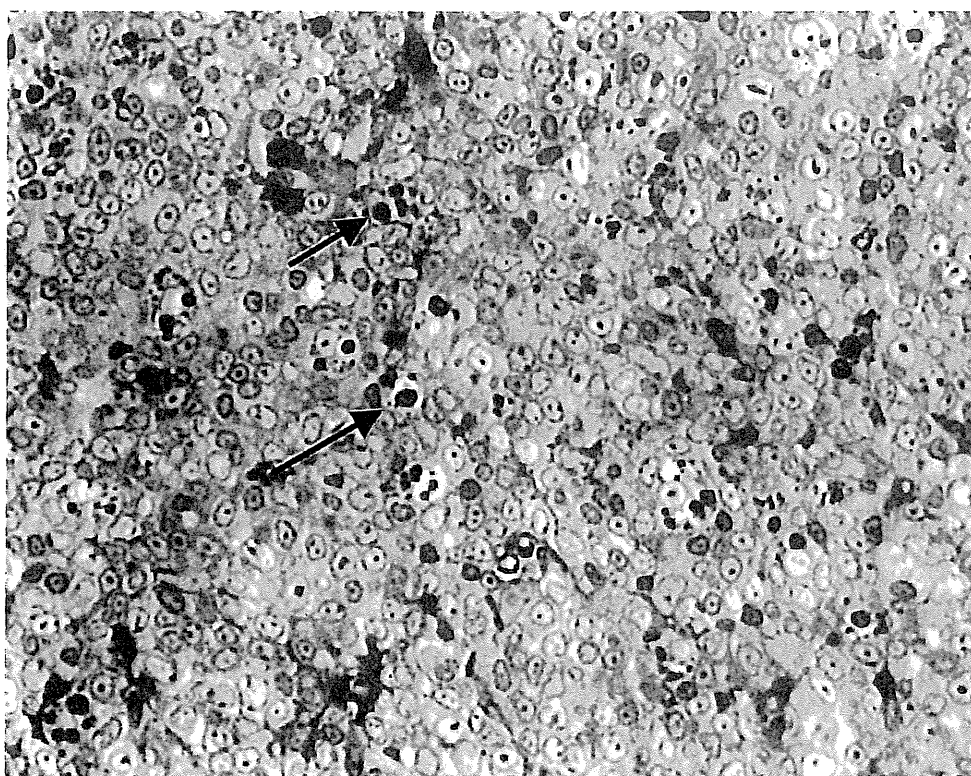


写真－ 1

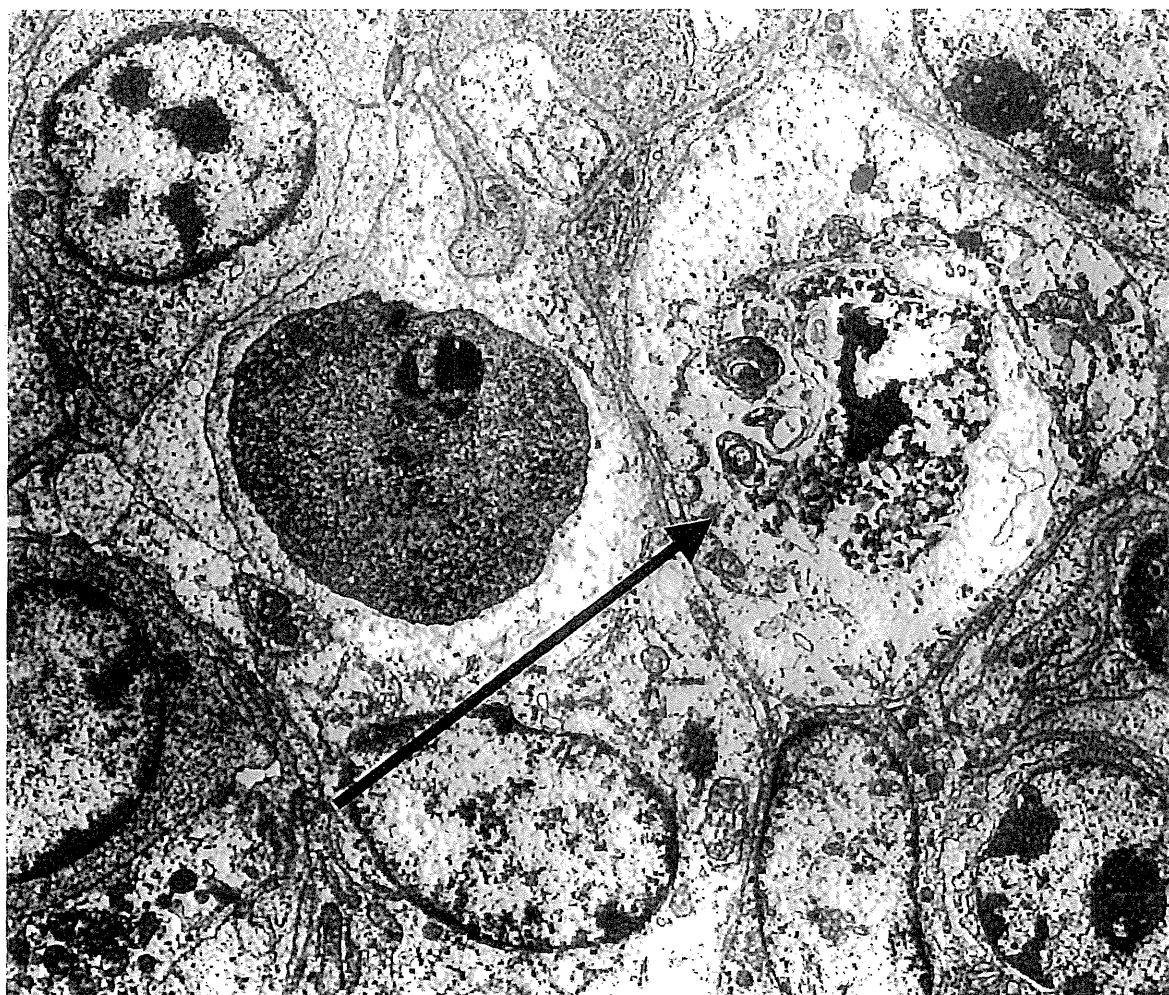
投与 1 2 時間後の胸腺（超薄切片）



矢印：アポトーシス像を呈する胸腺Ｔリンパ球

写真－2

投与12時間後の胸腺電顕像



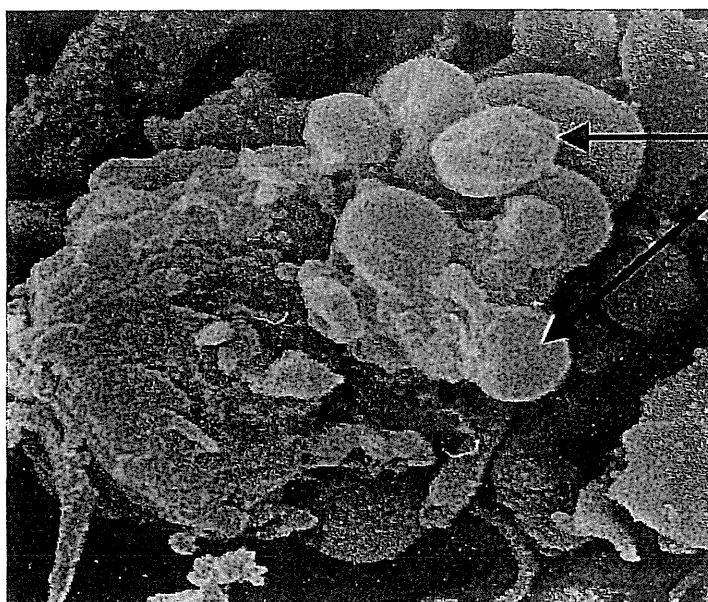
矢印：アポトーシスを生じたTリンパ球

写真-3・4

コントロール群：胸腺Tリンパ球



投与群（12時間後）：胸腺Tリンパ球



→ ブレブ形成

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

分担研究者 中井 泉 東京理科大学理学部応用化学学科教授

研究要旨

和歌山における急性ヒ素中毒患者及び中国内モンゴル地方の慢性ヒ素中毒患者の生検試料について放射光を用いたヒ素の状態分析を行った。急性中毒患者毛髪中のヒ素は硫化物に、職業性ヒ素暴露者における毛髪中のヒ素は 2 種類の化学状態が含まれることがわかった。尿あるいは慢性中毒患者の皮膚切片中のヒ素は 5 価の有機ヒ素に類似したスペクトルを示すことがわかった。以上より、前年度までに我々が明らかにした蛍光 X 線分析による生検組織中のヒ素の分布に加え、ヒ素の化学状態に関する情報を得ることができた。

A. 研究目的

ヒ素中毒は、ヒ素を高濃度で含む井戸水を飲むことで引き起こされる慢性中毒や、和歌山カレー事件での急性中毒といった近年社会的に問題となっている金属中毒である。このようなヒ素中毒の機構解明には生検試料中に含まれる極微量のヒ素の分析が必要であるが、従来法では困難であり、ヒ素の生体内挙動については不明な点が多い。放射光蛍光 X 線分析は、散乱の多い試料においてもサブ ppm レベルの金属元素が検出可能であり、かつ非破壊で分析できることから、金属中毒生体試料の分析法として大変優れている。我々はこれまでに、本法を慢性及び急性ヒ素中毒患者の生検試料に適用し、毛髪においては伸長方向の分析からヒ素の摂取履歴の解明を行うとともに、断面方向のイメージングから、慢性・急性中毒におけるヒ素の 2 次元分布の違いを比較した。また、慢性中毒患者の皮膚を分析し、ヒ素は体内で代謝され真皮側に蓄積していることを明らかにした。本年

度は次のステージとして蛍光 XAFS 法によるヒ素の状態分析を試み、生体内でヒ素がどのような化学形態で蓄積されているか明らかにすることを目的とした。これにより、頭髪・尿・皮膚などへのヒ素の蓄積・代謝のメカニズムを解明する上で有効な知見を得ることが期待される。

B. 研究方法

1. 試料

本研究において測定を行った生検試料とその調整方法について以下に記す。

1-1. 毛髪

まずはじめに伸長方向の一次元分析を行った。測定対象は、和歌山のヒ素混入カレー事件にて発生した急性ヒ素中毒患者の毛髪 2 点、半導体産業従事者の毛髪 2 点である。一本の毛髪の両端をこよりに固定してホルダーに取り付け、毛髪の根元側から毛先側に向かって一次元分析を行った。ただし半導体産業従事者

の毛髪については伸長方向が不明である。

1-2. 尿

毛髪と同じく急性ヒ素中毒患者から採取された尿をポリエチレン袋に封入したものを XAFS 測定に使用した。

1-3. 皮膚

中国内モンゴル地方の慢性ヒ素中毒患者からパンチバイオプシーによって採取された皮膚について OCT コンパウンドに包埋した。これをクライオスタットで温度 -15°C にした中で、マイクロームを用いて厚さ $80\mu\text{m}$ に切り出しマイラー膜上に固定した。

2. 放射光蛍光 X 線分析

測定はつくばの高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリー (PF) の BL-4A 及び 12C にて行った。

BL-4A では X 線を Si(111)二結晶モノクロメータにて単色化し、垂直方向の集光ミラーにより集光後、4象限スリットでビームサイズを調整した。測定雰囲気は真空であり、試料から発生した蛍光 X 線を Si(Li) 半導体検出器 (SSD) で検出した。試料はコンピュータ制御による XY ステージ上に固定し、二次元に動かして測定を行った。

12C での測定は、Si(111)二結晶モノクロメータを用い、As K 吸収端前後で入射 X 線エネルギーを掃引し、この時発生する As の蛍光 X 線強度を記録した。蛍光 X 線の検出には 19 素子 Ge-SSD を用いた。

C. 研究結果及び考察

1. 毛髪

XAFS 測定に先立って測定した急性患

者の毛髪の一次元分析の結果を図 1 に示す。前年度の報告通り、ヒ素の摂取に伴うピークが見られている。このピーク箇所をマーキングし、XAFS 測定を行った。図 2 に As K-XANES スペクトルを示す。各物質の吸収端エネルギーや有機ヒ素、無機ヒ素によってスペクトルの形状が変化していることから、As の化学状態が区別できることがわかる。急性ヒ素中毒患者のスペクトルは硫化物のもに極めて近いスペクトルを示しており、また、吸収端エネルギーもほぼ同じことから、毛髪中で 3 価の硫化物として存在していることが示唆される。比較として測定した健常者毛髪中のヒ素はこれとは明らかに異なったスペクトルを示すことから通常生活で摂取した場合とは異なったスペクトルを示すことがわかる。一方、図 3 に示す外部暴露となる半導体産業従事者の場合では、吸収端エネルギーは 3 価的な値を示し、ピーク位置は GaAs に近いものになっている。しかしながら、 11.875 keV 付近の形状が GaAs のものとは異なっている。その他の標準試料と比較すればこのエネルギー位置は健常者毛髪中のヒ素に最も近い。健常者のスペクトルを日常の食物などから摂取され、代謝された 5 価の有機ヒ素とすれば、産業従事者のそれも日常生活において摂取されたヒ素によるものと考えることができる。以上より、産業従事者については 2 種類の起源をもつヒ素が毛髪中に含まれていることが示唆される。すなわち 1 つは毛髪外部に付着した GaAs、もう 1 つは日常生活によって体内に摂取されたヒ素である。この 2 つについて区別するには毛髪断面を 2 次元分析し、ヒ素が検出された点において今回と同様の

XAFS 測定を行うことが必要である。残念ながら本研究において用いた KEK PF ではこのような実験を行うことは不可能である。今回新たに得られた知見を基に、第3世代放射光施設(SPring-8)において実験を行えばさらなる知見を得ることができるであろう。

2. 尿及び皮膚

尿は前述の通り、ポリエチレン袋に封入したものを直接測定した。皮膚についてはパラフィン包埋した切片を用いた。急性中毒の場合と同じように切片中に局在しているため、XAFS 測定に先立ち 1 次元分析を行った。その結果を図4に示す。この図から明らかなように表皮側から 200 μm の付近にヒ素の濃集が認められた。表皮の厚みはおよそ 150 μm であるため、ヒ素は表皮との境界に近い真皮側に存在することがわかった。

以上のようにしてヒ素の濃集場所を特定した状態で XAFS 測定を行った。その結果を図5に示す。尿についてはスペクトルの形状はアルソン酸に類似している。一般にヒ素が尿に排泄されるときには有機の 5 価まで代謝されているといわれることを考えると実験結果はこれを支持するが、ケミカルシフトについては今後 DMA, TMA などを準備し比較していく必要があると思われる。

皮膚についてはピーク位置のエネルギーは 11.868 keV であり、無機の 3 価のヒ素よりも高い酸化数であることを示している。皮膚中のヒ素が慢性中毒によりゆっくりとした時間で内部暴露されたと考えれば、おそらく代謝は 5 価まで進んでいることが予想される。

D. 結論

急性ヒ素中毒患者の毛髪中のヒ素の化学状態分析を行った結果、ヒ素は硫化物に近い形で蓄積していることがわかった。これは明らかに健常者の毛髪に蓄積するヒ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のヒ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ヒ素の存在が示唆された。

尿及び皮膚におけるヒ素の化学状態は有機形の 5 価に近いものを示した。これらは一般に知られているヒ素の代謝経路における最終形に最も近い結果を与えたものと考えられる。

以上の生体試料の分析において生体中のヒ素の化学形について有用な知見が得られた。放射光蛍光 X 線分析が生体中の微量元素の分析に有効であることを示している。本法によって生体組織での形態学的知見と元素分布、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。

謝辞 本研究をすすめるにあたり、貴重な資料をご提供くださった聖マリアンナ医科大学予防医学教室山内 博先生に深く感謝いたします。本研究は、東京理科大学理学部寺田靖子氏(現在 SPring-8, JASRI)および荒井輝子氏との共同研究として実施されました。記して謝意を表します。

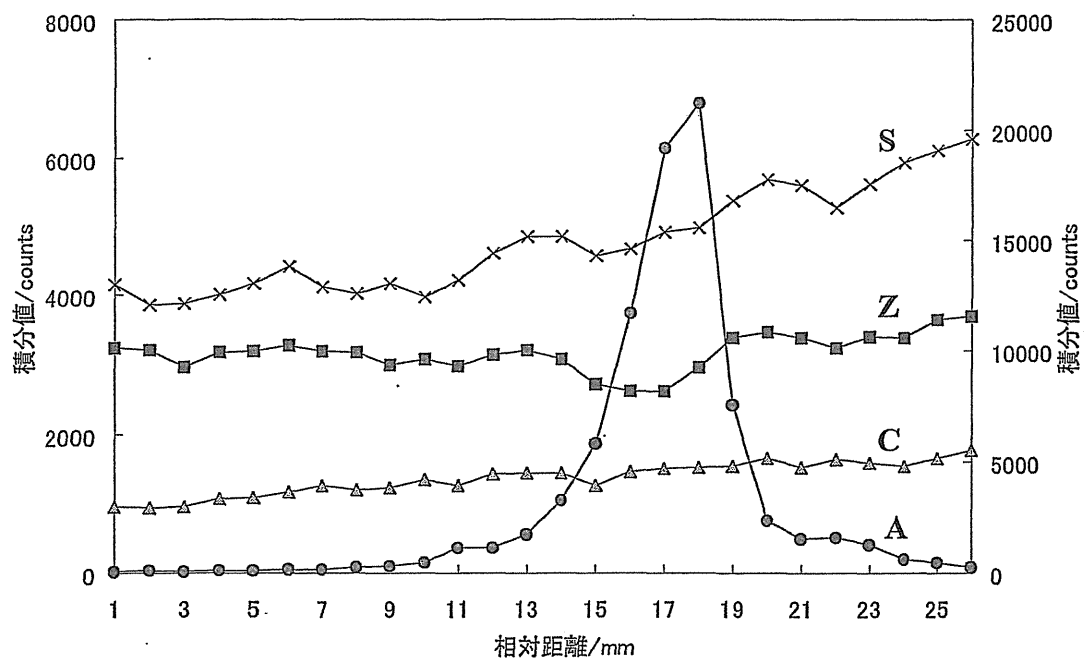


図 1 急性砒素中毒患者毛髪伸長方向の元素強度分布

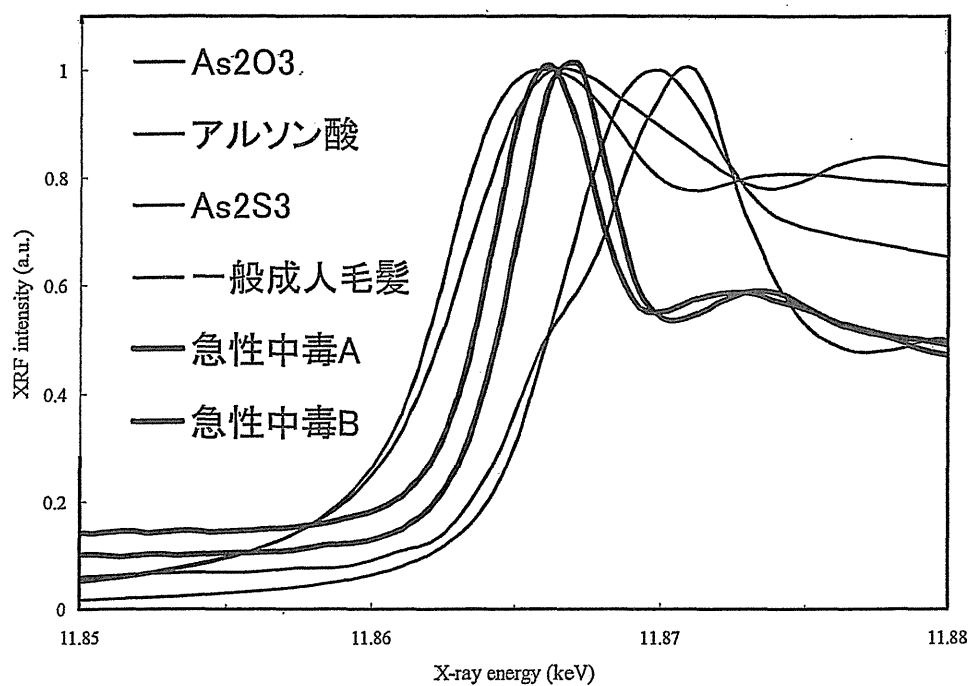


図 2 毛髪(急性中毒)中の As と標準試料の比較

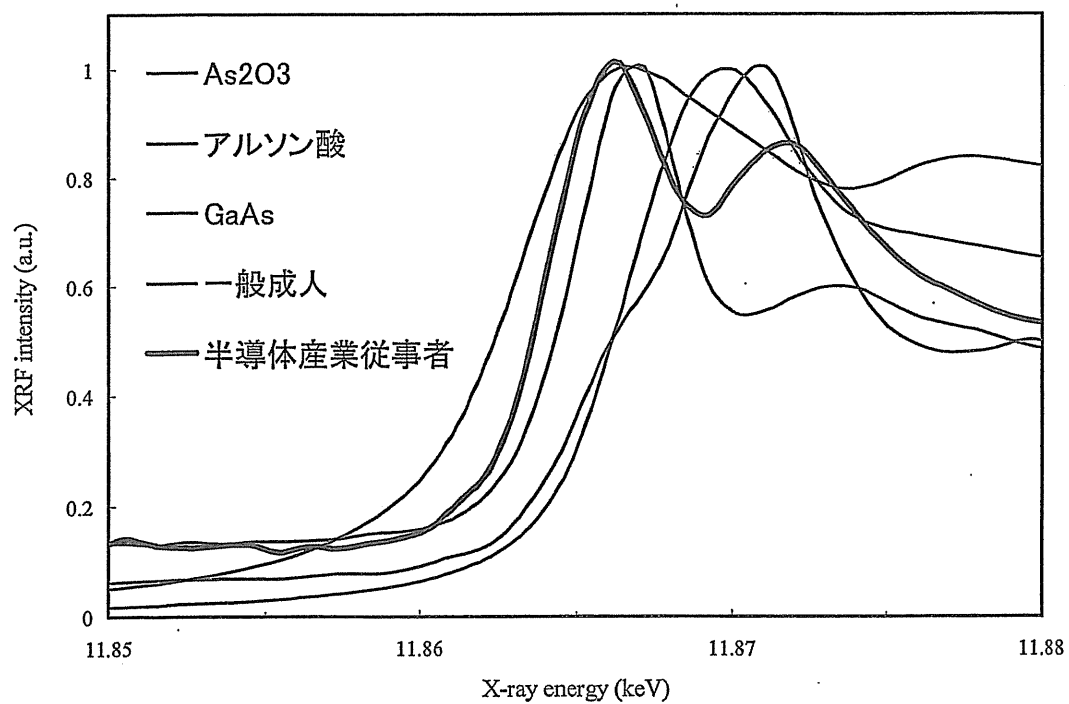


図 3 毛髪(職業性)中の As と標準試料の比較

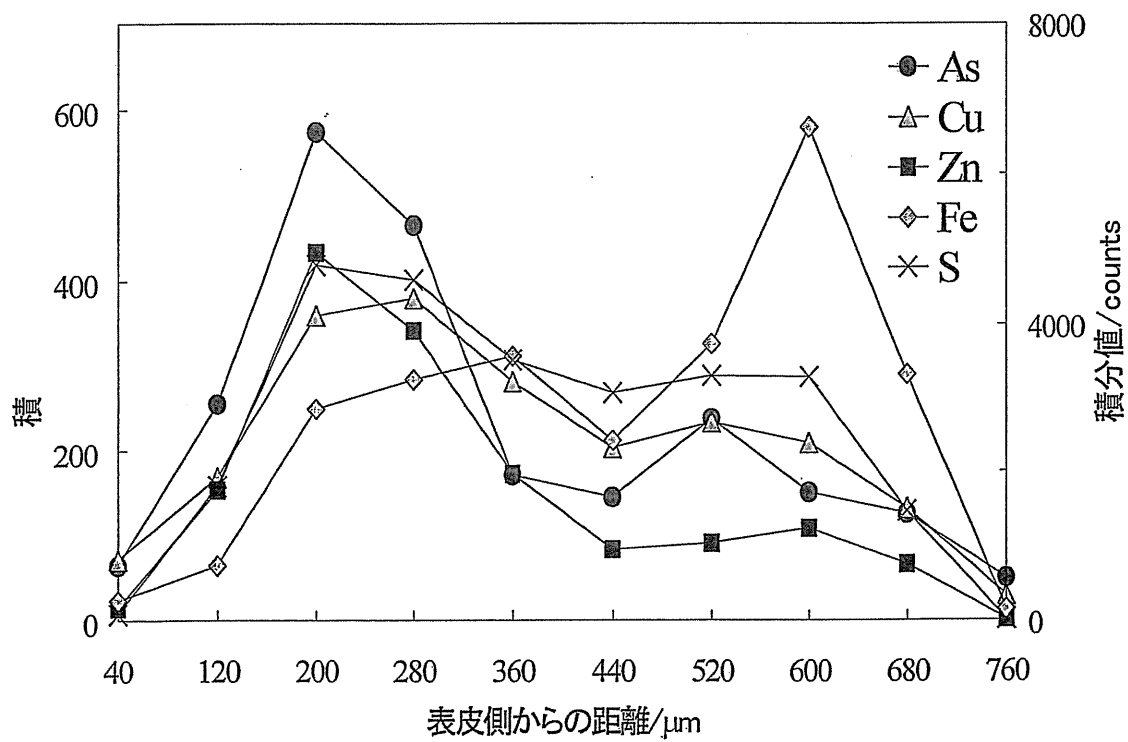


図 4 皮膚試料の 1 次元分析結果

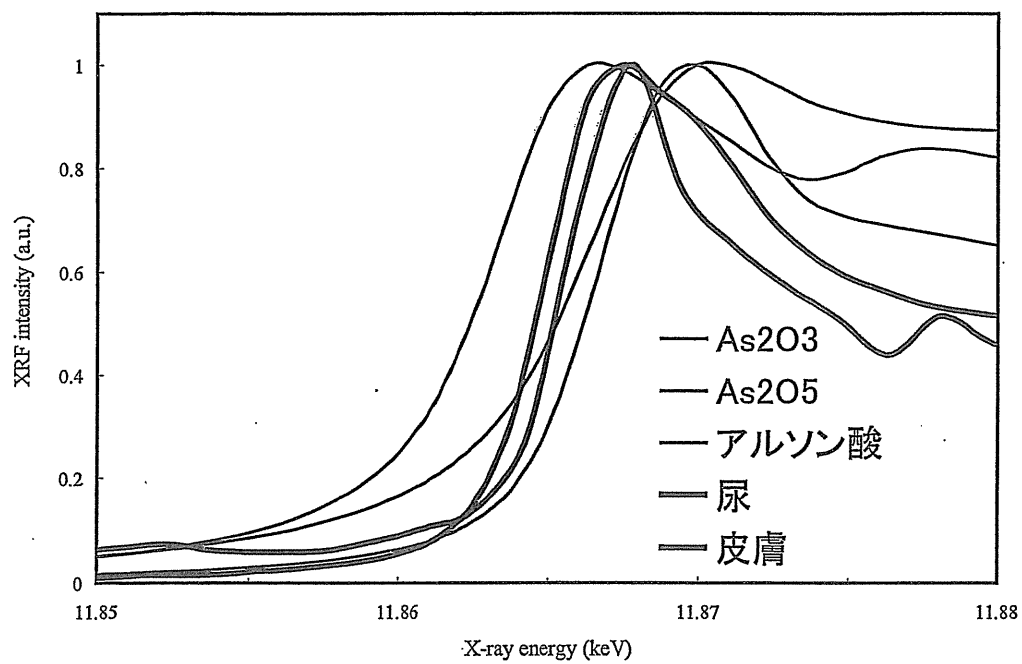


図 5 尿および皮膚の As K-XANES スペクトル

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
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

分担研究者 安藤正典 国立医薬品食品衛生研究所、環境衛生化学部長

協力研究者 徳永裕司 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究者 内野 正 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究者 Tarit Roychowdhury 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 尿中ヒ素化合物について

平成13年2月、インド共和国西ベンガル州 Mushidabad 地区を訪れ、ヒ素汚染された地下水を飲料水などに用いている23家族89名から飲料水及び尿を採取した。この内、4家族の9名は control 家族であった。19家族の内、1～2名に慢性的なヒ素汚染による皮膚症状が観察された。インド共和国の飲料水中のヒ素基準は50 ppb 以下である。Pの家族が用いる tubewell からインドの飲料水中のヒ素基準50 ppb を越える75.5 ppb が検出された。この家族3名から得られた尿中の total arsenic 量は、それぞれ、1360.7, 831.5, 1005.8 ng/mg/ml creatinine であり、明らかに高値を示した。control の3家族9名の利用する tubewell の水中のヒ素量は2.6 ppb であり、尿中の total arsenic 量は49.6～147.2 ng/mg/ml creatinine と低い値を示した。A～Lの家族の内、尿中 creatinine あるいはヒ素メチル化能に異常を示さない44名を選び、尿中のヒ素代謝物について検討した。ヒ素の代謝産物である As(III) と MMA, As(III) と DMA, MMA と DMA の間には良い相関関係が成立した。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11家族から夫婦を抽出し、尿中のヒ素代謝物の男女間の比較を行った。尿中 MMA、DMA 及び total arsenic 量の間に統計的に有意な関係が示された。

1. 角化細胞によるヒ素化合物の代謝について

As(V)の培養細胞への添加量が $10\mu\text{M}$ ～ $100\mu\text{M}$ /well と増加するに従い、lysate 中の As(III)の濃度が $0.002\mu\text{M}$ ～ $0.054\mu\text{M}$ /0.5ml と増加した。As(V)の添加量が $70\mu\text{M}$ /well では lysate 中の As(V)が認められなかったが、 $100\mu\text{M}$ /well の場合、 $0.034\mu\text{M}$ /0.5ml 検出され、細胞中の glutathione が枯渇し、その結果として、As(V)が lysate 中に増加したことが示唆された。少量の As(III)は角化細胞の活性化に寄与していることが示された。As(III) $10\mu\text{M}$ /ml/well を添加して24時間培養したとき、培養液中の As(III)の約3.5%が細胞中に蓄積した。DMA の 0.1mM /ml/well を添加して24時間培養を行ったとき、lysate 中には培養液中の DMA の0.02%分しか細胞中に存在しなかった。As(III) $0.5\mu\text{M}$ /ml/well を添加したとき、lysate 中には As(III)の添加量の4.5%が検出された。ヒ素のメチル化代謝物の細胞への取り込みが無機ヒ素の取り込みに比べて低いこと明らかになり、ヒ素化合物の細胞への取り込みに関して細胞膜

のバリアー機能が関与していることが示された。

A. 研究目的

世界各地で約20件の地下水のヒ素汚染とそれに起因する慢性的な被害が報告されている。この内、主要な地下水のヒ素汚染地域として、バングラデシュ、インド西ベンガル州、中国内蒙古自治区と新疆自治区、台湾及びベトナムのハノイ地区である。

ヒ素汚染された飲料水を長期間、慢性的に摂取することにより発生するヒ素による健康被害を調査するため、平成13年2月20日～22日にインド共和国西ベンガル州の Mushidabad 地区を訪れ、ヒ素汚染された地下水を長期間に渡り飲料水、料理用水あるいは家事の目的で使用している家族から飲料水及びヒト尿を採取した。飲料水中のヒ素及び尿中のヒ素化合物 (As(III)、As(V), methylarsonic acid (MMA)、dimethylarsinic acid (DMA)) の分析を行い、住民のヒ素による健康影響を尿中ヒ素代謝物量を用いて検討した。

更に、慢性的なヒ素被害の生体への最初の影響として、手足の皮膚の hyperkeratosis あるいは melanosis 等が報告されている。In vitro な皮膚への影響を調べるため、培養皮膚細胞に対する As(III) あるいは As(V) の無機ヒ素又はヒ素代謝物である MMA あるいは DMA の皮膚代謝について検討したので併せて報告する。

B. 研究方法

B-1. 採取試料

対象家族は、A～Y の23家族であった。A～L の12家族は大家族であり、兄弟の一家が一つの敷地内に独立した平屋を構

え、深度 26 feet と 240 feet の2種類の tubewell を共同で使用していた。また、W～Y の家族は Domkal Block, Mininpur Post-office, Bakshipur village に居住し、同一の兄弟で構成する家族であり、地下水のヒ素汚染がない control 地域として調査対象に加えた。調査対象の家族構成、皮膚に現れたヒ素症状の有無、性別及び年令を Table 1 に示した。

調査した 89 名の内、男女の内訳は男性 46 名、女性 43 名であり、20 才未満の子供は 48 名であった。井戸水は tube-well より採水し、ポリエチレン製共栓付き遠沈管に入れた。なお、井戸水約 10ml 当たり、1 滴の濃硝酸を保存剤として加えた。尿は 1 回採取し、その約 10ml をポリエチレン製共栓付き遠沈管に採取した。現地において、採取後の井戸水及び尿は、氷の入った ice-box に保存し、研究室では -30℃ の freezer に保存した。使用時に解凍して用いた。

B-2. 飲料水中のヒ素の分析

飲料水 0.1ml を精密に量り、ミリQ水 0.9ml を正確に加える。これに、濃硝酸 2 μ l を加え、試料溶液とする。試料溶液 100 μ l を reodyne 製 loop-injector に注入し、島津製 LC-10AT 型液体クロマトポンプで 0.7ml/min の流量で Agilent 製 7500 型 Inductively coupled plasma -mass spectrometer (ICP/MS) に送液し、試料溶液中のヒ素量を測定した。ヒ素量は、予め、As(III) 5, 10 及び 50 ppb を含む 0.1% 硝酸溶液を調製し、その 100 μ l を用いて作成した検量線より求めた。

B-3. 尿中ヒ素の形態分析

ヒト尿を解凍した後、尿 100 μ l をミク

Table 1 gender, age and symptom of arconisis of habitants

	sex	age	symptom		sex	age	symptom		sex	age	symptom
1. A-1	M	55	+	31. F-4	F			61. O-3	F	7	
2. A-2	F	46	+	32. G-1	F	21		62. O-4	M	5	
3. A-3	M	20		33. G-2	F	3		63. P-1	F	36	+
4. A-4	F	28		34. H-1	F	35	+	64. P-2	M	18	
5. A-5	F	9		35. H-2	F	16		65. P-3	M	16	
6. A-6	F	22		36. I-1	M	43	+	66. P-4	F	13	
7. B-1	M	50	+	37. I-2	F	35	+	67. Q-1	M	40	+
8. B-2	F	35	+	38. I-3	M	18	+	68. Q-2	F	30	+
9. B-3	M	28	+	39. I-4	M	15	+	69. Q-3	F	10	
10. B-4	M	19		40. J-1	M	30	+	70. Q-4	M	7	
11. B-5	M	16		41. J-3	F	8		71. R-1	M	36	+
12. B-6	M	14		42. J-4	F	4		72. R-2	F	29	
13. B-7	M	9		43. K-1	M	37	+	73. R-3	M	16	
14. B-8	F	11		44. K-2	F	30		74. R-4	M	12	
15. C-1	M	40		45. K-3	M	12		75. S-1	M	45	+
16. C-2	M	13		46. K-4	F	9		76. S-2	F	36	
17. C-3	F	11		47. K-5	M	7		77. S-3	M	16	
18. C-4	F	3		48. K-6	M	4		78. T-1	M	45	
19. D-1	F	42	+	49. L-2	M	19	+	79. U-1	M	30	
20. D-2	M	9		50. L-3	M	13		80. U-3	F	2	
21. E-1	M	39	+	51. L-4	M	9					
22. E-2	M	5		52. L-5	M	6		81. V-1	M	75	
23. E-3	M	5		53. M-1	M	35	+	82. V-2	F	65	
24. E-4	F	8		54. M-2	F	25		83. W-1	M	35	
25. E-6	F	55	+	55. M-3	F	8		84. W-2	F	30	
26. E-7	F	16		56. M-4	F	5		85. W-3	M	8	
27. E-8	M	14		57. M-6	F	60	+	86. X-1	M	27	
28. F-1	F	25		58. N-2	F	13		87. Y-1	F	35	
29. F-2	F	11		59. O-1	M	38	+	88. Y-2	F	13	
30. F-3	M	9		60. O-2	F	24		89. Y-4	F	9	

ロバイアルに入れ、ミリQ水100 μ lを加え、試料溶液とした。試料溶液20 μ lを用い、HPLCカラムに注入し、カラムにてヒ素化合物の分離を行った。分離した後、Agilent製7500型 ICP/MSにて、m/z75のピークを測定した。予めAs(III), DMA, MMA及びAs(V)の20及び100 ppbを含む標準溶液を調製し、この液20 μ lを用いて作成した検量線より各種ヒ素化合物の濃度を求めた。

HPLC 装置は、島津製 STM-10A 型システムコントローラーで制御された島津製 10AC 型 HPLC 用ポンプ、島津製 SSIL-10A 型オートサンプラー、島津製 CT0-10AC 型カラムオープンを連結させて用いた。また、カラム分離後の溶離液をポリエチ

レン管 (0.3 mm i.d.) にて Agilent 製 7500 型 ICP/MS に連結し、検出器として用いた。

HPLC 条件

検出器 : Agilent 製 7500 型 ICP/MS

カラム : Ge1 PAK GL-IC-A15 (日立化成製、4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm)

カラム温度 : 35 $^{\circ}$ C

溶離液 : 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0)

流量 : 1.0 ml/min

ICP/MS の装置の条件を Table 2 に示した。

B-4. 尿中creatinineの測定

尿0.5 mlを正確に量り、ミリQ水を加えて、正確に5 mlとした。この液0.5 mlを

Table 2 ICP/MS conditions

RF power	1400 W	Monitoring mass	35 (Cl), 75 (As)
RF refraction	5 W	Integrating interval	0.3 sec
Plasma gas current	15 l min ⁻¹	scan number	one time
carrier gas current	0.8 l min ⁻¹		

遠沈管に入れ、除蛋白液3 mlを正確に加え、10分間放置した。2500 rpmで10分間遠心分離した後、上清2 ml正確に量り、試験管に入れた。ピクリン酸試液1 ml及び0.75 mol/l水酸化ナトリウム試液1 mlを正確に加え、25～30℃の水浴中に20分間放置した。放置後、520 nmにおける吸光度 A_T を測定した。10 mg/dlの

creatinineを含む標準溶液を調製し、同様に操作を行い、得られた吸光度 A_S を測定し、次の式より尿中のcreatinine量を求めた。

$$\text{尿中のcreatinine量 (mg/dl)} = A_T / A_S \times 10$$

B-5. 培養角化細胞を用いたヒ素の代謝実験

凍結された NHEK-Neo 表皮角化細胞 (Cryo 製、三光純薬より購入) を解凍した後、3500 cells/cm² を 25cm² の培養フラスコに培養液 5 ml を用いて播種した。37℃の CO₂ incubator で 5 日間培養を行った。0.25%のトリプシン及び 0.02%の EDTA を含む PBS 溶液 0.5 ml を加え、4 分間角化細胞を処理した後、PBS 溶液を除き、更に、2～5 分間、時々、器壁をたたいた。角化細胞のトリプシン消化状況を観察しながら、角化細胞が流動化し始めた時、培養液 5 ml を培養フラスコに加え、細胞を懸濁させた。懸濁液を遠沈管に移し、1000rpm で 10 分間遠心分離を行った。上清を除き、培養液 5ml を加えて再度懸濁させ、細胞数を計測した。培養液で希釈し、角化細胞 1×10⁴ cells/ml

の懸濁液を調製し、その 1.0ml を 24 穴のマイクロプレートに播種した。37℃の CO₂ incubator で 4 日間培養を行った。培養液を交換した後、各種濃度のヒ素化合物を含む溶液を添加し、37℃の CO₂ incubator で 24 時間、角化細胞の培養を行った。培養液 0.7 ml をマイクロチップに移し、4℃の冷蔵庫に保存し、培養液中のヒ素代謝物の実験に用いた。残った培養液に Tetra color one 試液 30 μl を加え、37℃の CO₂ incubator で 2 時間培養を行った。呈色液 100 μl を 96 穴マイクロプレートに入れ、マイクロプレートリーダーにて 490 nm の吸光度を測定した。次に、24 穴のマイクロプレート培養液を除き、PBS 試液 0.5 ml を用いて角化細胞を 2 回洗った。0.2% Triton-X 試液 0.5 ml を加え、10 分間放置した。角化細胞の溶解液 (lysate) をマイクロチップに移し、細胞中のヒ素化合物の測定用試料とした。培養液あるいは lysate 20 μl を用い、HPLC-ICP/MS にてヒ素代謝物の測定を行った。

C. 研究結果

C-1. 尿中のヒ素化合物について

C-1-1. ヒ素化合物の HPLC クロマトグラム

As (III), As (V), MMA 及び DMA の 100ppb を含む溶液を調製し、その 20 μl を用いて HPLC 測定を行い、その結果を Fig.1 に示した。また、西ベンガル州の住民から採取した尿中のヒ素化合物の HPLC クロマトグラムを Fig.2 に示した。

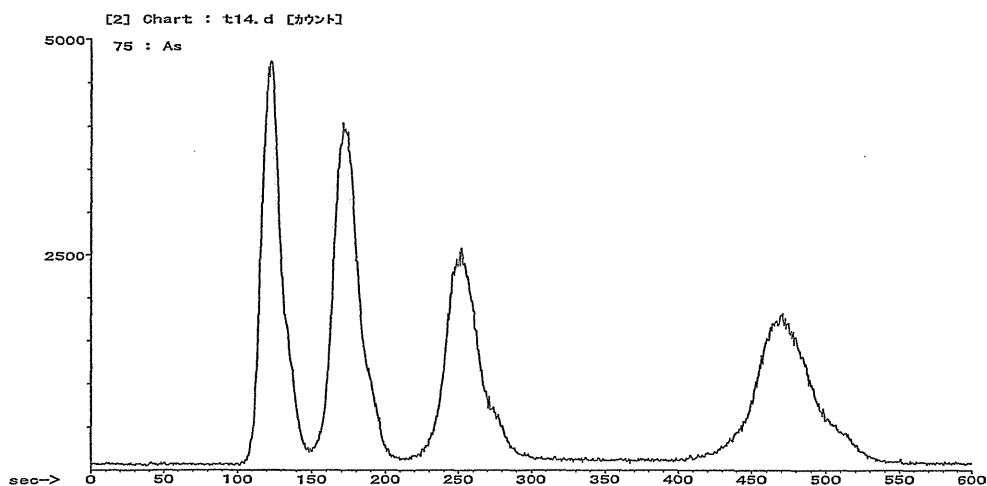


Fig.1 HPLC Chromatogram for As(III), DMA, MMA and As(V)

各ピークは保持時間の短い順に、それぞれ、As(III) (保持時間 120 秒)、DMA (保持時間 170 秒)、MMA (保持時間 250 秒) 及び As(V) (保持時間 470 秒) である。住民の尿の HPLC クロマトグラムで保持時間約 90 秒に出現する小さなピークは As betain に由来するピークであった。

た値を用い、ヒ素化合物 ng 当たりの mg/ml creatinine 単位を用いた。また同時に tubewell 中の無機ヒ素量を ppb の単位で示した。A～L の家族は 2 本の tubewell を並行して用いているため、両方の値を示した。

28 番の E-8 の 14 才の男子であるが、creatinine で補正後のヒ素化合物の量が MMA の 15932.9 ～DMA の 1014087.4

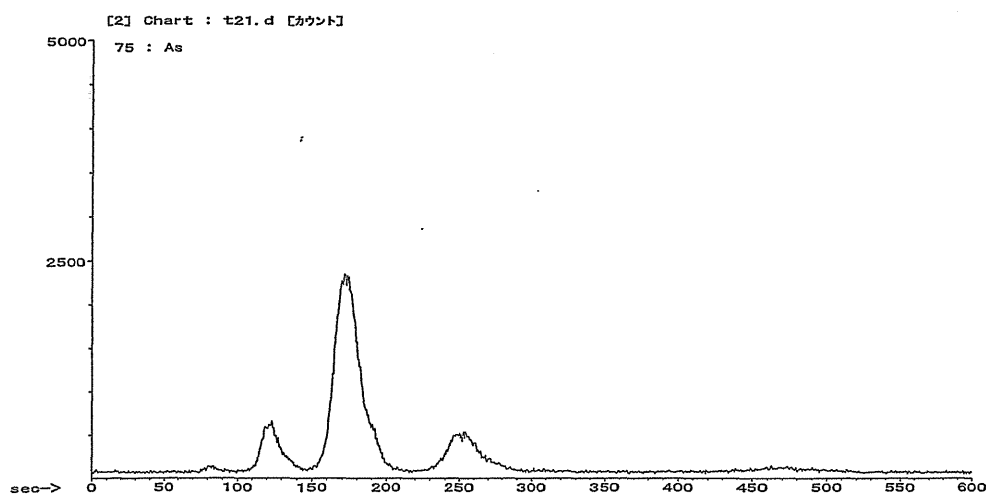


Fig.2 HPLC Chromatogram of As Speciation from D-1 Urine

C-1-2. 尿中のヒ素化合物について

A～Y の 23 家族、89 名の住民から採取した尿中のヒ素化合物の測定結果を Table 3 に示した。得られたヒ素化合物の濃度は尿中 creatinine の濃度 mg/ml で補正し

ng/mg/ml creatinine と異常に大きな値を示した。この理由として、尿 1ml 当たりの creatinine 量が 0.001 mg と異常に低い値を示しており、腎機能の異常が考えられた。従って、このデータは除外することにした。

Table 3-1 Arsenic in tubewells and arsenic species
in urines from A to Y families

(unit: ng/mg/ml creatinine)

	As(III)	As(V)	MMA	DMA	Total
	0.752	13.3	0.0	23.1	194.8
	0.407	16.0	0.0	12.5	218.2
	0.630	15.9	0.0	15.4	197.6
	0.405	9.9	29.6	16.5	231.8
	0.568	33.6	0.0	35.0	302.2
	0.205	31.6	0.0	25.8	317.9
	0.483	19.7	0.0	15.7	112.1
	0.444	29.5	16.7	27.5	221.0
	0.394	55.6	5.6	67.5	207.1
	0.624	24.4	0.0	33.2	190.4
	1.520	53.3	0.0	38.7	202.0
	0.721	69.7	0.0	39.1	257.2
	0.487	36.8	0.0	35.3	312.9
	0.503	67.2	0.0	47.9	378.1
	0.444	0.0	14.4	22.8	81.3
	0.921	16.1	0.0	12.4	133.5
	0.170	15.3	0.0	17.6	207.5
	0.574	22.5	20.6	16.2	202.8
	0.472	14.2	17.2	16.8	205.0
	0.307	18.6	0.0	22.1	258.6
	0.822	11.8	132.1	12.3	263.6
	0.461	11.7	40.5	15.4	169.8
	0.487	12.1	78.3	17.5	117.9
	1.132	8.0	17.5	14.1	241.6
	0.028	39.7	65.0	0.0	209.4
	0.890	186.6	15.3	149.1	1480.7
	0.001	81269.1	15932.9	150158.8	1014087.4
	0.144	19.4	0.0	13.8	123.2
	0.248	36.7	0.0	16.5	193.9
	0.248	43.1	0.0	16.9	200.0
	0.984	6.3	0.0	20.8	71.0
	0.343	32.9	0.0	18.1	114.5
	0.262	52.6	0.0	25.5	219.5
	0.594	7.2	29.6	12.0	93.9
	0.845	15.2	0.0	15.4	94.8
	0.614	19.9	0.0	16.0	104.3
	0.367	20.2	85.0	17.2	7.1
	0.568	20.4	0.0	12.7	123.8
	0.595	26.0	0.0	15.8	136.1
	0.809	21.9	0.0	17.3	119.4
	0.361	30.2	0.0	16.3	171.2
	0.008	271.2	904.1	0.0	180.8
	0.245	11.4	0.0	8.6	86.7
	1.018	27.9	0.0	18.2	210.0
	0.293	21.8	0.0	15.0	154.4
	0.899	15.0	0.0	10.7	193.4
	0.519	16.0	0.0	6.9	107.1
	0.075	55.8	0.0	43.9	311.0
	0.611	29.0	168.5	27.7	0.0
	0.587	31.5	0.0	20.6	99.2
	0.203	12.3	0.0	14.8	84.9
	0.091	40.6	90.1	18.7	146.1

また、48 番目の J-4 は 4 才の女兒である
が、尿 1 ml 当たりの creatinine 量が
0.008 mg とやはり異常に低い値を与えた。

尿中の creatinine 補正前のヒ素量は MMA
の 0ppb

Table 3-2 Arsenic in tubewells and arsenic species
in urines from A to Y families

(unit: ng/mg/ml creatinine)

		As(III)	As(V)	MMA	DMA	Total
37.9		33.4	0.0	43.3	128.4	205.2
37.9	3.075	7.0	331.7	16.5	4.1	359.1
37.9	0.861	0.0	184.6	28.8	364.6	578.1
37.9	0.251	43.9	6478.5	108.9	179.1	6810.3
37.9	0.953	59.8	257.9	65.6	358.9	742.2
20.9	0.640	11.4	188.5	81.9	414.4	696.2
48.1	0.819	159.3	12.4	149.2	188.4	509.4
48.1	0.669	28.3	102.9	136.6	538.5	806.2
48.1	0.787	58.5	5.2	77.0	474.5	615.2
48.1	0.085	1143.5	9167.1	376.1	453.4	11140.2
75.5	0.202	238.8	0.0	282.5	839.4	1360.7
75.5	0.594	143.4	8.6	145.8	533.7	831.5
75.5	0.411	134.1	38.4	151.2	682.1	1005.8
75.5	0.190	78.5	739.3	171.1	113.7	1102.7
37.2	0.270	69.0	0.0	58.6	336.5	464.1
37.2	0.239	43.5	0.0	67.4	368.2	479.1
37.2	0.139	233.6	0.0	111.8	635.2	980.6
37.2	0.101	153.7	0.0	90.2	777.4	1021.3
0.6	0.445	15.7	0.0	18.0	185.9	219.6
0.6	0.721	9.3	0.0	8.9	129.9	148.1
0.6	0.204	26.5	32.3	21.6	133.7	214.1
0.6	0.565	56.2	0.0	20.3	305.6	382.2
37.2	1.707	26.2	7.6	20.9	182.8	237.6
37.2	0.956	55.4	51.0	73.1	465.7	645.2
37.2	0.669	111.6	20.2	128.6	270.7	531.1
0.7	0.342	5.0	0.0	13.5	73.7	92.2
0.7	0.198	26.2	54.9	36.3	130.5	247.9
0.7	0.204	23.0	0.0	18.1	204.3	245.4
2.6	0.528	6.8	0.0	12.1	41.9	60.9
2.6	0.529	2.3	0.0	8.9	49.4	60.5
2.6	0.416	15.1	0.0	17.3	65.1	97.5
2.6	0.377	5.3	0.0	8.0	36.4	49.6
2.6	0.292	8.2	0.0	16.8	62.6	87.5
2.6	0.389	16.2	0.0	28.3	56.5	101.0
2.6	0.784	6.4	0.0	9.9	58.4	74.7
2.6	0.238	15.5	0.0	22.2	109.4	147.2
2.6	0.363	19.8	0.0	20.4	92.8	132.9

～As(V)の 7.0 ppb であり、creatinine 補正により、Total 量が 1356.1 ng/mg/ml creatinine と高い値を与えた。このデータも除外することにした。

ヒトの体内においては、As(III)あるいは As(V)の形態で取り込まれた無機ヒ素

は体内のメチル化酵素により、70～90% が MMA あるいは DMA の形に代謝されて尿中から排泄されている。今回調査した大部分のヒトの MMA と DMA の割合はこれまでの報告された範囲に入っていたが、Table 4 に示した 11 名の人々が 4.2～

57.2%という低い値を与えた。これらの人々は肝臓のヒ素のメチル化酵素の活性が他の人々に比べて低下していることが示唆された。この結果より、以後の解析にこの 11 名のデータは使用しないことにした。

同様に、角化細胞 1×10^4 cells/ml の懸濁液 1.0 ml を用いて 4 日間培養を行った後、As(III) の $0.5 \sim 10 \mu\text{M}$ /well を添加して、更に 24 時間培養を行った。その結果を Table 6 に示した。

As(III) の添加量が増加するに従い、

Table 4 Samples that showed the abnormal ratio of (MMA+DMA)/Total arsenic

(unit: ng/mg/ml creatinine)

	As(III)	As(V)	MMA	DMA	Total arsenic	(MMA+DMA)/Total Arsenic ×
0.822	11.8	132.1	12.3	107.5	263.6	45.4
0.487	12.1	78.3	17.5	10.1	117.9	23.3
0.028	39.7	65.0	0.0	104.7	209.4	50.0
0.367	20.2	85.0	17.2	7.1	129.4	18.7
0.611	29.0	168.5	27.7	0.0	225.2	12.3
3.075	7.0	331.7	16.5	4.1	359.1	5.7
0.251	43.9	6478.5	108.9	179.1	6810.3	4.2
0.953	59.8	257.9	65.6	358.9	742.2	57.2
0.085	1143.5	9167.1	376.1	453.4	11140.2	7.4
0.190	78.5	739.3	171.1	113.7	1102.7	25.8

C-2. 角化細胞によるヒ素化合物の代謝について

角化細胞 1×10^4 cells/ml の懸濁液 1.0 ml ずつを 24 穴マイクロプレートに播種し、 37°C の CO_2 incubator で 4 日間培養を行った。培養液を交換した後、As(V) の $10 \sim 100 \mu\text{M}$ を含む培養液 1.0 ml を 24 穴マイクロプレートに添加し、 37°C の CO_2 incubator で 24 時間培養を行った。角化細胞の viability 及び lysate 中の As(III) の量を測定し、その結果を Table 5 に示した。培養液中に As(V) を $10 \sim 100 \mu\text{M}$ /well 添加して 24 時間培養したとき、培養液中の As(V) が細胞に取り込まれ、培養液中の As(V) の濃度が低い場合には、As(III) のみが観察され、濃度が $100 \mu\text{M}$ /well になった場合、lysate 中に As(V) が存在することが観察された。

lysate 中の As(III) の量が増加した。しかし、lysate 中には MMA、DMA の様なヒ素代謝物を検出することが出来なかった。角化細胞 1×10^4 cells/ml の懸濁液 1.0 ml を用いて 4 日間培養を行った後、MMA の $0.2 \sim 2 \text{ mM}$ /well を添加して、更に 24 時間培養を行った。その結果を Table 7 に示した。

Lysate 中には、培養液中に添加した MMA 以外の化合物は観察されなかった。MMA 0.2 mM /ml/well の添加した場合、lysate 中に $0.0657 \mu\text{M}$ /0.5 ml の MMA しか観察されなかった。培養液中の MMA の 0.06 % 分しか細胞中に存在しないことが示された。As(III) $0.5 \mu\text{M}$ /ml/well の添加の場合、lysate 中には $0.045 \mu\text{M}$ /0.5 ml が存在しており、As(III) の細胞中での存在量は As(III) の添加量の 18 % が存

Table 5. Viability of keratinocyte and As(III) nad As(V) in lysate after adding 10–100 μ M/well As(V)

(a) Viability

0 μ M	0.553	0.569	0.637	0.671	4	0.608	0.056
10 μ M	0.629	0.664	0.556	0.679	4	0.632	0.055
30 μ M	0.650	0.755	0.849	0.236	4	0.623	0.270
50 μ M	0.855	0.756	0.861	0.710	4	0.796	0.075
70 μ M	0.859	0.767	0.832	0.551	4	0.752	0.140
100 μ M	0.833	0.858	0.852	0.679	4	0.806	0.085

(b) As(III) in lysate

(unit: μ M)

0 μ M	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
10 μ M	0.001	0.003	0.001		3	0.002	0.001
30 μ M	0.009	0.007	0.008		3	0.008	0.001
50 μ M	0.021	0.015	0.013		3	0.016	0.004
70 μ M	0.039	0.027	0.029		3	0.032	0.006
100 μ M	0.059	0.055	0.047		3	0.054	0.006

(c) As(V) in lysate

(unit: μ M)

0 μ M	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
10 μ M	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
30 μ M	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
50 μ M	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
70 μ M	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
100 μ M	0.050	0.004	0.047		3	0.034	0.026

存在していた。このことから、ヒ素代謝物の細胞への取り込みが無機ヒ素の取り込みに比べて低いことが示され、ヒ素取り込みに関して細胞膜の関与が示唆された。

角化細胞 1×10^4 cells/ml の懸濁液 1.0 ml を用いて 4 日間培養を行った後、DMA の 0.1~1 mM/well を添加して、更に 24 時間培養を行った。その結果を Table 8 に示した。

Table 6. Viability of keratinocyte and As(III) in lysate after adding 0.5–10 μ M/well As(III)

1. viability

0 μ M	0.187	0.178	0.213	0.230	4	0.202	0.024
0.5 μ M	0.737	0.640	0.672	0.716	4	0.691	0.044
1 μ M	0.653	0.632	0.642	0.701	4	0.657	0.031
3 μ M	0.660	0.763	0.788	0.839	4	0.763	0.075
7 μ M	0.802	0.736	0.780	0.685	4	0.751	0.052
10 μ M	0.682	0.662	0.651	0.739	4	0.684	0.039

2. As(III) in lysate

(unit: μ M)

0 μ M	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
0.5 μ M	0.055	0.047	0.034		3	0.045	0.011
1 μ M	0.070	0.078	0.078		3	0.075	0.005
3 μ M	0.179	0.232	0.183		3	0.198	0.030
7 μ M	0.440	0.492	0.485		3	0.472	0.028
10 μ M	0.687	0.697	0.686		3	0.690	0.006

Table 7. Viability of keratinocyte and MMA in lysate after adding 0.2–2mM/well MMA

(a) Viability

0 mM	0.504	0.575	0.589	0.522	4	0.548	0.041
0.2 mM	0.642	0.644	0.726	0.616	4	0.657	0.048
0.6 mM	0.629	0.668	0.589	0.611	4	0.624	0.033
1 mM	0.627	0.586	0.702	0.470	4	0.596	0.097
1.4 mM	0.641	0.613	0.648	0.706	4	0.652	0.039
2 mM	0.615	0.673	0.772	0.720	4	0.695	0.067

(b) MMA in lysate

(unit: μ M)

0 mM	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
0.2 mM	0.062	0.074	0.064		3	0.067	0.006
0.6 mM	0.206	0.207	0.237		3	0.217	0.018
1 mM	0.341	0.330	0.310		3	0.327	0.016
1.4 mM	0.512	0.499	0.443		3	0.485	0.037
2 mM	0.628	0.670	0.645		3	0.648	0.021

MMA の場合、0.2～2 mM/well を用いたが、DMA の場合には、1.4 mM/well で cell viability の低下が認められたため、0.1～1 mM/well を用いて検討した。

+DMA) /Total arsenic が 4.2～57.2%と正常人のヒ素のメチル化能が低い Table 4 に示した 11 名を除き、76 名の住民から採取した尿を用いて解析を行った。

Table 8. Viability of keratinocyte and DMA in lysate after adding 0.1–1mM/well DMA

(a) Viability

0 mM	0.606	0.574	0.651	0.643	4	0.619	0.036
0.1 mM	0.609	0.620	0.741	0.622	4	0.648	0.062
0.3 mM	0.586	0.718	0.622	0.621	4	0.637	0.057
0.5 mM	0.626	0.654	0.596	0.604	4	0.620	0.026
0.7 mM	0.614	0.507	0.596	0.552	4	0.567	0.048
1 mM	0.474	0.550	0.645	0.535	4	0.551	0.071

(b) MMA in lysate

(unit: μ M)

0 mM	0.000	0.000	0.000		3	0.000	0.000
0.1 mM	0.039	0.045	0.043		3	0.042	0.003
0.3 mM	0.106	0.119	0.111		3	0.112	0.007
0.5 mM	0.149	0.156	0.160		3	0.155	0.006
0.7 mM	0.222	0.255	0.213		3	0.230	0.022
1 mM	0.290	0.292	0.298		3	0.293	0.004

D. 考察

D-1. 尿中のヒ素化合物について

尿中の creatinine 濃度が 0.001 mg/ml あるいは 0.008 mg/ml と異常に低い値を示した 28 番の E-8 (14 才の男子) 及び 48 番目の J-4 (4 才の女儿) 並びに (MMA

尿中の total arsenic 量を 0～99、100～199 と 100 刻みで 999 まで、1000 からは 200 刻みで 1400 ng/mg/ml creatinine まで分け、各範囲に入るヒトの数を Fig.3 に示した。

インド共和国の飲料水中のヒ素基準は 50 ppb 以下である。

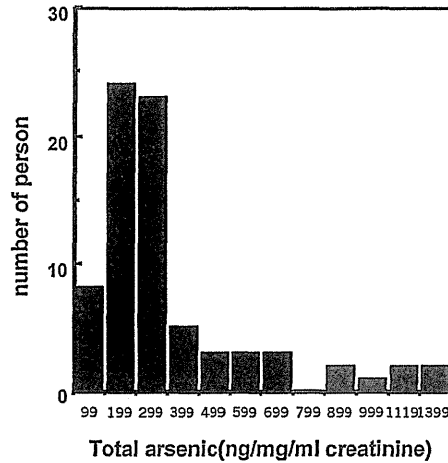


Fig.3 Number of persons who ranged from 0 to 1400 ng/mg/ml creatinine of total arsenic in urines

P の家族は 75.5 ppb のヒ素を含む tubewell を飲料水、料理などに用いており、インド共和国の飲料水中のヒ素基準を over している。P-1、P-2 及び P-3 の家族の尿中の total arsenic 量は、それぞれ、1360.7, 831.5, 1005.8 ng/mg/ml creatinine であり、明らかにインド共和国の飲料水のヒ素基準以下の水を用いている家族に比べて高い値を与えていることが分かった。V~Y の家族は地下水のヒ素汚染がない地域に居住する家族である。飲料水中のヒ素濃度は 2.6 ppb であり、3 家族の人々 9 名の尿中の total arsenic 量は 49.6~147.2 ng/mg/ml creatinine であり、今回検討した人々の中で尿中の total arsenic 量は低い部類に属していた。Control 家族の V~Y 家族を除く 20 家族の内、インド共和国の飲料水のヒ素基準を越える家族は P 家族のみであり、このことから考えても今回検討した家族の尿中の total arsenic 量は低い方向に shift していることが示唆された。

A~L の家族は大家族を形成し、2 つの tubewells を用いている。今回検討した中で、13 人の何らかの異常を示した人を除く 76 名の中で A~L の家族は 44 名を占

めていた。そこで、飲料水からのヒ素の摂取が同じであると仮定し、これら 44 名の尿中のヒ素代謝物について比較検討を行い、その結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 4(a) に示したように、尿中の As(V) と As(III) の間には有意な相関関係が観察されなかった。この結果はヒト体内での無機ヒ素の代謝を考えた場合、当然の結果と言えるかもしれない。即ち、体内に摂取されたヒ素化合物は glutathione の存在下、arsenate reductase, arsenite methyltransferase, MMA methyltransferase の各種酵素の作用により、As(V)→As(III)→MMA→DMA で代謝されることが報告されている。従って、尿中の As(V) と As(III) の間の関連性が観察されないことは当然の帰結かもしれない。しかし、ヒ素の代謝産物である As(III) と MMA (Fig. 4(b)), As(III) と DMA (Fig. 4(c)), MMA と DMA (Fig. 4(d)) の間には良い相関関係が成立することが観察された。検討した A~L の家族の尿中の As(III)、As(V)、MMA 及び DMA の存在割合を 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。