平成２３年度

環境研究総合推進費補助金　研究事業

総合研究報告書

ヒ素の無毒化法とレアメタルのリサイクル技術の開発

K2102, K22087, K2334

平成２４年３月

日本板硝子株式会社　中村浩一郎

補助事業名	平成２３年度環境研究総合推進費補助金研究事業（平成２１年度～平成２３年度）
所　　管	環境省
国庫補助金	57,274,000 円
研究課題名	ヒ素の無毒化法とレアメタルのリサイクル技術の開発
研究期間	平成２１年４月１日～平成２４年３月３１日
研究代表者名	中村浩一郎（日本板硝子株式会社）
研究分担者名	山内　博　（北里大学）

目　次

	頁
総合研究報告概要	1
第１章　ヒ素の無毒化処理法の効率と経済性向上	7
１．はじめに	7
２．ヒ素無毒化法	7
３．バイオミメティック触媒システム	10
４．バイオインスパイアード触媒システム	23
５．酸化チタン光触媒システム	179
６．ヒ素無毒化処理の応用	196
７．結論	202
第２章　レアメタルのリサイクル技術の開発	207
１．はじめに	207
２．白色 LED の分析	208
３．太陽電池（GaAs）の Ga のリサイクル	218
４．GaAs 半導体廃棄物の Ga のリサイクル	230
５．液晶パネルの ITO ガラスからインジウムのリサイクル	231
第３章　安全性試験	238
１．アルセノベタイン	238
1.1.　急性経口毒性試験	238
1.2.　急性眼刺激性／腐食性試験	240
1.3.　急性皮膚刺激性／腐食性試験	252
２．トリメチルアルシンオキシド	260
2.1.　急性経口毒性試験	260
2.2.　急性眼刺激性／腐食性試験	261
2.3.　急性皮膚刺激性／腐食性試験	265
３．文献	267
４．細胞毒性試験	268
第４章　安定性試験	284
１．安定性試験	284
２．海洋投棄モデル試験	287
第５章　無機ヒ素のオンサイト簡易光学モニター	289
研究発表	291
知的財産権の取得状況	295

研究報告概要

ヒ素の無毒化法とレアメタルのリサイクル技術の開発（K2334）

研究代表者　中村　浩一郎（日本板硝子株式会社　研究開発部）
研究分担者　　山内　博（北里大学　医療衛生学部）

研究目的=

我々は、発ガン性、急性・慢性毒性物質である無機ヒ素を無毒化処理する簡易的な合成技術を開発した。この新たなヒ素廃棄技術は注目され、日本学術会議による「提言」として報告された。Ⅲ－Ⅴ族化合物半導体(GaAs 他)は我が国が世界供給の中核をなし、今後、大きな市場が予想されている。我が国は、希少金属であるガリウム(Ga)、インジウム(In)の安定供給に困窮している。国家備蓄鉱種に指定されている Ga、In は、リサイクルする必要がある。一方、GaAs 半導体のリサイクルの処理について、アルシンガス中毒の事例が、依然として報告されている。我々は、ヒ素の無毒化処理技術は、希少金属の回収に対して有効な支援技術と考える。本研究については、効率、経済性に優れたヒ素の無毒化処理技術とレアメタルのリサイクル技術を開発することを目的とする。また、プロセスのコストダウン、無毒化ヒ素の自然還元に関する検討を行う。

研究方法=

１．ヒ素の無毒化法の効率と経済性向上

ヒ素化合物の毒性は、酸化状態、メチル化の程度に強く依存する。酸化状態については、５価が３価よりも毒性が低く、メチル基の数が増えるにつれて毒性は小さくなる。魚介類に豊富に存在するアルセノベタイン(AsB)の急性毒性値は、三酸化二ヒ素[iAs(Ⅲ)]に比べて約 1/300 であり、国際的に無毒のヒ素として理解されている。無機ヒ素[iAs(Ⅲ)]を AsB に変換する系として、（１）バイオミメティックシステム、（２）バイオインスパイアード触媒システム、（３）酸化チタン光触媒システムを開発する。

（１）バイオミメティックシステム

ビタミンB_{12}をメチル基供与酵素モデル、システイン(Cys)を還元酵素モデルとして用い、無機ヒ素が定量的にトリメチルアルシンオキシド(TMAO)に変換され、引き続き、ヨード酢酸と Cys で処理することにより、定量的に AsB を得る。

（２）バイオインスパイアード触媒システム

ビタミンB_{12}、酸化チタン、メチル基供与体（XCH_3）で構成し、ヒ素へのメチル基転移反応について、触媒サイクルを発現することを実証する。

（３）酸化チタン光触媒システム

ビタミンB_{12}、アミノ酸を必要としない究極の低コストプロセスを開発する。酸化チタンの光触媒作用により、酢酸存在下、無機ヒ素からアルセノベタイン(AsB)を直接合成する条件を明確にす

る。様々なヒ素化合物（無機ヒ素、有機ヒ素）に対する適用可能性を評価する。様々な廃棄物、排水のヒ素処理に適用できることを明らかにする。水銀、鉛、錫に対するメチル化能を評価する。

２．GaAs 半導体の Ga リサイクルとヒ素無毒化

GaAs 半導体の Ga リサイクルとヒ素無毒化について、GaAs 半導体を酸に溶解して得られるヒ酸イオンとガリウムイオンの溶液に、セリウム系ヒ素選択吸着剤を作用させて、Ga を回収するプロセスとセリウム系のヒ素選択吸着剤を使用しない Ga リサイクルシステムを開発する。吸着された無機ヒ素は、吸着剤から脱離させ、無毒化システムで AsB に変換し単離する。さらに、酸溶解したヒ酸イオンとガリウムイオンの溶液を直接無毒化処理することにより、iAs を AsB に変換し、Ga と AsB を分離するプロセスについても実証する。

３．安全性試験

毒物劇物取締法により AsB は毒物に指定されている。AsB を毒物指定解除することにより、AsB の取り扱い、保管について、過剰な設備が不要となる。また、AsB の自然還元が可能となれば、最終処分場を不要とする処理法を提案することができる。これまで毒物指定解除されているヒ素化合物には、ヒ化インジウム、ヒ化ガリウム、メタンアルソン酸塩等がある。AsB の安全性試験を実施して、毒物劇物判定基準に該当しない結果を示すことにより、AsB の毒物指定解除が近い将来に可能となるとみられる。AsB を毒物指定解除するためには、急性毒性試験（経口、経皮、吸入）、皮膚刺激、眼刺激試験を実施する必要がある。また、厚生労働省の担当部署からの情報により、OECD、GLP に準拠した研究機関でのデータが必要である。AsB の安全性試験については、これまで、文献により経口急性毒性値[LD_{50} 10,000mg/kg]が報告されているが、OECD、GLP に準拠してはいない。昨年の本研究については、皮膚刺激、眼刺激試験について、AsB は安全な化合物であり、毒物、劇物には該当しないことを明らかにした。本年度は、AsB の急性毒性試験（経口、経皮、吸入）を、OECD、GLP に準拠した研究機関で実施し、毒物指定解除に必要なデータを獲得する。また、ヒ素無毒化の副生成物、中間体物質である TMAO についても同様の検討を行う。

４．安定性試験

無毒化品である AsB の最終処分については、隔離保存と自然還元の二つの方法がある。AsB が毒物指定解除されることにより、AsB の取り扱い、保存について過剰な設備、管理が不要となる。一方、AsB は自然界では海洋生物の食物連鎖によって生合成され、海洋生物の体内に濃縮蓄積され、自然に回帰する。人工合成 AsB も生物合成 AsB と同様に、自然還元、つまり海洋投棄が可能になれば、最終処分場を必要としない究極の低コストのヒ素の処理法が提案できる。今年度は、AsB の自然環境での安定性試験を行い、海洋投棄の可能性を検討する。具体的には、海水中での安定性試験、拡散実験を行い海洋投棄を可能とする条件を明らかにする。また、AsB 合成の副生成物、中間体化合物である TMAO についても同様の検討を行う。

結果と考察=

１．ヒ素の無毒化法の効率と経済性向上

無機ヒ素[iAs(Ⅲ)]を AsB に変換する系として、（１）バイオミメティックシステム、（２）バイオインスパイアード触媒システム、（３）酸化チタン光触媒システムを開発した。

（１）バイオミメティックシステム

ビタミンB_{12}をメチル基供与酵素モデル、システイン(Cys)を還元酵素モデルとして用い、無機ヒ素が定量的にトリメチルアルシンオキシド(TMAO)に変換され、引き続き、ヨード酢酸と Cys で処理することにより、定量的に AsB を得た。反応は、温和な水溶液中で定量的に進行し、有機溶媒を必要としない。固体や高濃度のヒ素化合物の溶液に適用され、GaAs 半導体、ヒ素化学兵器などに由来する無機ヒ素を AsB として単離することに成功した。

（２）バイオインスパイアード触媒システム

ビタミンB_{12}、酸化チタン、メチル基供与体（XCH_3）で構成し、ヒ素へのメチル基転移反応について、触媒サイクル［ターンオーバー数（B_{12}基準）：＞150 回］を発現することに成功した。

（３）酸化チタン光触媒システム

酸化チタンと酢酸存在下、光照射により無機ヒ素化合物[亜ヒ酸:iAs(Ⅲ)、ヒ酸:iAs(V)]、有機ヒ素化合物[モノメチルアルソン酸：MMA、ジメチルアルシン酸：DMA]など様々なヒ素化合物（50ppm）が 1 段階で無毒のアルセノベタイン(AsB)に変換された。また、酸化チタンは吸着剤としても機能する。酸化チタンは毒性の高い無機ヒ素に対しては吸着能が高く、毒性の低い AsB、TMAO については、吸着能は小さい。従って、毒性の高い無機ヒ素を吸着濃縮し、光触媒反応により AsB に変換した後、酸化チタン表面から溶液中に AsB として脱離する。これにより、酸化チタンのリサイクルが容易になる。酸化チタンと酢酸による無毒化システムは、低濃度のヒ素含有産業廃液、自然界のヒ素汚染地下水等に対して適用できる。スケールアップの無毒化装置を試作して、実証試験についても実施した。更に重要な点は、酸化チタン、酢酸による無毒化システムについては、水銀、鉛、錫に対するメチル化能は認められない。水銀、鉛、錫のメチル化体は、無機体よりも毒性が高い。ヒ素がメチル化される条件で、水銀、鉛、錫（50ppb）のメチル化体の生成は、高速液体クロマトグラフ法－誘導結合プラズマ質量分析法（HPLC-ICP-MS 法）やガスクロマトグラフ法－電子捕獲型検出法（GC－ECD 法）などの分析法で認められなかった。本無毒化処理システムは、酸化チタン、酢酸と水を使用し、有害な副生成物を生成しない、ヒト、環境に対して安全な無毒化処理法であるといえる。

２．GaAs 半導体の Ga リサイクルとヒ素無毒化

GaAs 半導体製造メーカから提供された GaAs 半導体のプロセス廃棄物（脱水ケーキ）について、無毒化処理システムにより AsB が合成できることを確認した。ヒ素のメチル化が進行する条件で、Ga のメチル化は進行しなかった。また、諸種の pH に調整した水溶液に対する Ga とヒ素の溶出試験を実施したところ、中性から高 pH について、ヒ素のみを選択的に溶出させる条件があることを見出した。従って、セリウム系ヒ素選択吸着剤、シリカゲルやイオン交換樹脂等を使用しない Ga リサイクルシステムを構築することが可能である。

３．安全性試験

OECD、GLP に準拠した条件で、AsB と TMAO の急性毒性試験（経口）を実施した。6 匹のラットに 2000mg/kg の AsB または TMAO を投与した。具体的には、生理的食塩水（0.9%)に AsB を溶解(0.2g/mL）し、投与(10mL/kg）した。2 週間観察したところ死亡はなく、毒性の所見は認められなかった。毒物劇物取締法では、毒物は、LD_{50} 値が 50mg/kg 以下、劇物は、300mg/kg 以下と規定されている。今回の結果(LD_{50} >2000mg/kg）により、AsB、TMAO は毒物、劇物のいずれにも該当しないことが明らかになった。また、TMAO の眼刺激/腐食試験、皮膚刺激/腐食試験を実施したところ、いずれも刺激性は観察されなかった。従って、TMAO は毒物、劇物のいずれにも該当しないことが明らかである。これまで毒物指定解除されているヒ素化合物には、ヒ化インジウム、ヒ化ガリウム、メタンアルソン酸塩等がある。AsB の安全性試験を実施して、毒物劇物判定基準に該当しない結果を示すことにより、AsB の毒物指定解除が近い将来に可能となるとみられる。

４．安定性試験

無毒化ヒ素 AsB、TMAO の安定性試験（100ppm）により、海水中、20℃で 3 ヶ月間以上安定に存在した。海洋投棄モデルとして AsB の海水中での拡散希釈挙動を調べたところ、24 時間以内に海水中に元来存在するヒ素濃度（2ppb）に到達し、その２ヶ月以上安定に存在した。無機ヒ素は、海洋生物による生物学的メチル化反応を受け、食物連鎖により AsB として魚介類の体内に生物濃縮、蓄積される。従って、元来、海水中には AsB は存在しないことから、AsB を海洋投棄した場合、AsB は速やかに拡散、希釈され、無機ヒ素濃度（2ppb）に到達した後、更に希釈され、無機ヒ素濃度よりも著しく低い濃度にまで低下する。安全性試験により、AsB は毒物、劇物に該当しない。さらに、海水中には元来 AsB は存在しないことから、海水中の無機ヒ素濃度よりもはるかに低濃度まで AsB は希釈される。AsB の海洋投棄による自然界への影響は著しく小さく、影響はないレベルでの海洋投棄が可能であると推定される。

５．無機ヒ素のオンサイト簡易光学モニター

AsB 中に存在する不純物の無機ヒ素を、高価な分析装置（HPLC-ICP-MS、LC-MS 等）を用いないで、簡易にオンサイトでモニターするニーズがある。AsB を隔離保管する場合や、海洋投棄する場合に、無機ヒ素を簡便な方法で検出する必要があるからである。ヒ酸の比色検出法として、モリブデンブルー法が知られている。ヒ酸[iAs(V)]、AsB、TMAO に対して、モリブデンブルー法を適用したところ、ヒ酸に対してのみ青色の発色が認められた。AsB、TMAO に対しては、発色は全く見られなかった。また検出限界は、1ppb 程度であり、ヒ素の排水基準値（100ppb)、環境基準値（10ppb）に対して充分に適応できることが明らかである。以上の結果により、モリブデンブルー法により、AsB に含まれる無機ヒ素[iAs(V)]を高選択、高感度で検出できるオンサイト光学モニタリングの原理確認ができた。高価な分析機器を使用せずに、隔離保存や海洋投棄の場合に、AsB、TMAO に含まれる無機ヒ素を選択的に高感度で、オンサイトで検出できる。

結論=

酸化チタン光触媒、酢酸の存在下、光照射により、無機ヒ素はアルセノベタイン（AsB）に変換された。モノメチルヒ素、カコジル酸（ジメチルヒ素）などの有機ヒ素も AsB に無毒化された。これらは、農薬として使われ土壌汚染の問題があり、土壌浄化への応用も期待される。GaAs 半導体の製造プロセスの廃棄物から、水溶液によりヒ素のみを選択抽出する条件を明らかにした。GaAs 半導体廃棄物のヒ素も AsB に変換された。無毒化ヒ素 AsB、TMAO の安定性試験により、海水中、20℃で 3 ヶ月以上安定に存在した。海洋投棄モデルとして AsB の海水中での挙動を調べたところ、24 時間以内に海水中に元来存在するヒ素濃度（2ppb）に到達し、その後、安定に存在した。また、AsB から無機ヒ素を区別して検出する簡便なオンサイト光学的モニター手法を開発した。究極の低コストプロセスの確立と無毒化ヒ素の海洋投棄が可能な条件を提案することができた。

英語概要

・研究課題名：Development of Arsenic Detoxification Method and Rare-Metal Recycling Technique

・研究代表者名及び所属：Koichiro Nakamura（R ＆ D Dept., Nippon Sheet Glass Co., Ltd.）

・研究分担者名及び所属：Hiroshi Yamauchi （School of Allied Health Sciences, Kitasato University）

・要旨

We have developed a simple technique for the detoxification of inorganic arsenic (iAs) by using TiO_2 photocatalyst and acetic acid, transforming iAs into non-toxic arsenobetaine (AsB) under mild aqueous conditions. This system doesn't produce methylated species of mercury, lead or tin; those are more toxic than their inorganic counterparts. This system is safe and environment-friendly because no organic solvents are required and no harmful byproducts are produced. Safety tests demonstrated that AsB should not be categorized as a toxic compound by animal experiments in line with laws and regulations. Diffusion and stability tests confirmed that AsB was diluted to the level at the concentration of inorganic arsenic (2 ppb) in the seawater and stable for more than three months. These results suggest that the ocean disposal of AsB is feasible because no significant effects on the natural environment are expected to occur. An optical on-site monitoring system allowed to detect only inorganic arsenic in the water containing gallium, AsB and other methylated arsenic with high selectivity and high sensitivity. The arsenic detoxification system is effective for rare-metal recovery, including Ga recycling from III-V compound semiconductors, as well as the treatment of inorganic arsenic of abandoned chemical weapons and arsenic contaminated drinking water.

・キーワード

Arsenic Detoxification, Rare-Metal Recycle, Gallium Arsenide, TiO_2 photocatalyst, Arsenobetaine

第１章　ヒ素の無毒化処理法の効率と経済性向上

1. はじめに

２１世紀の科学技術に期待されるのは、環境との調和である。バイオミメティックケミストリーあるいはバイオインスパイアードケミストリーは環境に調和する新しい化学の分野として期待されている。生物内の反応は、高効率で無駄の無い反応である。それに学んだ科学技術の開発は、バイオミティクスと呼ばれてきた（Chemical Reviews 96, 721-758(1996)）。自己組織化や分子認識を応用した新素材の開発、新規反応の開拓など広範な研究がある。バイオミメティックケミストリーとは、生物がもつ優れた機能を人工の物質、及びそれらの組み合わせで実現しようとする新しい化学の領域である。温和な条件で反応が高度に選択的に進む、生体内反応を、フラスコ内で実現させるという目標からは、酵素の機能が最も重要な模倣対象の一つである。

一方、バイオインスパイアードケミストリーについては、生体分子、細胞、それらの集合体を含め、生体系を発想の源とする材料を実現しようとする化学の領域である。生体機能を抽出し、模倣する従来の材料開発からも脱却し、これまでにない新しい材料創成の道が切り開かれることが期待される。生体系の機能発現を規範として、それに材料科学的な発想を加味して生体系の機能を凌駕する技術を目指すバイオインスパイアードケミストリーの研究が始まっている。

このようなバイオミメティックケミストリー、バイオインスパイアードケミストリーは、ヒト、環境に優しい、環境調和型の次世代技術として期待されている。本研究では、バイオインスパイアード触媒を構築するビタミン B_{12} を用いて、無機ヒ素をメチル化して無毒なアルセノベタインに変換する新規な毒物の処理法を開発した。また、このヒ素無毒化処理法をレアメタルのリサイクルに応用した。

2. ヒ素無毒化法

2.1. ヒ素の化学構造と毒性

無機ヒ素化合物は、発ガン性、急性・慢性毒性物質である。ヒ素は自然環境中に広く存在し、ヒト・環境への悪影響が懸念されている(Nickson, 1998)。地下水など自然由来によるヒ素中毒の被害者は、アジアを中心に、世界に広がっている（Chowdhury, 1999; Sun, 2004）。ヒ素化合物の毒性は、酸化状態、化学構造に強く依存する。水銀、鉛などの重金属については、メチル水銀やアルキル鉛などの有機金属化合物は、対応する無機体よりも毒性が強いことが知られている。しかし、ヒ素化合物の場合は例外である(Craig, 2003)。ヒ素化合物については、無機体よりも、対応する有機体の毒性が低い傾向がある（図 1.1）。特にトリメチルヒ素化合物であるアルセノベタイン[AB, $Me_3As^+CH_2CO_2^-$; (trimethylarsonio) acetate]の急性毒性(LD_{50}, 10g kg^{-1}, mouse, oral)は、三価の無機ヒ素である三酸化ヒ素[iAs(Ⅲ), arsenite; As_2O_3: 0.03 g kg^{-1}, mouse oral]の急性毒性の約 1/300 である(Kaise, 1985)。

このアルセノベタインは魚介類に多く含まれており、通常の条件では安定であり、生体組織との親和性が小さく、生物の体内に摂取されても速やかに排泄されることから、無毒の天然有機ヒ素化合物

として国際的に認知されている(Vahter, 1983)。

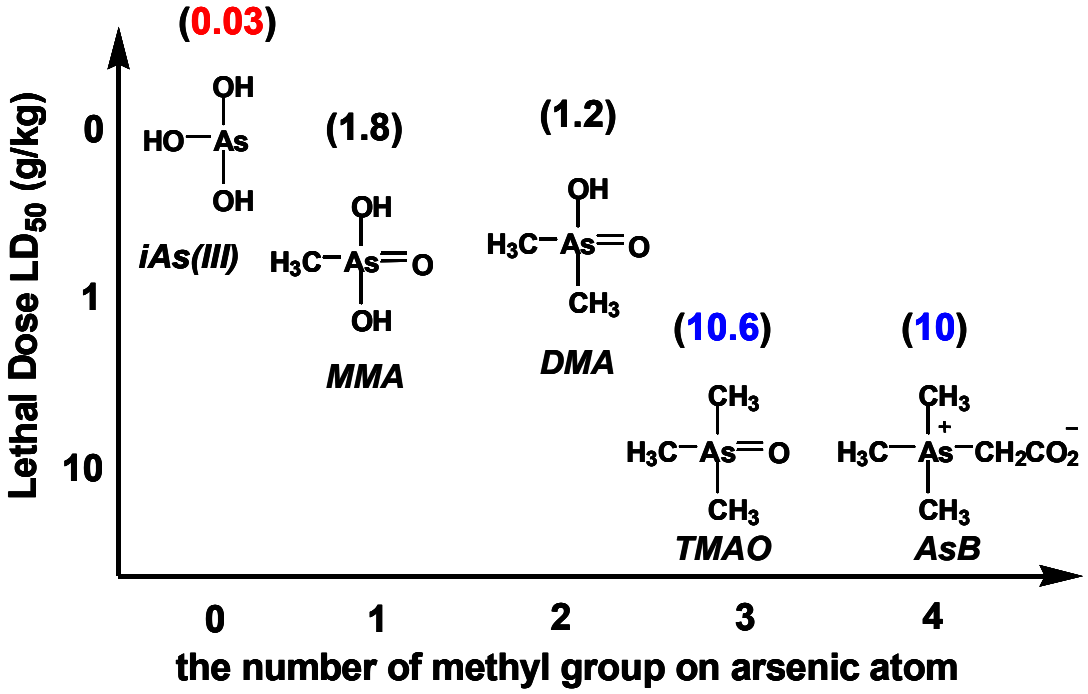


図 1.1.　ヒ素化合物の化学構造と急性毒性値（図中括弧内の数字は LD_{50} 値を示す）
iAs(Ⅲ)：三酸化二ヒ素、MMA:モノメチルヒ素、DMA:ジメチルヒ素、TMAO：トリメチルヒ素、AsB：アルセノベタイン

2.2. 生物学的システム

海洋生物の生態系では、無機ヒ素は生物学的にメチル化を受け、食物連鎖を通して、アルセノベタインとして、魚介類に生物濃縮される。この生物学的メチル化反応は、還元酵素により五価のヒ素化合物[As(V)]が三価のヒ素化合物[As(Ⅲ)]に還元されて、メチル基転移酵素により酸化的メチル化反応を受ける交互反応により進行するとして説明されている(図 1.2)。これらの生化学的反応は、メチル基転移酵素と還元酵素が関与している(Edmonds & Francesconi, 1987; Edmonds, 2000)。

2.3. 酵素法

無機ヒ素化合物のアルセノベタインへの変換には、多くの酵素が関与していることが報告されているが(Thomas et al., 2004)、アルセノベタインの生合成に直接関与している酵素はまだ単離されていない(Edmonds & Francesconi, 1981)。

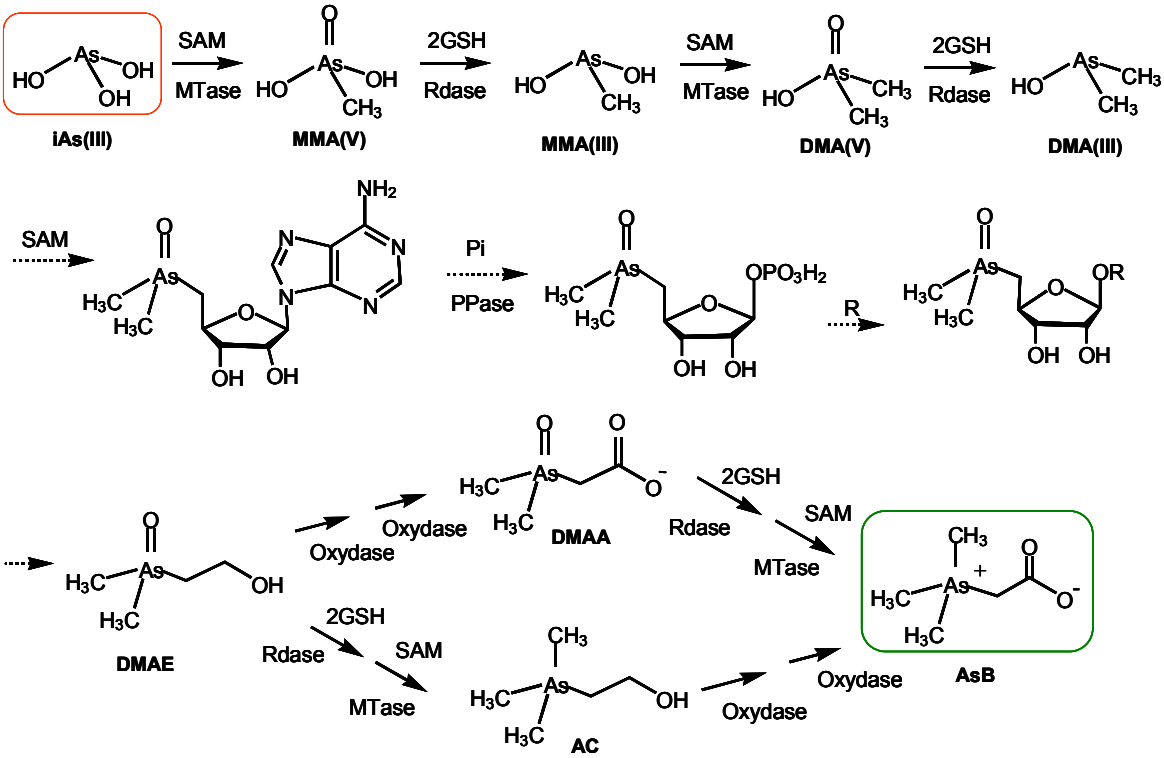


図 1.2. 海洋生物の食物連鎖と生物学的メチル化によるアルセノベタインの生物学的合成経路. SAM: S-adenosyl methionine, GSH: glutathione (reduced), MTase: methyltransferase, Rdase: reductase, Pi: inorganic phosphate, PPase: protein phosphatase, iAs(III): arsenite, MMA(V): methylarsonate, DMA(V): dimethylarsinate, DMA(III): dimethylarsonite, DMAE: dimethylarsinoyl ethanol, DMAA: dimethylarsinoyl acetate, AC: arsenocholine, AsB: arsenobetaine.

2.4. 非酵素法

ヒ素化合物のメチル化反応に関与するメチル基転移酵素の補酵素については、S－アデノシルメチオニン(SAM)とビタミンB_{12} 誘導体であるメチルコバラミン(CH_3B_{12})が提案されている。また、還元酵素の補酵素としては、還元型グルタチオン(GSH)が提案されている。SAM をメチル基供与体とした無機ヒ素のメチル化反応については、SAM と GSH のみでは、メチル化反応は進行しない。生体由来の酵素抽出液が存在する場合にのみ、SAM と GSH により、無機ヒ素はメチル化される。一方、メチルコバラミンをメチル基供与体とした場合については、アポ酵素が存在しない場合についても、GSH 存在下、無機ヒ素はメチル化される。このことから、メチルコバラミンをメチル基供与体とする反応は、SAM をメチル基供与体とする反応よりも、単純な構成要素でヒ素のメチル化を進行させることが可能である。

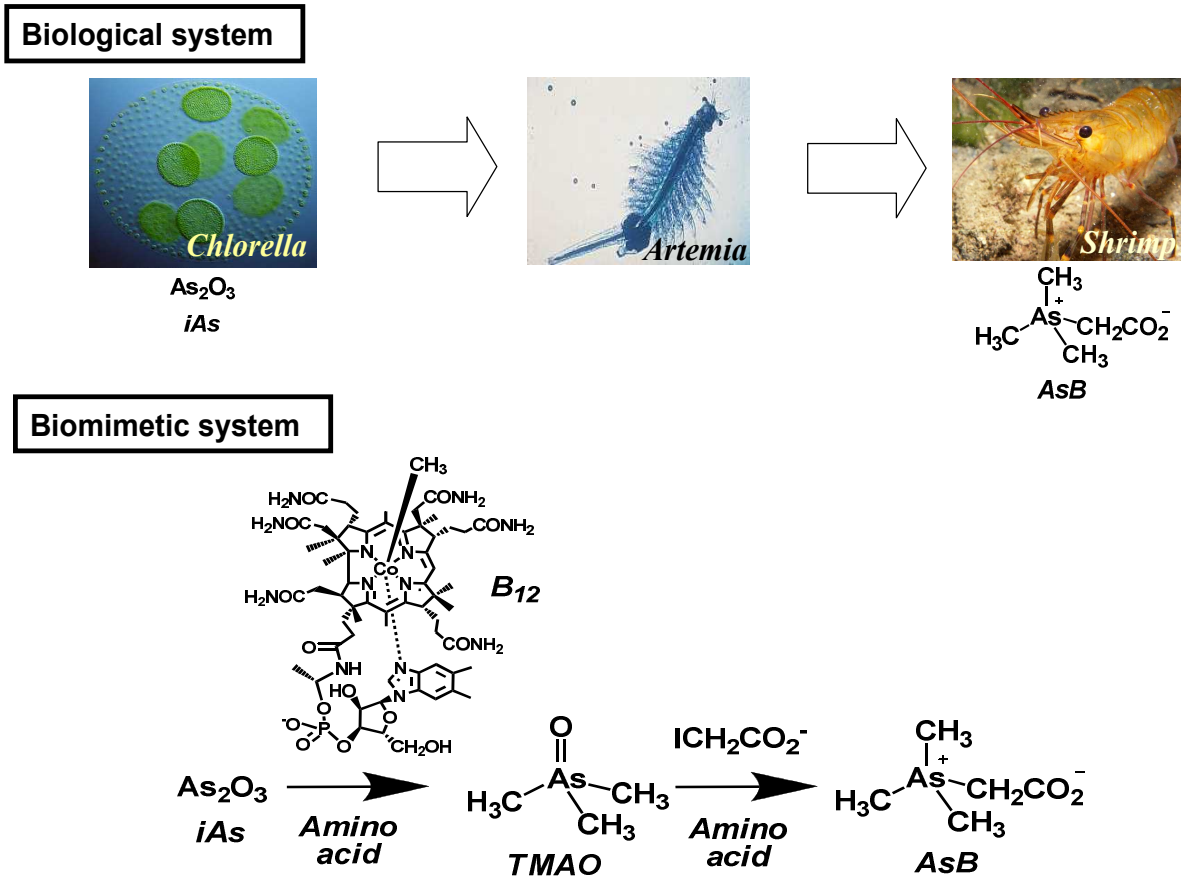


図 1.3. 生物学的手法、バイオミメティック法によるアルセノベタインの合成

A biological path-way involves the three-step food chain system consisted of chlorella, artemia and shrimp.

2.5. 有機合成法

有機合成化学的手法により、無機ヒ素からアルセノベタインを合成する方法が提案されている。三酸化ヒ素をトリメチルアルミニウムや Grignard 試薬で処理して、トリメチルアルシンを合成する方法が報告されている(Ismail & Toia, 1988; Moore & Ehman, 1977))。しかしながら、工業的スケールでのアルセノベタインの合成を考慮した場合、これらの試薬の取り扱いは容易ではない。アルキルアルミニウムは、禁水性物質であり、Grignard 試薬は、水分により失活する。無機ヒ素による環境汚染が、地下水等の水処理分野に多く存在することを考慮すると、水溶媒で進行する反応系を設計する必要がある。

3. バイオミメティック触媒システム

3.1. 反応機構

天然由来の化合物を使用し、有機溶媒を全く使用せず、温和な水溶液中で無機ヒ素をメチル化させることを目的としてバイオミメティック系の検討を行った(図 1.3)。天然B_{12} であるメチルコバラミンと天然アミノ酸誘導体である GSH を、三酸化ヒ素と反応させることにより、アルセノベタイン合成の重要

な中間体であるトリメチルアルシンオキシド（TMAO）を水溶液中の化学量論反応により高収率、高選択性で合成することに成功した。GSH を単純なアミノ酸であるシステインに置き換えても反応は進行した。TMAO は、温和な水溶液中で、GSH 存在下、ヨード酢酸との反応によりアルセノベタインを定量的に生成した。この反応についても、GSH をシステインに置き換えた系についても反応は同様に進行した。

電子スペクトルの解析により、メチルコバラミンは、GSH により還元され Co(II)種を生成することが明らかになった。この反応により生成する活性メチル基が、ヒ素のメチル化に関与することが示唆された。

メチルコバラミンからヒ素へのメチル基転移については、カルボニウムイオン型、ラジカル型、カルバニオン型の3つの機構が考えられる。

$$Co^{III}-CH_3 \rightarrow Co^{I} + CH_3^{+} \quad (1)$$
$$Co^{III}-CH_3 \rightarrow Co^{II} + CH_3\cdot \quad (2)$$
$$Co^{III}-CH_3 \rightarrow Co^{III} + CH_3^{-} \quad (3)$$

もし反応がカルボニウムイオン型で進行するとすれば iAs(Ⅲ)へのメチル基転移により、MMA(V)が生成するはずである。しかしながら、最初に生成するのは、MMA(Ⅲ)であった。メチオニンシンターゼのモデル反応について、メチルコバラミンから、チオールへのメチル基転移は、カルボニウムイオン型が提案されている。しかしながら、本反応条件下では、GSH のチオール基へのメチル基転移は観測されていない。したがって、カルボニウムイオン型以外の機構が提案される。メチルコバラミンから水銀、鉛、パラジウム等の重金属へのメチル基転移は、正に帯電した金属イオンへのカルバニオンの求核攻撃として説明されている。ヒ素は、リンと同属体であり、亜ヒ酸は水溶液中で亜リン酸と同様にアニオンとして存在している。アニオン種へのカルバニオンの攻撃はエネルギー的に不利と考えられる。したがって、カルバニオン型のメチル基転移以外のメカニズムで進行していると判断される。

電子スペクトルにより、GSH 存在下、$Co^{III}-CH_3$ は、GSH が配位した種を経由して、Co^{II} に還元されることが明らかになった（Nakamura et al, 2009）。この反応は、化式(4)～(6)で表される。グルタチオンの硫黄がコバルトに配位した C-Co-S 種が生成する〔化式(4)〕。この配位種について脱プロトン化が進行しチオレート型のグルタチオン配位種が生成する〔化式(5)〕。この錯体のトランス効果により、コバルト炭素結合のホモリティック解裂が促進されると考えられる〔化式(6)〕。ここで生じたメチルラジカルがヒ素へのメチル基転移に関与していると判断された。

$$Co^{III}-CH_3 + GSH \rightarrow GSH-Co^{III}-CH_3 \quad (4)$$
$$GSH-Co^{III}-CH_3 \rightarrow GS-Co^{III}-CH_3 + H^{+} \quad (5)$$
$$GS-Co^{III}-CH_3 \rightarrow GS-Co^{II} + CH_3\cdot \quad (6)$$

一方、ヒ素化合物は、GSH により、還元[$As^{V}\rightarrow As^{III}$]される。またヒ素－グルタチオン抱合体を形成することが知られている〔化式(7)－(9)〕。このヒ素－GSH 抱合体は、SAM を補酵素とした場合のヒ素メ

チルトランスフェラーゼの基質であることが報告されている。GSH の役割は、メチルコバラミンを還元的に活性化すると同時に、ヒ素をメチル基転移に対して活性種である As^{III}あるいは抱合体種の状態で存在させているものと推定される。

$$As(OH)_3 + GSH \Leftrightarrow As(SG)(OH)_2 + H_2O \quad (7)$$
$$As(SG)(OH)_2 + GSH \Leftrightarrow As(SG)_2(OH) + H_2O \quad (8)$$
$$As(SG)_2(OH) + GSH \Leftrightarrow As(SG)_3 + H_2O \quad (9)$$

トリメチルアルシンオキシド(TMAO)からアルセノベタイン(AsB)の合成については、GSH 存在下、温和な水溶液条件下で進行した。

$$O{=}As(CH_3)_3 + 2\,GSH \rightarrow As(CH_3)_3 + GSSG + H_2O \quad (10)$$
$$As(CH_3)_3 + ICH_2CO_2H \rightarrow As^{+}(CH_3)_3CH_2CO_2H{\cdot}I^{-} \quad (11)$$

この反応〔化式(10)－(11)〕の機構については、以下のように説明される。TMAO は、GSH により、2 電子還元を受け、トリメチルアルシンに還元され、このヒ素上の孤立電子対が、ヨード酢酸の正に荷電したα－炭素を求核的に攻撃して、アルセノベタインが生成したものと考えられた。

3.2. スケールアップの検討

三価の無機ヒ素[iAs(Ⅲ)]からアルセノベタインの合成法については、ビタミンB_{12}誘導体であるメチルコバラミン（CH_3B_{12})、グルタチオン還元型（GSH)、ヨード酢酸を用いた方法について文献に報告している。今回、細胞毒性試験の実施ために必要な量を確保するため、スケールアップを検討した。無毒化の対象とする無機ヒ素については三価の無機ヒ素[iAs(Ⅲ)]と五価の無機ヒ素[iAs(Ⅴ)]について検討した（図 1.4)。

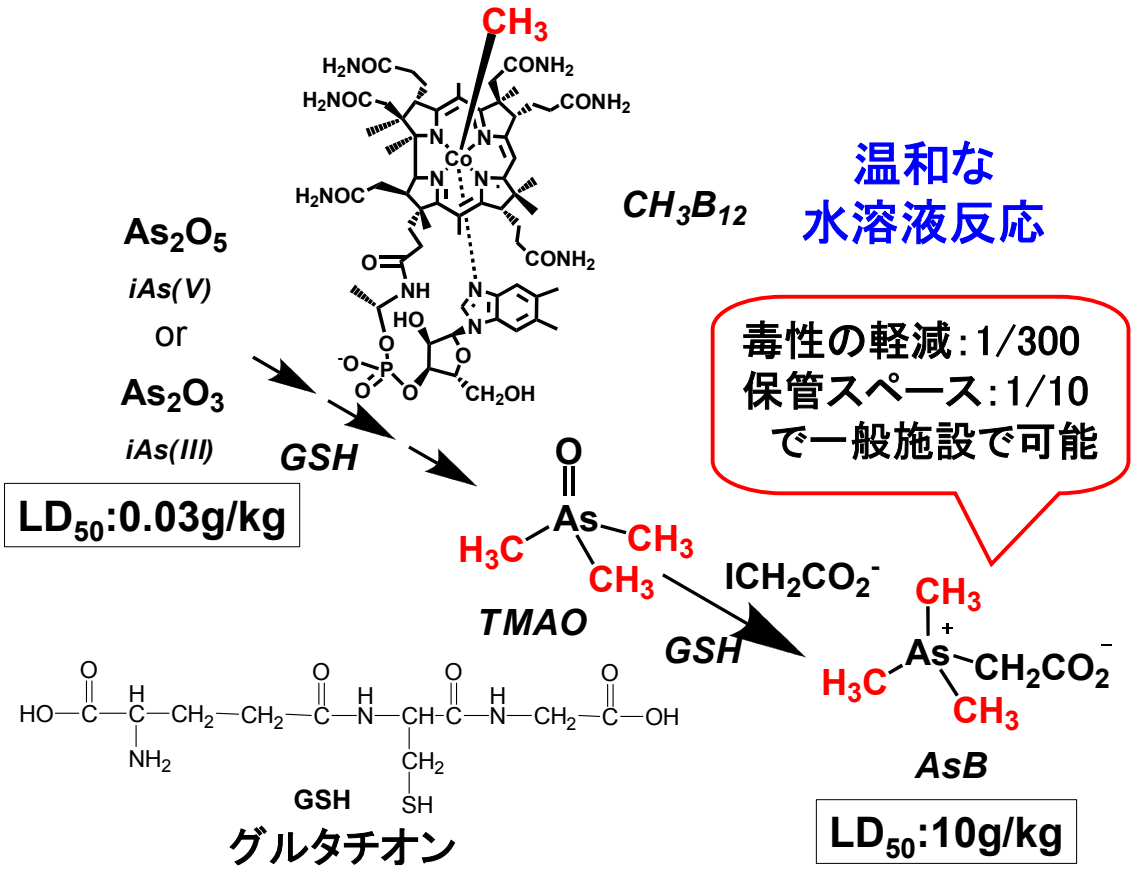


図 1.4. ビタミンB_{12}誘導体（メチルコバラミン、CH_3B_{12}）とグルタチオン（GSH）、ヨード酢酸を用いる無機ヒ素の無毒化反応

3.2.1. 試薬・装置

メタ亜ひ酸ナトリウム(亜ひ酸ナトリウム)、メタひ酸水素二ナトリウム[iAs(V)]、メチルコバラミン[CH_3B_{12}]、グルタチオン還元型（GSH)、ヨード酢酸（IAA）は、和光純薬から購入した。亜ヒ酸[三酸化二ヒ素、iAs(Ⅲ)]、ヒ酸[五酸化二ヒ素、iAs(Ⅴ)、モノメチルヒ素(MMA)、ジメチルヒ素(DMA)、トリメチルアルシンオキシド(TMAO)、テトラメチルヒ素(TeMA)、アルセノベタイン(AsB)などのヒ素化合物の標準物質は、トリケミカルから購入した。反応生成物の分析については、高速液体クロマトグラフ装置を直接結合した誘導結合プラズマ質量分析装置(HPLC-ICPC-MS)により、定性定量分析を行った。分析条件を表 1.1、表 1.2 に示す。

表 1.1. ICP-MS 分析条件

Model	Agilent 7500ce
RF forward power	1.6kW
RF reflect power	＜1 W
Carrier gas flow	Ar 0.75L/min
Sampling position	8.5mm
Monitoring mass	m/z=75 and 35, internal std. m/Z=71
Dwell time	0.5 sec 0.01sec 0.1sec
Times of scan	1 time

表 1.2. ICP-MS 分析条件

Model	Agilent 1100
Solvent	5mM HNO_3/6mM NH_2NO_3 /1.5mM Pyridinedicarboxylic acid
Rate	0.4mL/min. Injection volume：20μL
Colum	Shodex RSpak NN-414(150mm×4.6mm i.d.)
Temperature	40℃

本研究で使用した HPLC-ICPC-MS 装置と構造をそれぞれ図 1.5、図 1.6 に示す。また、HPLC-ICPC-MS により標準ヒ素化合物を分析した場合のクロマトグラムを図 1.7 に示す。
諸種のヒ素化合物に対する検量線のグラフを図 1.8～図 1.14 に示す。また、検量線のパラメータを表 1.3、表 1.4 に示す。

図 1.5. HPLC-ICP-MS 装置外観[設置場所：日本板硝子㈱]

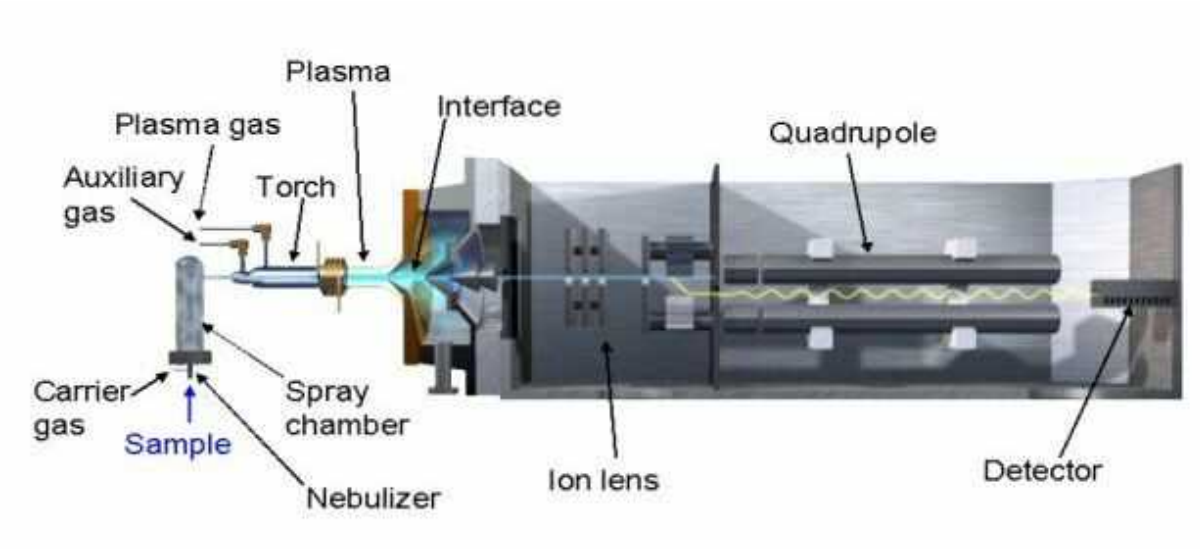


図 1.6. ICP-MS 装置の構造

(アジレント・テクノロジー株式会社ホームページより転載、

ttp://www.chem-agilent.com/contents.php?id=35074)

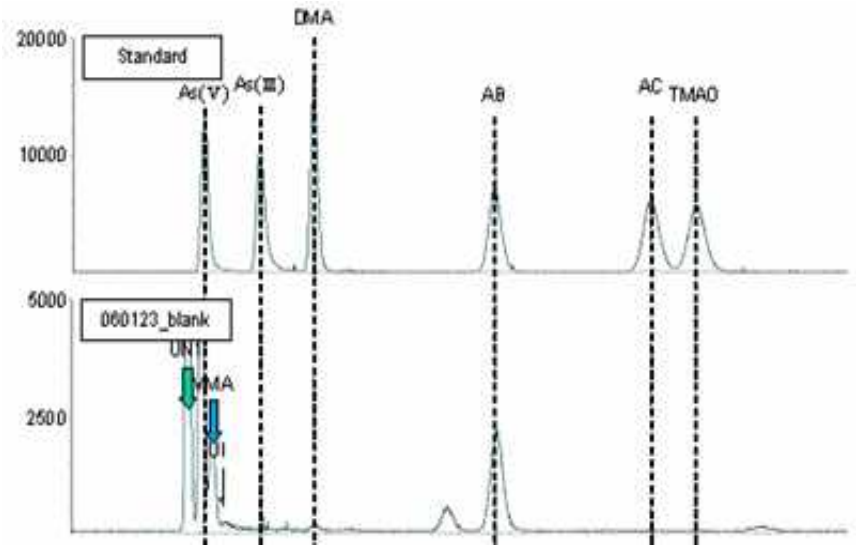


図 1.7. ヒ素化合物の HPLC-ICP-MS クロマトグラム

表 1.3. 諸種の濃度のヒ素化合物に対する ICP-MS のレスポンス*

濃度	ヒ素化合物に対するレスポンス						
ppb	iAs(Ⅴ)	MMA(Ⅴ)	iAs(Ⅲ)	DMA	AB	TMAO	TeMA
10	406884	380900	519518	299531	232809	270482	158066
50	2021188	1626622	2346832	1425476	935303	1213821	608513
100	4027977	3125724	4442059	2836722	1825286	2501512	1327188
500	20038022	15230231	21366148	13735648	8881440	12170431	5947067
1000	40088301	30441158	42214751	27797669	17355396	24123825	11622152

＊クロマトグラフの面積値

表 1.4. 諸種のヒ素化合物に対する検量線の傾きと相関係数の値

ヒ素化合物	式			相関係数
iAs(Ⅴ)	Y=	40088	x	1.0000
MMA(Ⅴ)	Y=	30456	x	1.0000
iAs(Ⅲ)	Y=	42345	x	0.9999
DMA	Y=	27739	x	1.0000
AB	Y=	17446	x	0.9998
TMAO	Y=	24174	x	1.0000
TeMA	Y=	11690	x	0.9996

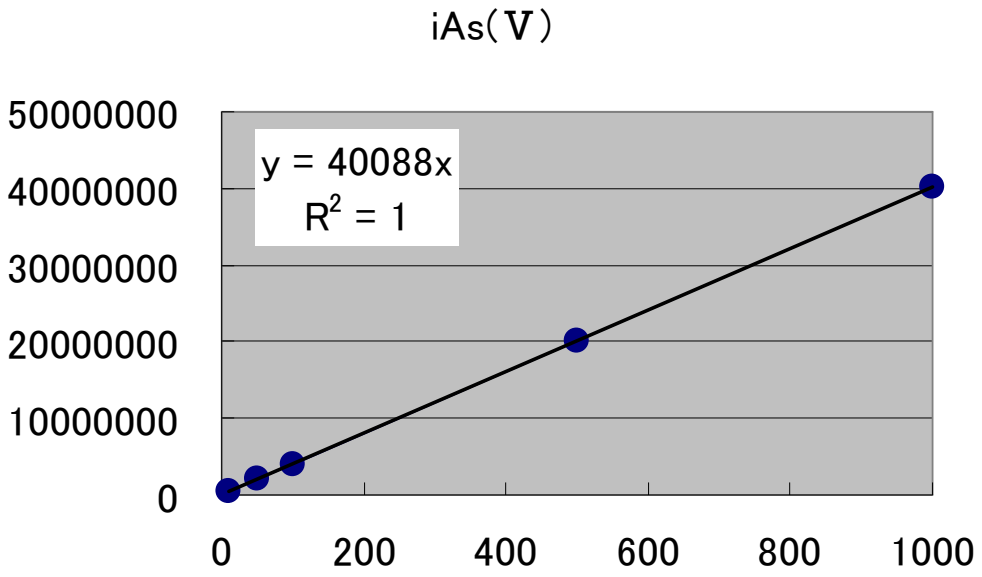


図 1.8. iAs(V)に対する検量線

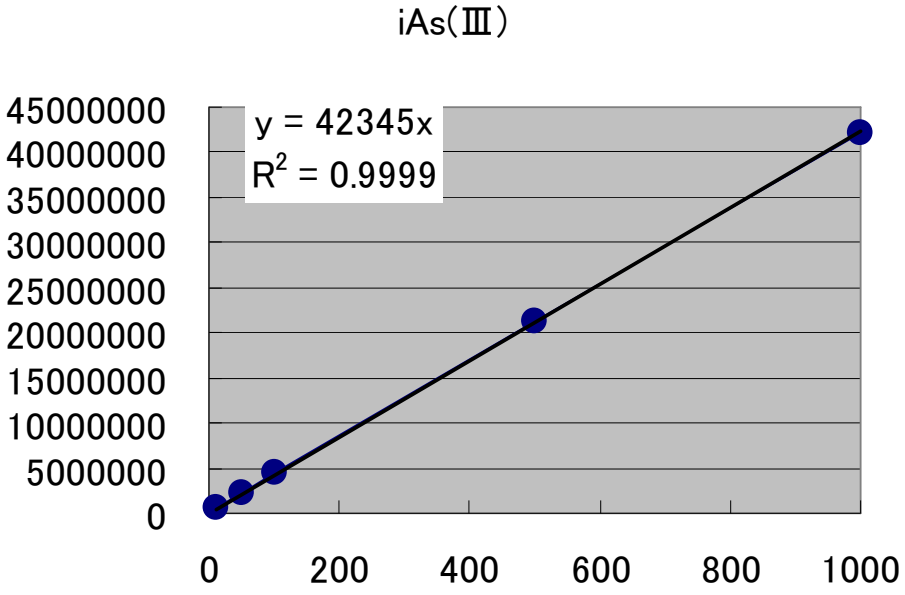


図 1.9. iAs(Ⅲ)に対する検量線

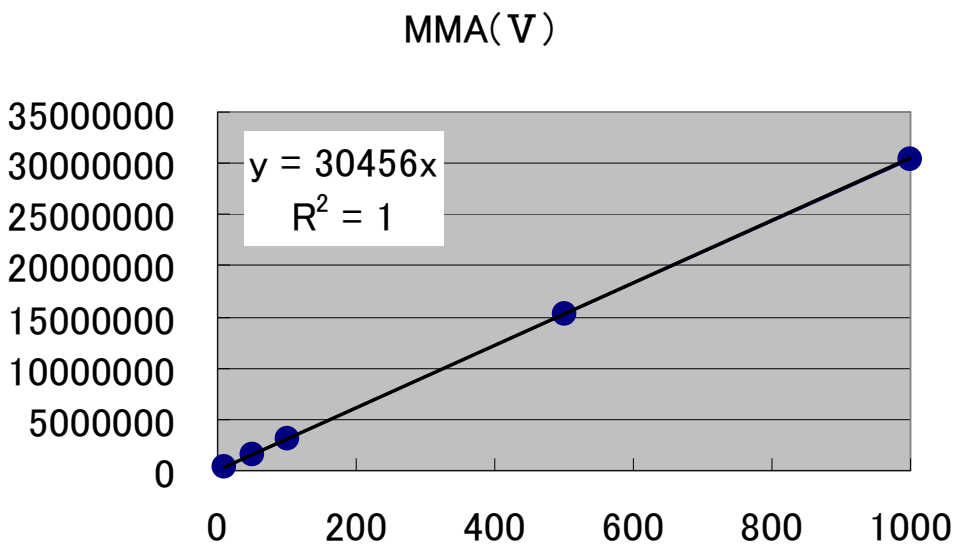


図 1.10. MMA に対する検量線

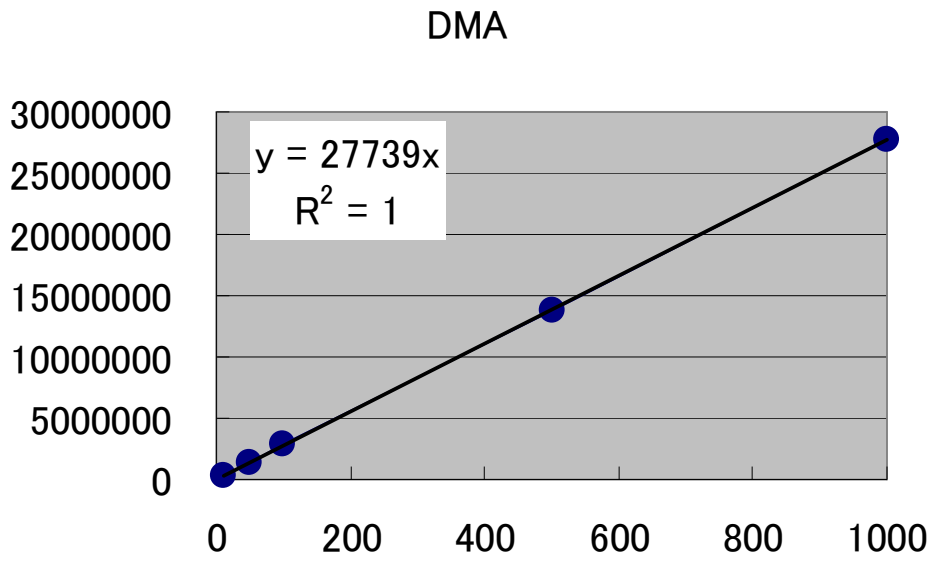


図 1.11. DMA に対する検量線

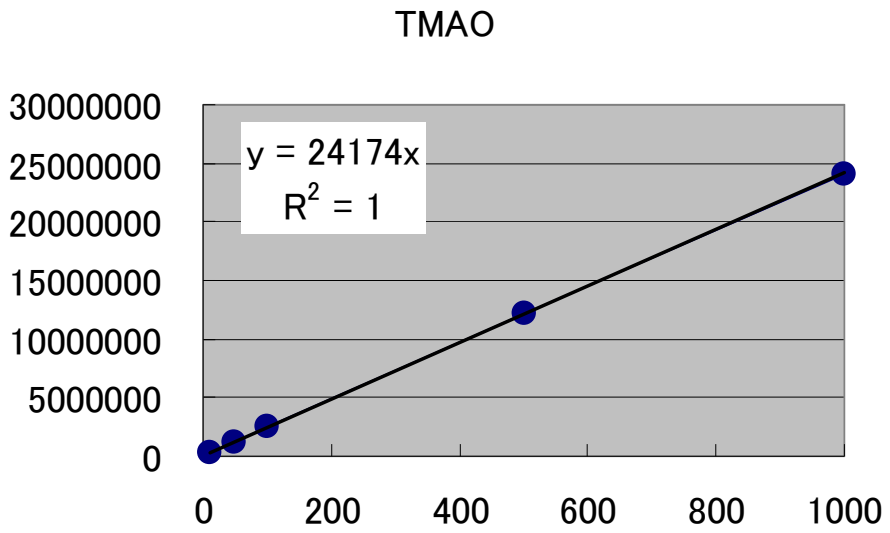


図 1.12. TMAO に対する検量線

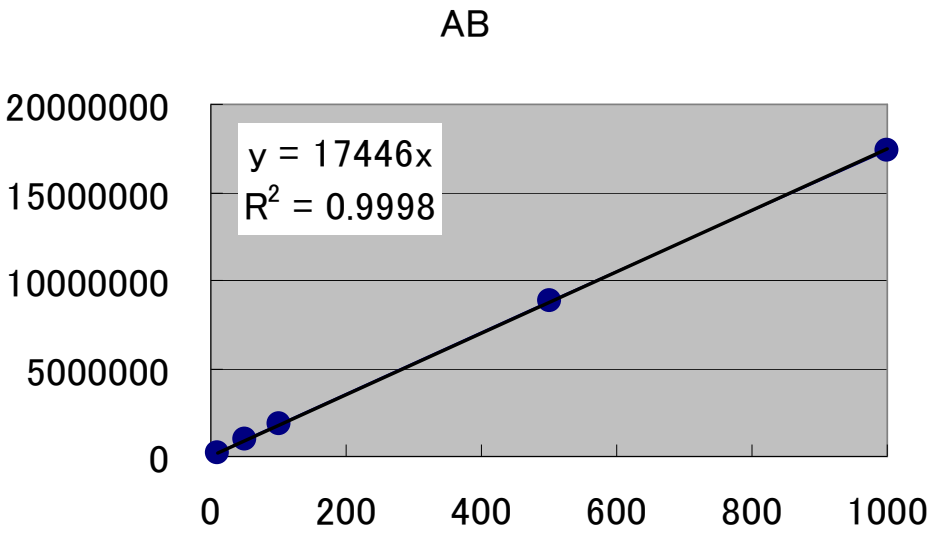


図 1.13. AsB に対する検量線

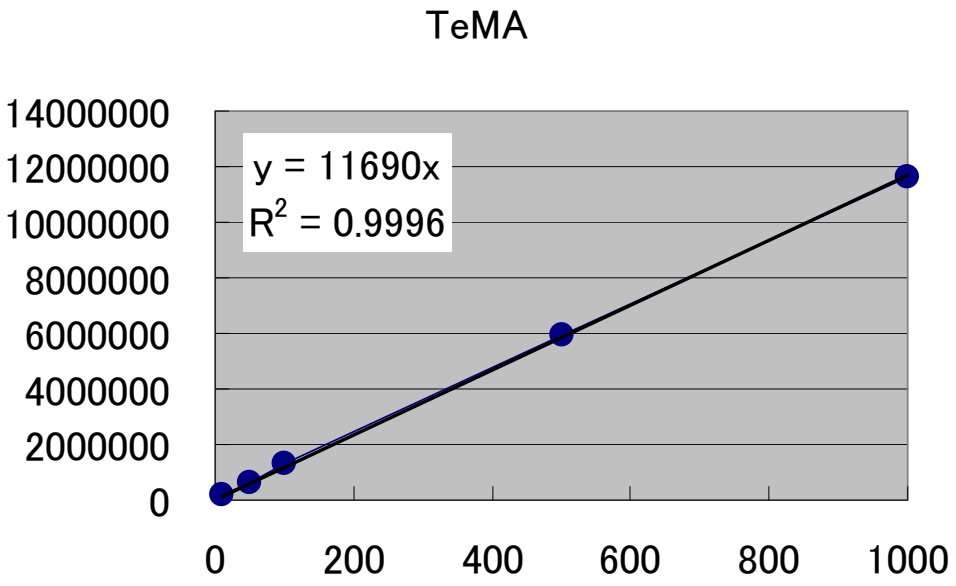


図 1.14. TeMA に対する検量線

3.2.2. 実験操作

出発無機ヒ素として、五価の無機ヒ素[ヒ酸、iAs(V)]を用いた場合の実験操作を以下に示す。三価の無機ヒ素[亜ヒ酸、iAs(Ⅲ)]についても同様にして行った。

200mL の丸底フラスコに還流冷却器を取り付けオイルバスにセットした。0.21g のメタひ酸水素二ナトリウム（ヒ素として 50.4mg)、５g のメチルコバラミン、20g のグルタチオン還元型（GSH)、20mL の超純水を丸底フラスコに加え、100℃に加熱したオイルバス上で 1 時間反応させた。反応後のヒ素化合物を表 1.5(Run1)示す。反応後、室温に冷却した反応混合物に、１g の GSH と 0.6 g のヨード酢酸を加え 2 時間反応した（表 1.5, Run2)。引き続き、５g の GSH と３ g のヨード酢酸を加え 2 時間反応した（表 1.5, Run3)。さらに、５g の GSH と３ g のヨード酢酸を加え 2 時間反応した（表 1.5, Run4)。シリカゲルを充填したカラムクロマトグラフ法により、反応混合物から AsB を単離した（図 1.15)。純度は HPLC-ICP-MS 法により確認した（図 1.16)。水をエバポレーターにて減圧留去した。得られた無色固体（AsB）は真空ラインを用いてガラスアンプル中に封入した（図 1.17)。

表 1.5. メチルコバラミン、GSH、IAA による iAs(V)から AsB の合成

	ベタイン化剤		ベタイン化反応条件	反応後のヒ素化合物の相対比率					
Run	GSH (g)	IAA (g)		DMA (%)	AsB (%)	TMAO (%)	TeMA (%)	UN8.5 (%)	Total (%)
1	-	-	-	0.52	0	4.64		61.2	100
2	1	0.6	50℃/1h	0.31	7.0	41.4	31.3	20.0	100
3	5	3	50℃/1h	0.18	65.7	12.8	21.3	0	100
4	5	3	50℃/1h	0.07	78.6	0	21.3	0	100

3.2.3. 結果

反応混合液からサンプルを採取して、前節で述べた方法で分析した合成結果を表 1.5.に示す。ベタイン化試薬の添加量を増やすにつれて、TMAO と UN8.5 の量が減少し、AsB の生成量が増加した。最終的には、Run４でトリメチル化ヒ素は無くなり、AsB が生成した。HPLC-ICP-MS 法により、無機ヒ素、モノメチルヒ素、ジメチルヒ素、トリメチルヒ素、テトラメチルヒ素などの副生成物は存在しないことを確認した。得られたアルセノベタインの純度は、ヒ素化合物として＞99%であった（図 1.17 の右図）。本合成法により、三価の無機ヒ素[亜ヒ酸、iAs(Ⅲ)]または五価の無機ヒ素[ヒ酸、iAs(Ⅴ)]から合成した合成したアルセノベタイン（AsB）は、北里大学医療衛生学部にて、細胞毒性試験を実施し、無毒であることが証明された（第３章に後述）。

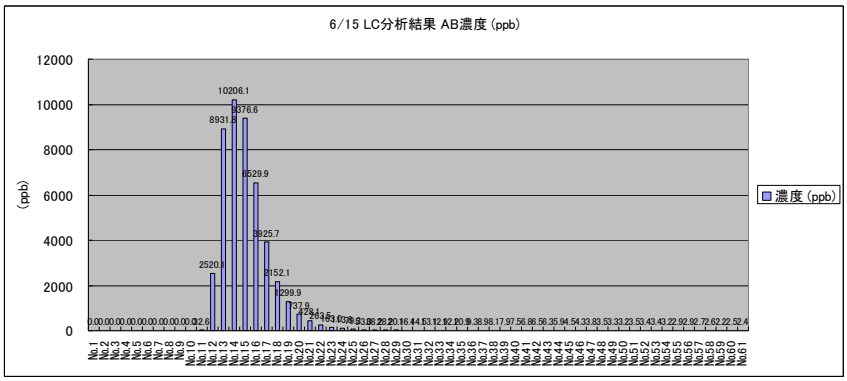


図 1.15. 分取クロマトグラム

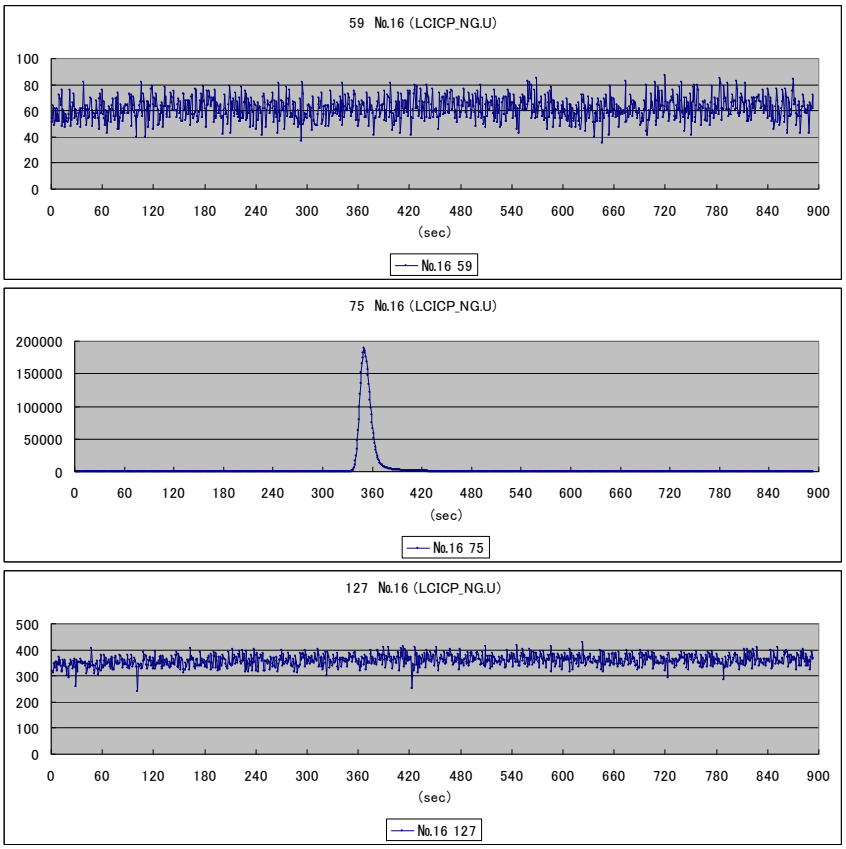


図 1.16. 単離したアルセノベタインの HPLC-ICP-MS クロマトグラム
(上図：m/z 59 for Co、中図：m/z 75 for As、
下図：m/z 127 for I)

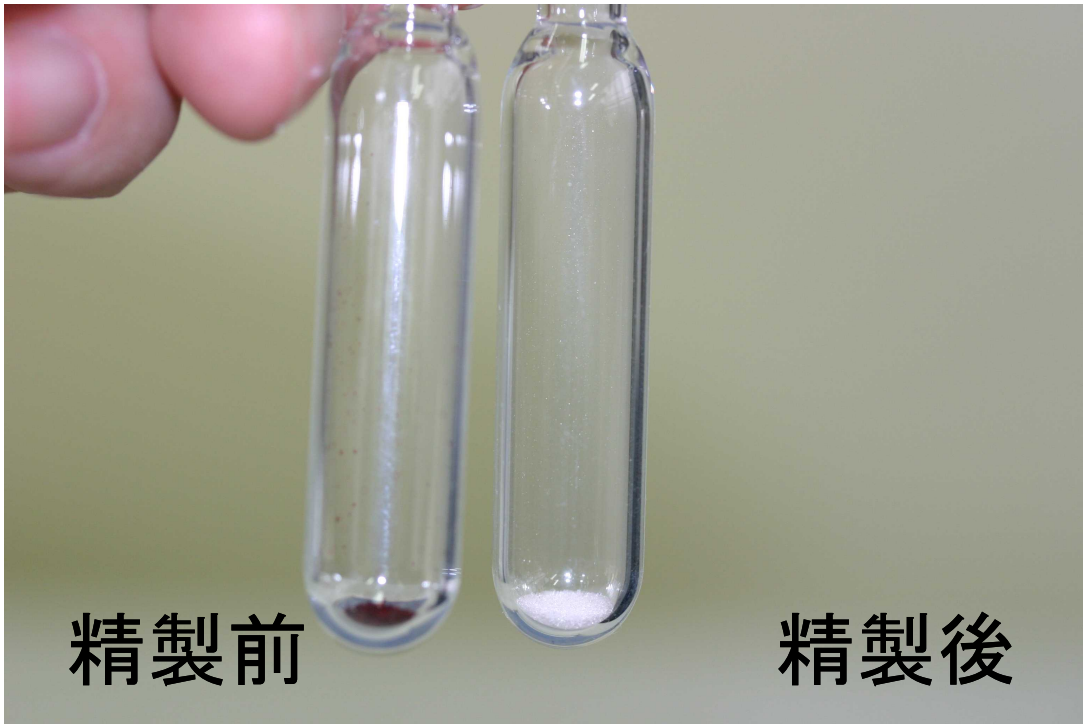


図 1. 17. 単離したアルセノベタインの外観（左：精製前、右：精製後）

4. バイオインスパイアード触媒システム

4. 1. 触媒システムの構成

バイオインスパイアード触媒システムは、以下のように構築した（図 1.18）。メチルコバラミン存在下、三酸化二ヒ素の水溶液に光照射を行うと、光化学的メチル基転移が進行し、メチル化ヒ素が生成する(Nakamura et al., 2008a; Nakamura & Hishinuma, 2009)。メチルコバラミンに光照射することにより、Co－C 結合がホモリティックに開裂し、Co（II）種とメチルラジカルを生じることが知られている［Co(III)－CH_3→Co(II)+CH_3・］(Nakamura et al., 2008e)。このメチルラジカルがヒ素をメチル化したものと推察された(Nakamura et al., 2009)。触媒サイクルを実現するには、Co(II)種を還元して超求核種であるCo(I)種を生成し［Co(II)+e^-→Co(I)］、メチル基供与体による酸化的メチル化［Co(I)+CH_3^+→Co(III)－CH_3］により、Co(III)－CH_3を生成すればよい。可視光照射により、光化学的にヒ素のメチル化反応が進行することから、触媒サイクルを発現するシステムについても、光化学的還元系を構築することが望ましい。酸化チタンの光照射により生成する伝導体の励起電子は、よい還元剤であることが示されている。その還元電位は、+0.5～−1.5V vs SHE、あるいは、−0.65V（vs SHE at pH 9）と見積もられている(Hoffman et al., 1995)。ビタミン B_{12} の Co(II)/Co(I)の酸化還元電位は、−0.5～−0.61V（vs SHE）であり(Lexa & Saveant, 1983)、適切な条件を選べば、酸化チタンの光励起電子により、Co(II)を Co(I)に還元する系を構築することが可能である(Nakamura et al, 2008a, 2008c)。さらに、Co(I)は超求核種であり、p-トルエンスルホン酸メチルなどのメチル供与体と反応し、Co(III)-CH_3 を生成することが知ら

れている(Krautler, 1984)。したがって、これらの三つの素反応を組み合わせることにより、触媒サイクルの実現が可能である(Nakamura, 2010a, 2011a)(図 1.18)。

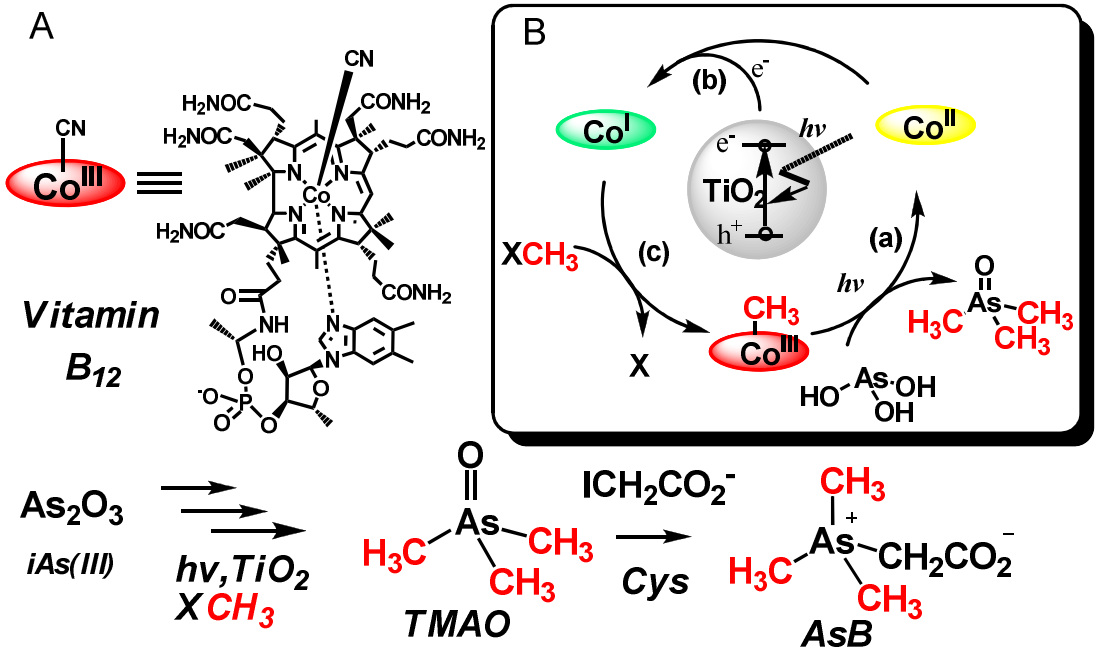


図 1.18. ビタミン B_{12} の光駆動型バイオインスパイアード触媒システム. XCH_3: methyl donor, *hv*: photoirradiation. A: synthesis of arsenobetaine by using bioinsupired catalytic system with vitamin B_{12}. B: estimated reaction mechanism of catalytic system with vitamin B_{12}

バイオインスパイアード触媒として、ビタミンB_{12}、酸化チタン、メチルドナーからなる触媒システムを構成して、三酸化二ヒ素へのメチル基転移反応を検討した。紫外線照射条件下、ビタミンB_{12}、メチルドナー、酸化チタンが存在する場合にのみ、メチル化反応は進行した。ビタミンB_{12} 基準で、15,000%のメチル化反応が進行した(Nakamura, 2008b)。

本研究の無機ヒ素の無毒化反応に用いられるメチルコバラミン、GSH、システインは天然有機化合物誘導体である。また、この無毒化反応は有機溶媒を用いない温和な水溶液反応で進行する。したがって、ヒト、環境に優しい方法であるといえる。

猛毒の無機ヒ素を、温和な水溶液反応により、無毒の天然有機ヒ素化合物であるアルセノベタインに変換する、安全で効率的な反応の開発に成功した。本研究の天然化合物を用いたヒ素の無毒化処理技術は、水処理分野をはじめ、幅広い分野で、新しいヒ素の処理法として応用されることが期待される(Nakamura, 2010b, 2011b)。

4.2. 量子収率の評価

前述のバイオインスパイアード触媒システムにより、無機ヒ素[iAs(III)]は、トリメチルアルシンオキシド(TMAO)に選択的に変換されることが明らかになった。さらに、TMAO から、アルセノベタイン(AsB)への反応を触媒的に進行させるシステムの構築が期待される。

本研究については、メチル化反応に関する触媒システムの高率化と、AsB 合成反応を司る触媒システムの構築を目的として、メチル基、カルボキシメチル基、その他の置換基を有するビタミンB_{12} 誘導体の光化学的な特性を詳細に検討した。

使用したビタミン B_{12} 誘導体は、メチルコバラミン、シアノコバラミン、アデノシルコバラミン、カルボキシメチルコバラミンなどの天然 B_{12} と、メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩、メチルアココビリン酸ヘプタメチル過塩素酸塩、カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩などの非天然型である。カルボキシメチルコバラミンとカルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩は、カルボキシメチル（$-CH_2COOH$）基を有し、アルセノベタイン合成に関与するビタミン B_{12} として、その反応性が期待される。

メチルコバラミンをはじめとするアルキルコバラミンは、光照射によりコバルト－炭素結合がホモリティックに開裂し、アルキルラジカルと Co(II)種を生成する。このアルキルラジカルがヒ素のメチル化反応に関与していると考えられている。Co(II)種は、水分子と反応し、ヒドロキソコバラミン[Co(III)-OH]を生成する。ここでは、感光性触媒システムの反応効率を評価するための基礎データを得る目的で、ビタミン B_{12} 誘導体の光還元的脱メチル化反応の量子収率の波長依存性を調べた。量子収率 η は、照射された光の光子数 N[個]、光反応により生成した分子数 D[個]から、次のように表される。

$$\eta = D / N$$

ここで、反応溶液に照射された光の光子数 N[個]は、N = 5.03×1015× λ dt [個](ただし、λ:波長[nm]、d:光強度[W/cm^2]、t:時間 [sec])である。また、反応した分子数 D [個]は、 D= 6.02×1018 ×ab [個](ただし、a:溶液濃度 [mol/L]、b:反応率 [%])である。したがって、量子収率 η は、次式で表される。

$$\eta = D / N = 1.20 \times 10^3 \times ab / (\lambda\, dt)$$

ここでは、生成物(中間体とヒドロキソコバラミン)の吸収による影響を小さくするため、5%以下の反応率の条件で、光照射時間を変えて、吸光度の変化を調べた。5%の生成物生成に必要な光照射エネルギーから反応系に照射された光子数を求め、反応した分子数から量子収率を算出した。吸収スペクトルと量子収率の波長依存性を、メチルコバラミン(図 1.19 と図 1.20)、シアノコバラミン(図 1.21 と図 1.22)、アデノシルコバラミン(図 1.23 と図 1.24)、メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩(図 1.25 と図 1.26)、メチルアココビリン酸ヘプタメチル過塩素酸塩(図 1.27 と図 1.28)、カルボキシメチルコバラミン(図 1.29 と図 1.30)について示す。250nm から 600nm までの各波長の光を照射した場合の、吸収スペクトルの変化と吸光度の経時変化については、メチルコバ

ラミン（図 1.31～と図 1.66）、メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩（図 1.67～図 1.102）、カルボキシメチルコバラミン（図 1.103～図 1.138）とカルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩（図 1.139～図 1.174）の例を示す。 メチルコバラミンについては、紫外線領域(270nm)で最高値（η ＝0.30）を示し、300nm から 360nm 付近では平坦部が認められた。可視領域では、520nm 付近で極大を示し、600nm 付近では、反応は著しく減少した。吸収スペクトルと量子収率の波長依存性の関係については、400nm から 450nm で極小をとり、520nm で吸収をとる傾向が一致した。シアノコバラミンについても、光照射による反応は認められたが、その量子収率は、メチルコバラミンに比べて、二桁ほど小さかった。アデノシルコバラミンについても、フォトリシスは進行し、反応の量子収率は、η ＝0.10 （波長：270nm）であった。メチル（ジエチルエーテル）コビリン酸、メチルアココビリン酸ヘプタメチル過塩素酸塩などの非天然型B_{12} については、高い量子収率を示した（最高値：η ＝～0.50）。これまで報告されたビタミンB_{12}誘導体の値としては最高の値である。カルボキシメチルコバラミンについても、フォトリシスは進行し、0.1 を超える量子収率を示した。カルボキシメチルコバラミンのフォトリシスの量子収率については、これまで報告例はなく初めての値である。カルボキシメチルコバラミンへの光照射により、カルボキシメチルラジカル（・CH_2COOH）が生成している可能性が示唆された。無機ヒ素あるいは反応中間体（例えば、TMAO）から AsB が合成できる経路が存在することが示された。

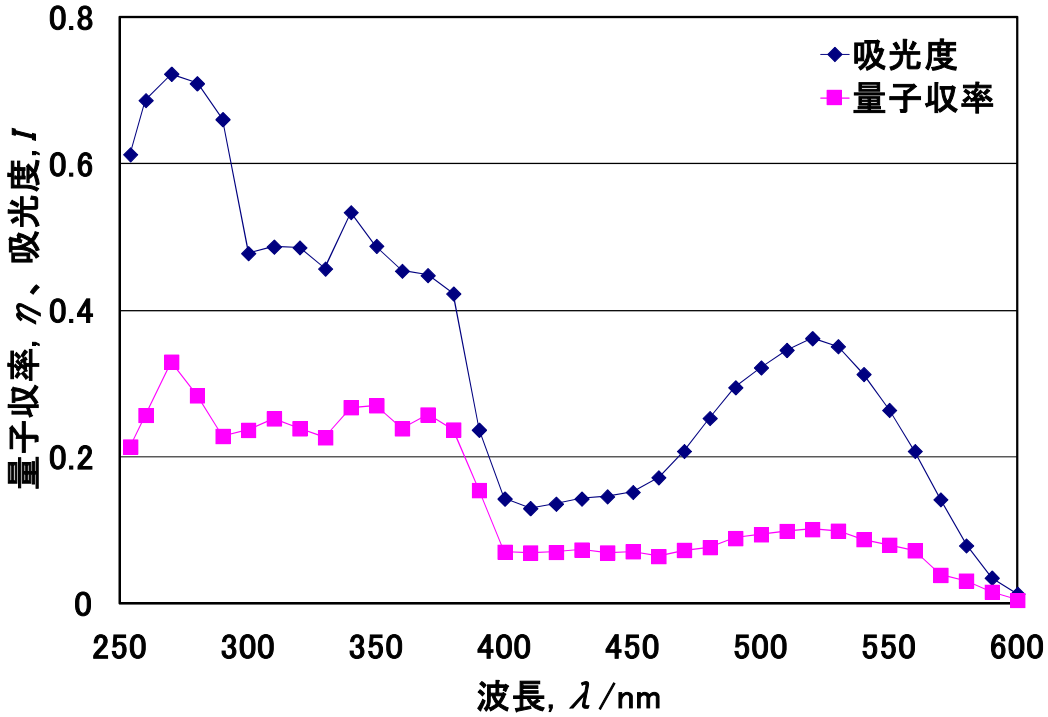


図 1.19.メチルコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

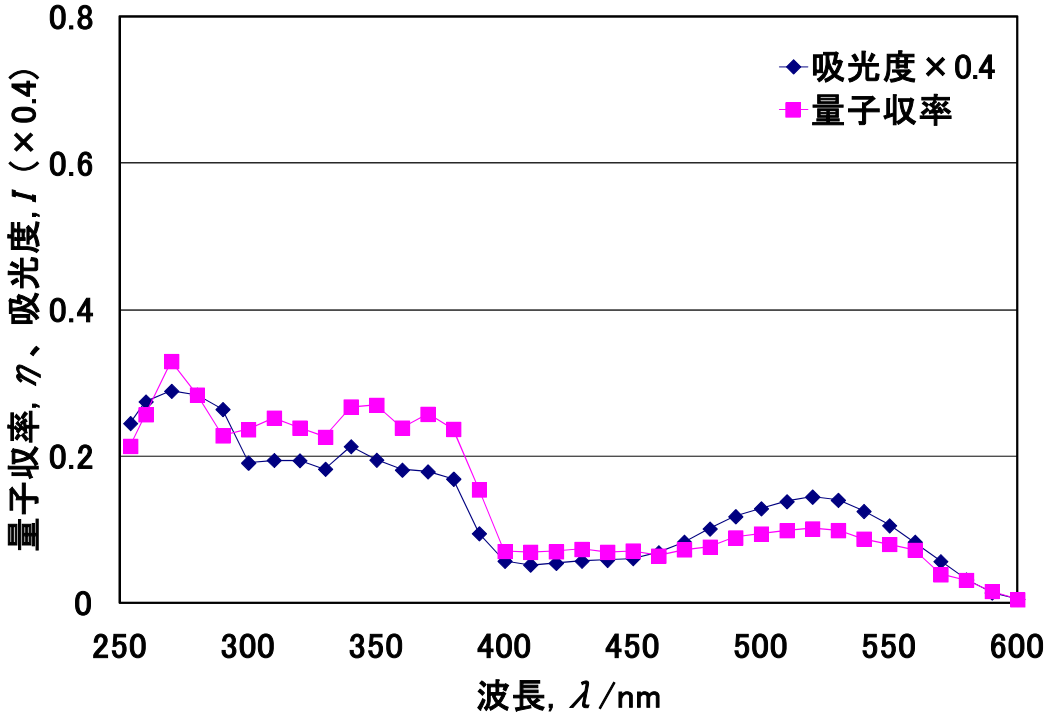


図 1.20.メチルコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

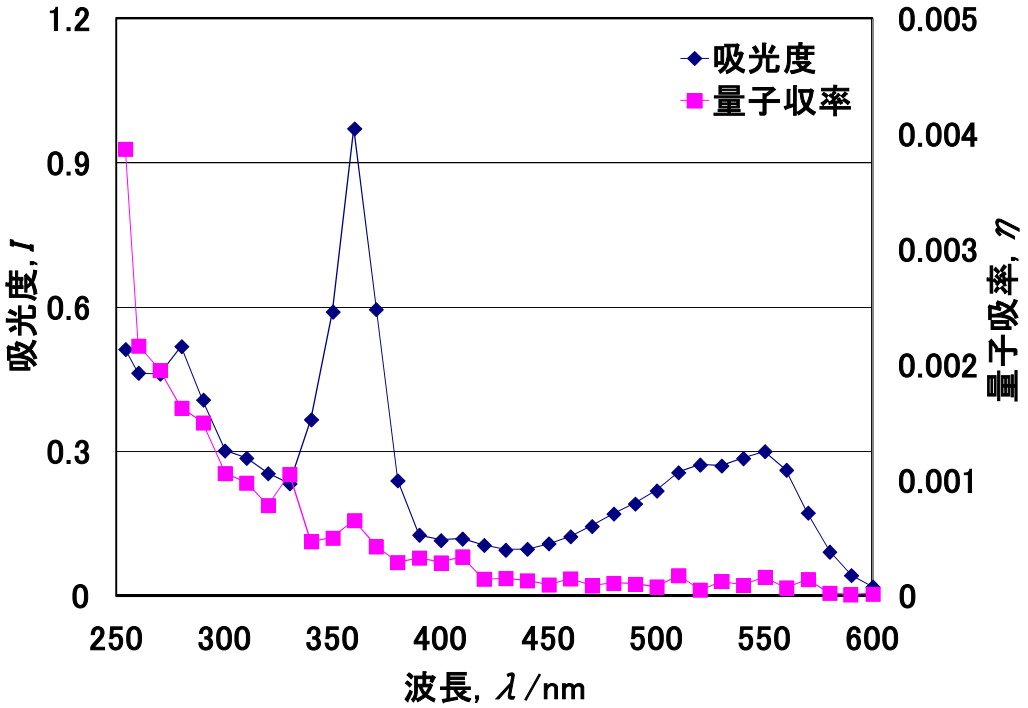


図 1.21. シアノコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

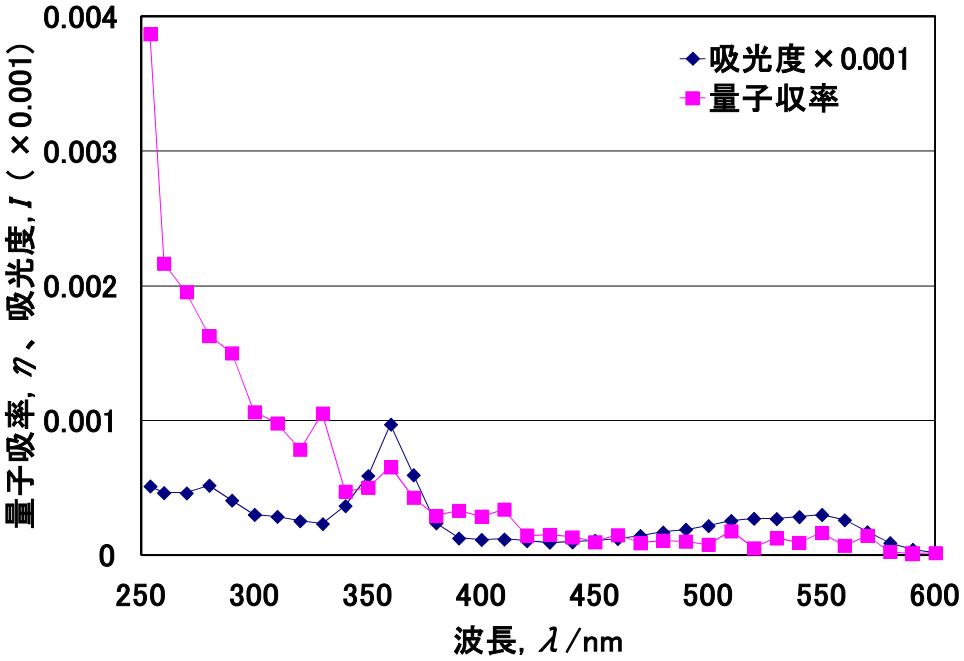


図 1.22. シアノコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

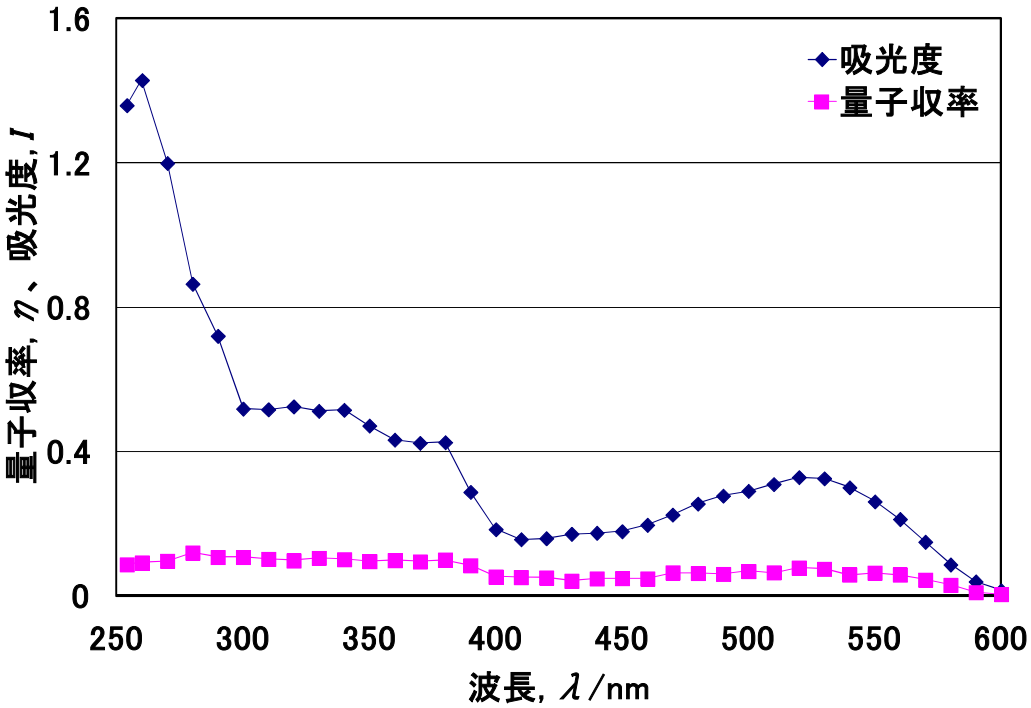


図 1.23. アデノシルコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

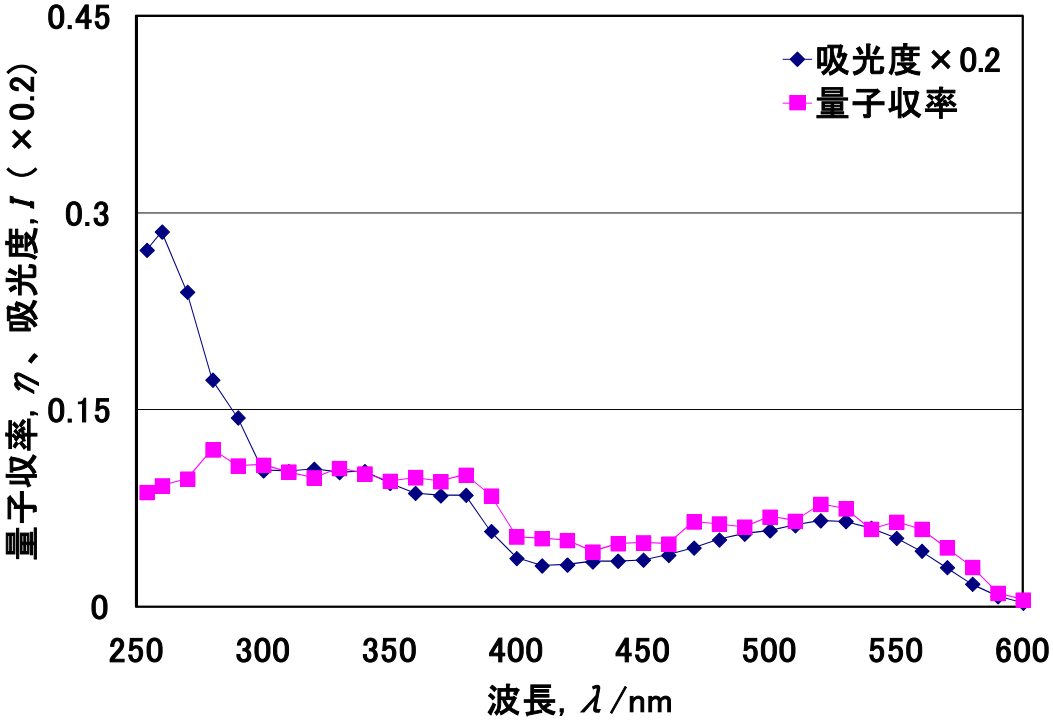


図 1.24. アデノシルコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

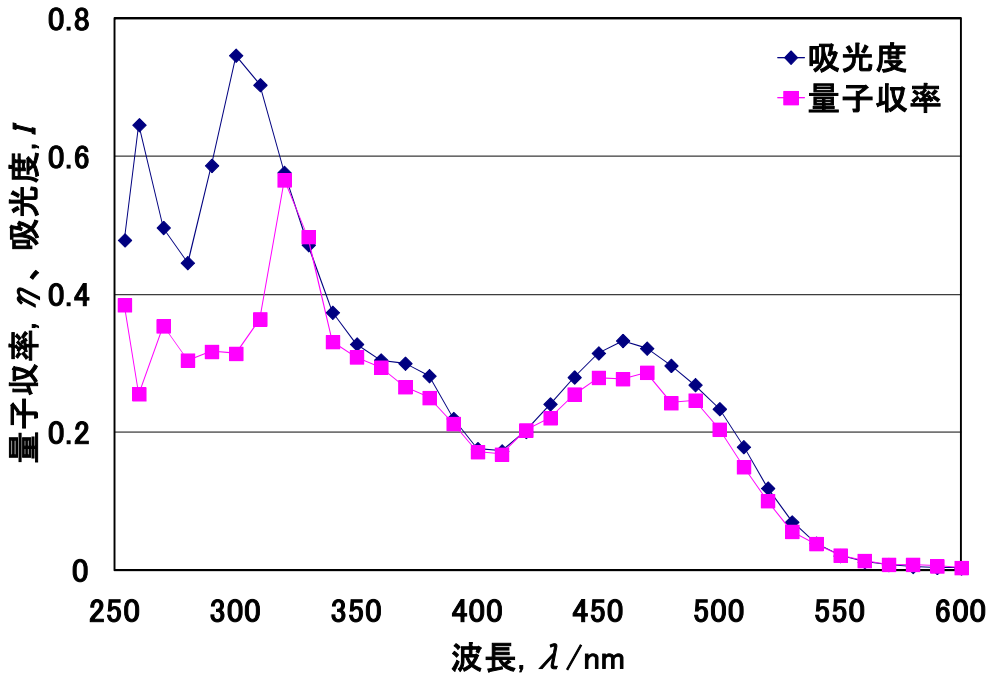


図 1.25. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

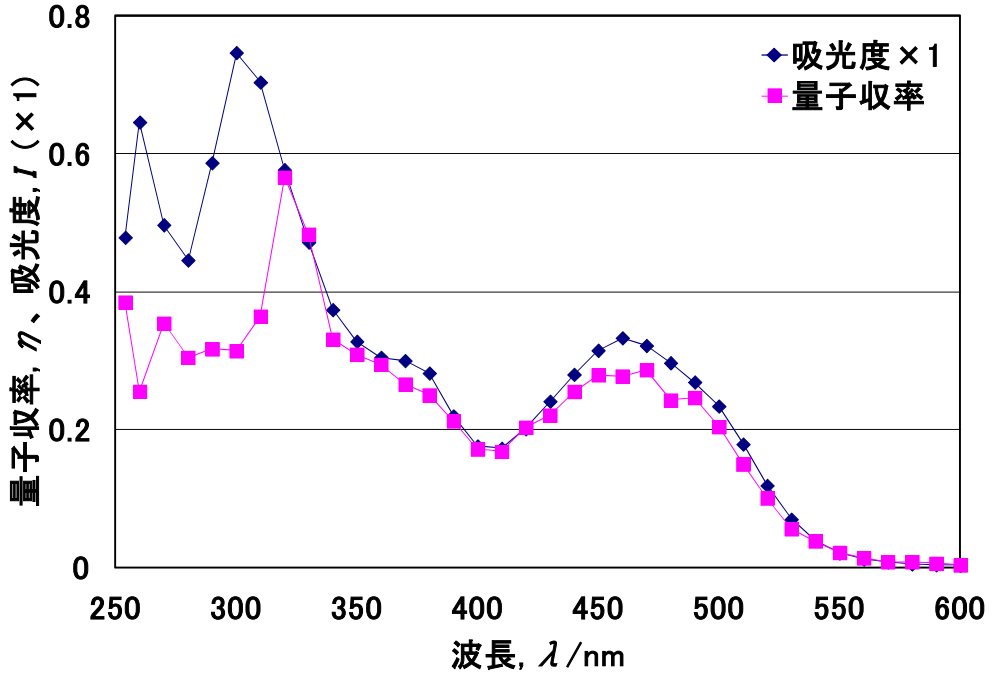


図 1.26. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

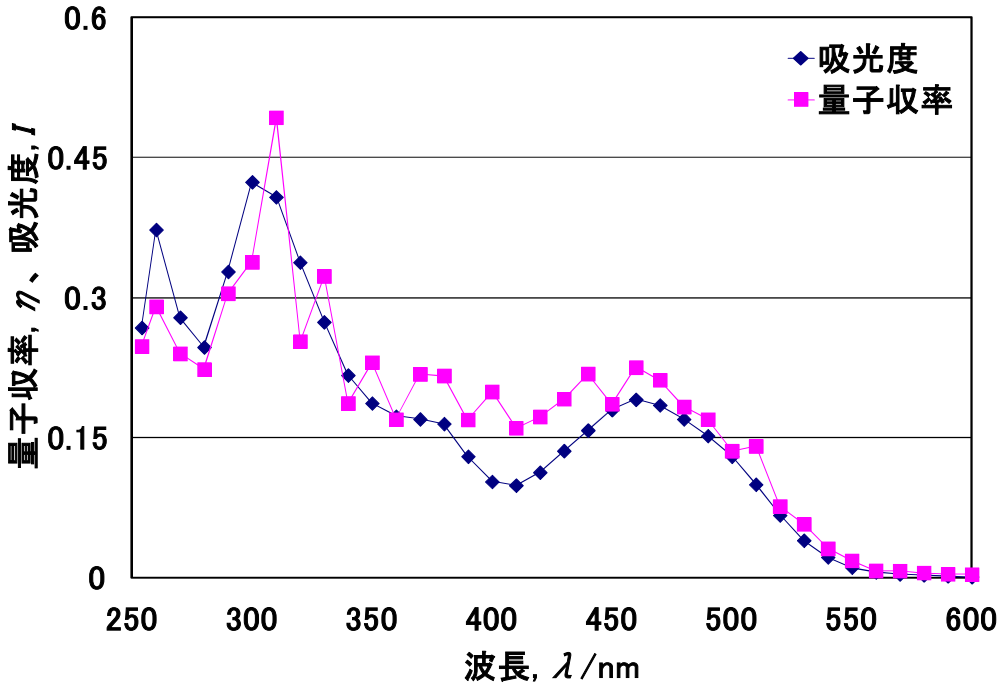


図 1.27. メチルアココビリン酸ヘプタメチル過塩素酸塩の吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

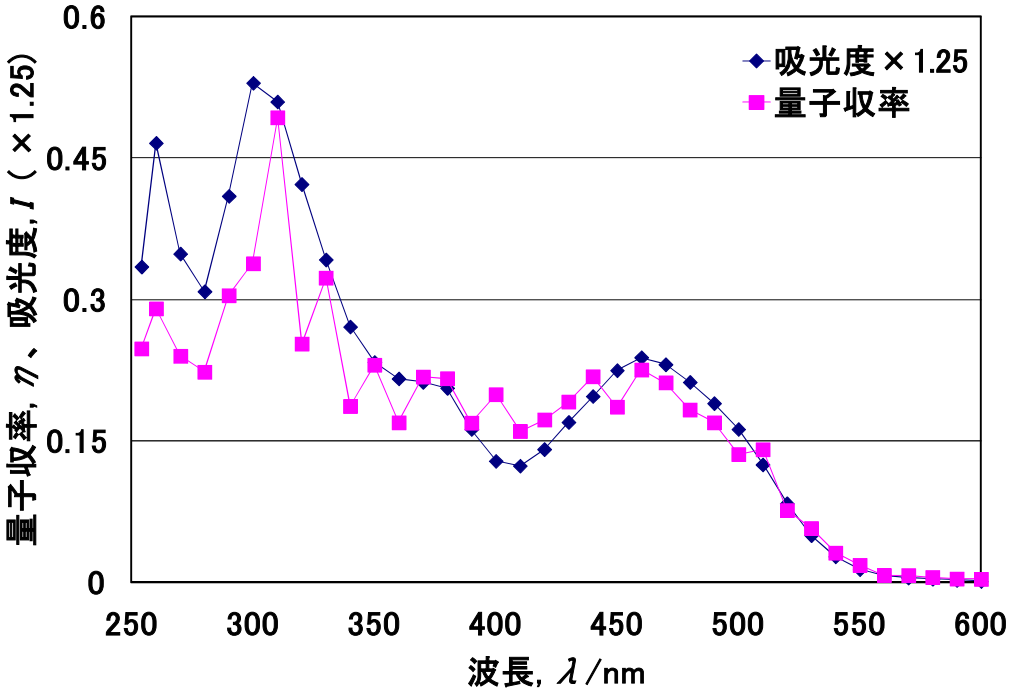


図 1.28. メチルアココビリン酸ヘプタメチル過塩素酸塩の吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

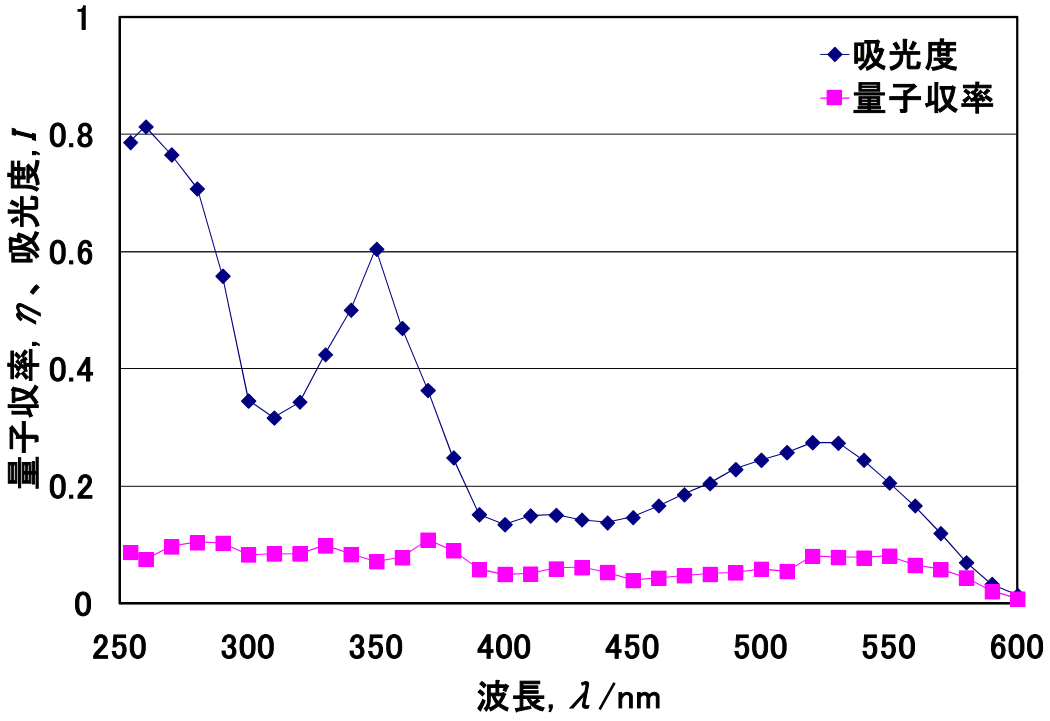


図 1.29. カルボキシメチルコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

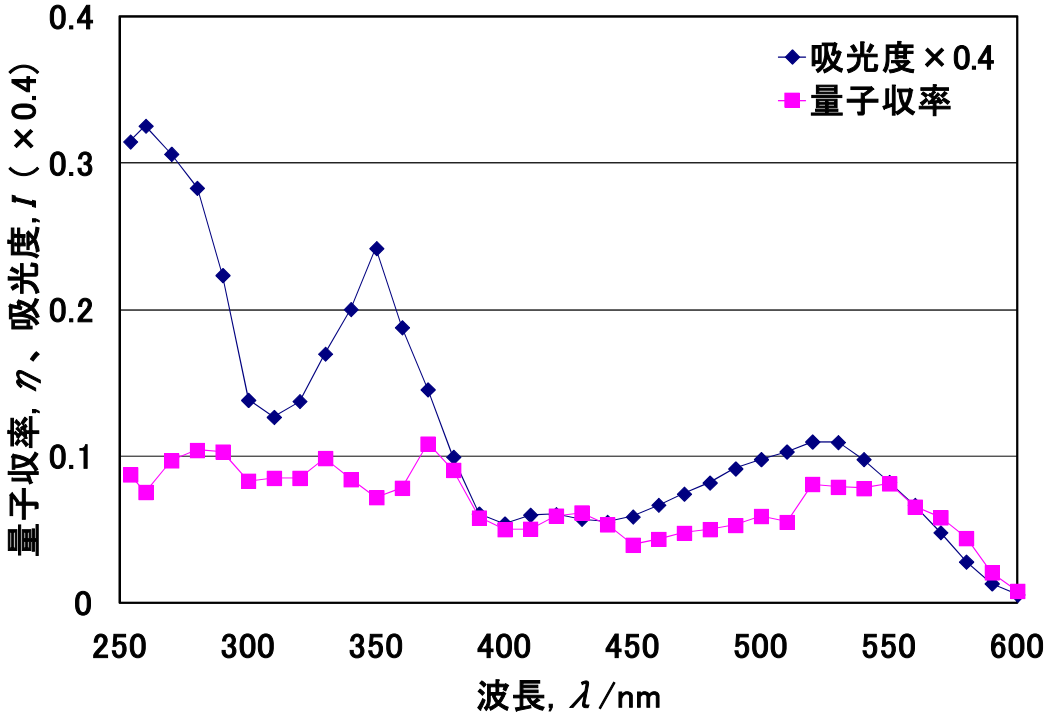


図 1.30. カルボキシメチルコバラミンの吸収スペクトルとフォトリシスの量子収率の波長依存性

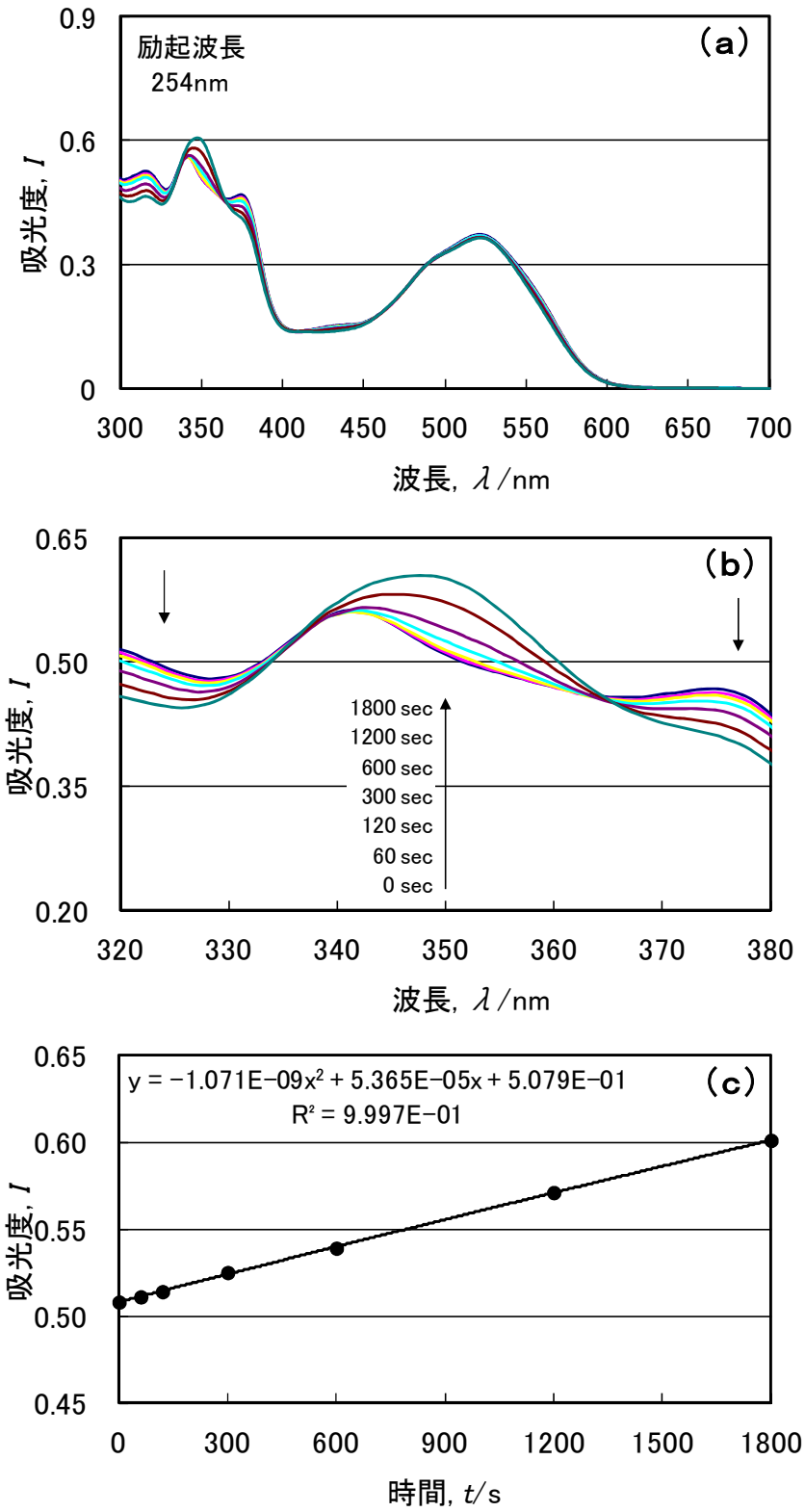


図 1.31.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：254nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

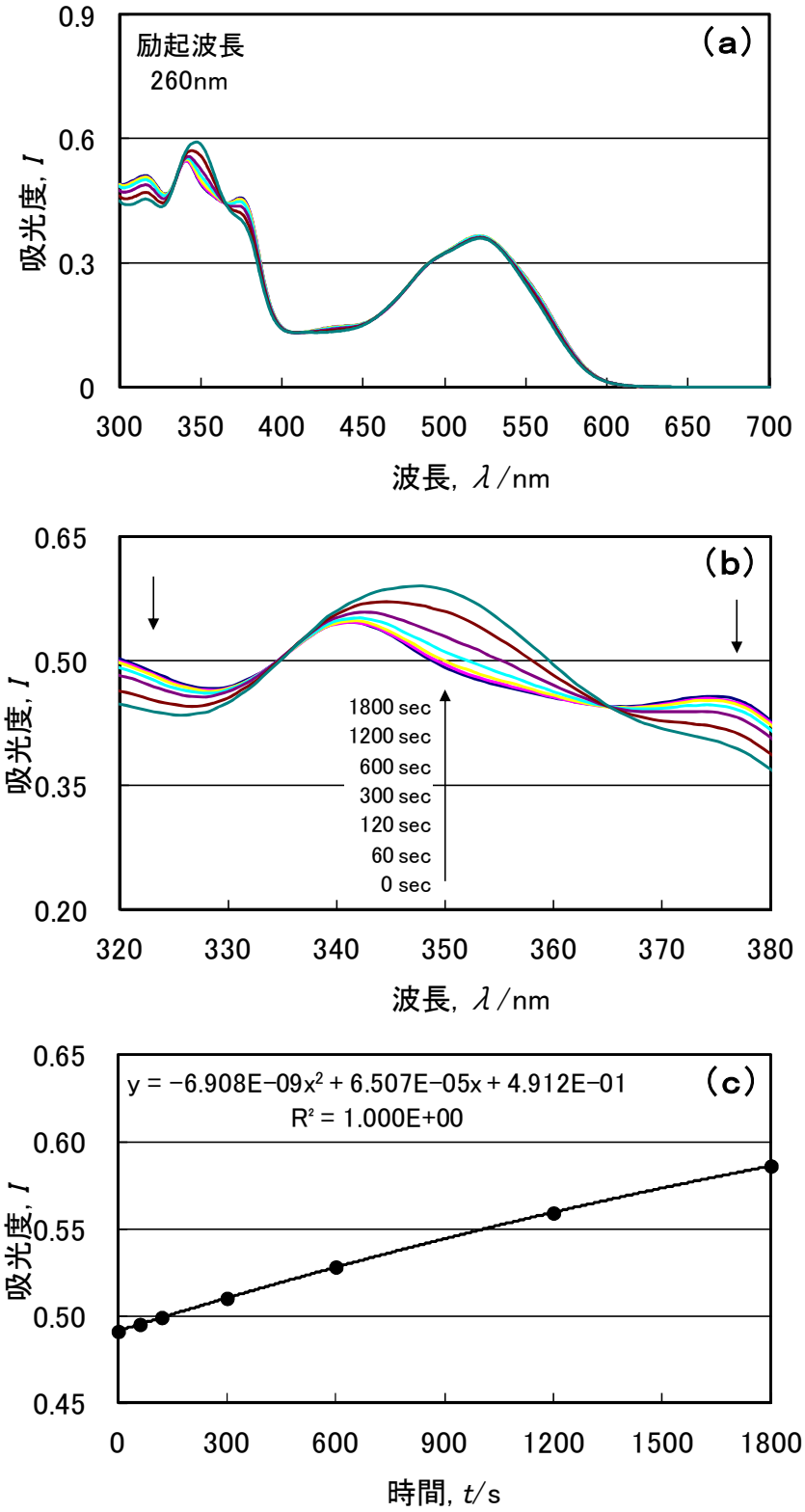


図 1.32.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：260nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

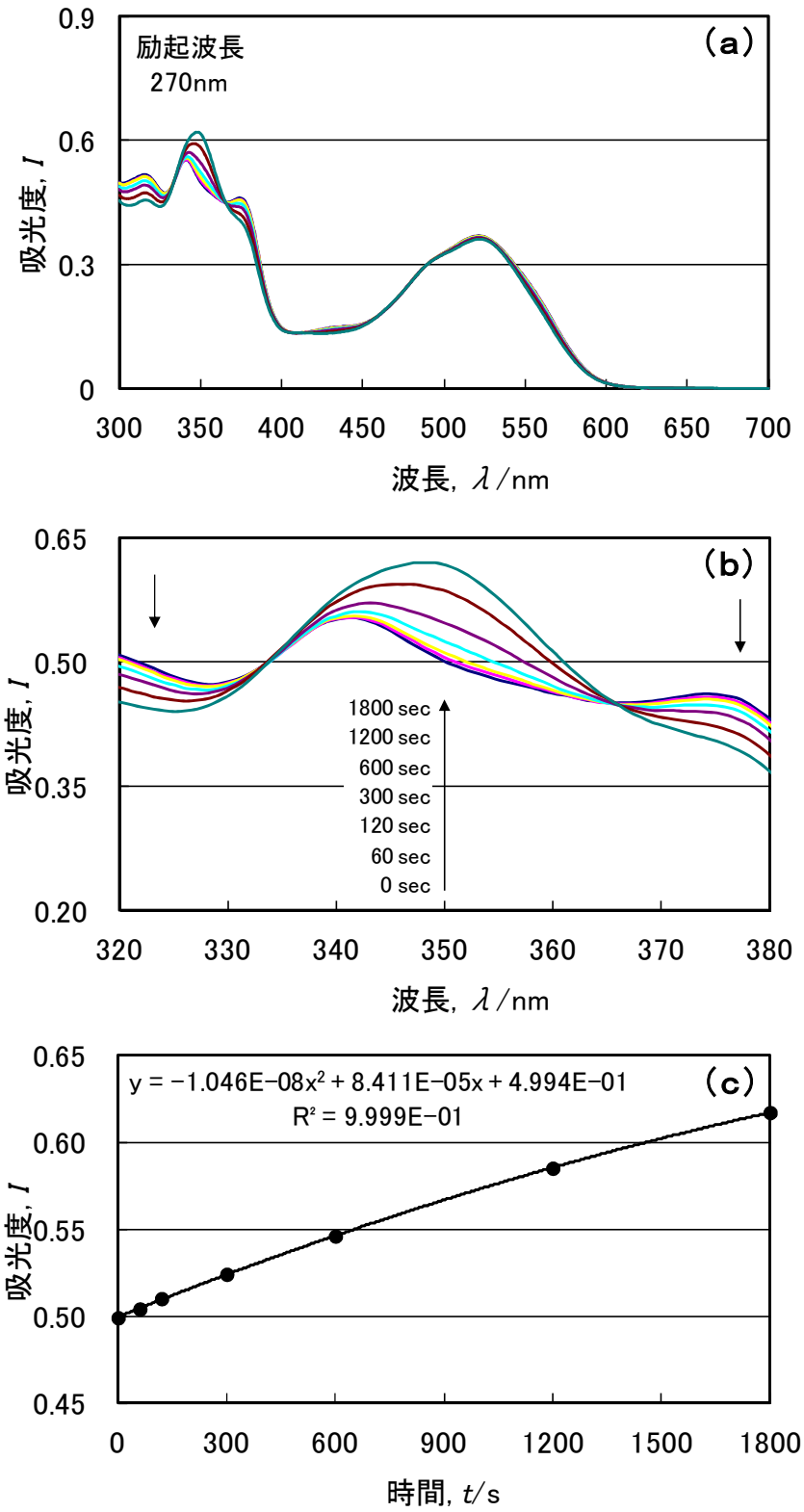


図 1.33.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：270nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

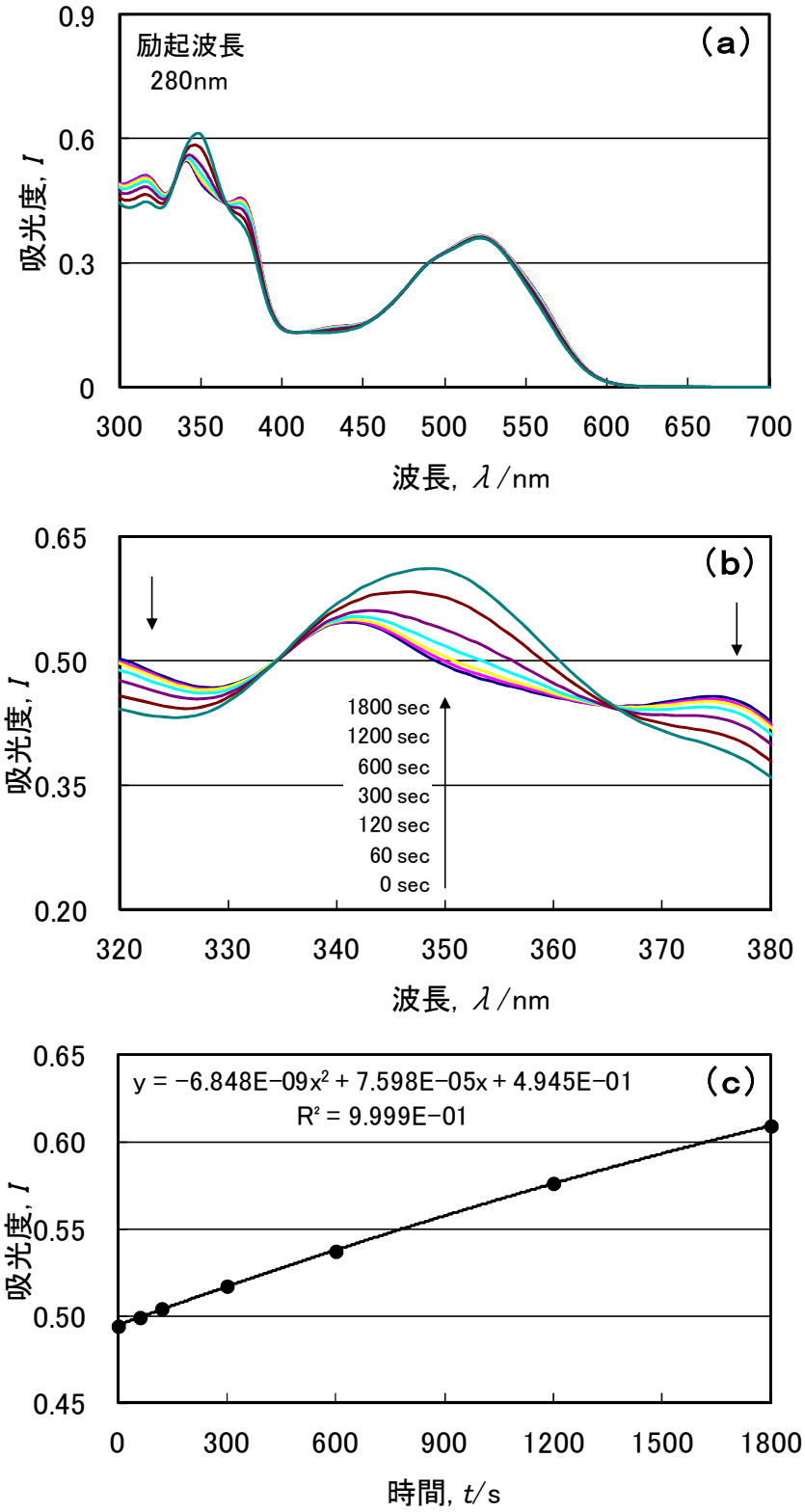


図 1.34.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：280nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

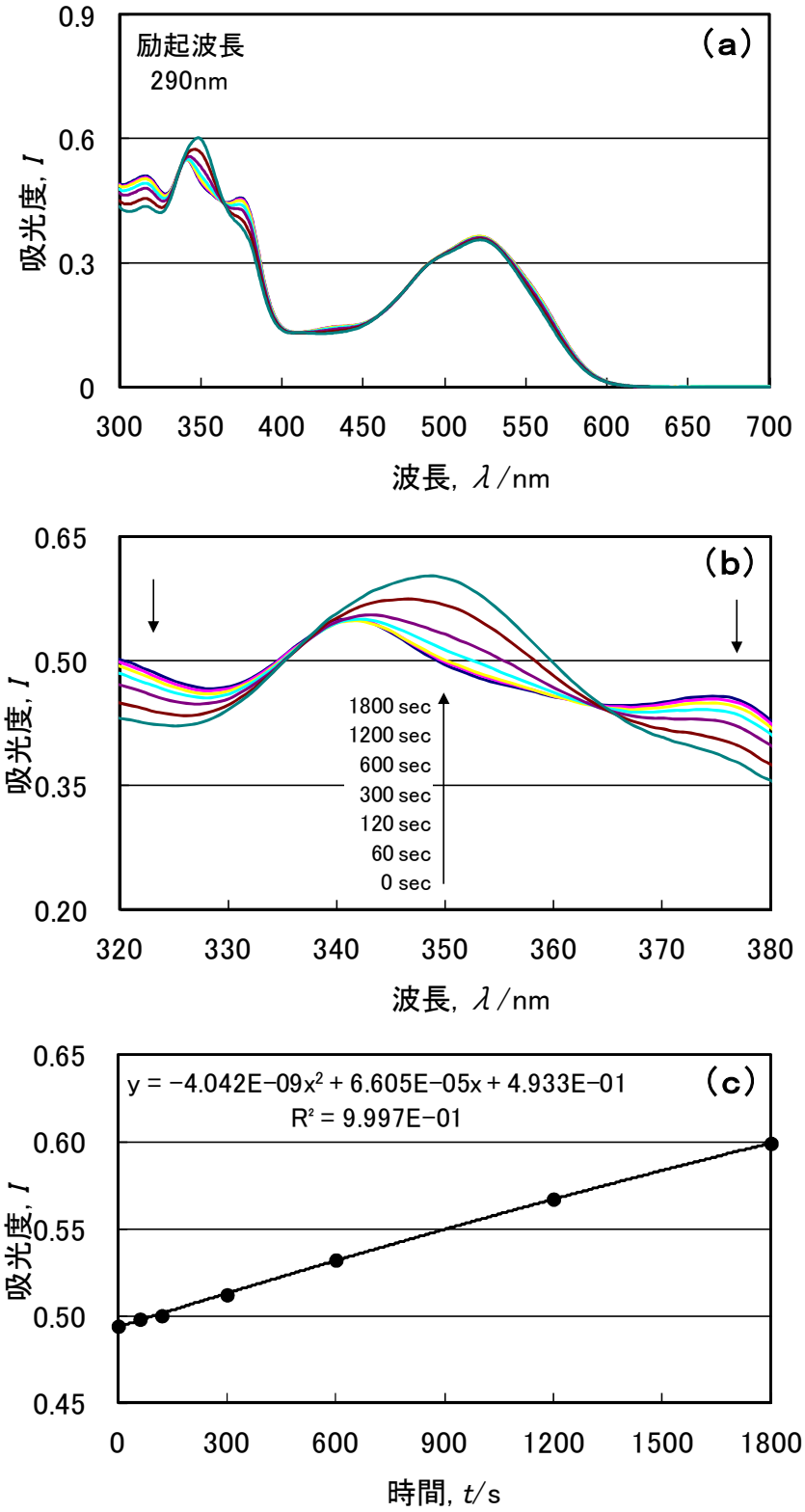


図 1.35.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：290nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

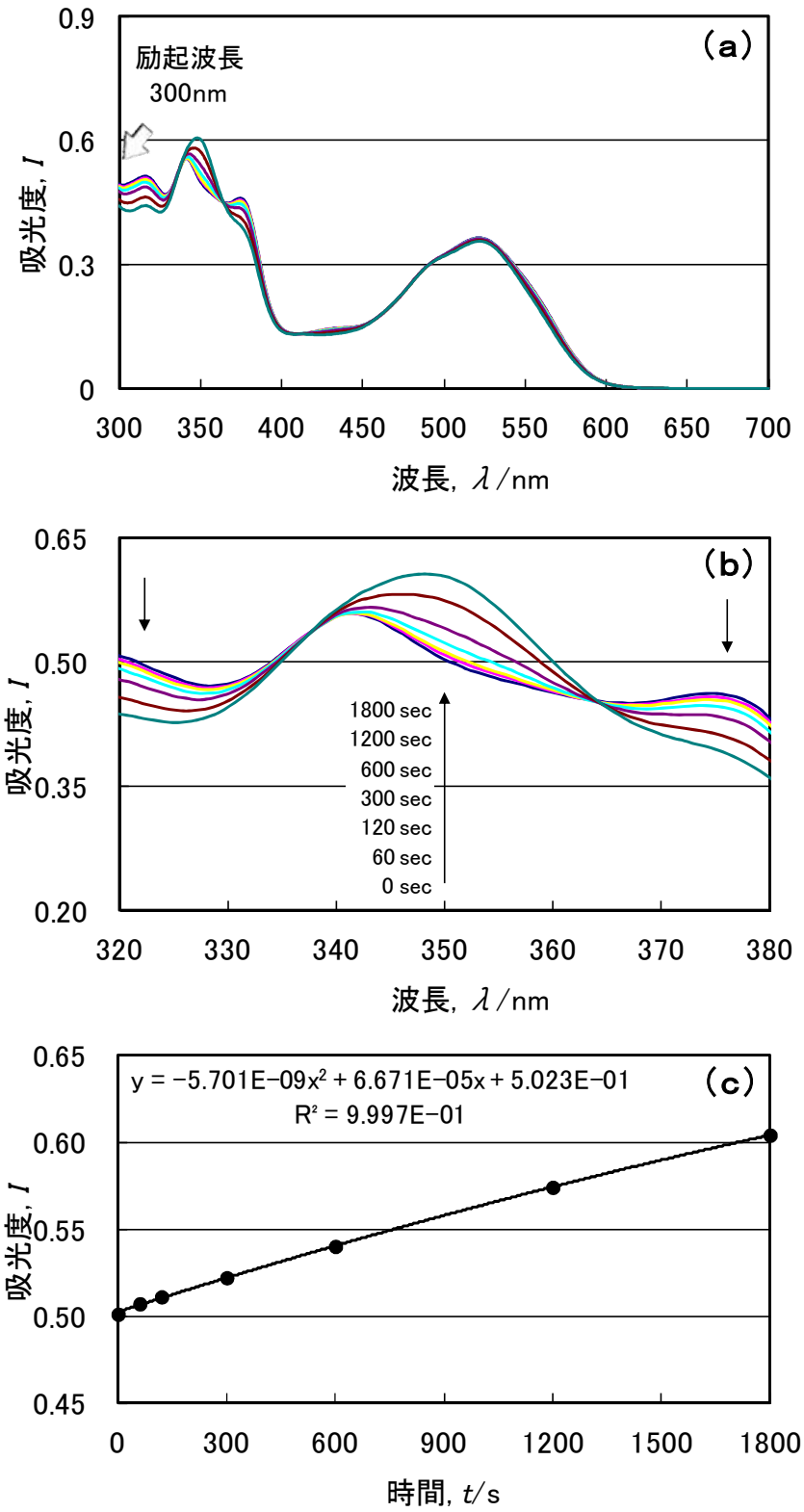


図 1.36.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：300nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

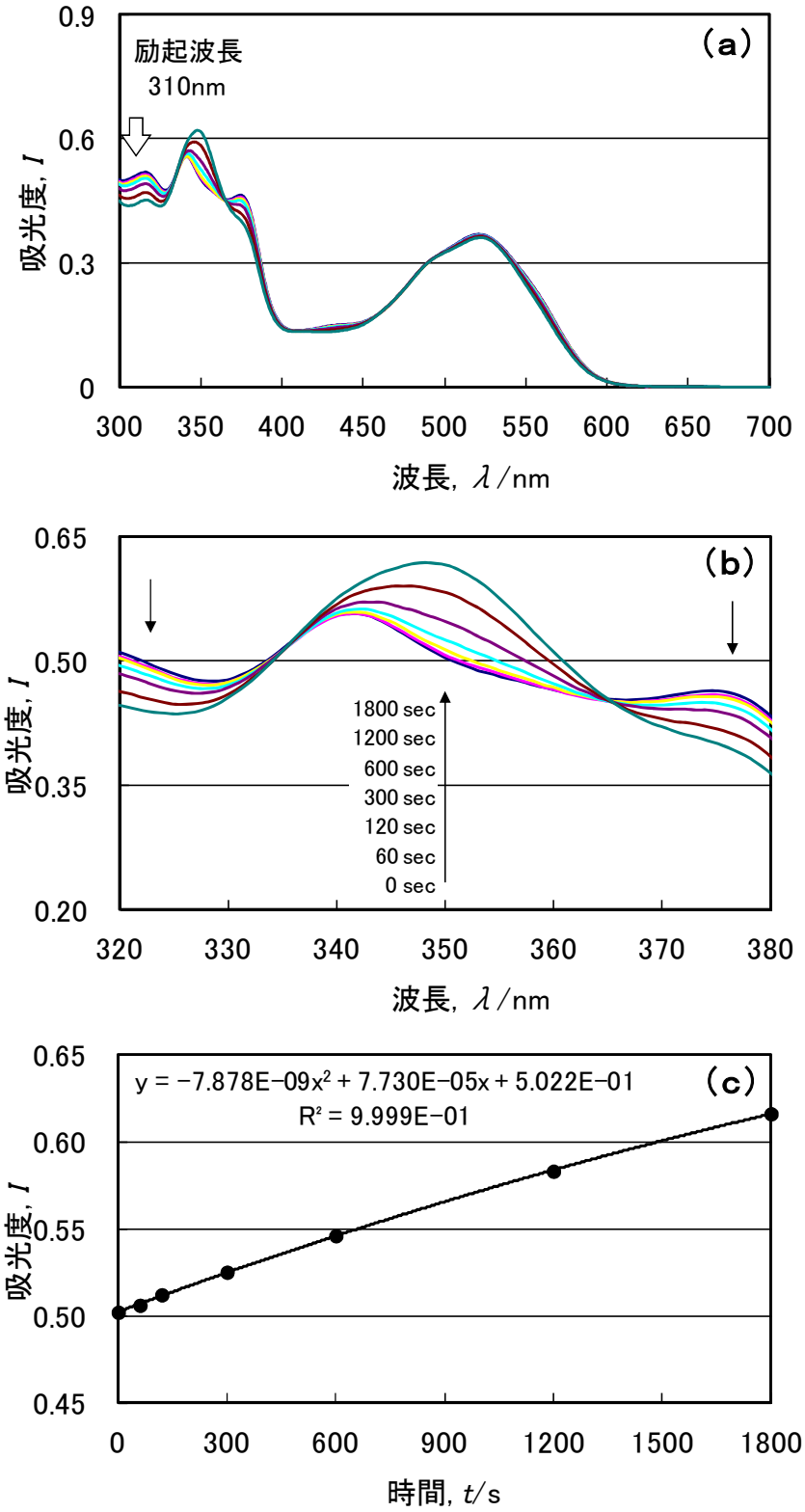


図 1.37.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：310nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

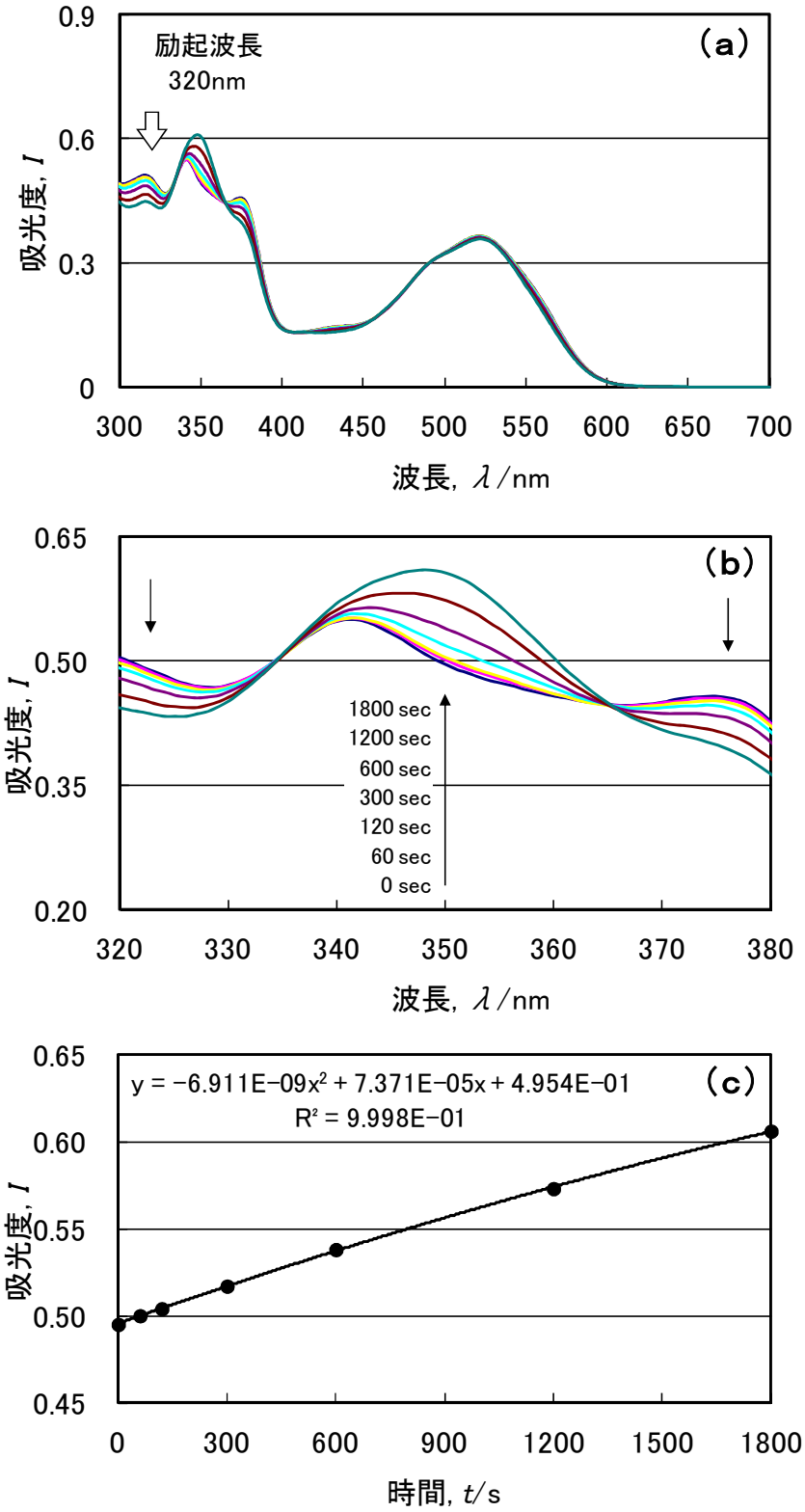


図 1.38.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：320nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

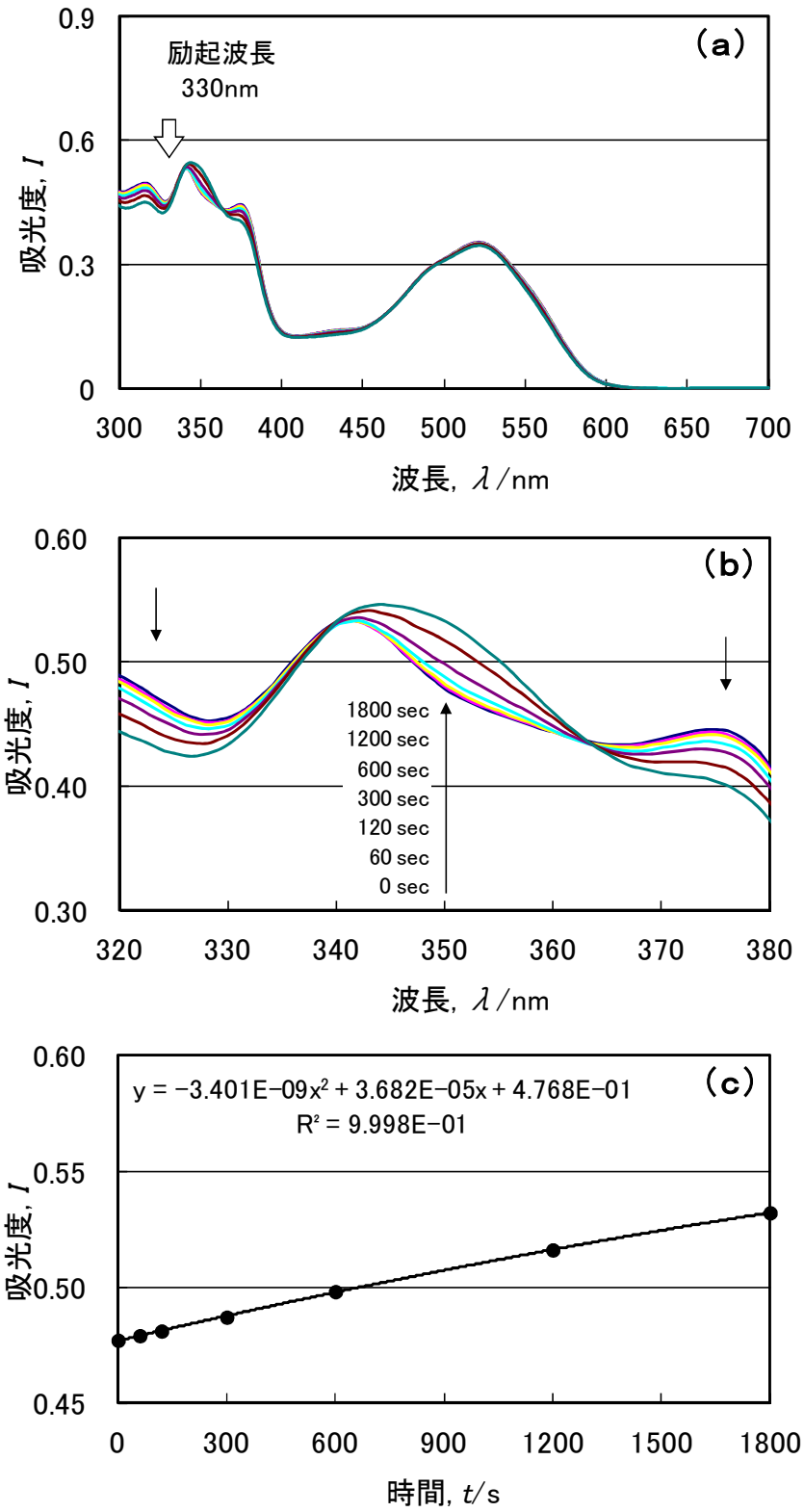


図 1.39.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：330nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

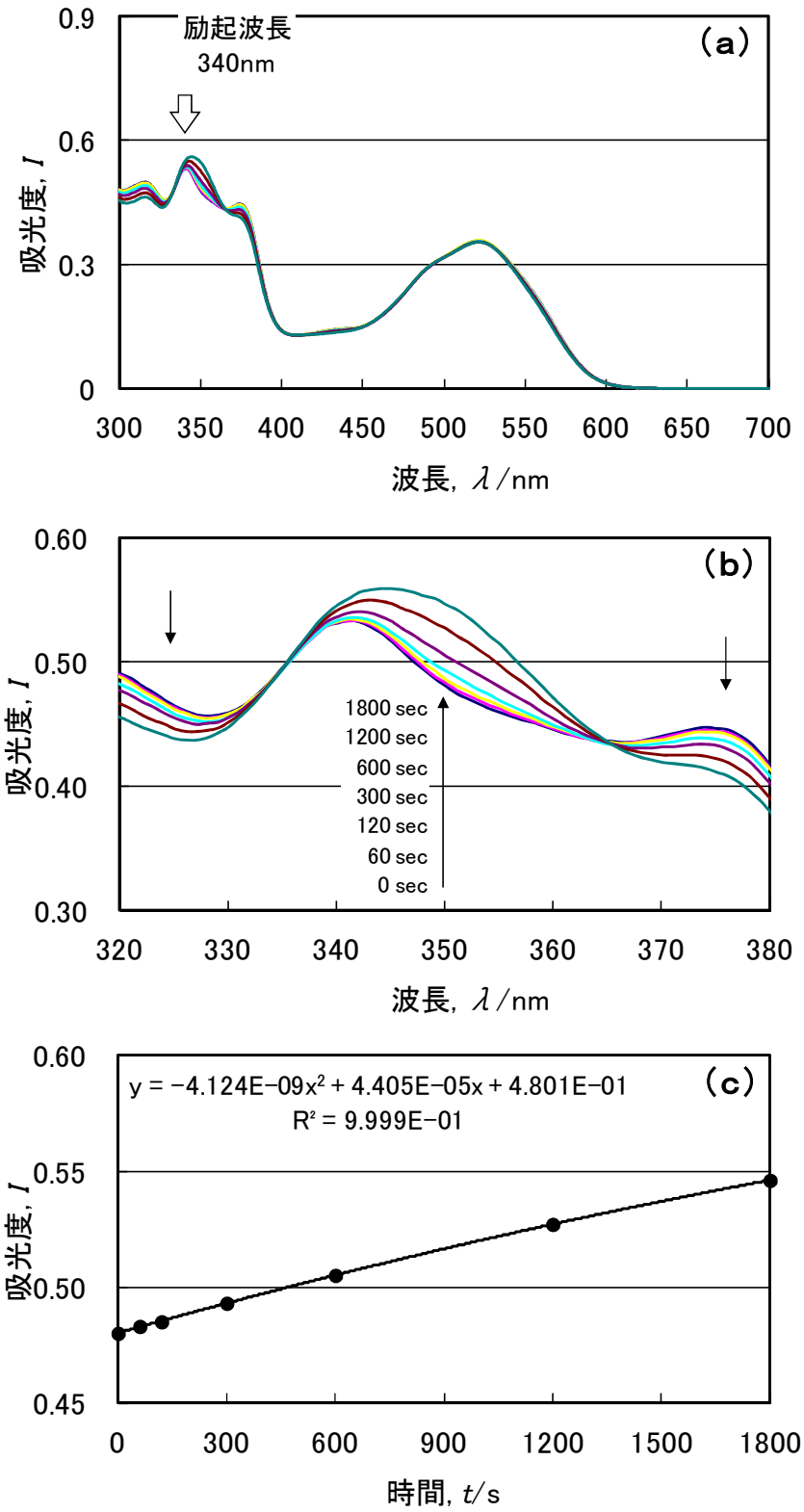


図 1.40.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：340nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

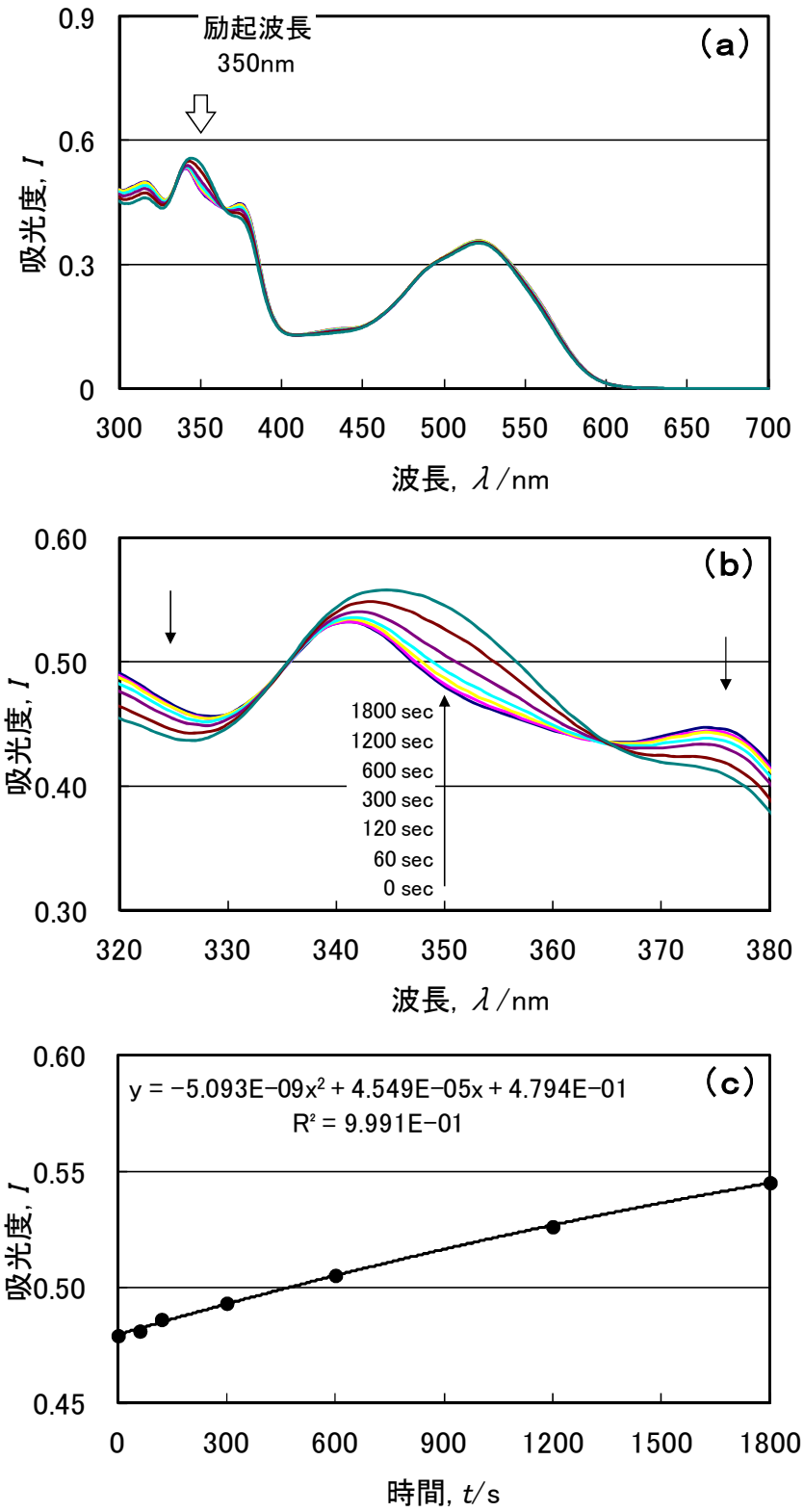


図 1.41.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：350nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

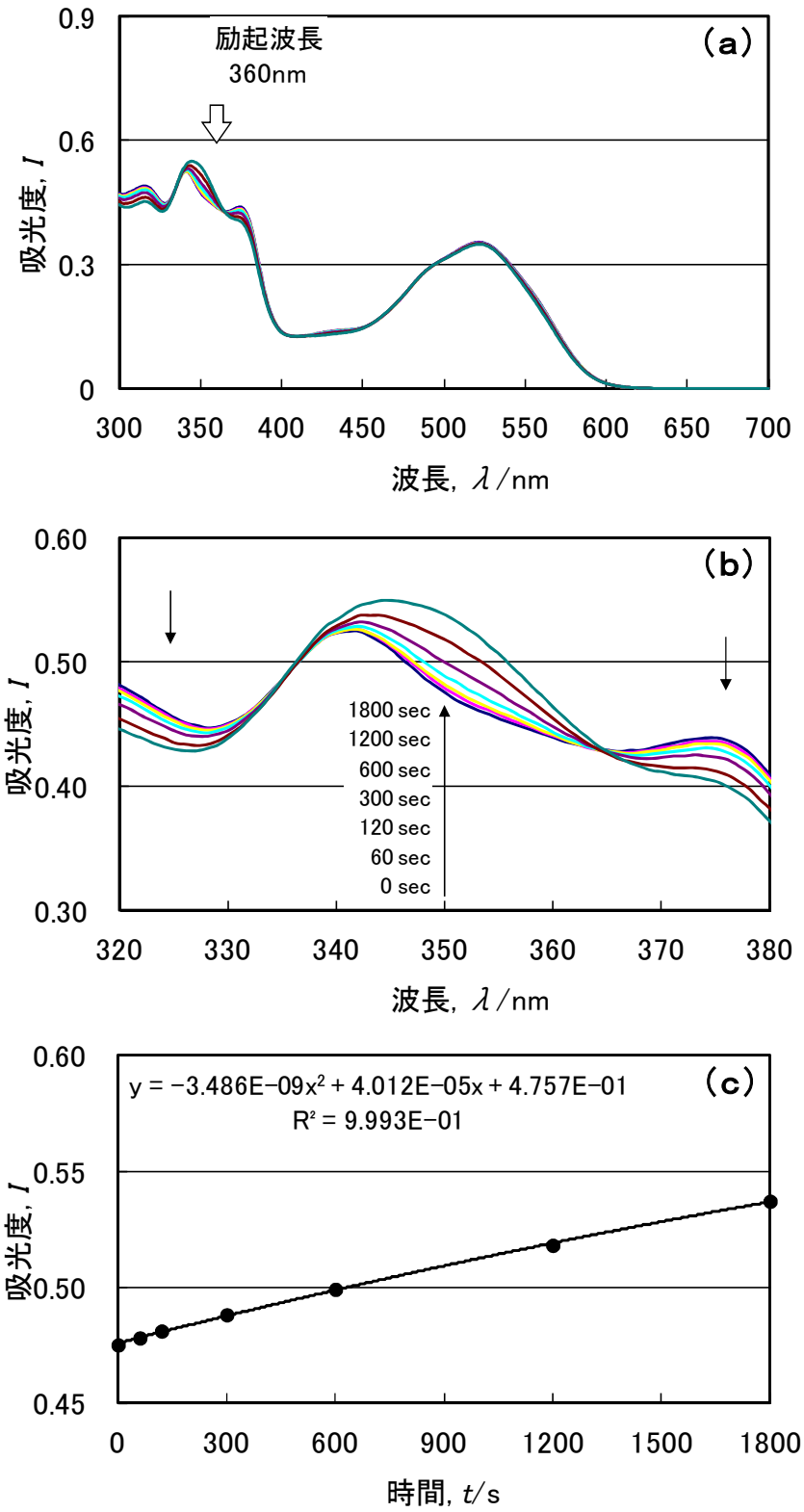


図 1.42.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：360nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

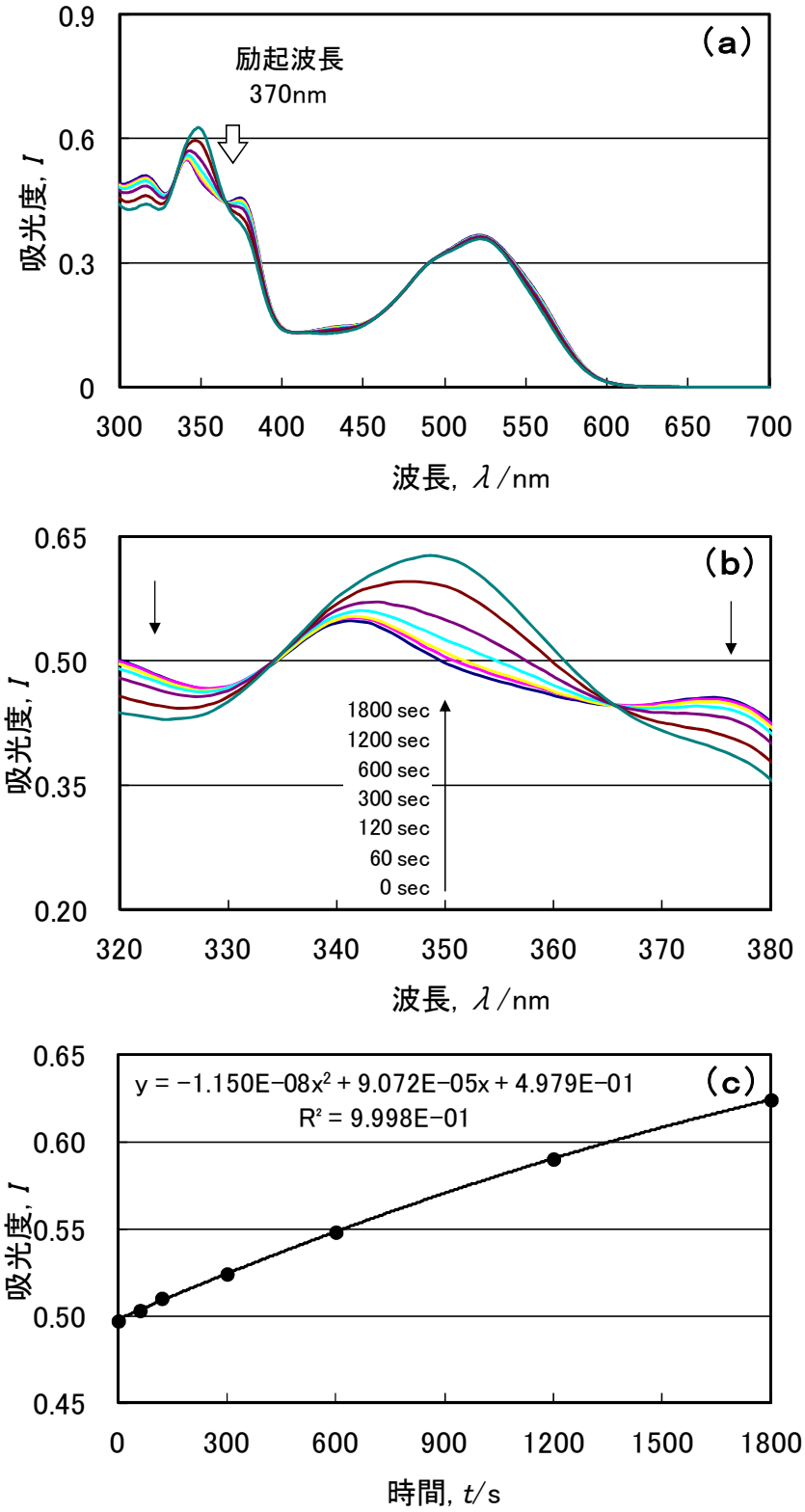


図 1.43.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：370nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

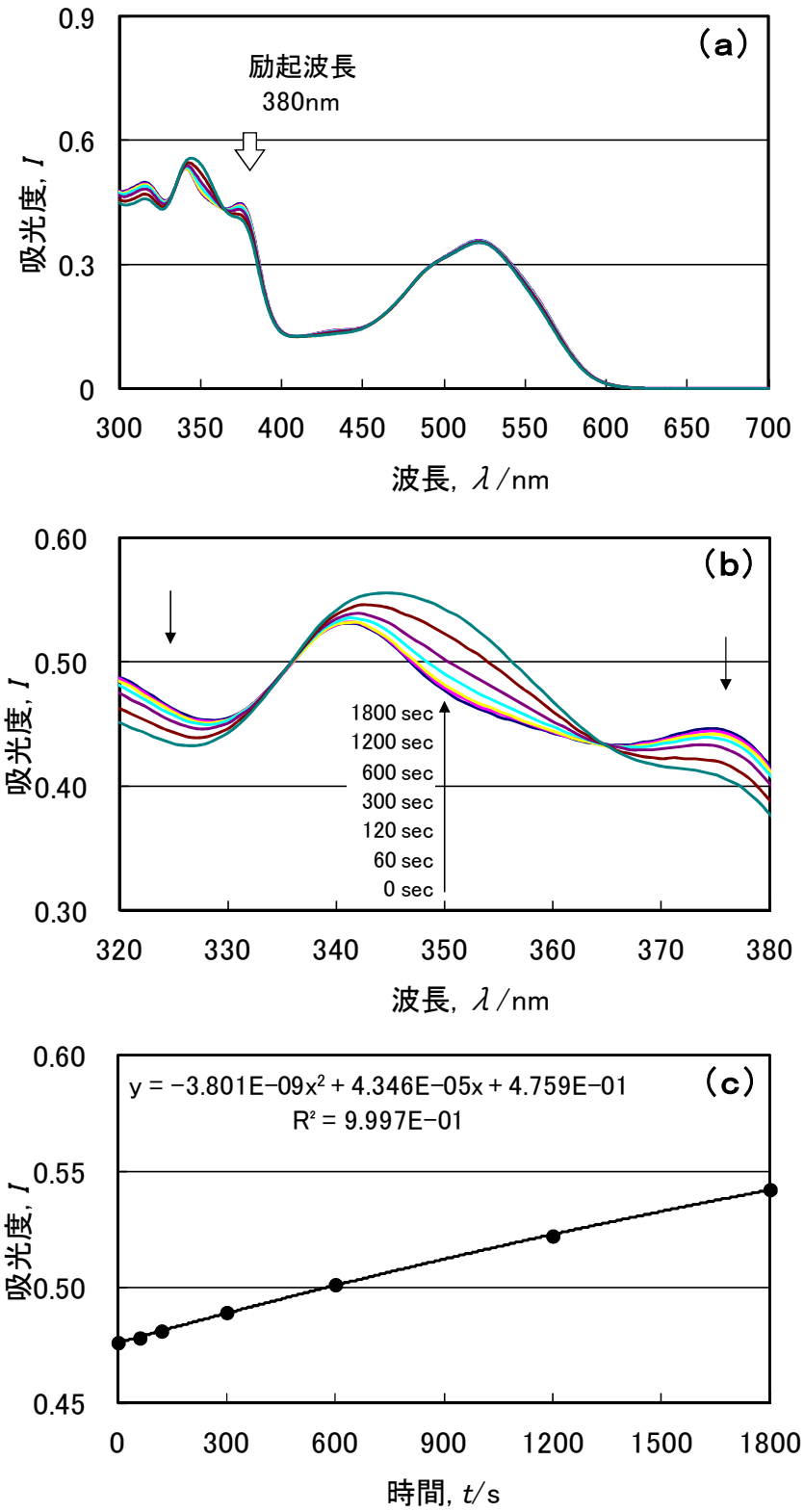


図 1.44.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：380nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

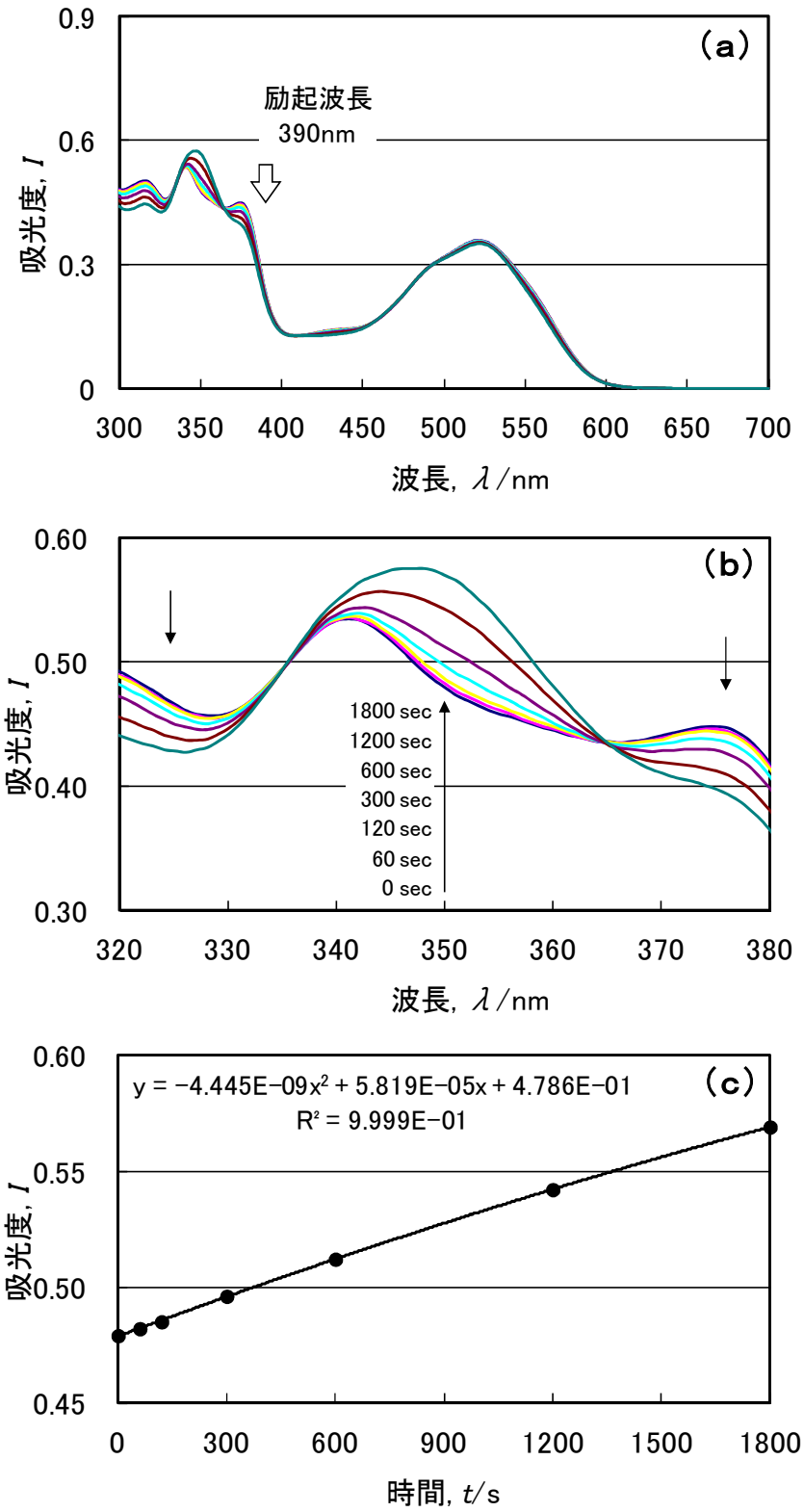


図 1.45.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：390nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

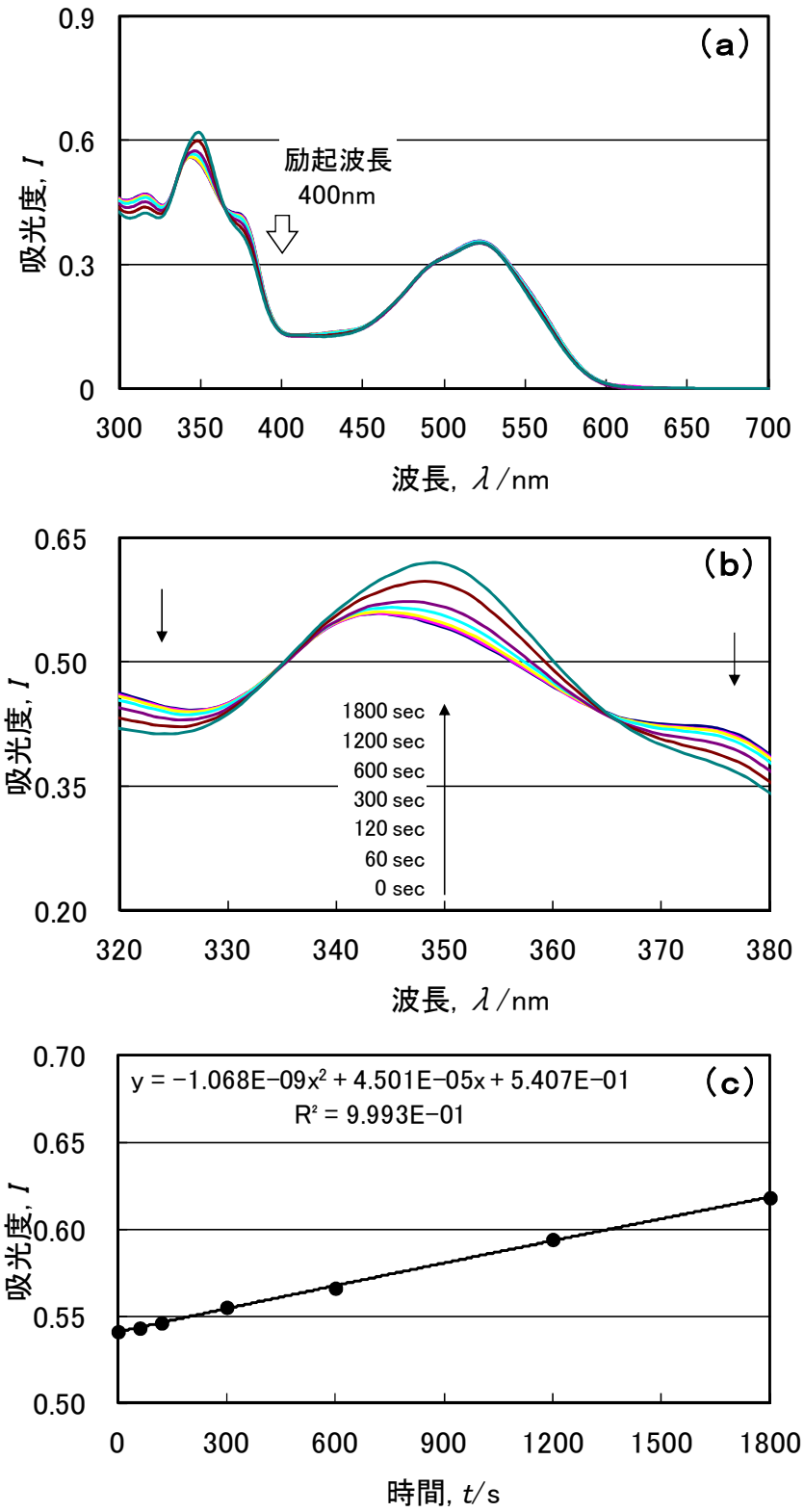


図 1.46.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：400nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

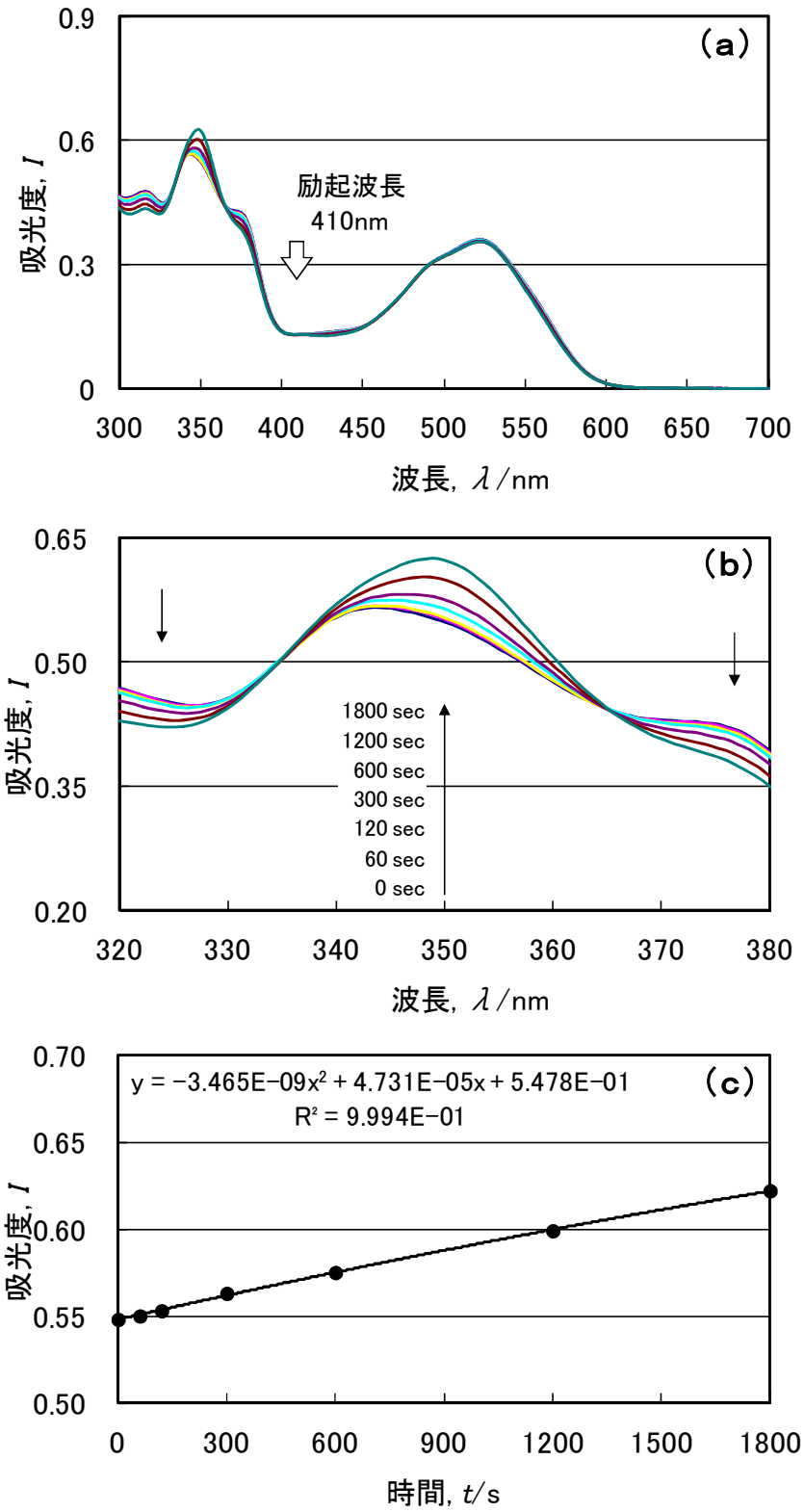


図 1.47.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：410nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

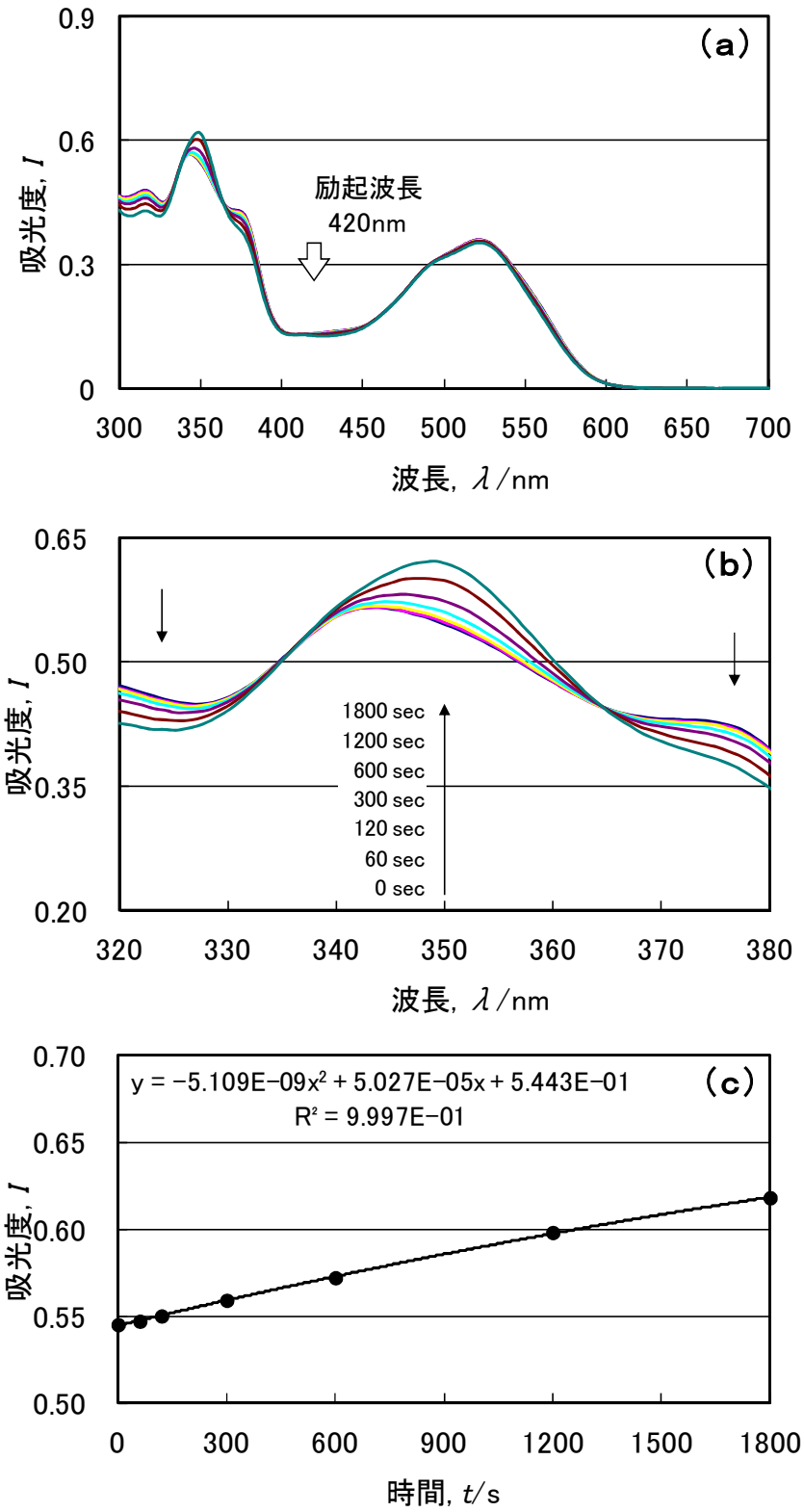


図 1.48.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：420nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

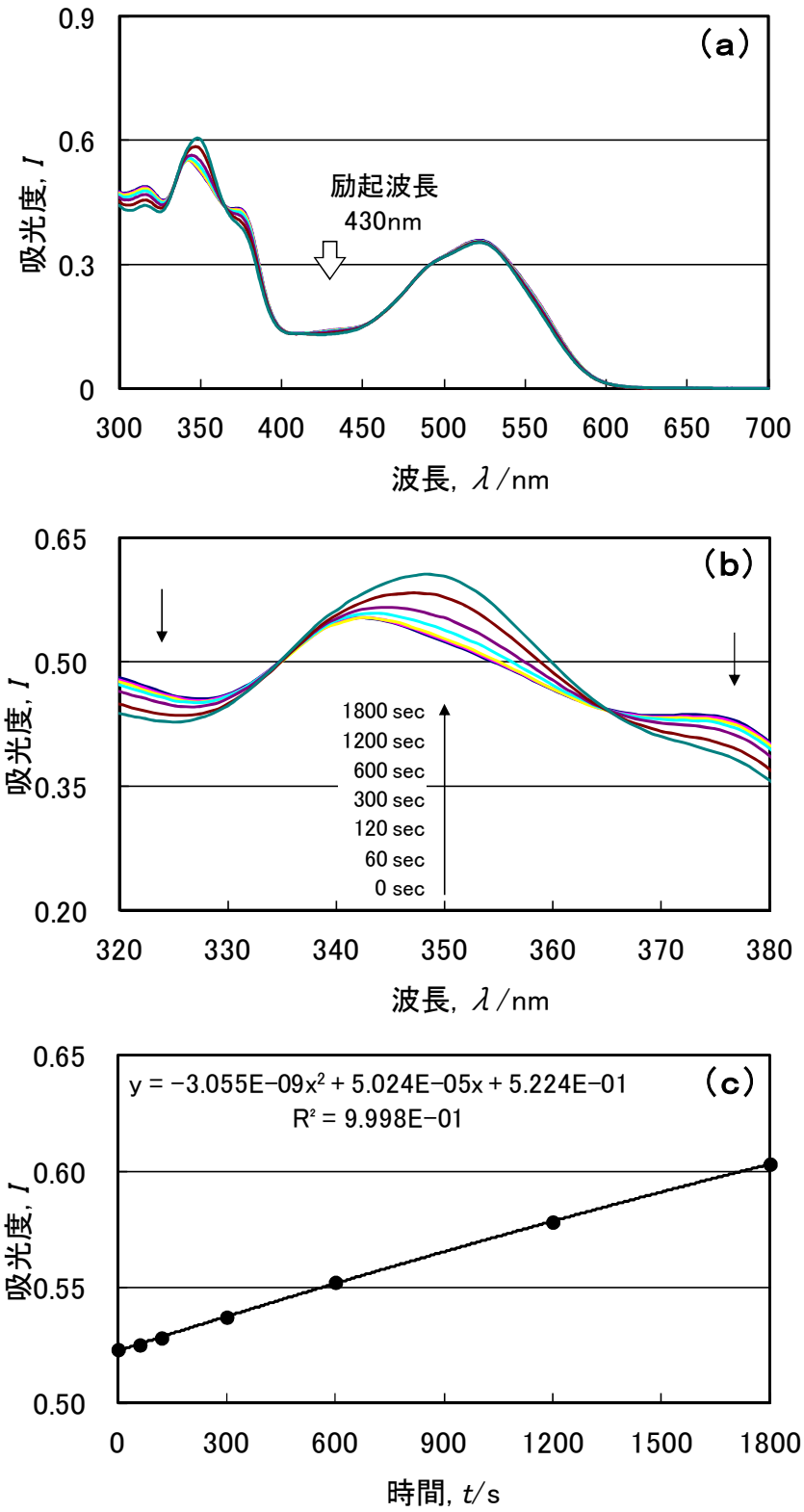


図 1.49.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：430nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

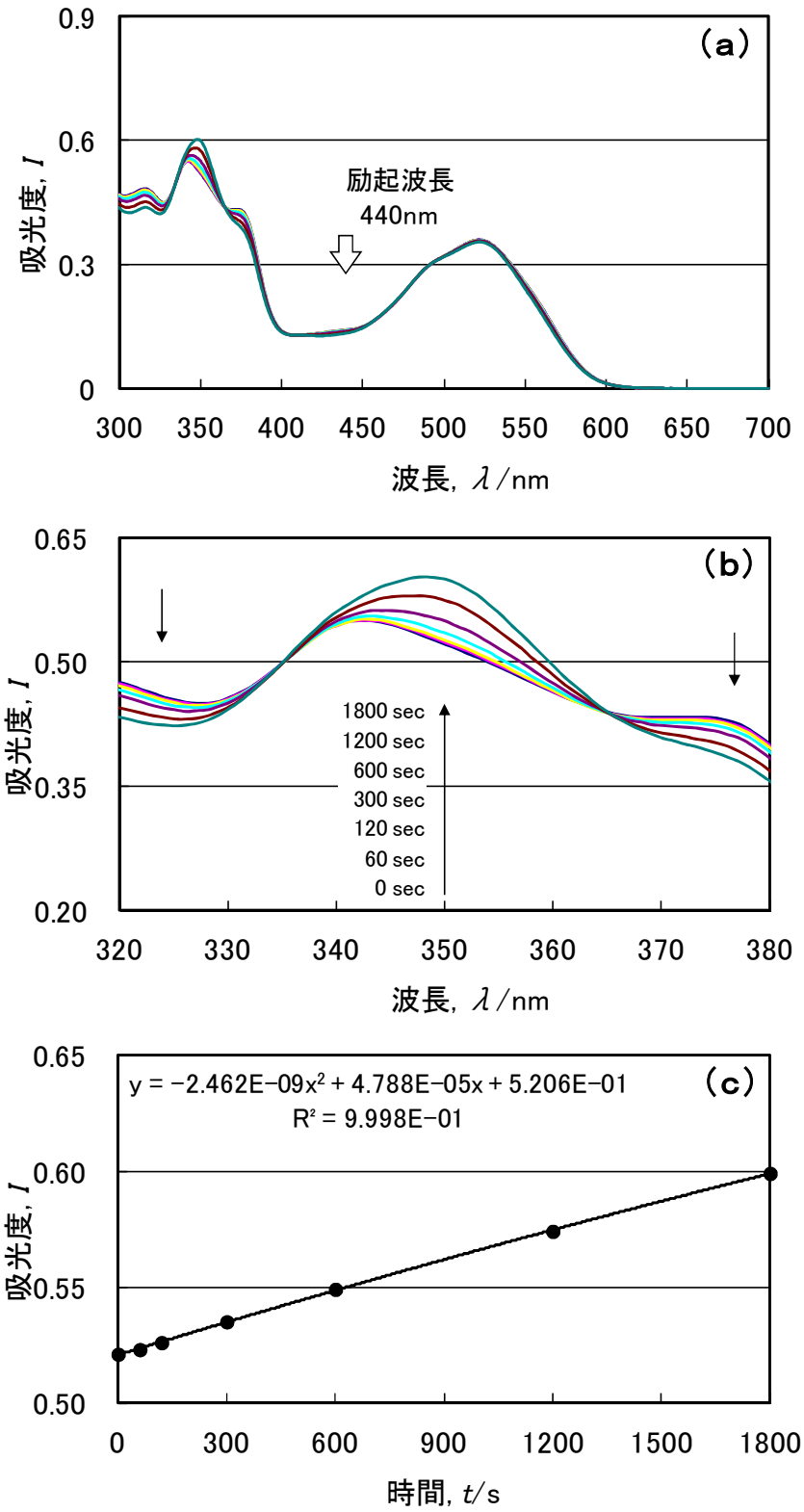


図 1.50.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：440nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

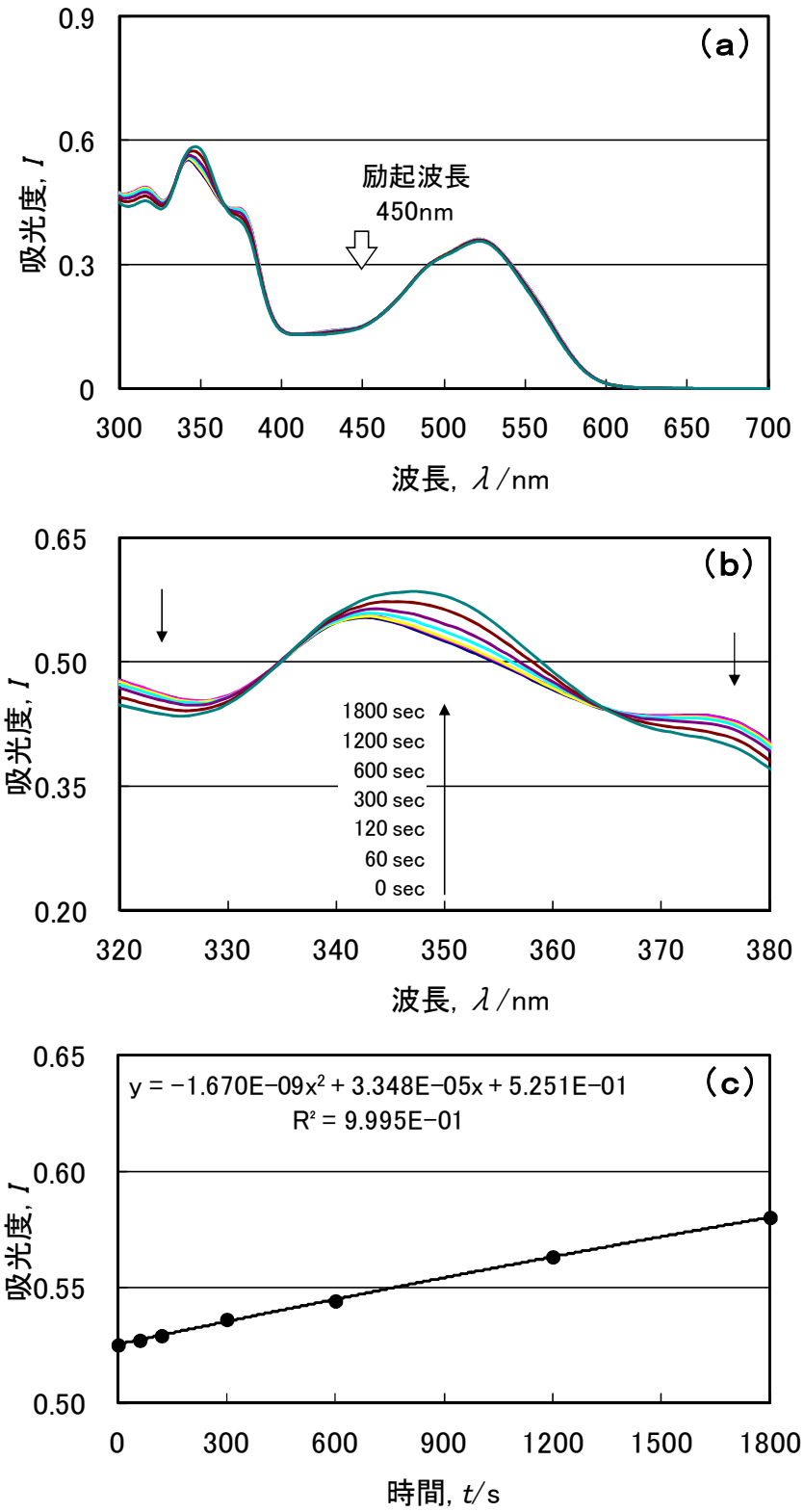


図 1.51.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：450nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

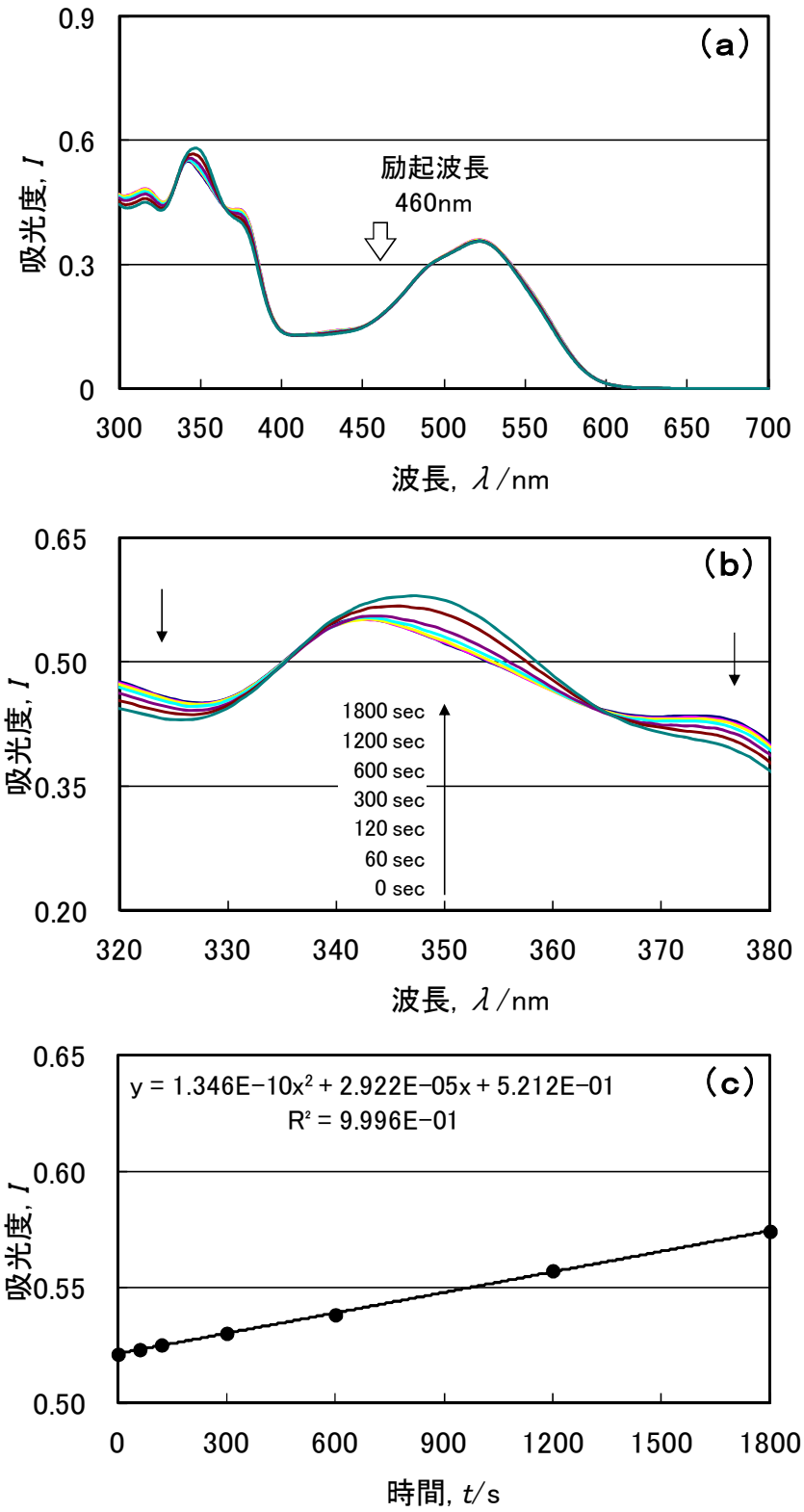


図 1.52.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：460nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

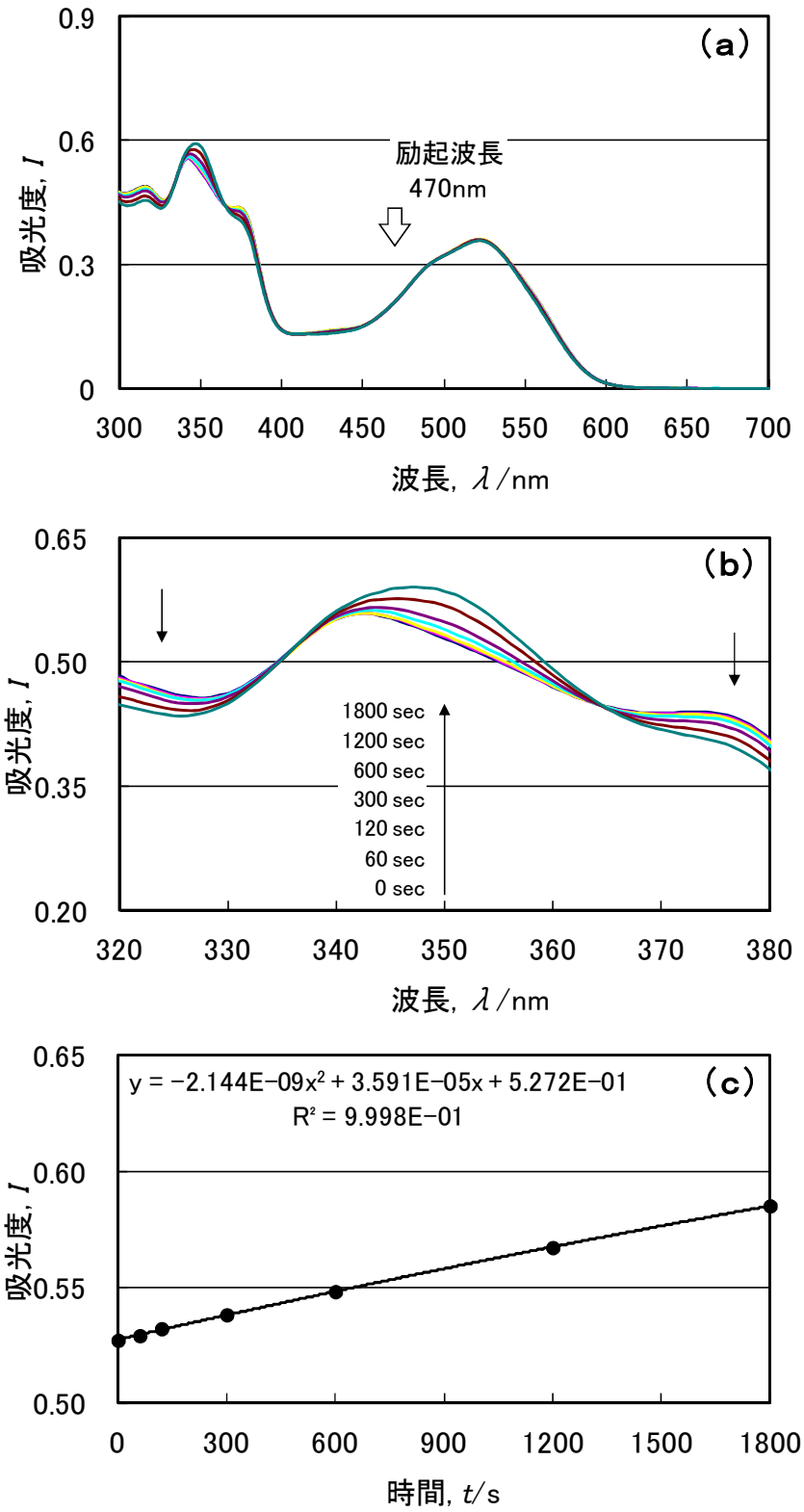


図 1.53.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：470nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

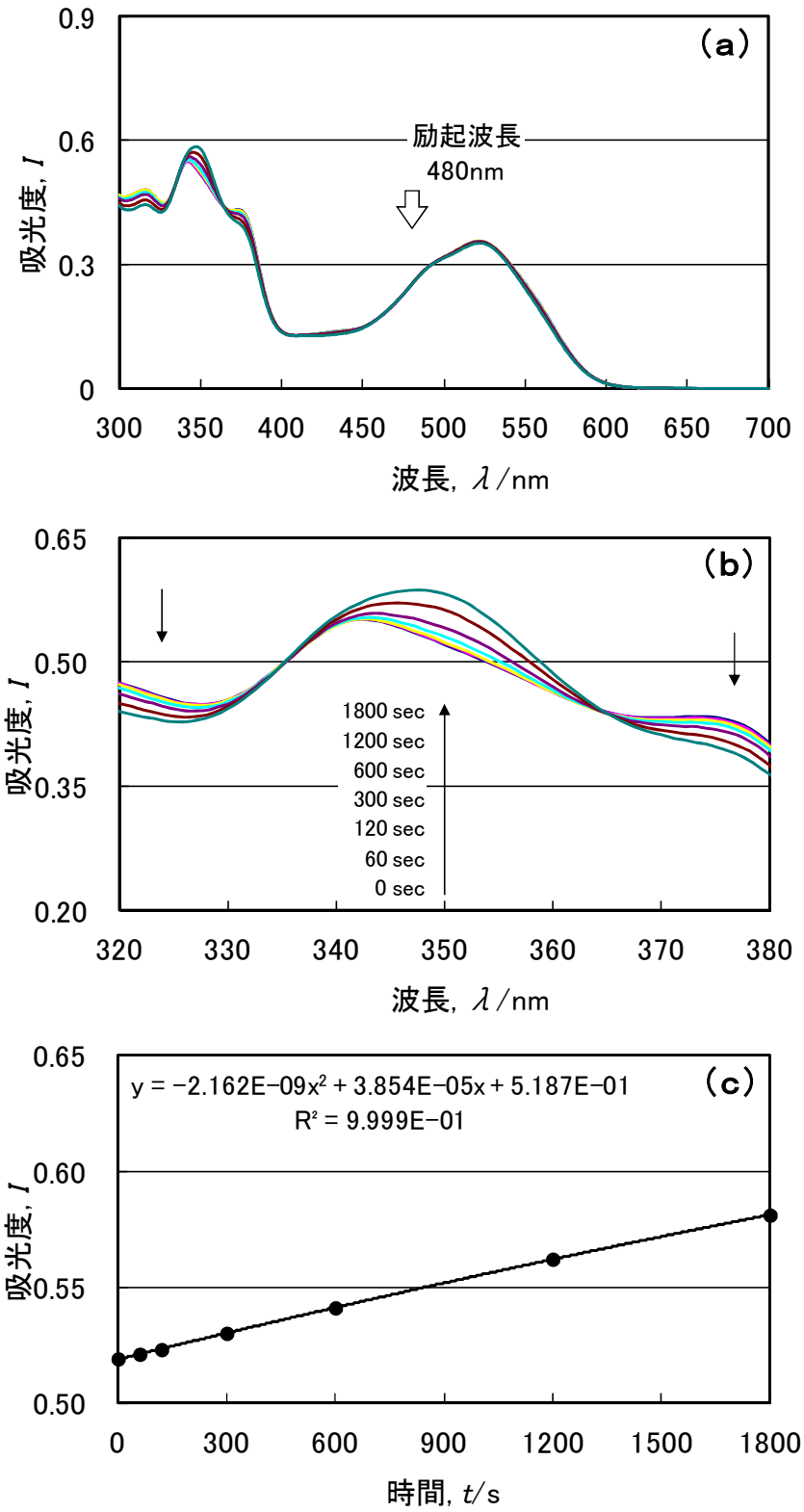


図 1.54.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：480nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

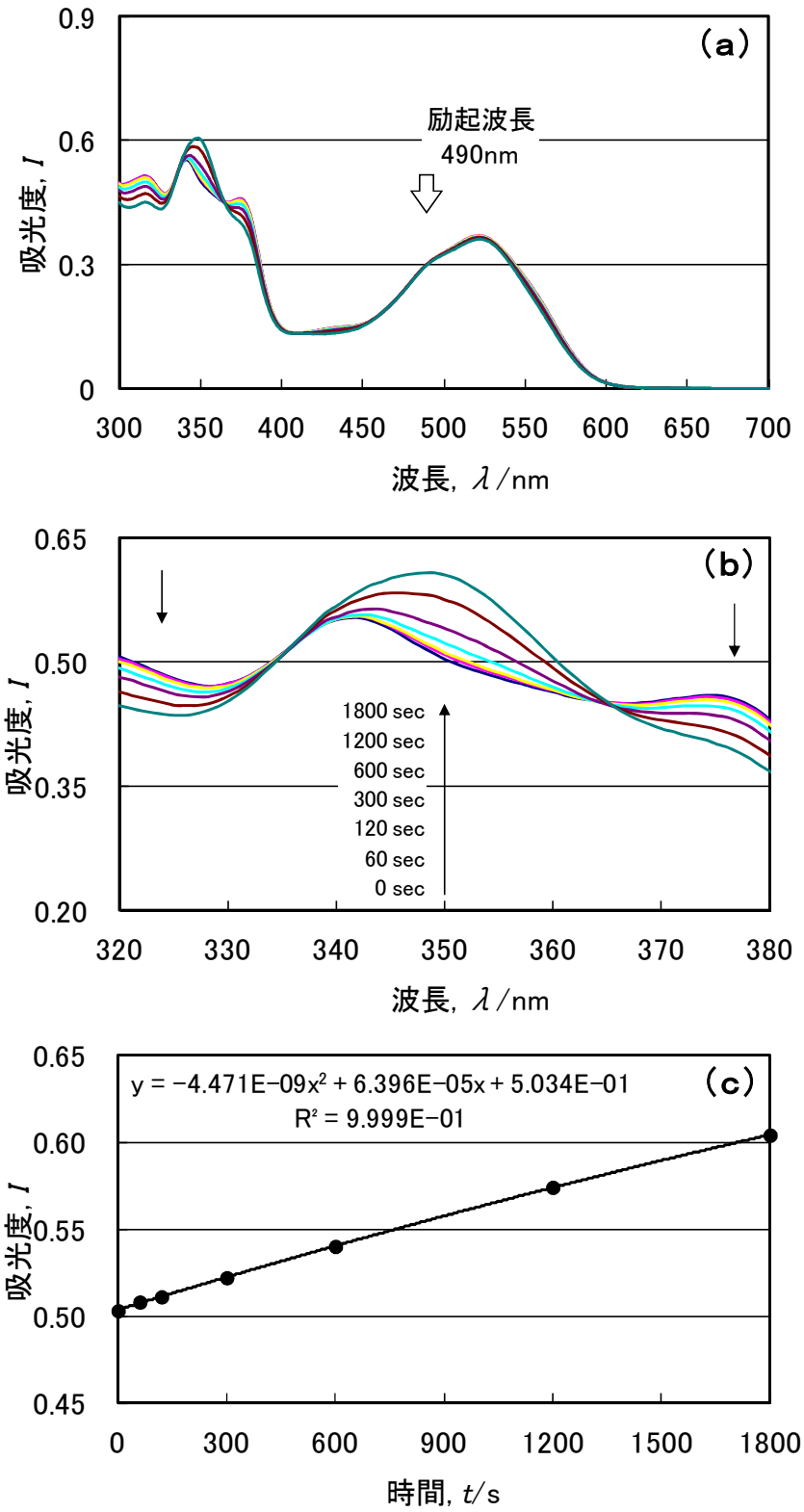


図 1.55.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：490nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

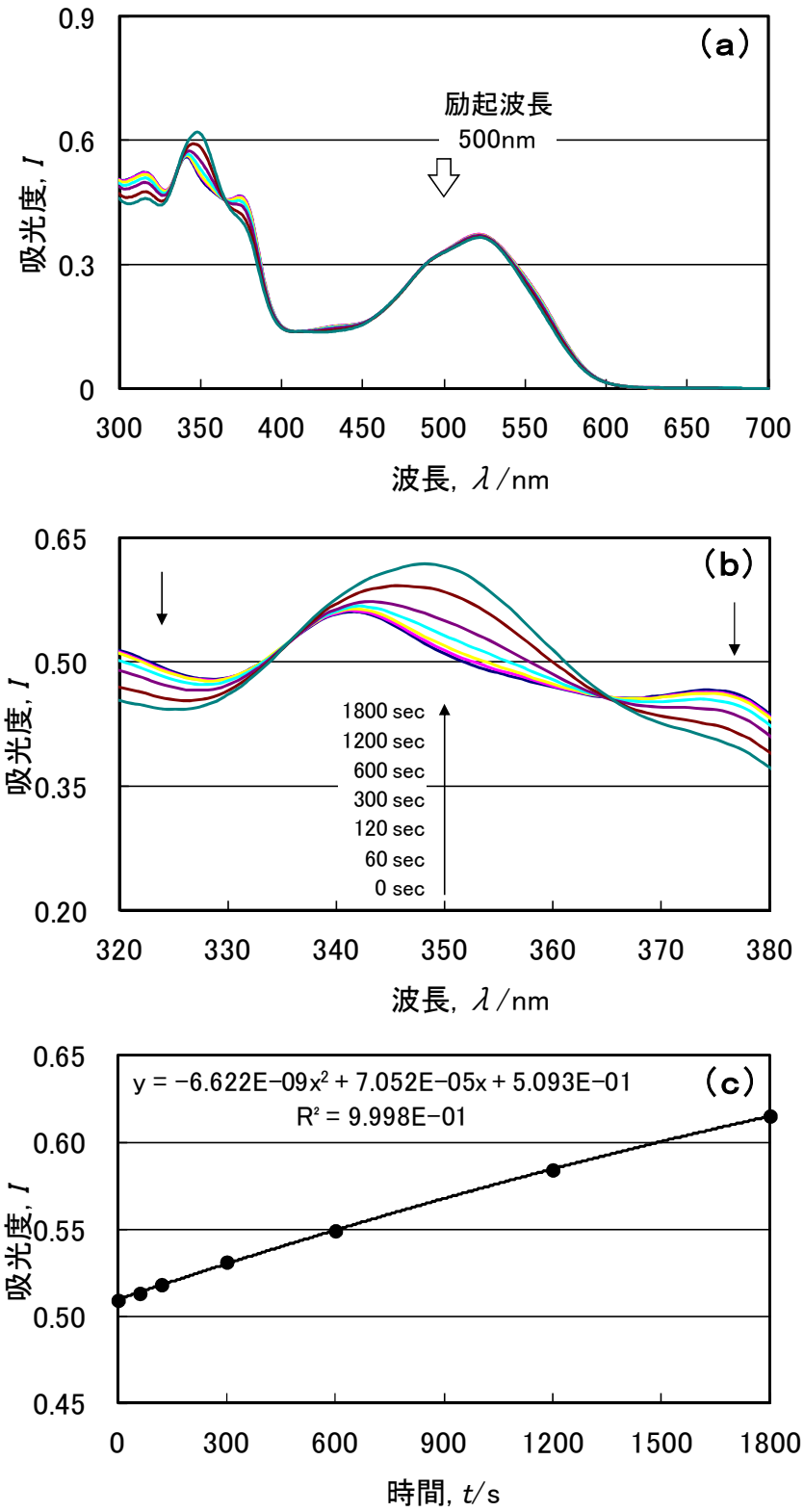


図 1.56.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：500nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

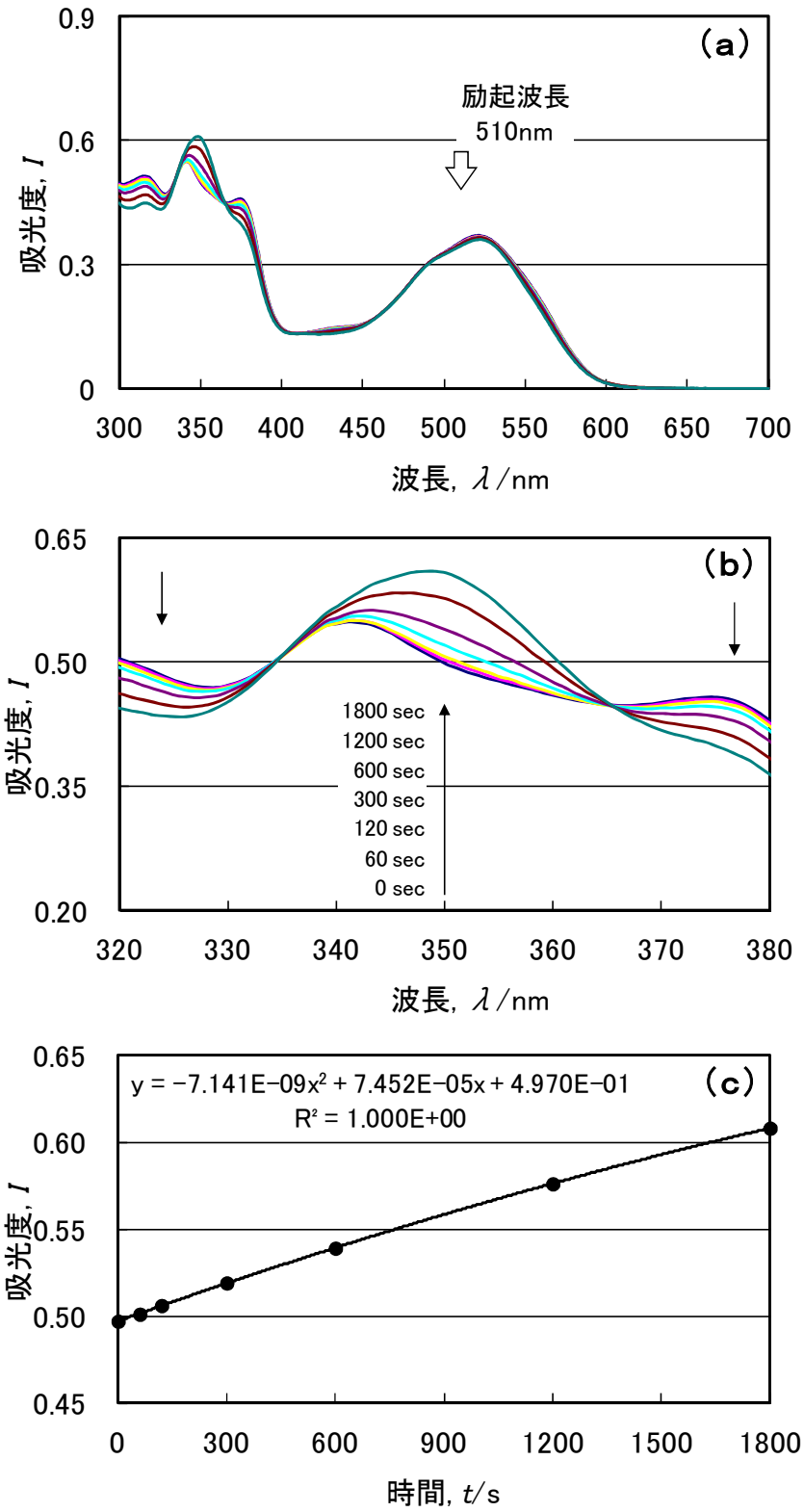


図 1.57.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：510nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

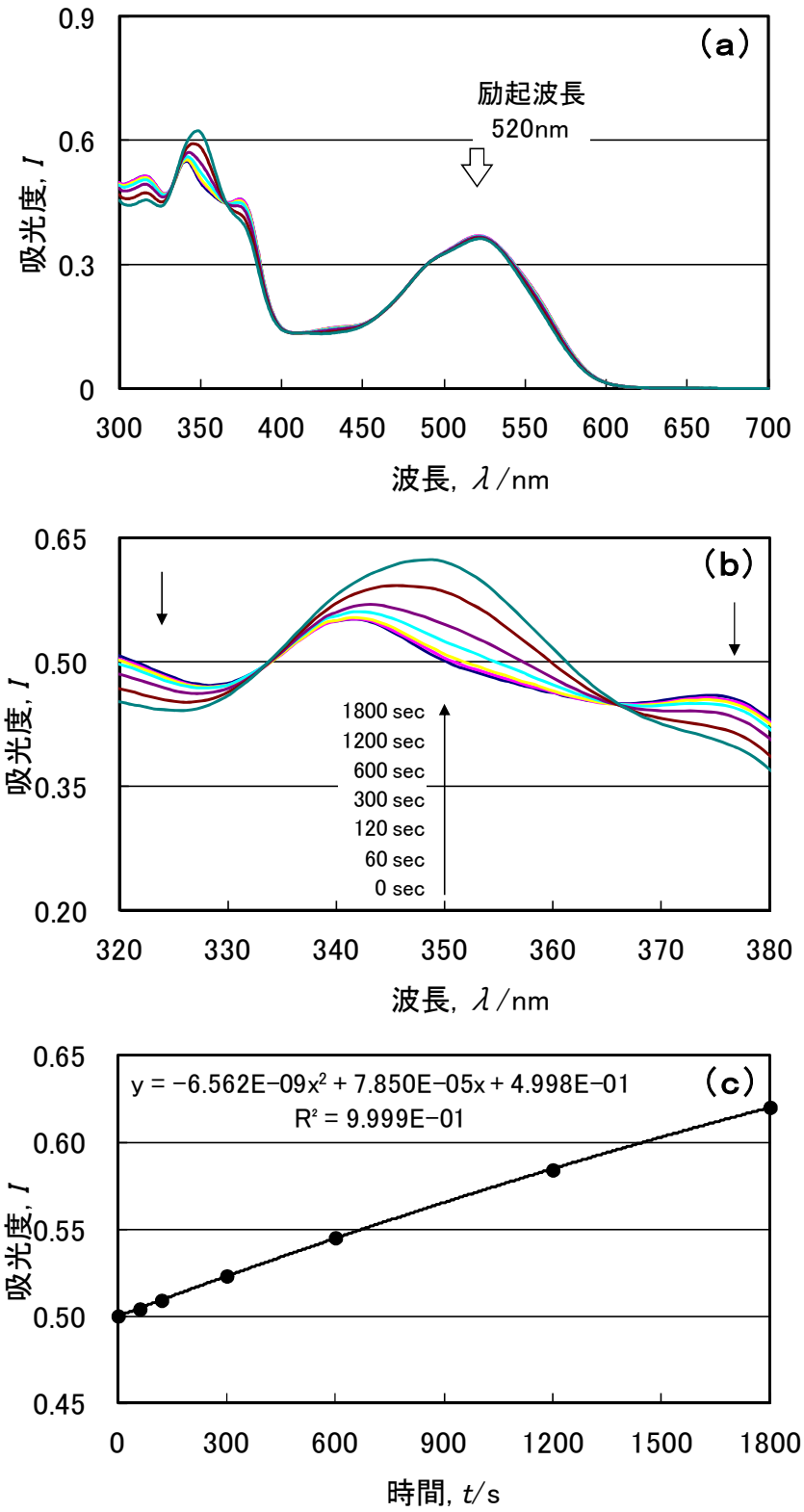


図 1.58.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：520nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

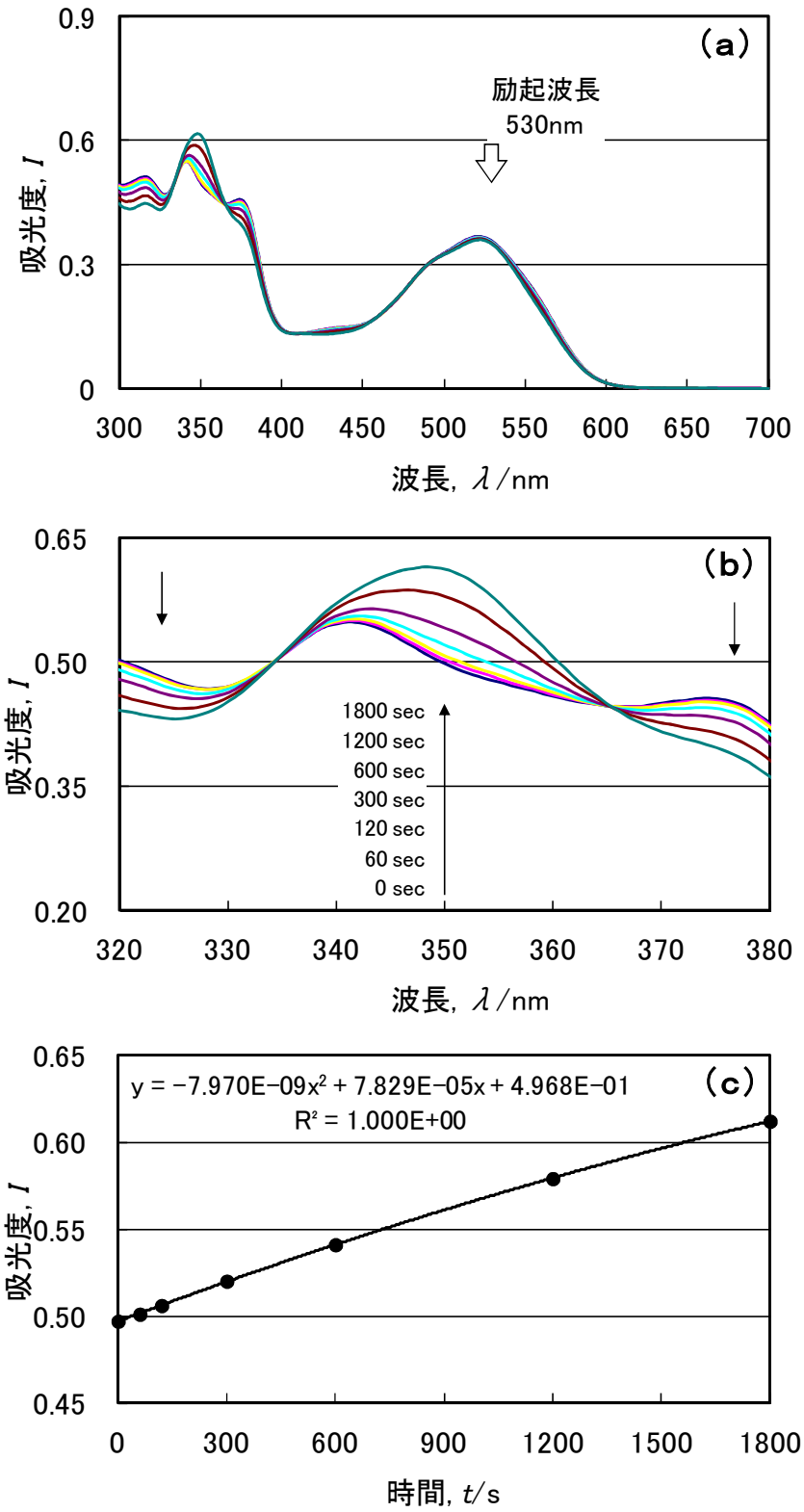


図 1.59.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：530nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

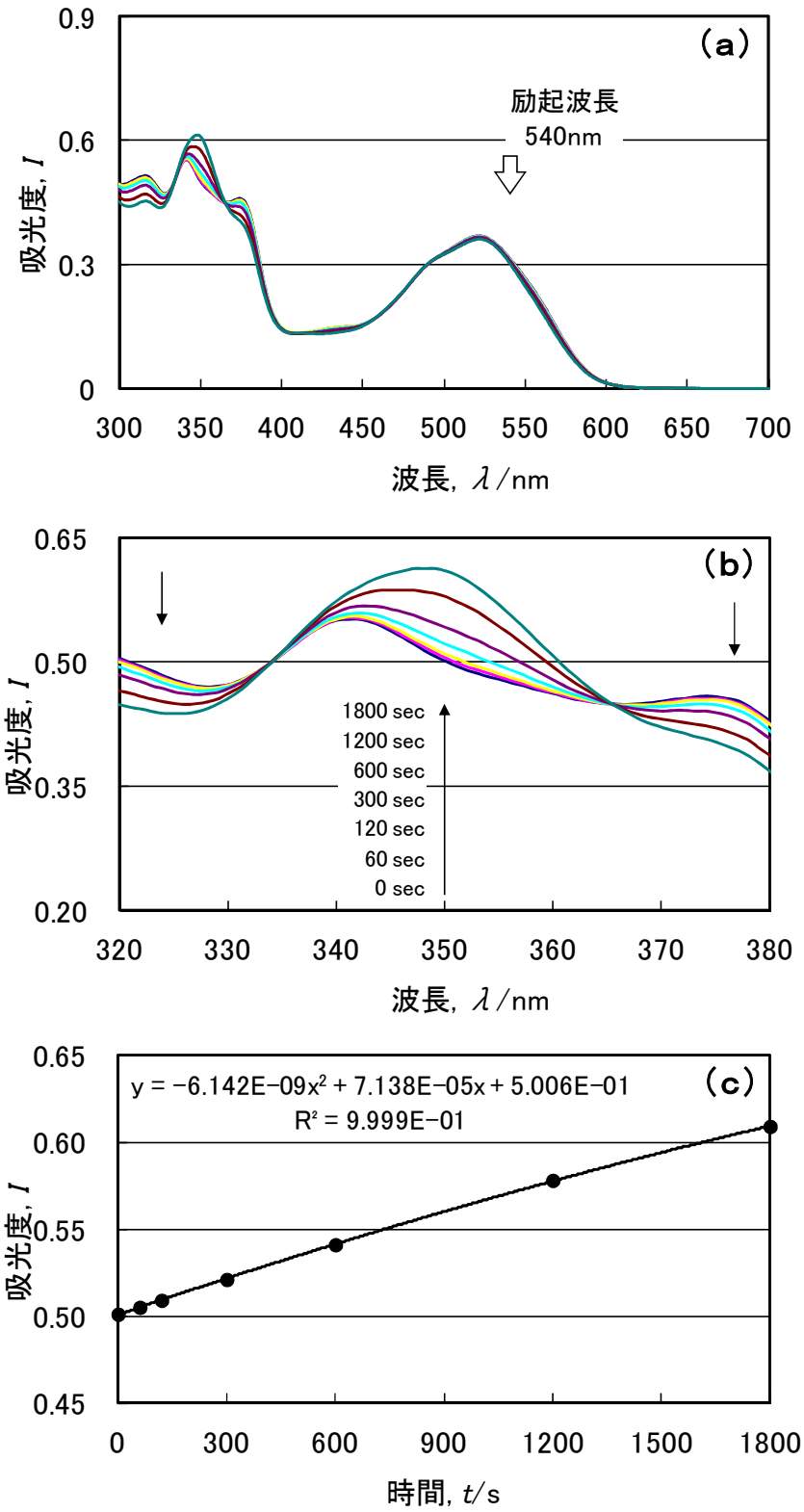


図 1.60.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：540nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

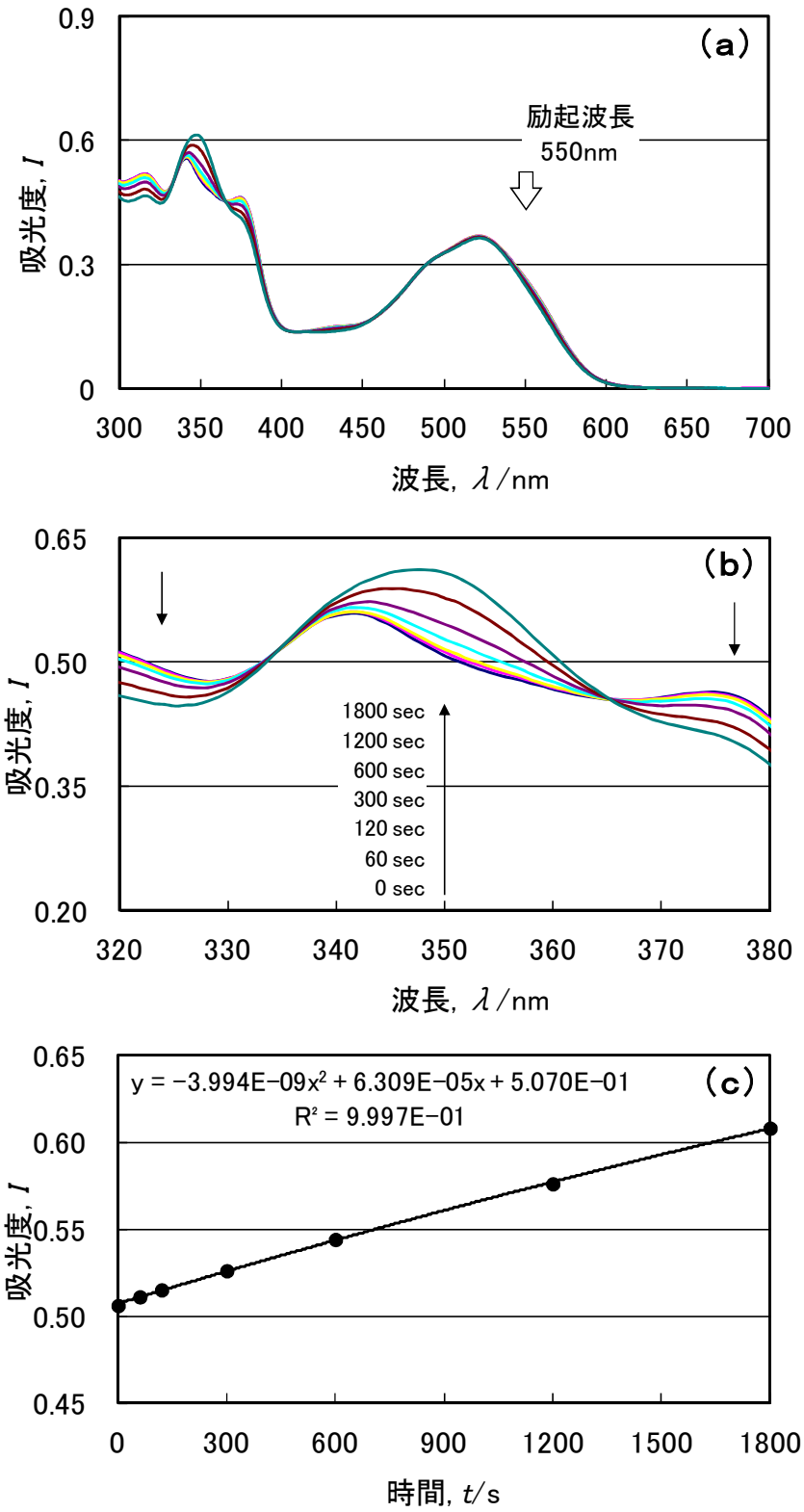


図 1.61.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：550nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

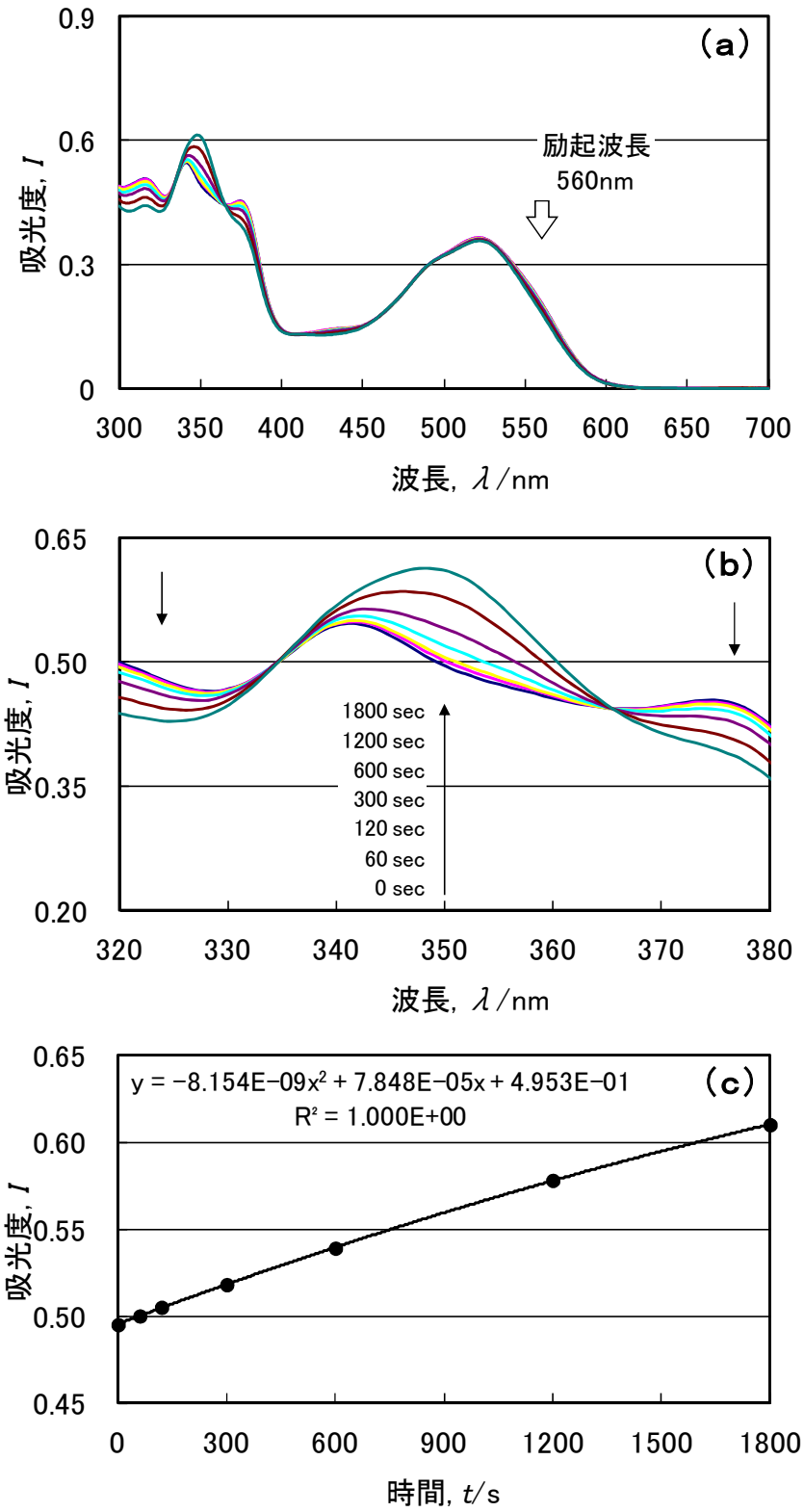


図 1.62.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：560nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

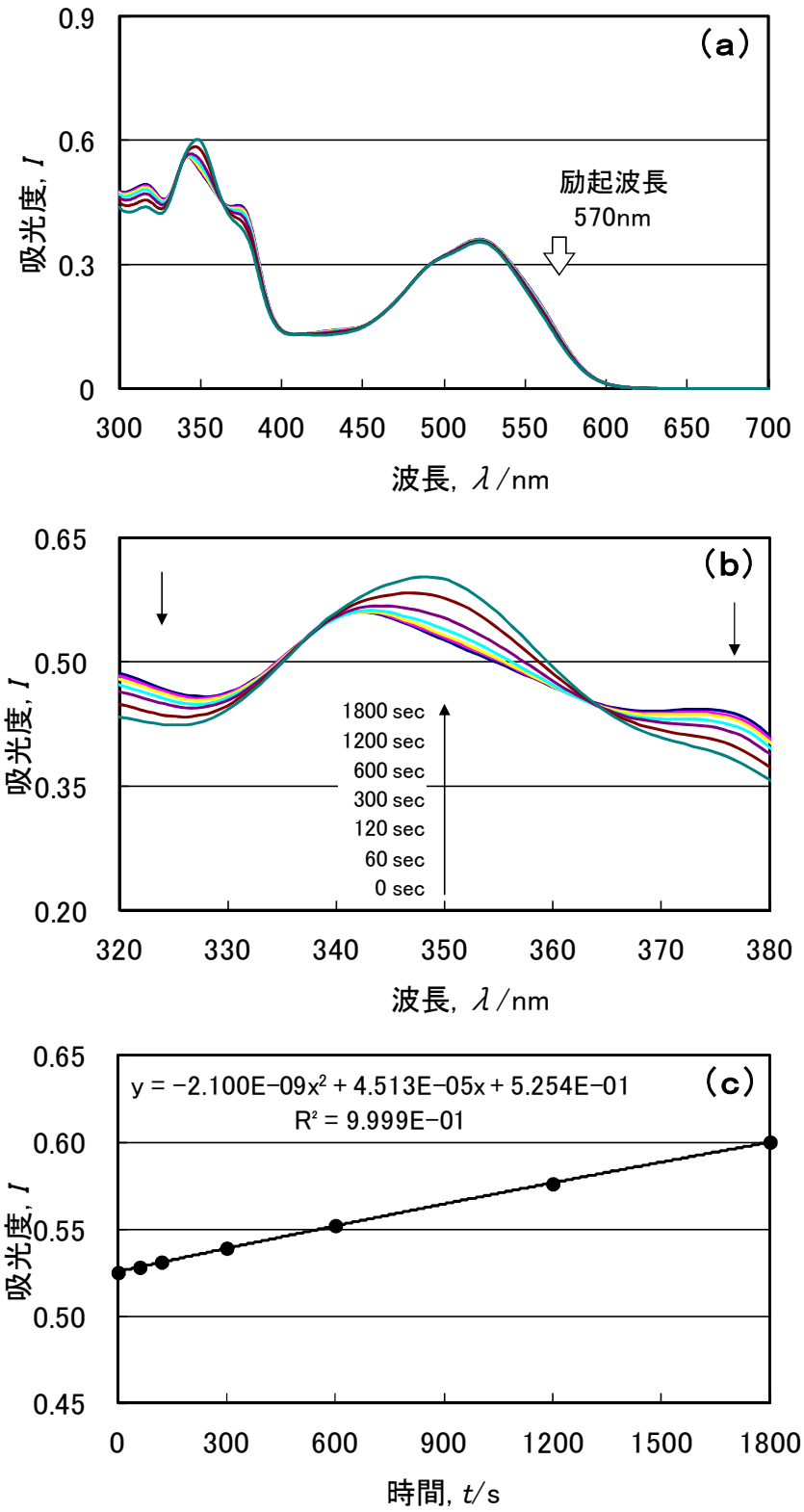


図 1.63.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：570nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

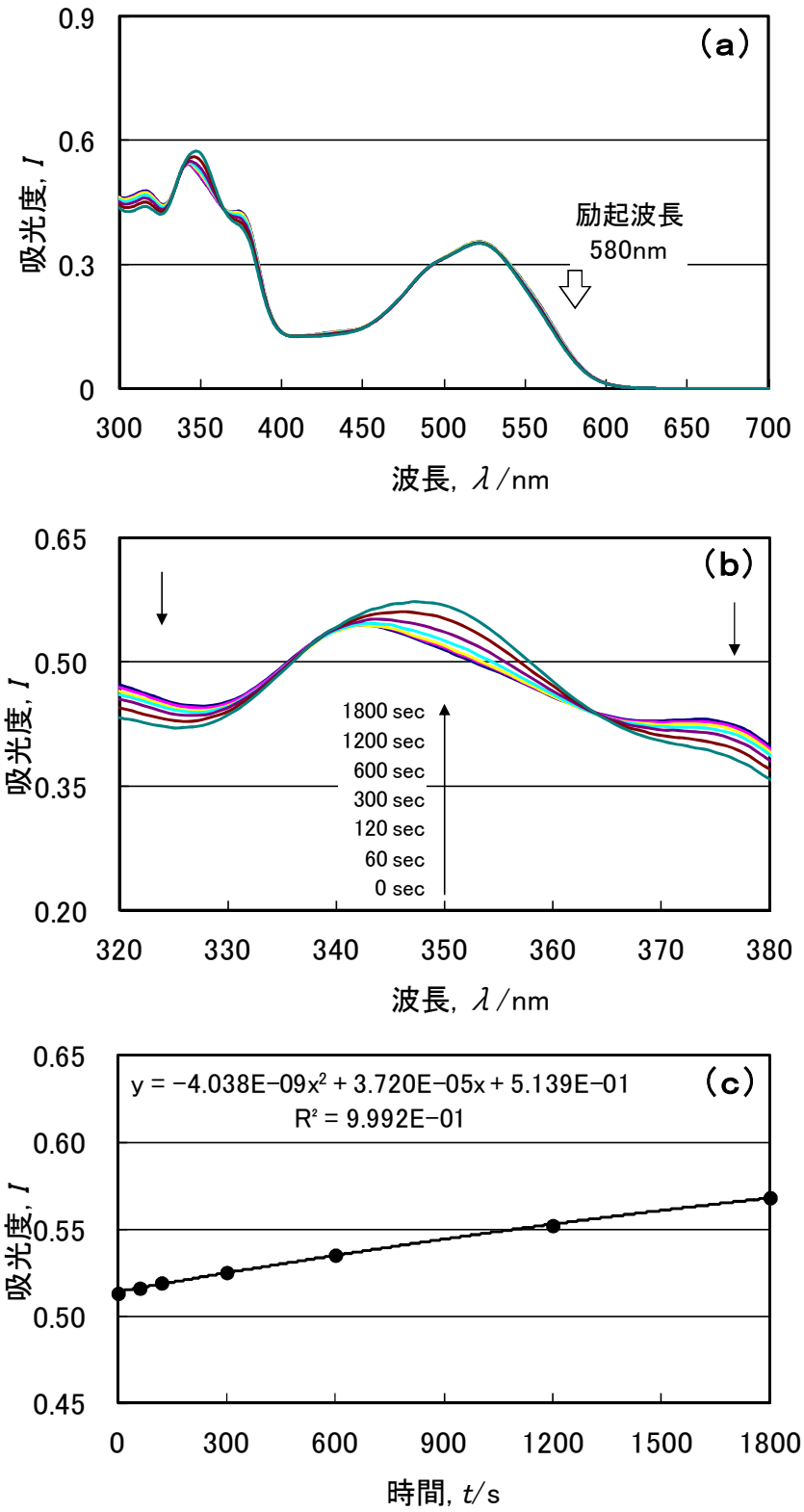


図 1.64.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：580nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

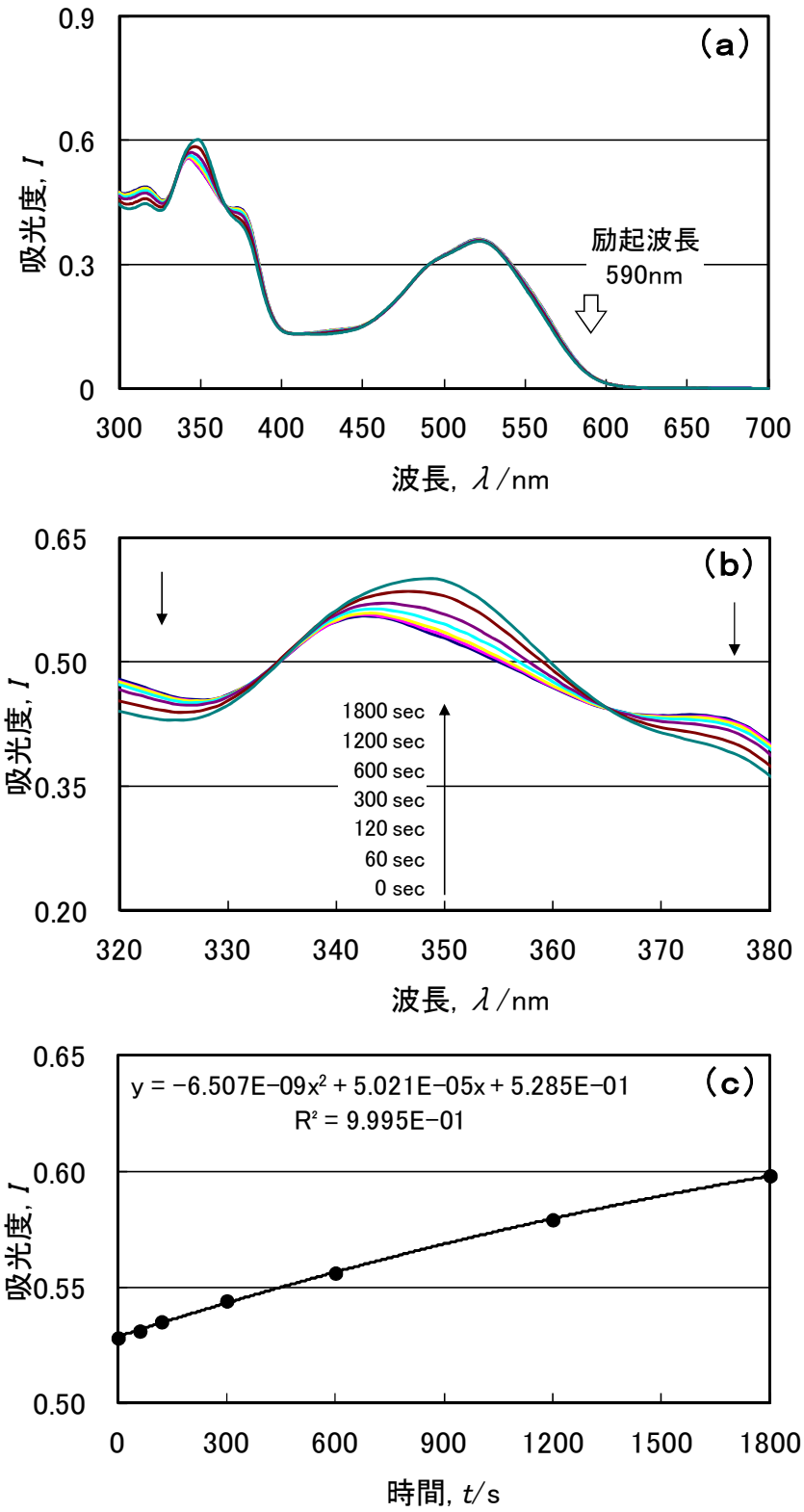


図 1.65.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：590nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

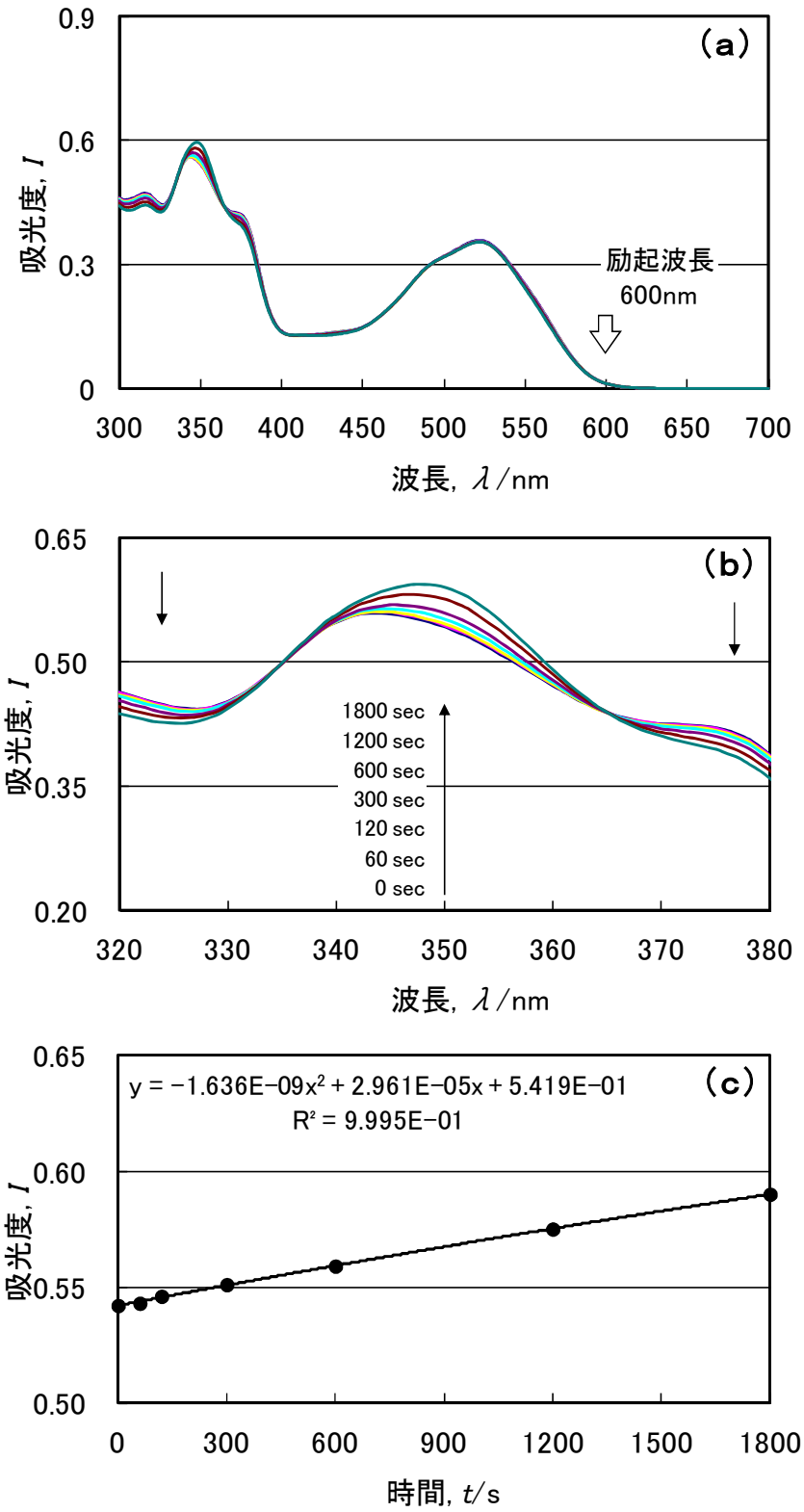


図 1.66.メチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：600nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

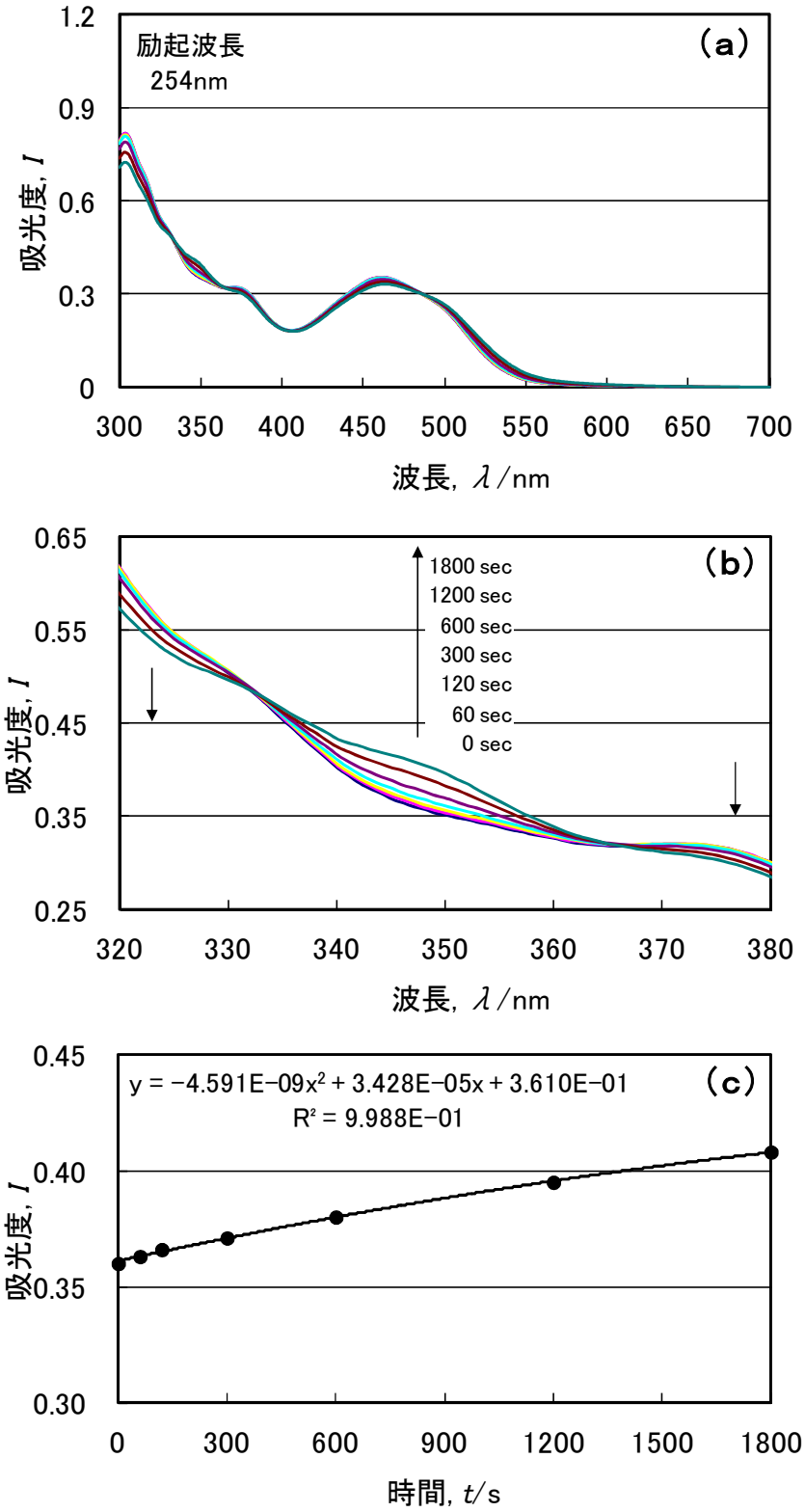


図 1.67. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：254nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分

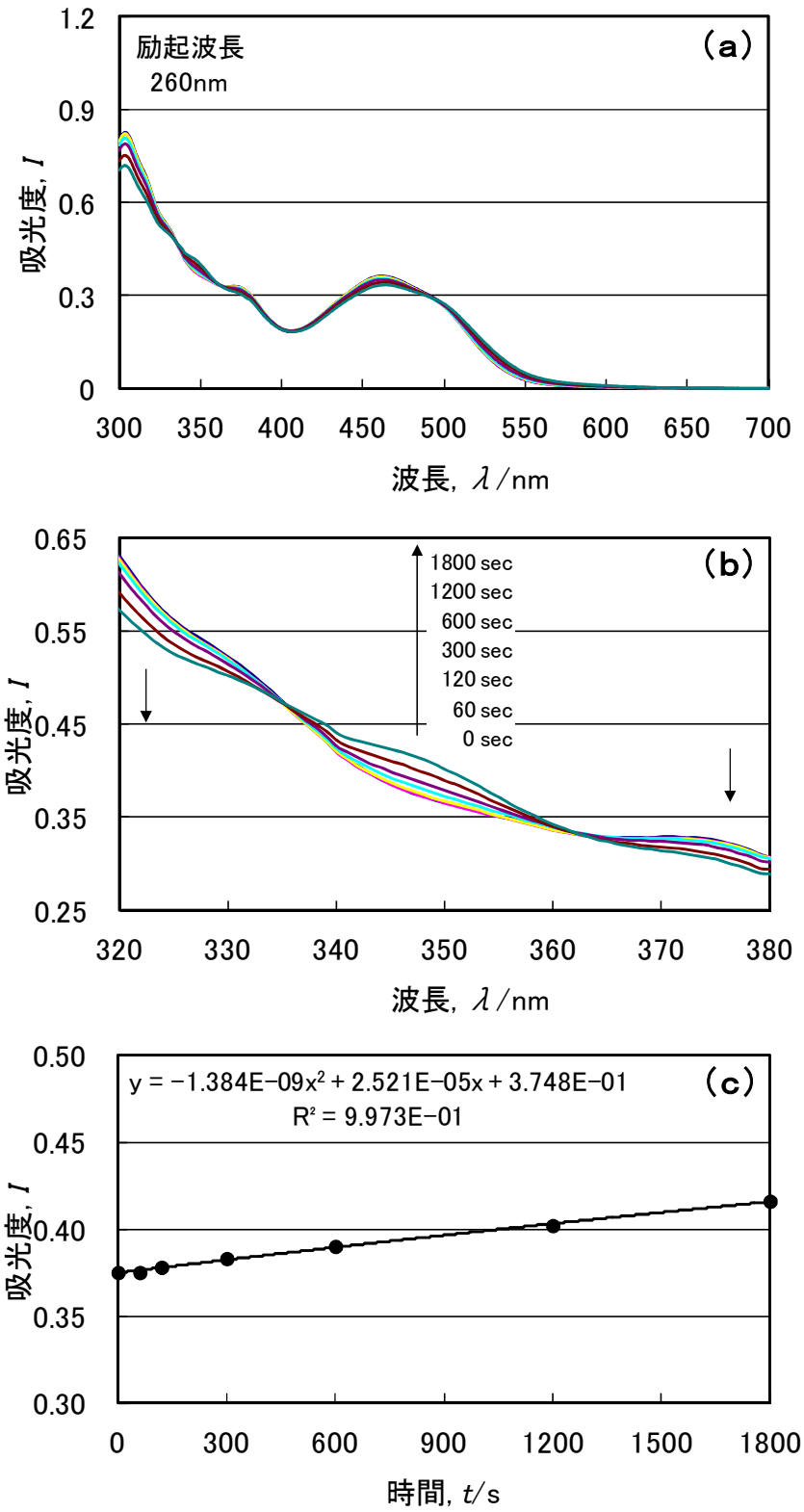


図 1.68. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：260nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

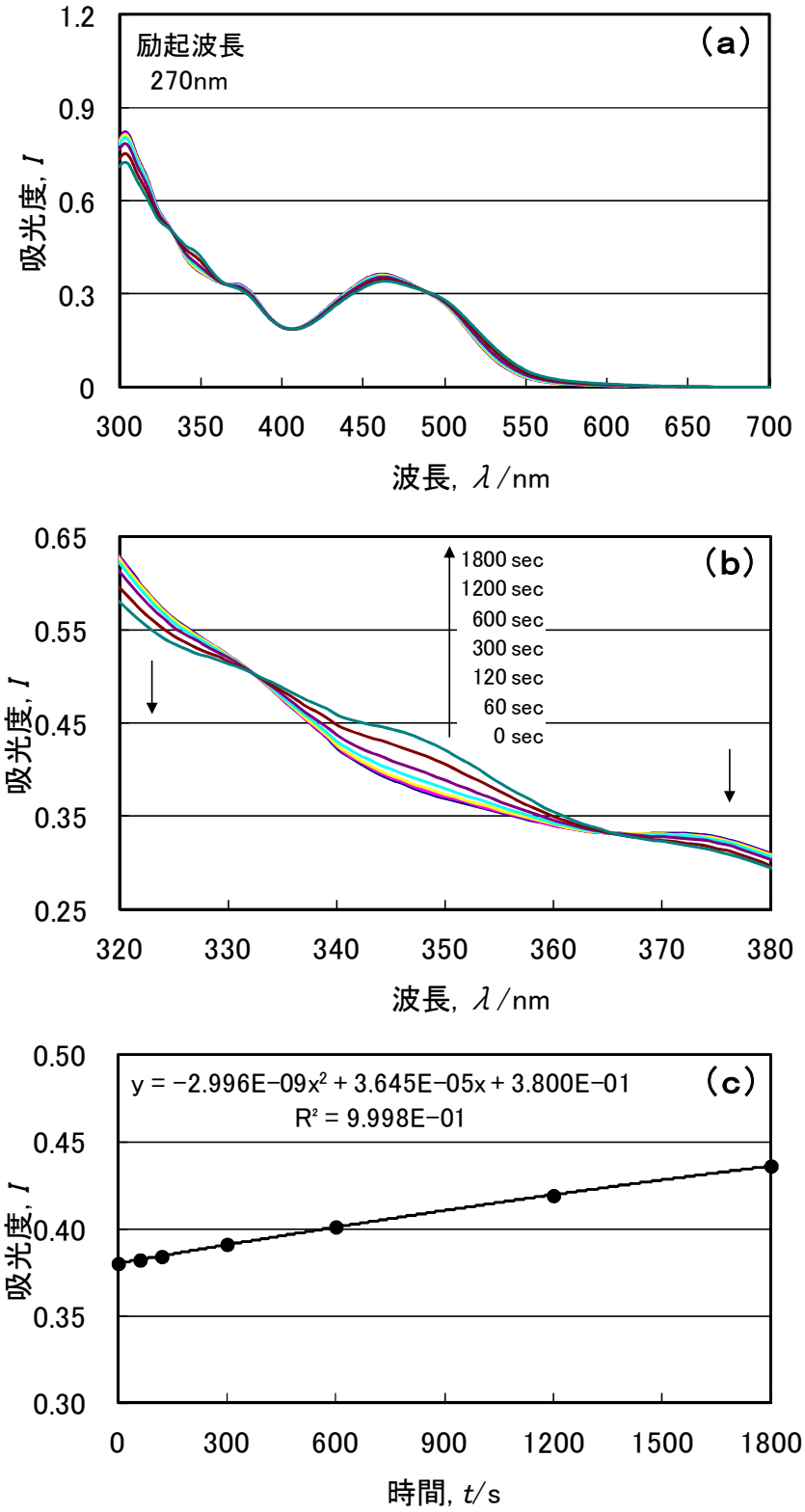


図 1.69. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：270nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

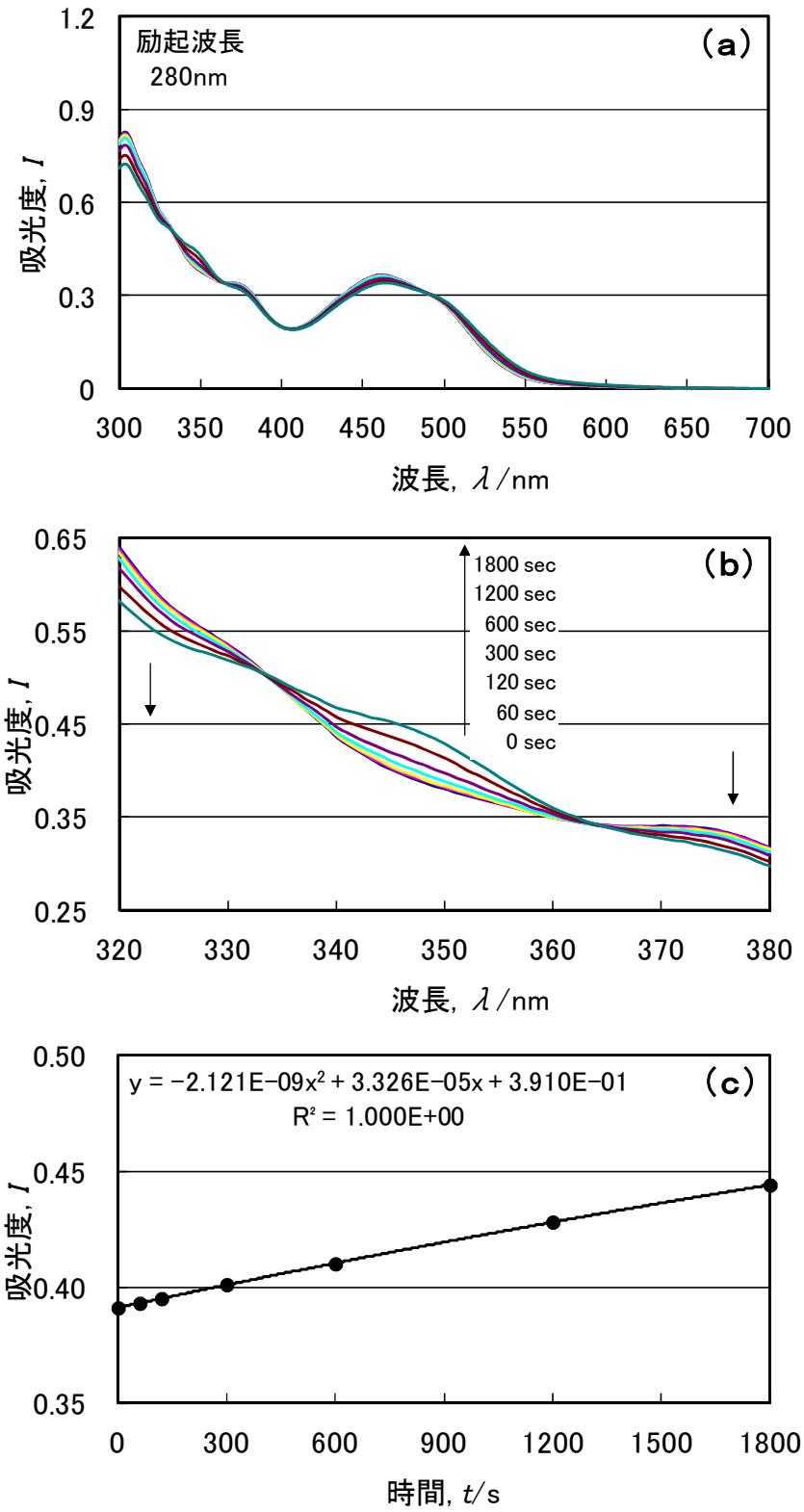


図 1.70. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：280nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

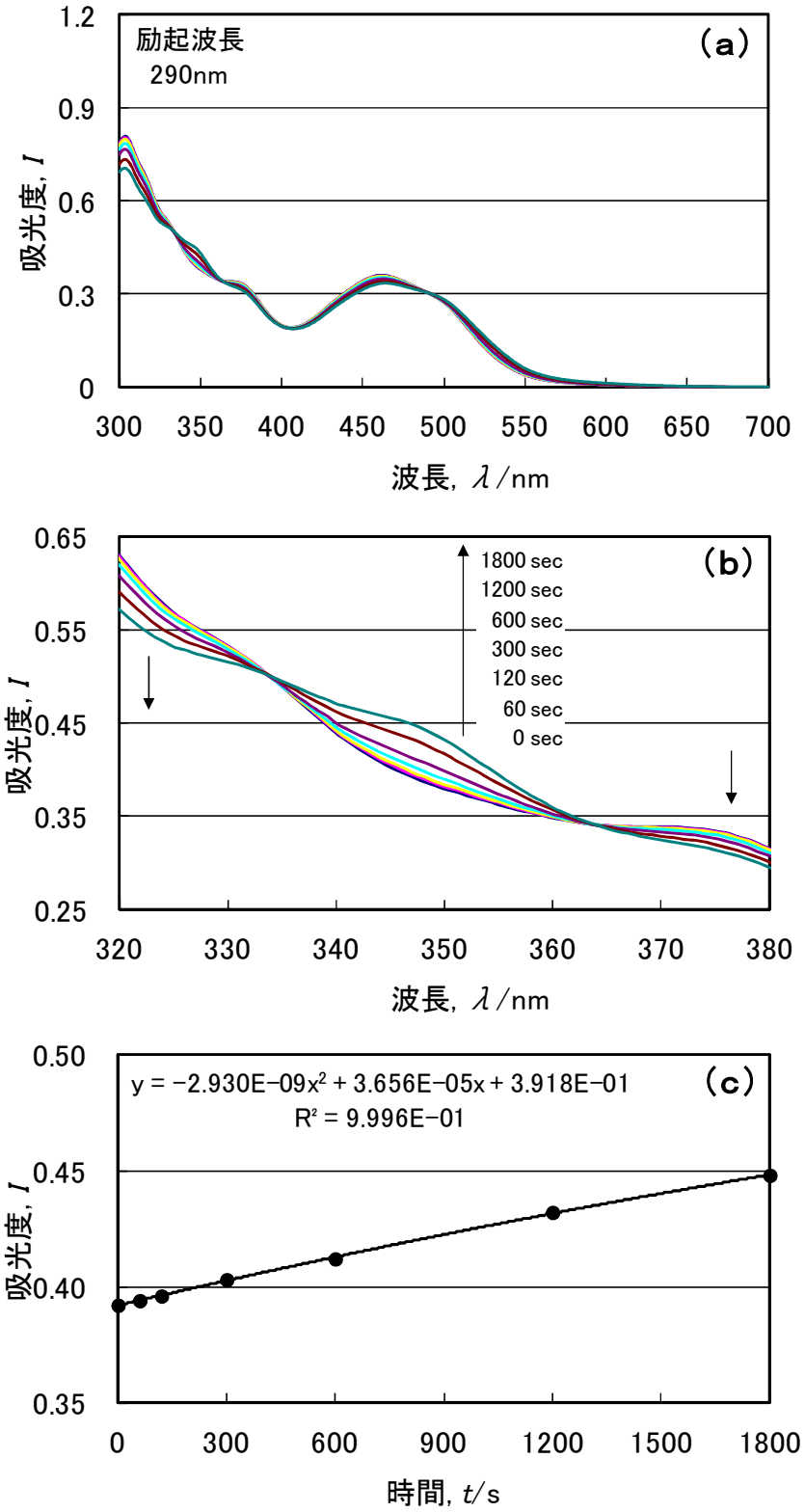


図 1.71. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：290nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

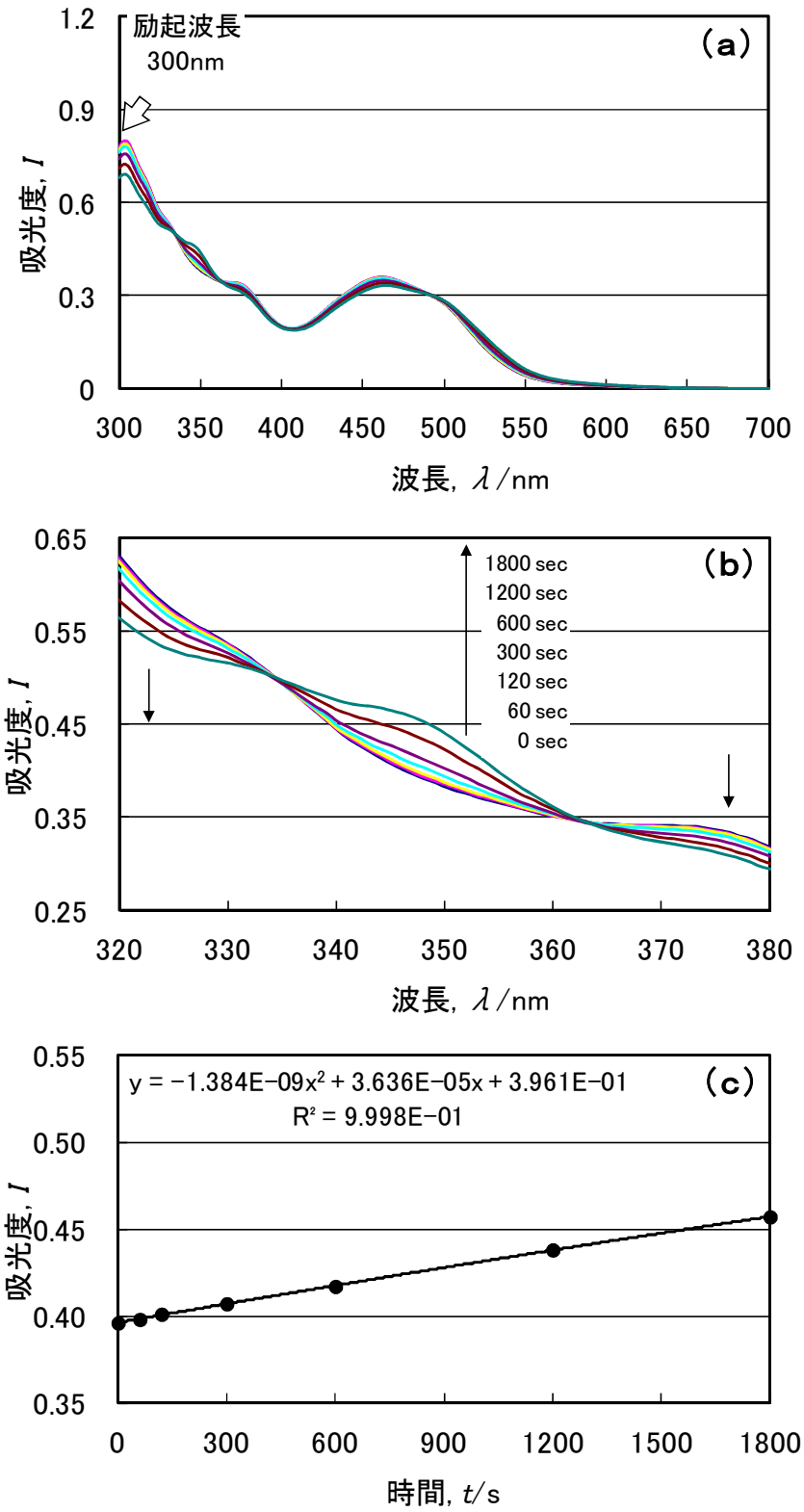


図 1.72. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：300nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

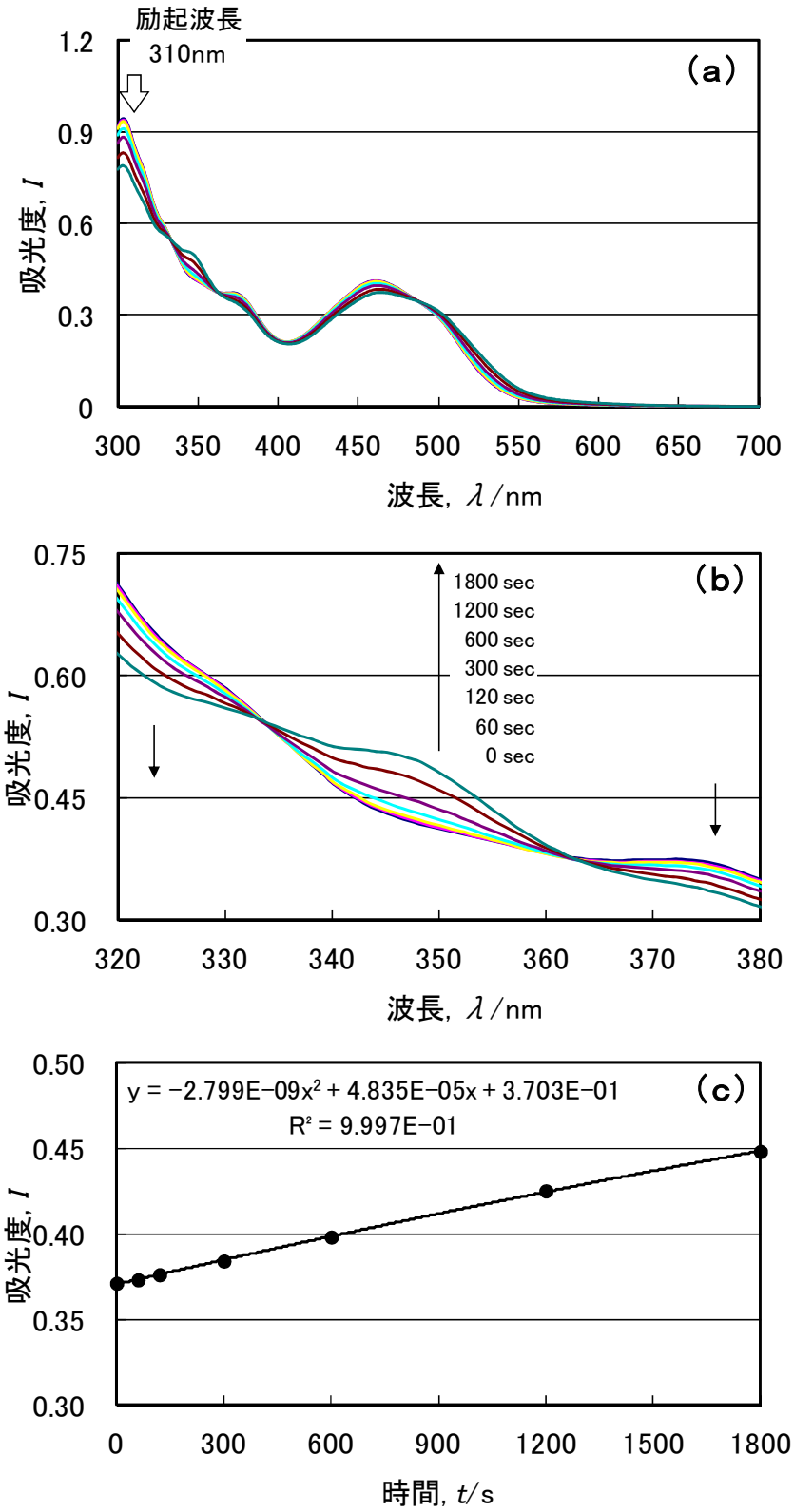


図 1.73. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：310nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

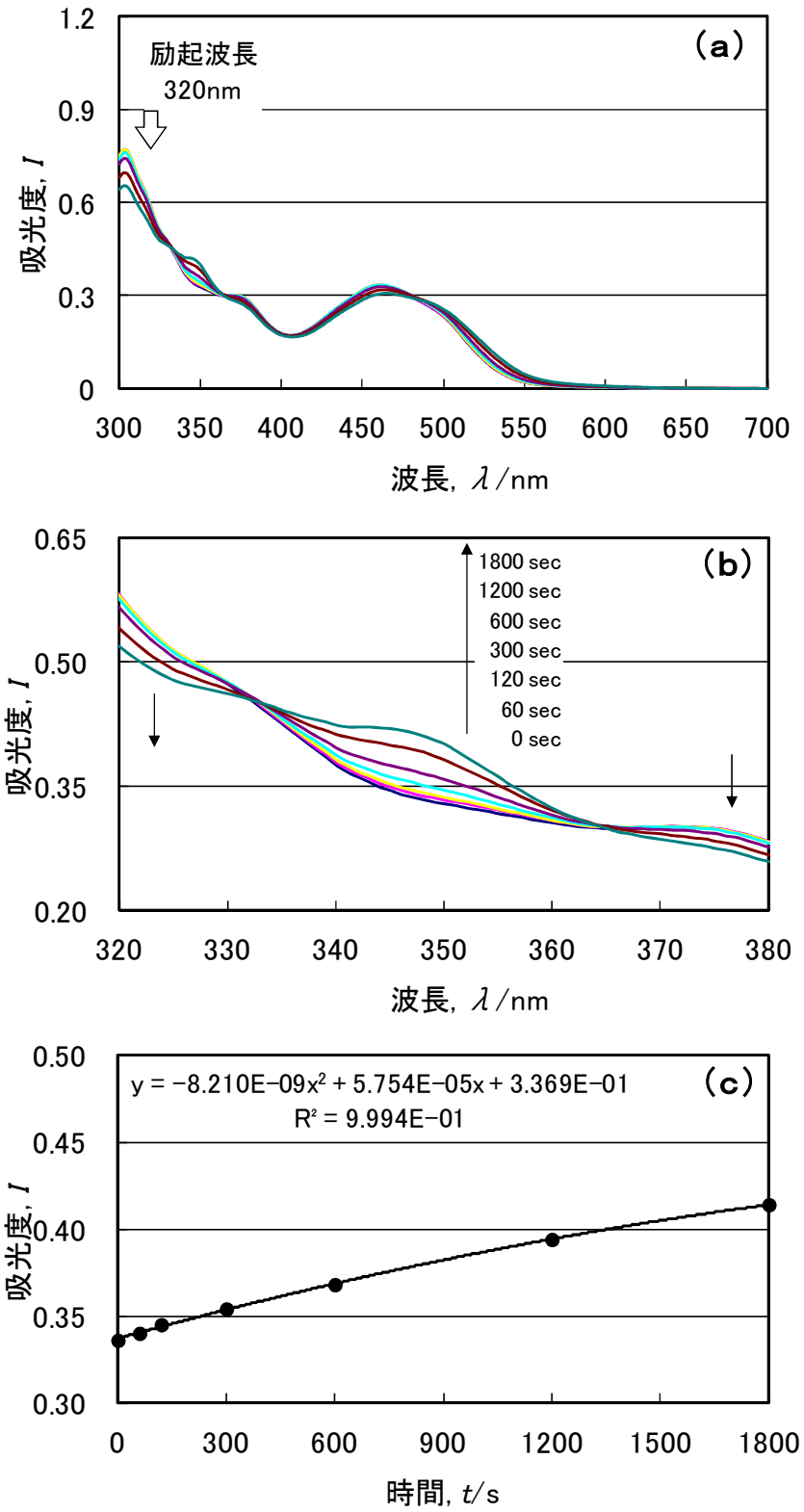


図 1.74. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：320nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

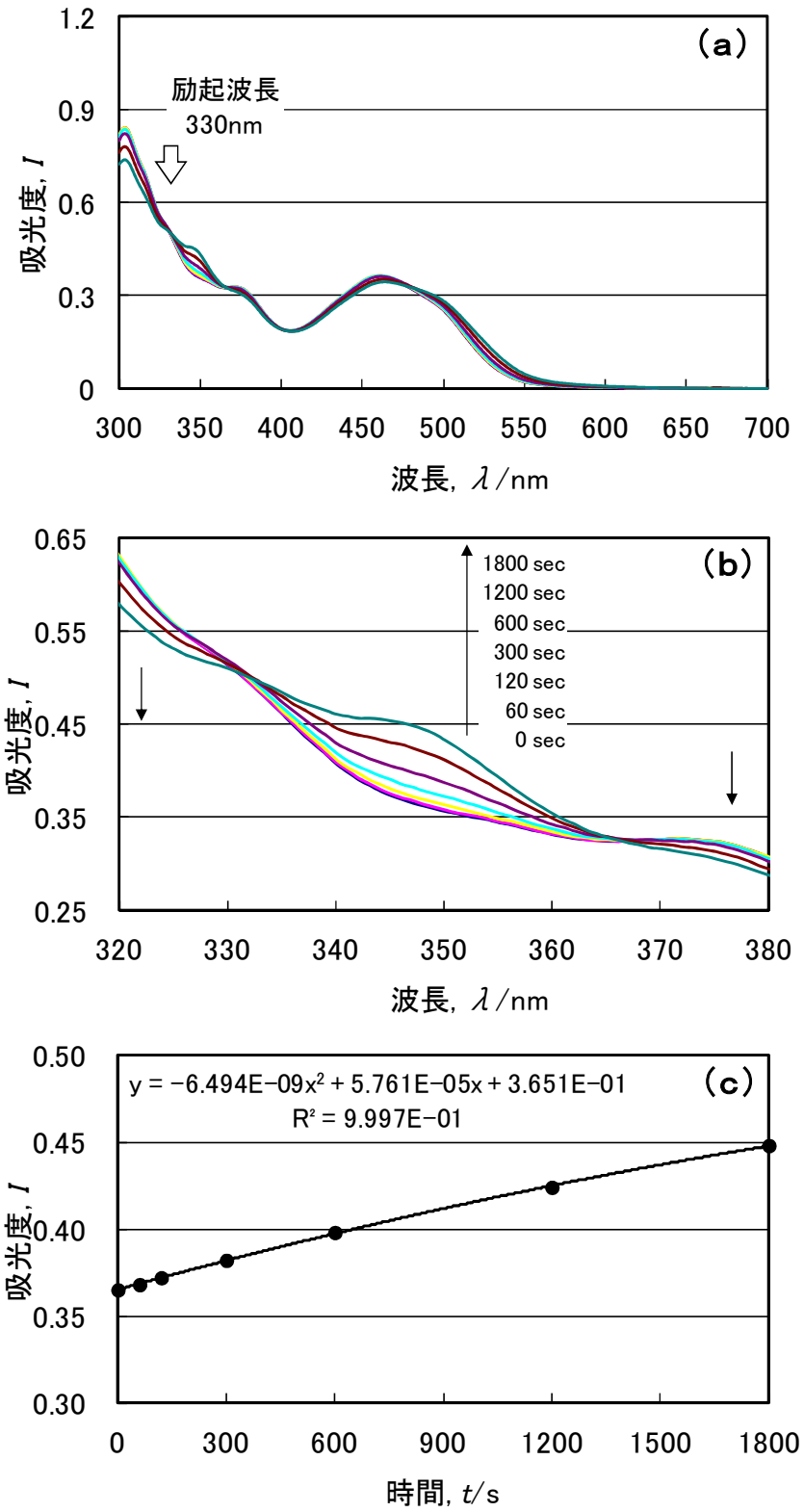


図 1.75. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：330nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

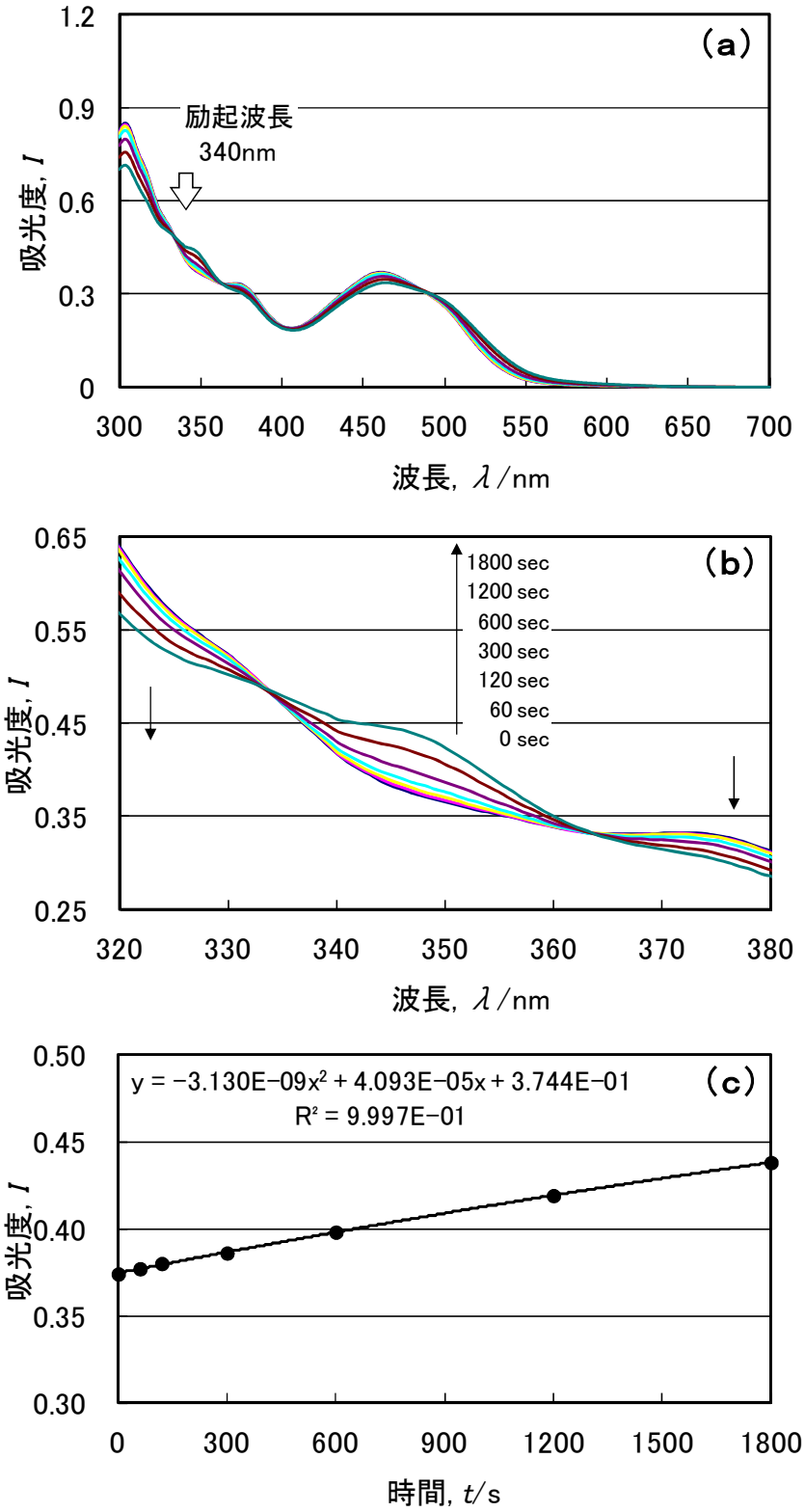


図 1.76. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：340nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

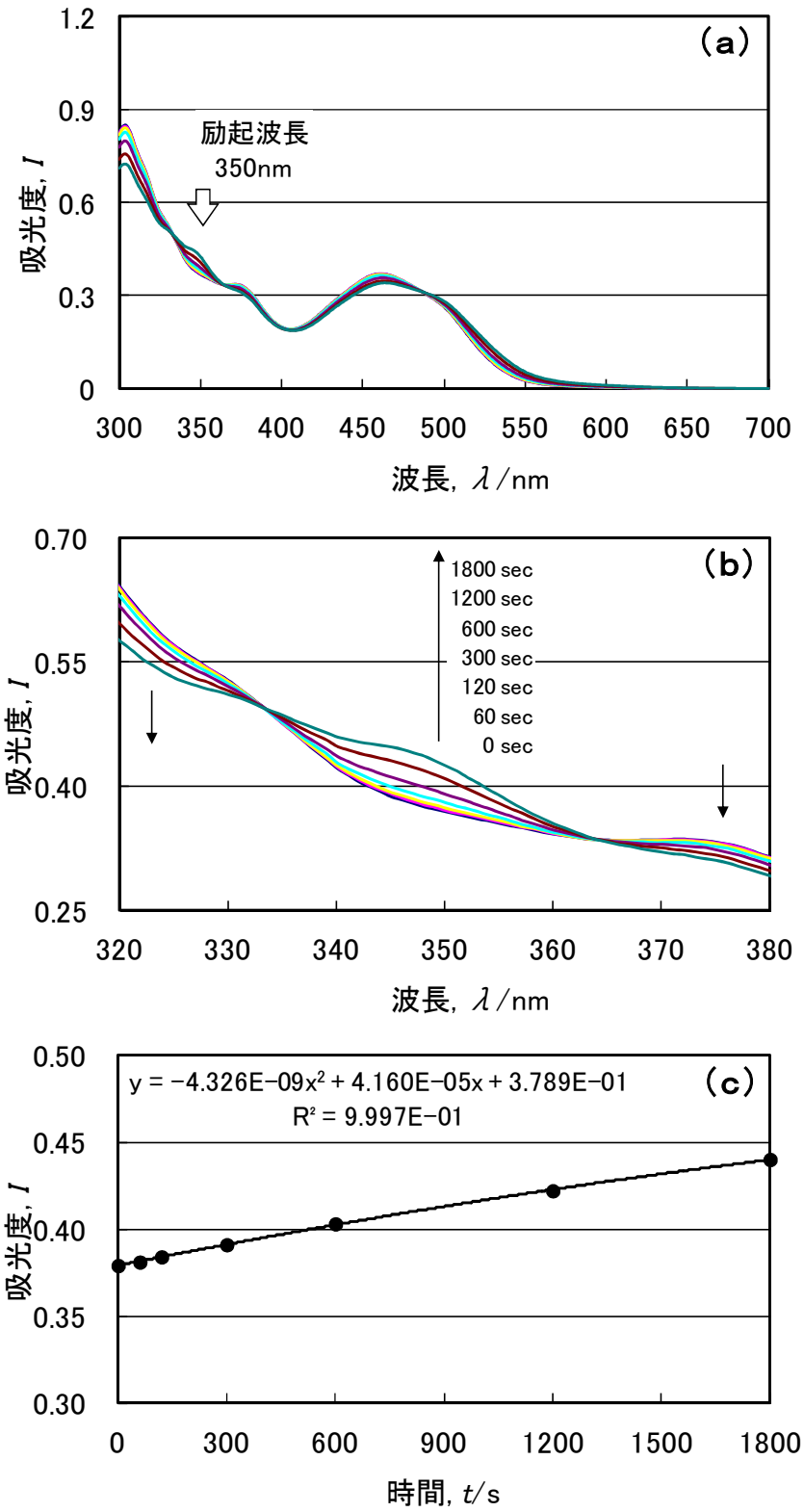


図 1.77. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：350nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

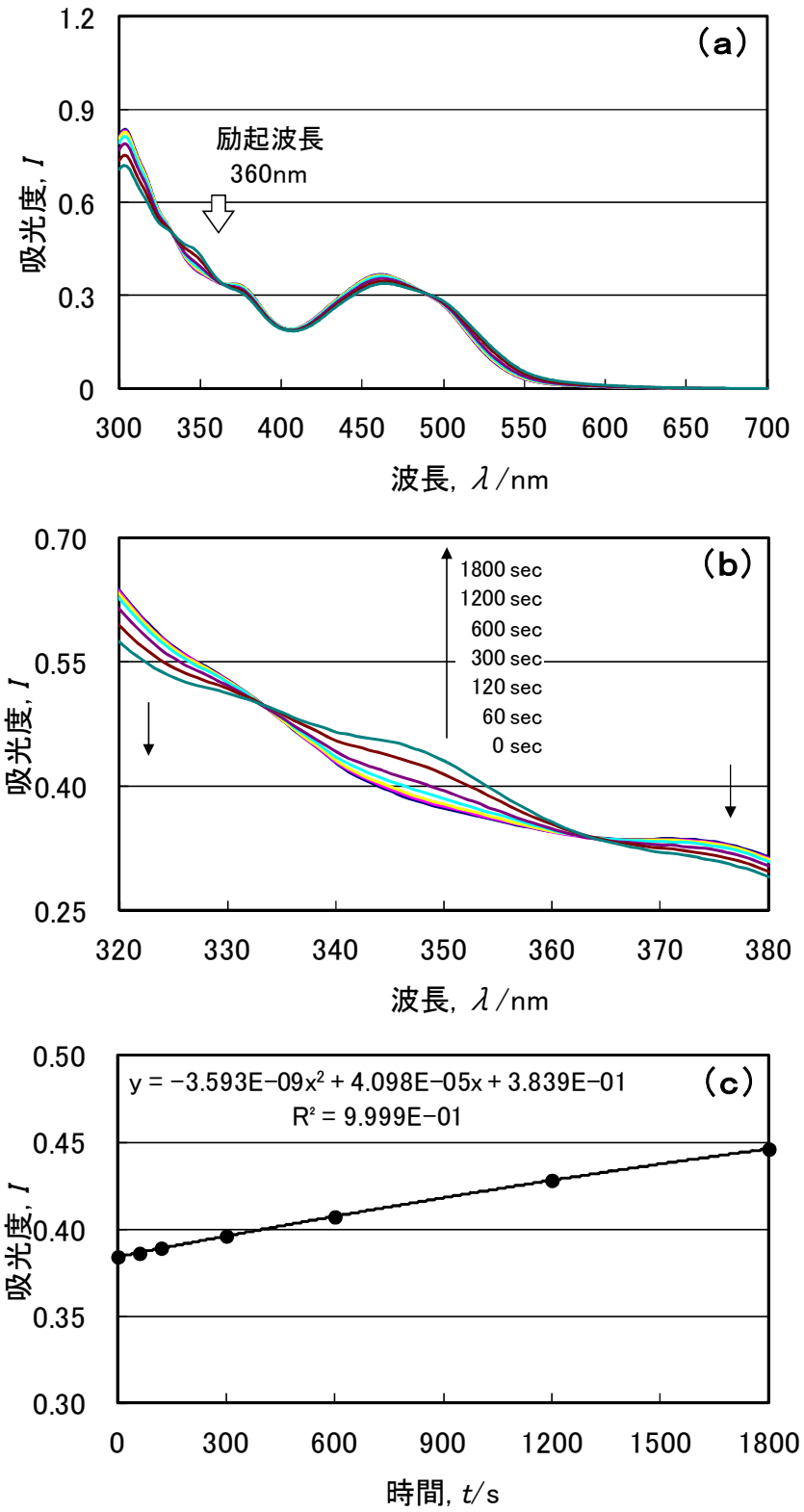


図 1.78. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：360nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

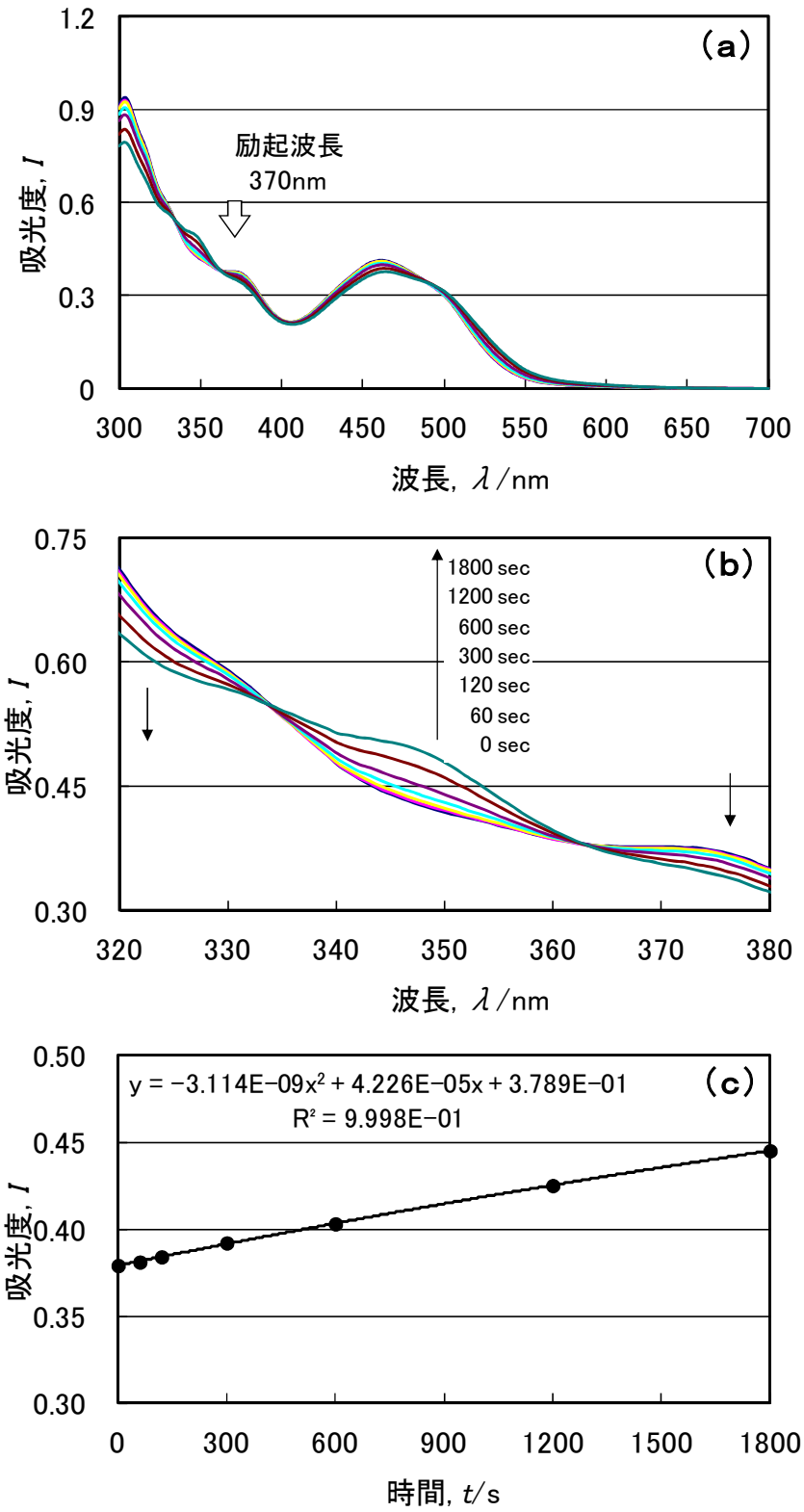


図 1.79. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：370nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

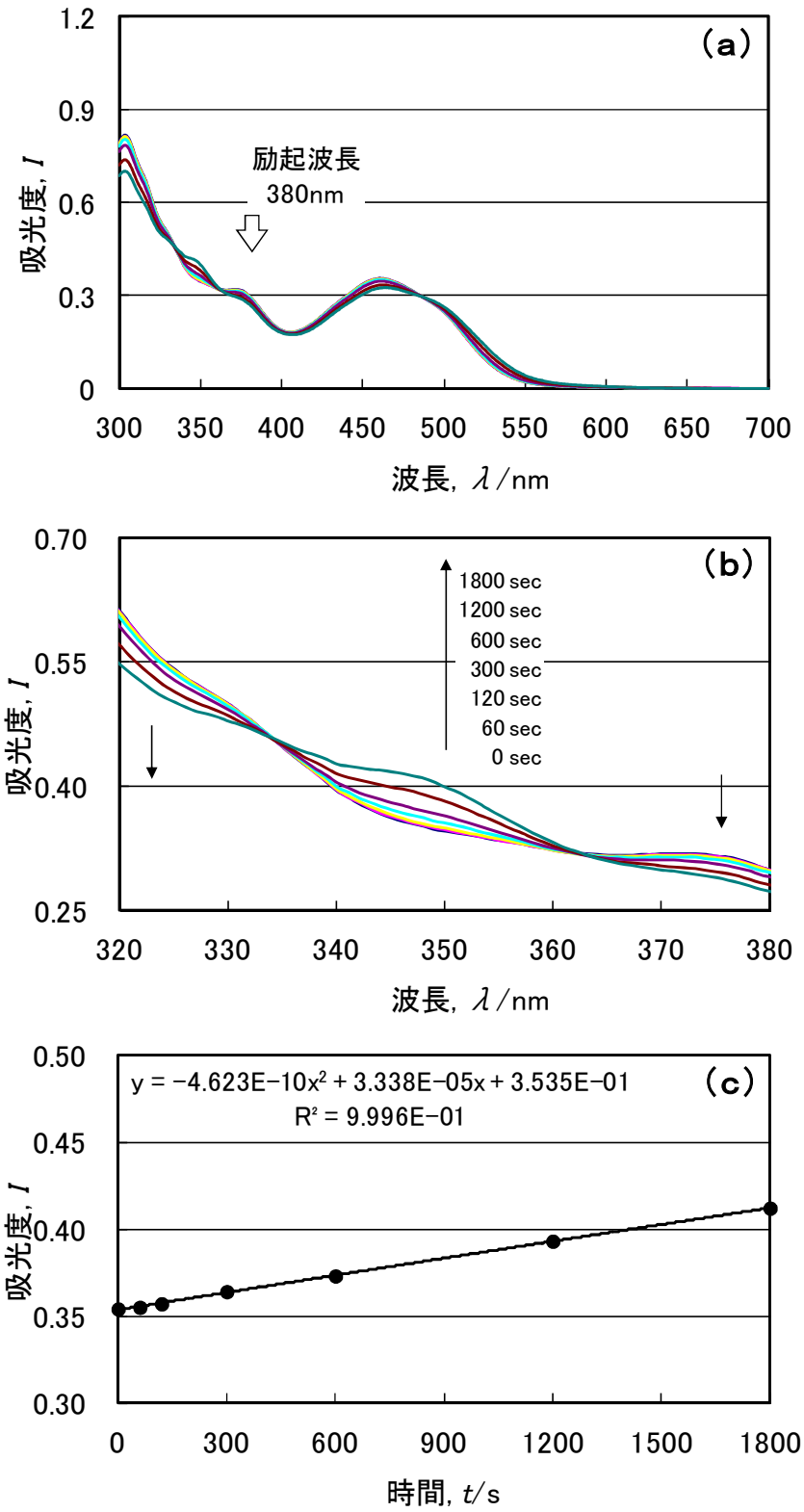


図 1.80. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：380nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

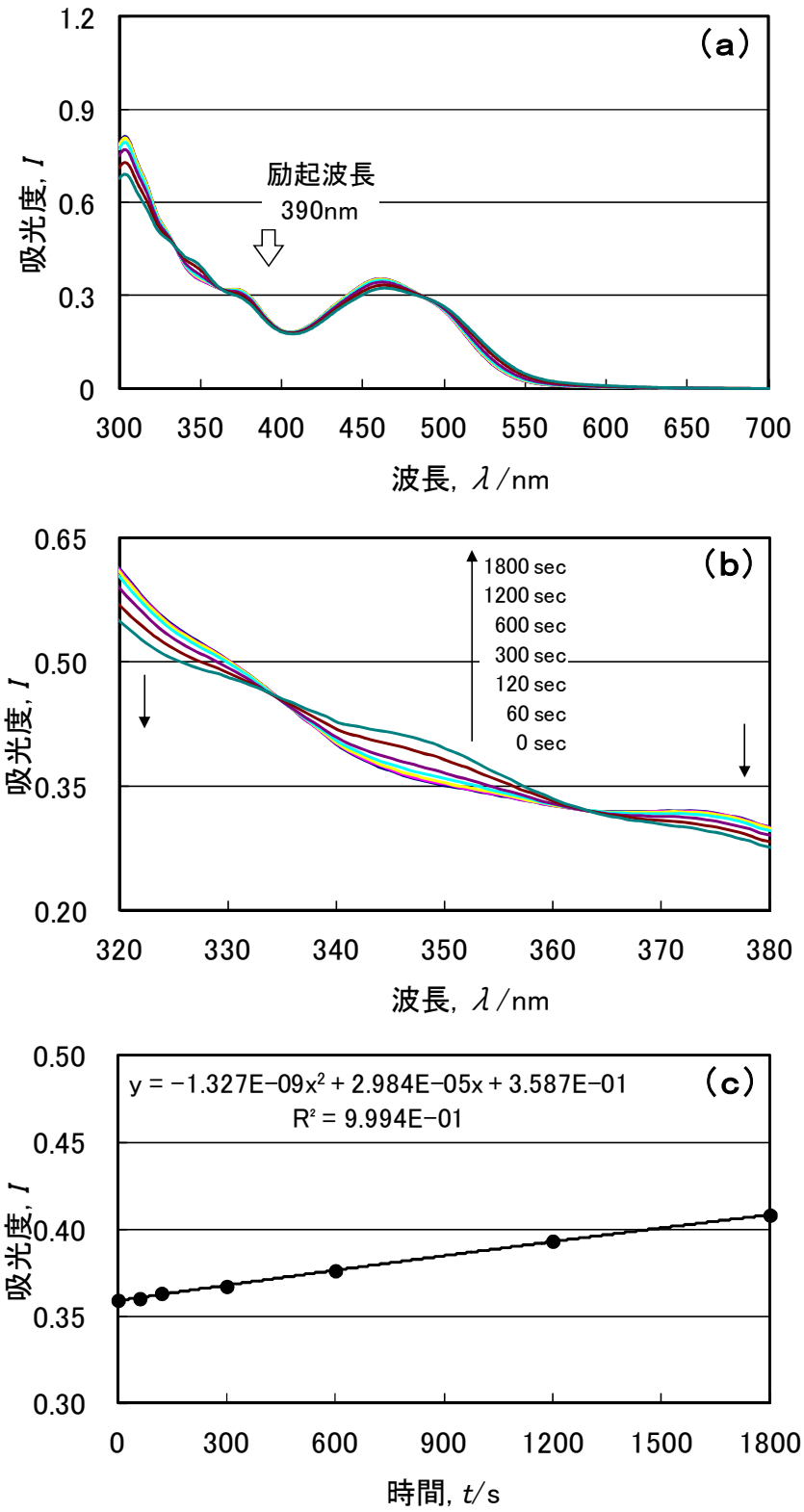


図 1.81. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：390nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：5μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

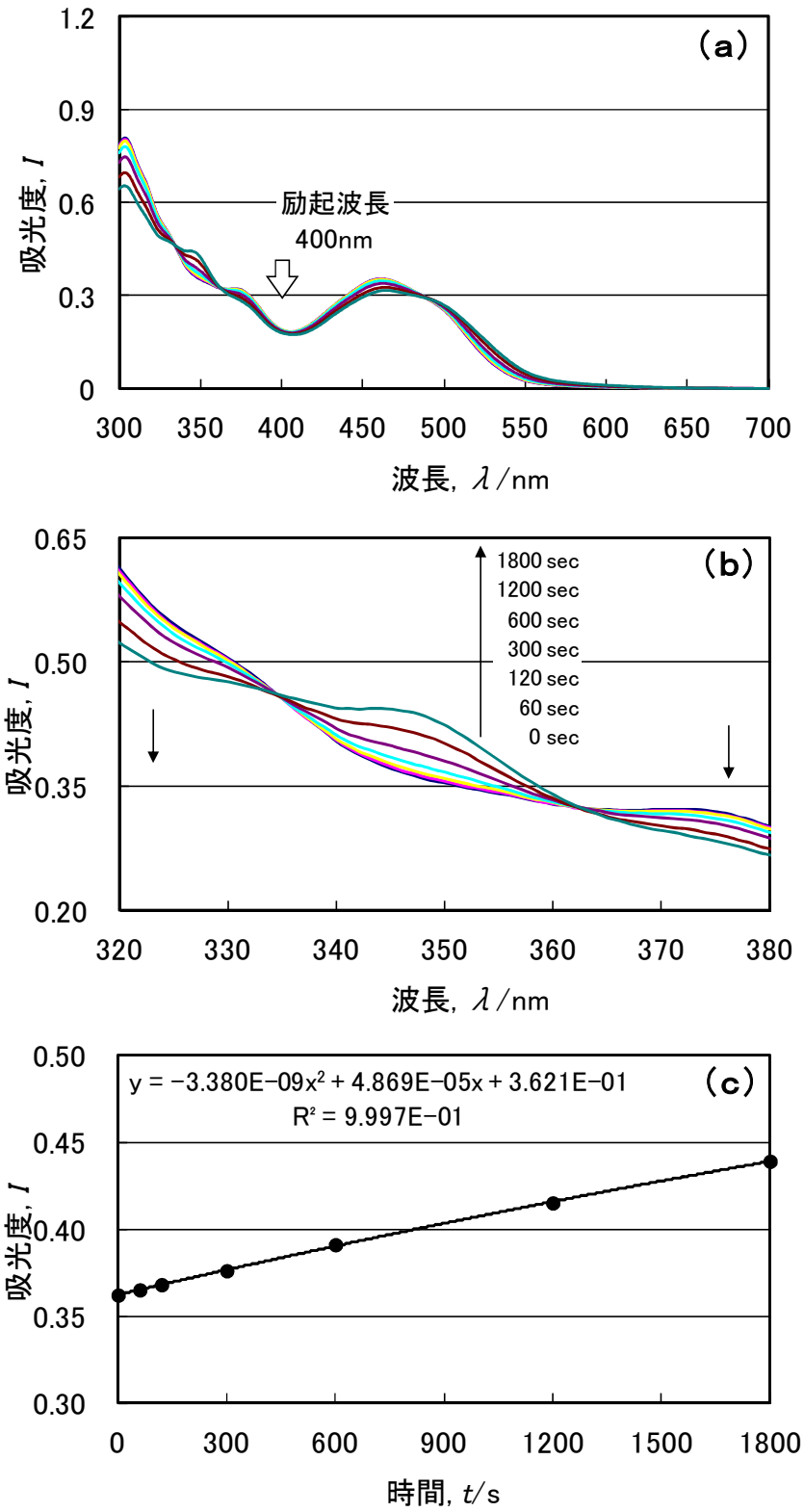


図 1.82. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：400nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

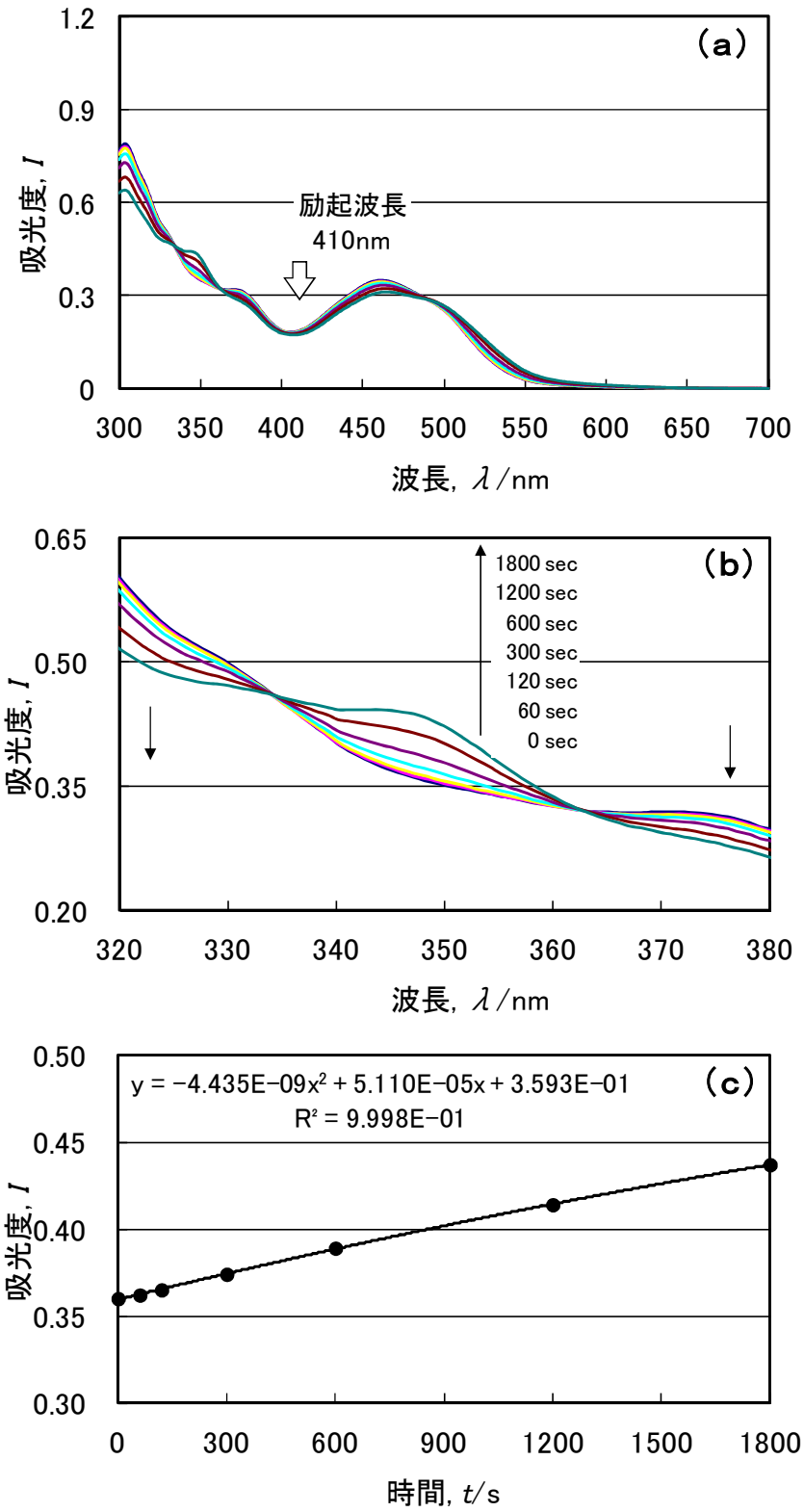


図 1.83. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：410nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

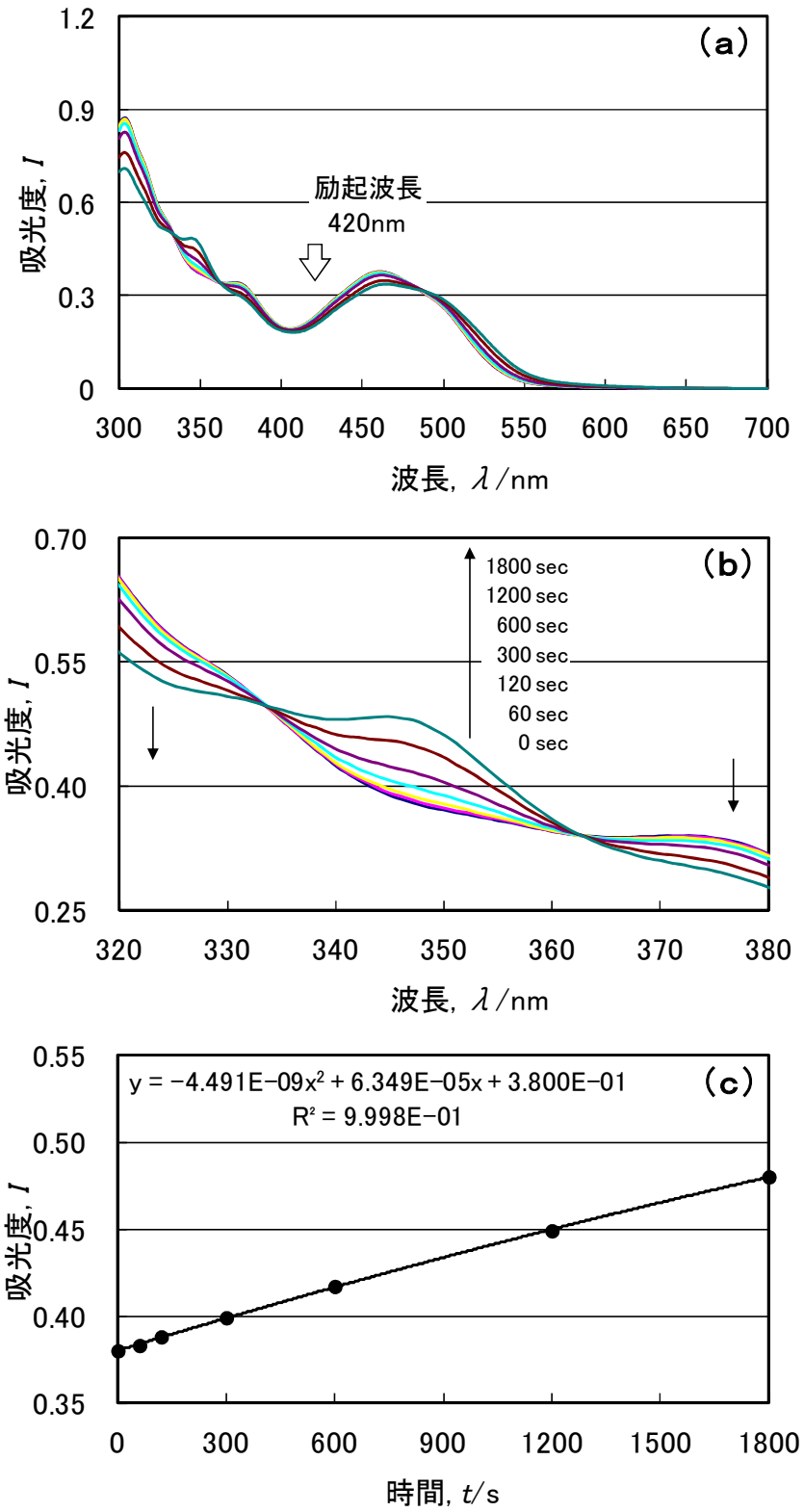


図 1.84. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：420nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

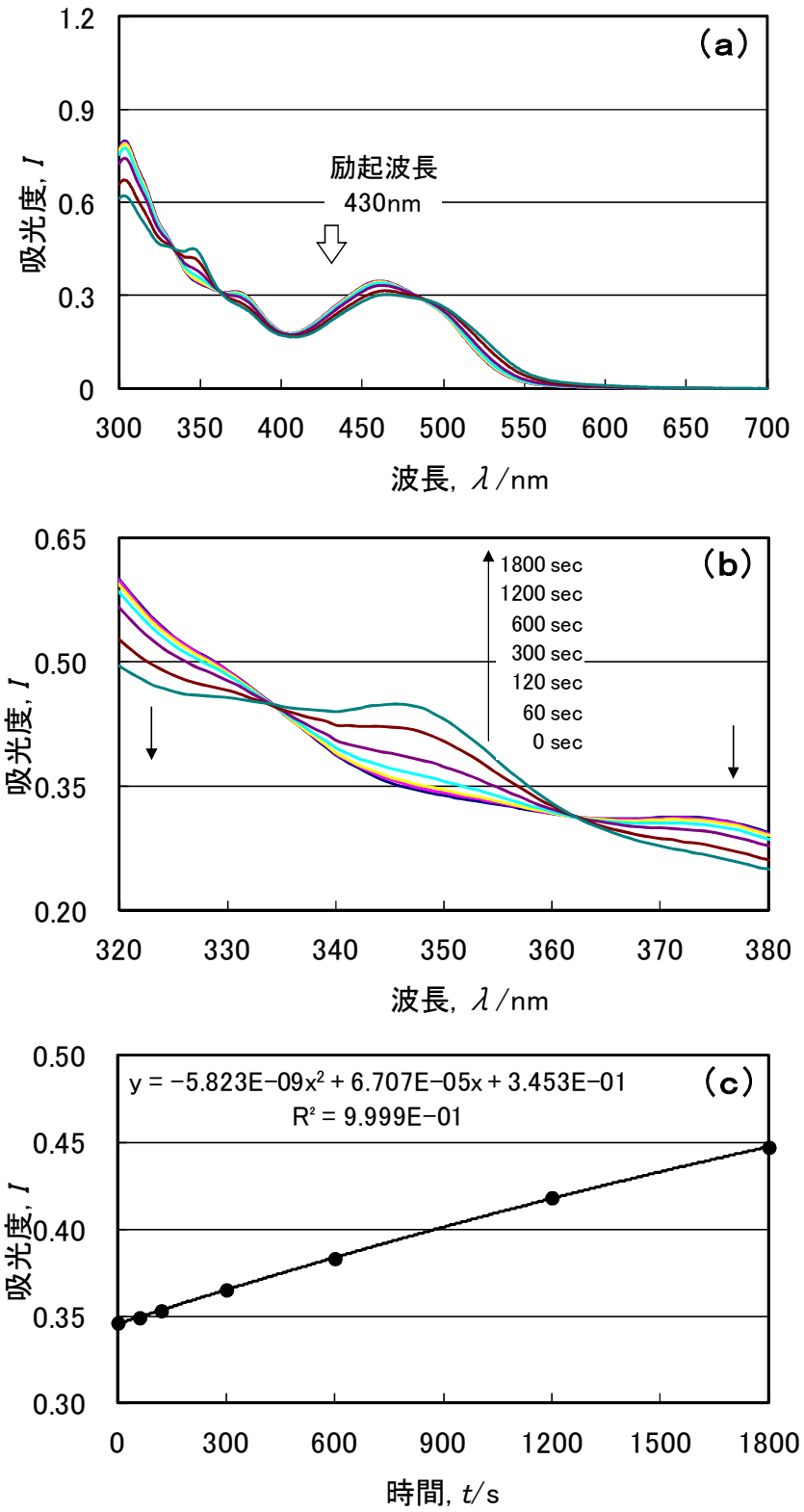


図 1.85. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：430nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

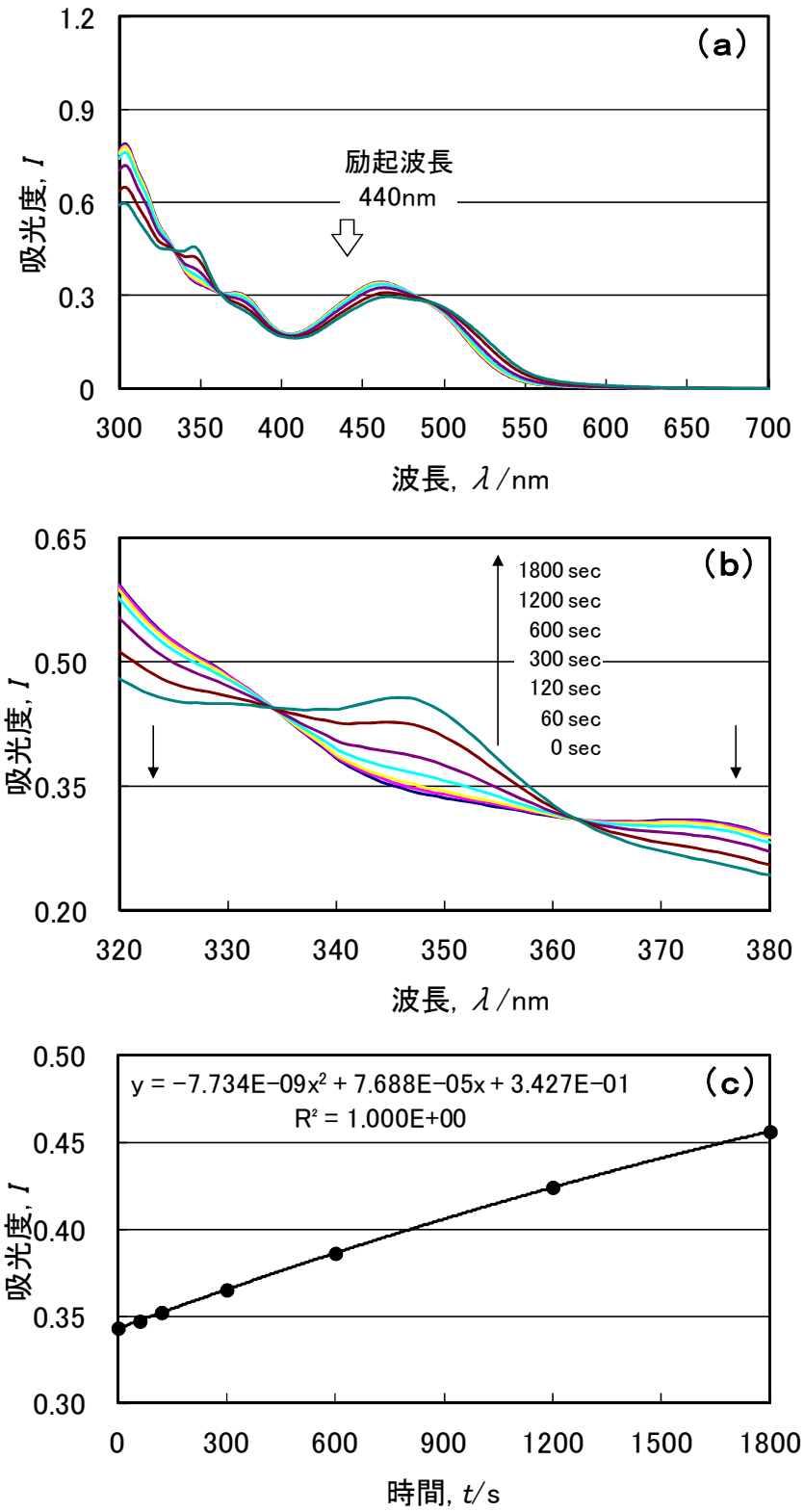


図 1.86. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：440nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

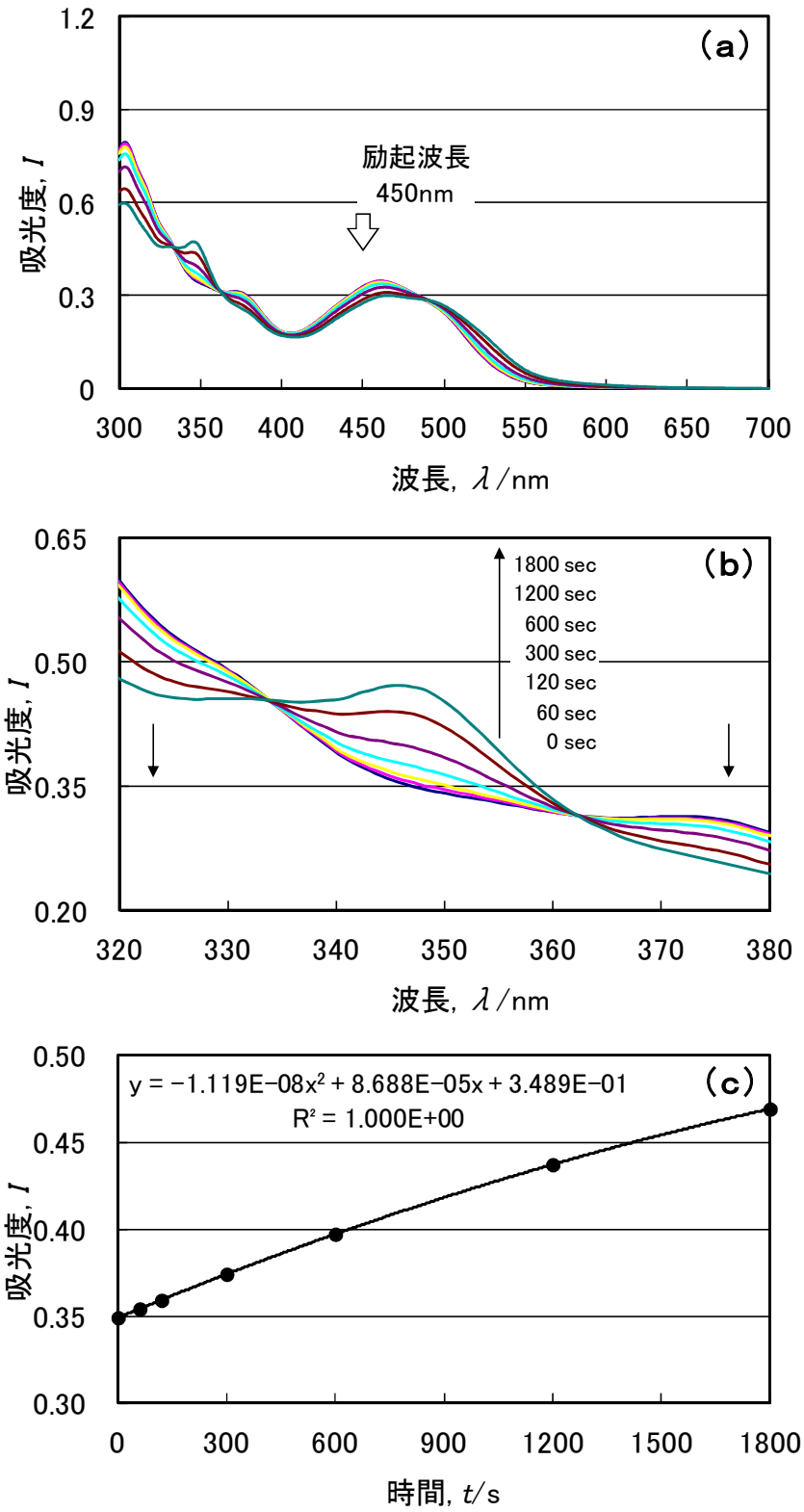


図 1.87. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：450nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

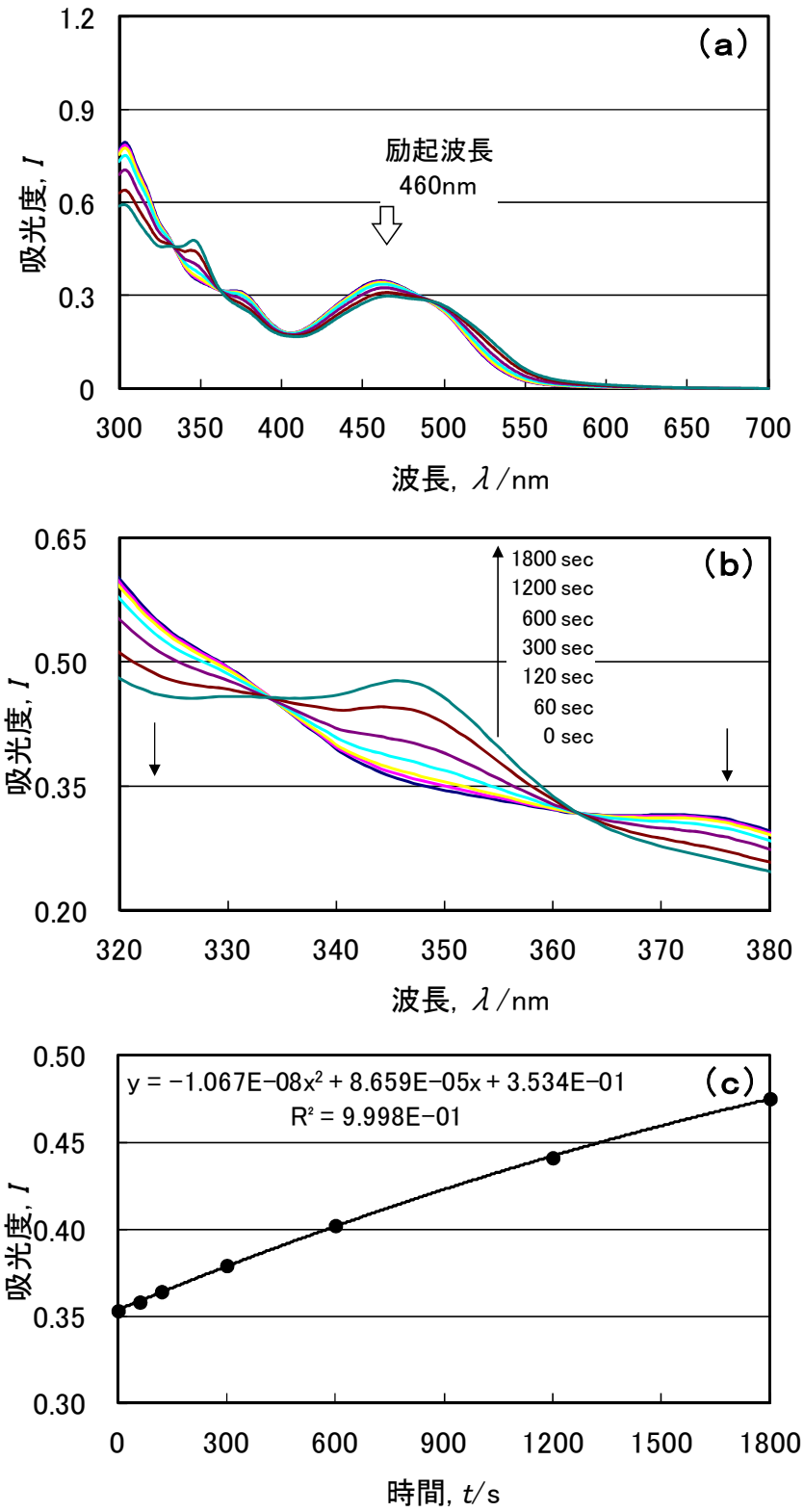


図 1.88. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：460nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

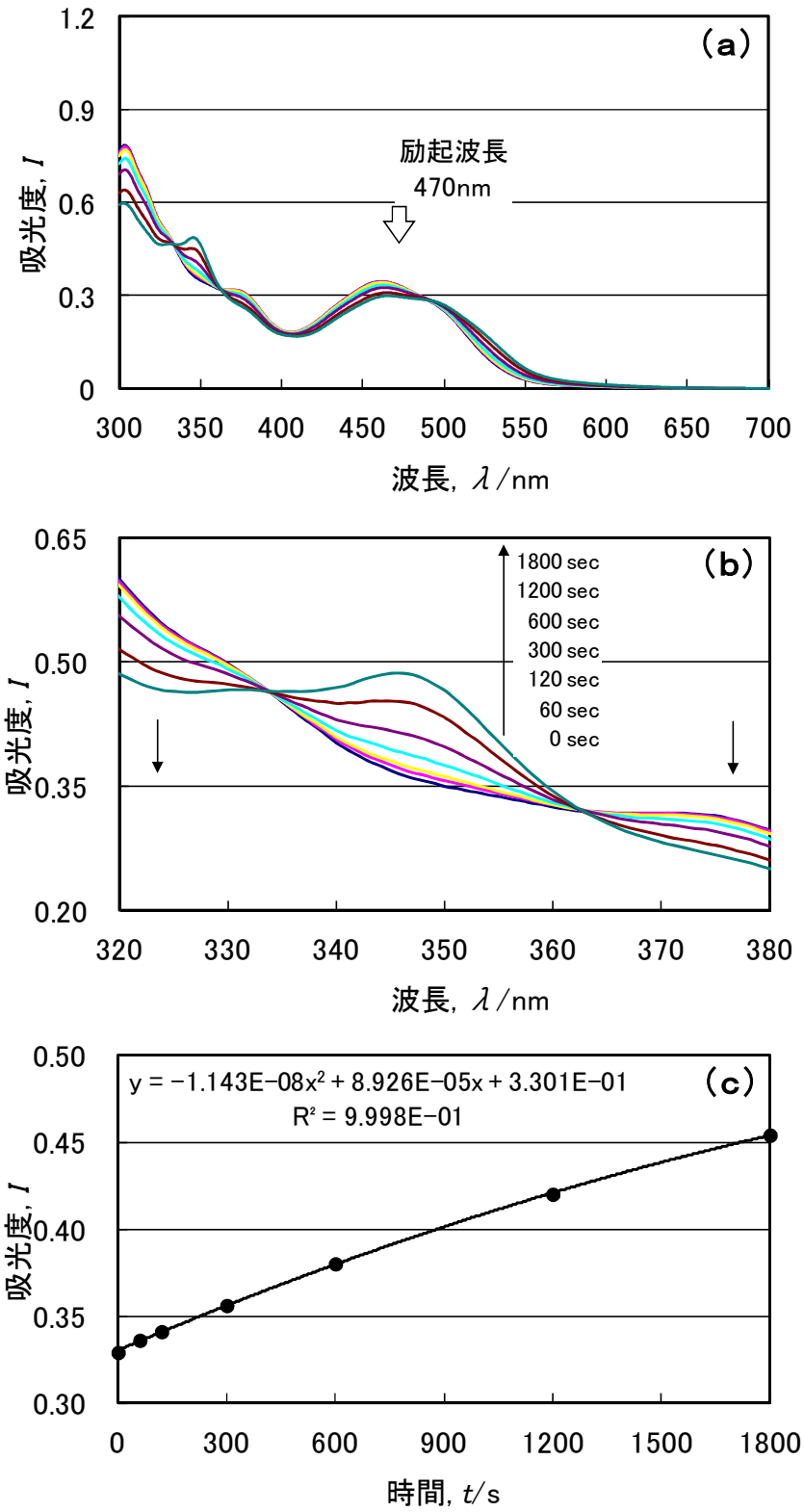


図 1.89. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：470nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

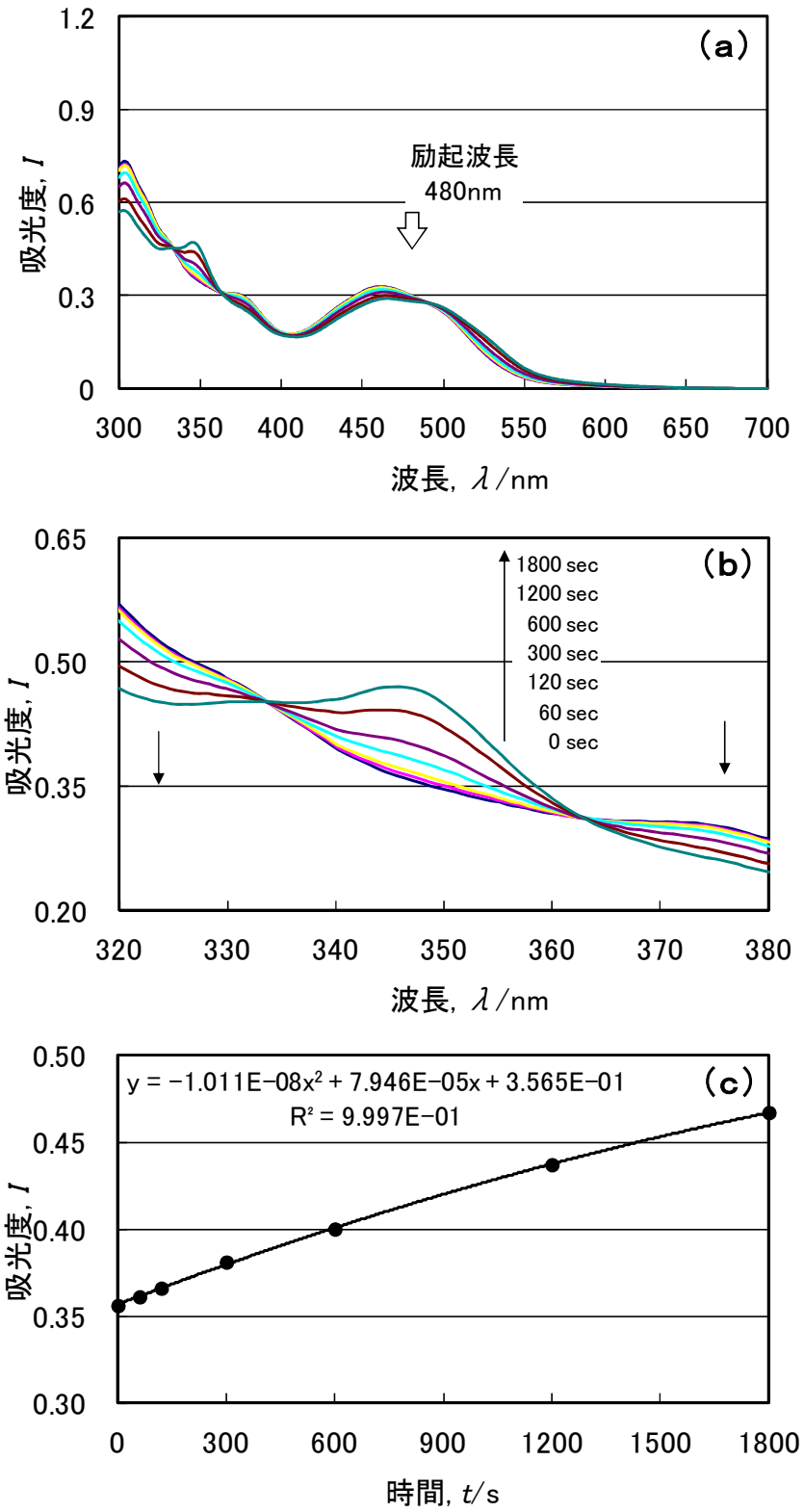


図 1.90. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：480nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

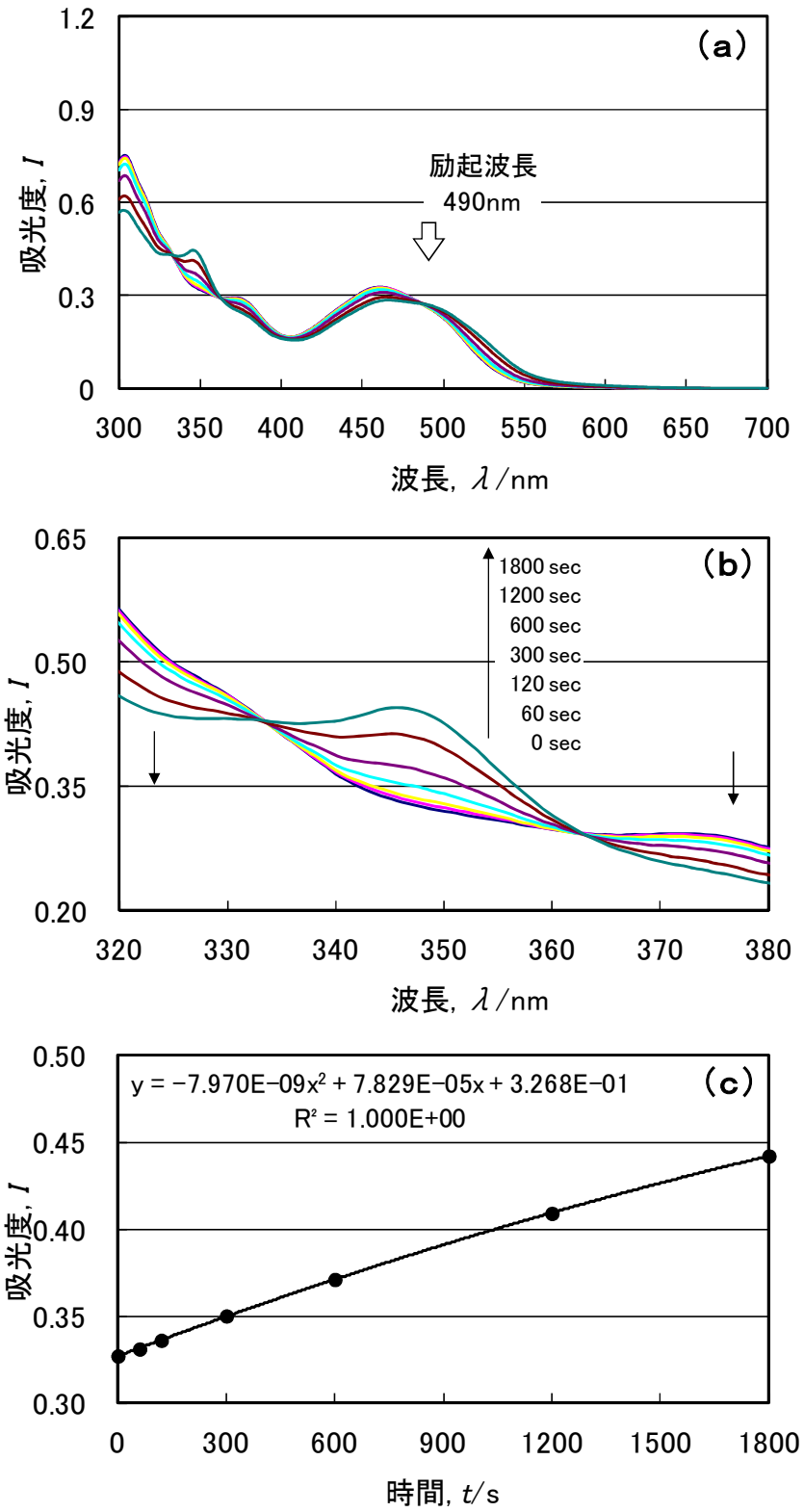


図 1.91. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：490nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

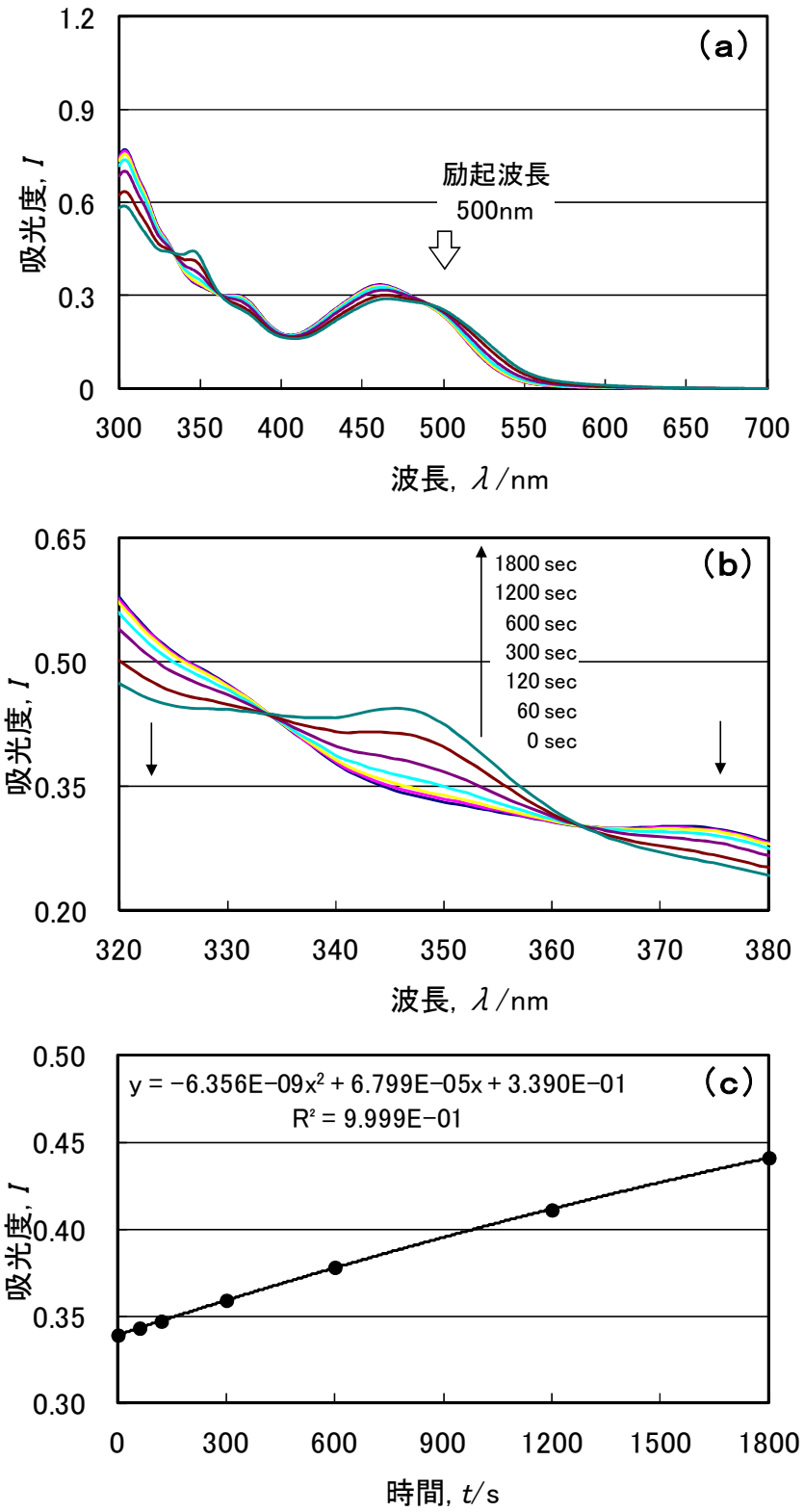


図 1.92. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：500nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

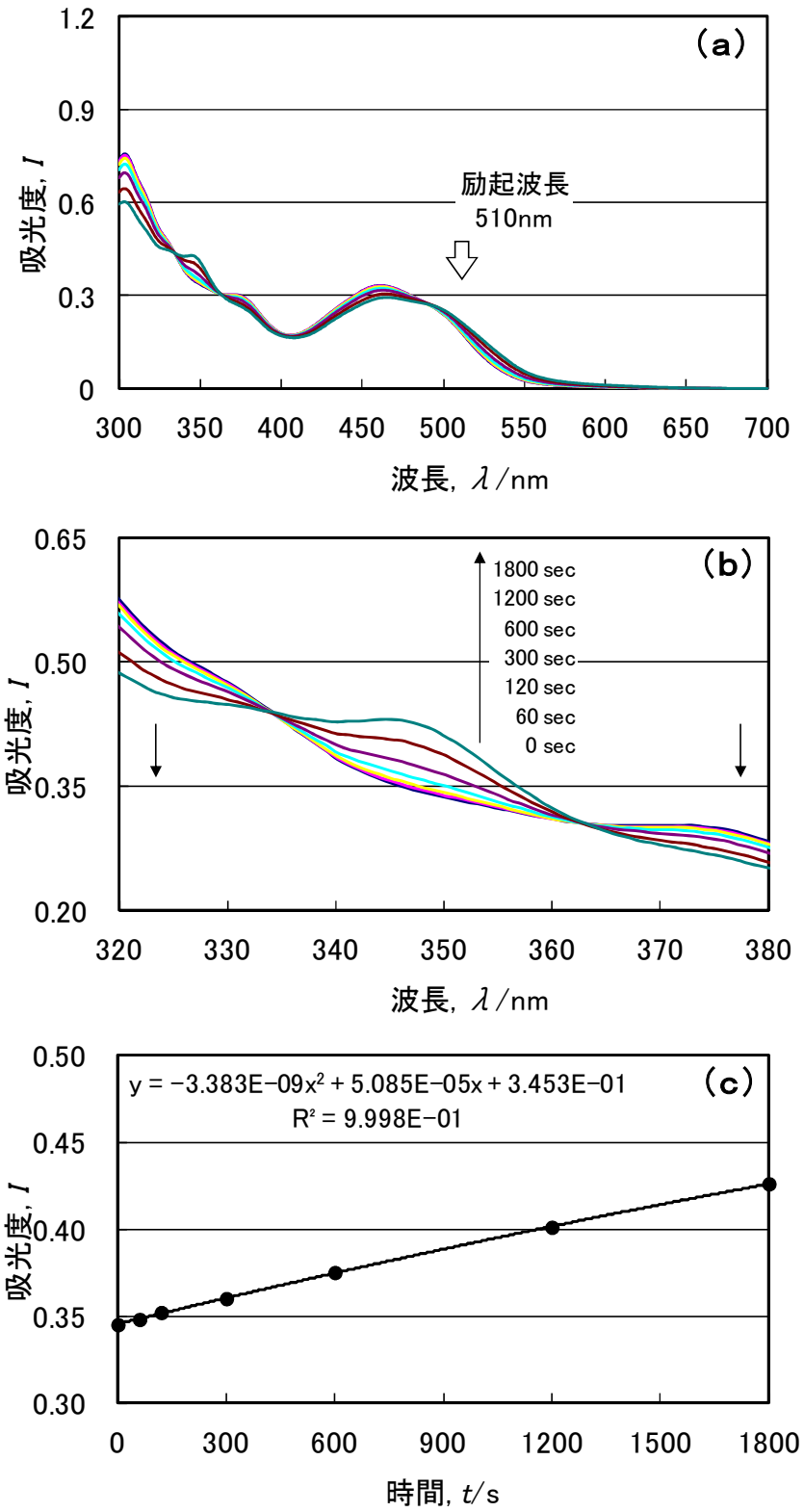


図 1.93. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：510nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

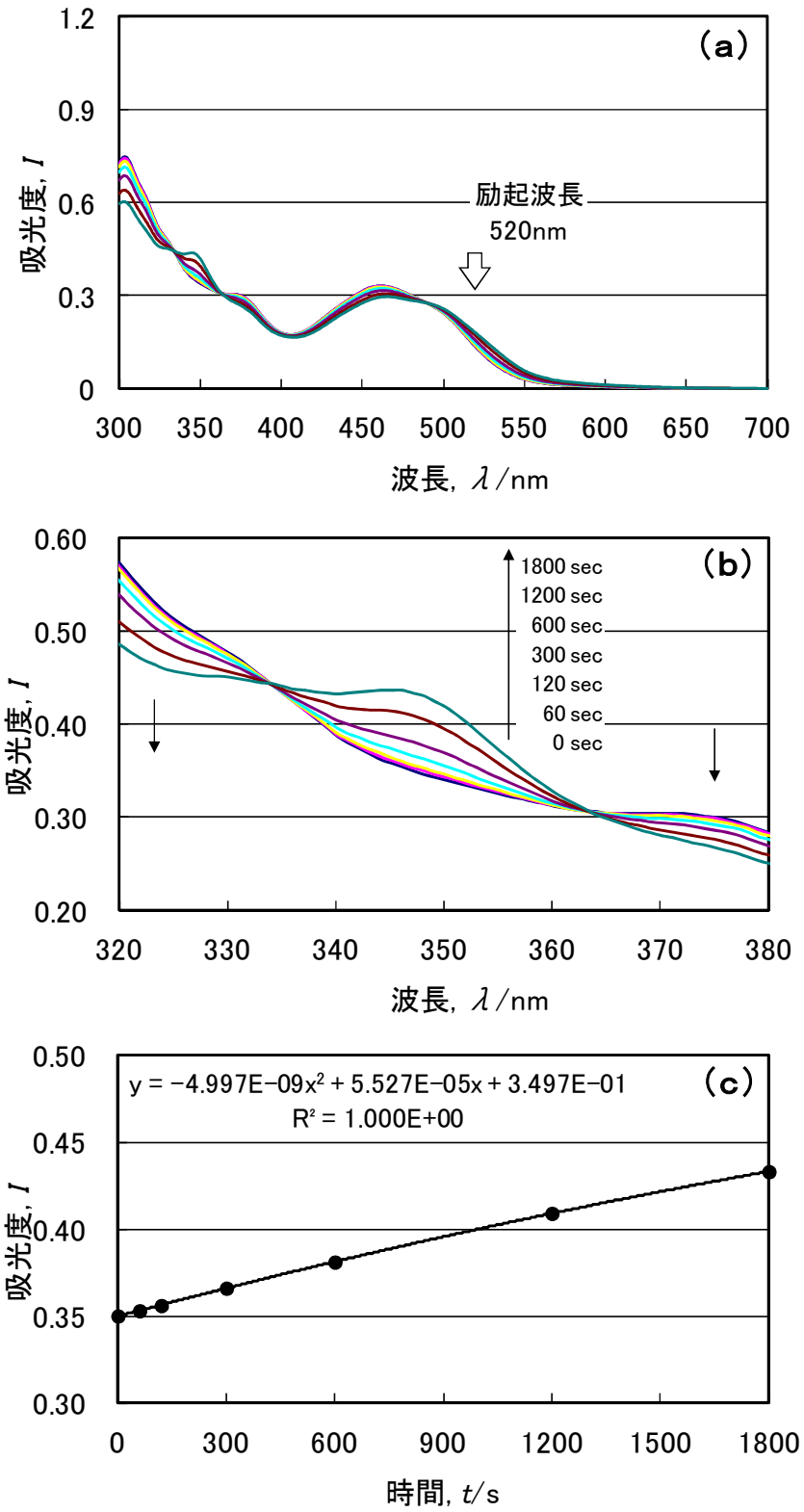


図 1.94. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：520nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

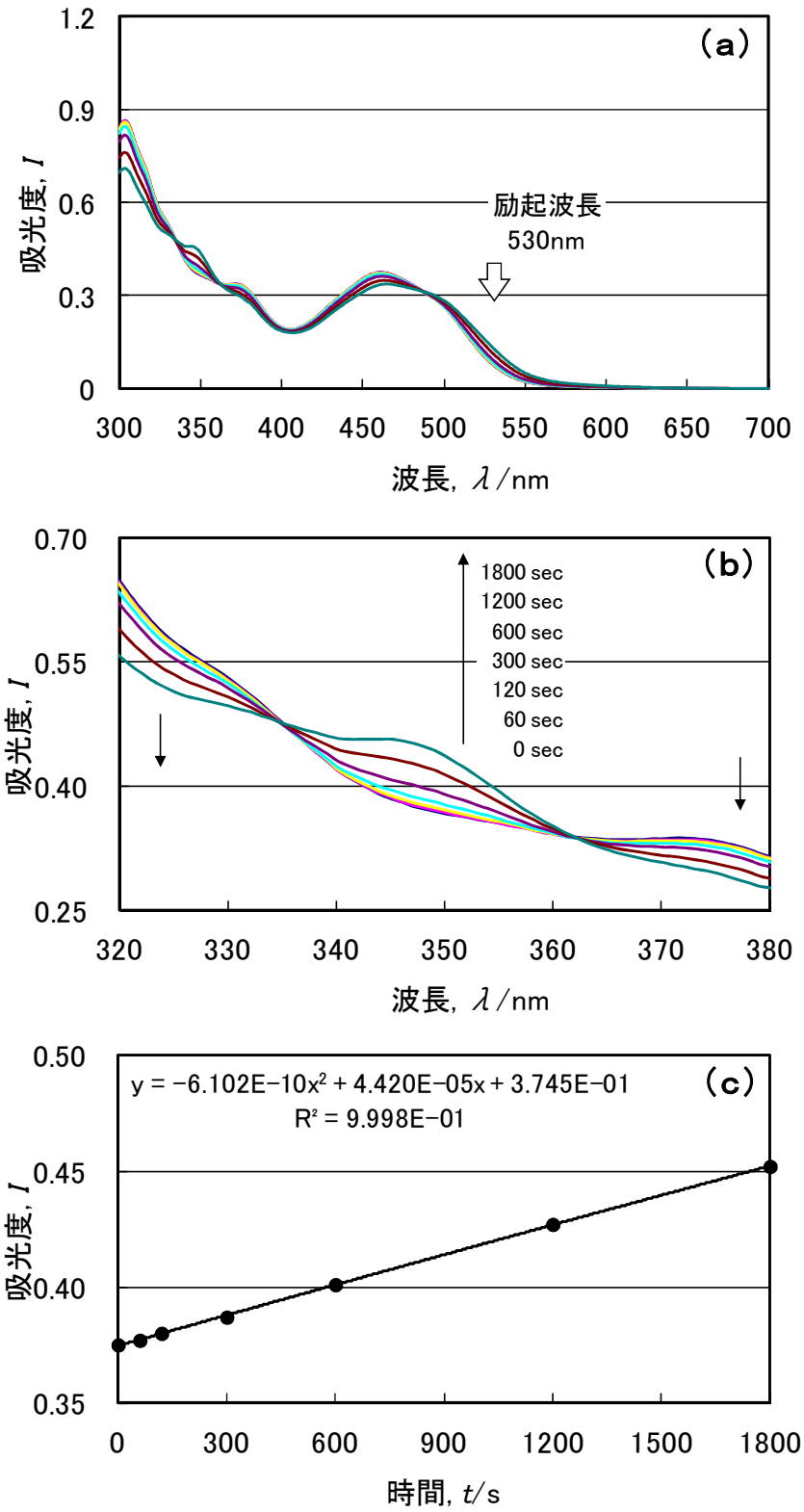


図 1.95. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：530nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

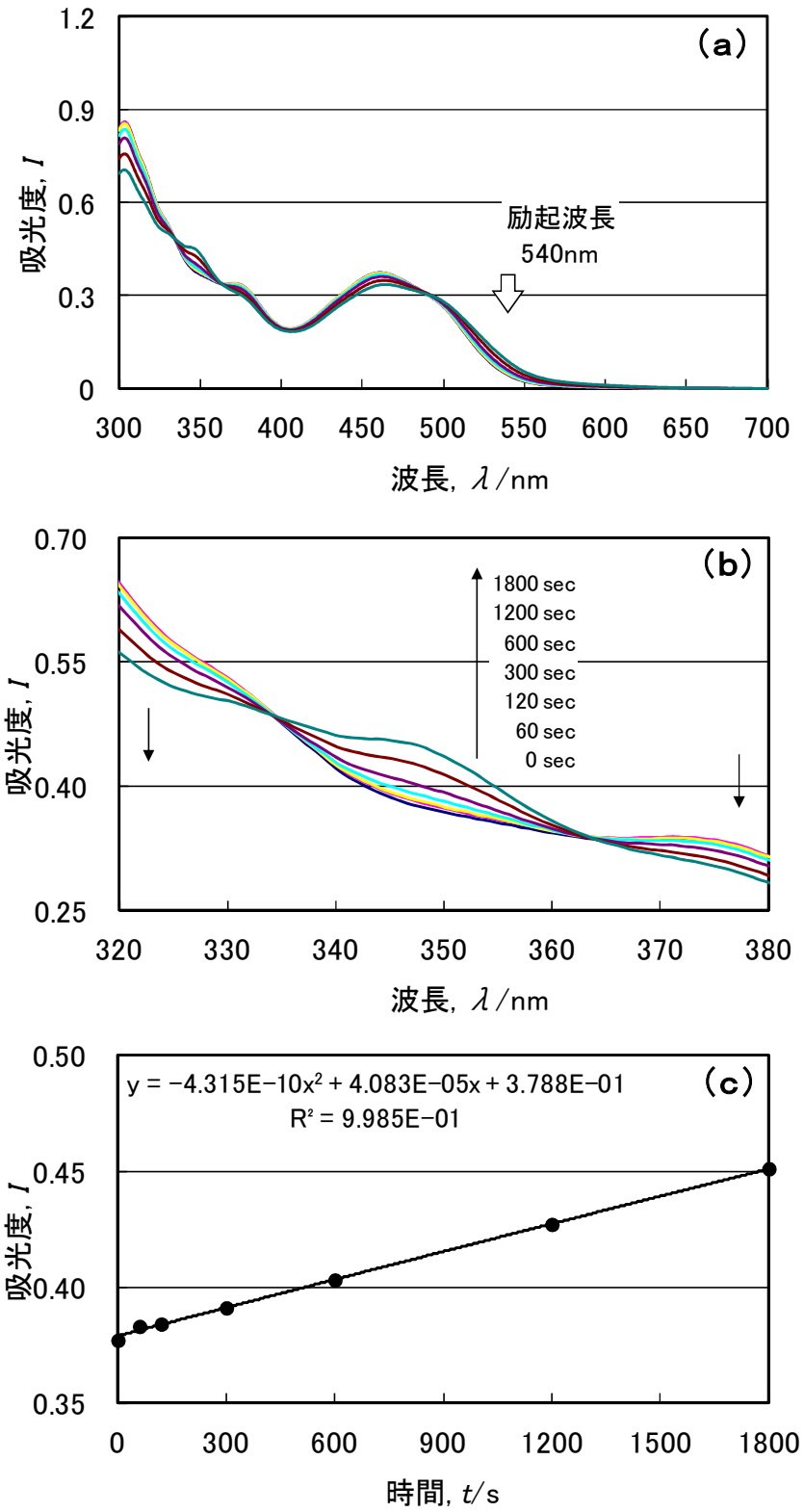


図 1.96. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：540nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：30μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

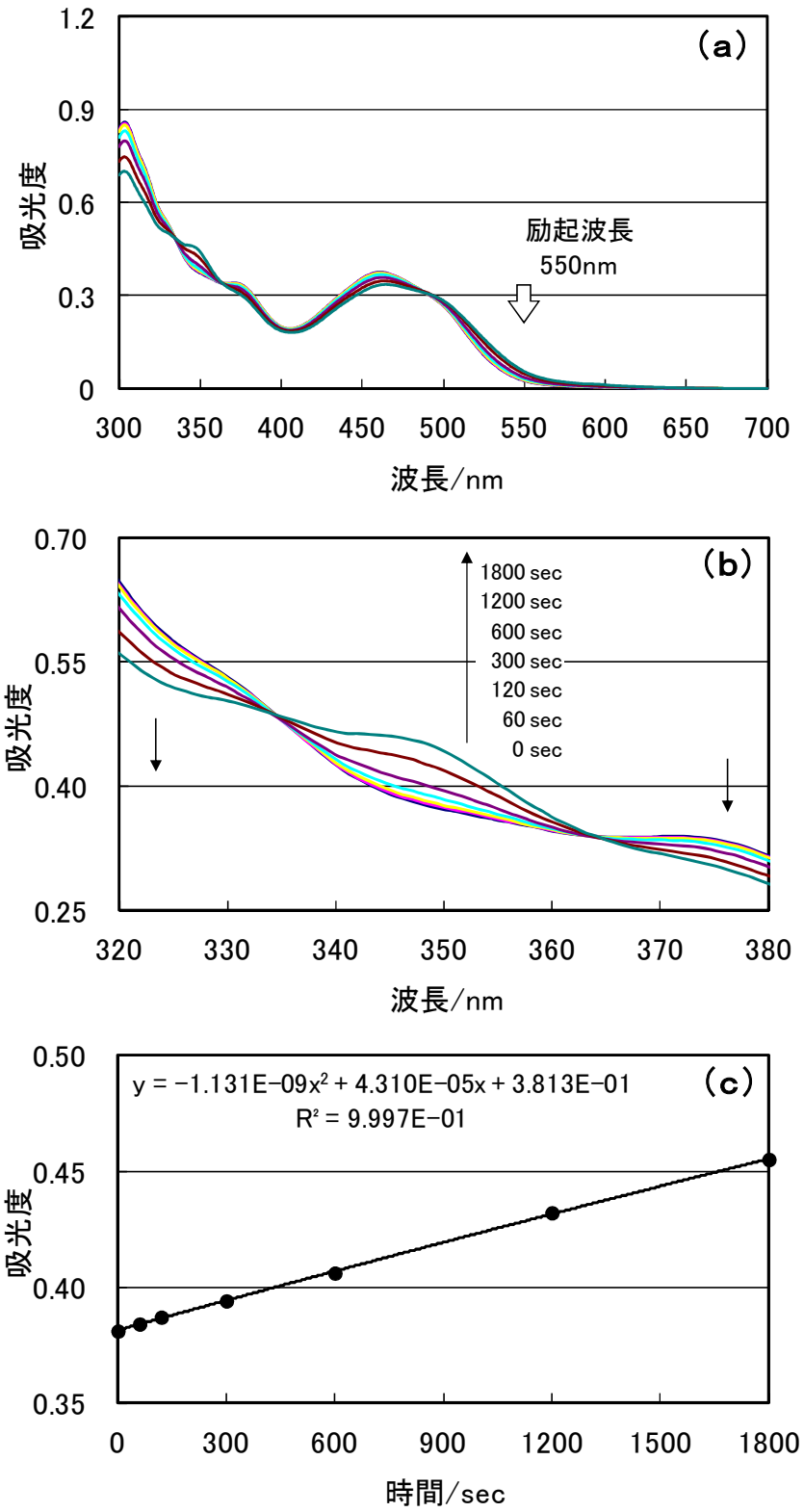


図 1.97. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：550nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

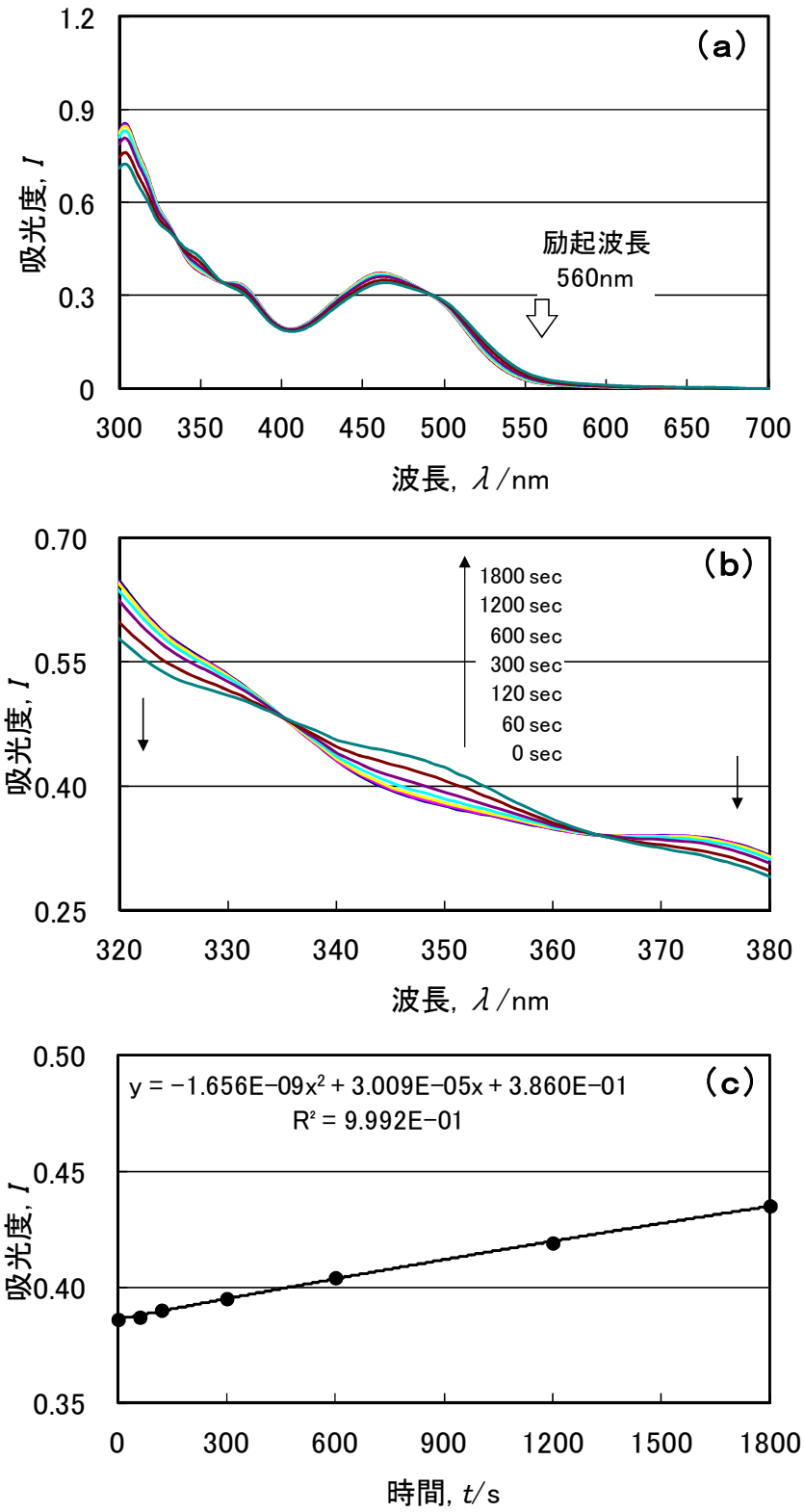


図 1.98. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：560nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

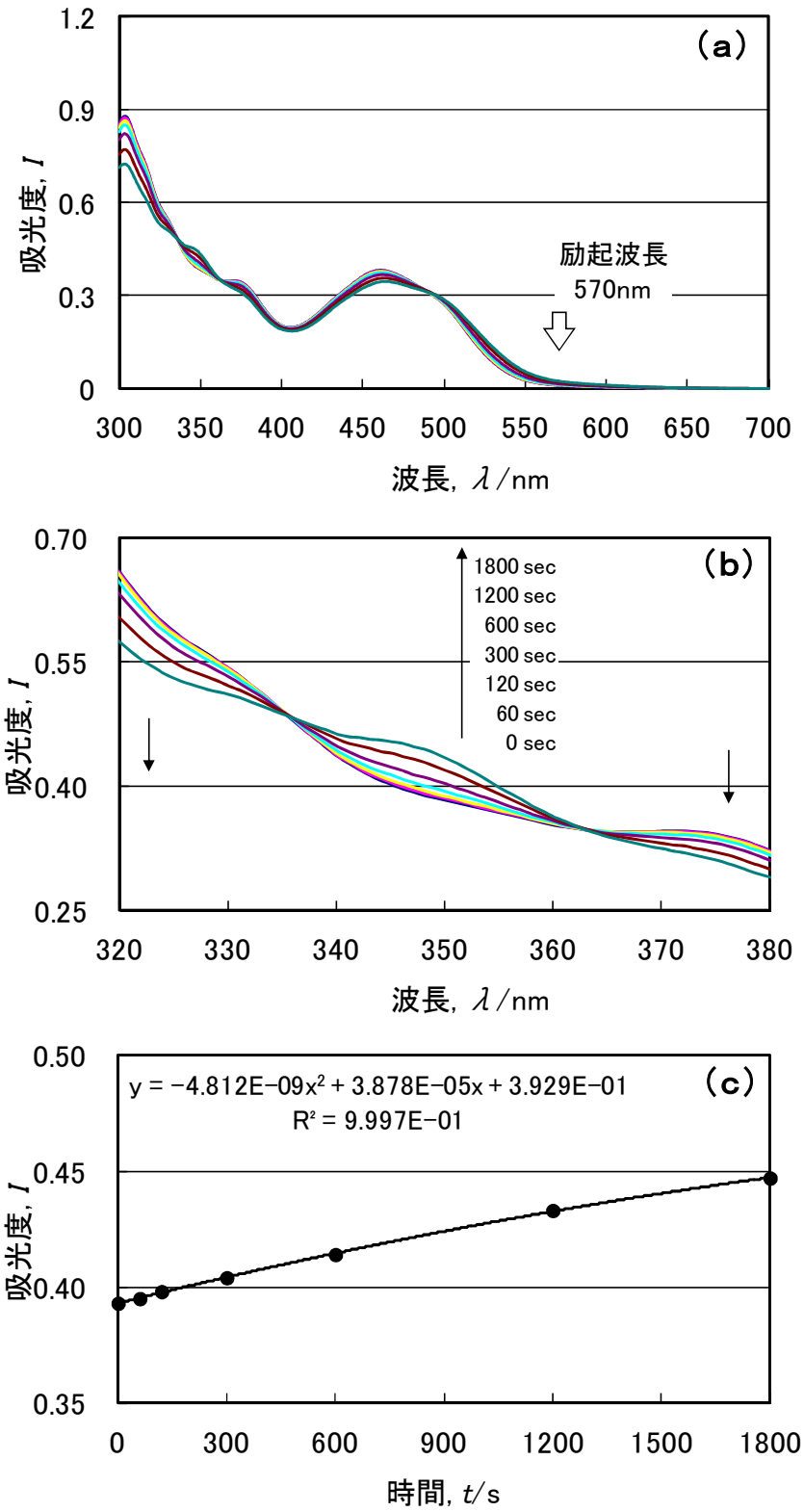


図 1.99. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：570nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

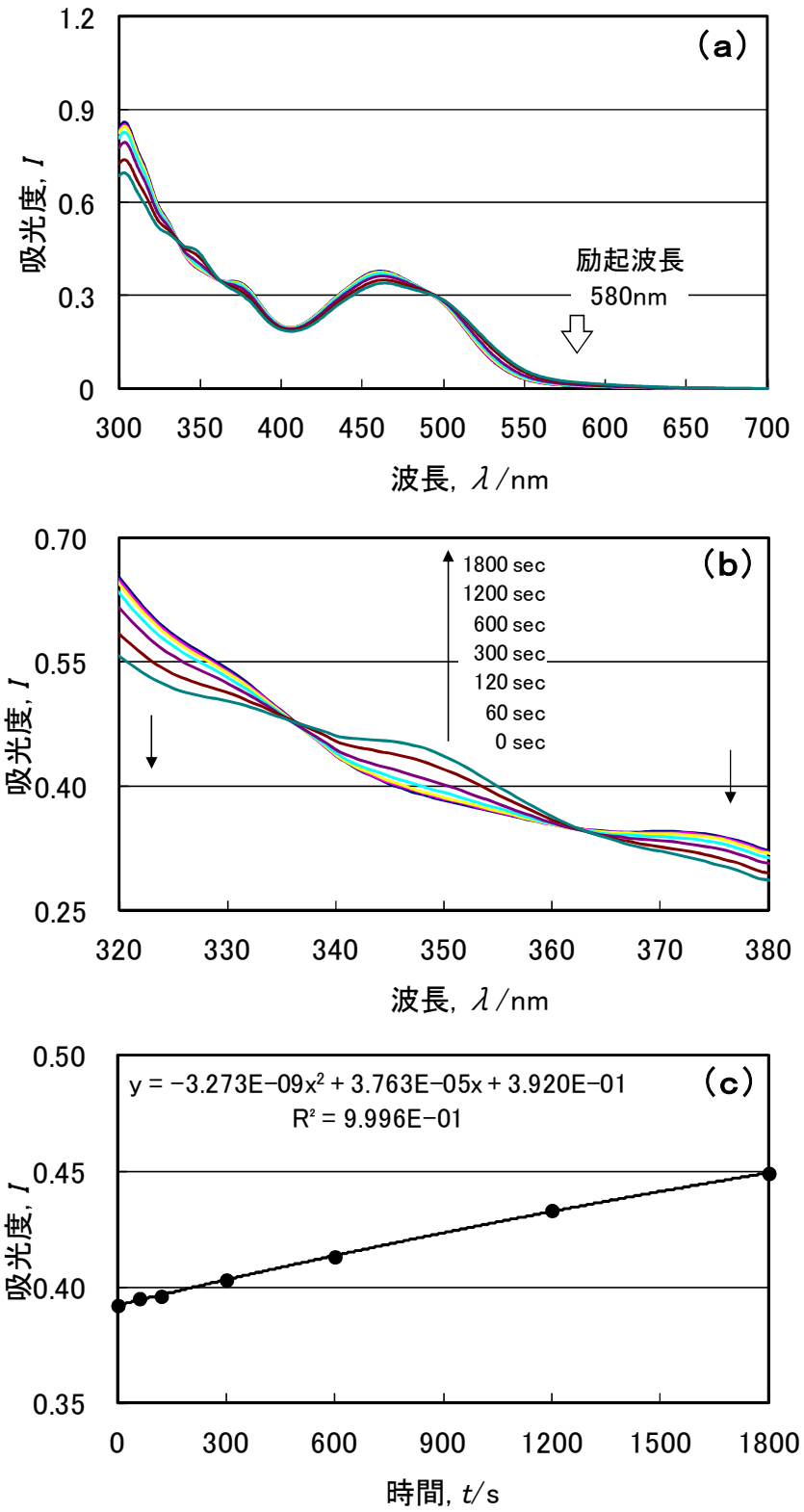


図 1.100. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：580nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：150μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

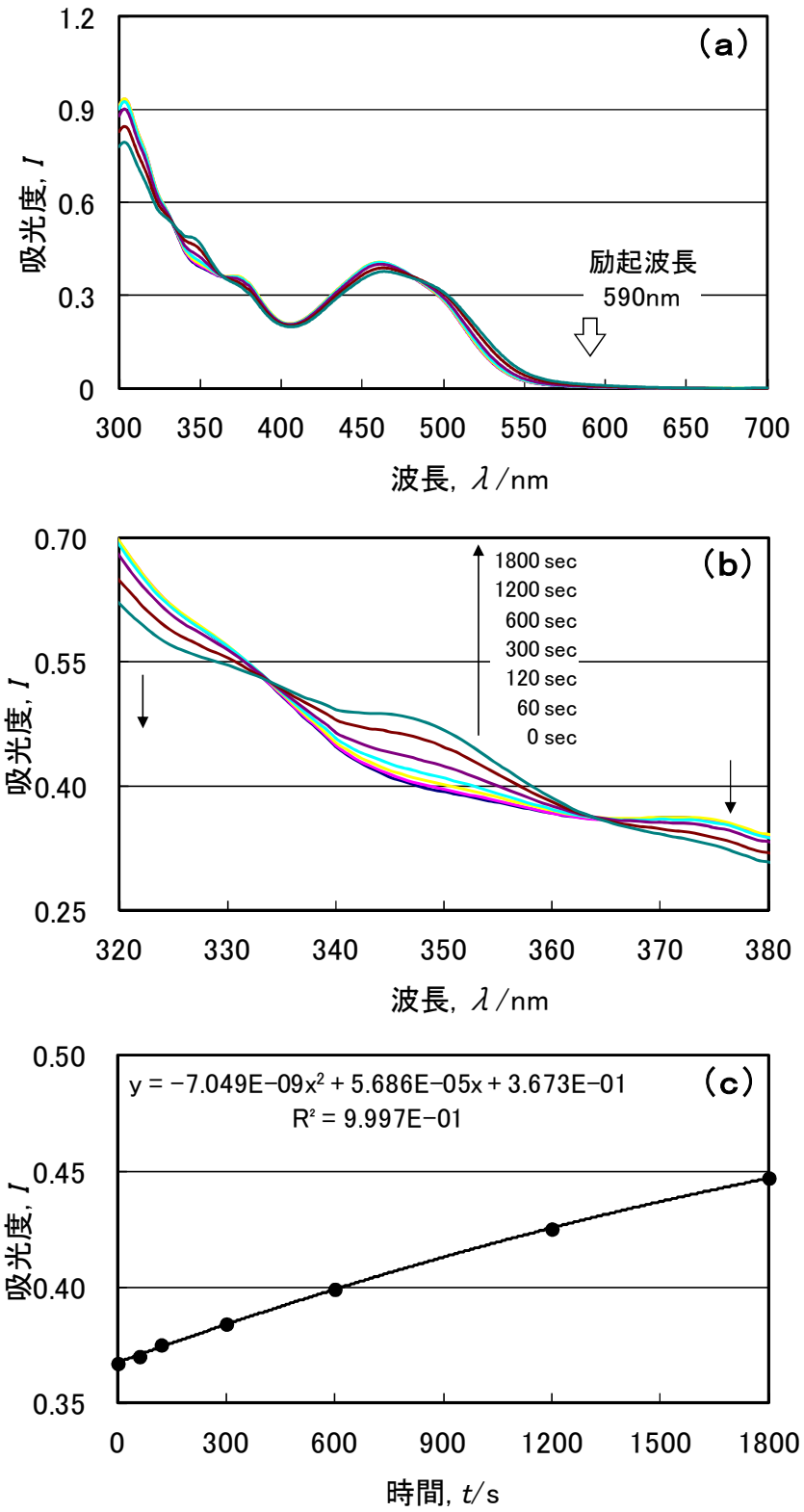


図 1.101. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：590nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：200μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

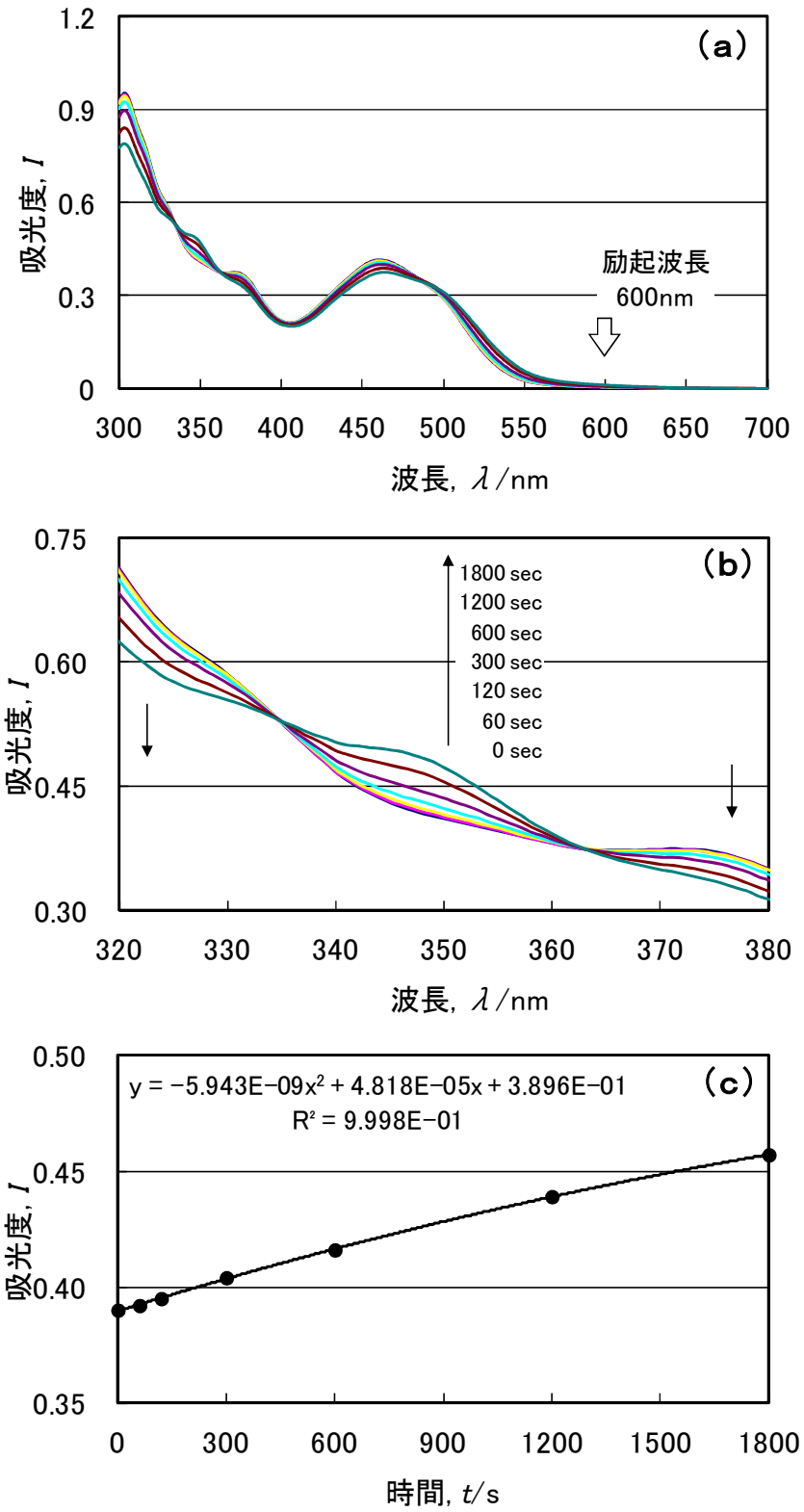


図 1.102. メチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：600nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：250μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

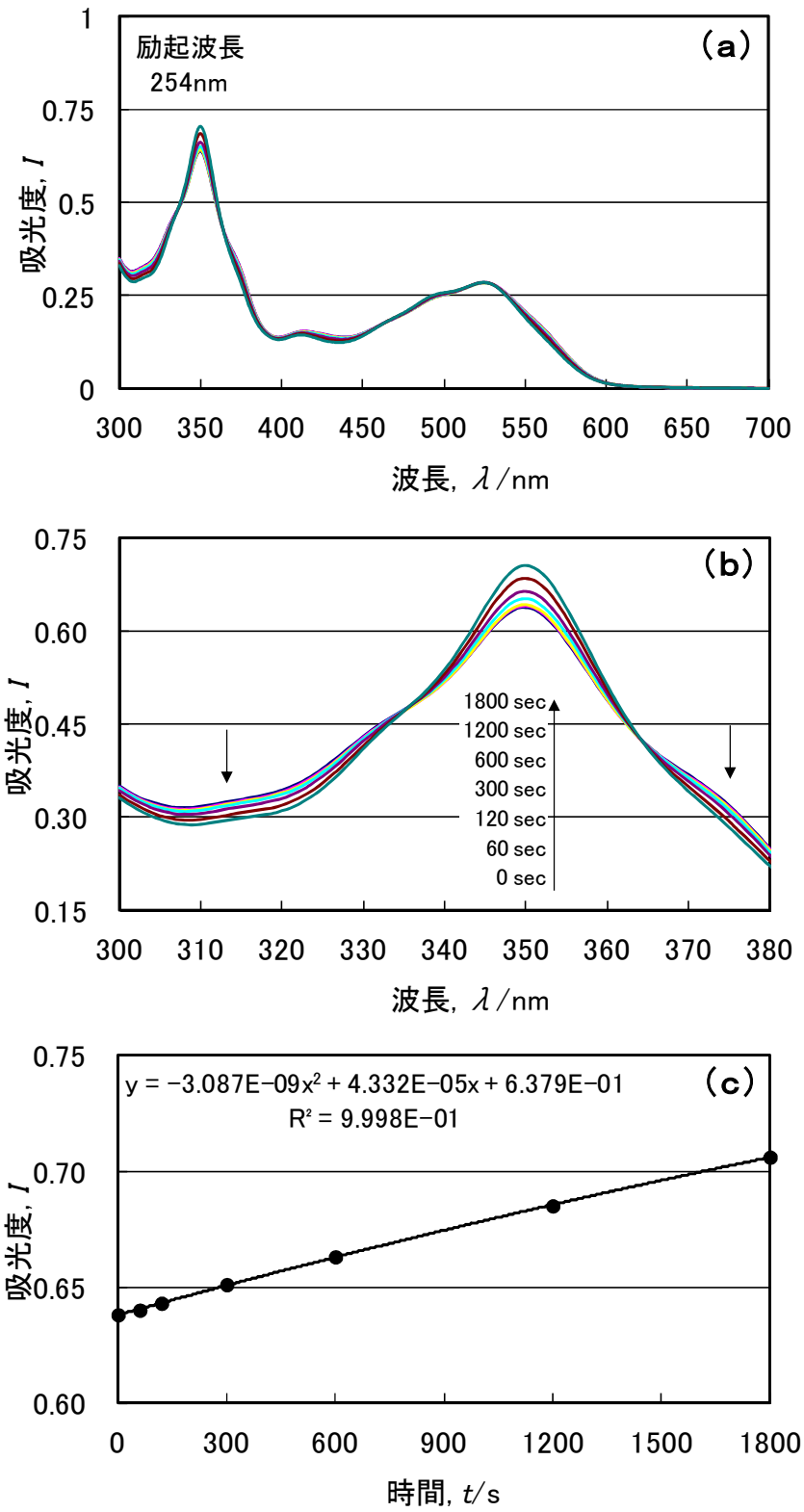


図 1.103. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：254nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

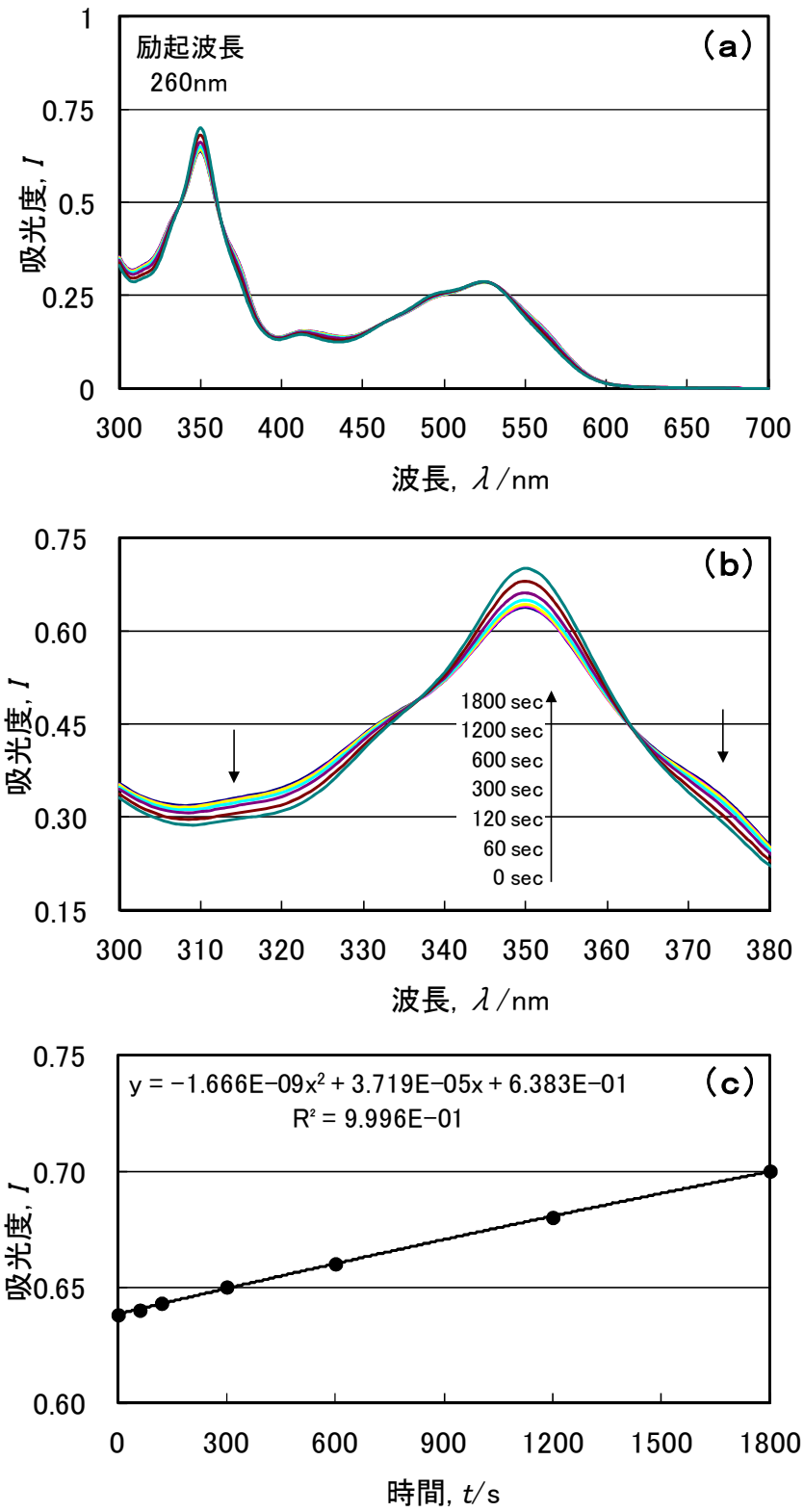


図 1.104. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：260nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

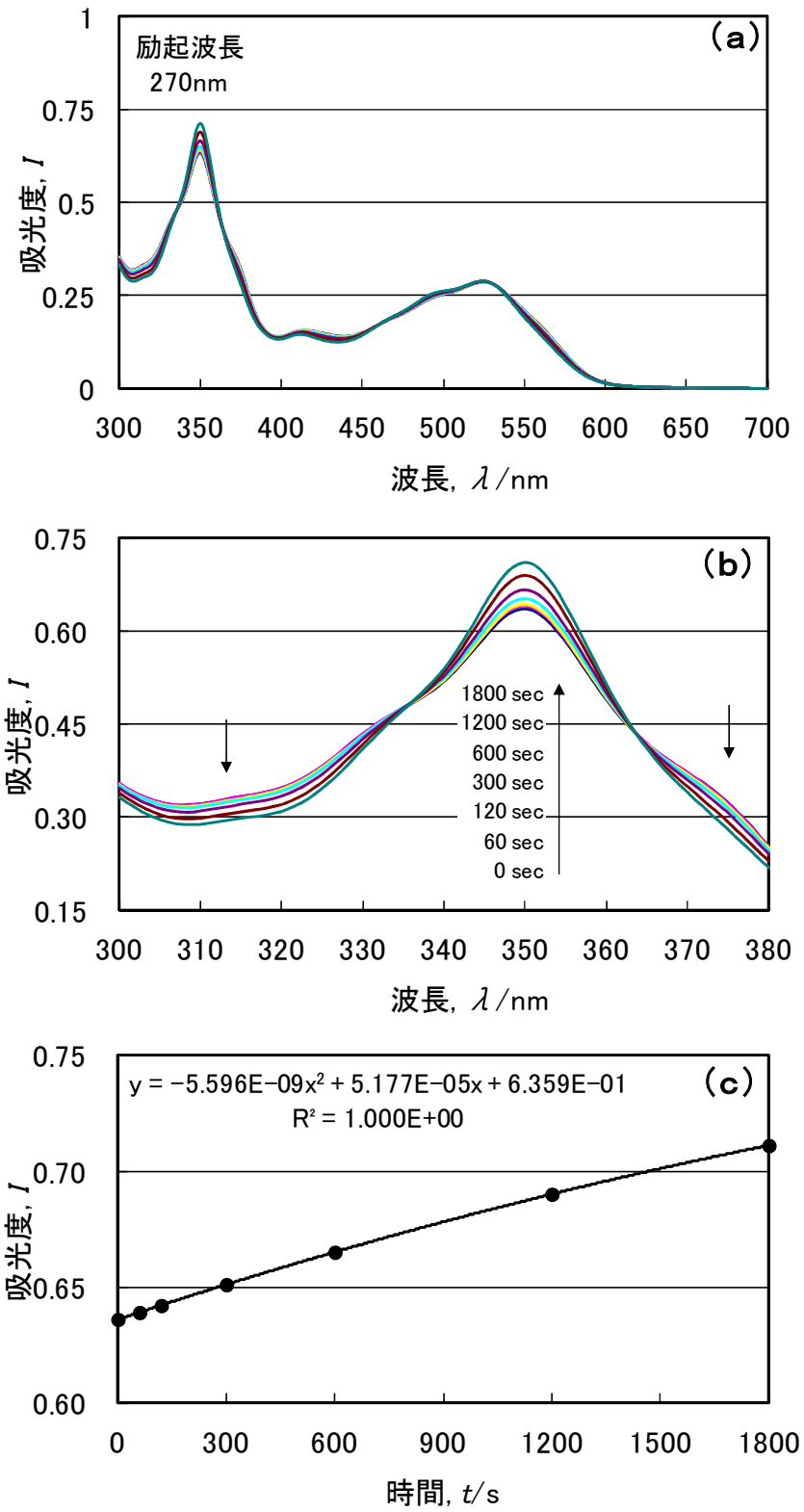


図 1.105. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：270nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

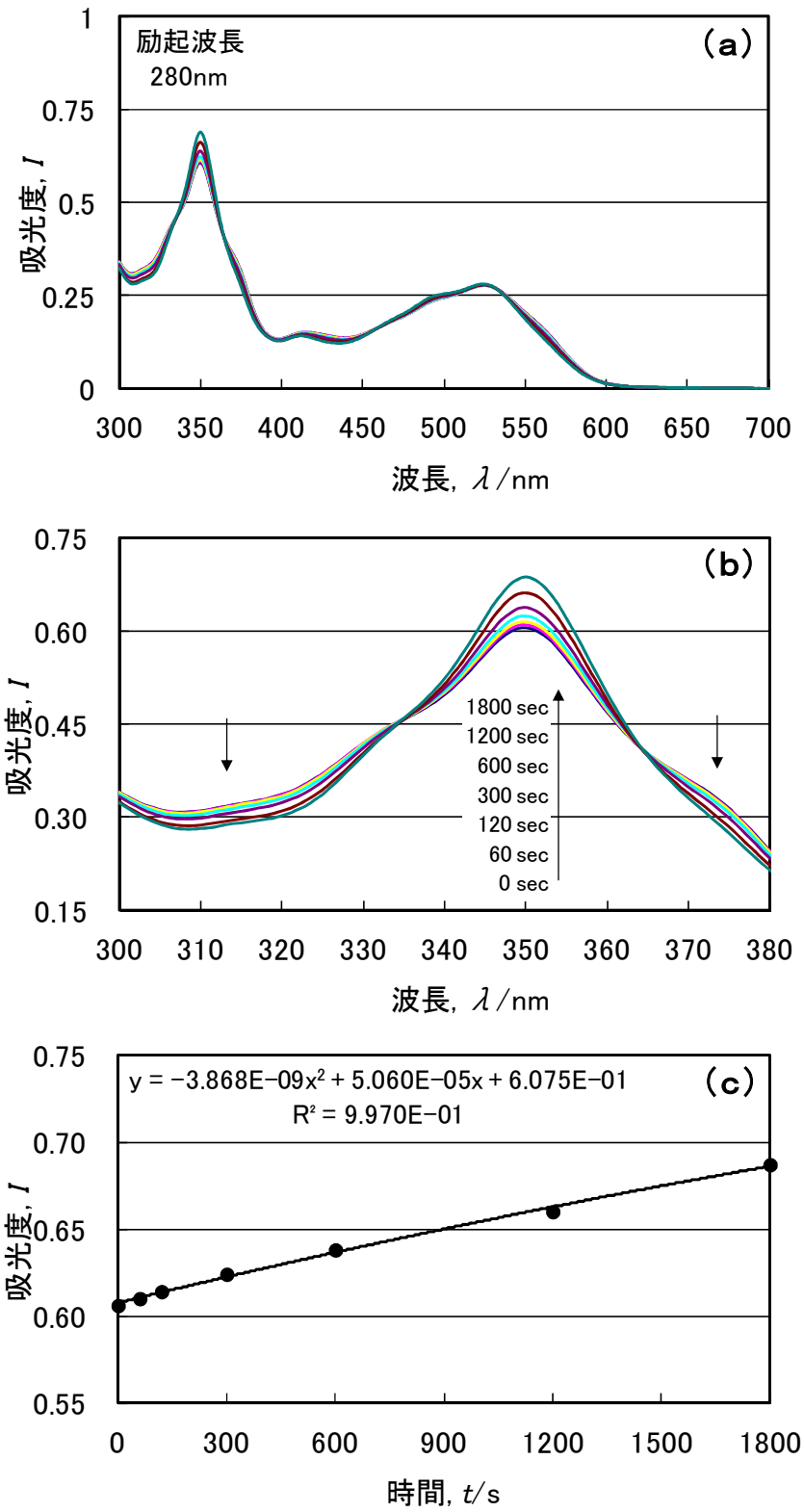


図 1.106. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：280nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

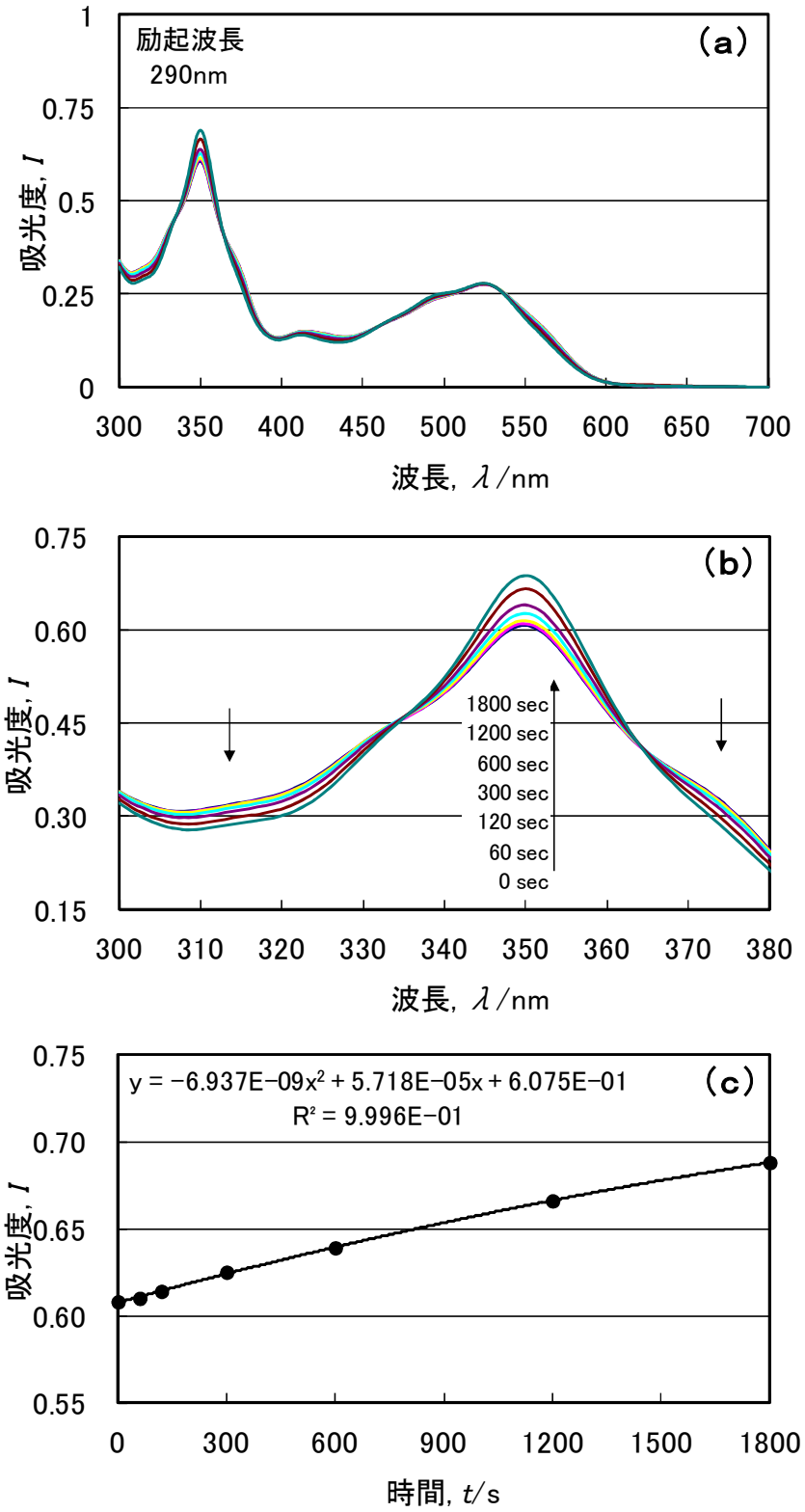


図 1.107. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：290nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

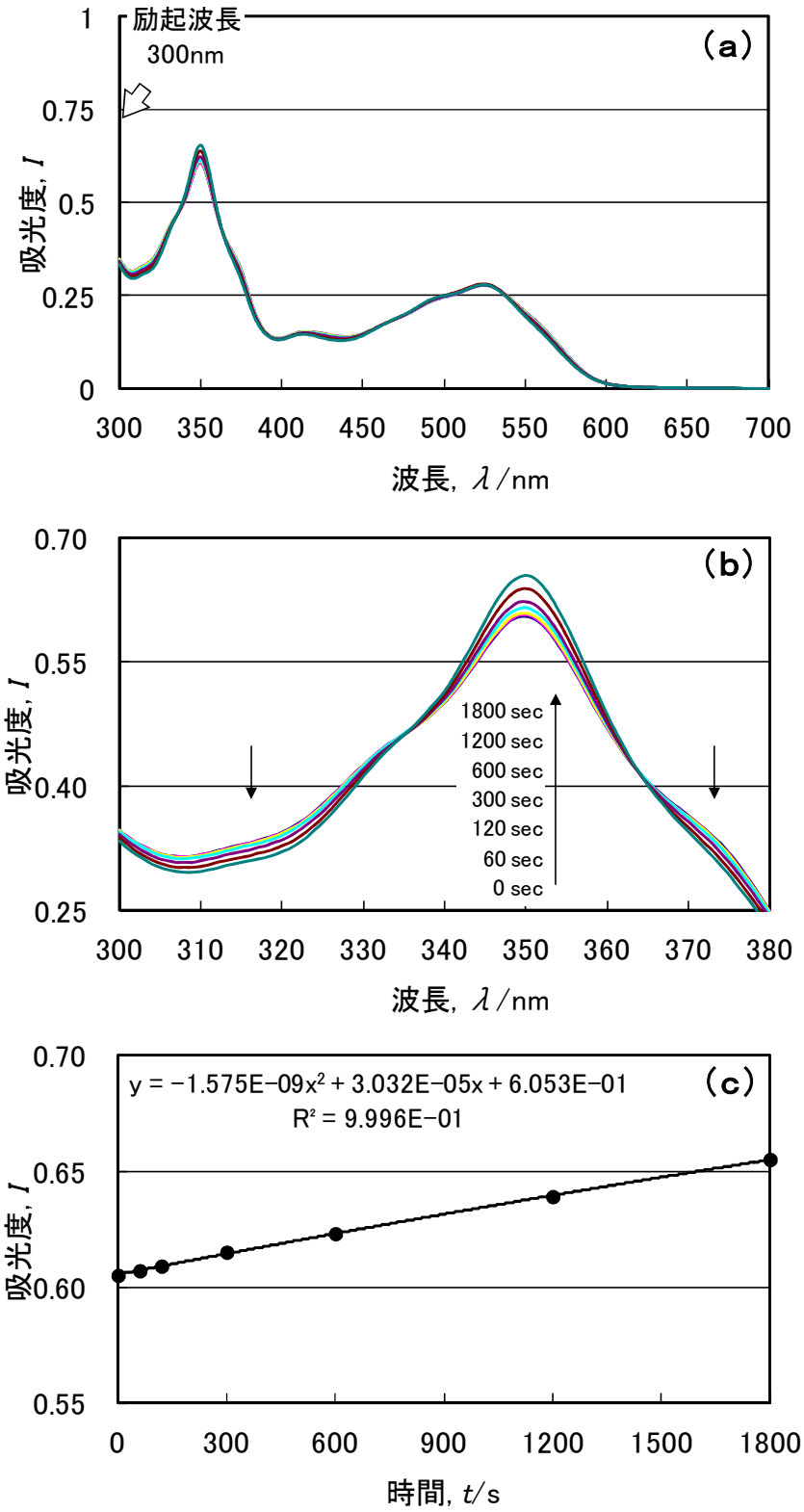


図 1.108. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：300nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：10μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

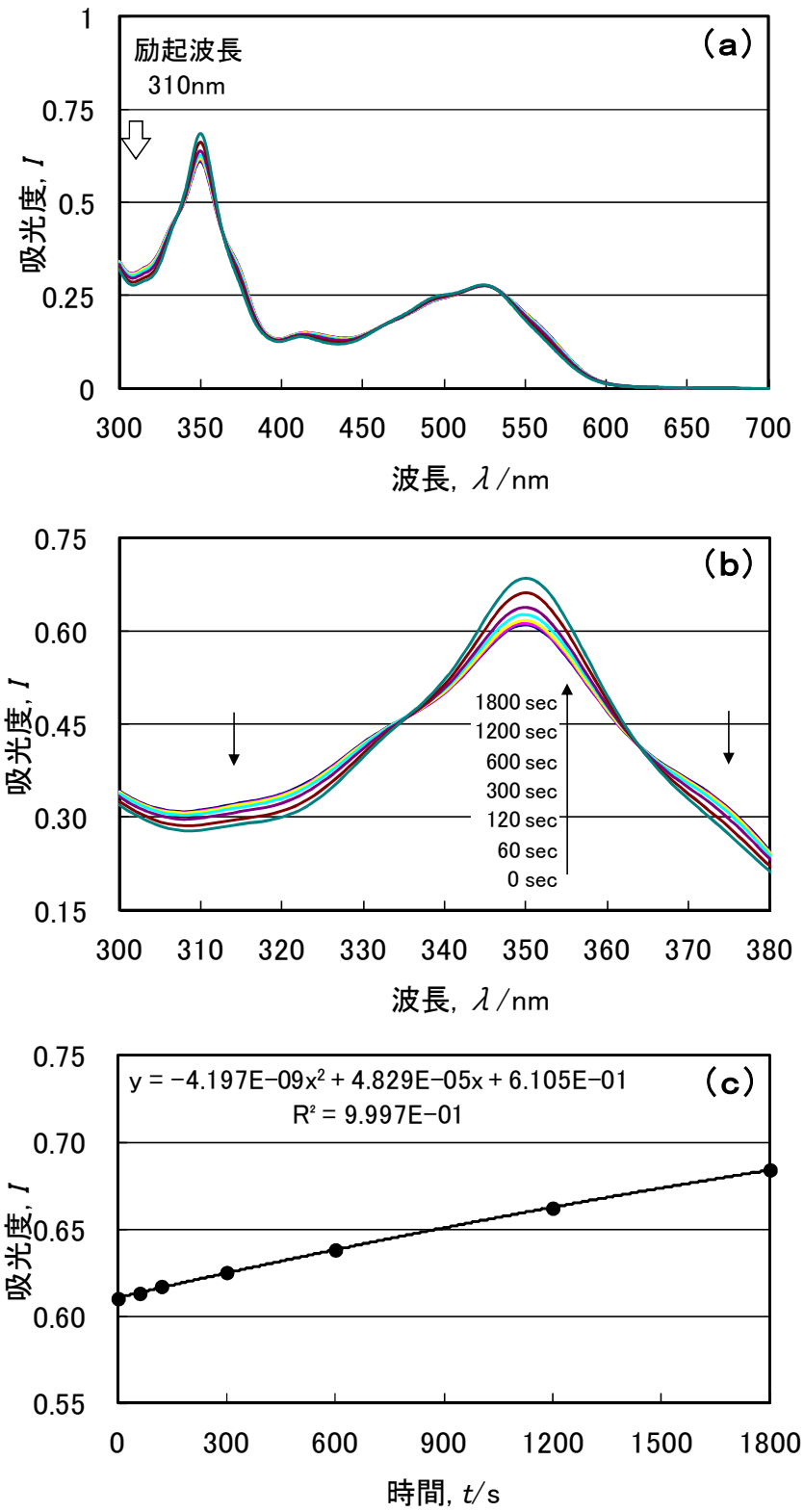


図 1.109. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：310nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

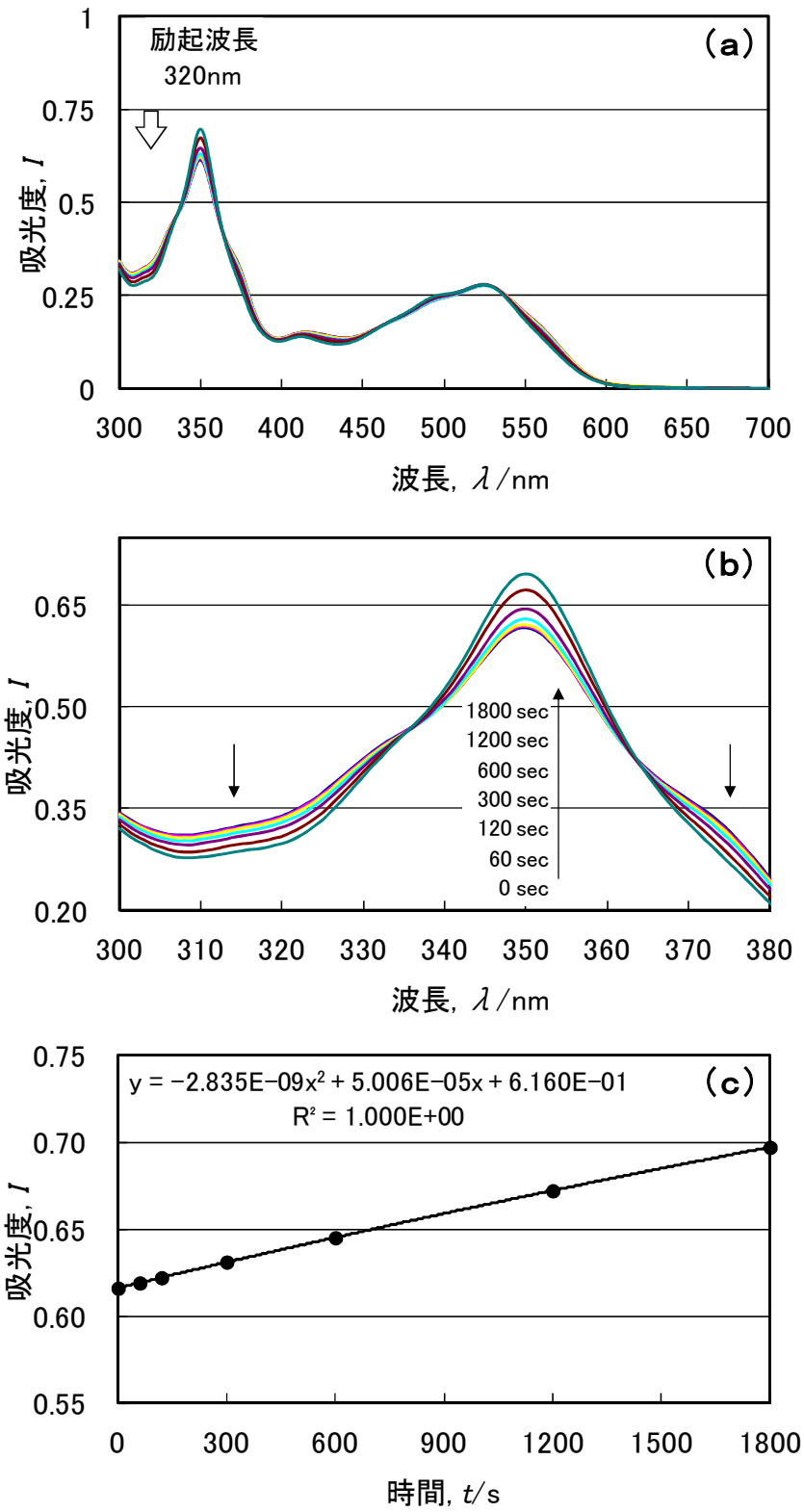


図 1.110. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：320nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

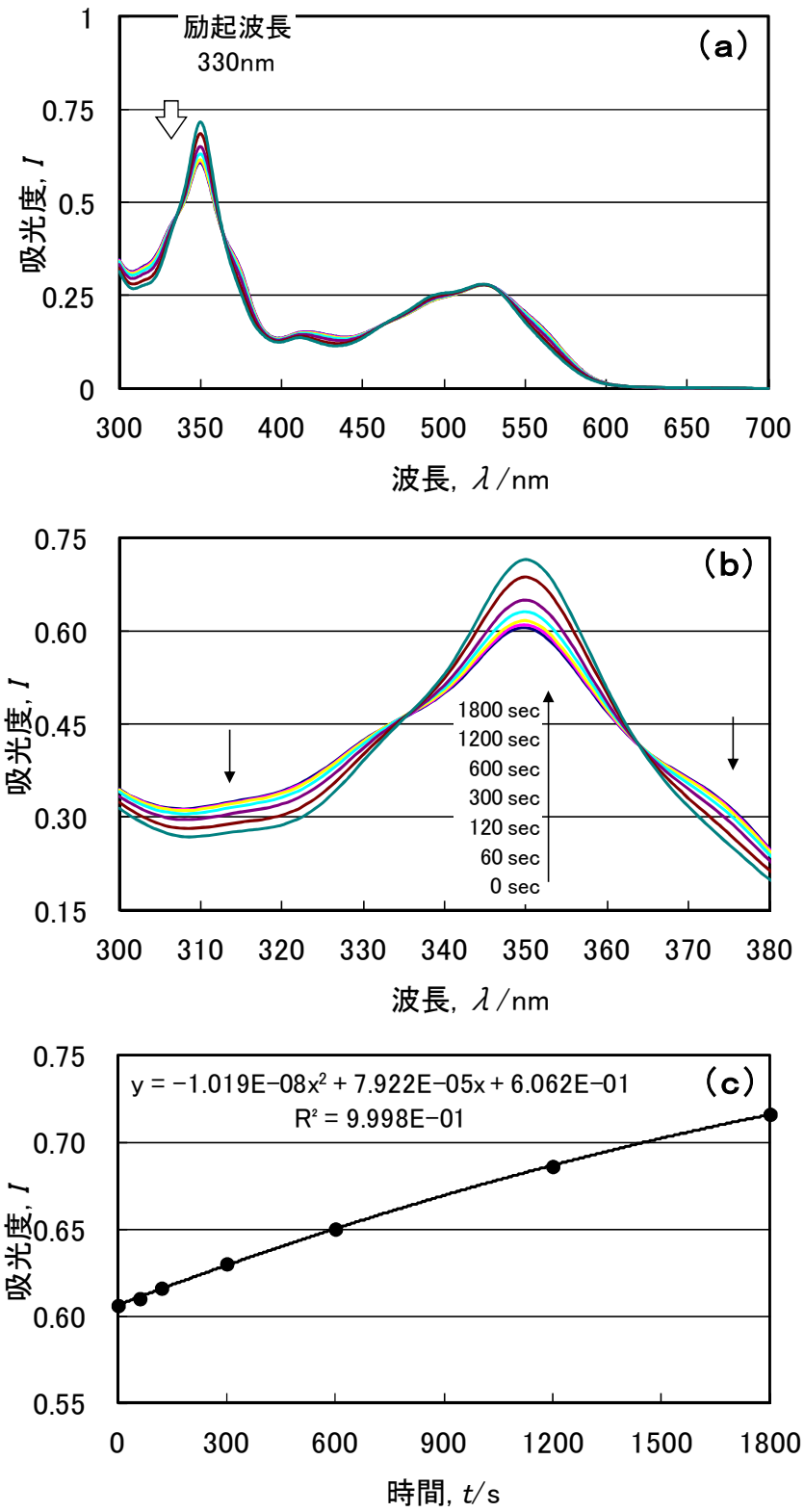


図 1.111. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：330nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

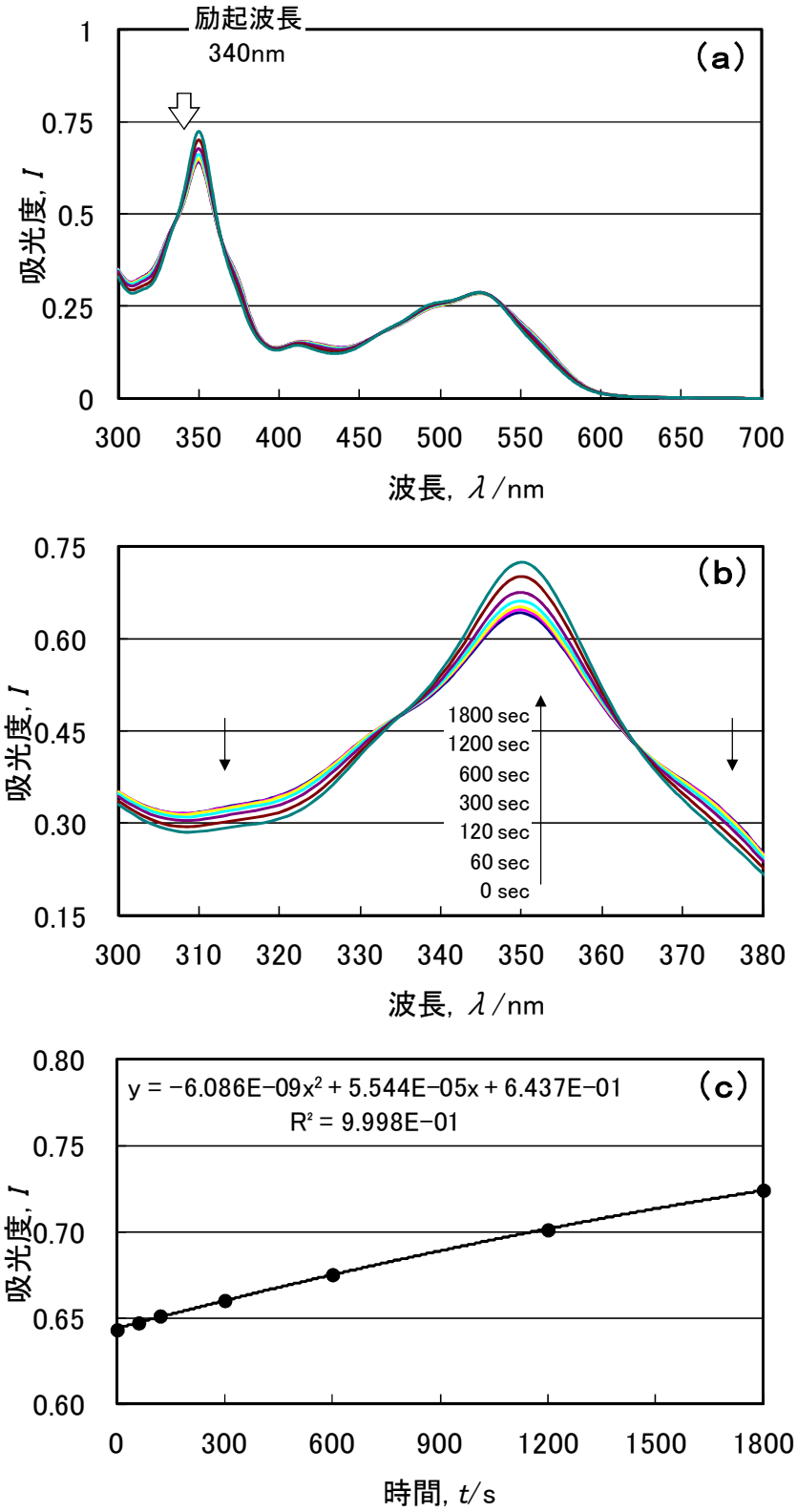


図 1.112. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：340nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

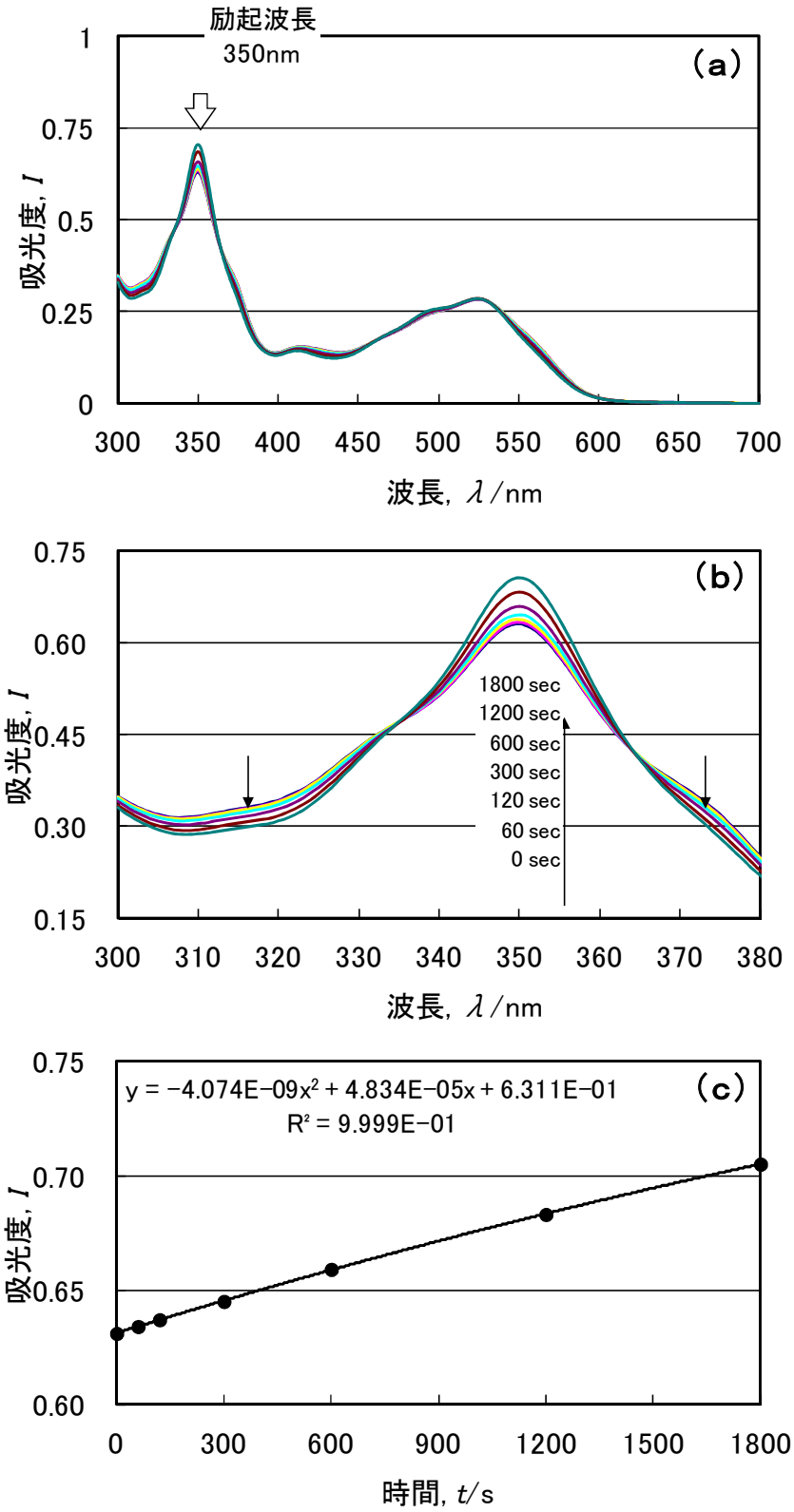


図 1.113. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：350nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

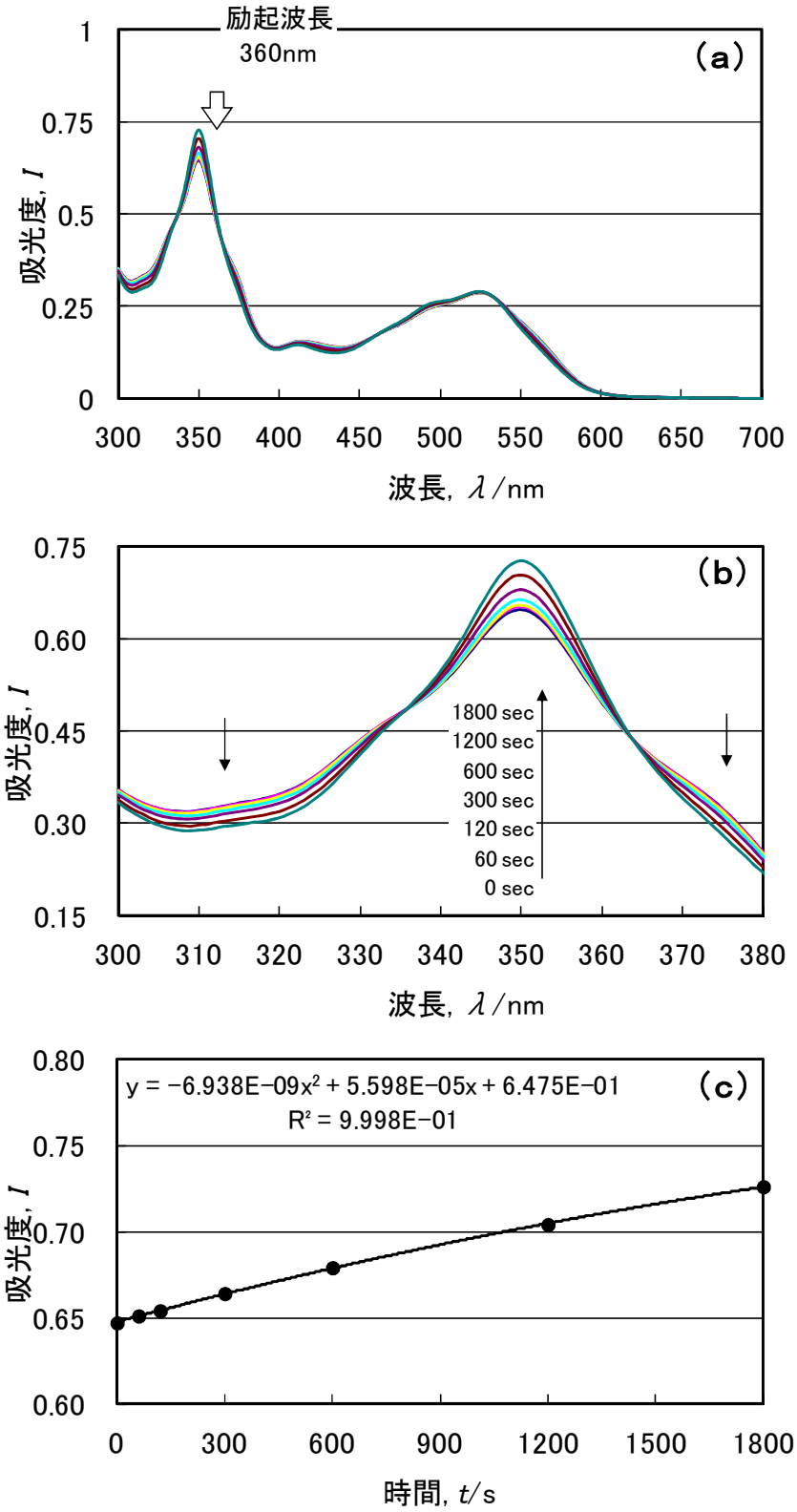


図 1.114. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：360nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：15μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

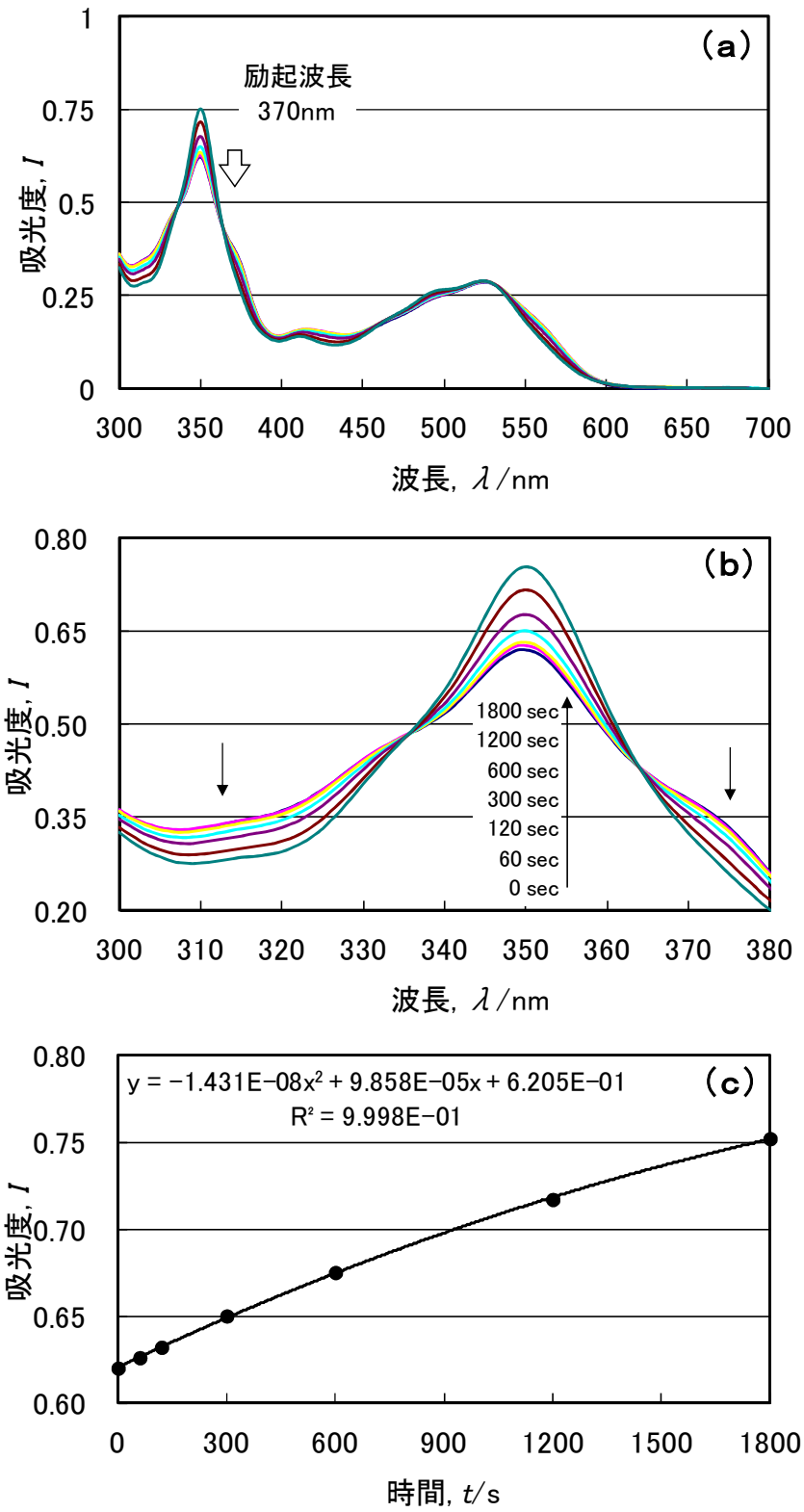


図 1.115. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：370nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

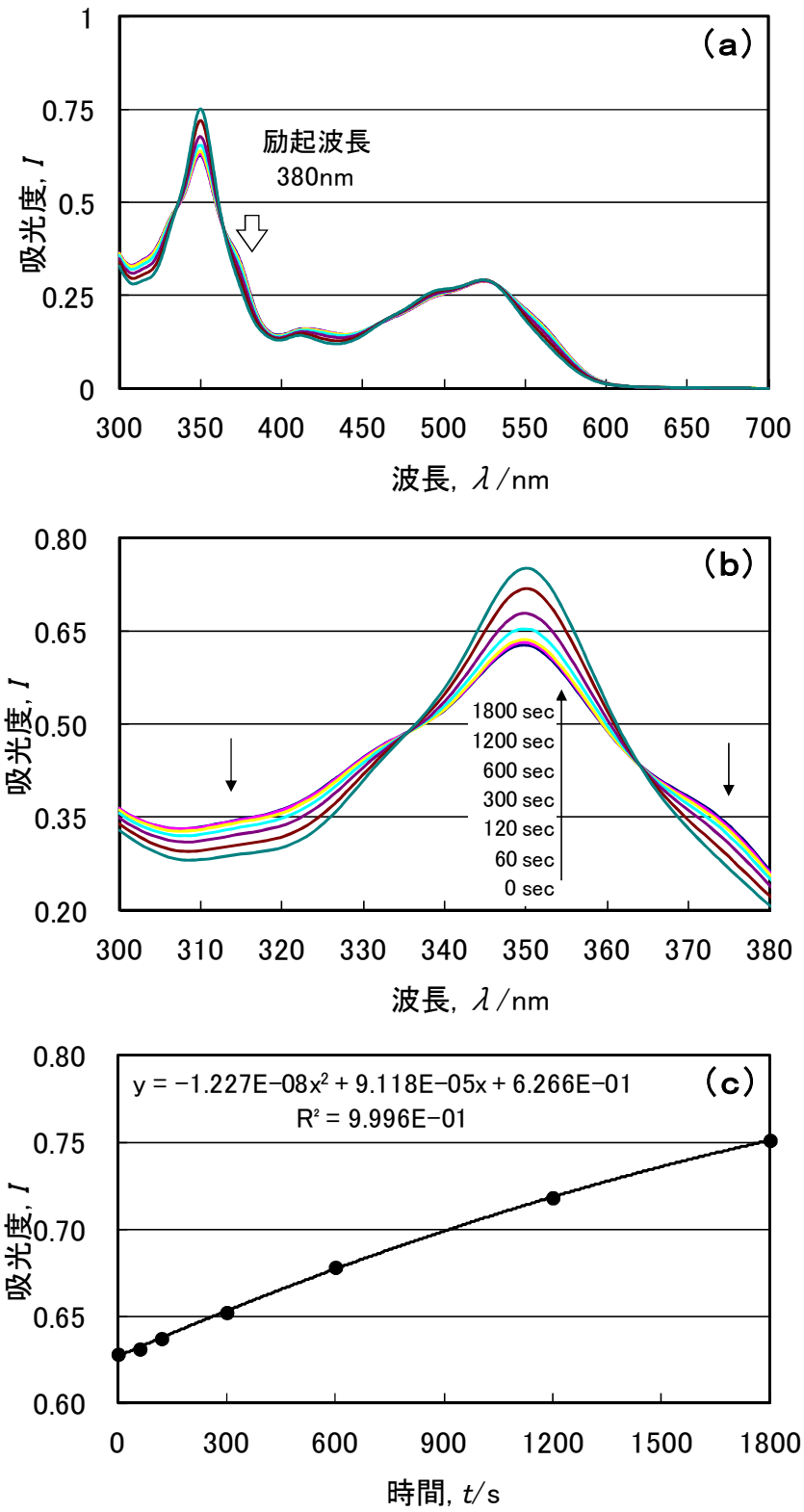


図 1.116. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：380nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

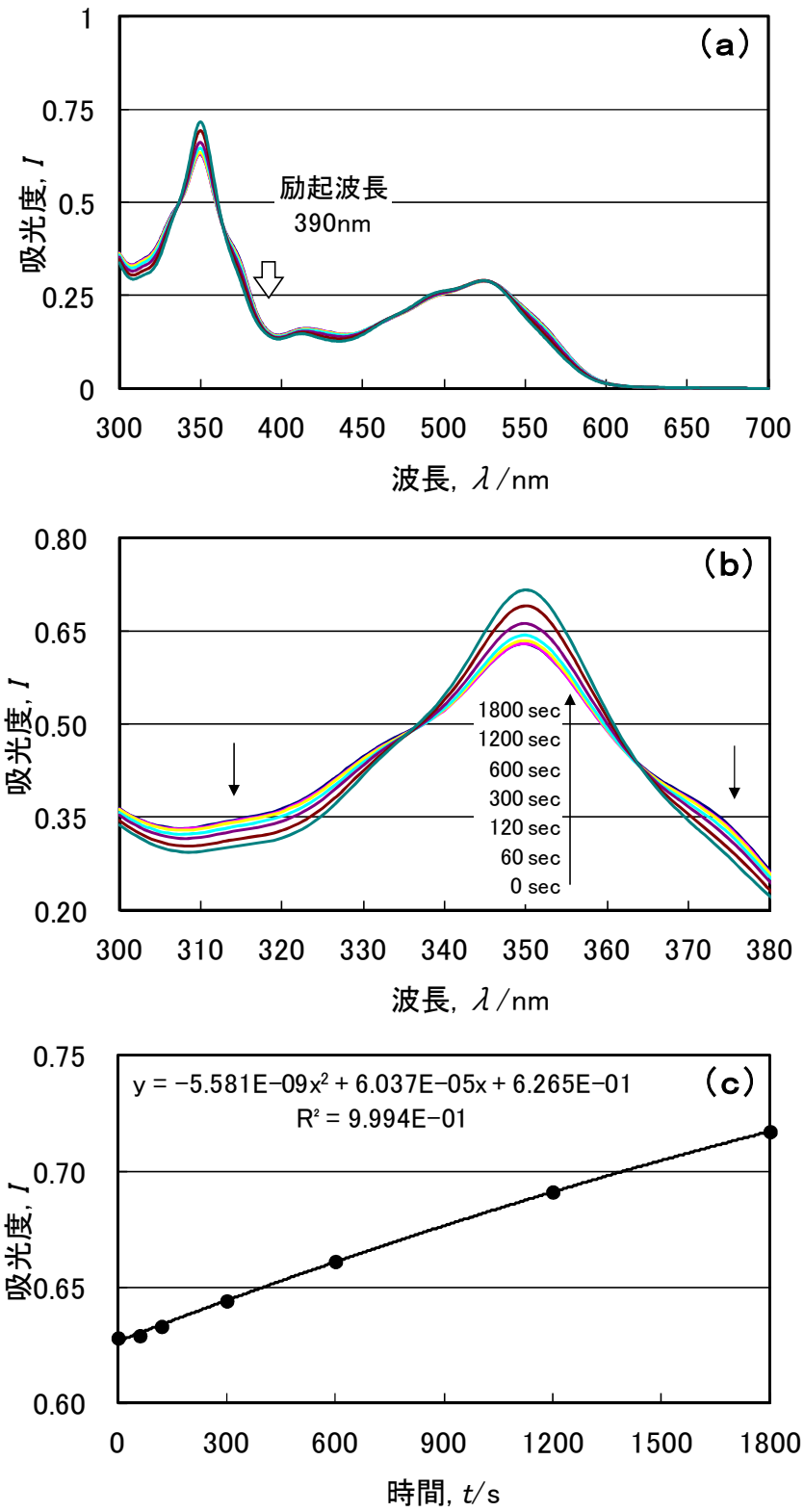


図 1.117. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：390nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

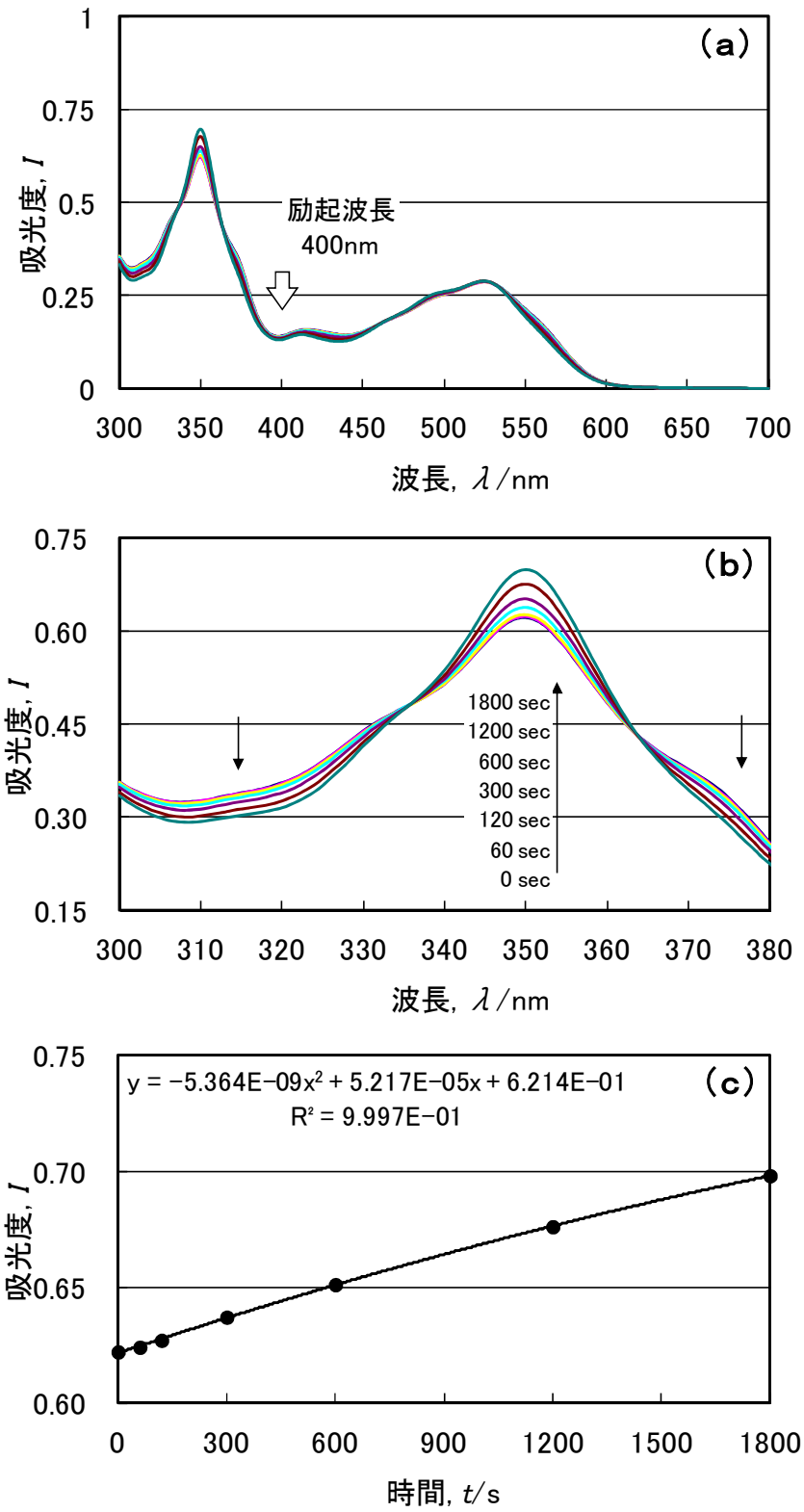


図 1.118. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：400nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

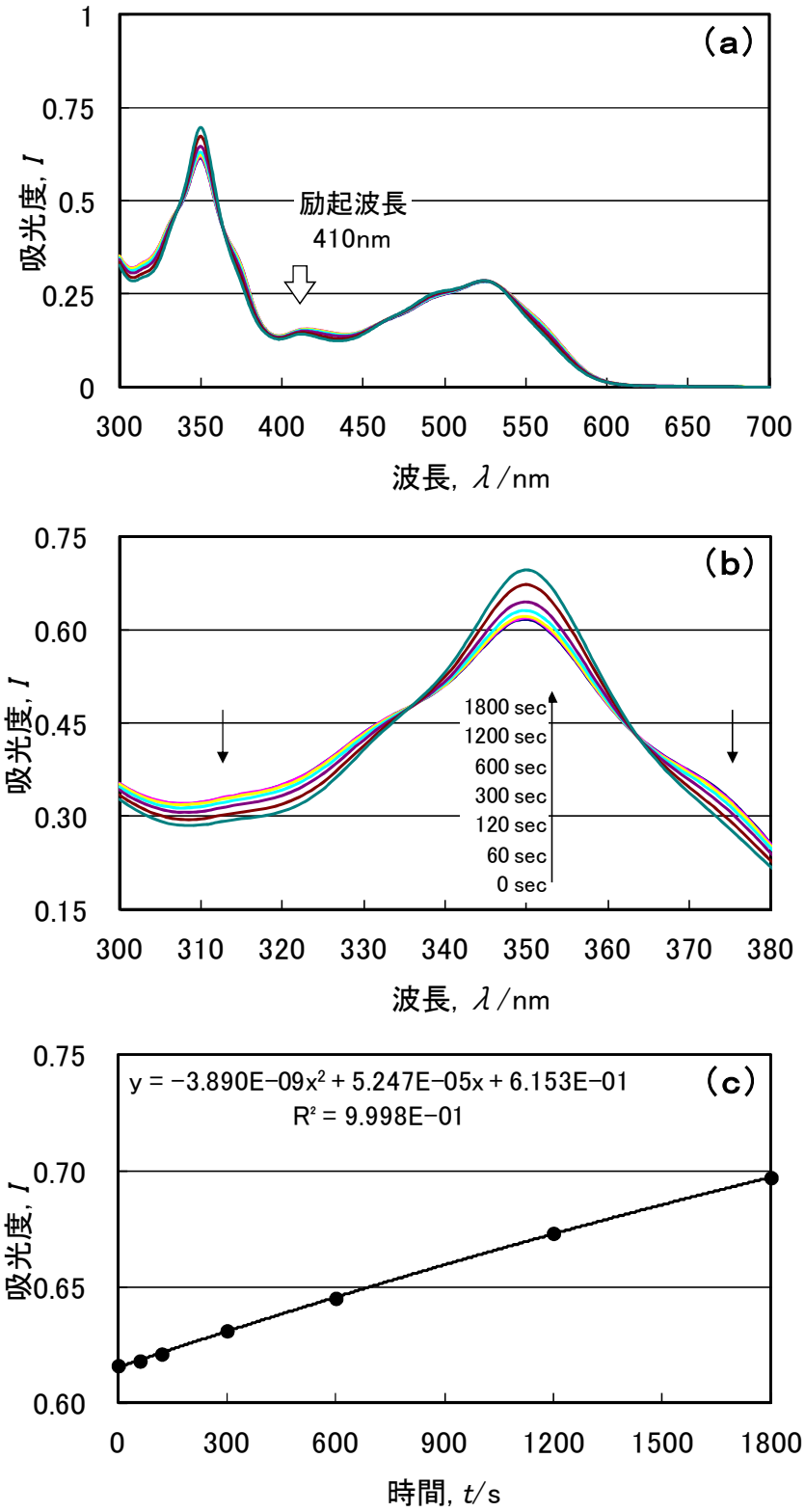


図 1.119. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：410nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

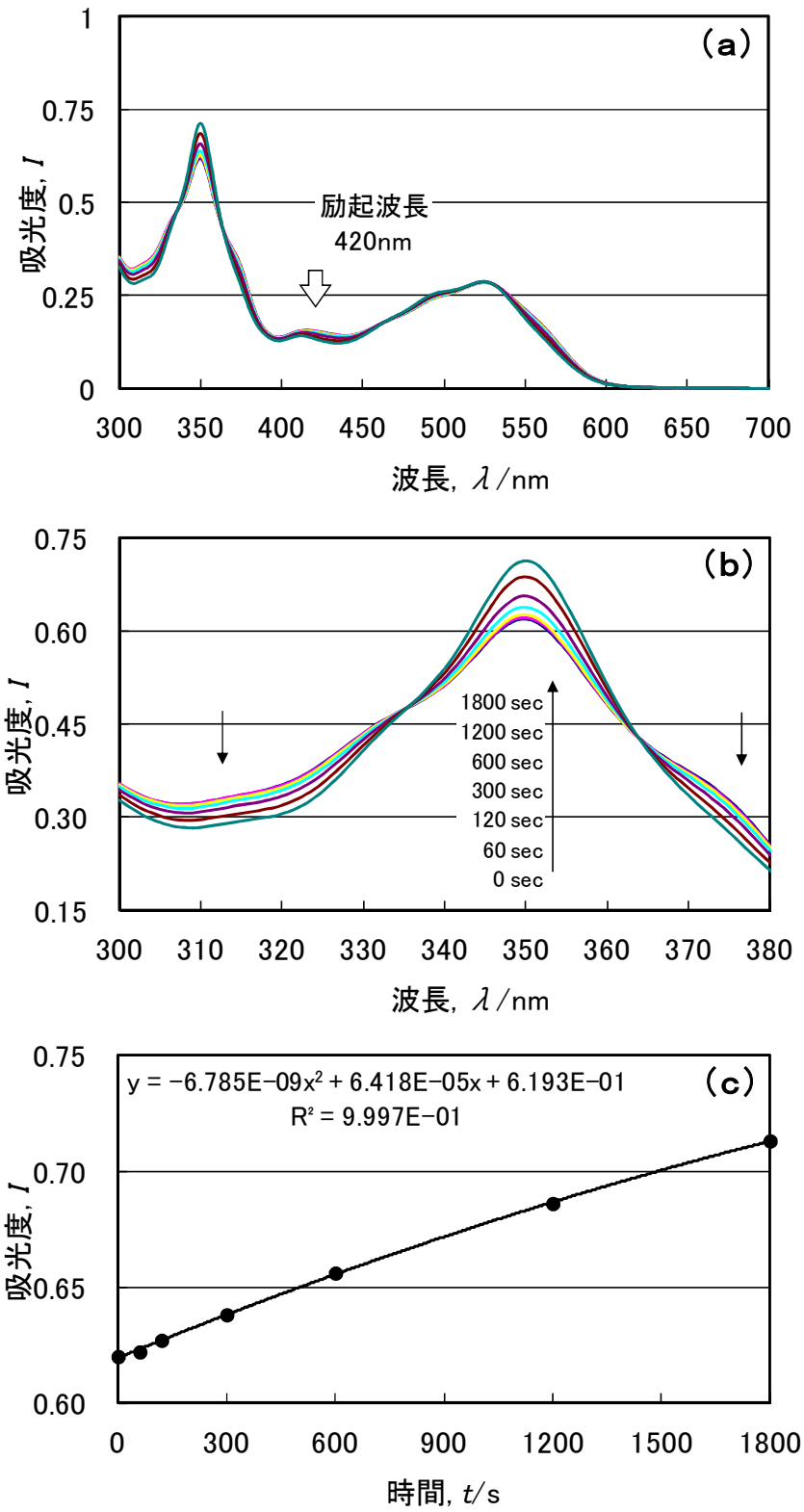


図 1.120. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：420nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

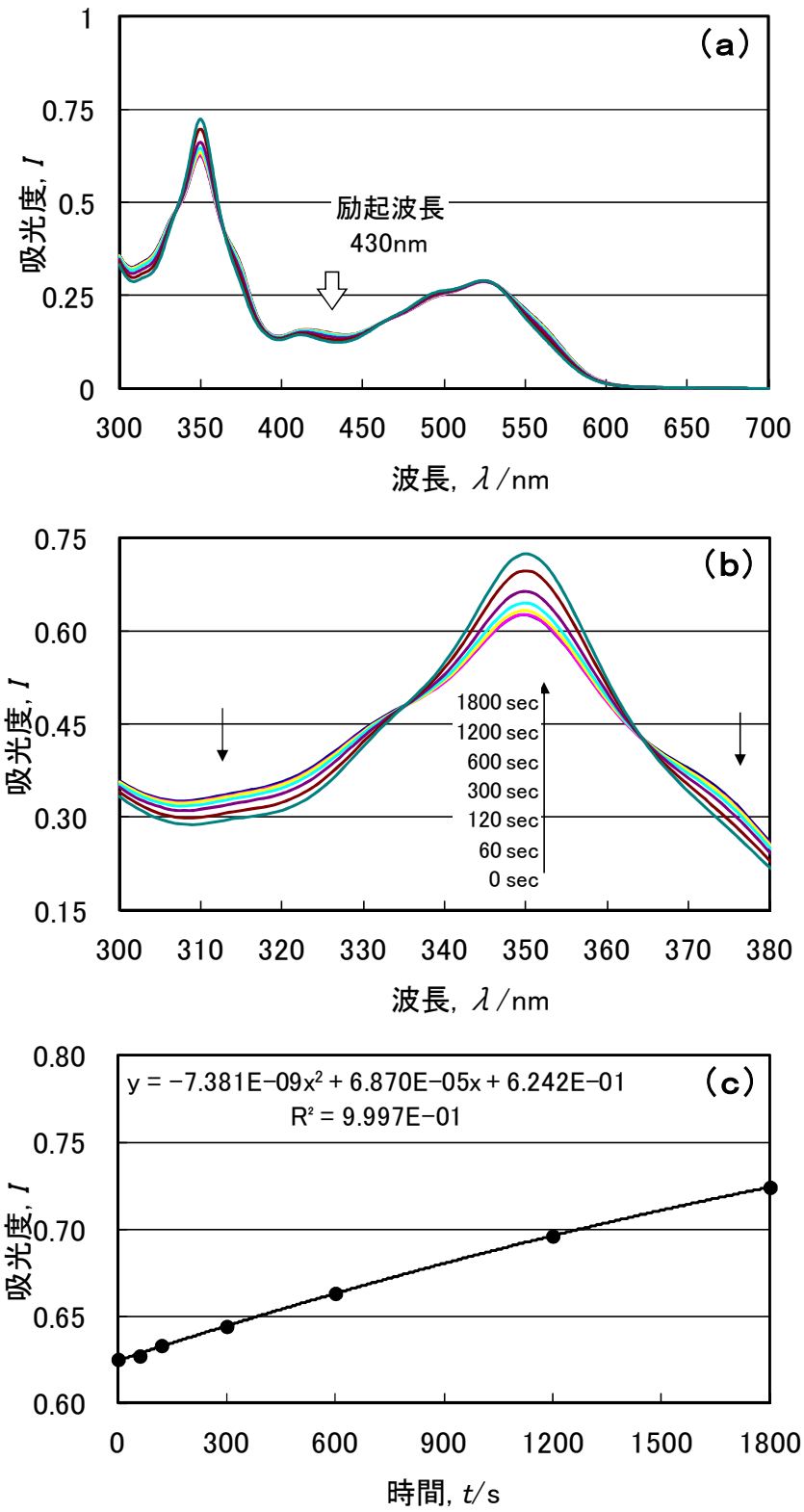


図 1.121. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：430nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

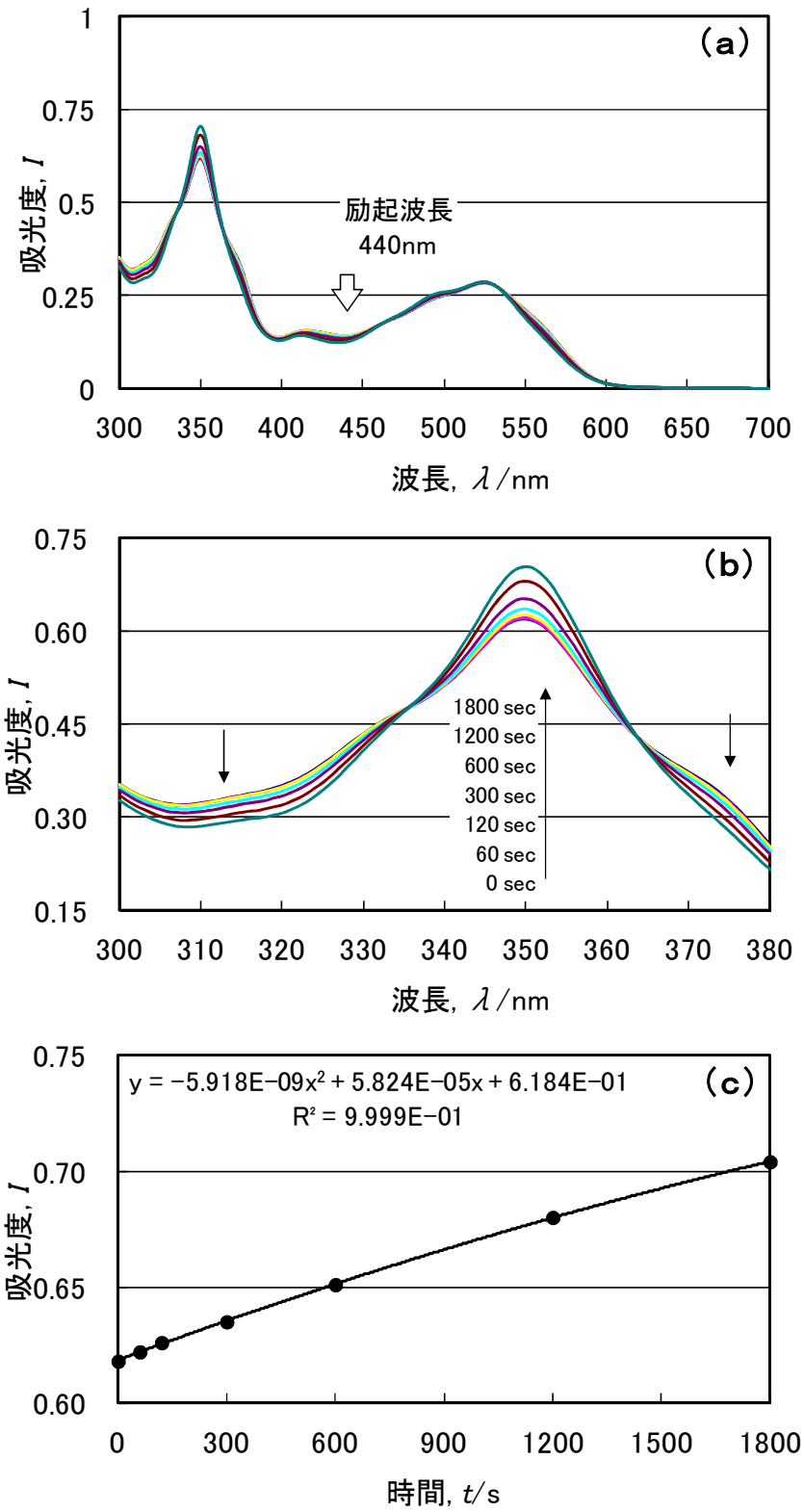


図 1.122. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：440nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

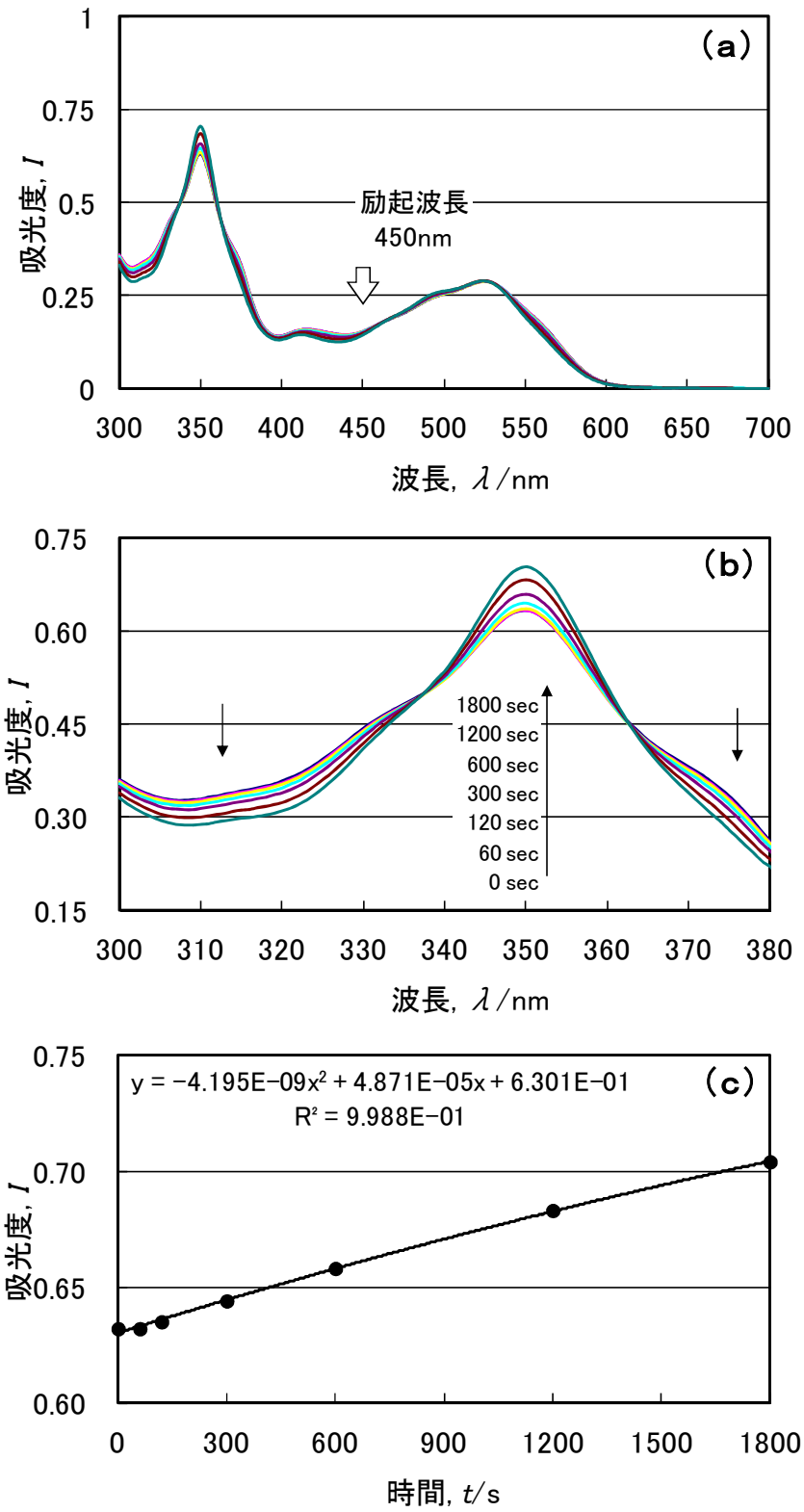


図 1.123. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：450nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

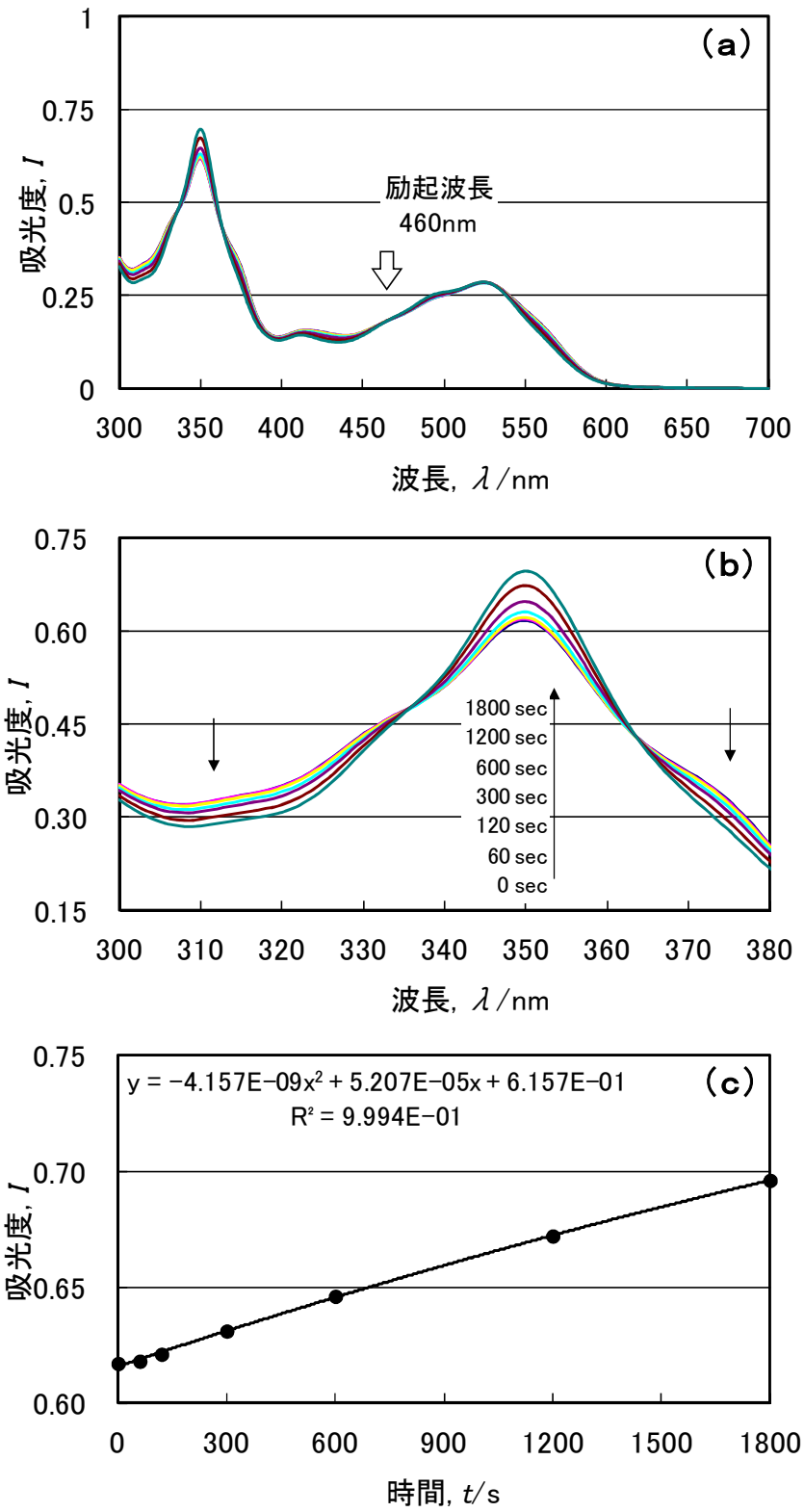


図 1.124. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：460nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm^2、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

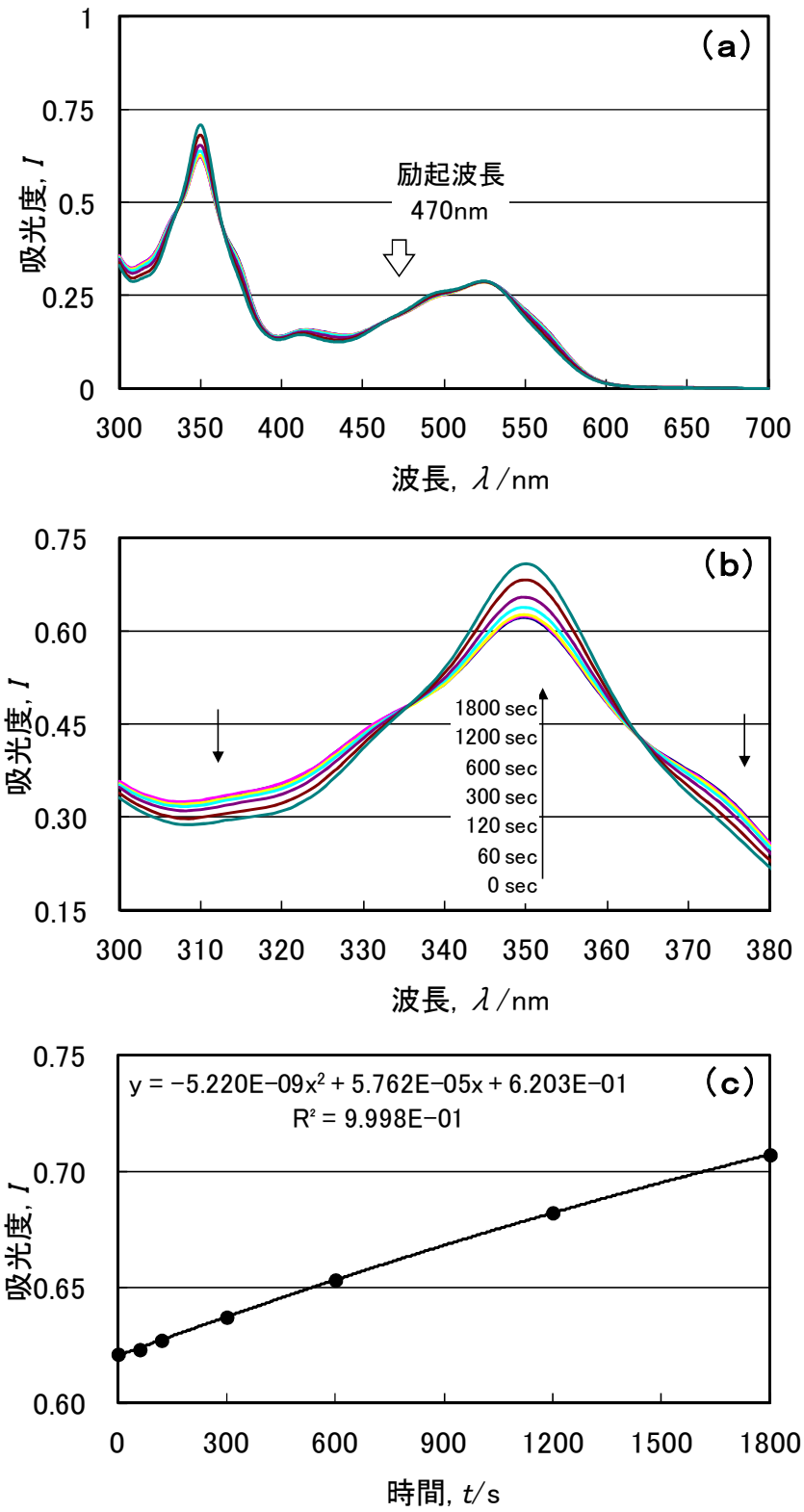


図 1.125. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：470nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

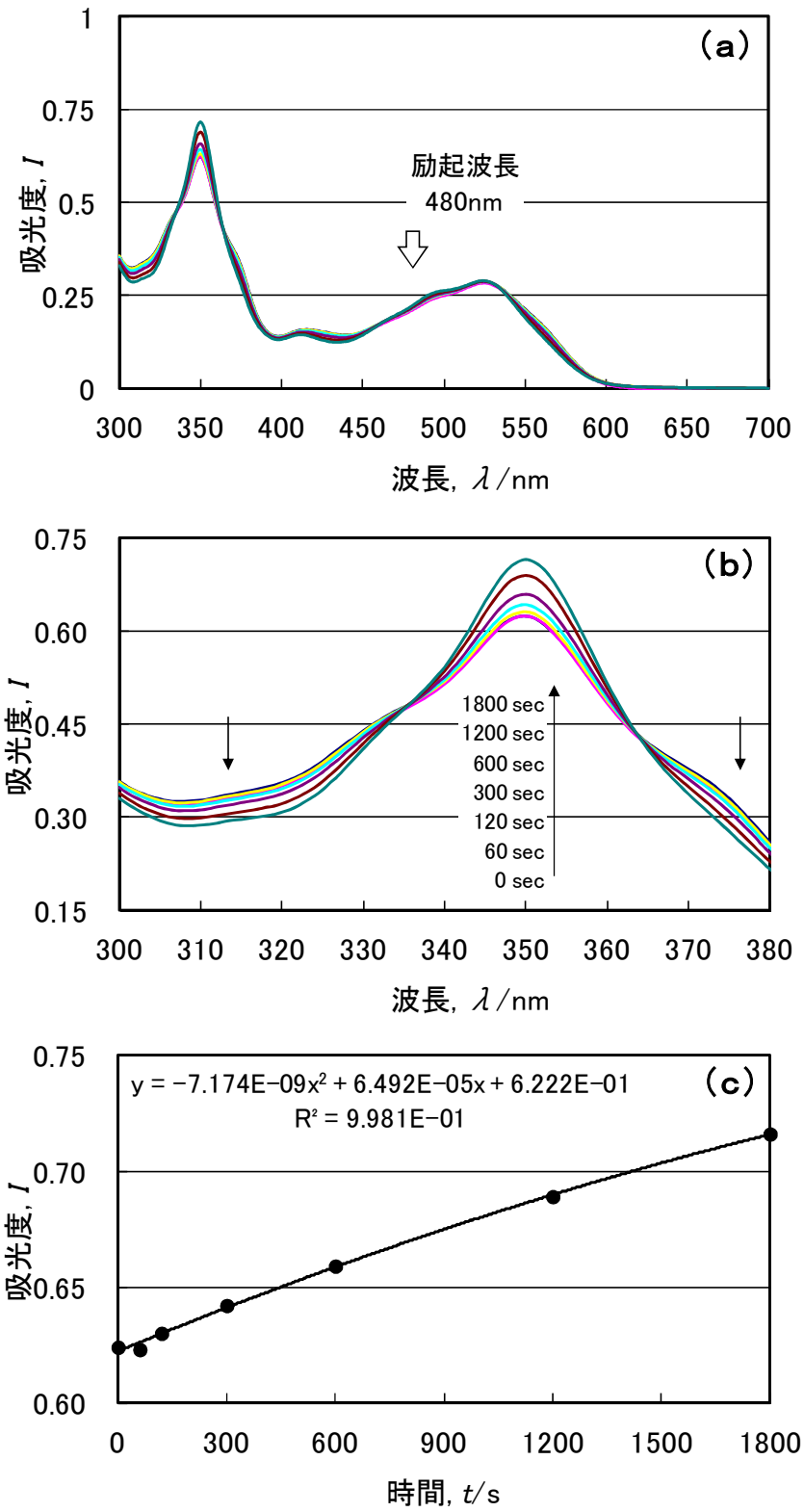


図 1.126. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：480nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

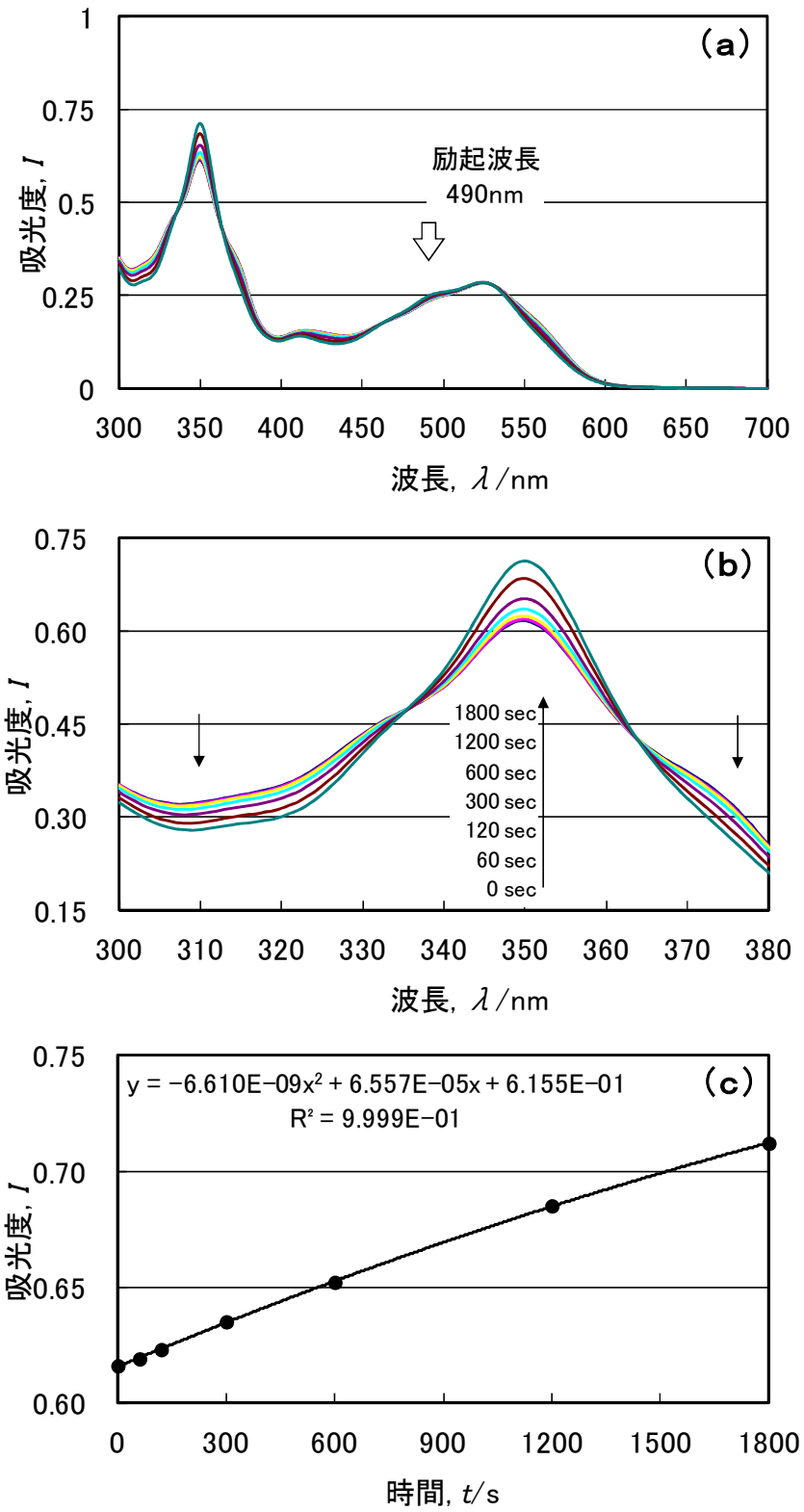


図 1.127. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：490nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

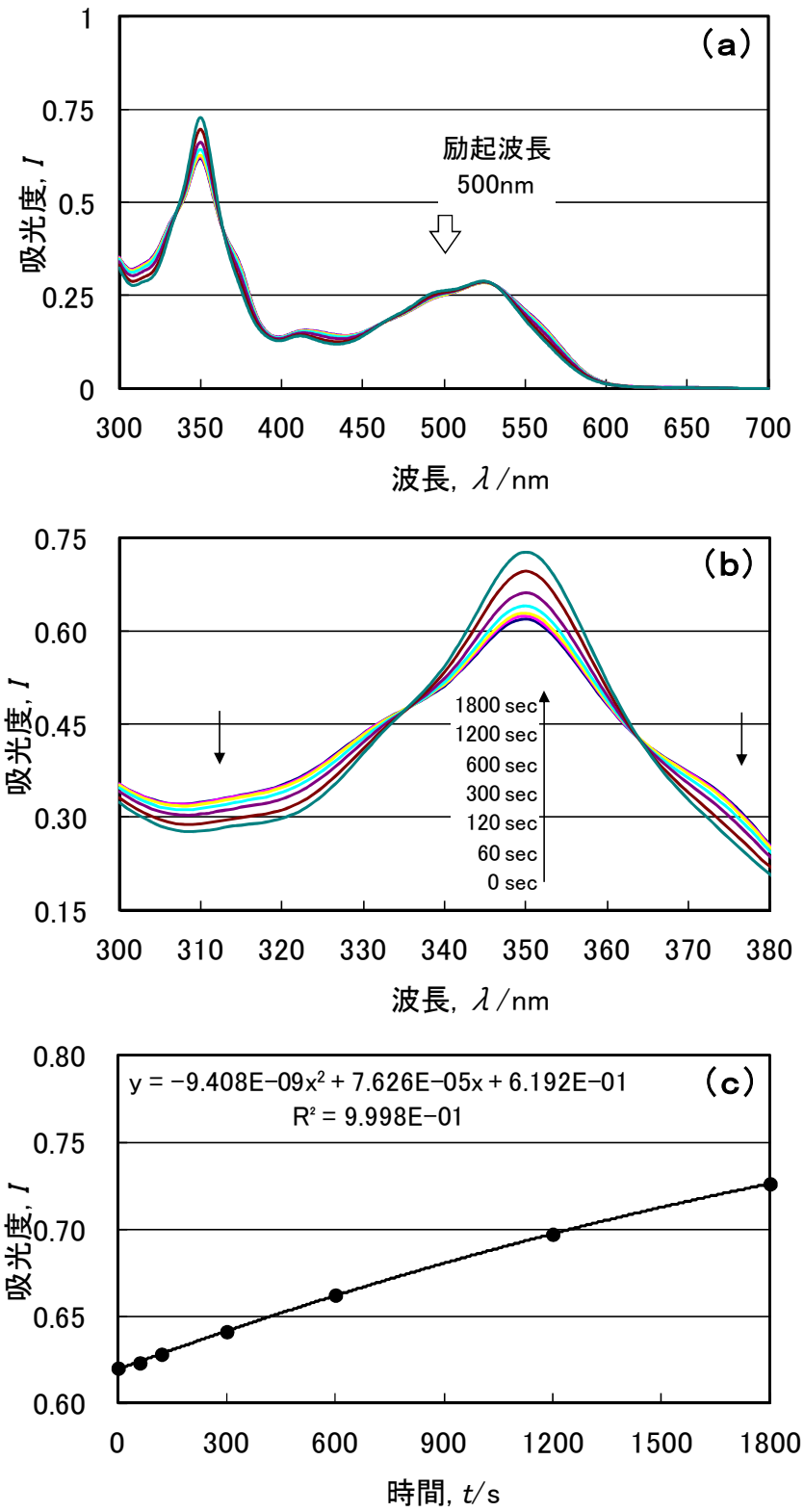


図 1.128. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：500nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

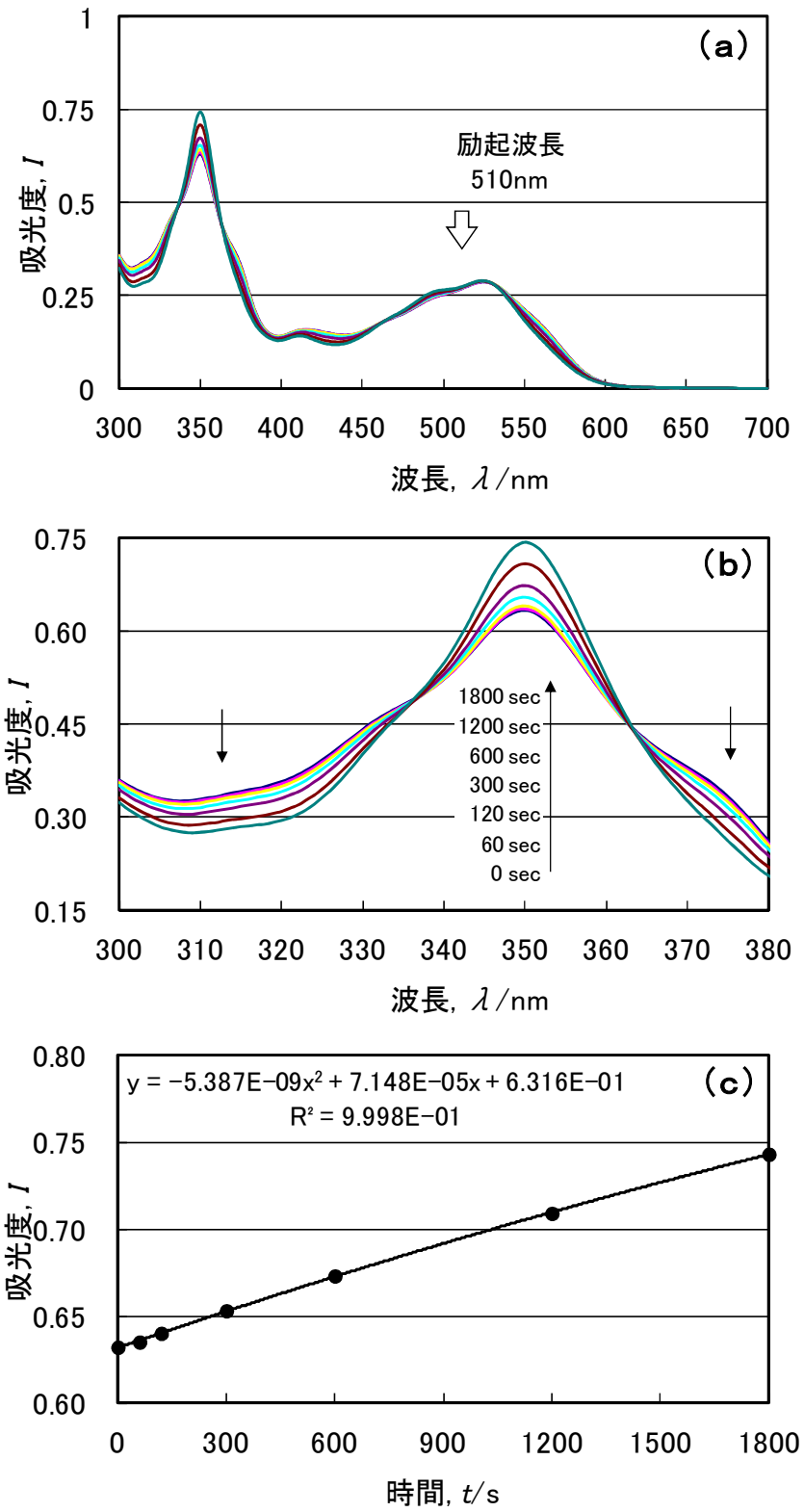


図 1.129. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：510nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

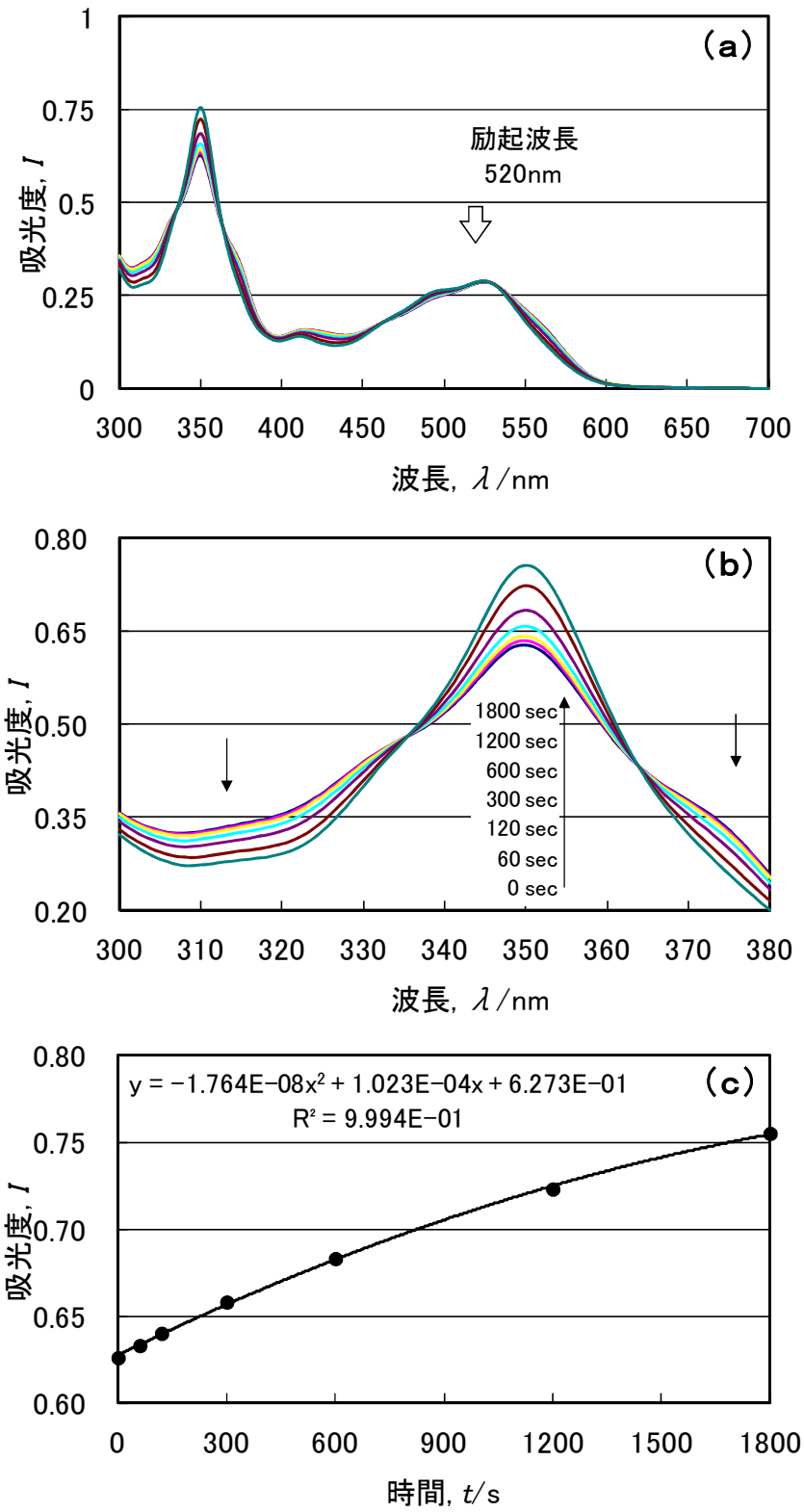


図 1.130. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：520nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

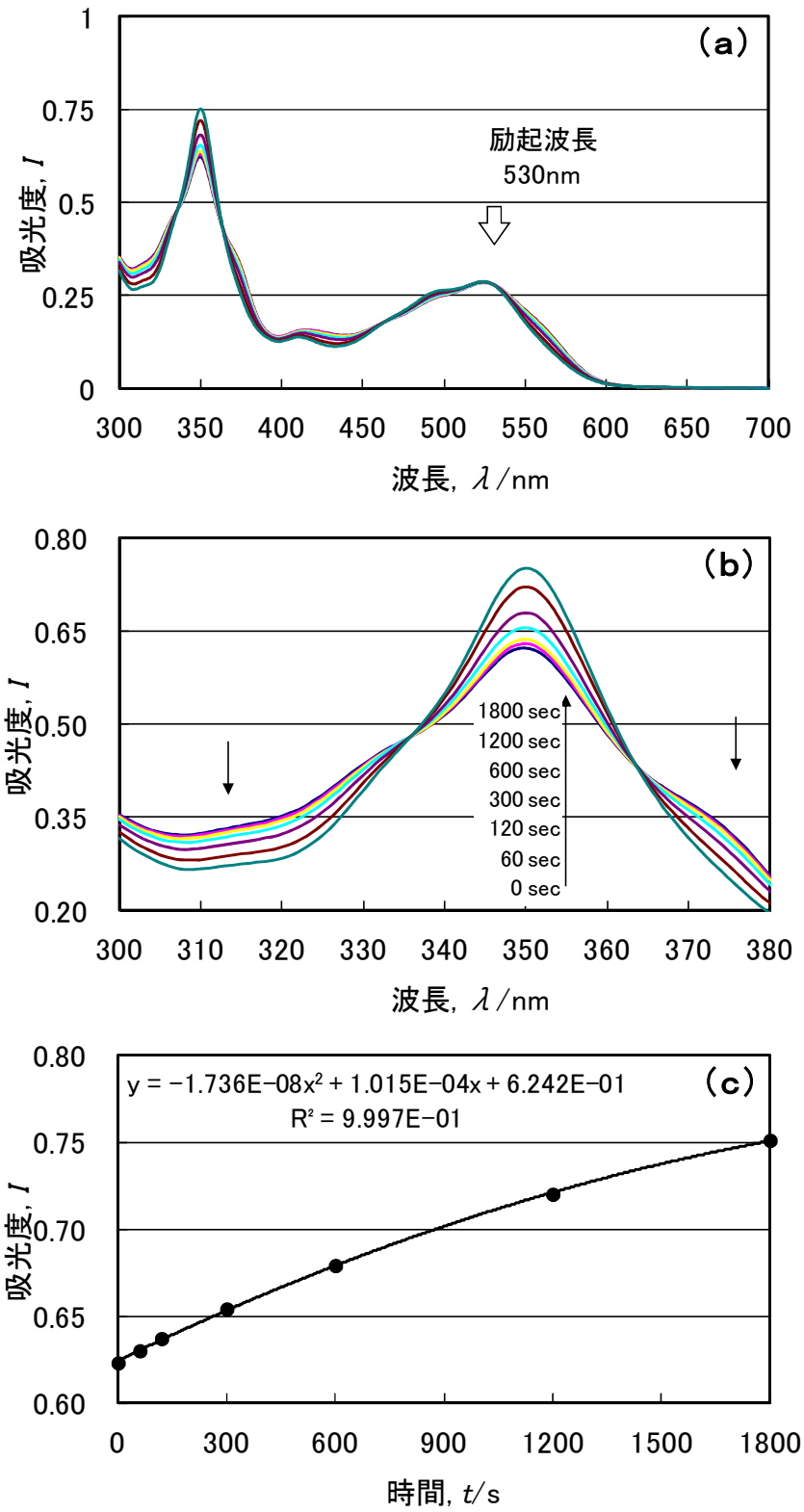


図 1.131. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：530nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

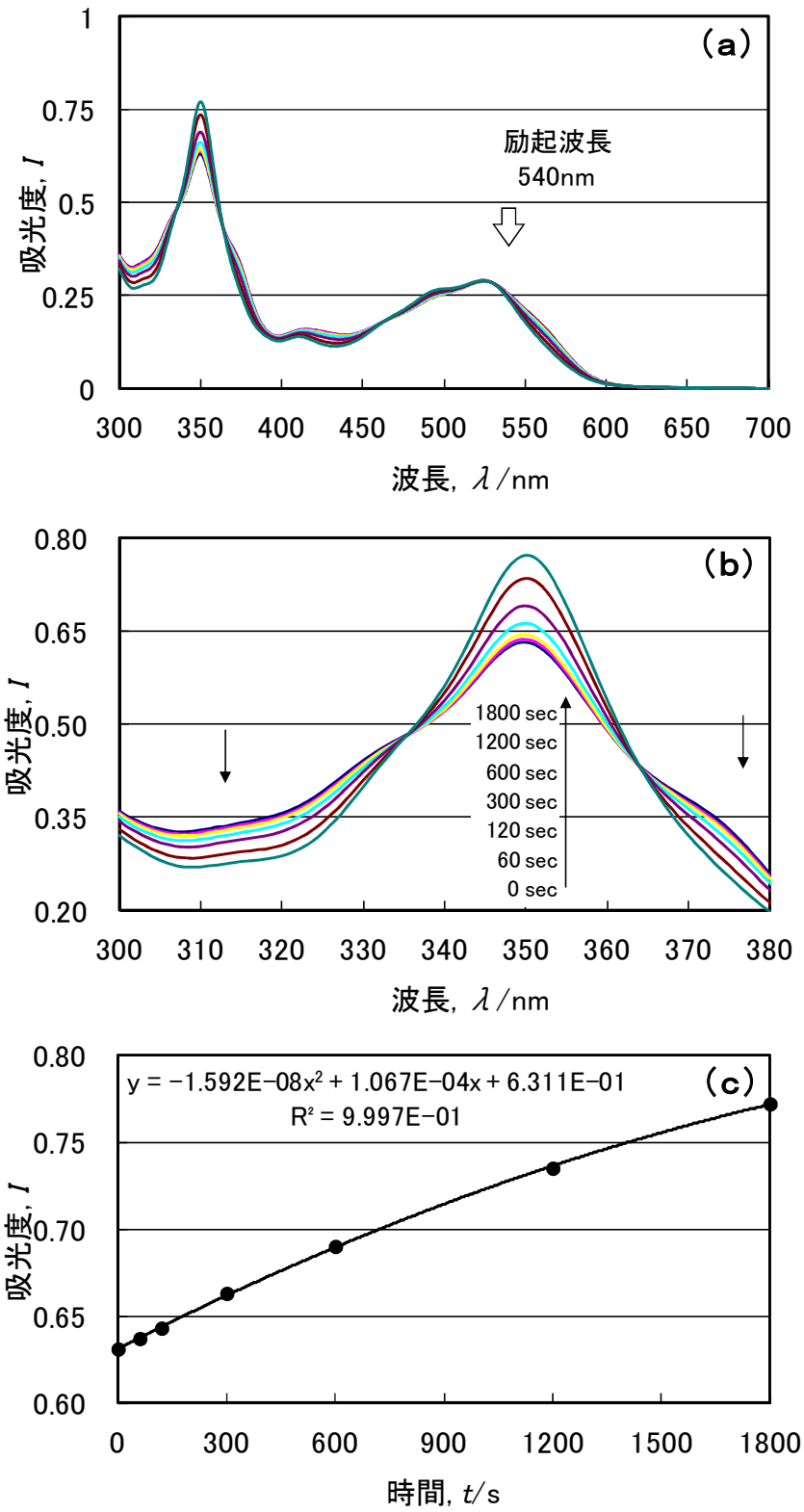


図 1.132. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：540nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

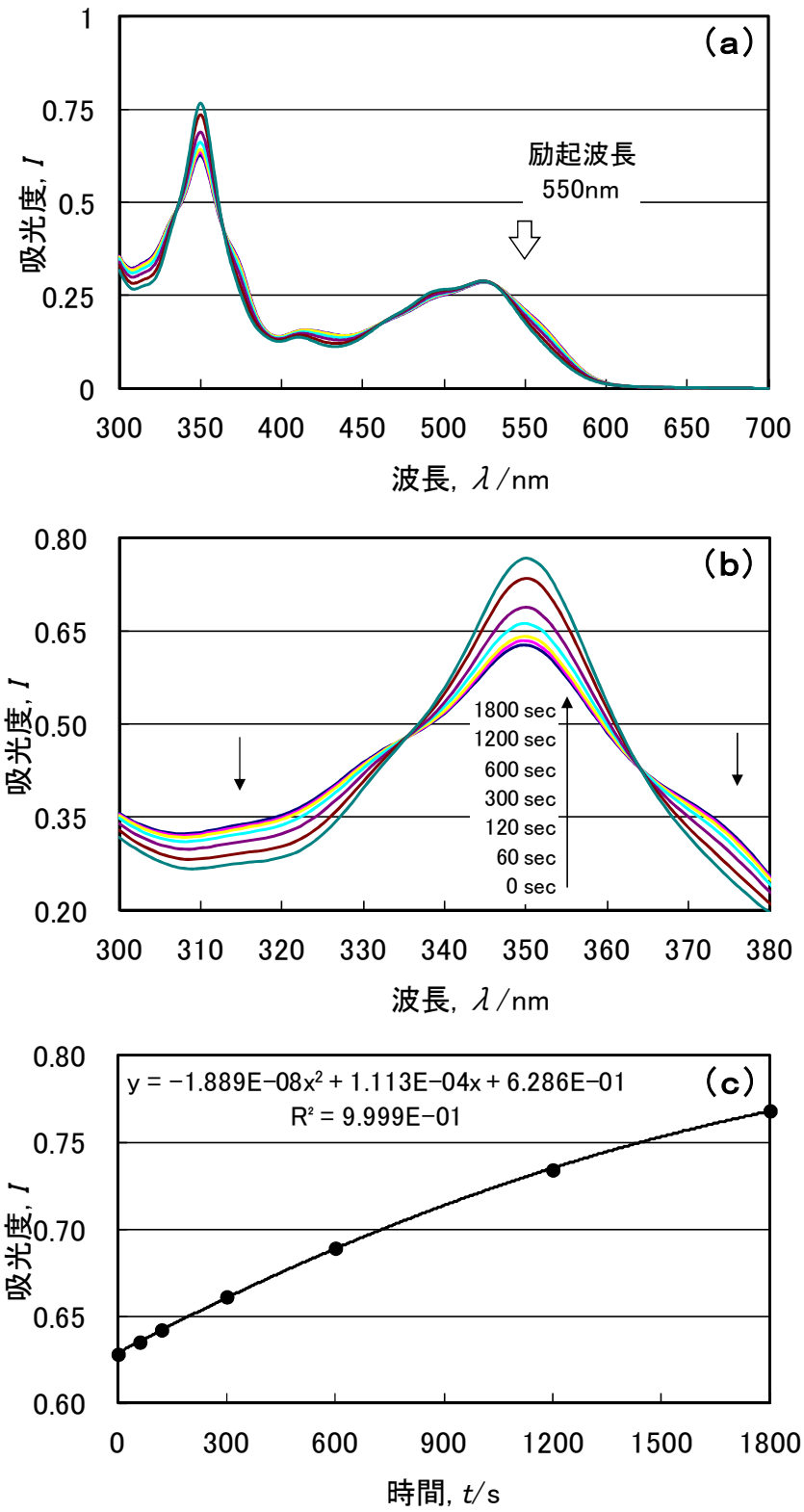


図 1.133. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：550nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

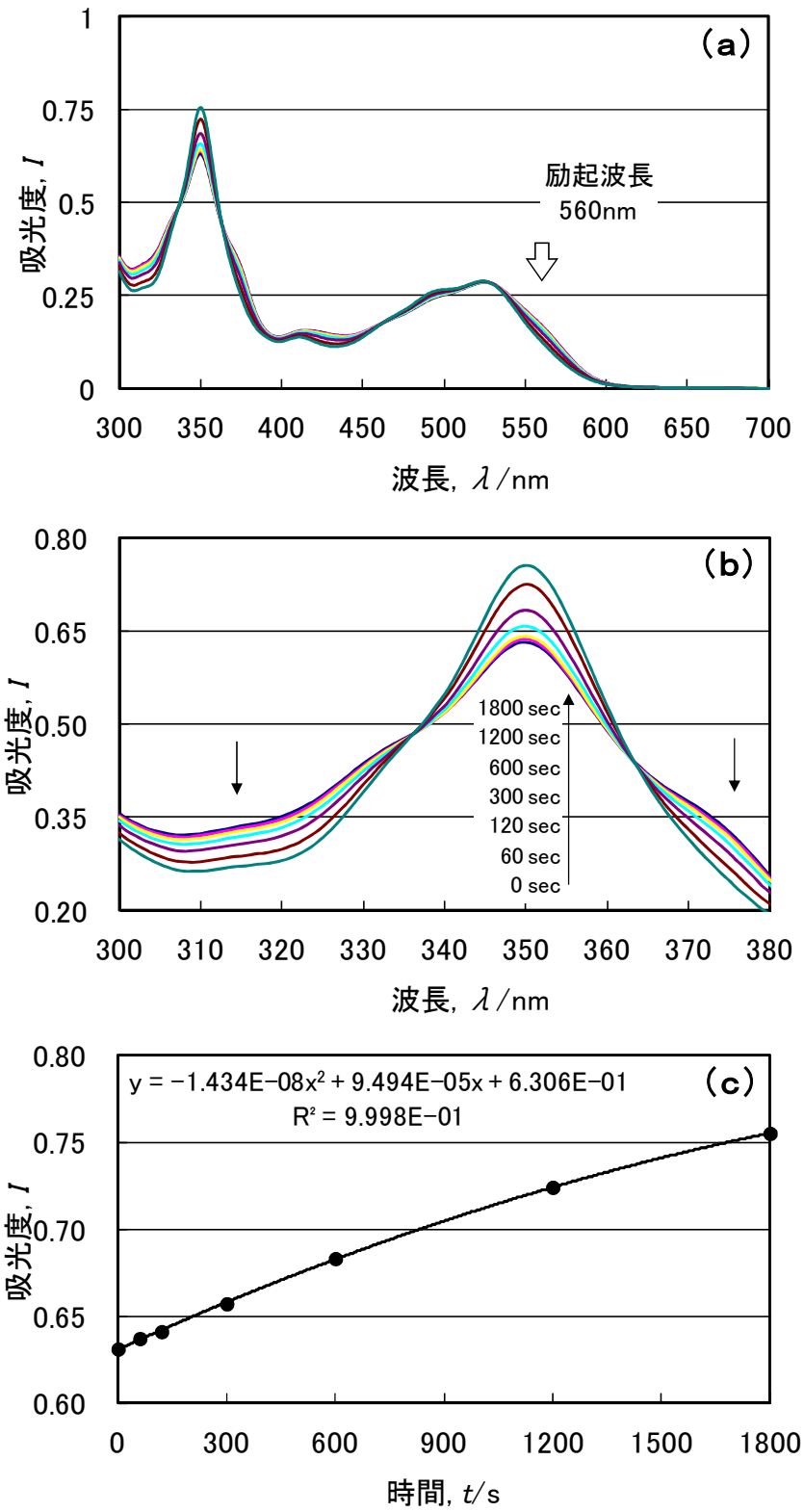


図 1.134. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：560nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

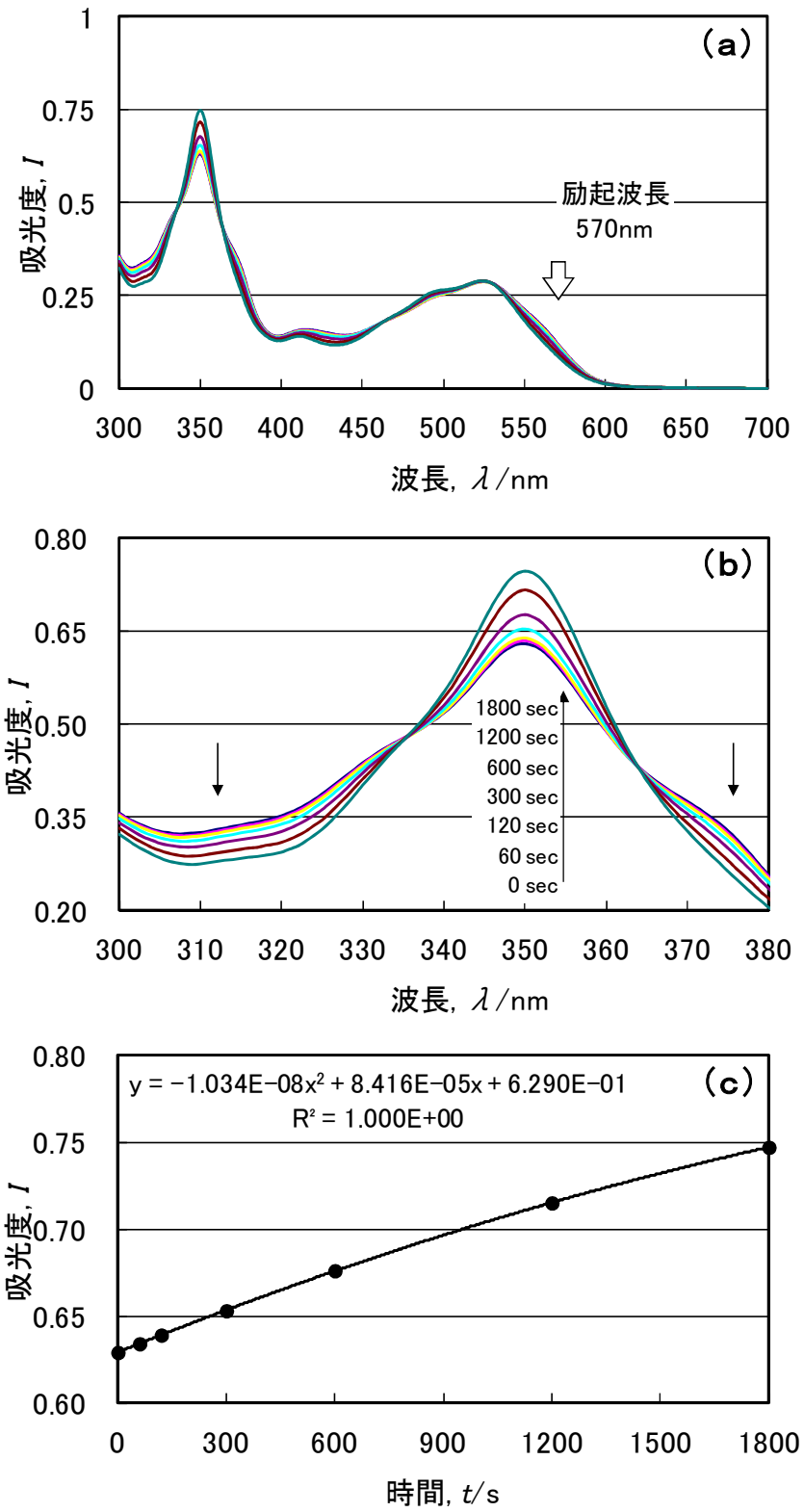


図 1.135. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：570nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

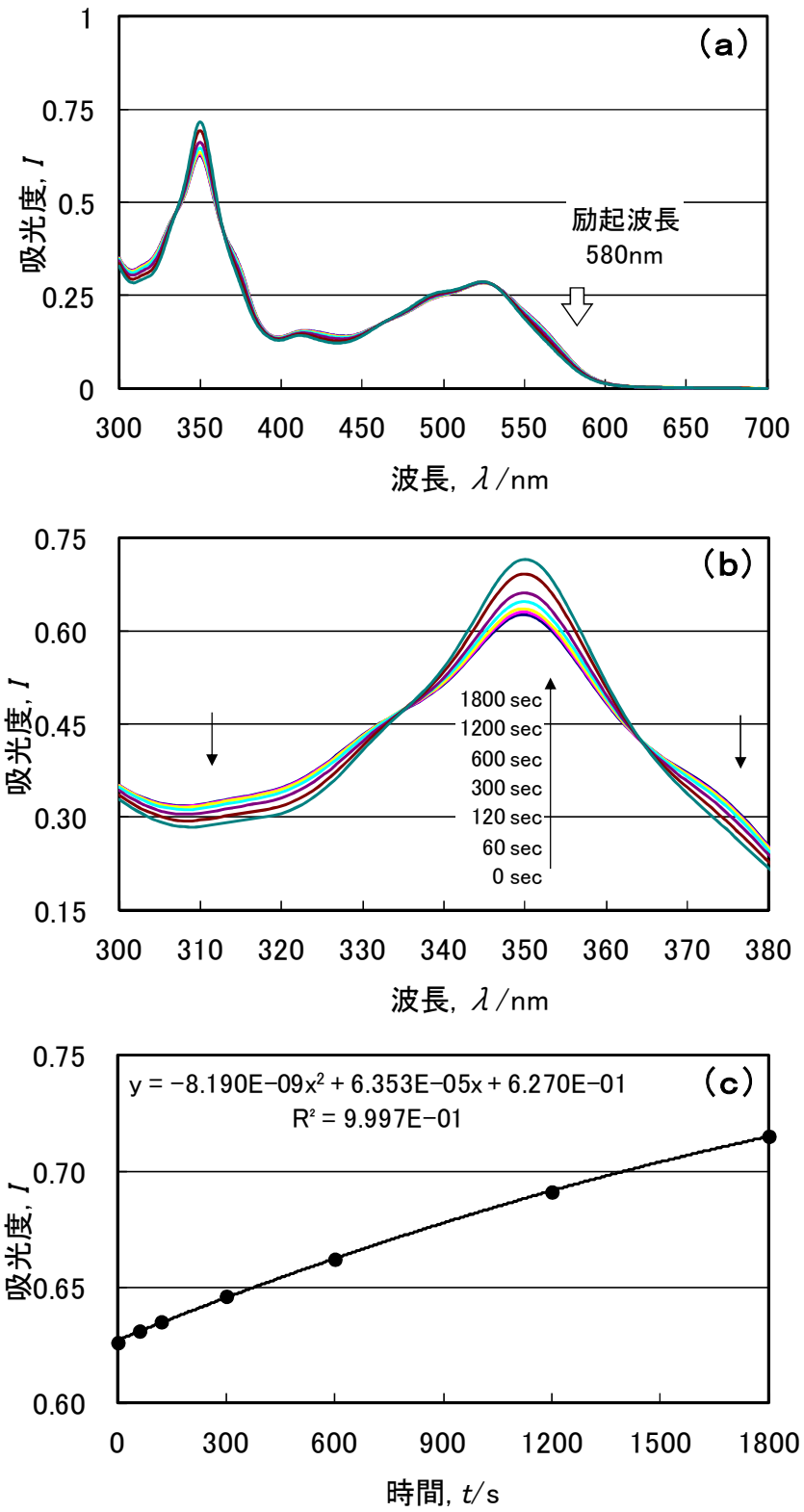


図 1.136. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：580nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

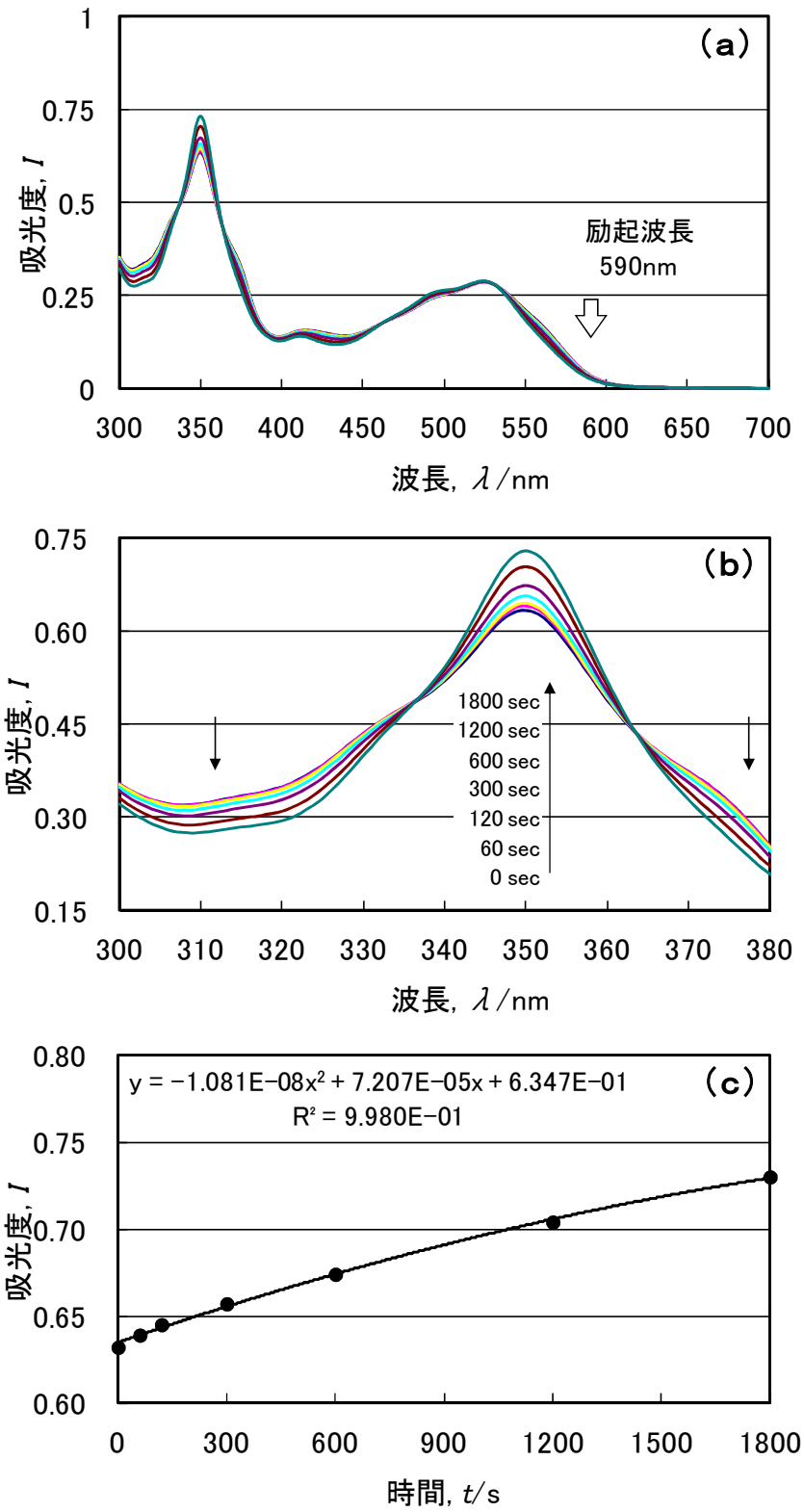


図 1.137. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：590nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

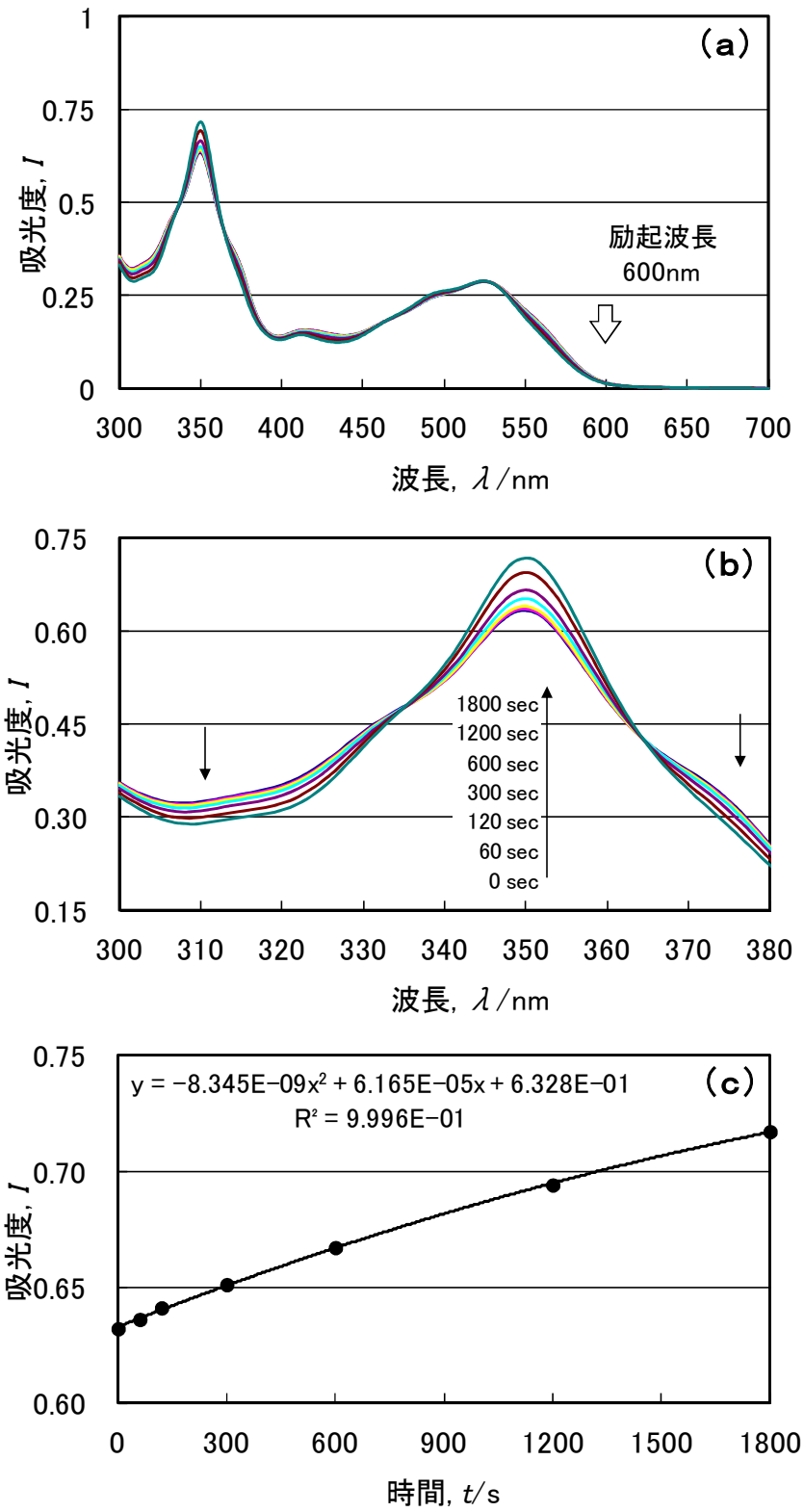


図 1.138. カルボキシメチルコバラミンの光反応の経時変化

（励起波長：600nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm²、室温）

（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：300～380nm）、

（c）吸光度の経時変化（波長：350nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

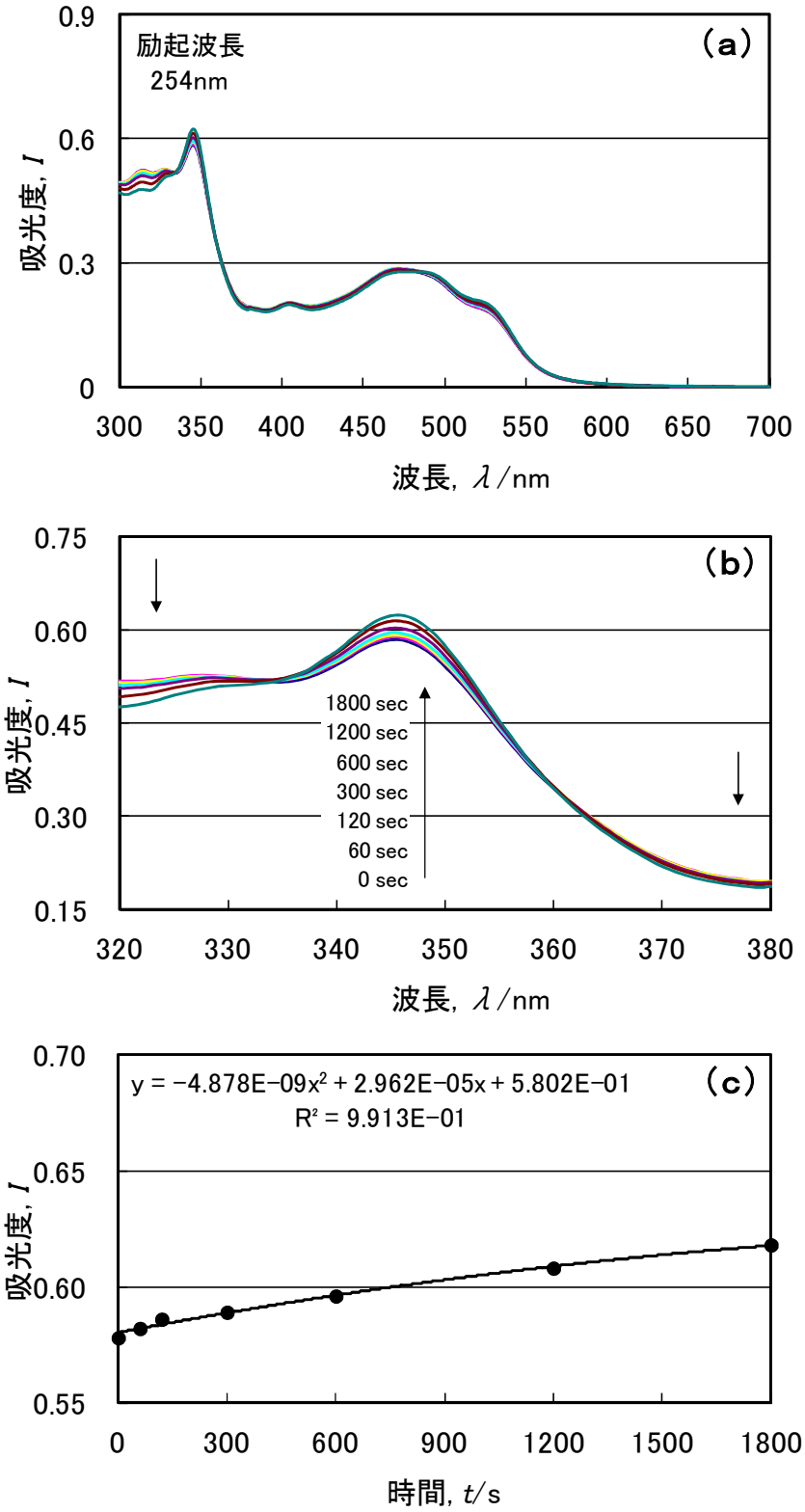


図 1.139. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：254nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：25μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

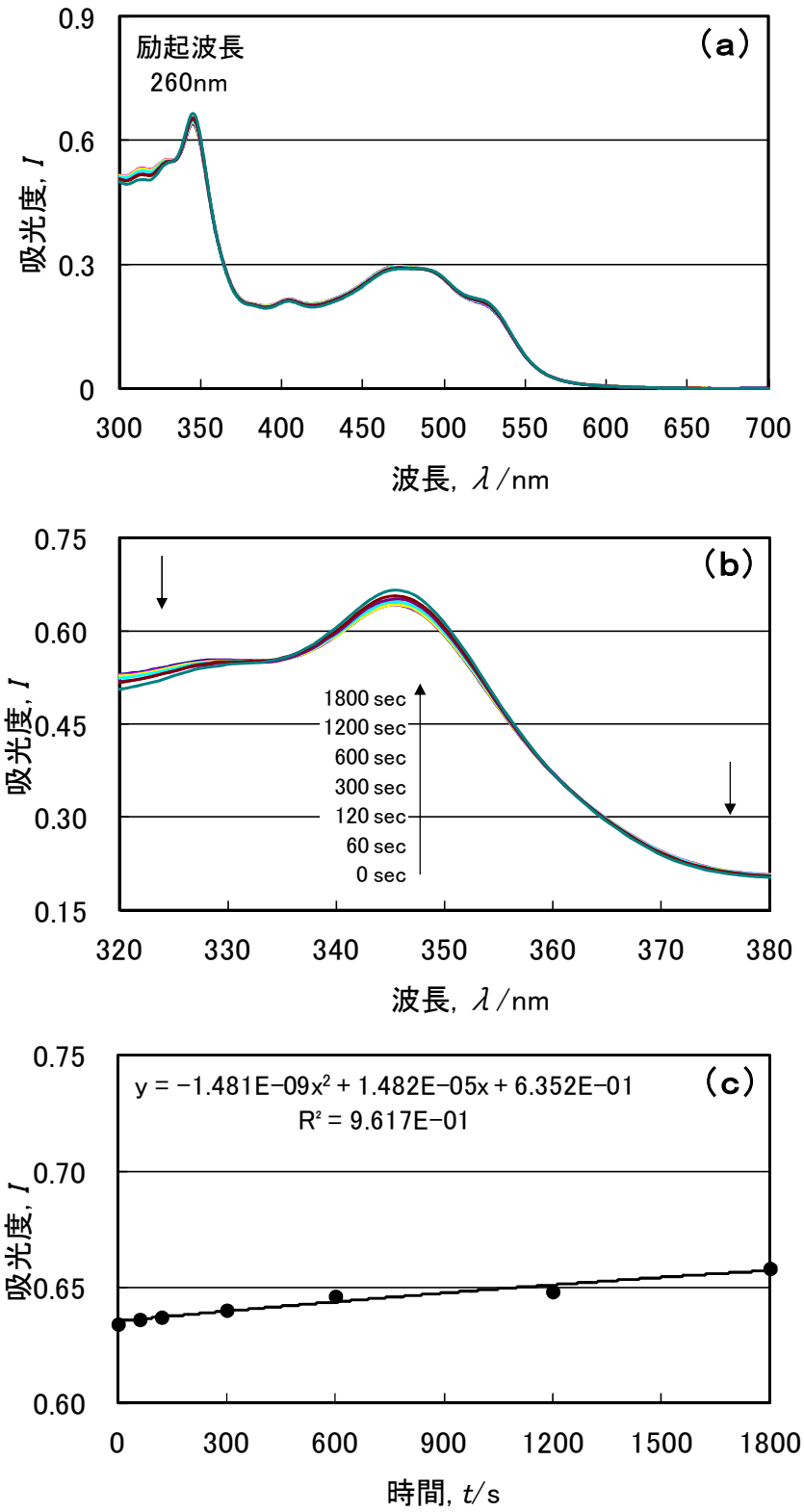


図 1.140. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：260nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：25μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

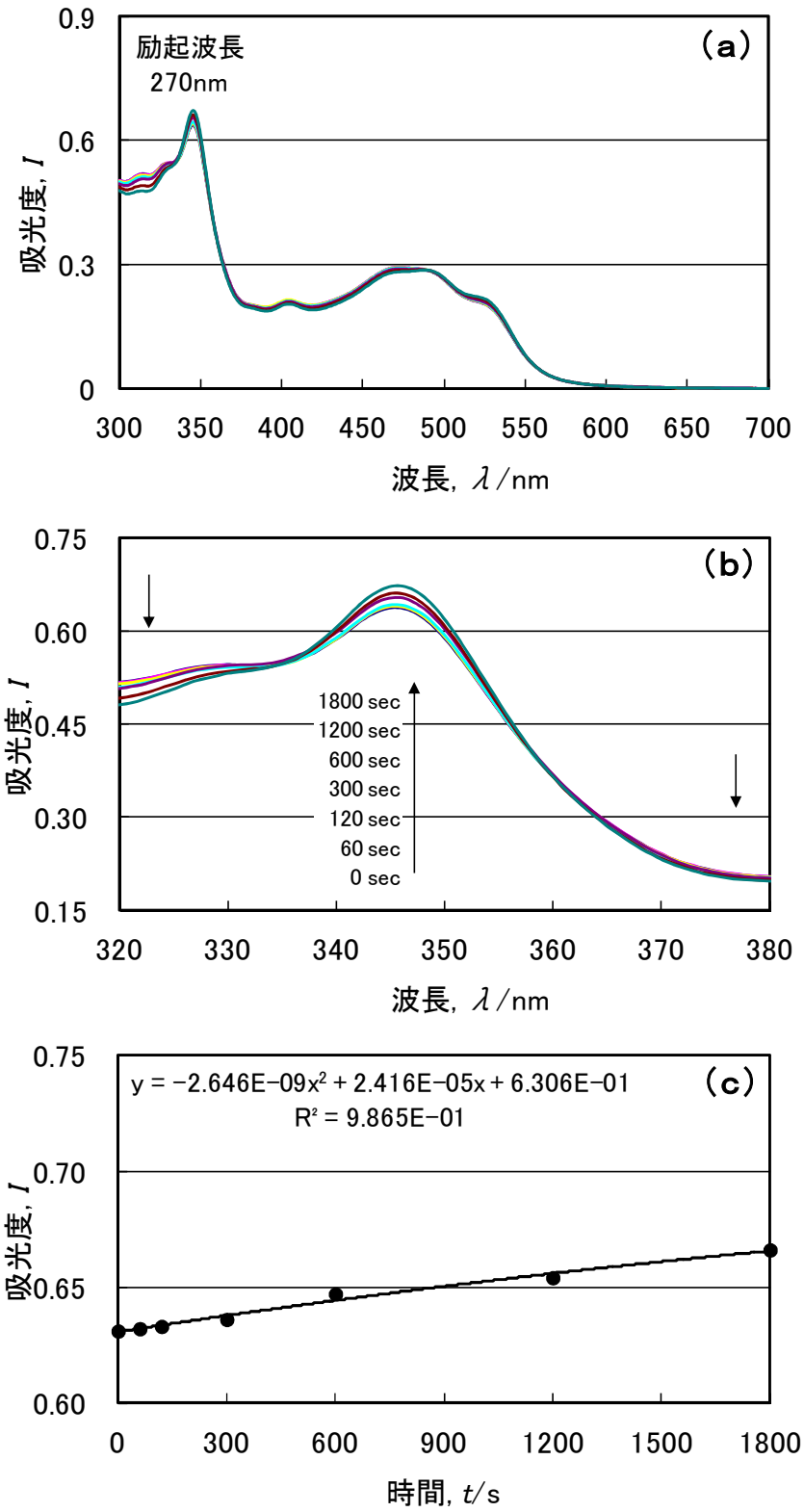


図 1.141. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：270nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：30μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

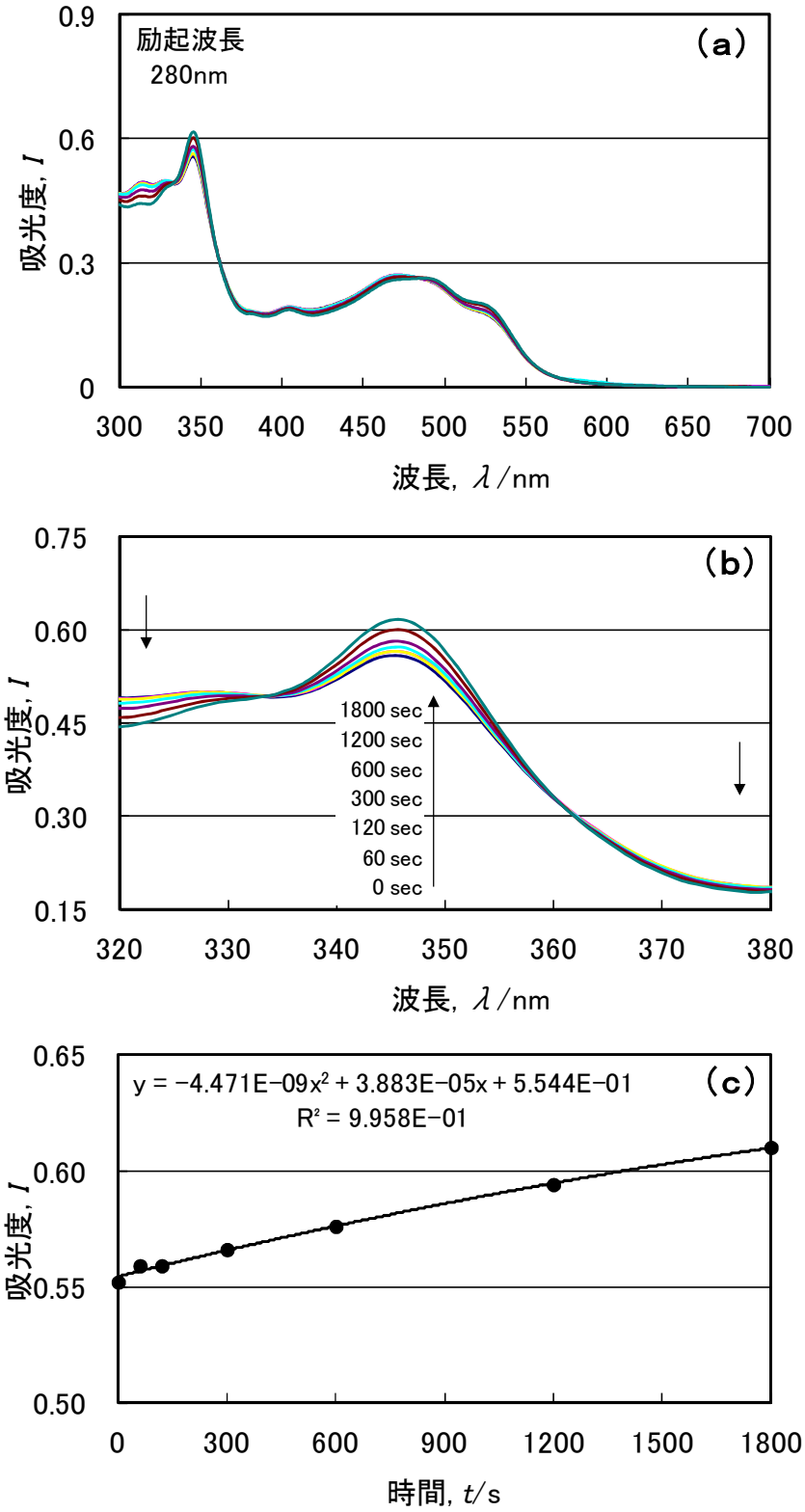


図 1.142. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：280nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

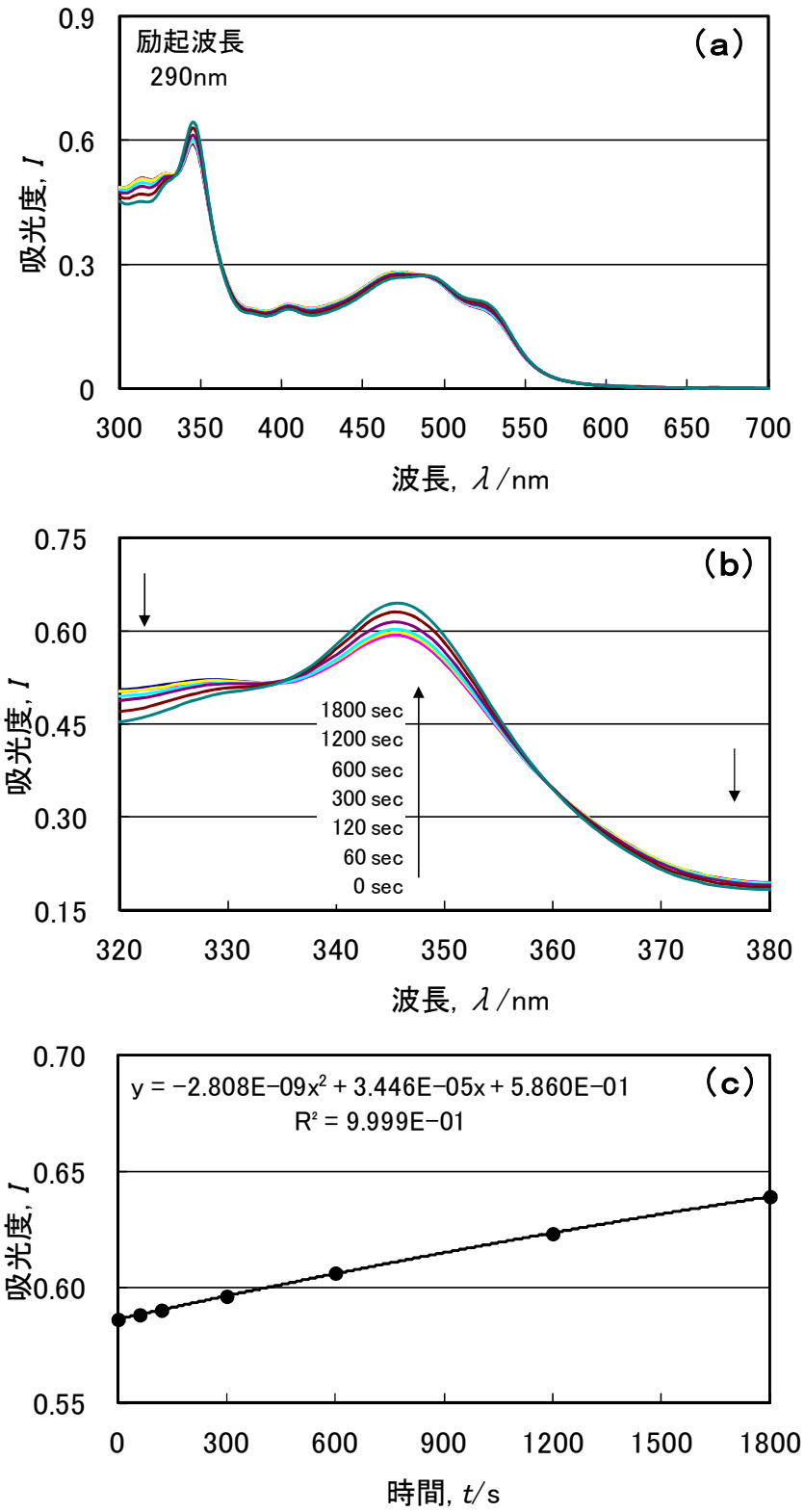


図 1.143. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：290nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

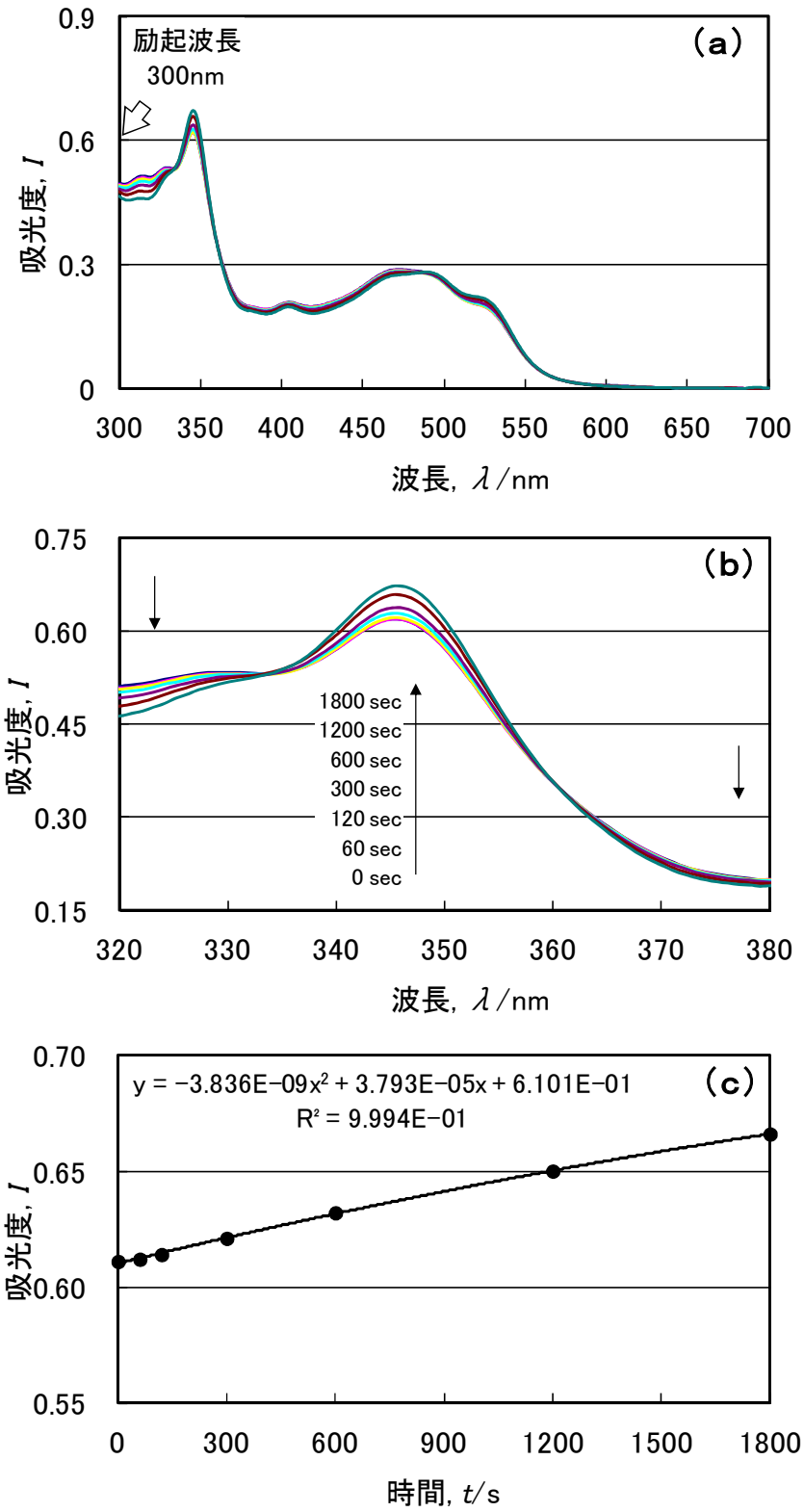


図 1.144. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：300nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

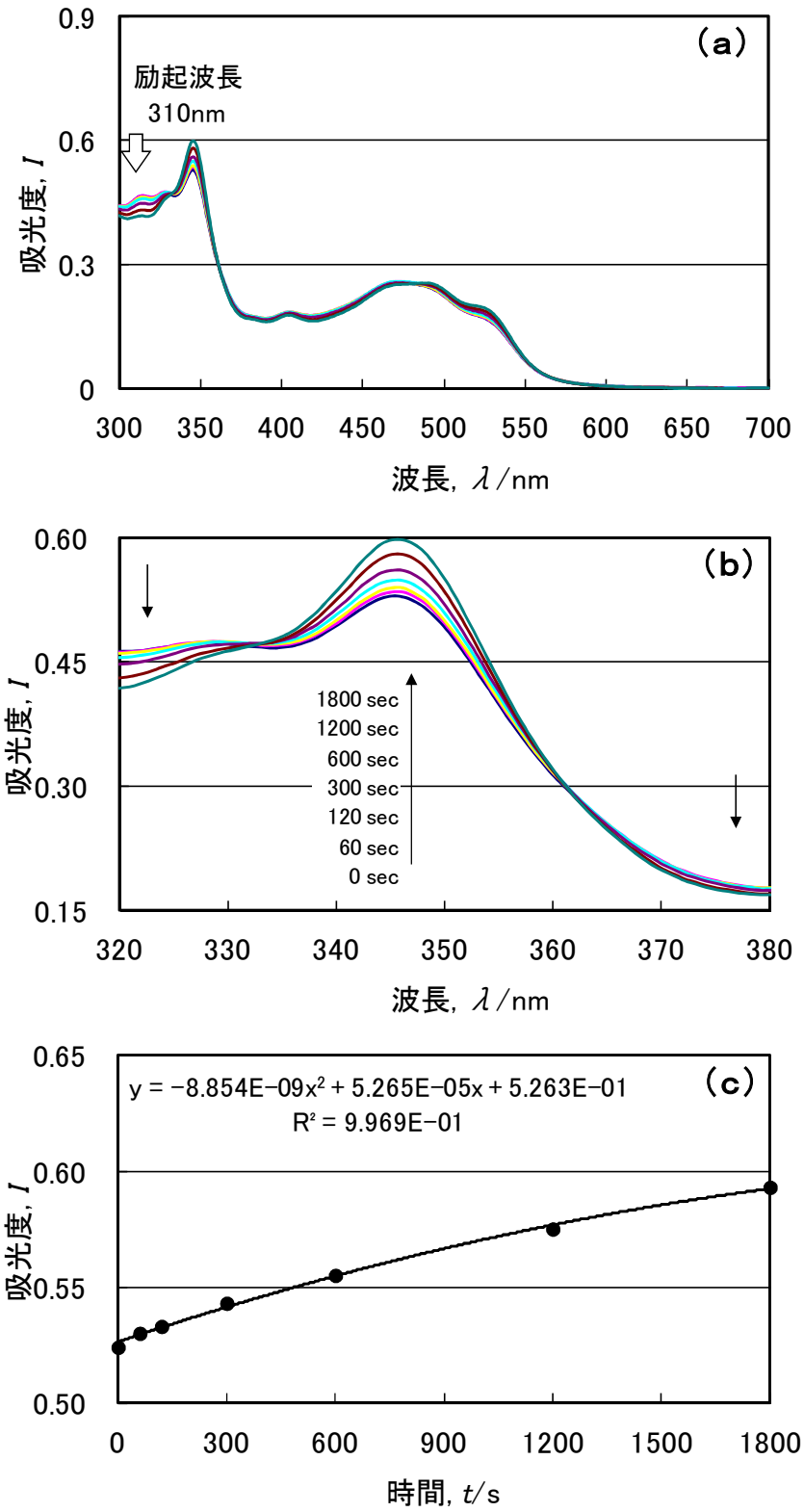


図 1.145. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：310nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

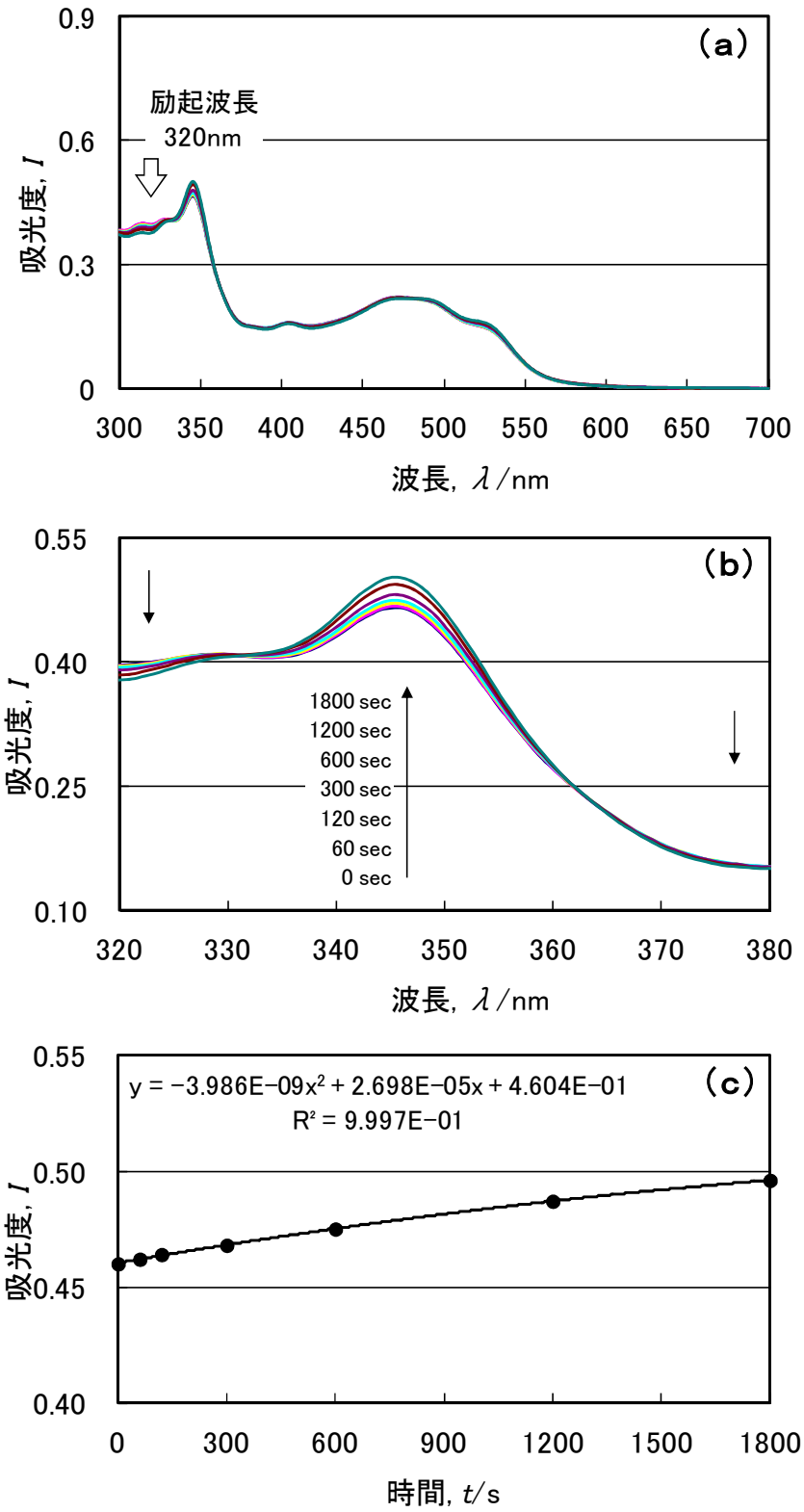


図 1.146. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：320nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：20μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

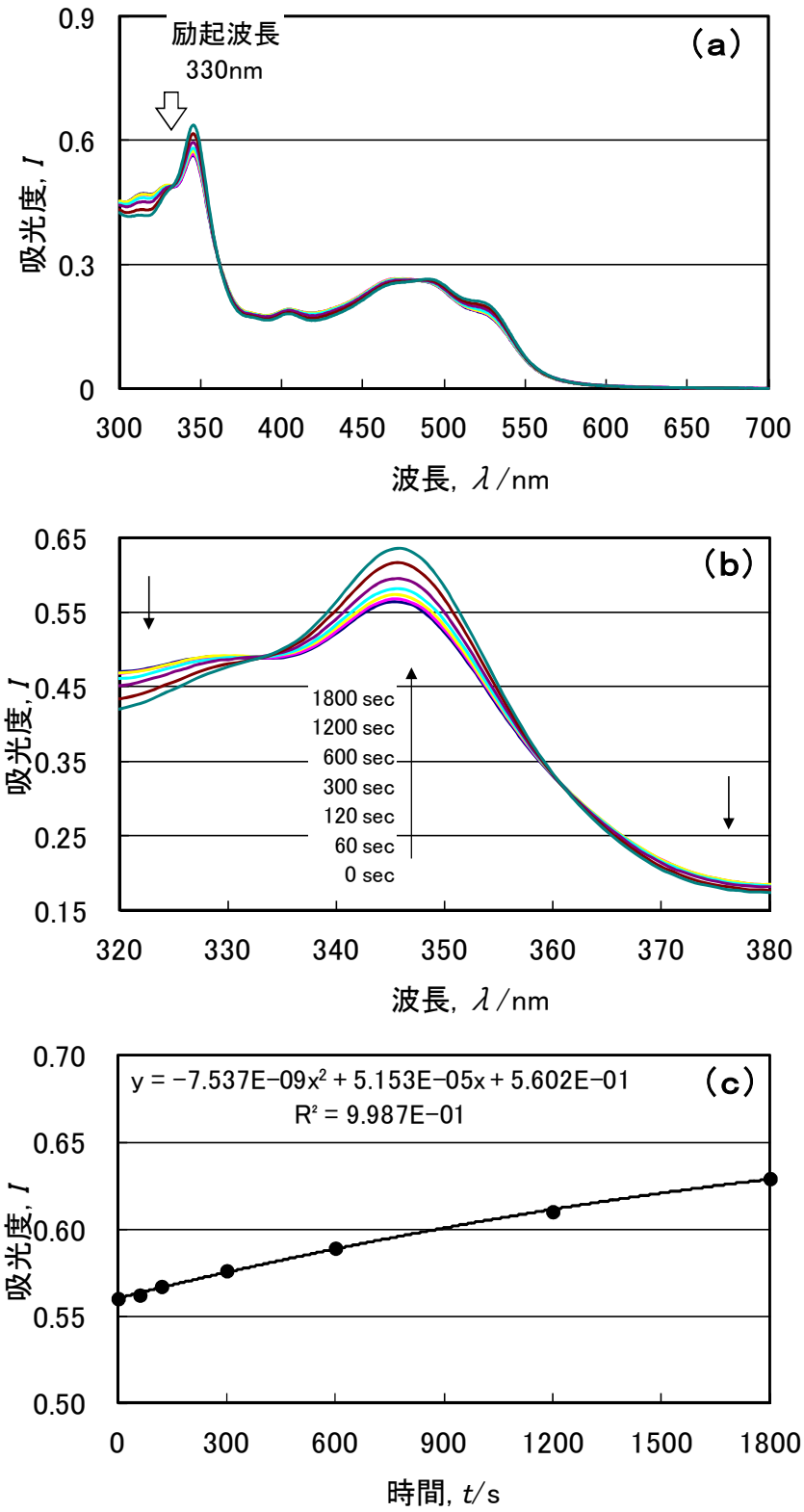


図 1.147. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：330nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

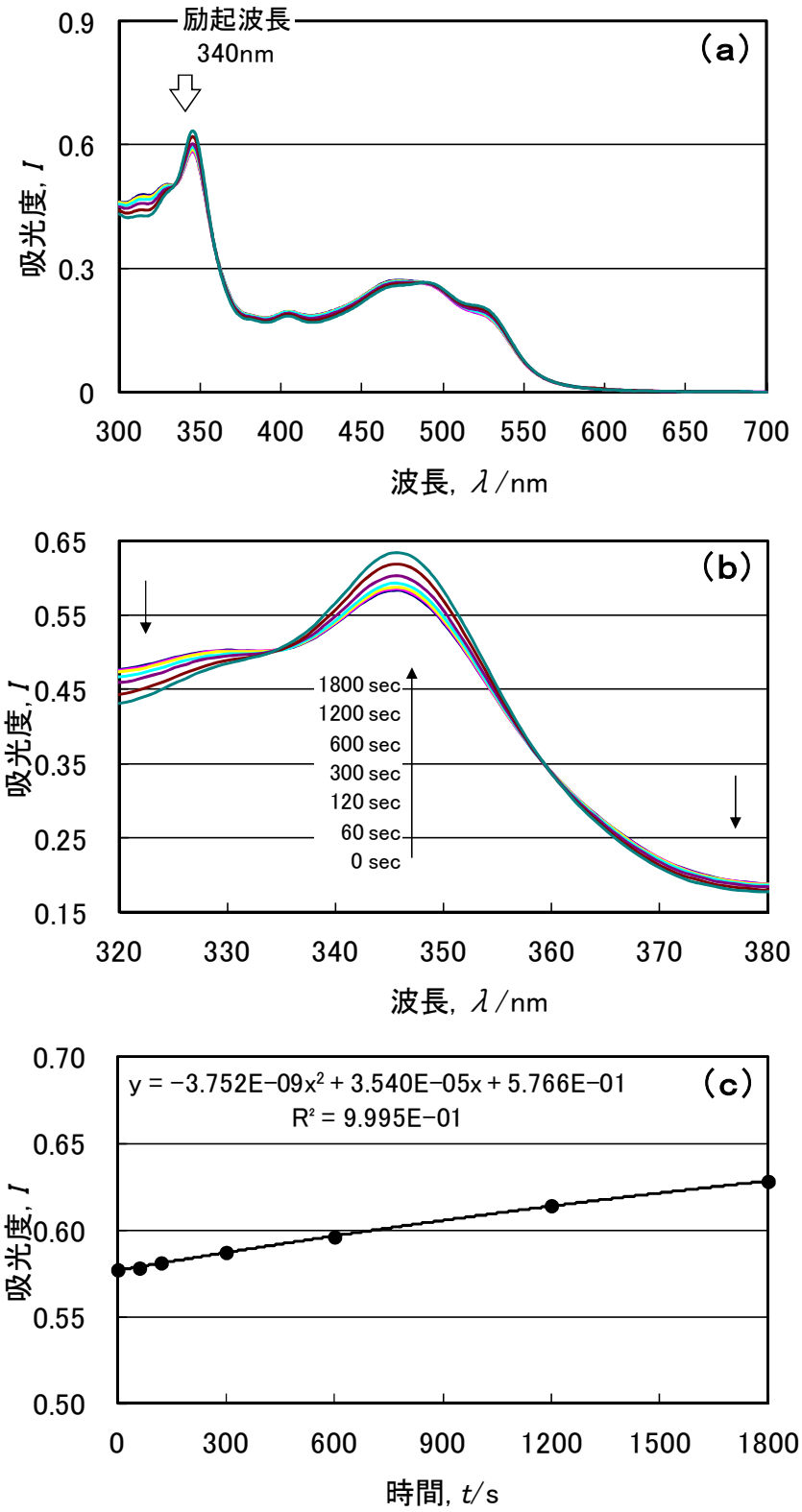


図 1.148. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：340nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

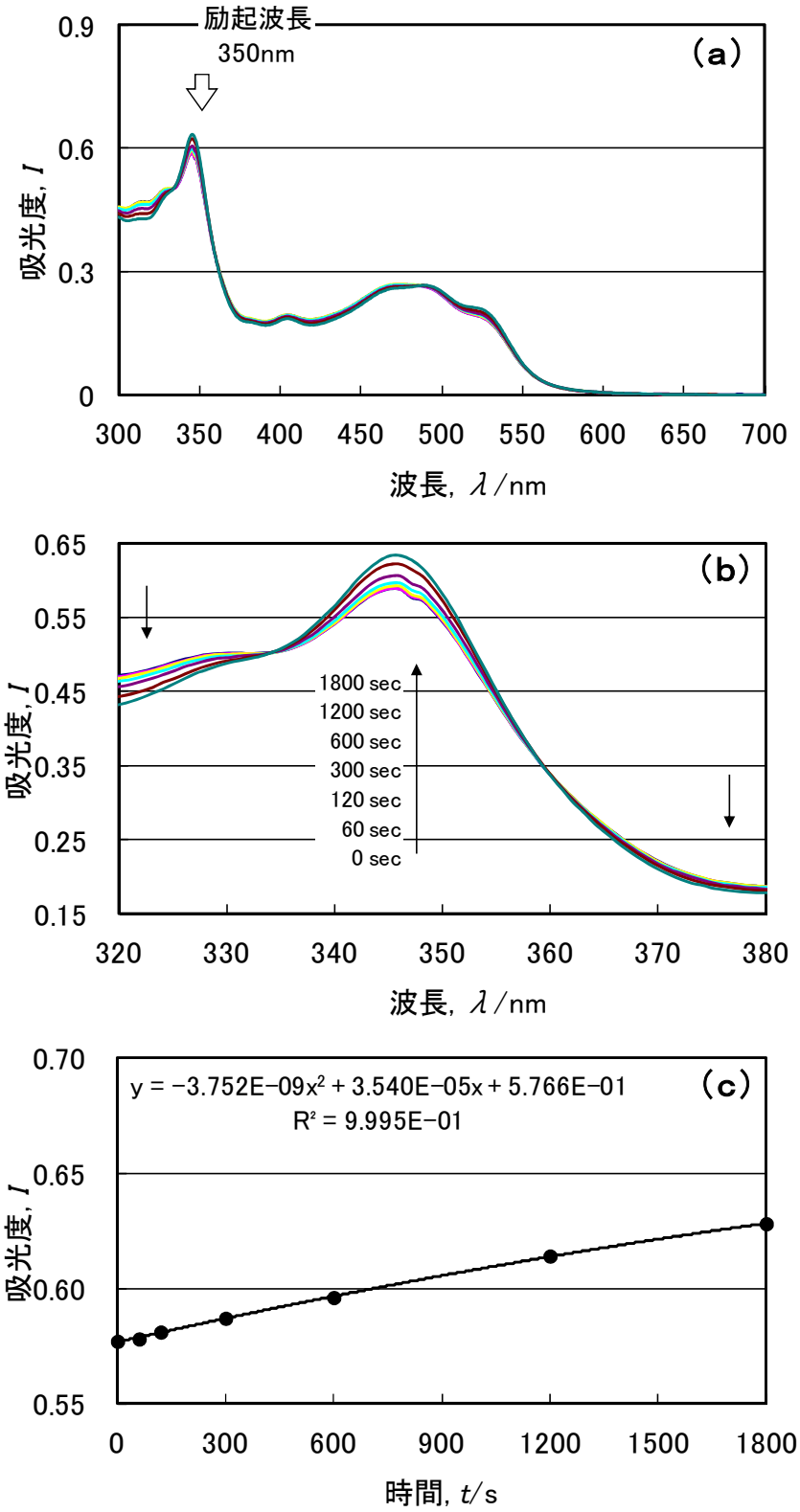


図 1.149. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：350nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

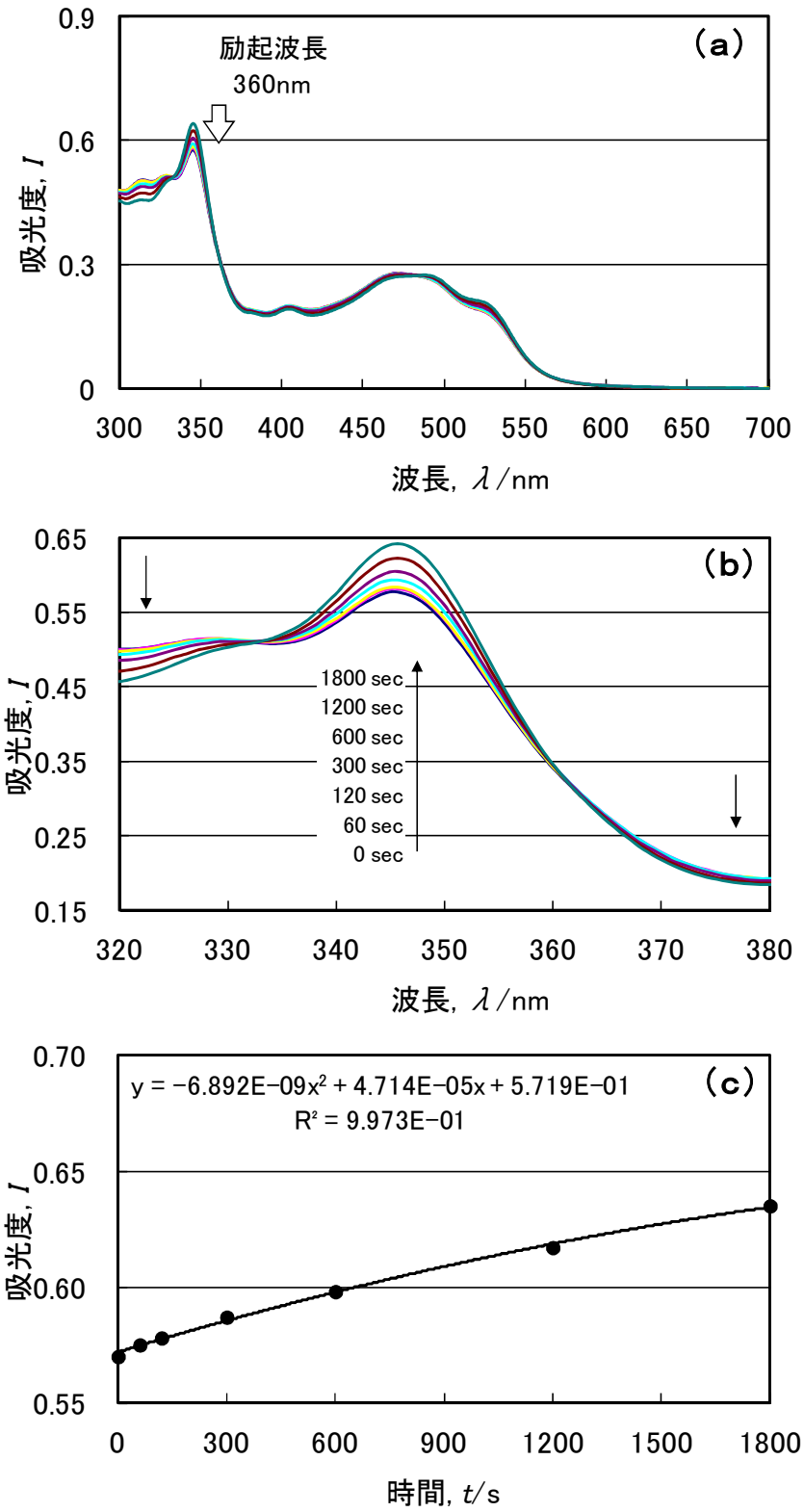


図 1.150. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：360nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

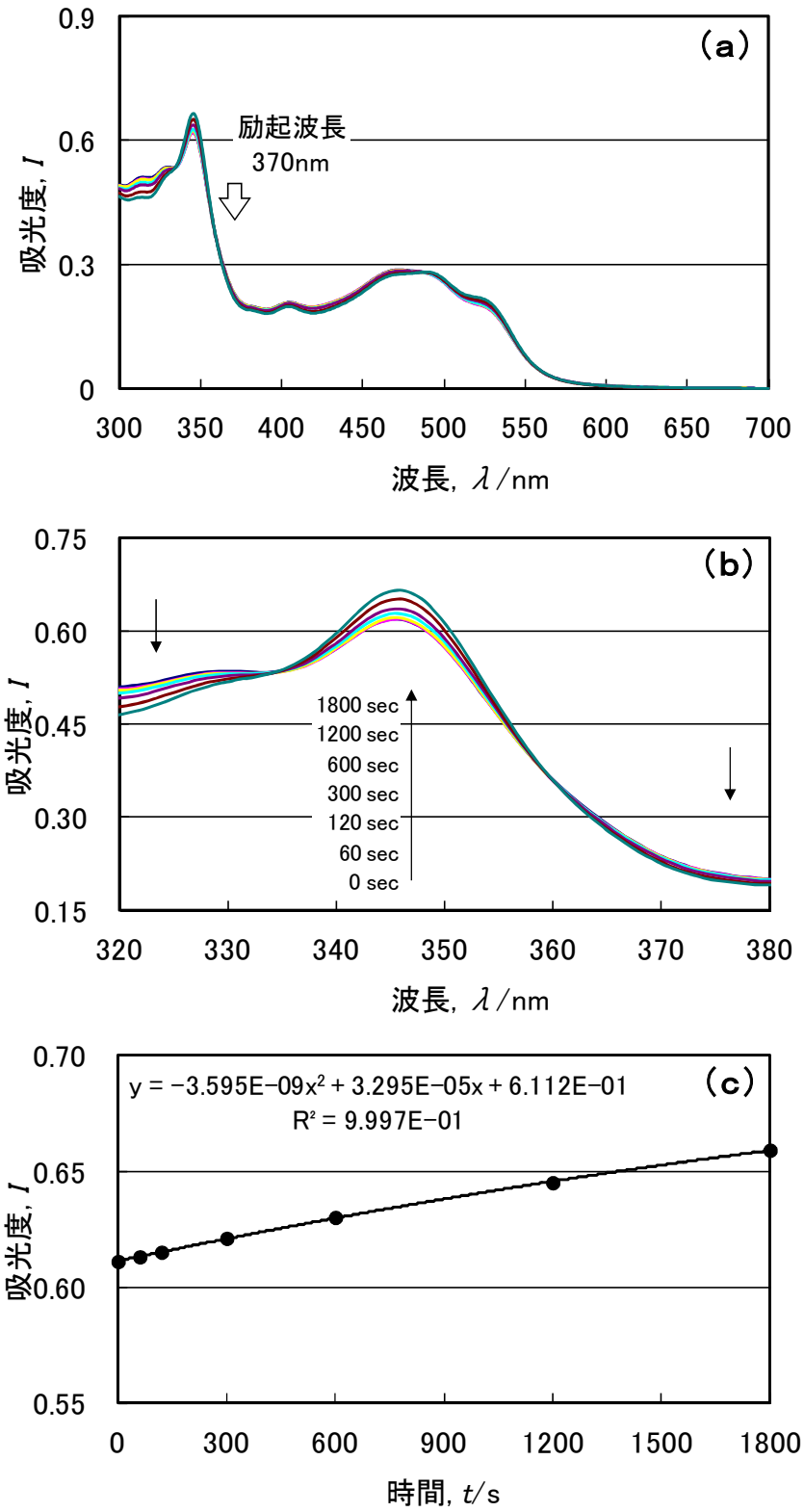


図 1.151. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：370nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

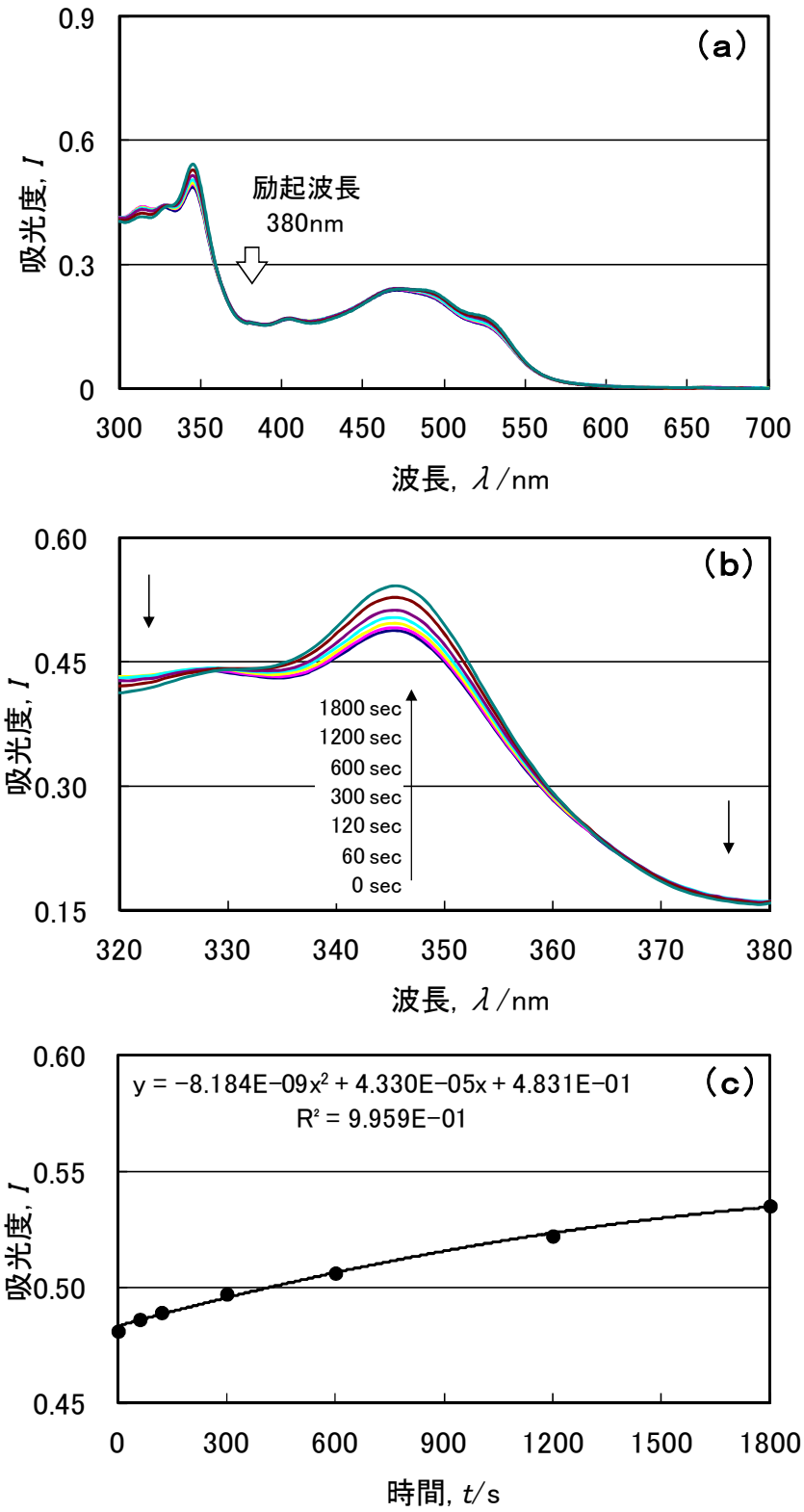


図 1.152. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：380nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

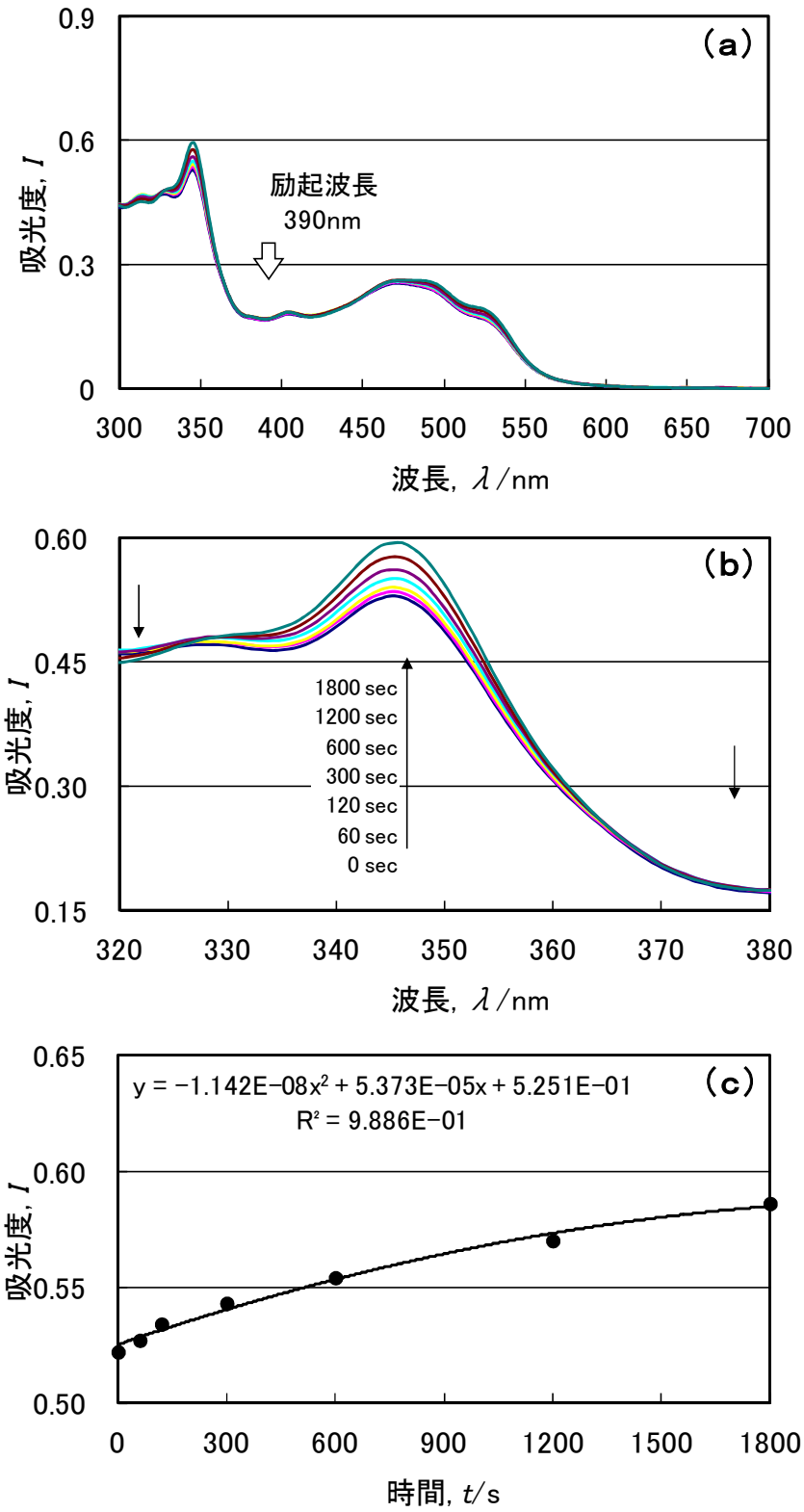


図 1.153. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：390nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：50μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

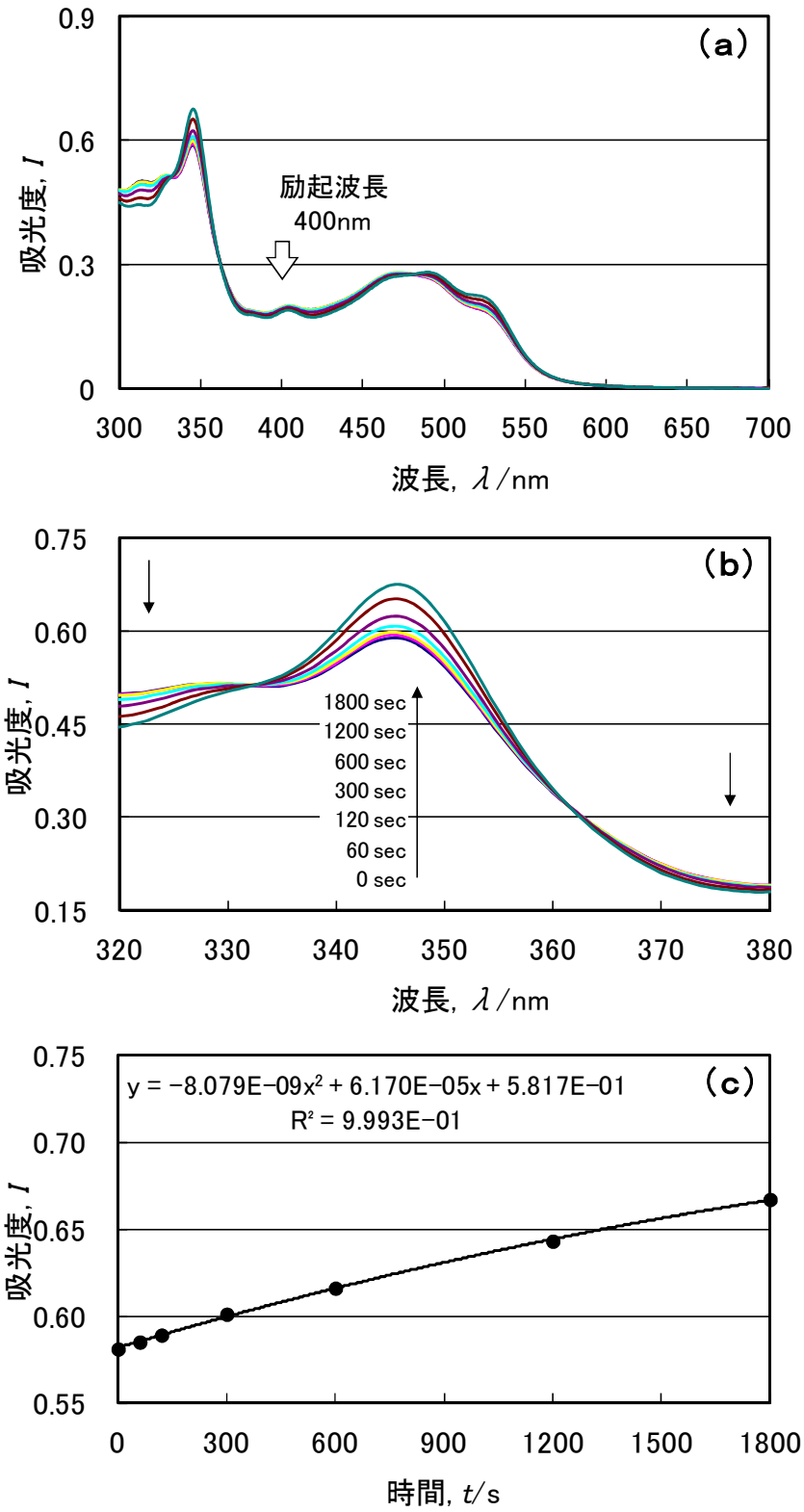


図 1.154. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：400nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

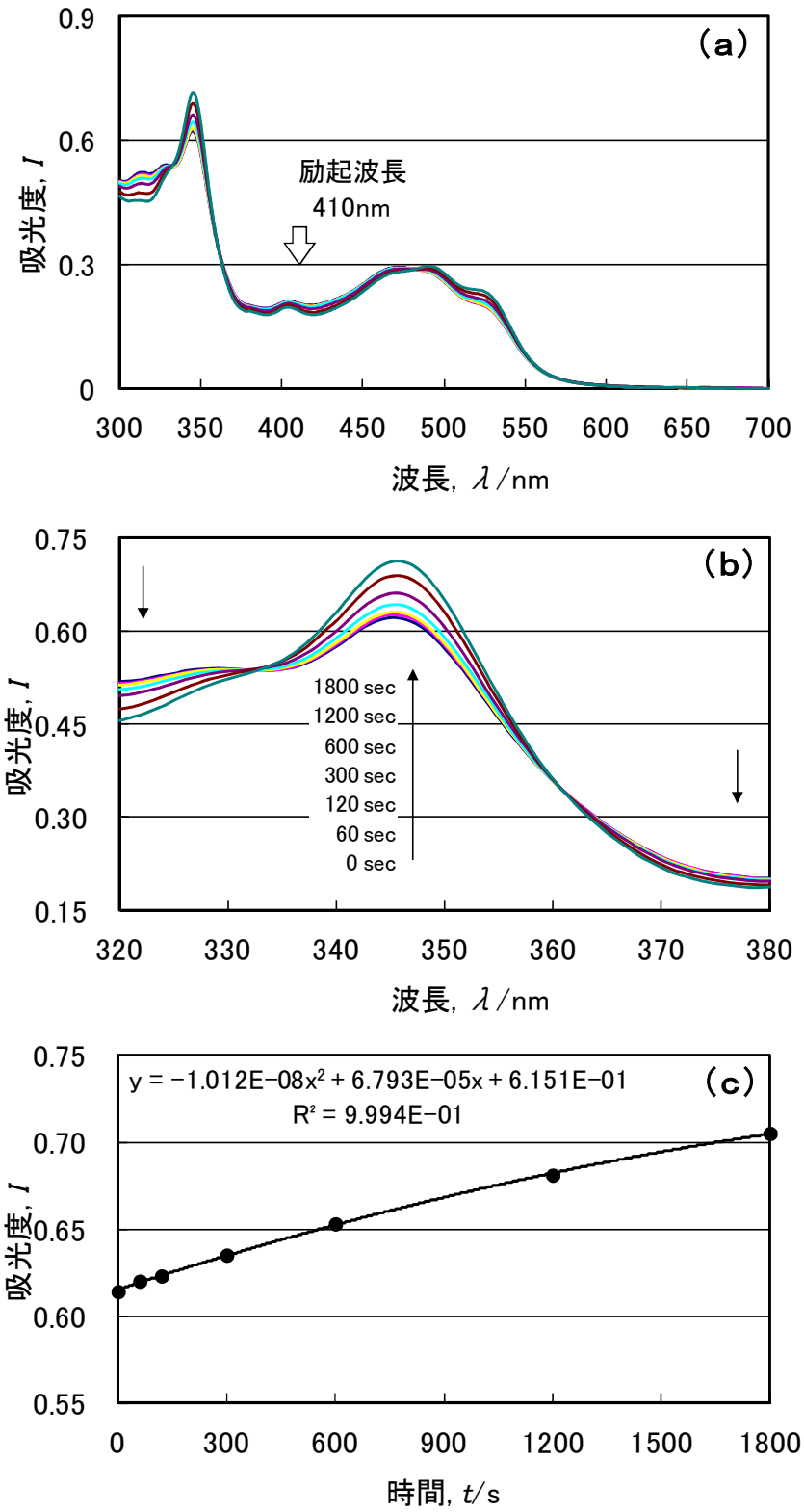


図 1.155. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：410nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

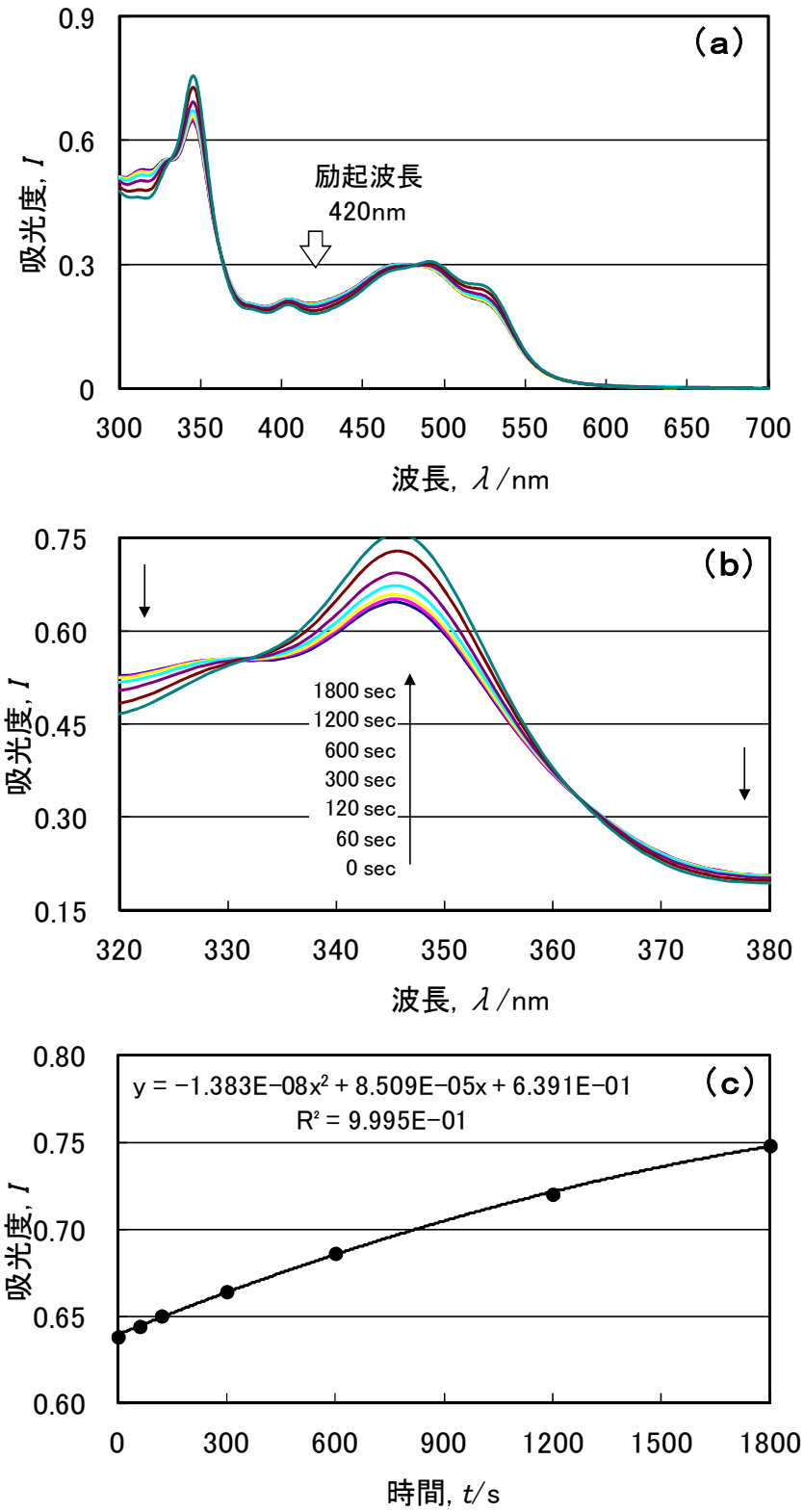


図 1.156. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：420nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

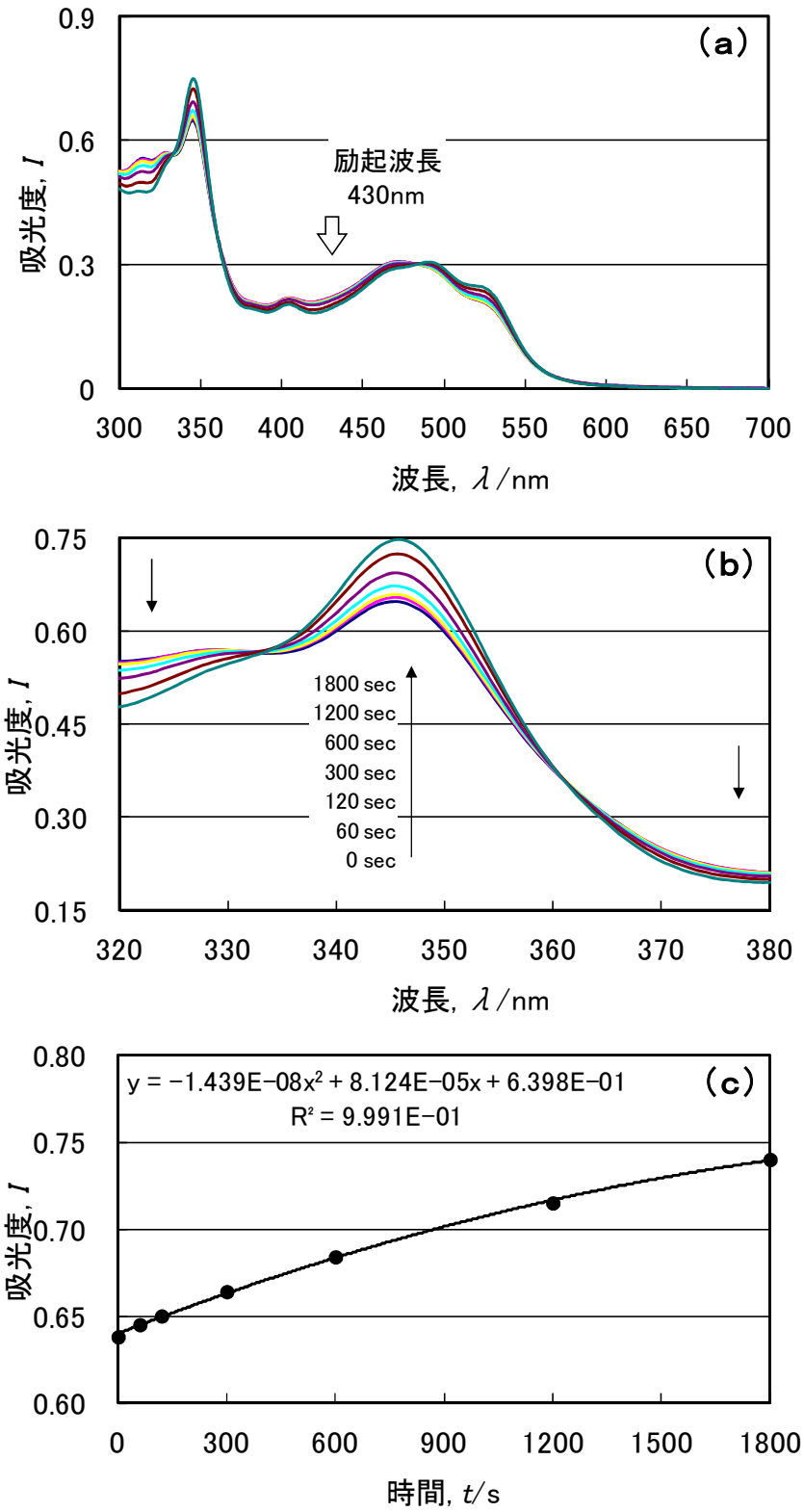


図 1.157. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：430nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

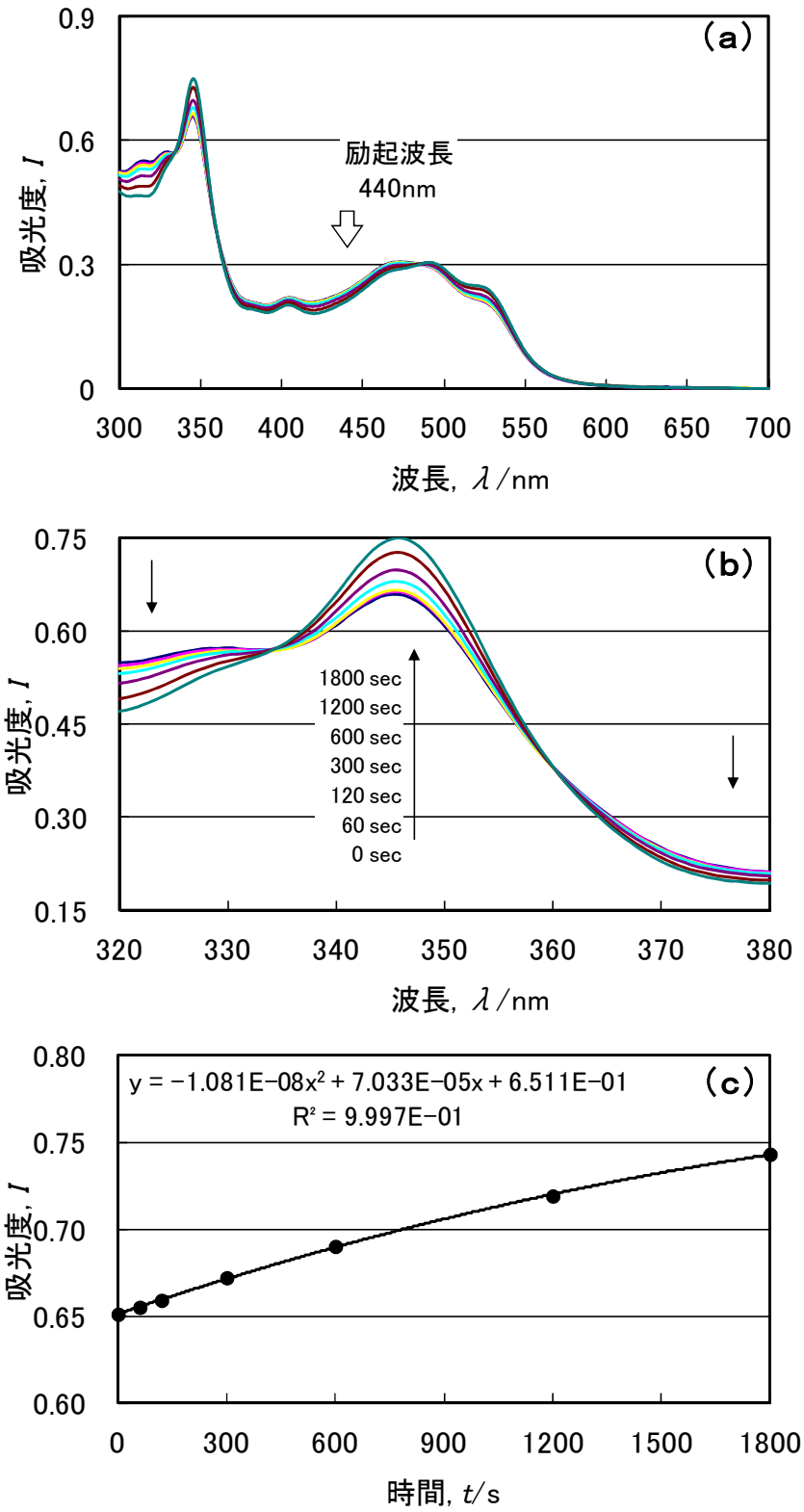


図 1.158. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：440nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

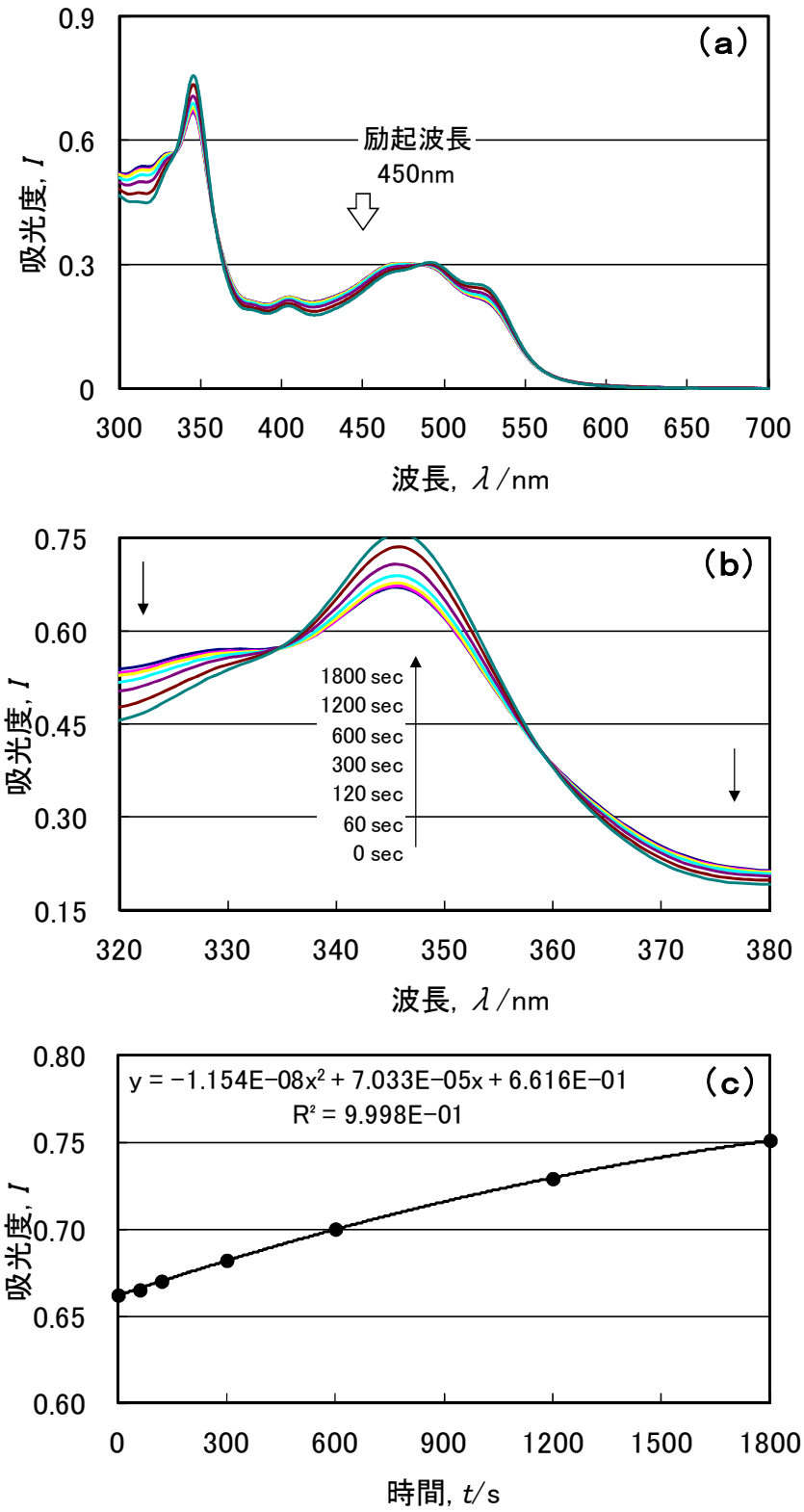


図 1.159. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：450nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

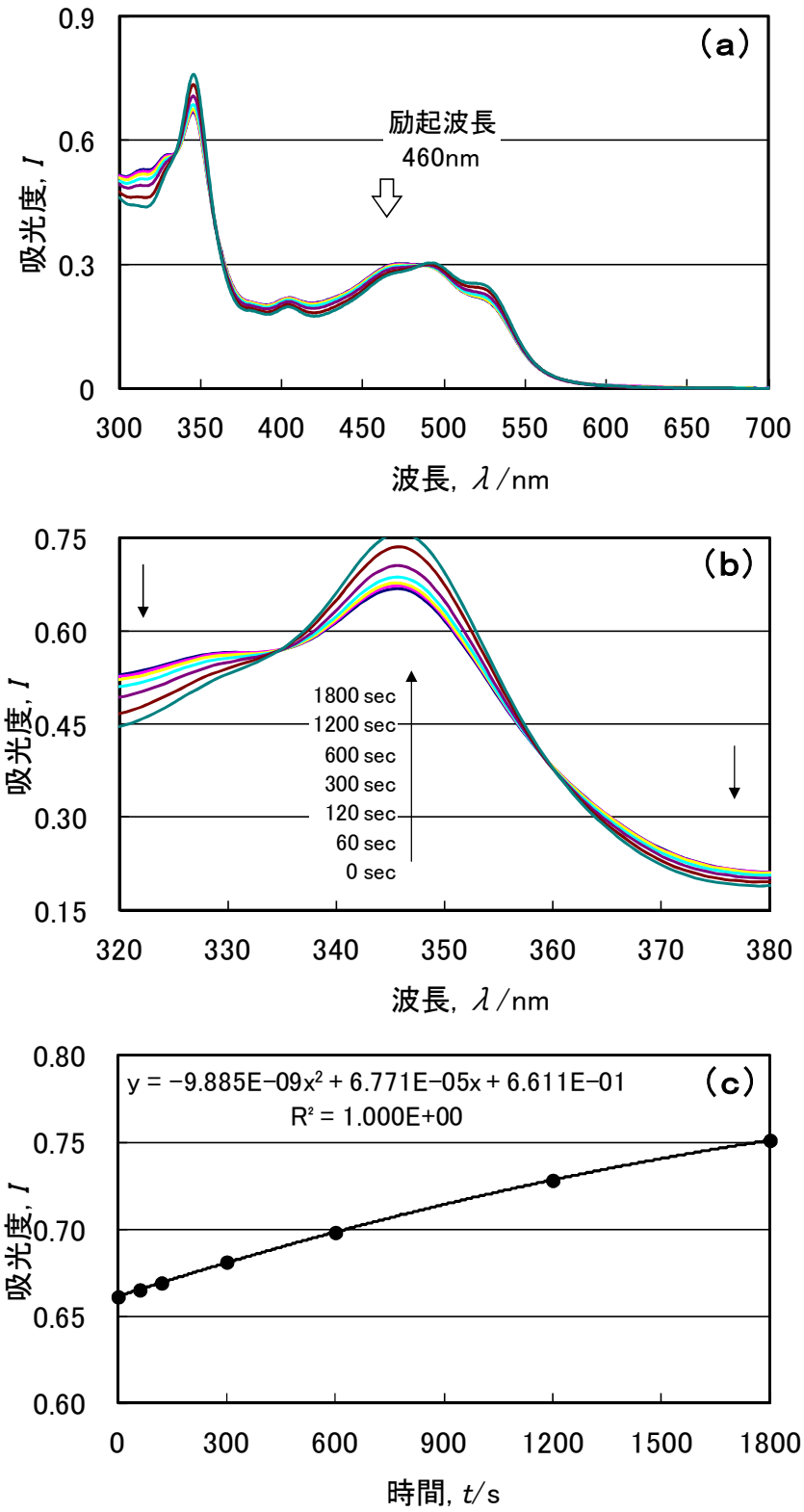


図 1.160. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：460nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

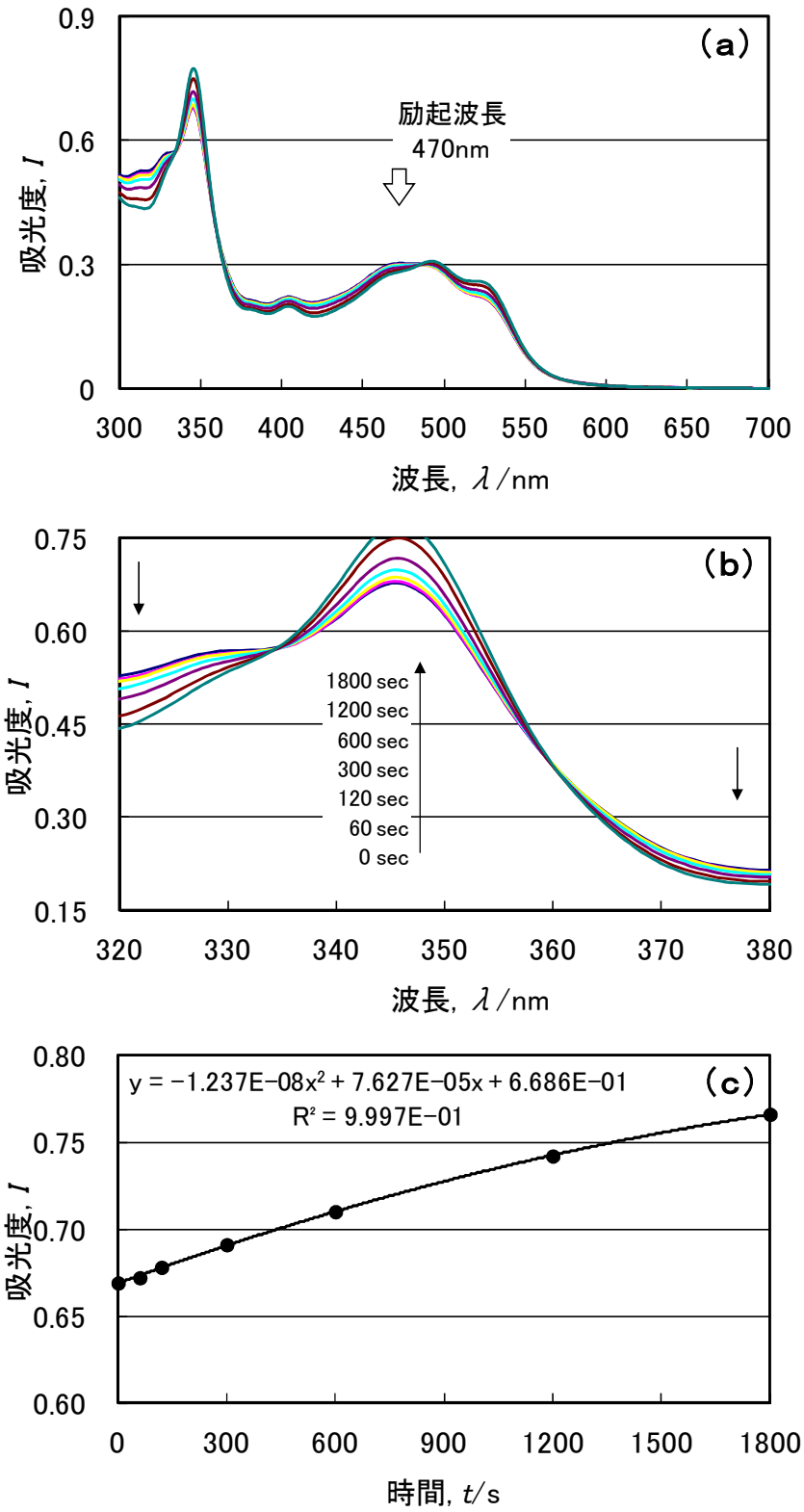


図 1.161. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：470nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

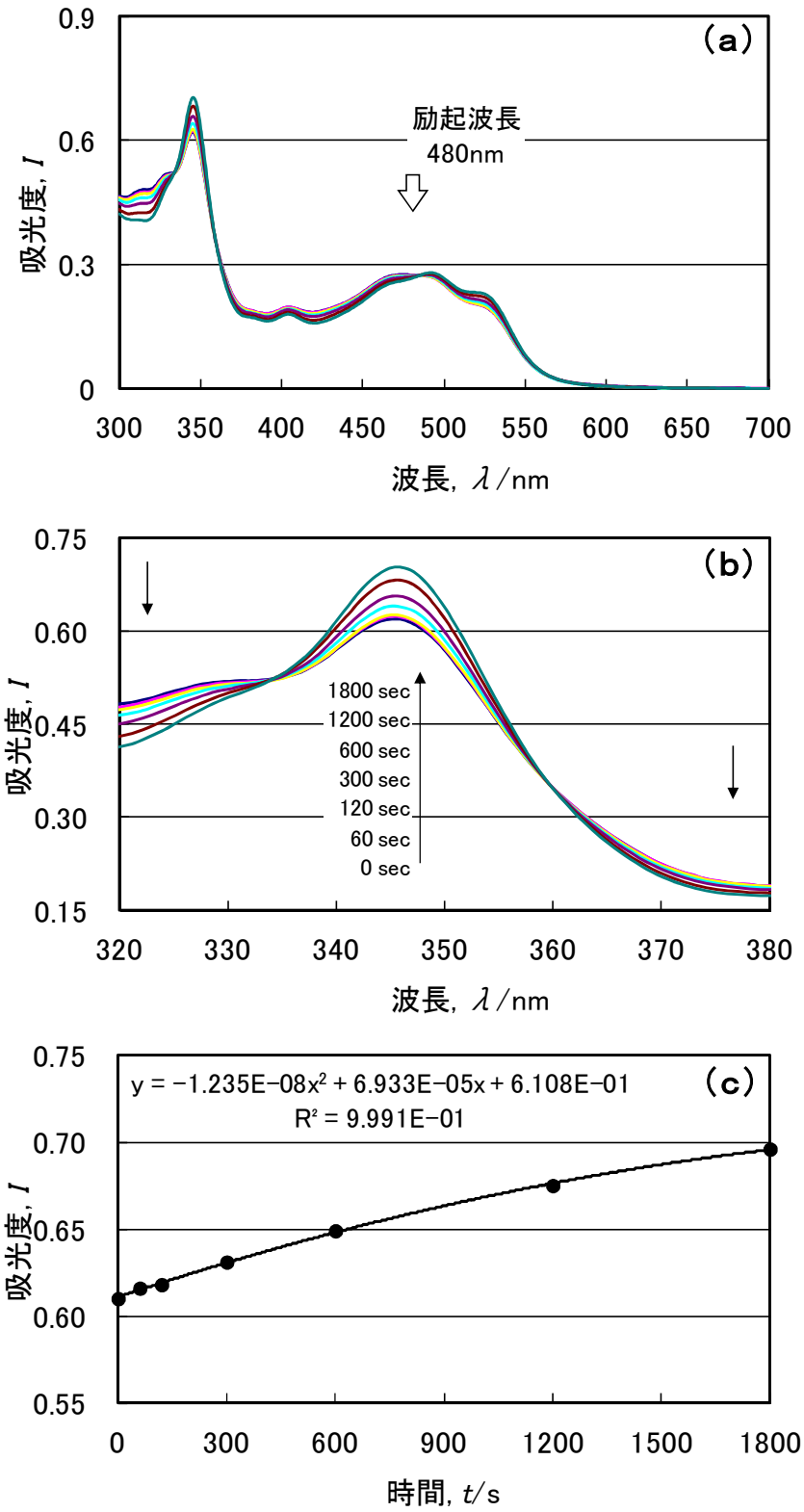


図 1.162. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：480nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

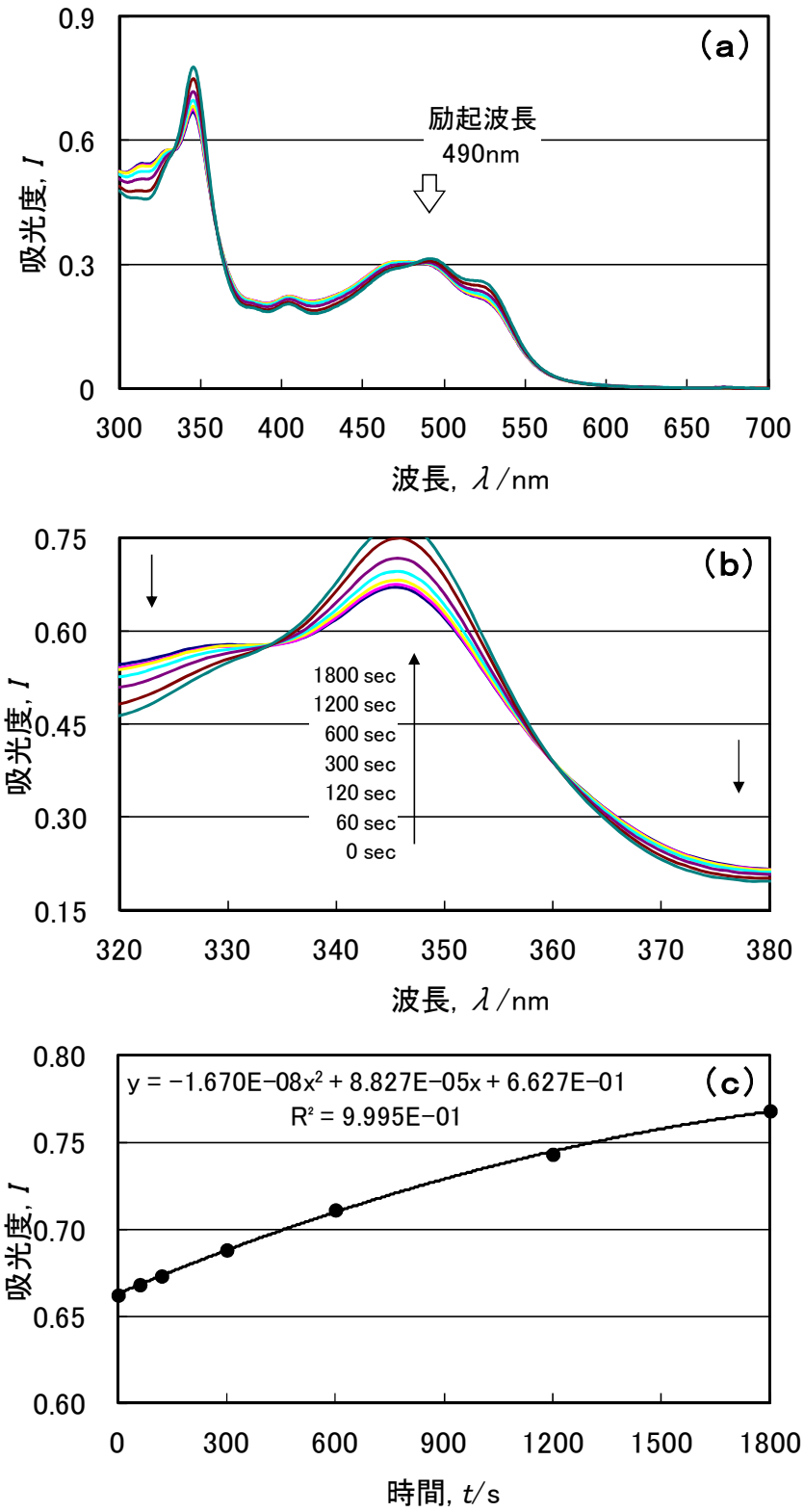


図 1.163. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：490nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

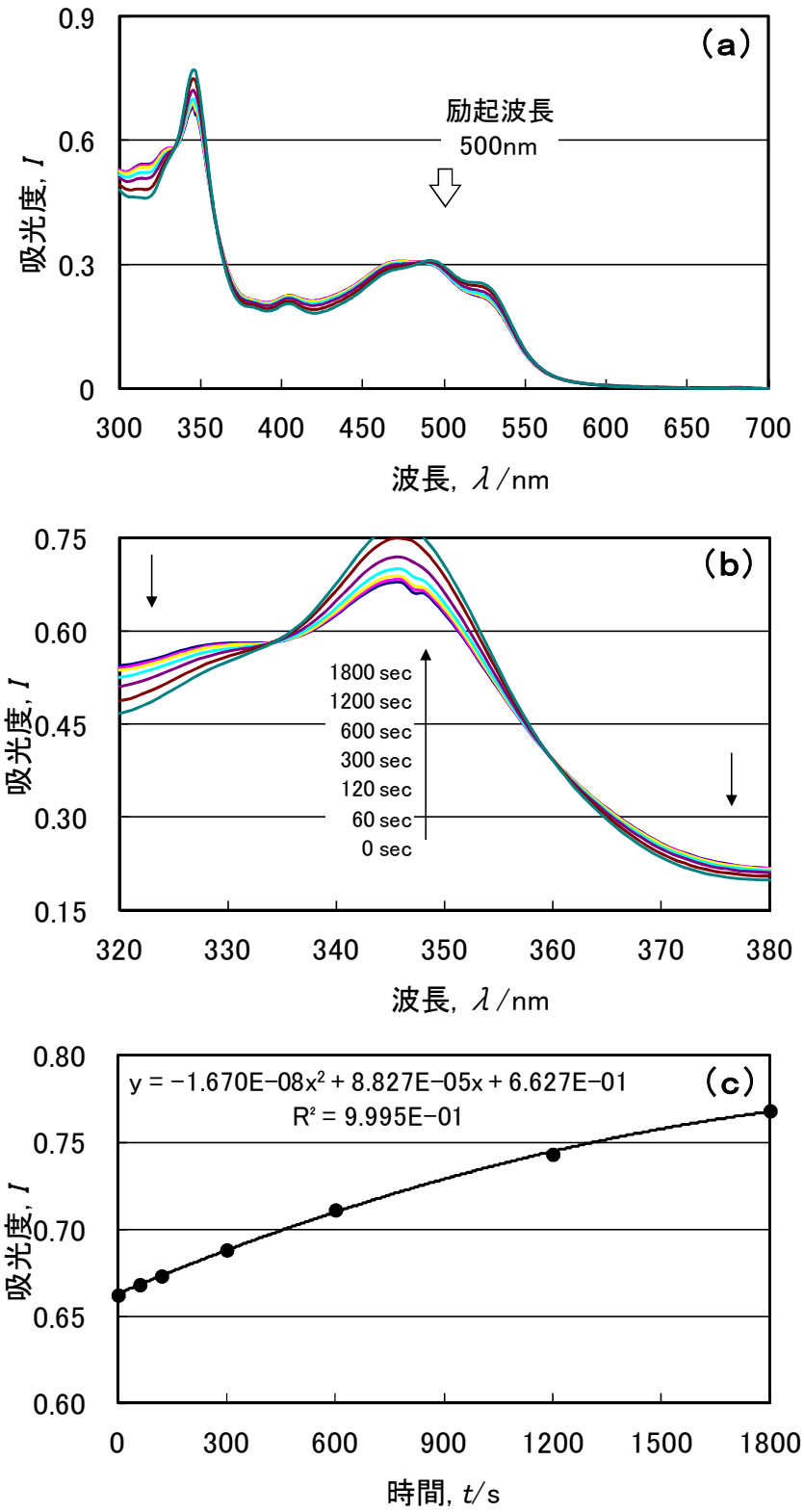


図 1.164. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：500nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

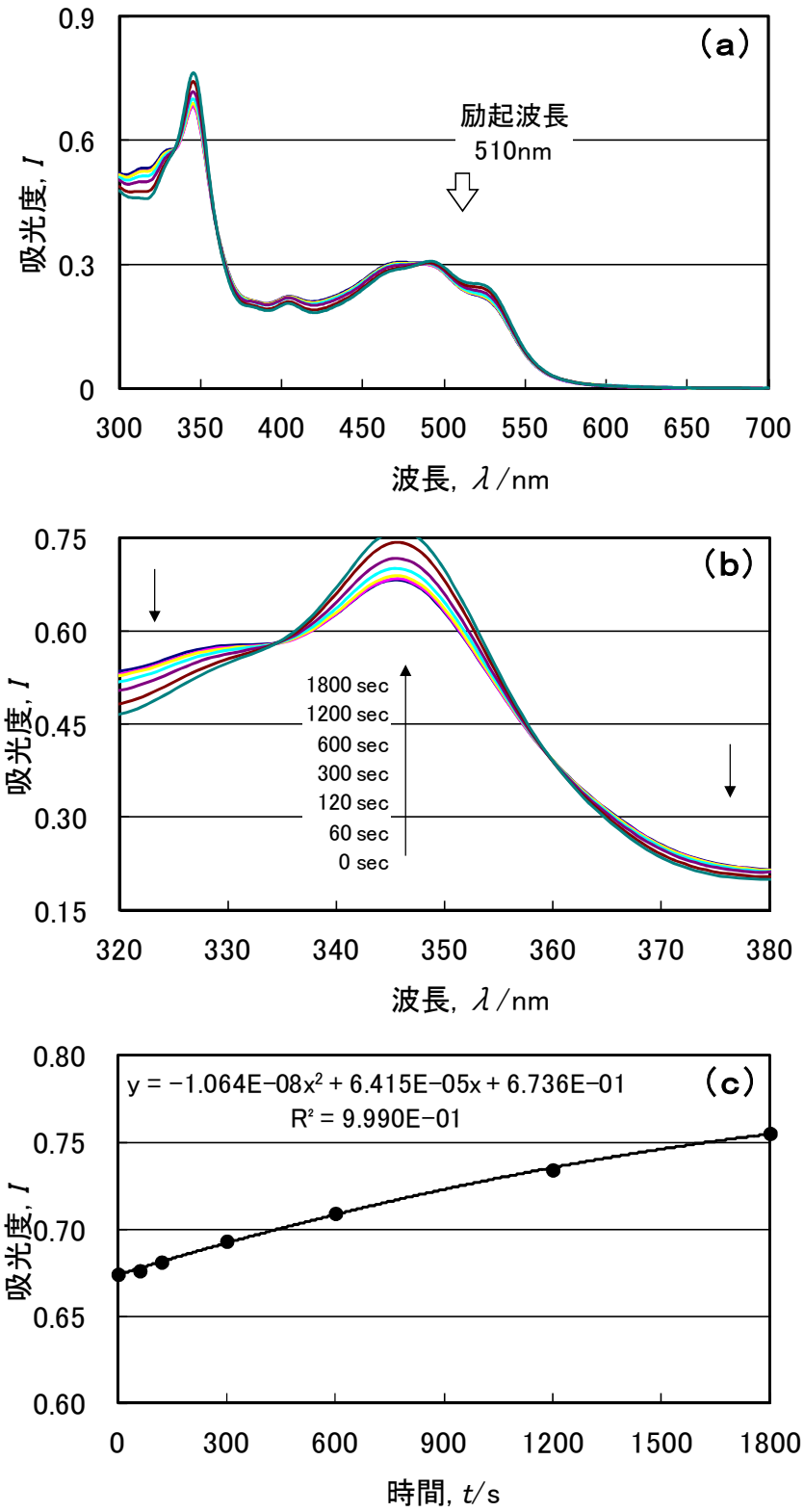


図 1.165. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：510nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

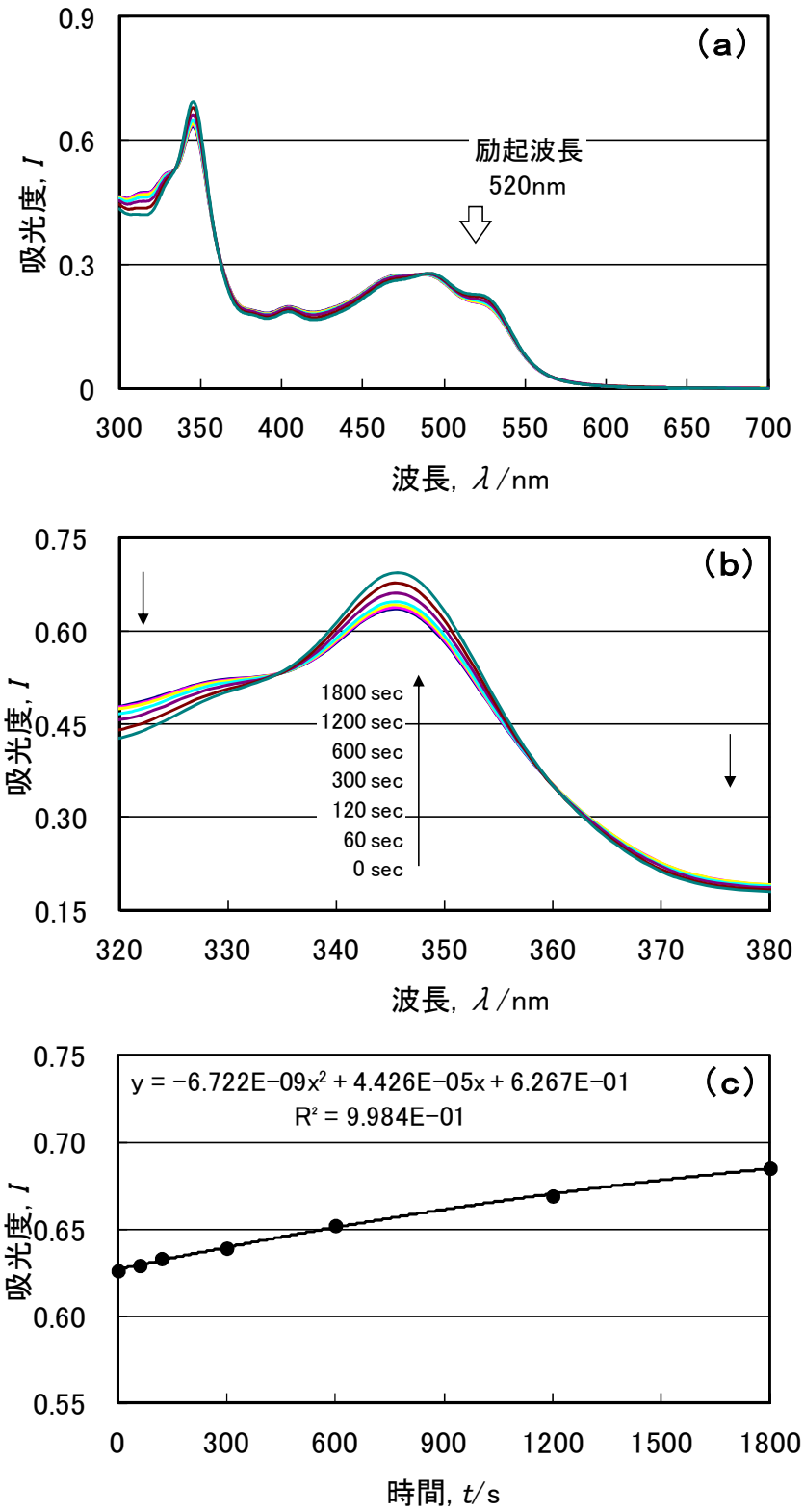


図 1.166. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：520nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

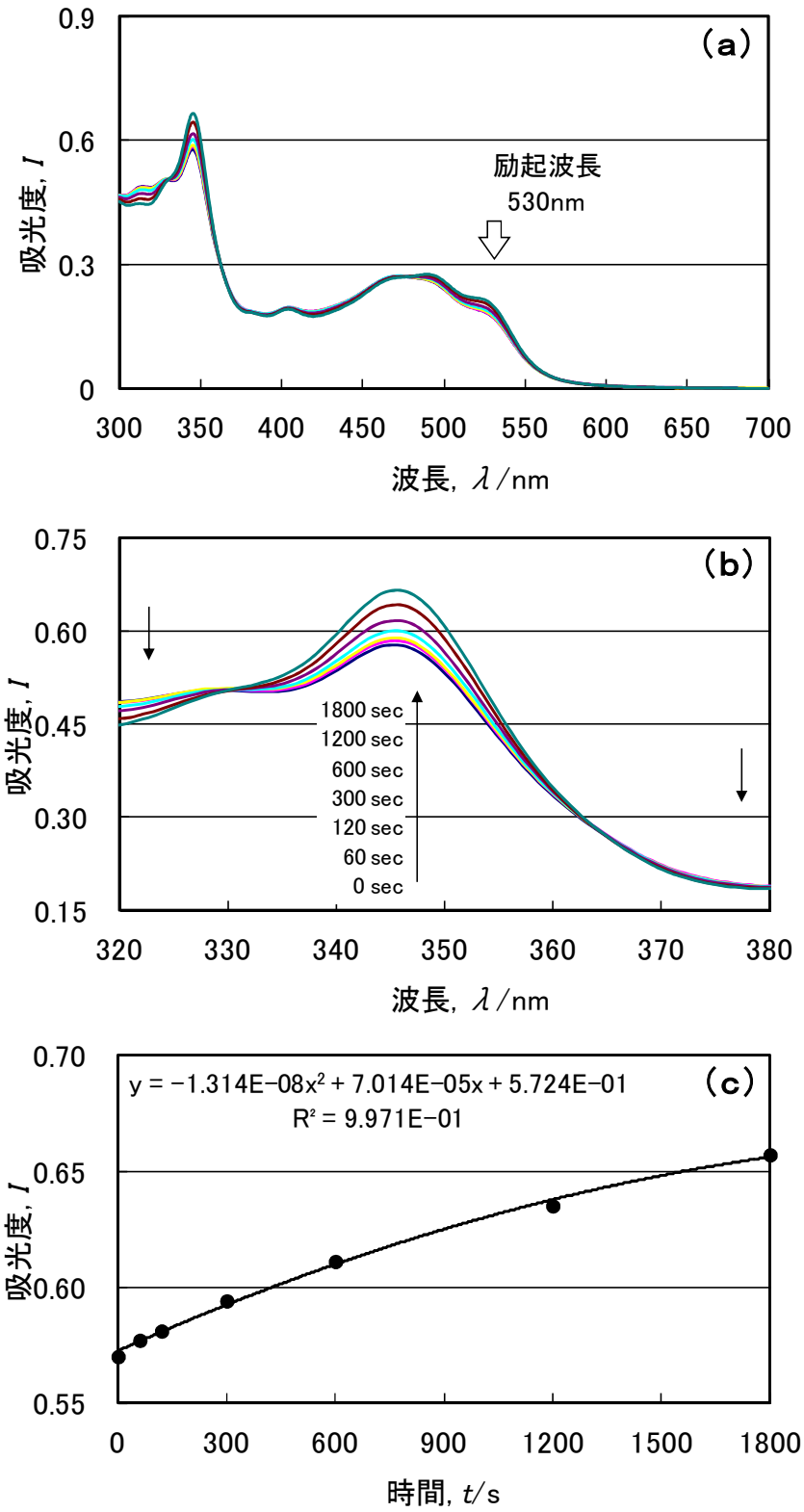


図 1.167. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：530nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

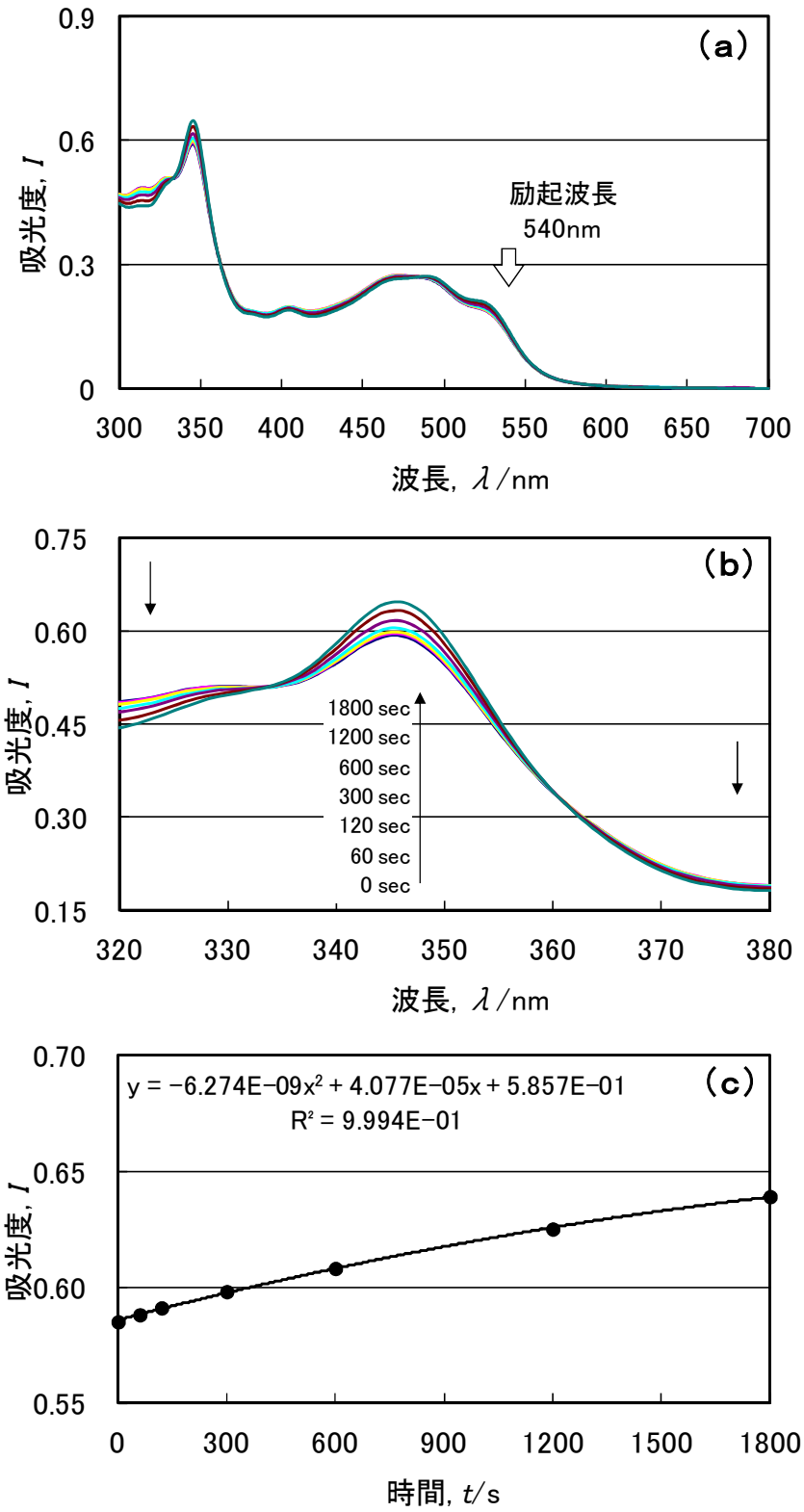


図 1.168. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：540nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

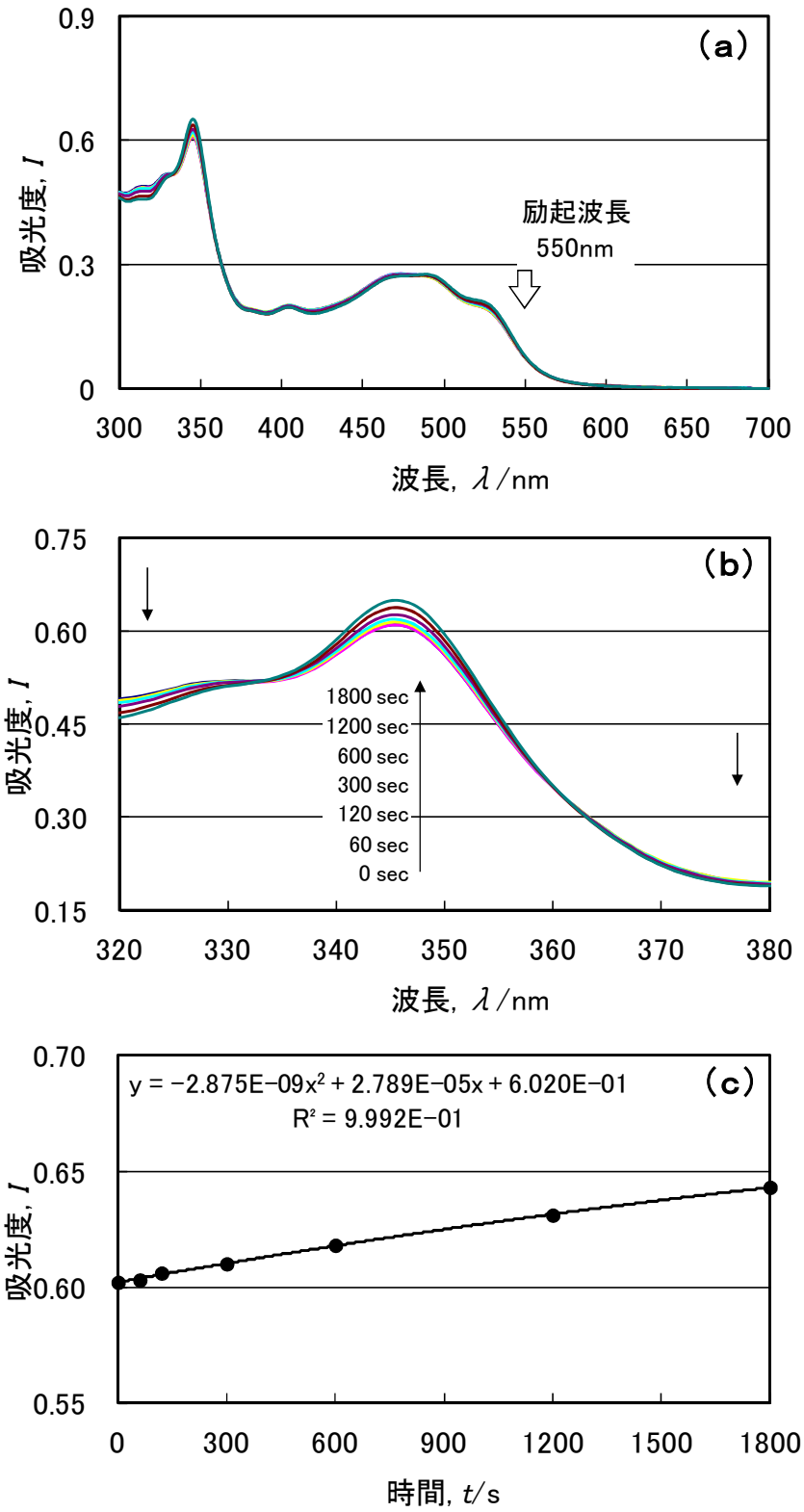


図 1.169. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：550nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：100μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

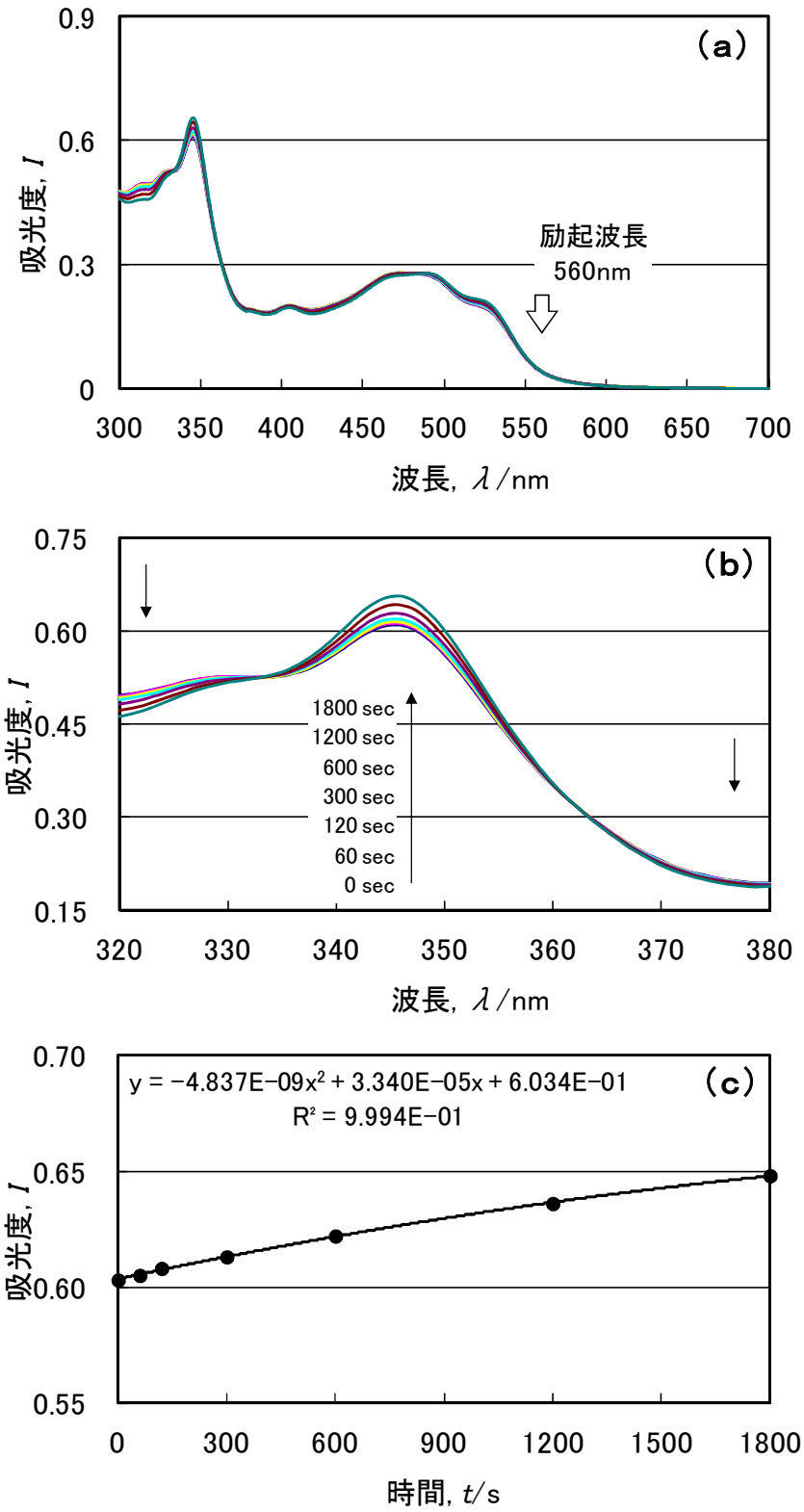


図 1.170. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：560nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：200μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

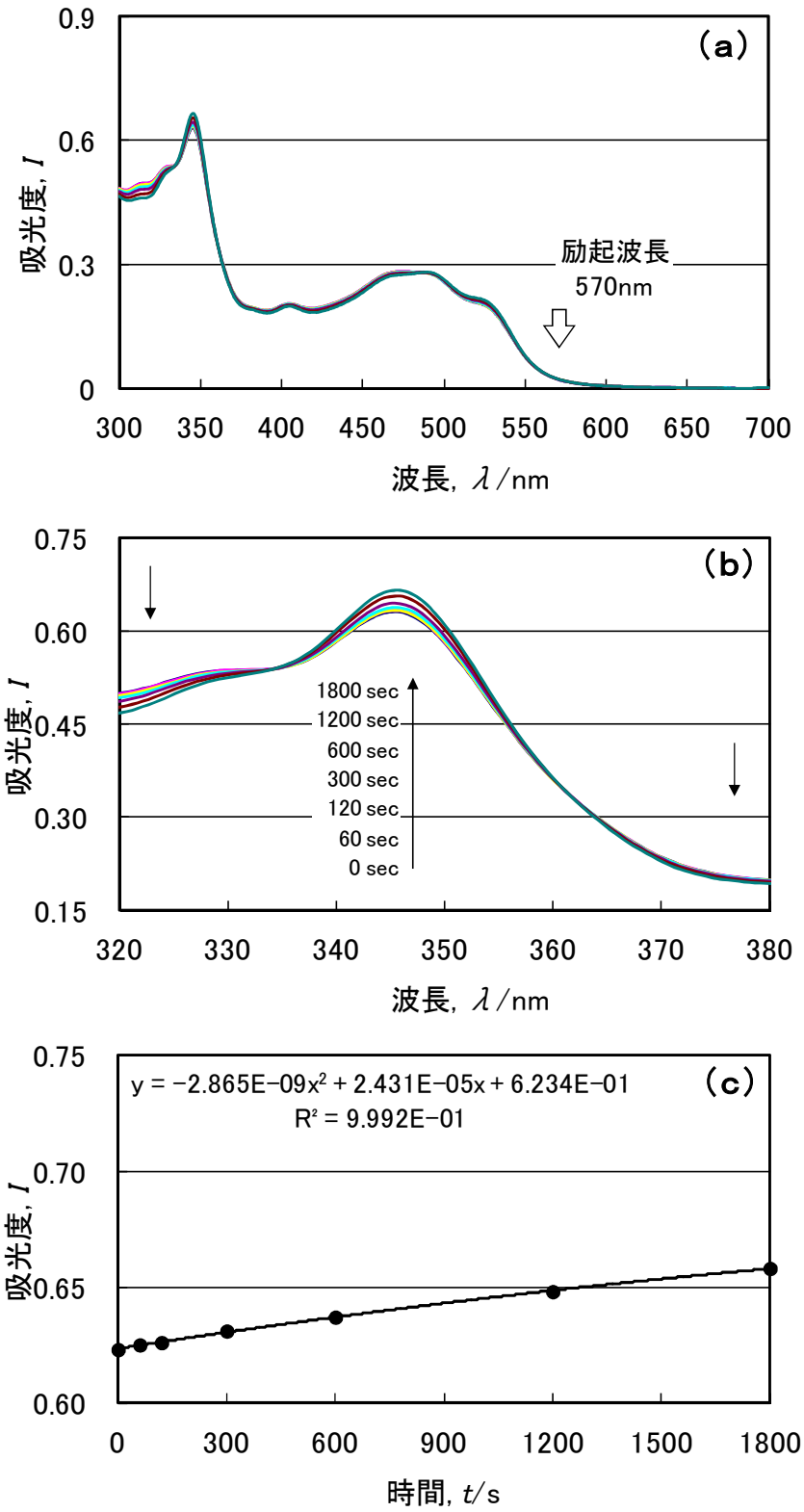


図 1.171. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：570nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：300μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

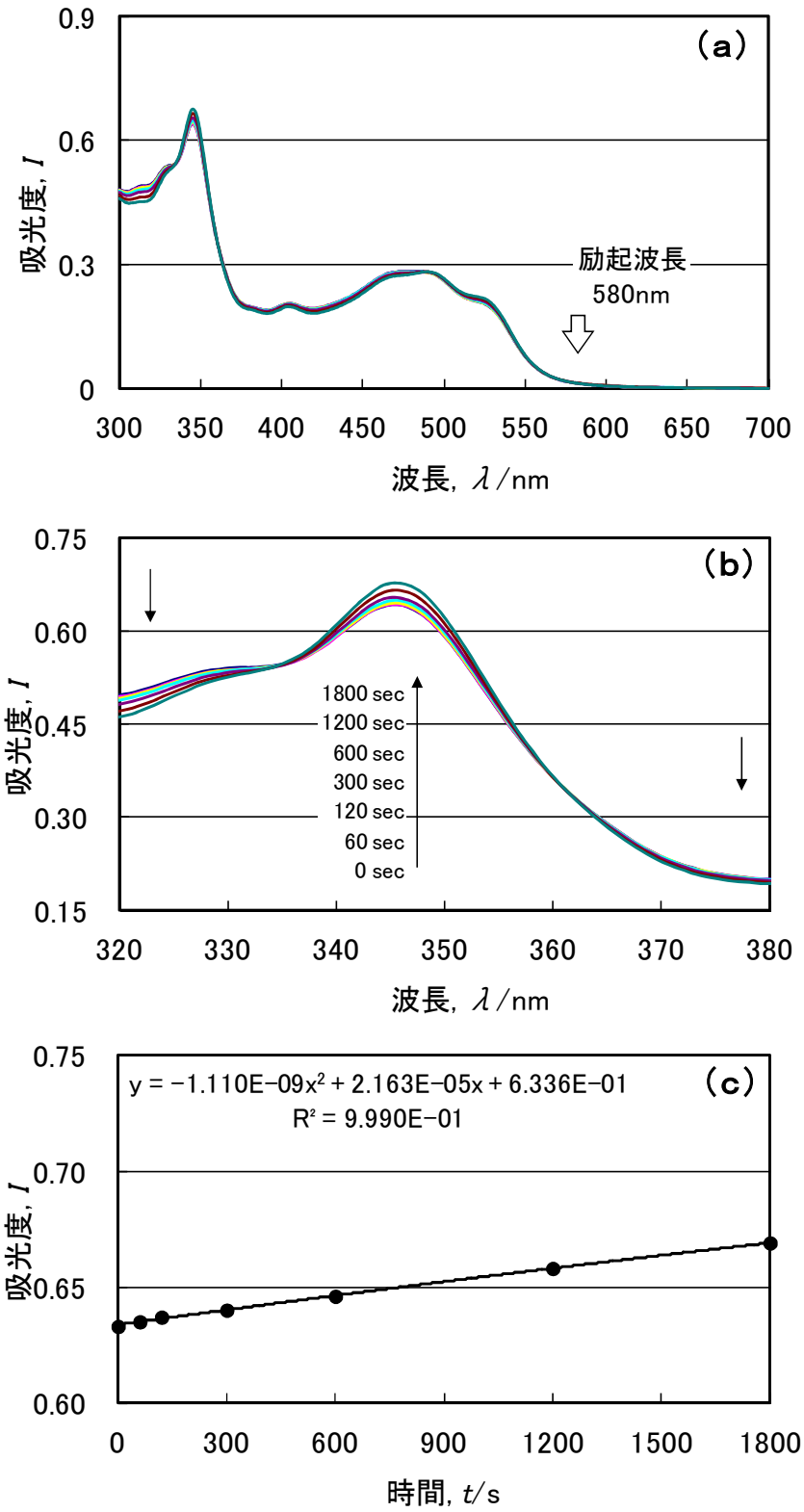


図 1.172. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：580nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：500μW/cm^2、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

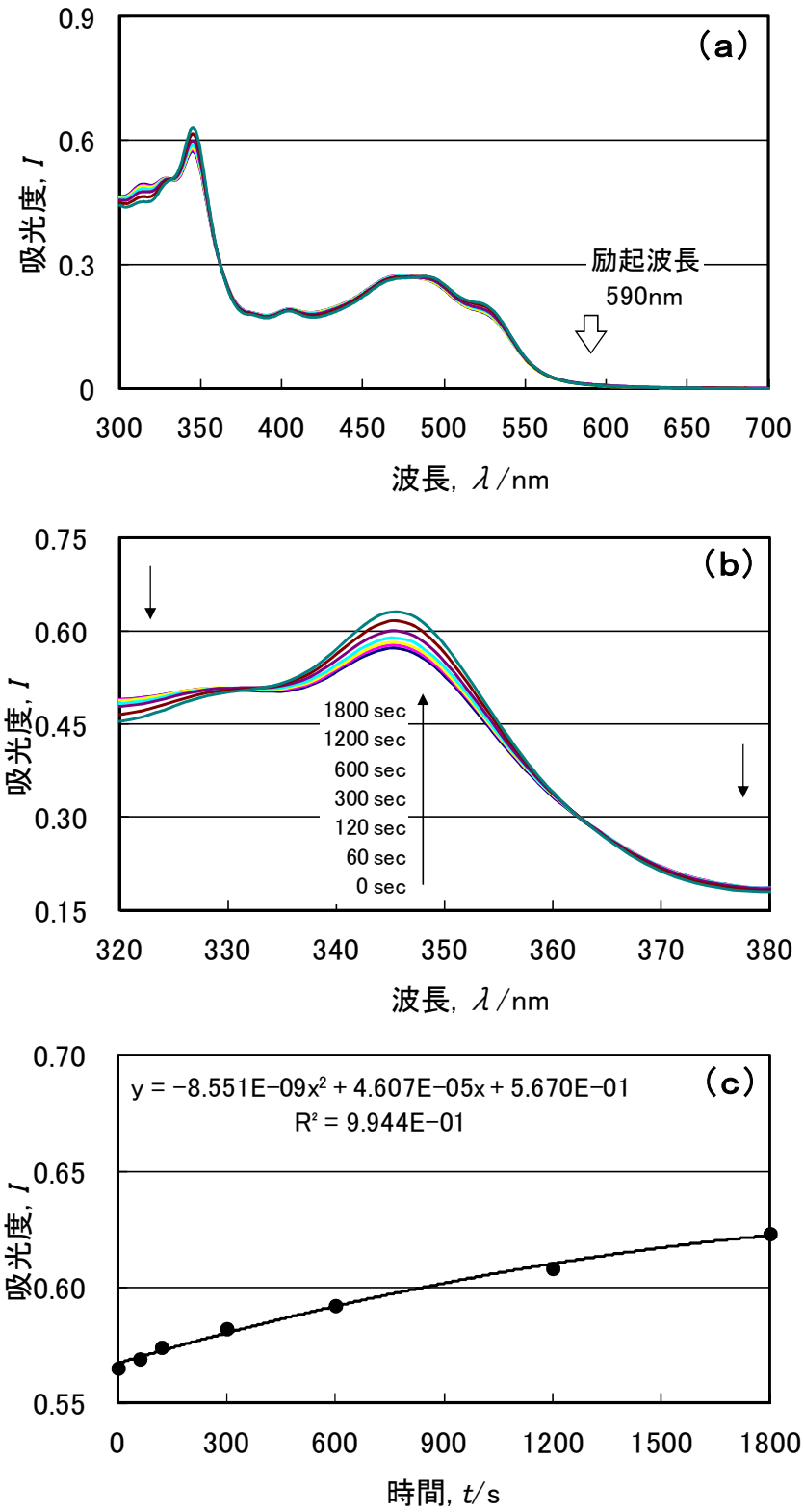


図 1.173. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：590nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：1000μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

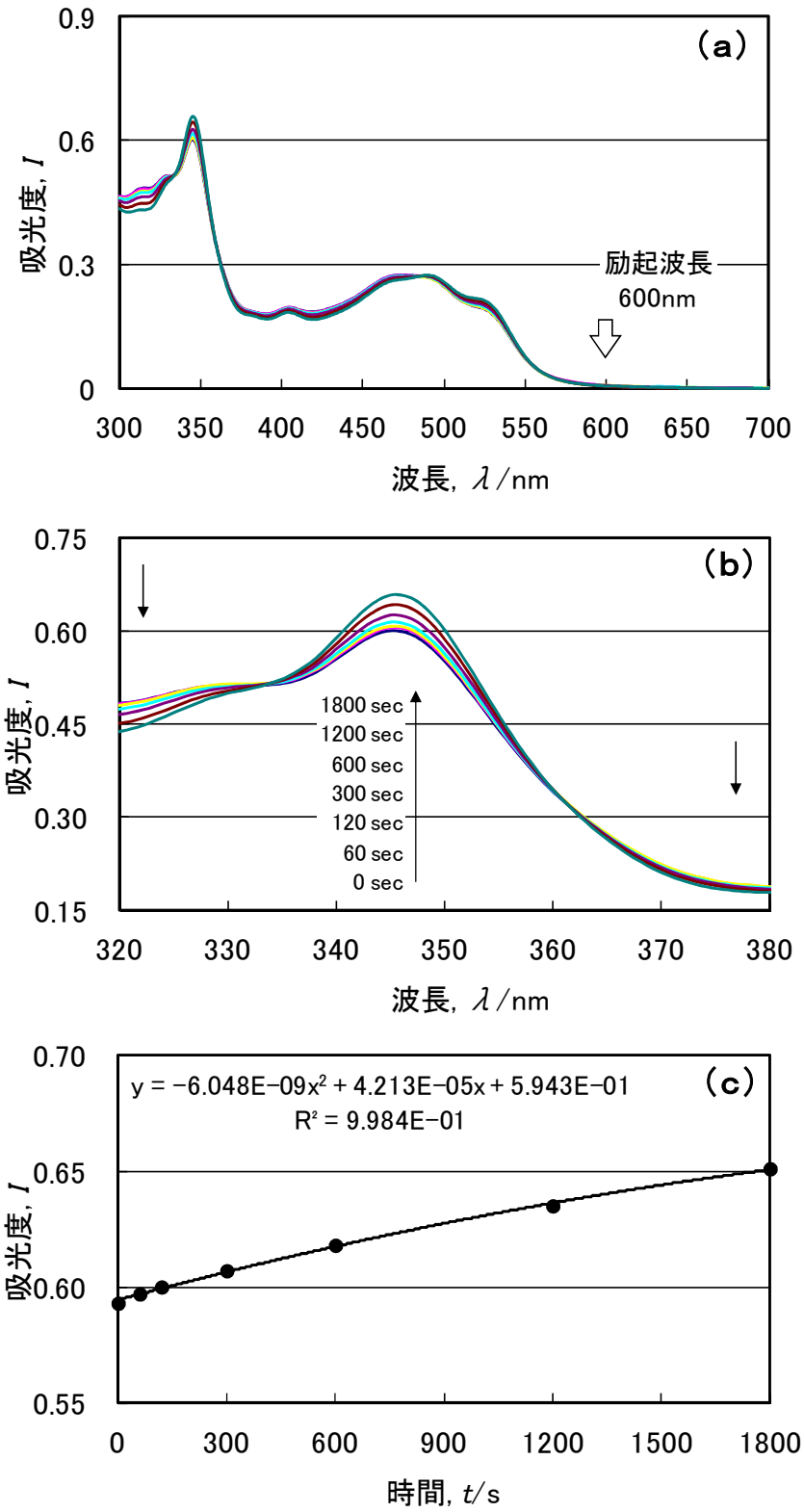


図 1.174. カルボキシメチル(ジエチルエーテル)コビリン酸過塩素酸塩の光反応の経時変化
（励起波長：600nm、濃度：4.35×10^{-5}M、光照射強度：1500μW/cm²、室温）
（a）吸収スペクトル（波長：300～700nm）、（b）吸収スペクトル（波長：320～380nm）、
（c）吸光度の経時変化（波長：347nm）.測定：0、1、2、5、10、20、30 分後

以上の結果から、ビタミンB_{12}について、中心金属のコバルトがカルボキシメチル基を有する場合（Co-CH_2COOH）、可視光照射により、Co(II)とカルボキシメチルラジカル（・CH_2COOH）が生成して、アルセノベタインが合成される経路が存在することが示された。

そこで、カルボキシメチル供与体として、カルボキシメチルトシレート（Tos-CH_2COOH）存在下、ビタミンB_{12}、酸化チタンからなる触媒システムにより、無機ヒ素の AsB への直接 1 段階合成の可能性を検討した。その結果、実際に、AsB の合成が確認された（図 1.175 と図 1.176）。高速液体クロマトグラフ法－誘導結合プラズマ質量分析法（HPLC-ICP-MS 法）において、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂の二種類の充填剤を用いて生成物である AsB の同定を行った。反応混合物の AsB に帰属されるピークは標品に一致したことから、AsB が生成しているものと判断された。この反応で特筆すべき点は、メチル基供与体（XCH_3）が存在しない場合についても、カルボキシメチル基供与体（XCH_2COOH）が存在すれば、無機ヒ素から直接、1 段階で AsB が生成する点である（図 1.177）。反応中間体として、メチルラジカル（・CH_3）、カルボキシメチルラジカル（・CH_2COOH）が生成している可能性が示唆された。

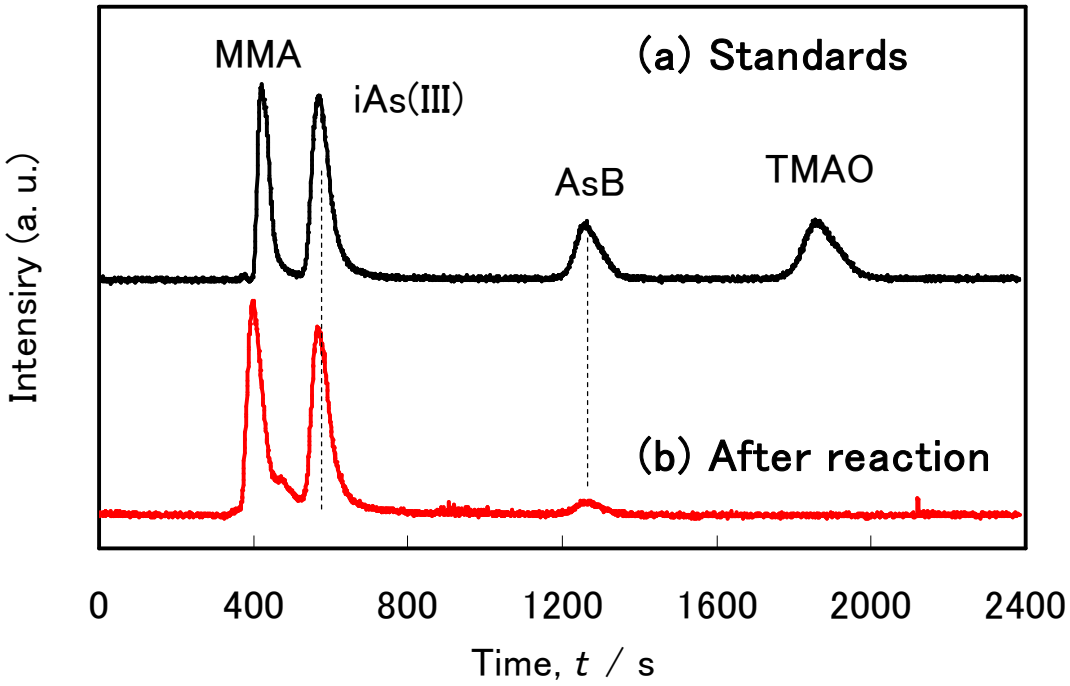


図 1.175. HPLC-ICP-MS クロマトグラム（陽イオン交換カラム）

（a） 標準溶液（MMA：モノメチルアルソン酸、iAs(III)：亜ヒ酸、TMAO：トリメチルアルシンオキシド、AsB:アルセノベタイン）、（b） 反応後（酸化チタン、ビタミンB_{12}、カルボキシメチルトシレート、室温）

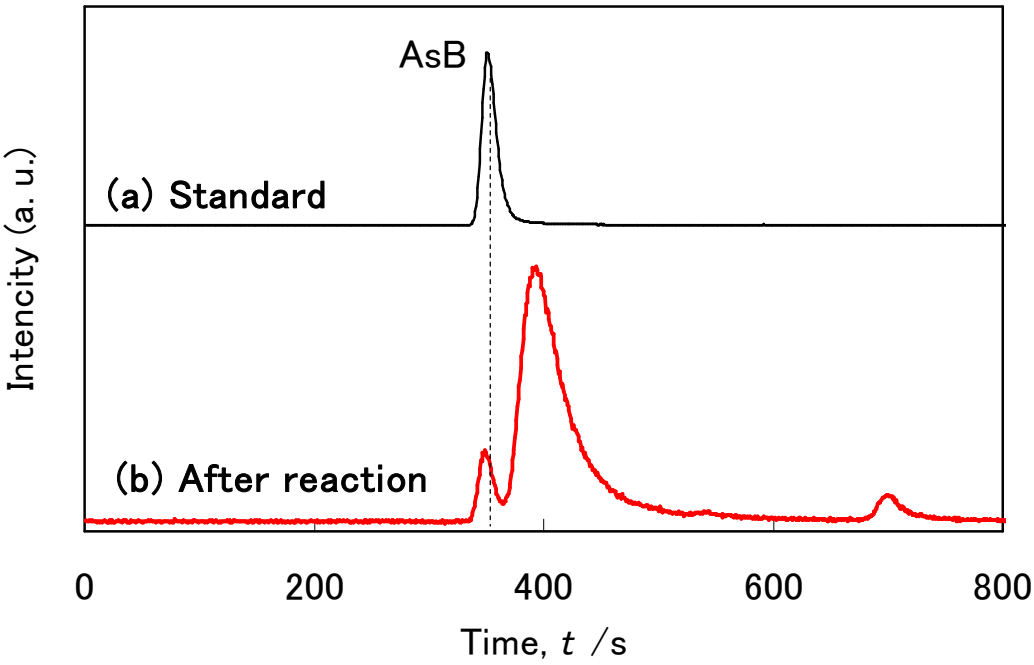


図 1.176. HPLC-ICP-MS クロマトグラム(陰イオン交換カラム)
(a) 標準溶液(AsB:アルセノベタイン)、(b) 反応後(酸化チタン、ビタミンB_{12}、カルボキシメチルトシレート、室温)

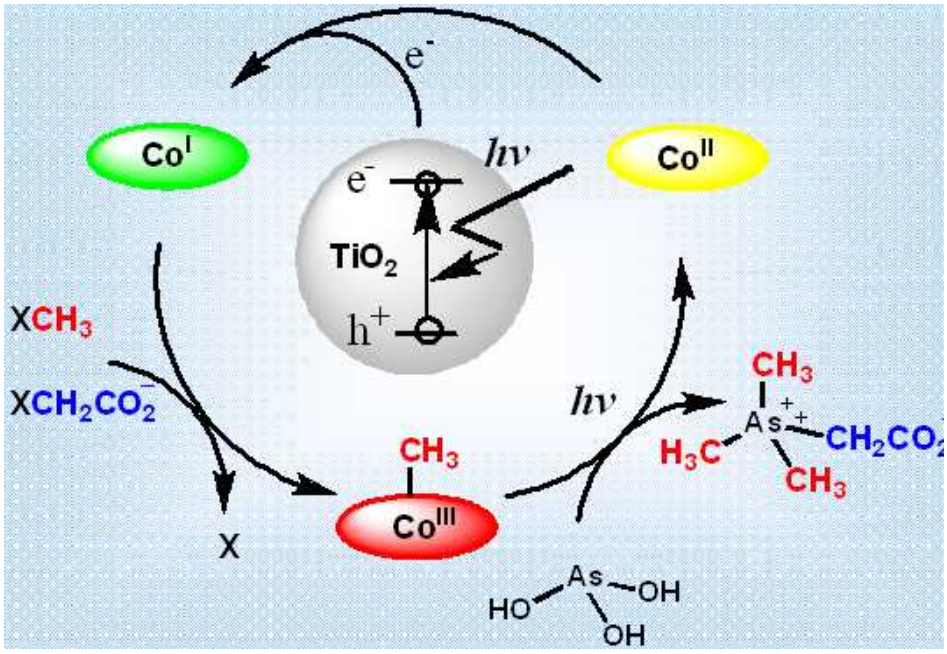


図 1.177. バイオインスパイアード触媒による無機ヒ素から AsB の一段階合成の推定反応経路

5. 酸化チタン光触媒システム

前節での検討により、触媒システムについて、カルボキシメチル基供与体（XCH_2COOH）が存在すれば、無機ヒ素から直接、1 段階で AsB が生成することが示された。この反応中間体として、メチルラジカル（・CH_3）、カルボキシメチルラジカル（・CH_2COOH）が生成している可能性が示唆された。したがって、さらに単純な系で、メチルラジカル（・CH_3）、カルボキシメチルラジカル（・CH_2COOH）を生成させることができれば、ビタミンB_{12}誘導体やアミノ酸が存在しない場合についても、無機ヒ素から AsB が直接、1 段階で合成できる。酸化チタンは光触媒として、光照射により酢酸を分解することが知られている。酢酸の分解物の反応中間体として、メチルラジカル（・CH_3）やカルボキシメチルラジカル（・CH_2COOH）の生成が示唆されている。また、酸化チタンは無機ヒ素の吸着剤としての作用も期待される。したがって、ヒ素の希薄溶液に対しても、酸化チタン表面への無機ヒ素の濃縮効果により、高効率の触媒システムが構築できる可能性がある。このような観点から、酸化チタン光触媒によるヒ素無毒化の触媒システムについて検討を行った。

5.1. 酸化チタンのヒ素化合物に対する吸着特性

諸種のヒ素化合物[iAs(III)：亜ヒ酸、iAs(V)：ヒ酸、MMA：モノメチルアルソン酸、DMA：ジメチルアルシン酸、TMAO：トリメチルアルシンオキシド、AsB：アルセノベタイン、TeMA：テトラメチルアルソニウムイオン］ からなる混合液(金属ヒ素濃度：50ppb)に酸化チタン(10wt％)を添加した後の、各ヒ素化合物イオンの濃度変化を示す（図 1.178）。酸化チタンを添加して、5分後に、亜ヒ酸イオン[iAs(III)]、ヒ酸イオン[iAs(V)]、モノメチルアルソン酸イオン（MMA）、ジメチルアルシン酸イオン（DMA）のピークは消滅した。これに対し、アルセノベタイン（AsB）、トリメチルアルシンオキシド（TMAO）、テトラメチルアルソニウムイオン（TeMA）のピークは存在した。したがって、亜ヒ酸イオン、ヒ酸イオン、モノメチルヒ素イオン、ジメチルヒ素イオンは、酸化チタンに吸着されたのに対し、アルセノベタイン、トリメチルアルシンオキシド、テトラメチルアルソニウムイオンに対する酸化チタンの吸着能は著しく小さいことが明らかである。

ヒ素化合物の化学構造と急性毒性値を示す（図 1.179）。この図から明らかなように、酸化チタンは、毒性の高いヒ素化合物（亜ヒ酸、ヒ酸、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸）に対する吸着能が大きく、毒性の低いヒ素化合物（アルセノベタイン、トリメチルアルシンオキシド）に対する吸着能は小さいことが明らかである。この諸種のヒ素化合物に対する酸化チタンの吸着特性は、反応系中に酢酸が存在する場合についても同様の傾向が認められた。

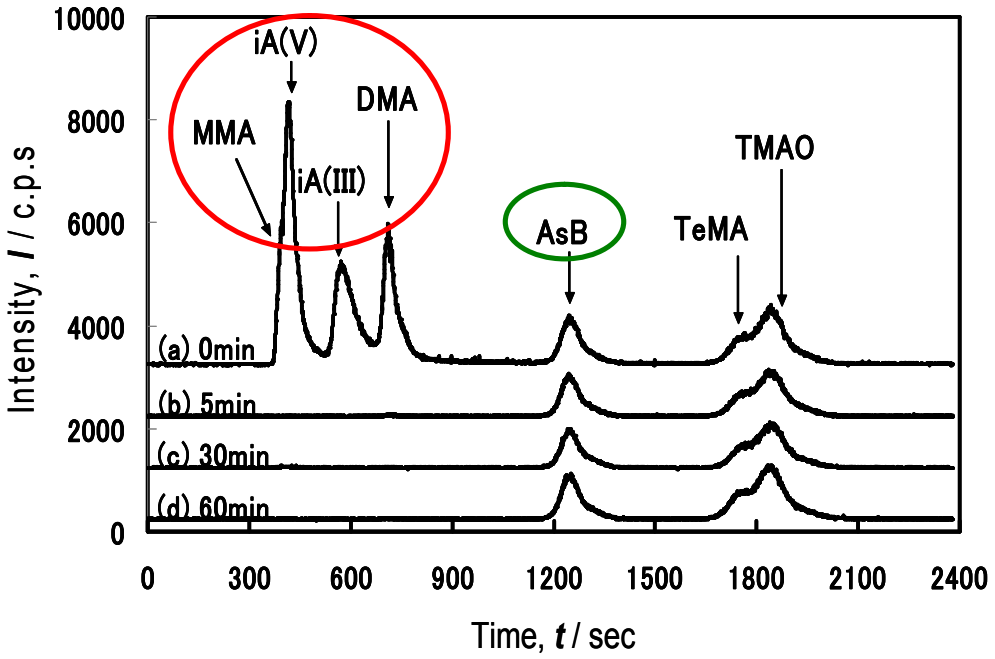


図 1.178. 諸種のヒ素化合物の混合溶液に対する酸化チタンの吸着特性(室温)

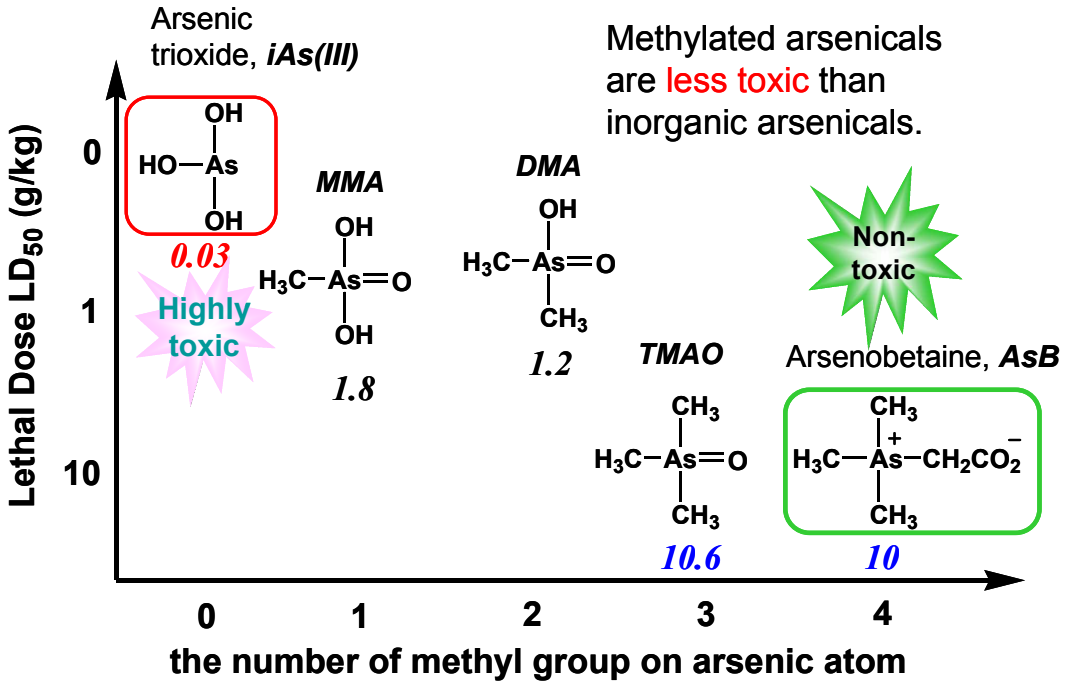


図 1.179. ヒ素化合物の化学構造と急性毒性値（図中の数字は LD_{50} 値を示す）

iAs(Ⅲ)：三酸化二ヒ素、MMA: モノメチルアルソン酸、DMA: ジメチルアルシン酸、TMAO：トリメチルアルシンオキシド、AsB：アルセノベタイン

5.2. ヒ素のメチル化反応

酸化チタン、酢酸存在下、光照射による無機ヒ素[iAs(V)]の無毒化反応の経時変化について示す（図 1.180）。酸化チタンと酢酸を添加すると直に無機ヒ素は酸化チタンに吸着されるため、溶液中には遊離のイオンとしては存在しない[図 1.180（b）]。光照射後に、溶液を HPLC-ICP-MS 法により分析したところ、AsB、TMAO が検出された[図 1.180（c）～（f）]。したがって、酸化チタンに吸着されたiAs(V)は、酢酸存在下、光照射による酸化チタンの光触媒作用によりメチル化、カルボキシメチル化を受けて、AsB とTMAO が生成したことが示唆された。AsB とTMAO は、酸化チタンに対する親和性が小さいため、酸化チタン表面から解離して、溶液中に遊離のイオン種として存在することから、HPLC-ICP-MS により検出されたものと推定される。すなわち、毒性の高い無機ヒ素[iAs(V)]は、酸化チタンに吸着され、光照射により、酢酸存在下、酸化チタンの光触媒的無毒化反応により、毒性の低い、TMAO や AsB に変換されて、酸化チタン表面から脱離するものと推定される。この酸化チタンの反応原料に対する濃縮効果、光触媒による無毒化作用の効果、生成物に対する解離効果を利用することにより、酸化チタンの再利用が容易となり、持続可能なシステムの構築が可能となると期待される。

5.3. 水銀、鉛、錫に対する反応

ヒ素はメチル化されることにより、毒性は低くなることについて説明した（図 1.179）。しかしながら、水銀はメチル水銀の例からもわかるように、メチル化されることにより毒性は増すことが知られている。鉛についても、アルキル鉛の毒性は、無機鉛よりも高いことが知られている。錫についても同様に、メチル体は毒性が高いことが報告されている。したがって、ヒ素化合物を含有する廃棄物に水銀、鉛、錫が共存する場合、本無毒化処理システムにより、メチル化、アルキル化がこれらの金属についても進行するかどうかを確認することは、極めて重要である。ヒ素がメチル化される条件で、水銀、鉛、錫が存在した場合にメチル化を受けるかどうかについて、光触媒システムで検討した結果を示す（図 1.181～図 1.183）。水銀、鉛、錫のいずれについても、メチル化体の生成は、高速液体クロマトグラフ法－誘導結合プラズマ質量分析法（HPLC－ICP－MS）、ガスクロマトグラフ－電子捕獲型検出器（GC－ECD法）により確認されなかったことから、検討した条件については、これらのメチル化反応は進行しないと結論付けられた。

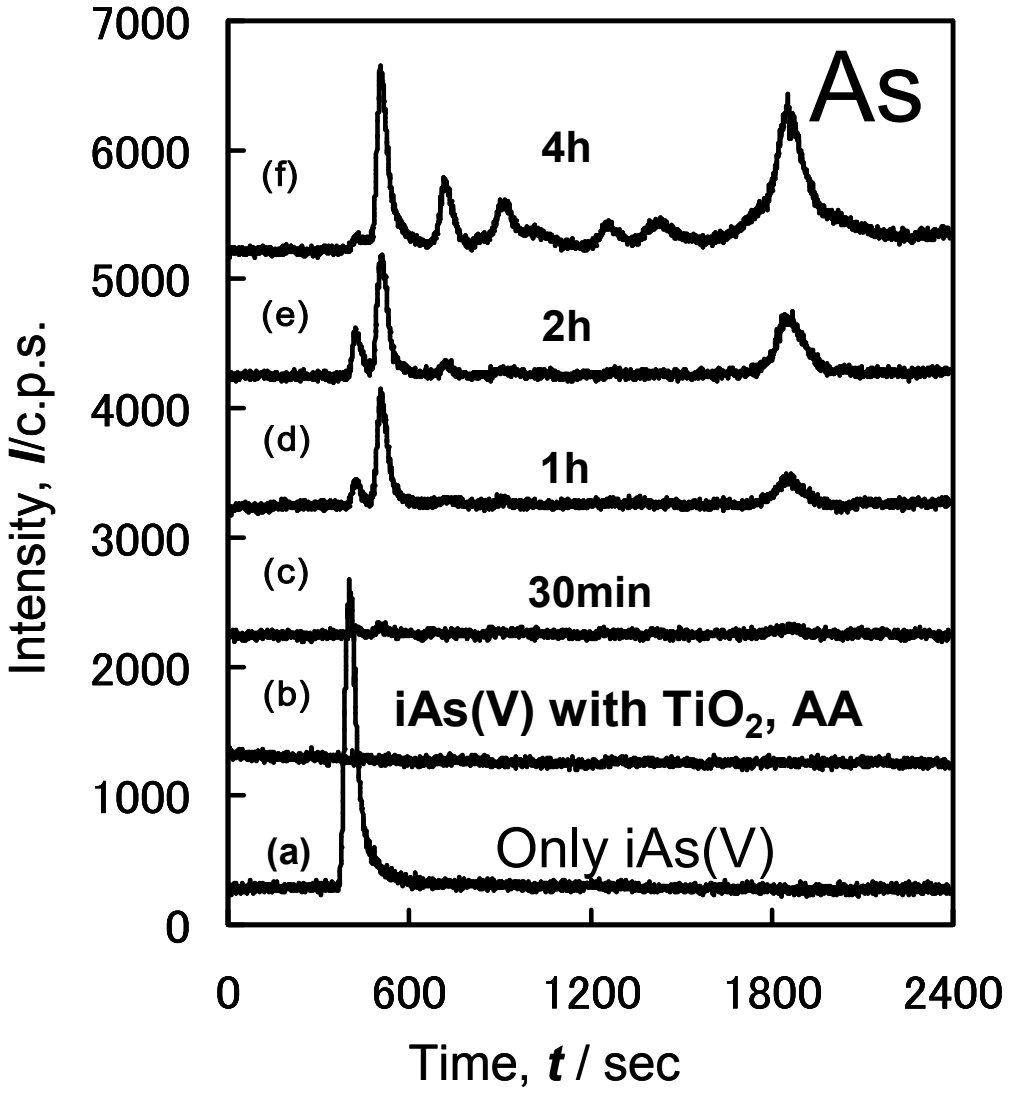


図 1. 180.　酸化チタン、酢酸存在下、光照射による無機ヒ素[iAs(V)]の反応の経時変化を示す HPLC-ICP-MS クロマトグラム. (a) iAs(V)、(b) iAs(V)、TiO_2、酢酸(AA)添加直後、(c) 30 分後、(d) 1 時間後、(e) 2 時間後、(f) 4 時間後

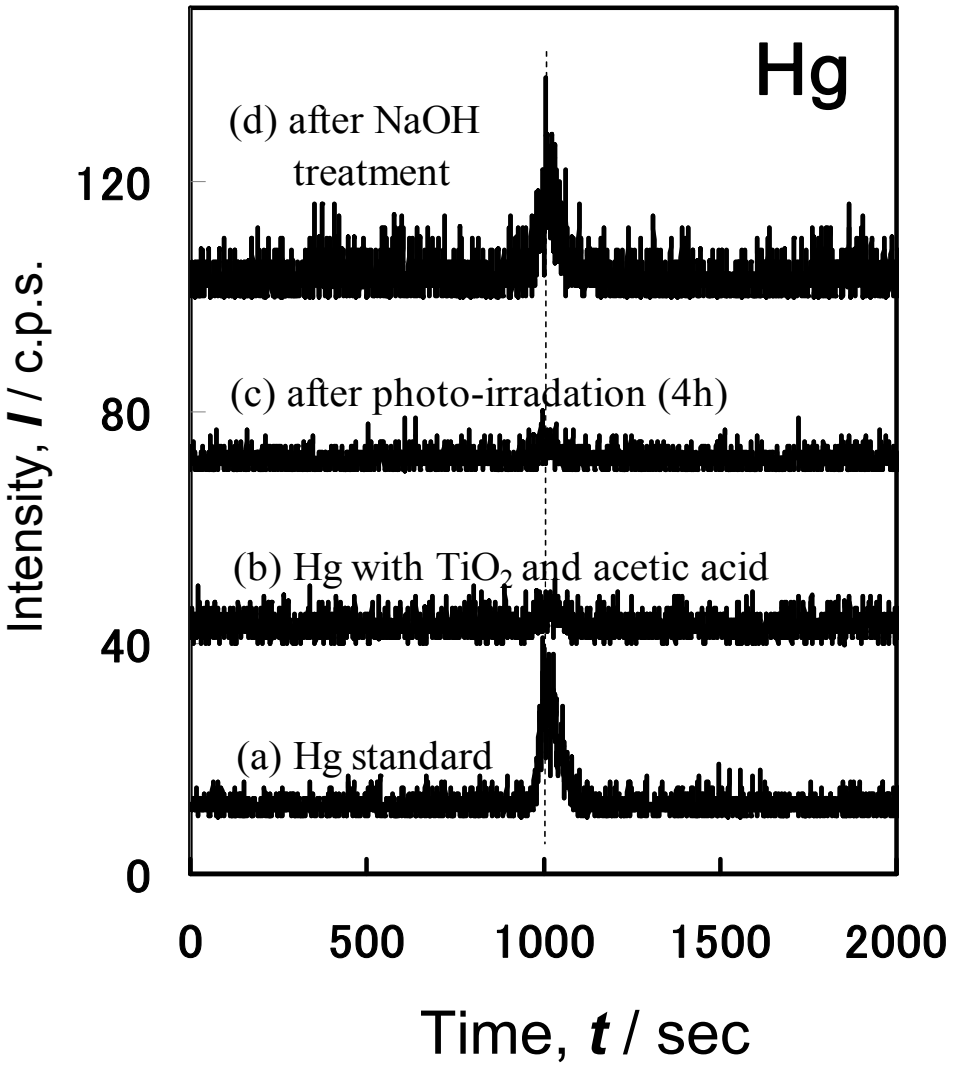


図 1. 181.　酸化チタン、酢酸存在下、光照射による水銀イオンの反応の経時変化を示す HPLC-ICP-MS クロマトグラム. (a) 水銀標準溶液、(b) 水銀、TiO_2、酢酸添加直後、(c) 光照射 4 時間後、(d) アルカリ処理後

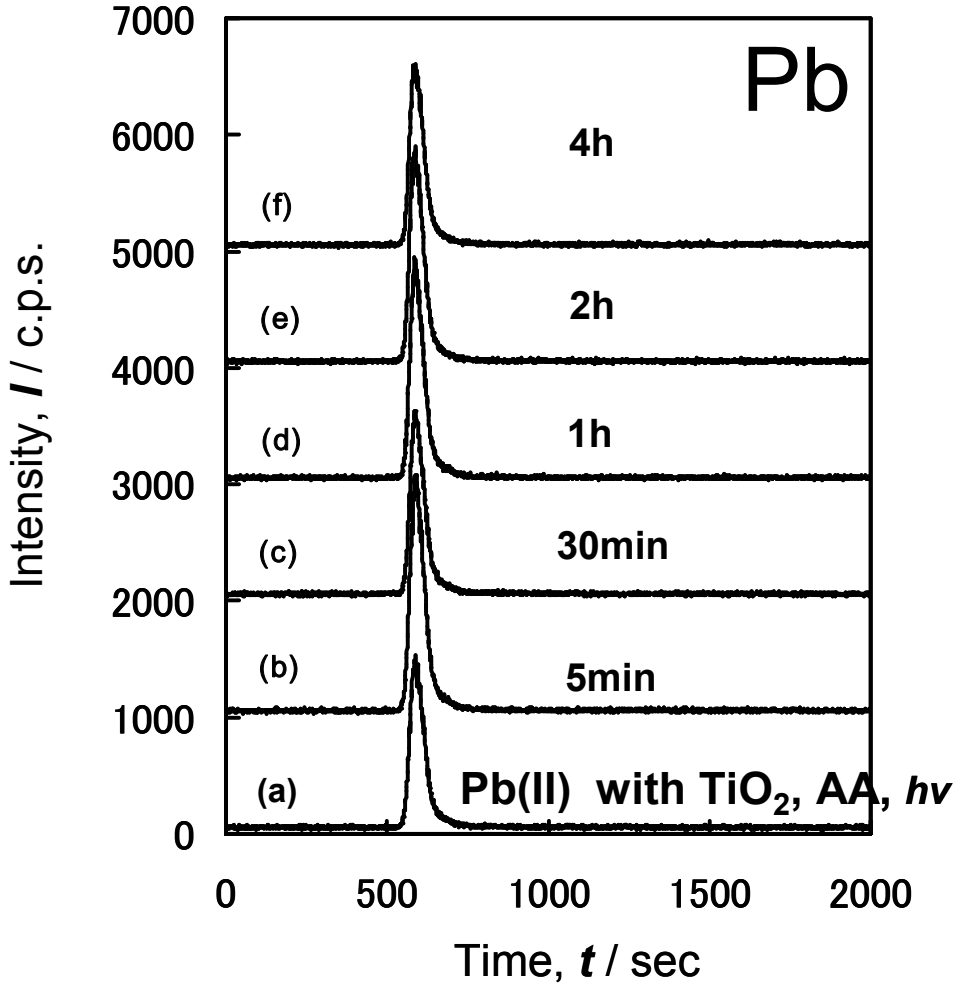


図 1.182.　酸化チタン、酢酸存在下、光照射による鉛イオンの反応の経時変化を示す HPLC-ICP-MS クロマトグラム.(a) 鉛、TiO_2、酢酸存在下、(b)光照射 5 分後、(c) 光照射 30 分後、(d)光照射 1 時間後、(e)光照射2時間後、(f)光照射4時間後

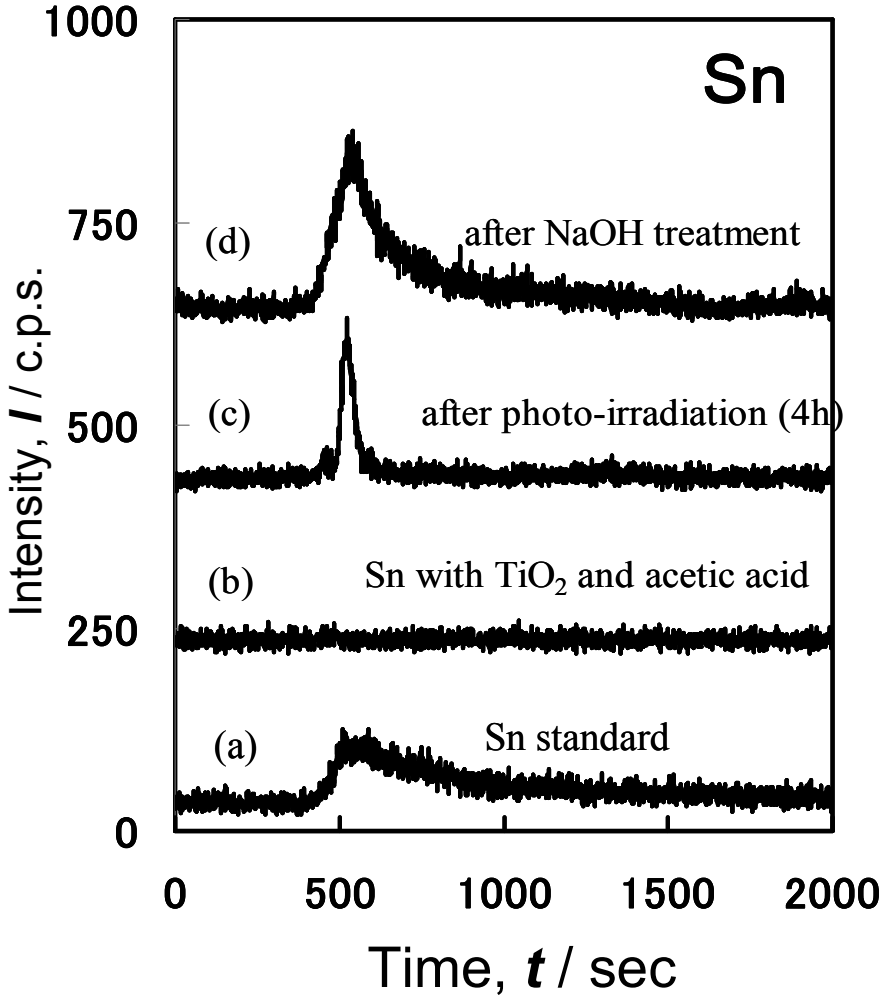


図 1.183. 酸化チタン、酢酸存在下、光照射による錫イオンの反応の経時変化を示す HPLC-ICP-MS クロマトグラム. (a) 錫標準溶液、(b) 錫イオン、TiO_2、酢酸存在下、(c) 光照射 4 時間後、(d) アルカリ処理後

5.4. ヒ素汚染水への適用

前記検討結果により、酸化チタン光触媒によるヒ素の無毒化のメカニズムとしては、以下が提案される。無機ヒ素[iAs(III)、iAs(V)]、モノメチルヒ素(MMA)、ジメチルヒ素(DMA)は、As-OH 基と、酸化チタンの表面に存在する Ti-OH 基との間の静電相互作用あるいは水素結合によって吸着される[図 1.184 の(i)]。メチル基(CH_3)とカルボキシメチル基(CH_2COOH)の供与体として機能する酢酸は、酸化チタンの光触媒作用によって、酸化分解される。この際、反応中間体として、メチルラジカル(・CH_3)とカルボキシメチルラジカル(・CH_2COOH)が発生し[図 1.184 の(ii)]、ヒ素に結合したヒドロキシ

基(OH)との置換反応により、As−CH_3結合とAs−CH_2COOH結合が生成し[図 1.184 の(iii)]、AsB あるいは TMAO が生成する。生成した AsB と TMAO には、As−OH 基が存在しないため、酸化チタン表面の Ti−OH 基との間の静電相互作用あるいは水素結合を形成することができずに、酸化チタンの表面から解離して、溶液中に遊離したイオンとして存在する[図 1.184 の(iv)]。酸化チタンは、吸着剤、触媒としてリサイクルされ、次の反応に再利用される。

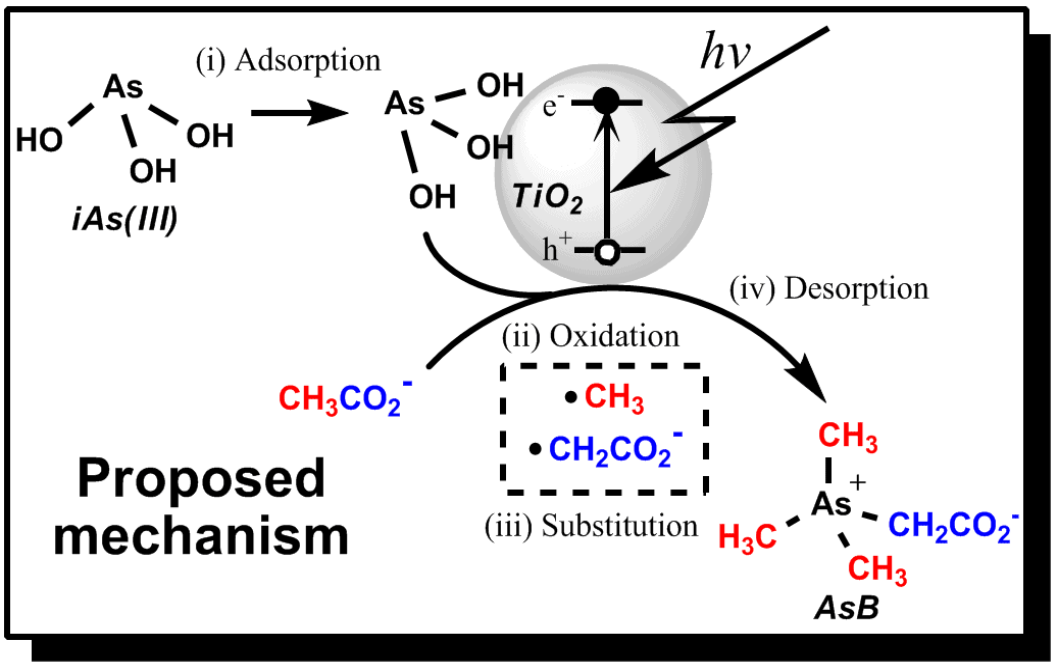


図 1.184. 酸化チタン光触媒によるヒ素の無毒化の推定メカニズム

このヒ素吸着剤として機能する酸化チタン光触媒を用いたヒ素の無毒化処理システムの応用例としては、ヒ素汚染地下水や非鉄金属鉱山、特に銅精錬所から発生する大量のヒ素汚染に対する処理が挙げられる。世界保健機関(WHO)のガイドラインによる飲料水のヒ素の許容濃度は、0.01mg/L、日本の環境基準についても 0.01mg/L と規定されている。酸化チタンは、無機ヒ素の選択的吸着剤として機能するため、低濃度のヒ素を含む大量の汚染水から、無機ヒ素を濃縮することが可能である(図 1.185)。酸化チタン表面に濃縮された無機ヒ素は、汚染水から分離することにより、ヒ素を含まない水が提供される。一方、無機ヒ素を吸着した酸化チタンは、酢酸存在下、光照射することにより、吸着した無機ヒ素を無毒の AsB、TMAO に変換して、これらを溶液中に遊離イオンとして放出する。酸化チタンは、再び無機ヒ素を含む汚染水の処理に再利用される。無機ヒ素の簡易モニターとしては、後述するが、モリブデンブルー法により、オンサイトで行うことができる(図 1.185 の写真)。無機ヒ素[iAs(V)]に対しては、青の発色を示すが、AsB や TMAO に対しては、全く発色を示さない。AsB、TMAO を含む処理水の中に、無機ヒ素[iAs(V)]が存在するかどうかを、発色により容易にオンサイトで検出することができる。

この無毒化システムは、コスト的に極めて有利である。酸化チタンは、再生可能な吸着剤、触媒として機能するため、材料費としては、初期費用のみで済み、ランニングコストは発生しない。材料費

のランニングコストとしては、酢酸のみである。設備投資については、既存の紫外線ランプを用いることにより装置の製作が可能である。ランニングコストのエネルギー費については、光照射に要する電気エネルギーは、自然の太陽光エネルギーで置き換えることができれば、低コスト化が可能である。太陽光について、反応に必要な波長で光照射強度が確保できれば、紫外線ランプも不要となると期待される。

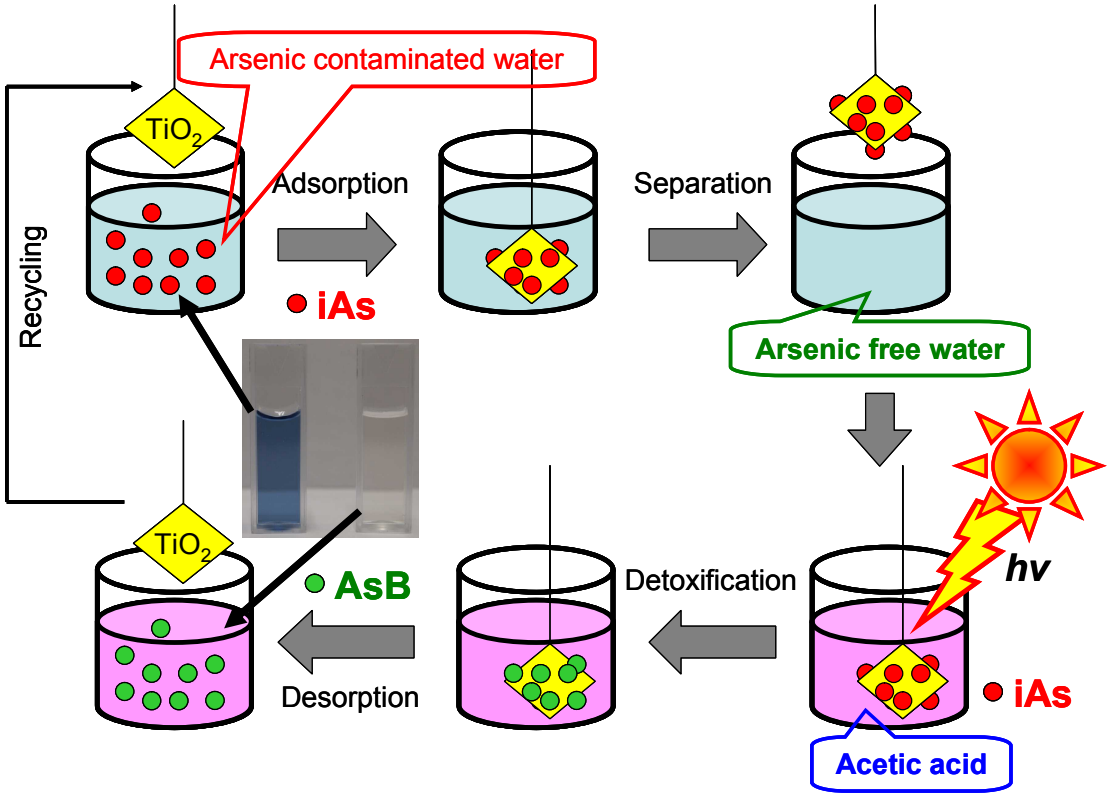


図 1.185. 酸化チタン光触媒によるヒ素汚染水の処理

5.5. カコジル酸の無毒化処理

前節については、酸化チタン光触媒を用いた無機ヒ素の無毒化処理について報告した。環境汚染物質としてのヒ素化合物は、無機ヒ素化合物にとどまらず、有機ヒ素についても報告されている。米国環境保護庁(EPA)により、環境汚染物質として提示されている有機ヒ素化合物に、カコジル酸(ジメチルヒ素化合物)がある(図 1.186)。

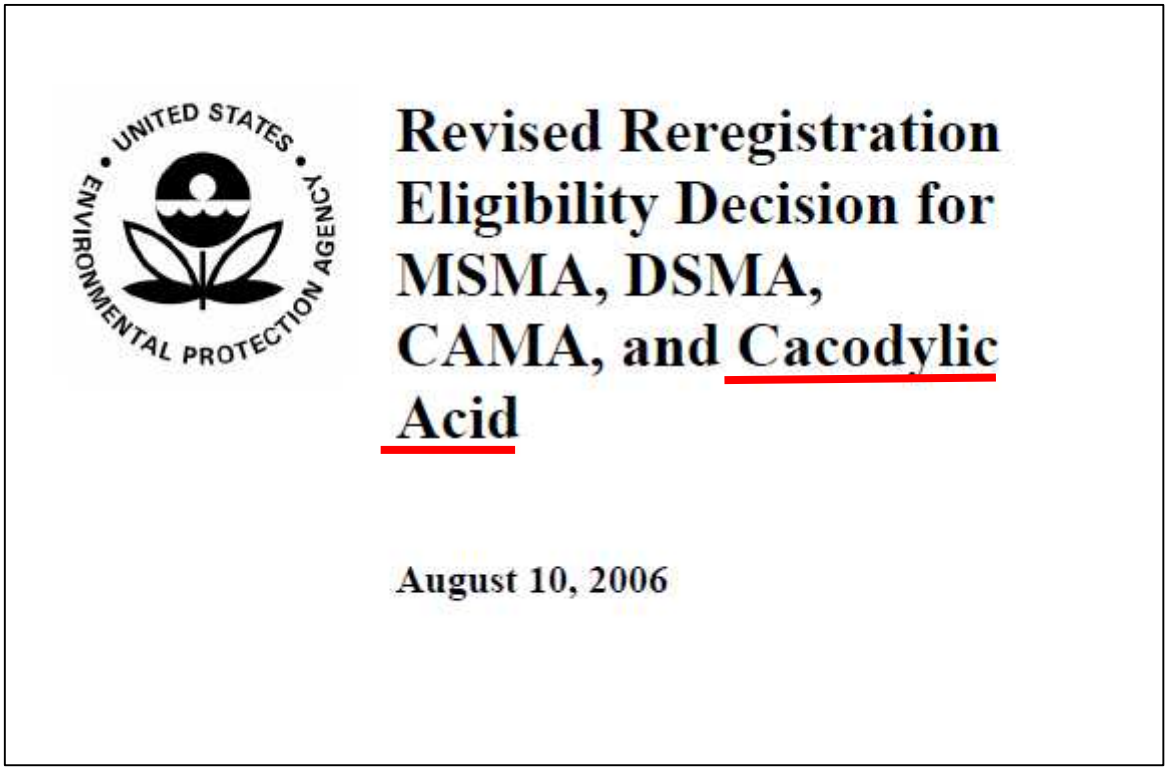


図 1.186. 米国環境保護庁(EPA)によるカコジル酸に関する報告書

カコジル酸は、米国で 1960 年以前から除草剤として綿花畑、果樹園、街路樹、ゴルフ場で使用されてきた。資料から推定されるカコジル酸の使用量は、少なくとも 2000 トンと見積もられる。カコジル酸(ジメチルアルシン酸:DMA)の急性毒性値は、無機ヒ素よりも大きく、毒性は低いが、発がん性物質に指定されている。このため、EPA は、カコジル酸で汚染された農地、ゴルフ場の土壌からカコジル酸が溶出し、飲料水の水源が汚染されるリスクを指摘している。また、ベトナム戦争で使用された枯葉剤の中にも、カコジル酸が使用された。カコジル酸は、Agent Blue のコードネームで呼ばれ、1,252,541 ガロン使用されたとの報告が残っている。

従来のヒ素処理技術については、無機ヒ素に関しては、鉄沈殿法、吸着剤、フィルター処理等が提案されてきたが、有機ヒ素に対しては有効な処理法が存在しないという問題点があった。

そこで、酸化チタン光触媒を用いた有機ヒ素(カコジル酸)の無毒化処理について検討した。酸化チタンは、カコジル酸(DMA)に対しても吸着能が高く(図 1.178)、無機ヒ素に対して認められた吸着濃縮効果と光触媒作用が発現され、アルセノベタイン(AsB)に変換されることが期待される。

カコジル酸の無毒化処理に対して用いられた試薬類を示す(図 1.187)。カコジル酸の無毒化反応に用いられた光照射装置、反応に用いた石英セル(図 1.188)と実際に光照射を行っている様子の写真を示す(図 1.189)。反応生成物の定性定量分析に用いた HPLC-ICP-MS 装置(図 1.190)、クロマトグラム(図 1.191)を示す。

図 1.187. カコジル酸（ジメチルアルシン酸）、酸化チタン、酢酸水溶液（1mol/L）

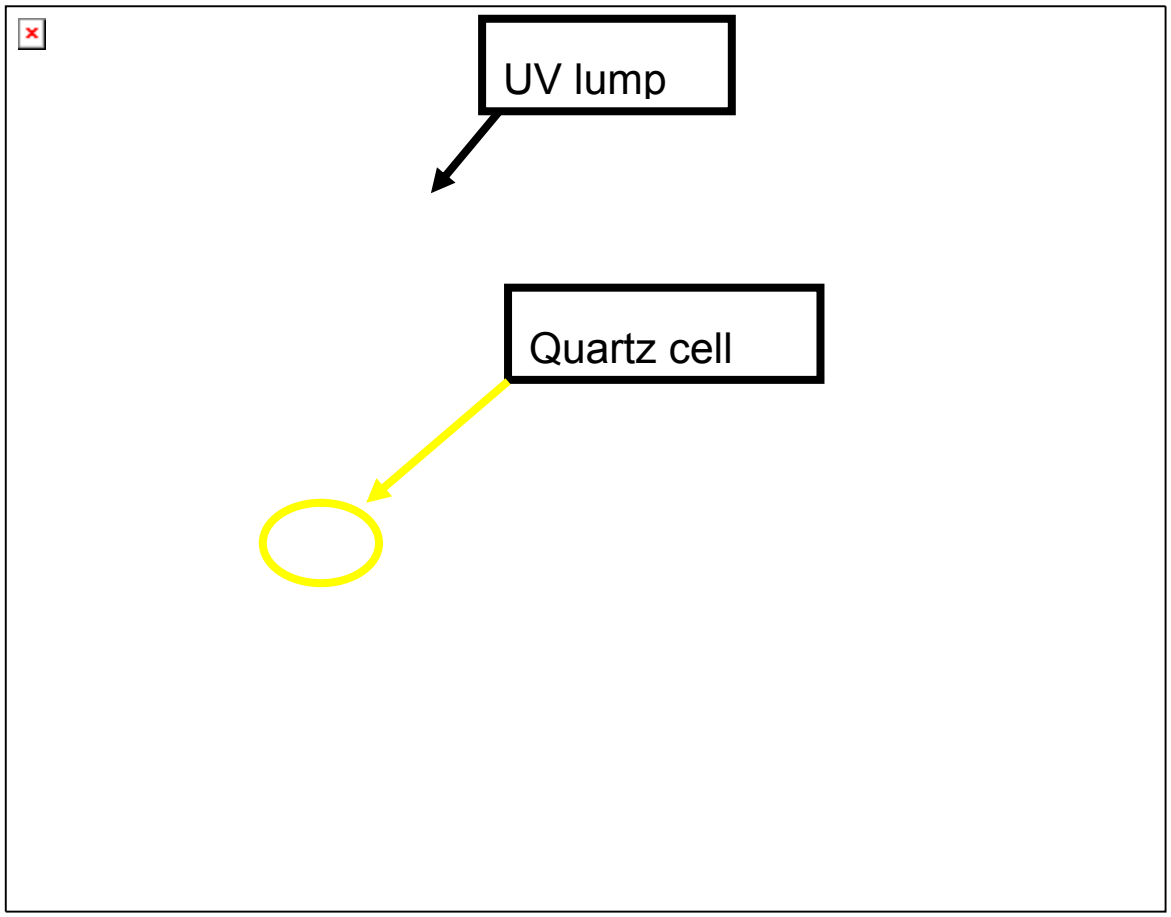


図 1.188. 酸化チタン光触媒によるカコジル酸（ジメチルアルシン酸）の無毒化に用いた光照射装置

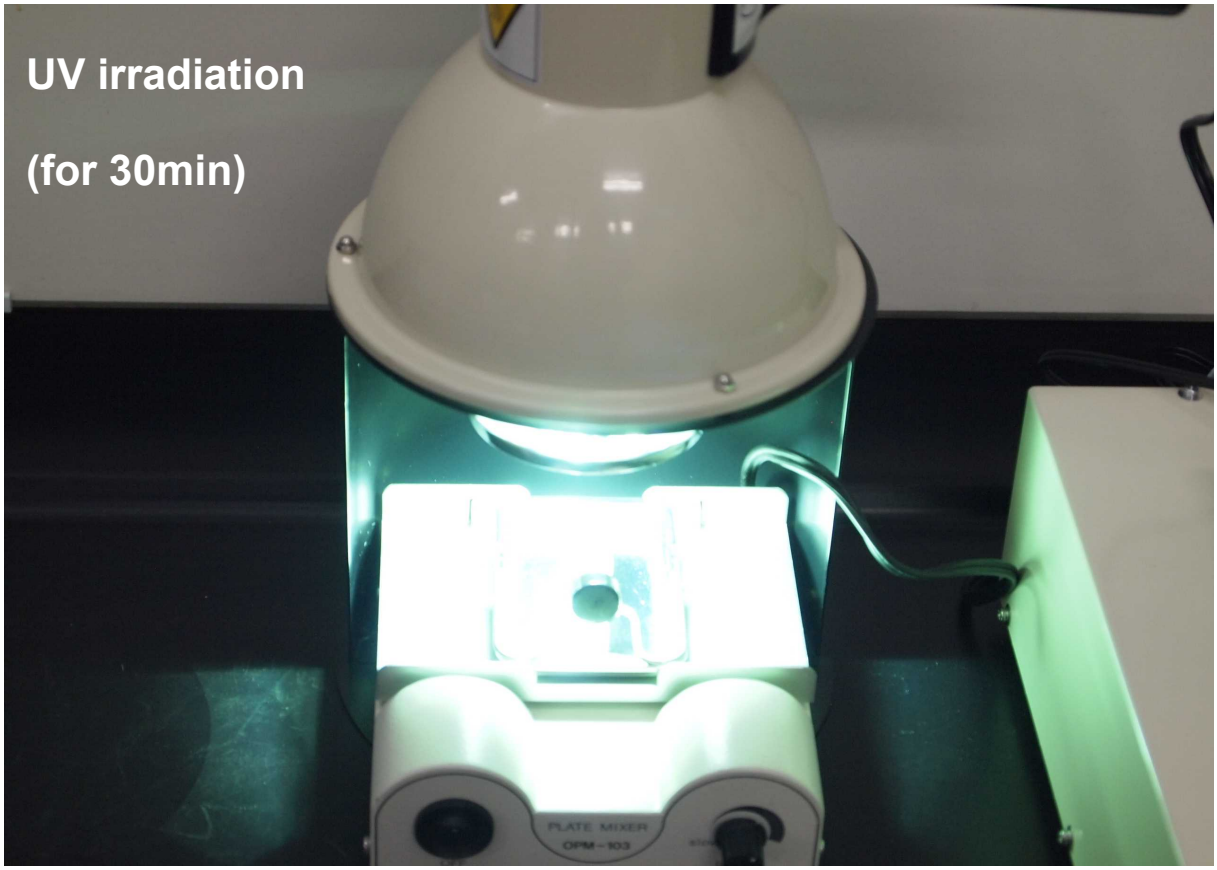


図 1.189. 光照射装置を用いた酸化チタン光触媒によるカコジル酸（ジメチルアルシン酸）の無毒化

図 1.190. 酸化チタン光触媒によるカコジル酸（ジメチルアルシン酸）の無毒化反応の生成物の分析に用いた HPLC-ICP-MS 装置

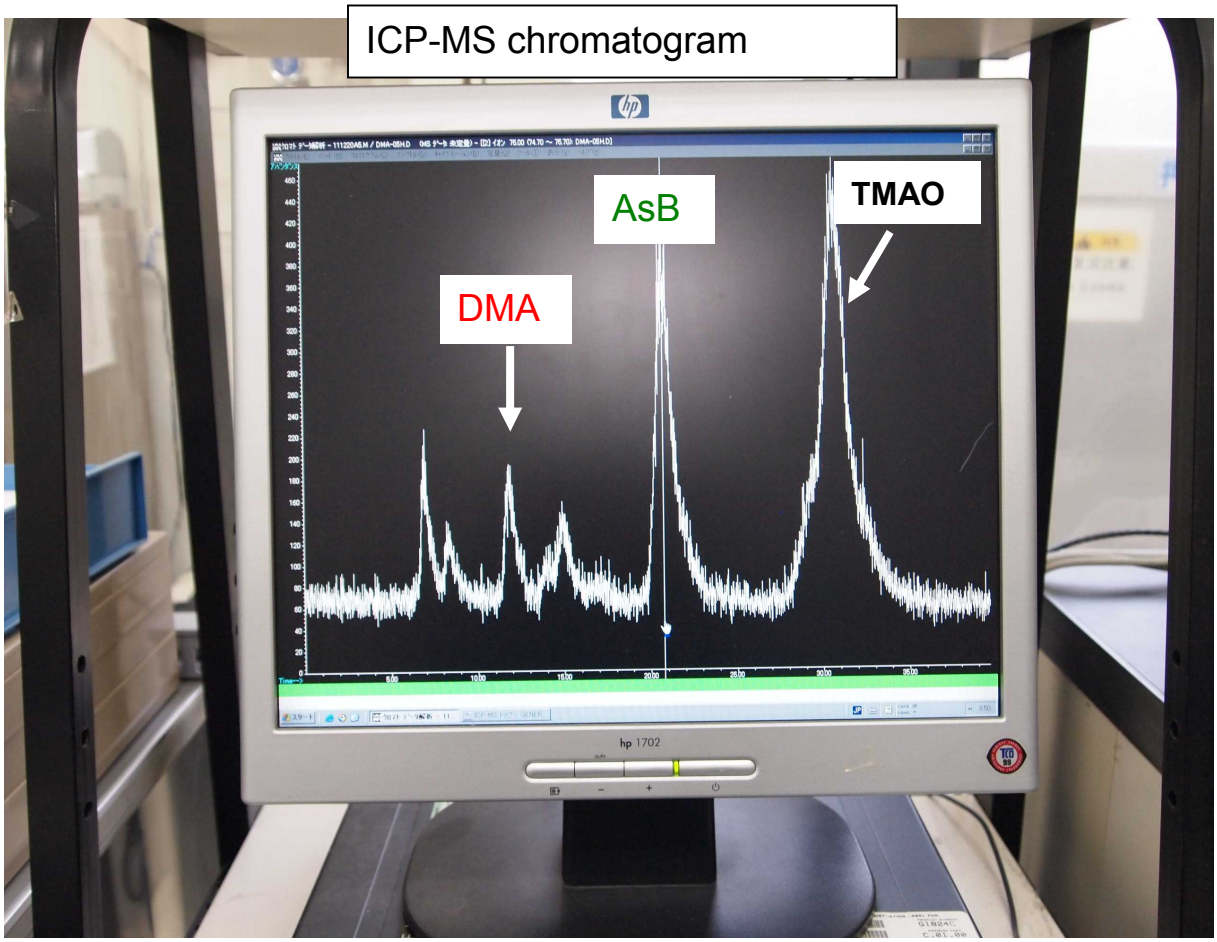


図 1.191. 酸化チタン光触媒によるカコジル酸（ジメチルアルシン酸）の無毒化反応の生成物の分析結果（モニターに映し出された HPLC-ICP-MS 装置によるマスクロマトグラムの写真）.
カコジル酸（DMA）がアルセノベタイン（AsB）とトリメチルアルシンオキシド（TMAO）に変化.

以上の結果より、カコジル酸は、酸化チタン光触媒と酢酸の存在下、光照射（高圧水銀ランプ）により、アルセノベタイン（AsB）とトリメチルアルシンオキシド（TMAO）に変換された。カコジル酸の代わりに、三価の無機ヒ素[iAs(III)]、モノメチルアルソン酸（MMA）を用いた場合についても、AsB に変換されることが明らかになった。酸化チタンと酢酸という安価な市販の試薬を用いて、紫外線ランプを用いた単純な装置によって、無機ヒ素化合物だけでなく有機ヒ素化合物も無毒化できるヒ素無毒化処理システムを開発することに成功した(図 1.192)。

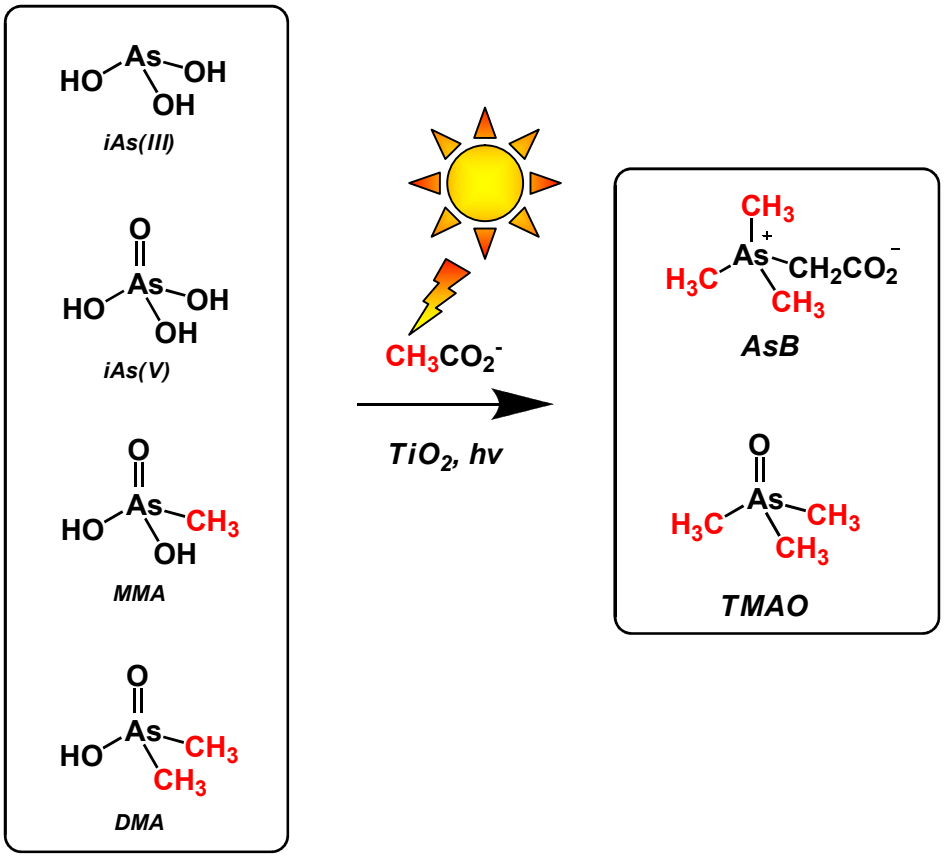


図 1.192. 様々なヒ素化合物に対する酸化チタン光触媒を用いたヒ素無毒化処理システム

5.6. スケールアップ実証試験

酸化チタン光触媒を用いたヒ素の無毒化処理システムは、酸化チタン、酢酸という市販の安価な試薬を用いて、紫外線ランプを有する簡便な反応装置があれば、実証試験が可能である。

市販の紫外線ランプを用いた簡便なスケールアップ実証試験機を設計、作製した(図 1.193)。

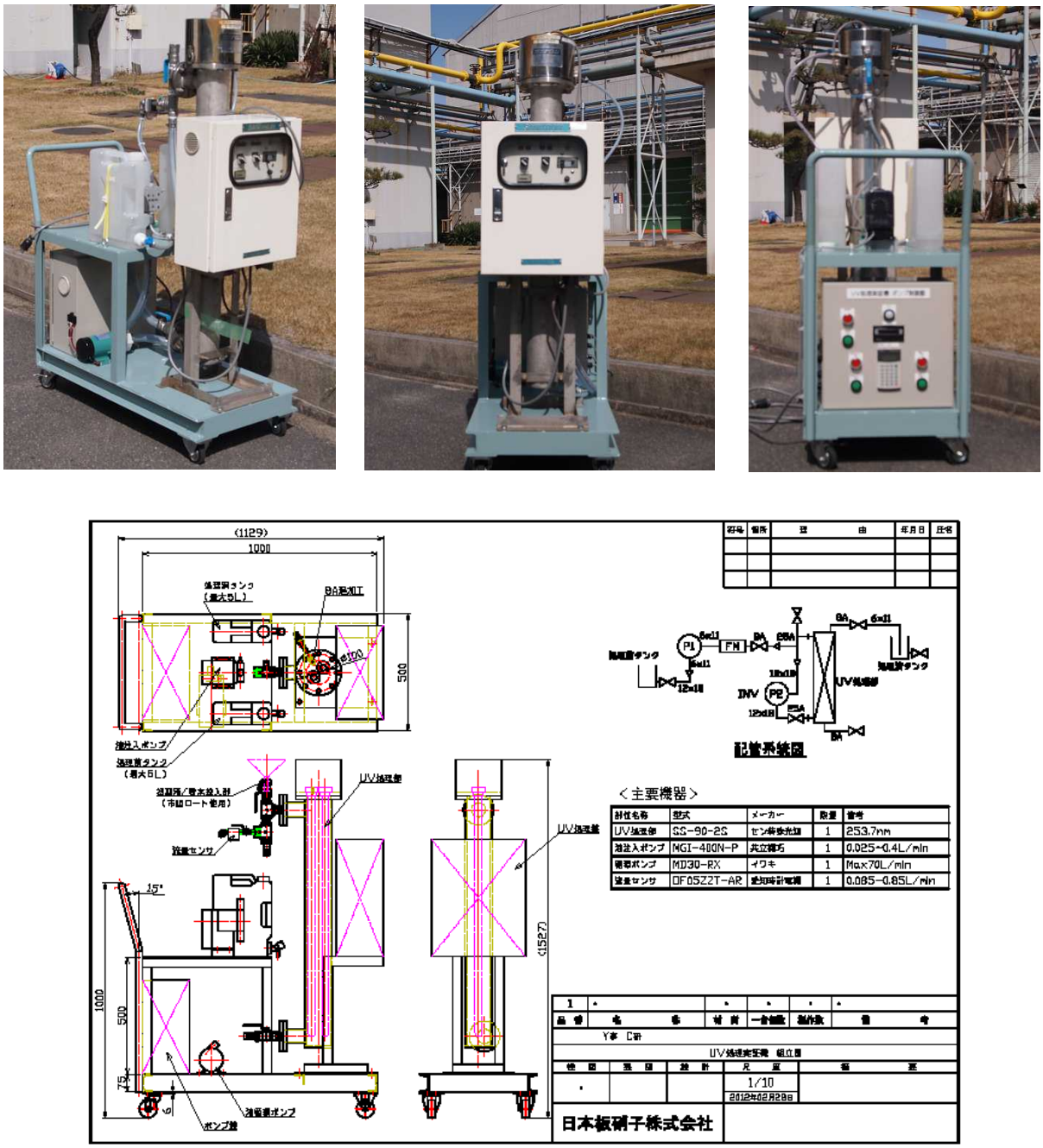


図 1.193. 酸化チタン光触媒を用いたヒ素無毒化処理システムのスケールアップ実証試験機

6. ヒ素無毒化処理の応用

6.1. ヒ素汚染水の無機ヒ素の無毒化処理

2009 年1月にスイスで開催された世界経済フォーラム「ダボス会議」の年次報告書で、「人類が今まで通り水資源を浪費、過剰に使い続けると世界は 20 年以内に水資源破産の苦境に立ち、経済が崩壊する」と警告された。実際に農業用水や飲料水源である世界各地の 70 以上の主要河川が枯渇危機に瀕している。また、水資源の不足に伴い、世界の穀物生産の 30%に相当する食糧を作る耕作面積が縮小すると予想されている(Samans & Waughray, 2009)。環境分野では、地球温暖化問題が大きくクローズアップされているが、実は、人類最大の環境問題は今後迎える「水不足」である。水問題の中でも無機ヒ素による汚染が地球規模で深刻である。自然環境中に存在する無機ヒ素により汚染された地下水を長期間摂取することが原因で、特に東南アジア、南米で、ヒ素中毒患者が増大している。

バイオミメティック、バイオインスパーアード触媒、酸化チタン光触媒によるヒ素の無毒化システムは、この地球規模のヒ素汚染水の処理について、根本的な解決法を提示することが可能である。ヒ素汚染水からヒ素を除去し、ヒ素に汚染されていない飲料水を得る方法としては、従来からいくつかの処理法が提案されている。例えば、蒸発法、フィルター法、吸着剤による吸着法、共沈法、逆浸透膜などによる膜処理法である。これらの方法は、水中の無機ヒ素を除去、あるいは、移動することにより、ヒ素のない水を得ることが可能であるが、処理した後の無機ヒ素の安全で効率的な処理法が存在しない。蒸発法では、蒸発後に得られる残渣中に高濃度の無機ヒ素が存在する。フィルター法や吸着剤については、充填剤や吸着剤に高濃度の無機ヒ素が残存する。これらの逆洗液には、高濃度の無機ヒ素が含まれる。鉄などの共沈法では、無機ヒ素を含有する大量の廃棄物が発生する。逆浸透膜(RO 膜)による処理については、高濃度の無機ヒ素を含む濃縮液が発生し、その適切な処理法が存在しない。このような従来法によって発生する高濃度の無機ヒ素含有物は、適切な管理がなされない場合、2 次汚染を引き起こし、ヒ素汚染水を発生する。

このような、2 次汚染を防止するためにも、無機ヒ素は、無毒化処理法により、安全に処理することが望まれる(図 1.194)。バイオミメティック、バイオインスパーアード触媒によるヒ素無毒化処理技術を用いた具体的な処理プロセスについて説明する(図 1.195)。WHO 飲料水水質ガイドライン(1996 年)で設定されたヒ素濃度の値である0.01mg As/Lを越えたヒ素汚染水を従来法で処理し(a)、ヒ素濃度が 0.01mg As/L の飲料水を得る(b)。除去された無機ヒ素は、無毒化処理(c)され、無毒のアルセノベタインに変換される(d)。変換されたアルセノベタインは、法規制にしたがって、保管、あるいは、廃棄処理される。次に、無毒化処理について詳しく述べる。除去された無機ヒ素が高濃度、あるいは、固体の場合には、直接処理される。一方、低濃度の場合については、濃縮プロセスにより、高濃度の無機ヒ素溶液を得る(f)。次にビタミンB_{12}、アミノ酸、ヨード酢酸を用いたバイオミメティック法でアルセノベタインに変換される(g)。クロマトグラフ法により目的生成物であるアルセノベタインとB_{12}、アミノ酸を分離する(g)。

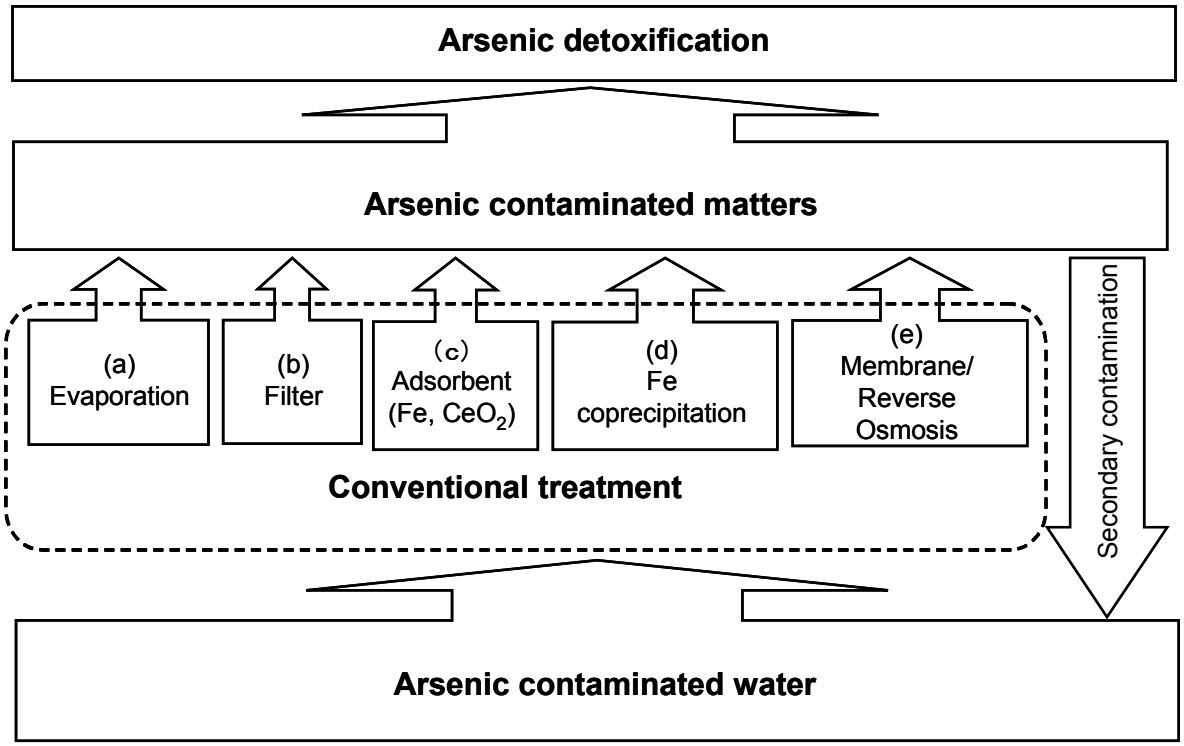


図 1.194. 従来法とヒ素無毒化処理法の組み合わせによるヒ素汚染水の処理プロセス.

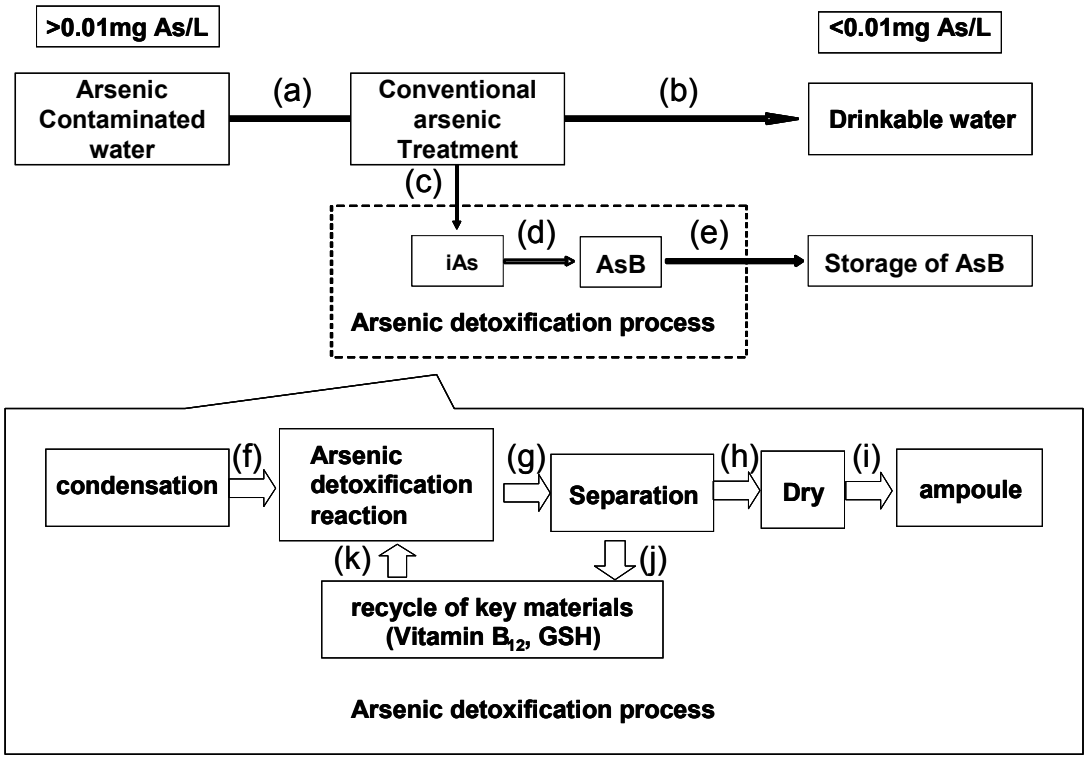


図 1.195. ヒ素無毒化処理技術を用いたヒ素汚染水の処理プロセス

アルセノベタインは、濃縮乾固し(h)、容器に入れて保存する(i)。分離したビタミンB_{12}とアミノ酸は、

再生処理により(j)、次の無毒化反応に再利用する(k)。アルセノベタインは、容器に入れて隔離保存することにより、2次汚染のリスクがなくなる。このプロセスにより、持続可能なヒ素汚染水の処理が可能となる。

実際に、WHO ガイドラインの値の 20 倍の無機ヒ素(0.2mg As/L)を含有するヒ素汚染地下水(図 1.196)について、バイオミメティック法で無毒化処理した。自然環境中では、無機ヒ素は、五価種(ヒ酸)として存在した(図 1.196)。このヒ素汚染地下水を蒸留法で精製し、生じた残渣をバイオミメティック系で無毒化処理してアルセノベタインに変換することに成功した(図 1.197)。現在、WHO ガイドラインを越える 30 μg As/L に換算すると 10m^3/day の水量に相当するヒ酸を無毒化処理することに成功している(図 1.197)。

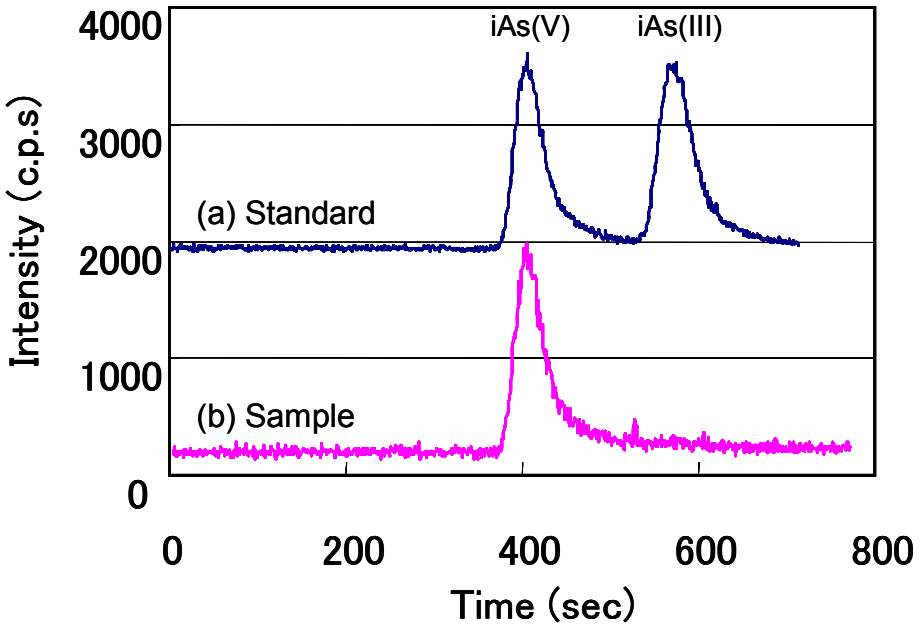


図 1.196. 高速液体クロマトグラフ法－誘導結合プラズマ質量分析法(HPLC-ICP-MS)によるマスクロマトグラム

(a) Standard splution of iAs(III) and iAs(V)

(b) arsenic contaminated ground water

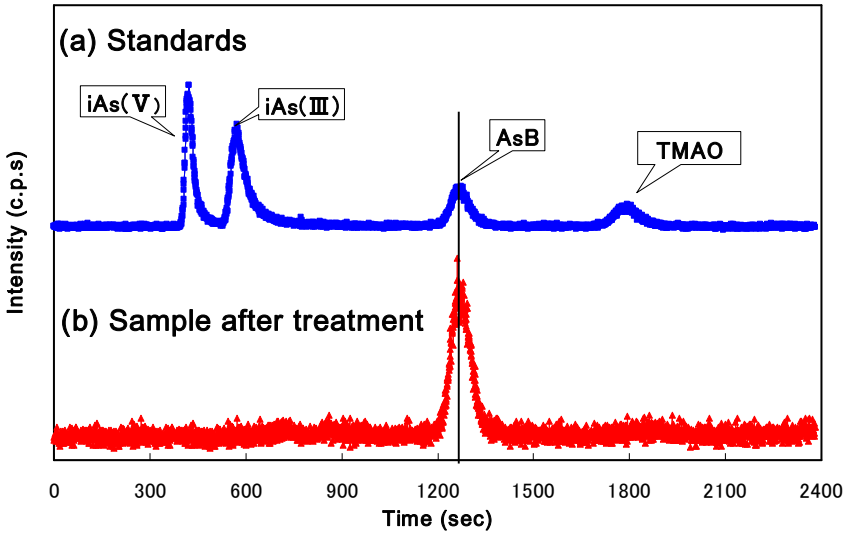


図 1.197. HPLC-ICP-MS 法によるマスクロマトグラムクロマトグラム

(a) standard solution of iAs(III), iAs(V), MMA(V), DMA(V), AsB, TeMA and TMAO

(b) arsenic contaminated ground water

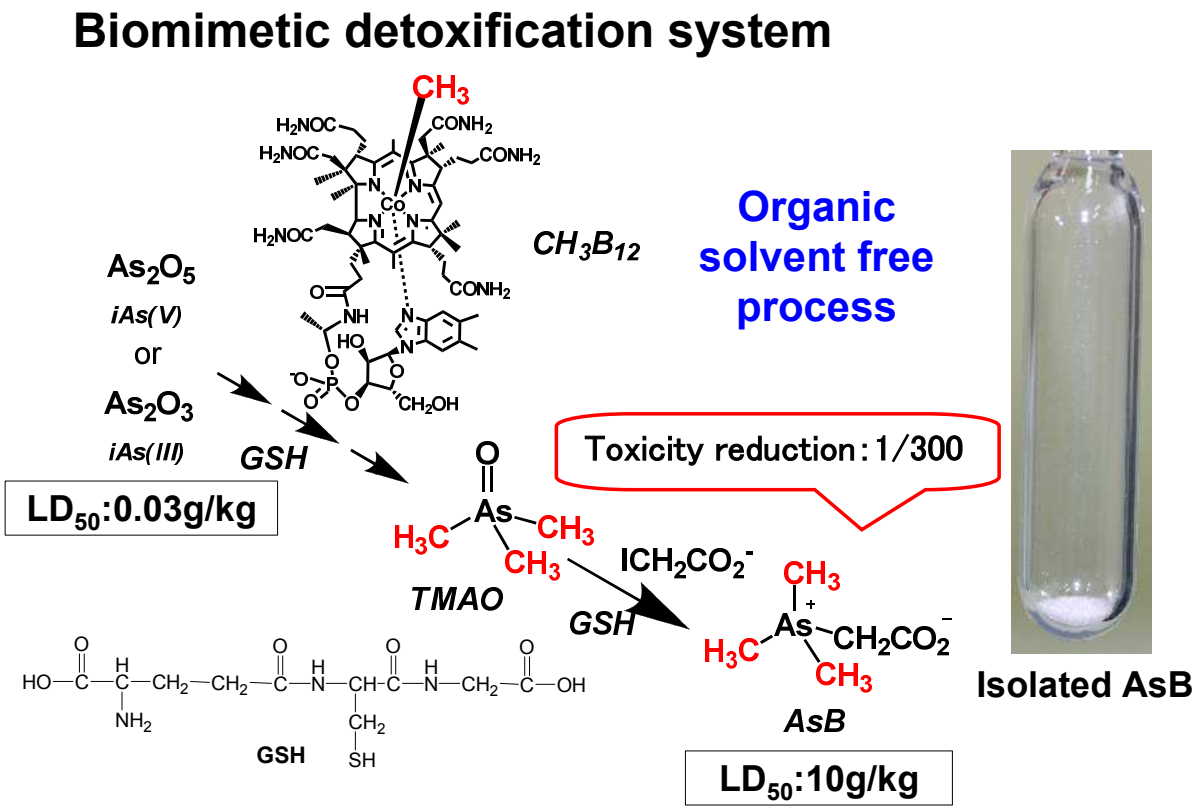


図 1. 198. 無機ヒ素[iAs(V)]から合成、単離されたアルセノベタイン(写真:アンプル封入された AsB)

ヒ素の処理について従来法と無毒化処理法を比較した(表 1.6)。無毒化処理技術以外の処理法については、処理前後でヒ素の化学形態は変わらず、毒性の高い無機ヒ素のままであり、2 次汚染が懸念される。無毒化処理法については、三価、五価の無機ヒ素の両方に対して適用可能である。一方、活性アルミナ、二酸化マンガン、凝集沈殿法などの処理法については、三価の無機ヒ素には適用できず、酸化剤で、三価の無機ヒ素を五価に変換する必要がある。廃棄物の処理スペースについては、無毒化処理法は、アルセノベタインを単離することにより、ヒ素含有廃棄物としての体積を最小にすることができる(図 1.198 の写真)。一方、吸着法、凝集沈殿法については、ヒ素に対して数十倍から数百倍以上の吸着剤、凝集沈殿剤が必要である。したがって、無機ヒ素を含有するこれらの処理剤は、もとの無機ヒ素よりも数百倍以上も廃棄物の量が増えることになる。ヒ素無毒化処理技術は、水処理分野について単独で用いることも可能であり、また、従来技術との組み合わせについても用いることが可能である。

表 1.6. 従来処理法とヒ素無毒化処理法の比較

Method	Property		
	Detoxification capability	Space needed for waste storage	Note
Arsenic detoxification	Yes	Minimal	Applicable for iAs(III) and iAs(V)
Adsorbent	No	Large	Interfering substance: Phosphate
Filter	No	Med-large	Oxidant needed for iAs(III)
Reverse osmosis membrane	No	Medium	Fouling substance
Co-precipitation	No	Large	Oxidant needed for iAs(III)

バイオミメティックシステムとバイオインスパイアード触媒システムについては、ヒ素化合物の固体あるいは高濃度のヒ素を含む溶液について、効率的な処理が可能である。蒸留法によって生成したヒ素化合物の固体残渣[図 1.194(a)]、フィルター、吸着剤、鉄共沈法、膜処理によって生成するヒ素濃縮液[図 1.194(b)～(e)]が例示される。一方、酸化チタン光触媒システムについては、酸化チタン自体に無機ヒ素に対する吸着能があるため、低濃度のヒ素含有する大量の水に対して適応できる。

6.3. ヒ素遺棄化学兵器の無機ヒ素の無毒化処理

化学兵器(ACW: Abandoned Chemical Weapon)に含まれる化学剤の多くは、ヒ素を含有する。旧日本軍が製造した化学兵器にも、ヒ素化合物が含有されている。ドイツにおけるクラークⅠ(DA、ジフェニルクロロアルシン)、クラークⅡ(DC、ジフェニルシアノアルシン)、ポーランドにおけるアダムサイト、ロシアにおけるルイサイトなど海外についても、ヒ素化合物を含有する。化学剤を用いた化学兵器

の処理に対して、安全でかつ効率的な廃棄技術が要望されている（SCJ, 2006）。

化学兵器のヒ素の処理法については様々な方法が提案されている。例えば、（1）硫黄燃焼炉で焼却処理して硫化ヒ素として回収する方法（SCJ, 2006）、（2）セメント等の固化剤で固化・不溶化する方法、（3）ロータリーキルンにより、800℃～1100℃の温度で加熱する方法がある。

（1）の硫黄燃焼炉で焼却処理して硫化ヒ素として回収する方法については、得られた硫化ヒ素（As_2S_5）は、熱湯により、容易に亜ヒ酸（H_3AsO_3）、硫黄（S）と硫化水素（H_2S）に加水分解し、猛毒の亜ヒ酸と硫化水素ガスが生じるという問題点があった。

$$As_2S_5 + 6\ H_2O \rightarrow 2\ H_3AsO_3 + 2\ S + 3\ H_2S$$

（2）セメント等の固化剤で固化・不溶化する方法については、ヒ素を処理するために大量のセメントが必要であるという問題点があった。また、セメントからヒ素が溶出し、土壌環境基準以下には不溶化できない例も報告されていた。更に、長期安定性という観点から、セメント自身のアルカリ、酸に対する耐久性が悪く、猛毒の無機ヒ素が容易に溶出するという問題点があった。

（3）ロータリーキルンにより、有機ヒ素化合物を含有するヒ素汚染物に、プラスチック系産業廃棄物を加えて混合物とし、その混合物を 800～1100℃の温度で加熱する方法について報告されている（文献3）。このロータリーキルン法については、高温で加熱するため、発生した無機ヒ素が、昇華（亜ヒ酸の昇華点：135℃）したり、熱分解（ヒ酸の分解点：315℃）したりする問題があった。これにより、大気汚染、環境汚染を引き起こし、作業者が無機ヒ素に暴露されてヒ素中毒になる危険性があった。

図 1.199. 遺棄化学兵器(ACW)のヒ素の無毒化処理プロセスと実際の処理に用いた遺棄化学兵器と合成、単離されたアルセノベタイン

これらの問題点を解決するために、化学兵器のヒ素をバイオミメティック系で無毒化処理を行った。遺棄化学兵器の爆破処理後の残渣を酸で処理し、無機ヒ素を全て抽出した。ろ過法により、不要物を除去した。ろ液をそのままバイオミメティック法で無毒化処理し、カラムクロマトグラフ法によりアルセノベタインを単離することに成功した。処理に用いた遺棄化学兵器に含まれるヒ素は、アルセノベタインに変換することにより全て無毒化された。また、ヒ素廃棄物としての廃棄物量は、アルセノベタインとして単離することにより約 1/25 に減少した(図 1.199)。

7. 結論

ビタミン B_{12} を有するバイオミメティック、バイオインスパイアード触媒システムと酸化チタン光触媒システムを設計し、触媒サイクルを発現するシステムを構築することに成功した。本システムは、天然の生体物質であるビタミン B_{12} とアミノ酸、あるいは、天然無機物質である酸化チタンを用い、水を溶媒とする安全で環境に優しい触媒システムである。このバイオミメティック、バイオインスパーアード触媒を

用いて、ヒ素汚染地下水の無機ヒ素を無毒化することを実証した。従来法は、無機ヒ素をそのまま除去、移動するもので、無機ヒ素の毒性は残っており、2 次汚染が問題であった。本処理法は、ヒ素の毒性そのものを無くすことが可能で、地球規模のヒ素汚染地下水の問題解決に貢献することが期待される。循環型社会の実現のため、レアメタルのリサイクルに対して、このバイオミメティック、バイオインスパーアード触媒システム、酸化チタン光触媒システムを適用した（第2章に記載）。GaAs 半導体のガリウムを回収し、ヒ素を無毒化処理できることが明らかになった。ヒ素化学兵器の無機ヒ素を無毒化処理して、アルセノベタインとして単離することに成功した。ビタミン B_{12} のバイオミメティック、バイオインスパイアード触媒システムは、有機溶媒を用いない温和な水溶液条件下で作用する安全で効率的な処理システムである。今後も様々な分野で利用されることが期待される。

8. 文献

Challenger, F. (1945), Biological methylation. *Chem. Rev.*,Vol. 36, 315–362.

Chowdhury, A. M. & Jakariya, M. (1999), Testing of water for arsenic in Bangladesh. *Science*, 284, 1622–1622.

Chu, Jiun-Haw, Analytis, J. G., De Grove, Kristiaan, McMahon, P. L., Islam, Zahirul, Yamamoto, Y. Fisher, I. R (2010). In-Plane Resistivity Anisotropy in an Underdoped Iron Arsenide Superconductor, Science, Vol. 329, 5993, 824-826.

Craig, P. (2003), Organometallic compounds in the environment, John Wiley & Sons Ltd., England, 22–25.

Edmonds, J. & Francesconi, K. (1987), Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*, (1987), Vol. 43; 553–557.

Edmonds, J. (2000), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 10; 1105–1555.

Edmonds, J. & Francesconi, K. (1981), Arseno-sugars from brown kelp (Ecklonia radiata) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem. *Nature*, Vol. 289: 602-604.

Hoffman, M. R., Martin, S. T., Choi, W. & Bahnemann, D. W., (1995), Environmental Application of Semiconductor Photocatalysis, *Chemical Reviews* Vol.95 (1) :69－96.

Ismail, H. & Toia, R. (1988), Preparation of Arsenobetaine hydrobromide. *Pertanika*,Vol. 11: 437–439

Kaise, T. Watanabe S. & Ito, K. (1985), The acute toxicity of arsenobetaine *Chemosphere*, Vol. 14 (9): 1327–1332.

Kim, Y-H. & Carraway, E. (2002), Reductive dechlorination of pce and tce by vitamin B_{12} and zvms, Environmental Technology Vol. 23: 1135–1145.

Ko, H., Takei, K., Kapadia, R., Chuang, S., Fang, H., Leu, P. W., Ganapathi, K., Plis, E., Kim, H., Chen, S., Madsen, M., Ford, A. C., Chueh, Y., Krishna, S., Salahuddin, S. & Javey, A. (2010), Ultrathin compound semiconductor on insulator layers for high-performance nanoscale transistors. Nature, 468, 7321, 286-289.

Kräutler, B. & Caderas, C. (1984), Komplementar diastereoselective Cobalt-Methy lierungendes Vitamin-B_{12}-Derivatives <Cobester>, *Helvetica Chimica Acta* Vol. 67: 1891－1896.

Lee, D. H. & Gupta, J. A. (2010), Tunable Field Control Over the Binding Energy of Single Dopants by a Charged Vacancy in GaAs. Science, Vol. 330, 1612, 1807-1810.

Lexa, D. & Saveant, J-M. (1983), The electrochemistry of vitamin B12, Accounts of Chemical Research, Vol. 16: 235–243.

Moore, L. & Ehman, P. (1977), in *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*, ed. J. J. McKetta, Dekker, New York, Vol. 3: 396.

Nakamura, K., Kamiya, S., Hishinuma, A., Akatsuka, Y., Tada T., & Yamauchi, H. (2006),

Detoxification process of inorganic arsenic to methylated arsenic by biotransformation reaction, *Abstract of 86th annual meeting of the Chemical Society of Japan*. :197.
URL:sciencelinks.jp/j-east/article/200613/000020061306A0407509.php

Nakamura, K., Hishinuma, A. & Kamiya, S. (2008a), Method for detoxifing toxic compound, and process for producing organic semiconductor element compound, *International Patent*, WO/2008/012950.
URL: www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2008012950

Nakamura, K. (2008b), Method for detoxifing toxic compound, and process for producing organic semiconductor element compound, *International Patent*, WO/2010/053072.
URL: www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2010053072

Nakamura, K. (2008c), Arsenic detoxification technology by using a bio-inspired catalist with vitamin B_{12}, *Research report of collaborative development of innovative seeds of Japan Science and Technology Agency (JST)*.
URL: www.jst.go.jp/innovate/innovativeh19/pdf/73145.pdf

Nakamura, K., Hisaeda, Y., Pan, L. & Yamauchi, H. (2008d), Detoxification system for inorganic arsenic: transformation of As_2O_3 into TMAO by vitamin B_{12} derivatives and conversion of TMAO into arsenobetaine, *Chemical Communications* Vol.694 (6): 5122–5124.

Nakamura, K., Hisaeda, Y. & Yamauchi, H. (2008e), Photochemical Detoxification of Inorganic Arsenic. Effect of Photoirradiation on Methyl Group Transfer Reaction Mediated by Vitamin B_{12} Derivatives, *Abstract of Annual Meeting on Photochemistry*, September 11–13, Osaka, Japan: 57–57.

Nakamura, K., Hishinuma, Akihiro & Kamiya, S. (2008f), Method for recovering metal, *International Patent*, WO/2008/132830.
URL:http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2008132830

Nakamura, K. & Hishinuma, A. (2009), Toxic compound detoxification method, *International Patent*, WO/2009/041002.
URL: www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2009057300

Nakamura, K., Hisaeda, Y., Pan, L. & Yamauchi, H. (2009), Methyl transfer from a hydrophobic vitamin B_{12} derivative to arsenic trioxide, *Journal of Organometallic Chemistry* Vol.41 (6): 916–921.

Nakamura, K. (2010a), Arsenic detoxification mediated by vitamin B_{12}, *Abstracts of 90th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, Vol. II, 1C2–08, pp. 210.

Nakamura, K. (2010b), Arsenic detoxification mediated by vitamin B_{12} and Photo-driven catalysts composed of B_{12} and TiO_2 and its application to rare metal recycling,

Abstracts of 90th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan, Vol. I, 1H7–49, pp. 69.

Nakamura, K. (2011a), Vitamin B_{12} catalyzed arsenic detoxification reaction, *Abstracts of 91th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, Vol. II, 3A6–12, pp. 276.

Nakamura, K. (2011b), Vitamin B_{12} catalyzed arsenic detoxification reaction and recycle of rare metal, *Abstracts of 91th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, Vol. I, 2G4–03, pp. 18.

Samans, R. & Waughray, D. (2009), The bubble is close to bursting: A forecast of the main economic and geopolitical water issues likely to arise in the world during the next two decades, Draft for discussion at the World Economic Forum Annual Meeting 2009. URL:members.weforum.org/pdf/water/WaterInitiativeFutureWaterNeeds.pdf

Nickson, R. McArthur, J. Burgess, W. Ahmed, K. M. Ravenscroft, P. & Rahman, M. (1998), Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater.*Nature*, Vol.395: 338–338.

Sun, G. F. (2004), Arsenic contamination and arsenicosis in China, *Toxicol.* Appl. Pharmacol.,198, 268–271.

SCJ, 2006, in Report of Section of National Committee on Abandoned Chemical Weapons, National Committee for Restoration of Devastated Living Environments: Risk Assessment of Old and Abandoned Chemical Weapons and Development of Safe Advanced Destruction Technologies, Science Council of Japan, Tokyo, 1–89.

Thomas, D, Waters, S. & Styblo, M. (2004), Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 198: 319–326.

Turner, D. B, & Nelson, K. A. Coherent measurements of high-order electronic correlations in quantum wells. (2010), Nature, 468, 7310, 1089-1092.

Vahter, M. & Marafante, E. (1983), Metabolism of arsenobetaine in mice, rats and rabbits. *Sci.Total Environ.*, **30**, 197–211.

Yoon, J, Jo, S., Chun, I., Jung, I., Kim, H., Meitl, M., Menard, E., Li, X., Coleman, J., J., Paik, U. & Rogers, J. A. GaAs photovoltaics and optoelectronics using releasable multilayer epitaxial assemblies. (2010), Nature, 465, 7296, 329-333.

第２章　レアメタルのリサイクル技術の開発

1. はじめに

地球規模での省資源・省エネルギーに対する問題意識の高まりの中で、大量消費社会から、循環型持続性社会への転換が強く望まれている。資源セキュリティ、環境保全の観点から、レアメタルのリサイクルは重要である。GaAs 半導体は、携帯電話などの情報電子機器や、低炭素社会の実現に必要な発光ダイオード(LED)や太陽電池などに使われてきた。今後社会の発展にともない、その使用量はますます増えることが予想されている。また、Ⅲ−Ⅴ族化学物半導体は、高度情報化社会を支える先端技術、先端材料として活発な研究がなされている(Chuet al., 2010; Lee et al., 2010; Ko et al., 2010; Turner et al., 2010; Yoon et al., 2010)。レアメタルであるガリウム(Ga)の安定供給を確保するという資源セキュリティの観点から、Ga のリサイクルは重要である。また、Ga の採掘や製造に伴い、環境破壊が進んでいる。環境保全の観点からも、環境調和型のリサイクル技術の開発は重要である。

Ⅲ－Ⅴ族化合物半導体(GaAs 他)は我が国が世界供給の中核をなし、ヒ素系半導体部品の市場は、太陽電池市場 (1.4 兆円、2012 年)、LED 市場で 7,000 億円(2018 年)と予測されている。我が国は、希少金属であるガリウム(Ga)、インジウム(In)の安定供給に困窮している。国家備蓄鉱種に指定されている Ga、In は、リサイクルする必要がある。一方、GaAs 半導体のリサイクルの処理について、アルシンガス中毒の例が依然として報告されている。我々は、ヒ素の無毒化処理技術は、希少金属の回収に対して有効な支援技術と考える。

図 2.1.　携帯電話とガリウム、インジウムの含まれる電子部品
（液晶パネルの ITO ガラスにはインジウムが、バックライトの LED やスイッチやアンプなどの GaAs 半導体にはガリウムが含まれる。）
（日経 NETWORK, 2001 年 11 号、61 頁より転載）

本研究については、ガリウムあるいはインジウムが含まれる白色 LED、太陽電池、液晶パネルを対象として、ガリウム、インジウム等のレアメタルの回収とヒ素の無毒化処理技術の検討を行った。携帯電話などの小型家電の液晶パネルのインジウムスズ酸化物（ITO : Indium tin oxide）薄膜付ガラスには、インジウムが含まれる。バックライトの LED や、スイッチやアンプなどの GaAs 半導体にはガリウムが含まれる（図 2.1）。

2. 白色 LED の分析

低炭素社会の実現のため、全ての照明器具は消費電力の小さい LED に置き換える動きがある。商品化されている LED には、GaAlAs、AlInGaP、AlInGaP、InGaN、AlInGaN などの半導体材料が使用されている。

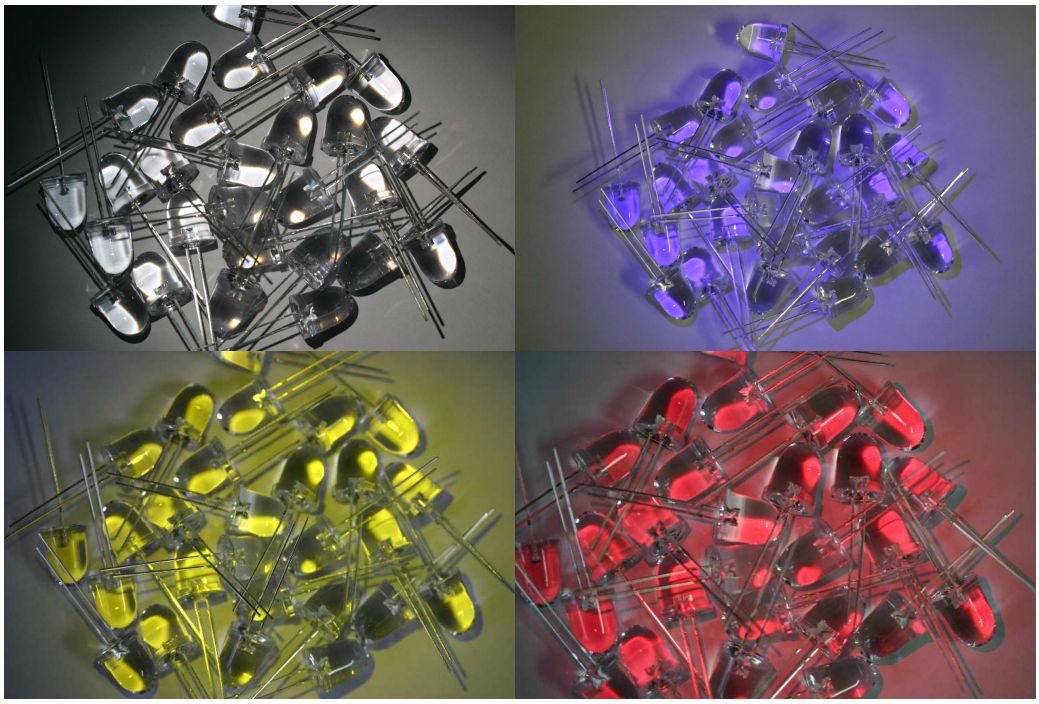


図 2.2.　砲弾型 LED

砲弾型 LED（図 2.2）を剥離液で処理し、封止樹脂を分解した。封止樹脂から取り出した電極の発光部の一部（図 2.3 の赤丸）を硝酸で分解した溶液の分析結果を表 2.1 に示す。ガリウム、ヒ素とともに、Fe、Ni、Cu、Ag が検された。更に HPLC-ICP-MS 法で、ヒ素の化学構造を評価したところ、五価の無機ヒ素[iAs(V)]として存在していることが明らかになった（図 2.4）。

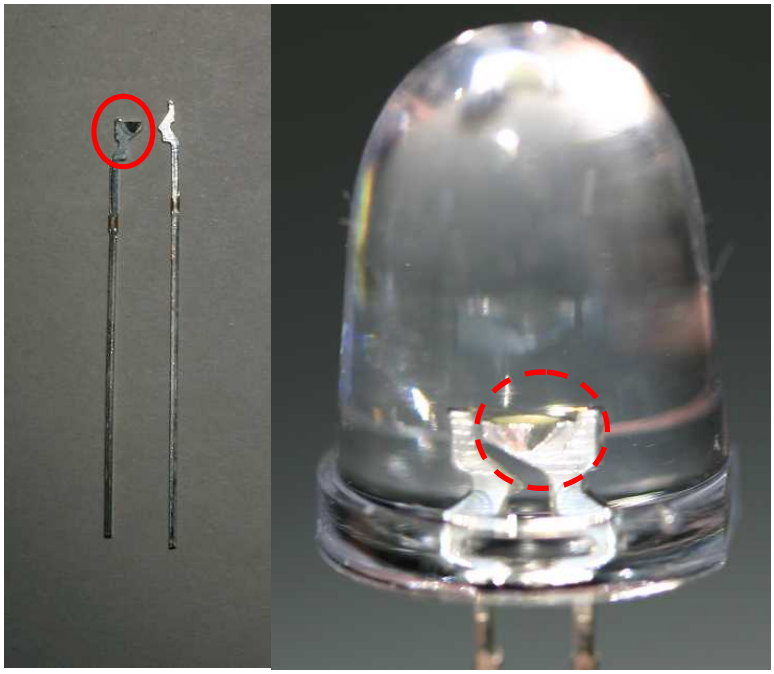


図 2. 3.　砲弾型 LED（写真右）と電極（写真左）

表 2. 1.　LED の発光部の硝酸溶液の分析結果

質量数		白色LEDの発光部 電極の硝酸溶液 （ppm）
C	12	130
Al	27	1.2
Si	29	5.9
S	34	230
Cl	35	38
K	39	3.8
Mn	55	11
Fe	57	5300
Co	59	0.58
Ni	60	180
Cu	63	210
Zn	66	0.39
Ga	69	0.67
Ge	72	0.93
As	75	3
Ag	107	15

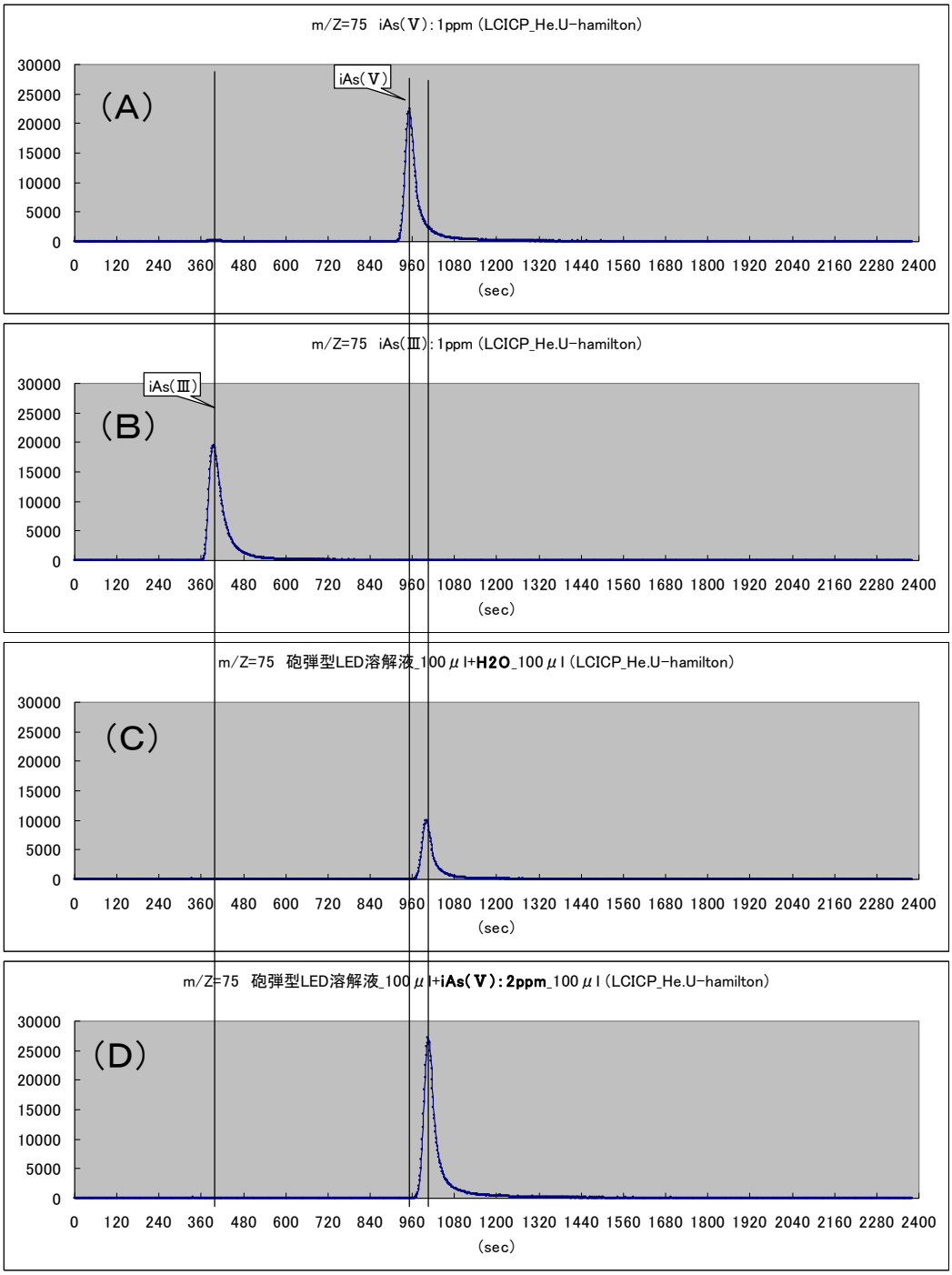


図 2. 4. LED の発光部の硝酸溶液中に存在するヒ素の HPLC-ICP-MS 法による化学構造分析
A：標準サンプル[iAs(V)]、B：標準サンプル[iAs(Ⅲ)]、C：サンプル、D：サンプル＋[iAs(V)]

ＬＥＤの電極について、元素分布を調べるため、非破壊分析を行った。条件を以下に示す。

【分析方法】

試料（図2.3の赤丸部）を樹脂に埋め込み、断面から研磨後、フィールドエミッション電子プローブマイクロアナライザー（JXA8500F型）日本電子製によりAs, AuGa, N, Al, Fe, Yについて面分析を行った。

【分析結果】

面分析より電極A（図2.3の赤丸部の電極）のカップから、Au, Ga, N, Al, Fe, Yが検出された。Alの基板（図2.5のＦ）があり、その上に層があり、そこからGa（図2.5のC）とN（図2.5のD）が検出された。ワイヤーボンディングのAuが検出された（図2.5のB）。

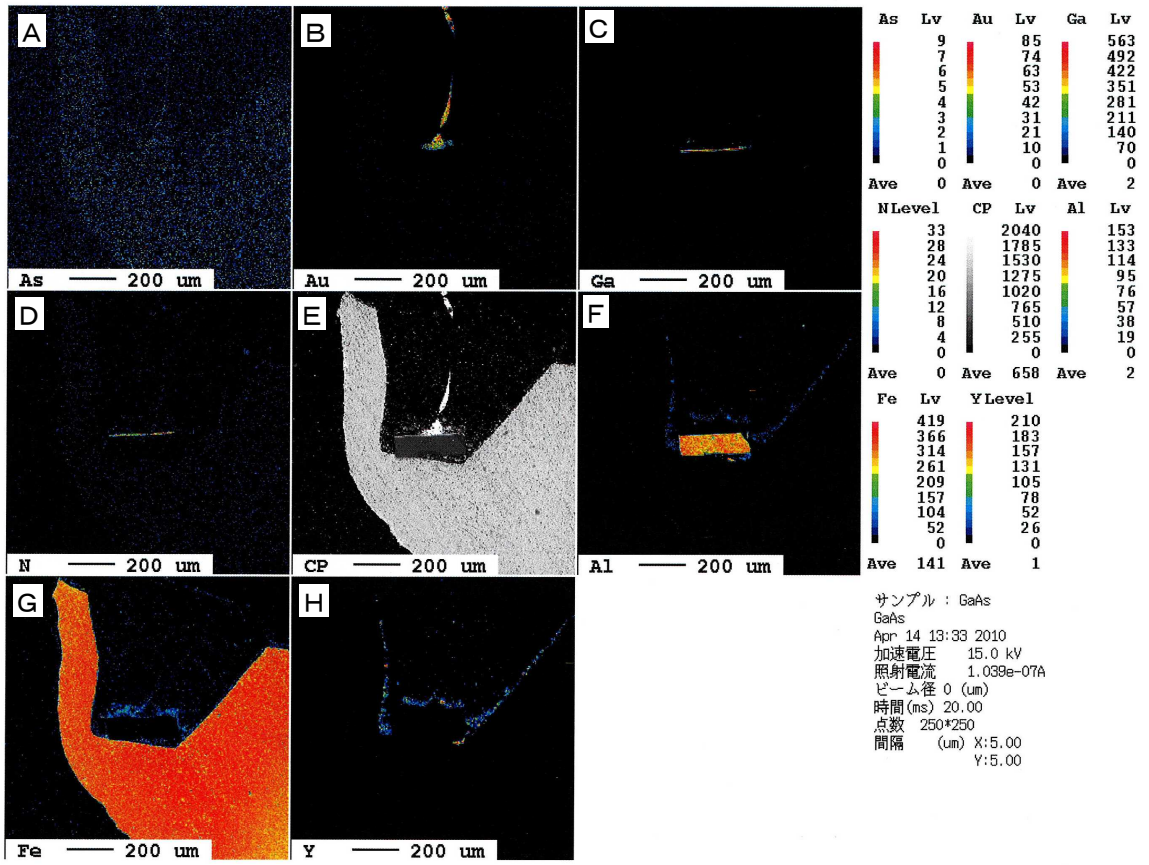


図 2.5. フィールドエミッション電子プローブマイクロアナライザーによる LED 発光部の分析

ＬＥＤ発光部（図 2.3 の赤丸部）と電極部に存在する元素の深さ方向の分布を調べるためにフィールドエミッション電子プローブマイクロアナライザーで非破壊分析を行った。

【分析試料】
・電極A（図2.3の赤丸部の電極）（図2.6）
・電極B（図2.3の赤丸部でない方の電極）（図2.7）

【分析方法】
試料についてフィールドエミッション電子プローブマイクロアナライザー（JXA8500F型）日本電子製によりＢ～Ｕ迄の元素の範囲で定性分析・半定量分析を実施した。試料表面を研磨後、同条件で分析を実施した。

【分析結果】
各元素の定性分析結果を図2.8（研磨前）、図2.9（研磨後）に示す。
各試料の表面を研磨する前では主成分としてAgが検出された。表面を研磨後、電極AにはFe, Niが、電極BにはFe, Cuが検出された（電極Ｂのデータは省略）。なお、電極Ａ、Ｂの組成像で輝度の明るい（①）部分は研磨されていない箇所を表す(図2.6、図2.7)。

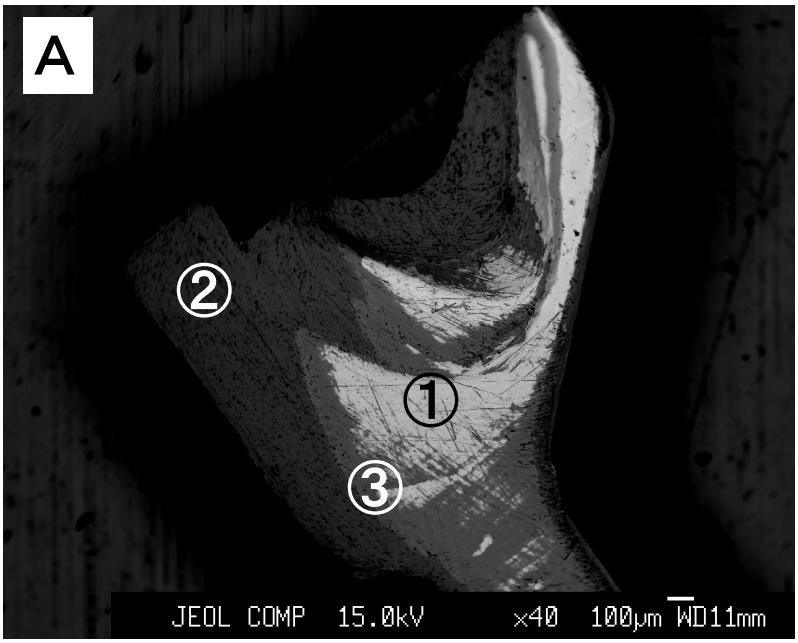


図 2.6. LED の電極Ａ（発光部）の元素分析
①未研磨部、②研磨部、③研磨部

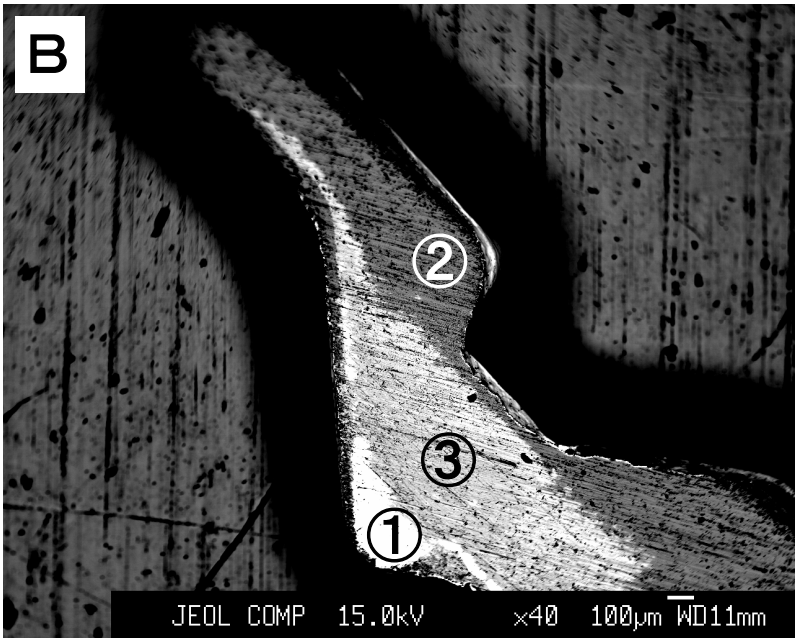


図 2.7. LED の電極Ｂ
①未研磨部、②研磨部、③研磨部

電極A
Mar 19 17:28 2010
加速電圧　　15.0 kV
照射電流　　1.045E-07A
スキャン Off ビーム径 100

ZAF Metal

Element	Mass(%)	Atom(%)	K(%)
Al	1.488	5.6083	1.088
Fe	0.615	1.1193	0.705
Ni	0.627	1.0849	0.260
Cu	0.788	1.2601	0.355
Ag	96.482	90.9274	105.175
Total	100.000	100.0000	107.583

Norm.F = 0.910

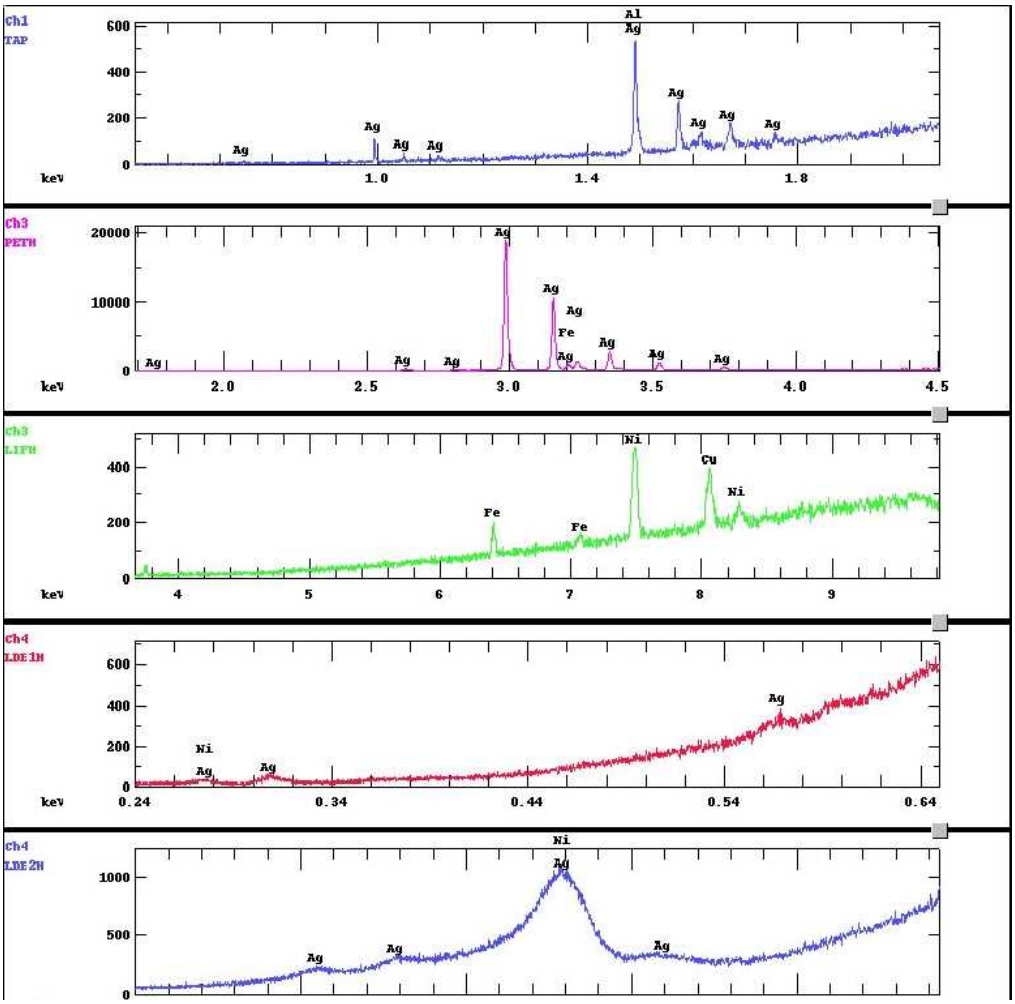


図 2.8. LED の電極Ａ（発光部）の元素分析（①未研磨部）

電極A
Mar 23 12:08 2010
加速電圧　15.0 kV
照射電流　9.800E-08A
スキャン Off ビーム径 100

ZAF Metal

Element	Mass(%)	Atom(%)	K(%)
Al	0.151	0.3063	0.071
Si	1.427	2.7938	0.859
Mn	0.428	0.4290	0.372
Fe	97.455	96.0041	86.517
Cu	0.540	0.4668	0.442
Total	100.000	100.0000	88.261

Norm.F = 1.124

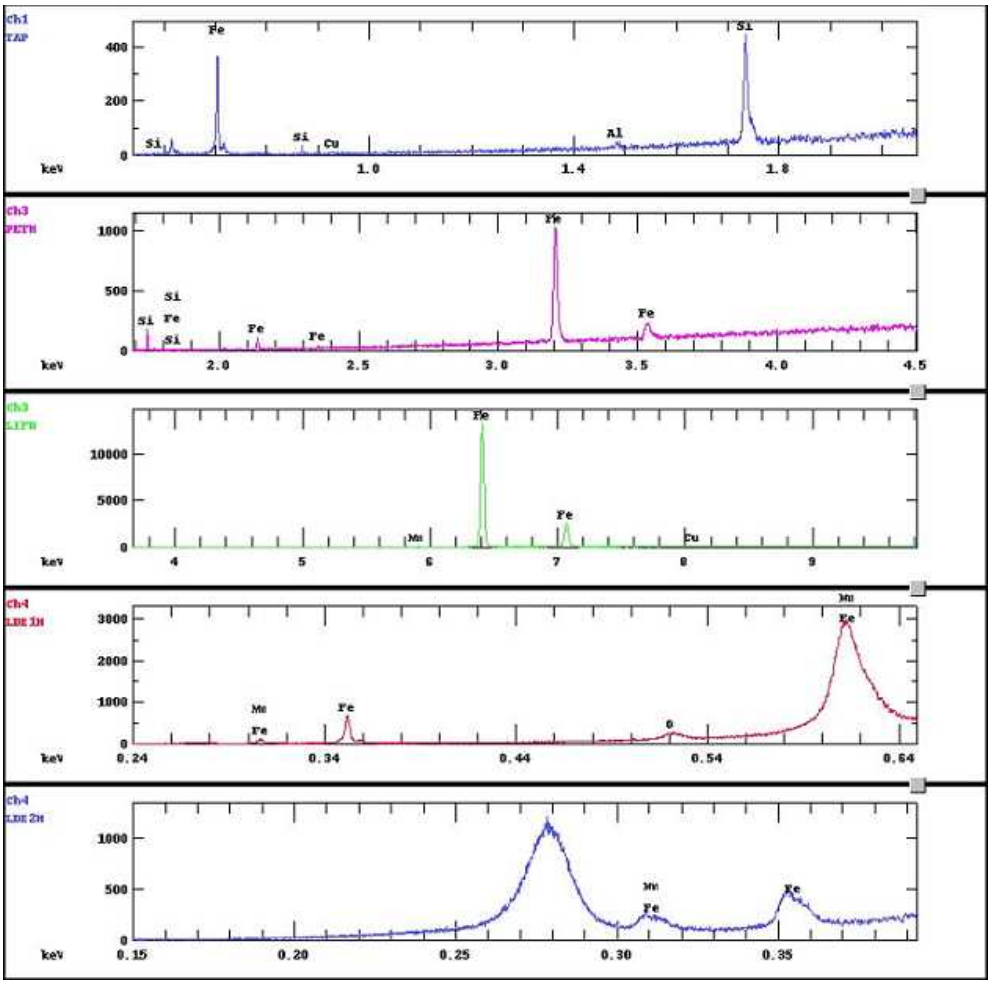


図 2.9. LED の電極Ａ（発光部）の元素分析（②研磨部）

更にガリウム、ヒ素の存在する部分を特定するために、SEM観察により半導体チップの層構造を観察した。層構造が観察されるように、半導体のチップの深さ方向にFIBにより加工して断面を観察した。Ga、Nが存在する層については、多層構造ではなく、1層のみのコントラストが観察された（図2.10）。したがって、その層は窒化ガリウムである可能性が高いことが判明した。実際にEDX分析により、GaとNが検出された（図2.11）。

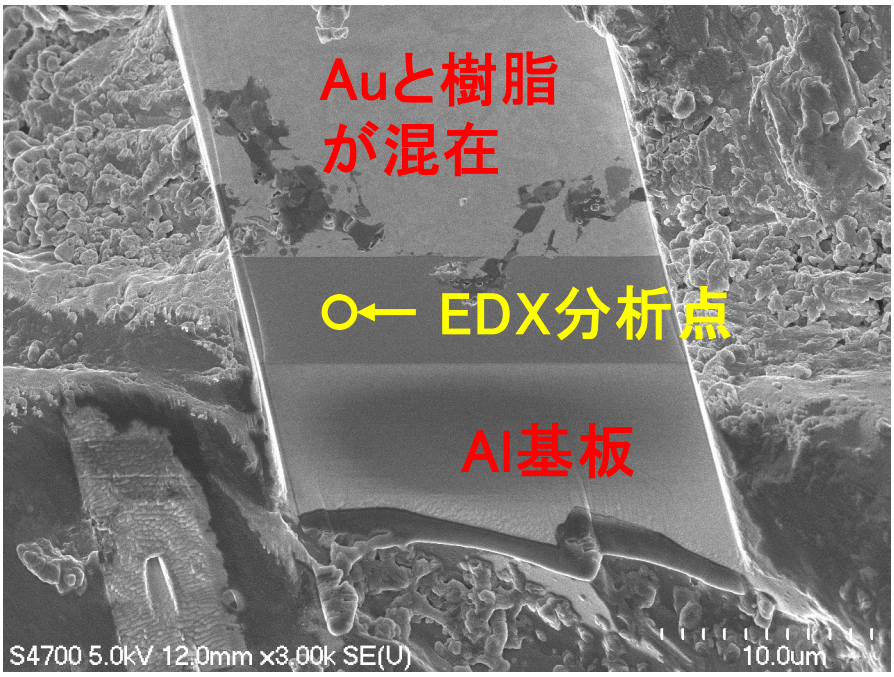


図 2.10. LED の電極Ａ（発光部）の半導体チップの破断面観察

図 2. 11.　LED の電極Ａ（発光部）の半導体チップの破断面で観察された層の EDX 元素分析（図 2. 10 の黄色の部分）

3. 太陽電池(GaAs 半導体)のガリウムのリサイクル

低炭素社会実現のために太陽光発電の大幅な拡大の社会的要請がある。太陽電池には、Si、In、GaAs などの半導体材料が使用されている。本研究では、GaAs 半導体を使用した太陽電池からガリウムの回収の検討を行った。

図 2.12. GaAs 半導体型太陽電池

GaAs 半導体太陽電池（図 2.12）を剥離液で処理し、封止樹脂を分解した。封止樹脂から取り出した太陽電池を構成する部品を示す（図 2.13)。半導体基板の元素分析から、GaAs 半導体であることが確認された。また、電極の元素分析から、Ag、Sn が検出された（図 2.14)。

更にガリウム、ヒ素の存在する部分を特定するために、SEM観察により半導体チップの層構造を観察した。層構造が観察されるように、半導体のチップの深さ方向にFIB法により加工して断面を観察した（図2.15）。実際にEDX分析により、GaとAsが検出された（図2.16）。

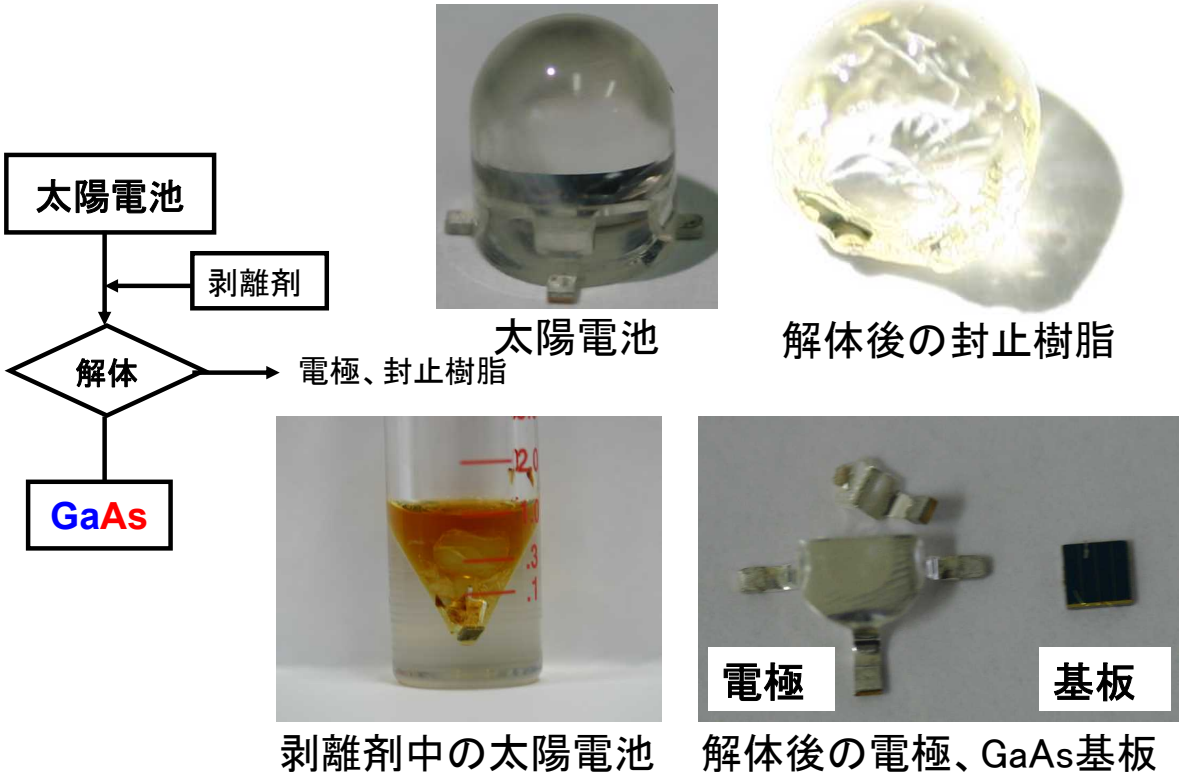
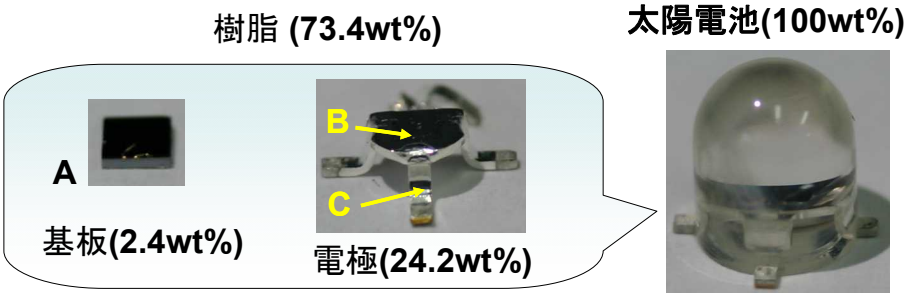


図 2. 13.　GaAs 半導体型太陽電池の解体処理



A

Element	Wt%	At%
Ga	39.9	35.2
As	49.3	40.5
Al	5.2	11.9
Si	5.6	12.3

B

Element	Wt%	At%
Ag	96.1	90.5
Al	1.5	5.7
Cu	1.7	2.8
Zn	0.7	1.0

分析（EPMA/WDX）

C

Element	Wt%	At%
Sn	97.6	96.0
Ag	0.9	1.0
Cu	0.7	1.3
Zn	0.6	1.1
Si	0.1	0.6

図 2. 14. GaAs 半導体型太陽電池の部品の元素分析

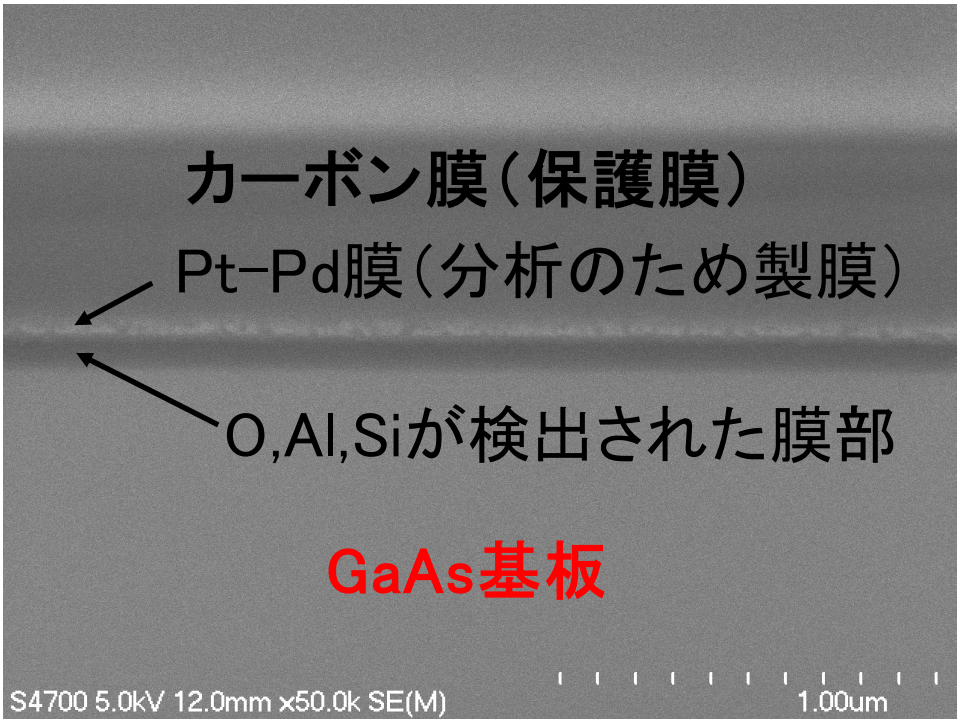


図 2. 15.　太陽電池の半導体チップの破断面観察

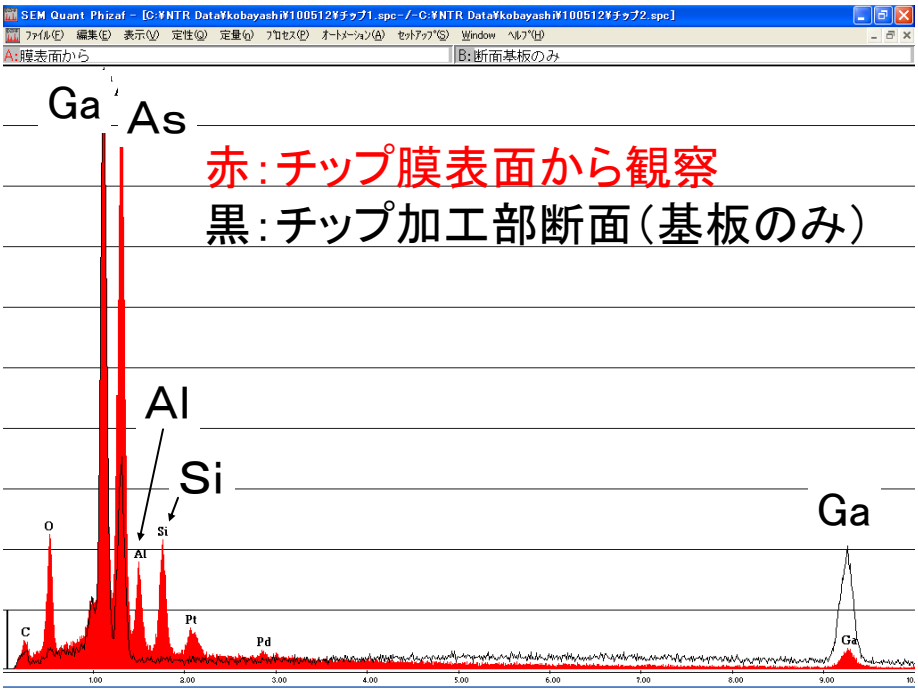


図 2. 16.　太陽電池の GaAs 半導体チップの破断面で観察された層の EDX 元素分析

次に太陽電池の GaAs 半導体チップを硝酸に溶解させ、ヒ素吸着剤（日本板硝子㈱）でヒ素を選択吸着してガリウムから分離し、ガリウムを回収(Ga 純度：>90%)することに成功した（図 2.17、図 2.18）。

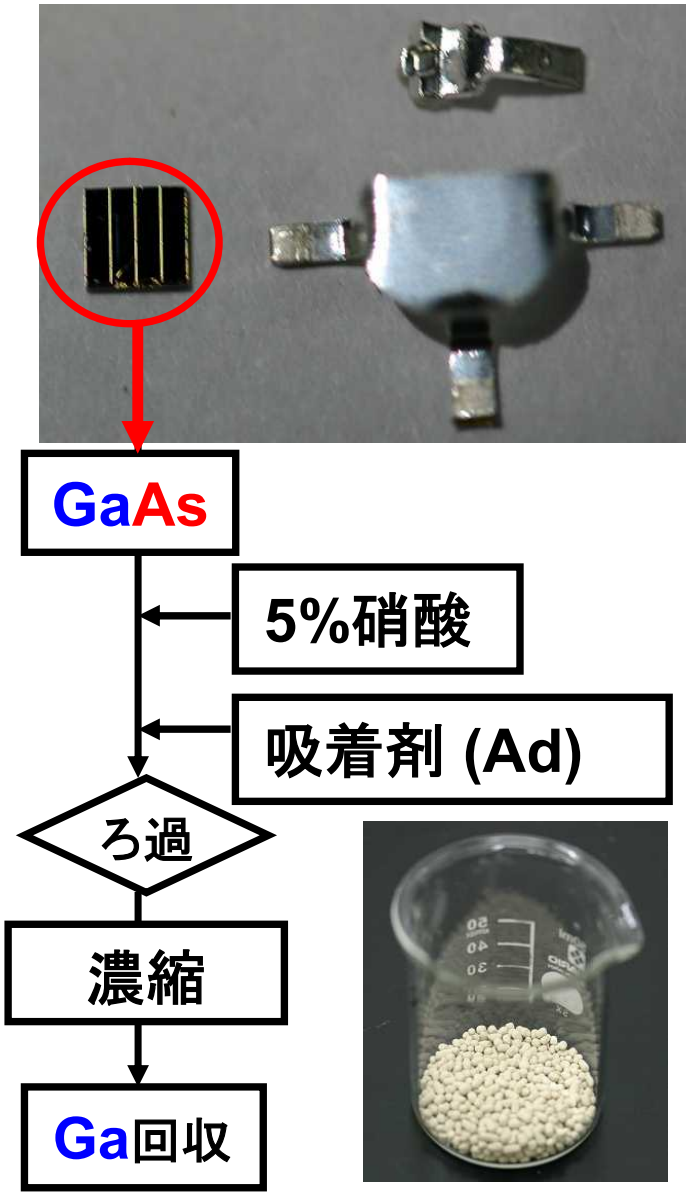


図 2.17. GaAs 半導体型太陽電池からガリウムの回収

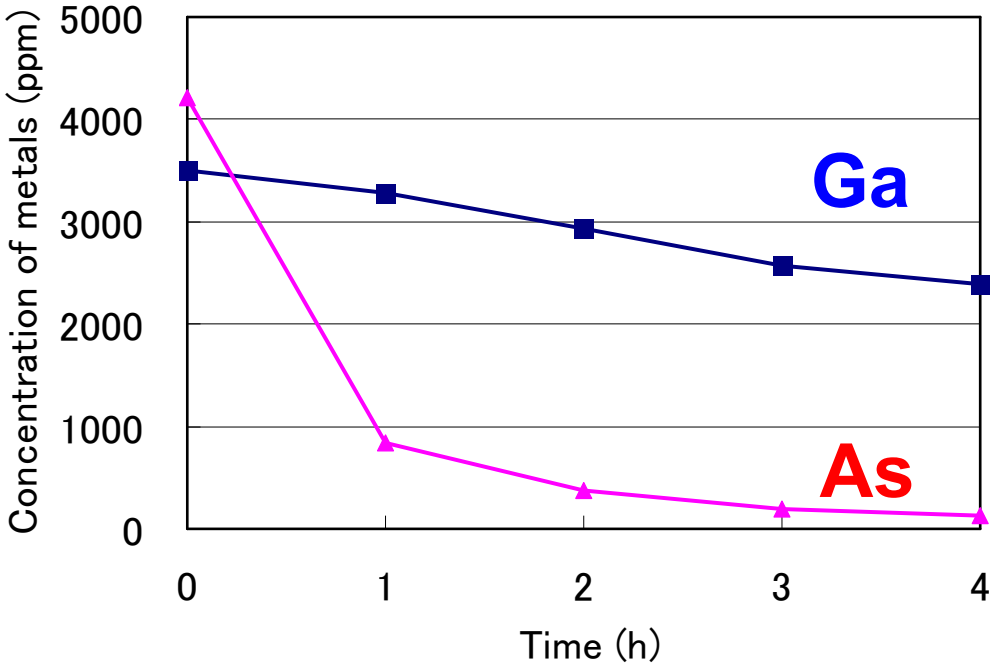


図 2.18. 太陽電池の GaAs 半導体からガリウムの回収

GaAs 半導体から、Ga の回収、ヒ素の無毒化を下記スキームにしたがって検討した(図 2.19)。

ガリウム標準液(原子吸光用、1000ppm)とヒ素標準液(原子吸光用、1000ppm)を用いて、100ppm のガリウム、ヒ素混合液(200ml)を調整した(液Ａ)。ヒ化ガリウム(40mg)と５%硝酸(2ml)をテフロンるつぼに入れ、100℃に保持した恒温槽で 9 時間過熱した。室温に冷却後、白色沈殿物(17.1mg)をろ過した。ろ液を超純水で 200ml に希釈した(液Ｂ)。溶液Ａまたは溶液Ｂについて、吸着剤 Ad(日本板硝子製)10g を加えて室温で 4 時間攪拌した。溶液中の金属濃度は ICP-MS 法で測定した。

吸着剤をろ過で分取し、ろ液をエバポレーターで濃縮した。ICP-MS 法で金属濃度を評価した。吸着剤は、0.1mol/l 水酸化ナトリウム(200ml)で３回処理して吸着剤からヒ素を脱離させた。この溶液を 100mg As/l に調整した(液Ｃ)。液Ｃを 2μl、1mol/l Tris 塩酸緩衝液(48μl)、CH_3B_{12}(15mg)、Cys(8mg)を加え、100℃で 2 時間反応した。引き続き、超純水 100μl、ヨード酢酸(20mg)、Cys(40mg)を加え、80℃で 2 時間反応した。反応生成物は、HPLC-ICP-MS 法で分析した。

GaAs 半導体を硝酸で処理して生じた白色沈殿のＸＲＤを図 2.20 に示す。スペクトルの比較により $GaAsO_4 \cdot 2H_2O$ に同定された（図 2.21 と図 2.22)。

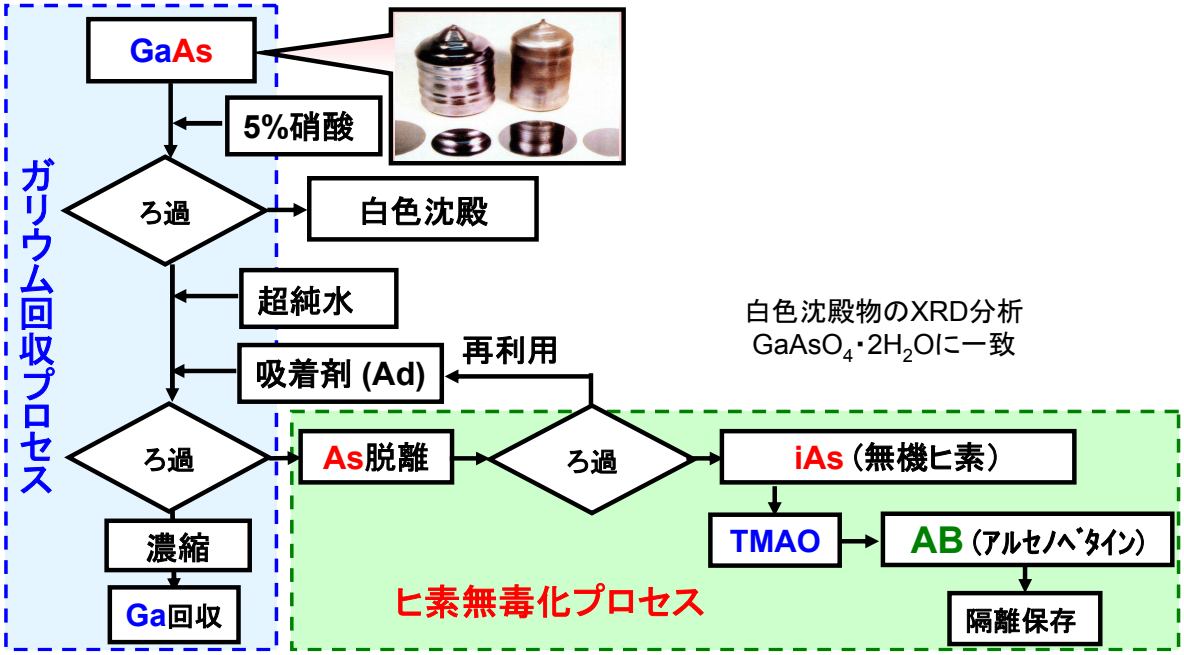


図 2. 19.　GaAs 半導体のガリウムの回収とヒ素の無毒化処理プロセス

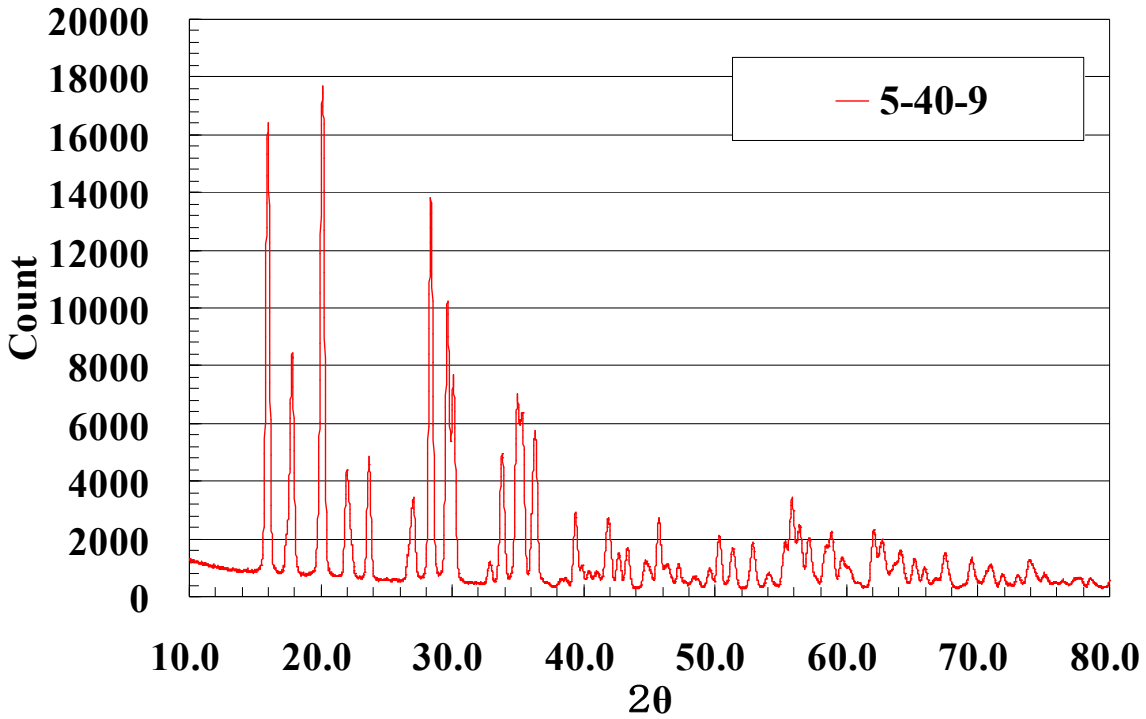


図 2. 20.　白色沈殿のＸＲＤスペクトル

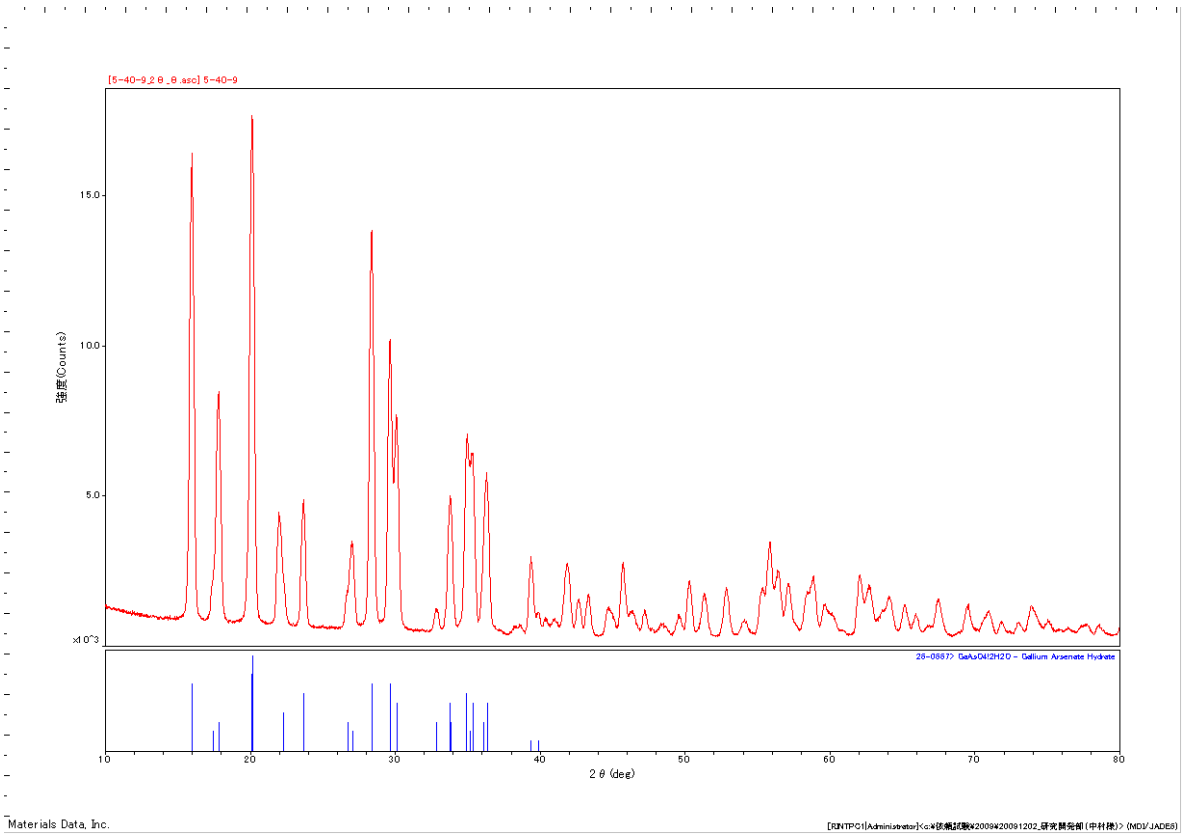


図 2. 21.　白色沈殿と $GaAsO_4 \cdot 2H_2O$ のＸＲＤの比較①

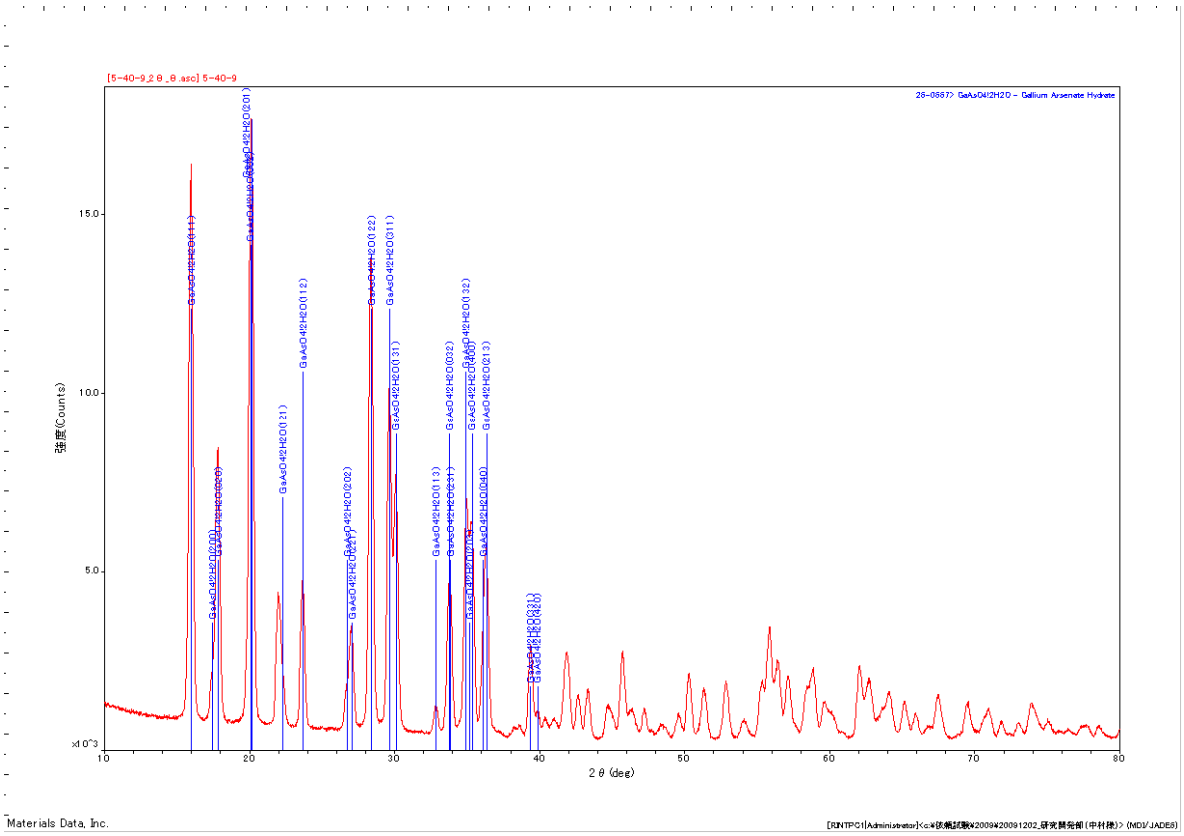


図 2. 22.　白色沈殿と $GaAsO_4 \cdot 2H_2O$ のＸＲＤの比較②

ガリウム標準液またはヒ素標準液(金属濃度:100mg/l)を用いた場合の、ガリウムイオン、ヒ素イオンに対する吸着剤の吸着特性を図 2.23 に示す。ヒ素イオンに対して選択的な吸着特性を示した。

GaAs 半導体を５％硝酸で処理した場合の溶液に含まれる Ga イオン、As イオンに対する吸着特性を図 2.24 に示す。標準液の場合と同様に、ヒ素に対して特異的な吸着特性を示した。ガリウムのヒ素からの分離の程度について、下式(i)に従って定義した純度について、ろ液中のガリウム濃度とヒ素濃度から評価すると、ガリウムの純度は、＞99％であった。

$$w(Ga)/[w(Ga)+w(As)]\times 100 \cdots\cdots (i)$$

[ただし、w(Ga):ガリウムの重量、w(As)：ヒ素の重量]

GaAs 半導体を５％硝酸で処理した溶液に対する吸着反応後(図 2.24)、溶液から吸着剤を取り出し、アルカリ溶液中で処理することにより、選択的に吸着したヒ素イオンがアルカリ溶液中に脱離した(図 2.25)。HPLC-ICP-MS 法により、遊離したヒ素イオンの化学形態は、５価の無機ヒ素[ヒ酸イオン、iAs(V)]であった。

GaAs 半導体の酸処理溶液から、吸着剤を用いてガリウムから分離した無機ヒ素[iAs(V)]を CH_3B_{12}、Cys で処理し、選択的にトリメチルアルシンオキシド(TMAO)に変換した[図 2.26(b)]。更にヨード酢酸と Cys により、無機ヒ素を定量的にアルセノベタインに変換した[図 2.26(c)]（無毒化ヒ素純度：>99%)。

ヒ化ガリウムの水溶液から、吸着剤 Ad（日本板硝子製）を用いてヒ素イオンを選択的に吸着し、ガリウムを回収した[Ga/(Ga+As)>99%]。吸着した無機ヒ素は、CH_3B_{12} と Cys を用いてアルセノベタインに変換された(純度：>99%)。

レアアースであるセリウムは、国内では、主にガラス用研磨剤、紫外線吸収ガラスなどに使用されている。本研究に用いたヒ素選択吸着剤に使用されるセリウムは、ガラスを研磨した後の使用済み研磨屑を再資源化したものである。吸着したヒ素を脱離することにより、吸着剤の再利用も可能となり、持続可能なセリウムの再利用プロセスを提案することができた[図 2.27.(a)]。しかしながら、酸化セリウムの価格が、2010 年から 2011 年にかけて、急騰し（価格上昇率：1200%)、セリウムの需給が逼迫したため、セリウムの再資源化とともに、セリウム代替材料によるガリウムとヒ素の分離プロセスについての検討も行った。セリウムフリープロセスの設計は、無毒化処理の特徴を利用した分離プロセスを適用することにより可能である。無毒化処理により、無機ヒ素は有機ヒ素化合物であるアルセノベタインに変換される。アルセノベタインは、トリメチル体であり、対応する無機イオンよりも高い疎水性を有する。したがって、クロマトグラフ法における分離モードを選ぶことにより、ガリウムイオンとの分離が容易になる。本検討では、ユビキタス元素である珪素を構成元素とするシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフ法によりガリウムから、ヒ素を分離した[図 2.27.(b)]。写真で示したように、GaAs 半導体由来のヒ素は、アルセノベタインとして高純度で単離されることが実証された。

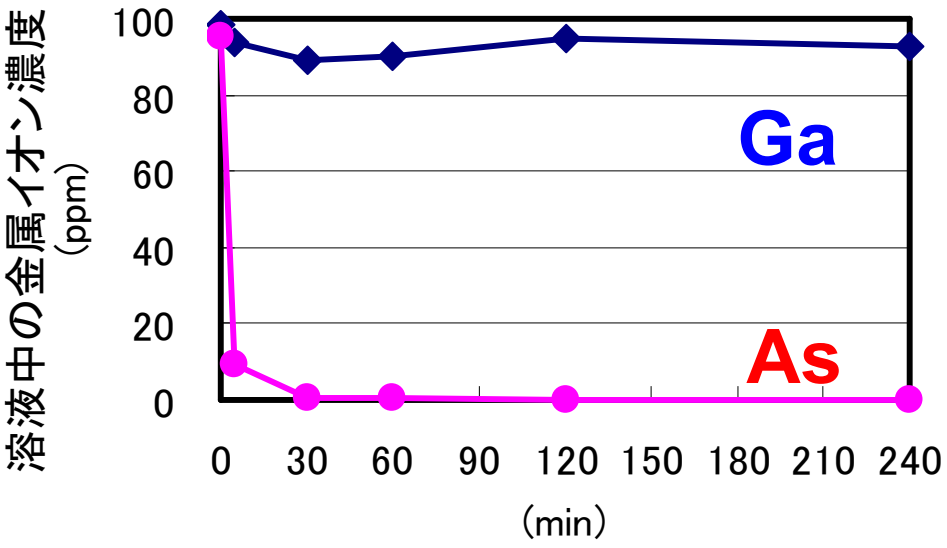


図 2.23.　Ga と As に対する吸着特性(標準液)

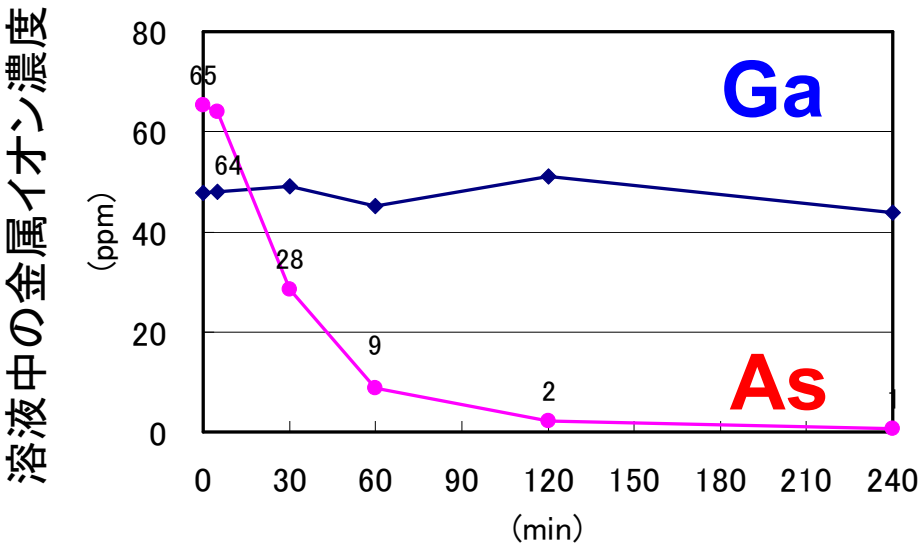


図 2.24.　Ga と As に対する吸着特性(GaAs 半導体)

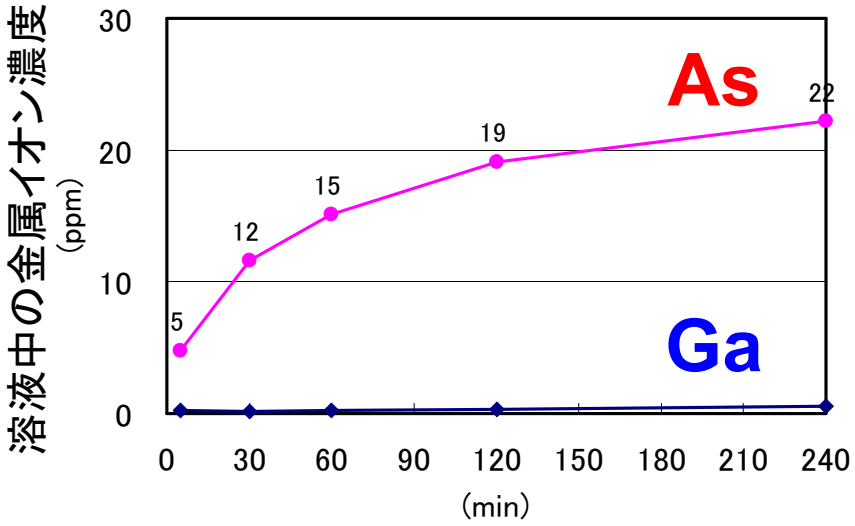


図 2.25.　Ga と As に対する脱離特性(GaAs 半導体)

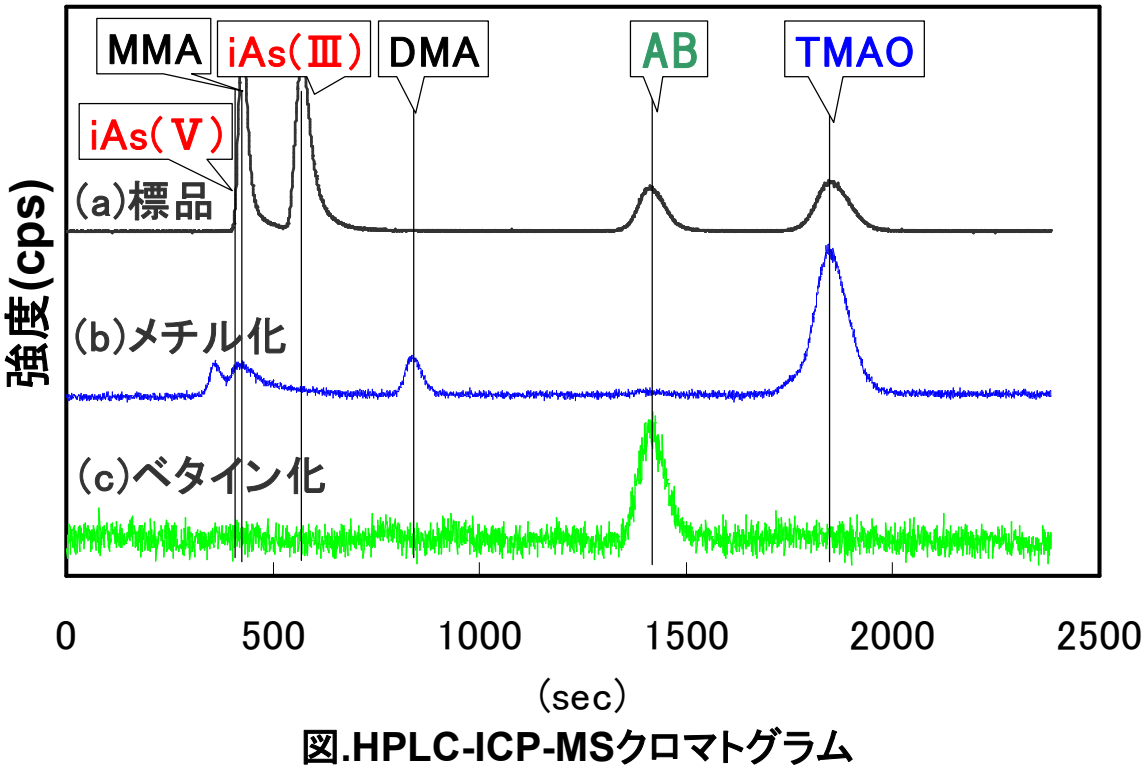
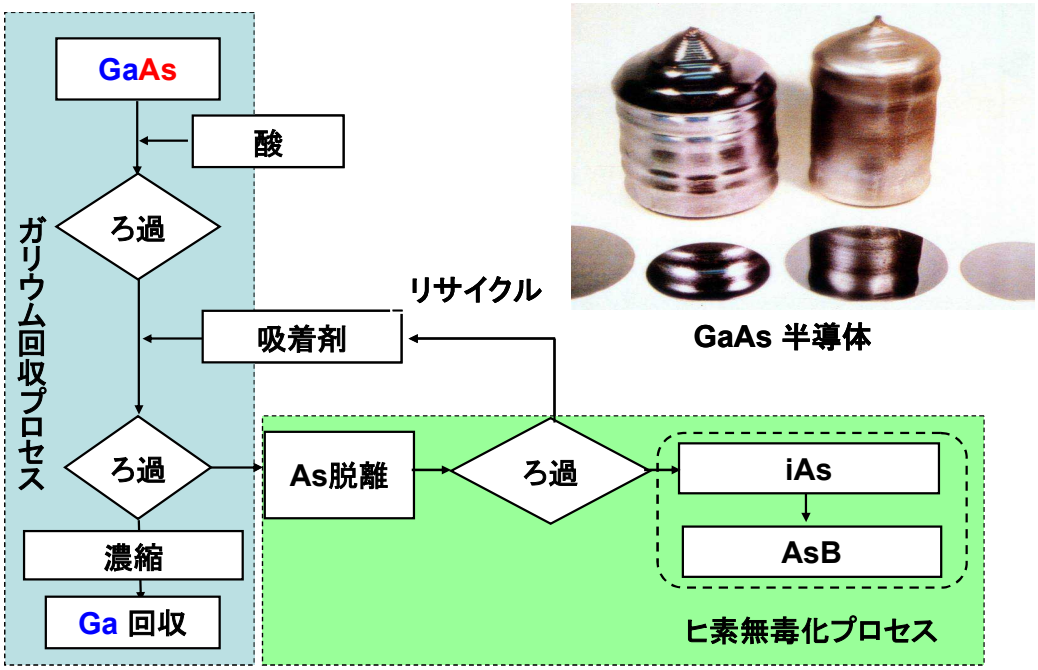


図 2.26.　GaAs 半導体のヒ素の無毒化反応生成物

(a)



(b)

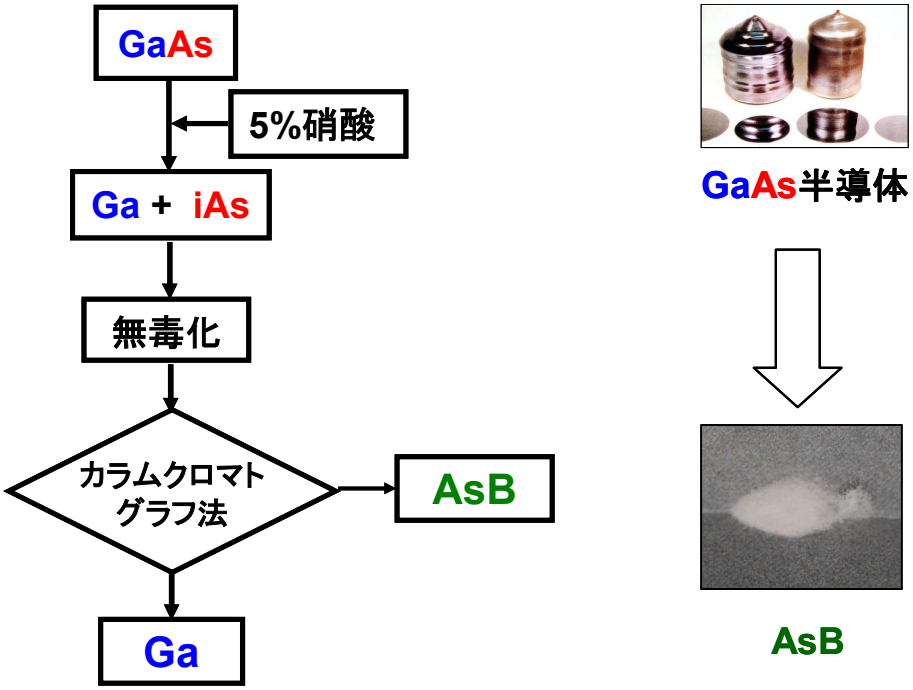


図 2.27. GaAs 半導体からガリウムの回収とヒ素の無毒化処理のスキーム.
写真右は、GaAs 半導体の無機ヒ素を無毒化処理して単離されたアルセノベタイン
(a)セリウム系ヒ素吸着剤を用いたプロセス、(b) セリウム系ヒ素吸着剤を用いないプロセス

4. GaAs 半導体廃棄物の Ga リサイクル

GaAs 半導体製造メーカから提供された GaAs 半導体製造プロセスの実際の廃棄物について、ヒ素を選択的に溶出させる条件について検討した。ガリウムとヒ素を当量含む廃棄物（固形分：約 90%）（図 2.28）について、pH を変化させた場合のヒ素の溶出率[=ヒ素溶出量/（ヒ素溶出量＋ガリウム溶出量）]を調べた。

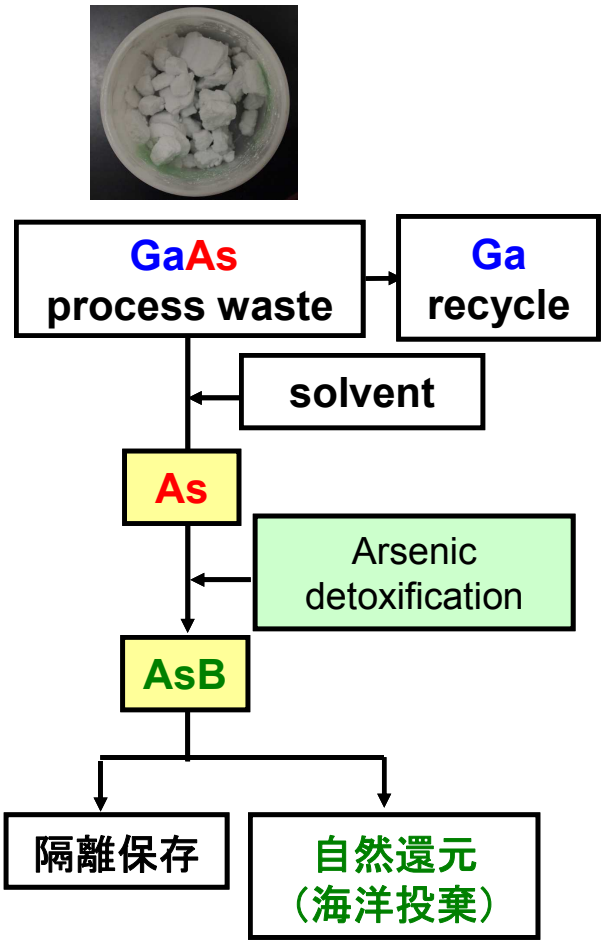


図 2.28. GaAs 半導体のプロセス廃棄物（図中の写真）の Ga リサイクルとヒ素無毒化処理

結果を図 2.29 に示す。中性から pH 12 の範囲で、ヒ素が選択的に溶出する領域があることが確認された。したがって、ヒ素吸着剤、シリカゲルやイオン交換樹脂等のクロマトグラフィーによるヒ素とガリウムの分離プロセスを必要としない低コストのプロセスが提案される(図 2.28)。

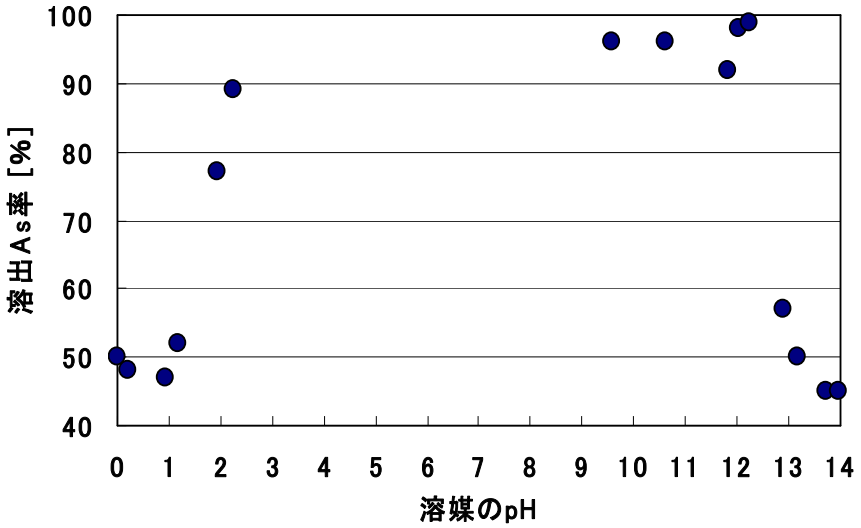


図 2.29. GaAs 半導体のプロセス廃棄物(図 2.28 の写真)に対するヒ素溶出率の pH 依存性
[溶出ヒ素率＝ヒ素溶出量/(ヒ素溶出量＋ガリウム溶出量)、室温] .

5. 液晶パネルの ITO ガラスからインジウムの回収

液晶テレビからインジウムの回収において、液晶パネルのガラスからのヒ素の溶出が問題となる可能性が指摘されている。ITO ガラス（図 2.30、図 2.31）からインジウムの回収の検討を行った(図 2.32)。ガラスを破砕(powder)した場合と破砕しない場合(plate)について（図 2.31)、ITO エッチング液に対する溶出特性を評価した(非破砕品:図 2.33、破砕品:図 2.34)。

インジウム（図 2.35)、スズ（図 2.36）の溶出については、非破砕品(plate)でエッチング液に対して溶出量が大きい傾向が見られた。また、非破砕品についてはヒ素の溶出は認められなかった（図 2.37)。

破砕品(powder)の ITO エッチング溶液処理液にヒ素吸着剤を添加した場合のインジウム、スズ、ヒ素イオンの変化をに示す（図 2.38)。ヒ素イオンは、インジウム、スズから分離が可能であることが示された。

液晶パネルの処理については、破砕しない処理法が推奨される。また、ヒ素は吸着剤でガリウム、スズから分離することが可能である（図 2.38)。分離したヒ素は第 1 章で示した方法により、無毒化処理することが提案される（図 2.27、図 2.28、図 2.39)。

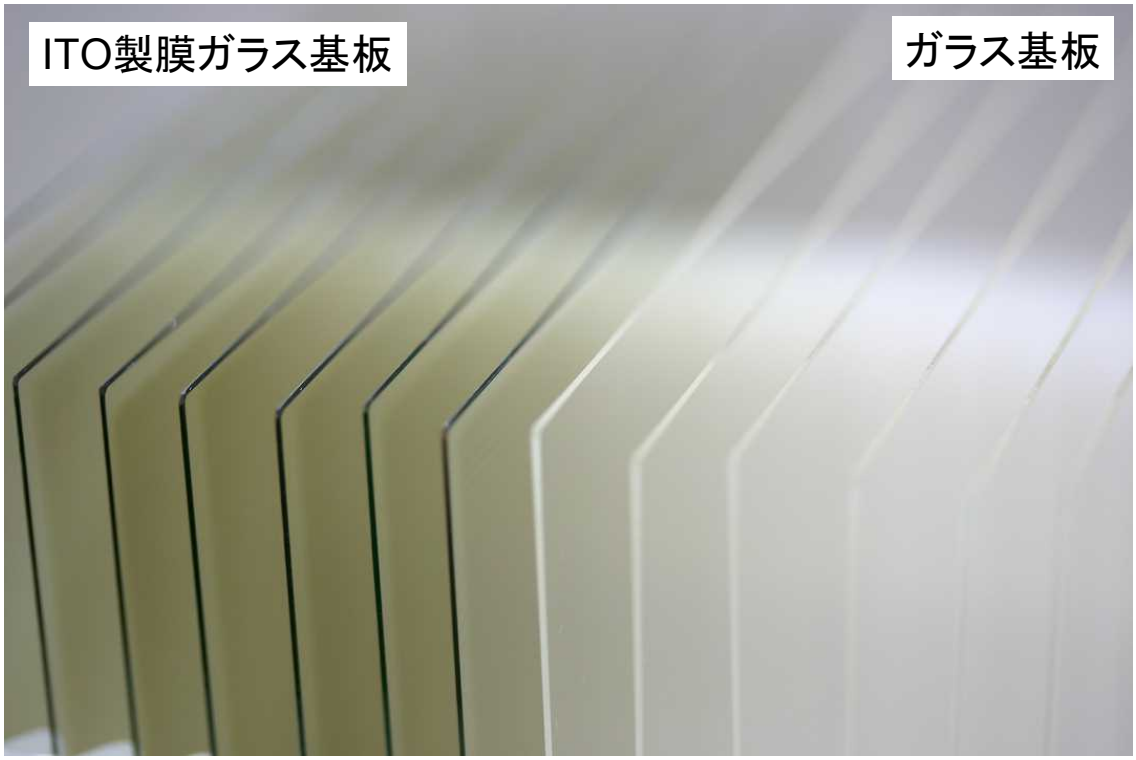


図 2. 30.　液晶用ガラスと ITO 製膜ガラス

図 2. 31.　液晶用 ITO 製膜ガラスとその破砕品

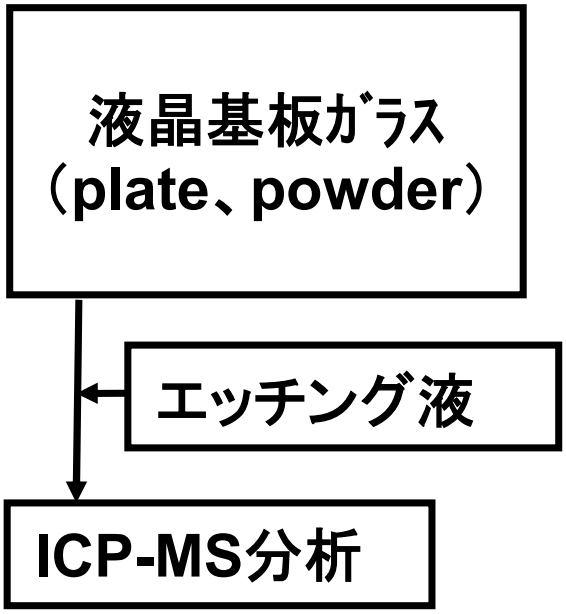


図 2. 32.　液晶用 ITO 製膜ガラスとその破砕品のエッチング液処理プロセス

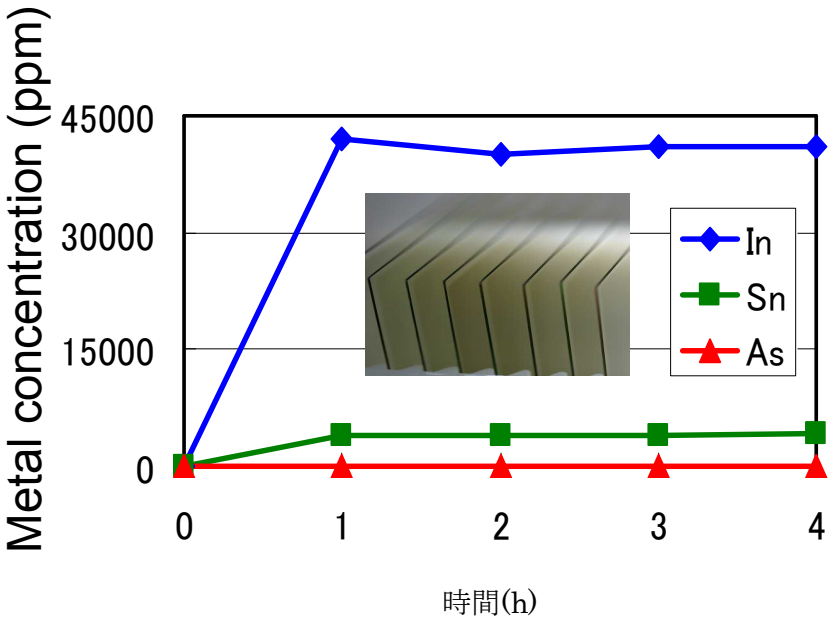


図 2. 33.　液晶用 ITO 製膜ガラスのエッチング液に対する溶解特性

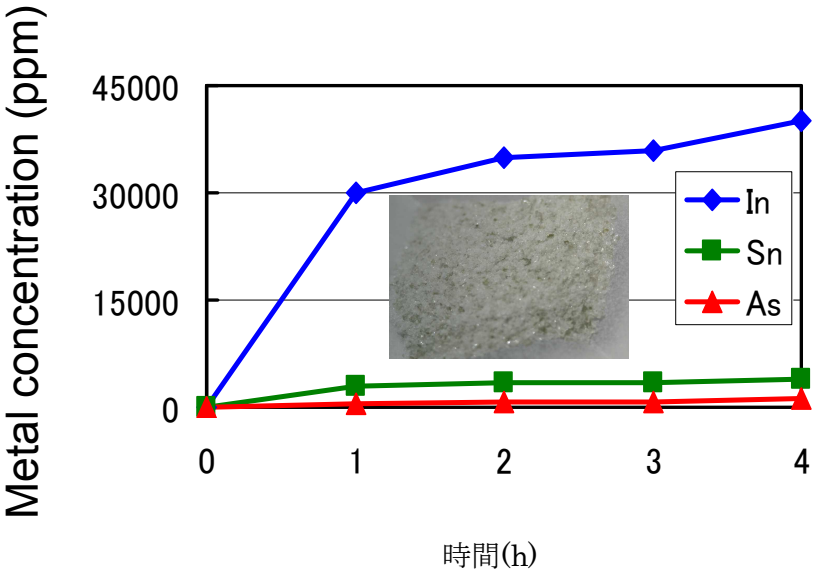


図 2. 34.　液晶用 ITO 製膜ガラス(破砕品)のエッチング液に対する溶解特性

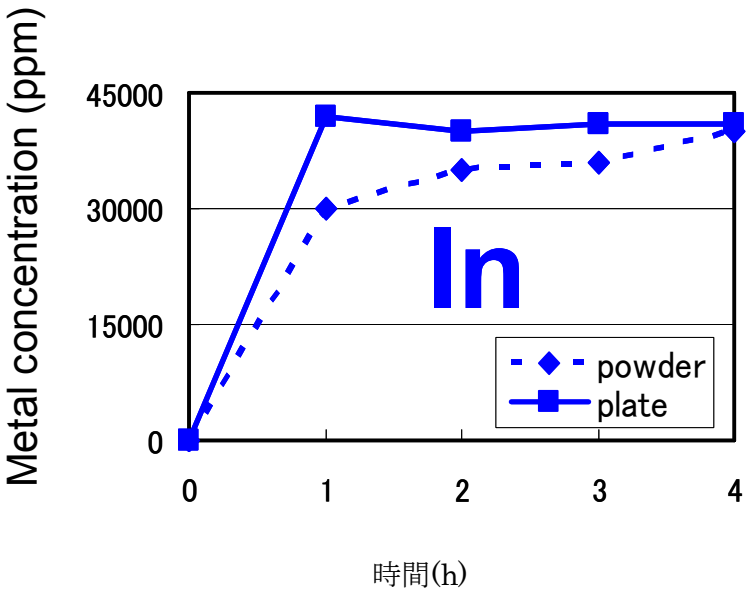


図 2.35. 液晶用 ITO 製膜ガラスのエッチング液に対するインジウムの溶解特性の破砕品と非破砕品の比較

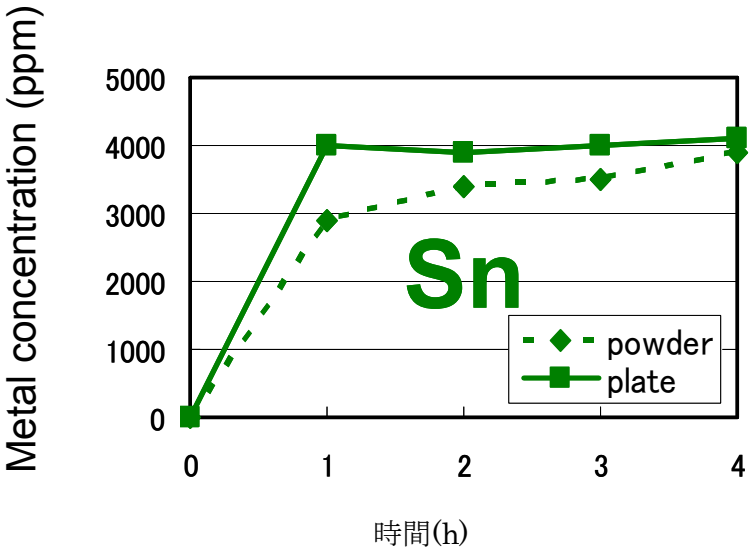


図 2.36. 液晶用 ITO 製膜ガラスのエッチング液に対するスズの溶解特性の破砕品と非破砕品の比較

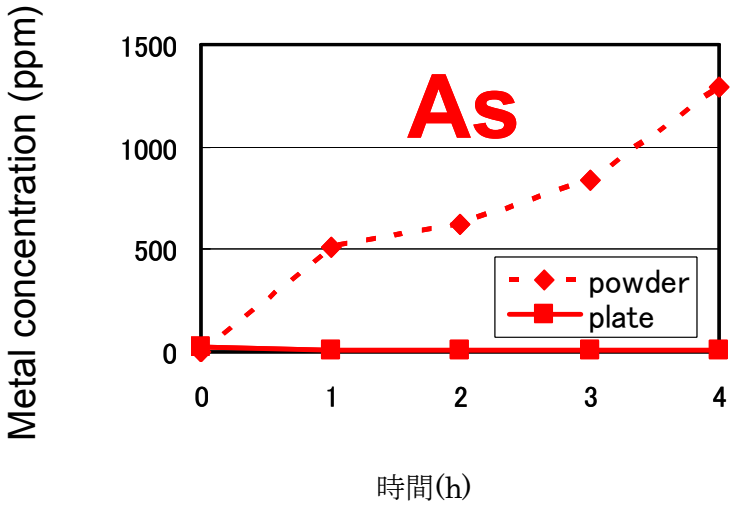


図 2.37　液晶用 ITO 製膜ガラスのエッチング液に対するヒ素の溶解特性の破砕品と非破砕品の比較

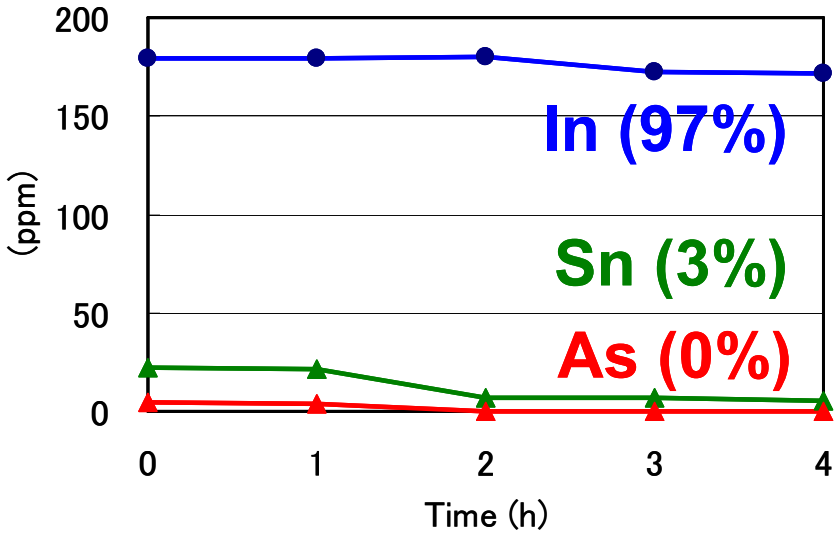


図 2.38.　ITO ガラス破砕品のエッチング液を吸着剤で処理した場合の金属イオン濃度の変化

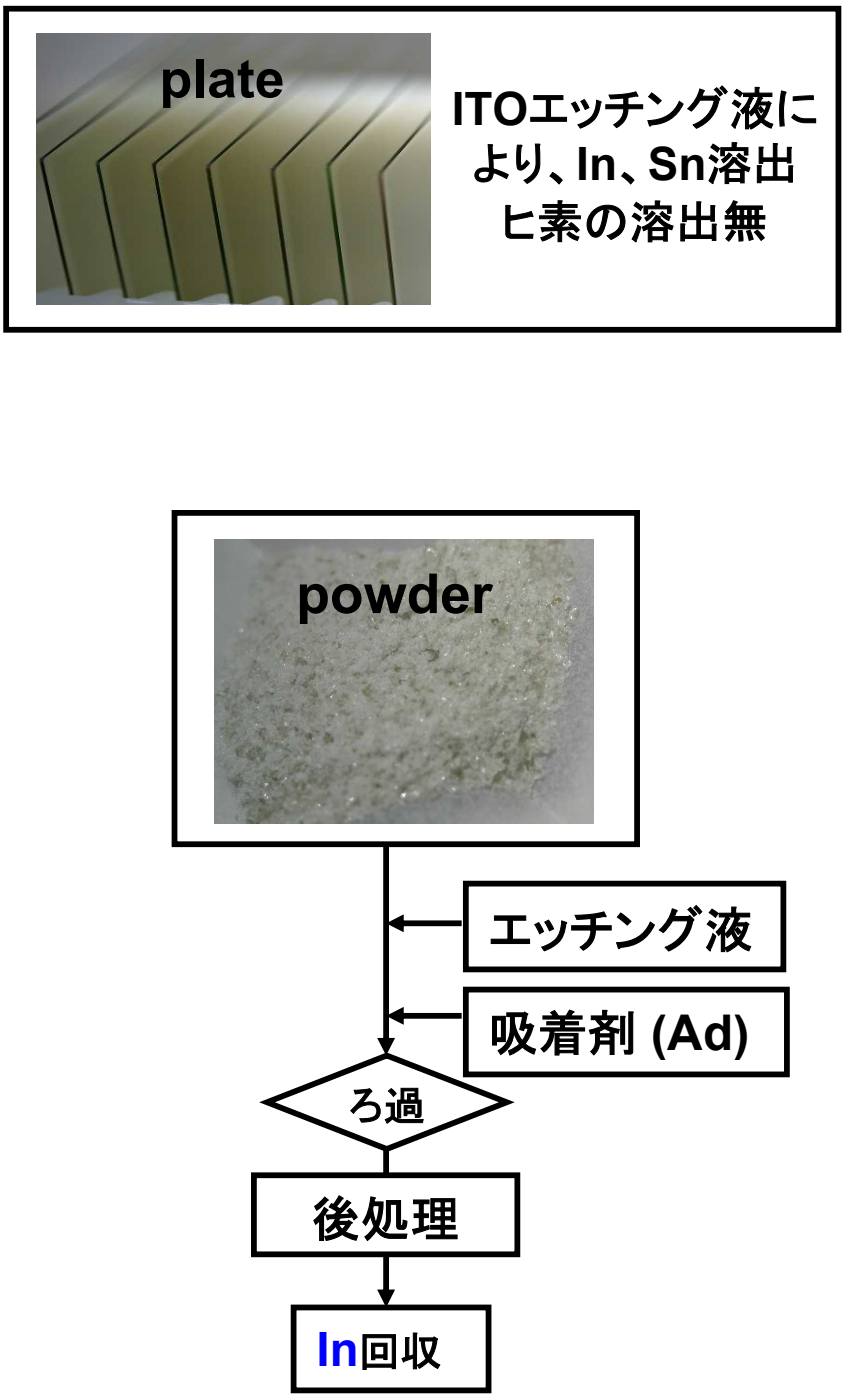


図 2.39. ITO ガラスからのインジウムの回収プロセス

第３章　安全性試験

毒物劇物取締法により、ヒ素を含む化合物は毒物に分類されている。アルセノベタイン（AsB）についても、法規制上は毒物と解釈される。AsB を毒物指定解除することにより、AsB の取り扱い、保管について、過剰な設備が不要となる。また、AsB の自然還元が可能となれば、最終処分場を不要とする処理法を提案することができる。これまで毒物指定解除されているヒ素化合物には、ヒ化インジウム、ヒ化ガリウム、メタンアルソン酸塩等がある。AsB の安全性試験を実施して、毒物劇物判定基準に該当しない結果を示すことにより、AsB の毒物指定解除が近い将来に可能となるとみられる。AsB を毒物指定解除するためには、急性毒性試験（経口、経皮、吸入）、皮膚刺激、眼刺激試験を実施して、法規制上の毒物劇物指定基準に該当しないことを示す必要がある。また、厚生労働省の担当部署からの情報により、OECD、GLP に準拠した研究機関で実施した動物実験のデータが必要である。AsB の安全性試験については、これまで、文献により経口急性毒性試験の結果[LD_{50} 10,000mg/kg]が報告されているが、OECD、GLP に準拠してはいない。昨年の本研究については、皮膚刺激、眼刺激試験について OECD、GLP に準拠した研究機関で実施し、AsB は安全な化合物であり、毒物、劇物には該当しないことを明らかにした。AsB の急性毒性試験（経口、経皮、吸入）を、OECD、GLP に準拠した研究機関で実施し、毒物指定解除に必要なデータを獲得する。また、ヒ素無毒化の副生成物、中間体物質である TMAO についても同様の検討を行う。

１．アルセノベタイン

1.1. 急性経口毒性試験

1.1.1.　要旨

試験結果より、Annex VI to Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation (EC) 1272/2008 に基づき、アルセノベタインは、毒性物質に分類されなかった。GSH (Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)により、アルセノベタインは、毒性物質に該当しないため表示義務はない。

1.1.2. 方法

2群各3匹のラット[メス、WISTAR Crl:WI(Ham)]に強制経口投与により 2000mg/kg-体重となるようにアルセノベタインを投与した。0.2g/mL の濃度になるように生理的食塩水(0.9% NaCl)にアルセノベタインを溶かし、ラットに投与した。全てのラットは、投与後1日目、8日目、15 日目に、毒性による異常が発現していないか目視により観察した。また、体重についても測定した。

1.1.3. 結果

全ての実験動物は、検査の最終日まで生存し、毒性による影響は認められなかった(表 3.1～表 3.4)。14 日間の体重測定の結果、体重の増加は、実験動物の種において、通常認められる範囲内であった(表 3.2)。

表 3.1. 各段階での結果

段階	性/動物番号	投与量（mg/kg）	動物数	死亡数
1	メス/1-3	2000	3	0
2	メス/4-6	2000	3	0

表 3.2. 実験動物の体重(g)と体重増加(%)

動物番号/性	g 1 日目	g ８日目	g 15 日目	g 1 日目～15 日目
段階１　(2000mg/kg 体重				
1/メス	184	208	215	17
2/メス	170	197	203	19
3/メス	178	198	198	11
段階２　(2000mg/kg 体重				
4/メス	177	202	207	17
5/メス	193	216	225	17
6/メス	161	172	188	17

表 3.3. 解剖検査の所見

動物番号/性	臓器	目視検査
段階１　(2000mg/kg 体重)		
1/メス	-	所見なし
2/メス	-	所見なし
3/メス	-	所見なし
段階２　(2000mg/kg 体重)		
4/メス	-	所見なし
5/メス	-	所見なし
6/メス	-	所見なし

（病理学的変化なし）

表 3.4. LD50 Cut-Off

投与量(unit)	動物数	死亡数	LD50 Cut-Off
2000mg/kg　体重	6	0	該当せず

1.2. 急性眼刺激性／腐食性試験

1.2.1. 要旨

試験結果より、Annex VI to Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation (EC) 1272/2008 に基づき、アルセノベタインは、刺激性物質に分類されなかった。

1.2.2. 方法

BSL BIOSERVICE Scientific Laboratories GmbH（プラネック、ドイツ）で実施した。GLP 規制(Good Laboratory Practice)を遵守した。方法は、OECD 405、EC 440/2008、OPPTS 870.2400 に準じた。ウサギ：３羽、New Zealand White Rabbits Crl: KBL (NZW)、暴露時間：4 時間、サンプル量：0.1g/各試験部位。結果を表 3.5～表 3.11 に示す。

1.2.3. 初期症例

投与後１時間後

３羽のうち３羽に、グレード１の発赤とグレード２の結膜浮腫が見られた（表 3.5、表 3.6、表 3.8、表 3.9)。

1.2.4. 最終症例

動物番号１については、72 時間後にグレード１の発赤が見られた（表 3.6)。

動物番号２については、48 時間後にグレード１の発赤が見られた（表 3.8)。

動物番号３については、６日後にグレード１の発赤が見られた（表 3.10)。

1.2.5. 観察された症例の可逆性

動物番号１については、4 日後に完全に可逆的に回復した（表 3.7)。

動物番号２については、72 時間後に完全に可逆的に回復した（表 3.8)。

動物番号３については、７日後に完全に可逆的に回復した（表 3.10)。

表 3.5. 眼反応の平均データ(24、48、72 時間)

動物番号	性	結膜	結膜浮腫	虹彩	角膜
1	メス	1.00	0.67	0.00	0.00
2	メス	0.67	0.33	0.00	0.00
3	メス	1.00	0.33	0.00	0.00

表 3.6. 眼反応の個別データ

単一動物の眼反応データ(動物番号１)					
	処方後の時間				平均得点
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	

	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	1/0	1.00
結膜腫脹	2/0	1/0	1/0	1/0	0.67
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	0
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	0

表 3.7. 眼反応の個別データ

単一動物の眼反応データ（動物番号１）		
	処方後の時間	
	4 日	
	試験／対照	
結膜発赤	0/0	
結膜腫脹	0/0	
虹彩	0/0	
角膜	0/0	

表 3.8. 眼反応の個別データ

単一動物データ（動物番号２）					
	処方後の時間				平均得点
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	0/0	0.67
結膜腫脹	2/0	1/0	0/0	0/0	0.33
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	0
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	0

表 3.9. 眼反応の個別データ

単一動物の眼反応データ（動物番号３）					
	処方後の時間				平均得点
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	1/0	1.00
結膜腫脹	2/0	1/0	0/0	0/0	0.33
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	0
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	0

表 3.10. 眼反応の個別データ

単一動物の眼反応データ（動物番号３）					
	処方後の時間				
	4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	0/0	
結膜腫脹	0/0	0/0	0/0	0/0	
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	

表 3.11. 眼反応の所見

動物番号１		
処方後の時間	全身所見	特異的所見
1 時間後	所見なし	流涙 1
24 時間後	所見なし	所見なし
48 時間後	所見なし	所見なし
72 時間後	所見なし	所見なし
4 日後	所見なし	所見なし
動物番号２		
処方後の時間	全身所見	特異的所見
1 時間後	所見なし	流涙 1
24 時間後	所見なし	所見なし
48 時間後	所見なし	所見なし
72 時間後	所見なし	所見なし
動物番号３		
処方後の時間	全身所見	特異的所見
1 時間後	所見なし	所見なし
24 時間後	所見なし	所見なし
48 時間後	所見なし	所見なし
72 時間後	所見なし	所見なし
4 日後	所見なし	所見なし
5 日後	所見なし	所見なし
6 日後	所見なし	所見なし
7 日後	所見なし	所見なし

1.2.6. 結論

本研究の結果、一羽のウサギの眼にアルセノベタインを1回投与（処方量：0.1g）したところ、刺激性が観察された(表 3.6、表 3.8、表 3.9)。しかしながら、7 日以内に完全に可逆的に回復した(表 3.6～表 3.10、図 3.1～図 3.16)。致死や重篤な臨床症状は観察されなかった。Annex VI of Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation (EC) 1272/2008 に基づき、供試物質、アルセノベタインは、眼刺激物質には分類されない、また、眼刺激性としての表示義務はない。OECE-GHS (Globally Harmonized Classification System)によると、アルセノベタインは、眼刺激性については、Category 2B に分類された。ウサギを用いた無機ヒ素（三酸化二ヒ素）の急性眼刺激毒性試験については、眼瞼の浮腫、角膜の損傷および混濁が認められたとの報告があり（CERI ハザードデータ集、2001-8、2001 年）、Category 2A に分類されている。無機ヒ素に比べて、アルセノベタインは、著しく減毒されていることが実証された。

図 3.1.　試験前の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号１、対照群）

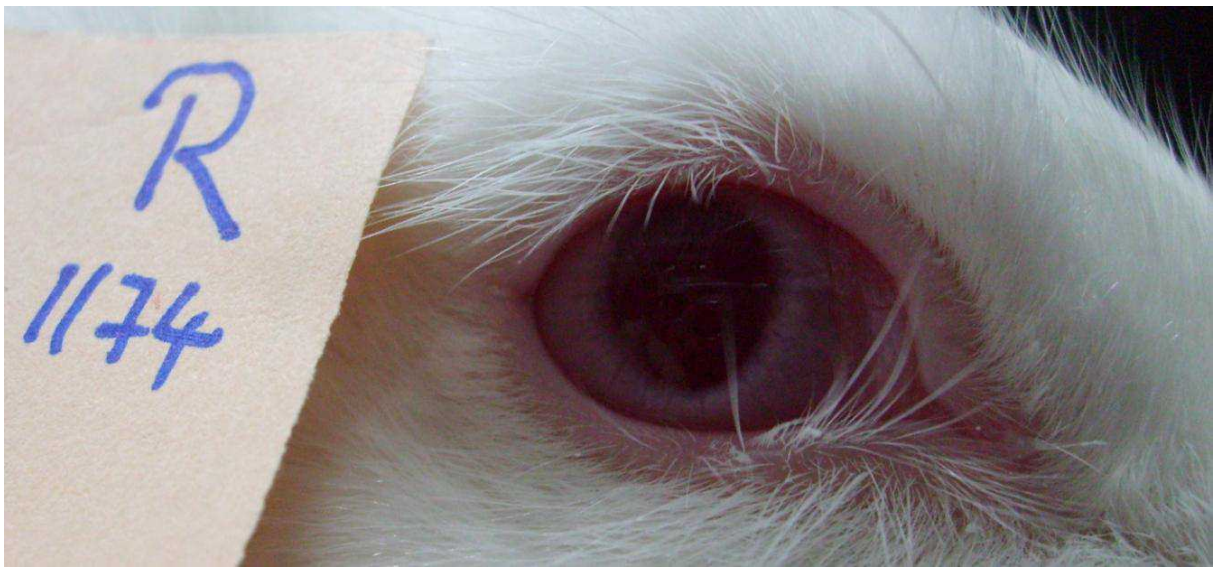


図 3.2.　試験前の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号１、試験群）

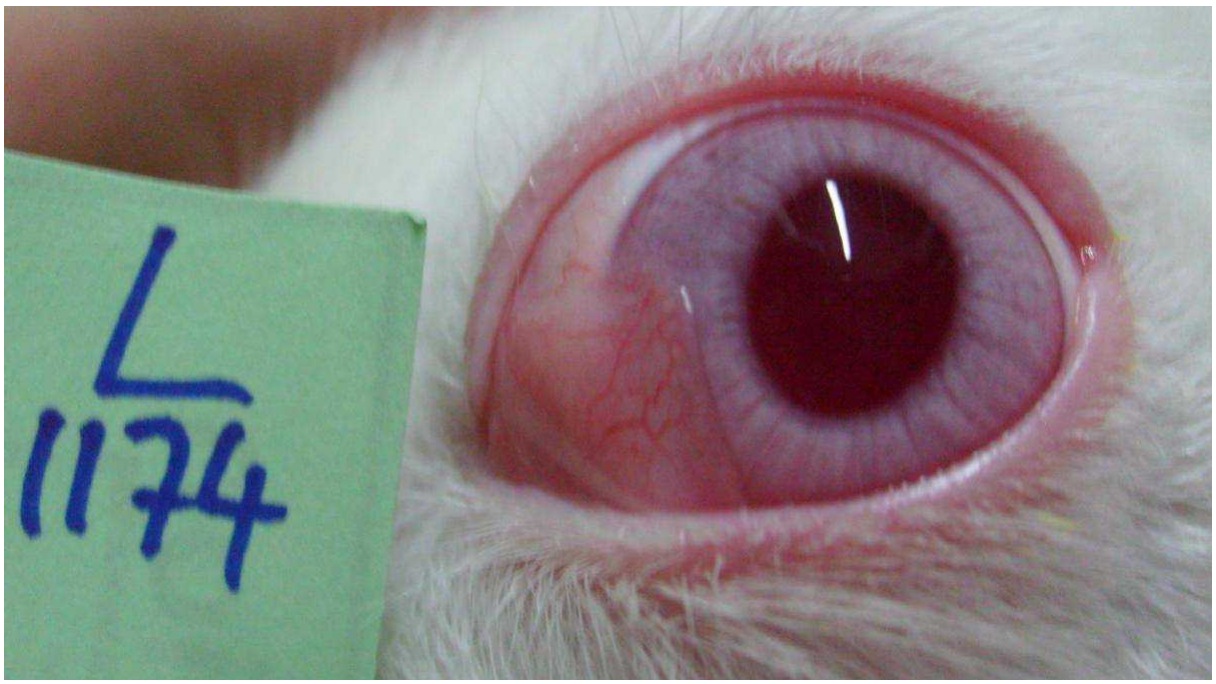


図 3.3. 72 時間後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号１、対照群）

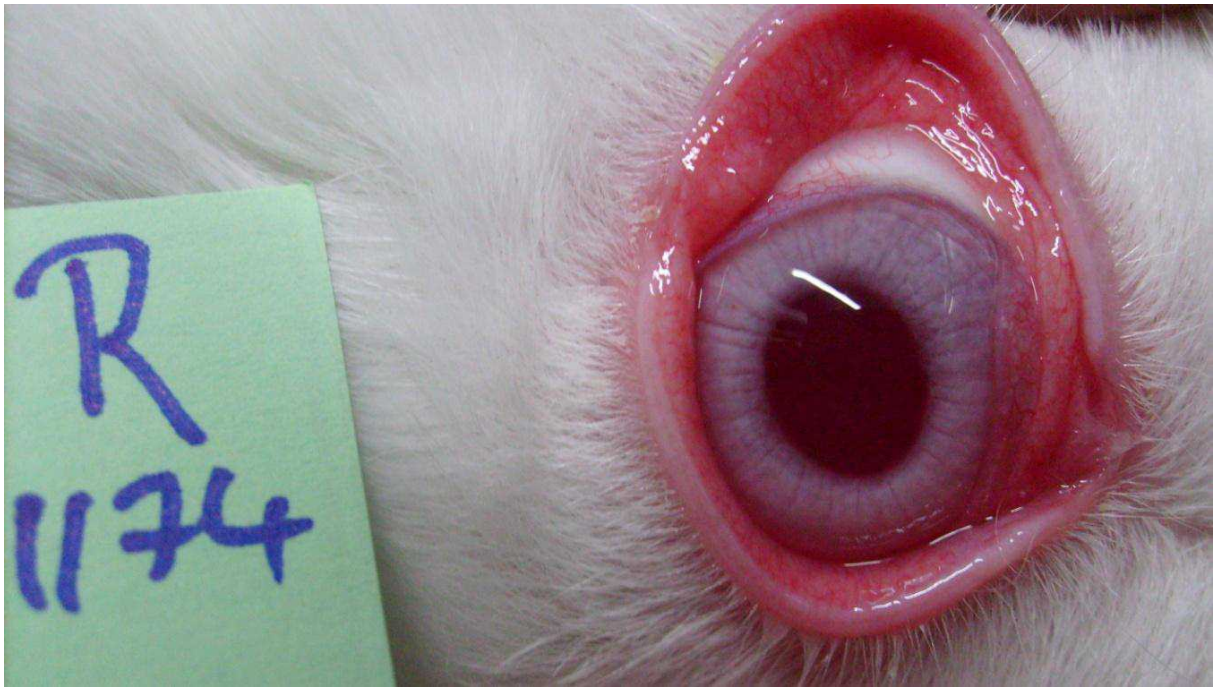


図 3.4. 72 時間後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号１、試験群）

図 3.5. 4 日後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号１、対照群）

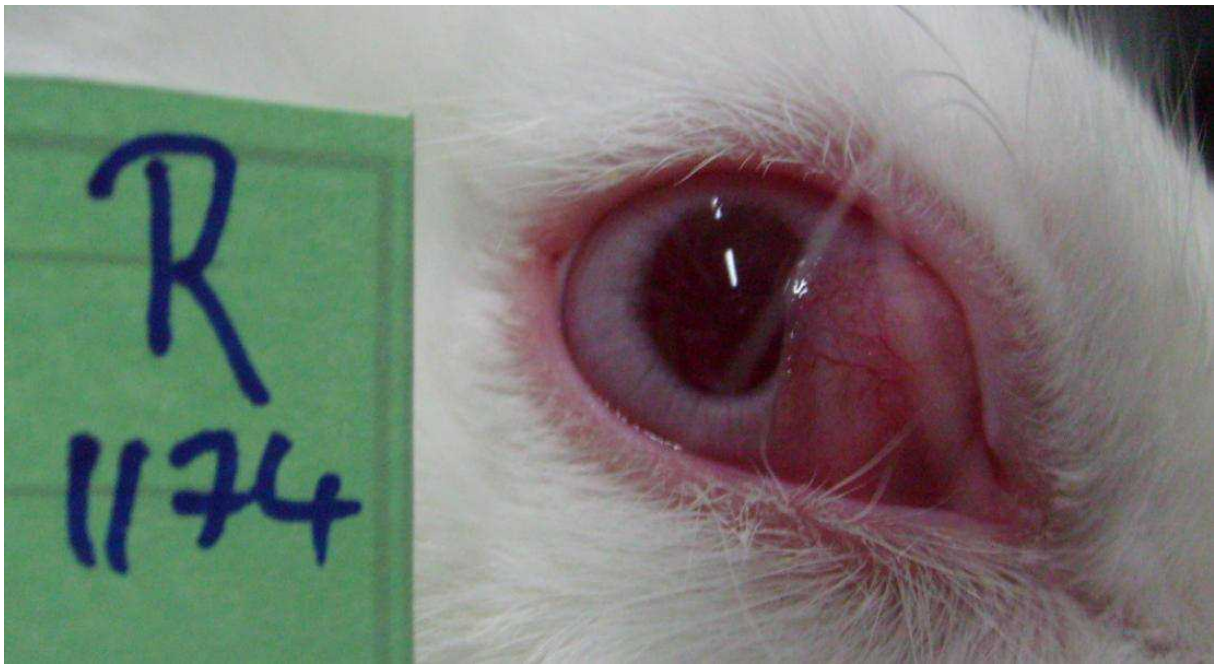


図 3.6. 4 日後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号１、試験群）

図 3.7. 試験前の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号２、対照群）

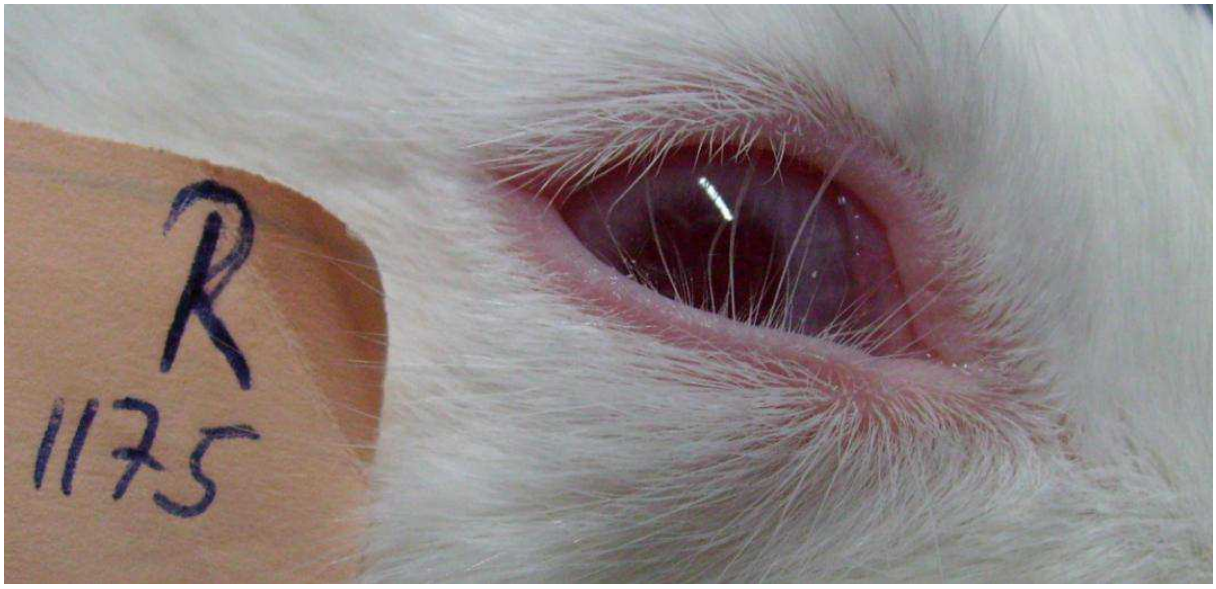


図 3.8. 試験前の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号２、試験群）

図 3.9.　72 時間後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号２、対照群）

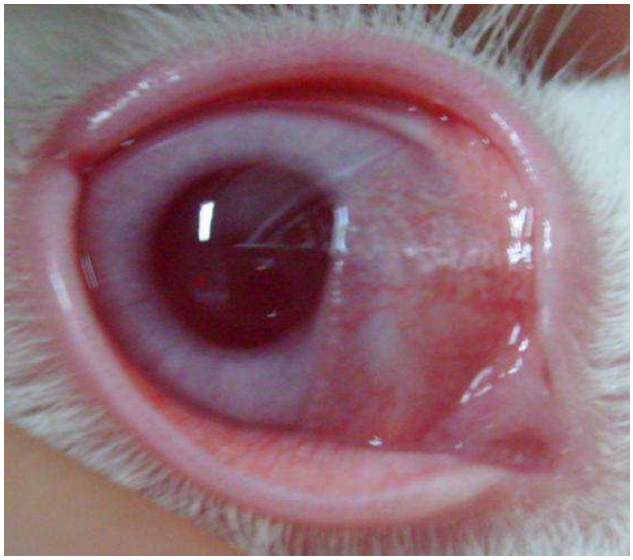


図 3.10.　72 時間後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号２、実験群）

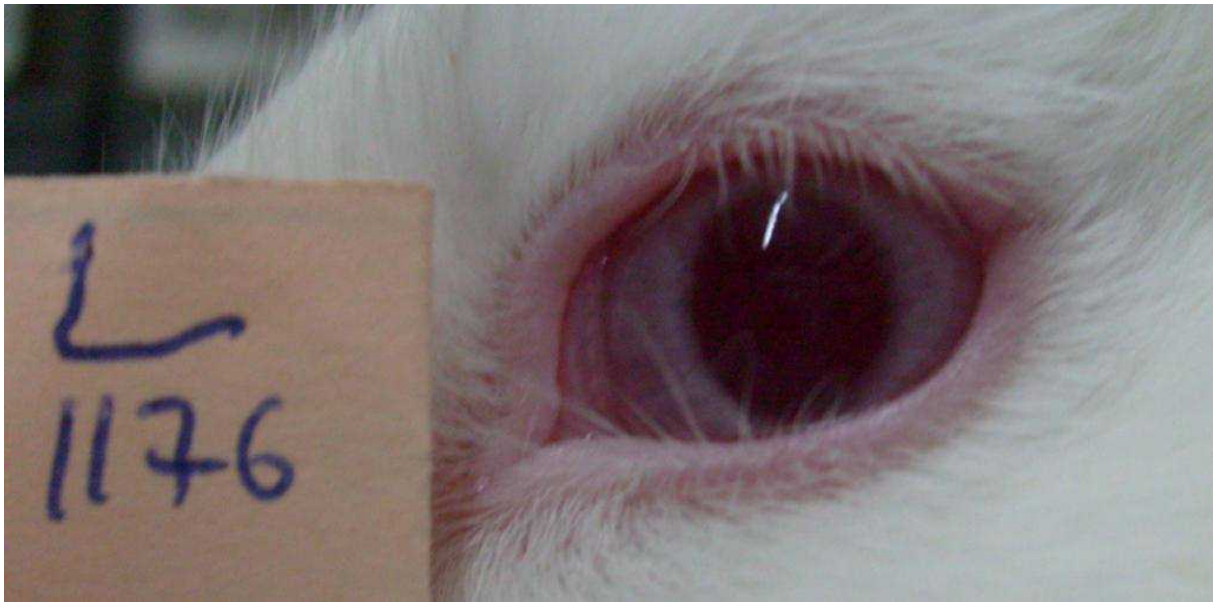


図 3.11. 試験前の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号３、対照群）

図 3.12. 試験前の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号３、試験群）

図 3.13. 72 時間後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号３、対照群）

図 3.14. 72 時間後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号３、試験群）

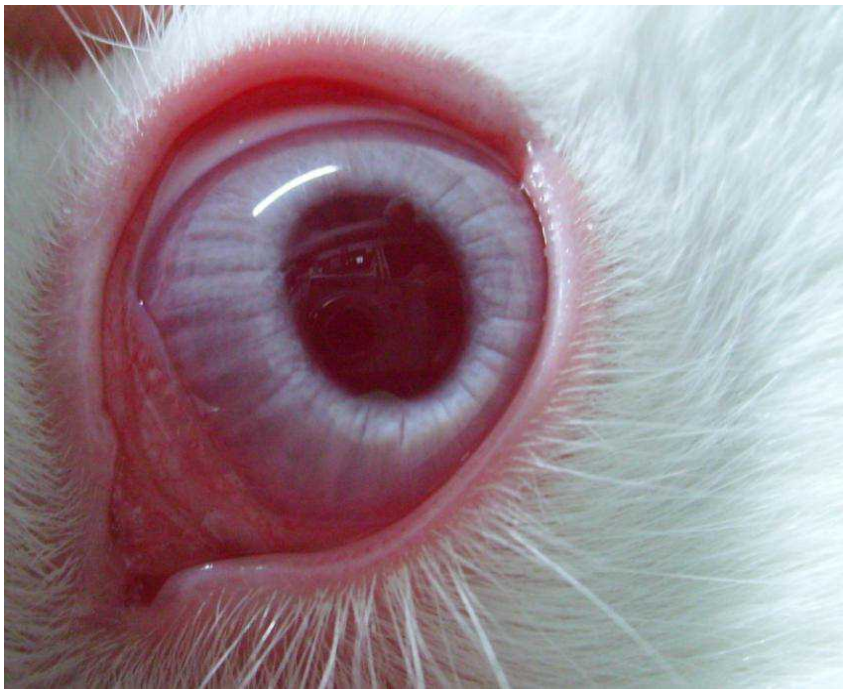


図 3.15. 7 日後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号３、対照群）

図 3.16. 7 日後の実験動物の試験部位（眼）の臨床観察（動物番号３、試験群）

1.3. 急性皮膚刺激性／腐食性試験

1.3.1. 方法

試験は、BSL BIOSERVICE Scientific Laboratories GmbH（プラネック、ドイツ）で実施した。GLP 規制(Good Laboratory Practice)を遵守した。方法は、OECD 404、EC 440/2008、OPPTS 870.2500 に準じた。ウサギ：３羽、New Zealand White Rabbits Crl: KBL (NZW)、暴露時間：4 時間、サンプル量：0.5g/各試験部位、試験部位：胴体背部皮膚

表 3.12. 平均スコア(24、48、72 時間)

刺激スコアの平均値		
動物番号	平均（２４～７２時間）	
	紅斑	浮腫
1	0	0
2	0	0
3	0	0
平均値	0	0

表 3.13. 個別スコア

動物番号	適用部位	刺激性（パッチ除去後の時間）							
		1 時間		24 時間		48 時間		72 時間	
		試験群	対照群	試験群	対照群	試験群	対照群	試験群	対照群
1	紅斑	0	0	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0	0
2	紅斑	0	0	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0	0
3	紅斑	0	0	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3.14. 個別データ

全身、特異的所見（動物番号：１）			
パッチ除去後の時間	全身所見	特異的所見	備考
1 時間	所見なし	所見なし	－
24 時間	所見なし	所見なし	－
48 時間	所見なし	所見なし	－
72 時間	所見なし	所見なし	－
全身、特異的所見（動物番号：２）			

パッチ除去後の時間	全身所見	特異的所見	備考
1 時間	所見なし	所見なし	－
24 時間	所見なし	所見なし	－
48 時間	所見なし	所見なし	－
72 時間	所見なし	所見なし	－
全身、特異的所見（動物番号：１）			
パッチ除去後の時間	パッチ除去後の時間	パッチ除去後の時間	パッチ除去後の時間
1 時間	所見なし	所見なし	－
24 時間	所見なし	所見なし	－
48 時間	所見なし	所見なし	－
72 時間	所見なし	所見なし	－

1.3.2. 結果の要約

皮膚刺激性、皮膚腐食性物質には分類されないことが示された（表 3.12～表 3.14）。

1.3.3. 結論

本研究の結果、一羽のウサギの皮膚にアルセノベタインを単一塗布（処方量：0.5g）したところ、パッチ除去後に刺激性、腐食性は観察されなかった（表 3.13～表 3.14）。三羽のウサギの皮膚にアルセノベタインを単一塗布（処方量：0.5g）したところ、パッチ除去後に刺激性、腐食性は観察されなかった（図 3.17 ~図 3.28）致死や重篤な臨床症状は観察されなかった。Annex VI of Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation (EC) 1272/2008 に基づき、アルセノベタインは、危険性物質には分類されない。また、危険物質としての表示義務はない。OECE-GHS (Globally Harmonized Classification System)によると、アルセノベタインは、皮膚刺激性物質としての表示義務はない。

図 3.17.　試験前の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号１、対照群、面積：約 6cm^2）

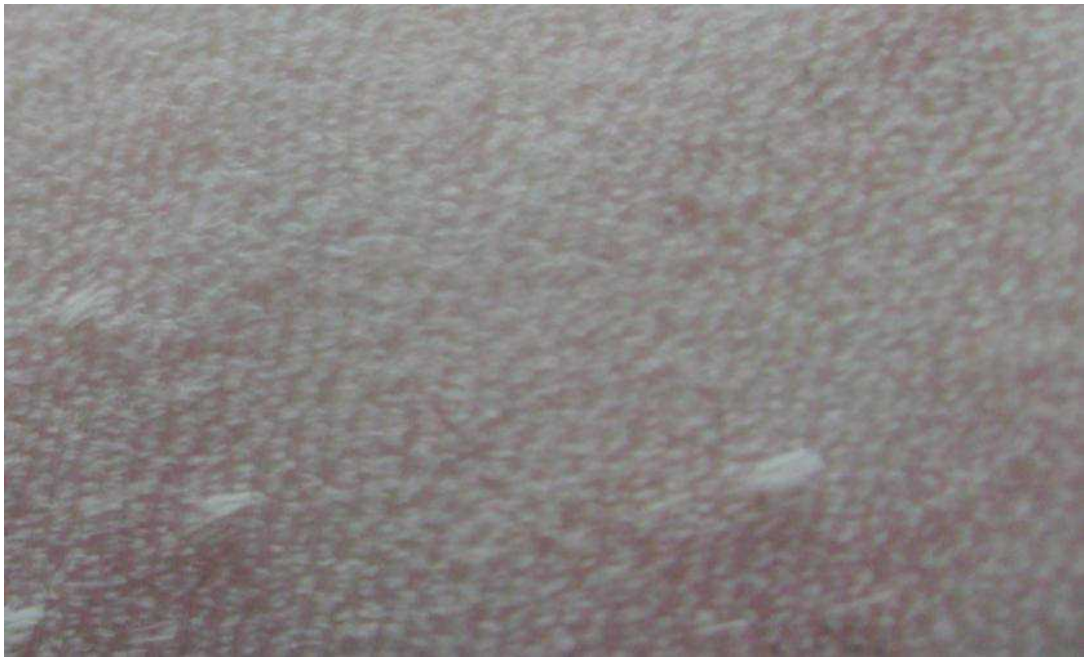


図 3.18.　試験前の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号１、試験群、面積：約 6cm^2）

図 3.19.　72 時間後の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号１、対照群、面積：約 6cm^2）

図 3.20.　72 時間後の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号１、試験群、面積：約 6cm^2）

図 3.21.　試験前の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号２、対照群、面積：約 6cm^2）

図 3.22.　試験前の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号２、試験群、面積：約 6cm^2）

図 3.23.　72 時間後の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号２、対照群、面積：約 6cm^2）

図 3.24.　72 時間後の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号２、試験群、面積：約 6cm^2）

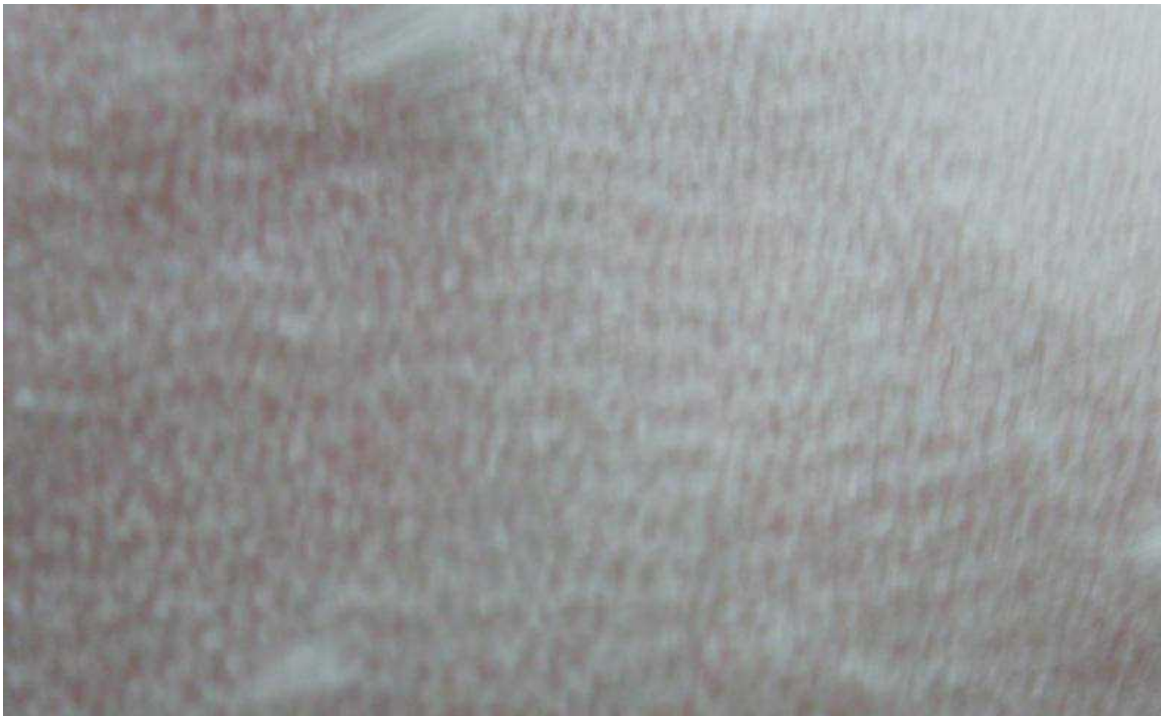


図 3.25.　試験前の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号３、対照群、面積：約 6cm^2）

図 3.26.　試験前の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号３、実験群、面積：約 6cm^2）

図 3.27.　72 時間後の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号３、対照群、面積：約 6cm^2）

図 3.28. 72 時間後の実験動物の試験部位（胴体背部の皮膚）の臨床観察
（動物番号３、実験群、面積：約 6cm^2）

２．トリメチルアルシンオキシド

2.1. 急性経口毒性試験

2.1.1.　要旨

試験結果より、Annex VI to Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation (EC) 1272/2008 に基づき、トリメチルアルシンオキシドは、毒性物質に分類されなかった。GSH (Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)により、トリメチルアルシンオキシドは毒物に該当しないため表示義務はない。

2.1.2. 方法

2群各3匹のラット[メス、WISTAR Crl:WI(Ham)]に強制経口投与により 2000mg/kg-体重となるようにトリメチルアルシンオキシドを投与した。0.2g/mL の濃度になるように生理的食塩水(0.9% NaCl)にトリメチルアルシンオキシドを溶かしてラットに投与した。全てのラットは、投与後1日目、8日目、15日目に、目視検査により毒性による異常が発現していないか観察した。体重についても測定した。

2.1.3. 結果

全ての実験動物は、検査の最終日まで生存し、毒性による影響は認められなかった(表 3.15～表 3.18)。14 日間の体重測定の結果、体重の増加は、実験動物の種において、通常認められる範囲内であった(表 3.16)。

表 3.15. 各段階での結果

段階	性/動物番号	投与量（mg/kg）	動物数	死亡数
1	メス/1-3	2000	3	0
2	メス/4-6	2000	3	0

表 3.16. 実験動物の体重(g)と体重増加(%)

動物番号/性	g 1 日目	g ８日目	g 15 日目	g 1 日目～15 日目
段階１　(2000mg/kg 体重				
1/メス	172	190	193	12
2/メス	177	189	198	12
3/メス	189	212	227	20
段階２　(2000mg/kg 体重				
4/メス	189	205	214	13
5/メス	157	172	171	9
6/メス	190	216	215	13

表 3.17. 検査の所見

動物番号/性	臓器	目視検査
段階１　(2000mg/kg 体重)		
1/メス	-	所見なし
2/メス	-	所見なし
3/メス	-	所見なし
段階２　(2000mg/kg 体重)		
4/メス	-	所見なし
5/メス	-	所見なし
6/メス	-	所見なし

（病理学的変化なし）

表 3.18. LD50 Cut-Off

投与量(unit)	動物数	死亡数	LD50 Cut-Off
2000mg/kg　体重	6	0	該当せず

2.2. 急性眼刺激性／腐食性試験

2.2.1. 要旨

試験結果より、Annex VI to Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation

(EC) 1272/2008 に基づき、トリメチルアルシンオキシドは、刺激性物質に分類されなかった。

2.2.2. 方法

BSL BIOSERVICE Scientific Laboratories GmbH（プラネック、ドイツ）で実施した。GLP 規制(Good Laboratory Practice)を遵守した。方法は、OECD 405、EC 440/2008、OPPTS 870.2400 に準じた。ウサギ：３羽、New Zealand White Rabbits Crl: KBL (NZW)、暴露時間：4 時間、サンプル量：0.1g/各試験部位。

2.2.3. 初期症例

投与後１時間後

動物番号１、２については、グレード１の発赤、グレード１の結膜浮腫とグレード１の流涙が見られた（表 3.19～表 3.26)。

動物番号３については、グレード１の発赤、グレード１の結膜浮腫とグレード２の流涙が見られた（表 3.19～表 3.26)。

2.2.4. 最終症例

動物番号１については、７日後にグレード１の発赤が見られた（表 3.20 と表 3.21)。

動物番号２、３については、６日後にグレード１の発赤が見られた（表 3.22～表 3.25)。

2.2.5. 観察された症例の可逆性

動物番号１については、８日後に完全に可逆的に回復した（表 3.20 と表 3.21)。

動物番号２、３については、７日後後に完全に可逆的に回復した（表 3.22～表 3.25)。

表 3.19. 眼反応の平均データ(24、48、72 時間)

動物番号	性	結膜	結膜浮腫	虹彩	角膜
1	メス	1.33	0.33	0.00	0.00
2	メス	1.00	0.33	0.00	0.00
3	メス	1.00	0.33	0.00	0.00

表 3.20. 眼反応の個別データ

単一動物の眼反応データ(動物番号１)					
	処方後の時間				平均得点
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	2/0	1/0	1/0	1.33
結膜腫脹	1/0	1/0	0/0	1/0	0.33

虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	0
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	0

表 3.21. 眼反応の個別データ

単一動物データ（動物番号１）					
	処方後の時間				
	4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	8 日後
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	1/0	0/0
結膜腫脹	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

表 3.22. 眼反応の個別データ

単一動物データ（動物番号２）					
	処方後の時間				平均得点
	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	1/0	1.00
結膜腫脹	1/0	1/0	0/0	0/0	0.33
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	0
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	0

表 3.23. 眼反応の個別データ

単一動物データ（動物番号２）					
	処方後の時間				
	4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	0/0	
結膜腫脹	0/0	0/0	0/0	0/0	
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	

表 3.24. 眼反応の個別データ

単一動物の眼反応データ（動物番号３）		
	処方後の時間	平均得点

	1 時間	24 時間	48 時間	72 時間	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	1/0	1.00
結膜腫脹	1/0	1/0	0/0	0/0	0.33
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	0
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	0

表 3.25. 眼反応の個別データ

単一動物の眼反応データ（動物番号３）					
	処方後の時間				
	4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	
	試験／対照	試験／対照	試験／対照	試験／対照	
結膜発赤	1/0	1/0	1/0	0/0	
結膜腫脹	0/0	0/0	0/0	0/0	
虹彩	0/0	0/0	0/0	0/0	
角膜	0/0	0/0	0/0	0/0	

表 3.26. 眼反応の所見

動物番号１		
処方後の時間	全身所見	特異的所見
1 時間後	所見なし	流涙 1
24 時間後	所見なし	流涙 2
48 時間後	所見なし	所見なし
72 時間後	所見なし	所見なし
4 日後	所見なし	所見なし
5 日後	所見なし	所見なし
6 日後	所見なし	所見なし
7 日後	所見なし	所見なし
8 日後	所見なし	所見なし
動物番号２		
処方後の時間	全身所見	特異的所見
1 時間後	所見なし	流涙 1
24 時間後	所見なし	流涙 1
48 時間後	所見なし	所見なし
72 時間後	所見なし	所見なし

4 日後	所見なし	所見なし
5 日後	所見なし	所見なし
6 日後	所見なし	所見なし
7 日後	所見なし	所見なし
動物番号３		
処方後の時間	全身所見	特異的所見
1 時間後	所見なし	流涙 2
24 時間後	所見なし	流涙 1
48 時間後	所見なし	所見なし
72 時間後	所見なし	所見なし
4 日後	所見なし	所見なし
5 日後	所見なし	所見なし
6 日後	所見なし	所見なし
7 日後	所見なし	所見なし

2.2.6. 結論

本研究の結果、一羽のウサギの眼にトリメチルアルシンオキシドを１回投与（処方量：0.1g）したところ、刺激性が観察された(表 3.26)。しかしながら、７日以内に完全に可逆的に回復した(表 3.26)。致死や重篤な臨床症状は観察されなかった。Annex VI of Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation (EC) 1272/2008 に基づき、供試物質、トリメチルアルシンオキシドは、眼刺激物質には分類されない、また、眼刺激性としての表示義務はない。GHS (Globally Harmonized Classification System)によると、トリメチルアルシンオキシドは、眼刺激性については、表示義務はない。ウサギを用いた無機ヒ素（三酸化二ヒ素）の急性眼刺激毒性試験については、眼瞼の浮腫、角膜の損傷および混濁が認められたとの報告があり（CERI ハザードデータ集、2001-8、2001 年）、Category 2A に分類されている。無機ヒ素に比べて、トリメチルアルシンオキシドは、著しく減毒されていることが実証された。

2.3. 急性皮膚刺激性／腐食性試験

2.3.1. 方法

試験は、BSL BIOSERVICE Scientific Laboratories GmbH（プラネック、ドイツ）で実施した。GLP 規制(Good Laboratory Practice)を遵守した。方法は、OECD 404、EC 440/2008、OPPTS 870.2500 に準じた。ウサギ：３羽、New Zealand White Rabbits Crl: KBL (NZW)、暴露時間：4 時間、サンプル量：0.5g/各試験部位、試験部位：胴体背部皮膚

表 3.27. 平均スコア(24、48、72 時間)

刺激スコアの平均値		
動物番号	平均（２４～７２時間）	
	紅斑	浮腫
1	0	0
2	0	0
3	0	0
平均値	0	0

表 3.28. 個別スコア

動物番号	適用部位	刺激性（パッチ除去後の時間）							
		1 時間		24 時間		48 時間		72 時間	
		試験群	対照群	試験群	対照群	試験群	対照群	試験群	対照群
1	紅斑	0	0	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0	0
2	紅斑	0	0	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0	0
3	紅斑	0	0	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3.29. 個別データ

全身、特異的所見（動物番号：１）			
パッチ除去後の時間	全身所見	特異的所見	備考
1 時間	所見なし	所見なし	－
24 時間	所見なし	所見なし	－
48 時間	所見なし	所見なし	－
72 時間	所見なし	所見なし	－
全身、特異的所見（動物番号：２）			
パッチ除去後の時間	全身所見	特異的所見	備考
1 時間	所見なし	所見なし	－
24 時間	所見なし	所見なし	－
48 時間	所見なし	所見なし	－
72 時間	所見なし	所見なし	－
全身、特異的所見（動物番号：３）			
パッチ除去後の時間	パッチ除去後の時間	パッチ除去後の時間	パッチ除去後の時間
1 時間	所見なし	所見なし	－
24 時間	所見なし	所見なし	－

48 時間	所見なし	所見なし	－
72 時間	所見なし	所見なし	－

2.3.2. 結果の要約

皮膚刺激性、皮膚腐食性物質には分類されないことが示された（表 3.27~表 3.29）。

2.3.3. 結論

本研究の結果、一羽のウサギの皮膚にトリメチルアルシンオキシドを単一塗布（処方量：0.5g）したところ、パッチ除去後に刺激性、腐食性は観察されなかった。三羽のウサギの皮膚にトリメチルアルシンオキシドを単一塗布（処方量：0.5g）したところ、パッチ除去後に刺激性、腐食性は観察されなかった（表 3.29）。致死や重篤な臨床症状は観察されなかった。Annex VI of Commission Directive 2001/59/EC と Annex I of Regulation (EC) 1272/2008 に基づき、トリメチルアルシンオキシドは、危険性物質には分類されない。また、危険物質としての表示義務はない。GHS (Globally Harmonized Classification System)によると、トリメチルアルシンオキシドは、皮膚刺激性物質としての表示義務はない。

3. 文献

Chemikaliengesetz(“Chemicals Act”) of the Federal Republic of Germany, Appendix 1 to § 19a as amended and promulgated on 20 June 2002 (BGB1. Nr. 40 S. 2090), revised 31 October 2006 (BGB1. Nr. 50 S. 2407).

OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris 1998

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 405, “Acute Eye Irritation/Corrosion” (2002)

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, No. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion (2002), Organisation for Economic Co-Operation and Development, Paris

Commission Regulation (EC) No 440/2008, L 142, Annex Part B of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH)

EPA Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.2400 Acute Eye Irritation, EPA 712-C-98-195 (August 1998), United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101)

EPA Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.2500 Acute Eye Irritation, EPA 712-C-98-196 August 1998, United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and

Toxic Substances (7101)
EC, 2001: Commission Directive 2001/59/EC of 6th August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council, Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the Classification, Packaging and Labeling of Dangerous Substances. Official Journal of the European Communities, L 225, 21 August 2001
Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labeling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official Journal of the European Communities, L 353, 31 December 2008
GHS-Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals. Third revised edition, United Nations. New York / Geneva, July 2009
German Animal Welfare Act, Art. 9.2, No. 7 (Deutsches Tierschutzgesetz, 24. Juli 1972 (BGBl. IS. 1277), Inkrafttreten der letzten Änderung: 22. Juli 2009, (Art. 2 ÄndG vom 15. Juli 2009)
Merkblatt zur tierschutzgerechten Haltung von Versuchstieren; Merkblatt 55 Kaninchen; TVT Tierärztliche Vereingung für Tierschuntz
Planung, Struktur von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institution; Veröffentlichung GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde, Society for Laboratory Animal Science), Mai 1988
Draize, J. H. (1955), Dermal Toxicity pp. 46-59, Association of Food and Drug Officials of the U. S. , Washington D. C.
Draize, J. H. (1965), Appraisal of the Safety of Chamicals, in: Foods, Drug and Cosmetics-Dermal Toxicity pp. 49-52., Assoc. of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas
Weil, S. C., Scala, R. A., (1971), Study of Intra- and Interlaboratory Variability in the Results of Rabbit Eye and Skin Irritation Tests. *Toxicol. Appl. Phamacol.* 12: 276-360

4. 細胞毒性試験

実験方法

1）細胞

HeLa 細胞（ヒト子宮頸がん細胞）は ECACC（Cat. No. EC EC93021013）より購入し、10%牛胎児血清（Lot.No. 68313101, MOREGATE, Australia & New Zealand）を含む Eagle MEM 培地（Sigma-aldrich 社製）を用いて継代培養した。HL-60 細胞（ヒト急性前骨髄性白血病細胞）も同様に ECACC（Cat. No EC98070106）より購入し、10%牛胎児血清（Lot.No. 68313101, MOREGATE, Australia & New Zealand）を含む RPMI1640 培地（Sigma-aldrich 社製）を用いて継代培養した。

2) 細胞毒性試験

細胞は 96-well culture dish に 90μl づつ播種し(HeLa; $5x10^4$ viable cells/ml, HL-60; $1x10^5$ viable cells/ml)、炭酸ガスインキュベータ内で 24 時間培養した。三酸化ヒ素[iAs(Ⅲ)]およびアルセノベタイン（AsB）は最終濃度が 2.5-100 μM になるように 10μl づつ添加し、24 時間曝露した。曝露終了後、培地に Cell counting kit (DOJINDO 社製) を 10ul 添加し、さらに 1~4 時間（HeLa; 1 時間、HL-60; 4 時間）培養した。その後マイクロプレートリーダー（ARVO X4, Perkin Elmer 社製）を用いて 450nm (reference 650nm) の吸光度を測定することにより相対的生細胞数を測定した。iAs(Ⅲ)および AsB を加えないウェルの吸光度を用いて規格化することにより iAs(Ⅲ)および AsB の細胞毒性を測定した。

3) 細胞の形態変化観察

細胞は培養フラスコに播種（$5x10^5$ viable cells/T25 bottle）し炭酸ガスインキュベータ内で 24 時間培養した。iAs(Ⅲ)および AsB は最終濃度が 1ppm になるように添加し、24 時間曝露した。曝露終了後、細胞は位相差顕微鏡下で形態観察を行った。

4) アポトーシス細胞および分裂期細胞誘発頻度の検討

細胞は培養フラスコに播種（$5x10^5$ viable cells/T25 bottle）し炭酸ガスインキュベータ内で 24 時間培養した。iAs(Ⅲ)および AsB は最終濃度が 5～100μM になるように添加し、24 時間曝露した。曝露終了後、HeLa 細胞は PBS で 2 度洗浄後 0.25%トリプシン-EDTA 処理により 15ml チューブに回収した。HL-60 細胞はピペッティングにより 15ml チューブに回収した。チューブに回収した細胞は遠心（1500rpm、3 分）し、PBS で 1 回洗浄後、100 μl の 1%グルタルアルデヒドにて固定した(4 ℃、24 時間)。遠沈（4 ℃、1000 rpm、5 分）後、上清を除去し、細胞を 200 μl の PBS に浮遊させた。細胞浮遊液 10 μl に 1 μl の 1mM Hoechst 33342 を添加した。一滴をスライドグラスに載せカバーグラスをかけ、蛍光顕微鏡（オリンパス IX-71、U 励起、油浸 100 倍）でクロマチン凝縮を起こした細胞をアポトーシス細胞(図 3.33、図 3.34)とし、染色体分裂像を示す細胞を分裂期細胞(図 3.37)として計数し、計数した全細胞数に対する割合を算出し、誘発頻度とした。

5) DNA ラダーの検出

iAs(Ⅲ)および AsB を曝露した HeLa 細胞は、24 時間培養後、トリプシンで回収し、遠沈(1500 rpm、3 分)した。HL-60 細胞は iAs(Ⅲ)および AsB を曝露後、24 時間培養し、遠沈（1500 rpm、3 分）した。PBS で 1 回洗浄後、500 μl の PBS に浮遊させ、微量遠心機で再び遠沈(1500 rpm、3 分）した。上清除去後、ペレットを再分散させ 200 μl の細胞融解バッファーを加え、4 ℃で 10 分、細胞融解させ、融解液を遠沈（4 ℃、15000 rpm、30 分）して、DNA 断片を含む上清を 1.5 ml チューブに取った。4 μl の 20 mg/ml RNase A を加えて、37 ℃で 1 時間インキュベートした。4 μl の 20 mg/ml Proteinase K を加え、さらに 37 ℃で 1

時間インキュベートした。この DNA 抽出液に 50 µl の 5 M NaCl と 250 µl のイソプロパノールを加え、-20 ℃ で 24 時間安置した。遠沈（4 ℃、15000 rpm、20 分）し上清除去後、イソプロパノールの除去を完全にするため、再度遠沈（4 ℃、15000 rpm、5 分）後、TE バッファー 12 µl に回収し DNA を電気泳動の試料とした。2 g のアガロース（タカラバイオ社製; LO3）に 100 ml の泳動用バッファー（10 ml TBE, 90 ml H_2O）を加え、電子レンジで加温溶解させ、ゲルトレー（Mupid2、コスモバイオ）に流してゲルを作製した。DNA 試料は DNA 抽出液とゲルローディング液を 5：1 となるように混合した（全量として 6 µl)。電気泳動槽（Mupid-2 plus, ADVANCE)に泳動バッファー（300 ml）をゲル上面がバッファー中に入らない程度入れ、泳動槽にセットしたゲルのウェルに試料および DNA 分子量マーカーを入れた。電圧 50 V で５分間泳動を行い、マーカー色素がゲルに入るのをみてから、一時停止し、泳動バッファーがゲル上を 3 ～5 mm 被う程度に追加した。さらに 50 V で泳動を続け、マーカー色素（BPB）が先端付近に達するまで氷上で泳動を行った（約 2 時間)。その後、蒸留水に最終濃度 0.5 µg/ml となるようにエチジウムブロマイドを 加え、ゲルを染色後、紫外線検出器で DNA の蛍光を検出し、写真撮影を行った。

2. 結果と考察

1) 細胞毒性試験

HeLa 細胞に iAs(Ⅲ)および AsB を添加した際に観察される細胞毒性を図 3.29 に示した。5μM で iAs(Ⅲ)と AsB の細胞毒性に明らかな違いが観察された。iAs(Ⅲ)は濃度依存的に細胞致死効果が増強するのに対し、AsB は 100μM という高濃度になってもコントロールの細胞生存率と有意差が見られなかった。この結果より iAs(Ⅲ)は低濃度で明確な細胞致死効果を示すのに対し、AsB は高濃度でも細胞致死が観察されないことから、無毒化ヒ素化合物であることが明らかとなった。

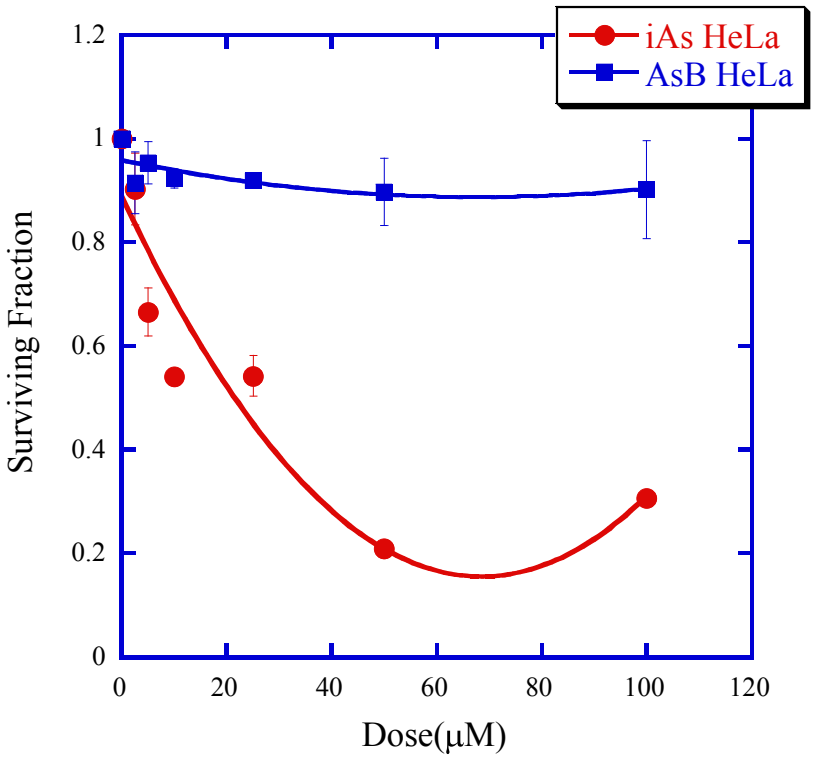


図 3.29. iAs(Ⅲ), AsB 添加後の HeLa 細胞の細胞生存率

図 3.30 は HL-60 細胞に iAs(Ⅲ)および AsB を添加した際に観察される細胞毒性である。2.5μM で iAs(Ⅲ)と AsB の細胞毒性に明らかな違いが観察された。HL-60 細胞でも iAs(Ⅲ)は濃度依存的に細胞致死作用が増強するのに対し、AsB は 100μM という高濃度になってもコントロールの細胞生存率と有意差が見られなかった。この結果より iAs(III)は低濃度で明確な細胞致死作用を示すのに対し、AsB は高濃度でも細胞の致死作用が観察されないことから、HL-60 細胞についても無毒化物であることが明らかになった。

また、HeLa 細胞と HL-60 細胞の細胞毒性を比較すると、HL-60 細胞の方が HeLa 細胞よりも

やや iAs(Ⅲ)に対する細胞毒性が強く出現する傾向が示された。

すなわち、AsB は両細胞を用いた実験において共に毒性が観察されない結果が得られた。

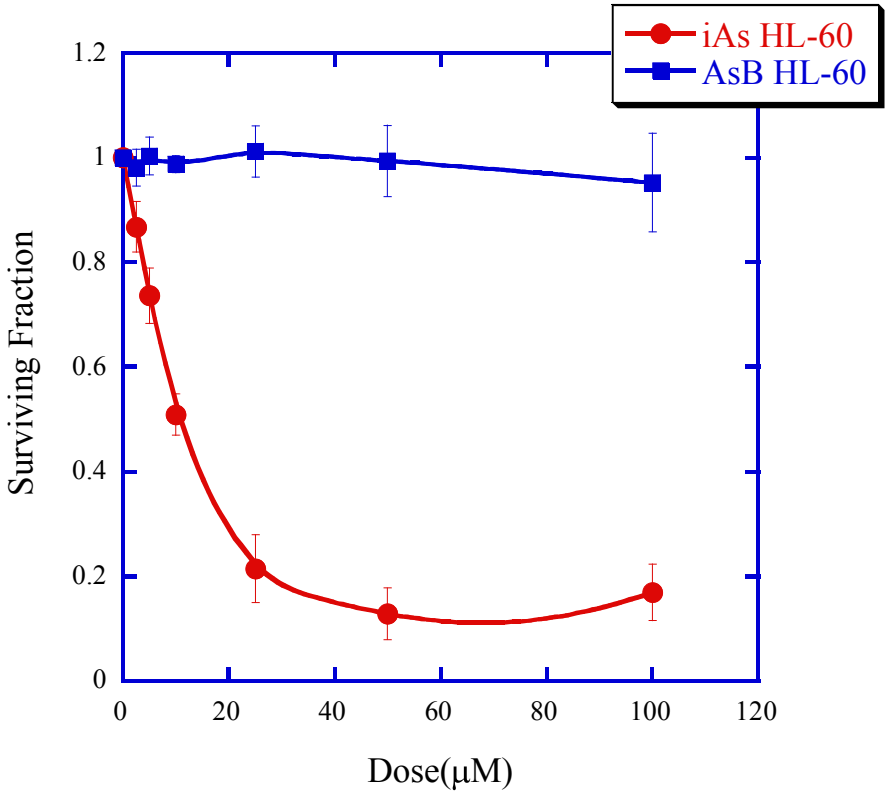
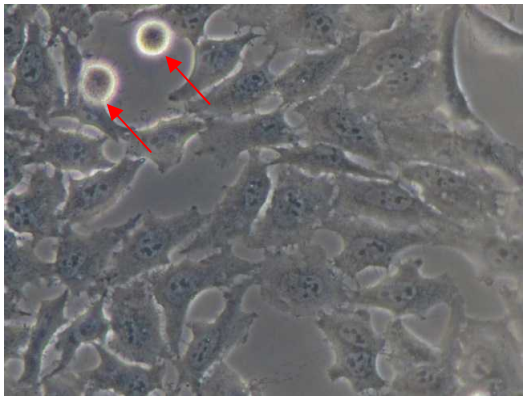


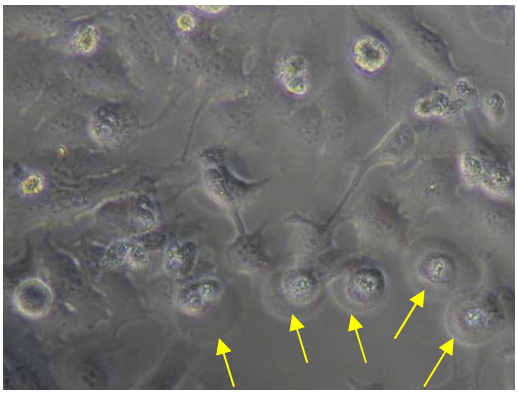
図 3.30. iAs(Ⅲ), AsB 添加後の HL-60 細胞の細胞生存率

2) 細胞の形態変化観察

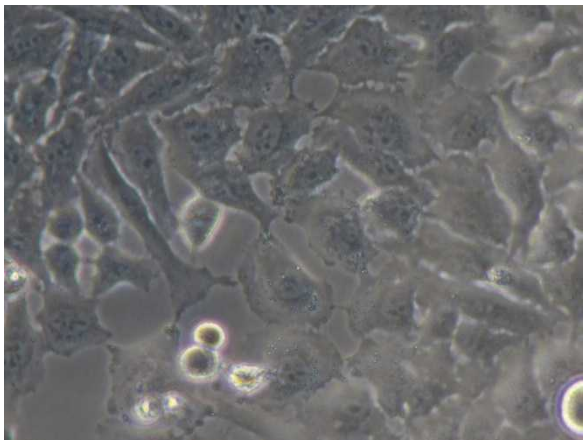
iAs(Ⅲ)および AsB を 1ppm 添加後 24 時間培養した HeLa 細胞の位相差顕微鏡像を図 3.31 に示した。



control



iAs(III) 1ppm



AsB 1ppm

図 3.31. iAs(Ⅲ)および AsB を 1ppm 添加後 24 時間培養した HeLa 細胞の位相差顕微鏡像

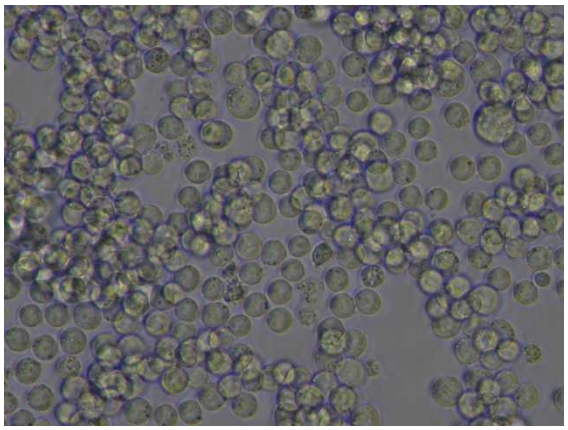
HeLa 細胞は上皮細胞様の接着細胞である。コントロールの細胞像には分裂期の細胞（写真左上、赤矢印）が観察され、細胞が活発に増殖している様子が見られた。

iAs(Ⅲ)　1ppm を添加した場合、コントロールで観察された石垣状の形態を持つ細胞は減少し、iAs(Ⅲ)の毒性により接着能が低下し球形を示す細胞（黄色矢印）が増加した。画面上の細胞数も減少していることから細胞増殖が阻害されていることが示唆された。

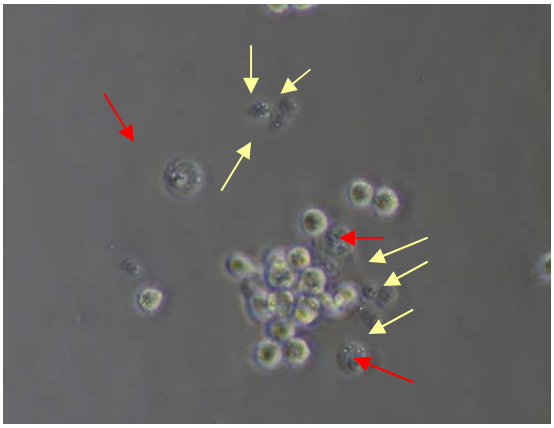
一方、AsB を添加した細胞ではコントロールの細胞像と相違が見られず、位相差顕微鏡下での形態観察では細胞毒性が認められなかった。

次に iAs(Ⅲ)および AsB を 1ppm 添加後 24 時間培養した HL-60 細胞の位相差顕微鏡像を図

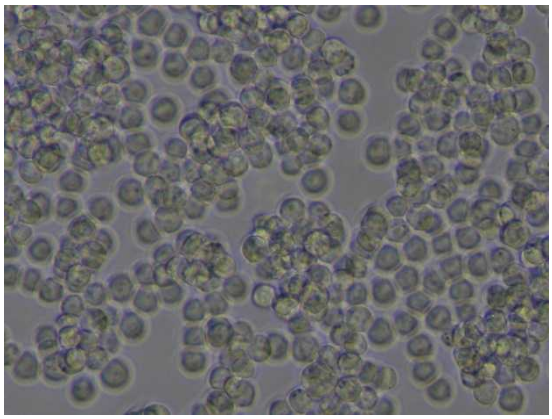
3.32 に示した。



control



iAs(Ⅲ) 1ppm



AsB 1ppm

図 3.32. iAs(Ⅲ)および AsB を 1ppm 添加後 24 時間培養した HL-60 細胞の位相差顕微鏡像

HL-60 細胞はリンパ球様の浮遊細胞である。コントロールの細胞では球状で細胞膜がしっかりとした光沢のある細胞が多数観察された。

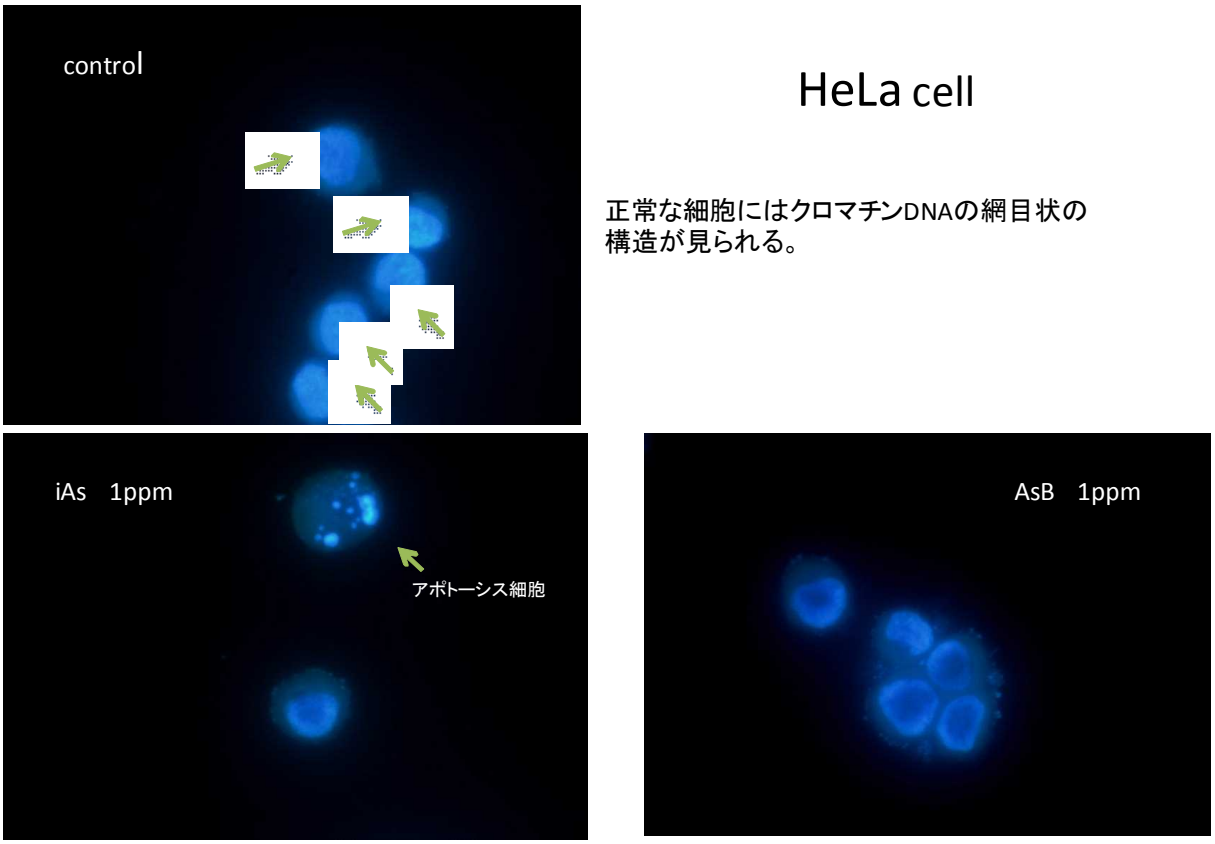
iAs(Ⅲ) 1ppm を添加した場合、細胞質が膨潤し、体積が増加した細胞が観察された（赤矢印)。また細胞収縮した死細胞と思われる細胞（黄色矢印）が観察された。また画面上の細胞数も減少していることから細胞増殖が阻害されていることが示唆された。

一方、AsB を添加した細胞ではコントロールの細胞像と相違が見られず、位相差顕微鏡下での形態観察では細胞毒性が認められなかった。

3)　アポトーシス細胞誘発頻度

①アポトーシス細胞の観察

図 3.33 は iAs(Ⅲ)および AsB を 1ppm 添加後 24 時間培養した HeLa 細胞をヘキスト 33342 で染色し、蛍光顕微鏡下で観察した細胞像を示した。



iAs(Ⅲ)を添加した細胞にはアポトーシスが誘導され
大小多数の球状のクロマチン凝縮像が観察された

AsBを添加した細胞には正常細胞と比べて
大きな変化は見られなかった

図 3.33.　iAs(Ⅲ)および AsB を 1ppm 添加後 24 時間培養した HeLa 細胞の蛍光顕微鏡像

コントロールの細胞には核内に広がるクロマチン DNA が、Hoechst 33342 によって広い範囲で染色され網目状の構造が観察された。

iAs(Ⅲ) 1ppm を添加した場合、細胞核内にはコントロール細胞には観察されなかった粒状の多数の核が観察された。これらの細胞は iAs(Ⅲ)によって誘発されたアポトーシス細胞であり、クロマチン凝縮が生じ、濃染、小球状の像を示したものと考えられた。

一方、AsB を 1ppm 添加した場合にはコントロールの細胞像との違いが観察されず、蛍光顕微鏡下での観察では細胞毒性が認められなかった。

次に iAs(Ⅲ)および AsB を 1ppm 添加後 24 時間培養した HL-60 細胞の位相差顕微鏡像を図 3.34 に示した

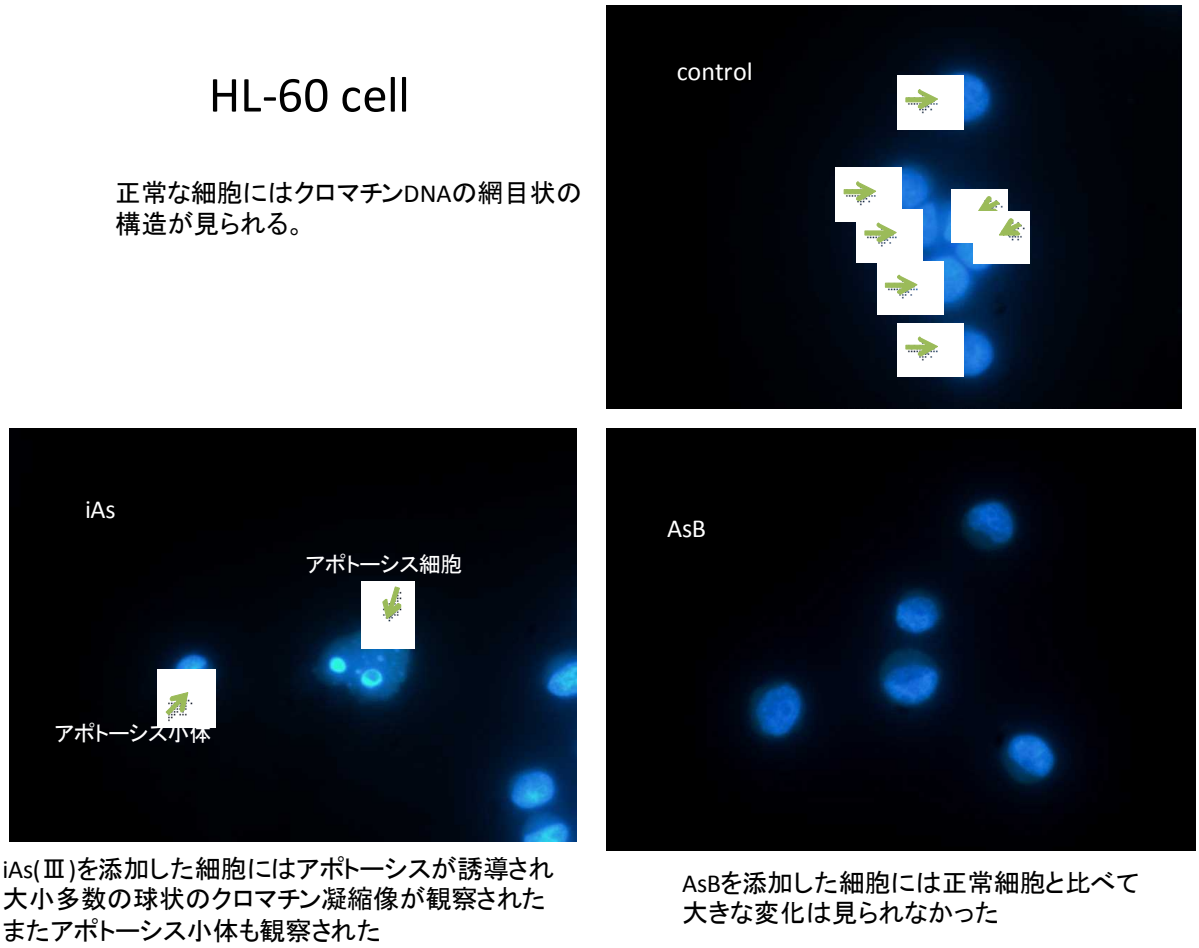


図 3.34. アポトーシス細胞の誘導

コントロールの細胞核内に広がるクロマチン DNA は、Hoechst 33342 によって広い範囲で染色され網目状の構造が観察された。

iAs(Ⅲ) 1ppm を添加した場合、細胞核内にはコントロール細胞では観察されなかった粒状の多数の核が観察された。また細胞にはアポトーシスによるクロマチン凝縮が生じ、濃染、小球状の像が観察された。細胞によっては、核が一個のみの場合と、大小多数に断片化し球状の多核化が見られる場合があった。また、細胞自体が断片化してその中に凝縮クロマチン像の認められる場合（アポトーシス小体）などがあった。

一方、AsB を 1ppm 添加した場合にはコントロールの細胞像との違いが観察されず、蛍光顕微鏡下での観察では細胞毒性が認められなかった。

②アポトーシス誘発頻度の検討

HeLa 細胞に iAs(Ⅲ)および AsB を 5, 10, 100μM 添加後 24 時間培養した時のアポトーシスが死細胞び占める割合を図 3.35 に示した。死細胞の割合は細胞毒性試験結果（図 3.29）で得られた値を用いた。

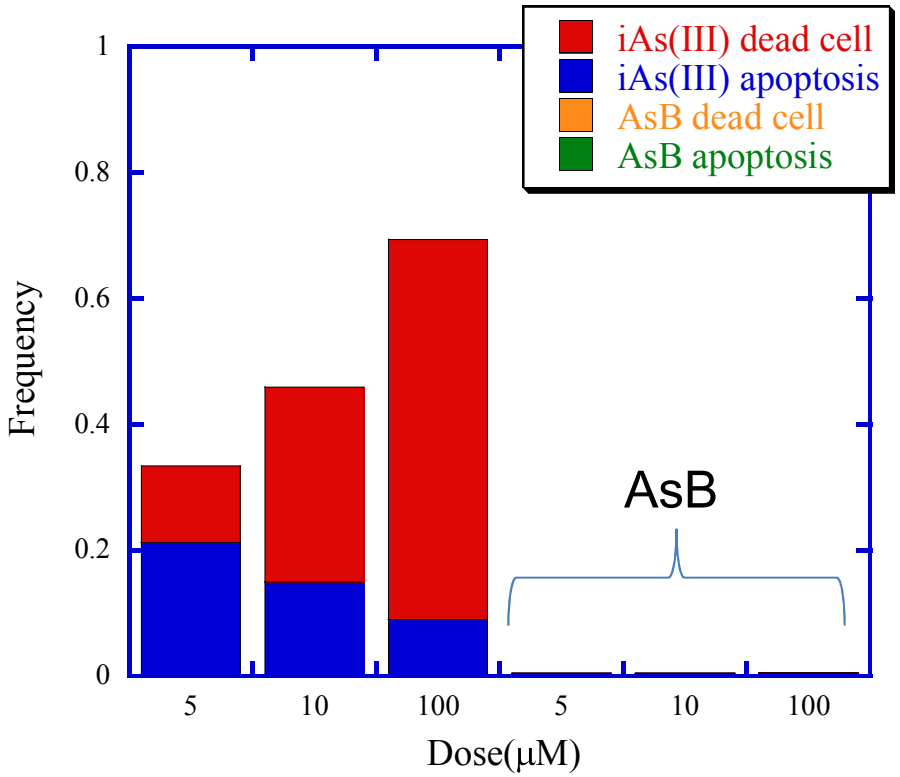


図 3.35. アポトーシスが死細胞に占める割合（HeLa 細胞）

iAs(Ⅲ)を添加した場合、濃度依存的に死細胞は増加するのに対し、アポトーシスが死細胞に占める割合は減少した。これは iAs(Ⅲ)による HeLa 細胞の死の様式の多くはアポトーシスではない別の細胞死であることが考えられた。

一方、AsB はどの濃度でもアポトーシスを含む細胞死の誘発は確認できなかった。この結果より AsB は 100μM という高濃度でも HeLa 細胞に毒性を示さないことが示唆された。

次に HL-60 細胞に iAs(Ⅲ)および AsB を 5, 10, 100μM 添加後 24 時間培養した時のアポトーシスが死細胞び占める割合を図 3.36 に示した。死細胞の割合は細胞毒性試験結果(図 3.30)で得られた値を用いた。

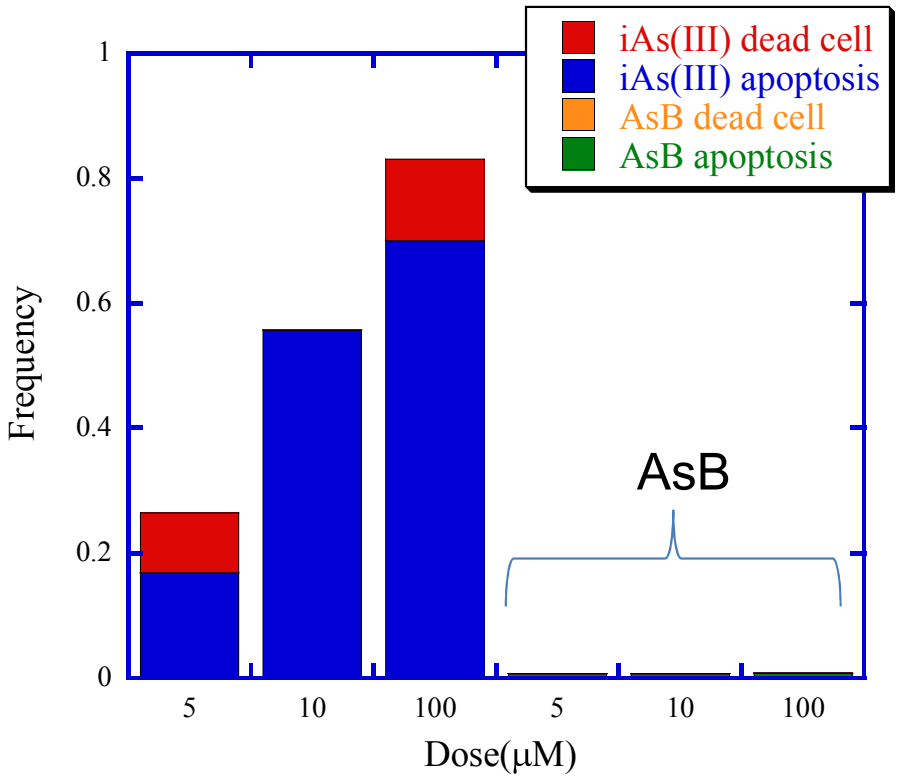


図 3.36. アポトーシスが死細胞に占める割合（HL-60 細胞）

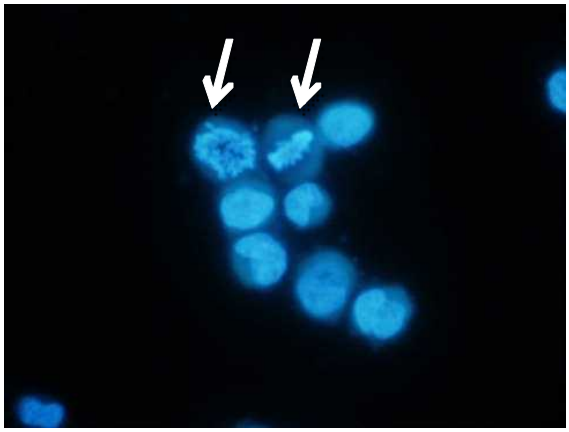
iAs(Ⅲ)を添加した場合、濃度依存的に死細胞とアポトーシス細胞は増加した。これは iAs(Ⅲ)による HL-60 細胞の死の様式の多くはアポトーシスであることが考えられた。

一方、AsB はどの濃度でもアポトーシスを含む細胞死の誘発は確認できなかった。この結果より AsB は 100μM という高濃度でも HL-60 細胞に毒性を示さないことが示唆された。

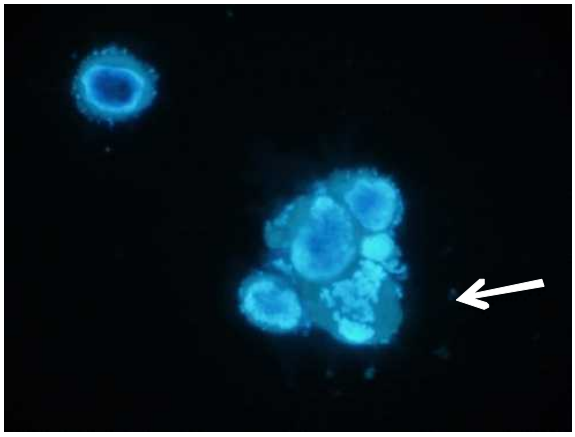
4) 分裂期細胞の誘発頻度

①分裂期細胞の観察

細胞はある大きさになると成長を止めるか分裂をする。分裂から次の分裂までを細胞周期と呼ぶ。細胞分裂は核が複雑な過程をたどって分裂する有糸分裂(mitosis)と細胞質が２つに分かれる細胞質分裂(cytokinesis)に分類される。



control の分裂期細胞



iAs(III)　5μM 添加 24 時間後の分裂期細胞

図 3.37. 分裂期の HeLa 細胞像（ヘキスト 33342 で蛍光染色し蛍光顕微鏡下で観察）

分裂期の HeLa 細胞像を図 3.37 に示した。コントロールの細胞には有糸分裂期前期(左側)、有糸分裂期中期（右側）などの分裂期の細胞が観察され、細胞分裂が活発に行われていると考えられた。

一方、iAs(Ⅲ)を添加した細胞で観察される分裂期細胞の中には断片化した染色体や不均一に分離した染色体が観察された。これは iAs(Ⅲ)によって紡錘糸など細胞分裂に関わる器官が何らかの障害を受け、染色体が正確に姉妹細胞に分配されないために観察される細胞像であることが示唆された。

iAs(Ⅲ)の添加により細胞分裂が正常に行われない結果、染色体異常が誘発され、細胞は死に至る可能性も示唆された。

一方、AsB を添加した細胞の分裂期細胞はコントロールの細胞像と大差なく、AsB によって分裂期が阻害されたり、染色体異常が引き起こされる可能性は低いことが考えられた。

②分裂期細胞の誘発頻度

HeLa 細胞と HL-60 細胞に iAs(Ⅲ)および AsB を 5μM 添加したとき誘発される分裂期細胞の頻度を図 3.38 に示した。

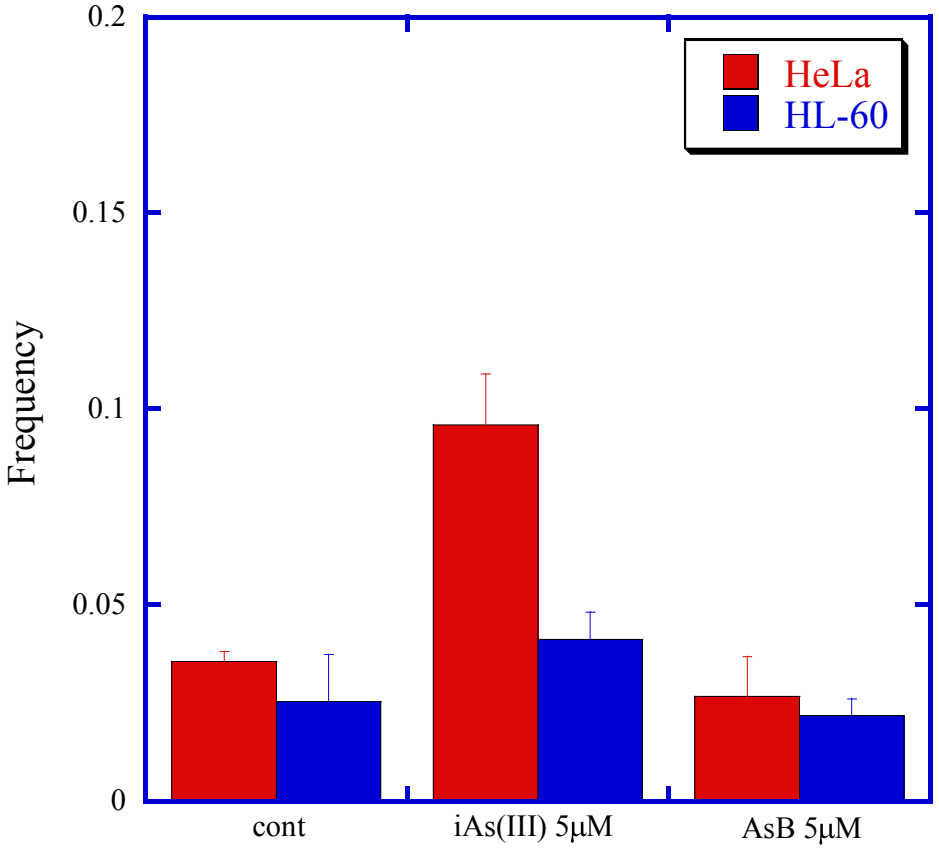


図 3.38. iAs(Ⅲ)および AsB を 5μM 添加したとき誘発される分裂期細胞の頻度

HeLa 細胞の場合、iAs(Ⅲ) を 5μM 添加したときに有意に分裂期の細胞が誘発された。これは iAs(Ⅲ)によって細胞分裂が促進された結果というより、図 3.37 に示した細胞像の結果より細胞分裂が阻害され、分裂期で細胞周期が停まってしまった細胞が増加したためと考えられた。

HL-60 細胞でも iAs(Ⅲ)によって分裂期の細胞が誘発されたが、その頻度は HeLa 細胞よりも低く、細胞の種類によって iAs(Ⅲ)の作用機序がことなることが考えられた。

また両細胞とも AsB による分裂期細胞の誘発は観察されなかったことから AsB による細胞分裂阻害や染色体異常誘発の可能性は低いことが示唆された。

5)　DNA ラダーの検出

5μM の iAs(Ⅲ)および AsB を 24 時間曝露した HeLa 細胞からアポトーシスにより、DNA を細胞から抽出し、アガロースゲル電気泳動を行った結果を図 3.39 に示した。

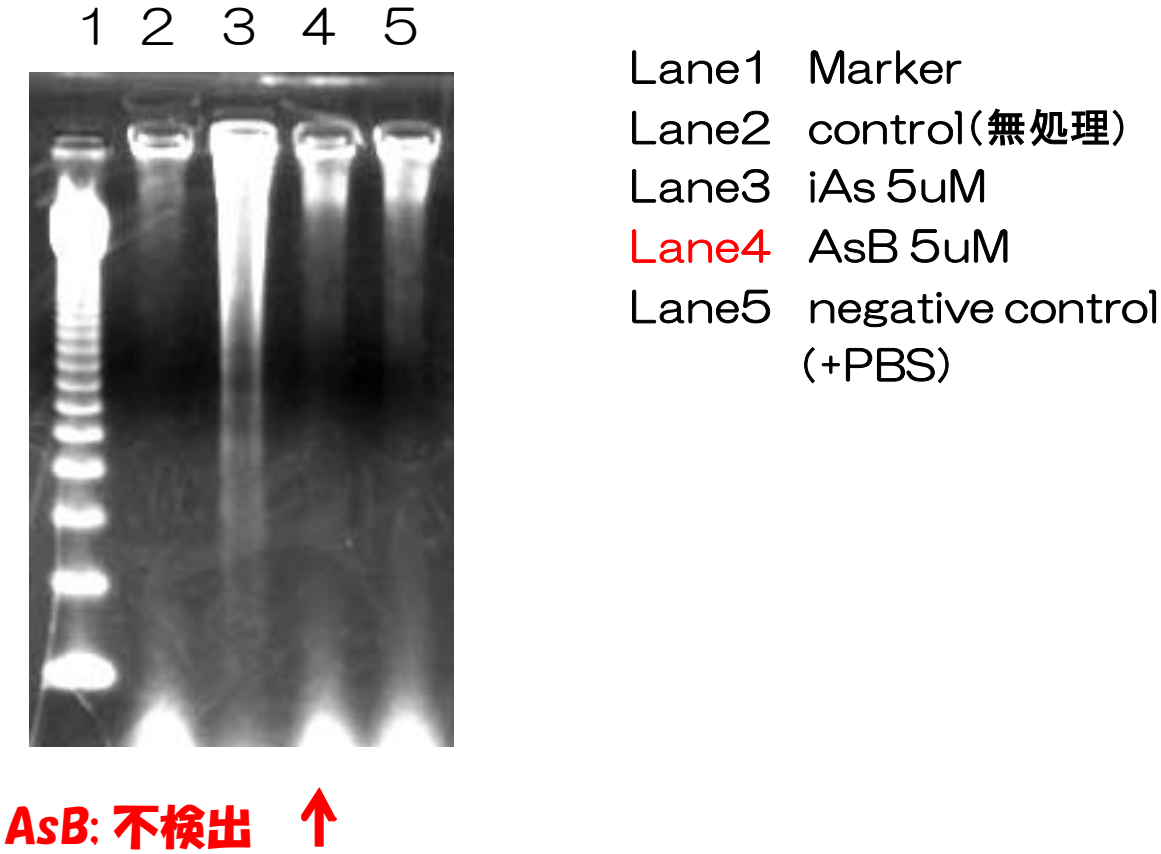


図 3.39.　iAs(Ⅲ)および AsB を 24 時間曝露し HeLa 細胞から DNA 抽出し電気泳動を実施

アポトーシスを起こした細胞は染色体 DNA が約 200bp 程度の長さの倍数に断片化するため、電気泳動により DNA ラダーと呼ばれるはしご状の DNA 断片が観察される。

コントロール、陰性対照からは DNA の断片化によるラダーは検出されなかったのに対し、iAs(Ⅲ)を添加した細胞からは断片化した DNA ラダーが検出された。これは iAs(Ⅲ)によってアポトーシスが誘発され、DNA 断片化が起こったためと考えられた。

一方、AsB を添加した細胞からはコントロール、陰性対照と同様に DNA ラダーは検出されなかったことからこの濃度では AsB によってアポトーシスは誘発されないと考えられた。

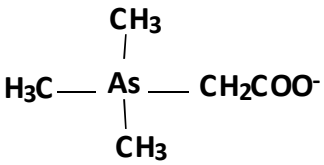
６）AsB の無毒化ヒ素としての認識

本来、AsB は海洋生物が哺乳動物や陸上の植物が保有しない機序により生成している。海

洋生物においては、海水中のごく微量な無機ヒ素を植物性プランクトンがアルセノ糖（As-Sug）に変換し、さらに、動物性プランクトン、魚介類に移行する過程で As-Sug がアルセノコリンへ、そして最終的に AsB が生成されると推測されている。これに対して、AsB はヒトと哺乳動物では生成されず、ヒト尿中から高濃度（約 0.1mg/L）に検出するその全ては魚介類由来である。哺乳動物の体内での脱メチル化は殆ど生じないと推測され、また、化学的に安定な物質である（図 3.40）。

日本人健常者における一日の食事からのヒ素摂取量は欧米人に比較すると高い傾向にあり、その理由は魚介類と海藻類の相対的な摂取量と判断される。日本人健常者 36 名を対象に蔭膳方式で算出した結果では、総ヒ素での平均摂取量は 195±235 ・g/日で、男性は女性に比較してやや高い傾向にあり、化学形態の割合は無機ヒ素 17%、メチル化ヒ素 1%、ジメチル化ヒ素 7%、AsB 75%で、食事から摂取しているヒ素の主体は AsB である結果が得られている。さらに、日本人健常者 248 名の化学形態別の平均尿中ヒ素濃度は 149±129 ・gAs/g creatinine（無機ヒ素 2.4%、メチル化ヒ素 1.3%、ジメチル化ヒ素 26.8%、AsB 69.1%）であり、食事からのヒ素摂取量のパターンと相関している。AsB の半減期は３－５時間と敏速であり、体内蓄積性のないことなどが明らかになっている。

このように、AsB はヒトの食生活と深く関係しており、魚介類の多量摂取から健康影響も議論されることがないほど、このヒ素が無害であることは広く国際的に認識されている。



何故、AsBが無毒化ヒ素と認められるのか？

✓一般環境で安定
✓酸アルカリに強い

アルセノベタイン：　AsB

アルセノベタイン（AsB）　LD_{50} 10g/kg
無機ヒ素の毒性に比較して1/300のレベル

無機ヒ素：三酸化ヒ素
LD_{50} 0.03g/kg

AsBは甲殻類、魚類に高濃度に含有する

魚介類中AsB濃度
1 - 10 ppm

図 3.40. AsB の魚介類含有濃度と致死量

3. 結論

三酸化二ヒ素にビタミンB_{12}を作用させ合成したAsBの細胞毒性試験を包括的に実施した。２種類の細胞から得られた結果に差異は認められず類似していた。CCK-8 で測定した細胞生存率は、三酸化二ヒ素に比較して AsB は明確に減毒されており、さらに、無作用の対照群細胞と相違は示されなかった。

クロマチン凝縮や DNA ラダーを指標としてアポトーシス誘発を検討した結果、三酸化二ヒ素は HeLa 細胞および HL-60 細胞にアポトーシスを誘発するが、AsB にその作用は認められなかった。

また HeLa 細胞と HL-60 細胞のアポトーシス誘発頻度を比較すると HL-60 細胞の方が HeLa 細胞よりも iAs(Ⅲ)によってアポトーシス誘発頻度が高く、細胞により誘発頻度異なることが確認された。

さらに HL-60 細胞の死の様式は主にアポトーシスであることが示唆された。三酸化ヒ素によって急性前骨髄性白血病細胞である HL-60 細胞に引き起こされる主な細胞死が炎症を伴わず、最終的にはマクロファージに貪食されるアポトーシスであることはトリセノックスなどの抗がん剤治療においても望ましい結果であると考えられた。

細胞周期や染色体異常についての詳細な検討はフローサイトメーターや FISH 法などの染色体検査が必要とされるが、簡易的に行った蛍光顕微鏡下での分裂期細胞の観察および計数結果から、iAs(Ⅲ)により細胞周期阻害や染色体異常の誘発が示唆されたが、AsB ではこのような結果は見られなかった。

以上の結果より、三酸化ヒ素にビタミンB_{12}を作用させ合成した AsB は、細胞毒性試験においてはアポトーシスを含む細胞死の誘発を観察できないことから、無毒化ヒ素化合物であることが判断された。今後、無機ヒ素の無毒化処理技術の普及により、無機ヒ素からの環境汚染防止や健康障害の予防に貢献が期待される。

第４章　安定性試験

ヒ素の無毒化品である AsB の最終処分については、隔離保存と自然還元の二つの方法がある。AsB が毒物指定解除されることにより、AsB の取り扱い、保存について過剰な設備、管理が不要となる。一方、AsB は自然界では海洋生物の食物連鎖によって生合成され、海洋生物の体内に濃縮蓄積され、自然に回帰する。合成 AsB も生合成 AsB と同様に、自然還元、つまり海洋投棄が可能になれば、最終処分場を必要としない究極の低コストのヒ素の処理法が提案できる(図 4.1)。今年度は、AsB の自然環境での安定性試験を行い、海洋投棄の可能性を検討する。具体的には、海水中での安定性試験、拡散実験を行い海洋投棄を可能とする条件を明らかにする。また、AsB 合成の副生成物、中間体化合物である TMAO についても同様の検討を行う。

図 4.1. アルセノベタインの自然還元と海洋投棄

１．安定性試験

アルセノベタイン(AsB)とトリメチルアルシンオキシド(TMAO)の安定性について、人工海水と海水（三重県四日市港から採取）について調べた（20℃)。AsB、TMAO ともに 3 ヶ月以上安定に存在した（図 4.2 と図 4.3)。

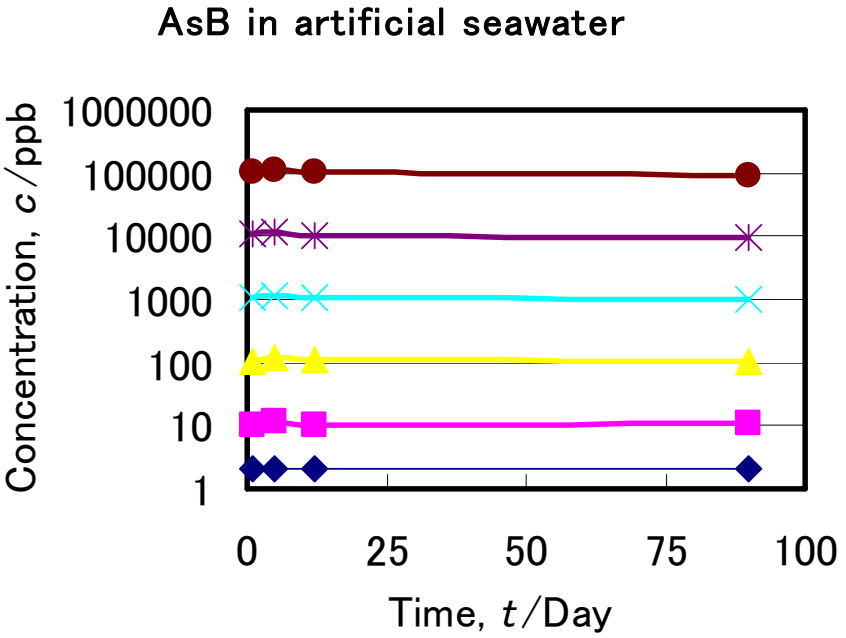


図 4.2. アルセノベタイン（AsB）の安定性試験（人工海水、20℃）

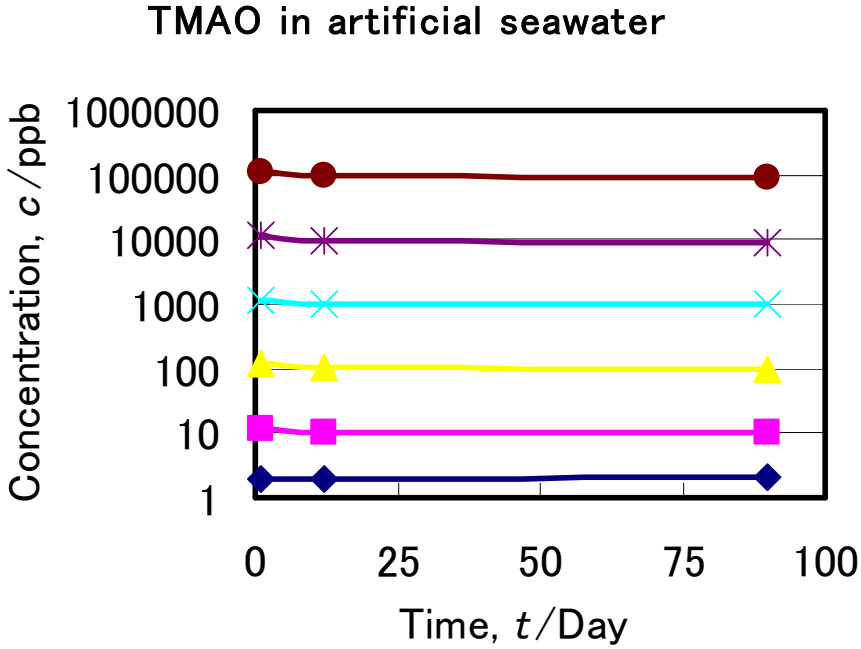


図 4.3. トリメチルアルシンオキシド（TMAO）の安定性試験（人工海水、20℃）

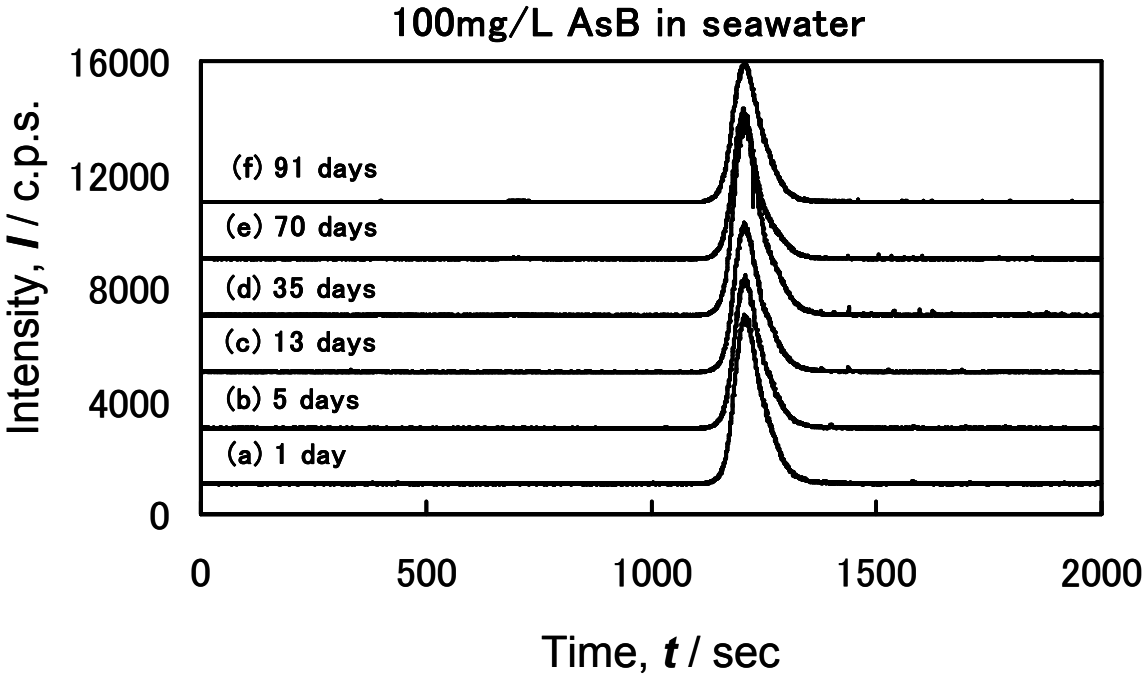


図 4.4.　アルセノベタイン（AsB）の安定性試験（海水、20℃）

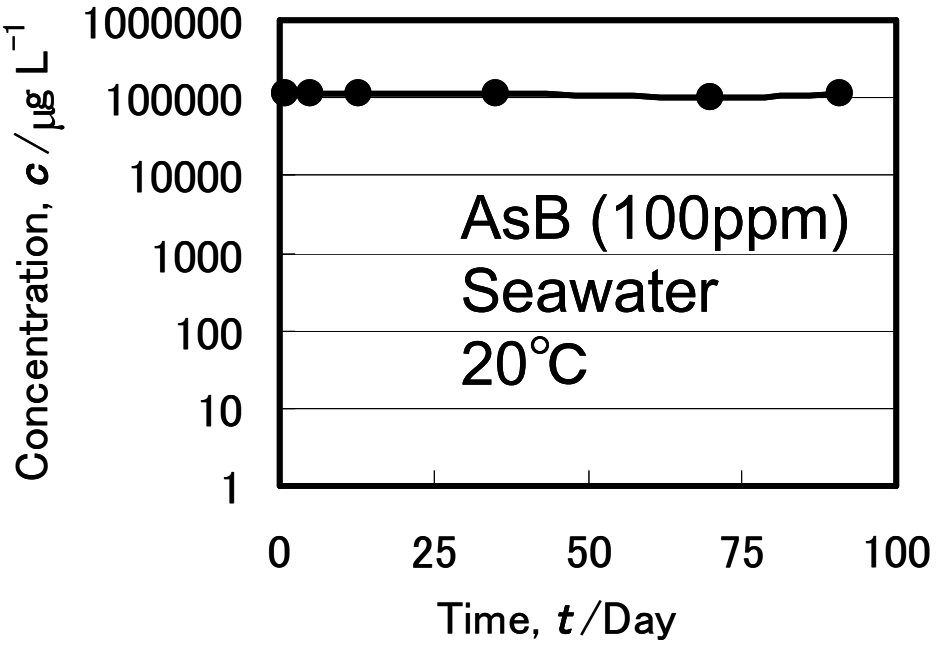


図 4.5.　アルセノベタイン（AsB）の安定性試験（海水、20℃）

次に、実際に三重県四日市港から採取した海水に対する安定性試験を実施した。100ppm（100mg As/L）の AsB は、3 ヶ月以上安定に存在した（図 4.4 と図 4.5）。また、トリメチルアルシンオキシドについても、同様に海水中でも 3 ヶ月以上安定に存在した（図 4.6）。

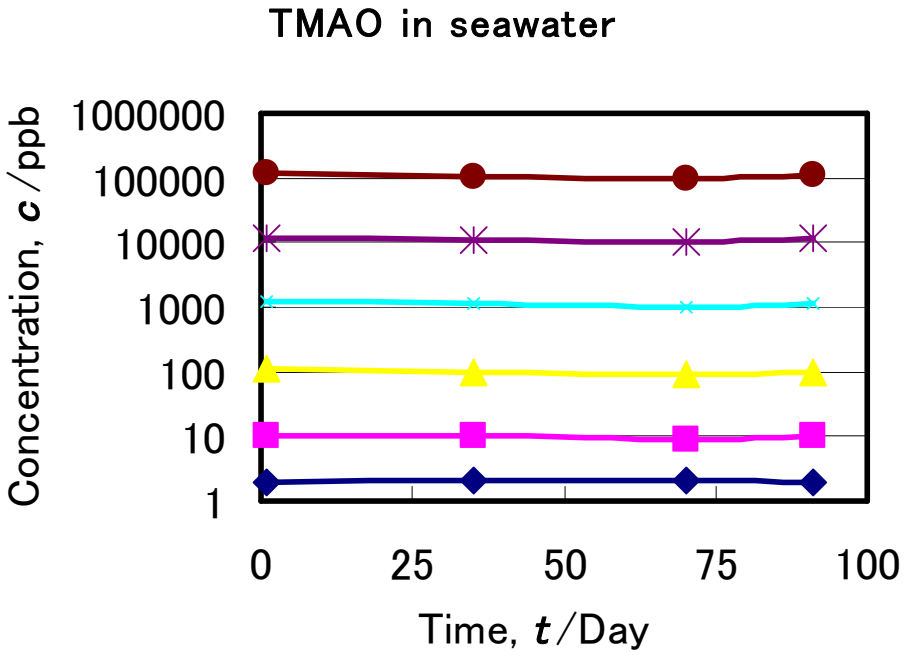


図 4.6.　トリメチルアルシンオキシド（TMAO）の安定性試験（海水、20℃）

２．海洋投棄モデル試験

海洋投棄モデルとして AsB の海水中での拡散希釈挙動を調べたところ（図 4.7）、24 時間以内に海水中に元来存在するヒ素濃度（2ppb）に到達し、その２ヶ月以上安定に存在した（図 4.8）。無機ヒ素は、海洋生物による生物学的メチル化反応を受け、食物連鎖により AsB として魚介類の体内に生物濃縮、蓄積される。従って、元来、海水中には AsB は存在しないことから、AsB を海洋投棄した場合、AsB は速やかに拡散、希釈され、無機ヒ素濃度（2ppb）に到達した後、更に希釈され、無機ヒ素濃度よりも著しく低い濃度にまで低下する。安全性試験により、AsB は毒物、劇物に該当しない。さらに、海水中には元来 AsB は存在しないことから、海水中の無機ヒ素濃度よりもはるかに低濃度まで AsB は希釈される。AsB の海洋投棄による自然界への影響は著しく小さく、影響はないレベルでの海洋投棄が可能であると推定される。

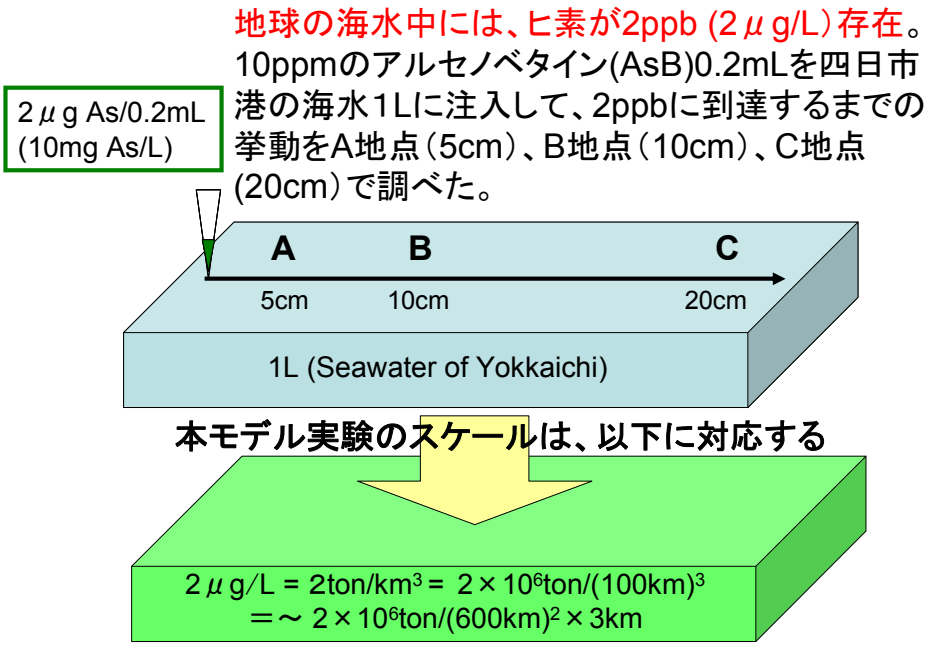


図 4.7.　アルセノベタイン(AsB)の海洋投棄モデル拡散実験

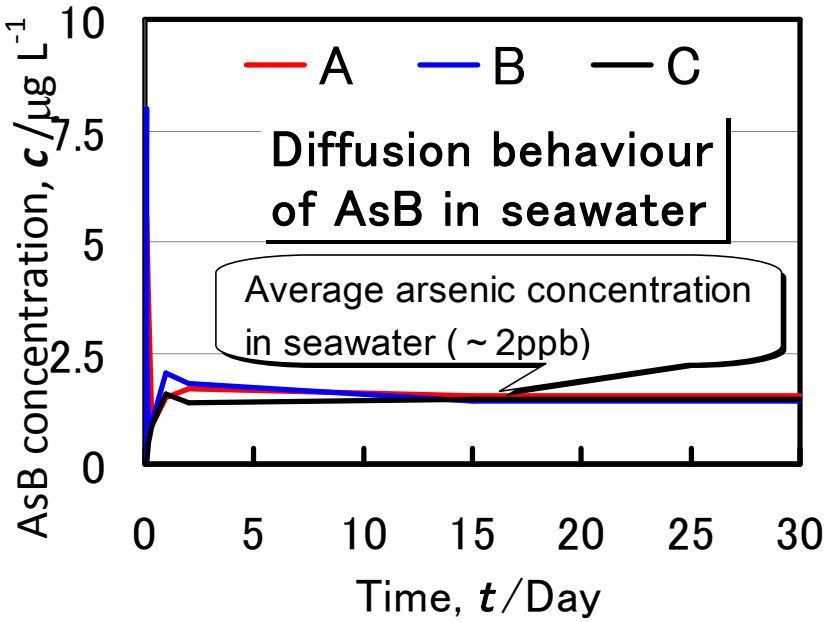


図 4.8.　アルセノベタイン(AsB)の海洋投棄モデル拡散実験の結果

第５章　無機ヒ素のオンサイト簡易光学モニター

アルセノベタイン(AsB) 中に存在する不純物の無機ヒ素を、高価な分析装置（HPLC-ICP-MS、LC-MS 等）を用いないで、簡易にオンサイトでモニターするニーズがある。AsB を隔離保管する場合や、海洋投棄する場合に、無機ヒ素を簡便な方法で検出する必要があるからである。ヒ酸の比色検出法として、モリブデンブルー法が知られている。ヒ酸[iAs(V)]、AsB、TMAO、Ga に対して、モリブデンブルー法を適用したところ、ヒ酸に対してのみ青色の発色が認められた(図 5.1)。Ga、AsB、TMAO に対しては、発色は全く見られなかった。また検出限界は、1ppb 程度であり、ヒ素の排水基準値（100ppb)、環境基準値（10ppb）に対して充分に適応できることが明らかになった(図 5.2)。以上の結果により、モリブデンブルー法により、AsB に含まれる無機ヒ素[iAs(V)]を検出する高選択、高感度オンサイト光学モニタリングの原理確認ができた。高価な分析機器を使用せずに、隔離保存や海洋投棄の場合に、AsB、TMAO に含まれる無機ヒ素を選択的に高感度で、オンサイトで検出できる。

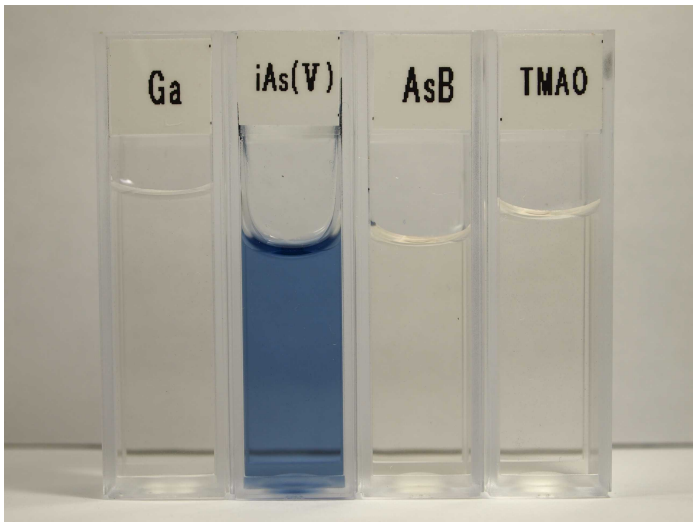


図 5.1.　モリブデンブルー法による無機ヒ素[iAs(V)]の発色．ガリウム、AsB、TMAO に対しては、青に発色しない．

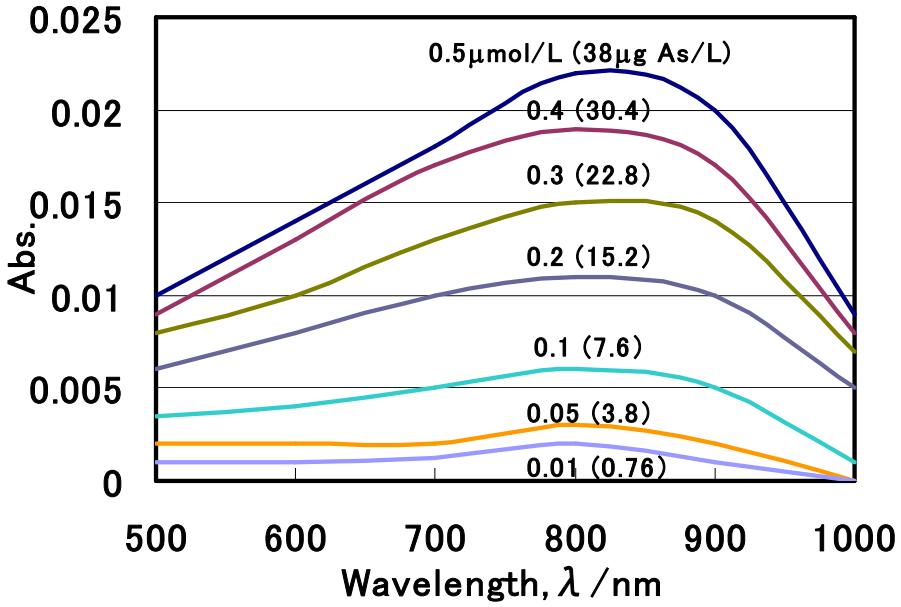


図 5.2.　モリブデンブルー法による無機ヒ素[iAs(V)]の発色に対する濃度依存性(室温).

結論

酸化チタン光触媒、酢酸の存在下、光照射により、無機ヒ素はアルセノベタイン（AsB）に変換された。モノメチルヒ素、カコジル酸（ジメチルヒ素）などの有機ヒ素も AsB に無毒化された。これらは、農薬として使われ土壌汚染の問題があり、土壌浄化への応用も期待される。GaAs 半導体の製造プロセスの廃棄物から、水溶液によりヒ素のみを選択抽出する条件を明らかにした。GaAs 半導体廃棄物のヒ素も AsB に変換された。無毒化ヒ素 AsB、TMAO の安定性試験により、海水中、20℃で 3 ヶ月間以上安定に存在した。海洋投棄モデルとして AsB の海水中での挙動を調べたところ、24 時間以内に海水中に元来存在するヒ素濃度（2ppb）に到達し安定に存在した。また、AsB から無機ヒ素を区別して検出する簡便なオンサイト光学的モニター手法を開発した。究極の低コストプロセスの確立と無毒化ヒ素の海洋投棄が可能な条件を提案することができた。

研究発表

発表論文

1. Nakamura K., Arsenic detoxification system: Transformation of inorganic arsenic into non-toxic arsenobetaine mediated by artificial enzyme with vitamin B_{12} cofactor, *12th International Conference on Chemistry and the Environment*, 2009, 377－377.
2. Nakamura K., Arsenic detoxification: a new approach for transformation of inorganic arsenic into arsenobetaine mediated by S-amino acids and vitamin B_{12} under mild aqueous conditions, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2009, S237－S237.
3. Nakamura K., Arsenic Detoxification: Transformation of Toxic Inorganic Arsenic into Non-toxic Arsenobetaine Mediated by Vitamin B_{12} and Glutathione (GSH), *Abstracts of 10th International Symposium on Applied Biological Inorganic Chemistry*, 2009, 36－36.
4. Nakamura K., Arsenic Detoxification: Synthesis of Non-toxic Organoarsenic Compound, Arsenobetaine, from Toxic-inorganic Arsenic by Using Vitamin B_{12} and Amino Acid, *Abstracts II of 11th Intl. Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry*, 2009, 281－281.
5. Nakamura K., Synthesis of Arsenobetaine by using Vitamin B_{12} and Aminoacid, Symposium Papers of 51st Symposium on the Chemistry of Natural Products, 2009, 371－376.
6. Nakamura K., *Abstracts of the 19th Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine*, 2009, 30－30.
7. Nakamura K., *Abstract of 24th Symposium on Biorelevant Chemistry*, 2009, 36－36.
8. Nakamura K., Yamauchi H., *Journal of Health Science*, Vol.55 Supplement 2009, 112－112.
9. Nakamura K., Arsenic detoxification by vitamin B_{12}, *Abstracts of 90th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2010, Vol.Ⅱ, 1C2-08, 210－210.
10. Nakamura K., Arsenic detoxification by vitamin B_{12} and photocatalytic system and rare-matal recycling, *Abstracts of 90th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2010, Vol.I, 1H7-49, 69－69.
11. Nakamura K., Arsenic detoxification by vitamin B_{12} catalytic system, *Abstracts of 91st Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2011, Vol.Ⅱ, 3A6-12, 276－276.
12. Nakamura K., Arsenic detoxification by vitamin B_{12} catalytic system and rare-metal recycling, *Abstracts of 91st Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2011, Vol.I, 2G4-03, 18－18.
13. Nakamura K., Arsenic detoxification by vitamin B_{12} catalytic system and rare-metal recycling, *Abstracts of 91st Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2011,

Vol.I, 2PB-013, 79－79.
14. Yamauchi Y., Nakamura K., Arsenic detoxification, *Abstracts of the 16th Arsenic Symposium*, 2011, p60－61.
15. Nakamura K., *On Biomimetics*, InTech, 2011, ISBN 978-953-307-271-5, 213－228. Available from:http://www.intechopen.com/articles/show/title/biomimetic-and-bio-inspired-catalytic-system-for-arsenic- detoxification-bio-inspired-catalysts-with-
16. Nakamura K., *Abstracts of 242nd American Chemical Society National Meeting*, August 28-September 1, 2011, Denver CO, USA, 453
17. Nakamura K., *Abstracts of 13th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment*, September 11-15, 2011, ETH Zurich, Switzerland, p265.
18. Nakamura K., *J. Japan Inst. Metals,* 2011, 57,11, 626－632.
19. Nakamura K. *et al.*, *Archives of Toxicology, submitted.*
20. Nakamura K., Biomimetic and bio-inspired catalysts with vitamin B_{12} for arsenic detoxification system, *Abstracts of the 21st Symposium on the Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine*, 2011, p26.
21. Nakamura K., Arsenic detoxification and rare metal recycling, *Proceedings of 2011 Research Conference of Japan Society of Material Cycles and Waste Management 2011, 92.*
22. Nakamura K., *Proceedings of the 22nd Annual Conference of Japan Society of Material Cycles and Waste Management*, 2011.
23. Nakamura K., Arsenic detoxification of inorganic arsenic by bio-inspired catalyst with TiO_2 and vitamin B_{12}, *Abstracts of the 17th Arsenic Symposium*, 2011, p24-25.
24. Nakamura K., Bio-inspired catalysts with vitamin B_{12} and TiO_2 for arsenic detoxification, *Abstracts of the 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10)*, 2011, p129－130.
25. Nakamura K., Yamauchi H., Rare metal recycling and arsenic detoxification by TiO_2 photocatalyst, *Abstracts of 92nd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2012, Vol.I, 3C5-38, p41－41.
26. Nakamura K., Yamauchi H., Arsenic detoxification by TiO_2 photocatalyst, *Abstracts of 92nd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2012, Vol.Ⅱ, 3G1-29, p507.
27. Nakamura K., Yamauchi H., Rare metal recycling and arsenic detoxification by TiO_2 photocatalyst, *Abstracts of 92nd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2012, Vol.I, 3PD-041, 88－88.

国際会議、学会発表

1. Nakamura K., Arsenic detoxification system: Transformation of inorganic arsenic into non-toxic arsenobetaine mediated by artificial enzyme with vitamin B_{12} cofactor, 12th International Conference on Chemistry and the Environment, 14-17 June 2009, Stockholm University, Stockholm, Sweden
2. Nakamura K., Arsenic detoxification: a new approach for transformation of inorganic arsenic into arsenobetaine mediated by S-amino acids and vitamin B_{12} under mild aqueous conditions, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 25-30 July, 2009, Nagoya, Japan
3. Nakamura K., Arsenic Detoxification: Transformation of Toxic Inorganic Arsenic into Non-toxic Arsenobetaine Mediated by Vitamin B_{12} and Glutathione (GSH), 10th International Symposium on Applied Biological Inorganic Chemistry, 25-28 September, 2009, Debrecen, Hungary
4. Nakamura K., Arsenic Detoxification: Synthesis of Non-toxic Organoarsenic Compound, Arsenobetaine, from Toxic-inorganic Arsenic by Using Vitamin B_{12} and Amino Acid, 11th Intl. Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 9-13 November, 2009, Rihga Royal Hotel Kyoto, Japan
5. 中村浩一郎、ヒ素の無毒化反応：S-アミノ酸とビタミンB_{12}による無機ヒ素のトリメチル化とアルセノベタインへの変換、第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2009 年 6 月 11 日、大阪大学、大阪
6. 中村浩一郎、Photochemical detoxification of inorganic arsenic: Ptotochemical methyl transfer from vitamin B_{12} to arsenic trioxide、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、2009 年 9 月 15 日、九州大学医学系キャンパス、福岡
7. 中村浩一郎、ビタミンB_{12}とアミノ酸を利用したアルセノベタインの合成、第 51 回天然有機化合物討論会、2009 年 10 月 75 日、名古屋市公会堂、名古屋
8. 中村浩一郎、山内博、ビタミンB_{12}とアミノ酸による無機ヒ素の無毒化とその機構、フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー、2009 年 11 月 5 日、沖縄
9. 中村浩一郎、ビタミンB_{12}と光駆動型触媒システムを用いたヒ素の無毒化処理法とレアメタルのリサイクル技術の開発、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 26 日、近畿大学、大阪
10. 中村浩一郎、ビタミンB_{12}を用いたヒ素の無毒化、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 26 日、近畿大学、大阪
11. 中村浩一郎、環境省循環型社会形成推進科学研究費　レアメタル特別枠委員会公開シンポジウム、2010 年 3 月 15 日、東京大学生産技術研究所、東京
12. 山内博、中野瑞穂、中村浩一郎、無機ヒ素の無毒化処理：アルセノベタインの毒性評価、

第80回日本衛生学会学術総会（平成22年5月9日～11日、仙台）

13. 中村浩一郎、ビタミンB_{12}触媒システムを用いた無機ヒ素の無毒化、日本化学会第91春季年会、2011年、3A6-12
14. 中村浩一郎、ビタミンB_{12}の触媒システムを用いたヒ素の無毒化処理法とレアメタルのリサイクル技術の開発、日本化学会第91春季年会、2011年、2G4-03
15. 中村浩一郎、ビタミンB_{12}の触媒システムを用いたヒ素の無毒化処理法とレアメタルのリサイクル技術の開発、日本化学会第91春季年会、2011年、2PB-013
16. 中村浩一郎、平成22年度環境省循環型社会形成推進科学研究費　レアメタル特別枠委員会公開シンポジウム、2011年3月14日、東京大学生産技術研究所、東京
17. 山内博、中野瑞穂、井上葉子、中村浩一郎等、無機ヒ素の無毒化処理合成アルセノベタインの細胞毒性評価、第81回日本衛生学会学術総会（平成23年3月25日～28日、昭和大学旗の台キャンパス）、2011年、O-048
18. 中村浩一郎、Biomimetic and bio-inspired catalysts with vitamin B_{12} for arsenic detoxification system, 第21回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(The 21st Symposium on the Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine)、平成23年5月30～31日、千葉大学、千葉）
19. 中村浩一郎、レアメタルのリサイクルとヒ素の無毒化処理技術の開発、平成23年度廃棄物資源循環学会研究討論会（平成23年5月31日～6月1日、川崎、神奈川）
20. 中村浩一郎、Arsenic Detoxification for Sustainable Water treatment by Biomimetic and Bioinspired Catalysts with Vitamin B_{12}、第242回米国化学会年会（平成23年8月28日～9月1日、デンバー、コロラド、米国）
21. 中村浩一郎、Bioinspired Catalysts with Vitamin B_{12} for Arsenic Detoxification, 欧州化学連合環境化学国際会議、EuChemMS International Conference Chemistry and the Environment）（平成23年9月11日～9月15日、チューリッヒ、スイス）
22. 中村浩一郎、レアメタルのリサイクルとバイオインスパイアード触媒によるヒ素の無毒化、Proceedings of the 22nd Annual Conference of Japan Society of Material Cycles and Waste Management、第22回度廃棄物資源循環学会発表会（平成23年11月3日～5日、東洋大学白山第二キャンパス、東京）
23. 中村浩一郎、酸化チタンとビタミンB_{12}を用いたバイオインスパイアード触媒による無機ヒ素の無毒化、第17回ヒ素シンポジウム（平成23年11月19日～20日、つくば国際会議場、茨城）
24. 中村浩一郎、The 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10)、第10回有機反応国際会議（平成23年11月21日～24日、慶応大学、横浜）
25. 中村浩一郎、山内博、酸化チタン光触媒を用いたヒ素の無毒化とレアメタルのリサイクル技術の開発、日本化学会第92春季年会（2012年3月25日～28日、慶応義塾、横浜）、3C5-38、
26. 中村浩一郎、山内博、酸化チタン光触媒を用いた無機ヒ素の無毒化処理技術の開発、日本化

学会第 92 春季年会（2012 年３月 25 日～28 日、慶応義塾大学、横浜）、3G1-29

27. 中村浩一郎、山内博、酸化チタン光触媒を用いた無機ヒ素の無毒化処理技術の開発、日本化学会第 92 春季年会（2012 年３月 25 日～28 日、慶応義塾大学、横浜）、3PD-041

知的財産の取得状況

出願特許

1. 中村浩一郎、日本板硝子、有害化合物を含む被処物の処理方法、特願 2012-064439（2012 年 3 月 21 日）
2. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、日本板硝子株式会社、有機金属化合物と無機化合物の分離方法、特願 2009-502463（日本移行日：2009 年 7 月 2 日）
3. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、日本板硝子株式会社、金属の回収方法、特願 2009-511680（日本移行日：2009 年 9 月 4 日）
4. 中村浩一郎、久枝良雄、Pan Lin、日本板硝子株式会社、九州大学、メチルアココビリン酸誘導体、アルキル化用組成物及び当該化合物を利用した有害化合物の無害化方法、RU2009106658（露国移行日：2009 年 2 月 25 日）
5. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、メチル化合物の無害化方法、US12/309992（米国移行日：2009 年 2 月 6 日）
6. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、メチル化合物の無害化方法、200780032829.8（中国移行日：2009 年 3 月 4 日）
7. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、メチル化合物の無害化方法、2009124465（露国移行日：2009 年 6 月 26 日）
8. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、アルキル化用組成物及び当該組成物を利用した有害化合物の無害化方法、12/309494（米国移行日：2009 年 1 月 21 日）
9. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、アルキル化用組成物及び当該組成物を利用した有害化合物の無害化方法、200780031728.9（中国移行日：2009 年 2 月 25 日）
10. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、アルキル化用組成物及び当該組成物を利用した有害化合物の無害化方法、2009106660（露国移行日：2009 年 2 月 25 日）
11. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、アルキル化用組成物及び当該組成物を利用した有害化合物の無害化方法、US12/596539（米国移行日：2009 年 10 月 19 日）
12. 中村浩一郎、有害化合物の無害化方法および有機半導体元素化合物の製造方法、JP2009/06877（米国移行日：2009 年 11 月 2 日）
13. 中村浩一郎、日本板硝子株式会社、有害化合物と無害化方法および有機半導体元素化合物の製造方法、特願 2010-536768（日本移行日：2010 年 3 月 8 日）
14. 中村浩一郎、菱沼晶光、日本板硝子株式会社、有害化合物の無害化方法、EP08834593.9（欧州移行日：2010 年 3 月 18 日）

15. 中村浩一郎、菱沼晶光、日本板硝子株式会社、有害化合物の無害化方法、US12/679,754（米国移行日：2010 年 3 月 24 日）
16. 中村浩一郎、有害化合物と無害化方法および有機半導体元素化合物の製造方法、100/2010（バングラディッシュ国移行日：2010 年 4 月 25 日）
17. 中村浩一郎、日本板硝子株式会社、有害化合物の無害化方法、EP08843562.3（欧州移行日：2010 年 4 月 27 日）
18. 中村浩一郎、日本板硝子株式会社、有害化合物の無害化方法、US12/740,480（米国移行日：2010 年 4 月 29 日）
19. 中村浩一郎、有害化合物の無害化方法、2573/CHENP/2010（インド国移行日：2010 年 4 月 30 日）
20. 中村浩一郎、有害化合物の無害化方法、2010122348（露国移行日：2010 年 6 月 1 日）
21. 中村浩一郎、有害化合物の無害化方法、2.0088E+11（中国移行日：2010 年 6 月 2 日）

特許査定、登録特許

1. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、堂見新二郎、日本板硝子株式会社、アルキル化用組成物及び当該組成物を利用した有害化合物の無害化方法、特願 2006-118388、特開 2008-050265、特許 4802036、日本国特許査定日(2011 年 7 月 12 日)
2. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、日本板硝子株式会社、アルキル化用組成物及び当該組成物を利用した有害化合物の無害化方法、特願 2008-526681、WO2008/012950、露国出願番号 2009106660、露国特許査定日(2011 年 6 月 21 日)
3. 中村浩一郎、久枝良雄、Pan Ling、日本板硝子株式会社、九州大学、メチルアココビリン酸誘導体、アルキル化用組成物及び当該組成物を利用した有害化合物の無害化方法、特願 2008-526679、WO2008/012948、露国出願番号 2009106658、露国特許査定日(2011 年 8 月 24 日)
4. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、日本板硝子株式会社、メチル化合物の無害化方法、特願 2008-546876、WO2008/065750、出願番号 2009106658、バングラデッシュ共和国登録番号 1004837（2011 年 8 月 24 日）
5. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、日本板硝子株式会社、メチル化合物の無害化方法、特願 2008-546876、WO2008/065750、中国公開番号 101541381、中国特許査定日(2011 年 7 月 28 日)
6. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、日本板硝子株式会社、有害化合物の無害化方法および有機半導体元素化合物の製造方法、特願 2008-285882、WO2010/053072、特許 4866483（2011 年 11 月 18 日）
7. 中村浩一郎、菱沼晶光、神谷晋司、日本板硝子株式会社、メチル化合物の無害化方法、特願 2008-546876、WO2008/065750、露国出願番号 2009124465、登録番号 2446848（2012 年 4 月 10 日）