Dithizone 比色法による生体試料の水銀定量と銅イオンの妨害について

谷村逸子*, 布田悦子*

THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF MERCURY IN THE HAIR, BLOOD AND URINE WITH DITHIZONE AND THE INTERFERENCE BY COPPER ON THE ASSAY

Itsuko TANIMURA†, Etsuko NUNODA†

From 1964 to 1965, 26 cases of organic mercury poisoning were observed among villagers living along the Agano River of Niigata in Japan. For the purpose of an epidemiological survey of these areas, a rapid method of screening the patients was needed.

This paper reports the simplicity of dithizone extraction which made the method highly suitable

for quantitative determination of mercury in the hair, urine and blood of the patients.

The possibility of the copper interference was also investigated. We tested the influence of copper at varying concentrations upon the mercury contents. Only high concentrations of copper were found to have significant effects.

I. 緒 論

1964年8月より1965年にかけて、新潟県阿賀野川流域に27名の有機水銀中毒患者が集団発生した。この緊急事態にあたり、迅速に汚染の実態を把握し、高水銀保有患者を識別すべく毛髪、尿、血液等多数の検体の正確な水銀量を測定する必要にせまられた。

水銀定量法には各種あるが、一般的で信頼度の高い dithizone 比色法をもちいた。dithizone による比色定量法には灰化、抽出、比色それぞれの段階でさまざまな方法が報告されている。

著者らは多数の検体処理を要する毛髪、尿の水銀定量には Natelson²⁾法を改良した藤村¹⁾らの測定法をもととした。この方法は試料の湿性灰化法に改良が加えられ、単比色法という原法の利点に加え、操作が比較的簡便ですぐれた測定法である。また、この方法は、生体試料中の銅イオンの妨害を 2.4—4.5 N・H₂SO₄ 溶液中で Hg・dithizone complex を抽出することでのぞきうるとしている点も一つの特徴である。

生体試料の水銀定量にさいし、dithizone で抽出される Cu, Ag 等金属の妨害は dithizone 比色法の一つの問題とされている。生体試料中の Ag はきわめて微量であり、また過量の Cl⁻ の存在下では妨害をのぞきうる^{5,10)}ことより問題ないとしても、Cu は多量にふくまれており無視できない。Cu の分離操作については ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) をもちい Cu を除去する方法³⁾、dithizone CCl₄ 溶液で抽出した水銀をさらに、KI-HCl 溶液⁵⁾に、acid bromide 溶液に⁶⁾、または、チオ硫酸塩をふくむ硫酸溶液⁷⁾に移行させ、dithizone で再抽出する方法などが報告されている。しかし、いずれも操作が複雑で多数の検体をあつかうには適当でない。著者らは藤村の方法を応用し、毛髪、尿中にふくまれる水銀量を測定し、さらに、Cu の妨害につき詳細に検討を加えた。

100 µg/100 ml 前後¹⁴⁾と比較的多量の銅を含有する血液水銀の測定には EDTA をもちい Cu の妨害をのぞく Frieberg³⁾ 大八木⁴⁾らの方法にしたがった。

試料は、正常人および、有機水銀中毒患者の毛髪、尿、血液であり、測定検体は3000におよんだ。

II. 測 定 法

試 薬

*新潟大学脳研究所神経内科教室 (主任: 椿 忠雄教授)

昭和42年4月24日受付、普通掲載

†From the Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

Received for publication, Apr. 24, 1967.

血液 10 ml

後 6 N-NH₄OH で PH 2 に調整し、1% EDTA 溶液 1 ml を加え、ふたたび dithizone-CCl₄ で抽出する。その後の操作は毛髪の場合とおなじ。操作の要約を Fig. 2 にしめす。

生体試料中の銅の測定法

松葉²⁴⁾による吸光度定量法をもちいて生体試料中の銅を定量した。

III. 実験成績

毛髪水銀測定時の銅イオンの妨害

正常人 5 名の毛髪 Cu 量は表にしめすごとくほぼ一定で、平均 3.6 ppm であった。有機水銀中毒患者の毛髪 Cu 量も有意の差をみとめなかった。

表 1 正常人毛髪 Cu 含有量

正常人毛髪	Cu 含有量 (ppm)
No.1	3.8
2	3.7
3	3.6
4	3.3
5	3.5
平均値	3.6
標準偏差	0.2

Cu⁺⁺の影響をみるため標準 Hg 1, 2, 5, 5, 10, 20 μ g 中にそれぞれ標準 Cu 3.6 μ g を加え測定を行なった。結果は Fig. 3 でしめすごとく、Hg 20 μ g 以上では同一直線上にのるがそれ以下では水銀のみの検量線よりかなりへだたる。Cu⁺⁺の妨害による誤差率は Hg 1, 2.5,

表 2 Hg 測定に及ぼす Cu の妨害

標準 Cu (ppm)	標準 Hg (ppm)	Cu 妨害による Hg 測定量 (ppm)	誤差 (ppm)	誤差の%
3.6	1	2.1	1.1	110
"	2.5	3.5	1.0	40
"	5	6.0	1.0	20
"	10	10.8	0.8	8
"	15	15.7	0.7	4
"	20	20.0	0	0
0.7	1	0.2	0.2	20
"	5	0	0	0

10, 15 μ g でそれぞれ 110, 40, 20, 8, 4% と連続的に減少し、Hg 20 μ g 以上では Cu⁺⁺の影響は無視しうる。(室温 15°C)

この実験結果は、Hg/Cu 比が大きく、Cu の変動が少ない場合は、Hg 量が一定値以上では妨害を無視でき、それ以下でも Cu⁺⁺の妨害は連続的に変化するので、簡単な補正曲線をつくることで Cu⁺⁺の妨害を完全にのぞきうることをしめしている。

尿中水銀測定時の銅イオンの妨害

正常人 5 名の尿中 Cu 量は 120~200 μ g/l であった。尿中 Cu 量は個人差、日変動、尿量による影響が大きく、含量も多い (Hg に比し) ことから毛髪のごとく簡単な補正曲線を得ることはできない。

尿 50 ml に Cu 10 μ g を加え水銀測定への影響を検討した結果を表 3 と Fig. 4 にしめす。Hg 1 μ g では Cu⁺⁺の妨害により 2.4 μ g (誤差 240%) と高くでている。(この値は尿 1 l 換算では 48 μ g となる。)しかし、Cu に比し Hg 量が多くなると誤差は漸減している。

Fig. 3 Cu妨害によるHg検量線の変化

表3 Hg測定に及ぼすCuの妨害

Cu量 (μg)	Hg量 (μg)	Cu妨害による Hg測定量 (p)	誤差 (μg)	誤差の%
10	0	2.5	2.5	
"	1	3.4	2.4	240
"	2	4.0	2.0	100
"	3	5.1	2.1	70
"	4	5.9	1.9	48
"	5	6.5	1.5	30
"	6	7.4	1.4	23
"	10	10.8	0.8	8
"	15	15.2	0.2	1.4
"	20	20.0	0	0

Fig. 4 Cu妨害によるHg検量線の変化

妨害金属と EDTA の効果

多量の Cu を除くために用いる EDTA の量は多種金属が共存する生体試料の分析では理論的に決めることは難しい。EDTA の効果を調べるには過剰の EDTA を用い、Hg の損失の有無を実験的に検討するのが合理的である。

Hg 0, 5, 10 μg に Cu 10 μg , Fe 10 μg をそれぞれ加え、これに 1% EDTA 1 ml を加え Hg の回収率、blank の吸光度を調べた。結果は blank の値は変わらず回収率はほとんど 100% であった。

著者らは EDTA 使用時の PH を検討し、PH 2.0 で Hg 10 μg を抽出した値に比し、PH 1.8, PH 1.6 での抽出は 98%, 96% と漸減するという結果を得た。

湿性灰化による水銀の回収率

表 5 に示すごとく、Hg 5, 10 μg の回収率は、96%,

表4 EDTA の効果

EDTA	Hg (μg)	Cu (μg)	Fe (μg)	Hg 測定値	blank (吸光度)
0	0	0	0	0	0.018
0	5.0	0	0	5.0	0.017
1% 1 ml	0	10	10		
"	5.0	10	10	4.9	
"	0	10	10		0.018
"	10	10	10	10.0	

表5 湿性灰化の回収率

Hg			Cu		
標準 Hg 量	回収した Hg 量	回収率	標準 Cu 量	回収した Cu 量	回収率
5 (μg)	4.8 (μg)	96(%)	5 (μg)	4.9	98(%)
5	4.8	96	5	4.9	98
10	9.9	99	10	9.9	99
10	9.8	98	10	9.8	98
10	9.8	98	10	9.9	99

表6 毛髪測定の回収率

毛髪測定値 (ppm)	加えた Hg (μg)	回収された Hg (μg)	回収率
5	5	4.2	84
7	5	4.1	82
10	5	4.6	92
20	5	4.8	96
5	10	9.2	92
7	10	9.3	93
10	10	9.8	98
20	10	9.9	99

表7 正常人毛髪 Hg 量

正常人毛髪	Hg 含有量 (ppm)
No.1	5.5
2	6.8
3	9.2
4	8.4
5	6.2
6	9.0
7	4.0
8	7.2
平均値	7.0

98% であり、灰化に伴う Hg の損失は軽微であった。また Cu 5, 10 μg の回収率は 98%, 99% であった。

毛髪水銀の定量

回収率：毛髪水銀値 5, 7, 10, 20 ppm の試料に標準 Hg 5, 10 μg を加えた回収率を表 6 にしめす。毛髪水銀 20 ppm 以上では曲線の補正なしで Hg 10 μg の回収率は 99% であった。

正常人の毛髪水銀量：新潟大学医学部学生，医局員の毛髪8例を測定した結果は4.0～9.2 ppm で平均7.0 ppm であった。

尿中水銀の定量

回収率：前述のごとく，正常人および，低水銀保有患者の尿中水銀量は Cu を除去し測定した方が正確である。Cu を除去して測定した正常人の回収率と，高水銀保有患者の Cu をのぞかずに測定した回収率を比較し表8に示す。いずれも良好な回収率をえた。

表8 尿中 Hg 測定回収率

Hg μ g/50ml 尿	加えた Hg	得られた Hg	回収率	
2.2 (μ g)	5 (μ g)	7.1 (μ g)	98(%)	Cu を除いて測定
"	10	12.1	99	
1.9	5	6.7	96	
"	10	12.0	105	
10.1(患者)	5	15.0	98	Cu を除かないで測定
"	10	19.9	98	

正常人の尿中水銀量：正常人5名の尿中水銀量は平均36 μ g/l で 25～46 μ g/l の幅があった。

表9 正常人尿中 Hg 量

正 常 人	Hg (μ g/l)
No.1	34
2	41
3	25
4	46
5	37
平 均	36

β -Mercaptovaline (Penicillamine) 投与時の尿中水銀量と銅量の関係：Penicillamine 投与で尿の銅量は増加する。Fig. 5に示す例は比較的水銀量の低い患者で penicillamine 投与で Cu が Hg より多量に排泄されている。本例で Cu をのぞいて測定した値と，Cu をのぞかないで測定した Hg 値を比較してみると，Hg と Cu の含有量が同程度のところ（12月2，3日）では誤差がほとんどなく，Hg に比し Cu の多いところ（11月30日，12月4，5日）では誤差が大きい。このことは Penicillamine, Thiola 等の水銀排泄剤を使用した場合の尿中水銀量は Cu をのぞいて定量した方が正確であることをしめしている。

血液水銀の定量

回収率：表10のごとく，血液 Hg 値 0.50 μ g/10 ml，0.52 μ g/10 ml の試料に Hg 5，10 μ g を加えて測定し

Fig. 5 penicillamine 投与による尿中 Hg 量と Cu 量の関係

表10 血液 Hg 測定回収率

血液測定値	加えた Hg	得られた Hg	回 収 率
0.15 (μ g)	1 (μ g)	0.65 (μ g)	50(%)
0.35	5	5.0	94
0.50	5	5.2	94
0.52	10	10.52	100

表11 正常人血中 Hg 量

正常人血液	Hg 量 (μ g/dl)
No.1	1.5
2	1.2
3	3.1
4	0.9
5	2.5
平 均	1.8
標 準 偏 差	0.8

た回収率は94，100%であった。しかし，0.15 μ g/10 ml の試料に Hg 1 μ g を加えた回収率は56%に低下していた。

正常人の血液水銀量：正常人5名の血液水銀量は表のごとく 1.8 μ g/100 ml で標準偏差は0.8であった。

IV. 考 察

Dithizone 比色法による水銀定量において Cu⁺⁺ の妨害についてはいくつかの報告がある。

たとえば，Simonsen⁵⁾は PH 1 以下で Hg-dithizone を抽出し，Cu 1000 μ g 共存下では妨害はなく，2000 μ g

以上の Cu 存在下で Hg の回収率は低下すると報告している。

Barett⁸⁾は 100, 1000 μg の Cu が共存する PH 0.7 溶液中で Hg 5 μg を抽出し、前者で 5.1 μg 後者で 5.6, 5.8 μg の測定値をえている。

また、Tompsett⁹⁾も Cu 100 μg 共存下で酸性灰化液から Hg 10, 20, 40 μg を抽出し妨害はまったくなかったとしている。

その他 Sorby¹¹⁾Polley¹⁰⁾等も特別な Cu 除去を行わず Cu 1000 μg 共存下で水銀定量は妨害されないとしている。

これ等の報告は主として、生体試料における水銀定量時の Cu 妨害を論じたものだが、比較的 Cu 含量の少ない尿の分析においては Cu による妨害はあまり重視されなかったことをしめしている。

著者らがその方法にしたがった藤村¹⁾は Hg と dithizone の反応時至適 PH が Cu より低いことに着目し、条件をさらに、厳密に規定し 3.2~4.3N H_2SO_4 溶液中で Hg 抽出を行えば Cu の妨害をまったくのぞきうるとしている。しかし、著者らが尿 50 ml に Cu 10 μg を加え Hg 0, 1, ……20 μg を測定した結果では、低濃度水銀測定時にあきらかに Cu による妨害がみられた。この実験結果は正常人の微量尿中水銀の測定時には Cu²⁺ の妨害を無視しえないことをしめしている。

Fig 4 でしめしたごとく Cu の妨害は Hg/Cu 比により変動し、Hg 量が比較的高い場合は妨害も少ないか無視しうる。Cu 値が低くとも同様のことがいえるが、正常人の尿中 Cu 量は著者らの測定では 120~200 $\mu\text{g/l}$ であったが、Tompsett¹⁵⁾は 8~48 100 $\mu\text{g/l}$, Cartwright¹⁶⁾は 0~26 $\mu\text{g/day}$, Bearn¹⁷⁾は 48 $\pm$ 16.3 $\mu\text{g/day}$ と報告している。

Litin¹²⁾は正常人に penicillamine を投与し尿中 Cu 排泄量が著増することをしめた。水銀排泄の目的で penicillamine 等をもちいたさい多量に排泄される Cu により水銀測定が妨害されることが想定される。著者らは妨害の事実を Cu を除去した測定値と、除去しない測定値を比較することにより確認した (Fig 5)。また、Hg に比し Cu が多い場合とくに、その妨害がいちじるしいことをしめた。水銀排泄剤の使用が一般化されつつある現在測定上注意さるべき事実であろう。

毛髪中 Cu 量は正常人、有機水銀中毒患者とも平均 3.6 ppm (S.D. 0.2) とほぼ、一定なことから、Hg 値 20 ppm 以上では Cu に妨害されず、それ以下では簡単な補正を行なうのみで正確な値がえられた。しかし毛髪中銅量に関しては、当教室でその後原子吸光法で14例の

正常人を測定した結果、平均 11.0 ppm (5.6~25.6 ppm) という値がえられておりなお、検討を要するものとおもわれる。

銅を多量にふくむ試料は EDTA をもちい、Cu の妨害はのぞくことができた。操作が複雑で多数の検体を処理する方法としては難点があるが、いかなる生体試料にも応用できることをみとめた。また、本法で Hg を dithizone で抽出するさいの PH を Frieberg, 大八木とも PH 1.5~2.0 と幅をもたせているが、著者らが行った実験での至適条件は PH 2.0 であった。

毛髪、尿、血液の正常人水銀値は、いずれも例数が少ないが、それぞれ平均 7.0 $\mu\text{g/g}$, 36 $\mu\text{g/l}$, 1.8 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ をしめた。毛髪水銀量は星野、浮田¹³⁾らの報告値 6.02 ppm にちかい。尿中水銀量は報告者によりかなりことなり、Simonsen⁵⁾, Battigelli¹⁸⁾は 0, Brown²⁰⁾ 0.5 $\mu\text{g/day}$ まで、Lane²¹⁾ 80 $\mu\text{g/l}$ まで、Buckell²⁴⁾ 5~50 $\mu\text{g/l}$, 藤村¹⁾ 41.5 $\mu\text{g/l}$, 山口²³⁾ 1.8~2.3 $\mu\text{g/day}$ をしめている。公害、農薬をはじめとする広範な人体への水銀汚染が問題となっている現在、測定法の一層の検討、標準化された測定法の確立がのぞまれる。

有機水銀中毒患者の毛髪、尿、血液の水銀量に関する詳細は別に報告²⁵⁾した。

V. 結 語

有機水銀中毒症の集団発生という緊急事態にあたり多数の生体試料の水銀量を dithizone 比色法により測定した。

毛髪、尿の測定には Natelson 法を改色した藤村¹⁾の方法を、血液の測定には Frieberg³⁾ 大八木⁴⁾の方法をもととし、各試料測定時の銅イオンの水銀測定におよぼす影響につき検討を加えた。

1. 毛髪中 Cu 量はほぼ、一定かつ低値をしめし、特別の Cu 除去操作は必要でなく、水銀量 20 ppm 以上では Cu²⁺ の妨害は無視でき、それ以下では補正曲線を作製することで正確な水銀定量が可能であった。
2. 尿中 Cu 量は微量ながら、低濃度の水銀定量を妨害する。正常人尿の水銀定量には Cu²⁺ の影響を注意する必要がある。
3. 水銀排泄剤—— β -mercaptovaline (penicillamine) 等——の使用時に尿中に多量の Cu が排泄され水銀定量を妨害する。とくに、Hg に比し Cu の多い場合妨害がいちじるしい。
4. 血液など Cu を多量にふくむ生体試料は EDTA の使用で Cu²⁺ の妨害をのぞきうる。操作が複雑な点、迅

速に多数の検体を測定する場合には難点がある。

5. 銅イオンの影響をのぞき測定した正常人水銀値は毛髪 $7.0 \mu\text{g/g}$, 尿 $36 \mu\text{g/l}$, 血液 $1.8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。

椿 忠雄教授の御校閲と新大脳研究所神経化学教室佐竹 明教授の御指導を深謝します。さらに、本研究に御協力いただいた生田淑子氏に感謝します。

なお、本研究は昭和40年度科学技術庁特別研究費および、昭和41年度文部省科学研究費の補助を受けた。

文 献

- 1) 藤村 豊: 日衛誌, 17; 239, 1963.
- 2) Natelson, S.: Microtechniques of Clinical Chemistry, 2nd Ed. Charles C. Thomas Springfield, 294, 1961.
- 3) Frieberg, H.: Anal. Chemist., 27; 305, 1955.
- 4) 大八木義彦, 吉野佳一: 臨床神経学, 5; 130, 1965.
- 5) Simonsen, D.G.: Am. J. Clin. Path., 23; 789, 1953.
- 6) Laug, E.P. et al: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 25, 399, 1942.
- 7) Winker, W.O.: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 21; 220, 1938.
- 8) Barrett, F.R.: Med. J. Australia. 2; 411, 1955.
- 9) Tompsett, S.L. & Smith, D.C.: J. Clin. Path., 12; 219, 1959.
- 10) Polley, D. & Miller, V.L.: Analy. Chemist. 27; 1162, 1955.
- 11) Sorby, D.L. et al: J. Am. Pharm. Associat., 49; 160, 1960.
- 12) Litin, R.B., et al: Neurology, 10; 123, 1960.
- 13) 星野乙松, 浮田忠之進・他: 衛生化学, 12; 90, 1960.
- 14) Cartwright, G. E.: Copper metabolism, Johns Hopkins Press. Baltimore, 1950.
- 15) Tompsett, S.L.: Biochem. J., 28; 2088, 1934.
- 16) Cartwright, G.E. et al: J. Clin. Invest., 33; 685, 1954.
- 17) Bearn, A.G. et al: J. Clin. Invest. 33; 400, 1954.
- 18) Battigelli, M.C.: J. Occup. Med., 2; 337, 1960.
- 19) Elkins, H.B.: Chemistry of Industrial Toxicology, 2nd Ed. New York, 1959.
- 20) Brown, I.A.: Arch. Neurol. Psychiat., 72; 674, 1954.
- 21) Lane, R.E.: Clinical Pathology in General Practice, Brit. Med. Association, London, 310, 1955.
- 22) Buckell, M.: Brit. J. Indust. Med., 3; 55, 1946.
- 23) 山口誠哉: 産業医学, 5; 695, 1963.
- 24) 松葉安郎: 生化学, 37; 7, 1967.
- 25) 新潟大学有機水銀中毒研究班研究報告書, 新潟大学, 1966.

Symposium sur "Fatigue et Stress en Médecine du Travail" のお知らせ

本年10月22~23日, パリにおいて, 表記の集会が開催される旨, Prof. Granjean (Subcommittee for the study of higher nervous functions in occupational health) より連絡がありました。(1月20日受信)

『肉体的及び精神的活動に関連した疲労とストレス』に関する実験的及び疫学的調査研究がうけつけられます。(英, 独または仏語)

参加希望者は1968年3月1日までに下記へ「出題の意向と演題名」を御連絡下さい。

Professeur J. Scherrer, Secteur de CHU PITIERSALPETRIERE, 91,
Boulevard de l'Hôpital, Paris 13e, France

申込みに応じて, 主催者により送付される申込用紙により, 5月1日までに最終登録することになります。御参加の方は下記に御一報下さい。

なお, 同シンポジウムへの招待講演者の推薦を依頼されています。御希望の方は, 至急, 演題名とも, 下記へ御申し出下さい。

大阪府守口市文園町 関西医大・公衆衛生学教室
連絡者 東田敏夫宛