

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13年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 山内 博

平成14（2002）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. 砒素暴露の家兎における臓器中8-OHdG濃度分布に関する研究	7
山内 博、網中 雅仁	
2. 妊娠前ヒ素暴露した両親から出生した仔の中樞神経への影響の研究	16
相川 浩幸	
3. 胎生期における砒素暴露と「神経-免疫系」機能障害 ー 1 4 - 3 - 3 サブタイプの発現と関連させてー	32
坂部 貢	
4. 放射光蛍光X線分析によるヒ素の生体内挙動に関する研究	42
中井 泉	
5. インド西ベンガル州におけるヒ素暴露評価及び角化細胞による ヒ素代謝に関する研究	48
安藤 正典、徳永 裕司、内野 正、Tarit Roy Chowdhury	

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括全体報告

主任研究者 山内 博 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 助教授

研究要旨

本年度は、砒素曝露による脳障害、砒素曝露と DNA 損傷、砒素曝露と生体防御、放射光蛍光 X 線分析法による砒素分析の可能性などの課題を実施した。急性砒素中毒の生体影響と発癌性のリスク評価に関する研究について 3 カ年の研究成果を概要すると、動物実験モデルにより砒素曝露による脳障害は胎児期に急性砒素中毒発症量の砒素曝露が母獣に投与された場合、出生した仔には脳障害の所見が認められ、さらに、類似の所見は慢性砒素投与実験でも観察された。砒素曝露による発癌性の発生機序の解明は国際的にも未解決の問題であるが、砒素曝露による DNA 損傷の評価は、急性と慢性砒素中毒患者を対象者とした研究から、尿中 8-OHdG 濃度の測定が有効であることを明らかにした。急性砒素中毒における症状は、無機砒素に対するメチル化能力に依存的であり、特に 2nd-メチル化能の役割の重要性が推測された。急性と慢性砒素中毒患者において、小児のメチル化能は成人に比較して高率であり、結果的に病状は軽度になることを明らかにした。放射光蛍光 X 線分析は極めて微量な試料により、砒素の形態学的知見や分布状態、さらに組織中化学形などが定量的に測定が可能となり、砒素中毒学の研究分野に新たな技術として貢献が期待された。

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 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

本年度は、砒素曝露による脳障害、砒素曝露と DNA 損傷、砒素曝露と生体防御、放射光蛍光 X 線分析法による砒素分析の可能性などの課題を和歌山市で発生した急性砒素中毒患者の生体試料、インド西ベンガ

ル州および中国内モンゴル自治区の慢性砒素中毒患者の生体試料、学習試験用近交系 THA ラットおよび妊娠 SPF/VAF ラット、NZW 家兎による動物実験、角化細胞による培養実験により実施した。

B. 研究方法

急性砒素中毒の対象者は和歌山市で発生したカレー毒物混入事件の患者 63 名、そのうち男性 29 名、女性 34 名、妊婦 4 名であった。砒素の測定は患者から提供された尿、頭髮を検査試料とした。

慢性砒素中毒患者の対象者はインド西ベンガル州のガンジス川流域の Mushidabad 地区 19 家族 80 名であった。砒素の測定は

患者から提供された尿を検査試料とした。中国内モンゴル自治区の対象者は慢性砒素中毒患者 109 名、年齢 5-70 (34.6 ± 15.3) 歳であった。

測定は患者から提供された尿、頭髮、バイオプシーによる皮膚を検査試料とした。

動物実験では、砒素暴露した母獣から出生した仔の中樞神経影響について、THA ラットを用いて自発行動試験 (open-field 試験、Animex 試験) により実施した。

また、胎児期における砒素暴露と「神経系-免疫系」機能障害を明らかにするため、SPF/VAF 妊娠ラットを用いて、砒素暴露した母獣の胸腺、胎児の脳および胸腺を用いて 14-3-3 サブタイプの発現から検討した。

さらに砒素暴露と DNA 損傷を明らかにする目的で NZW 家兎を用いて慢性砒素暴露における臓器中 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの分布について検討をおこなった。

In vitro による培養角化細胞を用いて砒素の代謝を明らかにする目的で NHEK-Neo 表皮角化細胞を用いた砒素暴露培養実験をおこなった。

(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および中国内モンゴル自治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。

動物実験の屠殺に際しては、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

砒素暴露と脳障害に関する研究

砒素暴露による脳障害発生に関する検討を試みた。砒素を妊娠ラットに投与すると母獣を介して胎仔に移行した砒素が、胎生期の神経系の発生・分化・成熟に深く関連する蛋白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) での発現が強く抑制され、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が判明した。さらに、胎児胸腺組織においても 14-3-3 の発現の強い抑制が認められ、脳組織と同様、主として θ サブタイプが影響を受けることが判明した。これらの結果を総括すると、妊娠期における砒素暴露は、母獣に強い影響を与えるに留まらず、母獣を介して移行した砒素およびその代謝物が、「神経系-免疫系」の機能軸の確立に致命的な障害を与える可能性を示唆するものであり、生後の神経系と免疫系のクロストークの遂行とそれに依存する恒常性維持機能に重大な欠陥が生じる可能性を示すものである。慢性砒素暴露の実験条件における脳障害について検討を試みた。母獣の飲水量は多少の変動があるものの交配前、妊娠および授乳のいずれの期間とも、砒素濃度に依存的な飲水量の変化並びに個体間に大きな差がみられなかった。出生した全仔を対象に、発育の一般的な指標である耳介展開、歯牙萌出、眼瞼開裂を分化指標とした。いずれの分化指標とも各群間に差が認められなかった。自発行動に関する Open-field 試験は、雌についてはいずれの観察項目とも各群間に差がみられなかったが、雄については、潜時では対照群と比して 1 ppm 群、10 ppm 群が有意に短く、行動量では対照群と比して 1 ppm 群、10 ppm

群が有意に多かった。Animex 試験は、各群ごとに 2 時間間隔に 24 時間分集計した行動量の結果は、照明時には行動量は少なく、消灯時には行動量が多いパターンは各群とも同様であった。また単位時間ごとの行動量の群間比較では雄では 2 点、雌では 1 点に差がみられたものの一定の傾向がみられなかった。学習行動成績は 60 分間の試行を 10 分ごとに記録し、前・後半 30 分に集計した成績を雌雄別に比較した結果、各群間に差はなかった。以上の結果から、慢性砒素中毒発生地域で観察される、井戸水中砒素濃度において妊娠前から成熟までの生涯与えたラットには、体重の増加抑制と自発行動の異常が確認された。これらの結果から、人においても発育成長や中枢神経系への影響が起りうることが動物実験から推察された。

砒素曝露と DNA 損傷に関する研究

砒素曝露による DNA 損傷に関して、動物モデルによる臓器中 8 ヒドロキシ 2 デオキシグアノシン (8-OHdG) 濃度分布および尿中 8-OHdG 排泄パターンについて検討した。連続投与した無機砒素および五価砒素投与群では、対照群に比較して肝臓と腎臓中 8-OHdG 濃度に上昇傾向があり (t-test, $p<0.001$)、これに対して、脳、肺、脾臓は顕著な変化が認められず、すなわち、無機砒素曝露後の生体内での 8-OHdG 生成には臓器特異性の存在が明らかになった。一方、体内で生成された 8-OHdG の尿中排泄には、無機砒素が三価砒素に比較してやや高値の傾向が存在するが、統計学的な有意差は認められなかった。

尿中 8-OHdG 濃度の経時変化は、無機砒素投与後、徐々に上昇する傾向が認められ、

統計学的な有意差は 6 週目以後から認められた (t-test, $p<0.05$)。以上の結果から、無機砒素には共通して DNA 損傷の作用が存在し、体内の作用部位に臓器特異性が認められ、そして、DNA 損傷で生成した 8-OHdG の尿中排泄には曝露との時間差が存在することが明らかになり、この結果はヒトでの急性砒素中毒の結果を支持していた。

砒素曝露と生体防御に関する研究

砒素曝露からの生体防御機構に関して、急性砒素中毒患者のメチル化機序を解析した。生体内での無機砒素のメチル化は解毒機序として知られている。63 名の患者の尿中砒素排泄パターンについて検討した結果、男女間に差は認められなかったが、これに対して、小児 (1-12 歳群) は成人 (13 歳以上群) に比較して、三酸化二砒素摂取早期 (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したことが推定された。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、小児と成人で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。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、重症者に認められる末梢神経障害は小児に存在しなかった。慢性砒素中毒患者のメチル化機序に関して、インド共和国西ベンガル州地区で居住する 23 家族 89 名

から飲料水及び尿を採取し検討した。尿中から検出された砒素には、As(III)とメチルアルソン酸 (MMA)、As(III)とジメチルアルシン酸 (DMA)、 MMA と DMA の間に有意な相関関係が認められた。

これら住民から得られた尿中の As(III)、As(V)、 MMA 及び DMA の存在割合は total arsenic 量を 100 %としたとき、それぞれ、12.5、 2.0、 10.4 及び 75.2 %であった。生活習慣、食習慣の同じ各家族の 11 組の夫婦を 23 家族の中から抽出し、尿中砒素代謝物の男女間の比較を行った。尿中 As(III)の場合には男女の間に相関性が観察されなかったが、尿中 MMA、DMA 及び Total arsenic の間に統計的に有意な相関関係が観察された。女性の場合、男性に比べて多くの砒素化合物を尿中に排出していることが示唆された。

放射光蛍光エックス線分析法による砒素分析の可能性に関する研究

放射光蛍光 X 線分析法を用いた砒素曝露の検査法に関して急性砒素中毒患者と職業性砒素曝露者の毛髪を用いて検討を試みた。毛髪中砒素の化学状態分析を行った結果、砒素は硫化物に近い形で蓄積していることが判明した。この結果は健常者の毛髪に蓄積する砒素とは化学形が異なっていた。半導体産業従事者の毛髪中砒素は外部汚染によるものと内部暴露によるものを起源とする砒素の存在が示唆された。従来の砒素の分析法においては、一本の毛髪を用いて毛髪中砒素を外部付着砒素と内部砒素とを区別することは不可能なことであった。この研究において、それらの問題に対して可能性が示された。放射光蛍光 X 線分析は極めて微量な試料により、形態学的知見や元素分布、さらに組織中での化学形との対応が

明確になり、微量元素の組織中における役割の解明への貢献が期待できる手法であることが明らかになった。

D. 結論

本研究から、過剰の砒素曝露を受けた妊婦から生まれる子供には、脳障害が発生する可能性を示唆する結果が急性と慢性砒素曝露実験から得られた。このことから、急性砒素中毒の妊婦から生まれた子供に対しては、長期の観察の必要性が考えられる。一方、地球規模で発生している慢性砒素中毒患者には多くの妊婦がおり、従来研究がなされていない妊婦と胎児への砒素曝露からの生体影響の研究の必要性に対する科学的な根拠になると考えられる。砒素曝露からの発癌性のリスク評価は国際的にも確立されていないが、本研究において、砒素曝露からの DNA 損傷は尿中 8-OH d G 濃度の測定により明確に評価できることをヒトと動物実験で明らかにした。この成果は、上述した慢性砒素中毒患者や職業性砒素曝露者の生物学的モニタリングに活用が期待される。ヒトには無機砒素曝露からの生体防御機序としてメチル化が存在していることは従来から知られていたが、本研究から、その作用の根幹はメチル化砒素からジメチル化砒素への変換 (2nd-methylation) に依存する作用であることを明らかにした。この成果から、メチル化促進に関する薬理的作用の研究の必要性が明らかになり、その成果は急性と慢性砒素中毒に対する病状の軽減に貢献するものと考えられる。従来、放射光蛍光 X 線分析法は砒素中毒や職業性砒素曝露者の健康管理への応用は検討されていなかったが、本研究から、放射光蛍光 X 線分析法は従来の機器分析法では不可能であった問題

を解決し、この分析技術の活用は、砒素中毒学領域の研究にも革新的な貢献が期待されるものとする。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山内 博、網中雅仁、吉田勝美、世良耕一郎 健康者の DNA 損傷とその作用因子に関する研究. NMCC 共同利用研究成果報文集. 印刷中.
- 2) 安藤正典 インド・バングラディッシュにおける地下水ヒ素汚染と健康影響 公衆衛生研究 49. 266-274,2000
- 3) 吉田貴彦 慢性砒素中毒の生体影響指標を求めて 中国における砒素汚染フィールドから先端技術産業労働現場まで. 旭川医科大学研究フォーラム 2. 20-29,2001

2. 学会発表

- 1) 木村慎吾、山内 博、久保正幸、児玉典央、今井統隆、賓来直人、長瀬博文、中村裕之、荻野景規、岩本美江子 尿中 8-OHdG 測定による環境化学物質健康影響モニタリングについて. 日本衛生学雑誌 57.261,2002.
- 2) 網中雅仁、山内 博、吉田勝美 慢性砒素暴露の家兎における臓器中 8-OHdG について. 日本衛生学雑誌 57.262,2002.
- 3) 山内 博、木村慎吾、世良耕一郎、網中雅仁、荒井二三夫、吉田勝美 健康者の健康影響モニタリングに関する研究. 日本衛生学雑誌

57.263,2002.

- 4) 山内 博、網中雅仁、吉田勝美、千葉啓子 DNA 損傷物質暴露における生物学的モニタリング. 産業衛生学雑誌 44.増刊 237,2002.
- 5) 千葉啓子、網中雅仁、山内 博、世良耕一郎 魚介類多食者の尿中微量元素濃度と 8-OHdG 濃度の関係について. 第 9 回 NMCC 共同利用研究成果発表会 仙台 2002.5 月
- 6) 山内 博、網中雅仁、吉田勝美、世良耕一郎 健康者の DNA 損傷とその作用因子に関する研究. 第 9 回 NMCC 共同利用研究成果発表会 仙台 2002.5 月
- 7) 山内 博、網中雅仁、吉田勝美、千葉啓子 砒素暴露による DNA 損傷の評価法. 第 13 回日本微量元素学会 千葉 2002. 7 月
- 8) 山内 博、網中雅仁、吉田勝美 砒素暴露による DNA 損傷の健康影響モニタリング. 第 11 回日本臨床環境医学会 札幌 2002. 7 月
- 9) 坂部 貢、国松佳奈、角田隆俊、斉藤 明、相川浩幸、相澤好治、宮田幹夫、石川 哲 甲状腺 C 細胞におけるエストロゲン受容体 β 型の意義—環境エストロゲンの作用と関連させて. 第 11 回日本臨床環境医学会 札幌 2002. 7 月
- 10) 伊東俊弘、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 飲水を介した砒素及びフッ素の混合暴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.
- 11) 吉田貴彦 慢性砒素中毒の皮膚病変

をめぐる最近の知見 臨床環境医学
10.109,2001

- 1 2) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、相
澤好治、川上智史、門脇武博、相川
浩幸、吉田貴彦 14-3-3 蛋白質キナ
ーゼ調節因子の発現に及ぼす環境シ
グナルの影響 胎児期にける影響を
中心として . 臨床環境医学
10.116,2001

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
砒素暴露の家兎における臓器中 8-OHdG 濃度分布に関する研究

分担研究者 山内 博 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 助教授
協力研究者 網中 雅仁 聖マリアンナ医科大学予防医学教室 助手

研究要旨

本研究では、慢性砒素暴露と生体での 8 ヒドロキシ 2 デオキシグアノシン (8-OHdG) 濃度の関係を明確にすることを目的に、実験動物モデルによる臓器中 8-OHdG 濃度分布および尿中 8-OHdG 濃度排泄について検討した。その結果、砒素暴露による臓器中 8-OHdG 濃度分布は各臓器で違うことが明らかになり、砒素の標的臓器への影響が示唆された。一方、無機砒素の化学形態別の生体影響への違いは 8-OHdG 濃度では確認できなかった。また、慢性砒素暴露による尿中 8-OHdG 濃度分布は徐々に上昇するが、暴露開始 6 週目以降は平衡状態であった。

以上の結果、慢性砒素暴露の酸化的 DNA 損傷の状態は、各臓器で差があることが明らかになったが、尿中 8-OHdG 濃度は、標的臓器と示唆される臓器ほどの有意差を見出すものではないことも確認された。このことから、中国の慢性砒素暴露患者の臓器中 8-OHdG 濃度も砒素の標的臓器を中心として酸化的 DNA 損傷が誘導されたことを示唆されるものとなった。

A 研究目的

我々は、和歌山で発生した無機の三価砒素による急性砒素中毒患者および中華人民共和国、内モンゴル自治区で起きている地下水を原因とした無機の五価砒素による慢性砒素中毒患者について砒素による生体影響を検討してきた^{1) 2)}。この研究課程の中から多くの成果がもたらされた一方、砒素の発癌性およびその発症機序の解明は、砒素暴露による生体影響を研究する上で極めて重大な検討課題となっている。我々は、砒素暴露と DNA 損傷の関係について以前から注目し

ており、砒素中毒患者では、生体内で酸化的 DNA 損傷物質である尿中 8 ヒドロキシ 2 デオキシグアノシン (8-OHdG) 濃度の排泄が増加することを明らかにした³⁾。

8-OHdG は、DNA の構成分子であるデオキシグアノシンに活性酸素などにより、グアニン核の 8 位に酸素を導入した化合物である。酸化的 DNA 損傷因子による化学修飾のために、本来 DNA の相補鎖のシトシン(C)と水素結合を形成するはずのグアノシンが、アデニン(A)と塩基対をつくってしまい、GC→TA 転換 (transversion)

を起こして変異遺伝子を生じる。核酸中の 8-OHdG は、修飾酵素によって切りだされて尿中に排泄され、その定量によって変異原物質の影響を評価することが可能となる。

現在、砒素暴露と生体内における 8-OHdG 生成との関係については、多くが未解明の状態である。とくに砒素の科学的形態の違いが及ぼす生体影響と 8-OHdG 生成との関係や臓器別の影響など基礎的な研究段階から明らかにするべき問題がある。本研究では三価および五価の化学形態別の慢性無機砒素暴露による生体影響、砒素暴露による臓器別の影響について 8-OHdG 生成との関連性を明らかにすることを目的に実験動物モデルを用いて検討をおこなった。

B 研究方法

B-1 実験方法

動物実験では、雄性 New Zealand White 種（家兎）を一群 5 匹で使用した。家兎は 7 週齢で搬入し、1 週間の予備飼育の後、8 週齢から実験を開始した。砒素投与群は三価の砒素暴露群として 10% 亜ヒ酸ナトリウム水溶液（SIGMA）を飲料水に使用した。また、五価の砒素投与群としては 10% ヒ酸二ナトリウム水溶液（SIGMA）を飲料水に使用した。対照群には水道水を使用し、各群自由に経口摂取させた。投与開始から飼育期間中は経時的に尿を採取し、18 週間の飼育期間後にと殺して大脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓および皮膚を採取した。臓器は摘出後 -80°C で、尿は -30°C で 8-OHdG 測

定まで保存した。

B-2 測定法

臓器中の 8-OHdG 濃度の分析には、現在 8-OHdG 測定法として確立されている高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器（HPLC-ECD）法を用いた⁴⁾。また、尿中 8-OHdG 濃度の測定には免疫抗体（ELISA）法を用いた⁵⁾。HPLC 測定用試薬には特級もしくは HPLC 用試薬特級（和光純薬）を ELISA 法には 8-OHdG TEST KIT（日研フード）を使用した。臓器の前処理用の酵素には生化学用（SIGMA）を使用した。

HPLC の分析条件および分析機器を表 1、表 2 に示した。また、ELISA 法の分析機器を表 3 に示した。

臓器は凍結破砕器（クライオプレス マイクロテックニチオン）を使用して、液体窒素凍結状態で臓器を粉末状に粉砕し、2N-EDTA 3ml に溶解して測定用試料とした。

臓器中 8-OHdG 濃度の分析では、前処理として図 1 の DNA 抽出法をおこない、HPLC 測定試料とした。臓器中 8-OHdG 濃度は、臓器中の 2 デオキシグアノシン（dG）濃度を HPLC-UV 法で同時に測定し、 $\text{dG 値} \times 10^5$ あたりの 8-OHdG 検出割合で表示した。尿中 8-OHdG 濃度の分析では、試料を 1500rpm 10 分間遠心分離し、上清を測定に使用した。尿中 8-OHdG 濃度は尿中クレアチニン（Cr）濃度で補正をおこなった。Cr 値は Jaffe 反応による Folin-Wu 法によって測定した。

C 研究結果

無機の三価および五価砒素および対照群の臓器中 8-OHdG 濃度を臓器別に表 4 および図 2 に示した。三価砒素投与群および五価砒素投与群では、対照群に比較して肝臓および腎臓で 4.89–5.89 倍の高値に上昇し、有意な増加が確認された (t-test; $P < 0.001$)。しかし、大脳、肺および脾臓では、肝臓や腎臓のような顕著な変化は認められなかった。また、三価砒素投与群と五価砒素投与群において全ての各臓器で異なる傾向は見られず、有意差は認められなかった。

慢性砒素暴露による尿中 8-OHdG 濃度の経日変化を週単位で図 3 に表した。三価砒素投与群および五価砒素投与群では尿中 8-OHdG 濃度は共に投与開始後、徐々に上昇傾向を示し、6 週目から投与前に比較して有意な上昇が確認された (t-test $P < 0.05$)。しかし、投与 6 週目以降では、ほぼ平衡状態で保持される傾向が確認された。一方、三価砒素投与群と五価砒素投与群の間では、尿中 8-OHdG 濃度が五価砒素暴露群で高値傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。

D 結論

我々は、和歌山で発生した急性の無機三価砒素中毒事例から砒素暴露が尿中 8-OHdG 濃度を上昇させることを明らかにし、また、中国内モンゴル自治区で起きている慢性の無機砒素中毒患者においても有意な上昇を見出した。今回の結果から、明らかに砒

素暴露が酸化 DNA 損傷物質である 8-OHdG 濃度を上昇させ、その排泄増加の課程は慢性暴露では暴露開始と共に徐々に生じることを確認した。一方、本研究でおこなった慢性砒素暴露レベルでは、尿中 8-OHdG 濃度は実験期間内では一定濃度以上には上昇しないことも明らかになった。これは変異源物質である砒素が 8-OHdG の生成を促し、ある暴露レベルまでは修復機能の働きとの間で拮抗状態が生じるためではないかと推察された。この状態は飼育期間である暴露開始後 18 週まで続いており、以降の変化が検討課題となった。他方、我々⁶⁾の研究では慢性砒素暴露患者の砒素暴露を改善することによって、皮膚などの臨床症状や尿中 8-OHdG 濃度レベルの低下など、砒素暴露の改善が生体影響を改善する実態も明らかになっている。これらの事実から、砒素暴露の停止により、尿中 8-OHdG 濃度の低下が推察される一方、我々の調査結果⁷⁾による 30 年以上の中国慢性砒素暴露患者での皮膚癌の発症などから継続投与に基づいた、発癌のメカニズムに結びつくものと示唆された。

本研究で投与に使用した三価と五価の無機砒素は、生体影響に差のあることが確認されており、マウスによる三価砒素の LD₅₀ は 14mg/kg、五価砒素は 20mg/kg とされ、五価砒素は三価砒素よりも毒性は低い。この生体影響の違いは砒素代謝課程に起因することが明らかにされている。一方、Pi

ら⁸⁾によれば三価と五価の無機砒素暴露による酸化ストレス影響について大動脈の NO に着目し、三価と五価の無機砒素暴露では有意差な違いがあることを明らかにしている。しかし、本研究結果からは、三価と五価の無機砒素暴露による 8-OHdG 生成への影響は、臓器中および尿中の両者においても確認されなかった。その理由として、慢性砒素暴露による生体内への取り込みおよび代謝課程から生成される 8-OHdG は、NO に比較して直接的ではなく、とくに慢性暴露では生体反応が緩やかに生じるため、無機砒素の化学形態別生体影響の差では統計学的な有意差を確認には至らなかったのではないかと推察された。次に各臓器と 8-OHdG 濃度の関係について検討した。

肝臓および腎臓で確認された 8-OHdG 濃度の上昇が脳、肺、脾臓では確認されなかった。この違いは、経口暴露であったことおよび、砒素の標的臓器との関係が示唆されるものであった。

以上の結果、慢性砒素暴露の酸化 DNA 損傷の状態は、各臓器で差があることが明らかになったが、尿中 8-OHdG 濃度では、化学形態の違いによる有意差を見出すものではないことも確認された。このことから、中国の慢性砒素暴露患者の臓器中 8-OHdG 濃度も尿中 8-OHdG 濃度以上に砒素の標的臓器を中心として酸化 DNA 損傷が誘導されたことを示唆されるものとなった。

DNA 抽出法

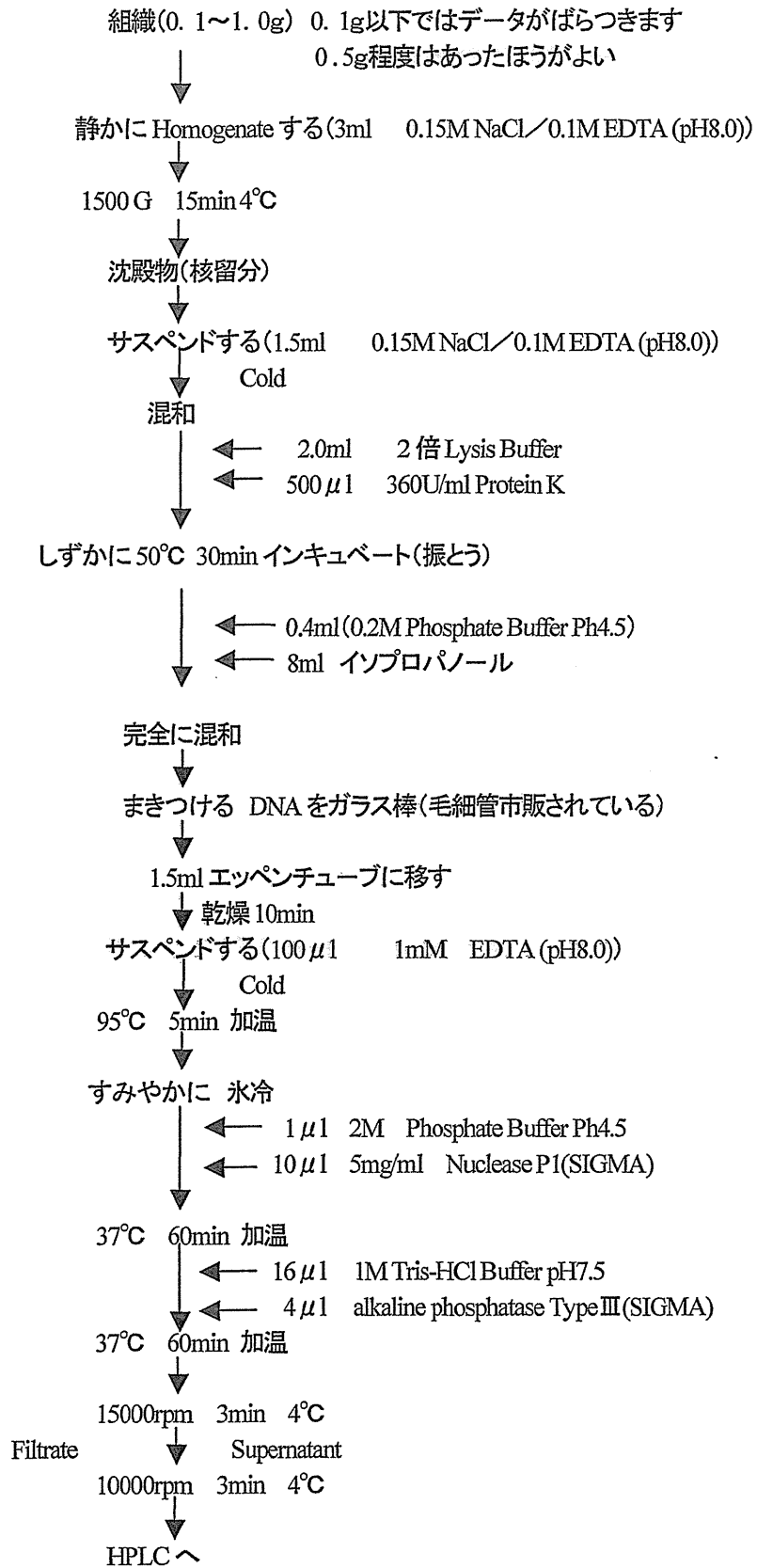


図1 臓器中 8-Hydroxy-deoxyguanine 測定に対する前処理方法について

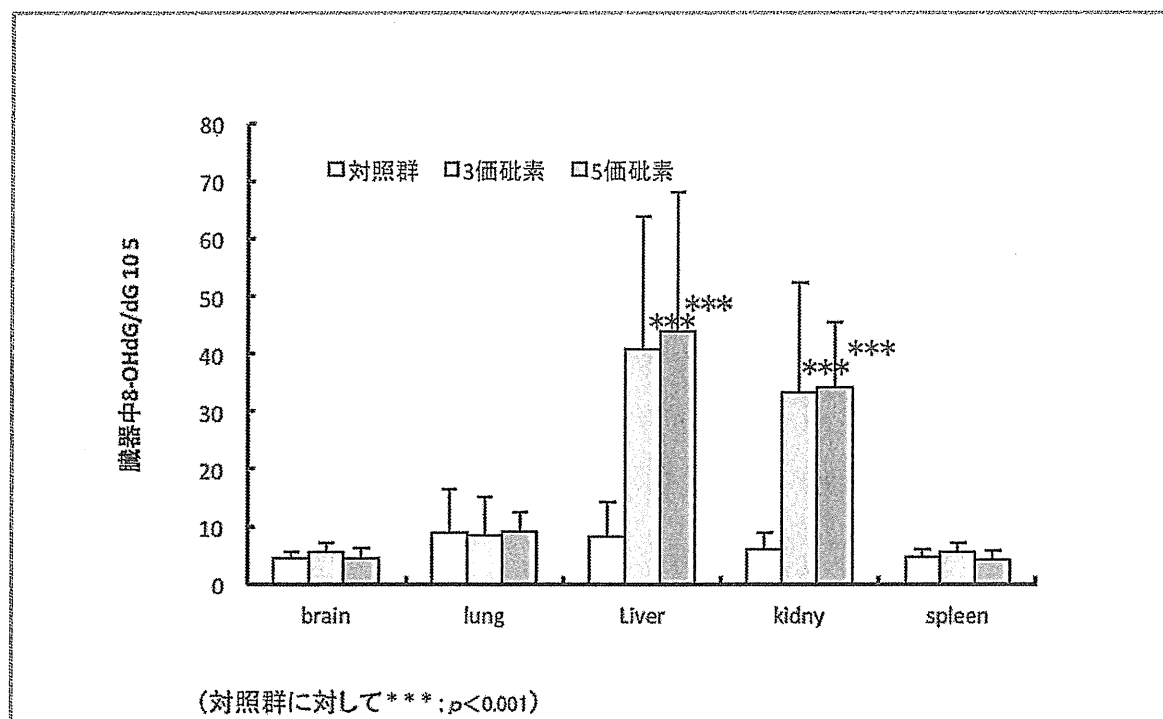


図2 家兎への無機の三価及び五価ヒ素の経口投与後における臓器中8-OHdG濃度の推移

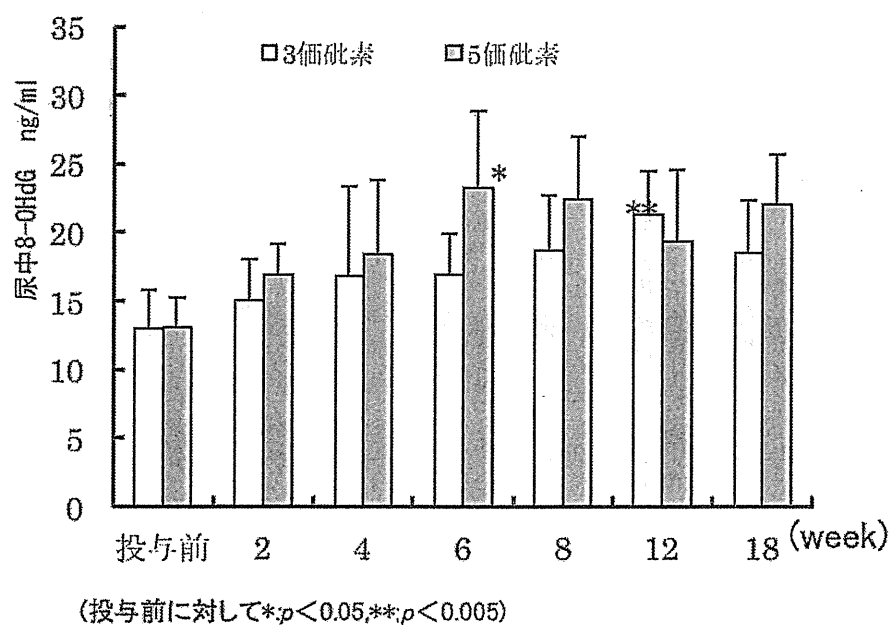


図3 家兎への無機の三価及び五価ヒ素の経口投与後における尿中8-OHdG濃度の推移

表1 HPLC—電気化学検出器法による 8-OHdG の測定における分析条件

Column: capcellpak C18 UG120 S-5 4.6x250mm (Shiseido Co. Japan)

Line Filter: pore size 0.45 μ m

HPLC system: GULLIVER SERIES (Jas.Co. Japan)

Ditector: Coulochem II (ESA, Inc. USA)

GUARD CELL OUT PUT E350mV

CH1 E1 150mV R1 1 μ A

OUTPUT 1V

OFFSET 0%

CH2 E2 300mV R2 500nA

OUTPUT 10V

OFFSET 0%

Solvent: MeOH 8%, NaH₂PO₄ 10mM in Distilled Water

Flow rate: 0.8ml/min

Column Temp. : 40°C

Analyzed Time : 25min

8-OHdG 標準液 1mg/ml (Wako Co. Japan)

表2 HPLC 法による 8-OHdG の測定に用いる分析機器 (写真)

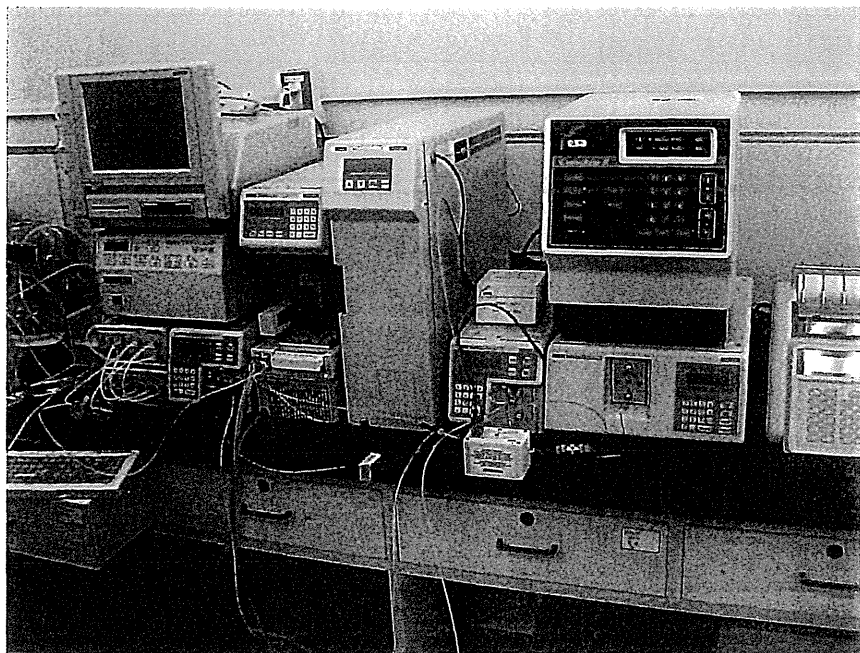


表3 ELISA 法による 8-OHdG の測定に用いる吸光光度計 (写真)

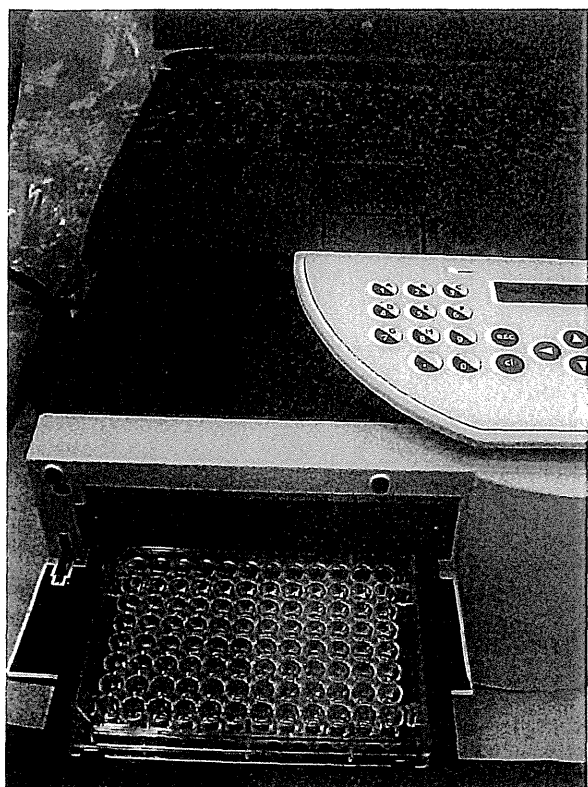


表4 家兎への無機のスズ及び五価ヒ素の経口投与後における臓器中 8-OHdG 濃度

	脳	肺	肝臓	腎臓	脾臓
対照群	4.42 ±1.23	8.94 ±7.49	8.35 ±5.92	6.05 ±2.93	4.64 ±1.31
3価砒素	5.59 ±1.48	8.41 ±6.67	40.88 ±22.98 ***	33.21 ±19.01 ***	5.61 ±1.43
5価砒素	4.52 ±1.72	9.12 ±3.44	43.84 ±24.18 ***	34.13 ±11.37 ***	4.22 ±1.56

8-OHdG/dG*105

対照群に対して*** ; p<0.001

【参考文献】

- 1) 山内 博、木下純子、永井尚子、島崎久美子、笠松美恵 尿中砒素濃度からみた重症度分類および砒素暴露と DNA 損傷評価に関する研究. 和歌山における毒物混入事件に関する臨床報告書, 和歌山における毒物混入事件に関する臨床研究班, 32, 2002
- 2) Hiroshi Yamauchi, Takahiko Yoshida, Hiroyuki Aikawa, Fujio Kayama, Masahito Aminaka, Katsumi Yoshida, Miriann Akkerman, Bruce A. Fowler Metabolism and Biological Monitoring of Arsenic Poisoning Following Chronic Arsenic Exposure in Inner Mongolia, China . The Toxicologist, 42,1581,1998
- 3) 山内 博、網中雅仁、吉田勝美、千葉啓子 DNA 損傷物質暴露における生物学的モニタリング. 日本産業衛生学雑誌,44,237,2002
- 4) 葛西 宏. 活性酸素による DNA 損傷、8-ヒドロキシグアニンの生成、修復および突然変異誘導. 代謝,997,1991
- 5) 斉藤 秀、山内 博、蓮井ゆり、蔵重 篤、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ニシンの定量法. 臨床検査,44,913,2000
- 6) 山内 博. 中国における慢性ヒ素中毒の疫学研究. 平成 10～11 年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）研究成果報告書. 2000
- 7) 山内 博. 砒素暴露の生物学的モ

ニタリングに関する研究. 平成 9～10 年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）研究成果報告書. 2000

- 8) Jingbo Pi, Yoshihiko Kumagai, Guifan Sun, Hiroshi Yamauchi, Takahiko Yoshida, Hiroyasu Iso, Akiko Endo, Luyang Yu, Koichi Yuki, Takashi Miyauchi, Nobuhiro Shimojyo Decreased serum concentration of nitric oxide metabolites among chinese in an endemic area of chronic arsenic poisoning in Inner Mongolia. Free Radical Biology & Medicine, 2000

妊娠前砒素曝露した両親から出生した仔の中樞神経系 への影響の研究

分担研究者 相川浩幸 東海大学医学部講師

要旨

低濃度長期ヒ素曝露による中枢神経系への影響を動物実験より検討した。実験は、中国において現在も曝露している飲水中ヒ素濃度と同等量およびその 10 倍容量を妊娠前の両親から出生後の全実験終了まで、THA-ラット(電撃回避学習試験に対して高回避能力を有し、かつ個体差の少ない近交系のラット; Tokai High Avoidar rat)に投与した。この結果、ヒ素投与群において、学習成績には影響はみられなかったが、体重増加の抑制、および探索行動の促進(徘徊)が観察された。

A. 研究目的

慢性ヒ素曝露による皮膚異常や発ガンなどの生体影響については多くの報告がなされているが、中枢神経系への影響については、子供に障害がみられた報告がある程度で非常に少ない。また、急性高濃度ヒ素曝露、すなわち、森永ドライミルク事件(1955 年)のような事故による曝露においては、成人では中枢神経系への影響がないものの、脳一血液関門の未形成時期である新生児、乳児時期に高濃度ヒ素曝露した児童の IQ が低い(Yamashita et al., 1972; Mizukawa et al., 1988)報告もある。以上の報告の如く、周産期の脳一血液関門が未発達の時期の無機ヒ素曝露は中枢神経系への影響があることが疑われる。我々は、現在も生活用水として無機ヒ素の曝露をし続け、ヒ素の皮膚影響がみられている中国内モンゴル自治区の農民の状況を加味し、飲水中無機ヒ素濃度 1 ppm を妊娠前から一生涯ヒ素曝露した時の中枢神経系への影響の研究を動物実験による行動学的手法によって行った。

B. 研究方法

1. 実験動物

使用動物: 東海大学医学部環境保健学教室において、JcL-Wistar-rat を母系とし、繁殖と学習試験による選択の繰り返しによって育成した THA ラット(THA: Tokai High Avoidar-rat)の 10 週齢を使用した。この THA ラットは Sidman 型電撃回避学習試験に対して高い回避能力を有し、かつ個体差の少ない近交系のラットである。

動物の飼育は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ に 24 時間空気調節と、8:00~20:00 を照明、20:00~8:00 を消灯とした照明調節を施した動物室内に設置したクリーン・ラック内で行った。餌は CE-2 (日本クレア製)の固形飼料、水は水道水を学習行動試験中を除き自由に与えた。

2. ヒ素投与

1) 投与ヒ素濃度: ヒ素濃度はラットが平均 1 日飲水量 30ml、体重 250g と仮定して換算した結果、1 ppm とした。さらに、ラットが飲水を拒否しない範囲内で、量一反応関係を得るために、住民の飲水中ヒ素濃度の

10倍量に当たる10ppmの曝露群も追加した。なお、対照群には水道水を与えた。

2) ヒ素飲料水の作成：砒酸溶液(トリケミカル研究所作成)を水道水にて1%の保存液を作成し、使用時に既定濃度のヒ素混入水を作成した。

投与期間：投与期間は交配前1週間より両親に投与を開始し、交配後の妊娠期間及び授乳期間までは母親に交配前より与えたと同じヒ素濃度混入飲料水を与えた。さらに離乳後は仔に母親と同濃度のヒ素濃度混入飲料水を全実験終了まで与えた。

3. 検査項目

1) 飲水量及び体重：飲水量は隔日または毎日、給水瓶の重量を計測し、重量をもって飲水量とした。体重は母親については離乳まで、出生仔については実験終了まで週1回、午前中に測定した。

2) 発育分化：出生仔の発育分化の観察は耳介展開、眼瞼開裂、歯牙萌出の項目について毎日2回(朝、夕)同時刻に行った。

3) 自発行動試験

(1) open-field による試験：Petit らの一部を改良した自作の open-field 装置を使用した。測定は生後28日齢のラットをスタート・ボックスに入れたのち、3分間の行動を観察した。観察行動項目はスタート・ボックスからフィールドに出るまでの時間(潜時)、両前肢を床より上げる回数(立ち上がり回数)、四肢全てが分割線を超えた数(歩行量)、前肢で顔を描く数(洗顔回数)、前肢や口で体毛を擦る数(毛繕い回数)、排尿回数、脱糞回数を観察し、各行動ごとに時間または回数を記録した。

(2) Animex による試験：MK-Aimex 装置(室町科学株式会社)の上に、飼育用プラスチック製ケージを設置し、このケージ内にラットを入れ測定した。測定は生後35日齢のラットについて、36時間行い、外部環境の影響が少なくなる後半の24時間を記録した。

4) Sidman 型電撃回避学習試験：スキナー

箱とミニコンピューターによる制御およびプリンターからなるオペラント行動測定装置を用いた。スキナー箱は外部環境の影響を避けるため、蛍光灯と換気扇を備えた防音箱に入れた。学習スケジュールは回避反応(レバー押し)と電撃刺激との間隔を30秒、電撃刺激と電撃刺激との間隔を5秒、電撃刺激は100V、3mAの強さで0.5秒間通電する条件で行った。この学習試験は生後56日齢のラットについて、1試行を60分、1日1試行の頻度で連続10日間行った。

C. 研究結果

1. 実験動物

1) 飲水量

母親の飲水量は多少の変動があるものの、交配前、妊娠および授乳のいずれ期間とも、ヒ素濃度に依存的な飲水量の変化並びに個体間に大きな差がみられなかった。

離乳以降の出生仔の飲水量は、雄雌ともに対照群と1ppm群は差が認められなかったが、雌の10ppm群では対照群と比して飲水量の低下が認められた。

2) 発育

(1) 体重

出生後の仔体重は、雄については5週齢までは各群間に差がみられなかったが、6週齢以降、対照群と比して10ppm群との間に、また7週齢以降では1ppm群との間に有意な抑制が認められた。また雌については対照群と比して10ppm群の5、6、8週齢時に、また6週齢時の1ppm群との間に有意な体重抑制がみられた(図1)。

(2) 分化

出生した全仔を対象に、発育の一般的な指標である耳介展開、歯牙萌出、眼瞼開裂とした。この結果、いずれの分化指標とも各群間に差が認められなかった(表1)。

2. 自発行動

1) Open-field 試験

3 分間の Open-field の試験結果は、雌についてはいずれの観察項目とも各群間に差がみられなかったが、雄については、潜時では対照群と比して 1 ppm 群、10 ppm 群が有意に短く、行動量では対照群と比して 1 ppm 群、10 ppm 群が有意に多かった (図 2)。

2) Animex 試験

各群ごとに 2 時間間隔に 24 時間分集計した行動量の結果は、照明時には行動量は少なく、消灯時には行動量が多いパターンは各群とも同様であった。また単位時間ごとの行動量の群間比較では雄では 2 点、雌では 1 点に差がみられたものの、一定の傾向がみられなかった。

3. 学習行動

学習成績は前後半ともに各群間に差はなかった。

D. 考察

1. 発育

出生仔の体重が 10 ppm 群では 5 週齢より、また 1 ppm 群では 6 週齢より明らかな体重増加の抑制がみられたが、母親の体重、飲水量及び出生時の出生仔体重、出生後から離乳までの授乳仔の体重増加、発育指標の分化にはヒ素曝露の影響がみられなかった。この結果より、成熟動物においては少なくとも飲料水中ヒ素濃度 10 ppm までは飲水を拒むことなく、また妊娠中の胎仔及び授乳中の乳仔の外表的な発育に影響がないことを示唆するものである。しかしながら出生仔においては、母親ではみられなかった雌の 10 ppm 群でヒ素混入水の飲用を拒む結果が得られた。また母親の哺育から離れた離乳以降より、ヒ素曝露群の体重の抑制が雌雄ともにあらわれ、特に高濃度群により強くあらわれた。飲水量が減少すれば体重増加の抑制が起ることは陶然の結果であるが、飲水量の減少がみられなかつ

た雌においても、体重増加の抑制が飲水中ヒ素濃度と依存的にみられたことは、飲料水の低下によるものと評価するより、ヒ素の影響と考えるべきであろう。

2. 中枢神経系

行動学的手法により中枢神経系への影響を自発行動と学習行動から検討した。学習行動試験においては、1 ppm 群のみならず 10 ppm 群においても回避能力に差がみられなかった。この Sidman 型電撃回避学習試験は学習の強化が取り入れやすく学習効果が高い試験方法であり、また今回の実験では THA-ラットを使用したため、このラットの特徴である高学習能であり、かつ個体差の少ないことから、学習への影響が比較的鋭敏に観察されるが、対照群と同様の成績であったことは 10 ppm までの曝露濃度では回避学習に影響を及ぼすものではないことを意味する。

自発行動は生体影響の総合評価の現われであり、一例として妊娠中のアルコール飲料による出生仔の多動 (Furuya, Aikawa et al 1996)、やトルエン曝露による興奮 (Aikawa et al 1997) を行動量の増加として表現された報告がある。これらの結果を化学物質などの影響評価として用いることができる。今回の慢性ヒ素の検討には、open-field 試験と Animex 試験を自発行動試験に用いた。open-field 試験では行動量を観察のみならず、運動能力 (歩行の仕方、行動範囲など) と情動性の観察が可能である。また Animex 試験では、詳細な行動内容の観察ができないものの、長時間の行動量を観察できる。この両測定方法を用いた結果、1 日の行動量、昼夜の行動量並びにそのパターン、すなわちサーカディアンを乱すようなヒ素曝露の影響はみられなかった。しかし曝露群において、明らかな潜時の短縮と行動量の増加がみられた結果