

プレカラム誘導体化-蛍光検出HPLCによる尿中 δ-アミノレブリン酸の分析

δ-アミノレブリン酸 (δ-ALA: $H_2N-CH_2-CO-CH_2-CH_2-COOH$) は、各種の生物に広く分布し、δ-ALAシントラーゼによりスクシニル-CoAとグリシンから生合成され、さらに2分子のδ-ALAがポルホピリノーゲンシントラーゼにより脱水縮合されポルホピリノーゲンとなります。この脱水酵素は、鉛暴露において容易に阻害され、その結果尿中に排泄されるδ-ALAの量が増加します。従って、尿中δ-ALAの分析が鉛暴露者の健康管理の指標となっています。

ここでは、アセチルアセトン ($CH_3COCH_2COCH_3$) とホルムアルデヒド (HCHO) を用いたプレカラム誘導体化 (図-1) による蛍光検出HPLCについて紹介します。

測定条件及びプレカラム誘導体化反応を下記に示します。この条件下において、δ-ALAの濃度範囲0.1 ~ 50 mg/l (1 ~ 500 ng) における検量線の相関係数 (r) は 1.000 (n=6) と原点を通る良い直線性を有し、検出限界は S/N = 3において 0.014 mg/l (140 pg) でした。図-2は尿のクロマトグラムで、δ-ALAのピーク面積値の繰り返し再現性 RSD は、n=8 で 0.996 %と良好な結果となりました。

測定条件

カラム: TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm I.D. × 15 cm)
 溶離液: (A) $CH_3CN / CH_3OH / CH_3COOH / H_2O = 10 / 35 / 1 / 54$ (B) CH_3CN
 グラジエント条件

8 min A ———— A ———— B (50%) ———— B (50%) ———— A
 4 min ———— A ———— B (50%) ———— A

流速: 1.0 ml/min
 温度: 40 °C
 注入量: 10 ul
 検出: 蛍光 (励起波長 363 nm, 蛍光波長 473 nm)
 試料: 標準δ-アミノレブリン酸は、1000 mg/lの原液を脱イオン水で調製し、0.6% NaH_2PO_4 にて希釈調製する。
 尿は、1000 G, 10 minの遠心で除タンパクする。

プレカラム誘導体化反応

反応液: (C) 4 g/l NaCl in $CH_3COCH_2COCH_3 / C_2H_5OH / H_2O = 15 / 10 / 75$
 (D) 9.3% HCHO (試薬特級 37% 含有液を脱イオン水で4倍希釈)

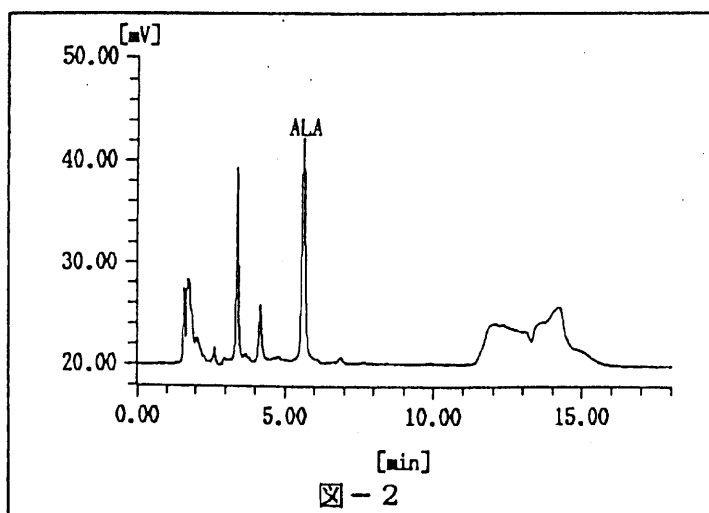
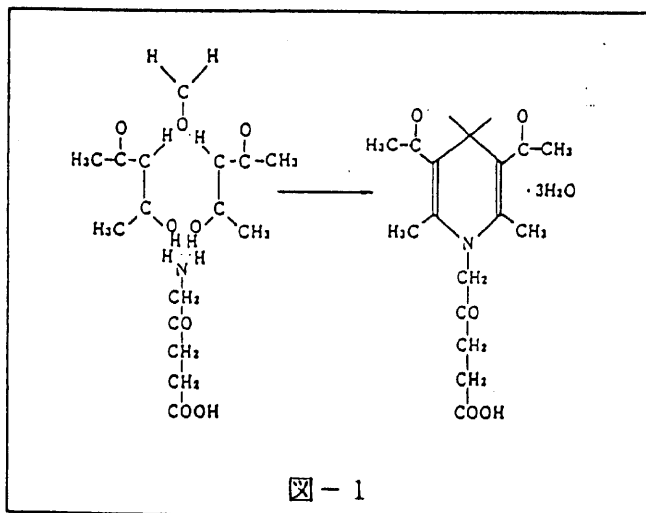
反応液 C 5 ml
 ↓
 反応液 D 0.45 ml
 ↓
 試料 20 ul → 100°C, 15 min (Hot Dry Bath) → 水冷 → 10 ul 注入

装置構成

CCPM- II, FS-8020, CO-8020, AS-8020, SD-8022, スタティックミキサ(A), SC-8020

参考文献

- (1) Y.ENDO, A.OKAYAMA, G.ENDO, T.UEDA, N.NAKAZONO, S.HORIGUCHI: Jpn. J. Ind. Health, 36, 49 (1994)
- (2) A.OKAYAMA: 労働衛生管理, Vol.3, No.4, 45 (1992)



1. 鉛の物性

鉛 (lead, blei, plomb, Pb) は、「原子番号 82, 原子量 207.2, 比重 11.34, 硬さ 1.5 の帯青白色の軟らかい重金属」(理化学辞典)である。融点は 327.4°C, 沸点は 1750°C であるが, 500°C を超えると気化が始まるという。したがって溶融釜の中の温度が 450°C にもなると, その表面の温度は 500°C 近く, あるいはそれ以上になるので, 気化が始まり, フェームの発生があると考えられる。

しかし, 実際には, 500~600°C 程度では, 溶融した鉛の表面に酸化鉛の被膜ができ, 鉛の蒸発が妨げられるため, フェームの飛散はそれほど多くない。しかし, このような場合には, 表面の酸化鉛が何らかの原因で飛散するケースがかなりあり, やはり危険は多い。

Elkins (1951) は, いろいろの温度における金属鉛の飽和蒸気圧と, 釜表面の気中鉛量を, 表 I-1 に示すごとく紹介している。この表からも, 鉛溶融釜の温度は, 可能な限り低く抑えることが望ましいことが分かる。

表 I-1 いろいろの温度における金属鉛の飽和蒸気圧と気中鉛量 (Elkins, 1951)

温度 (°C)	飽和蒸気圧 (mmHg)	気中鉛量 (mg/m ³ at 25°C)
507	0.000016	0.18
527	0.000033	0.37
636	0.001	11.3
808	0.08	900
985	1.0	—

また鉛は, 融点 (327.4°C) と沸点 (1750°C) との差が大きいこと, 比較的軟らかい金属であるなどが利点となって, いろいろの化合物が作られ, いろいろの方面に使用されている。

2. 鉛中毒の歴史

鉛は, 文明が進むにつれて, ますます多方面に使用されるようになってきた。われわれの周囲を見渡しても, 実に多くのものに使用されている。ガラス, ゴム, 塩化ビニル樹脂, リノリウム, 顔料, 塗料, 絵の具, 陶磁器の釉薬, 鉛蓄電池, 電線, ケーブル, 鉛管, 鉛板, パネル, 壁材, 耐酸バルブ, 耐酸流し台, 耐酸接合剤, 鉛はんだ, 農薬(ヒ酸鉛), 医薬, マッチ, カイロ灰, 活字などなど数え切れないほどある。したがってわれわれは, 日常生活において, 鉛と密接な関係があるといってよい。

人類が初めて鉛を使用したのは, 数千年も前のことであつたという。エジプトの第 1 期ピラミッド建設時代 (B.C. 3000 年頃) に既に青色陶器の釉薬など多方面に使用されていたという。また B.C. 1500 年頃に, スペインで帆船のおもりとして使用され, メソポタミアでは, 宮殿のタイルの釉薬, 家庭用品などにも使用されていたというし, さらにローマ帝国時代 (B.C. 500 年頃) には, 飲料水, および浴場の水道に, 鉛管が使用されていたという。

わが国では持統天皇 6 年 (692 年) に, 中国から僧観成によって鉛白 (炭酸鉛) の製法が伝来し, 初めて製造されたという。これがわが国での鉛の使用の始めであるとされている。また 14 世紀には鉛丹が作られたともいう。

以上のように, 鉛は古くから使用されてきたので, 鉛中毒も随分古くから存在していたらしい。すなわち, Hippocrates (B.C. 460~375 年) や, Nicander (B.C. 200 年頃) らの時代に既に, 鉛精錬業者などに疝痛, 便秘, 蒼白などがあつたという記録が彼らによって残されているという。鉛中毒はこのように古くから存在していたので, 鉛中毒に関する研究も, 随分古くから, しかも精力的に行われてきた。Plinius (23~79 年) は, 金属精錬工の疝痛を報告し, 鉛作業者にマスクの必要なことを暗示している。また 1600 年頃になると Crats, Cytosis などは, 当時葡萄酒の保存に鉛で作られた容器が使われていたため, 鉛の溶出している葡萄酒によって疝痛が起こることを記載している。1700 年になると, 産業医学の父といわれる Ramazzini は, 陶器作りや画家の病氣として鉛中毒の存在を報告している。

しかし, 鉛中毒の記載として整理されたものが出始めたのは 19 世紀に入ってからで, Tanquerel des Planches が "Traites de muladies se Plomb" (1839 年) という論文集で, 鉛中毒を系統的に研究発表したのが最初であ

るといわれている。それ以後鉛中毒の細部に渡る形態学的、病理学的、生化学的研究、種々の観察などが多数の学者によって行われ、ついに Aub 一派によって(1930年頃)、鉛の吸収、排出をはじめ、生体内における動向、鉛中毒の症状、治療法などに関する膨大な研究が行われ、鉛中毒のほぼ全貌が明らかにされた。その後も鉛中毒に関するより精細な、生化学的、病理学的、解剖学的、生理学的、神経学的、疫学的など各方面にわたる研究が続けられ、今日の鉛中毒の概念ができたのである。

わが国においては、明治末期から乳児のみにみとめられた有名な「Sogenante Meningitis (いわゆる脳膜炎)」がある。これは明治 34 年、弘田 長教授(東大小児科)によって命名されたもので、当時原因不明であったが、わが国小児科学の始祖の一人といわれている平井疏太郎教授(京大小児科)が、これら乳児の血液中に、好塩基点赤血球の増加のあることを発見し、この「いわゆる脳膜炎」は、鉛によるものであると診断されたのである。

当時「ノビ」と「ノリ」がよいため、体に悪いとは知りながら、「鉛おしろい」(鉛白)がよく使用されていた。この「鉛おしろい」を、顔から胸にかけて広範囲に塗りたくったらしく、乳首についた鉛白を母乳とともに飲んだり、乾燥して飛散した鉛白を乳児が吸入したりして、鉛中毒にかかり、脳膜炎症状を呈したものである。ただしこの脳膜炎症状は、乳児にのみにくるものであって、成人にはみとめられないものである。

鉛白が「おしろい」に使用されたのは奈良時代からといわれているが、特に「鉛おしろい」を多量に使用した女形役者に鉛中毒がみられたことはよく知られている。

現在においても、シカゴ、ニューヨークなどで、また英国やオーストラリアにおいても、スラム街などで、住居の壁や階段などに塗られた、古い鉛塗料(鉛を顔料とした塗料は広範囲に使用されている)を、異食症(Pica)の幼児が食べ、また幼児が、含鉛塗料を塗った玩具をなめ、脳症状を伴う鉛中毒が発生して問題となったことはよく知られている。

3. 鉛の毒性

鉛はわれわれの周辺で実に多くのものに使用されている。またわれわれが日常摂取している飲食物、吸入している空気中にも鉛は入っている。後述するごとくわれわれは平均で 300 μg 程度の鉛を毎日摂取し続けている。この日常生活における鉛の摂取量は 1 mg/日にも達することもあるらしい。これはこの程度の鉛の摂取では、生体影響はまったくないということでもある。これは閾値(無作用量)の範囲内のことであるからである。

しかし鉛作業に従事すれば、この日常生活からの鉛の摂取に加えて、鉛作業からの鉛の摂取が加わり、それによって鉛による生体影響が現れることがあるのである。鉛による健康障害にも量-影響、量-反応関係があり、この暴露量、体内摂取量が多くなればなるほど、鉛の影響はひどくなり、影響をうける人の数が増える。

鉛は、化合物を作りやすい金属である。これは鉛の特性の 1 つでもあり、いろいろの化合物が作られ、いろいろの方面に使用されることになるのであるが、鉛の毒性は、化合物によって同じであるかというところではない。一般には、水、体液に溶けるもの、溶けやすいものほど毒性が高いと考えられている。

次に、鉛化合物の種類、毒性、用途を 1 つにまとめた佐野(1978)の表があるので、表 I-2 として紹介しておく。

(原田 章)

文 献

- Elkins, H. B. (1951): Lead. In: The Chemistry of Industrial Toxicology. - The elements, Part II, Group IV, 2nd ed., John Wiley, New York. pp.49-58.
- 佐野晴洋(1978): 産業衛生, 総合衛生公衆衛生学(藤原元典・渡辺敏一編), 南江堂, 東京. p.715.

表 I-2 鉛化合物の種類・毒性・用途 (佐野, 1978)

物質名	分子式	溶解度				LD ₅₀ (mg/kg)	吸入時の 毒性順位	経口時の 毒性順位	用途など	
		冷水	温水	酸	アルカリ					
鉛	Pb	-	-	硝酸+		100-200	3	5	製造, 電線, ケーブル, 蓄電池(電板), 化学工業装置, 鉛管合金・鍍金, 耐酸バルブ・コックなどの合金, 鉛顔料, ライニング, 各種原料故鉛再生, 弾丸	
酸化鉛	亜酸化鉛	Pb ₂ O	+	+	+	+			鉛の溶融時に発生する, 浮流	
	一酸化鉛 (密陀僧, リサーチ)	PbO	+	+	+	+	100-400	2	3	製造, 農薬(ヒ酸鉛), 顔料(黄鉛華), 鉛ガラス, マッチ頭薬, 塗料(油乾燥剤), ゴム(耐熱増強剤, 石油精製, 蓄電池極板製造, リノリウム(亜麻仁油ドライヤー), 耐酸接着剤, パイプ用接合剤, 医薬, ビニル安定剤化合物原料, エナメル
	四・三酸化鉛 (鉛丹・光明丹)	Pb ₃ O ₄	+	-	±	-	220	6	7	製造, 塗料, 電球・真空管, 釉薬, ガラス製品, ゴム着色料, 医薬, 冶金, 研磨剤
	二酸化鉛 (過酸化鉛)	PbO ₂	-	-	±	+	115-230	7	8	蓄電池, 化学工業
	三・二酸化鉛	Pb ₂ O ₃	-		-	+				顔料
水酸化鉛	Pb(OH) ₂	±	±	+	+				顔料	
塩化鉛	PbCl ₂	±	+	+	+	1500-2000 ¹⁾			各種化合物原料, 塗料	
塩基性炭酸鉛 (鉛白・白鉛)	2PbCO ₃ ・Pb(OH) ₂	+	+	+	+	124-250	1	2	製造, 釉薬, ペイント用顔料, 絵の具, 医薬(軟膏), ビニル安定剤, 塗料, ベンキ	
炭酸鉛	PbCO ₃								白鉛鉱として天然に産出, 塗料, 顔料	
硫酸鉛	PbSO ₄	-		+	-	146-290		4	製造, 釉薬, 触媒, ペイント顔料, ゴム配合剤, 石版製版, ビニル安定剤, 絵の具	
ケイ酸鉛	PbSiO ₃	-			+	致死量 136	9		窯業, 防火性織物, ガラス	
クロム酸鉛黄鉛	PbCrO ₄	±		+	+	156-310	5	6	製造, ペイント, 絵具用顔料, 医薬, 陶器用セメント, 耐酸セメント, 製陶, 接着剤, ゴム配合剤, 印刷インキ	
チタン酸鉛	PbTiO ₃								絵具	
ホウ酸鉛	Pb(BO ₂) ₂ ・H ₂ O								製造, ペイントドライヤー, プラスチック	
ヒ酸鉛	Pb ₂ (AsO ₄) ₂	+	±	+	+	100-825 ^{1,2)}	4	1	製造, 駆虫剤(農薬)	
硝酸鉛	Pb(NO ₃) ₂	#	#			致死量 270 ²⁾			製造, 鉛塩の製造, キャラコ染色, 捺染用媒染剤, 写真増感剤, 染料製造用酸化剤, 燐薬, 皮鞣, 製版, 黄鉛, 医薬, マッチ	
酢酸鉛	Pb(CH ₃ COO) ₂ ・3H ₂ O	#	#	#	+	150 ²⁾			製造, 合成染料(過酸化鉛, 染色助剤, 絹の増量剤, 防水剤, 鉛ドライヤー, 顔料(黄鉛), 金精錬, カイロ灰, 医療	
ステアリン酸鉛	Pb(C ₁₇ H ₃₅ COO) ₂					20000			塩ビ安定剤	
硫化鉛	PbS	-	-	+	-	220	10	10	方鉛鉱(galena)として天然に産出, アメリカ, スペイン, メキシコに多い	
リン酸鉛	Pb ₃ (PO ₄) ₂						8	9		
スルファミン酸鉛	Pb(SO ₂ NH ₂) ₂								鉛鍍金	
三塩基性硫酸鉛	3 PbO・PbSO ₄ ・H ₂ O								塩ビ安定剤	

① LD₅₀列中の1)は経口投与, 他は腹腔内注射, 2)はラット, 他はモルモットによる。*塩基性塩(basic salt)は水酸化物塩のことであり, 一酸性塩(acid salt)とは水素を含む塩をいう。

② 毒性類はFairhall & Sayersによる。