

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 MAR./APR. 1990
VOL.33 NO.2

U.D.C. 543. 4/5 : 613. 632

目 次

労働衛生と分析化学

巻 頭 言

産業保健と分析化学 ……緒方正名- 1

報 文

有機スズの分析法について ……
……………森田昌敏- 7トルエン、キシレンおよびスチレ
ンの尿中代謝産物の測定—HPLC
による尿中代謝産物の定量—
……………緒方正名 田口豊郁-11尿中デルタアミノレブリン酸の分析
……………菅原悦子 友国勝磨-17全血中のプロトポルフィリン量の測
定法について ……
……………坂上佳司 原田 章-21還元気化濃縮黒鉛原子吸光光度計
の開発と生体試料への応用
……………道辻広美
大原昭男 山口恭平 藤木幸雄-24

トピックス

R-1900形日立FT-NMR装置 ……-10
ICP発光分析用分析線選択支援シ
ステム (P-5200用) を発売 ……-28
日立理化学機器データ集“分光螢
光”を発刊 ……-20
第9回表面科学講演大会開催さ
る ……-6
第10回記念 液体クロマトグラフィー
討論会 国際大会 (CIS'89) 開催さ
る ……-10
第39回日本臨床衛生検査学会 開
催のお知らせ ……-6

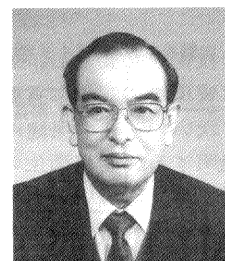
労働衛生と分析化学

巻 頭 言

産業保健と分析化学

Industrial Health and Analytical Chemistry

緒方 正名*



従来、産業保健では作業環境中の有害化学物質の定量に分析化学の手法が用いられてきた。近年さらに有害化学物質を取り扱う作業者について、生体試料である呼気・血液・尿の中に含まれる有害化学物質や尿中代謝産物を定量して、その成績から環境とともに健康影響の評価を行う方法が発達してきた。この手法は「生物学的モニタリング」¹⁾と呼ばれるようになった。一般に「モニタリング」とはある指標物質を継続的に測定し、その成績から対象の評価を行うことを言う。そして、我が国では地域の環境保健の領域で「生物試料における環境モニタリング」が広く行われてきた現状から、読者の方々のご理解のためにこの方面から「モニタリング」の説明を述べることにする。

地域環境における環境モニタリングとは、一般に環境中の大気汚染や水質汚濁に関係した化学物質を測定し、環境汚染の程度を評価することである。大気汚染の測定では、注目する地域を代表すると考えられる場所に、測定局を設けて測定定点とする。そして、定点において、一定の時間間隔ごとに大気中の汚染物質の濃度を測定する。その測定値に基づいて、固定発生源及び移動発生源から排出される大気汚染物質の拡散状態を知るとともに、人に対する影響を評価しその対策を立てる。また二酸化窒素については個人の暴露量に注目して、個人個人にバッジ方式のモニターを付けて暴露状態を知る測定方法も用いられている。一方、水質汚染では河川、海域等の水域の測定には、定点を定めて定期的に採水して、有害物質あるいは汚染指標の測定を行う。

次いで「生物試料による環境モニタリング」とは、大気汚染においては、作物の採集場所等を定めて、かつ植物に与える影響を調査する「影響モニタリング」の例もある。また、水質汚濁では、魚貝類（魚：遠海魚、近海魚、貝：ムラサキガイ）に含まれる有害物質の分析を行って、これらの生物に、濃縮され蓄積された状態の汚染物質の含有量を測定する「有害化学物質の量モニタリング」の例がある（表1、図1）。これらは、いずれも環境測定の補助手段として有効に用いられている。

これらの大気汚染、水質汚濁の測定や生物試料によるモニタリングには高度の分

* 岡山大学 医学部・公衆衛生学教室、教授、医博

表1 生物試料による環境モニタリング（魚貝類の例）

生物種	生物種の特長など	試料採取地域	調査目的
サケ（シロザケ） (<i>Oncorhynchus</i>)	1. 北海道、カムチャッカ、北米に分布 2. 淡水域で孵化し北洋域で成長、産卵のために再び淡水に帰る。	北海道釧路沖	地球的な規模での汚染レベルの把握
サンマ (<i>Cololabis saira</i>)	1. 北部太平洋に広く分布 2. 日本列島周辺を回避し、千島(秋)、九州沖(冬)に至る。	太平洋（常盤沖）	日本列島周辺の汚染レベルの把握
ムラサキガイ (<i>mytilus edulis</i>)	1. 熱帯を除き、世界的に分布 2. 内湾岩礁、橋脚などに付着	(汚染レベルの異なる3地域で調査を実施) 1. 神奈川県三浦半島 2. 岩手県山田湾内 3. 石川県能登半島	特定地域の汚染レベルの把握

出典：環境庁環境保健部保健調査室編（化学物質と環境，1985から抜粋）

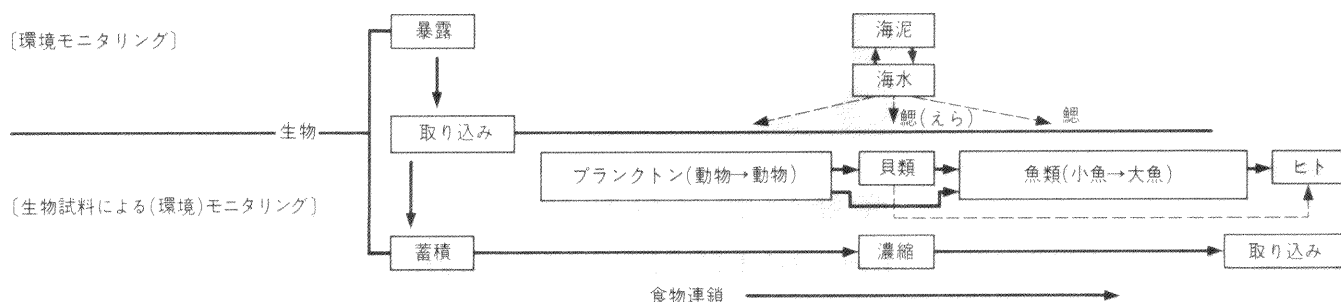


図1 生物試料による環境モニタリング（海域の例）

析技術を必要とし、またこれらの分析技術の発展が大気、水質環境の評価に貢献していることは言うまでもない。

次いで「産業保健における環境モニタリング」²⁾について説明する。産業衛生の分野、特に有害物質を取り扱う作業場では、環境中の有害物質としての重金属や有機溶剤の大気中濃度を、作業場を等間隔のメッシュに切ってその交点で測定して、結果を評価することを“area monitoring”すなわち「場のモニタリング」と呼び、これによる「作業環境管理」が行われてきた。この方法では、作業場の定点から採集された試料について、重金属濃度の測定に原子吸光分析法が、また有機溶剤濃度のそれについてはガスクロマトグラフ分析法が用いられてきた。

一方、汚染物質の濃度は、時間的にもまた位置的にも差異があるので、米国等においては作業者個人個人にサンプラーを取り付けて、個人の暴露量そのものを測定し評価する“personal monitoring”すなわち個人のモニタリングが行われるようになってきている。粉じん暴露量の評価のための個人サンプラー、有機溶剤暴露量の評価のための活性炭バッジを、作業者の呼吸域に装着（図2を参照）して吸着された有機溶剤を二硫化炭素で脱着し、ガスクロマトグラフ法で定量する。その成績から個人の暴露量を推定しようとするものである。米国では作業者が多数の場合には、個人サンプラーを、同じような作業をしている数人のうち代表となる人に装着して測定し評価する方法が用いられている。有害化学物質が生体に吸収された後の運命は図3に記している。有害化学物質は作業者の肺や皮膚（時に消化管）を通して吸収される。そのうち作業環境中の重金属は、主に経気道から肺に吸収されて体内に侵入し、血液を経て臓器に蓄積される。重金属は蓄積されやすく生物学的半減期は長い。そして尿や糞便から排泄される。したがって、血

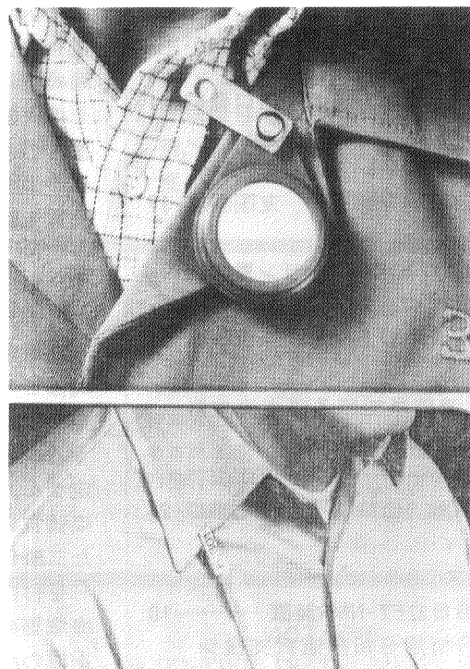


図2 活性炭バッジ上図（3M#3500），
下図（プロテック G-AA）

液次いで尿中の重金属の測定が重要視される。また有機溶剤は肺で吸収されるほかに、それが脂溶性であるので、皮膚からも吸収される。その量は平均的には肺による吸収量の約1割と言われる。そして血液を経て臓器に蓄積する。また溶剤は揮発性であるので、呼気中には溶剤のまま排泄される。また、溶剤のその多くの成分は尿中に代謝産物として排泄される。また微量の溶剤が尿中に排泄されること

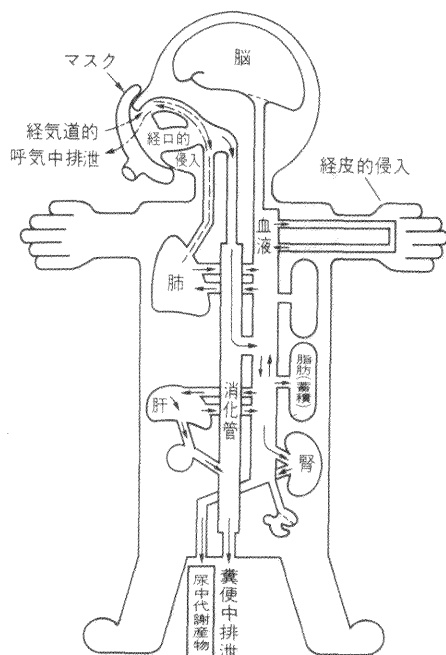
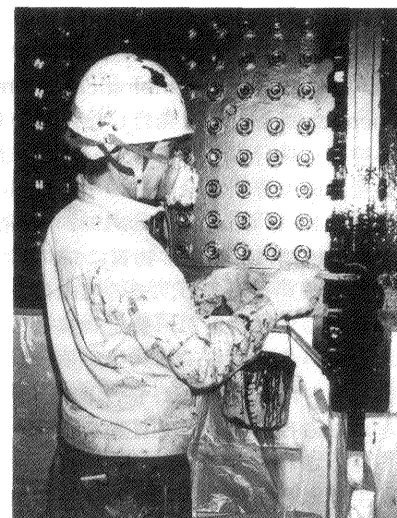


図3 作業者の有機溶剤の吸収と排泄



(a) モーターボートの船体に強化プラスチック塗装作業（スチレンモノマーとガラス繊維を同時に船体に吹き付ける作業）
作業者は防毒マスクをし、保護手袋を着用している。



(b) 本州四国架橋 ケイソン中の塗装作業
作業者は防毒マスクを使用し、軍手を着用している。

図4 有機溶剤職場の実例

もある。呼気、血液中の溶剤、微量の尿中溶剤は主として暴露の確認に用いられる。また、尿中代謝産物の濃度は溶剤の気中濃度とよい相関にあるので、溶剤の暴露量の推定に用いられる。

「生物学的モニタリング」すなわち作業者の生体試料を用いる測定と評価が、環境モニタリングに加えて近年用いられるようになったが、その必要性を述べることとする。まず、作業者が摂取した有害物質の量を測定することにより、作業者の暴露を評価する手法「量モニタリング」が、用いられるようになった。それは、同じ化学物質の中で作業する場合でも、作業条件の差によっては、作業者の有害化学物質の吸収量に差異を生ずることがある。すなわち、(1)皮膚からの吸収量、(2)防毒マスクを利用した際のマスク漏れによる吸収量、(3)運動負荷量の増加に従って呼吸量の増加があり、これによる吸収量の増加、さらに、(4)作業時間の延長や短縮による吸収量の変化等は、気中濃度の測定だけでは推定し、評価することは困難である。さらに、重要なことは、作業者の有害化学物質の吸収量は、それによる人体障害と直接関係を持つ産業保健上重要な因子だからである。

例えば、強化繊維プラスチック取り扱い作業（FRP取り扱い職場）の例〔図4(a)〕および本州四国架橋ケイソン内の有機溶剤職場の例〔図4(b)〕を写真で示すこととする。いずれも作業者は、防毒マスクを使用している。したがって、経気道による吸収量の把握は困難である。また皮膚からの吸収についても、その保護のために手袋を着用しているが、有機溶剤の気中濃度の測定だけでは真の吸収量の測定が困難である。近年、このように作業環境中の化学物質の大気濃度と、作業者の吸収量との間に多くの相違のあることから、生体内の有害化学物質の測定が特に重要視されるようになった。このため、前述のように重金属暴露の測

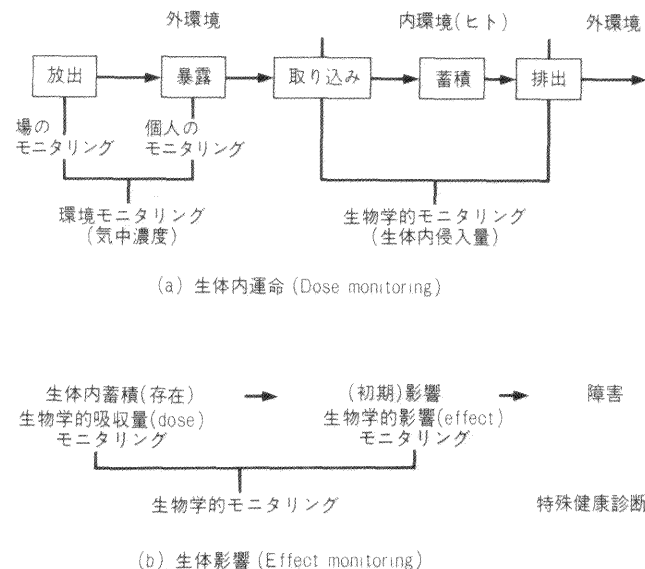


図5 工業化学物質の人の生物学的モニタリング

定の際には血液、尿中の重金属を測定し、また有機溶剤暴露の測定の際には血液、呼気中の有機溶剤や、尿中の微量の溶剤や溶剤の代謝産物量を測定して、生体内に摂取された有害化学物質を測定する方法が実用化されるようになった。このようにpharmaco-kineticsの見地から生体試料中の有害化学物質の量を測定して評価する方法を、biological dose monitoring「生物学的（吸収）量モニタリング」と呼んでいる。

有害化学物質が作業環境から作業者に吸収され、その後の運命及び生体に対する影響については図5(a)、(b)に模式

的に示している。生物学的モニタリングは比較的歴史の浅いものである。すなわち、1983年ヨーロッパ共同体委員会(CEC)は“Human biological monitoring of industrial chemicals series”を発行した。緒方による日本語訳は同文書院より発行されている³⁾。米国ではACGIH(米国政府関係産業衛生専門家会議)の中にBiological Exposure Indices (BEI) Committeeが1982年に発足し、1985年及び1986年に10種類の工業化学物質について具体的なBEI(生物学的暴露指標)を勧告し、その理由書を発行した。現在は決定物質として19物質が、暫定物質として7物質の指標が勧告されている。なお、1986年から1987年の暴露指標設定理由書の緒方による邦訳は、同文書院⁴⁾から発行されており、1987年から1989年の設定理由書の邦訳は、産業医学振興財団⁵⁾から発行されている。

生体試料中の有害化学物質等の測定方法の実施については、生体内の多くの有機物質の中に含まれる微量の有害化学物質について選択性に優れ、またよりよい精度で測定できる分析法が必要とされている。

重金属の原子吸光分析法では、有炎法、無炎法、さらにバックグラウンド補正のための透過光のゼーマン補正法というように改良されつつある機器の進歩は、この目的に適するように発達を遂げた。そして鉛、カドミウムの分析次いで、近年はクロムの分析のような比較的分析の困難な重金属を測定することが可能となってきた。

さらに、有機溶剤のガスクロマトグラフ法については、使用するカラムが、フューズドキャピラリー・カラムの開発・実用化により分離精度がよくなり、次いでワイドボア・カラムにより、注入量の増加を可能とした。またFIDを主体とした検出器の分野においても、各元素に比較的に特異的な検出器も進出してきた。例えば、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタンの尿中代謝産物であるトリクロロ酢酸や、トリクロロエタノールグルクロン酸抱合物の微量分析には、検出器としてハロゲン化合物に特異なECDを用いて、これらの物質の空間ガスクロマトグラフ法による測定が有効である。また、ジメチルホルムアミドの代謝産物であるN-メチルホルムアミドの測定には、窒素化合物の検出に精度の高いFTDの使用が勧められる。

また、高速液体クロマトグラフ法は、揮発しにくいある種の有機溶剤の尿中代謝産物の測定に広く用いられるようになってきた。トルエンの代謝産物である馬尿酸、キシレンの代謝産物であるメチル馬尿酸、さらに、スチレンの代謝産物であるマンデル酸、フェニルグリオキシル酸などは、従来はメチルエステル化処理により、ガスクロマトグラフで分析していた。近年は直接測定が可能で、そのために精度のよい定量法である高速液体クロマトグラフ法が代謝産物の分析に専ら用いられるようになった。高速液体クロマトグラフ法による尿中代謝産物測定例については、1979年、日立インストルメントニュース⁶⁾に報告している。

前述のように生体中の有害化学物質量は、作業者の健康に直接関係があるので、その測定は有害化学物質の健康に対するリスクの評価にも適切である。

一方において、作業者が生体障害を起こす前段階の影響

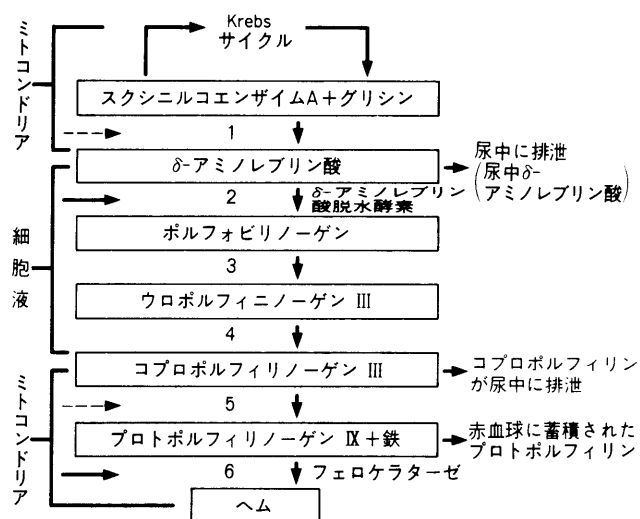


図6 生物学的影響モニタリングの例としての鉛の生体影響

鉛の摂取によるヘム合成経路の乱れ〔ヘム合成は鉛によって阻害され、合成経路の中間代謝物質の蓄積を生じる。鉛は二つのステップを阻害し(実線矢印)、また、鉛は二つのステップ(点線矢印)を阻害する可能性がある。これについて生物学的影響モニタリングが行われる。

をとらえて予防に役だてることが生物学的影響モニタリング(biological effect monitoring)と言われている。例えば図6に示すように、鉛の暴露のある作業者の場合、まずδ-アミノレブリン酸脱水酵素の活性が低下することによって、δ-アミノレブリン酸が尿中に排泄(せつ)される。また、プロトポルフィリン〔IX〕に鉄が組み込まれてヘムが合成されるが、鉛はヘム合成に関係する酵素(鉄キレターゼ)を阻害するため、赤血球中の遊離プロトポルフィリン、亜鉛プロトポルフィリンの濃度が上昇する。そして、尿中にはコプロポルフィリンが出現する。これらのポルフィリン代謝の乱れによって生じる初期の生体影響を把握して、評価することができる。こうした手法が「生物学的影響モニタリング」である。これに対して鉛中毒の際の貧血の有無を調べることは、暴露による生体障害(初期の生体影響ではない)の有無を調べることであり、また貧血は鉛中毒に特異的でもないで、鉛による生体の障害を調べる健康診断(health surveillance)の対象となっている。

次いで健康診断と生体試料測定の実施について述べることにする。鉛中毒予防規則と有機溶剤予防規則が改定され、平成元年10月から施行されることとなった。鉛中毒予防規則では、鉛取り扱い作業者の健康診断項目に血中鉛の定量(dose monitoring)とともに尿中ALAの定量、及び医師が必要とする場合は血中のコプロポルフィリンの測定が行われることになった。このことは影響モニタリング(effect monitoring)の適用された例と考えられる。そして、血中鉛の測定には、フレイムレス原子吸光法、尿中δアミノレブリン酸の測定には、分光光度法のほか高速液体クロマトグラフ法(検出には紫外外部吸光光度法・蛍光光度法)が、ま

た赤血球の遊離プロトポルフィリンの測定には、蛍光光度法などの分析法が用いられている。

また有機溶剤中毒予防規則では、トルエン、キシレン、スチレン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1, 1, 1-トリクロロエタン、n-ヘキサン、N, N-ジメチルホルムアミドの8種類の有機溶剤の取り扱い作業についても、その尿中代謝産物の測定が実施されることになった。このことから多くの検査場所ですべての測定が行われるようになり、そのために精度管理が必要とされ、精度管理に適合した測定法が要求されている。表2に健康診断に加えられた対象項目と測定法を総括した。そして測定成績の概略を知るために各事業所において鉛作業員の生体試料の測定値及び8種の有機溶剤の尿中代謝産物濃度の測定

成績値は分布1、分布2、分布3の3段階に分けて所轄労働基準監督所に報告することとされている。有害物質作業場におけるdose monitoring(量モニタリング)とeffect monitoring(影響モニタリング)を含む生物学的モニタリングの衛生管理における位置づけを表3に示した。すなわち、生物学的モニタリングは作業環境や作業方法(マスクの着用、作業強度、作業時間)を含む作業実態や生体障害の予防に役立つものとする。

1982年に設置されたACGIHの生物学的暴露指標委員会は、1986年から1989年まで、毎年暴露指標とその設定理由書を公表している。その設定理由書のなかで、これらの生物学的モニタリングの近年の発達は、その一つとして、選択的なかつ測定精度のよい測定法が可能となったということ述べている。我が国の生体試料による生物学的モニタリングについての精度管理(昭和62年、212機関対象)については、標準試料を用いては古くから行われており、その成績及び測定法については原田章^{7),8)}が詳しく報告している。昭和55年から60年の測定法の変遷を見ると、選択性がよくしかも精度のよい方法が順次用いられるようになっていく。すなわち、近年は血中鉛の測定についてはフレイムレス原子吸光分析が、また尿中馬尿酸、メチル馬尿酸、マンデル酸の測定については高速液体クロマトグラフ法が多く用いられるようになっていく。我々は昭和37年トルエン作業員の尿中馬尿酸測定の成績を報告⁹⁾した。この報告は世界における芳香族溶剤の生物学的モニタリングの最初の仕事とされている。当時の馬尿酸の測定は、尿を試料としその中に含まれる馬尿酸をペーパークロマトグラフや薄層クロマトグラフで分離後、ろ紙や薄層プレートにジメチルアミノベンズアルデヒドをsprayし、加熱発色させる方法であった。自動化された近年の機器をみると、分析機器の発達のすばらしさに感無量である。科学的な方法論や分析機器の発達によって、労働衛生の一つの新しい実施体系が確立されつつあることはまことに喜ばしいことと考える。

なお、鉛健康診断における生体試料による測定法、有機溶剤健康診断における尿中代謝産物測定法については、著者らの共著^{10),11)}を参考にさせていただくと幸いである。

表2 新しい健康診断と生体試料による測定法

(a) 鉛健康診断(鉛中毒予防規則)

測定項目	測定法
血中鉛	フレイムレス(ゼーマン補正)原子吸光法
尿中デルタアミノレブリン酸(δ-ALA)	●分光光度法(友国・緒方法) ●高速液体クロマトグラフ(紫外部吸光光度法、蛍光光度法)
赤血球中遊離プロトポルフィリン(医者が必要とする場合)	蛍光光度法

(b) 有機溶剤(有機溶剤中毒予防規則)

有機溶剤の種類	測定項目(尿中代謝産物)	測定法
トルエン	尿中馬尿酸	●高速液体クロマトグラフ法 ●メチルエステル化後、ガスクロマトグラフ法
キシレン	尿中メチル馬尿酸	
スチレン	尿中マンデル酸	
テトラクロロエチレン	尿中トリクロロ酢酸または総三塩化物	●比色法(アルカリピリジン法またはp-クロロアニリン法)によるトリクロロ酢酸及び総三塩化物の定量 ●ガスクロマトグラフ法によるトリクロロ酢酸、トリクロロエタノールの分別定量
1, 1, 1-トリクロロエタン	尿中トリクロロ酢酸または総三塩化物	
トリクロロエチレン	尿中トリクロロ酢酸または総三塩化物	
N,N-ジメチルホルムアミド	尿中N-メチルホルムアミド	●ガスクロマトグラフ法
n-ヘキサン	尿中2,5-ヘキサジオン	

表3 労働衛生管理におけるモニタリングとサーベイランスの位置づけ

モニタリング	環境モニタリング		生物学的モニタリング		health surveillance
	場	個人	量(dose)	影響(effect)	
定義	環境中濃度	個人濃度	体内存在量	初期の生体影響	生体障害
場所	環境		生体		
評価対象	化学物質		影響		
対策	予防				治療 配置転換
基準	T L V 管理濃度	T L V	B E I BAT	B E I(一部) BAT	クライテリア
欠点	時間・場所的変動	作業量による変動	代謝の個人差 共存物質の影響	感受性の個人差	

参考文献

- 緒方正名：生物学的モニタリング，第57回日本衛生学雑誌，42，(1)，1987
- 緒方正名，田口豊郁：労働衛生管理における生物学的モニタリングの意義，トキシコロジーフォーラム，11(4)，333～344，1988
- 緒方正名，武田和久：工業化学物質の(ヒト)の生物学的モニタリング，同文書院 東京，1988
- ACGIH発行：生物学的暴露指標 1986～1987(緒方正名訳)同文書院，1987
- ACGIH発行：生物学的暴露試料 1987～1989(緒方正名訳)産業医学振興財団，1989
- 緒方正名，杉原黎子：高速液体クロマトグラフィによる有機溶剤の尿中代謝産物の定量，The Hitachi Scientific Instrument News，22(1)，1979
- 原田章：測定法の利点・欠点と精度管理，産業衛生学会，生物学的モニタリング研究会抄録集，3～5，1988
- 原田章：測定の正確性と信頼性，日本衛生学会ワークシ

- ヨップ・ヒトにおける有害化学物質の生物学的モニタリング抄録集, 31~41, 1988
- 9) Ogata M., Sugiyama K., Moriyasu H., : Studies on poisoning (IV) Toluene concentration in air and urinary hippuric acid. Acta Med. Okayama, 16, 281~292, 1962
- 10) 原田 章, 緒方正名, 井上尚英, 河部慶三(労働省監修): 鉛健康診断のすべて, 全国労働衛生団体連合会発行, 1990
- 11) 緒方正名, 原田 章, 井上尚英, 河部慶三(労働省監修): 有機溶剤健康診断のすべて, 全国労働衛生団体連合会発行, 1990

筆者略歴

略歴 1926年 岡山市に生まれる
 1949年 岡山医科大学医学部卒業
 1962年 岡山大学医学部教授・公衆衛生学 現在に至る
 1963~1964年 米国ニューイングランドデイクネルズ病院 癌研究所及びハーバード大学医学部生化学教室に在学
 1983~1985年 岡山大学医学部長
 1988年 米国政府関係産業衛生専門家会議 生物学的暴露指標委員会委員 現在に至る
 1989年 岡山県公害対策審議会会長
 1990年 財団法人 全国労働衛生団体連合会 総合精度管理委員会特別委員
 現在 岡山大学医学部教授・医学博士 専攻, 公衆衛生学
 主著 疲労判定のための機能検査法 (共著, 同文書院, 1962)
 遺伝生化学II (共著, 中山書店, 1974)

公衆衛生学入門 (編著, 朝倉書店, 1975)
 コンピュータ・プログラムによる統計技術 (共著, 同文書院, 1978)
 ベーシック・プログラムによる統計手法 (共著, 同文書院, 1982)
 ベーシック・プログラムによる医学統計手法 (共著, 同文書院, 1983)
 現代公衆衛生学 (編著, 朝倉書店, 1985)
 工業化学物質のヒトにおける生物学的モニタリング (共訳, 同文書院, 1987)
 衛生学・公衆衛生学 (編著・同文書院, 1987)
 生物学的暴露指標 (単訳, 同文書院, 1987)
 基礎衛生・公衆衛生学 (編著, 朝倉書店, 1989)
 鉛健康診断のすべて (共著, 労働省監修, 全国労働衛生連合会発行, 1990)
 有機溶剤健康診断のすべて (共著, 労働省監修, 全国労働衛生連合会発行, 1990)

Topics

第9回表面科学 講演大会開催さる

各種材料の表面に関する最先端の研究, および技術の発表の場としての表面科学講演大会が, 昨年11月27日から11月29日の3日間にわたり早稲田大学で開催された。

本学会は, 応用物理学会の表面関連分野を抜き出したような性格を持っており, 表面の分析・評価を始めとして表面化学, 薄膜などの9分野で95件が発表され, 表面科学に関し最も情報量の多い学会と言える。なお, 今回は本学会創立10周年を記念して表面科学国際シンポジウムも昨年12月29日から12月30日の2日間にわたって開催され, 11件の招待講演が開催された。なお, これら学会への総参加者数は300人を超えた(事務局調べ)。

表面分析・評価分野では, SIMSを用い, 一次イオン種によるSiウェーハ表面

の形状変化と二次イオン強度との関係を調べた報告があった。表面の形状変化は深さ方向分解能にも大きく関与しており, 完全な解明が望まれているが, これは今後の研究課題であろう。

なお, 1990年度は, 従来どおり11月下旬から12月初旬に開催されることが予定されている。

(池辺義紀 記)

第39回 日本臨床衛生検査学会 開催のお知らせ

来る4月28日から30日までの3日間の予定で, 題記学会が水戸市で開催されます。

本年の学会のメインテーマとしては, 「のびゆく生命, その役割と重要性」またサブテーマとして「高齢化社会に向けて」が掲げられています。

本学会は毎回春に開催されますが, 年々その規模は大きくなり, 本年は約5,000人の参加者が見込まれています。

本年の学会の特別講演としては, 筑波大学の村上和雄教授, ねむの木学園の宮城まり子園長, 中国大連医学院の白先生と多士済々な先生方が予定されています。

またシンポジウム4題, パネルディスカッション6題と充実したプログラムが組まれています。

一方, 付設展示会(水戸市民体育館ほか)には, 150社以上の機器・試薬メーカーの展示が予定されています。日立でも新製品を展示すべく, その準備を進めています。

現在, 本学会の担当である茨城県臨床衛生検査技師会(軍司光夫学会長, 堀越晃実行委員長)では, 学会開催成功へ向けて着々と準備が進められています。

本年学会の地元である(株)日立製作所那珂工場は, 学会の見学コースとして組み込まれ, バイオメディカルセンタ, テクノリサーチセンタなどを, 多くの方々に見ていただこうと準備に取り組んでいます。

学会員各位の多数のご来場をお待ちしています。

報 文

有機スズの分析法について

Determination of Organo-Tin Compounds

森田 昌敏*

(平成元年12月12日受理)

1. 有機スズ化合物とは

スズは四座配位をとり、したがって、有機スズ化合物は R_4-nSnX_n ($n=0\sim3$) の一般式をとる。工業的に生産され利用されている有機スズ化合物には次のようなものがある。(図1)→スキーム R_3SnX_n 型の化合物は毒性が強く、殺生物剤としての用途がある。この型で我が国で最もよく利用されているのはトリブチルスズ (TBT) およびトリフェニルスズ (TPT) 化合物である。船底にふじつぼが付着するのを防ぐ船底塗料や魚網に藻や貝類が付着するのを防ぐ防汚塗料などに用いられる。また、TPTは農業としても登録されており、ビート栽培に用いられる。 R_2SnX_2 型の化合物は毒性が低く、主として塩化ビニルの安定剤として用いられる。

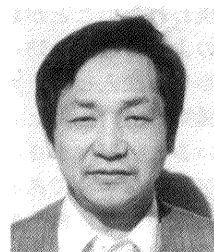
2. 分離検出法

環境試料のような複雑なマトリックス中に含まれる微量の有機スズ化合物を分析する場合には、選択性の高い高感度の分析法が必要である。またマトリックス成分からの妨害を避けるために、分離技術を組み合わせることが必要である。分離法と検出法は組み合わせられて初めて分析が可能となるのであるが、それぞれに対応している場合が多いので、分離法に従って分類して記述することにする。分離法としては、(1) 水素化物/気化導入法、(2) ガスクロマトグラフ法、(3) 液体クロマトグラフ法の3法に大別される。これを基盤として本稿は記述する。これ以外にも溶媒抽出による分離やポーラログラフ法、メスパウワー分光法等多数の報告があるが本稿では触れないこととした。

(1) 水素化物/気化導入法

原子吸光法において高感度選択的試料導入法として発達した水素化物導入法が基本である。スズは還元されると比較的安定な水素化物を生成する。還元は酸性Fで $NaBH_4$ で行うのが普通である(次の反応式)。生成した水素化物をコ

ールドトラップで捕捉(そく)し、次にコールドトラップの温度を上昇させて、沸点差を利用した気化を行うと、Rの差によって分離される[沸点は SnH_4 ($-52^\circ C$)、 CH_3SnH_3 ($1.4^\circ C$)、 $(CH_3)_2SnH_2$ ($35^\circ C$)、 $(CH_3)_3SnH$ ($59^\circ C$)、 $C_4H_9SnH_3$ ($100^\circ C$)、 $(C_4H_9)_2SnH_2$ ($250^\circ C$)、 $(C_4H_9)_3SnH$ ($280^\circ C$)。これを元素選択性のある検出器で検出するものである。検出器としてはフレイム原子吸光法^{1)~5)}、加熱炉原子吸光法^{6)~10)}、原子発光分析法^{11)~12)}、原子蛍光法¹³⁾、質量分析法¹⁰⁾、炎光光度法⁹⁾などがある。



本法は生成した水素化物の全量を検出系に送ることができるので感度がかせげること、また無機スズから3置換の有機スズまで一連の置換シリーズについて同時に分析できること、分析時間が短い利点があることである。一方欠点としては、分離がそれほど良くないので、有機スズに多種類のものが混合しているときに分離不十分になってしまうことがあること、水素化物は反応しやすいので、コールドトラップから検出系までの流路をトリメチルシラン化などの対策を必要とすることがある。装置の普及していることもあって、原子吸光を検出系として用いられていることが多いが、高感度を得るためには長光路セルや炭素炉を用いることが必要である。長光路セルとして、炎を内部で発生させる石英セル、通常のスロットバーナの上に石英ガラスやアルミナ管を置いて加熱する外部炎加熱型のセル、あるいは外から電氣的加熱のアルミナセルなどが提案されている。いずれの場合も、管の中央に小孔をあけ、そこに水素化物をキャリアーガスとともに送入する。検出下限は、絶対量で1 ng付近である。海水500 mlに用いた場合、検出下限は2 ng/l程度、また魚貝類0.1 gを用いた場合、10 ng/g湿重量程度である。コールドトラップには、ガラスウールやビーズ、石英ビーズ、シリコン油をコーティングしたけい藻土などが用いられる。ジブチルスズやトリブチルスズは沸点が高いので加熱して送入させる。

(2) ガスクロマトグラフ法
ガスクロマトグラフ法は、複雑な環境試料の分析に最も広く用いられている。有機スズ化合物を揮発性の一定の化合物に変換する必要がある。大別して以下の3つの誘導体グループに分けられる。

(a) ハロゲン化物

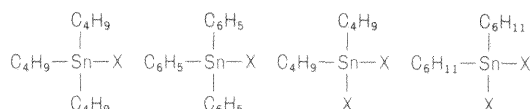


図1 (工業的に多量生産される有機スズ化合物)

* 国立公害研究所 計測技術部 部長

有機スズの中でも特にトリブチルスズおよびトリフェニルスズについて塩化物または臭化物として分析する方法である高感度な検出器として電子捕獲型検出器ECDがよく用いられる^{14)~17)}。またMSを用いることももちろん可能である。トリブチルスズハロゲン化物は、メチル水銀ハロゲン化物と類似しており、したがって、後者の分析法として発達した方法が援用できる。例えば、ガスクロマトグラフのカラム充てん剤にはメチル水銀分析用として同様なものが選択される。

トリブチルスズハライドは、充てん剤の活性部位と結合しやすい。このため、特に微量を分析するとき、ピークが現われないことが起こりうる。パッキドカラムにおけるこのような吸着を防ぐため、水石等は塩酸を含む溶液をあらかじめ注入して、カラムコンディショニングを行う方法を提案している。ヒューズドシリカのキャピラリカラムを用いると吸着は小さくなり、また塩化物よりも臭化物のほうが有利なようである。

電子捕獲型検出器は高感度である。純品に対する検出下限は絶対量として1 pg程度である。ただし選択性は十分ではない。すなわち多くの有機ハロゲン化合物、多環化合物、NやOを有する化合物にも高感度に応答する。このため、ガスクロマトグラフにかける前に十分なクリーンアップが必要である。

(b) 水素化物

前述の水素化物をガスクロマトグラフに導入し、検出するものである。検出器としてはECD¹⁷⁾及び炎光分光検出器(FPD)^{18)~21)}が用いられるが、このほかに質量分析法²²⁾、原子吸光法、プラズマ発光法も用いられる。トリブチルスズの水素化物は比較的安定であるが、酸素との反応あるいはシラノール基との反応も考えられ、極微量の分析においてはこのことが効いてくる。またジアルキルスズやモノアルキルスズの水素化物はより不安定である。

汎(はん)用性の検出器としてはECDとFPDがあるが、選択性の点からFPDのほうが優れている。FPDで検出するのはSnHの分子発光である^{23),24)}。スズの水素化物あるいはアルキル化物を水素炎中で加熱するとSnHの分子発光がある。この発光波長は393 nmおよび610 nmにあるが、610 nmの発光線のほうが対称的な狭いバンドの発光であるので、干渉フィルタを用いて610 nmでモニタするのがよい。最高0.2 pgの検出下限が報告されている。

(c) 四級アルキル化スズ(またはアリル化スズ)

四級アルキル化合物は有機スズの誘導体のうちで最も安定な化合物である。この物質の誘導体化は有機スズ(または無機スズ)のハロゲン化物にグリニャール試薬を反応させて行う。反応の収率は高く、一度生成すると安定であるので取り扱いがやさしい。

グリニャール試薬によるアルキル化として、エチル^{25),26)}、イソプロピル²⁷⁾、ペンチル^{28),29)}、ヘキシル化³⁰⁾が用いられる。自然界にメチルスズ化合物があり、また工業的な生産としてブチル、フェニルスズ化合物が用いられているので、それを避けて上記の3つが選ばれている訳である。環境試料からの抽出物は、グリニャール試薬と反応する物を多量に含んでいる場合が多い。このような場合、前処理が必要

であり、例えばトリブチルスズ塩化物の場合、フロリジアル、アルミナ、イオン交換樹脂などを用いてクリーンアップする方法が提案されている。また、グリニャール試薬として普通市販されているのは、エチル化物はエーテル溶液、イソプロピル化物がTHF溶液である。クリーンアップ後の抽出液がヘキサンの場合、イソプロピル化グリニャール試薬を混ぜると沈殿が発生する(反応には差し支えないようであるが)。高感度検出のためのガスクロマトグラフとしては、メチルシリコン系のキャピラリカラムが用いられる。またトリフェニルスズ誘導体は高沸点であり、インジェクション部の濃度が高すぎると、熱分解するのではないかとこの指摘がある。

検出器としてはFPD、MSがよく用いられている。正確な分析値を得るために、内部標準が必要である。TBTやTPTをFPDを用いて検出する場合、トリベンチル化物を内部標準として試料に最初に混入し抽出、クリーンアップを行ったのちイソプロピル化を行い検出するのが一法である。FPDの検出下限は実用的には10 pg付近にあり、選択性が高いので取り扱いがやさしい。

MSを検出法とする場合、安定同位体を内部標準を用いることができる。TBT-d₂₇体、TPT-d₁₅体を内部標準することにより、TBTとTPTの正確な測定が可能となる。MSによる検出下限は、使用するMSの機種に大きく依存するが、pgの検出は容易である。

(3) 液体クロマトグラフ法

液体クロマトグラフ法は、複雑な誘導体化を伴わないので有利な点がある。分離の点から高速液体クロマトグラフが便利である。検出器としては蛍光検出法³¹⁾、UV検出法^{32),33)}、フレイム原子吸光法^{34)~36)}、加熱炉原子吸光法^{37)~39)}、水素化物導入/原子吸光法⁴⁰⁾、ICP質量分析法⁴¹⁾、LC-MS法⁴²⁾などがある。フレイム原子吸光に長光路管を用いたときの検出下限は、トリブチルスズについて5 ngオーダーであった。

3. 実試料分析におけるいくつかの問題点

実試料の分析においては、抽出率が大きな問題点である。TBT、TPTなどは実試料中には、塩化物、水酸化物としてあるいはタンパク質のSH基と結合したりして存在している。これを塩化物(臭化物)として抽出する訳であるが、このために塩酸等の添加が行われる。生成した塩化物は油溶性で、有機溶媒で抽出するのであるが、不均一系である魚肉の抽出などには、脱水に留意しないと抽出率の低下をひきおこすので注意を要する。TBT、TPTの水系からの抽出には、ベンゼン、ヘキサンなどがよいが、二置換体などはトロポロンを添加して錯体として抽出するとよい。

分析の精度管理のために標準試料が重要である。国立公害研究所では、スズスキの凍結乾燥粉末をNIES No. 11として作製しており、近い将来、配布可能となる。この試料のガスクロマトグラフを図2に示す。本試料は東京湾で獲(と)れたスズスキであるが、TPTがTBTよりもむしろ多くなっているのは興味深い。

最後にどのような分析法が実際的かという点について触れておこう。非常に多くの分析法が有機スズの分析法として提案されており、読者らはいったいどの方法が実用的で

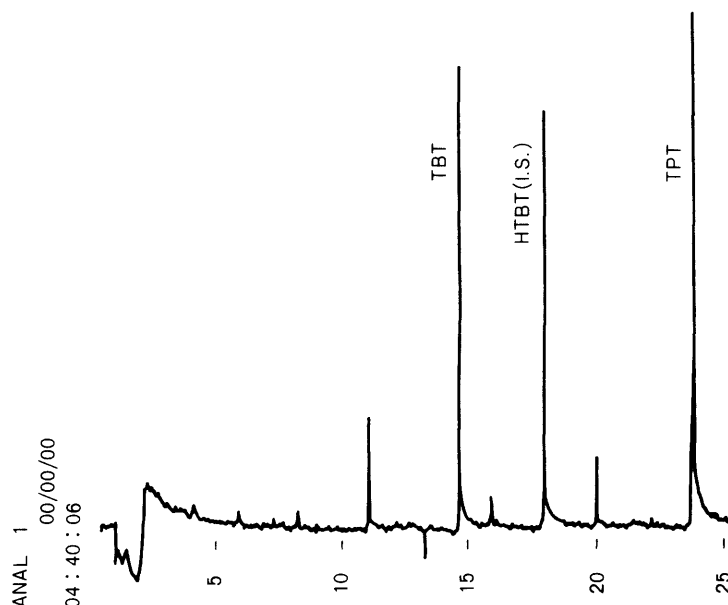


図2 スズキ魚粉標準試料のガスクロマトグラフ

(試料は抽出後イソプロピル化し、キャピラリカラムGC/FPDによって検出)

あるか迷うに違いない。行政官庁の指示した分析法も最近数年間のうちにくるくる変わっているのが実情である。しかし、一応の方向が見えてきたような感じである。GC/MSは高価なこともあり、GC/FPDが広く用いられそうである。また、誘導体化もグリニャール試薬を用いたアルキル化が主流になりそうである。まだそれぞれマイナーな違いを残しているが。

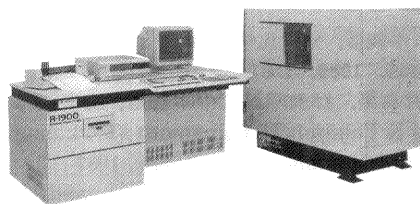
参考文献

- 1) R.J.Maguire and R.J.T.Katz, J.Chromatogr., 1983, **268**, 99
- 2) A.O.Valkirs, P.F.Seligman, P.M.Stang, V. Homer, S. H.Lieberman, G.Vaga and C.A.Dooley, Mar. Pollut. Bull., 1986, **17**, 319
- 3) H.D.Fleming and R.G.Ide, Anal. Chim. Acta, 1970, **83**, 67
- 4) S.Tugral, T.I.Bulkas, E.D.Goldberg and I.Salihoglu, J. Elud.Pollut. Mar. Mediterr., 1982, **6**, 497
- 5) D.T.Burns, F.Glockling and M. Harriott, Analyst, 1981, **106**, 921
- 6) J.S.Haus and J.H.Weber, Anal. Chem., 1988, **60**, 316
- 7) M. Chamsaz, I.M.Khasawneh and J.D.Winefordner, Talanta, 1988, **35**, 519
- 8) A.O.Valkirs, P.F.Seligman, G.J.Olson, F.E.Brinckman, C.L.Matthias and J.M.Bellama, Analyst, 1987, **112**, 17
- 9) P.W.Balls, Anal. Chem. Acta, 1987, **197**, 309
- 10) J.R.Ashby and P.J.Craig, Sci, Total Environ., 1989, **78**, 219
- 11) B.M.Patel, E.Heithmar and J.D.Winefordner, Anal. Chem., 1987, **59**, 2374
- 12) R.S.Braman and M.A.Thompkins, Anal. Chem., 1979, **12**, 51
- 13) A.D' Vlivo, Talanta, 1988, **35**, 499
- 14) Y.Arakawa, O.Wada, T.H.Yu and H.Iwai, J. Chromatogr., 1981, **216**, 209
- 15) 竹内正博, 水石和子, 山野辺秀夫, 渡辺四男也, 分析化学, 1987, **36**, 138
- 16) 近本武次, 片山益代, 鎌田 功, 足立 透, 衛生化学, 1988, **34**, 164
- 17) 高橋一暢, 大八木義彦, 分析化学, 1987, **36**, 133; 高橋一暢, 日本化学会誌, **1988**, 1591
- 18) 高見勝重, 奥村為男, 杉前昭好, 中本雅雄, 分析化学, 1987, **36**, 143; K.Takami, H.Yamamoto, T.Okumura, A.Sugimae and M.Nakamoto, Anal. Sci., 1987, **3**, 63
- 19) C.L.Matthias, J.M.Bellama, G.J.Olson and F.E.Brinckman, Environ. Sci. Technol., 1986, **20**, 609
- 20) J.J.Sullivan, J.D.Torkelson, M.W.Wekell, T.A.Hollingworth, W.L.Saxton, G.A.Miller, K.W.Panaro and A.Uhler, Anal. Chem., 1988, **60**, 6260
- 21) G.L.Olson, F.E.Brinckman and J.A.Jackson, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 1983, **15**, 249
- 22) D.J.Hannah, T.L.Page, L.Pickton and J.A.Taucher, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1989, **43**, 22
- 23) C.G.Flinn and W.A.Aue, Can. J. Spectrom., 1980, **25**, 141; W.A.Aue and C.G.Flinn, J.Chromatogr., 1977, **142**, 145
- 24) S.Kapila and C.R.Vogt, J.Chromatogr. Sci., 1980, **18**, 144
- 25) M.D.Muler, Anal. Chem., 1987, **59**, 617
- 26) K.Sasaki, T.Suzuki and Y.Saito, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1988, **41**, 888
- 27) 環境庁 保健調査室
- 28) R.J.Maguire and H.Huneault, J.Chromatogr., 1981, **209**, 458
- 29) 大平修三, 松井寿夫, Jpn. J. Ind. Health, 1989, **31**, 150
- 30) J.Greaves and M.A.Unger, Biomed. Environ. Mass Spectro., 1988, **15**, 565

- 31) L.Ebdon and J.I.A.Garcia, Analyst, 1987, 112, 1551
- 32) W.G.Lakata, E.P.Laukwazr and K.Muller, Fresenius Z. Anal. Chem., 1984, 319, 563
- 33) C.W.Whang and L.L.Yang, Analyst, 1988, 113, 1393
- 34) L. Ebdon, S.J.Hills and P.Jones, Analyst, 1985, 110, 515
- 35) D.T.Burns, F.Glockling and M.Harriot, Analyst, 1981, 106, 921
- 36) K.Kadokami, T.Uehiro, M.Morita and K.Fuwa, J. Anal. Atom. Spectro., 1988, 3, 187
- 37) K.L.Jewett and F.E.Brinckman, J.Chromatogr. Sci., 1981, 19, 583; F.E.Brinckman, W.R.Blair, K.L.Jewett and W.P.Irerson, J.Chromatogr. Sci., 1977, 15, 493
- 38) T.M.Vickery, H.E.Huston, E.Howell, G.V.Harrison and G.J.Ramelon, Anal. Chem., 1980, 52, 1743
- 39) O.Nygren, C.A.Nilsson and W.Frech, Anal. Chem., 1988, 60, 2204
- 40) I.S.Krull and K.W.Panaro, Appl. Spectrosc., 1985, 39, 960
- 41) H.Suyani, D.Heitkemper, J.Creed and J.Caruso, Appl. Spectrosc., 1989, 43, 962
- 42) K.W.Sin, G.J.Gardner and S.S.Berman, Anal. Chem., 1989, 61, 2320

Topics

R-1900形 日立FT-NMR装置



FT-NMR装置は、次々に開発される新しい手法が加わって、ますます複雑化、多様化しています。R-1900形では、徹底した測定自動化とメッセージ対話方式による高い操作性によって気軽に最新の機能を利用できます。高安定永久磁石の採用による高品質データ、容易な保守性とあわせ、有機化合物を扱う各分野で幅広くご利用いただける高性能FT-NMR装置です。

■ 主な特長

- (1) 測定・処理がいつそう自動化されました。ワンタッチオート!
- (2) 有機構造解析のための豊富な機能を備えています。
 - ・ 各種スペクトルエディティング
 - ・ 二次元NMRなど
- (3) 充実したファイル機能を持ってい

ます。

- ・ データ索引機能
 - ・ オートファイリングなど。
- (4) 高安定永久磁石を採用
 - ・ 優れた長時間安定性を示します。
0.2 Hz/12 h
 - ・ 容易なメンテナンス

■ 主な仕様

- (1) 共鳴周波数: 90 MHz
- (2) 磁場安定度: 0.2 Hz/12 h
- (3) 分解能: 0.2 Hz以下
(¹H, ¹³C)

第10回記念 液体クロマトグラフィー 討論会 国際大会 (CIS '89 Tokyo) 開催さる

第10回記念液体クロマトグラフィー討論会 国際大会 (CIS' 89 Tokyo) が、10月18日から20日まで日本都市センターで盛大に開催された。演題申込みは231題で、うち59題は国外19か国から寄せられ、討論参加者は750人を超えた。

口演は3日間で30題、ポスター発表は200題となり、液体クロマトグラフィーのカラム充てん剤や分離機構、検出法や誘導体化、試料前処理とカラムス

イッチング、マイクロ化とマクロ化、コンピュータ利用による最適化とエキスパートシステムなどのほか、キャピラリー電気泳動法とその応用など広い範囲にわたった熱心な討論がなされた。

日立からは、「イオンクロマトの定量分析に及ぼす溶離液中の不純物と試料マトリックスの影響」と「プレおよびポストカラム誘導体化による生体成分の自動分析」の2題をポスターで発表した。

学会2日目の夕方、浅草の伝統芸能太鼓囃子にしばし陶酔したあとで懇親会が開かれ、熱心な討論や談笑など約200人を超す参加者でにぎわった。

一方、機器・カタログ展示も同時に開催され54社が参加し、それぞれ工夫を凝らしたディスプレイで会を盛り上げた。日立ブースも液体クロマトシステムのほか、カラムやHPLCマネジャーを実演し、好評を博した。

10年一昔と言われるが、顧みれば1970年液体クロマト研究懇談会が約10人余りでスタートしたのが、1980年以降日本分析化学会液体クロマト研究懇談会主催で、毎年秋に討論会が開かれるようになり、1989年第10回を記念して国際大会にまで発展してきた。

クロマトは、応用分野や方法論など多岐にわたってきており、1990年代に入った現在、今後10年間ますますの発展に大いに期待したい。

(鴈野重威 記)

報 文

トルエン、キシレンおよびスチレンの尿中代謝産物の測定
— HPLCによる尿中代謝産物の定量 —Measurement of Urinary Metabolites of Toluene, Xylene and Styrene
— Quantitative Determination of Urinary Metabolites by High Performance Liquid Chromatography —

緒方 正名* 田口 豊郁*

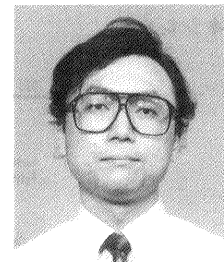
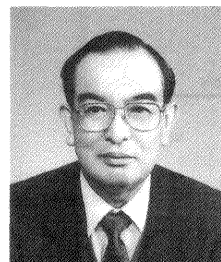
(平成元年12月12日受理)

1. はじめに

トルエン、キシレン等の有機溶剤は、塗装溶剤、印刷用インク、接着剤、工業原料等に広く利用されている。したがって、これらの有機溶剤に暴露される機会のある労働者数は多い。昭和63年度の有機溶剤特殊検診の受診者数は、55万8,611人で、じん肺を除く法定特殊検診受診者の52%に相当する(労働衛生のしおり 平成元年度¹⁾)。有機溶剤に暴露されると、その種類によって尿中に各種代謝産物が排泄されることが知られている。これらの尿中代謝産物量は、有機溶剤の暴露濃度とよい相関を示す。このように生体試料(尿、血液、呼気等)中の有害物質、その代謝産物の測定値、またはその有害物質によって引き起こされる初期の影響(生化学的変化)の測定値から、労働衛生管理のため予防的情報を得ることを生物学的モニタリングと呼んでいる。また、生物学的モニタリングは、dese-monitoring(有害物質の吸収量の評価)とeffect-monitoring(有害物質による初期の影響評価)に分けられる。生物学的モニタリングは、呼吸器系からの吸入だけではなく、皮膚からの吸収、経口摂取等のルートからの暴露を評価の対象としている。また、作業負荷、防毒マスク、作業時間等による有害物質の吸収量の変動にも対応することができる。したがって、従来、広く行われている作業環境測定および個人暴露濃度測定(両者を合わせて外環境モニタリングと言う)と比較して生物学的モニタリングは、健康に対する危険度の評価という点では、より直接的で有効な情報量が多いと考えられる。

労働衛生管理を進展させるためには、労働環境と作業方法及び作業者とのかかわりを明らかにすることが重要であるが、そのためには多くの情報が必要であることは言うまでもない。生物学的モニタリングによる情報は、作業環境測定及び健康診断による情報とともに不可欠なものとする。

今回、有機溶剤中毒予防規則の改正²⁾により有機溶剤特殊健康診断に尿中代謝産物による生物学的モニタリングが採用され、トルエン、キシレン等の8種類の有機溶剤について、尿中代謝産物の測定が義務づけられた(1989年10月から施行)。これらの対象物質のうち、トルエン、キシレンおよびスチレンの尿中代謝産物の測定には、HPLCが有効である。以下に、HPLCによる尿中代謝産物測定の実際について紹介したい。

2. トルエン、キシレンおよびスチレンの代謝^{3),4)}

トルエン、キシレンおよびスチレン等の有機溶剤は、主として呼吸器を通して肺胞から血液へと体内に取り込まれる。血液に溶け込んだ有機溶剤は臓器に運ばれ、組織に侵入する。揮発性の有機溶剤は呼気によって排泄(せつ)される。吸収量に対して呼気から排泄される割合は、およそトルエンで20%、キシレンで5%、スチレンで1%程度と言われている。吸収された有機溶剤の大部分は、主として肝臓で代謝されて尿中に排泄される。有機溶剤の代謝とは、簡単に言うと、水に溶けにくい有機溶剤を尿中に排泄しやすいように、水に溶けやすい形に変えることである。トルエンは、メチル基が酸化され、安息香酸となり、さらにグリシン抱合され、馬尿酸(HA)となる。キシレンも同様にメチル基の一つが酸化され、さらにグリシン抱合されてメチル馬尿酸(MHA)となる。スチレンは、ビニル基が酸化され、大部分はマンデル酸(MA)になり、一部はフェニルグリオキシル酸(PGA)になる。これらの代謝産物は、尿中に排泄される(図1)。

3. 尿中代謝産物とHPLC

トルエン、キシレン、ベンゼン、スチレン、エチルベンゼン、フェノール等のベンゼン環を持った有機化合物の代謝産物は、ベンゼン環を持っているので、紫外吸収がある(図2)。このことを利用して、HPLCによる尿中代謝産物の測定が発達してきた。近年、高速液体クロマトグラフ(HPLC)が汎(はん)用されるようになったが、検出器として、紫外検出器が安定性、感度、取り扱いやすさ、測定対象となる物質数の多さという点から、他の蛍光、電気伝導度検出器等より多用されている。HPLCで分析する場合、種々の分離モードがあるが、尿を直接HPLCに導入する場合には、逆相モードが用いられる。すなわち、移動相として、水系(水/メタノール、水/アセトニトリル系等)を用いる。逆相モードの充填剤としては、ODS(オクタデシル化学修飾型シリカゲル)が利用されることが多い。現在で

* 岡山大学 医学部 公衆衛生学教室

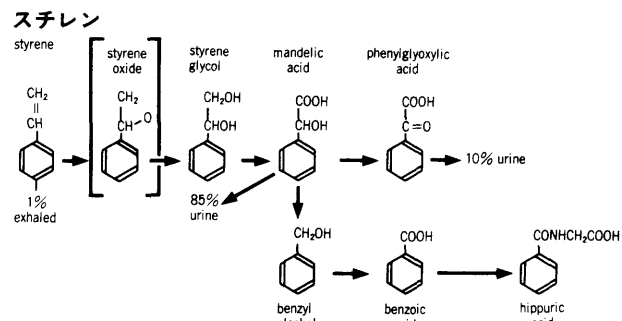
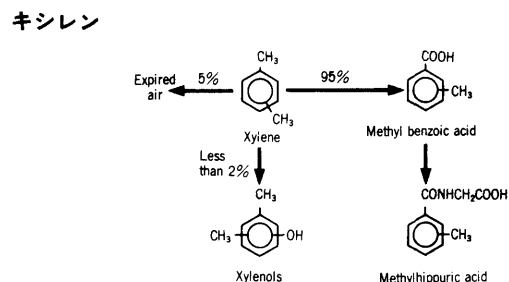
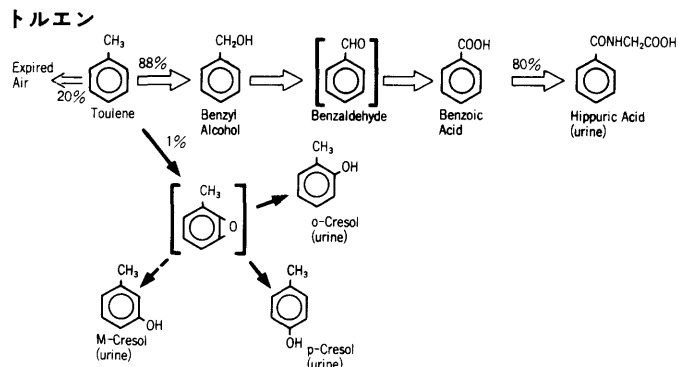


図1 トルエン、キシレンおよびスチレンの代謝経路

は、尿中の有機溶剤代謝産物測定では、検出器：UV、充てん剤：ODS、移動相：水／メタノール系、または水／アセトニトリル系を用いているのがほとんどである。

4. 尿中濃度の表示方法

4.1 尿試料の採取

尿を用いて生物学的モニタリングを行うためには、尿の採取方法と結果の表示方法を基準化する必要がある。尿の採取方法として種々の方法がある。

(1) 24時間尿

24時間分の尿を採取し、24時間中に排泄された量で表示する (mg/day, g/day等)。しかし、実際の作業現場では、試料の汚染または劣化なしに24時間分の尿を採取することは不可能と考える。

(2) 時間尿

規定された時間内の尿を採取し、尿中濃度と尿の体積および時間から時間排泄量 (mg/h, mg/min) として表示する。例えば、15時に排尿して膀胱をいったん空にし、17時に排尿 (全量) して尿の体積も量る。このときの尿を2時

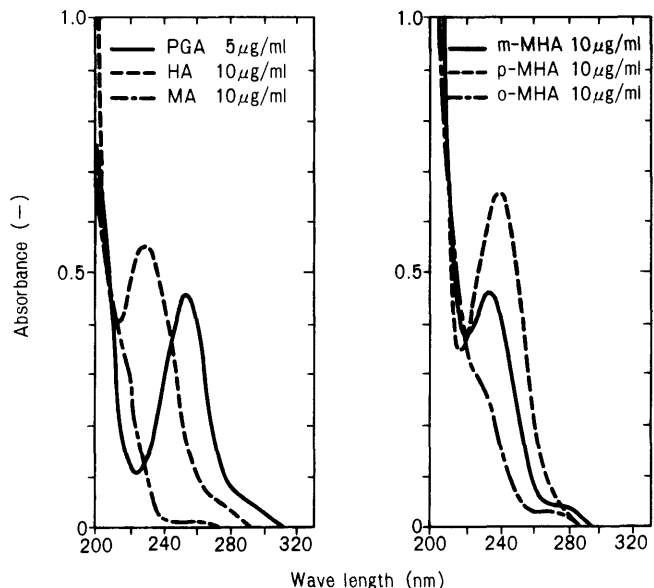


図2 有機溶剤の尿中代謝産物の紫外吸収スペクトル
(対照：メタノール、セル：石英製 10 mm×10 mm)

間尿と言う。また、尿流量と尿中物質濃度との間に各々の対数値で強い逆相関があることから、物質ごとに補正係数を求めておいて補正するという尿量補正濃度が提案されている⁵⁾。

(3) スポット尿

随時尿を採取する。全量を採取する必要はない。有機溶剤の生物学的モニタリングでは作業の終了時に採取することが多い。現場の尿の採取ではこの方法が最も実際的である。しかし、この場合1回に排泄する尿量によって目的物の濃度は大きく変化する。例えば汗を多くかけば尿は濃縮されるし、水を多く飲めば尿量が増えて尿は希釈される。したがって、測定値を評価する場合、対象物の濃度を尿の希釈に対して補正する必要がある。補正方法として①比重補正法および②クレアチニン補正法がよく用いられる。

4.2 スポット尿中の濃度表示方法

(1) 比重補正

尿成分は90～98%が水であり、成人の1日の排泄量は0.6～2.5 l/日であり、そのうち、固体成分の排泄量は30～70 g/日の範囲である。非常に希釈または濃縮された尿は例外として測定対象物質を含めた固体成分は比較的一定して維持されているが、その濃度は尿の排泄量により大きく変動する。したがって、尿中測定対象物質濃度は尿中の固形成分の排泄 (濃度) と関係する³⁾。実際には、測定濃度を標準尿比重で補正したものを生物学的モニタリングに用いる。標準尿比重として、1.020を用いる。以下に比重による補正式を示す。

$$Cd = \frac{1.020 - 1}{d - 1} \times Co$$

ここで、 Co ：測定値 (g/l), Cd ：比重補正值 (g/l: 1.020), d ：尿比重である。

(2) クレアチニン補正

クレアチニンは骨格筋の代謝産物であり、その排泄速度は被験者の脂肪を除く体質量 (lean body mass) を反映する。成人におけるその1日の排泄量は1.0~1.6g (15~25mg/kg・体重) の範囲で、女性はこれよりも低く、男性はさらに高い値を示す。身体的緊張があると排泄は増加する。通常的环境下では、食餌 (じ)、水分負荷状態、利尿などによるクレアチニンの排泄速度への影響は比較的少ない。日内変動は少ない。したがって、クレアチニン排泄量で補正した測定対象物質の測定値は、通常暴露の程度とよく相関する。しかし、測定対象物質の排泄機序がクレアチニンのものと異なる場合、クレアチニンでは補正しない。したがって、クレアチニン補正は元来、糸球体濾過により排泄される測定対象物質には最適であるが、窒素酸化物、メタノールおよびその他の有機溶剤のような尿細管からの拡散により排泄される測定対象物質には適さない。

以下にクレアチニンによる補正式を示す³⁾。

$$Ccr = Co / A$$

ここで Co : 測定値 (g/l), A : クレアチニン濃度 (g/l), Ccr : クレアチニン補正值 (g/g・クレアチニン) である。

5. HPLCによる尿中代謝産物とクレアチニンの同時測定法⁶⁾

尿中代謝産物濃度の表現方法として、尿の濃淡 (尿量) を補正するために比重補正、クレアチニン補正などが提案されているが、ACGIHの生物学的暴露指標 (BEI) では、多くの尿中暴露指標にクレアチニン補正を採用している。通常用いられるODSカラムによる逆相分配クロマトグラフィーでは、クレアチニンの保持時間 (Rt) は短く、尿中の他の多くの妨害成分と重なり、その定量は不可能であった。しかし、イオン対クロマトグラフィーを応用することによってクレアチニンの Rt を長くし、HA、MHAなどの尿中代謝産物と同時に定量することができた。イオン対クロマトグラフィーの保持機構はまだ確立されていないが、次の2つのモデルが考えられている。①イオン対試薬が解離しているイオン性化合物と一緒になり、解離が打ち消され、逆相充てん剤に保持される。②イオン対試薬の非極性部分が逆相固定相に吸着され、充てん剤自身がイオン交換的作用をする。イオンペア試薬の種類および濃度、pHを調整することによって Rt を制御することができる。クレアチニンのような塩基性物質には、イオン対試薬として、アルキル硫酸塩やアルキルスルホン酸塩が有効である。尿中代謝産物とクレアチニンの同時分析では、イオン対試薬として1-デカンスルホン酸ナトリウムを用いた。

〔尿の前処理〕

尿をメタノール+水 (1+1) で100倍希釈し、遠心分離 (3,000 rpm×5分) 後、その上清10 μ lをHPLCに導入した。

〔HPLC条件〕

カラム：ステンレス製 ϕ 4.6 mm×L150 mm、充てん剤：ODS, 5 μ m (エンドキャップを施した無シラノール型)、検出器：紫外可視検出器、検出波長：225 nm、流速：0.7 ml/min、圧力：100 kg/cm²、注入量：10 μ l

移動相：〔20 mM KH₂PO₄ (pH 3.3 ; リン酸で調整) + 3 mM 1-デカンスルホン酸ナトリウム〕/CH₃CN = 85/15、カラム温度：30℃、

この系では、m-MHAとp-MHAは分離できないが、測定

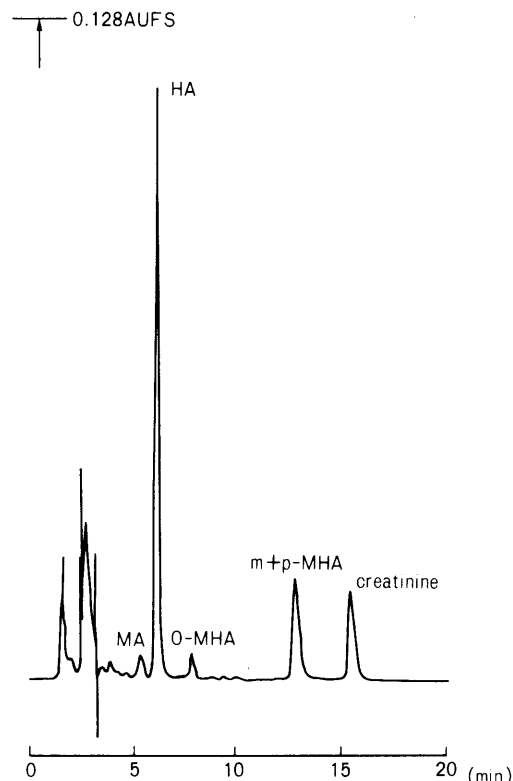


図3 有機溶剤暴露者尿の高速液体クロマトグラム

〔暴露濃度〕トルエン：70 ppm, o-キシレン：6 ppm, m-キシレン：25 ppm, p-キシレン：10 ppm, エチルベンゼン：15 ppm (8時間荷重平均濃度)

〔代謝産物濃度〕MA：0.22 g/l, HA：1.7 g/l, o-MHA：0.15 g/l, (m+p)-MHA：0.56 g/l, クレアチニン：0.83 g/l (作業直後尿)

波長225 nmでは、各々の感度が一致するので、(m+p) MHAとして測定できる⁷⁾。

トルエン、キシレン、エチルベンゼン暴露尿のクロマトグラムを図3に示す。クレアチニンについての本HPLC法とJaffe法 (日立726型オートアナライザーを使用) との相関および帰帰式は、 $r=0.997$, $y=0.029+1.00x$ (x : HPLC法, y : Jaffe法) であった。また、移動相中の1-デカンスルホン酸ナトリウムの濃度だけを0~3 mMに変化させた場合 (他のHPLC条件は同じ) のクロマトグラムの変化を図4⁸⁾に示す。クレアチニンを量る必要のないときは、移動相〔20 mM KH₂PO₄ (pH 3.3)/CH₃CN〕を用いて、HA、MHA、MA、PGAの同時測定ができた。

本HPLC法では、尿中代謝産物濃度とクレアチニン濃度を同時に求められるので、クレアチニンピークによって尿の濃淡が判断できる。さらに、クレアチニン補正值を簡便に得ることができる。クレアチニン補正值は、 $[(g \text{ 代謝産物} / l) / (g \text{ クレアチニン} / l)]$ で求められるから、同時分析ではHPLCへの導入量 (l) に影響されないの、試料の希釈誤差や注入誤差が無視でき、精度よくクレアチニン補正值を得ることができる。同じ名前の充てん剤で同じサイズのカラムであっても、メーカーによって分離の状況は若干異なる。本HPLC法では、遊離のシラノール基がエンドキャッ

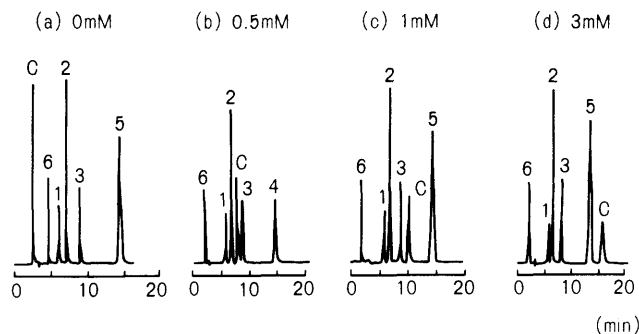


図4 イオン対濃度と高速液体クロマトグラム

[イオン対濃度] (a) : 0 mM, (b) 0.5 mM, (c) 1 mM, (d) 3 mM, 1 : マンデル酸 (MA), 2 : 馬尿酸 (HA), 3 : o-メチル馬尿酸 (o-MHA), 4 : m-メチル馬尿酸 (m-MHA), 5 : (m+p)-メチル馬尿酸, 6 : フェニルグリオキシル酸 (PGA), C : クレアチニン

ブされたODSカラムを用いたが、エンドキャップしていないカラムでは、クレアチニンのピークがテーリングするなどして、うまくいかない。また、エンドキャップされたODSカラムでもメーカーによっては、上記の移動相では、HAとMAが分離しないものがあるようである（このような場合、上記の移動相の組成およびpHを若干改良する必要がある）。

6. 有機溶剤の暴露濃度と尿中代謝産物濃度の関係

有機溶剤の暴露濃度と尿中代謝産物濃度との間には良い相関関係がある。したがって、尿中代謝産物濃度から有機溶剤の暴露濃度を推定することができる。

6.1 トルエン濃度対馬尿酸濃度⁹⁾

(1) 標準チャートの作成

一定のトルエン濃度に暴露されたグループについての尿中HAの測定結果から、HA濃度の平均値、信頼限界および

棄却限界を算出し、トルエン暴露と各グループのHA平均濃度との回帰直線、各グループのHA平均濃度の90%信頼限界および個々のHA濃度の90%信頼限界を示したのが図5である。

(2) 正常範囲および暴露の有無の判別

HAは、トルエン非暴露者尿中からも検出される。これは主として、食品中の安息香酸によるものである。HAの正常範囲の上限およびトルエンの判別限界濃度DC（緒方、田口：1986）の算出法を説明する。 $x = 0$ ppmのときyの個々のデータの95%上限がHAの正常範囲の上限0.58 g/g・クレアチニン (NL₅) である。尿中HA濃度がNL₅以上であると、トルエンの暴露あり（危険率5%）と推定できる。次に $x = 0$ のときの個々のデータの95%上限からx軸に平行に線を引き、個々のデータの95%下限との交点から下ろした垂線とx軸との交点のトルエン濃度が、HAから暴露を判別できるトルエンの限界濃度 (DC) である。すなわち、トルエン濃度が37 ppm以下の暴露であった場合、尿中のHA濃度からトルエン暴露の有無を明確に判別できない。

(3) TLV-TWA相当値

トルエンの許容濃度 (TLV-TWA : 100 ppm) 暴露のときの暴露グループの平均値 (ML₅₀) は、2.35 g/g・クレアチニンである。したがって、ML₅₀は、TLV-TWA暴露相当値である。ACGIH（米国産業衛生専門家会議）は、BEI（生物学的暴露指標）¹⁰⁾を勧告しているが、トルエンについては、BEI値として2.5 g/g・クレアチニンを勧告している。ML₅₀は、このBEI値に相当するものである。TLVに暴露した際に50%の人はML₅₀の値を超え、50%の人はこの値以下ということになる。個人の尿中HA濃度がTLV相当平均値2.35 g/g・クレアチニンであった場合、この濃度から推定できる個人（90%）の暴露濃度範囲は79~125 ppmである。

(4) スクリーニングレベル

スクリーニングレベルとして、個々のデータの両側10%

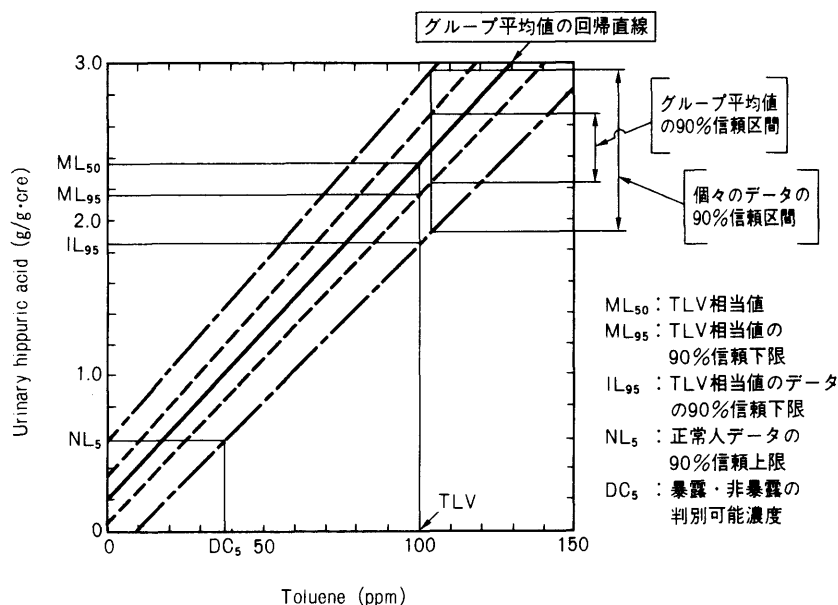


図5 気中トルエン濃度と尿中馬尿酸濃度の関係（緒方、田口 1988）

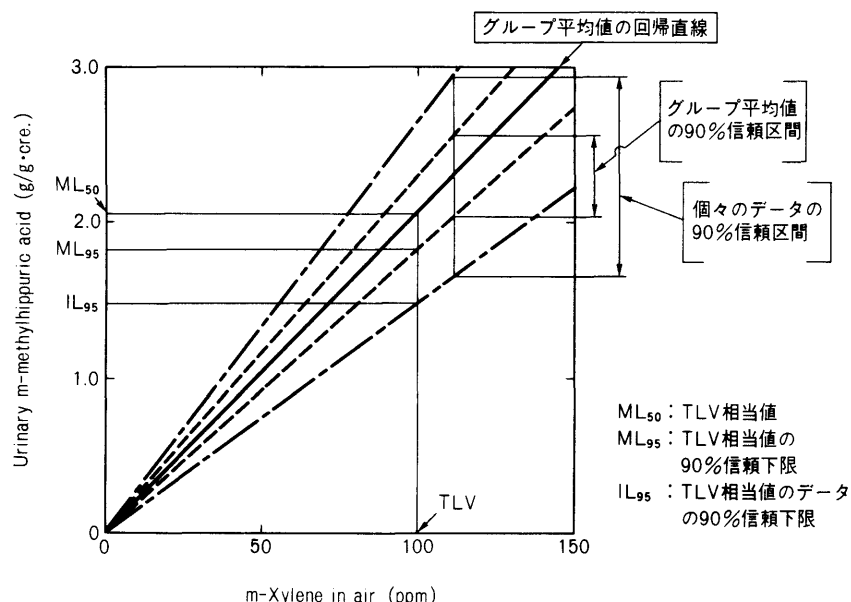


図6 気中m-キシレン濃度と尿中m-メチル馬尿酸濃度の関係(緒方, 田口 1986)

の棄却限界(90%レンジの下端値)を利用すればIL₉₅(1.85 g/g・クレアチニン)がスクリーニングレベルとなる。

6.2 m-キシレン濃度対m-メチル馬尿酸濃度⁶⁾

図6はm-キシレンとm-MHAとの関係を示す回帰直線で、図5と同様にして作図したものである。非暴露尿には、MHAが含まれていないので、測定法の特異性による測定値の上限を越えれば、暴露を推定することができる。キシレンの許容濃度100 ppm相当値は2.05 g/g・クレアチニンである。一方、ACGIHの生物学的暴露指標は1.5 g/g・クレアチニンである。スクリーニングレベルは1.4 g/g・クレアチニンである。また、p-キシレンとp-MHA、o-キシレンとo-MHAの関係もm-キシレンとm-MHAとの関係とほぼ等しい。

6.3 スチレン濃度対マンデル酸またはフェニルグリオキシル酸濃度

強化繊維プラスチック製のボート製作所の池田ら¹¹⁾によるスチレンの気中濃度と尿中MAの回帰式から、スチレンのTLV-TWA(50 ppm)相当値を算出すると、尿中MA濃度は比重1.016補正では818 mg/l、クレアチニン補正では828 mg/g・クレアチニンとなる。また、PGAについてスチレン50 ppm相当値は、比重1.016補正では278 mg/l、クレアチニン補正では238 mg/g・クレアチニンとなる。

ACGIHの生物学的暴露指標は尿中MAは1 g/lまたは0.8 g/g・クレアチニン、PGAは250 mg/lまたは240 mg/g・クレアチニンである。

7. 有機溶剤中毒予防規則(労働省令)による健康診断

有機溶剤中毒予防規則の改正³⁾により、有機溶剤特殊健康診断に尿中代謝産物検査が採用され、平成元年10月1日から施行されることとなった。作業環境管理などの労働衛生対策の進展により、労働者の有害因子への暴露状況は、高濃度暴露からより低濃度暴露へと変化してきたため、従来

の検診項目では対応しきれなくなったのが現状であった。このため、健康障害が発現する前段階に有害物による健康影響を把握する—①有害物の体内摂取状況、②有害物質に対する早期の生体反応の把握、③有害物質による早期の健康障害の把握—という観点から今回の有機溶剤健康診断の改正となった。

代謝産物の検査について、対象有機溶剤名と検査内容を表1に示す。また、有機溶剤健康診断結果報告書の中で、代謝産物の測定結果について、3区分に分けて労働基準監督署長に報告するようになっている。労働省の通達¹²⁾によると、「この分布の区分は正常・異常の鑑別を目的としたものではない」としているが、分布3の数値はおおむねACGIHのBEI値(すなわちTLV-TWA暴露相当値)に一致している。有機健康診断では、尿中濃度に対して、比重補正やクレアチニン補正について触れていないが、「尿の排泄量が極端に多いか、または少ない尿を用いることは検査結果に影響を与えるので、適切な水分摂取について指導することが必要であること」と尿量について注意することが通達¹²⁾の中で示されている。一般には、極端に濃い尿(比重>1.030、クレアチニン3 g/l)または極端に薄い尿(比重<1.010、クレアチニン<0.5 g/l)については、尿を再採取¹³⁾するか、少くとも比重またはクレアチニンで補正する必要がある。

8. おわりに

労働衛生の分野で生物学的モニタリングの手法が発展してきたが、ACGIHは、1985年からBEI(生物学的暴露指標値)を勧告し始め、また、DFG¹⁴⁾(Deutsche Forschungs Gemeinschaft)は1981年からBAT(生物学的許容値)を勧告し始めた。一方、わが国では、1986年に日本産業衛生学会の中に「生物学的モニタリング研究会(世話人:緒方正名)」が発足し、さらに1988年に日本衛生学会の中にワークショップ「ヒトにおける有害化学物質の生物学的モニタリ

表1 有機溶剤健康診断（労働省令 有機溶剤中毒予防規則）

有機溶剤の名称	検 査 内 容	単 位			
			1	2	3
11. キシレン	1. 尿中のメチル馬尿酸	g / l	0.5以下	0.5超	1.5以下
30. N・N-ジメチルホルムアミド	1. 尿中のN-メチルホルムアミド	mg / l	10以下	10超	40以下
31. スチレン	1. 尿中のマンデル酸	g / l	0.3以下	0.3超	1以下
33. テトラクロルエチレン	1. 尿中のトリクロル酢酸	mg / l	3以下	3超	10以下
	2. 尿中の総三塩化物	mg / l	3以下	3超	10以下
35. 1・1・1-トリクロルエタン	1. 尿中のトリクロル酢酸	mg / l	3以下	3超	10以下
	2. 尿中の総三塩化物	mg / l	10以下	10超	40以下
36. トリクロルエチレン	1. 尿中のトリクロル酢酸	mg / l	30以下	30超	100以下
	2. 尿中の総三塩化物	mg / l	100以下	100超	300以下
37. トルエン	1. 尿中の馬尿酸	g / l	1以下	1超	2.5以下
39. ノルマルヘキサン	1. 尿中の2,5-ヘキサジオン	mg / l	2以下	2超	5以下

ング」（代表：緒方正名）が発足し活動してきた。この間に生物学的モニタリングは、職場の労働衛生管理のための有力な手法として認められ、広まり、データも蓄積されつつあるようになった。このような生物学的モニタリングの発展の要因として分析技術の発達、とりわけHPLCとGCの進歩と普及が挙げられる。現在では、トルエン、キシレンおよびスチレンの尿中代謝産物は、尿を希釈するだけで特別な前処理をすることなく簡便かつ精度よく、しかも同時に測定できるようになった。生物学的モニタリング手法の発展と分析技術の発達とあいまって、労働省は労働者の健康管理のための有力な情報源として尿中代謝産物の検査を健康診断に採り入れた。今後さらに生物学的モニタリングについてのデータが蓄積され、生物学的モニタリングが労働衛生管理に今以上に役立つ情報を与えることを期待している。なお、生物学的モニタリングについては、著者らの総説等を参照されたい^{15)~19)}。

参考文献

- 1) 労働省労働基準局：（1989）労働衛生のしおり（1989）pp. 207~208.
- 2) 労働省令第23号：有機溶剤中毒予防規則の一部改正（1989）
- 3) American Conference of Governmental Industrial Hygienists : Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. ACGIH, Cincinnati, OH (1988) .
- 4) ACGIH編, 緒方正名訳：生物学的暴露指標(1987)同文書院
- 5) Araki S, Aono H, Murata K : Adjustment of urinary concentration to urinary volume in relation to erythrocyte and plasma concentration : an evaluation of urinary heavy metals and organic substances. Arch Environ Health (1986) 47, 171~177.
- 6) Ogata M and Taguchi T : Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. Int Arch Occup Environ Health. (1988) 61 : 131~140.
- 7) Ogata M and Taguchi T : Quantitation of urinary metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene, benzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. Int Arch Occup Environ Health (1987) 59, 263~272.
- 8) 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、岡山医学会雑誌（1990）102（1, 2）113-127
- 9) Ogata M and Taguchi T : Quantitative analysis of glycine conjugate by high performance liquid chromatography : excretion of hippuric acid and methylhippuric acids in the urine of subjects exposed to vapours of toluene and xylenes. Int Arch Occup Environ Health. (1986) 58 : 121~129.
- 10) American Conference of Governmental Industrial Hygienists : Threshold limit values and biological exposure indices for 1989-1990. ACGIH, Cincinnati, OH (1989)
- 11) Ikeda M, Koizumi A, Miyasaka M and Watanabe T : Styrene exposure and biological monitoring in FRP boat production plants. Int Arch Occup Environ Health. (1982) 49 : 325~339
- 12) 労働省基発第463号：有機溶剤中毒予防規則第29条及び鉛中毒予防規則第53条に規定する検査のための血液又は尿の採取時期及び保存方法並びに健康診断項目の省略について（1989）
- 13) Alessio L, Berlin A, Dell'Orto A, Toffoletto F, Ghezzi I : Reliability of urinary creatinine as a parameter used to adjust values of urinary biological indicators. Int Arch Occup Environ Health (1985) 55, 99~106.
- 14) Deutsche Forschungsgemeinschaft : Maximum concentration at the workplace and biological tolerance value for working materials. (1986) .
- 15) 緒方正名, 田口豊郁：労働衛生管理における生物学的モニタリングの意義, トキシコロジーフォーラム（1988）11（4）, 333~344
- 16) 緒方正名, 田口豊郁（1986）（1987）有機溶剤と健康障害〔前編〕生物学的モニタリングの基礎—生体内運命, 健康障害—作業環境 7(6) : 43~50, 8(1) : 35~40
- 17) 緒方正名, 田口豊郁（1987）有機溶剤と健康障害〔後編〕生物学的モニタリングの実際—意義と測定法—, 作業環境 8(2) : 37~46, 8(3) : 43~50
- 18) 緒方正名（1987）有機溶剤取り扱いの健康管理, 産業医学シリーズ1, 有機溶剤, 産業医学振興財団, pp.63~93
- 19) EC委員会発刊, 緒方正名, 武田和久訳（1987）工業化学物質の（ヒト）の生物学的モニタリング, 同文書院

尿中デルタアミノレブリン酸の分析

Improved Method for The Determination of Urinary δ -Aminolevulinic Acid in Lead Workers

菅原 悦子* 友国 勝磨**

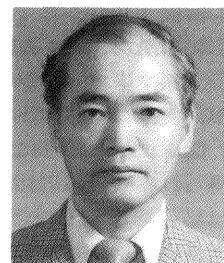
(平成元年12月6日受理)

1. はじめに

鉛による中毒症状の記載は古くはヒポクラテスまでさかのぼり、日本では明治、大正のころ原因不明の乳児の脳膜炎が母親の使用する鉛白を主体としたお白粉（おしろい）に由来する鉛中毒であることが大正12年、平井教授によって明らかにされた。その後、三木もと氏により鉛白に代わるチタン酸バリウムを素材としたお白粉が作り出されたことによって乳児の鉛中毒による脳膜炎は姿を消し、白粉を大量に使う歌舞伎役者の寿命を延ばすこととなった。鉛は融点が低く、軟らかで加工しやすく、他の金属との摩擦係数が小さいこと、耐食性に優れていることなどから現在でも多くの製品に使われているが、作業環境の改善により鉛中毒の発生例は減少している。鉛による生体の影響で最も知られているのは、ヘムの合成阻害から生ずる貧血である。呼吸器あるいは消化器から侵入し血液に入った鉛は、容易に赤血球膜を通過して赤血球内に入るが、骨髓に存在する骨髓赤芽球にも容易に入り、ヘム合成系の δ -アミノレブリン酸脱水酵素（ALA-D）、ヘム合成酵素を阻害し、一方 δ -アミノレブリン酸合成酵素を活性化し、その他グロビンの合成を阻害する。そのために最終的な合成ヘム総量は減少し、 δ -アミノレブリン酸（ALA）やコプロポルフィリン（CP）、遊離プロトポルフィリン（FEP）および亜鉛プロトポルフィリン（ZPP）等の中間産物が増加することとなる。実際に鉛作業員の尿中ALAの増加を明らかにしたのはHaeger-Aronsen¹⁾であるが、その後鉛暴露と尿中ALAの関連については多くの事実の蓄積がなされ、その測定意義が評価されてきた。1989年10月1日から鉛中毒予防規則の健康診断項目が改正され、鉛作業員の暴露指標に血中鉛とともに尿中ALAの測定が加えられたことにより労働衛生に携わる人には尿中ALAの測定の機会は増えることと思われる。尿中ALAの測定法と意義について著者らの経験を折り交ぜながら触れてみたいと思う。

2. 尿中ALA測定の変遷

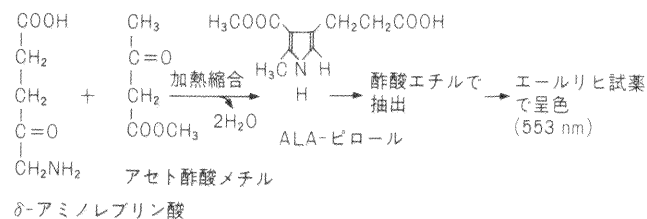
尿中ALA測定法の変遷に触れるとき、生体試料、特に尿においては目的物質以外の夾雑物をいかに除去するかという問題に多くの研究者の知恵と苦労の跡を知る思いである。尿中ALAの測定法は、最終的にはALA・ピロールをエールリヒ試薬で呈色させるという方法であるが、エールリヒ反応を考えれば容易に想像がつくように尿中にはエールリヒ試薬（p-ジメチルアミノベンズアルデヒド）と反応する物質がALA以外にも相当量存在するために、これらの共存物質を分離除去する方法として二つの方法が考えられた。一つにはカラムクロマトグラフィーを用いる方法で、陰イオ



ン交換樹脂と陽イオン交換樹脂を用いるMauzerall-Granick法²⁾、浦田-Granick法³⁾、Davis-Andelman法⁴⁾などがある。また、陽イオン交換樹脂だけを用いるWilliams-Few法⁵⁾、Sum, et al. 法⁶⁾などは前者の簡便法として考案されたものである。ここで陰イオン交換樹脂は尿中のポルホビリノーゲンの除去に、また陽イオン交換樹脂は尿素、ウロビリノーゲン、アミノアセトンの除去に有用とされている。Mauzerall-Granick法と浦田-Granick法は特異性、精度の点から優れた方法ではあるが、操作が複雑で多数検体の測定には不適当である。そこで考え出されたもう一つの方法は、エールリヒ試薬と反応する非特異物質を有機溶媒で抽出除去する方法である。和田らの方法⁷⁾ではブタノールを用いてあらかじめ尿中のウロビリノーゲンやインジカンを除き、一方、友国・緒方法⁸⁾では形成したALA・ピロールを特異的に酢酸エチル層に抽出し、呈色に導くという非常に効率のよい方法で、現在最も普及している方法と言える。近年、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の普及により、HPLCを用いた尿中ALAの定量的試みがなされている^{9),10)}。各々の詳細については文献を参照されたい。

3. 尿中ALA定量法

尿中ALAのスクリーニング検査法として、一般的に利用されている友国・緒方法⁸⁾に若干の改良を加えた方法¹¹⁾について紹介する。測定の原理は下記のようなものである。



操作法は尿をあらかじめ蒸留水で3倍に希釈し、この1 mlを2本の試験管（A）、（B）に各々にとり、ALA標準液（5 mg/l）1 ml（S）も同時に用意する。1 M酢酸緩衝液（pH 4.6）を1 mlずつ加え、さらに（A）、（B）にアセト酢酸メ

* 中部労災病院 健康診断センター 研究指導部

** 佐賀医科大学 地域保健科学 教授、医博

チル0.2 mlを加えてパイプレーションミキサで2～3秒混和する。すべての試験管を沸騰湯浴中で10分間加熱したのち冷却する。酢酸エチル3 mlを加えて振とう（数分間）した後、遠心して二層に分離する。上層（酢酸エチル層）2 mlを別の試験管にとり、2 mlのエールリヒ試薬を加えて混和し発色させる。10分後に酢酸エチル・エールリヒ試薬（1：1）混液を対照として波長553 nmで吸光度を測定する。

ここで原法の改良点とは、尿を希釈したことと縮合剤をアセト酢酸エチルからアセト酢酸メチルに変えたことである。尿中ALAの定量もALA標準液に対する相対的濃度測定であり、尿マトリックスの影響がないという前提に立っているが、実際には尿マトリックスによる負の影響が認められた。図1に示すように、種々の尿に既知量のALAを添加して得られる検量線の傾きはALA標準液だけの検量線の傾きとは必ずしも平行せず、比重の高い尿ほど平行性のずれは大きいことがわかった。そこで、尿マトリックスの影響を小さくするために尿を希釈することを考え、蒸留水で

2倍、3倍、4倍に希釈した尿に既知量のALAを添加して検量線の傾きを比較してみると、3倍以上の希釈によってALA標準液だけの検量線とほぼ平行することがわかった（図2）。種々の尿について原法と改良法でALAを定量し、比較したのが表1であるが、希釈の効果はほぼ満足のいくものであった。次に、原法では縮合剤としてアセト酢酸エチルを用いていたが、アセト酢酸エチル、アセト酢酸メチル、アセチルアセトンの3種類を用いてALA・ピロールの形成の度合いを比較してみると、アセト酢酸メチルが最も高いことがわかり（図3）、改良法ではアセト酢酸メチルを縮合剤として用いることとした。

4. 鉛暴露と尿中ALA

鉛に暴露されていないと思われる健常者の尿中ALA濃度は、友国ら¹²⁾によれば対数正規分布を示し、その幾何平均値は2.81、SDの範囲は1.95～4.04、95%上限値は5.74 mg/lである。これまで労働省が採用していた鉛中毒認定基準の尿中ALA濃度は6 mg/lであったが、1989年10月の改正に

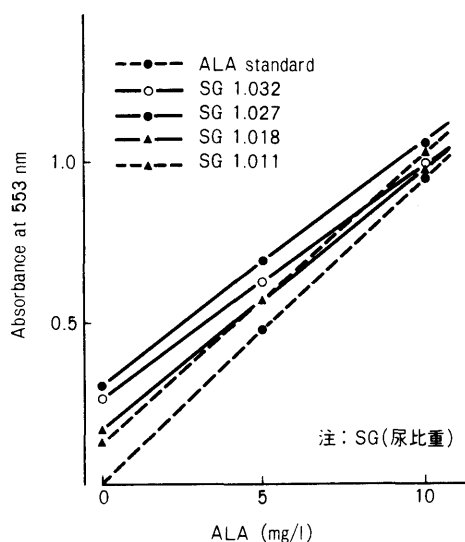


図1 種々の尿に既知のALAを添加した場合の吸光度

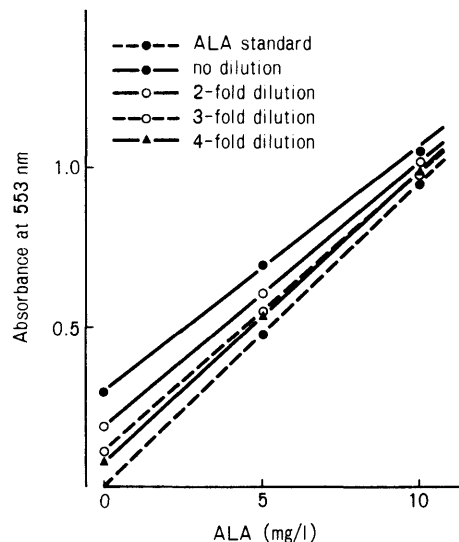


図2 希釈した尿に既知のALAを添加した場合の検量線の傾き

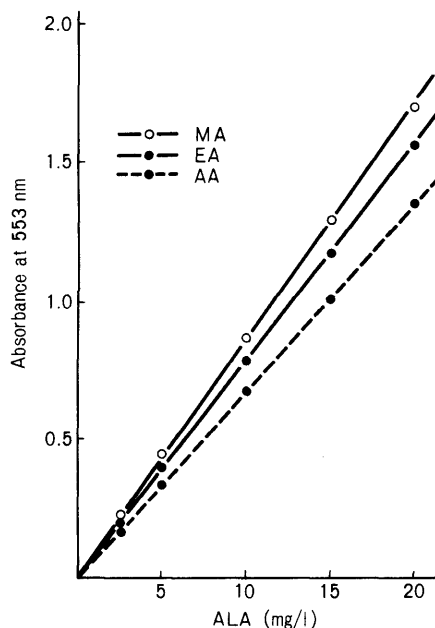
表1 三法での尿中ALA定量の比較

Subject	Urinary ALA (mg/l)			Ratio (%)	
	Present method (A)	Standard addition method (B)	Tomokuni and Ogata method (C)	(A)/(B)	(C)/(B)
1	2.5	2.4	1.8	104	75
2	2.8	3.0	2.4	93	80
3	3.6	3.8	3.0	95	79
4	4.7	4.8	3.3	98	69
5	8.2	8.1	6.0	101	74
6	8.5	8.7	7.3	98	84
7	9.7	10.5	8.0	92	76
8	17.4	18.9	13.5	92	71
9	20.4	21.9	17.4	93	79
10	34.2	37.2	36.0*	92	97
			Mean	96	78
			SD	4	7

★This value was determined using the urine sample of 5-fold dilution

より10 mg/lに引き上げられた。血中鉛が40 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以下の低濃度の鉛暴露指標としては、末梢血の赤血球ALA-D活性が有用とされている¹³⁾。また、血中鉛が40 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上では尿中ALAの増加が認められるようになり(図4)、尿中ALAは中程度以上の鉛暴露指標と言えよう。血中鉛の99%以上は赤血球内に存在しており¹⁴⁾、鉛から離脱後、血中鉛濃度は指数関数的に減少するが、その半減期は3.3年~4.8年¹⁵⁾、著

者らの経験でも血中鉛が80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上では7.9か月、それ以下では18.2か月¹⁶⁾というように非常に長いことが知られている。したがって、鉛作業者の血中鉛濃度は鉛の再暴露を受けていてもさほど大きな変化を示さないが、尿中ALAの増加は顕著であることから(図5)、尿中ALAは近い時点での鉛の再暴露の推定にも役だつと考えられる。血中鉛が40~60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ のときに認められる他の生化学的変化としては、尿中CPの増加や赤血球中のFEPやZPPの増加、網状赤血球の軽度増加などが挙げられている。なお、血中鉛濃度と貧血との関連については、高濃度暴露を受けた鉛作業者の鉛から離脱後の血中鉛の減少と貧血の回復経過から、赤血球数が正常域以下に減少するのは血中鉛が約110 $\mu\text{g}/\text{dl}$ から、ヘモグロビン濃度では血中鉛が約80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ からと推定された(図6)。鉛による貧血の原因としてはヘムの合成阻害のほかに赤血球寿命の短縮が挙げられており、現在そのメカニズムについて検討中である。



注：MAアセト酢酸メチル，EA：アセト酢酸エチル，
AA：アセチルアセトン

図3 ALA・ピロール形成における縮合試薬の比較

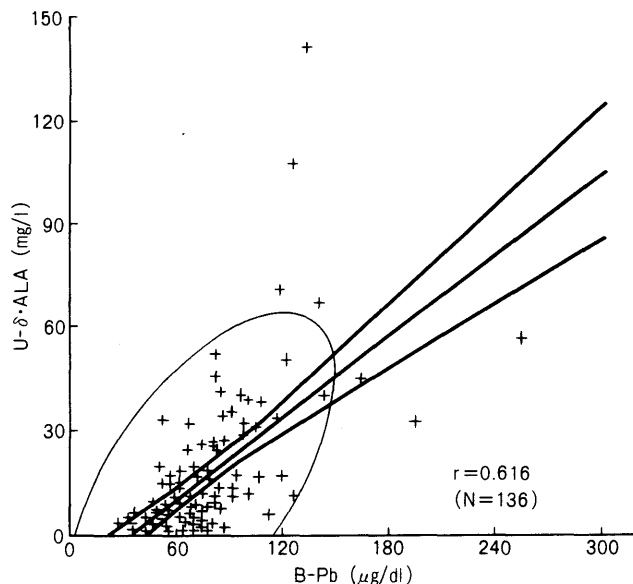


図4 血中鉛と尿中 δ -アミノレブリン酸の関係

〔図の曲線は信頼だ円，直線は回帰直線(中)と信頼区間(上，下)を示す。〕

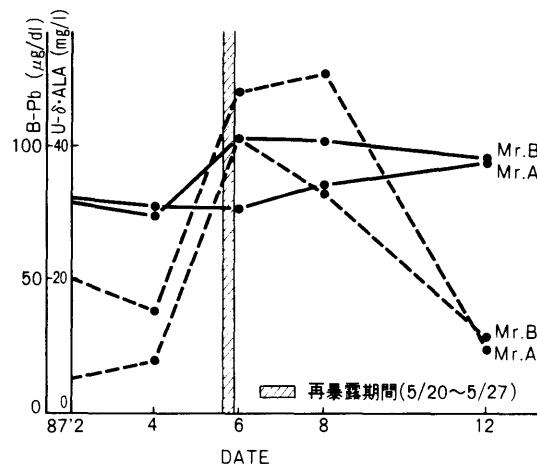


図5 鉛に再暴露後の血中鉛と尿中 δ -アミノレブリン酸の変化
(実線は血中鉛，破線は尿中 δ -アミノレブリン酸)

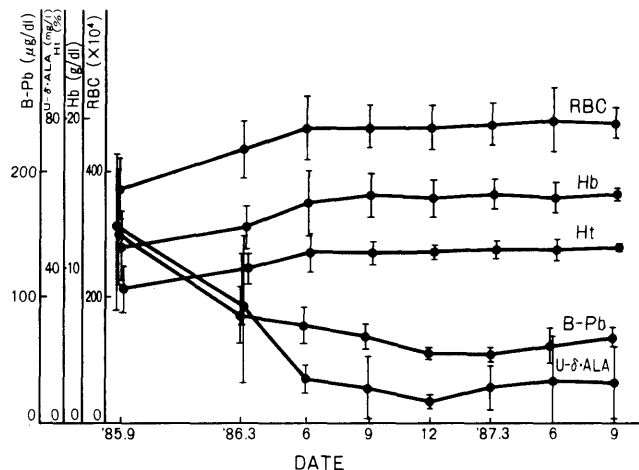


図6 血中鉛の減少と貧血の回復

(5名の作業者の鉛離脱後の経過，各々平均値と標準偏差を示した。)

5. おわりに

おわりに、本研究についてご指導いただいた中部労災病院健康診断センター、故長谷川敬彦研究指導部長に対し深謝する次第である。

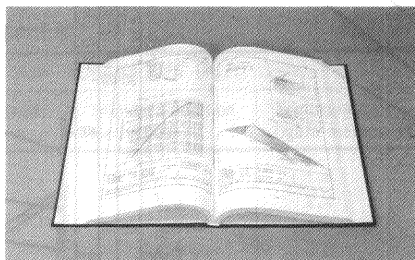
参考文献

- 1) Haeger-Aronsen, B. Studies on urinary excretion of delta-aminolevulinic acid and other haem precursors in lead workers and leadintoxicated rabbits. Scand.J.Clin. Lab.Invest. 12 (Supple 47), 1, 1960
- 2) Mauzerall, D. and Granick, S.: The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J. Biol. Chem. 219, 435, 1956
- 3) Ulata, G. and Granick, S.: Biosynthesis of α -amino-ketones and the metabolism of aminoacetone. J. Biol. Chem. 238, 811, 1963
- 4) Davis, J.R. and Andelman, S.L.: Urinary delta-aminolevulinic acid (ALA) levels in lead poisoning: I. A modified method for the rapid determination of urinary delta-aminolevulinic acid using disposable ion-exchange chromatography columns. Arch. Environ. Health. 15, 53, 1967
- 5) William, M.K. and Few, J.D.: A simplified procedure for the determination of urinary δ -aminolevulinic acid. Brit. J. Ind. Med. 24, 294, 1967
- 6) Sum, M.W., et al.: A single column method for the determination of urinary δ -aminolevulinic acid. Clin. Chem. 15, 183, 1969
- 7) Wada, O., et al.: A simple method for the quantitative analysis of urinary delta-aminolevulinic acid to evaluate lead absorption. Brit. J. Ind. Med. 26, 240, 1969
- 8) Tomokuni, K. and Ogata, M.: Simple method for determination of urinary δ -aminolevulinic acid as an index of lead exposure. Clin. Chem. 18, 1534, 1972
- 9) Okayama, A.: Fluorimetric determination of urinary δ -aminolevulinic acid by high performance liquid chromatography and post-column derivatization. J. Chromatogr. 426, 365, 1988
- 10) Tabuchi, T., Okayama, A., Ogawa, Y., Miyajima, K., Hirata, M., Yoshida, T., Sugimoto, K. and Morimoto, K.: A new HPLC-fluorimetric method to monitor urinary delta-aminolevulinic acid (ALA-U) level in workers exposed to lead. Inv. Arch. Occup. Environ. Health 61, 297, 1989
- 11) 友国勝麿, 長谷川敬彦, 菅原悦子: 鉛作業における尿中デルタアミノレブリン酸定量法の改良について, 産業医学, 28, 114, 1986
- 12) 友国勝麿, 緒方正名: 鉛作業者の尿中デルタアミノレブリン酸の測定意義と簡易定量法, 労働の科学, 28, 23, 1973
- 13) 大森昭子, 山川みさ子, 原田幸一, 三浦 創: 授与鉛量とポルフィリン代謝に関する各種指標との関係, 産業医学, 21, 257, 1979
- 14) Desilva, P.E.: Determination of lead in plasma and studies on its relationship to lead in erythrocytes. Br.J. Med. 38, 209, 1981
- 15) Araki, S., Murata, K., Aono, H., Yanagihara, S. and Ushio, K.: A comparison of the diminution rates of lead in blood and lead mobilized by CaEDTA after termination of occupational exposure: A long-term observation in two lead workers. J. Toxicol-Clin. Toxicol. 20, 475, 1983
- 16) 長谷川敬彦, 三宅俊宏, 菅原悦子, 福村 亮, 堀 浩, 橋瓜 稔: 鉛再生鑄造工場で発生した鉛中毒例の臨床経過と工学的対策, 日本災害医学会会誌, 36, 890, 1988

Topics

日立理化学機器データ集 「分光蛍光」を発刊

日立理化学機器データ集シリーズは、すでに原子吸光、液体クロマト、ガスクロマトが出版されていますが、このたび「分光蛍光」がこれに加わりました。本データ集は、基礎データ、分析例、および解説から構成されています。基礎データに関しては、次のような特



長を盛り込んで実用性を高めています。

- (1) 蛍光スペクトルと励起スペクトルは補正されているので、測定装置によらない真の形を示しています。
- (2) 濃度と相対蛍光強度の関係が、両対数グラフに描かれているので、蛍光

分析可能な濃度範囲がわかります。

- (3) 希薄溶液の蛍光スペクトルをのせたので、検出限界の濃度を確認することができます。
- (4) 三次元蛍光スペクトルと等高線図から、励起波長と蛍光の関係を含体的に把握することができます。

分析例としては、生体内のカルシウム、牧草中のセレン、希土類元素原料中のテルビウムなど、ただちに役立つ例を取り上げました。

解説では、測定法や測定装置の原理、測定上の留意点などが詳しく述べられています。

■A4判, 250頁, ¥27,000

全血中のプロトポルフィリン量の測定法について

Determination of Protoporphyrins in Whole Blood

坂上 佳司* 原田 章**

(平成元年11月29日受理)

1. はじめに

血液中的プロトポルフィリン量の測定は、鉛暴露によるヘム代謝異常の指標の一つとして注目されてきた。しかし、吸光光度法による測定法はやかかいで、また、多量の血液が必要であったため、労働衛生の現場では、あまり用いられていなかった。

ところが、Sassa¹⁾やPiomelli²⁾によって、20～50 μ lの血液で測定ができる蛍光光度法が開発され、さらに分光蛍光光度計が広く普及して、ようやく鉛暴露の影響モニタリングとして活用されるようになった。この方法は、酢酸エチルと酢酸の混合液で抽出した後、さらに塩酸溶液で逆抽出し、蛍光光度法で定量する方法である。Piomelliの論文が、“A micro method for free erythrocyte porphyrins: The FEP test”として発表されたので、赤血球遊離プロトポルフィリン量(FEP量)の測定法として普及している。

一方、Lamola³⁾が鉛中毒患者の血液中には、このプロトポルフィリンに亜鉛と結合しているプロトポルフィリンのあることを、蛍光スペクトルによって証明した。さらに、Garden⁴⁾やHart⁵⁾によって、亜鉛プロトポルフィリン量の測定法が考案された。すなわち、エタノールやアセトンで抽出する方法により、亜鉛プロトポルフィリンとプロトポルフィリンの同時定量が可能となった。

ここでは、酢酸エチル／酢酸抽出による方法およびアセトン抽出による方法を使用した検討結果と、血液中的鉛量とプロトポルフィリン量との関係を検討した結果について報告する。

2. 試薬および機器

亜鉛プロトポルフィリン(以下、ZnPと略す)、およびプロトポルフィリンIX(以下、P.P.と略す)の標準物質は、Porphyrin Products(Logan, Utah)製を用いた。購入したプロトポルフィリン類の結晶を、約5 mgずつ秤(ひょう)量し、ZnPはピリジンで、P.P.はエタノール(99.5%)で、それぞれ500 mlの保存溶液として溶解した。この保存溶液の使用に当たっては、後述する校正方法により正確なZnPとP.P.の濃度を求めておく必要がある。

その他の試薬については、すべて試薬特級を用いた。

分光蛍光光度計は、日立650-10型に、浜松ホトニクスR-456光電子増倍管を装着して使用し、日立056型記録計を用いて蛍光スペクトルを記録させ、ピークの高さから濃度を測定した。

血液中的鉛量の測定には、日立偏光ゼーマン原子吸光光度計を用い、光温度制御付属装置を組み合わせ使用した。

血液はリン酸アンモニウムとトリトンを含む溶液で希釈し⁶⁾、オートサンプラーを用いて黒鉛管に注入した。

3. 測定対象および試料

ZnP量の正常範囲を調査するため、大阪近郊の電機工場に勤務する、鉛を取り扱っていない作業員の血液中のZnP量をアセトン抽出法で測定した。また、調査対象の鉛作業員の集団は、はんだ製造事業場や電子機器製造工場に勤務する作業員である。血液は健康診断の際に、抗凝固剤を予め添加した真空採血管を使用して、静脈血を採血した。

4. 蛍光スペクトル

図1に、アセトン溶液として測定したZnPとP.P.の標品の蛍光スペクトルを、また図2に、鉛作業員の血液からアセトン溶液で抽出して測定した蛍光スペクトルの例を示す。この鉛作業員の血液中のZnP量は、117.9 μ g/l、P.P.量は61.0 μ g/lで、また血液中の鉛量は、59.6 μ g/lであった。

ZnPの最大蛍光波長は、589 nmであり、P.P.のそれは632 nmと離れているので同時定量が可能である。しかし、標品のスペクトルで分かるように、632 nm付近にはZnPのスペクトルが重なっており、P.P.量の測定がややめんどくなる。

励起スペクトルを測定したところ、ZnPは415 nmで、P.P.は405 nmで蛍光感度が最大になった。ZnPとP.P.を同時測定するために、励起波長は410 nmで測定することにした。

図3に、1.5 molの塩酸溶液で測定したP.P.の蛍光スペク

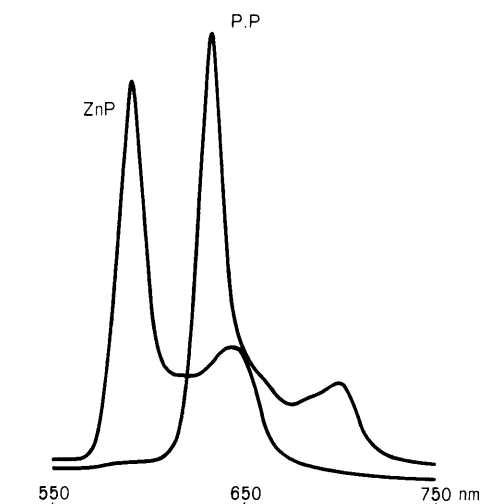


図1 亜鉛プロトポルフィリンおよびプロトポルフィリンの蛍光スペクトル(アセトン溶液)

* (社)関西労働衛生技術センター 労働衛生コンサルタント
** (社)関西労働衛生技術センター 労働衛生コンサルタント、医博

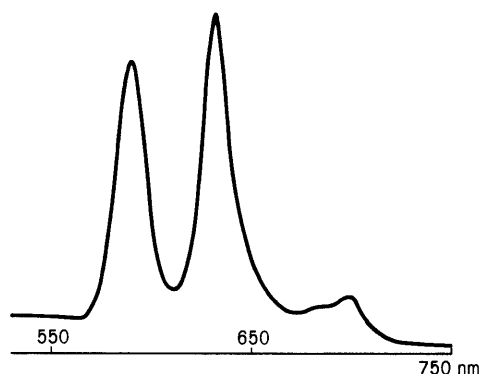


図2 鉛作業者の血液からアセトン溶液で抽出したプロトポルフィンの蛍光スペクトル

トルを示した。塩酸溶液の場合には、ZnPとP.P.いずれも同じ蛍光スペクトルを示す。酸性溶液では、ZnP中のピロール環に結合している亜鉛が取れて、P.P.となるためである。

5. 抽出操作

血液中のプロトポルフィリン類を抽出する溶媒として、エチルアルコール、アセトン／水、酢酸エチル／酢酸溶液が主に使用されている。エタノールおよびアセトン溶液で抽出した場合、遠心器で血球部分を沈殿させ、上清液を直接、蛍光スペクトルの測定に使用するが、酢酸エチル／酢酸溶液で抽出した場合は、ヘムも抽出されてくるために抽出層は、暗い赤色を呈する。このヘムが蛍光測定の際の励起波長である。400 nm付近の光を吸収するため、蛍光感度がほとんどなくなる。このため、1.5 molの塩酸に抽出して蛍光測定を行う。

抽出操作の手順は次のとおりである。

- (1) 10 mlのスピッツに、精製水0.5 mlを入れておき、血液を0.1 ml入れて攪拌（かくはん）し、溶血させる。
- (2) 抽出溶媒を5 ml加えて攪拌する。

抽出溶媒としてはエタノール（99.5%）、アセトンと精製水（4：1）混合液および酢酸エチルと酢酸（4：1）の混合液のいずれかを使用する。

- (3) 3,000 rpmで10分間遠心する。

エタノールおよびアセトン抽出の場合、上清液を直接、蛍光セルに入れて測定する。

- (4) 酢酸エチル抽出の場合は、上清液の全量を別の試験管に移し、5 mlの1.5 mol塩酸を加え、激しく攪拌する。
- (5) 約10分間放置して、完全に有機層と塩酸層が分離してから有機層を捨て、塩酸層を蛍光セルに取って測定する。

* アセトン抽出の場合、血液を希釈する精製水の量を0.2 mlから1.0 mlの範囲で変えて測定した結果、0.5 mlで蛍光感度が最大となった⁷⁾。0.7 ml以上では、有機層に色素が混入し、400 nm付近の光を吸収して、蛍光感度が低下する。

* また、酢酸エチル層から塩酸層に移す際に、色素を含む有機層を完全に除いておかないと、蛍光セルに色素が吸着して、わずかの色素でも蛍光感度を著しく低下させる。

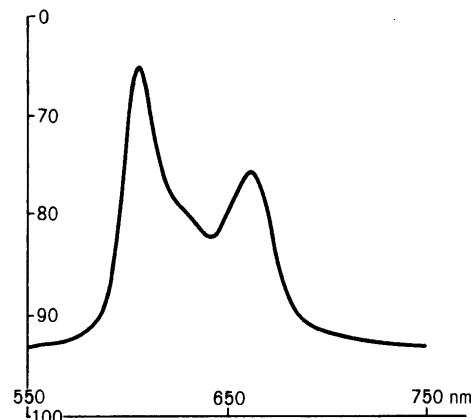


図3 プロトポルフィリンの蛍光スペクトル（1.5 mol塩酸溶液）

図1, 2, 3の測定条件

励起波長 410 nm スペクトル幅：10 nm

蛍光波長 スペクトル幅：5 nm

レンジ 1 レスポンス：norm

6. 蛍光測定

蛍光測定の場合には、必ず検量線を測定のたびごとに、濃度と蛍光強度の関係を調べる必要がある。このため、ZnPとP.P.の保存溶液の濃度を求めておかなければならない。

保存溶液の濃度は、必ずスペクトル幅1 nm以下の分光光度計を用いて補正吸光度を測定し、Rimington⁹⁾の報告した分子吸光係数により求めておく。ZnPはやや安定性に欠けるために、6か月ごとに確認しておく必要がある。

7. 測定結果

(1) 測定法の比較

酢酸エチルと酢酸混合溶液で抽出した場合、ZnPとP.P.は図3で示したように、塩酸溶液で同じスペクトルとなるので、定量値は双方を足したものとなる。この方法による測定値を、FEP量とする（ただし、このFEP量は全血中の量であり、赤血球遊離プロポルフィリン量としては、全血中の量をヘマトクリット値で補正して求める。この場合、 $\mu\text{g}/\text{dIPCV}$ —Packed cell volume—と表される）。

そこで、酢酸エチル抽出とアセトン抽出の二つの方法で、同じ血液を測定してその定量値を比較した。アセトン抽出法の場合は、ZnPの定量値を分子量を考慮してP.P.量に換算し、P.P.量と合計して測定値とした。その結果は、図4に示すように両者の測定値の間の相関係数は0.994で、回帰係数は1.03であった。

(2) ZnP量の正常値

鉛暴露を受けていない人の、血液中プロトポルフィリン量を調査した⁹⁾。電機会社に勤務し、鉛を吸っていない作業者の集団を対象として、男性392人、女性454人の血液中のZnP量とP.P.量を測定した。貧血者ではZnP量が高くなる。血色素量（ヘモグロビン量）が10 g/l以下の人は、すべてZnP量は30 $\mu\text{g}/\text{l}$ を超えていた。このため血色素量が11 g/l以上の作業員を対象とし、男女別にZnP量のヒストグラムを求めると、いずれも対数正規分布を示し、幾何平均値は男性15.2 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、女性15.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ であり、男女間には有差は認められなかった。95%上限値としては29.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ であった。

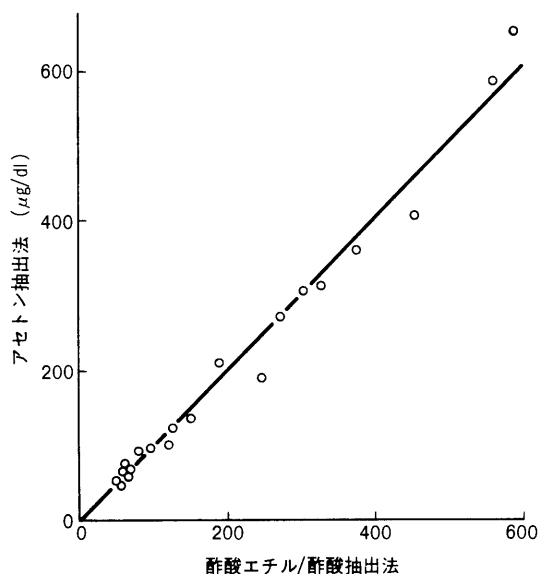


図4 酢酸エチル/酢酸抽出法およびアセトン抽出法による測定結果の比較

相関係数： $r=0.994$

回帰係数：1.03

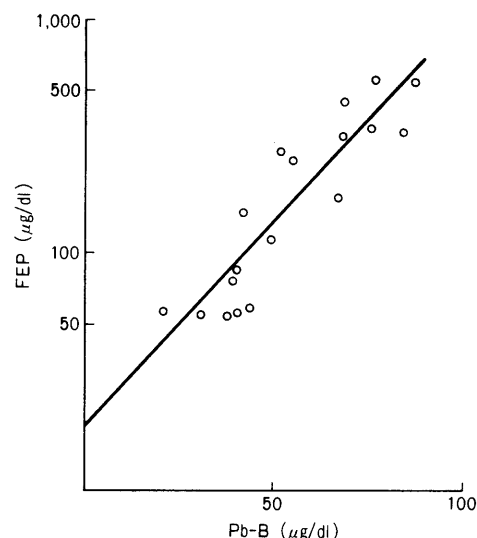


図5 血中鉛量とFEP量の関係

相関係数： $r=0.8834$

回帰式： $\log FEP=0.017 (Pb-B) + 1.26$

また、P.P.量の平均濃度は男性で $4.2 \mu\text{g/l}$ 、女性で $4.5 \mu\text{g/l}$ であった。このことから、血液中のプロトポルフィリンの約80%は、亜鉛と結びついていると考えられる。ごくまれに、P.P.量のほうがZnP量より多い作業者があり、年2回、10年間の追跡調査を行ったが、ZnP量とP.P.量の比率はほとんど変化していなかった。

したがって、FEP量としての正常値範囲は、ZnPとP.P.を合わせた約 $40 \mu\text{g/l}$ 以下であると言える。

(3) FEP量と血中鉛量との関係

FEP量は、鉛暴露によるポリフィリン・ヘム代謝系への影響の指標として有効であるとされ、血中鉛量は暴露量を知る最も有効な指標である。このため、血中鉛量とFEP量の関係が以前から検討されて、多くの報告がなされている。

しかし、単純に血中鉛量とFEP量の測定結果を対比させて相関分析を行っても、血中鉛量が $30 \mu\text{g/l}$ 以下の集団では、高い相関はみられない場合がある。鉛暴露を受けて、すぐにFEP量が増加する訳ではなく、個人差があり、また、鉛作業から離れて暴露を受けなくなって血中鉛量が減少しても、すぐにはFEP量が低下しないので、血中鉛量と比例しないと推定される。

最近、FEP量と血中鉛量を測定した、いくつかの鉛作業者の集団についてそれぞれの集団ごとに、血中鉛量とFEP量との関係を調べた。図5に示した18人の集団では、平均の血中鉛量が $54 \mu\text{g/dl}$ と非常に高く、FEP量の平均も $216 \mu\text{g/dl}$ であった。この集団では、血中鉛量とFEP量の対数値との相関係数は0.88と高い相関を示した。しかし、平均血中鉛量および平均FEP量が、いずれも $30 \mu\text{g/dl}$ 程度の25人の集団では、相関係数は0.45であり、一応ぎりぎり有意であると言える程度であった。

8. まとめ

血液中のプロトポルフィリン類の測定法としては、酢酸

エチル/酢酸抽出法でFEP量として求めても、アセトン抽出法およびエタノール抽出法でZnP+P.P.量として求めても、測定結果に差が認められなかった。

ここに説明した測定結果は、すべて血液中のプロトポルフィリン量である。鉛暴露の影響を評価する指標としては、血球中のFEP量で示されている例が多い。したがって、ヘマトクリット値で補正して評価しなければならない。もちろん、血球中の量として測定できる方法はない。

参考文献

- 1) Sassa, S.; Granick, J. L.; Granick, S.; Kappas, A.; Levere, R. D.: Biochem. med. 8, 135 (1973)
- 2) Piomelli, S.: J. Lab. Clin. Med. 81, 932 (1973)
- 3) Lamola, A. A. and Yamane, T.: Science 186, 836 (1987)
- 4) Garden, J. S.; Mitchell, D. G.; Jackson, K. W., and Aldous, K. M. Clin. Chem. 23, 1585 (1977)
- 5) Hart, D.; Piomelli, S.: Clin. Chem. 27, 220 (1981)
- 6) 坂上佳司, 栗山涼美, 原田 章: 第61回産業衛生学会講演集, 258 (1988) 金沢
- 7) 原田 章, 坂上佳司, 広田昌利, 松井良友, 吉田康久, 河野公一: 第53回産業衛生学会講演集, 505 (1980) 仙台
- 8) Rimington, C.: Biochem. J. 75, 620 (1960)
- 9) 原田 章, 坂上佳司, 栗山涼美, 河野公一: 第58回産業衛生学会講演集, 272 (1985) 北九州市

還元気化濃縮黒鉛原子吸光光度計の開発と生体試料への応用

Improvement of Graphite Furnace of AAS for On-Furnace Concentration of Metalloid Elements using Hydride Generation Technique and It's Application to Biological Sample Analysis

道辻 広美* 大原 昭男* 山口 恭平* 藤木 幸雄*

(平成元年 11 月 29 日受理)

1. はじめに

現在、有害物質取り扱い作業員の有害物暴露による事故や、急性あるいは慢性暴露を防止するために作業環境測定、尿や血液を用いた生物学的モニタリング、および特殊健康診断が実施されている。当科学センターでは、血液や尿中の金属を黒鉛炉原子吸光光度計（GFAA）を用い測定を行っている。GFAAは各種元素に対し高感度であるため、さまざまな分野で汎（はん）用されている反面、試料中に含まれる共存物質による分光干渉や化学干渉を受けやすいことや、黒鉛炉の構造上、試料導入量が微量で限定されていることに起因する相対検出限界の低下が考えられる。それらの問題を解決するために、化学干渉や分光干渉については種々のMatrix modifierの開発、相対検出限界の低下に対しては数回インジェクション法により対処されている。しかし、Matrix modifierの使用や、数回インジェクション法にはいずれの場合も限度があり、生体試料を中心とした複雑なマトリックスを持つ試料を直接GFAAで分析するには困難な場合もある。特に、半導体製造等のいわゆる先端産業分野で使用されるヒ素、アンチモン、ゲルマニウム、ビスマス、テルル等をGFAAで直接分析することは困難である。これら元素の測定は一般的に還元気化原子吸光光度計が汎用されている。

著者らは1985年において、GFAAとHAAの長所を兼ね備えた還元気化濃縮黒鉛炉原子吸光光度計（HGFAA）を開発¹⁾し、翌年に水銀の分析について一部報告した。その後、改良を重ね翌々年にはその他の元素についても報告²⁾した。HGFAAの開発に当たって留意した点は、単なる専用機（水素化物を生成し気化する元素だけ分析できる）として用いるのではなく、通常はGFAAとして使用でき、かつ簡単にHGFAAに変更できることである。

今回は、HGFAAの構造および基礎的検討について報告するとともに、生体試料について応用した結果も併せて報告する。

2. 実験装置

図1は日立180-80形のファーンレス周辺の概略である。図2には日立180-80形を改造したHGFAAの概略を示す。改造方法について以下に述べる。まず、黒鉛炉の内部にアルゴンガス（キャリアーガス）を供給するチューブを装置外部に取り出して切断する。次に、反応ビン（図3）と除湿を目的とした氷水に漬けたインピンジャーをキャリアーガス配管切断部に接続する。黒鉛製のリングの内壁は石英管（図

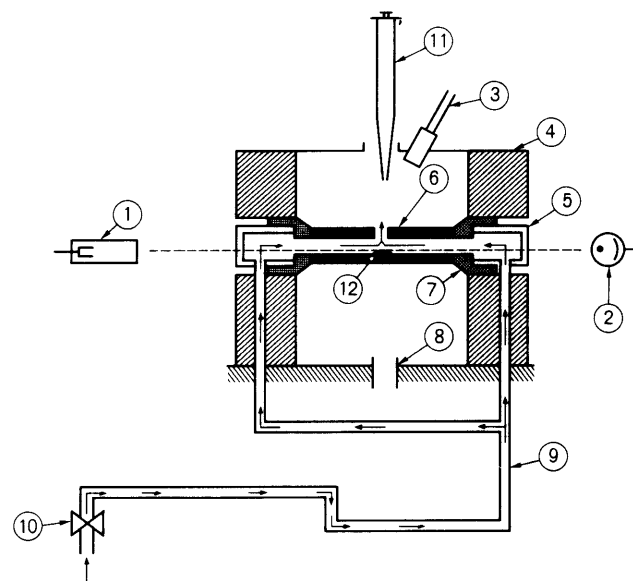


図1 通常の黒鉛炉原子吸光計の概略

① ホローカソードランプ	⑦ リング
② 光電子増倍管	⑧ シースガス排出口
③ 光温度制御装置	⑨ キャリヤーガス流路
④ 通電端子	⑩ 電磁弁
⑤ 石英管	⑪ 微量ピペット
⑥ キュベット	⑫ 試料

4)を挿入（図5）し、キャリアーガスを供給する経路はすべてタイゴンまたはテフロンチューブを用い、水素化物が経路内で反応または吸着されるのを防止した。また、テトラヒドロホウ酸ナトリウムを注入するために、ディスペンサーを用いた。図6はHGFAA使用例である。

2.1 キュベット

市販のカップ形キャベットの改造した。キャベットの試料部底中央に直径2 mm、側方下部に1 mm、合計3か所のキャリアーガス排出口を設け、希釈したカーボンセメント（ユニオンカーバイト社製C-34）に含浸した網目ガラス状カーボン（総研商事社製、80～100メッシュ）を挿入した。次に試料注入口を黒鉛板とカーボンセメントで閉じ、100℃の乾燥機で一晩乾燥後、ファーンレス内に取り付け100～600℃で99秒、1,000～2,000℃で30秒、2,400℃で20秒の温度プログラムを実行させた。また、必要に応じて行ったタンタル処理はzatka³⁾の方法に従った。

* 松下産業衛生科学センター

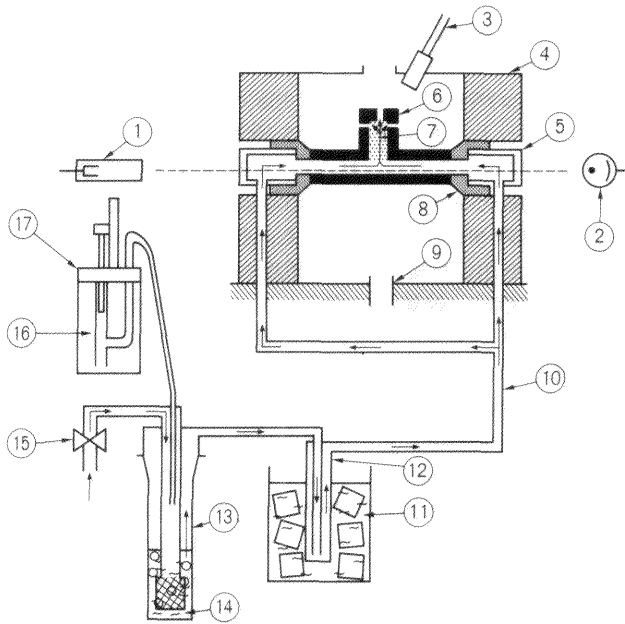


図2 還元気化濃縮黒鉛炉原子吸光度計の概略

① ホローカソードランプ	⑩ キャリヤーガス流路
② 光電子増倍管	⑪ 氷水
③ 光温度制御装置	⑫ 除湿管
④ 通電端子	⑬ 反応瓶
⑤ 石英管	⑭ 試料
⑥ キュベット	⑮ 電磁弁
⑦ 網目ガラス状カーボン	⑯ 1%テトラヒドロ
⑧ リング	⑰ ホウ酸ナトリウム
⑨ シースガス排出口	⑱ 分注器

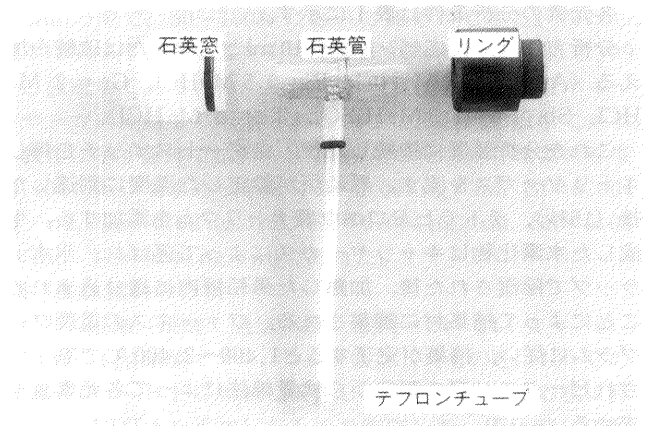


図4 石英窓、石英管、リング、テフロンチューブ

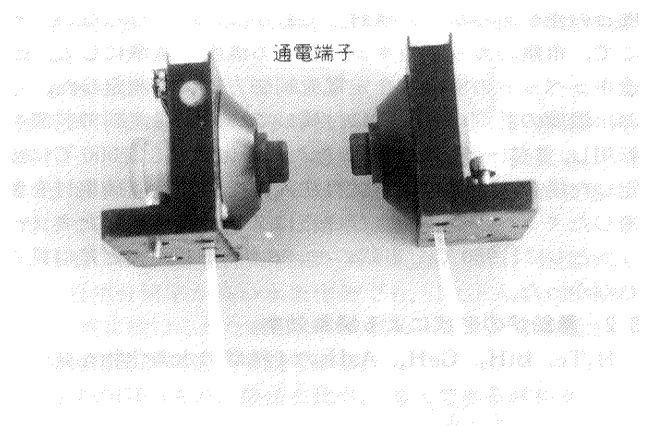


図5 通電端子

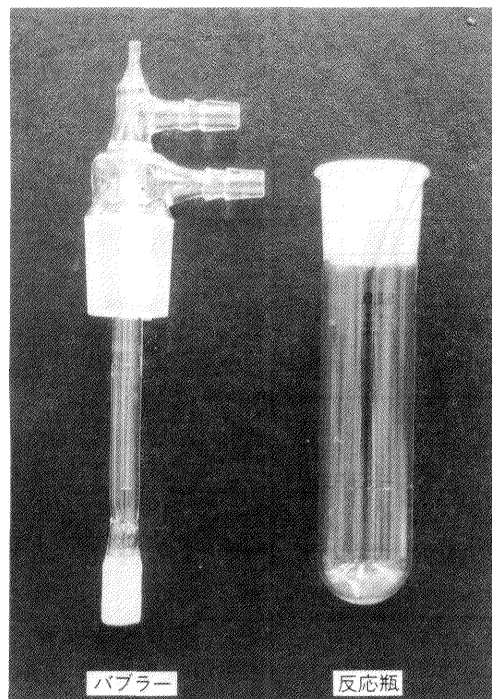


図3 バブラー、反応瓶

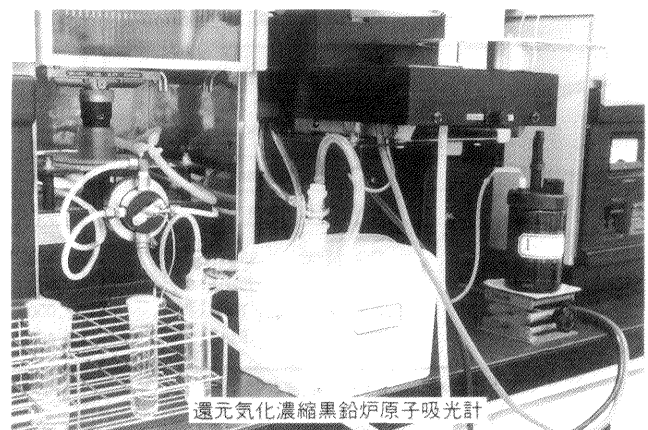


図6 還元気化濃縮黒鉛炉原子吸光度計

2.2 試薬

各元素の標準液は、和光純薬工業製1,000 ppmのものを適時希釈して用いた。テトラヒドロホウ酸ナトリウムは化学用を、塩酸および硫酸は同社製有害金属測定用を使用した。

2.3 分析条件および方法

各元素の分析条件は表1に示す。

分析方法は、反応ビンに試料10 mlと塩酸または硫酸を加える (As, Se=1 M-HCl, Bi=0.5 M-HCl, Ge=2 M-HCl, Sb, Sn=1.3 M-H₂SO₄, Te=6 M-HCl)。

これを分析装置に接続した後、スタートスイッチを押してキャリアガスを流す。黒鉛炉が設定した温度に到達した後 (15秒)、テトラヒドロホウ酸ナトリウムを添加する。生成した水素化物はキャリアガスによって運ばれ、氷水トラップで除湿された後、加熱した黒鉛炉内に送り込まれることによって捕集材に捕集される。ファーンズの温度プログラムに従い、捕集が完了すると1,400~2,400℃で原子化されピークエリアの測定から検量線法によって各元素量を求める。

3. 結果および考察

3.1 黒鉛炉の温度特性

改造キュベットを用いる場合、実温度を知る上で設定温度との差をあらかじめ検討しておかなければならない。そこで、市販のカップ型キュベットの温度を基準にして、改造キュベットの実温度を定電流制御方式にて測定した。なお、温度の計測には装置に付属している光温度制御装置を転用し、レコーダーに記録した。原子化温度を2,000℃に設定した場合、キュベット試料注入口を封鎖し、捕集材を装着したキュベット、およびさらにタンタル処理したキュベットともに1,960℃で市販のキュベットとほとんど差は見られなかった。

3.2 黒鉛炉の形状による捕集効率

H₂Te, BiH₃, GeH₄, AsH₃の4種類の水素化物を発生さ

せて、キュベットの形状の違いによる感度の比較を行った。検討に用いたキュベットは、市販のチューブ型キュベット、パイロ化キュベット、カップ型キュベット、捕集材なしの改造キュベット、および捕集材を挿入した改造キュベットの5種類である。ただし、H₂Te, BiH₃を捕集する際にはタンタル処理したキュベットを用いると感度が十分に低下するため、未処理のキュベットを用いた。捕集材を挿入した改造キュベットを用いた場合の相対感度を1.0として比較した結果を表2に示す。捕集材を挿入していない改造キュベットでもビスマス、テルルは黒鉛炉内壁に比較的良好に捕集された。市販のカップ型、チューブ型キュベットでは、ヒ素、ビスマス、テルルが10%程度の捕集であった。市販のパイロ型キュベットでは、どの元素とも捕集効率は低く、特に、ゲルマニウムは市販のキュベットすべてにおいて低値を示した。黒鉛炉内に水素化物を導入し分析する試みは、大きく2種類報告されている。一つは通常HAAと同様な使用方法⁴⁾である。すなわち、生成した水素化物を水素炎や加熱石英管で解離し、原子化させる代わりに黒鉛炉を用いる方法である。この方法は、発生した水素化物が黒鉛炉に到達するまでに、キャリアガスで希釈されることによる感度の低下や、高温で長時間加熱する時間が長いことによる黒鉛炉の安定性に問題が残る。また、感度を上げるため、もしくは化学種の分離を目的に液体窒素トラップを設けているもの⁵⁾があるが、自然分解率の大きい水素化物を液体窒素トラップで捕集後、加温し、キャリアガスによって黒鉛炉に導入する際に分解する可能性が高いと考えられる。

もう一つは、黒鉛炉内で水素化物を捕集する方法^{6),7)}であ

表1 分析条件

Element	As	Bi	Ge	Sb	Sn	Te
Wavelength (nm)	193.7	223.1	265.2	217.6	286.4	214.3
Carrier gas (Ar : L/min)	0.15	1.0	0.15	0.15	0.15	1.0
Sample volume (ml)	10					
Analytical mode	Absorbance					
Measurement mode	Peak area					
1%NaBH ₄ volume (ml)	1	2	5	4	7	2
Heating program	Temperature (℃)					
Dry (Trap) 99sec.	800	100	900	800	800	100
Ash (Clean1) 99sec.	50	50	50	50	50	50
Atom* 7sec.	2,000	1,400	2,400	2,200	1,800	2,000
Clean 2 5sec.	2,400	2,000	2,600	2,600	2,400	2,400

* : 光温度制御装置使用

表2 各種黒鉛炉の捕集効率

元素	改造キュベット (捕集材あり)	改造キュベット (捕集材なし)	カップ キュベット	チューブ キュベット	パイロ キュベット
ヒ素	1.0	0.76	0.37	0.46	0.04
ゲルマニウム	1.0	0.66	0.03	0.07	0.06
ビスマス	1.0	0.96	0.41	0.58	0.11
テルル	1.0	0.84	0.34	0.37	0.03

る。この方法でも市販の黒鉛炉もしくはほんの少し改造した黒鉛炉（捕集材が挿入されていないもの）を用いているのがほとんどで、測定可能な元素が自然分解率の高いビスマス、テルル等に限られている。

3.3 捕集温度の影響

各水素化物について捕集温度の検討を行った結果を図7に示す。テルルは100～300℃、ビスマスは100～500℃で最も感度が上昇した。また、アンチモンは800℃、ヒ素とスズは800～900℃、ゲルマニウムは800～1,000℃で最も感度が高くなった。

ヒ素等の分析でニッケル塩等を添加しないで通常のGFAAで分析する場合、灰化温度を800℃に設定すると目的とする元素まで原子化段階で蒸発する可能性がある。著者らの作成したキュベットでは、キャリアガスにより捕集材と排出口の一部が局所的に冷却されるため、高い設定温度でも各元素が保持できるものと推察される。

3.4 原子化温度の影響

各水素化物について原子化温度の検討を行った結果を図8に示す。ビスマスは1,200～1,400℃で最も感度が高く一定の吸収を示し、ヒ素は2,200℃以上、テルルは1,800℃以上、アンチモンは2,000℃以上でほぼ一定の吸光度を示した。ゲルマニウムは、原子化温度が高くなるに従って感度も上昇した。しかし黒鉛炉の劣化を考慮すれば2,400℃に設定したほうがよいと思われる。なお、捕集温度を900℃、原子化温度を2,400℃に設定した場合、約300回の使用に耐えられる。

3.5 捕集流量と捕集時間

ビスマスやテルルは0.8～1.2 l/min、その他は0.1～0.15

l/minの間で、50～100秒において捕集ができた。ただし、表1に示す黒鉛炉の温度条件でAsh (Clean 1)の50℃-99秒と設定してあるのは、発生した水素化物の極微量がキャリアガス流路等に吸着されるのを防ぐ目的で設けてある。

表1に示す条件で試料を10 ml使用した際の各元素の感度(0.0044 abs)を求めた結果、As=0.007 ng/ml, Bi=0.004 ng/ml, Ge=0.03 ng/ml, Sb=0.004 ng/ml, Sn=0.05 g/ml, Te=0.06 ng/mlであった。

3.6 生体試料の分析

試料に混酸（硝酸：過塩素酸：硫酸=24：24：1 v/v）を加え、1%硝酸マグネシウムを添加したものを、100℃のホットプレート上で加熱し灰化した。灰化液を反応瓶に移し、1%EDTAを添加したものを測定した。灰化時に硝酸マグネシウムを添加したのは、加熱による目的元素の飛散を抑えるためで、EDTAを添加したのは水素化物生成に際して共存物質による影響を除くためである。表3は本法により求めた生体試料中のヒ素、スズ、アンチモンの生理値である。

4. おわりに

還元気化濃縮黒鉛炉原子吸光光度計を開発し、基礎的検討を行った後、生体試料への応用を試みた。本装置は、

- (1) 改造キュベット、もしくは市販のキュベットを装着するだけでGFAAとHGFAAに簡単に変更できる。
- (2) HAA（液体窒素冷却濃縮・再気化法）では、感度が低下する自然分解率が高い水素化物でも、HGFAAは測光部（黒鉛炉内に設けられた網目ガラス状カーボン）で濃縮されるため超高感度測定が可能である。
- (3) 通常のGFAAの直接法と比べ、導入できる試料量に制

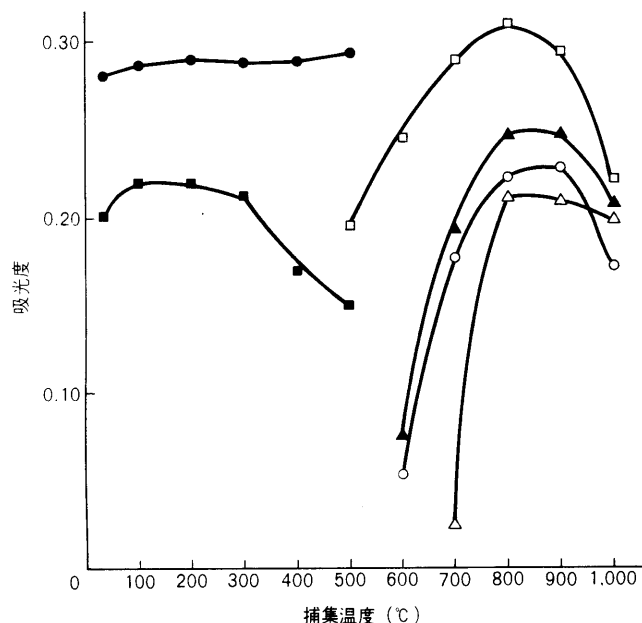


図7 捕集温度の影響

●：ビスマス (0.3 ppb), ○：スズ (3 ppb)
▲：ヒ素 (0.4 ppb), △：ゲルマニウム (1.5 ppb)
■：テルル (0.3 ppb), □：アンチモン (0.3 ppb)

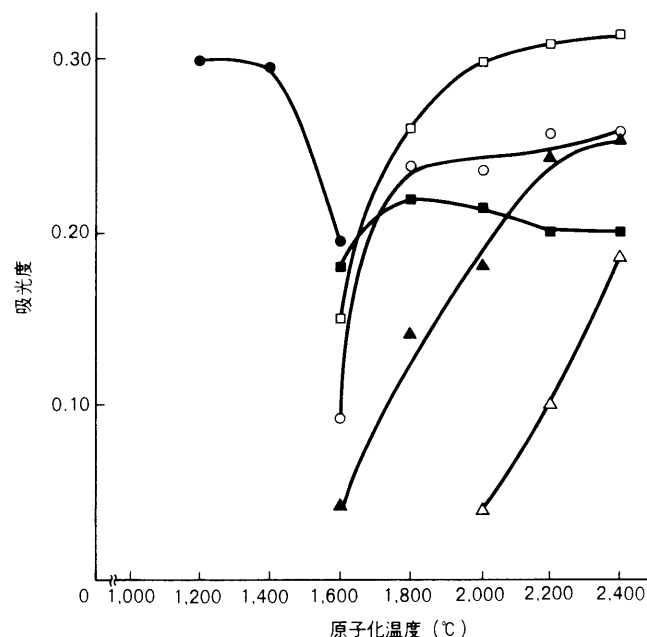


図8 原子化温度の影響

●：ビスマス (0.3 ppb), ○：スズ (3 ppb)
▲：ヒ素 (0.4 ppb), △：ゲルマニウム (1.5 ppb)
■：テルル (0.3 ppb), □：アンチモン (0.3 ppb)

表3 生体試料におけるヒ素、スズ、アンチモンの生理値

サンプル	ヒ素		スズ		アンチモン	
	Mean	range	Mean	range	Mean	range
尿 ($\mu\text{g/l}$)	58.4	6.8-489	8.8	6.0-15.8	0.18	0.07-0.56
血液 ($\mu\text{g/dl}$)	0.29	0.14-0.49				
毛髪 (ng/g)	48.1	10.2-113				

限されないことから1,000倍以上感度が良い。

(4) 試料をすべて黒鉛炉に導入しないため(水素化物だけ導入される)GFAAのような炉内での共存物質による分光干渉や化学干渉は非常に少ない。

(5) 水素化物生成過程においては、通常のHAAと同様な共存物質の影響を受ける。

現在、生体試料を用いその他の元素について検討中である。

参考文献

- 1) 道辻広美, 大原昭男, 山名正紀, 山口恭平, 藤木幸雄: 松仁会医学誌, 24 (2), 253 (1985)
- 2) 道辻広美, 大原昭男, 福田昌広, 山口恭平, 藤木幸雄: 日本産業衛生学会第60年会講演要旨集, p.205 (1987)
- 3) V.J.Zatka: Anal. Chem., 50, 538 (1978)
- 4) A.U.Shaikh, D.E.Tallman: Anal. Chem. Acta, 98, 251 (1978)
- 5) 藤田勝行, 中川泰夫, 高田健夫: 日本分析化学会第35年会講演要旨集, p.768 (1985)
- 6) D.S.Lee: Anal. Chem., 54, 1682 (1982)
- 7) R.E.Sturgeon, S.N.Willie, S.S.BerMan: Anal. Chem., 57, 2311 (1985)

Topics

人工智能を搭載、 『ICP発光分析用分析線 選択支援システム (P-5200用)』を発売

ICP発光分析法は、各種金属元素を高感度で迅速に測定でき、あらゆる分

野で応用されています。

この分析計を有効に活用するキーテクニックは、分析線の選択といっても過言ではありません。分析目的元素が同じでも、共存分によって分析線が異なるため、熟練が必要であり、試行錯誤の予備実験は不可避でした。

今回発売した最適分析線選択支援システム(エキスパートシステム)は、この悩みを一気に解決しようとするもので、日立の豊富なICP発光分析のノウ

ハウの全てが盛り込まれており、ファジー推論によってスピーディに、適切な分析線を選び出します。未知試料による発光スペクトルがオンラインでコンピュータに取り込まれ各分析線の性質が画面に表示されます。

1. 主な仕様 元素数: 25元素
分析線: 最大 120本
2. 評価項目 S/B比, ベースライン傾斜角, シグナル強度, 近接元素の影響度

日製産業株式会社

本社 電話 東京(03)504-7211
筑波支店 電話 土浦(0298)23-7391
千葉営業所 電話 千葉(0472)47-4151
北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386
京都営業所 電話 京都(075)241-1591
岡山営業所 電話 倉敷(0864)25-1316
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

札幌支店 電話 札幌(011)221-7241
北関東営業所 電話 大宮(048)653-2341
横浜支店 電話 横浜(045)671-5421
豊田営業所 電話 豊田(0565)28-5191
大阪支店 電話 大阪(06)366-2551
広島支店 電話 広島(082)221-4514

仙台支店 電話 仙台(022)264-2211
西関東営業所 電話 八王子(0426)43-0081
新潟営業所 電話 新潟(025)241-3011
名古屋支店 電話 名古屋(052)583-5841
四国営業所 電話 高松(0878)62-3391
九州支店 電話 福岡(092)721-3501

<編集後記>

環境物質の人体へのとり込まれ方、健康との関係などが究明されるにしたがい、分析化学が果すべき役割も益々大きなものとなっています。昨年10月に労働安全規則が改正され、その傾向が一層進んだのを機にこの特集を企画しました。緒方先生に巻頭言をいただきました。森田先生には最近、環境汚染物質としてクロースアップされた有機スズについて報文をいただきました。産業衛生関係の測定対象物に関して田口先生、菅原先生、坂上先生、道辻先生らから報文をいただきました。いずれも最先端のご研究であり、この分野での分析化学の重要性を感じました。また、これを支える分析化学の益々の発展に微力ながら全

力を尽す所存です。

- 本ニュースに関するお問い合わせは、下記へ、または、日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。
- 日立計測エンジニアリング株式会社
テクノリサーチセンター
〒312 茨城県勝田市市毛882番地
電話 勝田(0292)73-2111(代)
- 日製産業株式会社
科学機器営業本部 企画開発部
〒105 東京都港区西新橋1-24-14
電話 東京(03)504-7195(ダイヤルイン)
FAX (03)504-7756

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
MAR./APR. 1990 VOL.33 NO.2

発行 平成2年3月1日(年6回発行)
発行人 塚田勝男
編集人 永谷 隆
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
科学機器部
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
電話 東京(03)214-3123(直通)
印刷所 日立印刷株式会社