

に引き続きティシュー・コンディショナー（ヒストファイン製）でタンパク質をブロッキングした。マウス14-3-3モノクローナル抗体(同上)を反応させ、高感度ABP法にて発色、局在を比較観察した。観察画像は一旦デジタル化し、IBM-PC・アーガス10（同上）画像解析装置にて定量数値化した。

f. 統計処理

データの解析は、Stanton Granz Biostatics Program を用いて Student t 検定を行い、有意水準を5% ($P < 0.05$) とした。また、測定値は、平均±標準偏差(mean±S.D.)として表した。

C. 結果

a. 14-3-3の発現 (Table-1, Figure-1)

これまでの胎仔の脳組織におけるアポトーシス細胞の出現を検討した結果では、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が観察されたが、免疫プロッティングによる14-3-3の発現についても、タンパク当りの脳組織での発現量は、非投与コントロール群(100%)と比べて有意に抑制された。12, 24, 48時間目の発現量は、それぞれ、72%、74%、75%であった。12, 24, 48時間目間での発現量(%)には、有意の差は認められなかった。

Table 1 Expression of 14-3-3 protein kinase modulator in brains of fetuses after a single oral administration of arsenic trioxide in pregnancy.

Fetus N=6	Expression of 14-3-3 protein kinase modulator (% expression)
Control	100 ± 8.6 %
12h	72 ± 6.4 %*
24h	74 ± 5.9 %*
48h	75 ± 6.8 %*

Values are mean ± standard deviation. * $P < 0.05$ vs control value

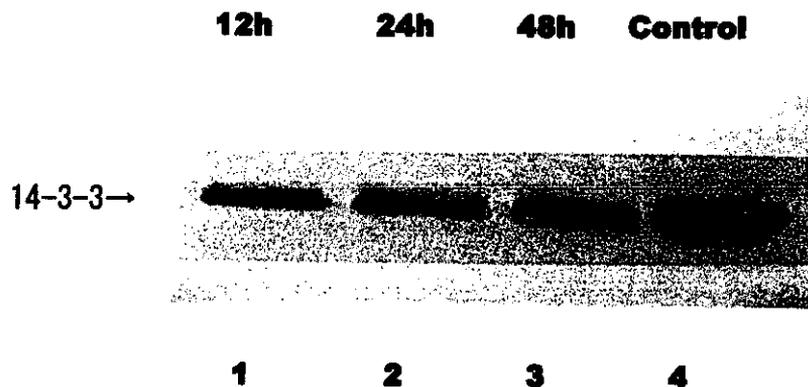


Figure 1 Immunoblot of 14-3-3 in brains of fetuses after a single oral administration of arsenic trioxide in pregnancy.

Lane 1: at 12h after administration, Lane 2: at 24h after administration, Lane 3: at 48h after administration, Lane 4: control

b. 14-3-3 の局在 (Figure-2, Figures-3a, b)

免疫組織化学的検討では、非投与コントロール群では、皮質全層にわたって、14-3-3を豊富に含有するニューロンが観察され、特にニッスル小体が明瞭の大型ニューロンの染色性が強かった (Figure-2, Figure-3a)。グリア系細胞、神経線維の染色性は、ほとんど認められなかった。一方投与群においては、皮質

全層において、染色性の低下が認められたが、主として大型のニューロンの14-3-3の含有量の低下が目立った。12時間目 (Figure-3b)、24時間目、48時間目間での相違を見出すことは、免疫組織化学的観察では、不可能であった。

また、画像解析装置による14-3-3含有細胞の陽性率とその染色強度の分析結果は、免疫ブロッティングの結果とよく一致した (Table-2)。

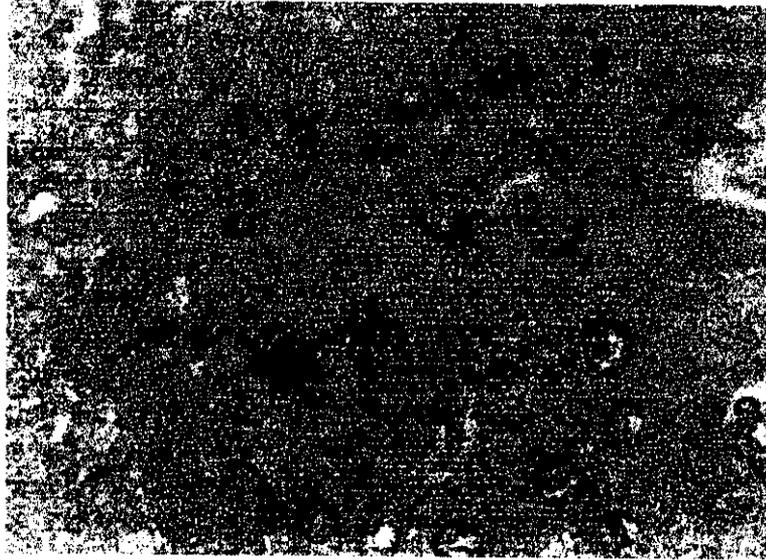


Figure-2 Immunohistochemical staining of 14-3-3 in cerebral cortex at the 19th days of gestation.
X 400.

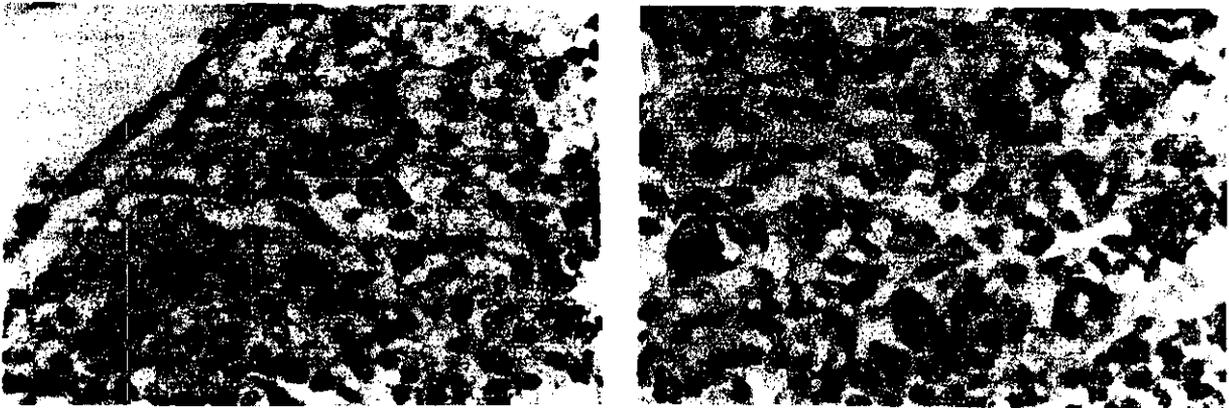


Figure-3a,b Immunohistochemical staining of 14-3-3 in cerebral cortex at the 19th day of gestation after a single oral administration of arsenic trioxide. a: control, b: 12h after administration. X400

Table-2 Image analysis of the expression of 14-3-3 in cerebral cortex at the 19th day of gestation after a single oral administration of arsenic trioxide.

Fetus N=3	14-3-3 positive cell number number/100 cells	14-3-3 staining intensity % decrease/control
control	46 ± 8	0
12h	32 ± 5	28 ± 12
24h	36 ± 7	27 ± 9
48h	33 ± 9	30 ± 14

The photometric intensity of untreated is designated as the “control”.

D. 考察と結論

これまで、妊娠ラットに投与した三酸化砒素により、胎仔の脳組織に障害(ニューロンのアポトーシス)が生じることを報告してきた¹⁾。ニューロンのアポトーシスは、砒素(代謝物も含む)曝露により致命的な影響を受けたニューロンがもはや生存する意義を失い、即ち、障害を受けたニューロンが生存することは個体にとっては意味のないことであり、自身のエンドヌクレアーゼ活性を上昇させることによりアポトーシスに至るシグナルがオンになったと解釈できる^{3)~5)}。しかし、アポトーシスに至るまでの過程は不明なままであり、アポトーシスに至るカスケードのシグナルをオンにする機構を解明することは、砒素の胎児期神経毒性を評価する上で極めて重要なことである。そこで神経系の発生・分化・成熟に重要な役割を担う14-3-3が、砒素により障害を受けたニューロンの最終像とし

てのアポトーシスにどのような関わりがあるのかを検討した。その結果、1) 母体を介して砒素に曝されることによって、分化・成熟過程におけるニューロンの14-3-3の発現が抑制されること、2) 分化・成熟過程における14-3-3の発現が、主としてニューロンだけに強く発現し、グリア系をはじめ他の神経要素には認められないこと、3) これまでの砒素曝露によるアポトーシスに至るまでの誘導時間に関する報告¹⁾と14-3-3の発現抑制までの時間的な推移が類似することがわかった。よって、三酸化二砒素(その代謝物も含む)が、グリア系細胞に代表されるようなニューロン支持細胞の神経成長因子等の産生・分泌に影響を及ぼし、その結果としてニューロンに間接的影響が及んだ可能性は極めて少ないと示唆され、三酸化二砒素およびその代謝物のニューロンに対する直接的な作用と解釈したほうがよいと思われる。また、ニューロンの分化・成熟に

関する細胞内シグナル伝達カスケード（例えば MAP キナーゼ系を介した活性化）のどの部位に砒素が影響するかを考へてみる場合、分化・成熟に関わる遺伝子の活性化に直接関連するような下流域における影響は考へにくい。なぜなら、砒素投与後 1 2 時間後にすでにアポトーシスが認められるためである¹⁾。もし、下流域での 1 4 - 3 - 3 の作用に対する影響が主だと仮定すると、細胞情報伝達カスケードの時間推移から考へて、今回の結果のように 1 4 - 3 - 3 の発現影響とアポトーシス誘導がほぼ同時に推移することはありえない（一つの細胞で、正常の分化・成熟に関連するシグナルカスケードとアポトーシスシグナルカスケードが、2 重で進行することになる！）。よって、砒素の影響は、1 4 - 3 - 3 の上流域における作用、特にその入り口である細胞膜レベルでの抑制作用、例えば、Raf1 (MAPKKK) の膜での保持促進作用の低下による MAP キナーゼ系の停止等が考へられる。受容体型キナーゼ系の初期停止は、ミトコンドリアの電位変化等を惹起し、神経系のみならずリンパ球系でもアポトーシスを誘導することはよく知られている現象であり、今回認められた現象もそのように解釈するのが最も妥当だと考へている。今後、比較的容易に行える胎児ニューロンの培養系を用いて、直接無機砒素およびその代謝物をニューロンに添加し、それを各種マーカーを用いてリアルタイムで観察することにより、詳細な情報 (Ca²⁺ の流入、カスパーゼ系の活性化など) を得たいと考へている。

参考文献

1. Nito, Y., Sakabe, K., Yamauchi, H. et al.: Fetal brain damage induced by acute arsenic poisoning in pregnancy in rats. *Biomed Res Trace Elements* 11(3):300-305, 2000. (*In Japanese*)
2. Isobe, T. : Activation of protein kinase C by 14-3-3 proteins homologous with Exo1 protein that stimulates calcium-dependent exocytosis. *FEBS* 308:121-124, 1992.
3. Deckwerth, TL., Elliot, JL., Knudson, CM. et al.: Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17:401-411, 1996.
4. Reed, SJ.: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-776, 1997.
5. Huang, C., Ma, WY., Li, J. et al.: Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH₂-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 59:3053-3058, 1999.

研究成果の刊行に関する一覧表

- 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-OHdG) by using ELISA, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 107: 39-44, 2000.