

はDPAAの神経障害機序を考える上で興味深い。

今回検討したのは、FDG-PET検査を施行し得た症例のうち、正常対照として比較しうる自験データを持っている20歳以上の成人例についてのみである。小児の脳ブドウ糖代謝に関して正常の加齢変化を報告した唯一の論文はChugani(1987)らの報告のみである。これによると、小児期は脳の発達に伴う神経細胞密度およびシナプス密度の変化に応じて脳ブドウ糖消費量がドラマチックに変化する。全脳の糖代謝は生後中枢神経系の発達と共に上昇し、6歳から10歳でピークとなる。このレベルは成人の約2から3倍にあたる。その後漸減して20歳頃にはほぼ成人のレベルに落ち着く。また、局所の分布も生直後の時点では、一次運動感覚皮質、視覚関連皮質の糖代謝は比較的高いがその他の連合野の部位は低い。連合野の代謝は生後1年頃までに徐々に上昇し、相対的には1歳で成人とよく似たパターンとなる。しかし詳細を見ると小脳、脳幹部、視床、線条体、側頭葉内側部などの糖代謝が他の部位と比較すると、成人のパターンと比べるとやや低い傾向にある。従って、小児のDPAA症例を検討するためには年齢相応の正常データが必要となる。しかし、PET検査はわずかであるが被曝があり、放射線に対する感受性の高い小児を対象とした正常データの収集は困難である。そこで、自験の正常データおよび報告されたデータから、小児の正常範囲を推定し、これにもとづいて小児DPAA症例の診断を行う必要がある。この点に関しては今後、詳細な検討を行う必要がある。

〔結 論〕

DPAA摂取を中止してから長期間経過し、臨床症状のない成人においても、PETにより脳代謝異常が高頻度に検出された。DPAAによる中枢神経障害のメカニズム解明と長期的な経過観察が必要である。

〔今後の課題〕

今年度の研究結果に基づき、今後以下の課題に取り組んでいきたい。

1. 小児におけるPET検査の正常範囲の推定とそれにもとづく小児例の解析
2. DPAA暴露量や臨床症状とPET画像の相関的解析
3. 経時的観察:1～2年後のフォローアップ検査

〔参考文献〕

- (1)Ishii K, Tamaoka A, Otsuka F, Iwasaki N, Shin K, Matsui A, Endo G, Kumagai Y, Ishii T, Shoji S, Ogata T, Ishizaki M, Doi M, and Shimojo N. Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan. *Ann Neurol* 56:741-745 (2004).
- (2)Chugani HT, Phelps ME, and Mazziotta JC. Positron Emission Tomography Study of Human Brain Functional Development. *Ann Neurol* 22:487-497 (1987)

20-49歳
n = 28

50歳以上
n = 20

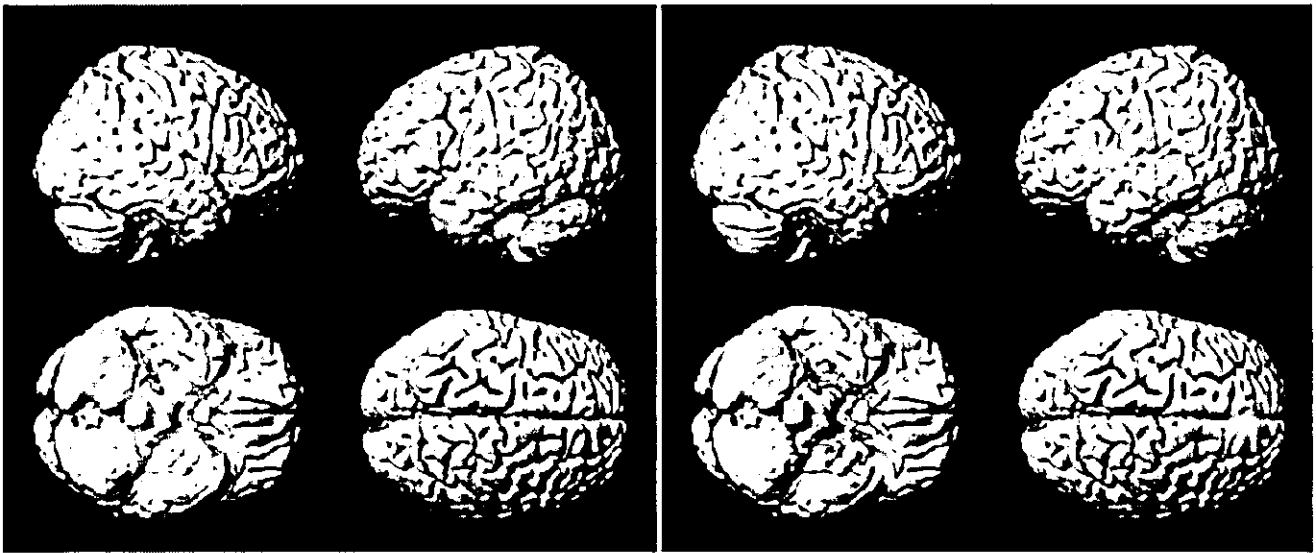


図1 DPAA患者における脳ブドウ糖代謝の変化

左：50歳未満症例（28例）、右：50歳以上症例（20例）を健常対照群と比較し、有意（ $p < 0.05$ ）に代謝の低下している部位を色つきで表示。

4. 井戸水・土壌中有機ヒ素化合物分析法の検討

分担研究者： 柴田康行((独)国立環境研究所化学環境研究領域)

研究協力者： ジョン・エドモンズ、森田昌敏(同上)、都竹克昭、伊藤智雄、辻野一茂、
倉谷和代、八木孝夫((株)島津テクニサーチ)

〔研究要旨〕

化学兵器として用いられたジフェニルクロルアルシン等の分解生成物と考えられるジフェニルアルシン酸 (DPAA) やフェニルアルソン酸 (PAA) の微量定量分析法の開発が急務となっている。DPAAについては、低分子用ゲルろ過カラムを用いた高速液体クロマトグラフ法に基づくHPLC/ICP-MS分析法を開発、確立して実地に応用してきているが、その分解産物として注目されるPAAについてはゲルろ過法では他のヒ素化合物等とピークが重なるために精度の高い分析が難しい。環境中にでたこれらの有機ヒ素化合物が生物作用などで変化する可能性もあり、これらの有機ヒ素化合物に対するより定性機能の優れた分析手法の開発、確立が望まれる。

本研究では、HPLC/ICP-MS法による分離条件のさらなる改良を図るとともに、タンデム質量分析法を用いた新たなLC/MS/MS法の検討を行い、有用な知見を得たので報告する。

ABSTRACT

Development and establishment of a highly sensitive analytical method for diphenylarsinic acid (DPAA) and phenylarsonic acid (PAA), which are thought to be decomposition products of chemical warfare reagent, dichlorocycanoarsine, is becoming an urgent task. An HPLC/ICP-MS method based on a gel permeation column was already established and has been applied for the determination of DPAA, but the method is not suitable for PAA because of insufficient separation from other known arsenic compounds. Establishment of a new analytical method with better separation and identification power will be necessary especially because of possible conversion of these chemicals to other forms by biological activities etc in the environment.

In the present study, application of other HPLC columns were examined for HPLC/ICP-MS analysis to get better separation, and development of new method using LC/MS/MS were conducted. A brief outline of the researches and results will be described.

〔はじめに〕

茨城県神栖町でおきた井戸水ヒ素汚染事例は、ジフェニルアルシン酸(DPAA)という特殊な有機ヒ素化合物による汚染であることが明らかとなり、汚染範囲の確定、汚染源の探索、並びに暴露者の特定と健康診査が進められている。これらの事業では水ばかりでなく土壌や生体試料など様々な試料に適用可能なDPAAの迅速高感度分析手法の確立が急務であり、試料溶液の汚れに強く試料あたり数分

程度で測定できるDPAA分析手法として、低分子用のゲルろ過カラムに基づくHPLC/ICP-MS法を開発、確立し¹⁾、これまでに千を超える実試料の分析に適用してきた²⁾。

この方法はポリビニルアルコール系の樹脂を基質とするHPLCカラムを用いて、分離されたヒ素化合物を順次連続的に高温プラズマ(ICP)に導入して分子を構成原子にばらばらにし、さらにイオン化して質量分析法で各元素(この場合はヒ素)を測定する手法をとっている。分離の基礎は分子のサイズに基づくゲルろ過であるが、樹脂の強度を上げるために二重結合が含まれており、弱い疎水的相互作用も分離の重要な原理となっている。さらに、合成過程で表面に比較的多くのカルボキシル基が生成するため、中性付近のpHではこれらが解離して負の電荷を表面に持つことになり、電気的な相互作用も分離の状況をさらに修飾する。そのため、実際の化合物の分離にあたっては複数の相互作用が重畳して複雑な様相を示すが、溶出溶液のイオン強度の増大により電気的相互作用を弱めた条件下では試料溶液中の共存物質の影響を受けにくく、汚れにも強いという利点を有している。DPAAは分子中に2つのベンゼン環を持ち、弱いながらもカラムの二重結合との間の疎水性相互作用がうまく働いて、有機溶媒を含まない水系のバッファーでは一般に環境中で見られる各種のヒ素化合物に比べて大きく遅れて溶出する。そのため、他のヒ素や共存物質の影響を受けにくく、信頼性の高いDPAAの同定、定量が可能であり、カラムを通常の1/5に短くして測定時間の短縮を図りながら実際の試料の測定に応用してきている²⁾。

一方、ベンゼン環を一つしかもたないPAAの場合は疎水相互作用が大幅に弱まり、短いカラムでは結果としてPAAとそれ以外のヒ素化合物との分離が悪い弱点を有している。検出器であるICP-MSはヒ素の有無しかわからないため、物質の同定はもっぱらHPLCでの分離に頼っており、定性機能はすぐぐれているとは言い難い。DPAAは環境中では次第に分解してPAAを経て無機ヒ素に変化すると考えられているが、上記のように現在確立された手法ではこうした変化を丁寧にたどることは必ずしも容易ではない。そこで、本研究ではPAAも含めて分離、定量可能なHPLC/ICP-MS用の新たなHPLC分離条件を探し、旧来の方法と組み合わせるとともに、もとの分子をそのままイオン化して選別後、さらに断片化して娘イオンを測定する、分子の構造情報に基づく定性機能に優れたLC/MS/MS法の開発についても検討を進めた。その結果を以下に報告する。

[実験]

DPAA、PAAは既報に基づき合成し、NMRで構造を確定した。また、別途トリケミカル製、ないし関東化学製のDPAA、東京化成工業製のPAAを一部の試験で標品として用いている。その他の試薬類は特級、ないしHPLCグレード等を用いた。用いた水は超純水製造装置(MilliQ)で作成したものか、LC/MS/MS用の蒸留水を用いた。HPLC/ICP-MSシステムは、Agilent社製の1100シリーズLCシステムと7500シリーズICP-MSとを組み合わせ用いた。LC-MS/MSシステムはLCとして、島津製作所製のCLASS-VPシステムを用い、MS/MSには、Applied Biosystems社製のAPI4000を用いた。各標準溶液は合成標準物質を秤量し、水で希釈して用いるか、または標準品の100 μ g/mLのメタノール溶液を水で希釈して調製した。

[結果並びに考察]

(1) HPLC/ICP-MSにおけるLC条件の検討

ゲルろ過の上記の欠点を克服するためには、異なる原理の手法を組み合わせると相互の比較から同

定の確かさを確認できることが望まれる。分離対象物質の化学的な特徴を考えると、2種類の分離原理が候補として考えられる。DPAA、PAAはいずれも中性付近では脱プロトン化して負イオンとなっていることから、イオン交換カラムが有力な候補の一つと考えられる。また、これらはベンゼン環をそれぞれ2つないし1つ有することから、疎水性相互作用に基づく逆相系のカラムも候補となろう。一方、検出系の特徴を考えると、ICP-MSの場合は有機溶媒や高濃度の無機塩の導入に弱い、という欠点を有している。一方のMS/MSの方は無機、有機をとわず溶離液中のイオン性物質濃度をなるべく下げたいところであるが、有機溶媒の導入に対しては基本的には問題がない。以上の結果から、ICP-MSへの接続には有機バッファーを含む水溶液を溶離液とするイオン交換樹脂カラムを、MS/MSには有機溶媒を用いる逆相系のカラムを優先順位の高い分離条件とし、さらに検討を進めた。

HPLC/ICP-MSとして予備的に検討したところ、一般的によく用いられるシリカゲルベースのイオン交換カラムでは、よい分離を得ることができなかった。原因ははっきりわからないが、イオン交換基を導入するため等のシリカゲル表面の化学修飾部分がDPAAと相互作用するためかもしれない。よりよい分離条件の確立を目指して異なる基質のカラムを検討した結果、ポリマー系のイオンクロマト用カラムでよい分離を示すものが見つかった。用いたのは島津製作所製のイオンクロマトグラフィ用陰イオン交換カラム、Shim-Pack IC-A3(ノンサブレッサータイプ)で、ポリアクリレート系樹脂を基材として四級アンモニウム塩型の官能基を有する。緩衝液を検討した結果、10mM酢酸アンモニウム緩衝液がもっとも相互分離がよく、かつ比較的短い時間で分析を終了できることがわかった(保持時間はPAA=3.5min、DPAA=9.5min)。検出下限はピークがブロードニングをおこすDPAAの方が悪いが、いずれもヒ素として1ng/mlを切る高感度な測定が可能であることがわかった。

(2) LC/MS/MS条件の検討⁴⁾

MS/MS測定条件の検討

イオン化法には、一般的な大気圧イオン化法であるエレクトロスプレーイオン化法(ESI法)と大気圧化学イオン化法(APCI法)の両方を試したが、特にPAAの測定にはAPCIの方が感度も高いことがわかり、夾雑物によるイオンサプレッションが起こりにくい利点もあることから、最終的にAPCI法を採用した。最終的なイオン源条件並びに測定質量数を表1にまとめる。

表1 MS/MS測定条件

	DPAA	MPAA
Q1 Mass[amu]	263.1	203.1
Q3 Mass[amu]	152	77.2
DP	66	71
CE	37	37
CXP	10	6

LC条件の検討

分析カラムにはDPAAに対して保持力のある、ODSカラムを用いた。移動相には0.05%TFA溶液とメタノールを用い、測定時間の目安を10分以下とし、メタノール含量70%を初期値とするグラジエント条件とした。本条件でDPAA標準溶液を測定したところ、約3分で良好な形状のピークが観察され、DPAA濃度として0.05ng/mL(ヒ素濃度として0.014ng/mL)においてS/N=10以上のピークが得られた。

しかしながら、PAA標準溶液をDPAAと同一LC条件で測定したところ、PAA濃度100ng/mLの標準溶

液においてもピークが検出されず、本条件においてPAAはDPAAに比べ著しく感度が低いことが確認された。ポジティブモードのLC-MSの移動相として良く用いられる、酸性や中性のギ酸や酢酸アンモニウムでも検討したが、いずれも良好な結果を得ることは出来なかった。そこで視点を変え、移動相としてメチルアミン溶液を主体とした移動相を用い、分離カラムに耐アルカリ性を有する逆相カラムに変更したところ、PAAの大幅な感度上昇が認められ、PAA濃度で0.2ng/mL（ヒ素濃度として0.074ng/mL）において、S/N=10以上のピークを検出することができた。

直線性、再現性

分析方法の妥当性を確認するため、検量線の作成と同時再現性を確認した。

DPAA: DPAA濃度として、0.05～50ng/mLの7ポイントの濃度水準の標準溶液を各n=1で測定し、絶対検量線法で検量線を作成したところ、その相関係数は $r=1.0$ であり、各濃度ポイントにおける相対誤差（RE値[%]）は-4.8～6.0%と非常に良好な直線性と真度が得られた。また0.5、5及び20ng/mL標準溶液の同時再現性（n=6）における変動係数（CV値[%]）は1.7～3.7%であり、良好な再現性が得られた。

PAA: PAA濃度として0.2～50ng/mLの6ポイントの濃度水準の標準溶液を各n=1で測定し、作成した検量線の相関係数は $r=0.9996$ であった。各濃度ポイントのRE値[%]は検量線最低濃度の0.2ng/mLでは15.5%、それ以外の濃度では-6.5～1.8%と良好な真度が得られた。0.5、5及び20ng/mLの標準溶液の同時再現性(n=6)における変動係数は1.8～7.2%であり、こちらも良好な再現性が認められた。

[まとめ]

LC/ICP-MS並びにLC-MS/MSを用いたDPAA及びPAAの分析法について検討を行い、それぞれについてDPAA並びにPAAを高感度かつ精度、確度の高い条件で分析できる条件を確立した。LC/ICP-MSはヒ素を含む物質が溶離してくればすべて検出することができ、測定対象として想定外のヒ素化合物が存在する場合にもその存在を検出することができる点で大きな利点を有している。一方、LC-MS/MSによる測定法は感度も選択性も高く、また安定同位体を用いた内標準法を適用することができることから、より複雑なマトリックス中のDPAA及びPAAを選択的かつ高感度に精度良く定量する手法として利用されることが期待できる。今後、DPAAとPAAの同時測定法の開発及び生体試料を含めた各種マトリックスの前処理方法を検討する予定である。

[参考文献]

- 1) 柴田康行、都竹克昭、森田昌敏:ジフェニルアルシン酸の分析条件の検討、第11回ヒ素シンポジウム講演要旨集 47-48(2003)
- 2) Y. Shibata, K. Tsuzuku, S. Komori, C. Umedzu, H. Imai, M. Morita: Analysis of diphenylarsinic acid in human and environmental samples by HPLC-ICP-MS, *Appl. Organomet. Chem.*, 19, 276-281 (2005)
- 3) 木下健司、貝瀬利一、石崎陸雄:生体試料中のジフェニルアルシン酸の分析方法の検討、第11回ヒ素シンポジウム講演要旨集、45-46 (2003)
- 4) 辻野一茂、倉谷和代、八木孝夫、柴田康行、森田昌敏:LC-MS/MSを用いたジフェニルアルシン酸及びモノフェニルアルソン酸の分析、第13回環境化学討論会講演要旨集 150-151 (2004)

5. 生体試料中のジフェニルアルシン酸および その代謝物の LC-MS による定量法の検討

分担研究者：瀬戸康雄（科学警察研究所法科学第三部）
研究協力者：金森美江子（科学警察研究所法科学第三部）

〔研究要旨〕

ジフェニルアルシン酸 (DPAA) 摂取による神経症状の発生機序を解明するためには、DPAAが摂取された後の生体内におけるDPAAの挙動、すなわち代謝経路と分布を詳細に調べる必要がある。代謝機構解明に欠かせない手法として、生体試料からのDPAA及びその代謝物の検出、同定、定量法を確立する。

ABSTRACT

It is necessary to investigate the behavior of diphenylarsinic acid (DPAA), metabolic route and distribution, in the body after the intake of DPAA, for the elucidation of the mechanism of appearance of the neuronal sign derived from DPAA. We establish the analytical method for detecting, identifying and quantifying DPAA and metabolites from the biological samples, as the inevitable technique for the elucidation of DPAA metabolic mechanism.

〔はじめに〕

茨城県神栖町において発生した有機砒素化合物(ジフェニルアルシン酸:diphenylarsinic acid, DPAA)による飲用井戸水汚染によって生じた集団健康被害は、その原因物質が遺棄された化学兵器由来であると想定されたことで注目されたが、DPAAの毒性やこれによる神経障害についてはこれまでほとんど報告されておらず、その発症メカニズムについても全く分かっていない。DPAA中毒症の発症機序の解明とその治療法の確立に至るには、基礎的な研究事項としてDPAA摂取後の生体内における代謝・分解・活性化反応の解明がある。本事業「飲用井戸の合成有機砒素汚染による健康影響の低減化に関する研究」においては、「DPAA投与による実験動物の健康影響の解明」を主要な実験としているが、その課程で得られる動物組織試料中のDPAA及びその代謝物の濃度を測定し、DPAA類の生体内分布を明らかにする必要がある。

〔目 的〕

生体試料からのDPAA、並びにその代謝物と考えられるフェニルアルシン酸(PAA)及び同族体フェニルアルシンオキシド(PAO)等を検出し、同定・定量する分析法を確立する。これまでに我が国のDPAA代謝及び分析法に関する研究成果を踏まえた上で、また新規の代謝物に対応するために、化合物の構造情報が得られ、検出特性の高い分析手段である液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)を採用する。

[方 法]

(1) 生体試料前処理

動物臓器は細かく刻みポッター型ホモジェナイザーで均一化する。血液(血漿、血清)はそのままで、これら液体試料に2 M水酸化ナトリウム溶液を加えて、90℃で5時間試料マトリックスを分解する。分解液にクロロホルム・ヘキサン混液を加え抽出し脂溶性物質を除去する。残液に塩酸を加え酸性としてジエチルエーテルで目的生物を抽出する。溶媒を留去して、メタノール(溶解しない場合には酸を加える)に溶解させ、ろ過後LC-MS分析に供する。

(2) LC-MS分析

装置: Agilent 1100 Series capillary LC system, 1100 MSD ion-trap mass spectrometer

カラム: Zorbax StableBond C18 (150 x 0.5 mm)、40℃

溶出: 0.1% TFA水溶液-アセトニトリル、95:5から5:95までリニアグラジエント

流速: 20 μ l/min、注入量: 0.5 μ l

イオン化: ESI、極性: ポジティブ

キャピラリー電圧: 3.5 kV、乾燥温度: 300℃、ネブライザーガス圧: 20 psi、乾燥ガス流量: 8 l/min

質量範囲: m/z 80-400

DPAAの定量法: 内部標準法(試料前処理時に¹³C-DPAAを添加)

代謝物の定量: 絶対検量線法

(3) *in vitro*代謝実験

ラット肝臓ホモジェネートまたは肝臓ミクロソーム画分にNADPH生成系を添加し、基質であるDPAAを加え37℃で一定時間反応させ、2 M水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を停止する。クロロホルム・ヘキサン混液を加え抽出し脂溶性物質を除去する。残液に塩酸を加え酸性として、ろ過後LC-MS分析に供する。

[結 果]

(1) LC-MS 分析系

上記のLC-MS分析系により、DPAA、その脱フェニル体であるフェニルアルソン酸(PAA)、酸化体フェニルアルシンオキシド(PAO)は分離溶出され、それぞれのピークから[M+H]⁺を基準ピークとする質量スペクトルが得られた。検出感度はDPAAがサブng/ml、PAAが100 ng/ml、PAOが10 ng/mlであった。

(2) 生体試料からの分析

ラット臓器(脳、肝臓、腎臓、筋肉、血液)からのDPAA類の分析法について検討を行った。DPAAに関しては、内部標準法を用いるが、代謝物に関しては実験で得られた回収率から組織含有量を計算する。妨害成分の影響を考慮して、MS/MS分析を採用して検出感度の向上をはかることが必要と考えられた。

(3) *in vitro* 代謝実験

生体内ではDPAAの脱フェニル体の生成以外に、水酸化反応、抱合反応等が起こる可能性がある。これら水溶性の高まった代謝物の生成の可能性を、ラット肝臓を用いた*in vitro*実験で明らかにすることが必要と考えられた。

[考 察]

生体試料からのDPAA類の定量法に関して、検討を実施した。今後、DPAA投与による動物実験で得られる臓器試料中のDPAA類の定量に活用することが可能と考えられる。

[参考文献]

- (1) Ishii K et al. Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan. *Ann Neurol* 56:741-745 (2004).
- (2) Hanaoka S. et al. Determination of diphenylarsenic compounds related to abandoned chemical warfare agents in environmental samples. *Appl Organometal Chem* 19: 265-275 (2005)
- (3) Kinoshita K. et al. Determination of diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, the degradation products of organoarsenic chemical warfare agents, in well water by HPLC-ICP-MS. *Appl Organometal Chem* 19: 287-293 (2005)
- (4) Ishizaki M. et al. Detection of bis(diphenylarsine)oxide, diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, compounds probably derived from chemical warfare agents, in drinking well water. *J Health Sci* 51: 130-137 (2005)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kazuhiro Ishii, et al.	Diphenylarsinic Acid Poisoning from Chemical Weapons in Kamisu, Japan	Annals of Neurology	Vol. 56, No.5	741-745	2004
石井一弘、玉岡晃、岩崎信明、大塚藤男	茨城県神栖町で発生した有機ヒ素中毒について	中毒研究	Vol.17	125-131	2004
石井一弘	茨城県神栖町のジフェニルアルシン酸等による健康被害	環境ホルモン学会 講演集	Vol.14	46-56	2005
Fukumitsu, N., <u>Ishii Kenji</u> , Kimura, Y., Oda, K., Sasaki, T., Mori, Y. and Ishiwata, K.	Adenosine A ₁ receptor mapping of the human brain by PET with 8-dicyclopropylmethyl-1- ¹¹ C-methyl-3-propylxanthine.	J Nucl Med	Vol. 46, No.1	32-37	2005
Mochizuki H, Kimura Y, <u>Ishii Kenji</u> , Oda K, Sasaki T, Tashiro M, Yanai K and Ishiwata K	Quantitative measurement of histamine H ₁ receptors in human brains by PET and [¹¹ C]doxepin	Nucl Med Biol	Vol. 31, No.2	165-171	2004

研究成果の刊行物別刷

- 1) Kazuhiro Ishii, et al., Diphenylarsinic Acid Poisoning from Chemical Weapons in Kamisu,
Japan Annals of Neurology, Vol. 56, No.5 741-745, 2004 _____ 31
- 2) 石井一弘、玉岡晃、岩崎信明、大塚藤男、茨城県神栖町で発生した有機ひ素中毒について、
中毒研究, Vol.17, 125-131, 2004 _____ 36
- 3) 石井一弘、茨城県神栖町のジフェニルアルシン酸等による健康被害、環境ホルモン学会講演集、
Vol.14, 46-56, 2005 _____ 44
- 4) Fukumitsu, N., Ishii, Kenji, Kimura, Y., Oda, K., Sasaki, T., Mori, Y. and Ishiwata, K.:
Adenosine A1 receptor mapping of the human brain by PET with 8-dicyclopropylmethyl-1-¹¹C-
methyl-3-propylxanthine. *J Nucl Med*, 46(1), 32-37, 2005 _____ 55
- 5) Mochizuki H, Kimura Y, Ishii Kenji, Oda K, Sasaki T, Tashiro M, Yanai K and Ishiwata K:
Quantitative measurement of histamine H1 receptors in human brains by PET and
[¹¹C]doxepin, *Nucl Med Biol*, 31(2), 165-171, 2004 _____ 63

Diphenylarsinic Acid Poisoning from Chemical Weapons in Kamisu, Japan

Kazuhiro Ishii, MD, PhD,¹ Akira Tamaoka, MD, PhD,¹
Fujio Otsuka, MD, PhD,² Nobuaki Iwasaki, MD, PhD,³
Kenji Shin, MD,⁴ Akira Matsui, MD, PhD,³
Ginji Endo, MD, PhD,⁵ Yoshito Kumagai, PhD,⁶
Tetsuro Ishii, PhD,⁶ Shin'ichi Shoji, MD, PhD,¹
Tsuyoshi Ogata, MD,⁷ Mutsuo Ishizaki, PhD,⁸
Mikio Doi, MD, PhD,⁸ and Nobuhiro Shimojo, PhD⁶

We noted a new clinical syndrome with prominent cerebellar symptoms in apartment building residents in Kamisu, Japan. The well that provided drinking water contained diphenylarsinic acid, a degradation product of diphenylcyanoarsine or diphenylchloroarsine, which were developed for use as chemical weapons, inducing severe vomiting and sneezing. Characteristics of diphenylarsinic acid poisoning include brainstem-cerebellar and cerebral symptoms. Mental retardation associated with brain atrophy in magnetic resonance images was evident in some infants. We must be vigilant to prevent or minimize the effects of further diphenylarsinic acid poisoning in Japan or elsewhere.

Ann Neurol 2004;56:741-745

Diphenylarsinic acid (DPAA) is a degradation product of diphenylchloroarsine (Clark I) or diphenylcyanoarsine (Clark II), both of which were synthesized for the Japanese Imperial Army as chemical weapons of emetic type under the code name Agent Red No. 1 (Fig). During World War II, large amounts of diphenylcyanoarsine and diphenylchloroarsine were manufactured both in the United States and European countries as well as in Japan.¹⁻³ Soil and groundwater in an area near the German-Polish border has been found to be

From the ¹Departments of Neurology, ²Dermatology, and ³Pediatrics, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba; ⁴Department of Pediatrics, Ibaraki Prefectural University, Ami, Ibaraki; ⁵Department of Preventive Medicine and Environmental Health, Osaka City University Medical School, Osaka; ⁶Department of Environmental Medicine, Institute of Community Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki; ⁷Itako Public Health Center, Ibaraki Prefectural Government of Japan, Itako; and ⁸Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Mito, Ibaraki, Japan.

Received Mar 8, 2004, and in revised form Jul 30 and Aug 8. Accepted for publication Aug 9, 2004.

Published online Oct 28, 2004, in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.20290

Address correspondence to Dr Ishii, Department of Neurology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan.
E-mail: kazishii@md.tsukuba.ac.jp

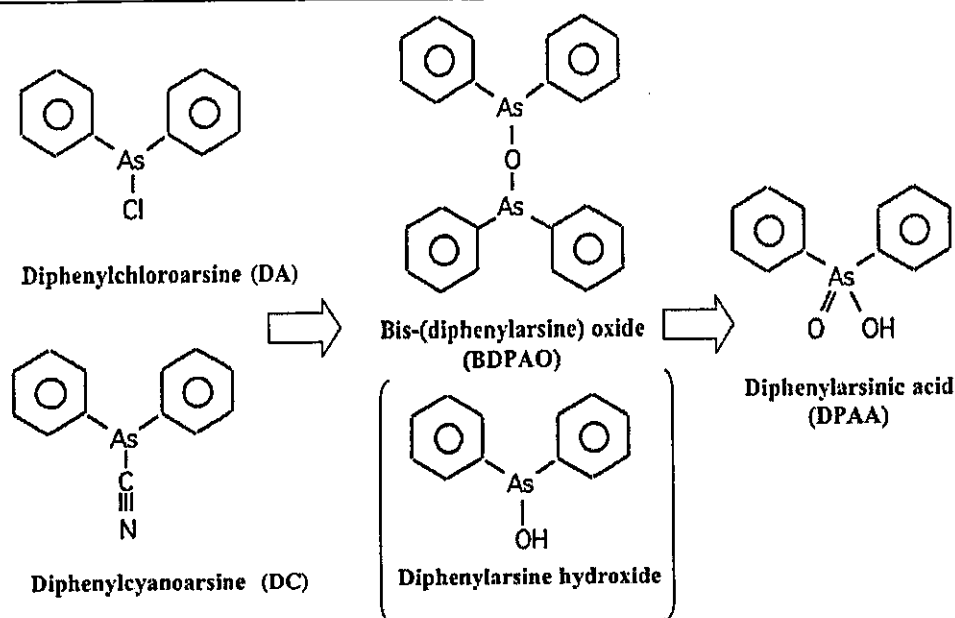


Fig. Diphenylarsinic acid (DPAA) generation pathway. DPAA is generated from diphenylchloroarsine (DA) or diphenylcyanoarsine (DC) by hydrolysis after conversion to bis-diphenylarsine oxide (BDPAO). In the cases reported here, the intermediate product BDPAO was detected as well as DPAA, suggesting that DPAA was a degradation product of DC and/or DA.

contaminated by organoarsenic compounds (diphenylchloroarsine etc.).⁴ The town of Kamisu, located east of Tokyo facing the Pacific Ocean, was not identified as a site related to the production and storage of chemical weapons in 1973 government surveys.³

Here, we document a syndrome presenting mainly with cerebellar symptoms that first became apparent in 2000 in a few residents of one apartment building in Kamisu. The well providing drinking water for the building was found to be contaminated with DPAA. When we noted the possibility of a causal relationship between DPAA and this syndrome, we promptly advised residents not to drink the well water. This advisement prevented further occurrences of DPAA poisoning in and near the building. To our knowledge, this is the first report of mass poisoning caused by oral ingestion of water contaminated with DPAA.

Case Reports

Case 1

A 38-year-old woman gradually became aware of scanning speech in 2000. She noted difficulty riding a bicycle in 2001. Symptoms increased in severity, with gait disturbance, myoclonus, diplopia, and opsoclonus becoming evident in July 2001 in addition to scanning speech. She was admitted to a nearby hospital. After admission, her condition improved, and she was discharged from the hospital in September 2001 after 1 month. She experienced three relapses, for which she received pulse-steroid therapy and intravenous administration of high-dose immunoglobulin, which appeared to

be effective. Flowers and trees near the apartment building that were supplied regularly with water from the well were noted to have withered. In August 2002, the patient was admitted to our hospital. Neurological examination showed scanning speech, truncal and limb ataxia, myoclonus in the trunk and all extremities, upbeat nystagmus, diffuse hyperreflexia, and pathological reflexes. Cerebrospinal fluid examination showed no pleiocytosis or protein elevation. No abnormalities were found by magnetic resonance imaging of the brain, a nerve conduction velocity study, or electroencephalography. Single-photon emission computed tomography using ¹²³I-N-isopropyl-p-iodoamphetamine (¹²³I-IMP) indicated moderate bilateral decreases in brain perfusion in the occipital and parietal lobes. Symptoms improved 1 to 2 weeks after admission to the hospital; although dizziness and general malaise persisted, cerebellar symptoms did not recur after the patient stopped drinking water from the well.

Case 2

A 20-month-old boy with developmental delay was admitted to our hospital. He was born in September 2001 after a full-term pregnancy and normal delivery, with no neonatal abnormalities. The family moved into the apartment building in November 2001; since then, preparation of his infant's formula had included dilution with water from the well. Periodic examinations during infancy indicated delayed development, and the patient underwent rehabilitation to improve his motor function. In July 2002, he began to exhibit

wheezing and dyspnea at night. In November 2002, he was referred to the department of pediatrics at the prefectural medical university. Psychomotor developmental testing conducted at 16 months indicated a developmental level corresponding to 9 months; posture and movement, to 7 months; cognition and adaptation, to 10 months; and language and socialization, to 9 months. Instability in standing and developmental aphonia were noted. Chest radiography suggested bronchial inflammatory changes. Magnetic resonance imaging showed mild cerebral atrophy. Electroencephalography showed a slight abnormality in basic rhythm. After admission to the hospital, physicians noticed abatement of respiratory symptoms as well as steady increases in motor and social functioning.

Materials and Methods

Testing Water from the Contaminated Well

We tested water samples from the well that was shared by the apartment residents, and we also analyzed urine samples obtained from current and past residents 2 months after well water consumption had been suspended. The total amount of arsenic in the well water was quantified with a graphite furnace atomizer.⁵ Urine and water samples were extracted with *n*-propanthiol, and total diphenylarsinic compounds including DPAA and bis-diphenylarsine oxide (BDPAO) were quantified by using gas chromatography and mass spectrometry. In addition, water samples from other wells within a 1km radius of the building were analyzed.

Inhabitant Health Examination

We identified and examined all residents who had recently lived in the apartment building. Of 32 residents from 11 families, 30 agreed to undergo physical, dermatological, and neurological examinations (by K.I., A.T., and F.O.).

Results

Analysis of Well Water

In view of the cerebellar symptoms, contamination from various agricultural chemicals such as organic chlorides was suspected, but no such substances available in Japan were detected. Except for 4.5mg/L arsenic detected as DPAA (molecular weight, 262; 15mg/L), no heavy metals were detected in the water. In addition, we found 20 other wells contaminated with DPAA (0.369 ± 0.277 mg/L, mean \pm standard deviation). DPAA was detected in urine at concentrations of 0.02mg/L or higher in 11 of 12 current residents of the building. The resident whose urine contained no DPAA habitually drank very little well water. Past residents who had moved to other areas at least 1 year before this investigation had no detectable DPAA in their urine.

Health Examination Results

Subjective complaints included staggering (in 16/28 symptomatic building residents, 57%), gait disturbance (13/28, 46%), hand tremors (15/28, 54%), weakness in extremities (14/28, 50%), and general malaise (15/28, 54%). Clinical examinations performed at this and other hospitals yielded objective findings, presented in the Table, in 22 of 30 residents. As for past residents who moved, we identified similar symptoms in most of them according to a review of clinical records. In addition to cerebellar and brainstem symptoms such as ataxic gait, titubation, scanning speech (20/30, 67%), myoclonus (6/30, 20%), and tremors (15/30, 50%), some patients complained of cerebral symptoms such as visual impairment (5/30, 17%), insomnia and/or nightmares (9/30, 30%), and memory impairment (5/30, 17%). Moreover, four of seven children proved to have mental retardation. Specifically, the delayed developmental index of three children was 68, 42, and 46 according to a standardized developmental test, whereas results of the Wechsler Intelligence Scale for Children-III (WISC-III) showed mild retardation (IQ of 66) in another child. No patients showed the skin pigmentation typical of inorganic arsenic poisoning.

Discussion

Terminating exposure to contaminated well water by admission to the hospital or by relocation from the area resulted in dramatic amelioration of symptoms within 1 to 2 weeks. When patients resumed ingestion of the contaminated water, symptoms reappeared within a few months. Patients exposed during infancy showed serious psychomotor developmental delay, associated with brain atrophy in Case 2. Typical neurological symptoms of DPAA toxicity reflected dysfunction of the cerebellum and brainstem, inducing ataxia, myoclonus, and diplopia. In addition, memory loss, sleep disturbance, and visual disorders suggested cerebral dysfunction. We concluded that the cerebellar and brainstem symptoms in the apartment residents in Kamisu constituted a syndrome caused by subacute poisoning by DPAA, since DPAA and its precursor BDPAO, both synthetic arsine compounds, were detected in the well water, whereas DPAA was detected in urine from some affected patients. DPAA poisoning shares some similar features with Minamata disease⁶ in central nervous dysfunction, such as visual disorders, memory disturbance, and cerebellar signs including tremors, dysarthria, and incoordination.

No previous reports of DPAA intoxication resulting from oral ingestion by humans are known. The only report of oral administration to animals indicated a 50% lethal dose of 17mg/kg of body weight in mice.⁷ The monophenyl form (phenylarsone form; PAA), but not the diphenyl form, has been added to animal rations to promote growth and to prevent or treat dis-

Table. Clinical Findings in DPAA Poisoning

Age (yr)	Sex	Daily Intake of Water (ml)	DPAA in Urine ($\mu\text{g/mL}$)	Cerebellar Symptoms	Tremors	Myoclonus	Memory Impairment	Sleep Disturbance	Visual Disorder	Others Symptoms
1.6	M	2,000	0.29	+	+					MR, bronchitis (Case 2)
4	F	500								MR
7	F	2,000	0.36	+	+	+		+		
8	F	400	ND	+						Diplopia
14	M	600	ND	+	+			+		
15	F	1,000	0.02	+	+	+	+	+		
17	F	1,000			+					
26	F	1,000	0.12	+	+					Cough
31	F	600	ND	+						Dermatitis
31	F	400	0.05	+	+					Edema, dermatitis
31	M	500	0.02	+				+		LGF, cough
33	M	1,000	ND	+	+	+			+	
38	M	1,500	ND	+		+				Cough
38	F	1,800	0.03	+	+	+	+	+		(Case 1)
39	F	400	ND	+	+				+	
43	F	2,400		+	+	+	+	+	+	Edema, dermatitis
48	F	500	ND	+	+					
50	F	1,500	ND	+	+					
51	M	1,500	ND	+	+		+	+		Edema
51	M	600	0.17	+	+			+	+	
52	M	600	ND	+	+			+		LGF
69	F	1,000	ND	+			+		+	Edema

DPAA = diphenylarsinic acid; ND = not determined. MR = mental retardation; LGF = low-grade fever.

eases in swine and other livestock. Previous reports have described staggering, incoordination, ataxia, and quadriplegia in some domestic animals exposed to these chemical additives. In these animals the mortality rate is low, and no changes have been noted in samples from tissues at autopsy except for peripheral nerves.⁸ However, data from animal experiments with PAA have shown less effective clearance of this substance from the central nervous system than in peripheral organs.⁸ Magnetic resonance imaging in Case 2 showed brain atrophy, suggesting that DPAA intoxication can result in a pathological change in the central nervous system. DPAA may be particularly toxic to the infant brain because of the immature blood-brain barrier.⁹

Several treatments have been carried out in our cases without evidences. Specific therapy against DPAA intoxication will require elucidation of DPAA dynamics in vivo and central nervous system toxicity in animal experiments. We have no information about the long-term prognosis, and the patients, especially the children, need to be followed up.

The Kamisu area where these incidents of poisoning occurred was not identified in official records as a production or storage site for Agent Red No. 1. Official documents are not sufficiently complete to assess how much concern is warranted about future incidents within Japan, surrounding countries, and Europe. If careful physical and neurological examinations disclose

similar findings, future clinical cases of contamination from such substances should be suspected by physicians with awareness of this possibility.

We are indebted to Dr K. Yoshida for measuring DPAA in urine from exposed persons and to Drs H. Araki and M. Yamamoto for supervising health examinations of building residents.

References

1. Pearson GS, Magee RS. Critical evaluation of proven chemical weapon destruction technologies. *Pure Appl Chem* 2002;74: 187-316.
2. Compton, JA. Military chemical and biological agents: chemical and toxicological properties. Caldwell: Telford Press, 1988: 194-204.
3. Kurata, H. Lessons learned from the destruction of the chemical weapons of the Japanese Imperial Forces. In: Chemical weapons: destruction and conversion, Stockholm International Peace Research Institute. London: Taylor and Francis, 1980:77-93.
4. Pitten FA, Müller G, König P, et al. Risk assessment of a former military base contaminated with organoarsenic-based warfare agents: uptake of arsenic by terrestrial plants. *Sci Total Environ* 1999;226:237-245.
5. Ishizaki M, Ueno S, Okazaki T, et al. Interaction of arsenic and selenium on the metabolism of these elements in hamsters. *Appl Organometall Chem* 1988;2:323-331.
6. McAlpine D, Araki S. Minamata disease, an unusual neurological disorder caused by contaminated fish. *Lancet* 1958;2: 629-631.
7. Plague MJ. *Prehled prumyslove toxikologie: organické látky*. Czechoslovakia: Avicenum, 1986:1276.

8. Ledet AE, Duncan JR, Buck WB, Ramsey FK. Clinical, toxicological, and pathological aspects of arsenic acid poisoning in swine. *Clin Toxicol* 1973;6:439-457.
9. Rodier PM. Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect* 1995;103 Suppl 6:73-76.

The
Japanese Journal
of
TOXICOLOGY

Jpn. J. Toxicol. Vol. No.

中	毒
研	究

〈抜刷〉

Jiho, Inc.

特集 地中の化学兵器

茨城県神栖町で発生した有機ヒ素中毒について

石井一弘, 玉岡 晃, 岩崎信明*¹, 大塚藤男*²
筑波大学臨床医学系神経内科, *¹小児科, *²皮膚科

はじめに

戦後50余年が経つが、近年、戦争直後に不当処理された旧軍遺棄化学兵器による健康被害が全国各地または周辺諸国で頻発している。2002年3月および9月に旧相模海軍工廠跡地で工事作業中に起きたマスタードガス中毒、さらに2003年8月に中国黒竜江省チチハル市で起きたマスタードガス中毒は旧軍遺棄化学兵器問題の深刻さに加え、新たな国際問題を引き起こしている。本中毒の原因になったジフェニルアルシン酸(diphenylarsinic acid: DPAA)は、1995~1996年に大久野島ですでに土壤・地下水の汚染が、また、本年旧海軍相模工廠跡地にてDPAAによる土壤汚染と井戸水汚染が発覚しているが、ヒトへの被害にまではいたってない。さらに、ドイツ・ポーランド国境付近には、第二次大戦直後にドイツ軍が遺棄した化学兵器によるものと考えられる有機ヒ素化合物(トリフェニルアルシン酸)の高濃度汚染地域がみられるという¹⁾。

有機ヒ素化合物は大きくわけて、自然界に存在するものと人工的につくられたものにわけられるが、前者は海藻類に含まれているヒ素糖(arsenosugar)や海洋生物に多く含まれているアルセノベタイン(arsenobetaine)などが含まれており、比較的low毒性のものが多い。一方、後者の本中毒の原因物質であるジフェニルアルシン酸(DPAA)はくしゃみ・嘔吐剤の成分であるジフェニルシアノアルシン(DC)、ジ

フェニルクロロアルシン(DA)が加水分解されて生成される(図1)。このDPAAはヒトに対する毒性や中毒症状はおろか、動物に対する毒性の詳細な報告がほとんどない。

今回、われわれは茨城県神栖町において、旧軍くしゃみ・嘔吐剤由来によると考えられるジフェニルアルシン酸(DPAA)などの中毒を経験したので、その詳細を報告する。

1. 発 見

発端となった患者を診察したのは、2002年8月上旬、茨城県中央部にある筑波大学関連病院であった。神栖町とは全く正反対の方角にある病院で、最初の患者を診察できたのは、患者の祖母が孫の“異変”に気づき、山奥だが専門医がいるとの噂を聞きつけ来院したことからである。この祖母の機転から、今回の中毒発見が動き出したといってもよい。患者は女学生で、2000年まで柔道で上位の成績を上げていたが、2001年ごろから柔道が下手になり、すぐに投げられ、最近では柔道部も辞め、登校拒否にもなったという。さらに話を聞くと、夜驚のように突然に睡眠中手足をバタつかせて暴れるとのこと。また、物を持つ手が震えて、体がピクつき、字もうまく書けなくなったことを話された。夏休みで祖母の家を訪れたとき、祖母がこの“異変”に気づいたのだ。症状は体のふらつき(小脳症状)、手足のふるえ(振戦)、体のピクつき(ミオクローヌス)、それに夜驚であった。よくある、いわゆる common disease でないこ

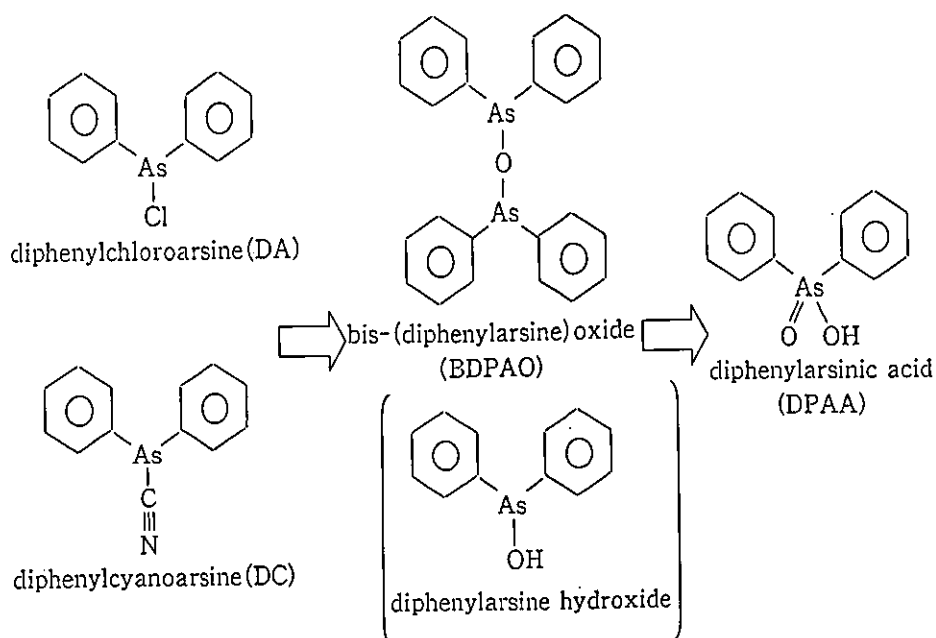


図1 シフェニルアルシン酸への分解経路

とは明らかで、家族の話などを詳細に聞いた。すると、母親がすでに数回他院に入院し、治療を受けていること、症状が似ていて、より重篤であることがわかった。2002年8月上旬より筑波大学神経内科に母親を入院させ、精査を開始した。さらに、10月には女学生にも入院していただき、母親の精査を開始した。前医での数回分の詳細な入院経過表と紹介状を送っていただき、こちらの検査結果と総合して文献的考察を加えたが、前医でくださった“特発性オプソクローヌス・ミオクローヌス・アタキシア症候群”を凌駕する適切な診断名にはいたらなかった。この母親はほぼ同一症状で、母親は四肢・体幹に小脳失調を認め、四肢に振戦と上肢にミオクローヌス。さらに睡眠障害や記憶力障害などを認めた。神経学的所見にて眼振、オプソクローヌス(全方向性の不規則な素早い眼球の不随運動)がみられ、娘は同様に四肢の小脳失調、上肢振戦、ミオクローヌス、夜驚などの睡眠障害を認めた。この母親から考えられる疾患は、同一家族内での発症から、小脳・脳幹症状を呈するウイルス性疾患または家族性オプソクローヌス・ミオクローヌス・アタキシア症候群などのきわめてまれな疾患が考えられた。さらに症状経過の特徴であるが、入院により、すなわち、曝露から遠ざかると1~2週間で症状

が著明に軽快・消失した。この母親は、その後、外来にて経過観察していた。年が明けた2月上旬、同じ集合住宅に居住している3人目の患者である42歳女性が歩行時のふらつき・めまい、手の震えを主訴に筑波大学神経内科の外来を訪れた。母親の症状と同一で小脳症状、振戦、ミオクローヌスがみられた。入院後の精査でも、脳血流シンチグラフによる脳血流の異常が指摘されたのみで、この患者も入院後、速やかに症状が軽快していった。さらに問診を重ねると、その集合住宅の奇妙な話をきくことができた。“数匹の犬が、ここ数年で相次いで死んだ”、“ハムスターなどの小動物がすぐに死んだ”、“切り花を井戸の水に生けると1日で萎れる”、“泊まりに来た親戚の調子が悪くなる”など、ほとんど飲用水に関連した話であった。さらに、この集合住宅は1本の井戸を共有していることがわかり、飲用井戸水が原因であると確信するにいたった。その後、3月になってから、小児の被害者2名をみる機会があり、7歳の女兒は成人と同様の小脳症状、振戦、ミオクローヌス、夜驚がみられており、1歳8カ月の男児は、精神運動発達遅滞で他院外来にて、治療を受けていた。この男児は呼吸器症状もあり、慢性気管支炎の診断も下されていた。2児とも井戸水の飲用を中止してから、症状は徐々に軽快した。

現在も外来にて、慎重に経過がフォローされている。さらに、4、5月に行われた住民健診の結果から、本中毒の症状が明確になった(表3)。

2. 同 定

原因物質同定に関しては、茨城県衛生研究所の功績がある。2003年3月17日に患者が水質検査依頼状を持って、潮来保健所(茂手木所長、緒方所長)を訪れ、飲用井戸水を直ちに採取し、茨城県衛生研究所(石崎部長、土井所長)で分析が始まった。3月19日には、当研究所にてヒ素が水質基準の450倍であることが明らかになった。その検査結果は、直ぐにわれわれに報告されてきたが、ヒ素(=無機ヒ素)との認識しなく、無機ヒ素で認められる症状(貧血、末梢神経障害、皮膚症状など)が全くなかったことから、“汚染された井戸水”ではあるが、症状の原因はヒ素ではなく他の物質であり、なかでも農薬などの有機塩素(中毒症状は小脳症状、振戦)やくん蒸剤の有機臭素(中毒症状は小脳症状、ミオクローヌス)であろうと予想していた。したがって、茨城県衛生研究所には、日本で使用されている農薬などを中心に検出をお願いしていた。しかし、県衛生研究所では以下の理由で当該原因物質を絞り込んでいた。すなわち①ヒ素が高濃度であること、②フェニル基に相当する紫外線吸収が認められること、③分析で未知の有機ヒ素化合物であること、④有機塩素などの他の有害物質が検出されなかったこと、から有機ヒ素化合物であると推察していた。さらに井戸水を1,000倍濃縮し、CG/MSにて2週間ほどで“原因物質はジフェニルアルシン酸である”との結論にいたった。また、同時に中間生成物であるビス・ジフェニルアルシンオキサイド(BDPAO)を微量ながら検出しており、当該のジフェニルアルシン酸(DPAA)は、ジフェニルシアノアルシン(DC)、ジフェニルクロロアルシン(DA)由来の可能性が高くなった(図1)。慎重を期するために(財)化学物質評価機構の花岡氏に再検を依頼し、同様にBDPAOおよびDPAAが、当該の集合住宅井戸水から同定された。

3. 経 過

3例目の患者が退院する2003年2月下旬には、井戸水汚染の可能性を疑っていたので、独自に調査するため井戸水を持参するように話していた。同時に、外来で経過フォローしていた母娘に井戸水検査の依頼状を渡して、潮来保健所に行くよう指示した。当人は全く井戸水が原因であると考えていなかった様子で、約10日後の17日に依頼状を持参して保健所を訪れた。即日、保健所職員2名が筑波大学附属病院に来院され、患者3人の病状を詳細に聴取していった。この時点では、これほどの“大事件”になるとは想像もしなかった。2日後、県衛生研究所所長が来院され、ヒ素が水質基準の450倍(4.5 mg/l:水質基準0.01 mg/l)であるとの報告を受けた。患者3人の症状がヒ素中毒(=無機ヒ素中毒)として妥当かどうか議論したが、ヒ素(=無機ヒ素)ではないだろう、との結論を得た。その後前述のように、茨城県衛生研究所にて、原因物質の分析・同定が着実に進められていった。

茨城県の対応は、異例の速さであった。JCO事故の教訓から直ちに健康危機管理対策委員会を設置し、4月1日に「茨城県神栖町における飲用井戸水を利用して有症者の健康影響に関する専門委員会」を発足し、対象住民健康診断の実施や飲用井戸水汚染の実態調査を開始した(表1)。さらに行政水質検査により、4月上旬、新たにA地区から西に1 kmの地点(B地区)に比較的高濃度汚染地域(約0.45 mg/l)がみつかり、汚染地域は大きく2地点になった(図2)。この専門委員会で、住民健診の実施が決まり、筑波大学皮膚科大塚、神経内科玉岡と石井が4月19日(A地区住民健診)と5月3日(B地区住民健診)に現地に入った(表3)。その結果、小児に精神運動発達遅滞が認められることがわかり、5月29日「小児科専門医ワーキンググループ」がつくられ、小児曝露者に対して、現状の把握と治療について専門家による討議が行われた。この間、茨城県知事は国に要望書を提出し、汚染源の特定や健康被害者の健