

原 著

鉛作業血球亜鉛プロトポルフィリンIXと
プロトポルフィリンIXの高速液体クロマト
グラフによる自動分析

坂 井 公*, 竹 内 幸 子*, 池 谷 由美子*
荒 木 高 明*, 牛 尾 耕 一*

AUTOMATED HPLC METHOD FOR DETERMINING ZINC
PROTOPORPHYRIN IX AND PROTOPORPHYRIN IX IN
ERYTHROCYTES OF WORKERS EXPOSED TO LEAD

Tadashi SAKAI,* Yukiko TAKEUCHI,* Yumiko IKEYA,*
Takaharu ARAKI* and Koichi USHIO*

We developed an automated HPLC method for determining erythrocyte protoporphyrin. After a single extraction with *N,N*-dimethylformamide (DMF), zinc protoporphyrin IX (ZP) and protoporphyrin IX (PP) were separated by the column packed with a new type of reversed phase silica (capcell type) within 5 min. The column life was markedly extended to facilitate sample injection for about 1,000 times. The concentrations of ZP or TP (total protoporphyrin = 0.9 ZP + PP) determined by the present method correlated well with those determined by the conventional methods, i.e. by hematofluorometer (HF) or acid extraction method (FEP). In 150 workers exposed to lead, the ratio of 0.9 ZP/TP varied between 0.43 and 0.99 with the ratio being less than 0.6 in only 5 workers. The correlation coefficient between Pb-B and ZP was significantly higher than that between Pb-B and PP. Both anticoagulants, heparin and EDTA, could be used in the present method as well as in HF and FEP methods. Reference values for TP by HPLC were between 31.2 and 120.9 $\mu\text{g/dl}$ RBC. Samples stored at 37°C for 3 days were also used in the present method and the same results were obtained as in the samples stored at 4°C.

Key words: protoporphyrin; zinc protoporphyrin; lead; HPLC; free erythrocyte protoporphyrin; biological monitoring

I. 緒 言

ヘム代謝に及ぼす鉛の影響については既に多くの報告があり、なかでもデルタアミノレブリン酸脱水酵素 (ALA-D) によるポルフィリノーゲンの合成およびプロトポルフィリンへの鉄挿入の二つの過程が鉛の作用を強く受けることで良く知られている^{1,2)}。特に骨髓の活性鉛が直接作用して血球にプロトポルフィリンを蓄積すると考えられる後者の過程は鉛の標的器官への影響^{3,4)}

を示すものとして体内、外の負荷鉛量を示す血中鉛、尿中鉛とは別の意義を有す。米国の ACGIH⁵⁾ では鉛被曝の生物学的暴露指標として血球プロトポルフィリンが血中鉛、尿中鉛と並び取り入れられ、我が国でも各施設で血球プロトポルフィリンについて測定精度の向上を目指す取り組みがなされている⁶⁾。しかし、その測定値は施設ごとでかなり異なるのが現状であり測定法および標準物質についての検討がせまられている。鉛被曝および鉄欠乏性貧血で血球に蓄積するプロトポルフィリンの大部分は亜鉛のキレートしたもの (ZP) であるが、亜鉛のキレートしないプロトポルフィリン (PP) の増加する疾患も知られていることから^{7,8)}、これら疾患の鑑別には ZP と PP の分別定量が必要となる。また亜鉛のキレートしない PP 量に個人差があるとすれば ZP を分別定量する

* 東京労災病院健診センター

昭和 63 年 3 月 4 日受付

* Center of Occupational Medicine, Tokoy Labor
Accident Hospital

Received for publication, March 4, 1988

ほうが鉛被曝あるいは鉄欠乏性貧血の指標としてはより優れたものとなると考えられる。

血球のプロトポルフィリンを測定する方法は今日まで数多く提案されているが、その主なものは酸性溶剤/塩酸抽出法 (FEP 法)⁹⁻¹¹⁾、中性溶剤 (エタノール、アセトン) 抽出法¹²⁻¹⁴⁾、希釈法^{15,16)}、ヘマトフルオロメーター (HF) 法^{17,22)}、液体クロマトグラフ (HPLC) 法¹⁸⁻²¹⁾ の五つである。これらの方法にはそれぞれに問題があり、測定法の標準化がいまだなされていない。2回の抽出操作を必要とする FEP 法は操作が繁雑であるが比較的安定した測定値が得られるため現在最も汎用されている。しかし、この方法では塩酸抽出により ZP から亜鉛がはずれ遊離のプロトポルフィリン (FEP) として測定され、ZP と PP の分別定量ができない。中性溶剤による方法では抽出操作が1回で済むが、抽出効率が低く回収率も検体によって異なる^{12,13)}。希釈法は定量性に欠ける欠点がある¹²⁾。HF は非常に簡便に測定できる利点があるが、標準物質の安定性と検定に問題がある。中性溶剤抽出法、希釈法および HF 法は FEP 法とは異なり基本的には ZP を測定するものである。HPLC 法では ZP と PP を分別して測定することが可能であるが、これには中性条件下での処理操作が心須となり抽出効率、カラムの劣化という問題がつきまとう。

本研究において我々は HPLC 法のこれらの問題を解決し、ZP と PP を簡単な前処理だけで自動測定する方法を確立し、これを鉛作業者の健診に適用したので、その結果を報告する。

II. 材料と方法

用いた検体は鉛作業に従事する男性労働者 150 名 (古バッテリー解体工、バッテリー電極製造工、鉋金製造工、印刷工等、年齢は 29 歳から 61 歳で平均 45.7 歳、作業歴は 1 年から 20 年で平均 8.7 年) および鉛以外の作業に従事する労働者 68 名 (年齢 18 歳から 55 歳までの平均 38.7 歳の男性 34 名、年齢 18 歳から 38 歳までの平均 21.1 歳の女性 34 名) の健診で得られたヘパリンおよび EDTA 処理血液である。

血球プロトポルフィリンは血液 50 μ l に 2.5 ml の *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) を添加、振盪抽出し 3,000 rpm で 10 分間遠心、上清を得た。この上清 20 μ l をオートサンプラー (島津 SIL-2A) で液体クロマトグラフ (HPLC) に注入した。用いた HPLC は島津製の LC-3A 型ポンプ、CTO-2A 型カラムオーブン、RF-530 型蛍光検出器、C-R1A 型クロマトパックから成る。蛍光検出器にはポルフィリンを高感度で検出できる

ホトマル R-928 を装着した。励起および蛍光波長はおのおの 420, 630 nm に設定した。カラムは Capcell Pak C-18 (4.6 \times 150 mm, 資生堂) を、移動相は 50 mM 水酸化テトラブチルアンモニウム溶液 (pH 7.5) とアセトニトリルの混液 (34:66) を用いた。カラム温度は 40°C、移動相の流速は 1.0 ml/min とした。血球プロトポルフィリンは HPLC 以外に先に報告した FEP 法¹¹⁾および HF 法²²⁾によっても測定した。標準物質はポルフィリンプロダクト社 (Logan, USA) 製の亜鉛プロトポルフィリン IX (St. 1) およびプロトポルフィリン IX (St. 2) を購入し、DMF 溶液 (25 mg/500 ml) として保存した。この溶液は 4°C 暗所で 1 年以上安定である。用時これを DMF で 40 μ g/l に希釈し標準液とした。これはクロマト上で 200 μ g/dl blood 相当のポルフィリン濃度になる。FEP 法には標準物質として既報²²⁾のようにシグマ社 (St. Louis, USA) 製のプロトポルフィリン IX ジメチルエステル (St. 3) を用いた。St. 1~3 の 3 種の標準物質を 1.5 N の HCl 中で mm 分子吸光係数を測定したところおのおの 276.3, 274.3, 273.7 であった。血液鉛量 (Pb-B) は湿式灰化後 DDTC によりキレート、MIBK にて抽出、原子吸光光度計により測定した。

III. 結果

Fig. 1 は HPLC による ZP と PP の分離を示す。今回の分析条件では正常者および鉛作業からの種々の量比の ZP と PP が完全に分離される。5 から 200 μ l までの血液を用い抽出して得られる淡黄緑色透明試料を HPLC に注入し ZP および PP の蛍光強度を調べたところ両者の蛍光強度は血液量に比例し直線的に上昇した。検量線は 2,000 μ g/dl blood 相当まで直線性を示し、100 から 1,000 μ g/dl 相当の ZP と PP 添加の回収率はおのおの平均 88%, 96% であった。変動係数は ZP, PP について 10 検体分析時で 0.8~2.6% となり、この方法は十分な分析精度を有することを示す。カラムの寿命については 1,000 回以上の分析においても著しい劣化が認められず、長期間安定した測定が可能であった。

Fig. 2 は HPLC 法の TP (Total protoporphyrin = 0.9 ZP + PP) および ZP 値を従来の方法による値と比較したものである。HPLC 法による TP 値は Fig. 2a のごとく FEP 値と良く相関するが、やや高値を示す。他方、ZP 値は Fig. 2b のごとく HF 法による値と良い一致を示す。Fig. 3 は TP と 0.9 ZP および PP との相関を示す。回帰直線より平均 88% の血球プロトポルフィリンが亜鉛にキレートしているものと推定される。

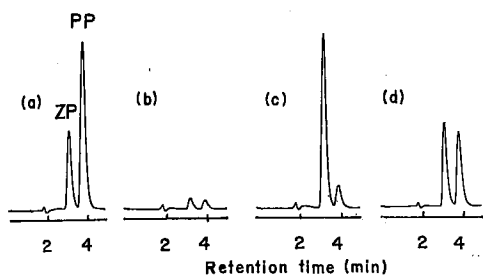


Fig.1. Chromatographic separations of zinc(ZP) and free (PP) protoporphyrin. The mixture of ZP and PP standard (a) and the extract from a control subject (b), and from lead workers (c and d) were injected onto HPLC. The levels of ZP and PP in the standard mixture (a) were equivalent to the concentration of 476 $\mu\text{g/dl}$ RBC (Hct=42%). The concentrations of Pb-B ($\mu\text{g}/100\text{ g}$), ZP and PP ($\mu\text{g/dl}$ RBC) were 4.9, 31.6, and 4.1 in (b), 103.4, 972.0, and 54.5 in (c), and 73.0, 295.1, and 146.6 in (d), respectively.

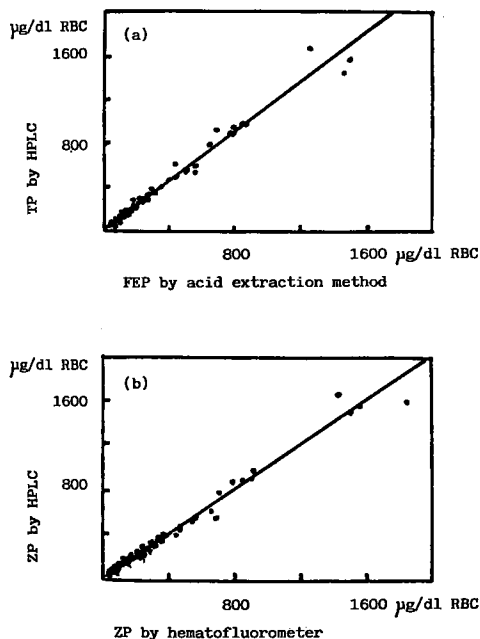


Fig.2. Linear regression for erythrocyte protoporphyrin (TP=total protoporphyrin and ZP) concentrations as determined by HPLC and conventional methods. (a) $y=1.119x+8.98$ ($r=0.990$), (b) $y=1.017x-13.8$ ($r=0.990$).

Fig. 4 は TP, ZP, PP おのおの対数および 0.9 ZP/TP 比と Pb-B との相関を示す。Pb-B との相関は ZP

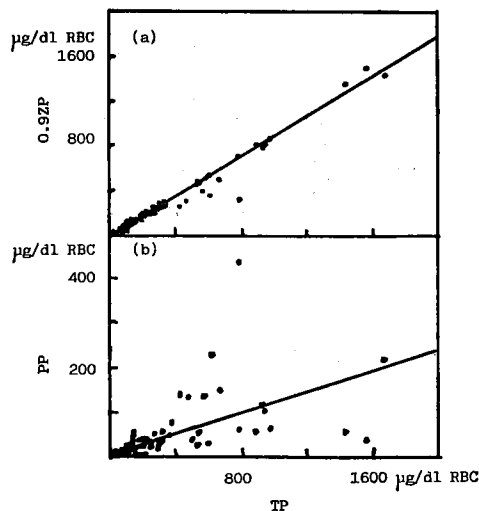


Fig.3. Relationship between ZP or PP and TP by HPLC method. (a) $y=0.884x-0.08$ ($r=0.987$), (b) $y=0.116x+7.37$ ($r=0.633$). $n=150$.

が最良で次いで TP が良い相関を示し、PP と Pb-B との相関はこれらよりかなり劣る。この群で FEP 法、HF 法によるポルフィリン値の対数と Pb-B との相関はおの $y=0.0162x+1.558$ ($r=0.886$), $y=0.0143x+1.717$ ($r=0.887$) となり HPLC 法と同じ水準の相関である。0.9 ZP/TP 比は Pb-B とは相関せず 0.43~0.99 の範囲で変動し (Fig.4 d), その平均は 0.836 である。この比が 0.6 以下となるのは 150 人の鉛作業員中 5 人のみであった。この 5 検体では 0.9 ZP 値はほぼ回帰直線上に乗るが、それらの PP 値は Pb-B の増加に伴い上昇するものの回帰線より高いところに分布する。これより鉛作業員によっては亜鉛のキレートしないプロトポルフィリンの割合の高いものも出現するが、これは Pb-B との比較でみると ZP 値が低くなるのではなく PP が高値となっているものと推定される。このような 0.9 ZP/TP 比の低い作業員について 2 年間経過をみたところ、この比は大きな変動を示さずほぼ一定であった。

以上はヘパリン血を用いた結果であるが、次に一部の検体 ($n=102$) について EDTA 血でも測定してヘパリン血での結果と比較した (Fig.5)。ZP 値および TP 値では EDTA 血を用いると回帰直線の傾きから 5% ほど高めの値が予想されるが平均値には有意差が認められなかった。PP 値については回帰直線および平均値のいずれにも両凝固防止剤の差異が認められなかった。また、これらの検体で FEP 値および、HF 法による ZP

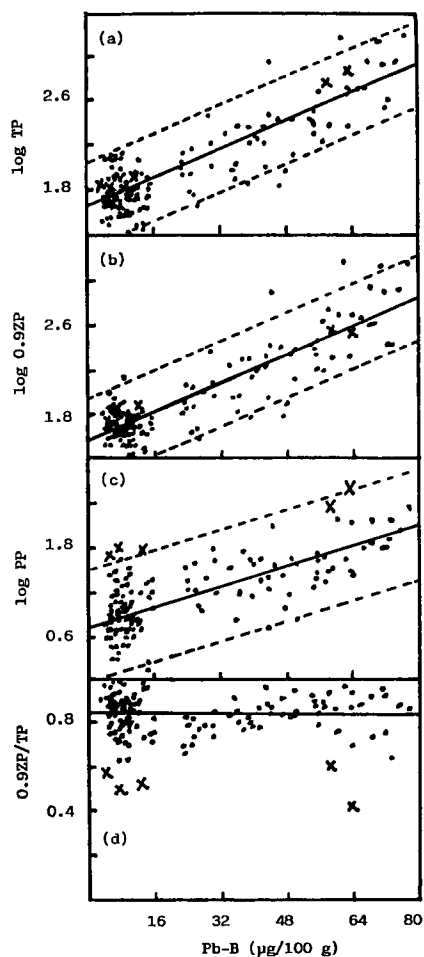


Fig. 4. Relationship between erythrocyte protoporphyrin by HPLC and Pb-B. (a) $y=0.0158x+1.65$ ($r=0.872$), (b) $y=0.0158x+1.57$ ($r=0.881$), (c) $y=0.0175x+0.674$ ($r=0.612$), (d) $y=1.842x+0.836$ ($r=0.004$). The symbols "x" indicate the subjects with ratio of 0.9ZP/TP less than 0.6. Solid and dotted lines show the regression ones and 95% predictive intervals of individual values, respectively.

値についても凝固防止剤による差異がなかった。すなわち、ヘパリン血および EDTA 血での測定値をおのの x, y とすると FEP 値では $y=1.009x+2.02$ ($r=0.996$), HF 法による ZP 値では $y=0.997x-5.0$ ($r=0.999$) であった。この作業群のなかで Pb-B が $10 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 以下 (平均 $6.56 \pm 1.85 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) の 65 検体でこれら測定値を比較すると Table 1 のようになる。HPLC による ZP 値を含め FEP 法, HF 法による測

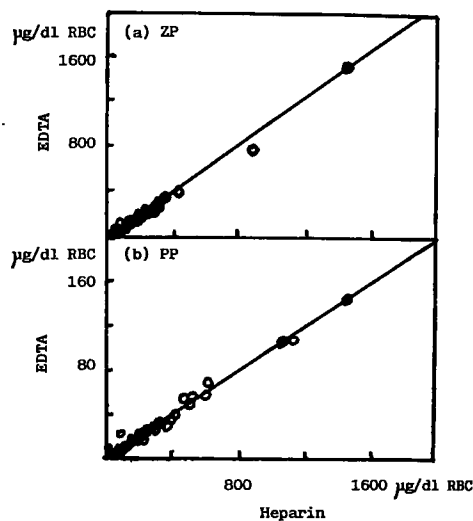


Fig. 5. Linear regression for erythrocyte protoporphyrin concentrations determined in the blood treated with heparin and EDTA by HPLC. (a) $y=1.048x-2.95$ ($r=0.995$), (b) $y=0.994x+1.45$ ($r=0.985$).

定値のいずれでも凝固防止剤による有意差は認められない。この鉛作業群のプロトポルフィリン値 (EDTA 血での FEP 値, TP 値) を鉛を扱わない男性群のそれと比較すると両者には有意差がなくほぼ一致した値が得られる。これよりこの表に示すポルフィリン値は正常範囲を示すものと考えて良い。鉛暴露のない女性群では Hct 値が男性群より平均 4.4% 低い ($p<0.01$) ことを反映して TP 値あるいは EFP 値も高めの値となっており、女性に多い鉄欠乏状態を示唆している。二つの男性群を合わせた 99 検体の TP 値の平均 \pm SD は $65.2 \pm 24.1 \mu\text{g}/\text{dl RBC}$ であり、対数正規分布に近似した分布型を示し (Fig. 6), その幾何平均 \pm 幾何標準偏差は 61.4 ± 1.404 , 2SD の範囲は 31.2 から $120.9 \mu\text{g}/\text{dl RBC}$ であった。

Fig. 7 は EDTA 血を 37°C で保存した時の影響を示す。3日間 37°C で保存した血液について HPLC 法で得られる TP 値は 4°C 保存の場合とほぼ一致する。HPLC 法の ZP, PP 値および FEP 値でも同様な結果が得られた。これに反し HF 法による測定値は、 37°C に 3日間保存した血液では 4°C 保存に比べ著しく高値を示す (Fig. 7b)。この傾向はヘパリン血より EDTA 血でより顕著であった。このように HPLC 法および FEP 法でのポルフィリン値は室温以上の保存による安定した値を示すことから検体の搬送も容易となり暴露指標

Table 1. Erythrocyte protoporphyrin concentrations in control subjects and lead workers (male) with Pb-B levels less than 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$.

Group	Hct (%)	Protoporphyrin ($\mu\text{g}/\text{dl RBC}$)				
		HF	FEP	ZP	PP	TP
Lead workers	45.37	72.6	52.6	59.4	11.0	64.5
$n=65$ (heparin)	2.29	18.6	18.8	20.8	10.1	25.5
		70.3	49.7	56.5	7.7	60.3
		1.28	1.38	1.36	2.44	1.44
Lead workers	45.37	67.9	56.8	59.6	13.1	66.8
$n=65$ (EDTA)	2.29	19.8	20.2	20.4	11.3	25.7
		64.7	53.6	56.8	9.8	62.7
		1.33	1.39	1.34	2.16	1.41
Male control subjects $n=34$	44.67		55.7	57.4	10.6	62.2
(EDTA)	2.90		16.3	14.7	8.6	20.0
			53.2	55.3	7.8	58.9
			1.35	1.31	2.26	1.38
Female control subjects $n=34$	40.26		61.4	69.5	10.0	72.6
(EDTA)	2.04		21.8	22.5	8.4	26.4
			58.1	66.2	8.0	68.2
			1.38	1.36	1.86	1.41

HF : Hematofluorometer, FEP : Free erythrocyte protoporphyrin by Pionelli's method, ZP, PP, TP : HPLC method. 1st and 2nd row : arithmetic mean and SD, 3rd and 4th row : geometric mean and SD.

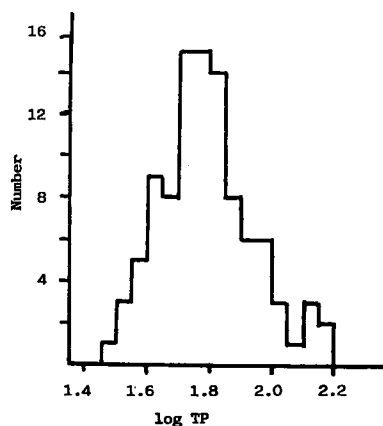


Fig.6. Distribution (log normal) of TP by HPLC in 99 male subjects (control subjects and lead workers with Pb-B less than 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). Geometric mean and SD were 61.4 and 1.404 $\mu\text{g}/\text{dl RBC}$.

としての利用範囲が広まりスクリーニングに適した指標といえる。

IV. 考 察

HPLCによるポルフィリンの分析については誘導体化する方法も含め多くの報告があるが²³⁾, ZP と PP の分離についての報告は少ない。これは ZP を亜鉛のキレートしたまま HPLC で分離するには中性に近い条件で抽出し、分離しなければならない難しさがあるためと考えられる。すなわち、中性溶媒での ZP の抽出は一般に抽出効率が悪く^{12,13)}かつ中性の移動相を用いるとカラムの劣化を早める¹⁸⁾。他方、酢酸エチル/酢酸混液 (弱酸性) による抽出では ZP からの亜鉛の離脱は少ないが、ヘミンが抽出液に混入しポルフィリンの分離に影響するという¹⁹⁾。Gotelli ら¹⁸⁾はトリトン X-100 を含む移動相溶液で血液を単に希釈するだけで HPLC に注入し、ペアドイオンを用いて分析しているが、カラムの劣化が大であると述べている。我々は先にプロトポルフィリンを DMF で抽出して彼らの分離条件で分析することを試みた²⁰⁾。DMF による抽出で淡黄緑色透明試料が得られ抽出液へのヘミンの混入を抑えることができ、カラム寿命を Gotelli ら¹⁸⁾ のいう 150 検体より延ばすことができ

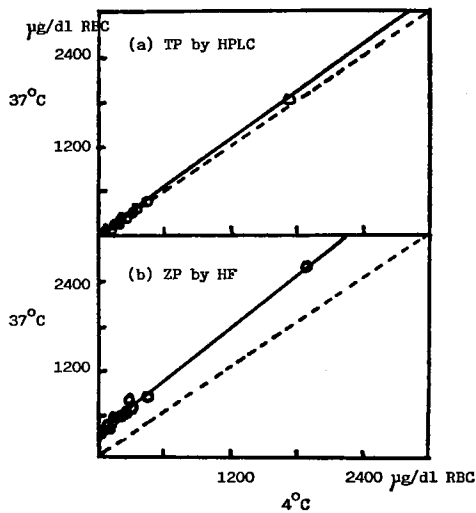


Fig. 7. Effect of sample storage on the measurement of erythrocyte protoporphyrin. Blood treated with EDTA from 12 lead workers was stored at 4°C or 37°C for 3 days after sampling. Solid and dotted lines show the regression and identical lines, respectively.

た。しかし、当時我々の用いた蛍光検出器の感度が低かったので高濃度の抽出液を必要とした。そのために血液量を多くした結果、抽出効率が低くなり、また試料による回収率の不安定さを免れなかった。このため標準添加法を適用して ZP と PP とを別々に注入し測定することを要した。今回はポルフィリンを高感度で検出できるホトマルを装着し検出感度を上げることに成功したので、抽出に用いる血液量を減らすことが可能となった。これにより満足すべき抽出効率および回収率の向上が得られたので、絶対検量線法で ZP と PP の同時測定を達成できた。また最近開発された中性-アルカリ性の移動相でも使用可能なカプセル型の充填剤²⁴⁾を用いることによりカラムの寿命を著しく延ばし安定した長期間の使用を可能にした。今回の我々の方法は抽出に先立つ溶血操作もなく血液を直接 DMF で 1 回抽出するだけの簡単な前処理で自動分析を可能にした。また 1 回の分析時間も 5 分以内と大幅に短縮でき多数検体の処理が容易になった。最近 Bailey ら²¹⁾も ZP と PP の HPLC による分離を報告しているが彼らの方法では抽出溶媒と移動相に蟻酸が含まれ、その濃度の調整が微妙で標準物質の注入では ZP から亜鉛が外れやすいという。

今回の HPLC 法による TP 値は従来の FEP 法による値と良く相関し、やや高めの値となった。これは

FEP 法では抽出効率、回収率がおよそ平均 85%, 93% と低いことに起因する²²⁾。今回の HPLC 法では ZP, PP の回収率がおよそ 87.8%, 96.25% であり、ZP/PP 比を 9 とすると TP の平均回収率は 88.6% と計算される。HPLC 法では抽出効率について考慮する必要がないが、FEP 法では抽出効率と回収率とを合わせると 79.5% となり HPLC 法の回収率より低くなる。

血球中のプロトポルフィリンのうちで亜鉛のキレートする割合についての報告は少ない。Gotelli ら¹⁸⁾の 22 検体についての結果では平均 92% が亜鉛のキレートするものと計算できる。我々は先の報告²⁰⁾で 25 人の鉛作業者の検体で ZP の割合が 67 から 99% の範囲で変化し、回帰直線の傾きから約 91% が亜鉛のキレートしたものと述べた。今回の 150 人の鉛作業者についての結果では ZP の割合は 43~99.5% の範囲でその平均は 83.6%, TP と 0.9 ZP との相関式の傾きから推定すると 88% が ZP となり先の報告に近い。

Harada と Miura²⁵⁾は希釈法で測定した ZP と FEP との比は FEP 量の増加に伴い低下することから ZP より FEP のほうが被曝指標として望ましいと述べている。今回の結果では亜鉛のキレートしたポルフィリンの割合 (0.9 ZP/TP 比) は TP 値および Pb-B のいずれとも相関せず (Fig. 4 d), Harada と Miura²⁵⁾の結果と異なる。更に Pb-B と ZP との相関はむしろ Pb-B と TP との相関より強いことも明らかとなった (Fig. 4 b, c)。また 0.9 ZP/TP 比の低い検体 (Fig. 4 d) では ZP は回帰直線の近辺に分布し他の検体と同様に Pb-B の増加に伴い上昇するのに対し、PP だけが回帰直線より高い位置に離れて分布する点できわだった特徴を示していた (Fig. 4 b, c)。このように Pb-B との比較でみると 0.9 ZP/TP 比の低い検体では ZP 量が相対的に減少したことによるのではなく PP 量だけが增大することによると結論できよう。

Lamola ら²⁶⁾は血球中のグロビン上にプロトポルフィリンの結合サイトが 2 種類あると考えている。鉛被曝や鉄欠乏性貧血では通常のヘム結合サイト (第 1 の結合サイト) でプロトポルフィリンと亜鉛が結合して安定した型となる。このようにして生成したグロビン結合 ZP は鉛による PP への鉄挿入阻害の結果を示すものといえる。これに対しグロビン量に見合う以上に生成するプロトポルフィリンは第 2 の結合サイトに結合するがこの場での結合力は弱く亜鉛も挿入されにくく、血球膜を通して血漿に流出すると考えられる。個体により PP の比率の高いものが出現するのは第 2 の結合サイトでの結合力が強いあるいは血球膜のポルフィリン透過性が低い等

の理由でPPが血球中に残留蓄積しやすいことによると思われる。このように血球中のPP量は鉛の影響を直接に示すのではなく別の因子によって修飾された最終結果を示しているものと推定される。また本研究ではこの因子による修飾は個体により一定しており経時的に変化しないものであることも確認された。

我々は従来血球プロトポルフィリンの測定にはヘパリン処理血を使用してきたが、HF法やFEP法ではEDTA処理血を用いた報告も多い。今回の結果ではFEP値、HF法による値と同様にHPLC法での測定値も抗凝固剤による差異は認められなかった。

鉛作業に従事しない正常者とPb-Bが10 µg/100 g以下の鉛作業者のポルフィリン値を比較したところ両者に有意差が認められず、この二つの群を合わせた男性99名のTP値の算術平均±SDは65.2±2.1 µg/dl RBCで、幾何平均が61.4、2 SDの範囲は31.2~120.9 µg/dl RBCであった。我々はこれを正常範囲と判断した。この群でのFEPの算術平均±SDは56.4±18.9 µg/dl RBCであり上述のように回収率の違いを反映してTPのそれより低値であった。これらの値はMarshら²⁷⁾が男性66名について報告しているFEP値±SDの59.9±14.2 µg/dl RBCと見合うものと思われる。この群のPb-Bの平均±SDは15.1±4.4 µg/dl bloodである。これ以外にもFEP値の正常範囲については種種報告されている^{9,28,29)}。報告者により正常値が異なる原因は測定法により抽出効率、回収率が異なるほか、標準溶液の調整にも起因すると思われる⁹⁾。今回我々の用いた亜鉛プロトポルフィリン、プロトポルフィリン、プロトポルフィリンジメチルエステルの3種の標準物質のmm分子吸光係数はそれぞれ276.3、274.3、273.7であったが、報告にあるmm分子吸光係数には241³⁰⁾、262³⁰⁾、275³⁰⁾、297²¹⁾等があり、どの係数を採用するかにより測定値が変わる。我々のHPLC法とFEP法で用いた標準物質の分子吸光係数に大きな差異がないことから両法による測定値の差は抽出効率の違いにあることが裏づけられる。

冷蔵保存時の血球プロトポルフィリンの安定性については既に述べられているが³⁰⁾、今回は室温以上での保存の影響についても明らかにした。広い範囲でスクリーニングとしてポルフィリンの測定が行われるようになれば、採血現場から測定機関までの搬送の機会が多くなるものと思われる。この場合、より簡便には室温あるいは一時的な高温条件にも耐えられる測定法が望まれる。高温保存によるHF法での測定値の上昇は血液成分の変化により蛍光物質が生成することによると考えられ

る^{31,32)}。HPLC法、FEP法等では抽出操作を加えるのでこの蛍光物質を除去でき高温保存の影響を少なくできるものと思われる。HF法では非常に簡便に測定できる利点があるが血液の保存についてはHPLC法やFEP法のほうが優れている。

V. 要 約

我々は簡単な前処理で血球のZPとPPをHPLCを用い5分以内に自動分析する方法を確立した。DMFによる1回抽出でヘミンの混入しない抽出液を得、カプセル型の逆相充填剤を用いることでカラム寿命を延ばし長期間安定した分析が可能であった。この方法で150名の鉛作業者について得られたZP値あるいはTP値はいずれも従来のHF法、FEP法による値と良く相関した。血球プロトポルフィリンのうち亜鉛のキレートする割合は0.43から0.99まで変化し、0.6以下となるのは5名のみであった。Pb-Bとの相関はPPよりZPのほうがより高い相関係数を示しZPが鉛被曝の指標としてより意義のあるものと考えられた。HPLC法ではHF法、FEP法と同様にEDTA血、ヘパリン血のいずれも使用でき、TP値の正常範囲は男性で31.2~120.9 µg/dl RBCであった。またHPLC法は37°C 3日間保存した血液でも4°C保存と同様な測定値が得られ、鉛被曝のスクリーニングテストとしての利用範囲が広がるものと思われる。

文 献

- 1) Moore MR, Meredith PA, Goldberg A. Lead and heme biosynthesis. In: Singhal RL, Thomas JA, eds. Lead toxicity. Baltimore-Munich: Urban & Schwarzenberg, 1980: 79-117.
- 2) Hindmarsh JT. The porphyrias: recent advances. Clin Chem 1986; 32: 1255-1263.
- 3) Nordberg GF. Effects and dose-response relationships of toxic metals. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co, 1976: 47-54.
- 4) Sassa S, Granick JL, Granick S, et al. Studies in lead poisoning. I. Microanalysis of erythrocyte protoporphyrin levels by spectrofluorometry in the detection of chronic lead intoxication in the subclinical range. Biochem Med 1973; 8: 135-148.
- 5) American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Threshold limit values and biological exposure indices for 1987-1988. Cincinnati: ACGIH, 53-63.
- 6) 全国労働衛生団体連合会. 企業外健康診断機関業務適正化のための精度管理調査結果報告書. その1 生体試料測定による精度管理のためのクロスチェック結果. 東京: 全衛連, 1987: 9-11.
- 7) Lamola AA, Yamane T. Zinc protoporphyrin in the erythrocytes of patients with lead intoxica-

- tion and iron deficiency anemia. *Science* 1984; 186: 936-938.
- 8) McLaren GD, Carpenter JT, Nino HV. Erythrocyte protoporphyrin in the detection of iron deficiency. *Clin Chem* 1975; 21: 1121-1127.
 - 9) Piomelli S. A micromethod for free erythrocyte porphyrins: the FEP test. *J Lab Clin Med* 1973; 81: 932-940.
 - 10) Tomokuni K, Osaka I, Ogata M. Erythrocyte protoporphyrin test for occupational lead exposure. *Arch Environ Health* 1975; 30: 588-590.
 - 11) 新沼幸子, 坂井 公, 柳原 進, ほか. 血球遊離ポルフィリン (FEP) の測定法—Piomelli 法の検討. *産業医学* 1981; 23: 254-259.
 - 12) Hanna TL, Dietzler DN, Smith CH, et al. Erythrocyte porphyrin analysis in the detection of lead poisoning in children: evaluation of four micromethods. *Clin Chem* 1976; 22: 161-168.
 - 13) Sakai T, Niinuma Y, Yanagihara S, et al. Determination of blood zinc protoporphyrin concentrations by the ethanol extraction method and by the hematofluorometer. *Jpn J Traumatol Occup Med* 1981; 29: 807-815.
 - 14) Hart D, Piomelli S. Simultaneous quantitation of zinc protoporphyrin and free protoporphyrin in erythrocytes by acetone extraction. *Clin Chem* 1981; 27: 220-222.
 - 15) Lamola AA, Joselow M, Yamane T. Zinc protoporphyrin (ZPP): a simple, sensitive, fluorometric screening test for lead poisoning. *Clin Chem* 1975; 21: 93-97.
 - 16) Lamola AA, Eisinger J, Blumberg WE, et al. Quantitative determination of erythrocyte zinc protoporphyrin. *J Lab Clin Med* 1977; 89: 881-890.
 - 17) Blumberg WE, Eisinger J, Lamola AA, et al. The hematofluorometer. *Clin Chem* 1977; 23: 270-274.
 - 18) Gotelli GR, Wall JH, Kabra PM, et al. Simultaneous liquid-chromatographic determination of zinc protoporphyrin IX, protoporphyrin IX, and coproporphyrin in whole blood. *Clin Chem* 1980; 26: 205-208.
 - 19) Smith RM, Doran D, Mazur M, et al. High-performance liquid chromatographic determination of protoporphyrin and zinc protoporphyrin in blood. *J Chromatogr* 1980; 181: 319-327.
 - 20) Sakai T, Niinuma Y, Yanagihara S, et al. Relationship between zinc or free protoporphyrin concentrations determined by high pressure liquid chromatography and erythrocyte protoporphyrin concentrations by the hematofluorometer, in blood from workers chronically exposed to lead. *Jpn J Traumatol Occup Med* 1982; 30: 62-69.
 - 21) Bailey GG, Needham LL. Simultaneous quantification of erythrocyte zinc protoporphyrin and protoporphyrin IX by liquid chromatography. *Clin Chem* 1986; 32: 2137-2142.
 - 22) 新沼幸子, 坂井 公, 柳原 進, ほか. ヘマトフルオロメーターによる鉛作業者の血球遊離ポルフィリン値と他の生体指標との関係. *日本災害医学会会誌* 1982; 30: 816-824.
 - 23) Petryka ZJ. High-performance liquid chromatography of porphyrins. *Adv Chromatogr* 1983; 22: 215-246.
 - 24) 資生堂. 高速液体クロマトグラフ用カプセルタイプシリカ逆相分配型充填剤について. 技術資料 No. 1. 東京: 資生堂, 1987.
 - 25) Harada K, Miura H. Free erythrocyte protoporphyrin (FEP) and zinc protoporphyrin (ZnPP) as biological parameters for lead poisoning. *Int Arch Occup Environ Health* 1984; 53: 365-377.
 - 26) Lamola AA, Piomelli S, Poh-Fitzpatrick MB, et al. Erythropoietic protoporphyria and lead intoxication: the molecular basis for difference in cutaneous photosensitivity. II. Different binding of erythrocyte protoporphyrin to hemoglobin. *J Clin Invest* 1975; 56: 1528-1535.
 - 27) Marsh WL, Nelson DP, Koenig HM. Free erythrocyte protoporphyrin (FEP) I. Normal values for adults and evaluation of the hematofluorometer. *Am J Clin Path* 1983; 79: 655-660.
 - 28) Alessio L, Bertazzi PA, Toffoletto F, et al. Free erythrocyte protoporphyrin as an indicator of the biological effect of lead in adult males. *Int Arch Occup Environ Health* 1976; 37: 73-88.
 - 29) 山田裕一, 城戸照彦, 岡田 晃, ほか. 低濃度鉛暴露の生体影響についての研究. 第1報 職業的鉛暴露指標としての各種生化学検査の有用性の評価. *産業医学* 1981; 23: 260-269.
 - 30) Chisolm JJ, Brown DH. Micro-scale photofluorometric determination of "free erythrocyte porphyrin" (protoporphyrin IX). *Clin Chem* 1975; 21: 1669-1682.
 - 31) Buhrman E, Mentzer WC, Lubin BH. The influence of plasma bilirubin on zinc protoporphyrin measurement by a hematofluorometer. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 710-716.
 - 32) Lamola AA, Eisinger J, Blumberg WE, et al. Bilirubin sensitivity of zinc protoporphyrin hematofluorometers. *J Lab Clin Med* 1979; 93: 345-348.

著者への通信先: 坂井 公, 〒143 東京都大田区大森南4丁目 13-21 東京労災病院健診センター
 Reprint requests to Center of Occupational Medicine, Labor Accident Hospital, 13-21, Omori-minami 4, Ota-ku, Tokyo, 143 Japan (T. Sakai)