

胎生期における砒素曝露が行動および学習に及ぼす影響

(課題番号 14570295)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金

(基盤(C)(2)) 研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者

(旭川医科大学医学部伊藤俊弘)

はしがき

地下水のヒ素汚染が世界各地に存在し、これらの地域では慢性ヒ素中毒の発生が深刻な問題になっている。ヒ素の慢性中毒に関して胎児～乳児期の供ではヒ素が脳内へ容易に侵入し得ると考えられているにも関わらず、中枢神経系に対する研究はあまり行われおらずにこなかった。そのため幼少期のヒ素曝露と成長過程での脳機能の発達に及ぼす影響との因果関係が明らかでないことから、我々は胎生期以前からのヒ素投与が出生後の中枢神経系に及ぼす影響を検討するために、C57Bl/6 系マウスを用いて飲水を通して3価または5価の無機ヒ素を低濃度(10ppm)または高濃度(100ppm)で曝露し、この条件で2代まで継代飼育を行った。生まれてきた仔(F2)の成長・発達過程における行動発達試験とこれらの成長後におけるオープンフィールドテストおよびT型水迷路試験を行い、中枢神経系の機能に及ぼす影響と脾臓組織中のリンパ球を用いて免疫学的検査を行った。F2 マウスの出生後の行動発達に対して、長期間の無機ヒ素曝露による影響は、3価と5価で異なる結果が認められた。3価では砒素曝露の影響はほとんどみられなく、反対に発達が亢進する項目も見られたが、5価では反対にヒ素曝露により反射の発達や運動機能の遅延を認める結果が得られた。さらに成長後の情動反応についても影響がみられた。このように無機ヒ素曝露による行動影響は3価砒素と5価砒素では明らかに異なる実験結果も認められており、今後はこれらの原因についても解明していくことが重要であると考えられた。

本研究は、平成14年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤(C)(2)(課題番号14570295)の補助によった。

研究組織

研究代表者：伊藤俊弘（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者：吉田貴彦（旭川医科大学医学部教授）

中木良彦（旭川医科大学医学部助手）

佐藤 洋（東北大学大学院医学系研究科教授）

渡辺知保（東京大学大学院医学系研究科助教授）

山内 博（聖マリアンナ医科大学医学部助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	1,700	0	1,700
平成15年度	1,600	0	1,600
総計	3,300	0	3,300

研究発表

口頭発表

伊藤俊弘、渡辺知保、仲井邦彦、山内博、中木良彦、吉田貴彦、佐藤洋
胎児期の無機ヒ素曝露が出生後の行動に及ぼす影響
第73回日本衛生学会 2003年3月

伊藤俊弘、吉田貴彦、中木良彦、仲井邦彦、渡辺知保、山内博、佐藤洋
交配以前からの無機ヒ素曝露が仔の免疫系に及ぼす影響について
第10回日本免疫毒性学会 2003年9月

伊藤俊弘、中木良彦、吉田貴彦、仲井邦彦、渡辺知保、山内博、佐藤洋
胎生期前からの無機ヒ素曝露が仔の発達・行動に及ぼす影響について
第11回ヒ素シンポジウム 2003年10月

伊藤俊弘、中木良彦、仲井邦彦、渡辺知保、山内博、吉田貴彦、佐藤洋
飲水による長期間の無機ヒ素曝露が次世代に及ぼす生体影響について
第74回日本衛生学会 2004年3月

目 的

地下水のヒ素汚染は、アジア諸国や中南米諸国など世界各地に認められており、これらの地域では飲料水として摂取している者に慢性ヒ素中毒の発生が深刻な問題になっている。ヒ素の慢性中毒に関する研究は、皮膚症状や発癌に関するものが圧倒的に多く、中枢神経系に対する影響についてはごく限られている。その理由としては、ヒ素は成人では血液脳関門を通過しないことからヒ素が中枢神経系に対してあまり影響しないと考えられていることによる。一方、胎児期や乳児期の供では胎盤や授乳を介して体内へ侵入したヒ素は、脳血管関門が未熟なためにこれを通過して脳内へ容易に侵入し得ると考えられる。しかしながら、幼少期のヒ素曝露と成長過程での脳機能の発達に及ぼす影響との因果関係は明らかでなく、実験による検討も十分とはいえないことから、我々は胎生期におけるヒ素投与が出生後の中枢神経系に及ぼす影響を検討するために予備的実験を試みた。実験には C57BL6 系妊娠マウスを用い、5価の無機ヒ素溶液 10ppm および 100ppm とこれらのコントロールとして Milli-Q 水を含む飲料水を妊娠 7 日目から出産まで母獣に与え出生した雄性仔の行動発達、生長後のオープンフィールドテストおよび Morris 水迷路試験を行い無機ヒ素曝露の影響を評価した。母獣の5価無機ヒ素の飲水投与における飲水量は、100ppm を投与した群ではコントロールに比べて約 25%の低下が認められたものの、出生仔の出生時体重やその後の体重増加には影響はみられなかった。出生後の行動発達試験において、ヒ素 10ppm を投与した群に断崖落下回避反応およびピボットイングの発達遅延がみられ、感覚－運動協調機能(断崖落下回避反応)および初期の歩行運動の発達(ピボットイング)に影響を及ぼす可能性が示唆された。仔の成長後(8 週齢)においても 100ppm 投与群にオープンフィールドテストの複数の指標に影響が現れた。Morris 水迷路試験では潜時・移動距離・移動速度のいずれも差は認められず、空間

的学習・記憶に関する機能にヒ素曝露の影響は見られなかった。

このように胎生期前におけるヒ素曝露が出生後の仔に対して行動奇形を発症し得ることが示唆されたことから、ヒ素曝露による行動毒性の発現機序の解明が重要な課題であると考えた。特に体内におけるヒ素の代謝過程であるメチル化が毒性発現のプロセスに関与する可能性を示唆する知見が得られていることから、ヒ素のメチル化による影響についても検討を要すべき重要な課題となっている。また、母獣への急性ヒ素曝露による仔の脳へ及ぼす影響については多くの研究が行なわれているが、ヒ素の大量投与による催奇形性の誘導を検討したものや神経伝達系に対する直接的影響をみたものがほとんどであり、ヒトにおける慢性ヒ素中毒を考慮した行動異常の発現に関する影響を検討した研究は極めて少ない。

妊娠中または出生後における高濃度の急性ヒ素曝露により、高頻度に奇形を誘発することや脳神経細胞の微小神経管形成不全、アポトーシスの誘導、酸化ストレスを亢進することなどが報告されている。幼少期のヒ素曝露とその成長後の中枢神経系に及ぼす影響については、我が国の森永ヒ素ミルク中毒事件後に疫学調査が行なわれているものの、ヒ素曝露による量-反応関係が明確でないことや、実験的研究もほとんど行なわれていない。飲水を介して発生する慢性ヒ素中毒に関しては、ヒ素の汚染地域で子供たちのIQ低下を疑う報告もみられ、ヒトにおける低濃度のヒ素曝露が脳の発達に影響を及ぼし得ることが示唆されている。

本研究の目的は、慢性ヒ素中毒の発生が飲料水を介して発生している現状を考慮し、飲水を介した母獣へのヒ素曝露により、仔の成長後に見い出される行動毒性の発現機序を実験的に明らかにすることである。さらにヒ素曝露の量-反応関係について検討を行なうとともに脳組織中におけるヒ素の代謝物との関連性を分析して行動毒性発現への関わりを検討する。本研究の特色は、上記の問題点を踏まえて飲水を介した母獣への長期ヒ素曝露による仔の行動毒性発現の機序を生体内におけるヒ素代謝と

の関連性から明らかにしようとする点にある。これはヒ素中毒発現のメカニズムを解明するための重要な知見となり得るもので、将来の実験研究への展開やヒトでのヒ素に対する感受性の相違やヒ素に対する性差などの問題解決に対しても寄与することが期待される。

材料および方法

実験動物および無機ヒ素投与

実験には C57BL/6 系マウスを用いた。ヒ素投与は、3価および5価の無機ヒ素としてそれぞれ亜ヒ酸ナトリウム(Merck, Germany) およびヒ酸ナトリウム(Sigma, USA)の水溶液による飲料水を用いて行った。ヒ素濃度は、共同研究者の渡辺による検討の結果、母体毒性および胎仔、新生仔に及ぼす毒性が現れる閾値が100ppm付近にあると推定されたことから、10ppmと100ppmの水溶液を実験に使用し、対照群にはイオン交換処理した蒸留水を投与した。第1世代の動物(P)が8週齢の時に動物を3価ヒ素曝露群(As3群)、5価ヒ素曝露群(As5群)およびコントロール群に分け、ヒ素投与群はさらに10ppm投与群と100ppm投与群に分けて投与した。P動物が12週齢の時に交配を行い出生した仔(F1)に対し離乳期までは母乳を介して、離乳期以後はP動物と同様にヒ素水溶液を飲料水として摂取させて飼育した。F1が12週齢に達した時、これらを更に交配させてF2を出産させた。このF2動物を行動解析に用いた。

行動解析

胎生期におけるヒ素曝露は、仔の成長・発達に強く影響を及ぼすと考えられることから、行動発達試験を出生1日目から行い、詳細に観察した。行動発達試験は、水谷の方法(水谷正寛、トキシコロジーフォーラム、6(5): 476-488, 1983)に準じておこなった。すなわち、検査項目には反射の発達試験として、立ち直り試験、断崖落下回避反応(cliff avoidance)、背地走性試験(negative geotaxis)、握り反射、運動機能の発達検査としてピボッティング(pivoting)、歩行運動(walking)およびぶら下がり(握力)試験を採用した。F2による行動発達試験は出生後1日目と、4日目から1日おきに14日目まで観察を行った。

また、As3 群に対してこれらが成獣に達する8週齢には Open field test と T 型水迷路試験による解析を行なった。Open field test は、動物を未知の条件に曝したときの情動反応を観察する方法である。本研究では、一辺が 50cm、高さ 30cm の白色に塗装した正方形の枠内にマウスをおき、2 分間行動観察を行った。行動観察はフィールド上に1000ルクスの照明を当て、その上方約1.2mの位置に CCD カメラを設置して撮影しビデオデッキに映像を取り込んだ。観察項目は、Rearing (起き上がり)、Grooming (毛づくろい)、Preening (洗顔)、Urination (放尿回数)、Feces (脱糞回数)、R-Turn (右ターン)、L-Turn (左ターン)、Cross (敷居をまたいだ回数)、Latency (潜時)、Time (移動時間)、Path (移動距離)、Velocity (移動速度) の 12 項目とした。オープンフィールドによる行動解析は、画像解析装置(ニューロサイエンス、AXIS 60 video-tracking system)を用いて解析を行った(Fig.1)。

T 型水迷路試験は、Fig.2 に示したように水温を20℃に調整した1辺 50cm 高さ 30cm の立方体に T 型の枠が形成されたプールの T の底辺部からマウスを泳がせ T の右辺、または左辺に設置したプラットフォームにたどり着くことを学習させ、スタートからゴールまでの時間を測定してこれらの学習・記憶力を評価した。最初は両翼にプラットフォームを設置し、2回目からは最初に到達した側と反対側にのみプラットフォームを設置した。試行回数は、1日4回、3日間連続して同じプラットフォームの位置で行い、4日目にプラットフォームの位置を入れ替えて4回試行した。

組織学的検査

F2 の出生直後、これらの一部を組織検査用に用いるとともに、行動解析終了後これらの動物を屠殺し、脳、肝臓、腎臓および脾組織を採取した。脾組織は採取後直ちにリンパ球を分離した。リンパ球幼若化試験は、リンパ球に LPS および ConA を加えて48時間培養した後、チミジン(6-3H)を加えて4時間 incubate した試料をガラスろ

紙に取り、シンチレーションカウンターで測定した。フローサイトメーターを用いた表面抗体マーカー (CD4, CD8、CD45 および CD90) の分析、および Jerne plaque assay による抗体産生細胞応答について検討を行なった。また、ヒ素の曝露状況を確認するために脳組織と肝組織の一部を用いてヒ素濃度の測定を行った。ヒ素の測定には原子吸光光度計 (日立 Z-8100) および水素化物発生付属装置 (日立 HFS-3) を使用した。

結果と考察

無機ヒ素曝露の出産へ及ぼす影響

P 動物から二世代に渡り、3 価または 5 価無機ヒ素の曝露を継続させて飼育した結果、F2 動物の出産率は、コントロールが 64.3%であったのに対し、As3 10ppm 群は 88.9%、As3 100ppm 群は 25%であった。これに対して 5 価ヒ素曝露では As5 10ppm 群および As5 100ppm 群の出生率はいずれも 80%であった。また、3 価 100ppm は F1 から出生した F2 のすべてが翌日までに死亡した。これらの結果から 3 価ヒ素 100ppm による飼育はマウスの正常な妊娠・出産には毒性が強すぎることを示されたが、他の群ではマウスの出産には影響は認められず、むしろコントロールよりも高い値が観察された。砒素の形態による毒性の差に関して、Sakurai らは培養細胞を用いて検討した結果、3 価無機砒素の急性毒性は LC_{50} として $5 \mu M$ 、5 価無機砒素はその 100 倍であり、砒素のメチル化に伴い毒性はさらに減弱することを示している。本研究では哺乳動物への慢性曝露であり、これらの値は直接参考にすることはできないが、マウスへの生体負荷量として 3 価無機砒素の 100ppm は、正常な分娩や繁殖を維持できる範囲を超えていたと考えられる。

出生時体重および体重変化

無機ヒ素曝露による出生仔の出生時体重およびその後の体重変化を Fig.3 および Fig.4 に示した。また、生後 1 日目から 14 日目までの体重変化と行動発達試験の各指標に対し繰り返しのある二元配置分散分析を行ないヒ素投与の影響を検討した。As3 10ppm 群のオスは、コントロールとの間に差が認められなかったが、As5 投与群では、8 日目より体重の抑制がみられた。この傾向はメスにも同様に認められた。As5 10ppm 投与群はコントロールに比べて成長が遅れる傾向がみられ実験群間に有意な

差がみられた($p<0.05$)。この原因として、この時期に As5 投与群で F2 の複数の母獣が死亡したことにより仔の栄養状態が一時的に悪化したものと考えられる。このことは、As5 投与群のその後の生長・発達に影響を及ぼす可能性があることから、再検討が必要と考えられた。

行動発達試験

行動発達試験の評価は、各検査項目に基準を設定し、その基準に達成しているときは2点、達していなければ0点、判定が難しい場合は1点として得点した。各群間の比較はこれらの平均点を計算して行った。その結果、オスの As3 10ppm 曝露群において、出生から生後14日までの各行動発達試験の成績はいずれもコントロールと同様以上の成績を示した(Fig. 5)。背地走性($p<0.05$)および握力($p<0.01$)は、As 10ppm 群がコントロール群よりも早く発達することが観察された。この傾向はメスにも認められた(Fig. 6)。メスの As3 10ppm 群はオスと同様に背地走性試験と握力でオスと同様に As 群の成績が良く($p<0.05$)、さらに立ち直り反射も As 10ppm 群のほうがコントロールよりも高い値を示した($p<0.05$)。立直り反射、断崖落下回避、背地走性は、感覚系・運動系が成熟した後に現れ、神経分化の成熟や中枢神経系の機能障害の指標になると考えられている。今回の我々が行った実験結果は、無機砒素の長期曝露によりこれらの機能が亢進する結果がみられたが、これらの機序を説明する中枢神経系の変化については明らかではない。一方、5価ヒ素曝露は、3価の場合とは異なり、オスでは立直り反射($p<0.01$)と背地走性($p<0.05$)、メスではピボッティング($p<0.01$)と握り反射($p<0.05$)の各項目で発達の遅延を認める結果が観察された。無機ヒ素の長期曝露の影響が3価と5価で異なる理由については、体内におけるヒ素代謝を詳細に検討して明らかにする必要があると考えられるが、本研究ではこれらの解析が十分に進んでおらず今後の課題としたい。

オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストの結果を Table 1 に示した。コントロール群と砒素曝露群の間に有意差がみられた項目は、オスメスとも 2 項目ずつであった。オスでは As3 10ppm 群に排尿回数の増加および潜時の有意な延長が観察された ($p < 0.05$)。メスでは左回転数の減少と潜時の延長が観察された ($p < 0.05$)。これらのうち砒素曝露群ではオスメスとも潜時の延長が確認されており、無機砒素曝露が情動に影響を及ぼしていることが示唆された。

T 型水迷路試験

T 型水迷路試験の結果を Fig. 10, 11 に示した。オスでは、1 日目の成績に比べると 2 日目及び 3 日目では成績の向上が認められていた。4 日目は前日までとプラットフォームの位置を入れ替えて試行した結果であるが、成績は 1 日目とほぼ同じ程度まで交代する結果となった。この傾向は As3 10ppm 群およびコントロール群とも同じように認められており、両群間には有意差は認められなかった。メスについてみると、コントロール群は第 1 日目から成績が良く、第 2 日目以降もほぼ同様の水準であったのに対し、As3 10ppm 群は第 1 日目の成績が平均で約 25 秒近くかかっており、第 2 日目以降もコントロールに比べて成績が悪い傾向がみられた。しかし両群間には統計的有意差はみられなかった。

組織中の各指標について

マウス脾組織から分離したリンパ球を用いて行った LPS および ConA 刺激によるリンパ球幼若化試験の結果を Fig. 10 に示した。リンパ球幼若可能において雌雄いずれも砒素曝露による差は認められなかった。CD4, CD8, CD45 および CD90 の各表面抗体の陽性率を Fig. 11 および Fig. 12 に示した。オスでは As3 曝露群の抗体陽性率は、

CD45 および CD90 ではコントロールとの間に差は認められなかったが、CD4 および CD8 はコントロールに比して高値を示した。しかしながら、CD4/CD8 比については有意な変化は見られなかった。メスでは CD4 には変化が見られなかったが As3 曝露群の CD8 と CD90 は抗体陽性率が増加し、CD45 は低下した。また、CD4/CD8 比は有意な低下が認められた。

As5 曝露群の新生仔より摘出した脳組織および肝組織中のヒ素濃度は、ヒ素の妊娠期間中のみ曝露したときとほぼ同じ値が得られた。コントロールでは脳・肝のいずれも 10-15 ng/g 程度で As5 10ppm 曝露群が約 2 倍、As5 100ppm 群が約 20 倍増加していた。(Fig.13)

その他の指標

無機ヒ素曝露の脳組織中へ及ぼす影響を見るために、脳組織中の神経伝達物質や DNA 損傷などについても検討を進めているところであるが今回の報告で結果に加えるには至っていない。これらの結果は、雑誌への掲載や学会等で順次発表していく予定である。

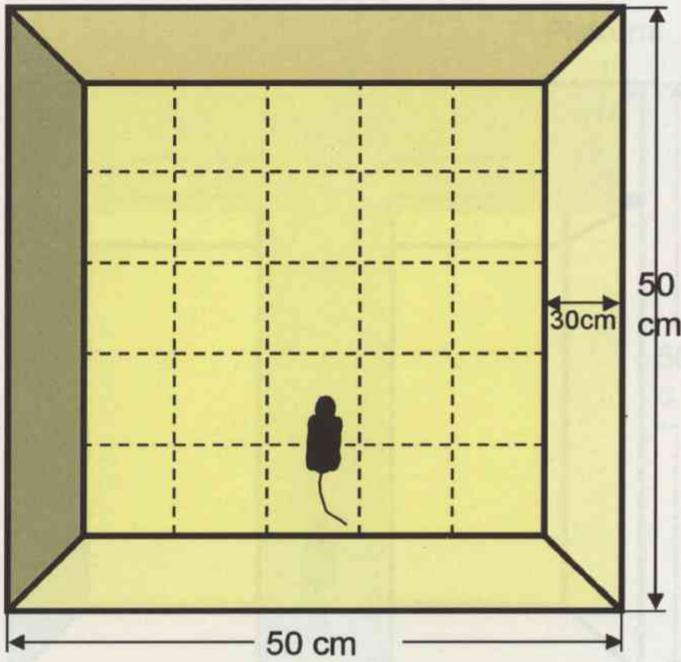
まとめ

C57BL/6J マウスに 3 価または 5 価無機ヒ素の長期飲水投与が次世代の仔 (F2) の行動発達について検討した。その結果、3 価砒素の場合 100ppm の濃度では母体の正常な妊娠、出産に影響を及ぼし得るが、3 価 10ppm の無機ヒ素では成長・発育期におけるマウスの行動特性に強い影響を及ぼし得ることを示す十分なデータは得られなかったが、5 価無機ヒ素曝露動物では反対に成長発育過程における反射や運動機能の発達に遅延を認める結果が得られており、3 価と 5 価の無機ヒ素が生体に及ぼす影響が異なることが示された。また、3 価無機ヒ素投与では背地走性試験および握力などで発達が促進された項目もみられたが、これらの結果については今後別の見地から検討する必要があると考えられた。

オープンフィールドテストでは雌雄ともに潜時の延長が観察された。オープンフィールドテストは主として動物の情動に対する影響を見る指標であり、潜時は情動影響との関わりが深いと考えられる項目である。我々の以前の研究では無機砒素が情動系の発達に影響を及ぼし得ることを示唆する結果が示されたが、学習・記憶に対する指標である T 型水迷路試験ではゴールまでの到達時間にはコントロールとの間に有意差は認められなかった。

3 価ヒ素による長期間曝露の免疫系への影響について、リンパ球幼若化能試験の結果はコントロール群との間に差がみられなかった。フローサイトメトリーによるリンパ球表面抗体マーカー陽性率は、オスとメスとで異なる反応がみられた。表面抗体マーカーは、オスでは CD4、CD8 の陽性率が As 投与群で高かったものの、CD4/CD8 比に有意な変化は観察されなかった。一方、メスは As 投与群の陽性率が CD4、CD90.3 で増加、D45R で低下が認められた。さらに CD4/CD8 比が有意に低下したことから免疫機能の抑制が示唆された。

以上の結果から、無機ヒ素による長期投与は、出生した仔の行動発達に対して、情動面への影響が認められるものの出生後の成長・発達や学習・記憶に対してはほとんど影響が観察されなかった。母獣の妊娠前後におけるヒ素投与の影響について経口投与では仔に及ぼす影響はほとんどみられないことが報告されているが、本研究で行なった長期間の経口投与においても同様の結果が示された。今後は、体内における砒素の存在形態や、生体影響に関連する様々な指標についても解析を進め今回得られた結果との関連性を早急に明らかにする必要がある。



観察項目

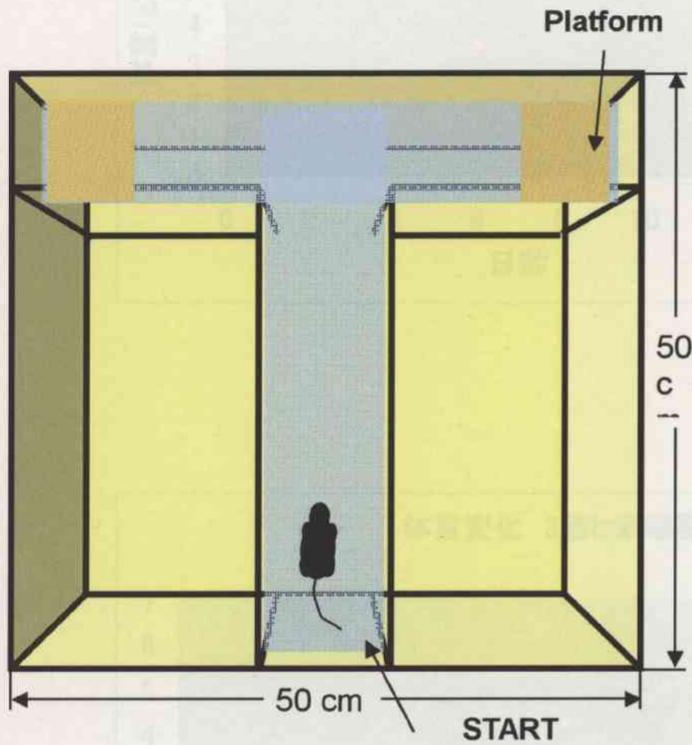
- Rearing: 起き上がり
- Grooming: 毛づくろい
- Preening: 洗顔
- Urination: 放尿回数
- Feces: 脱糞回数
- R-Turn: 右ターン
- L-Turn: 左ターン
- Cross: 敷居をまたいだ回数
- Latency: 潜時
- Time: 時間
- Path: 移動距離
- Velocity: 移動速度

観察時間

120 秒

Fig.1 Open field test の概要

Fig.2 T型水迷路試験



1. 両側の水面下1cmにプラットフォームをセットし、1回泳がせて乗ったほうのプラットフォームを取り除き、4回試行する。
2. 同じ操作1を3日間繰り返す。
3. 4日目にプラットフォームを反対側に置き換えて同じ施行を繰り返す。

測定項目: ゴールまでの到達時間

Fig. 2 T型水迷路試験

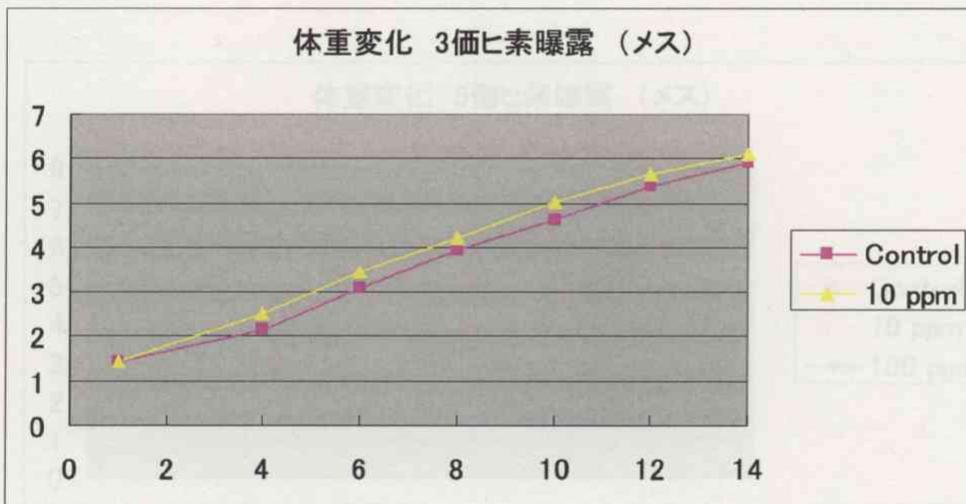
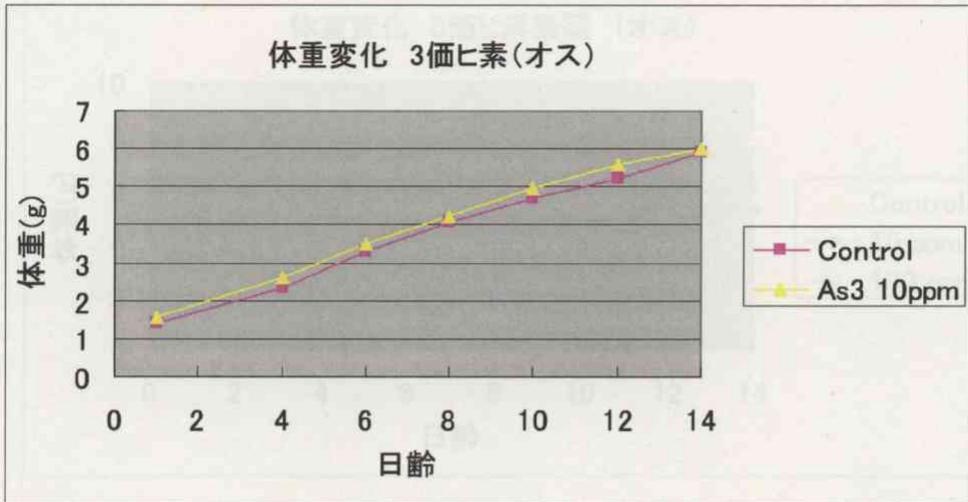


Fig.3 3価無機ヒ素曝露群の体重変化

Fig.4 5価無機ヒ素曝露群の体重変化

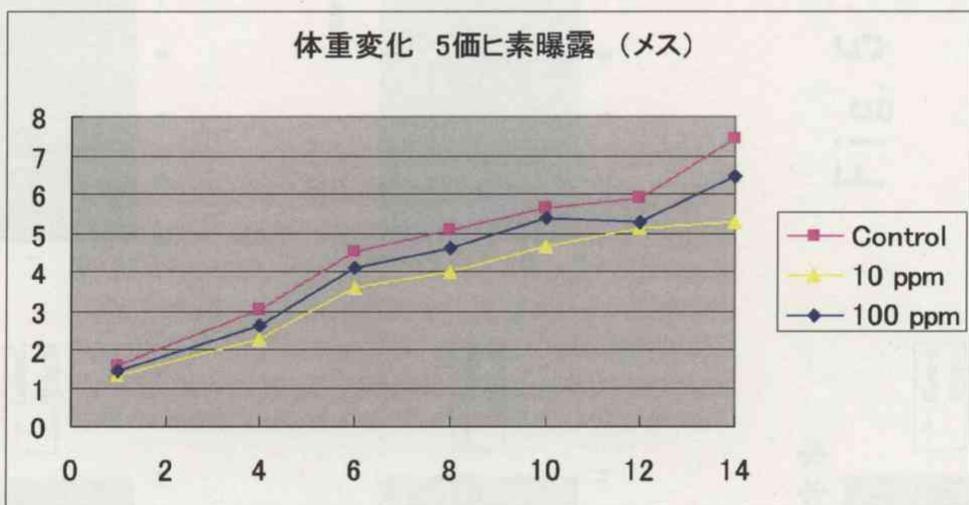
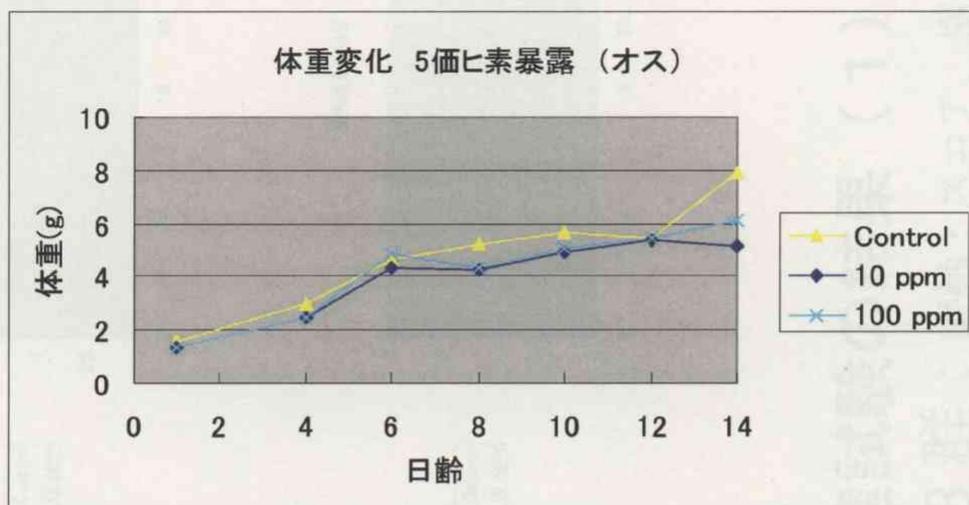


Fig.4 5価無機ヒ素曝露群の体重変化

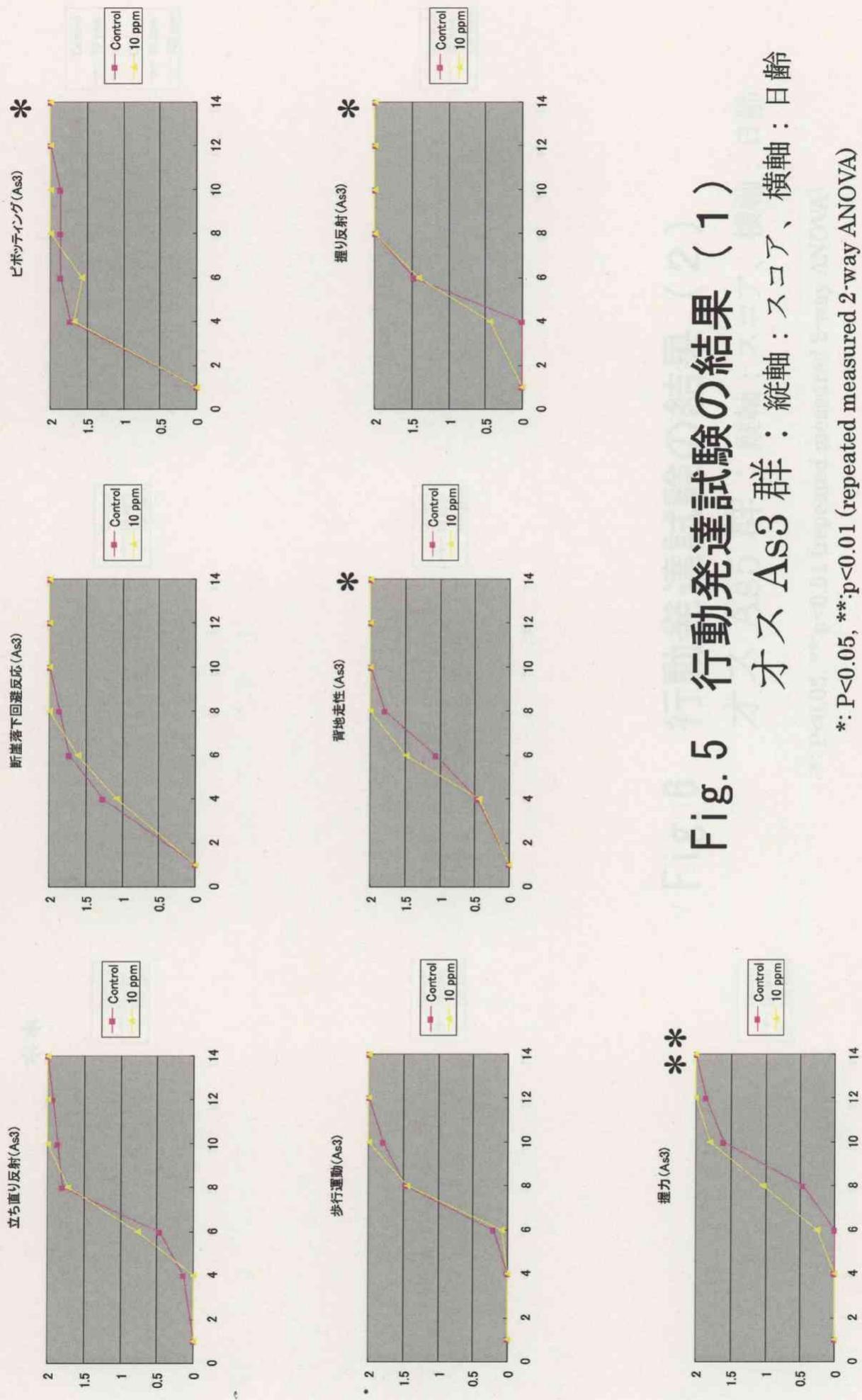


Fig. 5 行動発達試験の結果 (1)

オス As3 群 : 縦軸 : スコア、横軸 : 日齢

*: P<0.05, **:p<0.01 (repeated measured 2-way ANOVA)

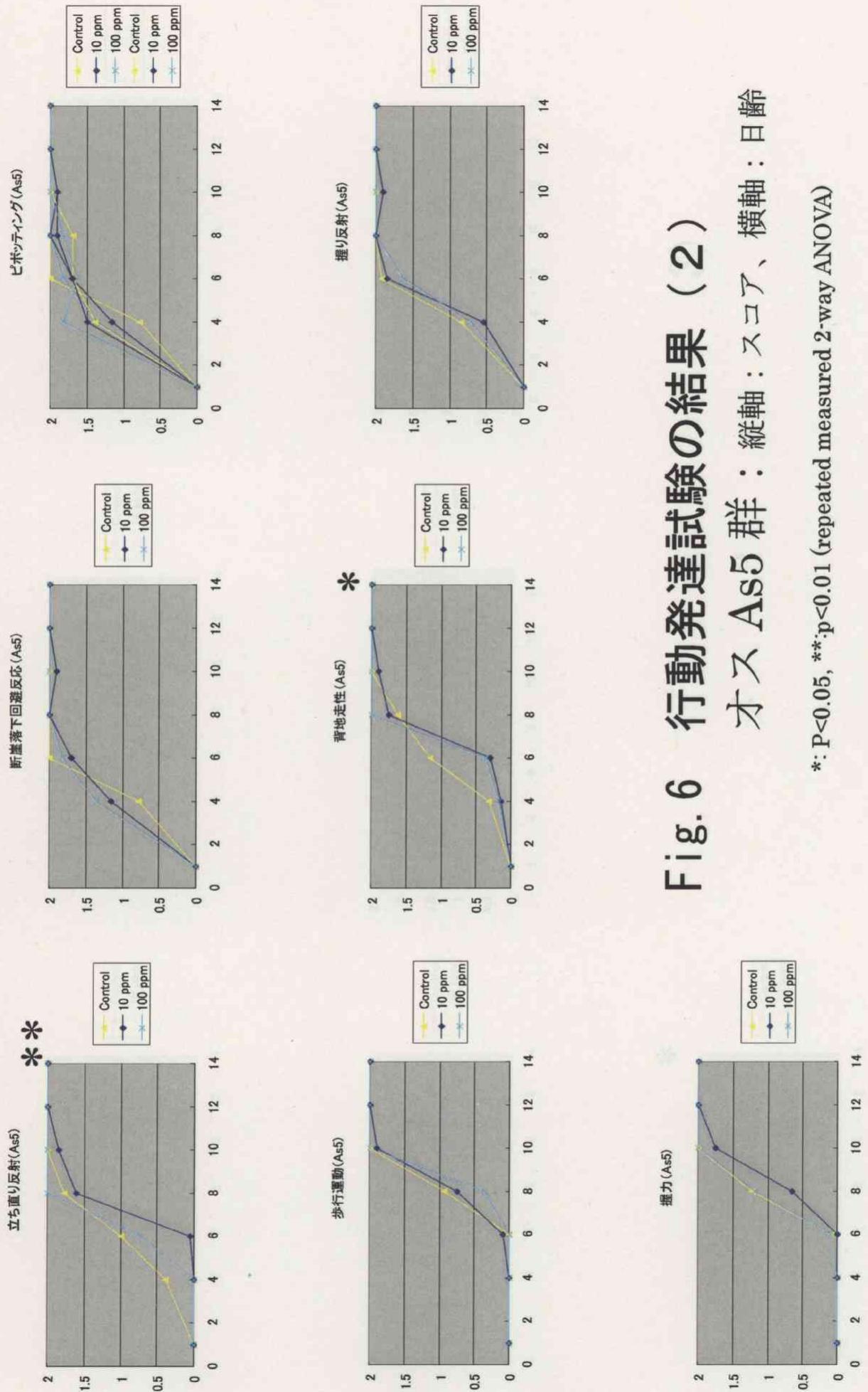


Fig. 6 行動発達試験の結果 (2)

オス As5 群 : 縦軸 : スコア、横軸 : 日齢

*: $P < 0.05$, **: $p < 0.01$ (repeated measured 2-way ANOVA)

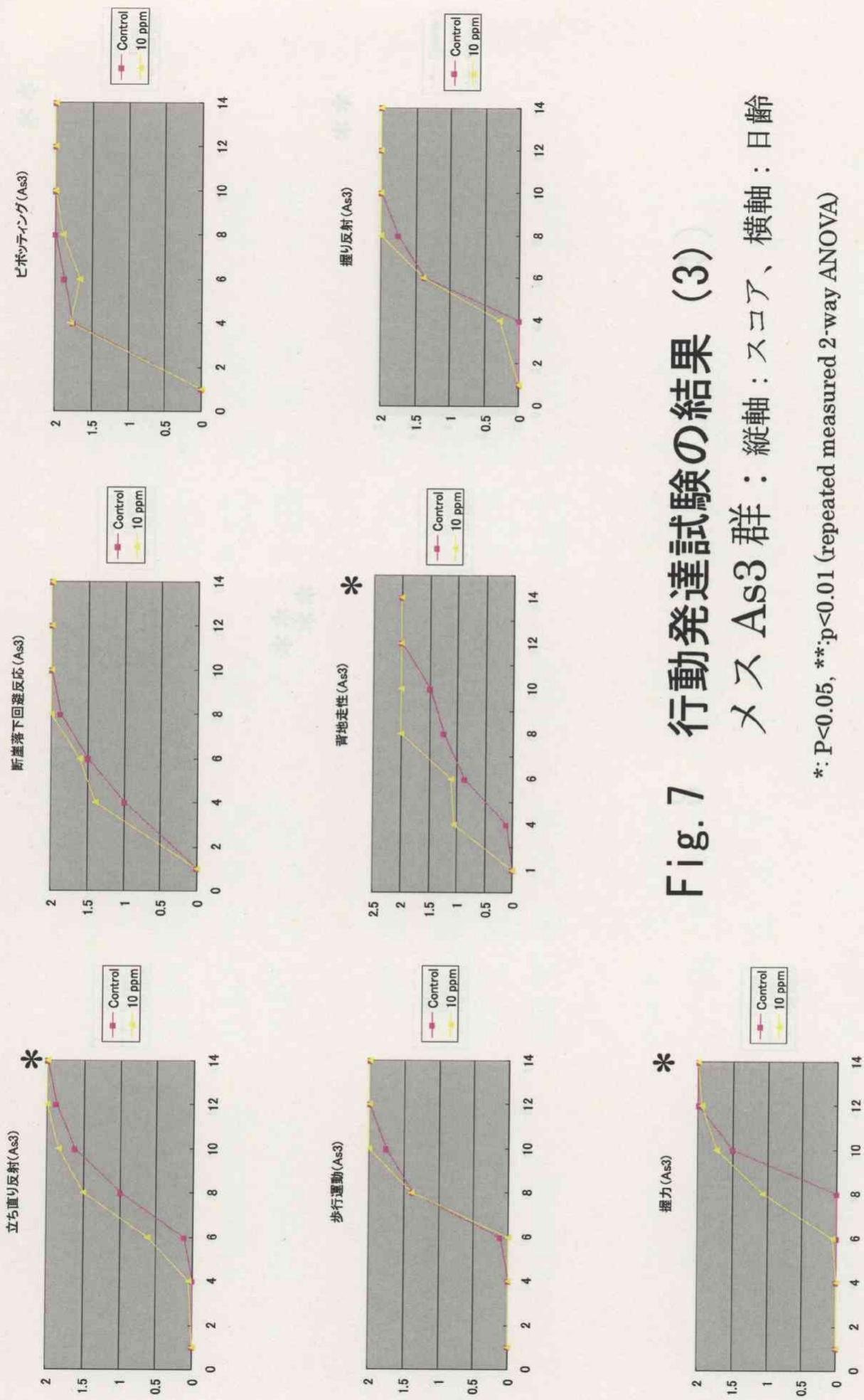


Fig. 7 行動発達試験の結果 (3)

メス As3 群 : 縦軸 : スコア、横軸 : 日齢

*: $P < 0.05$, **: $p < 0.01$ (repeated measured 2-way ANOVA)

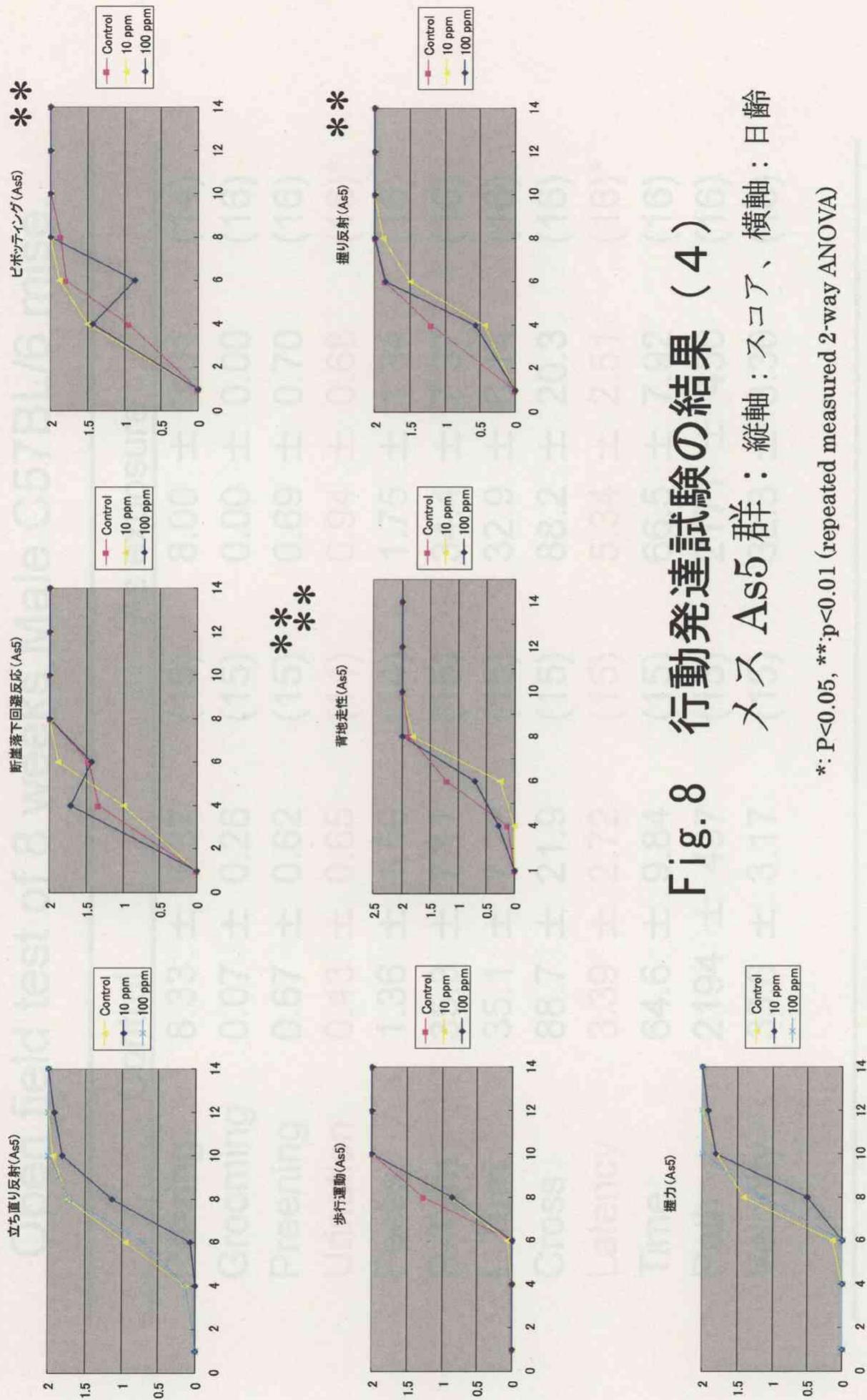


Fig. 8 行動発達試験の結果 (4)

メス As5 群 : 縦軸 : スコア、横軸 : 日齢

*: P<0.05, **: p<0.01 (repeated measured 2-way ANOVA)

Open field test of 8 weeks Male C57BL/6 mice.

	Control	As exposure
Rearing	8.33 ± 5.37 (15)	8.00 ± 3.01 (14)
Grooming	0.07 ± 0.26 (15)	0.00 ± 0.00 (16)
Preening	0.67 ± 0.62 (15)	0.69 ± 0.70 (16)
Urination	0.43 ± 0.65 (14)	0.94 ± 0.68 (16)*
Feces	1.36 ± 1.50 (14)	1.75 ± 1.34 (16)
R-Turn	35.3 ± 7.17 (15)	34.4 ± 7.37 (16)
L-Turn	35.1 ± 7.22 (15)	32.9 ± 6.14 (16)
Cross	88.7 ± 21.9 (15)	88.2 ± 20.3 (16)
Latency	3.39 ± 2.72 (15)	5.34 ± 2.51 (16)*
Time	64.6 ± 9.84 (15)	66.5 ± 7.92 (16)
Path	2194 ± 497 (15)	2171 ± 450 (16)
Velocity	33.6 ± 3.17 (15)	32.3 ± 3.30 (16)

mean ± SD (n), *: p<0.05 by

Open field test of 8 weeks Female C57BL/6 mice.

	Control	As exposure
Rearing	7.23 ± 5.15 (13)	4.40 ± 1.51 (10)
Grooming	0.00 ± 0.00 (13)	0.00 ± 0.00 (10)
Preening	0.69 ± 0.63 (13)	1.30 ± 1.25 (10)
Urination	0.08 ± 0.28 (13)	0.20 ± 0.42 (10)
Feces	0.77 ± 0.93 (13)	1.20 ± 1.40 (10)
R-Turn	34.8 ± 9.40 (13)	29.7 ± 6.34 (10)
L-Turn	33.2 ± 7.36 (13)	27.3 ± 5.70 (10)*
Cross	83.2 ± 27.5 (13)	70.1 ± 13.5 (10)
Latency	2.45 ± 3.38 (13)	6.94 ± 5.36 (10)*
Time	63.6 ± 13.3 (13)	57.9 ± 5.74 (10)
Path	2055 ± 610 (13)	1754 ± 287 (10)
Velocity	31.7 ± 3.53 (13)	30.2 ± 2.89 (10)

mean ± SD (n), *: p<0.05 by

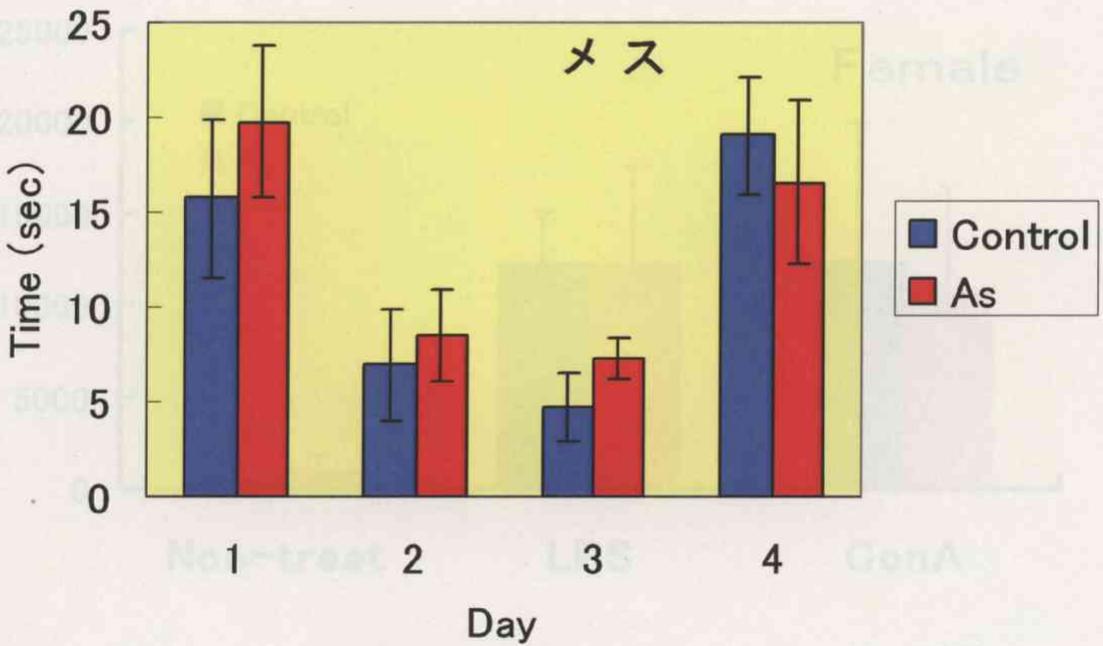
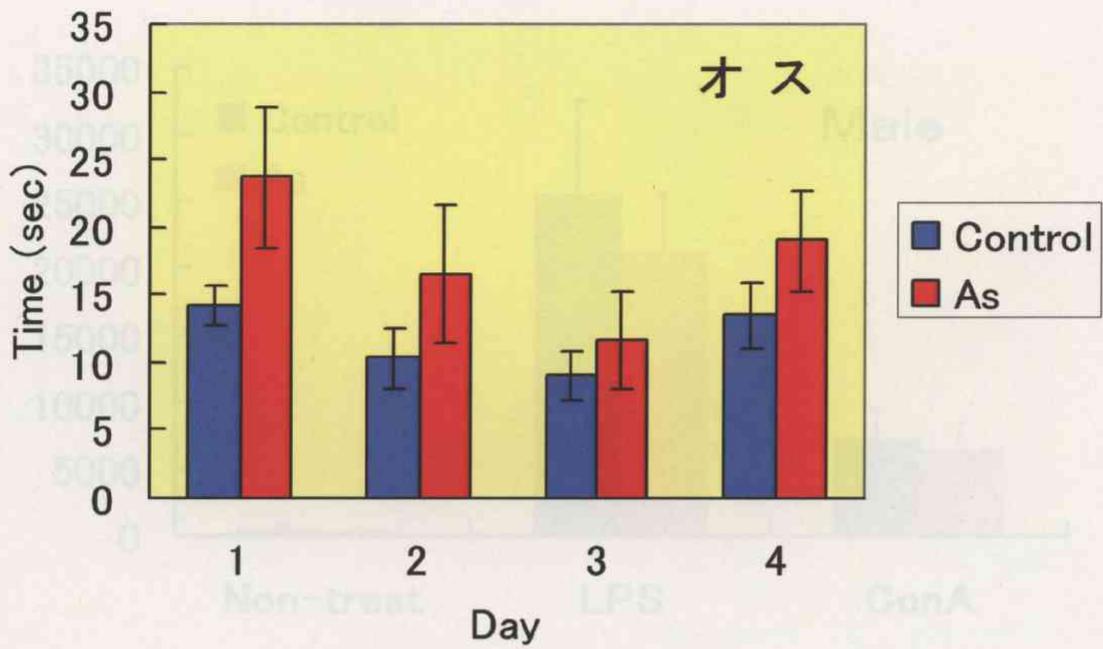


Fig.9 3価AsにおけるT型水迷路の結果

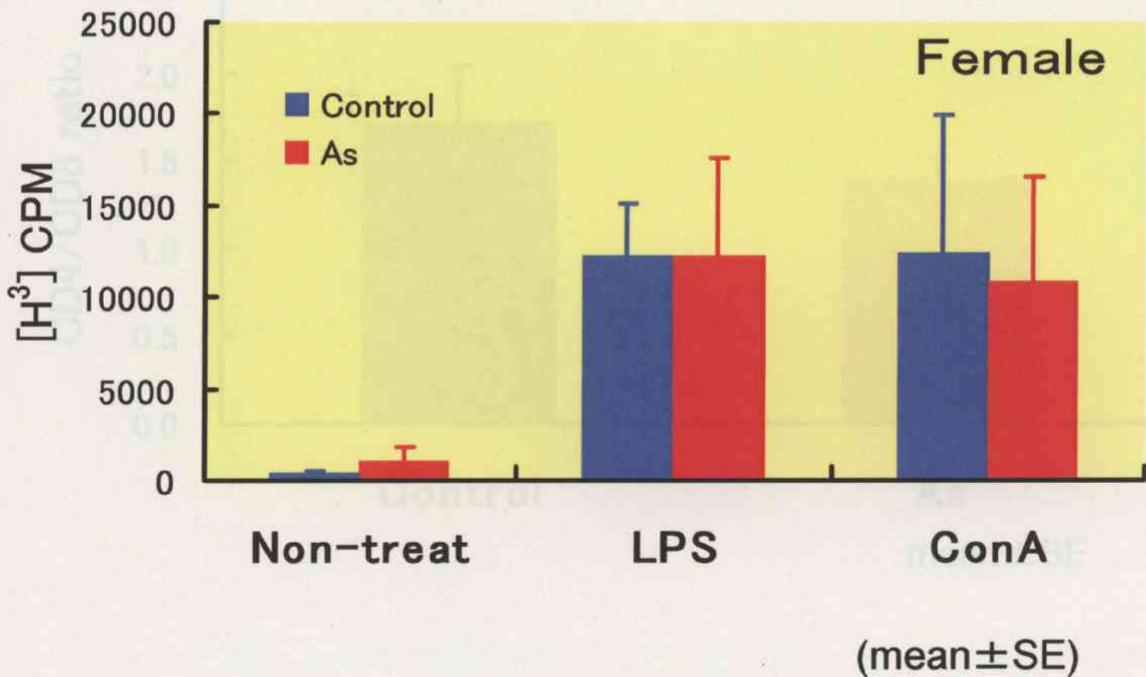
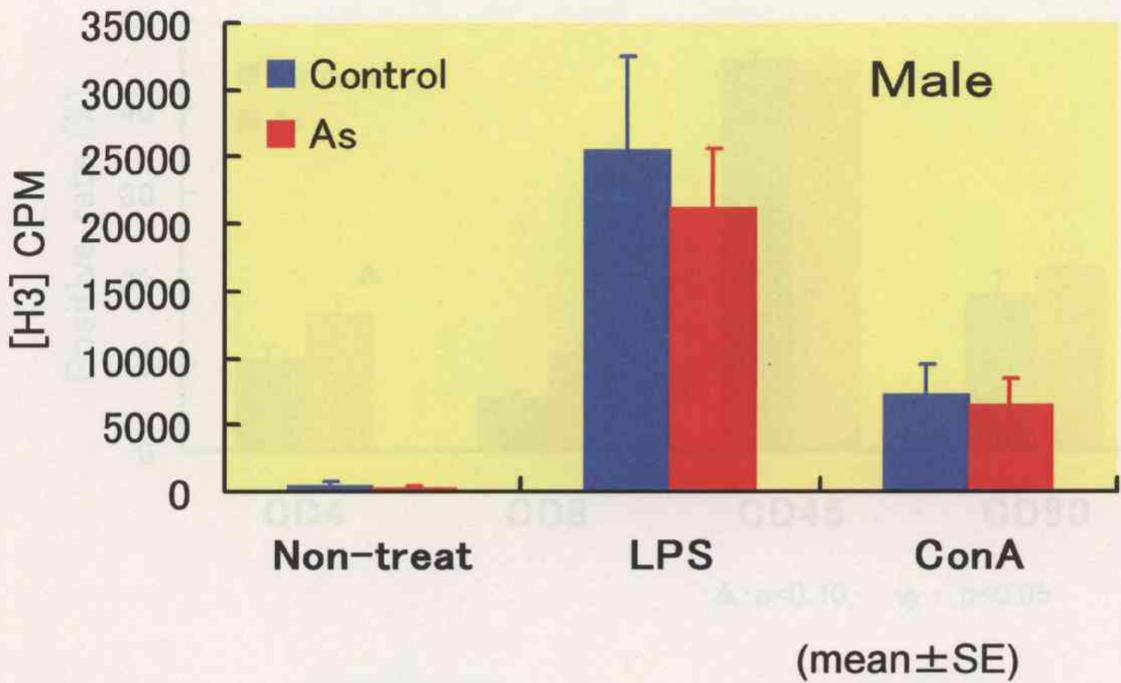


Fig.10 3価Asにおける脾細胞リンパ球幼若化能

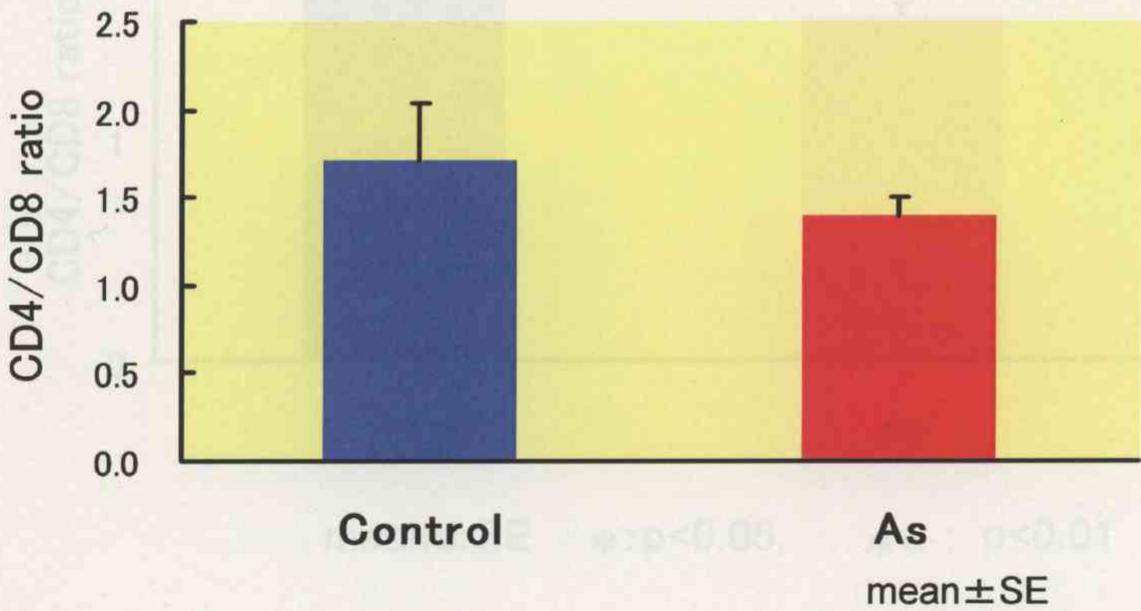
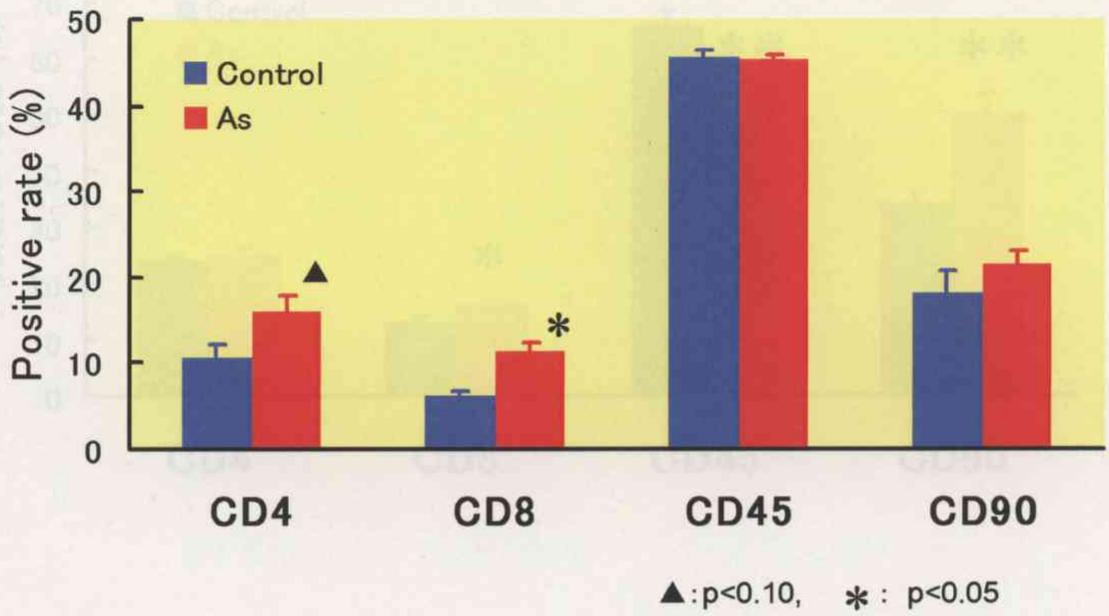
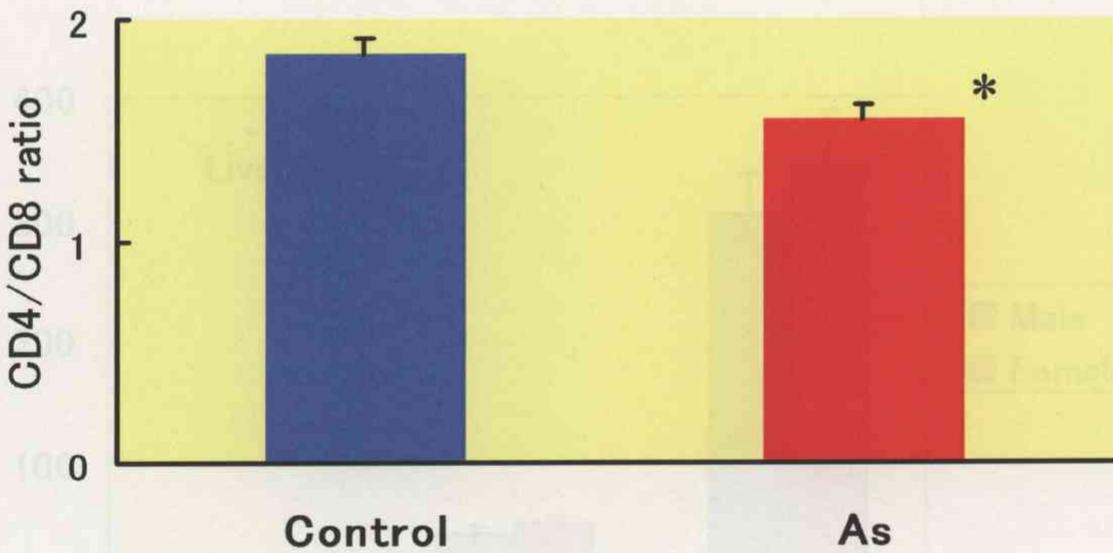
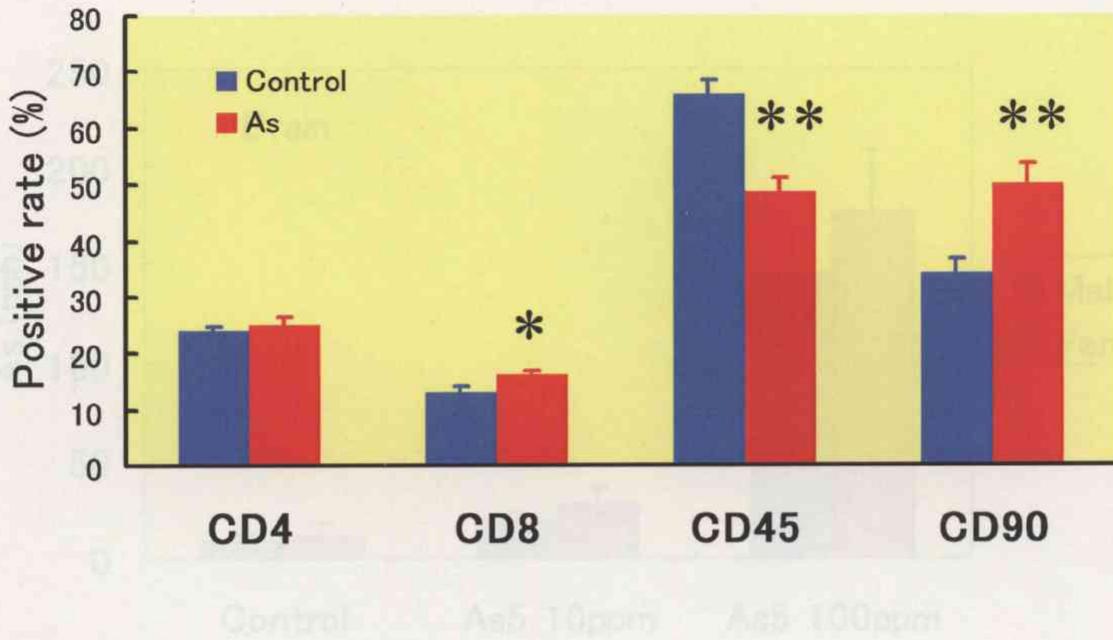


Fig.11 3価Asオスの脾細胞リンパ球における表面抗体陽性率(上)および CD4C/D8 比 (下)



mean ± SE * : p < 0.05, ** : p < 0.01

Fig.12 3価Asメスの脾細胞リンパ球における
表面抗体陽性率(上)および
CD4C/D8比(下)

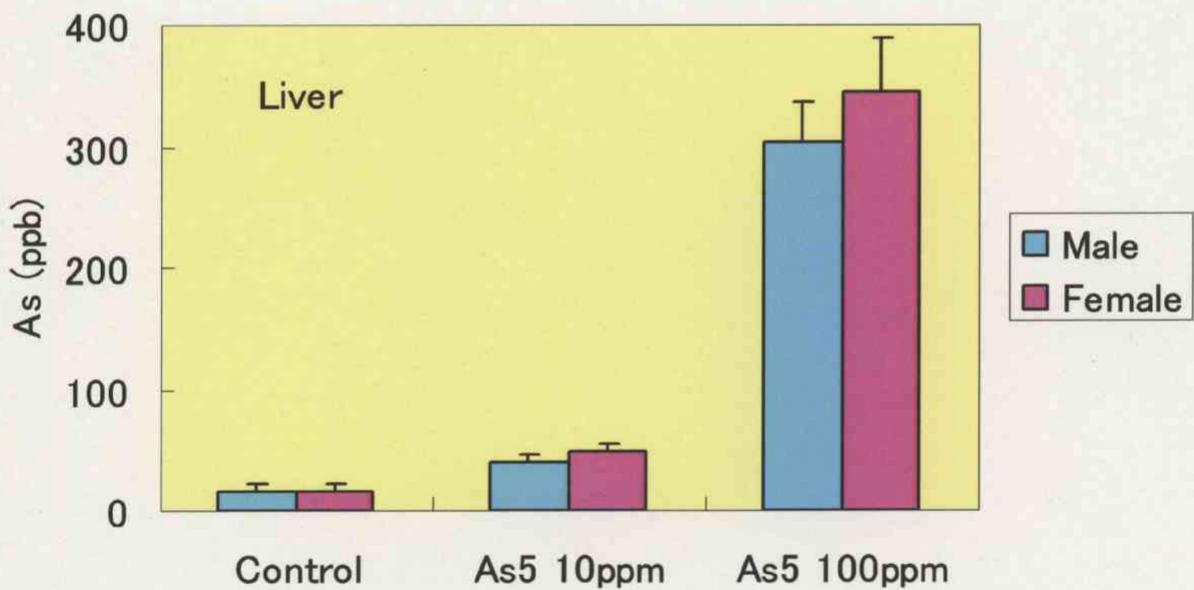
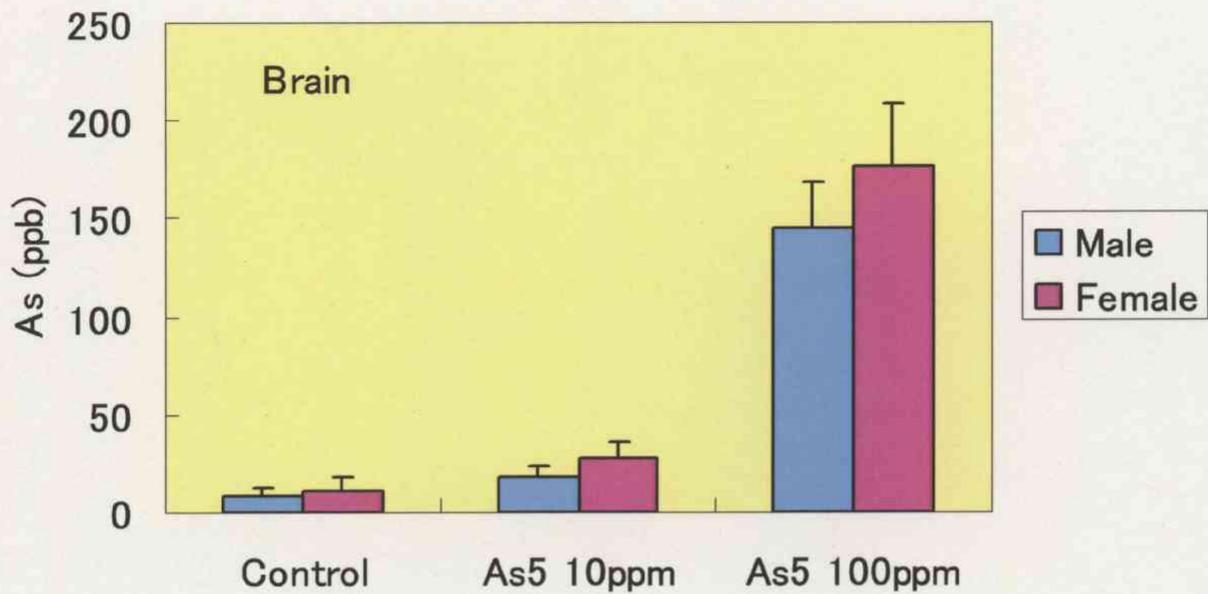


Fig.13 C57 BL/6 系 F2 マウスの脳および肝組織中
砒素濃度