

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23406003

研究課題名(和文)無機ヒ素の無毒化処理技術を用いた慢性ヒ素中毒の予防と改善の研究

研究課題名(英文)The advanced study of the role of detoxification treatment of inorganic arsenic for the prevention of health disorders of arsenic and chronic arsenic poisoning

研究代表者

山内 博(Yamauchi, Hiroshi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：90081661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：現在、無機ヒ素(iAs)の飲料水や土壌汚染からの大規模な慢性ヒ素中毒がアジア諸国で発生している。中毒の原因であるiAsの無毒化は、慢性ヒ素中毒の予防や根絶に寄与すると推測している。社会普及に繋がるiAsの無毒化技術を検討した。本研究から、酸化チタン光触媒、酢酸の存在下、光照射により、iAsは無毒化ヒ素であるアルセノベタイン(AsB)に変換された。この手法はヒ素汚染土壌や水の浄化に应用が期待される。海洋投棄モデルとしてAsBの海水中での挙動を検討した結果、短時間で海水中ヒ素濃度(2ppb)に安定的に到達し、この結果は究極の低コストプロセスとしてのAsBの海洋投棄の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Chronic arsenic poisoning, currently, inorganic arsenic (iAs) contamination of drinking water causes the victim of more than 50 million has been identified in Asia. We have developed a synthesis technology simple to detoxification process the iAs is a causative agent of arsenic poisoning. Establishing the non-toxicity of arsenobetaine (AsB) on scientific and legal grounds will expedite the application of arsenic detoxification in many areas as a safe and eco-friendly way to treat iAs in the natural environment. The presence of titanium oxide photocatalyst, acetic acid, by light irradiation, the iAs is converted to AsB. Examination of the behavior in seawater of AsB as ocean dumping model, was present in a stable manner to reach the (2ppb) arsenic concentration originally present in seawater within 24 hours. It was able to ocean dumping of toxic arsenic and establishment of low-cost process of ultimate propose a possible conditions.

研究分野：医歯薬学A

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

キーワード：慢性ヒ素中毒 ヒ素 無毒化 無毒化ヒ素 アルセノベタイン 飲料水 汚染土壌

1. 研究開始当初の背景

現在、国際社会において有害化学物質からの健康障害において、井戸水の無機ヒ素汚染からの慢性ヒ素中毒が最も深刻な問題であると考えられ、その被害者はアジア諸国（バングラディシュ、西インド、ネパール、カンボジア、ベトナム、中国）、中南米諸国はメキシコ、チリ、アルゼンチン等で約6,000万人以上と国際機関（WHO）は推測し、歴史上人類が経験したことの無い規模の被害であるとの認識を持っている。この無機ヒ素は自然由来であり、その源は火山に関係している。被害者が多い国はバングラディシュ（4,600万人）、西インド、中国（300万人）である。筆者は1996年から、中国内蒙古自治区、山西省を中心に疫学調査を実施し、中毒の発生のメカニズムと予防対策について国際学術共同研究を科学研究費において実施してきた。中国での井戸水からの過剰な無機ヒ素摂取は、文化革命後の解放政策に関係し、各家庭で使用し始めた深井戸（地下約15 - 20m）が原因し、約30年の無機ヒ素暴露が経過し、現在最も発がん性が懸念されている（潜伏期は約30年）。今日、飲料水の改水が行われているが、中国やバングラディシュ、他の国も同様であるが、井戸水から様々な技術で取り除いた高濃度に濃縮された無機ヒ素が放置され、二次汚染が発生し、これから新たな患者は発生する悪循環が存在する。すなわち、この無機ヒ素の放置問題を解決しない限り、地球規模での慢性ヒ素中毒の予防、改善、根絶は無理と考えている。

2. 研究の目的

アジア諸国の慢性ヒ素中毒の現状は歴史的に例を見ない規模で発生し、被害者は約6,000万人に達し、その原因は、自然由来の無機ヒ素による井戸水汚染である。中毒の改善が進まない最大の要因は、井戸水から除去した無機ヒ素を適切に最終処理できない技術不足が存在する。筆者は猛毒な無機ヒ素を人工的に無毒のヒ素であるアルセノベタイン(AsB)に変換処理し、安全な保管や自然還元を検討している。無機ヒ素の無毒化処理の知識と技術は、国際的にも初めてであり、日

本学術会議として政府に提言した。慢性ヒ素中毒は無機ヒ素暴露を軽減・停止することにより症状の改善が先行研究で明らかにした。我々が提案する無毒化処理方法の基本は、無機ヒ素の毒性が維持した隔離・放置の方法ではなく、毒性を完全に消去する新たな発想である。提案する先端的な有害物質の新たな環境処理技術は、国内や国際社会にて実践的に貢献が可能であると考えている。

本研究は環境中に放置される無機ヒ素を無毒のヒ素(AsB)に人工的に変換し、無機ヒ素の環境汚染レベルの低下を達成し、慢性ヒ素中毒の減少を科学的に検証する、国際社会で最初の取り組みを実施した。

3. 研究の方法

(1) 無機ヒ素の無毒化ヒ素であるアルセノベタイン(AsB)の高率合成法の検討：

先行研究においてビタミンB₁₂を用いたAsBの基礎的な合成法は、国際社会で最初に報告している。しかし、経済性の視点から安価なビタミンB₁₂、システイン、メタノール、反応条件等の工夫を試みた。関連して、バイオインスパイアード触媒等の利用も検討した。

(2) 合成AsBの安全性試験の検討：

合成AsBや中間体ヒ素の毒性試験をHeLa（ヒト子宮頸がん細胞）、HL-60（ヒト前白血病由来細胞）、V-79（ハムスター肺由来細胞）を用いて細胞毒性試験（アポトーシス、DNA損傷、活性酸素種、コロニー形成法、微少核形成法等）にて検証した。

(3) 合成AsBの自然界への還元の検討：

将来的なAsBの自然還元の可能性と安全性の検証を試みた。

(4) 慢性ヒ素中毒発生井戸水中に含有する無機ヒ素の無毒化処理：

慢性ヒ素中毒患者が飲水していた試料を用いて、無機ヒ素の無毒化処理を検討した。

(5) 無機ヒ素の無毒化処理過程における、他元素への影響評価：

水銀、鉛、錫などアルキル化金属は、強毒性であることが知られており、本処理方法はこれらの元素に対するメチル化の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 無機ヒ素の無毒化ヒ素であるアルセノベタイン (AsB) の高率合成法の検討:

酸化チタンと酢酸存在下、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。

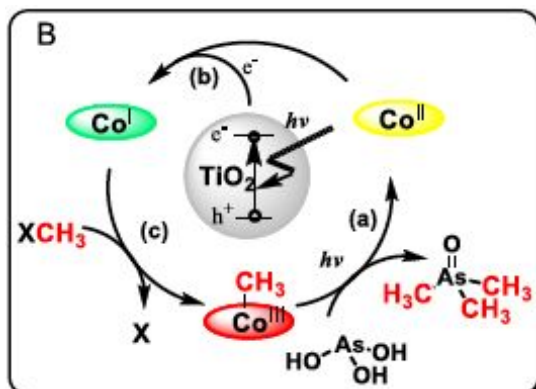


図1 バイオインスパイアード触媒システムによる無機ヒ素の AsB への変換

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) 合成 AsB の安全性試験の検討:

CCK-8 法による細胞生存率を検討した結果、 $iAs(III)$ は濃度依存的に細胞致死効果が増強するのに対し、AsB は 100 μM 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。

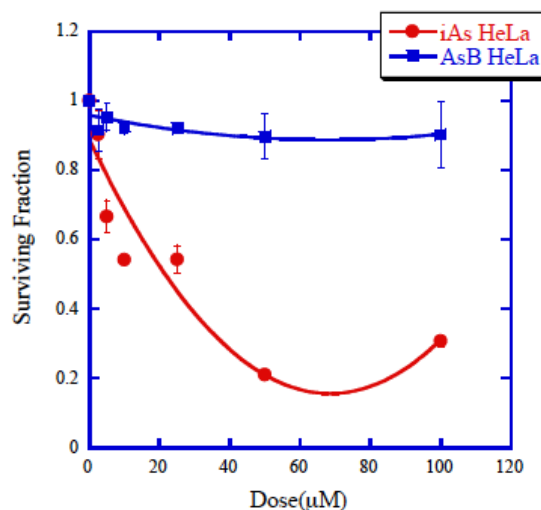


図2 CCK-8 法による無機ヒ素と AsB の細胞生存率の比較

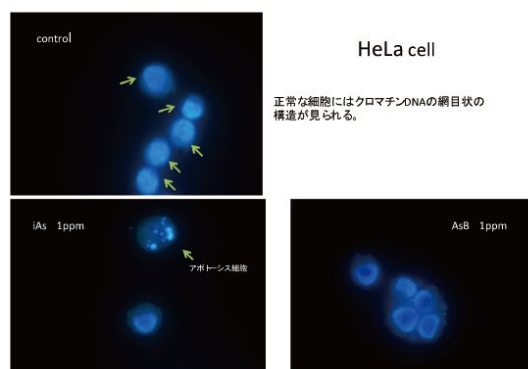


図3 HeLa 細胞を用いた無機ヒ素と AsB のアポトーシス試験

アポトーシス試験法により、 $iAs(III)$ と AsB

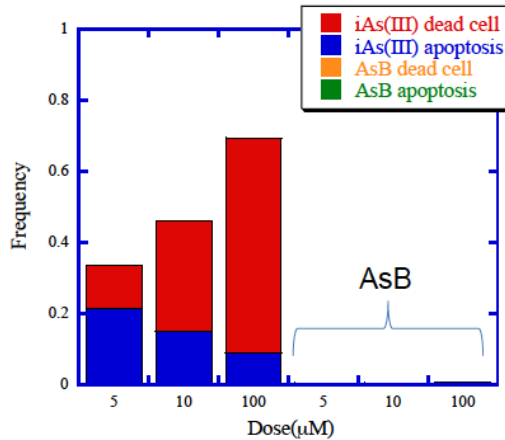


図4 無機ヒ素とAsBにおけるアポトーシス細胞の出現比率の比較

を比較検討した結果、ヘキスト染色法、DNAラダー法においてもAsBにアポトーシス作用のないことを確認し、一方、酸化ヒ素は顕著な作用が認められた。

合成AsBの急性毒性試験として、ラットに2000mg/kgを経口投与した後、2週間の状態観察をしたが、肉眼的な所見に異常は認められなかった。次いで、OECD、GLPに準拠した条件でAsBの眼刺激/腐食試験、皮膚刺激/腐食試験を実施した結果、各検査において異常は認められなかった。

(3) 合成AsBの自然界への還元の見直し：

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た。

(4) 慢性ヒ素中毒発生井戸水中に含有する無機ヒ素の無毒化処理：

中国内蒙古自治区において慢性ヒ素中毒として診断を受けた患者が長期に使用していた井戸水を用いて、無機ヒ素の無毒化処理を検討した。試験水を本方法にて処理した結果、無機ヒ素は直接AsBに変換したことを確認した。この結果から、自然環境下において無機ヒ素汚染水の処理を可能とする基礎的な結果を得たと考えている。この手法は汚染土壌へも転換が可能とも考えている。

(5) 無機ヒ素の無毒化処理過程における、他元素への影響評価：

ヒ素はメチル化されることにより、毒性は低くなると一般的に理解されている。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。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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 5件)

- 1) Nakamura K., Yamauchi H., Rare metal recycling and arsenic detoxification by TiO₂ photocatalyst, *Abstracts of 92nd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2012, Vol.1, 3PD-041, p88-89. 査読有り
- 2) Nakamura K., Yamauchi H., Arsenic detoxification by TiO₂ photocatalyst, *Abstracts of 92nd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2012, Vol. , 3G1-29, p507. 査読有り
- 3) Nakamura K., Yamauchi H., Rare metal recycling and arsenic detoxification by TiO₂ photocatalyst, *Abstracts of 92nd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, 2012, Vol.1, 3C5-38, p41 - 41. 査読有り
- 4) 山内博、提言、老朽・遺棄化学兵器の廃棄処理の実施における保安対策：中国の遺棄化学兵器処理の開始に当たって、日本学術会議、2011. 査読有り
- 5) Yamauchi H., Nakamura K., Arsenic detoxification, *Abstracts of the 16th Arsenic Symposium*, 2011, p60 - 61. 査読有り

〔学会発表〕(計 7件)

- 1) 山内博、ヒ素中毒やヒ素汚染の検証に対するヒ素の同一性の検証、日本学術会議、東京、2013.
- 2) 山内博、化学兵器廃棄と安全性：ヒ素による被ばくの現状と防止対策、日本学術会議安全工学シンポジウム、東京、2013.
- 3) 山内博、無機ヒ素の無毒化処理に関する背景と展望、日本水処理生物学会、東京、2012.
- 4) 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、横浜、2012.
- 5) 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、横浜、2012.

- 6) 山内博、無機ヒ素の無毒化処理技術、資源材料学会、堺、2011.
- 7) 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バタインの細胞毒性評価、第81回日本衛生学会学術総会、東京、2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山内 博 (YAMAUCHI, Hiroshi)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号： 90081661

(2)研究分担者

吉田 貴彦 (YOSHIDA, Takahiko)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号： 90200998

(3)連携研究者

高田 礼子 (TAKATA, Ayako)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号： 30321897