原 著

有機溶剤代謝産物の尿中排泄に及ぼす
肉体負荷の影響第1報 肉体負荷による尿中馬尿酸およびグリシン排泄
からみたグリシン抱合能の変動

吉 良 尚 平*, 泉 武 寛*, 緒 方 正 名*

EFFECTS OF PHYSICAL LOADS ON THE URINARY
EXCRETION OF METABOLITES FROM
ORGANIC SOLVENTSPart 1. Change in the Urinary Excretion of Glycine Conjugate,
Hippuric Acids, and Glycine after a Physical Burden

Shohei KIRA,* Takehiro IZUMI* and Masana OGATA*

Effects of physical loads on the excretion of urinary glycine conjugates, which are commonly used as an index of organic solvent intake, were examined.

After physical exertion by Kendo exercise in university students for about 2 hours, urinary protein excretion changed from the levels of (−) or (+) before the exercise to (+) or (++) after the exercise revealed by the test-tape semi-quantitative indication, and the levels of urinary creatinine increased to approximately 1.9 time the initial level.

Under the present experimental conditions, the following results were obtained.

- 1) Statistically no significant change was observed in the levels of urinary hippuric acid, but an increasing trend was recognized.
- 2) The glycine levels in the urine decreased and the significance was stressed when the values were adjusted with reference to the specific gravity of urine or to the levels of urinary creatinine.
- 3) The ratio of hippuric acid to the glycine in the urine increased almost twice as high as the initial ratio and the physical load seemed to promote the glycine conjugation.
- 4) As to the adjusted levels of urinary metabolites, especially due to several organic solvents, values adjusted with reference to the specific gravity of urine and those to the levels of urinary creatinine correlated well in the samples collected before the exertion. But a poor correlation was observed in the samples collected after the exertion. Therefore, a notice should be given when the adjustment of the values with reference to the levels of urinary creatinine, which is widely used in the health administration practice for organic solvent workers to assess the levels of exposure, since the adjusted values were lowered unnecessarily by excess excretion of creatinine after the physical exertion and the tendency would be exaggerated especially under the low level exposure to organic solvent vapours in the work yard.

* 岡山大学医学部公衆衛生学教室
昭和56年10月31日受付

* Department of Public Health, Okayama University Medical School
Received for publication, October 31, 1981

I. は じ め に

有機溶剤作業者の、溶剤ガス吸入指標として、尿中に排泄される代謝産物が測定されてきている。これらのうち、たとえばトルエンに対する馬尿酸のように、非暴露者においても、尿中に排泄される物質については、多くの研究者により、いわゆる正常値が報告されており、これに対する増加分を、吸入ガスに由来する量として計算されている。しかしながら同じ有機溶剤を取り扱う作業であっても、作業形態に基づく、肉体負荷の差異により、溶剤吸入量、代謝排泄動態が大きく異なることが推定されるものの、確たる報告は少ない。そこで本研究では、第1報として、トルエン-馬尿酸系をモデルに想定して、グリシン抱合体である馬尿酸とグリシンの尿中排泄量に関して、肉体負荷の影響を調べ興味ある知見を得たので報告する。

II. 実験材料および方法

試料尿：大学生剣道部員を対象に、スポット尿として稽古開始直前に採尿した。約2時間の稽古を肉体負荷として、稽古終了直後に採尿して、肉体負荷後尿とした。尿比重、pH、タンパク、潜血は採尿直後に測定記録し、試料尿の一部を共栓付試験管（プラスチック製）に移し、クレアチニン、馬尿酸、グリシンの測定を始めるまで、 -20°C 以下にて凍結保存した。

測定項目と方法：尿比重はD・Z型（共栄製作所）、pH・タンパク・潜血は、KIDSTIX（マイルス・三共KK）を用いた。クレアチニンは、クレアチニン-テスト・ワコー（和光純薬）を用いた。馬尿酸、グリシンの定量は、Ohmori ら^{1,2)} による比色定量を用い、Table 1 に示すように一部改変した。

III. 結 果

Table 2 に試料尿の定性結果を示す。尿比重は負荷の前後とも、平均値で1.030 以上で濃縮傾向であった。これは、本実験に供した尿は、盛夏に行われた稽古の前後に採尿したものを使用したためと考えられる。負荷の前後の比較では、尿比重、pH は一定の傾向が見られないものの、尿タンパクは、負荷前では1例が判定(+)であったほか、(一)あるいは(±)であったものが、負荷後では全員(+)～(卅)の排泄増加を示した。クレアチニンも尿タンパク同様負荷後は増加を示した。

Fig.1 は尿中馬尿酸、Fig.2 は尿中グリシン、Fig.3 は尿中馬尿酸およびグリシン濃度をモル濃度で表わして和した値について、おのおの測定値(A)、比重補正值(B)、

Table 1. Determination procedure of hippuric acid and glycine in urine.

クレアチニン補正值(C)についての、肉体負荷の前後の比較を示す。Table 3 は、これらの負荷前後での変動を検定した結果の t 値を示す。馬尿酸については、肉体負荷後、濃度の上昇傾向を示したが、クレアチニン補正を行った値では、逆に低下傾向となった。これは、負荷前後で、尿比重の増加傾向($0.05 < p < 0.10$)に比較して、クレアチニン濃度が著明に増加(平均1.91倍、最高4.23倍、 $p < 0.001$)した結果によるものである。一方グリシンについては、補正なしで低下傾向、補正を行うと著明な低下が認められた。さらに馬尿酸とグリシンの濃度について、モル濃度に換算後の和は、クレアチニン補正したものを除いて、著明な変化を認めなかった。次に、Fig.4 に示すごとく、馬尿酸とグリシンのモル濃度の比の変化は、負荷後、平均約2倍の増大が認められた。以上のことから、尿中の主たるグリシン抱合体である馬尿酸とグリシンの排泄動態は、肉体負荷により抱合能が促進される傾向を示した。次に、今日広く用いられている、尿中物質濃度の補正法について、比重補正法と、クレアチニン補正法とを比較した。Fig.5 は馬尿酸濃度、Fig.6 はグリシン濃度について、比重補正值(X軸)とクレアチニン補正值(Y軸)の相関を示したものである。肉体負荷の前後の尿中濃度を別々に回帰を求めると、負荷前(図中○にて表示)では、馬尿酸、グリシンの場合ともに高い相関が認められ、比重補正值とクレ

Table 2. General findings of urine before and after physical exertion.

Sample No.	Specific gravity		pH		Urinary protein		Creatinine level (mg/ml)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
1	1.034	1.035	5.5	6.0	±	++	1.80	2.28
2	1.032	1.031	6.0	6.0	±	++	2.50	2.88
3	1.036	1.032	5.5	6.0	±	++	2.69	2.85
4	1.035	1.033	6.0	6.0	±	+++	2.01	2.52
5	1.032	1.032	5.5	6.0	±	++	1.77	2.79
6	1.020	1.035	5.5	6.0	±	+++	1.36	5.75
7	1.039	1.040	5.5	5.5	+	+++	2.75	3.57
8	1.032	1.032	5.5	6.0	±	++	2.69	5.54
9	1.029	1.048	7.0	6.0	±	+	2.34	4.69
10	1.025	1.036	6.0	5.5	—	++	1.78	5.66
11	1.034	1.035	6.0	5.5	±	++	2.82	5.15
12	1.025	1.028	6.5	6.0	±	+	1.48	3.32
13	1.029	1.030	6.0	5.5	±	+++	2.82	4.19
14	1.039	1.042	6.0	5.5	±	+	2.22	4.70

Fig.1. Changes in hippuric acid levels in urine after physical exertion. (A): observed levels, (B): corrected values with urinary specific gravity to 1.024, (C): corrected values with the levels of urinary creatinine.

アチニン補正值の関係を、回帰直線を用いて相互の値の変換と比較が可能と思われた。これに対して、負荷後(図中●にて表示)では、両者の相関はいずれも低く、ことに馬尿酸の場合は、クレアチニン補正值が比重補正

Fig.2. Changes in glycine levels in urine after physical exertion. (A): observed level, (B): corrected values with urinary specific gravity to 1.024, (C): corrected values with the levels of urinary creatinine.

値より著しく低く算出されることが示された。

IV. 考 察

肉体負荷の尿中有機酸組成に及ぼす影響については、尿中ステロイドホルモンのレベルの変化に関連して、

Table 3. Statistical test for the difference of the mean after physical exertion.

Compounds	Observed (uncorrected)	Adjusted with specific gravity (1.024)	Adjusted with creatinine concentration (g/l)
Hippuric acid (HA)	2.1003** increasing	1.4559* increasing	1.5412* decreasing
Glycine (Gly)	2.0014** decreasing	2.8528*** decreasing	5.3695**** decreasing
HA+Gly (after conversion to mole/l)	0.2506 n.s.	0.6796 n.s.	3.6845**** decreasing

* : $0.10 < p < 0.20$, ** : $0.05 < p < 0.10$, *** : $0.01 < p < 0.02$, **** : $p < 0.001$, n.s. : not significant ($p > 0.5$). Numbers indicate observed t . $N=14$.

Fig. 3. Changes in the sum of hippuric acid and glycine in urine after physical exertion. (A): observed levels, (B): corrected with urinary specific gravity to 1.024, (C): corrected with the levels of urinary creatinine, HA: hippuric acid, Gly: glycine

Ludwig ら³⁾ のガスクロマトグラフを用いた報告がある。これによると、0.5 時間のランニングを負荷として、負荷終了 90 分後の尿中馬尿酸排泄は、負荷前の値の 50~75% に減少し、アミノ酸抱合物の排泄低下を結論している。しかしながらこの報告では、尿中物質の尿比重またはクレアチニンによる濃度補正についての検討はなく、また、負荷後 60 分をピークとする、著明な高利尿現象⁴⁾ についての配慮がなされていないこと、さらには、抱合の対象となるグリシン濃度が測定されていないことから、彼らの研究結果を、そのままグリシン抱合能への肉体負荷の影響と考えることができないため、本

Fig. 4. Changes in the molecular ratio of hippuric acid to glycine in urine after physical exertion.

Fig. 5. Correlation of adjusted values of hippuric acid levels with specific gravity (X) and with creatinine level (Y).

研究を行った。

本研究では、馬尿酸、グリシンの定量に、簡便なこと、同一の測定系で行えること、溶剤作業者の健康管理に広く用いられていることから、比色法によって測定した。この方法では、発色試薬として用いた、無水酢酸-*p*-dimethylaminobenzaldehyde が馬尿酸のほか、尿中に存在する他のグリシン抱合物と、あるいはグリシンのほかに、微量存在するグルタチオン等のグリシン類似のアミノ酸と反応することが知られている²⁾。したがって、キシレン等の有機溶剤からの、グリシン抱合物の代謝産物についての詳細な研究は、クロマトグラフ法により検討中である。

次に、産業現場における実際的な採尿として、作業終了時に行う、いわゆるスポット尿が利用されている。その際の代謝産物濃度の補正法についての検討がなされている⁵⁾。Seki ら⁶⁾によれば、比重補正により、測定値のばらつきは減少すると報告している。Table 4 に示すように、本研究で求めた測定値について、対数化した後の平均値 (m)、標準偏差 (SD) および変異係数 (CV) か

ら比較すると、比重補正値が最も少ないばらつきを示した。さらに興味あることは、グリシンのクレアチニン補正後の値以外では、いずれも、負荷後の尿の個人間のばらつきが減少していることである。この点については、今後、今回測定した物質以外についても、同様の現象があるかどうか検討する予定である。さらに、クレアチニン補正の適否については、本研究での負荷のごとく、クレアチニン濃度が大きく変動するような場合、結果として尿中代謝産物濃度が計算上低く示される傾向があるので、注意を要するものと考えられる。ことに、作業現場における、トルエンの低濃度暴露の際には、この点が顕著となることが考えられる。

V. 結 論

有機溶剤の吸入指標として用いられている尿中代謝産物の、尿中への排泄動態に及ぼす肉体負荷の影響を調べるために、トルエン-馬尿酸系をモデルに想定して、肉体負荷前後での、馬尿酸およびグリシン量の変動を測定し、以下の成績を得た。

肉体負荷の程度が、尿所見の前後の比較で、タンパク定性で(一)~(+)から(+)~(卅)に、クレアチニン濃度で平均 1.9 倍、最高で 4.23 倍となるような、約 2 時間の負荷では、

1) 馬尿酸濃度は増加傾向があるものの、著明な変化は認められない。

2) グリシン濃度は低下傾向が認められた。

3) 馬尿酸とグリシンのモル濃度比は著明に増加し、グリシン抱合能に促進的な影響があるものと考えられる。

4) 代謝産物の濃度補正法として、負荷前の尿においては、比重補正値とクレアチニン補正値がよい相関を示すが、負荷後では相関が悪く、クレアチニン補正により、低い値となって表わされ、適用上注意を要すること

Fig. 6. Correlation of adjusted values of glycine levels with specific gravity (X) and with creatinine level (Y).

Table 4. geometric means, standard deviations and the coefficients of variance of the value observed and adjusted with reference to specific gravity and to creatinine level.

Compounds		Observed (uncorrected)			Adjusted with specific gravity (1.024)			Adjusted with creatinine concentration (g/l)		
		m	SD	CV (%)	m	SD	CV (%)	m	SD	CV (%)
Hippuric acid	before	2.41	0.23	9.54	2.30	0.21	9.13	2.08	0.23	11.06
	log ₁₀ (mg/l) after	2.57	0.17	6.61	2.41	0.13	5.39	2.00	0.16	8.00
Glycine	before	2.14	0.32	14.95	2.10	0.17	8.10	1.87	0.20	10.70
	log ₁₀ (mg/l) after	2.12	0.15	7.08	1.96	0.14	7.14	1.54	0.21	13.64

$N=14$

がわかった。

本研究の一部は、文部省科学研究費、奨励研究、課題番号 56770308 によった。

また、本研究に際し、比色定量法についてご助言をいただきました、岡山大学薬学部大森晋爾教授、池田己喜子氏に謝意を表します。さらに、採尿にご協力いただきました、岡山大学剣道部の諸君に感謝します。

文 献

- 1) Ohmori, S., Ikeda, M., Kira, S. and Ogata, M.: Colorimetric determination of hippuric acid in urine and liver homogenate, *Anal. Chem.*, 49: 1494-1496, 1977.
- 2) Ohmori, S., Ikeda, M., Watanabe, Y. and Hirota, K.: A simple and specific determination of glycine in biological samples, *Anal. Biochem.*, 90: 662-670, 1978.
- 3) Ludwig, H., Spiteller, M., Egger, H.J. and Spiteller, G.: Correlation of emotional stress and physical exertion with urinary metabolite profiles, *Isr. J. Chem.*, 16: 7-11, 1977.
- 4) 井上岳秋, 小郷克敏, 澤田芳男, 野見山俊一: 運動性利尿の発現と走負荷強度との関係, 97(6): 435-439, 1978.
- 5) Cralley, L. V. and Cralley, L. J.: *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology III*, John Wiley and Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane and Toronto, 1979.
- 6) Seki, Y., Urashima, Y., Aikawa, H., Matsumura, M., Ichikawa, Y., Hiratsuka, F., Yoshida, Y., Shimbo, S. and Ikeda, M.: Trichloro-compounds in the urine of humans exposed to methyl chloroform at sub-threshold level, *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 34(1), 39-50, 1975.

著者への通信先: 吉良尚平, 〒700 岡山市鹿田町 2-5-1 岡山大学医学部公衆衛生学教室 *Reprint requests to* Department of Public Health, Okayama University Medical School, 2-5-1, Shikata-cho, Okayama, 700 Japan (S. Kira)