

Fig.5 Relationship between As and V in hair

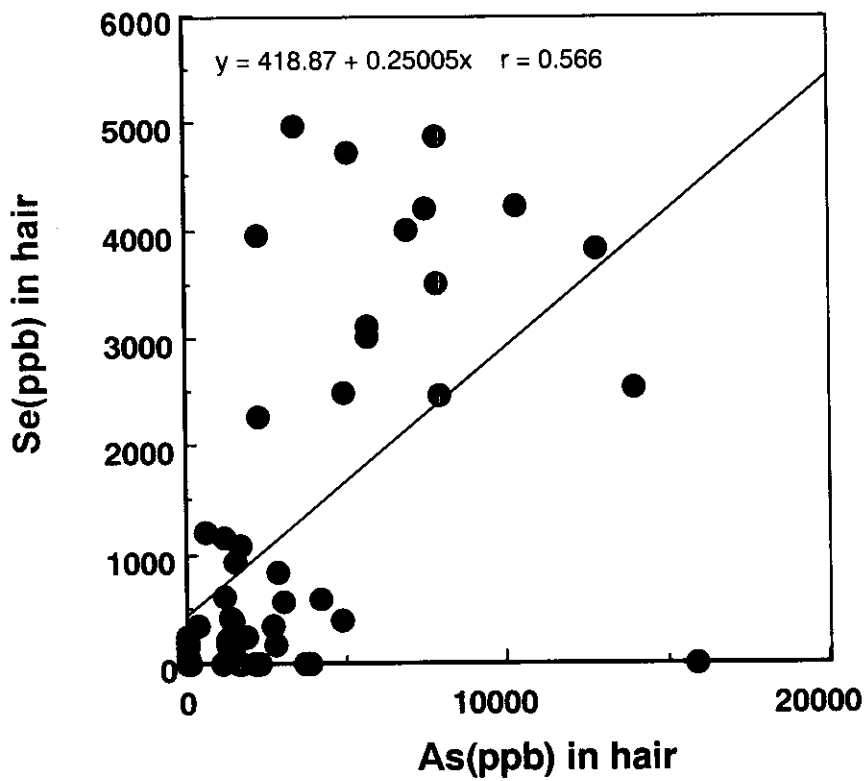


Fig.6 Relationship between As and Se in hair

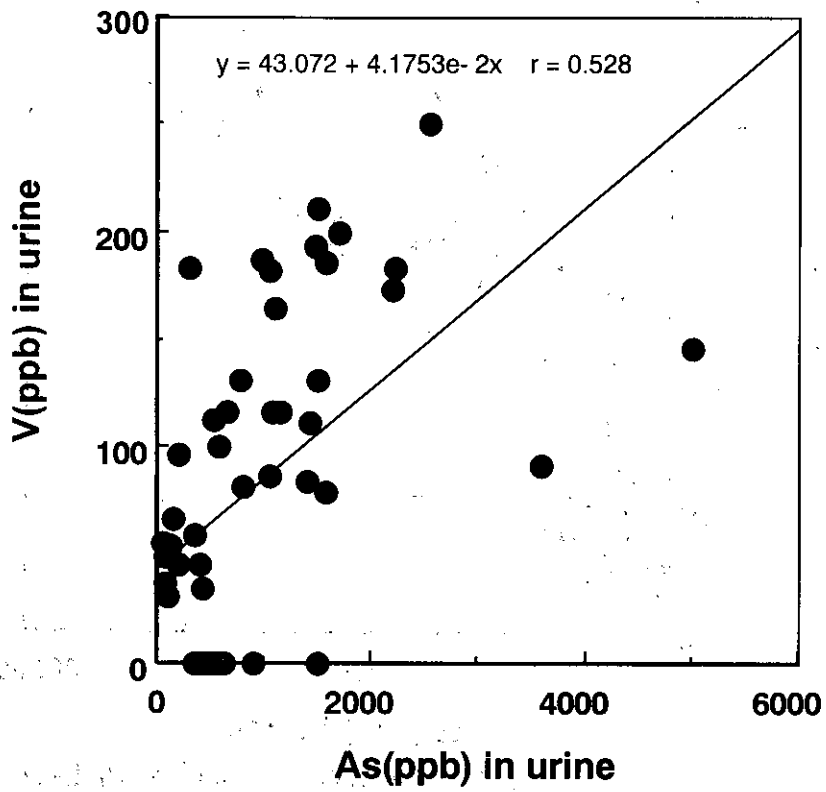


Fig.7 Relationship between As and V in urine

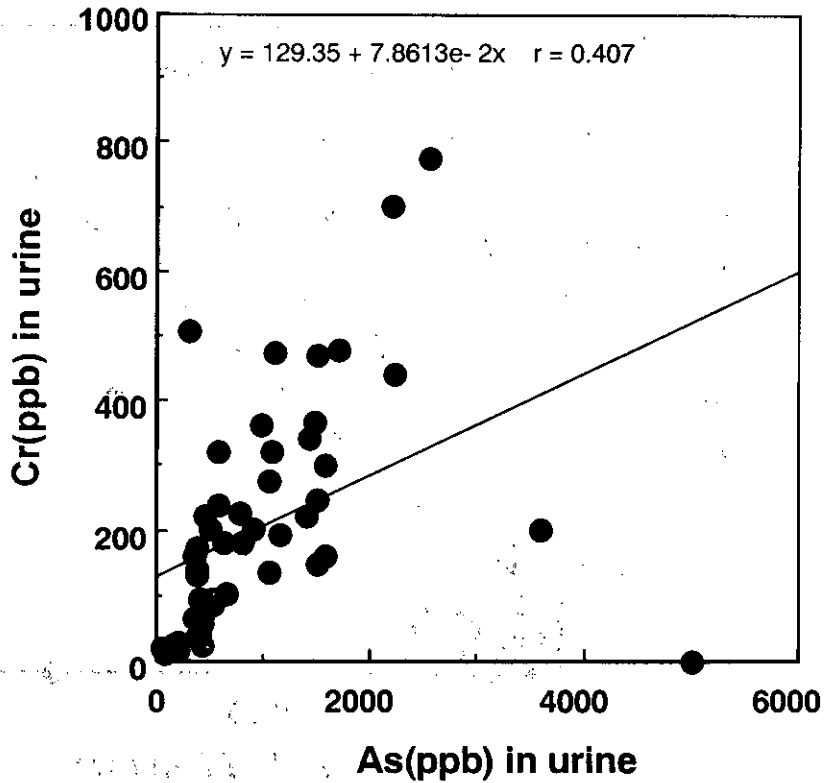


Fig.8 Relationship between As and Cr in urine

## D-2. 尿中の砒素化合物について

尿中の砒素化合物を尿中の代謝物であるMMAとDMAの和とAs(III), As(V), MMA及びDMAのtotal Asの比、即ち、 $(\text{MMA}+\text{DMA})/\text{total As}(\%)$ で比較した。その平均値は83.2%であった。これは、文献などで報告されている尿中のtotal Asと代謝物の(MMA+DMA)の%とほぼ同程度の値を与えていた。しかし、D-3とF-3の男の子(2才及び13才)の場合、27.3及び16.5%であり、明らかに多の人々と違った代謝パターンを示しており、砒素代謝の体内酵素に異常があるものと考察された。以後の検討では、この2人のデータは異常値として取り扱い、解析の結果から除いた。

インドでの飲料水中の砒素の基準は50ppb以下である。F, K及びLの家族は飲料水中の砒素量が23.9, 2.7及び7.3ppbであり、インドの飲料水の砒素基準に適合していた。以前は、これら3家族は砒素濃度の高い飲料水を用いていたが、Dr. Chakrabortiの薦めに従い、飲料水の水源を変更した家族であり、インドでの飲料水の砒素基準以下の水を用いている。しかし、F家族の尿中のtotal AsはK及びLの家族に比較して高い値を示し、飲料水の砒素濃度がtotal As 154ppbとインドの基準を大きく越えている家族と同程度の尿中のtotal Asを示している。F家族は砒素として、他の汚染源が示唆された。

インドの飲料水の砒素基準50ppbを上回る、砒素を飲料水から摂取している家族、A-E、G-I及びJ家族の9家族を対象に尿中の各々の砒素化合物量の関係を検討し、Fig. 9に示した。

As(V)とAs(III), MMAおよびDMAとの相関性がなかった。しかし、砒素の代謝物

であるAs(III)、MMA及びDMAの各濃度との間に関連性 (Fig. 9-4, 9-5, 9-6) が大きい( $P < 0.01$ )ことが明らかになった。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A-EおよびG-Iの家族は、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。

次に、同じ家族は同じ様な砒素曝露の履歴があるとの仮定に基づき、A-Lの家族の中で夫婦を抽出し、それをmale及びfemaleに分け、尿中の砒素化合物について検討し、Fig. 10に示した。

各家族の夫婦間での尿中砒素化合物の濃度は統計的に有意な相関性( $p < 0.05$ )があり、砒素曝露の履歴が同じ場合、尿中への砒素化合物の排泄に関連性があることが示唆された。

同一のtubewellを用いているA-E家族について、年齢と尿中砒素化合物の関係について検討し、Fig. 11に示した。Fig. 11には、年齢と尿中の(MMA+DMA)の量とTotal Asとの関係を示しているが、その他の関連性は認められなかったため、Fig. 11に示していない。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。

飲料水中の砒素濃度と尿中のAs speciationの関連性について検討し、Fig. 12に示した。As(III)、MMA、DMAおよびTotal Asの濃度と飲料水の砒素濃度の間に有意( $p < 0.05$ )な相関性が観察された。

尿採取は1回の尿を通常採取している。同一人が24時間で排出する尿中の砒素化合物の量と1回の採取で得られた尿中の砒素化合物の量との違いを検討するた

め、各家族から1~3名の成人男子を選び、24時間尿を採取し、1回採取尿との関連性を調べ、Table 9に示した。1人当たりの24時間の尿量は約2.5 lであった。各砒素化合物の同一人での1回採取尿での値と24時間尿での値を検討した。

1回採取尿での値の平均値と24時間採取尿での値の平均値の間には、統計的に有意な差が観察されなかった。そのため、次回の尿採取の場合は1回の尿採取で十分なデータが得られることが分かった。

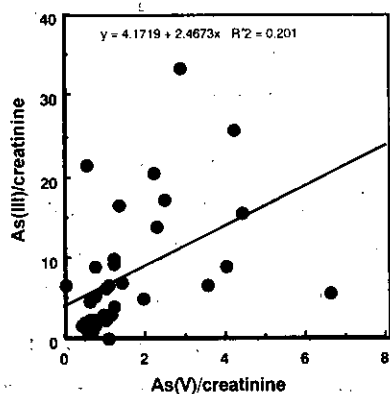


Fig.9-1 Relationship between As(V) and As(III) in Urine from A- E and G- I Families

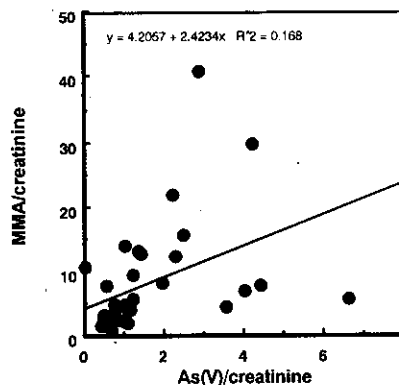


Fig.9-2 Relationship between As(V) and MMA in Urine from A- E and G- I Families

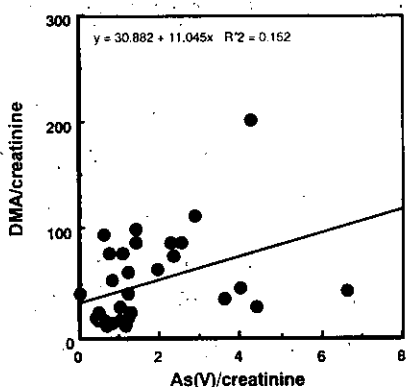


Fig.9-3 Relationship between As(V) and DMA in Urne from A- E and G- I Families

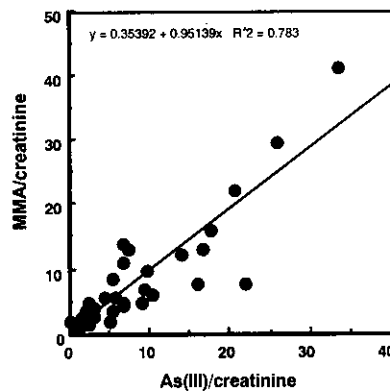


Fig.9-4 Relationship between As(III) and MMA in Urine from A- E and G- I Families

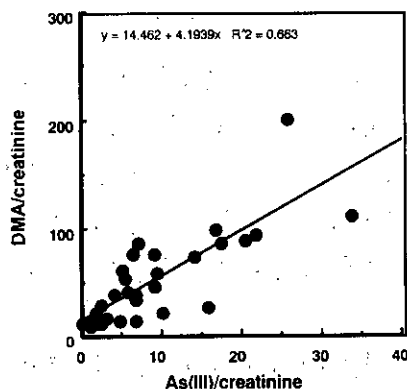


Fig.9-5 Relationship between As(III) and DMA in Urine from A- E and G- I Families

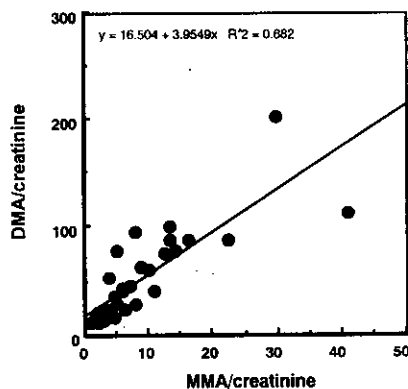


Fig.9-6 Relationship between MMA and DMA in Urine from A- E and G- I Families

Fig.9 Relationship between Each Arsenic Speciation in Urines from A-E and G-I Families

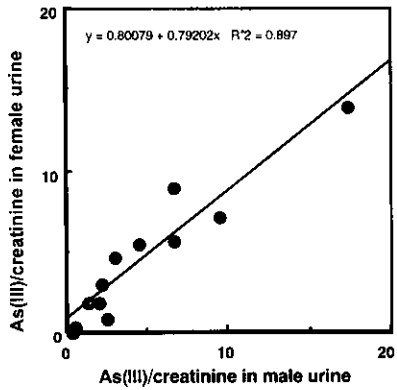


Fig.10 - 1 Relationship between As(III) in Male and Female Urine

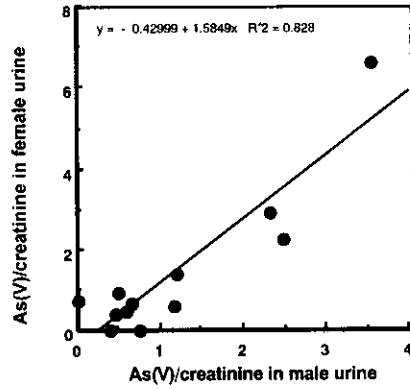


Fig.10 - 2 Relationship between As(V) in Male and Female Urine

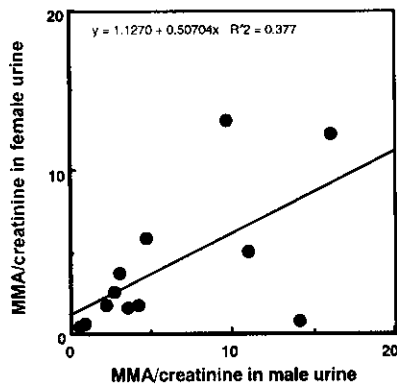


Fig.10 - 3 Relationship between MMA in Male and Female Urine

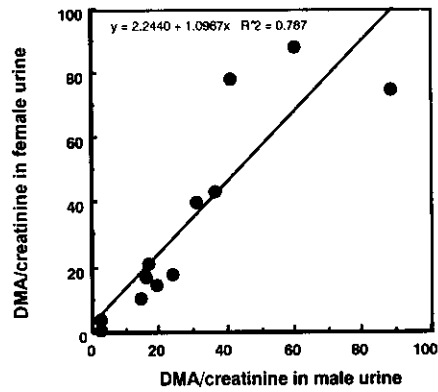


Fig.10 - 4 Relationship between DMA in Male and Female Urine

**Fig.10 Relationship of As Speciation between each couple in Families**

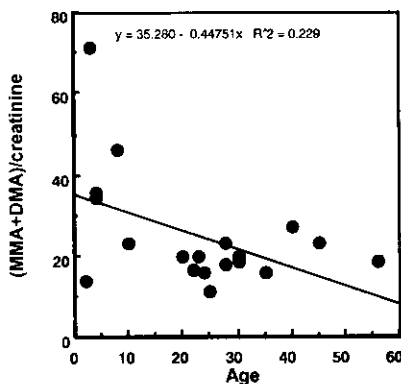


Fig.11 - 1 Relationship between Age and (MMA+DMA)/creatinine in A- E Families using the Same Tubewell

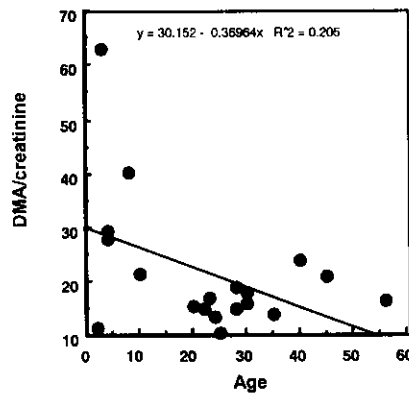


Fig.11-2 Relationship between Age and Total Arsenic in A- E Families using the Same Tube well

**Fig.11 Relationship between Age and As Speciation from A-E Families**

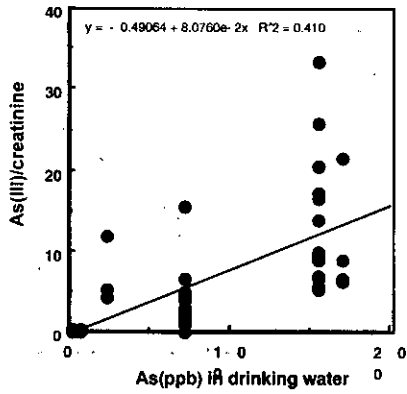


Fig.12- 1 Relationship between As(ppb) in Drinking Water and As(III) in Urine

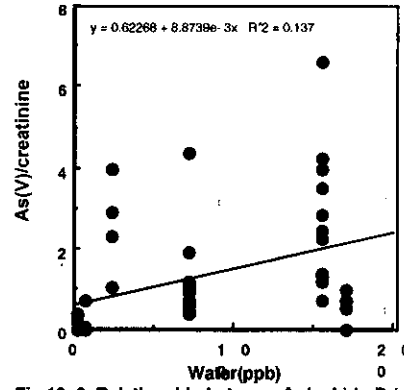


Fig.12- 2 Relationship between As(ppb) in Drinking Water and As(V) in Urine

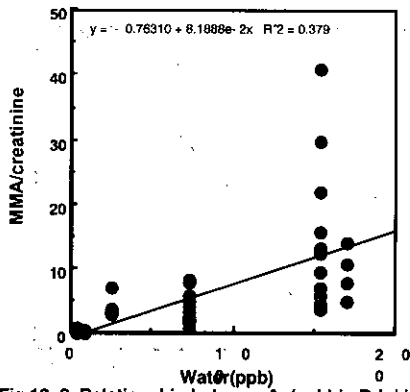


Fig.12- 3 Relationship between As(ppb) in Drinking Water and MMA in Urine

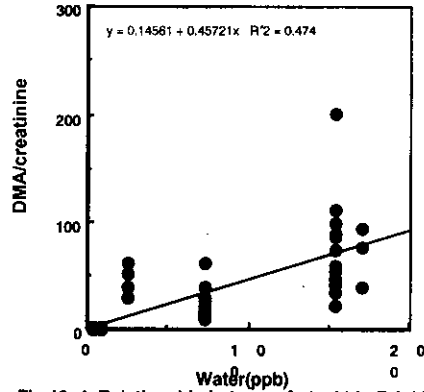


Fig.12- 4 Relationship between As(ppb) in Drinking Water and DMA in Urine

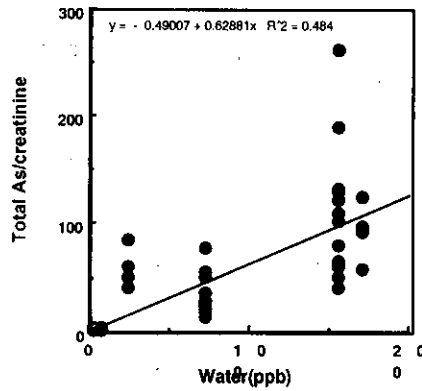


Fig.12- 5 Relationship between As(ppb) In Drinking Water and Total As in Urine

Fig.12 Relationship between As(ppb) in Drinking Water and Total As in urine

**Table 9 As Speciation in One-spot and 24-hour Urines from Male.**

	age	As(III)	As(V)	MMA	DMA	Total As
A1	40	1.9	0.5	3.5	23.9	29.8
B1	35	2.4	0.6	1.7	14.1	18.8
C1	30	2.1	0.5	2.6	16.2	21.4
D1	28	3.0	1.2	4.1	18.9	27.2
E1	56	1.2	0.6	2.2	16.5	20.5
E3	24	2.3	0.8	2.5	13.8	19.4
E4	28	1.6	0.7	2.7	15.2	20.2
F1	45	4.4	2.3	2.9	30.8	40.4
G1	40	9.4	1.2	9.7	60.2	80.5
H1	55	17.3	2.5	16.0	88.5	124.3
H6	26	10.1	1.2	6.1	23.4	40.8
I1	48	6.6	3.5	4.6	36.4	51.2
J1	32	6.6	0.0	10.9	41.1	58.6
<b>Av</b>		<b>5.3</b>	<b>1.2</b>	<b>5.3</b>	<b>30.7</b>	<b>42.5</b>

	As(III)	As(V)	MMA	DMA	Total As
A1(24 hours)	1.2	6.0	1.5	1.2	9.9
B1(24 hours)	1.8	5.6	0.2	0.8	8.5
C1(24 hours)	3.9	0.8	2.8	10.7	18.1
D1(24 hours)	0.9	0.8	1.4	5.8	8.8
E1(24 hours)	0.6	0.8	0.9	8.2	10.6
E3(24 hours)	1.7	0.5	1.8	11.0	15.0
E4(24 hours)	1.3	0.4	1.6	8.8	12.1
F1(24 hours)	2.4	0.2	1.7	21.3	25.7
G1(24 hours)	4.3	4.3	7.4	44.0	59.9
H1(24 hours)	22.1	2.1	13.6	101.7	139.6
H6(24 hours)	23.1	2.8	15.4	53.2	94.6
I1(24 hours)	8.1	3.6	6.9	53.0	71.6
J1(24 hours)	9.4	0.6	7.0	19.2	36.3
<b>Av</b>	<b>6.2</b>	<b>2.2</b>	<b>4.8</b>	<b>26.1</b>	<b>39.3</b>

## E 結論

砒素の体内動態及び生体影響を研究することを目的に大規模な地下水の砒素汚染が報告されているインド共和国西ベンガル州のガンジス川流域のデルタ地帯を訪れ、地下水を飲料水として用いている住民で既に砒素による被害が現れている家族を対象に飲料水、各家族の尿、毛髪を採取した。得られた試料中の砒素を含む17元素を硝酸・過酸化水素水混液(3:1)の溶液中でmicrowave ovenで疎解した後、ICP-MS装置で定量を行った。また、尿中砒素の代謝物の測定をHPLC/ICP-MS装置で測定した。平成12年12月4~7日、インド共和国西ベンガル州Mushidadad地区を訪れ、地下水の砒素汚染地域で地下水を飲料に供している家族12家族で構成員数は51人の調査を行った。男女の内訳は男性26名、女性25名であり、13才未満の子供は18名であった。飲料水中の砒素濃度は2.7~154ppbの範囲であった。インドの飲料水の砒素基準は50ppb以下であるが、砒素濃度が50ppb以下の水を飲料水としてい

る家族は、砒素による被害が皮膚などに現れた時点で井戸を別に新設した家族であった。飲料水中に10 $\mu$ g/g以上を含まれる元素はFe, Mn, Mg, Cu, Zn及びPbであった。毛髪中の砒素濃度は0~16 $\mu$ 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。

次に、尿中砒素化合物の検討を行った。砒素代謝に関連する化合物として、As(III), As(V), MMA及びDMAを対象とした。それ以外に、アルセノコリン、アルセノベタイン等があるがヒトでの代謝物でないため測定対象から除外した。一部の家族から採取した尿から微量なアルセ

ノベタインを検出できた。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、明らかに他の人と違った代謝パターンを示し、砒素の代謝物の生成能 (メチル化能) に異常がでていることが示唆された。インドの飲料水中の砒素の基準 (50ppb) 以上の砒素を飲料水から摂取してる9家族のインドの飲料水中の砒素の基準 (50ppb) 以上の砒素を井戸水から摂取してる9家族を対象に検討を行った。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 ( $P < 0.01$ ) 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 A-E および G-I の家族は、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。それら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ところ、各代謝物とも男女間に有意な相関性があり、同じ夫婦の男性尿中の砒素の代謝物濃度が高い場合には女性の尿中の砒素の代謝物が高いことが観察された。



**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**  
**急性砒素中毒ラットから出産された仔の脳障害に関する研究**

分担研究者 相川 浩幸 東海大学医学部講師  
分担研究者 吉田 貴彦 旭川医科大学教授  
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** 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、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。以上の実験結果より、胎児期の後期に無機砒素曝露を受けた場合に、脳組織障害が発生し、出生後に行動抑制が発生し、過去の中毒事例の後遺症を示唆する結果であった。

**A. 研究目的**

これまで、無機砒素化合物の曝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 (Lawson and Cattanaach, 1925; Schoolmeester et al., 1980; Massey and Heyman, 1984)。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。その上、胎児の症例報告はほとんどが死亡例であった (Frank and Frank, 1923; Lugo et al., 1969)。代表的な事例として、1955 年、日本で発生した森永ドライミルク事件が有名である。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曝露による脳障害が指摘されていた (Yamashita et al., 1972; Mizukawa et al., 1988)。

1998 年、日本の和歌山市において三酸化二砒素の摂取による 67 名の急性砒素中毒患者が発生し、4 人が死亡した。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 (Yamauchi, 1999)。

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(Das et al., 1995)、バングラディシュ(Chowdhury, 1999; Tondel et al., 1999)、タイ(Choprapawon, 1995; Piamphongsant, 1999)、中国(Lianfang and Jianzhong, 1994; Yamauchi et al., 1997; Yoshida and Yamauchi, 2000)などのアジア諸国、そして、メキシコ(Zaldiver, 1974; Cebrian et al., 1983, 1994)、チリ(Hopenhayn-Rich et al., 1996)、アルゼンチン(Chocha et al., 1998)など中南米地域では、井戸水の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(Grandjean et al., 1995; Ihrig et al., 1998; Concha et al. 1998)。そして、高濃度な無機砒素曝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。無機砒素曝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(Siripitayakunkit et al., 1998)。

胎児期及び小児期の脳-血液関門が未発達段階での無機砒素曝露による神経精神障害については、散発の臨床報告はされていたがそれについて認識されておらず、これまで、胎児期の無機砒素曝露による精神神経障害に強い関心は示されていなかった。

従来、無機砒素化合物に関する催奇性試験から、脳を中心とした奇形として無脳症、脳露出症などが主な報告であった(Ferm et al., 1967, 1971, 1977, 1985; Holmberg and Ferm, 1969; Hood et al., 1972, 1978, 1982; Khalman and Ferm,

1967; DeSesso et al., 1998)。しかし、これらの実験で用いられる砒素投与量は多量であり、急性や慢性砒素中毒を想定した研究領域は殆どなく、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。

我々は、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、胎児の脳障害を評価するのにアポトーシスのTUNEL染色を用いて実験を行ったところ、三酸化二砒素投与群の胎児にアポトーシス細胞の出現を認めた。この結果より、出生後の胎児に脳障害が出現する可能性が示唆された。本研究においては、胎児期に三酸化二砒素を曝露した胎児が出生後にどのような障害を発生するかについて、動物実験モデルでの行動学的評価を行った。

## B. 研究方法

### 動物

行動学用の動物は、妊娠SSPF/VAF rat (Crj: Wistar) (Charles River Japan Inc., Yokohama, Japan)を使用した。妊娠17日目に三酸化二砒素のLD50 1/4量8.5mg/kgを一回経口投与した。その後は通常に自然分娩させ、出産させた胎仔は生後3週目に雌雄各4匹ずつの計8匹に揃えた。生後28日目に離乳させ、雌雄各4匹で実験終了まで飼育した。行動学の対照には、無処理で自然分娩させ、上記条件と同様に動物数を揃えた。最終的に行動学での使用動物数は、三酸化二砒素投与群は雄21匹、雌18匹、合計39匹、対照群は雌雄各15匹、合計30匹とした。

## 砒素分析

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°C 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—還元気化—原子吸光光度計で測定した。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、この論文では一括して 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。

## Open-field 試験

測定装置は Petit ら (Petit and Alfano, 1979) の Open-field を改良した装置を本実験に使用した (図 1)。黒の亚克力板を用いて、縦横 1 m、周囲を 40 cm の壁で囲み、さらに壁側の一部に 17 x 25cm のスタート箱を設け、フィールド内部を一辺 25 cm で 16 分割した自作装置である。

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、すなわちスタート箱からフィールドに出るまでの時間 (潜伏時間)、歩行量 (25 cm の線を四肢が交差した時を 1 とする)、立ち上がり回数 (両前肢が床より離れた時を 1 とする)、毛繕い回数、洗顔回数、脱糞回数、排尿回数を観察し、各行動毎に時間または回数を記録した。

表 1 ラット母獣と胎仔における脳中砒素の化学形態別濃度

Group	Concentrations of arsenic in brain (ng As / g wet wt.)			
	iAs	MA	DMA	IMD
Mother				
control	1.76±0.61	2.41±1.40	8.57±1.43	12.7±0.68
12h	8.03±1.05**	3.15±1.16	8.80±3.22	20.0±5.23
24h	2.12±1.14	1.30±0.85	8.78±4.76	12.2±5.77
48h	3.03±0.26	1.67±0.56	8.84±4.12	13.5±4.33
Fetus				
control	2.33±0.91	1.92±0.59	3.69±0.71	7.94±1.38
12h	5.03±1.37**	2.38±0.78	16.7±4.90***	23.7±5.18***
24h	2.87±0.89	2.49±0.76	18.5±3.18***	23.9±3.04***
48h	3.18±0.63	2.68±1.01	18.2±4.76***	24.0±5.75***

Arsenic concentrations in brain tissue were obtained from three mother rats and 6 fetuses in each group. Value: mean±standard deviation.

iAs: inorganic arsenic; MA: methylated arsenic; DMA: dimethylated arsenic;

IMD: iAs+MA+DMA. Significance in each group is in comparison with control values: \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01 and \*\*\*, p < 0.001.

## 自発行動量の測定

測定は生後5週齢に行った。電磁誘導を発生させ、動物がその磁力線を横切るとカウント（運動量）される MK-Animex 装置 (SE-type: 室町科学株式会社; 東京) の上に、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。なお、記録はハンドリングや探索行為がなく、安定した後半24時間とした。明暗条件は飼育条件と同様に、8:00-20:00を明期、20:00-8:00を暗期とし、測定中も自由に給水給餌とした。

## 解析方法

Open-field test の結果には、関連のない2群間の t 検定を行った。また、自発行動量の結果には関連のない2群間の t 検定と ANOVA の検定を行った。

## C. 結果

### 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,  $p < 0.001$ )。

表2 出産後4週齢時におけるラットの open-field 試験結果

group	squre crossing	rearing	grooming	preening	defecation	urination	latency time
As-M	30.5 ± 17.7***	19.9 ± 6.3	0 ± 0.2	1.9 ± 1.5	1.4 ± 1.5	0.6 ± 0.8	29.1 ± 38.4**
As-F	26.2 ± 19.1***	15.1 ± 7.5*	0.5 ± 1*	2.5 ± 1.7	1.8 ± 1.7	0.5 ± 0.7***	41.2 ± 63.3***
Cont.-M	51.5 ± 17.5	20.4 ± 8.5	0.1 ± 0.3	2.5 ± 2	1.8 ± 1.4	0.3 ± 0.5	7.8 ± 7.2
Cont.-F	57.6 ± 22.9	19.6 ± 7.3	0.1 ± 0.2	1.8 ± 1.2	1.7 ± 1.4	0.9 ± 0.9	3.8 ± 3.1

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



図1 Petit 改良法での open-field 試験の風景

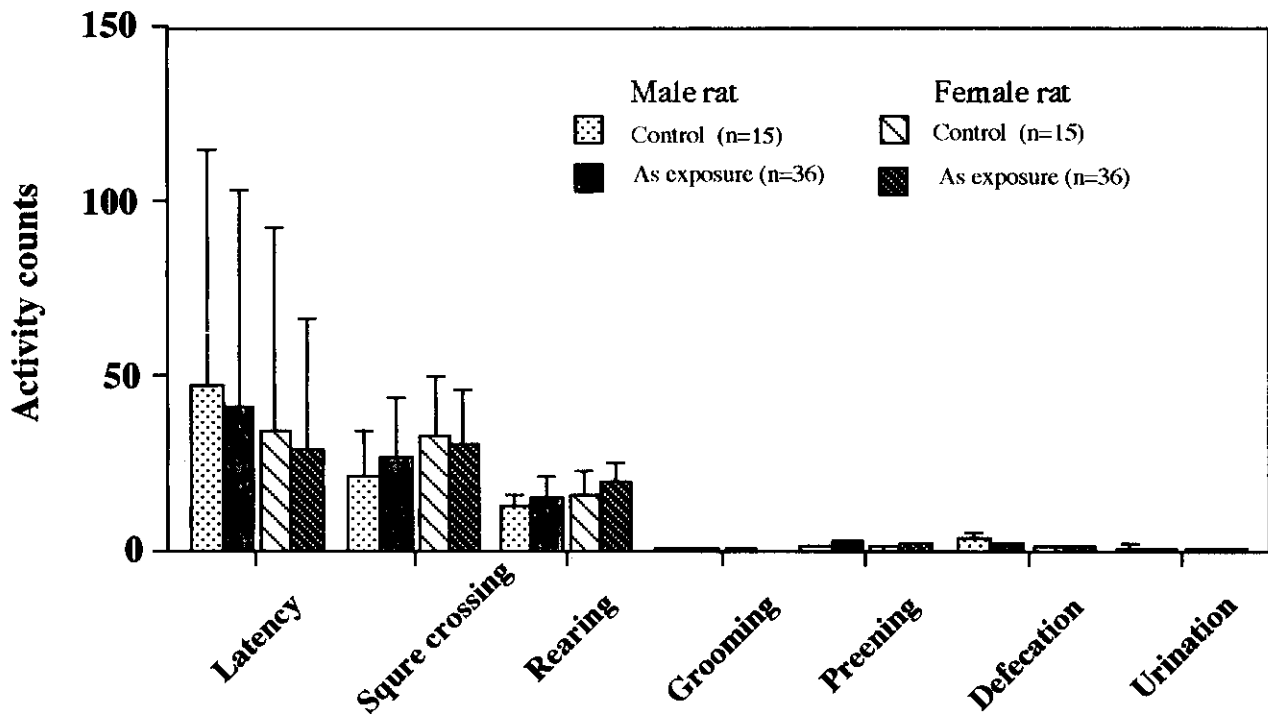


図2 出産後4週齢時と対照群におけるラットの open-field 試験結果

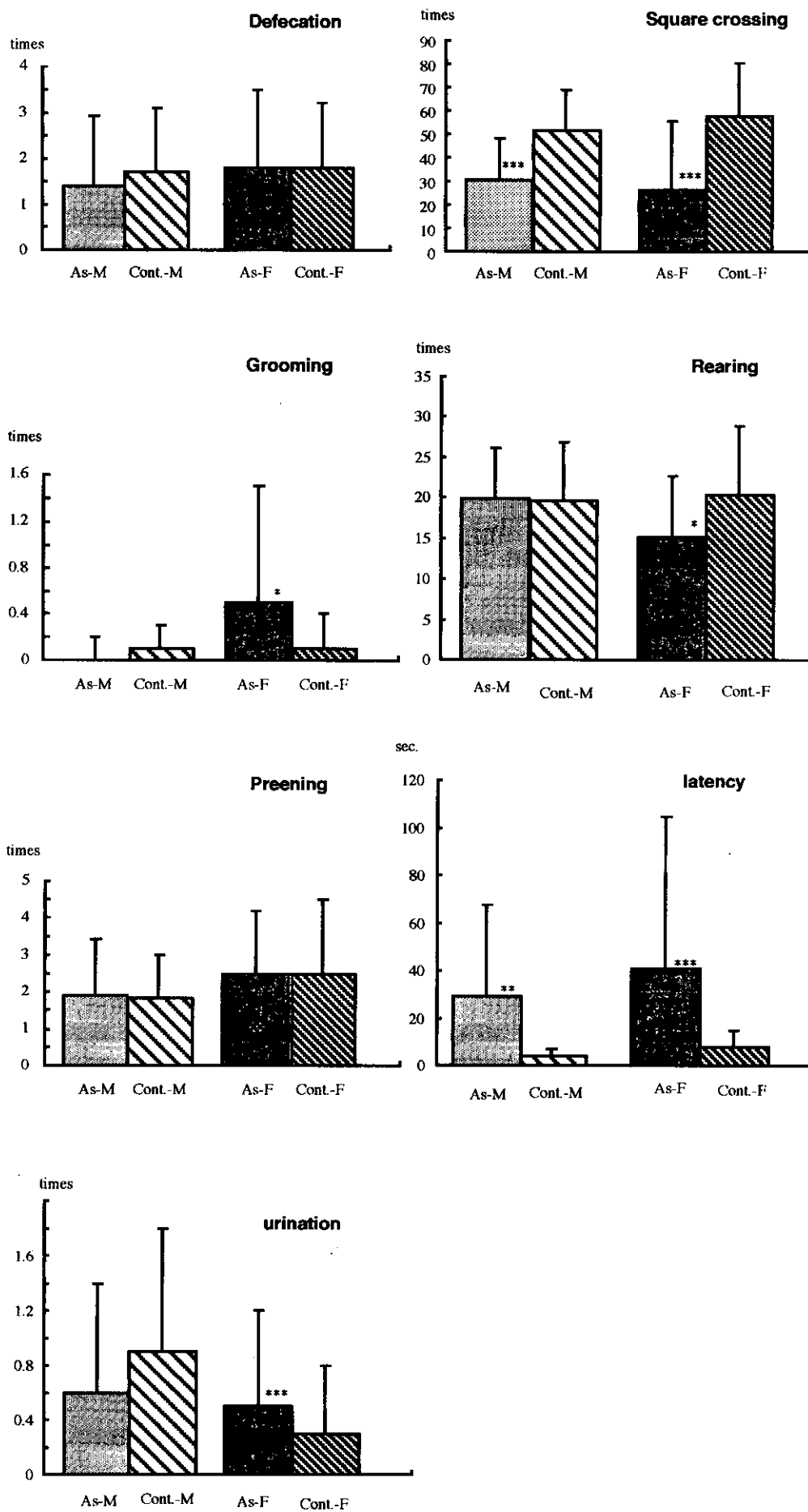


図3 出産後4週齢時と対照群におけるラットのopen-field試験結果

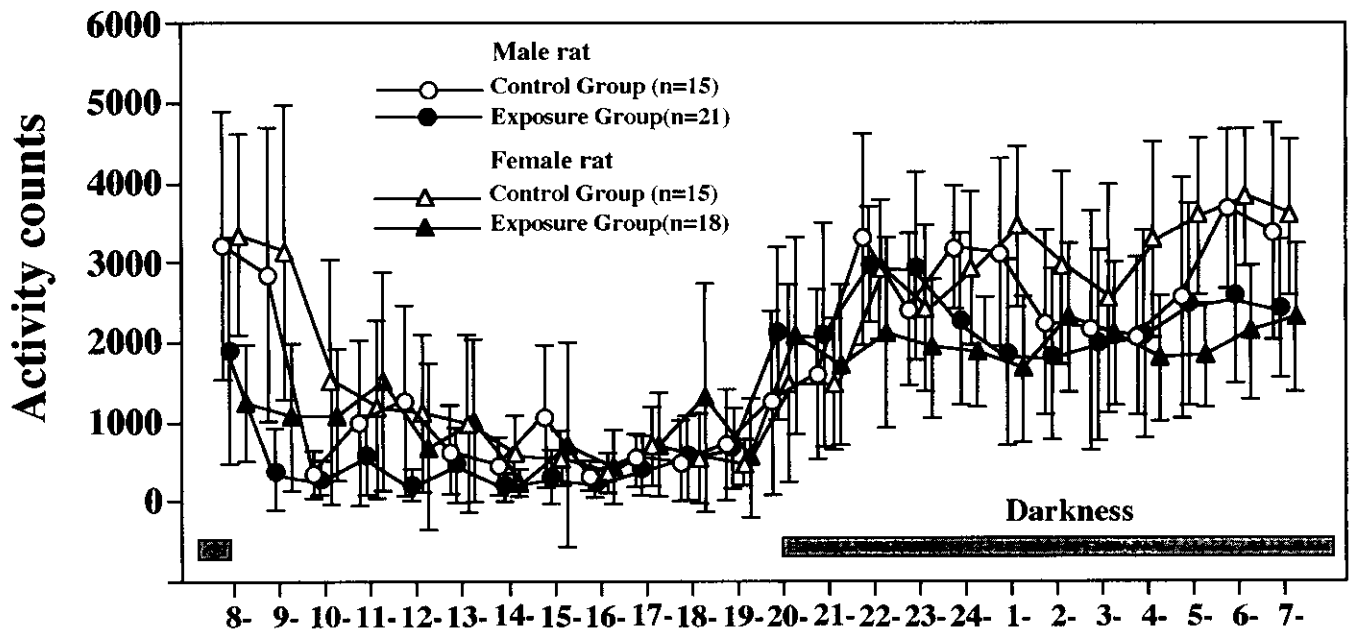


図4 出産後5週齢時と対照群におけるラットの自発運動量試験

表3 出産後5週齢時と対照群におけるラットの自発運動量の統計検定

	T-test			ANOVA
	♂	♀	As と cont.	
20:00	0.0387	2E-01	0.0381	0.8451
21:00	0.2634	5E-01	0.0181	
22:00	0.4301	5E-02	0.0677	
23:00	0.1685	2E-01	0.7175	
0:00	0.0121	4E-03	0.0004	
4:00	0.9463	1E-03	0.0257	0.0030
5:00	0.8488	2E-05	0.0066	
6:00	0.0077	1E-05	8E-07	
7:00	0.0312	1E-03	0.0002	
8:00	0.0261	2E-05	4E-06	

## 行動学

### Open-field 試験

Open-field test の 7 観察項目のうち、三酸化二砒素投与群と対照群の二群間を比較すると次の結果であった (表 2、図 2, 3)。三酸化二砒素投与群では、歩行量の減少 (t-test,  $p < 0.001$ ) と潜伏時間の延長 (t-test,  $p < 0.001$ ) が見られた。立ち上がり回数、毛繕い回数、洗顔回数、脱糞回数、排尿回数に関しては、二群間で統計学的な有意差は示されなかった。このうち、三酸化二砒素投与群の雌において、立ち上がり回数の減少と毛繕い回数の増加傾向が認められた (t-test,  $p < 0.05$ )。

### 自発行動量

Animex による自発運動量の測定では、三酸化二砒素投与群と対照群の休眠期の活動に差は認められなかった (表 3、図 4)。しかし、活動期では三酸化二砒素投与群は午前 4:00—午前 8:00 の時間帯での活動量の減少を認めた (t-test,  $p < 0.01$ , ANOVA 0.0030)。

## D. 考察

胎児期に急性砒素曝露を受けた場合に、胎児および小児において脳障害が発生するか否かについて、妊娠動物を用いて検証を試みた。研究は段階的に砒素曝露と脳内砒素蓄積性の動態、砒素曝露と組織的障害、そして、行動学的な評価に関して、本研究では Open-field test と自発行動量の測定結果から評価を実施した。

従来、無機砒素中毒で中枢神経障害の発生は、医薬品として使用された有機砒

素化合物に比較して、重大な懸念は持たれていなかった。さらに、胎児期での曝露についての影響は殆ど研究がされていなかった。一方、森永ドライミルク事件による乳児の後遺症として中枢神経障害の発生の危惧が以前、一部の医療関係者で議論された (Yamashita et al., 1972; Mizukawa et al., 1988)。

本研究に関連して、妊娠ラットに一回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が発生することは apoptosis 細胞の出現により明らかとなり、しかし、この現象は母体のラットの脳組織に認められないものであった (仁藤ら、2000)。この時、胎仔の脳組織に認められた過剰な apoptosis 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。母体のラット脳中砒素濃度は極めて一過性に上昇し、直ちに減少した。

これに対して、胎仔の脳中砒素濃度は母体に比較して約 4-5 倍の高値となった。

我々は胎仔の脳中砒素により組織障害が発生する事実を実験的に証明したことにより、次段階の解明課題として、出生後の脳障害に関して検討を実施した。この時、検査時期はヒトの年齢として 5-7 歳を念頭に置いた。これは森永砒素ミルク事件における最初の児童への検査時期に対応させたものである。

中枢神経障害の指標として行動学的は評価を行った。Open-field 試験の結果、三酸化二砒素投与群では歩行量の減少と潜伏時間の延長が認められ、動物が顕著に不安状態を表した結果と判断された。



次に、Animex による自発行動量の測定でも、通常、日内変動は二峰性になるが、三酸化二砒素投与群の動物では一峰性を示し、明確な活動量の減少が認められた。すなわち、この2つの行動学的な結果より、胎児期に三酸化二砒素に曝露された動物は、ヒトの年齢で5-7歳時において、脳障害から動物の活動の顕著に抑制されることが明らかとなった。この結果は、森永砒素ミルク事件の追跡調査での結果と同様であり、鬱病や不安神経症などの行動抑制の結果に一致するものであった。

今日、飲料水（井戸水）の無機砒素汚染からの地球規模での慢性砒素中毒が発生しており、高濃度な無機砒素曝露者数は1500万人に達しており、相当数の妊婦も含まれている。本研究は急性砒素中毒の妊婦とその胎児を想定しているが、本来、砒素は胎盤をフリーに通過する物質であり、高濃度砒素曝露者や慢性砒素中毒の妊婦に対して、この研究成果は貢献できるものであると考えられる。

## 文献

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

Cebrian M. E., Albores A., Garcia-Vargas G., Del Razo L. M., Chronic arsenic poisoning in humans: the case of Mexico. In "Arsenic in the Environment. Part II: Human health and ecosystem effects", ed. by J. O. Nriagu. John Wiley & Sons, Inc., New York, 93-107, 1994.

Choprapawon C., Topic: 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, 1995.

Chowdhury A. M., Testing of water for arsenic in Bangladesh. *Science.* 284, 1622, 1999.

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, 1998a.

Concha G., Nermell B., Vahter M., Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in Northern Argentina. *Environ. Health. Perspect.* 106, 355-359, 1998b.

Das D., Chatterjee A., Mandal B. K., 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 (biopsy) of the affected people. *Analyst.* 120, 917-924, 1995.

DeSesso J. M., Jacobson C. F., Scialli A. R., Farr C. H., An Assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reproductive Toxicology.* 12, 358-433, 1998.

Ferm Vergil H., Hanlon David P., Constant rate exposure of pregnant hamsters to arsenate during early gestation, *Environ. Res.* 37, 425-432, 1985.

Hood Ronald D., Bishop Sally L., Teratogenic effects of sodium arsenate in mice. *Arch. Environ. Health.* 24, 62-65, 1972.

Hood Ronald D., Thicker Gary T., Patterson Barbara L., Prenatal effects of oral versus intraperitoneal sodium arsenate in mice: *J. Environ. Patho. Toxicol.* 1, 857-864, 1978.

Hood Ronald D., Harrison William P., Vedel Ginger C., Evaluation of arsenic metabolites for prenatal effects in the hamster. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 679-687, 1982.

Hopenhayn-Rich C., Biggs M. L., Kalman

D. A., Moore L. E., Smith A. H., Arsenic methylation patterns before and after changing from high to lower concentrations of arsenic in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 104, 1200-1207, 1996.

Lianfang W., Jianzhong H., Chronic arsenism from drinking water in some areas of Xinjiang, China. In "Arsenic in the Environment. Part II: Human health and ecosystem effects", ed. by J. O. Nriagu. John Wiley & Sons, Inc., New York, 159-172, 1994.

Lugo G., Cassady Gerge, Palmisano Paul, Acute material arsenic intoxication with neonatal death. *Amer. J. Child.* 117, 328-330, 1969.

Massey E. W., Heyman A., Arsenic: Homicidal intoxication. *Southern Medical Journal.* 77, 848-851, 1984.

Mizukawa R., Umezawa Y., Inagaki T., Fukuda T., Yamane N., Tsunemastu A., Psychosymptomatic characteristics of mentality disordered victims poisoned by arsenic contained in Formula Milk. *Seishin igaku.* 30, 857-864, 1988.

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、*Biomed. Res. Trace. Elements.*, 11, 300-305, 2000.

Piamphongsant T., Chronic environmental arsenic poisoning. *Int. J. Dermatology.* 38, 401-410, 1999.

Schoolmeester W. L., White Douglas R., Arsenic poisoning. *Southern Medical Journal.* 73, 198-208, 1980.

Siripitayakunkit U., Visudhiphan P., Pradipasen M., vorapongsathorn T., Third international confarence on arsenic exposure and health effects. San Diego, CA, USA, 1998.

Tondel M., Rahman M., Magnuson A., Chowdhury I. A., Faruquee H. M., Ahmad Sk. A., The relationship pf arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesion in Bangladesh. *Environ. Health Perspet.* 107, 727-729, 1999.

Yamashita N., Doi M., Nishino M., Recent observations of Kyoto children poisoned by arsenic tainted "Morinaga Dry Milk". *Jap.J. Hyg.* 27, 336-399, 1972.

Yamauchi H., Yoshida T., Aikawa H., Kayama F., Yoshida K., Human exposure and metabolism from drinking water in Inner Mongolia, China. *Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues.* Maryland, USA, 1997.

Yoshida T., Yamauchi H. Arsenic poisoning in China. *Biomed. Res. Trace. Elements.*, 11, 45-53, 2000.

Zaldiver R., 1974. Arsenic contamination of drinking water and foodstuffs casusing endemic chronic poisoning. *Beithr. Path.* 151, 384-400.

和歌山市、山内博；和歌山市毒物混入事件報告書、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

### 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 -

分担研究者 坂部 貢 北里研究所・北里研究所病院・臨床環境医学センター部長

**研究要旨** 今回の研究目的は、胎生期に母体を介して砒素に曝されることによって惹起される脳障害のメカニズム解明の糸口を得ることにある。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（代謝産物も含む）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。

#### A. 研究目的

これまで、急性・慢性砒素中毒の妊婦が高濃度な無機砒素（三酸化二砒素）を摂取した場合に、胎児の中枢神経障害が発生するか否かについて、動物実験モデルを用いて検討してきた<sup>1)</sup>。その結果によると、投与群では発育過程の胎児脳におけるニューロンのアポトーシスを誘導し、母体を介して砒素に曝露されることにより、胎児脳組織の障害が発生することがわかった。しかしながら、アポトーシスが誘導されるまでの機構、即ち、脳組織障害の過程は不明なままである。

本年は、脳組織障害の過程を解明する糸口を得るために、神経系発生の初期の段階から発現するタンパク質キナーゼ調節因子の発現に、砒素曝露がどのような影響を及ぼすかについて知見を得たいと考えた。そこで神経系の発生・機能維持に深く関係する蛋白質キナーゼ調節因

子のひとつである14-3-3タンパク質キナーゼ調節因子（以下、14-3-3）<sup>2)</sup>に注目し、胎児期の中枢神経系（特に脳）における14-3-3の発現量および局在が、砒素に曝されることによりどのような影響を受けるかについて検討した。

14-3-3は、酵母から人を含めた高等哺乳動物まで普遍的に存在するタンパク質キナーゼ調節因子であり、そのタンパク質配列は高いホモロジー（80%以上）を有する。

その役割は豊富で、RAF1 (MAPKKK) の細胞膜構築を強固にする作用、Cキナーゼの活性化、タンパク質あるいは核酸転写因子の活性化、エンドヌクレアーゼの活性化（アポトーシスと関連）、細胞膜プロトンポンプ機構、Ca<sup>2+</sup>の流入、神経伝達物質の生合成、サイトカインの生合成など、多彩な機能に関与し、特に神経

系と免疫系の発生・分化・成熟の遂行には、あらゆるところで重要な機能を担っている。よって、14-3-3の発現が、砒素曝露によって何らかの影響を受ける可能性を追求することが、砒素の胎児毒性のメカニズムを解明する大きな力となることは言うまでもない。

## B. 研究方法

### a. 動物

妊娠ラットは、SPF/VAF ラット (Cri:Wistar:日本チャールス・リバー社)をそれぞれの実験群で3匹使用した。動物の飼育は、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、明暗は12時間サイクルとし、動物室内にクリーンラック (日本クレア) を設置し、ラック内で飼育した。餌はCE-2 固形飼料 (日本クレア)、水は水道水を自由摂取とした。

### b. 試薬と処置

妊娠ラットには、純度99%以上の三酸化二砒素 (シグマ社製) 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、三酸化二砒素溶液として妊娠17日目に投与した。一回経口した三酸化二砒素の投与量は $LD_{50}$ の1/4量 (8.5mg/kg) とした。動物は、投与後12, 24, 48時間目に屠殺した。無処置コントロール群は、妊娠19日目に屠殺した。

### c. 組織のサンプリング

妊娠ラットはハロセン麻酔後、妊娠子宮から胎仔を分離した。胎仔は冷PBSで十分に洗浄の後、脳を取り出した。取り出した脳は、血液の汚染を除去するために再び冷PBSで洗浄、新鮮凍結保存(一

80°C)およびパラフィン切片用として、ザンボニー溶液 (パラフォルムアルデヒド・ピクリン酸混合固定液) にて固定した。

### d. 14-3-3の免疫ブロッティング

凍結保存していた脳組織は、ソニケーター (超音波破砕器; ブランソン社) によって0.5%KClを含む緩衝液中でホモゲナイズ後、800Gで10分遠心した。KClを用いた理由は、全細胞抽出物 (Whole Cell Extracts) を得るためである。遠心後の上清は、ブラッドフォード法を用いてタンパク質濃度を測定し、各サンプル間でタンパク質濃度を一定に調整した。タンパク調整したサンプルは液体窒素フリーザーミル (凍結乾燥振動装置) でパウダー処理し、ブロッティング用試料とした。試料は泳動用緩衝液にて溶解し、常法通りにSDS-PAGEを行った。膜転写の後、マウス14-3-3モノクローナル抗体 (湧永製) 反応、ウサギ第二抗体 (ニチレイ製) 反応、引き続き酵素反応を行い、Western-Light にて増感処理し観察した。バンドの解析は、IBM-PC・アーガス10 (浜松ホトニクス製) 画像解析装置にて定量数値化した。

### e. 14-3-3の免疫組織化学

ザンボニー固定をおこなった各組織は脱水後、常法通りパラフィン (低温用パラプラスト) 包埋し、薄切切片を作成した。切片は、シランコートスライド (松浪製) に貼り付け、キシロール系溶剤で脱パラフィン後、PBSで十分洗浄した。洗浄した切片は、イソベ法により内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行い、バックグラウンド染色の低減を図るため