

- 血液中のメトヘモグロビン (Met-Hb) の測定法

芳香族ニトロ・アミノ化合物 (アニリン, ニトロベンゼン, パラニトロクロルベンゼン等) などの有害化学物質に暴露されると, 血中のヘモグロビンの酸化が異常に促進され, Met-Hb 血症を起こす。健康被害危機事例発生時において, 血液中のMet-Hb測定は, a) 該当化学物質への曝露の有無の判定, b) 曝露量の推定, c) 生体影響の推定, d) 曝露後の経過・回復をみるための指標などとして役立つ。本項では, 1) Met-Hb血症の概要と測定事例, 2) Met-Hbの測定法, 3) 測定にあたっての留意点などを記述する。

1) Met-Hb 血症の概要と測定事例

Met-Hb はヘモグロビンの鉄が 2 価 (Fe^{2+}) の状態から 3 価 (Fe^{3+}) の状態になったもので, 暗赤褐色の独特の色調を示す。Met-Hb は正常の人のヘモグロビン中にも常時生成されているが, 赤血球内の還元酵素 (Met-Hb reductase, G6PD) で常に還元されており, 正常人の血中には 1 % 前後検出されるにすぎない。先天性の Met-Hb 血症は上記酵素の欠損によるものである。

事故や犯罪などによる Met-Hb 血症は, 化学物質の体内吸収によって, ヘモグロビンの酸化が異常に促進された状態で起こる。Met-Hb 血症を起こす化学物質としては, 芳香族ニトロ・アミノ化合物 (アニリン, ニトロアニリン, アミノフェノール, クロルアニリン, ニトロベンゼン, ジニトロベンゼン, ニトロクロルベンゼン, クロロジニトロベンゼン, ニトロフェノールなど) がよく知られている。また, 生後 6 ヶ月以内の新生児期では消化器中で, 硝

酸塩が亜硝酸塩に還元されて吸収され Met-Hb 血症を引き起こす。そのため, 水道水中の基準として硝酸性窒素と亜硝酸性窒素の合計が 10mg/l 以下と定められている。

成人における Met-Hb 量と症状の関係は表 1 に示すとおりである。

我々は, 1984 年にパラニトロクロルベンゼン (PNCB) 被曝者の Met-Hb 測定を継続し経過観察した。当該事例では Met-Hb が 66.7% に達し, 意識を失い危篤状態となったが, 交換輸血によって一命をとりとめた。本事例は, 紙袋入り PNCB をモッコに積みクレーンで吊り下げて船積みしていたところ, 袋が破れて頭上から PNCB を浴び, 作業衣, 皮膚などに付着したものが主として経皮吸収によって体内に取り込まれたものと推測されている。このように芳香族ニトロ・アミノ化合物の多くは経気道のみならず経皮吸収がみられるものが多く, 速やかな脱衣と身体洗浄等の処置が大切である。

表 1 . 血中のメトヘモグロビン (Met-Hb) 量と症状との関係

Met-Hb 量	症 状
10%まで	全く無症状
10 ~ 25%	チアノーゼが現れるがほとんど無症状
25 ~ 35%	チアノーゼが著明になる
35 ~ 40%	運動により頭痛, めまい, 疲労, 呼吸困難, 頻脈等を起こす
40%以上	酸素欠乏症が出現する
50 ~ 60%	意識喪失, 痙攣を起こす
60 ~ 75%以上	昏睡状態で生命の危険を招く

2) 測定法

【測定原理】PH6.6におけるMet-Hbの吸光度は630nmで最大であり，シアンメトヘモグロビンの吸光度は540nmで最大となり630nmでは吸収を示さない。血液中のMet-Hbはシアン化ナトリウムを添加することによってシアンメトヘモグロビンに変換される。したがって，シアン化ナトリウム添加前後の630nmでの吸光度の差はMet-Hbの吸光度を表しており，Met-Hb濃度と比例する。

1. 試薬とその調整

1) M/10燐酸緩衝液(PH6.6)

M/10-KH₂PO₄：燐酸一カリウム(KH₂PO₄) 13.62gを蒸留水に溶かして1000mlとする。
M/10-Na₂HPO₄：燐酸二ナトリウム(Na₂HPO₄)17.82g(Na₂HPO₄-12H₂Oならば35.81g)を蒸留水に溶かして1000mlとする。

〔 〃 : 〃 = 62.5 : 37.5 〕の割合で混合したのち，PHメーターを用いて， または の溶液でPHを6.6に調整する。

2) 20%フェリシアン化カリウム水溶液：フェリシアン化カリウム2gを蒸留水に溶かして10mlとする（密閉して冷暗所で保存すれば長期間安定）。

3) 5%シアン化ナトリウム水溶液

4)シアン化ナトリウム0.5gを蒸留水に溶かして10mlとする（密閉して冷暗所に保存すれば約1ヶ月保存可）。

5) 臨床検査用ヘモグロビン測定キット（シアンメトヘモグロビン法）

2. 器具・機械

1)ヘパリン加採血管（血液 1ml に対し，ヘパリン 0.1～0.2g）。

2) 50ml ネジ蓋付きプラスチック遠心管（FALCON Conical Tubesなど）。

3) 10ml試験管。

4) 200 μl用マイクロピペット。

5) 50 μl用マイクロピペット。

6) 分光光時計。

7) pHメーター。

8) 遠心分離器。

3. 測定操作

1) 50mlネジ蓋付きプラスチック遠心管に蒸留水16.0mlをとる。

2) ヘパリン加採血管に採血した全血200μlを1)に加え，蓋をして転倒混和して，約30分室温に放置し，完全に溶血させる（採血後直ちに希釈する場合は抗凝固剤（ヘパリン）を使用しなくてもよい）。

3) M/10燐酸緩衝液(PH6.6)4.0mlを加え，転倒混和する。

4) 3000rpmで10分間遠心分離する。

5) 3本の試験管に上清を5mlずつ分注する（遠心管に残った上清を試料 とし，分注したものをそれぞれ試料 ， ， とする）。

6) 試料 について630nmおよび680nmの吸光度を測定する（ $L_1 = OD_{630} - OD_{680}$ ）。

7) 試料 に5%シアン化ナトリウム水溶液を1滴(50 μl)加え，630nmおよび680nmの吸光度を測定する（ $L_2 = OD_{630} - OD_{680}$ ）。

8) 試料 および に20%フェリシアン化カリウム水溶液を1滴（50 μl）加え，30分間放置する。

9) 試料 の630nmおよび680nmの吸光度を測定する（ $L'_1 = OD_{630} - OD_{680}$ ）。

10) 試料 に5%シアン化ナトリウム水溶液1滴(50 μl)を加え，630nmおよび680nmの吸光度を測定する（ $L'_2 = OD_{630} - OD_{680}$ ）。

11) Met-Hb (%) の計算：上述の 6) 7) 9) 10) で得た L_1, L_2, L'_1, L'_2 を下記の計算式に代入して，総ヘモグロビン中に占めるMet-Hbの比率 (%) を求める。

$$\text{メトヘモグロビン (\%)} = \frac{(L_1 - L_2)}{(L'_1 - L'_2)} \times 100$$

12) Met-Hbの総量 (g/dl) を知る必要がある場合には、別途、市販の臨床検査用ヘモグロビン測定キットを使用して総ヘモグロビン量 (g/dl) を測定する。ここで得た総ヘモグロビン量 (g/dl) と 11) で得たMet-Hb (%) とから、次式を用いて総Met-Hb量 (g/dl) を求める。

$$\text{総メトヘモグロビン量 (g/dl)} = \text{Met-Hb (\%)} \times \text{総ヘモグロビン量 (g/dl)} \times 0.01$$

3) 測定にあたっての留意点

- 1) 採血後直ちに、測定操作の 2) または 3) の操作まで実施し、溶血液又は溶血緩衝液を氷冷保存する(採血後Met-Hbが形成されることがあるが、溶血後は比較的安定である。凍結するとMet-Hbが多量に形成されるので、やむをえず全血で保存する場合にも凍結せず氷冷保存する)。
- 2) 5%シアン化ナトリウム水溶液を添加すると、吸光度のベースが若干低下するのでプラスの誤差を生じ、Met-Hb量が少ない場合

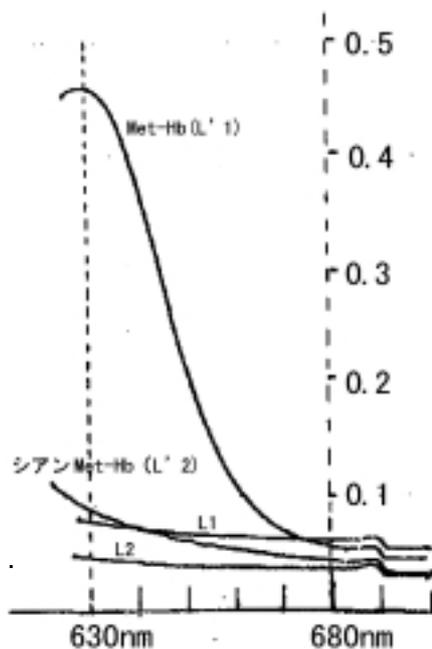


図 1.

メトヘモグロビンおよびシアンメトヘモグロビンの吸収曲線

には無視できない。Met-Hbにもシアンメトヘモグロビンにも吸収を持たない680nmでの吸光度と630nmでの吸光度を同時に測定し、630nmでの吸光度と680nmでの吸光度の差を、それぞれ L_1 、 L_2 、 L'_1 、 L'_2 として計算する。

- 3) L_1 と L_2 を交互に測定する場合、セルにシアン化ナトリウムが残留しないように十分洗浄しなければならない。
- 4) Met-Hb (L'_1)、シアンメトヘモグロビン (L'_2)、低濃度サンプルの L_1 および L_2 の吸収曲線は左下の図 1 の如くである。

文 献

- 1) 労働省労働基準局補償課編：労災保険業務上疾病の認定基準と主な関連通達集、労働基準行政普及会(1978)
- 2) 田淵武夫，原一郎，南正康：芳香族ニトロ・アミノ化合物取り扱い作業者の曝露評価（ジアゾ反応陽性物質を中心に）．大阪府立公衛研所報労働衛生編，21(1983)
- 3) 田淵武夫，原一郎，南正康，山城久和：港湾荷役作業者における急性パラニトロクロルベンゼン中毒例．大阪府立公衛研所報労働衛生編(1985)
- 4) 三浦豊彦 他 編「現代労働衛生ハンドブック増補改訂第2版本編」．(財)労働科学研究所出版部(1994)