

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860463

研究課題名(和文) アルシンの慢性影響に関する研究 遺伝子発現とタンパク発現、行動学からの解析

研究課題名(英文) The chronic effect of arsine on brain function

研究代表者

山内 武紀(Yamauchi, Takenori)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：40576287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：半導体や発光ダイオードの製造過程で使用するアルシンは強い急性毒性を示します。吸入曝露による中毒事故は散発的に起こっており、今後も発生が危惧されます。しかし、管理濃度が設定されていないため、産業現場におけるリスク管理の観点から、曝露を示すマーカーを見つけることは急務です。また、アルシン曝露による急性影響として溶血がよく知られていますが、慢性影響についてはわからないことも多く、その解明が期待されています。

本研究により、ヘモグロビンへの付加体が曝露を示すマーカーとして利用可能であることが示唆されました。また、慢性影響の一つとして脳機能への影響があることが示唆されました。

研究成果の概要(英文)：Arsine is used in semiconductor and light-emitting diode manufacturing has strong acute toxicity. Accidental arsine poisoning other than that occurred in 2008 can be sporadically observed, and its future occurrence is concerned. However, the control concentration has not been established, and the development of a biomarker reflecting exposure is essential in terms of risk management in the workplace. Furthermore, although there are a lot of reports on acute effect of arsine inhalation, its chronic effect remains to be elucidated.

In this study, it was indicated that arsenic adducts on globin generated by arsine inhalation in blood plasma can be a candidate biomarker of arsine poisoning in conjunction with hemoglobinuria. Furthermore, the possibility that chronic arsine inhalation may affect brain function was also indicated.

研究分野：衛生学

キーワード：アルシン バイオマーカー 脳機能

1. 研究開始当初の背景

アルシン (AsH_3) は無色の気体であり、毒性が強いヒ素化合物である。アルシンはそれ自身が半導体製造で使用されるほか、半導体やダイオードの製造に不可欠なガリウムやインジウムなどの希少金属の精製およびリサイクル過程で副産物として発生する。

しかし、アルシンに対する管理濃度は設定されておらず、作業場におけるアルシン濃度の測定なども義務付けられていないため、作業環境管理が必ずしも十分であるかは評価できない部分も多い。今まで大きな労働災害はなかったが、2008年12月、ガリウムヒ素からガリウムを精製する冶金工場において、アルシンの曝露による重篤な急性中毒事例が発生し、改めてアルシン曝露の危険性が認識された。

我が国ではガリウムおよびインジウムのリサイクルを推進しており、今後曝露機会の増加とそれに伴う中毒の発生が危惧されることから、アルシンの影響を評価する必要性が高まっている。作業現場における管理が適切であれば急性中毒は予防が可能であるものの、作業の種類によっては曝露を絶つことが難しい場合もあり、慢性中毒についても考慮する必要がある。急性中毒については中毒濃度、溶血やそれに伴うヘモグロビン尿・腎不全、神経系への影響など数多く報告されているが、慢性影響についての報告は少なく、今後の影響評価が不可欠である。

2. 研究の目的

アルシン慢性曝露によるメカニズムも含めた脳機能への影響を明らかにし、産業現場でのリスク管理に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 曝露マーカーの探索

市販の血液を用いてアルシンの曝露実験を実施し、得られたサンプルを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(MALDI-TOF-MS)、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)および液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を利用した分析により、曝露の指標となるマーカー候補を探索した。

また、マーカー候補となった物質について、アルシンを曝露したマウスの血清と非曝露マウスの血清を用いて、同様の分析により *in vivo* の検体でもマーカー候補が検出可能かを確認した。

(2) メカニズムも含めた脳機能への影響評価

厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書の通り、亜ヒ酸($As(OH)_3$)を水

素化ホウ素ナトリウム($NaBH_4$)で還元することで発生させたアルシンをマウスに曝露した。曝露濃度は0.96 mg/Lとし、1回の実験あたりの曝露時間は4時間とした。3ヶ月間の実験期間のうち、毎週月曜日に曝露実験を実施し同じ週の金曜日に行動的試験(Y字迷路試験)を実施することにより、脳機能を評価した。

曝露マウスの脳における遺伝子発現パターンを非曝露マウスと比較することで、曝露による遺伝子発現の変化を検討し、発現の変化を利用して影響を受ける範囲の評価を試みた。

さらに、アルシンを吸入曝露したマウスと三酸化二ヒ素(As_2O_3)を経口曝露したマウスとの比較を行い、アルシン曝露による影響がアルシンそのものによるのか代謝物によるのかを検討した。

4. 研究成果

(1) 曝露マーカーの探索

ヘモグロビン付加体について

in vitro でアルシンを曝露した血液について、MALDI-TOF-MSで解析したところ、質量電荷比(m/z)15,000 および 15,700 近辺に曝露サンプル特異的なピークが認められた。

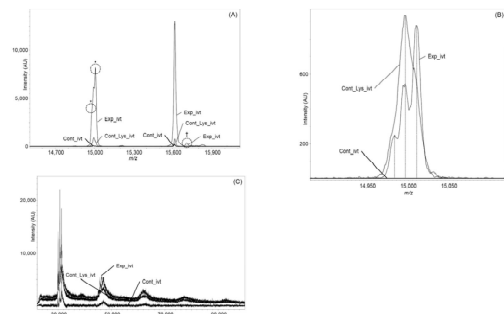


Fig. 1. Three *in vitro* samples (Cont_ivt, Cont_Lys_ivt and Exp_ivt) were analyzed by MALDI-TOF-MS. (A) Peaks at m/z 15,000 and 15,700. The * and † symbols show the specific peaks for Exp_ivt at m/z 15,000 and 15,700 respectively. (B) The magnified peaks of Cont_ivt, Cont_Lys_ivt and Exp_ivt at m/z 15,000 obtained by another experiment in which Exp_ivt was irradiated with much less laser than Cont_ivt and Cont_Lys_ivt in order to additionally examine the peak of Exp_ivt. (C) The peaks at m/z over 20,000.

他の化学物質における知見から、当該ピークはヒ素がヘモグロビン中のグロビンに結合した付加体であることが推測されたため、ヘモグロビンに対する抗体を用いて免疫沈降反応を実施し、3つの分画(上清、ビーズ、溶出液)中のヒ素濃度をICP-MSで定量したところ、溶出液分画におけるヒ素濃度は曝露検体で最も高かった。アルシンを曝露したマウスの血清および非曝露マウスの血清を用いた同様の実験においても、溶出液分画のヒ素濃度は曝露マウスの方が高かった。

これらのことから、アルシン曝露によりヒ素がグロビンに結合し、付加体を形成することが *in vitro* およ

び *in vivo* の両方で強く示唆された。ヒ素と血液を混合させた場合およびヒ素をマウスに経口投与する場合、当該付加体は形成されないことが先行研究により報告されていることから、この付加体は気体のヒ素であるアルシン曝露によってのみ形成されると推測され、曝露を反映するマーカーとなりうることが示唆された。

本研究はアルシン曝露によって付加体が形成されることを報告した初めての研究であるが、メカニズム研究および動物実験のみの結果であり、実際の曝露作業において付加体が形成されているかを今後検討していく必要がある。また、本研究では曝露マーカー候補を定性的に探索しているため、付加体が曝露の程度(曝露濃度、総ヒ素摂取量等)をどの程度反映しているかについても、定量下限と併せて今後検討すべき課題である。

網羅的解析によるマーカー探索について

アルシン吸入曝露マウス(Inh)、三酸化二ヒ素経口曝露マウス(Ora)および非曝露マウス(Con)の血清を用いて代謝物の網羅的な解析を実施したところ、Con に比べて Inh で有意に変動していた物質は 84 種類あり、そのうちデータベース検索で化合物名の候補が得られたものは 37 種類であった。これに対し、Con に比べて Ora で有意に変動していた物質は 82 種類あり、そのうちデータベース検索で化合物名の候補が得られたものは 33 種類であった。しかし、それぞれの比較で得られた 84 物質と 82 物質のうち、共通するものは 1 物質のみであった。

これらのことから、三酸化二ヒ素曝露には反応せず、アルシン曝露にのみ反応する 37 物質はマーカー候補となることが強く示唆された。

しかし、これらの物質の生理学的機能に関する先行研究は極めて少なく、マーカーとしての意義等については研究期間内に明らかにすることはできなかった。また、37 物質にヒ素化合物は含まれていなかったことから、これらは曝露マーカーではなく影響マーカーである可能性が高く、今後は影響マーカーとしての有用性について検討していく必要があると考えられる。

Y 字迷路試験は自発行動量と空間作業記憶を評価することが可能な試験とされているが、本研究では脳機能の評価の手法として Y 字迷路試験を実施することとした。

何も処置をしていない群(Control 群)、アルシンを吸入曝露した群(Inhalation 群)および三酸化二ヒ素を投与した群(Oral 群)の継時的な行動試験の結果を比較したところ、各群ごとに異なる傾向が見られた。

Control 群においては自発行動量が実験期間中を通して変化が認められなかったのに対し、Inhalation 群および Oral 群では時間の経過とともに自発行動量が低下していた。また、空間作業記憶については、Control 群においては変化が認められなかったのに対し、Inhalation 群では上昇傾向が、Oral 群では低下傾向が認められた。

三酸化二ヒ素の曝露による脳機能の低下は先行研究により示唆されていたことから、Inhalation 群および Oral 群における自発行動量の低下と Oral 群における空間作業記憶の低下傾向は予想していたが、Inhalation 群における空間作業記憶の上昇傾向は当初の予想に反した結果となった。

本研究のリミテーションとして、研究代表者の異動に伴う諸要因により、研究期間内では 1 種類の濃度でしか実験を実施できていない点が挙げられる。今後は実験に使用するマウスを増やし、さらに種々の曝露濃度においても同様の現象が観察されるのかを確認したい。これらの制限はあるものの、本研究によりアルシン曝露は脳機能に影響を与える可能性が示唆された。また、アルシンも三酸化二ヒ素も摂取後のヒ素を含む代謝物の構成割合は同様であるが、Oral 群と Inhalation 群では空間作業記憶に関する傾向が異なることから、脳機能への影響はヒ素を含む代謝物によるものではないことも示唆された。

また、分子生物学的な手法を用いて曝露により発現が変化する遺伝子の同定を試みた。その結果、いくつかの候補遺伝子が得られたものの、先行研究等これまでの知見からは、遺伝子発現の変化と脳機能の変化に関連性を見出すことはできなかった。本研究で利用した手法は安価ではあるものの、感度は DNA マイクロアレイや次世代シーケンズに劣ることから、今後はこれらのような新しい手法を用いて検討を進めたい。一般的には前頭皮質、頭頂皮質、大脳基底核等が空間作業記憶に関連すると考えられていることから、今後は脳全体ではなく部位を局限して遺伝子発現を検討していくことにより、さらに特異的な遺伝子

(2) メカニズムも含めた脳機能への影響評価

の候補を得られる可能性がある。

(3) 終わりに

現在、日本産業衛生学会によってアルシンの許容濃度が勧告されているが、管理濃度が設定されていないため作業環境測定が行われていない職場も少なくないことが想定される。

血尿や貧血を自覚症状として受診し、急性中毒が明らかになる場合が多いようであるが、脳機能の変化に関する自覚症状は乏しい場合も多いことから、潜在的な中毒患者を看過している可能性が否定できない。

本研究における曝露濃度は許容濃度(0.01 ppm)や最大許容濃度(0.1 ppm)よりも明らかに高濃度であるが、今後の検討により少なくとも空間作業記憶に関する無毒性量(NOAEL)を明らかにすることで、許容濃度の改定、管理濃度の設定等にあたって利用可能な結果を報告し、最終的に産業現場におけるリスク管理に役立てたいと考える。

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1件)

Yamauchi T, Yamano Y, Yamanaka K, Hata A, Nakadate T, Kuroda Y, Endo Y, Endo G. Possible production of arsenic hemoglobin adducts via exposure to arsine. *Journal of Occupational Health*. 査読有. Vol.57. No.2. 2015. 161-168.
DOI: 10.1539/joh.14-0148-OA

〔学会発表〕(計6件)

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, 中館俊夫. メタボローム解析を用いたアルシン曝露マーカーの探索. 第88回日本産業衛生学会. 2015年5月15日. 大阪府.

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. メタボローム解析を用いたアルシン曝露のバイオマーカーの探索. 第20回ヒ素シンポジウム. 2014年12月6日. 千葉県.

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, 中館俊夫. アルシン曝露によるヘモグロビン付加体生成. 第42回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2014年10月25日. 長野県.

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. 2014年5月

23日. 岡山県.

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 - 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. 2013年11月16日. 福岡.

Takenori Yamauchi, Yuko Yamano, Kenzo Yamanaka, Akihisa Hata, Yoshiki Kuroda, Yoko Endo, Ginji Endo. 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". 2013年8月22日. Bazel (Switzerland).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 武紀(YAMAUCHI, Takenori)
昭和大学・医学部・衛生学公衆衛生学講座・
衛生学部門・助教

研究者番号: 40576287

(2) 研究分担者
なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

山野 優子(YAMANO, Yuko)

昭和大学・医学部・衛生学公衆衛生学講座・

衛生学部門・准教授