

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659332

研究課題名（和文） ヒ素の高次脳神経機能に及ぼす影響に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic study on the effects of arsenic on higher brain functions.

研究代表者

高宮 考悟 (TAKAMIYA KOGO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40283767

研究成果の概要（和文）：ヒ素の人体に対する毒性は、急性毒性と慢性毒性が知られている。現在南アジアの多くの国々で地下からの飲料水にヒ素が混入しており、それを摂取した住民の健康被害が深刻である。このような慢性的にヒ素を摂取することによる慢性毒性としては、皮膚病変がよく知られているが、本研究においてヒ素慢性中毒における神経機能への影響を、主たる中枢神経系における神経伝達物質受容体であるグルタミン酸受容体に注目し、その影響を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： It is known that the arsenic toxicities consist of acute and chronic effects. Recently the chronic arsenic exposure causes critical health problem for people who drink ground water containing arsenic in many countries of South Asia. One of well-known chronic toxicities of arsenic is a skin lesion. In this study, we try to elucidate the chronic toxicity of arsenic against neuronal functions, focusing on glutamate receptors, major neurotransmitter receptors in central nervous system.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：挑戦的萌芽研究

科研費の分科・細目：衛生学・環境中毒

キーワード：ヒ素、高次脳機能、シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

ヒマラヤ山系を源とする水脈に環境基準を大きく越えるヒ素が混入しており、それらが河川や地下水にも多量に存在することは、よく知られている。さらにそれらを飲料水としている南アジアの国々であるインド、ネパール、バングラディッシュなどでは、深刻な環境問題となっている。しかも飲料水中のヒ素

の混入は、その他、台湾、モンゴル、中国などでも見られ、わが日本や米国などの先進国でも報告されている。現在潜在的な患者も含め、ヒ素中毒者は世界で8000万人以上といわれ、今後世界最大規模での中毒問題となる可能性が大いに予想される。

これまでも急性ヒ素中毒としては、森永ヒ

素ミルク中毒事件や和歌山毒物カレー事件などで多数の死者をだしている。また、慢性ヒ素を摂取することにより発生する中毒症状としては、ボーエン病として知られる特有の色素沈着を伴う皮膚病変と、末梢神経障害、発ガンが知られている。他に症状として、上記以外にも中枢神経に対する影響も、報告されている (Rodriguez, V.M., et al. (2003) Toxicol. Lett. 145, 1-18; Luo, J. H., Z. Q. et al. (2009) Toxicol Lett 184, 121-5.)。本宮崎県では、高千穂の土呂久鉦山において慢性ヒ素中毒として初めて公害病に認定され、現在でも本学によって調査が継続されている。上記の南アジアの国々では貧困のため上水道が発達しておらず、ため池の水など細菌が繁殖し飲料水として不適切な水を使用している地域が多数存在する。そこで、簡易の井戸を掘ることにより、安定して清潔な飲料水を入手することが広く普及した。ODA などを中心として日本を含む先進国は、これら貧困地域の衛生的な飲料水確保のため膨大な数の井戸の作成事業に大々的に参画した。ところが、これらくみ上げた井戸水には、多量のヒ素が混入していることが明らかとなり現在深刻な問題となっている。特に即効的な解決法もなく、多くの住民達は今もなおヒ素の多量に混入した飲料水を毎日飲んでおり、慢性ヒ素中毒の場合、摂取したヒ素が長年体内に蓄積し発症するため、将来深刻な問題となることが懸念される。

2. 研究の目的

これまでヒ素の脳への影響は、明らかな中毒症状としてさほど注目されていなかった。ヒ素がBBBを通過し脳内へ到達し、また臨床上慢性ヒ素中毒者が脳神経症状をきたすことが知られている。したがって、飲料水として毎日摂取し長年経過した後にはさまざまな脳神経症状を呈

してくる可能性は十分予想されるため、このような研究を早期に開始することは、将来的に大きな意義があると考えられる。

特に、多くの食料を輸入に頼る本国の場合、近隣の中国などにおけるヒ素汚染により、汚染された農作物が日本へ持ち込まれる可能性も高く、現実に中国におけるヒ素による水質汚染も現在問題化している。したがって本研究は、今後中毒が拡大すると考えられる南アジアの国々のみでなく我が国を含む他の多くの国々や地域に有用な情報をもたらすと考えられる。以上のように本研究は、日本やアジア各地が現在そして近い将来直面するであろう、飲料水のヒ素汚染による中毒をより理解し、現状の悪化した環境から健康被害を防ぐことにより、ともにアジア地域で共生することに大きく寄与すると考えられる。また本研究は、これからの我が国の国際貢献のあり方にも有用な研究と考えられる。

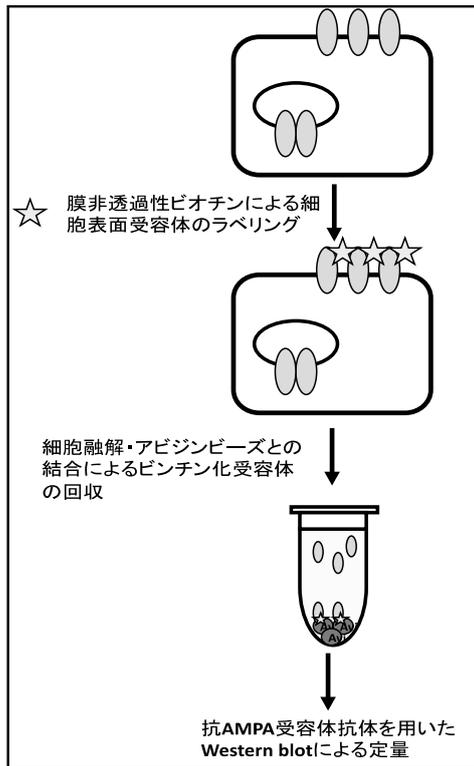
本研究において、ヒ素の神経機能への影響を医学・生物学的観点より検討し、基礎的データを集めることにより、現在注目されていないヒ素の中枢神経機能への影響を明らかにすることを目的とする。

具体的には、ヒ素の神経細胞に及ぼす影響を分子・細胞レベルで観察し、生化学的、電気生理学的な基礎的解析を行う。

3. 研究の方法

無機ヒ素化合物として三酸化二ヒ素 (As_2O_3 , $As[III]$)、ヒ酸 (H_3AsO_4 , $As[V]$)、有機ヒ素化合物としてジメチルアルソン酸 (DMA)、モノメチルアルソン酸 (MAA) の4種類を用いて神経機能への影響をスクリーニングする。方法としては、ラット胎児より神経細胞を培養し、2週間培養を続け成熟させた後、これら4種のヒ素化合物を一定濃度で培養液に添加し、20分後と60分後における細胞表面の

AMPA 型グルタミン酸受容体を定量した。細胞表面の AMPA 受容体を生化学的に定量する方法として、当初スクリーニングの目的で ビオチン化実験を行った (図1)。このシステムでは、各種刺激後に細胞表面にある全タンパク質をビオチンでラベルし、低温にて AMPA 受容体の trafficking を停止した後、細胞を融解し、アビジンカップリングしたビーズで細胞表面に存在するタンパク質のみを回収する。これらのうち、Western blot を



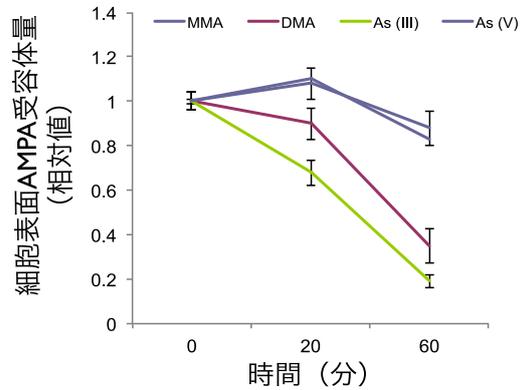
用いて AMPA 受容体の主要なサブユニットである GluA1 サブユニットに対する抗体で検出し、そのシグナル強度を測定する。全 AMPA 受容体 GluA1 サブユニットと細胞表面に発現した GluA1 サブユニットの比を計算することにより、相対的な細胞表面の AMPA 受容体 GluA1 サブユニットの量を比較定量した。さらに培養神経細胞と急性脳スライスを用いた電気生理学的解析を行った。

4. 研究成果

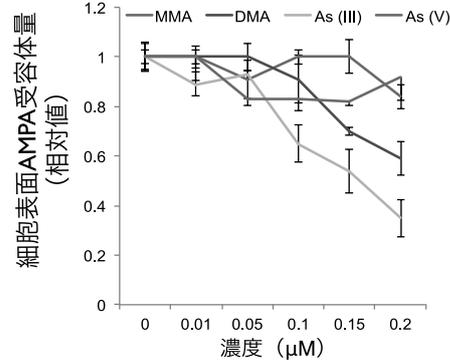
As[III]と DMA の2種類のヒ素が、細胞表面

の AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞内へ取

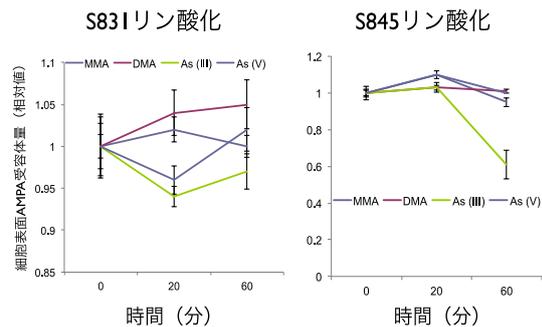
細胞表面AMPA受容体 (mature neuron)



細胞表面AMPA受容体のヒ素濃度依存性 (mature neuron)



GluA1サブユニットのリン酸化に対するヒ素の影響

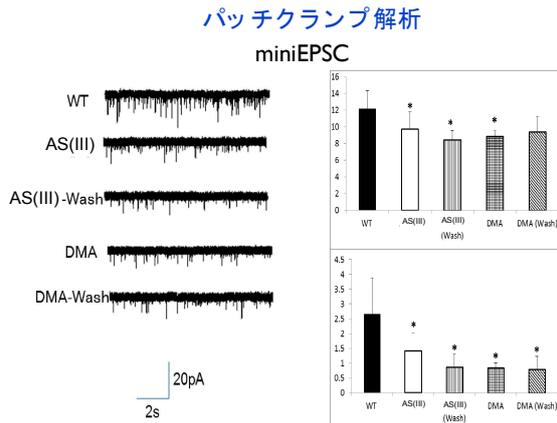


り込ませることが明らかとなった(上図上段)。

さらに、1) この変化が神経細胞の成熟度によって異なる。2) これら変化が加えたヒ素に濃度依存的である (図中断)。3) ヒ素の影響は、一過性でありヒ素の除去により 24

時間以内に回復する。4) ヒ素は、主にシナプスに存在する AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞内へ取り込ませていた。5) ヒ素は、AMPA 型グルタミン酸受容体のリン酸化を介してその細胞内への取り込みに関与している (図下段)。等のことが明らかとなった (北米神経科学会 2012 にて発表、論文準備中)。

さらに培養神経細胞と急性脳スライスを用



いた電気生理学的解析を行ったところ、上図の如く以下のような結果が得られた。① whole cell patch clamp を用いた miniatureEPSC (mEPSC: 微小興奮性シナプス後電流) の測定からヒ素の一部は、上記の結果を反映してシナプス表面の AMPA 型グルタミン酸受容体を減少させる。②すべてのヒ素は、シナプス前部からの神経伝達物質の放出を減少させる。③ 低濃度のヒ素は、シナプスにおける AMPA 型グルタミン酸受容体の活動を低下させるが、高い濃度では、逆に活性化させる。といった知見が得られている。このように、電気生理学的な機能解析によって、これまでのヒ素が AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス局在を制御する (①より) だけでなく、シナプス前部より神経伝達物質の放出の制御にも関与する (②より)、さらに濃度依存的に神経伝達効率への影響が変化す

ることから、中毒の際の病態やヒ素の作用機序解明の糸口となる知見が得られてきた (③より)。

今後、詳細な電気生理学的解析とヒ素の AMPA 型グルタミン酸受容体に対する毒性のメカニズムを生化学的・細胞生物学的に詳細に検討する。さらには、動物の行動解析を行うことにより、これまで注目されてこなかったヒ素の神経毒性を明らかとすることが重要と考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

第18回ヒ素シンポジウム 招待講演

高宮考悟

ヒ素の高次脳神経機能に及ぼす影響に関する基礎的研究

H. Madhyastha (シンポジウム): Arsenic Affects AMPA Receptor Trafficking in Primary Cultured Neurons

北米神経科学界 2012

H. Madhyastha, M. Maruyama, K. Takamiya
Organic and inorganic arsenic impair synaptic potentials: Studies on GluA1 trafficking.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/1physiol/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮 考悟 (TAKAMIYA KOGO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 40283767

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

マドゥエスタ ハリシャクマール

(MADHYASTHA HARISHKUMAR)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00543951

若園 佳彦 (WAKAZONO YOSHIHIKO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90377755