

# ポルフィリンの吸光特性を用いた 重金属分析技術の開発

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生命産業科学専攻

博士（生物工学）学位論文

浅野 貴春

## 目次

<b>第1章 緒論</b>	
1.1 背景と目的	.....1
1.2 ポルフィリンの吸光特性	.....2
1.3 測定対象の重金属について	.....2
1.3.1 鉛	.....2
1.3.2 カドミウム	.....3
1.3.3 水銀	.....3
1.3.4 亜鉛	.....4
1.3.5 銅	.....4
1.3.6 コバルト、マンガン及びニッケル	.....4
1.3.7 銀およびビスマス	.....5
1.4 本論文の構成	.....5
<b>第2章 ポルフィリン導入ポリマーを用いた重金属の多成分測定</b>	
2.1 はじめに	.....7
2.2 実験方法	.....7
2.2.1 試薬	.....7
2.2.2 ポルフィリン導入ポリマーの合成	.....8
2.2.3 測定試薬および金属イオン溶液の調製	.....9
2.2.4 差スペクトルの測定	.....10
2.3 結果および考察	.....10
2.3.1 ポルフィリン導入ポリマーの性状	.....10
2.3.2 各金属との反応性	.....11
2.3.3 金属混合溶液中の各金属イオンの測定	.....12
2.3.4 その他の金属との反応性	.....13
2.3.5 実試料の測定	.....13

2.4	まとめ	……14
-----	-----	------

### 第3章 飛灰溶出液中の鉛簡易測定法の開発

3.1	はじめに	……27
3.2	実験方法	……28
3.2.1	試薬および試料	……28
3.2.2	鉛測定試薬の調製	……28
3.2.3	飛灰溶出液および模擬溶出液の調製	……29
3.2.4	比色反応の測定方法	……29
3.2.5	鉛簡易測定装置の構成と測定操作	……30
3.3	結果および考察	……30
3.3.1	PP-AAmの比色反応の条件検討	……30
3.3.2	Pb-100を用いた時間差スペクトルの測定	……31
3.3.3	Pb(II)測定時における $\Delta A_{466}$ へのCa(II)の影響	……32
3.3.4	Pb(II)測定時におけるZn(II)の影響とマスク剤の効果	……32
3.3.5	最適化された鉛測定試薬の性能	……33
3.3.6	妨害イオンの許容限界	……34
3.3.7	飛灰溶出液中のPb(II)濃度測定	……35
3.4	まとめ	……35

### 第4章 パラメータ設計を用いた鉛測定試薬の組成最適化

4.1	はじめに	……49
4.2	実験方法	……50
4.2.1	試薬	……50
4.2.2	鉛測定試薬および検液の調製	……50
4.2.3	因子の割り付けと測定方法	……51
4.3	結果および考察	……52
4.3.1	土壌溶出液の成分	……52

4. 3. 2	直交表実験	.....52
4. 3. 3	最適条件の選定と確認実験	.....53
4. 3. 4	最適化された試薬の有用性	.....54
<b>第5章 メタロチオネイン解離亜鉛の吸光検出に基づく重金属毒性の評価方法</b>		
5. 1	はじめに	.....62
5. 2	実験方法	.....63
5. 2. 1	試薬	.....63
5. 2. 2	金属イオンと試料溶液	.....64
5. 2. 3	Zn-MT から解離した Zn(II)の吸光検出	.....64
5. 2. 4	Zn-MT に結合した Cd(II)の検出	.....64
5. 2. 5	重金属毒性試験	.....65
5. 3	結果	.....65
5. 3. 1	Bi(III)によって Zn-MT から解離した Zn(II)の吸光検出	.....66
5. 3. 2	反応条件の検討	.....66
5. 3. 3	夾雑成分の影響	.....67
5. 3. 4	様々な金属イオンによる Zn-MT からの Zn(II)の解離	.....67
5. 3. 5	重金属毒性評価におけるバイオアッセイとの比較	.....68
5. 4	考察	.....68
<b>第6章 統括および展望</b>		.....83
要約		.....88
付記		.....91
謝辞		.....93
参考文献		.....94

## 第1章 緒論

### 1.1 背景と目的

重金属は、様々な製品に使用されている一方で、生物にとって有害な環境汚染物質でもある<sup>1-3)</sup>。河川水、海水、地下水、土壌および底質といった広範囲に渡って、今日の産業活動による重金属汚染が観測されている。そのような地域に生息する動物や植物には重金属が蓄積する傾向があり、それを人が食すれば健康に重大なダメージを与えることとなる。このような背景から、環境中の重金属濃度を規制する基準値が設定されるに至った。これらを順守するための重金属分析技術の開発は、重金属汚染による健康被害を未然に防ぎ、環境を保全する上で重要である。環境試料の重金属分析には、フレイム原子吸光分析装置 (FAAS)、電気加熱原子吸光分析装置 (ETAAS)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) 及び誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) といった分析機器が広く一般に用いられている。これらは、高感度且つ高精度に重金属を分析できるため、基準値の判定を行う際の公定法としても採用されている。しかしながら、(a) 装置自体が大型であるだけでなく、(b) アルゴンガスやアセチレンガスを安全に供給するための排気・配管といった設備を要する、(c) 複雑な操作を必要とする、等の特徴を有するラボ用の分析機器であり、オンサイトでの分析には適していない。そのため、採取した環境試料を一旦ラボに持ち帰ることとなり、分析結果を得るまでの迅速さも損なう。また、大型の機器を使用しない分析法であっても、夾雑成分の影響を除去し正確な測定値を得るために、試料の複雑な前処理を要するものは簡易性を損なうこととなる。さらに、環境分析や環境調査においては、個々の金属濃度に加えて、重金属による毒性を総合的に評価したい場合もある。そのような場合、供試生物に試料を曝露して生理活性を測定するバイオアッセイが利用されているものの、供試生物の取り扱いと操作には熟練した技術や相応の設備を要するため、簡易性および可搬性には優れていない。

この現状を踏まえ、本研究では、様々な夾雑成分を含む試料溶液中の重金属濃度および重金属毒性をオンサイトで簡易に測定できる分析法の開発を目的に種々検討

を試みた。

## 1.2 ポルフィリンの吸光特性

近年、重金属をオンサイトで簡易に分析するために、小型蛍光 X 線分析装置、ポルタンメトリ分析計<sup>4,5)</sup> 又はイムノアッセイ法<sup>6,7)</sup> といった様々な重金属分析技術が開発されている。一方、簡易分析法として、吸光光度法は古くから用いられてきた。現在、吸光光度法に使用する吸光度計および分光光度計は理化学機器として広く普及し、小型で安価なものがすでに市販されている（簡易なオンサイト分析法を開発するうえで有望である）。

吸光光度法において、測定対象の重金属と錯体を形成し、発色あるいは変色する指示薬を比色試薬と呼ぶ。ポルフィリンは、ポルフィリン環を有する化合物の総称であり、様々な重金属と錯体を形成する優れた比色試薬である<sup>8,9)</sup>。ポルフィリン及びその誘導体は、血液中のヘモグロビンに含まれるヘム、光合成を行うクロロフィル及びビタミン B<sub>12</sub> 等といった自然界由来の天然物として見出されたが、現在では化学的に合成できるようになり、様々なポルフィリンが市販品として入手できる。ポルフィリン及びポルフィリン環の中心に金属が配位した金属ポルフィリンの吸収スペクトルは、ソーレー帯と呼ばれる極めて強力な吸収ピークを紫外可視光領域に示すため、錯体形成に伴い鋭敏な吸光度変化を示す。このような吸光特性は、ポルフィリン骨格の環状構造に由来する。

本研究では、ポルフィリンを比色試薬とした吸光光度法に基づく重金属分析法の開発を試みた。

## 1.3 測定対象の重金属について

### 1.3.1 鉛

鉛は、蓄電池、塗料、ガラス及び水道管等に使用されている。アンチノック剤としてテトラエチル鉛を含む有鉛ガソリンは現在使用が禁止されているものの、有鉛ガソリン

に由来する鉛汚染が途上国を中心に現在でも観測される<sup>10)</sup>。日本では、環境基準 (0.01 mg/L)、排水基準 (0.1 mg/L)、土壌含有基準 (150 mg/kg)、土壌溶出基準 (0.01 mg/L) 及び埋立基準 (0.3 mg/L) 等が設定されている。電気電子機器への特定有害物質の含有を禁止するRoHS指令 (2006年7月に施行) により、EU向け製品には原則として鉛を使用できなくなった。鉛による人体への影響については、造血系の障害がよく知られている<sup>3)</sup>。ヘムの合成材料となるポルフィリンの合成を触媒する $\delta$ -アミノレブリン酸脱水酵素のSH基には亜鉛が結合しているが、そこへ鉛が結合し正常な活性を阻害する<sup>11)</sup>。さらに、神経系、腎臓および幼児の脳への障害の他、発ガン性も疑われている<sup>1)</sup>。

### 1.3.2 カドミウム

カドミウムは、電池、めっき、蛍光剤および塗料等に用いられる。日本では、環境基準 (0.01 mg/L)、排水基準 (0.1 mg/L)、土壌溶出基準 (0.01 mg/L)、土壌含有基準 (150 mg/kg) 及び埋立基準 (0.3 mg/L) 等が設定されている。米への含有が問題となることも多く、米のカドミウム残留基準値は1 mg/kgである。鉛と同様にカドミウムもRoHS指令により、EU向け製品への使用は控えられた。カドミウムによる人体への影響は、とくに腎臓および肝臓で早期に認められる。イタイイタイ病の原因物質でもあった。カドミウムは化学的な性質が必須元素の亜鉛と類似することから、亜鉛運搬経路を通して細胞内に取り込まれると考えられている<sup>12)</sup>。また、カドミウムは、アルコール脱水酵素、カルボキシペプチダーゼ、炭酸脱水酵素、 $\delta$ -アミノレブリン酸脱水酵素、SOD及びカルモジュリンといった様々な金属酵素内の金属と置換し、正常な活性を阻害すると考えられている<sup>13)</sup>。

### 1.3.3 水銀

水銀は、体温計、水銀灯および触媒等に用いられる。水俣病の原因金属であり、極めて毒性が強い。そのため、環境基準 (0.0005 mg/L)、排水基準 (0.005 mg/L)、土壌溶出基準 (0.0005 mg/L)、土壌含有基準 (15 mg/kg) 及び埋立基準 (0.005 mg/L) 等において厳しい基準値が設定されており、RoHS指令の規制対象でもある。

常温で液体の金属水銀、有機および無機水銀といった多様な化学形態を示し、様々な経路で生体内に取り込まれる可能性がある。数多くの酵素タンパク質の SH 基に結合し、活性を阻害するが、とくに細胞膜に局在する酵素と相互作用し、細胞膜の透過性を変えることが知られている<sup>3)</sup>。

#### 1. 3. 4 亜鉛

亜鉛は、各種金属材料やめっき等に用いられる。多くの生物にとって必須微量元素であり、遷移金属としては細胞内の含有量が鉄の次に多い。亜鉛を含む酵素（亜鉛酵素）はすでに 200 種類以上見出されており、活性中心や構造維持に亜鉛を配している<sup>14)</sup>。赤血球中の亜鉛のほとんどは、炭酸脱水酵素として存在し、ヒスチジン由来のイミダゾール窒素 3 つと水分子 1 つに囲まれている。カルボキシペプチダーゼでは、ヒスチジン由来のイミダゾール窒素 2 つ、グルタミン酸由来のカルボキシル基 1 つ及び水分子 1 つが亜鉛に配位している。アルコール脱水素酵素では、ヒスチジン由来のイミダゾール窒素 1 つ、システインの S が 2 つ及び水分子 1 つが亜鉛に配位している。その他にも、タンパク質内のシステインの S やヒスチジン由来のイミダゾール窒素に亜鉛が配位したジンクフィンガーと呼ばれる特徴的な構造は、転写因子の DNA 結合部位を形成するなど多彩な機能を担っている。このように、亜鉛は生物にとって重要な元素であるが、過剰又は長期摂取は有害であるため、環境基準 (0.03 mg/L) 及び排水基準 (2 mg/L) が近年強化された。

#### 1. 3. 5 銅

銅は、電線や各種金属材料に用いられる。必須微量元素であり、銅を含む酵素、タンパク質 (SOD、シトクロム酸化酵素等) が多数見つかっている<sup>14-16)</sup>。過剰な摂取は有害であるため、排水基準 (3 mg/L) が設定されている。

#### 1. 3. 6 コバルト、マンガン及びニッケル

これらの金属は、合金材料、電池および触媒等に用いられる。これらの高濃度溶液は水生生物に毒性を及ぼす<sup>15, 16)</sup>。とくにニッケルカルボニルの毒性は強い。マンガン

は排水基準 (10 mg/L) が設定されている。

### 1. 3. 7 銀およびビスマス

銀およびビスマスは、細菌類に対する毒性が強く、抗菌剤として用いられる。次硝酸ビスマスは、整腸剤としても知られている。

上記のように、環境中への重金属の過剰な流出は生物にとって有害であり、環境に関する基準値が定められているものも多い。本研究では、上記の金属を簡易に分析・検出する方法の開発を目的とする。

## 1. 4 本論文の構成

第 1 章では、本研究の背景と目的を述べた。ポルフィリン及び測定対象となる重金属の概要を解説した。

第 2 章では、複数の重金属を同時に測定する方法について述べた。具体的には、ポルフィリン化合物をポリマー鎖に導入したポルフィリン導入ポリマーを合成し、金属イオンとの錯体形成に伴う吸収スペクトルの多様な応答を利用した重金属の多成分測定法を検討した。

第 3 章では、焼却飛灰溶出液中の鉛簡易分析法の開発について述べた。具体的には、第 2 章で合成したポルフィリン導入ポリマーの一つを比色試薬として用い、飛灰溶出液中の妨害成分の影響を受けにくい鉛測定試薬を開発した。また、専用の鉛測定装置を開発することで測定操作の更なる簡易化を図り、実用的な鉛簡易分析法の構築を試みた。

第 4 章では、第 3 章と同じく鉛を測定対象としたが、より広範な試料に適用できる鉛測定試薬の開発について述べた。具体的には、品質工学の分野で多用されているパラメータ設計を用いて、水溶性ポルフィリンと複数のマスクング剤から成る鉛測定試薬の組成を最適化した。

第 5 章では、重金属毒性を総合的に評価する方法について述べた。具体的には、

生体内においてメタロチオネインが有害金属を捕捉し無毒化する仕組みに着目し、メタロチオネインから解離した亜鉛を水溶性ポルフィリンで吸光検出する重金属毒性の評価方法を開発した。本法と発光細菌によるバイオアッセイの両者による毒性評価を行い、結果を比較検討した。

最後に第 6 章では、本論文を総括し、今後の課題および展望を述べた。

## 第2章 ポルフィリン導入ポリマーを用いた重金属の多成分測定

### 2.1 はじめに

水溶液中の金属イオンを簡易且つ高感度に定量するための比色試薬として、ポルフィリン骨格の周辺にスルホン酸基やカルボキシル基等の官能基を修飾した水溶性ポルフィリンが合成され、現在では市販品として入手できる。これまで、水溶性ポルフィリンは、カドミウム (Cd(II))<sup>17-20)</sup>、コバルト (Co(II))<sup>21)</sup>、銅 (Cu(II))<sup>22-25)</sup>、マンガン (Mn(II))<sup>26)</sup>、鉛 (Pb(II))<sup>27-32)</sup> 及び亜鉛 (Zn(II))<sup>33-36)</sup> といった様々な金属イオンの吸光度法に適用されてきた。しかしながら、これらの金属イオンが水溶性ポルフィリンに配位した金属ポルフィリン錯体は、ソーレー帯由来の吸収ピークが互いに重なるため、各ピーク波長の吸光度から多種類の金属を同時に測定することは難しい。クロマトグラフィーやフローインジェクション法と組み合わせた多成分同時測定法も開発されているが<sup>21, 37-43)</sup>、検出器に加えてカラム及びポンプを必要とするなど、オンサイト分析には適していない。従って、可搬性を損なうことなく、多成分の金属を測定できる新たな方法が求められている。そこで、金属イオンに対する反応性が互いに異なるポルフィリンを同一の試料に作用させ、その吸収スペクトルを解析すれば試料に含まれる複数の金属イオンを検出・定量できるのではないかと考えた。

本章では、金属イオンに対するポルフィリンの反応性を改変することを目的として、ポルフィリンとビニルモノマーをラジカル共重合したポルフィリン導入ポリマーを新規に合成した。さらに、金属に対する反応性が互いに異なるポルフィリン導入ポリマーを用いて重金属の多成分測定を試みた。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 試薬

本章および以後の章において、全ての試薬は、分析化学用の高純度品を使用し、全ての水溶液は、超純水製造装置 (Milli-Q Synthesis system, Millipore, MA, USA)

から得た超純水を用いて調製した。ポルフィリンとして、プロトポルフィリン二ナトリウム塩 (PP; Sigma-Aldrich, MO, USA) を用いた。ビニルモノマーとして、アクリルアミド (AAm; Wako, Osaka, Japan)、メタクリル酸 (MAcid; Wako)、アクリル酸 (AAcid; Wako)、ジメチルアクリルアミド (DMAA; Kohjin, Tokyo, Japan) 及びヒドロキシエチルアクリルアミド (HEAA; Kohjin) を用いた。重合液溶媒に、ジメチルスルホキシド (DMSO; Wako) を、重合開始剤に、2,2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (AIBN; Wako) を用いた。ポリマー沈殿剤として、メタノール (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)、エタノール (Junsei Chemical Co., Ltd.)、アセトン (Wako)、ジエチルエーテル (DEE; Junsei Chemical Co., Ltd.) 及びテトラヒドロフラン (THF; Wako) を用いた。モルホリノエタンスルホン酸 (MES; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) とシクロヘキシルアミノプロパンスルホン酸 (CAPS; Sigma-Aldrich) を pH 緩衝液として用いた。

## 2. 2. 2 ポルフィリン導入ポリマーの合成

PPと各ビニルモノマー (AAm、MAcid、AAcid、DMAA 及び HEAA) をラジカル共重合することによって 5 種類のポルフィリン導入ポリマー (PP-AAm、PP-MAcid、PP-AAcid、PP-DMAA 及び PP-HEAA) を作製した (図 2-1 及び表 2-1)。PP を 0.3 mM、ビニルモノマーを 1 M 含む DMSO 溶液を 100 mL 調製した。この重合液に、500 mM の AIBN を含む DMSO 溶液を 2 mL 添加し、窒素雰囲気下、60°C で 4 時間インキュベートした。ポルフィリン導入ポリマーは不溶だが未重合のモノマーは可溶性沈殿剤 (表 2-1) を 1000 mL 以上用意し、そこへ重合液を全量加えてポルフィリン導入ポリマーを沈殿させた。沈殿物を回収し、沈殿剤で再度洗ってモノマー成分を除去した。風乾によって沈殿剤を揮発させた後、ポルフィリン導入ポリマーを超純水に溶かして水溶液とした。このとき、400 nm 付近のピーク波長における吸光度が 4 になるよう濃度を調整し、ポルフィリン導入ポリマー原液とした。

ポルフィリン導入ポリマーの分子量は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて測定した。TSK-gel GMPW<sub>XL</sub> カラム (i.d.: 7.8 mm, length: 300 mm, particle size: 13  $\mu$  m; Tosoh, Tokyo, Japan) を使用し、カラム温度は 40°C に設定した。溶離液に 0.1 M

のリン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用し、流速 1 mL/min で送液した。ポルフィリン導入ポリマー原液を 10  $\mu$  L 注入し、示唆屈折計 (RI-8020, Tosoh) と吸光度計 (Waters 486, Waters Corporation, MA, USA) の2つの検出器で屈折率と 400 nm の吸光度をモニターした。TSK 標準ポリエチレンオキサイド (SE-2, 5, 8, 15, 30, 70, and 150, Tosoh) の水溶液を調製し、同様にクロマトグラムを得た。ピークを示した保持時間と分子量の関係から検量線を作成し、ポルフィリン導入ポリマーで得られたピークの保持時間を代入してピークトップ分子量を算出した。

### 2. 2. 3 測定試薬および金属イオン溶液の調製

MES (100 mM) 及び CAPS (100 mM) を用いて、pH 6 及び 10 の pH 緩衝液をそれぞれ調製した。検液中の金属濃度が 10  $\mu$  M 以上のときは、800 mM の MES 及び CAPS を用いた。各ポルフィリン導入ポリマー原液 (5 種類) と各 pH 緩衝液 (2 種類) を等量混合して、10 種類の測定試薬 (PP-AAm/pH10、PP-AAm/pH6、PP-MAcid/pH10、PP-MAcid/pH6、PP-AAcid/pH10、PP-AAcid/pH6、PP-DMAA/pH10、PP-DMAA/pH6、PP-HEAA/pH10 及び PP-HEAA/pH6) を得た。

銀 (Ag(I))、アルミニウム (Al(III))、ヒ素 (As(III))、ビスマス (Bi(III))、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、ニッケル (Ni(II))、Pb(II)、パラジウム (Pd(II)) 及び Zn(II) の 1000 mg/L 原子吸光分析用標準液 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を、これらの金属イオン原液として用いた。また、塩化ナトリウム (NaCl; Wako)、塩化カリウム (KCl; Wako)、塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>; Wako)、塩化マグネシウム (MgCl<sub>2</sub>; Wako)、ニクロム酸カリウム (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; Wako)、塩化クロム (CrCl<sub>3</sub>; Wako) 及び塩化鉄 (FeCl<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich) の水溶液を Na(I)、K(I)、Ca(II)、Mg(II)、Cr(VI)、Cr(III) 及び Fe(III) イオンの原液として、それぞれ調製した。各金属イオン原液を超純水で希釈して 100  $\mu$  M の金属イオン溶液を調製した。Bi(III)、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、Pb(II) 及び Zn(II) イオンの原液を混合・希釈して、これら 7 種類の金属イオンを等モル含む金属イオン混合溶液も調製した。研究所の排水 (排水 A)、瓦業者の排水 (排水 B) 及び水道水を実試料として入手した。これらを孔径 0.45  $\mu$  m の酢酸セルロースフィルター (DISMIC-13CP, ADVANTEC, Tokyo, Japan) でろ過した後、分析に供した。実試料中

の Cu(II)、Pb(II)及び Zn(II)濃度を FAAS (Z-5000, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) で、Mn(II)濃度を ICP-AES (JY2000, HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan) で測定した。

#### 2. 2. 4 差スペクトルの測定

測定試薬 (0.25 mL) と金属イオン溶液 (0.25 mL) を 1.5 mL のサンプリングチューブ (72.690, Sarstedt, Numbrecht, Germany) 内で混合し、アルミブロックヒーター (DTU-1B, TAITEC Co., Ltd., Saitama, Japan) により 75°C で 30 分加熱した。混合液を 1 cm 角のポリスチレンキュベット (67.742, Sarstedt) に移し、紫外可視分光光度計 (Genespec III, Naka Instruments Co., Ibaraki, Japan) を用いて水ブランクに対する 374 ~ 608 nm の吸収スペクトル (見かけの波長分解能: 0.38 nm) を測定した。この分光光度計は可搬性に優れたシングルビーム・マルチチャンネル方式である。金属イオン溶液の代わりに、超純水を用いて同様な加熱処理をし、参照スペクトルを得た。続いて、吸収および参照の両スペクトルに Standard normal variate (SNV) 変換を適用した。SNV 変換後のスペクトルの値を成分とするベクトル  $\mathbf{z}$  は次式で与えられる。

$$\mathbf{z} = [\mathbf{x} - \text{mean}(\mathbf{x}) \mathbf{i}] / \text{std}(\mathbf{x})$$

ここで、 $\mathbf{x}$  は測定されたスペクトルの値を成分とするベクトル、 $\mathbf{i}$  は全ての成分が 1 のベクトル、 $\text{mean}(\mathbf{x})$  は  $\mathbf{x}$  の成分の平均値、 $\text{std}(\mathbf{x})$  は  $\mathbf{x}$  の成分の標準偏差である。SNV 変換後の吸収スペクトルから参照スペクトルを差し引くことにより、差スペクトルを算出した。上記の計算過程を図 2-2 に示す。

### 2. 3 結果および考察

#### 2. 3. 1 ポルフィリン導入ポリマーの性状

各ポルフィリン導入ポリマーを含む測定試薬の参照スペクトルを図 2-3 に示す。いずれも、PP のソーレー帯に由来する吸収ピークが 400 nm 付近に観察された。各吸収ピーク波長 ( $\lambda_{\text{max}}$ ) を表 2-1 にまとめた。屈折率の SEC クロマトグラムを図 2-4a に示

す。SEC では、分子量の大きい溶質ほど保持時間が短く、PP-AAm、PP-MAcid、PP-AAcid、PP-DMAA 及び PP-HEAA の保持時間は、それぞれ 7.6、6.9、7.8、7.0 及び 7.1 分であった。それらの値から算出された分子量は、 $4.8 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^5$ を示した(表 2-1)。PP-AAm 及び PP-MAcid について、屈折率と共に、400 nm の吸光度のクロマトグラムも合わせて図 2-4b 及び 2-4c に示す。屈折率と吸光度のいずれにおいても、クロマトグラムは同様の形状を示し、屈折率のクロマトグラムでピークを示した高分子の画分が 400 nm の吸収を持つことが示された。これらの結果から、ポルフィリン導入ポリマーに PP が導入されていることが確認された。

### 2. 3. 2 各金属との反応性

Bi(III)、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、Pb(II)及び Zn(II)の金属溶液 (100  $\mu$  M) を用いて得られた各ポルフィリン導入ポリマーの差スペクトルを、pH 10 及び pH 6 の場合について、図 2-5 及び 2-6 に示す。PP-AAm/pH10 の場合、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Pb(II) 及び Zn(II)によってピークが生じた。PP-AAm がこれらの金属イオンと錯体を形成し、吸収スペクトルが変化したことを示している。ピークの位置は金属イオン種によって異なり、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)及び Zn(II)によるピークは互いの重なりが大きかったのに対して、Pb(II)によるピークは離れた位置に観察された。また、Cd(II)、Pb(II)及び Zn(II)によるピークは比較的大きく、pH 10 の条件下ではこれらの金属イオンに対する感度が高いことを示唆していた。PP-DMAA/pH10 及び PP-HEAA/pH10 も、PP-AAm/pH10 と類似した差スペクトルを示した。PP-MAcid/pH10 は Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Zn(II)及び Mn(II)によるピークが大きく、Pb(II)によるピークは小さかった。PP-AAcid/pH10 の場合は、Cu(II)と Zn(II)によるピークが大きく、それ以外の金属イオンによるピークは小さかった。

PP-AAm/pH6 の場合、Bi(III)、Co(II)、Cu(II)及び Zn(II)によるピークが観察され、とくに Bi(III)によるピークは他から分離していた。Co(II)や Cu(II)と比べると、Zn(II)によるピークは比較的大きかった。PP-HEAA/pH6 は、PP-AAm/pH6 と類似した差スペクトルを示した。PP-DMAA/pH6 の場合は、Cu(II)と Zn(II)によるピークが大きく、それ以外の金属イオンによるピークは小さかった。PP-MAcid/pH6 の場合、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)

及び Zn(II)によるピークが生じた。とくに Mn(II)によるピークが大きかった一方で、Bi(III)によるピークは観察されなかったのが特徴的である。PP-AAcid/pH6 は、PP-MAcid/pH6 と類似した差スペクトルを示した。

このように、ポルフィリン導入ポリマーは、上記 7 種類の金属イオンに対し、pH 毎に各々異なる反応性を示した。ポリマーに組み込まれていない水溶性ポルフィリンも、pH によって金属イオンとの反応性は変化するが、周辺側鎖を変えても反応する金属イオン種は大きくは変わらない<sup>36, 44-46)</sup>。ポリマーの種類による反応性の変化は、ポルフィリン導入ポリマーに特徴的な現象であった。今回合成した 5 種類のポルフィリン導入ポリマーの反応性は、ビニルモノマー側鎖にアミド基を有する PP-AAm、PP-DMAA 及び PP-HEAA から成る 1 郡と、カルボキシル基を有する PP-MAcid、PP-AAcid から成るもう 1 郡とに大きく分けられた。ポルフィリン導入ポリマー毎の反応性の違いは、ポリマーを構成するモノマーの側鎖と PP との相互作用によるものと考えられる。

### 2. 3. 3 金属混合溶液中の各金属イオンの測定

金属イオンに対する反応性が互いに異なるポルフィリン導入ポリマーとして、PP-AAm と PP-MAcid を選んだ。さらに pH による反応性の違いも考慮し、PP-AAm/pH10、PP-AAm/pH6 及び PP-MAcid/pH6 の 3 つの測定試薬を用いることとした。これらの測定試薬に同一の金属イオン混合溶液を作用させ、得られた差スペクトルを解析することで各金属イオン濃度を検出・定量することを試みた。

Bi(III)、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、Pb(II)及び Zn(II)を全て  $1 \mu\text{M}$  含む金属イオン混合溶液を各測定試薬に作用させて得た差スペクトルを図 2-7 に示す。図 2-7 には、図 2-5 及び 2-6 で得られた各金属イオンによるピーク位置も示した。PP-AAm/pH10 の差スペクトルからは Pb(II)が検出された。ただし、Cd(II)のピークは Zn(II)のピークと分離されず、重なっていた。PP-AAm/pH6 の差スペクトルからは Bi(III)と Zn(II)が検出され、PP-MAcid/pH6 からは Co(II)、Cu(II)及び Mn(II)が検出された。すなわち、混合溶液中の Bi(III)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、Pb(II)及び Zn(II)を分離したピークとして検出することができた。全ての金属イオンを等モル濃度含む金属イオン混合溶液の希釈系列を用いて、各金属イオンに対応するピーク高から各々の検量線を作成した(表 2-2)。

定量限界は、0点での繰返し測定値 (n=5) の標準偏差の10倍のシグナルを与える濃度として算出した。変動係数 (RSD) は、各金属が  $1\ \mu\text{M}$  の金属イオン混合溶液を繰返し測定 (N=9) して求めた。RSD は、SNV 変換を用いなかった場合と比べると、著しく改善されていることがわかる。SNV は、固体試料の近赤外反射分光分析において比較的良好に用いられるデータ変換方法であり、ベースラインの変動 (加算的変動) 及び増幅効果 (乗算的変動) を除去し、スペクトルの形状の変化のみを抽出できる<sup>47, 48)</sup>。SNV は、ポルフィリン導入ポリマーの紫外可視領域のスペクトルを再現性良く取得するのにも有効であることが示された。RSD の改善は定量限界の向上にも寄与し、Cu(II) に対しては  $1.6\ \mu\text{M}$ 、それ以外の金属イオンについては  $0.5\ \mu\text{M}$  以下の定量限界を達成した。これらの金属イオンのうち Cu(II)、Mn(II)、Pb(II) 及び Zn(II) については排水基準が定められており、その値はそれぞれ、47、182、0.48 及び  $31\ \mu\text{M}$  と設定されている。本測定試薬の定量限界はこれらの排水基準値を十分に下回っており、基準値判定に用いるのに十分なレベルと言える。

#### 2. 3. 4 その他の金属との反応性

先に検討した 7 種の金属イオン以外のイオン ( $100\ \mu\text{M}$  の Cr(VI)、Cr(III)、Fe(III)、Ag(I)、Al(III)、As(III)、Pd(II) 及び Ni(II)) に対する応答を調べた (図 2-8)。Pd(II) は、PP-MAcid/pH6 の差スペクトルの 385 nm にピークを生じ、その値は 0.72 であった。Pd(II) 以外の金属イオンによる差スペクトルの最大値は 0.3 以下であり、図 2-5 及び 2-6 に示したピークよりも明確に小さかった。また、多くの実試料に共通して含まれていることが多いアルカリ金属 (Na(I) と K(I)) 及びアルカリ土類金属 (Ca(II) と Mg(II)) は、各々 100 mM 及び 1 mM という比較的高濃度でもピークを生じなかった (図 2-9)。これらの結果から、PP-AAm/pH10、PP-AAm/pH6 及び PP-MAcid/pH6 は、先に検討した 7 種類の金属 (Bi(III)、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、Pb(II) 及び Zn(II)) に、特異的に応答していることが確認された。

#### 2. 3. 5 実試料の測定

本測定法を実試料に適用した。その際の差スペクトルを図 2-7b に示す。水道水の

場合、PP-AAm/pH6 の差スペクトルから微量な Zn(II)が含まれていることがわかる。排水 A の場合は、Cu(II)と Zn(II)が含まれており、排水 B には、Mn(II)、Pb(II)及び Zn(II)が含まれていることが予想された。検量線から算出した濃度を、FAAS 及び ICP-AES による測定値と比較した (表 2-3)。このとき、定量範囲の上限を上回った場合は、サンプルを超純水で希釈してから再度測定した。ICP-AES で測定した排水 A の Mn(II)濃度は、本測定法の定量限界を下回っていたが、本測定法では有意な値が算出された。これは、Cu(II)及び Zn(II)による差スペクトル変化が Mn(II)のピーク位置にも及んでいたためと考えられる。本測定法によるその他の測定値は、FAAS 及び ICP-AES の測定値とおおよそ相関する結果を得ることができた。

## 2.4 まとめ

本研究では、5 種類のポルフィリン導入ポリマーを合成した。これらのポルフィリン導入ポリマーは異なる金属反応性を示したため、ポリマーの種類と pH が異なる3種類の測定試薬 (PP-AAm/pH10、PP-AAm/pH6 及び PP-MAcid/pH6) を用いることで6種類の金属 (Bi(III)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、Pb(II)及び Zn(II)) を分離したピークとして検出できた。また、ピークの高さから濃度を定量することもでき、その定量限界は排水基準値以下の微量な金属イオンを十分に測定できるレベルであった。このような良好な定量限界を達成できたのは、吸光係数が極めて大きいポルフィリン特有のソーレー帯を利用していることと、スペクトルの再現性の良い取得を可能にした SNV の寄与によるところが多い。さらに、実試料への適用においても、FAAS あるいは ICP-AES による測定値と相関する結果が得られた。本測定法は、シングルビーム方式の小型分光光度計を用いていることから、複数金属イオンのオンサイト測定に適していることが示された。

表 2-1 合成したポルフィリン導入ポリマーの比較

Abbreviation	Vinyl monomer <sup>a</sup>		Precipitant	M. W.	$\lambda$ max (nm)	
	Name	R <sub>1</sub>			R <sub>2</sub>	pH 6
PP-AAm	AAm	$\text{---C(=O)NH}_2$	Methyl alcohol	$6.5 \times 10^4$	401	399
PP-MAcid	MAcid	$\text{---COOH}$	Acetone	$2.3 \times 10^5$	398	397
PP-AAcid	AAcid	$\text{---COOH}$	Acetone	$4.8 \times 10^4$	402	400
PP-DMAA	DMAA	$\text{---C(=O)N(CH}_3)_2$	Ethyl alcohol	$2.2 \times 10^5$	400	401
PP-HEAA	HEAA	$\text{---C(=O)N(CH}_2)_2\text{---OH}$	THF: DEE (1:1) <sup>b</sup>	$1.7 \times 10^5$	403	403

<sup>a</sup> 基本構造は図 2-1 に示す

<sup>b</sup> THF と DEE を体積比 1:1 で混合した溶液

**表 2-2 測定対象金属の定量範囲、相関係数および変動係数**

Measuring reagent	Wavelength (nm)	Target metal	Quantitative range ( $\mu$ M)	R <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup> (%)
PP-AAm/pH10	465	Pb	0.04~2	0.998	2.2 (7.4)
PP-AAm/pH6	415	Zn	0.08~3	0.993	2.4 (23)
	465	Bi	0.05~2	0.996	5.9 (9.3)
PP-MAcid/pH6	400	Cu	1.6~4	0.917	6.8 (14)
	420	Co	0.48~2	0.988	2.9 (11)
	461	Mn	0.47~2	0.982	3.8 (8.2)

<sup>a</sup> 相関係数

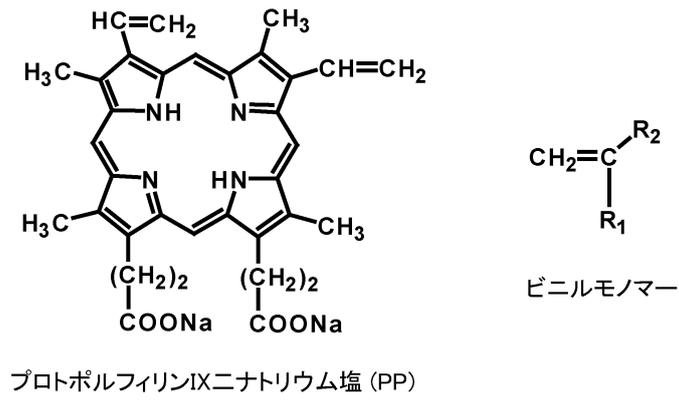
<sup>b</sup> 括弧内の値は、SNV 変換を適用しないで算出した RSD

**表 2-3 本法と FAAS 又は ICP-AES による測定値の比較**

Sample	Method	Concentrations <sup>a</sup> ( $\mu$ M)			
		Cu(II)	Mn(II)	Pb(II)	Zn(II)
Tap water	FAAS or ICP-AES	N.D.	N.D.	N.D.	0.12
	This method	N.D.	N.D.	N.D.	0.12
Effluent A	FAAS or ICP-AES	1.8	0.19	N.D.	2.7
	This method	2.2	0.97	N.D.	2.4
Effluent B	FAAS or ICP-AES	N.D.	25	1.1	6.0
	This method	N.D.	33	1.8	5.1

<sup>a</sup> Cu、Pb 及び Zn は FAAS で、Mn は ICP-AES で測定した

N.D.は、定量限界値以下を表す



AIBN  
ラジカル共重合

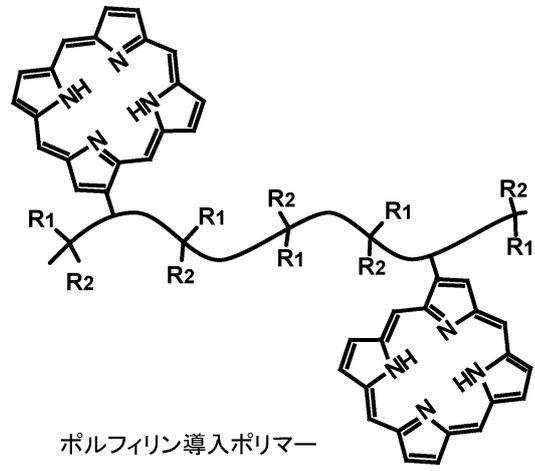


図 2-1 ポルフィリン導入ポリマーの合成方法

R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> はビニルモノマーの側鎖官能基を表し、その構造は表 2-1 に示す。

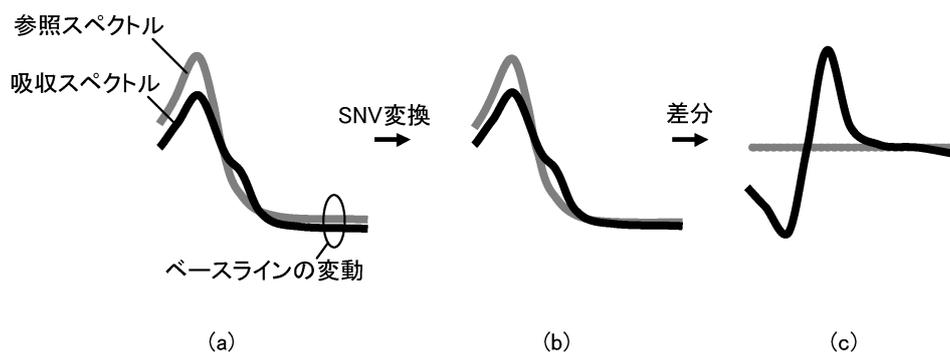


図 2-2 差スペクトルの算出方法

(a) 吸収および参照スペクトル、(b) SNV 変換後のスペクトル、(c) 差スペクトル

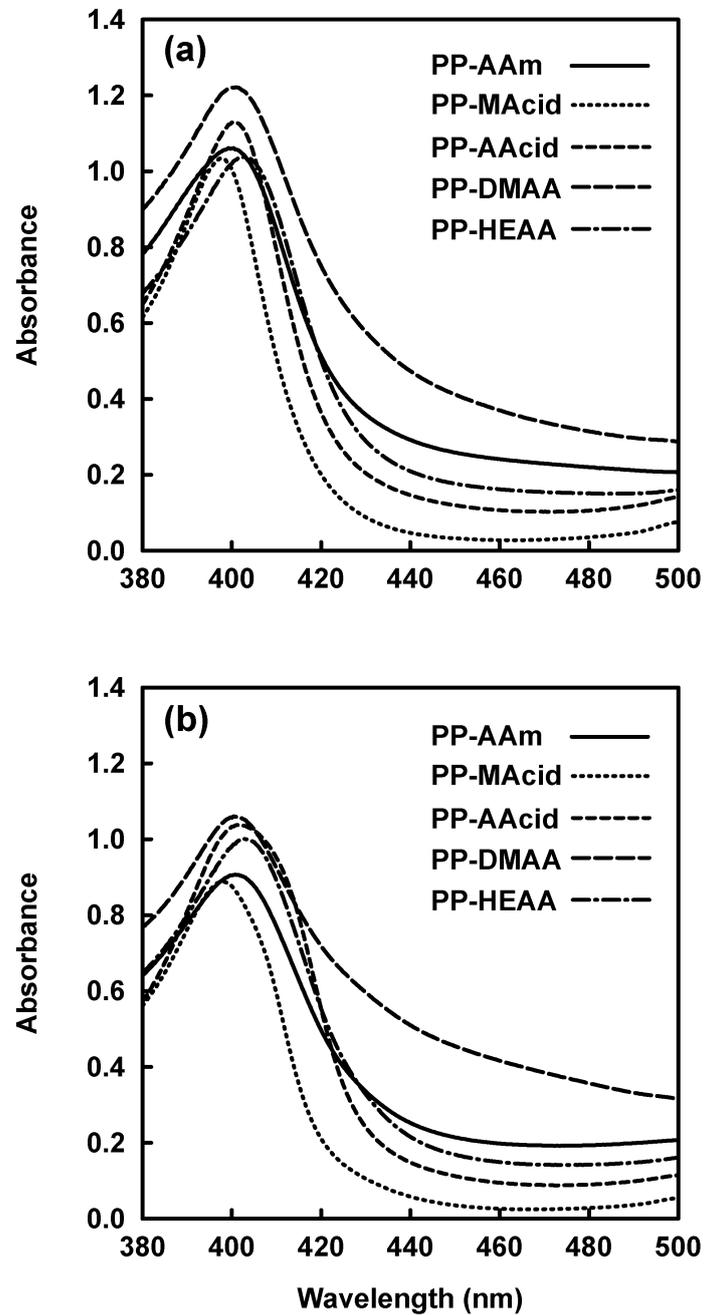


図 2-3 ポルフィリン導入ポリマーの参照スペクトル  
測定試薬の pH が (a) 10 及び (b) 6 の場合

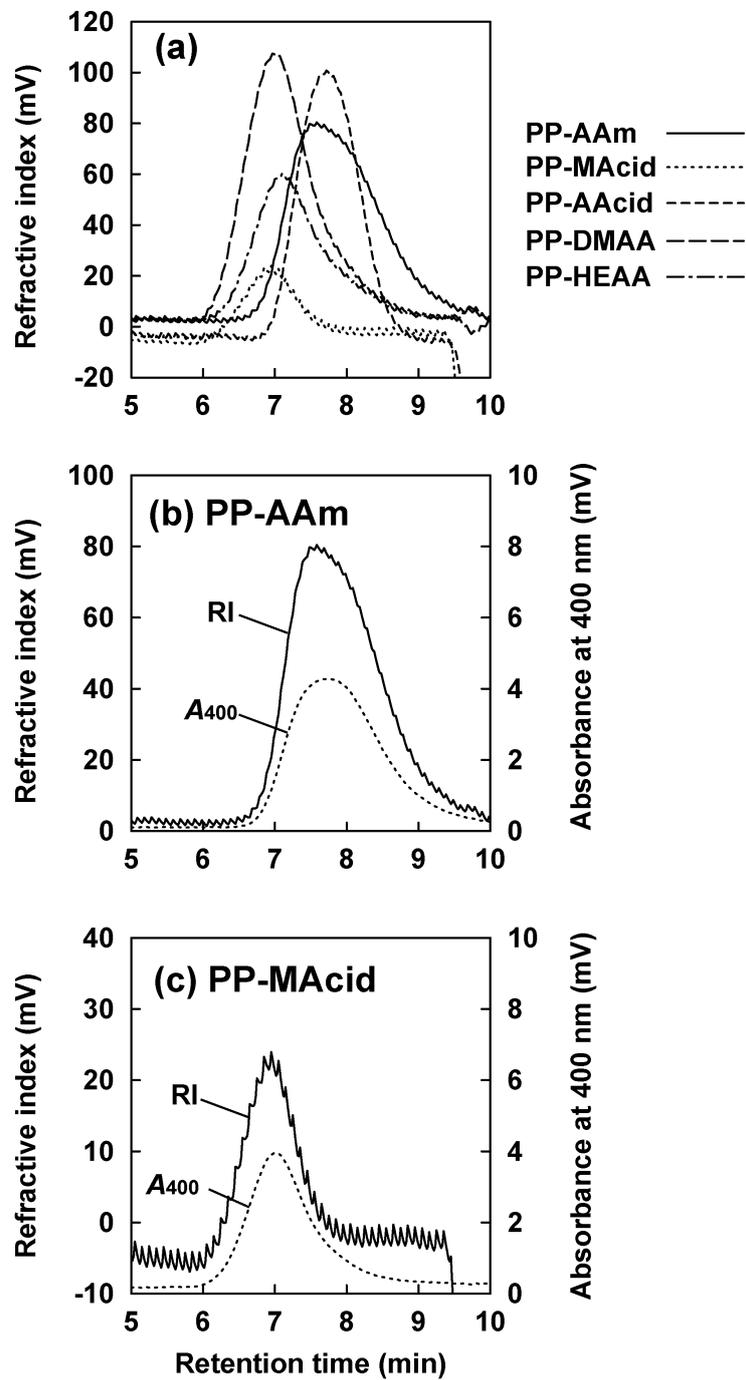


図 2-4 ポルフィリン導入ポリマーの SEC クロマトグラム

- (a) 全てのポルフィリン導入ポリマーの屈折率クロマトグラム、(b) PP-AAm 及び  
(c) PP-MAcid の屈折率 (RI) 及び吸光度 ( $A_{400}$ ) クロマトグラム

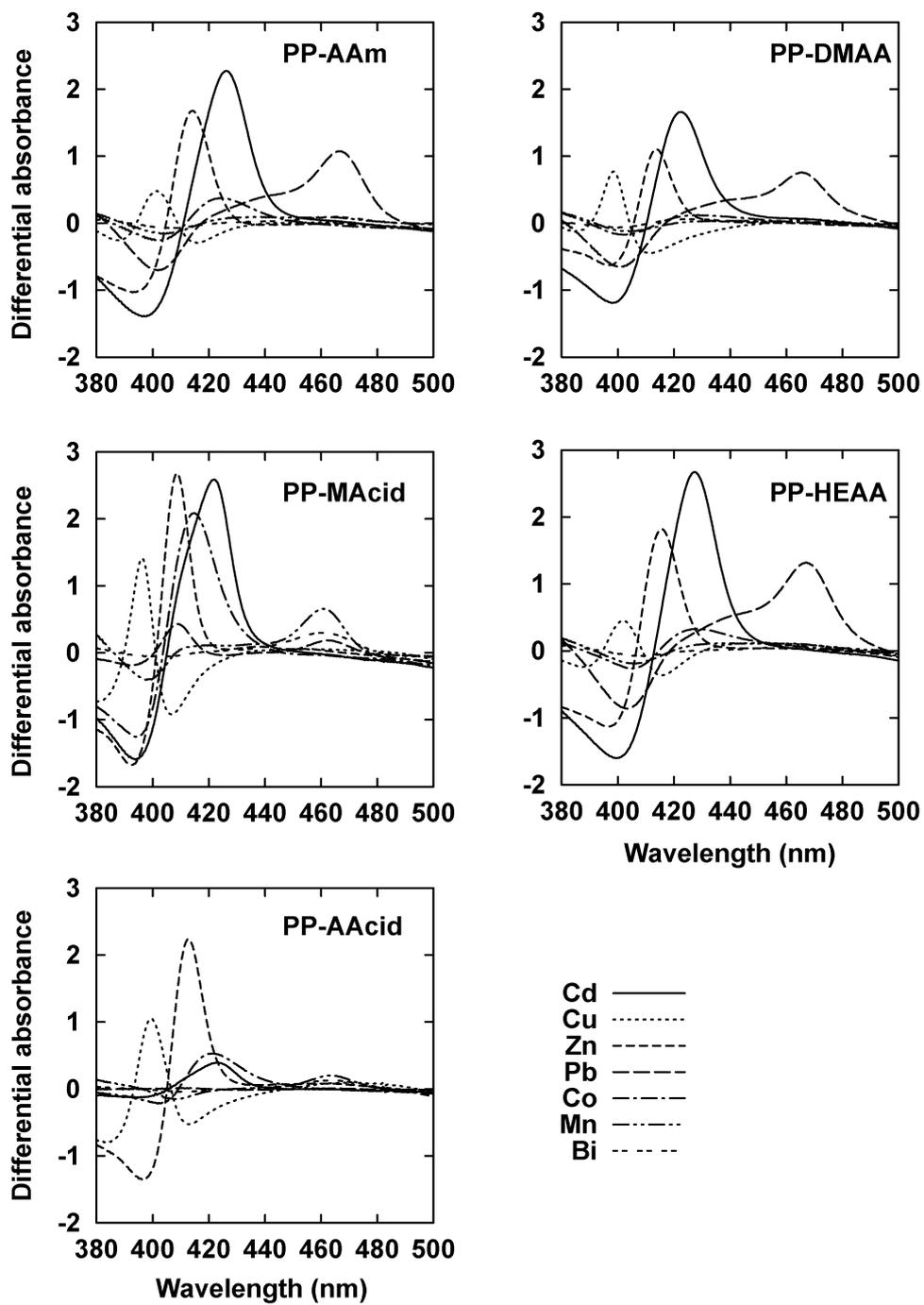


図 2-5 各金属イオンに対するポルフィリン導入ポリマーの差スペクトル (pH 10)

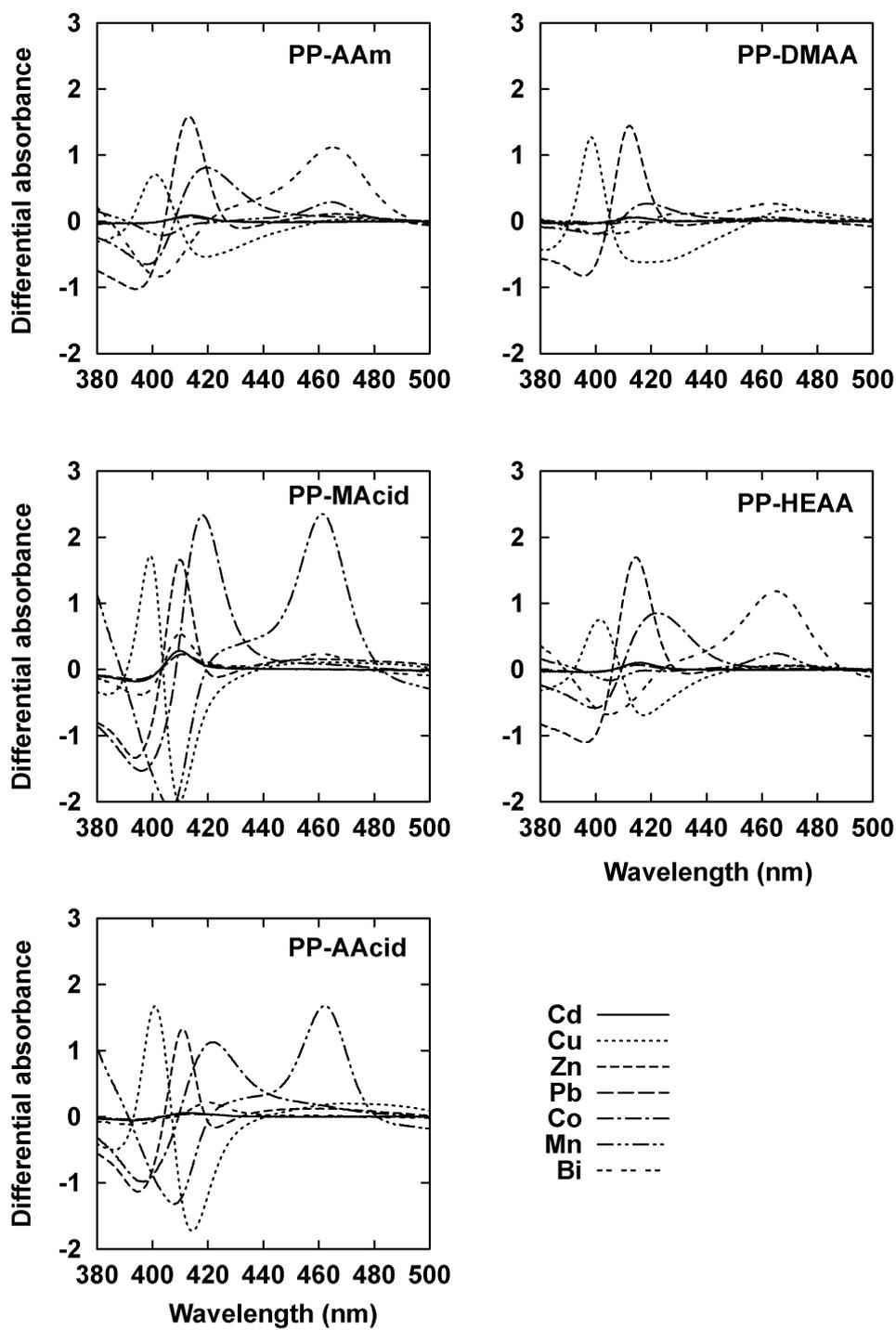


図 2-6 各金属イオンに対するポルフィリン導入ポリマーの差スペクトル (pH 6)

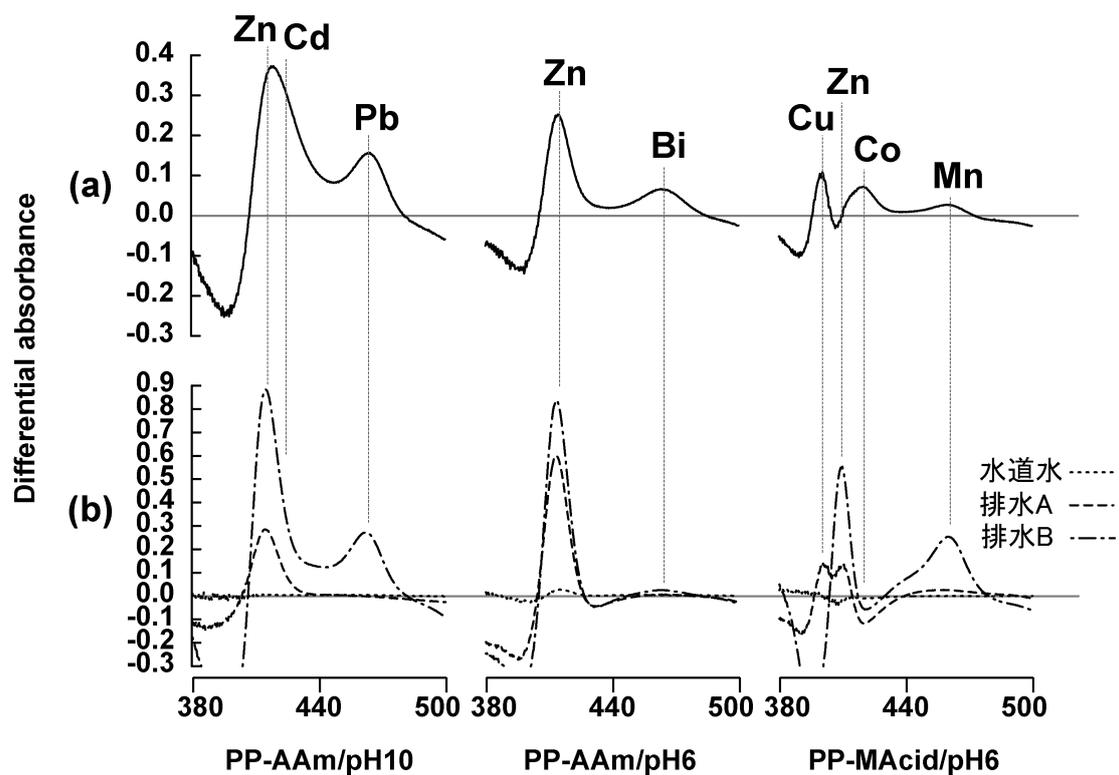


図 2-7 金属イオン混合溶液に対する測定試薬の差スペクトル

縦線は、図 2-5 及び 2-6 で観察されたピーク波長を示している。

(a) Bi、Cd、Co、Cu、Mn、Pb 及び Zn を全て  $1 \mu\text{M}$  含む金属イオン混合溶液

(b) 実試料 (水道水、排水 A、排水 B)

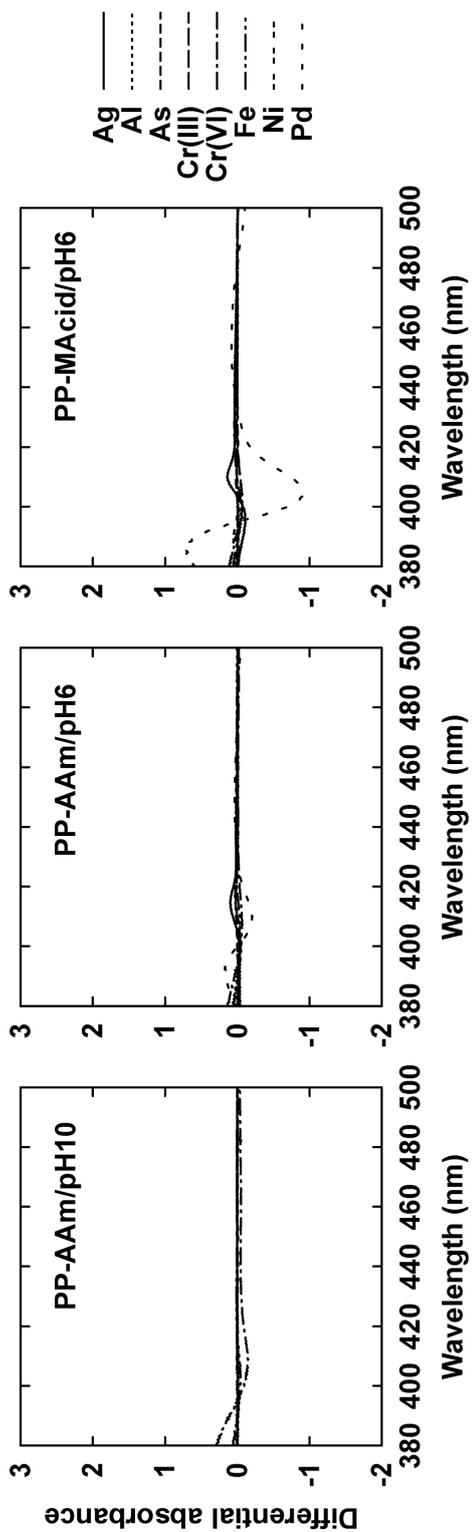


図 2-8 測定対象外の重金属イオンに対する測定試薬の差スペクトル

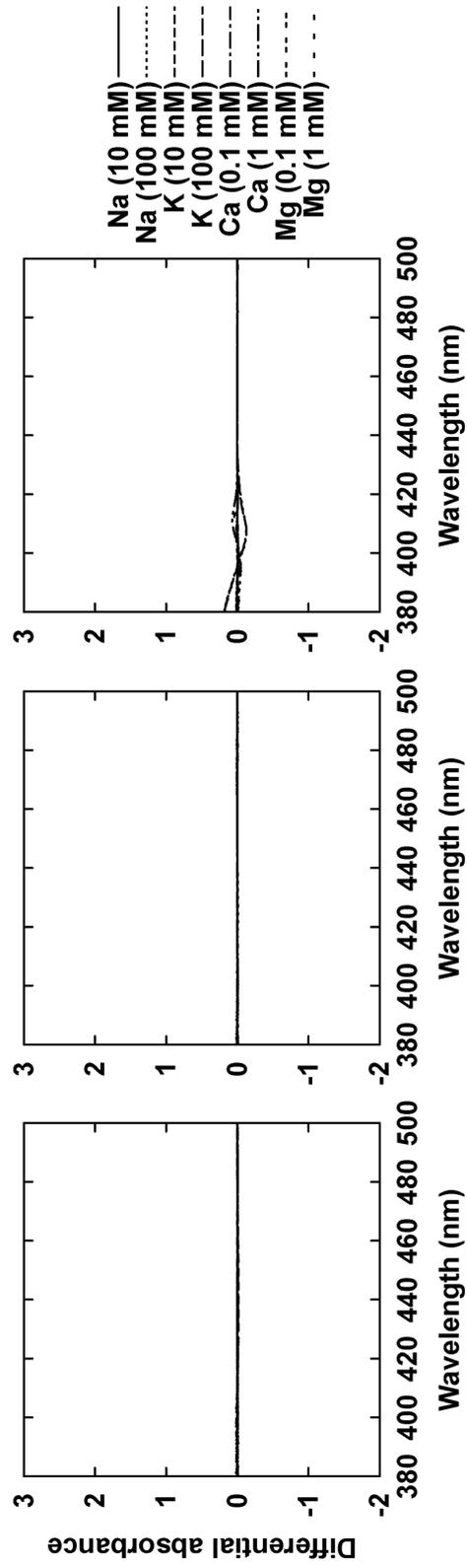


図 2-9 アルカリ金属及びアルカリ土類金属イオンに対する測定試薬の差スペクトル

### 第3章 飛灰溶出液中の鉛簡易測定法の開発

#### 3.1 はじめに

鉛は、重金属の中でも特に毒性が強く、神経系、腎臓、肝臓および脳に障害をもたらす他、発ガン性も疑われている<sup>1,2)</sup>。一方で、様々な産業製品に使用されているため、それらを焼却して生じた焼却飛灰には高濃度の鉛が含まれている。そのような飛灰を埋め立て処理すれば、雨水や地下水等との接触によって鉛がイオン (Pb(II)) として流出することが懸念される<sup>49)</sup>。そのため、埋立基準が設定されており、溶出試験によって得られた飛灰溶出液中の Pb(II)濃度が 0.3 mg/L 以下になるよう重金属固定化剤を添加するなどの処理をしなければならない。したがって焼却場の現場では、埋め立ての可否および重金属固定化剤の適切な添加量を迅速に判断することが求められるが、現状では、採取した飛灰を分析センター等に送付し、そこで溶出試験および FAAS による Pb(II)濃度測定を行うなど、数日の日数を要して分析値を得ている。飛灰溶出液の酸化還元電位を測定することによって、重金属固定化剤の必要量を推定する方法も開発されているが<sup>50)</sup>、Pb(II)濃度を直接求めていないため、精度が十分とは言えない。この電気伝導度による測定法の開発過程で、溶出試験をオンサイトで行える振とう機はすでに開発されていた。したがって、飛灰溶出液中の Pb(II)濃度を簡易に測定する方法があれば、焼却場での迅速な飛灰処理への活用が期待できる。

簡易分析法として有力な吸光光度法による Pb(II)測定法は、ポルフィリンを含む様々な比色試薬を用いて、環境試料、食品および生体試料等に適用されている<sup>27-32, 51-54)</sup>。しかしながら、飛灰溶出液中には Ca(II)や Zn(II)といった夾雑イオンが高濃度含まれているため<sup>55)</sup>、これらの測定法を飛灰溶出液中の Pb(II)濃度測定に適用することは難しい。一方で、飛灰溶出液は高アルカリ溶液であるため、Pb(II)や Zn(II)といった両性金属を除く重金属は、水酸化物として沈殿し、飛灰溶出液中の濃度は低いと予想される。したがって、Pb(II)濃度測定において Ca(II)及び Zn(II)の妨害を受けにくい測定系を構築することが望ましいと考えた。これらの妨害イオンを、溶媒抽出やイオン交換樹脂等を用いて除去することも可能であるが<sup>30, 51, 52, 54, 56, 57)</sup>、簡易性を損なうことにな

る。また、Zn(II)に結合し、その妨害を除去するマスクング剤としてシアン化物イオンが知られているが<sup>27)</sup>、有毒ガスが生じる可能性があるなど取り扱いに厳重な注意を要する。第2章で用いたポルフィリン導入ポリマーのうち、PP-AAmはアルカリ条件でPb(II)を定量でき、しかも比較的高濃度のCa(II)には応答しなかった。

そこで本研究では、PP-AAmを比色試薬として含む鉛測定試薬を飛灰溶出液中のPb(II)濃度測定へ適用することを試みた。Zn(II)による妨害は、シアン化物イオンとは異なるマスクング剤を検討した。さらに、小型分光光度計および測定部にヒーターを内蔵した小型分光光度計（専用の鉛簡易測定装置）を開発し、測定の簡易化を図った。Ca(II)及びZn(II)による妨害を受けないよう鉛測定試薬の組成を最適化し、実際の飛灰溶出液中のPb(II)濃度を測定した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬および試料

ポルフィリン及びビニルモノマーとして、PP及びAAmを用いた。重合液溶媒にDMSOを、重合開始剤にAIBNを用いた。CAPSをpH緩衝液として用いた。比較用の水溶性ポルフィリンとして、5,10,15,20-Tetraphenyl-21*H*, 23*H*-porphinetetrasulfonic acid, disulfuric acid, tetrahydrate (TPPS; Dojindo Laboratories)を用いた。マスクング剤として、エチレンジアミンニプロピオン酸 (EDDP; TCI Co., Ltd., Tokyo, Japan) 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA; Dojindo Laboratories) を検討した。飛灰は、国内8ヶ所の焼却場から異なる日時で採取した26種類を用意した。

### 3.2.2 鉛測定試薬の調製

PP-AAmは、第2章に示した方法により合成した。超純水にPP-AAmを溶解し、100 g/LのPP-AAm原液を調製した。EDDP原液(100 mM)は、EDDPを0.3 NのNaOHに溶解し、調製した。PP-AAm原液を88.6 mL用意し、超純水を加えて全量を100 mLとし、鉛測定試薬とした。このとき、必要に応じてCaCl<sub>2</sub>及びEDDP原液を添加した。

### 3. 2. 3 飛灰溶出液および模擬溶出液の調製

原子吸光分析用の Pb(II)標準液 (Kanto Chemical) を Pb(II)原液として用いた。飛灰溶出液は pH 12 以上の高アルカリ性溶液であるため、同様に高アルカリ性の 20 mM CAPS 緩衝液 (pH 12.5) を希釈液とし、Pb(II)原液を大過剰の CAPS 緩衝液で希釈した溶液を模擬溶出液として用いた。また、pH の影響を検討する際は、CAPS 緩衝液の代わりに、濃度が異なる NaOH 溶液で Pb(II)原液を希釈し、pH が異なる模擬溶出液を用いた。

フッ化ナトリウム (NaF; Wako) 、NaCl、臭化ナトリウム (NaBr; Wako) 、ヨウ化ナトリウム (NaI; Wako) 、硝酸ナトリウム (NaNO<sub>3</sub>; Wako) 及び硫酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Wako) の水溶液を、F<sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、I<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>及び SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>といった妨害陰イオン原液として調製した。NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、CrCl<sub>3</sub>、塩化アルミニウム (AlCl<sub>3</sub>; Wako) 、塩化ニッケル (NiCl<sub>2</sub>; Wako) 、塩化マンガン (MnCl<sub>2</sub>; Wako) 、塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>; Wako) 、硫酸亜鉛 (ZnSO<sub>4</sub>; Wako) 、硫酸銅 (CuSO<sub>4</sub>; Wako) 及び FeCl<sub>3</sub> の水溶液を、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>及び Fe<sup>3+</sup>といった妨害陽イオン原液として調製した。Cd<sup>2+</sup>及び Hg<sup>2+</sup>の 1000 mg/L の原子吸光分析用標準液 (Kanto Chemical) も、妨害陽イオン原液として用いた。各々の妨害イオン原液と Pb(II)原液を混合後、CAPS 緩衝液で希釈して、0.5 mg/L の Pb(II)と様々な濃度の各妨害イオンが共存する模擬溶出液を調製し、妨害イオンの影響の検討に使用した。

実際の飛灰溶出液は、環境省告示第 13 号試験に従って調製した。飛灰と超純水を質量比 1:10 で混合し、振とう機 (SR-2w, TAITEC Co., Ltd.) により 200 rpm で水平方向に 6 時間振とうした。上澄みを孔径 0.45 μm の酢酸セルロースフィルター (DISMIC-25CS, ADVANTEC) でろ過し、飛灰溶出液を得た。Pb(II)濃度測定の際、検量線の上限を上回る場合は、CAPS 緩衝液で希釈してから測定した。飛灰溶出液中の Ca(II)、Pb(II)及び Zn(II)濃度を FAAS により測定した。

### 3. 2. 4 比色反応の測定方法

PP-AAm の Pb(II)錯体の吸収スペクトルを測定するために、鉛測定試薬 0.1 mL、超純水 0.9 mL 及び 20 mg/L の Pb(II)を含む模擬溶出液 1 mL を混合し、75°C で 1 時間

加熱した。その反応液の吸収スペクトルを、紫外可視分光光度計を用い、空気ブランクに対して測定した。加熱温度毎の比色反応の進行を調べるため、鉛測定試薬 0.25 mL と 0.5 mg/L の Pb(II) を含む模擬溶出液 0.25 mL を混合し、各温度 (30~75°C) で 5~60 分間加熱した。Pb(II) を含まない模擬溶出液を用いて同様に加熱処理した溶液をブランクとして吸収スペクトルを測定し、Pb(II) との錯体形成によって生じた吸光度変化量を測定した。

### 3. 2. 5 鉛簡易測定装置の構成と測定操作

飛灰溶出液中の Pb(II) 濃度をより簡易に測定できるように、専用の鉛簡易測定装置 Pb-100 (Kowa Co., Ltd., Nagoya, Japan) を開発した。Pb-100 は、小型の分光光度計 (USB-2000, Ocean Optics, Inc., FL, USA) と温度制御されたキュベットフォルダから成り、USB ケーブルを介した PC 上の専用ソフトウェアによって操作する (図 3-1)。小型分光光度計は、見かけの波長分解能が 0.36 nm で 430~590 nm の吸収スペクトルを空気ブランクに対して測定する。キュベットフォルダは、マイコン制御されたヒーターにより常時 80°C に保たれている。専用ソフトウェアは、Microsoft Visual Basic 6.0 (Microsoft, WA, USA) によって作製した。

鉛測定試薬 0.5 mL と飛灰溶出液 0.5 mL を混合し、混合液を 1 cm 角のポリスチレンキュベットに移した後、速やかにキュベットフォルダにセットして加熱前の吸収スペクトルを測定した。続いて 5 分経過後、加熱後の吸収スペクトルを測定した。加熱前後の両吸収スペクトルに SNV 変換を適用し、加熱後から加熱前のスペクトルを差し引いて、時間差スペクトルを得た (図 3-2)。

## 3. 3 結果および考察

### 3. 3. 1 PP-AAm の比色反応の条件検討

PP-AAm の Pb(II) 錯体の吸収スペクトルを図 3-3 に示す。PP-AAm は 400 nm に吸収極大ピークを持つのに対し、PP-AAm の Pb(II) 錯体は 466 nm に吸収極大ピークが観察された。これは、第 2 章で得た PP-AAm/pH10 の参照スペクトル及び Pb(II) 反応

後の差スペクトルのピーク位置とも一致する (図 2-3 及び 2-5)。この結果から、466 nm の吸光度変化を測定することで Pb(II)を検出できることが確認された。

各加熱温度における Pb(II)と PP-AAm の錯体形成によって生じる 466 nm の吸光度変化の経時変化を図 3-4 に示す。加熱温度が 30°C のとき、吸光度差が十分に変化するのに 60 分を要したが、加熱温度を上げると錯体形成反応が進行する速度が増加した。加熱温度が 75°C のときでは、吸光度差は 5 分以内に最大値に達し、さらに長時間加熱すると吸光度差は減少した。これは、PP-AAm 及び PP-AAm の Pb(II)錯体が長時間の加熱により熱分解したためと考えられる。迅速で高感度な測定には、75°C 付近で 5 分間の加熱が望ましいことが示された。

加熱温度および加熱時間を 75°C 及び 5 分とし、pH が異なる模擬溶出液を用いて pH の影響を検討した (図 3-5)。鉛測定試薬と模擬溶出液を混合し加熱処理した後の反応液の pH が 9 以下のとき、有意な吸光度差は観察されなかった。これは、PP-AAm はアルカリ条件でのみ Pb(II)と錯体を形成することを示しており、第 2 章で得た結果と一致する。吸光度差は pH の上昇と共に増加し、pH 10.6 で最大を示し、それ以上では減少した。この結果から、反応液の pH は 10~11 とするのが適切と判断した。また、模擬溶出液 (pH 12.5) を用いたとき、反応液の pH は、10.9 となり、吸光度差は最大値に近接したため、飛灰溶出液の pH 調整はとくに行わないこととした。

### 3. 3. 2 Pb-100 を用いた時間差スペクトルの測定

上記の結果から、Pb-100 のキュベットフォルダの加熱温度および加熱時間を 80°C 及び 5 分に設定した。Pb(II)濃度が異なる模擬溶出液を Pb-100 により測定したときの時間差スペクトルを図 3-6 に示す。時間差スペクトルは 466 nm にピークを持ち、その高さ ( $\Delta A_{466}$ ) は、Pb(II)濃度に応じて増加した。そこで、 $\Delta A_{466}$  をシグナルとして Pb(II)濃度を算出することとした。

Pb-100 を用いた測定では、時間のカウント及び SNV 変換を含む一連の計算はソフトウェアによって自動的に行われる。そのためユーザーは、鉛測定試薬と飛灰溶出液を混合し、キュベットを Pb-100 にセット後、PC モニター上の測定開始ボタンをクリックするだけでよく、測定の簡易化を図ることができた。

### 3. 3. 3 Pb(II)測定時における $\Delta A_{466}$ へのCa(II)の影響

Pb(II) (0.5 mg/L) と様々な濃度のCa(II) (0~500 mM) が共存する模擬溶出液を、Pb-100を用いて測定し、共存Ca(II)の影響を検討した(図3-7)。共存するCa(II)が増加するに従い、 $\Delta A_{466}$ も増加し、15 mMで最大値(Ca(II)を含まない場合の約3倍)に達した。Ca(II)濃度がそれ以上になると、 $\Delta A_{466}$ は極めて緩やかに減少した。これは、低濃度(15 mM以下)のCa(II)の共存は、PP-AAmのPb(II)錯体の形成をCa(II)濃度依存的に促進し、Pb(II)測定値に正の誤差を与えることを示している。また、高濃度(15 mM以上)のCa(II)が共存すると、錯体形成を阻害するものの、その影響は極めて小さいことが見出された。従って、低濃度のCa(II)による影響は、鉛測定試薬側に予め適量のCa(II)を添加しておくことで排除できると考えられた。実際、PP-AAmと共に14 mMのCa(II)を含む鉛測定試薬を用いて同じ模擬溶出液を測定した結果、 $\Delta A_{466}$ は低濃度のCa(II)に影響されることなく一定値を維持し、高濃度のCa(II)に対しては、Ca(II)未添加の場合と同様な推移を示した。PP単体とPb(II)を反応させたときの吸収スペクトルを図3-8に示す。PPもPb(II)と錯体を形成し、PP-AAmと類似した吸収スペクトルの変化を示したが、10 mMのCaが共存する模擬溶出液を用いた場合は、Pb(II)濃度に応じた吸光度変化が観察されずPb(II)を測定することはできなかった。PP-AAmが高濃度のCa(II)による影響を受けにくいのは、PP自身の性質によるものではなく、PPをAAmポリマーに組み込んだことによる効果であることを示唆している。

### 3. 3. 4 Pb(II)測定時におけるZn(II)の影響とマスク剤の効果

PP-AAm、14 mMのCa(II)及びEDDPを含む鉛測定試薬を用いて、EDDPによるZn(II)のマスク剤効果を検討した。Pb(II) (0.5 mg/L) と様々な濃度のZn(II) (0~8 mg/L) が共存する模擬溶出液をPb-100で測定したときの $\Delta A_{466}$ を図3-9に示す。鉛測定試薬がEDDPを含まない場合、 $\Delta A_{466}$ は共存するZn(II)濃度に応じて単調に減少した。TPPS等の水溶性ポルフィリンは、Pb(II)よりZn(II)と安定な錯体を形成することが報告されている<sup>36, 45, 46, 58)</sup>。第2章で述べたように、PP-AAmを含む全てのポルフィリン導入ポリマーもZn(II)と錯体を形成したことから、PP-AAmもまたZn(II)との親和性は強

いと予想される。したがって  $\Delta A_{466}$  の単調減少は、共存 Zn(II)が PP-AAm と Pb(II)の錯体形成を競合的に阻害したためと考えられる。EDDP が 2 mM の場合も同様な傾向を示した。EDDP が 4 mM 以上の場合は、 $\Delta A_{466}$  は Zn(II)の増加に応じて一端上昇した後、減少した。これは、以下の反応が推察される。(1) 共存 Zn(II)が含まれていない場合、EDDP は Pb(II)と錯体を形成することにより、PP-AAm と Pb(II)の錯体形成は阻害され、 $\Delta A_{466}$  は減少した。(2) そして、共存 Zn(II)濃度が増加するに従い、EDDP は Pb(II)に代わって Zn(II)と錯体を形成し、PP-AAm と Pb(II)の錯体形成が回復し、 $\Delta A_{466}$  は増加した。(3) さらに高濃度の Zn(II)に対しては、EDDP による Zn(II)のマスキング効果が及ばず、PP-AAm の Pb(II)錯体の形成が Zn(II)によって再び競合的に阻害され、 $\Delta A_{466}$  は減少した。

Pb(II)濃度の測定においては、 $\Delta A_{466}$  が共存する Zn(II)濃度に影響されず一定であることが望ましく、それに適した EDDP 濃度は、図 3-9 より 4~6 mM であると見積もられた。この条件下では、EDDP は Pb(II)より優先的に Zn(II)と錯体を形成し、Zn(II)のマスキング剤として適切に機能していると考えられる。EDDP の代わりに、一般的に用いられているキレート剤の EDTA の使用も検討したが、EDTA は Pb(II)との親和性が Zn(II)より大きいため、 $\Delta A_{466}$  を一定に保つ適切な EDTA 濃度を見出すことはできなかった。PP-AAm を用いた Pb(II)の比色測定において、EDDP は Zn(II)のマスキング剤として効果的であることが示された。

### 3. 3. 5 最適化された鉛測定試薬の性能

これまでの結果から、PP-AAm と共に 14 mM の Ca と 5 mM の EDDP を含む鉛測定試薬が、Pb(II)測定時に Ca(II)及び Zn(II)の妨害を排除する上で最適であることが示された。この鉛測定試薬で、様々な Pb(II)濃度の模擬溶出液を測定し、検量線を作成した。 $\Delta A_{466}$  は、模擬溶出液中の Pb(II)濃度が 0~1 mg/L まで直線的に増加し、相関係数は 0.999 であった。このとき、SNV 変換されていない吸光度変化は、-0.032~0.054 であった。Pb(II)濃度が 0 mg/L のとき、吸光度変化が負の値となるのは、PP-AAm の吸収スペクトルは加熱によっても変化し、466 nm の吸光度はわずかに減少するためである。したがって、一次式の回帰直線を検量線として使用し、 $\Delta A_{466}$  から Pb(II)濃度を算

出した。Pb(II)を含まない模擬溶出液の繰返し測定によって得られたシグナルの標準偏差を求め、その 3 倍のシグナルを与える濃度を検出限界として見積もった結果、0.05 mg/L であった（埋立基準 [0.3 mg/L] を十分に下回る）。Pb(II) (0.5 mg/L) の模擬溶出液を繰返し測定して得られた変動係数は 2.3%であった（n=5）。鉛測定試薬の 466 nm の吸光度を長期にわたって経時的に測定し、安定性の指標とした。鉛測定試薬を-20°Cで保管した場合、吸光度は一年間でほとんど変化しなかった。しかしながら、4、25 及び 40°Cで保管した場合、吸光度は 26 日間で各々13、24 及び 40%減少した。すなわち、長期間保存するには冷凍する必要があることが示された。第 2 章で述べたように、PP-AAm はメタノールにより沈殿するため、測定に使用した後、回収することができるが、再度 Pb(II)を与えても吸光度変化は観察されず、再利用はできなかった。

### 3. 3. 6 妨害イオンの許容限界

Pb(II) (0.5 mg/L)と様々な濃度の他イオンが共存する模擬溶出液を測定し、共存イオンの妨害影響を調べた。測定された Pb(II)濃度の誤差が 10%を超えない（すなわち、測定値が 0.45~0.55 mg/L に収まる）最大の共存濃度を許容限界として表 3-1 にまとめた。アルカリ金属イオン ( $\text{Na}^+$  及び  $\text{K}^+$ ) と  $\text{F}^-$ 以外の陰イオンの許容限界は、10000 mg/L 以上であり、Pb(II)測定にほとんど影響を与えないことが示された。一方、Cd(II)、Cu(II)、Fe(III)及び Mn(II)の許容限界は小さく、微量でも妨害影響を及ぼすことが示された。

実際の飛灰溶出液中の Ca(II)、Zn(II)及び Pb(II)濃度を表 3-2 に示す。いずれの飛灰溶出液も 2400 mg/L 以上の Ca(II)が含まれていた。この結果は、飛灰溶出液中の Pb(II)を定量するには、極めて高濃度の Ca(II)の許容限界が要求されることを示している。Pb(II)の比色試薬として知られている水溶性ポルフィリン (TPPS) を用いて、Ca(II)が共存する 0.5 mg/L の Pb(II)を含む模擬溶出液を通常吸光度法により測定した結果を図 3-7 に示す。Pb(II)の測定値は、Ca(II)濃度に応じて急速かつ単調に減少した。その結果、Ca(II)の許容限界は 200 mg/L であった。TPPS 及びジブロモハイドロキシルフェニルポルフィリンの Pb(II)吸光度法の既報においても、各々 20 及び 300

mg/L の Ca(II)による妨害が報告されている<sup>27, 29-31)</sup>。ポルフィリン以外の比色試薬として、ジブロモ-*p*-メチルメチルスルフォナゾ又はジブロモ-*p*-カルボキシルスルフォナゾを用いた Pb(II)吸光光度法も報告されているが、これらの方法も微量な Ca(II)によって著しい妨害を受けていた<sup>51, 54)</sup>。このように、これまでの Pb(II)吸光光度法では Ca(II)の許容限界が十分とは言えなかったのに対し、本法の Ca(II)許容限界は図 3-7 からも期待されたように 4000 mg/L であった。これは、多くの飛灰溶出液中の Ca(II)濃度に相当する。

一方、Zn(II)の許容限界は、4 mg/L であった。これは、TPPS の Pb(II)吸光光度法における Zn(II)許容限界より小さいが、TPPS による方法<sup>27)</sup> と異なり Zn(II)のマスキング剤として危険性の高いシアン化物を使用していない。また、表 3-2 に示したように飛灰溶出液中の Zn(II)濃度は 0.18~6.7 mg/L であり、4 mg/L を超える試料は少なかった。したがって、本法の Zn(II)の許容限界は実用的な範囲にあると言える。

### 3. 3. 7 飛灰溶出液中の Pb(II)濃度測定

実際の飛灰溶液中の Pb(II)濃度を、最適化された鉛測定試薬を用いて測定した。本法と FAAS で得た Pb(II)測定値の相関を図 3-10a に示す。全体として、Pb(II)測定値は FAAS とよく一致していた ( $r = 0.996$ )。Pb(II)の濃度が濃い場合は、妨害イオンの濃度は相対的に低いため、より良好な結果が得られたと考えられる。Pb(II)濃度が低く、希釈することなく測定した飛灰溶出液 (Nos. 1~12) の Pb(II)測定値の相関を図 3-10b に示す。本法の測定値は、FAAS による測定値よりわずかに低くなる傾向が認められた。許容限界を上回る濃度の Ca(II)による妨害のため、測定値が低下したと考えられる (表 3-2)。しかしながらその影響は小さく、この場合においても測定値の相関は依然として良好であった ( $r = 0.984$ )。

## 3. 4 まとめ

ポルフィリン導入ポリマーである PP-AAm を、飛灰溶出液の Pb(II)濃度測定における比色試薬として用いた。PP-AAm と Pb(II)の錯体形成に伴う吸光度変化を利用した吸

光光度法であるが、専用の鉛簡易測定装置 (Pb-100) を開発し、測定操作の簡易化が図られている。PP を AAm ポリマーに組み込んだ効果と鉛測定試薬に適量の Ca(II) を添加したことにより、これまでの Pb(II)吸光光度法では達成できなかった Ca(II)の許容限界を得ることができた。また、EDDP をマスキング剤として用いることで、Zn(II)による妨害を実用可能なレベルまで軽減した。結果として、Ca(II)及び Zn(II)による妨害を受けないよう最適化された鉛測定試薬を用いることで、実際の飛灰溶出液の Pb(II)濃度を FAAS と同様な精度で測定することができた。上記の実験成果に基づき、ポータブルな Pb-100 を用いた本法は焼却場現場で測定可能であり、焼却飛灰の迅速な管理および処理に貢献することが期待される。

**表 3-1 妨害イオンの許容限界**

Tolerance limits <sup>a</sup> (mg/L)	Ions
10000	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , NO <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
4000	Ca <sup>2+</sup>
20	Al <sup>3+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , F <sup>-</sup>
4	Co <sup>2+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
0.2	Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup>
0.05	Cd <sup>2+</sup>

<sup>a</sup> Pb(II)濃度が 0.5 mg/L の模擬溶出液の測定値が 0.45~0.55 mg/L に収まる最大の共存濃度

**表 3-2 飛灰溶出液の pH、Pb(II)、Ca(II)及び Zn(II)濃度**

No.	pH	mg/L			No.	pH	mg/L		
		Pb	Ca	Zn			Pb	Ca	Zn
1	12.4	0.11	2500	0.38	14	12.2	1.1	8490	0.77
2	12.5	0.23	4840	1.3	15	12.2	1.2	4960	0.13
3	12.5	0.24	4438	1.1	16	12.2	1.8	4650	0.48
4	12.4	0.29	3957	0.70	17	12.2	1.9	7690	0.71
5	12.4	0.30	4293	0.53	18	12.3	2.8	4840	0.23
6	12.5	0.34	4472	0.61	19	12.2	5.2	7230	2.3
7	12.4	0.38	4506	0.60	20	12.3	5.3	6810	0.29
8	12.4	0.61	4080	0.18	21	12.2	5.4	5240	0.22
9	12.4	0.67	2400	0.36	22	12.1	7.7	6770	3.0
10	12.4	0.68	3340	0.18	23	12.2	8.8	5710	6.4
11	12.6	0.68	3926	0.72	24	12.1	10	6970	3.8
12	12.4	0.69	6890	1.5	25	12.2	12	7570	5.1
13	12.2	1.1	5590	0.42	26	12.1	16	15000	6.7

FAAS により、Pb、Ca 及び Zn 濃度を測定した

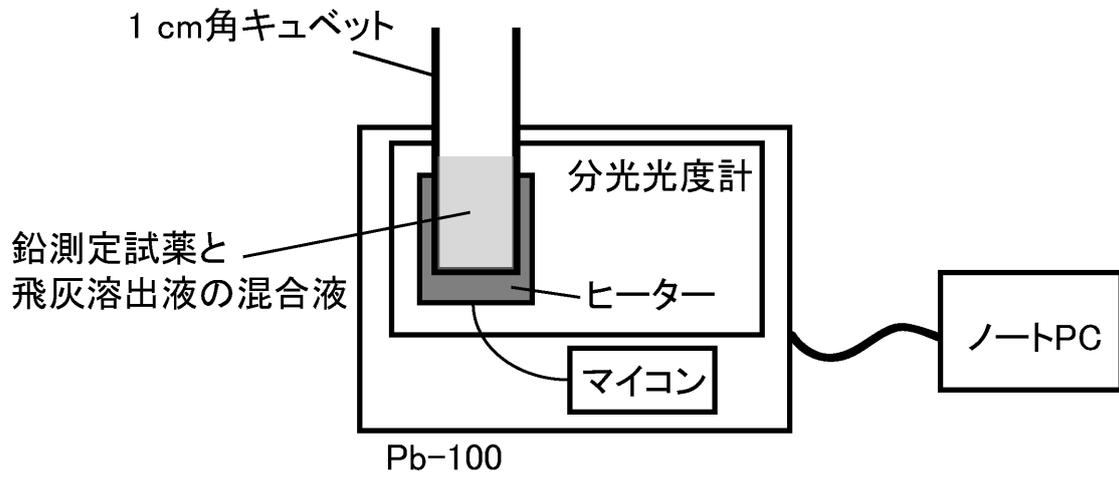
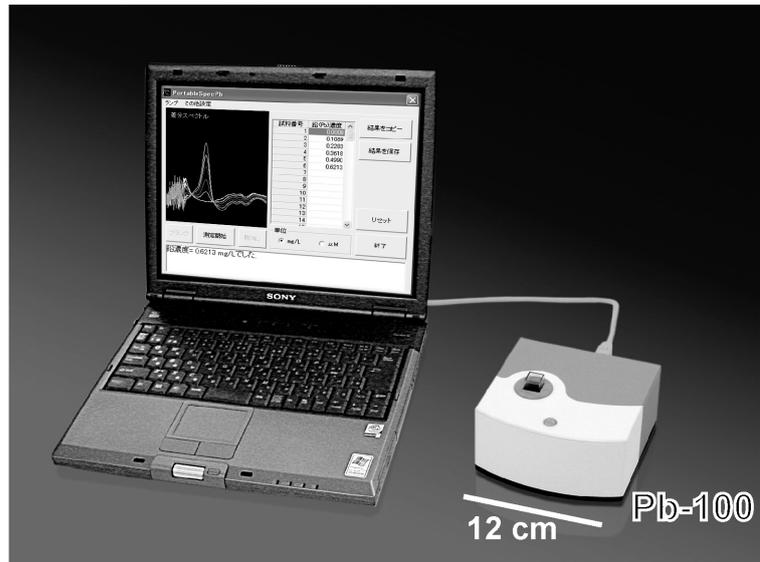


図 3-1 鉛簡易測定装置 Pb-100 の写真 (上) 及び構成 (下)

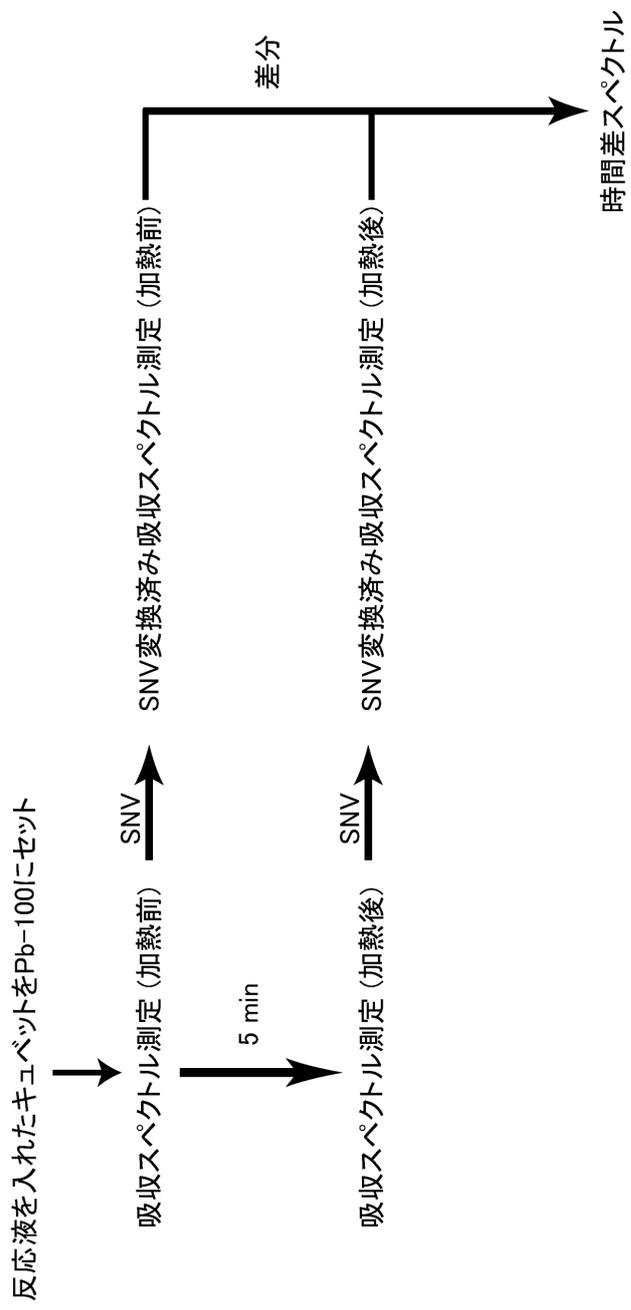


図 3-2 Pb-100 による時間差スペクトルの算出過程

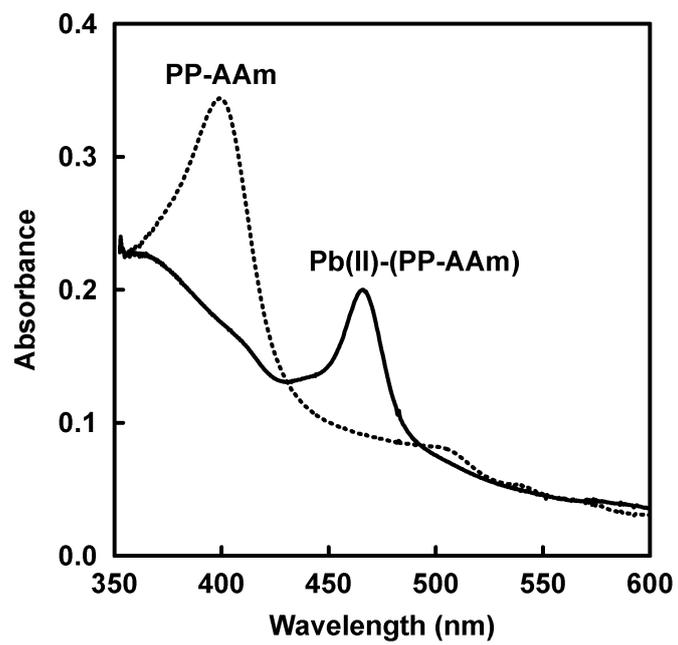


図 3-3 PP-AAm 及びその Pb(II)錯体の吸収スペクトル

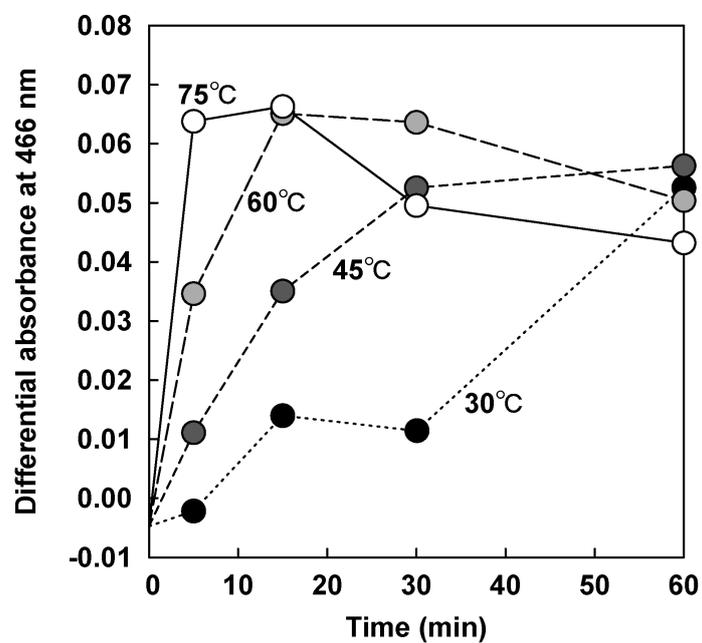


図 3-4 各種加熱温度毎の 466 nm における吸光度変化の経時変化

Pb(II)濃度が 0.5 mg/L の模擬溶出液と鉛測定試薬の混合液を加熱後、紫外可視分光光度計により吸光度変化を測定した。

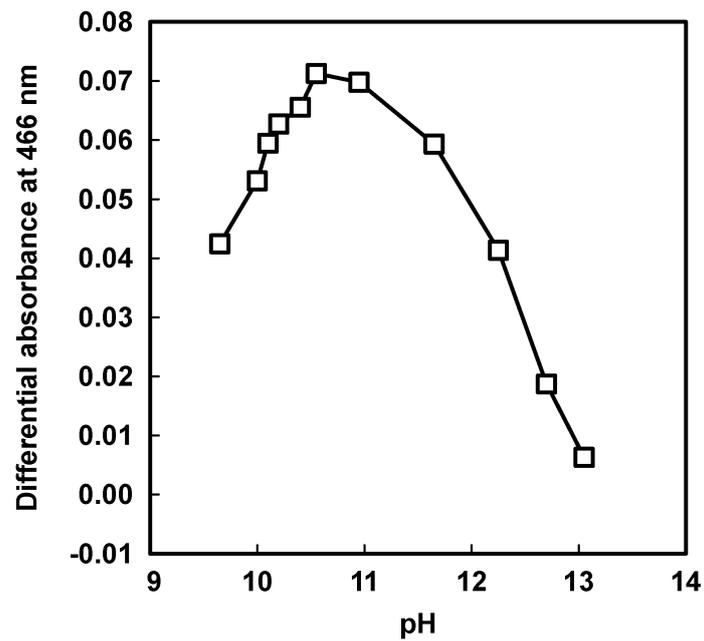


図 3-5 PP-AAm の Pb(II)錯体形成における pH 依存性

Pb(II)濃度が 0.5 mg/L の水酸化ナトリウム溶液と鉛測定試薬の混合液を 75°C で 5 分加熱後、紫外可視分光光度計により吸光度変化を測定した。

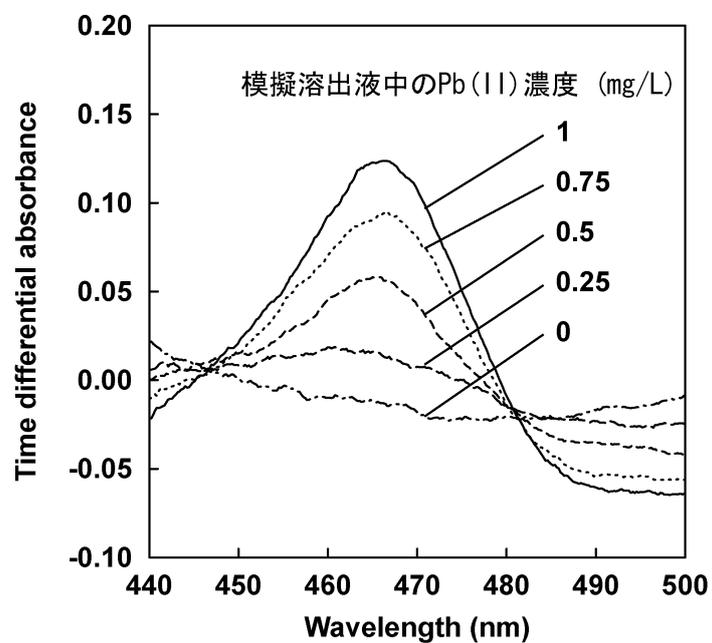


図 3-6 Pb-100 で取得した鉛測定試薬の時間差スペクトル  
Pb(II)濃度が 0、0.25、0.5、0.75 及び 1 mg/L の模擬溶出液を用いた。

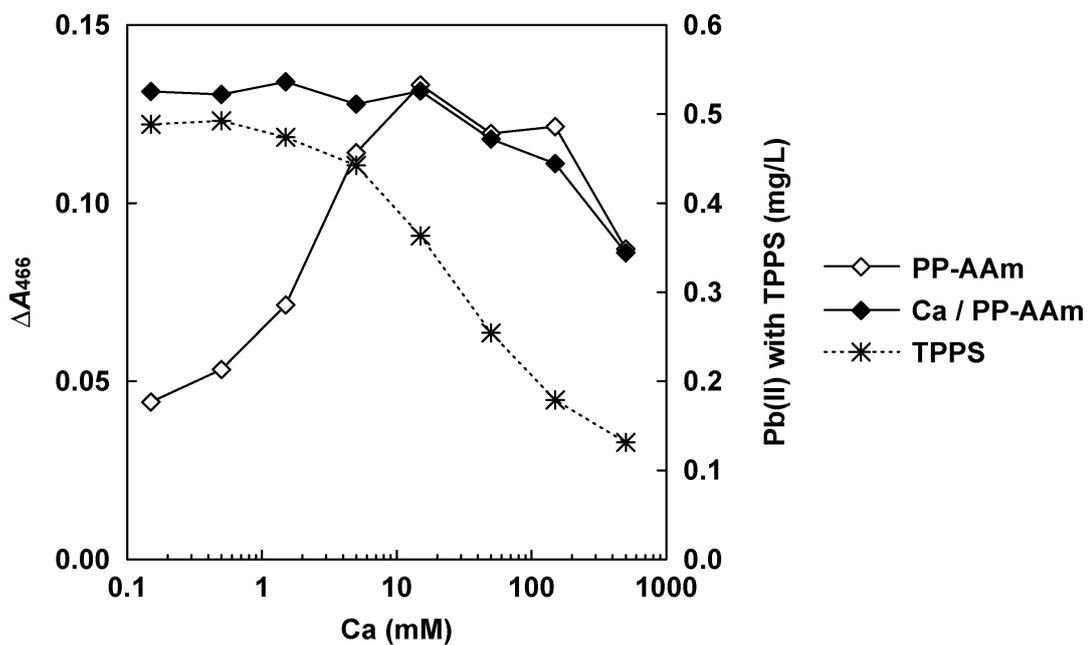


図 3-7 模擬溶出液中の共存 Ca による  $\Delta A_{466}$  への影響

PP-AAm のみの鉛測定試薬 (PP-AAm) 及び PP-AAm と 14 mM の Ca を含む鉛測定試薬 (Ca / PP-AAm) を用いて、0.5 mg/L Pb(II) と 0~300 mM Ca(II) を含む模擬溶出液を Pb-100 により測定し、 $\Delta A_{466}$  を得た。

PP-AAm に代わって 25  $\mu$ M の TPPS を含む鉛測定試薬 (TPPS) と同模擬溶出液を混合し 75°C で 5 分加熱し、紫外可視分光光度計を用いた通常の吸光光度法により Pb(II) 濃度を算出した。

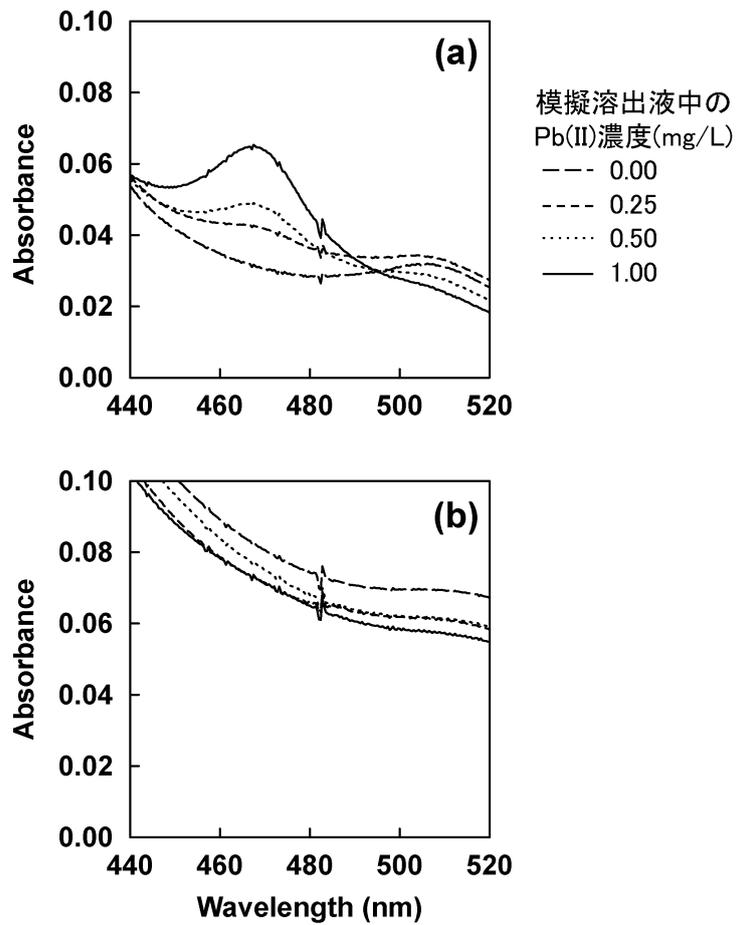


図 3-8 PP と Pb(II)を含む反応液の吸収スペクトル

(a) PP のみを含む鉛測定試薬 (10  $\mu$  M PP in 20 mM CAPS at pH 10) と模擬溶出液 (0~1 mg/L Pb(II)) を 75°C で 5 分反応後、紫外可視分光光度計により吸収スペクトルを測定した。

(b) PP に加え 10 mM の Ca を含む鉛測定試薬を用いて同模擬試料を測定した。

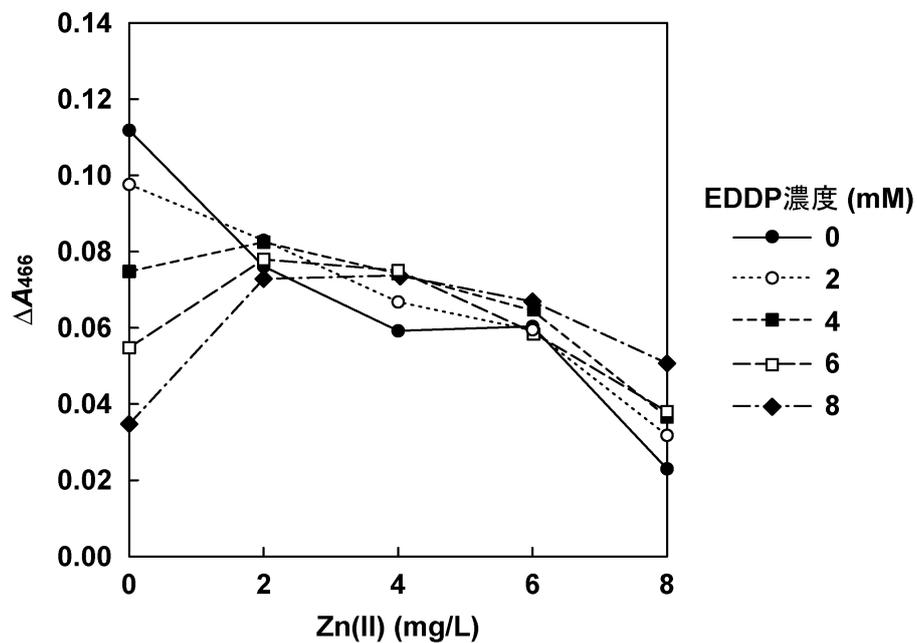


図 3-9 模擬溶出液中の共存 Zn(II)による  $\Delta A_{466}$  への影響と

EDDP による Zn(II)のマスキング効果

PP-AAm と 14 mM の Ca(II)に加え、0~8 mM の EDDP を含む鉛測定試薬を用いて模擬溶出液 (0.5 mg/L Pb(II) & 0~8 mg/L Zn(II)) を Pb-100 により測定し、 $\Delta A_{466}$  を得た。

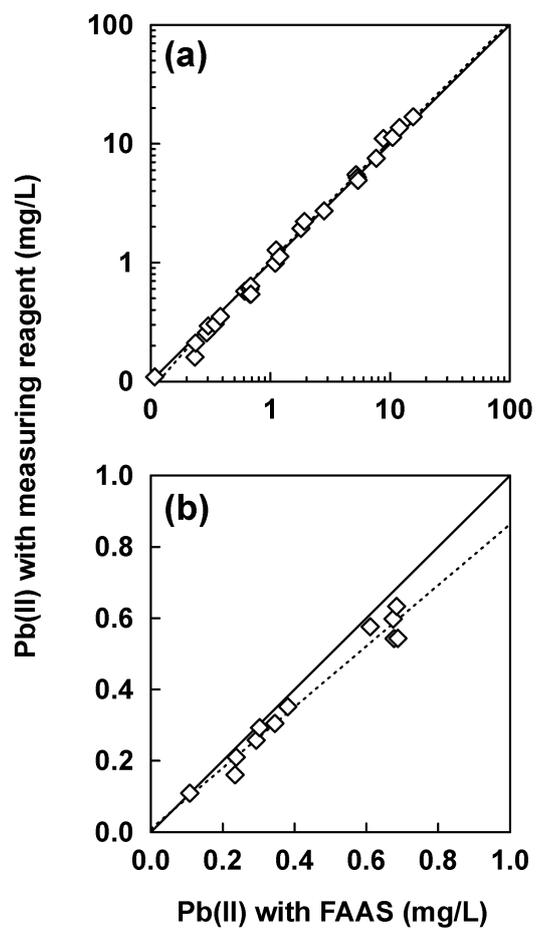


図 3-10 飛灰溶出液中の Pb(II)濃度測定

(a) すべての飛灰溶出液 (Nos. 1~26) 及び (b) Pb(II)濃度が 1 mg/L 以下の飛灰溶出液 (Nos. 1~12) の測定結果。実線および点線は、理想値および一次回帰式を表す。

## 第4章 パラメータ設計を用いた鉛測定試薬の組成最適化

### 4.1 はじめに

埋め立て処理された焼却飛灰からだけでなく、製品の製造や使用の過程におけるPb(II)の流出も懸念されている。そのため、埋立基準と共に、環境基準、排水基準、土壌含有基準および土壌溶出基準といった規制値が複数設定されており、Pb(II)濃度を測定すべき環境試料は多岐に渡る。

水溶性ポルフィリンである 5,10,15,20-tetrakis (*N*-methylpyridinium-4-yl)-21*H*, 23*H*-porphine (TMPyP) は、常温で Pb(II)と速やかに錯体を形成し、480 nm 付近の吸光度が鋭敏に変化するため、Pb(II)吸光光度法の優れた比色試薬として知られている<sup>32)</sup>。TMPyPも、他の比色試薬同様に、共存物質による妨害を受けるため、多種多様な成分が未知量混在する実際の検液に、そのままでは適用できない。さらに、多岐に渡る環境試料を対象とする場合、飛灰溶出液のように妨害成分を特定できず、対策を講じることは難しい。

パラメータ設計は田口が提唱したロバスト設計手法であり、品質工学の分野で活用されている<sup>59, 60)</sup>。パラメータ設計では、ノイズが意図的に入る状況で検討を行い、製品機能や計測方法がノイズに影響されないよう制御可能なパラメータを調節することとなる。ここで、意図的に導入したノイズを誤差因子、調節可能なパラメータを制御因子と呼ぶ。実験によって制御因子の適切な水準を探索することになるが、制御因子が複数の場合、検討すべき条件は膨大となり、すべてを実施することは現実的でない。例えば、7つの制御因子があり、各々に3水準を設定した場合、 $3^7=2187$ 通りの条件が生じる。パラメータ設計では、実際に検討する条件を直交表にしたがって絞り込む。品質工学で多用されている  $L_{18}$ 直交表(表 4-1)を用いれば、2及び3水準の制御因子を各々最大で1及び7つ割り付けることができ、18通りの条件でのみ実験を行えばよい。それだけの情報があれば、各実験の結果とそのときの制御因子の水準との関係から、適切な水準を合理的に見出すことができる。ここで、各実験の結果とは、各条件での製品機能や計測方法の優劣であり、それを定量化した SN 比が評価指標として用いら

れる。

本研究では、マスクング剤を多種類併用することで、夾雑成分による妨害に強い鉛測定試薬を作製できるのではないかと考えた。そこで、TMPyP と共に最大で 7 種類のマスクング剤を含む鉛測定試薬を調製し、検討した。各マスクング剤濃度および妨害成分を制御因子および誤差因子とし、Pb(II)濃度に対する TMPyP の吸光度変化が誤差因子によらず一定の応答を示すようなマスクング剤の配合を、パラメータ設計により決定した。

## 4. 2 実験方法

### 4. 2. 1 試薬

使用したマスクング剤は、EDDP、エチレンジアミン二酢酸 (EDDA; TCI Co., Ltd.)、ジアミノヘキサン四酢酸 (DAHTA; TCI Co., Ltd.)、イミノ二酢酸 (IDA; Dojindo Laboratories)、イミダゾール (IMZ; Wako)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (リン酸 Na; Wako) 及びニトリロトリプロピオン酸 (NTP; TCI Co., Ltd.) である。CAPS を pH 緩衝液として使用し、標準土壌として、EnviroMAT (SS-1, SCP SCIENCE, QC, Canada) を用いた。

### 4. 2. 2 鉛測定試薬および検液の調製

超純水に TMPyP (Dojindo Laboratories) を溶解し、0.5 mM の TMPyP 原液を作製した。マスクング剤原液として、500 mM の EDDP、0.5 mM の EDDA、5 mM の DAHTA、0.5 mM の IDA、1000 mM の IMZ、5 mM のリン酸 Na 及び 1000 mM の NTP 水溶液を用意した。いずれも NaOH を用いて pH 値を 10 に調整した。同様に 100 mM の CAPS 緩衝液 (pH 10) を調製した。各マスクング剤原液を適切な割合で混合し、超純水を加えて 3.95 mL とした後、CAPS 緩衝液を 1 mL、TMPyP 原液を 0.05 mL 加えて鉛測定試薬を得た。

土壌溶出液は、環境省が定める方法 (環告 46 号試験) を参考にして調製した。EnviroMAT (5 g) に超純水を 50 mL 加えた懸濁液を、振とう機 (SR-2w, TAITEC Co.,

Ltd.) により 200 rpm で 6 時間振とうした。約 20 分間静置後、上澄みを孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の酢酸セルロースフィルター (DISMIC-25CS, ADVANTEC) でろ過し、土壌溶出液を得た。土壌溶出液中の Pb(II)濃度を ETAAS (Z-5000, Hitachi, Ltd.) で、Zn(II)及び Ca(II)濃度を FAAS により測定した。原子吸光分析用の  $1000 \text{ mg/L}$  Pb(II)標準液 (Kanto Chemical) を大過剰の超純水または土壌溶出液に添加することにより、Pb(II)濃度が 0、25、50 及び  $100 \mu\text{g/L}$  の検液を得た。

#### 4. 2. 3 因子の割り付けと測定方法

鉛測定試薬中の各マスキング剤濃度を制御因子とした。その水準を表 4-2 に示す。水準 2 の濃度は、各マスキング剤を単独で使用したときの至適濃度である。表 4-2 に示した水準を、 $L_{18}$  直交表の第 2 から 8 列目 (列 B から H) に割り付け、直交表に従って鉛測定試薬を調製した。例えば実験 No.8 の場合、鉛測定試薬中の EDDP、EDDA、DAHTA、IDA、IMZ、リン酸 Na 及び NTP の濃度は、水準 3、2、3、2、1、3 及び 1 を採用することとし、それぞれ 50、0.005、0.5、0.005、5、0.5 及び 5 mM となる。検液を超純水または土壌溶出液で調製した場合を誤差因子 N1 または N2 とした。N1 は Pb(II)以外の成分を含まないのに対し、N2 は Pb(II)と共に土壌溶出液と同じ成分を含むことになる。鉛測定試薬 0.2 mL と検液 0.2 mL を混和し、477 nm の吸光度 ( $A_{477}$ ) を紫外可視分光光度計により測定した。このとき、検液に超純水を用いたときの混合液をブランクとした。ここまでの一連の実験の流れを図 4-1 に示す。この測定法を未知検液に適用する際は、N1 の Pb(II)溶液を用いて  $A_{477}$  と Pb(II)濃度の比例関係式を導出し、未知検液で得た  $A_{477}$  を代入して Pb(II)濃度を見積もることになる。したがって、ゼロ点比例式を用いて動特性の SN 比 (デシベル変換値) を算出することとした。SN 比の算出式を図 4-2 に示す<sup>61)</sup>。直交表実験によって得た 18 個の SN 比から、各制御因子の要因効果および主効果を、品質工学における一般式に従って算出した<sup>61)</sup>。全要因効果の平均値に各制御因子の主効果を加算することで SN 比を推定し、それが最大となる水準を選択して最適条件とした。一方、すべての水準が 2 の場合を、改善がなされる前の現行条件とした。確認実験では、現行条件および最適条件での鉛測定試薬を調製し、直交表実験と同様の測定を行った。検出限界は、SN 比を真数に変換し、その平方

根の逆数を3倍して算出した。

### 4.3 結果および考察

#### 4.3.1 土壌溶出液の成分

土壌溶出液からPb(II)は検出されなかった ( $5 \mu\text{g/L}$  未満)。このことから、誤差因子 N1 と N2 の検液の Pb(II)濃度は同じであることが確認された。一方、土壌溶出液中の Zn(II)及び Ca(II)濃度は  $0.55$  及び  $560 \text{ mg/L}$  であった。N2 の検液には、モル濃度で Pb(II)の  $17$  及び  $28000$  倍以上の Zn(II)及び Ca(II)がそれぞれ含まれていることになる。土壌溶出液にはその他にも未測定成分が含まれることから、N2 の Pb(II)以外の成分は N1 と大きく異なることが示された。

#### 4.3.2 直交表実験

直交表に従って調製された各鉛測定試薬を用いたときの、検液の Pb(II)濃度と  $A_{477}$  の関係を図 4-3 に示す。各実験で得られた SN 比を表 4-1 に示す。SN 比の最大値、最小値および平均値は、 $-22.0$ 、 $-34.6$  及び  $-27.9 \text{ dB}$  であった。例として実験 No.5 に着目すると、誤差因子 N1 の場合、 $A_{477}$  は Pb(II)濃度にはほぼ比例して増加した。誤差因子 N2 のとき、 $A_{477}$  は N1 と比べて全体的に高い値をとり、ゼロ点を通らない応答を示した。これは、土壌溶出液中の成分による妨害影響と考えられる。また、このときのマスク剤濃度では効果が不十分であることを示している。この実験 No.5 の SN 比は  $-27.5 \text{ dB}$  であり、他の SN 比と比べて中程度であった。実験 No.7 においても、N2 のときの  $A_{477}$  は、N1 より高い値を示した。しかしながら、実験 No.5 の場合より N1 と N2 の応答は近接しており、相対的に良好な SN 比を示した。このときの各マスク剤の濃度が、妨害成分の影響を除去するのに比較的適切であったことを示している。

表 4-3 に、SN 比の分散分析表を示す。列 G に割り付けたリン酸 Na の効果が最も大きく、列 C に割り付けた EDDA がそれに続いている。図 4-4 に SN 比の要因効果図を示す。列 B に割り付けた EDDP は、水準数の増加に従い主効果が増加した。これは、EDDP は有効なマスク剤であり、高濃度添加することが望ましいことを示唆してい

る。一方、列 C 及び E に割り付けた EDDA 及び IDA は右肩下がりの傾向を示し、これらを添加することは逆効果であることが示された。これらは妨害成分と結合せず、測定対象の Pb(II)と結合することによって TMPyP と Pb(II)の錯体形成を阻害したと考えられる。それ以外の列 D、F、G 及び H に割り付けた DAHTA、IMZ、リン酸 Na 及び NTP は、水準 2 で最大値を示す山型となった。これらは適量であれば効果があり、その至適濃度は水準 2 付近であることを示唆している。列 G に割り付けたリン酸 Na の主効果は、水準 3 でとくに低かった。これは、列 G の水準が 3 のとき SN 比が低下する傾向にあることを示している。実際、列 G の水準が 3 である実験 No.3 では、N2 での  $A_{477}$  が顕著に高く、N1 の応答と大きく隔たり (図 4-3)、SN 比はとくに低かった (表 4-1)。その他に、 $L_{18}$  直交表において列 G の水準値が同じく 3 となる実験 No.4、8、11、13 及び 18 においても同様な傾向が共通して観察された。土壌溶出液には高濃度の Ca(II)が含まれていたため、不溶性のリン酸カルシウムによる白濁が生じ、吸光度が増加したと考えられる。その結果、実験 No.3 のように、N2 はゼロ点比例式から大きく逸脱するとともに N1 との不一致も増強され、SN 比が著しく低下したと考えられる。

#### 4. 3. 3 最適条件の選定と確認実験

本研究対象のような受動的動特性を利用した計測システムは、感度を合わせ込む必要がなく、SN 比のみで評価できる<sup>60)</sup>。各制御因子の水準値がすべて 2 の現行条件に対して、SN 比の要因効果が最も高くなる水準を選択し、最適条件とした (図 4-4)。各条件で推定された SN 比 (推定値) と確認実験で得られた SN 比 (確認値) を表 4-4 に示す。また、現行条件に対する最適条件での SN 比の増加量である利得も表 4-4 に示した。最適条件の確認値は推定値との差が 0.8 dB とほぼ等しかったのに対し、現行条件の確認値は推定値より 2.9 dB 小さかった。その結果、利得は推定値より 2.1 dB 大きい 4.1 dB であった。利得が推定値と一致せず、利得の再現性は乏しかったものの、利得は正であり、最適条件の確認値は現行条件の確認値および推定値のいずれよりも大きく、改善効果が認められた。現行条件の確認値は直交表実験で得た SN 比と比べて平均以上であり、現行条件であってもマスキング剤濃度は比較的適切であったと言える。それでも最適条件の確認値は現行条件より良好であり、さらに直交表実

験で得た SN 比の最大値以上でもあった。以上の結果より、パラメータ設計により見出された最適条件は、数ある組み合わせの中から適切なマスクング剤濃度の水準を選択していることを示している。

#### 4. 3. 4 最適化された試薬の有用性

本研究では誤差因子として Pb(II)を含む検液の溶媒に超純水 (N1) と土壤溶出液 (N2) を用いた。最適条件の鉛測定試薬は、N1 と N2 の差異が極力生じないように設計されているため、妨害成分が土壤溶出液レベルかそれ以下であれば、最適条件の SN 比 (-21.5 dB) で Pb(II)濃度を測定できる。この SN 比から算出された Pb(II)の検出限界は  $36 \mu\text{g/L}$  であった。これは Pb(II)の排水基準および埋立基準 (100 および  $300 \mu\text{g/L}$ ) を下回る。すなわち、検液がこれらの基準値を満たしているかどうかの判定に用いることができる。この最適化された試薬を用いた Pb(II)の吸光光度法に、妨害成分の影響を除去する別の方法を任意に併用することもできる。そのような方法としてスペクトル変換を用いた。鉛測定試薬と検液 (N1 及び N2) との混合液の吸光度を 374~608 nm のスペクトルとして測定し SNV 変換を適用した。変換後の  $A_{477}$  も Pb(II)濃度に比例し、-10.9 dB の SN 比を得た。これは Pb(II)の検出限界に換算すると  $11 \mu\text{g/L}$  となり、環境基準および土壤溶出基準 (いずれも  $10 \mu\text{g/L}$ ) にほぼ相当する。吸収スペクトルの測定には分光器を備えた分光光度計を必要とし、単波長用の吸光度計と比べて一般に高価であるが、可搬性に優れた安価な分光光度計が既に開発されている。実際の分析への適用に当たっては、用途とコストに応じて装置構成を検討する必要があるが、いずれにしても、鉛測定試薬自身が妨害成分の影響を受けにくいことが簡易測定においては最も望ましく、本パラメータ設計によって最適化されたマスクング剤組成は、その要求を十分に満たすものであった。以上のように、妨害成分の影響を受けことなく微量な Pb(II)を検出できる極めて簡易な Pb(II)の吸光光度法を開発することができた。環境分析においては、採取した場所や時期によって試料の成分が大きく異なるため、不定な夾雑成分による妨害を如何に除去するかが常に課題となる。誤差因子を導入し、その影響を抑えるよう制御因子を調節するパラメータ設計は、新たな分析法開発の有用な手段として期待できる。

表 4-1  $L_{18}$  直交表と直交表実験によって得られた SN 比

実験 No.	A <sup>a</sup>	B	C	D	E	F	G	H	SN 比 (dB)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	-25.8
2	1	1	2	2	2	2	2	2	-22.0
3	1	1	3	3	3	3	3	3	-34.6
4	1	2	1	1	2	2	3	3	-30.1
5	1	2	2	2	3	3	1	1	-27.5
6	1	2	3	3	1	1	2	2	-28.6
7	1	3	1	2	1	3	2	3	-22.7
8	1	3	2	3	2	1	3	1	-30.9
9	1	3	3	1	3	2	1	2	-27.6
10	2	1	1	3	3	2	2	1	-28.1
11	2	1	2	1	1	3	3	2	-30.3
12	2	1	3	2	2	1	1	3	-30.2
13	2	2	1	2	3	1	3	2	-29.7
14	2	2	2	3	1	2	1	3	-24.1
15	2	2	3	1	2	3	2	1	-28.7
16	2	3	1	3	2	3	1	2	-23.8
17	2	3	2	1	3	1	2	3	-26.7
18	2	3	3	2	1	2	3	1	-30.4

<sup>a</sup> 本研究では、列 A は使用しない

**表 4-2 制御因子として割り付けたマスク剤とその鉛測定試薬中の濃度**

列	マスク剤	鉛測定試薬中の濃度 (mM)		
		水準 1	水準 2	水準 3
B	EDDP	0.5	5	50
C	EDDA	0	0.005	0.05
D	DAHTA	0.005	0.05	0.5
E	IDA	0	0.005	0.05
F	IMZ	5	50	200
G	リン酸 Na	0.005	0.05	0.5
H	NTP	5	50	200

**表 4-3 制御因子の分散分析表**

列	マスク剤	平方和 S	自由度 f	分散 V	F 比	P 値
B	EDDP	7.39	2	3.69	1.26	0.402
C	EDDA	41.9	2	21.0	7.13	0.072
D	DAHTA	5.72	2	2.86	0.972	0.473
E	IDA	12.9	2	6.46	2.20	0.259
F	IMZ	7.67	2	3.83	1.30	0.391
G	リン酸 Na	88.0	2	44.0	15.0	0.028
H	NTP	7.53	2	3.76	1.28	0.396
	e	8.82	3	2.94	1.26	0.402

**表 4-4 最適および現行条件での SN 比の確認値、推定値および利得**

	SN 比 (dB)	
	確認値	推定値
最適条件	-21.5	-20.7
現行条件	-25.6	-22.7
利得	4.1	2.0

No.	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

列	マスティング剤	測定試薬中の濃度 (mM)		
		水準1	水準2	水準3
B	EDDP	0.5	5	50
C	EDDA	0	0.005	0.05
D	DAHTA	0.005	0.05	0.5
E	IDA	0	0.005	0.05
F	Imida	5	50	200
G	Phos	0.005	0.05	0.5
H	NTP	5	50	200

①

鉛測定試薬を調製

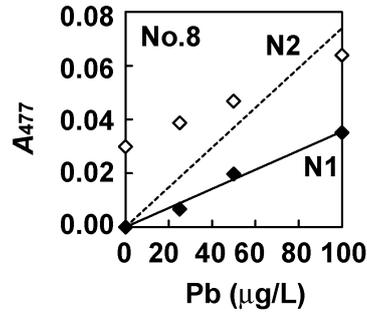
②

0、25、50、100  $\mu\text{g/L}$  in Milli-Q ...N1  
 0、25、50、100  $\mu\text{g/L}$  in 土壤溶出液 ...N2

混合

③

$A_{477}$ 測定



Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	$A_{477}$	
	N1	N2
0	0.0000	0.0300
25	0.0067	0.0388
50	0.0198	0.0468
100	0.0351	0.0640

図 4-1 直交表実験の過程

例として、実験 No.8 の場合を示す。①直交表を参照し、水準を決める。②決められた水準に従って鉛測定試薬を調製する。③誤差因子 N1 及び N2 の検液と反応させて  $A_{477}$  を測定し、データを得る。

①一つの直交表実験で得られるデータ構造

Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	A477	
	N1	N2
Cd <sub>1</sub>	A <sub>11</sub>	A <sub>12</sub>
Cd <sub>2</sub>	A <sub>21</sub>	A <sub>22</sub>
Cd <sub>3</sub>	A <sub>31</sub>	A <sub>32</sub>
Cd <sub>4</sub>	A <sub>41</sub>	A <sub>42</sub>

以下、信号因子及び誤差因子の水準数を  $k(=4)$  及び  $n(=2)$  とする

②有効序数  $r$  と線形式  $L$  を求める

$$r = \sum_{i=1}^k Cd_i^2$$

$$L_1 = \sum_{i=1}^k Cd_i A_{i1}$$

$$L_2 = \sum_{i=1}^k Cd_i A_{i2}$$

③変動  $S$  及び分散  $V$  を求める

$$S_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n A_{ij}^2$$

$$S_\beta = \frac{(L_1 + L_2)^2}{nr}$$

$$S_{N \times \beta} = \frac{L_1^2 + L_2^2}{r} - S_\beta$$

$$S_e = S_T - S_\beta - S_{N \times \beta}$$

$$S_N = S_T - S_\beta$$

$$V_e = \frac{S_e}{kn - n}$$

$$V_N = \frac{S_N}{kn - 1}$$

④SN比  $\eta$  は以下の式で求められる

$$\eta = 10 \text{Log} \frac{\frac{1}{nr} (S_\beta - V_e)}{V_N}$$

図 4-2 SN 比の算出方法

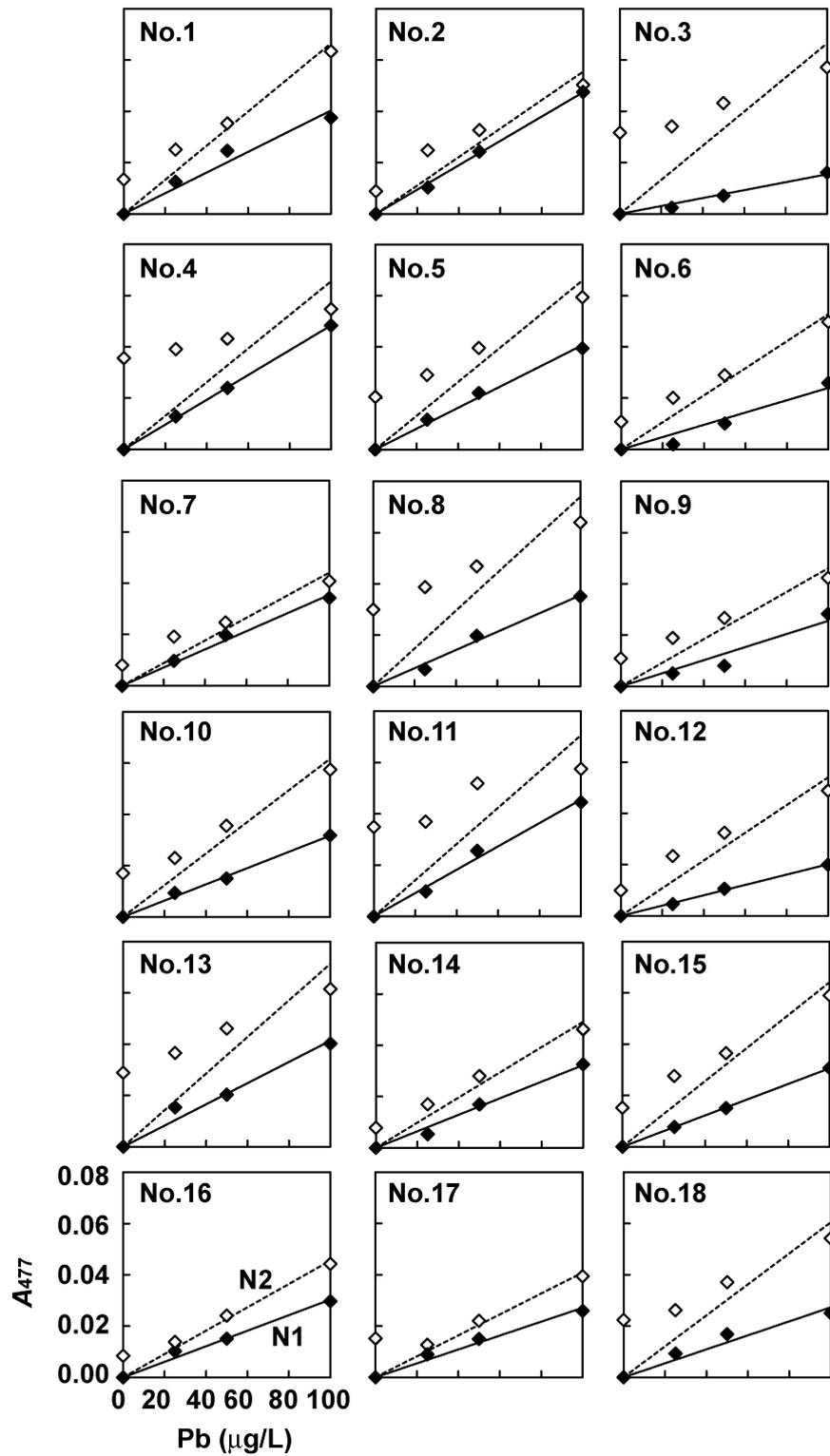


図 4-3 検液の Pb(II)濃度に対する  $A_{477}$  の変化

◆と実線および◇と点線は、

誤差因子 N1 及び N2 でのプロットと原点を通る回帰直線を表す。

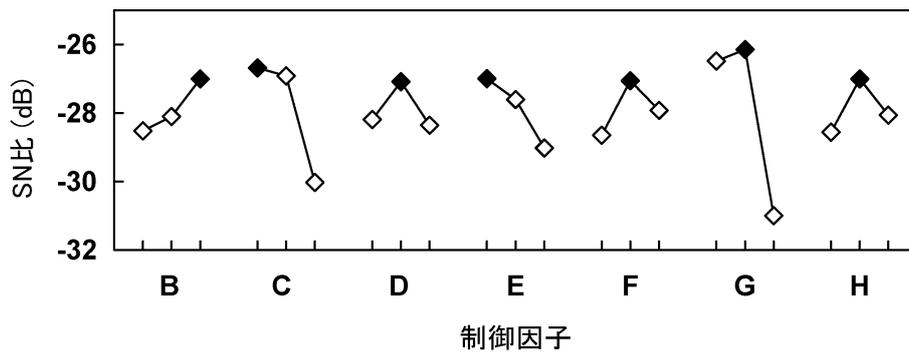


図 4-4 SN 比に対する要因効果図

制御因子 B~H は、表 4-2 のマスキング剤に対応し、◆は最適条件の水準を表す。

## 第5章 メタロチオネイン解離亜鉛の吸光検出に基づく重金属毒性の評価方法

### 5.1 はじめに

カドミウム、水銀および鉛といった有害金属の長期にわたる摂取は、人の健康に重大なダメージを与える可能性がある。それゆえ、環境試料の重金属による汚染レベルを迅速に評価する方法の開発は重要である。個々の金属濃度は、FAAS、ETAAS、ICP-AES 及び ICP-MS といった機器分析によって定量できるが、重金属による毒性を総合的に評価するといった場合には、これらの手法は適していない。重金属毒性は、存在する金属の組成や、その化学的形態および共存する物質によって変化することが知られている<sup>62-66</sup>。このような場合、水生生物<sup>67, 68</sup>、微生物<sup>64, 65, 69</sup>あるいは培養細胞<sup>62, 63, 66, 70</sup>といった供試生物に試料を曝露し、その生理活性を観察するバイオアッセイ法（生物検定法）が用いられる。なかでも、発光バクテリアを供試生物とし、試料曝露による発光強度の低減率（発光阻害率）を毒性の指標としたバイオアッセイは、重金属毒性の評価に広く用いられてきた<sup>64, 65, 71-73</sup>。このアッセイ法は、簡単で迅速である一方、発光バクテリアの培養などの煩雑な操作を伴う。また、感度も十分とは言えず、 $1\ \mu\text{M}$  以下の濃度の有害金属を検出することは難しい。すなわち、供試生物を用いることなく、簡単で高感度に重金属毒性を評価できる方法が求められている。

重金属毒性の作用機序は極めて複雑であるが、一つの主な要因として、重金属と酵素タンパク質の相互作用が挙げられる。酵素タンパク質の SH 基やその他の結合サイトに有害金属が結合し、酵素の構造が変化して本来の機能を損なうと考えられている<sup>11, 74, 75</sup>。このような重金属毒性に対して生物は、SH 基リッチなペプチドを産生することで有害金属を捕捉し、無毒化する防御機構を備えている。代表的な SH 基リッチなペプチドとしては、植物、菌類および藻類に見られるファイトケラチン (PC)<sup>76, 77</sup>、動物細胞で産生されるメタロチオネイン (MT) が知られ<sup>13, 78</sup>、いずれも必須金属の恒常性維持と有害金属の解毒に関わる重要な生体分子と考えられている。哺乳類の MT は、おおよそ 60 のアミノ酸から成り、その約 1/3 は SH 基を有するシステインであり、通常の生理的条件下では Zn(II) が結合した状態 (Zn-MT) で観察される<sup>78, 79</sup>。そこへ有害金属

を曝露すると、有害金属が結合した MT が Zn-MT に代わって観察されると共に、MT の発現量が増加することが知られている<sup>13, 79-81)</sup>。これは、有害金属が Zn-MT に結合したときに Zn-MT から解離した Zn(II)が、重金属応答性転写因子である MTF-1 を活性化し、MT の発現を誘導するためと考えられている<sup>82-85)</sup>。それゆえ、Zn-MT を試料溶液に作用させたときの Zn-MT から解離した遊離な Zn(II)を測定することで、MT に結合して解毒される有害金属を間接的・網羅的に検出することができ、延いては、試料溶液の重金属毒性を総合的に評価できるのではないかと考えた。これまでの章でも述べたように、ポルフィリンは Zn(II)と安定な錯体を形成し、鋭敏な吸光度変化を示すため<sup>36, 45, 46, 58)</sup>、Zn-MT から解離した Zn(II)の検出に適していると考えられる。

以上の背景を踏まえ本研究では、水溶性ポルフィリン TPPS 及び Zn-MT を試料溶液に作用させて生じた吸光度変化を重金属毒性の指標として用いる新たな毒性評価法を検討した。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 試薬

Zn-MT 溶液 (1380 mg/L) は、Alexis Biochemicals (ALX-202-070, CA, USA) から購入した。製品データシートより、Zn-MT を構成する MT は、ウサギ肝臓由来の MT-1a、MT-2e 及び少量の MT-2d といったアイソフォームの混合物であり、その平均分子量は 6145 である。Zn-MT 溶液中の Cd(II)、Cu(II)及び Zn(II)濃度を FAAS によって測定した結果、Zn-MT 溶液には Cd(II)及び Cu(II)が含まれていなかったことから、総濃度 (1380 mg/L) は Zn(II)及び MT の両濃度の和と見なし、総濃度から Zn(II)濃度を差し引いて MT 濃度を見積もった。酢酸 (Wako)、MES、モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS; Dojindo Laboratories)、トリスヒドロメチル・メチルアミノプロパンスルホン酸 (TAPS; Dojindo Laboratories) 及び CAPS を pH 4.1、5.5~6.1、7.2、7.7~8.9 及び 9.9~12.6 の pH 緩衝液として使用した。凍結乾燥された発光バクテリア (*Vibrio fischeri*) は、土壌毒性検査システム (RT01, Hitachi Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) の消耗品である酸抽出用毒性成分評価キット (Metal kit RTM 22, Hitachi Chemical Co.,

Ltd.) として入手した。

### 5. 2. 2 金属イオンと試料溶液

Ag(I)、Bi(III)、Ca(II)、Cd(II)、Co(II)、Cu(II)、Hg(II)、Mg(II)、Mn(II)、Ni(II)、Pb(II)及び Zn(II)の 1000 mg/L の原子吸光分析用標準液 (Kanto Chemical) をこれらの金属イオン原液として用いた。AlCl<sub>3</sub>、CrCl<sub>3</sub>、FeCl<sub>3</sub> 及び K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> の水溶液を用意し、Al(III)、Cr(III)、Fe(III)及び Cr(VI)の原液とした。これらの金属イオン原液を適宜混合・希釈し、必要に応じて EDTA を添加した金属混合溶液を、毒性試験用の試料溶液として調製した。水道水 (TW)、研究所および瓦メーカーの未処理排水 (E1 及び E2)、河川水 (RW) といった実環境水 (10 mL) に、1000 mg/L の原子吸光分析用の Cu(II)標準液を 32  $\mu$  L 添加して模擬汚染水とした。これらは、遠心によって不溶物を除去した後、毒性試験を行った。その際の Cu(II)、Cd(II)、Ni(II)及び Ca(II)濃度を FAAS により測定した。

### 5. 2. 3 Zn-MT から解離した Zn(II)の吸光検出

TPPS (2.5  $\mu$  M)、Zn-MT (0~0.28  $\mu$  M) 及び金属イオン (0~2.5  $\mu$  M) を 50 mM の pH 緩衝液に溶解した反応液を調製し、30~90°C で 5~120 分間インキュベートした。同様の組成で金属を含まない反応液をブランクとして用意し、同様の条件でインキュベートした。ブランクに対する反応液の吸収スペクトル及び 423 nm の吸光度 ( $A_{423}$ ) を紫外可視分光光度計で測定した。

夾雑成分の影響を検討する際は、TPPS、Zn-MT 及び 1  $\mu$  M の Bi(III)に加え、0~100 mg/L の NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、NH<sub>3</sub>、NaNO<sub>2</sub>、NaNO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 又はフミン酸を含む反応液を用いた。

### 5. 2. 4 Zn-MT に結合した Cd(II)の検出

Zn-MT への Cd(II)の結合を、250 nm の吸光度を測定することで直接的に検出した。第 2 章で使用した SEC と同じ条件 (ただし、リン酸緩衝液の pH は 7.2) で反応液を 200  $\mu$  L 注入した。MT を含む画分が現れる保持時間を、220 nm の吸光度によるクロマ

トグラムから決定した上で、MT 画分の 250 nm の吸光度を測定した。

### 5. 2. 5 重金属毒性試験

重金属混合溶液および模擬汚染水を試料溶液とし、その重金属毒性を、発光バクテリア (*V. fischeri*) の発光阻害を指標としたバイオアッセイにより評価した。凍結乾燥状態の発光バクテリアを、滅菌済 2% NaCl 溶液に懸濁して再活性化した。その発光バクテリアを、0.5% Bacto yeast extract (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)、1.0% Bacto tryptone (Becton Dickinson)、2% NaCl 及び 1.5% agar (Wako) を含む Luria-Bertani (LB) 寒天培地上に播種し、25°C で 20 時間インキュベートした。LB 培地上の *V. fischeri* のコロニーを回収し、2% NaCl 溶液に懸濁した。遠心と 2% NaCl による洗浄を 2 回行い、懸濁液から培地成分を取除いた。遠心後のペレットを 2% NaCl に懸濁し、O.D.<sub>600</sub> が 5 になるよう調整した。試料溶液を 0.16 mL、超純水を 0.34 mL、4% NaCl を 1 mL 及び 100 mM MOPS (pH 7.2) を 0.5 mL 混合した溶液に、発光バクテリア懸濁液を 40  $\mu$  L 添加した。この反応液を 25°C で 15 分間インキュベートした後、蛍光分光光度計 (F-4500, Hitachi, Ltd.) を用いて 490 nm の発光強度 (BL) を測定した。このとき、測定モードを”発光”とし、励起側のシャッターは閉じ、蛍光側のスリット幅は 10 nm とした。試料溶液の代わりに超純水を用いて得た発光強度 (BL<sub>C</sub>) をコントロールとし、次式より発光阻害率 (INH%) を算出した。

$$\text{INH}\% = (\text{BL}_C - \text{BL}) / \text{BL}_C \times 100$$

同じ試料溶液の重金属毒性を、MT 解離 Zn(II)の検出による方法でも評価した。TPPS (5  $\mu$  M) 及び Zn-MT (0.42  $\mu$  M) を 100 mM MOPS (pH 7.2) に溶解した溶液 (0.2 mL) と、試料溶液の超純水による 200 倍希釈液 (0.2 mL) を混合し、75°C で 60 分間インキュベート後、 $A_{423}$  を測定し、毒性の指標とした。

## 5. 3 結果

### 5. 3. 1 Bi(III)によって Zn-MT から解離した Zn(II)の吸光検出

Zn-MT 溶液中の MT 及び Zn(II)濃度は、211 及び 1280  $\mu$  M であり、MT に対する Zn(II)のモル比は 6.1 であった。Bi(III)は MT へ強く結合することが知られている金属の一つである。そこで、TPPS、Zn-MT 及び Bi(III)を含む反応液を用いて、Zn-MT から解離した Zn(II)の吸光検出を検討した。反応液の吸収スペクトルを図 5-1a に示す。 $A_{423}$  は Bi(III)濃度に応じて上昇し、生じたスペクトルの形状は Zn(II)-TPPS 錯体のスペクトル形状と一致した<sup>34, 35, 58)</sup>。一方、Zn-MT を含まない反応溶液を用いた場合は、このようなスペクトルは観察されなかった (図 5-1b)。

### 5. 3. 2 反応条件の検討

加熱温度、加熱時間、pH 及び Zn-MT の量といった反応条件を、TPPS、Zn-MT 及び Bi(III)を含む反応液を用いて検討した。

様々な温度で反応液を加熱したときの  $A_{423}$  の経時変化を図 5-2 に示す。加熱温度が 30°C の場合、 $A_{423}$  は時間の経過と共に緩やかに増加し 120 分で約 0.1 に達した。より高温で加熱すると  $A_{423}$  の増加速度は上昇し、加熱温度が 75°C の場合は 60 分以降でほぼ一定値となった。さらに高温の 90°C で加熱した場合は、 $A_{423}$  は急速に上昇したものの 30 分以降は減少に転じた。MT 解離 Zn(II)を迅速かつ高感度に検出するため、以下の実験では、加熱時間および加熱温度を 75°C 及び 60 分とした。

様々な pH の緩衝液で調製した反応液を用いて pH の影響を検討した (図 5-3)。 $A_{423}$  は pH 7.7 で最大値を示し、pH 7 以下および 9 以上では急速に減少した。この結果から、反応液の pH は 7~9 が望ましいことが示された。以下の実験では、反応液の pH は生理的条件に近い 7.2 に設定した。

Zn-MT の濃度が異なる反応液を用いて Bi(III)濃度に対する  $A_{423}$  の変化を測定した (図 5-4)。 $A_{423}$  は、Bi(III)濃度に比例して増加し、やがて飽和し一定値を示した。Zn-MT が 0.07、0.14、0.21 及び 0.28  $\mu$  M のとき、 $A_{423}$  が飽和する Bi(III)濃度は、0.5、1、1.5 及び 2  $\mu$  M であった。Bi(III)濃度に対する  $A_{423}$  の応答の傾きである感度は Zn-MT の濃度に影響されずほぼ一定であったが、Zn-MT の濃度は  $A_{423}$  の応答可能な範囲の上限を規定していた。以下の実験では、反応液の Zn-MT 濃度は 0.21  $\mu$  M とした。

Zn(II)が解離するまでの一連の反応の進行を確認するために、最適化された条件でBi(III)の代わりにCd(II)を用い、Cd(II)のMTへの結合を調べた。Cd(II)を含む反応液を用いた場合も、Bi(III)の場合と同様に、 $A_{423}$ はCd(II)濃度に比例して上昇後、 $1.5\ \mu\text{M}$ で飽和に達した(図5-5)。その反応液のSECによるMT画分の保持時間は9.0分であった。その画分の250 nmの吸光度は、Cd(II)濃度に比例して上昇し、 $1.5\ \mu\text{M}$ で飽和後、一定となった(図5-5)。

### 5.3.3 夾雑成分の影響

実試料に含まれる様々な夾雑成分が $A_{423}$ に与える影響を調べるために、TPPS、Zn-MT及び $1\ \mu\text{M}$  Bi(III)に加え、NaCl、KCl、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{NH}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 又はフミン酸を含む反応液の $A_{423}$ を測定した。NaCl、KCl、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{NH}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ による $A_{423}$ の変動は7%以内であり、濃度依存的な影響は見られなかった。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (100 mg/L)により $A_{423}$ は12%減少したが、フミン酸 (100 mg/L)では32%減少し、濃度依存的減少が明確に認められた。

### 5.3.4 様々な金属イオンによるZn-MTからのZn(II)の解離

様々な金属イオンによるZn-MTからのZn(II)の解離を調べるため、TPPS、Zn-MT及び様々な金属イオン ( $0.5\ \mu\text{M}$ ) 含む反応液を用いて $A_{423}$ を測定した(図5-6)。Cu(II)を含む反応液が最も大きい $A_{423}$ を示した他、Pb(II)、Bi(III)、Cd(II)、Hg(II)、Co(II)、Ag(I)及びNi(II)を含む反応液も、この順に大きい $A_{423}$ を生じた。同様に外部からZn(II)を与えた反応液においても $A_{423}$ の変化が観察され、その値はPb(II)、Bi(III)、Cd(II)及びHg(II)による $A_{423}$ とほぼ等しかった。一方、Mn(II)、Al(III)、Fe(III)、Ca(II)、Mg(II)、Cr(VI)及びCr(III)といった金属を含む反応液では、有意な $A_{423}$ は観察されなかった。また、Zn-MTを含まない場合は、Zn(II)以外のいずれの金属イオンを与えても $A_{423}$ は変化しなかった(図5-6b)。

複数の金属イオンによるZn(II)の解離を検討するため、TPPS及びZn-MTと共に表5-1に示した複数の金属イオンを含む反応液を調製した。各々の金属イオンがZn-MTと独立して相互作用するならば、観測される $A_{423}$ は以下のような加算的な式で

与えられる。

$$A_{423} = 2k_{\text{Cu}}[\text{Cu}] + 2k_{\text{Pb}}[\text{Pb}] + 2k_{\text{Bi}}[\text{Bi}] + 2k_{\text{Cd}}[\text{Cd}] + 2k_{\text{Hg}}[\text{Hg}] + 2k_{\text{Co}}[\text{Co}] + 2k_{\text{Ag}}[\text{Ag}] + 2k_{\text{Ni}}[\text{Ni}] + 2k_{\text{Zn}}[\text{Zn}]$$

ここで、 $k_{\text{metal}}$  は、 $0.5 \mu\text{M}$  の各金属によって生じた  $A_{423}$ 、すなわち図 5-6a の値であり、 $[\text{metal}]$  は、反応液中の各金属イオン濃度 ( $\mu\text{M}$ ) である。実際に  $A_{423}$  を測定した結果、実測値は計算値とよく一致していた (図 5-7 及び表 5-1)。

### 5. 3. 5 重金属毒性評価におけるバイオアッセイとの比較

表 5-2 に示した Cu(II)、Cd(II)、Ni(II) 及び Ca(II) を様々な割合で含む金属混合溶液を調製した (Nos. 1~15)。また、金属イオンの組成は同じで  $50 \mu\text{M}$  の EDTA をさらに添加した金属混合溶液も調製した (Nos. 16~30)。これらの金属混合溶液および模擬汚染水 (TW、E1、E2、RW) を試料溶液として、発光バクテリアの発光阻害による毒性試験と、TPPS 及び Zn-MT を用いた  $A_{423}$  測定の両方を行った。 $A_{423}$  と INH% の相関を図 5-8 及び表 5-2 に示す。Nos. 1~15 の試料溶液で得た  $A_{423}$  は  $-0.006 \sim 0.188$  の範囲に、INH% は  $12 \sim 99\%$  の範囲に分散し、正の相関を示した。Nos. 16~30 の試料溶液で得た  $A_{423}$  は  $-0.052 \sim 0.123$  の範囲に分散し、Nos. 1~15 の場合と比べて値が小さくなる傾向が認められた。同じ試料 (Nos. 16~30) での INH% は  $-0.3 \sim 46\%$  となり、こちらも Nos. 1~15 の場合より小さくなる傾向が見られた。模擬汚染水の Cu(II)、Cd(II)、Ni(II) 及び Ca(II) の濃度を表 5-2 に示す。模擬汚染水からは各々異なる  $A_{423}$  が得られたが、INH% もまた  $A_{423}$  に連動して変化した。結果として、 $A_{423}$  と INH% の間には全体として正の相関が認められた。

## 5. 4 考察

MT と Zn(II) のモル濃度比が 6.1 であったことから、本研究で使用した Zn-MT は、1 個の MT 分子に約 6 個の Zn(II) が結合していると考えられる。MT は、1 分子に最大 7

個の Zn(II)を結合できることから<sup>78, 86)</sup>、MT の金属結合サイトの約 87%は Zn(II)によって占められていると考えられる。Bi(III)と MT の相互作用はよく調べられており、Zn(II)より強固に MT に結合することが知られている<sup>78, 86)</sup>。また、哺乳類動物への Bi(III)の曝露によって MT の発現が誘導されることや<sup>81)</sup>、微生物に対しては抗菌性を示すことも報告されている<sup>87)</sup>。そこで、反応条件を検討する金属として Bi(III)を用いた。TPPS、Zn-MT 及び Bi(III)を含む反応液の吸収スペクトルは Zn(II)-TPPS 錯体のスペクトルと一致し、そのピーク値である  $A_{423}$  は Bi(III)濃度依存的に増加した (図 5-1a)。この結果から、以下の反応が推察される。(1) Bi(III)が Zn-MT へ結合することにより、Zn-MT から Zn(II)が解離した。(2) 解離した Zn(II)が TPPS と錯体を形成し、 $A_{423}$  が増加した。

一連の反応を速やかに進行させるには室温以上の温度による加熱が必要であった (図 5-2)。TPPS と Zn(II)の錯化速度は常温では非常に遅いため<sup>34, 35, 58)</sup>、この反応が律速となっていると考えられる。一方、90°C以上の高温による長時間加熱により  $A_{423}$  は減少した。これは、ブランクの吸光度が増加したことによる見かけ上の減少である。すなわち、加熱による MT の分解または構造変化によって Bi(III)を含まないブランクにおいても Zn(II)が解離し、Zn(II)-TPPS 錯体が生じたと考えられる。 $A_{423}$  の同様な減少は、酸およびアルカリ性の反応液でも観察された (図 5-3)。酸性の場合は MT に結合している Zn(II)とプロトンとの置換<sup>86, 88, 89)</sup>、アルカリ性の場合は TPPS の Zn(II)親和性の増加によって、ブランクにおいても Zn(II)-TPPS 錯体が生じたと考えられる。Bi(III)濃度に対する  $A_{423}$  の応答で (図 5-4)、 $A_{423}$  の飽和が始まる Bi(III)濃度は、Zn-MT から全ての Zn(II)を解離させるのに要した Bi(III)濃度であり、その値はいずれも Zn-MT 濃度の約 7 倍であった。これは、1 分子の MT に最大 7 個の Bi(III)が結合できるという報告と一致する<sup>86)</sup>。これらの検討結果から、以下の実験は Zn-MT を  $0.21 \mu\text{M}$  含む pH 7.2 の反応液を用い、75°Cで 60 分反応することとした。

最適化された条件の下での一連の反応過程を確認するため、Zn-MT からの Zn(II)の解離と共に、Zn-MT への金属イオンの結合を検出することを試みた。Cd(II)と SH 基の結合は、250 nm の吸光度測定によって検出できる<sup>90)</sup>。そこで、SEC による MT 画分の 250 nm の吸光度測定を行った。同じ反応液で得た  $A_{423}$  及び 250 nm の吸光度は Cd(II)濃度に比例して増加し、同じ  $1.5 \mu\text{M}$  で飽和に達した (図 5-5)。このことは、

Zn-MT からの Zn(II)の解離が Cd(II)の Zn-MT への結合によって引き起こされたことを示している。

Bi(III)及び Cd(II)と同様に、Cu(II)、Pb(II)、Hg(II)、Co(II)、Ag(I)及び Ni(II)も Zn-MT に結合し、 $A_{423}$ の増加を生じた (図 5-6a)。これが、解離した Zn(II)と TPPS の錯体形成に由来することは、Zn-MT が含まれない場合は  $A_{423}$ の変化が生じなかったことから支持される (図 5-6b)。外来の Zn(II)によっても  $A_{423}$ は生じた。使用した Zn-MT の金属結合サイトの 87%はすでに Zn(II)で占められており、外来の Zn(II)のほとんどは直接 TPPS と錯体を形成したためである。その他の金属イオンは MT との親和性が小さいため、Zn-MT に結合しなかった。Zn(II)によって生じた  $A_{423}$ に対して、各金属によって生じた  $A_{423}$ の比率を交換率 (金属イオン 1 個によって Zn-MT から解離した Zn(II)の数) として算出した。Pb(II)、Bi(III)、Cd(II)及び Hg(II)の交換率は、おおよそ 1 であった。これらの金属は、MT との親和性が Zn(II)より強いので<sup>78, 86, 88)</sup>、Zn-MT に結合していた Zn(II)と速やかに交換が起きたと考えられる。Co(II)、Ag(I)及び Ni(II)の交換率は 1 より小さかった。Co(II)と Ni(II)は、MT への親和性が Zn(II)より小さいため<sup>78, 86, 88)</sup>、Zn(II)が容易には解離しなかったためと考えられる。Ag(I)は 1 分子の MT に最大 12 個まで結合できると報告されている<sup>86)</sup>。そのため、Ag(I)の交換率は低くなったと考えられる。しかしながら、Cu(II)の交換率は 1.4 と大きく、親和性の強さや結合数では説明がつかない。Cu(II)は、その酸化力ゆえ、Zn-MT へ結合すると同時に Zn-MT の SH 基を酸化することによる Zn(II)の解離も生じているかもしれない<sup>91-93)</sup>。

反応液に複数の金属イオンが含まれる場合、各々の金属イオンが独立して Zn-MT と相互作用することを仮定して  $A_{423}$ を算出した。この計算値は実測値とよく一致し (図 5-7)、上記の仮定が裏付けられた。すなわち、測定される  $A_{423}$ は Cu(II)、Pb(II)、Bi(III)、Cd(II)、Hg(II)、Co(II)、Ag(I)、Ni(II)及び Zn(II)の反応液中の濃度と交換率の両方を反映している。これら 9 種の金属イオンの中でも、Hg(II)、Pb(II)及び Cd(II)は、毒性がとくに強い重金属として知られている。これらに加えて、Ag(I)、Cu(II)、Co(II)、Ni(II)及び Zn(II)も *V. fischeri*に対して毒性を示すことが報告されている<sup>71, 72, 94)</sup>。Cr(VI)も一般的には毒性の強い金属として認識されているが、*V. fischeri*に対しては、還元物質の産生と放出による防御機構のため、急性毒性を示さない<sup>72, 95)</sup>。つまり、 $A_{423}$ の増加を引き

起こす金属イオンは、*V. fischeri* に毒性を示す金属イオンでもあることが期待される。実際、重金属混合溶液および模擬汚染水について得られた  $A_{423}$  と INH%の間にはおおよその正の相関が認められた (図 5-8)。相関に幅や外れ値があるのは、細胞膜透過性や溶解度、或いは SH 基以外の結合サイトへの重金属結合といった重金属毒性に影響を及ぼすその他の要因を  $A_{423}$  が反映していないためと考えられる。しかしながら、バイオアッセイにおいては、使用した供試生物によって結果が異なることが多々ある<sup>96)</sup>。これに対し、 $A_{423}$  を指標とするこの方法は、様々な動物種で共通して発現している MT の重金属解毒機構に基づいており、本法と *V. fischeri* を用いたバイオアッセイ間の評価結果の差異は許容できる範囲にあると言える。本研究によって、Zn-MT から解離した遊離な Zn(II) と TPPS との錯体形成によって生じた  $A_{423}$  を測定することで試料溶液に含まれる有害金属を間接的・網羅的に検出することができた。一方、そのような有害金属に曝された発光バクテリア内では、発光に関与する様々な酵素タンパク質の SH 基に有害金属が結合し発光阻害を引き起こしたと考えられる。結果として  $A_{423}$  は、発光阻害率と正に相関し、試料溶液の重金属毒性の良好な指標となり得ることが示唆された。本法では、試料溶液中の金属イオンと MT に結合している Zn(II) との交換率が毒性指数の役割を担っている。

アルカリ金属、アルカリ土類金属、窒素化合物、リン化合物およびフミン質といった実試料によく含まれる夾雑成分の影響も検討した。フミン酸以外の夾雑成分は  $A_{423}$  に影響を与えなかったが、キレート性化合物であるフミン酸は  $A_{423}$  を減少させた。この結果は、フミン酸以外にも EDTA のようなキレート性化合物が  $A_{423}$  に影響を及ぼすことを示唆していた。そこで、EDTA が  $A_{423}$  および発光バクテリアの INH% に与える影響を検討した (図 5-8)。金属の化学形態のなかでも遊離な金属イオンは、とくに生物毒性の強い形態と考えられ<sup>69)</sup>、EDTA、DPTA 及びフミン酸といったキレート性の化合物によって重金属毒性が軽減されることが知られている<sup>64, 65)</sup>。Nos. 16~30 の *V. fischeri* に対する毒性が Nos. 1~15 と比べて低く見積もられたのは、上記と同様な EDTA による毒性軽減効果と考えられる。そして、EDTA と錯体を形成した金属イオンは Zn-MT に結合しないため、もう一つの指標である  $A_{423}$  も減少傾向を示した。模擬汚染水にはキレート性又は金属吸着性の不溶物が含まれるため、Cu(II)濃度が各々異なった。つまり、

重金属毒性に影響を及ぼす様々な成分が含まれていることとなる。このような模擬汚染水で得た  $A_{423}$  と INH% の相関も、重金属混合溶液で得た相関にほぼ含まれていた (図 5-8)。すなわち、検討した全ての試料溶液で、 $A_{423}$  と INH% の相関は依然として良好であった。この結果は、TPPS と Zn-MT を用いた本法が多様な試料に適用できる実用的な重金属毒性の評価方法であることを示している。このような、キレート性化合物による毒性軽減効果を AAS や ICP といった機器分析で評価することは難しい。

TPPS 及び Zn-MT を用いた本法のとくに優れている特徴は感度である。これは、高感度比色試薬であるポルフィリン TPPS の性質に依るところが大きい。重金属毒性の指標に用いた  $A_{423}$  は、実験方法で述べたように、試料溶液を 200 倍希釈して測定された。これは、本法が *V. fischeri* を用いたバイオアッセイよりもはるかに高感度であることを示している。実際、図 5-4 及び 5-6 に示したように、本法は  $1 \mu\text{M}$  以下の有害金属を検出することができた。バイオアッセイの欠点である感度不足を補うために、同じ発光バクテリアを用い、曝露時間を 22 時間に延長した方法 (Microtox<sup>®</sup> chronic toxicity test) がある<sup>97)</sup>。この試験方法は、他の様々な供試生物を用いたバイオアッセイよりも高感度であり、Cd(II)、Cu(II)、Pb(II)、Ni(II) 及び Zn(II) の検出限界濃度は、 $0.3 \sim 0.5$ 、 $0.1 \sim 0.2$ 、 $3.0 \sim 6.0$ 、 $0.4 \sim 3.4$  及び  $0.2 \sim 1.2 \mu\text{M}$  である<sup>96)</sup>。TPPS と Zn-MT を用いた本法は、感度においてこの試験方法に匹敵し、しかも短時間で測定できる。また、PC による金属イオンの解毒後、残存した SH 基をエルマン試薬で定量する微量金属測定法も提案されており、この方法は  $3.0$ 、 $0.3$  及び  $5.0 \mu\text{M}$  の Cd(II)、Cu(II) 及び Hg(II) を検出できる<sup>98)</sup>。しかしながら、この方法は Pb(II) を検出することができない。PC を用いたこの方法は植物における有害金属解毒機構を模倣しているのに対し、Zn-MT を用いた本法は動物の有害金属解毒機構を模倣している。本法において、Zn(II) が結合した PC を Zn-MT の代わりに用いることで、植物に対する重金属毒性を評価できるようになるかもしれない。

本研究で開発した Zn-MT と水溶性ポルフィリン TPPS を用いた重金属毒性の簡易評価法は、高感度で従来のバイオアッセイ法と相関のある実用的な方法である。

表 5-1 複数の金属イオンを含む反応液の  $A_{423}$  の計算値と実測値

No.	Concentrations (nM)																	$A_{423}$	
	Ag	Al	Bi	Ca	Cd	Co	Cr <sup>3+</sup>	Cr <sup>6+</sup>	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Ni	Pb	Zn	Calculated	Measured	
1	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	N.P.	0.077	0.055	
2	N.P.	N.P.	N.P.	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	0.086	0.092	
3	31	31	31	31	31	31	31	31	31	N.P.	31	31	31	31	31	31	0.105	0.123	
4	50	N.P.	N.P.	N.P.	50	100	N.P.	N.P.	25	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	50	25	100	0.131	0.134	
5	100	N.P.	N.P.	N.P.	25	50	N.P.	N.P.	25	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	100	50	100	0.132	0.146	
6	63	63	63	63	N.P.	N.P.	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	0.169	0.172	
7	63	63	63	63	63	N.P.	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	0.195	0.194	
8	133	N.P.	N.P.	N.P.	67	33	N.P.	N.P.	133	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	33	67	133	0.236	0.218	
9	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	0.172	0.226	
10	100	N.P.	N.P.	N.P.	100	100	N.P.	N.P.	100	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	100	100	100	0.247	0.252	
11	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	125	N.P.	N.P.	N.P.	125	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	63	250	0.273	0.266	
12	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	250	N.P.	N.P.	N.P.	125	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	250	63	0.326	0.319	
13	100	N.P.	100	N.P.	100	200	N.P.	N.P.	50	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	100	50	200	0.306	0.368	
14	125	125	125	125	125	125	125	125	N.P.	N.P.	125	125	125	125	125	125	0.340	0.384	
15	50	N.P.	100	N.P.	200	100	N.P.	N.P.	100	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	50	50	200	0.342	0.414	

N.P. indicates that the metal is not present.

表 5-2 重金属混合溶液および模擬汚染水の金属イオン組成、 $A_{423}$  及び INH%

Sample No.	Concentrations ( $\mu M$ )					$A_{423}$	INH%	Sample No.	Concentrations ( $\mu M$ )					$A_{423}$	INH%	
	Cu	Cd	Ni	Ca	EDTA				Cu	Cd	Ni	Ca	EDTA			
1	100	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	0.188	99	16	100	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	50	0.095	46
2	N.P.	100	N.P.	N.P.	N.P.	0.126	48	17	N.P.	N.P.	100	N.P.	N.P.	50	0.046	12
3	N.P.	N.P.	100	N.P.	N.P.	0.024	19	18	N.P.	N.P.	N.P.	100	N.P.	50	0.012	14
4	N.P.	N.P.	N.P.	100	N.P.	-0.006	21	19	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	100	50	-0.052	3.9
5	50	50	N.P.	N.P.	N.P.	0.159	90	20	50	50	50	N.P.	N.P.	50	0.064	11
6	50	N.P.	50	N.P.	N.P.	0.108	89	21	50	N.P.	N.P.	50	N.P.	50	0.035	37
7	50	N.P.	N.P.	50	N.P.	0.123	90	22	50	N.P.	N.P.	N.P.	50	50	0.006	19
8	N.P.	50	50	N.P.	N.P.	0.095	12	23	N.P.	N.P.	50	50	N.P.	50	0.042	14
9	N.P.	50	N.P.	50	N.P.	0.090	29	24	N.P.	N.P.	50	N.P.	50	50	0.002	5.4
10	N.P.	N.P.	50	50	N.P.	0.047	52	25	N.P.	N.P.	N.P.	50	50	50	-0.025	-0.3
11	33	33	33	N.P.	N.P.	0.133	43	26	33	33	33	N.P.	N.P.	50	0.123	44
12	33	33	N.P.	33	N.P.	0.128	50	27	33	33	33	N.P.	N.P.	50	0.117	42
13	33	N.P.	33	33	N.P.	0.099	58	28	33	N.P.	N.P.	33	33	50	0.070	41
14	N.P.	33	33	33	N.P.	0.070	21	29	N.P.	33	33	33	33	50	0.053	14
15	25	25	25	25	N.P.	0.115	35	30	25	25	25	25	25	50	0.102	37
TW	36	N.P.	N.P.	508	N.P.	0.089	41									
E1	23	N.P.	N.P.	460	N.P.	0.070	16									
E2	31	N.P.	N.P.	7565	N.P.	0.098	5.8									
RW	47	N.P.	N.P.	479	N.P.	0.122	71									

N.P. indicates that the metal is not present.

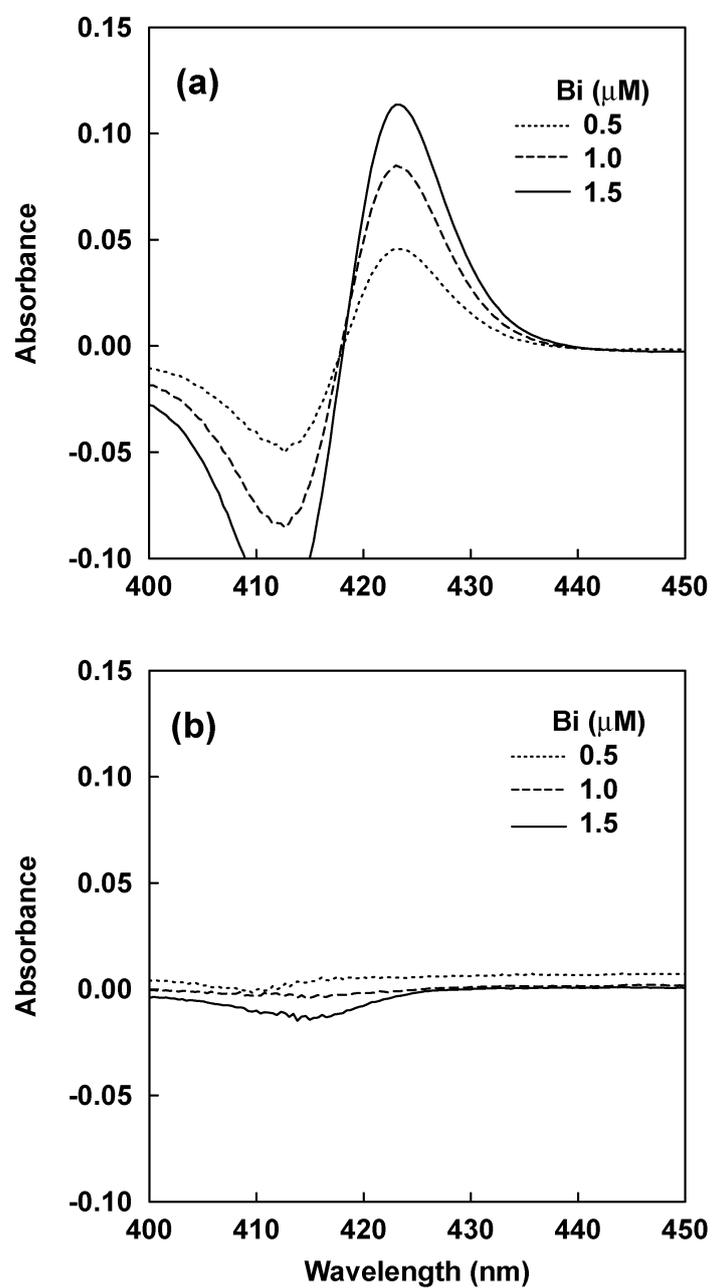


図 5-1 Bi(III)によって生じた Zn(II)-TPPS 錯体の吸収スペクトル

TPPS (2.5  $\mu\text{M}$ )、Zn-MT ((a) 0 or (b) 0.21  $\mu\text{M}$ ) 及び Bi(III) (0.5~1.5  $\mu\text{M}$ ) を含む反応液 (pH 7.2) を 75°C で 5 分加熱後、吸収スペクトルを測定した。

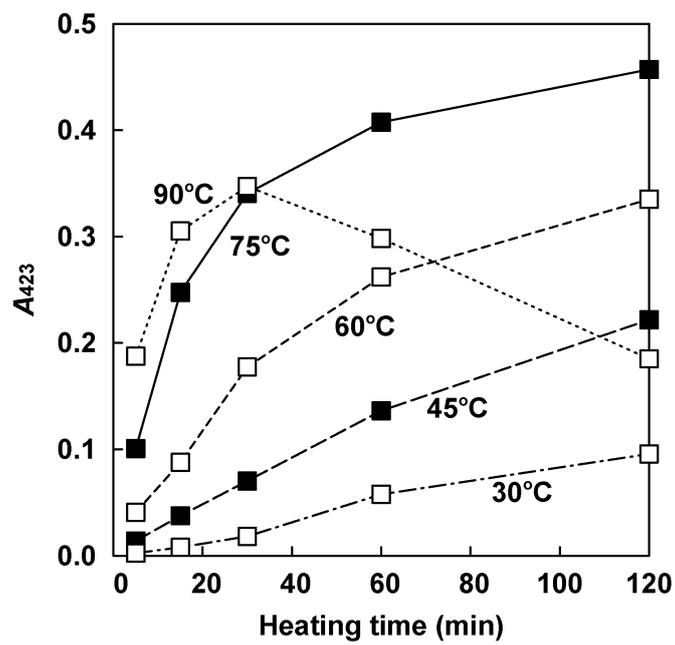


図 5-2 加熱温度毎の  $A_{423}$  の経時変化

TPPS ( $2.5 \mu\text{M}$ )、Zn-MT ( $0.21 \mu\text{M}$ ) 及び  $1 \mu\text{M}$  Bi(III)を含む反応液 (pH 7.2)を用いた。

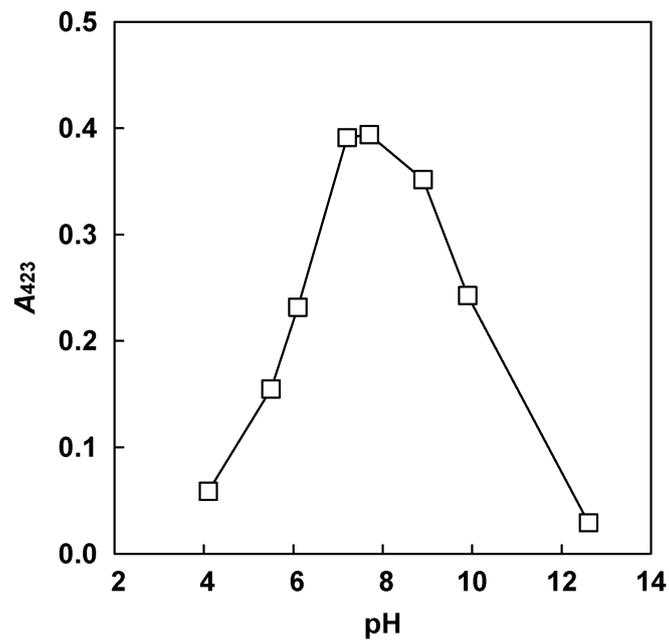


図 5-3  $A_{423}$  の pH 依存性

TPPS ( $2.5 \mu\text{M}$ )、Zn-MT ( $0.21 \mu\text{M}$ ) 及び  $1 \mu\text{M}$  Bi(III)を含む反応液 (pH 3.9~12.6) を  $75^\circ\text{C}$  で 60 分加熱後、 $A_{423}$  を測定した。

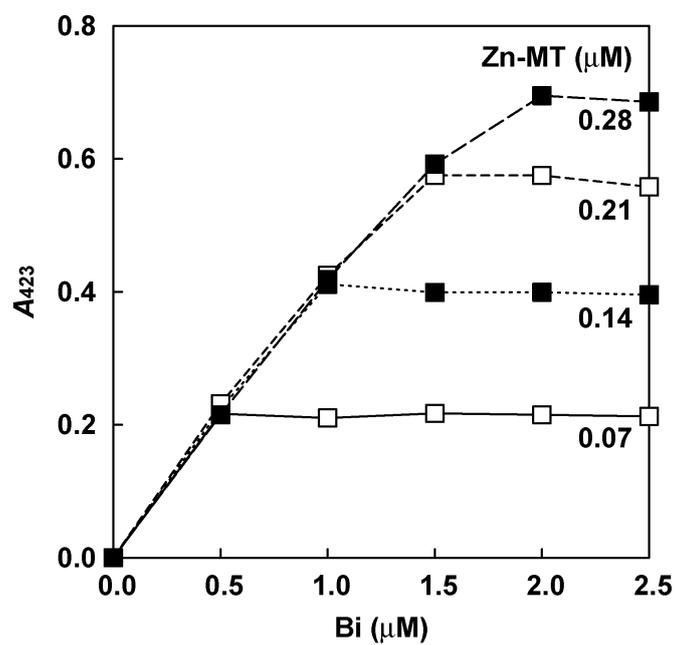


図 5-4 Bi(III)濃度に対する  $A_{423}$  の応答

TPPS ( $2.5 \mu\text{M}$ )、Zn-MT ( $0.07 \sim 0.28 \mu\text{M}$ ) 及び  $0 \sim 2.5 \mu\text{M}$  Bi(III)を含む反応液 (pH 7.2) を  $75^\circ\text{C}$  で 60 分加熱後、 $A_{423}$  を測定した。

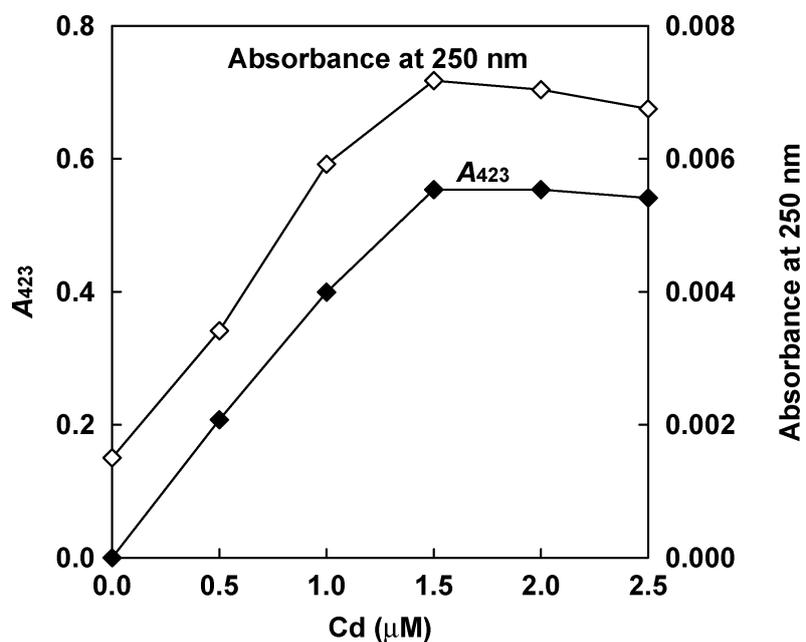


図 5-5 Cd(II)濃度に対する  $A_{423}$  と MT 画分の 250nm の吸光度

TPPS ( $2.5 \mu\text{M}$ )、Zn-MT ( $0.21 \mu\text{M}$ ) 及び  $0 \sim 2.5 \mu\text{M}$  Cd(II)を含む反応液 (pH 7.2) を  $75^\circ\text{C}$ で 60 分加熱後、 $A_{423}$ を測定した。同じ反応液の SEC による MT 画分の 250 nm の吸光度 (Absorbance at 250 nm) を測定した。

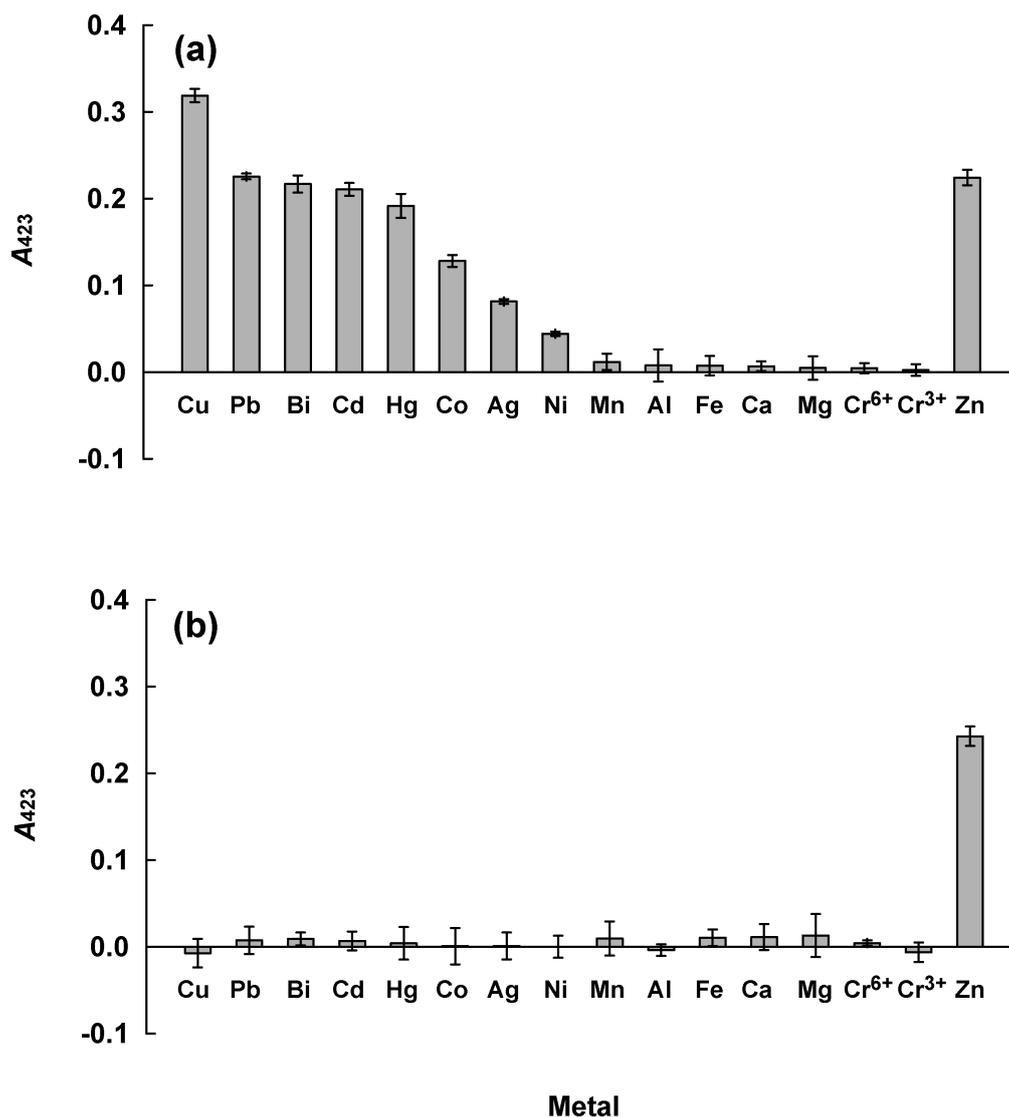


図 5-6 様々な金属イオンを含む反応液の  $A_{423}$

TPPS ( $2.5 \mu\text{M}$ )、Zn-MT ((a) 0 or (b)  $0.21 \mu\text{M}$ ) 及び各金属イオン ( $0.5 \mu\text{M}$ ) を含む反応液を用いた。各値は、平均値±標準偏差 (n=3) で表した。

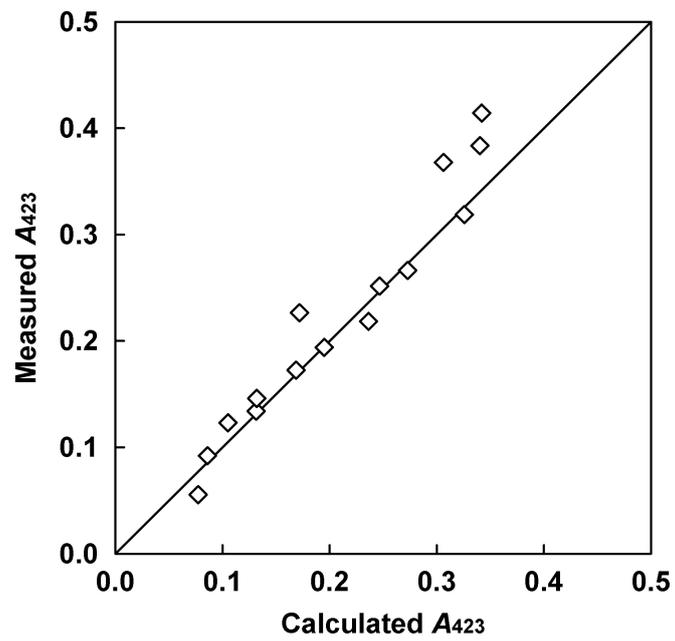


図 5-7  $A_{423}$  の計算値と実測値の相関

表 5-1 に示した複数の金属イオンを含む反応液を用いた。実線は計算値と実測値が一致する理想直線を表す。

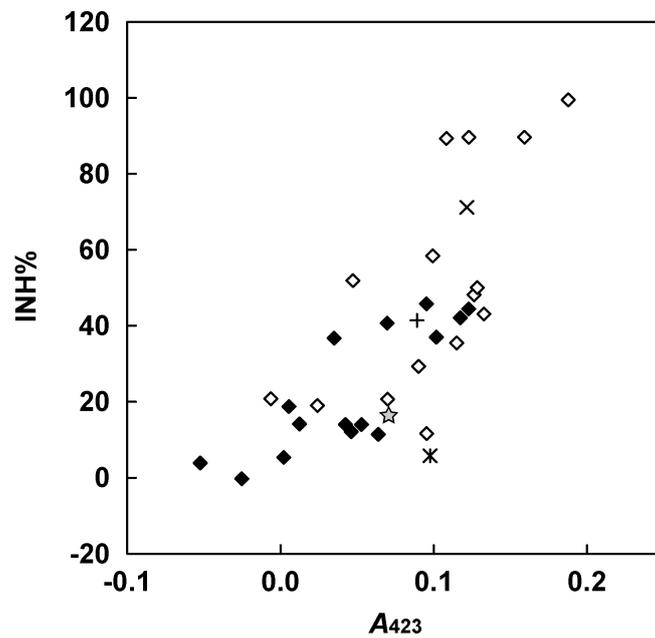


図 5-8 重金属混合溶液および模擬汚染水の  $A_{423}$  と INH% の相関

Symbols: Nos. 1~15 (open diamonds); Nos. 16~30 (solid diamonds); TW (cross); E1 (star sign); E2 (asterisk); RW (x-mark).

## 第6章 統括および展望

本研究では、測定対象および用途が異なる4つの重金属分析法を開発した。

方法1: ポルフィリン導入ポリマー試薬 (PP-AAm/pH10、PP-AAm/pH6、PP-MAcid/pH6) を用いた6種の重金属イオンの同時測定法 (第2章)

方法2: ポルフィリン導入ポリマー (PP-AAm) と専用の鉛簡易測定装置 Pb-100 を組み合わせた焼却飛灰溶出液中の Pb(II)簡易分析法 (第3章)

方法3: 水溶性ポルフィリン (TMPyP) 及び複数のマスクング剤を含む測定試薬による Pb(II)吸光光度法 (第4章)

方法4: 水溶性ポルフィリン (TPPS) 及び Zn-MT を用いた重金属毒性の評価方法 (第5章)

これらの特徴を表6-1にまとめた。方法1は、Bi(III)、Co(II)、Cu(II)、Mn(II)、Pb(II)及びZn(II)を測定できる点が、Pb(II)のみを測定対象とした方法2及び3と異なる。また、後述のように、方法4は個々の重金属イオン濃度を求める目的では使用できない。したがって、これらの重金属イオンが測定対象の場合は方法1が用いられる。方法1は、同一の検液を3つの測定試薬に作用させ、それらの差スペクトルを測定するため、他の方法と比べてやや操作が複雑となる。用途によっては6種類の重金属イオン濃度を同時に知る必要がない場合もあり、この場合は、測定対象に応じて測定試薬を選び、少ない操作で重金属濃度を得ることが望ましい。とくに測定対象がPb(II)のみであれば、後述の方法2又は3を採用するのが賢明と言える。方法1によって得られる各重金属イオンに対応するスペクトルのピークは完全には分離されていない。そのため、原子吸光による測定値と一致しない場合も見られた。また、重金属イオンの濃度バランスによっては、相対的に濃度が低い重金属イオンのピークが検出されなくなることが予想される。この問題に対しては、解析方法の工夫が有効と考えられる。特定のスペクトルピークに着目するのではなく、スペクトル全体を多変量データと見なし、6種の重金属イオン濃度と関連付ける重回帰分析を適用することで確度の良い測定が期待できる。

また、少ない標準試料で予測精度に優れた検量モデルを構築できる主成分回帰分析や PLS 法といったケモトリックスの手法またはニューラルネットワークを適用することも考えられる。これらの手法を用いれば、ピークが分離されていることは必須でなくなるため、Zn(II)とのピークの重なりが大きいために測定が不可能だった Cd(II)も測定できるようになるかもしれない。

方法 2 及び 3 は、いずれも Pb(II)を測定対象としている。方法 2 は、高濃度の Ca(II)及び Zn(II)からの妨害のみを排除するように最適化された。一方、方法 3 は、妨害成分量が土壌溶出液と同等かそれ以下である試料溶液に適用できるが、飛灰溶出液レベルの高濃度 Ca(II)による妨害は排除できない。したがって方法 2 は、飛灰溶出液中の Pb(II)濃度測定に特化した方法と言える。実用化にあたって、方法 2 を実際に実施するのは焼却場現場の作業員であるため、測定操作の簡便化は重要な課題であった。そこで、鉛測定試薬を、予め、一定量チューブに分注した状態で提供することで、ユーザーはそこへ飛灰溶出液を添加するだけ済むようにした。この鉛測定試薬および鉛簡易測定装置 (Pb-100) は、重金属固定化剤メーカーに試験的に販売され、焼却場現場での飛灰処理に活用されるに至った。この試験運用で浮上した問題としては、ポルフィリン導入ポリマー (PP-AAm) の製造コスト及び安定性等が挙げられる。長期保存には冷凍又は冷蔵の必要があるため、鉛測定試薬の配送時にもそれらを配慮する必要があった。一方、方法 2 の研究開発を通して、PP と AA m ポリマーの相互作用によって Ca(II)の妨害影響が軽減されていることが明らかになった。これらの知見から、水溶性ポルフィリンとポリマーの適切な組み合わせによっても同等の効果を期待できる。このアプローチによって、より安価で安定性に優れた鉛測定試薬の開発を試みる予定である。なお、方法 2 で使用する専用の鉛簡易測定装置 Pb-100 は分光光度計を内蔵しているため、方法 1、3 及び 4 の吸収スペクトル及び吸光度測定にも使用することができる。その場合は、各方法に合わせてソフトウェアを用意する必要がある。

方法 3 は、加熱の必要がなく瞬時に測定でき、検出限界においても方法 2 より優れている。したがって、飛灰溶出液以外の広範な環境試料への適用が期待できる。土壌溶出液レベルの妨害影響を排除するように最適化されたが、各々の妨害成分の許容

限界を今後確認する必要がある。今回、誤差因子として標準土壌による土壌溶出液を用いたが、標準土壌に代わって、特定の地域や性質、性状の土壌を用いることで、各々に特化した鉛測定試薬を得ることも可能と考えられる。方法 3 の研究により、測定試薬の組成最適化にパラメータ設計が有用であることが示された。パラメータ設計は極めて汎用的な最適化手法であるため、方法 1~4 の様々な改良あるいは全く新規な測定法においても最適条件を見出す手法として活用できるものと考えられる。

方法 4 は、方法 1~3 と異なり、Zn-MT に親和性のある全ての金属イオンを網羅的に検出することができる。そして、方法 4 によって得られる  $A_{423}$  は重金属毒性と正に相関し、重金属毒性の総合的な評価に用いられることが見出された。さらに、バイオアッセイとの比較においては特に感度が優れていた。方法 1~3 で用いられた SNV 変換は、方法 4 にも適用できる。方法 4 を微量元素の検出法と見なし、さらなる高感度を図る際には、SNV は有効なデータ処理方法になると考えられる。方法 4 は動物細胞で観察される Zn-MT の解毒機構に基づいていることから、動物種に対してより適切な重金属毒性の指標を与えることができるかもしれない。動物細胞を用いたバイオアッセイとの比較を今後検討していく必要がある。一方、植物等においては、有害金属を PC が無毒化すると考えられている。PC もまた SH 基リッチなペプチドであり、Zn(II)の他、様々な重金属が結合することが知られている。また、市販価格も MT より安い。Zn(II)が結合した PC を Zn-MT の代わりに用いることは、方法 4 の興味深い改良案であり、植物に対する重金属毒性の指標となることが期待される。重金属毒性の作用機序は極めて複雑であり、酵素タンパク質の SH 基へ重金属の結合によってのみ毒性が発現するわけではない。生体内には、炭酸脱水酵素、カルボキシペプチダーゼ及びアルコール脱水酵素等の多数の亜鉛酵素が見つかったが、Zn(II)に配位している官能基には、システインの SH 基の他、ヒスチジン由来のイミダゾール基およびグルタミン酸由来のカルボキシル基がある。したがって、これらの官能基から解離した Zn(II)を検出することでより多様な毒性評価を行えるようになるかもしれない。

いずれの測定法にも共通する留意点としては、試料溶液の調製方法があげられる。所望する測定値（含有量、溶出量、遊離な金属イオン濃度または錯体形成した金属を含む総濃度など）が得られるように、酸あるいは熱による分解、酸性あるいは中性溶

媒による溶出試験といった処理法を適切に選択する必要がある。また、溶媒抽出、固相抽出あるいはマスクング剤の添加といった処理によって妨害成分の除去や測定対象金属の選択的濃縮も可能であることから、このような前処理法の検討も重要な課題である。

このように本研究では、ポルフィリンの吸光特性を用いて、各々異なる特徴を持った重金属分析法を開発することができた。いずれも、小型の分光光度計を用いた簡易な操作で測定を実施することができ、AAS や ICP あるいはバイオアッセイを用いた方法が従来抱えている測定操作の煩雑さと可搬性の乏しさといった問題点を克服している。これまで困難であった場所でのオンサイト分析やより迅速な測定が期待できる。上記の課題に対する検討を行い、さらに高精度・高感度な重金属分析技術へ発展させたい。

表 6-1 本研究で開発された重金属測定法

	方法 1 (第 2 章)	方法 2 (第 3 章)	方法 3 (第 4 章)	方法 4 (第 5 章)
使用したポルフィリン	PP-AAm/pH10 PP-AAm/pH6 PP-MAcid/pH6	PP-AAm	TMPyP	TPPS
その他添加物		Cd, EDDP	各種 マスキング剤 (EDDP, DAHTA, IMZ, リン酸 Na, NTP)	Zn-MT
反応条件	75°C, 30 min	80°C, 5 min	室温, 0 min	75°C, 60 min
測定対象金属	Cu, Pb, Zn, Bi, Co, Mn	Pb	Pb	重金属毒性
備考	上記 6 種の金属を同時測定。	専用の鉛簡易測定装置 Pb-100 を使用。Ca の妨害に強く、飛灰溶出液中の Pb 測定に特化。	加熱及び待ち時間を必要としない、極めて簡易な Pb 吸光度法。広範な試料に適用できる。	重金属に由来する毒性の総合的な評価が可能。

## 要約

### ポルフィリンの吸光特性を用いた重金属分析技術の開発

生命環境科学研究科

生命産業科学専攻

浅野貴春 (学籍番号:200730507)

重金属は様々な工業製品に使用されている一方で、生物にとって有害な環境汚染物質でもある。そのため、環境基準をはじめとした様々な規制値が法令で定められている。それらを順守するために、環境中の重金属を分析・監視することは、環境を保全し人の健康を維持する上で重要である。重金属の測定方法としては、原子吸光法や ICP 法といった機器分析が広く一般に用いられている。これらの手法は様々な重金属濃度を十分な精度と感度で定量できるが、大型の測定装置と煩雑な操作を要するため、オンサイトでの簡易分析には適していない。また、重金属による毒性を総合的に評価するといった場合には、個々の重金属濃度を知るだけでは不十分であり、生物や細胞を取り扱うバイオアッセイを行う必要があった。本研究の目的は、重金属の濃度および毒性を簡易に測定できる分析法を開発することにある。

ポルフィリン環を有するポルフィリン化合物とその金属錯体は、紫外から可視光領域にかけて鋭いピークを持った吸収スペクトルを示し、そのピーク波長は金属錯体ごとに異なる。本研究では、このようなポルフィリン化合物の吸光特性に着目し、重金属分析に適用した。はじめに、多様な重金属の測定に対応するため、ビニル基を有するポルフィリン化合物を様々なビニルモノマーとラジカル共重合させた新規なポルフィリン導入ポリマーを合成した(第2章)。これらのポルフィリン導入ポリマーは、pHだけでなく、ポルフィリン導入ポリマーを構成するビニルモノマーが異なると、各金属イオンに対して異なる吸収スペクトル変化を示した。含有するポルフィリン導入ポリマーの種類と pH が異なる 3 種類の測定試薬を用いることで、6 種類の金属イオンを分離したピークとして検出でき、各々の濃度を定量することができた。

Pb(II)は重金属の中でもとくに毒性が強く、焼却飛灰溶出液に高濃度で含まれている。しかしながら、焼却飛灰溶出液には多量のカルシウムや亜鉛も含まれており、従来の吸光光度法を適用することができなかった。一方、ポルフィリン導入ポリマーの一つである PP-AAm を比色試薬として用いると、カルシウムによる妨害を受けることなく Pb(II)を測定できることが見出された。第 3 章では、PP-AAm を用いた吸光光度法に基づき、専用の鉛簡易測定装置と組み合わせて測定操作の簡易化が図られた Pb(II)分析法の開発について述べた。

焼却飛灰溶出液の他にも、Pb(II)の簡易分析が求められる環境試料は多い。しかしながら、広範な環境試料に適用できる測定法を開発する場合、妨害成分を特定できず、対策を立てることは困難となる。そこで、品質工学の分野で用いられているパラメータ設計を Pb(II)簡易分析法の開発に適用することとした(第 4 章)。水溶性ポルフィリンと共に最大で 7 種類のマスキング剤を含む鉛測定試薬を調製し、様々な妨害成分の有無に関わらず Pb(II)濃度に対して一定の応答を示すようなマスキング剤の配合をパラメータ設計により決定した。

環境分析および調査においては、総合的な重金属毒性を評価することも必要となる。このような毒性評価にはバイオアッセイが用いられてきたが、簡易さだけでなく毒性検出感度においても未だ十分とは言えない。重金属による毒性は、酵素タンパク質の SH 基に有害な重金属が結合することによって主にもたらされると考えられている。これに対し、動物細胞内では Zn(II)が結合したメタロチオネイン (Zn-MT) が有害金属を Zn(II)と交換して捕捉し、無毒化する。このことから第 5 章では、MT から解離した Zn(II)を水溶性ポルフィリンにより吸光検出することで有害金属を間接的に検出できるのではないかと考えた。この方法により、Zn(II)-水溶性ポルフィリン錯体の極大吸収ピーク波長である 423 nm の吸光度 ( $A_{423}$ ) は、MT に結合する金属イオンに応答して変化することが見出された。さらに、様々な金属混合溶液について得られた  $A_{423}$  は、発光バクテリアを用いたバイオアッセイによって得た毒性評価と正に相関し、重金属毒性の指標となり得ることが示唆された。

このように本研究では、ポルフィリン導入ポリマー及び水溶性ポルフィリンが重金属と錯体を形成した際に生じる鋭敏な吸収スペクトル変化を利用することで、様々な重金

属濃度およびその毒性を分析する技術を開発することができた。

## 付記

本論文は、下記に示す公表論文および学会発表をまとめたものである。

### 原著論文

1. Takaharu Asano, Pi-Chao Wang, Akio Iwasaki: Synthesis of porphyrin-incorporated polymers and their application for simultaneous detection of multimetal components by using spectrophotometry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75 (2010) 305–309.
2. Takaharu Asano, Katsumi Yabusaki, Pi-Chao Wang, Akio Iwasaki: Determination of lead(II) in fly ash leachate using a newly developed simple spectrophotometric method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75 (2010) 819–824.
3. Takaharu Asano, Pi-Chao Wang, Akio Iwasaki: Spectrophotometric detection of labile zinc(II) released from metallothionein: A simple method to evaluate heavy metal toxicity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (*in press*).
4. 浅野貴春: パラメータ設計を用いた鉛測定用試薬の組成最適化. *品質工学* (*in press*).

### 学会発表 (登壇者を○で示す)

1. ○浅野貴春, 岩崎昭夫. ポルフィリン導入ポリマーを用いた重金属の多成分同時測定 (口頭発表). 化学工学会第 74 年会 (2009).
2. ○浅野貴春, 藪崎克己, 岩崎昭夫. 灰溶出液中の鉛簡易測定法の開発 (ポスター). 第 18 回環境化学討論会 (2009).
3. ○浅野貴春. パラメータ設計を用いた鉛測定用試薬の組成最適化 (ポスター). 第 17 回品質工学研究発表大会 (2009).
4. ○浅野貴春, 王碧昭, 岩崎昭夫. メタロチオネイン解離亜鉛の吸光検出に基づく重金属毒性の評価方法 (口頭発表). 第 61 回日本生物工学会大会 (2009).

5. ○浅野貴春, 岩崎昭夫. 亜鉛メタロチオネインと水溶性ポルフィリンを用いた重金属毒性の評価方法 (口頭発表). 第 44 回日本水環境学会年会 (2010).

## 謝辞

本研究および本論文を遂行および作成するにあたり、懇切なる御指導を賜りました筑波大学大学院 生命環境科学研究科 王碧昭 教授に、心より御礼申し上げます。

また、本論文の査読、校閲を賜った筑波大学大学院 生命環境科学研究科 杉浦則夫 教授、繁森英幸 教授ならびに青柳秀紀 准教授に、心より御礼申し上げます。

本学での研究の機会を与えてくださり、また、論文の執筆にあたり多大な御指導を賜りました興和株式会社 興和総合科学研究所 岩崎昭夫 所長に深謝致します。

本研究の遂行にあたり御協力を賜り、また、有益な御助言を頂いた興和株式会社 電気光学事業部 藪崎克己 博士に、心より御礼申し上げます。

興和総合科学研究所 研究課の皆様には、本研究を実施するに当たり詳細な指導と御助言を頂きました。御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Manahan, S. E.: Environmental Chemistry, sixth ed., Lewis Publishers, Florida (1994).
- 2) Nebel, B. J. and Wright, R. T.: Environmental Science, sixth ed., Prentice Hall, New Jersey (1998).
- 3) 鈴木継美, 和田攻: 重金属中毒, 医歯薬出版, 東京(1978).
- 4) Feldman, B. J., Osterloh, J. D., Hata, B. H., and D'Alessandro, A.: Determination of lead in blood by square wave anodic stripping voltammetry at a carbon disk ultramicroelectrode. Anal. Chem., **66**, 1983-1987 (1994).
- 5) 田中龍彦: 微量金属のストリッピングアナリシス, ぶんせき, 62-68 (2001/2).
- 6) Khosraviani, M., Pavlov, A. R., Flowers, G. C., and Blake D. A.: Detection of heavy metals by immunoassay: Optimization and validation of a rapid, portable assay for ionic cadmium. Environ. Sci. Technol., **32**, 137-142 (1998).
- 7) Johnson, D. K., Combs, S. M., Parsen, J. D., and Jolley M. E.: Lead analysis by anti-chelate fluorescence polarization immunoassay. Environ. Sci. Technol., **36**, 1042-1047 (2002).
- 8) 五十嵐淑郎: ポルフィリン化合物の機能と分析化学, ぶんせき, 190-196 (1989/3).
- 9) 田端正明: ポルフィリンを用いる分析化学, ぶんせき, 188-193 (1994/3).
- 10) Agusa, T., Kunito, T., Ramu, K., Chamnan, C., Trang, P. T. K., Minh, T. B., Subramanian, A., Iwata, H., Viet, P. H., Tana, T. S., and Tanabe, S.: Lead contamination and its human health effects in India, Vietnam and Cambodia. Biomed. Res. Trace Elements, **17**, 413-416 (2006).
- 11) Goering, P. L.: Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. Neurotoxicology, **14**, 45-60 (1993).
- 12) Fujishiro, H., Okugaki, S., Kubota, K., Fujiyama, T., Miyataka, H., and Himeno, S.: The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null

- cells. *J. Appl. Toxicol.*, **29**, 367–373 (2009).
- 13) Goering, P. L., Waalkes, M. P., and Klaassen, C. D.: Toxicology of cadmium, p. 189–214. In Goyer, R. A. and Cherian, M. G. (eds.), *Toxicology of metals: Biochemical aspects. Handbook of experimental pharmacology*, vol. 115. Springer-Verlag, New York (1995).
  - 14) 第 15 回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会: 生物と金属 金属イオンの生体内で働く仕組み, クバプロ, 東京 (2001).
  - 15) 不破敬一郎: 生体と重金属, 講談社, 東京 (1981).
  - 16) 茅野充男, 斎藤寛: 重金属と生物, 博友社, 東京 (1988).
  - 17) Igarashi, S., Itoh, J., Yotsuyanagi, T., and Aomura, K.: Spectrophotometric determination of small amounts of cadmium(II) with  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tetraphenylporphinetrisulfonic acid. *Nippon Kagaku Kaishi*, 212–216 (1978/2). (in Japanese)
  - 18) Koh, H., Kawamura, K., and Ishii, H.: Spectrophotometric determination of ultramicro amounts of cadmium with anionic porphyrins in the presence of pyridine. *Nippon Kagaku Kaishi*, 591–596 (1979/5). (in Japanese)
  - 19) Ishii, H., Satoh, K., Satoh, Y., and Koh, H.: Spectrophotometric and analogue derivative spectrophotometric determination of ultramicro amounts of cadmium with cationic porphyrins. *Talanta*, **29**, 545–550 (1982).
  - 20) Kawamura, K., Igarashi, S., and Yotsuyanagi, T.: Acceleration effect of L-tryptophan on metal ion exchange reaction of cadmium(II) with watersoluble-porphyrin-lead(II) complex and its application to stopped-flow spectrophotometric determination of nM level of cadmium(II). *Anal. Sci.*, **4**, 175–179 (1988).
  - 21) Igarashi, S., Aihara, T., and Yotsuyanagi, T.: Flow injection spectrophotometric determination of  $\text{ng ml}^{-1}$  levels of cobalt(II) using the photochemical decomposition of a cadmium(II)-water-soluble porphyrin complex. *Anal. Chim. Acta*, **323**, 63–67 (1996).
  - 22) Itoh, J., Yotsuyanagi, T., and Aomura, K.: Spectrophotometric determination of

- copper with  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tetraphenylporphine trisulfonate. *Anal. Chim. Acta*, **74**, 53–60 (1975).
- 23) **Ishii, H. and Koh, H.:** Analytical application of porphyrins—I Spectrophotometric determination of ultramicro amounts of copper with alpha, beta, gamma, delta-tetra-(3-*N*-methylpyridyl)porphine. *Talanta*, **24**, 417–420 (1977).
  - 24) **Makino, T. and Itoh, J.:** A highly sensitive colorimetric determination of serum copper using alpha, beta, gamma, delta-tetrakis(4-*N*-trimethylaminophenyl)-porphine. *Clin. Chim. Acta*, **111**, 1–8 (1981).
  - 25) **Tabata, M. and Kaneko, K.:** Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(II) using the homolysis reaction of the copper(II)-*N*-*p*-nitrobenzyl-5,10,15,20-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphine complex. *Analyst*, **116**, 1185–1188 (1991).
  - 26) **Ishii, H., Koh, H., and Satoh, K.:** Spectrophotometric determination of manganese utilizing metal ion substitution in the cadmium –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tetrakis(4-carboxyphenyl)porphine complex. *Anal. Chim. Acta*, **136**, 347–352 (1982).
  - 27) **Itoh, J., Yamahira, M., Yotsuyanagi, T., and Aomura, K.:** Spectrophotometric determination of small amounts of lead(II) with tetraphenylporphine trisulfonic acid (TPPS). *Bunseki Kagaku*, **25**, 781–784 (1976). (in Japanese)
  - 28) **Tabata, M.:** Kinetic method for the determination of nanogram amounts of lead(II) using its catalytic effect on the reaction of manganese(II) with 5,10,15,20-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphine. *Analyst*, **112**, 141–144 (1987).
  - 29) **Li, Z., Zhu, Z., Jan, T., and Pan, J.:** Synthesis of meso-tetra-(3,5-dibromo-4-hydroxylphenyl)-porphyrin and its application to second-derivative spectrophotometric determination of lead in clinical samples. *Analyst*, **124**, 1227–1231 (1999).
  - 30) **Zaijun, L., Yuling, Y., Jian, T., and Jiaomai, P.:** Spectrophotometric determination of trace lead in water after preconcentration using mercaptosephadex. *Talanta*, **60**, 123–130 (2003).

- 31) Li, Z., Tang, J., and Pan, J.: The determination of lead in preserved food by spectrophotometry with dibromohydroxyphenylporphyrin. *Food Control*, **15**, 565–570 (2004).
- 32) Kawamura, K., Igarashi, S., and Yotsuyanagi, T.: Stopped-flow spectrophotometric determination of nM level of Pb(II) using 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphine. *Microchim. Acta*, **157**, 87–91 (2007).
- 33) Igarashi, S., Kobayashi, J., Yotsuyanagi, T., and Aomura, K.: Spectrophotometric determination of Zinc with  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tetrakis-(1-methylpyridinium-4-yl)porphine—Application of the “Soret band” shift of free porphyrine by lead complex formation—. *Nippon Kagaku Kaishi*, 602–606 (1979/5). (in Japanese)
- 34) Ishii, H. and Tsuchiai, H.: Spectrophotometric and analogue derivative spectrophotometric determination of trace zinc with 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfophenyl)porphine in presence of high concentrations of cadmium. *Anal. Sci.*, **3**, 229–233 (1987).
- 35) Igarashi, S. and Yotsuyanagi, T.: Spectrofluorimetric determination of traces of zinc with the cadmium- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tetrakis(4-sulphophenyl)-porphine complex. *Anal. Chim. Acta*, **281**, 347–351 (1993).
- 36) Kilian, K. and Pyrzyńska, K.: Spectrophotometric study of Cd(II), Pb(II), Hg(II) and Zn(II) complexes with 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxylphenyl)porphyrin. *Talanta*, **60**, 669–678 (2003).
- 37) Xu, X., Zhang H., Zhang, C., and Cheng, J.: Separation and determination of copper, zinc, palladium, iron, and manganese with meso-tetrakis(3-bromo-4-sulfophenyl)porphine and reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **63**, 2529–2532 (1991).
- 38) Shi, Z. and Fu, C.: Porphyrins as ligands for trace metal analysis by high-performance liquid chromatography. *Talanta*, **44**, 593–604 (1997).
- 39) Igarashi, S., Ide, N., and Takagai, Y.: High-performance liquid chromatographic-spectrophotometric determination of copper(II) and palladium(II) with 5,10,15,20-

- tetrakis(4*N*-pyridyl)porphine following homogeneous liquid-liquid extraction in the water-acetic acid-chloroform ternary solvent system. *Anal. Chim. Acta*, **424**, 263-269 (2000).
- 40) **Hu, Q., Yang, G., Yin, J., and Yao, Y.:** Determination of trace lead, cadmium and mercury by on-line column enrichment followed by RP-HPLC as metal-tetra-(4-bromophenyl)-porphyrin chelates. *Talanta*, **57**, 751-756 (2002).
- 41) **Yuanqian, L., Jingmei, H., Jingguo, Y., Bo, Z., and Yuanqing, H.:** Multi-component analysis by flow injection-diode array detection-spectrophotometry using partial least squares calibration model for simultaneous determination of zinc, cadmium and lead. *Anal. Chim. Acta*, **461**, 181-188 (2002).
- 42) **Huang, Z., Yang, G., Hu, Q., and Yin, J.:** Determination of lead, cadmium and mercury in microwave-digested foodstuffs by RP-HPLC with an on-line enrichment technique. *Anal. Sci.*, **19**, 255-258 (2003).
- 43) **Yamane, T., Tsuchimoto, T., and Yoshikawa, H.:** Simple, rapid and simultaneous determination of lead and cadmium in river water and soil samples with a flow-injection system utilizing in-line cation exchange separation and photometric detection. *Bunseki Kagaku*, **53**, 297-302 (2004). (in Japanese)
- 44) **Igarashi, S. and Yotsuyanagi, T.:** New "amphoteric ion type" water-soluble porphines as a spectrophotometric reagent. *Chemistry Letters*, **13**, 1871-1874 (1984).
- 45) **Igarashi, S., Suzuki, H., and Yotsuyanagi, T.:** The equilibrium constants of cadmium(II)-, lead(II)-, magnesium(II)-, and zinc(II)- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphine complexes. *Talanta*, **42**, 1171-1177 (1995).
- 46) **Igarashi, S.:** Studies on porphyrins as ultra-highly sensitive analytical reagents. *Bunseki Kagaku*, **46**, 1-23 (1997). (in Japanese)
- 47) **Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., and Lister, S. J.:** Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.*, **43**, 772-777 (1989).

- 48) **Cen, H., He, Y., and Huang, M.:** Measurement of soluble solids contents and pH in orange juice using chemometrics and vis-NIRS. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7437-7443 (2006).
- 49) **Ugurlu, A.:** Leaching characteristics of fly ash. *Environ. Geol.*, **46**, 890-895 (2004).
- 50) **吉田恒行:** キレート系重金属固定化剤の添加量の決定方法, 特許 4254396 (2009 登録).
- 51) **Li, Z., Zhu, Z., Chen, Y., Hsu, C., and Jiaomai, P.:** Spectrophotometric determination of lead in biological samples with dibromo-*p*-methyl-methylsulfonazo. *Talanta*, **48**, 511-516 (1999).
- 52) **Fang, G., Meng, S., Zhang, G., and Pan, J.:** Spectrophotometric determination of lead in foods with dibromo-*p*-methyl-bromosulfonazo. *Talanta*, **54**, 585-589 (2001).
- 53) **Jamaluddin, A. M. and Mamun, M.:** Spectrophotometric determination of lead in industrial, environmental, biological and soil samples using 2,5-dimercapto-1,3,4-thiadiazole. *Talanta*, **55**, 43-54 (2001).
- 54) **Fang, G., Liu, Y., Meng, S., and Guo, Y.:** Spectrophotometric determination of lead in vegetables with dibromo-*p*-methyl-carboxysulfonazo. *Talanta*, **57**, 1155-1160 (2002).
- 55) **Shim, Y., Rhee, S., Lee, W.:** Comparison of leaching characteristics of heavy metals from bottom and fly ashes in Korea and Japan. *Waste Manag.*, **25**, 473-480 (2005).
- 56) **Hayashita, T., Sawano, H., Higuchi, T., Indo, M., Hiratani, K., Zhang, Z., and Bartsch, R. A.:** Molecular design of acyclic polyether dicarboxylic acids possessing pseudo-18-crown-6 frameworks for selective lead(II) extraction. *Anal. Chem.*, **71**, 791-795 (1999).
- 57) **Mesquita, R. B., Fernandes, S. M., and Rangel, A. O.:** A flow system for the spectrophotometric determination of lead in different types of waters using

- ion-exchange for pre-concentration and elimination of interferences. *Talanta*, **62**, 395-401 (2004).
- 58) Inamo, M., Tomita, A., Inagaki, Y., Asano, N., Suenaga, K., Tabata, M., Funahashi, S.: Equilibria, kinetics and mechanism of complexation of 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin and its N-methylated derivative with cadmium(II) and zinc(II) ions in aqueous solution at various temperatures and pressures. Effects of metal ion size and porphyrin ring deformation on metal ion incorporation. *Inorg. Chim. Acta*, **256**, 77-85 (1997).
- 59) 宮川雅巳: 品質を獲得する技術, 日科技連出版社, 東京 (2000).
- 60) 田口玄一, 横山巽子: ベーシック オフライン品質工学, 日本規格協会, 東京 (2007).
- 61) 井上清和, 中野恵司, 林裕人, 芝野広志, 大場草司: 入門 パラメータ設計, 日科技連出版社, 東京 (2008).
- 62) Apostoli, P., Huard, C., Chaumontet, C., Martel, P., Alessio, L., and Mazzoleni, G.: Effects of four inorganic lead compounds on the proliferation and junctional coupling of cultured REL liver cells. *Am. J. Ind. Med.*, **38**, 340-348 (2000).
- 63) Aleo, M. F., Bettoni, F., Boniotti, J., Morandini, F., Giuliani, R., Steimberg, N., Apostoli, P., and Mazzoleni, G.: A comparative in vitro study of the toxic potency of five inorganic lead compounds on a rat liver epithelial cell line (REL). *Toxicol. In Vitro*, **20**, 874-881 (2006).
- 64) Sillanpää, M. and Oikari, A.: Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using Microtox bioassay. *Chemosphere*, **32**, 1485-1497 (1996).
- 65) Tsiridis, V., Petala, M., Samaras, P., Hadjispyrou, S., Sakellaropoulos, G., and Kungolos, A.: Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **63**, 158-167 (2006).
- 66) Chen, L., Yang, X., Jiao, H., and Zhao, B.: Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2

- cells. *Toxicol. Sci.*, **69**, 149–156 (2002).
- 67) **Kaneko, H.:** Evaluation of municipal waste incinerator fly ash toxicity and the role of cadmium by two aquatic toxicity tests. *Waste Manag.*, **16**, 555–559 (1996).
- 68) **Horvat, T., Vidaković–Cifrek, Z., Orescanin, V., Tkalec, M., and Pevalek–Kozlina, B.:** Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *Sci. Total Environ.*, **384**, 229–238 (2007).
- 69) **Huang, F., Bitton, G., and Kong, I. C.:** Determination of the heavy metal binding capacity of aquatic samples using MetPLATE: a preliminary study. *Sci. Total Environ.*, **234**, 139–145 (1999).
- 70) **Tan, F., Wang, M., Wang, W., and Lu, Y.:** Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*, **22**, 164–170 (2008).
- 71) **Dutka B. J. and Kwan K. K.:** Comparison of three microbial toxicity screening tests with the Microtox test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 753–757 (1981).
- 72) **Fulladosa, E., Murat, J. C., Martínez, M., and Villaescusa, I.:** Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere*, **60**, 43–48 (2005).
- 73) **Parvez, S., Venkataraman, C., and Mukherji, S.:** A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.*, **32**, 265–268 (2006).
- 74) **Mattiasson, B., Danielsson, B., Hermansson, C., and Mosbach, K.:** Enzyme thermistor analysis of heavy metal ions with use of immobilized urease. *FEBS Lett.*, **85**, 203–206 (1978).
- 75) **Sharma, S. K., Goloubinoff, P., and Christen, P.:** Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372**, 341–345 (2008).
- 76) **Zenk, M. H.:** Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene*, **179**, 21–30 (1996).

- 77) **Hirata, K., Tsuji, N., and Miyamoto, K.:** Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 593–599 (2005).
- 78) **Stillman, M. J.:** Metallothioneins. *Coordination Chem. Rev.*, **144**, 461–511 (1995).
- 79) **Kagi, J. H. R.:** Evolution, structure and chemical activities of class 1 metallothioneins: An overview, p. 29–55. In Suzuki, K. T., Imura, N., and Kimura, M. (eds.), *Metallothionein III*. Birkhäuser Verlag, Basel (1993).
- 80) **Piotrowski, J. K., Bolanowska, W., and Sapota, A.:** Evaluation of metallothionein content in animal tissues. *Acta Biochim. Pol.*, **20**, 207–215 (1973).
- 81) **Szymańska, J. A. and Zelazowski, A. J.:** Effect of cadmium, mercury, and bismuth on the copper content in rat tissues. *Environ. Res.*, **19**, 121–126 (1979).
- 82) **Palmiter, R. D.:** Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1219–1223 (1994).
- 83) **Otsuka, F.:** Molecular mechanism of the metallothionein gene expression mediated by metal-responsive transcription factor 1. *J. Health Sci.*, **47**, 513–519 (2001).
- 84) **Daniels, P. J., Bittel, D., Smirnova, I. V., Winge, D. R., and Andrews, G. K.:** Mammalian metal response element-binding transcription factor-1 functions as a zinc sensor in yeast, but not as a sensor of cadmium or oxidative stress. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3130–3140 (2002).
- 85) **Otsuka, F., Ohno, S., Suzuki, K., Takahashi, K., Ohsawa, M., and Koizumi, S.:** Mechanism of metallothionein gene activation mediated by heavy-metal dependent transcription factor MTF-1. *Yakugaku Zasshi*, **127**, 675–684 (2007). (in Japanese)
- 86) **Nielson, K. B., Atkin, C. L., and Winge, D. R.:** Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.*, **260**, 5342–5350 (1985).
- 87) **Shaikh, A. R., Giridhar, R., and Yadav, M. R.:** Bismuth-norfloxacin complex: Synthesis, physicochemical and antimicrobial evaluation. *Int. J. Pharm.*, **332**, 24–30 (2007).
- 88) **Wu, C. M. and Lin, L. Y.:** Immobilization of metallothionein as a sensitive

- biosensor chip for the detection of metal ions by surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 864–871 (2004).
- 89) **Toyama, M., Sasaki, M., Hirayama, N., Murooka, Y., and Yamashita, M.:** Construction of an additional metal-binding site in human metallothionein-2. *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 354–360 (2006).
- 90) **Satofuka, H., Fukui, T., Takagi, M., Atomi, H., and Imanaka, T.:** Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *J. Inorg. Biochem.*, **86**, 595–602 (2001).
- 91) **Rupp, H. and Weser, U.:** Conversion of metallothionein into Cu-thionein, the possible low molecular weight form of neonatal hepatic mitochondriocuprein. *FEBS Lett.*, **44**, 293–297 (1974).
- 92) **Winge, D. R., Premakumar, R., Wiley, R. D., and Rajagopalan, K. V.:** Copper-chelatin: Purification and properties of a copper-binding protein from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 253–266 (1975).
- 93) **Geller, B. L. and Winge, D. R.:** Metal binding sites of rat liver Cu-thionein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**, 109–117 (1982).
- 94) **Fulladosa, E., Murat, J. C., and Villaescusa, I.:** Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere*, **58**, 551–557 (2005).
- 95) **Fulladosa, E., Desjardin, V., Murat, J. C., Gourdon, R., and Villaescusa, I.:** Cr(VI) reduction into Cr(III) as a mechanism to explain the low sensitivity of *Vibrio fischeri* bioassay to detect chromium pollution. *Chemosphere*, **65**, 644–650 (2006).
- 96) **Hsieh, C. Y., Tsai, M. H., Ryan, D. K., and Pancorbo, O. C.:** Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox<sup>®</sup> chronic toxicity test. *Sci. Total Environ.*, **320**, 37–50 (2004).
- 97) **Bulich, A. A., Huynh, H., and Ulitzur, S.:** The use of luminescent bacteria for measuring chronic toxicity, p. 3–12. In Ostrander, G. K. (ed.), *Techniques in*

aquatic toxicology, vol. 2. CRC, Boca Raton (1996).

- 98) **Satofuka, H., Amano, S., Atomi, H., Takagi, M., Hirata, K., Miyamoto, K., and Imanaka, T.:** Rapid method for detection and detoxification of heavy metal ions in water environments using phytochelation. *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 287–292 (1999).