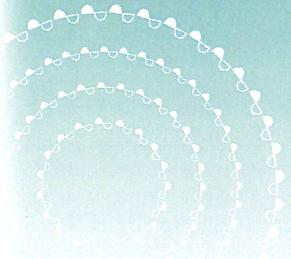


尿中 N-メチルホルムアミド及び尿中 N-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について



労働衛生検査精度向上研究会

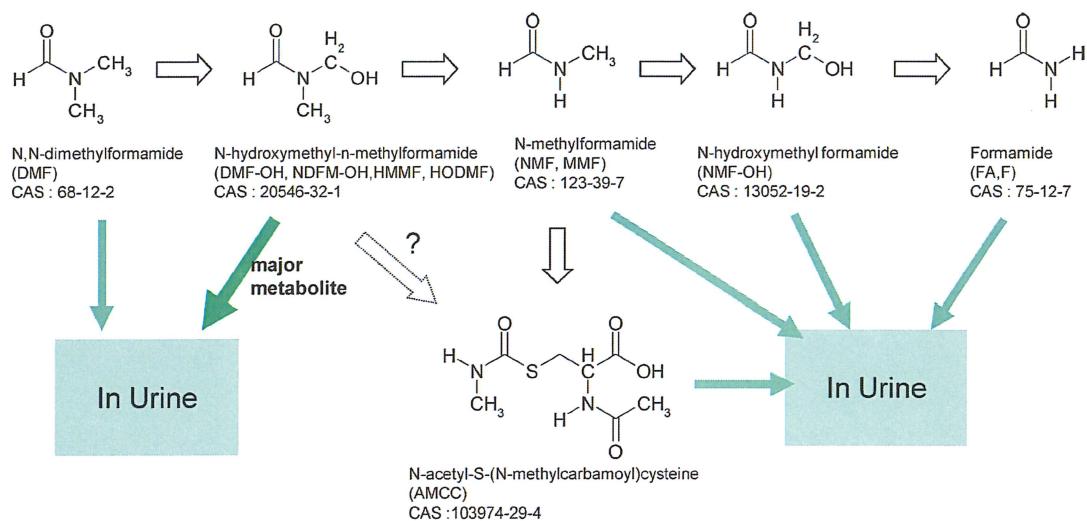
山本 忍 市場 正良 佐賀大学医学部
天野 有康 中村 正 (株)江東微生物研究所

1. はじめに

労働衛生検査精度向上研究会では、特殊健康診断項目の精度向上および測定法の標準化等を目的として活動を続けている。分析の信頼性を確保・維持するため、各機関では精度管理が日常的に行われている。施設内部での精度管理は、一般に管理用試料や標準物質を利用して実施される。一方、他機関との分析値の整合性を確認する、あるいは外部に対して分析値を保証するためのいわゆる外部精度管理においては、技能試験又は施設間精度管理に参加するのが通常である。今回、全国労働衛生団体連合会（全衛連）が実施する労働衛生検査精度管理調査の対象項目となっていない、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）の尿中代謝物である N-メチルホルムアミド（NMF）について、施設間差の確認のために平成 23 年度に実施したクロスチェックの結果について報告する。また、DMF に類似した物質として今後ばく露評価を考えるべき N,N-ジメチルアセトアミド（DMAC）の尿中代謝物である N-メチルアセトアミド（NMAC）について、精度管理の予

備的検討と会員機関の検査受託状況調査を実施したので報告する。

N,N-ジメチルホルムアミド（DMF, CAS 番号 : 68-12-2, 分子量 : 73.09, 沸点 153°C, 比重 0.95）は、わずかにアミン臭のある無色透明の液体で水に可溶な有機溶媒である。人工皮革またはウレタン系合成皮革、スパンデックス纖維、有機合成用の溶媒等として使用されており、日本における生産量は 2005 年で推定 50,000t とされる¹⁾。DMF の職業性ばく露による影響は高濃度では急性中毒を起こし、低濃度の長期ばく露によって胃・肝・腎の障害を起こす²⁾。また、ヒトにおける発がん性は分類できていない。DMF の許容濃度は、日本産業衛生学会が 10ppm (30mg/m³) (皮) を勧告しており²⁾、作業環境測定における管理濃度は 10ppm とされている。諸外国の勧告値は、米国の ACGIH が 10ppm (30mg/m³) (skin)³⁾、英国の Health and Safety Executive (HSE) が Work Place Exposure Limit (WEL) として 5ppm (15mg/m³)⁴⁾ である。DMF は主に体内で、N-ヒドロキシメチル-N-メチルホルムアミド (DMF-OH), NMF を経て



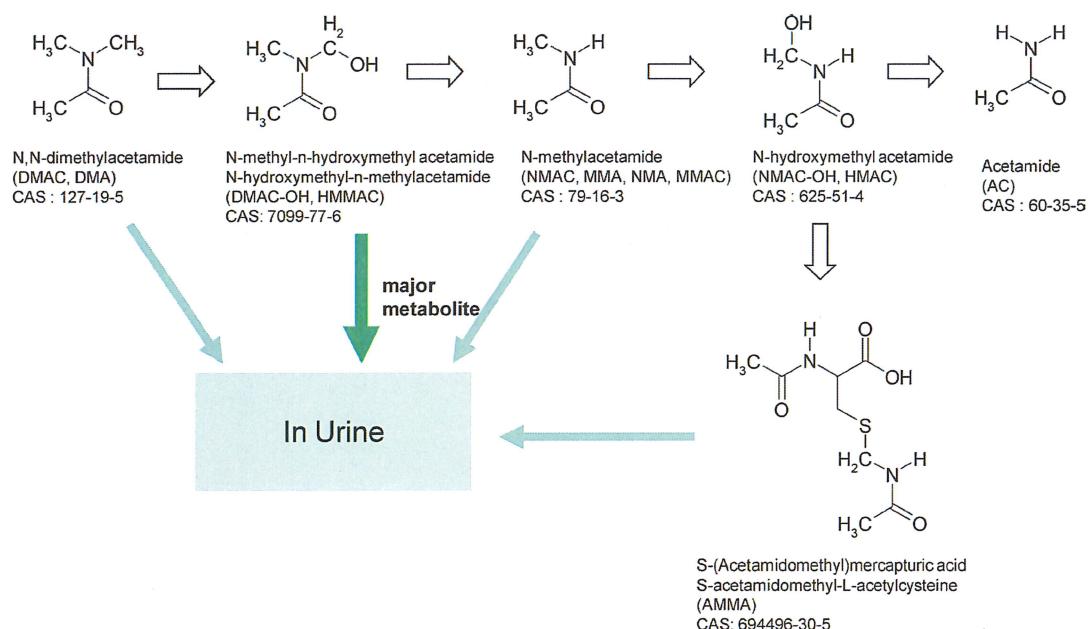
ACGIH Documentation-BEIs 2001

図1 N,N-ジメチルホルムアミド代謝経路

N-アセチル-S- (N-メチルカルバモイル) システイン (AMCC), N-ヒドロキシメチルホルムアミド (NMF-OH), ホルムアミドに代謝され (図1), 主に DMF-OH と NMF として尿に排泄される⁵⁾。皮膚吸収もあることから, 作業者の正確なばく露量を知るために生物学的モニタリングによるばく露評価が重要となる。生物学的許容値 Biological Exposure Indices (BEI) は, 日本においては勧告されていないが, 有機溶剤中毒予防規則では, 分布 1, 2, 3 の区分として, 尿中 NMF 10mg/L, 40mg/L が使用される。ACGIH は尿中 NMF を作業終了後に 15mg/L の他に週末のシフト後で AMCC 40mg/L を勧告している⁵⁾。

N,N-ジメチルアセトアミド (DMAC, CAS 番号 : 127-19-5, 分子量 : 87.1, 沸点 165°C, 比重 0.94) は, 刺激性のある無色の液体で水によく混和する。アルキルアミド類の一つで, 繊維, 樹脂の溶剤, 医薬品, 写真薬などの各種反応溶剤として使用されており¹⁾, 日本における製造・輸入量は 2008 年

において 10,000~100,000t である⁶⁾。DMF と構造が類似し, DMF と同様の用途で使用されている。毒性も DMF と比較し低いとされているため, 使用量が増加しており, 国における化学物質のリスク評価推進事業で調査対象物質に挙げられている。DMAC の職業性ばく露による影響は, ウレタン繊維工場で DMAC 取り扱い作業者における急性肝炎が報告され, 皮膚からも吸収される⁷⁾。ヒトにおける発がん性は分類できていない。許容濃度は, 日本産業衛生学会が 10ppm (36mg/m³) (皮) を勧告しており⁷⁾, 米国の ACGIH は 10ppm (36mg/m³) (skin)³⁾, 英国の大気汚染指針 (WEL) として 10ppm (36mg/m³)⁴⁾ を勧告している。DMAC は主に体内で, N-ヒドロキシメチル-N-メチルアセトアミド (DMAC-OH), NMAC, N-ヒドロキシメチルアセトアミド (NMAC-OH) を経て S-アセトアミドメチル-L-アセチルシステイン (AMMC), アセトアミドに代謝され (図2), DMAC ばく露者尿中には DMAC-OH と



ACGIH Documentation-BEIs 2011

図2 N,N-ジメチルアセトアミド代謝経路

NMACが多く排泄されると言われている⁸⁾。 DMAcはDMFと同様に皮膚吸収があることから、作業者の正確なばく露量を知るために生物学的モニタリングによるばく露評価が重要となる。生物学的許容値は、日本においては勧告されておらず、ACGIHが尿中NMACとして週末の作業終了後で30mg/g creatinine⁸⁾、HSEが尿中NMACとしてシフト後で100mmol/mol creatinine⁴⁾を勧告している。

50mg/Lに調製した標準水溶液3濃度、ばく露尿4濃度、非ばく露尿に標準水溶液を添加し5, 20, 50mg/Lに調製した（添加尿）3濃度を用いた。NMACにおいては、ばく露尿2濃度を用いた。各試料はプラスチックチューブに分注後、凍結状態で各機関に郵送にて配布した。

各尿中代謝物の測定方法は各施設の通常の方法で実施した。各施設の分析条件を表1に示した。また、それぞれの前処理のフローチャートを図3に示した。今回参加した施設で、5施設がGC-高感度窒素リン検出器(NPD)法、3施設がGC-質量分析(MS)法であり、いずれの施設もNMAC、NMFともに同じ分析条件を用い、使用カラムは極性カラム、定量には内部標準法を採用していた。また、炭酸カリウム処理は、5施設で行われ、注入口温度は、150°Cから、280°Cであった。150°Cの2施設では、炭酸カリウム処理を行っていた。

2. 試料および方法

(1) クロスチェック

今回実施したクロスチェックに参加した機関の数は尿中NMF8施設、尿中NMAC6施設である。また、結果の取りまとめは佐賀大学で行なった。

試料の調製は、株式会社江東微生物研究所が実施し、試料は、NMFにおいては5, 20,

表1 前処理及び測定分析条件

		施設	A	B	C	D
前処理	炭酸カリウム処理(有/無)	0.5—1.0g/sample	無	0.5g/mL	0.2g/mL	
	試料量(μL)	500	100	500	500	
	希釈溶媒	エタノール	イソプロピルアルコール	エタノール	エタノール	
	溶媒量(μL)	4500	1400	5000	2000	
	内部標準物質名	N,N-ジエチルホルムアミド	アニリン	キノリン	キノリン	
分析方法	GC-NPD	GC-NPD	GC-NPD	GC-MS	GC-NPD	
測定条件	カラム(スペック)	Quadrex Methyl Silicone(0.32mm ×50m, 1 μm)	DB-WAXETR (0.32mm×60m, 0.25 μm)	DB-WAX(0.25mm ×60m, 0.25 μm)	EC-WAX(0.25mm ×30m, 0.25 μm)	
	注入口温度(℃)	280	240	250	150	
	検出器温度(℃)	300	325	250	250	
	カラム温度	50°C(1min)-12°C/min-210°C(10min)	70°C(1min)-8°C/min-200°C(8min)	100°C(5min)-10°C/min-7.5°C/min-200°C(2min)	45°C(0min)-30°C/min-250°C(4.5min)	
	注入法	スプリット	スプリットレス	スプリット	スプリットレス	
	試料注入量(μL)	2	2	2	1	
	キャリアーガス	He(1.99ml/min)	He(1.7ml/min)	He(1.83ml/min)	He(2.0ml/min)	
定量	I.S	IR.Time(min)	13.75	18.3	20.68	7.5
	NMF	R.Time(min)	10.24	16.3	13.47	6.0
		定量下限(mg/L)	1	1.0	1.0	0.5
	NMA C	R.Time(min)	11.39	—	13.37	5.9
		定量下限(mg/L)	1	—	0.5	0.5
		施設	E	F	G	H
前処理	炭酸カリウム処理(有/無)	0.5g/mL	0.5—1.0g/sample	無	無	
	試料量(μL)	1000	500	500	300	
	希釈溶媒	エタノール	エタノール	1,4-ジオキサン	メタノール	
	溶媒量(μL)	2000	2000	1000	2700	
	内部標準物質名	キノリン	キノリン	N,N-ジエチルホルムアミド	N,N-ジエチルアセトアミド	
分析方法	GC-NPD	GC-MS	GC-NPD	GC-MS		
測定条件	カラム(スペック)	DB-WAX(0.25mm ×30m, 0.5 μm)	DB-WAX(0.25mm ×30m, 0.25 μm)	007-CW-25V (0.53mm×25m, 3 μm)	HP-INNOWAX (0.25mm×30m, 0.25 μm)	
	注入口温度(℃)	240	150	280	250	
	検出器温度(℃)	250	200	290	240	
	カラム温度	150°C(0min)-5°C/min-200°C(0min)	50°C(0min)-25°C/min-30°C/min-230°C(3min)	130°C(1min)-10°C/min-170°C(0min)	40°C(1min)-10°C/min-200°C(0min)	
	注入法	スプリット(11:1)	スプリット	スプリット	スプリット(10:1)	
	試料注入量(μL)	1	1	1	1	
	キャリアーガス	He(1.3ml/min)	He(41ml/min)	He(15ml/min)	He(1.0ml/min)	
定量	I.S	IR.Time(min)	10.80	8.1	2.5	11.35
	NMF	R.Time(min)	5.91	6.9	4.2	13.58
		定量下限(mg/L)	0.5	0.5	0.5以下	0.5
	NMA C	R.Time(min)	5.7	—	4.1	13.47
		定量下限(mg/L)	0.5以下	—	0.5以下	0.5

(2) 測定値に影響をあたえる要因の検討

① 検量線

尿及び精製水それぞれ 180 µl に、0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml に調製した NMF, NMAC 混合水溶液を 20 µl 添加し、内標準物質 (N,N-ジエチルアセトアミド) を含有 (4.5 µg/ml) した 1.8 ml のメタノールで希釈した後、遠心 (3,000 rpm, 5 min) 後上澄みを GC/MS 分析を行い、それぞれのピーク面積比を比較した。測定分析条件は佐賀大学の条件を用いた。尿は非ばく露者尿を用いた。

② NMAC における GC 注入口温度の影響

精製水で 100 µg/ml に調製した、DMAC-OH および NMAC 100 µl をそれぞれ内標準物質 (N,N-ジエチルアセトアミド) を含有 (4.5 µg/ml) した 0.9 ml のメタノールで希釈したサンプルを GC の注入口温度を 150 – 275 °C に変化させ分析した。NMAC のピーク面積比から DMAC-OH から NMAC に変化した量を定量し、その変化率を求めた。測定分析

条件は佐賀大学の条件を用いた。

(3) NMAC 受託状況

会員機関の NMAC 測定の年間受託件数と濃度レベルの報告を依頼した。また、DMAC は DMF の混合物として使用されている可能性がある。したがって、尿中 NMF 測定のクロマトグラムに NMAC のピークが含まれているかどうか、NMAC のピークが認められる検体数の割合の調査を依頼した。

3. 結果および考察

(1) クロスチェック結果

各試料の施設別集計結果を表2に示した。変動係数 (CV) は NMF において、ばく露尿と水溶液の低濃度試料でそれぞれ 13.2, 19.1% と 10% を超え、それ以外の試料はばく露尿 5.5 – 8.5%, 添加尿 5.1 – 7.5%, 5.0 – 9.0% であった。NMAC においては、低濃度試料で 24.4%，高濃度試料で 7.1%

表2 クロスチェック結果

施設	N-メチルホルムアミド (尿中 NMF)										N-メチルアセトアミド (尿中 NMAC)	
	ばく露尿				添加尿			水溶液			ばく露尿	
	試料①	試料②	試料③	試料④	試料①	試料②	試料③	試料①	試料②	試料③	試料①	試料②
A	7.3	16.5	19.3	31.3	6.4	20.7	48.3	3.9	18.2	47.0	12.7	40.6
B	6.4	17.5	22.7	33.3	6.1	22.8	52.6	3.2	16.0	43.0		
C	5.4	15.3	20.1	28.4	5.6	19.8	50.6	5.1	19.3	49.2	12.3	37.7
D	5.0	14.7	19.4	28.5	5.3	19.6	49.1	5.1	21.5	49.8	10.0	35.8
E	5.7	15.5	20.5	30.2	5.7	21.2	52.1	5.6	20.0	48.9	10.9	37.8
F	5.9	16.7	22.4	31.9	6.3	22.7	54.0	6.0	21.3	50.6		
G	5.7	18.8	24.3	31.4	6.6	22.8	52.7	5.4	19.5	48.3	18.1	43.0
H	5.0	15.3	20.4	29.9	5.8	23.7	56.6	5.6	19.8	46.8	10.2	36.5
Mean ± SD	5.8 ± 0.8	16.3 ± 1.4	21.1 ± 1.8	30.6 ± 1.7	6.0 ± 0.4	21.7 ± 1.5	52.0 ± 2.7	5.0 ± 1.0	19.5 ± 1.8	48.0 ± 2.4	12.4 ± 3.0	38.6 ± 2.7
RSD (%)	13.2	8.4	8.5	5.5	7.5	7.1	5.1	19.1	9.0	5.0	24.4	7.1

であった。

今回のクロスチェックでは低濃度のサンプルにおいてバラつきが大きくなる傾向があり、前年度においても同様の傾向は見られたが CV10% を超える試料はなかった。前年度から前処理、分析条件を大きく変更した施設はなかったことから、日常の測定分析において高濃度試料では比較的精度よく測定分析できているものの、低濃度試料では何かしらの要因により測定値に影響を与える可能性が示唆された。

NMF と NMAC のリテンションタイムは各機関近接していた。今回のクロスチェックは、NMF、NMAC それぞれ単独の溶液を用いたが、次回は混合液を使用しピークの近接による

誤差がないかを検討する。

(2) 測定値への影響要因

尿試料の測定の際、検量線に水試料を用いる時はマトリックスの影響がないことを事前に確認する必要がある。したがって、尿マトリックスによる検量線と水（精製水）マトリックスの検量線の違いを比較した。結果を図3に示す。NMF の傾き 0.99、NMAC の傾き 1.00 と良好な値となり、尿と水のマトリックスの違いによる影響はないと考えられた。しかしながら低濃度でのバラつきが大きく、測定値に影響を及ぼす可能性が示唆された。

DMF-OH および DMAC-OH の挙動は十分

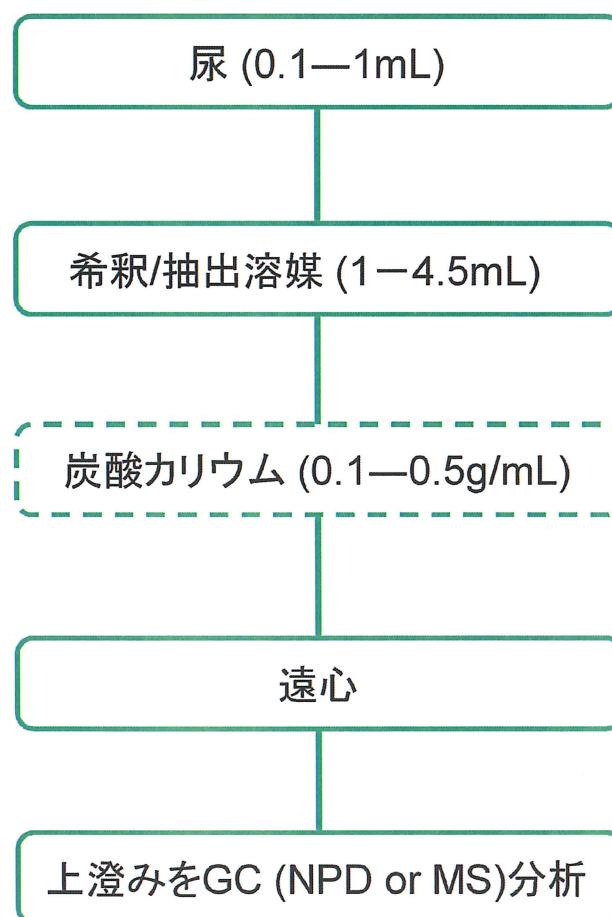


図3 前処理フローチャート

に確認されていないが、注入口の熱によって代謝物である DMF-OH, DMAC-OH が熱分解し NMF, NMAC に変化していると考えられている。注入口温度に関する検討では、河合ら⁹⁾が DMAC と DMF にばく露された作業者の尿の測定において、GC 注入口の温度を 150 – 300°C に変化させ、NMF, NMAC を定量しているが、それぞれ最大で約 50%, 10% 程度の誤差を生じている。しかしながら、ACGIH の BEI が示す NMAC 濃度は注入口温度 150°C の測定分析法から算出された値である^{8, 10)}。今回我々が行った注入口温度による DMAC-OH から NMAC への変化率を図 4 に示す。DMAC の代謝物である DMAC-OH

を合成し、その 5% 水溶液を用いて河合らと同様の実験をおこなった。その結果、注入口温度 175°C でプラトーとなった。河合らは 225°C でプラトーとなっていることからマトリックスによる違いは見られたもののほぼ一致した傾向であった。したがって、注入口温度 150°C では未変化体の DAMC-OH も含まれることから測定値に影響を及ぼすことが示唆された。

また、NMF および NMAC はアミノ基を持つため、GC 注入口やライナーに吸着しキャリーオーバーによる感度低下や希釈による前処理ではサンプル中の水分量が多くカラムダメージがある等、ルーチン分析においても問題点が

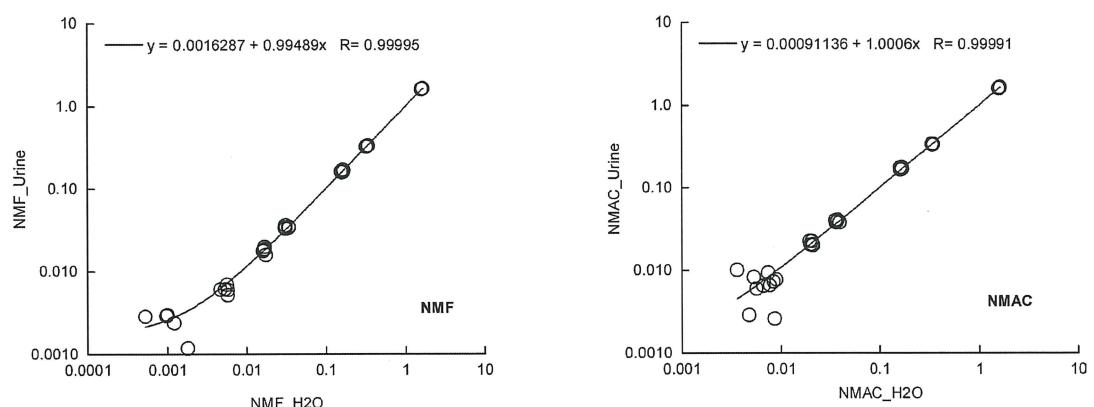


図4 検量線マトリックスの比較

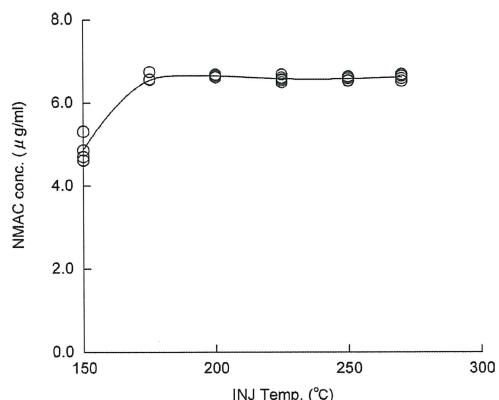


図5 GC 注入口温度の影響

多い。したがって、これらの諸問題を精査し測定分析を行うことも必要である。

(3) NMAC 検査受託状況

有機溶剤健診として会員施設のうち3施設で受託があり、年間受託件数は1,279件であった。そのうち、30mg/L以上を示す検体数は、7%程度であった。

DMF の DMAC 混合に関しては、MMF 検体数の0.8%とわずかではあるがNMFのサンプルにNMAC ピークが確認されたサンプルもあった。

4. まとめ

クロスチェック、検量線および注入口温度の影響の結果から低濃度でのバラつきが測定精度に影響を及ぼすことが示唆された。今回は2つの項目についてのみの確認となつたが、キャリーオーバーの影響や前処理における炭酸カリウムの有無など種々の要因が絡んでおり、明確な原因を突き止めることはできていない。したがつて、これらの問題を1つずつ丁寧に解決していく必要があると言える。

〈参考文献〉

- 1) 化学工業日報：2011年度版 15911の化学商品：518-519, 2011
- 2) 日本産業衛生学会：許容濃度提案理由書集、123-124,
- 3) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. (ACGIH) : 2003 Guide to Occupational Exposure Values, 48, 2011
- 4) Health and Safety Executive (HSE) : EH40/2005 List of approved workplace exposure limits, 2011 (http://www.hseni.gov.uk/eh40_2005.pdf#search='List of approved workplace exposure limits 2011')

http://www.hseni.gov.uk/eh40_2005.pdf#search='List of approved workplace exposure limits 2011'

- 5) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. (ACGIH) :N,N-dimethylformamide (DMF) Recommended BEI, 2011
 - 6) 経済産業省：化学物質の製造・輸入量に関する実態調査（平成19年度実績）結果概要報告（確報）、2009 (<http://www.meti.go.jp/statistics/sei/kagaku/result-2/h19kakuhoh.html>)
 - 7) 日本産業衛生学会：許容濃度提案理由書集、118-119,
 - 8) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. (ACGIH) :N,N-dimethylacetamide (DMAC) Recommended BEI, 2011
 - 9) T Kawai et al.: Separate determination by gas-chromatography of Dimethylformamide, Dimethylacetamide, Monomethylformamide and Monomethylacetamide in urine for biological monitoring, J Occup Health: 39:113-118, 1997
 - 10) J.R.Barnes and N.W.Henry: The determination of N-methylformamide and N-methylacetamide in urine, AIHA journal: 84-87, 1974
- ※ 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, (財)神奈川県予防医学協会 石渡 和男, (財)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)エスアルエルエス 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, 三菱化学生メディエンス(株)竹嶋 淳, 錦織 千賀, 全衛連事務局 國吉 克正