

第 17 回ヒ素シンポジウム

主催 : 日本ヒ素研究会
開催日 : 2011 年 11 月 19 日 (土)・20 日 (日)
会場 : つくば国際会議場 (茨城県つくば市竹園 2 丁目 2 0-3)

特別講演 1 : Barry P. Rosen (Florida International University)
“The arsenic biogeochemical cycle: pathways of metalloid transport,
metabolism and detoxification.”

特別講演 2 : 柴田康行 (国立環境研究所 環境計測研究センター)
“ヒ素化合物の環境動態”

基調講演: 戸田 英作 (環境省 総合環境政策局 環境保健部)
石井 一弘 (筑波大学 医学医療系)
岩崎 信明 (茨城県立医療大学 医科学センター)
“神栖市におけるジフェニルアルシン酸にかかる汚染とその健康影響”

シンポジウム日程

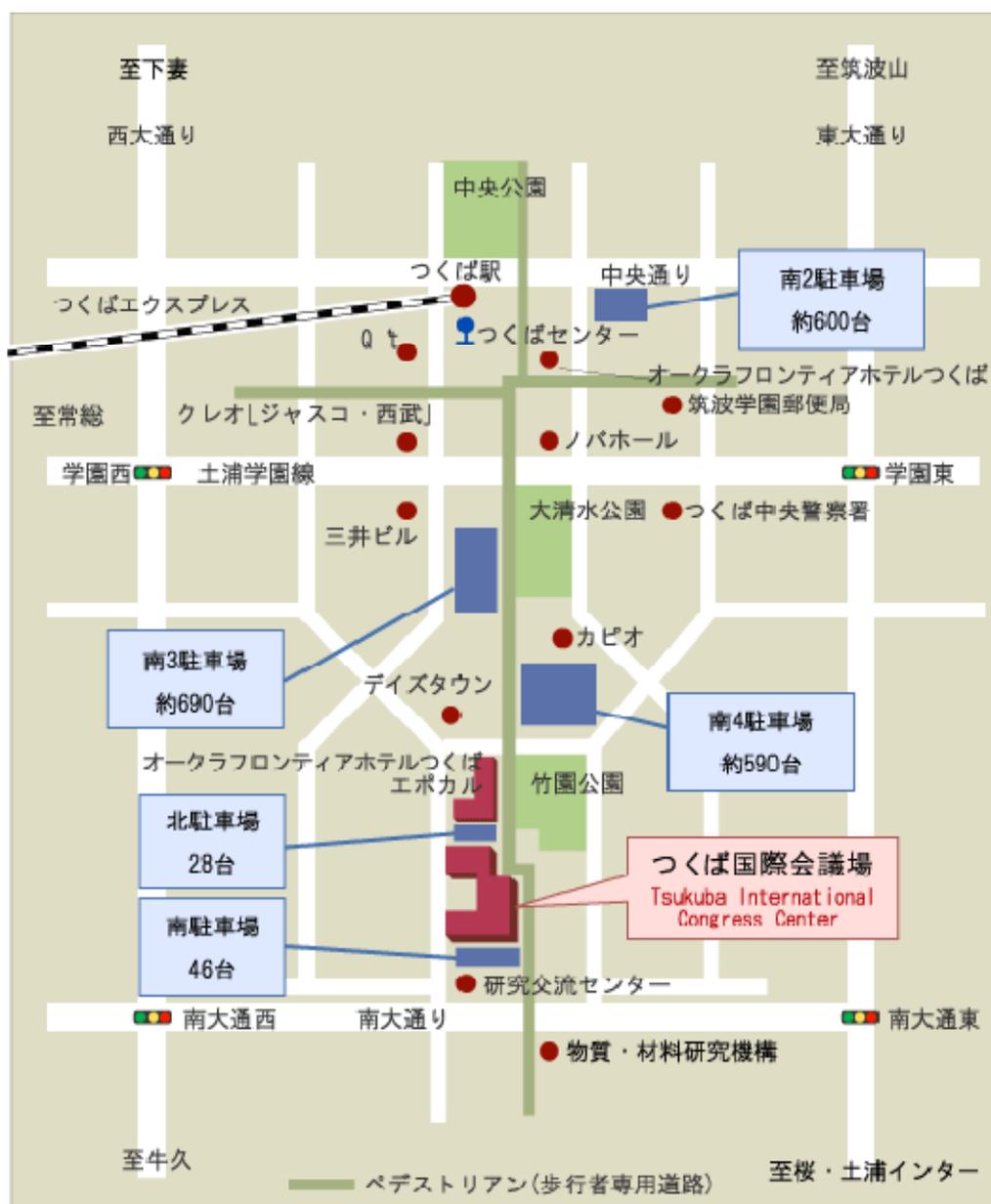
11 月 19 日 (第 1 日目)

12 : 50 ~ 12 : 55	開会の辞
12 : 55 ~ 18 : 40	シンポジウム
18 : 45 ~	懇親会 (エスポアール 同会場 1F)

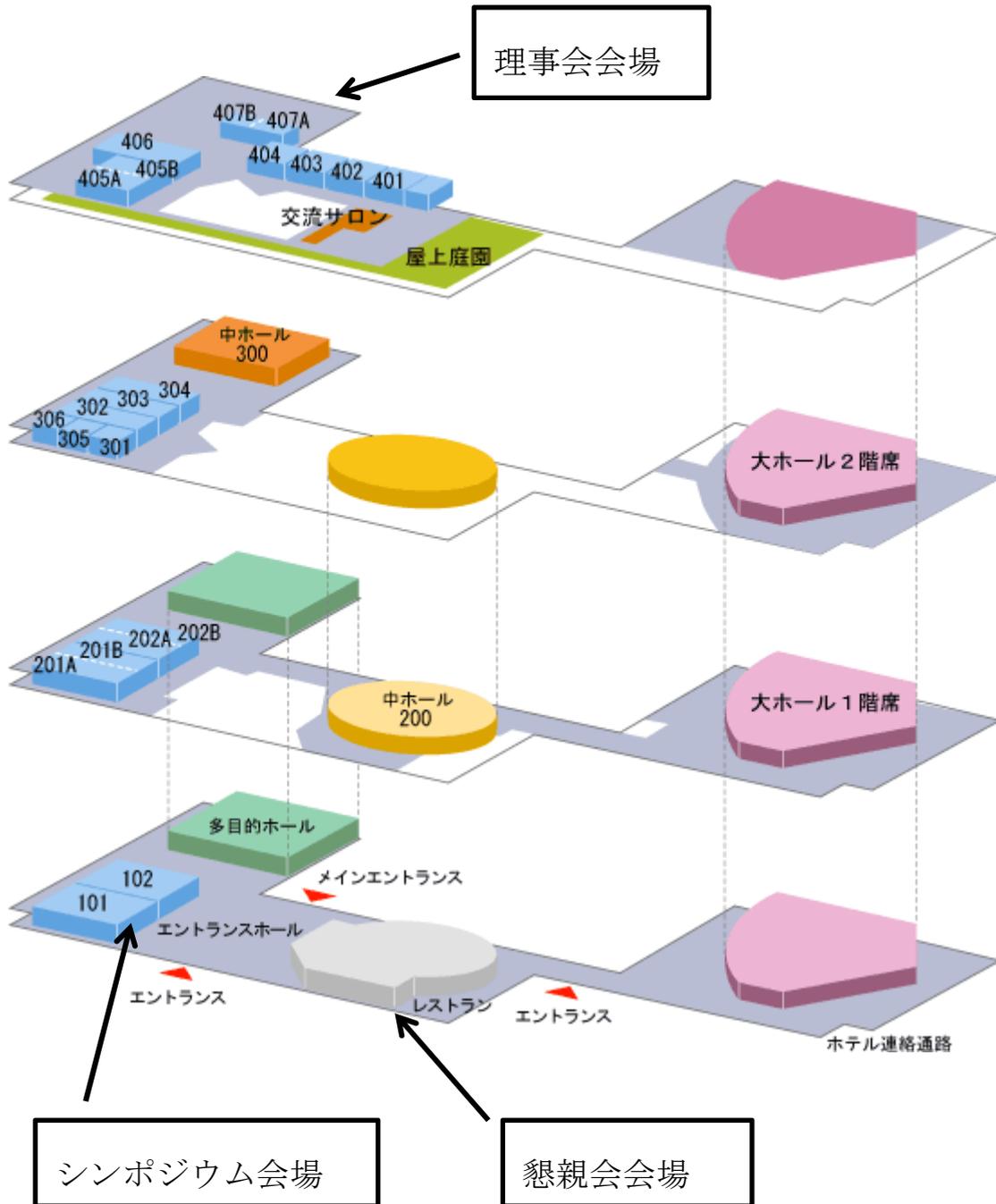
11 月 20 日 (第 2 日目)

9 : 00 ~ 11 : 30	シンポジウム
11 : 30 ~ 12 : 00	総会 閉会の辞

会場周辺案内図



会場案内図



ごあいさつ

この度、つくば国際会議場におきまして第17回ヒ素シンポジウムを開催できるはこびとなりました。ヒ素研究会会員の皆様をはじめとして、関係各位のご協力を賜りましたこと、ここに深く御礼申し上げます。前回の第16回ヒ素シンポジウムは、旭川医科大学の吉田貴彦教授を大会長として、今年の2月5日と6日に北海道の旭川において開催されました。その、約一か月後の3月11日に東日本大震災が起これ、東北地方を中心に多くの方が被災されました。つくば市にもまだ震災当時の爪痕が一部残ってはいますが、大きな被害は免れたため、今回のシンポジウムの開催場所であるつくば国際会議場も、震災後しばらくは被災された方の避難所として使われておりました。学会開催のラッシュとなる三月の末に予定されていた幾つもの学術集会在終止を余儀なくされるなか、第17回ヒ素シンポジウムのつくば開催に当たっての不安も完全には払拭できませんでした。その様な状況下でシンポジウム開催に向けて準備を始めましたが、多くの方から励ましの言葉をかけてもらいましたことは、まだ記憶に新しいところです。

第17回ヒ素シンポジウムでは、ヒ素の研究で名高い国内外のお二方の先生に特別講演をお願いしております。Prof. Bary P. Rosen は、細胞内へのヒ素の取込みや排泄に関するトランスポーターの研究で画期的な研究を進めてきておられます。柴田康行博士は、環境や生物試料における様々なヒ素化合物の分析や環境動態の研究で数々の研究成果をあげられてきておられます。また、今回は茨城県開催ということもあり、本シンポジウムでも度々取り上げられてきた茨城県神栖市におけるジフェニルアルシン酸による環境汚染と健康影響に関して、環境省や、実際住民の診断に当たってこられた先生方による基調講演をお願いしてあります。一般演題と合わせまして、ジフェニルアルシン酸の環境問題とその影響に関してますます理解が深まりますことを期待しております。

開催期間は、秋も深まり紅葉もきれいな頃合いになるかと思えます。会場近くには、筑波山、霞ヶ浦などの景勝地も点在しております。また、つくばエキスプレス周辺には新しい街づくりが行われており若い方にも人気があります。お時間のゆるす限り、自然観察やショッピングなどもお楽しみになり、つくばの地で楽しくお過ごしください。

平成23年10月吉日

第17回ヒ素シンポジウム大会長 平野靖史郎

◆ 理事会 ◆ 10:45-12:30 つくば国際会議場 407 室 (関係者のみ)

1 日目 11 月 19 日 (土) プ ロ グ ラ ム

12 : 50-12 : 55 開会の挨拶

平野靖史郎 (独立行政法人 国立環境研究所)

【一般演題 (発表 10 分、質疑応答 約 3 分)】

12 : 55-13 : 35 座長 : 熊谷 嘉人 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)

I-1 ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング

角大悟、 福島佳代、 宮高透喜、 姫野誠一郎

徳島文理大学薬学部衛生化学研究室

I-2 酸化チタンとビタミン B₁₂ を用いたバイオインスパイアード触媒による無機ヒ素の無毒化

中村浩一郎

日本板硝子株式会社研究開発部

I-3 胎児期無機ヒ素曝露によって増加したマウス肝臓癌におけるゲノムワイドな DNA メチル化変化の解析

鈴木武博 1)、 山下聡 2)、 内匠正太 1)、 立石幸代 1)、 佐野友春 3)、 牛島俊和 2)、 野原恵子 1)

1) 国立環境研究所 環境健康研究センター

2) 国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ

3) 国立環境研究所 環境計測研究センター

13 : 35-14 : 15 座長 : 田中 昭代 (九州大学大学院 医学研究院 環境医学分野)

I-4 アクアポリン 9 はマウス初代肝細胞においてヒ素の細胞内蓄積とそれに伴う細胞毒性に関与する

新開泰弘、 角大悟、 外山喬士、 熊谷嘉人

筑波大学大学院人間総合科学研究科

プログラム

- I-5 多剤耐性タンパク MRP2 を介した細胞内ヒ素代謝・排出機構の解析
渡辺喬之 1)、小林弥生 1)2)、平野靖史郎 1)2)
1)千葉大学大学院薬学研究院薬学部
2)国立環境研究所
- I-6 ATO 治療を受けた APL 患者由来臨床検体におけるヒ素代謝産物の化学種同定
および白血病細胞分化誘導能
(Speciation of arsenic trioxide metabolites in peripheral blood and bone marrow from an acute promyelocytic leukemia patient.)
Bo Yuan¹, Noriyoshi Iriyama², Yuta Yoshino¹, Yoshihiro Hatta², Akira Horikoshi³, Yukio Hirabayashi², Shin Aizawa², Jin Takeuchi², Hiroo Toyoda¹
¹Shool of pharmacy, Tokyo University of Pharmacy & Life Sciences, ²Itabashi Hospital, ³Nerima-Hikarigaoka Hospital, School of Medicine, Nihon University

14 : 15-14 : 45 座長 : 花岡 研一 (独立行政法人 水産大学校 水産学研究所)

- I-7 ヒジキの成育過程におけるヒ素含有量の変化
片山眞之、片山洋子
大阪青山大学

- I-8 水耕栽培でのヒ素化合物添加が玄米のジメチルアルシン酸含量に及ぼす影響
荒尾知人 1)*、馬場浩司 1)、川崎晃 1)、松本真悟 2)
1) (独) 農業環境技術研究所、2) 島根大学、* (現農林水産省)

14 : 45-15 : 35 座長 : 平野 靖史郎 (独立行政法人 国立環境研究所)

◆ 特別講演 1 ◆

The arsenic biogeo-cycle: pathways of metalloids transport, metabolism and detoxification.

Barry P. Rosen

Department of Cellular Biology and Pharmacology,

Herbert Wertheim College of Medicine, Florida International University

15 : 35-15 : 50 休 憩

プログラム

15 : 50-16 : 30 座長： 鰐淵 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 都市環境病理学)

- I-9 マグロ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究
畑 明寿 1)、山中健三 2)、山野優子 3)、圓藤陽子 4)、藤谷 登 1)、圓藤吟史 5)
1)千葉科学大学 危機管理学部
2)日本大学 薬学部
3)昭和大学 医学部
4)関西労災病院産業中毒研究センター
5)大阪市立大学大学院医学研究科
- I-10 慢性ヒ素中毒の予防と改善：ヒトにおけるスルフォラファン摂取後のヒ素化合物及び必須元素の代謝と排泄について
水津珠世 1)、吉田貴彦 2)、西條泰明 2)、伊藤俊弘 2)、中木良彦 2)、杉岡良彦 2)、岡崎秀人 2)、井上葉子 1)、江尻直美 1)、小野槿子 1)、片桐裕史 1)、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) 旭川医科大学健康科学
- I-11 スポット尿中無機ヒ素代謝産物濃度の個人内・個人間変動
小栗朋子、鈴木弥生、久田文、吉永淳
東京大学大学院新領域創成科学研究科

16 : 30-17 : 10 座長： 圓藤 陽子 (関西労災病院 産業中毒研究センター)

- I-12 アンチモンのラット経口投与による経世代影響
田中昭代、平田美由紀、清原裕
九州大学大学院 医学研究院 環境医学分野
- I-13 数種の海産物に含まれる水溶性および脂溶性ヒ素化合物の検討
古田和也、筒井雄基、野田里美、町田倫子、臼井将勝、花岡研一
独立行政法人 水産大学校 水産学研究科
- I-14 クロマグロ筋肉に存在する脂溶性ヒ素化合物のマウスにおける体内動態
町田倫子、小西玄治、古田和也、臼井将勝、花岡研一
独立行政法人 水産大学校 水産学研究科

プログラム

17 : 10-17 : 50 座長 : 塩盛 弘一郎 (宮崎大学工学部物質環境化学科)

I-15 国内水田土壌からのヒ素の溶出に及ぼす微生物の影響
天知誠吾 1)、中村崇志 1)、大塚俊彦 1)、櫻井和宏 1)、木村建太 1)、
工藤桂太郎 1)、牧野知之 2)、山口紀子 2)

1)千葉大学大学院園芸学研究科応用生命化学領域

2)農業環境技術研究所

I-16 湛水期・落水期の水田土壌の気相率と溶液中ヒ素・カドミウム濃度の関係
中村乾 1)、加藤英孝 1)、鈴木克拓 2)、本間利光 3)

1) 農業環境技術研究所

2) 中央農業総合研究センター

3) 新潟県農業総合研究所

I-17 環境微生物によるヒ素の酸化・還元に及ぼす抗生物質の影響

山村茂樹、渡邊圭司、渡邊未来

国立環境研究所 地域環境研究センター

17 : 50-18 : 40 座長 : 神 和夫 (北海道立衛生研究所)

◆ 特別講演 2 ◆

ヒ素の環境循環

柴田康行

国立環境研究所 環境計測研究センター

18:45 懇親会 (エスポアール、つくば国際会議場 1 F)

2 日目 11 月 20 日 (日) プ ロ グ ラ ム

【一般演題 (発表 10 分、質疑応答 約 3 分)】

9 : 00-9 : 40 座長 : 角 大悟 (徳島文理大学薬学部衛生化学研究室)

II-1 産業廃棄物処分場建設予定地で見つかった自然由来のヒ素汚染土壌

丸茂克美、小野木有佳

産業技術総合研究所地質情報研究部門

プログラム

- II-2 インド UP 州における地下水砒素汚染機構の検討
伊藤健一 1)、矢野靖典 1)、宮武宗利 3)、塩盛弘一郎 3)、瀬崎満弘 2)、横田漠 1)
1)宮崎大学 国際連携センター
2)宮崎大学工学部土木環境工学科
3)宮崎大学工学部物質環境化学科

- II-3 組換え近交系マウスを用いたヒ素代謝感受性規定因子の探索
阿草哲郎 1)、小森浩章 2)、曾我美子 2)、能勢真人 2)、森 士朗 3)、久保田領志 4)、
田辺信介 1)、岩田久人 1)
1)愛媛大学沿岸環境科学研究センター
2)愛媛大学医学部
3)東北大学歯学部
4)国立医薬品食品衛生研究所

9 : 40-10 : 40 座長 : 吉田 貴彦 (旭川医科大学健康科学)

◆ 基調講演 ◆

神栖市におけるジフェニルアルシン酸にかかる汚染とその健康影響

戸田 英作 環境省 総合環境政策局 環境保健部

石井 一弘 筑波大学 医学医療系

岩崎 信明 茨城県立医療大学 医科学センター

10 : 40-11 : 20 座長 : 山内 博 (北里大学大学院 医療系研究科 環境医科学群)

- II-4 神栖市 A 地区・B 地区での有機ヒ素地下水質の違いと健康被害
楡井 久 1,2)、檜山知代 3,4)
1) NPO 法人日本地質汚染審査機構、2) 医療地質研究所
3) 大阪市立大学大学院理学研究科、4) (株) テクノアース

- II-5 茨城県神栖市 B 地区民家井戸の有機ヒ素地下水汚染機構
檜山知代 1,2)、楡井 久 3,4)
1)大阪市立大学大学院理学研究科、2) (株) テクノアース
3)NPO 法人日本地質汚染審査機構、4) 医療地質研究所

- II-6 ジフェニルアルシン酸のラットにおける慢性毒性および発がん性の検討
田尻正喜、魏民、山野荘太郎、鰐淵英機
大阪市立大学大学院医学研究科 都市環境病理学

プログラム

◆ 総合討論 ◆ ジフェニルアルシン酸に関する諸問題について (約 10 分)

11 : 30-12 : 00 総会 圓藤吟史 (ヒ素研究会 会長、 大阪市立大学 医学部)

特別講演

基調講演

The arsenic biogeochemical cycle: pathways of metalloid transport, metabolism and detoxification

Barry P. Rosen. Department of Cellular Biology and Pharmacology, Herbert Wertheim College of Medicine, Florida International University, Miami, FL 33134, USA, 305-348-0657, brosen@fiu.edu.

Abstract: Arsenic is widely distributed in the Earth's crust and occurs primarily in four oxidation states: arsenate [As(V)], arsenite [As(III)], elemental arsenic [As(0)], and arsenide [As(-III)]. Volcanic eruptions are a source of human exposure to arsenic. Mining, copper smelting, coal burning, and other combustion processes also bring in arsenic to our environment. Anthropogenic sources of arsenic include both inorganic and organic forms. Arsenic serves as an active ingredient in various commonly used herbicides, insecticides, rodenticides, wood-preserved, animal feeds, paints, dyes, and semiconductors. As a result of its environmental ubiquity and adverse health effects, arsenic ranks first on the Superfund List of Hazardous Chemicals <<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>>. The metalloid is a carcinogen and is considered a causative agent of a number of other diseases, including cardiovascular and neurological disorders. As a consequence of the omnipresence of arsenic, nearly every organism, from bacteria to man, has evolved detoxifying mechanisms. This presentation will focus on organisms, genes and enzymes that contribute to the arsenic biogeochemical cycle (3). Microbes play an important role in cycling arsenic between its various oxidation states (19). Inorganic arsenate entering the microbial cytosol through the phosphate transport system is reduced to arsenite, which is then extruded out of the cell, either through channels or secondary transporters. Arsenite is also generated by certain microbes that use arsenate as the terminal electron acceptor in anaerobic respiration (21). Arsenate respiring microbes can release arsenite from arsenate-rich sediments, leading to arsenic contamination of ground water (20). Arsenite-oxidizing microbes utilize the reducing power from As(III) oxidation to gain energy for cell growth (25). Microbes can also convert inorganic arsenic into gaseous methylated arsines (1, 23). Marine microorganisms convert inorganic arsenicals to various water or lipid soluble organic arsenic species, including di- and trimethylated arsenicals, arsenocholine, arsenobetaine, arsenosugars, and arsenolipids. Arsenobetaine and methylated arsenicals can be degraded to inorganic arsenic by microbial metabolism, completing the arsenic cycle in marine (5) and soil ecosystems (29).

Introduction, Results and Discussion: Two major pathways of $\text{As}(\text{OH})_3$ (the solution form of $\text{As}(\text{III})$) uptake have been identified: aquaglyceroporin channels and glucose permeases. We first identified aquaglyceroporins, channels that transport water and uncharged organic solutes such as glycerol and urea as transporters for $\text{As}(\text{OH})_3$ and $\text{Sb}(\text{OH})_3$ (24). Aquaglyceroporins are found in nearly every organism (2), and they are responsible for metalloid conduction, not only of arsenic and antimony, but also boron (27) and silicon (14), which are especially important for plants, and probably germanium (13). Surprisingly, glucose permeases from yeast, rat and humans efficiently transport arsenite (10, 12). Arsenite efflux has been best characterized in bacteria and yeast, where two unrelated extrusion systems have been identified, the ArsAB pump and Acr3 permease (7). Recently homologues of the bacterial ArsB (15) and Acr3 (9) arsenic efflux proteins have been identified in plants as well.

Arsenic methylation is catalyzed by an enzyme that transfers methyl groups from S-adenosylmethionine to trivalent arsenite in a series of oxidative methylations and reductions three pentavalent species, $\text{MAs}(\text{V})$, $\text{DMAs}(\text{V})$ and $\text{TMA}(\text{V})\text{O}$. These are reduced to $\text{MAs}(\text{III})$, $\text{DMAs}(\text{III})$ and the gaseous final product $\text{TMA}(\text{III})$. The enzyme AS3MT was first identified in mammals (11). Liver methylates arsenic primarily to $\text{DMAs}(\text{V})$ and to a lesser extent $\text{MAs}(\text{V})$. These methylated species are excreted in urine, so this is probably for detoxification, although the transiently formed trivalent species $\text{MAs}(\text{III})$ and $\text{DMAs}(\text{III})$ may increase the carcinogenicity of dietary arsenic (26). Many microbes, including bacteria, archaea, fungi and algae, have genes encoding AS3MT homologues. In microbes these have been termed ArsM enzymes. We isolated an *arsM* gene from the photosynthetic soil bacterium *Rhodospseudomonas palustris* (23). The occurrence of *arsM* genes appears to be widespread in photosynthetic microbes (28). The *arsM* gene was expressed in an arsenic hypersensitive strain of *Escherichia coli*. Heterologous expression of RpArsM conferred arsenic resistance to *E. coli*, demonstrating that ArsM is sufficient to detoxify arsenic. The cells methylated $\text{As}(\text{III})$ primarily to $\text{DMA}(\text{V})$, but other methylated species were formed, including $\text{TMA}(\text{III})$ gas. Higher plants do not have *arsM* genes, so the *RparsM* gene was expressed in *Japonica* rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Nipponbare, and the transgenic rice produced methylated arsenic species, including some $\text{TMA}(\text{III})$ gas (17). The demonstration of biotransformation of arsenic in transgenic rice is an important step in the creation of safer rice for the human food supply. Lower plants such as algae have *arsM* genes. The *arsM* gene was cloned from the thermophilic eukaryotic alga *Cyanidioschyzon merolae*, which forms the major biomass in arsenic-rich hot springs in Yellowstone National Park (22), where $\text{TMA}(\text{III})$ gas is generated (18). This

gene also conferred arsenic resistance in the hypersensitive *E. coli* strain. The purified CmArsM enzyme is very active at 50-70 °C and produces volatile TMAs(III) (30). These studies illustrate the importance of microbes to the biogeochemical cycling of arsenic in geothermal systems. The pathway of methylation is not certain. One hypothesis proposed by Challenger (4) is that the enzyme catalyzes a series of alternating oxidative methylations and reductions, using S-adenosylmethionine (SAM) as the methyl donor to produce the pentavalent species methylarsenate (MAs(V), dimethylarsenate (DMAs(V)) and trimethylarsine oxide (TMAsO(V)), and the trivalent species MAs(III), DMAs(III) and TMAs(III). More recently Hayakawa and coworkers (8) proposed an alternate pathway in which the preferred substrates of the methyltransferase are the glutathione (GSH) conjugates As(GS)₃ and MAs(GS)₂. This pathway also involves a series of sequential oxidations and reductions, but SAM is oxidized to S-adenosylhomocysteine (SAH), and GSH is oxidized to GSSG rather than changes in the oxidation state of arsenic, which remains trivalent throughout the catalytic cycle. To differentiate between these two hypotheses, we analyzed the enzymatic properties of CmArsM. All As(III) SAM methyltransferases identified to date have three conserved cysteines, which are residues 72, 174 and 224 in CmArsM. Alanine substitutions of any of the three led to loss of As(III) methylation. In contrast, a C72A mutant still methylated trivalent methylarsenite (MAs(III)). A single tryptophan derivative, T70W, reported binding of As(III) or MAs(III) with quenching of protein fluorescence. As(GS)₃ and MAs(GS)₂ bound much faster than the free metalloids. The data support that hypothesis that the glutathionylated arsenicals are preferred substrates for the enzyme (8). Moreover, the data indicate that all three cysteines are involved in As(III) methylation but that only Cys174 and Cys224 are necessary for MAs(III) methylation. We propose that, following the first round of methylation, the product, MAs(III), has higher affinity for Cys174 and Cys224 than the initial substrate, As(III) and so remains bound the enzyme. This facilitates the second round of methylation to DMAs(III) and indicates that arsenic remains trivalent during the catalytic cycle. CmArsM has been crystallized (16), and the structure solved. The relationship of the As(III) and SAM binding sites are consistent with our model for catalysis.

Methylated arsenicals are not only produced by many organisms but are also used as pesticides and herbicides for weed control, especially for cotton, ornamental plants, lawns and golf course turf. Annually approximately 1.4M kg of MAs(V) is applied commercially in the USA. Much of the MAs(V) is demethylated to more toxic and carcinogenic As(III) (6). Recently we showed that demethylation of MAs(V) is the result of microbial activity (29). No single microorganism isolated from golf course soils was

capable of demethylating MAs(V). We identified a *Burkholderia* species capable of reducing MAs(V) to MAs(III) and a *Streptomyces* species that could demethylate MAs(III) to As(III). In mixed culture the two bacteria demethylate MAs(V) to As(III), a novel pathway for demethylation of an organic arsenical utilizing a communal sequential reduction and demethylation reactions catalyzed by different soil microorganisms.

Conclusions. The activity of environmental microbes strongly affects the geocycling of arsenic, in particular microbial uptake and efflux, oxidation and reduction, methylation and demethylation. These biological processes shape the solubility, mobilization and volatility of arsenic and other metalloids. (*Supported by NIH grant R37 GM55425*).

References:

1. **Bentley, R., and T. G. Chasteen.** 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:250-71.
2. **Bhattacharjee, H., R. Mukhopadhyay, S. Thiyagarajan, and B. P. Rosen.** 2008. Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids. *J Biol* **7**:33.
3. **Bhattacharjee, H., and B. P. Rosen.** 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes, p. 371-406. *In* D. H. S. Nies, Simon (ed.), *Molecular microbiology of heavy metals*, vol. 6. Springer-Verlag, Heidelberg/New York.
4. **Challenger, F.** 1951. Biological methylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **12**:429-91.
5. **Dembitsky, V. M., and D. O. Levitsky.** 2004. Arsenolipids. *Prog Lipid Res* **43**:403-48.
6. **Feng, M., J. E. Schrlau, R. Snyder, G. H. Snyder, M. Chen, J. L. Cisar, and Y. Cai.** 2005. Arsenic transport and transformation associated with MSMA application on a golf course green. *J Agric Food Chem* **53**:3556-62.
7. **Fu, H., X. Jiang, and B. P. Rosen.** 2011. Metalliod Transport Systems, p. 181-207. *In* H. Sun (ed.), *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, NJ.
8. **Hayakawa, T., Y. Kobayashi, X. Cui, and S. Hirano.** 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* **79**:183-91.

9. **Indriolo, E., G. Na, D. Ellis, D. E. Salt, and J. A. Banks.** 2010. A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell* **22**:2045-57.
10. **Jiang, X., J. R. McDermott, A. Abdul Ajees, B. P. Rosen, and Z. Liu.** 2010. Trivalent arsenicals and glucose use different translocation pathways in mammalian GLUT1. *Metallomics* **2**:211-219.
11. **Lin, S., Q. Shi, F. B. Nix, M. Styblo, M. A. Beck, K. M. Herbin-Davis, L. L. Hall, J. B. Simeonsson, and D. J. Thomas.** 2002. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem* **277**:10795-803.
12. **Liu, Z., E. Boles, and B. P. Rosen.** 2004. Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:17312-17318.
13. **Ma, J. F., K. Tamai, M. Ichii, and G. F. Wu.** 2002. A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiol* **130**:2111-7.
14. **Ma, J. F., K. Tamai, N. Yamaji, N. Mitani, S. Konishi, M. Katsuhara, M. Ishiguro, Y. Murata, and M. Yano.** 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* **440**:688-91.
15. **Ma, J. F., N. Yamaji, N. Mitani, X. Y. Xu, Y. H. Su, S. P. McGrath, and F. J. Zhao.** 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:9931-5.
16. **Marapakala, K., A. A. Ajees, J. Qin, B. Sankaran, and B. P. Rosen.** 2010. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the ArsM arsenic(III) S-adenosylmethionine methyltransferase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **66**:1050-2.
17. **Meng, X. Y., J. Qin, L. H. Wang, G. I. Duan, G. X. Sun, H. L. Wu, C. C. Chu, H. Q. Ling, B. P. Rosen, and Y. G. Zhu.** 2011. Arsenic biotransformation and volatilization in transgenic rice. *Proc Nat. Acad Sci USA* **submitted**.
18. **Meng, X. Y., J. Qin, L. H. Wang, G. L. Duan, G. X. Sun, H. L. Wu, C. C. Chu, H. Q. Ling, B. P. Rosen, and Y. G. Zhu.** 2011. Arsenic biotransformation and volatilization in transgenic rice. *New Phytol* **191**:49-56.
19. **Mukhopadhyay, R., B. P. Rosen, T. Phung le, and S. Silver.** 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* **26**:311-25.
20. **Oremland, R. S., and J. F. Stolz.** 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol* **13**:45-9.
21. **Oremland, R. S., and J. F. Stolz.** 2003. The ecology of arsenic. *Science* **300**:939-44.
22. **Qin, J., C. R. Lehr, C. Yuan, X. C. Le, T. R. McDermott, and B. P. Rosen.** 2009. Biotransformation of arsenic by a Yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:5213-7.

23. **Qin, J., B. P. Rosen, Y. Zhang, G. Wang, S. Franke, and C. Rensing.** 2006. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2075-80.
24. **Sanders, O. I., C. Rensing, M. Kuroda, B. Mitra, and B. P. Rosen.** 1997. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:3365-7.
25. **Stolz, J. F., P. Basu, J. M. Santini, and R. S. Oremland.** 2006. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol* **60**:107-130.
26. **Styblo, M., Z. Drobna, I. Jaspers, S. Lin, and D. J. Thomas.** 2002. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 5**:767-71.
27. **Takano, J., M. Wada, U. Ludewig, G. Schaaf, N. von Wiren, and T. Fujiwara.** 2006. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* **18**:1498-509.
28. **Yin, X. X., J. Chen, J. Qin, G. X. Sun, B. P. Rosen, and Y. G. Zhu.** 2011. Biotransformation and volatilization of arsenic by three photosynthetic cyanobacteria. *Plant Physiol* **156**:1631-8.
29. **Yoshinaga, M., Y. Cai, and B. P. Rosen.** 2011. Demethylation of methylarsonic acid by a microbial community. *Environ Microbiol* **13**:1205-15.
30. **Yuan, C., X. Lu, J. Qin, B. P. Rosen, and X. C. Le.** 2008. Volatile arsenic species released from *Escherichia coli* expressing the AsIII S-adenosylmethionine methyltransferase gene. *Environ Sci Technol* **42**:3201-6.

ヒ素の環境循環

(独)国立環境研究所 環境計測研究センター
柴田康行

ヒ素は周囲の酸化還元状態あるいは生物作用により、主としてⅢ価とⅤ価の 2 つの価数を行き来しながら、有機体と無機体を含めてガス状から水溶性、脂溶性、さらには不溶性物質まで、様々に異なる化学形態をとることが知られている。その毒性や環境動態、生物吸収なども化学形態によって大きく異なっており、ヒ素の環境動態はきわめて多様でかつ変化が大きいことが特徴である。とりわけヒトを含む動物体内においては、酸化還元状態を支配し活性酸素種などへの防御に役立つグルタチオン系との相互作用が注目され、研究されてきた。

一方、海洋生態系においては、アルセノベタインに代表されるテトラアルキルアルソニウム構造を有する有機ヒ素と、ヒ素糖 (Arsenosugars) と総称されるトリアルキルアルシノオキサイド構造 (ジメチルアルシノイル基) をもつ化合物群がそれぞれ動物 (魚介類) 並びに藻類を中心として様々な生物に見いだされ、生物種毎のヒ素化合物の化学形態の解明とその代謝系、さらには進化との関係などが注目されてきた。これらの中にはヒ素糖のグリセリン残基に脂肪酸が 2 分子エステル結合したヒ素糖脂質のほか、アセチルコリンの窒素がヒ素に置換されたアルセノコリンを含むリン脂質様の脂溶性ヒ素も見つかっている。さらに最近になり、ヒ素糖と同様にジメチルアルシノイル基を共通骨格としてもつ一連のヒ素含有脂質が魚油中に発見され、その構造が同定、報告された。これらの代謝的關係やその合成の意義が注目される。

陸上生態系においては、ヒ素の還元メチル化とガス状ヒ素の生成が古くから注目されてきた。こうした中で、有機ヒ素化合物による地下水汚染事例において、自然環境中で人工ヒ素化合物であるフェニルヒ素の脱フェニルとメチル化、ならびにヒ素に結合した酸素のイオウへの置換反応が起こり、人工的なヒ素化合物についても複雑な環境動態を示すことが明らかになってきた。こうしたヒ素の複雑な環境動態について、概要を報告する。

Environmental Cycling of Arsenic

Yasuyuki Shibata

Center for Environmental Measurement and Analysis

National Institute for Environmental Studies

Arsenic takes various organic / inorganic forms with different chemical properties and toxicities. Oxidation / reduction and methylation are among the common chemical / biological reactions on arsenic, and dimethylarsinoyl group has been found commonly in many natural organoarsenic compounds identified in marine organisms. These reactions were also detected on man-made arsenicals, including diphenylarsinic acid, which, however, was found to experience other type of reaction, i.e., replacement of oxygen by sulfur. Major chemical forms and possible reactions on both natural and man-made arsenic will be summarized in the presentation.

神栖市におけるジフェニルアルシン酸にかかる汚染とその健康影響

戸田 英作 環境省 総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室 室長
石井 一弘 筑波大学医学医療系(臨床医学系 神経内科) 准教授
岩崎 信明 茨城県立医療大学 医科学センター(小児科) 教授

1. はじめに

平成15年、茨城県神栖市(旧神栖町)において、通常自然界には存在しない有機ヒ素化合物であるジフェニルアルシン酸による環境汚染に起因すると考えられる健康被害が生じていることが判明した。ジフェニルアルシン酸による環境汚染を通じた人への影響等については、十分な科学的知見に乏しく、かつ、早急な対策が求められている状況にあるため、環境省では、平成15年6月「茨城県神栖町における有機ヒ素化合物汚染等への緊急対応策について」(閣議了解)に基づき、健康被害に係る緊急措置、有機ヒ素化合物に関する基礎研究及び環境モニタリング調査等を実施することとなった。

2. 緊急措置事業及びリスク評価について

緊急措置事業においては、ジフェニルアルシン酸にばく露したと認められる方に対して、健康診査を行うとともに、医療費及び療養に要する費用を支給することにより治療を促進することとしている。また、著しくジフェニルアルシン酸にばく露したと認められる方に対して、病歴、治療歴等に関する健康管理調査を行っている。これらにより、発症のメカニズム、治療法等を含めた症候及び病態の解明を図り、もって、その健康不安の解消等に資することを目的としている。

また、これらの取組の過程で得られた科学的知見を集約し、物性、汚染の状況、代謝及び動態、動物実験等による毒性、及び健康影響について各々整理・解析することにより、DPAAの健康リスクについて総合的な評価を行い、平成20年3月に中間報告書、平成23年6月に第2次報告書を取りまとめた。この第2次報告書におけるリスク評価及び「ジフェニルアルシン酸に係る健康影響等についての臨床検討会」の意見を踏まえ、緊急措置事業について、平成23年7月以降も継続するとともに、小児期にばく露され、相当程度の精神発達への影響がみられた方に対する調査(精神発達調査)を拡充したところである。

ジフェニルアルシン酸の人体に及ぼす影響については、症候及び病態の解明に向けた進展はみられるものの、さらなる経過の観察によらなければ未解明な点も多いことから、引き続き、健康影響等の調査研究を引き続き実施し、知見を集積していくこと

としている。

3. 参考文献

- ・「ジフェニルアルシン酸等にリスク評価 第2次報告書」平成23年6月 ジフェニルアルシン酸等にリスク評価に係るワーキンググループ
- ・「ジフェニルアルシン酸(DPAA)の毒性試験報告書(第2版)」平成23年6月 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課
- ・「ジフェニルアルシン酸等の健康影響に関する調査研究」研究報告(平成15年度~22年度) 財団法人日本科学技術振興財団

一般講演

I-1. ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング

○角大悟、福島佳代、宮高透喜、姫野誠一郎
徳島文理大・薬・衛生化学

1. はじめに

ヒ素化合物は環境化学物質として地殻に存在している一方で、急性前骨髄球性白血病の治療薬として使用されている。ヒ素化合物のなかでも毒性の強い無機三価ヒ素(As(III))は、生体内に入るとヒ素メチル基転移酵素(As3MT)によってメチル化を受けることが知られている。本研究では、ヒト肝がん HepG2 細胞から As3MT のスプライシングフォームを検出し、それらスプライシングフォームから翻訳される As3MT タンパク質の酵素活性と細胞特異的発現について解析を行ったので報告する。

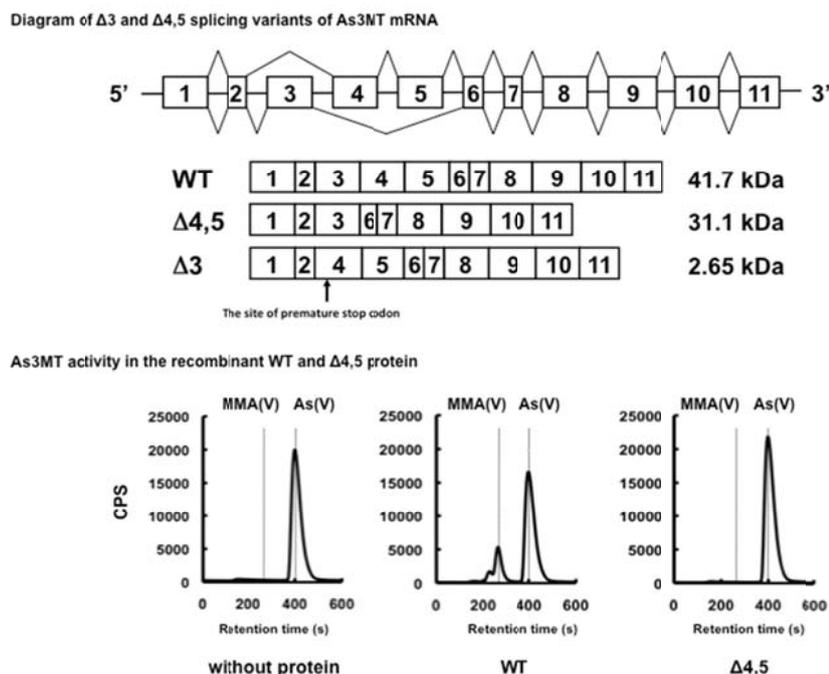
2. 方法

As3MT タンパク質精製：大腸菌高発現系を用いて His-Tag との融合タンパク質を作成し、Ni カラムを用いてアフィニティー精製を行った。As3MT 酵素活性：作製したリコンビナント As3MT タンパク質に S-アデノシルメチオニン、グルタチオン、As(III)を加え、反応後、過酸化水素を添加し HPLC-ICP-MS にてメチル化体のヒ素化合物のピークを定量した。細胞：ヒト肝がん HepG2 細胞、ヒト急性骨髄性白血病 HL60 細胞、ヒト慢性骨髄性白血病 K562 細胞、ヒト胎児腎臓 HEK293 細胞、ヒト肺上皮腺がん A549 細胞、サル腎臓 COS-7 細胞を使用した。遺伝子導入：COS-7 細胞に lipofection 法を用い遺伝子を導入した。

3. 結果

HepG2 細胞から RT-PCR 法により As3MT の全長 cDNA を抽出したところ、wild type(WT) の 1,128 bp と比較して、サイズの異なる 2 つの cDNA を検出した。これらの遺伝子の塩基配列を解析したところ、ひとつは As3MT のエキソン 3 が欠落 ($\Delta 3$)、もう一方はエキソン 4 と 5 ($\Delta 4,5$) が欠落していることが明らかとなった。得られた cDNA から予想されるタンパク質の分子量は、WT の 41.7 kDa に対し、 $\Delta 3$ は途中で終止コドンが出現するため 2.65 kDa、 $\Delta 4,5$ は本来の終止コドンまで翻訳され、31.1 kDa のタンパク質の産生が予想された。WT と $\Delta 4,5$ As3MT のリコンビナントタンパク質を精製し、As(III)に対するメチル化能を検討したところ、WT ではメチル化されたヒ素化合物が検出されたが、 $\Delta 4,5$ では検出されなかった。さらに、WT および $\Delta 4,5$ As3MT cDNA を導入した COS-7 細胞に As(III)を 24 時間添加したところ、WT As3MT 遺伝子を導入した細胞内において、メチル化されたヒ素化合物を検出したが、 $\Delta 4,5$ As3MT を遺伝子導入した細胞では検出されなかった。次に、種々の細胞間におけるこれらスプライシングフォームの発現量の違いを明らかにするために、5 種類の異なるヒト由来の細胞を用い RT-PCR を行った。その結果、HepG2、A549 細

胞では WT の mRNA が多く発現しているものの、HL60 や K562 細胞においては $\Delta 4,5$ の発現が WT とほぼ同等であった。また、ウエスタンブロットを行ったところ、HL60 や K562 細胞において WT は検出されず、 $\Delta 4,5$ の発現が検出された。今後、これら異なるスプライシングフォームの As3MT の細胞特異的な発現の差の意義と機構について検討を行う予定である。



Alternative splicing of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase

○Daigo Sumi, Kayo Fukushima, Hideki Miyataka, Seiichiro Himeno
(Fac. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ.)

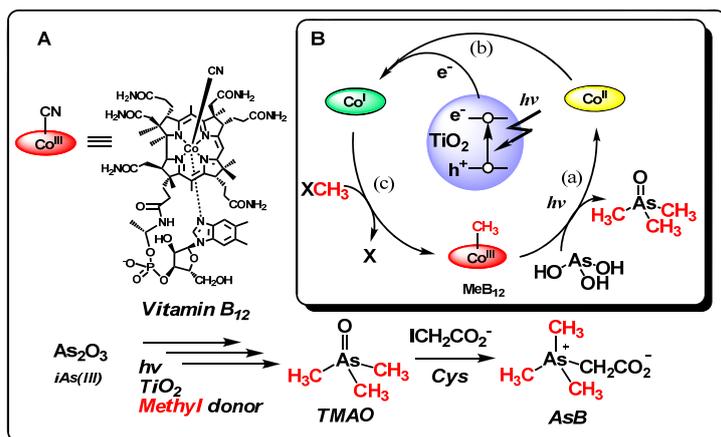
We found two alternative spliced forms of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (As3MT) in HepG2 cells. These two splicing forms were deletion of exon-3 ($\Delta 3$), and exon-4 and -5 ($\Delta 4,5$). Results from speciation analysis using recombinant protein and lysates from cDNA-transfected cells indicated that the $\Delta 4,5$ As3MT did not have methyltransferase activity to As(III). The mRNA and protein levels of splicing forms were varied in human-derived cells. HepG2 and A549 cells had more abundant WT mRNA than $\Delta 4,5$, whereas the mRNA levels of WT in HL-60 and K562 cells were approximately equal to that of $\Delta 4,5$. Western blot analysis showed that the $\Delta 4,5$ As3MT protein was the predominant form in HL60 and K562 cells.

I-2. 酸化チタンとビタミン B₁₂ を用いたバイオインスパイアード触媒による無機ヒ素の無毒化

中村 浩一郎

日本板硝子株式会社研究開発部

無機ヒ素は、急性・慢性中毒物質、発がん性物質である。この無機ヒ素をアルセノベタイン(AsB)に変換するバイオミメティック、バイオインスパイアード触媒システムを開発した。ビタミン B₁₂ (MeB₁₂) と S 含有アミノ酸存在下、水溶液中で三酸化二ヒ素 [iAs(III)] は、トリメチルアルシンオキシド(TMAO)に定量的に変換され、TMAO は、S 含有アミノ酸存在下、ハロゲン化酢酸により AsB に定量的に変換される(Fig A のスキーム右)¹⁻³⁾。S 含有アミノ酸は、還元的に Co-Me 結合を活性化し、ホモリシスを経て生じたメチルラジカルが無機ヒ素をメチル化する [Fig B(a)]⁴⁾。生じたビタミン B₁₂ の Co(II)種を酸化チタンの光還元励起電子で超求核種である Co(I)に還元することにより [Fig B(b)]、反応系中に存在するメチル基供与体(XCH₃)から酸化的メチル化を受け、MeB₁₂ を生成する [Fig B(c)]。このように、酸化チタン、ビタミン B₁₂、メチル基供与体



から構成される感光性バイオインスパイアード触媒により、効率的なヒ素無毒化処理システムを構築することに成功した (Fig A)⁵⁻¹⁵⁾。合成 AsB は、動物実験により、毒物劇物取締法における毒物劇物の判定基準に該当しない (Table)¹⁶⁾。この触媒システムの反応機構と無機ヒ素の無毒化処理システムの様々な応用例について紹介する¹²⁻¹⁵⁾。

Fig. Photo-sensitive bio-^{12, 15)}

inspired catalytic system with vitamin B₁₂ and titanium dioxide

A. Synthesis of arsenobetaine (AsB) by using bio-inspired catalytic system with vitamin B₁₂.

B. Estimated reaction mechanism of catalytic system with vitamin B₁₂ for methyl transfer from methyl donor to arsenic. XCH₃: methyl donor, *hν*: photo-irradiation.

Table. Definition of toxic and deleterious substances by the law in Japan* and the results of safety tests for arsenic trioxide [iAs(III)] and arsenobetaine (AsB).

Safety tests required by the guideline ¹⁶⁾	Substances			
	iAs(III)	Toxic substance ¹⁶⁾	Deleterious substance ¹⁶⁾	AsB
LD ₅₀ (mg/Kg)	30 ¹⁷⁾	< 50	50—300	10,000 ¹⁷⁾
Dermal corrosion	ND**	Yes	Yes	No
Eye corrosion	Yes ¹⁸⁾	Yes	Yes	No

* The Poisonous and Deleterious Substances Control Law in Japan. **ND: No data available.

Acknowledgements

This study was partially supported by grant programs “Establishing a Sound-Cycle Society (K2102, K22087) in 2009-2010 and “The Environment Research and Technology Development Fund

(ERTDF) (K2334)” in 2011 from Ministry of the Environment (MOE), Government of Japan.

References

- [1] K. Nakamura *et al.*, International Patent, WO/2008/012950.
- [2] K. Nakamura *et al.*, International Patent, WO/2008/065750.
- [3] K. Nakamura *et al.*, *Chem. Commun.*, **2008**, 41, 5122.
- [4] K. Nakamura *et al.*, *J. Organometal. Chem.* **2009**, 694, 916.
- [5] K. Nakamura, *12th International Conference on Chemistry and the Environment*, **2009**, 377.
- [6] K. Nakamura, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, 14 (Suppl. 1) S237.
- [7] K. Nakamura, *10th International Symposium on Applied Biological Inorganic Chemistry*, **2009**, 36.
- [8] K. Nakamura *et al.*, International Patent, WO/2009/041002.
- [9] K. Nakamura *et al.*, International Patent, WO/2010/053072.
- [10] K. Nakamura, *Abstracts of 90th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, **2010**, Vol. II, 1C2-08, pp. 210. ; K. Nakamura, *ibid.*, **2010**, Vol. I, 1H7-49, p. 69.
- [11] K. Nakamura, *Abstracts of 91st Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, **2011**, Vol. II, 3A6-12, p. 276.; K. Nakamura, *ibid.*, **2011** Vol. I, 26 2G4-03, p. 18.
- [12] K. Nakamura, *On Biomimetics*, InTech, **2011**, (ISBN 978-953-307-271-5), 213-228, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/biomimetic-and-bio-inspired-catalytic-system-for-arsenic-detoxification-bio-inspired-catalysts-with->
- [13] K. Nakamura, *Abstracts of 242nd American Chemical Society National Meeting*, ENVR 453 (August 28-September 1, **2011**, Denver CO, USA).
- [14] K. Nakamura, *Abstracts of 13th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment*, p.265 (11-15 September, **2011**, ETH Zürich, Switzerland).
- [15] K. Nakamura, *J. Japan Inst. Metals*, **2011**, 75, 11, in press.
- [16] Definition of poisonous and deleterious substances by the law in Japan: Available from: <http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/kijun.pdf>
- [17] T. Kaise, S. Watanabe and K. Ito, *Chemosphere*, **1985**, 14, 1327-1332.
- [18] CERi Hazard Data 2001-8, Available from: http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/Chemical_hazard_data_list_03.html

Bio-inspired Catalysts with TiO₂ and Vitamin B₁₂ for Arsenic Detoxification

Koichiro Nakamura

R & D Dept., Nippon Sheet Glass Co., Ltd.

Inorganic arsenic (iAs) is an acute and chronic toxicant and a carcinogen. The arsenic detoxification (AsDetox), where iAs is transformed into non-toxic arsenic, arsenobetaine (AsB), has been developed by using biomimetic and bio-inspired systems with vitamin B₁₂. In the presence of reduced form of glutathione (GSH) and vitamin B₁₂ in the form of methylcobalamin, arsenic trioxide [iAs (III)] was quantitatively transformed into trimethylarsine oxide (TMAO)¹⁾. Furthermore, in the presence of GSH, TMAO was converted into AsB by the treatment of iodoacetic acid at the high conversion rate²⁾. The reactions also proceed when GSH was replaced with S-amino acids such as cysteine and homocysteine^{1,2)}. The methyl transfer also proceeded when MeB₁₂ was replaced with biomimetic B₁₂ derivatives^{3,4)}. This AsDetox is a safe and environment friendly treatment, because biomaterials such as vitamin B₁₂ and amino acids were used and the reactions proceed under mild and aqueous conditions. A photosensitive bio-inspired catalytic system for AsDetox can be realized and was successfully demonstrated⁵⁻¹⁵⁾. Safety tests of synthesized AsB have not shown that AsB should be categorized as poisonous or deleterious substances according to the definition of the guideline in the law (Table)¹⁶⁾. iAs from various types of materials such as products and wastes can be detoxified by using these biomimetic and bio-inspired vitamin B₁₂ catalytic systems. iAs of arsenic contaminated ground

11 月 19 日 (土)

water, GaAs semiconductors and arsenic chemical weapons have been successfully transformed into AsB by these AsDetox systems¹²⁻¹⁵⁾.

I-3. 胎児期無機ヒ素曝露によって増加したマウス肝臓癌におけるゲノムワイドな DNA メチル化変化の解析

○鈴木武博¹、山下聡²、内匠正太¹、立石幸代¹、佐野友春³、牛島俊和²、野原恵子¹

- 1) 国立環境研究所 環境健康研究センター
- 2) 国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ
- 3) 国立環境研究所 環境計測研究センター

1. はじめに

癌におけるエピジェネティック作用の異常は、主に DNA のメチル化異常であり、全メチル化量の低下（グローバルな低メチル化）と部位特異的な高メチル化である。これまでの研究から、胎児期無機ヒ素曝露によって C3H マウス 74 週令の雄の仔の肝臓で癌が増加することが確認された。ヒ素による発癌にもエピジェネティック作用の異常が関与することが示唆されており、ヒ素による癌で特異的に DNA メチル化が変化する領域を同定することは、ヒ素以外の要因で発症した癌との区別を可能とし、ヒ素による発癌メカニズムの解明のために非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、C3H マウス胎児期ヒ素曝露で増加した肝臓癌で特異的にメチル化が変化する領域をゲノムワイドに検索した。また、グローバルな DNA メチル化変化量についても検討した。

2. 方法

妊娠 8~18 日目まで 85 ppm の NaAsO₂ を飲水曝露した C3H マウスから産まれた 74 週令の雄マウス（ヒ素曝露群）及びコントロール群の雄マウスから、正常肝臓組織（正常組織）、癌が存在する肝臓の非癌部（非癌部）、癌が存在する肝臓の癌部（癌部）を採取した。それらの部位からゲノム DNA を抽出し、以下の実験に用いた。

MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation) -CpG island microarray

コントロール群正常組織とヒ素曝露群癌部のゲノム DNA を用いて MeDIP を行い、Agilent 社のマウス CpG island microarray によりメチル化が変化した領域を網羅的に検索した。メチル化の指標として Me value [Yamashita et al. DNA Res. 2009] を用いた。

メチル化特異的 PCR (MSP)

正常組織、非癌部、癌部のゲノム DNA をバイサルファイト反応したものをサンプルとし、完全メチル化 DNA 配列（すべての CpG がメチル化された DNA）に対応した M プライマーと、完全非メチル化 DNA 配列（すべての CpG がメチル化されていない DNA）に対応した U プライマーを用いて、リアルタイム MSP によりメチル化率を求めた。

LC/ESI-MS 法による 5 メチルシトシン量の精密測定

ゲノム DNA をヌクレオシドに加水分解し、deoxycytidine (dC) と 5-methyldeoxycytidine

(5medC)の量を液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリー(LC/ESI-MS)により測定した。同位体標識した 5medC と dC をスタンダードとして用いることで、5medC 量の精密測定をおこなった。

3. 結果と考察

MeDIP - CpG island microarray の結果から、コントロール群の正常組織と比較してヒ素曝露群の癌部で高メチル化状態になったと考えられる 5 領域を抽出した。それらの領域について、正常組織、非癌部、癌部のメチル化率を定量した。その結果、今回測定した 5 つの領域すべてにおいて、コントロール群及びヒ素曝露群ともに、正常組織と比較して癌部では有意にメチル化率が高いことが明らかになった。さらに、Fosb (FBJ osteosarcoma oncogene B)、Btd (Biotinidase) の CpG island は、コントロール群の癌部と比較して、ヒ素曝露群の癌部でメチル化率が有意に高いことが明らかとなった。また、Fosb 領域は、非癌部においても、コントロール群と比較してヒ素曝露群でメチル化率が有意に高かった。以上の結果から、Fosb 及び Btd 領域の DNA メチル化は、ヒ素曝露が関与する癌の指標となる可能性が示唆された。また、LC/ESI-MS 法による 5 メチルシトシン量の精密測定の結果、コントロール群、ヒ素曝露群ともに、全シトシン中の 5 メチルシトシンの割合は、正常組織及び非癌部で 4.6%、癌部では 4.3~4.5%となり、癌部で 5 メチルシトシン量が減少していることが確認された。

Genome-wide analysis of DNA methylation changes in arsenic-affected hepatic tumors in mice

○T. Suzuki¹, S. Yamashita², S. Takumi¹, Y. Tateishi¹, T. Sano³, T. Ushijima², K. Nohara¹
1) Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies, 2) Group for Development of Molecular diagnostics and Individualized Therapy, National Cancer Center Research Institute, 3) Center for Environmental Measurement and Analysis, National Institute for Environmental Studies

Previous studies have shown that gestational exposure of C3H mice to inorganic arsenic increases liver tumors in the male offspring at 74 weeks old. DNA methylation changes specific for arsenic-affected tumors will be useful markers to distinguish tumors caused by arsenic from those induced by other factors. In this study, we searched for DNA regions where methylation status is specifically altered in the arsenic-exposed hepatic tumors using MeDIP-CpG island microarray. We found that CpG islands in Fosb and Btd were significantly hypermethylated in the hepatic tumors of arsenic-exposed mice compared to those of control mice. These results suggest that DNA methylation of these CpG islands gives an indication of the tumors caused by arsenic exposure.

I-4. アクアポリン9はマウス初代肝細胞においてヒ素の細胞内蓄積とそれに伴う細胞毒性に關与する

○新開泰弘、角大悟、外山喬士、熊谷嘉人
(筑波大院・人間総合科学)

【目的】水チャネルであるアクアポリン、その中でもアクアグリセロポリンファミリーに属するアクアポリン9 (AQP9) は、細胞膜において水だけでなくグリセロールや3価の無機ヒ素を輸送する役割を担っている (Rosen BP, FEBS letters, 86-92, 2002)。無機ヒ素の毒性発現の引き金の1つは、細胞内に有害なヒ素が蓄積することに起因することから、細胞内への侵入経路である AQP9 の発現はヒ素の毒性発現と関連性があることが予想される。しかし、哺乳類細胞系において、AQP9 がヒ素の細胞内蓄積とそれに伴う毒性発現に重要な役割を担っているか否かについての知見は乏しい。また、ヒ素の細胞内への取り込みを阻害して毒性防御に働く物質の探索は予防環境医学的な側面からも重要である。本研究では、マウス初代肝細胞を用いて、ヒ素の細胞内蓄積とそれに伴う毒性発現における AQP9 の役割を明らかにし、当該経路を介したヒ素の毒性を抑制する物質を探索することを目的とした。

【方法】細胞：C57BL/6J 雄性マウスの初代肝細胞ならびに HEK293 細胞を使用した。細胞内ヒ素濃度：細胞を灰化後、ICP-MS を用いて決定した。細胞毒性：MTT 法および LDH 法で測定した。AQP9 の発現量：膜を分画後、ウエスタンブロット法により検討した。AQP9 のクローニング：RT-PCR 法により AQP9 の cDNA を得た後、発現ベクターに挿入した。遺伝子導入：AQP9 siRNA および AQP9 cDNA をリポフェクション法で導入した。細胞内グリセロール取り込み量： ^{14}C で放射ラベルしたグリセロールの取り込み量を測定した。

【結果及び考察】マウス初代肝細胞に3価の無機ヒ素を曝露すると、時間依存的な細胞内ヒ素蓄積量の増加とそれに伴う細胞死の増強が観察された。この毒性発現における AQP9 の関与を調べるために AQP9 をノックダウンしたところ、細胞内ヒ素蓄積量は有意に低下し、細胞毒性は軽減された。一方、HEK293 細胞に AQP9 を高発現したところ、細胞内へのヒ素蓄積量の増加および細胞毒性の有意な増強が見られた。次に、AQP9 の基質8種類 (グリセロール、尿素、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、アデニン、ウラシル、5-フルオロウラシル) をマウス初代肝細胞に前処理しヒ素の毒性に対する防御効果を調べたところ、ソルビトールは有意にヒ素の毒性発現を抑制した。同条件下において、ヒ素およびグリセロールの細胞内取り込みは減少していた。以上より、AQP9 はヒ素の細胞内蓄積とそれに伴う毒性発現に重要な役割を担っているチャネルであり、競合的阻害剤として働くソルビトールは当該経路を抑制してヒ素の毒性を軽減する働きがあることが示唆された。

【参考文献】 Shinkai et al., Toxicol Appl Pharmacol, 232-236, 2009

11月19日(土)

Participation of aquaporin-9 (AQP9) in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes

○Yasuhiro Shinkai, Daigo Sumi, Takashi Toyama, Yoshito Kumagai (Grad. School of Comp. Human Sci., Univ. of Tsukuba)

Aquaporin-9 (AQP9) is found to be an important membrane protein that serves as a channel in the transfer of water and small solutes such as glycerol and arsenite. In the present study, we found that siRNA-mediated knockdown of AQP9 and pretreatment with sorbitol blocked intracellular uptake of arsenite, thereby diminishing its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes.

I-5. 多剤耐性タンパク MRP2 を介した細胞内ヒ素代謝・

排出機構の解析

○渡辺喬之¹, 小林弥生^{1,2}, 平野靖史郎^{1,2}

(¹千葉大・院・薬, ²国立環境研究所)

【目的】 多剤耐性タンパク multidrug-resistance associated proteins (MRPs) はヒ素-グルタチオン抱合体の細胞外への排出を介して細胞内におけるヒ素毒性調節機構に関与することが示唆されているが、細胞内におけるヒ素メチル化代謝機構との関わりに関しては不明な点が多い。本研究では tetracycline 誘導性 humn MRP2 (hMRP2) 発現 CHO 細胞を構築し、MRP2 による細胞外へのヒ素排出促進作用を調べ、ヒ素メチル化酵素 arsenic (III) methyltransferase (AS3MT) による細胞内ヒ素メチル化代謝機構との関わりを解明することを目的とした。

【方法】 Gateway™ システムを用いて tetracycline 誘導性 MRP2 発現ベクター pT-REx™ -DEST 30- hMRP2 を作成し、tetracycline により一過性に発現誘導される MRP2 高発現 CHO 細胞 (T-REx™-CHO-hMRP2tr cells) を構築した。MRP2 によるヒ素の細胞外への排出に関して細胞内グルタチオンの重要な役割が示唆されているため、細胞内グルタチオン枯渇剤である L-Buthionine-sulfoximine (BSO) 添加、非添加条件下において 3 価無機ヒ素化合物である sodium arsenite (iAs^{III}) に対する細胞毒性試験を改変 MTT 法により行った。

【結果および考察】 T-REx-CHO-hMRP2tr cells において tetracycline による hMRP2 の高発現誘導が確認された。一方、遺伝子導入を行っていない細胞 (T-REx™-CHO cells) においても MRP2 の恒常的な発現が確認された。構築した T-REx-CHO-hMRP2tr cells を用いて iAs^{III} の細胞毒性試験を行ったところ、MRP2 の一過性高発現誘導による細胞のヒ素感受性への有意な変化は BSO の添加、非添加条件のいずれにおいても認められなかった。T-REx™-CHO cells は AS3MT を発現しておらず、また iAs^{III} 曝露後の細胞上清及び培地中にメチル化ヒ素が検出されないため (Watanabe 2011)、T-REx™-CHO cells では細胞内へ取り込まれた iAs^{III} が無機ヒ素-グルタチオン抱合体、主に arsenic triglutathione (ATG) として細胞外へ排出され、その排出促進作用に MRP2 の関与が示唆されるが、MRP2 の高発現誘導によりヒ素感受性に有意な変化が認められなかったことから、T-REx™-CHO cells では恒常的な MRP2 発現が ATG の細胞外への排出に極めて重要な役割を果たしている事が示唆された。この恒常的 MRP2 発現が細胞外へのヒ素排出促進作用に及ぼす影響の詳細

11月19日(土)

を明らかにするために、現在 MRP 阻害剤などを用いて検討中である。また、AS3MT 発現ベクター等を用いて T-RExTM-CHO-hMRP2tr cells におけるメチル化酵素の役割を解析中である。

Excretion and metabolism of arsenic in MRP2- overexpressing cells

○Takayuki Watanabe¹, Yayoi Kobayashi^{1,2}, Seishiro Hirano^{1,2} (¹ Grad. School of Pharm. Sci., Chiba University, ² National Institute for Environmental Studies)

It has been shown that multidrug-resistance associated proteins (MRPs) play a critical role in excretion of arsenicals and arsenic-glutathione complexes are substrates for MRPs. However, the mechanism of arsenic excretion via MRPs has not been fully understood in relation to methylation levels of arsenic. In this study, we constructed T-RExTM-CHO-hMRP2tr cells that transiently overexpress human MRP2 (hMRP2) in response to tetracycline and investigated effects of ectopic expression of hMRP2 on cytotoxic effects of sodium arsenite (iAs^{III}). Since cellular glutathione has been suggested to play an important role in MRP2 driven excretion of arsenic, we also investigated effects of cellular glutathione depletion by L-buthionine-sulfoximine (BSO) on cytotoxic effects of sodium arsenite (iAs^{III}) in T-RExTM-CHO-hMRP2tr cells. Decrease in cell viability of tetracycline-treated cells after exposure to iAs^{III} was not significantly different from that of untreated cells with or without BSO. Unexpectedly, westernblot analysis indicated that MRP2 was constitutively expressed in untransfected T-RExTM-CHO cells. As we have previously shown that T-RExTM-CHO cells do not express AS3MT and methylated metabolites of iAs^{III} have not been detected in both cell lysate and culture medium (Watanabe et al. 2011), these results suggest that T-RExTM-CHO cells excrete arsenic triglutathione (ATG) and constitutively expressed MRP2 have been suggested to play an effective role in excretion of ATG. We are now investigating effects of MRP2 inhibition on excretion of arsenicals as well as the effects of hAS3MT expression on excretion of methylated arsenic metabolites in T-RExTM-CHO-hMRP2tr cells.

(References)

Watanabe T, Ohta Y, Mizumura A, Kobayashi Y, Hirano S.
Analysis of arsenic metabolites in HepG2 and AS3MT-transfected cells
Arch.Toxicol., 85, 577-588 (2011)

I-6. Speciation of arsenic trioxide metabolites in peripheral blood and bone marrow from an acute promyelocytic leukemia patient

Bo Yuan¹, Noriyoshi Iriyama², Yuta Yoshino¹, Yoshihiro Hatta², Akira Horikoshi³,
Yukio Hirabayashi², Jin Takeuchi², Hiroo Toyoda¹

¹School of pharmacy, Tokyo University of Pharmacy & Life Sciences, ²Itabashi Hospital,
³Nerima-Hikarigaoka Hospital, School of Medicine, Nihon University

Introduction

Administration of ATO (As^{III}) has demonstrated a remarkable efficacy in the treatment of relapsed and refractory APL patients. So far, we have demonstrated that aquaporin 9 and multidrug resistance-associated protein 2 are functionally involved in controlling arsenic accumulation in human-derived normal cells, which then contribute to differential sensitivity to As^{III} cytotoxicity among these cells¹. We also demonstrated that various arsenic species including inorganic arsenic and methylated arsenic metabolites accumulated in peripheral blood (PB) red blood cells in an APL patient². We further demonstrated for the first time that these arsenic metabolites also existed in cerebrospinal fluid³, in which the concentrations of arsenic reached levels necessary for differentiation induction. These findings provide a new insight into clinical applications of As^{III}, and may contribute to better therapeutic protocols⁴. However, a study on speciation of arsenicals in bone marrow (BM) samples from APL patients has not yet been conducted. Therefore, we investigated the arsenic speciation in plasma of BM and compared its profiles between PB and BM plasma.

Patient and methods

A relapsed APL patient (49-year-old, female) was enrolled in the study. The complete treatment protocol was approved by the Internal Review Committee of Nihon University, and a written informed consent was obtained from the patient. ATO was administered intravenously daily for 2 h at a dose of 0.15 mg/kg for 43 consecutive days. PB samples were collected before the treatment start (day -1), and 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 42, 56 days after the start of administration. BM aspirations were performed before treatment (day -1), and after 14, 28, 42, and 56 days from the start of administration. To prepare samples for arsenic speciation, the PB and BM plasma was ultrafiltrated with a 10kDa molecular mass cutoff. The filtrates were defined as low molecular weight fraction (LMW-F) and subjected to arsenic speciation analysis. The remains trapped on filter were defined as high molecular weight fraction (HMW-F) and subjected to total arsenic determination. The analysis of total arsenic concentrations and arsenic speciation were performed by ICP-MS, and HPLC/ICP-MS, respectively.

Results and Discussion

BM aspirate with ≤5% blast cells plus promyelocytes with no evidence of leukemic cells

(from day-28) and negative FISH results (day-56) indicated that the patient achieved complete remission after remission induction therapy with ATO. The PB plasma concentrations of methylated arsenic metabolites (MA & DMA) substantially increased after the start of administration, while those of inorganic arsenic (As^{III}) was still kept at a low level until day 10, followed by substantial increase from day-14 after administration (Fig.1). Biomethylation is well known as a metabolic pathway for ingested inorganic arsenic. Collectively, these results suggest that the patient has relatively higher

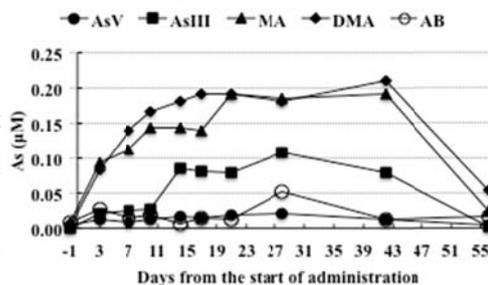


Fig.1 Profiles of concentrations of arsenic species in PB plasma

efficiency for drug metabolism probably due to her young age or without clinical complications. Furthermore, a trend toward reaching a plateau in both inorganic arsenic and methylated arsenic metabolites was observed in PB plasma (Fig.1). Although the similar trend was not observed

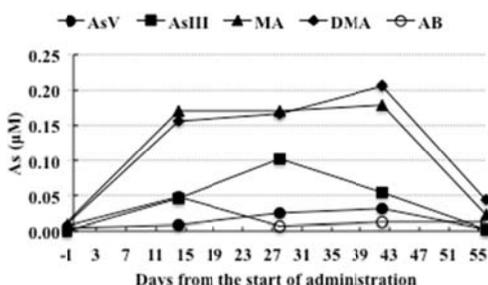


Fig.2 Profiles of concentrations of arsenic species in BM plasma

in BM plasma due to a limited number of sampling points (Fig.2), the arsenic speciation profiles of PB plasma were very similar to those of BM plasma throughout the remission induction therapy (Fig.3). These results suggested for the first time that arsenic speciation analysis of PB plasma could be predictive for BM speciation without applying BM aspiration.

We further demonstrated that the total arsenic concentrations in HMW-F were much higher in BM plasma than that in PB plasma. Based on the vital role of BM microenvironment in the homeostasis of the hematopoietic system, we assumed that a higher amount of proteins (MW>10kDa)-bound arsenic complex contribute to protection effect from the attack of free arsenic species. Understandably, further investigation of the detailed information about these proteins is need.

In conclusion, we clarified for the first time the arsenic speciation in BM plasma, and found that there was a close similarity in its speciation profile between BM and PB plasma. These results probably not only give further evidence of clinical application of ATO, but also provide new insight into host defense mechanism in APL patients undergoing ATO treatment.

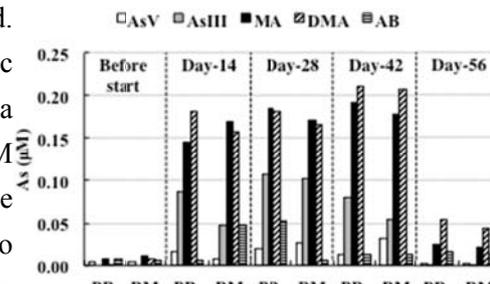


Fig.3 Comparison of arsenic speciation pattern between PB and BM plasma

References:

1). Toxicol Appl Pharmacol. **257**, 198 (2011). 2). Anal Bioanal Chem. **393**, 689 (2009). 3). Leuk Res. **34**, 403 (2010). 4). Application of arsenic trioxide therapy for patients with leukemia, in: Sun, H.Z. (Ed.), Biological Chemistry of As, Sb and Bi. John Wiley & Sons, New York, pp. 263-292 (2011).

I-7. ヒジキの成育過程におけるヒ素含有量の変化

○片山眞之 片山洋子 (大阪青山大学)

【序】 ヒジキ藻体中のヒ素(**As**)含有量はヒジキの生育環境によって大きく異なり¹⁻³⁾、乾燥製品の**As**濃度においても**As**含有量のばらつきは大きく、時には比較的高濃度に**As**が検出される^{4,5)}。ヒジキの生育過程において**As**がどのように集積してくるのか、その詳細は明らかではない。著者らはこの点を解明するために、カルシウム(**Ca**)などのミネラル元素の集積と併せて**As**の集積を測定した。

【実験法】 植物体の採集、処理： ヒジキ藻体は和歌山県串本町姫海岸にて採集したものを用いた。採集した藻体は、直ちに氷冷して持ち帰り、人工海水-蒸留水にて順次複数回ずつ洗浄した後、一定サイズに切断し、茎・葉に分離し凍結乾燥した。

Asの定量法： HPLC-ICPMS法によった。

Caの定量法： conc H₂SO₄ - HNO₃混液にて湿式灰化し、原子吸光分光光度計にて定量した。

【実験結果と考察】 植物体の生育状況： 11月末では葉のみで茎部は目視できないが、2月になると20cm長位まで生育していた。4月初旬には40cm前後に成長した。

As集積の特徴： 11月の試料における**As**濃度は2月試料のレベルと似ているが、2月試料では葉部に比べて茎部に多く集積していた。3月4月試料では茎部と比べて葉部により多くの**As**集積が見られた。**As**の集積はどの時期においても茎に沿って均一になることは無く、傾向としては下部位に向って高濃度に集積していた。**As**の存在濃度において、個体を通じて不均一性であることが、**As**集積の特性であるといえよう。収穫時期の個体で観察定量したこれまでの結果^{3,5)}と同じ傾向であった。

Caの集積過程の特性： **Ca**集積の傾向は**As**集積の状況とは異なっていた。**Ca**は茎・葉とも、成長した茎の中位の部位に比較的高濃度に集積していた。**Ca**の集積においては、ヒジキと共生する微生物群の関与を考慮すべきかもしれない。海藻と他生物との共生に関しては、我々は先に珪藻と共生細菌との関係を観察しており、その結果は珪藻の**As**代謝がその共生細菌における**As**代謝と密接に関連していることを示していた^{6,7)}。従って、ヒジキにおいても同様な事象を考慮するべきであるが、今後の課題である。

【英文要旨 Abstract】

Accumulation of arsenic in growing Hijiki plants.

Masayuki Katayama and Yohko Sugawa-Katayama

(Osaka Aoyama University)

Freshly sampled Hijiki (*Sargassum fusiforme*) plants were lyophilized, and their

arsenic (**As**) and calcium (**Ca**) contents were determined. **As** was determined by High Performance Liquid Chromatography – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and **Ca** was determined by atomic absorption spectrophotometry.

In growing Hijiki plants, accumulation of **As** in the stalks and leaves was evaluated in the sections along their stalks. In the samples of March and April, arsenic accumulation in the stalks was less than in the leaves. On the dry weight basis the arsenic concentrations in the stalks as well as in the leaves were higher in the lower sections than those in the upper sections. In contrast, **Ca** concentrations were higher in the middle sections than in the lower and upper sections.

The distribution of **As** and **Ca** should also be considered in relation with their metabolism in symbiotic living organisms as found in diatoms and their symbiotic bacteria^{6,7}.

【Keywords】 Hijiki, *Sargassum fusiforme*, **As** accumulation, **Ca** accumulation, growing process.

【文献 References】

- 1) Katayama M, Sakiyama C, Nakano Y, Sugawa-Katayama Y (2001) Distribution of accumulated arsenic in the seaweed Hijiki, *Hijikia fusiforme* OKam. (1). Trace Nutrients Research, 18: 29-34.
- 2) Sugawa-Katayama Y, Katayama M, Sakiyama C, Nakano Y (2004) Distribution of accumulated arsenic in the seaweed Hijiki, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell (2). Bull Fac Human Environmental Science, Fukuoka Women's University, 35:81-90.
- 3) Katayama M, Yamamoto Y, Sawada R, Sugawa-Katayama Y (2008) Distribution of accumulated arsenic in the seaweed Hijiki, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell (6). J Osaka Aoyama University, 1: 29-34.
- 4) Katayama M, Sugawa-Katayama Y, Otsuki K (1994) Effects of Hijiki feeding on arsenic distribution in rats administered large doses of arsenate. Appl. Organomet. Chemistry, 8:259-264.
- 5) Sugawa-Katayama Y, Katayama M, Arikawa Y, Yamamoto Y, Sawada R, Nakano Y (2005) Diminution of the arsenic level in Hijiki, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell, through pre-cooking treatment. Trace Nutrients Research, 22:107-109.
- 6) Katayama M, Benson AA (1985) Arsenic metabolism in marine algae – The effect of the symbiotic bacteria on the metabolic pattern. Abstract Book of 13th Int. Congr. Biochem. Amsterdam, 180 (TH-639).
- 7) Benson AA, Katayama M, Knowles FC (1988) Arsenate metabolism in aquatic plants. Appl. Organomet Chem., 2: 349-352.

I-8. 水耕栽培でのヒ素化合物添加が玄米のジメチルアルシン酸含量に及ぼす影響

○荒尾知人^{1)*}・馬場浩司¹⁾・川崎晃¹⁾・松本真悟²⁾

1) (独) 農業環境技術研究所、2) 島根大学、*現農林水産省

1. はじめに

食品衛生法が改正され、米に含まれるカドミウム(Cd)濃度基準が 0.4 mg kg^{-1} に引き下げられた。現在国内の約 4 万 ha の水田において出穂期前後の湛水管理による玄米 Cd 濃度低減対策が取り組まれている。出穂期前後の湛水管理により稲のヒ素吸収が高まり、玄米中のジメチルアルシン酸 (DMA) の割合が高くなる¹⁾。しかし、玄米中の DMA が土壌中でメチル化されたものに由来するのか、稲体内でメチル化されたものなのかについては明らかでない。このため、水耕栽培で稲を栽培し、各種ヒ素化合物の添加が玄米 DMA 含量に及ぼす影響について検討を行った²⁾。

2. 方法

(実験 1)

5月上旬に水田に苗を移植して稲を栽培し、7月初めに水耕栽培に移植した。出穂直後、5日後、10日後に各種ヒ素化合物 (DMA- d^6 $1.3\mu\text{M}$, MMA- d^3 $1.3\mu\text{M}$, NaAsO₂ $1.3\mu\text{M}$, $13\mu\text{M}$) を水耕液に添加し、出穂15日目以降は通常の水耕液で栽培後収穫した。

DMA, DMA- d^6 , MMA- d^3 は HPLC-ESIMS (Waters Micromass ZQ) を用い、分子イオン $m/z139$ [DMA+H]⁺, $m/z142$ [DMA- d^6 +H]⁺, $m/z145$ [MMA- d^3 +H]⁺ を用いて定量した。

(実験 2)

水田の土壌を用いて7日間栽培した稲の幼苗を各種ヒ素化合物 (MMA- d^3 , NaAsO₂) を含む水耕液に移植して栽培した。0.02%クロラムフェニコール添加区を設けた。

2mm篩を通した水田の土壌1gに各種ヒ素化合物 (MMA- d^3 , NaAsO₂) を含む水耕液を50mL添加して培養した。0.02%クロラムフェニコール添加区を設けた。

3. 結果と考察

(実験 1)

DMA- d^6 , MMA- d^3 , NaAsO₂ の水耕液への添加により、玄米および稲茎は DMA 濃度が増加した。MMA- d^3 添加区の玄米 DMA は DMA- d^6 であり、添加した MMA- d^3 に由来していると考えられた。MMA- d^3 添加5日目の水耕液中に DMA- d^6 が検出された。

(実験 2)

11月19日(土)

MMA- d^3 , NaAsO₂ 添加区の水耕液中に DMA が検出されたが、0.02%クロラムフェニコール添加区では検出されなかった。

MMA- d^3 , 添加区の水耕液及び土壌中に DMA が検出されたが、0.02%クロラムフェニコール添加区では検出されなかった。NaAsO₂ 添加区の水耕液及び土壌中に DMA は検出されなかった。

以上のことから、玄米へ蓄積する DMA の多くは稲に吸収される前に土壌微生物によってメチル化されたものに由来すると推察された。

文献

- 1) Arao, T., Kawasaki, A., Baba, K., Mori, S., and Matsumoto, S. 2009. Effects of water management on cadmium and arsenic accumulation and dimethylarsinic acid concentrations in Japanese rice, *Environ. Sci. Tech.*, 43, 9361-9367.
- 2) Arao, T., Kawasaki, A., Baba, K. and Matsumoto, S. 2011. Effects of Arsenic Compound Amendment on Arsenic Speciation in Rice Grain, *Environ. Sci. Tech.*, 45, 1291-1297.

Effects of As Compound Amendment to soil and solution culture on As Speciation in Rice Grain

○T. Arao¹⁾, A. Kawasaki¹⁾, K. Baba¹⁾ and S. Matsumoto²⁾

1)National Institute for Agro-Environmental Sciences, 2)Shimane University,

Rice consumption is a major source of arsenic for Asian populations. Arsenic is present in rice grain both as inorganic arsenic and as dimethylarsinic acid (DMA). It is unclear whether DMA in rice is taken up from the soil or synthesized in planta. We investigated the effect of DMA, methylarsonic acid (MMA) and arsenite amendment on arsenic speciation in rice grain grown in solution culture. We also investigated the methylation of arsenic in solution culture under suppression of bacterial activity. In the solution culture, not only DMA amendment but also MMA or arsenite amendment increased the DMA concentration in brown rice and rice straw. DMA was detected in the solution amended by MMA or arsenite with young rice plants. When the solution included the antibacterial agent chloramphenicol, DMA concentration in the solution decreased dramatically. When only the soil was incubated with MMA or arsenite, only a slight amount of DMA was detected in the soil. These results suggest that rice rhizosphere associated bacteria would be involved in the formation of DMA in brown rice.

I-9. マグロ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究

畑 明寿¹⁾, 山中 健三²⁾, 山野 優子³⁾, 圓藤 陽子⁴⁾, 藤谷 登¹⁾, 圓藤 吟史⁵⁾

¹⁾ 千葉科学大学危機管理学部, ²⁾ 日本大学薬学部, ³⁾ 昭和大学医学部,

⁴⁾ 関西労災病院産業中毒研究センター, ⁵⁾ 大阪市立大学大学院医学研究科

研究背景

海産食品は様々なヒ素化合物を含んでいるが、摂取による健康リスクは不明な点が多い。今回我々は海産食品摂取後の尿中ヒ素代謝物について知見を得るため、ボランティアにおけるマグロ摂取後の尿中ヒ素分析を行った。

方法

供試海産食品：千葉県沖産の生メバチマグロ赤身刺身用を用いた。

被験者：インフォームドコンセントを得た健常な男女各2名(21±1.4歳)がマグロ摂取ボランティアとなり、マグロ刺身300gを1回の食事で摂取した。なお、マグロ摂取の前5日間は海産食品を摂取しなかった。摂取後5日間、すべての尿を採取し、排尿時刻と尿量を記録するとともに、クレアチニン量の測定を実施した。

マグロ中ヒ素分析：凍結乾燥させたマグロを分析用試料とし、総ヒ素分析は、試料をマイクロウェーブ分解装置(Multiwave3000, Perkin Elmer)を用い湿式灰化した後、ICP-MS(ELAN DRC-II, Perkin Elmer)分析を行った。またヒ素化学形態別分析は、抽出溶媒として50%メタノールを用い、ビーズ破碎処理の後、得られた抽出液のHPLC-ICP-MS分析を行った。未同定のヒ素化合物濃度はジメチルアルシン酸(DMA)をスタンダードとして測定した。

尿中ヒ素分析：採取した尿は測定時まで凍結保存し、MilliQ-水で5倍希釈後、ヒ素化合物の分離に陰イオン交換カラム(AS-22, Dionex)を用いてHPLC-ICP-MS分析を行った。

結果

マグロ300gに含まれる総ヒ素量は2.6mgであった。抽出液の化学形態別分析の結果、アルセノベタイン(AsBe)と未同定のヒ素化合物が検出され、マグロ300g中の含有量はそれぞれ1.4mgと0.7mgであった。50%メタノールに抽出されなかったヒ素化合物は0.4mgであった。なお、無機ヒ素(iAs)、モノメチルアルソン酸(MMA)、DMA、トリメチルアルシンオキシド、アルセノコリンは検出されなかった。尿中ヒ素分析の結果、マグロ摂取後5日間で総ヒ素摂取量の約40%が尿中に排泄されていた。尿から検出された主なヒ素化合物はAsBeとDMAで、それぞれ5日間の尿中排泄量は948±201µgと94±38µgであった。時間あたり尿中ヒ素排泄量が最大に達したのは、AsBeではマグロ摂取4時間後で66.5µg/h、DMAは9時間後で1.47µg/hであった。

考察

今回摂取したマグロからは DMA、iAs および MMA は検出されなかったが、摂取後の尿からは DMA が検出された。このことから尿中 DMA は、50%メタノール可溶性または不溶性未知ヒ素化合物の代謝産物である可能性が考えられる。

Arsenic metabolites in urine after ingestion of sashimi-grade tuna

Akihisa Hata¹⁾, Kenzo Yamanaka²⁾, Yuko Yamano³⁾, Yoko Endo⁴⁾,
Noboru Fujitani¹⁾, Ginji Endo⁵⁾

¹⁾ Chiba Institute of Science, ²⁾ Nihon University, ³⁾ Showa University,

⁴⁾ Japan Labour Health and Welfare Organization, ⁵⁾ Osaka City University

Seafood contains large amounts of various arsenic compounds but the risk from seafood ingestion is not clear. After the development of arsenic speciation analysis of seafood, we examined sashimi-grade tuna fish ingestion experiment using volunteers. Arsenic content of tuna was measured after bead-beating treatment and 50% methanol extraction. Four volunteers ingested 300 g of sashimi-grade tuna fish, after refraining from eating seafood for 5 days. Arsenic metabolites in urine were monitored over 5-day period after the ingestion. Speciation analysis of arsenic in tuna and urine was performed by HPLC-ICP-MS. Total arsenic (T-As) of the 300g of tuna was 2.6 mg. The compounds detected were arsenobetaine (AsBe) and unidentified arsenic compounds, but dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid (MMA), trimethylarsine oxide, arsenocholine, and inorganic arsenic (iAs) were not detected in 50% methanol extract. In 2.6 mg of arsenic ingested, 1.4 mg was AsBe, 0.7 mg was 50% methanol soluble unknown arsenic, and 0.4 mg of arsenic was insoluble arsenic. Approximately 40% of the ingested T-As was excreted in the urine during 5 days of the observation. The major urinary arsenics were AsBe and DMA, and the excreted total amounts were $948 \pm 201 \mu\text{g}$ and $94 \pm 38 \mu\text{g}$, respectively. Urinary AsBe excretion rate reached to $66.5 \mu\text{g/h}$ at 4 h after ingestion and that of DMA was $1.47 \mu\text{g/h}$ at 9 h. Tuna contains not only AsBe but also soluble arsenic compounds and insoluble arsenic. Since neither DMA nor MMA nor iAs detected in tuna, urinary DMA may be produced metabolically from unidentified arsenics or insoluble arsenic compounds.

I-10. 慢性ヒ素中毒の予防と改善: ヒトにおけるスルフォラファン

摂取後のヒ素化合物及び必須元素の代謝と排泄について

○水津珠世¹⁾、吉田貴彦²⁾、西條泰明²⁾、伊藤俊弘²⁾、中木良彦²⁾、杉岡良彦²⁾
岡崎秀人²⁾、井上葉子¹⁾、江尻直美¹⁾、小野楨子¹⁾、片桐裕史¹⁾、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) 旭川医科大学健康科学

【目的】現在、アジアや中南米諸国を中心に自然由来の無機ヒ素(iAs)による井戸水汚染から慢性ヒ素中毒が大規模発生し、WHOでは約5000万人以上と推定している。

我々は1996年より中国、内モンゴル自治区、山西省等において疫学調査、その後、慢性ヒ素中毒患者に対する症状の改善や予防に取り組み、10年間の追跡調査を行った。しかし、無機ヒ素の曝露量の軽減のみでの皮膚症状の回復効果は乏しく、新たな取り組みの必要性を感じている。

急性ヒ素中毒には有効な治療薬としてBALが存在するが、慢性ヒ素中毒に有効な治療薬は知られていない。先行研究において、*in vitro*研究、動物実験においてブロッコリースプラウト(BS)中のスルフォラファン(SF)による、無機ヒ素のメチル化と体外排泄の促進作用が認められ、SF含有の機能性食品が注目されている。

本研究は、ボランティアの成人男性6名におけるSF摂取によるヒ素化合物の代謝と排泄、及び必須元素の動態について検討した。

【方法】対象者は成人男性6名で、SFを約1mg含有するブロッコリー粉末を14日間連続摂取した。SF摂取前、摂取後1, 4, 7, 10, 14日目の尿を用いた。測定ヒ素は無機の5価(iAs⁵⁺)、無機の3価(iAs³⁺)、モノメチルアルソン酸(MMA)、ジメチルアルシン酸(DMA)、アルセノベタイン(AsB)、トリメチルアルシンオキサイド(TMAO)、アルセノコリン(AsC)の7種である。また、必須元素はCa, Cr, Cu, Fe, Mn, Se, Zn,の7種である。

1) 誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)法による尿中総ヒ素と必須元素分析

ユニシール分解容器に尿1mlを取り、濃硝酸1mlを加え、130℃、2時間の加熱処理し分析に用いた。ICP-MSはPerkin Elmer社製ELAN DRC-eを使用した。

2) 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(HPLC/ICP-MS)法によるヒ素の化学形態別分析

尿を超純水で10倍希釈した後、HLC-DISK3水系φ0.45μm(関東化学)にて1回濾過し用いた。HPLC/ICP-MSは上記ICP-MSにHPLC: Series200 LC Pump + Series 200 Auto sampler(同社)を連結。条件: カラム; CAPCELPK18 MG(4.6 mm i.d. × 250mm, 5μm: 資生堂), カラムオープン40℃, 流量1 ml/min, 溶離液: 10 mM sodium 1-butan-sulfonate, 4 mM moronic acid, 4 mM tetramethylanmonium hydroxide, 0.5% MeOH、これらをpH 3.0に調整した。ヒ素濃度は実測値と尿中クレアチニン補正值をそれぞれ求め、統計解析は

11月19日(土)

SPSS.ver 15Jにて行った。

本研究は旭川医科大学の倫理委員会の承認を得て行った。

【結果と考察】 被検者6名の尿中から検出したヒ素は、 iAs^{3+} 、 iAs^{5+} 、MMA、DMA、AsBの5種類で、これに対してTMAOとAsCは全ての検体から検出されなかった。SF含有ブロッコリー粉末を14日間摂取した結果、尿中 iAs^{5+} と iAs^{3+} 濃度は摂取後4日目までやや上昇傾向が示された。 iAs の第一メチル化代謝物のMMAは、摂取後4日目よりやや上昇にあり、さらに、類似の傾向は第二メチル化代謝物であるDMAにも示されたが、それぞれ統計学的な有意差は認められなかった。本来、SFにはメチル化促進作用を有するが、被検者が摂取した量および素材においては、DMAをさらにメチル化する結果は得られず、哺乳動物における無機ヒ素の最終代謝産物はDMAであることを確認した。

被検者6名における、必須元素7種類の尿中濃度は、SF摂取14日間を通して大きな変動は示されず、この結果から必須元素の尿中への過剰排泄は生じていないことを確認した。

本研究から、先行研究の細胞と実験動物での無機ヒ素のメチル化と体外排泄の促進効果は、人でのSF摂取からも、作用を示唆する結果が確認出来たことは、今後の慢性ヒ素中毒患者における予防や改善に対して検討する価値があるものと考えられる。

Prevention and treatment of chronic arsenic poisoning: Metabolism and excretion of arsenic compounds and essential elements following sulforaphane intake in humans

Tamayo Suizu¹⁾, Takahiko Yoshida²⁾, Yasuaki Saijyo²⁾, Toshihiro Itoh²⁾, Yoshihiko Nakagi²⁾, Yoshihiko Sugioka²⁾, Hideto Okazaki²⁾, Youko Inoue¹⁾, Naomi Ejiri¹⁾, Makiko Ono¹⁾, Hiroshi Katagiri, Hiroshi Yamauchi¹⁾

1) Department of Public Health, Kitasato University Graduate School of Medical Science,

2) Asahikawa Medical University, Department of Health Science

The purpose of this study was to examine the metabolism and excretion of arsenic compounds and essential elements following 14 days of continuous intake of sulforaphane (SF) in broccoli among six adult male volunteers. Five arsenic compounds, i.e., arsenite, arsenate, monomethylarsinic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), and arsenobetaine (AsB), were detected in the urine of the six subjects; trimethylarsine oxide (TMAO) and arsenocholine (AsC) were not detected in any of the specimens. MMA and DMA concentrations showed a slight increasing trend from the fourth day of SF intake, but the differences were not significant. Urine concentrations of seven essential elements did not change throughout the 14 days of SF intake.

The results of our study are consistent with other studies performed in cultured cells and animal models. Given the efficacy of SF in humans, SF presents a promising agent in the prevention and treatment of chronic arsenic poisoning.

I-11. スポット尿中無機ヒ素代謝産物濃度の個人内・個人間変動

○小栗朋子 鈴木弥生 久田文 吉永淳
東京大学新領域創成科学研究科

【はじめに】

無機ヒ素 [As(V) + As(III), iAs] 曝露による健康影響は 1970 年以降、地下水汚染地域を中心に大きな問題となった。iAs の健康影響調査のための曝露評価には、スポット尿中 iAs 代謝産物濃度を用いたバイオモニタリングが地下水汚染地域で広く用いられている。しかしながら iAs の生物学的半減期は尿中で約 1 日と比較的短時間であることから、対象者の iAs 摂取と尿サンプリングのタイミングによっては、尿中濃度の個人内変動が大きい可能性がある。地下水汚染地域においては 1 回分のスポット尿中 iAs 代謝産物濃度であっても長期間の日常的 iAs 曝露レベルを反映している¹⁾という報告があるものの、主な曝露源が異なる日本人の場合、これがそのままあてはまらない可能性がある。そこで本研究では日本人の iAs 曝露による健康影響評価の一環として、スポット尿中 iAs 代謝産物濃度の個人内・個人間変動について級内相関係数 (Intraclass correlation coefficient, ICC) を用いて評価し、スポット尿中 iAs 代謝産物濃度の適用性を検討することを目的とした。

【対象と方法】

対象およびサンプリング：本研究では、事前に研究参加への同意を得た 20 歳から 37 歳の日本人成人女性 (平均 ± 標準偏差：25 ± 5 歳) 14 名を調査対象者とした。2009 年 7 月から 2010 年 1 月までの期間中、約 3 週間ごと (20.3 ± 7.3 日) に 5 回、早朝スポット尿試料のサンプリングを行い、同時にサンプリング前日の食事内容に関する質問票への回答を依頼した。対象者 14 名の属性は会社員 2 名、大学生 10 名、不明 2 名であり、これら対象者のサンプリング前日の食事 210 食分のうち、欠食は 4%であった。

As 分析：尿試料は純水を用いて 5 倍希釈後、0.45 μm メンブランフィルターでろ過したものを検液とし、液体クロマトグラフィー水素化物発生-ICP 質量分析法 (LC-HG-ICPMS) での分析に供した。LC カラムは逆相型分離カラム CAPCELL PAK C18 MG S3 (Shiseido Co. Ltd.)、移動相は 10 mM 1-ブタンスルホン酸-4 mM マロン酸-4 mM 水酸化テトラメチルアンモニウム-0.05%メタノール (pH 3.0) を用い、流速 0.5 mL/min²⁾ とした。HG 法の反応試薬は 0.49 M 塩酸、還元剤は 1% テトラヒドロホウ酸ナトリウム溶液 (0.1 M 水酸化ナトリウム) とし、各々 1.8 mL/min で流した。試料導入量は 20 μL、検出器は ICP-MS (Agilent 7500ce, Agilent 製) を用い、m/z = 75 で測定を行った。本測定系にて S/N = 3 より算出した検出下限は、As(V), As(III), MMA,

DMA で 0.39, 0.19, 0.15, 0.22 ng As/g (尿中濃度) であり、認証標準物質 NIES CRM No.18 Human urine 中 As 化合物の併行精度は 2.6 - 5.8%、各 As 化合物濃度は既往文献値と同程度であったため、本測定系は精度・真度ともに良好であると判断した。尿中 iAs 代謝産物濃度はクレアチニン濃度を用いて尿量補正を行った。また iAs 曝露量指標として尿中 iAs + MMA 値を用いた³⁾。個人内・個人間分散値は一元配置分散分析を用いて算出し、ICC は Rosner⁴⁾ のランダムモデルにて、 $ICC = (\text{個人間分散値}) / (\text{個人間分散値} + \text{個人内分散値})$ とした。

【結果と考察】

尿中濃度：表 1 に対象者 14 名各 5 回 (計 70 検体) の尿中代謝産物濃度の中央値 (最小 - 最大)、幾何平均 (幾何標準偏差) を示した。尿中 As(V) の検出率は低かった (36%) ことからこれ以降の統計解

表 1 尿中 iAs 代謝産物濃度(μg/g-cre)(n=70)と ICC

	Min	Median	Max	GM (GSD)	ICC
尿中 iAs + MMA 値の中央値	<LOD	0.650	21.4	0.656 (2.68)	0.15
As(V)	<LOD	<LOD	2.69	<LOD	-
As(III)	<LOD	0.204	11.9	0.161 (3.61)	0.10
MMA	<LOD	0.388	7.94	0.331 (3.13)	0.22
DMA	1.30	7.61	72.5	7.25 (2.37)	0.23

析は行わなかった。対象者の尿中 iAs + MMA 値の中央値は 0.650 μg As/g-cre であり、日本人成人男性 (5.7 μg As/g-cre, n = 210)³⁾、アメリカ成人男女 (1.7 - 1.9 μg As/g-cre, n = 60)⁵⁾ と比べるとやや低い値であった。これは対象者数が少ないため、食習慣の偏りが反映されている可能性がある。

ICC：各対象者から採取された 5 回の尿中 iAs 代謝産物濃度について ICC を算出したところ (表 1)、Rosner による ICC の評価基準 poor reproducibility (ICC < 0.4) に該当した。よって、1 回のスポット尿中 iAs 代謝産物濃度は長期間の日常的な iAs 曝露レベルを反映しておらず、1 回のスポット尿で個人の日常的 iAs 曝露レベルを推定することは不適當であると考えられた。そこで尿中 iAs + MMA 値について ICC の評価基準 good reproducibility (0.4 ≤ ICC < 0.75) に該当するための必要サンプリング回数を算出したところ 3.7 (回) となり、個人の日常的な iAs 曝露レベルを把握するためには少なくとも 4 回分のスポット尿中 iAs + MMA 値の平均が必要と考えられる。

【結論】

1 回分のスポット尿中 iAs 代謝産物濃度は日常的な iAs 曝露の個人間変動を検出する指標として不適であり、スポット尿を用いて個人の日常的 iAs 曝露レベルを評価するには少なくとも 4 回以上スポット尿サンプリングを行い、その尿中濃度の平均値を用いる必要があることがわかった。

Reference 1) Kile et al. *Environ. Health Perspect.*, 117, 455-, 2009, 2) Narukawa et al. *Appl. Organomet. Chem.*, 20, 565-, 2006, 3) Hata et al. *J. Occup. Health*, 49, 217-, 2009, 4) Rosner *Fundamentals of biostatistics*, 2006, 5) Navas-Acien et al. *Environ. Health Perspect.*, 117, 1428-,

11 月 19 日 (土)

2009.

Intra- and inter-individual variability in urinary concentration of inorganic arsenic metabolites in Japanese subjects.

Tomoko Oguri, Yayoi Suzuki, Aya Hisada and Jun Yoshinaga
The University of Tokyo

Urinary concentrations of inorganic arsenic (iAs) metabolites are used as biomarker of exposure. The aim of this study was to compare inter- and intra-individual variability of urinary iAs metabolites in Japanese subjects for evaluating whether single spot urine is suitable medium for long-term iAs exposure assessment. We collected five spot urine samples from each of 14 healthy female subjects for 4 - 5 months at 2 - 3 wks interval. Urinary iAs metabolites concentrations were determined by liquid chromatography-ICP mass spectrometry with hydride generation system. The median concentration of iAs + MMA in 70 urine samples was 0.650 $\mu\text{g As/g-cre}$ (range: <LOD - 21.4). The intraclass correlation coefficient of urinary concentration of iAs metabolites of the 14 subjects were 0.10 - 0.23, indicating poor reproducibility. Concentration of iAs in single spot urine is not a suitable biomarker of long-term exposure levels of iAs in Japanese at individual level; it was estimated that four spot urine samples were required from a subject for that purpose.

I-12. アンチモンのラット経口投与による経世代影響

○田中 昭代、平田 美由紀、清原 裕
九州大学大学院医学研究院 環境医学分野

1. はじめに

アンチモン化合物は各種樹脂・ゴム・繊維の難燃助剤、触媒・ガラスの清澄剤・顔料・減摩剤など幅広く用いられ、主に三酸化アンチモンが用いられている。しかし、アンチモン(Sb)の飲料水投与による動物実験においては、三酸化アンチモン(antimony trioxide;ATO)が難溶性であることから、可溶性の錯体である酒石酸アンチモニルカリウム(antimony potassium tartrate;APT)が用いられ、APTの毒性がSbの経口毒性として評価されてきた。

今まで、同一実験でATOとAPTの飲料水経口投与による毒性評価が行われていないことから、今回、ラットを用いてSbとして低濃度の5 ppm (5mg Sb/L)のATOおよびAPTを飲料水として、成熟期、妊娠期、授乳期の約4ヶ月間にわたって投与し、妊娠、出産への影響、Sbの体内分布、胎盤移行について検討を行った。

2. 実験方法

親動物(F0ラット)として雌雄のWistar ratを用い、ATO群、APT群、対照群の3群(雄雌各11~13匹)を設定し、1ケージあたり3匹飼育した。ATOとAPTは水道水を用いて、5 mg Sb/Lに調製した。離乳直後(3週齢)から5 ppmのATOおよびAPT溶液を雌雄のF0ラットに飲料水として投与した。対照群には水道水を投与した。餌は自由摂食させた。投与開始より10週目(13週齢)で同じ投与群のオスとメスを交配させ、妊娠確認後、F0オスラットはF0メスラットから離し、群飼に戻し、F0メスラットは個飼で飼育した。出産後1日目に各腹の仔ラット(F1)数を8匹に合わせ、F1ラットは生後3週間後の離乳時まで哺育した。F0ラットのメスは19週齢(離乳時)、雌雄のF1ラットは3週齢(離乳時)で安楽死させ、F0メスラット、F1ラットの成長、妊娠、出産に係わる各指標の評価を行った。Sb濃度測定はF0メスラットでは血清および全血、生後1日目のF1ラット、離乳直後(生後21日目)のF1メスラット全血を用いた。5 mg/Lに調製したATOおよびAPT液は0.22 μmのフィルターでろ過後、ろ液中Sb濃度の測定を行い、Sb濃度は各々1.6 mg/L、5.0 mg/Lであった。

各項目の統計解析には分散分析後 Student's *t*-test を用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 結果および考察

F0メスラットのATOおよびAPT群の摂餌量、飲水量、臓器重量、出産成績や性周期の指標は対照群と比べて有意な差は認められなかった。F1雌雄ラットの授乳期間中の体重増加に関し、ATOおよびAPT群では対照群と比べて有意な差は認められなかった。

Table 1 Antimony concentration in tissues of F0 and F1 rats

Group	F0(Female)		F1 PND ^c 1	F1(Female) PND 21
	Blood (μ g/g)	Serum (μ g/ml)	Whole body (μ g/g)	Blood (μ g/g)
Control(9) ^a	0.00 \pm 0.00	ND ^b	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
ATO(13)	8.67 \pm 4.50	0.01 \pm 0.01	0.12 \pm 0.05	0.74 \pm 0.28
APT(9)	18.78 \pm 6.42	0.03 \pm 0.01	0.26 \pm 0.08	1.76 \pm 0.42

Note. Data are expressed as Mean \pm SD

a: No. of rats examined

b: Measurements are lower than quantitative limit

c: Post natal day

F0 メスラットの APT 群の全血、血清、生後 1 日目 Whole Body、離乳直後の生後 21 日目 F1 メスラット全血中 Sb 濃度を Table 1 に示している。F0 メスラット APT 群の全血、血清 Sb 濃度は ATO 群の各々約 2 倍、3 倍であり、Sb 濃度の全血/血清比は ATO 群では約 600 倍、APT 群は 800 倍であった。F1 ラット生後 1 日目の whole body、生後 21 日目の全血の Sb 濃度は APT 群では ATO 群の各々約 2 倍の濃度であり、ATO、APT 群 F1 メスラット全血中 Sb 濃度は各々 F0 メスラットの約 1/10 の値を示した。

APT 群の F0、F1 の全血、血清の Sb 濃度は ATO 群の 2~3 倍であり、投与液ろ液の Sb 濃度に依存すると考えられた。F1 生後 1 日目のラットから Sb が検出されたことより、Sb は胎盤を介して仔に移行することが明らかになった。

Two-generation reproductive toxicity study of antimony trioxide and antimony potassium tartrate via drinking water in rats

○Akiyo Tanaka, Miyuki Hirata, Yutaka Kiyohara

Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University

A two-generation reproductive toxicity study of the effects of antimony trioxide (ATO) and antimony potassium tartrate (APT) was conducted in female rats following administration of drinking water at 5 ppm antimony. No differences were observed concerning the reproductive outcomes of dams and the growth of pups between the Sb-treated groups and the control group. From the fact that antimony was detected in whole body of pups on the first day of birth, it is apparent that antimony transfer to pups through the placenta when administered orally in dams.

I-13. 数種の海産物に含まれる水溶性および脂溶性

ヒ素化合物の検討

○古田和也・筒井雄基・野田里美・町田倫子・臼井将勝・花岡研一(水大校)

【緒言】

海産生物に含まれるヒ素は、主に毒性の低い水溶性ヒ素化合物として存在する。一方、この水溶性ヒ素化合物に加え、脂溶性のヒ素化合物も存在する。しかし、この脂溶性のヒ素化合物については、その毒性、形態について、あまり研究が進んでいない。そこで本研究では、鮮魚および市販魚油を試料として分析を行い水溶性および脂溶性ヒ素化合物の形態について検討した。

【方法】

試料：生鮮マイワシ、生鮮ホシザメ、生鮮マアジについては鮮魚店で購入したものを用いた。この他、市販のイワシ油も試料として用いた。生鮮マイワシについては、普通筋および血合筋を分取し、凍結乾燥後、粉碎して分析に用いた。生鮮ホシザメについては、普通筋、血合筋、脳、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、胃、腸の9部位を分取し、それぞれ凍結乾燥後、粉碎して分析に用いた。市販の生鮮マアジからは、冷風乾燥機を用いた開き干しマアジ(冷乾アジ)および天日開き干しマアジ(天日アジ)を作製した。これらのマアジ筋肉についても凍結乾燥後、乳鉢で粉末にした。脂質の抽出：Folchの方法に準じて水溶性画分、脂溶性画分に分画した。極性脂質画分の分画：シリカゲルを用いるバッチ法により、脂溶性画分を極性脂質画分および中性脂質画分に分画した。極性脂質の部分加水分解：Dawsonの方法によるアルカリ加水分解を行い、極性脂質画分をアルカリ安定画分およびアルカリ不安定画分に分画した。総ヒ素量の定量：各試料に硝酸を添加し、マイクロ波分解装置で分解後、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS法)を用いて試料中の総ヒ素濃度を測定した。硝酸加熱溶解 HPLC-ICP-MS法：各試料に硝酸を添加し、加熱溶解後、HPLC-ICP-MSによりヒ素化合物の同定を行った。分離用カラムにはNucleosil 100SAカラムおよびNucleosil 100SBカラムを用いた。

【結果および考察】

マイワシ普通筋および血合筋における水溶性ヒ素化合物画分からは、アルセノベタイン(AB)、ジメチルアルシン酸(DMAA)および1種の未知ヒ素化合物(UK)が検出された。一方、これら筋肉を硝酸加熱溶解した場合、ABおよびDMAAの他にトリメチルアルシンオキシド(TMAO)が検出された。この硝酸加熱溶解後に検出されたDMAAの濃度は、水溶性画分から検出されたDMAAの濃度の約2倍(普通筋)あるいは約6倍(血合筋)であった(図-1)。また、市販のイワシ油から調製された水溶性ヒ素化合物画分あるいはアルカリ不安定画分から、微量のメタンアルソン酸(MMA)およびDMAAが検出された。

ホシザメ各組織を硝酸加熱溶解後に分析した結果、肝臓および脳を除き、検出されたヒ素化合物の大部分がABであった。これに対し、脳および肝臓においてはTMAO、さらに肝臓においてはMMA およびDMAAも検出された。

生鮮マアジ普通筋を硝酸加熱溶解後に分析した結果、主要なヒ素化合物はABであった。しかし、その総ヒ素に対する割合は、冷乾マアジおよび天日干しマアジ普通筋の両者で有意に減少した。反対に、生鮮マアジ普通筋におけるTMAOの総ヒ素に対する割合は、冷乾マアジおよび天日干しマアジ普通筋の両者で有意に増加した。

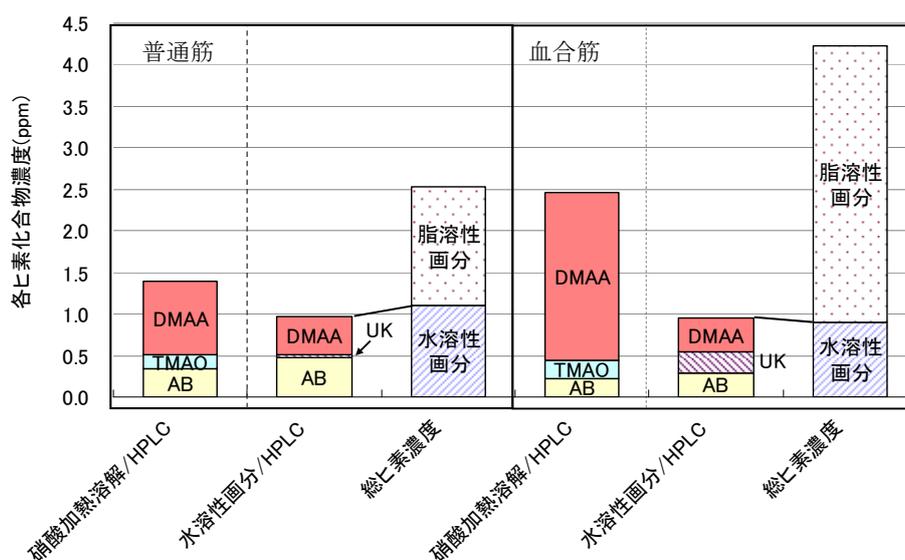


図1 マイワシ普通筋および血合筋における各ヒ素化合物の濃度

Water-soluble and lipid-soluble arsenic compounds in several marine foods

°Kazuya Furuta, Yuki Tutui, Satomi Noda, Michiko Machida, Masakatu Usui, Ken'ichi Hanaoka

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University

In this study, we investigated the water-soluble and lipid-soluble arsenic compounds present in tissues from several fishes. In the water-soluble arsenic extracts prepared by the method of Folch et al. (extract-(a)), arsenobetaine (AB), dimethylarsinic acid (DMAA) and an unknown compound were detected both in ordinary and dark muscles of sardine. On the other hand, besides AB and DMAA, trimethylarsine oxide (TMAO) was detected in the extracts prepared by a nitric acid-based partial-digestion method (extract-(b)). The DMAA concentration in the extract-(b) from the dark muscle was much more than that in the extract-(a) (Fig. 4). In 9 tissues from star-spotted shark, the major arsenic compound in the extract-(b) was AB. TMAO, DMAA and monomethylarsonic acid were also detected in some tissues.

I-14. クロマグロ筋肉に存在する脂溶性ヒ素化合物の

マウスにおける体内動態

○町田倫子・小西玄治・古田和也・臼井将勝・花岡研一(水大校)

【緒言】

これまでに、海産食品中に含まれるヒ素およびその化合物の形態や含有量の調査が精力的に進められ、水溶性ヒ素化合物については哺乳類での代謝および体内動態についても理解が深まりつつある。しかし、脂溶性ヒ素化合物に関する研究例は極めて少ない。脂溶性ヒ素化合物の代謝および体内動態を明らかにするためには、糞や尿中に排泄されるヒ素化合物だけでなく、体内の蓄積についても検討する必要がある。また、脂質代謝は主に肝臓で行なわれる。

そこで本研究では、海産食品由来の脂溶性ヒ素化合物の体内動態について知見を得るために、マウスにおける天然クロマグロ大トロ由来の脂溶性ヒ素化合物の肝臓への蓄積について調査した。同時に重要な脂肪組織であり、脂質の移行が注目される脳についても調査を行なった。脂溶性ヒ素化合物を含有する脂質としては、天然クロマグロの大トロ部位から抽出して用いた。この天然クロマグロ大トロ部位については、これまでの本研究室における分析の結果、比較的高濃度の脂溶性ヒ素化合物を含有すること、および一般に人気のある食材であることから着目した。

【試料および方法】

マグロ抽出油:天然クロマグロの大トロ部位からクロロホルム-メタノール法にて抽出・精製した脂質画分(FTO:Fatty tuna-oil)を用いた。脂溶性ヒ素化合物標品:合成ホスファチジルアルセノコリン(PAC)からグリセリルホスホリルアルセノコリン(GPAC)を誘導して標品とした。ヒ素化合物の抽出:Folchの方法を用いた。極性脂質画分の分画:シリカゲルを用い、極性脂質と中性脂質に分画した。極性脂質の部分加水分解:Dawsonの方法によるアルカリ加水分解を行い、アルカリ不安定画分およびアルカリ安定画分を得た。総ヒ素の定量:誘導結合プラズマ-質量分析法(ICP-MS)を用いた。ヒ素化合物の分析:絶対検量線法によるHPLC-ICP-MS分析法を用いた。実験動物:Sea:ddYマウス(オス、10週齢、SPF)を10匹購入して馴化させた後、FTO投与群およびControl群に分けて試験を行なった。飼料:一般的な飼育にはマウス維持用精製飼料(AIN-93M)を購入して用いた。投与試験においてはAIN-93MにFTOまたは大豆油を3%添加となるように加えたものを用いた。投与方法:24時間ごとに各添加飼料7gを与え、飼料残量から摂餌量を求めた。投与期間は14日間とした。肝臓および脳の採取:麻酔下で開腹し、

1月19日(土)

肝臓および胆のうを摘出した。脳についてはマウス頭部を切開し、全脳を摘出した。肝臓、脳ともに、超純水で洗浄し-80°Cで凍結保存した。

【結果および考察】

ICP-MS 分析を行った結果、天然クロマグロ大トロ部位に含まれる総ヒ素量の約 50% が脂溶性画分に存在していた。PL/アルカリ不安定画分の HPLC-ICP-MS 分析の結果、FTO では GPAC およびジメチルアルシン酸 (DMAA)、大豆油では微量の DMAA と考えられるピークが検出された。FTO 群の肝臓の PL/アルカリ不安定画分では GPAC、DMAA およびいくつかの未同定ヒ素化合物 (UK) が検出された。一方、Control 群では DMAA およびいくつかの UK のみが検出された。このことから、この GPAC はマグロ抽出油に由来すると推測した。脳では、FTO 群の PL/アルカリ不安定画分より、メタンアルソン酸 (MMA) の他、微量の GPAC が検出された。一方、Control 群では、GPAC は検出されなかった。このことから、肝臓におけると同様、検出された GPAC はマグロ抽出油に由来すると推測した。以上の結果より、一部の脂溶性ヒ素化合物が体内に移行・蓄積する可能性も示された。

現在、魚油添加飼料を短期投与したマウスおよび長期投与したマウスの両者について分析を行い、PAC における蓄積性の有無について検討中である。

Disposition of lipid-soluble arsenic compounds in mice following oral administration of fish oil extracted from ordinary muscle of bluefin tuna *Thunnus orientalis*

°Michiko Machida, Genji Konishi, Kazuya Furuta, Masakatsu Usui and Ken'ichi Hanaoka

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University

Total lipids were extracted by the method of Folch et al. The arsenic compounds that separated into the total lipid layer (chloroform layer) were referred to as lipid-soluble arsenic compounds. With mild alkaline hydrolysis, the alkali-labile lipid-soluble arsenic compounds were prepared from liver and brain of mice following oral administration of the total lipids extracted from ordinary muscle of bluefin tuna *Thunnus orientalis*. The water-soluble arsenic residues in the alkali-labile fractions were analyzed by high performance liquid chromatography-inductively coupled mass spectrometry. As a result, glycerylphosphorylarsenocholine was detected as one of the arsenic residues derived from lipid-soluble arsenic compounds occurring in both tissues.

I-15. 国内水田土壌からのヒ素の溶出に及ぼす微生物の影響

○天知誠吾¹、中村崇志¹、大塚俊彦¹、櫻井和宏¹、木村建太¹、工藤桂太郎¹、
牧野知之²、山口紀子²

¹千葉大院・園芸・応用生命化学、²農業環境技術研究所

1. はじめに

土壌中でヒ素は主にヒ酸と亜ヒ酸として存在している。ヒ酸はフェリハイドライドなどの鉄(水)酸化物に吸着しやすいが、湛水等により酸化還元電位が低下すると、一部が亜ヒ酸として溶出することが知られている。農産物からのヒ素摂取量において、我が国では米の寄与が大きいことがわかっているため、特に水田土壌からのヒ素の溶出メカニズムを理解することは重要である。これまでに、バングラディッシュやカンボジアのヒ素汚染堆積物を用いた研究から、ヒ素の溶出には鉄還元細菌やヒ酸還元細菌といった嫌気性微生物が関与することが示唆されている。そこで本研究では国内の水田土壌を対象として、土壌嫌気培養試験、ヒ酸還元細菌の分離、滅菌土壌への細菌接種試験、機能遺伝子マーカーの解析などを行い、ヒ素の溶出に及ぼす微生物の影響とその溶出メカニズムを解明することを目的とした。

2. 方法

島根県より採取した水田土壌および休耕田土壌を用いた。いずれの土壌も総ヒ素は約40 mg kg⁻¹であった¹。土壌20 gを純水60 mLと混合し、窒素雰囲気下密栓ガラスバイアル中で嫌気培養し、液層のヒ素をHPLC-ICPMSで化学形態別に定量した。ヒ酸還元細菌の分離は酢酸を電子供与体、ヒ酸を唯一の電子受容体とする嫌気性培地で集積培養を行い、アガーシェイク法で純粋分離した。集積培養に伴う微生物群集構造の変化はPCR-DGGEで追跡した。土壌の滅菌はオートクレーブ(121°C, 2h)またはγ線照射(30~50 kGy)で行った。異化的ヒ酸還元酵素遺伝子(*arrA*)のPCR増幅は、土壌より抽出・精製したDNAを鋳型として、Songら(FEMS Microbiol. Ecol., 68, 108-117, 2009)の設計したdegenerateプライマーを用いてnested PCRを行い、得られた産物をクローニング・シーケンス後、Clustal Wで系統解析を行った。アミノ酸配列が98%以上相同なものを1つのOTUとした。

3. 結果と考察

土壌の嫌気培養(60~90日)に伴い、Ehの低下および液層へのヒ素の溶出(173~468 ppb)が観察された。溶出したヒ素の87~97%が亜ヒ酸であった。土壌から溶出した亜ヒ酸と2価鉄濃度の間には高い相関が認められた。オートクレーブ滅菌した試料ではヒ素の溶出は全く観察されなかった。土壌より集積培養を経て3種類の新規なヒ酸還元細菌を分離した。これらはそれぞれ*Geobacter*、*Anaeromyxobacter*、*Desulfitobacterium*属細

1月19日(土)

菌に近縁で、ヒ酸の他に鉄還元能も有していた。 γ 線滅菌土壌を低 Eh 条件で安定的に培養する系を確立し、ここにヒ酸還元または鉄還元集積培養微生物群集を接種したところ、7日間で60~70 ppbの垂ヒ酸の溶出が観察され、顕著な鉄の溶出も見られた。現在、上記分離株の接種試験を行っている。土壌より抽出したDNAより、ヒ酸の還元に関する酵素遺伝子 (*arrA*) をPCR増幅し、その系統解析を行った。その結果、*Geobacter* 属細菌の ArrA タンパクに近縁なアミノ酸配列が主に検出された。以上の結果より、今回用いた水田土壌中で *Geobacter* 属細菌がヒ素の溶出に何らかの役割を演じていることが示唆された。本研究は農林水産省からの受託事業「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発(ヒ素・カドミ) AC-1100」の一環として実施されたものである。

(参考)

¹Yamaguchi, N *et al.*, Arsenic release from flooded paddy soils is influenced by speciation, Eh, pH, and iron dissolution (2011) *Chemosphere*, 83, 925-932.

Microbial influences on arsenic release from Japanese paddy soils

S. Amachi¹, T. Nakamura¹, T. Ohtsuka¹, K. Sakurai¹, K. Kimura¹, K. Kudoh¹,
T. Makino² and N. Yamaguchi² (¹Chiba Univ. and ²Nat. Inst. Agro-Environ. Sci.)

Predominant arsenic species in soil environment are arsenate (As(V)) and arsenite (As(III)). Under oxic conditions, As(V) is strongly sorbed on Fe mineral phases such as ferric (hydr)oxide. Under reducing conditions, on the other hand, ferric (hydr)oxide undergoes reductive dissolution, and arsenic sorbed on mineral phases is released mainly as As(III). Metal-reducing bacteria may play key roles in the process of arsenic release, either through reduction and dissolution of arsenic-bearing Fe minerals, or through a direct reduction of sorbed As(V). Since arsenic release occurs in flooded paddy soils, rice is a major source of dietary intake of inorganic arsenic in the Japanese population. In this study, we determined microbial influences on arsenic release from Japanese paddy soils by using culture-dependent and -independent approaches. Our results suggest that arsenate-reducing *Geobacteraceae* bacteria might play significant roles in arsenic release from Japanese paddy soils.

I-16. 湛水期・落水期の水田土壌の気相率と溶液中ヒ素・カドミウム濃度の関係

○中村 乾¹, 加藤英孝¹, 鈴木克拓², 本間利光³

農業環境技術研究所¹, 中央農業総合研究センター², 新潟県農業総合研究所³

[背景・目的]

水田土壌中のヒ素(As)は還元的条件で可溶化し, 酸化的条件で不溶化するのに対し, カドミウム(Cd)は酸化的条件で可溶化し, 還元的条件で不溶化する。そのため水田土壌溶液中のAs濃度とCd濃度の間にはトレードオフの関係があるとされている。これらを支配する水田土壌の酸化還元状態は, 酸素拡散を通じて気相率の影響を受けると考えられる。ここでは, 水田土壌溶液中As濃度およびCd濃度と気相率との関係を明らかにしようとした。

[材料と方法]

土壌類型の異なる水田圃場I圃場(中粗粒強グライ土)およびN圃場(細粒灰色低地土)の長め湛水区および節水栽培区から, 中干し期(2009年6月下旬), 出穂期(2010年8月下旬)および収穫前落水期(2008年9月下旬)に100 cm³の不攪乱土壌試料を採取した(採取深さ0~5, 5~10および10~15 cm)。採取試料は気相率, 体積含水率を測定するとともに遠心分離により土壌溶液を採取し, AsおよびCd濃度をICP-MSで測定した。

長め湛水区・節水栽培区ともに5月末にイネを定植し, 6月初旬まで湛水後, 約20日間中干しを行った。長め湛水区は間断灌漑を行った後, 7月下旬から9月初旬まで湛水した後, 9月初旬に落水し, 10月初旬の収穫までその状態を保った。節水栽培区では中干し後収穫まで降雨のみで灌水しなかった。

[結果と考察]

土壌類型, 水管理, 採取時期によらず, 溶液中AsおよびCd濃度と気相率の関係には一貫した傾向が見られた。いずれの圃場・処理区においても, 溶液中As濃度は気相率0.03–0.10 m³ m⁻³をしきい値とし, 濃度2.0 μg L⁻¹以上のAsが検出されるのは気相率がそれ以下の時に限られた(Fig. 1)。一方, 気相率と溶液中Cd濃度との間には, ほぼ原点を通る直線により近似される正の相関関係があった(Fig. 1)。この関係は, 中干し期に最も明瞭に見られ, 両者の相関係数はI圃場では0.81, N圃場では0.73であった(ともに0.1%水準で有意)。このように, 溶液中As濃度とCd濃度は必ずしも相補的關係にあるわけではなく, 気相率0.10–0.13 m³ m⁻³付近では, 両者がともに低い傾向があった(Fig. 2)。これらの結果は, 水管理により, 気相率をAs濃度変化のしきい値よりもやや高めに維持することにより水田土壌溶液中As濃度とCd濃度をともに当該圃場で可能な低濃度レベルに抑えられることを示唆する。

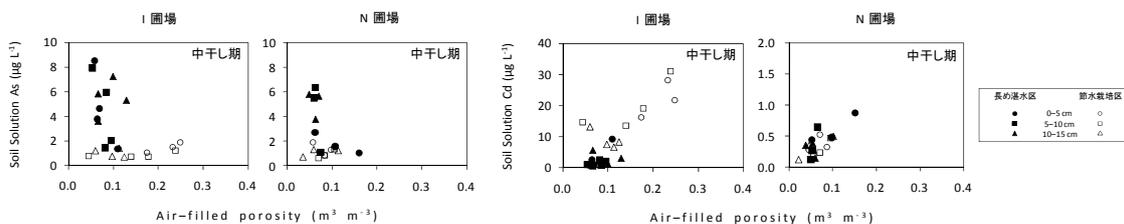


Fig. 1 水田土壌溶液中ヒ素(As)濃度およびカドミウム(Cd)濃度と気相率との関係. 中干し期 (2009 年 6 月) に I 圃場および N 圃場の長め湛水区・節水栽培区で調査.

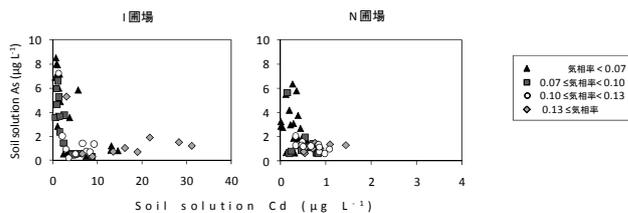


Fig. 2 水田土壌溶液中ヒ素(As)濃度とカドミウム(Cd)濃度との関係. 中干し期 (2009 年 6 月下旬), 出穂期 (2010 年 8 月下旬) および収穫前落水期 (2008 年 9 月下旬) に I 圃場および N 圃場の長め湛水区・節水栽培区で調査.

Air-filled porosity controls on dissolved arsenic and cadmium concentrations in paddy soils under submerged and drained conditions

○K. Nakamura¹, H. Katou¹, K. Suzuki², and T. Honma³

¹ National Institute for Agro-Environmental Sciences, ² National Agricultural Research Center, Hokuriku Research Center, ³ Niigata Agricultural Research Institute

Relations of arsenic (As) and cadmium (Cd) concentrations to reductive/oxidative conditions in soil solution in paddy fields imply the "trade-off" of As and Cd concentrations if they are to be minimized by appropriate water management practices. Reductive/oxidative conditions are most likely controlled by the oxygen diffusion, which in turn is governed by the air-filled porosity in soil. The objective of this study was to elucidate the relations between the dissolved As and Cd concentrations and the air-filled porosity in paddy soils. Cylindrical soil cores were collected from paddy fields at different water management stages during rice growing seasons. The As and Cd concentrations were determined on soil solutions extracted by centrifugation, while the air-filled porosity determined gravimetrically. Dissolved As concentrations higher than $2 \mu\text{g L}^{-1}$ were found only in the soil samples having an air-filled porosity smaller than a threshold value of $0.03\text{--}0.10 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$. The dissolved Cd concentrations, on the other hand, linearly increased with the air-filled porosity. These relations were observed irrespective of the fields and the sampling times. The results suggest that by adopting appropriate water management practices so as to maintain the air-filled porosity slightly above the threshold value for As, both the dissolved As and Cd concentrations can be simultaneously kept near the lowest levels achievable in a given field.

I-17. 環境微生物によるヒ素の酸化・還元にあぼす

抗生物質の影響

○山村茂樹、渡邊圭司、渡邊未来
(独)国立環境研究所 地域環境研究センター

1. はじめに

近年、医薬品類による環境汚染問題が欧米を中心として大きな関心を呼んでおり、我が国でも広範な水環境中からの検出事例が、活発に報告されるようになってきた¹⁾。なかでも抗生物質は、臨床の現場のみならず、畜産業や水産業でも感染症防止の目的で使用されているため、環境中における抗生物質耐性細菌の発生や、耐性遺伝子の伝播・拡大が憂慮されている。抗生物質耐性細菌の増加によるリスクとしては、ヒトへの感染などといった直接的な影響が注目されているが、その一方で、物質循環の重要な担い手である微生物の群集構造を大きく変遷させる可能性がある。

ヒ素は、自然環境中に極低濃度で広く存在しているが、一様に分布しているわけではなく、局所的に高濃度で偏在している場合もある。また、地熱水にもしばしば含まれるため、温泉などから湧出して下流域に運ばれ、その一部は河川や湖沼の底泥に蓄積することがある²⁾。環境中での広範な微生物活動が、炭素や窒素などのいわゆる親生物元素の循環に多大な貢献をしていることは周知の事実であるが、近年の研究から、ヒ素の環境動態にも深く関わっていることが明らかとなっている³⁾。東南アジアを中心に、ヒ素を高濃度で含む地層からの地下水の取水が大規模な健康被害を引き起こすケースも報告されているが、その地層から水相へのヒ素溶出は、主に微生物の活動に起因すると考えられている⁴⁾。

一方、ヒ素を含めた金属に耐性を持つ細菌は、抗生物質に対する耐性も同時に有することが知られている。従って、抗生物質の水環境中への流入には、ヒ素耐性細菌の優先化を間接的に促し、ヒ素の環境動態を大きく変化させる恐れがあるが、これまでにその可能性を検討した研究例はない。そこで本研究では、ヒ素の環境動態に深く関わる微生物によるヒ酸塩〔As(V)〕還元及び亜ヒ酸塩〔As(III)〕酸化に着目し、それらにあぼす抗生物質の影響を個別の活性試験により調べた。

2. 方法

国立環境研究所構内の池から採取した底泥サンプルを Tris-HCl バッファー(pH 7.2)で3回洗浄し、遠心分離(8000 rpm, 5 min)にて底泥を回収した。その後、固相と液相の容積比がほぼ 1:1 となるよう同バッファーで懸濁したものを実験に用いた。50mL 容

1月19日(土)

量バイアルビンに分注した As(V)もしくは As(III)(1 mM)を含む乳酸無機塩培地 20mL に、クロラムフェニコール(Cm)を終濃度で 50 mg/L となるよう加え、上述の底泥懸濁液 1mL を接種して好気及び嫌気の両条件下において振盪培養(120 rpm, 30°C)を行った。また、対照として、Cm を加えずに同様の実験を行った。実験期間中、適時サンプリングを行い、溶液中の As(V)及び As(III)濃度をイオンクロマトグラフィーにより測定した。

3. 結果および考察

好気条件下において As(V)還元試験を行った結果、Cm を加えていない対照系では、実験開始 1 日後にほぼ全量の As(V)が還元され、それに伴う As(III)の生成が見られた。また、4 日後には、As(V)濃度が増加へと転じ、それに伴う As(III)の減少が認められたことから、還元されて生じた As(III)の酸化も起きていた。これに対して Cm を加えた実験系では、As(V)の還元は対照系と同様に認められたが、その後の As(V)及び As(III)濃度に変化はなく、As(III)の酸化は見られなかった。同様の条件で行った As(III)酸化試験でも、Cm の添加によって As(III)酸化が強く阻害されることが確認された。ここで、好気性細菌による As(V)還元は、ヒ素耐性機構により行われていると考えられるが、一般に、ヒ素などの金属耐性遺伝子は、薬剤耐性プラスミド(R プラスミド)に含まれる事が多いため、金属耐性細菌は抗生物質に対する交差耐性を示す場合がある。実際に、ヒ素耐性遺伝子を含む R プラスミドの存在も知られている⁵⁾。従って、ここで得られた結果は、Cm が選択圧となって、As(V)還元能を持つ好気性ヒ素耐性細菌が、間接的に優先化されたことを示唆している。また、Cm 耐性を持たない As(III)酸化細菌が阻害を受け、結果として As(V)還元のみが生じたものと考えられた。

一方、嫌気条件での同様の実験では、対照系でのみ As(V)の還元が確認され、Cm 添加系では還元が強く阻害された。従って、嫌気条件では、As(V)還元へのヒ素耐性細菌の寄与率は低く、Cm によって As(V)を嫌気呼吸に用いる異化型 As(V)還元細菌の活性が阻害された結果、As(V)還元が起き難くなると考えられた。なお、全ての系において、As(III)の酸化は確認されなかった。

4. 結論

以上、本研究の結果から、抗生物質の一つである Cm が、環境微生物によるヒ素の酸化・還元に大きく影響することが示された。一般的に、As(III)より吸着性が高い As(V)は、土壌・底泥中の Fe(III)や Al 酸化物によって固相に保持され易い。一方、筆者らの最近の研究から、好気環境では As(V)還元と As(III)酸化が繰り返し、もしくは同時に起きることで、結果的に As(V)が優先し、固相に保持されている可能性が示された⁶⁾。従って、Cm 等の抗生物質が好気環境に流入すると、そのバランスが崩れることで As(V)還元が促され、固相から水相へとヒ素が移行し易くなる可能性がある。

1月19日(土)

<参考文献>

- 1) 田中宏明ら: 環境技術, 37, 834-839 (2008).
- 2) 辰巳謙一ら: 水環境学会誌, 28, 109-115 (2005).
- 3) Oremland, R.S. and Stolz, J.F.: *Science*, 300, 939-944 (2003).
- 4) Islam, F.S. et al.: *Nature*, 430, 68-71 (2004).
- 5) Whelan K.F. and Colleran E.: *J. Bacteriol.*, 174, 1197-1204 (1991).
- 6) Yamamura S. et al.: *Chemosphere.*, 77, 169-174 (2009).

<謝辞>

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金 若手研究 A (No. 23681005)の助成を受けて実施した。ここに記して謝意を表す。

II-1. 産業廃棄物処分場建設予定地で見つかった自然由来の ヒ素汚染土壌

○丸茂克美¹・小野木有佳¹

¹独立行政法人産業技術総合研究所地質情報研究部門

1. はじめに

広島県の白亜紀火山岩類は流紋岩組成であるため、一般に砒素含有量は日本列島の上部地殻の平均値程度の低い値であり 17 mg/kg 程度であると考えられる¹⁾。しかし、産業廃棄物建設予定地の白亜紀火山岩類起源の風化土壌を蛍光 X 線分析法で調べた結果、砒素含有量（蛍光 X 線分析法による全量）は 2,000 mg/kg を超過するものから、定量下限値(5 mg/kg) 以下のものまでであることが判明した。

また、こうした土壌の公定法による砒素溶出量は最大 100 mg/L を超過することが判明したものの、砒素の含有量と溶出量がいずれも高い試料と、砒素含有量が高いものの、溶出量が低い試料が存在することが判明した

(図 1)。そのため我々は、広島県の白亜紀火山岩類が露出する工事現場を対象に、蛍光 X 線透視分析装置を用いてこれらの土壌の砒素の存在形態を把握した。

2. 蛍光 X 線透視分析装置の概要

土壌は可視光線に対して不透明であるため、土壌の内部を肉眼で観察することはできないが、X 線は可視光線より透過能力が遥かに高いので、土壌内部に含まれる砒素を含有する粒子

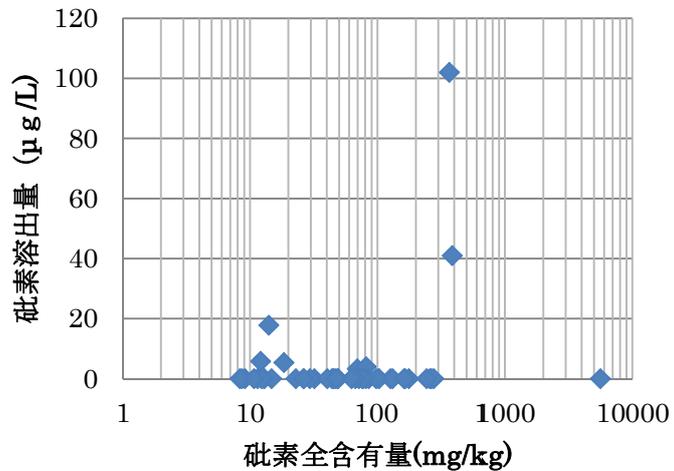


図 1：風化土壌の砒素含有量と溶出量

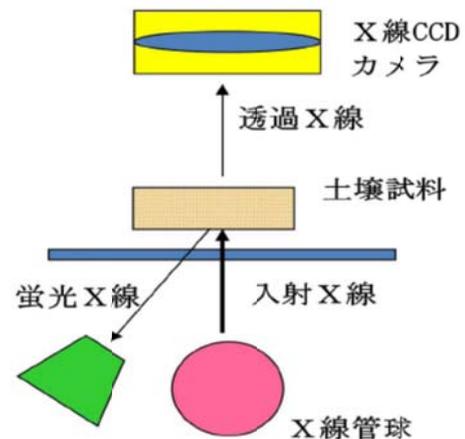


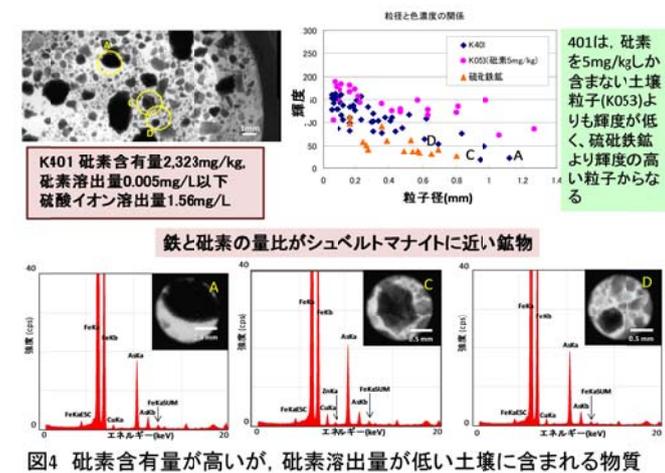
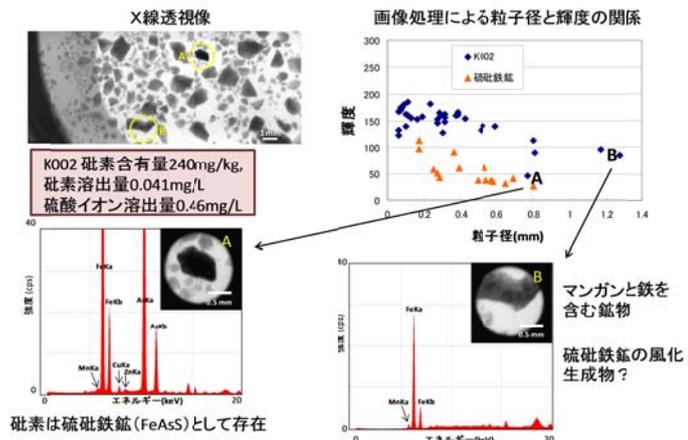
図2：蛍光 X 線透視分析装置の構造

を可視化できる。我々は蛍光X線透視分析装置を開発し、土壤汚染の原因となる土壤構成粒子の可視化に必要なX線透視像を得るとともに、これらの粒子の構成元素をエネルギー分散型蛍光X線分析法で定性分析を試みた。

蛍光X線透視分析装置を用いれば、X線 CCD カメラによって土壤粒子のX線透視像を瞬時に得ることができる。土壤粒子のX線透過量は、粒子のX線透視像の濃淡（輝度）によって表現される。粒子の比重が大きいとX線透過率が低くなり、X線透視像の輝度が低く（暗く）なる。一方、比重が小さいとX線透過率が高く、色輝度は高く（明るく）なる。従って、アルミニウムやシリコンなどの軽元素を主成分とするケイ酸塩鉱物（石英や長石など）粒子のX線透過率は、鉄や砒素、鉛などを主成分とする比重の大きな硫化鉱物（黄鉄鉱や硫砒鉄鉱など）のX線透過率よりも大きいため、ケイ酸塩鉱物の輝度は硫化鉱物の輝度より高いはずである。ただし、こうした議論は対象とする鉱物の厚みが一定であることを前提としたものであり、輝度は鉱物粒子の厚みによっても変化する点に留意する必要がある。比重が小さな粒子であっても大きな粒径の粒子は厚みがあるためX線透過率が低くなる²⁾。

3. 砒素含有量と溶出量がいずれも高い試料中の砒素の存在形態

蛍光X線透視分析装置には1.5 mm径のコリメーターが装着されているため、このコリメーターでX線を絞って土壤粒子に照射し、各土壤粒子の蛍光X線分析を行うことができる。砒素含有量が240 mg/kg、砒素溶出量が0.041mg/Lの試料のX線透視像や粒子の輝度や粒子径、コリメーターを用いた各粒子の蛍光X線スペクトルを図3に示す。輝度と粒子径との関係が硫砒鉄鉱に類似する土壤粒子（図3のA）の蛍光X線スペクトルは鉄と砒素から成り、この粒子が硫砒鉄鉱であることを示している。また他の粒子（図3のB）は硫砒鉄鉱よりも輝度が高いのに粒子径が大き



1月20日(日)

く、砒素を含まない。この粒子は硫砒鉄鉱より比重が小さい、マンガンと鉄を含む粒子で鉄とマンガンの水酸化物あると考えられる。こうした水酸化物は硫砒鉄鉱の風化過程で生成したものと考えられる。

一方、砒素含有量が 2,300 mg/kg でありながら砒素溶出量が 0.005mg/L 以下の試料(図4)のA~Dの各粒子はいずれも砒素が含まれていることが判明した。さらに、図3のAの粒子の鉄と砒素の蛍光X線強度比と図4のA~Dの粒子の鉄と砒素の蛍光X線強度比を比較すると、図4のA~Dでは鉄の蛍光X線強度に比べて砒素の蛍光X線強度が小さいものの、鉄と砒素の蛍光X線強度比は類似し、砒素を含む鉱物であるシュベルトマナイトであることを示している。X線回折の結果もこの試料にシュベルトマナイトが含まれることを示している。こうしたシュベルトマナイトは硫砒鉄鉱の風化過程で解放された砒素がシュベルトマナイトの硫酸イオンを置換、固定しているものと考えられる。

5. まとめ

火山岩類中の砒素含有量は一般に低いと考えられているが、火山岩類が風化して形成された土壌の中には砒素含有量が著しく高いものがあることが判明した。岩石の風化過程では硫砒鉄鉱などの砒素含有鉱物が分解して砒素が解放されるものの、砒素の多くはシュベルトマナイトに固定している可能性がある。こうした砒素は溶出試験でも溶出しにくいものの、硫砒鉄鉱が残存する土壌に関しては、溶出量試験の過程で硫砒鉄鉱の分解に伴って砒素が解放される可能性が高い。本研究は環境省の地球環境研究総合推進費(S2-08)の支援により実施された。

6. 参考文献

- 1) Togashi, S., Imai, N., Okuyama-Kusunose, Y., Tanaka, T., Okai, T., Koma, T. and Murata, Y. (2000) : Young upper crustal chemical composition of the orogenic Japan Arc. *Geochemistry Geophysics and Geosystem*, 1, Paper No. 2000GC000083.
- 2) 丸茂克美, 小野雅弘, 小野木有佳, 細川好則 (2010) : 可搬型蛍光 X 線透視分析装置を用いた土壌・鉱物試料の X 線イメージングと元素分析, *X 線分析の進歩* 41, 85-98.
線強度比と図4のA~Dの粒子の鉄と砒素の蛍光X線強度比を比較すると、図4のA~Dでは鉄の蛍光X線強度に比べて砒素の蛍光X線強度が小さいものの、鉄と砒素の蛍光X線強度比は類似し、砒素を含む鉱物であるシュベルトマナイトであることを示している。X線回折の結果もこの試料にシュベルトマナイトが含まれることを示している。こうしたシュベルトマナイトは硫砒鉄鉱の風化過程で解放された砒素がシュベルトマナイトの硫酸イオンを置換、固定しているものと考えられる。

1月20日(日)

5. まとめ

火山岩類中の砒素含有量は一般に低いと考えられているが、火山岩類が風化して形成された土壌の中には砒素含有量が著しく高いものがあることが判明した。岩石の風化過程では硫砒鉄鉱などの砒素含有鉱物が分解して砒素が解放されるものの、砒素の多くはシュベルトマナイトに固定している可能性がある。こうした砒素は溶出試験でも溶出しにくいものの、硫砒鉄鉱が残存する土壌に関しては、溶出量試験の過程で硫砒鉄鉱の分解に伴って砒素が解放される可能性が高い。本研究は環境省の地球環境研究総合推進費(S2-08)の支援により実施された。

6. 参考文献

- 1) Togashi, S., Imai, N., Okuyama-Kusunose, Y., Tanaka, T., Okai, T., Koma, T. and Murata, Y. (2000) : Young upper crustal chemical composition of the orogenic Japan Arc. *Geochemistry Geophysics and Geosystem*, 1, Paper No. 2000GC000083.
- 2) 丸茂克美, 小野雅弘, 小野木有佳, 細川好則 (2010) : 可搬型蛍光 X 線透視分析装置を用いた土壌・鉱物試料の X 線イメージングと元素分析, *X 線分析の進歩* 41, 85-98.

II-2. インド UP 州における地下水砒素汚染機構の検討

○伊藤健一¹, 矢野靖典¹, 宮武宗利³, 塩盛弘一郎³, 瀬崎満弘², 横田漠¹
¹宮崎大学国際連携センター, ²宮崎大学土木環境工学科, ³宮崎大学物質環境化学科

1. はじめに

ガンジス河川中流域のインド北東部ウッタール・プラデシュ州(以下, UP 州)では, 2002 年から 2004 年に地下水砒素汚染が確認された。UP 州上水道局と UNICEF が行った政府が設置の公共井戸(以下, GTW)の全井戸調査から, UP 州内 70 県のうち 20 県で砒素がインドの飲用水基準: 50 µg/L を超過し, 特にケーリ、バリア、バライチの 3 県でその割合が高いこと, バライチ県内 14 ブロック(行政区画)のうち 10 ブロックで砒素汚染が確認され, テジャワプール・ブロックでは 25%を超える井戸で 50 µg/L を超過することが確認された²⁾。しかし, 目立った健康被害が少ないことから, 汚染状況の把握が未だ十分ではなく, 汚染メカニズムの調査についてもなされていない。

そこで, UP 州で最も地下水砒素汚染頻度が高いガンジス川支流ガガラ川流域に位置するバライチ県のテジャワプール・ブロック内の 7 集落をモデル調査地域として抽出し, 飲用井戸水を対象とした地下水調査, 及びボーリングによる土壌調査を行った³⁾。

2. 調査・試験方法

井戸は, GTW, 個人用井戸(以下, PTW), 釣瓶井戸(以下, DW)があり, 採水深度は GTW: 30 m 前後, PTW・DW: 10 m 前後或いは以浅である。まず, 地下水の砒素汚染状況を把握するため調査地域の全井戸に対して砒素濃度調査を行った。次にボーリングを行って地質層序と深度方向の土壌砒素濃度を確認し, 採取された試料に対して, 土壌中の砒素の存在状態を理解するために逐次抽出分析を行った。

3. 全井戸水質砒素汚染調査結果

調査地域の全井戸, GTW: 42 本, PTW: 327 本, DW: 8 本の計: 377 本について, 簡易砒素分析用フィールドキット(Wagtech 社製)を用いて砒素濃度を分析した。また, 地表の衛生状態の地下水への影響を確認のために一部の井戸では大腸菌群簡易検出紙(共立理化学研究所製)を用いて大腸菌群数(cfu/100 ml)を測定した。調査の結果, GTW の砒素濃度は 61.9%で 50 µg/L を, 1 本を除く 97.6%で 10 µg/L を超過し, ほぼ全てで砒素汚染されていることが判った。一方, PTW の砒素濃度 50 µg/L の超過は 7.0%であり, 10 µg/L の超過も 23.9%であったが, 多くの井戸で大腸菌が検出された。また, DW は 1 本を除く全て砒素濃度が 10 µg/L 未満であったが, 高い大腸菌群数が検出された。

以上の結果, 調査範囲のほぼ全ての井戸が砒素あるいは大腸菌により飲用に適さないこと, GTW の取水深度では全域で地下水が砒素汚染されている確認された。

4. ボーリング調査結果

1月20日(日)

地質状況を確認するためにパッシンパッティ集落付近にてボーリングを行った。掘削は、孔壁崩壊により深度156mで終了し、土壌試料は129mまで回収された。土壌は酸分解後、砒素を原子吸光光度計AAS(島津製作所製AA-6200)、鉄、アルミニウム、カルシウムをICP-AES(島津製作所製ICP-8100)で測定し、土壌含有量とした。ボーリング調査の結果、地表から156mまで砂質層であることが確認され、全ての井戸が同じ帯水層を水源としている可能性が示唆された。砒素含有量は1~6mg/Lの範囲で推移し、5~10m、25m付近、35~40mで高く、鉄とアルミニウムについては40~50mと110mで、カルシウムは35~50mと100m以深で、それぞれ他の深度より比較的高い傾向であった。しかし、それらに明確な相関は見られなかった。

次に、複数地点で土壌中の砒素分布を比較するために調査地域のチェトラ村の北部(C.N.)と南部(C.S.)、パッシンパッティ集落近郊(P.P.)、ネワダプロパー集落北部(N.P.)、ダンニプルワ集落北部(D.P.)、バブニチェック集落南部(B.C.)の計6地点でハンドパーカッションによるボーリングを行った。井戸の取水深度30mまで掘削し、採取土壌を風乾後、エネルギー分散型蛍光X線分析装置(セイコーインスツルメンツ製SEA1100)にて砒素と鉄の含有量を測定した。ボーリングの結果、地下水面は1.2~2.3mと浅く、30mまで遮

水層は見られず、全ての井戸は不圧帯水層から取水している可能性が示唆された。分析の結果、砒素と鉄の含有量は近い挙動を示したが、明確な相関は見られなかった。

5. 逐次抽出分析結果

土壌中で砒素含有量と、砒素の吸着体やソースになりやすい鉄やカルシウム等の含有量との間に明確な相関が無いことから、C.N., C.S., P.P.の各ボーリングにおける表層の砂泥混合層、砂礫層、砂質層など地点毎に4試料を選択し、貫上(2008)らの方法を参考に逐次抽出分析を行った。抽出は、水抽出+BCR法の4段階で行い、

表-1 逐次抽出の各画分と条件⁴⁾

Step	抽出画分	抽出媒：抽出形態
1	水溶性	脱イオン水：水溶性
2	酸可溶性	酢酸：イオン交換態、炭酸塩態、非晶質・低結晶性 Fe・Al
3	還元性	塩化水素アンモニウム：結晶性の酸化 Fe・Mn
4	酸化性	過酸化水素水+酢酸アンモニウム：硫化物態、有機物態

各成分を分析した(表-1)⁴⁾。また、固相は粉末X線回折分析(PANalytical製X'part)により鉱物組成を調べた。分析の結果、全試料で砒素はStep 1~3の抽出画分に存在し、Step 4：酸化性画分には含まれなかった。また、表層に近い試料の一部では溶出しやすいStep 1またはStep 2 或いは両画分に砒素が含まれなかった。鉱物種としては、全試料が雲母、石英を主体とし、層状ケイ酸塩鉱物、長石、カルサイト、ドロマイトを含むことが確認された。ガンジス川下流域のバングラデシュ等では砒素が微細な黄鉄鉱等の硫化物に含まれる例が報告されている^{1),5)}。しかし、試料の酸化性画分からは砒素が検出されず、鉱物分析でも還元性の鉱物種は確認されなかった。

以上から、土壌は全体的に類似した鉱物組成であり砒素やそれに関連しやすい鉄などの

1月20日(日)

成分の含有量も深度方向により井戸水の砒素濃度への影響が明瞭に関係づけられる結果は得られなかった。

6. 井戸水水質分析結果

そこで、砒素汚染の要因が水質側にもあると推察し、砒素汚染井戸水について、多成分の水質分析を行った。各成分を比較した結果、砒素と二価鉄とアンモニウムイオンの間に明確ではないながらも一定の相関を示す傾向が見られた。

7. 考察

逐次抽出から、酸化鉄などはアンモニアを含む抽出媒を用いる還元性画分で溶解する。また、地下水中でアンモニア濃度と溶存二価鉄と砒素の濃度との間に正の相関が示された。これは、土壌中において、砒素を含む結晶度の低い鉄鉱物、或いは少量の鉄酸化物等がアンモニアによって溶解されて砒素を放出する砒素溶出メカニズムの存在を示唆している。

今後、より緻密な地質層序の把握と地下水位毎の水質調査などを行うことで、地下水汚染の作用機構の解明を進める。溶出メカニズムを理解しその原因を防ぐことにより、地下水砒素汚染を広域的に且つ効果的に低減させられる可能性が期待される。

謝辞

研究には宮崎大学戦略重点経費及び地盤環境保全コンソーシアム研究寄附金の一部を活用した、蛍光 X 線分析では国土防災技術(株)の氏家亨氏に、水質分析では児玉明彦氏(当時京都大学大学院勝見研究室所属)に協力いただいた。御礼申し上げます。

文献

- 1) 横田 渚(2006) : 第 10 章海外における砒素汚染, 地下水・土壌汚染の基礎から応用, 日本地下水学会編, 理工図書, pp.223-251.
- 2) Yano Y., Kodama A., Ito K., Shiomori K., Sezaki M., Tanabe K., Jaiswal R., Jaiswal P., Tripathi R. M., and Yokota H. (2009) : Arsenic Contamination of Groundwater at Uttar Pradesh state in India, International Joint Symposium on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia, Fukuoka.
- 3) Jaiswal R. K., Yano Y., and Jaiswal P. (2010) : Integrated Approach for Arsenic Pollution Mitigation in Uttar Pradesh state, India, 2nd International Symposium on Health Hazards of Arsenic Contamination of Groundwater and Its Countermeasures, Miyazaki, pp.10-17.
- 4) 貫上佳則, 毛利光男, 加瀬隆雄(2008) : 改良 BCR 逐次抽出法による汚染土壌中の重金属類の形態と溶出特性の評価, 土木学会論文集 G, 64, 4, pp.304-313.
- 5) Fendorf S., Michael H. A., and Geen A. H. (2010) : Spatial and Temporal Variations of Groundwater Arsenic in South and Southeast Asia, SCIENCE. Vol.328, pp.1123-1127.

II-3. 組換え近交系マウスを用いたヒ素代謝感受性規定因子の探索

○阿草哲郎¹, 小森浩章², 曾我美子², 能勢真人², 森 士朗³,
久保田領志⁴, 田辺信介¹, 岩田久人¹

¹愛媛大学沿岸環境科学研究センター (CMES), ²愛媛大学医学部,
³東北大学歯学部, ⁴国立医薬品食品衛生研究所

1. はじめに

組換え近交系 MXH/lpr マウスは、親系統マウス間の交配 (MRL/lpr x C3H/lpr) の第2世代を出発点に兄妹交配を20世代以上繰り返して作出され、両親系統のゲノムがランダムなモザイク状のホモ型となっている近交系統群である。これらの系統間では両親系統に見られる量的形質を様々な組み合わせで発現するのみならず、一定の環境因子に対してもこれらの系統間で異なった生体反応・病態を発現するところから、環境化学物質に対するリスク感受性を遺伝的に特定できる。また親系統間で多型を有するマイクロサテライトマーカーについて、MXH/lpr 各系統におけるそれらの遺伝子型をゲノムワイドに決定しているところから、各系統の表現型についての量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci (QTL)) 解析が容易におこなえる利点がある。

そこで本研究では、MXH/lpr 各系統マウスに無機ヒ素を投与し、その代謝産物を系統毎に解析し、さらにこれらの QTL 解析を行い、無機ヒ素の代謝感受性を規定する遺伝子座の同定を試みた。

2. 試料と方法

MRL/lpr と C3H/lpr、および両種の F2 を20世代以上兄妹交配をさせて得られた MXH/lpr 各系統マウス (MXH07、MXH28、MXH36、MXH41、MXH43、MXH51、MXH54) を実験に用いた。各系統のマウス (メス、12週齢) に 13.3 mg/kg body weight のメタ亜ヒ酸ナトリウムを経口投与した。8時間後、肝臓を採取し、分析まで-80℃で保存した。なお本研究は、愛媛大学動物実験規則に従って実施した。

化学分析は既法に従い、凍結乾燥させた肝臓をメタノール/水 (9:1 v/v) で振とうし、抽出したヒ素化合物、arsenite (As[III])・arsenate (As[V])・monomethylarsonic (MMA)・dimethylarsinic acid (DMA) を HPLC/ICP-MS で定性・定量した。得られたヒ素化合物組成 (%ヒ素化合物) をヒ素代謝能力の指標とした。

MXH/lpr 各系統マウスにおける122個の多型マイクロサテライトマーカーの遺伝子型情報に基づき、上記化学分析値を表現型とする QTL 解析をおこなった。

3. 結果と考察

分析した全てのマウスを対象に、肝臓中総ヒ素 (sum of As compounds; SA) 濃度

1月20日(日)

と%DMAの関係を解析したところ、有意な負の相関関係が得られた。一方、%inorganic As (IA; As[III] + As[V]) との間には有意な正の相関関係が認められた。また、%DMA と%IAの間には負の相関関係がみられた。これらのことから、無機ヒ素をDMAに代謝する能力が高い個体ほど、体内ヒ素をDMAとして効率的に排泄していると推察された。

一方、用いた系統には、総ヒ素濃度とヒ素代謝物組成に大きな差を有する系統が存在することが判明した。すなわち、C3H/lpr と MXH54 では他系統よりも高%DMAかつ低SA濃度であり、MXH07 と MXH51 では低%DMAかつ高SA濃度であった。

次に、%DMA と%IA 値を用いて QTL 解析をおこなった。その結果、第14染色体と第3染色体に%DMA と関連する遺伝子座が存在した。一方、%IA と関連する遺伝子座は、%DMA と同じ第14染色体と第5染色体に位置した。これら同定された QTL の近傍に位置するマイクロサテライトマーカーの個々のマウスの遺伝子型 (MRL 型または C3H 型) と各ヒ素代謝指標との関連解析をおこなったところ、%DMA と第3染色体上の QTL 近傍のマイクロサテライトマーカーとの関連以外は C3H 型と有意に関連していた。また、%IA については、それぞれ第14染色体と第5染色体に位置する遺伝子座の感受性アレルによる有意な相加効果が認められた。同定した QTL 上に存在する候補遺伝子については現在解析中である。

Searching of Gene Loci Involved in Arsenic Metabolism using Recombinant Inbred Mice

○Tetsuro Agusa¹, Hiroaki Komori², Yoshiko Soga², Masato Nose², Shiro Mori³,
Reiji Kubota⁴, Shinsuke Tanabe¹, Hisato Iwata¹

¹ Center for Marine Environmental Studies (CMES), Ehime University, Matsuyama,
Japan

² Department of Pathology, Ehime University Graduate School of Medicine, Toon,
Japan

³ Department of Oral Medicine and Surgery,
Tohoku University Graduate School of Dentistry Sendai, Japan,

⁴ National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

To identify genetic loci responsible for inorganic As (IA) metabolism, a quantitative trait locus (QTL) analysis was performed using MXH/lpr recombinant inbred mouse strains exposed to inorganic As. We analyzed concentrations of arsenite (As[III]), arsenate (As[V]), monomethylarsonic acid (MMA), and dimethylarsinic acid (DMA) in the liver of nine MXH/lpr strains. In all the strains, concentration of the sum of As compounds (SA) in the liver was negatively correlated with hepatic DMA composition (%DMA), whereas the opposite trend was observed for IA (As[III] +

1月20日(日)

As(V) composition (%IA). This result suggests that IA metabolic capacity significantly influences As accumulation in mice. Furthermore, significant differences in the concentrations and compositions of As compounds were found among these strains. QTL analysis showed that a significant linkage was identified on for %DMA with chromosomes 14 and 3. For %IA, a significant linkage was identified on chromosomes 14 and 5. Interestingly, the loci on the chromosomes 14 and 5 were correlated with %IA in an additive manner.

II-4. 神栖市A地区・B地区での有機ヒ素地下水質の違いと健康被害

楡井 久^{1・2}・楡山知代^{3・4}

1・NPO 法人日本地質汚染審査機構・2. 医療地質研究所
3・大阪市立大学大学院理学研究科・4 (株) テクノアース

A地区とB地区との健康被害

2003年4月に、A地区とB地区での飲用地下水利用で発生した神経系等の自覚症状出現率が発表されている(潮来保健所, 2003)。ちなみに、無機砒素の慢性被曝で見られる皮膚の過角化症(Arsenic-induced hyperkeratosis), 皮膚の過色素沈着(Arsenic-induced hyperpigmentation), 皮膚癌(Arsenic-induced skin cancers)(Selinus, et.al., 2005)や黒足病(blackfoot Disease)(Baoshan et.al., 2010)といった病状とはことなる。

次に、B地区とA地区との健康被害の関係を求めるために、両地区の自覚症状出現率を比較しA地区・B地区での被害者の各自覚症状を出現率の高い順に4つの症状を述べてみる。

[A地区] ①立ちくらみ・ふらつき(Dizziness, faintness) 59.3%, ②疲れる(Fatigue) (58.3%), ③手がふるえる(Hand trembling) 55.6%, ④頭痛(Headache) 52.0%。

[B地区] ①頭痛(Headache) 15.8%, ②立ちくらみ・ふらつき(Dizziness, faintness) 11.1%, ③手・足がビリビリ・ジンジン(Hand and foot numbness) 10.5%, ④咳(Cough) 5.3%, ④文書が書きにくい(Difficulty writing) 5.3%, ④めまい(Vertigo) 5.3%, ④腹痛(Abdominal pain) 5.3%, ④微熱が続いている(Continuous slight fever) 5.3%, ④嘔気・嘔吐(Nausea, vomiting) 5.3%, ④起きあがれない(Inability to get up) 5.3%, ④むくみ(Edema) 5.3%。

B地区での全自覚症状は、出現率の高い順に①から④にまとめられる。そして、これらの全自覚症状は、A地区での自覚症状に全て認められる。特に、B地区で出現率の高い①頭痛(Headache) 15.8%と②立ちくらみ・ふらつき(Dizziness, faintness) 11.1%は、A地区での出現率の高い④①のそれぞれに対応する。

ちなみに、DPAA化合物による健康被害の事例がなく(玉岡, 石井ほか, 2005), これらの実施された検査結果は、脳血流低下の長期的症状であり、小児の場合には精神運動発達障害として認められている。

2004年3月16日に、被害が発覚したA地区のA井戸で、揚汚水試験が実施された(茨城大学広域水圏研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団, 2004)。連続揚水を継続すると形態別ヒ素総濃度と全砒素(楡山, 2004)との濃度は、揚水の持続につれて

1月20日(日)

高くなる(図-1)。しかし、全砒素濃度は DPAA・MPAA・As^{III}・As^Vの値を累計した形態別ヒ素総濃度より高い。また、B地区近くで DPAA 汚染地下水が揚水されていた農業用井戸でも揚汚水試験を実施した(図-2)。A井戸と同じく揚水持続につれて総ヒ素濃度・全ヒ素濃度ともに高くなり、全ヒ素濃度も高い。しかし、有機ヒ素の濃度組成が変化する。

A地区からB地区までの流動過程で、DPAA から transformation で生成された各有機ヒ素汚染地下水 plume が形成され、その各 plume を揚水したようである。

A地区とB地区の健康被害に多少の変化もみられるが、A地区とB地区との地下水中の有機ヒ素組成の違いも考えられる。今後、医学と地質学との総合的研究の必要性を示唆している。

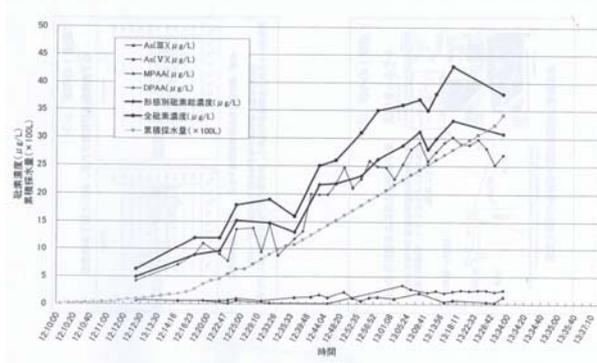


図-1 A地区A井戸の揚汚水試験結果

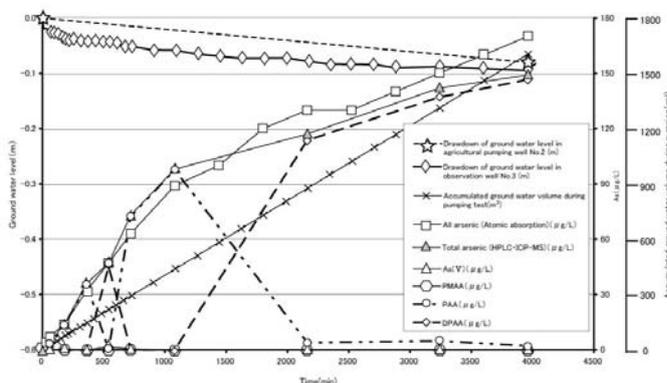


図-2 B地区の汚染農業用井戸での揚汚水試験結果

Health Problems and the Difference of Ground Water Quality on Organoarsenic Compounds in District A and B, Kamisu City, Japan

Hisashi Nirei^{1・2}・Tomoyo Hiyama^{3・4}

1. (NPO) The Geopollution Control Agency, Japan
2. Medical Geology Institute(MGI)
3. Graduate School of Science, Osaka City University
4. Techno Earth Co.

II-5. 茨城県神栖市B地区各民家井戸の有機ヒ素地下水汚染機構

檜山知代^{1・2} ・ 楡井 久^{3・4}

1・大阪市立大学大学院理学研究科・2. (株) テクノアース

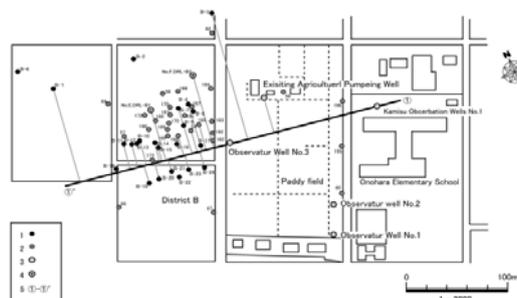
3・NPO 法人日本地質汚染審査機構・4. 医療地質研究所

神栖市A地区から西方1 kmにあるB地区で、有機ヒ素汚染地下水飲用による健康被害として ①頭痛(Headache) 15.8%, ②立ちくらみ・ふらつき(Dizziness, faintness) 11.1%, ③手・足がビリビリ・ジンジン(Hand and foot numbness) 10.5%, ④咳(Cough) 5.3%, ④文書が書きにくい(Difficulty writing) 5.3%, ④めまい(Vertigo) 5.3%, ④腹痛(Abdominal pain) 5.3%, ④微熱が続いている(Continuous slight fever) 5.3%, ④嘔気・嘔吐(Nausea, vomiting) 5.3%, ④起きあがれない(Inability to get up) 5.3%, ④むくみ(Edema) 5.3%が報告されている(潮来保健所, 2003)。

2003年3月・4月にA地区・B地区で健康被害が発覚された。6月に茨城大学広域水圏研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団で、B地区の有機ヒ素地質汚染調査が行われた。その資料からB地区で断面線(①—①')に沿って有機ヒ素を含む全砒素(檜山, 2004)の全ヒ素汚染地下水 plume 形態の垂直断面図を作成した(図-1)。作成では①—①'断面線北側に分布する各井戸のスクリーン深度の全ヒ素汚染値を投影した。最下部高透水性帯水層の地下水で全砒素濃度が高く、また中部高透水性帯水層にスクリーンを置く民家井戸群も汚染されている。

さらに、2007年6月の全ヒ素汚染地下水 plume 形態の垂直断面図を作成すると、民家井戸群のスクリーンを置く中部高透水性帯水層の地下水で極端に低下している(図-2)。

その結果、2003年6月には継続して地下水を使用している民家もあり、基本的には被害発覚時の3月や4月の全ヒ素汚染地下水 plume 形態とそれほど変形してないと思われる。したがって、健康被害は、最下部高透水性帯水層の全砒素濃度の高い地下水を、中部高透水性帯水層にスクリーンを置く民家井戸群で吸い上げて飲用したことが原因と思われる。



1月20日(日)

図-1 B地区の全ヒ素地下水汚染 plume 形態表示の垂直断面図線と各観測井・各住宅地井戸分布図 1: 各住宅用井戸 2: 環境省観測井 3: 研究用観測井(例えば, 神栖観測井 No.1) 4: 茨城大学広域水圏研究センター神栖町有機ヒ素地質汚染調査団によるボーリング調査地点(2004) 5: 水文地質単位と全ヒ素地下水汚染 plume 形態表示の垂直断面図線

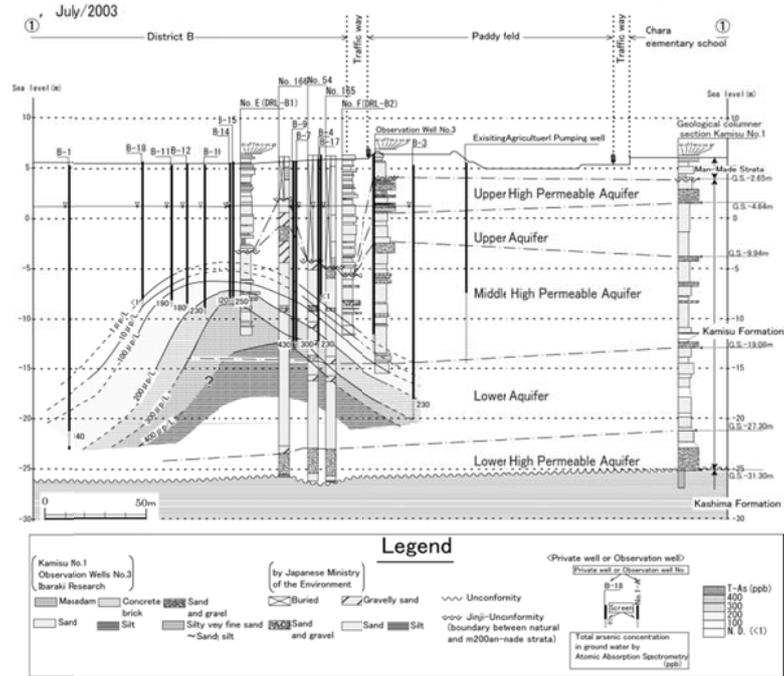


図-2 全ヒ素汚染地下水 plume 形態の垂直断面図 (2003, 6)

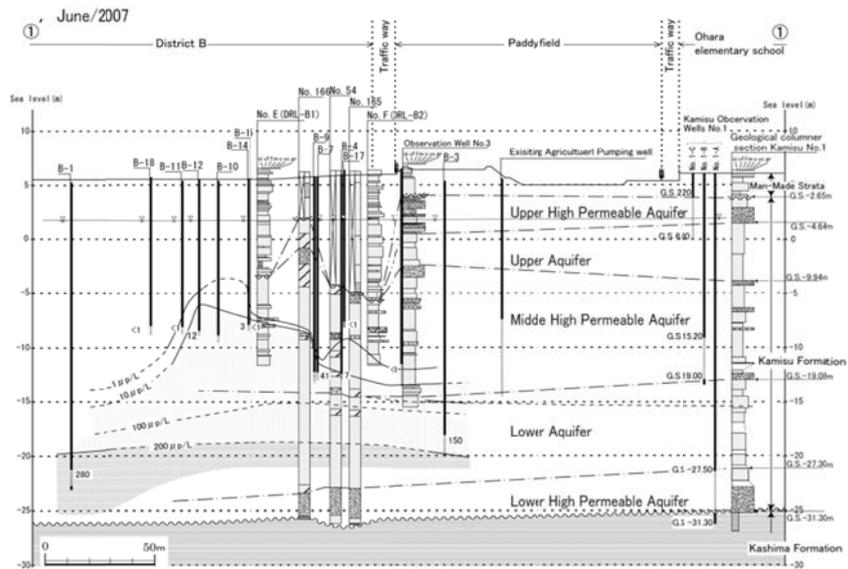


図-3 全ヒ素汚染地下水 plume 形態の垂直断面図 (2007, 6)

The mechanism of Groundwater pollution with Organoarsenic Compounds in Wells of Multiple Dwelling Area in District B, Kamisu City, Japan
Tomoyo Hiyama^{1・2}・**Hisashi Nirei**^{3・4} 1. Graduate School of Science, Osaka City University・2. Techno Earth Co.・3. Medical Geology Institute(MGI)・4. (NPO) The Geopollution Control Agency, Japan

II-6. ジフェニルアルシン酸のラットにおける慢性毒性および発がん性

の検討

田尻正喜、魏民、山野荘太郎、鰐淵英機

大阪市立大学大学院医学研究科、都市環境病理学

【目的】有機ヒ素化合物である Diphenylarsinic acid(DPAA)がヒトに対して神経毒性を有することがよく知られているが、その発がん性に関する知見はまだ報告されていない。我々はこれまでに、ラット肝中期発がん性試験において、DPAA がラット肝発がん促進作用を有することを明らかにしてきた。本研究では DPAA の有害性を評価することを目的とし、ラットを用いた飲水投与による慢性毒性・発がん性合併試験を行った。

【方法】5週齢の雌雄 F344ラット408匹(雌雄各204匹)を、3週間の検疫・馴化飼育の後、8週齢にて試験に供した。動物数は、1年間慢性毒性試験では雌雄各10匹、2年間発がん性試験では雌雄各51匹を用いた。DPAAの投与用量は、平成19年度に実施されたラット中期毒性試験(ラット肝中期発がん性試験)の結果に基づき、0、5、10 および 20 ppm に設定した。

【結果】1年間慢性毒性試験の結果、最終体重は雌雄とも対照群とDPAA投与群の間に雄の10および20 ppm群、また雌の20 ppm群で増加抑制傾向がみられた。肝臓の絶対重量および相対重量が対照群に比較して雌の20 ppm群で有意に増加した。肝臓においては、DPAA投与による胆管増生が雌雄とも20 ppm群で認められた。また、ファーター乳頭部における総胆管上皮過形成およびそれによる開口部の狭窄、さらに総胆管の拡張が雌雄とも20 ppm群の全例に認められた(図.1)。

2年間発がん性試験では、雌の20 ppm群で生存率は対照群と比較して有意に低下した。組織学的には、途中死亡および瀕死期屠殺動物の全例に総胆管開口部の狭窄およびそれによる高度な総胆管拡張、ならびに肝内胆管増生が認められた。DPAAによる胆道系および肝障害が主な死因であると考えられた。肝細胞腺腫および肝細胞がんが雌雄の2.0%群に認められなかった。雄の5、10 ppm群、および雌の5 ppm群で肝細胞腺腫あるいは肝細胞がんが低頻度に見られたが、いずれの群においても対照群と有意な差は認められなかった。また、発生頻度はF344ラットで過去に報告されている自然発生頻度とほぼ同様であったことから、これらは自然発生病変と考えられた。これらの結果から、DPAAは単独で肝発がん性を示さないことが明らかとなった。その他の器官・組織に種々の腫瘍性病変が観察されたが、F344ラットで過去に報告されている自然発生頻度とほぼ同様であることから、これらは自然発生病

1月20日(日)

変と考えられた。なお、神経毒性は認められなかった。

【考察】DPAA はラットの胆道系に毒性を示すが、自身には発がん性はないことがあきらかとなった。

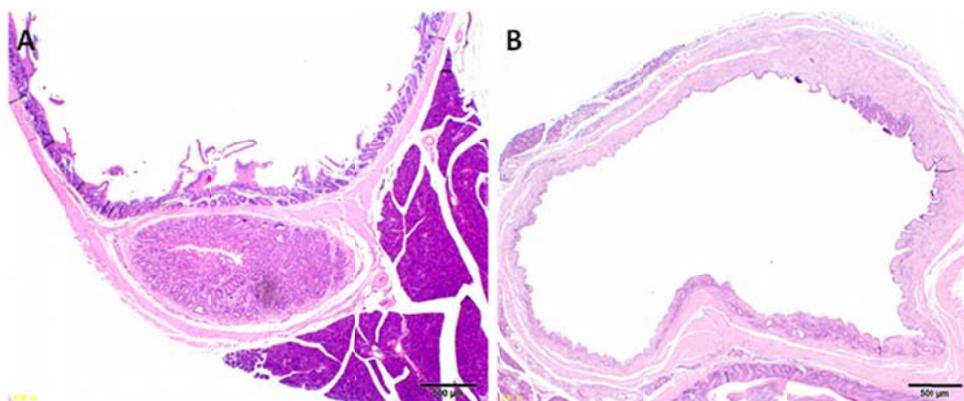


図.1: ファーター乳頭部における総胆管上皮過形成および開口部狭窄(A)、総胆管の拡張(B)、雌 20 ppm 群(一年間慢性毒性試験)

Chronic toxicity and carcinogenicity studies of diphenylarsinic acid in rats

Masaki TAJIRI, Min WEI, Shotaro YAMANO and Hideki WANIBUCHI

Department of Pathology, Osaka City University Graduate School of Medicine

We previously reported that Diphenylarsinic acid (DPAA) had promotion effects on rat liver carcinogenesis in a medium-term bioassay (Ito test). The purpose of present study is to evaluate chronic toxicity and carcinogenicity of DPAA in rats. Groups of male and female F344 rats were treated with DPAA at doses of 0, 5, 10, and 20 ppm in the drinking water. In the 1-year chronic toxicity study, bile duct hyperplasia in liver and common bile duct dilatation due to the stenosis of an aperture in the Vater papilla and expansion of the common bile duct recognized in all examples that male and female 20ppm groups. In the 2-year carcinogenicity studies, there was no increase in tumor incidence in any organs including liver in DPAA-treated groups compared to the controls. No neurotoxicity was observed in the DPAA treatment groups. In conclusion, DPAA exerts bile duct toxicity but lack of carcinogenicity in rats.

協賛

本シンポジウムの趣旨にご賛同とご理解を賜り、
協賛いただきました各位に厚くお礼申し上げます。

第17回ヒ素シンポジウム
大会長 平野靖史郎

協 賛 企 業

岩井化学薬品 株式会社

株式会社 アイ・シー・エム

株式会社 イセブ

株式会社 三啓

株式会社 トミー精工

太陽計測 株式会社

和光純薬 株式会社