

201326003B

厚生労働科学研究費補助金

労働安全衛生総合研究事業

リスク評価のためのバイオリジカル・モニタリング手法の
開発に関する研究

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 圓藤 吟史

研究分担者 山中 健三

山野 優子

市場 正良

平成26(2014)年5月

目 次

I. 総合研究報告	
リスク評価のためのバイオロジカル・モニタリング手法の開発に関する研究-----	2
研究代表者	圓藤吟史
研究分担者	山中健三
研究分担者	山野優子
研究分担者	市場正良
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	51
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	53

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）

リスク評価のためのバイオリジカル・モニタリング手法の開発に関する研究

研究代表者 圓藤吟史 大阪市立大学大学院医学研究科産業医学 教授
研究分担者 山中健三 日本大学薬学部環境衛生学 教授
研究分担者 山野優子 昭和大学医学部衛生学 准教授
研究分担者 市場正良 佐賀大学医学部社会医学 教授

研究要旨

経皮吸収が無視できない化学物質の曝露評価にはバイオリジカルモニタリング(BM)法による評価が必要とされる。近年、低濃度の作業環境におけるアルシン中毒やN,N-ジメチルアセトアミド(DMAC)中毒が報告され、これらには経皮吸収が関与している可能性がある。そこで、本研究は、アルシンの皮膚吸収の可能性を追及するとともにアルシンおよびDMACについてBM法の開発を実施する。

アルシンについては、①適切かつ安定な濃度のアルシンガスを発生する装置を作製し、②マウスに経皮または全身曝露を行い、④溶血などの生体影響との量反応関係を明らかにするとともに、③*in vivo*, *in vitro*曝露によるアダクトを観察した。その結果、①約300ppm5分間全身曝露では曝露直後から溶血が認められ、Ht値は3時間後に曝露前の30%、6時間後では16%にまで減少した。②約300ppm5分間の経皮曝露では、溶血は認められず、血球中HbへのAs付加体形成も見られなかった。③約90ppm5分間の4回反復曝露の場合、4回目曝露後12時間においてHt値は24.4%にまで減少した。④溶血にともなう腎毒性を病理組織学的に明らかにした。⑤*in vitro* 曝露したマウス血液試料では通気の有無にかかわらず溶血が認められた。⑥MALDI-TOF-MSの結果は、酸素の存在の有無にかかわらずアルシンに曝露したサンプルに分子量15 kDaと15.6 kDaの2本のピークが得られ、15kDaはグロビン α 鎖にヒ素が結合したものであり、15.6kDaはグロビン α 鎖+ヘム(616.2)+ヒ素が結合したものと推測できた。

国内におけるN-メチルアセトアミド(NMAC)測定は、労働衛生検査精度向上研究会会員の3社が受託していた。ACGIHのBEIである30mg/Cr以上の検体が7%程度存在していた。また、DMACはN-ジメチルホルムアミド(DMF)の混合物として使用されている可能性があり、DMF代謝物のN-メチルホルムアミド(NMF)測定のクロマトグラムに0.8%の検体にNMACピーク(3mg/l以上)が確認された。NMFとNMACのリテンションタイムは各施設とも近接していた。NMAC分析では、GC注入口の熱によって代謝物であるDMAC-OHが熱分解しNMACに変化していることが明らかになった。DMAC-OHとNMACを分離定量する方法として、LC-MSMSでの分離測定を検討した。DMAC-OH,NMACの分離定量条件を、得ることができたが、AMMAは再現性に問題が残る。

A. 研究目的

化学物質のリスク評価の柱である曝露評価には、個人曝露量の測定または作業環境測定が使われているが、経皮吸収が無視できない化学物質においては、これらは吸収量を正確に反映していないことから、バイオロジカルモニタリング(BM)法による曝露評価が必要とされる。特に近年、低濃度の作業環境におけるアルシン中毒や N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)の代替品として使用される N,N-ジメチルアセトアミド(DMAC)中毒が報告され、これらには経皮吸収が関与している可能性がある。

(1) アルシン曝露実験

そこで、本研究は、アルシンについて、マウスで経皮吸収の有無について明らかにするとともに、溶血とそれに伴う腎毒性の機序を病理組織学的に明らかにすること、*in vitro*でヘモグロビン(Hb)との相互作用、グロビンの結合について明らかにする。

(2) DMACの適切なBM法の開発

次に、全衛連の労働衛生検査精度向上研究会の協力を得て、DMACの適切なBM法を開発する。DMACの生物学的許容値は米国と英国、ドイツの専門機関より勧告されているが、使われている測定法が古く、現在の方法では値が異なる可能性がある。また測定値が測定法や条件によって変動するであろう。リスク管理に用いるためには、代謝経路をふまえた測定対象物質の選択と測定法の吟味をする必要がある。この研究においては、測定対象物質と測定法を確立し、参加機関における精度管理を実施し、精度管理の向上を目指して、DMACの生物学モニタリングのより適切な手法を確立す

ることを目的とした。

※労働衛生検査精度向上研究会会員：佐賀大学医学部 市場正良，財団法人神奈川県予防医学協会，財団法人近畿エコサイエンス，中央労働災害防止協会労働衛生調査分析センター，関西労災病院中毒研究センター，パナソニック産業衛生科学センター，株式会社エスアールエル，株式会社江東微生物研究所，株式会社ビー・エム・エル，株式会社保健科学研究所，三菱化学メディエンス株式会社，全衛連事務局

B. 研究方法

(1) アルシン曝露実験

イソフルラン吸入麻酔下において、ヘアレスマウス(Hos:HR-1)に対して、無機ヒ素を中性の NaBH_4 による還元で発生させたアルシンガス(40—300 ppm)を全身及び経皮的に単回または反復曝露する。本実験は強制排気と除ガスができるドラフト内で行う。溶血をアルシン中毒の指標とし、血球、血清中の形態別ヒ素を経時的に測定することにより吸入または経皮吸収率を算出するとともに、アルシンの体内動態学的知見を得る。

① 予備実験I：*in vitro*溶血実験

ICR 雄性マウスの保存血(日本生物材料センター)を供試血液試料とした。

ヒ素分析法(ジエチルジチオカルバミン酸銀法：JIS K 0102)に準じて、2mg/mlヒ素を塩酸と亜鉛末で還元しアルシンガスを発生し、血液試料に10分間導入した。遠心分離後の上澄液を吸光分析用試料とした。上澄液の吸光度測定は、コントロールおよびアルシン曝露の直後、90分後、通気しながらの4群について、KR-PBSで50倍希釈し

で測定した。

② 予備実験：マウス曝露装置内でのアルシンの発生

容積約 2.5L の曝露装置内で 5 mg、2 mg、

0.5 mg の亜ヒ酸を中性 $\text{NaBH}_4(1\text{g})$ で還元しアルシンを発生させ、装置内アルシン濃度を北川式検知管で測定した。(図 1、図 2)

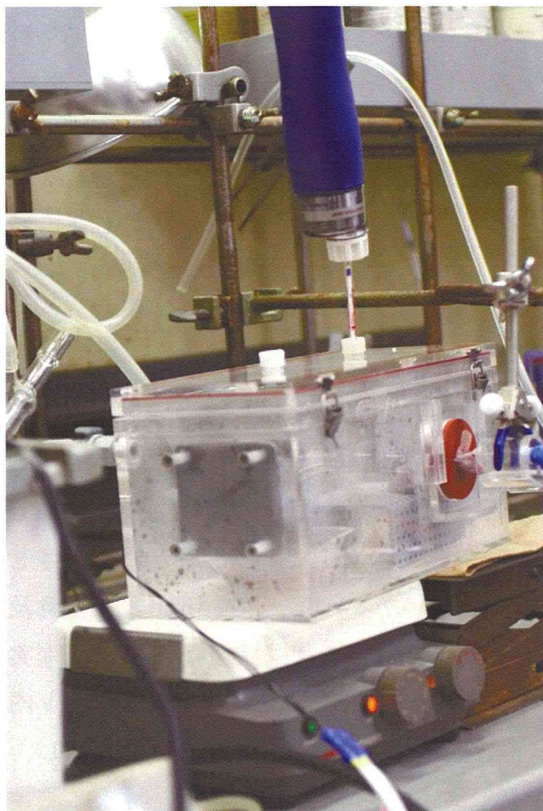


図1 曝露装置

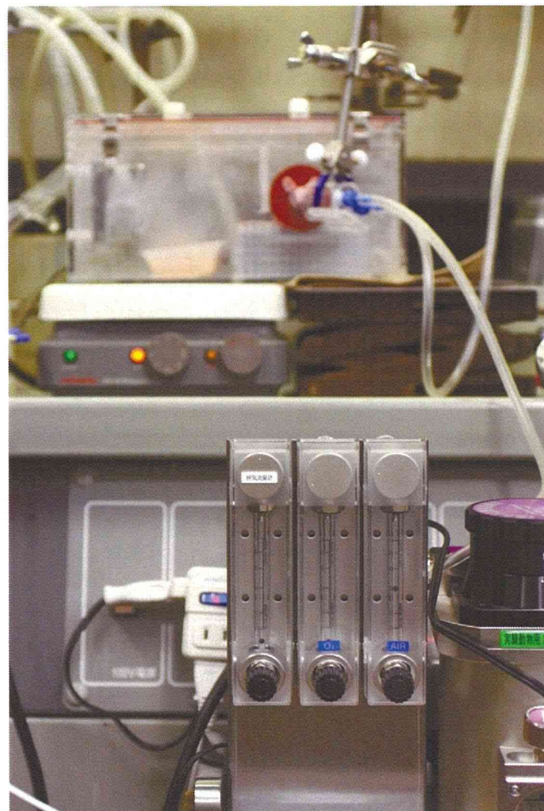


図2 曝露装置

③ マウス予備実験 (単回曝露)

②項で述べた装置を用いて、ヒ素量として 0.5、1.0、2.0、5 mg の亜ヒ酸を中性 NaBH_4 で還元してアルシンを発生させ、発生直後の容器中のアルシン濃度を北川式検知管で測定した。曝露時間は 5 分 (約 25°C)。その後、ヘパリン処理 Ht 毛細管 (テルモ) へ尾静脈より採取した血液を経時的に導入し、Ht 値を測定した。

④ アルシン曝露実験の方法

- マウス：Hos: HR-1 ヘアレスマウス、雄性、5 週齢とした。コントロール 1 頭、アルシン曝露群は 1 群 4 頭とした。
- 曝露装置容積：約 2.5 L
- ヒ素量として 1 または 5 mg の亜ヒ酸を曝露装置内で中性 NaBH_4 により還元してアルシンを発生させた。
- アルシン曝露はマウス 1 頭ずつイソフルラン麻酔下で全身ならびに頭部を除く全身 (経皮吸収) を曝露装置内に入れ、アルシン発生後 5 分間曝露した。

(図 3)

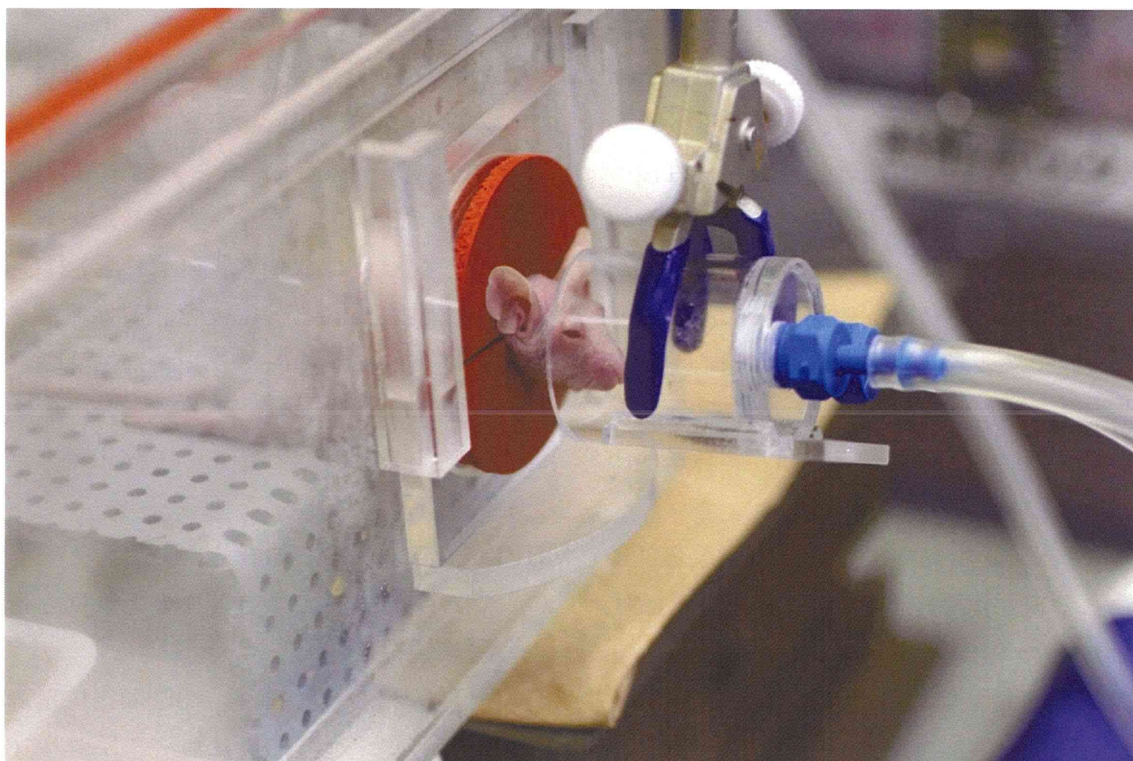


図3 麻醉下での曝露（経皮曝露）

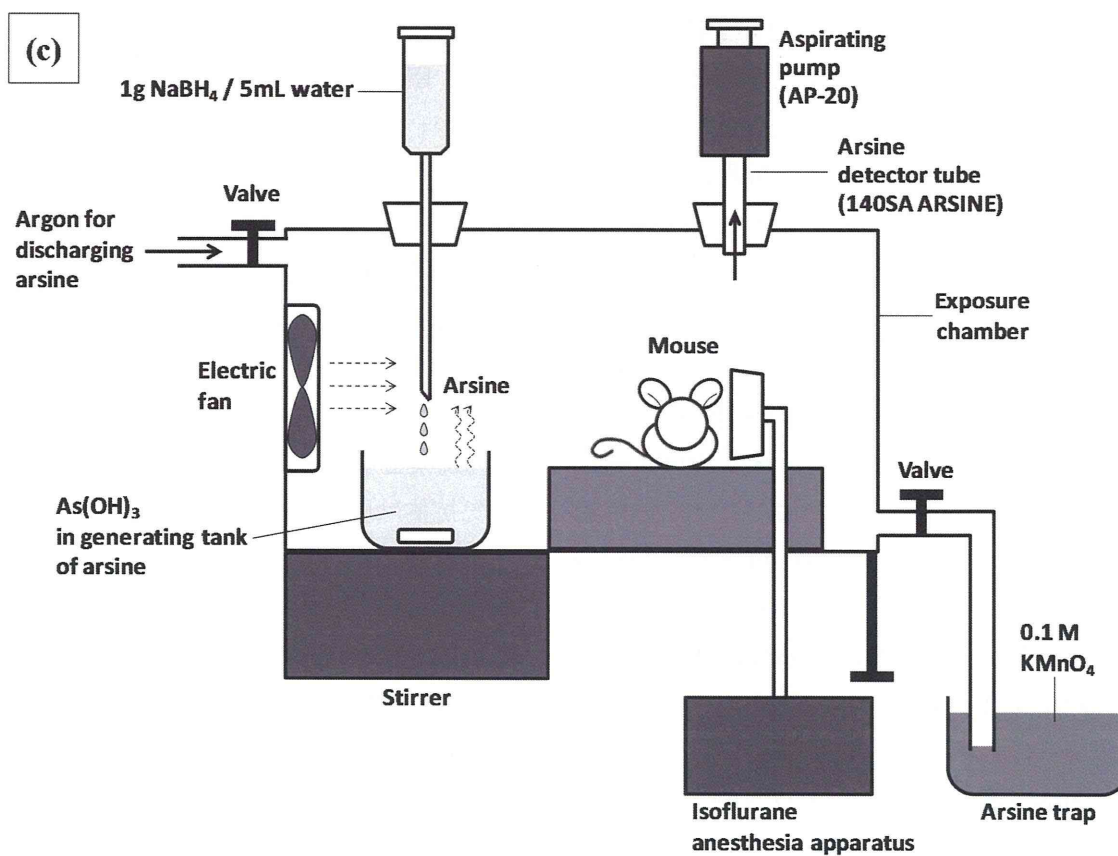


図4 曝露装置概略図

- ・アルシン濃度測定：発生直後に北川式検知管で50mL採取。(25°Cで5-160 ppmの範囲で測定可能)
- ・血液採取：経時的に尾静脈から、直接ヘマトクリット毛細管(テルモ、ヘパリン処理済み)に採取し、Ht値を測定した。最終的にはイソフルラン麻酔下で心臓により血液を採取し、全血ならびに遠心分離して得られた血漿を-80°Cで保存した。
- ・解剖により肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、中性ホルマリン固定した。

⑤ アルシン曝露による溶血機序ならびにHbとの相互作用の検討

a. *in vitro* 曝露実験

ICR 雄性マウスの保存血(日本生物材料センター)を供試血液試料とし、これにヒ素分析法(ジエチルジチオカルバミン酸銀法:JIS K 0102)に準じて、2 mg 亜ヒ酸を塩酸と亜鉛末で還元して発生させたアルシンガスを10分間導入した。この血液試料の遠心分離後の上澄液を吸光分析用試料とした。上澄液の吸光度測定はコントロールおよびアルシン曝露の直後、90分後、通気しながらの4群について測定した。

また、アルシンを2分間曝露した血液試料について、コントロール、曝露直後、60-90分間室温放置および空気置換後60-90分間室温放置した各群の上澄液の分光学的解析を行うとともに、血球stromaまたは上澄液を、ゲル濾過カラム(Superdex™ 75 10/300GL, GL Healthcare)を用いたHPLC-ICP-MSで分析した。

b. *in vivo* アルシン曝露実験

Hos: HR-1 ヘアレスマウス(オス、5週齢)に、ヒ素量として5mgの無機Asを中性NaBH₄で還元してアクリル樹脂製曝露装

置内(容積約2.5 L)で発生させたアルシン(約300 ppm)を、イソフルラン吸入麻酔下のマウスに5分間単回全身または経皮曝露、また、約90ppmアルシンを、12時間の間隔をおいて計4回反復全身曝露した。装置内アルシン濃度は北川式検知管(No.121U、光明理化学工業)で測定した(図1)。採血は、曝露後経時的に尾静脈より、または実験終了時に麻酔下心臓穿刺により行った。血液および遠心分離後(2000rpm、10min)得られた血漿部分について、吸光分析およびHPLC-ICP-MS分析を行った。

⑥ アルシン曝露による溶血とそれともなう腎毒性機序

5分間曝露後、曝露直後、3時間後に尾静脈よりヘパリン処理Ht管に血液を採取し、6時間後には心臓尖刺により採血した。得られた血液サンプルを用い、経時的にHtを測定し、曝露6時間後の血液は、ICP-MSで全血中のヒ素濃度の分析も行った。また6時間後には肺、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、中性ホルマリン固定した。

⑦ 病理組織学的検索

曝露後6時間後に得られた組織は、パラフィンブロック作成後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および、ヘモグロビン(Hb)免疫染色を行った。なお、免疫染色に使用した抗体は以下の通りである。

一次抗体：Rabbit anti-mouse hemoglobin antibody(Cappel Lab., OH, USA)、二次抗体：HistofineR Simple Stain [mouse MAX-PO(Rabbit) (Nichirei Bioscience, Japan)]

組織切片作製ならびに病理学的評価を行った。

⑧ 実験I：*in vitro*溶血サンプル作成

上述の通り、亜ヒ酸（ヒ素量として2 mg）を塩酸と亜鉛末で還元して発生させたアルシンに雄性ICRマウス保存血（日本生物材料センター）5 mlを10分間曝露した。曝露90分後に遠心分離して得られた血漿をサンプルとした（以下Exposed）。また、対照サンプルとして、無処置の保存血から分離した血漿（以下Cont. Pla）および血漿分離後の残渣血球に超純水を加えて溶血させ、遠心後の上清（以下Cont. Lys）の2種類を得た。

⑨ 実験Ⅱ：in vivo溶血サンプル作成

雄性ICRマウス由来のアルシン曝露保存血から血漿を分離し、曝露サンプルを2種類作製した。同様に2種類の対照サンプルを作製した。

⑩ 実験Ⅲ：MALDI-TOF-MS分析

各々のサンプルを0.1%トリフルオロ酢酸で25~75倍に希釈し、シナピン酸のTA（アセトニトリル:0.1%トリフルオロ酢酸=1:2の混合溶液）飽和溶液と1:3の割合で混合し、1 µlをターゲットにスポットした。MALDI-TOF-MS（マトリックス支援レー

ザー脱離イオン化飛行時間質量分析計）を用いた分析での、測定にあたっては、1サンプル当たりランダムに4,000か所を抽出し、1か所当たり10本のレーザーを照射した。得られたピークのm/z値から、付加体の分子量を推定した。

⑪ 免疫沈降反応

上記サンプルに対し、抗αおよび抗β-ヘモグロビン抗体を用いた免疫沈降反応を実施し、それぞれのサンプルから3つの分画（Sup, Beads, Eluate）を得た。抗体として抗αおよび抗β-ヘモグロビン抗体を使用しているため、ヘモグロビンを含む分子はEluate分画またはBeads分画に回収されることが期待される。

また同時に、血中ヒ素のSepharose 4Bビーズへの吸着を調べるために、抗体を使用しない免疫沈降反応サンプルも作製した。

⑫ ヒ素濃度の測定

免疫沈降反応を実施したサンプルに含まれる総ヒ素濃度を誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）で定量した。

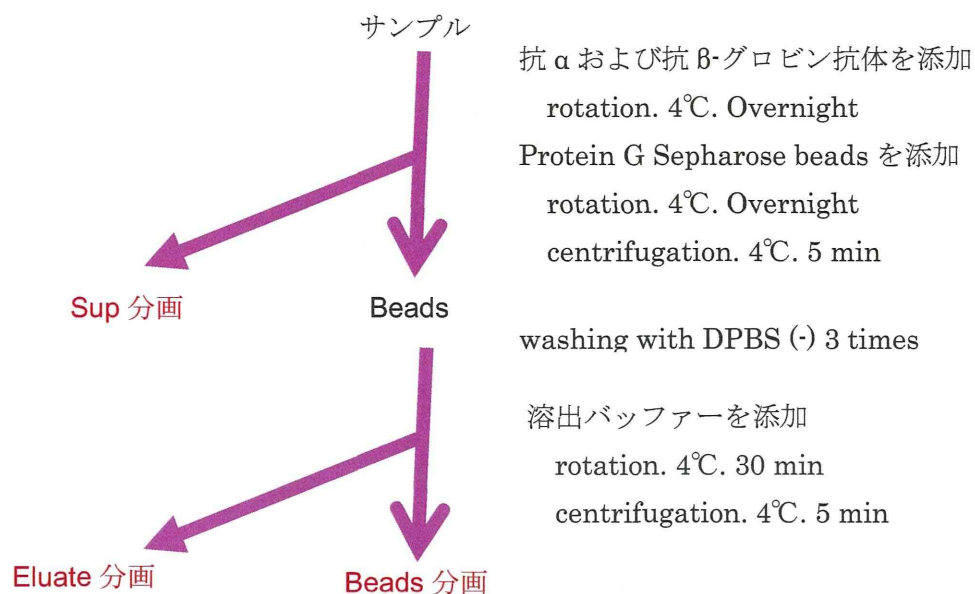


図5 免疫沈降反応

(2) DMACの適切なBM法の開発

DMACの国内での生産量、使用量、中毒事例、代謝、尿中代謝物測定法、測定事例に関して文献調査を行った。労働衛生検査精度向上研究会会員機関に対しクロスチェック予備調査を実施し、また現状のDMAC代謝物測定受託状況も調査した。

④ジメチルアセトアミドのBMの検討

④-1. 文献調査

昨年に引き続き DMAC の尿中代謝物測定法、測定事例に関して文献調査を行った。文献検索サイト PubMed, 医中誌 web, google scholar 等を用いて N,N-Dimethylacetamide(DMAC), N-methylacetamide (NMAC), urine, biological monitoring, exposure, workplace, occupational 等をキーワードとして、DMAC の生物学的モニタリング手法について国内・海外の文献を検索した。

④-2. 国内における DMAC 代謝物測定状況調査

昨年に引き続き NMAC 測定状況と濃度レベル調査を会員 7 機関に対し行った。

(図1)

④-3. 現行測定手法での施設間差比較

現行測定手法による施設間差比較(クロスチェック)を実施した。クロスチェックの参加は佐賀大学を含め DMAC の測定実績のある 6 施設であった。

試料の調製は、江東微生物研究所が実施し、試料は、ばく露尿 3 濃度(①,②,③), 非ばく露尿に標準水溶液を添加し 25mg/L に調製した添加尿, および 25mg/L に調製した標準水溶液を用いた。試料③, 添加尿,

水溶液は NMF,NMAC 混合試料である。試料はプラスチックチューブに分注後、凍結状態で各機関に郵送にて配布した。

④-4. 代謝物一斉測定手法の検討

1) クロロギ酸アルキルを用いた誘導体化
精製水で 10 μ g/ml に調製した NMAC 300 μ l に 30 μ l のクロロギ酸アルキル 6 種類 (クロロギ酸メチル, エチル, プチル, ヘキシル, フェニル, ベンジル) (東京化成工業, 東京) をそれぞれ添加し, 30 μ l のピリジン及び 300 μ l のノルマル-ヘキサンを加え 1 分間攪拌後, 遠心 (3,000rpm, 5min) しヘキサン層を GC/MS に注入した。

2) 4-(4,6-Dimethoxy[1,3,5]triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMT-MM)を用いた誘導体化

精製水で 10 μ g/ml に調製した NMAC 1000 μ l に 1000 μ g/ml の酢酸 50 μ l, 5000 μ g/ml の DMT-MM (和光純薬工業, 京都) 50 μ l, 反応促進剤として 1000 μ g/ml の N-Methylmorpholine(NMM) 50 μ l を加え 60 $^{\circ}$ C で 1 時間放置した後, 1ml のメタノールで希釈し GC/MS に注入した。

3) 高速液体クロマトグラフによる一斉分析

高速液体クロマトグラフによる尿中代謝物一斉分析のために紫外吸収(UV)検出器と質量分析計(MS)を用いて検討を行った。

① 国内における DMAC 代謝物測定状況調査

昨年に引き続き NMAC 測定状況と濃度レベル調査を全衛連の労働衛生検査精度向

上研究会会員 7 機関に対し行った。

※労働衛生検査精度向上研究会会員：(財)近畿エコサイエンス，中央労働災害防止協会労働衛生調査分析センター，関西労災病院中毒研究センター，パナソニック産業衛生科学センター，(株) エスアールエル，(株) 江東微生物研究所，(株) ビー・エム・エル，(株) 保健科学研究所，三菱化学メディエンス (株)

② 現行測定手法での施設間差比較

現行測定手法による施設間差比較(クロスチェック)を実施した。クロスチェックの参加は NMAC の測定実績のある労働衛生検査精度向上研究会会員 5 機関である。

試料の調製は，(株) エスアールエルが実施し，試料は，ばく露尿 3 濃度①,②,③)，非ばく露尿に標準水溶液を添加し 25mg/L に調製した添加尿④，および 25mg/L に調製した標準水溶液⑤を用いた。試料③，添加尿④，水溶液⑤は NMF,NMAC 混合試料である。試料はプラスチックチューブに分注後，凍結状態で各機関に郵送にて配布した。

③ 代謝物一斉測定手法の検討

DMACの尿中代謝物であるN-メチルアセトアミド(NMAC)の測定法について、液体クロマトグラフ(LC)を用いた同時分析の検討を行った。紫外吸収(UV)検出器と質量分析計(MS)を用いて検討を行った。DMAC-OH、AMMAは標準品が市販されていないため、東京化成工業株式会社に合成を依頼した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関する倫理審査を日本大学において受け、承認された。

動物の愛護及び管理に関する法律」、「実

験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)」を遵守して実験を行った。

C. 研究結果

(1) アルシン曝露実験

① 予備実験 (*in vitro*)

アルシンを曝露した血液試料は明らかに溶血による変色が見られ、変色は曝露直後よりも90分後の方が強く認められた。さらに空気に曝すことで速やかな変色影響が見られた(図6)。

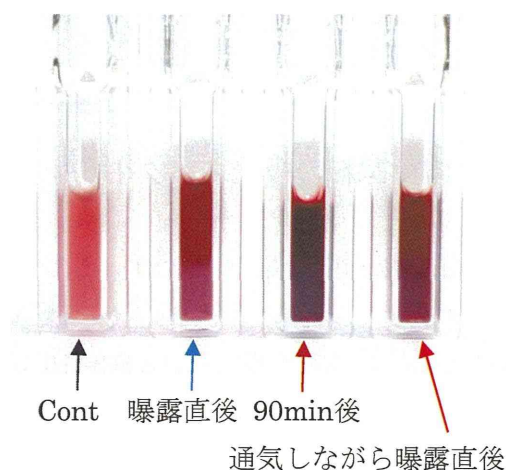


図6 アルシン曝露した溶血試料

溶血試料の吸光スペクトルを測定した結果、ヘモグロビン(Hb)のヘム構造に反映するQバンドスペクトル付近の変化は認められず、Soret帯付近に変化が見られたことから、Hbのグロビン蛋白部分にアルシン付加体が形成されている可能性が示唆された(図7)。

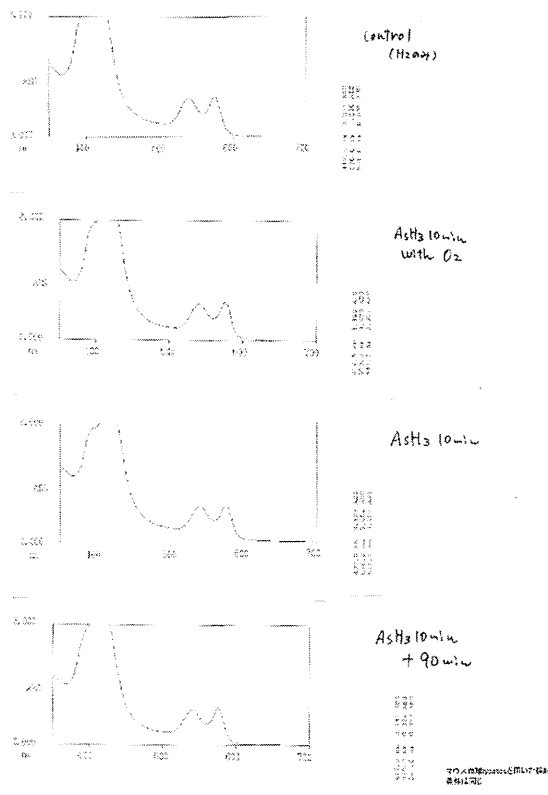


図7 溶血試料の吸光スペクトル

② 予備実験：曝露装置内でのアルシニングガスの発生

表1のような濃度が得られ、曝露後10分間はアルシン濃度が安定していることを確認できた。

表1 発生したアルシニングガスの経時推移

min	(ppm)		
	5 mg As	2 mg As	0.5 mg As
0min	140	120	40
5min	120	110	35
10min	120	100	30
30min	80	80	25
60min	50	60	20
90min	40		
120min	35	25	5
240min	5		

しかしながら、曝露装置内の湿度、温度等の僅かな変化で発生初期のアルシン濃度を一定に保つことが困難であることが判明した。そこで、装置内の発生初期アルシン濃度は各験ごとに検知管で測定することとした。

③ マウス予備実験I (単回全身曝露)

発生直後の曝露容器内アルシン濃度(表2)、Ht値(表3)ならびに溶血の程度(図8および9)を示す。90・100ppm曝露マウスは24時間後にHt値の減少が見られ、約1/2濃度の40ppmアルシン曝露マウスでも同様に24時間後にはHt値の減少が見られた。一方、200ppm曝露マウスでは、6時間後にHt値の顕著な減少が見られた。

溶血は、5 mg As (アルシン濃度200ppm)曝露マウスでは、直後に見られ、2 mg As (アルシン濃度100ppm)曝露マウスでは6時間後に認められた。

表2 発生直後のアルシン濃度

As量(mg)	アルシン濃度(ppm)	マウス体重(g)
0.5	40	22
1	90	25
2	100	21
5	200	21

表3 Ht値(%)

アルシン曝露濃度(ppm)	曝露直後	3時間後	6時間後	24時間後
0(control)	50	54	54	47
40	49	55	49	39
90	51	50	48	38
100	54	49	48	34
200	40	39	7	

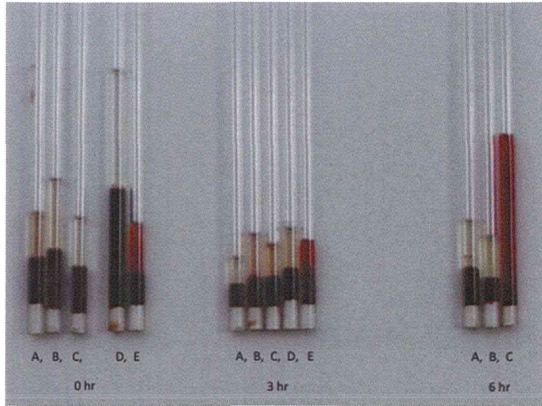


図8 1回全身曝露後のHt値の推移
(A: 0、B: 40、C: 90、D: 100、E: 200ppm
アルシン曝露)

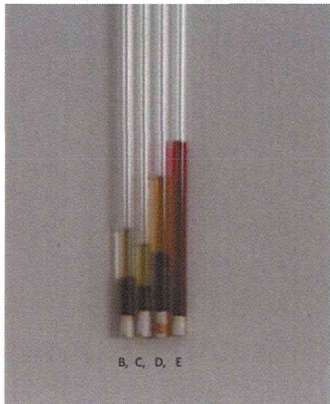


図9 単回全身曝露6h後のHt値

(B: 40、C: 90、D: 100、E: 200ppmアルシン曝露)

④ マウス予備実験II(単回経皮曝露)

Ht値でみると、6時間後にやや減少傾向が

みられるものの、全身曝露に比べて極めて軽微であった。

⑤ マウス本実験I(単回全身および経皮曝露)

図10、図11に示すように、320ppmアルシンの単回全身曝露マウスでは目の周りが赤く、皮膚が紫色になっている。解剖所見では図12に示すように血尿が認められた。Ht値でみると、3時間後には曝露前に比較して約30%に、6時間後では約16%まで減少し、溶血はアルシン曝露後も速やか進行することが窺われた(表5)。一方、310ppmアルシン単回経皮曝露では6時間後においてもHt値の減少は認められなかった(表4)。



図10 320ppmアルシン単回全身曝露6時間後のマウス(手前)(目の周りが赤く、皮膚が紫色になっている)とコントロール(奥)

表4 経皮曝露

マウス#	体重 (g)	アルシン濃度(ppm)	ヘマトクリット(%)		
			曝露直後	3時間後	6時間後
1	22.56	320	55	51	49
2	23.09	300	49	50	50
3	22.80	320	46	50	48
4	22.50	300	50	49	47
average	22.74	310	50	50	48.5



図11 320ppmアルシン単回全身曝露6時間後のマウス (右) (皮膚の色が紫色になっている)とコントロール(左)

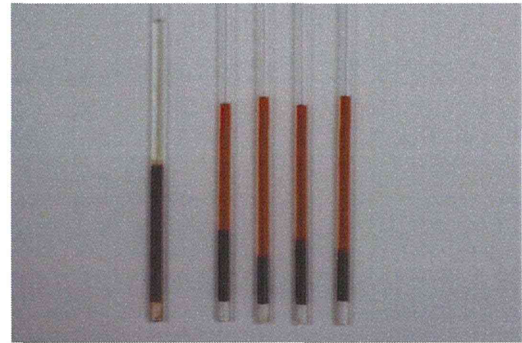


図13 アルシン4回曝露12時間後の Ht管内の血液(左はCont、4本はアルシン曝露)

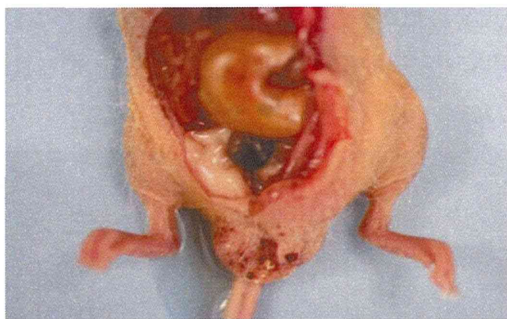


図12 320ppmアルシン単回全身曝露6時間のマウス (血尿あり)

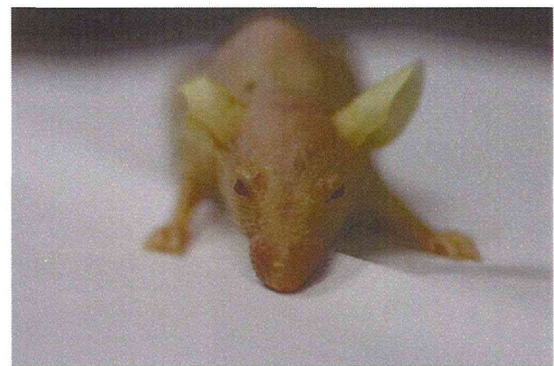


図14 アルシン4回反復曝露12時間後(解剖直前)黄疸と目の上が赤い

⑥ マウス本実験II (80-100ppmアルシン反復 (計4回) 全身曝露実験)

80-100ppmアルシンを約12時間のインターバルを経て計4回、反復全身曝露した結果のHt値を表6に示す。4回目曝露直後にHt値が約31.5%まで減少し、その12時間後では12.75%と大幅に減少した(表6)。その時のHt管に採取した血液を図13に示すが、血漿が紫色を呈し、明らかな溶血像を示している(図11)。解剖直前では皮膚の変色(黄疸)が認められ、目の上が赤い。(図14、図15)。解剖時、肉眼的血尿は認めない(図16)が、脾臓の黒色化が認められる。

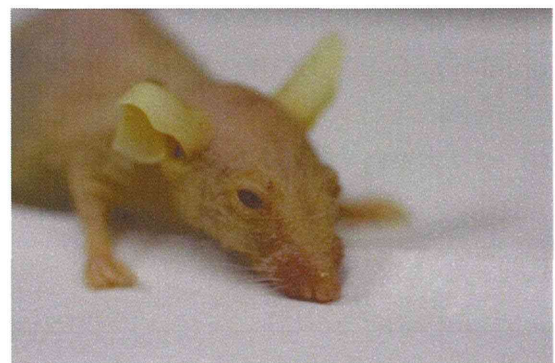


図15 アルシン4回曝露12時間後(解剖直前)黄疸と目の上が赤い

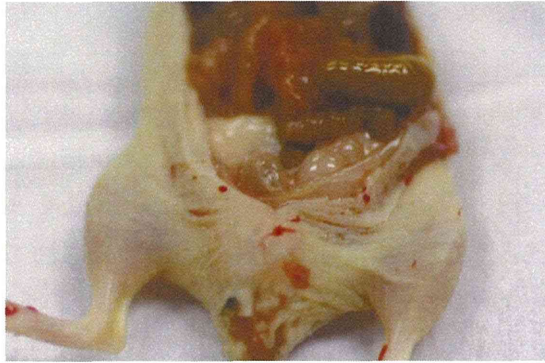


図16 アルシン4回曝露12時間後(解剖時)
膀胱、血尿なし

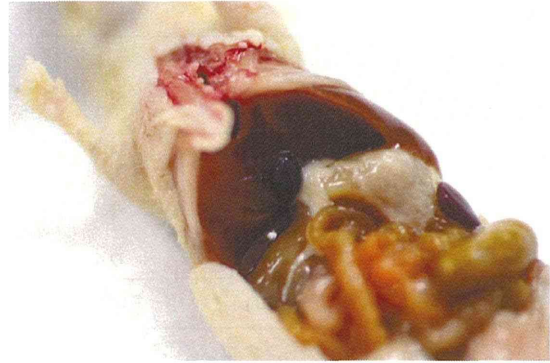


図17 1 mgアルシン4回曝露12時間後(解剖時) 脾臓の黒色化

表5 全身曝露

マウス#	体重 (g)	アルシン濃度(ppm)	ヘマトクリット(%)		
			曝露直後	3時間後	6時間後
1	22.72	320	53	15	8
2	22.36		50	13	7
3	21.93		52	19	8
4	20.47		53	16	10
average	21.87	320	52	15.75	8.25

1mg iAsから発生させた無機アルシンの反復曝露実験(4回曝露 (インターバル約12時間) したのち12時後に解剖)

表6 全身曝露

マウス#	体重 (g)	アルシン濃度(ppm)				各曝露直後のヘマトクリット(%)	4回目曝露 12時間後
		1回目	2回目	3回目	4回目		
		80	80	100	80		
1	22.18	52	50	*	38	12	
2	20.77	53	48	*	25	13	
3	22.36	53	49	*	35	12	
4	19.67	51	48	*	28	14	
average	21.25	52.25	48.75		31.5	12.75	

*3回目直後は測定していません。

表7 コントロール

コントロール マウス	体重 (g)	ヘマトクリ ット(%)
①		56
②		49
③		52
average	19.40	52.33

*3回尾静脈から採血、測定した。

⑦ アルシン曝露による溶血機序ならびにHbとの相互作用の検討

a. *in vitro* 曝露実験

アルシン発生器内で発生させたアルシンをマウス血液試料に導入し、遠心分離後に得られた上澄液を図18に示す。コントロールに比較して曝露群では溶血の増大が認められたが、通常の曝露よりも通気を伴いながら曝露した直後の方が、さらに、曝露後90分間室温放置した方が、より強い溶血効果が認められた。

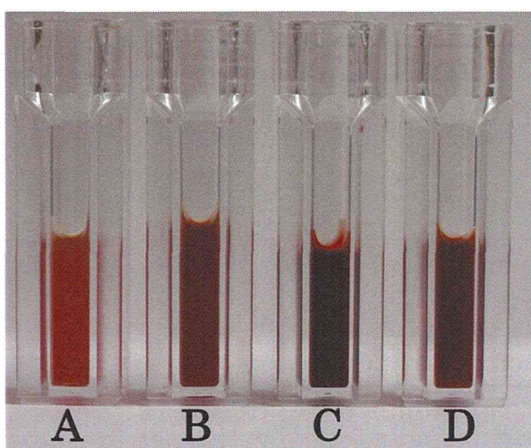


図18 アルシン曝露した溶血試料

A : コントロール、B : 曝露直後、C : 曝露後90分、D : 曝露直後(通気)

a-1. スペクトル分析

同試料のスペクトル分析結果から、曝露群において、ヘム構造に反映するQバンド付近の吸収に変化は認められず、Soret帯付近に変化が見られたことから(図19)、少なくともグロビン蛋白にヒ素付加体が形成されている可能性が強く示唆された。

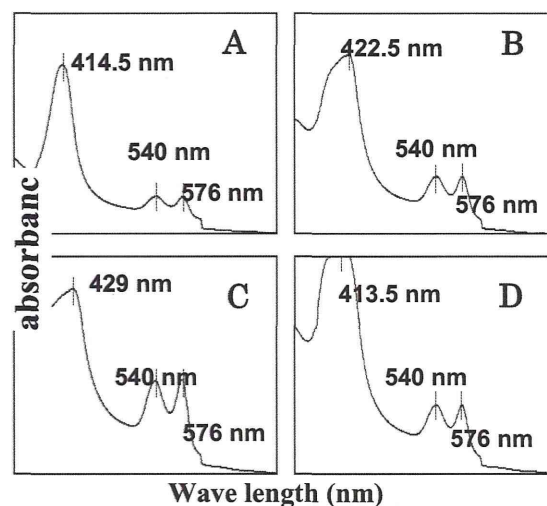


図19 溶血試料の吸光スペクトル

A : コントロール、B : 曝露直後、C : 曝露後90分、D : 曝露直後(通気)

a-2. HPLC-ICP-MS分析

また、アルシン曝露血液について血球stroma試料をHPLC-ICP-MSで分析したところ、Fe(m/z 57)に由来するHbの溶出ピーク位置にAs(m/z 75)のピークが検出され、Hb-As付加体の生成が示唆された。このピークは曝露後直ちに生成し(図20b)、時間経過による変化はほとんど見られなかった(図20c,d)。

a-3. 吸収スペクトル

さらに、アルシン曝露した血液の上澄液の吸収スペクトルを経時的に測定したところ、曝露後室温放置60分まで溶血は見られ

なかったが、90分では強い溶血が認められ、特に曝露後に空気置換した血液試料においてその効果が著しく認められた(図21、表7)。これらのことから、アルシン溶血機序においては酸素分子に起因する複雑な要因の関与が推察された。

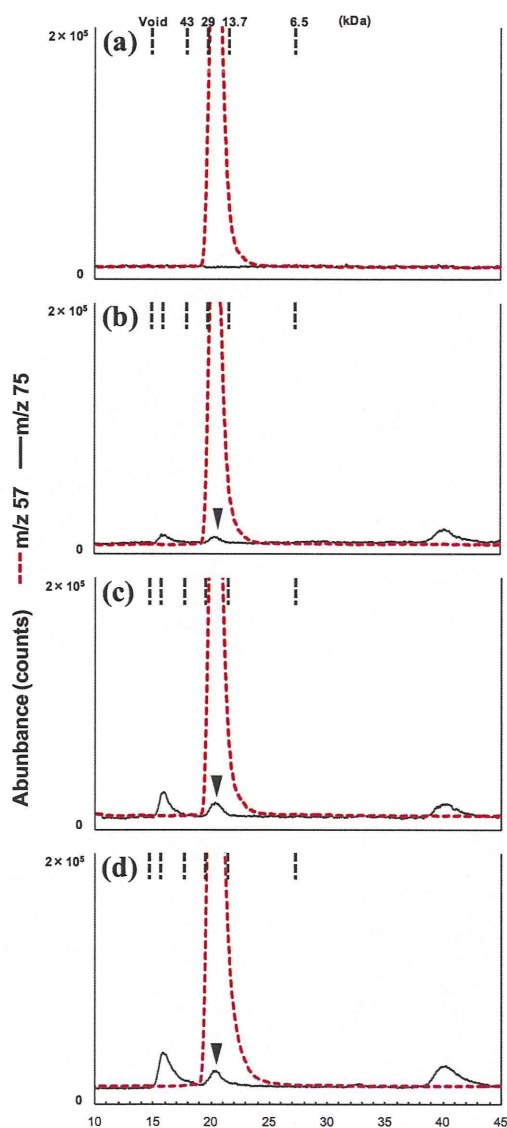


図20 アルシン曝露マウス血液から得られた血球stromaのHPLC-ICP-MSクロマトグラム
(a)コントロール、(b)曝露直後、(c)曝露後60分、(d)曝露後90分

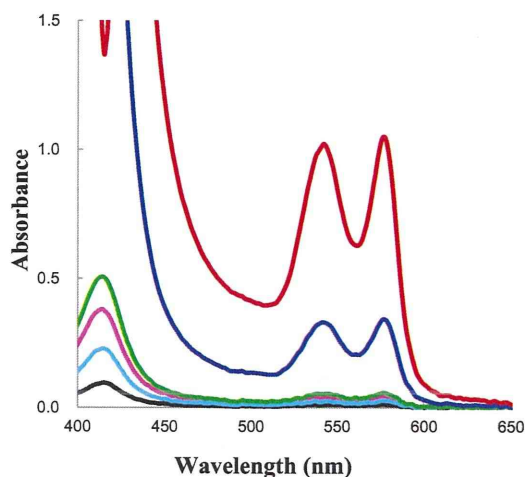


図21 アルシン曝露した血液の上澄液の吸収スペクトル

表7 アルシン曝露した血液の上澄液のピーク波長および吸光度

	ABS (波長 [nm])	
	Soret 帯	Q バンド
コントロール	0.097(415)	0.013(537), 0.013(576)
曝露直後	0.381(414)	0.044(538), 0.046(576)
曝露後 60min	0.228(415)	0.026(537), 0.028(576)
曝露後 60min (空気置換)	0.507(416)	0.055(539), 0.059(577)
曝露後 90min	—	0.330(543), 0.344(577)
曝露後 90min (空気置換)	—	1.022(542), 1.051(577)

b. *in vivo* 曝露実験

アルシン曝露マウスから採取した血液(血漿)をHPLC-ICP-MSで分析したところ、Hbの溶出ピーク位置にAsのピークも検出されたことから(図22)、*in vivo* においてもHb-As付加体が生成する可能性が示唆された。

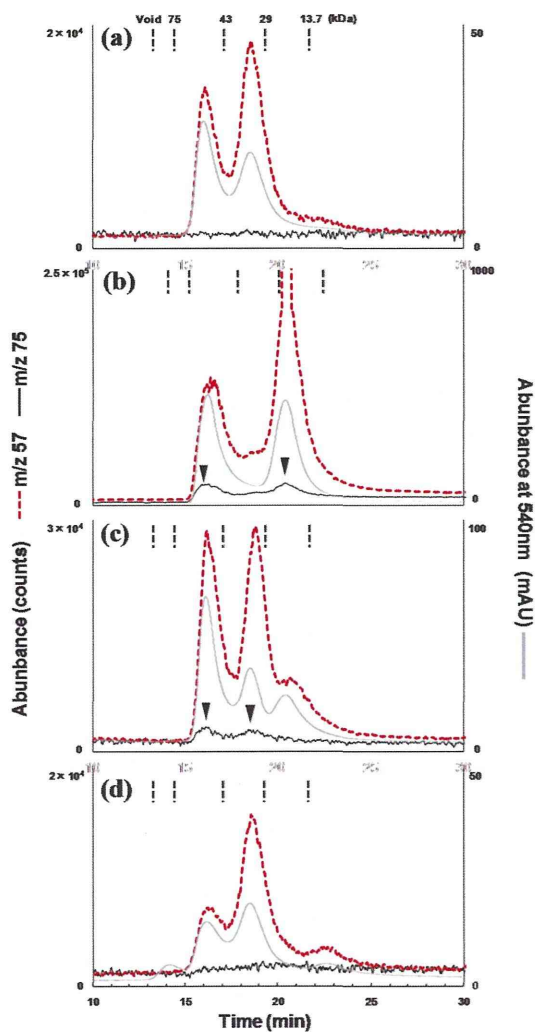


図22 アルシン曝露マウス血液(血漿)のH PLC-ICP-MSクロマトグラム

(a)コントロール、(b)単回全身曝露、(c)反復全身曝露、(d)単回経皮曝露

※(a)、(d)は全血、(b)、(c)は血漿を測定。

⑧ アルシン曝露による溶血とそれにとりまなう腎毒性機序の解明

病理組織学的検査では、経皮曝露マウスは各臓器とも変化が認められなかったが、全身吸入マウスには腎臓、肝臓および脾臓に変化がみられた。腎臓では、近位尿細管曲部の上皮の細胞質内にエオジン好性の球状物質が多量に沈着し、尿細管の内腔にも

貯留がみられた(図23)。同様に肝臓のクッパー細胞(図24)と脾臓の赤脾髄内の網内系細胞(図25)にも認められたが、沈着の程度は腎臓が最も顕著であった。エオジン好性物質はいずれの臓器もHb免疫染色に陽性であり、Hbの沈着(図26)であることが確認できた。なお、これらの臓器に壊死性の変化は認められなかった。また、肺組織には特に変化は認められなかった。なお、これらの結果をまとめたものを表8に示した。



図23 アルシン曝露マウスの腎臓組織(HE染色)

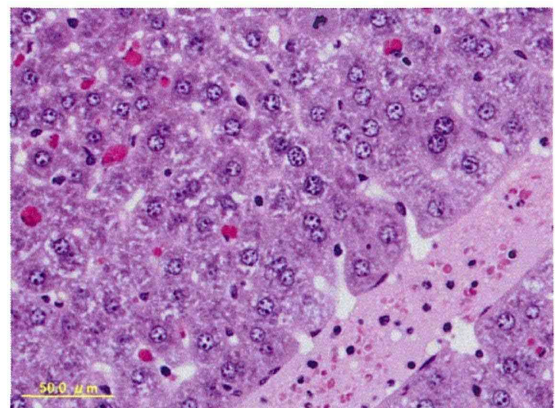


図24 アルシン曝露マウスの肝臓組織(HE染色)

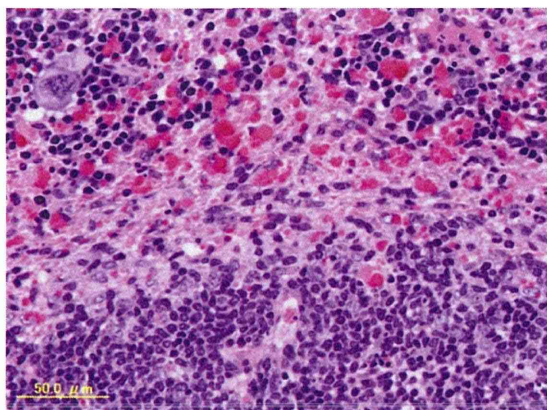


図25 アルシン曝露マウスの脾臓組織(HE染色)

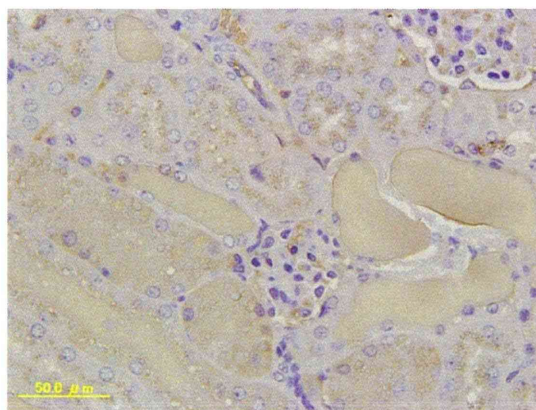


図26 アルシン曝露マウスの腎臓組織(Hb染色)

表 8. Histopathological findings observed in hairless mice exposed to arsine gas by whole-body or percutaneous-only route

Route of exposure	Control	Whole-body inhalation	Percutaneous-only
No. of animals examined	1	4	4
Kidney	NS		NS
Eosinophilic globules: proximal convoluted tubules		4 (3+)	
Eosinophilic casts: distal tubules		3 (+ ~ 2+)	
Eosinophilic casts: Henle's loops		2 (+)	
Liver	NS		NS
Eosinophilic globules: Kupffer cells		4 (+ ~ 2+)	
Spleen	NS		NS
Eosinophilic globules: red pulp		4 (3+)	
Lung	NS	NS	NS

Note: Values indicate number of animals bearing lesions.

(): Grade of histopathological findings (+: slight, 2+: moderate, 3+: severe)

NS: No significant change in all animals

⑨ マウス保存血へのアルシン *in vitro* 曝露によるヘモグロビン付加体生成

a. *in vitro* 溶血サンプル作成

Exposed サンプルについては明らかな溶血が認められたが、Cont.Lys についても同程度の溶血が観察された。Cont. Pla については溶血は認めなかった。

b. MALDI-TOF-MS分析

MALDI-TOF-MS によって得られたスペクトルを分析した結果、分子量 7.5, 7.8, 15.0, 15.6, 15.7 kDa にピークが認められた。このうち、15 kDa のピークについては三峰性 (15-1, 15-2, 15-3) であることが明らかになった。また、30, 46, 61, 77 kDa にいく

つかのピークから構成されるピークのグループが認められた。同一グループ内におけるピーク間分子量の差は概ね 610 Da であった。

これらのうち、15-1, 15-3, 15.7 kDa のピークについては Exposed、つまりアルシン曝露サンプルでのみで認められることから、アルシン曝露特異的なピークであることが確認された。また、7.5, 7.8, 15-2 kDa のピークについては Exposed 以外にも Cont. Lys で認められることから、強い溶血に伴って出現するピークであることが示唆された。

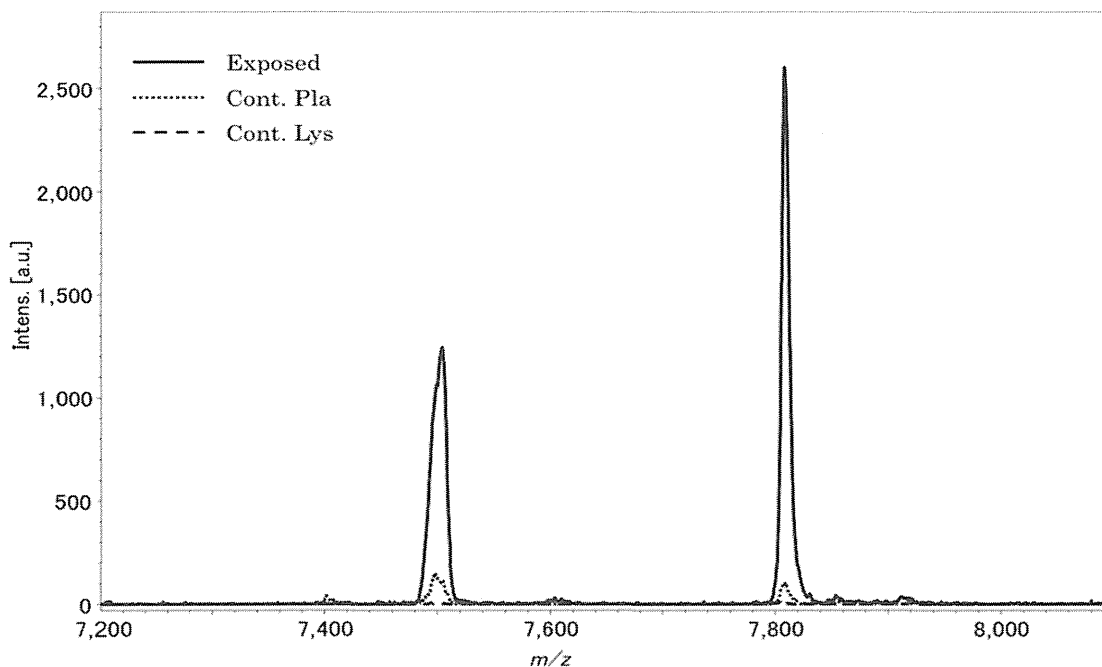


図27 7.5, 7.8 kDaのピーク拡大図

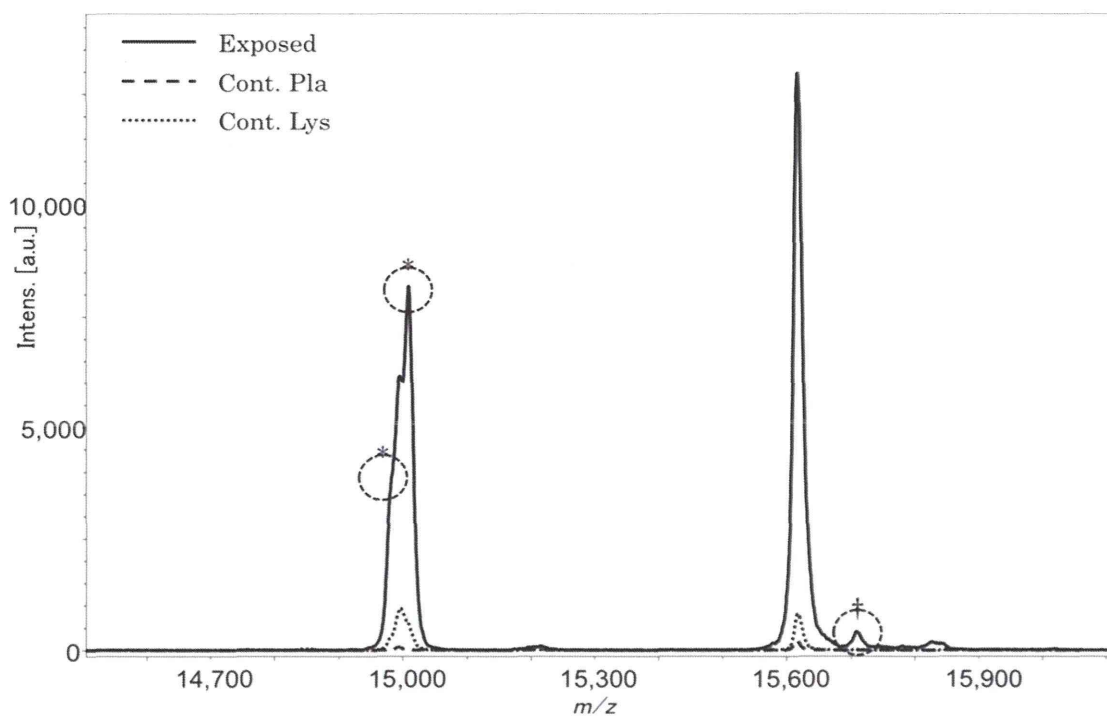


図28 15, 15.6, 15.7 kDaのピーク拡大図

15 KDaにおいてアルシン曝露のみで見られた2つのピーク (図中*印)

15.6KDaにおいてアルシン曝露で大きなピークが見られた。

15.7 KDaにおいてアルシン曝露のみで見られたピーク (図中+印)

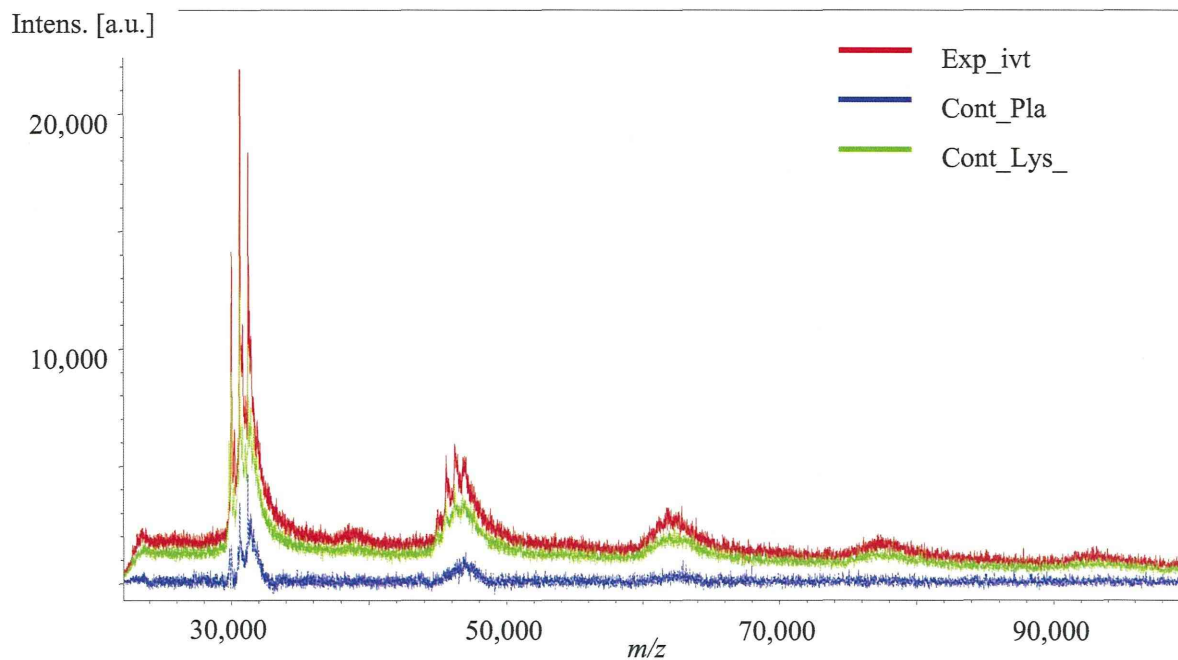


図29 30, 46, 61, 77 kDa のピークグループの拡大図

曝露群で特異的なピークは確認できなかった。