

I 分析研究班

[1] 分析研究班全体研究報告

【分析研究班班員】

	氏 名	所 属	役職名	研究テーマ
班長	柴田 康行	国立環境研究所化学環境研究領域	領域長	ジフェニルアルシン酸 (DPAA) 並びに関連化合物の生物体内動態に関する分析手法の確立
班員	貝瀬 利一	東京薬科大学生命科学部	教授	環境試料ならびに生体試料中ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の測定法の確立に関する研究
	吉永 淳	東京大学新領域創成科学研究科	准教授	汚染土壌分析用精度管理試料の作成と評価

【分析研究班研究概要】

茨城県神栖市でおきた井戸水汚染事例は、有機ヒ素化合物であるジフェニルアルシン酸 (DPAA) による環境汚染という特徴をもっている。DPAA の環境動態や吸収、代謝、排泄、生体影響についてはほとんど情報がなく、汚染実態の解明やばく露による健康影響の調査をすすめ適切な対策を迅速にとっていくために、類縁化合物を含めた環境中、生体中における高感度な分析手法の確立が急務となっている。特に日本人は海の魚介類、海藻などに含まれるアルセノベタインやヒ素糖などの自然由来の各種ヒ素化合物を多く摂取するため、もともと生体成分中に様々な化学形態のヒ素を多く含んでおり、DPAA へのばく露の有無やその量を判断するには生体成分中の様々な自然由来ヒ素化合物から DPAA やフェニルアルソン酸 PAA、これらの分解・代謝産物を明確に区別して検出、定量しなければならない。そこで、本分析班では、自然由来のヒ素とこれらのフェニル基を有する合成ヒ素化合物並びにそれらの分解、代謝産物を区別して定量できる分析手法の開発並びに確立、精度管理手法の確立を目的として研究を進め、あわせてこれらの手法を適用した自然界、生物体内での DPAA 並びに代謝産物の解明を進めることを目的とする。

本分析班では、これまで DPAA の高精度高感度測定法の開発を進めるかたわら、固相抽出法や水素化物発生法と原子吸光法を組み合わせた迅速スクリーニング法の開発を進めてきた。また、DPAA 並びに PAA 含有農業用水で育てられた稲の中にフェニルメチルアルシン酸という新たな化学形態の有機ヒ素化合物が同定されたことを契機として、一連のメチル化体 (フェニルジメチルアルシンオキシド、ジフェニルメチルアルシンオキシド) を含む類縁化合物の探索とその分析手法の開発などを進め、土壌中或いは植物中の分析を進めるとともに、細胞を用いた毒性試験を行い代謝・分解産物の中で注目すべき物質のスクリーニングを行ってきた。さらに、分析精度管理のための DPAA 含有共通均質試料として DPAA 投与ラット体毛試料、DPAA、PMAA 等含有玄米均質化試料などを作成し、それらの共同分析を進めてきた。

今年度はこれまでの上記の研究成果を元に、未知化合物も含めてヒ素を含む物質をすべて検出可能な HPLC-ICPMS 法と、安定同位体ラベル化合物をサロゲートとして利用し複雑な前処理を必要とする生体試料などの場合でも回収率を補正した精度の高い分析が可能な LCMSMS 法それぞれの特徴を生かし、実際の投与動物体内或いは環境試料中の DPAA 並びに類縁化合物に関する分析を進め、体内動態や代謝に関する知見を蓄積するとともに、尿中排泄形態に関する分析を行った。また、これまで検討が遅れていた 3 価の有機ヒ素化合物であるフェニルアルシンオキサイド (PAO) の新たな高感度高精度分析手法の開発を行った。DPAA 並びに一連の類縁フェニルヒ素化合物について、その毒性発現機構、ならびに生体内成分との相互作用の毒性強度に対する影響の解析のため、詳細一斉分析法の確立を図るとともに、細胞毒性と生体成分との相互作用の関係を引き続き解析した。さらに新たな精度管理用均質化試料として土壌の均質化試料を作成した。

[2]テーマ別研究報告

[2.1] ジフェニルアルシン酸 (DPAA) 並びに関連化合物の生物体内動態に関する分析手法の確立

主任研究者：柴田 康行 (国立環境研究所化学環境研究領域 領域長)
研究協力者：吉兼 光葉 (国立環境研究所化学環境研究領域 アシスタントフェロー)
：中宮 邦近 (国立環境研究所化学環境研究領域 アシスタントフェロー)
：今井 裕恵 (国立環境研究所化学環境研究領域 アシスタントフェロー)

1 概要

本年度は LCMSMS による DPAA 投与動物試料の分析対象物質を増やすために、市販品の得られない類縁化合物の ^{13}C ラベルサロゲートを作製して、LCMSMS による一斉分析法をさらに改良した。これをもとに DPAA 投与ラットの各組織の抽出と分析を行い、体内でのメチル化に関する基礎情報をえた。また、これまで検討の遅れていた 3 価の有機ヒ素化合物 PAO の新たな分析手法の開発、確立を行った。

2 目的

これまでの研究の進展により、ジフェニルアルシン酸 (DPAA) は環境中、或いは生体内でフェニル基の切断と還元、メチル化反応を主体とする様々な代謝を受け、変化していく様子が次第に明らかになってきている。このサブテーマでは、分子構造の特徴に由来する特異的な質量数をもつイオンの生成、並びに高速液体クロマトグラフィーによる分離とを組み合わせ、対象化合物の確実な同定、定量ができ、かつ同位体ラベル化合物の添加によって複雑な前処理を有する生体試料などの場合にも精度の高い分析が可能となる LCMSMS 法を中心に分析手法の高度化を図り、実試料の分析を進めて DPAA の環境動態、生体内代謝・動態を明らかにすることを目的とする。そのため、本年度は、

- (1) DPAA、PAA (フェニルアルソン酸) のメチル化物で市販の良好な安定同位体ラベル標準物質のないフェニルメチルアルシン酸 (PMAA)、フェニルジメチルアルシンオキシサイド (PDMAO)、ジフェニルメチルアルシンオキシサイド (DPMAO) それぞれの安定同位体 ^{13}C ラベルサロゲートを合成し、これらの一斉定量分析手法を確立する。
- (2) この一斉分析法を DPAA 投与ラットの組織に適用し、DPAA、PAA 並びにこれらの代謝産物の濃度に関する基礎情報を蓄積する。
- (3) PAA の還元型で毒性の強い PAO (フェニルアルシノキシサイド) の分析手法を確立する。

ことを目的として研究を進めた。あわせて、分析手法の相互比較と評価並びに今後の分析精度管理に資することを目的として吉永班員が作成する土壌均質化試料の共同分析に参画した。

3 方法

3.1 同位体ラベルサロゲートの合成

$^{13}\text{C}_6$ -PMAA は、 $^{13}\text{C}_6$ -アニリンと亜ヒ酸を反応させて $^{13}\text{C}_6$ -PAA を合成し、還元して $^{13}\text{C}_6$ -PAO を作成後、ヨウ化メチルと反応させて $^{13}\text{C}_6$ -PMAA を合成した。不純物として残る $^{13}\text{C}_6$ -PAA はイオン交換樹脂を用いて除去した。 $^{13}\text{C}_6$ -PDMAO はカコジル酸からスタートし、還元、ヨウ素化後、 $^{13}\text{C}_6$ -臭素化ベンゼンと反応させ、できた $^{13}\text{C}_6$ -フェニルジメチルアルシン (PDMA) を過酸化水素で酸化して $^{13}\text{C}_6$ -PDMAO とした。 $^{13}\text{C}_6$ -PDMAO は亜ヒ酸をヨウ化メチルでメチル化後、還元ヨウ素化してから $^{13}\text{C}_6$ -臭素化ベンゼン 2 分子と反応させて $^{13}\text{C}_{12}$ -ジフェニルメチルアルシンを合成し、これを過酸化水素で酸化した後不純物のメタンアルソン酸とイオン交換カラムで分離して $^{13}\text{C}_{12}$ -DPMAO を得た。合成した各標準物質は HPLC-ICPMS で純度と不純物の存在を確認し、FAB-MS、NMR で構造を確認した。最終的に作られた標準物質の純度は以下の通り。

$^{13}\text{C}_6$ -phenyl	
- $^{12}\text{C}_1$ -methylarsinic acid	97%
$^{13}\text{C}_6$ -Phenyl	
- $^{12}\text{C}_2$ -dimethylarsine oxide	99%
$^{13}\text{C}_{12}$ -diphenyl	
- $^{12}\text{C}_1$ -methylarsine oxide	98%

3. 2 フェニルアルシンオキサイド PAO の分析法の開発

PAO の存在を確実に捉え定量的に分析を行うため、分子としての検出が可能な LCMSMS 法を採用し、回収率やイオン化効率の変化等の補正のために $^{13}\text{C}_6$ -PAO を合成した (同位体ラベルサロゲートの合成方法は 3. 1 参照)。PAO の分離状況並びに安定存在条件を検討した結果、酸性側のギ酸溶液下での分離条件を確立し、測定を行った。作成した分離条件は以下のとおり。

カラム : Zorbax XDBC18 (2.1x150 mm, 3.5m)

溶離液 : A : 0.1% ギ酸、 B : メタノール

グラディエント条件 : B (20%) – 5min – B (20%) – 10min – (B 100%)

流速 0.2ml/min、カラム温度 40 度、打ち込み量 10L

3. 3 DPAA 投与ラット中の PMAA、PDMAO、DPMAO の分析

組織中の DPAA 並びに類縁化合物の抽出条件は、抽出前に PMAA、PDMAO、DPMAO を含む ^{13}C ラベルサロゲートを既知量添加する事を除いて昨年度までに報告した方法と同じアルカリ分解法を適用している。また、分離、検出、定量法もこれまでに報告したイオンクロマトグラフカラムを用いた手法を適用したが、定量にあたっては検量線用の標準溶液にも同じ濃度の ^{13}C ラベルサロゲートを添加しておき、同位体希釈法で定量を行っている。

分子量分布の測定には、凍結保存試料を解凍後、水をくわえてポリトロンでホモジナイズし、0.45m のフィルターでろ過した溶液を用いた。測定には HPLC-ICPMS 法を用いた。ゲルろ過カラムである AsahiPak GS220 で分子量別に分離を用い、ICPMS でヒ素特異的な $m/z=75$ をモニターして検出した。

4 結果

4. 1 安定同位体ラベルサロゲートの合成

以前に行ったラットに引き続き、より人に近いサルでの DPAA 投与実験を開始するにあたり、複雑な前処理を要する DPAA 投与動物試料中の DPAA 代謝・分解産物を確実に同定し、正確に

定量するために、LCMSMS での測定を前提として ^{13}C ラベル標準物質の合成を行った。DPAA、PAA 以外では PMAA も安定同位体ラベルのサロゲートが市販されているが、不純物が多いため他の物質の定量が困難となる問題を抱えている。そこで本課題では、PMAA、並びに PDMAO、DPMAO のあわせて 3 種類の同位体ラベルサロゲートの作成を試みた。いずれも比較的高い収率で目的物質を合成することができたが、PMAA、DPMAO の 2 つについてはそれぞれ反応の途中段階の物質が未反応の不純物として最終産物に混じることがわかり、その分離、精製のために解離の差を利用してイオン交換樹脂を用いた。結果は上記の通りで、もっとも悪い PMAA で 97%、他は 98%以上の純度で標準が得られた。

4. 2 DPAA 投与ラット中のメチル化体、並びに分子量分布の測定

今回作成した同位体ラベルサロゲートを用いて回収率を補正しながら、DPAA 投与ラット組織中の DPAA 関連化合物の測定を試みた。回収率を補正して得られた濃度を図 1 にまとめる。

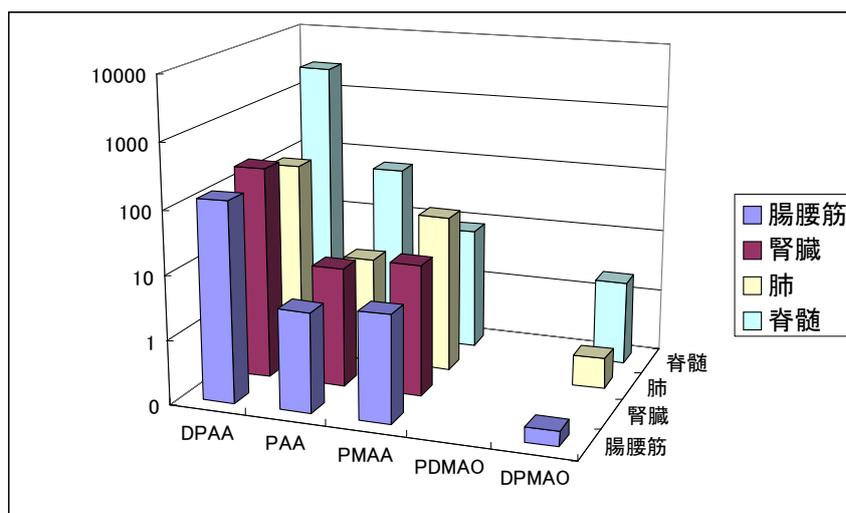


図 1 DPAA 投与ラットの脊髄、肺、腎臓、筋肉中 DPAA 並びに関連ヒ素化合物濃度

DPAA と比較して PAA や PMAA、DPMAO の濃度が低いため、縦軸を対数表示してある。図で明らかなように、PDMAO 以外は基本的にすべての物質が検出、定量された。このうち、腸腰筋と腎臓は相互によく似た組成をもつのに対し、肺の場合は DPAA と PAA のメチル化体に相当する DPMAO 並びに PMAA の相対的な割合が、他の組織より高めにてでている。一方、脊髄においては PMAA の相対的な割合が他の組織に比較して低い一方で、DPMAO と DPAA との比率はほかと同等のように見える。まだ 1 体だけの結果であり、今後例数を増やした動物の違いによる差の有無を検討していく必要があるが、今回の結果から組織毎のメチル化（代謝）能の違い、或いは蓄積性ないし透過性の違いがある可能性が示唆された。

一方、組織中に存在するヒ素の大部分を占める DPAA の分子量分布を調べた結果、フリーの低分子で存在するものより蛋白などの高分子と結合していると考えられるものの割合が高いことが明らかとなった。一例として、肝臓をホモジナイズして抽出されてくるヒ素の分子量分布を図 2 に示す。分離に用いたゲルろ過カラム GS220 は低分子用のものであり、数千以上の分子量を持つものは分離されずに最初に出てくるので、具体的にどの程度の分子量なのかは明らかではないが、DPAA 投与動物の組織中に存在する DPAA のかなりの割合が生体高分子に結合していることをこの結果は示唆するものと言える。なお、ホモジナイズして出てくるヒ素は全体の数%～十数%にすぎず、殆どは不溶性画分にある。これがどのような形で存在しているのかにも興味をもたれる。

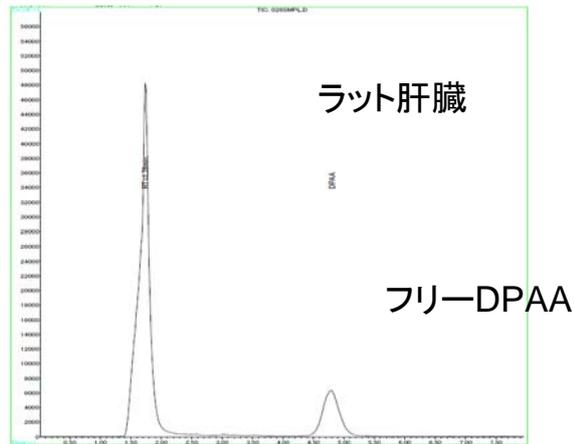


図2 ラット肝臓中の可溶性ヒ素の分子量分布

4. 3 PAOの分析法の開発

ヒ素は酸化型の5価と還元型の3価の2つの価数で存在し、周囲の環境条件などに応じてこの2つの間を行き来することが知られている。これまでの研究班での結果から、DPAAやPAAなどの5価の状態よりも還元型の3価の方が培養細胞に対する毒性が高いことが明らかとなってきた。特にPAAの還元型に相当するPAOはDPAAより3桁高い毒性を示しており、毒性面からは注目される化学形態である。以前に他のヒ素化合物の一斉分析の際にPAOの同時分析を試みたことがあったが、PAAと区別できないままに終わっていた。毒性データの蓄積にあわせ、あらためてPAOの分析条件の確立を目指して検討を進めたので、その結果を報告する。

当初の分析法は、4.2で用いたイオンクロマトグラフカラムによる分離とICPMSによる検出を組み合わせたものであった。これでPAOが検出されていることを確認するために、同じカラム条件で検出系をMSMSに変更したところ、PAAと重なると考えていたピークはPAAそのものであり、PAOではないことが明らかとなった。すなわち、カラムで分離を行うわずか十数分間に、打ち込んだPAOがPAAに酸化されてしまうことを示している。保持時間もPAAと重なることから、打ち込んだPAOは実際には殆ど瞬間的にPAAに酸化されると考えられる。PAOが安定に存在する条件を探した結果、酸性側のギ酸溶液なら問題ないことが分かり、ギ酸での分離条件をあらためて検討し、最終的にギ酸-メタノールグラディエントでODSカラムによる分離のシステムをとることとした。この条件でのPAO並びに ^{13}C ラベル体のPAOのクロマトグラムを図3に示す。

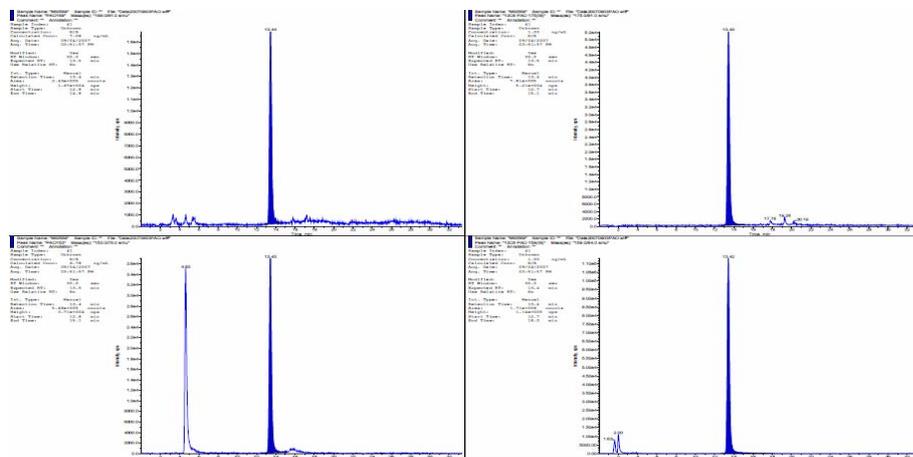


図3 LCMSMSによるPAO（ネイティブ；左）、 $^{13}\text{C}_6$ -PAO（右）のクロマトグラム

興味深いことに、MSMS モードで測定した場合にフラグメントとして強度が大きいのは、PAA では $C_6H_5^+=77$ であったが PAO では $C_6H_6^+=78$ であった。ヒ素側が 3 価か 5 価かに応じてフラグメンテーションの際のプロトンの移動がおきるように思われる。一方、プレカーサーイオンとしては、分子構造上この物質に相当する 169 の他に、229、505、673 等のより大きいイオンも検出された。いずれもクロマトグラム上は 169 の親イオンと重なっており、この PAO に由来するものと思われる (図 4)。

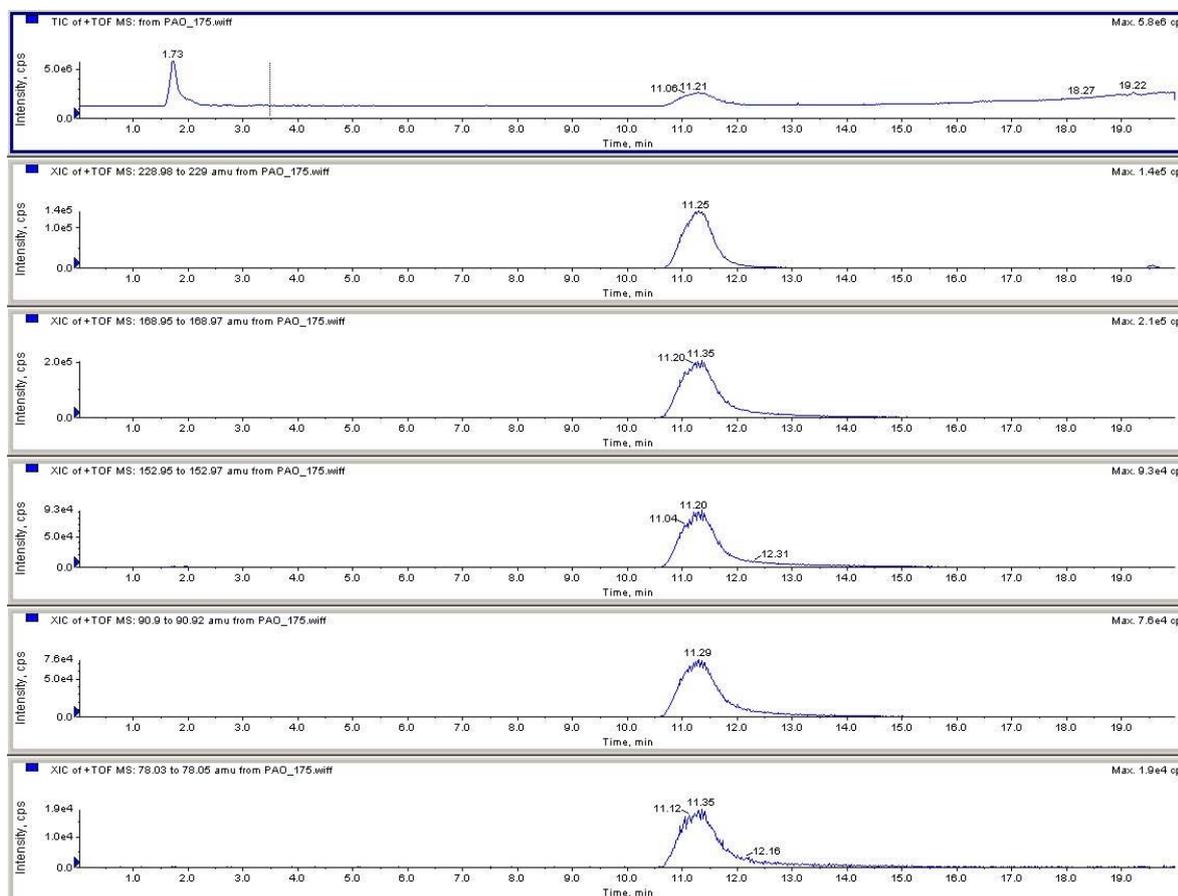


図 4 LCMSMS による PAO 分離の際に検出される他のプレカーサーイオン

この点をさらに確認するため、LC-TOFMS を用いた精密質量数の測定を企業の分析ラボに依頼して実施した。結果を下表にまとめる。

	<Native>	<Surrogate>	[Formula]	<Surrogate – Native>
UK1	78.0471	84.0672	C_6H_6	Phenyl = 1 (6.0201)
UK2	90.9166	90.9166	OAs	0
UK3	152.9681	158.9884	C_6H_6As	Phenyl = 1 (6.0203)
PAO	168.9632	174.9832	C_6H_6OAs	Phenyl = 1 (6.0200)
UK4	228.9995	241.0397	$C_{12}H_{10}As$	Phenyl = 2 (12.0402)
UK5	504.8742	522.9343	$C_{18}H_{16}O_3As_3$	Phenyl = 3 (18.0601)
UK6	672.8302	696.9091	$C_{24}H_{21}O_4As_4$	Phenyl = 4 (24.0789)

上記の 78 のピークは精密質量数でもベンゼン C_6H_6 そのものである。また、 ^{13}C ラベルのサロゲートの場合に相当するピークの質量数は 6.02 増えており、 $^{12}C_6 \Rightarrow ^{13}C_6$ の変化に対応する。すなわち、上記の解釈でまったく矛盾のないことが示された。同様に見ていくと、OAs というフラグメントや PAO から酸素が一つはずれたフラグメントも作られていることが分かる。

一方、PAO 単独より分子量の大きい 229 はジフェニルアルシンに相当することが明らかとなった。また、505 は PAO の三量体に、また 673 は四量体にそれぞれ相当することがわかる。これらは LC では相互に、また PAO 単体ともまったく分離されておらず、もとの標準溶液中に初めから存在していたわけではないと考えられる。以上の結果から、PAO はイオン源におけるイオン化の際に様々な反応が進んで複雑なイオン種を作る様子が明らかとなった。

5 まとめ

以上の結果、今後の DPAA 投与サルの分析、並びに DPAA 汚染土壌の分析に対する基本的な手法が確立され、準備が整ったと言える。今後は送付されてくる土壌均質化試料、並びに DPAA 投与サル試料の分析を行い、環境中、生体中における DPAA の変換、動態の詳細を明らかにしていきたい。なお、微生物により合成される可能性があるフェニルトリメチルアルソニウムなどのテトラアルキルアルソニウム体についても標準の合成を進め、分析体制を整えることが今後に残された課題と考えられる。

謝辞

LC-TOFMS の測定をしていただいた Agilent 株式会社、並びに担当していただいたアプリケーションセンターの清水尚登博士に感謝の意を表します。

研究報告

<論文>

Ishii K., Shibata Y., Hosoya T., Takeda T., Iwasaki N., Nakamagoe K., Itoh Y., Kaise T., Hirano S., Ishizaki M. et al.: Central nervous effect of organoarsenic compound clinical and neurological features of diphenylarsinic acid (DPAA) intoxication in Kamisu, Japan, *Organohalogen Compd.*, 69, 432-436 (2007)

<学会発表>

中宮邦近, 今井裕恵, 柴田康行: 有機ヒ素の安定同位体化合物の合成、日本ヒ素研究会 第 13 回ヒ素シンポジウム (静岡, 2007/11)

Shibata Y., Yoshikane M., Imai H., Nakamiya K., Shimizu N.: Sensitive analytical method of highly toxic phenylarsine oxide in environmental samples, *Int.Symp.Metallomics 2007 (ISM2007)* (Nagoya, 2007/11)

Yoshikane M., Shibata Y., Suzuki S.: Development of a highly-sensitive micro-LC/MS/MS method for the elucidation of toxicokinetics of diphenyl arsenic acid in central nervous system, *Int.Symp.Metallomics 2007 (ISM2007)* (Nagoya, 2007/11)

[2.2] 環境試料並びに生体試料中ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の測定法の確立に関する研究

主任研究者：貝瀬 利一（東京薬科大学生命科学部 教授）
分担協力者：太田 敏博（東京薬科大学生命科学部 准教授）
：高橋 滋（東京薬科大学生命科学部 准教授）
：瀬戸 康雄（科学警察研究所法科学第三部 部付主任研究官）
研究協力者：木下 健司（東京薬科大学大学院生命科学研究科 博士後期課程院生）
：宮下 振一（東京薬科大学大学院生命科学研究科 博士前期課程院生）

1 概要

環境中及び生体試料中のフェニルヒ素化合物の分析を行うための分析手法を検討し、神栖市内から採取した環境試料並びに DPAA ばく露者尿試料の分析を行った。検討した分析手法は幅広いフェニルヒ素化合物の分離が達成され、また低濃度試料でも適用可能であると考えられた。DPAA ばく露者尿試料中の主要ヒ素化合物はジフェニルアルシン酸（以下「DPAA」）やフェニルメチルアルシン酸（以下「PMAA」）であり、その他にも多くの未知ヒ素化合物が検出された。地下水や米といった環境試料の分析を行った結果、主要ヒ素化合物の DPAA や PMAA の他に未知ヒ素化合物が検出されたが、DPAA ばく露者尿試料中の未知ヒ素化合物との明らかな一致を示すものは見られなかった。

さらに、DPAA とグルタチオン（以下「GSH」）の反応生成物ビスジフェニルアルシンオキシド（以下「BDPAO」）について、その毒性に関する性質について分析機器を用いて調べた結果、遊離状態の BDPAO 単体はきわめて毒性が高いことが示唆された。

2 目的

平成 17～18 年度の研究報告書では DPAA などフェニルヒ素化合物は環境中、特に水田土壌における微生物によるメチル化など化学形態の変化を伴いながら環境中を拡散していることが示された。神栖市内の住民は様々な化学形態のフェニルヒ素化合物を含む米や井戸水を摂取していたことが考えられるために DPAA ばく露者尿試料には様々な化学形態のフェニルヒ素化合物が存在する可能性が考えられた。そこで、多様なヒ素種に対応可能なフェニルヒ素化合物のための分析法を検討し、それを基に DPAA ばく露者尿試料および地下水、米試料などを分析し、フェニルヒ素化合物の汚染状況の把握を試みた。

また、DPAA の毒性研究において注目される分野の一つであるグルタチオン（以下「GSH」）の毒性発現機構への関与について両化合物の反応生成物 BDPAO について分析手法を利用し、BDPAO の性質を調べることにした。

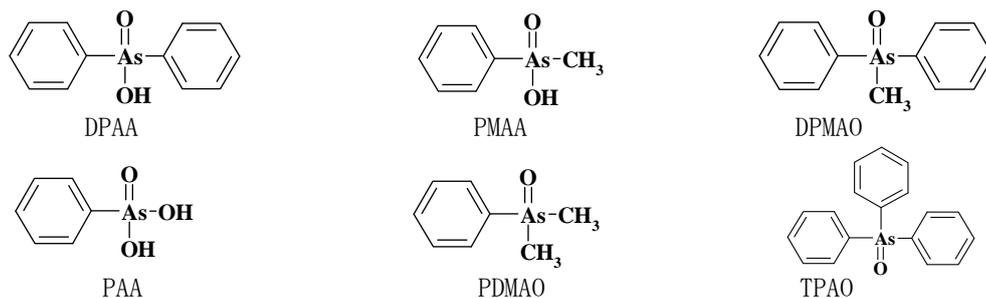


図1 主なフェニルヒ素化合物の構造

3 方法

3. 1 フェニルヒ素化合物の分析法

実試料分析では多数に及ぶ試料を測定することが予想され、それに伴い分析に要する時間を考慮しなければならない。そのために迅速かつ低濃度試料の測定に対応できる分析法が必要であると考えられる。分析対象のフェニルヒ素化合物は DPAA、フェニルアルソン酸（以下「PAA」）、PMAA、フェニルジメチルアルシンオキシド（以下「PDMAO」）、ジフェニルメチルアルシンオキシド（以下「DPMAO」）の他に、神栖市において検出報告はないが、より広範囲の物質に対応するためにトリフェニルアルシンオキシド（以下「TPAO」）を含めた。また、環境中や生体中では様々な反応が生じ新たなヒ素化合物が生成する可能性が考えられ、そのため未知ヒ素化合物の検出も行える分析条件でなければならない。さらに、我々は日常生活においても海産物など食事を通じてヒ素（メチル化ヒ素や無機ヒ素）を摂取しており、尿をはじめとする生体試料の分析においては海産物由来のヒ素化合物との分離が必須となる。DPAA ばく露者尿試料測定を可能にするため、海産物由来ヒ素化合物とフェニルヒ素化合物との分離も考慮に入れた。

本研究報告における分析法は液体試料中のヒ素化合物を分離し、各ヒ素化合物それぞれを検出する手順とし、そのために分離には高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」）を用い、検出には既知の物質以外のヒ素化合物の存在も確認できるように、ヒ素化合物を選択的に検出できる誘導結合プラズマ質量分析計（以下「ICP-MS」）を使用した。

以下に検討した分析条件を示す。

〈HPLC 分離条件〉

カラム：Inertsil C4 (2.1×150 mm、5 μm および 1.5×10 mm、5 μm を連結)

移動相：水 (pH 2.0、硝酸) / エタノール / アセトニトリル = 80 : 15 : 5

流速：0.2 mL/min、カラム温度：40°C、注入量：20 μL

〈ICP-MS 検出条件〉

高周波出力：1600 W、ネブライザガス流量：0.9 L/min、プラズマガス流量：17 L/min

3. 2 神栖市 DPAA ばく露者尿試料分析

尿試料は筑波大より送られたものを超低温冷凍庫（-84°C）で測定まで保存した。測定時には尿試料を解凍後、超純水を用いて 3 倍希釈し、メンブレンフィルターを用いてろ過を行い測定試料とした。さらに、本分析法では分離されないヒ素化合物を調べるために既に確立されている分析法を用いて更なる未知ヒ素化合物の検索も試みた。分離条件を以下に示す。

〈HPLC 分離条件〉

カラム：CAPCELL PAK MG II (4.6×250 mm、5 μm および 4.0×10 mm、5 μm を連結)

移動相：10 mM 1-ブタンスルホン酸、4mM テトラメチルアンモニウム、4mM マロン酸 (pH 3.0、硝酸)、0.5%メタノール

流速：1.0 mL/min、カラム温度：40°C、注入量：20 μL

〈ICP-MS 検出条件〉

高周波出力：1500 W、ネブライザガス流量：1.0 L/min、プラズマガス流量：17 L/min

3. 3 神栖市環境試料分析

汚染された地下水試料および米試料（可食部）の分析を行うことで、DPAA ばく露者尿試料中のヒ素化合物の由来を調べた。地下水試料はメンブレンフィルターを用いてろ過を行い測定試料とした。米試料は可食部を粉末化後、水/メタノール（5 : 5）で 80°C 水浴下 1 時間抽出し、抽出溶媒をロータリーエバポレータを用いて減圧下蒸発させた後、超純水に溶解しメンブレンフィルターを用いてろ過を行い測定試料とした。さらに米試料について、本分析法では分離されないヒ素化合物については既に確立されている分析法（3. 2 と同様）を用いて確認した。

3. 4 フェニルヒ素化合物投与マウス尿試料分析

DPAA ばく露者尿試料中のヒ素化合物についてその由来をさらに調べるために、マウス（4 週令、SPF/VAF Crij:CD1 (ICR)）に地下水汚染物質である DPAA、PAA および汚染米に含まれていた PMAA を 1 ヶ月間投与しその尿試料を分析した。ヒ素添加飼料は栄養補助食品（カロリーメイト）を粉末化し、小麦粉と混ぜた後、1mgAs/kg となるよう DPAA、PAA、PMAA のいずれかを添加し、攪拌後凍結乾燥し調製した。このように調製した飼料をマウスに 1 ヶ月間自由摂取させた後、尿を回収し、超純水により 3 倍希釈しメンブレンフィルターを用いてろ過を行い測定試料とした。

3. 5 DPAA と GSH の反応生成物ビスジフェニルアルシンオキシドの性質

DPAA と GSH との反応により、図 2 に示すように生成物として毒性の低い DPAA-GSH 抱合体（以下「DPA (GS)」）を経て強毒性の BDPAO が生じること、および GSH の量によりその毒性が変化することが平成 17 年度の報告（毒性研究班）に示された。

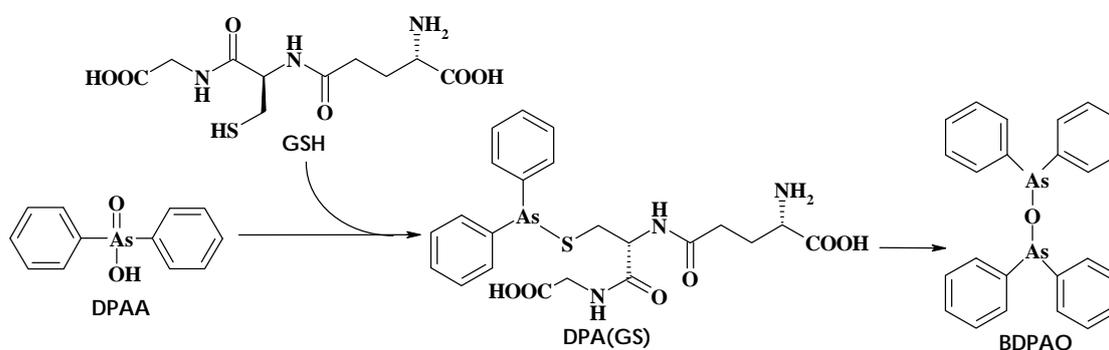


図 2 DPAA と GSH の反応略図

本研究報告では BDPAO について細胞毒性試験時の培養液中での挙動を調べることで、その性質を調べることにした。HepG2 細胞の培養にはダルベッコ変法イーグル培地に 10% のウシ胎児血清を添加した培養液にて行った。細胞は 25-mL フラスコで培養後、リン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄後、トリプシン様酵素 (TrypLE) を用いて細胞を剥がし分離した。その後、血球計算盤を用いて細胞数を計算し、最終的に 2×10^5 cells となるように培地を用いて希釈調整し、96 穴プレートに 100 μ L ずつ細胞を撒いた。1 日後、BDPAO を 1 μ M で添加し、1~12h 後、培養液を吸い取り、ヒ素化合物の分析を行った。比較のために、細胞非存在下の培養液における BDPAO の挙動も調べた。培養液中のヒ素化合物の挙動を調べるために HPLC および ICP-MS を用いて以下の分析条件を設定した。

〈HPLC 分離条件〉

カラム : Inertsil Diol (1.5 \times 150 mm、5 μ m)

移動相 : 0.1% ギ酸、20 mM SDS / アセトニトリル = 70 : 30

流速 : 0.1 mL/min、カラム温度 : 40°C、注入量 : 5 μ L

〈ICP-MS 検出条件〉

高周波出力 : 1600 W、ネブライザガス流量 : 0.9 L/min、プラズマガス流量 : 17 L/min

4 結果

4. 1 フェニルヒ素化合物の分析法

図 3 にフェニルヒ素化合物を分離したクロマトグラムを示す。クロマトグラムに見られるように TPAO を含めるとおよそ 11 分で分離が達成された。特に神栖市試料に関係する DPAA まで

では 8 分以内に分離が達成された。また、日本における無機ヒ素の環境基準値（水質）は 10 $\mu\text{g/L}$ 以下であるが、その 1 / 10 以下の濃度でも測定が可能であった。以上より、比較的迅速に低濃度試料の測定も可能となった。さらに、本分析手法においては海産物由来のヒ素化合物はクロマトグラムに示したようにフェニルヒ素化合物と分離が達成されたために、DPAA ばく露者尿試料分析にも適していると考えられた。

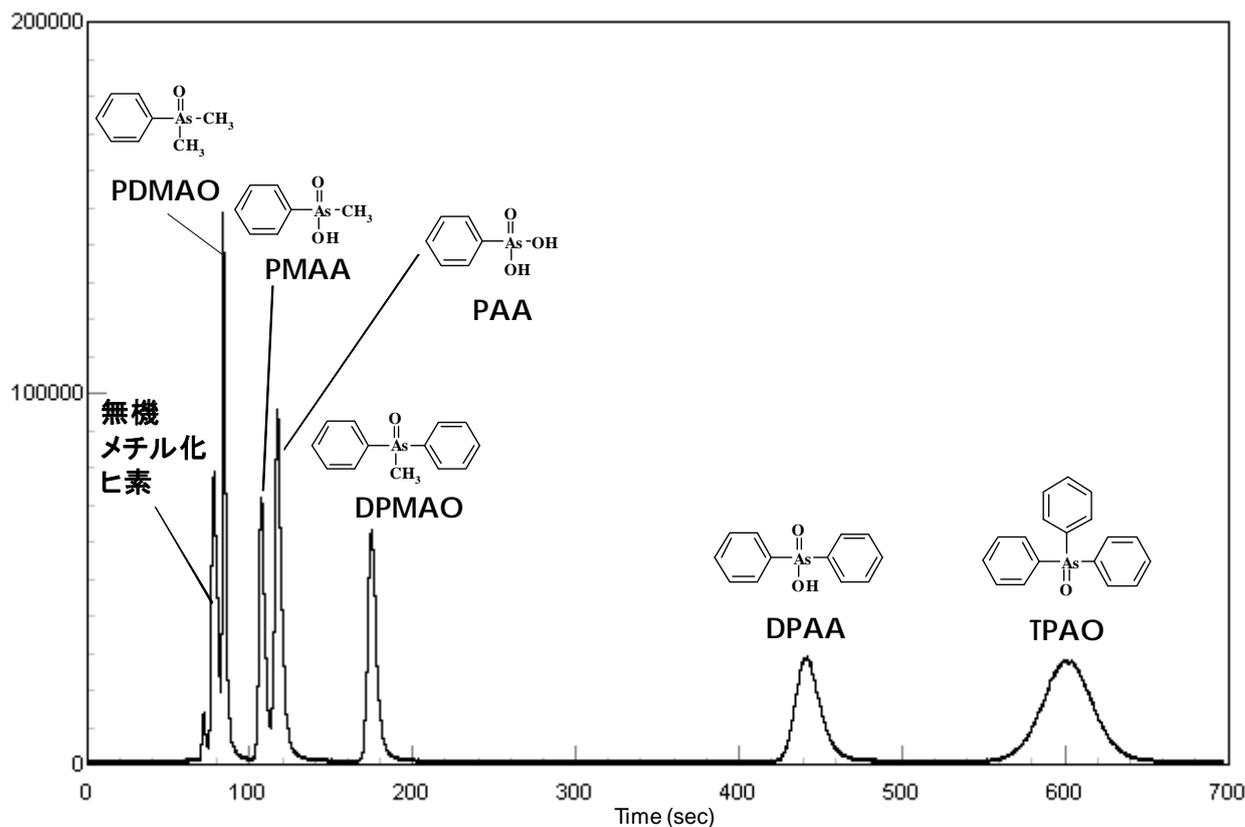


図3 HPLC/ICP-MS クロマトグラム (C4 カラム使用)

なお神栖市試料測定に関して、ヒ素化合物の誤認を防ぐために、上記 C4 カラムを用いた分析法に加え、分析結果の正確性を保つために、分離メカニズムの異なる分離手法（平成 18 年度研究報告に示した CHEMCOSORB 5CN-U カラムを用いる方法）により同一試料を測定した。

4. 2 神栖市 DPAA ばく露者尿試料

神栖市 DPAA ばく露者尿試料は 49 サンプルの分析が行われ、そのフェニルヒ素化合物の濃度は全く含まれないものから 100 ngAs/mL を超える高濃度の試料も存在した（DPAA 濃度：0～240 ngAs/mL 、PAA 濃度：0～14 ngAs/mL 、PMAA 濃度：0～180 ngAs/mL 、PDMAO 濃度：0～30 ngAs/mL ）。図 4 に分析例を示す。クロマトグラムに示したように、DPAA ばく露者尿中の主要フェニルヒ素化合物は DPAA および PMAA であった。また、既知のフェニルヒ素化合物以外に多数の未知ヒ素化合物が検出された。

次に、本分析法では分離されないヒ素化合物について HPLC 分離条件を変えた分析例を図 5 に示す。クロマトグラムに示されるように、分離されなかった成分にはアルセノベタインやジメチルアルシン酸が主な成分でありこれらは海産物摂取に由来すると考えられた。しかしながら、この分離されなかった成分においても未知ヒ素化合物が検出される試料も存在した。

以上に示したように、DPAA ばく露者尿試料中の主要フェニルヒ素化合物は DPAA および PMAA であり、その他に多くの未知ヒ素化合物が存在していた。

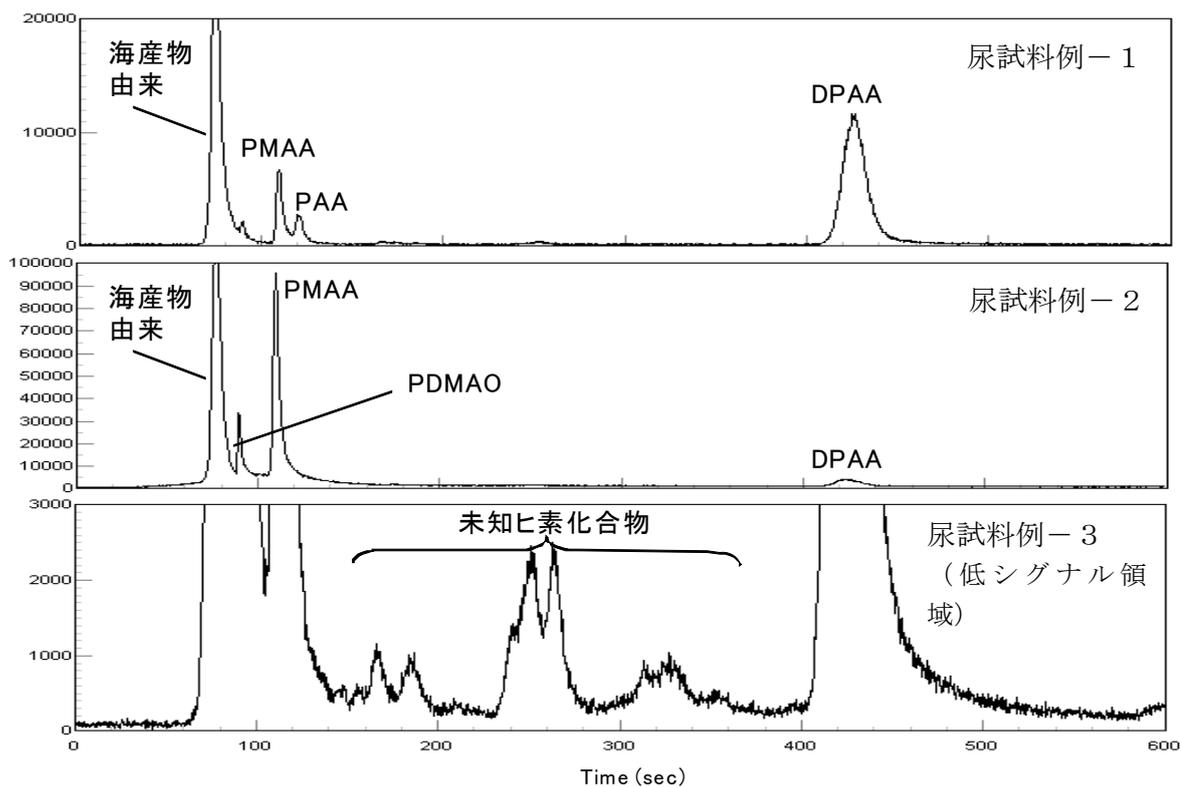


図4 DPAA ばく露者尿クロマトグラム (C4 カラム使用)

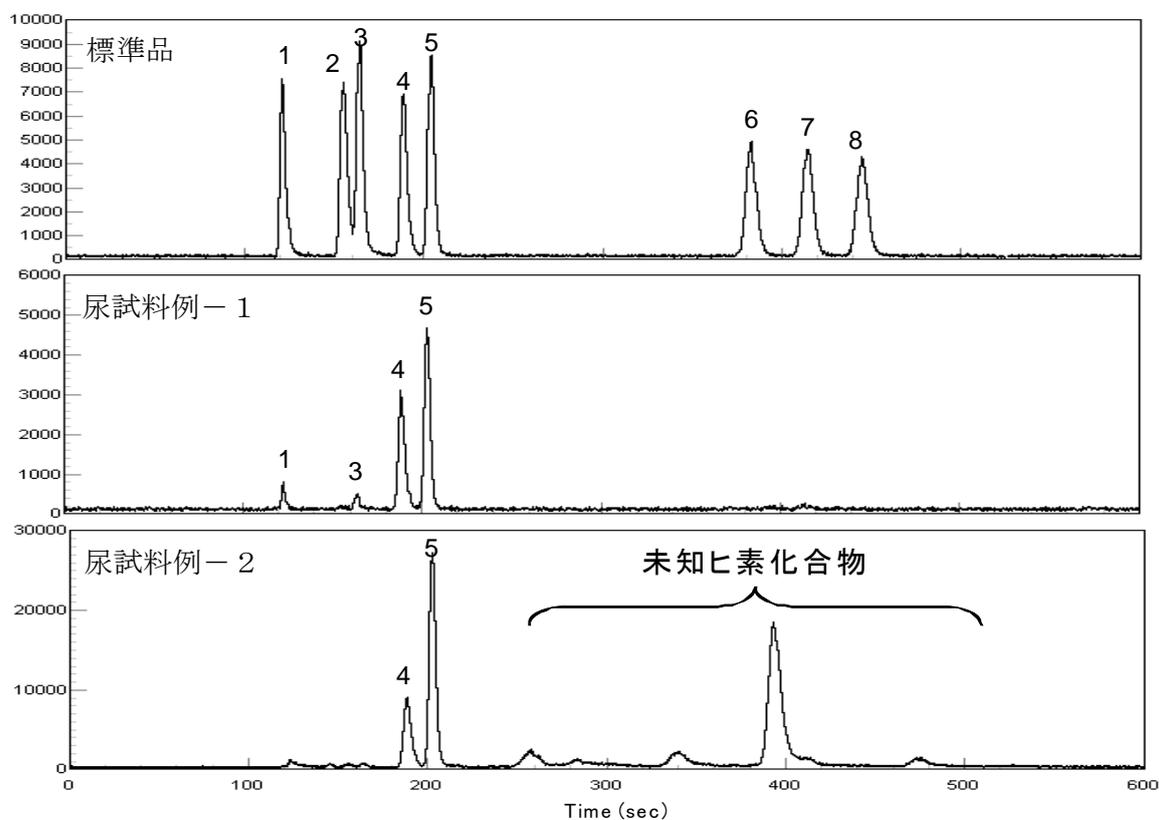


図5 DPAA ばく露者尿中ヒ素化合物 (分離カラム:CAPCELLPAK MG II)

1 : ヒ酸、2 : 亜ヒ酸、3 : メチルアルソン酸、4 : ジメチルアルシン酸、5 : アルセノベタイン、
6 : トリメチルアルシンオキシド、7 : テトラメチルアルソニウム、8 : アルセノコリン

4. 3 神栖市環境試料分析

地下水試料について分析例を図6に示す。クロマトグラムに示されたように、主要フェニルヒ素化合物はDPAAやPAAであった。さらに、微量ながら汚染地下水には数多くの未知ヒ素化合物が検出された。未知ヒ素化合物はフェニルヒ素化合物の汚染度が高いほど多く検出される傾向が見られた。しかしながら、その中にDPAAばく露者尿中未知ヒ素化合物と明らかな関連性を示す成分は認められなかった。

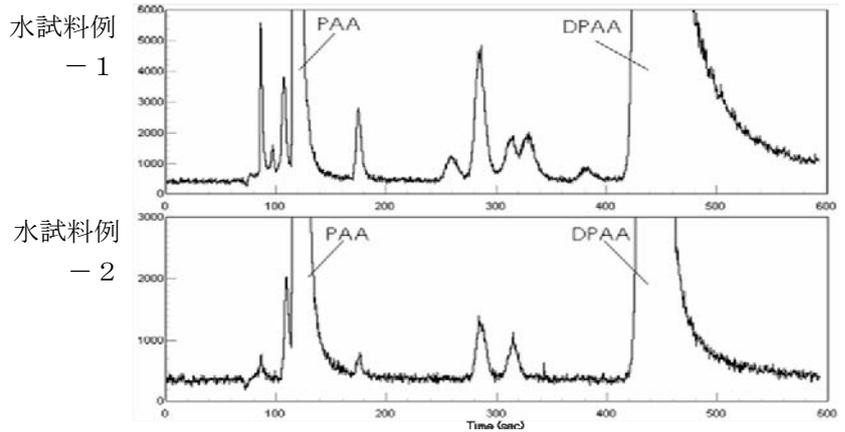


図6 地下水試料クロマトグラム（低シグナル領域拡大）

次に米試料について分析例を図7に示す。クロマトグラムに示したように、米試料中にはPMAAが高濃度に含まれており、その他にPDMAOやDPAA、また微量のDPMAOも検出された。また、分離されない成分も多量に含まれていた。さらにごく微量ながら未知成分のヒ素化合物が多く検出された。DPAAばく露者尿中にはこの米試料中の未知ヒ素化合物と類似した未知ヒ素化合物も検出されたものの、米試料中にはごく微量しか含まれなかったために、両者の関連性は低いと考えられた。次に分離されないヒ素化合物を分析した結果、図8に示されているようにその大半は無機態のヒ酸であり、その他はメチル化ヒ素であることが示された。

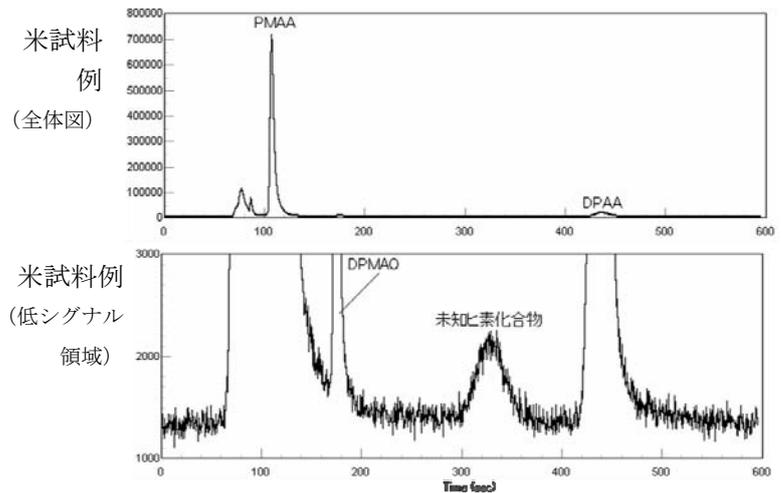


図7 米試料クロマトグラム

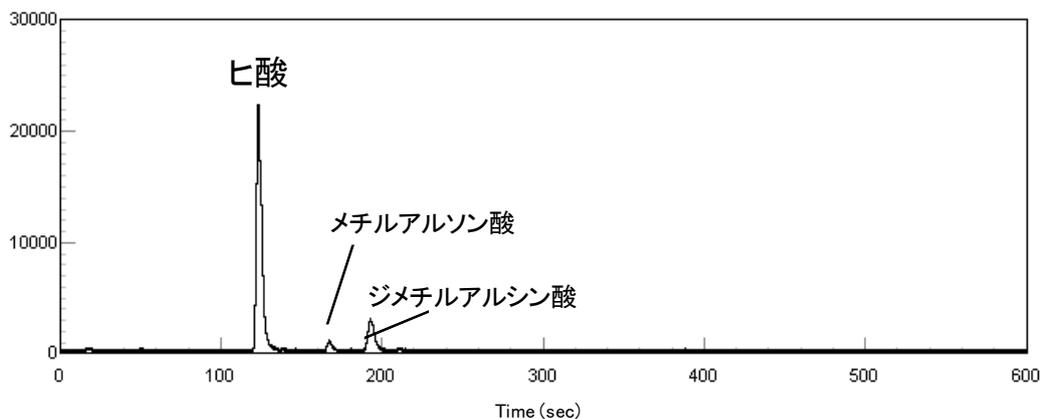


図8 米試料中無機-メチル化ヒ素化合物

4. 4 フェニルヒ素化合物マウス尿試料分析

図9にクロマトグラムを示す。投与された DPAA、PAA、PMAA はそれぞれ尿中の主要ヒ素化合物として排泄されており、尿中には代謝物は PAA および PMAA についてわずかなメチル化が見られる他は、ほとんど生じていないことが示された。また、微量な代謝ヒ素化合物についても DPAA ばく露者尿中の未知ヒ素化合物と一致することはなかった。

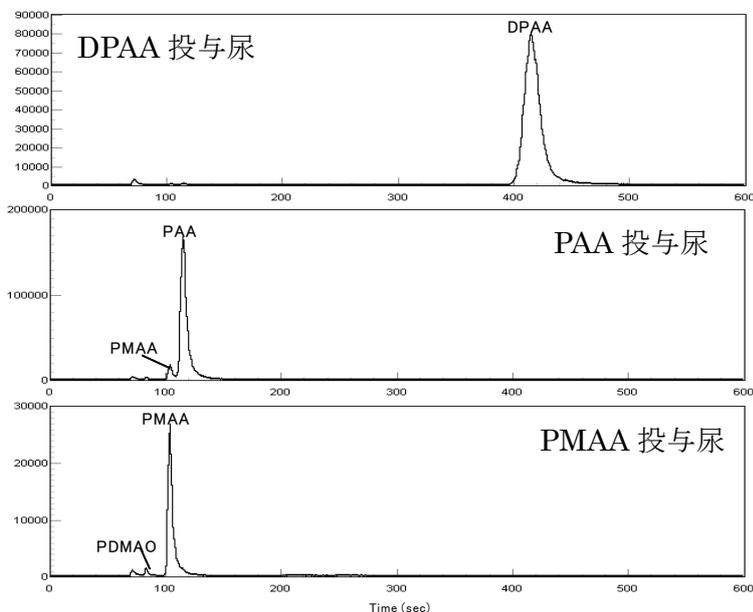


図9
ヒ素投与マウス尿クロマトグラム

4. 5 BDPAO の性質

平成17年度の研究報告の中で DPAA と GSH の反応生成物である BDPAO の Hep G2 における細胞毒性は図10に示されているように DPAA に比べ、はるかに高いことが示された。この BDPAO について細胞試験時の培養液中における挙動を調べたところ、図11のように培養液に添加するとその大部分は培養液中の血清タンパク質へ結合し、時間経過と共に、培養液中に存在するヒ素化合物の中で BDPAO のみが徐々に減少していることが示された。また培養液に添加する血清の量を変化させると、血清量の増加に応じて細胞毒性が減少した。このことからタンパク質へ結合していない遊離状態の BDPAO が細胞に作用していることが示唆され、遊離状態の BDPAO の細胞毒性は極めて高いことが示唆された。

なお様々なヒ素化合物の中で、このタンパク質への結合は DPAA および PMAA と GSH が反応する際に顕著であり、毒性の高い3種の形態である亜ヒ酸やフェニルアルシンオキドでは結合はあまり見られなかった。

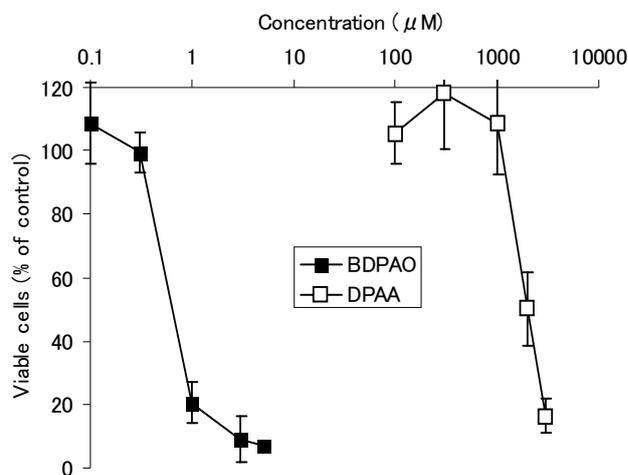


図10 DPAA、BDPAO の細胞毒性

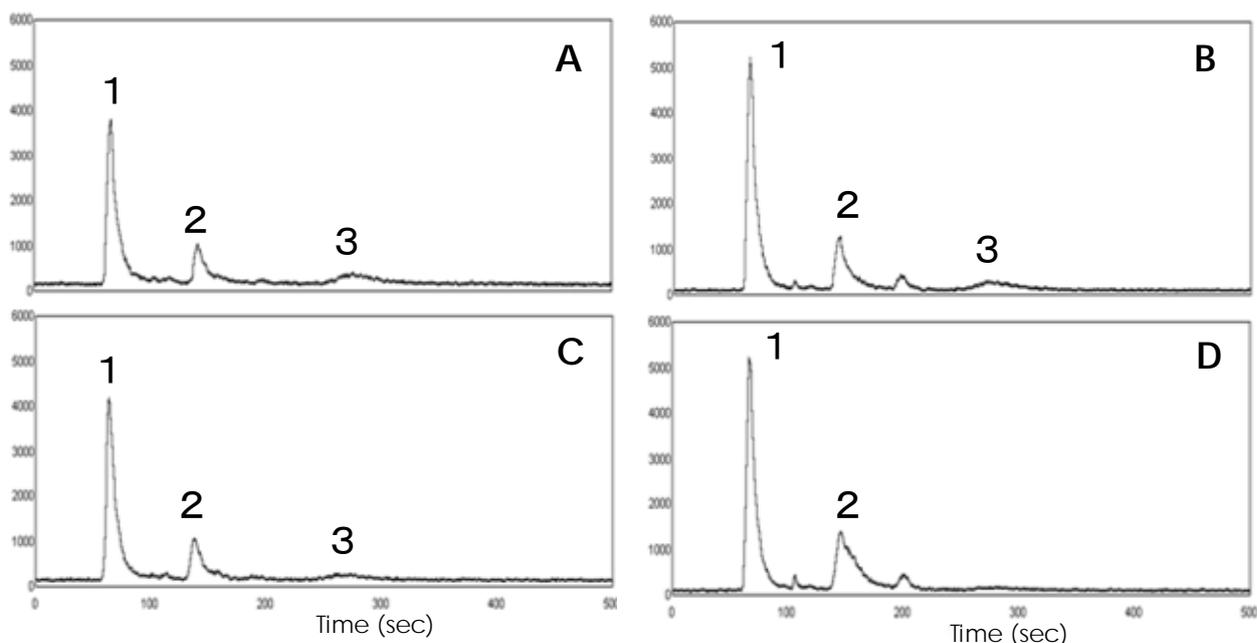


図 1.1 BDPAO の培養液中の挙動

A : 細胞無 / 1 時間後、B : 細胞有 / 1 時間後、C : 細胞無 / 12 時間後、D : 細胞有 / 12 時間後

1 : 血清タンパク質-ヒ素結合体、2 : DPAA、3 : BDPAO

5 考 察

ICP-MS 検出を行うことで新たな未知ヒ素化合物の存在を確認できることは、本分析法の利点の一つであり、神栖市で採取された試料中には未知ヒ素化合物が多く存在していることが示された。未知ヒ素化合物の毒性は不明ではあるものの、一般にヒ素化合物はその化学形態により毒性が大きく変化することが知られており、無視することはできないと考えられた。また、DPAA ばく露者尿中未知ヒ素化合物の由来は本研究結果からは断定することはできないものの、マウス尿中代謝物が微量であることや「DPAA の毒性試験報告書 (p.57)」における DPAA は薬物代謝酵素系に影響を及ぼさないという報告から、体内における既知のフェニルヒ素化合物の代謝ではなく外部から摂取したもの、もしくはその代謝物である可能性が高いと考えられた。

また、図 7 に示されるように米試料には PMAA の他にその 50% 近い面積を有する分離されないヒ素化合物のピークが存在し、その大半はヒ酸であった。分析したどの米試料にもこのピークは含まれており、PMAA の 3~5 割程度の面積を有していた。PMAA の濃度は 720~1400 $\mu\text{gAs/kg}$ であったため、米中無機ヒ素は 220~700 $\mu\text{gAs/kg}$ 程度であることが推測された。文献¹⁾によると、認証標準試料に用いられる米中の総ヒ素量は 0.280~0.290 $\mu\text{g/kg}$ 程度であり、無機ヒ素汚染地域であるバングラデシュ産の米中の総ヒ素量は 80~1800 $\mu\text{g/kg}$ であることから、神栖産の米試料は比較的高い濃度の無機ヒ素にも汚染されていたことが示唆された。この高い濃度の無機ヒ素の由来は米組織におけるフェニルヒ素の無機化ではなく無機ヒ素の取り込みの可能性が強いと考えられ、このことは水田土壌におけるフェニルヒ素の無機化を示唆している。これは DPAA が *Kytococcus sedentarius* strain NK0508 により無機化されるという報告²⁾からも支持される。我々は平成 18 年度までの研究報告において、土壌微生物により PMAA、PDMAO、DPMAO といったメチル化フェニルヒ素化合物が生じることを示したが、水田土壌ではより多様な化学変化が生じていたことが示された。さらに、無機ヒ素では土壌微生物によりメチル化だけでなく揮発性化合物の生成も伴うことも示されていること³⁾や、PAA や PMAA から *Candida humicola* によって揮発性のフェニルジメチルアルシンが生じるという報告⁴⁾ から、土壌微生物によるメチル化が進むことにより PDMAO や DPMAO の一部が揮発性化合物に変化している可能性も推測された。

BDPAO は細胞試験において、培養液に添加された内の一部のみが細胞に作用し遊離状態のBDPAOの細胞毒性は極めて高いことが示唆された。この結果から、同じく3価のフェニルヒ素化合物であるフェニルアルシンオキシドについて、報告書「有機ヒ素化合物の細胞毒性試験の結果について」においてその細胞毒性が高い原因として、血清への結合能の低さと関係していることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Alex Heikens, Golam M. Panaullah, and Andy A. Meharg : Arsenic Behavior from Groundwater and Soil to Crops: Impacts on Agriculture and Food Safety, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **189**, pp.43-87, 2007
- 2) Nakamiya, Kunichika, Nakayama, Takashi, Ito, Hiroyasu, Edmonds, John S., Shibata, Yasuyuki, Morita, Masatoshi : Degradation of arylarsenic compounds by microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, **274** (2), pp.184-188, 2007
- 3) Willian R. Cullen and Kenneth J. Reimer : Arsenic Speciation in the Environment, *Chemical Reviews*, **89**, pp.713-764, 1989
- 4) Willian R. Cullen, Ann E. Erdman, Barry C. McBride and A. Wendy Pickett : The identification of dimethylphenylarsine as a microbial metabolite using a simple method of chemofocusing, *Journal of Microbiological Methods*, **1**, pp.297-303, 1983

[2. 3] 汚染土壌分析用精度管理試料の作成と評価

主任研究者：吉永 淳（東京大学新領域創成科学研究科 准教授）

1 概 要

2003年3月の茨城県神栖市でのDPAAによる健康影響の顕在化によって、それまで未知であったDPAAの毒性、環境動態、さらには地域住民のばく露評価、疫学などの調査研究が一斉にスタートした。さらにはDPAAの分解代謝産物と考えられる各種有機ヒ素化合物（モノフェニルアルソン酸、MPAA；フェニルメチルアルシン酸、PMAAなど）も環境中から検出されるようになった。こうした状況の中で、DPAAをはじめとする各種有機ヒ素化合物分析は、あらゆる調査研究のもっとも基礎をなすものであるが、そうした分析の結果として得られる分析値は信頼性の高いものであることが必要であることは言うまでもない。

しかしながら、これまでに行われた各種の汚染物質に関する環境・生体分析のなかで、不正確な分析値が横行してしまった例は枚挙にいとまがなく、適切な方法で信頼性が確保されていない環境・生体分析はいまや許されない。分析の信頼性確保にはいくつかの方法があるが、もっとも効率的・現実的なのは、認証標準物質（certified reference material, CRM）を使用した方法である。CRMは、実際に分析する試料と同様の主成分組成を持ち、かつそこに含まれる分析対象成分濃度が既知（認証値）であるような試料である。実試料を分析する際に、CRMも同様に前処理および測定し、その測定値と認証値とが与えられた不確かさの範囲内で一致することを確認することで、実試料分析の信頼性を担保する。

DPAA関連有機ヒ素化合物分析はまだ広く一般に行われていないために、こうしたCRMがまだ整備されていない。一方で、これら有機ヒ素化合物については、その分析値が社会的にも非常に大きな影響力を持つ可能性があり、そのためにも分析値の信頼性を評価する手だてが必要不可欠である。

2 目 的

本研究では、各種 DPAA 関連有機ヒ素化合物の環境を念頭におき、その分析値の信頼性担保のための材料として、汚染地域で見いだされた水田土壌試料をもとに精度管理用試料を作製することを目的とした。

3 方 法

【作製方法】

茨城県神栖地域の水田土壌で、予備分析により、ジフェニルアルシン酸（DPAA）、フェニルメチルアルシン酸（PMAA）等有機ヒ素が検出されたものを原材料とした。

原材料とした水田土壌 34 kg は、室温で恒量となるまで風乾し、小石や草の根などのような異物を取り除いて約 29 kg の風乾土壌試料を得た。それを順次開き目 2mm および 150 μm のプラスチック製ふるいにかけて、150 μm を通過した約 9.1 kg を国立環境研究所の V 型混合機（30 回転/分）を利用して 2 時間混合した。混合後、約 45 g ずつを 200 本の褐色瓶に分注した（図 1,2）。この段階での水分含量（105℃、2 時間乾燥）は 5.9%であった。

4 結 果

【均一性評価】

作製した 200 本の瓶から 4 本を無作為に抽出し、各瓶から 300 mg ずつ 4 サブサンプルをと

って、テフロンビーカーと硝酸・過塩素酸・フッ化水素酸による開放分解をおこなった（4 サブサンプル×4 瓶=16 サンプル）。分解液中の Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Ti, V, Zn 濃度を ICP 発光法により測定した。また酸分解した溶液を一部（10g）とり、硫酸 0.5mL を加えてさらに 300℃で分解し、難分解性の有機ヒ素化合物を完全無機化して、ICP 質量分析法で総 As 濃度測定を行った。これらの結果を一元配置分散分析によって解析した。その結果、S を除くすべての元素濃度の瓶間変動は有意ではなく、作製した 200 本はどれをとっても均一な試料であるとみなすことができた（表 1）。S に見られた瓶間不均一性は偶然である可能性が高い。また Ti の瓶内変動（3.2%）は、濃度レベルからみてやや大きく、Ti には瓶内に不均一性があることが示唆された。この試料は DPAA 等有機ヒ素分析用であるので、S や Ti に見られたわずかな瓶間、瓶内不均一性は問題にはならない。



図1 作製した水田土壌試料



図2 水田土壌試料（200本）保管状況

表1 作製した玄米粉末の均一性試験結果（元素濃度は乾燥重量あたり）

	Al (%)	Ba (mg/kg)	Ca (%)	Cu (mg/kg)	Fe (%)	K (%)	Mg (%)	Mn (mg/kg)
平均値	8.93	326	1.90	25.7	5.26	1.08	1.14	977
SD	0.08	3	0.02	0.4	0.05	0.01	0.01	9
CV %	0.9	0.8	1.1	1.4	0.9	0.9	1.1	0.9
瓶間 CV%	0.2	0.3	1.4	1.5	0.7	0.7	1.6	1.1
瓶内 CV%	1.0	0.9	1.0	1.4	1.0	0.9	1.0	0.8
F 値	0.032	0.081	2.016	1.229	0.456	0.631	2.721	1.762
有意性	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

	Na (%)	Ni (mg/kg)	P (mg/kg)	S (mg/kg)	Sr (mg/kg)	Ti (%)	V (mg/kg)	Zn (mg/kg)
平均値	1.35	18.7	760	378	176	0.446	168	101
SD	0.01	0.6	15	9	1	0.015	2	1
CV %	0.9	3.3	1.9	2.5	0.8	3.4	1.4	0.6
瓶間 CV%	1.1	2.3	0.7	4.2	0.8	2.0	1.0	0.4
瓶内 CV%	0.9	3.5	2.2	1.8	0.8	3.7	1.5	0.6
F 値	1.319	0.418	0.102	5.440	0.948	0.324	0.476	0.404
有意性	NS	NS	NS	P<0.05	NS	NS	NS	NS

	As (mg/kg)
平均値	11.6
SD	0.2
CV %	2.0
瓶間 CV%	2.0
瓶内 CV%	2.1
F 値	0.922
有意性	NS

NS: 瓶間の変動は瓶内変動に比較して有意に大きくない、つまり瓶間で均一であることを表す。

5 考 察

【作成した水田土壌試料の元素組成】

表 1 より、作成した水田土壌試料の元素組成は、わが国の汚染のない土壌のそれと比べるとかなり類似したものであり、有機ヒ素以外の重金属類汚染のない土壌であると考えられた。総 As 濃度も 11 mg/kg であるが、わが国の非汚染土壌の代表的な濃度は 6.82 mg/kg といわれているので（日本土壌協会、1984）、やや汚染があると見なされる濃度であった。

【有機ヒ素濃度の共同分析】

均一性のある水田土壌試料の作製が完了したので、次のステップはこの試料中の DPAA、PMAA 等有機ヒ素濃度の参照値の策定である。有機ヒ素の分析に当たり土壌の総含有量を求めるか溶出量を求めるか、溶出量の場合どの溶出法にするか、などにより求まる値が異なってくる。

現時点では土壌→地下水汚染、あるいは土壌→作物汚染のルートの評価法である環境庁告示第 46 号（水抽出）および土壌の非意図的摂取による人体影響の評価法である環境省告示第 19 号（1M 塩酸による抽出）を採用する予定である。現在これら抽出法による共同分析を行っているところである。