短 報

有機溶剤暴露者の尿試料の保存方法

A Method for Storage of Urine Samples
in the Biological Monitoring
of Organic Solvents

Key words : organic solvent ; biological monitoring ; hippuric acid ; methylhippuric acid ; urine

1989年10月より有機溶剤特殊健康診断の一環として有機溶剤暴露者の尿中代謝物の測定が施行されている¹⁾。尿中代謝物の測定に当たって、尿試料の保存方法が問題視されている。すなわち、有機溶剤の尿中代謝物の中には分解しやすいものがあり、尿試料を低温あるいは冷凍保存することが望ましいとされている。しかし、冷蔵設備が乏しい事業所、あるいは遠隔地から測定機関への輸送の場合、常温保存が可能であれば便利である。そこで私たちは広く使用されているトルエン、キシレンの代謝物である馬尿酸(HA)、メチル馬尿酸(MHA)の安定性試験を行い、尿試料の常温保存方法について検討した。

材料と方法

1) 温度と pH の影響 : 有機溶剤非暴露者の尿 100 ml に HA を 50 mg, *o*-, *p*-, *m*-MHA をそれぞれ 5 mg 添加し、塩酸で 6 段階の pH 値に調整した後、ポリプロピレンチューブに分取して、22°C, 4°C, -20°C, -85°C で保存した。また Wistar 系雄性ラット (310~350 g) にトルエン、*o*-, *p*-, *m*-キシレンをそれぞれ 0.25 ml/kg 経口投与して、12 時間に排泄された尿を採取し、前述と同様の操作を行った。あらかじめ定められた時点で各試料の HA, MHA の濃度を測定した。

2) 保存剤の影響 : 上記の実験から抽出された有機溶剤の尿中代謝物の安定性に対する至適 pH (2.5) 付近において、数種の保存剤を HA, MHA のヒト尿溶液および有機溶剤暴露ラット尿に加え、22°C において HA, MHA の安定性について検討した。これらの保存剤による pH 調整は尿量にはほとんど影響を与えなかった。

3) 有機溶剤の代謝物の測定 : HA, *o*-, *p*-, *m*-MHA 濃度は竹内ら²⁾の高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

結 果

1) 尿中代謝物の安定性に対する温度の影響 : ヒト尿 (pH 6.7) およびラット尿 (pH 6.6) 中の HA は 22°C

Fig.1. Effects of pH and storage duration on *m*-methylhippuric acid concentration in human urine at 22°C. The pH of urine was adjusted with hydrochloric acid to 6.7 (○), 5.0 (●), 3.8 (△), 2.5 (▲), 1.6 (□), and 0.6 (■). Each symbol represents the mean of duplicate determinations.

で3日目に若干減少し、7日目にそれぞれ 28% および 25%, 30日目にそれぞれ 73% および 74% 減少した。4°C, -20°C と -85°C 保存の場合、HA 濃度は 30 日間ほとんど変化しなかった。*m*-, *p*-, *o*-MHA の安定性は HA とほぼ同様の結果を示したが、温度の影響の受けやすさは *m*-MHA > *p*-MHA > *o*-MHA の順であった。

2) 尿中代謝物の安定性に対する pH の影響 : HA, *o*-, *p*-, *m*-MHA を添加したヒト尿溶液を 22°C で保存した場合の、pH が尿中代謝物の安定性に与える影響を検討した。[*m*-MHA の結果を代表として Fig.1 に示す。塩酸での pH 調整操作は全ての測定値に影響を与えなかった (pH 調整直後の測定値参照)。pH 3.8~6.7 において、HA, *o*-, *p*-, *m*-MHA 濃度はいずれも 7~14 日目から減少し始めた (12~28%)。減少の程度と速度は HA が最も大きく、*m*-と *p*-MHA がこれに続いた。*o*-MHA は 4 つの代謝物の中では減少程度が最も小さかった。pH 2.5 においては、30 日目に初めてこれらの代謝物濃度の減少が認められ、その程度は HA, *m*-, *p*-, *o*-MHA の場合、それぞれ 15, 26, 24, 6% であった。pH 1.6 と 0.6 においては、60 日間 HA, *o*-, *p*-, *m*-MHA 濃度はいずれも明らかな変動を示さなかった。

トルエンおよびキシレン暴露ラット尿中の代謝物の安定性に対する pH の影響はヒト尿の場合と類似した挙動を示した。

3) 保存剤による尿中代謝物の安定性 : dowex を加えた場合の尿中 HA 濃度は 0 日目すでに 10% 低く、その後も徐々に減少した。amberlite を添加した場合は (この場合のみ pH 6.1) 7 日目に尿中 HA 濃度の減少が認められ、30 日目には未添加の対照 (pH 6.4) と同様に

Fig.2. Effects of acidic preservatives on the hippuric acid content in urine sample at 22°C. (○) control; (●) dowex; (△) amberlite; (▲) oxalic acid; (□) tartaric acid; (■) hydrochloric acid.

検出できなくなった。一方、シュウ酸、酒石酸、塩酸を保存剤とした場合は、尿中 HA の濃度は 14 日間変化しなかったが 30 日目に若干減少した (13~18%) (Fig.2)。

シュウ酸を加えた場合、尿中 *m*-と *p*-MHA 濃度は 30 日間減少しなかったが、*o*-MHA 濃度が 30 日目に 18% 減少した。これとは逆に酒石酸あるいは塩酸を加えた場合、*o*-MHA の濃度は 30 日目まで低下しなかったが、*m*-と *p*-MHA は 30 日目に 20~26% 減少した。

アスコルビン酸は HA のクロマトグラムに影響を与え、望ましい保存剤とは思われなかった。

考察

今回の結果は、尿中 HA, MHA 濃度が尿試料の pH を 2.5 に下げれば常温下で少なくとも 14 日間、また pH 2.0 以下に下げれば 30 日以上安定であることを示している。スチレンの尿中代謝物、マンデル酸 (MA) についても同様の結果を得た (データ示さず)。

イオン交換樹脂である dowex と amberlite は尿試料の pH 値を 2.5 以下に下げるのは困難であり、これらのイオン交換樹脂への HA や MHA の吸着も認められた。したがって、dowex と amberlite は理想的な保存剤とはならない。

塩酸、シュウ酸、酒石酸は pH 2.5 において HA の安定性に対し良い保存効果を示した。MHA に対しては pH 2.5 において、これらの安定剤による一致した保存効果は得られなかったが、pH 値をさらに下げれば (たとえば pH 2.0 以下)、より高い安定性が期待できるとされる。また、今回データを示していないが、マレイン酸についても同様の検討を行い、pH 2.0 において HA, MHA および MA すべてに良い保存効果を示すことを確認している。

以上の結果は、有機溶剤暴露者の尿試料を保存する場合、必ずしも冷蔵、冷凍する必要はなく、pH 2.0~2.5 付近に調整すれば常温保存が可能であることを示している。しかし、これらの保存剤が他の有機溶剤の代謝物 (たとえば 2,5-ヘキサジオン) に対してどのような影響を及ぼすか検討する必要がある。

有機溶剤の尿中代謝物が常温で分解しやすいのは細菌の繁殖による分解であると報告されている³⁾。しかし、肉眼的には細菌の繁殖が観察できなかった pH 3.5~4.0 の水溶液でも、これらの代謝物の濃度は常温下の保存で低下した (データ示さず)。したがって、尿中代謝物の分解はこれらの代謝物の自然分解にも起因すると考えられる。HA, MHA が低下した尿および水溶液試料のクロマトグラムには安息香酸および 3 種類のメチル安息香酸のピークが検出された (データ示さず)。これは HA, MHA の分解は安息香酸あるいはメチル安息香酸とグリシンとの解離によることを意味する。pH 値を下げることによってこれらの代謝物の安定性が高くなる理由は、細菌の繁殖の抑制以外、弱酸である代謝物のイオン解離が抑制されるためと思われる。さらに低い pH 下ではグリシン抱合の安定性も増大すると解される。

以上をまとめると 1) 尿中 HA, MHA の濃度は 22°C において尿の pH 値を 2.5 付近に保てば 14 日間、2.0 以下に保てば 30 日間変化しない; 2) 塩酸、シュウ酸、酒石酸は酸性保存剤として HA, MHA の安定性に有効である。簡易な薬剤投入によって尿の pH を 2.0 以下に調整する方法を現在考案中である。

文献

- 1) 労働省令第23号, 有機溶剤中毒予防規則の一部改正 (1989)。
- 2) 竹内幸子, 坂井 公, 池谷由美子, ほか. 高速液体クロマトグラフによる尿中馬尿酸及びメチル馬尿酸の分離定量法についての検討. 産業医学 1986; 28: 455-461.
- 3) 田口豊郁. 有機溶剤の生物学的モニタリングのための尿試料の保存と尿中濃度の補正について. 岡山医誌 1990; 102: 99-111.

王 瑞生*, 中島民江*, 島 啓視**, 村山忍三*, 佐藤章夫***

* 信州大学医学部衛生学教室

** 三菱油化ビーシーエル

*** 山梨医科大学第 I 保健学教室

Rui-Sheng WANG,* Tamie NAKAJIMA,* Keishi HATA,**
Ninzo MURAYAMA* and Akio SATO***

* Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, 390 Japan

** Mitsubishi Yuka Bio-Clinical Laboratories, Inc.

*** Department of Environmental Health, Medical University of Yamanashi

平成 3 年 7 月 3 日受付

通信先: 王あて, Reprint requests to R.S. Wang