

向上および測定法の標準化等を目的とし、登録衛生検査所5社を含めた9機関で構成されている。本研究会では事業計画の一環として定期的に施設間クロスチェックを実施しており、今回は平成22及び23年度に実施したn-ヘキサン（の尿中代謝物である2,5-ヘキサンジオン5-HD）の結果について報告する。両年度実施したクロスチェックへの参加は8施設であった。試料の調製は、(株)ビー・エム・エルが実施し、結果の取りまとめは(株)ビー・エム・エルと関西労災病院が行なった。

試料および方法

試料

クロスチェック用試料は、分布区分に合わせた標準水溶液3濃度および非曝露者尿に標準水溶液を添加した添加尿3濃度に曝露者尿2濃度を加えた3種類8試料とした。標準水溶液と添

加尿に分注後、3月2日に冷蔵状態にて各測定機関に送付した。回答締め切りは3月31日で、全機関が期限内に回答した。平成23年度も同様に、2012年1月22日に試料を作製し、1月23日に送付し、回答締め切りは2月10日で、全機関が期限内に回答した。

(2) 測定方法

曝露により体内に吸収されたn-ヘキサンは、肝臓で酸化され、図1のように2,5-HD、 γ -バレロラクトンにまで代謝される。尿中に

表1 配布試料の調整濃度 (mg/L)

試料の種類	試料番号	平成22年度	平成23年度
標準水溶液	①	0.59	0.59
	②	4.72	4.72
	③	18.88	18.88
添加尿	①	0.9	9.4
	②	3.7	4.3
	③	6.5	0.9

労働衛生検査精度向上研究会活動報告

尿中 2,5-ヘキサンジオンのクロスチェック 集計結果報告

労働衛生検査精度向上研究会
木戸誠二郎 (株)ビー・エム・エル
圓藤陽子 関西労災病院

はじめに

労働衛生検査精度向上研究会は、鉛・有機溶剤健康診断における生物学的モニタリングの精

加尿試料の調製濃度を表1に示した。曝露尿はプールした作業尿を試料として用いた。平成22年度クロスチェック用の試料作製は2011年3月1日に行い、ポリプロピレン製

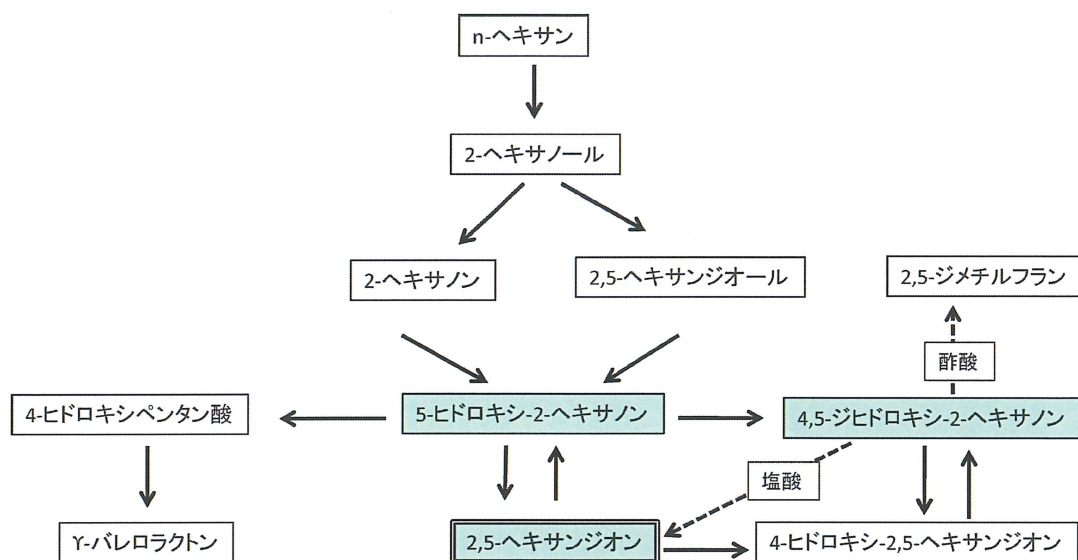


図1 n-ヘキサンの代謝（総 2,5-HD として測定される物質をグレーで示し、加熱分解による変化を破線で示した）

は、2,5-HD、5-ヒドロキシ-2-ヘキサノンおよび4,5-ジヒドロキシ-2-ヘキサノンのグルグルンサン抱合体およびγ-バレロラクトンが排泄される。2,5-HDが神経障害の原因物質と考えられていることから、尿中に検出される2,5-HD、5-ヒドロキシ-2-ヘキサノンおよび4,5-ジヒドロキシ-2-ヘキサノンのグルグルンサン抱合体およびγ-バレロラクトンのうち、2,5-HDに代謝される代謝物、5-ヒドロキシ-2-ヘキサノンおよび4,5-ジヒドロキシ-2-ヘキサノンのグルグルンサン抱合体を含めた測定が曝露評価法として求められている。これら代謝物のうち4,5-ジヒドロキシ-2-ヘキサノン抱合体は酢酸などによるマイルドな酸分解では、2,5-ジメチルフランに分解され、塩酸などによる強力な酸分解では2,5-HDに分解される。それ故、n-ヘキサンの生物学的モニタリングではpH1以下における酸加水分解によりこれら3種の代謝物を2,5-HDに変換し、総2,5-HD量として測定することになっている。

2,5-HDの測定方法は各施設の通常の方法で実施した。前処理は、全機関が塩酸による加水分解後に内部標準物質含有有機溶媒で抽出をしていた。内部標準物質としてはシクロヘキサノン、3-メチルシクロヘキサノン、3-メチルシクロペンタノン、キノリンが順に4、2、1、1機関で使用され、有機溶媒は1機関がエタノールであったが、それ以外の7機関はジクロロメタンを用いていた。そのフローチャートを図2に示す。6施設が水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（GC-FID）法、2施設がガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）法で分析していた。いずれの施設もキャピラリーカラムを使用しており、液層の性質は4機関が無極性、低/中極性を3機関、強極性を1機関が使用していた。カラム長は6機関が30m、各1機関が60mまたは12.5mを使用していた。全機関が内部標準法により、定量していた。定量に用いる試薬の純度は95%以上であったが、試薬のグレードによって95%以上～99.5%以上と多少異なり、4機関はそ

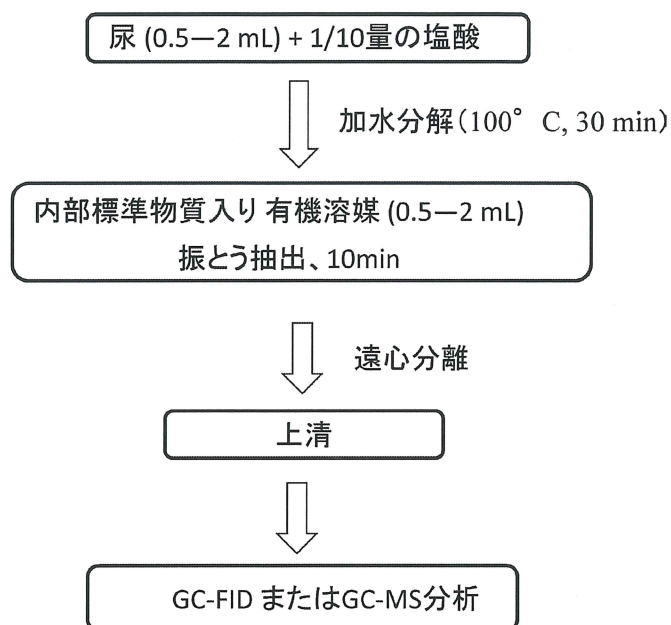


図2 尿中 2,5-HD 前処理フローチャート

の補正をしていた。各施設の分析測定条件を表 2 に示す。両年度における測定条件が異なっている場合は、23 年度を基本とし、括弧内に平成 22 年度の条件を記述した。

3. 結果および考察

平成 22 および 23 年度の測定結果を表 3-1 及び 3-2 に示した。表 2 によると、各機関の定量下限値は 0.1～0.6mg/L に分布していることから、検出下限値は、0.03～0.2mg/L 程度と考えられる。分布 2 の上限が 5mg/L、日本産業衛生学会¹⁾が勧告している生物学的曝露指標は 3mg/g クレアチニン、ドイツ DFG²⁾の BAT (生物学的許容値) が 5mg/L である。検出下限値はそれらの 1/10 である 0.3mg/L よりも低くなっているため測定精度は得られていると考えられた。しかしながら、両年度とも、0.59mg/L である低濃度の水溶液濃度の施設間変動係数 (CV) が 15.5-

16.2% と最も大きく 10% を超えていた。これは、低濃度の水溶液の有効桁数が 1 桁であることから、CV が大きくなってしまったと考えられた。ちなみに、この濃度は非曝露者における濃度レベルである¹⁾。両年度とも試料の種類に関係なく、試料中 2,5-HD 濃度の上昇に伴い CV は小さくなっていた。分布 2 と 3 の区分濃度である 5mg/L 付近である標準水溶液 4.73mg/L と添加尿 4.43mg/L の CV は、5.8 及び 5.6% と機関内の変動は十分小さかった。このことは分布区分 2 以上の判定は機関差がないことを示しており、全国組織の企業においては、検査機関が異なっても工場別の数値の比較ができることを意味している。

水溶液 3 種と添加尿 1 種は両年度において同じ濃度なので 8 機関の平均値を調製濃度に対する回収率として表 4 に示した。22 年度よりも 23 年度の方が回収率は良く、23 年度の水溶液ではほぼ 100% であった。添加尿も低濃度のためか両年度とも 90～110% を外れてい

表 2 2,5-ヘキサンジオン測定に関する諸条件

測定機関			A	B	C	D
前処理	試料量 (mL)		2.5	1.5	2 (5)	5
	希釈液と倍率		なし	なし		なし
	水解	試薬名	塩酸	塩酸	塩酸	塩酸
		試薬量 (mL)	0.25	0.15	0.1 (0.25)	0.5
		反応条件	100℃ 30min	100℃ 30min	100℃ 30min	100℃ 30min
	抽出	試薬名	ジクロロメタン	ジクロロメタン	ジクロロメタン	ジクロロメタン
		試薬量 (mL)	1	0.75	1 (2)	2
内部標準物質		3-メチルシクロヘキサノン (シクロヘキサノン)	シクロヘキサノン	シクロヘキサノン	シクロヘキサノン	
検出器	検出器		GC-FID	GC-FID	GC-FID	GC-FID
	検出器温度 (℃)		250	250 (260)	260	250
測定条件	キャリアガス種類		He	He	He	He
	試料注入量 (μL)		2	2	2	2
	スプリット/スプリットレス		スプリットレス	スプリットレス	スプリットレス	スプリットレス
	注入口温度 (℃)		200	200	250	225
	カラムメーカー		Agilent	Agilent	J&W	Restek (Supelco)
	カラム名		HP-1	DB-1701	DB-1	Rtx-20 (SPB-20)
	カラムサイズ		30m×0.32mm	60m×0.32mm	30m×0.25mm	30m×0.32mm (30m×0.53mm)
	膜厚 (μm)		0.25	1	1	1
定量	2.5-ヘキサンジオン(分)		6.4 (7.5)	19.1	10.9 (10.7)	9.4 (8.2)
	内部標準 (分)		7.1 (8.4)	15.7	10.3 (10.0)	8.6 (6.3)
	計算方法		内部標準法	内部標準法	内部標準法	内部標準法
	定量下限値 (mg/L)		0.1	0.1	0.1	0.2
	試薬純度補正		あり (98%)	あり (97%)	あり (95%)	なし (95%)
測定機関			E	F	G	H
前処理	試料量 (mL)		0.5	1	1	1
	希釈液と倍率		水, 1~10	水, 1~2	水, 1~2 (2)	なし
	水解	試薬名	塩酸	塩酸	塩酸	塩酸
		試薬量 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
		反応条件	100℃ 30min	100℃ 30min	100℃ 30min	100℃ 30min
	抽出	試薬名	エタノール	ジクロロメタン	ジクロロメタン	ジクロロメタン
		試薬量 (mL)	2	2	1	0.5
内部標準物質		キノリン	3-メチルシクロヘキサノン	3-メチルシクロペンタノン	シクロヘキサノン	
検出器	検出器		GC-MS	GC-MS	GC-FID	GC-FID
	検出器温度 (℃)		250	280	250	250
測定条件	キャリアガス種類		He	He	He	He
	試料注入量 (μL)		1	2	2	1
	スプリット/スプリットレス		スプリットレス	30 : 1	スプリットレス	10 : 1
	注入口温度 (℃)		150	220	200	200
	カラムメーカー		Alltech	Agilent	J&W	J&W
	カラム名		EC™-WAX	HP-5MS	DB-1701	ULTRA2
	カラムサイズ		30m×0.25mm	30m×0.25mm	30m×0.25mm	12.5m×0.2mm
	膜厚 (μm)		0.25	0.25	0.25	0.33
定量	2.5-ヘキサンジオン (分)		4.5	4.7	5.1	5.5
	内部標準 (分)		6.7	5.2	7.2	4.1
	計算方法		内部標準法	内部標準法	内部標準法	内部標準法
	定量下限値 (mg/L)		0.5	0.6	0.5	0.2
	試薬純度補正		なし (97%)	あり (97%)	なし (97%)	なし (97%)

平成 22 年度と 23 年度をまとめて表示。条件が異なる場合は、平成 22 年度を括弧内に表示

表 3-1 平成 22 年度 2,5-ヘキサジオン測定結果 (単位 : mg/L)

試料の種類		水溶液			添加尿			曝露者尿	
試料番号		①	②	③	①	②	③	①	②
調整濃度		0.59	4.72	18.88	0.9	3.7	6.3		
測定機関	A	0.4	4.3	19.2	0.7	3.6	5.8	3.3	4.3
	B	0.4	4.3	18.4	0.7	3.2	5.4	3.2	4.0
	C	0.5	4.3	18.6	0.9	3.5	5.9	3.5	4.1
	D	0.5	5.0	19.9	0.8	3.6	6.2	3.5	4.5
	E	0.6	4.8	18.9	0.8	3.4	5.4	3.5	3.9
	F	0.5	4.8	19.3	0.8	3.5	5.5	3.1	3.8
	G	0.5	5.0	20.2	0.9	3.7	5.8	3.8	4.7
	H	0.6	5.0	20.6	0.8	3.6	6.1	3.3	4.0
n		8	8	8	8	8	8	8	8
Mean		0.50	4.68	19.38	0.80	3.51	5.76	3.40	4.16
SD		0.078	0.337	0.782	0.076	0.156	0.307	0.220	0.311
CV (%)		15.5	7.2	4.0	9.4	4.4	5.3	6.5	7.5

表 3-2 平成 23 年度 2,5-ヘキサジオン測定結果 (単位 : mg/L)

試料の種類		水溶液			添加尿			曝露者尿	
試料番号		①	②	③	①	②	③	①	②
調整濃度		0.59	4.72	18.88	9.4	4.3	0.9		
測定機関	A	0.6	5.0	18.9	9.8	4.6	1.1	1.3	3.1
	B	0.6	4.8	19.7	10.5	4.5	1.0	1.3	3.2
	C	0.5	4.4	18.5	10.1	4.5	1.1	1.4	3.0
	D	0.6	5.0	19.5	10.0	4.7	1.1	1.3	3.2
	E	0.6	4.6	19.0	9.2	4.0	0.9	1.2	2.8
	F	0.5	4.4	18.9	9.6	4.1	0.9	0.9	2.5
	G	0.4	4.6	19.7	9.6	4.6	1.0	1.3	3.4
	H	0.7	5.1	19.7	9.8	4.4	1.1	1.4	3.2
n		8	8	8	8	8	8	8	8
Mean		0.56	4.73	19.24	9.82	4.43	1.03	1.26	3.05
SD		0.090	0.276	0.469	0.383	0.249	0.088	0.160	0.281
CV (%)		16.2	5.8	2.4	3.9	5.6	8.6	12.6	9.2

たが、23 年度の方が改善していた。

機器による測定法では、GC-FID 法が 6 機関、GC-MS 法が 2 機関で用いられていた。23 年度の測定報告値に純度補正を加えた数値を用いた両測定法による平均値を表 5 に一覧した。尿試料では GC-MS 法が低値を示したので、有意な相違があるか否かを順位相関検定 (Kruskal-Wallis test) により調べてみた。

ころ、表 5 に示すように標準水溶液では有意差が見られなかったが、高濃度曝露者尿および 2 種の添加尿で、2 法の数値に有意差が見られた。FID-GC による総 2,5-HD 測定においては、尿試料の加熱酸分解により生成される 2-アセチルフランが妨害物質になることが知られているため、2-アセチルフランと 2,5-HD を分離するために無極性のキャピラリーカラムの

表 4 試料調整濃度に対する平均回収率

試料の種類		水溶液			添加尿
試料番号		①	②	③	①または③
調整濃度		0.59	4.72	18.88	0.90
22 年度	平均値	0.50	4.68	19.38	0.80
	回収率 (%)	84.7	99.2	102.6	88.9
23 年度	平均値	0.56	4.73	19.24	1.03
	回収率 (%)	94.5	100.2	101.9	114.0

表 5 測定法による 2,5-HD 濃度の相違に関する順位相関検定 (Kruskal-Wallis test) 結果

試料の種類	水溶液			添加尿			曝露者尿	
	①	②	③	①	②	③	①	②
調整濃度	0.59	4.72	18.88	9.4	4.3	0.9		
GC-FID (mean)	0.56	4.73	18.97	9.78	4.48	1.05	1.32	3.11
GC-FID (SD)	0.10	0.23	0.45	0.44	0.10	0.05	0.08	0.11
GC-MS (mean)	0.55	4.45	18.65	9.25	4.00	0.90	1.05	2.60
GC-MS (SD)	0.07	0.07	0.35	0.49	0.14	0.00	0.21	0.14
Kruskal-Wallis value	0.030	1.844	1.412	1.012	4.541	4.308	3.620	4.098
p	0.864	0.175	0.235	0.314	0.033	0.038	0.057	0.043

使用が推奨されている³⁾。今回対象となった 7 機関は、無～低 / 中極性のキャピラリーカラムを使用しており、数値も GC-MS 法よりやや高い程度だったので、この妨害物質による影響はないと考えられる。2 機関が採用している GC-MS 法における 2,5-HD 保持時間は 5 分以内と GC-FID 法の平均 10 分と比較すると有意に短く ($p=0.046$)、カラムも極性カラムを用いているが、GC-MS 法は 2,5-HD の検出に質量数を用いているので、有機の炭素を検出する GC-FID 法よりもさらに特異性が高いと考えられる。それ故、今回の結果は、2-アセチルフラン以外に尿試料によっては微量ではあるが 2,5-HD と同じ保持時間を示す有機化合物が混在していることを示唆している。しかしながら、生物学的モニタリングとしての分布区分の判定に必要な精度としては問題ないと考えられた。

4. まとめ

平成 22 及び 23 年度における 2,5-HD のクロスチェック結果をまとめた結果、試料の種類に関係なく、1 mg/L 以下の低濃度試料の測定値の機関差は、10%を超えていたが、分布区分 2 および 3 においては 5%程度に収束していたことから、分布区分の判定において、機関差による影響がないと考えられた。

〈参考文献〉

- 1) 日本産衛学会許容濃度委員会, 生物学的許容値の提案理由, ヘキサン, 産業医学 36 : 286-288, 1994
 - 2) DFG, Hexane metabolites (2,5-Hexanedione, 2-Hexanone), In: Angerer J (ed) : Essential Biomonitoring Methods from the MAK-collection for Occupational Health and Safety, p.309-326, Wiley-VCH, Weinheim, 2006
 - 3) ACGIH, n-Hexane BEI, In TLVs and BEIs with 7th edition Documentation, CD-ROM, ACGIH, Cincinnati, 2011
- ※ 労働衛生検査精度向上研究会会員：佐賀大学医学部 市場正良, (公財)神奈川県予防医学協会 石渡 和男, (株)近畿エコサイエンス 廣瀬隆穂, 中央労働災害防止協会・労働衛生調査分析センター 山内 恒幸, 関西労災病院・産業中毒研究センター 圓藤 陽子, パナソニック産業衛生科学センター 城山 康, (株)エスアールエル 森 浩司, 金村 茂, 濱野和可子, (株)江東微生物研究所 天野 有康, 中村正, (株)ビー・エム・エル 木戸誠二郎, (株)保健科学研究所 関 顯, 杉山 浩貴, 三菱化学メディエンス(株) 竹嶋 淳, 錦織 千賀, 全衛連事務局 國吉 克正