

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670069

研究課題名(和文) 淡水魚中に含まれる未知のヒ素化合物の同定と毒性評価

研究課題名(英文) Identification of unknown form of arsenicals and evaluation of toxicity in freshwater fish

研究代表者

宮高 透喜(miyataka, hideki)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：50157658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素による地下水汚染がアジア諸地域で問題となっている。カンボジア住民はたんぱく質の8割を淡水魚から得ており、毒性の高い無機ヒ素(三価、五価)含有は重要な課題であり、対象魚の総ヒ素量、ヒ素化学形態解明を目的とした。

40種の淡水魚を調べた結果、DMA、TMAOなど低毒性の有機ヒ素が多く、無機ヒ素は少なかった。住民の摂食量と無機ヒ素量を乗じ、個人摂取総ヒ素量を求めた結果、淡水魚からの無機ヒ素摂取量は健康影響が出るレベルでは無かった。

研究成果の概要(英文)：Arsenic poisoning of ground water is prevalent in Asian countries including Cambodia. The chemical forms of arsenic contained in ground water are inorganic arsenate (As(V)) and arsenite (As(III)). In addition to tube-well water, the sources of arsenic exposure include fish. In Cambodia, about 80% of the protein source for people is fish, mainly freshwater fish in the river. A little information is available on the chemical forms of arsenicals in freshwater fish. To properly evaluate arsenic exposure levels among Cambodian people, it is necessary to clarify the concentrations and chemical forms of arsenicals in freshwater fish.

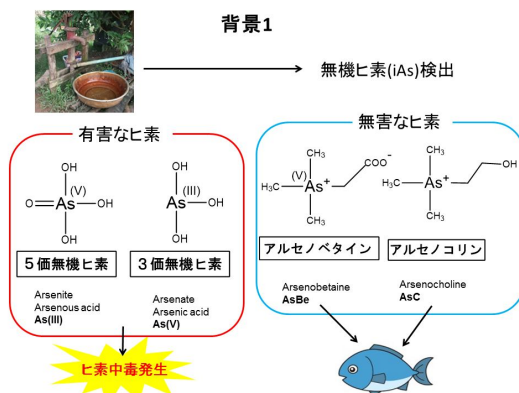
Some types of freshwater fish contributed to the intakes of DMA, TMAO, and As(V). Further studies are required to precisely estimate the exposure levels of non-toxic and toxic forms of arsenicals among Cambodian people who are deeply dependent on freshwater fish consumption.

研究分野：衛生薬学

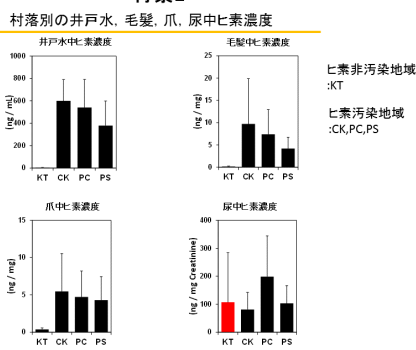
キーワード：ヒ素化学形態 無機ヒ素 有機ヒ素 淡水魚 ヒ素汚染地域

1. 研究開始当初の背景

- 1) . 20 世紀の終盤、アジア各地で井戸水のヒ素汚染問題が広がった。特にバングラデシュでは数千人も汚染水を飲水し、重篤な中毒患者が多くなってきた。河川を含む地表水を生活に利用することは衛生的に問題が多いとされ、NPO が各地に井戸を提供した。その結果、感染症などの対策に功を奏したがヒ素汚染水を常用し中毒患者を生み出す皮肉な結果となった。
- 2) . カンボジアでは、井戸を封印するなど制限を設けたにもかかわらず、一部にはヒ素摂取の症状が見られ、毛髪・爪・尿中にヒ素が含まれていることがわかった。一方、メコン川流域住民はたんぱく質の約八割を淡水魚（メコン川産）から摂取しており、ヒ素の摂取源になっているかどうかは重要な課題である。
- 3) . ヒ素はその化学形態により毒性が大きく異なる。地下水などに含まれる無機ヒ素は 価、 価とも極めて毒性が高くヒ素中毒の原因となっている。海産魚に多く存在するアルセノベタインなどの有機ヒ素はほとんど毒性が無い。



背景2



2. 研究の目的

ヒ素化学形態の解明は毒性との関連で重要である。総ヒ素の九割以上がアルセノベタインである海産魚に関しては研究報告が多いが、淡水魚に関する論文はほとんど無い。そこで、カンボジア住民が摂取する淡水魚を入手し、総ヒ素量およびヒ素化学

形態を調べ、健康状態との関連を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

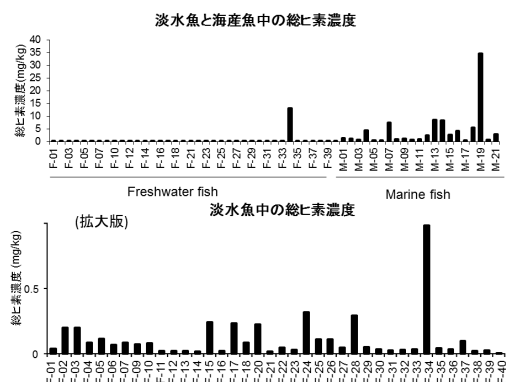
カンボジア現地市場で 40 種の淡水魚を入手、同時に魚の種類毎に接触頻度、摂食量を住民から聞き取った。凍結状態で持ち帰り、ICP-MS を用いてヒ素量を測定した。

- 1) . 総ヒ素量の測定: マイクロウェーブで灰化した後、ICP-MS を用い、元素分析を行い定量した。
- 2) . ヒ素科学形態別分析: 試料を凍結乾燥後、水 - メタノール混合液で抽出、濃縮後水溶液とし HPLC を接続した ICP-MS を用い、2 種の無機ヒ素と 6 種の有機ヒ素を同定・定量した。
- 3) . ヒ素摂取量の算定: 分析結果が得られた総ヒ素量と無機ヒ素量および、接触頻度・摂食量を乗じ、各個人のヒ素量とした。

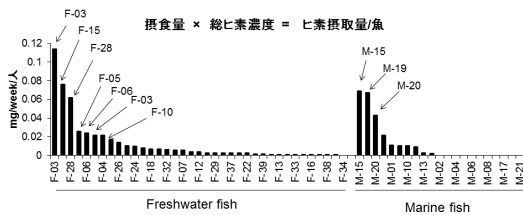
4. 研究成果

- 1) . 背景に示したように KT 地区（非汚染地域）では井戸水中にヒ素は検出されないが尿中に排泄されている。他の三地区（汚染地域）では井戸水、毛髪、爪、尿中に検出された。調査の結果 KT 地区では井戸水の飲用はしていないことや海産魚を主に摂食していることがわかった。海産魚中のアルセノベタインは、代謝を受けず尿に排泄されることが知られており、実験結果を反映している。一方、他の三地区では、井戸水を使用しないと回答しているにもかかわらず、生体試料からの検出が認められた。ほぼ毎食摂取している淡水魚由来と考えられるが、井戸水利用（飲水はしていないが、洗い物や調理に利用）の可能性も否定できない。

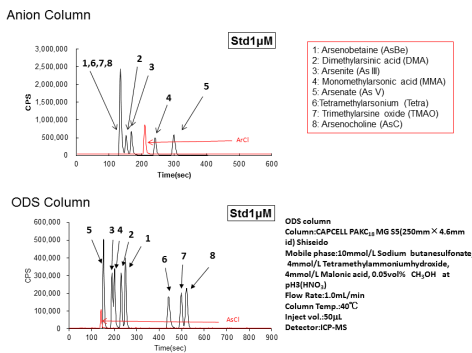
- 2) . 従って、淡水魚中の総ヒ素濃度およびヒ素化学形態を明らかにすることが必要であり、ICP-MS を用いて測定を行った。総ヒ素濃度は明らかに海産魚で多く、平均で淡水魚の約 50 倍であった。海産魚の総ヒ素量は 10mg/kg を超えるものが多いが、淡水魚では 1 種以外は 0.1 ~ 0.3mg/kg 以下であった。



3) . まず、それぞれの魚種ごとの総ヒ素濃度を測定した結果、海産魚中にはヒ素が平均で 4.24ppm 含まれていたのに対して淡水魚中には 0.087ppm と海産魚の約 1/50 ほどだった。本調査では魚種ごとの摂食量調査も行っている。その結果は平均で淡水魚 3.97kg/週/人、海産魚 0.143kg/週/人で、淡水魚を非常に多く食べていることが明らかとなった。そこで、魚種ごとの摂食量と総ヒ素濃度の結果とを掛け合わせて魚種ごとのヒ素摂取量を求めた。その結果、淡水魚では摂食量が多いため摂取するヒ素の総量は 255.8 μ g/週/人となり、海産魚の 179.8 μ g/週/人よりも多かった。



4) . ヒ素化学形態別分析には、HPLC-ICP-MS を用いた。標準品として用いたのは入手可能な次の 8 種であった。(無機 価ヒ素、無機 価ヒ素、モノメチル 価ヒ素、ジメチル 価ヒ素、) これらヒ素化合物は水溶性であるが、物理化学的特性が異なるため溶出時に保持時間の重なりがあり、定性・定量性を確保するため二種類の HPLC 条件を用いた。

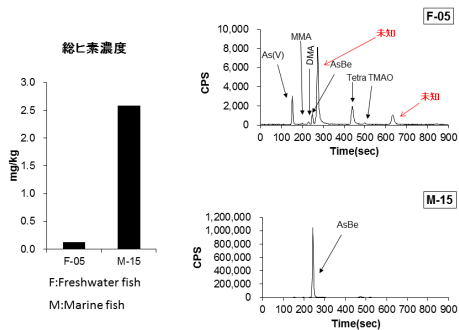


一方は、陰イオン交換樹脂を充填したカラムで、炭酸水素アンモニウム溶液を溶離液として実験を行った。他方は、オクタデシルシリル基をコーティングしたシリカゲルいわゆる逆相カラムで、イオン排斥薬、イオンペア試薬混合液を溶離液として用いた。陰イオン樹脂カラ

ム法では脂溶性が比較的高い化合物が未分離となり、逆相カラム法では、無機 価ヒ素とモノメチル 価ヒ素のピークが重なった。

また、両方法とも m/z:75 のアルゴン - 塩素がクロマトグラム上に表れるが、逆相カラム法では無機 価のピークと重なるため、ヘリウムコリジョン法を用いて妨害ピークを減弱させた。

5) . 次に魚種ごとのヒ素の化学形態別分析を行った。その結果、海産魚にはほぼ AsBe のみが検出されたが、淡水魚ではモノメチルアルソン酸(MMA(V))、ジメチルアルシン酸(DMA(V))など様々な有機ヒ素化合物のピークが検出された。次に、毒性が高い無機ヒ素に着目し、濃度を比較した。その結果平均で淡水魚 2.95ppb、海産魚 5.32ppb といずれも低い値だった。無機ヒ素についても摂食量を掛けて淡水魚、海産魚それぞれからの摂取する無機ヒ素の総量を求めた。その結果、淡水魚では 13.8 μ g/週/人、海産魚では 0.6 μ g/週/人と約 20 倍の差があり、ほとんど淡水魚から無機ヒ素を摂取していることが明らかとなった。



6) . 以上の結果から、カンボジア住民がそれぞれの魚からどのくらいどのような化学形のヒ素を摂取しているか明らかにすることができた。有機ヒ素化合物は毒性が低いので人体に問題はないと推測されるが、無機ヒ素は毒性が高いため人体への影響を考える必要がある。

| Fish | As摂取量 (μ g/week/人) | | | | | | | SUM |
|------|-------------------------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|---------|
| | iAs | MMA | DMA | AsBe | AsC | TMAO | Tetra | |
| F | 11.2 | 5.0 | 17.7 | 79.6 | 2.6 | 7.2 | 4.8 | 128 |
| (%) | (8.7) | (3.9) | (13.8) | (62.2) | (2.0) | (5.6) | (3.7) | (100.0) |
| M | 0.3 | 1.0 | 0.7 | 206.5 | 0.6 | 2.0 | 0.1 | 210.8 |
| (%) | (0.2) | (0.5) | (0.3) | (98.0) | (0.3) | (0.9) | (0.1) | (100.0) |

F:Freshwater fish
M:Marine fish

| Fish | HPLCピークの和 (SUM) | 灰化サンプルのヒ素 (Total As) |
|------|-----------------|----------------------|
| F | 128.0 | 381.1 |
| M | 210.8 | 243.5 |

iAs: As(III) + As(V)

SUM=iAs + MMA + DMA + AsBe + AsC + TMAO + Tetra

Total As:生のサンプルを灰化によりICP-MSで求めた値

飲料水の無機ヒ素に関するWHOの基準値(10ppb)から算出した無機ヒ素摂取量は140□g/週/人である。この値と比べて、淡水魚由来の無機ヒ素摂取量(13.8μg/週/人)は約1/10ほどであった。このことから、カンボジア住民が魚から摂取する無機ヒ素の量は健康影響が懸念されるレベルではないと考えられる。

- 7) . 今後は、未知ピークとして得られたヒ素化合物の同定と毒性試験が必要となる。例えば今回実験に使用したモノメチル 価ヒ素の毒性はほとんど無いとされているが、モノメチル 価ヒ素の毒性は無機 価の毒性より高いとの報告もあり、分析方法の検討が必要となる。

HPLC-ICP-MSでは標品の入手可能な水溶性化合物について分析条件の検討を行ってきた。従って試料作成時の抽出には水-メタノール混液を用い、溶媒留去後、水に溶解して化学形態別分析に供した。予備的に行った実験で、陽イオン交換樹脂カラムを用いた場合、陰イオン交換樹脂カラムとは異なるクロマトグラムが得られ、全く別の未知ピークを見ることができた。さらにエタノールや他の有機溶媒など、脂溶性の高い溶媒での抽出後、分析をすると全く異なったヒ素化合物が得られる可能性がある。

最も大きな問題は、未知ヒ素化合物の単離・同定である。HPLC-ICP-MS分析条件ではLC-MS/MSでの分析には溶離液が不適となる。新規標準化合物の化学合成も含め、今後の課題となる。

カンボジアやバングラデシュなどヒ素汚染地域はヒマラヤを源流に持つ河川によって運ばれ濃縮され地下水に多くヒ素が存在するようになった。地下水の採取場所により、水中の無機 価ヒ素/無機 価ヒ素の含有量が異なる。住民の健康状態も相違があるが、河川の淡水魚中のヒ素化学形態も異なることが考えられる。現地では、雨季と乾季では河川の水量が大きく異なり、淡水魚中のヒ素濃度も影響してくると考えられる。手元にタイ、ベトナムの淡水魚もあり、比較検討を行いたい。

- 8) . カンボジア住民が摂取している淡水魚中のヒ素量は健康に影響を及ぼさないことが明らかになった。しかし、毛髪・爪・尿中にヒ素が排泄されていること、健康被害も見られることから、体内にヒ素が取り込まれる状況を再調査する必要がある。

尿：数日、毛髪：1~2ヶ月、爪：1年程度とヒ素取り込みから排泄までの期間が異なるにもかかわらず、全て検出された。何らかの形で常時ヒ素が取り込まれていることが考えられる。難しい課題かもしれない。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

藤森千鶴、宮高透喜、姫野誠一郎、メコン川流域の淡水魚中ヒ素濃度と化学形態、第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 長崎県長崎市長崎大学 2015年5月30日~5月31日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮高透喜 (MIYATAKA Hideki)
徳島文理大学薬学部・助教
研究者番号：50157658

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

姫野誠一郎 (HIMENO Seiichiro)
徳島文理大学薬学部・教授
研究者番号：20181117

(4) 研究協力者

藤森千鶴 (TOHMORI Chidzuru)