— 原 著 —

クロルニトロベンゼンからアミノフェノールとアニシジンを 合成している作業者に関する調査研究

勝又 聖夫

日本医科大学衛生学公衆衛生学教室

An industrial toxicological study on workers who synthesize
aminophenol and anisidine from chloronitrobenzene

Masao Katsumata

Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School

Aromatic nitro- and amino-compounds (ANA) are notorious methemoglobin forming substances. From 1987 to 1993, the author surveyed the exposure level to ANA and health status of workers in a chemical industry where they synthesize nitrophenol and anisidine from chloro-nitrobenzene. The ANA exposure indicator was the diazo-reaction positive substance in the worker's urine (Dz) and the biological effect of ANA was monitored through the methemoglobin concentration in the blood (MHb). The following results were obtained from the survey.

1. Both the Dz and MHb values tended to become lower between 1987 and 1993.

2. The MHb levels of the workers were a little higher than the control levels, and the difference between the values was statistically significant ($p < 0.01$); both levels were, however, within the normal range.

3. The MHb value was estimable from a mathematical model:

$MHb = (k_1 - k_2/a) \times DU \times CH$, where k_1 and k_2 were constants and a , DU and CH indicated the activity of glutathion S transferase in erythrocytes (GST), DZ in urine and blood hemoglobin concentration, respectively. The correlation coefficient of the multiple regression was statistically significant ($R^2 = 0.263$, $p < 0.01$). This model suggests that the biotransformed fraction of ANA in the pulmonary uptake site, the lung, could not penetrate into erythrocytes or act as an MHb former. The model seemed to be consistent and valid when urinary DZ values were less than 1.0 (mg/mg creatinine) and MHb values were less than 2.0 (mg/m ℓ blood). Thus, the upper limit of normal levels for MHb can be considered to be 2.0 (mg/m ℓ blood), or 12-1.6% of total hemoglobin in blood.

4. The significance of the uptake sites, i.e., lung, skin etc., was discussed with reference to the evidence obtained from the longshoremen cases, who were percutaneously exposed to chloronitrobenzene in 1984.

5. Hemolysate solutions from the blood of workers were applied to isoelectric focus-

ing electrophoresis (IEF), and Hb species of different valencies were separated; intermediate MHbs, where the heme iron in one of the components of Hb, i.e., in the α or β chain was oxidized and MHb where both the α and β chain heme iron oxidized and Hb X and Y, were separated and easily discernible. The correlation matrix was calculated using the data relevant to IEF and other indicators; MHb estimated spectrophotometrically, GST activity of erythrocytes, Hb and urinary DZ vale. The statistical procedure of principal component analysis was applied to the matrix, and two major principal components were extracted from the calculation. One of the components is relevant to the redox state of erythrocytes explained by MHb and Hb (X, Y) levels in the IEF pattern, and the other is relevant to detoxication by GST. The intermediate MHb values separated by IEF correlated to both of the components.

Key words: aromatic nitrocompounds, industrial toxicology, glutathion transferase, methemoglobin, diazo-reaction

緒 言

芳香族ニトロアミノ (ANA) 化合物は染料、医薬を始めとする化学製品の重要な原料である¹⁾。ANA は、血液毒性があり、メトヘモグロビン (MHb) 血症、溶血性貧血を惹起することはよく知られている²⁾。なかでも、塩素化されたクロルニトロベンゼン (CNB) は、上記の毒性作用が強い。1977年に労働省の委託によって、Ikeda ら³⁾は、ANA 作業者を対象として、被曝状況と人体影響に関する広汎な調査を行った。その結果、(1) ANA への被曝の指標としては、尿中ジアゾ反応陽性物質、(2) 被曝による人体影響を知る最も鋭敏な指標は、血中メトヘモグロビン (MHb) 濃度であることが確認された。これに基づき ANA 作業者の健康管理のための手順が決められた。1979年には Tomoda と Yoneyama⁴⁾が、分光光度計を用いて測定した MHb には、等電点電気泳動 (IEF) 法によるヘモグロビン (Hb) の分画で、Hb の α 鎖にあるヘム鉄のみが酸化された分画と、 β 鎖にあるヘム鉄のみが酸化された分画が分離同定できることを認め、この二つの分画を MHb 中間体 (MHb (intmed); intermediate methemoglobin) と呼んだ。また α 鎖、 β 鎖のヘム鉄がすべて酸化された MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) が本来の MHb であろうと述べた。そして分光学的な MHb 値には、この三者が含まれていることを示した⁵⁾。1989年には、Tomoda ら⁶⁾が塩素化 ANA を取り扱う作業

者の Hb を IEF 法で分画したときに、MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$)、MHb (intmed) 分画が多くみられるほか、陽極 (+) 側に移動する HbX と HbY の分画が、対照者に比べて高い割合で認められたことを報告した。この現象は、酸化性物質 (クレゾール) を誤飲し、血中 MHb 値が高値を示した事例でも、Minami ら⁷⁾が確認した。この陽極側の HbX、Y 分画の中で、HbY は、グルタチオン化 Hb と推測している (南, 勝又, 未発表)。さらに、荷役作業者が、港湾で CNB の入った袋の荷役作業中に、袋の破損による多量被曝した事例で、作業者の経皮的な被曝が認められ、CNB が容易に経皮吸収されたことを報告した⁸⁾。以上のことを考え合わせ、CNB などの塩素化 ANA への被曝状況と人体影響の指標である分光学的 MHb (MHb (Ab)) 値、IEF 法で検出される Hb の各分画値 (MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$), MHb (intmed), Hb (X, Y)) との相互関連の機序を考察した。なお、被曝状況と人体影響の指標である MHb (Ab) 値は、線型な用量反応関係をとらないが、作業者の赤血球グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性を、用量反応関係を修飾する指標として考慮することで、塩素化 ANA 被曝と MHb (Ab) 値の関係を明らかにすることが出来た。

研究対象および方法

(1) 対象者

対象者は、1987年から1993年の7年間に年1回

の健康調査を少なくとも 5 回以上受診した作業者 26 名, 対照者 (同工場の事務職) 7 名, 合計 33 名の男性 (23~60 歳, 平均年齢 44.7 歳 (1993 年)) である。作業歴は 5~38 年 (平均 20 年) で作業内容は, p-クロロニトロベンゼン (p-CNB) から p-ニトロフェノール Na 塩や p-アニシジンを製造する作業である。この対象者の各年の健診時に行った尿検査 (糖, 蛋白質, ウロビリノーゲン), 血液検査 (赤血球数, ヘモグロビン値, 赤血球比重) および肝機能検査 (GOT, GPT, γ -GTP) は, いずれも異常を認めなかった。

(2) 測定項目

ヘモグロビン (Hb) 濃度 (シアンメトヘモグロビン法⁹⁾), メトヘモグロビン (MHb (Ab)) 値の測定 (Evelyn and Malloy 法の Hegesch 変法¹⁰⁾), ヘモグロビン (Hb) の等電点電気泳動 (IEF) (Tomoda ら^{5,6)}の方法); Ampholine PAG plate (pH 3.5~9.5) を用いて, 各分画値 (HbA, MHb (intmed), MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$), (Hb (X, Y))) をデンストメーター (島津, CS-930) で測定), 赤血球内グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性の測定 (Habig ら¹¹⁾の方法) および有害物被曝指標としての尿中ジアゾ反応陽性物質 (Dz) の測定 (Watanabe ら¹²⁾の方法) を行った。ただし, IEF は 1992 年と 1993 年のみ測定を行い, GST 活性は, 1993 年のみ測定を行った。

(3) 統計学的方法

平均値間の有意差の検定は, Student の t 検定を行い¹³⁾, また種々の指標間の相関関係の成り立

つ背景を知るために, 回帰分析と主成分分析を用いた¹⁴⁾。

結 果

1. 作業環境との関連について

Hb 値, MHb (Ab) 値, GST 活性値および尿中 Dz 値の各指標を, 作業者群と対照者群に分類し, 各指標の平均値の有意差検定 (t 検定) を行うと, MHb (Ab) 値を除くいずれの指標にも二群間に有意差が認められなかった。ただし, 有意差が認められた MHb (Ab) 値は, いずれの群においても正常範囲であった (Table 1)^{15,16)}。また, 尿中 Dz 値 (1987 年, 0.74 ± 0.23 (mg/mg c; mg/mg of creatinine) (平均値 $\pm$ 標準偏差), 1993 年 0.78 ± 0.40 (mg/mgc)) および MHb (Ab) 値 (1987 年, 2.19 ± 0.81 (mg/ml bl; mg/ml of blood), 1993 年, 1.05 ± 0.63 (mg/ml blood)) の年次推移は低下傾向を示し, 特に MHb (Ab) 値でその傾向が強く認められた (Fig. 1,2)。有害物の生体影響の指標である MHb 値が正常範囲であることは, ホメオスタシスが働いて有害物の毒作用を十分に抑えていることが考えられるので, この考え方が妥当であるか否かを以下に検討した。

2. 尿中 Dz 値が塩素化 ANA への被曝量 (dosis) の指標と仮定した場合に, 生体側の反応 (response) である MHb (Ab) 値とは, どのような関係を示すかの検索

1987 年から 1993 年に測定を行った 212 検体の尿

Table 1 The clinico-chemical findings indicating the exposure to the chlorinated aromatic nitro-compounds (Dz in urine) and its biological effects on hemoglobin (Hb) and MHb (Ab) and GST (glutathione-S-transferase)

	GST (nmol/min/ml of blood)	Hb (mg/ml of blood)	MHb (Ab) (mg/ml of blood)	Dz (mg/mg of creatinine)
Workers	67.24 ± 34.82 (N=26)	149.6 ± 8.27 (N=170)	$1.58 \pm 0.75^*$ (N=170)	0.58 ± 0.39 (N=170)
Control	53.28 ± 16.51 (N=7)	151.8 ± 14.66 (N=42)	1.21 ± 0.56 (N=42)	0.51 ± 0.34 (N=42)

(mean $\pm$ standard deviation) (*; $p < 0.01$)

Dz; diazo-reaction positive substance indicating the level of the exposure to the chlorinated aromatic nitro-compounds, Hb; hemoglobin, GST; The activity of glutathione-S-transferase in erythrocytes assayed by the method of Habig et al.¹¹⁾

Fig. 1 The annual difference of the distribution.
(1) The concentration of diazo-reaction positive substance in urine of workers in a chemical industry. The value indicates the exposure level to the aromatic nitro-compounds.

Fig. 2 The annual difference of the distribution.
(2) The MHb level of workers

Fig. 3 The scatterogram as to the two indicators relevant to methemoglobinemia; the concentration of diazo reaction positive substance (Dz) in urine (mg/mg creatinine) and the methemoglobin concentration in blood (mg/ml blood). Abscissa and ordinates indicate the urinary Dz levels and methemoglobin concentration in blood, respectively.

中 Dz 値と MHb (Ab) 値の相関係数は、 $r=0.160$ ($p<0.05$) で統計学的に有意ではあったが低値を示した (Fig. 3)。これは、Dz 値が MHb (Ab) 値の変動に約 2.6% ($r^2=0.0256$) しか寄与していないことを示している。Dz 値と MHb (Ab) 値の相関が高ければ、血中塩素化 ANA 量と尿中 Dz 値の相互間に単純な比例関係が認められることを意味する。その上で、血中塩素化 ANA 値と MHb (Ab) 値に高い相関係数が認められることが期待できるが、実際の検診結果からは、上記のような単純なモデル化はできなかった。これは、生体へ取り込まれた塩素化 ANA 化合物の分布と、塩素化 ANA の代謝を含む biotransformation が有害物による Hb の酸化に大きく寄与していることを示唆している。そこで以後のモデル化では、有機塩素化合物の代謝と関わりの強いグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性も考慮に入れた、尿中 Dz 値と MHb (Ab) 値の用量反応関係をモデル化することを以下に示したように試みた。

(1) 一定期間当たりの体内に入った塩素化

ANA の総量を D_0 (mg/min), 尿中に排泄される D_0 の分画を D_u (mg/min) とし, 式①のような仮定をおいた.

$$D_0 = p_1 \times D_u \cdots \cdots \textcircled{1} \quad (p_1; \text{定数で次元は無名})$$

(2) D_0 の中, GST が作用する分画を D_1 , 作用を受けない分画を D_2 とした. D_1 の一部が尿に排泄されると仮定し, GST 活性を a とした.

$$a \times D_1 = p_2 \times D_u \cdots \cdots \textcircled{2}$$

(a ; (nmol/min)/mg protein, p_2 ; 定数で次元 mg/(min/nmol)) 移項して,

$$D_1 = p_2 \times D_u / a \cdots \cdots \textcircled{3} \text{ が導かれる.}$$

GST の作用を受けない分画 D_2 は, $D_2 = D_0 - D_1$ となる. 式①と式③をここへ代入すると,

$$D_2 = p_1 \times D_u - p_2 \times D_u / a \cdots \cdots \textcircled{4}$$

この D_2 の一部 (D_m) が Hb の酸化に関与すると考えた.

(3) D_m (mg/ml bl) は, D_2 の一部とすると, 式⑤が成り立つ.

$$D_m = p_3 \times D_2 \cdots \cdots \textcircled{5}$$

(p_3 ; 定数で次元は ml $\times$ min.)

(4) D_m が赤血球内へ入った塩素化 ANA 濃度と仮定すると, Hb の酸化は, D_m と Hb 濃度 (mg/ml bl) に比例する. Hb 濃度を C_H (mg/ml bl) とし, 式⑥が求められる.

$$\text{MHb (mg/ml bl)} = p_4 \times D_m \times C_H = p_4 \times (p_3 \times D_2 \times C_H) \cdots \cdots \textcircled{6} \quad (p_4; \text{定数で次元は mg}^{-1})$$

式④を式⑥へ代入すると,

$$\begin{aligned} \text{MHb} &= (p_1 \times p_3 \times p_4 \times D_u - p_2 \times p_3 \times p_4 \times D_u / a) \times C_H \\ &= (p_1 \times p_3 \times p_4 - p_2 \times p_3 \times p_4 / a) \times (D_u \times C_H) \end{aligned} \text{ が導かれ,}$$

定数項を $p_1 \times p_3 \times p_4 = k_1$ および $p_2 \times p_3 \times p_4 = k_2$ とし, 式⑦で示したモデルが得られた.

$$\text{MHb (mg/ml bl)} = (k_1 - k_2 / a) \times D_u \times C_H \cdots \cdots \textcircled{7}$$

GST 活性は, 1993年度の血液についてのみ測定したので, 1987年から1993年の各年ごとのモデルの式⑦へあてはめ(定数 k_1 と k_2) の計算は, 1993年の GST 活性値を用いて行った. モデルの式⑦に実測値を当てはめる条件として, 以下の二つを用いた. (1) 赤血球 GST 活性は, 他の臓器での GST 活性と比例関係にある. (2) D_u は, 尿中ク

レアチニン値で補正し, 次元を mg/mg c として式⑦の D_u 値に用いる. 本来は, 時間を定量的に限って蓄尿した尿を用いるべきであるが, 作業現場の検診は, 多忙な作業中の間隙をぬって実施されるので, その制約下では, 一時点の採尿しかできない. (2) の条件は, 塩素化 ANA 化合物が主として糸球体濾過率 (GFR) に依存して排泄され, かつ GFR は, 時間的に一定であると考えて測定値を比較することしかできないので, クレアチニン補正を行ったという背景からでたものである. 式⑦より求めた予測値と実測値の重相関係数は, 尿中 D_z 値が 1.0 (mg/mg c) 以下のときに高値を示し, 1992年と1993年の予測値と実測値間に統計学的に有意な相関を認めた (Table 2). なお, 1993年のデータから MHb 値 2.0 (mg/ml bl) 以上の事例を除くと, 重相関係数は, $R^2 = 0.432$ ($p < 0.01$) とさらに高い係数が得られた. この結果を Fig. 4 に示した.

Table 2 The regression coefficients for the mathematical model estimating the methemoglobin (MHb) level with the values of urinary concentration of diazopositive substance (D_z) and GST activity in erythrocytes

Year	Numbers	k_1	k_2	R^2
1987	26	0.0164	0.0602	0.0161
1988	22	0.0233	0.295	0.0107
1989	31	0.0377	0.313	0.0000
1990	32	0.0279	0.339	0.0006
1991	26	0.0234	0.353	0.1010
1992	30	0.0304	0.239	0.2980*
1993	30	0.0125	0.138	0.2630*

(* ; $p < 0.01$)

The regression coefficients were calculated separately on the respective year with applying the data of blood Hb and MHB concentrations, erythrocytes GST activity and Dz level in urine to the equation ⑦

$$\text{MHB} = (k_1 - k_2 / \text{GST}) \times D_z \times \text{Hb} \cdots \textcircled{7}$$

The multiple correlation coefficient (R^2) indicating the contributory level of the values on the right side of the equation to the left side values. The D_z values used for calculation of the above cited coefficients were less than 1.0 (mg/mg c).

Fig. 4 The relationship between the estimated methemoglobin level using the equation; $MHb = (k_1 - k_2/GST) \times Dz \times Hb \cdots \textcircled{7}$ and the measured MHb level. The relationship is statistically significant and the multiple regression coefficient is $R^2=0.432$ ($p < 0.01$). The Dz values used for calculation of the regression coefficient were less than 1.0 (mg/mg creatinine), and the MHb levels for the calculation were less than 2.0 (mg/ml blood).

3. 尿中 D_z 値 1.0 (mg/mg c) 以上を示した 23 検体の D_z 値と MHb (Ab) 値間の関係をモデル化

D_z 値と MHb 値の相関係数は、 $r=0.210$ と低値で統計学的に有意ではなかった。これは、 D_0 が Hb の酸化および MHb の還元の双方に働いているためと思われる (友田ら¹⁵⁾) ので、以下のモデルを仮定した。

(1) Hb の酸化に働く D_0 の分画を $q_1 \times D_0$ 、また MHb の還元に働く D_0 の分画は、その濃度と逆比例 ($1/D_0$) すると仮定し、式⑧を立てた。

$$MHb = q_1 \times D_0 \times q_2 / D_0 \cdots \textcircled{8}$$

(q_1 ; 定数で次元は $\text{min} \times \text{mg}^{-1}$, q_2 ; 定数で次元は $\text{min} \times \text{mg}^2/\text{ml}$)

(2) 式①の関係は、 D_z 値が 1.0 (mg/mg c) 以上のときに成り立つものと仮定して、 D_z 値が 1 (mg/mg c) 以上を示した個体からのデータを用いて回帰式⑨を推定した。

$$MHb = p_1 \times q_1 \times Du + p_1 \times q_2 / Du \cdots \textcircled{9}$$

定数 $p_1 \times q_1 = k_3$, $p_1 \times q_2 = k_4$ と置き換え、

$$MHb = k_3 \times Du + k_4 / Du \cdots \textcircled{10}$$

(k_3 , k_4 ; 次元は q_1 , q_2 と同じ)

k_3 と k_4 の定数を実測値を用いて推定し、式⑩にあてはめ、式⑩のモデルが得られた。

$$MHb \text{ (mg/ml bl)} = 0.389 \times Du + 1.6235 / Du \cdots \textcircled{11}$$

予測値と実測値の重相関係数は、 $R^2=0.110$ で統計学的に有意でなかった。23 検体から MHb 値が 2.0 (mg/ml bl) 以上であった 14 例については、重相関係数は $R^2=0.436$ と統計学的に有意であった。

4. 等電点電気泳動 (IEF) の結果との関係

IEF は、1992 年と 1993 年の血液検体に対してのみ行った。各年度の MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値は、分光学的に測定した MHb (Ab) 値より大きかった。また、作業群 (48 検体) と対照群 (13 検体) の各々の分画値 (MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値, MHb (intmed) 値, MbA 値, (HbX, Y)) の平均値間には、統計学的に有意差は認められなかった (Table 3)。IEF の各分画値 (MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値, MHb (intmed) 値, (HbX, Y) 値), 分光学的に測定した MHb (Ab) 値, GST 活性値および D_z 値の相関係数行列を計算し (Table 4), MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) と Hb (X, Y) の相関が特に高い値を示した ($r=0.612$, $p < 0.01$)。これらの測定値の相互関係を推定するために、主成分分析を行った¹⁴⁾。ただし、GST 活性値

Table 3 The results of isoelectric focusing electrophoresis (IEF) applying to the sample of hemolysate

	HbA	MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$)	MHb (intmed.)	Hb(X, Y)
Workers (N=48)	126.73 $\pm$ 9.13	5.18 $\pm$ 2.27	10.41 $\pm$ 4.69	6.76 $\pm$ 2.58
Controls (N=13)	124.6 $\pm$ 14.41	5.38 $\pm$ 2.10	11.30 $\pm$ 6.78	6.64 $\pm$ 2.15

(mean $\pm$ standard deviation)

The respective value indicates Hb species having different valencies in mg/ml of blood. The IEF method was administered as reported by Tomoda et al. (1986), and the gel was scanned by a densitometer of high resolution.

Table 4 The correlation coefficients among different Hb species having different valencies separated by IEF method, GST activity in erythrocytes, MHb (Hb) and Dz level in urine

	GST	Dz	MHb (Ab)	MHb ($\alpha^3\beta^3$)	Hb(intmed)	HbX, YD
GST	1.000	-0.164	0.125	0.154	0.154	0.223
Dz	-0.164	1.000	-0.011	0.232	-0.234	0.294
MHb (Ab)	0.125	-0.011	1.000	-0.104	0.179	0.098
MHb ($\alpha^3\beta^3$)	0.154	0.232	-0.104	1.000	-0.338	0.612
Hb(intmed)	0.154	-0.234	0.179	-0.338	1.000	-0.107
HbX, Y	0.223	0.294	0.098	0.612	-0.107	1.000

The data obtained from the individual whose urinary Dz level exceeded more than 1 mg/ml of urine were omitted the calculation. The reason is described in detail in the text.

は、モデルの式⑦が1992年のデータについても成立していることを考慮して、GST が測定されていない1992年については、1993年の GST 活性値をそのまま用いた。また、D_z値が1.0 (mg/mg c) 以上、MHb (Ab) 値が2.0 (mg/ml bl) 以上を越えたものは、主成分分析を行うときには除いた。その結果、二つの主成分が抽出された。主成分 I とは、MHb ($\alpha^3\beta^3$) 値、Hb (X, Y) 値と D_z値が順相関を示し、MHb (intmed) 値が逆相関を示した。主成分 II とは、GST 活性値、MHb (Ab) 値および MHb (intmed) 値が順相関を示した。MHb (intmed) は、主成分 I, II 共に有意な相関関係を認めた (Fig. 5)。さらに、Hb (X, Y) 値、MHb ($\alpha^3\beta^3$) 値および MHb (intmed) 値の三者間には、回帰式⑫が成立した。

$$\text{Hb (X, Y)} = 0.929 \times \text{MHb } (\alpha^3\beta^3) + 0.160 \times \text{MHb (intmed)} \cdots \cdots \text{⑫}$$

その実相関係数は、 $R^2=0.372$ ($p<0.05$) で、統計学的に有意であった。また、MHb ($\alpha^3\beta^3$) 値、D_z値および MHb (intmed) 値に関しては、回帰式⑬が成立した。

$$\text{MHb } (\alpha^3\beta^3) = 1.63 \times \text{D}_z - 0.549/\text{D}_z + 0.563 \times \text{MHb (intmed)} \cdots \cdots \text{⑬}$$

その重相関係数は、 $R^2=0.317$ ($p<0.05$) で、統計学的に有意であった。

考 察

塩素化 ANA は、多量被曝により MHb 血症を惹起することは古くからよく知られている¹⁷⁾。ANA

中毒は、今日に至っても症例報告があり^{8,18,19)}、アニリンの取り扱いで人目をひいたのが始まりで、anilism という言葉もある¹⁷⁾。アニリンやニトロベンゼンの誘導体は化学製品の合成に広く用いられ、その需要は低下をみない¹⁾。著者の所属する教室では、この数年、主として CNB を製造する工場作業者の健康管理を行ってきた。塩素化 ANA 取り扱い作業者は対照者に比べ、Hb 値は低値、MHb (Ab) 値と尿中 D_z値は高値を示し、作業者は有害物により生体影響を受けていることが確認された。特に MHb (Ab) は、作業者群が対照群に比べ有意に高値であった (Table 1)。しかし、MHb (Ab) の変化は minimal change で、いわゆる教科書的に正常域の変化であった^{15,16)}。これらの事実より、①現状の被曝条件下では、血中 MHb 濃度は 1～2 % 以内 (およそ 1.5～3.0 (mg/ml bl)) で、教科書的に正常値の範囲であるが、MHb 値の正常値がこれでよいのか。②この程度の被曝条件下では、D_z値と MHb 値には線型な用量反応関係が成立しないようにも見えるが、そう考えてよいのか。この二つの疑問について、塩素化 ANA 取り扱い作業者の検診データを用いて、検討を試みた。

被曝の指標である尿中 D_z値と生体障害の指標である MHb (Ab) 値の年次推移は、低下傾向がはっきりと示された (Fig. 1,2)。尿中 D_z値が 1.0 (mg/mg c) 以上や MHb 値が 2.0 (mg/ml bl) 以上を示す例はこの 7 年間で、年に 2～3 例を数えるにすぎない。これは、作業環境条件が改善さ

Fig. 5 The contributory ratio of biochemical indicators (GST (■) and MHb (Ab) (▲)), an indicator of the exposure level to an aromatic nitro-compound (Dz (●) in urine) and the values relevant to different Hb species having different valencies (MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) (◆), MHb (intmed) (□) and Hb (X, Y) (○)) by IEF separation method to the components I and II which are derived from a principal component analysis procedure.

The meanig of the respective component could be surmised by the contributory ratio of the indicator having high value to the respective components.

Component I might be relevent to redox state in erythrocytes stroma. Component II might be relevent to the degree of detoxication.

The contributory ratios of MHb (Ab) to the both of the components seems to be consistent to the model ⑦

れ、作業者自身が化学物質に汚染されない予防措置を行うことが身につけていることを示唆している。防塵マスク、夏場の衣服の汚染防止（発汗で経皮吸収を促進する）、作業後のシャワーの励行などである。

尿中の D_z 値と MHb (Ab) 値間の単相関係数は、 $r=0.160$ ($p<0.05$) と低値であった。これが統計学的に有意な高値を示したならば、血中塩素化 ANA 量と尿中 D_z 値の相互間に単純な比例関係が認められると言えるが、現実には単純な比例関係は認められなかった。塩素化 ANA への被曝の程

度を示す尿中 D_z 値と MHb (Ab) 値の間に単純な相関関係が成立しないのは、生体へ取り込まれた塩素化 ANA 化合物の分布と、代謝を含む biotransformation の機構がその間に大きく寄与し、体内に負荷された塩素化 ANA、(D_0) の代謝と体外への排除の機序が、Hb を酸化する塩素化 ANA の量を修飾していることを示唆している。これについて、 D_z 値と MHb (Ab) 値の関係を、赤血球 GST 活性および赤血球 GST 活性が、肺、肝などの他臓器の GST 活性と比例関係にあることを仮定してモデル化を行った。その結果、尿中 D_z 値が 1.0 (mg/mg c) 以下でかつ MHb (Ab) 値が 2.0 (mg/ml bl) 以下のレベルでは、Hb の酸化に関わる塩素化 ANA は、GST による代謝を受けない分画であることと思われた。これは、6 年間 (1987~1992 年) の現場での検診項目に加えて、7 年目の 1993 年に赤血球 GST 活性測定を取り入れたために考察できたことである。1987~1992 年の検診では、GST 活性は測定していないが、GST 活性がそれほどゆらいでいないと仮定し、1993 年度の GST 活性値を用いたモデルの式⑦に当てはめ計算を行った。1992 年度と 1993 年度は、この当てはめが妥当であったが（それぞれ $R^2=0.298$, $R^2=0.263$ いずれも $p<0.01$ ）、それ以前の年度の当てはめは妥当ではなかった。これは、GST の aging などによるゆらぎのためであると考えられる。しかし、 D_z 値が 1.0 (mg/mg c) 以上の例では式⑦のモデルが当てはまらなかった。その理由としては、体内に取り込まれた塩素化 ANA の量 D_0 が大になるにしたがい、GST の作用を受ける割合が少なくなることが考えられる。これは、GST 活性にも上限があるからと思われる。また、経皮吸収の寄与が取り込みの際に影響していることも考えられる。すなわち、田淵、南ら⁸⁾が 1984 年に報告した CNB 多量被曝例において、皮膚への塩素化 ANA の付着や皮膚組織への蓄積が大きいほど、尿中への D_z の排泄量に比べて MHb 値が高いことが認められた (Fig. 6)。これは、1984 年に教室の南もこの共同研究に参加していたため南の手持ちのデータを用いて計算できたものである。体内へ移行した塩素化 ANA の中、血中へ移行す

Fig. 6 The dosis-response curves expressing the relation between the exposure to the chlorinated aromatic nitro-compounds and its effect on hemoglobin oxidation (MHb). The upper line traced according to the data obtained from the samples of long-shoremen accidentally exposed to chloronitrobenzene powder and the most of the absorption seemed to be percutaneous. The lower line traced according to the data obtained from the samples of workers of a chemical industry where they synthesize nitrophenol and anisidine from chloronitrobenzene and the main absorption site is considered to be from respiratory tract.

る塩素化 ANA の分画が多いほど Hb の酸化も多くなり得ることを考え合わせると、経皮吸収された塩素化 ANA の大部分は血中へ移行していることを示唆するものである。一方、工場作業者の場合は、経気道的な塩素化 ANA の取り込みが多いと思われる。したがって、肺を通過して GST の作用を受けた分画は、赤血球に入りにくいと考えられており²⁰⁾、工場作業者での Hb の酸化に関する塩素化 ANA は、肺で GST の作用を受けない塩素化 ANA の分画であると思われる。塩素化 ANA の侵入門戸である肺は、還元型グルタチオン (GSH) の含量も多く GST の活性も高いので、塩素化 ANA のかなりの割合が GST による代謝を受ける。さらに、侵入門戸(肺)で、GST によって塩素をはずされてグルタチオン抱合をしたのち、メルカプトツール酸となった ANA は、血球へ

の移行も少ないと思われる²⁰⁻²²⁾。経気道吸収された塩素化 ANA は、赤血球に入る前に多くの部分がグルタチオンと抱合していると思われる。一方、経皮吸収された塩素化 ANA は、血球に入った後にグルタチオン抱合を受けるものの割合が多く、式⑦のモデルは成立しないと思われる。Yoshida ら²³⁾も、夏期には塩素化 ANA の経皮吸収が大であり、環境中塩素化 ANA 濃度と尿中 D_2 排泄量は、ばらつきがあり相関関係が認められないが、冬には、この二者間には高い相関が認められたことを指摘している。以上のことをふまえて、MHb (Ab) 値の正常域と考えられる範囲は、有害物の被曝量 (D_2 値) と生体影響を示す MHb (Ab) 値の関係をモデル化した式⑦で示した線型性がある範囲にあると思われる。その上限は、 $2.0(\text{mg/ml bl})$ ($1.2\sim 1.6\%$) である。

1992年と1993年には、赤血球の IEF を行った。一般に MHb と言われているものには、Hb の α 鎖あるいは β 鎖のヘム鉄のみが酸化された MHb (intmed) および α 鎖と β 鎖にあるヘム鉄すべてが酸化された MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) が含まれていることが確認されている⁵⁻⁷⁾。さらに IEF で、HbA より陽極側に移動する HbX と Y が検出され、HbY は、著者ら (未発表) によってグルタチオン化 Hb であることが確認されている。分光学的に測定した MHb (Ab) 値と IEF による各分画値との関連と有害物への被曝との関連を知るために、主成分分析を行った (Fig. 5)。主成分 I は、MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値 ($r=0.854$, $p<0.01$) と Hb (X, Y) 値 ($r=0.791$, $p<0.01$) と高い相関があり、主成分 II は、GST 活性値 ($r=0.791$, $p<0.01$) と高い相関が認められた。主成分の意味を解釈するには、その主成分と相関の高い指標をみて考察するのがルールであるので¹⁴⁾、MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値と Hb (X, Y) 値と高い相関を持つ主成分 I は、赤血球内の酸化還元状態の指標と考えられた。主成分 II は、GST 活性と相関が高く、解毒の指標と関わりを持つことが推測された。また、MHb (Ab) 値は主成分 II と関わりが深く ($r=0.550$, $p<0.01$)、Hb の酸化は、GST の作用を受けない塩素化 ANA の一部で行われているとした仮定と矛盾しない。MHb

(intmed) 値は、Hb の酸化還元状態と負の相関を持ち ($r = -0.521$, $p < 0.01$), これは酸化状態がより強いと MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) へ移ること, すなわち, MHb (intmed) $\rightarrow$ MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) の方向へ反応が進むことを示唆している。これは, 式⑬のモデルによっても支持される。また, MHb (intmed) 値は, 解毒の要因 (主成分 II) と正の相関 ($r = 0.524$, $p < 0.01$) があり, これは, MHb (Ab) 値も同じ傾向であった。MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値と MHb (intmed) 値および Hb (X, Y) 値の三者間には, 回帰式⑫が成り立ち, この式の右辺は, MHb (intmed) $\rightleftharpoons$ MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) の平衡を示し, Hb (X, Y) は, 赤血球内の酸化状態を示していると考えられる。これは, 赤血球内の酸化状態が高まるとき, 赤血球内にある還元型グルタチオン (GSH) が酸化型になり (GSH $\rightarrow$ GSSG), この酸化型グルタチオン (GSSG) は, Hb の β 鎖にあるシステイン残基の SH と反応して SS-SH 交換反応でグルタチオン化 Hb を形成すると思われるからである²⁴⁾。グルタチオンは, GSSG になると積極的に細胞外へ排除する ATPase と共役した機構が赤血球にも存在するが^{20~22)}, グルタチオン抱合体が塩素化 ANA 被曝などで細胞内に増加すると, この輸送機構を抱合体が抑制して²⁰⁾, 細胞内に GSSG が貯留し, グルタチオン化 Hb (HbY) の増加へと導くと思われる。また, MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) と MHb (intmed) の平衡には, D_z 値も関連しており, 回帰式⑬は, これを示唆している。この回帰式⑬は, MHb (Ab) 値と D_z 値, GST 値との関係を表したモデルの式⑦と同じ型をとっている。この式は, 赤血球中の酸化還元ストレスへは, D_z 値すなわち塩素化 ANA の負荷が影響を及ぼし, D_z 値は, 酸化の方向にも還元方向にも作用していることを意味している¹⁸⁾。IEF の分析では, 赤血球溶血液中に含まれる Hb に電場がかかっており, しかも, 外気に 1 時間程度, 4°C の温度下に曝されているので, Hb が赤血球中にある時とは異なっている。その上, 内因性にある還元性物質の GSH, NADH や酸化還元ストレスへ対抗する MHb 還元酵素などの還元系と, IEF のゲル上では希釈されているので (1/20~1/50), IEF ゲル上では MHb の還

元に効いてこない。このような, IEF 上での問題があったとしても, 取り込まれた塩素化 ANA の一部は IEF 上でも Hb の酸化に効いていることが, 式⑬から考察できる。したがって, MHb (Ab) のできてくる反応の場とは, IEF のゲル上で溶血液に電場をかけた状態は異なっているので, MHb (Ab) 値と MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値や MHb (intmed) 値の間に高い相関係数が得られないと思われる。これは, IEF による Hb の各分画値が, 作業群と対照者群間で有意差を認めないこと, すなわち塩素化 ANA への被曝による影響が顕著に現れないことは, 外因性の酸化還元ストレス (Hb への荷電や外気の酸素との接触) が有害物による酸化還元ストレスの寄与よりも大きいためと思われる。また, 主成分分析を用いると, これら相互間の関係はモデルの式⑦と矛盾しないので, IEF を赤血球内での酸化還元状態を知る補助手段としては用いることができると考えられた。

結 論

芳香族ニトロアミノ化合物は, MHb 形成毒として知られている。塩素化 ANA への被曝の指標として尿中 D_z 値, その生体障害の指標として MHb (Ab) 値を用いることが, 産業医学の現場で行われている。著者は, 1987 年から 1993 年にわたり, 主として CNB からアニシジンやニトロフェノールを合成する工場作業者の検診を行ってきた。その際, 尿中 D_z 値と MHb (Ab) 値を測定し, 被曝が身体に及ぼす変化を観察した。その結果, 近年は作業環境が改善され, 作業群への塩素化 ANA の被曝量が減り, MHb 値も低下してきていることがわかった。しかも, この被曝レベルと MHb (Ab) レベルの間に, ヘモグロビン (Hb) $\rightleftharpoons$ MHb のホメオスタシスが成り立っていることが判明した。

1) 尿中 D_z 値と MHb 値は, いずれも 1987 年~1993 年にかけて, 低下傾向を示した。

2) Hb 値, MHb (Ab) 値, GST 活性値および尿中 D_z 値の各指標を, 作業群と対照群に分類し有意差検定 (t 検定) を行うと, MHb (Ab) 値のみに有意差が認められた ($p < 0.01$)。ただし,

MHb (Ab) 値は、いずれの群においても正常範囲であった。

3) 尿中 D_z 値と MHb (Ab) 値の間には、単純な相関関係を認めなかった。しかし、1993年度に赤血球 GST 活性を測定した結果を考慮し、MHb (Ab) 値と尿中 D_z 値間の関係をモデル化すると、 $MHb (mg/ml\ bl) = k_1 - (k_2/a) \times Du \times C_H \dots\dots\dots$

⑦ (a ; 赤血球 GST 活性値, C_H : Hb 値, Du ; 尿中 D_z 値) のモデルが成り立ち、式⑦より求めた予測値と実測値の重相関係数は、 $R^2 = 0.263$ ($p < 0.01$) と有意な相関関係が認められた。これは、Hb の酸化に効いている塩素化 ANA 化合物は、侵入門戸の肺で GST の作用で代謝をうけなかった分画であることを示唆している。このような ($Hb \rightleftharpoons MHb$) のホメオスタシスが成り立つのは、尿中 D_z 値が 1.0 (mg/mg c) 以下で、MHb (Ab) 値が 2.0 (mg/ml bl) 以下のレベルであった。これは、塩素化 ANA の作業現場での許容濃度を決める上で、有益な知見である。また、以上のことから、MHb (Ab) 値の正常上限は、2.0 (mg/ml bl; 1.2~1.6%) と考えられる。

4) 塩素化 ANA の取り込みが経皮吸収の寄与が大の場合は、尿中 D_z 値に比べ、MHb (Ab) 値が高値を示し、式⑦が成立しなかった。これは、1984年に田淵らが報告した CNB の被曝事故例と今回の結果を比較することにより判明した。

5) IEF 法を用いた Hb の各分画 (MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) 値, MHb (intmed) 値および Hb (X, Y) 値), GST 活性値, MHb (Ab) 値および尿中 D_z 値の相互の相関係数行列を用いた主成分分析で、Hb の酸化と関係の深い赤血球内の酸化還元状態に関わる要因 (主成分 I) と、Hb の酸化を行う塩素化 ANA を解毒する要因 (主成分 II) の二つの主成分を抽出した。その結果、MHb ($\alpha^{3+}\beta^{3+}$) と Hb (X, Y) は主成分 I と、GST 活性値と MHb (Ab) 値は主成分 II と関連が深かった。MHb (intmed) 値は、この両主成分と関連があった。また、主成分分析を用いると、これら相互間の関係はモデルの式⑦と矛盾しないので、IEF を赤血球内での酸化還元状態を知る補助手段としては用いることができると考えられた。

文 献

- 1) 後藤 稔, 池田正之, 原 一郎: 芳香族ニトロアミノ化合物, 産業中毒便覧. 第2版(増補版), p. 1274~1304, 医歯薬出版, 東京, 1972.
- 2) Beard, R.R., and Noe, J.T.: Aromatic nitro and amino compounds. Patty's Industrial hygiene and toxicology third revised edition. vol. IIA. p. 2413~2489, A Wiley-Interscience Publication, New York, 1981.
- 3) Ikeda, M., Watanabe, T., Har, I., Tabuchi, T., Nakamura, S.I., Kosaka, H., Minami, M., and Sakurai, Y.: A field survey on the health status of workers in dye-producing factories. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **39**, 219~235, 1977.
- 4) Tomoda, A., and Yoneyama, Y.: Analysis of intermediate hemoglobins in solutions of hemoglobin partially oxidized with ferricyanide. *Biochem. Biophys. Acta*, **581**, 128~135, 1979.
- 5) Tomoda, A., Ida, M., Tsuji, A., and Yoneyama, Y.: Mechanism of methemoglobin reduction by human erythrocytes. *Biochem. J.*, **188**, 535~540, 1980.
- 6) Tomoda, A., Tomioka, K. and Minami, M.: Increased concentration of hemoglobin X and Y in the erythrocytes of workers in a chemical plant in Japan. *Brit. J. Ind. Med.*, **46**, 502~504, 1989.
- 7) Minami, M., Katsumata, M., and Tomoda, A.: Methemoglobinemia with oxidized hemoglobins and modified hemoglobins found in bloods of workers handling aromatic compounds and in those of a man who drank cresol solution. *Biomed. Biochem. Acta*, **49**, S326~S333, 1990.
- 8) 田淵武夫, 原 一郎, 南 正康, 山城久和: 港湾荷役作業による急性パラニトロクロルベンゼン中毒例. 大阪府立公衛研報, 労働衛生編, **23**, 25~30, 1985.
- 9) 金井 泉, 金井正光 編: 血液検査, ヘモグロビン定量. 臨床検査法提要, 改訂第30版, p. 261~265, 金原出版, 東京, 1993.
- 10) Hegesch, E., Cruener, N., Cohen, S., Bochkovsky, R., and Shuval, H.I.: A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. *Clin. Chim. Acta*, **30**, 679~682, 1970.
- 11) Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130~7139, 1974.
- 12) Watanabe, T., Ishihara, N., and Ikeda, M.: Toxicity of and biological monitoring for 1,3-diamino-2,4,6-trinitro-benzen and other nitroamino derivatives of benzene and chlorobenzene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **37**, 157~168, 1976.
- 13) Snedecor, G.W., and Cochran, W.G.: Statistical methods, 6th edition, p. 59~65, The Iowa Univer-

- sity Press, Ames, Iowa, USA, 1971.
- 14) 芳賀敏郎, 榎本茂司: 回帰分析と主成分分析. 統計解析プログラム講座 2, 日科技連, 東京, 1980.
 - 15) 友田輝夫, 米山良昌: メトヘモグロビンの生成と還元反応. 蛋白質・核酸・酵素, **32**, 842~853, 1987.
 - 16) 谷島清郎: 遺伝性メトヘモグロビン血症. 蛋白質・核酸・酵素, **32**, 870~876, 1987.
 - 17) Hunter, D.: *Aromatic carbon compounds the diseases of occupations*. Fifth edition, p. 471~540, The English University Press, Ltd., London, 1975.
 - 18) Kokal, K.C., Khanna, S.S., Retnam, V.J., and Dastur, F.D.: Methemoglobinemia; An unusual presentation. *J. Assoc. Physician. India*, **32**, 833~834, 1984.
 - 19) 田淵武夫, 熊谷信二, 松永一朗, 吉田俊明, 小坂 博, 宮島啓子, 平田 衛, 杉本寛治: 芳香族ニトロアミノ化合物曝露労働者における個人曝露と血中メトロヘモグロビン量に関する調査. 大阪府立公衛研報, 労働衛生編, **26**, 1~6, 1988.
 - 20) Ishikawa, T., Esterbauer, H., and Sies, H.: Role of cardiac glutathione transferase and of the glutathione S-conjugate export system biotransformation of 4-hydroxynoneal in the heart. *J. Biol. Chem.*, **261**, 1576~1581, 1986.
 - 21) Lunn, G., and Beutler, E.: Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. *Blood*, **54**, 238~244, 1979.
 - 22) Kondo, T., Dale, G.L., and Bentler, E.: Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6359~6362, 1980.
 - 23) Yoshida, M., Sunaga, M., and Hara, I.: Urinary diazopositive metabolites levels of workers handling p-nitrochlorobenzene in a dye producing factory. *Indust. Heth.*, **26**, 87~91, 1988.
 - 24) Gilbert, H.F.: Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol.*, **63**, 69~172, 1990.

(受付: 1994年 3月22日)