

## 分担研究報告書

### 健康危機管理における地方衛生研究所の役割に関する研究

分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所副所長

**研究要旨** 地域の健康危機管理において地方衛生研究所の最も大きな役割は原因の究明である。平常時から原因物質検索のマニュアルを整備し、非常時に備えて普段あまり実施しない測定についても訓練・検討しておく必要がある。本研究においては、昨年度、有害化学物質やエントロトキシンの検索法の検討を行ったが、想定される化学物質や細菌などは多岐にわたる。今年度は、Ⅰ. 昨年度の報告以外の、これまで不備であった細菌や有害化学物質について、実際に測定・検討してマニュアル化を図った。すなわち、①2001年にバイオテロで問題が顕在化した炭疽菌、②血液中の鉛・クロム・水銀、③血液中メトヘモグロビン、④空気中有害化学物質（塩素ガス、シアン化水素、揮発性有機化合物類）の測定マニュアルを作成すると同時に、気中有害物質採取時の安全性確保のために、⑤防毒マスクや防護服などの着用についての手順や問題点を検討した。また、原因究明において重要な役割を果たす疫学解析のマニュアル化の過程において、Ⅱ. O157 集団発生を事例に日米の疫学調査の比較を行い、わが国の研究の問題点を探った。さらにまた、健康被害危機管理における情報入手の必要性に鑑み、情報入手の支援として、Ⅲ. 健康被害危機管理ホームページの構築を試みた。

#### 研究協力者

小林一寛，小坂博，宮野直子，田淵武夫，  
熊谷信二，吉田俊明，田井中秀嗣（大阪府立  
公衆衛生研究所）  
福島若葉（大阪市立大学医学研究科公衆衛生  
学）

と同時に、情報入手の支援体制を整えておく必要がある。本報告では今年度実施・検討したⅠ. 検査方法の検討・整備、Ⅱ. O157 集団発生を事例に日米の疫学調査比較からみた今後の課題、Ⅲ. 情報入手を支援する危機管理ホームページの構築について述べる。

#### 本分担研究報告の構成

地域における健康危機に際し、地方衛生研究所が迅速かつ的確に原因究明ができるように、平常時から検査などについてマニュアルを整備し、訓練を行い、問題点を明らかにしておく

#### Ⅰ. 検査マニュアルの検討・整備

昨年度（H12 年度）の厚生科学研究補助金厚生科学特別研究事業『保健所等における地域健康危機管理のあり方に関する研究（主任研究者：藤本眞一）』の分担研究報告（健康危機管理における地方衛生研究所の役割に関する報告）において、有害化学物質の検索法の検討を

行った。本研究では、今後に発生の可能性のあるものについて、これまで不備であった項目を補うために検査マニュアル類の整備を、添加確認検査やサンプリング時などの安全確保のための検討などを行いつつ進めた。今年度は以下について検討した結果を報告する。

- ①炭疽菌とその検査法
- ②血液中有害金属類の測定(原子吸光法による迅速測定)法の検討
  - ・ 血液中鉛の測定
  - ・ 血液中クロムの測定
  - ・ 血液中水銀の測定(酸分解…還元気化法)
- ③血液中メトヘモグロビンの測定法(有害化学物質による生体側の変化の指標として)
- ④気中有害化学物質の分析法の検討
  - ・ 気中塩素濃度の測定(ABTS法)
  - ・ 気中シアン化水素濃度の測定(ピリジン・ピラゾロン法)
  - ・ 空气中揮発性有機化合物(VOC)の分析(GC-MSによる一斉分析法)
- ⑤有毒ガス・蒸気の捕集法および捕集時の安全確保のための呼吸保護具・防護服などの着用法と問題点の検討

## Ⅱ. 健康被害危機事例対応における疫学調査の活用 — 0157:H7 集団発生対応における米国とわが国の比較から見た今後の課題 —

感染症や食中毒、有害物質汚染、毒物劇物中毒、医療関連事故、自然災害、精神科関連など多くの分野において、疫学は重要な位置を占めている。健康被害危機発生時において、発生の確認(本当に起こっているか)、発生状況の全体像把握(時系列、地理的分布、性・年齢・職業分布など)、および、原因・経路についての検証などの役割を疫学が担う。また、潜在している集団発生の早期発見には、広域的なサーベイランスの継続が重要な役割を果たす。早期に発見でき適切な措置がとられれば、その後の多

くの発生を予防できるはずである。

昨年度(平成12年度)の報告では、主要国における疫学解析事例を収集・分類・検討し、①アウトブレイク調査は症例対象研究やコホート研究が主流であること、②サーベイランスが疫学の基本であること、③広域事例として感染症を捉えることの重要性、④インターネットやネットワークを活用した新しい情報収集の方法が疫学にとっても重要になってきた、といった点を指摘した。

今年度は、疫学マニュアルの作成を目指す過程で、米国とわが国の0157:H7集団発生を事例として取り上げ、両国における地方保健行政機関の対応を、疫学的観点に絞って比較検討および考察した結果を報告する。

## Ⅲ. 健康危機管理ホームページの構築

健康危機管理にあつて、地方衛生研究所の主要な役割である原因究明にあたっては、様々の情報が必要になる。情報入手を支援するために、また、関連諸機関との連携を支援するために、情報ネットワークと危機管理ホームページとを企画した。

当初、研究班として全国の保健所と衛生研究所が共同して使えるような情報ネットワーク・ホームページを考えたが、厚生労働省が平成14年度に全国の地域保健関係者をカバーする健康危機管理ホームページと連絡網を立ち上げることが明らかになったので、地域内の情報ネットワークを目指すこととした。

当該ホームページは、健康危機事例集、各種検査法、研究報告などの独自情報の発信、健康危機管理関連の政府関連ガイドライン・マニュアルなどの発信、毒性情報などのデータベースや内外諸機関へのリンク、および、地域の保健医療行政関係者の会議室などを備えたものとし、健康危機管理に関して、情報提供支援の入り口を提供する。それら目指したことがらと概要を報告する。

## I-① 炭疽菌とその検査法

炭疽菌は大量生産しやすく、扱いやすく、経費もあまりかからず、その上、芽胞は死滅しにくく、バイオテロ兵器としてテロなどで使用される可能性が高い。2001年に米国で炭疽菌郵送事件が多発し、わが国でもいたずらの模倣事件が多発した。大阪府立公衆衛生研究所においても菌の確認・同定などの依頼が多数持ち込まれた。本項では、1) 炭疽病・炭疽菌についての解説 (a.炭疽病とは、b.炭疽菌とは、c.炭疽の病型)、および、2) 当所で検討・実施した炭疽菌の検査法 (a.染色法、b.培養法、c.遺伝子診断法)などを記した。今後、予期しない病原微生物の検査が要求されることを想定して、検査機関としての検査能力の向上と検査体制の整備および発生時の危機管理体制の整備が急務である。

### 1) 炭疽病・炭疽菌

#### a) 炭疽病とは

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は炭疽病 (anthrax) の原因であるが、これまでは主に家畜の病気として研究され、日常生活では家畜に接触しないヒトの感染症として検査対象となることはなかった細菌である。動物における病原性は牛、山羊、羊などの反芻獣にはきわめて強く、突然に敗血症を発病し数時間以内に斃死する。次いで馬、豚であるが、豚の感受性は低く敗血症死は希である。高い体温の鳥類は強い抵抗力をもち、犬は自然免疫状態にあり感受性が低いといわれる。ヒトは牛などよりも抵抗性があるが敗血症死に至ることもある。実験動物ではマウス、モルモット、ウサギの感受性が高く感染後数日以内に敗血症死する。

#### b) 炭疽菌とは

炭疽菌はグラム染色性が陽性、37℃で酸素のある条件が最もよく発育する竹節状の大きな棒状細菌 (大桿菌) である。発育には特別な栄養素を必要とせず培養は容易で、普通寒天平板では24時間以内に直径2~3mmで灰白色、周囲が鋸歯状の中央が隆起した集落を形成する。また液体培地では均一に混濁せず綿毛が沈殿しているような発育をし上層部は透明である。培養菌の染色により長い連鎖が観察される。

一方、感染動物の血液や浸出液などの染色標本では連鎖がみられず、菌体を囲むようにして粘稠性 (D-グルタミン酸ポリペプチドから成る) の莢膜を形成するが、これは炭疽菌だけが保有するものではなく枯草菌 (*B.subtilis*) などの類似菌にも少量ながら認められる。莢膜は感染宿主の殺菌作用に抵抗し、菌体を保護して病原性を発揮するのに重要である。これらの動物由来の菌体や培養した菌体の多くは栄養型で O157などを殺菌するのに有効な加熱温度 (炭疽菌はより低い55℃) や消毒薬などで死滅するが、酸素にふれると芽胞を形成する。芽胞型になると抵抗性がきわめて強くなり、自然界で乾燥状態では数十年の生存が可能となる。芽胞そのものは乾熱に対しては抵抗力があり殺菌には140℃、3時間を要するが、湿熱では100℃、約10分の煮沸で死滅する。しかしながら獣毛や皮革に付着した状態では121℃蒸気 (オートクレーブ) で、30分以上を要し、汚染の状態によってかなり相違するものと考えられる。直接紫外線に照射される条件ではほぼ12時間以内に死滅するといわれる。また化学的方法でも0.5%次亜塩素酸ナトリウム液で殺菌されるが、獣毛などに付着した状態ではさらに濃い濃度で長時間処理が必要となり、羊毛などでは10%ホルマリン水に4時間以上浸すのが有効であるといわれている。

炭疽菌の歴史は細菌学の歴史といわれているが本菌の発見はDavaineら(1850)が家畜の血液の非染色標本で非常に大きな菌をみつけたのに始まる。その後Brauell(1857)はこの大桿菌は症状がある動物の血液中にみられることを見つけ、さらにKoch(1876)が雄牛の眼球水様液から純粋培養し、この細菌を他の実験動物に投与して同様の病気を再現させることに成功した。これがコッホの三原則といわれるものである。パスツールら(1881)はこの菌を42℃の高温で培養し毒力を減弱させたワクチンを開発し、活動免疫による牛、羊での予防法を確立して細菌学の先駆的役割を果たしたのがこの炭疽菌である。

### c) 炭疽の病型

炭疽病には3つの病型がある。

(1) 皮膚炭疽 (cutaneous anthrax) は創傷部位に感染した炭疽菌が、保有する2つのプラスミド(pX01, pX02)に制御されている防御抗原(protective antigen, PA)によって細胞の受容体に結合した後、壊死因子(lethal factor, LE)あるいは浮腫因子(edema factor, EF)によって産出される毒性物質が細胞内に侵入しておこるとされる。感染後24時間以内に発赤～紅斑、浮腫、水疱が現れまもなく血性水疱になるが痛みはあまりみられず、数日後には潰瘍となり黒変してくる。これが「炭のような色をした皮膚のかさぶた」であることから「炭疽」といわれている。なお菌種名のanthracもcoal(炭)を意味している。皮膚炭疽は治療を行わないときには致命率は10%といわれるが、的確な抗生物質投与を行うことで1%以下に減少させることができる。皮膚炭疽は家畜の敷き藁交換などの作業を行う牧夫、獣毛や皮革、骨材料を扱ったり、加工する職業人などが、作業中に受けた擦過傷や傷口へ感染することによって起こる。

(2) 肺炭疽 (pulmonary anthrax あるいは inhalation anthrax) は8,000～10,000個の芽胞を吸引して起こるとされているが、今回のアメリカ

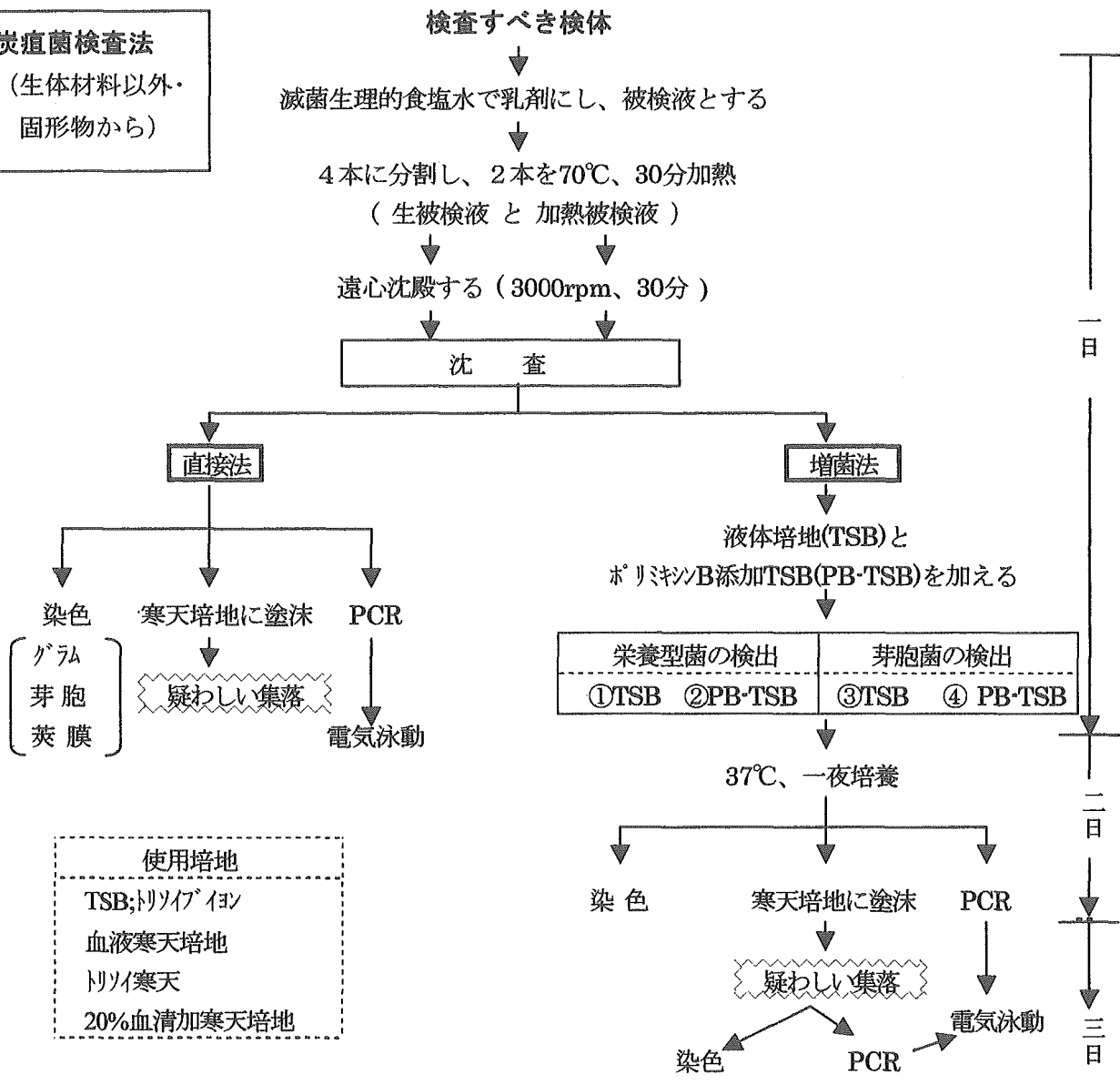
での炭疽事件ではもっと少ないと推定される量で発症している例もみられていることは、感染成立は吸引される芽胞粒子の大きさ、エアゾル状であるなどの芽胞の状態に左右されるものと考えられる。初発症状は風邪様で発熱と咳が主であるが、数日後には突然呼吸困難やチアノーゼが現れ、ショック状態に陥り、適切な抗生物質療法を行っても3日以内に死亡することが多い。経過中には脈が弱く、心拍数が亢進し、頻回の呼吸、大量の発汗をみることが多い。鼻腔のふき取り検査は暴露後速やかに行われないと感染の有無を確認するのにあまり信頼できないといわれる。アメリカ炭疽事件で死亡した患者では炭疽菌が検出されなかったことが報告されている(MMWR,2001)。潜伏期間は一般には1～5日と考えられるが、吸引した芽胞の量以外に個人差が大きいと考えられている。1979年旧ソ連、Sverdlovsk(スベルトロフスク、現Ekaterinburg)における軍事研究施設から漏出した炭疽菌芽胞のエアゾルが、風下の住民に多数の肺炭疽感染を起こした事件では46日後に発病した患者が報告されている。これは感染した芽胞が体内で発芽するのに日数が必要であったと考えられている。

(3) 腸炭疽 (intestinal anthrax) は斃死獣肉を加熱不十分で食べることにより起こる。発生は食糧が不足している開発途上国で多い。潜伏期間は2～5日で嘔気、悪寒、発熱、腹痛で始まり血性下痢や吐血、全身衰弱が現れる。咽頭部に感染を起こした場合には嚥下傷害、頸部リンパ節腫脹がみられる。腸炭疽の場合も有効薬の治療を実施しても致命率は20%程度に達することがある。

## 2) 検査法

このように炭疽病は危険な感染症であるがヒトからヒトへの感染はみられず炭疽病の患者と接触した家族や同僚などへの何らかの予防的処置は必要ではない。ただし患者と同じ感染の危険があるときには有効な抗生物質投与や

**炭疽菌検査法**  
(生体材料以外・固形物から)



**【炭疽菌の同定】**

性状確認後が理想的であるが72時間以内に判定するため下記による

- (1)普通寒天平板の37°C、一夜培養：2～3mmの大きな灰黄白色、周辺鋸齒状集落（拡大鏡では表面は縮毛状）。液体培地の37°C、一夜培養：綿毛状沈殿発育（上清は透明）
- (2)培養菌のグラム染色法；陽性、竹節状大桿菌（中央に菌体幅より狭い芽胞をみることがある）
- (3)血清加寒天培地または血液寒天培養で莢膜を認める
- (4)血液寒天で非溶血性である
- (5)遺伝子診断（PCR）法で毒素、莢膜関連遺伝子領域が陽性である
- (6)非運動性である

以後の確認：γ-ファージ感受性、(ペニシリン感受性であれば)パーリス陽性、糖分解などの性状確認

図1 生体材料以外・固形物からの炭疽菌の検査法

予防のためのワクチン接種(一般には実施していないが)などが必要で、60日程度の健康監視を行うことはいうまでもない。

平常時では皮膚炭疽の初期症状はクモや衛生害虫の刺咬として処理されるのが大部分であるが、バイオテロリズムとしての炭疽菌は生存性から芽胞が使用されていることは容易に推察できる。しかしながら、検査すべき材料中に高純度に精製された大量の芽胞が含まれているのか、夾雑菌がどの程度含まれているのか等が不明である。そのため、当所ではその両方を想定した検査法を実施した(図1)。

検査の基本は、a) 染色法、b) 培養法、c) 遺伝子診断法(PA, LE, EFと莢膜関連の各遺伝子領域)である。炭疽菌が栄養型あるいは芽胞型、多数あるいは少数含有、精製された状態あるいは雑菌混入が多い検体などを考慮し、いずれの場合にも迅速に結果を出せるように直接法と増菌法(高度汚染材料に選択増菌法も併

用)を行った。実施したそれぞれの検査法は以下のとおりである。

#### a) 染色法

芽胞染色、グラム染色、莢膜染色を行う必要があるが、以下のごとく区別して行うことになる。テロに限定すれば芽胞のみを対象とした検査でよく、白い粉等の検体を滅菌生食水で湿らせた綿棒で取り出し、スライドガラスに塗抹する。火炎固定の後、芽胞染色とグラム染色を行う。この場合純度の高いものでは芽胞の存在を確認できるが、夾雑物が多いときにはゴミとの判定が困難な場合がある。培養法からの集落はグラム染色が主となり、連鎖したグラム陽性大桿菌、人体や動物体内由来材料では莢膜染色の結果が重要である。なお、染色液中には芽胞が生存している危険があるので溜置き、検査終了後にオートクレーブ処理したのち廃棄する。図2に48時間培養後の芽胞染色標本を示す。

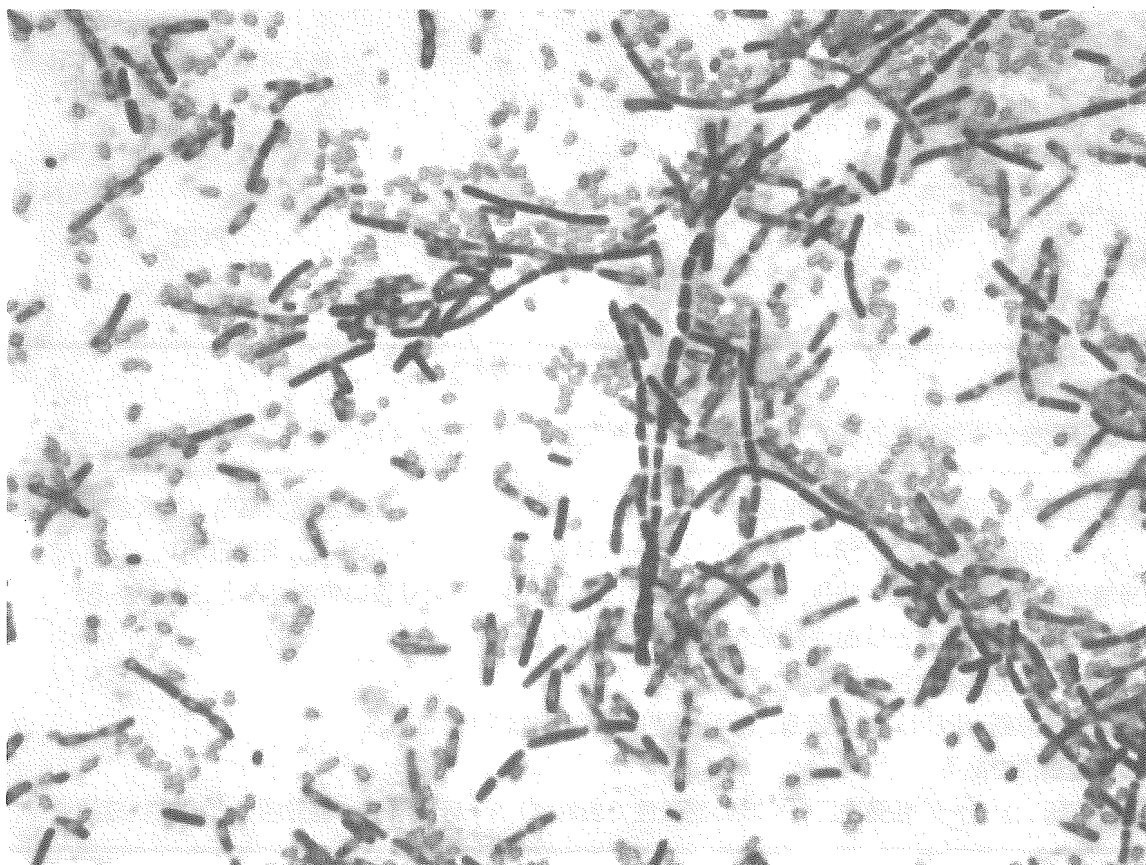


図2, 48時間培養後の芽胞染色標本

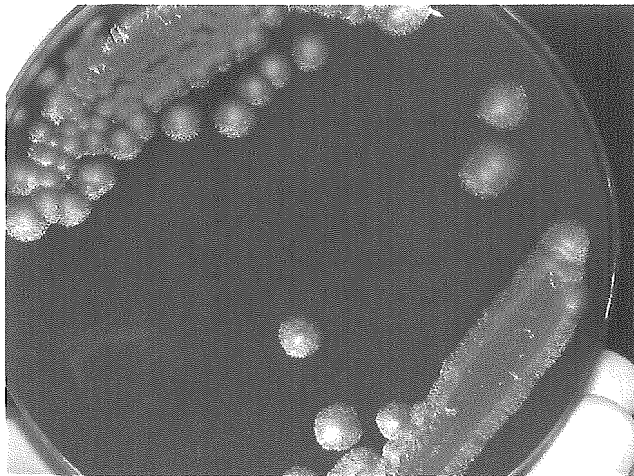


図3. 培地で発育した栄養型の集落  
(非溶血で灰白色の大きな集落)

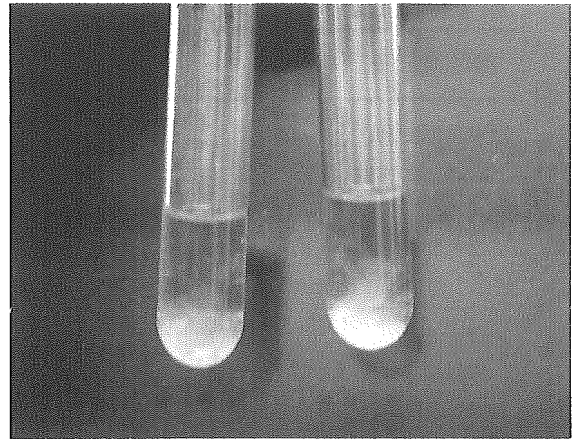


図4. 芽胞を液体培地で37°C一夜培養後  
(炭疽菌は沈殿して発育)

### b) 培養法

栄養型の菌体は羊血液寒天培地やトリプトソーヤ寒天培地に容易に発育し、図3のような非溶血で灰白色の大きな集落が認められたならば上記の染色法によって特徴的な形態を確認する。

芽胞を主体とする材料の場合には液体培地に接種し、その一部を綿棒等で寒天培地に塗抹

した後37°C、一夜培養する。炭疽菌は図4のごとく完全に沈殿して発育するが、他の雑菌が混在した場合には全体が混濁することになるので染色によってグラム陽性大桿菌の有無を確認する。炭疽菌が疑われる菌体を確認されたならば上記の寒天培地に塗抹し翌日発育した集落の確認と染色を行う。混濁がみられない場合には炭疽菌の存在は否定できる。

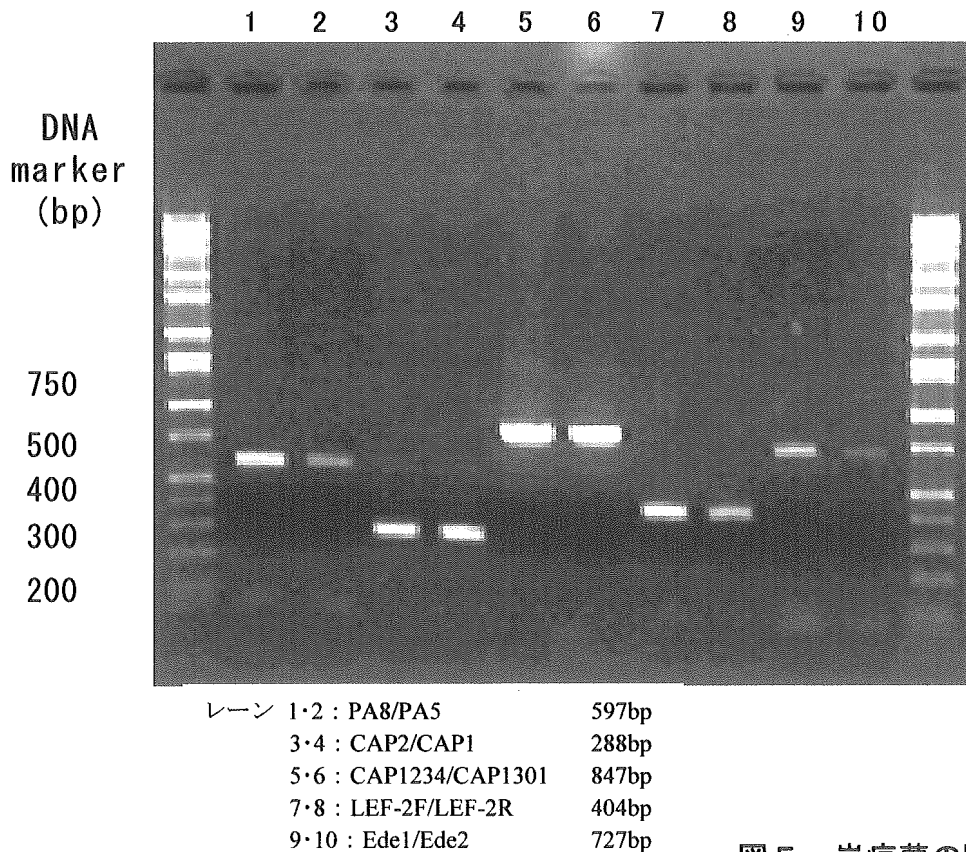


図5. 炭疽菌のPCR



表 1. 炭疽菌同定用プライマー

標的遺伝子	プライマーとその塩基配列 (上段:sense primer, 下段:antisense primer)		増幅サイズ (bp)
防御抗原 (PA)	PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	597
	PA5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	
莢膜 (CAP)	CAP2	GCTGATCTTGACTATGTGGGTG	288
	CAP1	GGCTTCCTGTCTAGGACTCGG	
	CAP1234	CTGAGCCATTAATCGATATG	847
	CAP1301	TCCCACCTACGTAATCTGAG	
壊死因子 (LF)	LEF-2F	GAAACATCGGTCTGGAAAT	404
	LEF-2R	CCCTTTTGAATGAACTTGC	
浮腫因子 (EF)	Ede1	GCGTTTTCTTTAGCGTTTTC	727
	Ede2	CTACATTTTGTAGCCATCACTTCT	

### c) PCR法による遺伝学的検査法

テンプレートは、検体懸濁液またはコロニーをかき取った菌液や増菌液にアクロモペプチダーゼ（和光純薬）を最終濃度100unit/ $\mu$ lになるように加え、37°C45分間反応させた後、沸騰水浴中で10分加熱処理した遠心上清を使用する。PCR試薬はReady-To-Go PCR Beads (Amersham Biotech) を用い、表1のプライマーを各6 $\mu$ mol（最終濃度0.24 $\mu$ M）、テンプレートを2.5 $\mu$ l加え、全量25 $\mu$ lで反応させる。陽性対照に当課保存株であるBT4を、陰性対照に *B. cereus* をおき、94°C5分、94°C30秒→50°C30秒→72°C30秒を35回反復、最終伸長72°C10分の条件で増幅させる。

標的DNAの増幅は2%アガロース電気泳動で確認し、対照と同じサイズに増幅断片が見られた場合を陽性と判定する（図5）。

### 3) おわりに

日常時において炭疽菌の検査が必要な場合は先に述べたごとく何らかの症状があって且つ家畜との関連が疑われる患者においてであるが、皮膚炭疽が疑われる患者の検査は比較的容易で24時間以内に結果が得られる。すなわち浸出液や血液の塗抹標本の染色（グラムおよび莢膜）とそれの直接培養検査、遺伝子診断である。また血液や臓器が採取できるならば、それらの100°C加熱遠心上清と炭疽菌沈降素血清を

用いたアスコリーの沈降反応が実施でき、5分以内に判定可能である。腸炭疽の診断は選択培地を用いて糞便から炭疽菌を検出する。もっとも困難であるのは肺炭疽で病初期での診断はほとんど不可能で、病勢が進行してからは喀痰や血液、髄液からの菌検出が可能である。いずれにしても感染の有無や時期、感染源が明らかではないため発病していないが、感染が強く疑われる場合には有効な薬剤の投薬が大切である。

細菌は大量生産しやすく、扱いやすく、経費もかからないことから生物兵器として研究が行われてきた。その上芽胞を作る細菌は死滅しないことからもっとも適したものとして研究が進められ、1995年には少なくとも17カ国に達しているといわれる。炭疽菌については50年以上も前にすでに多くの変異株を作り呼吸器系に侵入、定着しやすい菌株を選別したとする報告や、より微細な芽胞の乾燥エアゾル作成法も既に開発されているようである。今後は日常生活においても予期しない病原微生物を対象とした検査が要求されることを想定し、検査機関としての検査能力の向上ならびに検査体制の整備と発生時の危機管理体制の確立が急務であると考えている。



## I-② 血液中金属類の測定法の検討

毒性をもつ金属類に暴露された場合、暴露の有無や暴露量の確認のために当該物質類の血中濃度の測定が必要になる。正確に生体試料中の金属を測定するためには、湿式灰化法等により試料中の有機物を分解し共存化合物(マトリクス)の影響をできるだけ小さくする必要がある。しかし、灰化操作には数時間が必要であり、緊急時における測定には適していない。ここでは試料入手後、直ちに測定できる方法として、希硝酸に血液を分散・溶血させ、直ちにフレイムレス原子吸光光度計で測定する方法を検討した。本項では、1)血液中鉛、2)血液中クロムの検討結果を報告する。また併せて、3)血液中水銀を酸分解・還元気化する測定法を検討した結果を報告する。次年度以降はさらに対象物質を広げて、対応できる健康被害発生事例を拡大したい。

### 1) 血液中鉛の迅速測定法

#### — フレイムレス原子吸光法 —

#### 1. 試薬・器具類

- ・有害金属測定用硝酸、鉛標準液(1000mg/l)、凍結乾燥牛血液(精度管理用)はいずれも和光純薬工業株式会社製を用いた。
- ・精製水はミリポア社製 Milli-RX で脱イオン・濾過精製したものを用いた。
- ・ガラス器具および栓付ポリプロピレン製試験管(100mm×12mm)は硝酸溶液(1:1)に一夜浸漬し、精製水で十分にすすいだ後、乾燥させて使用した。
- ・採血にはプラスチック製ディスポーサブル注射器(テルモ)を用い、血液の保存には抗凝固剤としてカルシウム EDTA を含む採血ビン(商品名オデルロ S)を用いた(以前の検討で血液中鉛量の測定では抗凝固剤としてヘパリンよりも EDTA を用いたほうが安定した測定値が得られた)。

#### 2. 機器類

- ・島津製作所製原子吸光光度計(AA-6700)および同社製グラフィトファーネスオートマイザー(GFA-6500)にパイロ化グラフィトファーネスを装着し、試料の注入には同社製オートサンプラー(ASC-6000)を用いた。

- ・ホロカソードランプは浜松フォトニクス社製を用い、バックグラウンドの補正は重水素ランプを用いて行った。

#### 3. 測定方法

##### 3-1) 試薬の調製

- ①検量線用血液；凍結牛乾燥血液に精製水 25ml を加え、ロータリーミキサーで 1 時間以上混和した。分散させた牛血液はポリプロピレン製のサンプル瓶に 1ml ずつ分注し、冷凍保存した。
- ②鉛標準溶液；鉛標準原液(1000mg/l)を 0.1N 硝酸で希釈し、10mg/l の濃度に調整し、保存鉛溶液とした。毎回使用時に 0.1N 硝酸で 1mg/l(100 μg/dl に相当)の濃度に調整し、さらに 0.1N 硝酸で 0.2mg/l, 0.4mg/l, 0.6mg/l の鉛溶液を作成した。これらはそれぞれ 20 μg/dl, 40 μg/dl および 60 μg/dl の鉛濃度に相当する。

##### 3-2) 血液加鉛標準溶液の調整

- ①8 本のポリプロピレン製試験管にそれぞれ 0.1N 硝酸を 3.8ml を分注し、すべてのチューブに、泡立たないように十分に攪拌した牛血液(3-1-①)を 100 μl 加え、よく攪拌した。
- ②これらのチューブに 0.1N 硝酸を 100 μl(血液鉛量 0 μg/dl に相当)、および先に調製した鉛標準溶液(3-1-②)をそれぞれ別の試験

管に 100  $\mu$ l ずつ加えて総量を 4.0ml とし、直ちに攪拌した。これらはそれぞれ血液鉛量 20, 40 および 60  $\mu$  g/dl に相当し、これらを用いて標準曲線を作成し、試料中の濃度を算出した。

### 3-3) 測定試料の調製

- ①血液を泡立てないようによく混和した。
- ②0.1N 硝酸 3.9ml を加えた試験管に血液 100  $\mu$ l を加えて直ちに攪拌し、測定試料とした。

## 4. 結果および考察

### 1) 灰化温度と灰化時間の影響

原子吸光法では、特に微量で測定するファーンネス法では、混在する成分が測定値に種々の影響を与えることが知られている。本法での測定試料には血液成分が多量に含まれているので、それらの成分による測定値への影響を少なくするために、ファーンネス内での十分な灰化が必要と考えられた。

一方、鉛は他の金属に比べ比較的低温で気化しやすい性質を持っており、十分な灰化が行え、しかも試料中の鉛の消失を最小限に抑える条件を選ぶ必要がある。

原子化温度は 1,800 $^{\circ}$ C とし、灰化時間と灰化温度を変えて吸光度の変化を観察した。なお、測定試料は上記の血液添加鉛標準液(60  $\mu$  g/dl) を用い、ファーンネスに注入する試料量は 20  $\mu$ l とした。

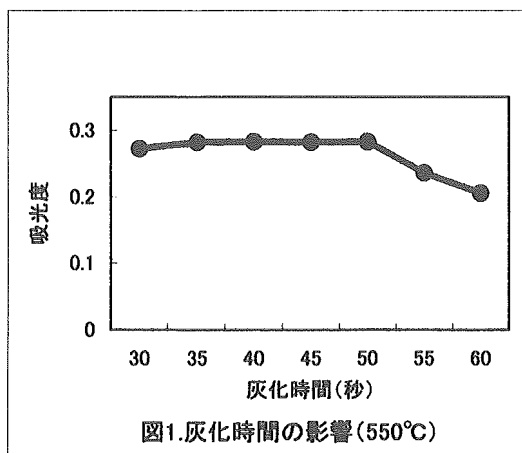


図 1 に示したように灰化温度 550 $^{\circ}$ C では灰化時間が 50 秒まではほとんど吸光度は変化しなかったが、55 秒を超えると吸光度が低下した。

また、4 回の繰り返し測定の変動係数(CV) は図 2 に示したように灰化時間が 40 秒では 0.5% であったが、55 秒および 60 秒では 20% 程度に増加した。600 $^{\circ}$ C および 700 $^{\circ}$ C では灰化時間の多少に関わらず吸光度が 50% 程度に低下した。

したがって、灰化温度は血液成分の多い試料にも対応できるように 50 秒とした。この条件をベースに使用時の機器およびファーンネスの状態にあった設定に調製することにより精度よく測定できると考えられる。

### 2) 検量線の作成

上記の灰化条件を含む測定条件(表 1)で、3-2)で作成した血液添加標準液を 20  $\mu$ l 注入して得られた標準曲線は相関係数(r)が 0.9985

表 1.血液中鉛測定のパラメータ設定条件

	温度	時間	モード	感度	ガス流量
1	60	55	Step	Regular	1.00
2	125	45	Ramp	Regular	1.00
3	250	15	Step	Regular	1.00
4	550	50	Step	Regular	1.00
5	550	3	Step	High	0.00
6	1800	4	Step	High	0.00

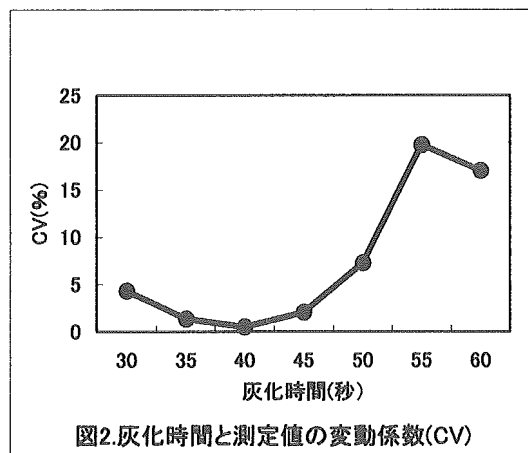


表 2.血液加鉛標準液の吸光度および変動係数

	STD-0	STD-20	STD-40	STD-60
1	0.0040	0.0610	0.1228	0.1788
2	0.0050	0.0629	0.1233	0.1814
3	0.0040	0.0663	0.1215	0.1808
4	0.0040	0.0636	0.1252	0.1800
平均	0.0042	0.0635	0.1232	0.1803
SD	0.0002	0.0022	0.0015	0.0011
CV%	3.43	3.43	1.23	0.62

～0.9999 と良好な結果が得られた。しかし、低濃度溶液での吸光度の変動係数(CV)が大きく、0 μg/dl 溶液で 16～28%であった。しかし、注入サンプル量を 1/2 量の 10 μl として測定を行った結果、相関係数が 0.9995～0.9999 となり、しかも血液加鉛標準溶液の各測定値の CV 値も改善され満足できる結果が得られた(表 2, 図 3)。

### 3) 添加回収試験

ヒト血液 100 μl を 0.1N 硝酸 3.9ml で溶血させた試料および 0.1N 硝酸 3.8ml に同血液 100 μl および鉛標準液(30 μg/dl)を 100 μl 添加した試料を測定し、それぞれの測定値の差から回収率を算出した。血液中鉛量が 0.8 μg/dl, 30.5 μg/dl および 31.7 μg/dl のヒト血液試料では、それぞれ 104.5, 94.3 および 93.3%の回収率であり、迅速測定法としては十分であると考えられる。

これらの結果から、血液中鉛の測定法は、a) 血液成分を含む検量線を用い、b) 血液試料は 100 μl を 0.1N 硝酸 3.9ml に分散・溶血処理を行い、c) 表 1 のフレームレス原子光吸光度計の設定で、d) 注入サンプル量を 10 μl にすることにより、精度よく測定できることがわかった。

#### 【参考 1】

- 多数のサンプルを測定する場合には、10 サンプル毎に 1 回、一連の測定の中で少なくとも 2 回、血液試料と同じ処理を行った精度管理用血液試料を測定し、精度管理を行う必要

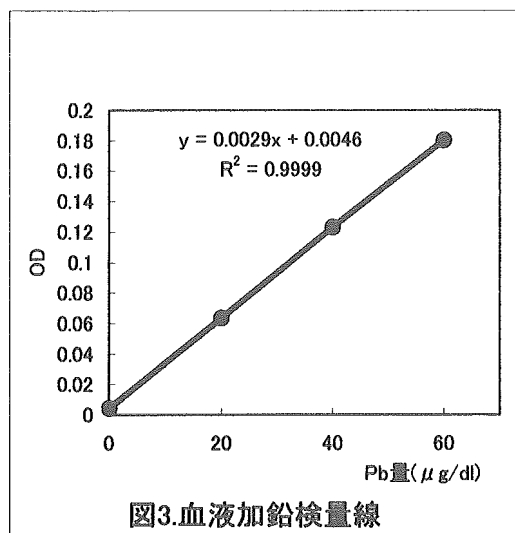


図3.血液加鉛検量線

がある。当所では精度管理用血液を以下のように作成している。

- 精度管理用血液：凍結牛乾燥血液(精度管理用, 和光純薬工業株式会社製)に 0.1N 硝酸で 40 μg/dl の濃度になるように調整した鉛標準液 25ml を加え、ロータリーミキサーで 1 時間以上混和する。この牛血液をサンプル瓶に 1ml ずつに分注し冷凍保存する。

#### 【参考 2】

- 血液は粘性が高いため、ピペットチップ内壁に膜として一部が残る。正確に量り取るために少量の血液試料をピペットで採って捨て、あらかじめチップ内壁を血液で濡らしてから測定用の血液を採取する。またできるだけゆっくりとピペット操作をすることが必要である。

#### 【参考 3】

- 人からの生体試料、特に血液からウイルス等の感染の恐れがあるため、必ず使い捨てのプラスチック手袋を使用する必要がある。
- 血液の混和やピペット採取の操作などで気泡を生じさせると、泡が壊れるときに生じる血液のミストからの感染も考えられるので、気泡を生じさせない操作を心がけること。できればドラフト中で行うことが望ましい。
- 血液などが付着した試験管、ピペットチップはオートクレーブ等で滅菌し廃棄する。

## 2) 血液中クロムの測定

クロム化合物は合金材料として多く用いられており、さらにシアンと同様にメッキ工業でも広く使用されている化学物質である。それゆえ比較的容易に入手が可能な化学物質であると考えられる。大阪府下では1999年に麦茶にクロム酸が混入される事件があり、これからも起こる可能性は十分に考えられる。

クロムは生体内に入った場合、速やかに血液から組織に移行するが、危機管理においては事故後直ちに血液等の試料が採取されるため、血液中クロム量の測定は尿中クロム量の測定とともに重要な指標になると考えられる。

本測定においても試料入手後、直ちに測定できる処理方法として血液を希硝酸で分散・溶血させる方法を検討した。

### 1) 血液の前処理

一般人の血液中クロム濃度は $1 \mu\text{g/dl}$ 程度と微量であるため、血液試料 $100 \mu\text{l}$ を $0.1\text{N}$ 硝酸 $1.9\text{ml}$ に加え直ちに混和し測定試料とした。血液は溶血し赤褐色透明の溶液となった。

### 2) 灰化条件の検討

試料は $0.1\text{N}$ 硝酸 $1.8\text{ml}$ に牛血液 $100 \mu\text{l}$ および $0.1\text{N}$ 硝酸で希釈したクロム標準液( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) $100 \mu\text{l}$ を加えよく混和したものをを用いた。この溶液は血液中クロム量 $10 \mu\text{g/dl}$ の血液を処理した試料に相当する。

試料はオートサンプラーで $20 \mu\text{l}$ を注入し、原子化温度は $2,500^\circ\text{C}$ で行った。灰化時間は40秒で灰化温度を $500^\circ\text{C}$ から $1,400^\circ\text{C}$ まで変化させ、吸光度の大きさおよび吸光度の変動係数(CV)を観察した。 $500\sim 900^\circ\text{C}$ では吸光度は $0.0463\sim 0.0538$ であり、変動係数は $21.6\sim 59.6\%$ と大きかった。 $1,100$ および $1,200^\circ\text{C}$ では吸光度は $0.0669$ および $0.0629$ であり、吸光度の変動係数はそれぞれ $2.8$ および $4.4\%$ であった。 $1,300^\circ\text{C}$ および $1,400^\circ\text{C}$ では吸光度が $0.0378$ および $0.0119$ に低下した。

表 3.血液中クロム測定の設定条件

	温度	時間	加熱モード	感度	ガス流量
1	60	50	Step	Regular	1.00
2	120	50	Ramp	Regular	1.00
3	1,100	40	Step	Regular	1.00
4	1,100	3	Step	Regular	0.00
5	2,500	3	Step	High	0.00

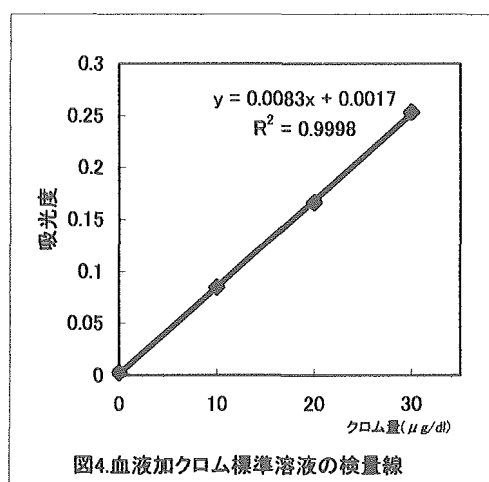


図4.血液加クロム標準溶液の検量線

これらの結果から、灰化時間は40秒で灰化温度は $1,100^\circ\text{C}$ の灰化条件が適切と判断した。

### 3) 検量線の作成

血液加クロム標準液は、 $0.1\text{N}$ 硝酸 $1.8\text{ml}$ に牛血液 $100 \mu\text{l}$ および $0.1\text{N}$ 硝酸 $100 \mu\text{l}$ (血液中クロム量 $0 \mu\text{g/dl}$ に相当)を加え混和した。同様に希釈クロム標準液(クロム濃度 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.2 \mu\text{g/ml}$ および $0.3 \mu\text{g/ml}$ ) $100 \mu\text{l}$ を各々の試験管に加え、 $10 \mu\text{g/dl}$ ,  $20 \mu\text{g/dl}$ および $30 \mu\text{g/dl}$ の血液中クロム量に相当する標準液を作成した。

フレームレス原子吸光光度計の設定条件は表3に示した。

オートサンプラーで $20 \mu\text{l}$ を注入し、それぞれ4回測定しその平均値から検量線を作成した。相関係数が $0.9998\sim 0.9999$ の検量線が得られた(図4)。

測定結果の一例を表4に示した。クロムを含まない $0.1\text{N}$ 硝酸のみを添加した血液(血液中クロム量 $0 \mu\text{g/dl}$ に相当)試料では変動係数が $24.9\%$ であったが、 $10\sim 30 \mu\text{g/dl}$ の濃度に

表 4. 血液加クロム標準溶液の吸光度  
および変動係数

	0 $\mu\text{g/dl}$	10 $\mu\text{g/dl}$	20 $\mu\text{g/dl}$	30 $\mu\text{g/dl}$
1	0.0023	0.0861	0.1657	0.2565
2	0.0018	0.0875	0.1661	0.2561
3	0.0032	0.0810	0.1672	0.2500
4	0.0022	0.0853	0.1673	0.2533
平均	0.0024	0.0850	0.1666	0.0035
SD	0.0006	0.0028	0.0008	1.4000
CV%	24.9	3.3	0.5	1.4

クロムを添加した血液試料では 0.5~3.3%と変動係数は小さかった。微量の血液中クロム量を精度よく測定することは難しいが数  $\mu\text{g/dl}$  以上の血液の測定には充分に対応可能であると考えられる。

### 3. 血液中水銀の測定法

#### 一 酸分解-還元気化法 一

##### 1. 装置

・試料分解部：テフロン製ルツボ（容量 75ml）およびステンレス（SUS-304）ジャケット。いずれもフロン工業製。

・還元気化装置：島津製 MVU-1A

・検出器：島津原子吸光光度計

・恒温槽

##### 2. 試薬

・水銀標準液：塩化第 2 水銀 135.4mg を水に溶解し、硫酸 0.1ml を加え、水で 100ml とする (1000ppmHg)。

・硝酸、硫酸、塩酸は有害金属測定用を用い、その他の試薬はすべて試薬特級を用いる。

・牛血液

##### 3. 分析操作

牛血液 1ml をテフロン製のつぼにとり、硝酸 5ml を加えた後、ステンレスジャケットにのつぼを入れ、恒温槽内で 130°C 90 分間加熱する。室温まで冷ました後、0.2% 過マンガン酸カリウム-4N 硫酸溶液 20ml で希釈して試験溶液とする。還元気化装置の反応槽に試験溶液を移し、精製水 130ml, 10% 塩酸ヒドロキシルアミン液 1ml を加える。さらに 10% 塩化第

一スズ塩酸溶液 5ml を素早く加えゴム栓をして、ポンプで内溶液をバブリングさせ、還元気化した水銀を原子吸光に取り付けたガスフローセルに導き波長 2537 Å で吸光度を測定する。

#### 4. 検量線

20ml の 0.2% 過マンガン酸カリウム-4N 硫酸溶液に水銀標準液を直接添加し、還元気化させて得られた検量線を図 1 に示す。水銀 0.05~0.6  $\mu\text{g}$  の範囲内で良好な直線性を示した。

日本人の平常値は 0.05  $\mu\text{g/ml}$  (血液中) 以下といわれる。その値は今回の検量線の下限值に相当するが、中毒が起こる量はこれ以上と推察され、実際の測定に適用できると考えられる。

#### 5. 添加回収実験

血液 1ml に水銀 0.2  $\mu\text{g}$  と 0.4  $\mu\text{g}$  を添加して酸分解を行い、回収率を求めた結果を表 1 に示す。変動係数は 0.2  $\mu\text{g}$  添加の場合は 5.4%, 0.4  $\mu\text{g}$  では 3.3% であった。また平均回収率は 101% と 97.3% であった。

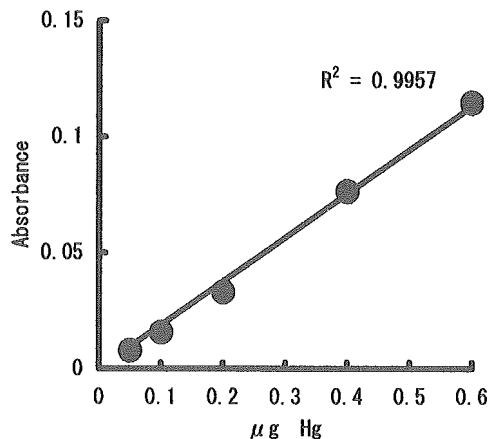


図1 Hg 検量線

表 1 水銀の添加回収

	0.2 $\mu\text{g}$ 添加	0.4 $\mu\text{g}$ 添加
1	0.200 $\mu\text{g}$	0.388 $\mu\text{g}$
2	0.196	0.394
3	0.196	0.407
4	0.182	0.403
5	0.211	0.376
6	0.215	0.380
7	0.212	0.375
Mean $\pm$ S.D.	0.202 $\pm$ 0.011	0.389 $\pm$ 0.013
C.V.(%)	5.4	3.3
recovery	101%	97.3%

## I-③ 血液中のメトヘモグロビン (Met-Hb) の測定法

芳香族ニトロ・アミノ化合物 (アニリン, ニトロベンゼン, パラニトロクロロベンゼン等) などの有害化学物質に暴露されると, 血中のヘモグロビンの酸化が異常に促進され, Met-Hb血症を起こす。健康被害危機事例発生時において, 血液中のMet-Hb測定は, a) 該当化学物質への曝露の有無の判定, b) 曝露量の推定, c) 生体影響の推定, d) 曝露後の経過・回復をみるための指標などとして役立つ。本項では, 1) Met-Hb血症の概要と測定事例, 2) Met-Hbの測定法, 3) 測定にあたっての留意点などを記述する。

### 1) Met-Hb血症の概要と測定事例

Met-Hb はヘモグロビンの鉄が 2 価 ( $Fe^{2+}$ ) の状態から 3 価 ( $Fe^{3+}$ ) の状態になったもので, 暗赤褐色の独特の色調を示す。Met-Hb は正常の人のヘモグロビン中にも常時生成されているが, 赤血球内の還元酵素 (Met-Hb reductase, G6PD) で常に還元されており, 正常人の血中には 1% 前後検出されるにすぎない。先天性の Met-Hb 血症は上記酵素の欠損によるものである。

事故や犯罪などによる Met-Hb 血症は, 化学物質の体内吸収によって, ヘモグロビンの酸化が異常に促進された状態で起こる。Met-Hb 血症を起こす化学物質としては, 芳香族ニトロ・アミノ化合物 (アニリン, ニトロアニリン, アミノフェノール, クロロアニリン, ニトロベンゼン, ジニトロベンゼン, ニトロクロロベンゼン, クロロジニトロベンゼン, ニトロフェノールなど) がよく知られている。また, 生後 6 ヶ月以内の新生児期では消化器中で, 硝

酸塩が亜硝酸塩に還元されて吸収され Met-Hb 血症を引き起こす。そのため, 水道水中の基準として硝酸性窒素と亜硝酸性窒素の合計が 10mg/l 以下と定められている。

成人における Met-Hb 量と症状の関係は表 1 に示すとおりである。

我々は, 1984 年にパラニトロクロロベンゼン (PNCB) 被曝者の Met-Hb 測定を継続し経過観察した。当該事例では Met-Hb が 66.7% に達し, 意識を失い危篤状態となったが, 交換輸血によって一命をとりとめた。本事例は, 紙袋入り PNCB をモッコに積みクレーンで吊り下げて船積みしていたところ, 袋が破れて頭上から PNCB を浴び, 作業衣, 皮膚などに付着したものが主として経皮吸収によって体内に取り込まれたものと推測されている。このように芳香族ニトロ・アミノ化合物の多くは経気道のみならず経皮吸収がみられるものが多く, 速やかな脱衣と身体洗浄等の処置が大切である。

表 1. 血中のメトヘモグロビン (Met-Hb) 量と症状との関係

Met-Hb 量	症 状
10%まで	全く無症状
10~25%	チアノーゼが現れるがほとんど無症状
25~35%	チアノーゼが著明になる
35~40%	運動により頭痛, めまい, 疲労, 呼吸困難, 頻脈等を起こす
40%以上	酸素欠乏症が出現する
50~60%	意識喪失, 痙攣を起こす
60~75%以上	昏睡状態で生命の危険を招く

## 2) 測定法

【測定原理】PH6.6におけるMet-Hbの吸光度は630nmで最大であり、シアンメトヘモグロビンの吸光度は540nmで最大となり630nmでは吸収を示さない。血液中のMet-Hbはシアン化ナトリウムを添加することによってシアンメトヘモグロビンに変換される。したがって、シアン化ナトリウム添加前後の630nmでの吸光度の差はMet-Hbの吸光度を表しており、Met-Hb濃度と比例する。

### 1. 試薬とその調整

#### 1) M/10磷酸緩衝液(PH6.6)

①M/10-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 磷酸一カリウム(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
13.62gを蒸留水に溶かして1000mlとする。

②M/10-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 磷酸二ナトリウム(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
17.82g(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>Oならば35.81g)を蒸留水に溶かして1000mlとする。

③ [① : ② = 62.5 : 37.5] の割合で混合したのち、PHメーターを用いて、①または②の溶液でPHを6.6に調整する。

2) 20%フェリシアン化カリウム水溶液 : フェリシアン化カリウム2gを蒸留水に溶かして10mlとする (密閉して冷暗所で保存すれば長期間安定)。

3) 5%シアン化ナトリウム水溶液

4) シアン化ナトリウム0.5gを蒸留水に溶かして10mlとする (密閉して冷暗所に保存すれば約1ヶ月保存可)。

5) 臨床検査用ヘモグロビン測定キット (シアンメトヘモグロビン法)

### 2. 器具・機械

1) ヘパリン加採血管 (血液 1ml に対し、ヘパリン 0.1~0.2g)。

2) 50mlネジ蓋付きプラスチック遠心管 (FALCON Conical Tubesなど)。

3) 10ml試験管。

4) 200 μl用マイクロピペット。

5) 50 μl用マイクロピペット。

6) 分光光時計。

7) pHメーター。

8) 遠心分離器。

### 3. 測定操作

1) 50mlネジ蓋付きプラスチック遠心管に蒸留水16.0mlをとる。

2) ヘパリン加採血管に採血した全血200 μlを1)に加え、蓋をして転倒混和して、約30分室温に放置し、完全に溶血させる (採血後直ちに希釈する場合は抗凝固剤 (ヘパリン) を使用しなくてもよい)。

3) M/10磷酸緩衝液(PH6.6)4.0mlを加え、転倒混和する。

4) 3000rpmで10分間遠心分離する。

5) 3本の試験管に上清を5mlずつ分注する (遠心管に残った上清を試料①とし、分注したものをそれぞれ試料②,③,④とする)。

6) 試料①について630nmおよび680nmの吸光度を測定する ( $L_1 = OD_{630} - OD_{680}$ )。

7) 試料②に5%シアン化ナトリウム水溶液を1滴(50 μl)加え、630nmおよび680nmの吸光度を測定する ( $L_2 = OD_{630} - OD_{680}$ )。

8) 試料③および④に20%フェリシアン化カリウム水溶液を1滴 (50 μl) 加え、30分間放置する。

9) 試料③の630nmおよび680nmの吸光度を測定する ( $L'_1 = OD_{630} - OD_{680}$ )。

10) 試料④に5%シアン化ナトリウム水溶液1滴(50 μl)を加え、630nmおよび680nmの吸光度を測定する ( $L'_2 = OD_{630} - OD_{680}$ )。

11) Met-Hb (%) の計算 : 上述の 6) 7) 9)

10) で得た  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L'_1$ ,  $L'_2$  を下記の計算式に代入して、総ヘモグロビン中に占めるMet-Hbの比率 (%) を求める。

$$\text{メトヘモグロビン (\%)} = \frac{(L_1 - L_2)}{(L'_1 - L'_2)} \times 100$$



12) Met-Hbの総量 (g/dl) を知る必要がある場合には、別途、市販の臨床検査用ヘモグロビン測定キットを使用して総ヘモグロビン量 (g/dl) を測定する。ここで得た総ヘモグロビン量 (g/dl) と 11) で得たMet-Hb (%) とから、次式を用いて総Met-Hb量 (g/dl) を求める。

$$\text{総メトヘモグロビン量 (g/dl)} = \text{Met-Hb (\%)} \times \text{総ヘモグロビン量 (g/dl)} \times 0.01$$

### 3) 測定にあたっての留意点

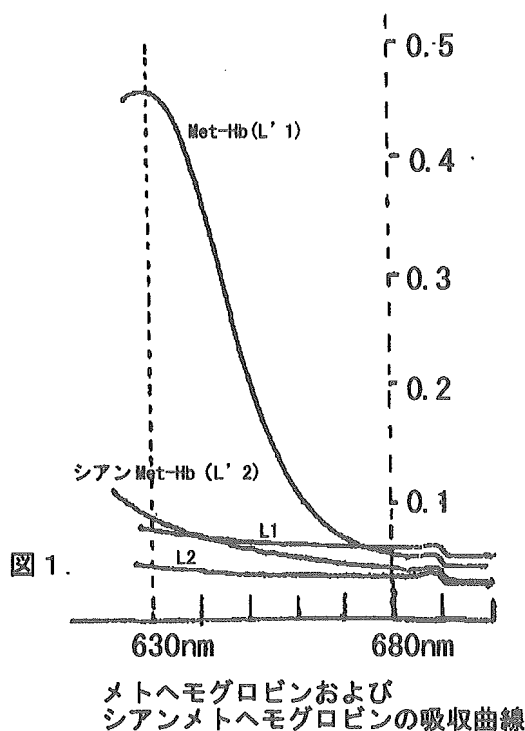
- 1) 採血後直ちに、測定操作の 2) または 3) の操作まで実施し、溶血液又は溶血緩衝液を氷冷保存する（採血後Met-Hbが形成されることがあるが、溶血後は比較的安定である。凍結するとMet-Hbが多量に形成されるので、やむをえず全血で保存する場合にも凍結せず氷冷保存する）。
- 2) 5%シアン化ナトリウム水溶液を添加すると、吸光度のベースが若干低下するのでプラスの誤差を生じ、Met-Hb量が少ない場合

には無視できない。Met-Hbにもシアンメトヘモグロビンにも吸収を持たない680nmでの吸光度と630nmでの吸光度を同時に測定し、630nmでの吸光度と680nmでの吸光度の差を、それぞれ $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L'_1$ 、 $L'_2$ として計算する。

- 3)  $L_1$ と $L_2$ を交互に測定する場合、セルにシアン化ナトリウムが残留しないように十分洗浄しなければならない。
- 4) Met-Hb ( $L'_1$ )、シアンメトヘモグロビン ( $L'_2$ )、低濃度サンプルの $L_1$ および $L_2$ の吸収曲線は左下の図1の如くである。

### 文 献

- 1) 労働省労働基準局補償課編：労災保険業務上疾病の認定基準と主な関連通達集,労働基準行政普及会(1978)
- 2) 田淵武夫, 原一郎, 南正康：芳香族ニトロ・アミノ化合物取り扱い作業者の曝露評価（ジアゾ反応陽性物質を中心に）. 大阪府立公衛研所報労働衛生編, 21(1983)
- 3) 田淵武夫, 原一郎, 南正康, 山城久和：港湾荷役作業における急性パラニトロクロルベンゼン中毒例. 大阪府立公衛研所報労働衛生編(1985)
- 4) 三浦豊彦 他 編「現代労働衛生ハンドブック増補改訂第2版本編」. (財)労働科学研究所出版部(1994)



## I-④ 気中有毒化学物質の分析法の検討

気中有毒物による中毒事故発生時に物質を同定する場合、GC・MS による測定と同時に、GC・MS では測定できないケースを想定して、数種類の検知管で簡易的に測定を行なう。この時、検知管測定で反応があれば確認検査が必要になる。今年度は、1) 塩素ガス、および、2) シアン化水素の確認検査についてマニュアル化するとともに試薬の保存性について検討を行なった。また併せて、3) 気中の揮発性有機化合物 (VOC) の一斉分析法について検討した。なお、有害ガス・蒸気の捕集とその安全対策 (防護具類) の検討については、I-⑤ に記述する。

### 1) 気中塩素濃度の測定 (ABTS 法)

塩素の測定には、①オルト・トリジン法、② ABTS 法、③メチルオレンジ法がある。ここでは、作業環境測定に用いられている ABTS 法を使用することとした。

#### 1. 試薬

- ・2,2'-アジノ・ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS)
- ・中性リン酸塩標準液 (pH6.86/25℃)
- ・硫酸
- ・次亜塩素酸ナトリウム溶液 (アンチホルミン)
- ・ヨウ化カリウム
- ・塩酸
- ・でん粉 (溶性)
- ・0.01M チオ硫酸ナトリウム (力価を測定したもの)

#### 2. 試薬の調製

- 1) ABTS 溶液 : ABTS0.1g を秤量し、中性リン酸塩標準液で 100ml に溶解する。
- 2) 0.25M 硫酸 : 硫酸 1.4ml を精製水で 100ml にする。
- 3) 吸収液 : ABTS 溶液 10ml と 0.25M 硫酸 1ml を精製水で 100ml にする。
- 4) 標準原液 : 次亜塩素酸ナトリウム溶液 0.5ml を精製水で 100ml にする。

この溶液の有効塩素濃度を下記の方法で標定する。

- 5) 標準液 : 標準原液を精製水で希釈し、塩素濃度を 10 $\mu$ g/ml とする。
- 6) 指示薬 : でん粉 1g に水 100ml を加え、煮沸して溶かす。

#### 3. 標準原液の標定

- 1) 標準原液 10.0ml を共栓三角フラスコ (100ml) にとり、ヨウ化カリウム 0.2g および 20%塩酸 1ml を加えて栓をして 5 分間程度放置する。
- 2) ビューレットを用いて 0.01M チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する。指示薬はでん粉溶液であり、ヨードでん粉色が消失した時点のチオ硫酸ナトリウム溶液量 Vml を求める。
- 3) 次式で有効塩素濃度を算出する。

$$\text{有効塩素濃度 (mg/ml)} = 35.46 \times 0.01 \times (V - V_0) \times f / 10$$

(但し  $V_0$  = ブランク試験値,  $f$  = 力価)

#### 4. 試料のサンプリング

吸収液 10ml を入れたバブラーを 2 本連結し、1 ml/min 以下の一定流量で空気を吸引する。

## 5. 定量

- 1) 以下のような標準系列を作り，波長410nm で吸光度を測定する。

濃度(μg/ml)	0	0.1	0.2	0.5	1.0
標準液(ml)	0	0.2	0.4	1.0	2.0
吸収液(ml)	20.0	19.8	19.6	19.0	18.0

- 2) サンプリングしたバブラー中の吸収液を試料液とし，吸光度を2本，別々に測定する。
- 3) 次式により，気中塩素濃度を算出する。

$$C = \frac{10 c_1}{Q} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{24.47}{70.91}$$

但し C: 気中塩素濃度 (ppm)

$c_1$ : 1 本目の試料液中塩素濃度 (μg/ml)

$\varepsilon$ : 捕集率  $1 - c_2/c_1$  ( $c_2$ : 2 本目のサンプル中塩素濃度 (μg/ml))

Q: 吸引空気量 (l)

## 6. 注意事項

臭素，ヨウ素，二酸化塩素，オゾンなどの酸化性ガスが混在すると着色され，正確な測定が妨害される。

## 7. 気中塩素濃度の測定 (ABTS 法) における試薬の保存性の検討

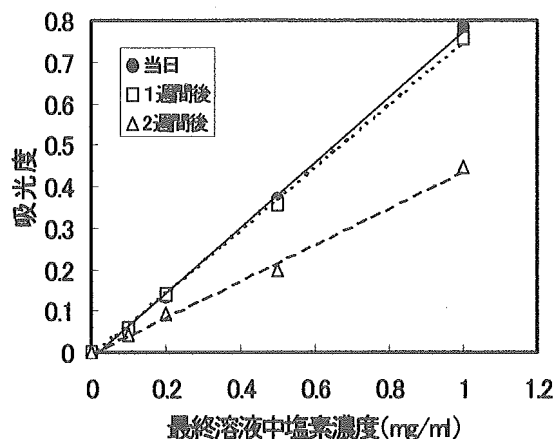
### 1) 検討方法

試薬を作成した当日，およびその後1週間ごとに，上記マニュアルに従って標準系列を測定し，試薬の保存性を検討した。なお，試薬は冷蔵庫で保存した。

### 2) 検討結果

結果を図に示す。試薬作成当日および1週間後の検量線はいずれも直線性があり，かつ傾きも同程度である。しかし，試薬作成2週間後の

塩素の検量線



検量線は，直線性はあるが，傾きが大きく異なる。したがって，試薬作成後，1週間以内に測定する必要がある。

## 2) 気中シアン化水素濃度の測定 (ピリジン-ピラゾロン法)

シアン化水素の測定には，①ピリジン-ピラゾロン法，②バルビツル酸-ピリジン法，③イオン電極法がある。ここでは，作業環境測定に用いられているピリジン-ピラゾロン法を使用することとした。

### 1. 試薬

- シアン化カリウム
- 水酸化ナトリウム
- 酢酸
- 中性リン酸塩標準液 (pH6.86/25°C)
- クロラミン T
- 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン
- ビス (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン)
- ピリジン
- ヨウ化カリウム
- 0.1M 硝酸銀溶液 (力価を測定したもの)

### 2. 試薬の調製

- 1) 吸収液 : 水酸化ナトリウム 4g を精製水で 1 L とする。

- 2) 3%酢酸 : 酢酸 3ml を精製水で 100ml とする。
- 3) クロラミン T 溶液: クロラミン T 0.25g を精製水で 20ml とする。
- 4) ビス (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン) 溶液: ビス (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン) 0.04g をピリジンで 40ml とする (温浴中で加熱すれば完全に溶ける)。
- 5) ピリジン-ピラゾロン溶液: 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 0.2g を精製水 80ml に入れ, 70°C の温浴中で加熱して溶かした後 (完全に溶けなくてもよい), 室温にもどす。これにビス (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン) 溶液 16ml を加える。
- 6) 標準原液: シアン化カリウム 0.1g を精製水で 100ml とする。
- 7) 標準液 : 標準原液を吸収液で希釈して CN<sup>-</sup>濃度が 4.0μg/ml とする。

### 3. 標準原液の標定

- 1) 標準原液 10.0ml を共栓三角フラスコ (100ml) にとり, 5%ヨウ化カリウム 0.2ml および 28%アンモニア水 0.5ml を加える。
- 2) ビューレットを用いて 0.1M 硝酸銀溶液で滴定する。沈殿が消失なくなった時点の硝酸銀溶液 Vml を求める。
- 3) 次式でシアン濃度 (CN<sup>-</sup>濃度) を算出する。

$$\text{CN}^- \text{濃度 (mg/ml)} = 5.206 \times (V - V_0) \times f / 10$$

(但し V<sub>0</sub> = ブランク試験値, f = 力価)

### 4. 試料のサンプリング

吸収液 10ml を入れたミゼットインピンジャーに 0.5~1 ml/min 以下の一定流量で空気を吸引する。

### 5. 定量

- 1) 以下のような標準系列を共栓試験管に作る。

CN <sup>-</sup> 濃度(μg/ml)	0	0.2	0.8	2.0	4.0
標準液(ml)	0	0.25	1.0	2.5	5.0
吸収液(ml)	5.0	4.75	4.0	2.5	0

- 2) ミゼットインピンジャー中の吸収液 10ml から 5ml を共栓試験管に移し試料液とする。
- 3) 標準系列および試料液に, 3%酢酸 1ml, 中性リン酸塩標準液 4ml を加えて混合した後, クロラミン T 溶液 0.2ml を加えて, 直ちに栓をして静かに混合し 2~3 分間放置する。これにピリジン-ピラゾロン溶液 5ml を加えて混合し, 20~25°C で 50 分間放置する。
- 4) 波長 620nm で, 標準系列および試料液の吸光度を測定する。
- 5) 次式により, 気中シアン化水素濃度を算出する。

$$C = \frac{10c}{Q} \times \frac{24.47}{26.03}$$

C: 気中シアン化水素濃度 (ppm)

c: 試料液中 CN<sup>-</sup>濃度 (μg/ml)

Q: 吸引空気量 (l)

### 6. 注意事項

塩素, 臭素などの酸化性ガス, および硫化水素が共存すると妨害がある。

### 7. 気中シアン化水素濃度の測定 (ピリジン-ピラゾロン法) における試薬の保存性の検討

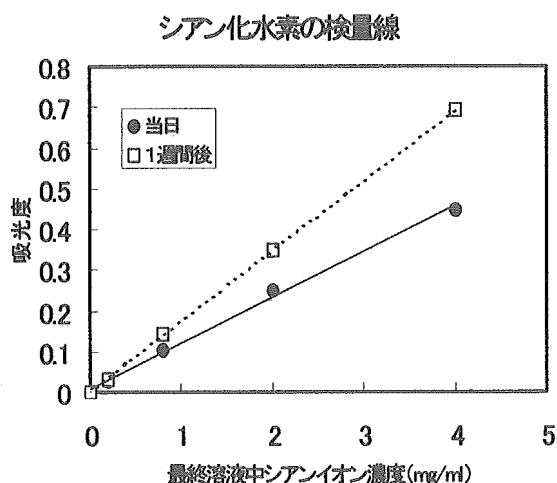
#### 1) 検討方法

試薬を作成した当日, およびその後 1 週間ごとに, 上記マニュアルに従って標準系列を測定

し、試薬の保存性を検討した。なお、試薬は冷蔵庫で保存した。ただし、ピリジン-ピラゾロン液は室温で保存した。

## 2) 検討結果

結果を図に示す。試薬作成当日および1週間後の検量線はいずれも直線性があるが、傾きが大きく異なる。したがって、試薬作成当日に測定する必要がある。



## 3) 空气中揮発性有機化合物(VOC)の分析 —— GC-MSによる一斉分析 ——

化学物質を製造・使用する工場等の労働現場では、室内空気を媒介して高濃度の化学物質に曝露される可能性が高い。また、近年、社会的に話題となっている「シックハウス症候群」の発症も室内空気中の化学物質が一つの要因として考えられている。したがって、曝露される空气中化学物質を再現性良く定量する技術が必要である。

厚生省が1997～1998年度に行った「居住環境内における揮発性有機化合物の全国実態調査」<sup>1)</sup>で用いた方法を参考にして、室内空気中における42種の揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds: VOC)のガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)による一斉分析法

について検討した。

以下に、(1)方法(1. 試薬・器具, 2. VOCの捕集, 3. 対象物質と定量法), (2)結果・考察(1. クロマトグラフィ出力, 2. 検量線の直線性, 3. ブランク試験, 4. 破過試験, 5. 再現性試験, 6. 保存性試験, 7. 脱着率試験), (3)まとめ, および、文献を示す。

### (1) 方法

#### 1. 試薬および器具

空气中VOCの捕集には柴田科学器械工業製活性炭チューブ(Organic gas sampler precutting, JUMBO, 20-40メッシュ, 第1層400mg, 第2層200mg)およびデュポン製P-2500型携帯用小型吸引ポンプを用いた。二硫化炭素は、和光純薬工業製作業環境測定用を用いた。標準には関東化学製室内環境測定用VOCs混合標準原液(45物質混合, 各1mg/ml二硫化炭素溶液。ただしm-キシレンおよびp-キシレンは0.5mg/ml。)を使用した。器具はすべてイオン交換水で洗浄後、アセトンで洗浄し、乾燥したものを使用した。定容量の二硫化炭素の分取には、ガラス製パスツールピペットを接続したソコレックス製分注器(0.5～5.0ml用)を使用した。内部標準物質として用いるトルエン-d8(純度:>99.95%, 比重:0.943)はアルドリッチから供した。

#### 2. VOCの捕集

測定する室内の床上1.2～1.5mにおいて、携帯用小型吸引ポンプに連結した活性炭チューブを用いて、流速0.1L/minで24時間空气中VOCを採取した。捕集後、チューブの両端に付属のキャップを付けて密栓し、アルミホイル等で遮光して分析までの期間冷蔵庫に保管した。

#### 3. 対象物質とVOCの定量

##### a) 分析対象物質

以下の42物質を測定の対象とした。ただし、