パラチオン中毒時の尿中パラニトロフェノールの意義について

第 I 報 尿中パラニトロフェノール測定法の検討

On the Significance of p-Nitrophenol in Urine in Parathion Poisoning

Report I. On the Determination Method of p-Nitrophenol in Urine

慶応義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室（主任 原島進教授）

高 橋 謙
Ken Takahashi

Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University
(Director: Prof. S. Harashima)

有機燐殺虫剤 Parathion は農場、果樹園等で昭和27年来多量に使用され、昭和30年度には死亡 510名（内自殺 462名）、重症中毒 118名、中毒症 152名、軽症 626名を出している。この Parathion 中毒の診断方法として、現在臨床症状によるもの、その抗コリンエステラーゼ作用を目標とした血液コリンエステラーゼ活性値の低下による診断と、Parathion の生体内分解産物であるパラニトロフェノールの尿中排泄を目標とした診断法等がある。

血液コリンエステラーゼ（以下 ChE）活性値は 確実な診断方法であるが、その値の個人差が大きく、各個人の正常値或は経過をみなければその診断を確実にすることはできない欠点がある。尿パラニトロフェノール（以下 PNP）排泄量の測定は間接に体内に Parathion が吸収された量を推定することができ、ChE 法と併用すれば中毒の診断を一層確実にすることができる。しかし独立の診断法としての意義については未解決の部分が多い。本論文においては尿中PNPの測定方法の検討及び改良について述べ、種々の中毒時における尿中PNPについて実験的追求を行い、その意義について考察する。

尿中PNPの排泄量の測定はアルカリ性でPNPが黄色調を呈することを利用する方法と、還元してアミノフェノールとし、フェノール類と縮合呈色さすインドフェノール法とに大別しうる。

後者の方法は Mountain と Zlotolow¹⁾ によりまず報告され、Waldman と Krause²⁾、更に Lawford と

Harvey³⁾により簡易化された。Mountain や Waldman 等は尿の色素を除くために種々の薬品（Mountain は醋酸鉛と磷酸、Waldman は塩化バリウム、過マンガン酸カリ、蓚酸等）を使用し、Lawford 等は尿色素の移行しない有機溶剤の追求をした。尿色素の脱色方法はその過程においてPNPの損失をきたす。たとえば Waldman—Krause の方法においてはこの過程に20～25%が失われる（第1表）。しかも操作が複雑となり時間も多くなる。従つて操作も簡単であり試薬も安価である Law-

第1表 Waldman—Krause 法の尿固有色素脱色の際に起るパラニトロフェノールの損失

脱色法

- 第 I 段階：尿 10 ml に
40 % NaOH 0.2 ml } を加え振盪30分
25 % BaCl 5.0 ml } 間放置後速沈分
5 % KMnO₄ 3.0 ml } 離
- 第 II 段階：上記の上清に
10 % 蓚酸 7.0 ml を加え振盪放置速沈
- 第 III 段階：上清より有機溶剤に抽出、次にアルカリ層に転溶、フェノールを加え三塩化チタンで還元、呈色したインドフェノール青を測定

パラニトロフェノール 20 μg 添加の段階	吸光度係数		
	尿 A	尿 B	尿 C
尿に加えた後 I, II, III	0.066	0.072	0.070
I 段階後に加えた時	0.080	0.086	0.079
II 段階後に加えた時	0.088	0.090	0.085

ford—Harvey 法について検討を行い必要な改良を試みた。

実 験

Lawford—Harvey 法の原理は Parathion が体内(血漿, 肝その他)で分解して生ずる PNP を尿から有機溶剤で抽出し, アルカリ液(アンモニア水等)に移行させ, 亜鉛末等の還元剤を加えて還元してパラアミノフェノールとなし, これに o-クレゾール(またはフェノール)を加え縮合して生じるインドフェノールの呈色(青色)を $620\text{m}\mu$ またはその付近で吸光度を測定定量する(第1図)。

第1図 PNP のインドフェノール反応

試 薬：

パラニトロフェノール標準液 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$

濃塩酸 (GR)

アンモニア水 (2N)

混合溶剤 エチルエーテル 1 容

* 石油エーテル 4 容

これにイソアミルアルコール 1 V/V % に加える

* 沸点 $40\sim 60^\circ\text{C}$.

亜鉛末 (または三塩化チタン)

o-クレゾール溶液 1% (1 g/dl)

器 具：

ビペット各種

100cc 分離ロート (著者改良法では内容 50cc 共栓付遠沈管)

10cc 遠沈管

光電比色計 (フィルター $620\text{ m}\mu$ またはその付近)

Lawford 原法の各段階を検討しながら改良すべき点も述べて行く,

a) 前処置としての酸分解

尿中に排泄される PNP は遊離の形においてはほとんど存在せず, エーテル硫酸, グルクロン酸に抱合されて

おり塩酸等の酸性加熱により分解を行わなくては, 完全に検出はできない。原法はこの前処置に全く触れていない。

酸分解の濃塩酸の量と温度と時間: 尿 (Parathion 粉剤工場工員の尿) と濃塩酸の比が 10:1 (本邦慣用の濃度) の場合は 100°C 60 分で一定の値に達し加熱時間を延長しても増加しない。10:3 とすると 100°C 180 分に至るもなお呈色増加の過程にあつて一定値に達しない。

第2図 尿:濃塩酸=10:3 の場合
加熱時間による酸分解の差

い(第2図)。加熱条件を 100°C 1 時間と限定した場合には尿 10 ml に対し濃塩酸 6~7 ml で最高に達し(第3図), オートクレープを用いる場合は 120°C 1 時間の加熱で塩酸の濃度は 10:2~10:6 の範囲で一定の値を示し,

100°C 加熱の場合の最高値と一致する。これは同時に Fishman⁴⁾ の方法により同一尿のグルクロン酸を定量するとグルクロン酸の増加と一致し, グルクロン酸抱合という裏付にもなる(第2表)。従つて加水分解条件として尿 10cc に対し濃塩酸 6 ml, 100°C , 60 分加熱で充分であり, 従来の慣用の 10:1, 1 時間は約 50% を検出するに過ぎない(第3図)。なお酸分解として Brodie⁵⁾ は 5:1, 120°C , 90 分, Eicken⁶⁾ は 5:1, 100°C , 60 分を行つている。まだ 10:6 の加熱分解で PNP は変化しない。

b) 抽出溶剤

分解後冷却するのを待つて, 試薬の項に述べた混合溶

第3図 100°C, 60分, 尿 10 ml に対する
濃塩酸の多少による酸分解の差

第2表 酸分解時間による尿中パラニトロフェ
ノール, グルクロン酸の検出

尿：濃塩酸=10：3

	パラニトロ フェノール	グルクロン酸
100°C 1時間	0.180	0.125
2 "	0.232	0.185
3 "	0.254	0.220
120°C 1時間	0.279	0.240

尿：濃塩酸=10：6, 100°C 1時間で
PNP 0.281, 120°C 1時間 0.280

剤を試料 10 ml に対し 25 ml を加え約 10 分間（5 分以上は差はない）振盪抽出する。混合溶剤のエーテルの比が大なる時は尿色素の移行が多くまた抽出率もよい。石油エーテルの多い場合は尿色素の移行も少いが抽出率も少い（第4図）。またエーテルの多い場合は安定な均等液をつくりやすいのでエーテル、石油エーテルの混合比は原法通り 1：4 がよい。

c) アルカリ転溶

抽出後（液層はよく分離するが要すれば軽く遠沈し）混合溶剤 25 ml 中 20 ml をとる。2 回抽出、混合溶剤計 40 ml をとり、これを 2 N アムモニア水 10 ml で 10 分間振盪抽出する。

原法では酸分解を行わないので色素形成が少かったが、酸分解を行った時は相当の暗褐色の色素を形成しア

第4図 混合溶剤混合率の差によるパラニトロ
フェノール, 尿色素の抽出の差
（尿は酸分解をしたもの）

ルカリ液に一部移行する。その対策として原法ではアムモニア液 5 ml を用いるところを 10 ml を使用、転溶後 2 分し一方を対照管として使用する。10 ml メスピペットで混合溶剤と分離したアムモニア層（PNP が多ければ黄色）を 10 ml とり 10 ml 遠沈管にそれぞれ 5 ml ずつ分注する。この場合、混合溶剤が少し混入してもさしつかえない。ただし還元剤として亜鉛末の代りに三塩化チタンを使用する場合には混合溶剤が入ると安定な膠状濁濁を生じて除去しにくいから、むしろ 10 ml 中 9 ml をとり 4.5 ml ずつ分注した方が安全である。

d) 還元及び縮合

還元は強アルカリ性（pH 11）で行うが、著者改良法に従い酸分解で用いる濃塩酸を増量したための酸の移行による pH の低下は僅少（—pH 0.4）に止る。アムモニア液を分注した一管に 1% o-クレゾール液 0.5 ml を他方（対照管）に蒸留水 0.5 ml を入れ亜鉛末 0.5 g を加えよく振盪（1 分以上）後遠沈（15 分）を行い上清を傾斜分離し 1 時間後対照管を 100% とし 620 mμ のフィルターを用いて、吸光度を計り標準曲線よりその含量を定める。Lawford 原法では亜鉛末で還元、分離後 o-クレゾール液を加え呈色させるように指示してあるが、実際には還元、遠沈分離より o-クレゾール液を加えるまでの時間により呈色の差を生ずる（第5図）。o-ク

第5図 亜鉛末で還元遠沈分離後1%
オルトクレゾール溶液を加える
までの時間による発色の差

レゾール液を還元前か同時または遠沈分離前に加えれば常に一定値を得る。遠沈は濾過で代用しうる。

還元剤として亜鉛末の代りに Waldman²⁾, Eicken⁶⁾, 佐々木⁷⁾ 等の如く三塩化チタンを用いるのも良法である。三塩化チタン液(市販15% TiCl_3 溶液 0.6ml を水で 10ml に稀釈) 0.5 ml を加え色がなくなるまで強く振盪後遠沈する。o-クレゾールを添加する時期は亜鉛末法と同様である。本剤の特色は亜鉛末法に比し、速やかに少くとも15分後呈色が極大に達し安定することである。

e) 標準曲線の作製

正常尿をとり 10, 20, 30 μg /10 ml の標準液をつくる(標準原液: PNP 1000 g を水 500ml に溶かし、この 10ml を水で 1000ml とし、この標準原液(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.5, 1.0, 0.5ml をとり正常尿で 10ml にする。上記の全経過を追って吸光度を測定し標準直線を作製する。抽出遠沈その他の損失及び換算率等は標準曲線の中に含まれる。稀釈の目的で尿の代りに通常の如く蒸留水を用いてもよいが、この場合混合溶剤抽出率が尿に比較して良好であるので、この補正が必要である。定量至適範囲は通常の光電比色計でアムモニア溶液 5 ml 中 0.2 ~ 40 μg 。著者の改良法は尿固有色(盲検値)を相殺するために対照管を置く必要上アムモニア液 10cc に転溶さす。この場合は尿としてこの 2 倍の濃度を含有するか、或は 2 倍量の尿 (20 ml) を試料とする必要がある。呈

色したインドフェノール青色は 45 分より 3 時間は安定である。

また山村⁸⁾ は簡易法として肉眼的比色の目的でアムモニア性硫酸銅の標準管を作製し、その色調がインドフェノール青と極めて一致して実用に供しうることを発表している。

f) 手技上の改良

試料の数が極く少い時はよいが、パラチオン粉剤工場工員、集団撒布時の農民を対象とするような多数の試料について行う場合には、太目(直径 2.0cm くらい)のゴム栓付試験管に尿を 30~40ml くらいとらせる。前処理と抽出分離を同一容器で行うために 50ml 共栓付遠沈管に尿 10cc 濃塩酸 6 ml を入れ栓をし、栓のとばぬようにセロファンで被い輪ゴムで止め 10 本或は 20 本をまとめ重湯煎中で加熱分解、冷却後混合溶剤を 25ml 加え振盪抽出する。この後静置により液層が分離しない時があるが遠沈により容易に分離できる。このように分離ロートを使用するより操作が簡単になる。

尿はできるだけ新しい方がよく、保存する場合は一定量の濃塩酸を加えるか、冷蔵庫内に保存することが必要である。

総 括

パラチオン吸収によるパラニトロフェノール(PNP)定量法を検討して次の結論を得た。

- 1) Lawford—Harvey 法は最も優り Mountain 等, Waldman 等の方法は脱色前処理中に損失があり、繁雑である。
- 2) Lawford 等の原法によつてはグルクロン酸と抱合した PNP を定量しえない。尿と濃塩酸の比を 5 : 3 として 100°C, 1 時間加熱で極大値を得る。
- 3) 抽出溶剤のエーテルと石油エーテルの比は原法 (1 : 4) が最良である。
- 4) アルカリ抽出は原法の 2 倍のアムモニア液を用い、その半分を呈色せしめずに対照管として用い盲検値を打消さす。
- 5) 還元後の呈色操作において、原法の如く亜鉛末を遠沈した後に o-クレゾールを加えると呈色は不定となる。遠沈前に o-クレゾールを加え、数分後に遠沈する必要がある。
- 6) 1 試料に対し 50ml 共栓付遠沈管 2 本を用い、加熱前処理、溶媒抽出、アルカリ抽出を行うのが能率的である。

御指導，御校閲を賜わった原島教授及び上田助教授に
深謝いたします。

本論文の要旨は第9回日本産業医学会（昭和29年4
月）及び農林省報告⁹⁾，厚生省報告に発表した。

文 献

- 1) Mountain, J. T.; Zlotolow, H. and O'Connors, G. T.: *Indust. Health Month.* 11: 88, 1951.
- 2) Waldman, R. K. and Krause, L. A.: *Occup. Health* 12: 37, 1952.
- 3) Lawford, D. J. and Harvey, D. G.: *Analyt.* 78: 63, 1953.
- 4) Fishman, W. H. et al.: *J. Clinic. Invest.* 30: 7, 1951.
- 5) Brodie, B. B. and Axelord, J.: *J. Pharm. & Exp. Therap.* 94: 22, 1948.
- 6) Eicken, v. S.: *Angew. Chem.* 66: 551, 1954.
- 7) 佐々木直亮他: *日本公衆衛生誌* 1: 400, 1954.
- 8) 山村醇一: 厚生省編, 有機燐剤の薬理作用と化学的性質 p. 17, 1955.
- 9) 農薬中毒研究班: 新農薬の人畜に対する影響に関する研究, 第3中間報告 1953, 第5中間報告 1955.

（受付：1956年5月22日）