

## A. 研究目的

現在、中国内には慢性ヒ素中毒患者と潜在的な患者を含めて約 300 万人の高濃度ヒ素暴露者が存在し、その 90%は無機ヒ素汚染の井戸水を使用している。井戸水の無機ヒ素汚染は全て自然由来のヒ素であり、多くはヒ素を多く含む岩盤を流れた地下水が原因している。ヒ素汚染された井戸水の使用開始は文化大革命以後、すなわち、1980 年前後からであり、これまでの平均した暴露期間は約 25 年で、なかには 30-50 年間の暴露を受けた者も存在し、皮膚癌を発症した患者も認める。国際癌研究機関によるヒ素の発がんまでの潜伏期間は 30 年以上であり、このことから、今後、中国では潜伏期間を満たした慢性ヒ素中毒患者の中には皮膚癌が特異的に増加する懸念が深刻に議論されている。このような背景から、最近中国政府は、ヒ素汚染井戸水の使用を抑制し、新たにヒ素の飲料水基準 (0.05 ppm) を満たした井戸水の給水活動の展開を開始した。従来、慢性ヒ素中毒患者が使用していた井戸はポンプ式で、地下 15-20m から水をくみ上げて使用し、この様式の井戸は各家庭に共通している。中国政府による、慢性ヒ素中毒改善を目的とした井戸水の改善方法は、ヒ素濃度が 0.05 ppm 以下の井戸水をパイプ方式で各家庭に給水するものである。

本研究は、ヒ素汚染された井戸水を長期間摂取していた住民を対象にヒ素の代謝・排せ、そして、ヒ素暴露による酸化的 DNA 損傷の動態について親子間で比較を行った。ついで、今日国際社会において、慢性ヒ素中毒の予防対策や患者の症状の改善について有効で効果的な方法が見いだされていないことから、筆者は患者に対して一日のヒ素暴露量を 100  $\mu\text{g}$  以下に制限した場合、ヒ素の暴露量の軽減のみで、角化症と色素沈着・色素脱失の改善が認められるかを検証した。本格的な慢性ヒ素中毒患者に対してヒ素の暴露量の軽減を目的とした場合、飲料水をパイプ方式で給水することは望ましく、その効果と問題点を整理した。

## B. 研究方法

### B-1 高濃度ヒ素暴露者のヒ素代謝と排泄お

### よび酸化的 DNA 損傷：母子間での比較

研究対象者は中国内蒙古自治区フルホト市の住民で農業と牧畜で生計を立てている農民である。対照群は 39 名、年齢は 5-44 歳、男性 14 名、女性 25 名、このうち小児 21 名、成人 18 名である。ヒ素暴露者群の住民が暮らす村は約 500 世帯で人口約 2000 名である。この村民の中からボランティアの被験者を選別した。ヒ素暴露者群は 54 名、年齢は 2-34 歳、男性 18 名、女性 36 名、このうち小児 28 名、成人 26 名である。対照群および高濃度ヒ素暴露者群の住民はそれぞれの村において共通した井戸から水をくみ上げ、各家庭にパイプ方式による給水を受けていた。すなわち、対象群の全員が同じ井戸水を使用していた。対照群は中国のヒ素飲料水基準 (0.05 ppm) を満たす井戸水を使用し、39 名は同じ井戸水を飲水していた。

なお、尿中 8-OH dG 濃度による酸化的 DNA 損傷の調査において、対照群は瀋陽市在住の中国成人 80 名を用いた。

### 1) 井戸水中ヒ素と尿中ヒ素の化学形態分析

井戸水中ヒ素の測定において、検水は無処理で測定に供した。尿中ヒ素の化学形態別の測定には試料を 1 ml 使用した。試料は 10-ml の耐熱製ポリプロピレン試験管に取り、これに 4N-NaOH 溶液を 2 ml 加え、加熱器にて 100°C で 3 時間加熱して測定試料とした。無機ヒ素 (iAs)、メチル化ヒ素 (MMA)、ジメチル化ヒ素 (DMA)、トリメチル化ヒ素 (TMA) は超低温捕集-還元気化-原子吸光光度計で測定した。

### 2) 尿中 8-OH dG の分析

尿中 8-ヒドロキシグアノシン (8-OH dG) 濃度の測定では、試料を 1500rpm 10 分間遠心分離し、上清を測定に使用した。尿中 8-OH dG は日本老化制御研究所製の ELISA kit で測定した。尿中 8-OH dG の測定値は尿中クレアチニン濃度で補正した。

### B-2 井戸水の改水による慢性ヒ素中毒症の改善と予防対策

調査対象者は内蒙古自治区包頭市郊外に居住する村民で、このガンファンジン村の人口は430世帯、2080名である。村民は農業、牧畜で生計を立て、家族の生活と食習慣はほぼ同一である。村民から96名を選出し、皮膚科的検診を行った。皮膚科検診は中国医科大学と日本側の医師により実施された。過去の井戸水からのヒ素暴露の実態の解明に関して、井戸水の使用状況について詳細に聞き取りを実施した。

次に、山西省太原市山陰県の住民においても同様な検証を試みた。なお、山陰県の住民の調査は皮膚科的な検査結果のみであった。

### 1) 井戸水中ヒ素の化学形態別の分析

ガンファンジン村には303箇所の井戸があり、これまで各家庭で使用されてきた。井戸水中ヒ素濃度は0.0001—1.79 ppmで、平均0.133 ppmであった。これに対して、慢性ヒ素中毒の改善計画には、ヒ素濃度0.037 ppmの井戸水をパイプ方式で各家庭に給水した。各家庭には午前中に2-3時間の給水があり、瓶などに溜める方式で、この水を飲料水や料理に使用した。なお、各家庭にある無機ヒ素汚染のある井戸水は体の洗浄、家畜の飲料水には使用した。

### 2) パイプ方式による井戸水の給水システム

村民に配水される井戸水中ヒ素濃度は中国の飲料水基準0.05 mg/L (ppm) 以内で、地下水に対する化学的な処理は実施されていない。配水工事は村民の労働負担で実施されている。水源から各村までは塩化ビニール製の配管や鋼鉄製配管が組み合わせられ、村まで配管されていた。村の各家庭には給水栓付きの配管がなされ、一日の給水時間は朝8時から11時で、飲料水は陶器製の瓶に蓄えられていた。

### 3) 慢性ヒ素中毒の改善の検証

調査対象者の村民96名において下記の検査を実施した。

#### 調査方法

- ◇ 中国医科大学医師団による検診

- ◇ 問診表によるアンケート調査
- ◇ 写真撮影とビデオ撮影
- ◇ 井戸水、食事中からの化学形態別のヒ素濃度の測定
- ◇ 尿、血液、頭髮中化学形態別のヒ素濃度の測定
- ◇ PIXE (Particle Induced X-ray Emission) 法での多元素同時分析
- ◇ DNA 損傷の指標である尿中8-hydroxy-2-deoxy-guanosine (8-OH d G) の測定
- ◇ 血中抗酸化物質・過酸化脂質、ビタミン類の測定

### 4) 倫理面

インホームドコンセント：調査対象者への研究目的の説明と承諾は、調査場所が中国であることから、国際共同研究者が所属する中国医科大学の倫理委員会の承諾を得て、同大学公衆衛生院院長孫貴範教授により行われる。書式は中国語であるが、我が国の形式は十分に反映されている。

## C 結果

### C-1 高濃度ヒ素暴露者のヒ素代謝と排泄および酸化DNA損傷：母子間での比較

#### 1. 井戸水中ヒ素濃度

対照群とヒ素暴露者群が使用していた井戸水からは無機ヒ素のみが検出された。対照群とヒ素暴露者群の井戸水中無機ヒ素濃度はそれぞれ0.04 mg/L、0.16 mg/Lであった。

#### 2. 臨床所見

対照群に皮膚症状は認められなかった。0.16 mg/Lの無機ヒ素を含み井戸水を生活水としていた54名の高濃度ヒ素暴露者群に、慢性ヒ素中毒の主要症状である色素沈着、色素脱失、角化症は認められなかった。54名の村民が利用した井戸水の年数は成人と小児共通して7年間であった。筆者のこれまでの中国における慢性ヒ素中毒患者に関する疫学調査において、慢性ヒ素中毒の発症時間は井戸水の無機ヒ素濃度に依存的であることを明らかにしている。井戸水中無機ヒ素濃度が平均

0.15 mg/L の場合、5－8年間で色素沈着と色素脱失が混在した症状が認められ、このうち多くの患者にさらに掌と足の裏に角化症が発症していた。次いで、1－3 mg/L と高濃度の無機ヒ素汚染した井戸水を利用した場合、3ヶ月から1年以内に色素沈着、色素脱失、角化症がほぼ同時に発症するケースも認められている。

本調査対象者が利用している井戸水中無機ヒ素濃度はこれまでに多くのケースで経験したヒ素濃度であり、また、暴露期間も約7年間を経過しており、経験則の上では発症が認められるものである。このことから、これらの調査対象者は注意深く継続観察することが、慢性ヒ素中毒発症の機序解明に貢献するものと考えている。

### 3. 尿中ヒ素濃度

0.04 mg/L の無機ヒ素を含む井戸水を飲んでいる対照群の尿中ヒ素濃度は、一般的な日本人健常者の値(尿中IMD(無機ヒ素とその代謝物)濃度: 46 µg As/L)と比較しても低い傾向にあった。これに対して、0.16 mg/L の無機ヒ素を含む井戸水を飲んでいるヒ素暴露者群の尿中ヒ素濃度は、対照群と比較して約23倍(IMD)の高値であった。この調査対象地域は内蒙古で内陸部にあることから、海洋性魚介類中ヒ素の主体であるトリメチル化ヒ素(アルセノベタイン)は全員から検出されなかった。このヒ素暴露者群の尿中IMD濃度は、これまで経験してきた慢性ヒ素中毒患者の値に類似していた。

高濃度ヒ素暴露者群から16組の親子を選択し両群を比較したが、成人(親)は小児(子供)に比較してやや高値の傾向はあるが、統計学的な有意差は認められなかった。この調査は16組の親子間で比較を行ったが、両群には統計学的に有意な相関関係が成り立っていた( $r=0.835$ ,  $p<0.001$ )。本来、彼らの生活様式は農業で生計を立てており、家族単位での生活が基本であり、井戸水や食事内容は同じである。この結果から、小児への無機ヒ素暴露のリスクは成人に比較して高い実態が明らかになった。

### 4. 尿中8-OHdG濃度

筆者のこれまでの研究から、急性・慢性ヒ素中毒患者において無機ヒ素暴露により酸化的DNA損傷の発生することを明らかにしてきた。本結果では、高濃度ヒ素暴露者群の小児と成人は共通して対照群に比較して尿中8-OHdG濃度の上昇傾向が認められた。小児と成人の値に相違は認められなかった。この対象群において、最高値を示した同一家族の親子における尿中8-OHdG濃度は子供が230 ng/mg クレアチン、母親が265 ng/mg クレアチンと極めて高く、一方、子供と母親の尿中ヒ素(IMD)濃度はそれぞれ2191 µg/L、6857 µg/Lで、これらの値は中国人対照群に比較して250倍と800倍の高値であった。

16組の親子間における尿中IMD濃度と尿中8-OHdG濃度の相関関係を示した。両群の間には統計学的に有意な相関関係が認められた( $r=0.878$ ,  $p<0.001$ )。この結果は、これまでのヒ素暴露とDNA損傷の評価に関して矛盾しないものであった。

### C-2 井戸水の改水による慢性ヒ素中毒症の改善と予防対策

#### a) 井戸水の改水によるヒ素暴露の軽減

ガンファンジン村にて行った井戸水の改水からの慢性ヒ素中毒症の改善に関して、患者の無機ヒ素暴露の指標について、84名の患者のうち半数以上は中国の飲料水基準0.05 ppm以上のヒ素汚染井戸水を飲んでいて、さらに、高濃度なヒ素汚染井戸水0.3 ppm以上が17名に認められた。

この村の患者における井戸水からのヒ素暴露と皮膚症状について、多重ロジスティック回帰分析を行った。まず対象期間としたこの10年間について5年ごとで比較すると、5-10年前は角化症と色素沈着ともにオッズ比が有意に高い傾向が認められた。すなわち、この地域での慢性ヒ素中毒問題が表面化していない時代、村民はヒ素汚染された井戸水を知らずに飲んでいて、推測させた。なお、この5年間は井戸水のヒ素汚染が知られ、村の中での患者発生と井戸水との関係を経験的なルールで対処し、すなわち、危険が指摘される井戸水を村人間で回避していたことが(聞き取り調査

で判明) 裏付けられたと考える。

井戸水の改水からの活動について、ヒ素濃度 0.037ppm の井戸水をパイプ方式で各家庭に給水を受けた1年後における、患者の尿中ヒ素濃度を比較した。この村民達は中国の内陸部で生活しており、海洋性の魚介類の摂取習慣はなく、このことから尿からアルセノベタイン(魚介類由来のヒ素)は検出されなかった。井戸水からは無機ヒ素(iAs)を摂取し、この無機ヒ素は肝臓中でメチル化されメチル化ヒ素(MA)とジメチル化ヒ素(DMA)に代謝され、患者の無機ヒ素暴露停止後の尿中ヒ素濃度(I MD:iAs+MA+DMA)は暴露中に比較して約1/2程度に減少していた。しかし、この尿中I MD濃度は日本人健常者の値に比較すると依然として約3倍の高値であった。

#### b) 井戸水からの無機ヒ素暴露の軽減による皮膚症状の変化

井戸水の改水により患者のヒ素暴露は約1/2に低下していることが確認された。半年と1年目の検診から、無機ヒ素の高濃度暴露中に比較して、33名中20名の手掌角化症の改善が、11名が変化なし、2名に増悪の傾向が認められた。色素沈着に関しては、21名の患者のうち14名に改善、変化なしが6名、そして、1名に増悪の傾向が認められた。半年と1年目においては、井戸水からの無機ヒ素暴露の軽減から角化症と色素沈着は改善の傾向があり、重症者ほど顕著である傾向が感じられた。

山陰県の村民は5年前から中国衛生部による井戸水の改善が行われ、各家庭にはパイプ配管方式による給水が行われている。井戸水は化学処理されたものではなく、地下水そのまま、ヒ素濃度が0.05ppm以内で、この井戸水を生活水として使用していた。患者は、この村で角化症の症状が最も悪く、そして、無機ヒ素暴露の軽減により5年目の観察ではやや改善が認められた。一方、家族は、子供3人(男性2名、女性1名)は無機ヒ素暴露の軽減により角化症や色素沈着の増悪は予防

できたと考えられる。父親の角化症の改善は十分なものではなかった。同様な傾向は、この村の多くの男性村民で認められた。

他方、慢性ヒ素中毒において最も重要な案件として、将来の発ガン性の予防対策である。この問題に関して、対象者に実施した酸化的DNA損傷検査において、ヒ素暴露を停止し、1年後の検査では対象者の酸化的DNA損傷が正常値範囲に回復した。すなわち、ヒ素暴露の停止により角化症と酸化的DNA損傷は並行して改善するプロセスの存在することが国際的に最初に科学的な証明となった。

#### D 結論

1) 中国における地方地域(農村部)の社会インフラ整備は十分でなく、今回のようなパイプ方式の飲料水給水(中国の飲料水基準内;0.037ppm)を一日に数時間、各家庭に実施し、飲料水と料理に使用した。しかし、これらの施設の耐久性や維持、管理には様々な問題が生じ、一貫した給水の継続は無理であった。なお、地方行政担当者は最大限の努力をしておいた結果であった。給水が故障している間は、以前使用していた無機ヒ素汚染井戸水を使用するほか無く、平均して半年間の暴露の再現があり、ヒ素中毒の改善には大きく影響が確認された。

2) パイプ方式の給水システムは中国内においては多くの場所で可能と推測されるが、国土が広大なためにその限りでないことも明らかになった。このために、地域においては、高濃度に汚染された井戸水から無機ヒ素の除去システム(簡易的な除去システム;吸着剤やフィルター)が必要である。しかし、その持続的な管理、そして最も重要なことは、除去して回収した無機ヒ素の安全な処理システムの課題が重要な問題として明らかになってきた。除去や回収された高濃度な無機ヒ素の放置は、新たなヒ素中毒の原因となることが危惧される。中国にはこの方面の技術や知識はなく、著者らが開発した無機ヒ素の無毒化システムが将来期待されると考えている。

3) 慢性ヒ素中毒の改善に使用した井戸水中のヒ素濃度は、中国の基準を満たすものであったが、本来、EPA, WHO, EU, 我が国では0.01ppmを使用しており、中国の基準はヒ素の発ガン性の将来的な過剰発生には十分でない印象を感じている。この領域の研究はさらなる継続的に必要性であると強く感じている。

無機ヒ素暴露の停止や軽減から、慢性ヒ素中毒の改善や予防、将来の発ガン性のリスクの軽減に対しては科学的な根拠を獲得した。他方、中国においてはヒ素汚染されていない地下水の確保は可能であるが、患者発生地域が経済的に発展途上の地域であり、その維持管理や整備、機材の劣悪など様々な問題がある。さらに、広大な慢性ヒ素中毒の発生地域を十分に整備するには膨大な時間と経費が必要と感じ、非現実的と思われる。今後の重要な課題として、井戸水から除去や回収した無機ヒ素の安全な無毒化システムが必要であり、すなわち、現在の慢性ヒ素中毒の拡大の防止と将来の予防対策に貢献が可能と考える。

## E 研究発表

Yoshida T., Yamauchi H., et al., Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198, 243-252, 2004.

Yamauchi H., Aminaka Y., et al., Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198, 291-296, 2004.

Pi J., Yamauchi H., et al., Vascular dysfunction in patients with chronic arsenosis can be reversed by reduction of arsenic exposure. *Environ Health Persp.*, 113, 339-341, 2005.

山内博, 福田美穂、網中雅仁、吉田勝美: 小児の脳障害に対する酸化的ストレスのバイオマーカー: ヒ素暴露を中心に、*臨床環境医学*, 14: 2-8, 2005.

山内博: ヒ素、*救急医学*, 29: 605-607, 2005.

Kimura S, Yamauchi H et al., : Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanine in health Japanese people, *Basic Clinical Pharmacol Toxicol.*, 98, 496-502, 2006

網中雅仁、山内博: 尿中ポルフィリンを用いた無機ヒ素暴露の生物学的指標に関する研究、*臨床環境医学* 15 : 41-49, 2006

## 2. 学会発表

山内博: 酸化的DNA損傷と尿中8-OH d G、第75回日本衛生学会総会、新潟、2005. 3.

山内博: ヒ素の毒性、日本学術会議、東京、2005. 5.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

厚生労働科学研究費（地域健康危機管理研究事業）

総合研究報告書

研究課題名：バングラデシュ及び中国を中心とする地下水のヒ素汚染地域において地下水を  
（安全な）水道水源とする実現可能性評価に関する研究

分担研究課題名：陰膳調査による包括的なヒ素摂取量の推定と安全な水の供給により得られる  
改善効果

分担研究者 大野 浩一 北海道大学大学院工学研究科 助手

研究要旨

本研究においては、バングラデシュ国のチュナカリ村にヒ素の簡易除去施設として GSF (Gravel Sand Filter) 施設を設置し、GSF 水供給前と GSF 水供給後における水と食料からの 1 日ヒ素摂取量を飲水量調査および陰膳サンプルの分析によって推定した。結果として、GSF 導入により、以前は安全な水の十分量確保できずに調理用水にはヒ素汚染水を使用していたと考えられた家庭において、ご飯由来のヒ素摂取量が減少したことが明らかとなった。GSF 処理水を飲用と調理に十分な量を供給することの効果として「水を運搬する労力が軽減され」、また「調理用水にも安全な水を使用する家庭が増加し、調理用水由来のヒ素摂取量が減少すること」が考えられた。一方、GSF 水はヒ素で汚染された水を原水として簡易処理している水であるため、住民が以前飲料水源としていた「掘り井戸(dug well)」の水中ヒ素濃度よりは GSF 処理水ヒ素濃度がやや高くなってしまおうという課題も見られた。今後、GSF 水の処理能力が向上すれば、飲料水由来のヒ素摂取量も減少することになり、調理用水中ヒ素濃度の改善効果がより一層明らかになると考えられる。

また、炊飯用水中のヒ素が炊飯後のコメ中ヒ素濃度に与える影響について研究を行った。現地調査、およびバングラデシュ式炊飯実験の結果、炊飯用水中のヒ素濃度と炊飯後のコメ中ヒ素濃度増加量の間には強い正の相関が見られた。また、炊飯後のコメ中ヒ素濃度変化については、炊飯用水ヒ素濃度・精米ヒ素濃度・炊飯後の含水率増加分という 3 つの要素で説明できるであろうことが示された。

A. 研究目的

本研究は、ヒ素濃度の低い安全な水を供給することによって、住民のヒ素摂取量にどのような変化するかを調べることを目的とした。安全な水源としては、簡易ヒ素除去装置として Gravel Sand Filter(GSF)装置を調査対象地区であるバングラデシュ国チュナカリ村の集落に設置した。GSF 処理水を現地住民に配達してもらうことで調査対象家庭に安全な水を供給した。

なお、GSF 設置は横田漠分担研究者(宮崎大学教授)の研究グループが中心となって行われた。

本研究では、水と食料からのヒ素摂取量を推定した。食料からのヒ素摂取量は陰膳サンプルの分析によって推定した。陰膳法は、対象住民が実際に食べている食事を重量も含めて同じように複製してもらいサンプルとする方法である。なお調査は徳永主任研究者と共同で行った。

また、調理用水の影響について検討を行うため、調理用水の中でも最もヒ素摂取量に影響を与えると考えられる炊飯用水が炊飯後のコメ中ヒ素濃度を与える影響についても研究を行った。具体的には、現地調査と室内でのバングラデシュ炊飯方式による炊飯実験を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 陰膳調査によるヒ素汚染地域住民のヒ素摂取量の推定と安全な水供給前後の変化

#### (1) 調査内容について

調査は、バングラデシュ国のナワブガンジ地区郊外にあるチュナカリ村で2005年6月(GSF水供給前)と2006年8月(GSF水供給から約半年後)に行った。調査は徳永主任研究者と共同で行い、分担研究者は水と食料に関する調査を行った。本調査における調査対象は18家庭である(2006年調査時は16家庭に減少)。なお、調査では飲水量調査(自己記録方式による)とサンプル採取を行った。

食料のサンプル採取は、各家庭の代表者1人を選定した。代表者の1日分の食事(朝飯・昼飯・晩飯)を複製してもらい、陰膳として採取した。陰膳を、ご飯・チャパティ・スープ類・固形物の4種に分類し、それぞれの重量を測定、これを代表者の1日食品摂取量とした。食料の他には、各家庭が飲用している水を採取した(2006年調査ではGSF処理水を採取)。

#### (2) 総ヒ素濃度の分析

飲料水のヒ素濃度はICP-MSで分析した。食品サンプルの総ヒ素分析は次の通りである。固体類のサンプルは凍結乾燥ミルにて粉碎した。その後、スープ類は1g-wet、それ以外のサンプルは0.5g-dryに対して、硝酸と過酸化水素を添加後、マイクロウェーブ抽出装置で分解、抽出液を希釈後ICP-MSにて定量を行った。なお、標準試料2種類(コメSRM1568a: NIST, USA及び日常食SRM1548a: NIST, USA)を用いて、分析の精度・確度を確認した。

### B-2 炊飯用水中ヒ素濃度と炊飯前後のコメ中ヒ素濃度変化に関する研究

#### (1) 現地調査

2004年11月にバングラデシュ国のナワブガンジ地区ナワブガンジ市において29家庭を調査対象とし、それぞれの家庭から精米・実際に炊いたコメ・炊飯用水を採取した。なお、この調査地域は陰膳調査の実施地域とは異なる。

#### (2) 炊飯実験

コメ試料として、ナワブガンジ地区近郊のチュナカリ村で市販されている3種類のコメ(SCV, IRRI, FVR)を使用した。炊飯用水は、浄水場の急速砂ろ過後水(塩素添加前、ヒ素濃度0.0003mg/L)を原水として、無機ヒ素を所定の濃度(0~1 mg-As/Lの数段階)になるようにそれぞれ添加して用いた。本炊飯実験ではバングラデシュにおける一般的な炊飯方式、すなわち、大量の水でコメを炊きその後余った水を捨てるという方式を採用した。炊飯前・炊飯後のコメ中ヒ素濃度は陰膳サンプルの分析に準じた方法で行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、「人体より採取された材料」は直接使用していない。しかし、共同調査を行う徳永主任研究者が毛髪及び尿などを採取していることから、徳永主任研究者と同様の配慮をしている。

## C. 研究結果と考察

### C-1. 陰膳調査によるヒ素汚染地域住民のヒ素摂取量の推定と安全な水供給前後の変化

2005年(GSF水供給前)と2006年(GSF水供給後)における調査対象16家庭代表者の水と食料からの1日ヒ素摂取量について図1に示す。水と食料からのヒ素摂取量は、平均値±標準偏差(最小値-最大値)として、2005年は $0.15 \pm 0.11$  (0.043-0.49) mg-As/day、2006年は $0.13 \pm 0.04$  (0.061-0.22) mg-As/dayとなった(図2)。平均値で見ると、0.02mg-As/dayの減少となり、多少の効果は見られたが大きな改善ではなかった。この理由については後ほど考察を行う。

一方、標準偏差は0.11から0.04へと減少しており、このことはヒ素摂取量の家庭間でのばらつ

きが減少したことを意味している。特に、最大値が GSF 水導入後に減少していることから、GSF 水の導入によってヒ素摂取量が多かった家庭への効果が大きかったと言える。この理由は、GSF 水を供給することによって調理用水、特に炊飯用水にヒ素濃度の低い水を使用するようになったことが大きいと考えられる。ご飯からのヒ素摂取を平均値±標準偏差(最小値-最大値)の形で示すと 2005 年は  $0.090 \pm 0.079$  ( $0.014 - 0.31$ )  $\text{mg}\cdot\text{As}/\text{day}$  だったものが 2006 年には  $0.053 \pm 0.030$  ( $0.0077 - 0.11$ )  $\text{mg}\cdot\text{As}/\text{day}$  まで減少している。全ヒ素摂取量に対する割合の変化としては、GSF 設置前は 56%がご飯由来のヒ素摂取だったものが GSF 設置後は 40%にまで減少した(図 2)。これは、GSF 水供給前には一部家庭で(ヒ素濃度の低い水が十分に確保できないため)炊飯用水には手近にあるヒ素汚染された水を使っていたのだが GSF 水を供給することによって、炊飯用水にもヒ素濃度が低い水を使用することになったためと考えられた。

一方、飲料水由来のヒ素摂取量は、2005 年には  $0.023 \pm 0.027$  ( $0.0016 - 0.099$ )だったものが 2006 年には  $0.053 \pm 0.030$  ( $0.0077 - 0.11$ )へと増加してしまっている。全ヒ素摂取量に対する割合としては、13%から 43%へと増加している(図 2)。これは、GSF 水はヒ素で汚染された水を原水として簡易処理している水であるために、バングラデシュ水質基準値( $0.05\text{mg}/\text{L}$ )よりは低い水(2006 年 8 月調査時の GSF 処理水ヒ素濃度は  $0.018\text{mg}/\text{L}$ )を供給できるものの、現地住民が以前、ヒ素濃度の低い飲料水源として使用していた「掘り井戸(dug well)」の水中ヒ素濃度( $0.001 \sim 0.010\text{mg}/\text{L}$ 程度)よりは高くなってしまっているためであった。このことが GSF 水供給後のヒ素摂取量が平均値としては十分に改善しなかった原因であると考えられる。ただし、飲料水からのヒ素摂取量の推定は、住民が自己申告した水源中のヒ素濃度と飲水量を掛け合わせて推定したものであるため、食料からのヒ素摂取量と比較して信頼性が低い。特に、GSF 供給前には、住民は必ず「掘り井

戸」の水を飲んでいたらと推定しているが、実際に飲んでいたかどうかは断言できず、調理用水の場合と同様に手近にあるヒ素に汚染していた水を一部飲用していた可能性は否定できないし、本研究ではそのことに由来するヒ素摂取量の推定もできない。GSF 水のようにヒ素濃度の低い水を充分量供給できることによって、そのような汚染水の不規則な飲用による過剰なヒ素摂取をさけることができる。

全体としては、GSF による安全な水の供給により、以下の効果があったと考えられる。1つは、GSF 水を供給することにより水を運搬する労力が軽減されたこと、そしてもう1つは、そのことにより調理用水にも安全な水を使用する家庭が増加し、調理用水由来のヒ素摂取量が減少したことである。今後、GSF 水の処理能力が向上すれば、飲料水由来のヒ素摂取量も減少することになり、調理用水中ヒ素濃度の改善効果がより一層明らかになると考えられる。

## C-2. 炊飯用水中ヒ素濃度と炊飯前後のコメ中ヒ素濃度変化に関する研究

### (1) 2004 年度現地調査

2004 年にナワブガンジ市内 29 家庭から採取した精米中のヒ素濃度は生のコメ・炊いたコメの平均ヒ素濃度と標準偏差はそれぞれ  $0.22 \pm 0.11$ ,  $0.26 \pm 0.15$  ( $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{dry}$ )であった。本研究で調査した家庭において、生のコメと炊いたコメのヒ素濃度を比較すると、約 6 割の家庭で炊飯後にコメのヒ素濃度が増えた。また、炊飯用水中のヒ素濃度は  $0.032 \pm 0.067$  ( $\text{mg}/\text{L}$ )であり、24%の家庭(7/29)においてバングラデシュの水質基準値( $0.05\text{mg}/\text{L}$ )以上のヒ素を含む水を炊飯用水として使用していた。次に、炊飯前後におけるコメ中ヒ素濃度の差と炊飯用水のヒ素濃度の関係について図 3 に示す。このとき、回帰直線は  $y=1.87x-0.02$  ( $x$ : 炊飯用水のヒ素濃度( $\text{mg}/\text{L}$ ),  $y$ : コメの炊飯前後のヒ素濃度の差( $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{dry}$ ))となり、 $R^2$  値は 0.89 となった。バングラデシュにおける代表的なコメの炊き方は日本におけるそれと異なり、炊飯途中

に煮汁を捨てるという特徴がある。今回の調査により、バングラデシュにおいては日本の炊飯方法と水の使い方が異なり全ての水がコメに吸収されるわけではないものの、炊飯用水のヒ素濃度が炊飯前後のコメ中ヒ素濃度の差に大きな影響を与えていることが示された。また、炊飯用水のヒ素濃度が比較的低い(0.001~0.01mg/L)場合、炊飯後のコメ中ヒ素濃度が炊飯前よりも低くなる場合が多いことが示された。

## (2) 炊飯実験 (2005 年度)

実験で使用した 3 種類のコメにおける、炊く前のコメ(精米)中のヒ素濃度は、SCV: 0.21, IRRI: 0.36, FVR: 0.033 [mg/kg-dry]であり、SCV 種は 2004 年度の現地調査結果とほぼ同程度、IRRI 種はやや高い濃度であった。FVR は 2004 年度の調査及び他の 2 種とはヒ素濃度が大きく異なり、かなり低い濃度であった。この原因の一つに精白方法の違いが考えられた。SCV と IRRI 種は精白の前に一度コメを煮てから精白をするタイプのコメ、FVR 種はコメを煮ることなく精白するタイプのコメである。バングラデシュでは一般的には前者のタイプの精白を行っており、後者のタイプの精白は例外的と見なすことができる。

図4に炊飯用水中ヒ素濃度を横軸、炊飯前後のコメ中ヒ素濃度差を縦軸にとった散布図を示す。2004 年度の現地調査結果と同様に、炊飯用水中のヒ素濃度が高くなるに従って炊飯前後のコメ中ヒ素濃度差が大きくなることが実験においても示された。

図4における、炊飯用水中ヒ素濃度(x 軸)と炊飯前後のコメ中ヒ素濃度差(y 軸)との関係について回帰分析を行った結果を図4の右に示す。回帰直線の傾きに注目すると、SCV 種の 1.65, IRRI 種 1.47 と比較して、FVR 種は 2.66 と大きな傾きとなった。前述のように、FVR 種は SCV・IRRI 種とは異なる精米過程を経ている。FVR 種と SCV・IRRI 種との傾きの違いが生じる可能性の一つとして、炊飯後の含水率の違いが考えられる。FVR 種は他の 2 種と比較して炊飯後の含水率が高い。この理由は FVR 種の精米度合いが他の 2 種と比較して高いため、吸水速度が大きいためと考えられた。ただし、炊飯用水中のヒ素(無機ヒ素)が

水と同様の吸収特性を示すかどうかについては今後検討を行う必要がある。

次に回帰直線の切片について着目する。切片は FVR 種、SCV 種、IRRI 種の順に大きい。このことは、精米中のヒ素濃度と関連があることを示している。つまり、炊飯用水中のヒ素濃度が低い場合、精米を洗米する時や大量の水で煮る時にコメ中のヒ素が一部水相へと移動することが考えられる。

これらのことから、炊飯後のコメ中ヒ素濃度増加については、(1) 炊飯用水ヒ素濃度、(2) 精米ヒ素濃度 (3) 炊飯後の含水率増加という3つの要素で説明できると考えられた。

## D. 結論

2005 年(GSF 水供給前)と 2006 年(GSF 水供給後)における水と食料からの 1 日ヒ素摂取量について飲水量調査および陰膳サンプルの分析によって、水と食料からのヒ素摂取量を推定した。

その結果、GSF 導入により、以前は安全な水量を十分に確保できずに調理用水にはヒ素で汚染されている水を使用していたと考えられた家庭において、ご飯由来のヒ素摂取量が減少したことが示された。GSF 水を供給することによって水を運搬する労力が軽減され、また、調理用水にも安全な水を使用する家庭が増加し、調理用水由来のヒ素摂取量が減少したことが安全な水を供給することの効果として考えられた。一方、GSF 水はヒ素で汚染された水を原水として簡易処理している水であるため、住民が以前飲料水源としていた「掘り井戸(dug well)」の水中ヒ素濃度よりは GSF 処理水ヒ素濃度がやや高くなってしまおうという課題も見られた。今後、GSF 水の処理能力が向上すれば、飲料水由来のヒ素摂取量も減少することになり、調理用水中ヒ素濃度の改善効果がより一層明らかになると考えられる。

また、炊飯用水中のヒ素が炊飯後のコメ中ヒ素濃度に与える影響について、現地調査およびバングラデシュ式炊飯実験の結果、炊飯用水中のヒ素濃度と炊飯後のコメ中ヒ素濃度増加量の間には正の相関が見られた。また、炊飯後のコメ中ヒ素濃度変化について

は、炊飯用水ヒ素濃度・精米ヒ素濃度・炊飯後の含水率増加分という3つの要素で説明できることが示された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 大野浩一、古川明彦、林健司、亀井翼、眞柄泰基(2004) バングラデシュにおける地下水ヒ素濃度と他の金属・イオン類濃度との関連、環境工学研究論文集, 41, 591-600

2) K. Ohno, A. Furukawa, K. Hayashi, T. Kamei and Y. Magara (2005) Arsenic contamination of groundwater in Nawabganj, Bangladesh, focusing on the relationship with other metals and ions, *Water Science & Technology*, 52 (8), 87-94

3) Ohno, K., Yanase, T., Matsuo, Y., Kimura, T., Rahman, MH., Magara, Y., Matsui, Y., Arsenic intake via water and food by a population living in arsenic-affected area of Bangladesh, *Science of the Total Environment*, accepted (2007)

### 2. 学会発表

1) 中添真弥、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基 (2004) 鉄系凝集剤 PSI によるヒ素除去に関する研究、第 55 回全国水道研究発表会講演集、pp. 140-141

2) 江端克明、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基 (2004) PSI を用いた凝集処理における攪拌条件とフロック粒径との関係、第 55 回全国水道研究発表会講演集、pp. 142-143

3) K. Ohno, A. Furukawa, K. Hayashi, T. Kamei and Y. Magara (2004) Arsenic Contamination of Groundwater in Nawabganj, Bangladesh, Focusing on the Relationship with Other Metals and Ions, The Proceedings of 4th IWA World Water Congress, in CD-ROM (paper ID: 134280), Marrakech, Morocco

4) 大野浩一 (2004) ヒ素とアンチモンの NF 膜による処理、ニューメンブレンテクノロジーシンポジウム 2004、pp. 2-1-1~2-1-11

5) 草野真一、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基 (2004)

鉄系凝集剤 PSI を用いた有害金属類の凝集効果と E260 による迅速な処理性評価、第 12 回衛生工学シンポジウム論文集、pp. 117-120

6) 梁瀬達也、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基 (2004) バングラデシュ井戸水ヒ素汚染地域における食物中ヒ素の分析、第 41 回環境工学研究フォーラム講演集、140-142

7) T. Yanase, K. Ohno, T. Kamei and Y. Magara (2005) Analysis of arsenic concentration in foods and the total daily intake of arsenic in Nawabganj, Bangladesh, *Proceedings of 1st IWA-ASPIRE Conference and Exhibition* [CD-ROM], Singapore, Jun. 2005

8) 中添真弥、草野真一、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基(2005) 鉄系凝集剤 PSI によるヒ素及び E260 除去における 2 成分系吸着等温線の適用性に関する研究、第 56 回全国水道研究発表会講演集、米子市、142-143, 2005.5

9) 草野真一、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基(2005) 鉄系凝集剤 PSI による金属類の凝集除去効果と E260 による迅速な処理性評価、第 56 回全国水道研究発表会講演集、米子市、142-143, 2005.5

10) 松尾祐樹、梁瀬達也、大野浩一、眞柄泰基 (2005) バングラデシュ井戸水ヒ素汚染地域における炊飯前後のコメ中ヒ素濃度変化について、第 12 回ヒ素シンポジウム講演要旨集、岩手県立大学、80-81, 2005.11.5-6

11) 松尾祐樹、梁瀬達也、大野浩一、松井佳彦、眞柄泰基(2006) Bangladesh 井戸水ヒ素汚染地域住民に対する陰膳調査による水と食物からのヒ素摂取量の推定、第 40 回日本水環境学会年会講演集、於：東北学院大学、p.258、2006.3.15-18

12) 三崎富生、草野真一、大野浩一、眞柄泰基、松井佳彦、攪拌強度及び攪拌時間がヒ素の凝集処理に及ぼす影響、第 57 回全国水道研究発表会講演集、長崎、2006.5.24-26, pp.170-171.

13) Yanase, T., Matsuo, Y., Ohno, K., Magara, Y. and Matsui, Y., Contribution of drinking water to the total daily intake of arsenic in Bangladesh, *Proceedings of IWA 5th World Water Congress*, Beijing, China, 10-14

September 2006.

14) Ohno, K., Yanase, T., Matsuo, Y., Magara, Y., Matsui, Y., Effect of cooking water on the arsenic intake in Bangladesh, 5th IWA specialised conference on assessment & control of micropollutants/hazardous substances in water, 17-20 June 2007, Frankfurt/Main, Germany, accepted

**F. 知的財産権の所得状況**

特になし

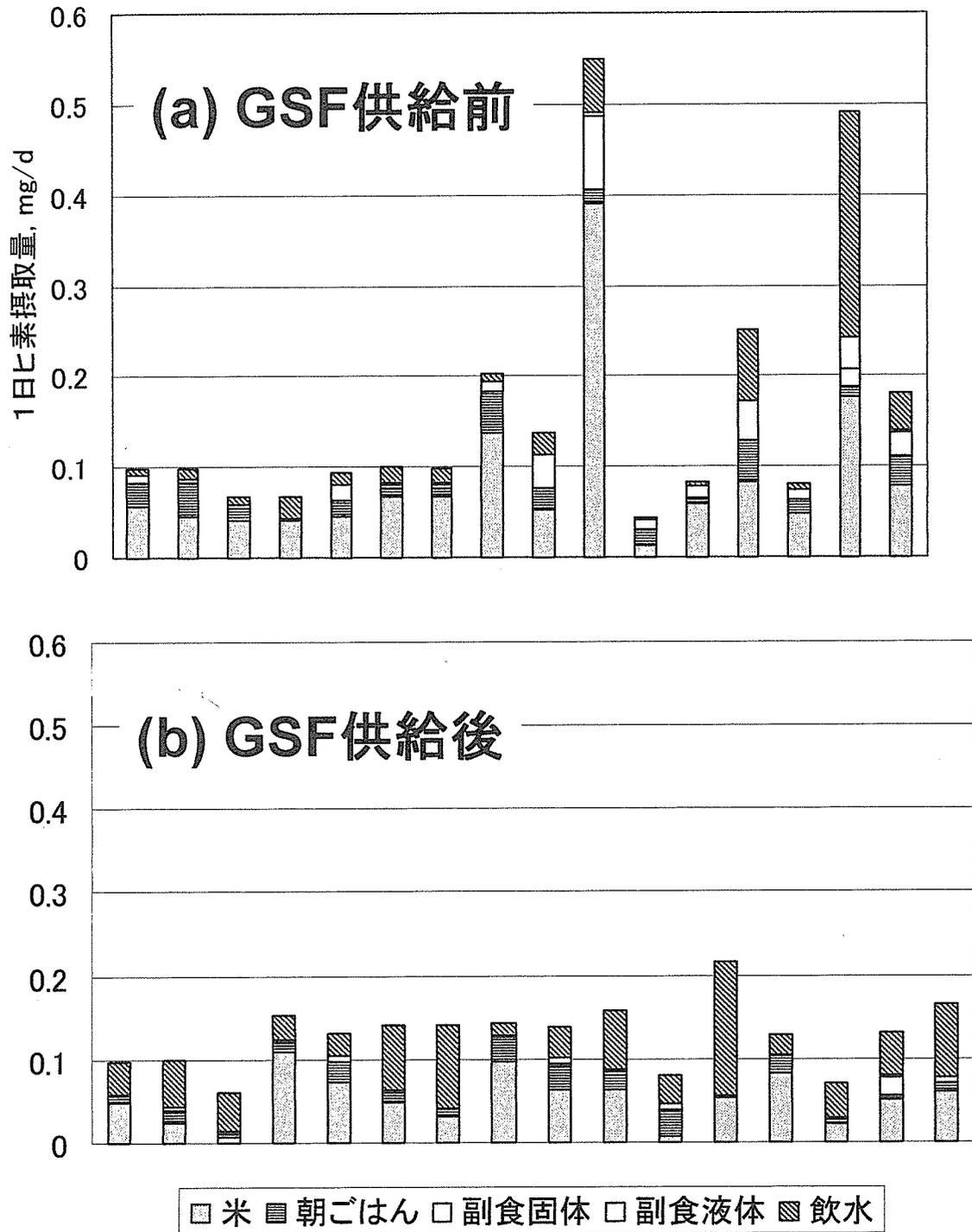
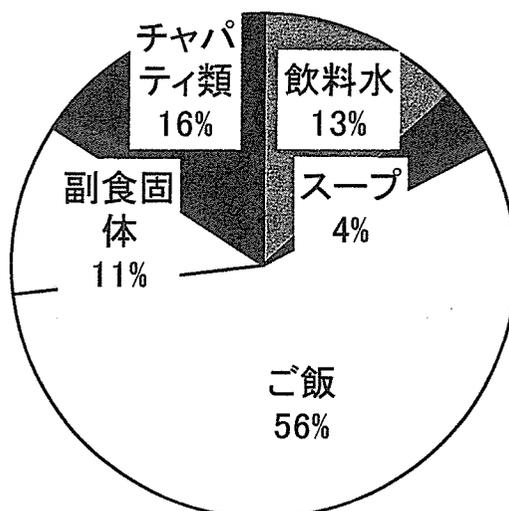


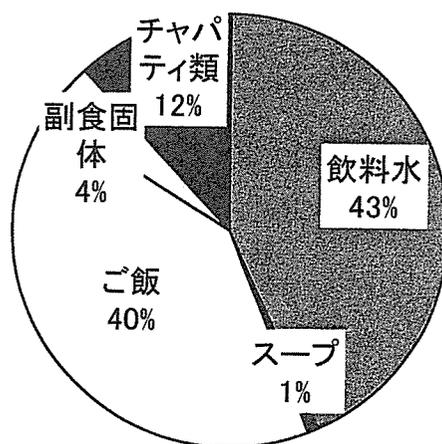
図1 GSF設置前後の水と食料からのヒ素摂取量の変化  
 (陰膳調査を行った16家庭代表者の結果)

### (a) GSF供給前



0.15±0.11 mg-As/day

### (b) GSF供給後



0.13±0.04 mg-As/day

図2 GSF設置前後のヒ素摂取量の変化、及び各カテゴリー別摂取割合について

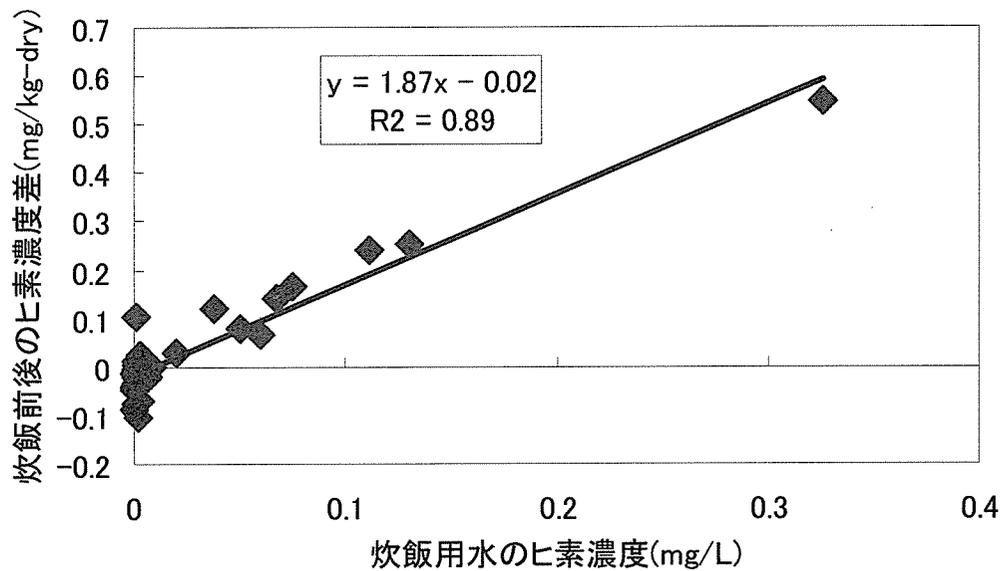


図3 炊飯前後のコメ中ヒ素濃度の差と炊飯用水中ヒ素濃度との関係  
(2004年度ナワプガンジ市内29家庭に対する調査結果)

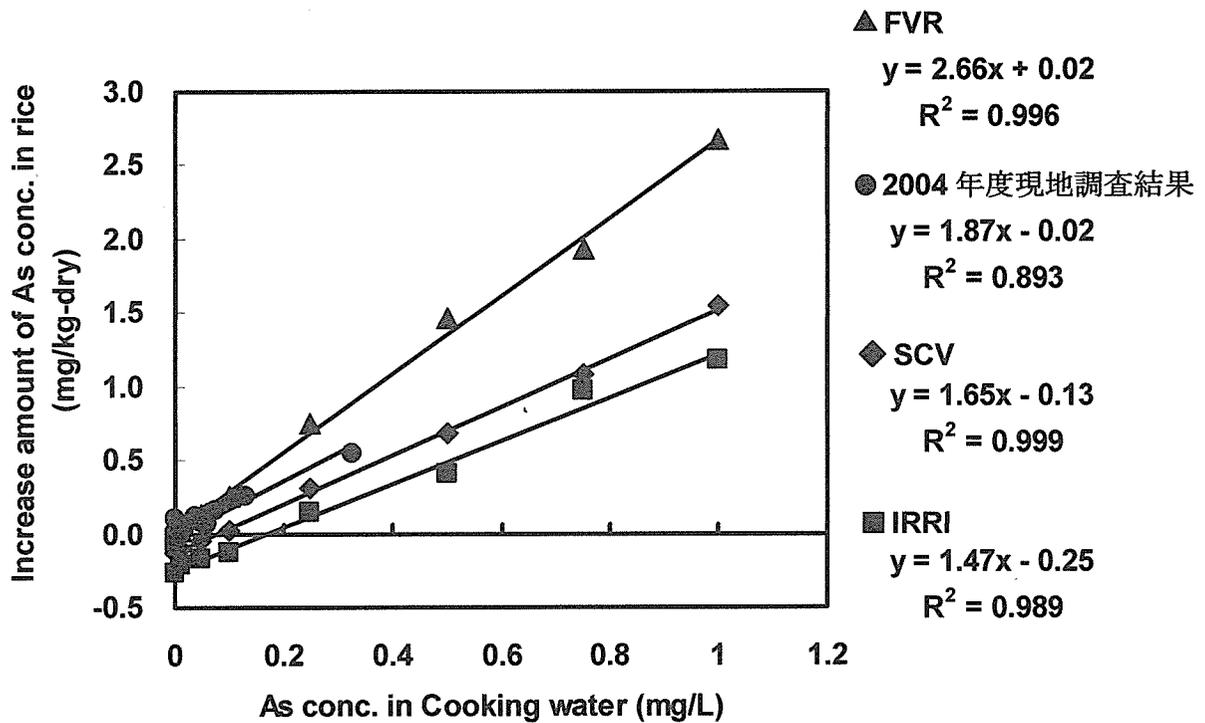


図4 炊飯前後のコメ中ヒ素濃度と炊飯用水中ヒ素濃度の関係  
(2005年度 炊飯実験結果)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Hiroshi Tokunaga, Tarit Roychowdhury, Tadashi Uchino, Masanori Ando	Urinary arsenic species in an arsenic- affected area of West Bengal, India(part III)	Appl. Organometal. Chem.	19	246-253	2005
Tarit Roychowdhury, Hiroshi Tokunaga, Tadashi Uchino, Masanori Ando	Effect of arsenic-contaminated irrigation water on agricultural land soil and plants in West Bengal, India	Chemosphere	58	799-810	2005
T. Uchino, T. Roychowdhury, M. Ando, H. Tokunaga	Intake of arsenic from water, food composites and excretion through urine, hair from a studied population in West Bengal, India	Food Chem. Toxicol.	44	455-461	2006
Hiroshi Yokota et al.,	"Collaboration between NGO and University of Miyazaki and Asian Arsenic Network for the mitigation of arsenic contamination in Ganga basin"	Proc. of 1st Intern. Symp. on Health Hazards of Arsenic Contamination of Groundwater and its Countermeasures, keynote lecture,		pp.47-58	2006
M.M Hussainuzaman, H.Yokota and K.Tanabe	Arsenic Removal from Contaminated Groundwater of Bangladesh with Naturally Occurring Iron	Proc. of 1st Intern. Symp. on Health Hazards of Arsenic Contamination of Groundwater and its Countermeasures		pp.137- 142	2006
K.Ohe, T.Oshima, Y.Baba, M.Shimoizu, Y.Miyake, T.Horikawa and H.Yokota	Removal Arsenic from Contaminater Groundwater by Iron Oxide	Proc. of 1st Intern. Symp. on Health Hazards of Arsenic Contamination of Groundwater and its Countermeasures		pp.162- 165	2006
M. Miyatake, H. Yokota, K. Tanabe, M.M. Hussainuzzaman and S.Hayashi	Sludge Teatment of Arsenic Removal Unit in Bangladesh and Removal of Arsenic using Microorganisms	Proc. of 1st Intern. Symp. on Health Hazards of Arsenic Contamination of Groundwater and its Countermeasures		pp.166- 169	2006
Miah M., Hussainuzzaman, Hiroshi Yokota	Efficiency of Arsenic Removal Unit working in Bangladesh and Cement Stabilization of its Sludge	Journal of ASTM International	13	pp.1-9	2006
Ohno, K., Yanase, T., Matsuo, Y., Kimura, T., Rahman, MH., Magara, Y., Matsui, Y.	Arsenic intake via water and food by a population living in arsenic-affected area of Bangladesh	Science of the Total Environment		accepted	2007

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊

# Urinary arsenic species in an arsenic-affected area of West Bengal, India (part III)

Hiroshi Tokunaga\*, Tarit Roychowdhury, Tadashi Uchino and Masanori Ando

National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan

Received 28 November 2003; Accepted 2 June 2004

Arsenic contamination of groundwater has long been reported in the Mushidabad district of West Bengal, India. We visited 13 arsenic-affected families in the Makrampur village of the Beldanga block in Mushidabad during 18–21 December 2001 and collected five shallow tubewell-water samples used general household purposes, four deep tubewell-water samples used for drinking and cooking purposes, and 44 urine samples from those families. The arsenic concentrations in the five shallow tubewell-water samples ranged from 18.0 to 408.4 ppb and those in the four deep tubewell-water samples were from 5.2 to 9.6 ppb. The average arsenite (arsenic(III)), dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid (MMA) and arsenate (arsenic(V)) in urine were  $28.7 \text{ ng mg}^{-1}$ ,  $168.6 \text{ ng mg}^{-1}$ ,  $25.0 \text{ ng mg}^{-1}$  and  $4.6 \text{ ng mg}^{-1}$  creatinine respectively. The average total arsenic was  $227.0 \text{ ng mg}^{-1}$  creatinine. On comparison of the ratio of (MMA + DMA) to total arsenic, the average proportion was  $86.7 \pm 9.2\%$  (mean plus/minus to residual standard deviation,  $n = 43$ ). The exception was data for one boy, whose proportion was 8.0%. One woman excreted the highest total arsenic, at  $2890.0 \text{ ng mg}^{-1}$  creatinine. When using 43 of the urine samples (the exception being the one sample obtained from the boy) there were significantly positive correlations ( $p < 0.01$ ) between arsenic(III) and MMA, between arsenic(III) and DMA and between MMA and DMA. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

**KEYWORDS:** arsenic species; urine; tubewell water; HPLC–ICP-MS; West Bengal; India; arsenic(III); arsenic(V); MMA; DMA

## INTRODUCTION

Natural contamination of groundwater by arsenic has become a crucial water quality problem in many parts of the world. The world's two biggest cases of groundwater arsenic contamination and illnesses of people have been reported in Bangladesh and West Bengal, India.<sup>1–3</sup> The entirety of the subject areas is not yet affected, but they are running at risk. The arsenic contamination incident in well water in Taiwan (1961 to 1985) is well known.<sup>4</sup> Black-foot disease was noted, as were other arsenical manifestations, such as hyperkeratosis, spotted melanosis and diffuse keratosis. Recently, arsenic-contaminated groundwater in Vietnam has been reported.<sup>5,6</sup>

In 1987, Chakraborti and Saha<sup>7</sup> reported arsenical skin manifestation in five districts of West Bengal. From 1989 until now, the group of Chakraborti has continued to report

the arsenic calamity in West Bengal, India.<sup>8–11</sup> Our present study is focused on the Murshidabad district. The district is located on the border of Bangladesh and is one of the nine arsenic-affected districts of West Bengal. In order to estimate people's total exposure to arsenic, we visited the Jalangi block in the Murshidabad district during 4–7 December 2000 and collected 51 urine samples and hair samples and foodstuffs such as rice, potato and onion obtained from 12 arsenic-affected families and six tubewell-water samples used by those families. The arsenite (arsenic(III)), arsenate (arsenic(V)), monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) in each urine sample and the inorganic arsenic in tubewell water samples obtained from the Jalangi block have been reported in our earlier publication.<sup>12</sup> Similarly, we visited the Damkal block in Murshidabad during 22–24 February 2001 and collected 10 tubewell-water samples, 89 urine samples and foodstuffs such as rice, potato and onion from 19 arsenic-affected families and from four non-arsenic-affected families. The arsenic(III), arsenic(V), MMA and DMA concentrations in

\*Correspondence to: Hiroshi Tokunaga, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan.  
E-mail: tokunaga@nihs.go.jp  
Contract/grant sponsor: Ministry of Environment.

each urine samples and the inorganic arsenic in tubewell-water samples obtained from the Domkal block have been reported elsewhere.<sup>13</sup>

The dietary intakes of arsenic from the villagers in the Jalangi and Domkol blocks were respectively 801  $\mu\text{g day}^{-1}$  and 658  $\mu\text{g day}^{-1}$  for adult males, 718  $\mu\text{g day}^{-1}$  and 588  $\mu\text{g day}^{-1}$  for adult females, and 432  $\mu\text{g day}^{-1}$  and 351  $\mu\text{g day}^{-1}$  for children of approximately 10 years of age.<sup>14</sup> Water contributes 76.8% and 71.4% of arsenic in adult males, 74.1% and 68% of arsenic in adult females, and 76.9% and 71.2% of arsenic in children, with respect to the total intakes of arsenic from all sources in the Jalangi and Domkol blocks respectively.

In the present study, we visited the Makrampur village in the Beldanga block in Murshidabad during 18–21 December 2001 and collected five shallow tubewell-water samples, four deep tubewell-water samples and 44 urine samples from 13 arsenic-affected families. Most of the family members, especially the adults in our survey, have severe arsenical skin manifestations as they have consumed a high concentration of arsenic from their shallow tubewells for a long period. They have now stopped using the contaminated water from their shallow tubewells for drinking and cooking purposes for a short period and started to use the deep tubewell water (around 1000 ft), installed by the local government. We determined the inorganic arsenic, such as arsenic(III) and arsenic(V), in tubewell-water samples and the arsenic species in urine samples by using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC–ICP–MS), and report the contribution of the inorganic arsenic with respect to the total arsenic in urine samples and the evaluation of the arsenic-methylating capacity of each person.

## MATERIAL AND METHODS

### Reagents and samples

Sodium arsenite and sodium arsenate were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). MMA and DMA were obtained from Tri Chemical Lab. (Yamanashi, Japan). Other chemicals (analytical grade) were also from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

Stock standard solutions, each of 3750 ppm (50  $\text{mmol l}^{-1}$ ) for arsenic, were obtained by weighing accurate amounts of arsenic(III), arsenic(V), MMA and DMA and dissolving them in MilliQ water. These stock standard solutions were kept in the refrigerator at 4 °C until required.

Mixed standard solutions, one containing 30 ppb of each arsenic species and one containing 150 ppb of each arsenic species, were prepared daily from the stock standard solutions to the appropriate dilution.

Spot urine samples were collected from 44 villagers of 13 arsenic-affected families, identified as A to M, and kept in polyethylene centrifuge tubes. The samples were not

subjected to any chemical treatment. After collection, the samples were stored in an icebox cooler.

The water samples were stored in polyethylene centrifuge tubes in an icebox cooler.

Both the urine samples and tubewell-water samples were transported from India to Japan by air and kept in a refrigerator at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the laboratory before use.

### Instrumentation

An Agilent 7500 ICP mass spectrometer (Agilent, DE, USA) was used for detecting the arsenic species. The operating conditions for ICP–MS are shown in Table 1.

The chromatograph had an STM-10A system controller with a Shimadzu 10AC HPLC pump, Shimadzu SIL-10A auto sampler and Shimadzu CTO-10AC column oven. The analytical column was a Gel PAK GL-IC-A15 (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm) packed with anion-exchange resin (Hitachi Kasei Co. Ltd. Tokyo, Japan).

### HPLC–ICP–MS analysis

HPLC was performed under the following conditions for inorganic arsenic species, such as arsenic(III) and arsenic(V), in tubewell-water samples and arsenic species in urine samples: mobile phase 10  $\text{mmol l}^{-1}$  phosphate buffer (pH 6.0), flow rate 1  $\text{ml min}^{-1}$ , column temperature 35 °C and injection volume 20  $\mu\text{l}$ . The outlet from the separation column was connected directly to the nebulizer of the ICP mass spectrometer using a polyethylene tube of 0.3 mm i.d.

After thawing 20  $\mu\text{l}$  of water sample or urine sample, they were injected into the HPLC column and the peak areas of arsenic species were measured by ICP–MS for 8 min. The amounts of arsenic species were calculated using working curves prepared by using 0, 30 and 150 ppb solutions of arsenic species. The arsenic species in urinary samples were determined within at least 1 month because of degradation of arsenic species in urines.

After a day's work, the skimmer cone and the sampling cone of the ICP mass spectrometer were always cleaned with distilled water.

Detection limits of arsenic(III), DMA, MMA and arsenic(V) were all 0.2 ppb (20  $\mu\text{l}$  injection) on an arsenic basis when the analyte concentrations corresponded to a signal-to-noise ratio of 3 was taken. The precision of analysis for these analytes ( $n = 6$ ) was in the range of 2.6–3.5%

**Table 1.** ICP–MS conditions

RF power (W)	1500
RF refraction (W)	1
Plasma gas flow ( $\text{l min}^{-1}$ )	15
Carrier gas flow ( $\text{l min}^{-1}$ )	0.8
Monitoring mass	34 (Cl), 75 (As)
Integration interval (s)	0.3
Scan number	1

at the concentration of 30 ppb. The average of duplicate measurements was used for all of the samples and standards.

### Assay of urinary creatinine

Urine (1 ml) was diluted with MilliQ water to 10 ml; 0.5 ml of the diluted urine were put into a centrifuge tube and 3 ml of a solution (containing 0.8% sodium tungstate, 0.3% phosphoric acid and 0.2% sulfuric acid) for eliminating urinary protein was added. After standing for 10 min, the urinary solution was centrifuged for 10 min at 2500 rpm, 2 ml of supernatant was put into the test tube and 1 ml of 22 mmol l<sup>-1</sup> picric acid solution and 1 ml of 0.75 mol l<sup>-1</sup> sodium hydroxide solution were added and completely mixed. After standing for 20 min in a water bath at 25 to 30 °C, the absorbance at 520 nm was determined. Creatinine standard solutions ranging from 0.025 to 0.10 mg ml<sup>-1</sup> were prepared and a working curve determined. The urinary creatinine was calculated using the working curve.

## RESULTS

The groundwaters of Makrapur village were highly contaminated with arsenic. Several members from each family in our survey had arsenical skin manifestations. Gender, age and arsenical symptoms for each of 44 subjects are listed in Table 2, along with the depth and arsenic concentrations in the tubewell waters the subjects utilized. The age of the subjects ranged from 3 to 66 years old. The numbers of male and female subjects were 26 and 18 respectively. Of the 44 subjects, 24 had the arsenical manifestations such as hyperkeratosis, melanosis and Bowen's disease on their palms, chests and backs.

Most of the families in our surveyed area had their own shallow tubewell. Those who do not have their own tubewells used to collect the water from their neighbor's tubewell or from the panchayet (local government) tubewell, deep in nature, installed near their house. The water was supplied from the deep tubewell to the villagers through the pipeline beside the road, 5 h per day.

Families A to E formed a big and relational family. They had one shallow tubewell and one deep tubewell administrated in cooperation. Thirteen within 14 families used the water from the shallow and the deep tubewells.

The concentrations of arsenic in the waters obtained from three shallow tubewells were 61.0, 120.9 and 408.4 ppb, exceeding the Indian guideline of arsenic in drinking water (50 ppb). The concentrations of arsenic in deep tubewell-waters ranged from 5.2 to 9.6 ppb.

The depth of each tubewell used by the families and the inorganic arsenic concentration (arsenic(III), arsenic(V), total arsenic and arsenic(III)/total arsenic) in water are shown in Table 3. The families from A to E had two shallow tubewells of A-E (TW) and A-E (115 ft) on their site. Each water sample included arsenic(III) and arsenic(V).

Figure 1a shows the HPLC-ICP-MS chromatogram of arsenic species when 20 µl of a standard solution containing 150 ppb of arsenic(III), arsenic(V), MMA and DMA. The HPLC chromatogram is demonstrated in the retention times  $t_R$  of arsenic(III), DMA, MMA and arsenic(V) were 113 s, 153 s, 215 s and 421 s respectively. The  $t_R$  of arsenocholine and arsenobetaine was 82 s and 95 s respectively (data not shown). HPLC-ICP-MS chromatogram obtained from a urine sample is shown in Figure 1b. The peaks of arsenobetaine, arsenic(III), DMA and MMA appeared on the chromatogram.

The concentrations of creatinine (mg ml<sup>-1</sup>), arsenic(III) (ng/mg creatinine), arsenic(V) (ng mg<sup>-1</sup> creatinine), MMA (ng mg<sup>-1</sup> creatinine), DMA (ng mg<sup>-1</sup> creatinine), total arsenic (ng mg<sup>-1</sup> creatinine) in urine samples, the ratio of (MMA + DMA) to total arsenic obtained from 44 urine samples are shown in Table 4.

## DISCUSSION

The groundwater of the Makrapur village of the Beldanga block is highly contaminated with arsenic and the local government is supplying safe water with respect to arsenic to the villagers from a deep aquifer (around 1000 ft). Of 44 inhabitants from 13 arsenic-affected families, 24 had arsenical skin manifestations, such as Bowen's disease, melanosis or keratosis, as shown in Table 2. In our survey, we did not find any arsenic-affected people below 17 years old. Chakraborti and coworkers<sup>15,16</sup> reported that the age of the arsenic-affected people in West Bengal, India, and in Bangladesh has exceeded 11 years old. So our data coincide with their findings. Of 13 families, 12 used two sources of water from shallow and deep tubewells. The families started to use the deep tubewell water for cooking and drinking purposes after stopping using their old arsenic-contaminated shallow tubewells. Families A to E in Makrapur village formed a relational family. They had two shallow tubewells administrated in cooperation. As shown in Table 3, one tubewell marked as A-E (TW) has not been used because of its high arsenic concentration (577.9 ppb). Another tubewell-water has been used by the household. The high concentration of arsenic (577.9 ppb) suggests that family members would have got long-term damage on their bodies during the usage of this contaminated water for a long period of time, and this is why 10 out of 14 members have arsenic manifestations on their skin. The arsenic concentrations of the five shallow tubewell-water samples ranged from 18.0 to 408.4 ppb and their depth was from 45 to 152 ft. The arsenic concentrations of the four deep tubewell-water samples ranged from 5.2 to 9.6 ppb, below the WHO recommended standard of 10 ppb arsenic in drinking water. The percentage of arsenic(III) in the five shallow tubewell-water samples ranged from 75.6 to 98.6% of total arsenic concentrations. The percentage of arsenic(III) in the shallow tubewell-water samples was higher than that in the deep tubewell-water samples.

**Table 2.** Sex, age and symptom of inhabitants and arsenic in tubewell waters

	Sample	Sex	Age	Symptom	As in water (ppb)	Tubewell Depth
1	A-1	M	66	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
2	A-2	F	57	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
3	A-3	M	17	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
4	A-4	M	21	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
5	B-1	M	36	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
6	B-2	F	32	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
7	C-1	M	31	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
8	C-2	F	26	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
9	C-3	M	4		61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
10	D-1	M	26	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
11	D-2	F	20		61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
12	D-3	M	5		61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
13	D-4	M	2		61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
14	E-1	M	24	+	61.0, 9.6	115 ft, deep tubewell
15	F-1	M	50	+	9.6	Deep tubewell
16	F-2	F	46	+	9.6	Deep tubewell
17	F-3	F	17		9.6	Deep tubewell
18	F-4	F	11		9.6	Deep tubewell
19	F-5	F	24	+	9.6	Deep tubewell
20	F-6	M	25		9.6	Deep tubewell
21	F-7	F	22		9.6	Deep tubewell
22	G-1	M	61	+	120.9, 5.2	72 ft, deep tubewell
23	G-2	F	55	+	120.9, 5.2	72 ft, deep tubewell
24	G-3	M	19		120.9, 5.2	72 ft, deep tubewell
25	G-4	M	15		120.9, 5.2	72 ft, deep tubewell
26	G-5	F	30	+	120.9, 5.2	72 ft, deep tubewell
27	G-6	F	8		120.9, 5.2	72 ft, deep tubewell
28	H-1	F	45	+	120.9, 5.2	72 ft, deep tubewell
29	I-1	M	55	+	18, 6.6	152 ft, deep tubewell
30	I-2	F	47	+	18, 6.6	152 ft, deep tubewell
31	I-3	M	26		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
32	I-4	M	22		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
33	I-5	M	16		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
34	J-1	M	35		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
35	J-4	M	4		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
36	K-1	F	40	+	408.4, 6.2	45 ft, deep tubewell
37	K-2	M	18	+	408.4, 6.2	45 ft, deep tubewell
38	L-1	M	45	+	18, 6.6	152 ft, deep tubewell
39	L-2	F	41		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
40	L-3	M	18		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
41	M-1	M	55	+	18, 6.6	152 ft, deep tubewell
42	M-2	F	47	+	18, 6.6	152 ft, deep tubewell
43	M-3	M	25		18, 6.6	152 ft, deep tubewell
44	M-4	F	15		18, 6.6	152 ft, deep tubewell

As shown in Table 4, the concentrations of urinary creatinine in 44 samples ranged from 0.07 to 1.456 mg ml<sup>-1</sup>. Thomas and coworkers<sup>17</sup> reported on arsenic in urines in the Millard County, Utah, population chronically exposed to arsenic from drinking water; a correlation was found between arsenic in drinking water and the mean total arsenic

per creatinine. Thus, we corrected the urinary arsenic species by using the urinary creatinine.

As shown in Figure 1b, an arsenic-containing compound was detected at  $t_R = 95$  s, which coincides with  $t_R$  of arsenobetaine. Detection of arsenobetaine in some urine samples may be attributed to the fact that people in this survey