ノ ー ト

ICP-MS による環境試料中のビスマス定量とビスマス化合物の細胞毒性に関する基礎的検討

小 林 淳^{®1,2}, 寺 田 宙², 杉山 英男³, 松川 岳久¹, 千葉 百子¹, 横山 和仁¹

1 はじめに

ビスマス (Bi) は地殻中におよそ 100 µg/kg 含まれ、ヒ素やアンチモンと同族で鉛や水銀に近い性質を持つ金属種である¹⁾。ヒトへは主に食物経由で 1 日に 5~20 µg が摂取され、その一部は体内に吸収、蓄積されていると考えられているが、現在までに栄養素としての必須性は知られていない¹⁾²⁾。しかしながら、その次没食子酸塩は 200 年以上も前から梅毒、消化性潰瘍、皮膚病の治療薬として、また現在ではジサリチル酸塩やクエン酸塩等が抗胃炎剤、止瀉薬^{しや}などとして利用がある¹⁾³⁾⁴⁾。今までに環境汚染が原因で中毒を引き起こした例はなく、毒性が問題となったのは、治療用に多量あるいは長期に投与された場合に限定されている¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾。

現在まで環境汚染が問題とならなかった理由は、工業的に使用量が少なく、環境排出量が極めて低かったことによると考えられる。現行の日本国内の規制では、水質基準値、監視項目指針値、薬品等基準、資機材等基準、給水装置等基準のいずれにも Bi は含まれておらず、環境基準値、要監視項目としての指定もない。また諸外国等の水質基準値またはガイドライン値を見ても、WHO, EU, USEPA のいずれにも規程がない⁷⁾。しかしながら近年、産業界では化粧品、殺菌剤、染料、合金材料等として、Bi が用いられるようになったほか、半導体製造、化学工業、核燃料事業等での使用が増加しているという報告がある³⁾。身近な例では、鉛フリーハンダや上下水道管材料で鉛の代替品としての使用も検討が始まっている⁸⁾。以上より、Bi は「次世代の環境汚染物質」、すなわち今現在影響はほとんど出ていないが、今後汚染がひどくなり警戒が必要と考えられる物質として考えられ、水道法の新規監視項目の検討リストに加えられている。

現在までに原子吸光光度法 (Atomic Absorption Spectrometry; AAS) あるいは誘導結合プラズマ質量分析法

(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; ICP-MS) を用いた生体試料及び環境試料中のビスマス報告例がある^{1)~3)}。ビスマス化合物を投薬された患者からの血清や尿等の生体試料から、AAS を用いて ppb レベル、また ICP-MS を用いた ppt レベルのビスマス検出の報告がある一方、環境試料からの検出はほとんど例がなく、ICP-MS を用いた同時分析の対象元素として測定を試みた報告があるが、原試料は検出下限以下である場合が多い⁹⁾。

そこで今回著者らは、ICP-MS を用いて Bi の高感度測定法を確立し、環境試料への適用を行った。従来、Bi 測定は臨床検査項目の一つとして薬剤の副作用をコントロールするために、体内蓄積量の指標として生体試料 (尿や血液) 中の比較的高い濃度 (ppm レベル) を把握する目的でしか行われなかったが¹⁾³⁾、本研究では ppt レベルで存在する試料が対象となる。試料としては、飲料水 (水道水、ミネラルウォーター) と土壌や一般ゴミ中の無機成分を反映していると考えられるスラグに着目した。他方、Bi 化合物の毒性試験の報告は少ないので、Bi 化合物標準品と培養細胞を用いて細胞毒性について基礎的な検討を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

環境試料中の Bi 含量を求めるため、和光純薬製の原子吸光分析用標準液を使用した。濃硝酸及び濃塩酸は有害金属測定用試薬 (和光純薬製) を使用した。

細胞培養実験を行うため、ヒト甲状腺癌^{がん}培養細胞株 8505C, RPMI-1640 培地 (Sigma, St. Louis, MO), ウシ胎児血清 (FBS; Difco, Detroit, MI), ストレプトマイシン及びペニシリン (Wako; biochemical grade), 0.25 % トリプシン/1 mM EDTA (Gibco, Carlsberg, CA), MTT (Dojin, Kumamoto, Japan) を使用した。

Bi 化合物を含むその他の試薬は市販特級品を使用した。水は Elix/Milli-Q Element (日本ミリポア) により精製した超純水 (比抵抗値: 18 MΩ cm⁻¹ 以上) を用いた。

2.2 装置及び器具

今回金属分析には、日立製の誘導結合プラズマ質量分析

¹ 順天堂大学医学部: 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

² 国立保健医療科学院生活環境部: 351-0197 埼玉県和光市南 2-3-6

³ 帝京平成大学健康メディカル学部: 170-8445 東京都豊島区東池袋 2-51-4

Fig. 1 Ion Level

10 ppb bismuth ion was used. Conditions: 100 ms (Ion trapping time) $\times$ 50 times $\times$ 3 replicates (Scanning), 50 V (Guide Voltage), and no internal standard.

装置 (P-5000, 以下, ICP-MS) を使用した。スラグの分解はマイクロウェーブ分解装置 (MLS-1200MEGA, Milestone) と専用容器 (内容積 100 mL, テフロン[®]製) を用いて行った。

細胞培養実験では 24 穴プレート (Iwaki, Tokyo, Japan; 各孔の底面積, 1.9 cm²) を用いた。ピペットや試験管等は滅菌済みディスポのものか、オートクレーブ滅菌したものを使用した。

2.3 分析試料

今回 14 種類の採取地, 製造法, 材料の異なるスラグを使用した¹⁰⁾。水道水は千葉, 埼玉, 石川県内の集合住宅の家庭内蛇口から採水したものを使用した。ミネラルウォーターは原産国等の異なる市販品 10 種を用いた。

2.4 スラグの分解と試料調整

0.2 g のスラグを分解用専用容器に取り, そこに各 2 mL の塩酸と硝酸を加える。これをマイクロウェーブ分解した。分解条件はマニュアルに従い, 2450 MHz, 120 $^{\circ}$ C, 60 分, 400 W で行った。分解後, 容器を冷却してから内容物を遠心チューブに移し, また分解容器を水で共洗した液も遠心チューブに移した。遠心チューブを 3000 rpm, 10 分遠心し, 全部で上澄み液 20 mL を得た。この液を Bi 測定に使用した。この分解法はフッ化水素を使用していないため, シリカ由来と思われる残さが残るが, 今回の測定では上澄みのみを使用した。

水道水あるいはミネラルウォーターはメンブランフィルター (0.22 μ m ϕ pore size) で濾過後, 硝酸を添加して 0.1 N 酸性にすることにより前処理を行った。

Fig. 2 Guide Voltage

Conditions: 146.0 (Ion level). Other Conditions were as Fig. 1.

2.5 培養細胞における Bi 毒性

CO₂ インキュベーター (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂, 高湿度下) 内でサブコンフレントな状態まで培養した 8505C 細胞を, 0.25 % トリプシン/1 mM EDTA でシャーレよりはがし, 滅菌済み遠心チューブに移して, 800 rpm, 5 分遠心した後, 上澄みを除いて新しい培養液 (10 % FBS を含む RPMI-1640) を加えることにより, 培地交換を行う。その細胞懸濁液 (5×10^4 cells/mL) 1 mL を 24 穴プレートの各孔に加えて, 一晚放置後に上澄みを実験用培地 (FBS を含まない RPMI-1640) に変更するとともに, Bi 化合物を添加した。24 時間後に生細胞のみを MTT 法により計測した¹¹⁾。

3 結果及び考察

3.1 ICP-MS 装置条件

Bi を高感度に測定するため, まず ICP-MS の装置条件について検討した。Bi イオンの機器への導入において, 今回用いた装置はイオンレベルと FNF (filtered noise field) という二つのファクターにより選択性を制御している。またイオントラップを備えており, その時間条件を変えることで機器内で簡易な濃縮が可能である。まずイオンレベルについて検討した。イオンレベルは Bi を測定時に共存イオン等検出の必要ないイオン (ある質量以下のイオン) をカットするものである。10 ppb Bi 標準溶液を用いて検討したところ, 設定値 150 のときに最も高い感度が得られたので 150 を用いることにした (Fig. 1)。次に FNF とガイド電圧について検討した。これは目的質量前後の幅 (FNF) を決め, そこに電圧をかけることにより, 目的原子イオンのみを残すものである。結果として, 207~209 を FNF とし, 60 V を負荷したときが最適であった (Fig. 2)。またイオントラップ時間について検討したところ, およそ 500 msec までは直線性があることが確認され, それを越えると徐々に

飽和することがわかった (Fig. 3). この結果は, 10 ppt ~ 100 ppb に濃度を変えて同じ量の Bi を ICP-MS に導入した時も同様であり, 試料中の Bi 濃度に応じてトラップ時間を簡便に調節可能であることを示す. その他検討した測定条件をまとめたものを Table 1 に示す. この条件で良好な直線性 (相関係数 $r = 0.995$ 以上, 標準溶液 100 ppt のとき: CV 0.5 %) を有する検量線を作成することができたが, 本装置に限らず測定時間が長くなると徐々に応答値が半分以下にまで減少し, 再現性のある結果が得られないことが危惧されるため, 次に内部標準イオンの検討を行った.

3.2 内部標準イオン

今回は, 候補イオン (質量) として, 一般によく用いられる Ga(69), Ga(71), Cs(133), Tl(203,205), Th(232) について検討した. 各試料に 10 ppb 添加した場合の直線性, 感度, 精度, 非特異的応答の少なさを考慮した結果, Tl(203) を選択した. 本装置は, 他の連続的に質量や波長を読みな

Fig. 3 Ion Trapping Time

Conditions: 60 V (Guide voltage). Other conditions were as Fig. 2.

Fig. 4 Calibration Curve

Conditions: 500 ms (Ion trapping time) $\times$ 200 times $\times$ 5 replicates (Scanning). Vertical bar showed SD. Other conditions were as Fig. 3.

がら測定を行う方法と異なり, 一度の測定では単イオン種のみをトラップし測定する方法なので, 質量が似ているかどうかはあまり問題ではないと考えた. 結果として作成した Bi の検量線 (内部標準物質のタリウムイオンで校正した) は試料約 10 mL を用いた場合, 検出下限値 11 ppt (3SD 法) で $r = 0.998$ 以上の良好な直線性が得られている (Fig. 4). また機器応答値のばらつきは Bi 単独の場合よりも数倍悪化する傾向が認められているが (標準溶液 100 ppt のとき: CV 3 %), 応答値の比 (Bi/Tl) は時間が経過しても一定していたため, 連続測定に耐えうると思われた.

3.3 環境水及びスラグ試料への適用 (Table 2)

実試料である水道水, 河川水と廃物熔融スラグを塩酸及び硝酸で酸分解した溶液について, Bi の濃度を測定した. スラグについては分解後にシリカ由来と思われる残さが認められたが, 今回はさらに分解せず, 上澄の液中の Bi 濃度のみを求めた. その結果, 一部の水道水とスラグにおいて Bi が検出された. 水道水は千葉県内の団地の一家庭の台所蛇口より採水したものである. 同じ蛇口からは持続して Bi が検出されたが, その一方で同じ家庭でも他の蛇口からは検出されなかった. このことは原水そのものではなく, なんらかの形で一部の水道管や蛇口に由来するものと思われ

Table 1 Optimal Conditions of ICP-MS for Determining Bismuth

RF output	1.2 kW	Plasma gas	14 L/min
Auxiliary gas	1.2 L/min	Carrier gas	1.3 L/min
Internal standard	Tl-203		
Ion level	146.0 (142.0)	FNF	208.0-210.0 (202.0-204.0)
Data collection voltage	4.0 (5.0) V	Guide voltage	60.0 (60.0) V

Some conditions to measure internal standard are shown in parentheses

Table 2 Determination of Bismuth in Real Environmental Samples

Samples	Numbers	Concentration (ppt)	Sources
Slag A	1	< 10	Garbage, Chiba
B	1	443.5 ± 18.1 (0.44 µg/g*)	Sewage, Toyama
C	1	< 10	Garbage, Gifu
D	1	6825.0 ± 50.2 (6.83 µg/g*)	Sewage, Osaka
E	1	67.4 ± 19.9 (0.07 µg/g*)	Garbage, Chiba
F	1	< 10	Sewage, Chiba
G	1	< 10	Garbage, Tochigi
H	1	< 10	Garbage, Tokyo
I	1	< 10	Garbage, Chiba
J	1	< 10	Garbage, Tokyo
K	1	< 10	Sewage, Osaka
L	1	75.4 ± 36.7 (0.08 µg/g*)	Sewage, Tokyo
M	1	< 10	Sewage, Osaka
N	1	< 10	Garbage, Ishikawa
Tap water a	1	20.4 ± 3.7	Chiba
a'	1	< 10	Chiba
a''	1	< 10	Chiba
b	1	< 10	Saitama
c	1	< 10	Ishikawa
Mineral water	10	< 10	commercial

Detail of all slags are shown in the reference 10). Tap waters a' and a'' are taken from the same house as a. Bismuth concentrations in slags were shown in by direct measured values (left) and calculated original values (in parentheses).

Fig. 5 Effect of Bismuth Compounds on 8505C Cell Survival

Data were calculated and scaled linearly using negative (only medium, 0 %) and positive (cells in medium, 100 %) controls to give the survival rate (%). $n = 4$. Vertical bar showed SD. Similar data were obtained in 3 individual experiments.

る。他方、一部のスラグからも Bi が検出された。このスラグは下水や一般ごみ由来のものであり、病院排水からの医薬品の混入によるとも考えられた¹²⁾。

3・4 培養細胞における Bi 毒性

今回、培養細胞 8505C を用いて Bi 化合物の毒性について基礎的検討を行った。8505C 細胞培養液に 0～0.1 mM の Bi 化合物（次没食子酸塩、次サリチル酸塩、酢酸塩、塩化

Fig. 6 Effect of Gallic Acid on 8505C Cell Survival

Data were calculated and scaled linearly using negative (only medium, 0 %) and positive (cells in medium, 100 %) controls to give the survival rate (%). $n = 4$. Vertical bar showed SD. Similar data were obtained in 3 individual experiments.

物) を添加し、細胞の生存率を MTT 法で調べた。その結果、次没食子酸塩のみで明らかな細胞死が観察された (Fig. 5)。この結果が、Bi によるのか次没食子酸によるのか、あるいは両方の相乗効果かを確かめるため、入手でき

た遊離没食子酸単独, 及び塩化物と次没食子酸塩を同時に作用させた場合の毒性についても調べた。その結果, 没食子酸のみが最も毒性が高く, 次いで次没食子酸塩を同時に作用させたときの順であった (Fig. 6)。このことは遊離没食子酸の細胞毒性を Bi 化合物が緩和すると解釈できる。Bi 塩化物が共存した場合に毒性が低くなることを考えると, イオン性 Bi が遊離の没食子酸と錯体を形成することにより, 細胞膜通過や有機酸単独の毒性が調節されているのかもしれない¹³⁾¹⁴⁾。次没食子酸などの有機酸塩では培養液中での遊離 Bi イオンの割合が低いことも矛盾しないと思われる。しかし既報における Bi の作用をキレート形成により調節される^{5)12)~14)}, あるいは無毒化されるという説明とは相反する¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。今回は毒性に関して極めて基礎的な検討しか行えなかったが, 今後, 遊離次没食子酸や他の培養細胞等を用いた実験を行い, 細胞内外の Bi 濃度や形態変化を調べる必要があると思われる¹⁷⁾。

謝 辞

今回実験に用いた培養細胞 (8505C) は, 東北大学加齢医学総合研究所より供与を受けました。また本論文をまとめるにあたり, ご助言をいただきました同志社女子大学の木津良一教授に深謝致します。

文 献

- 1) 坂井 公 : 日本臨床, **62** (Suppl 12), 344 (2004).

- 2) 和田 攻 : “金属とヒト—エコトキシコロジーと臨床—”, p. 274 (1985), (朝倉書店).
- 3) 野牛 弘, 林 修 : 日本臨床, **43**, 592 (1985).
- 4) A. Slikkerveer, F. A. de Wolff : *Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.*, **4**, 303 (1989).
- 5) W. J. Serfontein, R. Mekel, S. Bank, G. Barbezat, B. Novis : *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **26**, 383 (1979).
- 6) 藤井喜一郎 : 治療学, **9**, 479 (1982).
- 7) 千葉百子, 篠原厚子 : 順天堂医学, **50**, 458 (2004).
- 8) Mineral Tolerance of Domestic Animals, “Bismuth”, pp. 60-70 (1980), (National Academy of Sciences, Washington, D. C.).
- 9) 大沼章子, 池田清栄, 富田伴一 : 愛知衛所報, **53**, 51 (2003).
- 10) J. Kobayashi, R. Kizu, H. Sugiyama : *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1378 (2004).
- 11) J. Kobayashi, R. Kizu, H. Sugiyama : *J. Health Sci.*, **51**, 202 (2005).
- 12) S. Hann, Z. Stefanka, K. Lenz, G. Stingeder : *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 405 (2005).
- 13) N. Krani, Y. Mauras, Y. Allain : *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **89**, 357 (1995).
- 14) A. G. Dodge, L. P. Wackett : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 876 (2005).
- 15) P. Allain, N. Krari, D. Chaleil, G. Lagier, J. Jouglard : *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **5**, 39 (1991).
- 16) A. Slikkerveer, H. B. Jong, R. B. Helmich, F. A. de Wolff : *J. Lab. Clin. Med.*, **119**, 529 (1992).
- 17) L. H. Pedersen, M. Stoltenberg, E. Ernst, M. J. West : *J. Appl. Toxicol.*, **23**, 235 (2003).

Determination of Bismuth in Environmental Samples by ICP-MS and Basic Examination of Cell Toxicity for Their Compounds

Jun KOBAYASHI^{1,2}, Hiroshi TERADA², Hideo SUGIYAMA³, Takehisa MATSUKAWA¹,
Momoko CHIBA¹ and Kazuhito YOKOYAMA¹

¹Juntendo University School of Medicine, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421

²Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, 2-3-6, Minami, Wako-shi, Saitama 351-0197

³Faculty of Health and Medical Science, Teikyo Heisei University, 2-51-4, Higashi-ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170-8445

(Received 23 July 2010, Accepted 14 December 2010)

We examined both bismuth content levels in some environmental water samples (tapwater, bottled drinking water and slag obtained by sewage disposal) by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and cultured cell toxicity of their compounds by the MTT assay. For ICP-MS, the conditions examined were addition of internal standard (IS), apparatus condition, and determination range, etc. When we examined an IS, the advantage was not clear that the ICP-MS response of the IS candidate elements was very variable. However, the sample induction rate into ICP-MS is more changeable at any time. Since the correction of analytical results was enabled by the addition of IS, Tl-203 was selected for IS, and was used in this study. The determination lower limit was 11 ppt by using 10 ppb Tl. Bi was detected in a few environmental water samples at 20.4 ppt ~ 6.8 ppb (0.07 ~ 6.83 µg/g original slags), but Bi concentrations of most samples were lower than the determination limit. On the other hand, concerning cell toxicity, the subgallate and free gallic acid affected the lives of cultured cells. Especially, the toxicity of free gallic acid was higher. It has been understood that the toxicity is weakly adjusted by chelating with Bi.

Keywords : bismuth subgallate ; ICP-MS ; environmental sample ; cell toxicity.