第15回ヒ素シンポジウム

主　　催 ： 日本ヒ素研究会

開 催 日 ： 2009年11月28日(土)・29日(日)

会　　場 ： 大阪市立大学医学部学舎 大講義室（大阪市阿倍野区旭町1-4-3）

会長講演　動物モデルを用いたヒ素の発がん性と発生機序の解明
　　鰐渕 英機（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

特別講演１　海洋生物のヒ素－化学形解明を中心として－
　　塩見 一雄（東京海洋大学食品生産科学科 教授）

特別講演２　食品中に含まれるヒ素の食品影響評価に関する調査
　　山崎 静香（財団法人国際医学情報センター 連携事業室 EBM支援センター研究員）

特別講演３　和歌山カレー毒物事件における集団急性ヒ素中毒
　　山内　 博（北里大学医療衛生学部 教授）

特別講演４　中国の慢性ヒ素中毒の疫学研究から解明されたこと
　　吉田 貴彦（旭川医科大学衛生学講座 教授）

シンポジウム日程

11月28日(1日目)

9:30－ 9:40	開会の辞
9:40－12:00	一般講演(1-1～1-7)
(12:00－13:00	理事会)
13:30－14:30	一般講演(1-8～1-10)
14:40－15:40	特別講演1
15:40－16:40	会長講演
16:40－17:40	特別講演2
18:00－20:00	懇親会(医学部学舎生協食堂)

11月29日(2日目)

9:00－10:00	一般講演(2-1～2-3)
10:10－12:10	特別講演3、4
(12:10－12:40	総会)
13:30－16:10	一般講演(2-4～2-11)
16:20－16:30	奨励賞発表
16:30～16:40	閉会の辞

プログラム　　11月28日(第1日目)

◆ 開会の辞　　9:30〜9:40

鰐渕英機(大阪市立大学大学院医学研究科 都市環境病理学)

◆ 一般講演 (発表15分、質疑5分)

9:40〜10:20　座長:圓藤陽子((独)労働者健康福祉機構・東京労災病院 産業中毒研究センター)

1-1 単細胞緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*における水溶性ヒ素代謝物の分布

〇宮下振一、岸田和久、貝瀬利一

東京薬科大学大学院生命科学研究科 環境動態化学研究室

1-2 カツオ普通筋および血合筋における、脂溶性および水溶性ヒ素化合物に関する研究

〇田中祥平[1)]、千田裕晃[1)]、貝瀬利一[2)]、臼井将勝[1)]、花岡研一[1)]

[1)] 水産大学校、[2)] 東京薬科大学

10:20〜11:00　座長:塩見一雄(東京海洋大学海洋科学部)

1-3 急性アルシン中毒患者における血清中ヒ素化合物濃度について

〇圓藤陽子[1)]、吉村幸浩[2)]、下田康代[3)]、鈴木芳宏[1)]、山中健三[3)]、圓藤吟史[4)]

[1)] 労働者健康福祉機構東京労災病院産業中毒研究センター、[2)] 横浜市立市民病院感染症科

[3)] 日本大学薬学部衛生薬学研究部門環境衛生学、[4)] 大阪市立大学大学院医学研究科産業医学分野

1-4 HPLC-ICP-MSおよび同位体希釈LC-MSによるヒ素スペシエーションと認証標準物質開発

〇黒岩貴芳、稲垣和三、成川知弘、千葉光一

(独)産業技術総合研究所 計測標準研究部門／計量標準総合センター (NMIJ)

11:00〜12:00　座長:平野靖史郎(国立環境研究所環境リスク研究センター)

1-5 DPAA汚染地下水を使用した水田のDPAA汚染濃度分布と非汚染米の収穫例

〇檜山知代[1)]、野口綾乃[2)]、貝瀬利一[3)]、楡井久[4)]

[1)] 大阪市立大学大学院理学研究科、[2)] 元東京薬科大学大学院生命科学研究科

[3)] 東京薬科大学大学院環境動態化学研究室、[4)] 地球汚染―地質汚染基礎科学研究センター

1-6 神栖町(現在紳栖市)A井戸のDPAA汚染揚水試験と地下水汚染機構

○檜山知代[1)]、楡井久[2)]、大脇正人[3)]、武島俊達[3)]

[1)] 大阪市立大学大学院理学研究科、[2)] (NPO)日本地質汚染審査機構・国際地球汚染—地質汚染基礎科学研究センター、[3)] 茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団

1-7 ジフェニルアルシン酸による肝発がん促進作用の機序解明

○山田貴宣、謝曉利、魏民、菅直人、梯アンナ、鰐渕英機

大阪市立大学大学院医学研究科 都市環境病理学

◆ 理事会	12:00〜13:00

◆ 一般講演

13:30〜14:30 座長:吉田貴彦(旭川医科大学衛生学講座)

1-8 海藻類多食者における一日の食事からのヒ素, カドミウム, 鉛, スズ摂取量の相互関係

○千葉啓子[1)]、中塚晴夫[2)]、渡辺孝男[3)]、新保慎一郎[4)]、山内博[5)]

[1)] 岩手県立大学盛岡短期大学部、[2)] 宮城大学看護学部、[3)] 宮城教育大学

[4)] 京都女子大学、[5)] 北里大学大学院医療系研究科環境医科学群

1-9 ベトナムのヒ素汚染地域住民におけるAS3MT遺伝子多型とヒ素代謝の関係

○阿草哲郎[1) 2)]、岩田久人[2)]、藤原純子[1)]、國頭恭[3)]、Tu Binh Minh[4)]、Pham Thi Kim Trang[4)]
Pham Hung Viet[4)]、竹下治男[1)]、田辺信介[2)]

[1)] 島根大学医学部法医学講座、[2)] 愛媛大学沿岸環境科学研究センター (CMES)

[3)] 信州大学理学部物質循環学科、[4)] Center for Environmental Technology and Sustainable Development (CETASD), Hanoi University of Science, Hanoi, Vietnam

1-10 ウッタールプラディシュ州バライチ県における地下水ヒ素汚染

○瀬崎満弘[1)]、田川大輔[1)]、田辺公子[2)]、真智代[2)]、塩盛弘一郎[1)]、横田漠[2)]

[1)] 宮崎大学工学部、[2)] 宮崎大学産学連携センター

◆ 特別講演1

14:40〜15:40 座長:神和夫(北海道立衛生研究所健康科学)

海洋生物のヒ素ー化学形解明を中心としてー

塩見一雄　　東京海洋大学 食品生産科学科

◆ 会長講演

15:40～16:40　座長:花岡研一（独立行政法人 水産大学校）

動物モデルを用いたヒ素の発がん性と発生機序の解明

鰐渕英機　　大阪市立大学大学院医学研究科 都市環境病理学

◆ 特別講演2

16:40～17:40　座長:圓藤吟史（大阪市立大学大学院医学研究科）

内閣府食品安全委員会平成20年度食品安全確保総合調査

「食品中に含まれるヒ素の食品影響評価に関する調査」

山﨑静香　　財団法人国際医学情報センター

◆ 一般講演（発表15分、質疑5分）

9:00～10:00　座長:山中健三（日本大学薬学部）

2-1　亜ヒ酸の心毒性に係る因子の解析

〇角大悟、佐々木貴彦、藤代瞳、宮髙透喜、姫野誠一郎

徳島文理大・薬・衛生化学

2-2　ヒト卵膜由来正常細胞に対する亜ヒ酸の影響

〇吉野雄大[1)]、袁博[1)]、武市信[2)]、貝瀬利一[3)]、豊田裕夫[1)]

[1)] 東京薬科大学　臨床ゲノム生化学教室、[2)] 米山産婦人科病院

[3)] 東京薬科大学　環境動態化学研究室

2-3　日本人小児の無機ヒ素曝露と酸化ストレス

〇森拓哉[1)]、吉永淳[1)]、河原純子[2)]、鈴木慧[3)]、溝井美穂[3)]、安達修一[3)]、葛西宏[4)]

田尾博明[5)]、中里哲也[5)]

[1)] 東京大学新領域創成科学研究科、[2)] 国立環境研究所、[3)] 相模女子大学栄養科学研究科

[4)] 産業医科大学職業腫瘍学、[5)] 産業技術総合研究所

◆ 特別講演3

10:10～11:10　座長:鰐渕英機（大阪市立大学大学院医学研究科）

和歌山カレー毒物事件における集団急性ヒ素中毒

山内博　　北里大学大学院医療系研究科環境医科学群、医療衛生学部公衆衛生学

◆ 特別講演4

11:10～12:10　座長:久永　明（福岡県立大学人間社会学部）

中国の慢性ヒ素中毒の疫学研究から解明されたこと

吉田貴彦[1)]、中木良彦[1)]、山内博[2)]

[1)] 旭川医科大学医学部健康科学、[2)] 北里大学大学院医療系研究科環境医科学群

◆ 総　会　12:10～12:40

◆ 一般講演

13:30〜14:10 座長:黒岩貴芳(産業技術総合研究所環境標準研究室)

2-4 鉄酸化物を固定化したPVA凍結ゲルによるヒ素の吸着挙動

○塩盛 弘一郎[1)]、横山佳奈[1)]、松下明日香[1)]、清山史朗[2)]、田辺 公子[3)]

1) 宮崎大学工学部、2) 都城高専、3) 宮崎大学産学連携センター

2-5 ガス化ヒ素の過酸化水素を用いた捕集

○中宮邦近、柴田康行

(独)国立環境研究所

14:10〜15:10 座長:山内博(北里大学医療衛生学部)

2-6 ラットにおけるジフェニルアルシン酸の胆汁排泄機構

○小林弥生[1) 2)]、山城彩花[2)]、平野靖史郎[1) 2)]

1) 国立環境研究所、2) 千葉大・院・薬

2-7 ヒ素メチル化細菌の増殖特性とヒ素代謝

○宮武宗利[1)]、田辺公子[2)]、林幸男[1)]

1) 宮崎大学工学部、2) 宮崎大学産業連携センター

2-8 膀胱尿路上皮におけるジメチルモノチオアルシン酸の影響

○菅直人[1)]、謝暁利[1)]、金川明裕[1) 2)]、吉田香[1)]、魏民[1)]、圓藤吟史[2)]、鰐渕英機[1)]

1) 大阪市立大学大学院医学研究科 都市環境病理学、2) 大阪市立大学大学院医学研究科 産業医学

15:10〜16:10 座長:田辺公子(宮崎大学産学連携センター)

2-9 ヒト肝癌由来培養細胞HepG2のヒ素による細胞死における転写因子ATF5の役割

○山崎高志、大味麻子、車谷春香、加藤研司、阿部貴則、山本宙亨、中西教子、奥山隆一
貝瀬利一、高橋滋、高橋勇二

東京薬科大学 生命科学研究科 環境ストレス生理学研究室

2-10 発癌に関与するジメチルヒ素の赤血球内動態

○下田康代[1)]、山中健三[1)]、加藤孝一[1)]、圓藤陽子[2)]、圓藤吟史[3)]

1) 日本大学薬学部、2) 東京労災病院産業中毒センター、3) 大阪市立大学大学院医学研究科

2-11 無機ヒ素のメチル化と酸化的DNA損傷に対するブロッコリースプラウトの効果について

〇鶴見麻依[1)]、岩立有加[1)]、寺中彩葉[1)]、鳥居佳介[1)]、内村彩子[1)]、高野(宮本)清子[1)]
中野(青木)瑞穂[1)]、伊藤俊弘[2)]、吉田貴彦[2)]、山内博[1)]
[1)] 北里大学大学院医療系研究科・環境医科学群、[2)] 旭川医大・健康科学

◆ 奨励賞発表	16:20～16:30

◆ 閉会の辞	16:30～16:40

圓藤吟史（大阪市立大学大学院医学研究科 産業医学）

MEMO

会長講演

動物モデルを用いたヒ素発がん性および発生機序の解明

鰐渕英機

大阪市立大学大学院医学研究科　都市環境病理学

1. はじめに

ヒ素は疫学的に皮膚、肺、膀胱、肝などに発がん性が認められている。しかしながら、動物実験においてのヒ素の発がん性は、まだ十分に検証されておらず、その発がんの本態は不明である。そこで、我々はほ乳類における無機ヒ素の主な代謝産物である有機ヒ素化合物の dimethylarsinic acid (DMA^V)の染色体毒性に注目し、DMA^V の発がん性およびその発生機序を様々な動物モデルを用いて明らかにしてきた。また、その他の無機ヒ素代謝物である monomethylarsonic acid (MMA^V) および trimethylarsenoxide (TMAO)の発がん性の検討も行った。さらに、ヒ素投与ラットの尿中から同定された新規ヒ素代謝物である M-2 (dimethylmonothioarsinic acid, $DMMTA^V$) の毒性およびラット膀胱粘膜に及ぼす影響について検討した。今回の報告では、これまでに得られた知見について紹介する。

2. ラット発がんモデルを用いた DMA^V の発がん性の検討

1) ラット多臓器中期発がん性試験法を用いた DMA^V の発がん修飾作用の検討[1]

雄 F344 ラットに実験開始 4 週間にイニシエーション処置として 5 種類の発がん物質(diethylnitrosamine (DEN), N-butyl-N-(hydroxylbutyl)nitrosamine (BBN), N-methyl-N-nitrosourea, dihydroxy-di-N- propylnitrosamine, 1,2-dimethylhydrazine）を投与し、1 週間の休薬後 DMA^V を 0（対照群）、50、100、200 、400 ppm の濃度で 25 週間飲水投与した。その結果、DMA^V は 50 ppm から膀胱発がんを促進し、また、肝、腎では 200 ppm から、さらに甲状腺では 400 ppm で発がん促進作用が認められた。

2) 二段階ラット膀胱発がん試験法を用いた DMA^V の膀胱発がんへの影響の検討[2,3]

膀胱発がん促進作用について、実際の環境中のヒ素濃度に近い 2 ppm という低濃度から 100 ppm の高濃度まで DMA^V の用量相関性を検討した。雄 F344 ラットにイニシエーション処置として BBN を 4 週間飲水投与し、その後 DMA^V を 32 週間飲水投与した。その結果、10 ppm 群から膀胱腫瘍の発生は有意に増加し、DMA^V の膀胱発がん促進作用が認められた。さらに、それに細胞増殖促進作用が関連することが明らかとなった。また、DMA^V の膀胱発がん促進作用は膀胱発がんに低感受性の NCI-Black-Reiter ラット

を用いた実験でも明らかにされ、その際にも DMA^V の細胞増殖促進作用が関与することが示された。

3)　二段階ラット肝発がん試験法を用いた DMA^V の肝発がんへの影響と機序の検討 [4,5]

DMA^V のラット肝発がん促進作用について、ラット肝中期発がん性試験法(伊東法)を用いて 25、50、100 ppm の 3 用量で検討した結果、DMA^V は 25 ppm から用量依存的に肝前がん病変のマーカーである胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST-P)陽性細胞巣の数、面積ともに増加させ、DMA^V の肝発がん促進作用が認められた。また、ラット肝における酸化的 DNA 傷害の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)が、DMA^V 投与により有意に増加することが判明し、DMA^V 投与により酸化的ストレスが惹起されることも明らかとなった。

4)　DMA^V のラット 2 年間発がん性試験[4,6,7]

上述の実験から DMA^V のラットへの発がん性が強く示唆されたため、DMA^V のラット 2 年間発がん性試験が施行された。すなわち、F344 雄ラットに DMA^V を 12.5、50、200 ppm の濃度で 2 年間飲水投与した。その結果、50 ppm で膀胱がんが 19%、乳頭腫とあわせた腫瘍では 26%で、200 ppm では膀胱がん、腫瘍が 39%発生し、12.5 ppm と対照群では腫瘍の発生は見られなかった。このことから、DMA^V は用量依存的にラット膀胱に発がん性を示すことが世界で初めて証明された。DMA^V を 2 週間投与したラット膀胱の 8-OHdG 形成は対照群に比較し、有意に増加を示し、膀胱においても酸化的 DNA 傷害が惹起されていることが明らかとなった。

5)　DMA 誘発膀胱がんの分子病理学的解析[6]

DMA^V で 2 年間の投与で発生した膀胱がんについて、p53、K-ras、H-ras、β-catenin 遺伝子の突然変異および microsatelite instability（MSI）を検索した結果、わずか、2 例に k-ras 遺伝子に変異を認めるのみで、他に変異は全く認めなかった。これは遺伝毒性発がん物質である BBN で誘発された膀胱がんに p53 遺伝子変異や MSI の不安定性が高頻度に認められるのとは、対照的である。また、免疫組織化学的に cyclin D1、cyclooxygenase-2 (COX-2)の過剰発現が過形成病変と腫瘍において、また、$p27^{kip1}$ の発現低下が腫瘍で認められた。

3. 遺伝子改変マウスモデルを用いた DMA^V の発がん性の検討

1)　ODC トランスジェニックマウスにおける DMA^V の皮膚発がん促進作用[8]

ヒ素は疫学的に皮膚への発がん性が明らかにされているが、これまで動物実験では証明されていない。そこで、皮膚発がん高感受性の雄 K6/ODC トランスジェニックマウスを用いて皮膚二段階発がん性試験により DMA^V の皮膚発がんへの影響を検討した。そ

の結果、皮膚発がん物質の 7,12-dimethylbenz[α]anthracene でイニシエートした群において、DMA^V を 200 ppm の濃度でクリームに混ぜて塗布した群では、皮膚発がんプロモーターの TPA と同程度の皮膚発がん促進作用を示した。非イニシエーション群では DMA^V の有無にかかわらず、皮膚腫瘍の発生はみられなかった。このことから、DMA^V はマウス皮膚発がん促進作用を有することが明らかとなった。

2)　p53 ノックアウトマウスにおける DMA^V の発がん性[9]

雄 p53 ノックアウトマウス及び野生型マウスに、DMA^V を 0（対照群）、50、200 ppm の濃度で 80 週間飲水投与した実験では、p53 ノックアウトマウス及び野生型マウスの DMA^V 投与群でそれぞれの対照群と比較し、早期から腫瘍の有意な増加が認められた。また、200 ppm の DMA^V が投与された p53 ノックアウトマウスでは 1 匹あたりの総腫瘍数、野生型マウスでは 50 及び 200 ppm の DMA^V 投与群で腫瘍の発生頻度と総腫瘍数が、それぞれの対照群に比較して有意に増加していた。これらの結果より、DMA^V は p53 ノックアウトマウス及び野生型マウスに発がん性を有することが示された。

3)　Ogg1 ノックアウトマウスにおける DMA^V の肺発がん性[10]

酸化的 DNA 傷害修復酵素である Ogg1 のノックアウトマウス及び野生型マウスに、DMA^V を 0（対照群）、200 ppm の濃度で 72 週間飲水投与した実験では、Ogg1 ノックアウトマウスにおける肺腫瘍の発生頻度及び個数は、対照群に比べ DMA^V 投与群で有意に増加した。一方、野生型マウスにおいては、肺腫瘍の発生はみられなかった。これらの結果から、DMA^V は Ogg1 ノックアウトマウスで肺発がん性が示され、酸化的 DNA 傷害が DMA^V の肺発がんに関与していることが明らかとなった。

4.　ラット発がんモデルを用いた MMA^V 及び TMAO の発がん性の検討

1)　MMA^V 及び TMAO のラットにおける肝発がん促進作用[11]

MMA^V および TMAO も DMA^V 同様に染色体毒性を示している。そこで、ラット肝中期発がん性試験法を用いて MMA^V 及び TMAO のラット肝発がんに及ぼす影響を 100 ppm の濃度で検討した結果、MMA^V、TMAO も DMA^V と同様に GST-P 陽性細胞巣の数および面積を増加させ、ラット肝発がんを促進することが明らかとなった。

2)　MMA^V 及び TMAO のラットにおける膀胱発がん促進作用[12]

MMA^V、TMAO について、DMA^V 同様に膀胱発がん促進作用があるかをラット二段階発がん性試験法で検討した。F344 ラットに BBN を飲料水で 4 週間、その後肝、腎発がん物質である N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN)を 2 週間飲水投与した。MMA^V、DMA^V、TMAO はヒ素として 100 ppm の濃度で 30 週間投与した。その結果、DMA^V>MMA^V>TMAO の強度で膀胱発がん促進作用が認められた。さらに、尿中ヒ素代

謝物のうち、新規ヒ素代謝物である M-2 (dimethylmonothioarsinic acid, DMMTA^{V}) の濃度と膀胱腫瘍の発生数との間に強い相関関係がみられ、これが膀胱発がんに関連する共通のヒ素化合物である可能性が示唆された。

3) MMA^{V}および TMAO のラット 2 年間発がん性試験[13,14]

MMA^{V}のラット 2 年間発がん性試験では、雄 F344 ラットに MMA^{V}を 0、50、200 ppm の濃度で飲水投与したが、発がん性はみられなかった。一方、ラットに TMAO を 0、50、200 ppm の濃度で 2 年間飲水投与した実験では、対照群に比較して 200 ppm で肝腺腫の発生が増加したことが判明した。

5. 新規ヒ素代謝物 DMMTA^{V}の尿路上皮細胞における毒性についての検討

ラット膀胱上皮細胞である MYP3 とヒト膀胱上皮細胞である 1T1 を用いて、DMMTA^{V}、iAs^{V}、iAs^{III}、MMA^{V}、DMA^{V}、dimethylarsinous acid (DMA^{III}) の半数致死濃度 (LC_{50}) を比較検討した結果、DMMTA^{V}は無機ヒ素と同程度の毒性が認められた。また、DMMTA^{V}は DMA^{V}よりも強い細胞毒性を有することから、ヒ素の毒性および発がん性に関与する可能性が示唆された。

6. まとめ

DMA^{V}はラットにおいては膀胱発がん性と、肝発がんプロモーション作用を有することが、また遺伝子改変マウスにおける肺発がん性および皮膚発がんプロモーション作用が明らかにされた。これらの結果は、ヒ素のヒトへの発がん性の本態を十分に証明するものである。また、その発がん性および発がんプロモーション作用の機序に関しては、酸化的 DNA 傷害およびがん関連遺伝子の発現異常が関与することが明らかにされた。さらに、DMMTA^{V} は細胞毒性が高いことと、ヒ素に曝露されたヒトの尿中にも存在することから、ヒ素の発がん性に関与する可能性が考えられる。現在、DMMTA^{V} の産生経路、遺伝毒性の有無および膀胱粘膜におけるがん関連遺伝子に及ぼす影響などを検索中である。これらの研究は、ヒ素発がん性のさらなる解明につながることが期待される。

文献

1. Yamamoto, S., Endo, G. and Fukushima, S. (1995) Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res*, 55, 1271-6.
2. Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yamamoto, S., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S. (1998) Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett*, 134, 29-36.
3. Wanibuchi, H., Yoshida, K., Endo, G., Hori, T. and Fukushima, S. (1996) Promoting effects of dimethylarsinic acid on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 17, 2435-9.
4. Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Wei, M., Yunoki, T. and Fukushima, S. (2007) Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell proliferation via generation of oxidative stress by organic arsenicals contributes to their carcinogenicity in the rat liver and bladder. *Toxicol Appl Pharmacol*, 221, 295-305.
5. Wanibuchi, S., Nakae, D., Konishi, Y. and Fukushima, S. (1997) Promotion of rat hepatocarcinogenesis by dimethylarsinic acid: association with elevated ornithine decarboxylase activity and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in the liver. *Jpn J Cancer Res*, 88, 1149-54.
6. Wei, M., Wanibuchi, H., Yoshida, K., Endo, G., Nakae, D. and Fukushima, S. (2002) Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis*, 23, 1387-97.
7. Wei, M., Wanibuchi, H.and Fukushima, S. (1999) Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 20, 1873-6.
8. Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M. and Fukushima, S. (2000) Promotion of skin carcinogenesis by dimethylarsinic acid in keratin (K6)/ODC transgenic mice. *Jpn J Cancer Res*, 91, 579-81.
9. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Mitsuhashi, M., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S. (2003) Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 24, 335-42.
10. Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D., Arai, T., Minowa, O., Noda, T., Nishimura, S. and Fukushima, S. (2007) Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in Ogg1-deficient mice. *Cancer Sci*, 98, 803-14.
11. Nishikawa, T., Wanibuchi, H. and Fukushima, S. (2002) Promoting effects of monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide on induction of rat liver preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci: a possible reactive oxygen species mechanism. *Int J Cancer*, 100, 136-9.
12. Wanibuchi, H., Salim, E.I., Kinoshita, A., Shen, J., Wei, M., Morimura, K., Yoshida, K., Kuroda, K., Endo, G. and Fukushima, S. (2004) Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models. *Toxicol Appl Pharmacol*, 198, 366-76.
13. Shen, J., Wanibuchi, H., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S. (2003) Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats--association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation. *Carcinogenesis*, 24, 1827-35.
14. Shen, J., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Wei, M., Doi, K., Yoshida, K., Endo, G., Morimura, K. and Fukushima, S. (2003) Induction of glutathione S-transferase placental form positive foci in liver and epithelial hyperplasia in urinary bladder, but no tumor development in male Fischer 344 rats treated with monomethylarsonic acid for 104 weeks. *Toxicol Appl Pharmacol*, 193, 335-45.

特別講演

特別講演 1

海洋生物のヒ素−化学形解明を中心として−

塩見一雄

東京海洋大学　食品生産科学科

1.はじめに

ヒ素の毒性は化学形に大きく依存しているので、ヒ素の健康影響評価は化学形を踏まえて行う必要がある。ヒ素含量が ppm オーダーと非常に高い海洋生物はヒ素の主要な摂取源であるので、海洋生物に含まれるヒ素の化学形解明は古くから食品衛生上の重要課題であった。今やヒ素研究では化学形別分析を抜きにしては考えられないが、こうした分析技術の開発・向上は海洋生物に含まれるヒ素の化学形に関する知見が後押しをしてきたといえる。本講演では、ヒ素研究の中で重要な一角を占めてきた「海洋生物に含まれるヒ素の化学形解明」に焦点をあて、これまでの成果と今後の課題を述べてみたい。

2.存在状態

海洋生物に含まれるヒ素については、化学形解明に先立って存在状態（無機態か有機態か?水溶性か脂溶性か?）がまず検討された。無機態か有機態かという点では、ヒ酸含量が約 50％を占めるヒジキなど一部の例外はあるものの、ほとんどの海洋生物において大部分は有機態であることが示された。ヒ素化合物の毒性は一般に 3 価無機態（亜ヒ酸）＞5 価無機態（ヒ酸）＞有機態とされているので、食品衛生上好ましい結果である。一方、水溶性か脂溶性かという点では、大部分（90％以上）は水溶性であることが判明した。以上より、海洋生物のヒ素化合物は主として水溶性の有機態であると結論された。

3.水溶性ヒ素化合物

1977 年に、Edmonds らはオーストラリアイセエビの筋肉から水溶性ヒ素化合物を単離し、機器分析によりアルセノベタインであることを証明した。この研究が海洋生物に含まれるヒ素の化学形を解明した最初の例で、その後の精力的な研究により海洋生物には図 1 に示す各種水溶性有機ヒ素化合物の存在が明らかにされている。水溶性ヒ素化合物はすべてメチル化態で、主要なヒ素化合物は海洋動物ではアルセノベタイン、海藻ではアルセノシュガーであるが、例外もかなり多い。例えば、ヒジキや一部ゴカイ類では無機ヒ素が、多くのイソギンチャクではアルセノコリンやテトラメチルアルソニウムイオンが、一部カイメン類ではアルセノシュガーが主成分となっている。また、アルセノベタインは動物特有のヒ素化合物であると長年考えられてきたが、最近、数種海藻にも検出され、これまでの常識が覆りつつある。

海洋生物に各種水溶性ヒ素化合物が同定されてくると、それと歩調をあわせるように化学形別分析法の開発も進展した。ヒ素化合物の化学形別分析法としては、HPLC で分離し、ヒ素特異的検出器を用いて検出する方法が一般的である。HPLC ではイオン交換またはイオンペアーによる分離が採用されているが、分析対象ヒ素化合物が増えるとともに分離条件の改良も行われている。一方、ヒ素特異的検出器としては当初は高周波誘導結合アルゴンプラズマ発光分光分析装置（ICP）または原子吸光分析装置がよく用いられたが、1980 年代後半からは高感度分析ができる ICP-MS に取って代わられている。今のところ、LC/ICP-MS 法がヒ素分析の主流になっているが、感度面でやや難があるが同定が確実で未知ヒ素化合物にも対応できるという利点があるので、LC/MS 法（または LC/MS/MS 法）の使用も増えてくると思われる。

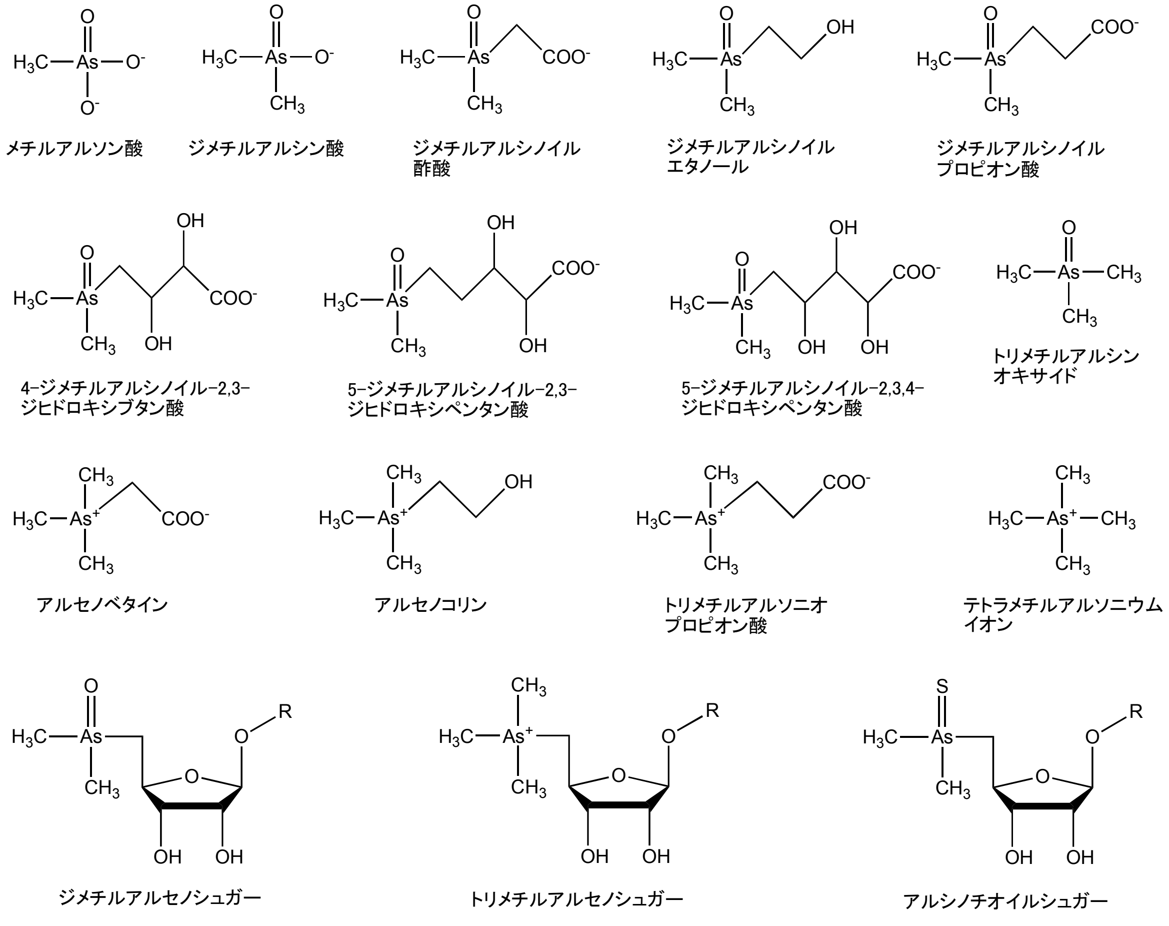


図 1　海洋生物に含まれる水溶性有機ヒ素化合物

4. 脂溶性有機ヒ素化合物

海洋生物に含まれるヒ素化合物は主として水溶性であるので、化学形に関するこれまで

の研究は水溶性ヒ素化合物に集中し、脂溶性ヒ素化合物に関する知見は非常に少ない。1988年にワカメから脂溶性ヒ素化合物が単離され、ホスファチジルアルセノシュガー（図 2）であることが明らかにされた。その後、オーストラリアイセエビの肝膵臓、サメ類の肝臓などに含まれる脂溶性ヒ素化合物は、分解によって生成する水溶性ヒ素化合物の分析結果に基づき、いずれもリン脂質（ホスファチジルアルセノシュガー、ホスファチジルアルセノコリン、ジメチルアルシン酸含有脂質など）であると推定されている。最近、魚の肝油から、必ずしも主要な脂溶性ヒ素化合物ではないが、6 種類のヒ素含有脂肪酸（図 2）が単離されている。

5. おわりに

海洋生物に含まれる水溶性ヒ素化合物については、最近でも新しい成分が発見されているとはいえほぼ全体像が明らかになり、分析法の開発、毒性・代謝の解明においても大きな成果が得られたといってよい。しかし、海水中の無機ヒ素から海洋動物にみられるアルセノベタインに至る経路については不明な点が多く、今後に残された大きな課題である。一方、脂溶性ヒ素化合物に関しては知見が非常に乏しい。まず、各種海洋生物に含まれる脂溶性ヒ素の化学形解明を行い、次いで分析法の開発、毒性・代謝の解明と順を追って成果が得られることを期待したい。

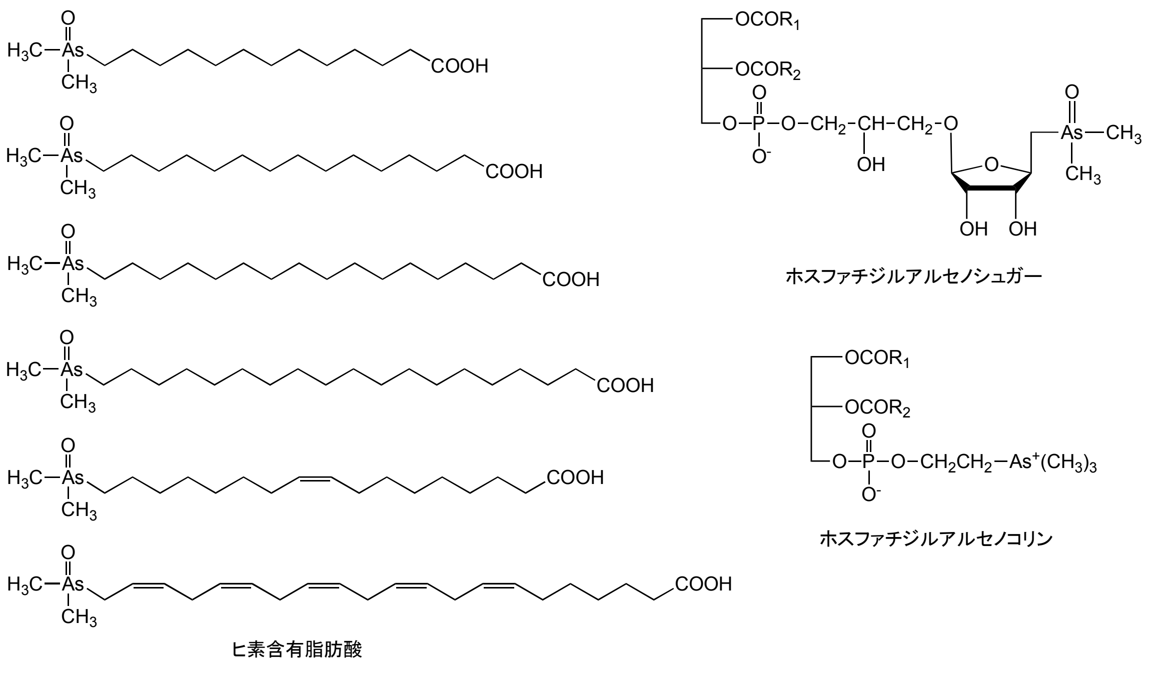


図 2 海洋生物に含まれる脂溶性ヒ素化合物

MEMO

特別講演 2

内閣府食品安全委員会平成 20 年度食品安全確保総合調査
「食品中に含まれるヒ素の食品影響評価に関する調査」
調査報告

山﨑静香
財団法人国際医学情報センター

１．はじめに

内閣府食品安全委員会ではリスク管理機関である厚生労働省や農林水産省から要請された食品健康影響評価とは別に自らの判断で評価を行っており（以下「自ら評価」とする）、食品中のヒ素（有機ヒ素、無機ヒ素）は平成 20 年度の「自ら評価」採択案件と決定した。

「自ら評価」の採択までに、食品安全委員会では、平成 16 年度に「食品に含まれる汚染物質等の健康影響評価に関する情報収集調査」、18 年度に「ひじきに含まれるヒ素の評価基礎資料調査」を行っており、多くのヒ素に関する情報が蓄積されていた。そして、平成 20 年度は、これらの調査を踏まえ、今後に行われるヒ素の食品健康影響評価に必要な情報の収集と整理、そして内容の分析を行うことを目的として「食品中に含まれるヒ素の食品影響評価に関する調査」を行った。本稿では平成 20 年度に行った調査の概要を報告する。

なお、調査のために設置された検討会は大阪市立大学大学院医学研究科 圓藤吟史教授を座長とする有識者より構成され、検討会での意見および調査結果を取りまとめた最終報告書は内閣府のホームページにて公開されている（著作権処理の問題等がある部分および抄録集を除く）。以降に示す調査報告概要は報告書のまとめに記したものであり、講演内容は平成 21 年 8 月 20 日に内閣府で行われた調査報告に準ずる。

「食品中に含まれるヒ素の食品影響評価に関する調査」検討会

圓藤 吟史（座長）	大阪市立大学大学院医学研究科教授
花岡 研一	水産大学校水産学研究科教授
安井 明美	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所食品分析研究領域長
山内 博	北里大学大学院医療系研究科教授
山中 健三	日本大学薬学部環境衛生学教授
鰐渕 英機	大阪市立大学大学院医学研究科教授

（五十音順　敬称略）

この他に、調査を受託した弊社のアドバイザーとして、ヒ素の分析等に詳しい独立行政法人国立環境研究所化学環境研究領域 柴田康行領域長よりご助言を賜った。

２．調査報告概要

ヒ素は自然界に広く分布し、水環境では主として無機ヒ素の形態で存在する。食品、特に海産物中には無機及び多種類の有機ヒ素化合物が含まれ、その化学形態及び含有量は生物種によって異なる。ヒジキなどの一部の褐藻類は例外的に無機ヒ素が多く含まれる。他の海産植物はアルセ

ノシュガー、海産動物は AsBe などの有機ヒ素化合物が主に含まれる。海産物を好む日本人は総ヒ素の摂取量が多いが、無機ヒ素の摂取量は多くないと推定される。摂取された無機ヒ素は生体内でメチル化され、主として DMA（V）として尿中排泄される。アルセノシュガーは DMA（V）に代謝されて尿中排泄されるが、AsBe はその大部分が代謝されずに摂取後速やかに尿中に排泄される。ヒ素の毒性に関しては、高濃度の無機ヒ素に汚染された飲料水摂取による慢性毒性、生殖・発生毒性及び発達障害、遺伝毒性、発がん性が疫学調査で示されているが、低濃度摂取でのリスクは明確ではなく、自然食品による影響はケルプサプリメントの事例報告などに限られている。一方、動物実験においては、無機ヒ素よりも代謝物である DMA（V）やその関連物質で、より強い遺伝毒性が示され、発がん性が認められている。

<u>生物及び食品中のヒ素の化学形態と含有量</u>

海洋生態系において、海水中の無機ヒ素は、植物プランクトン（Shibata et. al 1996）や海藻（Lunde 1973）、微生物（花岡 2010）に取り込まれて濃縮有機化される。そのため、様々な化学形態の有機ヒ素化合物が海産動植物中に存在する。ヒジキを含む褐藻類ヒバマタ目ホンダワラ科に限っては特異的に無機ヒ素の割合が 60%程度と高いが、海産植物である海藻類の主要な化学形態はアルセノシュガーであり（Francesconi and Edmonds 1997）、総ヒ素濃度も高い（Uneyama et al. 2007）。一方、海産動物の主要な化学形態は AsBe であり（Edmonds et al. 1977; Hanaoka et al. 1988; Francesconi and Edmonds 1994; Francesconi and Edmonds 1997; Shiomi 1994）、エビやホラガイ等からは AsBe の前駆体と考えられている AsC なども検出されている（Francesconi and Edmonds 1994）。また、ムラサキイガイやホタテなど植物プランクトンあるいは藻類を餌とする様々な二枚貝（Shibata and Morita 1992）、巻貝（Morita and Shibata 1987）、さらには植物プランクトンを食べる動物プランクトンにはアルセノシュガーが認められている（Shibata et al. 1996; Edmonds et al. 1997）。現在、海産動植物中の水溶性ヒ素化合物に関しては前述のように明らかになりつつあるが、脂溶性ヒ素化合物に関しては情報が限られている。また、海産動植物を食する場合、部位や調理方法によりヒ素の摂取量が異なることにも注意を要する。魚の目周辺や体表面部に無機ヒ素由来のヒ素が多く集まることや（Lunde 1977）、カツオの目の視神経などに高濃度のヒ素が認められている（黒岩ら 1999）。そして、鮮度の高い魚ほど AsBe の割合が高く、冷凍食品、保存食品の順に割合が低下することが報告されている（Velez et al. 1995; 1996）。ヒジキに関しては、十分な水戻しによりヒ素の摂取量は少なくなる（柴田と森田 2000; Hanaoka et al. 2001; 片山ら 2007）。

陸上生態系においては、植物は根から土壌中のヒ素を吸収し、動物は食物からヒ素を吸収すると考えられている。一般的に海洋生物が含有するヒ素濃度は数 ppm から百数十 ppm まで幅があるが、陸上植物に含まれるヒ素濃度には大きな差はなく（Lunde 1973）、野菜や果実類中に含まれるヒ素濃度は 10 ppb 程度であり、土壌中のヒ素濃度に影響を受けると考えられている（山内と山村 1980）。ヒ素汚染土壌で育ったキノコからは様々な化学形態のヒ素化合物が検出されており（Byrne et al.1995）、1,000 ppm に近い DMA（V）も報告されている（Larsen et al. 1998）。イネに対するロキサルソンなどのヒ素曝露に関する実験では、茎や葉でヒ素濃度が高くとも米粒中への移行は少ないとの報告がある（Wang et al. 2006）。また、ヒ素汚染水で育てて非汚染水で炊いた米は DMA を主に含み、ブタでの実験で、バイオアベイラビリティは 33.1±3.2 %と低く、

非汚染水で育てて汚染水で炊いた米は無機の As（Ⅴ）を含みバイオアベイラビリティは 89.4±9.4%と高くなり、米に含まれるヒ素のバイオアベイラビリティはヒ素の化学形態に依存し、調理する時に使用される水も高く影響を及ぼすと報告されている（Juhasz et al. 2006）。哺乳動物に関しては、牛肉 24 ppb、豚肉 18 ppb、鶏肉 34 ppb と報告されている（山内と山村 1980）。米国で家禽の添加物として使用されているロキサルソンは大部分が未変化体で排泄されると報告されているが（Morrison 1969）、微量でも血管新生を促すことが示され、がんの発現との関係が考えられるため問題視されている（Basu 2008）。

ヒ素の化学形態別分析における留意点

前述のように生物や食品に含まれるヒ素の化学形態と含有量の報告が多くなされているが、分析方法の相違や検出限界に留意する必要がある。ヒ素の化学形態別分析法としては従来、水素化物発生－液体窒素捕集－原子吸光光度法が用いられてきた（Yamato 1988; 山内 1995)。この方法は、無機ヒ素、モノメチルヒ素、ジメチルヒ素、トリメチルヒ素の分析には便利な方法であるが、As（Ⅲ）や As（Ⅴ）など 3 価と 5 価の分別や、TMAO、AsBe、AsC の分別はできない。近年、LC-ICP-MS による化学形態別分析が盛んに行われ、多くの生物に存在する化学形態や濃度が報告されている。しかし、生体中ヒ素を測定するにあたり、前処理法や分離条件を確立することは容易ではない。また、海藻や一部の海産生物に多く存在するアルセノシュガー（柴田と森田 2000）の大部分、或いは海産魚類の脂溶性ヒ素化合物（Taleshi et al. 2008）は市販の標準がなく、実際の環境試料から抽出、精製、同定作業を行って標準物質を持たないと確実な分析ができない状況にあり、化学形態の監視体制はまだ不十分な状況と言える。

日本人におけるヒ素の推定摂取量と食品群からの摂取割合

海産物を摂食する食習慣を持つ日本国民は総ヒ素摂取量が多く、1 人当たりの推定 1 日摂取量は、トータルダイエット調査（厚生労働省）によると平成 14～18 年度平均で 178 μg/人/日である。食品群からの摂取割合は、魚介類から 53.6 %、野菜・海藻から 35.4 %、米から 7.1 %で、90 %近くを魚介類と海藻等が占める。このトータルダイエット調査の結果を元に、厚生労働省によるヒジキの 1 日摂取量と FSA が調査した水戻し後の最大無機ヒ素濃度などの値を用いて無機ヒ素の摂取量を推定すると、合計は 62.8 μg/人/日で、WHO の基準 15 μg/kg 体重/週から体重 50 kg として算出した 107 μg/人/日以下となる。陰膳方式の調査でも無機ヒ素の割合は低い値となっている（Mohri et al. 1990; Yamauchi et al. 1992）。

ヒ素の生体内運命

無機ヒ素は、生体内に吸収された後にメチル化代謝され、主として DMA（V）として尿中に排泄される。ヒジキ加工食品 8 食分（825 μg As）摂取後の尿中ヒ素の形態別分析とその経時的変化を観察した結果、As（Ⅴ）、As（Ⅲ）、MMA（Ⅴ）、DMA（Ⅴ）はヒジキ摂取後それぞれ 4、6.5、13、17.5 時間でピーク濃度に達し、50 時間で全体の 28%（それぞれ 11.2、31.8、40.9、104.0 μg）が尿中排泄された（Nakajima et al. 2006）。ヒ素のメチル化機序は、3 価から 5 価へのヒ素の酸化に伴いメチル基が導入される酸化的メチル化反応や 3 価ヒ素－グルタチオン複合体の形成を介したメチル化反応が報告されている。いずれも S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）がメチル供与体となり、3 価ヒ素メチル転移酵素（AS3MT）をはじめとするメチル転移酵素による触媒

反応であると考えられている（Thomas et al. 2007）。その過程で生じる活性酸素による酸化ストレスの誘発（Hu et al. 2002)、DMA（Ⅲ）のさらなる還元代謝過程でのフリーラジカル生成（Yamanaka et al. 1990; Kitchin 2001）、ジメチルヒ素と生体内含硫化合物との反応によるジメチルチオアルシン酸生成の可能性（Yoshida et al. 2003; Raml et al. 2007; Naranmandura et al. 2007）などが指摘されており、無機ヒ素化合物の代謝過程の多様な中間代謝物の生成による細胞毒性や発がん性との関連が問題視されている。そして、AS3MT においては、動物での種差やヒトでの遺伝子多型の相違が報告されている（Lindberg et al. 2007; Hernández et al. 2008）。

一般に、AsBe はその大部分が代謝されず摂取後速やかに尿中排泄されるが、アルセノシュガーは一部の動物で DMA（V）、ジメチルアルセノエタノール（DMAE）などに代謝変換され、尿中排泄されることが知られている（Ma and Le 1998; Francesconi et al. 2002; Heinrich-Ramm et al. 2002）。日本人男性 210 人の HPLC-ICP-MS による尿中ヒ素の形態別分析では、総ヒ素濃度（中央値）141.3 μg As/L のうち、AsBe 61.3 μg As/L、DMA（V）42.6 μg As/L と高く、AsBe と DMA（V）は海産物を好む人の方がより高値であり、イタリアや米国の研究に比べても高値であることが示されている（Hata et al. 2007）。

ヒトや動物におけるヒ素の毒性

ヒ素の経口摂取による中毒事例に関しては、急性中毒では和歌山のカレー事件、亜急性中毒では森永ヒ素ミルク事件などの中毒事件が例として挙げられる。疫学調査は無機ヒ素に汚染された飲料水による報告が主であり、食品での慢性中毒の明確な事例はないと判断されるが、ケルプサプリメントに関しては問題提示されている。飲料水の無機ヒ素汚染が原因で起こるような慢性ヒ素中毒の最小影響量 700～1,400 μg/日が数年間継続した場合、最初の症状が腹部・躯幹部に色素沈着と色素脱失が雨滴状に認められ、ついで、手掌や足底部に角化症（5～6 年）が発症すると U.S.EPA はしている。Tseng の報告でも太陽を浴びない体の部分に色素沈着や角化が起こることが特徴的と述べている（Tseng 1977）。なお、1 日の曝露量が 3,000～5,000 μg/日と高い場合には、段階的な症状の出現ではなく、色素沈着や色素脱失と同時期に角化症が発症する。また、ヒ素化合物は胎盤を通過し、胎児へ移行することが報告されており（Lindgren et al. 1984; Concha et al. 1998）、自然由来の無機ヒ素による飲料水汚染で、自然流産、死産、早産のリスク（Ahmad et al. 2001; Hopenhayn-Rich et al. 2003; Milton et al. 2005; von Ehrenstein et al. 2006; Cherry et al. 2008）や出生時体重の低下（Hopenhayn-Rich et al. 2003; Yang et al. 2003; Huyck et al. 2007; Rahman et al. 2009）が報告されている。妊娠時から出生後の累積曝露の影響として乳児の生存率低下や幼児及び児童の知的機能への影響が報告されている（Wasserman et al. 2004; Wasserman et al. 2007; Wang et al. 2007; von-Ehrenstein et al. 2007）。遺伝毒性に関しては、DNA methylation による遺伝子発現調節（Marsit et al. 2006; Chanda et al. 2006）、酸化ストレスの誘発による遺伝子障害（Matsui et al. 1999; An et al. 2004）などの報告がなされている。発がん性に関しては、ヒ素汚染飲料水などによる高濃度曝露では一致した見解があるものの、用量依存性があり、低濃度曝露における発がんリスクとの相関は明らかになっていない（Baastrup et al. 2008）。

動物実験において無機ヒ素の遺伝毒性のデータは限られており、無機ヒ素に汚染された飲料水による疫学研究から無機ヒ素に発がん性があると考えられていたが、発がん性についてはいくつ

かの研究が報告されているのみで、IARC が「無機ヒ素の発がん性は実験動物で限られた証拠がある（IARC 1973）」と結論した時点から状況は変化してない（IARC 2004）。近年、無機ヒ素よりもその代謝物であるDMA（V）に変異原性（Yamanaka et al. 1989）、DNA鎖切断（Tezuka et al. 1993）、4倍体形成（Eguchi et al. 1997）などの遺伝毒性が示された。発がん性試験においても、イニシエーション処置による中期発がん性試験でプロモーターとして働くことが認められ（Yamanaka et al. 1996; Wanibuchi et al. 1996; Wanibuchi et al. 1997）、膀胱がんにおいては単独でも2年間の発がん性試験で発がん性を示した（Wei et al. 1999; Wei et al. 2002）。IARCは「有機ヒ素化合物 DMA（V）の発がん性は実験動物で十分な証拠がある（IARC 2004）」と結論しており、さらにMMA（V）及びTMAOについても経口投与による発がん促進作用が認められている（Nishikawa et al. 2002）。体内に取り込まれた有機ヒ素化合物が発がん性を示すことから、無機ヒ素化合物の中間代謝物が発がんを引き起こす可能性が示唆される。また、3 価メチルヒ素が遺伝子障害性を強く示すことが *in vitro* の実験で指摘されている（Walter et al. 2007）。

海産物由来のAsBe、AsC、アルセノシュガーについては、染色体異常誘発能が低いことが示されている（Oya-Ohta et al. 1996）。これらの遺伝毒性については、未解明の部分が多く研究課題と認識されている。ヒ素摂取量の90%近くを魚介類や海藻類が占める日本人にとって、食品中に含まれるヒ素のリスク評価を行うには海産物由来のヒ素やその代謝物の毒性に関して評価を行う必要がある。しかし、必ずしもアルセノシュガーの形態別分析が十分な状態ではなく、さらに、それらのヒ素の生体内運命や毒性評価は現在研究が行われているところである。また、脂溶性ヒ素化合物についても研究の端緒が開かれた段階で、今後の研究発展が期待される。これらの分野の更なる研究の充実と内外における科学的に信頼性が担保される情報の継続的な収集は必要とされる。

３．謝辞

本調査は、内閣府食品安全委員会 平成20年度食品安全確保総合調査にて行われたものである。検討会委員の方々には、調査の遂行において終始ご指導をいただいた。本調査の検討会座長であり、また日本ヒ素研究会の会長でもあられる大阪市立大学大学院医学研究科教授 圓藤吟史先生をはじめ、水産大学校水産学研究科教授 花岡研一先生、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所食品分析研究領域長 安井明美先生、北里大学大学院医療系研究科教授 山内博先生、日本大学薬学部環境衛生学教授 山中健三先生、そして、本会の大会長であられる大阪市立大学大学院医学研究科教授 鰐渕英機先生に心より深謝の意を表する。そして、独立行政法人国立環境研究所化学環境研究領域領域長 柴田康行先生、内閣府食品安全委員会の事務局の方々のご助言にも厚く御礼申し上げたい。また、本調査は、日本ヒ素研究会の会員の先生方をはじめ、多数のヒ素研究者の方のご研究に基づいている。独立行政法人国立医薬品食品衛生研究所安全情報部畝山智香子先生ほか、ご協力いただきました方々に深謝する。

参考文献

Ahmad SA, Sayed MH, Barua S, Khan MH, Faruquee MH, Jalil A, et al. Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. Environ Health Perspect. 2001 Jun;109(6):629-31.

An Y, Gao Z, Wang Z, Yang S, Liang J, Feng Y, et al. Immunohistochemical analysis of oxidative DNA damage in arsenic-related human skin samples from arsenic-contaminated area of China. Cancer Lett. 2004 Oct 8;214(1):11-8.

Basu P, Ghosh RN, Grove LE, Klei L, Barchowsky A. Angiogenic Potential of 3-Nitro-4-Hydroxy Benzene Arsonic Acid (Roxarsone). Environ Health Perspect 2008;116(4):520-3.

Baastrup R, Sorensen M, Balstrom T, Frederiksen K, Larsen CL, Tjonneland A, et al. Arsenic in drinking-water and risk for cancer in Denmark. Environ Health Perspect 2008;116(2):231-7.

Byrne AR, Slejkovec Z, Stijve T, Fay L, Gossler W, Gailer J, et al. Arsenobetaine and other arsenic species in mushrooms. Appl Organomet Chem. 1995;9(4):305-313.

Chanda S, Dasgupta UB, Guhamazumder D, Gupta M, Chaudhuri U, Lahiri S, et al. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. Toxicol Sci. 2006 Feb;89(2):431-7.

Cherry N, Shaikh K, McDonald C, Chowdhury Z. Stillbirth in rural Bangladesh: arsenic exposure and other etiological factors: a report from Gonoshasthaya Kendra. Bull World Health Organ. 2008;86(3):172-177.

Concha G, Vogler G, Lezcano D, Nermell B, Vahter M. Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. Toxicol Sci. 1998 Aug;44(2):185-90.

Edmonds JS, Francesconi KA, Cannon JR, Raston CL, Skelton BW, White AH. Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster *Panulirus longipes cygnus* George. Tetrahedron Lett. 1977;18(18):1543-1546.

Edmonds JS, Shibata Y, Francesconi KA, Rippingale RJ, Morita M. Arsenic Transformations in Short Marine Food Chains studied by HPLC-ICP MS. Appl Organometal Chem. 1997;11(6):281-287.

Eguchi N, Kuroda K, Endo G. Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. Arch Environ Contam Toxicol. 1997 Feb;32(2):141-5.

Francesconi KA, Tanggaar R, McKenzie CJ, Goessler W. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. Clin Chem. 2002 Jan;48(1):92-101.

Francesconi KA, Edmonds JS. Biotransformation of arsenic in the marine environment. In: Nriagu JO, editors. Arsenic in the Environment Part I: Cycling and Characterization. New York: John Wiley & Sons; 1994:221-261.

Francesconi KA, Edmonds JS. Arsenic and Marine Organisms. Adv Inorg Chem. 1997;44:147-189.

Hanaoka K, Yamamoto H, Kawashima K, Tagawa S, Kaise T. Ubiquity of arsenobetaine in marine animals and degradation of arsenobetaine by sedimentary microorganisms. Appl Organometal Chem. 1988;2(4):371-376.

Hanaoka K, Yosida K, Tamano M, Kuroiwa T, Kaise T, Maeda S. Arsenic in the prepared edible brown alga hijiki, *Hizikia fusiforme*. Appl Organomet Chem 2001;15:561-5.

Hata A, Endo Y, Nakajima Y, Ikebe M, Ogawa M, Fujitani N, et al. HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure. J Occup Health. 2007 May;49(3):217-23.

Heinrich-Ramm R, Mindt-Prufert S, Szadkowski D. Arsenic species excretion after controlled seafood consumption. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002 Oct 5;778(1-2):263-73.

Hernandez A, Xamena N, Surralles J, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D, et al. Role of the $Met_{287}Thr$ polymorphism in the *AS3MT* gene on the metabolic arsenic profile. Mutat Res. 2008;637(1-2):80-92.

Hopenhayn-Rich C, Ferreccio C, Browning SR, Huang B, Peralta C, Gibb H, et al. Arsenic exposure from drinking water and birth weight. Epidemiology. 2003 Sep;14(5):593-602.

Hu Y, Jin X, Snow ET. Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappaB DNA binding activity and related gene expression. Toxicol Lett. 2002 Jul 7;133(1):33-45.

Huyck KL, Kile ML, Mahiuddin G, Quamruzzaman Q, Rahman M, Breton CV, et al. Maternal arsenic exposure associated with low birth weight in Bangladesh. J Occup Environ Med. 2007;49(10):1097-1104.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Volume 84 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2004 [cited 2009 Mar 23].
Available from: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol84/index.php.

Juhasz AL, Smith E, Weber J, Rees M, Rofe A, Kuchel T, et al. *In Vivo* Assessment of Arsenic bioavailability in rice and Its significance for human health risk assessment. Environ Health Perspect 2006;114(12):1826-31.

Kitchin KT. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. Toxicol Appl Pharmacol. 2001 May 1;172(3):249-61.

Larsen EH, Hansen M, Gossler W. Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated and uncontaminated locations. Appl Organomet Chem. 1998;12(4):285-291.

Lindberg AL, Goessler W, Grander M, Nermell B, Vahter M. Evaluation of the three most commonly used analytical methods for determination of inorganic arsenic and its metabolites in urine. Toxicol Lett. 2007 Feb 5;168(3):310-8.

Lindgren A, Danielsson BR, Dencker L, Vahter M. Embryotoxicity of arsenite and arsenate: distribution in pregnant mice and monkeys and effects on embryonic cells *in vitro*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 1984 Apr;54(4):311-20.

Lunde G. Separation and analysis of organic-bound and inorganic arsenic in marine organisms. J Sci Food Agric 1973;24(9):1021-7.

Lunde G. Occurrence and transformation of arsenic in the marine environment. Environ Health Perspect. 1977;19:47-52.

Ma M, Le XC. Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. Clin Chem. 1998 Mar;44(3):539-50.

Marsit CJ, Karagas MR, Danaee H, Liu M, Andrew A, Schned A, et al. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. Carcinogenesis. 2006;27(1):112-6.

Matsui M, Nishigori C, Toyokuni S, Takada J, Akaboshi M, Ishikawa M, et al. The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen's disease. J Invest Dermatol. 1999 Jul;113(1):26-31.

Milton AH, Smith W, Rahman B, Hasan Z, Kulsum U, Dear K, et al. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in bangladesh. Epidemiology. 2005;16(1):82-6.

Mohri T, Hisanaga A, Ishinishi N. Arsenic intake and excretion by Japanese adults: a 7-day duplicate diet study. Food Chem Toxicol. 1990;28(7):521-9.

Morita M, Shibata Y. Speciation of arsenic compounds in marine life by high performance liquid chromatography combined with inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometry. Anal Sci. 1987;3:575-7.

Morrison JL. Distribution of arsenic from poultry litter in broiler chickens, soil, and crops. J Agr Food Chem 1969;17:1288-1290.

Nakajima Y, Endo Y, Inoue Y, Yamanaka K, Kato K, Wanibuchi H, et al. Ingestion of Hijiki seaweed and risk of arsenic poisoning. Appl Organomet Chem 2006;20:557-64.

Nishikawa T, Wanibuchi H, Ogawa M, Kinoshita A, Morimura K, Hiroi T, et al. Promoting effects of monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide on induction of rat liver preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci: a possible reactive oxygen species mechanism. Int J Cancer. 2002 Jul 10;100(2):136-9.

Naranmandura H, Suzuki N, Iwata K, Hirano S, Suzuki KT. Arsenic metabolism and thioarsenicals in hamsters and rats. Chem Res Toxicol. 2007 Apr;20(4):616-24.

Oya-Ohta Y, Kaise T, Ochi T. Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. Mutat Res. 1996

Oct 25;357(1-2):123-9.

Rahman A, Vahter M, Smith AH, Nermell B, Yunus M, El Arifeen S, et al. Arsenic exposure during pregnancy and size at birth: a prospective cohort study in Bangladesh. Am J Epidemiol. 2009;169(3):304-312.

Raml R, Rumpler A, Goessler W, Vahter M, Li L, Ochi T, et al. Thio-dimethylarsinate is a common metabolite in urine samples from arsenic-exposed women in Bangladesh. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Aug 1;222(3):374-80.

Shibata Y, Morita M. Characterization of organic arsenic compounds in bivalves. Appl Organomet Chem 1992;6:343-9.

Shibata Y, Sekiguchi M, Otsuki A, Morita M. Arsenic Compounds in Zoo- and Phyto-plankton of Marine Origin. Appl Organometal Chem. 1996;10(9):713-719.

Shiomi K. Arsenic in marine organisms: chemical forms and toxicological aspects. In: Nriagu JO, editors. Arsenic in the Environment part II: Human Health and Ecosystem Effects. New York: John Wiley & Sons; 1994:261-282.

Taleshi MS, Jensen KB, Raber G, Edmonds JS, Gunnlaugsdottir H, Francesconi KA. Arsenic-containing hydrocarbons: natural compounds in oil from the fish capelin, *Mallotus villosus*. Chem Commun (Camb). 2008(39):4706-7.

Tezuka M, Hanioka K, Yamanaka K, Okada S. Gene damage induced in human alveolar type II (L-132) cells by exposure to dimethylarsinic acid. Biochem Biophys Res Commun. 1993 Mar 31;191(3):1178-83.

Thomas DJ, Li J, Waters SB, Xing W, Adair BM, Drobna Z, et al. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. Exp Biol Med (Maywood). 2007 Jan;232(1):3-13.

Tseng WP. Effects and dose--response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. Environ Health Perspect. 1977 Aug;19:109-19.

Uneyama C, Toda M, Yamamoto M, Morikawa K. Arsenic in various foods: cumulative data. Food Addit Contam. 2007;24(5):447-534.

Velez D, Ybanez N, Montoro R. Percentages of Total Arsenic Represented by Arsenobetaine Levels of Manufactured Seafood Products. J Agr Food Chem 1995;43(5):1289-1294.

Velez D, Ybanez N, Montoro R. Monomethylarsonic and Dimethylarsinic Acid Contents in Seafood Products. J Agr Food Chem 1996;44(3):859-864.

von Ehrenstein OS, Guha Mazumder DN, Hira-Smith M, Ghosh N, Yuan Y, Windham G, et al. Pregnancy outcomes, infant mortality, and arsenic in drinking water in West Bengal, India. Am J Epidemiol. 2006;163(7):662-9.

von Ehrenstein OS, Poddar S, Yuan Y, Mazumder DG, Eskenazi B, Basu A, et al. Children's intellectual function in relation to arsenic exposure. Epidemiology. 2007;18(1):44-51.

Walter I, Schwerdtle T, Thuy C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A. Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribosyl)ation in cultured human cells. DNA Repair (Amst). 2007 Jan 4;6(1):61-70.

Wang FM, Chen ZL, Zhang L, Gao YL, Sun YX. Arsenic uptake and accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) at different growth stages following soil incorporation of roxarsone and arsanilic acid. Plant Soil. 2006;285:359-367.

Wang SX, Wang ZH, Cheng XT, Li J, Sang ZP, Zhang XD, et al. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. Environ Health Perspect. 2007;115(4):643-7.

Wanibuchi H, Hori T, Meenakshi V, Ichihara T, Yamamoto S, Yano Y, et al. Promotion of rat hepatocarcinogenesis by dimethylarsinic acid: association with elevated ornithine decarboxylase activity and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in the liver. Jpn J Cancer Res. 1997 Dec;88(12):1149-54.

Wanibuchi H, Yamamoto S, Chen H, Yoshida K, Endo G, Hori T, et al. Promoting effects of dimethylarsinic acid on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. Carcinogenesis. 1996 Nov;17(11):2435-9.

Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, Kline J, et al. Water arsenic exposure and

intellectual function in 6-year-old children in Araihazar, Bangladesh. Environ Health Perspect. 2007;115(2):285-9.

Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, van Geen A, et al. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihazar, Bangladesh. Environ Health Perspect. 2004;112(13):1329-33.

Wei M, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Yoshida K, Endo G, et al. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. Carcinogenesis. 2002 Aug;23(8):1387-97.

Wei M, Wanibuchi H, Yamamoto S, Li W, Fukushima S. Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. Carcinogenesis. 1999 Sep;20(9):1873-6.

Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Sawamura R, Hasegawa A, Okada S. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxyl radical. Biochem Biophys Res Commun. 1990 Apr 16;168(1):58-64.

Yamanaka K, Ohba H, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S. Mutagenicity of dimethylated metabolites of inorganic arsenics. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1989 Oct;37(10):2753-6.

Yamanaka K, Ohtsubo K, Hasegawa A, Hayashi H, Ohji H, Kanisawa M, et al. Exposure to dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline 1-oxide in the lungs of mice. Carcinogenesis. 1996 Apr;17(4):767-70.

Yamato N. Concentrations and chemical species of arsenic in human urine and hair. Bull Environ Contam Toxicol. 1988 May;40(5):633-40.

Yamauchi H, Takahashi K, Mashiko M, Saitoh J, Yamamura Y. Intake of different chemical species of dietary arsenic by the japanese, and their blood and urinary arsenic levels. Appl Organomet Chem 1992;6(4):383-8.

Yang CY, Chang CC, Tsai SS, Chuang HY, Ho CK, Wu TN. Arsenic in drinking water and adverse pregnancy outcome in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. Environ Res. 2003;91(1):29-34.

Yoshida K, Kuroda K, Zhou X, Inoue Y, Date Y, Wanibuchi H, et al. Urinary sulfur-containing metabolite produced by intestinal bacteria following oral administration of dimethylarsinic acid to rats. Chem Res Toxicol. 2003 Sep;16(9):1124-9.

片山眞之，片山洋子，山口容子，村上　香，平田静子．乾燥ヒジキ（Saegassum fusiforme (Harvey) Setchell）の調理前水浸漬処理について．第13回ヒ素シンポジウム講演要旨集 2007:32-33.

黒岩貴芳，高津章子，内海 昭．カツオの目組織を中心としたヒ素化学形態分析．第9回ヒ素シンポジウム講演要旨集 1999:82-3.

厚生労働省．トータルダイエット調査．In:農林水産省．食品安全に関するリスクプロファイルシート．作成日（更新日）：平成 21 年 3 月 6 日[Internet]. 2009 [cited 2009 Mar 23]. Available from: http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/chem_as.pdf.

柴田康行，森田昌敏．環境中ヒ素の化学形態（海洋環境を中心に）．Biomed Res Trace Elements 2000;11:1-24.

花岡研一． In: レアメタル便覧．東京：丸善; 2010:in press.

山内 博．無機ヒ素暴露の生物学的モニタリングに関する研究．日本衛生学雑誌．1995;49:973-83.

山内 博，山村行夫．食品中の3価ヒ素、5価ヒ素、メチルヒ素について．日本公衆衛生雑誌 1980;27(12):647-53.

MEMO

特別講演 3

和歌山カレー毒物事件における集団急性ヒ素中毒

山内　博
北里大学大学院医療系研究科環境医科学群、医療衛生学部公衆衛生学

背景

平成 10 年 7 月 25 日、和歌山市園部において 67 名が急性中毒になり、6－12 時間後に４人が死亡した。生存者は 63 名で男性 29 名、女性 34 名、１－12 歳は 20 名、13－67 歳が 43 名である。その後、中毒患者の妊婦から 4 名が出産された。この事件は最初シアン中毒と誤認され、筆者が 10 日目において急性ヒ素中毒であることを、患者の尿中ヒ素の化学形態と濃度から確定した。このことから患者は急性ヒ素中毒の治療がなされていない。急性ヒ素中毒の原因は意図的にカレー鍋に混入された工業用の三酸化ヒ素で、そのカレーを摂取後約 5－10 分で消化器症状が発現した。現在でも末梢神経炎の後遺症が治癒しない患者が数名存在する。

本件は、犯罪により発生した集団的な急性ヒ素中毒であり、最高裁判決が確定するまで多くの医学的な知見は公表を控えてきた経緯があるが、本年、刑が最終的に確定されたことから可能な範囲でヒ素研究に必要な情報を紹介する。

急性ヒ素中毒の発生機序と推定ヒ素摂取量

患者が摂取したカレーの鍋には約 200ｇの工業用の三酸化ヒ素が混入された。その後、混入された三酸化ヒ素は調理後の余熱が鍋に残存していたことから、その大部分は溶解したと推測された。発生機序の検証に *in vitro* での試験が実施され、その結果から約 85%は溶解しうることが推測された。カレーをティースプーンで数口食べた程度で急性ヒ素中毒の発症は、鍋に含有していたカレー中ヒ素濃度と化学形態から可能であると判断された。

患者における推定ヒ素摂取量は、尿中ヒ素濃度の値を基に算出した。63 名の平均値は 53 mg、100 mg 以上が 4 名、50—99 mg が 25 名で、このうち、最も三酸化ヒ素摂取量の多かった患者の値は 141mg で、逆に、最も摂取量の少なかった患者は 18mg であった。他方、12 歳以下の 20 名のヒ素摂取量は 48.5±23.0 mg、13 歳以上 43 名の値は 55.5±26.3 mg であり、小児と成人におけるヒ素摂取量に有意差は存在しなかった

急性ヒ素中毒患者の症状

急性ヒ素中毒の症状の出現は結晶と溶解された無機ヒ素で異なることが知られている。本症例は溶解した無機ヒ素を摂取したために、患者は約５－10 分で激しい嘔気･嘔吐、ついで、下痢や腹痛が続いて出現した。初期には血清リンと CPK 値が上昇した。白血球数は初期に増加し続いて血小板数と共に減少し３-６日に最低値となり、その後、回復傾向を示した。中・重症者では低血圧が数日続き、頻脈、虚脱、ショックもみられ、循環器障害が主な死因となった。心電図検査ではQ—Ｔ間隔延長が特徴的、Ｔ波の逆転も示した。中毒の発症後、１週間後ぐらいから一過性に AST と ALT が並行して上昇し、その後、減少傾向を示した。重症者では中枢神経障害として、頭痛、脱力感、痙攣、精神障害を認めた。中・重症者では２週間前後から、四肢末梢部に両側対称性末梢神経障害が出現し、感覚異常と疼痛を特徴とした。この時期、重症者に皮膚障害として、紅斑性発疹が腹部と脇の下、首筋に認めた（無痛）。爪に Mees 線（白線）が徐々に出現した。この他に、結膜炎、顔面浮腫、口内炎、落屑、脱毛などを認めることもあった。腹部Ｘ線単純撮影でＸ線非透可性物質として消化管内にヒ素の点状陰影の出現を認めた。

尿中ヒ素の化学形態と濃度、排泄パターン

三酸化ヒ素摂取後一日目の尿中 IMD（iAs+MMA+DMA）濃度は平均値で 9029μg As/g. creatine で、一般健常者の約 200-300 倍に相当し、iAs(無機ヒ素)の割合が高い特徴を示した。尿中ヒ素濃度は時間の経過にしたがい減少し、10 日目 1148、30 日目 160、そして、正常値 50 μg As/g. creatine に回復したのは摂取後 2－3 ヶ月目であった。三酸化ヒ素摂取後 3 日目以後では、三酸化ヒ素の最終代謝物である DMA（ジメチル化ヒ素）の割合が高くなる傾向を認めた。

尿中ヒ素排泄パターンについて年齢別に比較すると、1-12 歳群は 13 歳以上の群に比較して、三酸化ヒ素摂取早期（5 日以内）のヒ素排泄は格段に速やかであった。この現象は、小児と成人において推定の三酸化ヒ素量に大差がないことから、小児におけるヒ素の排泄が速やかであったことを明らかとし、その原因として肝臓や腎臓の機能が優れていたものと考えられた。関連して、患者の健康障害の度合いと回復傾向を見ると、小児は成人に比較して傷害は軽く、そして、回復は速やかであった。すなわち、急性ヒ素中毒においては、ヒ素摂取後、極めて早期のヒ素化合物の体外排泄は重要である。さらに、三酸化ヒ素のメチル化に関する *1 st methylation* と *2 nd methylation* について小児と成人を比較した結果、*2 nd-methylation* は 12 歳以下の群（平均値は 17.5）は 13 歳以上の群（平均値は 9.83）に比較して高い結果が得られ、この作用の差異が生体影響に寄与したことが推測された。

頭髪中ヒ素濃度

患者の頭髪は根元部位から 20mm 間隔で切断し、4 群を作成した。根元から 20mm 以内を A 群、20－40mm を B 群、40－60mm を C 群、そして 60－80mm を D 群とした。38 名の被験者の頭髪中ヒ素濃度の最高値は D 群から主に認められ、一部Ｃ群の位置からも認められた。一般健常者 100 名の平均頭髪中ヒ素濃度は 0.08±0.04 μg As/g である。38 名のうち 36 名から 0.1 μg As/g 以上の値が示され、最高値は 2.13 μg As/g、そして、最低値は 0.05 μg As/g であった。38 名の平均値は 0.63 μg As/g であった。頭髪中ヒ素濃度が 1 μg As/g 以上であった患者は 5 名、0.5－0.99 μg As/g が 14 名、0.1－0.49 μg As/g が 16 名であった。さらに、頭髪中ヒ素濃度と推定の三酸化ヒ素摂取量との間には統計学的に有意な相関関係が認められた（$r = 0.583, p < 0.001$）。推定の三酸化ヒ素摂取量の最高者は最も高い頭髪中ヒ素濃度を示し、逆に、最も少ない三酸化ヒ素摂取量の患者は最低の頭髪中ヒ素濃度の値を示した。

三酸化ヒ素摂取と酸化的 DAN 損傷

健常者 248 名の尿中 8-hydroxy-deoxyguanine (8-OHdG)濃度は平均値で 15.7±5.4 ng/mg creatine であった。52 名の三酸化ヒ素摂取後の尿中 8-OHdG 濃度について、12 歳未満と 13 歳以上の患者とを区別して経時的な変化を検討した結果、小児の値が成人より高くなる傾向が示された。尿中 8-OHdG 濃度の経時的な動態を見ると、検査期間中で最も高い値を示した時期は 10 や 30 日目の検体であった。患者の尿中 8-OHdG 濃度が健常者の値にまで回復するには約半年の時間を必要とした。他方、胎児期や 1 歳児に三酸化ヒ素に暴露された者の尿中 8-OHdG 濃度は、小児や成人とは異なる結果であることも明らかになり、特に、妊娠初期の胎児期暴露は酸化的 DNA 損傷を生じやすいことから注意が必要であることも明らかとなった。

まとめ

小児や成人での急性ヒ素中毒の症状は、三酸化ヒ素摂取量に差がないにもかかわらず、小児は軽症で成人に重症者が多数認められ、その原因はメチル化能の差異が示唆された。一方、胎児や幼児への三酸化ヒ素暴露による酸化的 DNA 損傷は強く影響する可能性が示唆された。

特別講演４

中国の慢性ヒ素中毒の疫学研究から解明されたこと

吉田貴彦[1)]、中木良彦[1)]、山内　博[2)]

[1)]旭川医科大学医学部健康科学、[2)]北里大学大学院医療系研究科環境医科学群

1. はじめに

世界各地で天然に砒素汚染された地下水を飲用して起こる慢性砒素中毒が起こっている。これらの中毒発生には共通点がある。農村部の住民は古来、河川など表層水あるいは広口井戸（深度の浅い開口井戸）水を飲用していた。これらは土壌濾過を受けにくく細菌汚染されやすいため下痢症など消化管感染症が多発していた。1970 年頃より各国政府や WHO など世界の保健機関･保健支援団体等は深井戸（深深度のポンプ式パイプ井戸）を奨励した結果、感染症罹患が減った一方、手掌・足底の角化症、躯幹部中心の色素異常（瀰漫性色素沈着を伴う色素脱失斑）など皮膚症状等の慢性砒素中毒を呈する住民が多く現れた。曝露期間が長く 30 年程を越える地域では Bowen 病、皮膚癌の発生も見られている。その後、中毒の規模調査が進むとともに、砒素中毒の予防と改善に向けた研究調査が行なわれてきた。そうした中で、中毒発生に至らない砒素濃度の決定と、中毒者の症状緩和に対する飲料水の改善（砒素曝露低減）の有効性を確認すること、中毒治療・発症予防を探るための症状発現の個人差の解明等が求められてきた。

演者の研究グループも、1996 年より中国内モンゴル自治区を中心に砒素汚染地域でのフィールド調査を行ってきた。今回、我々の中国における一連のフィールド調査を中心に疫学調査から解明された事柄をまとめてみたい。

２．慢性砒素中毒発症にかかわる因子

1)　砒素曝露量

砒素曝露と中毒との関係の解明は簡単ではない。地域によっては井戸毎に砒素濃度が大きく異なり、症状を呈した住民が症状の無い者が所有する井戸水を貰い飲用する、など曝露量は時とともに変遷するなど砒素曝露量の把握には工夫が必要である。

包頭市の農村部（調査当時の砒素曝露歴は長い者で 23 年間）でフィールド調査を行い、砒素曝露量を詳細に把握し皮膚症状との関連を検討した。それぞれの調査参加者の過去に利用した井戸と飲用期間を調査した。さらに地域に現存する全ての井戸水の砒素濃度を測定した。その結果、皮膚症状から見た砒素中毒症状の強さは直近 5 年間に飲用した平均砒素濃度が最も相関すること、また、飲料水基準である 0.01mg/L を下回る砒素濃度 0.005 から 0.01mg/L であっても飲用期間が長いと症状を呈することがわかった。

２）性差

包頭市農村部の調査では、男性において砒素曝露による皮膚症状の度合いが強く発現

することがわかった。同じ砒素曝露歴をもつ夫婦においても男性において症状が強かった。皮膚症状のうち、手掌・足底の角化症において特に性差が強かった。

３）年齢

包頭市農村部の調査には、132 人中 18 人の 20 歳以下の者があったが、若年者においては症状発現が成人と異なるため解析から除外した。成人よりも症状は軽度であったが、年齢が小さいために曝露年数が浅い上に例数が少ないことから今後の検討課題である。

４）砒素代謝能

包頭市の農村部での調査では、皮膚症状との関連において最も高いオッズ比を示したのは血中 MMA であり、DMA のそれは１を下回った。すなわち、MMA から DMA となる段階の良くない者に症状が強い事が推測された。

５）地域差ないし他の要因

我々の一連の中国における砒素汚染地下水を飲用して慢性砒素中毒のフィールド調査では、包頭市農村部の調査ほど詳細な曝露状況が把握できなかったが、比較的砒素曝露量が多くとも皮膚症状が軽い地域が多く見受けられた。こうした結果をもたらす要因は明確でないが、栄養状態などが影響するとの報告がある。

３．砒素曝露軽減による症状の改善

包頭市の農村部で砒素濃度の比較的低い飲料水（開始当時 0.038mg/L）の供給開始による砒素曝露の軽減が計られたのを機に半年、1 年、5 年後に経時的な調査を行った。半年後には生物学的モニタリングで確認される砒素曝露が低減し、角化症、色素異常の両方の皮膚症状が改善された例が多く見られたが、その後の改善の度合いは緩やかとなり、症状の改善には比較的時間を要することがわかった。酸化的 DNA 損傷の指標となる尿中 8-OHdG（8-hydroxy-deoxyguanosine）は、飲料水改善前に高値であったものが砒素曝露軽減によって低値となったことから、DNA 損傷自体は減った事が確認されたが皮膚癌などの発症リスクが低下するかどうかは今後の調査を待たねばならない。

Introduction of epidemiological research on the chronic arsenic poisoning in China

Takahiko Yoshida[1], Yoshihiko Nakagi[1] and Hiroshi Yamauchi[2]

[1]Asahikawa Medical Collage and [2]Kitasato University

Many people are suffering from chronic arsenic (As) poisoning by drinking contaminated well water. We had been investigating the As poisoning in China from 1996 and accumulated several knowledge. Skin lesions, main symptoms of As poisoning, related with individual factors such as the As conc. for the last 5 years, gender, age, methylating ability of arsenic and others.

MEMO

一般講演

１－１

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における水溶性ヒ素代謝物の分布

○宮下振一、岸田和久、貝瀬利一

東京薬科大学大学院生命科学研究科　環境動態化学研究室

1．はじめに

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* におけるヒ酸［As(V)］および亜ヒ酸［As(III)］への応答機構はこれまで盛んに研究されており、培地中の As(V)はナトリウム/リン酸共輸送体により細胞内に取り込まれ、還元型グルタチオンにより As(III)へと還元された後、As(III)ポンプにより細胞外へと排出されることが報告されている。また我々はこれまでの研究において、細胞内で生成した As(III)の一部がメチルアルソン酸［MMA(V)］、ジメチルアルシン酸［DMA(V)］、アルセノシュガー［oxo-arsenosugar-glycerol (oxo-Gly), oxo-arsenosugar-phosphate (oxo-PO_4)］へと代謝されることを明らかにした。しかしながらそれらのヒ素代謝物の細胞内分布に関する知見は得られておらず、その解明はヒ素代謝経路の全体像ならびに代謝の意義を理解する上で重要である。

そこで本研究では、細胞内小器官の分画法が確立されている細胞壁欠損株 *C. reinhardtii* cw-15 における水溶性ヒ素代謝物の細胞内分布について検討した。

2．方法

<u>培養細胞へのAs(V)曝露および細胞分画</u>

対数増殖期の細胞は0.01 mMのAs(V)を曝露し、24時間培養した後、遠心分離操作により回収した。回収した細胞はpH shockおよび遠心分離操作により、鞭毛、核、細胞膜および細胞質に分画した。また細胞分画精度の確認は蛍光顕微鏡を用いた核および葉緑体の観察により行った。

<u>無傷細胞および各画分の総ヒ素測定</u>

分画前の細胞および分画後の各画分は硝酸および過酸化水素により湿式灰化し、超純水で適宜希釈した後、誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）により総ヒ素測定を行った。

<u>無傷細胞および各画分における水溶性ヒ素代謝物の化学形態別分析</u>

分画前の細胞および分画後の各画分は凍結乾燥し、超純水を添加後、超音波ホモジナイザーを用いた超音波処理により水溶性ヒ素代謝物を抽出した。超音波処理後の懸濁液は遠心分離操作により上清を回収し、フィルター濾過した後、高速液体クロマトグラフィー/誘導結合プラズマ質量分析計（HPLC-ICP-MS）により化学形態別分析を行った。

3．結果

<u>細胞および各画分の総ヒ素測定</u>

細胞内に取り込まれたAs(V)は細胞膜および細胞質画分に最も多く分布しており（66%）、次いで核画分（2.7%）、鞭毛画分（0.011%）の順に多かった。また細胞内に含まれていたヒ素は細胞分画過程において一部損失が生じた。

<u>細胞および各画分における水溶性ヒ素代謝物の化学形態別分析</u>

分画前の細胞からはAs(V)の他に代謝物としてAs(III)、MMA(V)、DMA(V)、oxo-Gly、oxo-PO_4が検出された。一方、鞭毛画分からはAs(V)、oxo-Gly、oxo-PO_4が僅かに検出され、核画分からはAs(V)、As(III)、MMA(V)、DMA(V)、oxo-Gly、oxo-PO_4、未知ヒ素化合物が検出された（図1）。また細胞膜および細胞質画分からはMMA(V)および未知ヒ素化合物が検出された。

4．考察

核画分は As(V)以外にも代謝物として As(III)、MMA(V)、DMA(V)、oxo-Gly、oxo-PO_4 を含んでい

たことから、細胞内に取り込まれた As(V)は細胞質において種々のヒ素化合物へと代謝された後、核へと移行することが示唆された。一方、細胞膜および細胞質画分からは MMA(V)が検出されたことから、細胞質において生成された MMA(V)の一部は核へ移行し、残りは細胞質に留まることが示唆された。

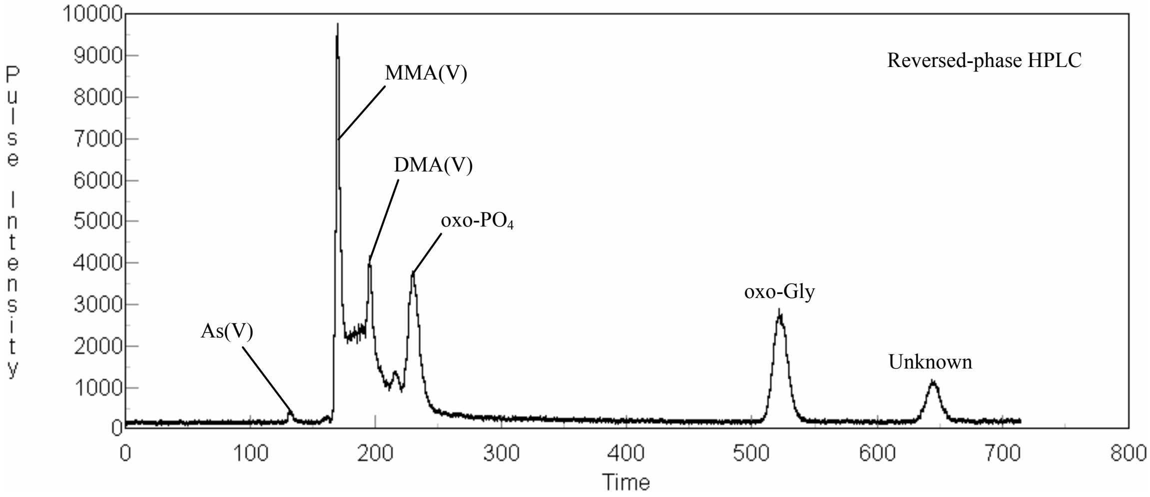


図1　核画分に含まれる水溶性ヒ素代謝物のクロマトグラム

Distribution of water-soluble arsenic metabolites in a unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Shinichi Miyashita, Kazuhisa Kishida and Toshikazu Kaise
Laboratory of Environmental Chemodynamics, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Researchers have extensively studied about the response mechanisms of a unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to toxic inorganic arsenic compounds such as arsenate [As(V)] and arsenite [As(III)] and revealed that *C. reinhardtii* incorporates As(V) into the cells via putative Na^+/Pi co-transporters and reduces it to As(III) by glutathione in order to facilitate the arsenic excretion into the external medium via As(III) efflux pumps. In addition, we have revealed that a portion of As(III) produced in the cells could be transformed into monomethylarsonic acid [MMA(V)], dimethylarsinic acid [DMA(V)], and arsenosugars [oxo-arsenosugar-glycerol (oxo-Gly) and oxo-arsenosugar-phosphate (oxo-PO_4)]. However, the distribution of these arsenic metabolites in the cells is unclear. In the present study, we examined the distribution of water-soluble arsenic metabolites in the cells, using a cell-wall-deficient mutant strain *C. reinhardtii* cw-15. As a result, a large amount of incorporated As(V) was distributed to the plasma membrane and cytoplasmic fraction (66%), followed by the nuclear and flagellar fraction (2.7% and 0.011%, respectively). The water extracts of the intact cells contained As(V) and many of its metabolites, including As(III), MMA(V), DMA(V), oxo-Gly, and oxo-PO_4. On the other hand, the water extracts of the flagellar fraction included small amounts of As(V), oxo-Gly, and oxo-PO_4, and those of the nuclear fraction contained As(V), As(III), MMA(V), DMA(V), oxo-Gly, oxo-PO_4, and an unknown arsenic metabolite as shown in Fig. 1. Moreover, the water extracts of the plasma membrane and cytoplasmic fraction included MMA(V) and an unknown arsenic metabolite. These results indicated that As(V) incorporated into the cells were transformed into various arsenic metabolites in the cytoplasm, and then they were transferred to the nuclei, although a portion of MMA(V) remained in the cytoplasm.

1－2

カツオ普通筋および血合筋における、脂溶性および水溶性ヒ素化合物に関する研究

○田中祥平[1)]、千田裕晃[1)]、貝瀬利一[2)]、臼井将勝[1)]、花岡研一[1)]

[1)]水産大学校、[2)]東京薬科大学

１．緒言

昨年、中国において日本製のだし入りしょうゆから、同国での基準値を上回るヒ素が検出され、問題化した。この高濃度のヒ素は、原料のかつお節に含まれていた有機ヒ素化合物に由来するとされている。すなわち、カツオ *Katsuwonus pelamis* も含め、海洋生物は陸上生物に比べてヒ素を高濃度に含有する。しかし、海洋生物に含有されるヒ素のすべてが毒性を有するわけではなく、ほとんどの場合、無毒もしくは毒性の低い有機態として存在する。さらに、これらは水溶性ヒ素化合物と脂溶性ヒ素化合物に分類される。このうち、脂溶性ヒ素化合物の研究については、水溶性ヒ素化合物のそれに比べてかなり遅れていたが、近年、新たな知見が得られるようになってきた。本研究では、かつお節の原料であるカツオの普通筋および血合筋に含まれる水溶性ヒ素化合物の形態とともに、脂溶性ヒ素化合物の形態についても検討した。

２．方法

試料として、市販カツオの血合筋と普通筋を用いた。さらに、普通筋については、腹側を前部、中部、後部の 3 部位、また、背中側を同様に 3 部位に分けた(以下、それぞれ、腹カミ、腹ナカ、腹シモ、背カミ、背ナカおよび背シモと略称する)。ヒ素化合物の抽出には、硝酸加熱溶解法を用いた。また、Folch の方法を用いて、水溶性および脂溶性ヒ素化合物の抽出も行った。極性脂質画分の分画にはシリカゲルを用いた。この極性脂質画分から Dowson の方法により、アルカリ安定画分およびアルカリ不安定画分を得た。総ヒ素の定量に当っては、試料をマイクロ波分解装置で分解した後、ICP-MS 分析を行った。ヒ素化合物の測定については、Nucleosil 100SA カラムおよび Nucleosil 100SB カラムを分離用カラムとして、HPLC-ICP-MS 分析を行った。

３．結果および考察

普通筋における総ヒ素濃度を比較すると、腹側の 3 部位における総ヒ素濃度と背側のそれらにおける総ヒ素濃度とは、ほぼ等しかった。また、腹側では、腹ナカの濃度、一方、背中側では、背カミの濃度が高かった。血合筋の総ヒ素濃度は、普通筋の各部位における総ヒ素濃度の 2~3 倍高かった。硝酸加熱溶解の後に行った HPLC-ICP-MS 分析の結果、普通筋のすべての部位および血合筋で、アルセノベタイン(AB)、トリメチルアルシンオキシド（TMAO）、ジメチルアルシン酸（DMAA）および 1 種類の未知ヒ素化

合物（UK）が検出された（図 1（a））。これらに対し、Folch の方法により血合筋から抽出された水溶性ヒ素化合物画分では、ヒ素のほとんどは、AB として検出された（図 1 (b)）。これらのことから、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS 分析により検出された TMAO、DMAA および UK は、脂溶性ヒ素化合物に由来すると考えた。

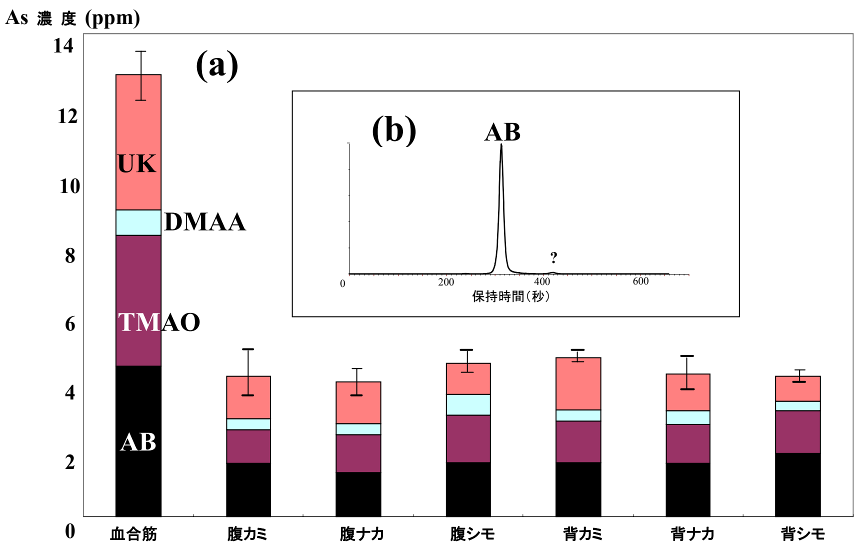


図1. カツオ血合筋および普通筋における各ヒ素化合物の部位別濃度（a）および血合筋から調製された水溶性画分におけるHPLC-ICP-MSクロマトグラム（b）.

Arsenic compounds accumulated in ordinary and dark muscles of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*

○ S. Tanaka[1)], H. Senda[1)], T. Kaise[2)], M. Usui[1)], K. Hanaoka[1)]

[1)] National Fisheries University, [2)] Tokyo University of Pharmacy and Life Science

We investigated the water-soluble and lipid-soluble arsenic compounds present in the ordinary and dark muscles of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. The muscles were subjected to two extraction procedures: (a) a nitric acid-based partial-digestion method and (b) the method of Folch et al**.** (chloroform-methanol (2:1)). The extracts were analyzed by HPLC-ICP-MS. Besides Arsenobetaine (AB), the major water-soluble arsenic compound occurring in marine animals, trimethylarsine oxide (TMAO), dimethylarsinic acid (DMAA) and an unknown compound (UK) were detected in the extract-(a) without exception (Fig. 1(a)). On the other hand, AB was the almost sole arsenic compound in the water-soluble fraction fractionated from extract-(b) (Fig. 1(b)). From these results, we concluded that the TMAO, DMAA and UK detected in the extract-(a) were derived from the lipid-soluble arsenic compounds: a considerable amount of arsenic is accumulated as trimethylated or dimetylated lipid-soluble compounds in the muscles of skipjack tuna.

1－3

急性アルシン中毒患者における血清中ヒ素化合物濃度について

○圓藤陽子[1)]、吉村幸浩[2)]、下田康代[3)]、鈴木芳宏[1)]、山中健三[3)]、圓藤吟史[4)]

[1)] 労働者健康福祉機構東京労災病院産業中毒研究センター、[2)] 横浜市立市民病院感染症科、
[3)]日本大学薬学部衛生薬学研究部門環境衛生学、[4)]大阪市立大学大学院医学研究科産業医学分野

1. はじめに

最近、夜間救急外来を受診した原因不明の溶血性貧血患者の血清中及び尿中ヒ素化合物の形態別分析を実施した結果、高濃度のヒ素化合物が検出され、アルシン急性中毒であると確定診断されたので報告する。

2. 方法

外来受診時及び入院中における血清試料及び退院時とその後における尿試料を用いて、HPLC-ICP-MSにより形態別ヒ素分析を実施した。血清試料は10倍希釈した後に、マイクロコンを用いて蛋白除去を行い、その濾液を分析に供した。その際、ヒ素化合物の回収率を添加法により算出した。尿試料は超純水により5倍希釈し、0.45 µmのメンブレンフィルターで濾過した後に分析に供した。ヒ素化合物の定量分析にはAgilent 1200 HPLC-Agilent 7500cx ICP-MS（Agilent, USA）を用いた。分析カラムは陰イオン交換カラム(Dionex IonPac AS22)及び陽イオン交換カラム(Shodex RSpak NN-614)の2種を用い、それらの分析条件は我々の以前の報告と同条件で行なった（Suzuki Y et al, 2009）。分析法の妥当性はヒト尿標準試料（NIES CRM No.18, 国立環境研究所）を用いて総ヒ素、ジメチルアルシン酸（DMA）、アルセノベタイン(AsBe)を分析し、保証値内であることを確認した。そのほかICP-MSで総ヒ素量を測定した。

3. 結果

血清中には、AsBe, AsIII, AsV, モノメチルアルソン酸（MMA）, DMAの5種のヒ素化合物が検出された（図１）。血清に添加した5種のヒ素化合物の回収率はほぼ100％であった（表1）。AsBe濃度は、観察期間中ほぼ同じ濃度であったが、それ以外のヒ素化合物濃度は変化が見られた。曝露後34時間である受診時においては、AsIIIが最も高かったが、5日後の退院前日である曝露112時間後では、DMAが最も高くなっていた。その推移は、図2に明らかなように、AsIIIとAsVは指数的に減衰したが、MMAは64時間後まで減衰せず、DMAは時間とともに上昇していた。

退院時及びその後におけるAsBe以外の尿中濃度の推移は、図3に示すように全て指数関数的に減少した。

表１　マイクロコン処理における回収率

Sample	AsBe	DMA	AsIII	MMA	AsV
血清 (µg/l)	0.5	ND	ND	ND	ND
添加血清 (10 µg/l)	12.6	10.1	9.6	11.7	10.6
標準液 (10 µg/l)	11.5	9.8	9.7	11.3	10
回収率 (%)	105	103	99	104	106

4. 考察

今回定量された血清中のヒ素化合物濃度は、蛋白除去をした血清中に存在している濃度である。非曝露者においては、AsBeのみが検出された。血中のAsBeは、蛋白と結合していないと報告されている。通常、血中のヒ素化合物は速やかに消失するので、曝露指標としては用いることができないと言われている。しかしながら、AsIII, AsV及びMMAの推定半減期は30.1, 43.0及び96.3時間と算出され、DMAは上昇していた。本患者には、腎障害のみならず、肝機能異常も見られたことから、入院当初においてはメチル化の抑制が示唆された。通常の日本人において高濃度に見られるAsBeが本患者尿には微量しか検出されなかったのは、入院中は点滴栄養のみで経口摂取を行っていなかったことによる。また、入院中の総排泄尿量は12.6 Lであった。仮に退院時の尿中濃度で推定すると、総排泄ヒ素量は約20 mg以上となった。以上の結果はアルシンがヒト体内でAsIIIを経てDMAに変換されることを初めて示唆するものである。

参考文献　Suzuki Y, Shimoda Y, Endo Y, Hata A, Yamanaka K, Endo G, J. Occup. Health 51: 380-385 (2009).

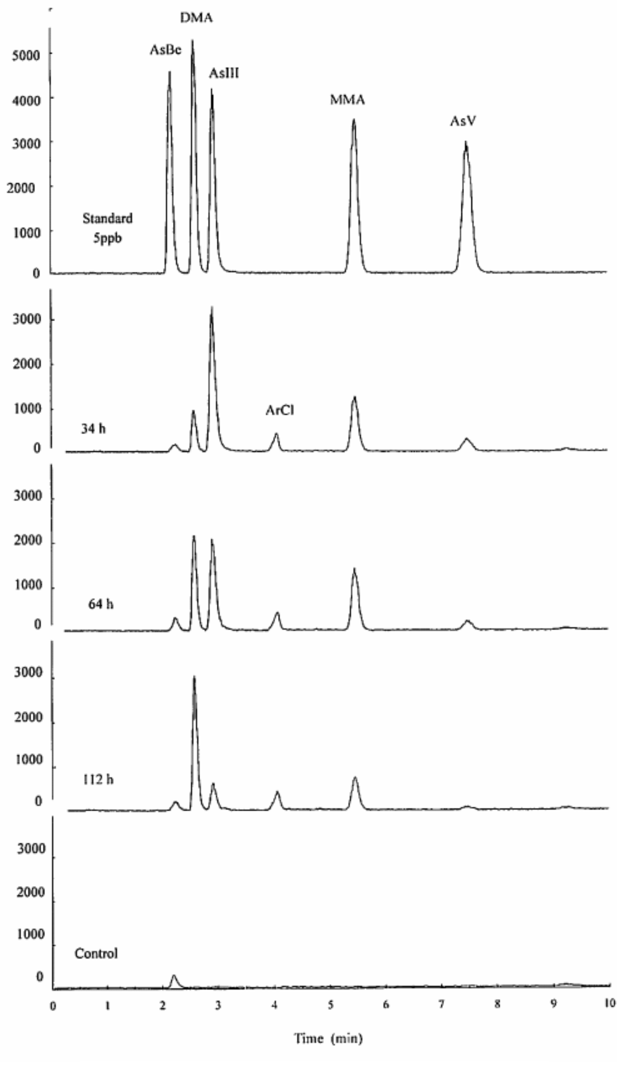


Fig. 1 HPLC-ICP-MS chromatograms of As in serum samples

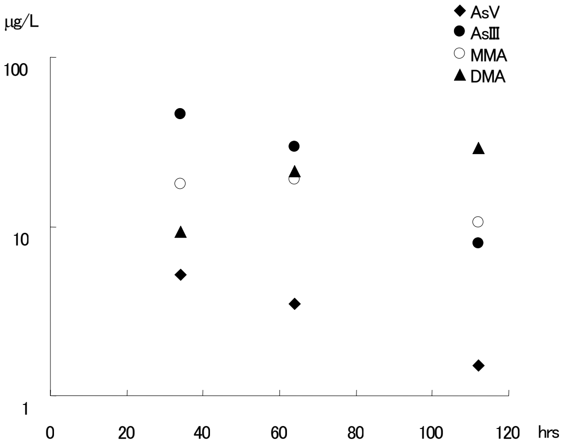


Fig 2 Change of As concentration in serum during the admission

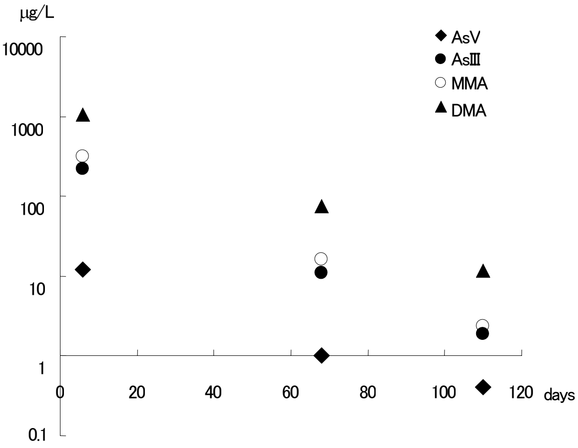


Fig 3 Change of As concentration in urine after the discharge

Speciation analysis of arsenic compounds in a serum and urine by HPLC-ICP-MS in a case of acute arsine poisoning

Yoko Endo[1], Yokihiro Yoshimura[2], Yasuyo Shimoda[3], Yoshihiro Suzuki[1], Kenzo Yamanaka[3], Ginji Endo[4]
[1] Research Center for Occupational Poisoning, Tokyo Rosai Hospital, Japan Labour Health and Welfare Organization; [2]Department of infectious disease, Yokohama Municipal Citizen's Hospital; [3]Department of Environmental Toxicology and Carcinogenesis, Nihon University College of Pharmacy; [4]Department of Preventive Medicine and Environmental Health, Graduate School of Medicine, Osaka City University.

Speciation analysis using HPLC-ICP-MS was performed about As compounds in serum and urine of an acute arsine-intoxicated patient. The arsenic compounds, AsIII, AsV, MMA, DMA, and AsBe, were detected in serum and urine of the patient. Except AsBe, the other As compounds were extremely higher than those of non-exposed people. Biological half life (BHL) of AsIII, AsV and MMA were estimated to be 30.1, 43.0 and 96.3 hrs, respectively. However, BHL of DMA could not be calculated because of its further increase in serum in 5 days admission. It was suggested that over 20 mg of As during the admission were excreted into urines. This result indicated that arsine was metabolized to DMA via the production of AsIII in the human body.

1－4

HPLC-ICP-MS および同位体希釈 LC-MS による ヒ素スペシエーションと認証標準物質開発

○黒岩貴芳、稲垣和三、成川知弘、千葉光一、

（独）産業技術総合研究所　計測標準研究部門／計量標準総合センター (NMIJ)

1．はじめに

ヒ素はその化学形態によって毒性が大きく異なることは良く知られており、環境・食品分析や生体分析において、全量分析のみならず化学形態に関する情報を得ることが非常に重要である。一方で、今のところ日本の法令等では、「ヒ素およびその化合物」として規制されており、形態の区別はなされていない。最近では化学形態や毒性に関するある程度の知見が得られてきたことや、高感度な分析機器の普及により、環境や食品分野において、化学形態に関する議論が広く行われれるようになってきた。国内外でヒ素の化学形態に関しての規制の議論も行われるようになってきており、今後ますます活発化してくると予想される。しかし、これらの議論の中で、あまりにも多くの化学形態が種々の試料中に存在しており、それらの知見がまだ十分でないことが指摘されてもいる。また、基準となる標準的な化学形態分析手法がまだ確立されているとは言えない、分析のための化合物標品や分析手法のバリデーションのための化学形態を認証した認証標準物質が十分でないことが大きな課題として指摘されている。我々は国家計量機関として、高感度かつ高精度な化学形態分析手法の開発と、それらの技術を応用した化合物標準物質や組成型認証標準物質を開発している。ここでは、様々なヒ素の化学形態を分析するための新たな手法について検討した結果と新たに開発した認証標準物質に関して報告する。

2．方法

2-1．新規標準物質開発

化学形態分析における妥当性確認用の組成型認証標準物質開発は、候補標準物質試料として調製したメカジキ魚肉粉末について、以下に示す分析を行い、認証値を決定した。全ヒ素（及び微量元素）分析については、生物試料の分解に硝酸－過酸化水素を用い、マイクロ波加熱分解装置（Anton Paar、Multiwave 3000）を使用して行った。測定はICP-MS（Agilent 7500）を中心として、高分解能ICP-MS、ICP-AES、黒鉛炉原子吸光法（GFAAS）などで分析した。アルセノベタイン濃度認証のための化学形態分析については、水のみでの超音波抽出を行い、遠心分離、ろ過をした後、分離カラムに資生堂CAPCELL PAK C18 MG S3を用いたHPLC-ICP-MSにて測定を行った。また、アルセノベタインの3つのメチル基の炭素を^{13}Cに置換した^{13}Cラベル化アルセノベタインを合成し、化合物としての同位体希釈-LC-ESI-MS測定を行った。分離カラムには資生堂CAPCELL PAK C18 MG S3およびShodex RSpak NN-414を用いた。

さらに、化学形態分析における標準液として利用可能な、ヒ酸水溶液およびジメチルアルシン酸水溶液認証標準物質の開発も行った。ヒ酸水溶液は分解することなく、ICP-MS、ICP-AES 、GFAAS、HPLC-ICP-MSで分析し、認証値を決定した。ジメチルアルシン酸水溶液は、王水を用いたマイクロ波加熱分解によって無機ヒ素とした後、先に開発したヒ酸水溶液を標準液として、ICP-MS、高分解能ICP-MS、およびHPLC-ICP-MSを用いて測定した。また, 分解なしでICP-MSによる測定も行い、認証値を決定した。

2-2．脂溶性ヒ素化合物の分析

今後の新たな分析手法や標準物質の開発に向けて、カツオの眼を試料として用い、脂溶性ヒ素化合物の分析を検討した。眼をいくつかの組織に解剖し、クロロホルム/メタノール/水を用いた超音

波抽出＋振とう抽出によりヒ素化合物を抽出した。水溶性ヒ素化合物の分析には HPLC-ICP-MS を用いた。脂溶性ヒ素化合物については、リン脂質様のヒ素化合物を分析するために、当研究室にて開発した全量消費型微少試料導入システムを用いたキャピラリーシリカカラム（Inertsil SIL 100A; 0.3×150 mm, 3 µm）を用いたキャピラリーLC-ICP-MS 分析の条件検討を行った。

3．結果

認証標準物質の認証値は各分析手法から得られた分析値を各々の合成標準不確かさの逆数で重み付け平均して求めた。メカジキ魚肉粉末は NMIJ CRM 7403-a として、ヒ素を含め微量元素 14 元素、アルセノベタイン、メチル水銀の濃度の認証値を決定し、すでに頒布を開始している。またヒ酸水溶液は NMIJ CRM 7912-a、ジメチルアルシン酸水溶液は NMIJ CRM 7912-a として、すでに頒布を開始している。

カツオの眼組織では、これまでの我々の研究で蓄積に関して、ヒ素と鉄、亜鉛に相関がみられ、網膜や視神経には脂溶性のヒ素化合物の割合が多く、リン脂質様な化合物として存在する可能性があることを報告した。これまで、脂溶性ヒ素化合物の分析は標品がないこと、有機溶媒を溶離液組成に用いた分離分析がもっとも適当であるが、多量の有機溶媒はICP-MSの装置への影響により、適用が困難であり、なかなか分析が進んでいなかった。当研究室にて開発した全量消費型微少試料導入システムを用いた場合、溶離液の流速が3μL/minと極少量のため、有機溶媒100％の溶離液組成でも、長時間安定に測定を実施することができる。リン脂質様の脂溶性ヒ素化合物を分析するために、まずは市販のリン脂質をICP-MSでリンをモニターすることで分離分析する条件を検討したところ、いくつかのリン脂質を高感度に分離分析することが可能となった。

Determination of arsenic species and development of certified reference materials by HPLC-ICP-MS and species-specific isotope dilution LC-MS

Takayoshi Kuroiwa, Kazumi Inagaki, Tomohiro Narukawa and Koichi Chiba
National Metrology Institute of Japan / National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Arsenic speciation is very important and the certified reference materials (CRMs) are necessary for use in validating analytical methods. We are developing arsenic species standard solution CRMs, matrix-type CRMs and related accurate analytical techniques. In this study, we investigated the arsenic speciation analysis by HPLC-ICP-MS and species-specific isotope dilution LC-MS and developed new CRMs.
We applied the species-specific isotope dilution LC-MS using ^{13}C labeled arsenobetaine and HPLC-ICP-MS using SI traceable arsenobetaine solution, NMIJ CRM 7901-a as calibration standard. And, HPLC-ICP-MS and species-specific isotope dilution LC-MS techniques with several column conditions were applied for certification of arsenic species. As(V) and DMAA standard solution CRMs and Sword fish CRM for arsenic speciation analysis are now in available.
We applied the total quantity consumption introduction system of ICP-MS which was developed in our laboratory to measurement for phospholipid. This system made it possible to measure some phospolipids by measuring phosphorus as an analyte of ICP-MS. We apply this method thst we established to the analysis of the fat-solble arsenic compounds such as phospholipid type in ocular tissues of marine fish.

１－５

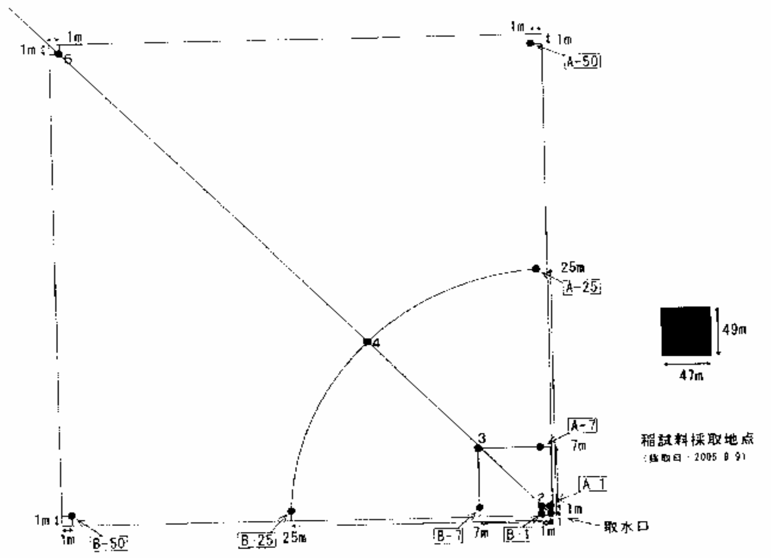
ＤＰＡＡ汚染地下水を使用した水田のＤＰＡＡ汚染濃度分布と非汚染米の収穫例

大阪市立大学大学院理学研究科　檜山知代
元東京薬科大学大学院生命科学研究科　野口綾乃
東京薬科大学大学院環境動態化学研究室　貝瀬利一
地球汚染一地質汚染基礎科学研究センター　楡井　久

茨城県神栖市（旧神栖町）の A 地区で有機砒素（DPAA）の汚染地下水の飲用で健康被害が発生した。この地区から西方約 1km にある集合住宅（B 地区）でも汚染地下水の飲用で健康被害が発生した。B 地区の近効の農業用地下水からも DPAA は検出され、収穫米からも DPAA が検出された。

その水田の DPAA 農耕土の汚染分布を調査した（図—１、表—１）
また、地質汚染の単元調査法により、非汚染帯水層と汚染帯水層とを区別し、非汚染地下水の農業用地下水供給に成功した。

その結果、DPAA 非汚染米収穫に成功した（表—２）



図—１　DPAA 汚染土水田と試料採取地点
表—１　水田土から検出された有機砒素濃度

sample	PAA	PMAA	PDMAO [μgAs/kg]	DPAA	DPMAO	PhAs-Total [μgAs/kg]
soil-no.1	TR	167.4	81.7	28.9	62.1	365.2
soil-no.2	TR	242.1	91.8	49.3	79.8	463.2
soil-no.3	TR	232.0	134.5	50.3	62.4	479.2
soil-no.4	TR	215.1	74.6	5.6	10.0	305.3
soil-no.5	TR	68.8	107.9	TR	12.8	189.6
soil-A-7	TR	277.0	125.8	42.2	78.8	523.8
soil-A-25	TR	230.4	105.3	21.9	46.5	404.2
soil-A-50	TR	80.3	82.7	18.6	17.8	199.5
soil-B-25	TR	257.3	140.2	41.5	52.8	524.8
soil-B-50	TR	151.6	118.9	23.9	33.6	328.0

TR:定量限界以下

表―２　２００７年収穫米から検出された有機砒素濃度

sample	PAA	PMAA	PDMAO [μgAs/kg]	DPAA	DPMAO	PhAs-Total [μgAs/kg]
rice-X-10	−	158.3	−	−	−	158.3
07.rice-X-9	−	185.0	−	−	−	185.0
07.rice-X-7	−	175.7	−	−	−	175.7
07.rice-X-genma	−	243.1	−	−	−	243.1
07.rice-X-nuka	−	1084.3	−	−	−	1084.3
07.rice-Y-10	−	507.3	−	−	−	507.3
07.rice-Y-9	−	222.8	−	−	−	222.8
07.rice-Y-7	−	236.9	−	−	−	236.9
07.rice-Y-genma	−	295.1	−	−	−	295.1
07.rice-Y-nuka	−	685.5	−	−	−	685.5

— :not detected

X―１０　：　10 分突き

X―　９：　９分突き

×―　７：　７分突き

Genmai:　　玄米

Nuka　　：　1

１－６

神栖町（現在紳栖市）Ａ井戸のＤＰＡＡ汚染揚水試験と地下水汚染機構

檜山知代（大阪市立大学大学院理学研究科後期博士課程）、楡井　久（ＮＰＯ）日本地質汚染審査機構・国際地球汚染―地質汚染基礎科学研究センター）、大脇正人・武島俊達（茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団）

ｉ　Ａ井戸の揚汚水試験を行なうことになった経緯

筆者等は、以下の点から，有機砒素汚染地下水で健康被害が発生した茨城県神栖町大字木崎（Ａ地区）にある集合住宅Ａ井戸の地下水汚染の汚染源は，東側の砂利採取跡地の人工地層内にあることの指摘と，同井戸の有機砒素による地下水汚染機構を次のように述べている（茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団，2003；楡井，2004）．

① Ａ地区・Ｂ地区を含めた地域の広域的地下水流動系に関わる自然地層の物性的同一地層単元として、下位・中位・上位の層準に，それぞれ主帯水層が存在する。民家井の地下水位測定結果（茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団，2003a；茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団，2003b）では，流向に多少異なる点も見られるが，東から西への流動方向は基本的に変わらない．

② 補足データとして，地下水汚染発覚井戸の孔内の地下水流向を測定した結果，東から西への流向が主体であることを明らかにした．

③ Ａ地区の汚染発覚井戸の東側では,1970年代後半から1980年代前半にかけて大規模な砂利採取が行なわれている．その後，砂利選別後の砂や他地域からの砂で水域を埋め立てられて，水田となるが，平成の初期に一部である 600 ｍ^{2}ほどが釣り堀用ヘラ鮒の養魚池（フィシュ・ポンド）として使用される．そして、そこは平成５年(1993年)頃に残土石・廃棄物で埋め戻され，さらに黒色土で盛土され水田となる．作付けと同時に稲が枯れる．

これらの地点などから，DPAAが，それを含む人工的時間的同一地層単元（楡井，2004）から地下水に溶出し，人工地層の物性的同一地層単元や自然地層の物性的同一地層単元を東から西へと形成されている地下水流動系に乗って垂直そして水平方向へ移動し，深部にある下位層準の帯水層を汚染するに至った．そして，Ａ地区汚染発覚井戸の直下に汚染水塊（地下水汚染プリューム）として到達していた。そして，汚染発覚井戸からの地下水揚水で地下水位が低下するにつれて，井戸底直下や周辺に存在していた地下水汚染プリュームを揚水し，有機砒素地下水汚染濃度が揚水とともに上昇していったと結論づけた．したがって，この仮説の検証が必要である．

ⅱ　揚汚水試験による有機砒素汚染地下水濃度上昇の検証

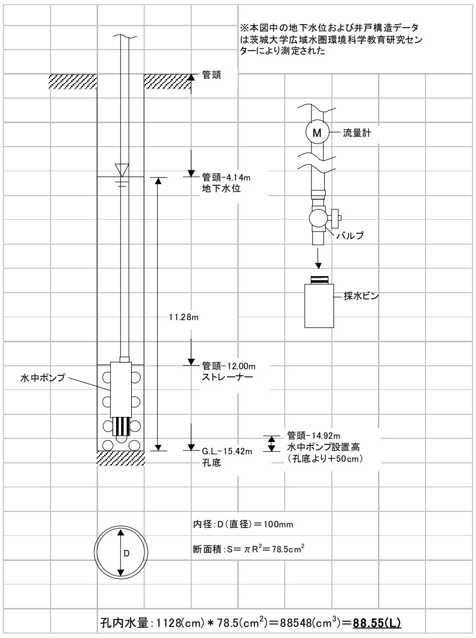
Ａ井戸所有者の許可を得て、Ａ井戸の地下水揚水で有機砒素濃度が上昇するといった仮設を検証する目的から，次の連続揚汚水試験と有機砒素（DPAA・MPAA）地下水汚染に関わる時系列的濃度変化の調査が行なわれた．DPAA・MPAAの分析に関しては東京薬科大学貝瀬研究室の協力による。

a．揚汚水試験と分析用地下水の採水

揚汚水試験と分析用地下水の採水は以下の手順で実施した（茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター神栖町有機砒素地質汚染調査団，2004MS）【実施目的】地下水の揚水に伴う地下水中の有機砒素濃度の変化を調べる．【実施日時】2004年3月16日（火）9：00～14：00【実施方法】揚水時に孔底の沈積泥を掻き乱さないように配慮し，水中ポンプは，孔底から＋50cm高止まり状態で設置した（図－１）．

水中ポンプユニットの吐出口には積算流量計を設置し，揚水量を常時管理した．揚水中の孔内の水位変化は，水位計を用いて測定した．水中ポンプユニット内部を共洗いする為に，初期の揚水を20Lタンク１個に排水した．揚水開始直後

A井戸採水方法
概念図

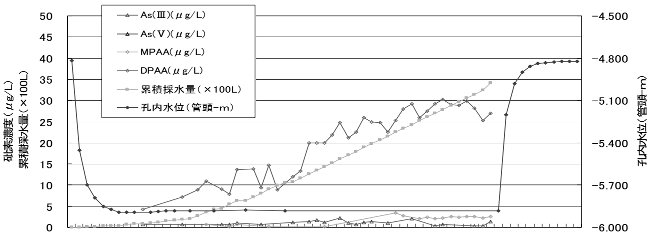


図―1

は，1m³ タンク（3 基）(CWES-Kamisu No.1～CWES-Kamisu No.3)へ採水した．有機砒素濃度測定用のサンプルは，揚水開始後から 90L 毎に採水ビンにて採水した．採水 1 回目のサンプル名は CWES-Kamisu-1 とし，以降，同様に採水回数に応じた名称をつけた．揚水中は，90L 毎に揚水時間を記録し，揚水速度を測定した．揚水開始直後 1 分間は，10 秒毎に水位測定を行なった．その後，水位が安定してくるにつれて 30 秒，1 分，5 分,30 分毎に水位測定を行なった.揚水終了直前のサンプルを採水ビンにて採水し，　これを CWES-Kamisu-37 とした．揚水終了直後は，10 秒毎に水位測定を行なった．その後，水位が安定してくるにつれて 30 秒，1 分毎に水位測定を行ない，水位が元の高さ付近まで復旧した

点で測定を終了した．【水位および揚水量測定結果】揚水開始時間：12:10:00 揚水終了時間：13:34:00　孔内水位：定常状態　管頭‐4.860m（10:30:00 時点）ポンプ投入時　管頭－4.815m 揚水時最低水位　管頭－5.895m 最大水位差 1.08m 平均揚水速度：42.2 L/min 総揚水量：3420L　 有機砒素濃度測定用サンプル数：37 検体

結論：，Ａ地区汚染発覚井戸の直下の下位層準付近にある汚染水塊（地下水汚染プリューム）を，汚染発覚井戸からの地下水揚水で地下水位が低下するにつれて，井戸直下や周辺に存在していた地下水汚染プリュームを揚水し，有機砒素地下水汚染濃度が揚水とともに上昇する仮設を、２００４年９月に実証した（図―２）。



揚汚水試験時における累積採水時ー地下水位ー形態別砒素濃度変化図

図－２

1－7

ジフェニルアルシン酸による肝発がん促進作用の機序解明

○山田貴宣、謝暁利、魏民、菅直人、梯アンナ、鰐渕英機
大阪市立大学大学院医学研究科　都市環境病理学

1.　はじめに

ジフェニルアルシン酸（Diphenylarsinic acid, DPAA）は第2次世界大戦中に使用された化学兵器の分解産物である。また、これは茨城県、神栖町において、住民が訴えている中枢神経障害の原因物質として疑われている。一方、DPAA の発癌性についても懸念されているが、その詳細は不明である。我々は先の研究で、ラット中期発がん性試験を用いて DPAA、20ppm において肝発がん促進作用を示すことを明らかにした。しかし、DPAA による肝発がん促進作用の機序はまだ不明である。そこで、本研究は DPAA による発がん促進作用の機序の解明を行った。

1.　方法

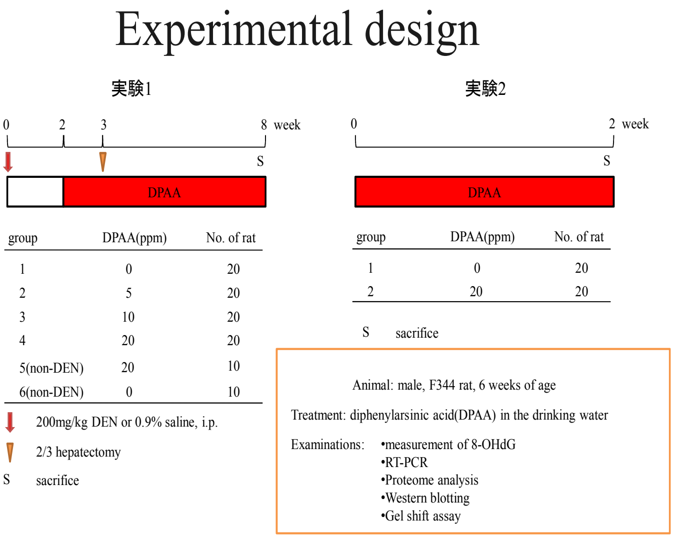
解析サンプルは、実験1と2（図1.）から得た凍結のラット肝臓を用いた。検索項目として、HPLC を用いた酸化的 DNA 傷害の指標である 8-hydroxy-2'-deoxygunosine (8-OHdG)の形成レベル、RT－PCR を用いたシトクロム P450 各分子種および癌関連遺伝子の mRNA 発現量、Western blotting および Gel shift assay を用いた Arylhydrocarbon receptor(AhR)のタンパク発現量および転写活性、さらに QSTAR Elite LC/MS/MS を用いたプロテオーム解析による発現タンパクのプロファイリングの検討を行った。

2.　結果

8-OHdG 形成レベルは、実験1（DPAA8 週間投与）おいて、DEN 処理の有無に関らず 20ppm 投与群で有意に増加していた。一方、実験2（DPAA2 週間投与）においては、8-OHdG 形成レベルに変化は見られなかった。CYP1B1 の mRNA 発現量は、2つの実験系において、DEN 処理の有無に関らず 20ppm 投与群で有意な発現増加が見られた。このことから、CYP1B1 の上流に位置する Aryl hydrocarbon receptor(AhR)のタンパク発現量および転写活性を調べた。その結果、AhR のタンパク発現量および転写活性は、2つの実験系において DEN 処理の有無に関らず、20ppm 投与群において、AhR の核内発現量および転写活性の増加が認められた。さらに、AhR の下流に位置する Cyclin D1 および c-Myc の mRNA 発現量を調べた結果、Cyclin D1 は、2つの実験系において、DEN 処理の有無に関らず 20ppm 投与群で有意な発現増加が見られた。c-Myc は、実験1において、DPAA 20ppm 単独投与群で有意な発現増加が見られた。さらに、実験1の DEN 処理－DPAA 0、5、10、20ppm 投与を行った4群を用いたプロテオーム解析の結果、20ppm 特異的に変動するタンパク数が 65 個見つかり、その内 AhR pathway に関連するタンパクが 18 個見つかった。

3.　考察

20ppm の DPAA 投与により、8-OHdG 形成および AhR の活性化が誘導されることが明らかになった。以上より、DPAA のラット肝発がん促進作用に酸化的 DNA 障害および AhR pathway の活性化が関与していることが示された。(図 2.)



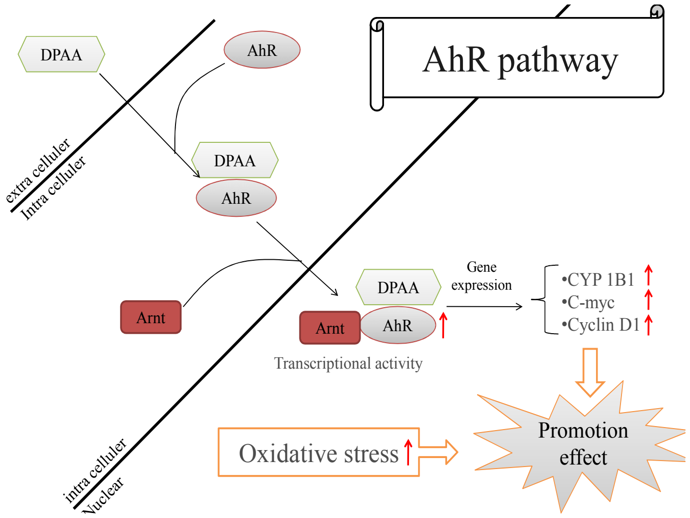


図 1.　実験プロトコール

Mechanism of promotion effect of diphenylarsenic acid on rat liver carcinogenesis

Takanori Yamada, Xie Xiaoli, Min Wei, Naoto Suga and Hideki Wanibuchi

Department of Pathology, Osaka City University Medical School

Diphenylarsinic acid (DPAA) is an enviromental degradation of product of diphenylarsine chloride or diphenylarsine cyanide, which were chemical warfare agents produced by Japan during the World War Ⅱ. DPAA is suspected of inducing health effect that include articulation disorders, involuntary movements, and sleep disorders in kamisu, Irbaraki (Japan).We previously showed that DPAA had promotion activities and increased liver weights at 20 ppm but not at below on rat liver carcinogenesis in medium-term bioassay (Ito test). The purpose of present study is to clarify the mechanism of DPAA-induced toxicity and promotion activity in rat liver.We found that DPAA at 20ppm increased significantly in oxidative DNA damage , mRNA expression of CYP1B1, cyclin D1, and c-Myc, and protein level and transcriptional activity of AhR. Proteome analysis showed that 69 proteins were differentially up or down-regulated in 20ppm DPAA group compared with DEN alone including 18 proteins of AhR pathway. These results suggested that activity of AhR pathway and oxidative DNA damage on rat liver carcinogenesis involved in promotion activity of DPAA.

１－８

海藻類多食者における一日の食事からのヒ素，カドミウム，鉛，スズ摂取量の相互関係

○千葉啓子[1)]，中塚晴夫[2)]，渡辺孝男[3)]，新保慎一郎[4)]，山内　博[5)]

[1)] 岩手県立大学盛岡短期大学部，[2)] 宮城大学看護学部，[3)] 宮城教育大学，
[4)] 京都女子大学，[5)] 北里大学大学院医療系研究科環境医科学群

1．はじめに

陰膳実測法で，海産物を多食する漁村居住者を対象とした食事調査を実施し，食事を介して摂取されたヒ素をはじめとする有害元素摂取量の相互の関連について検討したので報告する。

2．方法

調査は岩手県の沿岸地域の昆布・アワビ等の養殖漁業の従事者とその家族で，同意を得た 20～70 代の男性 39 名(平均年齢 54±15 歳)，女性 40 名(同 55±13 歳）を対象とした。食事調査は陰膳実測法で，1 日分の全飲食物を朝，昼，夕食，それ以外(間食等)を別々の容器に採取した。各食事検体は食品毎に分別秤量した後，均一に磨砕し，測定試料とした。栄養素等摂取量と食品群別摂取量は，五訂版日本食品標準成分表で算出した。元素分析は ICP-MS 法によった。

3．結果及び考察

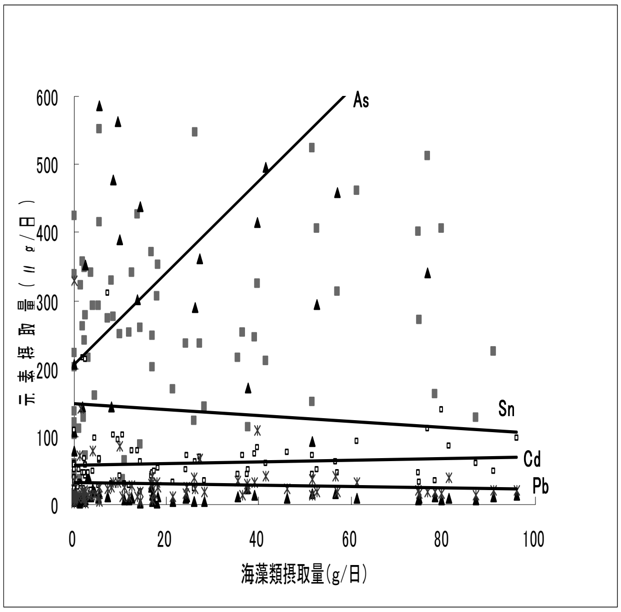
1 日の食事における海産物摂取量及び元素摂取量を表 1 に示した。

表 1　一日の食事中からの海産物摂取量(g)及び元素摂取量（μg/day）

		年齢(歳)	海藻類	魚介類	As	Cd	Pb	Sn
男性	mean	54.2	13.0	119.9	268.3	61.9	31.2	151.2
	sd	14.8	18.4	77.4	215.4	55.7	54.7	383.8
	max	82.0	79.6	267.6	1080.3	309.7	328.4	2142.8
	min	26.0	0.0	0.0	11.2	6.7	1.6	2.8
女性	mean	55.0	33.6	112.8	455.8	60.4	27.2	125.9
	sd	12.6	30.1	69.2	649.8	34.1	20.4	179.7
	max	76.0	96.0	266.6	3991.3	216.5	109.3	563.0
	min	27.0	0.0	5.9	38.0	23.2	7.6	3.4
全員	mean	54.6	23.4	116.3	363.2	61.2	29.2	138.0
	sd	13.6	26.9	73.0	492.6	45.8	40.9	297.0
	max	82.0	96.0	267.6	3991.3	309.7	328.4	2142.8
	min	26.0	0.0	0.0	11.2	6.7	1.6	2.8

漁村に居住する本対象者では全体的に海産物の摂取量が多かった。同年の国民健康・栄養調査報告の 20 歳以上の食品群別摂取量と比較して，藻類，魚介類の食品群の摂取量が多く，とくに女性では藻類摂取が多かった。次に，食事からの金属元素摂取量は，わが国における食品汚染物の摂取量調査（トータルダイエット調査）で示されているヒ素（As），カドミウム（Cd），鉛（Pb）の同年の全国平均値と比較して，As は 363 μg（全国平均値 180 μg），Cd は 61.2 μg（同 26 μg）で，かなり摂取量が多い。Pb は全国平均値の 23 μg よりやや多かった。スズ（Sn）については既存データが少ないが，共同研究者の新保らが先に実施した成人の陰膳食事調査結果では 0～5370 μg /日と摂取量に大きな幅がみられ，幾何平均値（同標準偏差）が 11.0（13.2）μg であった。本対象者の幾何平均値は 26.6（5.93）μg で，全国調査に比較して高値を示した。対象者は海産物の摂取量が多く，これらの食品由来の元素摂取量に起因していることが推測される。As，Cd，Pb，Sn と海藻類，

魚介類摂取量との相関を図 1，2 に示した。As は海藻類($r = 0.368$)と魚介類($r = 0.383$)共に共通して統計学的に有意な相関関係が認められた($p < 0.05$)。Cd は魚介類($r = 0.335$)に有意な相関関係が示された（$p < 0.05$）。次いで，食事から摂取されたこれら元素間の相互関係について検討したが，As，Cd，Pb，Sn 摂取量の間に統計学的に有意な関連性は認められなかった。



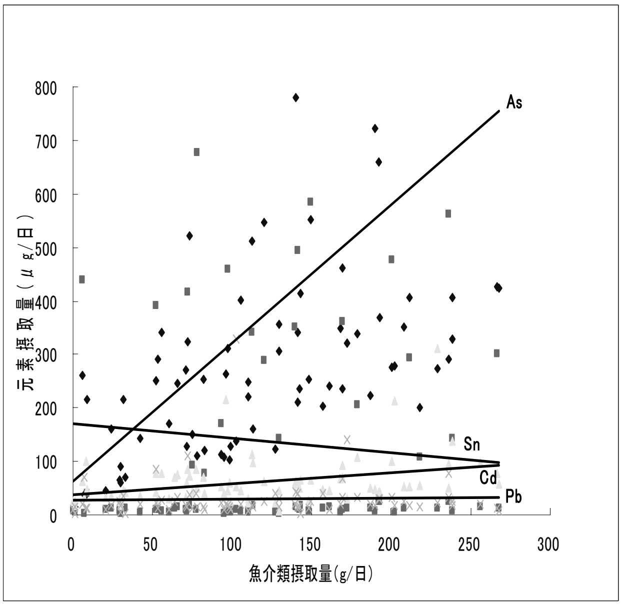


図１　海藻類摂取量と As, Cd, Pb, Sn の相関　　図２　魚介類摂取量と As, Cd, Pb, Sn の相関

4. まとめ

対象者は海産物の摂取量が多く，とくに女性では海藻類の摂取が多い傾向が示された。食事から摂取された金属元素では As と Cd の摂取量が多い傾向にあった。従来より，海藻類や魚介類と As 摂取量との間には有意な正の相関関係が認められることが知られていが，本研究でも明確な結果が得られた。他方，海藻類多食者における，Cd，Pb，Sn 摂取量に関しては十分な研究は少ないと考える。さらに，As と Cd，Pb，Sn 摂取量との相互関係を検討した研究は知られていない。この調査研究からは As は他のいずれの元素摂取量とも統計学的に有意な関連性が認められなかった。

Study on the relationships among daily intake of arsenic, cadmium, lead and tin with excessive eating of seaweeds

Keiko Chiba[1)], Haruo Nakatsuka[2)], Takao Watanabe[3)], Shinichiro Shimbo[4)], Hiroshi Yamauchi[5)]

[1)]Iwate Prefectural University, [2)]Miyagi University, [3)]Miyagi University of Education,
[4)]Kyoto Women's University, [5)]Kitasato University

To examine the relationships among daily intake of arsenic, cadmium, lead and tin with excessive eating of seaweeds, we investigated the 24-h food duplicate samples offered by the men and women who lived in a fishing village. Arsenic and cadmium intakes in subjects were larger compared with those amounts of total diet study in Japan. Dietary arsenic correlated significantly with seaweeds and seafoods intakes and cadmium also correlated significantly with seafoods. However, the relationships among daily intake of arsenic, cadmium, lead and tin were not significant.

1－9

ベトナムのヒ素汚染地域住民における AS3MT 遺伝子多型とヒ素代謝の関係

○阿草哲郎[1,2], 岩田久人[2], 藤原純子[1], 國頭 恭[3], Tu Binh Minh[4], Pham Thi Kim Trang[4]
Pham Hung Viet[4], 竹下治男[1], 田辺信介[2]

[1] 島根大学医学部法医学講座, [2] 愛媛大学沿岸環境科学研究センター (CMES),
[3] 信州大学理学部物質循環学科, [4] Center for Environmental Technology and Sustainable Development (CETASD), Hanoi University of Science, Hanoi, Vietnam

1. はじめに

亜ヒ酸（As^{III}）やヒ酸（As^{V}）などの無機ヒ素化合物は、発がん性を有することが知られている。生体内に取り込まれた無機ヒ素は、メチル化合物に代謝され、体外へ排泄される。その代謝過程において、arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase（AS3MT）はメチル化酵素として無機ヒ素にメチル基を付加する。これまでの研究から、ヒ素の代謝および毒性発現には個人差や民族差が存在し、このような差違は遺伝的要因によって生じることが示唆されてきた。最近の研究では、AS3MT の一塩基多型（SNP）とヒ素の代謝能の関係が報告されている。しかしながら、その情報は断片的であり、とくにアジア人を対象とした調査研究は皆無である。そこで本研究は、ベトナムのヒ素汚染地域を対象に、地下水およびヒトの尿試料を分析してヒ素の曝露実態を明らかにするとともに、AS3MT 遺伝子多型とヒ素代謝の関連について解析した。

2. 試料と方法

2007 年 9 月、ベトナム北部の Ha Tay 州の Thanh Vanh（TV）と Thach Hoa（TH）で調査を実施し、両地域から井戸水（n = 36）と住民の尿（n = 90）、血液（n = 90）を採取した。なお本研究は、愛媛大学医学部倫理委員会の承認および試料提供者のインフォームドコンセントを得て実施した。採取した試料は、愛媛大学沿岸環境科学研究センターの生物環境試料バンク（*es*-BANK）で分析時まで-25℃で保存した。

化学分析は既法に従い、ICP-MS で総ヒ素を、HPLC/ICP-MS でヒ素化合物（As^{III}、As^{V}、monomethylarsonic（MMA）、dimethylarsinic acid（DMA）、arsenobetaine（AB））を定性・定量した。AS3MT の 29 ヶ所の SNP は、血液から DNA を抽出した後、PCR/RFLP 法により判定した。

3. 結果と考察

化学分析の結果、TV で採取した地下水から WHO の飲料水の安全基準値（10 μg/l）を超える濃度のヒ素（5.5 － 145 μg/l）が検出された。TH の地下水中総ヒ素濃度は、<0.1 － 0.5 μg/l と TV よりも有意に低値であった。また、TV の一部家庭では、地下水を砂ろ過処理していた。そのろ過水中総ヒ素濃度は 1.5 － 50.7 μg/l であり、砂ろ過によって 61 － 95 %のヒ素が原水から除去されていた。

地下水の結果と同様に、ヒト尿中総ヒ素化合物濃度は、TH（幾何平均値（GM), 37.8 μg/g クレアチニン当たり）よりも TV（GM, 63.5 μg/g クレアチニン当たり）の方が有意に高値を示した。また、ヒト尿中 DMA、MMA、無機ヒ素（As^{III} + As^{V}）も TV で有意に高濃度であった。さらに、飲用水中総ヒ素濃度とヒト尿中総ヒ素化合物、DMA、MMA、無機ヒ素濃度の間に有意な正の相関関係が得られた。このことから、TV の住民は地下水を介してヒ素に曝露しているものと推察された。

次に、AS3MT の SNPs と無機ヒ素のメチル化能の関係について解析した。無機ヒ素は MMA、DMA と 2 段階で代謝されていくことから、本研究では尿中 MMA/無機ヒ素(primary methylation index; PMI)、DMA/MMA(secondary methylation index; SMI)をメチル化能の指標として用いた。今回調査した AS3MT の 29 ヶ所の SNPs 全てにおいて変異を同定することができた。このうち、37616C/A の CC 型よりも CA 型、37950T/C の TT 型よりも TC 型で PMI が有意に高値であったことから、これらの変異による無機ヒ素の第 1 メチル化の促進が窺われた。また、これら SNPs の間には強い連鎖不平衡の関係があった。一方、14458T/C の TT 型の SMI は、TC 型よりも高レベルであった。このことから、AS3MT 14458T/C の TT 型は、高い第 2 メチル化能をもつことが示唆された。

****

Relationship between genetic polymorphism in AS3MT and arsenic metabolism in residents of arsenic-contaminated area in Vietnam

○Tetsuro Agusa[1,2], Hisato Iwata[2], Junko Fujihara[1], Takashi Kunito[3], Tu Binh Minh[4], Pham Thi Kim Trang[4], Pham Hung Viet[4], Haruo Takeshita[1], Shinsuke Tanabe[2]

[1] Department of Legal Medicine, Shimane University Faculty of Medicine, Izumo, Japan,
[2] Center for Marine Environmental Studies (CMES), Ehime University, Matsuyama, Japan,
[3] Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University, Matsumoto, Japan,
[4] Center for Environmental Technology and Sustainable Development (CETASD), Hanoi University of Science, Hanoi, Vietnam

The present study investigated arsenic (As) exposure status from groundwater and residents in the Red River Delta, Vietnam. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in arsenic (+3) methyltransferase (AS3MT) with As methylation in human was also evaluated. Groundwater and human urine and blood samples were collected from Thanh Vanh (TV) and Thach Hoa (TH) communes in Ha Tay Province, Vietnam in September 2007. Total As and its speciation (arsenite (As^{III}), arsenate (As^{V}), monomethylarsonic (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), and arsenobetaine (AB)) were measured by inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP/MS) and high performance liquid chromatograph (HPLC)-ICP/MS, respectively. Genotyping of 29 SNPs in AS3MT was conducted by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Total As concentrations in groundwater were from <0.1 to 145μg/l and the level of TV was significantly higher than that of TH. Analysis of sand-filtered groundwater revealed that domestic sand-filter system could effectively reduce As from raw water. Urinary total As, inorganic As (As^{III}+ As^{V}), MMA, and DMA concentrations of residents from TV were also significantly high compared with those from TH. Moreover, concentration of total As in drinking water was positively correlated with those of total As, inorganic As, MMA, and DMA in human urine. These results indicate that water is a significant exposure source of As in residents from these regions. We could identify 29 SNPs in AS3MT. SNPs 37616 and 37950, which showed strong linkage disequilibrium were associated with primary methylation index (MMA/inorganic As in urine). Secondary methylation index (DMA/MMA in urine) of TT homozygote of SNP 14458 was significantly higher than that of TC heterozygote. This indicate that these SNPs may be responsible for As methylation.

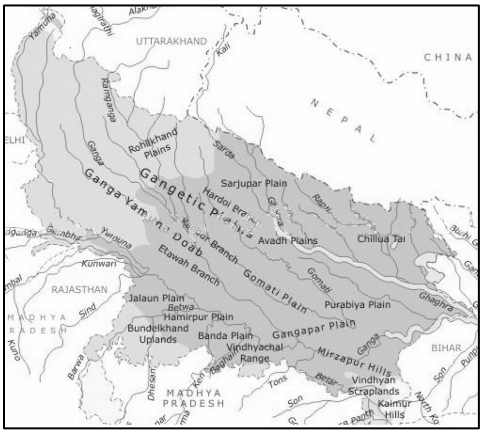
１－１０

ウッタールプラディシュ州バライチ県における地下水ヒ素汚染

○瀬崎 満弘[1)]、田川 大輔[1)]、田辺 公子[2)]、真 智代[2)]、塩盛 弘一郎[1)]、横田 漠[2)]
1) 宮崎大学工学部、2) 宮崎大学産学連携センター

１．はじめに

インド北部に位置しているウッタールプラデシュ州 (以下 UP 州と略称)は、面積が我国の本州と北海道を合わせたほどであり（州人口は約 1.7 億人)、ネパールの地下水ヒ素汚染地帯（テライ平原）を流下しているガガラ川（ガンジス支流）とガンジス川本流が 2 本、東端部分で合流している。その川はその後、地下水ヒ素汚染が確認されている東隣のビハール州を流下している（図―１)。



図―１　ＵＰ州の河川状況

UP 州上下水道公社は、UNICEF の支援を受け、UP 州の中で、地質学的に地下水のヒ素分布が懸念される主要な河川近傍の 49 県（UP 州の総県数は 70 県）で井戸のサンプル調査を実施した。2006 年 10 月時点の調査結果では、汚染率の高い県が数県あり、その中でも、地域によっては相当に高いヒ素汚染となっている。

宮崎大学は、昨年度より２年間に渡って、JICA の草の根技術協力の支援を受けて、「インドウッタールプラデシュ州における地下水砒素汚染の総合的対策」事業を、汚染率の高いバライチ県で実施している[1),2)]。

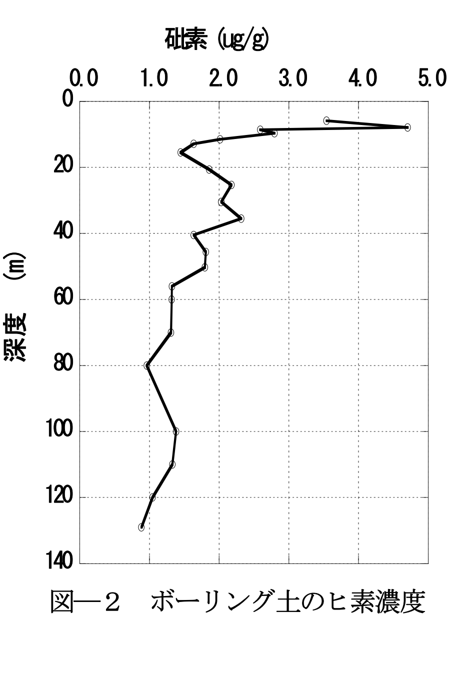
ここでは、この対策事業の一環として、実施したボーリング結果、そのボーリングから採取された土のヒ素分析および井戸水の分析結果を報告するものである。

写真―１　ボーリングマシン

２．ボーリング結果

調査対象となっているバライチ県は、UP 州の州都ラクナウから北へ車で約 4 時間の位置にあり、ネパールまで約 3 時間である。ボーリング調査を 2009 年 3 月に実施し、土の試料を日本に持ち帰り、ヒ素分析を実施した。UP 州のヒ素汚染地周辺に深いボーリング結果がなかったため、当初 200m 深度を目標として、写真―１に示すような大型のボーリングマシンで掘削を開始したが、種々のトラブルで 150m までしか掘進できなかった。

ボーリング孔内水と一緒に上がってきた土は、地表面から 150m の深さまで全てが細砂であった。その土を酸分解（硝酸）して、ヒ素濃度を測定した結果が図―２である。深度が浅いほど、ヒ素濃度が高いが、周辺にあるヒ素濃度の高い井戸を説明できるほどではなかった。理由としては、酸分解で砂全てを分解することができなかったことと、砂自身がボーリング孔内水で洗われたためと考えられる。



図―２　ボーリング土のヒ素濃度

３．井戸水の分析結果

2009 年 6 月に井戸水の採取、分析を実施した。現地で測定

した項目は、NH_4-N、NO_3-N、PO_4^{2-}、COD、Cl^-、Fe^{2+}、EC、ORP、DO 等で、その後持ち帰った試料で、As^{3+}、As^{5+}、Total-Fe、Na^+、NH_4^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}等を測定した。

図―３は、全ヒ素濃度と全鉄の関係である。全鉄濃度が 7ppm 以上の点を除けば鉄濃度が高くなると共に全ヒ素濃度は高くなる傾向が見える。ヒ素は大部分が 3 価で溶解していた。5 価のヒ素は，全鉄濃度が低い領域で高くなる傾向が見られた。全鉄が 7ppm 付近のデータの一つは 80m の試験井戸である。

ヒ素と ORP との関係を図―４に示す。ORP が正の値ではヒ素濃度が高い地下水はない。ORP120mV 付近でヒ素濃度が少し高いデータは，川の水の結果である。ORP が負の領域では，ヒ素濃度の範囲が広く一定の傾向は見られない。

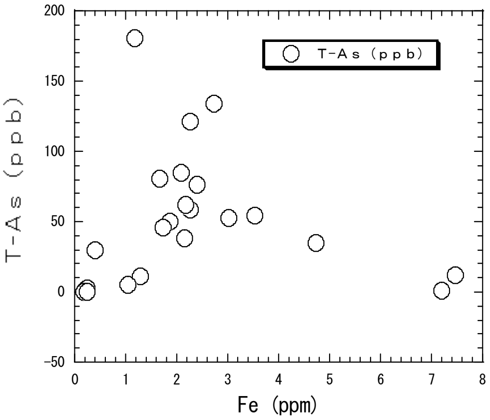
ヒ素濃度と正イオンの全濃度との関係を図―５に示す。カチオン濃度が高くなるとヒ素濃度が低くなる傾向がみられる。カチオン濃度が高い場合に，共沈や鉱物表面への吸着，溶出が起こりにくいなどの現象が起こっているのではないかと思われる。

４．おわりに

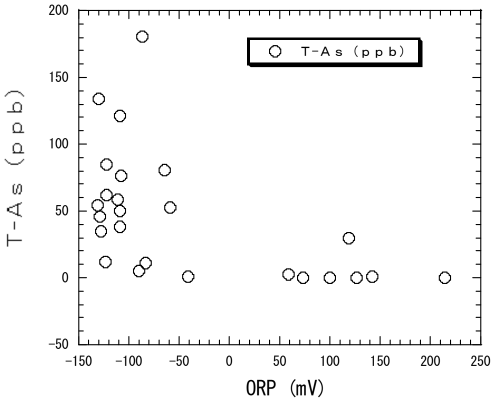
ヒマラヤを源流とするガンジス川流域における地下水のヒ素汚染は、インド西ベンガル州、バングラデシュそしてネパールと確認されてきた。そして今、ガンジス川の中流域であるインド UP 州で、その汚染が明らかにされつつある。宮崎大学は、この UP 州での総合的ヒ素対策事業を通じて、これらの地域でのヒ素汚染対策事業に貢献したいと考えている。

参考文献

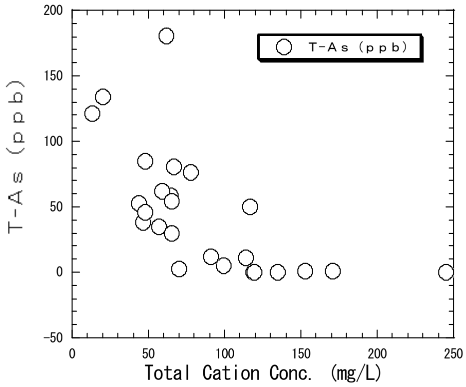
1) Arsenic pollution of groundwater in the Uttar Pradesh state, India, M. SEZAKI, K. TANABE, H. YOKOTA,IAH2008 in Toyama, International Association of Hydrogeologists, 2008.10
2) Mechanisms of Arsenic Contaminations of groundwater in the Ganges, Sezaki, M., Hussainuzzaman, M. M., Tanabe K. and Yokota Y. ,Proceedings of 13th ARC 2007, Dec., 2007



図―３　全ヒ素濃度と鉄イオンとの関係



図―４　全ヒ素濃度と ORP の関係



図―５　全ヒ素濃度とカチオンの関係

Arsenic Contamination on groundwater in Bahraich District, Uttar Pradesh State

M. SEZAKI[1], D.TAGAWA[1], K.TANABE[2], T.SANA[2], K.SHIOMORI[1], and H.YOKOTA[2]
1) Faculty of Engineering, University of Miyazaki, 2) Cooperative Research Center, University of Miyazaki,

The investigations of arsenic distributions in groundwater have been carrird out in the 49 districts thought to be ‘at risk’ by UP state government. It was observed that arsenic ‘hotspots’ are generally found near to the major rivers of UP. The arsenic pollution is serious there, and it is necessary to conduct an immediate full investigation. University of Miyazaki started the integrated arsenic mitigation project supported by JICA in June 2008. This paper is a summary of testing of arsenic in groundwater in UP state by University of Miyazaki.

2－1

亜ヒ酸の心毒性に係る因子の解析

○角大悟、佐々木貴彦、藤代瞳、宮髙透喜、姫野誠一郎
徳島文理大・薬・衛生化学

1. はじめに

近年、再発・難治性急性前骨髄球性白血病の治療に三酸化ヒ素（As_2O_3）が治療薬として用いられるようになった。しかし、3 価の無機ヒ素の毒性に起因した様々な副作用が報告されており、中でも心電図上で検出される QT 延長は治療を中止しなければならないほど重大で致死的な副作用である。そこで、今回我々は、2 種類のラット由来細胞（心臓由来：H9c2(2-1)細胞、肝臓由来：TRL1215 細胞）を用いて亜ヒ酸の心毒性に係る因子の解析を行った。

2. 方法

細胞：ラット心臓横紋筋細胞H9c2(2-1)細胞、ラット正常培養肝臓TRL1215細胞を使用した。細胞生存率 : alamarBlue法で検出した。ヒ素の細胞内蓄積 : ICP-MSで測定した。細胞内グルタチオン（GSH）量 : HPLC蛍光検出法で測定した。mRNA発現量：半定量的RT-PCR法により測定した。タンパク質発現量：ウエスタンブロット法を行った。Nrf2活性化：Nrf2タンパク質の安定化をウエスタンブロット法で検出した。

3. 結果

亜ヒ酸曝露 48 時間後の細胞生存率を測定したところ、肝臓由来の TRL1215 細胞より心臓由来の H9c2(2-1)細胞は亜ヒ酸に対し高い感受性を示した。これら 2 細胞間での亜ヒ酸に対する感受性の違いを検討するために、細胞内ヒ素蓄積量を測定した。その結果、亜ヒ酸 24 時間曝露後の細胞内ヒ素蓄積量は、H9c2(2-1)細胞の方が TRL1215 細胞に比して多いことがわかった。H9c2(2-1)細胞でヒ素蓄積量が多い原因として、ヒ素の取り込みおよび排泄能に差があることが予想されたが、両細胞間で顕著な差異は検出されなかった。そこで、ヒ素の排泄に必要な GSH について検討を行ったところ、H9c2(2-1)細胞の GSH 量は、TRL1215 細胞に比して顕著に低いことがわかった。このことは、GSH の生合成を制御するγ-グルタミルシステイン合成酵素（γ-GCS）の mRNA およびタンパク質発現量ともに、H9c2(2-1)の方が顕著に低いことからも理解できる。さらに、γ-GCS の発現を制御する転写因子 Nrf2 について検討したところ、TRL1215 細胞では亜ヒ酸曝露によって Nrf2 が強く活性化されていたが、H9c2(2-1)細胞ではその活性化が弱かった。以上のことから、TRL1215 細胞と H9c2(2-1)細胞では亜ヒ酸に対する Nrf2 の活性化に違いがあり、H9c2(2-1)細胞では細胞内に取り込まれたヒ素の代謝や排泄に関わる GSH 合成が TRL 細胞に比して弱いことから、細胞内にヒ素が蓄積されることにより、亜ヒ酸に強い感受性を示す可能性が示唆された。

Investigation of factors involved in cardiac toxicity of arsenite

Daigo Sumi, Takahiko Sasaki, Hitomi Fujishiro, Hideki Miyataka and Seiichiro Himeno
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University)

Arsenite is used as a therapeutic agent for the treatment of acute promyelocytic leukemia, however cardiac toxicity is observed as prominent side-effects that is defined by prolongation of QT interval. To investigate the factors involved in sensitivity to arsenite in cardiomyocyte, we compared the effects of arsenite in two rat-derived cells, TRL1215 (liver cells) and H9c2(2-1) (heart cells). H9c2(2-1) cells showed higher sensitivity to arsenite than TRL1215 cells. In addition, we found that 24 hours accumulation of arsenic is higher in H9c2(2-1) cells than in TRL1215 cells. The expression of γ-glutamylcysteine synthase (γ-GCS), a rate-limiting enzyme of GSH biosynthesis, was examined to explore the differences in susceptibility to and accumulation of arsenic. Basal and arsenite-induced increases in mRNA and protein levels of γ-GCS was lower in H9c2(2-1) cells compared than TRL1215 cells, resulting in lower GSH concentration in H9c2(2-1) cells. Transcription factor Nrf2 is known to regulate γ-GCS expression. As expected, Nrf2 activation by exposure to arsenite in H9c2(2-1) cells was lower than TRL1215 cells. These results suggest that high sensitivity of H9c2(2-1) cells to arsenite is partly caused by low availability of GSH accompanied by modest activation of Nrf2.

2－2

ヒト卵膜由来正常細胞に対する亜ヒ酸の影響

○吉野雄大[1]、袁博[1]、武市信[2]、貝瀬利一[3]、豊田裕夫[1]

1) 東京薬科大学　臨床ゲノム生化学教室、2) 米山産婦人科病院

3) 東京薬科大学　環境動態化学研究室

1.　はじめに

急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療において、三酸化ヒ素 (亜ヒ酸) が有効であることが報告された。また、固形がんを含む他のがん細胞に対して殺細胞作用を有することも示されている。さらに、aquaglyceroporin (AQP) が亜ヒ酸の細胞内への取り込みに、ABC トランスポーター (multidrug resistance-associated protein (MRP), P-glycoprotein (P-gp)) が亜ヒ酸の細胞外への排出に関与することが知られ、亜ヒ酸の作用を大きく左右することが報告されている。しかしながら、ヒト由来正常細胞に対する亜ヒ酸の影響は殆ど報告されていない。また、当研究室は、ヒト卵膜組織由来初代培養細胞である羊膜細胞 (amnion cells) および平滑絨毛膜細胞 (chorion cells) の、様々な外的刺激に対する応答性の違いを明らかにし、これら細胞から構成されるユニークな in vitro 細胞応答解析系を構築した。そこで、この in vitro 細胞応答解析系を用いて、亜ヒ酸の取り込みおよび排出に着目し、両細胞に対する亜ヒ酸の影響について比較検討した。

2.　方法

細胞調製法および生存率測定法

ヒト卵膜由来初代培養細胞、amnion cells および chorion cells は、妊娠後期の正常分娩予定妊婦より帝王切開によって得られた卵膜組織から、当研究室が確立した方法で調製した。細胞の生存率は亜ヒ酸曝露 48 時間後に XTT 法により測定した。

細胞内ヒ素濃度の測定

最終濃度が 17 µM となるように亜ヒ酸含有培地を調製し、amnion cells および chorion cells に曝露した後、細胞を回収し、PBS で 3 度洗浄を行った。試料に硝酸 0.1 mL および過酸化水素 0.05 mL を添加し、湿式灰化を行った。灰化した試料は milliQ 水で希釈後、フィルターろ過後を行い測定試料とした。ヒ素の検出には ICP-MS (ELAN DRC-*e*/PerkinElmer) を用いた。

亜ヒ酸トランスポーター阻害剤の影響

亜ヒ酸の細胞内への取り込みに関与する AQP の阻害剤としてソルビトールを用いた。また、亜ヒ酸の細胞外への排出に関わる MRP、P-gp の阻害剤としてシクロスポリン A、MRP 選択的阻害剤として MK571 を用いた。

3.　結果

亜ヒ酸に対する感受性は、amnion cells より chorion cells の方が高かった。また、両細胞の細胞内ヒ素濃度を比較したところ、amnion cells より chorion cells の方が高かった。亜ヒ酸の取り込みに関与する AQP をソルビトールにより阻害したところ､chorion cells において細胞内ヒ素濃度が低下し、亜ヒ酸の細胞障害作用が抑制された。一方、amnion cells では細胞内ヒ素濃度に変化は認められなか

った。さらに、亜ヒ酸の排出に関わる MRP、P-gp の阻害剤である CSA および MK571 の共存により、両細胞において細胞内ヒ素量は顕著に増加し、細胞障害作用は亢進した。

4. 考察

両細胞の亜ヒ酸に対する感受性と、細胞内ヒ素濃度との間に相関関係が示された。さらに、AQP の阻害により chorion cells において細胞内ヒ素濃度および生存率に有意な変化が見られたことから、chorion cells は AQP を介した亜ヒ酸の取り込みを行っていることが示された。一方で、amnion cells においては AQP 阻害による同様の変化は認められず、AQP 以外のトランスポーターが亜ヒ酸の取り込みに関与することが示唆された。また、亜ヒ酸排出トランスポーターである MRP、P-gp の阻害により、細胞内ヒ素濃度の増加および細胞生存率の低下が見られたことから、MRP および P-gp の亜ヒ酸排出への関与が示された。以上のことから、これらの分子は亜ヒ酸の正常細胞に対する作用を予測するパラメーターに成りうることが示唆された。

Effect of arsenite on normal cells from human fetal membrane

○Yuta Yoshino[1)], Bo Yuan[1)], Makoto Takeichi[2)], Toshikazu Kaise[3)], Hiroo Toyoda[1)]

1) Dept. of Clin. Mol. Genet., Tokyo Univ. of Pharm. & Life Sci.

2) Yoneyama Maternity Hospital

3) Lab. of Environmental Chemodynamics, Tokyo Univ. of Pharm. & Life Sci.

As_2O_3 has been applied effectively for the treatment of APL patients, and is also known to possess cytocidal activity against other cancer cells. Moreover, it has been reported that molecules of AQP and ABC transporter, such as MRP and P-gp, are associated to As_2O_3 uptake and efflux, respectively. However, effects of As_2O_3 on normal cells have not been well elucidated. In this study, we investigated the effects of As_2O_3 on normal cells using primary amnion and chorion cells prepared from normal human fetal membranes as a model system. XTT and ICP-MS analysis showed that there is a good correlation between sensitivity of these cells to As_2O_3 and intracellular arsenic concentrations. Furthermore, the inhibition of AQP resulted in a significant decrease of intracellular arsenic levels and As_2O_3 cytotoxicity in chorion cells, whereas no such phenomena were observed in amnion cells. In contrast, the inhibition of MRP and P-gp markedly increased intracellular arsenic levels and As_2O_3 cytotoxicity in both cells. These results suggest that these transporter molecules are crucial for the effect of As_2O_3 on normal cells, and could be used as parameters relevant to evaluating the efficacy of As_2O_3.

2－3

日本人小児の無機ヒ素曝露と酸化ストレス

○森拓哉[1]、吉永淳[1]、河原純子[2]、鈴木慧[3]、溝井美穂[3]、
安達修一[3]、葛西宏[4]、田尾博明[5]、中里哲也[5]
1) 東京大学新領域創成科学研究科、2) 国立環境研究所、3) 相模女子大学栄養科学研究科、
4) 産業医科大学職業腫瘍学、5) 産業技術総合研究所

【はじめに】

無機ヒ素（iAs）による健康リスクは世界的にも注目されている。日本人はヒ素化合物を多く含有する海産物を多食する食文化をもつが、そのほとんどが毒性の低い有機ヒ素であるため、これまであまりiAs曝露によるリスクに注目した調査は行われてこなかった。iAs曝露評価には尿中代謝産物を用いたバイオモニタリングが有効と考えられる。地下水As汚染地域などでのiAsの曝露評価には尿中iAs+モノメチルアルソン酸(MMA)+ジメチルアルシン酸(DMA)の合計が用いられるが、日本のように多様な形態のヒ素を日常摂取している集団の場合、尿中iAs+MMAによるiAs曝露評価の有効性が示されている[1)]。本研究では、一般的に化学物質の毒性に脆弱であるといわれる小児について、尿中iAs及びMMAを用いたiAs曝露評価を行った。さらにiAs曝露と酸化ストレスとの関連についても調べることとした。

【方法】

<u>対象とサンプリング</u>：保護者から研究参加への同意が得られた、K県某幼稚園に通う幼稚園児 132 名を対象として 2007 年 10 月に尿サンプリングを行った。期間中任意の日の朝最初のスポット尿を採取し、-20℃にて保存、分析時には解凍して用いた。なお本研究は相模女子大学、東京大学における倫理審査において承認を得たものである。

<u>尿分析</u>：As分析では、尿試料を純水を用いて 5 倍希釈後、メンブランフィルター（0.45µm）にてろ過して検液とし、高速液体クロマトグラフィー‐水素化物発生‐誘導プラズマ質量分析装置（HPLC-HG-ICPMS）での分析[2)]に供した。HPLCカラムはイオン排除型分離カラムのShim-packSCR-102H（SHIMADZU GLC Ltd.）を用い、溶離液は 10 mg L^{-1}の Na_2SO_4を添加した 0.01 mol L^{-1} HNO_3、流量を 1.5ml min^{-1}とした。HGの反応溶液として 1.4 mol L^{-1} HNO_3、還元剤として 1% $NaBH_4$（0.1 mol L^{-1} NaOH）を各々1ml min^{-1}の流速で導入した。酸化ストレス指標とした尿中 8-OHdG分析では、尿中沈殿物を遠心除去後、陰イオン交換カラムMCI GEL CA08F (Mitsubishi Chemical Corp.)と逆相カラムCapcell Pak C18 (Shiseido)を組み合わせたHPLCによる 2 段階分離法により分離し、電気化学検出器(ECD)にて定量した[3)]。なお本研究ではスポット尿を用いたため、尿中As類、8-OHdG濃度はクレアチニン補正を行った。

【結果と考察】

本測定系にて、0.1 µg L^{-1}標準液の繰り返し測定値の標準偏差の 3 倍から算出した検出下限はAs(V), As(III), MMAで各 0.14, 0.090, 0.14 µg L^{-1}（尿中濃度）、標準液 0.5 µg L^{-1}での精度（RSD）は 2.7, 2.9, 1.8%であった。また尿試料における回収率はAs(V) 113±10%, As(III) 106±5%, MMA 107±10%であり、測定系として良好であると判断した。

現在までに行った小児 40 名の尿中As分析結果をTable 1 に示した。本結果における尿中As濃度の分布はいずれの形態においても対数分布に近いため代表値を幾何平均(GM)および幾何標準偏差(GSD)で示した。日本における既往の報告[4)5)]では算術平均や 24h蓄尿分析結果が示されているため単純に比較できないが、本結果の各As濃度ともそれらと大きな差はなかった。また、この 40 名について、酸化ストレス指標である尿中 8-OHdG濃度（GM 4.97 µg g-cre^{-1}, GSD 1.49,

n=40）との間でピアソン相関分析を行ってみたが有意ではなかった（r=0.09, p>0.05）。しかし台湾成人での報告[6)]によれば本研究と同レベルの尿中As濃度（As(V), As(III), MMA各平均 0.61, 0.91, 2.50 μg g-cre^{-1}）と尿中 8-OHdG濃度（平均 5.95 μg g-cre^{-1}）との間に関連が認められている。また、山内らも無機ヒ素曝露と酸化ストレスの間に関連を示唆している[7)]。今後、尿中As分析例を増やし、受動喫煙など他要因の影響も考慮に入れた詳細な解析結果を報告する。

Table 1 小児の尿中 As 濃度と日本人を対象とした既往研究との比較

	As Conc.[μg-As g-cre^{-1}]			[μg-As 24h-urine^{-1}]
	This study (対象：一般小児 n=40)		Hata et al.(2007)[4)] (一般男性 n=402)	Mohri et al.(1990)[5)] (一般成人 n=210)
	GM (GSD)	50% tile	Arithmetic Mean	Mean ± SD
As(V)	0.53 (1.97)	0.45	0.1	2.1 ± 0.6
As(III)	1.88 (1.78)	2.00	3.0	
MMA	2.91 (1.62)	2.92	2.6	5.2 ± 2.2
iAs + MMA	5.43 (1.63)	5.27	5.7	7.3 ± 2.8

【文献】

1) 畑ら, 第 14 回ヒ素シンポジウム講演要旨集: 27-28 2) Nakazato et al., Talanta 58: 121-132 (2002) 3) Kasai et al., J. Radiat. Res. 44: 185-189 (2003) 4) Hata et al., J. Occup. Health 49: 217-223 (2007) 5) Mohri et al., Fd. Chem. Toxic 28: 521-529 (1990) 6) Chung et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 226: 14-21 (2008) 7) Yamauchi et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 198: 291-296 (2004)

Assessment of exposure to inorganic arsenic and oxidative stress in Japanese children

Takuya Mori[1)], Jun Yoshinaga[1)], Junko Kawahara[2)], Kei Suzuki[3)], Miho Mizoi[3)], Shuichi Adachi[3)], Hiroshi Kasai[4)], Hiroshi Tao[5)], Tetsuya Nakazato[5)]
1) University of Tokyo, 2) National Institute for Environmental Studies, 3) Sagami Woman's University, 4) University of Occupational and Environmental Health 5) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Exposure level of inorganic arsenic (iAs) in Japanese kindergarten children was estimated by urinary concentrations of arsenate (As(V)), arsenite (As(III)) and monomethylarsoic acid (MMA) determined by liquid chromatography-hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. Geometric mean concentration (n=40) of urinary As(V), As(III) and MMA was 0.53, 1.88 and 2.91 μg g-cre^{-1}, respectively, and they were similar to the previously reported values for Japanese adults. Correlation between iAs exposure level (sum of iAs and MMA concentrations in urine) and urinary 8-OHdG concentration as oxidative stress marker was analyzed. Geometric mean urinary concentration of 8-OHdG of the present subjects was 4.97 μg g-cre^{-1}. There was no significant correlation between them (r=0.09, p>0.05). Further analysis with adjustment of covariates, such as environmental tobacco smoke exposure, will be reported.

２－４

鉄酸化物を固定化したPVA凍結ゲルによるヒ素の吸着挙動

○塩盛 弘一郎[1)]、横山佳奈[1)]、松下明日香[1)]、清山史朗[2)]、田辺 公子[3)]
1) 宮崎大学工学部、2) 都城高専、3) 宮崎大学産学連携センター

１．はじめに

宮崎県の速日鉱山跡では酸性の鉄を高濃度に含んだ坑道水が排出され，中和処理が行われている。この過程で水酸化鉄を含有した中和沈殿物が 1 日あたり約１ｔ生成し，処分場に埋め立て処理されている。今後，処分場の不足が予測されることからその有効利用が求められている。我々は水酸化鉄がヒ素に対し親和性を有することからヒ素の除去・吸着剤に応用できないか検討している。中和沈殿物そのものは微細な粒子であることから，取り扱い性を向上するために何らかの成型加工が必要であるが，バインダーや無機物添加による焼成成型では吸着性能の低下が懸念される。そこで，比較的大きな細孔が形成される水溶性高分子の凍結ゲルへ中和沈殿物を混合固定することを検討した。ポリビニルアルコールやポリ-N-イソプロピルアクリルアミドなどの水溶性高分子の水溶液を凍結して調製する凍結ゲルは，氷の結晶痕により内部が多孔質となっており，凍結過程を制御することにより多孔性や細孔の方向を制御することが出来る。ここでは、凍結ゲルの構造およびヒ素の吸着特性におよぼす調製条件のおよぼす影響を明らかにした。

２．実験

PVA 水溶液と水酸化鉄殿物を分散させた水相を混合し，PVA 濃度 5wt%，澱物 5.0-12.5 wt%とした。混合溶液に HCl 水溶液を加え pH1.0～1.2 に調整し，30 分間氷水で冷却した。架橋剤として 25%グルタルアルデヒドを 0.25ml（最終濃度 0.0625wt%）加え，反応混合物を 1 分間撹拌した。その後，混合液を 15mｌプラスチックシリンジに 12ml ずつ取り，－18℃で凍結し一晩保った。生成した凍結ゲルを蒸留水に浸漬し，中性になるまで蒸留水を交換して洗浄した。その後、pH4 の HCl 水溶液に入れ，冷蔵庫に保管した。得られた酸化鉄含有凍結ゲルは凍結乾燥後，光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡にて観察した。酸化鉄含有凍結ゲルの調製条件を**表１**に示す。

砒素の吸着実験は，pH10 に調製した As(III)水溶液に所定量の凍結複合ゲルを入れ，48 時間振とうした。その後，ゲルと水溶液を分け，水溶液中の砒素濃度は，超低温捕集型水素化物発生原子吸光光度計を用いて測定した。

表 1 酸化鉄含有 PVA 凍結ゲルの調製条件

Sample No.	PVA 濃度 [wt%]	澱物濃度 [wt%]	GA 濃度 [wt%]
No.1	5.0	5.0	0.0625
No.2	5.0	7.5	0.0625
No.3	5.0	10.0	0.0625
No.4	5.0	12.5	0.0625
No.5	5.0	15.0	0.0625
No.6	4.25	15.0	0.0625
No.7	4.0	20.0	0.0625

３．結果および考察

調製した酸化鉄含有ポリビニルアルコール凍結ゲルを**図１**に示す。酸化鉄含有凍結ゲルは，中和沈澱物の茶褐色に着色し，弾性があり，含有された水は，ゲルを押すことにより容易に排出された。表面の電子顕微鏡観察より微細で一様な細孔が形成されていることが確認された。また，澱物と考えられる微少な球状粒子が所々に観察でき，中和澱物の仕込み量の増加と共に多くなった。中和澱物の含有量を増加させると茶褐色が濃くなりもろくなる傾向が見られ

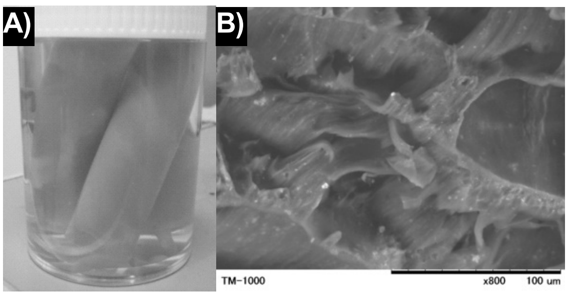


図 1 調製した酸化鉄含有 PVA 凍結ゲル（酸化鉄沈殿物仕込量: 5.0wt%）. A) 全体写真, B) 表面の SEM 写真. C_{PVA}=5.0 wt%, C_{GA}=0.0625 wt%

たが，ゲルの性状は大きく変化しなかった。また，使用時にゲルから中和澱物の漏れ出しは見られず，澱物はポリビニルアルコール内に完全に包括固定化されていると考えられる。

凍結複合ゲルによる砒素の吸着

調製した酸化鉄含有凍結ゲルによる As (III)および As (V)の吸着量におよぼす水相のヒ素濃度の影響を**図２および３**に示す。As (III)および As (V)は，ゲルに吸着され，水相の As 濃度が高くなるに従い，吸着量が高くなった。As が低濃度域では，As(III)よりも As(V)の方が吸着量は高いが，高度領域では As(V)よりも As(III)の方が吸着量は高くなる傾向が見られた。また，澱物の含有量が増加するに従い As の吸着量は高くなるが, 15wt%以上では As の吸着量は減少した。図２および３の吸着挙動を Langmuir 吸着等温式および Freundlich 吸着等温式を用いて解析した。その結果， As(III) は全濃度範囲にわたって Freundlich 吸着等温式でよく説明されたが, As(V)は低濃度領域と高濃度領域それぞれ別の Freundlich 吸着等温式で説明されることがわかった。As は，ゲル内部に固定化された水酸化鉄に吸着されていると考えられるが, As(III)と As(V)で吸着機構が異なることが示唆され，吸着機構の詳細はさらに検討が必要である。

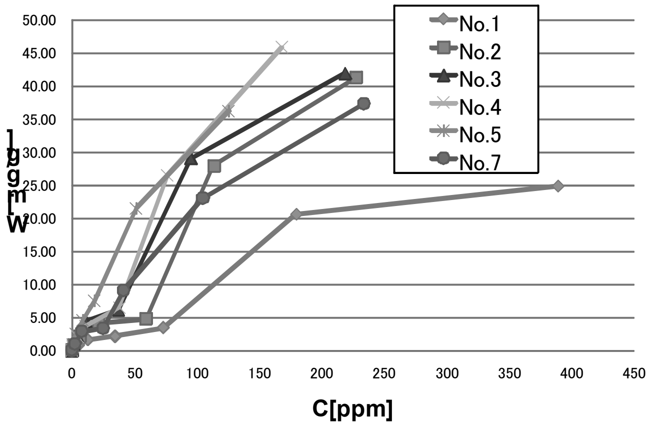


図２ 酸化鉄含有 PVA 凍結ゲルによる As(III)の吸着等温線. pH_{ini} ＝6

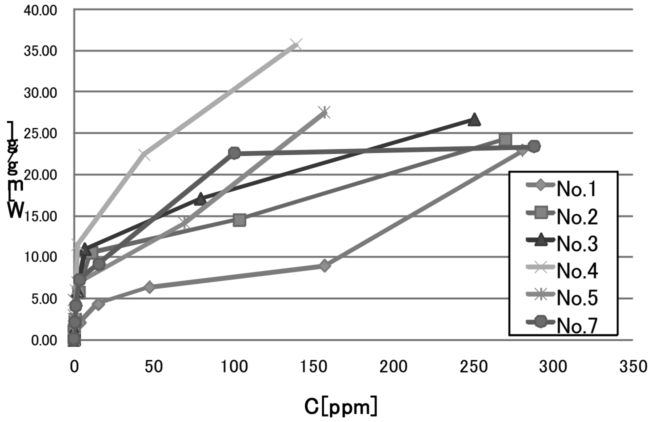


図３ 酸化鉄含有 PVA 凍結ゲルによる As(V)の吸着等温線. pH_{ini} ＝6

Preparation of PVA Cryogel containing Precipitates of Ferrous Hydroxides and It’s Adsorption Behavior of Arsenic

K. SHIOMORI[1], K. YOKOYAMA[1], A. MASTUSHITA[1], S. KIYOYAMA[2], and K.TANABE[3]
1) Faculty of Engineering, University of Miyazaki, 2) Miyakonojo National College of Technology,
3) Cooperative Research Center, University of Miyazaki

The Polyvinyl alcohol (PVA) cryogels containing precipitate of ferrous hydroxides, which is discharged from Hayahi abandoned mine at Misato-cho in Miyazaki prefecture, were prepared under various experimental conditions. The gels have highly porous structure and color of dark brown. The gels adsorbed both As(III) and As(V) from aqueous solution. The adsorption amount of As increased with increasing the As concentration in the aqueous solution. And the adsorption amount also increased with increasing the amount of the precipitation of ferrous hydroxides until 15wt%, but at more higher amount, the adsorption amount slightly decreased. The adsorption mechanism between As (III) and As(V) is suggested to be different by the analysis of adsorption equation.

2－5

ガス化ヒ素の過酸化水素を用いた捕集

○中宮　邦近、柴田　康行
(独)国立環境研究所

1. はじめに

ヒ素は環境中においてメチル化あるいは水素化されてガス化し、大気中に放出されることが知られている。これまでのガス化ヒ素の捕集方法はガス捕集バックに捕集し、GC-MS、GC-ICP-MS で測定、あるいは硝酸銀に吸着させ蛍光 X 線測定が行われていたが、それぞれ捕集後の安定性が低い、形態別分析が出来ない等の問題点があった。本研究ではガス化ヒ素の環境動態を詳細に把握するため、ガス化ヒ素を捕集と同時に過酸化水素を用いて安定な酸化物にする方法の検討を行った。

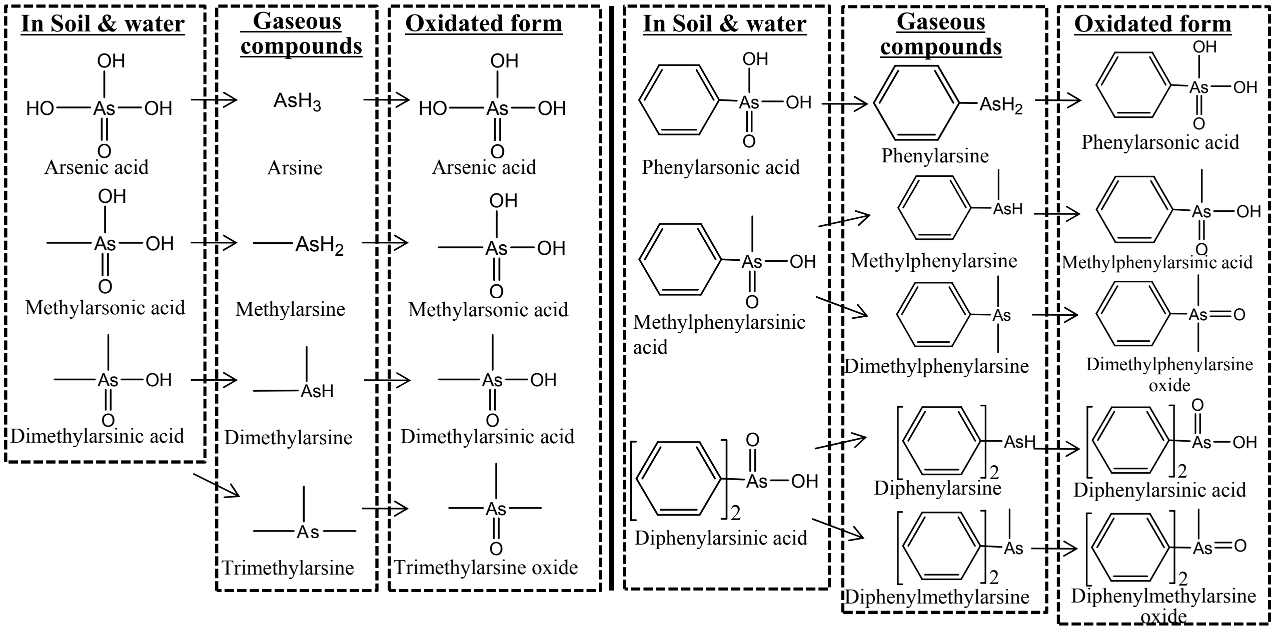


Fig.1. Summery of gaseous compounds and expected oxidation forms

2. 材料と方法

2-1.試薬

Trimethylarsine はNacali chemical Co. Ltd製を用いた。Arsine、methylarsine、dimethylarsineは、arsenic acid、methylarsonic acid、dimethylarsinic acidよりsodium borohydride($NaBH_4$)を触媒として合成した[1]。Phenylarsine、methylphenylarsine、diphenylarsineはそれぞれphenylarsonic acid、methylphenylarsinic acid、diphenylarsinic acidとzinc amalgam との混合物に塩酸を滴下して合成した。Dimethylphenylarsine、diphenylmethylarsineは以前の研究で合成したものを用いた。

2-2. 捕集方法

セプタム(PTFE/Silicone, 20 mm Septa, Supelco)とアルミシールでふたをしたバイアル瓶(33 mm X 63 m、日電理化ガラス)を窒素ガスで置換し、ガスタイトシリンジで各ガス化ヒ素を加えた。これに methanol 5 ml、ミリ Q 水 5 ml そして H_2O_2 を後述の濃度流した Oasis HLB plus カートリッジ(Waters)に 21G のニードルを取り付け吸引しつつセプタムに突き刺し、吸引して捕集した。捕集終了後、ミリ Q 水 5 ml、methanol 5 ml でカートリッジから溶出した成分を合わせて、35℃前後の温度でロータリーシェーカーを用いて濃縮し、分析した。バイアルからの回収は、バイアルに直接 30%過酸化水素 100ul を添加し、数回振って、ミリ Q 水で洗い込んだ。

2-3.分析方法

HPLC；カラム；ガードカラム(TSK guard column IC-AP (4.6 mm ID X 10 mm L, 東ソー(株)))、分離

カラム(TSK gel Super IC-AP (4.6 mm ID X 75 mm L, 東ソー(株)))。移動相；30mM 重炭酸アンモニウム (Fluka)。流速;1 ml/min。 カラムオーブン温度；40℃。サンプル導入量；20ul。ICP-MS:装置；Agilent 7500C。分析モード；リアクションモード(He、3.3 ml/min)。RF パワー；1600W

3. 結果と考察

捕集に対する H_2O_2 の効果を評価するため、カートリッジに流す H_2O_2 の濃度を 0 から 10%まで変化させて 5 分間 trimethylarsine の捕集を行い、Fig.1 に示す酸化生成物を定量した。H_2O_2 を流さない系では trimethylarsine の捕集率は 55%程度であり、バイアル瓶からもほとんど回収されなかった。しかしながら 1%以上の H_2O_2 を流すことによって 90%以上の trimethylarsine が trimethylarsine oxide として捕集が可能であることが分かった。このことは使用した HLB plus が ODS 系の担体であり trimethylarsine を吸着して捕集することが予想されるが、trimethylarsine はプラスチックに浸透しやすく、また吸引時の脱吸着によって吸着されない成分がカラムから素通りしたため捕集率が低下したためと思われた。またこの時、3%程度の dimethylarsinic acid の生成が確認された。これは気化中の酸素と反応する事によって trimethylarsine が酸化されたため生成したと考えられ[2)]、窒素ガス置換しない系では 50%以上の dimethylarsinic acid への酸化が確認された。他のガス化ヒ素についても、Fig.1 以外の酸化生成物の生成が確認出来た。

添加したガス化ヒ素の沸点は arsine では-55℃と低いの対し、arylarsine 特に水素化された arylarsine である phenylarsine、diphenylmethylarsine、diphenylarsine では 常圧で 100℃以上に達するものもある。Dimethylphenylarsine、diphenylmethylarsine の 5 分間吸引した場合の捕集率は 60%前後で、残り 40%の arylarsine がバイアル中より回収される。水素化された arylarsine の捕集率は酸化を伴い添加量に対してヒ素換算で 10%を下回った。この場合バイアル中から残り 90%の arylarsine が回収され、酸化物の生成があまり見られない。このことは、水素化された arylarsine は沸点が低いため添加直後に液体としてバイアル表面に付着し、その後、気化、捕集されなかったものと考えられる。経時的に 1 分から 15 分間サンプルを採取した場合、trimethylarsine では 1 分間で 90%以上の添加ヒ素を捕集出来たが、dimethylarsine では 1 分間で 60%、15 分で 90%、水素化された arylarsine では 1 分間で 5%以下であるが、いずれの場合もバイアル中から残りのガス化ヒ素成分が回収された。水素化された arylarsine に関しては空気との接触で生成する酸化生成物の中の主要成分の中に未同定の物も存在するが、これが何なのか現時点ではわからない。

H_2O_2 を用いた捕集方法を用いることによって、添加したガス化ヒ素のうち気化状態を維持している成分の 90%以上を 1 分間に捕集することが出来た。Trimethylarsine から dimethylarsinic acid への酸化物の生成は主に大気中の酸素によるものであり、環境中においてはより顕著にこの反応は進行しているものと予想された。さらに本研究によって、特に水素化された arylarsine において気化中に複雑な酸化を起こすことが明らかとなり、より複雑な環境動態を示す有機ヒ素化合物であることが示唆された。

4. 参考文献

1) M.H. Arbad-Zavar, et al. Analyst 105 (1980) 744. 2) A. Merijanian et al. Inorg. Chem. 5 (1966) 187.

Subject; The evaluation of oxidative-trapping method for instable gaseous arsines by hydrogen peroxide

Nakamiya Kunichika and Shibata Yasuyuki (National Institute for Environmental Studies, Japan)

To evaluate new trapping method of unstable gaseous arsines, hydrogen peroxide was used for the oxidizing reagent. HLB plus cartridge wetted by hydrogen peroxide can trap spiked gaseous arsines over 90%. This result indicated that gaseous arsines can be oxidized to stable arsenic compounds on HLB cartridge. In this study we found the hydroganated arylarsines have be degraded complicated compounds by O_2 from air.

2－6

ラットにおけるジフェニルアルシン酸の胆汁排泄機構

○小林弥生[1,2]、山城彩花[2]、平野靖史郎[1,2]
[1]国立環境研究所、[2]千葉大・院・薬

1．はじめに

ジフェニルアルシン酸（DPAA）は通常自然界には存在しない為、毒性学的知見は少ない。毒性発現のメカニズムを解明するためには、体内分布とその化学形態を明らかにすることが必要となる。生体内に摂取されたジフェニルアルシン酸（DPAA）の一部は胆汁排泄されることが示唆されているが、胆汁中のDPAA、あるいはDPAA代謝物は定量的に測定されていない。そこで、本研究ではラットを経口投与した際の体内分布と胆汁排泄に関して検討を行った。

2．方法

本研究では、精製飼料を用いることによりラットの組織中のヒ素バックグランド値を減少させ、経口摂取したDPAAの体内動態を調べた。2週齢の雄性SDラットを母獣と共に購入し、授乳中でもある1週間の馴化中から6週齢になるまで精製食を与えて飼育した。6週齢になった1群4匹のラットに、滅菌した脱イオン水、またはDPAAを1.0 mg As/kg b.w.の用量で単回経口投与し、3日間代謝ケージにて24時間ごとに尿および糞を採取した。3日後に解剖を行い、血液および肝臓を採取した。また、同じ条件で6週齢まで飼育した1群4匹の雄性ラットに、麻酔下で胆管カニュレーションを施し、滅菌した脱イオン水あるいは1.0 mg As/kg b.w.の用量でDPAAを単回経口投与してDPAAの胆汁排泄を調べた。胆汁は30分ごとに3時間まで氷上で採取し、3時間後に解剖を行い、血液および肝臓を採取した。各試料は硝酸と過酸化水素によって湿式灰化し、総ヒ素濃度をICP-MSにより測定した。また、血漿、尿、糞抽出液および胆汁中のヒ素の化学形態別分析をゲルろ過、あるいは逆相カラムを装着したHPLC-ICP-MS法で行った。

3．結果

DPAA投与3日後には、投与量に対して赤血球には約2.5%、肝臓には約1.4%のヒ素が分布していた。滅菌した脱イオン水を投与した各対照群における24時間のヒ素尿中排泄量は0.1 μg以下であった。1日目から3日目の尿中ヒ素排泄の割合は、投与量に対して順に54%、4.3%、1.9%となった。糞中ヒ素排泄の割合は、1日目から3日目までで、投与量に対して順に7.1%、12%、7.8%となった。血漿、尿および糞抽出液中のヒ素は主にDPAAだった。

一方、DPAA投与3時間後のヒ素の分布は、赤血球が投与量の約1.7%、肝臓で約0.9%となった。胆汁中へのヒ素の排泄は3時間まで経時的に増加し、投与量の約0.3%のヒ

素が３時間までに胆汁排泄された。HPLC-ICP-MS および HPLC-ESI-MS の結果から、DPAA 及び DPAA のグルタチオン（DPAA-GSH）抱合体の保持時間と一致するピークが検出され、DPAA-GSH 抱合体の胆汁排泄は経時的に増加していることが分かった。HPLC-ICP-MS による定量の結果から、胆汁中に排泄されるヒ素化合物のうち、約 85-95％が DPAA-GSH 抱合体であることが分かった。

4．考察

本実験では、3 日間で約 87%のヒ素が体外へ排泄されていた。投与 3 時間および 3 日後共に赤血球への蓄積は肝臓に比べて高かった。このことから、ラットにおいて、DPAA はジメチルヒ素化合物と同様に、赤血球中へ蓄積することが分かった。

体内に摂取された DPAA の一部は胆汁排泄されることが示唆されているが、DPAA 投与後の胆汁中のヒ素の化学形態については報告されていない。HPLC-ICP-MS 及び HPLC-ESI-MS の結果から、DPAA はフリーあるいは DPAA-GSH 抱合体として胆汁中に排泄されることが分かった。無機ヒ素を投与したラット胆汁中では、ヒ素が arsenic triglutathione (ATG)と monomethyl arsenic diglutathione (MADG)として排泄されることが報告されているが、DPAA も GSH 抱合されて胆汁排泄されることが明らかとなった。

以上のことから、生体内に摂取された DPAA の一部は GSH 抱合体となって胆汁中へ排泄され、再吸収される際に 3 価のジフェニルヒ素化合物へと加水分解される可能性が考えられた。また、5 価の DPAA はほとんど可溶性タンパク質と相互作用を示さないことから、生体内で 3 価に還元され、赤血球へ蓄積されると推定される。3 価ジフェニルヒ素化合物はタンパク質との相互作用が強いと考えられることから、毒性発現の原因になる可能性が示唆される。

Biliary excretion of arsenic in rats orally administered with dipheneylarsinic acid

〇Yayoi Kobayashi[1,2]、Ayaka Yamashiro[2]、Seishiro Hirano[1,2]
[1] National Institute for Environmental Studies
[2] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University,

The distribution and the biliary excretion of per orally administered dipheneylarsinic acid (DPAA) were examined using the rat that had been fed on arsenic-free chow to reduce the background tissue arsenic level. Approximately 87% of the dose was excreted in urine and feces as unchanged DPAA in three days. DPAA was accumulated in the red blood cells like dimethyl arsenic compounds. On the other hand, DPAA was excreted in bile either in an unchanged form (DPAA) or DPAA-GSH complex as determined by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS. DPAA-GSH may develop higher toxicity than DPAA, because DPAA-GSH is possibly converted to trivalent DPAA after hydrolysis and trivalent arsenic compounds react with proteins more avidly than corresponding pentavalent arsenicals.

２－７

ヒ素メチル化細菌の増殖特性とヒ素代謝

○宮武宗利[1)]、田辺公子[2)]、林　幸男[1)]

1) 宮崎大学工学部、　2) 宮崎大学産業連携センター

１．はじめに

ヒ素は自然環境中において微量ながら広く分布する元素であり、人為的作用や自然作用を受けて地下水中に溶出することで、それらを飲料水として摂取した人々に深刻な健康被害をもたらしている。汚染水中のヒ素は一般的に化学的沈殿やイオン交換、吸着のような方法で除去されている。しかしながら、これらの方法は高コストや二次汚染物質の発生などの問題を抱えている。そのため、これまでの物理化学的なヒ素除去方法に替わるもの、もしくは補助として使用することができるものとして、低コストで環境に優しいバイオレメディエーションが注目されている。一般にヒ素の毒性はその化学形態によって異なり、無機ヒ素に比べ有機ヒ素は極めて毒性が低いことが知られている。そのため、微生物によるヒ素のメチル化はヒ素の無毒化の有効な手段として考えられている。

本研究では、ヒ素のメチル化によるバイオレメディエーションを微生物により行うことを目的として、効率的にメチル化を行なうヒ素メチル化菌の探索を行い、諸性質の検討を行っている。今回は、無機ヒ素から非揮発性のメチル化有機ヒ素化合物を生成する *Bacillus cereus* を宮崎県内の土壌より分離することができたので、本菌株のヒ素存在下での増殖特性とメチル化によるヒ素の代謝について検討した。

２．方法

培地には Nutrient Broth (日水製薬) を基本培地 (NB) として使用した。ヒ素は 3 価のヒ素 (As(III)) として亜ヒ酸ナトリウム（和光純薬）を、5 価のヒ素（As(V)）としてヒ酸二ナトリウム（和光純薬）を各種濃度で添加した。培地への添加物の影響を見るために、NB にグルコース 1.0g/L、L-メチオニン 10.0mg/L、ビタミン B_{12} 0.5mg/L を添加した。グルコースの添加量の影響を調べる際には NB にグルコース 0.1～10.0g/L を添加した。

前培養は NB を用いて、30℃、24 時間、100 strokes/min の条件で実施した。本培養は前培養の培地を新たな培地に 2.0v/v%接種して行なった。好気的培養は 30℃、100 strokes/min で振とう培養した。嫌気的培養は上部を窒素で置換した後、30℃で静置培養した。

所定の時間ごとに培養液の濁度を測定した後、遠心分離（10,000rpm、15 分間）により菌体と培養上清に分け、培養上清中のヒ素濃度を形態別に測定した。

培養液の濁度は紫外分光光度計(Shimadzu UV-210A)にて 600nm で測定し菌株の増殖度とした。ヒ素の定量分析は形態別に還元気化 - 超低温捕集 - 原子吸光装置（Shimadzu ASA-2sp－Shimadzu AA6650）を用いて測定した。

３．結果と考察

無機ヒ素をメチル化する機能を保有した微生物として、*Bacillus cereus* R2 株を宮崎県内の土壌から分離した。R2 株は、好気的培養に比べて嫌気的培養では対数増殖期に入るまでの誘導期が長く定常期に達するまでに時間を要した。R2 株は、50.0mg As/L のヒ素を含む培地では増殖が見られず、好気的、嫌気的培養とも As(III)より As(V)の方が菌の増殖を抑制することが分かった。

培地中にグルコースを添加すると、ジメチルアルシン酸（DMAA）とトリメチルアルシンオキサイド（TMAO）の割合が向上し、メチオニンやビタミン B_{12} を加えると TMAO の割合だけが高くなることが分かった。培地中に添加したグルコース濃度が 1.0g/L までは無機ヒ素の割合が減少し、DMAA と TMAO の割合がそれぞれ増加し、メチル化有機ヒ素化合物の割合はグルコース濃度が 1.0g/L のと

きに 60.8%であった。

Fig.1 に示すように、R2 株は 5.0mg As/L までの As(III)を培地に添加した場合に好気、嫌気の両方で効果的に無機ヒ素をメチル化した。As(V)を培地に添加した場合ではあまりメチル化が進まず、As(III)のときとは逆に好気的より嫌気的の方がメチル化有機ヒ素化合物の割合が高くなった。このことから、R2 株は As(V)を As(III)に還元する機能が弱いと考えられる。メチル化有機ヒ素化合物の割合は 0.1mg As/L の As(III)を添加した場合に好気的培養時に 89.0%で最大であり、メチル化有機ヒ素化合物の収量は 5.0mg As/L の As(III)を添加した場合に好気的培養時に 1.99 mg As/L で最大であった。また、どの条件においても培養液全体のヒ素量が培地に添加したヒ素量と変化しなかったことから、揮発性のメチル化有機ヒ素化合物は生成していないことが分かった。

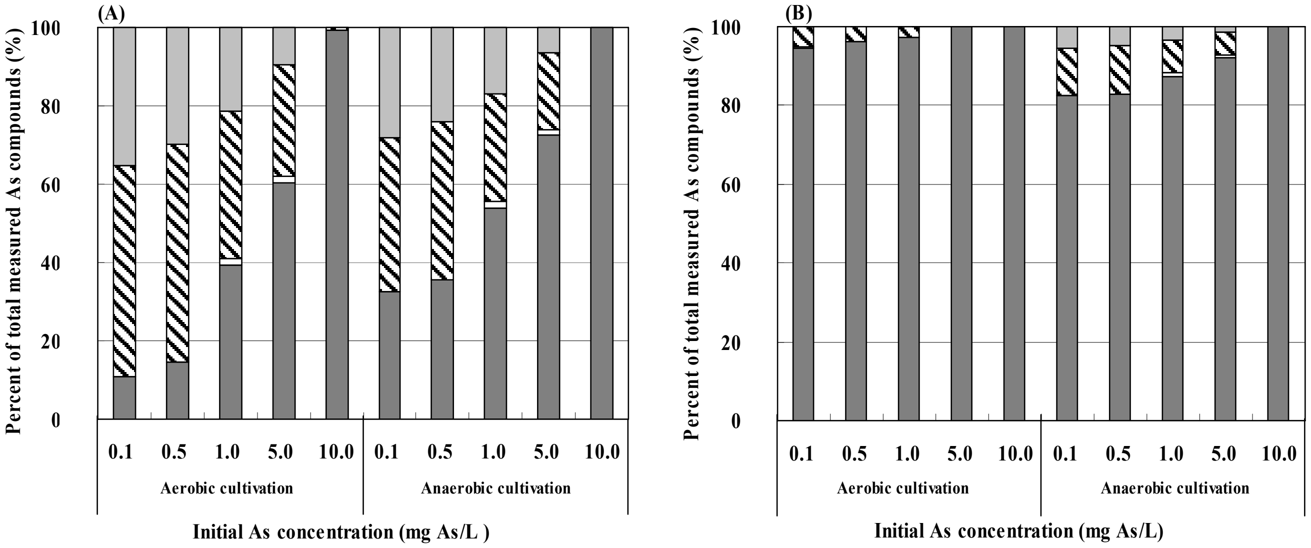


Fig. 1 Effect of arsenic concentration on arsenic methylation by strain R2. Strain R2 was cultured in NB medium containing 1.0 g/l glucose and arsenite (A), or arsenate (B) for four days. Symbols: ■, iAs; □, MMAA; ▨, DMAA; ■, TMAO.

謝辞　本研究は、(財)クリタ水・環境科学振興財団の援助を受けて行われたことを記して謝意を表する。

Growth characteristics and arsenic metabolism of an arsenic methylating bacterium

Munetoshi MIYATAKE[1], Kimiko TANABE[2], and Sachio HAYASHI[1]
1) Faculty of Engineering, University of Miyazaki,
2) Cooperative Research Center, University of Miyazaki

Biomethylation of arsenic is usually considered as a detoxification of arsenic because toxicity of most organic methylated arsenic is much less than that of inorganic arsenic. We investigated the feasibility of a novel bioremediation using an arsenic methylating bacterium. An arsenic methylating bacterium *Bacillus cereus* strain R2, isolated from soil in Miyazaki, was evaluated for growth characteristics and arsenic metabolism. The growth of strain R2 was inhibited in 50.0 mg As/L arsenic medium. Strain R2 metabolized arsenite (<5.0 mgAs/L) to nonvolatile species such as monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsenic oxide effectively. The percent of organic methylated arsenic excreted into the medium by strain R2 showed 89.0 % of total arsenic compounds when strain R2 was cultured aerobically in the medium containing 0.1 mgAs/L of arsenite and 1.0 g/L of glucose for four days.

2－8

膀胱尿路上皮におけるジメチルモノチオアルシン酸の影響

○菅直人[1)]、謝暁利[1)]、金川明裕[1)2)]、吉田香[1)]、魏民[1)]、圓藤吟史[2)]、鰐渕英機[1)]
[1)]大阪市立大学大学院医学研究科　都市環境病理学
[2)]大阪市立大学大学院医学研究科　産業医学

1．はじめに

ヒ素は疫学的に皮膚、肺、膀胱などで発がん性が認められている。動物実験においては、有機ヒ素化合物であるジメチルアルシン酸（dimethylarsinic acid, DMA^{V}）の発がん性が認められているが、他のヒ素化合物についてはまだ不明な点が多い。硫黄含有ヒ素化合物のジメチルモノチオアルシン酸（dimethylmonothioarsinic acid, $DMMTA^{V}$）はDMA^{V}の代謝物の1種で、ヒ素に曝露したラット及びヒトの尿中で検出される。以前、当研究室で arsenate（iAs^{V}）、arsenite（iAs^{III}）、monomethylarsonic acid（MMA^{V}）、DMA^{V}などのヒ素化合物を投与して膀胱がんの促進作用を検討した実験において、DMA^{V}投与群で膀胱腫瘍数が有意に増加した。また、尿中ヒ素濃度を測定した結果、$DMMTA^{V}$の濃度と促進作用に相関関係がみられ、$DMMTA^{V}$のヒ素発がんへの関与が疑われた。そこで今回、膀胱尿路上皮における$DMMTA^{V}$の影響を検討した。

2．方法

【実験 1】ラット膀胱上皮細胞である MYP3 とヒト膀胱上皮細胞である 1T1 を用いて、$DMMTA^{V}$、iAs^{V}、iAs^{III}、MMA^{V}、DMA^{V}、dimethylarsinous acid（DMA^{III}）の半数致死濃度（LC_{50}）を算出した。また、細胞の存在下および非存在下での$DMMTA^{V}$の安定性を確認するため、LC_{50}時の培地中ヒ素濃度を、液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマイオン質量分析装置（LC-ICP-MS）で化学形態別に測定した。

【実験 2】10 週齢の雄性 SD ラットを 4 群に分け、尿管および尿道を結紮した後、それぞれ生理食塩水、$DMMTA^{V}$、iAs^{III}、DMA^{V}を膀胱内に直接投与した。2 時間後に回収した溶液および膀胱上皮内のヒ素濃度を LC-ICP-MS で化学形態別に測定した。

【実験 3】10 週齢の雄性 SD ラットを 3 群に分け、浸透圧ポンプを用いて尿管からそれぞれ生理食塩水、$DMMTA^{V}$、DMA^{V}を持続投与した。2 週間後、尿中および膀胱上皮内のヒ素濃度を LC-ICP-MS で化学形態別に測定した。また、膀胱上皮におけるがん関連遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検索した。

3．結果

【実験 1】$DMMTA^{V}$、iAs^{V}、iAs^{III}、MMA^{V}、DMA^{V}、DMA^{III}のLC_{50}は、MYP3 ではそれぞれ、4.6μM, 47.9μM, 3.2μM, 7.7mM, 2.7mM,1.1μM 、1T1 ではそれぞれ 5.4μM, 81.7μM, 25.5μM, 6.1mM, 1.4mM,4.1μM となり、$DMMTA^{V}$は無機ヒ素と同程度の毒性がみられた。また、$DMMTA^{V}$は細胞非存在下では安定していたが、細胞存在下ではDMA^{V}への変換がみられた。

【実験 2】膀胱上皮内において、DMMTA^{V}の DMA^{V}への変換がみられた。
【実験 3】DMA^{V}投与群の尿中ヒ素はほぼ DMA^{V}であったが、DMMTA^{V}投与群の尿中ヒ素の大部分は DMA^{V}であった。また、膀胱がんの早期検出マーカーである Oncomodulin が、DMMTA^{V}投与群で上昇していた。

4. 結論

DMMTA^V は、発がん性の認められる DMA^{V}よりはるかに細胞毒性が高く、ヒ素化合物の毒性および発がん性に関与することが示唆された。

Effects of dimethylmonothioarsinic acid on bladder urothelium

Naoto Suga[1],Xie Xiaoli[1], Akihiro Kanagawa[1,2] , Kaoru Yoshida[1],
Min Wei[1], Ginji Endo[2] and Hideki Wanibuchi[1]
[1]Department of Pathology, [2]Department of Preventive Medicine and Environmental Health,
Osaka City University Medical School

[Background] Epidemiological studies have shown that arsenic exposure is associated with increased bladder cancers. We previously have demonstrated the bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid (DMA^V) in rats. Dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA^V) is an organic metabolite of DMA^V in rats, and has been found in the urine of humans exposed to arsenic. However, little is known about its toxic and carcinogenic effects. The purpose of the present study is to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of DMMTA^V on bladder urothelium. **[Methods]** Experiment 1: To determine the *in vitro* cytotoxicities, human and rat urothelial cells were treated with various concentrations of arsenicals for 48 hours. Experiment 2: DMA^V was injected into bladders of SD rats after ligation of the urinary duct and urethra. Two hours later, arsenic concentrations of urinary contents and urothelium were measured. Experiment 3: Bladders of SD rats were exposed directly to DMA^V and DMMTA^V by osmotic pumps for 2 weeks. Concentrations of urine arsenicals and gene expression in urothelium were evaluated. **[Results]** Experiment 1: *in vitro* LC_{50} of DMMTA^V, arsenate, arsenite, monomethylarsonic acid, DMA^V, and dimethylarsinous acid were 4.6µM, 47.9µM, 3.2µM, 7.7mM, 2.7mM and 1.1µM respectively, in rat urothelial cells, and were 5.4µM,81.7µM, 25.5µM, 6.1mM, 1.4mM and 4.1µM respectively, in human urothelial cells. Experiment 2: Both *in vitro* and *in vivo*, DMMTA^V was uptaken by urothelium and converted into DMA^V. Experiment 3: *In vivo*, oncomodulin expression was increased in urothelium treated with DMMTA^V but not in DMA^V. **[Conclusion]** DMMTA^V is much more toxic than DMA^V, and may be involved in DMA^V-induced toxicities and carcinogenicities in bladder.

2－9

ヒト肝癌由来培養細胞 **HepG2** のヒ素による細胞死における転写因子 **ATF5** の役割

○ 山崎高志、大味麻子、車谷春香、加藤研司、阿部貴則、山本宙享、中西教子、
奥山隆一、貝瀬利一、高橋滋、高橋勇二
東京薬科大学 生命科学研究科 環境ストレス生理学研究室

1. はじめに

ヒ素やある種のヒ素代謝物は強い毒性を持ち、細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。しかし、ヒ素暴露によるアポトーシスの分子メカニズムには未解明な点が多く残されている。これまでに当研究室ではヒ素暴露などのストレスによって転写因子 ATF (activating transcription factor) 5 の mRNA やタンパク質が安定化することを明らかにしている(1, 2, 3)。ATF5 の機能については細胞の癌化やアポトーシスへの関与などが報告されているが、その標的遺伝子についてはほとんど同定されていない。そこで本研究ではヒ素暴露時の ATF5 の役割、及びその標的遺伝子を同定することを目的とした。

2. 方法

細胞はヒト肝癌由来 HepG2、ヒト子宮頸部癌由来 HeLaS3、ヒト骨肉腫由来 U2OS、ヒト神経細胞腫由来 U87MG、T98G、U251MG を使用した。すべての細胞はダルベッコ変法イーグル培地に 10%牛胎児血清、グルタミンを添加したものを用い、37℃、5% CO_2 条件下で培養した。ヒ素暴露は亜ヒ酸ナトリウムを添加した非血清添加培地を用いて行った。*CHOP* [C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) homologous protein]遺伝子プロモーターの転写活性化は Lucifelase assay を用いて測定した。ATF5、CHOP タンパク質は Western blot 法で検出した。ATF5 のノックダウンは siRNA を用いて行った。

3. 結果・考察

今回我々は *In vitro* においてATF5 がアポトーシス関連遺伝子である *CHOP* 遺伝子の転写を活性化することを見出した。この活性化には細胞種特異性が見られ、調べた 6 種類の細胞株のうち HepG2 細胞でのみ ATF5 による *CHOP* 遺伝子プロモーターの活性化が確認された。さらに *CHOP* 遺伝子プロモーターの Deletion mutants や point mutants を用いた Lucifelase assay の結果、*CHOP* 遺伝子プロモーターの ATF5 による活性化は AARE (amino acid response element) 1 の欠失、ヒ素暴露における活性化は AARE1,AP-1(activating protein-1)認識配列の欠失によって著しく低下した。また ATF5 をノックダウンした細胞ではヒ素暴露における CHOP タンパク質の発現誘導量もおよそ 1/2 に低下した。以上のことからヒ素暴露時に ATF5 は AARE1 を介して *CHOP* 遺伝子プロモーターの転写を活性化することが示唆された。一方で、*CHOP* 遺伝子は既に ATF4、ATF6、AP-1 などの様々な転写因子によって転写制御されることが報告されており、HepG2 細胞でのみ ATF5 による CHOP 遺伝子の転写活性化が起こることや、ヒ素暴露による CHOP 遺伝子の転写活性化が AP-1 の欠失によっても減少したこと、さらに ATF5 をノックダウンし

ても CHOP タンパク質の発現誘導量が完全には失われないことは ATF5 以外の他の転写因子が働いているためと考えられる。今後は ATF5 のノックダウンがヒ素暴露による細胞死に及ぼす影響について検討する予定である。

文献
(1) Watatani Y. et al. *Life. Sci.* 80 (2007) 879-885
(2) Watatani Y. et al. *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 2543-2553
(3) Uekusa H. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 380 (2009) 673-678

ATF5 activates the human CHOP gene promoter via AARE1 site and potentiates arsenite-induced cell death in a cell type-dependent manner

○Takashi Yamazaki, Asako Ohmi, Kenji Kato, Haruka Kurumaya, Abe Takanori, Hiroyuki Yamamoto, Noriko Nakanishi, Ryuichi Okuyama, Toshikazu Kaise, Shigeru Takahashi, and Yuji Takahashi
Tokyo University of Pharmacy and Life Science

ATF (activating transcription factor) 5 is a member of CREB (cAMP response element binding protein)/ATF family of transcription factors. We have shown that ATF5 is a stress response transcription factor that responds to amino acid limitation, arsenite exposure, or cadmium exposure. In the current study, using a transient transfection system to express ATF5.We have shown that ATF5 activates the *CHOP* [C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) homologous protein] gene which is involved in stress-mediated apoptosis in human hepatoma, HepG2 cells. This activation was not seen in other type of cells whereas ATF4 activates the *CHOP* promoter in both HepG2 and HeLaS3 cells. Both promoter-deletion analysis and point mutations of stress response elements including AARE (amino acid response element) 1, AARE2, or AP-1 (activating protein-1) sites revealed that AARE1 is responsible for ATF5-dependent promoter activation. Furthermore, although the existence of either AARE1 or AP-1 is sufficient for transcriptional activation of CHOP promoter by arsenite exposure, a complete induction requires the existence of both elements. Knock-down of ATF5 reduced arsenite-induced CHOP protein expression, and arsenite-induced cell death. These results suggest that beside AP-1 site, AARE1 site is important for arsenate-induced CHOP promoter activation and ATF5 raises the arsenite-induced *CHOP* gene expression via AARE1 site in HepG2 cells. Altogether, these results suggest that *CHOP* gene is a potential target for ATF5.

２－１０

発癌に関与するジメチルヒ素の赤血球内動態

○下田康代[1)]、山中健三[1)]、加藤孝一[1)]、圓藤陽子[2)]、圓藤吟史[3)]
[1)]日本大学薬学部、[2)]東京労災病院産業中毒センター、
[3)]大阪市立大学大学院医学研究科

1. はじめに

演者らはこれまで、酸素分子と反応してヒ素フリーラジカルを生ずるジメチルアルシンがヒ素発癌の究極活性体の一つとなり得るとともに、このジメチルアルシンはグルタチオンリダクターゼによる3価ジメチルヒ素(DMA^{III})の二電子還元により生体内生成する可能性も指摘してきた。今回、ジメチルアルシンの生体内生成の可能性をさらに明らかにするため、ジメチルアルシン酸(DMA^{V})を曝露した赤血球のin vitro実験系におけるジメチルアルシン生成の可能性を検討した。また、赤血球内生成したジメチルアルシンの赤血球内動態を明らかにするため、特にヘモグロビン(Hb)との相互作用について分光学的検討を加えた。

2. 方 法

実験 1. 赤血球内におけるジメチルアルシンの生成: (1) リン酸の代替としてDMA^{V}(最終濃度10mM)を用いてKrebs-Ringer緩衝液(pH 7.4)を作製した。緬羊新鮮血から単離した赤血球をKrebs-Ringer-10mM ジメチルアルシン酸緩衝液（pH 7.4）中、アルゴン気流下、37℃でincubationした。反応容器中のアルゴンを2mM $KMnO_4$溶液に通ずることで、生成したガス状物質を酸化的に捕集した。このヒ素化合物の確認同定および捕集された総ヒ素の定量にはHPLC-ICP-MSおよびICP-MSを用いた。一方、実験に供した赤血球の溶血率を把握するため、経時的にヘマトクリット値を測定した。(2)合成したジメチルヒ素-グルタチオン抱合体（$(CH_3)_2$As-SG）およびdeoxy-Hbを1:1のモル比（12.5mM）で反応させ、遊離した還元型グルタチオンをHPLC-ECD（Coulochem）で測定することで、化学反応論的考察を加えた。

実験 2. 赤血球Hbとジメチルアルシンの結合

緬羊保存血とSigmacell type 50-α-セルロースを等量混合し、Krebs-Ringer phosphate buffer（KRP）で膨潤させたカラムを用いて赤血球を単離した。この単離赤血球に脱気下でジメチルアルシンおよび近縁のトリメチルアルシン、DMA^{III}としてヨウ化ジメチルアルシンを作用させ、赤血球in situでHbの吸収スペクトルを測定した。また、Hb内Feイオンの原子価数を把握するため、ESRによりそのスピン状態を決定した。

3. 結 果

実験 1. DMA^{V}を含むKrebs-Ringer溶液(pH 7.4)を用いて赤血球を37℃でincubationし、発生したガス状ヒ素化合物を酸化的に捕集した後、HPLC-ICP-MS法により分析した結果、DMA^{V}と同定された。さらに、総ヒ素量を測定した結果、DMA^{V}からジメチルアルシンへは0.001%程度の変換率であった。また、赤血球をDMA^{V}とともに37℃で2時間incubationしても溶血はほとんど起きなかった。これらのことから、わずかではあるが赤血球内に取り込まれたDMA^{V}は一部還元されジメチルアルシンとして細胞外排泄されることが推定された。

赤血球内でDMA^{V}からジメチルアルシンへの変換に関して検討するため、DMA^{III}とHbとの相互作用によるジメチルアルシン生成の可能性、具体的には、$(CH_3)_2$As-SGとdeoxy-Hbの反応によるアルシン生成に関して、$(CH_3)_2$As-SGに由来するGSHまたはGSSG生成について検討

した。これらの生成機構に関しては以下に示す二つの反応機構が考えられる。

$$2(CH_3)_2As\text{-}SG \xrightarrow{e^-} 2(CH_3)_2As^- + 2GS\bullet\ (GSSG) \qquad (1)$$
$$(CH_3)_2As\text{-}SG \longrightarrow (CH_3)_2As\bullet + GS^-\ (GSH) \qquad (2)$$

実際には、HPLC-ECD法によりグルタチオンを測定した結果、還元型グルタチオンの生成増加が認められ、酸化型グルタチオンの生成はみられなかった。このことは、赤血球内においてもDMA^Vから生成することが容易に推定される$(CH_3)_2As$-SGはヘムFe^{II}により還元され$(CH_3)_2As\bullet$に変換されるものと推定されるが（Formula (2)）、このジメチルヒ素ラジカルの一部はH^+の引き抜き反応によりジメチルアルシンに変換されるものと思われる。
実験 2. ジメチルアルシン、トリメチルアルシンは脱気下で赤血球deoxy-Hbに対して振動構造に変化を及ぼさない緩やかな結合で錯体形成することが分光スペクトル解析から推定された。これに酸素を導入した場合、アルシンは速やかに解離し、oxy-Hbに変換された。一方で、DMA^{III}は脱気下では赤血球deoxy-Hbに結合せず、oxy-Hbをmet-Hbに酸化変換した。

4. 考 察

赤血球にわずかに取り込まれたDMA^Vは$(CH_3)_2As$-SGの生成を介して非酵素的にジメチルアルシンへ一部代謝変換されることが示唆された。さらに生成したジメチルアルシンはHbとmildな錯体構造を形成することから、赤血球に取り込まれたジメチルヒ素化合物は細胞内でジメチルアルシンへ代謝変換され、deoxy-Hbに結合することで各臓器組織に輸送されることが推察された。

Physico-chemical dynamics of dimethylated arsenics in red blood cells

[1)]Yasuyo Shimoda, [1)]Kenzo Yamanaka, [1)]Koichi Kato, [2)]Yoko Endo, [3)]Ginji Endo
[1)]Nihon University College of Pharmacy, Chiba Japan
[2)]Research Center for Occupational Poisoning, Tokyo Rosai Hospital, Tokyo Japan
[3)]Graduate School Of medicine, Osaka City University, Osaka Japan

We have proposed that dimethylarsine, which forms by two-electron reduction of trivalent dimethylated arsenic, may be a possible ultimate substance in arsenic-induced carcinogenesis. The purpose of the present study is to further elucidate in vivo formation of dimethylarsine from the reduction of dimethylarsinic acid and its dynamics. We focused our attention on the physico-chemical dynamics of dimethylated arsenic in red blood cells. Only the small amounts of dimethylarsinic acid which becomes incorporated into red blood cells changes into dimethylarsine via the production of $(CH_3)_2$As-SG and the arsine complexes hemoglobin more mildly without change of its vibrational mode. We propose a hypothesis that red blood cells act as a carrier molecule of dimethylarsine which would be unstable and carcinogenic.

２－１１

無機ヒ素のメチル化と酸化的DNA損傷に対するブロッコリースプラウトの効果について

○鶴見麻依[1)]，岩立有加[1)]，寺中彩葉[1)]，鳥居佳介[1)]，内村彩子[1)]，高野（宮本）清子[1)]，中野（青木）瑞穂[1)]，伊藤俊弘[2)]，吉田貴彦[2)]，山内博[1)]
[1)] 北里大学大学院医療系研究科・環境医科学群．[2)] 旭川医大・健康科学

目的

現在、アジアと中南米を中心に自然由来の無機ヒ素による井戸水汚染（約0.2－1ppm）により大規模な慢性ヒ素中毒が発生している。しかし、慢性ヒ素中毒に対する有効な治療法は確立されていない。無機ヒ素のメチル化に還元型グルタチオン(GSH)の必須性は知られており、ブロッコリースプラウト(BS)に多く含まれるスルフォラファン(SF)は、GSHの生成を促進するとされている。本研究では、実験動物にSFを事前に自由摂取させ、無機ヒ素のメチル化と酸化的DNA損傷に対する影響を検討した。

方法

実験動物は雄のシリアン・ゴールデン・ハムスター（8週齢）を1群5匹とした。実験群はSF＋三酸化ヒ素と三酸化ヒ素のみ（非SF群）の2群とした。実験群にはオリエンタル社製固形飼料にBS 0.5%を添加した。餌からのSFの推定摂取量はハムスター1匹あたり135 ± 57 μg/dayであった。三酸化ヒ素は両群共に7.5 mg(as As)/kgを一回経口投与した。動物は代謝ケージで飼育し、1日毎に採尿した。尿中ヒ素の化学形態別の分析は、無処理にて超低温捕集－還元気化－原子吸光法で3種類のヒ素（無機ヒ素, iAs; モノメチル化ヒ素, MMA; ジメチル化ヒ素, DMA）を測定した。血中GSH濃度はTietze法で測定した。肝臓と尿中8-ヒドロキシ - デオキシグアノシン(8-OHdG)濃度はHPLC-ECD法で測定した。尿中ヒ素濃度と尿中8-OHdG濃度は尿中クレアチニン濃度で補正した。測定値の統計解析はSPSS Ver15Jで行った。

結果と考察

SF含有固形飼料を7日間連続的に摂取したハムスターの血中GSH濃度は、摂取前と比較して約8%の上昇を示した。三酸化ヒ素一回経口投与後の尿中総ヒ素濃度(IMD: iAs+MMA+DMA)を図1に示した。尿中ヒ素は両群共通してiAs、MMA、DMAの3種類が検出された。三酸化ヒ素投与後1日目の尿中総ヒ素濃度は、SF群が非SF群に比較して約1.5倍の高値を示した。また、三酸化ヒ素の尿中への最終代謝物であるDMAはSF群が非SF群に比較して約2倍の高値を示した。肝臓と尿中の8-OHdG濃度を図2と3に示した。両群における三酸化ヒ素投与後の肝臓と尿中の8-OHdG濃度は、共通して上昇する傾向が観察された。これに対して、投与後10日目の肝臓と尿中の8-OHdG濃度は抑制を示唆する結果を示した。

本研究から、SFを投与したハムスターにおいて、無機ヒ素のメチル化の促進効果が認められた。一方、SFを投与したハムスターの肝臓と尿中の8-OHdG濃度から、SFによる酸化的DNA損傷の抑制効果は、三酸化ヒ素投与後の短時間では認められず、1週間程度の時間が経過した段階で示唆された。

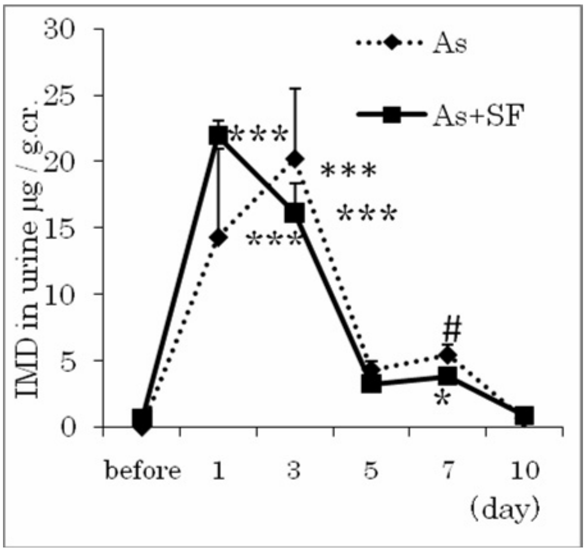


図１　三酸化ヒ素一回経口投与後の尿中IMDの経時的変化
ヒ素投与前との比較：*，p ＜ 0.05；***，p ＜ 0.001
SF群と非SF群の比較：#，p ＜ 0.05

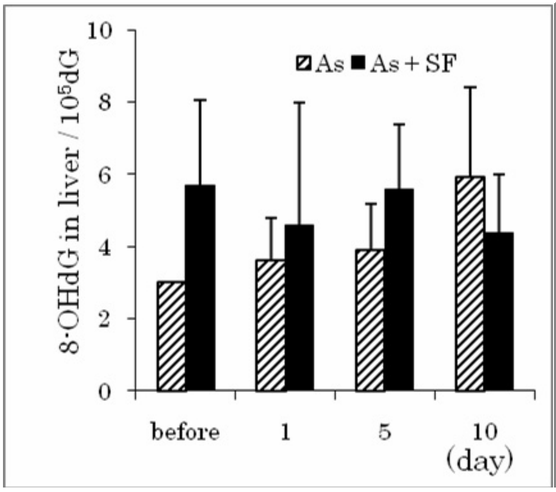


図２　三酸化ヒ素一回経口投与による
肝臓中 8-OHdG 濃度の経時変化

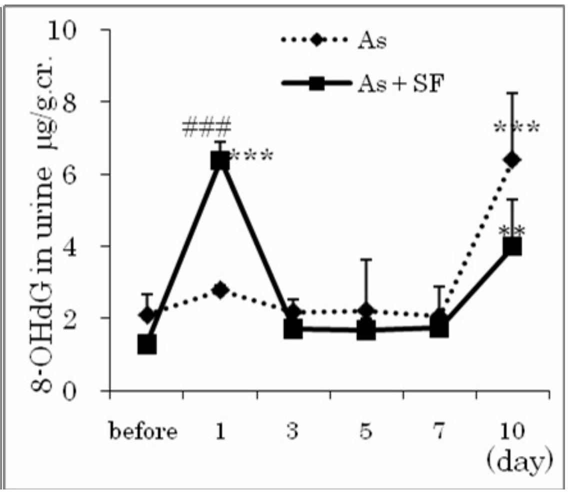


図３　三酸化ヒ素一回経口投与による
尿中 8-OHdG 濃度の経時変化
ヒ素投与前との比較：**，ｐ ＜ 0.01；
***，ｐ ＜ 0.001
SF 群と非 SF 群の比較：###，ｐ ＜ 0.001

Effect of broccoli sprouts on methylation of inorganic arsenic and oxidative DNA damage

○Mai Tsurumi[1],Yuka Iwatatsu[1],Iroha Teranaka[1],Keisuke Torii[1],Ayako Uchimura[1],Sayako Kohno-Miyamoto[1] ,Mizuho Nakano-Aoki[1] ,Toshihiro Itoh[2] ,Takahiko Yoshida[2] ,Hiroshi Yamauchi[1]
[1] Department of Public Health, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University
[2] Department of Health Science, Asahikawa Medical College

In this study, sulforaphane (SF) was administered to hamsters to examine its effects on methylation of inorganic arsenic and oxidative DNA damage. SF from broccoli sprouts (BS) was added to the chow at a dose of 0.5% (w:w). Two groups of animals were included in the study: the SF + arsenic trioxide group (SF group) and the arsenic trioxide group (non-SF group). The estimated amount of SF taken from the feed by the hamsters was 135 ± 57 μg/day. Oral administration of arsenic trioxide was performed once at a dose of 7.5 mg/kg. Since reduced glutathione (GSH) is necessary for the methylation of inorganic arsenic, we measured the GSH in the blood. The blood concentration of GSH increased by approximately 8%, after the 7-day ingestion of the solid feed, compared with that prior to the intake. The total arsenic concentration in urine measured on the first day of the arsenic trioxide administration in the SF group was approximately 1.5 times higher than that of the non-SF group. In a related examination performed using dimethyl arsenic, the ultimate metabolite of arsenic trioxide in urine, it was revealed that the concentration of dimethyl arsenic in the SF group was approximately 2 times higher than that in the non-SF group. The concentration of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) in the liver and urine after administration of arsenic trioxide tended to increase in both groups. However, it was confirmed on the 10th day after the administration that the increase of 8-OHdG in the liver and urine was inhibited in the SF group. Based on these results, it was confirmed that SF would accelerate the methylation of inorganic arsenic in hamsters. On the other hand, based on the data of the 8-OHdG concentration in the liver and urine of hamsters with SF intake, there was no decrease in oxidative DNA damage during the short duration of arsenic trioxide administration, but the effect was observed approximately 1 week after administration.

MEMO

Clearly Better ICP-MS

Agilent 7700 シリーズ ICP-MS 登場

20 年以上にわたる ICP-MS の進化の過程で、アジレントは常に技術開発の牽引者として、多くの重要な技術革新をもたらしてきました。

Agilent 7700 シリーズは、先進の ICP-MS テクノロジーを集約し、より高いレベルのパフォーマンスを実現しています。世界中の多くのお客様にご使用いただいてきた ICP-MS、7500 シリーズのすべての機能を向上させた 7700 シリーズは、生産性、操作性、感度など、あらゆる面でご期待を上回る性能をお届けします。

7700x の特長：

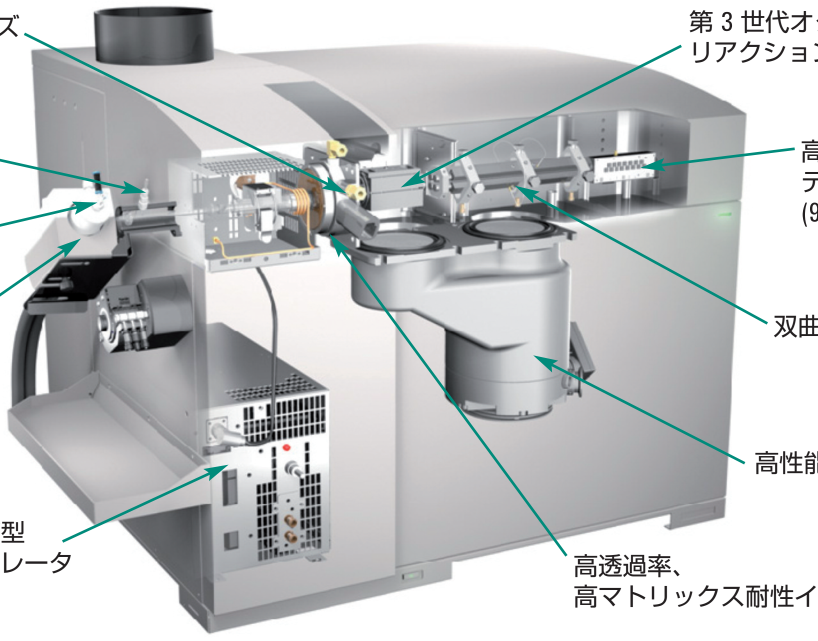
- 新開発の周波数マッチング型 RF ジェネレータにより、揮発性の高い有機溶媒にも対応
- 高マトリックス導入 (HMI) 機能を標準装備
- デザインを一新したイオンレンズにより、バックグラウンドノイズを低減し、感度を向上
- 第 3 世代のオクタポールリアクションシステム (ORS^3) により、ヘリウム (He) コリジョンモードの性能が大幅に向上
- 9 桁のダイナミックレンジ
- 新 Agilent MassHunter ソフトウェアにより、データ解析が、簡単、便利に
- 7500 シリーズに比べて 30 % 小型化し、重量はわずか 115 kg

革新的な技術を搭載した 7700x は、従来の ICP-MS の課題を克服しました。

1) 高マトリックスサンプルに対する耐性
   - HMI を搭載した 7700x なら、希釈や ICP-OES が必要とされていた高い濃度のマトリックスにも対応します。
2) ダイナミックレンジ
   - 9 桁にわたるワイドなダイナミックレンジを備えた 7700x なら、1 回の測定でサブ ppt から 500 ppm 以上にまで対応できます。
3) 複雑なマトリックスにおける多原子イオン干渉
   - ORS^3 の He モードにより、多原子イオン干渉を効果的に除去します。不活性な He をセルガスとして利用できることで操作が簡略化され、分析の信頼性も大幅に向上します。

7700x は、ICP-MS の新たな扉を開きます。メソッド開発やルーチン操作を簡素化しながら、幅広い濃度やサンプルマトリックスタイプに対しても、より正確な分析結果を提供します。もちろん、高度な研究開発用途に求められる性能とフレキシビリティも有しています。

7700 シリーズ ICP-MS の詳細については、アジレントのホームページをご覧ください。www.agilent.com/chem/icpms:jp



アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2009

July 14 2009
5990-4302JAJP

Agilent Technologies

第15回ヒ素シンポジウム実行委員

大会長　鰐渕 英機　大阪市立大学大学院医学研究科・教授

プログラム委員

圓藤 吟史（大阪市立大学大学院医学研究科産業医学・教授）
鰐渕 英機（大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学・教授）
魏　　民（大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学・講師）

事務局
〒545-8585　大阪市阿倍野区旭町1-4-3
大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学内
TEL：06-6645-3736～7　FAX：06-6646-3093
井浦 arsenic2009@med.osaka-cu.ac.jp　鰐渕 wani@med.osaka-cu.ac.jp