

D. 考察

(1) アルシン曝露実験

① 予備実験 (*in vitro*)

アルシンの *in vitro* 曝露でHbの蛋白部分における変性の可能性が示唆されたことから、*in vivo*の研究と *in vitro*の研究を比較研究することで、ヒ素-Hbアダクトの研究など、曝露指標の研究に繋げることができると考えられた。

② 予備実験：アルシンガスの発生

ヒ素量として 0、0.5、1.0、2.0、5.0 mg 亜ヒ酸を曝露装置内で中性のNaBH₄により還元することで0-200ppmのアルシン濃度を安定的に作る事ができた。なお、湿度、温度等により発生時のアルシン濃度は異なることから、実験ごとにその濃度を測定することとした。

5 mg のヒ素が 100%アルシンに還元されたならば、その気中濃度は 651 ppm と算出される。(5 mg As/2.5 L = 2000 mg As/m³, Arsine MW = 77.93, 1 mg/m³ = 0.313 ppm, 1 ppm = 3.19 mg/m³, As MW = 74.92

$$2000 \times 77.93 / 74.92 \times 0.313 = 651$$

原料のヒ素の量を調整することで発生するアルシンの量をコントロールでき、しかも、10分程度ならば安定したアルシン濃度を維持することができた。

③ マウス予備実験 (単回曝露)

40ppmアルシンの5分間曝露で24時間後にHt値の減少が見られ、それ以上の濃度では、より強く、より早く、量反応関係を示す影響がみられた。このことから、アルシン中毒を発現させるためには40ppm以上のアルシン5分間曝露が曝露条件の基準とし

て最適であると考えられた。

④ マウス予備実験II(単回経皮曝露)

全身曝露に比べて極めて軽微なHt値の減少であり、本実験での確認が必要である。

⑤ マウス本実験 (単回経皮および全身曝露実験)

平均320ppmアルシン5分間単回全身曝露で、血尿を含め強く影響が認められた。一方、平均310ppmアルシン経皮曝露した場合は平均320ppmアルシン全身曝露より影響は少なく、経皮曝露の影響を評価するには不十分であった。

⑥ 80-100ppmアルシンの反復 (計4回) 全身曝露実験

約90ppmアルシンの5分間反復 (計4回) 全身曝露で肉眼的血尿は認められないが、脾臓の黒色化が認められた。重度な溶血影響も認められた。

以上のことから、アルシンは、曝露直後の影響よりも、曝露終了後も赤血球あるいはHbに対して作用し、溶血をもたらす、変性したHbが脾臓に影響をもたらすことが示唆された。

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

アルシン曝露血液から得られた血球stroma試料のHPLC-ICP-MSで分析により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、時間経過による変化はほとんど見られなかった。また、同試料のスペクトル分析結果より、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場合においてその効果が著

しく認められた。グロビン蛋白にヒ素付加体が形成されている可能性も強く示唆された。

これらのことから、血液へのアルシン曝露により速やかにHb-As付加体が生成するが、その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。

b. *in vivo* 曝露実験

アルシン曝露マウスの血液(血漿)のHPLC-ICP-MSで分析により、*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。*in vitro* 実験の結果と併せて、このHb-As付加体のモニタリングは、アルシン曝露によるリスク評価のためのBM法として有用であると思われる。

⑧ アルシン曝露による溶血とそれにもともなう腎毒性機序の解明

腎臓、肝臓および脾臓においてHb陽性物質の沈着像が認められたことから、溶血により放出されたHbはこれらの臓器に沈着することが明らかになった。Hbの沈着は特に腎臓で顕著であり、腎臓の近位尿管にHbが蓄積した結果、腎機能障害を引き起こすものと推測されたが、溶血のメカニズムにもともなう腎機能障害に関しては、その機構解明とともに更なる検討が必要となろう。

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

先行研究により、分子量 10.0 kDa 以上にヒ素が結合した付加体があることが示唆されていた(Higashikawaら, 2008)が、本研究ではアルシン曝露特異的なピークが15 kDaに2つ、15.7 kDaに1つ確認できた。

赤血球関連成分の予測分子量(グロビン α 鎖: 14,940~14,950 Da、 β 鎖: 15,600~15,700 Da、ヘム: 616.2 Da、ヒ素: 74.92 Da)および前年度の報告(Soret帯付近の

吸光スペクトルに変化が認められること)から、これらのピークは「グロビン α 鎖 + ヒ素」または「グロビン α 鎖 + ヘム + ヒ素」であると推測された。また、15.0 kDaにピークが2つ観察される理由は、ヒ素の結合部位が異なるためであると考えられた。

(2) NMAC測定値への影響要因

有機溶剤中毒予防規則の健康診断の生物学的モニタリング検査は、日本が初めて法規化し、政策として行われたものである。近年、化学物質管理のあり方として未規制化学物質においてもリスクアセスメントを利用した事業者の自主管理として、ばく露を評価し、化学物質のばく露の防止、低減措置を講ずることが求められている。実際にDMACは規制のかかっていない物質であるにも関わらず事業所の自主管理として半年で約1800件の測定がされており、産業界においても健康障害が懸念されている物質であると考えられる。

企業の自主的な管理活動を知ることができたが、高濃度暴露者がいることも事実である。また、現状のクロスチェックでは、低濃度試料に若干ばらつきがみられることが、3年間の調査で確認できた。

このようにNMACの測定法は、現行で用いられるGC法では低濃度域で測定精度に問題がある

生物学的モニタリング研究の目的は、体内に吸収された有害化学物質が、生体に及ぼす最少量、あるいは悪い影響を及ぼさない最大量を求めることであるため、DMACは健康影響に関する疫学調査の報告も多くないことから、低濃度域まで精度よく測定することは重要である。

NMF分析では、注入口の熱によって代謝物であるDMF-OHが熱分解しNMFに変化

しているとされている。DMACも同様に、注入口の熱によってDMAC-OHが熱分解し、NMACに変化していると考えられている。DMAC-OH5%水溶液を用いてGCの注入口温度を150–275°Cに変化させ、DMAC-OHからNMACに変化した量を定量し、その変化率を求めた。その結果、注入口温度175°Cでプラトーとなった。したがって、注入口温度150°Cでは未変化体のDMAC-OHも含まれることから測定値に影響を及ぼすことが示唆された。

NMACの測定分析法は1974年にBarnesらによりGC法が報告され、ACGIHが勧告するBEIsはこの方法による定量が引用されており、以後の研究においてもこの手法がベースとなっている。すなわち、BEIsが占める尿中NMAC濃度はGC注入口温度200°Cの測定分析法から算出された値である。しかし、KawaiらはDMAC-OHがGCの注入口温度によって熱分解し脱メチルしNMACに変化することを報告した。DMACとDMFにばく露された作業者の尿でGC注入口の温度を変化させ(150–300°C)NMAC, NMFを定量し、それぞれ最大で約50%, 10%程度の誤差を報告している。DMF-OHおよびDMAC-OHの挙動は確認されていないが、これは注入口の熱によって代謝物であるDMF-OH, DMAC-OHが熱分解しNMF, NMACに変化していることを考察している。河合らの報告では作業員尿で脱メチルの変化はNMACでは225°C, NMFでは250°Cでプラトーとなっている。我々が昨年行ったDMAC-OH水溶液を用いた変化率は、ほぼ一致した傾向であった。したがって、BEIsで示される測定法は注入口温

度200°Cであり、施設間比較に参加した施設においても注入口温度が250°Cより低い場合は未変化体のDMAC-OHが含まれる可能性があり測定値に影響を及ぼすことが示唆された。

モニタリング指標には含有量が多く安定しているものが測定精度や感度の面から良いとされ、DMAC-OHをモニタリング指標にするのが適切であるが、標準品の市販がなく、合成が必要で測定が煩雑になる。また、最終代謝産物であるAMMAについても標準品は市販されていないが、半減期が長く長期ばく露の指標として適切との報告もあり、DMFの代謝物であるAMCCにおいては勧告値も設定されていることからAMMAをバイオマーカーとすることも検討できる。

今回の施設間差比較ではいずれの機関でも尿中NMACをバイオマーカーとし、GC法で測定をおこなっていたが、低濃度域でのばらつきが大きく測定精度に問題があることが示唆された。

DMF, DMACの混合ばく露では、GC法においてNMACとNMFの分離が必要であるが、現在多く用いられている極性カラムではピークが近接していることから測定精度に欠けることも示唆された。NMACとNMFを分離させるためには中極性から無極性のカラムを使用しなければならないが、極性物質と中無極性カラムの組み合わせはピークがテーリングし、測定精度に影響を及ぼす可能性がある。また、NMACはアミノ基を持つため、GC注入口やライナーに吸着しキャリーオーバーによる感度低下や、水溶性が高いため溶媒抽出がしにくく、希釈による前処理ではサンプル中の

水分量が多くカラムダメージがある等、日常分析においての問題点がある。これらが低濃度域での測定誤差の原因になっていると考えられる。

これらの問題を解決するために誘導体化による手法を試みた。誘導体化とは、測定対象物の分子構造を変えることで、その物理化学的性質を変える手法である。今回は誘導体化することで極性基をふさぎ、①溶媒抽出が容易になる、②GC 注入口でのキャリーオーバーの防止、③他の成分との分離等の効果が見込まれる。しかしながら、水中（尿中）すなわち水リッチな状態で誘導体化が可能な試薬は少なく、可能な試薬としてクロロギ酸アルキル及び DMT-MM を用いて誘導体化を試みた。クロロギ酸アルキルはアルカリ水溶液中で1級2級アミンと短時間で反応し、水酸基とも反応する。今回用いた GC/MS のイオン化法が電子イオン化(EI)法で分子イオンの検出が難しく、誘導体の生成は確認できなかったが、化学イオン化(CI)法あるいは LC/MS の大気圧化学イオン化(APCI)法によるイオン化であれば、分子イオンの確認ができる可能性もある。また、DMT-MM は脂肪酸のカルボキシル基を活性化させ NMAC のアミノ基と反応する原理で生成された誘導体は脂肪酸が追加されるので溶媒抽出しやすいという利点がある。しかしながら、原因は不明であるが誘導体の生成を確認することができなかった。

さらに LC/UV, LC/MS による一斉分析を試みた。液体クロマトグラフィーは熱に不安定な物質の分析可能で、測定できる物質の範囲が広いのが特徴である。今回は汎用性の高い UV 検出器を最初に用いたが、

検出波長が 190nm であったため、尿中の夾雑物の影響を強く受け分析には適さなかった。導入するサンプルの前段階の前処理で固相を用いて夾雑物の除去することで改善が得られるかもしれない。また、選択性の高い LC/MS を用いた検討では高極性物質に適したエレクトロスプレー(ESD)法を用いたが、代謝物の分子量が小さくイオン化にマトリックスの溶媒の影響を受けるため標準品のピーク特定に至っていない。

ガスクロマトグラフ法ではこの問題を解決することができなかつたため、液体クロマトグラフを用いた同時分析の検討を行った。DMAC は主に体内で、DMAC-OH、NMAC を経て NMAC-OH、AMMA、アセトアミドに代謝され(図3)、DMAC ばく露者の尿中には DMAC-OH と NMAC が多く排泄されると言われている²⁾。これまで使用されてきた DMF は代謝の過程でイソシアン酸メチルが生成されるが DMAC はこれが生成されないため毒性が DMF と比較し低いとされている。

主な代謝物である DMAC-OH と NMAC の測定法に関する文献調査の結果では、尿中 NMAC の測定にはガスクロマトグラフ(GC/FID, FDT, NPD, MS)法が多く用いられている³⁻⁸⁾。これは、分子量が比較的小さくその特性から GC 法が選択性が高いと考えられているためである。DMAC-OH に関する測定法は確立されていない。また、近年では DMAC および DMF の最終代謝物である AMMA, AMCC を測定対象成分としている報告もある^{3,9,10)}。ACGIH は DMF のバイオマーカーとして半減期が比較的長い AMCC に対する BEIs 値も規定している¹¹⁾。AMMA, AMCC は分子構造が

大きく、極性物質であるため測定に LC を用いる方法が報告されている³⁾。

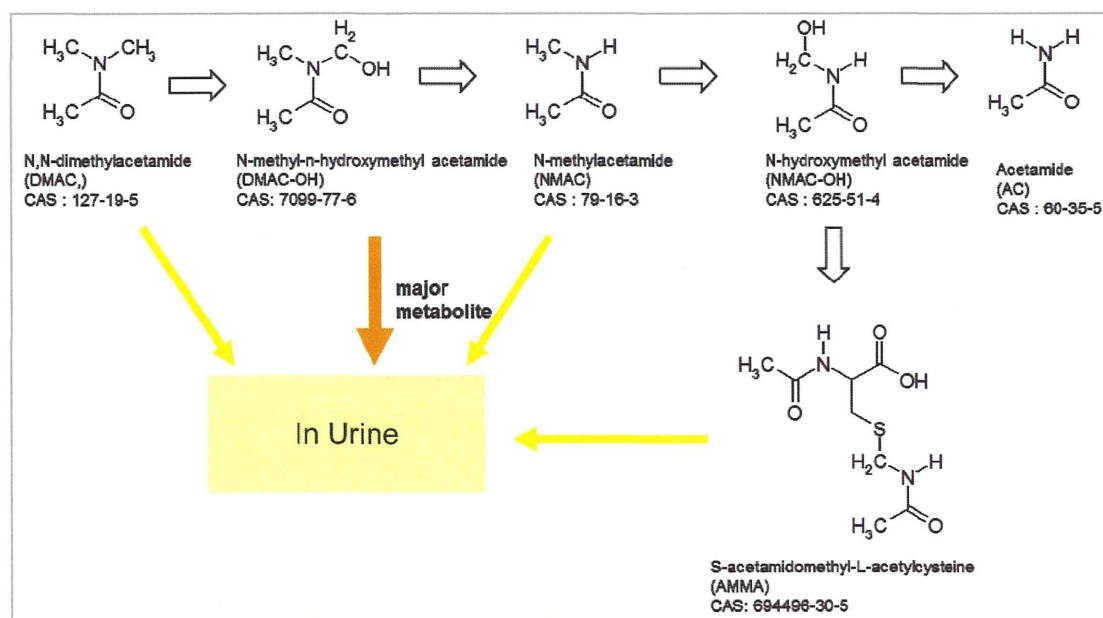


図 36 N,N-ジメチルアセトアミド代謝経路²⁾

このように DMAC は代謝物のどの成分を測定対象成分とするかで分析法が異なる。また、GC 注入口の熱によって DMAC-OH が脱メチルし NMAC に変換されることが報告されており⁶⁾、昨年の我々の研究でも確認した。

LC-MSMS による全代謝物の一斉分析を試みた。液体クロマトグラフィーは熱に不安定な物質が分析可能で、測定できる物質の範囲が広いのが特徴である。今回は汎用性の高い UV 検出器を最初に用いたが、検出波長が 190nm であったため、尿中の夾雑物の影響を強く受け分析には適さなかった。導入するサンプルの前段階の前処理で固相を用いて夾雑物の除去することで改善が得られるかもしれない。また、選択性の高い LC/MSMS を用いた検討では高極性物質に適したエレクトロスプレー(ESI)法を用いた。NMAC,DMAC-OH の分離定量は、ある程度できたが、不明ピークの存在と

AMMA のピーク特定に至っていない。

今後の課題は、夾雑ピークにより定量下限値が高いことから、夾雑ピークの除去(例えば、固相を用いる等)、S/N 比を上げるための分析条件の再検討が必要である。また AMMA を再現性良く定量できる分析条件等の検討があがる。

【参考文献】

- 1) Jae Ho Sohn et al.: Simultaneous determination of N-hydroxymethyl-N-methylformamide, N-methylformamide and N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine in urine samples from workers exposed to N,N-dimethylformamide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Phama an Bio Anal: 37: 165-170, 2005
- 2) American Conference of

- Governmental Industrial Hygienists, Inc. (ACGIH): TLVs and BEIs 7th Edition Documentation CD-ROM N,N-dimethylacetamide (DMAC) Recommended BEI, 2001
- 3) P.Andrea et al.: S - (acetamidomethyl) mercapturic acid (AMMA): A new biomarker for occupational exposure to N,N - dimethylacetamide, J Chromatogr B: 878: 2515-2519, 2010
 - 4) J.R.Barnes and N.W.Henry: The Determination of N-Methylformamide and N-Methylacetamide in Urine, AIHA journal:84-87,1974
 - 5) Paul J.A.Borm et al.: Environmental and Biological monitoring of workers Occupationally Exposure to Dimethylacetamide: J Occup Med: 29: 898-903, 1987
 - 6) T.Kawai et al.: Separate Determination by Gas - Chromatography of Dimethylformamide, Dimethylacetamide, Monomethylformamide and Monomethylacetamide in Urine for Biological Monitoring, J Occup Health: 39: 113-118, 1997
 - 7) T.Nomiyama et al.: Dermal absorption of N,N-dimethylacetamide in human colunteers: Int Arch Occup Health: 73: 121-126, 2000
 - 8) L Perbellini et al.: Biological monitoring of occupational exposure to N,N-dimethylacetamide with identification of a new metabolite: Occup Environ Med: 60: 746-751, 2003
 - 9) A.L.Casal et al.: Biological monitoring of workers exposed to N,N-dimethylformamide, Int Arch Occup Environ Health: 67: 41-46, 1995
 - 10) H.U.Kafferlein et al.: Analysis of metabolites of N,N-dimethylformamide in urine samples, Int Arch Occup Environ Health: 77: 427-432, 2004
 - 11) American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. (ACGIH): TLVs and BEIs 7th Edition Documentation CD-ROM N,N,-dimethylformamide (DMF) Recommended BEI, 2001
- E. 結論
- (1) アルシン曝露実験
 - ① 無機ヒ素の中性NaBH₄還元により、アルシンガスを安定して発生させることができ、原料のヒ素の量を調整することで、一定の濃度のアルシンを作ることができた。
 - ② マウスの*in vitro*、*in vivo*でのアルシン曝露により赤血球ならびにHbの変性が認められた。特にヒ素-Hbアダクト形成の有無はBM法の開発を可能とする。
 - ③ アルシン曝露による溶血は曝露終了後も速やかに進行することが明らかになった。
 - ④ 経皮曝露は全身曝露より弱く、経皮曝露の影響を評価するには更なる研究が求められた。
 - ⑤ アルシン曝露により、*in vivo*系において

でもHb-As付加体が生成することが明らかとなった。このHb-As付加体のモニタリングは、アルシン曝露によるリスク評価のためのBM法として有用であると思われる。一方で、アルシン曝露による溶血のメカニズムについては、Hb-As付加体よりも、酸素分子に起因する複雑な要因の関与が推察された。また、経皮曝露影響は全身吸入曝露影響に比べて小さいと推察された。

- ⑥ アルシン曝露による腎機能障害は、吸入により肺から吸収されたアルシンが溶血を引き起こし、溶血により放出されたHbが、腎臓の近位尿細管に蓄積したことにより引き起こされると推測した。
- ⑦ 雄性ICRマウス由来保存血にアルシンをin vitroで曝露したところ、溶血が認められた。そしてMALDI-TOFを用いた分析の結果、アルシン曝露によって生じるピークが3つ確認できた。これらはヒ素とヘモグロビンの構成要素であるグロビン α 鎖が結合した付加体であると推測され、付加体形成がアルシンによる溶血のメカニズムに強く関与することが示唆された。同時に、アルシンの曝露評価にあたっては、3つのピークの検出がBM法の候補となりうる可能性が示唆された。

(2) NMAC測定値への影響要因

未規制の有機溶剤であるDMACの生物学的モニタリング手法の開発を検討した。現行で用いられるガスクロマトグラフを用いた測定では文献調査や施設間差比較から低濃度域で測定精度に問題があることが示唆された。GC法においてはこれらの問題点を解決できる手法がなかった。DMACの尿中代謝を一斉に分析することができれば、

生物学的モニタリングにおける適切なバイオマーカーの選択ができる。LC-MSMSのよる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。

今後、さらにLCを用いた一斉分析の検討を継続し、測定方法を確立させたいと考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato K, Yamanaka K, Shimoda Y, Yamano Y, Nagano K, Hata A, Endo Y, Tachikawa M, Endo G. Arsine toxicity is induced by inhalation but not by percutaneous exposure in hairless mice. *J Toxicol Sci.* 2014;39(2):301-10.
2. 山本忍, 市場正良, 佐藤和也, 濱野和可子, 森浩司 尿中N-メチルホルムアミド及びN-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について(3), 労働衛生管理 2014; 25(3):(in press)
3. 圓藤吟史. 生物学的モニタリングの分布を明らかにする作業を. 労働衛生管理 2014; 25(2):2.
4. 市場正良, 山本忍, 圓藤吟史. 微量金属の施設間クロスチェック. 労働衛生管理 2014; 25(1):30-34.
5. 山中健三, 圓藤吟史: 食品に含まれるヒ素化合物の健康影響—有機ヒ素化合物の体内動態・毒性発現を中心として—. *ファルマシア* 2013; 49:43-47
6. 圓藤吟史. 平成24年度(第26回)労働衛生検査精度管理調査の実施結果について, 労働衛生管理 2013; 24(3):16-24.

7. 山本 忍, 市場正良, 天野有康, 中村正, 佐藤和也, 濱野和可子, 森浩司. 尿中 N-メチルホルムアミド及び N-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について (2), 労働衛生管理 2013; 24(3): 48-52.
 8. 市場正良, 山本忍, 天野有康, 中村正 : 労働衛生検査精度向上委員会かつどう報告微量元素の施設間クロスチェック. 労働衛生管理 2013; 24(1):15-19.
 9. Takeuchi A, Namera A, Kawasumi Y, Imanaka T, Sakui N, Ota H, Endo Y, Sumino K, Endo G. Development of an analytical method for the determination of arsenic in urine by gas chromatography-mass spectrometry for biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. J Occup Health. 2012; 54(6): 434-440.
 10. Hata A, Yamanaka K, Habib MA, Endo Y, Fujitani N, Endo G. Arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh. Environ Health Prev Med 2012; 17(3): 235-245
 11. 圓藤吟史, 芦田敏文, 圓藤陽子, 川本俊弘, 山瀧一. 平成 23 年度(第 25 回)労働衛生検査精度管理調査の実施結果について, 労働衛生管理 2012; 23(3):15-23.
 12. 山本忍, 市場正良, 天野有康, 中村正 : 尿中 N-メチルホルムアミド及び尿中 N-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について. 労働衛生管理 2012; 23(3):50-57.
 13. 圓藤吟史, 川本俊弘. 平成 22 年度(第 24 回)労働衛生検査精度管理調査の実施結果について, 労働衛生管理 2012; 22(3):15-23.
2. 学会発表
 1. 山内武紀, 山野優子, 山中健三, 畑明寿, 黒田嘉紀, 圓藤陽子, 圓藤吟史: アルシン曝露によるヘモグロビン付加体生成. 第87回日本産業衛生学会 岡山市 2014年5月21-24日
 2. 下田康代, 王大朋, 黒澤英俊, 加藤孝一, 立川真理子, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三, 安艶: 中国人ヒ素曝露者の尿ならびに唾液試料に対するヒ素の化学形態別分析. 日本薬学会第 134 年会, 熊本市, 2014.3.28.
 3. 山中健三 : ヒ素の代謝 : 化学形態と生体影響 - ジメチルヒ素を中心として - . 第19回ヒ素シンポジウム, 福岡市 2013.11.16.
 4. 山野優子, 長野嘉介, 山中健三, 畑明寿, 中館俊夫, 圓藤陽子, 圓藤吟史: 発表標題 : アルシンは経皮吸収されるのか - ヘアレスマウスを用いた経皮および吸入曝露実験 -. 第19回ヒ素シンポジウム 福岡市 2013年11月16-17日
 5. 山内武紀, 山野優子, 山中健三, 畑明寿, 黒田嘉紀, 圓藤陽子, 圓藤吟史: 発表標題 : アルシン曝露によるヘモグロビン付加体生成-マウス保存血へのin vitroアルシン曝露 -第19回ヒ素シンポジウム 福岡市 2013年11月16-17日
 6. 畑明寿, 大和田真由, 長谷川桃子, 山

- 中健三、黒澤英俊、山野優子、圓藤陽子、藤谷登、圓藤吟史: マグロおよびワカメ摂取後の尿中ヒ素代謝物第 19 回ヒ素シンポジウム 福岡市 2013.11.16.
7. 廣瀬隆穂, 市場正良, 圓藤陽子, 森浩司, 金村茂, 濱野和可子, 天野有康, 中村正, 佐藤和也, 木戸誠二郎, 関顯, 杉山浩貴, 竹嶋淳, 錦織千賀, 渡辺雅春, 山内恒幸, 城山康. 尿中 δ アミノレブリン酸の施設間クロスチェック 労働衛生検査精度向上研究会活動報告 日本産業衛生学会第 41 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 大阪市 2013.10.26-27.
 8. 市場正良, 山本学, 圓藤陽子, 森浩司, 金村茂, 濱野和可子, 天野有康, 中村正, 佐藤和也, 木戸誠二郎, 杉山浩貴, 竹嶋淳, 錦織千賀, 廣瀬隆穂, 山内恒幸, 城山康, 関顯. 微量金属の施設間クロスチェック 労働衛生検査精度向上研究会活動報告 日本産業衛生学会第 41 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 大阪市 2013.10.26-27.
 9. Yamano Y, Nagano K, Yamanaka K, Hata A, Nakadate T, Endo Y, Endo G: *In vivo* study of arsine exposure in hairless mice: percutaneous absorption vs. whole-body inhalation. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23, 2013.
 10. Yamauchi T, Yamano Y, Yamanaka K, Hata A, Kuroda Y, Endo Y, Endo G. Possible Production of arsenic adduct due to the exposure of mouse preserved blood to arsine *in vitro*. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23, 2013.
 11. Hata A, Yamanaka K, Kurosawa H, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of seafood. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23, 2013.
 12. Takeuchi A, Namera A, Kawasumi Y, Imanaka T, Sakui N, Ota H, Endo Y, Sumino K, Endo G. Development of analytical method for biological monitoring of inorganic arsenic exposure using gas chromatography-mass spectrometry. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23, 2013.
 13. 山本忍, 天野有康, 中村正, 濱野和可子, 森浩司, 金村茂, 廣瀬隆穂, 木戸誠二郎, 錦織千賀, 竹嶋淳, 関顯, 杉山浩貴, 山内恒幸, 圓藤陽子, 宮崎博喜, 松本明子, 市場正良. N,N-ジメチルアセトアミドの生物学的モニタリング 日本産業衛生学会 平成 25 年度九州地方会学会. 宮崎市 2013.7.5-6.
 14. 山内武紀, 山野優子, 山中健三, 畑明寿, 黒田嘉紀, 圓藤陽子, 圓藤吟史:

- 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-2. 第86回日本産業衛生学会 松山市 2013年5月14-17日
15. 山野優子, 長野嘉介, 山中健三, 畑明寿, 中館俊夫, 圓藤陽子, 圓藤吟史. ヘアレスマウスを用いたアルシンの経皮および吸入曝露実験. 学会名: 第86回日本産業衛生学会 松山市 2013年5月14-17日
 16. 下田康代, 加藤孝一, 山野優子, 畑明寿, 立川真理子, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三. 無機アルシンの溶血機序: ヘモグロビン-ヒ素付加体形成の可能性. 日本薬学会第133年会 横浜市 2013年3月28-30日
 17. 畑明寿, 山中健三, 圓藤吟史, 山野優子, 羽場亮太, 藤谷登, 圓藤陽子: ワカメ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究. 第18回ヒ素シンポジウム 宮崎県宮崎市、宮日ホール2012.11.24.
 18. 黒澤英俊, 下田康代, 畑明寿, 山野優子, 加藤孝一, 立川真理子, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三: グルタチオンに依存したジメチルモノチオアルシン酸の代謝活性化. 第18回ヒ素シンポジウム 宮崎県宮崎市、宮日ホール2012.11.24.
 19. 竹内靖人, 奈女良昭, 川澄八重子, 今中努志, 佐久井徳広, 太田裕一, 圓藤陽子, 住野公昭, 圓藤吟史: GC-MSによる尿中ヒ素化合物の分析法の開発. 第18回ヒ素シンポジウム 宮崎県宮崎市、宮日ホール2012.11.24.
 20. 竹内靖人, 奈女良昭, 川澄八重子, 今中努志, 佐久井徳広, 太田裕一, 圓藤陽子, 住野公昭, 圓藤吟史: 生物学的モニタリングのためのGC-MSによる尿中ヒ素化合物の分析法の開発. 第52回近畿産業衛生学会 和歌山市 2012.11.17.
 21. 市場正良, 山本忍, 天野有康, 中村正. 尿中 N-メチルホルムアミドおよび N-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果. 日本産業衛生学会第40回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 三浦市 2012.11.15-16.
 22. Hata A, Yamanaka K, Endo G, Yamano Y, Haba R, Fujitani N, Endo Y: Arsenic metabolites in humans after ingestion of wakame seaweed. 16th International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET 2012), Angelicum Conference Centre, Rome, Italy. Sep 26, 2012.
 23. Yamanaka K, Yamano Y, Yoshimura Y, Shimoda Y, Endo Y, Endo G, Speciation analysis of arsenic compounds in the serum and urine of a patient with acute arsine poisoning. 16th International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET 2012), Angelicum Conference Centre, Rome, Italy. Sep 27, 2012.
 24. 山中健三, 下田康代, 星井政志, 加藤孝一, 立川真理子, 畑明寿, 圓藤陽子, 圓藤吟史. ジメチルチオアルシン酸の毒性発現に係る代謝機構について. 日本薬学会第132年会 札幌市 2012年3月28-31日

25. 山本 忍, 市場正良, 天野有康, 中村正, 尿中N-メチルホルムアミド及びN-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果, 第40回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2011年11月15, 16日, 三崎
26. 畑 明寿, 山中健三, 山野優子, 圓藤陽子, 藤谷 登, 圓藤吟史. マグロ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究. 第17回ヒ素シンポジウム つくば市 2011年11月19-20日
27. Yamanaka K, Hata A, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G. A study of the extraction of arsenic from seafood for speciation analysis. International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH). Antalya, Turkey, Oct 16-21, 2011.
28. Hata A, Yamanaka K, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G. Arsenic metabolism in human urine after ingestion of sashimi tuna fish. International Society for Environmental Epidemiology (ISEE). Barcelona, Spain. Sep 13-16, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kato K, Yamanaka K, Shimoda Y, Yamano Y, Nagano K, Hata A, Endo Y, Tachikawa M, Endo G	Arsine toxicity is induced by inhalation but not by percutaneous exposure in hairless mice.	J Toxicol Sci.	39(2)	301-310	2014
山本 忍, 市場正良, 佐藤和也, 濱野和可子, 森浩司	尿中 N-メチルホルムアミド及び N-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について (3)	労働衛生管理	25(3)	印刷中	2014
市場正良, 山本 忍, 圓藤陽子	微量金属の施設間クロスチェック	労働衛生管理	25(1)	30-34	2014
圓藤吟史	生物学的モニタリングの分布を明らかにする作業を	労働衛生管理	25(1)	2	2014
山本 忍, 市場正良, 天野有康, 中村 正, 佐藤和也, 濱野和可子, 森浩司	尿中N-メチルホルムアミド及びN-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について (2)	労働衛生管理	24(3)	48-52	2013
圓藤吟史	平成24年度(第26回)労働衛生検査精度管理調査の実施結果について	労働衛生管理	24(3)	16-24	2013
山中健三, 圓藤吟史	食品に含まれるヒ素化合物の健康影響—有機ヒ素化合物の体内動態・毒性発現を中心として—	ファルマシア	49	43-47	2013
市場正良, 山本忍, 天野有康, 中村正	労働衛生検査精度向上委員会活動報告微量元素の施設間クロスチェック	労働衛生管理	24(1)	15-19	2013
Takeuchi A, Namera A, Kawasumi Y, Imanaka T, Sakui N, Ota H, Endo Y, Suginomo K, Endo G	Development of an analytical method for the determination of arsenic in urine by gas chromatography-mass spectrometry for biological monitoring of exposure to inorganic arsenic	J Occup Health	54(6)	434-440	2012
Hata A, Yamanaka K, Habib MA, Endo Y, Fujitani N, Endo G	Arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh	Environ Health Prev Med	17(3)	235-245	2012

圓藤吟史, 芦田敏文, 圓藤陽子, 川本俊弘, 山瀧一	平成23年度(第25回)労働衛生検査精度管理調査の実施結果について	労働衛生管理	23(3)	15-23	2012
山本忍, 市場正良, 天野有康, 中村正	尿中N-メチルホルムアミド及び尿中N-メチルアセトアミドのクロスチェック集計結果について	労働衛生管理	23(3)	50-57	2012
圓藤吟史, 川本俊弘	平成22年度(第24回)労働衛生検査精度管理調査の実施結果について	労働衛生管理	22(3)	15-23	2011

Original Article

Arsine toxicity is induced by inhalation but not by percutaneous exposure in hairless mice

Koichi Kato¹, Kenzo Yamanaka¹, Yasuyo Shimoda¹, Yuko Yamano², Kasuke Nagano³,
Akihisa Hata⁴, Yoko Endo⁵, Mariko Tachikawa¹ and Ginji Endo⁶

¹Laboratory of Environmental Toxicology and Carcinogenesis, School of Pharmacy, Nihon University,
7-7-1 Narashinodai, Funabashi, Chiba 274-8555, Japan

²Department of Hygiene and Preventive Medicine, School of Medicine, Showa University,
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

³Nagano Toxicologic-Pathology Consulting, 467-7 Ojiri, Hadano, Kanagawa 257-0011, Japan

⁴Division of Clinical Laboratory Science, Department of Environmental Security System,
Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, 3 Shiomi-cho, Choshi, Chiba 288-0025, Japan

⁵Research Center for Occupational Poisoning, Kansai Rosai Hospital,
3-1-69 Inabasou, Amagasaki-shi, Hyogo 660-8511, Japan

⁶Department of Preventive Medicine and Environmental Health, Graduate School of Medicine, Osaka City University,
1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

(Received December 15, 2013; Accepted February 6, 2014)

ABSTRACT — Arsine (AsH₃) is used in many industries, but there is insufficient knowledge about the potential for percutaneous absorption. In order to examine possible percutaneous absorption of arsine, we conducted inhalation studies. Arsine was generated by reducing arsenic trioxide with NaBH₄. Male 5-week-old Hos:HR-1 hairless mice were subjected to a single percutaneous exposure or whole-body inhalation exposure of ca. 300 ppm arsine for 5 min. The examination was performed 0-6 hr after the exposure. Total arsenic in whole blood and hematocrit (Ht) values were measured. Generation of an arsenic-hemoglobin (As-Hb) adduct in the blood was detected using high-performance liquid chromatography with an inductively coupled plasma mass spectrometer (HPLC-ICP-MS). Ht values in the inhalation group significantly decreased after 3 hr, but those in the percutaneous exposure group did not. Total arsenic in the inhalation group was 9.0-14.2 mg/l, which was significantly higher than that in the percutaneous group. The As-Hb adduct was detected only in mice in the inhalation group. Histopathological changes were noted only in the inhalation group, with marked deposition of eosinophilic globules in the proximal convoluted tubules of the kidneys, the Kupffer cells of the liver, and the red pulp in the spleen, but not in the lungs. Immunohistochemically, these eosinophilic globules were stained positively by hemoglobin (Hb) antibody. In the present study, arsine-induced hemolysis and deposition of Hb occurred in the kidney via the inhalation route but not via percutaneous exposure. The presence of As-Hb adduct may be a useful indicator for confirming arsine poisoning.

Key words: Arsine, Whole-body inhalation, Percutaneous exposure, Hairless mice,
Arsenic-hemoglobin adduct

INTRODUCTION

Arsine (AsH₃) is a gas used in organic synthesis and in the semiconductor industry for epitaxial growth of gallium-arsenide (GaAs) and as a dopant for silicon-based electronic devices (ACGIH, 2007). Exposure to arsine is possible from accidental release of the gas during these

manufacturing processes. It can also be accidentally generated from arsenic-containing substances, such as wastes from metal/mining and recycling of GaAs semiconductors (ACGIH, 2007). In one such recycling factory, acute poisoning occurred as described in our previous report (Yoshimura *et al.*, 2011). In that instance, percutaneous absorption was suggested because the victim wore a gas

Correspondence: Kenzo Yamanaka (E-mail: yamanaka.kenzo@nihon-u.ac.jp)

respirator.

Of the several hundred cases of arsine exposure recorded, 25% were fatal (Fowler and Weissberg, 1974). The main cause of death in humans is kidney damage due to hemolysis after inhalation. Levvy (Levvy, 1947) speculated that the high toxicity of arsine at higher concentrations may be due to the action of unreacted arsine gas on vital organs. However, in animal experiments, no kidney damage was reported after a single arsine exposure, although spleen damage was reported (Blair *et al.*, 1990).

Although many poisoning cases have been reported, there is no information about whether poisoning can occur through percutaneous absorption (ACGIH, 2007). Furthermore, human metabolites in urine and blood after inhalation of arsine (Apostoli *et al.*, 1997, Yoshimura *et al.*, 2011) are the same as the metabolites found in inorganic arsenic exposure. Thus, the effects of inorganic arsenic toxicity should be considered in chronic arsine exposure.

An *in vitro* study on the dermal uptake of arsenic compounds, inorganic arsenic, arsenosugars, and their metabolites through human skin has been reported (Ouypornkochagorn and Feldmann, 2010). The uptakes of these substances from skin depend strongly on their chemical forms (Ouypornkochagorn and Feldmann, 2010). Arsine has high hydrophobicity in spite of its instability in oxygen, so we presumed that it would be absorbed efficiently through the skin. However, there are no useful data about the transdermal absorbency of arsine.

An *in vitro* experiment indicated the possible formation of an unidentified arsenic-adduct from arsine-exposed human blood samples (Higashikawa *et al.*, 2008). Although no data were available whether such an arsenic-adduct could be produced *in vivo*, the formation of such adducts could be a good indicator of arsine poisoning and also lead to elucidation of the induction mechanism of hemolysis by arsine, its main mode of toxicity. Thus, it is necessary to measure the specific arsine metabolites such as arsenic-hemoglobin (As-Hb) adduct in the blood.

Therefore, in order to determine whether arsine can be absorbed percutaneously, we performed acute inhalation studies at the level of almost human lethal dose of arsine gas (ACGIH, 2007) consisting of whole-body inhalation and transdermal exposure using hairless mice, whose skin is in many ways similar to that of humans and is more permeable than human skin (Hinz *et al.*, 1989). In addition, blood samples obtained from arsine-exposed hairless mice were analyzed using high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) and spectrophotometry to verify the production of arsenic-adduct.

MATERIALS AND METHODS

Caution: Because arsine used in the present study is highly toxic, it must be handled with extreme care.

Animals

Animal experiment protocols were approved by the Ethical Committee of Nihon University (approval #: AP11P042), and all experiments with animals were performed in compliance with the Ethical Guidelines for Animal Experiments of Nihon University.

We used 4-week-old male Hos:HR-1 hairless mice (weight, 20-23 g), purchased from Sankyo Labo Service Corporation (Tokyo, Japan). Each group consisted of 4 mice. The animals were acclimated under a 12-hr light/dark cycle with free access to food and water under Specific Pathogen Free conditions for one week. The mice were placed in the exposure chamber with arsine gas for 5 min for the transdermal exposure route or for the whole-body inhalation exposure route, under isoflurane anesthesia.

Exposure to arsine

We handled the extremely toxic arsine with great care. The inhalation exposure chamber was made from acrylic resin with a volume of 2.5 l (Fig. 1A) and was able to facilitate whole-body inhalation (Fig. 1B) and transdermal exposure (Fig. 1C). All trials were carried out in the acrylic chamber located in a fume hood for chemical safety. Arsine gas was generated by the reduction of arsenic trioxide with alkaline NaBH_4 . The arsine concentration was measured by a Kitagawa-type detector tube system, which consisted of an aspirating pump (AP-20) and an arsine gas detector tube (140SA ARSINE, measuring range: 10-320 ppm/50 ml air) from Komyo Rikagaku Kogyo K.K. (Kanagawa, Japan). Prior to the exposure experiment, the change of arsine concentration in the inhalation chamber was measured and a stable concentration persisted for almost 10 min. Therefore, we chose a 5-min exposure. Actual arsine concentrations during a single exposure were 320 ppm for whole-body exposure and 300-320 ppm for transdermal exposure at 25°C. Immediately after the exposure, arsine in the acrylic chamber was discharged by introducing argon gas and was then oxidatively trapped into 0.1 M potassium permanganate.

Hematological changes

In order to observe hematological changes, degree of hemolysis and changes in hematocrit (Ht) values were targeted. We obtained murine blood from a tail vein at 0,

Arsine toxicities by inhalation and percutaneous exposures

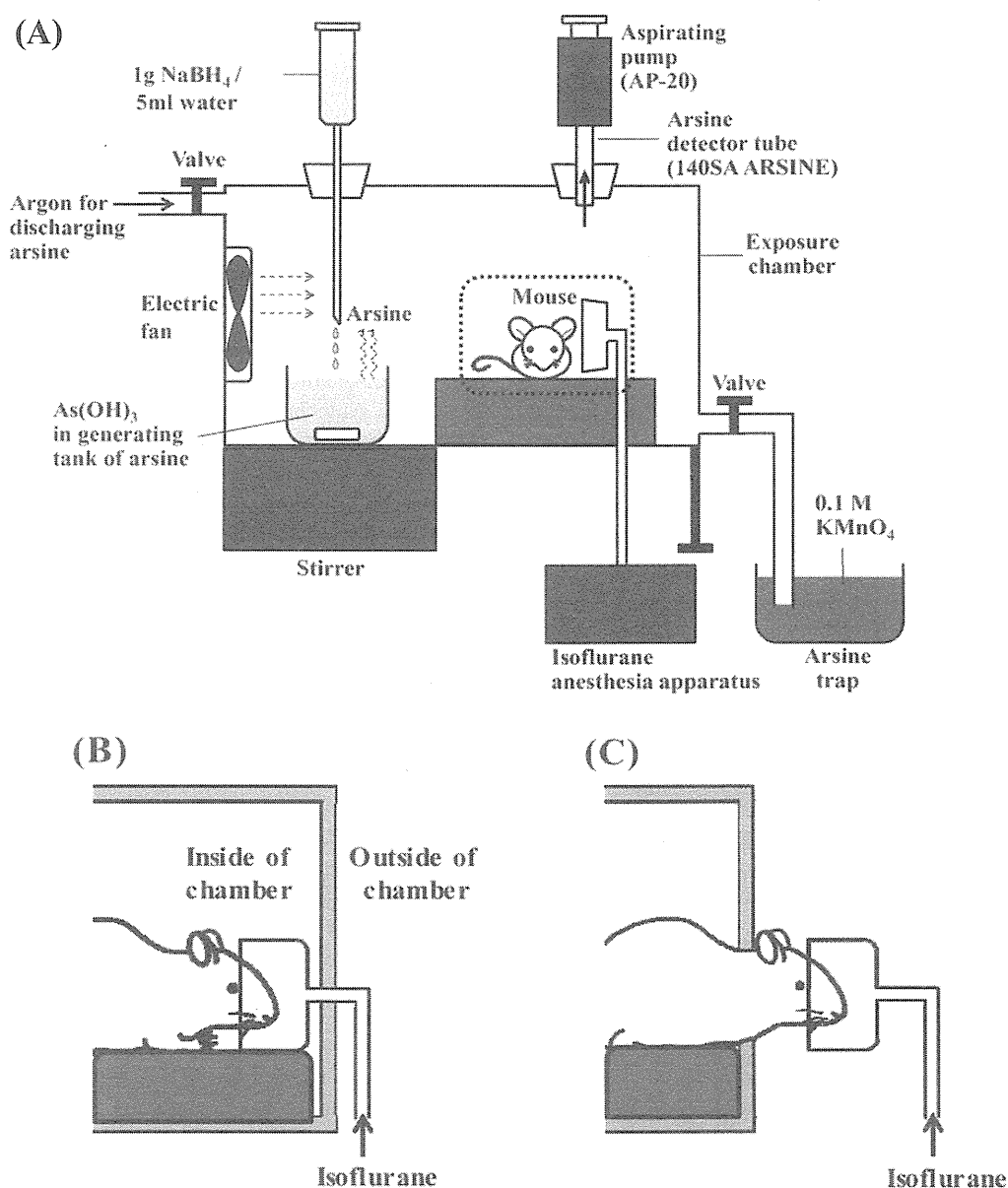


Fig. 1. (A) Schematic of arsine-generating system and exposure apparatus. (B) A mouse is set inside the chamber for whole-body inhalation, and (C) the head of a mouse is set outside the chamber for transdermal exposure. During the exposure, the mouse was maintained under isoflurane anesthesia.

3, and 6 hr after the end of a single exposure and assessed it by using Ht capillary tubes.

Total arsenic concentration in whole blood

Each mouse was killed by exposure to isoflurane 6 hr after the end of a single exposure to arsine; the blood

sample was obtained transcardially by using a syringe. Half of the blood sample taken was stored as whole blood at -80°C until analysis.

For total arsenic measurement, 100 μl of whole blood was diluted 10-fold with 0.1 M nitric acid (TAMAPURE AA-100, Tama Chemicals, Kawasaki, Japan), depro-

teinized with an Amicon Ultra filter (Ultracel 100 kDa, Millipore, Billerica, MA, USA), and analyzed using an ELAN DRC-II ICP-MS (PerkinElmer SCIEX, Concord, Ontario, Canada). The instrument settings of the ICP-MS were as follows: RF power 1300 W, argon plasma gas flow 15 l/min, auxiliary flow 1.2 l/min, and nebulizer flow 1.0 l/min. A coaxial-type nebulizer was used; skimmer and sample cones were platinum. ICP-MS detection mass was set as m/z 75 ($^{75}\text{As}^+$), m/z 77 ($^{40}\text{Ar } ^{37}\text{Cl}^+$), m/z 82 ($^{82}\text{Se}^+$), and m/z 72 ($^{72}\text{Ge}^+$). $^{72}\text{Ge}^+$ was used as an internal standard. According to the EPA Standard Methods (EPA, 2009), signal intensity (counts per second, CPS) of arsenic in blood samples was corrected by the following equation in order to remove interference by chlorine in the sample; arsenic CPS = $75\text{CPS} - 3.127 \times [77\text{CPS} - (0.815 \times 82\text{CPS})]$. The accuracy of the analysis was assessed using Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-3 (Lot No: 0512627, Sero AS, Billingstad, Norway) as a reference material.

Detection of As-Hb adduct

Half of the blood obtained from heart puncture was centrifuged at 2,000 rpm for 10 min to separate the plasma and blood cells and was then placed in a sealed plastic tube and stored at -80°C in a freezer until analysis. In order to detect As-Hb adduct, we used the blood cells sample. Since the blood cells obtained from mice with whole-body exposure were hemolytic, the supernatant after centrifugation at 2,000 rpm for 10 min was used for the As-Hb adduct analysis. The blood cells from control mice and mice with transdermal exposure were added to water and centrifuged at 2,000 rpm for 10 min to obtain hemoglobin (Hb) solution. We performed spectrometric analysis at 540 nm (a Q band absorption that is characteristic of Hb) in addition to speciation analysis of arsenic compounds by HPLC-ICP-MS. The proteins (including Hb) in the supernatant were separated using an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) by using a gel filtration column (Superdex™ 75 10/300GL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) under the following conditions: mobile phase, 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ with 0.15 M NaCl at pH 7.2; flow rate, 0.5 ml/min; column temperature, 25°C ; and injection volume, 100 μl . For Hb detection, absorbance at 540 nm was measured using a visible wavelength detector, and arsenic and iron were measured using an Agilent 7500a ICP-MS (Agilent Technologies). The instrument conditions for ICP-MS were as follows: RF power, 1400 W; plasma argon gas flow rate, 15 l/min; carrier argon gas flow rate, 0.9 l/min; make-up argon gas flow rate, 0.2 l/min. A coaxial-type nebulizer, copper sampling cone, and nick-

el skimmer cone were used. ICP-MS detection mass was set as m/z 75 ($^{75}\text{As}^+$), m/z 57 ($^{57}\text{Fe}^+$), m/z 35 ($^{35}\text{Cl}^+$), and m/z 72 ($^{72}\text{Ge}^+$).

Histopathological examination

Livers, spleens, kidneys, and lungs of mice were fixed in 10% neutral-buffered formalin and then paraffin-embedded. Paraffin sections were stained using hematoxylin and eosin (HE) for histological examination. Kidney sections were also stained with Berlin Blue for hemosiderin. For immunohistochemical examination, the lung, liver, kidney, and spleen sections were examined with rabbit anti-mouse Hb antibody (MP Biomedicals Cappel, Solon, OH, USA). Autoclave pretreatment was performed before reactions with primary antibodies. Endogenous peroxidase was inactivated using 1% H_2O_2 , and non-specific proteins were blocked with skim milk. Sections were then incubated with the primary antibody overnight at 4°C at a dilution of 1/100. Immunolocalization was performed using the Histofine® Simple Stain (mouse MAX-PO [Rabbit]; Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo, Japan) with 3,3'-diaminobenzidine as the chromogen, and the sample was counterstained with hematoxylin.

RESULTS

Hematological changes

Changes in Ht values after a single exposure to arsine are described in Table 1. Ht values from mice that underwent whole-body exposure to ca. 300 ppm arsine significantly decreased to 15.8% and 8.3% after 3 hr and 6 hr, respectively, and all blood was hemolyzed. Six hours after a single transdermal exposure, on the other hand, neither Ht value decrease nor blood hemolysis was observed.

Total arsenic concentrations in whole blood

The accuracy of the analytical procedure was tested by analyzing Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-3, which is certified as a reference for total arsenic. The total arsenic concentration of the reference material was $24.95 \pm 0.45 \mu\text{g/l}$ ($n = 5$) and the certified value was $25.0 \mu\text{g/l}$ (95% confidence interval: 23.7-26.3 $\mu\text{g/l}$). Thus, the arsenic concentration determined by the present ICP-MS method was within the allowable range for certified values.

The total arsenic concentration in the blood 6 hr after the end of the exposure period is presented in Table 1. Blood was not sampled from 2 mice that underwent whole-body inhalation because they were near death at the sampling time. The mean concentration of arsenic in the blood after transdermal exposure was significant-

Arsine toxicities by inhalation and percutaneous exposures

Table 1. Changes in hematocrit (Ht) value and total arsenic concentration in the blood of hairless mice after single exposure to arsine via whole-body inhalation or percutaneous-only route

Route of exposure	Mouse No.	Body weight (g)	Exposure concentration of arsine (ppm)	Ht value (%) after exposure			Total arsenic concentration in blood (mg/l)*
				0 hr	3 hr	6 hr	
Whole-body inhalation	1	23	320	53	15	8	9.0
	2	22		50	13	7	ND
	3	22		52	19	8	14.2
	4	21		53	16	10	ND
	Mean	22.0		52.0	15.8	8.3	11.6
Percutaneous-only	5	23	320	55	51	49	0.9
	6	23	300	49	50	50	0.9
	7	23	320	46	50	48	0.9
	8	23	300	50	49	47	1.1
	Mean	23.0	50.0	50.0	48.5	1.0	
Control	9	19	0	56	49	52	2.0
	10	22	0	50	54	54	1.0

ND: Not Determined

*The total arsenic concentration was analyzed in a blood sample taken 6 hr after the end of the exposure period.

ly lower than that after whole-body inhalation exposure, similar to control values.

Detection of As-Hb adduct in blood

The combination HPLC-ICP-MS chromatogram with absorbance at 540 nm is shown in Fig. 2. The peak absorbance at 540 nm (found between 43 and 75 kDa) showed high abundance of Fe (m/z 57), consistent with the 64.5 kDa mass of the Hb tetramer. In addition, the peak between 29 and 43 kDa is considered to be the Hb dimer. Two arsenic peaks were detected in the elution position of Hb shown in the blood after whole-body inhalation (Fig. 2B), but no arsenic peaks were detected after transdermal exposure (Fig. 2C) or for the control (Fig. 2A). The two arsenic peaks in the samples obtained after whole-body inhalation disappeared following filtration with a cut-off level of 10 kDa (data not shown). These results showed that the arsenic coexisted with Hb.

Autopsy findings

Hematuria was evident in the bladders of mice exposed to a single whole-body inhalation, but was not observed in the mice with transdermal exposure. All mice in the whole-body inhalation group had dark spleens. No gross lesions were observed in the control mice or in any of the

mice exposed percutaneously.

Histopathological findings

Histopathological findings from the livers, kidneys, spleens, and lungs of mice exposed to arsine gas by whole-body inhalation and percutaneous-only route are shown in Table 2. Exposure-related histopathological changes were observed in the kidneys, livers, and spleens of the mice exposed to arsine gas by the whole-body route. In the kidneys, marked depositions of eosinophilic globules were noted in the proximal convoluted tubules of all mice in the whole-body inhalation group (Fig. 3A-1). Numerous eosinophilic globules appeared in the cytoplasm of tubular epithelium cells, and the cytoplasm of almost all proximal convoluted tubules was filled with the eosinophilic globules. The eosinophilic globules were stained strongly with eosin and were round in shape. Their size varied from smaller than erythrocytes to moderately bigger than erythrocytes. In addition to the eosinophilic globules, eosinophilic casts were occasionally observed in the lumen of the distal tubules and Henle's loops in several mice that were exposed by the whole-body route, but glomeruli appeared normal.

The eosinophilic globules were also observed in the livers and spleens. In the livers, the eosinophilic globules appeared in the cytoplasm of Kupffer cells

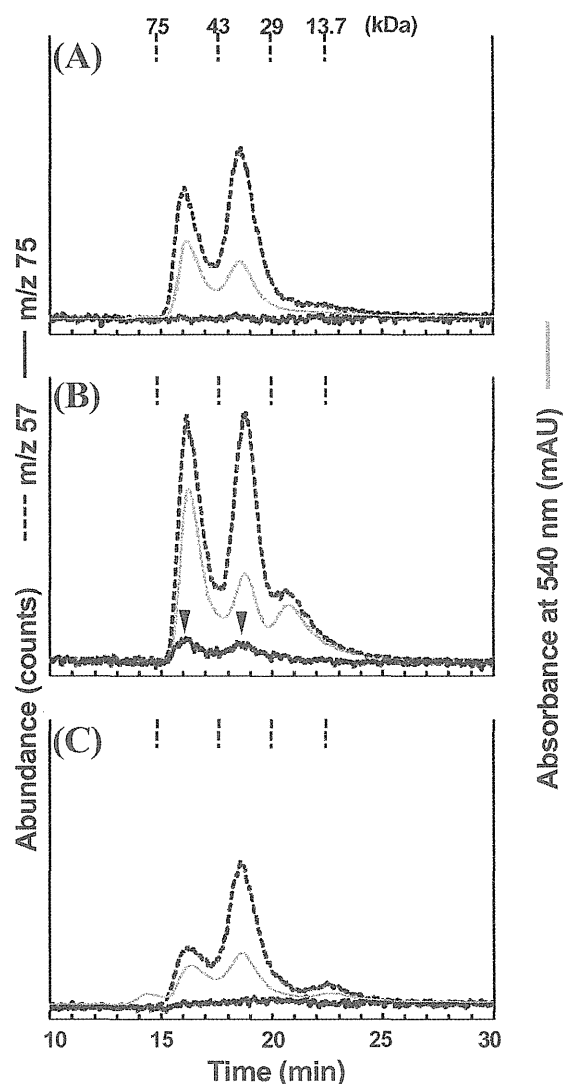


Fig. 2. HPLC-ICP-MS chromatograms of blood derived from (A) arsine-exposed mice control, (B) whole-body inhalation, (C) transdermal exposure. — : CPS at ^{75}As ; : CPS at ^{57}Fe ; — : absorbance at 540 nm (mAU).

(Fig. 3B-1). The eosinophilic globules were located within the red pulp in the spleens (Fig. 3C-1). The eosinophilic globules observed in the livers and spleens were stained strongly with eosin, similar to those in the kidneys, and were about 2-3 times larger than erythrocytes.

Immunohistochemically, the eosinophilic globules of the kidneys, livers, and spleens showed a positive reaction to the Hb antibody, indicating that Hb existed in the eosinophilic globules (Fig. 4A). The eosinophilic casts

in the distal tubules and Henle's loops were also positive for Hb. However, the eosinophilic globules did not show a positive reaction to Berlin Blue staining, revealing no evidence of hemosiderin formation (data not shown). Necrotic lesions were not observed in the kidneys, livers, or spleens. Intravascular erythrocytic stain affinity was weak, and the numbers of erythrocytes decreased in all organs examined in the whole-body exposure group. In the lungs of the whole-body exposure group, there were no significant changes except for the erythrocyte change in the blood vessels.

Neither exposure-related histopathological changes nor eosinophilic globules were found in the organs of any mice that were exposed percutaneously as well as control mice.

DISCUSSION

These findings suggest for the first time that arsine is not absorbed through the skin of mice. These exposure levels are almost equal to human lethal dose which is reported to be from 70 ppm to 300 ppm (ACGIH, 2007). Dutkiewicz (1977) reported that arsenate was absorbed from rat skin and the rate was $1.14\text{--}33.1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{hr}^{-1}$. In an *in vitro* study using human skin, arsenite and dimethylarsinic acid were taken up percutaneously at rates greater than a factor of 29 and 59 higher than that of arsenate (Ouyornkochagorn and Feldmann, 2010). From these results, we speculated that arsine gas could penetrate human skin. Since there was no data whether arsine gas could be absorbed through human skin, we examined the uptake of arsine through human skin by using hairless mouse as a model, because in this model, arsine gas is in direct contact with the skin and permeability of mouse skin is higher than that of human skin (Hinz *et al.*, 1989). However, the result from the present study did not show a toxic effect from ca. 300 ppm for a 5 min transdermal exposure to hairless mice, whereas whole-body inhalation caused severe hemolysis even 3 hr after the end of exposure period, as shown in Table 1.

The critical target system for arsine exposure is reported to be the hematopoietic system, and the impairment of renal function is correlated with the degree of intravascular hemolysis and death rate that the subjects experience (ACGIH, 2007; IPCS, 2001). Our animal experiments clearly expressed the severe typical effect on Ht values from acute arsine exposure in mice after whole-body inhalation at ca. 300 ppm for 5 min. We also observed histopathological changes in organs, including the kidneys, spleens, and livers, caused by inhalation of ars-

Arsine toxicities by inhalation and percutaneous exposures

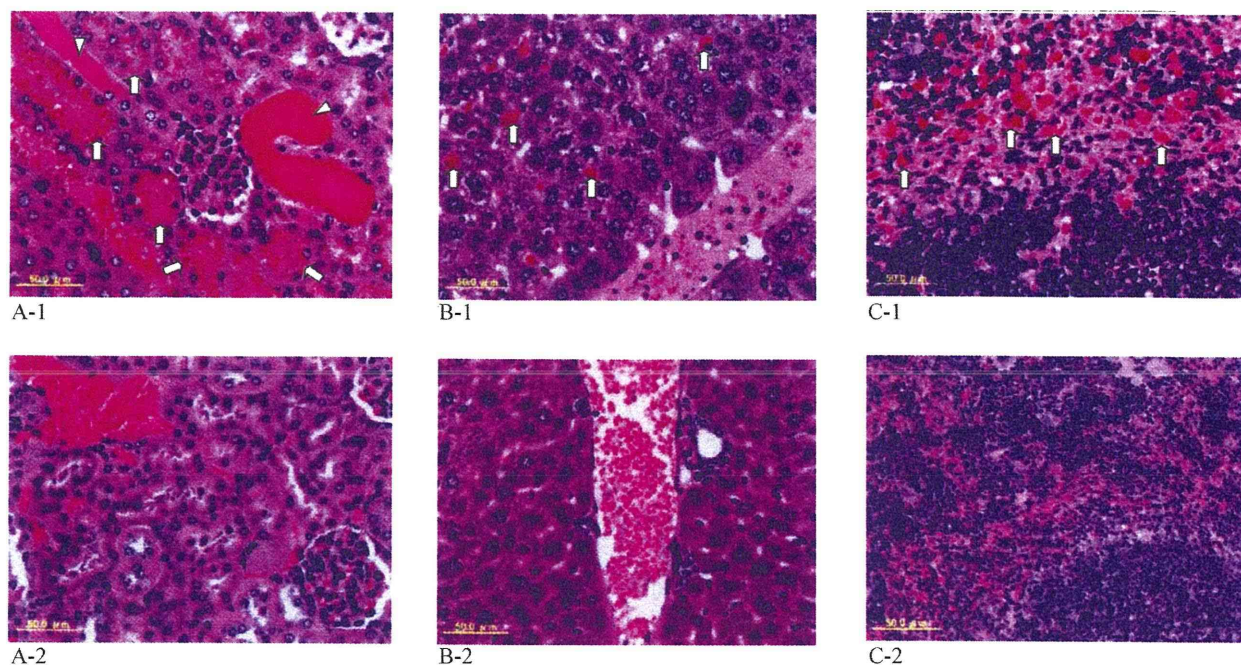


Fig. 3. Histopathological findings. Hematoxylin and eosin (HE) stain. A-1: Kidney of a mouse exposed to arsine gas by whole-body inhalation. Eosinophilic globules in the cytoplasm of proximal convoluted tubules (arrows), and eosinophilic cast in the lumen of the distal tubules (arrowheads). A-2: Kidney of a control mouse. B-1: Liver of a mouse exposed to arsine gas by whole-body inhalation. Eosinophilic globules in the cytoplasm of Kupffer cells (arrows). B-2: Liver of a control mouse. C-1: Spleen of a mouse exposed to arsine gas by whole-body inhalation. Eosinophilic globules in the red pulp (arrows). C-2: Spleen of a control mouse. Bars indicate 50 µm.

Table 2. Histopathological findings in hairless mice exposed to arsine gas by whole-body or percutaneous-only route

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

Each value indicates the number of lesion-bearing mice.

The number in parentheses represents a grade of histopathological findings (+: slight; 2+: moderate; 3+: severe).

NS: No significant change in all animals.