

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12年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 山内 博

平成13（2001）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. 急性砒素中毒の毒作用に影響する砒素代謝に関する研究	7
山内 博・網中 雅仁	
2. 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	19
—急性砒素中毒における母胎から胎児への砒素の移行—	
中井 泉	
3. インド共和国西ベンガル州における砒素曝露評価及び	
砒素の生体内動態に関する研究	26
安藤 正典・徳永 裕司・内野 正・Tarit Roy Chowdhury	
4. 急性砒素中毒ラットから出産された仔の脳障害に関する研究	47
相川 浩幸・吉田 貴彦・山内 博	
5. 胎生期における砒素曝露と中枢神経障害	
—14-3-3蛋白質キナーゼ調節因子の発現と関連させて—	57
坂部 貢	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	64

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 63名の急性砒素中毒患者の症状は三酸化二砒素の摂取量に依存的に重症になる傾向は存在する。この中毒事例において12歳未満20名と13歳以上43名の砒素摂取量に大きな違いは認められなかったが、成人の症状は小児に比較して重症であった。12歳未満の小児における摂取した三酸化二砒素の代謝に関して、体内で三酸化二砒素は2回メチル化されメチル化砒素、ジメチル化砒素に代謝され尿中に排泄された。小児は成人に比較してメチル化砒素からジメチル化砒素に代謝される 2nd-methylation の効率が顕著に高いことが明らかになり、この作用により砒素の対外排泄が速やかとなり、結果的に生体への障害が軽度になったものと考えられた。

急性砒素中毒の妊婦から出産された新生児に関して、胎児期の砒素曝露レベルを評価するために、新生児の毛髪を放射光蛍光 X 線分析法により伸長方向に1次元分析をした。1本の毛髪から検出した砒素のピークは、母体の砒素摂取と排泄パターンに一致するものであった。従来、胎児期の曝露評価は困難であったが、新生児の毛髪を放射光蛍光 X 線分析法で検査することによる、母体と胎児間における砒素の動態の評価が可能となった。

和歌山の急性砒素中毒は無機の3価砒素 (As(III)、三酸化二砒素) によって発生した。一方、無機の3価砒素による慢性砒素中毒患者における砒素代謝に関して、インド共和国西ベンガル州のガンジス川流域の Mushidadad 地区から、9家族の夫婦を抽出し検討した。尿中の無機の5価砒素 (As(V)) と As(III)、メチルアルソン酸 (MMA) あるいはジメチルアルシン酸 (DMA) との間に統計的に有意な相関性がなかった。しかし、砒素の代謝物である As(III)、MMA 及び DMA の各濃度との間に相関性 ($P < 0.01$) が成立し、インドの飲料水の砒素基準を越えた水を飲料に用いている家族は、各個人的に砒素の代謝酵素の活性に大きな違いがなく、摂取された砒素化合物を正常に代謝し、尿中に排泄していることが示唆された。

胎児期の砒素曝露が脳への障害に影響するか実験動物モデルを用い検討した。出生後の Open-field 試験と自発行動量から、三酸化二砒素投与群では歩行量減少と潜伏時間延長が認められ、さらに、自発行動量の測定から、行動抑制の傾向が強く示された。胎児期の後期に無機砒素曝露を受けた場合、脳組織障害により、出生後に行動抑制など中枢神経障害の発生する可能性の高い結果を得た。

三酸化二砒素を妊娠ラットに投与すると、胎生期の神経系の発生・分化・成熟に深く関連するタンパク質キナーゼ調節因子の一つである 14-3-3 の胎児脳 (特にニューロン) での発現が約 30% 抑制された。このことは、母体を介して胎児に移行した砒素が、分化・成熟過程におけるニューロンの細胞情報伝達機構のごく初期のシグナルカスケードに影響することを明らかとした。

分担者氏名

中井 泉 (東京理科大学教授)

安藤 正典 (国立医薬品食品衛生研究所
部長)

相川 浩幸 (東海大学医学部講師)

吉田 貴彦 (旭川医科大学教授)

坂部 貢 (北里研究所病院部長)

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) 砒素代謝と健康障害の差異、2) 急性砒素中毒の妊婦と胎児への砒素曝露評価法、3) 胎児期における砒素曝露から脳障害に関して、和歌山市で発生した急性砒素中毒患者の生体試料、インドの慢性砒素中毒患者の生体試料、そして、妊娠ラットを用いた実験動物モデルによる基礎的な研究を試み結果を報告する。

B. 研究方法

対象者

急性砒素中毒の対象者は、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。妊婦は4名である。対象者を年齢別に区別すると1-12歳は20名、13-67歳は43名である。

砒素の測定試料は患者から提供された尿、そして、妊婦の頭髪と臍帯、新生児の頭髪を検査試料とした。

慢性砒素中毒患者の対象者は、インド共和国西ベンガル州のガンジス川流域のMushidadad地区の住民で、12家族で51名、男女の内訳は男性26名、女性25名であった。13才以下の子供は18名であ

った。住民から井戸水、尿、毛髪を採取した。

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。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。

行動学試験は、Petit らの Open-field を改良した装置を使用した。測定は4週齢時のラットをスタート箱に入れ、3分間の行動観察、潜伏時間、歩行量、立ち上がり回数、毛繕い回数、洗顔回数、脱糞回数、排尿回数を観察した。自発行動量

は、生後 5 週齢に行った。測定は MK-Animex 装置を使用し、ラット 1 匹を入れた飼育用プラスチック製ケージを置き、36 時間の行動量を観察した。

(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生体試料の使用に関しては、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。

インド共和国西ベンガル州 Mushidadad 地区での調査からの生体試料の採取は、住民から直接にインフォームド・コンセントを得た。

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. 結果と考察

1. 急性砒素中毒の毒作用に影響する砒素代謝に関する研究

患者の一日目の尿中砒素濃度は 10 名の平均値で $9029\mu\text{g As/g. creatine}$ で、この値は一般健常者の約 200 倍に相当し、急性砒素中毒と判断できるものであった。尿中砒素濃度は時間の経過にしたがい減少し、正常値範囲に回復したのは摂取後 2-3 ヶ月目であった。

尿中砒素排泄パターンについて男女間に差は認められなかった。これに対して、小児と成人における砒素排泄の違いを検討した結果、1-12 歳群は 13 歳以上の群に比較して、三酸化二砒素摂取早期の期間 (5 日以内) の砒素排泄は極めて速やかであった。三酸化二砒素は体内で 2 回メチル化を受けるが、特に、メチル化砒素からジメチル化砒素への代謝 (2 nd methylation) 効率の高いことが明らかと

なり、すなわち、摂取した三酸化二砒素を排泄の速やかなジメチル化砒素に効率的に変換して尿中へ排泄された。尿中砒素濃度から算出した推定の三酸化二砒素摂取量は、12 歳未満と 13 歳以上では差は存在しなかった。有害な三酸化二砒素が短時間で効率的に對外排泄されたことから、小児の中毒症状は成人に比較して軽度であったと考えられる。小児の詳細な臨床所見を本報告に記述することは経緯から実施していない。現実的に、小児の症状の回復は成人に比較してはるかに早く、そして、重傷者に認められる末梢神経障害は小児に存在しなかった。

2. 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

急性砒素中毒患者の新生児の毛髪を放射光蛍光 X 線分析により伸長方向に 1 次元分析したところ、母胎の砒素の摂取に対応すると考えられる明瞭な砒素のピークが検出された。また、臍帯の蛍光 X 線分析からも明瞭に砒素が検出されたことから、母体が摂取した砒素は胎児へと移行する現象を高精度に実証できた。中毒学的研究に対して、放射光蛍光 X 線分析が生体試料中の砒素の分布情報を得るのに最も適した非破壊分析手法であることも明らかとなった。

3. インド共和国ベンガル州における砒素曝露評価および砒素の生体内動態に関する研究

Mushidadad 地区の飲料水中の砒素濃度は $2.7\sim 154\text{ppb}$ の範囲であった。井戸水に $10\mu\text{g/g}$ 以上を含まれる元素は Fe, Mn, Mg, Cu, Zn 及び Pb であり、毛髪中の砒素濃度は $0\sim 16\mu\text{g/g}$ であった。それらの内、砒素濃度と有意な相関性 ($P < 0.01$) を示した元素は V, Sb, Se, Ag, Sn, Cd,

Cr, Mn であった。尿中の砒素濃度と有意な相関性 ($P < 0.01$) を示した元素は V, Cr, B, Ni, Ag であった。毛髪中の砒素濃度は女性の方が男性よりも有意に高く、また女性の子供が全グループの中で最も高い値を示した。なお年齢と毛髪中の砒素濃度の間に有意な相関は見られなかった。成人女性の毛髪の場合、毛根部の毛髪中の砒素濃度が他の部分のものより有意に濃度が高かった。砒素代謝に関連する化合物として、As(III), As(V), メチルアルソン酸 (MMA) 及びジメチルアルシン酸 (DMA) を対象とし、尿中の As(III), As(V), MMA 及び DMA を測定した。As(III), As(V), MMA 及び DMA の尿中量は、それぞれ、0~79.7ppb、0~163.5ppb、0.2~41.1ppb 及び 0.8~201.8ppb であり、それらの平均値は、それぞれ、9.2, 4.6, 6.2 及び 39.1ppb であった。それら 4 種類の砒素量の和を total As とした場合、total As は 1.3~291ppb であり、その平均値は 59.2ppb であった。砒素の代謝物と total As の比である (MMA+DMA)/total As (%) を見た場合、その平均値は 83.2% であった。2 人の男子 (2 才及び 13 才) の場合、それらの比が 27.3 及び 16.5% であり、明らかに他の人々と違った代謝パターンを示した。尿中の As(V) と As(III), MMA あるいは DMA との間に統計的に有意な相関性がなかった。しかし、砒素の代謝物である As(III), MMA 及び DMA の各濃度との間に相関性 ($P < 0.01$) が認められた。9 家族の夫婦を抽出し、男女間での尿中砒素の代謝物である As(III), MMA, DMA の関連性を検討した。食習慣の同じ夫婦の間での尿中の砒素化合物の濃度は有意な相関性 ($p < 0.05$) がみられた。住民の年齢と尿中の (MMA+DMA) の量と Total As との間に

は、関連性は認められなかった。年齢が低い子供の尿中に (DMA+MMA) あるいは total As の量が高いことが観察された。

4. 急性砒素中毒ラットから出産された仔の脳障害に関する研究

胎児期の砒素曝露が脳への障害に影響するかに関して、出生後の Open-field 試験と自発行動量から評価した。出生後のラット (生後 4 週齢目) における Open-field 試験から、三酸化二砒素投与群では、歩行量減少と潜伏時間延長が認められた。出生後 5 週齢目に Animex による自発行動量の測定結果から、三酸化二砒素投与群では、通常、二峰性の行動パターンが一峰性となり、行動抑制の傾向が強く示された。

5. 胎生期における砒素曝露と中枢神経障害

三酸化二砒素を妊娠ラットに投与すると、母体を介して胎児に砒素が移行するが、その結果胎生期の神経系の発生・分化・成熟に深く関連するタンパク質キナーゼ調節因子の一つである 14-3-3 の胎児脳 (特にニューロン) での発現が約 30% 抑制された。このことは、母体を介して胎児に移行した砒素が、分化・成熟過程におけるニューロンの細胞情報伝達機構のごく初期のシグナルカスケードに影響を及ぼすことを示唆するものである。

D. 結論

無機砒素のメチル化に関する研究成果を大別すると、メチル化は無機砒素の解毒機序である、また、無機砒素の毒性はその第一代謝物が真の作用をする、との結論が得られているが不明な問題が山積している。本研究から、無機砒素のメチル化には、年齢の要因が働いており、成

人より小児の方が比較的効率にメチル化する作用が示され、この作用により砒素を短期間に体外排泄が可能となり、結果的に健康障害が軽度ですむことが明らかとなった。

従来、胎児期の砒素曝露を定量的に評価することは困難であったが、新生児と母親の頭髮中砒素を放射光蛍光 X 線分析法で測定すると、両者間の砒素の動態が高精度に評価が可能となった。

胎児期の無機砒素曝露は胎仔の脳組織に障害を与えることは前研究で観察されたが、同一グループの仔を出産させ、生後 4 - 5 週齢で行動学試験を実施すると、中枢神経障害を示唆する結果が得られ、過去の森永砒素ミルク事件における患者の後遺症に類似する所見が得られた。

E. 研究発表

1. 論文発表

山内博、哺乳動物における砒素代謝、*Biomedical Research on Trace Elements*, 11:25-34, 2000

吉田貴彦、山内博、最近の中国における砒素中毒について、*Biomedical Research on Trace Elements*, 11:45-53, 2000.

T. Yoshida, A Study of arsenism via consumption of arsenic contaminated ground water and intervention study in water mitigation in Inner Mongolia、*国立環境研究所研究報告*、166:45-53, 2001.

山内博、吉田貴彦、相川浩幸、網中雅仁、仁藤裕子、吉田勝美、慢性砒素中毒患者における砒素代謝に関する研究、*臨床環境医学*、9: 2, 2000.

齋藤秀、山内博、蓮井ゆり、蔵重淳、

越智宏倫、吉田勝美、ELISA法による尿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの定量法、*臨床検査* 44:913-916, 2000.

山内博、山村行夫、多い中毒・見逃しやすい中毒—診断と治療はこのように行う—砒素中毒、*Medical Practice*, 17:19, 2000.

S. Saito, H. Yamauchi, Y. Hasui, J. Kurashige, H. Ochi and K. Yoshida, Quantitative Determination of Urinary 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OH-Dg) by using using elisa, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 107: nos. 1&2, 2000.

2. 学会発表

GF. Sun, JB. Pi, B. li, XY. Guo, H. Yamauchi, T. Yoshida, Introduction of present arsenic research in China, 4th International Conference Arsenic Exposure and Health Effects, San Diego, 2000.

H. Yamauchi, J. Kinoshita, N. Nagai, K. Shimazaki, M. Kasamatsu, S. Saito, M. Aminaka, and K. Yoshida, Study on the metabolism of arsenic in the patients with acute arsenic poisoning by intake of arsenic trioxide in Wakayama city, Japan, 4th International Conference Arsenic Exposure and Health Effects, San Diego, 2000.

T. Yoshida, H. Yamauchi, H. Aikawa, W. Fujimoto, F. Kayama, GF. Sun, JB. Pi, M. Luster, An intervention study of arsenism in Inner Mongolia by a change of water source, 4th International Conference Arsenic Exposure and Health Effects, San Diego, 2000.

田中とも子、佐藤勉、丹波源男、吉田

貴彦、相川浩幸、山内博、網中雅仁、砒素とフッ素の同時曝露がマウス骨密度と強度に及ぼす影響、日本衛生学雑誌、56:1、212、2001.

山内博、吉田貴彦、相川浩幸、皮静波、熊谷嘉人、網中雅仁、吉田勝美、中国における慢性砒素中毒の改善に関する研究、日本衛生学雑誌、56:1、275、2001.

網中雅仁、山内博、荒井二三夫、仁藤裕子、吉田勝美、慢性砒素中毒患者における砒素曝露中止後の尿中ポルフィリン濃度の動態について、日本衛生学雑誌、56:1、277、2001.

山内博、網中雅仁、吉田勝美、半導体産業における砒素曝露の生物学的モニタリング、産業衛生学雑誌、43:454、2001.

伊藤俊弘、中木良彦、吉田貴彦、山内博、網中雅仁、佐藤勉、田中とも子、相川浩幸、木ノ上高章、飲水を介した砒素およびフッ素の混合曝露が脳内のモノアミンに及ぼす影響、産業衛生学雑誌、43:674、2001.

荒井二三夫、山内博、網中雅仁、仁藤裕子、吉田勝美、健常者 264 名における尿中アンチモン濃度について、産業衛生学雑誌、43:676、2001.

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
急性砒素中毒の毒作用に影響する砒素代謝に関する研究

分担研究者 山内 博 聖マリアンナ医科大学助教授
協力研究者 網中 雅仁 聖マリアンナ医科大学助手

研究要旨 三酸化二砒素摂取後一日目の尿中砒素濃度は 10 名の平均値で 9029 μ g As/g. creatine で、この値は一般健常者の約 200 倍に相当し、急性砒素中毒と判断できるものであった。尿中砒素濃度は時間の経過にしたがい減少し、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、三酸化二砒素の体外排泄には長時間を要した。

尿中砒素排泄パターンについて男女間に差は認められなかった。これに対して、小児と成人における砒素排泄の違いを検討した結果、1-12 歳群は 13 歳以上の群に比較して、三酸化二砒素摂取早期の期間（5 日以内）の砒素排泄は極めて速やかであった。その原因は、本来、三酸化二砒素は体内で 2 回メチル化を受けるが、特に、メチル化砒素からジメチル化砒素への代謝（2 nd methylation）効率の高いことが明らかとなり、すなわち、摂取した三酸化二砒素を排泄の速やかなジメチル化砒素に効率的に変換して尿中へ排泄された。尿中砒素濃度から算出した推定の三酸化二砒素摂取量は、12 歳未満と 13 歳以上では差は存在しなかった。有害な三酸化二砒素が短時間で効率的に對外排泄されたことから、小児の中毒症状は成人に比較して軽度であったことが考えられる。小児の詳細な臨床所見を本報告に記述することは経緯から実施していない。現実的に、小児の症状の回復は成人に比較してはるかに早く、そして、重傷者に認められる末梢神経障害は小児に存在しなかった。

一般的な知見として、小児は成人などに比較して有害因子には弱いとされる傾向があるが、しかし、砒素中毒においては体内での無機砒素のメチル化効率が高く、結果的に代謝物が速やかに尿中排泄し、生体への毒作用の時間が短くなり、健康障害が軽減されるものとする。

A. 研究目的

近年、ヒトと実験動物において無機砒素化合物の代謝研究が開始され、無機砒素はメチル化砒素とジメチル化砒素に代謝される現象が多くの研究で明らかにされた。無機砒素化合物に対するメチル化は毒性軽減の解毒機序であると結論されてきた。ヒトの体内では無機砒素は 2 回メチル化され、第一段のメチル化は無機砒素からメチル化砒

素、そして、第二段はメチル化砒素からジメチル化砒素へのメチル化である。これらの代謝機序の総合的な見解から、メチル化能力の効率は無機砒素の毒性軽減に寄与するものと考えられている。しかし、最近になり、従来の見解に対して疑問の意見が米国環境保護庁（US-EPA）から提示され、無機砒素の毒性はそれ自身ではなく、最初の代謝産物である 3 価のメチル化砒素が最も

強いとする研究結果が報告された。このような背景から、無機砒素曝露者や中毒患者を対象として、無機砒素に対するメチル化の意義について再検討することは極めて重要な研究課題となっている。

本研究は急性砒素中毒患者を対象として、その毒作用に関係する三酸化二砒素の代謝機序に関して性差、年齢などの要因を考慮して解析した。さらに、三酸化二砒素の代謝機序は、急性砒素中毒の症状に影響するかについて研究を試みた。

B. 研究方法

対象者：

平成10年7月25日、和歌山市園部において67名が急性砒素中毒になり、4人が三酸化二砒素摂取約12時間後に死亡した。生存者は63名で男性29名、女性34名である。1-12歳は20名、13-67歳が43名である。

急性砒素中毒の発生機序：

この毒物事件が三酸化二砒素によって発症したことは、63名の急性砒素中毒患者の尿中砒素濃度とその砒素の化学形態、特に、平成10年7月26日採尿の10名の尿中砒素濃度から判断された。患者が摂取したカレーの鍋には、約200gの三酸化二砒素が混入された。その後、混入された三酸化二砒素は調理後の余熱が鍋に存在していたことから、その大部分は溶解したと推測された。この機序の検証に *in vitro* での試験が実施され、その結果から約85%は溶解しうることが推測された。現実的にこの事件において、患者はカレーを摂取して5分から10分後に最初の急性

砒素中毒の症状である嘔吐が出現した。他方、カレーをティースプーンで数口食べた程度で急性砒素中毒の発症は可能であるかについては、カレーに含有していた砒素濃度から判断された。

化学形態別の尿中砒素分析：

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 (山内)。急性砒素中毒患者の尿中砒素濃度の評価は、この事件が三酸化二砒素によって発生したことから、三酸化二砒素とその代謝産物の総和 (IMD; iAs+MA+DMA) で評価し、実測値は尿中 creatine 濃度で補正して求めた。

三酸化二砒素摂取量の推定方法：

報告書の作成に関して下記の条件を満たす計算法を用い、三酸化二砒素摂取量を推定した。

一般的に薬物の摂取量は摂取0日の薬物濃度理論値に分布容積を乗する方法によって算出することが可能である。これは摂取0日の薬物濃度理論値というものが、摂取量を分布容積で除した数値であることによる。本件においては、各患者の推定三酸化二砒素摂取量の算出に用いた尿試料は三酸化二砒素摂取1日目(7月26日)から30日目(8月24日)まで全ての値を用いて、摂取0日の尿中砒素濃度理論値を計算し、分布容積については平均尿量(1.5L/日)を用いた。

尿中砒素濃度は無機砒素とその代謝産物(メチル化砒素、ジメチル化砒素)の総和である IMD 値を用いた。

推定三酸化二砒素摂取量の算出は摂

取 0 日の推定尿中砒素濃度の算出をまず行った。摂取 0 日の推定尿中砒素濃度の算出には、摂取 1 日目の尿試料は 10 検体、5 日目は 7 検体、10 日目は 51 検体、16 日目は 54 検体、23 日は 54 検体、30 日目は 52 検体をそれぞれ用いた。

摂取 0 日の推定尿中砒素濃度の算出には、上述の尿中 IMD 値を対数変換し、各値を図上にプロットした。次に、図上に減衰曲線を当てはめ、摂取 0 日の対数値を回帰曲線から読み取った (図 1)。図上から求めた摂取 0 日の対数値は 4.32 で、この対数値を実数に変換すると 20893 となり、すなわち、推定の尿中砒素濃度は 20.893(21) mg As/g. creatine となる。

上記の値は尿中 creatine 補正された尿中砒素濃度であるが、摂取量に算出には creatine 補正を実測値に戻す必要がある

三酸化二砒素摂取 1 日目から 30 日目までの 313 検体における平均尿中 creatine 濃度は 1.024 mg/L である。

実測値の尿中砒素濃度は 21mg As/g. creatine を尿中 creatine 濃度 1.024 で割ることにより求められ、その値は 20.5 (21) mg/L となる。

推定 0 日の砒素摂取量は、上記で求めた尿中砒素濃度 (21mg/L) に一般的な一日の尿排泄量 1.5 リットルを掛けて算出した。 $21 \times 1.5 = 31.5$ mg (この値 31.5 mg は 63 名から求めた理論的な砒素摂取量である。)

31.5mg の推定砒素摂取量は 63 名を代表する値であり、この値に対して各被験者の尿中砒素濃度を比例式を用いて計算した。例 $31.5 : 9029$ (摂取 1 日目の平均尿中 IMD 値) = $X : 17826$ (あ

る患者の摂取 1 日目の値) すなわち、 X の値は 62mg となる。各被験者の尿中砒素濃度は数点あり、各測定値を同様な方法で計算し平均値を求めた。

求めた値は砒素量であることから、三酸化二砒素の分子量で換算した (1.32 倍)。

C. 結果と考察

急性砒素中毒患者における三酸化二砒素の代謝と尿中砒素排泄

三酸化二砒素摂取後における化学形態別の尿中砒素濃度を表 1 に示した。この事件において、患者の尿採取が事件発生後早期の期間、確実に実施され保存された者は 10 名以内で、その後はほぼ全員が検査日時に採尿された。

三酸化二砒素摂取後一日目の尿中 IMD 濃度は 10 名の平均値で $9029 \mu\text{g As/g. creatine}$ で、この値はきわめて高く、一般健常者の約 200 倍に相当し、特に高値の患者は約 300 倍を示す患者も存在した。図 2 に示したごとく、尿中砒素濃度は時間の経過にしたがい減少し、10 日目で $1148 \mu\text{g As/g. creatine}$ 、30 日目で $160 \mu\text{g As/g. creatine}$ であった。尿中 IMD 値が正常値範囲 ($50 \mu\text{g As/g. creatine}$) に回復したのは摂取後 2-3 ヶ月目であり、三酸化二砒素の体外排泄には長時間を要した。

尿中砒素排泄パターンについて性差別に比較すると図 3 に示したように、男女間に差は認められなかった。これに対して、小児と成人における砒素排泄の違いを検討した結果、図 4 に示したように、1-12 歳群は 13 歳以上の群に比較して、三酸化二砒素摂取早期の期

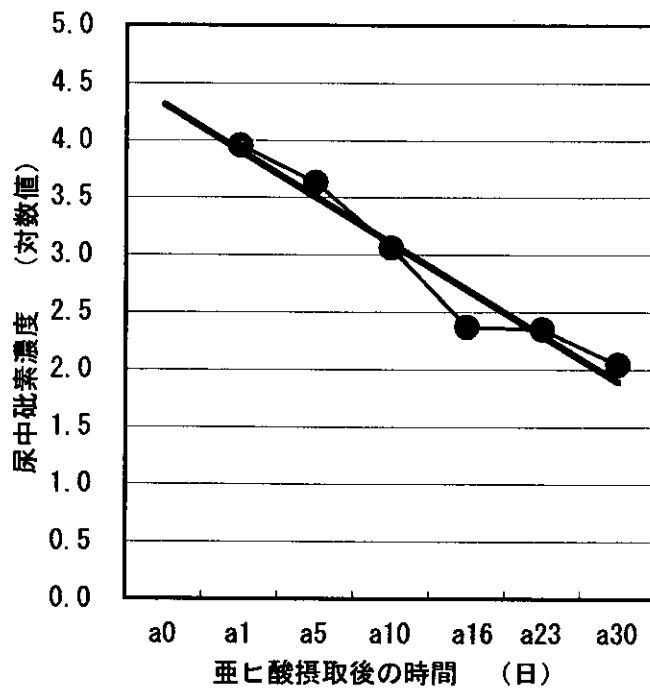


図1 尿中砒素濃度の減衰曲線
(砒素摂取0日の尿中砒素濃度算出)

表1 63名の急性砒素中毒患者における化学形態別の尿中砒素濃度

日数		尿中砒素濃度 $\mu\text{g As/g. cr.}$			
		iAs	MA	DMA	IMD
1	mean	8018	705	306	9029
	S.D.	5715	495	257	6062
5	mean	869	546	2870	4286
	S.D.	318	191	1488	1626
9	mean	196	154	1466	1789
	S.D.	240	147	1230	1375
10	mean	98.5	96.1	948	1148
	S.D.	58.3	81.4	623	703
11	mean	72.7	59.2	576	708
	S.D.	41.8	46.6	299	374
12	mean	63.4	54.6	546	664
	S.D.	37.3	44.1	273	333
23	mean	19.3	19.0	185	223
	S.D.	10.5	14.1	92.2	106
30	mean	11.5	10.3	138	160
	S.D.	7.5	8.7	77.1	87.6
44	mean	7.5	4.4	82.7	94.6
	S.D.	9.7	3.7	44.6	50.3
65	mean	5.0	3.1	52.0	60.1
	S.D.	3.8	2.1	27.7	29.2
91	mean	9.0	2.3	35.5	46.8
	S.D.	5.9	1.7	12.7	12.6

iAs, 無機砒素
MA, メチル化砒素
DMA, ジメチル化砒素
IMD, iAs+MA+DMA

間(5日以内)の砒素排泄は格段に速やかであった。

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三酸化二砒素そのものである無機砒素の比率が高い傾向が認められ、一日目の値では無機砒素が 89%、MA8%、DMA 3%であった。その後、時間の経過に従い三酸化二砒素の最終代謝物である DMA の割合が高くなる傾向が認められた(図 2、5)。

ヒトにおける砒素に対するメチル化の性差や年齢による影響を解明した研究は稀であり、未解決の問題が山積していると思われる。この分野の問題が解決しなかった背景には、集団的な急性砒素中毒患者および慢性砒素中毒患者を対象とした、詳細な研究を行なう機会が存在していなかったことが原因として考えられる。

なお、急性砒素中毒においては肝機能障害が発生することが知られていたが、本事例においても多くの患者に認められた。砒素のメチル化部位は肝臓中とされているが、肝臓の機能を低下させた状態、例えば肝硬変のヒトおよび実験動物でも、無機砒素のメチル化に影響は認められていない(Buchet ら 1984、Takahashi ら 1988)。

メチル化に関する年齢と性差の影響

表 2 に 63 名の急性砒素中毒患者における三酸化二砒素のメチル化に関する 1 st methylation と 2 nd methylation について示した。1 st methylation は無機砒素から MA、2 nd methylation は MA から DMA への代謝を意味している。

三酸化二砒素のメチル化に関して年

齢の違いで評価すると、1 st methylation の効率 は 13 歳以上の群(平均値は 0.70)が 12 歳以下の群(平均値は 0.44)に比較して高い結果が得られた。これに対して、2 nd methylation は 12 歳以下の群(平均値は 17.5)は 13 歳以上の群(平均値は 9.83)に比較して高い結果が得られた。これらの結果は図 6 に示した。次に、性差に関して評価を行った結果、図 7 に示したごとく男女間に違いは認められなかった。

今日、砒素化合物のメチル化にはメチル基供与体として S-アデノシルメチオニン(SAM)が用いられることは、Buchet ら(1985, 1987, 1988)の研究以来、in vivo と in vitro の研究で検証された(Mass、Styblo ら、1995, 1996, 1999、Zakharyan ら)。in vitro の研究から砒素のメチル化には無機砒素およびメチル化砒素化合物に共通して、常に砒素は 3 価の状態が必要であり、この還元反応は GSH が行なっている。GSH の役割を阻害することによりメチル化は進行せず、結果的に砒素の毒性が増加することも知られている(Hirata ら)る。図 8 に示したように、現在は無機砒素のメチル化は二段階式である考えが一般的であり、無機砒素から MA への反応を 1-st methylation、そして、MA から DMA への反応を 2-nd methylation と区別して論じている。

尿中砒素濃度から推定した三酸化二砒素摂取量

63 名の患者について、尿中砒素濃度から推定の三酸化二砒素摂取量を算出した。63 名の推定摂取量を図 9 に示した。63 名の平均値は 53 mg、100 mg 以

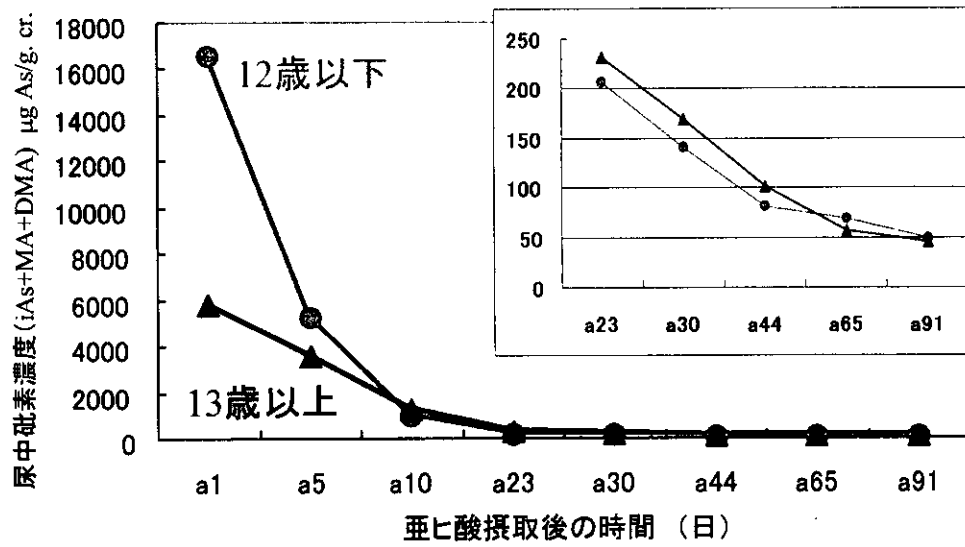


図4 63名の急性砒素中毒患者の年齢別における尿中砒素濃度の経時的変化

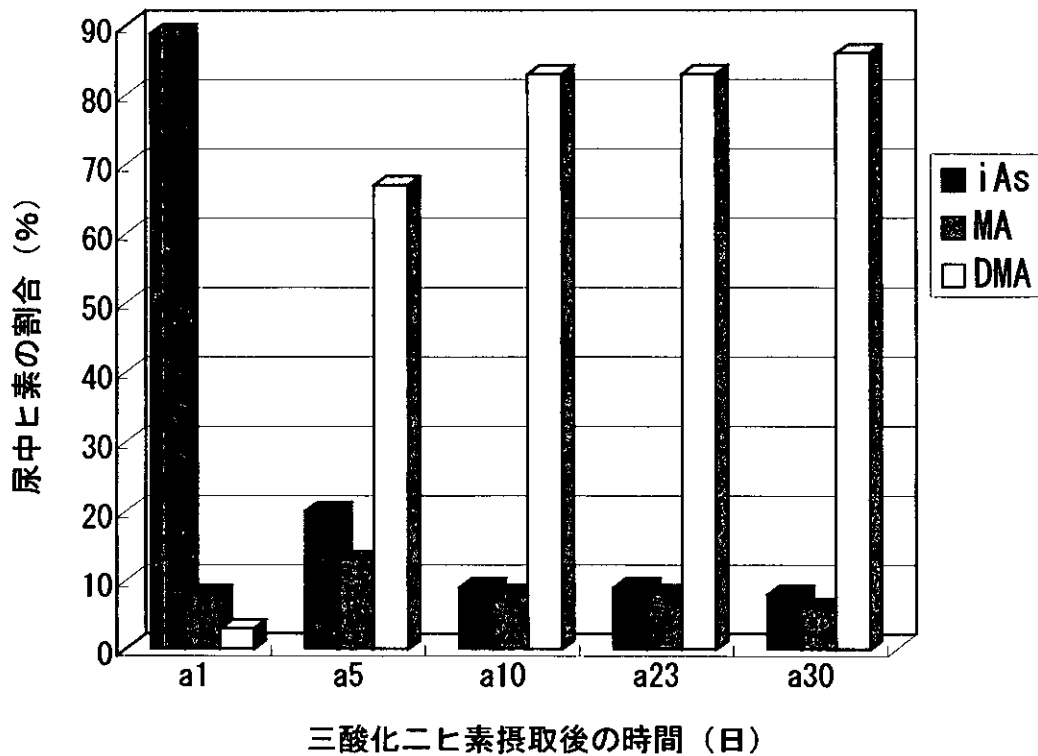


図5 63名の急性砒素中毒患者における化学形態別の尿中砒素濃度の経時的変化

表2 63名の急性砒素中毒患者におけるメチル化能の比較

摂取後の日数	1 st methylation(MA/iAs)		2 nd methylation (DMA/MA)	
	1-12歳	13-67歳	1-12歳	13-67歳
1	0.08	0.10	0.40	0.47
5	0.47	0.78	8.11	3.62
10	0.63	1.05	19.5	8.54
23	0.69	1.08	16.9	8.20
30	0.53	1.01	26.5	11.3
44	0.45	0.63	29.3	16.5
65	0.49	0.67	20.9	15.5
91	0.18	0.30	18.4	14.5

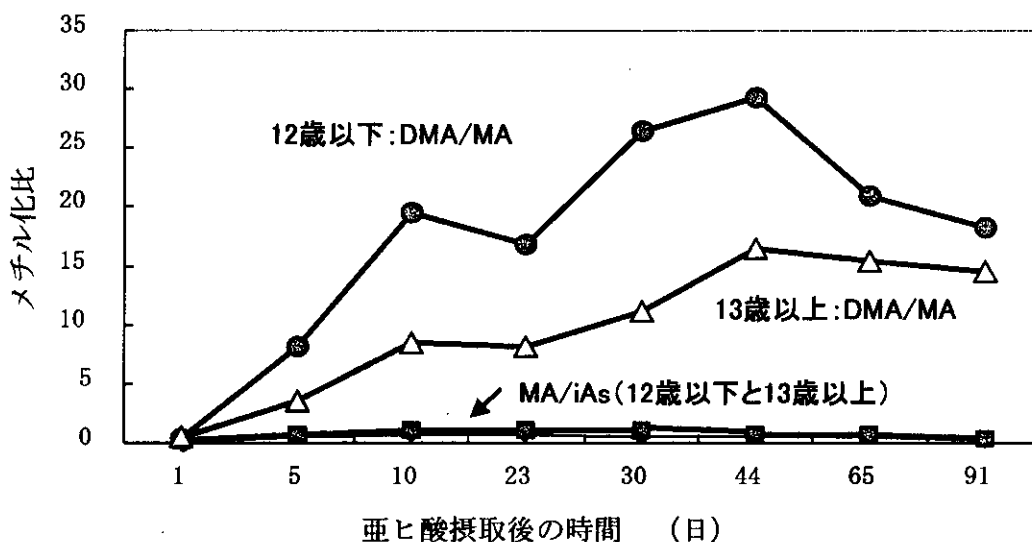


図6 63名の急性砒素中毒患者の年齢別におけるメチル化能の比較

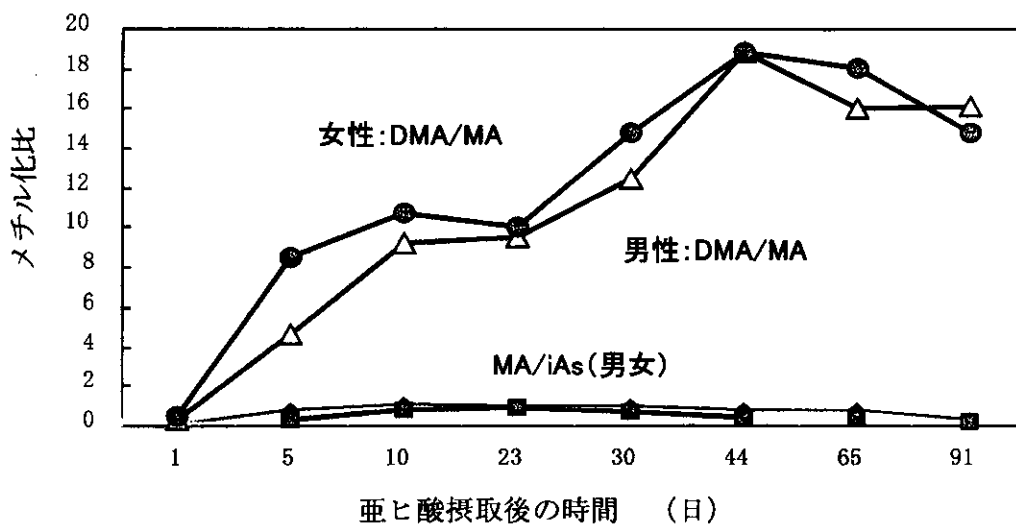


図7 63名の急性砒素中毒患者の性差別におけるメチル化能の比較

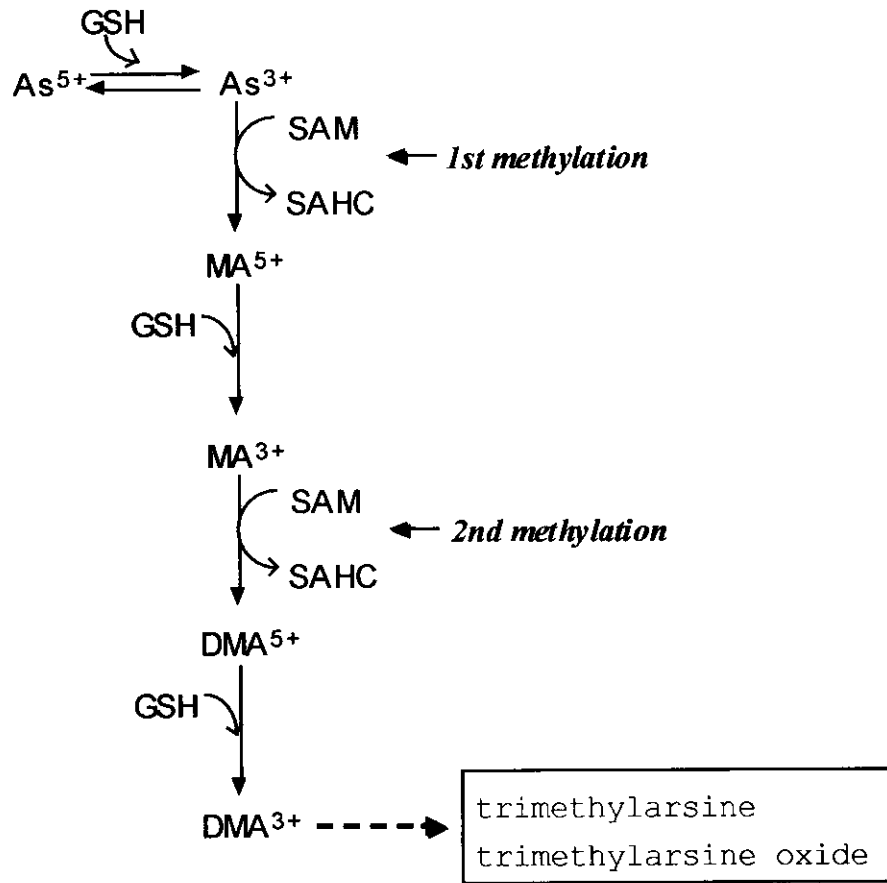


図8 砒素のメチル化機序

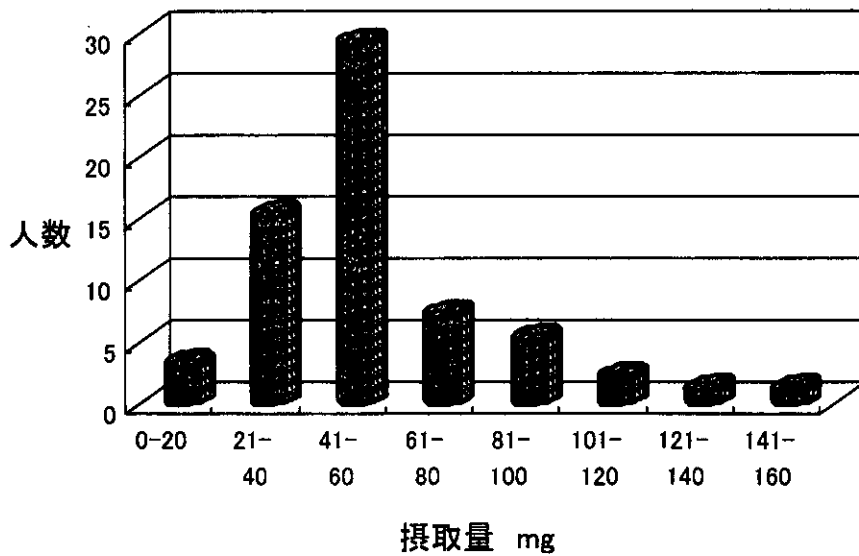


図9 急性砒素中毒患者の推定砒素摂取量

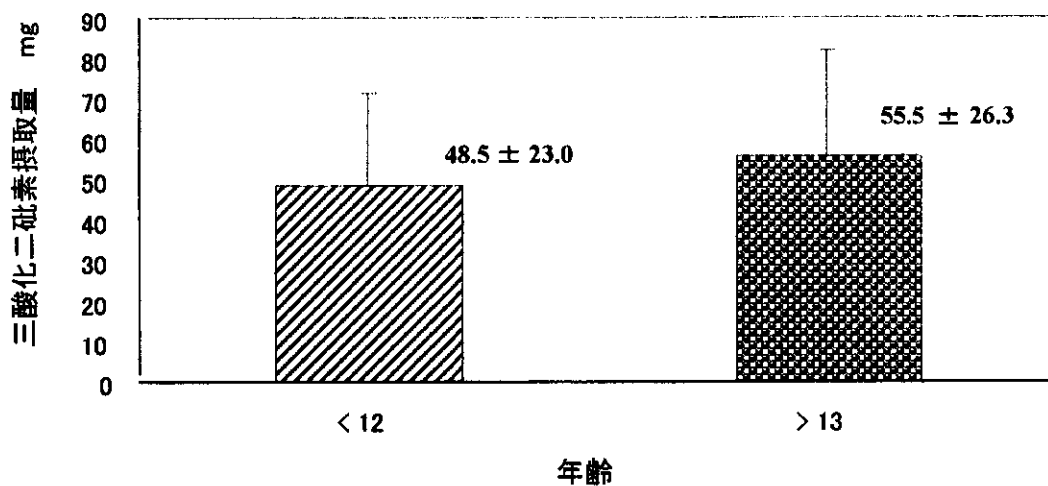


図 10 急性砒素中毒患者の年齢別における推定砒素摂取量

表 3 急性砒素中毒患者における砒素摂取量と血液・生化学検査値との相関関係

	WBC	血小板	GOT	GPT
1 - 12 歳				
血小板	0.73***			
GOT	-0.48*	-0.60**		
GPT	-0.49*	-0.60**	0.99***	
砒素摂取量	-0.44*	-0.48*	0.65***	0.66***
13 - 67 歳				
血小板	0.32*			
GOT	-0.28	-0.34*		
GPT	-0.29	-0.30	0.93***	
砒素摂取量	-0.24	0.07	0.40**	0.42**

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

上が4名、50—99 mgが25名で、このうち、最も三酸化二砒素摂取量の多かった患者の値は141mgで、逆に、最も摂取量の少なかった患者は18mgであった。他方、12歳以下の20名の砒素摂取量は 48.5 ± 23.0 mg、13歳以上43名の値は 55.5 ± 26.3 mgであり、砒素摂取量に大きな違いは存在しなかった(図10)。

三酸化二砒素摂取と生体影響

急性砒素中毒患者に実施した血液・生化学的な検査結果と推定の三酸化二砒素摂取量との関係について検討した。この評価に際しては患者のカルテに記載されていた各種の検査結果を用い評価した。三酸化二砒素は骨髄に対し強い影響を現すことから、三酸化二砒素摂取3—5日後に白血球や血小板値が急速に減少する傾向がある。

また、三酸化二砒素は肝臓に影響することから、GOTやGPTの肝臓系酵素に顕著な上昇変化が摂取約1週間後から認められた。三酸化二砒素摂取量と白血球、血小板、GOT、GPT値との関係を年齢別に結果を表3に示した。三酸化二砒素摂取量と白血球、血小板値の間には有意な負の相関が12歳以下の群に認められたが、13歳以上の群には認められなかった。GOTやGPT値に対する傾向は両群に正の有意な相関関係が認められ、特に、12歳以下の群に顕著であった(図11)。他の検査結果(RBC, Hb, ALP, ChE, LDH, BUN, Cr, その他)に有意な相関関係は認められなかった。

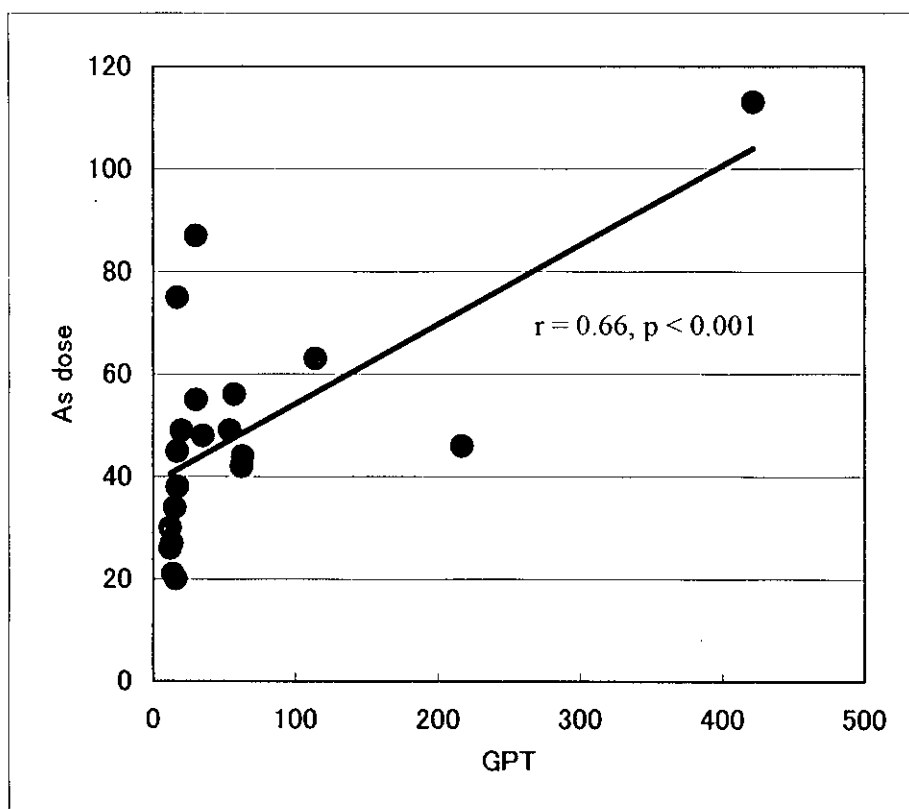


図11 12歳未満の急性砒素中毒患者における砒素摂取量とGPTとの相関関係

文献

Buchet J.P, Geubel A, Pauwels S, Mahieu P, Lauwerys R: The influence of liver disease on the methylation of arsenite in humans. *Arch. Toxicol.*55: 151-154, 1984.

Buchet JP, Lauwerys R: Study of inorganic arsenic methylation by rat liver in vitro: Relevance for the interpretation of observations in man. *Arch. Toxicol.* 57: 125-129, 1985.

Buchet JP, Lauwerys R: Study of factors influencing the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 65-74, 1987.

Buchet JP, Lauwerys R: Role of thiols in the in vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 37: 3149-3153, 1988.

Hirata M, Tanaka A, Hisanaga A, Ishinishi N: Effects of glutathione depletion on the acute nephrotoxic potential of arsenite and on arsenic metabolism in hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106:469-481, 1990.

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.

Hirata M, Tanaka A, Hisanaga A, Ishinishi N: Effects of glutathione depletion on the acute nephrotoxic potential of arsenite and on arsenic metabolism in hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106:469-481, 1990.

Stybło M, Yamauchi H, Thomas DJ: Comparative in vitro methylation of trivalent and pentavalent arsenicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135:172-178, 1995.

Stybło M, Delnomdedieu M, Thomas DJ: Mono- and dimethylation of arsenic in rat liver cytosol in vitro. *Chem. Biol.*

Interact. 5:147-164, 1996.

Stybło M, Del Razo LM, LeCluyse EL, Hamilton GA, Wang C, Cullen WR, Thomas DJ: Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes.

Chem. Res. Toxicol. 12:560-565, 1999.

Takahashi K, Yamauchi H, Yamamoto N, Yamamura Y: Methylation of arsenic trioxide in hamsters with liver damage induced by long-term administration of carbon tetrachloride. *Appl. Organomet. Chem.* 2: 309-314, 1988.

山内 博: 無機砒素曝露の生物学的モニタリングに関する研究. *日衛誌* 49: 973-983, 1995.

Zakharyan R, Wu Y, Bogdan GM, Aposhian HV: Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem. Res. Toxicol.* 8:1029-1038, 1995.