

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390039

研究課題名 (和文) 有機ヒ素化合物による中枢神経系への長期影響の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of long-term influence to a central nervous system by an organic arsenic compound

研究代表者

石井 一弘 (ISHII KAZUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：70323293

研究成果の概要 (和文)：

カニクイザルへの DPAA 経口投与では、中枢神経に長期に亘って蓄積することが明らかになった。また、脳 PET を用いて DPAA の脳血流と脳糖代謝に与える影響を調べたところ、小脳、脳幹、後頭葉に影響を与えることが分かった。しかし、中枢神経組織での病理学的変化は見られなかった。DPAA 暴露者では脳幹・小脳・側頭後頭葉症状と同部位の血流低下と糖代謝低下が見られており、カニクイザルでも DPAA の中枢神経影響が再現できたと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

This research makes it clear that in the peroral administration of diphenylarsinic acid (DPAA) to *Macaca fascicularis* (crab-eating macaques), DPAA accumulates in the central nervous system over a long period of time. Using brain PET to study the effects of DPAA on cerebral blood flow and brain glucose metabolism, we found that it had affected the cerebellum, brainstem, and occipital lobes. No pathological changes were seen, however, in the central nerve tissue. In people exposed to DPAA, symptoms present themselves in the brainstem, the cerebellum, and the temporo-occipital lobes, and decreased blood flow and brain glucose metabolism to these areas is also seen. We believe that we were able to reproduce this influence of DPAA on the central nervous system in *Macaca fascicularis*, as well.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：中毒学、脳・神経、薬理学、有害化学物質

1. 研究開始当初の背景

平成15年3月茨城県神栖市（旧神栖町）において、旧日本軍の化学兵器の原材料に由来するジフェニルアルシン酸(DPAA)中毒が石井・玉岡らにより発見された。DPAAにより地下水が汚染され、飲水により経口的にDPAAを摂取して症状が出現した。本中毒は小脳症状・ミオクローヌス・振戦といった小脳・脳幹部症状と視覚異常・記銘力障害・睡眠障害などの大脳皮質機能障害の症状がみられた。さらに小児では成人と同様の中枢神経症状に加え、精神遅滞がみられた。動物およびヒトにおけるDPAA中毒の報告は国内外でも皆無であり、中毒の症状・症候や毒性機序に関する知見もなく、適切な診断法、治療法を開発するためには、ヒトにおける毒性評価ならびにその毒性発現機構の解明が重要である。

DPAA暴露者に対する脳血流SPECTの解析では、神経症状の責任脳部位に一致して、暴露中止後数ヶ月より脳血流低下が出現・増悪し、数年後から、緩徐に改善することが、脳ポジトロン・エミッション・トモグラフィ(PET)では、脳血流低下部位に一致して側頭葉内側部(海馬)、脳幹、小脳を中心に糖代謝が長期間低下することが判明した。DPAAによる中枢神経への影響が長期間続くことが明らかになった。

ラットを使ったモデル動物が作成され、症状の一部が再現された。これらラットでは脳、脊髄など中枢神経系(特に小脳、脳幹)にDPAAが蓄積しやすいこと、さらに投与中止後も、中枢神経系からの排泄が極めて遅いことが明らかになった。サルへの投与実験では、中枢神経系へのDPAAの蓄積がラットより10倍以上多く、DPAAの生体からの排泄もラットに比べ遅いことが分か

った。

以上より、霊長類であるサルのDPAA体内動態はラットのそれと異なると考えられ、ヒトのDPAA中毒を考察する上で、サルを用いた実験系を確立し、実施することが急務であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、DPAA 暴露者の研究結果を基に、(1)カニクイザルへのジフェニルアルシン酸の行動毒性を定性的に明らかにしながら、同時に(2)カニクイザルにヒトと同程度のDPAAを暴露させた場合に生じる脳血流変化や脳糖代謝変化を動物 PET で長期間に亘り観察すること、(3)脳各部位及び全身の臓器のDPAAとその代謝物(フェニルメチルアルシン酸:PMAA,フェニルアルシン酸:PAA)を定量解析し、(4)病理学的変化も確認しながら、DPAAの中枢神経への長期影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ジフェニルアルシン酸の行動毒性

カニクイザルへのDPAA投与は、DPAA(トリケミカル社製)を蒸留水に溶解し、1N水酸化ナトリウムにてPH7.0に調整した10mg/mL溶液を用いた。各群カニクイザルに1mg/kg/dayのDPAA溶液を胃チューブで28日間投与した。同時に毎日、目視の行動観察を行い、異常が認められた場合はビデオ撮影にて半定量的行動分析を実施した。DPAA投与群は4群に分け、A群投与直後(4匹)、B群投与1ヵ月後(4匹)、C群6ヵ月後(6匹)、D群12ヵ月後(6匹)に最終脳PETを行い、脳PET終了後に屠殺、解体し、各臓器試料の一部を病理用試料として処理し、残りを-30℃にて冷凍保存した。(図1)

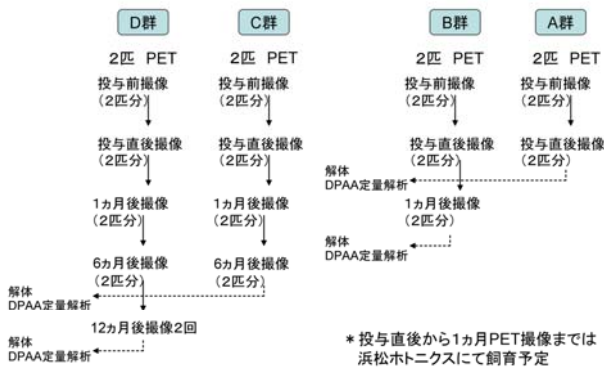


図1. 実験タイムテーブル

(2) 臓器中ジフェニルアルシン酸及びその代謝物の定量分析: 凍結試料は解凍後にホモジェネートし、 ^{13}C -DPAA、 ^{13}C -PAA、 ^{13}C -PMAAのサロゲートを入れ、アルカリ溶液に溶解後、脱脂、除タンパクを行い、固相カラムに吸着後に溶出して、LC/ICP/MS及びLC/MS/MSにて分離同定後、サロゲートで定量化した。特に大脳・小脳・脳幹は脳PETで関心部位(ROI)とした脳部位を切り出し試料とした。

(3) ジフェニルアルシン酸暴露による脳血流および脳糖代謝変化: A群は投与前、投与直後の2回、B群は投与前、投与直後、投与1ヵ月後の3回、C群は投与前、投与後、投与1ヵ月後、6ヵ月後の4回、D群は投与前、投与直後、投与1ヵ月後、6ヵ月後、12ヵ月後の5回の脳PETを施行した。(図1)動物研究用PET装置SHR-7700で撮像した。カニクイザルは全身麻酔下に ^{15}O - H_2O を用いて脳血流変化を計測し、 ^{18}F -FDGを用いて、脳糖代謝を計測した。撮像後に関心部位(ROI)での脳血流、脳糖代謝を計測した。投与直後、投与1ヵ月後、6ヵ月後、12ヵ月後のPET値からDPAA投与前のPET値を引いた値をDPAA投与によるPET値の変化とした。

(4) ジフェニルアルシン酸暴露による病理組

織の解析: 各臓器、特に大脳各部位、基底核、脳幹各部、小脳、脊髄における神経細胞死やグリア細胞の反応性変化をHE染色、髄鞘染色、鍍銀染色を行い調べた。

4. 研究成果

(1) DPAAの行動毒性: 1mg/kg/day, 28日間投与したカニクイザルA群(4匹)B群(4匹)C群(6匹)D群(6匹)でDPAA投与中および投与後(D群は最長12ヵ月)における行動変化や症状・症候の出現はなかった。

(2) 臓器中DPAA及びその代謝産物の定量解析: 各群の全身臓器中のDPAA、PMAA、PAAを測定したところ、中枢神経系(大脳、小脳、脳幹、脊髄)にてDPAAの蓄積が見られた。(図2)

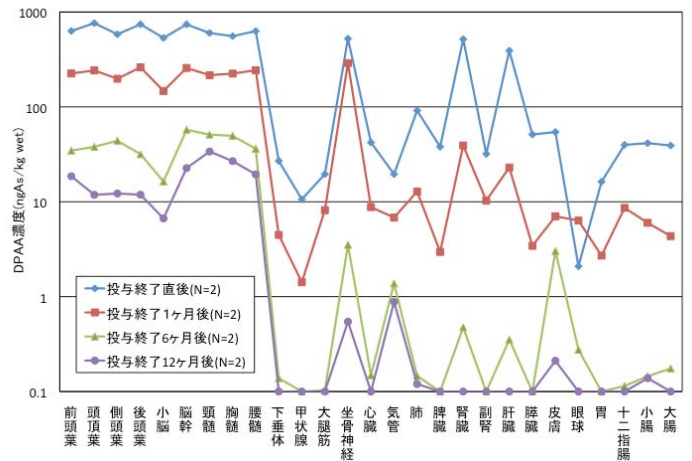


図2. カニクイザルの各組織中DPAA蓄積量

(3) DPAA暴露による脳血流および脳糖代謝変化: 小脳、脳幹、後頭葉において他の脳部位よりも糖代謝が低下傾向にあった。(図3)

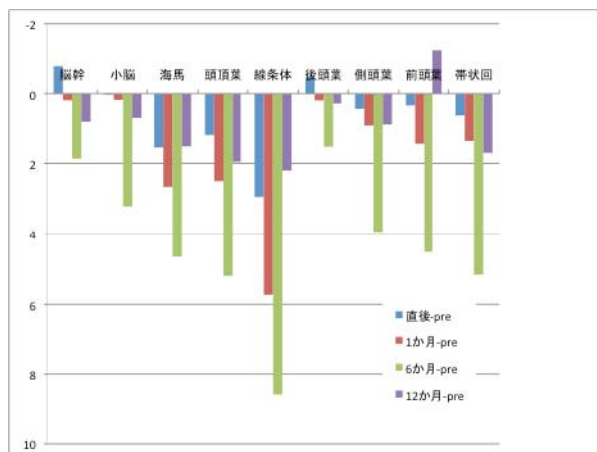


図3. DPAA 投与による各脳部位糖代謝の経時変化

(4) DPAA 暴露による病理組織の解析: 前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、基底核(被殻・尾状核・淡蒼球)における神経細胞脱落、グリア細胞増生、線維化、脱髄などの組織変化は認められなかった。肝臓組織における胆管増生、グリソン鞘の細胞浸潤、肝臓実質への細胞浸潤、脂肪化がみられた。(図4)

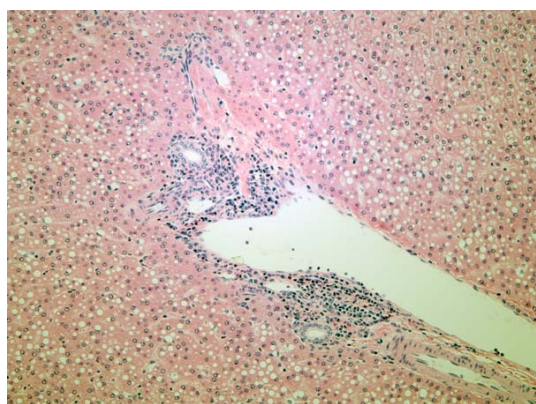


図4. グリソン鞘の細胞浸潤、胆管増生と肝細胞の脂肪化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Kinoshita K., Noguchi A., Ishii K., Tamaoka A., Ochi T. Kaise, T. Urine analysis of patients exposed to phenylarsenic compounds via accidental pollution. Journal of Chromatography B, 査読有、Vol. 867、2008、179-188

- ② Kobayashi Y, Negishi T, Mizumura A, Watanabe T, Hirano S. Distributions and Excretion of Arsenic in Cynomolgus Monkey Following Repeated Administration of Diphenylarsinic Acid. Arch. Toxicol. 査読有、Vol.82、2008、553-561

[学会発表] (計30件)

- ① 小林弥生, 山城彩花, 平野靖史郎、ヒ素-グルタチオン抱合体の体外排泄に関する γ -GTPの影響、第37回日本トキシコロジー学会学術年会、2010年6月17日、沖縄
- ② 石井一弘、岩崎信明、田中竜太、中馬越清隆、玉岡晃、平野靖史郎、柴田康行、細谷朋子、瀬戸康雄、ジフェニルアルシン酸(DPAA)の中樞神経内長期残留性の検討、第51回日本神経学会総会、2010年5月20日、東京

[図書] (計3件)

- ① 平野靖史郎、小林弥生. 日本臨床社、ヒ素 (In “日本臨床 増刊”) 68巻1号、2010、567-571

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 一弘 (ISHII KAZUHIRO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：70323293

(2) 研究分担者

玉岡 晃 (TAMAOKA AKIRA)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：50192183

柴田 康行 (SHIBATA YASUYUKI)
国立環境研究所・化学環境研究領域・領域長
研究者番号：80154251

瀬戸 康雄 (SETO YASUO)
科学警察研究所・法科第三部・部付主任
研究官
研究者番号：10154668

平野 靖史郎 (HIRANO SEISIROU)
国立環境研究所・環境リスク研究センター・室長
研究者番号：20150162