

ppb レベルにおける職業的ベンゼン曝露の尿中t, t-ムコン酸と フェニルメルカプツール酸の曝露指標としての比較

井上 修, 葛西 清美

東北労災病院健康診断部

(平成16年3月25日受付)

要旨： ppb レベルのベンゼンに曝露した労働者の尿中に排泄されるt, t-ムコン酸とフェニルメルカプツール酸（ベンゼン代謝物）について，職業的ベンゼン曝露の指標として有用であるか否かを比較検討した．調査はガソリンスタンドで働く ppb レベルのベンゼンに曝露した36名の労働者（男性20名，女性16名）である．個人のベンゼン曝露濃度は，有機ガスモニターを利用しFID検出器付きガスクロマトグラフィー装置で測定した．尿中t, t-ムコン酸とフェニルメルカプツール酸濃度は，高速液体クロマトグラフィー装置を利用する方法で測定した．調査分析によるベンゼン曝露濃度は，15.7～102.3ppbであった．得られたベンゼン曝露濃度とt, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸の濃度の両者を統計学的に処理し，相関係数，p値および回帰分析で得られるパラメーターを算出した．その結果，ppbレベルでも，尿中t, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸が共にベンゼン曝露の指標として有用であった．数値上，相関係数（r）の大きさとp値からは，フェニルメルカプツール酸（ $r = 0.479 \sim 0.540$ $p = 0.003 \sim 0.001$ ）がt, t-ムコン酸（ $r = 0.350 \sim 0.416$ $p = 0.036 \sim 0.011$ ）よりも，ベンゼン曝露の指標として優れている事が示唆された．LSC（最少弁別濃度）解析¹⁾では，測定値と比重補正值およびクレアチニン補正值を含めて計算した場合，尿中フェニルメルカプツール酸の排泄量でベンゼン曝露が明らかとなるのは，108～135ppbベンゼンの曝露濃度であった．それに対し尿中t, t-ムコン酸の場合には，185～409ppbのベンゼン曝露濃度であった．弁別の視点からは，数値が低い方が優れていると考えられる．その意味で尿中フェニルメルカプツール酸は，ベンゼンの曝露指標として尿中t, t-ムコン酸よりも優れていた．

両者を相関分析と回帰分析およびLSC解析のトータルで観察した場合，ppbレベルでのベンゼンの曝露指標としては，尿中フェニルメルカプツール酸の方が尿中t, t-ムコン酸よりも優れていた．

(日職災医誌, 53: 6—11, 2005)

—キーワード—

ppbベンゼン曝露，曝露指標，t, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸

はじめに

日本国内では，ベンゼンを溶剤として使用していない．しかし化学物質の合成原料として多量に使用している．またガソリンの中には，最高1パーセント程度のベンゼンが含まれているとの報告^{2) 3)}がある．現代の車社会を考えれば，人々は排気ガスとして不完全燃焼のベンゼン

やガソリンスタンドの給油時に空気中へ放出されるppb～数ppmレベルのベンゼンに曝露する危険性がある．

最近の疫学調査によれば，ベンゼン曝露と骨髄性白血病の因果関係が明らかとなってきた^{4) 5)}．一方，有害性の視点から見た場合，ベンゼン蒸気の吸入は中枢神経系に影響する．長期の接触は，造血組織や肝臓および免疫系に影響し，発ガンとの関連が示唆される^{6) 7)}．ベンゼン曝露の防止処置から見たベンゼン曝露の許容濃度は，日本産業衛生学会は過剰発ガン生涯リスクレベルが 10^{-3} のとき1ppm (1,000ppb)， 10^{-4} のとき0.1ppmと評価した⁸⁾．一方，ACGIH（アメリカ）では，TLV（閾値）－

Comparative evaluation of urinary t, t-muconic acid and phenylmercapturic acid as an indicator of occupational exposure to benzene at ppb levels

TWA（時間加重平均）値で0.5ppm, TLV-STEL（短時間曝露限界）値では2.5ppmと勧告した⁹⁾。またOSHA（労働安全衛生庁アメリカ）の曝露限界では、TWA値で1ppm, STEL値で5ppm, 健康診断規定発動レベル、すなわちアクションレベルでは0.5ppmと勧告した。以上の事からも、最近の世界的趨勢として、ベンゼン曝露の管理レベルは、0.1～5ppmの極めて低濃度の範囲を管理する必要性が要求されるようになってきた。そこで本研究は、ppbレベルのベンゼン曝露に対応するため、ベンゼンの曝露指標となるベンゼン代謝物としての尿中t,t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸に焦点を合わせ、その両者がベンゼン曝露の指標として有用性があるか否かを比較検討した。

材料と方法

被験者は、ガソリンスタンドで働く36名の労働者である。男性は20名で、女性は16名であった。個人のベンゼン曝露量を測定するため、作業始業時に労働者の襟元に活性炭入りの有機ガスモニター（3M社製）を着け、作業終了時に外して集めた。その後、活性炭に吸着したベンゼンを二硫化炭素で脱着してガスクロマトグラフィー装置（島津製GC-14A）で測定し、労働時間を加味したTWA（時間加重平均）値として計算した。ベンゼンの分離は、Bentone34 5%+ DIDP5% Uniport HP 80/100（GLサイエンス社）の充填剤入りガラスカラム（3mm ϕ × 4m）で行った。二硫化炭素には僅かにベンゼンが含有している。そこで同時に試薬ブランクも測定し、バックグラウンドの補正も行った。測定の条件として、カラムの温度は110℃、注入温度は200℃、検出器の温度は150℃に設定した。ベンゼンの測定時には、空気圧と水素ガス圧の設定は何れも1kg/cm²とした。純チソッガスの流量は60ml～80ml/分である。注入量は感度を上げるため2 μ lとした。尿中のt,t-ムコン酸は、高分離と高感度を図るため井上の方法¹⁰⁾を改良して測定した。測定用カラムはイナートシル ODS-3（GLサイエンス内径4.6mm × 長さ250mm 5 μ m）を使用した。カラム温度は37℃に設定し、移動相の流速は1ml/分とした。成分構成は1%酢酸水溶液：メタノールを9：1（v/v）とした。本法による尿中t,t-ムコン酸のピークは、16～17分前後に現れる。1検体に要する時間は40分に設定した。測定波長は265nmとした。測定用のサンプルは、尿検体1mlにメタノール1ml（ピペットで分注）を混和後、3,000rpmで遠心作製、得られる上清の10 μ lを高速液体クロマトグラフィー装置（島津製LC-10AD）に注入して測定した。検出限界は1 μ g/l（S/N = 2）である。尿中フェニルメルカプツール酸は井上の方法¹¹⁾で測定した。尿を48.5%の硫酸で処理後、エーテル：メタノール（9：1；v/v）の溶液で抽出遠心、有機層を濃縮して測定用サンプルを得た。その液を高速液体クロマトグラフ

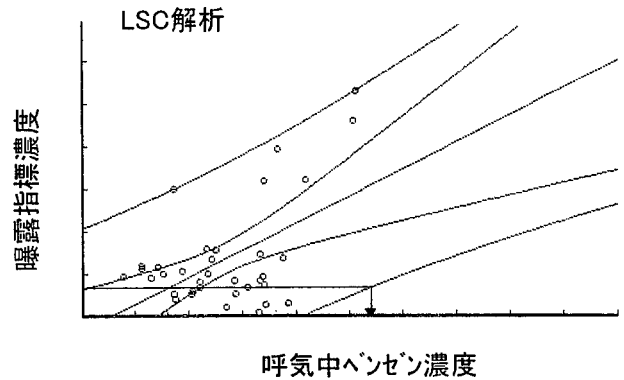


図1 呼気中ベンゼン濃度と曝露指標濃度

中央線は回帰直線式、その両側は回帰直線式の95%信頼区間、外側の両曲線は個別値の95%信区間

イー装置（島津製LC-10AD）に注入して測定した。カラムはイナートシル ODS-3（GLサイエンス内径4.6mm × 長さ400mm；5 μ m）で60℃に保温、測定波長を195nmに設定して測定した（長さ400mmは250mmと150mmカラムを連結して使用した）。なお尿の濃淡補正のため、ヤッフ法で尿中のクレアチニンを測定し、尿比重は屈折計（アメリカンオプティカル社製）で測定した。試薬は可能な限り特級以上の製品を使用した。

統計学的処理

基礎的な統計量はエクセルを利用して解析した。単回帰および重回帰分析と相関分析はSTATISTICA（Stat Soft Inc 米国）のソフトウェアをNECのコンピュータ（PC-9801）にインストールして解析した。LSC解析では、本研究では回帰分析で得られるベンゼンOppbに対応する回帰直線式の95%上限値と個別（サンプル）値の95%下限値で検討した（図1）。

結果

1. 被験者の年齢およびベンゼン作業内容と曝露状況

被験者は全て北海道東部のガソリンスタンドで勤務する労働者である。男性の総数は20名であった。年齢は40.0 ± 11.8歳（算術平均 ± 算術標準偏差：以下同様）であった。女性は16名で年齢は23.9 ± 4.7歳であった。男性と女性を合わせた年齢は、32.8 ± 12.3歳であった。年齢分布は、男性＋女性で20歳から55歳の間に分布していた。作業内容は、大部分の労働者が車のガソリンの給油と洗浄をする作業であった。但し一部の労働者は、灯油の運搬作業をしていた。就業時間は交代制で、午前8時から午後7時の間であった。ガソリンスタンドの労働者のベンゼン曝露濃度は、15.7～102.3ppbの範囲にあった。大部分は100ppb以下で、その分布は対数分布を示し、幾何平均で48.2ppb、幾何標準偏差で1.557であった。

表1 呼気中ベンゼン濃度と尿中 t, t-ムコン酸濃度の関係

尿中 t, t-ムコン酸 補正方法	単位	切片	勾配	相関係数	p 値
		(A)	(B)		
非補正	$\mu\text{g/l}$	35.9	5.79	0.385	0.020
クレアチニン補正	$\mu\text{g/g}$ クレアチニン	49.2	1.90	0.350	0.036
比重補正 (1.016)	$\mu\text{g/l}$	43.9	3.43	0.416	0.011

切片 (A) と勾配 (B) ; $Y = A + BX$. X は呼気中ベンゼン濃度 Y は尿中 t, t-ムコン酸濃度

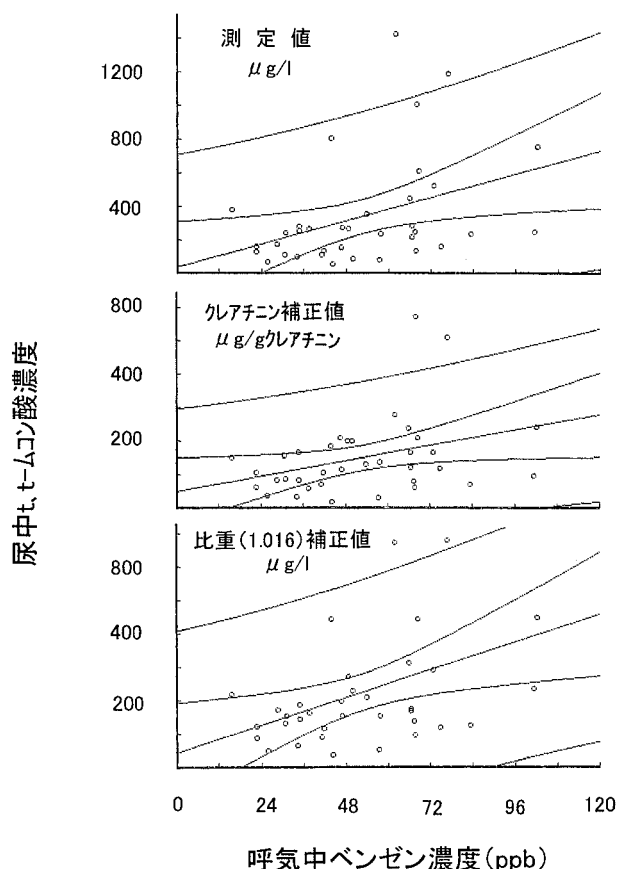


図2 呼気中ベンゼン濃度と尿中 t, t-ムコン酸濃度
中央線は回帰直線式, その両側の曲線は回帰直線式の95%信頼区間, 外側の両曲線は個別値の95%信頼区間

2. ベンゼン曝露濃度と尿中 t, t-ムコン酸濃度の関係

回帰分析からは, X を呼気中ベンゼン濃度 (ppb), Y を尿中 t, t-ムコン酸濃度 ($\mu\text{g/l}$ または $\mu\text{g/g}$ クレアチニン) とした場合, 切片は 35.9~49.2 ($\mu\text{g/l}$ または $\mu\text{g/g}$ クレアチニン) であった (表1, 図2). 勾配は 1.9~5.8 ($\mu\text{g/l/ppb}$ または $\mu\text{g/g}$ クレアチニン/ppb) であった (表1, 図2). 相関分析からは, ベンゼン曝露濃度と尿中 t, t-ムコン酸濃度の相関を示す係数は, 非補正で 0.385, クレアチニン補正で 0.350, 比重補正で 0.416 であった (表1). またそれぞれの相関の有意性を示す p (危険率) 値は, 非補正で 0.020, クレアチニン補正で 0.036, 比重補正で 0.011 であった (表1). 得られた p 値は, 全て 0.05 (5%) 以下であった. 従ってベンゼン曝露の濃

度上昇に伴って, ベンゼン曝露濃度が 15.7~102.3ppb のレベルでも尿中に t, t-ムコン酸が増加することが明らかとなった.

3. ベンゼン曝露濃度と尿フェニルメルカプツール酸濃度の関係

回帰分析からは, X を呼気中ベンゼン濃度 (ppb), Y を尿中フェニルメルカプツール酸濃度 ($\mu\text{g/l}$ または $\mu\text{g/g}$ クレアチニン) とした場合, 切片は -2.8~-0.2 ($\mu\text{g/l}$ または $\mu\text{g/g}$ クレアチニン) であった (表2, 図3). 勾配は 0.07~0.20 ($\mu\text{g/l/ppb}$ または $\mu\text{g/g}$ クレアチニン/ppb) であった (表2, 図3). 相関分析からは, ベンゼン曝露濃度と尿中フェニルメルカプツール酸の相関を示す係数は, 非補正で 0.535, クレアチニン補正で 0.479, 比重補正で 0.540 であった (表2). それぞれの係数に対応する相関の有意性を示す p 値は, 非補正で 0.001, クレアチニン補正で 0.003, 比重補正で 0.001 であった (表2). p 値は, 全て有用性の基準となる 0.05 (5%) 以下であった. 従ってベンゼン曝露の濃度上昇に伴って, ベンゼン曝露濃度が ppb レベル (102.3ppb 以下) でも尿中にフェニルメルカプツール酸が排泄され増加する事が明らかとなった.

4. LSC 解析¹⁾ と曝露指標の優劣

LSC 解析では, t, t-ムコン酸を利用した場合, 尿中 t, t-ムコン酸の排泄増加でベンゼン曝露が明らかとなるのは, 非補正では 236ppb ベンゼン濃度曝露からであった. クレアチニン補正では 409ppb で, 比重 (1.016) 補正では 185ppb であった (表3). 一方, フェニルメルカプツール酸を利用にした場合, 尿中フェニルメルカプツール酸の排泄増加でベンゼン曝露が明らかとなるのは, 非補正で 110ppb, クレアチニン補正で 135ppb, 比重補正では 108ppb であった (表4). 何れの数値も補正の有無に対応して観察した場合, 尿中フェニルメルカプツール酸の方が尿中 t, t-ムコン酸よりも LSC 値が低値を示していた (表3, 4). 曝露指標としての優劣の視点からは, 弁別濃度が低い方が優れている. LSC 解析からは, 尿中フェニルメルカプツール酸の方が尿中 t, t-ムコン酸よりも優れていた.

考 察

ガソリンスタンドに勤務する労働者の年齢は, 平均年

表2 呼気中ベンゼン濃度と尿中フェニルメルカプツール酸濃度の関係

尿中フェニルメルカプツール酸 補正方法	単位	切片	勾配	相関係数	p 値
		(A)	(B)		
非補正	$\mu\text{g/l}$	- 2.8	0.200	0.535	0.001
クレアチニン補正	$\mu\text{g/g}$ クレアチニン	- 0.2	0.070	0.479	0.003
比重補正 (1.016)	$\mu\text{g/l}$	- 1.3	0.130	0.540	0.001

切片 (A) と勾配 (B) ; $Y = A + BX$, X は呼気中ベンゼン濃度 Y は尿中フェニルメルカプツール酸濃度

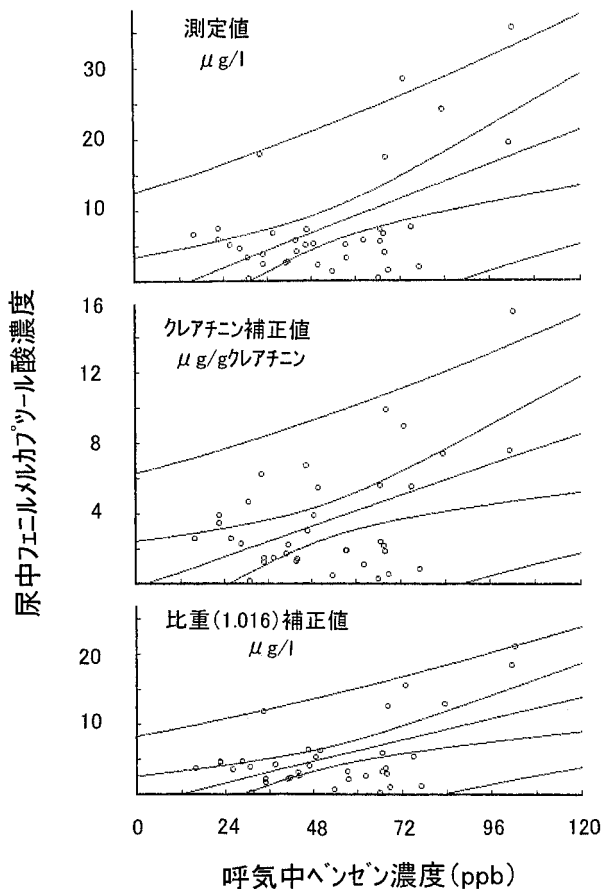


図3 呼気中ベンゼン濃度と尿中フェニルメルカプツール酸濃度
中央線は回帰直線式, その両側の両曲線は回帰直線式の95%
信頼区間, 外側の両曲線は個別値の信頼区間

齢では男性の方が女性よりも高い。また標準偏差値から推測できる年齢の幅は、男性の方が女性よりも広範囲に分布していた。その理由として、女性の場合は、アルバイトとしての短期就労型で、男性の場合は、本採用の長期就労型の傾向が主な原因であった。

調査での呼気中の個人ベンゼン曝露濃度は、15.7～102.3ppbの範囲に分布していた。本解析ではppbレベルの呼気中ベンゼン曝露濃度と尿中t, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸排泄濃度の関係を統計学的手法で検討した。その結果、正の値を示す相関係数と有意性の基準となる0.05 (5%) 以下のp値が抽出された。特にt, t-ムコン酸については、分析感度が低い従来法(検出限界; 100 $\mu\text{g/l}$) を改良した約100倍の感度を有

表3 尿中t, t-ムコン酸排泄でみたベンゼン
Oppbの回帰式の95%上限値と個別値の
95%下限値で分かるベンゼン弁別濃度

補正方法	ベンゼン弁別濃度 (ppb)
非補正	236
クレアチニン補正	409
比重 (1.016) 補正	185

表4 尿中フェニルメルカプツール酸排泄
でみたベンゼンOppbの回帰式の95%上限
値と個別値の95%下限値で分かるベンゼ
ン弁別濃度

補正方法	ベンゼン弁別濃度 (ppb)
非補正	110
クレアチニン補正	135
比重 (1.016) 補正	108

する高感度法(検出限界; 1 $\mu\text{g/l}$) を採用した事が今回のような結果になったと考える。相関係数の大きさでは、フェニルメルカプツール酸の方がt, t-ムコン酸よりも若干大きい数値を示した。一方、p値の大小では、フェニルメルカプツール酸の方がt, t-ムコン酸よりも低い数値を示した。有意性からは、小さい値(p値)の方が意義が高い。それらの意味でフェニルメルカプツール酸の方がt, t-ムコン酸よりも、ベンゼン曝露の指標として優れていた。一方、回帰分析からは、ベンゼン曝露濃度と尿中t, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸濃度の関係解析より正の勾配が得られた。数値を解釈した場合(相関係数を含め)、ベンゼンの曝露濃度の上昇に伴って尿中へのt, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸の排泄量が有意に上昇すると考えられる。LSC解析をみた場合、計算される数値が低い方が弁別能力が優れている。結果として、尿中フェニルメルカプツール酸の方が尿中t, t-ムコン酸よりも弁別濃度が低い。故にベンゼン曝露指標としては、尿中フェニルメルカプツール酸の方が尿中t, t-ムコン酸よりも優れていた。さらに詳細に個別毎の代謝物で非補正と補正のデータでみた場合、両代謝物とも弁別濃度が最も低いのは、比重(1.016)補正の場合であった。二番目は非補正で、最後はクレアチニン補正であった。ちなみに比重補正では、

t, t-ムコン酸は185ppb, フェニルメルカプツール酸は108ppbであった。この差(非補正, クレアチニン補正も同様)は喫煙や測定感度などが考えられるが, 今後の検討課題である。また, 今回, クレアチニン補正が非補正や比重補正よりも弁別濃度が高値となったが, 尿中へのクレアチニン排泄量の男女差を無視した解析手法が, 今回のような結果になったと想定される(但し本研究解析には影響なし)。今後は例数を増やして男性, 女性別に検討を加え, その事実を確認したい。

総論として, ベンゼン曝露に関する両代謝物の曝露指標の優劣は, 統計学的処理より得られる相関分析等とLSC解析より, 尿中フェニルメルカプツール酸の方が尿中t, t-ムコン酸よりも優れていた。

ま と め

ガソリン中に含まれるベンゼンに曝露した労働者の尿中に排泄されるt, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸に関するppbレベルでのベンゼン曝露指標としての有用性を比較検討した。方法として, 調査研究より得られた個人毎のベンゼン曝露濃度と尿中t, t-ムコン酸および尿中フェニルメルカプツール酸排泄濃度を統計学的に処理して解析した。その結果, 統計量や相関係数, p値および回帰分析により, 尿中t, t-ムコン酸およびフェニルメルカプツール酸がppbレベルでのベンゼン曝露の指標として有用($p < 0.05$)である事が分かった。相関係数とp値の大小からは, 尿中フェニルメルカプツール酸の方がt, t-ムコン酸よりもベンゼン曝露の指標として優れている事が示唆された。一方, LSC(最少弁別濃度)解析からは尿中フェニルメルカプツール酸の方が, 尿中t, t-ムコン酸よりもベンゼンの曝露指標として優れていた。そのベンゼン弁別濃度は, フェニルメルカプツール酸で108~135ppb, t, t-ムコン酸で185~409ppbであった。

総括として, ppbレベルでのベンゼン曝露に関する両代謝物の曝露指標としての優劣は, 尿中フェニルメルカプツール酸の方が尿中t, t-ムコン酸よりも優れていた。

文 献

- 1) Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, et al : Comparative

evaluation of urinalysis and blood analysis as means of detecting exposure to organic solvents at low concentrations. *Inter Arch Occup and Environ Health* 64 : 223—234, 1992.

- 2) Ikeda M, Kumai M, Watanabe T, et al : Aromatic and other contents in automobile gasoline in Japan. *Ind Health* 22 : 235—241, 1984b.
- 3) Ikeda M, Kasahara M : n-hexane and benzene contents in gasoline for industrial purpose. *Ind Health* 24 : 63—66, 1986.
- 4) Aksoy M : Benzene as a leukemogenic and carcinogenic agent. *Am J Ind Med* 8 : 9—20, 1985.
- 5) IPCS : Environmental Health Criteria 150, 1993.
- 6) Aksoy M : Different types of malignancies due to occupational exposure to benzene. A review of recent observation in Turkey. *Environ Research* 23 : 181—190, 1980.
- 7) NTP : Fourth Annual Report Carcinogenes Summary 1985.
- 8) Japan Society for Occupational Health 1999 : Recommendation of occupational exposure limits. *J of Occup Health* 41 : 191—206, 1999—2000.
- 9) American Conference of Governmental Industrial Hygienists 2000 : Threshold Limit Value and Biological Exposure Indices, 2000 (Cincinnati : ACGIH).
- 10) Inoue O, Seiji K, Kasahara M, et al : Urinary t, t-muconic acid as an indicator of exposure to benzene. *Br J Ind Med* 46 : 122—127, 1989c.
- 11) Inoue O, Kanno E, Yusa T, et al : A simple HPLC method to determine urinary phenylmercapturic acid and its application to gasoline station attendants to bio-monitor occupational exposure to benzene at less than 1 ppm. *Biomarkers* 6 (3) : 190—203, 2001.
- 12) Jackson S : Creatinine in urine as an index of urinary excretion rate. *Health Phys* 12 : 843—850, 1966.

(原稿受付 平成16. 3. 25)

別刷請求先 〒981-8563 仙台市青葉区台原4-3-21
東北労災病院健康診断部
井上 修

Reprint request:

Osamu Inoue
Department of Health Examination, Tohoku Rosai Hospital,
Sendai 981-8563, Japan

COMPARATIVE EVALUATION OF URINARY t, t-MUCONIC ACID AND
PHENYLMERCAPTURIC ACID
AS AN INDICATOR OF OCCUPATIONAL EXPOSURE TO BENZENE AT PPB LEVELS

Osamu INOUE and Kiyomi KASAI

Department of Health Examination, Tohoku Rosai Hospital

The present study was initiated to examine whether urinary t, t-muconic acid determined by means of a new HPLC method is a better indicator of occupational exposure to benzene at ppb levels than urinary phenylmercapturic acid. End-of-shift urine samples were collected from 36 gasoline station attendants (20 male attendants 16 female attendants) in the second half of a working week. Individual concentrations of benzene exposure were monitored by means of diffusive sampling. The concentrations of individual benzene exposure distributed from 15.7 to 102.3 ppb. The evaluation of the results was performed using statistical analysis such as correlation coefficients, p value, parameter of regression analysis and LSC analysis (Kawai et al). As a result, quantitative relation with benzene elucidated that urinary phenylmercapturic acid had a more and less great correlation coefficient with benzene ($r \doteq 0.5$) than urinary t, t-muconic acid ($r \doteq 0.4$). p-value with phenylmercapturic acid and t, t-muconic acid was from 0.001 to 0.003 and from 0.011 to 0.036, respectively. With regard to LSC (limit of separate concentration) analysis on the present survey, phenylmercapturic acid and t, t-muconic acid in urine could separate the exposed from the non-exposed (0 ppb benzene). The benzene concentrations were from 108 to 135ppb (phenylmercapturic acid) and from 185 to 409 ppb (t, t-muconic acid). Overall, therefore, it appeared reasonable to conclude that urinary phenylmercapturic acid is superior to urinary t, t-muconic acid as an indicator of occupational exposure to benzene at ppb levels.
