

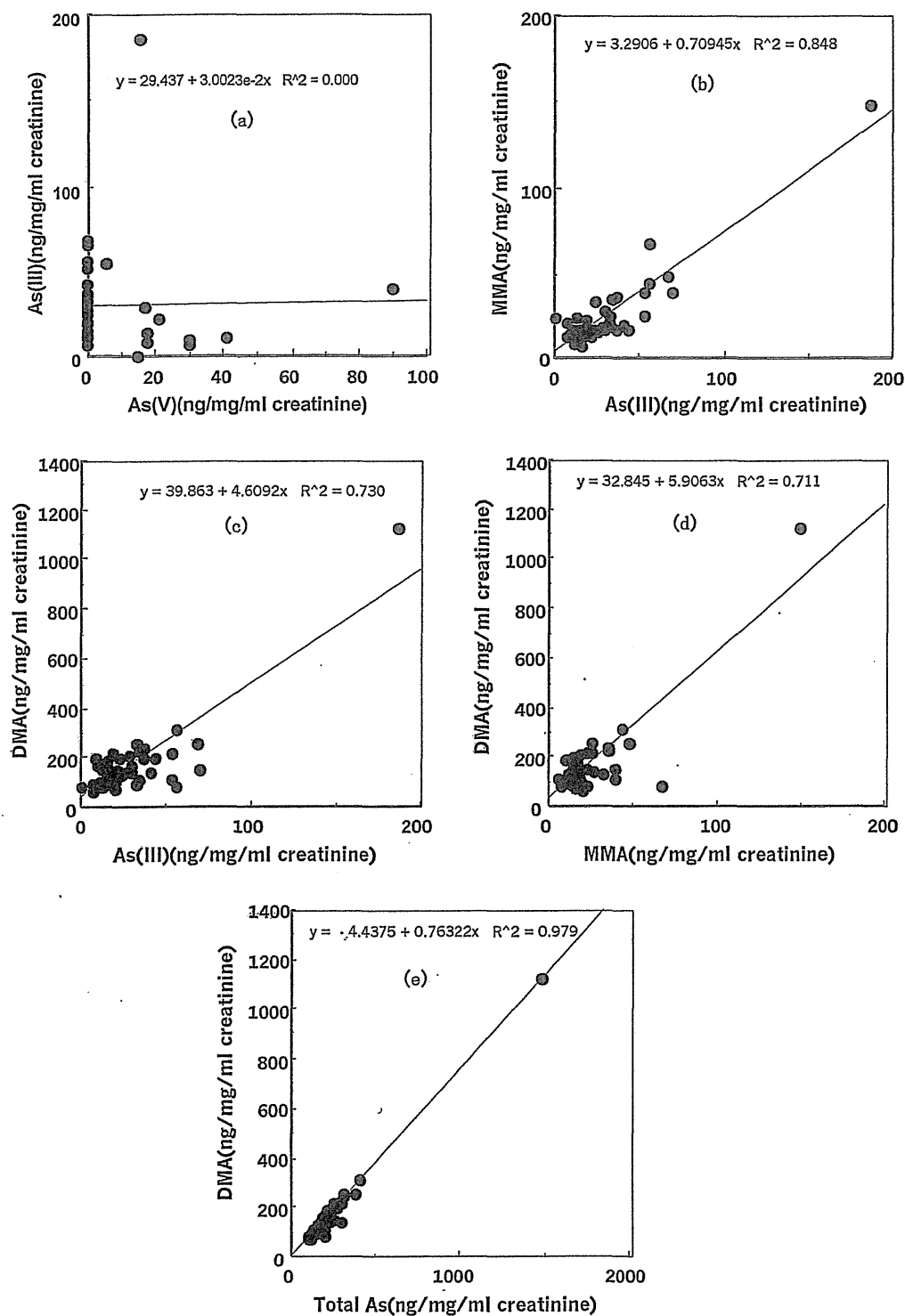


Fig.4 Relationship between each arsenic species in urines obtained from A to L families

Fig. 4(e)に total arsenic 量と DMA の関連性を示したが、両者の間に非常に良い相関関係が成立することが観察された。尿中のヒ素代謝物として 75.2%の存在量を示す DMA が total arsenic 量に影響を

与えていることが示された。

次に、生活習慣、食習慣の同じ各家族の 11 の夫婦を 23 家族の中から抽出し、尿中のヒ素代謝物の男女間の比較を行い、その結果を Fig. 5 に示した。

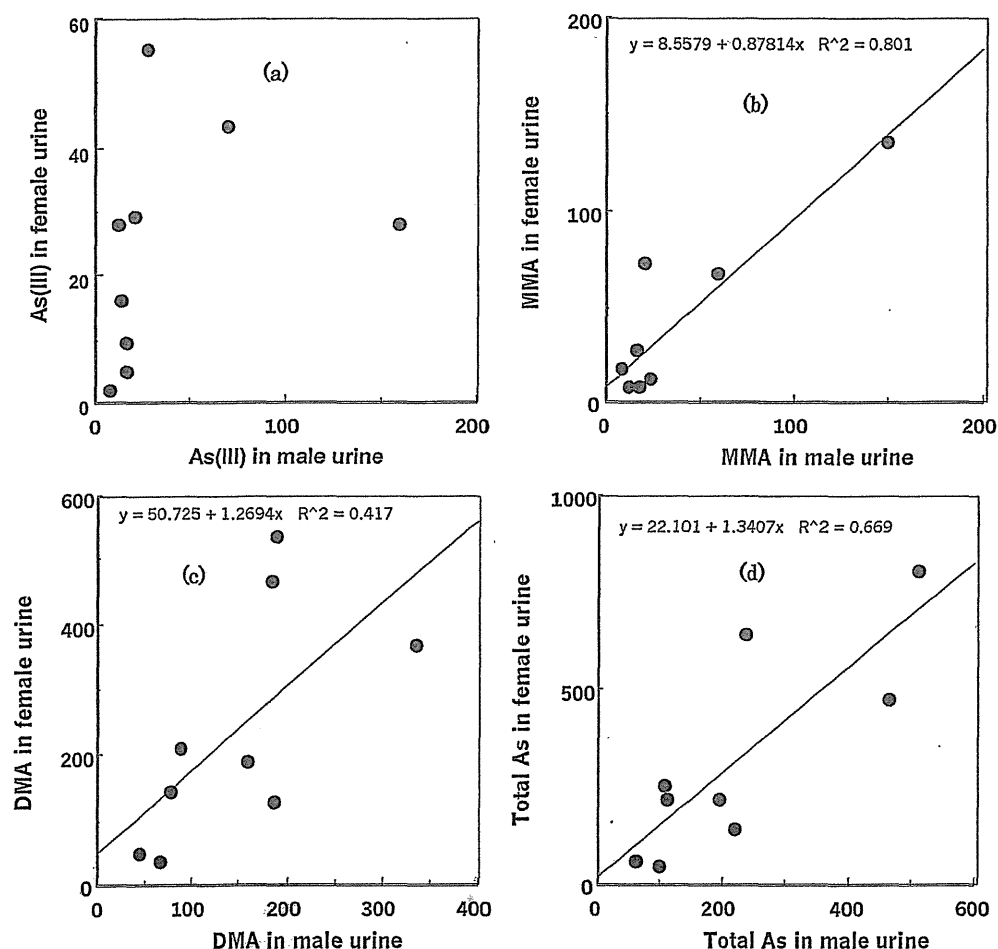


Fig.5 Relationship between male arsenicals and female ones in urines obtained from 11 couples

Fig. 5 から分かるように、男女の尿中代謝物の比較を夫婦を用いて行った場合、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。尿中のヒ素代謝物として、夫婦間で関連性のあった As(III)、MMA、DMA 及び total arsenic を見た場合、それらの平均値は、それぞれ、男性の場合には、35.4、34.8、141.4 及び 213.5 ng/mg/ml creatinine であり、女性の場合には、22.2、35.9、195.1 及

び 306.6 ng/mg/ml creatinine であった。女性の場合、男性に比べて多くのヒ素化合物を尿中に排出していることが示唆された。

D-2. 角化細胞によるヒ素化合物の代謝について

Table 5 に示した培養液中に As(V) を 10~100 μ M/well を添加して 24 時間培養したとき、の角化細胞の viability と lysate 中の As(III) の濃度 (μ M/0.5ml) を Fig. 6 に示した。

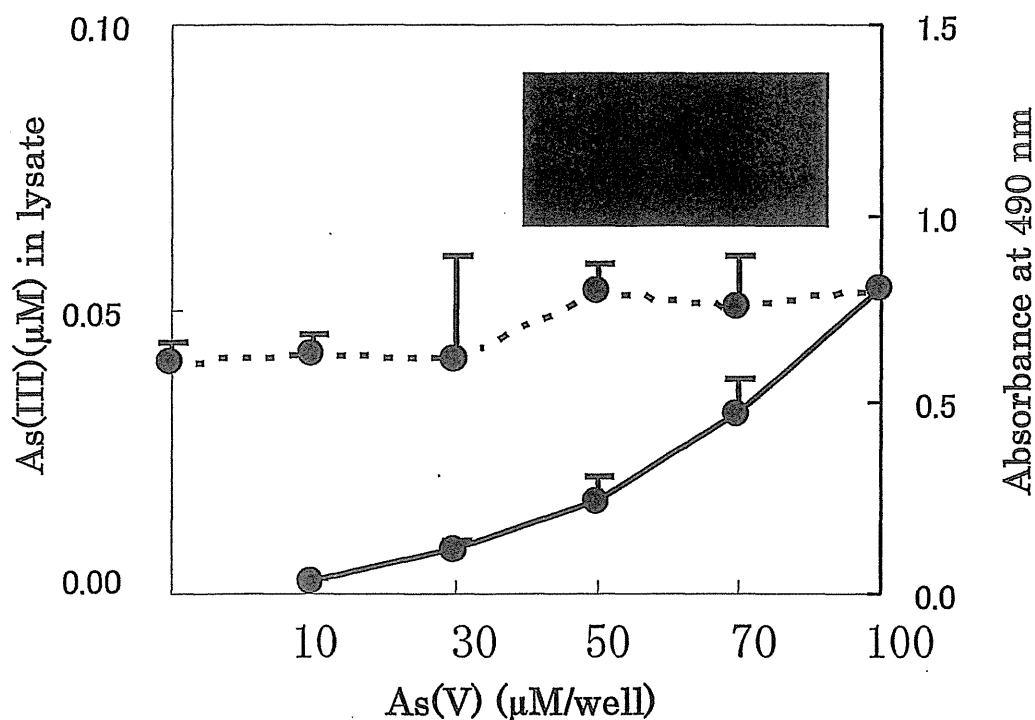


Fig.6 Viability of keratinocyte and As(III) in lysate after adding 10-100 $\mu\text{M}/\text{well}$ As(V)

As(V)の添加量が $10\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}/\text{well}$ と増加するに従い、lysate 中の As(III) の濃度が $0.002\mu\text{M}/0.5\text{ml}\sim 0.054\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ 増加することが分かった。測定した範囲において、490 nm での吸光度の変化はなく、cell viability にこの濃度の As(V) は影響を与えないことが認められた。また、As(V) の添加量が $70\mu\text{M}/\text{well}$ では lysate 中の As(V) が認められなかったが、添加量が $100\mu\text{M}/\text{well}$ となると lysate 中に $0.034\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ 検出された。As(V) は arsenic reductase と glutathione の存在下で As(III) に還元されると報告されている。As(V) $100\mu\text{M}/\text{well}$ を添加して 24 時間培養することにより、細胞中に流入した As(V) を As(III) に還元するための glutathione が消費され、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。

Table 6 に示した培養液中に As(III) を $0.5\sim 10\mu\text{M}/\text{well}$ を添加して 24 時間培養したとき、の角化細胞の viability と lysate 中の As(III) の濃度 ($\mu\text{M}/0.5\text{ml}$) を Fig. 7 に示した。

Control の viability を示す 490 nm での吸光度は 0.202 であるが、As(III) $0.5\sim 10\mu\text{M}/\text{well}$ を添加して培養したとき、吸光度は 0.657 $\sim$ 0.763 に上昇し、As(III) の添加により、見かけ上の viability が高くなったことが観察された。また、As(III) $10\mu\text{M}/\text{well}$ の添加により、lysate 中の As(III) の量は $0.69\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ を示した。即ち、As(III) $10\mu\text{M}/\text{ml}/\text{well}$ を培養液に添加し、24 時間培養することにより、培養液中の As(III) の約 3.5 % が細胞中に蓄積することが示された。

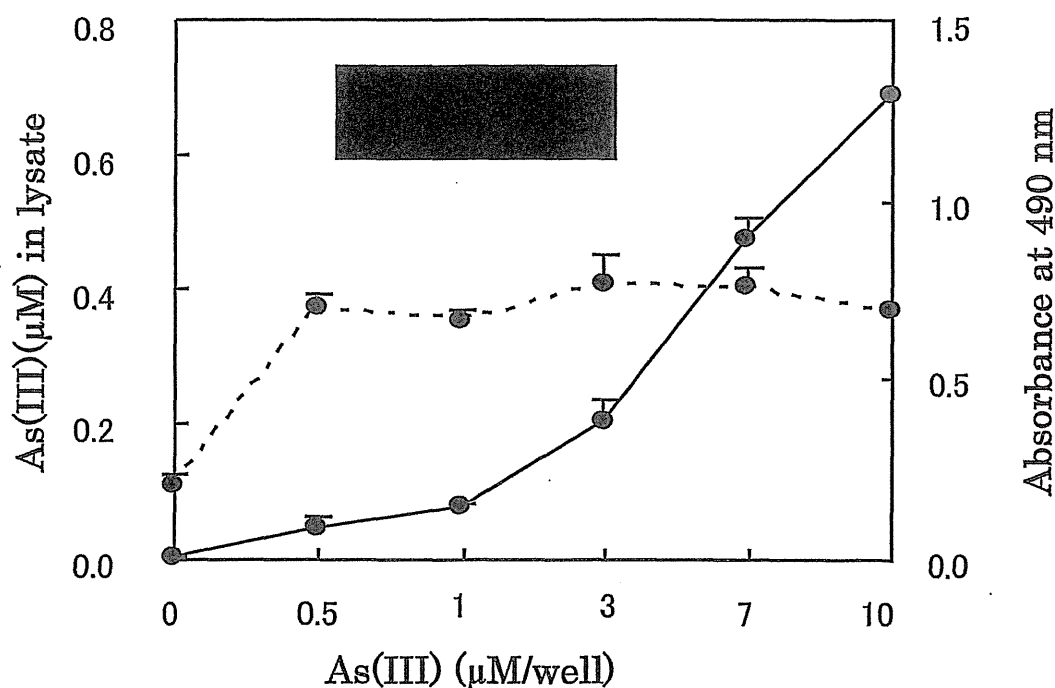


Fig.7 Viability of keratinocyte and As(III) in lysate after adding 0.0-10 uM/well As(III)

Fig. 8 に DMA の 0.1~1 mM/well を添加したときの角化細胞の viability と lysate 中の DMA の濃度 ($\mu\text{M}/0.5\text{ml}$) を示した。Table 8 に角化細胞に DMA の 0.1~1 mM/well を添加して、更に 24 時間培養を行ったとき結果を示したが、DMA 0.1 mM/ml/well の添加した場合、lysate 中に $0.042\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ の DMA しか検出されなかった。即ち、培養液中の DMA の 0.02% 分しか細胞中に存在しないことが示された。それに反して、As(III) $0.5\mu\text{M}/\text{ml}/\text{well}$ の添加の場合、lysate 中には $0.045\mu\text{M}/0.5\text{ml}$ 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 4.5% である。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。

E. 結論

今回の検討の結果、以下のことが明らかになった。

2. 尿中ヒ素化合物について

平成 13 年 2 月に地下水のヒ素汚染が激しい、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あるいは食品の調理などに用いている 19 家族 89 名から飲料水及び尿を採取した。インド共和国の飲料水中のヒ素基準は 50 ppb 以下である。P の家族が用いる tubewell から得られた水の中のヒ素量は 75.5 ppb であり、インド共和国の飲料水中のヒ素基準を over していた。P 家族の 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、明らかに今回検討した住民から得られた尿中のヒ素化合物の量が高い値を

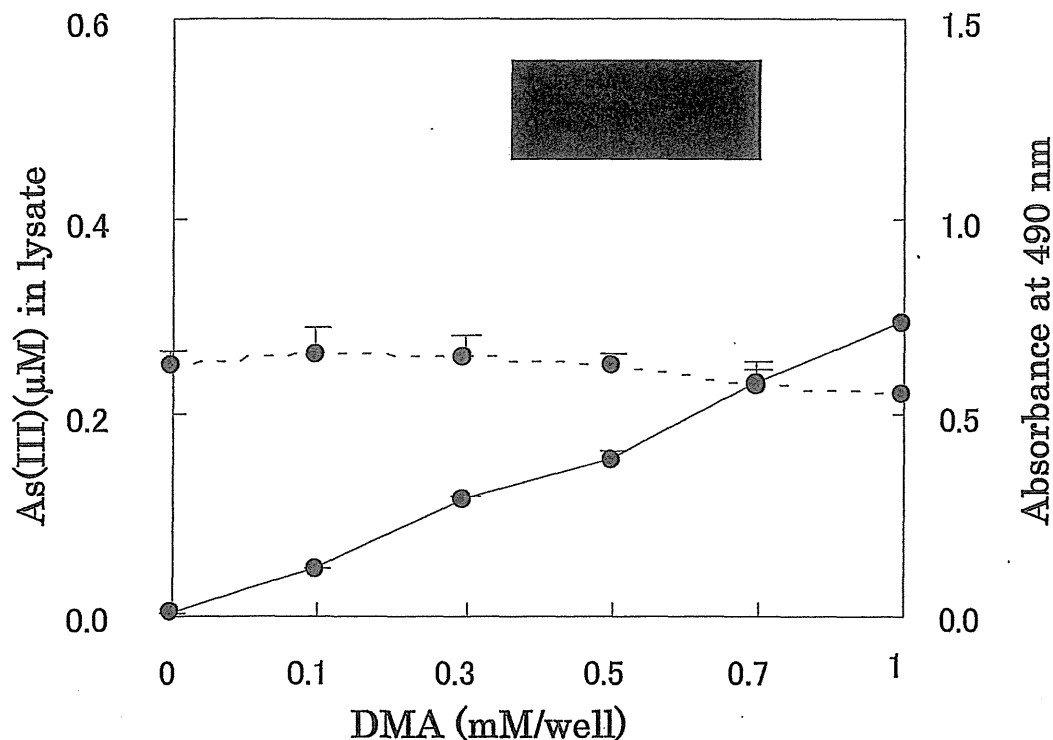


Fig.8 Viability of keratinocyte and DMA in lysate after adding 0.1-1 mM/well DMA

与えていた。Control 地域として地下水のヒ素汚染がないと言われている地域の tubewell から得られた水の中のヒ素量は 2.6 ppb であり、それを飲料水などの目的で使用している 3 家族 9 名から得られた尿中の 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 量は低い部類に入っていた。

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った。尿中の As(V) と As(III) の間の関連性が観察されなかった。しかし、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。

生活習慣、食習慣の同じ各家族の 11 の夫婦を 23 家族の中から抽出し、尿中のヒ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ヒ素化合物を尿中に排出していることが示唆された。

3. 角化細胞によるヒ素化合物の代謝について

As(V)の添加量が $10\ \mu\text{M}$ ~ $100\ \mu\text{M}$ /well と増加するに従い、cell viability に影響を与えなかったが、lysate 中の As(III) の濃度が $0.002\ \mu\text{M}/0.5\text{ml}$ ~ $0.054\ \mu\text{M}/0.5\text{ml}$ と増加した。また、As(V) の添加量が $70\ \mu\text{M}/\text{well}$ では lysate 中の As(V) が認められなかったが、添加量が $100\ \mu\text{M}/\text{well}$ となると lysate 中に $0.034\ \mu\text{M}/0.5\text{ml}$ 検出された。この現象は、細胞中に流入した As(V) を As(III) に還元するために glutathione が消費され、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。

As(III) を 0.5 ~ $10\ \mu\text{M}/\text{well}$ を添加して 24 時間培養したとき、control の viability を示す 490 nm での吸光度は 0.202 であるが、As(III) 0.5 ~ $10\ \mu\text{M}/\text{well}$ を添加して培養したとき、吸光度は 0.657 ~ 0.763 に上昇し、As(III) の添加により、見かけ上の viability が高くなった。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) $10\ \mu\text{M}/\text{ml}/\text{well}$ を 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 $0.1\ \text{mM}/\text{ml}/\text{well}$ 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。それに比べて、As(III) $0.5\ \mu\text{M}/\text{ml}/\text{well}$ を添加した場合、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が明らかになり、ヒ素化合物の細胞への取り込みに関して細胞膜のバリエー機能が関与していることが示された。

