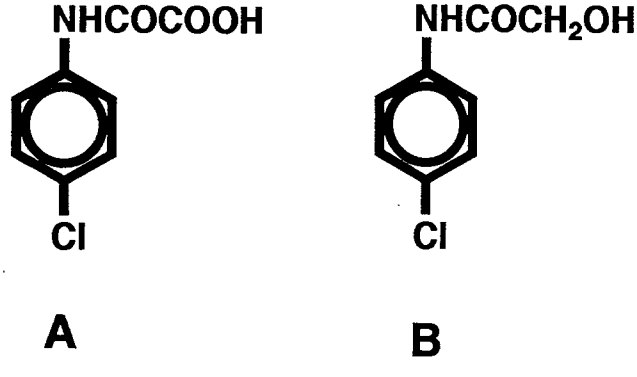


Fig. 1-4-1. Chemical Structures of *p*-COA (A) and *p*-CGA (B).

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をスクリュー管に移し、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 μm film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μm 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/cm^2; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μA; 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、

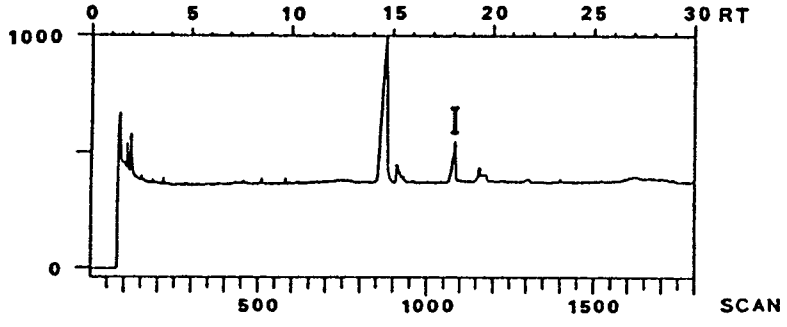


Fig. 1-4-2. Typical Total Ion Chromatogram of a Urine Sample of a Subject Acutely Poisoned with *p*-CNB by GC/MS under Condition-1.

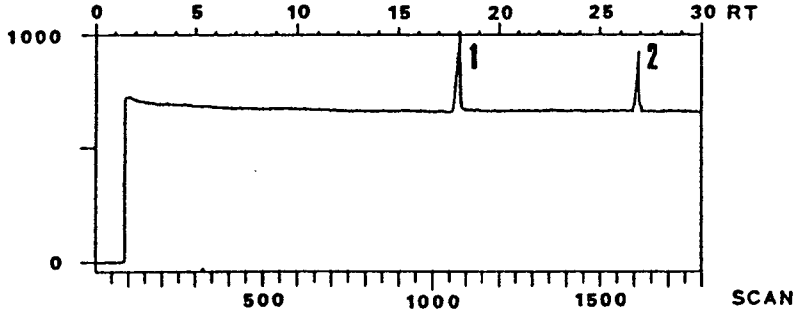


Fig. 1-4-3. Total Ion Chromatogram of Standard Solution with Dissolved *p*-COA (peak 1) and *p*-CGA (peak 2), 25 μg/ml Each, Determined by GC/MS under Condition-1.

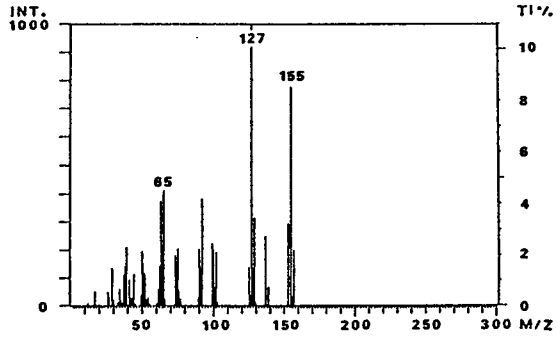


Fig. 1-4-4. Mass Spectrum of the Metabolite (peak I in Fig. 1-4-2) Isolated from Urine of a Subject Poisoned by *p*-CNB.
Mass spectrum of *p*-COA standard (peak 1 in Fig. 1-4-3) was the same as this mass spectrum.

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（２０ｍｇ／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ン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*-CNB100mg／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週間前から一匹づ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 μm film thickness cross-linked 5%-phenylmethylsilicone (Shimadzu)		25 m x 0.33 mm I.D., 0.50 μm 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/cm^2; ionization method on the mass spectrometry, electron impact mode (EI); ionization energy, 70 eV; ionization current, 300 μA; 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、

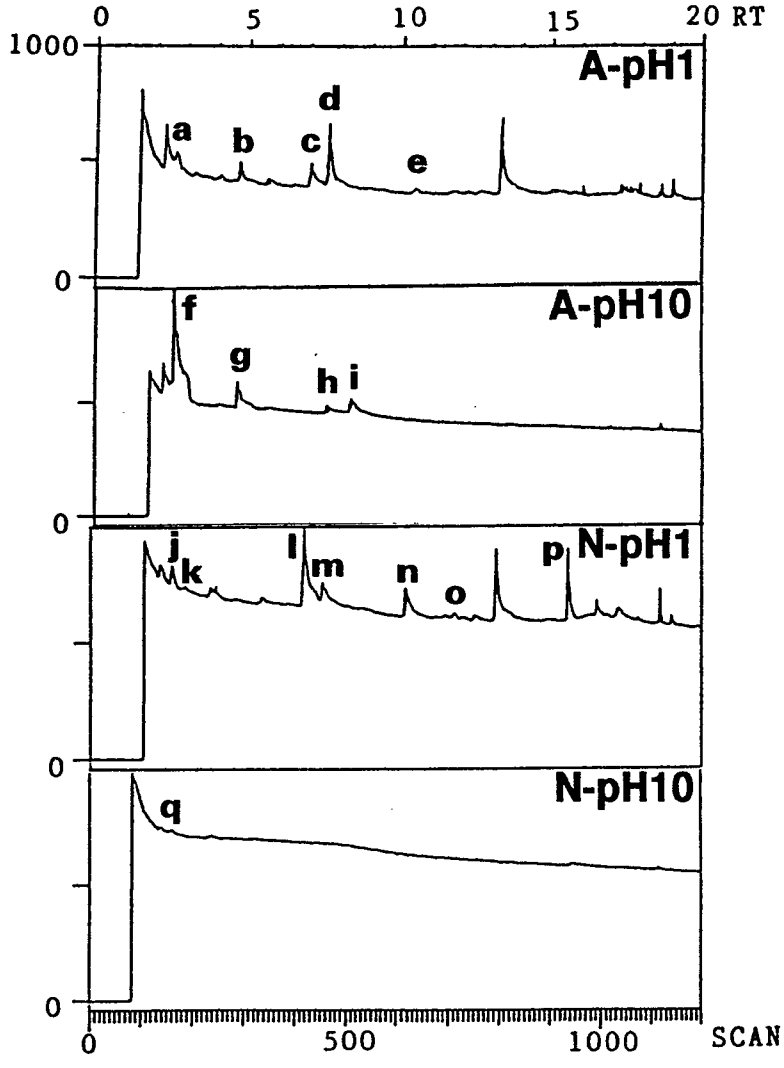


Fig. 2-1-1. Typical Total Ion Chromatograms of Urine Samples of Rats Administered *p*-CNB by GC/MS under Condition-1.

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。

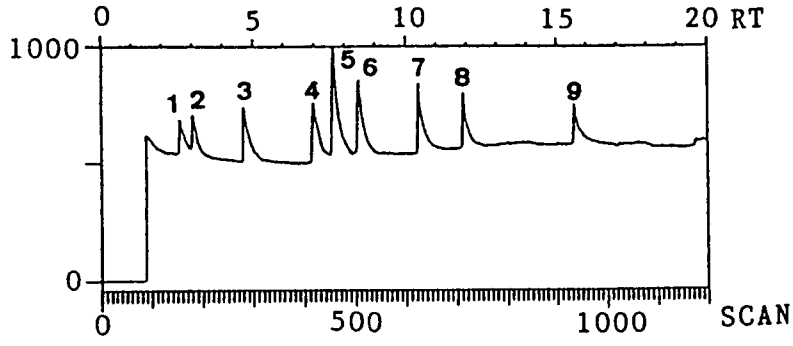


Fig. 2-1-2. Total Ion Chromatogram of Authentic Standards of *p*-CNB Metabolites Determined by GC/MS under Condition-1.
Peak 1, *p*-CA (18 μg/ml); peak 2, *p*-CNB (36 μg/ml); peak 3, 2,4-DCA (36 μg/ml); peak 4, ANPC (290 μg/ml); peak 5, 2-C-5-NP (218 μg/ml); peak 6, 2-A-5-CP (218 μg/ml); peak 7, *p*-COA (73 μg/ml); peak 8, *p*-CAA (36 μg/ml); peak 9, 4-C-2-HAA (55 μg/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
p-CA	a	f	j	q
p-CNB	—	—	k	—
2,4-DCA	b	g	—	—
ANPC	c	—	l	—
2-C-5-NP	d	h	m	—
2-A-5-CP	—	i	—	—
p-COA	e	—	n	—
p-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）（２８０～３２０ｇ）３匹づつ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-ＣＰ１００ｍｇ／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週間前から一匹づ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をスクリュー管に移し、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を別のスクリュー管に移し、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								
	p-CNB	2-C-5-NP	ANPC	*p*-CA	2,4-DCA	2-A-5-CP	*p*-CAA	4-C-2-HAA	*p*-COA
p-CA	—	—	—	O	O	O	O	O	O
2-A-5-CP	—	—	—	—	—	O	—	O	—
p-CAA	—	—	—	O	O	O	O	O	O

O : 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中からは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

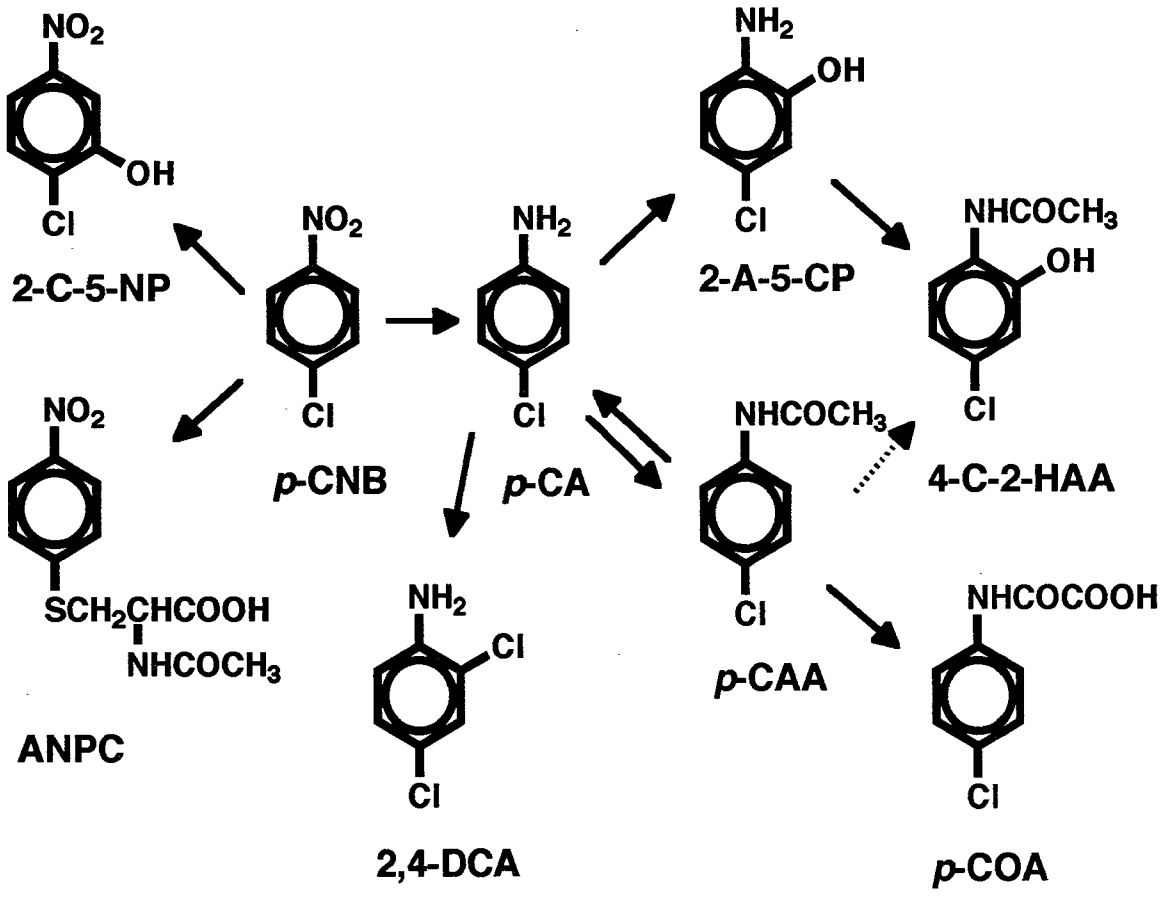


Fig. 2-2-1. Metabolic Pathway of *p*-CNB.
Dotted line: it was not clear whether 4-C-2-HAA was formed by hydroxylation of *p*-CAA.

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型カラムオーブン、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５０μｌ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０.４５μm）（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×４mm I.D.,粒子径５μm）を連結した分析カラムLiChrospher 100 RP-18(e)（１２５mm×４mm I.D.,粒子径５μm）（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℃で溶出し、検出波長　２８０nmで測定した。試料５０μｌ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℃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１００.０μg／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℃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、１０.０μg／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×g、１５分）し血漿を分離した。得られた血漿５０μｌ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５０μｌづつ加え除蛋白した。混和後遠沈（３０００×g、１５分）し、その上清をアドバンテックＰＴＦＥタイプディスポーサブルシリンジフィルター（DISMIC-13jp、孔径０．５０μm、東洋濾紙）でろ過し、分析試料とした。

定量：各標準溶液（０．０５０～１００．０μｇ／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５０μｌ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（０．０７５～３５．２４μｇ／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（０．１８～９０．５４μｇ／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本の褐色のスクリューバイアルに０．１ｍｌづづ分注した。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本づつ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、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５～１００μｇ／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倍溶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１０μｇ／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、２８０ｎｍ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、２４０ｎｍ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２８０ｎｍにより行った。

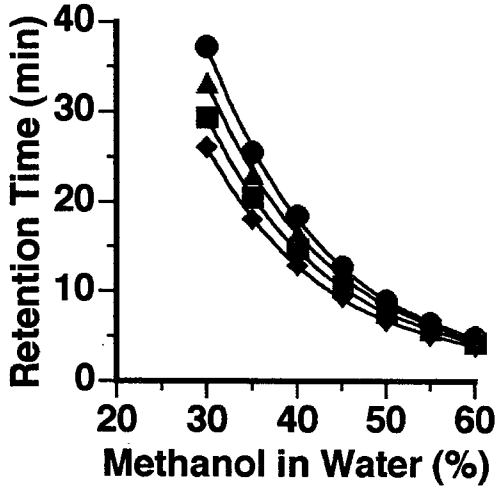


Fig. 3-1-1. Effect of Analytical Temperature and Mobile Phase Composition on Retention Time of *p*-CNB: (●) 30°C; (▲) 35°C; (■) 40°C; (◆) 45°C.

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、５０ｍＭのリン酸緩衝液（ｐＨ２．１～７．０）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

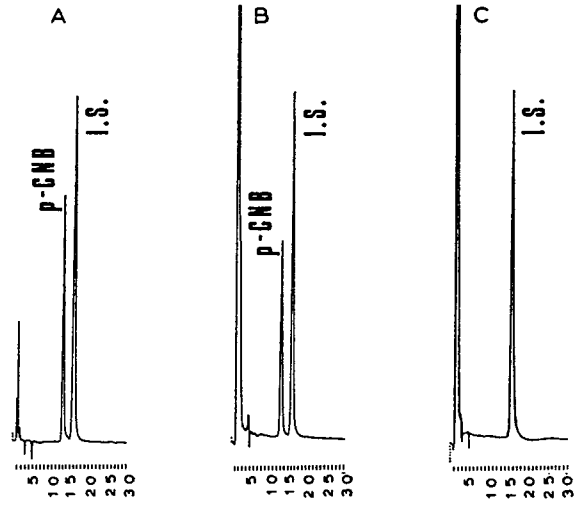


Fig. 3-1-2. Typical Chromatograms of Standard Solution of *p*-CNB (5 μg/ml) (A) and Plasma Samples of a Rat at 24 h after the Intraperitoneal Administration of 100 mg/kg *p*-CNB (concentration, 4.2 μg/ml) (B) and of a Control Rat (C).
I.S. = internal standard (*p*-BNB, 10 μg/ml).

標準溶液を分析した際のクロマトグラムを Fig. 3-1-2A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. 3-1-2B、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0.05～100μg／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

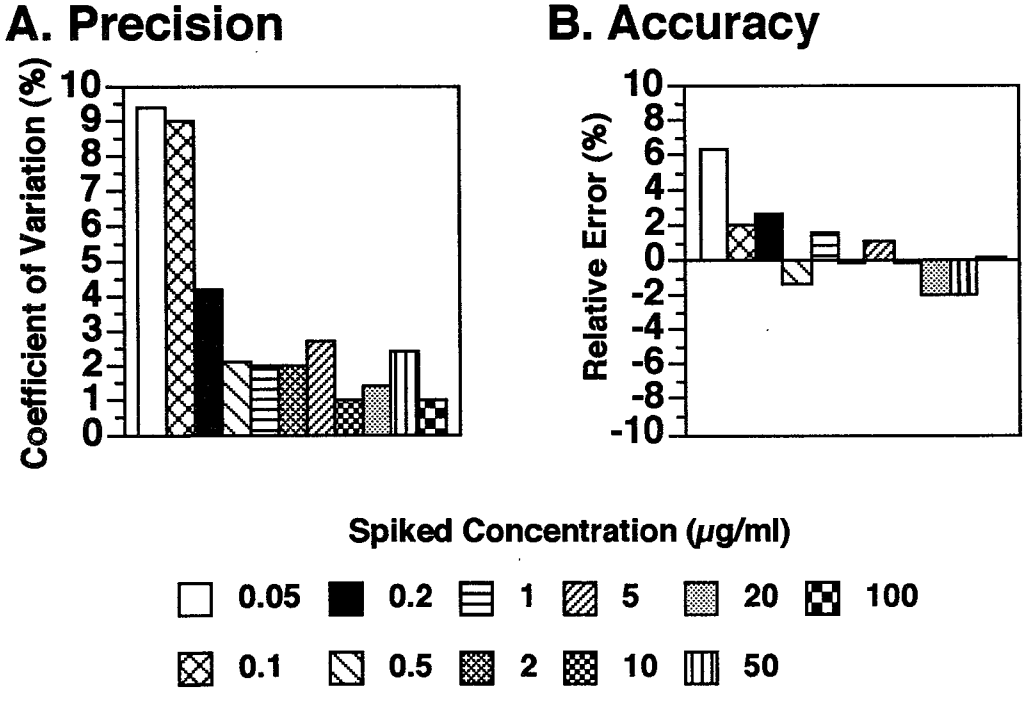


Fig. 3-1-3. Precision (A) and Accuracy (B) of the Method (n = 6).

した血漿（０．０５０～１００．００μｇ／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、０．２μｇ／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±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０．０５～１００μｇ／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（０．０７５～３５．２４μｇ／ｍｌ）のｐ-ＣＮＢを含む血漿試料に、既知量（０．１８～９０．５４μｇ／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.

p-CNB concentration (μg/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０．０１μｇ／ｍｌであった。

保存に対する安定性：－２０℃、４℃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℃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℃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℃で凍結保存するのが望ましいと考えられた。

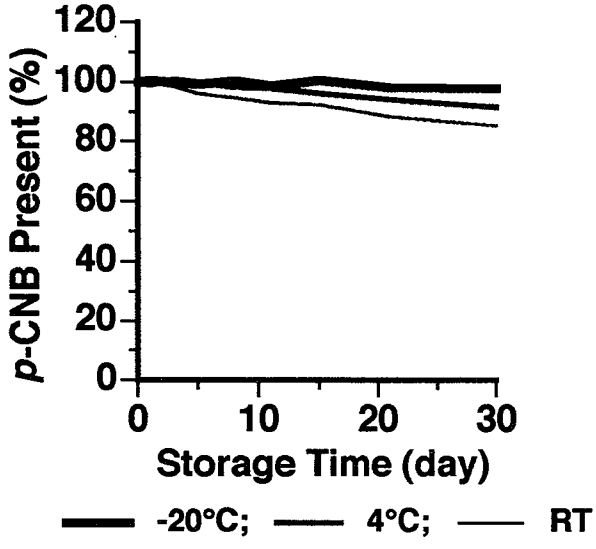


Fig. 3-1-4. Stability of *p*-CNB in Plasma at -20°C, 4°C and Room Temperature (RT).
p-CNB concentration just before storage (time zero) was set at 100% (*ca.* 30 μg/ml).

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取り扱い作業者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０．１５ｍｌ）であり、連続的な採血を必要とする動物を用いた *in vivo* での動力学の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取り扱い作業者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20μl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（4mm×4mmI.D.,粒子径5μm）を連結した分析カラム LiChrospher RP-Select B（125mm×4mmI.D.,粒子径5μm）（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0.45μm）（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	*p*-CNB 2,4-DCA	water - methanol (60:40, v/v)	250 nm
Condition-2	*p*-CA 2-C-5-NP 2-A-5-CP *p*-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	*p*-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 μl.

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200.0μg／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タイプディスポーサブルシリンジフィルター（DISMIC-13jp、孔径0.50μm、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（0.20～200.0μg／ml）を等量の水で希釈し、その混液の20μl 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１００．０μｇ／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１．０ｍｇをそれぞれ別々に、*p*-ＣＮＢ無投与のラットから得た尿（ｐＨ６～７）５０ｍｌに加えた。各代謝物について尿試料を２５本の褐色のスクリューバイアルに１ｍｌづづ分注した。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本づつ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１．０ｍｇをそれぞれ別々に、*p*-ＣＮＢ無投与のラットから得た尿５０ｍｌに加えた。各尿試料に１規定塩酸５ｍｌ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. ３-２-１Ａ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

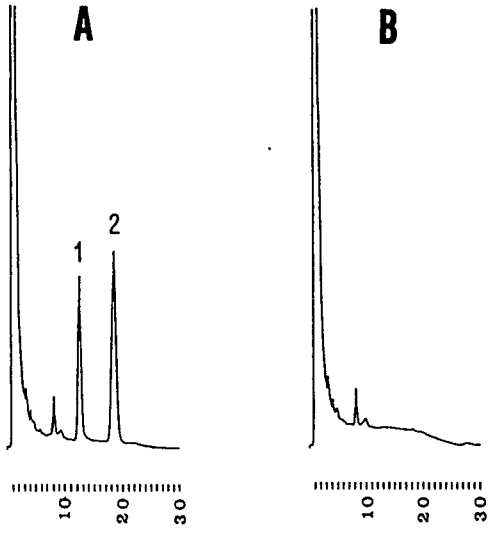


Fig. 3-2-1. Typical Chromatograms of a Sample Prepared from Rat Urine Spiked with *p*-CNB (1) and 2,4-DCA (2) (20 μg/ml each) (A) and a Control Urine Sample (B).

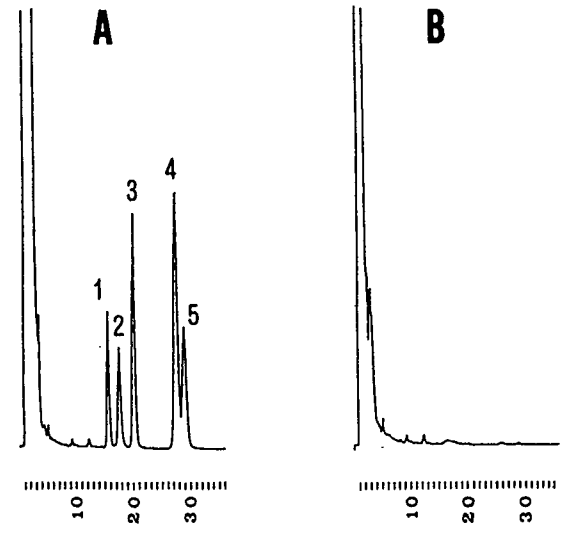


Fig. 3-2-2. Typical Chromatograms of a Sample Prepared from Rat Urine Spiked with 4-C-2-HAA (1), 2-A-5-CP (2), *p*-CA (3), *p*-CAA (4) and 2-C-5-NP (5) (20 μg/ml each) (A) and a Control Urine Sample (B).

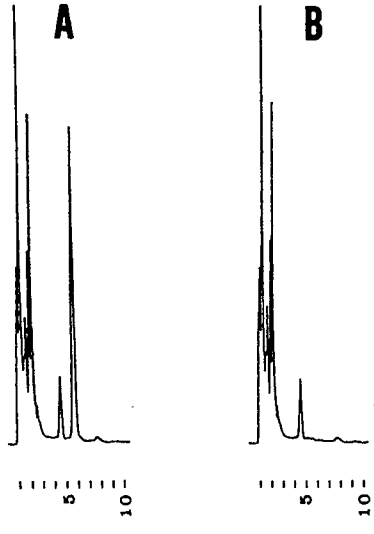


Fig. 3-2-3. Typical Chromatograms of a Sample Prepared from Rat Urine Spiked with ANPC (20 μg/ml) (A) and a Control Urine Sample (B).

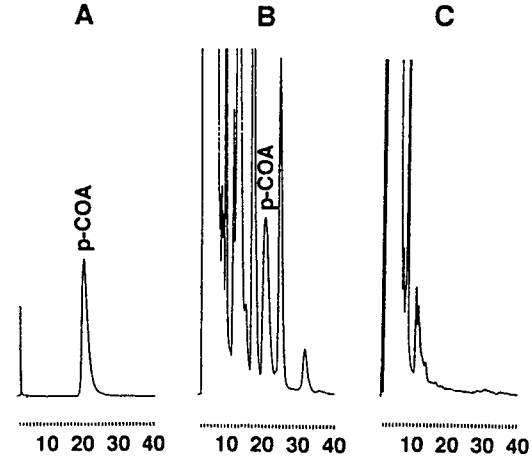


Fig. 3-2-4. Typical Chromatograms of Standard Solution of *p*-COA (20 μg/ml) (A) and Samples from Rat Urine Collected for 48 h after Intraperitoneal Administration of 100 mg/kg *p*-CNB (concentration, 22.2 μg/ml) (B) and from Control Rat Urine (C).

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２００μｇ／ｍｌ以下の濃度において直線性を示し、そ

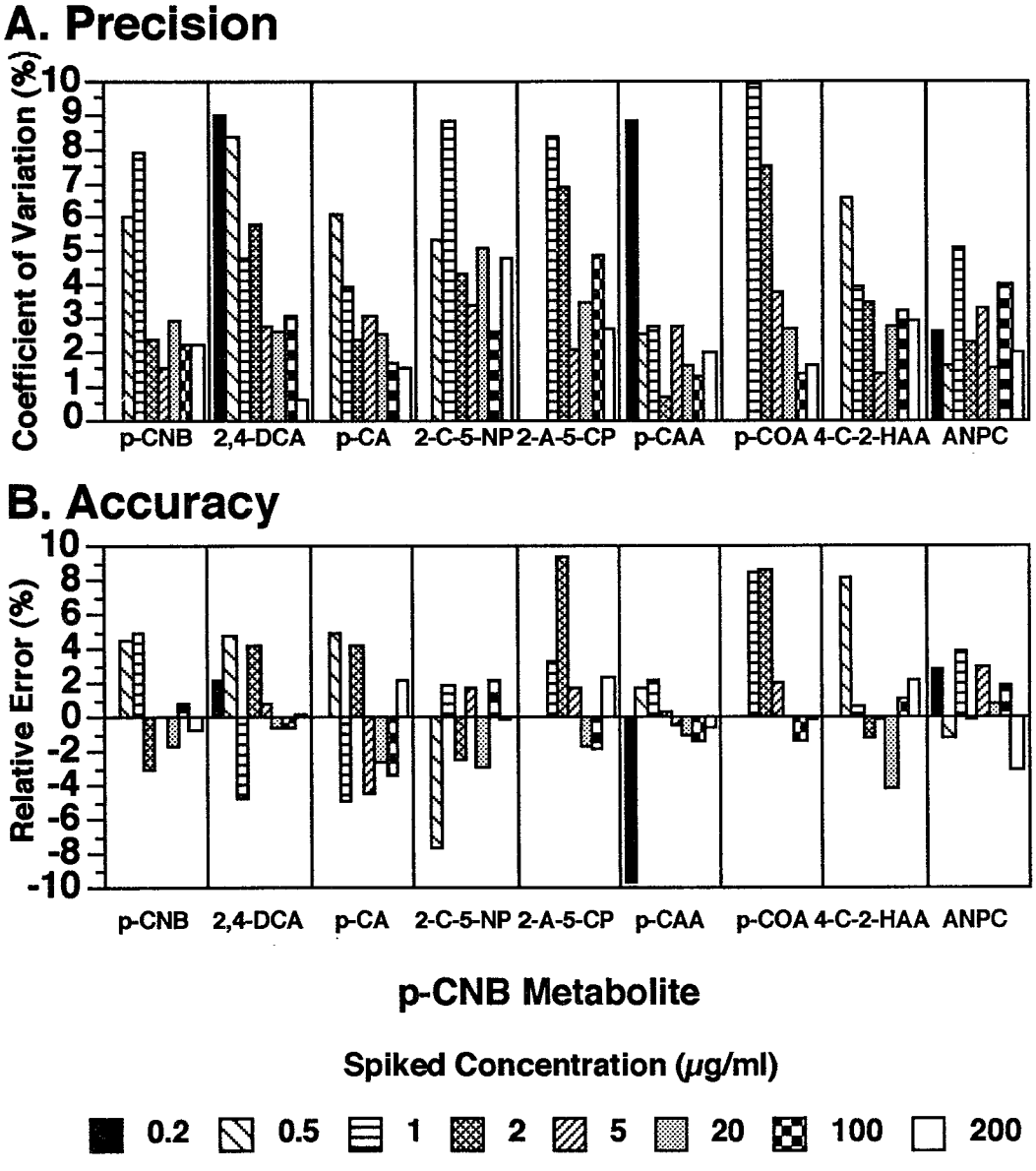


Fig. 3-2-5. Intra-day Precision (A) and Accuracy (B) of the Method (n = 6).

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０．２～２００μｇ／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０．５～２００μｇ／ｍｌの７種の濃度、２-Ａ-５-ＣＰおよび*p*-ＣＯＡでは１．０～２００μｇ／ｍｌの６種の濃度の各尿試料をそれぞ

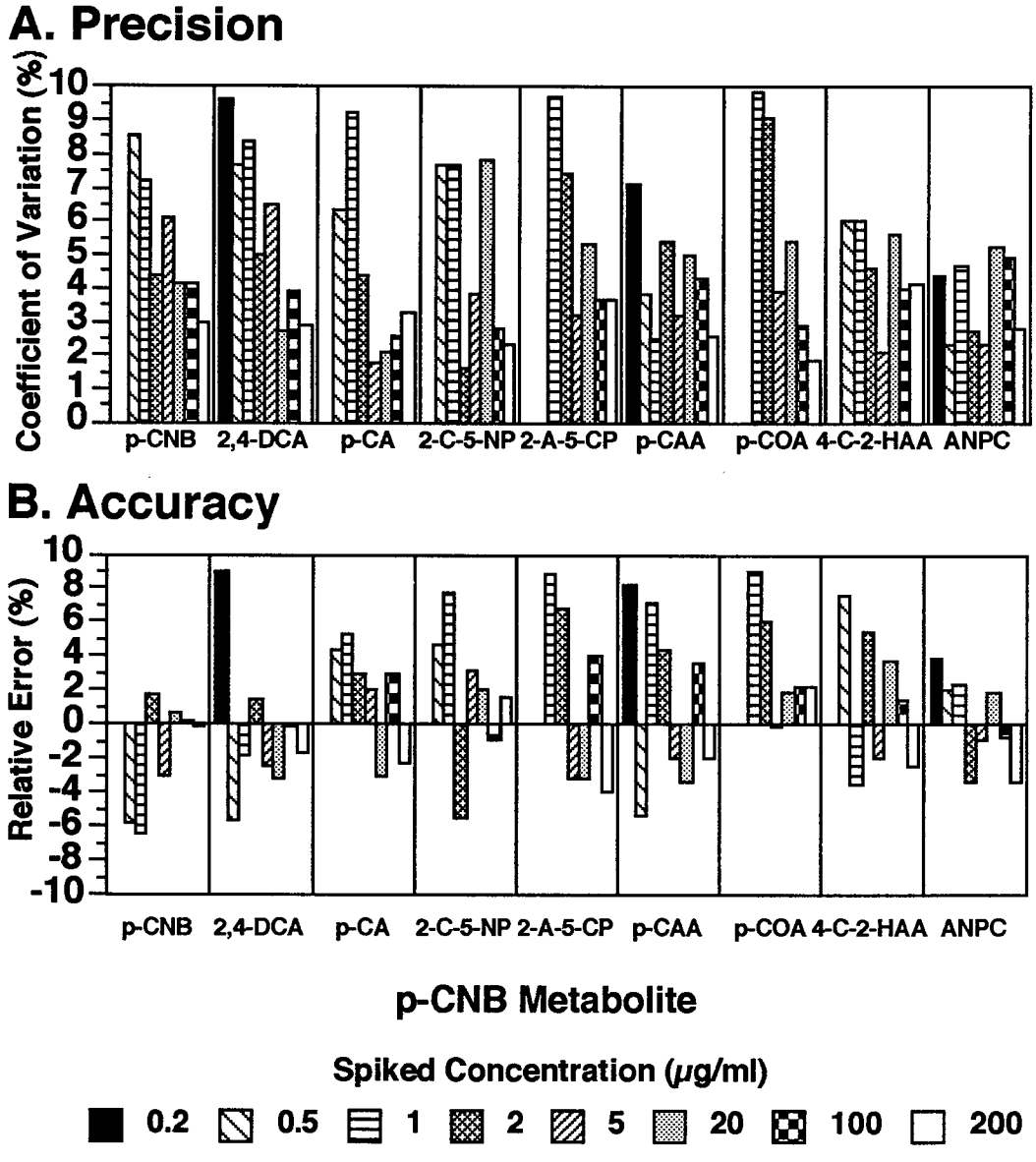


Fig. 3-2-6. Inter-day Precision (A) and Accuracy (B) of the Method (n = 6).

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、

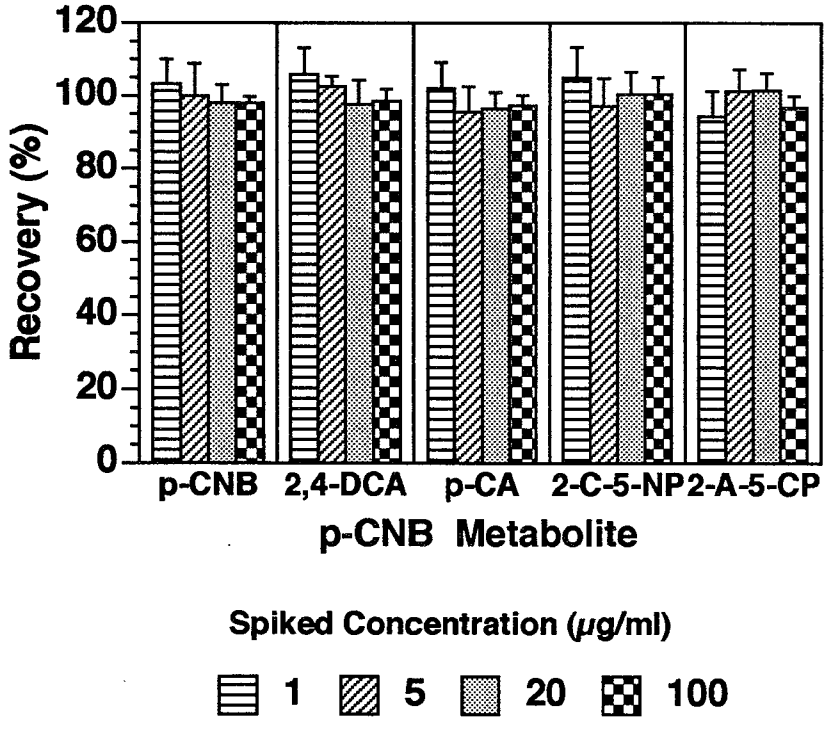


Fig. 3-2-7. Recoveries of *p*-CNB and Its Metabolites from Urine Heated for Hydrolysis.
Values are means + S.D. (n = 6).

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０．０５μｇ／ｍｌ、*p*-ＣＮＢ、*p*-ＣＡ、２-Ｃ-５-ＮＰおよび４-Ｃ-２-ＨＡＡは０．１μｇ／ｍｌ、２-Ａ-５-ＣＰおよび*p*-ＣＯＡは０．２μｇ／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。

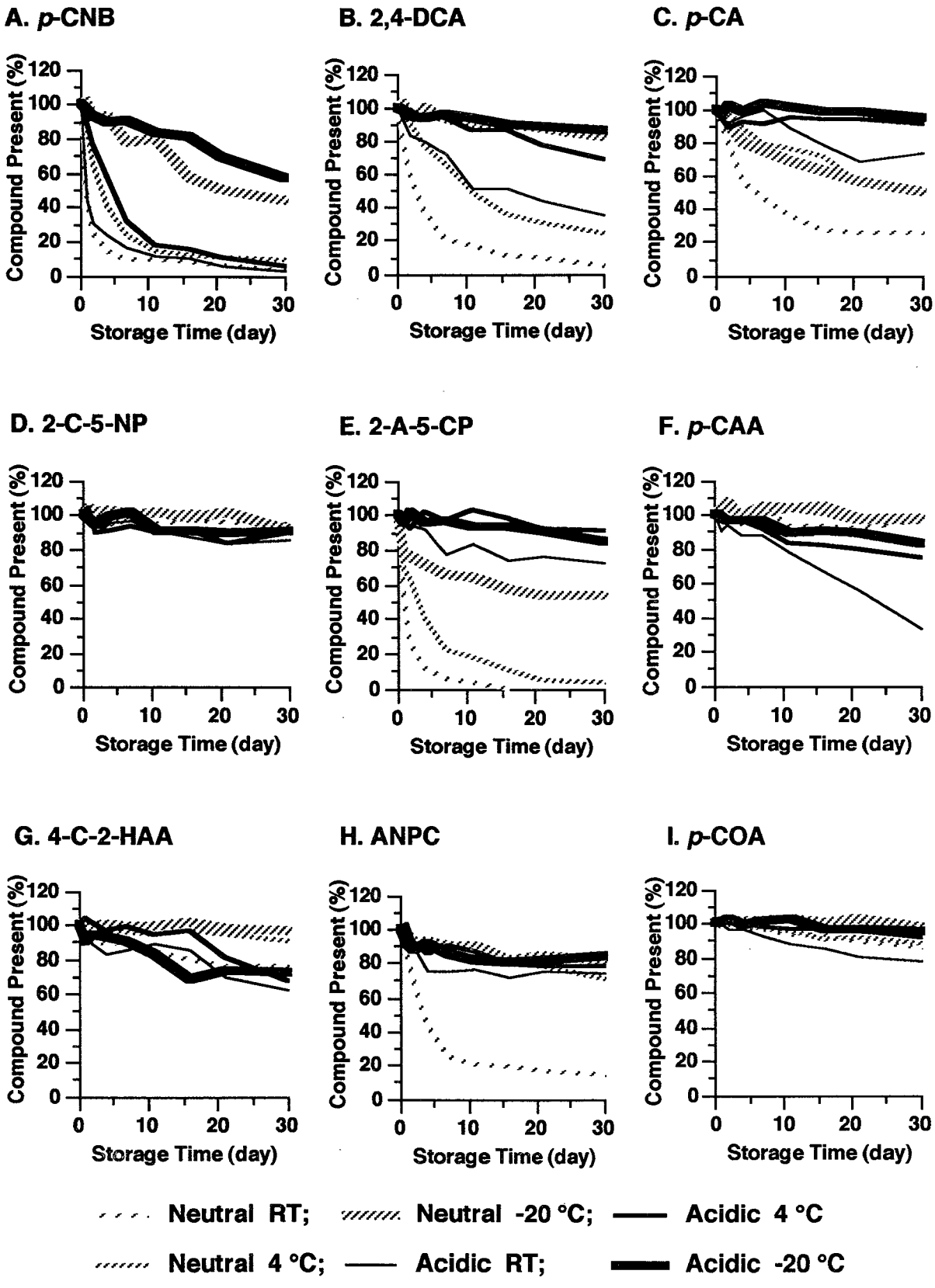


Fig. 3-2-8. Stabilities of *p*-CNB and Its Metabolites at -20°C, 4°C and Room Temperature (RT) in Acidic and Neutral Urine Samples.
The concentration of each compound just before storage (time zero) was set at 100% (each compound, *ca.* 20 μg/ml).

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取り扱い作業者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学的解析

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の代謝の薬物動力学的解析を試みた。

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。

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

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

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

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

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

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

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。

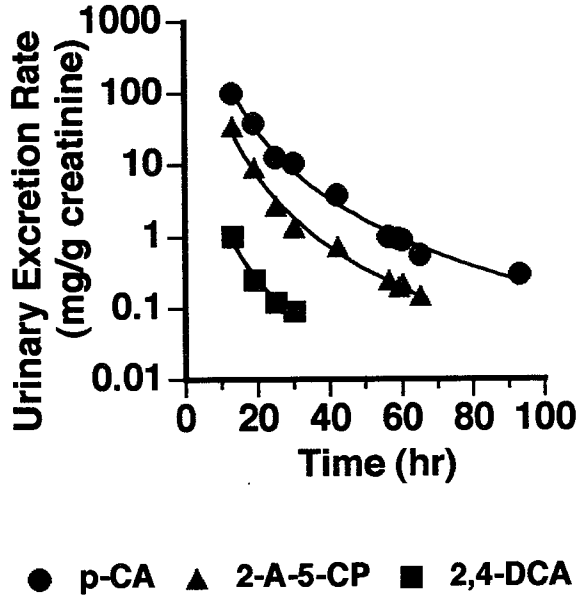


Fig. 4-1-1. Time Courses of Urinary Excretion Rates of *p*-CA Metabolites in a Subject.
The abscissa shows the number of days from *p*-CA exposure.

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
p-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-ＣＡ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*-ＣＡ尿中代謝物の総量は、*p*-ＣＡに換算して約４５０ｍｇであった。また、吸収された*p*-ＣＡ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*-ＣＡ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*-ＣＡ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-ＣＡ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*-ＣＡの代謝において体内で起こる*p*-ＣＡと*p*-ＣＡＡ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

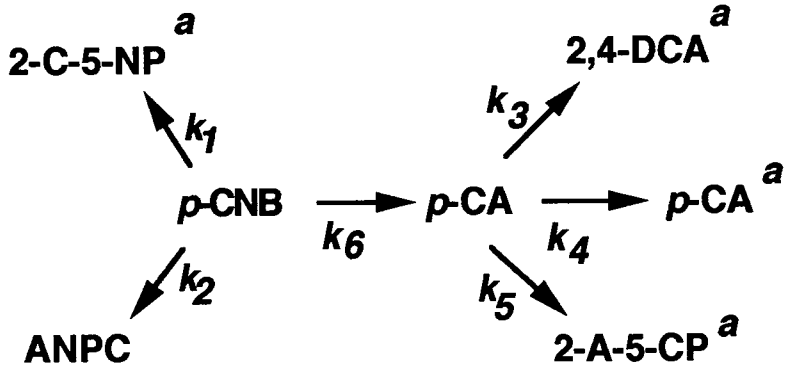


Fig. 4-2-1. A Model Metabolic Pathway of *p*-CNB for Estimation of Rate Constants in Transformation of *p*-CNB and Its Metabolites.
k1 - *k6*: rate constants in transformation. *a* : Most of the metabolite was in the conjugated form.

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～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MULTI（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～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_{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。

$$X^{\infty}=\int_{0}^{\infty}(dX/dt)\,dt \qquad (8)$$

$$MRT=\int_{0}^{\infty}t\,(dX/dt)\,dt/X^{\infty} \qquad (9)$$

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（k_1～k_6）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

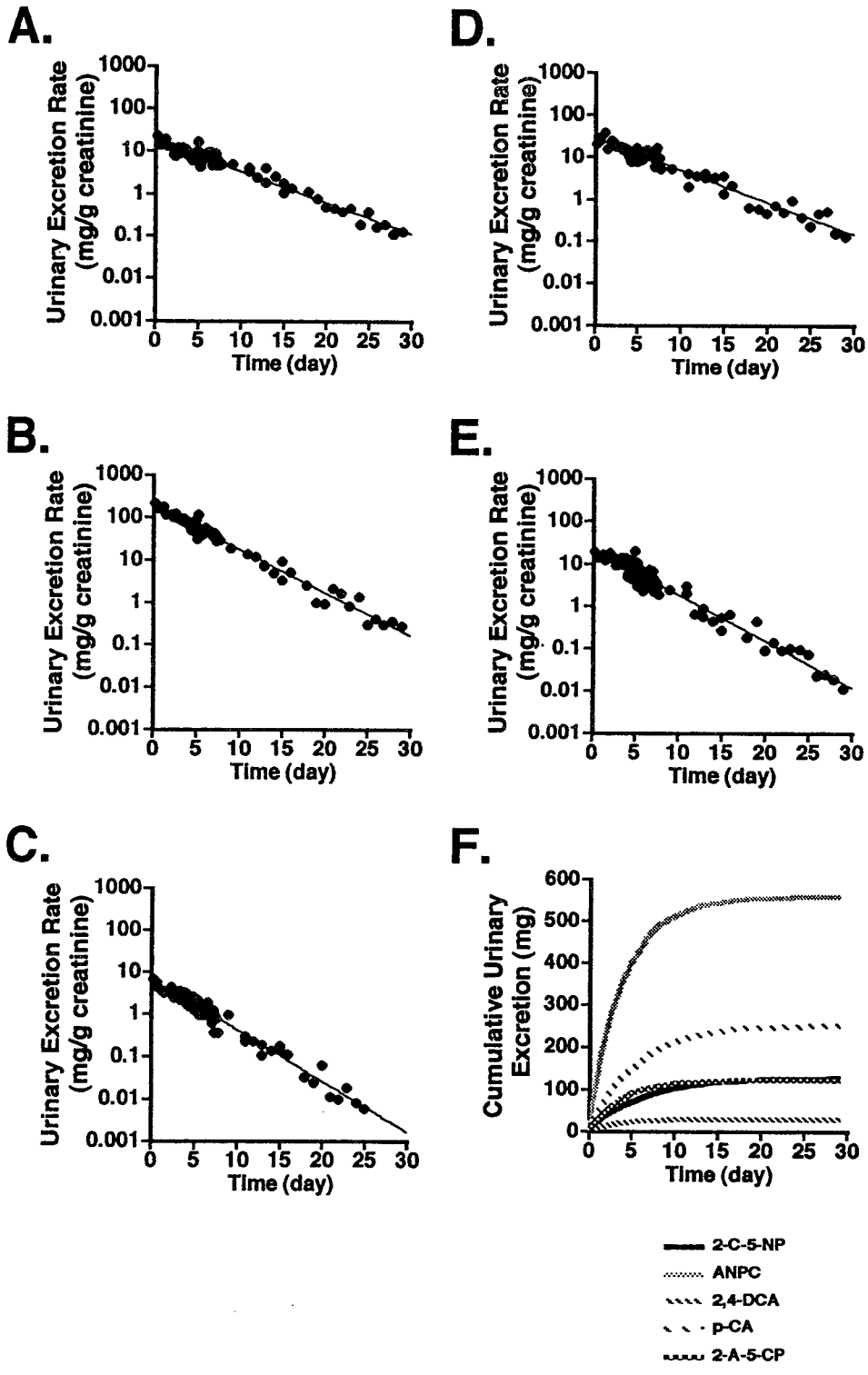


Fig. 4-2-2. Time Courses of Urinary Excretion Rates (A-E) and Cumulative Excretion Amounts (F) of *p*-CNB Metabolites in a Subject (U.A.).
The abscissa shows the number of days from *p*-CNB exposure. A, 2-C-5-NP; B, ANPC; C, 2,4-DCA; D, *p*-CA; E, 2-A-5-CP. For graph F, the values for the metabolites 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.
$X^{\infty}_{2\text{-}C\text{-}5\text{-}NP}$ [a]	124.3	90.8	46.8	74.7	57.8	9.4	67.3±39.3
	(11.6)	(12.8)	(9.8)	(17.4)	(16.4)	(5.3)	(12.2±4.4)
X^{∞}_{ANPC} [a]	552.0	379.2	242.1	187.9	156.5	79.0	266.1±172.2
	(51.3)	(53.3)	(50.8)	(43.9)	(44.5)	(44.2)	(48.0±4.3)
$X^{\infty}_{2,4\text{-}DCA}$ [a]	27.7	6.7	4.9	2.5	1.6	2.8	7.7±10.0
	(2.6)	(0.9)	(1.0)	(0.6)	(0.5)	(1.6)	(1.2±0.8)
$X^{\infty}_{p\text{-}CA}$ [a]	251.0	186.5	129.8	130.9	112.6	72.0	147.1±62.8
	(23.3)	(26.2)	(27.2)	(30.6)	(32.0)	(40.3)	(29.9±6.0)
$X^{\infty}_{2\text{-}A\text{-}5\text{-}CP}$ [a]	121.1	48.3	53.1	32.2	23.0	15.6	48.9±38.2
	(11.3)	(6.8)	(11.1)	(7.5)	(6.5)	(8.7)	(8.7±2.1)
X^{∞}_{Total} [a]	1076.1	711.5	476.7	428.2	351.5	178.8	537.1±316.0
$MRT_{2\text{-}C\text{-}5\text{-}NP}$ [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
$MRT_{2,4\text{-}DCA}$ [b]	3.7	4.3	3.4	3.0	5.1	2.8	3.7±0.9
$MRT_{p\text{-}CA}$ [b]	5.7	18.0	11.0	5.6	12.8	7.0	10.0±4.9
$MRT_{2\text{-}A\text{-}5\text{-}CP}$ [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者において、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±２５ｇ、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*-ＣＮＢ３０、１００または３３３ｍｇ／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０．３ｍｌづつ採血した。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匹づつ代謝ケージ（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*-ＣＮＢ３０、１００または３３３ｍｇ／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

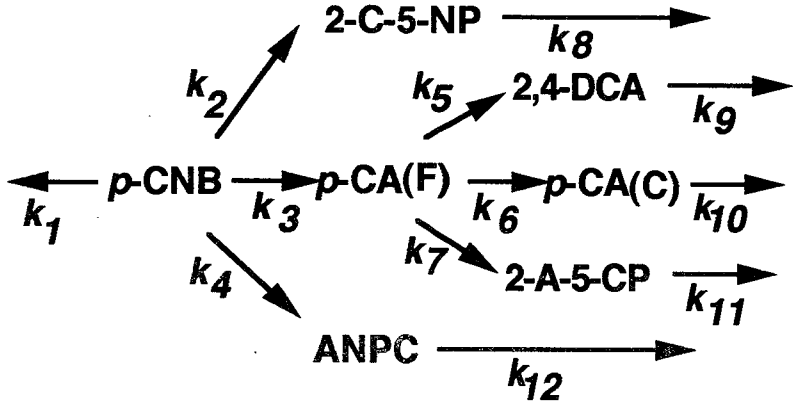


Fig. 5-1. A Model Metabolic Pathway of *p*-CNB for Estimation of Rate Constants in Transformation of *p*-CNB and Its Metabolites.
k1 : rate constant for elimination other than urinary excretion. *k2* - *k7*: metabolic rate constants. *k8* - *k12*: urinary excretion rate constants. *p*-CA(F), *p*-CA (free 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～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～k_7）および尿中排泄速度定数（k_8～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、$C_{p\text{-}CNB}$は血漿中p-CNB濃度、$X_{2\text{-}C\text{-}5\text{-}NP}$、$X_{ANPC}$、$X_{2,4\text{-}DCA}$、$X_{2\text{-}A\text{-}5\text{-}CP}$、$X_{p\text{-}CA(F)}$および$X_{p\text{-}CA(C)}$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、$X_{2\text{-}C\text{-}5\text{-}NP}'$、$X_{ANPC}'$、$X_{2,4\text{-}DCA}'$、$X_{2\text{-}A\text{-}5\text{-}CP}'$および$X_{p\text{-}CA}'$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。

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

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

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

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

ここで、$C_{p\text{-}CNB}$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333mg／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。

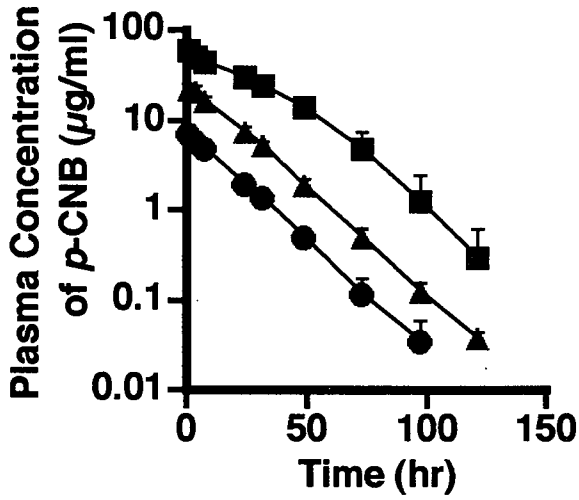


Fig. 5-2. Time Courses of *p*-CNB Concentration in Plasma of Rats after a 30 (●), 100 (▲) or 333 (■) mg/kg Intraperitoneal Injection.
Each point and vertical bar represent mean ± S.D. of five rats.

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３０ｍｇ／ｋｇでは２１３ｍｌ／ｈｒ／ｋｇ、１００ｍｇ／ｋｇでは１９８ｍｌ／ｈｒ／ｋｇ、３３３ｍｇ／ｋｇでは１７４ｍｌ／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*-ＣＮＢ３０ｍｇ／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$F_{2,4\text{-}DCA}$＋$F_{p\text{-}CA}$＋$F_{2\text{-}A\text{-}5\text{-}CP}$）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３３３ｍｇ／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（$F_{2\text{-}C\text{-}5\text{-}NP}$）は、３０および１００ｍｇ／ｋｇ投与時の約半分であった。

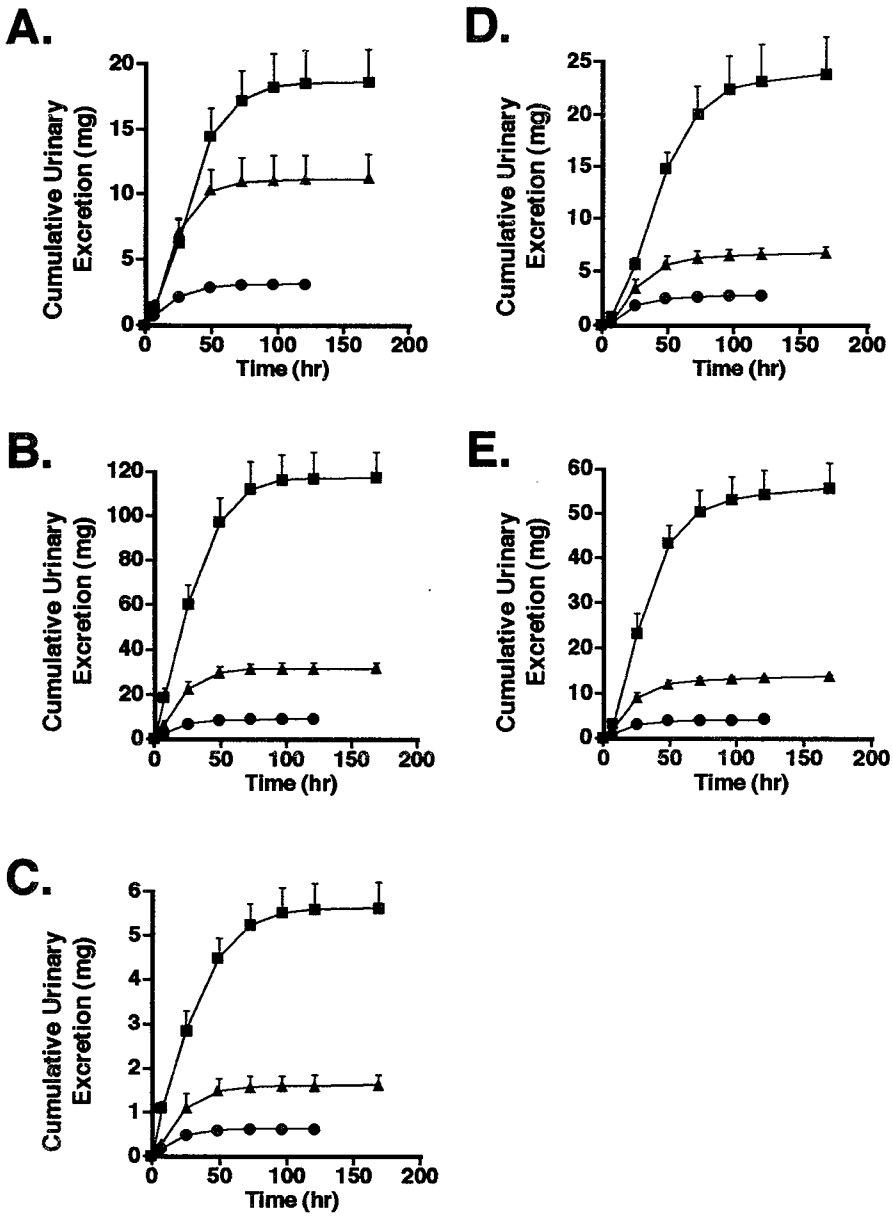


Fig. 5-3. Time Courses of Cumulative Urinary Excretion Amounts of *p*-CNB Metabolites in Rats after a 30 (●), 100 (▲), or 333 (■) mg/kg Intraperitoneal Injection.
Each point and vertical bar represent mean ± S.D. of five rats. The values for the metabolites were converted to excretion amounts per 1 kg 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-ＣＮＢ３０ｍｇ／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)
$F_{2\text{-}C\text{-}5\text{-}NP}$ [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)
$F_{2,4\text{-}DCA}$ [b]	2.1 (0.28)	1.6 (0.24)	1.5 (0.11)
$F_{p\text{-}CA}$ [b]	9.1 (1.05)	6.4 (0.59)	6.6 (0.78)
$F_{2\text{-}A\text{-}5\text{-}CP}$ [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)
$MRT_{p\text{-}CNB}$ [c] (hr)	17.4 (2.03)	18.3 (1.17)	27.1 (4.88)
$MRT_{2\text{-}C\text{-}5\text{-}NP}$ [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)
$MRT_{2,4\text{-}DCA}$ [c]	19.9 (1.00)	24.0 (3.35)	33.1 (2.58)
$MRT_{p\text{-}CA}$ [c]	25.4 (0.06)	32.6 (2.94)	48.4 (2.68)
$MRT_{2\text{-}A\text{-}5\text{-}CP}$ [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*-ＣＮＢ３０および１００ｍｇ／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、３３３ｍｇ／ｋｇの投与では、投与後初期の*p*-ＣＮＢの減少勾配は、３０および１００ｍｇ／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、薬物動力学的パラメーター（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4180ml／kg、5.2μg／ml／hrおよび80μg／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～k_{12}）を算出し、結果をTable 5-2に示した。p-CNB30mg／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0.019hr^{-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0.169hr^{-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-CNB333mg／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、薬物動力学的パラメーターを算出した。p-CNBの分布容積（V_d）は4180ml／kgであり、明らかに1000ml／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代謝の薬物動力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-ニトロフェニール）-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*-ＣＮＢ３０ｍｇ／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３３３ｍｇ／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１００ｍｇ／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、３３３ｍｇ／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３３３ｍｇ／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３３３ｍｇ／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-ＣＮＢ３０ｍｇ／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、１００ｍｇ／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～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、１００ｍｇ／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量を占めた。

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（３０～３３３ｍｇ／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０．２μｇ／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者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の代謝を薬物動力学的に解析した。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代謝物の約半分量を占めた。
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代謝物の約半分量を占めた。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　　辞

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).

43. G.M.J.Lower and G.T.Bryan, *Biochem.Pharmacol.*, **22**, 1581 (1973).

44. R.T.Williams, Detoxication Mechanisms. The metabolism and detoxication of drugs, toxic substances and other organic compounds, p.410-471, Chapman & Hall, London, 1959.

45. D.E.Rickert, *Drug Metabol.Rev.*, **18**, 23 (1987).

46. 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.

47. 吉村英敏, 毒性学. その生化学的側面, p.24-39, 講談社, 東京, 1982.

48. M.D.Corbett, J.E.Cahoy, and B.R.Chipko, *J.National Cancer Institute*, **55**, 1247 (1975).

49. M.D.Corbett and B.R.Chipko, *Biochem.J.*, **165**, 263 (1977).

50. M.D.Corbett, B.R.Chipko, and J.H.Paul, *J.Environ.Pathol.Toxicol.*, **1**, 259 (1978).

51. M.D.Corbett, D.G.Baden, and B.R.Chipko, *Bioorganic Chem.*, **8**, 227 (1979).

52. R.T.Williams, Detoxication Mechanisms. The metabolism and detoxication of drugs, toxic substances and other organic compounds, p.205-206, Chapman & Hall, London, 1959.

53. 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.

54. 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.

55. J.J.Betts, S.P.James, and W.V.Thorpe, *Biochem.J.*, **61**, 611 (1955).

56. J.J.Betts, H.G.Bray, S.P.James, and W.V.Thorpe, *Biochem.J.*, **66**, 610 (1957).

57. 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.

58. 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 Pharmak*, **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.Stelmaszy'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).