

重元素による環境汚染・体内暴露モニタリングのための
無調製定量分析法 -
- 無調製爪試料のための定量分析法の開発 -

世良耕一郎

岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

二ツ川章二

日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

村尾智

通産省産業技術総合研究所資源エネルギー地質部
305-8567 茨城県つくば市東 1-1-3

E. Clemente

Department of Mining, Metallurgical and Materials Engineering, University of the Philippines
Quezon City 1101, Philippines

1. はじめに

現在、世界では有害元素による広域的汚染に起因する環境問題が多数発生し、数千万の人々
がその被害を受けており、それが全人類の問題になりつつある。これら環境問題に対処するた
め元素分析法の担う役割は大きく、エアロゾル、河川水、土、農作物等の環境試料に加え、毛髪、
尿、血液等の分析が広く行われてきた。我々は7年前に「無標準定量分析法」¹⁾を開発し、医学・
生物学試料、環境試料分析等への応用を行ってきた。特に5年程前に開発された「毛髪試料に
対する無調製・無標準分析法」²⁾は、有害元素の体内暴露評価に極めて有効な手法として、種々
の国際的環境問題に応用されてきた。毛髪中元素濃度は、人体への有害元素暴露総量評価にとっ
て不可欠なものであり、本法は他の方法と比べ幾つかの利点を持っている。それらは、酸等
による灰化処理を必要とする他法と比べ、試料調製の手間が比較にならないほど軽減され、大量の
試料が短時間で処理できる。毛髪に手を加えず、元素が蛋白に結合した形のまままで分析を行
うため、一部の揮発性元素、特に重要な水銀等の損失が無視できる。数10mgの試料を必要と
する他法に対し、0.5cmの毛髪が1本あれば正確な定量分析が可能である。従って頭髪の採取

が困難な場合でも、他の体毛を分析することにより暴露評価が可能となる、等である。

しかし体内暴露総量評価のためには、毛髪分析のみでは不十分なことも多い。我々は尿、血清等の体液試料に対する定量分析法を確立し、数千にのぼる試料の分析を行ってきた。特に尿試料に対しては、無調製定量分析法を開発し本報文集に報告を行った³⁾。一方、爪中の元素濃度も毛髪や尿同様、重要な情報を与えるものである。実際我々は、「バングラデッシュにおける飲料水の砒素汚染に起因する人体暴露の実態調査研究」⁴⁾の中で、数十の爪試料分析を行い、その結果、毛髪同様高濃度の砒素が検出された。しかし、無調製で分析が可能な毛髪の場合と異なり、濃硝酸灰化処理が必要な爪試料は、一度に大量の試料を処理することが出来ない。このような環境問題調査研究においては、試料数が数百にのぼることは珍しいことではなく、実際に我々のもとに、フィリピンの小規模金鉱山における水銀体内暴露評価の目的で、百数十もの爪試料が送られてきている。

そのため、爪試料に対しても毛髪同様、無調製・無標準定量分析法の開発を行い、多数試料の迅速な処理法を確立することが望まれる。しかし、爪試料は毛髪と異なり試料の厚さが一定していないため、試料の最適な照射条件をまず確立しなければならない。さらに、毛髪はアセトンによる洗浄が有効なことが示されているが⁵⁾、爪試料は毛髪と比較しても表面が汚染しやすく除染が困難な場合が多い。また試料によっては、表面に細かい傷を持つ場合も多く、特に小規模金鉱山の鉱夫から採取した試料は、その傷の中に金属と思われる粉末が埋め込まれているように見えるものも多い。そのため照射前の試料洗浄法に関しても最適な条件を確立しなければならず、これは分析法以前の問題である。

さらに、試料の採取位置依存性も調べる必要がある。体毛の場合、特に砒素・水銀などの有害元素に関しては、体内における試料採取位置依存性は少なく、どの部分の体毛を採取しても有害元素暴露評価が可能であることが我々の研究により確認されている⁵⁾。手足10本ある爪のうち、どの部分の測定を行うのが良いのか、同一の爪内での位置依存性はどうか、それらの点についても詳しい検討が必要である。

2. 実験方法

ビーム、測定条件に関しては、文献3とほぼ同様であるので、参照していただきたい。異なる点は、検出器1に対し300 μ m Mylar フィルムをX線吸収体として用いている点である。ターゲット作成法としては、毛髪同様自己吸収が無視できる照射条件を整える必要がある。そのため爪試料は先端に向かって細く斜めにカットされ、図1のようにターゲットホルダーの中央に吊り下げられ、厚さが数100 μ m以下と思われる先端部のみにビームが当たる条件で照射が行われた。通常どおり2検出器同時測定法⁶⁾により、Na以上の元素の同時分析が行われた。全元素分析のために必要な照射時間は、毛髪同様5分前後である。

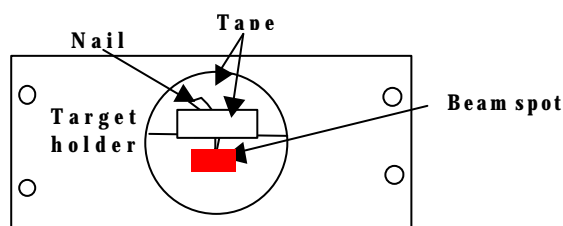


Fig.1 Schematic view of a nail sample on the holder. A nail is cut so as to taper it to a point and is hung at the center of a target holder. Only the top of the nail is irradiated by a proton beam.

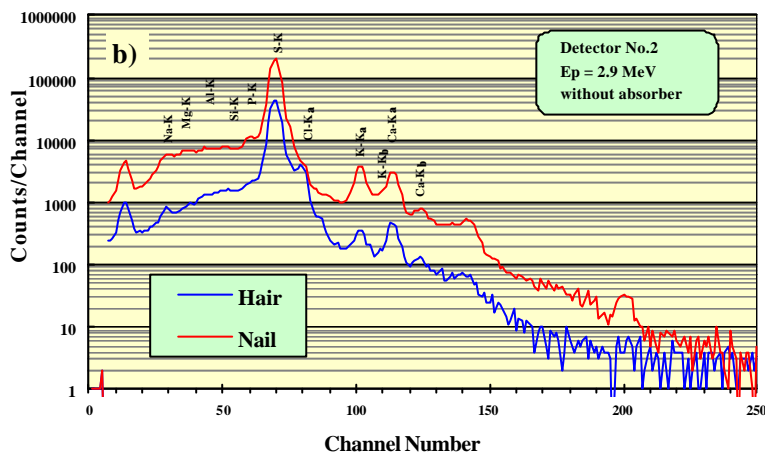
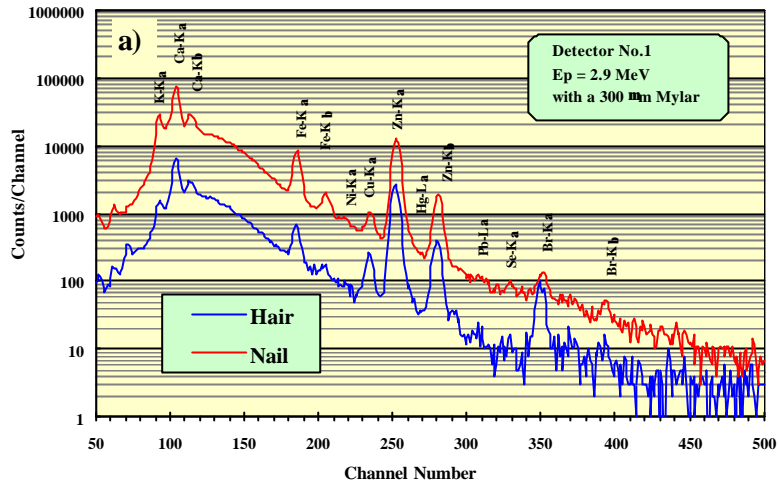


Fig. 2 a-b Comparison of x-ray spectra between hair and nail samples taken from the same person. Fig.2-a was obtained with a 300 μm Mylar and 2-b was without absorber.

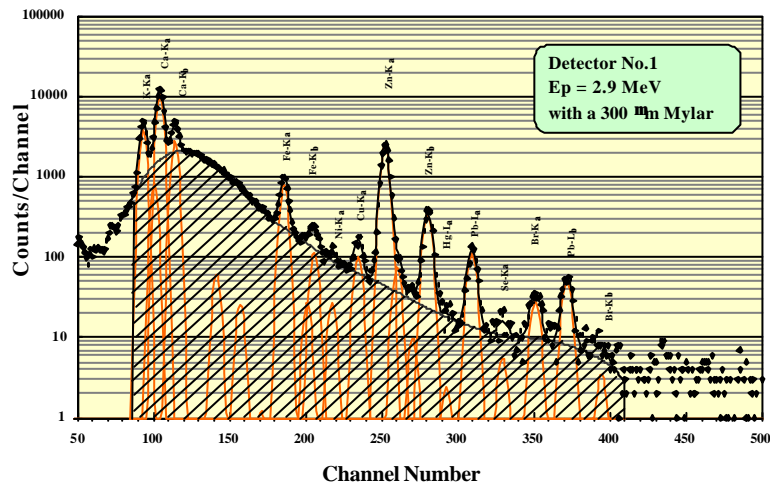


Fig. 3 An x-ray spectrum of a human nail obtained with a 300μm-Mylar absorber. Shaded portion of this figure corresponds to the total yields of continuous x-rays (Y_{CX}).

試料調製においては、幾つかの洗浄方法が試みられた。細くカットした爪試料を アセトンでよく拭いたもの、蒸留水、アセトン中で 60 分間超音波洗浄したもの、さらに 希塩酸中での超音波洗浄を施したものが、PIXE で測定され、最適な洗浄方法が検討された。

3. 無調製尿爪試料定量分析法

図 2-a,b には、同一人物より同一時期に採取された毛髪、及び爪試料からの X 線スペクトルを比較して示す。図 a が 300 μ m Mylar を装着し検出器 1 により測定されたもの、図 b が吸収体無しで検出器 2 により測定されたものである⁶⁾。両者は極めて良く似ており、毛髪と爪の元素組成はほぼ同一であることが確認出来る。特に S と Zn は主構成元素として両試料中に安定して存在することがわかった。これらの事実は、無標準法により Zn 濃度をまず求め、それを内部標準とみなして全元素の定量を行い、S 濃度によりその妥当性を確認するという手順で行われる毛髪に対する「無調製・無標準法」²⁾が、爪試料に対しても適用可能であることを物語っている。

図 3 は、無標準法で使用される連続 X 線収量の領域を示している。毛髪同様 3-14keV 領域の全 X 線が積分され、その領域内のピーク収量を差し引くことにより、全連続 X 線収量 Y_{CX} が求められる。添え字 s で指定される指標元素 (毛髪、爪の場合には Zn) の濃度 C_s は比 $R_s=Y_s/Y_{CX}$ から、変換係数 K_s ($K_s = C_s/R_s$) を用いて求めることができる。ここで Y_s は指標元素のピーク面積である。(変換係数決定までの無標準法手順の詳細は、文献 1 を参照のこと。)

爪試料に対する変換係数 K_s を求めるために、日本人 4 名の爪試料、フィイピンにおける小規模金鉱山鉱夫 2 名の爪試料、計 6 の試料が用いられ、図 1 の条件で調製され無調製法による測定が行われた。次に、照射を行った爪試料を硝酸灰化法により灰化し、それに内部標準を添加することにより、内部標準法による Zn の定量分析が行われた。変換係数 K_s は、無調製試料における Zn に対する比 $R_s=Y_s/Y_{CX}$ と、内部標準法による Zn 濃度とを比較することにより求められた。図 4 に、無調製・無標準法による Zn 濃度と、内部標準法によるそれらとを比較して示す。

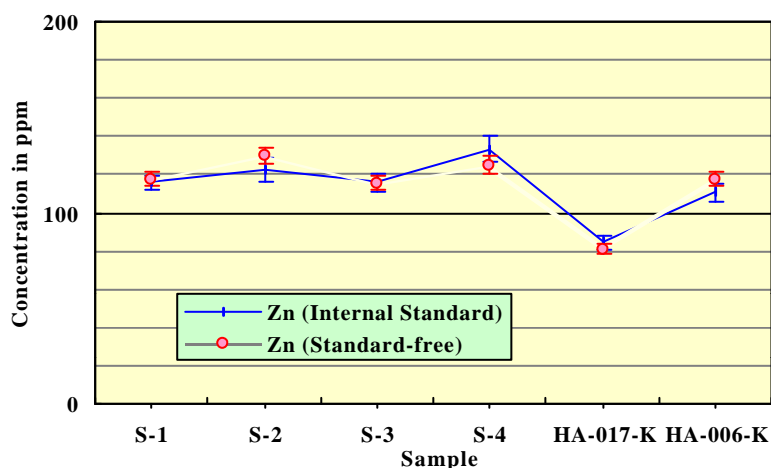


Fig. 4 Comparison of zinc concentration in six nail samples obtained from the present method with that from the internal-standard method.

両者はいずれの場合にも 5%以内で一致しており、本法による Zn 濃度が、多くの爪試料に対して内部標準法による濃度と矛盾がないことが確認された。

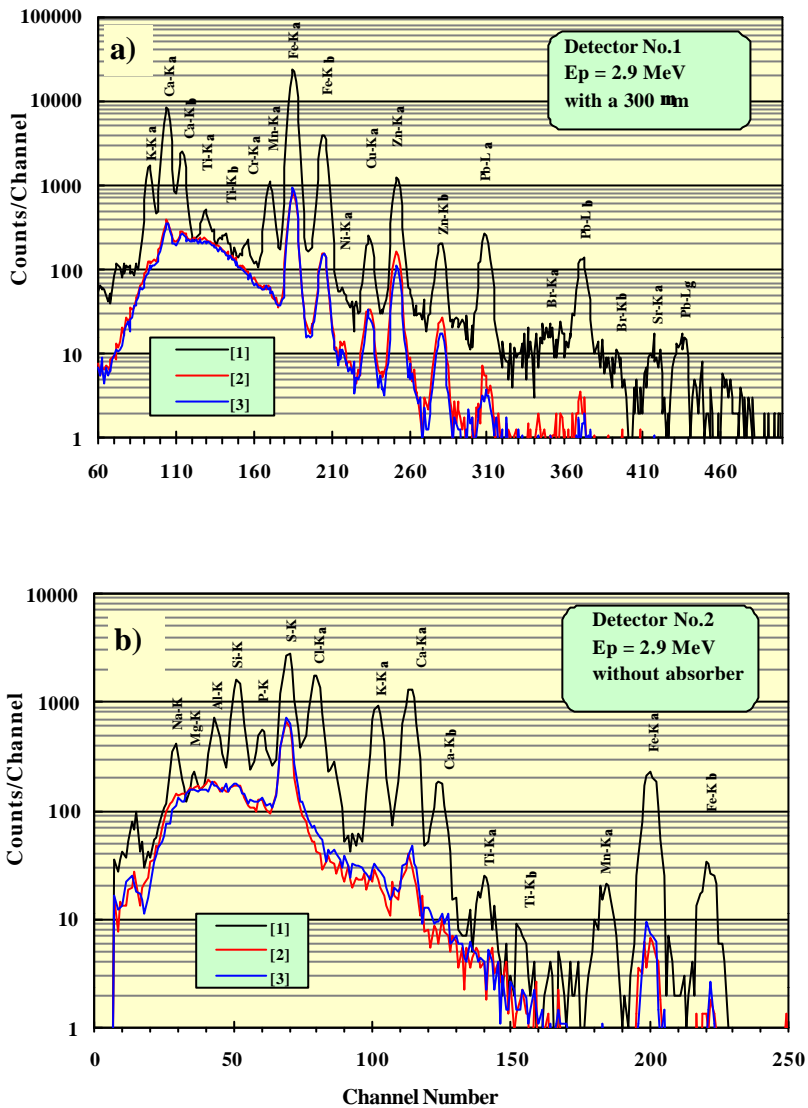


Fig. 6 X-ray spectra of a nail sample showing the effect of washing: [1] wiped with acetone, [2] treated by 60 min. ultrasonic washing in distilled water and [3] further treated by 60 min ultrasonic washing in acetone. These spectra are normalized by the yield of continuous x-rays.

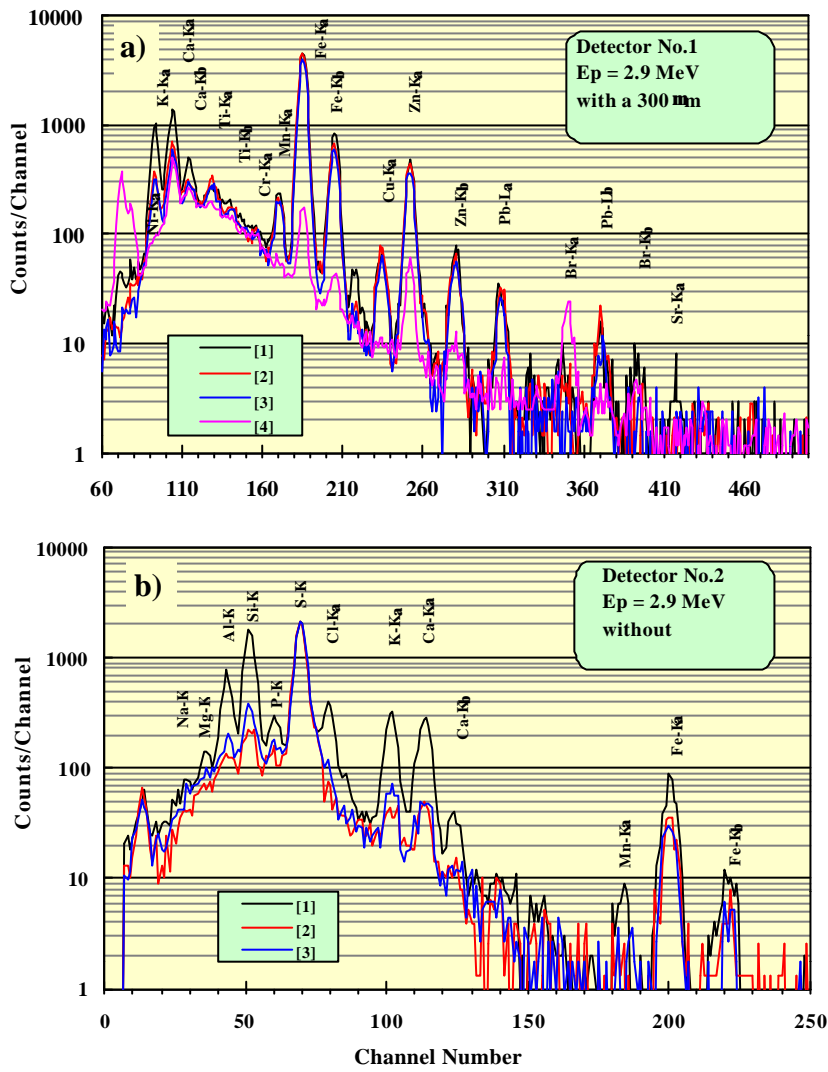


Fig. 7 Same as Fig.6 but for the case where ultrasonic washing is not effective. The sample was further treated by 60 min ultrasonic washing in 30% hydrochloric acid [4].

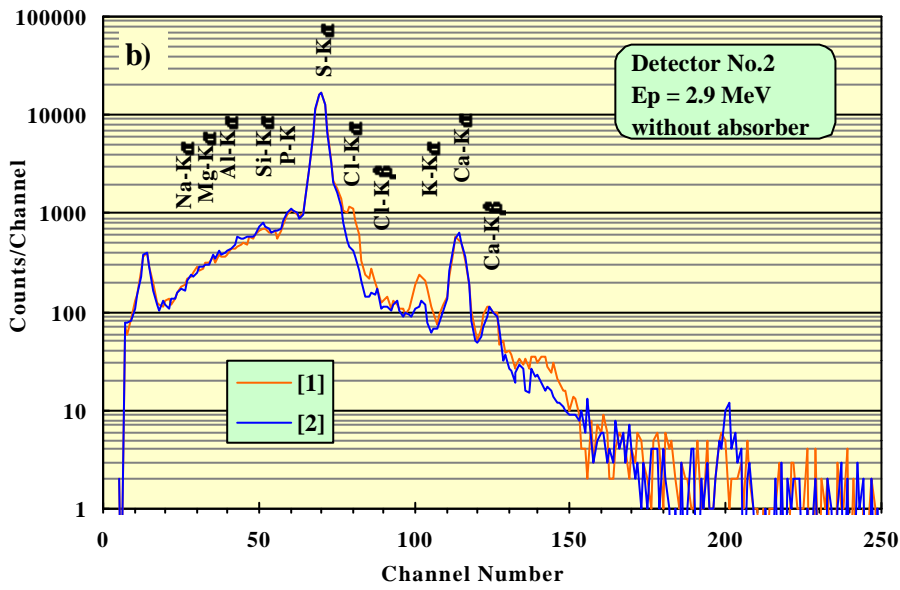
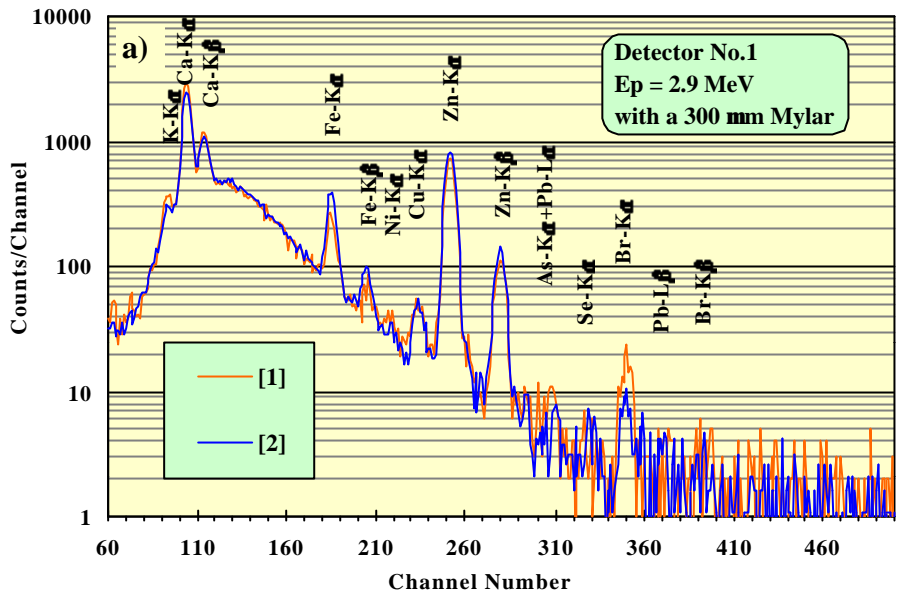


Fig. 8 Same as Fig.6 but for the nail which can be visually cleaned by wiping with acetone: [1] after wiping with acetone and [2] after 60 min ultrasonic washing in dis tilled water.

4. 結果

図5には、同一人物から同一時期に手のそれぞれの指から採取された、10 爪試料中の主要元素濃度を示す。我々の研究により、毛髪中元素濃度の毛根からの距離依存性は、その人物の履歴を反映する貴重な情報を与え得ることが分かった^{5, 7)}。さらに種々の体毛中の元素濃度は、採取位置にあまり大きく依存しないこと、そのため有害元素体内暴露評価は、頭髮以外の体毛でも可能であることが確認されている⁵⁾。しかし図5によれば、爪中微量元素濃度は大きく採取場所に依存することが分かる。しかし亜鉛のみは、常に一定して存在することも確認された。

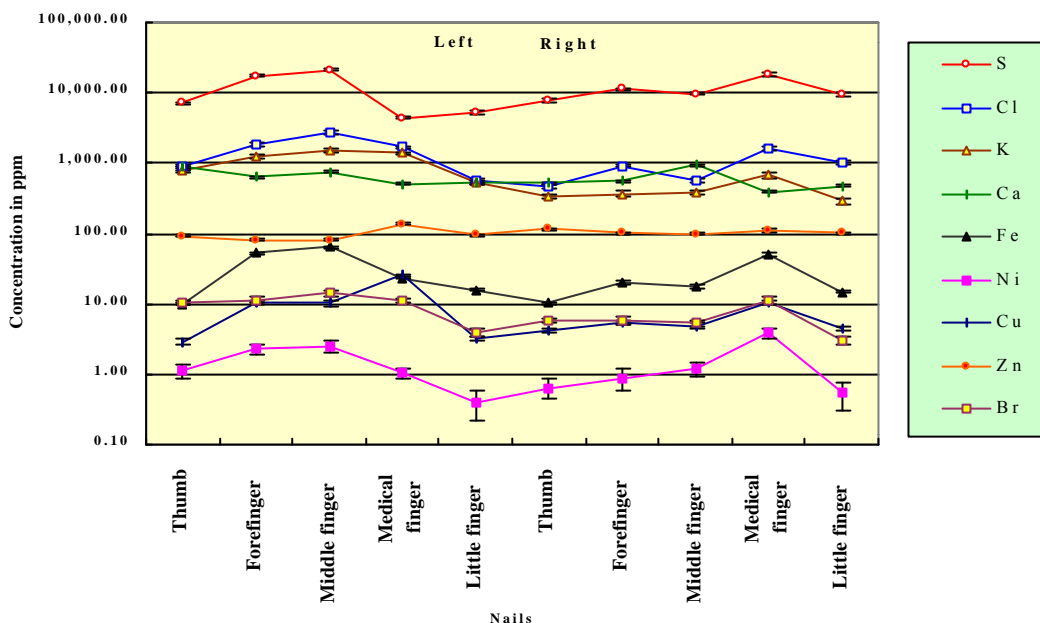


Fig.5 Elemental concentration for several main components obtained from the present method for 10 nail samples taken from the same person.

次に、洗浄法が各元素濃度に与える影響に関して詳しく調べられた。通常の爪試料は、毛髪同様アセトンで丁寧に拭くことにより、見た目がきれいになることを確認することが出来る。しかし、中には拭いたのみでは全く汚れの取れないものもある。このような試料の場合、鉄や亜鉛濃度が時として 1000ppm 以上という値になることも珍しくない。このような高濃度は、爪試料内に存在する元素としては考えられず、表面に付着したコンタミによるものであることは間違いない。特に小規模金鉱山鉱夫の爪は、表面に無数の傷があり、その中に金属紛が埋め込まれているように見えるが、拭いただけでそれを完全に除去することは不可能である。

この問題を解決するために、いくつかの表面汚染のある爪試料に対し、蒸留水中での 60 分の超音波洗浄が施された。その結果を図 6-a,b に X 線スペクトルの比較の形で示す。両者は、無標準法の原理に従い連続 X 線の収量で規格化されている。これらのスペクトルから、殆どの表面汚染が低 Z、高 Z 側とも取り除かれていることが分かる。特に亜鉛濃度は 120ppm になったが、これはほぼ通常の爪試料中の亜鉛濃度に匹敵する。図には、さらに同一試料に対しアセトン中で 60 分間の超音波洗浄を施した結果も示されているが、殆ど変化がなく、蒸留水中での洗浄で十分な効果があることを示している。

しかし中には、蒸留水中での超音波洗浄の効果が殆ど見られない例外的な場合もある。図 7-a,b に示される例においては、洗浄後も依然として極端に高い金属元素のピークが存在して

り、洗浄効果は殆ど認められない。このような試料には表面に無数の傷があり、その中に金属紛が埋め込まれているように見えるが、蒸留水中、アセトン中での超音波洗浄でそれを取り除くことは難しかったものと思われる。特に小規模金鉱山鉱夫の爪にはこのような傷が多く、このままでは正しい有害元素暴露評価が困難なものになってしまう。そのため、酸による汚染除去が試みられた。図 7-a 中の[4]で示されるスペクトルは、30%の塩酸中での 60 分の超音波洗浄後のものであり、殆どの汚染が除去されているように見える。しかしこの場合、爪内部からの元素の漏出を見積もることは極めて難しい。

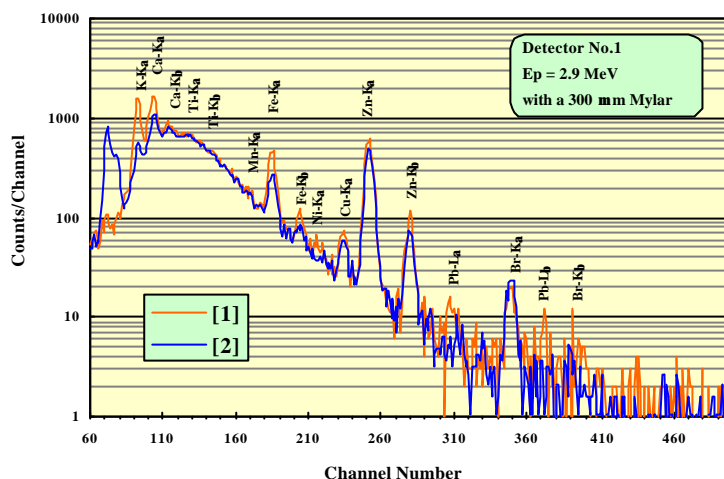


Fig. 9 Comparison of x-ray spectra of a nail sample before [1] and after [2] 60 min ultrasonic washing in 30% hydrochloric acid.

この効果を確認するため、アセトンで拭いただけで見た目がきれいになるいくつかの爪試料を用い、超音波洗浄前後の元素濃度の変化が調べられた。図 8-a,b にその結果をスペクトルの比較の形で示す。この結果から、Cl、K、Br の 3 元素の一部が蒸留水中での超音波洗浄後に失われることが確認できたが、これは毛髪試料の場合と全く同じ結果である⁵⁾。しかしこれらの元素は、有害元素体内暴露評価の研究にとって重要な意味を持つものではない。一方、Zn、Cu、Si、P には変化が見られなかった。図 9 には 30% 塩酸中の超音波洗浄後の濃度変化を示すが、この場合には Ca、Fe、Cu、Zn、Pb が、上述の 3 元素に加えて明確な減少を示した。

5. 議論

図 5 の結果から判断すると、爪試料においては採取位置依存性が極めて大きいことが分かる。この事実は、一箇所から採取された爪試料分析のみで、有害元素の体内暴露を定量的に評価することが難しいことを示している。しかし一方では、亜鉛がどの爪にもほぼ一定して存在し、本法で亜鉛を指標元素に指定した妥当性を確認することができた。図 4 は、無調製爪試料に対する本法の精度、再現性が充分なものであることを示している。X 線の自己吸収が無視できる照射条件を達成するためには、爪をできるだけ細くカットする必要がある。だが図 1 のように被照射部分の厚さが 0.5mm 以下となるような切り方をおこなうことは困難ではない。本法によ

る定量値と、硝酸灰化 - 内部標準法による定量値との比較により、X 線自己吸収効果は少なくとも Al 以上の元素に対して無視できることが確認された。

このような有害元素人体暴露評価のための調査研究は、試料数が膨大になる場合が多く、一度に数百の試料分析が必要になることも珍しくない。そのため、短時間で多くの試料を処理できる方法が考えられなければならない。本法により、試料調製の手順が著しく簡単なものとなり、短時間での大量処理が可能となった。通常有害元素暴露評価のための試料に対する照射時間は、約 5 分前後で充分である。

爪表面に付着したコンタミの問題は、しばしば重要なものとなる。今回の分析により、表面に付着した不純物濃度が、実際に爪内部に存在する濃度の 10 倍以上になるケースもあることが分かった。特に、鉾夫の爪の場合その問題は深刻なものとなり、最適な洗浄法の開発が望まれる。図 6 の結果から、蒸留水中における超音波洗浄は、表面に傷が殆ど見られない爪試料に対しては極めて有効であることが分かった。またこの方法による元素の爪内部からの漏出は、Cl、

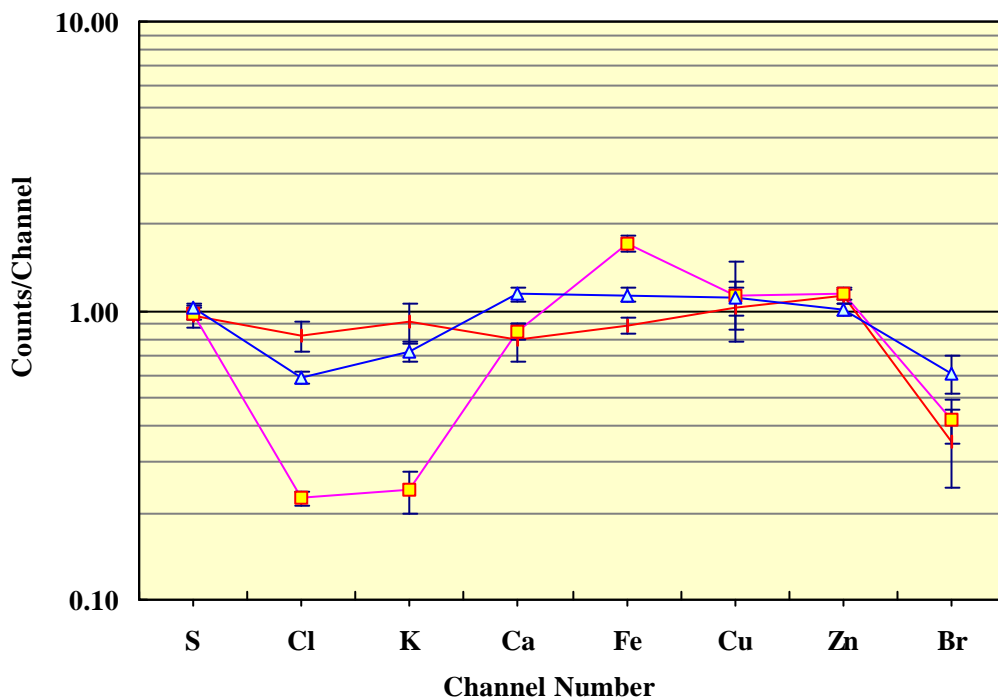


Fig. 10 Changes of elemental concentrations for eight elements in three nail samples after 60 minutes ultrasonic washing in distilled water as ratios to their concentrations before washing.

K、Br の 3 元素以外は無視できることも確認された。図 10 には、3 つの異なる爪試料に対する超音波洗浄前後の、主要 10 元素濃度変化を、洗浄前の値に対する比の形で示す。この図からも、上述の 3 元素以外の漏出は無視可能であることが定量的に確認出来る。この図において、いくつかの元素濃度が洗浄後に僅かに増加しているが、これは洗浄前後において、全く試料の同一場所を同一条件で照射することの困難さによるものである。図 6 の結果から、蒸留水を用いた超音波洗浄の効果は充分で、付加的に行ったアセトン中での洗浄効果は殆ど確認できないこと

もわかった。

しかし中には、超音波洗浄が効果的ではない場合がある。これらの試料は一般に表面に深い傷を持っており、その中に、金属粒のように見えるものが見受けられる。これらの試料に対しては、30%の塩酸中での超音波洗浄が有効であることが確認されたものの、試料中からの元素の漏出も避けられないものと推測される。次のステップとして、注目元素である水銀や砒素が、この洗浄法によりどの程度漏出するかを確認したい。その目的のために、砒素や水銀を多く含む爪試料を探しているところである。

60分間の蒸留水中での超音波洗浄が多くの爪試料に対し効果的であることがわかったが、それだけでは不十分な場合もあり、総合的な洗浄法のガイドラインを確立することが必要である。また、それに伴う元素の漏出の見積もりも、さらに詳しく行われなければならない。また一方では、爪試料中元素濃度の試料採取位置依存性はきわめて大きく、一本の爪のみで有害元素体内暴露評価を行うことは難しい。さらに、足の爪に多く見られるように痛んだり変色したりしている爪の場合には、蛋白の変性によりマトリクスが大きく変化し、健康な爪に対する変換係数が応用できないことも確認された。このように、爪試料分析による暴露評価法の方法論自体にも、大きな不確定要素が存在する。しかし昨年(2017年)の第6回 ICMGP(6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant)においても、「人によっては毛髪の5倍にのぼる水銀の蓄積が爪中に見られた」との例も報告されている。また我々のこれまでの研究により、毛髪中 vs. 爪中水銀濃度比が、水銀の化学形に依存して変化する可能性がある、との感触も得られている。その様な観点から、有害元素人体暴露評価のためには、爪試料分析も重要な情報を提供するものと言える。本法により、多量の爪試料を一度に分析することが可能となった。さらに本法は、灰化時の揮発性元素の漏出や試料の汚染等の不確定要素を完全に排除するものであり、本法を基礎とすることにより、洗浄法の確立や採取位置依存性など分析以前の不確定要素の詳細な検討が可能となるものと期待される。

6. おわりに

現在、我々と多くの機関との協力における国際調査研究プロジェクトが継続中でありそれらは、「中国における砒素汚染の調査研究(研究者: 聖マリアンナ医大山内助教授等、分析対象: 毛髪、尿、飲料水)」⁸⁾、「バングラデッシュにおける砒素汚染調査研究(研究者: 大阪市立大三尾野助教授、A.ハビブ博士等、分析対象: 毛髪、爪)」⁴⁾、「フィリピン、モンゴルの小規模金鉱山における水銀汚染調査研究(研究者: 産業技術総合研究所村尾主任研究員等、分析対象: 毛髪他)」^{9,10)}、「カザフスタンの子供達の風土病に関する広域的調査研究(研究者: 順天堂大千葉助教授、分析対象: 毛髪等)」、「中国の石炭燃焼地域における有害元素体内暴露調査研究(研究者: 大妻女子大桜井教授等、分析対象: 毛髪)」などである。このうち「小規模金鉱山」における水銀汚染では、世界中で100万人を超える人々が水銀、鉛、マンガン等の有害元素汚染の危険にさらされており、中国の砒素問題では200万人近く、さらにバングラデッシュの砒素汚染問題では2000万人近くの人々が、今現在砒素中毒に苦しんでいる。桜井教授によるエアロゾル経路の人体暴露評価の研究においても、経口摂取の場合を上回る高濃度砒素が、多数の人の毛髪中から検出されている。爪試料は毛髪試料や尿試料と並び、サンプリングに医師の立会いを必要とせず、人体に苦痛を与えることなく簡単に試料採取を行うことが出来る。毛髪と比較し不確定要素は大きいものの、やはり有害元素体内総暴露量評価のツールとしての爪試料分析は、重要な位置を占めていくものと期待される。

なお、本研究の内容は文献11にまとめられ、投稿が行われている。

謝辞

共同利用の円滑な運営のために日々献身的な働きをしておられる日本アイソトープ協会 NMCC のスタッフの方々、及び岩手医大サイクロトロンセンターのスタッフに謝意を表します。特に日本アイソトープ協会斉藤義弘主任には、いろいろな面で技術的協力をしていただきました。感謝いたします。

参考文献

1. Standard-free Method of Quantitative Analysis for Bio-samples.
K.Sera, S.Futatsugawa, K.Matsuda and Y.Miura
Int'l Journal of PIXE Vol. 6-3,4 1996 (467-481)
2. Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples.
K.Sera, S.Futatsugawa and K.Matsuda
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 150 1999 (226-233)
3. 無調製尿試料のための定量分析法の開発
世良耕一郎、ニッ川章二、三浦吉範
本報文集
4. Study of Toxic Arsenic in Bangladesh by PIXE Analysis
M. A. Habib, S. Miono, S. Futatsugawa and K. Sera
Annual Report of NMCC Vol. 8 2001 (167-173)
5. Quantitative Analysis of Untreated Hair Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.
K.Sera, S.Futatsugawa and S.Murao
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B189 2002 (174-179)
6. Bio-PIXE at the Takizawa Facility. (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron.)
K.Sera, T. Yanagisawa, H.Tsunoda, S.Futatsugawa, S.Hatakeyama, Y.Saitoh, S.Suzuki and H.Orihara.
International Journal of PIXE Vol.2, No.3 (1992) 325-330
7. 毛髪が語るあなたの履歴と健康 -私たちの生活に密着したPIXEの応用例 -
世良耕一郎
放射線と産業 第86号 特集“生活に身近なイオンビーム利用” 6月号(2000) 4-9
8. 中国における慢性砒素中毒の発生機序、生体影響、改善方法、そして予防対策に関する研究結果と今後の対応について
山内博 他
慢性砒素中毒に関する日中国際学術研究班報告 2000年10月
9. PIXE measurement of human hairs from a small-scale mining site of the Philippines.
S. Murao, E. Daisa, K. Sera, V. B. Maglambayan and S. Futasugawa 2. E.Clayton
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B B 150 1999 (in press)
10. Preliminary PIXE measurement of human hairs from small-scale mining sites of the Philippines
K.Sera, S.Futatsugawa, S.Murao, K.Tanno, E.B.Daisa, V.B.Maglambayan and H.Cabria
Proceedings on The 12th Annual Geological Convention “Geology Challenges in the 21st Century”,
December 1999, (Manila)
11. Quantitative Analysis of Untreated Nail Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.
K.Sera, S.Futatsugawa, S.Murao and E.Clemente
Submitted to Int'l Journal of PIXE