

# 第 18 回ヒ素シンポジウム

## 講演要旨集

開催日： 2012 年 11 月 24 日(土)・25 日(日)

会 場： 宮日会館 11 階 宮日ホール

(宮崎県宮崎市高千穂通り 1 丁目 1-33)

主 催： 日本ヒ素研究会

## 第 18 回ヒ素シンポジウム

---

主 催： 日本ヒ素研究会

開催日： 2012 年 11 月 24 日(土)・25 日(日)

会 場： 宮日会館 11 階 宮日ホール(宮崎県宮崎市高千穂通り 1 丁目 1-33)

特別講演 1 ヒ素の高次脳神経機能に及ぼす影響に関する基礎的研究

高宮 考悟 (宮崎大学医学部・大学院医学系研究科)

特別講演 2 軽症型慢性砒素中毒—口腔粘膜症状の重要性について—

古城 八寿子 (前 熊本中央病院皮膚科)

特別講演 3 Remediation of As contaminated soil in the metal mining area

Kyoung-Woong Kim (Gwangju Institute of Science and Technology)

### シンポジウム日程

11 月 24 日(1 日目)

(11:30-12:30 理事会)

13:10-13:15 開会の辞

13:15-13:55 一般演題(1-1~1-3)

13:55-14:45 特別講演 1

14:55-16:15 一般演題(1-4~1-9)

16:15-17:05 特別講演 2

17:15-17:55 依頼講演 1~3

19:00-21:00 懇親会(ホテルメリージュ 3 階 鳳凰の間)

11 月 25 日(2 日目)

9:20-10:55 一般演題(2-1~2-7)

10:55-11:45 特別講演 3

11:45-12:00 閉会の辞

12:00-12:30 総会

# プログラム

平成 24 年 11 月 24 日(1 日目)

## 理事会

11:30 - 12:30

---

## 開会の辞

13:10 - 13:15 塩盛 弘一郎 (宮崎大学工学部)

---

## 一般演題

(発表 10 分、質疑 3 分)

13:15 - 13:55 座長: 吉田 貴彦 (旭川医科大学)

---

### 1-1 ヒ素感受性に関与する遺伝子群の探索とヒ素誘導性アポトーシスの検討

○信國好俊、升本順子、沼本通孝

広島大学原爆放射線医科学研究所

### 1-2 亜ヒ酸がマスト細胞の応答性と遺伝子発現に及ぼす影響

○姫野誠一郎、清水由里、角 大悟

徳島文理大学薬学部

### 1-3 PML 発現細胞における亜ヒ酸の影響

○平野靖史郎、小林弥生、渡辺喬之

(独)国立環境研究所

## 特別講演 1

13:55 - 14:45 座長: 丸山 眞杉 (宮崎大学)

---

### ヒ素の高次脳神経機能に及ぼす影響に関する基礎的研究

高宮 考悟

宮崎大学医学部・大学院医学系研究科

14:55 - 15:35 座長：平野 靖史郎 ((独)国立環境研究所)

---

#### 1-4 GC-MS による尿中ヒ素化合物の分析法の開発

○竹内靖人<sup>1)</sup>、奈女良 昭<sup>2)</sup>、川澄 八重子<sup>3)</sup>、今中努志<sup>4)</sup>、佐久井 徳広<sup>5)</sup>、太田裕一<sup>1)</sup>、  
圓藤陽子<sup>6)</sup>、住野公昭<sup>1)</sup>、圓藤吟史<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup>中央労働災害防止協会 大阪労働衛生総合センター、<sup>2)</sup>広島大学大学院 医歯薬保健  
学研究院法医学、<sup>3)</sup>中央労働災害防止協会 労働衛生調査分析センター、<sup>4)</sup>ジーエルサ  
イエンス株式会社、<sup>5)</sup>アジレント・テクノロジー株式会社、<sup>6)</sup>(独)労働者健康福祉機構 関  
西労災病院産業中毒研究センター、<sup>7)</sup>大阪市立大学大学院 医学研究科産業医学分野

#### 1-5 数種カタクチイワシ加工品中のヒ素化合物

○白石直也、松本 駿、臼井将勝、花岡研一  
水産大学校

#### 1-6 グルタチオンに依存したジメチルモノチオアルシン酸の代謝活性化

○黒澤英俊<sup>1)2)</sup>、下田康代<sup>1)</sup>、畑 明寿<sup>3)</sup>、山野優子<sup>4)</sup>、加藤孝一<sup>1)</sup>、立川真理子<sup>1)</sup>、  
圓藤陽子<sup>5)</sup>、圓藤吟史<sup>6)</sup>、山中健三<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学薬学部、<sup>2)</sup>警視庁科学捜査研究所、<sup>3)</sup>千葉科学大学危機管理学部、<sup>4)</sup>昭和大学  
医学部、<sup>5)</sup>関西労災病院産業中毒研究センター、<sup>6)</sup>大阪市立大学大学院医学研究科

15:35 - 16:15 座長：花岡 研一 ((独)水産大学校)

---

#### 1-7 ワカメ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究

○畑 明寿<sup>1)</sup>、山中 健三<sup>2)</sup>、圓藤 吟史<sup>3)</sup>、山野 優子<sup>4)</sup>、羽場 亮太<sup>4)</sup>、藤谷 登<sup>1)</sup>、  
圓藤 陽子<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>千葉科学大学危機管理学部、<sup>2)</sup>日本大学薬学部、<sup>3)</sup>大阪市立大学大学院医学研究科、  
<sup>4)</sup>昭和大学医学部、<sup>5)</sup>関西労災病院産業中毒研究センター

#### 1-8 首都圏在住者の無機ヒ素摂取量と尿中排泄

○小栗朋子<sup>1)</sup>、鈴木弥生<sup>2)</sup>、吉永淳<sup>1)</sup>、田尾博明<sup>3)</sup>、中里哲也<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学大学院新領域創成科学研究科、<sup>2)</sup>国立環境研究所、<sup>3)</sup>産業技術総合研究所

## 1-9 アジア途上国における地下水のヒ素汚染とヒトへの影響

○阿草哲郎<sup>1)</sup>、岩田久人<sup>1)</sup>、國頭 恭<sup>2)</sup>、井上 英<sup>1)</sup>、久保田領志<sup>3)</sup>、Karri Ramu<sup>1)</sup>、Tu Binh Minh<sup>4)</sup>、Nguyen Minh Tue<sup>1)</sup>、Nguyen Ngoc Ha<sup>1)</sup>、Nguyen Phuc Cam Tu<sup>5)</sup>、藤原純子<sup>6)</sup>、Paromita Charaborty<sup>7)</sup>、Chhoun Chamnan<sup>8)</sup>、Pham Thi Kim Trang<sup>9)</sup>、Alissara Reungsang<sup>10)</sup>、Kriengsak Srisuk<sup>11)</sup>、中村 哲<sup>12)</sup>、滝沢 智<sup>13)</sup>、竹下治男<sup>6)</sup>、高橋 真<sup>1)</sup>、Annamalai Subramanian<sup>1)</sup>、Bui Cach Tuyen<sup>14)</sup>、Pham Hung Viet<sup>9)</sup>、Touch Seang Tana<sup>15)</sup>、田辺信介<sup>1)</sup>、

<sup>1)</sup>愛媛大学沿岸環境科学研究センター (CMES)、<sup>2)</sup>信州大学理学部、<sup>3)</sup>国立医薬品食品研究所、<sup>4)</sup>国立医薬品食品衛生研究所、<sup>5)</sup>Ministry of Natural Resources and Environment (MONRE), Vietnam、<sup>6)</sup>島根大学医学部、<sup>7)</sup>Guangzhou Institute of Geochemistry, China、<sup>8)</sup>Inland Fisheries Research and Development Institute (IFReDe), Cambodia、<sup>9)</sup>Hanoi National University, Vietnam、<sup>10)</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Thailand、<sup>11)</sup>Groundwater Research Center/Department of Geotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Thailand、<sup>12)</sup>国立国際医療研究センター、<sup>13)</sup>東京大学工学部、<sup>14)</sup>Nong Lam University, Vietnam、<sup>15)</sup>Office of the Council of Ministers, Cambodia

## 特別講演 2

16:15 - 17:05 座長：黒田 嘉紀（宮崎大学）

---

### 軽症型慢性砒素中毒—口腔粘膜症状の重要性について—

古城八寿子

前 熊本中央病院皮膚科

## 依頼講演

（発表 10 分、質疑 3 分）

17:15 - 17:55 座長：塩盛 弘一郎（宮崎大学）

---

## 1 日南層群土壌の砒素溶出特性

○伊藤健一、横田 漠

宮崎大学国際連携センター

## **2 宮崎県で発生した水道水ヒ素汚染事例**

○黒田嘉紀<sup>1)</sup>、山内武紀<sup>1)</sup>、伊藤健一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>宮崎大学医学部、<sup>2)</sup> 宮崎大学国際連携センター

## **3 Heavy metal distribution and chemical speciation in soils around small scale mining areas of Mongolia**

○Bolormaa Oyuntsetseg<sup>1)</sup>、Dorj Daichaa<sup>1)</sup>、Erdenetuya Ochir<sup>2)</sup>、Watanabe Makiko<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, National University of Mongolia, Mongolia、<sup>2)</sup>Labor Safety and Health department, Erdenet Mining Corporation, Mongolia、<sup>3)</sup>Graduate School of Urban Environmental Science, Tokyo Metropolitan University, Japan

9:20 - 10:00 座長: 天知 誠吾 (千葉大学大学院)

---

**2-1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 界面における砒素吸着におよぼすイオン強度の影響**

○大榮 薫、大島達也、馬場由成  
宮崎大学工学部

**2-2 微生物によるヒ素のメチル化とヒ素除去装置の汚泥処理に関する研究**

○宮武宗利、林 幸男  
宮崎大学工学部

**2-3 イネ根圏土壌から分離した微生物のヒ素代謝**

○倉俣 正人<sup>1)</sup>、片岡 良太<sup>1),2)</sup>、山崎 健一<sup>1)</sup>、榊原 風太<sup>3)</sup>、馬場 浩司<sup>1)</sup>、石坂 真澄<sup>1)</sup>、  
安部 匡<sup>1)</sup>、高木 和広<sup>1)</sup>、加茂 綱嗣<sup>1)</sup>、平舘 俊太郎<sup>1)</sup>、石川 覚<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>(独)農業環境技術研究所、<sup>2)</sup>山梨大学、<sup>3)</sup>東京農業大学

10:00 - 10:55 座長: 宮武 宗利 (宮崎大学)

---

**2-4 国内土壌より分離された亜ヒ酸酸化細菌 KGO-5 株**

○董 旦、天知誠吾  
千葉大学大学院園芸学研究科

**2-5 水田土壌におけるヒ素の酸化および吸着に及ぼす微生物の影響**

○董 典涛<sup>1)</sup>、山口紀子<sup>2)</sup>、牧野知之<sup>2)</sup>、天知誠吾<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>千葉大学大学院園芸学研究科、<sup>2)</sup>(独)農業環境技術研究所

**2-6 ヒ酸還元能を有する鉄還元細菌 *Geobacter* sp. OR-1 株の生理的特質**

○本間瑛理、天知誠吾  
千葉大学大学院園芸学研究科

**2-7 異化的ヒ酸還元能を有する *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株の性質**

○工藤桂太郎、天知誠吾  
千葉大学大学院園芸学研究科

### 特別講演 3

10:55 - 11:45 座長: 大榮 薫 (宮崎大学)

---

#### **Remediation of As contaminated soil in the metal mining area**

Kyoung-Woong Kim

Gwangju Institute of Science and Technology

### 閉会の辞

11:45 - 12:00 塩盛弘一郎 (宮崎大学工学部)

---

### 総会

12:00 - 12:30 圓藤 吟史 (日本ヒ素研究会 会長、大阪市立大学大学院医学研究科)

---

# MEMO

---

# 特 別 講 演

# 特別講演 1

## ヒ素の高次脳神経機能に及ぼす影響に関する基礎的研究

高宮 考悟

宮崎大学医学部・大学院医学系研究科  
機能制御学講座 統合生理学分野  
〒889-1692 宮崎市清武町木原5200番地  
TEL: 0985-85-0870  
FAX: 0985-85-5805

ヒマラヤ山系を源とする水脈に環境基準を大きく越えるヒ素が混入しており、それらが河川や地下水にも多量に存在することは、よく知られている。さらにそれらを飲料水としている南アジアの国々であるインド、ネパール、バングラディッシュなどでは、深刻な環境問題となっている。しかも飲料水中のヒ素の混入は、その他、台湾、モンゴル、中国などでも見られ、わが日本や米国などの先進国でも報告されている。現在潜在的な患者も含め、ヒ素中毒者は世界で8000万人以上といわれ、今後世界最大規模での中毒問題となる可能性が大いに予想される。

これまでも急性ヒ素中毒としては、森永ヒ素ミルク中毒事件や和歌山毒物カレー事件などで多数の死者をだしている。また、慢性にヒ素を摂取することにより発生する中毒症状としては、ボーエン病として知られる特有の色素沈着を伴う皮膚病変と、末梢神経障害、発ガンが知られている。他に症状として、上記以外にも中枢神経に対する影響も、報告されている(Rodriguez, V.M., et al. (2003) Toxicol. Lett. 145, 1-18; Luo, J. H., Z. Q. et al. (2009) Toxicol Lett 184, 121-5.)。本宮崎県では、高千穂の土呂久鉦山において慢性ヒ素中毒として初めて公害病に認定され、現在でも本学によって調査が継続されている。

我々はこれまで、学習や記憶といった高次脳神経機能の基礎となる神経機能である“シナプス可塑性”の詳細な分子メカニズムに関して研究してきた。とくに、シナプス可塑性で中心的役割を果たす、AMPA型グルタミン酸受容体とその分子修飾やそれらの機能を制御するさまざまな周辺分子群が発見されるとともに、シナプス可塑性の詳細な分子メカニズムの全貌が急激に明らかとなってきた。特に

代表的なシナプス可塑性である海馬CA1におけるシナプス長期増強現象(Long Term

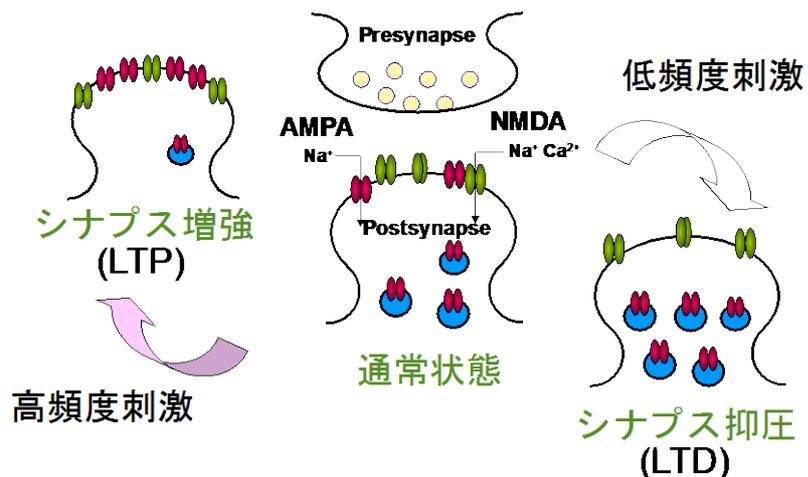


図1 シナプス可塑性の分子機構

AMPA型グルタミン酸受容体のトラフィックとシナプスにおける受容体の数の変化によるLTP, LTD発現のメカニズム

Potentiation: LTP) の分子機構は、その詳細がかなり明らかとなっており、他の脳の部位の可塑性を理解する上でモデルとなるものである。近年の研究により、シナプス可塑性の本体は、“シナプスにおける AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス内外への輸送 (トラフィッキング)” であることが研究者における現在のコンセンサスとなっている (図 1)。

今回我々は、ヒ素の高次脳神経機能への影響を調べるために、このシナプス可塑性の中心的役割をなす AMPA 型グルタミン酸受容体のトラフィッキングへのヒ素の影響を検討した。そして、これまでに明らかとなった学習や記憶における詳細な分子基盤に関する知見もとづいて、ヒ素がどのような分子機序で、脳神経機能を侵していくのかを明らかとしてゆこうとしている。

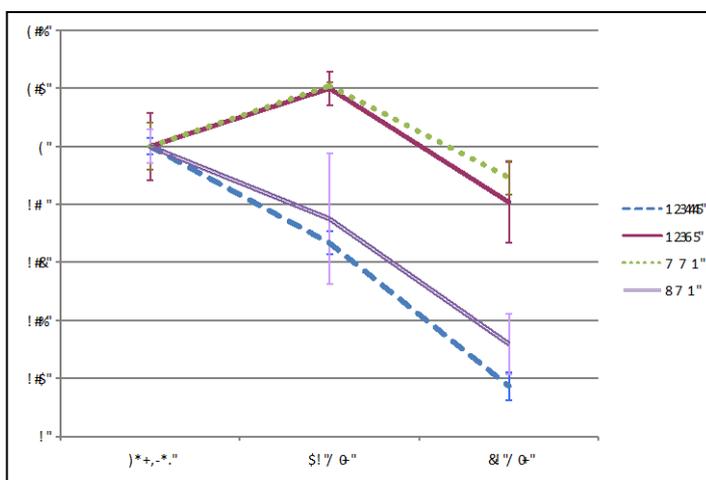


図 2 培養神経細胞表面 AMPA 受容体の定量による各種ヒ素の影響

これまでに我々は、無機ヒ素化合物として三酸化二ヒ素 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ , As[III])、ひ酸 ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ , As[V])、有機ヒ素化合物としてジメチルアルソン酸 (DMA)、モノメチルアルソン酸 (MAA) の 4 種類を用いて、培養神経細胞の細胞表面に存在する AMPA 型グルタミン酸受容体を定量した。

図 2 に示すように As[III] と DMA の 2 種類のヒ素が、細胞表面の AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞内へ急激に取り込ませることが明らかとなった。

さらに、1) この変化が神経細胞の成熟度によって異なる。2) これら変化が加えたヒ素に濃度依存的である。3) ヒ素の影響は、一過性でありヒ素の除去により 24 時間以内に回復する。4) ヒ素は、主にシナプスに存在する AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞内へ取り込ませていた。5) ヒ素は、AMPA 型グルタミン酸受容体のリン酸化を介してその細胞内への取り込みに関与している。等のことが明らかとなった。

さらに培養神経細胞と急性脳スライスを用いた電気生理学的解析を行ったところ。①whole cell patch clamp を用いた miniatureEPSC (mEPSC: 微小興奮性シナプス後電流) の測定からヒ素の一部は、上記の結果を反映してシナプス表面の AMPA 型グルタミン酸受容体を減少させる。②すべてのヒ素は、シナプス前部からの神経伝達物質の放出を減少させる。といった知見が得られている。このように、電気生理学的な機能解析によって、これまでのヒ素が AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス局在を制御する (①より) だけでなく、シナプス前部より神経伝達物質の放出の制御にも関与する (②より)、さらに濃度依存的に神経伝達効率への影響が変化することから、中毒の際の病態やヒ素の作用機序解明の糸口となる知見が得られてきた。

## 特別講演 2

### 軽症型慢性砒素中毒

#### —口腔粘膜症状の重要性について—

古城八寿子（前 熊本中央病院皮膚科）

堀田宣之（桜ヶ丘病院）

慢性砒素中毒（CAP と略）は特異的皮膚症状（色素沈着、雨滴状点状脱色素斑、手掌足底の角化、ボーエン病）を認めれば確定できるため、典型的な従来型 CAP の診断は容易である。しかし経口 CAP には非常に軽微な皮膚粘膜症状レベルのものがあり、これは皮膚科医などのエキスパートによる診断を必要とする。

最も早期に出現する症状は色素沈着である。

我々は 1982 年から台湾、タイロンピブン、中国内モンゴ・貴州、フィリピンミンダナオ、インド西ベンガル州、バングラデシュ、メキシコトレオン、インドネシアブイヤット、ベトナムドンタップの汚染地で患者を診てきた。その結果、ミンダナオ、ドンタップ、ブイヤットで、口唇・歯肉・頬粘膜・舌に局限した色素沈着のみで、他の皮疹を殆ど認めない症例の集団的発生を確認した。この口腔内色素斑は CAP で認めうる最も初期段階の症状だが、これまで無視ないし見過ごされてきた。一般に従来型の典型例のみを CAP として軽症例は切り捨てる風潮が存在するため、2010 年我々は注意喚起の意味で軽症型慢性砒素中毒 (Mild-type Chronic Arsenic Poisoning) の概念を提唱した。その後、ラオス、インドバライチでも同様症例を多数認めた。

軽症型 CAP の診断意義は非常に大きい。砒素性色素沈着は曝露中止にて軽減する。よって治療は汚染源を絶つのみでよく初期段階で完治でき、予防医学的・医療経済的にも有益である。

今後このタイプの汚染が多くなるのではとの予測もあり、検診時は必ず口腔内を詳細に見ること、手掌足底の軽微な角化や色素斑も見逃さないよう注意深く触診すること、そのために現地でエキスパートを育成することが必要である。

参考文献: N.Hotta, I.Kikuchi, Y.Kojo: Color Atlas of Chronic Arsenic Poisoning  
—目で見える砒素中毒—, 12-17pp, 93-115pp, 2010

# MEMO

---

## Remediation of As contaminated soil in the metal mining area

Kyoung-Woong Kim<sup>\*</sup>, Jiyeon Park, Ju-Yong Kim, Ki-Rak Kim and Myung-Soo Ko

School of Environmental Science and Engineering

Gwangju Institute of Science and Technology (GIST),

Gwangju 500-712, Republic of Korea

(\* e-mail: kwkim@gist.ac.kr)

### Introduction

There are more than 1,000 abandoned metal mines in Korea and we have serious As contamination cases in the tailing and waste rocks with particular reference to the Au mining areas. A number of remediation techniques were applied from the lab scale to the mining field sites in Korea and the selected results from stabilization and phytoremediation techniques will be discussed in this study.

### Results and Discussion

1. Stabilization of the soils from the metal mining area in Korea

Stabilization is known as fixation or capsulation process which is converting hazardous arsenic into less hazardous form of arsenic compound. Stabilization mainly focuses on decreasing the reachability of arsenic (Tyrovola and Nikoladis, 2007). In order to apply stabilization techniques, various kinds of additives have been examined (Moon *et al.*, 2011). Standard Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP) is dominant method to determine the stability of compound which is proposed by U.S Environmental Protection Agency (Mohan and Pittman, 2007). In general, Portland cement (PC) is widely used for stabilization process. Combination with Portland cement and calcined oyster shells (COS) was reported and another result showed that the combination of COS and PC was much effective for arsenic stabilization (Moon *et al.*, 2011). It showed the higher effect compared to use of Portland cement or COS.

Addition of iron is widely used for the stabilization process. Tyrovola and Nikolaidis (2007) used the ZVI (Zero Valent Iron) for constructing empirical model of relationship between released iron and arsenic. Stabilization process of ZVI occurs by reduction process of ZVI formed ferric ion. The reduced iron acts as adsorbent for arsenic. Since most of arsenic in the nature existed as anion form, they are likely to attach to reduced iron which is positively charged. We used granular ferric hydroxide (GFH), limestone, mine sludge and steel mill slag as additives. Soil contamination can affect to vegetation and human health through the food chain. Stabilization, which is focused on the reduction of mobility of target element in soils, is one of most useful field applicable remediation technique for agricultural soils. The soil in the Chungyang area was collected for arsenic stabilization experiments. This area is located in the

vicinity from abandoned Au-Ag mine and mainly contaminated with arsenic that average concentration is 131.5 mg/kg and 20% of arsenic existed easily mobile fraction (Ko *et al.*, 2012). The results of arsenic stabilization experiments show that acid mine drainage sludge (AMDS) may immobilize the arsenic in soil and 3 wt% sludge to soil is the optimal ratio. The field experimental plots were installed on arsenic contaminated area. The AMDS was employed as arsenic stabilizer and stabilizing depth was 50 cm below surface. The rice grain was cultivated in field plots to identify the arsenic transfer from soil to crop. Arsenic concentration of rice grain that cultivated in the stabilization soil was 0.05 mg/kg; however, rice grain on contaminated soil has 0.76 mg/kg of arsenic. From these results, arsenic has been stabilized by AMDS and As transfer was blocked from soil to vegetation.

## 2. Phytoremediation of heavy metal contaminated area by *Brassica napus*

All the world has faced with oil crisis and climate change which can be representative for the energy and environmental problem, respectively. We investigated the possibility of plant application, which can produce biodiesel, for phytoremediation of heavy metal contaminated agricultural area. Also, one more purpose of this study is to reveal the feasibility of utilizing oil extracted from plant seed.

We chose *Brassica napus* as our main target plant because it is widely used for phytoremediation and biodiesel production. In the perspective of the concentration of heavy metal in *Brassica napus*, plant grown in contaminated soil shows much higher concentration than plant grown in non-contaminated soil. From the results of sequential extraction, we found that heavy metal concentration in plant is increased with elevating phytoavailable heavy metal fractions in the soil. Our results showed the feasibility of oil extracted from *Brassica napus* which was grown in the contaminated soil. According to the results, seed contains low concentration of heavy metal except Zn which is essential for seed growth. The results of oil analysis show that more than the half of heavy metal is left in the residues. Therefore, the application of phytoremediation by *Brassica napus* for decontamination of heavy metal is suitable choice for removal of heavy metal and potential biodiesel production

## References

- Ko, M. S., Kim, J. Y., Bang, S., Lee, J. S., Ko, J. I. and Kim, K. W., 2012, Stabilization of the As-contaminated soil from the metal mining areas in Korea, *Environ. Geochem. and Health*, V. 34, p. 143-149.
- Mohan, D. and Pittman, C. U., 2007, Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents—a critical review, *Jour. of Haz. Mat.*, V. 142, No. 1-2, p. 1–53.
- Moon, D. H., Kim, K. W., Yoon, I. H., Grubb, D. G., Shin, D. Y. and Cheong, K. H., 2011, Stabilization of arsenic-contaminated mine tailings using natural and calcined oyster shells, *Environ. Earth Sci.*, V. 64, No. 3, p. 597-605.
- Tyrovola, K. and Nikoladis, N. P., 2007, Arsenic mobility and stabilization in topsoils, *Water Chemistry*, V. 43, No. 6, p. 1589-1596.

# MEMO

---

# 依 賴 講 演

## 依頼講演1

### 日南層群土壌の砒素溶出特性

○伊藤健一<sup>1</sup>，横田漢<sup>1</sup>

<sup>1</sup>宮崎大学国際連携センター地盤環境保全研究部門

- 1. はじめに：** 宮崎県の重金属汚染として旧土呂久鉱山の砒素鉱害が広く知られるが、鉱山地域以外の自然由来重金属類の問題はほとんど報告されていない。一方、海成泥質岩など堆積岩に含まれる砒素がしばしば土壌汚染を生じることが知られており<sup>1)</sup>、宮崎県中部から南部の宮崎層群や日南層群などにおいても自然由来の重金属問題が生じる可能性が高く、その特性を把握する必要がある。そこで、日南層群の土壌を対象に土壌からの砒素溶出特性の把握とのための室内試験を実施した。
- 2. 対象：** 宮崎市内に堆積された日南層群土壌から砒素の溶出が確認されたことから、この堆積場のボーリング調査から回収された土壌を試験に用いた。対象は頁岩（泥岩）或いは砂岩頁岩の混合物であった。土壌試料を29検体回収し、建設工事における自然由来重金属等含有岩石・土壌への対応マニュアル（暫定版）に従い、風乾して全量を粉碎し2mmの篩を通過させて分析試料とした<sup>1)</sup>。
- 3. 分析方法：** 分析は、29検体に土壌汚染対策法の公定法（溶出試験・含有量試験）を実施し、うち比較的砒素の溶出濃度が高い土壌15試料について、同一試料に公定法溶出試験を繰り返して水溶性成分を放出させるシリアルバッチ試験を行い、検液中の累積砒素量を土壌の可溶性砒素の総溶出量とした。次に、この15試料から濃度がばらつくよう6試料を選び、土壌中の砒素の分配等を把握のため貫上ら（2008）の改良BCR法による逐次抽出分析[STEP1：水溶性画分，STEP2：酸可溶性画分，STEP3：還元性画分，STEP4：酸化性画分]を実施した<sup>2)</sup>。最後に新たな試験の検討を行った。地中で砒素は土壌から土壌間隙水へと溶出するが、一定の空間における土壌と間隙水の固液比は、一般に重量/容積比で固相が1に対して液相は1以下であり、公定法溶出試験（土壌：水=1：10）に比べて非常に大きいと考えられ、汚染土壌の間隙水及び土壌からの浸出水における砒素濃度は溶出試験の検液の濃度に比べて高いと想定される。反対に、固液比が小さい場合、液相の砒素濃度は下がるため濃度勾配的に土壌から砒素は溶出しやすい状態と考えられる。この条件では土壌中の水溶性砒素が全て液相に溶出すると考えられ、その量はシリアルバッチ試験の累積溶出量（溶出リスク）と同程度となると推測される。この考えが正しければ、公定法を繰り返すシリアルバッチ試験より簡便に砒素の溶出量を見積もり、また砒素の濃度を推察することができると期待される。そこで、固液比を[1, 1.5, 2, 3, 5, 10, 30]に振って溶出試験を行う固液比変化試験と、液相の濃度がほぼ変わらない疑似平衡状態を確認する平衡濃度確認試験を行った。
- 4. 結果及び考察：** 公定法分析の結果、29検体の砒素溶出値は平均0.025mg/Lであり、約93%（27検体）で土壌環境基準値を超過した。含有量は平均7.6mg/kgであり、全て基準値以下であった。この中の15試料をシリアルバッチ試験に用いた。試料の溶出値は0.016～0.039mg/L，平均0.029mg/L，溶出液のpHは7.7～10.1，ECは38.1～59.3mS/m，含有量は6.8～8.4mg/kg，平均7.6mg/kgであった。シリアルバッチ試験の結果、僅かに基準値を超過した1試料を除いた5試料は溶出試験3回目で砒素溶出濃度が土壌環境基準値以下となった。結果から繰り返しにより砒素濃度が基準値以下に至った回までの溶出値を合計し、この合計値を固液比で割り戻した値を土壌1kgあたりの累積溶出量とした。対象15試料の砒素累積溶出量は0.33～0.75mg/kg，平均0.52mg/kgであった。これが対象土壌から溶出し得る可溶性砒素の総量、つまりは降雨等で溶出するリスクの量と見積もられた。また、公定法の含有量に対する累積溶出量の割合は4.5～10.3%，平均6.9%であり、土壌に含有する砒素の約90%以上は溶出の可能性が低いことが示唆された。シリアルバッチ試験から濃度がばらつくよう6試料を選んで逐次抽出分析を行った。STEP1：水溶性画分のみ全試料で砒素が検出され、5試料について各抽出画分間で最も高い割合を示した。シリアルバッチ試験の累積溶出量と比較すると概ね同程度の量であり、いずれも土壌中の水溶性砒素の量と判断された。STEP2：酸可溶性画分は4試料で砒素が確認された。STEP3：還元性画分及びSTEP4の酸化性画分では、砒素はSTEP3で2検体，STEP4ではそれ

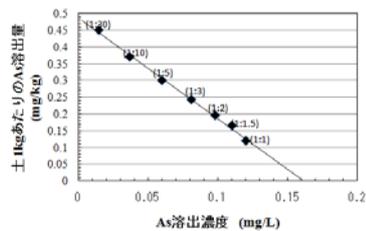


図1 各固液比での土 1kg あたりの砒素溶出量

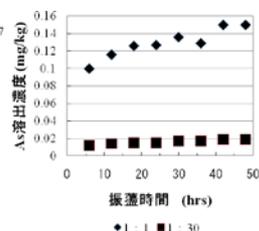


図2 振盪時間による砒素濃度の推移

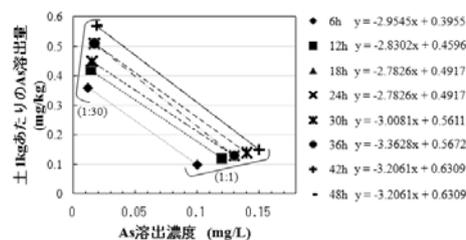


図3 各固液比における土 1kg あたりの砒素溶出量と溶出濃度

以外の異なる 2 検体で確認された。

次に、シリアルバッチ試験での砒素の累積溶出量が 0.69mg/kg の土壌で固液比変化試験を行った。予想通り、固液比が 1 : 30 のように低いほど砒素溶出濃度は低く、固液比が 1 : 1 のように高いほど液相の砒素溶出濃度は高くなる傾向がみられた。また、固液比から換算した土壌 1kg あたりの砒素溶出量と液相の砒素溶出濃度との間には直線的な相関があり、 $y = -3.0132x + 0.4877$  ( $x =$ 液相の砒素濃度、 $y =$ 土壌からの砒素溶出量) の近似直線が得られた (図 1)。この近似直線について、試験条件が土壌中の状態と同じと仮定した場合、近似直線の  $x$  切片  $= 0.16\text{mg/L}$  は限りなく土壌水分  $= 0$  に近い場合を模擬した、土壌間隙水及び浸出水の最大砒素濃度であり、 $y$  切片  $= 0.49\text{mg/kg}$  は、土壌から抵抗なく溶出した砒素が無限に拡散し液相の砒素濃度  $= 0$  となる場合を模擬した、土壌から溶出する砒素の最大溶出量と推定される。一方、供試された土壌試料の累積溶出量  $= 0.69\text{mg/kg}$  に対して  $y$  切片  $= 0.49\text{mg/kg}$  は低い値を示した。これは、同一液相を 6 時間振盪している固液比変化試験に比べて、6 時間毎に液相を交換して計 18 時間振盪しているシリアルバッチ試験の方が、土壌と水との反応時間が長いために砒素の溶出を促していると考えられる。つまり、固液比変化試験において振盪時間が短いためにシリアルバッチ試験と比べて砒素累積溶出量が低く見積もられている可能性があることから、これを明らかにするために固液比 2 種類 [土壌 : 脱イオン水  $= 1 : 1, 1 : 30$ ]、振盪時間を [6~48 時間] の 7 段階に振って平衡に至るまで浸透する試験を行った。試験の結果、各条件の砒素溶出濃度は経時的に上昇し、固液比 1 : 1, 1 : 30 の両方で振盪時間 42 時間、48 時間において等しくなったことから、固液比によらず振盪 42 時間で平衡に達したとみなした (疑似平衡状態) (図 2)。各振盪時間における土壌の砒素溶出量と液相の砒素溶出濃度との関係から、疑似平衡状態 42 時間以降で  $y = -3.2061x + 0.6309$  ( $x =$ 液相の砒素濃度、 $y =$ 土壌からの砒素溶出量) の一次の直線式を得た (図 3)。この式から、砒素最大の平衡濃度は  $0.197\text{mg/L}$  ( $x$  切片)、砒素の累積溶出量は  $0.631\text{mg/kg}$  ( $y$  切片) と見積もられ、累積溶出量  $= 0.69\text{mg/kg}$  と近い値であった。

**5. 結論：**日南層群の土壌は、対象範囲の 93% で溶出値が基準値を超過し、砒素を溶出しやすい地盤であることが示唆された。砒素の累積溶出量はシリアルバッチ試験から  $0.33 \sim 0.75\text{mg/kg}$  と見積もられ、その多くが水溶性の砒素であることが逐次抽出分析結果から示された。また、水酸化鉄などの還元性抽出画分に砒素が存在する場合には還元性抽出画分に砒素は存在せず、逆もまた然りであった。これは、日南層群では一部では既に風化 (酸化) が進んでおり、海成堆積物由来に多い硫化物中だけではなく酸化生成した水酸化鉄などに取り込まれている部分があり、これらが混在していることが考察された。状態の異なる土壌が混在する理由としては、日南層群に乱雑層が多いことが考えられる<sup>3)</sup>。シリアルバッチ試験から得た累積溶出量は、逐次抽出分析結果からおよそ水溶性の砒素であり、固液比変化試験・平衡濃度確認試験でも求められることが確認された。また、固液比変化試験を行うことで土壌の砒素最大溶出量が試算できることが示唆された。日南層群の土壌のように溶出試験の数回の繰り返しで環境基準値以下となる土壌については、溶出リスクの評価法としてシリアルバッチ試験が適切と考えられる。一方、高濃度に砒素を含み数十回の繰り返しを要するような土壌の場合、シリアルバッチ試験では作業性の点で厳しいことがある。そうした土壌に対しては、疑似平衡到達時間を確認した上での固液比変化試験が、シリアルバッチ試験に代わる新しい溶出リスク評価方法として期待できる可能性がある。

**謝辞：**国土交通省宮崎河川国道事務所、西日本高速道路株式会社九州支社宮崎工事事務所の現場関係各位、および逐次抽出分析にご協力の北海道大学環境地質学研究室の佐藤努教授と学生各位に御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) 建設工事における自然由来重金属等含有土砂への対応マニュアル検討委員会：建設工事における自然由来重金属等含有岩石・土壌への対応マニュアル (暫定版), 14, 2010.
- 2) 貫上佳則・毛利光男・加瀬隆雄：改良 BCR 逐次抽出法による汚染土壌中の重金属の形態と溶出特性の評価, 土木学会論文集, 64, 304-313, 2008.
- 3) 村田明広：宮崎県地質図説明書, <http://www.pref.miyazaki.lg.jp/shoukou/kougyou/m-geo/>, 宮崎県, 1998.

## 依頼講演 2

### 宮崎県で発生した水道水ヒ素汚染事例

黒田嘉紀<sup>1)</sup> 山内武紀<sup>1)</sup> 伊藤健一<sup>2)</sup>

- 1) 宮崎大学医学部社会医学講座公衆衛生学分野  
宮崎県宮崎市清武町木原 5200  
2) 宮崎大学国際連携センター  
宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地

#### Abstract

宮崎県某市で 2011 年に水道水ヒ素汚染事例が発生した。事例では井戸水を水道水として使用しており、水質検査においてヒ素 0.015mg/l が検出された。当該自治体からヒ素曝露の評価を依頼され、ヒ素汚染水を飲水した対象と、飲水していない対照の毛髪ヒ素濃度を測定した。両者に有意な差は見られなかったため、今回の汚染事例におけるヒ素曝露の程度は軽微であると考えられた。

Keywords: Arsenic, 気キーワード: 井戸水 ヒ素汚染

#### はじめに

昨年宮崎県某市で、水道水のヒ素汚染事例が起こった。水道水は井戸水を取水源としており、定期的に水質管理を行っていたが、昨年の水質検査でヒ素濃度 0.015mg/l が検出され問題となった。

この井戸は 1997 年に掘削され、2000 年から某小学校、中学校および教職員住宅に供給されていた。2003 年までの検査ではヒ素は基準以下であるためその後検査を行われず、2011 年の検査時にヒ素濃度が基準を上回ったことが分かった。

そのため、某自治体から曝露状況の把握を宮崎大学医学部社会医学講座公衆衛生学分野が依頼された。曝露量推定のために飲水量調査及び毛髪中のヒ素濃度分析を行った。

#### 対象と方法

対象はヒ素汚染水道水を飲水した 47 名、またこの水道水を使用していない対照 52 名である。各対象から毛髪を採取し、エネルギー分散型 X 線分析 (Energy Dispersive X-ray spectrometry) にて毛髪中のヒ素濃度を検出した。検出限界は 0.1mg/kg であった。

#### 結果

汚染井戸水を飲水した対象を曝露群、飲水していない対照を非曝露群として、毛髪中のヒ素濃度を比較したが、両者に有意な差は見られなかった (表 1)。

表1

	曝露群	非曝露群	P
平均±SD	0.15±0.01	0.21±0.05	0.24
mg/kg(範囲)	(0.1-0.57)	(0.1-2.06)	

さらに曝露群、非曝露群で性別に比較した。曝露群において女性は男性に比較して有意に毛髪中のヒ素濃度が高値であった(表 2)。

表2

	男性 (mg/kg)	女性 (mg/kg)	P
曝露群	0.12±0.01	0.18±0.03	0.04
非曝露群	0.15±0.02	0.26±0.09	0.23

曝露群において、曝露期間と毛髪中のヒ素濃度の関係を見た。曝露期間と毛髪中のヒ素濃度に有意な関係は見られなかった(図 1)。

### 考察と結論

宮崎県の某市で発生したヒ素汚染事例を経験したので報告した。汚染の程度は軽度であり、毛髪中のヒ素濃度は、非曝露群と有意な差は見られなかった。しかし、性別で比較すると、曝露群の女性は優位にヒ素濃度が高かった。その理由に関しては不明であった。今回の汚染事例に関しては汚染濃度が低く、毛髪ヒ素濃度は曝露群、非曝露群で有意差が見られないため、ヒ素中毒のリスクは少ないと考える。ただし日本の他の地域<sup>1)</sup>と比較すると、この地域住民の毛髪濃度は高いため、この地域は環境中のヒ素濃度が比較的高い可能性が考えられた。

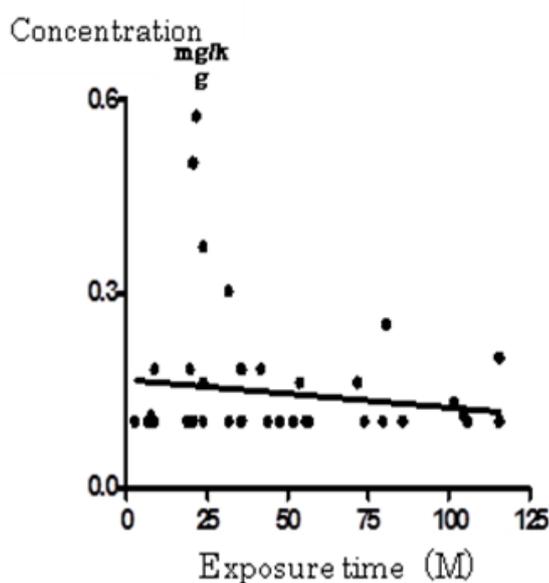


図 1：曝露期間と毛髪中のヒ素濃度

1) Yamato N. (1988) Concentrations and chemical species of arsenic in human urine and hair. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 40, 633-640pp.

## 依頼講演 3

### Heavy metal distribution and chemical speciation in soils around small scale mining areas of Mongolia

Bolormaa Oyuntsetseg<sup>1</sup>, Dorj Daichaa<sup>1</sup>,  
Erdenetuya Ochir<sup>2</sup> and Watanabe Makiko<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, National University of  
Mongolia, Mongolia

<sup>2</sup>Labor Safety and Health department, Erdenet Mining Corporation, Amariin  
square, Erdenet city, Orkhon province, Mongolia

<sup>3</sup>Graduate School of Urban Environmental Science, Tokyo Metropolitan  
University 1-1, Minami-Oosawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-039, Japan

Soil degradation and pollution has been very serious problem in Mongolia due to illegal gold mining activities. Evaluation of heavy metal pollution on the small-scale mining operations has been one of the major sources of concern for governments, local communities and researchers. The purpose of this work is to study the heavy metal distribution and chemical speciation in soils around selected small scale mining areas of Mongolia. The Zaamar small-scale mining area is located in the Zaamar sum Western Tov aimag, from which were taken surface soil samples for studying the extractability and mobility of heavy metals (Pb, Zn and Cd) and major elements (Mn, Fe, Al, Ca and P) and their relationship by using sequential extractions. Each of the chemical fractions is operationally defined as: (a) exchangeable; (b) bound to carbonates or specifically adsorbed; (c) bound to Fe-Mn oxides; (d) bound to organic matter and sulphides; (e) residual. Another studied area located in the Bornuur sum, Tov aimag, at the distance about 120km from the capital city Ulaanbaatar of Mongolia. The toxicity and the mobility of heavy metals in soils depend not only on the total concentration, but also on their specific chemical form, their binding state, the metal properties, environmental factors and soil properties like pH, organic matter content.

Other soil characteristics such as total carbon (TC) and nitrogen (TN) content, pH, and electrical conductivity (EC) were also performed. Also, the chemical properties of soils and correlation analysis between elements were determined for all studied soil samples. All information collected allowed the understanding of the small-scale mining effect on soil degradation, thus contributing to the qualitative prediction of pollution evolution on the basis of metal mobility. The results obtained in the study give a serious caution to local government and responsible environmental regulation bodies on the hazard of such a small-scale gold mining.

# 一 般 講 演

## ヒ素感受性に関与する遺伝子群の探索とヒ素誘導性アポトーシスの検討

○信國好俊、升本順子、沼本通孝  
広島大学原爆放射線医科学研究所 ゲノム障害病理

【目的】ヒ素感受性に関与する遺伝子群の探索とヒ素誘導性アポトーシスの検討。大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーの中から単離された三酸化ヒ素感受性低下変異細胞でトラップされていた遺伝子の、ヒ素誘導性アポトーシスに及ぼす影響と関与を明らかとする。

【背景】ヒ素の生体影響については、動物実験、細胞実験、生化学的解析など様々な方法で研究が進められ、これまでも多くの知見が得られてきた。しかし、その毒性発現や標的分子、感受性決定の分子機構については未だ十分には理解されていない。

我々はこれまで大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた機能遺伝子群の系統的解明法の検討と開発を行ってきた。これは random mutagenesis による遺伝学的解析法の1つで、ジーントラップ法で遺伝子を破壊した変異細胞ライブラリーの中から、特定の表現型を持つ変異細胞を単離できれば、その変異の責任遺伝子の解明が可能になる (Nobukuni et al, JBC, 2005, Nobukuni et al, Jpn J Hyg, 2005)。このゲノム機能学的解析法によってヒ素感受性に関与する遺伝子群を明らかにすることができるのではないかと考え、現在特に三酸化ヒ素について検討を進めている。

【方法】①大規模ジーントラップ挿入変異 CHO 細胞ライブラリーの中から、三酸化ヒ素処理 (40  $\mu$ M, 3 時間) でも生存しうる細胞を、三酸化ヒ素感受性低下変異細胞として単離した。② ヒ素感受性低下変異細胞でトラップ(同時に破壊)された遺伝子を 5' -RACE 法で増幅後、シークエンス/BLAST 解析によって同定した。③ miRNA(microRNA)を用いたドキシサイクリン誘導性遺伝子ノックダウン細胞を作製した。④ この薬剤反応性遺伝子ノックダウン細胞を使って三酸化ヒ素誘導性アポトーシスについての検討を行った。

【結果及び考察】①変異細胞ライブラリーから単離された三酸化ヒ素感受性低下細胞 AsR-13 では P450 関連遺伝子がトラップされている事が判明した。② miRNA(microRNA)を用いたこの P450 関連遺伝子ノックダウン細胞の検討から、この遺伝子の発現が三酸化ヒ素によるアポトーシス誘導に影響を及ぼすことが確認できた。③ P450 システムが三酸化ヒ素による重要な活性酸素発生源の一つである可能性が示唆された。

# Functional genetic screening of the genes involved in the susceptibility to arsenic trioxide cytotoxicity

Yoshitaka Nobukuni, Junko Masumoto, Michitaka Numoto  
Department of Human Genetics, RIRBM, Hiroshima University

## BACKGROUND

Biological effects of arsenic have been well studied. However, the target molecules of the arsenic and the molecular mechanisms determining the susceptibility to arsenic are not fully understood yet. We have been developing a genetic screening system to elucidate the obligate genes using the large-scale gene-trap mammalian mutant cell library (Nobukuni et al, JBC, 2005, Nobukuni et al, Jpn J Hyg, 2005). To investigate the molecular mechanisms underlying the arsenic toxicity, we conducted the functional genetic screening of the genes involved in the susceptibility to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

## METHODS

① The mutant cells which can survive after the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment (40 μ M, 3 hours) were isolated from a large-scale gene-trap insertional mutants library. ② The trapped (disrupted) genes in the mutant cells were identified by 5' -RACE-sequencing analyses and BLAST search. ③ P450-related gene knockdown cell was established using a doxycycline-inducible miRNA(microRNA) expression system. ④ Arsenic trioxide induced-apoptotic processes were investigated using this gene knockdown cell.

## RESULTS and DISCUSSION

① P450-related gene was trapped in the mutant cell named AsR-13 which was isolated from a gene-trap mutant cell library and showed the decreased susceptibility to arsenic trioxide. ② Knock down of this P450-related gene expression by miRNA(microRNA) reduces the arsenic-induced apoptosis. ③ P450-system seems to play an important role as a source of reactive oxygen species in the arsenic trioxide-induced apoptotic processes.

## 亜ヒ酸がマスト細胞の応答性と遺伝子発現に及ぼす影響

○姫野誠一郎、清水由里、角 大悟  
(徳島文理大学・薬学部)

**【目的】** ヒ素は古来より知られた毒物であるが、近年、世界各地の地下水汚染を通して環境汚染物質として人々の健康を害している。地下水のヒ素汚染が顕著なバングラデシュでは、ヒ素曝露を受けた母親から生まれた幼児が感染症で死亡する割合が高いことが報告され、ヒ素が免疫能に影響を及ぼしている可能性がある。一方、無機3価ヒ素化合物である「トリセノックス」が急性前骨髄球性白血病(APL)の治療薬として利用されているが、副作用として心疾患や皮膚症状に加えて皮膚の感染症も報告されている。本研究室では、ヒ素化合物が免疫能に及ぼす影響を検討するため、ナチュラルキラー細胞、T細胞、肥満細胞、マクロファージなどの免疫担当細胞を亜ヒ酸に曝露した際に起こる応答を系統的に調べている。これまでに肥満細胞のモデルとなるRBL-2H3細胞を1  $\mu\text{M}$ 以下の亜ヒ酸に28日間曝露すると、抗原抗体刺激による脱顆粒率が低下することを見出している。そこで、その機構を検討するとともに、亜ヒ酸曝露によって発現が変化する遺伝子の検索を行った。

**【方法】** 実験1： ラット好塩基球性白血病細胞RBL-2H3細胞を0, 0.5, 1.0  $\mu\text{M}$ の亜ヒ酸に14, 28日間曝露したのち、抗体(IgE)と抗原(卵白アルブミン), A23187, compound48/80, thapsigargin (TG)により刺激し、脱顆粒率を $\beta$ -hexosaminidaseの遊離率により測定した。細胞内Ca濃度はFluo-3を用いて測定した。

実験2： RBL-2H3細胞を1.0  $\mu\text{M}$ の亜ヒ酸に28日間曝露したのち、microarrayによって非曝露群との遺伝子発現の差を求めた。差が認められた遺伝子について、半定量的RT-PCRにより、その発現の変化を確認した。

**【結果及び考察】** 実験1： 低濃度の亜ヒ酸への長期曝露により、抗原抗体刺激による脱顆粒は、ヒ素の濃度依存的に抑制されることが確認された。一方、Ca ionophoreのA23187による脱顆粒、あるいは、Gタンパクを活性化してCa流入を起こすCompound48/80による脱顆粒は亜ヒ酸曝露による影響をまったく受けなかった。亜ヒ酸への曝露により、肥満細胞刺激後の細胞内Ca濃度の上昇が抑制されていた。肥満細胞内のCa濃度の上昇は、store-operated Ca entry (SOCE) によっておこる。そこで、小胞体のCaを枯渇させ、細胞外からのCa流入を起こすTGによる脱顆粒を調べた結果、亜ヒ酸曝露により、TG刺激後の脱顆粒率が低下し、細胞内Ca濃度上昇が抑制された。培地にTGと同時にEGTAを添加し、2分後にEGTAを除去した後の細胞内Ca濃度の変化を調べたところ、亜ヒ酸曝露により、小胞体からのCaの放出は変化しなかったものの、細胞外からのCa流入がヒ素の濃度依存的に抑制されていた。したがって、

亜ヒ酸に長期曝露された肥満細胞では、SOCEの過程において細胞外からのCa流入が抑制された可能性が示唆された。そこで、SOCEにおける細胞外からのCa流入に関与するSTIM1、Orai1、および、いくつかのTRPCファミリーCaチャンネルの発現を調べた結果、亜ヒ酸曝露によってTRPC5の発現が顕著に抑制されていた。SOCEにおける細胞外Ca流入の主役となるCaチャンネルはOrai1であるが、TRPC5も補助的な役割を果たすと考えられている。従って、亜ヒ酸への曝露によりTRPC5の発現が低下したことがSOCEの抑制、その後の脱顆粒の抑制につながったと考えられる。

**実験2：** 上記の結果を踏まえ、低濃度の亜ヒ酸にRBL-2H3細胞を28日間曝露したときの遺伝子発現の変化を探ったところ、免疫応答に関与するCa結合タンパク質ファミリーであるS100タンパク質のうち、S100A8/A9の発現が上昇していた。そこで、RT-PCRによりmRNAレベルを調べたところ、亜ヒ酸曝露14日目をピークにS100A8/A9の発現が顕著に上昇していることを見出した<sup>1)</sup>。S100A8/A9は肥満細胞の脱顆粒には関与しないものの、好中球ではNADH oxidaseの活性を高め、細胞内外でマンガンや亜鉛に結合することが知られており、亜ヒ酸が免疫能に及ぼす影響を検討する上で、新たな標的となる可能性がある。

1) Shimizu, Y., Fujishiro, H., Matsumoto, K., Sumi, D., Satoh, M., Himeno, S. (2011) Chronic exposure to arsenite induces S100A8 and S100A9 expression in rat RBL-2H3 mast cells. *J. Toxicol. Sci.* 36(1), 135-139.

### **Effects of exposure to low-dose arsenite on degranulation and gene expression of RBL-2H3 mast cells**

Himeno, S., Shimizu, Y., and Sumi, D., (Tokushima Bunri University, Tokushima)

To examine the effects of exposure to low-dose arsenite on the functions of mast cells, RBL-2H3 cells were exposed to low-dose arsenite for 4 weeks. The degranulation of cells stimulated by IgE and antigen as well as by thapsigargin was decreased after arsenite exposure. The increases in intracellular Ca in response to stimulation by antigen/IgE or thapsigargin were suppressed by arsenite exposure. We found that entry of extracellular Ca into RBL-2H3 cells during store-operated Ca entry (SOCE) was suppressed in cells exposed to arsenite. The expression of TRPC5, but not that of STIM1 or Orai1, was suppressed by arsenite exposure, suggesting that arsenite may decrease the expression of TRPC5 leading to the suppression of SOCE necessary for the degranulation of mast cells. A microarray study revealed that the expression of S100A8/A9 was enhanced by chronic exposure to low-dose arsenite.

## PML 発現細胞における亜ヒ酸の影響

○平野靖史郎・小林弥生・渡辺喬之  
独立行政法人 国立環境研究所

### 1. はじめに

急性前骨髄性白血病(APL)は、遺伝子転座により PML(Promyelocytic leukemia)とレチノイン酸レセプターとの融合タンパク質(PML-RARA)が生成することが原因で発症する疾病であるが、亜ヒ酸の投与により7割程度が治癒することが知られている。また、亜ヒ酸は、慢性骨髄性白血病(CML)の根治にも有効であることが示されている。これらの効果は、亜ヒ酸が PML の RING finger と呼ばれるシステインに富むドメインに結合することにより、PML あるいは PML 融合タンパク質の安定性を低下させることにより現れるものと考えられている。本研究では、PML を強制発現させた細胞株を用いて、PML が亜ヒ酸の細胞毒性に与える影響、ならびに亜ヒ酸を暴露した細胞における PML の局在の変化について調べることを目的とした。

### 2. 方法

CHO-K1細胞、ならびにC端にDDKタグがPML (variant 5) とともに安定に発現しているCHO-K1細胞 (CHO-PML) を用いた。CHO-PMLは、リポフェクタミン(LTX)でPML遺伝子を導入した後、G418耐性細胞を選択することにより樹立した。細胞におけるPMLの発現は、ウェスタンブロット法を用いて調べた。また、細胞質と核におけるPMLの存在割合を調べるため、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce)を用いてタンパクを抽出した後、ウェスタンブロット法を用いて各分画のPML量を調べた。タンパクの定量にはBCAキットを用いた。CHO-K1細胞、あるいはCHO-PML細胞に、0.5mM のBSOの存在、非存在下で亜ヒ酸( $iAs^{3+}$ )を最終濃度0-300  $\mu M$ で添加し、24時間後の細胞生存率をWST-8法を用いて調べた。また、これらの細胞を10  $\mu M$ の $iAs^{3+}$ に1-8時間暴露し、細胞層をHBSSで洗浄した後湿式灰化して、細胞に取込まれたヒ素の量をICP-MSを用いて定量した。一方、CHO-PML細胞を、3  $\mu M$ あるいは30  $\mu M$ の $iAs^{3+}$ に2時間暴露してPMLの免疫染色に供した。細胞を固定後、0.1%のTriton X-100で処理し、抗PML抗体、蛍光標識2次抗体で細胞を染色し、核をDAPIで対比染色した。

### 3. 結果

これまでに報告されているように、PMLは、CHO-PML細胞においてもウェスタンブロット膜上に幾つかの異なる分子量のタンパクとして発現していた。また、タンパク質重量当たりでは細胞質より核に多く存在していることが確認されたが、免疫染色を施した細胞の蛍光顕微鏡を用いた観察においてもこのことが確認された。 $iAs^{3+}$ の CHO-K1,

と CHO-PML 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、CHO-PML は CHO-K1 細胞に比べ  $iAs^{3+}$  に対する感受性が高くなっていた。しかし、0.5mM の BSO で前処理した CHO-K1 と CHO-PML 細胞では、BSO 処理により  $iAs^{3+}$  の細胞毒性がともに高くなったが、CHO-K1 と CHO-PML 細胞間の  $iAs^{3+}$  に対する感受性の差はなくなった。細胞の  $iAs^{3+}$  の取り込み量は、CHO-K1 と CHO-PML 間で差は認められなかった。免疫染色した細胞では、幾つかの細胞の核において PML の発現が認められたが、核質(nucleosome)全体に弱く染まるとともに、小体 (Nuclear body) としても限局的に強く染まることが確認された。一方、 $iAs^{3+}$  を暴露した CHO-PML 細胞では、小体だけが染色されていた。

#### 4. 考察

PML には RING finger, B box, coiled-coil からなる RBCC モチーフが存在するが、RING finger ドメインには多くのシステインが存在しており、ヒ素との結合することが報告されている。PML を強制発現させた細胞では、 $iAs^{3+}$  が PML に捕捉されるため細胞毒性が低くなることも予想されたが、今回の実験では PML の発現が  $iAs^{3+}$  に対する感受性をむしろ高めていることが明らかになった。また、BSO を添加した実験から、両細胞株において細胞内グルタチオンが  $iAs^{3+}$  の細胞障害性を著しく低下させていることも確認された。 $iAs^{3+}$  に暴露した細胞では、PML がより限局的に核内の小体に存在することが分かったが、 $iAs^{3+}$  の PML への結合が、PML の核内移行と小体形成に及ぼす影響についてはさらに詳細に調べ、ヒ素の細胞内動態を明らかにする必要がある。

### **Effects of arsenite on PML-overexpressing cells.**

○Seishiro Hirano, Yayoi Kobayashi, and Takayuki Watanabe

National Institute for Environmental Studies

Promyelocytic leukemia (PML) has been known to play a key role in the maintenance of leukemia cells and is implicated in acute promyelocytic leukemia (APL) when it occurs as a fusion protein with retinoic acid receptor- $\alpha$  (RARA) and also in chronic myelocytic leukemia (CML). Arsenic trioxide is known to be effective to eradicate both malignant cells. The present study was undertaken to investigate whether overexpression of PML modulates toxicity of arsenite in cells. CHO-K1 cells were stably transfected with a PML-DDK containing vector. The transfectants (CHO-PML) were slightly more susceptible to arsenite than CHO-K1 cells, although the cellular uptake of arsenite rate was almost the same between those two cell types. However, the immunostaining pattern of PML was remarkably changed by arsenite in the nucleoplasm of CHO-PML cells. Binding affinity of arsenite to nuclear proteins should be investigated in detail to reveal behavior of intracellular arsenic.

## GC-MSによる尿中ヒ素化合物の分析法の開発

○竹内靖人<sup>1)</sup> 奈女良 昭<sup>2)</sup> 川澄 八重子<sup>3)</sup> 今中努志<sup>4)</sup> 佐久井 徳広<sup>5)</sup>  
太田裕一<sup>1)</sup> 圓藤陽子<sup>6)</sup> 住野公昭<sup>1)</sup> 圓藤今史<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup>中央労働災害防止協会 大阪労働衛生総合センター <sup>2)</sup>広島大学大学院 医歯薬保健学研究院法医学

<sup>3)</sup>中央労働災害防止協会 労働衛生調査分析センター <sup>4)</sup>ジーエルサイエンス株式会社

<sup>5)</sup>アジレント・テクノロジー株式会社 <sup>6)</sup>(独)労働者健康福祉機構 関西労災病院産業中毒研究センター

<sup>7)</sup>大阪市立大学大学院 医学研究科産業医学分野

## 【目的】

ヒ素の形態別分析はHPLC-ICP-MSを用いた方法が一般的であるが、HPLC-ICP-MSは機器本体だけでなく、ランニングコストも高額になり、分析できる施設も限定されている。今回、より汎用性の高いGC-MSを用いた尿中の無機ヒ素(iAs:As(III)+As(V))およびモノメチルアルソン酸(MMA)の分析法を開発した。

## 【方法】

尿(2 ml)にSnCl<sub>2</sub>塩酸溶液(50 mg/ml, 0.4 ml)とKI水溶液(20%, 0.2 ml)を加え還元し、BAL(2,3-ジメルカプト-1-プロパノール)水溶液(0.2%, 0.2 ml)を加え、誘導体化した後、有機溶媒で抽出し、GC-MSで分析を行った。クロマトグラムをFig. 1に示した。誘導体化試薬の選定、抽出溶媒の選定、還元反応時間および誘導体化反応時間の検討を行った。米国のFDA(食品医薬品局)のガイドラインに従ってバリデーションを行い、更に認証標準物質(NIST SRM 2669, 米国国立標準技術研究所)を用いて、方法の妥当性を確認した。

## 【結果】

<誘導体化試薬の選定>3種類の誘導体化試薬(チオグリコール酸メチル(TGM), 1,3-プロパンジチオール(PDT)およびBAL)について、選定を行った。BALのみがiAsおよびMMAを共に誘導体化できたため、BALを採用した。<抽出溶媒の選定>6種類の有機溶媒(ベンゼン, トルエン, ジクロロメタン, n-ヘキサン, ジエチルエーテルおよび酢酸エチル)について、選定を行った。ベンゼン, トルエンおよびジクロロメタンが良好な結果を示したが、より大きなピーク強度が得られたジクロロメタンを採用した。<還元反応時間および誘導体化反応時間>還元反応は速やかに完了し、60分まで一定であった。また誘導体化反応は、30分で最大値を示し、60分まで一定であった。したがって、還元反応時間および誘導体化反応時間はともに、30分間とした。<バリデーション>いずれのヒ素化合物も1-100 µg/lの範囲で直線性が得られ、検出限界および定量限界は、それぞれ0.2 µg/lと1 µg/lであった。回収率は良好であり、正確度および精度もFDAの基準を満たしていた。本法によるNIST SRM 2669の分析値は、認証値とよく一致した(Table 1)。

## 【考察】

今回開発したGC-MS法は、HPLC-ICP-MS法と同程度の検出限界を持ちながら、キャピラリーカラムによる高い分離能や、マススペクトルによる高い同定能力を有する等の長所を持つ。また、高価な装置や高額なランニングコストも不要である。本法は、比較的簡単な前処理でiAsおよびMMAを選択的にかつ高感度で分析できるため、ヒ素曝露のモニタリングに有益な方法と考えられる。

## 【謝辞】

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B)(No. 22390165)によるものである。

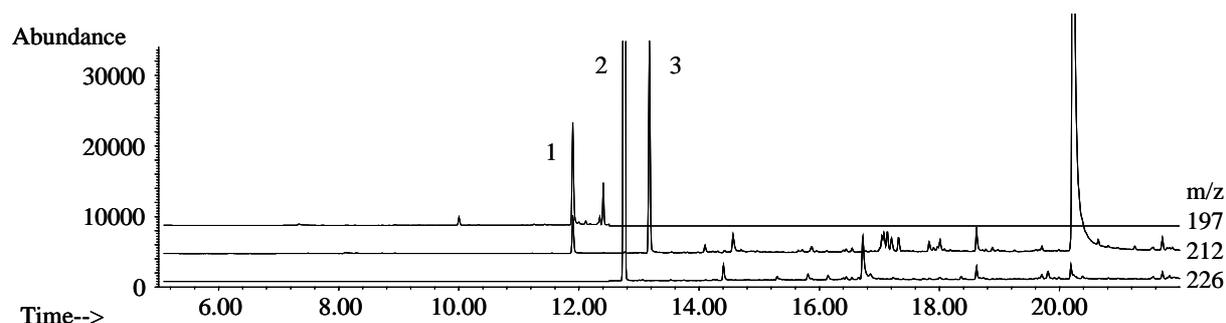


Fig. 1. Typical reconstructed mass chromatogram of Standard Reference Material (SRM) 2669 level II (National Institute of Standards and Technology) (MMA, 6.8  $\mu\text{g/l}$ ; iAs, 11.3  $\mu\text{g/l}$ ). Peak 1, BAL-MMA; peak 2, internal standard (IS); peak 3. BAL-iAs.

Table 1. Results for arsenic species in NIST SRM 2669 (Levels I and II) <sup>a</sup>

Species	Level I		Level II	
	This method <sup>b</sup>	Certified <sup>c</sup>	This method <sup>b</sup>	Certified <sup>c</sup>
As(III)	–	1.47 $\pm$ 0.10	–	5.03 $\pm$ 0.31
As(V)	–	2.41 $\pm$ 0.30	–	6.16 $\pm$ 0.95
iAs	3.9 $\pm$ 0.0	–	11.4 $\pm$ 0.1	–
MMA	2.4 $\pm$ 0.4	1.87 $\pm$ 0.39	6.9 $\pm$ 0.4	7.18 $\pm$ 0.56

<sup>a</sup> Concentrations in  $\mu\text{g/l}$  as As.

<sup>b</sup> Values are expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 3).

<sup>c</sup> Values are expressed as the certified value  $\pm$  the expanded uncertainty (95% confidence interval).

### Development of an analytical method for the determination of arsenic in urine by gas chromatography-mass spectrometry

Akito Takeuchi<sup>1</sup>, Akira Namera<sup>2</sup>, Yaeko Kawasumi<sup>3</sup>, Tsutoshi Imanaka<sup>4</sup>, Norihiro Sakui<sup>5</sup>, Hirokazu Ota<sup>1</sup>, Yoko Endo<sup>6</sup>, Kimiaki Sumino<sup>1</sup>, Ginji Endo<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Osaka Occupational Health Service Center, Japan Industrial Safety and Health Association, <sup>2</sup>Department of Forensic Medicine, Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, <sup>3</sup>Occupational Health Research and Development Center, Japan Industrial Safety and Health Association, <sup>4</sup>Fukushima Factory, GL Sciences Inc., <sup>5</sup>Agilent Technologies, <sup>6</sup>Research Center for Occupational Poisoning, Kansai Rosai Hospital, Japan Labour Health and Welfare Organization, <sup>7</sup>Department of Preventive Medicine and Environmental Health, Graduate School of Medicine, Osaka City University

We developed and validated a GC-MS method to simultaneously determine inorganic arsenic and monomethylarsonic acid in urine. Arsenic compounds (after reduction of arsenic to the trivalent state) were derivatized with 2,3-dimercapto-1-propanol and then analyzed using a GC-MS. The proposed method was validated according to the US Food and Drug Administration guidelines. The analytical values of Standard Reference Material (SRM) 2669 (National Institute of Standards and Technology) obtained by the proposed method were sufficiently accurate. The proposed method overcame the disadvantages of high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. It was a robust, selective and cost-effective method suitable for routine analyses and could be useful for the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic.

## 数種カタクチイワシ加工品中のヒ素化合物

○白石直也・松本 駿・臼井将勝・花岡研一（水大校）  
水産大学校

## 1. はじめに

海産生物には、ヒ素が高濃度（ $\mu\text{g/g}$  のオーダー）で存在するため、当然のことながら海産食品のヒ素濃度も高い。また、このヒ素は、水溶性と脂溶性とに大別される。これらのうち、脂溶性ヒ素に関わる研究は、水溶性ヒ素に関わる研究に比較して遅れているものの、近年、脂肪酸型あるいは炭化水素型の形態を持つ分子種も報告されるようになり注目されている。

本研究で試料として用いたカタクチイワシ(*Engraulis japonica*) は漁獲量の多い魚であり、多くの場合、煮干しなどの干物として加工される。カタクチイワシの煮干しは、だしを取る際によく使われ、様々な料理に利用されている。また、カルシウムの供給源などとしてそのまま食されることも多い。その他、ペットフードとして利用されることも少なくなく、人間のみならず動物も食する機会の多い水産加工食品である。そこで、本研究では、数種のカタクチイワシ加工品について分析を行い、それらの総ヒ素濃度を調べるとともに、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS 法を用いてヒ素化合物の形態別分析を行った。

## 2. 方法

試料：製造元の異なる市販のカタクチイワシ乾燥品、6種（以下、A、B、C、D、E、Fとする）を試料として用いた。それぞれ、乳鉢で細かく砕いた後、分析に用いた。

総ヒ素量の定量：それぞれの試料 0.2~0.3 g に、超微量分析用硝酸（69%）を 6 ml 添加した後、マイクロ波分解装置で分解（800W で 40 分）した。その後、この分解溶液に超純水を加えて 40 ml に定容し、誘導プラズマ-質量分析法（ICP-MS）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 0.1 g に、超微量分析用硝酸を 1 ml 添加し、80°C で 1 時間加熱してヒ素化合物を抽出した。この抽出液に、アンモニア水を pH 7 になるまで加え、50 ml に定容した。この溶液を数 ml ろ過した後、HPLC-ICP-MS によりヒ素化合物の形態別分析を行った。分離用カラムには Nucleosil 100SA カラムを用いた。なお、HPLC において、試料の注入に当たってはオートサンプラーを用いた。

## 3. 結果および考察

各市販乾燥品の総ヒ素濃度は、試料の体長や産地により異なり、 $3\mu\text{g/g}$  程度から  $14\mu\text{g/g}$  程度であった。また、体長の小さいものほど総ヒ素濃度の低い傾向が認められた。

形態別分析の結果、どの試料においても、アルセノベタイン(AB)、トリメチルアルシ

ンオキシド (TMAO) およびジメチルアルシン酸 (DMAA) が共通して検出された。これら 3 種のヒ素化合物濃度の合計は、総ヒ素濃度の 90%以上を占めた。また、各ヒ素化合物濃度の総ヒ素濃度に占める割合は、AB で 42.7% (試料-B) ~65.1% (試料-E)、TMAO で 20.0% (試料-A) ~41.2% (試料-E)、DMAA で 3.8% (試料-C) ~23.9% (試料-D) であった。ただし、DMAA の場合、どの試料においても、総ヒ素濃度の高低に関わりなく、0.5 から 0.6  $\mu\text{g/g}$  程度の濃度で検出された。これら 3 種のヒ素化合物以外では、試料-F を除く各試料から、微量あるいは少量の無機ヒ素 (As(V)) が検出された。この他、いくつかの試料から、微量のアルセノコリン、テトラメチルアルソニウムイオン等が検出された。

本研究では、ヒ素化合物の抽出に硝酸を用いているため、検出された DMAA や TMAO は脂溶性ヒ素化合物、すなわち、ジメチル態の脂溶性ヒ素化合物やトリメチル態の脂溶性ヒ素化合物から誘導されたと推定した。これを確認するために、今後、Folch の方法 (クロロホルム-メタノール抽出) に準じて水溶性ヒ素化合物を抽出して分析を行う予定である。また、試料-F を除いて無機ヒ素が検出された。本研究で用いた抽出法、すなわち硝酸加熱溶解法の条件では、有機ヒ素化合物から無機ヒ素の誘導は起こらない。したがって、この無機ヒ素は製品中に含まれていたと結論した。ただし、天然のカタクチイワシ組織にもともと含まれていたのか、あるいは、加工工程における誘導あるいは汚染であるのかについては、今後、調べる予定である。

## Detection of arsenic compounds in dried anchovy, *Engraulis japonica*

○Naoya Shiraishi, Shun Matumoto, Masakatsu Usui and Ken'ichi Hanaoka  
Department of Food Science and Technology, National fisheries University

Water-soluble arsenic compounds were shown to have many structures. On the other hand, relatively little is known about arsenolipid, mostly because of the limited amounts of these compounds and the difficulty of isolating them. In this study, arsenic was determined through inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in the acid-digested and diluted solutions of several commercial dried anchovies. Each sample was also subjected to an extraction procedure for arsenic, which involved a nitric acid-based partial-digestion method for chemical speciation using HPLC-ICP-MS. The major arsenic compounds detected were arsenobetaine and trimethylarsine oxide. Other than these arsenicals, small amounts of dimethylarsinic acid and inorganic arsenic were detected.

## グルタチオンに依存したジメチルモノチオアルシン酸の代謝活性化

○黒澤英俊<sup>1)2)</sup>、下田康代<sup>1)</sup>、畑 明寿<sup>3)</sup>、山野優子<sup>4)</sup>、加藤孝一<sup>1)</sup>、  
立川真理子<sup>1)</sup>、圓藤陽子<sup>5)</sup>、圓藤吟史<sup>6)</sup>、山中健三<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学薬学部、<sup>2)</sup>警視庁科学捜査研究所、<sup>3)</sup>千葉科学大学危機管理学部、

<sup>4)</sup>昭和大学医学部、<sup>5)</sup>関西労災病院産業中毒研究センター

<sup>6)</sup>大阪市立大学大学院医学研究科

### 1. はじめに

動物モデルにおいて発癌性が認められている無機ヒ素の主要メチル化代謝物であるジメチルアルシン酸(DMA<sup>V</sup>)は、その毒性発現において活性還元代謝物、例えば3価ジメチルヒ素が重要な役割を演じていることが示唆されている。一方、そのメチル化代謝過程においてDMA<sup>V</sup>以外にもジメチルモノチオアルシン酸[DMMTA<sup>V</sup>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsS(OH)]、ジメチルジチオアルシン酸[DMDTA<sup>V</sup>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsS(SH)]ならびに硫化トリメチルアルシン[TMAS<sup>V</sup>, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>AsS]などの含硫ジメチルヒ素化合物の代謝生成が報告されている。その代謝生成機構の詳細については明らかにされていなかったが、我々の研究グループはDMMTA<sup>V</sup>がDMA<sup>III</sup>の毒性軽減代謝機構として硫黄転移酵素による硫黄原子の酵素的付加反応により生ずることを明らかにし、第16回ヒ素シンポジウムにおいて報告した。一方、DMMTA<sup>V</sup>は生体内SH化合物であるグルタチオン(GSH)と反応し、安定な複合体(DMMTA<sup>V</sup>-SG)をはじめとした数種のジメチルヒ素化合物を生成すること、またGSHに依存して細胞毒性が増強するとの報告がなされており、特に膀胱癌発生との関連性が指摘されている。そこで今回、毒性増強機構と考えられるDMMTA<sup>V</sup>とGSHとの反応機構を明らかにするため、ODSカラムを装着したHPLC-ICP-MSならびにHPLC-TOF-MS等を用いて生成するジメチルヒ素化合物の経時変化の測定をin vitro実験により行った。

### 2. 方法

常法に従い合成したDMMTA<sup>V</sup>(終濃度1mM)とGSH(終濃度1-10mM)を10mM酢酸アンモニウム溶液中で作用させた後、反応生成物に関してODS column (SunFire<sup>TM</sup>, Waters)を装着したHPLC-ICP-MS(Agilent HP1100 HPLC, Agilent 7500a ICP-MS)およびHPLC-TOF-MS (SHIMADZU LC-30A HPLC, Bruker maXis 4G TOF-MS)により同定を試みた。また、DMMTA<sup>V</sup>ならびに同定されたヒ素化合物、さらにGSH量をHPLC-PDA(フォトダイオードアレイ検出器)により経時的に定量した。反応に伴い発生した硫化水素(H<sub>2</sub>S)は、反応容器中の気層を採取しcapillary column (HP-1, Agilent)を装着した

GC-FPD(炎光光度検出器)により測定した。

### 3. 結果

DMA<sup>V</sup>はGSHとの反応によりDMA<sup>III</sup>またはDMA<sup>III</sup>-SGを容易に生ずるが、DMMTA<sup>V</sup>では、その分子中のAs原子は3価に還元されることなく5価のままGSHと安定な複合体(DMMTA<sup>V</sup>-SG)を形成することが確認された。このことからDMMTA<sup>V</sup>とGSHの反応速度が比較的ゆっくりとしたものであることが推定された。その他のヒ素化合物については質量分析の結果から、DMA<sup>III</sup>とGSH複合体(DMA<sup>III</sup>-SG)ならびにDMDTA<sup>V</sup>の生成、ヒ素化合物以外にもH<sub>2</sub>Sの生成が確認された。これらのことから、DMMTA<sup>V</sup>とGSHにより生じたDMMTA<sup>V</sup>-SGは、ジメチルチオアルシンならびにH<sub>2</sub>Sの生成を介して、最終的には3価ジメチルヒ素(DMA<sup>III</sup>-SG、DMA<sup>III</sup>)やDMDTA<sup>V</sup>へ変換していくものと推定された。このように、3価ジメチルヒ素の他にジメチルチオアルシンやH<sub>2</sub>Sが活性中間体として生成し、毒性発現において重要な役割を演じている可能性が併せて推察された。

#### Metabolic Activation of Dimethylmonothioarsinic Acid by Biological Thiols

Hidetoshi Kurosawa<sup>1)2)</sup>, Yasuyo Shimoda<sup>1)</sup>, Akihisa Hata<sup>3)</sup>, Yuko Yamano<sup>4)</sup>, Koichi Kato<sup>1)</sup>,  
Mariko Tachikawa<sup>1)</sup>, Yoko Endo<sup>5)</sup>, Ginji Endo<sup>6)</sup>, Kenzo Yamanaka<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Nihon University School of Pharmacy, Chiba Japan

<sup>2)</sup>Criminal Investigation Laboratory, Metropolitan Police Department, Tokyo Japan

<sup>3)</sup>Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, Chiba, Japan

<sup>4)</sup>Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan

<sup>5)</sup>Research Center for Occupational Poisoning, Kansai Rosai Hospital, Hyogo Japan

<sup>6)</sup>Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka Japan

Dimethylmonothioarsinic acid [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsS(OH), DMMTA<sup>V</sup>] is increased genotoxicity with biological thiol, e.g., cystein and glutathione (GSH). However, the toxic mechanism of DMMTA<sup>V</sup> has not been fully elucidated. Thus, the aim of the present study is to elucidate the mechanism of in vitro reaction of DMMTA<sup>V</sup> with GSH. Chemically stable and lower toxic dimethyldithioarsinic acid [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsS(SH), DMDTA<sup>V</sup>] is produced from a reaction of DMMTA<sup>V</sup> with GSH via the generation of hydrogen sulfide and active dimethylated arsenics. Here we would like to discuss possible metabolic activation of DMMTA<sup>V</sup> with GSH.

## ワカメ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究

畑 明寿<sup>1)</sup>, 山中 健三<sup>2)</sup>, 圓藤 吟史<sup>3)</sup>, 山野 優子<sup>4)</sup>,  
羽場 亮太<sup>4)</sup>, 藤谷 登<sup>1)</sup>, 圓藤 陽子<sup>5)</sup>

1)千葉科学大学危機管理学部, 2)日本大学薬学部, 3)大阪市立大学大学院医学研究科,  
4)昭和大学医学部, 5)関西労災病院産業中毒研究センター

### 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ワカメ (*Undaria pinnatifida*) 摂取後の尿中ヒ素分析を行った。

### 方法

供試海産食品：千葉県内で購入した湯通し塩蔵ワカメ乾燥品（国産）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性 2 名、女性 3 名（ $21 \pm 0.7$  歳）がボランティアとなり、30 分間水戻ししたワカメ 300g を 1 回の食事で摂取し、その後 5 日間全ての尿を採取した。なお、ワカメ摂取の前後 5 日間は海産食品を摂取しなかった。  
ワカメ中ヒ素分析：凍結乾燥させたワカメを分析用試料とし、総ヒ素分析は、試料をマイクロウェーブ分解装置 (Multiwave3000, Perkin Elmer, Canada) を用い湿式灰化した後、ICP-MS (ELAN DRC-II, Perkin Elmer, Canada) 分析を行った。ヒ素化学形態別分析は、セルラーゼ処理の後、抽出溶媒に 50%メタノールを用いてビーズ破碎処理を行い、得られた抽出液の HPLC-ICP-MS 分析を行った。標準品の無い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。アルセノシュガー類 (AsSugs) の検出には HPLC-ESI-MS (amaZon SL, Bruker Daltonics, USA) を用いて Multiple reaction monitoring (MRM) 測定を行った。HPLC には陰イオン交換カラム PRP-X100 (250 × 2.1 mm i.d.; Hamilton, USA) を用いた。  
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、ワカメ抽出液と同様に化学形態別分析を行った。

### 結果と考察

乾燥ワカメに含まれる総ヒ素量は  $34.31 \pm 2.10 \mu\text{g As/g}$  ( $n = 3$ ) であった。抽出液の HPLC-ICP-MS 分析の結果、3 つのヒ素化合物が検出された。アルセノベタイン、DMA、モノメチルアルソン酸、トリメチルアルシンオキサイド、アルセノコリン、無

機ヒ素は検出されなかった。MRM 測定の結果、2つのピークは AsSug328 と AsSug482 であることが判明し、AsSug328 はワカメ中総ヒ素の 88.8%を占めた。

被験者が摂取した水戻しワカメ 300g 中に含まれる総ヒ素量は 593.7  $\mu\text{g}$  であり、その約 30%である 176.3  $\pm$  65.2  $\mu\text{g}$  (n = 5) が摂取後 5 日間の尿から検出された。尿中ヒ素の化学形態別分析では 5つのヒ素化合物が検出され、そのうち DMA の量が最も多く、総尿中ヒ素量の 58.1  $\pm$  5.0%を占めた。なお、ワカメ抽出液と尿の HPLC-ICP-MS クロマトグラムには一致するピークは認められなかった。ワカメ抽出液中ヒ素の約 90%が AsSug328 であったことから、尿中 DMA 由来の大部分は AsSug328 であることが示唆された。また、尿中における DMA 排泄率は摂取後 24 時間で最大値となり、摂取後 24 から 44 時間の値を用いて求めた DMA 排泄率の生物学的半減期は約 13 時間であった。

### Urinary arsenic metabolites after wakame seaweed ingestion

Hata A<sup>1</sup>, Yamanaka K<sup>2</sup>, Endo G<sup>3</sup>, Yamano Y<sup>4</sup>, Haba R<sup>4</sup>, Fujitani N<sup>1</sup>, Endo Y<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, <sup>2</sup> School of Pharmacy, Nihon University, <sup>3</sup> Graduate School of Medicine, Osaka City University, <sup>4</sup> School of Medicine, Showa University, <sup>5</sup> Research Center for Occupational Poisoning, Kansai Rosai Hospital

Seafood contains large amounts of various arsenic compounds such as arsenosugars (AsSugs), but their relative toxicities have not yet been fully evaluated. A risk evaluation of dietary arsenic would be necessary. In this study, we conducted a wakame seaweed (*Undaria pinnatifida*) ingestion experiment in volunteers. Five volunteers ingested 300 g of commercial wakame after refraining from seafood for 5 days. Arsenic metabolites in the urine were monitored over a 5-day period after ingestion. The total arsenic concentration of the wakame seaweed was 34.3  $\pm$  2.1  $\mu\text{g}$  arsenic/g (dry weight). Three peaks were detected in speciation analysis of the wakame seaweed, and 2 of them were the AsSug328 and AsSug482; however, arsenobetaine, dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid, and inorganic arsenics (iAs) were not detected. AsSug328 comprised 89% of the total arsenic content. Approximately 30% of the total arsenic ingested was excreted in the urine during the 5-day observation. Five arsenic compounds were detected in the urine after ingestion, the major one being DMA, which comprised 58.1  $\pm$  5.0% of the total urinary arsenic excreted over the 5 days. DMA was believed to be metabolized not from iAs but from AsSugs, and its biological half time was approximately 13 h.

## 首都圏在住者の無機ヒ素摂取量と尿中排泄

○小栗朋子<sup>1)</sup> 鈴木弥生<sup>2)</sup> 吉永淳<sup>1)</sup> 田尾博明<sup>3)</sup> 中里哲也<sup>3)</sup>

1) 東京大学大学院新領域創成科学研究科, 2) 国立環境研究所, 3) 産業技術総合研究所

### 【はじめに】

無機ヒ素 (iAs) はヒトに対して毒性が高く、アジア諸国では地下水の iAs 汚染による深刻な健康被害が報告されている。慢性的な iAs 曝露による最も重要な問題は発がんであり、ヒトにおいては皮膚、膀胱等における発がん性が疫学的に示されている<sup>1)</sup>。日本人は伝統的に海産物を多食するために、総ヒ素摂取レベルは他国に比べて高レベルにあるが、その大部分が無害な有機ヒ素であると認識されていたために、iAs についてはこれまであまり問題とされておらず、日常的な iAs 摂取量や、それに由来する発がんリスク評価も十分にされていない。

そこで本研究では、日本における日常的 iAs 摂取による発がんリスク評価の一環として、首都圏在住の成人男女 19 名の陰膳試料中 iAs 濃度を測定し、一日 iAs 摂取量を見積った。あわせて iAs 代謝産物の尿への排泄についても検討を行った。

### 【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 21 歳から 67 歳の日本人成人男女 (平均 ± 標準偏差 : 38 ± 12 歳) 19 名を調査対象者とし、陰膳および尿試料を採取した。陰膳試料は 2011 年 8 月から 9 月までの期間中任意の 1 日に採取し、均質化・凍結乾燥を行い、分析時まで 4°C で保存した。尿試料は陰膳試料採取日の翌日の早朝尿を採取し、-20°C で保存した。また陰膳採取日の食事内容に関する質問票への回答も依頼した。

**分析：**陰膳試料中 As 濃度は、消化管内で溶出する画分を分析した。凍結乾燥試料 1g に対し模擬胃液 (0.07mol/L 塩酸+ペプシン) 20mL を加え、37°C、2 時間振とう抽出したものを検液とし<sup>2)</sup>、光酸化/水素化物発生-液体クロマトグラフ-ICP 質量分析法 (LC-HEPO-HG-ICPMS)<sup>3)</sup>での分析に供した。分離カラムは Tosoh Super IC-A/C) を用い、移動相は 0.35 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 3.1) を流量 1.0 mL/min で流した。HG の反応溶液には 1.4 M HNO<sub>3</sub> と 1% NaBH<sub>4</sub>/0.1mol/L NaOH を用いた。陰膳中 As 分析の精度・真度は、認証標準物質 NIES CRM No.27 Typical Japanese Diet を用いて確認した<sup>4)</sup>。S/N=3 に相当する濃度から算出した検出下限値は、As(V), As(III), MMA, DMA, TMAOs で 0.29, 0.25, 0.14, 0.17, 0.23 ng/g-wet (陰膳試料中濃度) であった。

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 LC-HG-ICPMS<sup>5)</sup>での分析に供した。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。S/N=3 に相当する濃度から算出した検出下限値は、As(V), As(III), MMA, DMA でそれぞれ 0.37, 0.082, 0.10, 0.083 ng As/g (尿中濃度) であった。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い、iAs 摂取量の指標として尿中 iAs + MMA 値を用いた<sup>6)</sup>。

### 【結果と考察】

首都圏在住 19 名より推定された食物経由 1 日 iAs 摂取量は 8.6 ± 7.3 (0.69 - 32) μg/日 (算

術平均 ± SD, 最小 - 最大) であり、この値は 2009 年に首都圏で行った陰膳法による値 (6.5 ± 11 µg/日) と同程度であり、他の地域における値 (27 µg/日, 全国; 21 ± 32 µg/日, 広島・佐賀; 22 µg/日, 静岡) と比較すると本研究の値は低めの傾向がみられた (図 1)。小栗ら (2012) はマーケッ

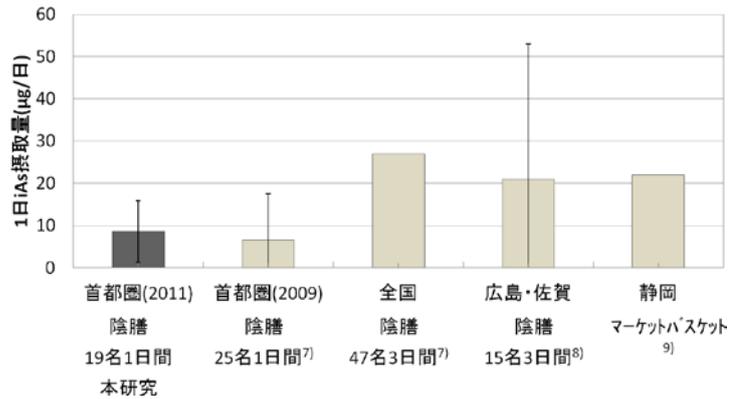


図 1 日本における 1 日 iAs 摂取量

トバスケット調査から日本における iAs の主な摂取源は「米」と「ひじき」であることを指摘しており、これら食品の摂取習慣の違いが反映した可能性が考えられる。

対象者 19 名の陰膳採取翌日の早朝尿中 iAs+MMA 濃度は 3.9 ± 2.4 (1.5 - 10) ng/mg\_cre (クレアチニン補正值) (算術平均 ± SD, 最小 - 最大) であった。食物経由体重あたり iAs 摂取量との間に有意な正の相関があり (r=0.658, p<0.01) (図 2)、早朝尿中 iAs 代謝産物濃度は前日に摂取した食物経由 1 日 iAs 摂取量をよく反映していることがわかった。

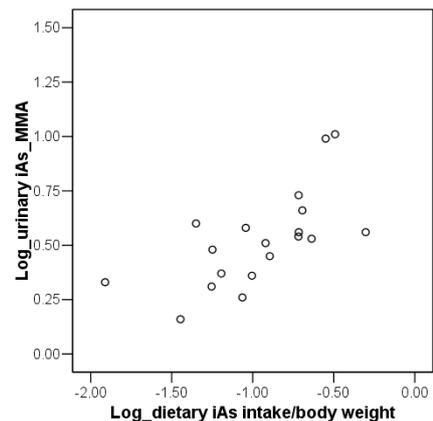


図 2 食物経由体重あたり 1 日 iAs 摂取量と翌日早朝尿中 iAs+MMA 濃度の関連

#### 参考文献

- 1) IARC (2004) monographs vol. 84, 2) Nakamura et al., (2008) *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2536-, 3) Nakazato and Tao (2006) *Anal. Chem.* 78; 1665-, 4) 小栗ら (2010) 分析化学, 60; 653-, 5) 小栗ら (2012) *Biomed. Res, Trace Elements* 23: 33-, 6) Hata et al. (2007) *J Occup Health*, 49: 217-, 7) Oguri et al. (2012) *Food Chem. Toxi.*, 50, 2663-, 8) 小栗, 未発表, 9) 小栗ら(2012) 第 21 回環境化学討論会要旨集 2D-16.

Dietary intake of inorganic arsenic and urinary concentration of inorganic arsenic metabolites among residents in the Tokyo Metropolitan area.

Tomoko Oguri, Yayoi Suzuki, Jun Yoshinaga, Hiroaki Tao and Tetsuya Nakazato

Levels of dietary intake and urinary excretion of inorganic arsenic (iAs) were estimated for 19 subjects (5 male and 14 female) in Metropolitan Tokyo by collecting and analyzing one-day duplicated diet and first urine void of the next day of diet sampling. As species were determined by LC-ICP mass spectrometry with a hydride generation and/or photo-oxidation system. Daily intake of bioaccessible iAs, extracted from sample with a synthetic gastric juice, was estimated to be 8.6 ± 7.3 µg/day (Mean ± SD), which was comparable to, or lower than the previously reported values. Sum of urinary concentration of iAs and MMA was 3.9 ± 2.4 ng/mg\_cre (Mean ± SD). The correlation between dietary intake of iAs and sum of iAs and MMA of urinary concentration was significant (r=0.658, p<0.01) indicating that urine analysis is useful for quantitative estimation of dietary intake.

## アジア途上国における地下水のヒ素汚染とヒトへの影響

○阿草哲郎<sup>1</sup>, 岩田久人<sup>1</sup>, 國頭 恭<sup>2</sup>, 井上 英<sup>1</sup>, 久保田領志<sup>3</sup>, Karri Ramu<sup>1</sup>, Tu Binh Minh<sup>4</sup>,  
 Nguyen Minh Tue<sup>1</sup>, Nguyen Ngoc Ha<sup>1</sup>, Nguyen Phuc Cam Tu<sup>5</sup>, 藤原純子<sup>6</sup>, Paromita  
 Charaborty<sup>7</sup>, Chhoun Chamnan<sup>8</sup>, Pham Thi Kim Trang<sup>9</sup>, Alissara Reungsang<sup>10</sup>, Kriengsak  
 Srisuk<sup>11</sup>, 中村 哲<sup>12</sup>, 滝沢 智<sup>13</sup>, 竹下治男<sup>6</sup>, 高橋 真<sup>1</sup>, Annamalai Subramanian<sup>1</sup>, Bui Cach  
 Tuyen<sup>14</sup>, Pham Hung Viet<sup>9</sup>, Touch Seang Tana<sup>15</sup>, 田辺信介<sup>1</sup>

<sup>1</sup>愛媛大学沿岸環境科学研究センター (CMES), <sup>2</sup>信州大学理学部, <sup>3</sup>国立医薬品食品研究所,  
<sup>4</sup>国立医薬品食品衛生研究所, <sup>5</sup>Ministry of Natural Resources and Environment (MONRE),  
 Vietnam, <sup>6</sup>愛媛大学農学部, <sup>7</sup>島根大学医学部, <sup>8</sup>Guangzhou Institute of Geochemistry, China,  
<sup>9</sup>Inland Fisheries Research and Development Institute (IFReDe), Cambodia, <sup>10</sup>Hanoi National  
 University, Vietnam, <sup>11</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen  
 University, Thailand, <sup>12</sup>Groundwater Research Center/Department of Geotechnology, Faculty of  
 Technology, Khon Kaen University, Thailand, <sup>13</sup>国立国際医療研究センター, <sup>14</sup>東京大学工学  
 部, <sup>15</sup>Nong Lam University, Vietnam, <sup>15</sup>Office of the Council of Ministers, Cambodia

### 1. はじめに

無機ヒ素は発がん性を持つことで知られている。1980年代以降、天然起源の無機ヒ素による地下水汚染が世界各地、とくにバングラデシュやインドの西ベンガルといった途上国で問題となっており、地下水を飲用する地域住民に皮膚障害やがんなどの健康影響がみられている。近年、東南アジアにおいても地下水のヒ素汚染が報告されており、WHOの基準値(10 µg/L)を超える濃度のヒ素が地下水から検出されている。しかしながら、地下水を利用している地域住民を対象とした調査報告は少ない。

我々の研究グループは、2000年から東南アジアを中心にヒ素汚染について調査してきた。今回のシンポジウムでは、とくにヒトへの曝露実態とヒ素代謝能力の感受性、毒性影響評価について報告する。

### 2. 試料と方法

調査および試料の採取は、2000年からベトナム、カンボジア、タイ、ラオス、インドで実施した。これらの地域から地下水と地域住民の尿および血液を採取した。なお本研究は、愛媛大学医学部倫理委員会の承認および試料提供者のインフォームドコンセントを得て実施した。

化学分析は既法に従い、ICP-MSで地下水中総ヒ素(T-As)を、HPLC/ICP-MSでヒト尿中ヒ素化合物(亜ヒ酸(As[III])・ヒ酸(As[V])・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(AB))を定量した。血液からDNAを抽出し、PCR法でAS3MT遺伝子の一塩基多型(SNP)を判定した。酸化ストレスのマーカーとして、尿中8-OHdGをELISAで測定した。

### 3. 結果と考察

これまでに調査した地域の地下水中T-As濃度は<0.1 - 1,930 µg/Lであり、また分析した地下水サンプルの37%がWHOによる飲料水の安全基準値(10 µg/L)以上であった。ベトナム、

カンボジア、インドにおいて、飲用水中 T-As 濃度とヒト尿中無機ヒ素(As[III]+As[V]; IA)、MMA、DMA 濃度の間にそれぞれ有意な正の相関がみられたことから、これら地域住民は地下水を経由してヒ素に曝露していることが推察された。

ヒ素代謝能力の指標として尿中ヒ素化合物組成を用い、AS3MTのSNPとの関係を調査したところ、Met287Thr において、ヘテロ型(Met/Thr)の方が野生型(Met/Met)よりも DMA/MMA が有意に低かった。このことは、MMA から DMA への代謝能力がヘテロ型(Met/Thr)の方が野生型(Met/Met)よりも弱いことを示唆する。

尿中 8-OHdG 濃度は、低濃度ヒ素曝露群よりも高濃度曝露群の方が有意に高値であった。以上のことから、ヒ素汚染地域住民は、地下水からの慢性ヒ素曝露によって DNA にダメージを受けていることが推察された。

\*\*\*\*\*

### **Arsenic Pollution in Groundwater and Its Effects on Residents from Asian Developing Countries**

○Tetsuro Agusa<sup>1</sup>, Hisato Iwata<sup>1</sup>, Takashi Kunito<sup>2</sup>, Suguru Inoue<sup>1</sup>, Reiji Kubota<sup>3</sup>, Karri Ramu<sup>1</sup>, Tu Binh Minh<sup>4</sup>, Nguyen Minh Tue<sup>1</sup>, Nguyen Ngoc Ha<sup>1</sup>, Nguyen Phuc Cam Tu<sup>5</sup>, Junko Fujihara<sup>6</sup>, Paromita Charaborty<sup>7</sup>, Chhoun Chamnan<sup>8</sup>, Pham Thi Kim Trang<sup>9</sup>, Alissara Reungsang<sup>10</sup>, Kriengsak Srisuk<sup>11</sup>, Satoshi Nakamura<sup>12</sup>, Satoshi Takizawa<sup>13</sup>, Haruo Takeshita<sup>6</sup>, Shin Takahashi<sup>1</sup>, Annamalai Subramanian<sup>1</sup>, Bui Cach Tuyen<sup>14</sup>, Pham Hung Viet<sup>9</sup>, Touch Seang Tana<sup>15</sup>, Shinsuke Tanabe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Marine Environmental Studies (CMES), Ehime University, Japan, <sup>2</sup>Faculty of Science, Shinshu University, Japan, <sup>3</sup>National Institute of Health Sciences, Japan, <sup>4</sup>Ministry of Natural Resources and Environment (MONRE), Vietnam, <sup>5</sup> Faculty of Agriculture, Ehime University, Japan, <sup>6</sup>Shimane University Faculty of Medicine, Japan, <sup>7</sup>Guangzhou Institute of Geochemistry, China, <sup>8</sup>Department of Fisheries, Cambodia, <sup>9</sup>Hanoi National University, Vietnam, <sup>10</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Thailand, <sup>11</sup>Groundwater Research Center / Department of Geotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Thailand, <sup>12</sup>International Medical Center of Japan, Japan, <sup>13</sup>Graduated School of Engineering, The University of Tokyo, Japan, <sup>14</sup>Nong Lam University, Vietnam, <sup>15</sup>Social and Cultural Observation Unit (OBSES), Office of the Council of Ministers, Phnom Penh, Cambodia

We have investigated the exposure, metabolism, and toxic effect of arsenic (As) in residents from As-contaminated groundwater areas of Asian developing countries such as Vietnam, Cambodia, Thailand, Laos, and India. Monitoring studies showed that As contamination is ubiquitous in the groundwater and also exceeded WHO guidelines in a large number of samples. The results of As analyses in the human urine indicate that residents in the As-contaminated areas are mostly exposed to As through the uptake of As contaminated groundwater. Studies on genetic polymorphisms of arsenic (+III) methyltransferase (AS3MT) suggested that the enzyme is involved in the metabolism of As in residents who have been exposed to As. Levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine were higher in the subjects with elevated levels of As in the urine, suggesting the induction of oxidative DNA damage by As exposure.

## Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>界面における砒素吸着におよぼすイオン強度の影響

○大榮 薫, 大島達也, 馬場由成  
宮崎大学工学部

はじめに

インド、バングラデシュなどのアジア諸国で WHO が定める環境基準値(0.01 mg/dm<sup>3</sup>)を超える砒素濃度が検出されており、その吸着材の開発は急務の課題である。砒素の吸着材には無機吸着材が用いられているが、その多くは粉末であり取扱いが難しい。そこで我々は磁気分離が可能な Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>に着目し、As(III)と As(V)に対して優れた吸着能力を有することを見出した。本研究では砒素吸着における水溶液中の Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>界面に及ぼすイオン強度の影響を調べた。

実験方法

### マグネタイトの合成

窒素雰囲気下 0.2M FeCl<sub>3</sub>および 0.1M FeCl<sub>2</sub>の混合溶液 500 cm<sup>3</sup>中に 1M NaOH を pH11 になるまで加えた。得られた懸濁液を水洗後凍結乾燥し、黒色の沈殿物を得た。ステンレス篩で分級し、吸着実験には 20-40 μm の粒子径を用いた。粉末 X線回折装置、比表面積測定装置およびレーザー回折粒度分析装置を用いて沈殿物の物性を評価した。

### 吸着実験

pH 4-12 に調整された 0.133 mM 砒素溶液 15 cm<sup>3</sup>にマグネタイト 10 mg を加え、303 K、24 時間振とうした。試料溶液中のイオン強度 I=0, 0.01, 0.1 とし、pH 調整を 0.1M-HCl 溶液と 0.1M-NaOH 水溶液を用いて行なった。イオン強度は NaCl を用いて調整した。試料溶液を 0.45 μm メンブレンフィルターで濾過し、濾液中の砒素濃度を ICP 分析により定量した。砒素の吸着率は初濃度と平衡濃度の差により求めた。

### ゼータ電位測定

所定の pH に調整した 10mM-NaCl を含んだ 0, 0.1, 1 mM 砒素溶液 100 cm<sup>3</sup>中に、マグネタイト 60 mg を加えて 350rpm で攪拌し、ナノ粒子解析装置を用いて平衡後の上澄み液のゼータ電位を求めた。

結果および考察

合成したマグネタイトは 88.6 m<sup>2</sup>/g の比表面積をもち、その平均粒径は 37.7 μm であった。

マグネタイトのゼータ電位におよぼす pH および砒素濃度の影響を Fig. 1 に示す。マグネタイトの等電位点 (PZC) は 6.0 であった。

1mM As(V)共存下のゼータ電位の挙動は 0.1mM As(V) とほぼ一致し、ゼータ電位は As(V) の濃度によって影響しないことが明らかとなった。また、0.1-1mM As(V) の共存により PZC は 6.0 から 3.6 へ移動した。イオン強度を調製するために用いた NaCl の各イオンは静電的相互作用により吸着材表面に引き付けられ外圏錯体を形成するが、PZC は影響されない。しかしながら、As(V) 存在下で得られた PZC は As(V) 吸着により大きくシフトしたため、As(V) はマグネタイト表面と直接配位する内圏錯体形成によって吸着されたと示唆される。Fig. 2 にマグネタイトを用いた As(V) 吸着率におよぼす pH およびイオン強度の影響を示す。As(V) の吸着率は  $\text{pH} < \text{PZC}$  のとき 100% を示し、 $\text{pH} > \text{PZC}$  では pH の増加に伴い減少した。イオン強度が 0.001 から 0.1 へ増加すると As(V) の吸着率が減少し始める pH がアルカリ側へ移動し、As(V) の吸着率は増加した。イオン強度の増加はマグネタイトの帯電した表面を電荷的に中和するため外圏錯体を形成しにくい。したがって、As(V) は内圏錯体形成によって吸着されたことが示された。

## 結論

As(V) が共存することによりマグネタイトのゼータ電位は減少し、PZC は酸性側へシフトした。イオン強度の増加は As(V) の吸着率を増加させた。以上の結果から As(V) は内圏錯体形成により吸着されたことが示された。

## Effect of ionic strength on arsenic adsorption at $\text{Fe}_3\text{O}_4$ interface

○Kaoru Ohe, Tatsuya Oshima, Yoshinari Baba

Department of Applied Chemistry, University of Miyazaki

Arsenic adsorption on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  was investigated as a function of pH and ionic strength. The adsorption percentage of As(V) increased in the region of pH 7.0-12.7 when the ionic strength increased  $10^{-3}$  to  $10^{-1}$ . The point of zero charge (PZC) of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  was 6.0. Zeta potentials decreased in the presence of As(V) and indicated negative values in the  $\text{pH} > 4.0$  region. The PZC shifted to an acidic side in the presence of As(V). These results suggest that As(V) form the inner-sphere complexes on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

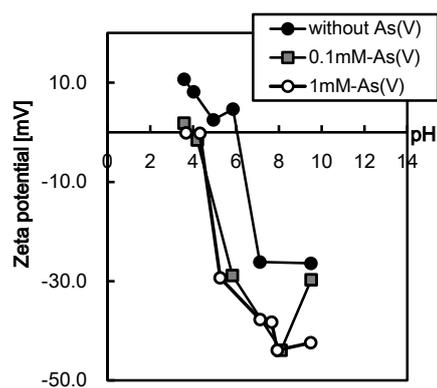


Fig.1 Zeta potential of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  as a function of pH in 0.01 M NaCl solution of 0.1 or 1 mM As(V).

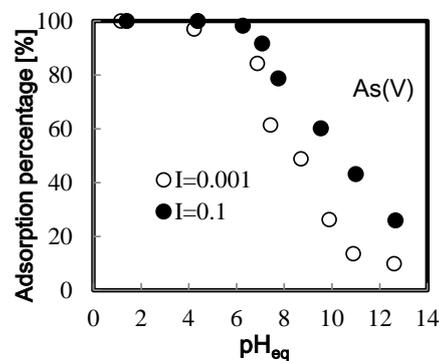


Fig.2 Effect of ionic strength on adsorption of As(V).

## 微生物によるヒ素のメチル化とヒ素除去装置の汚泥処理に関する研究

○宮武宗利、林 幸男

宮崎大学工学部

### 1. はじめに

現在、宮崎大学の研究グループで開発した4基のコミュニティ用ヒ素除去装置がバングラデシュで稼働しており、安全な水を地域住民に供給している。これらの装置において、常にヒ素濃度の低い安全な水を供給するためには、砂利槽が目詰まりを起こす前にヒ素汚泥（ヒ素・鉄共沈物）を引き抜く必要がある。現地では、砂利槽に設置された排水バルブを定期的に関けたり、砂利層内の砂利を洗浄したりすることにより、ヒ素除去機能を維持しているが、排出される砂利槽の汚泥と砂利洗浄水の処理方法が問題となっている。それらの処理方法を確立するため、排出された汚泥や洗浄水は沈殿処理のため汚泥槽に溜められ、その上澄み液は人工池に放流されている。

そこで、汚泥槽内でのヒ素処理の効率化を図り人工池へのヒ素の流出量を軽減することを目的として、汚泥槽内で生物機能を利用してのヒ素の毒性の低減化を図った上で、ヒ素を気化させることが可能かどうかを調べることにした。

本研究では、汚泥槽内の微生物によるヒ素のメチル化について検討し、さらにヒ素のメチル化を促進させ汚泥中の無機ヒ素をより多くメチル化有機ヒ素化合物に変換させるために、ヒ素メチル化細菌を汚泥中の微生物と一緒に培養した。

### 2. 方法

汚泥はバングラデシュのジェソール県マルア村に設置されたヒ素除去装置の汚泥槽より採取された汚泥を用いた。滅菌水 9.0 ml に汚泥 1.0 ml 加え懸濁した後の上澄み液を実験に使用した。

培地は Nutrient Broth（日水製薬）3.00 g/l にグルコース 1.00 g/l、硝酸アンモニウム 0.500 g/l、L-メチオニン 50.0 mg/l、乳酸ナトリウム 2.50 g/l、ビタミン B<sub>12</sub> 0.500 mg/l を添加したもの（pH 5.8）を使用した。ヒ素は3価のヒ素（As(III)）として亜ヒ酸ナトリウムを、5価のヒ素（As(V)）としてヒ酸二ナトリウムをヒ素濃度が 0.100 mg/l になるように添加した。

培養実験は上澄み液を培地に 2.0 v/v% 加え 30°C で4日間培養を行なった。ヒ素メチル化細菌の影響を調べる実験では、*Bacillus cereus* R2 株をヒ素の添加していない培地で 30°C、24時間振とう培養した後の培養液を、上澄み液 2.0 v/v% 加えた培地に 2.0 v/v% 加え 30°C で4日間培養を行なった。好氣的培養は 100 strokes/min で振とう培養した。嫌氣的培養は上部を窒素で置換した後、静置培養した。所定の時間培養した後、培養液を遠心分離により菌体と培養液上清に分けた。培養液上清はヒ素濃度を形態別に測定した。菌体は凍結乾燥後、重量を測定した。

ヒ素の定量分析は形態別に還元気化 - 超低温捕集 - 原子吸光装置と高速液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて測定した。

### 3. 結果と考察

ヒ素メチル化細菌 *Bacillus cereus* R2 株は、ジメチルアルシン酸（DMAA）やトリメチルアルシン酸（TMAO）のような非揮発性のメチル化有機ヒ素化合物を産生し、特に 0.100 mg As/l の As(III) を添加した場合、好氣的培養時に 89.0% の割合で無機ヒ素をメチル化有機ヒ素化合物に変換した。無機ヒ素のメチル化を促進させるために、R2 株の培養液を培地に加え汚泥内の微生物と一緒に培養を行なった。その結果を Fig. 1 に示す。その結果、各々の培養条件においても R2 株を添加した場合、無機ヒ素の濃度が減少し、特に As(III) を添加した好氣的培養では 0.005 mg As/l と、R2 株を添加していない場合に比べて 54.0% まで減少した。一方 DMAA は、R2 株を添加した場合でも添加しなかった

ときとほぼ同じ程度の濃度を示した。TMAO は R2 株を添加した場合に、As(V)を添加した好氣的培養以外で検出することができ、その濃度は As(III)を添加した好氣、嫌氣的培養で 0.015 mg As/l 以上であった。培養液の全ヒ素濃度は、TMAO を検出することができなかつた As(V)を添加した好氣的培養以外で、TMAO 分だけ増加した。R2 株を添加することで、無機ヒ素をより多くメチル化有機ヒ素化合物に変換することができ、ヒ素の毒性の低減化を図れることが分かつた。

謝辞 本研究の一部は、科研費 (23510099) の助成を受けたものである。

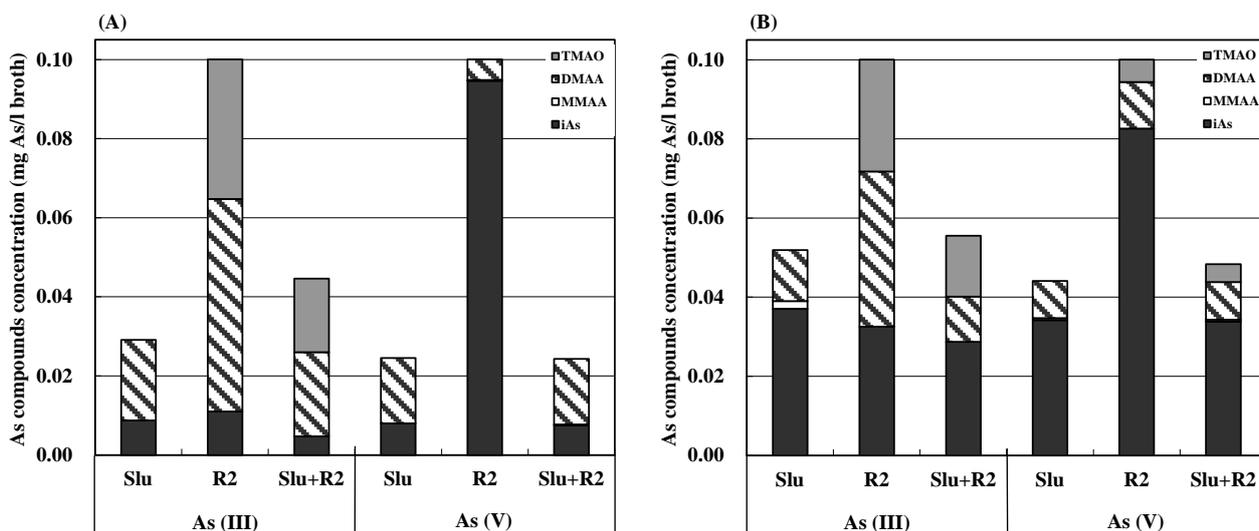


Fig. 1 Effect of arsenic methylating bacterium on arsenic methylation. Culture were carried out in the presence of 0.100 mg As/l of either As(III) or As(V) for 4 day at 30 °C. (A) Aerobic culture; (B) anaerobic culture. Slu, broth inoculated with supernatant solution of sludge; R2, broth inoculated with *B. cereus* strain R2; Slu+R2, broth inoculated with supernatant solution of sludge and broth of *B. cereus* strain R2.

## Arsenic Methylation by Microorganisms and Sludge Treatment on Sludge Tank of Arsenic Removal Unit

Munetoshi MIYATAKE and Sachio HAYASHI  
Faculty of Engineering, University of Miyazaki,

An arsenic removal unit was constructed by the Miyazaki University research group in Bangladesh. The sludge drained from the arsenic removal unit was directed to a sludge tank and allowed to settle down. Then the supernatant in the tank was released to an artificial pond. Biomethylation of arsenic is usually considered as a detoxification of arsenic because toxicity of most organic methylated arsenic is much less than that inorganic arsenic. Microorganisms in the sludge tank and arsenic methylating bacterium, *Bacillus cereus* R2, were evaluated arsenic methylation. As a result, the concentration of inorganic arsenic in the broth decreased to 0.005 mg As/l, when culture was carried out aerobically in the presence of 0.100 mg As/l of As(III) for 4 day at 30 °C. This result suggested that arsenic methylation by microorganisms in the sludge tank and arsenic methylating bacterium may be utilized for detoxification of arsenic sludge from the arsenic removal unit.

## 2 - 3

### イネ根圏土壌から分離した微生物のヒ素代謝

○ 倉俣 正人<sup>1</sup>、片岡 良太<sup>1,2</sup>、山崎 健一<sup>1</sup>、榊原 風太<sup>3</sup>、馬場 浩司<sup>1</sup>、石坂 真澄<sup>1</sup>、安部 匡<sup>1</sup>、高木 和広<sup>1</sup>、加茂 綱嗣<sup>1</sup>、平舘 俊太郎<sup>1</sup>、石川 覚<sup>1</sup> (<sup>1</sup>農環研、<sup>2</sup>山梨大、<sup>3</sup>東京農大)

#### 1. はじめに

コメに蓄積するヒ素は無機ヒ素だけでなくメチル化されたヒ素の一種であるジメチルアルシン酸 (DMA) も存在する。ヒ素濃度の高い土壌で湛水栽培すると、イネの玄米は、DMA 濃度が高まる。一方、土壌溶液中のヒ素形態は、DMA 濃度が低く、無機ヒ素の濃度が高い。このことから土壌と玄米の DMA 濃度間には関連性が見られないが、その原因は未だ解明されていない。近年、微生物からヒ素のメチル化酵素遺伝子が同定されたことから、土壌微生物によってメチル化されたヒ素をイネが直接吸収している可能性が考えられた。そこで、微生物によるヒ素代謝に注目し、イネ根圏でヒ素をメチル化する細菌の分離と同定を試みた。

#### 2. 方法

現地の農耕地から採取したヒ素濃度の高い土壌 ( $8.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) でイネを常時湛水栽培した。イネの根圏土壌および根部から平板希釈法により細菌の単離を行い、その中からヒ素を代謝する細菌の探索を行った。細菌の培養には R2A 培地を用い、スクリーニングには 3 価の無機ヒ素とモノメチルアルソン酸 (MMA) の化学形態変化を指標に行った。ヒ素の化学形態分析では 4 種のヒ素標品 (三価無機ヒ素, 五価無機ヒ素, MMA, DMA) を用い HPLC-ICP-MS で分析した。また、16S rRNA の塩基配列をもとに細菌の同定を行った。

#### 3. 結果と考察

分離した細菌からヒ素のメチル化に関与する菌株を選抜した。その中には無機ヒ素を DMA に変換する菌株の他に未知有機ヒ素化合物を合成する菌株も存在した。その未知ヒ素化合物を精製し構造解析を試みたところ、モノメチルヒ素の骨格をもつ新規の化合物であることが示唆された。さらに本化合物は他の細菌により分解され MMA を生じることにも明らかとなった。以上のことから、イネの根面や根圏土壌にはヒ素を代謝する細菌の存在が明らかとなった。したがって、イネの根圏では様々な細菌によってヒ素の化学形態が変化している可能性があり、イネに吸収されるヒ素の化学形態には根圏微生物が大いに関与していると考えられた。

## Arsenic metabolism by microbes isolated from the rice rhizosphere

Masato Kuramata<sup>1</sup>, Ryota Kataoka<sup>1, 2</sup>, Kenichi Yamazaki<sup>1</sup>, Futa Sakakibara<sup>3</sup>, Koji Baba<sup>1</sup>, Masumi Ishizaka<sup>1</sup>, Tadashi Abe<sup>1</sup>, Kazuhiro Takagi<sup>1</sup>, Shuntaro Hiradate<sup>1</sup>, Tsunashi Kamo<sup>1</sup> and Satoru Ishikawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Institute for Agro-Environmental Sciences

<sup>2</sup> University of Yamanashi

<sup>3</sup> Tokyo University of Agriculture

Arsenic (As) chemical form in rice grain contains only inorganic As but also dimethylarsinic acid (DMA), which is one of methylated arsenicals. When rice plants were grown on the As-contaminated soil under continuous flooded conditions, high level of DMA can be detected in its grains by As speciation analysis. However, the amount of DMA in the soil solution is quite low under such conditions as compared to that of inorganic As. Thus, it seems that there is low relationship between of DMA concentrations in soil solution and rice grains. Although the source of DMA accumulated in rice grains has not yet been clear, As methyltransferases from some bacteria have been identified in recent studies. Therefore, some bacteria in rice rhizosphere may have As methyltransferase gene and involve in DMA supply source to grains. Here we investigated the existence of bacteria involving in As methylation in the rhizosphere.

We separated two bacterial strains producing methylated As. The one is a bacterium that transforms inorganic As to MMA and DMA, but the other is that can produce unknown organic As. We purified the unknown As and analyzed its molecular mass and formula by HR-LC-MS-MS. The result showed that the compound consists of a novel organic As that has partially monomethylarsonic structure. Furthermore, another bacterium that we separated from the same rhizosphere sample degraded this unknown As and departed MMA. Our results indicate the existence of some types of bacteria metabolizing As in rice rhizosphere. We suggest that As in the rhizosphere might vary in various chemical forms by many kinds of bacteria and the microbial activities involving As metabolism could affect the As speciation in rice grains.

## 国内土壌より分離された亜ヒ酸酸化細菌 KGO-5 株

○董 旦、天知誠吾 (千葉大院・園芸・応用生命化学)

## 1. 目的

土壌中のヒ素は主に無機態ヒ素である亜ヒ酸[As(III)]とヒ酸[As(V)]として存在する。亜ヒ酸はヒ酸より毒性が強く環境中を移動しやすいことから、東アジアを中心にしばしばその汚染が問題となる。一方、亜ヒ酸がヒ酸に酸化されると鉄(水)酸化物などに吸着しやすくなり、環境中の移動性は低下する。ある種の細菌は、有機物に依存することなく、無機物である亜ヒ酸の酸化に伴い放出されるエネルギーを生育に利用することができる(化学合成独立栄養性亜ヒ酸酸化細菌)。このような細菌は土壌中ヒ素の挙動や動態に相当の影響を及ぼすと考えられているが、詳細はよくわかっていない。そこで本研究では、国内のヒ素汚染土壌より亜ヒ酸酸化細菌の分離を試み、その生理的な特徴を明らかにしたので報告する。

## 2. 実験方法

亜ヒ酸ナトリウムを唯一のエネルギー源として含む無機塩培地30 mLに土壌(ヒ素をおよそ1,000 mg Kg<sup>-1</sup>含む) 0.3 gを添加し、好気条件で振盪し集積培養を行った。HPLCにより定期的にヒ素の分析を行い、亜ヒ酸の完全な酸化が確認されたら、新鮮培地に継代を行い同様に培養した。この操作を複数回繰り返し、亜ヒ酸酸化細菌の集積を進めた。最後に集積培養液を、無機塩培地に2%寒天を加えた固体培地に塗抹し、細菌コロニー(集落)を形成させた。単離したコロニーは固体培地に複数回塗抹し、純化した。得られた菌株をKGO-5株とし、その亜ヒ酸酸化能を液体培地で確認した。KGO-5株の16S rRNA遺伝子のほぼ全長をシーケンスし、BLAST解析および近隣結合法による系統解析を行った。亜ヒ酸存在下でのKGO-5株の生育は、5 mMの亜ヒ酸を含む無機塩培地中で観察した。生育と亜ヒ酸酸化に及ぼす有機物の影響を検討するため、0.01%と0.1%の酵母エキスを添加した実験も行った。KGO-5株の菌体重量あたりの亜ヒ酸酸化速度は、洗浄菌体を用いたインキュベーション実験より算出した。

## 3. 結果と考察

亜ヒ酸を唯一のエネルギー源として含む集積培養系より、KGO-5株を分離した。KGO-5株はグラム陰性の桿菌で、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析より、根粒菌の1種である*Sinorhizobium* (シノリゾビウム) に近縁(98%~99%相同)であることがわかった(図1)。また、SDB1株(Lugtu *et al.*, 2009)や*Sinorhizobium* sp. DAO10株(Rhine *et al.*, 2006)など既知の亜ヒ酸酸化細菌とも近縁であった。KGO-5株は5 mMの亜ヒ酸を唯一のエネルギー源として含む無機塩培地で生育し、60 hで亜ヒ酸を完全に酸化した(図2)。また、この時の倍加時間(細胞が2倍に分裂するのに必要な時間)は3.0 hであり、他の独立栄養性亜ヒ酸酸化細菌の倍加時間(NT-26株: 7.6 h、

SDB1株：9.8 h) より短かった。KGO-5株は最大15 mMの亜ヒ酸存在下で生育可能であったが、20 mM以上の亜ヒ酸存在下では生育できなかった。0.01%と0.1%の酵母エキスを添加した場合、5 mMの亜ヒ酸は36 hで完全に酸化され、倍加時間は0.75～1.08 hに短縮した。以上の結果より、KGO-5株は通性独立栄養性細菌であり、酵母エキスのような有機物の存在下で生育が促進されることがわかった。亜ヒ酸が存在しない従属栄養条件では、KGO-5株は酵母エキス、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、グルタミン酸などの炭素源を利用できた。一方、亜ヒ酸以外のエネルギー源(アンモニア、亜硝酸、硫化物、2価鉄、亜セレン酸など)を用いた独立栄養的生育は確認されなかった。亜ヒ酸酸化酵素のラージサブユニットをコードする遺伝子 (*aioA*) をPCR増幅し、その部分アミノ酸配列に基づく系統解析を行ったところ、KGO-5株のAioAは *Ensifer adhaerens* と近縁であることがわかった。亜ヒ酸と0.1%酵母エキス存在下で生育した細胞の亜ヒ酸酸化速度は、 $10.7 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ であった。以上の結果より、KGO-5株は既知の亜ヒ酸酸化細菌と類似した性質を有しながらも、独立栄養条件での倍加時間など特異な特徴も有することが明らかになった。

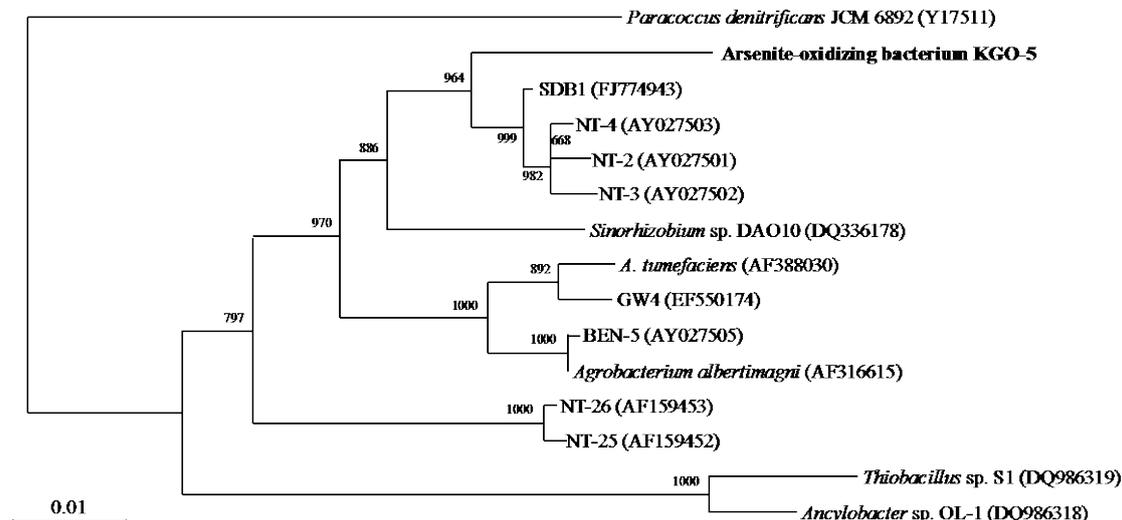


図 1. 16S rRNA 遺伝子に基づく KGO-5 株の系統樹

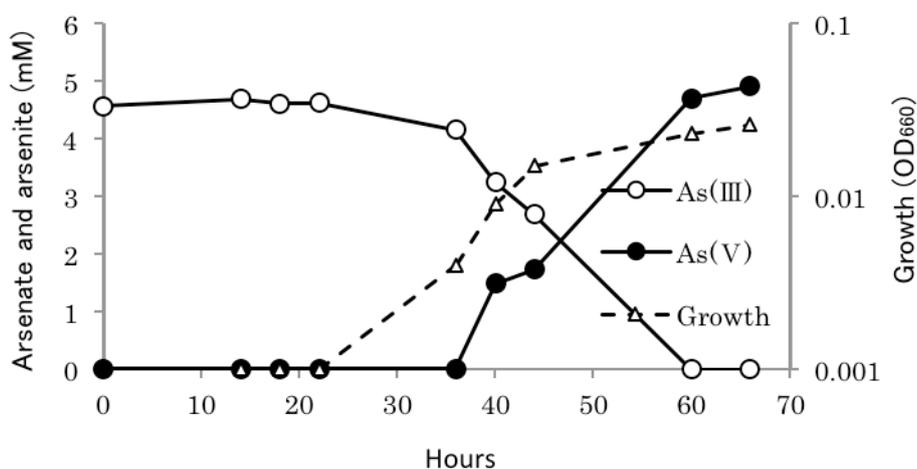


図 2. 亜ヒ酸を唯一のエネルギー源とした時の KGO-5 株の生育曲線

## 水田土壌におけるヒ素の酸化および吸着に及ぼす微生物の影響

董典涛<sup>1</sup>、山口紀子<sup>2</sup>、牧野知之<sup>2</sup>、天知誠吾<sup>1</sup><sup>1</sup>千葉大院・園芸・応用生命化学、<sup>2</sup>農業環境技術研究所

## 1. 目的

ヒ素中毒に至る経路の1つとして、ヒ素汚染水を用いて栽培された農作物の摂取が挙げられる。特に、水田では湛水によりヒ素が還元溶出し、それが水稻の根から吸収され玄米へ転流する。このため米は他の農作物と比較してヒ素濃度が高く、日本においても農作物からのヒ素摂取のうち米の寄与が最も高い。近年、土壌中ヒ素の還元溶出メカニズムやそこに関与する嫌気性細菌の役割について解明が進んできている。これに対し、酸化土壌におけるヒ素の酸化や土壌固相（鉄・アルミニウム鉱物）への吸着に及ぼす微生物の影響についてはほとんどわかっていない。土壌中には亜ヒ酸[As(III)]酸化細菌と呼ばれる微生物が広く存在するため、微生物がヒ素の酸化や吸着へ関与する可能性がある。そこで本研究では、国内の水田土壌を用いて、亜ヒ酸の酸化と吸着に及ぼす土壌微生物の影響を調べることを目的とした。実験は土壌由来のヒ素のみを利用した実験 A と、人為的にヒ素を添加した実験 B の 2 種類を実施した。また、土壌固相におけるヒ素の化学形態変化を X 線吸収端近傍構造（XANES）分析により明らかにした。

## 2. 実験方法

実験 A（土壌由来のヒ素のみを用いた実験）：総ヒ素濃度が 40 mg kg<sup>-1</sup> 程度の 2 種類の水田土壌を用いた。まず土壌 20 g を純水 60 mL と混合し、窒素ガスで脱気後、密栓バイアル中で還元培養し内在性のヒ素を液相に溶出させた。60～100 日培養後、HPLC-ICP/MS にて液相に 200 ppb (2.7 μM) 以上の亜ヒ酸が溶出していることを確認後、土壌スラリーを 500 mL 三角フラスコに移し、好気振盪条件での酸化培養にシフトした。ヒ素の酸化・吸着に及ぼす土壌微生物の影響を確認するため、一部のスラリーは還元培養後に 30 kGy の γ 線滅菌に供し、その後に酸化培養を行った。土壌固相の XANES 分析は KEK-PF 12C にて実施した。

実験 B（外因性のヒ素を添加した実験）：三角フラスコ中、土壌 20 g を純水 60 mL と混合し、ここへ液相における終濃度が 3.75 ppm (50 μM) になるように亜ヒ酸ナトリウムを添加した。これを好気振盪条件で酸化培養に供した。本実験では、亜ヒ酸酸化細菌の寄与を調べるため、γ 線滅菌土壌への亜ヒ酸酸化細菌 *Sinorhizobium* sp. KGO-5 株の接種も行った。

## 3. 結果と考察

実験 A：ヒ素を液相に溶出させた土壌スラリーを酸化培養にシフトしたところ、24 h 以内にほとんどの亜ヒ酸は固相に吸着した。固相における亜ヒ酸の挙動を XANES により追跡したところ、亜ヒ酸は固相上で徐々に酸化を受けることが分かった（図 1）。最

小二乗法フィッティングによりヒ素の形態別割合を算出したところ、酸化培養開始時に74~85%存在した亜ヒ酸が、24 h後に47%、その後も徐々に30%まで低下することがわかった(図2)。これに対しγ線滅菌土壌では、培養24 hまでの急激な酸化は観察されなかったものの、その後の緩やかな酸化が観察されず、培養7日後でも亜ヒ酸は50%ほど存在した。以上の結果より、本実験条件では亜ヒ酸は主に固相で酸化されること、またそれには速度の速い物理化学的(abiotic)なプロセスと、比較的速度の遅い微生物的なプロセスの両方が関与することが示唆された。γ線滅菌した土壌では、おそらく微生物的な酸化プロセスが阻害されたため、約20 ppbの亜ヒ酸がスラリーの液相に残存することもわかった。

実験B: 3.75 ppmの亜ヒ酸を添加した条件では、①微生物による亜ヒ酸の酸化反応に加えて、②物理化学的な亜ヒ酸の吸着反応、③物理化学的なヒ酸[As(V)]の吸着反応の3反応が同時進行することが明らかになった。さらに滅菌土壌に亜ヒ酸酸化細菌KGO-5株を接種したところ、亜ヒ酸の酸化速度は無処理土壌より顕著に促進された。

以上の結果より、土壌微生物は水田土壌における亜ヒ酸の酸化に関与すること、また間接的にヒ酸の吸着にも寄与することがわかった。また、ヒ素濃度が高い場合は微生物の寄与は大きい、極低濃度の場合はabioticな酸化が優先することも明らかとなった。

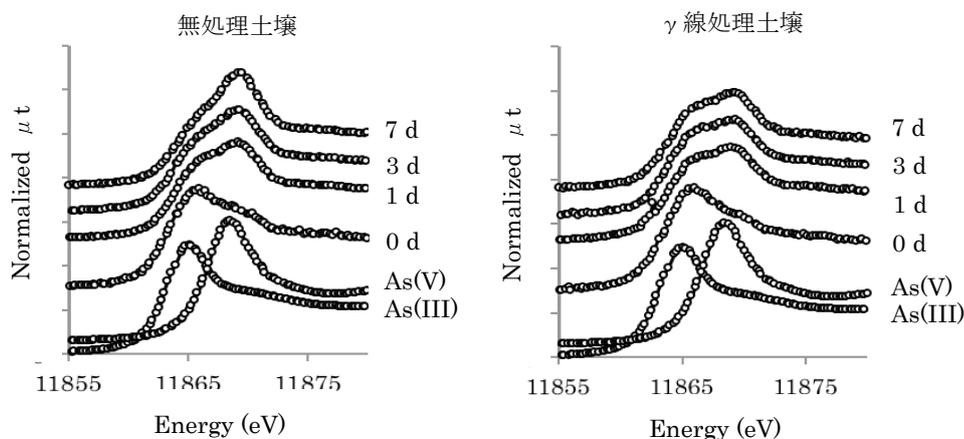


図1. 土壌のXANESスペクトル

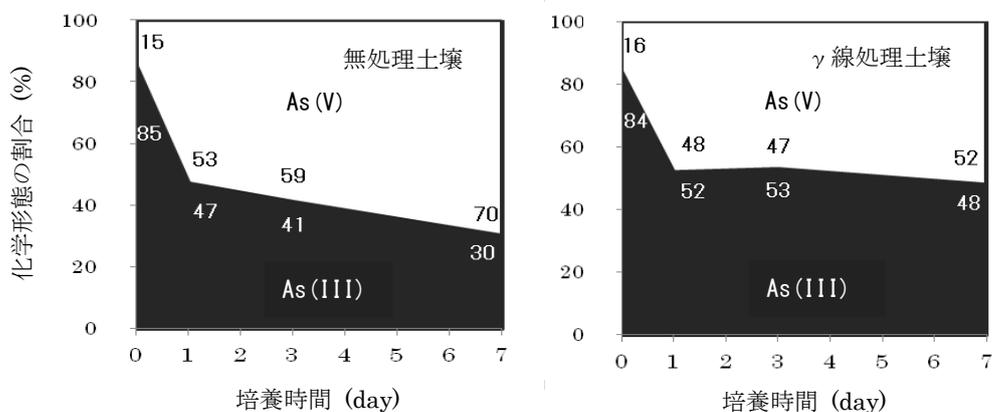


図2. 固相でのヒ素の形態変化

## ヒ酸還元能を有する鉄還元細菌 *Geobacter* sp. OR-1 株の生理的特質

本間瑛理、天知誠吾（千葉大院・園芸・応用生命化学）

### 1. 目的

現在東アジアを中心に、地下水のヒ素汚染が深刻な問題となっている。これはヒ素を含む堆積物中で、鉄（水）酸化物等の固相に吸着したヒ素が、鉄還元細菌やヒ酸還元細菌と呼ばれる一群の嫌気性細菌の作用を受け、液相へ溶出するためと推察されている（図1）<sup>1</sup>。特に、代表的な鉄還元細菌として知られる *Geobacter*（ジオバクター）属は、西ベンガルやカンボジアのヒ素汚染堆積物中で優占することが知られている<sup>2</sup>。しかしながら、これまでにヒ酸還元能をもつ *Geobacter* 属細菌に関する報告はなく、分離培養が求められていた。我々は国内水田土壌から *Geobacter* に属するヒ酸還元細菌 OR-1 株の分離にすでに成功している<sup>3</sup>。そこで本研究では、*Geobacter* sp. OR-1 株の生理的特性を詳細に明らかにすることを目的とした。

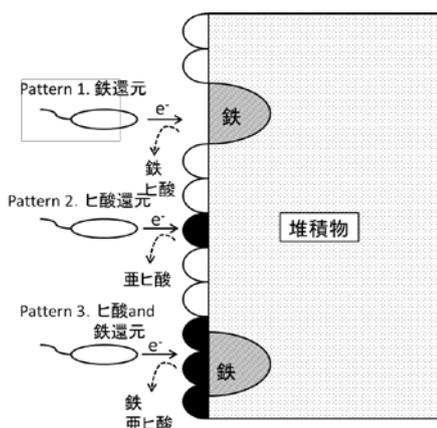


図 1. 嫌気性細菌の関与する堆積物からのヒ素溶出メカニズム

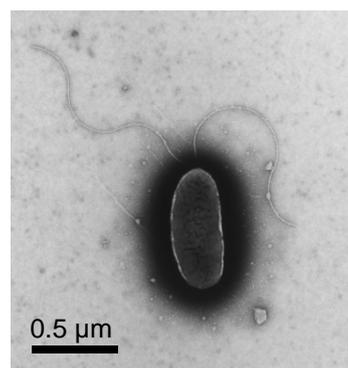


図 2. OR-1 株のネガティブ染色

### 2. 実験方法

OR-1 株は酢酸ナトリウムを電子供与体、ヒ酸カリウムを電子受容体として含む無機塩培地中で、嫌気条件下で培養した。培養液中のヒ酸、亜ヒ酸、酢酸の濃度は HPLC により定量した。2 価鉄の定量はフェロジン法で行った。ヒ素汚染モデル堆積物は、フェリハイドライトにヒ酸カリウムを吸着させて調製した (As/Fe モル比=0.4)。OR-1 株のゲノム DNA にコードされた異化的ヒ酸還元酵素遺伝子 (*arrA*) の増幅には、Song らの nested PCR の手法を用いた。得られた塩基配列をアミノ酸に翻訳した後、ArrA の系統解析を近隣結合法にて行った。また同様の解析を水田土壌より抽出した環境 DNA を鋳型としても行った。

### 3. 結果と考察

OR-1 株を酢酸を電子供与体として培養したところ、ヒ酸の還元に関与した生育が観察された (図 3)。この時のヒ酸、亜ヒ酸、酢酸の化学量論的解析より、OR-1 株のヒ酸還元は以下に示すヒ酸呼吸を表す化学式と一致することがわかった。



呼吸阻害剤である KCN、HQNO、dicumarol によりヒ酸還元が完全に抑制されたことから、OR-1 株のヒ酸還元は呼吸反応であることが示された。OR-1 株はヒ酸の他に可溶性鉄や非晶質鉄酸化物、フマル酸などを電子受容体として利用できた。OR-1 株を、ヒ素汚染堆積物を模擬したモデル堆積物へ接種したところ、ヒ素の溶出が確認された。一方、ヒ酸還元能を持たない鉄還元細菌 *G. metallireducens* を接種してもヒ素は溶出しなかった。このことから、ヒ素の溶出にはヒ酸還元能と鉄還元能の両方が必要であることが強く示唆された。また図 4 に示すように、OR-1 株の ArrA は鉄還元細菌 *G. uraniireducens* や *G. lovleyi* のゲノム中に見出された推定 ArrA と系統的に近縁であった (ただしこれらの *Geobacter* にはヒ酸還元能がない)。ヒ素溶出の観察された水田土壌中の ArrA を解析したところ、およそ 2/3 が *Geobacter* の ArrA に近縁であった。以上の結果より、ヒ酸還元能を有する *Geobacter* が環境中に広く分布すること、またそれらが土壌や堆積物からのヒ素の溶出に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

#### 参考文献

1. Reyes *et al.*, Geomicrobiology of iron and arsenic in anoxic sediments. *In* Arsenic Contamination of Groundwater (Ed. S. Ahuja), pp. 123-146, (2008).
2. Islam *et al.*, Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments, *Nature*, **430**, 68-71 (2004).
3. 天知ら, 国内水田土壌からのヒ素の溶出に及ぼす微生物の影響, 第 17 回ヒ素シンポジウム(2011).

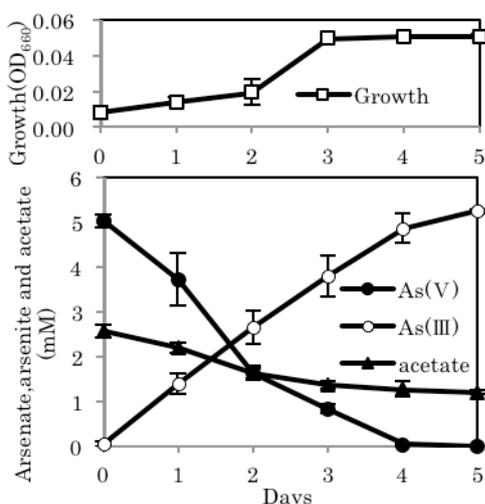


図 3. ヒ酸の還元に関与した OR-1 株の生育

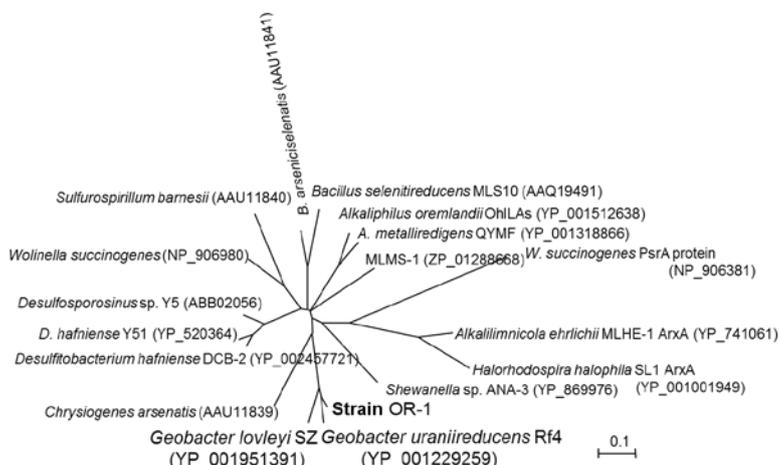


図 4. OR-1 株の異化的ヒ酸還元酵素 ArrA 様タンパクの系統樹

## 異化的ヒ酸還元能を有する *Anaeromyxobacter* sp. PSR-1 株の性質

工藤桂太郎、天知誠吾（千葉大院・園芸・応用生命化学）

**目的:**我々はこれまで水田土壌からのヒ素溶出に及ぼす土壌微生物群集の機能解明を目的として、国内水田土壌からヒ酸[As(V)]還元細菌の分離を行ってきた。その過程で、*Anaeromyxobacter* (アネアロミクソバクター) 属細菌の1種である PSR-1 株の分離に成功した<sup>1</sup>。*Anaeromyxobacter* 属細菌は、嫌気条件下でクロロフェノールを還元的に脱塩素化する細菌として 2002 年に分離・報告され<sup>2</sup>、ハロゲン化物以外にも鉄、酸素、硝酸、亜硝酸、フマル酸、亜セレン酸、ウラン、テクネチウムなど非常に多様な物質を電子受容体として利用できる細菌として知られる。しかしながら、これまで *Anaeromyxobacter* 属細菌によるヒ酸還元に関する報告はない。湛水土壌や還元的な堆積物からのヒ素の溶出には、鉄還元能とヒ酸還元能を有する嫌気性細菌が関与する可能性が指摘されている。また最近 Hori ら<sup>3</sup>は、水田土壌中で活発に鉄酸化物を還元する細菌を安定同位体実験により同定し、これが *Anaeromyxobacter* 属細菌と *Geobacter* 属細菌であることを示している。従って、鉄酸化物のような鉱物に吸着したヒ素の溶出に、鉄とヒ素の両還元能を有する PSR-1 株のような細菌が関与する可能性がある。そこで本研究では、PSR-1 株の生理的な特質を明らかにすると共に、PSR-1 株がヒ素汚染モデル堆積物や滅菌水田土壌からヒ素を溶出できるか検証することを目的とした。

**実験方法:** PSR-1 株は酢酸ナトリウムを電子供与体、ヒ酸カリウムを電子受容体として含む無機塩培地で嫌氣的に生育させた。培養液中のヒ酸、亜ヒ酸[As(III)]、酢酸濃度は HPLC により定量した。PSR-1 株のヒ酸還元能がどのような条件で発現するか調べるため、洗浄菌体を用いたインキュベーション実験を行った。前培養には電子受容体として 40 mM フマル酸または 40 mM フマル酸+1 mM ヒ酸を用いた。菌体を回収後リン酸緩衝液で洗浄・再懸濁し洗浄菌体とした。異化的ヒ酸還元酵素遺伝子 (*arrA*) の PCR 増幅には Song らの nested PCR プライマー、ArrA<sub>fw</sub>/ArrA<sub>rev</sub> (Malasarn *et al.*)、ArrA<sub>UF1</sub>/ArrA<sub>UR3</sub> (Fisher *et al.*) 等を用いた。ヒ素汚染モデル堆積物は、フェリハイドライトにヒ酸カリウムを吸着させて調製した (As/Fe モル比=0.4)。水田土壌はγ線照射 (50 kGy) によって滅菌した後、酢酸ナトリウムと PSR-1 株の洗浄菌体を接種し、嫌気条件で培養した。土壌から溶出したヒ素は HPLC-ICP/MS で化学形態別に定量した。2 価鉄の定量はフェロジン法で行った。

**結果と考察:** PSR-1 株はグラム陰性の桿菌で、孢子またはシストの形成が認められた (図 1)。PSR-1 株は酢酸を電子供与体とした時、ヒ酸還元に共役して生育した (図 2)。この時のヒ酸、亜ヒ酸、酢酸の化学量論はヒ酸呼吸を表す化学式と一致した。また PSR-1

株のヒ酸還元は呼吸阻害剤である dicumarol、HQNO によって完全に阻害された。PSR-1 株はヒ酸の他に可溶性鉄、非晶質鉄酸化物、3%酸素、硝酸、亜硝酸、セレン酸、フマル酸など多様な電子受容体を利用できた。ヒ酸の存在下または非存在下で生育した洗浄菌体を用いてヒ酸還元能を評価したところ、いずれの条件でもヒ酸還元能は発現していたが、ヒ酸による発現促進も認められた。また電子供与体の存在に依存しない解毒的なヒ酸還元能も確認された。複数の degenerate プライマーを用いて、PSR-1 株のゲノムより異化的ヒ酸還元酵素遺伝子 (*arrA*) の増幅を試みたが、増幅しなかった。このことは、PSR-1 株のヒ酸還元酵素が一般的な Arr とは異なった特徴を持つ可能性を示唆している。PSR-1 株をモデル堆積物または滅菌水田土壌へ接種したところ、いずれの場合も鉄と共にヒ素を溶出することができた (図 3)。以上の結果より、PSR-1 株は異化的ヒ酸還元細菌の 1 種であり、典型的な Arr は保持しないものの、土壌やモデル堆積物からヒ素を溶出する能力を有することが明らかになった。

#### 参考文献

1. 天知ら, 第 17 回ヒ素シンポジウム(2011); 2. Sanford *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 68, 893-900 (2002); 3. Hori *et al.*, ISME J., 4, 267-278 (2010).



図 1. PSR-1 株の SEM 写真

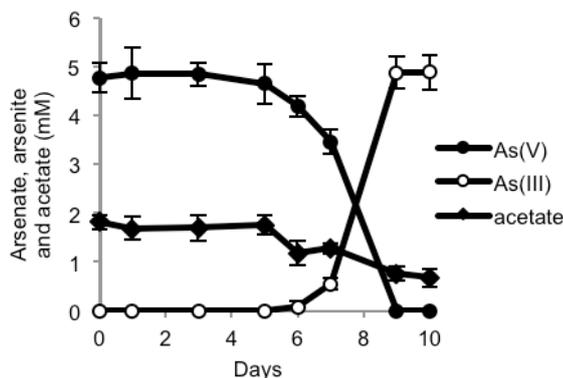


図 2. PSR-1 株のヒ酸還元に伴った生育

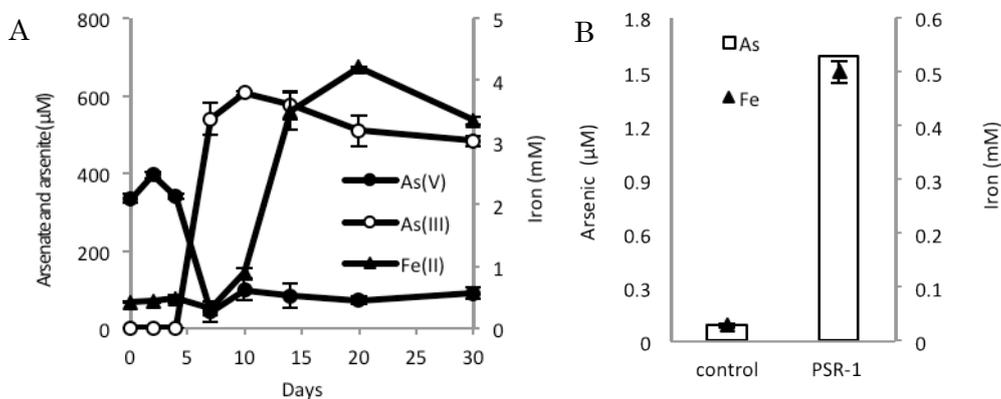


図 3. PSR-1 株によるヒ素の溶出

A: ヒ素汚染モデル堆積物 B: 滅菌水田土壌

## 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「サツマ薬品株式会社」に厚くお礼申し上げます。

第18回ヒ素シンポジウム  
実行委員長 塩盛 弘一郎

---

## 第 18 回ヒ素シンポジウム実行委員会

実行委員長 塩盛 弘一郎 宮崎大学工学部環境応用化学科  
事務局長 宮武 宗利 宮崎大学工学部環境応用化学科

事務局

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

宮崎大学工学部環境応用化学科内

TEL: 0985-58-7309 FAX: 0985-58-7323

e-mail: [asmiya2012@cc.miyazaki-u.ac.jp](mailto:asmiya2012@cc.miyazaki-u.ac.jp)

---