

海洋化学と健康科学の接点（その一）

血液中の無機化学成分の分析

玉田 知子*¹・堀 智孝

藤永太一郎*²

1. はじめに

生体内における無機元素の働きの重要性は、P、Ca、Feといった比較的多量に存在する元素に関して早くから知られていた。しかし、存在量が極めて小さい、いわゆる微量無機元素の働きに関しては、それらを正しく定量するための方法論と技術に問題があって、未知の部分が残っていた。生体内の微量元素の精度と確度に優れた定量を困難にしている主因は、多量に共存する有機物とNaClを主体とする無機塩類である。

この難問を解決に向かわせたきっかけは、極微量のCdやHgがそれぞれイタイイタイ病と水俣病の発症に密に関連していることが明らかになったことである。この二つの不幸な出来事への反省とその他の微量重金属による障害の予防と治療を目指すという観点から、生体内における微量元素の役割に関する分析化学的研究が勢力的に推し進められ、それらの存在量が次第にままと共に、それらと生命や健康にどのように関わっているのかという大系的議論も可能になりつつある。

桜井は本誌において[1]、生体微量元素の必須性とその医薬品への応用について述べている。現在までに、哺乳動物を用いた実験により生命活動に対する必須性が証明されている微量元素[†]は、Fe、F、Si、

Zn、Sr、Rb、Pb、Mn、Cu、超微量元素はSn、Se、I、Mo、Ni、B、Cr、As、Co、Vなど20余元素であり、その内、ヒトで必須性[‡]が認められている元素はFe、F、Si、Zn、Mn、Cu、Se、I、Mo、Ni、Cr、Coの12元素である。これに有機物を構成するC、H、N、O及び比較的多量に含まれているNa、Cl、Mg、Ca、P、S、K、の11元素を加えた23元素について、ヒトでの必須性が証明されている元素である[2]、[3]。

原口は[4]海洋中の微量元素の研究を行う中で、血清中の微量元素との比較を行い、両者の関係について次の二つの事実を指摘している。先ず、希土類に注目すると、両者の間で濃度分布パターンが類似している。この類似性は、海洋が生命誕生の場であることの一つの証拠であるとしている。次に、地球科学的分配則から各種元素を親鉄、親銅、親石元素に分類し、これをピアソンが提唱する硬い酸塩基・軟らかい酸塩基理論に照らすと、親鉄、親石元素であって硬い酸に属する元素は、海水と血中で濃度分布が一致しているが、

[†] ppm程度存在する場合を微量、ppb程度存在する場合を超微量とする。

[‡] 必須性は、その元素が欠乏したとき欠乏症を生じ、場合によっては死に至ることがあるか、及びその元素が酵素の活性中心に含まれているかどうかで判別される[2]。

*¹ 京都大学大学院 人間・環境学研究科 〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町 *² (財) 海洋化学研究所 〒606-8501 京都市左京区北白川追分町 京大・理・化

親銅元素であって軟らかい酸に属する元素は血清中濃度が海水中濃度より高くなっていることである。この事実から、ヒトにおける元素の「必須性」には統一した議論はないとしているが、ヒト血清における元素分布の特徴は、「嫌氣的条件下における生体反応」と強い関連があることを指摘している。

生物試料中の微量金属の定量における問題点は、感度の不足のみならず、外部からその金属が混入して試料が汚染されることである。加えて、生物試料は元素組成が複雑であるため、主要成分が微量成分に対して示すはずの干渉効果の程度を予め見積もるのが不可能に近く、定量値の信頼性(確度)が低くなることである。

海洋、湖水、河川水などの天然水の研究では、着目元素をまず溶存態と懸濁態とに二分して、その元素の挙動を追跡する手法を広く用いている。よく似た手法は、血液中の無機微量成分の分析にも用いられる。すなわち全血試料を、血漿または血清と赤血球に分画し、各々の画分で微量分析を実施する。しかし、現在までに報告されている血液の分析は、血漿や血清を対象とした研究が圧倒的に多く、全血や赤血球を対象とした研究は少ない。また、赤血球を含む画分は多量のFeを含んでいてその干渉が深刻である。血液中の微量無機成分の動態を総合的に理解するには、血漿や血清のみならず血球中の無機元素の追跡は不可欠である。またこの成果を援用して、血清-血球間や血清-組織間の細胞膜や生体膜を介した元素の分配に関する情報は健康科学の観点から重要であって、血球試料に適用可能な高精度かつ高確度の微量分析法の確立が強く望まれている。

本稿では、生体内無機微量元素の分析法の現状と今後解決すべき問題点を紹介し、併せて、微量無機元素を通して海洋化

学と健康科学の接点について述べる。

2. 無機化学成分から観た血液と海水の類似性

血液は遠心分離の操作を行うと、上層の透明な血漿部分と下層の赤く着色した赤血球を含む部分に分離する。そしてこの血漿部分に含まれる金属元素の組成は海水中の金属元素の元素組成に似ている[1], [5], [6]。このことは、生命の起源が海水にあるとする仮説の根拠の一つである。この仮説を支持するさらに進んだ提案として、Egami[7]は、生命誕生初期から現在まで生き延びていると思われる微生物の生体内酵素に着目して、そこに含まれる金属元素の種類と海水に含まれる金属元素濃度との相関について考察している。生体内酵素の触媒反応の反応場となる活性中心には、金属原子が存在していることが多い。このことから、バクテリアの進化の歴史とそれが持つ酵素に含まれる遷移金属の種類を比較することにより次のような説を導いている。すなわち、生命誕生期に生体内酵素が形成された際に、原始海洋により豊富に存在した元素から優先的にタンパク質の中に取り込まれ、これが酵素の前駆体となったというものである。具体的には、原始海洋に比較的多く含まれていたFe、Mo、Znは海洋中のタンパク質と結びついてそれぞれ、電子伝達系酵素、加水分解・低分子代謝酵素、情報伝達・巨大分子代謝の役割をする酵素の原型となり、その後の進化に伴って特異性が高まり、あるものは他の金属と置換されるなどして、現存の酵素のように機能分化したとしている。

3. 微量金属元素と健康障害

生体内において、一つの元素がいくつかの異なる生理作用や触媒作用を併せ持

つことが多い。また、複数の元素が協働して一つの生理作用を担う場合もある。そのため、ある元素の生体内での役割を知る手法は、その元素を欠くか、もしくは過剰に加えた食餌を与えるといった動物実験が主となる。しかし、ヒトの健康に対する作用は実験よりも、むしろ事故などによる偶発的な暴露による摂取過剰又は極度の欠乏状態で現れる症状から発見されることが多い。

一般に、生体は元素ごとの最適濃度範囲を有しており、この濃度に満たなければ欠乏症や生育障害を、また反対に、それを超えた状態が続くと過剰症が発現して死に至る。さらにまた、同じ元素であっても、その最適濃度範囲は摂取する化学形態、酸化状態、摂取する側の年齢、性別などに大きく依存する。以下に代表的な例を引用して、これまでに知られている生体必須元素の役割、欠乏症、過剰症について紹介する。

Znは、生体内の炭酸脱水酵素や加水分解酵素に含まれていること、味覚を感じる味蕾の構成成分であること、Zn-フィンガー [8]と呼ばれるタンパク質がDNAと結合し、遺伝情報の転写に関する機能に関わっていることが明らかとなっている。したがってこれが欠乏すると、発育不全、味覚障害、皮膚障害、脱毛症などが現れる。過剰症は起こりにくいが、極度に多量に摂取すると腹痛や発熱が生じる。

Cuは、生体内に広く分布し、電子伝達系酵素、メラニンの合成、活性酸素分解酵素などに含まれる。欠乏症には、貧血、毛髪異常、脳障害、また、過剰症には接触性皮膚炎、発熱などがある[9], [10]。

Coは、ビタミンB₁₂に含まれ[11]、エネルギー代謝に必須の元素である。欠乏時には悪性貧血、食欲減退、体重減少などが現れるが[12], [13], [14]、過剰症の詳細は不明である。

Moは、各種の酸化還元反応を行う酵素に含まれる[15], [16]。これが欠乏するとCuが肝臓に蓄積し、過剰に摂取するとCuの欠乏症が起こる。MoとCuとの相互作用は興味ある問題であるが、この機構は未知のままである[17]。

4. 血液中微量金属元素の分析

4.1 有機物を除くための前処理

血液中の無機成分を測定する場合、予めタンパク質、糖、脂質といった多量の有機物の分離または分解除去を行う。この前処理には、希釈法、除タンパク法、湿式あるいは乾式灰化法が用いられる。

希釈法は、原子吸光法(AAS)や誘導結合プラズマ発光分析法(ICP-AES)、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を使用する場合に多用される。特に有機物の含量が比較的少なくかつ分布に偏りがない場合に有効であって、酸または水で希釈した試料をフレームや黒鉛炉、プラズマ中に導入する。この前処理法は簡便であるが、希釈により分析感度が低下すること、また、有機物の分解が不十分であると試料の炭化による負誤差が生ずることが欠点となる。試料の炭化を回避するためにTritonや硝酸マグネシウム、リン酸アンモニウムなどのマトリックス修飾剤を用いて目的元素の揮発を抑え、より高温で試料を分解することが推奨されている。血清試料中のSeの測定では、5倍に希釈した試料に、マトリックス修飾剤(Triton X-100とIr)を加え、ゼーマン効果によるバックグラウンド補正を行い、黒鉛炉原子吸光法を適用する[18]。同様の方法で、全血を対象として、10倍に希釈した試料で、Al, Cu, Fe, Pb, V, Znが測定されている[19]。

除タンパク操作は、AASやICP法、蛍光法、比色法の前処理に用いられる。例えば、トリクロロ酢酸あるいは塩酸-メタ

酸-メタノール混合液を添加してタンパク質を除去した血清試料に、蛍光法を適用してAlを定量する[20], [21]。この処理を行うと、当然のことであるが、タンパク質と共に目的元素の一部が除去される心配もあるので、十分な予備検討が必要である。

灰化法は次の二法に分けられる。酸を使って加熱し、有機物を酸化分解する湿式灰化法と、電気炉などを用いて高温で焼成する乾式灰化法である。後者では、高温条件における元素の揮散、分解容器への吸着といった欠点はあるが[22]、分解試薬を用いないという点で試料の汚染が少なくなるという長所がある。現在多用されているのは、マイクロ波加熱を併用する湿式灰化法である。その代表例として、稲垣らによる血清中の希土類の定量が挙げられる[23]。

4.2 血液中微量無機元素の標準的分析法

これまでに、主としてフレイム原子吸光法(F-AAS)、黒鉛炉原子吸光法(GF-AAS)、中性子放射化分析法(NAA)、誘導結合プラズマ発光分析法(ICP-AES)、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)が適用されている。このうち、NAA、ICP-AES、ICP-MSは小容量試料で多元素を同時に分析するものであるが、一般的にあって、共存元素による干渉が深刻であるので、(i) 主成分元素を除去するための前処理や(ii) 測定時に適切な干渉補正を行うことが必要である[24]。

上記(i)に関して、主成分元素の除去には溶媒抽出、キレート樹脂やイオン交換樹脂を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が有効である。溶媒抽出を利用する例は、血清中のCuの定量であって、除タンパク後の試料に含まれるCuをバソクプロイン錯体として有機相に抽出濃縮

し、吸光光度定量するものである[25]。キレート樹脂を利用する例は、全血及び血清試料を湿式灰化し、目的元素であるFe, Ni, Cu, Zn, Pbをキレート樹脂カラムに濃縮、これを硝酸で溶離しICP-MSで定量する[26]。同様にして血清試料の希土類は、湿式灰化後、キレート樹脂に濃縮、硝酸で溶離させてICP-MSで定量する[23]。Alの定量にはHPLCを用いる。すなわち、血清試料中のAlを8-キノリノール錯体とし、これをHPLCに供試して有機物及び他の金属錯体から分離した後、目的錯体を蛍光検出する[27]。

前記(ii)の干渉補正は、内部標準法、マトリックスマッチング、標準添加法によって行う[22], [28]。Al、B、W、Zrといった耐火性元素はF-AAS、GF-AASによる定量が困難である。これらの元素に対しては第4.1節に述べたマトリックス修飾剤の併用が推奨される。

内部標準法は、血清や全血試料を硝酸により湿式灰化した後、Sc, Rh, Irを内部標準として添加し、ICP-MSでCo, Pbを始めとする14元素を同時定量する例がある[29]。

マトリックスマッチングは、血清試料中のCuを始めとする数種の金属の定量に際して、アルブミンを添加した例がある[30]。

標準添加法は血清試料のETA-AASによるPb, Cdの定量に際して、TritonX-100とリン酸アンモニウム(マトリックス修飾剤)を加えているが、マトリックス効果が依然残るため、標準添加法が併用される[31]。また、血清中のCuとZnのICP-MSによる定量に際しても、マトリックス効果が大きく内部標準法による補正では不十分で、標準添加法が推奨されている[32]。

これまでに知られているヒト成人血清及び全血中の標準元素濃度を表1に挙げる。

表1 ヒト成人の血清及び全血中の標準元素濃度[45]

	血清 (µg/L)	全血 (µg/L)
Al	1-5	2-8
As	<1-5	2-20
Au	0.002-0.08	0.006-0.050
B	15-45	20-50
Ba	-	0.5-2.5
Br	3000-6000	3000-5000
Cd	1.1-0.3	0.3-1.2 ^d 1-4 ^e
Co	0.1-0.3	5-10
Cr	0.1-0.2	<5
Cs	1-2	1.0-4.5
Cu	800-1100 ^a 1100-1400 ^b	800-1100 ^a 1000-1400 ^b
F	20-50	200-500
Fe	800-1200	425-500 ^f
Hg	<1	2-20
I	60-70	40-60
Li	0.2-0.8	0.4-1
Mn	0.5-1	8-12
Mo	<0.1-0.5	1-3
Ni	<1-2	1-5
Pb	<1	50-150
Rb	100-300	2000-4000
Sb	0.01-2	<0.1-3.5
Sc	0.003-0.1	0.002-0.12
Se	75-120	90-130
Si	300	-
Sn	<1	<1
Tl	0.02-0.34	0.15-0.60
U	-	0.001-0.005
V	0.1-1.0	0.1-0.5
Zn	800-1100	6000-7000

a: 男性, b: 女性 c: mg/L,
d: 非喫煙者, e: 喫煙者, f: mg/kg又はL

5. AlとSiの定量における精度と確度の改善とその健康科学への応用

Alは地殻中で三番目に豊富に存在し、しかも岩石の主要構成元素として生活圏に普遍的に分布するが、生体内ではごく微量元素に存在する元素である。Alの生理作用の詳細は知られていないが、この元素は必須性よりはむしろその毒性に関

する報告が数多く、過剰摂取や体内蓄積によって、アルツハイマー型痴呆などの神経障害[33], [34],[35], [36]や骨の障害[37]が起こる。Al³⁺とFe³⁺の化学反応性が近いことから、Al³⁺が誤ってFe³⁺の生理作用を乱すのがこの原因であろうとの予見もある[38]。他方、地殻中で二番目に豊富な元素Siは自然界ではケイ酸として存在し、生体に対して比較的毒性の低い元素であって、骨の形成過程などに関わっていると目されている。ケイ酸の生理作用は不明な点が多いが、毒性を示すAl³⁺と共存している時、ケイ酸はAl³⁺の生体獲得性を減少させるのである[39], [40], [41], [42]。環境中に豊富に存在するAlが生体内に殆ど取り込まれないことに対する説明として、生体内のpHでケイ酸がAl³⁺と結合してケイ酸アルミニウムとなり、これが消化管から吸収されにくい化合物であることが挙げられる。このケイ酸アルミニウムは、Al³⁺に対して錯形成能の高いクエン酸などが共存しても安定であって、消化管からのAl³⁺の吸収を妨げる[43]。このような健康科学的観点から、生体中のAlとSiの濃度を簡便にしかも精度よく知る方法が強く求められている。しかし、報告されているAlの血清中濃度の健常値は研究者によって大きくバラついており、現在のところ、AlとSiの健常値はそれぞれ数2 ppb程度および0.1~0.5 ppm程度であるとされている[33]。

6. おわりに

微量無機元素の分布と移動を通して、海洋や海水の本質に迫ろうとする海洋化学研究と重金属汚染に端を発した環境化学研究が相まって、今日、海水を始めとする天然水中の無機化学成分は、高い確度と精度で得られるようになった[44]。他方、人体の中の海水ともいえる血液に関しては、無機成分の分析化学は未だ多く

の問題点を抱えている。海水と血液はNaClを主成分にしている点では共通しているが、後者が多種多様の有機物質とFeを多量に含んでいる点で両者は大きく異なっている。

これまでの海洋化学の成果を積極的に援用して、健康科学からの求めに応えることは大事であると思う。また並行して、無機地球環境(海洋)と有機生命環境(生体)との接点における各種元素の挙動を、海水と血液の比較研究から考察することは、生命の誕生という原点にまでさかのぼることになると考える。

参考文献

- [1] 桜井弘, 海洋化学研究, **13**, 4 (2000).
- [2] 桜井弘, 田中英彦編, 「生体微量元素」, 廣川書店 (1994).
- [3] 桜井弘, 「金属は人体になぜ必要か」, 講談社 (1996).
- [4] 原口紘亮, 海洋化学研究, **13**, 16 (2000).
- [5] 久保田晴寿編, 「無機医薬品化学」, p.47, 廣川書店 (1984).
- [6] F. Egami, *J. Mol. Evol.*, **4**, 113 (1974).
- [7] F. Egami: *J. Biochem.*, **77**, 1165 (1975).
- [8] J. Miller, A. D. McLachlan, A. Klug, *EMBO J.*, 1609 (1985).
- [9] 山根靖弘, 田中久, 喜谷喜徳共編, 「無機生物化学」, pp.151-210, 南江堂 (1980).
- [10] 田中久, 桜井弘編著, 「生物無機化学」, pp.1-23, 67-75, 廣川書店 (1987).
- [11] E. L. Smith, L. F. G. Parker, *Biochem. J.*, **43**, VIII-IV (1948).
- [12] E. J. Underwood, "Trace Elements in Human and Animal Nutrition", Academic Press (1977).
- [13] 糸川嘉則, 「生体微量金属の話」, pp.116-128, 自然の友社 (1987).
- [14] 木村修一, 左右田健次編, 「微量元素と生体」, pp.167-168, 秀潤社 (1987).
- [15] I. Yamazaki, "Metalloproteins" S. Otsuka, T. Yamanaka eds., p.419, 講談社, Elsevier (1988).
- [16] R. C. Bray, T. C. Swann, *Structure and Bonding*, **11**, 107 (1972).
- [17] A.T. Dick, *Aust. J. Agr. Res.*, **5**, 511 (1954).
- [18] R. Sabe, R. Rubio, L. G. Beltran, *Anal. Chim. Acta*, **398**, 279 (1999).
- [19] J. E. Tahan, V. A. Granadillo, R. A. Romeo, *Anal. Chim. Acta.*, **295**, 187 (1994).
- [20] Y. Suzuki, S. Imai, T. Kamiki, *Analyst*, **114**, 839 (1989).
- [21] E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, N. Gunji, M. Sato, T. Kikuta, M. Yuasa, *Anal. Chem.*, **63**, 2219 (1991).
- [22] C. Vandecasteele and C. D. Block, 「微量元素分析の実際」原口紘亮他訳, 第2章, 丸善 (1995).
- [23] K. Inagaki, H. Haraguchi, *Chem. Lett.*, 775 (1997).
- [24] 藤森英治, 稲垣和三, 原口紘亮, 分析化学, **48**, 57 (1999).
- [25] K. Wrobel, K. Wrobel, G. Cruz-Jimenez, F. Anglo-Romo, *Anal. Chim. Acta*, **387**, 217 (1999).
- [26] C. Huang, M. Yang, T. Shih, *Anal. Chim.*, **69**, 3930 (1997).
- [27] M. Sato, H. Yoshimura, T. Shimmura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *J. Chromatogr. A*, **789**, 361 (1997).
- [28] 不破敬一郎, 原口紘亮 「ICP発光分析」, 南江堂 (1980).
- [29] P. Schramel, I. Wendler, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **361**, 487 (1998).
- [30] H. B. Lim, M. S. Han, K. J. Lee, *Anal. Chim. Acta*, **320**, 185 (1996).
- [31] N. Campillo, P. Vinas, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, *Anal. Chim. Acta*, **390**, 207 (1999).
- [32] J. Szpunar, J. Bettmer, M. Robert, H. Chassaigne, K. Cammann, R. Lobinski, O.

- F. X. Donard, *Talanta*, **44**, 1389 (1997).
- [33] D. R. Crapper, S. S. Krishnan, A. J. Dalton, *Science*, **180**, 511 (1973).
- [34] D. P. Pearl, A. R. Brody, *Science*, **208**, 297 (1980).
- [35] C. N. Martyn, D. J. P. Baker, C. Osmond, E. C. Harris, J. A. Edwardson, R. F. Lacey, *Lancet*, i, **59** (1989).
- [36] J. D. Birchall and J. S. Chappell, *Clin. Chem.*, **34**, 1008 (1988).
- [37] P. O. Ganrot, *Environ. Health Perspect.*, **65**, 363 (1986).
- [38] R. B. Martin, J. Savory, S. Brown, R. L. Bertholfe, M. R. Wills, J. D. Birchall, *Clin. Chem.* **33**, 405 (1987).
- [39] A. Sanz-Medel and B. Fairman, "Element Speciation in Bioinorganic Chemistry" Sergio Caroli ed., Chapter 7, p.223, John Wiley & Sons, Inc. (1996).
- [40] J. D. Birchall, *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 351 (1995).
- [41] J. P. Bellia, J. D. Birchall, N. B. Roberts, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **26**, 227 (1996).
- [42] J. A. Edwardson, P. B. Moore, I. N. Ferrier, J. S. Lilley, G. W. Newton, J. Baker, J. Templar, J. P. Day, *Lancet*, **342**, 211 (1993).
- [43] J. D. Birchall, *Chem. Bri.*, **26**, 141 (1990).
- [44] 野崎義行, *地球科学*, **26**, 25 (1992).
- [45] G. V. Ivengar, V. Ivengar, "Determination of Trace Elements", Z.B. Alfassi ed., pp.582-583, VCH Publ. (1994).

「湖沼の科学」開催に当たって

藤永 太一郎*

京都大学理学部で石橋雅義先生が海洋化学を初めて手がけられてから70年が経過した。当時は化学者でさえ、海水は塩水で、苦汁と総称するマグネシウムを主体とした不純物が加わっている、といった位の知識しかなかった。

地球上に存在する総ての化学元素が海水中に存在する、と考え、四半世紀の教授在籍中にそれを実証されたのが先生である。今日の海水化学はその間に出来上がったといってよい。また、その間に海洋化学研究所が開設され、上記成果の主要部分を担ったことになる。

海が理解できると、それが陸とどのように関わるかに研究者の興味が移るのは自然のなりゆきである。或る者は身近で本邦最大、太古は海であった琵琶湖について知ろうとし、或る者は今も海に連なっている汽水湖について知ろうとし、又或る者は海から隔絶されているような湖を大陸に求めて研究し始めた。これらの研究に共通している事は夫々独自に発意され、独自の手法で当面する湖に取り組まれた、従って、その成果はすべて夫々の研究者に占有されるべき性質の悦びに満ちた誇らしいものである。

此度、この偶然といえは偶然、必然といえは必然の経過によって研究成果を一堂に持ち寄って頂き、お話を承ることができるようになった事は企画した者にとっても悦ばしいことである。と同時に聴かれた出席者にとって格別のよい勉学の間となるであろう。更にこの場は演者にとっても得難い収穫の間となるに相違ない。たとえ同学であっても日頃は独自の思想と方法論をもって研究しており、成果を比較理解し合う事は次の研究展開に対する貴重な出会いの間となるものだからである。

最近の科学者、特に化学者が先端技術に追われて自然の探求に携わることが少なくなっている。湖を楔としてその大切さを省みる動機が生まれることを期待している。

* (財) 海洋化学研究所 名誉所長