鉛中毒ラットのポルフィリン代謝について

— 鉛含有粉じん曝露実験¹⁾ —

山本丈夫, 祐田泰延, 山口正義

静岡薬科大学²⁾

Study on the Porphyrin Metabolism in Lead Poisoning Rats¹⁾

— Exposure of Air-borne Dusts containing Lead —

TAKEO YAMAMOTO, YASUNOBU SUKETA

and MASAYOSHI YAMAGUCHI

Department of Environmental Health, Shizuoka College of Pharmacy²⁾

(Received November 20, 1972)

The contents of intermediates of porphyrin in the urine and blood were examined in lead-exposed rats in the workshop of lead glass factory to study relationship between metabolism of porphyrin and air-borne particles containing lead, and the following results were obtained.

The concentration of lead in air-borne particles were $0.83 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{hr}$ in places producing primary particles³⁾ (ground materials, etc.) and 2.45 and $3.27 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{hr}$ in places producing secondary particles³⁾ (fumes, etc.). These air-borne particles were found to mainly consist of particles below 1μ .

The contents of both δ -aminolevulinic acid and coproporphyrin in the urine and of protoporphyrin in the blood of rats exposed to air-borne dust containing lead increased over their levels in control rats.

Free protoporphyrin in erythrocyte is suggested to be important as an index of chronic lead poisoning, and such a biological examination was demonstrated to be valuable from this experiment as an index of environmental quality in workshops.

緒 言

従来, 産業中毒として多くの金属中毒が発生してきているが, これらはすべて作業環境において金属濃度が高くなり, 高濃度の金属に曝露されることによって起ってきた. 近年, 労働環境の整備改善などにより作業環境中の金属濃度が次第に低下し, 産業中毒が減少してきているが, 中毒発現形態も慢性中毒に変ってきている. このような場合, 従来の作業環境における有害性金属の理化学的測定値だけでは作業環境の条件の設定に限度があり, 生物学的な影響をもあわせて考慮する必要が生じてきた.

そこで, 著者らは, 鉛作業環境の改善などの労働衛生管理の立場から, 労働環境評価の指標として, ラットを供試動物として作業現場において曝露による生物実験を

試みた. 今回, 某鉛ガラス工場で生産過程に発生する気中鉛含有粉じんのラットへの影響を検討し, 作業環境汚染の強度と生体機能の変化との関連を明らかにする目的で, 気中鉛濃度と曝露ラットのポルフィリン代謝中間産物との関係を検討した.

実 験 方 法

1. 測定場所 測定場所 (Fig. 1) は, 某鉛ガラス工場の原料調合場 1ヶ所 (P-1) および溶融場 2ヶ所 (S-1, S-2) で行なった. 溶融場内の測定場所は溶鋳炉から, およそ 3 m の高さに位置している熱管理室の付近 (S-1) および溶融場と同一平面内であって, 溶鋳炉より約 20 m 離れたセラミックス製造場内 (S-2) を選んだ. 溶融場は 24 時間連続操業であったが, 原料調合場においては, 原料調合の回数が 1 日 3 回で, その作業時間が短

1) 山本丈夫, 祐田泰延, 山口正義, 野崎隆夫, 日本薬学会第 92 年会, 講演, 大阪, 1972 年 4 月.

2) Location: 2-1 Osika 2-Chome, Shizuoka (静岡市小鹿 2 丁目 2 番 1 号).

3) 山本丈夫, 福地知行, 青木 稔, 産業医学, 11, 67 (1969).

く、約1時間であった。

2. 被検動物 実験動物は、ウィスター系雄ラット体重120g前後の動物を使用し、前記の測定場所(3ヶ所)に、それぞれ1つのケージに動物を4匹づつ入れて設置した。対照群として同種の動物4匹を温度25°の恒温室中で同様に飼育した。動物には精製蒸留した水と固型飼料CE-2(日本クリアK.K)を与え、曝露期間中、ケージの飼料箱部分ではできるだけ鉛含有粉じんの汚染を防ぐために合成樹脂でおおった。動物への鉛含有粉じんの曝露は24時間連続曝露で30日間行なった。この測定期間中の作業場の気温の変化は、各測定点すなわちP-1, S-1 および S-2 において、それぞれ最高気温は29°, 29°, 28°であり、最低気温は22°, 19°, 24°であった。

3. 粉じんの測定と鉛の定量 総粉じん量はハイ・ボリウム・エアサンプラー(平均流量1.415 m³/min)で24時間吸引し、重量法により求めた。ただし、ハイ・ボリウム・エアサンプラー(紀本電子工業K.K)はシールド付を使用し、フィルターはWhatman GF/Aを使用した。カスケード・セントリピーター(Bird & Tole 社)はステージ型のものを使用し、粉じんを粒度別に捕集した。フィルターは上記のものを用いて流量30 liter/minで24時間吸引した。

また、上記の方法で測定した粉じん中の鉛の定量は、Ehrlich⁴⁾らの方法により湿式分解したものを標準添加法により原子吸光分析計(Perkin-Elmer 303 型)にて行なった。

4. 採尿法 採尿は糞尿分離型ゲージを用いて導尿法でポリ容器に採集した。採尿は曝露期間中、曝露開始から6日目ごとに合計5回行ない、24時間尿を測定用試料とし、採尿後24時間以内に分析を行なった。測定すべき尿中成分は、この時間内では安定であった。

5. 尿中成分の分離定量法 尿中δ-アミノレブリン酸の分離定量はJ.R. Davig⁵⁾の方法に準じて行なった。

尿中コプロポルフィリンの分離定量はSanoとGranick⁶⁾の方法に準じて行なった。

6. 採血および赤血球中遊離プロトポルフィリンの定量法 採血はヘパリンナトリウム溶液でコーティングした採血管に解剖時に殺すことなく、心臓せん刺により約

3 ml 採血し、4°に保存した。この血液を用いて井上⁷⁾の方法で赤血球を分離し、赤血球中の遊離プロトポルフィリンの分離定量はSchwartz⁸⁾らの方法に準じて行なった。ただし、プロトポルフィリンの濃度は全血当りのプロトポルフィリンμg/dlとして算出した。

7. 肝臓中のδ-アミノレブリン酸合成酵素活性の測定法 ラット肝臓中のδ-アミノレブリン酸合成酵素活性の測定は粗酵素液として、肝ホモジネート1.0 ml (3倍容の0.9% NaCl 溶液でホモジナイズしたもの)を用い、グリシン200μmoles, α-ケトグルタル酸2.5μmoles, エチレンジアミン四酢酸(EDTA)3.75μmoles およびトリス塩酸150μmoles (pH 7.2)を全容3.5mlとし、好氣的に37°で1時間インキュベートした。⁹⁾ 反応は40%トリクロロ酢酸(TCA)0.5 mlで停止した。反応停止後、生成したδ-アミノレブリン酸は遠心分離により得た上清を2.5N NaOHで中和した後、J.R. Davig⁵⁾らの方法により分離し、ManzeralとGranick¹⁰⁾の方法で定量した。酵素活性は1時間のインキュベートにより生成したδ-アミノレブリン酸量(mμmoles/gr/hr)で示した。

8. 酢酸鉛の投与方法 実験動物(ウィスター系雄ラット)は、恒温室で飼育し、鉛含有粉じんの曝露群とほぼ同等の体重(250—300g)のものを用いた。酢酸鉛(Pb(CH₃COO)₂·3H₂O)を蒸留水に溶かし、Pb²⁺20 mg/mlの溶液をPb²⁺50 mg/kgの割合で動物の腹腔内に1回投与した。排泄尿は糞尿分離型ゲージで採集し、尿中δ-アミノレブリン酸および尿中コプロポルフィリン量を上記の方法で定量した。

実験結果

1. 作業環境中の浮遊粉じん量と気中鉛量

作業環境中の浮遊粉じん量の測定はハイボリウムエアサンプラーを使用して、24時間連続測定で動物の曝露期間中の最初の第1日目、第15日目および第29日目の合計3回行なった。浮遊粉じん量と気中鉛量とは3回の測定の平均値と標準誤差で示した。Table I に示したごとく、気中鉛濃度の平均値は、第1次粉じん(物理的破砕と砕によって発生した粉じん)⁹⁾発生場所である調合場(P-1)では20±3.0 μg/m³であった。また、2次粉じん(蒸発した鉛フュームが融点以下に冷却されて酸化粉

4) P. Ehrlich, *Charite-annalen*, **10**, 136 (1885).

5) J.R. Davig, R.H. Abrahams, E.A. Fabrega, *Arch. Environ. Health*, **17**, 164 (1968).

6) S. Sano, S. Granick, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1173 (1961).

7) 井上 将, *国民衛生*, **28**, 189 (1959).

8) S. Schwartz, H.M. Wikoff, *J. Biol. Chem.*, **194**, 563 (1952).

9) 山口正義, 祐田泰延, 山本丈夫, *産業医学*, **14**, 407 (1972).

10) D. Mauzeral, S. Granick, *J. Biol. Chem.*, **219**, 435 (1956).

TABLE I. Air-borne Dust containing Lead at a Workingshop

Setting place of animals	Numbers of sample	Air-borne dust ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Air-borne lead ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Lead contents (%)
Primary dust ^{b)} (P-1)	3	1553 ± 12	20.0 ± 3.0	1.3 ± 0.2
Secondary dust ^{c)} (S-1)	3	350 ± 10	59.0 ± 4.0	16.8 ± 0.8
Secondary dust ^{c)} (S-2)	3	299 ± 61	79.0 ± 5.0	28.0 ± 4.8

a) Conf. Quality criteria for air-borne dust: $2.0 \text{ mg}/\text{m}^3$
air-borne lead: $0.15 \text{ mg}/\text{m}^3$

b) Setting place of animals, namely, P-1 shows place producing primary dust.

c) Setting place of animals, namely, S-1 and S-2 show to be lower place and upper place, respectively, than source of secondary dust.

Fig. 1. Sampling Station

P-1, S-1 and S-2: setting place of animals

- a) furnace
- b) heating control room
- c) ceramic place
- d) mixer room

じんとなり、空气中に浮遊しているもの)³⁾発生場所である S-1 および S-2 では、それぞれ $59.0 \pm 4.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $79.0 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。

一方、浮遊粉じん量は、調査場では平均 $1553 \pm 12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ で 2 次粉じん発生場所である溶融場よりも、かなり高い値を示したが、粉じん中の鉛量は少なく、鉛含量はわずかに 1.3% であった。

次に、浮遊粉じんの物理化学的性質を知る目的で、ハイボリウムエアサンプラーによる測定と並行してカスケードセントリピーターを使用し、作業環境中の浮遊粉じんを粒度別に捕集した。そのときの粉じん量と鉛量との関係を Fig. 1 に示した。1 次粉じん発生場所(P-1)と 2 次粉じん発生場所(S-1, S-2)の両地点で、ともに平均粒度 2μ 以下の浮遊粉じんが多く、ついで 8μ の粒径のものが、これについていた。しかし、調査場と溶融場では粉じんの粒度分布とその粉じん中の鉛量との関係がわずかに異なった傾向を示した。すなわち、調査場では 2μ から 8μ の粒径の粉じんが同じ割合で存在するが溶融場

では 2μ のものが少なく 8μ のものが多くなっていた。

2. 鉛含有粉じん曝露ラットの尿中コプロポルフィリンおよび δ -アミノレブリン酸について

Table I および Fig. 2 に示した環境下で鉛曝露されたラットの生体機能の変化を観察する目的で、尿中コプロポルフィリンおよび尿中 δ -アミノレブリン酸量を、24 時間尿を用いて曝露期間中に 5 回測定し、ラット一匹当りの尿 dl 中の量に換算して Table II に示した。また Table II はポルフィリン代謝産物と粉じん中の鉛量との関係を示した結果である。気中鉛量を $\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{hr}$ で表わすと、2 次粉じん発生場所である S-2 が最も高い値を示したが、一方、S-2 における尿中 δ -アミノレブリン酸および尿中コプロポルフィリン量も、気中鉛量に相関しており、他の測定場所の場合よりも高い値を示した。

Fig. 3 は鉛含有粉じんを曝露したラット尿中 δ -アミノレブリン酸およびコプロポルフィリンとの相関性について検討したものである。鉛含有粉じんを曝露した場合は相関係数 0.61、危険値 1% 以下で高い相関性が認められたが、酢酸鉛を実験的にラットの腹腔内に投与した場合も同様に高い相関性が認められ、回帰直線の傾きもほぼ近い値を示した。

3. 鉛含有粉じん曝露ラットの赤血球中遊離プロトポルフィリンについて

作業者が鉛曝露から隔離されたとき、赤血球中の遊離プロトポルフィリン量の減少が認められているが、ラットに鉛含有粉じんを 30 日間連続曝露した後に鉛曝露から隔離し、その隔離後の時間の経過とともに赤血球中遊離プロトポルフィリン量がどのように変動するのかを検討した。Fig. 4 に見られるごとく、1 次粉じん発生場所(P-1)では赤血球中遊離プロトポルフィリン量は隔離後の時間の経過とともに減少する傾向を示した。しかしながら、2 次粉じん発生場所(S-1, S-2)では対照よりは高い値を与えたが急激な変動は認められず、ほぼ一定の値の傾向を示した。

鉛曝露から隔離し、その後の時間の経過における赤血

Fig. 2. Relationship between Particles Size and Its Lead Contents

- : primary dust producing place (P-1)
 ●·····● : secondary dust producing place (S-1)
 ●---● : secondary dust producing place (S-2)

TABLE II. Effect of Air-borne Lead on Porphyrin Metabolism

Setting place of animls	Air-borne lead. ($\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{hr}$) ($n=3$)	δ -Aminolevulinic acid synthetase activity ($\text{m}\mu\text{moles}/\text{gr}/\text{hr}$) ($n=4$)	δ -Aminolevulinic acid in urine ^{a)} (mg/dl) ($n=5$)	Coproporphyrin in urine ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{dl}$) ($n=5$)	Protoporphyrin in erythrocyte ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{dl}$) ($n=4$)
Control	—	40.5 ± 3.8	0.668 ± 0.020	2.08 ± 0.14	2.56 ± 0.34
P-1 ^{c)}	0.83 ± 0.13	50.3 ± 3.5	1.089 ± 0.073	3.03 ± 0.31	5.14 ± 0.63
S-1 ^{d)}	2.45 ± 0.18	45.1 ± 4.0	0.956 ± 0.058	2.58 ± 0.23	3.35 ± 0.14
S-2 ^{d)}	3.27 ± 0.20	54.2 ± 1.4	1.163 ± 0.129	5.76 ± 0.49	4.24 ± 0.29

a) Urine was sampled five times through the exposed period of air-borne dusts containing lead.

b) Blood was sampled after the exposed period of air-borne dusts containing lead.

c) primary dust producing place

d) secondary dust producing place

Fig. 3. Correlation between δ -Aminolevulinic Acid in Urine and Coproporphyrin in Urine of Lead Exposed and Administered Rats

A: Air-borne dust containing lead exposed rats.

B: Lead acetate (Pb^{2+} 50 mg/kg) was administered intraperitoneally rats.

Fig. 4. Protoporphyrin in Erythrocytes of Lead Exposed Rats

Free protoporphyrin in erythrocyte was calculated as the content in blood: protoporphyrin $\mu\text{g}/\text{dl}$ of blood.

P-1: primary dust producing place

S-1, S-2: secondary dust producing place

球中遊離プロトポルフィリン量の平均を Table II に示した。1次粉じん発生場所である P-1 で飼育したラットの赤血球中遊離プロトポルフィリン量は、対照と比較

して、2倍の高い値を示した。また、2次粉じん発生場所(S-1, S-2)においても、それぞれ、1.3倍—1.7倍という高い値を示した。

4. 鉛含有粉じん曝露ラットの肝臓 δ -アミノレブリン酸合成酵素活性について

上記のごとく、鉛含有粉じんに曝露されたラットは、その尿中および血中のポルフィリン中間代謝産物の増加を引き起した。そこで、鉛含有粉じん曝露ラットの肝ホモジネートを用いて、ポルフィリン生合成系の律速酵素である δ -アミノレブリン酸合成酵素活性を測定した。

Table II に示したごとく、1次粉じんおよび2次粉じん発生場所で飼育したラット肝 δ -アミノレブリン酸合成酵素活性はやや高値を示した。

考 察

気中鉛量は1次粉じん発生場所(P-1)では $20.0 \pm 3.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2次粉じん発生場所のS-1, S-2では、それぞれ 59.0 ± 4.0 , $79.0 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。これらの作業環境現場にラットを30日間連続曝露し、その間の尿中 δ -アミノレブリン酸およびコプロポルフィリンを定量した。尿中 δ -アミノレブリン酸量は、対照と比較してP-1で1.63倍、S-1およびS-2では、それぞれ1.43倍、1.74倍であり、尿中コプロポルフィリン量はP-1, S-1, S-2で、それぞれ1.46, 1.24, 2.77倍であった(Table II)。いわゆる鉛曝露を受けたラット尿中の δ -アミノレブリン酸量は10 mg/liter以上の値を示すものが多くなっている。

和田¹¹⁾は鉛の持続的曝露を受けているときの作業者の尿中 δ -アミノレブリン酸量が20 mg/literであるとき、これを危険値と考えており、一方、久保田ら¹²⁾は人間の尿中 δ -アミノレブリン酸量が正常値で5 mg/literであったと述べているが、このことから考えると、鉛曝露を受けたラットの尿中 δ -アミノレブリン酸の値は、かなり高い値であると考えられる。

また、赤血球中遊離プロトポルフィリン量は対照に比して、曝露群では1.33—2.01倍に増加し、かなりの差が認められた。さらに、ポルフィリン生合成系の律速酵素であるラット肝 δ -アミノレブリン酸合成酵素活性も対照に比して高値を示した。このように、気中鉛含有粉じんが存在する作業環境中で、24時間連続曝露で飼育し

たラットの尿中 δ -アミノレブリン酸、コプロポルフィリンおよび赤血球中遊離プロトポルフィリン量の増大は気中鉛による直接的な影響であると考えられる。

許容濃度の勧告¹³⁾によれば作業環境中の気中鉛量は $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ とされている。本実験における作業環境中の鉛濃度が許容濃度以下であるにもかかわらず(Table I)かなり高いポルフィリン代謝異常が認められた原因としては、作業環境中の鉛粉じんの特性によるものであると考えられる。すなわち、Fig. 2 に示したごとく、作業環境中の鉛含有粉じんは 1μ 以下の粒径のものが多く、本実験において、動物の鉛含有粉じんの摂取はほとんど呼吸器系からのものである。このような呼吸器系から入った鉛が生体蓄積という点で重要であることは、呼吸器からの吸収率が消化管からのそれに比較して遙かに高く、Goldsmithら¹⁴⁾によれば、呼吸により大気中に浮遊する鉛粒状物の40%が吸収されと考えられていることからわかる。

土屋¹⁵⁾は尿中 δ -アミノレブリン酸の増加を鉛曝露の指標とすべきであると考えているが、著者らの実験によれば、Fig. 3 に示したごとく、鉛含有粉じんの曝露を受けた場合と、実験的に直接、鉛(酢酸鉛)をラットの腹腔内に投与した場合における尿中 δ -アミノレブリン酸とコプロポルフィリンとの相関性およびこれらの回帰直線の勾配を比較するとかなり類似していることが認められた。このことから、尿中 δ -アミノレブリン酸およびコプロポルフィリンは鉛曝露の指標として、かなり信頼性が高いものと考ええる。

本実験において、気中鉛含有粉じんのラットへの曝露実験で得られた尿中 δ -アミノレブリン酸と尿中コプロポルフィリンとの相関係数($r=0.61$, $p<0.01$)は、浜見ら¹⁶⁾が鉛蓄電池工場で鉛曝露者を対象に行なった調査から得られたものよりも低い値であるが、著者ら¹⁷⁾の一人が、本実験と同様の鉛ガラス工場従事者を対象に調査した場合とほぼ同じ値であった。

1次粉じん発生場所である原料調合場において、原料調合の回数は1日3回で、その作業時間が短く、およそ1時間であり、原料調合の際に高濃度の鉛化合物(鉛丹)が作業場に飛散されていた。また、原料調合以外の作業としては破碎した鉛ガラスの処理作業を行っていた。

11) 和田 政, 代謝, **7**, 25 (1970).

12) 久保田重孝, 北山孝允, 労働の科学, **22**, 19 (1967).

13) 許容濃度等の勧告, 産業医学, **9**, 25 (1967).

14) J. R. Goldsmith, A. C. Hexten, *Science*, **158**, 132 (1967).

15) 土屋健三郎, 科学, **41**, 575 (1971).

16) 浜見孝範, 国民衛生, **28**, 706 (1959).

17) 山本丈夫, 祐田泰延, 青木 稔, 高橋亮司, 産業医学, **12**, 5 (1970).

このように、1次粉じん発生場所では短時間高濃度の鉛が曝露されているものと考えられる。Fig. 4に見られるように、1次粉じん発生場所で曝露したラットの赤血球中遊離プロトポルフィリン量は、鉛曝露からの隔離時間の経過により急激に減少した後、一定の値を示した。一方、2次粉じん発生場所である溶融場では、作業時間が24時間連続であることから一定濃度の鉛が長時間曝露されているものと考えられる。この2次粉じん発生場所で曝露された場合、赤血球中遊離プロトポルフィリン量は、鉛曝露後の隔離時間の経過に対して対照よりやや高値を示すが、曝露開始より約3日間一定の値を示した。このような現象の相異は、鉛含有粉じんの曝露条件の違いによって起きているものと考えられる。すなわち、1次粉じん発生場所では短時間高濃度曝露で鉛の影響が迅速に強度に表われ、2次粉じん発生場所では長時間微慢的曝露による鉛の影響が長期にわたって表われるものと思われる。このことから、低濃度による慢性的中毒においては、赤血球中遊離プロトポルフィリンがかなり安定した鉛中毒の指標となり得るのではないかと考える。また、Table IIに見られるごとく、1次粉じん発生場所(P-1)における鉛量が2次粉じん発生場所(S-1)のそれよりも低いにもかかわらず、尿中 δ -アミノレブリン酸、尿中コプロポルフィリンおよび肝 δ -アミノレブリン酸合成酵素活性の高値は、上記のごとく理由によるものと考えられる。

最近、労働環境の改善に伴い、作業環境中の金属濃度

が低下しつつあるが、本実験で示したごとく、作業環境中の鉛濃度が許容濃度以下の場合でも動物実験では異常が認められた。このことから、生物学的評価が従来の物理化学的評価に付加されると労働環境評価の指標として労働環境の改善などに役立つものとする。

結 論

鉛作業環境の改善などの労働衛生管理の立場から、労働環境評価の指標として、ラットを供試動物として現場曝露による生物実験を試みた。特に、気中鉛濃度と曝露ラットのポルフィリン中間代謝産物との関係を検討し、作業環境汚染の強度と生体機能の変化との関連を明らかにした。

粉じん中の鉛量が20—80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲で、許容濃度以下の低濃度の場合でも、動物実験的に代謝異常が認められた。尿中 δ -アミノレブリン酸および尿中コプロポルフィリンは鉛中毒の指標として信頼性の高いものであるが、赤血球中遊離プロトポルフィリンは低濃度による慢性的中毒において、かなり安定した鉛中毒の指標となり得るものである。

このように、粉じん中の鉛濃度が許容濃度以下の場合でも、動物実験的に代謝異常が認められたことは、鉛含有粉じんが粒径1 μ 以下の粒子を多く含んでおり、鉛含有粉じんの特性によるものであると考えられる。

本実験結果より、従来の物理化学的評価に生物学的評価が付加されると、労働環境評価の指標として労働環境の改善などに役立つものとする。