

厚生科学研究研究費補助金
生活安全総合研究事業

急性砒素中毒の生体影響と
発癌性リスク評価に関する研究

平成11年度 総括研究報告書
主任研究者 山内 博

平成12(2000)年4月

目 次

I. 総括研究報告	
急性砒素中毒の生体影響と発癌性リスク評価に関する研究	1
山内 博	
II. 分担研究報告	
1. 急性砒素中毒における尿中DNA損傷物質の動態に関する研究	6
山内 博	
2. 砒素暴露の妊娠ラットの胎仔における脳障害の研究	11
山内 博・吉田 貴彦・相川 浩幸・藤本 亘	
3. 「妊娠ラットの一次免疫中枢に対する急性毒性、特に未熟リンパ球のアポトーシスとの関連性」に関する研究	21
坂部 貢	
4. 放射光蛍光X線分析による砒素の生体内挙動に関する研究	24
中井 泉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

急性砒素中毒の生体影響と発癌性リスク評価に関する研究

主任研究者 山内 博 聖マリアンナ医科大学助教授

研究要旨

1998年7月25日、和歌山市で発生した52名の急性砒素中毒において、尿中8-ヒドロキシ2-デオキシグアノシン（8-OHdG）濃度の検査を実施した結果、亜ヒ酸摂取量に対して依存的にDNA損傷は発生し、その現象は尿中8-OHdG濃度の上昇として評価された。体内で過剰に生成されたDNA損傷は、生体の治癒力により、約半年後には回復する傾向が観察され、一年後には完全に回復が確認された。

胎児期に急性砒素暴露を受けた場合に、胎児および小児において脳障害が発生するかについて妊娠動物を用いて検証を試みた。妊娠17日目のラットに三酸化二砒素を一回経口投与した結果、母獣に比較して胎仔の脳中総砒素濃度（無機砒素とその代謝物の総和）は上昇し、その結果、母獣の脳組織にアポトーシスは認められなかったが、一方、胎仔の脳には顕著にアポトーシス細胞の検出が認められ、将来その後遺症として、脳障害の出現することが示唆された。

妊娠ラットの一次免疫中枢、特に胸腺におけるTリンパ球の分化・成熟に、急性投与された砒素がどのような影響を与えるかについて、未熟リンパ球のサイトカイン反応性・サブセット解析・アポトーシス解析を中心として検討した。その結果、妊娠時の砒素暴露は、一次免疫中枢としての胸腺に重大な影響を、特に「自己と非自己の選択能力」という免疫系の要と考えられているポイントで致命的な影響を与えることが判明した。

急性砒素中毒患者の生検試料の放射光蛍光X線分析を行った。毛髪断面のマイクロビームを用いた分析より、砒素中毒の場合には砒素は毛髪周辺部に分布することが明らかとなった。

分担者氏名

吉田 貴彦（旭川医科大学教授）
中井 泉（東京理科大学教授）
坂部 貢（北里研究所病院医長）
藤本 亘（岡山大学医学部講師）
相川 浩幸（東海大学医学部講師）

損傷の関係」、2)「先進的な生体試料中砒素の測定に関して、放射光蛍光X線分析装置を用いた測定法の確立について」など和歌山市で発生した急性砒素中毒患者の試料を用いて検討した。次に、急性砒素中毒患者の妊婦において、妊婦が高濃度な無機砒素を摂取した場合、胎児の脳中枢神経障害と免疫毒性について、動物実験モデルを用いて解明を試みた結果を報告する。

A. 研究目的

本研究は、急性砒素中毒における生体影響について、1)「砒素暴露とDNA

B. 研究方法

対象者（急性砒素中毒患者について）

急性砒素中毒についての対象者は、1998年7月25日、和歌山市で発生したカレー毒物事件の患者63名である。対象者は男性29名、女性34名で合計63名である。対象者を年齢別に区別すると1-12歳は20名、13-50歳は30名、そして、50歳以上は10名である。次に、健常者は我が国に居住する成人で、内科的な検診と生化学的な検査を実施し、異常者を除いて249名を対照者とした。健常者の尿は、尿中8-OHdG濃度の対照値に用いた。

動物実験

妊娠ラットは体重 368.0 ± 29.6 gのSPF/VAF rat（日本チャールス・リバー社）をそれぞれの実験群において1群3匹として使用した。妊娠ラットは生後9週で初産である。

妊娠ラットに投与した三酸化二砒素は、シグマ社製（St.Louis, MO, USA）の純度99.9%の製品を使用した。三酸化二砒素は少量の水酸化ナトリウム溶液で溶解し、その溶液を蒸留水で希釈し、その三酸化二砒素溶液をラットに投与した。三酸化二砒素を投与したラットは妊娠17日目である。ラットに一回経口投与した三酸化二砒素の投与量は LD_{50} の1/4（三酸化二砒素として、8.5mg/kg）である。三酸化二砒素投与後、12、24、48時間目にラットを屠殺した。対照群の妊娠ラットは無処理で用い、妊娠19日目に屠殺した。

妊娠ラットはハロセンで麻酔後、下大静脈より21-Gの注射針を付けた注射器で採血を行った。胎仔は子宮を摘出し、その後、胎盤、臍帯、胎仔を個々に分離

した。子宮を摘出したラットは左心室よりヘパリン入りPBS溶液を注入し、右心室を放血路とし、臓器と組織の血液を灌流した。胎仔の臓器と組織に含まれる血液は、技術的に困難なことから灌流は実施していない。血液の灌流をした後、母獣のラットから脳を採取した。組織は組織診断用として凍結保存及びパラフィン切片を作成する試料としてそれぞれ保存した。脳中砒素の測定用に、母獣と胎仔の試料は -80°C で凍結保存した。

（倫理面への配慮）

和歌山市で発生した急性砒素中毒患者の尿を砒素測定および尿中DNA損傷試験に用いることに関しては、和歌山市保健所を介してインフォームド・コンセントが得られている。

実験動物の屠殺に際しては、米国NIHの指針に従い倫理面に考慮した上で本研究を遂行した。

C. 研究結果と考察

1. 急性砒素中毒の生体影響と発ガン性リスク評価に関する研究

1998年7月25日、和歌山市園部で発生した67名の急性砒素中毒において4名が死亡、そして、63名が生存し、重傷者5-7名には、現在でも末梢神経炎の後遺症が存在する。他方、急性砒素中毒患者63名は、急性期の症状が回復された段階において、将来の発ガン性に対して強い危惧が持たれた。63名のうち、52名に対して尿中8-OHdG濃度の検査を実施した結果、亜ヒ酸摂取量に対して依存的に尿中8-OHdG濃度は上昇した。すなわち、亜ヒ酸によるDNA損傷の発生は、尿中8-OHdG濃度を測

定することにより明確に評価できることが明らかになった。他方、体内で過剰に生成された DNA 損傷は、生体の治癒力により、約半年後には回復する傾向が観察され、一年後には完全に回復が確認された。

2. 砒素暴露の妊娠ラットの胎仔における脳障害の研究

胎児期に急性砒素暴露を受けた場合に、胎児および小児において脳障害が発生するかについて妊娠動物を用いて検証を試みた。妊娠 17 日目のラットに三酸化二砒素を一回経口投与し、投与後 12-48 時間目の母獣と胎仔の脳中砒素濃度の変化を観察した結果、対照群に比較して顕著な砒素濃度の上昇が胎仔に認められた。胎仔の脳中総砒素濃度（無機砒素とその代謝物の総和）は、投与後 12-48 時間目において対照群に比較すると約 3 倍の高値になった。胎児の脳から検出した砒素の化学形態の特徴は、投与後 12 時間目での無機砒素濃度の上昇であるが、しかし、胎児の脳中砒素の主体はどの時間帯も三酸化二砒素の最終代謝物である dimethylated arsenic 濃度の上昇であった。母獣と胎仔のラットにおける脳の組織診断を実施した。母獣のラットの脳にアポトーシスとネクローシスは認めなかった。胎仔の脳にネクローシスは同様に認めなかった。これに対して、胎仔の脳には、三酸化二砒素投与後 12、24、48 時間において、アポトーシス細胞の出現が明確に認められた。胎仔の脳に認められたアポトーシス細胞の検出は 12 時間目の群が最も顕著であった。この研究の結果から、胎児期に比較的高濃度な無機砒素暴露を受けた場合、脳組織の損傷の発生することは明らかであり、将来

その後遺症として、脳障害が出現することが示唆された。

3. 妊娠ラットの一次免疫中枢に対する急性毒性、特に、未熟リンパ球のアポトーシスとの関連性

妊娠ラットの一次免疫中枢、特に胸腺における Tリンパ球の分化・成熟に、急性投与された砒素がどのような影響を与えるかについて、未熟リンパ球のサイトカイン反応性・サブセット解析・アポトーシス解析を中心として検討した。その結果、以下のことが判明した。

1) 妊娠ラットの胸腺 Tリンパ球 (TC) のサイトカイン (IL-2) 反応性は、砒素投与により有意に抑制された。抑制率は、投与後 12 時間で最大となった。また、最も抑制を受けたのは、CD8⁺であった。

2) 妊娠ラットの胸腺における TC サブセットの解析の結果、砒素の投与は CD4⁺CD8⁺ (double positive) TC のネガティブ選択を促進した。また、double positive 細胞の相対的減少率は、サイトカイン反応性と同様、投与後 12 時間で最大となった。上記の理由から、砒素投与により、CD4⁺の相対的増加が認められた。

3) 妊娠ラットの胸腺の電子顕微鏡も含めた、詳細なる組織細胞化学的解析を行った。その結果、妊娠ラットでは、砒素非投与群においても、正常非妊娠ラットより TC のアポトーシス像が有意に増加はしていたが (2-3cells/100cells)、砒素投与により、アポトーシス細胞の出現率が著明に増加した (9-12cells/100cells)。またその出現率は、1)、2) の結果と同様、投与 12 時間後で最大であった。

これらの結果より、妊娠時の砒素曝露は、一次免疫中枢としての胸腺に重大な影響を、特に「自己と非自己の選択能力」という免疫系の要と考えられているポイントで致命的な影響を与えることが判明した。

4. 放射線蛍光 X 線分析による砒素の生体内挙動

和歌山における急性砒素中毒患者及び中国内モンゴル地方の慢性砒素中毒患者の生検試料の放射光蛍光 X 線分析を行った。急性中毒における毛髪の伸長方向の分析の結果、砒素の大量摂取に対応する急峻なピークが認められ、砒素濃度が通常的生活レベルに回復するまでに 1 ヶ月程度要することがわかった。また、毛髪断面のマイクロビームを用いた分析より、砒素中毒の場合には砒素は毛髪周辺部に分布することが明らかとなった。一方、これまで分析が困難とされた慢性中毒患者の皮膚試料について放射光蛍光 X 線分析法を適用したところ、真皮側に砒素が濃集していることがはじめて明らかとなった。

D. 結論

無機砒素の過剰摂取により体内で DNA 損傷が生じることは、尿中 8-OHdG 濃度の測定により明確に評価できることが明らかとなった。DNA 損傷と三酸化二砒素摂取量との間には有意な相関関係が成り立っていた。これに対して、砒素によって生じた DNA 損傷は生体の治癒能力により修復され、多くの患者において約半年でその効果が認められた。しかし、その作用機序は不明であり、今度の研究課題と考える。

次に、森永砒素ミルク事件の追跡調査により、乳児の段階に過剰な無機砒素を摂取した場合、脳中枢神経障害が発生する事実が報告されている。砒素暴露と脳障害の問題に関しての動物実験を実施した結果、脳血液関門が未成熟な胎仔の脳には、母獣に比較して砒素の取り込み濃度が高くなる傾向があり、この砒素が原因でのアポトーシス細胞の過剰出現が認められた。しかし、脳血液関門が完成している母獣にはこの現象は観察されなかった。これらの結果から、将来において胎仔の段階で過剰な砒素に暴露された動物における、脳障害の発生に関する研究のさらなる必要性を感じた。

E. 研究発表

1. 論文発表

Y. Terada, N. Kondo, M. Kataoka, M. Izumiyama, I. Nakai and S. Goto, X-ray Spectrom., 28:461-463, 1999.

仁藤裕子、坂部貢、山内博、相川浩幸、吉田勝美、急性砒素中毒の妊娠ラットの胎仔における脳障害の研究、Biomedical Research on Trace Elements, 11:300-305, 2000.

2. 学会発表

片岡正樹・寺田靖子・中井泉・吉田貴彦・山内博「砒素中毒患者の生検試料の放射光蛍光 X 線分析」第 12 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 1999.

片岡正樹・寺田靖子・中井泉・吉田貴彦・山内博「砒素中毒患者の生検試料の非破壊蛍光 X 線分析」第 60 回分析化学討論会, 1999.

寺田靖子・清宮貴美子・吉田貴彦・山内博・中井泉「X 線マイクロビームによる砒素中毒患者の毛髪断面の 2 次元蛍

光 X 線分析」日本分析化学会第 48 年会, 1999.

清宮貴美子・寺田靖子・中井泉・吉田貴彦・山内博「放射光蛍光 X 線分析による砒素中毒の研究」第 13 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 2000.

山内博・齋藤秀・吉田勝美「砒素曝露による DNA 損傷の評価に関する尿中 8-ヒドロキシルグアニン測定の有効性の研究」第 70 回日本衛生学会, 2000.

山内博・吉田勝美「急性・慢性砒素中

毒患者における砒素代謝の研究」第 70 回日本衛生学会, 2000.

仁藤裕子・坂部貢・相川浩幸・吉田貴彦・山内博・吉田勝美「胎児期における砒素曝露による脳への影響についての研究」第 70 回日本衛生学会, 2000.

齋藤秀・山内博・越智宏倫・蔵重淳・蓮井ゆり・吉田勝美「ELISA 法による尿中 8-ヒドロキシデオキシグアニンの定量」第 70 回日本衛生学会, 2000.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

急性砒素中毒の生体影響と発癌性リスク評価に関する研究

分担研究者 山内 博 聖マリアンナ医科大学助教授

研究要旨

1998年7月25日、和歌山市園部で発生した67名の急性砒素中毒において4名が死亡、そして、63名が生存し、重傷者5-7名には、今日でも末梢神経炎の後遺症が存在する。他方、急性砒素中毒患者63名は、急性期の症状が回復された段階において、将来の発ガン性に対して強い危惧が持たれた。63名のうち、52名に対して尿中8-OHdG濃度の検査を実施した結果、亜ヒ酸摂取量に対して依存的に尿中8-OHdG濃度は上昇した。すなわち、亜ヒ酸によるDNA損傷の発生は、尿中8-OHdG濃度を測定することにより明確に評価できることが明らかになった。他方、体内で過剰に生成されたDNA損傷は、生体の治癒力により、約半年後には回復する傾向が観察され、一年後には完全に回復が確認された。

A. 研究目的

有害化学物質、紫外線、放射線などの化学的および物理的有害要因により、生体内で活性酸素が生じ、DNA損傷をもたらすこと、また、その際に酸化されたDNAの指標である8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)が生成されることが知られている。8-OHdGは遺伝子DNAの構成成分の一つのデオキシグアノシンが酸化を受けることにより生成される。生体内で8-OHdGは安定でDNAから修復酵素で切り出された後、最終的に尿中に排泄されることが明らかになってきた。

本研究は、平成10年7月25日、和歌山市園部で発生した急性砒素中毒に関して、三酸化二砒素（俗称亜ヒ酸）摂取後の生体影響について、砒素暴露とDNA損傷に関して検討した結果を報告する。

B. 研究方法

対象者

急性砒素中毒の対象者は男性29名、女性34名で合計63名である。1-12歳は20名、13-50歳は30名、そして、50歳以上は10名である。

健常者は内科的な検診と生化学的な検査を実施し、異常者を除いて249名の尿を検査に使用した。健常者の尿は、8-OHdG測定の検査値に対する評価に用いた。

測定方法

砒素の分別測定：

無機砒素 (iAs)、メチル化砒素 (MA)、ジメチル化砒素 (DMA)、トリメチル化砒素 (アルセノベタイン、TMA) の分別測定は、超低温捕集-還元気化-原子吸光光度計で行なった。急性砒素中毒患者の尿中砒素濃度の評価は、この事件が

亜ヒ酸によって発生したことから、亜ヒ酸とその代謝産物の総和（IMD; iAs+MA+DMA）で評価し、実測値は尿中クレアチニン濃度で補正して求めた。8-OHdG の測定：

- 1) 8-OHdG 測定用キット(日本老化制御研究所)および検体を完全に室温にする。
- 2) 尿サンプルを 5000g、10 分間、遠心する。
- 3) プレーートの各ウェルに標準溶液及び検体の遠心上清各 50 μ l および第一抗体溶液(モノクローナル抗体)50 μ l をそれぞれ添加し、プレートを左右に振動させ、よく混合させた後、水温 37 °C、1 時間で反応させる。
- 4) 反応終了後、ウェルの反応液を捨て、洗浄液(0.05% Tween-20 ・リン酸緩衝生理食塩液)250 μ l で 3 回洗浄する。
- 5) 第二抗体溶液(酵素標識抗体)100 μ l を各ウェルに添加し、水温 37°C、1 時間で反応させる。
- 6) 反応終了後、ウェルの反応液を捨て、洗浄液 250 μ l で 3 回洗浄する。
- 7) 発色剤溶解液(0.012% 過酸化水素・0.01% テトラメチルベンジジン・クエン酸リン酸緩衝生理食塩液)100 μ l を各ウェルに添加し、室温で 15 分間反応させる。反応中はアルミホイル等でプレートを包み、遮光する。
- 8) 反応停止液(1N リン酸) 100 μ l を各ウェルに添加し、反応を停止する。
- 9) プレーートを振動させた後、マイクロプレートリーダーを使用し、450 nm における吸光度を測定する。
- 10) 標準溶液を測定して得られた吸光度をプロットして標準曲線を作成し、各吸光度から、検体の 8-OHdG 濃度を算出した。

C. 研究結果及び考察

a) 急性砒素中毒患者の尿中砒素濃度

63 名の急性毒物中毒が亜ヒ酸摂取により発生したことは、平成 10 年 7 月 26 日採尿の尿中砒素を化学形態別に測定し、尿中から急性砒素中毒を発症させる濃度の無機の 3 価砒素 (As(III)) を検出した結果から判断した。

次に、亜ヒ酸摂取後の尿中砒素排泄について経時的な変化を要約すると、亜ヒ酸摂取後一日目の尿中 IMD 濃度は 10 名の平均値で 9029 μ g As/g. creatine、10 日目で 1148 μ g As/g. creatine、30 日目で 160 μ g As/g. creatine であった。尿中 IMD 値が正常値範囲 (50 μ g As/g. creatine) に回復したのは摂取後 2-3 ヶ月目であり、亜ヒ酸の体外排泄には長時間を要した。次に、尿中 IMD における各砒素の割合をみると、摂取早期においては亜ヒ酸そのものである無機砒素の比率が高く、しかし、時間の経過に従い亜ヒ酸の最終代謝物であるジメチル化砒素 (DMA) の割合が高くなる傾向が認められた。

尿中砒素濃度は若年齢者より 50 歳以上の高年齢者のほうが常に高くなる傾向があり、すなわち、亜ヒ酸摂取後の体外排泄がやや緩慢であることが示唆された。次に、亜ヒ酸摂取後の体外排泄には性差が認められ、女性は男性より砒素排泄が速やかであった。

尿中砒素排泄に年齢差と性差が存在することは、肝臓中での亜ヒ酸（無機の 3 価砒素）に対するメチル化の違いであり、特に、メチル化のうち 2 nd methylation の差であることが示唆された。

b) 健常者の尿中 8-OHdG 濃度

表 1 に示したごとく、健常者 249 名から得られた尿中 8-OHdG 濃度の参考値（正常値）は、平均値では 15.7 ± 5.4 ng/mg creatine であった。この測定値に性差、年齢差は認められなかった。

c) 急性砒素中毒患者の尿中 8-OHdG 濃度

急性砒素中毒患者は 63 名であったが、尿中 8-OHdG 濃度の検査を希望された方は 52 名であった。

52 名の三酸化二砒素摂取後の尿中 8-OHdG 濃度について経時的な変化を図 2 に示した。この検査は 10 日目の尿検体から検査を開始して、検査期間中で最も高い平均値を示したのが 30 日目の値であった。具体的な平均値を記述すると、10 日目が 27.5 ± 10.5 ng/mg creatine、30 日目が 28.7 ± 10.1 ng/mg creatine、90 日目が 24.5 ± 7.8 ng/mg creatine、200 日目が 23.5 ± 4.9 ng/mg creatine であった。これらの検査結果を総合的に

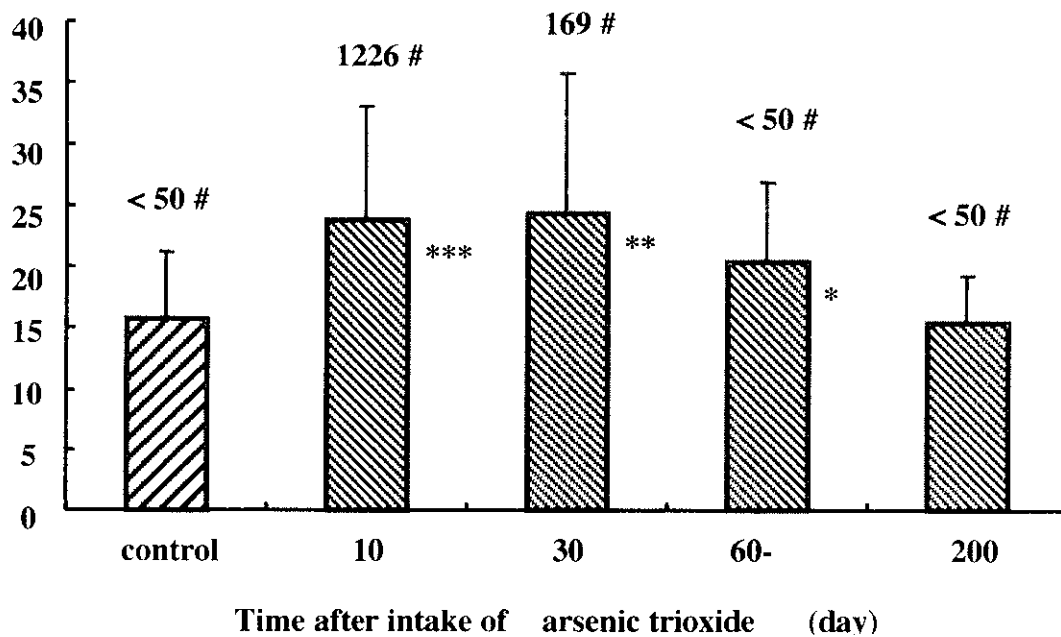
評価すると、まず第一に、尿中砒素濃度との関係を見ると、患者の尿中砒素濃度は三酸化二砒素摂取後一日目が最も高い値であったが、尿中 8-OHdG 濃度は約 30 日目に最高値が認められ、尿中砒素濃度とは一致しない傾向が明らかになった。次に、患者の尿中砒素濃度は一般健常者の値に回復した時期においても尿中 8-OHdG 濃度は、表 1 に示した健常者 249 名の平均値を上回っていた。尿中 8-OHdG 濃度が健常者の値にまで回復した時期は約半年を経過した時期であった。

52 名の患者の尿中 8-OHdG 濃度を比較すると、推定の三酸化二砒素摂取量が最も高かった患者において尿中 8-OHdG 濃度が高い実体も存在した。52 名の患者について、推定の三酸化二砒素摂取量と尿中 8-OHdG 濃度との間には統計学的に有意な相関関係が認められた。

表 1 健常者 249 名における尿中 8-OHdG 濃度

		尿中8-OHdG濃度 (ng/mg.cr)
全体	(n=249)	15.70±5.48
性別		
女性	(n=121)	16.19±5.51
男性	(n=128)	15.24±5.43
年齢		
20-29	(n=50)	14.92±6.14
30-39	(n=50)	15.71±5.72
40-49	(n=53)	15.96±5.28
50-59	(n=50)	16.23±4.75
60-79	(n=46)	15.67±5.56

Urinary 8-OHdG (ng/mg cr.)



***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$

Urinary arsenic ($\mu\text{g As/g cr.}$)

図1 急性砒素中毒患者における尿中8-OHdG濃度の経時的な変化

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

急性砒素中毒の生体影響と発癌性リスク評価に関する研究

分担研究者	山内 博	聖マリアンナ医科大学助教授
分担研究者	吉田 貴彦	旭川医科大学医学部教授
分担研究者	相川 浩幸	東海大学医学部講師
分担研究者	藤本 亘	岡山大学医学部講師

研究要旨

胎児期に急性砒素暴露を受けた場合に、胎児および小児において脳障害が発生するかについて妊娠動物を用いて検証を試みた。妊娠 17 日目のラットに三酸化二砒素を一回経口投与し、投与後 12-48 時間目の母体と胎子の脳中砒素濃度の変化を観察した結果、対照群に比較して顕著な砒素濃度の上昇は胎子に認められた。胎子の脳中総砒素濃度（無機砒素とその代謝物の総和）は、投与後 12-48 時間目において対照群に比較すると約 3 倍の高値になった。胎子の脳から検出した砒素の化学形態の特徴は、投与後 12 時間目では無機砒素濃度の上昇であるが、しかし、胎子の脳中砒素の主体はどの時間帯も三酸化二砒素の最終代謝物である dimethylated arsenic 濃度の上昇であった。母体と胎子のラットにおける脳の組織診断を実施した。母体のラットの脳にアポトーシスとネクローシスは認めなかった。胎子の脳にネクローシスは同様に認めなかった。これに対して、胎子の脳には、三酸化二砒素投与後 12、24、48 時間において、アポトーシス細胞の出現が明確に認められた。胎子の脳に認められたアポトーシス細胞の検出は 12 時間目の群が最も顕著であった。この研究の結果から、胎児期に比較的高濃度な無機砒素暴露を受けた場合、脳組織の損傷の発生することは明らかであり、将来その後遺症として、脳障害の出現することが示唆された。

A. 研究目的

無機砒素化合物の暴露から発生した急性や慢性砒素中毒における神経障害は末梢神経炎が主であり、脳中枢神経障害を示唆する臨床報告は成人において報告はないと思われる。しかし、特殊な事例として、脳に対する毒物の防御機構である脳一血液関門の未成熟な乳児においては、急性・亜急性砒素中毒において脳障害の発生が示唆されている。代表的な事例と

して、1955 年、日本で発生した、砒素ドライミルク事件が有名である[1,2]。この事件は、乳児が摂取するドライミルクに無機砒素が混入し、12000 名の亜急性砒素中毒患者が発生し、そのうち 120 名が死亡した。生存者の追跡調査の結果、砒素摂取後 7-8 年および 15 年目の健康調査において、患者の多くから知能障害やてんかん様発作など様々な神経や精神症状の増加が観察され、乳児期の

高濃度な無機砒素暴露による脳障害が指摘されていた[3,4]。

1998年、日本の和歌山市において三酸化二砒素の経口摂取による、67名の急性砒素中毒患者が発生し4名が死亡した。生存者63名には4名の妊婦そして1歳代の子供が6名含まれていた[5]。4名の妊婦からそれぞれ赤ん坊は出産されている。妊婦の三酸化二砒素摂取時期は、2名が妊娠早期、他の2名は妊娠後期であった。この急性砒素中毒事件の新たな健康影響についての問題として、新生児や乳児への三酸化二砒素暴露は明確に存在したことから、将来への問題として、脳障害の発生が顕在化するかなどの懸念が存在している。

他方、慢性砒素中毒において脳中枢神経障害が問題であると論議されたことはないと思われる。今日、インド、バングラディシュ[6-8]、タイ[9]、中国[10-12]などのアジア諸国、そして、メキシコ[13,14]、チリ[15,16]、アルゼンチン[17-19]など中南米地域では、井戸水への高濃度無機砒素汚染から大規模な慢性砒素中毒が発生している。そして、高濃度な無機砒素暴露者の中には大勢の妊産婦、乳児、そして、子供が含まれている。無機砒素暴露からの子供の脳障害に関して、タイの慢性砒素中毒発生地域に居住している子供には、IQの低下が観察されるとの報告がなされている[9]。

動物を用いた無機砒素化合物に関する催奇性試験は従来より多くの研究が実施されている。そのなかで脳を中心とした奇形として無脳症、脳露出症などが報告されている[20-23]。これらの実験で用いられる砒素投与量は多量であり、これに対して、急性や慢性砒素中毒患者が受

ける無機砒素暴露に相当する脳障害に関する研究は殆どなく、この分野の研究は未解決の問題が数多く存在していると考えられる。

本研究は、急性や慢性砒素中毒患者の妊婦が高濃度な無機砒素を摂取した場合、胎児の脳中枢神経障害は発生するか否かについて、動物実験モデルを用いて解明を試みた。この研究においては母獣と胎仔の脳中砒素濃度とその化学形態に対応する脳細胞の障害について、妊娠初期の発生学的な毒性評価より砒素中毒学的な視点に注目し検討を行なった。

B. 研究方法

1 動物

妊娠ラットは体重 368.0 ± 29.6 g の SPF/VAF rat(Crj:Wistar) (日本チャールス・リバー社) をそれぞれの実験群において1群3匹として使用した。妊娠ラットは生後9週で初産である。動物の飼育は、室温 22 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 % の環境条件とした。動物室内の明暗条件は8:00—20:00を照明下、20:00—8:00を消灯下とした。この動物室内にクリーンラック(日本クレア社; 東京)を設置し、このクリーンラック内で飼育した。餌はCE-2固形飼料(日本クレア社; 東京)、水は水道水を自由に与えた。

2 試薬と処置

妊娠ラットに投与した三酸化二砒素は、シグマ社製(St.Louis, MO, USA)の純度99.9%の製品を使用した。三酸化二砒素は少量の水酸化ナトリウム溶液で溶解し、その溶液を蒸留水で希釈し、その三酸化二砒素溶液をラットに投与した。三酸化二砒素を投与したラットは妊娠

17 日目である。ラットに一回経口投与した三酸化二砒素の投与量は LD₅₀ の 1/4 (三酸化二砒素として、8.5mg/kg) である。三酸化二砒素投与後、12、24、48 時間目にラットを屠殺した。対照群の妊娠ラットは無処理で用い、妊娠 19 日目に屠殺した。

3 解剖

妊娠ラットはハロセンで麻酔後、下大静脈より 21-G の注射針を付けた注射器で採血を行った。胎仔は子宮を摘出し、その後、胎盤、臍帯、胎仔を個々に分離した。子宮を摘出したラットは左心室よりヘパリン入り PBS 溶液を注入し、右心室を放血路とし、臓器と組織の血液を灌流した。胎仔の臓器と組織に含まれる血液は、技術的に困難なことから還流は実施していない。胎仔から取り出した脳は血液の汚染を PBS 溶液で洗浄し除去した。血液の灌流をした後、母獣のラットから脳を採取した。組織は組織診断用として凍結保存及びパラフィン切片を作成する試料としてそれぞれ保存した。脳中砒素の測定用に、母獣と胎仔の試料は -80℃ で凍結保存した。

4 砒素の分析

脳中砒素の測定には試料を 0.5g 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 2N-NaOH 溶液を 2 ml 加え、加熱器 (ヤマト社製 HF-61) で 100℃ で 3 時間加熱して、測定試料とした。無機砒素 (iAs)、メチル化砒素 (MA)、ジメチル化砒素 (DMA)、トリメチル化砒素 (TMA) は超低温捕集一還元気化一原子吸光光度計で測定した [24]。ラットの組織から検出された iAs は、本来、厳密には無機の 3 価砒素と無機の 5 価砒素に区別されるが、この

報告書では一括して iAs と表現した。母獣の脳組織は砒素の測定に十分な試料量は得られたが、胎仔の脳組織量は微量であった。胎仔における脳中砒素濃度の測定値に対する精度の確保から、1 匹の母獣から 2 匹の胎仔を無作為に選択して、合計 6 匹から求めた。

5 組織検査

母獣と胎仔のラットの脳組織におけるアポトーシスとネクローシスの検査には、凍結切片およびパラフィン切片を用いた。アポトーシスの検出法

母獣と胎仔のラット脳組織におけるアポトーシス細胞の検出には Terminal Transferase 法を用いた。アポトーシス細胞検出キットは Enzo 社 (60 Executive Boulevard Farmingdale, NY, USA) を使用した。

ネクローシスの検出法

母獣と胎仔のラットの脳組織におけるネクローシスの検査はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色法にて行った。

6 統計処理

データの解析には Stat View software package を用いて t 検定を行い、有意水準を 5% とした。測定値は平均値 ± 標準偏差として示した。

(倫理面への配慮)

実験動物の屠殺に際しては、米国 NIH の指針に従い倫理面に考慮した上で本研究を遂行した。

C. 研究結果

1 三酸化二砒素投与後の胎仔

妊娠ラットに三酸化二砒素を一回経口投与後、12、24、48 時間目に屠殺して摘出した胎仔は、どの実験群においても

死亡した胎仔は認められなかった。さらに、実験群と対照群において、子宮内の胎仔の数に差は認められなかった。三酸化二砒素投与後 12 と 24 時間目における胎仔の体重の変化に違いは示されなかった。これに対して、48 時間目（妊娠 19 日目）の実験群における胎仔の体重増加は示されず、三酸化二砒素投与の影響が示唆された。なお、48 時間目の実験群の胎仔体重は、妊娠 19 日目の対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

2 脳中砒素濃度

母獣と胎仔の脳中砒素濃度を化学形態別に測定した結果を表 1 に示した。対照群と三酸化二砒素投与後の母獣と胎仔の脳中から検出した砒素は iAs, MA, DMA の 3 種類で、TMA は検出されなかった。母獣の脳中砒素濃度を対照群と比較した結果、三酸化二砒素投与後 12 時間目の iAs 濃度は約 4 倍に上昇した。しかし、MA と DMA 濃度は顕著な変化は認められなかった。さらに、24、48 時間目における母獣の脳中 iAs, MA, DMA 濃度はそれぞれ対照群と比較して変化は認められなかった。

他方、胎仔の三酸化二砒素投与後の脳中砒素濃度と化学形態は、母獣の脳中砒素の結果と異なる現象が認められた。まず、脳中砒素の化学形態の特徴を見ると、iAs 濃度は三酸化二砒素投与後 12 時間目のみに変化が観察された。最も特徴的な変化は、脳中 DMA 濃度の上昇であり、対照群の値に比較して約 4-5 倍の高値であり (t-test, $p < 0.001$)、これは母獣の脳では観察されない特徴であった。次に、三酸化二砒素投与後の胎仔の脳中総砒素濃度 (iAs+MA+DMA) の変化

を見ると、投与後 12、24、48 時間目において対照群に比較すると約 3 倍の値に上昇し、これらの値の変化には統計学的な有意差が認められた (t-test, $p < 0.001$)。

3 組織変化

アポトーシスの判定

ラット母獣の脳組織から三酸化二砒素を投与した 12、24、48 時間目のどの群においてもアポトーシス細胞の出現は認めなかった。これに対して、胎仔の脳組織においては三酸化二砒素を投与した 12、24、48 時間目のどの群においてもアポトーシス細胞の出現を明確に認めた (図 1)。胎仔の脳に出現したアポトーシス細胞は 12 時間目の群が最も顕著である傾向が認められた。対照群にアポトーシス細胞の出現は認めなかった。

ネクローシスの判定

母獣の脳組織には三酸化二砒素を投与したどの群においてもネクローシスを認めなかった。同様に、胎仔の脳組織には三酸化二砒素を投与したどの群においても、ネクローシスを認めなかった。

D. 考察

この研究において妊娠ラットに投与した三酸化二砒素により、胎仔の脳組織に軽度な障害の発生することがアポトーシス細胞の観察により明らかとなり、特に、三酸化二砒素投与後 12 時間目が顕著であった。これに対して、母獣のラットの脳組織には何らの変化が認められないことをアポトーシス細胞とネクローシスの診断から判明した。胎仔の脳組織に認められたアポトーシス細胞の出現と脳中砒素濃度との間には興味深い関係が認められたが、母獣のラットで認められること

はなかった。

この研究で明らかになった興味深い結果に次の2点がある。まず第一の結果であるが、胎仔の脳に出現したアポトーシス細胞の背景は、母獣と胎仔の脳中総砒素濃度の単なる違いに起因しているかどうかの疑問である。本実験において、三酸化二砒素の投与後12時間目の母獣と胎仔の脳中総砒素濃度はほぼ同レベルであった(表1)。つぎに、母獣と胎仔の脳中砒素に関して異なる現象は次の結果である。胎仔の脳中DMA濃度は対照群の値に比較して約5倍高い値に上昇したが、母獣の脳中DMA濃度に変化は認められなかった。すなわち、胎仔の脳に出現したアポトーシス細胞は、脳中砒素濃度より砒素の化学形態が重要である可能性、具体的にはDMAの存在と思われる。Yamanakaら[25,26]は砒素の発ガン性機序に関して、生体内に過剰なDMAが存在した場合、DMAのさらなる変化から生じるラジカル反応によりDNA損傷が発生するとの報告をしている。さらに、Endoらの研究グループ[27-29]は、無機砒素の毒性や発ガン性に関して、無機砒素の作用より主要な代謝物であるDMAがその中心的な役割を行うとする興味ある研究成果を報告している。

本研究において、胎仔の脳に認められたアポトーシス細胞の出現と砒素の役割に関して、その機序を明確に明らかにすることは現状において出来ていないと考えている。胎児期の脳の発生過程においては、アポトーシスの制御はBcl-2, Bcl-xによってなされているとの報告がある[30-32]。本実験のような脳組織に対するアポトーシスの研究は存在してい

ないが、砒素とアポトーシスの関係について、白血病細胞に関して興味ある報告がなされている。従来、中国においては白血病の一つであるAPL(acute promyelocyte leukemia)患者に三酸化二砒素を投与し治療が実施されてきたが、最近、その作用機序が骨髄細胞に対するアポトーシスの誘導作用であることが、幾つかの研究で報告されている[33-35]。すなわち、砒素の作用によって発生するアポトーシスの役割そして作用機序の解明は様々な研究により解明される方向にある。それらの研究の一例として、砒素による脳障害についても、砒素が脳神経細胞への直接の作用によるためか、それとも神経栄養因子や神経細胞支持組織への阻害作用であるのか、さらに、砒素のメチル化によるDNA損傷に起因するかなど興味深い研究課題が山積していると思われる[36-38]。

他方、母獣および胎仔の脳組織にネクローシスは共通して観察されなかった。一般的に動物実験において、三酸化二砒素[39]やDMA[24]を経口投与した実験において、脳への砒素沈着は他の臓器や組織に比較して極めて少ないことは明らかである。すなわち、脳への砒素の分布を制限しているのは脳血液関門の役割であると思われる。しかしながら、本来、この実験の時期において胎仔の脳血液関門は未成熟な段階であるが、脳への砒素化合物の沈着は過剰ではなく、結果的に脳組織にネクローシスは発生していなかった。すなわち、胎児期においても脳組織への砒素沈着の機序は本質的に他の組織や臓器と異なる機序であると考えられる。本研究においては、砒素によって傷害された胎仔の脳組織について、具体的に何

の細胞であるかは言及していない。この問題は継続研究の一つとして実施している。

本研究の結果から次の結論が得られたものとする。脳血液関門が未成熟な段階において、胎子の脳へ iAs もしくはその最終代謝産物である DMA が増加した場合、脳細胞は損傷され脳障害が発生する可能性が示唆された。この作用は、iAs 自身（三酸化二砒素）によるものか、それとも代謝物である DMA による作用であるか、新たな研究の必要性を提起したものとする。

今日、飲料水の無機砒素汚染からの高濃度な無機砒素暴露者は約 1300 万人存在し、当然のこととして妊婦や乳児への暴露が存在していると思われる。また、急性砒素中毒患者の妊婦から生まれて来た赤ん坊も存在している。従来、砒素中毒学の研究領域において、砒素暴露と脳中枢神経障害の研究は比較的少ない状況にあったが、今後、この分野の研究は十分に発展させる必要があると考える。

【参考文献】

- 1) 北村直次、粕山敏明：森永ドライミルク MF による砒素中毒について、岡山県衛生研究所年報, 6: 42-43, 1955.
- 2) 山下節義：森永砒素ミルク中毒事件と被害者のその後、公衆衛生, 51: 538-543, 1987.
- 3) 佐藤武男：砒素ミルク中毒児の難聴、医学のあゆみ, 74: 25-27, 1970.
- 4) 湯浅亮一：1955 年の森永砒素ミルク被害者におけるてんかんの罹病について、医学のあゆみ, 77: 26-32, 1971.
- 5) 谷村弘、山内博、木下純子、杉本侃：和歌山における毒物混入事件に関する臨床研究、厚生科学研究補助金研究報告書 (H10—特別—059)、1999. 1-9 頁.
- 6) Das D, Chatterjee A, Mandal BK, Samanta G, Chakraborti D, Chanda B: Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 2, Arsenic concentration in drinking water, hair, nail, urine, skin-scale and liver tissue of the affected people. *Analyst* 120 : 917-924, 1995.
- 7) Chowdhury AM: Testing of water for arsenic in Bangladesh. *Science* 284: 1622-1629, 1999.
- 8) Tondel M, Rahman M, Magnuson A., Chowdhury IA, Faruquee HM, Ahmad SA: The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesion in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 107 : 727-729, 1999.
- 9) Choprapawon C: Chronic arsenic poisoning in Ronpibool District, Nakorn Srithammarat Province, Southern Thailand: How should we balance between economics and health?. Second International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects. San Diego, CA, USA. (Speaker's abstracts). 1995. pp8.
- 10) Lianfang W, Jianzhong H: Chronic arsenism from drinking water in some areas of Xinjiang, China. Nriagu JO (ed): *In Arsenic in the Environment. Part II : Human Health and Ecosystem Effects*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994,

pp159-172.

11) Sun GF, Dai GJ, Pi FJ, Yamauchi H, Yoshida T, Aikawa H: The present situation of chronic arsenism and research in China. Chappell, Abernathy CO and Calderon RL (eds) : Arsenic Exposure and Health Effects, Elsevier, New York, 1999. pp123-126.

12) 吉田貴彦, 山内博 : 最近の中国における砒素中毒について, Biomed Res Trace Elements 11, 45-53, 2000.

13) Cebrian ME, Albores A, Aguilar M., Blakely E: Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. Hum Toxicol 2 : 121-133, 1983.

14) Cebrian ME, Albores A, Garcia-Vargas G, Del Razo LM: Chronic arsenic poisoning in humans: the case of Mexico. Nriagu JO (ed): In Arsenic in the Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. pp93-107.

15) Zaldiver R: Arsenic contamination of drinking water and foodstuffs causing endemic chronic poisoning. Beitr Path 151 : 384-400, 1974.

16) Zaldiver R: Ecological investigations on arsenic dietary intake and endemic chronic poisoning in man: dose-response curve. Xentralbl Bakteriolog Orig B 164: 481-484, 1977.

17) Vahter M, Concha G, Nermell B, Nilsson R, Dulout F, Natarajan AT: A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. Eur J Pharmacol 7:455-462, 1995.

18) Gabriela C, Barbro N, Vahter M: Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in Northern Argentina. Environ Health Perspect 106: 355-359, 1998.

19) Concha G, Volger G, Nermell B, Vahter M: Low-level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in the drinking water, Int Arch Occup Environ Health 71: 42-46, 1998.

20) Holmberg RE, Fern VH: Interrelationships to selenium, cadmium, and arsenic in mammalian teratogenesis. Arch Environ Health 18 : 873-877, 1969.

21) Hood RD, Bishop SL: Teratogenic effects of sodium arsenate in mice. Arch Environ Health 24 : 62-65, 1972.

22) Hood RD, Thicker GT, Patterson BL: Prenatal effects of oral versus intraperitoneal sodium arsenate in mice. J Environ Pathol Toxicol 1 : 857-864, 1978.

23) Hood RD, Harrison WP, Vedel GC: Evaluation of arsenic metabolites for prenatal effects in the hamster. Bull Environ Contam Toxicol 29 : 679-687, 1982.

24) Yamauchi H, Yamamura Y: Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsenic acid in the hamster. Toxicol Appl Pharmacol 74: 134-140, 1984.

25) Yamanaka K, Okada S: Induction

of lung-specific DNA damage by methylarsenics via the production of free radicals. Nriagu JO (ed) : In *Arsenic in the Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994, pp143-157.

26) Yamanaka K, Okada S: Possible involvement of methylarsenics metabolically produced from inorganic arsenics in arsenic carcinogenesis. *Biomed Res Trace Elements* 10: 139-140., 1999.

27) Yamamoto S, Konishi Y, Matsuda T, Murai T, Shibata M, Matsui I, Otani S, Kuroda K, Endo G, Fukushima S: Cancer induction by an inorganic arsenic compound, in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogen. *Cancer Res* 55 : 1271-1276, 1995.

28) Li W, Wanibuchi H, Salim EI, Yamamoto S, Yoshida K, Endo G, Fukushima S: Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett* 134, 29-36, 1998.

29) Kashiwada E, Kuroda K, Endo G: Aneuploidy induced by dimethylarsinic acid in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 413, 33-38, 1998.

30) Deckwerth TL, Elliot JL, Knudson CM, Johnson Jr EM, Shider DW, Korsmeyer SJ: Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17 : 401-411, 1996.

31) Reed SJ: Double identity for

proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387 : 773-776, 1997.

32) Huang C, Ma WY, Li J, Dang Z: Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH₂-Terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 59: 3053-3058, 1999.

33) Akao Y, Mizoguchi H, Kojima S, Naoe T, Ohnishi N, Yagi K: Arsenic induces apoptosis in B-cell leukemia cell lines in vitro; activation of caspase and down-regulation of Bcl-2 protein. *Br J Haematology*. 102 : 1055-1060, 1998.

34) Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K: Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vivo. *FEBS Letters* 455: 59-62, 1998.

35) Dai J, Weimberg RS, Waxman S, Jing Y: Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 93 : 268-277, 1999.

36) Mass MJ, Wang L: Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res* 386:263-277, 1997.

37) Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP: Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*