

慢性砒素中毒の症状を規定する因子の解明に関する研究

(課題番号 15406022)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金

(基盤(B)(1))研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者

(旭川医科大学医学部吉田貴彦)

1. 始めに

申請者等は 1996 年より中国における慢性砒素曝露住民のフィールド調査を行い、慢性砒素中毒者の主症状である皮膚症状および末梢循環不全の発現に個体差があり、それに幾つかの因子の関与が示唆されることを見出してきた。

本研究では、申請者等がフィールド調査で慢性砒素曝露者の症状の程度に影響する因子と特定した性別、年齢、砒素代謝活性などについて、*in vivo* 実験動物実験を行い、動物の性差および週齢差ごとの砒素代謝活性などを検討する。さらに正常ヒト皮膚角化細胞およびマウス線維芽細胞において、*in vitro* 実験系において増殖活性などをもとに症状との関連を検討する。

II. 中国の砒素汚染フィールド調査

研究者のグループは 1996 年より、中国において天然に砒素に汚染され

た飲料水を飲用することによって発生する慢性砒素中毒についてフィールド調査を行ってきた。今回の研究は、このうちの 1 地域、内モンゴル自治区の包頭市地域における 1999 年の集積データ、および、同年 8 月末に砒素含有量の少ない飲料水の供給による中毒患者の症状の消長について経過を観察するための調査として 2003 年度および 2004 年度に実施した調査でのデータを総合して行った。

1. フィールド調査地域

中国内モンゴル自治区中西部に位置する包頭市郊外の土黙特佑旗岳房管子村を調査対象地域とした。包頭市に属する 47 村の一つで市の東方で土黙特盆地の西縁に位置する（図 1）。同村は人口 2080 人、480 世帯ほどであり、主たる職業は農業である。この地域では、個人ごとに深井戸の使用開始および利用井戸の変遷を聴取することにより、過去の砒素曝露状況が個人単位で把握できる特

徴がある。すなわち、住民達は過去には6ヶ所の共同井戸（地表下2m程の浅井戸、開口・広口井戸）を利用しており、唯一現存する北大井の濃度砒素濃度は0.00068ppmであり砒素曝露は無視しうるレベルにあった。中国の経済改革の進行にともない、1970年代後半から徐々に個人の住宅の中庭にポンプ井戸（地表下20m程の深井戸、チューブ式井戸）が作られ使用に供され、現在およそ330箇所が使われている。それら深井戸の平均砒素濃度は1999年の我々の調査により0.133ppm（範囲0.0001-1.79ppm）と濃度に大きな分布差がある事が判明したが、井戸の使用開始時点で砒素濃度が測定された事は無かった。当該地域での最初の砒素中毒症例発見は1996年に女性住民が砒素中毒とは別の疾病にて都市部の病院を訪れ、診察した医師によって砒素中毒を疑われたことによる。その後、包頭市、土默特右旗などの地方政府による調査が行われ、井戸水の飲用によって発生した慢性砒素中毒が発生していることが確認された。地方政府衛生部の調査によ

る推定砒素中毒患者率は20%である。曝露歴は長い者でも20年ほどであり、半数以上の者の曝露歴は10年未満であるため、現時点で砒素暴露に起因すると考えられる悪性腫瘍の発生は報告されていない。1999年7月下旬に自覚症状、生活習慣、井戸水の使用状況につき聞き取り調査を行った。同時に皮膚症状を中心とした診察、一般的な身体測定、冷水負荷試験を行い、さらに血液、尿、毛髪を得て生物学的砒素曝露モニタリングを行った。皮膚病変については、躯幹部を中心とした色素沈着と色素脱失、手掌および足底部の角化症について調べた。同時に村内の井戸水について水サンプルを得て砒素濃度を測定した。

2. 調査対象者

a. 対象者の選定

1999年7月の調査に先立って、包頭市衛生局から缶房菅村行政責任者（村長）を介して、各世帯に慢性砒素中毒症の研究調査が包頭市衛生局、

中国医科大学、日本の大学との共同で行われることを周知した。その内容は「世帯内に一人でも慢性中毒と思われる皮膚症状の有る患者が居る家族が受診する事」というものである。しかし、砒素中毒の判断は住民に委ねられるので皮膚症状の無い者が受診する場合も多かった。さらに中国国内および海外からの医療団による無料の健康診断を受診したい住民は多く世帯内に砒素関連の皮膚症状の有る患者が居なく受診対象とならない者の受診も有った。各自の意志に基づいて受付にて、読み聞かせによる説明と同意を得て、インフォームドコンセントの署名をした者を調査研究参加者(年齢幅は3-70歳)として登録した。その結果132名が調査受付をした。

b. 調査内容および診察・診断内容

登録された住民は聞き取りによって、姓名、性別、世帯主名、出生年月日、婚姻状況、職業、家族構成、現住所および前住所、現在までに飲用および調理等に供した井戸と、その使用期間、生活習慣(嗜好品、喫煙、飲酒な

ど)、服用薬剤などの個人情報その他、家族歴、既往歴、現症(特に砒素およびフッ素中毒に関する症状を詳細に)を調査した。引き続き、血圧、冷水浸水試験前後の皮膚温、心電図測定の後、皮膚科的診察および写真撮影を行った。さらに、砒素の生物学的曝露指標測定のため生体試料に供するために血液、尿、頭髪採取を行った。

c. 皮膚科的診断

皮膚症状のうち、角化症および色素異常症について重症度を3段階にわけ、mild case、moderate case、sever caseとした。さらに飲料水を低砒素濃度の水源の井戸水給水へと変えることによる症状の変化を観察するために、皮膚病変につき詳細な症度分類を試み、それぞれの症状度をさらに3段階にわけた。以下にその内容を示す。

1) 手掌角化症

(Palm hyperkeratosis)

手掌角化症の重症度を写真1のごとくに3段階に分けた。微細な小腫瘤性病変ないし中央が嵌凹する小丘疹状角化病変をmild caseとし、把持の

際に外力がかかる部位から始まる孤立性角化病変から手掌全体へと進展する多発性の孤立性角化病変の面積の広がりにより、-/0/+と評価した。複数個の前述角化病変が融合し表面が比較的平滑な角化層の肥厚局面性病変を moderate case とし、前述孤立性角化病変と同様の手掌上の広がり度合いをもって-/0/+と評価した。さらに癒合した角化局面病変が疣贅ないし胼胝状に表面が粗雑な凹凸を示し角化層が著名に重積した様相を呈する病変を sever case とし、その程度および手掌上での広がりをもって-/0/+と評価した。病変の広がりや考慮した細症状度分類の例を sever case を例にとり写真2に示す。

2) 足底角化症

(Sole hyperkeratosis)

足底の角化症にあっても手掌角化症と同様な診断評価基準とした。手掌での物体の把持に相当する皮膚部分は体重の荷重のかかる部位であり、進展例で見られる病変の広がりや土踏まずにあたる非荷重皮膚部位におよぶものである。

3) 皮膚色素異常症

(Skin dyspigmentation)

皮膚色素異常症の重症度を写真3のごとくに3段階に分けた。通常日光に曝されない躯幹部皮膚を中心に散在する色素沈着斑および色素脱失斑の単独あるいは複合した多発を mild case とした。また皮膚色調が暗色となる瀰漫性の色素沈着を moderate case とした。さらに典型的砒素中毒皮膚病変とされる瀰漫性色素沈着病変部位に多発する色素脱失斑が伴うものを sever case とした。これはいわゆる「rain drops on the dirty road」の所見に相当するものである。上記それぞれの病変の初発部位はウエスト周囲の衣服による擦過部位ないし、骨盤骨や仙骨が皮膚の直下であり外部からの圧力を受けやすい部位に始まり、躯幹部全体へ広がり、重症の例では上腕部ないし大腿部皮膚にまで至る。この広がりをもって症度をさらに、-/0/+と分類した。病変の広がりや考慮した細症状度分類の例を sever case を例にとり写真4に示す。

d. 砒素曝露歴および砒素曝露期間の算定

井戸水の試料は井戸毎に特定し、砒素濃度は超低温補足-還元気化-原子吸光光度計にて測定した。さらに聞き取り調査によって各個人ごとの飲水歴について、飲用および調理に使用した井戸とその使用期間を聴取した。既に埋め戻され井戸水の採取不可能な開放井戸（大井）については水脈レベルが地下2-3mであり、ポンプ式井戸の深度（15-20m）と大きく異なることから、現存する北大井の値0.00068ppmを当てはめることとした。大井の井戸水を飲用に供した時期はポンプ式深井戸使用以前であり当時は砒素中毒の発症が無かったことから低濃度であったことは間違いなく、これらによる欠損データの補充について問題ないと思われる。また、ポンプ式の深井戸にあっても破損などにより井戸水採取不可能な場合には、居住地域、症状、生体試料中砒素濃度等からの推測により高濃度あるいは低濃度と容易に推測が可能な場合にはデータの補完を行うこととし、高濃度と推測される場合には現存する深井

戸の砒素濃度の第3四分の一値の0.198ppmを、また低濃度と推測される場合には現存する深井戸の砒素濃度の第4四分の一値の0.013ppmを代入した。推測が困難な場合および飲水期間が不明の例は対象から除いた。開放井戸データの補完は24例、ポンプ式深井戸データの補完は19例で、一部重複例があった。不明のために使用しなかった例は3例であり、その結果、記録用紙が調査終了時に回収された114名中、飲水砒素濃度と期間について解析に値するデータがそろった者は111例であった。

以上のように得られた過去から現在までの井戸使用歴と現時点での井戸水砒素濃度とから対象者の砒素曝露歴を得た。砒素曝露の指標として、年単位（一部、月単位で答えた者は、それを反映）ごとの飲水期間と飲水中砒素濃度から平均化した飲料水中平均砒素濃度を用いた。

e. 生体試料中砒素濃度測定

生体試料は定法に基づいて前処理し、砒素濃度は超低温補足-還元気化-原子吸光光度計にて化学形態別に

測定した。測定した砒素化学形態は無機砒素 (iAs)、モノメチル化砒素 (MMA)、ジメチル化砒素 (DMA)、トリメチル化砒素 (TMA) である。ヒト体内において TMA は合成されないので全て海産物由来である。一方、MMA および DMA はヒト体内で iAs から合成されるため、MMA および DMA の総和を体内合成性メチル化砒素として IMA とした。

飲料水の飲用歴 (砒素曝露) が得られ、皮膚所見の診察・写真撮影がなされ、かつ尿・血液・毛髪等の生体試料が採取され砒素曝露指標の全てのデータが有効であった者は 96 名であった。図 2 に対象者の年齢別分布を示した。

以降の解析には 20 歳未満の未成年は除外することとした。なぜならば未成年者、特に 10 歳未満の小児においては躯幹部の皮膚症状が成人の典型的なものと異なることが多いためである (写真 5)。若年者においてはアトピー様と称される鳥肌の立った様相を呈する所見が躯幹部皮膚にみられる場合が多い。時に瀰漫性の色素沈着を伴うことがあり、その場合には丘状に隆起する鳥肌状皮膚の周囲の色調が薄く、白斑状に見える場合がある。

その結果、解析に供することができた例数は 84 名 (男 41 名、女 43 名) であった。

調査時点から過去 5 年間の調査対象者の飲料水の期間を重み付けした平均砒素濃度の分布を、性別および年代別に図 3 に示した。それらの両カテゴリー別の対象者において曝露平均砒素濃度の分布に著明な差は認められなかった。

f. 砒素メチル化率の算定

飲料水中砒素は全て無機砒素であった。体内において砒素はメチル化が 2 段階にわたって行われる。そこで第 1 段階砒素メチル化能を、MMA/iAs にて算定する。また第 2 段階砒素メチル化能を DMA/MMA にて算定した。さらに第 2 段階メチル化能と第 1 段階メチル化能の比率を、第 2 段階メチル化能 / 第 1 段階メチル化能すなわち DMA/iAs で算定した。砒素メチル化能は、血液検体および尿検体において、それぞれ計算した。

3. 結果および考察

1) 砒素曝露量と皮膚症状重症度との関係

図4に調査時点から過去5年間の井戸飲水中の平均砒素濃度ごとの対象者の皮膚症状の重症度 (moderate と sever を一つのカテゴリーとした) 別の有症率を示した。平均砒素濃度と皮膚症状 (角化症、色素異常症) の重症度との間に高い相関性のあることがわかる。

皮膚症状の有症について、20歳から39歳までと40歳以上の2つのカテゴリーに分けた年齢との関連について、また性別との関連について多重ロジスティック回帰分析を行った。皮膚症状の有無と年齢層の相違との間には有意な相関は無かった。一方、性差には有意な差が認められ、男性において女性よりもオッズ比が高く、症状の発現頻度が高いことがわかった (図5)。調査対象となった夫婦のうち砒素曝露についてのデータがそろったものが23組あった。夫婦は同一の井戸水を飲用しかつ同一の食事

を摂取すると考えられた。そこで3つの皮膚症状毎に対比させた (図6)。夫よりも妻で症状が重かった例数を図中○数字で表したが、手掌角化症で2例、足底角化症で1例、皮膚色素異常症で1例のみであった。全体として3つの症状全てで夫が妻よりも症度が重いことが明らかであり、男性で女性よりも砒素関連皮膚症状が重くなることが確認された。こうした傾向は、皮膚症状のうち特に色素異常症において顕著であった。

多重ロジスティック回帰モデルにおいて、調査時点から過去5年間と、さらにその前の5年間の飲水中平均砒素濃度を5段階 (0-0.005、0.005-0.01、0.01-0.05、0.05-0.3、 $0.3 < (\text{mg/L})$) に分けたうえで皮膚症状発現の有無との相関を分析した。最近の5年間の平均砒素濃度において皮膚症状の発現オッズ比が有意に高いことがわかった (図7)。特にその傾向は角化症において顕著であった。一方、さらに遠い過去の5年ではオッズ比は高くなかった。しかし、過去5年間に高い砒素濃度の飲料水を飲用していた者は先行する過去5

年間にも砒素濃度の高い飲料水を飲用していた例が多いために、過去 5 年とさらに過去 5 年の砒素濃度は互いに相関が高い。また先行する 5 年間に砒素濃度が高い飲料水を飲用した者が症状発現に不安を抱き安全な飲料水を求めて症状の無い者の井戸から飲料水を得ようとするなど最近の 5 年間の飲料水の平均砒素濃度が低くなる例が散見されるものの、逆に最近 5 年間の飲料水中砒素濃度が先行する 5 年間の飲料水砒素濃度を上回る例は少ないために、調査時点での皮膚症状の度合いに対して直近の 5 年間と先行する 5 年間のいずれの飲料水中の砒素濃度がより大きく影響するかの検定は難しい。そのため、先の 5 年間の砒素曝露の症状発現への影響は否定出来ないものの、少なくとも最近 5 年間の砒素曝露の方が皮膚症状発現に大きく関与することは確かであろう。

調査時点から最近の 5 年間の飲料水中砒素濃度と皮膚症状発現の量反応関係について、年齢、性を調整しつつ多重ロジスティック回帰分析にて解析した。図 8 に飲料水中砒素濃

度と皮膚症状の有症率オッズ比を示した。色素異常症の量反応曲線は砒素濃度 0.005mg/L 以下で色素異常症を持つ例が無かったために示すことが出来ない。角化症および角化症または色素異常のどちらかがある場合の双方ともに、飲料水平均砒素濃度と症状発現には明白な相関が見られた。年齢、性を調整したロジスティック回帰モデルにおける量反応関係に関するトレンドテストにおいても、色素異常症、および色素異常症ないし角化症のどちらかがある場合のいずれにも有意性が確認された。現在の WHO や我が国などの主要先進国の飲料水中砒素の基準値である 0.01mg/L を下回る、0.005 から 0.01mg/L の間でも皮膚症状を有するオッズ比が高くなることは注目に値する。

2) 砒素メチル化能と皮膚症状重症度との関係

3 つの化学形態の砒素 iAs、MMA、および DMA ごとの血中砒素濃度を 5 段階に分けて角化症ないし色素異常症のいずれかの皮膚症状発現の関連

について、年齢、性を調整し多重ロジスティック回帰分析を行った(図9)。iAsの血中砒素濃度は、 <0.2 、 $0.2-0.3$ 、 $0.3-0.4$ 、 $0.4-0.5$ 、 $0.5<$ ($\mu\text{g/L}$)、MMAの血中砒素濃度は、 <0.1 、 $0.1-0.4$ 、 $0.4-0.6$ 、 $0.6-1.2$ 、 $1.2<$ ($\mu\text{g/L}$)、DMAの血中砒素濃度は、 <0.1 、 $0.1-0.2$ 、 $0.2-0.4$ 、 $0.4-0.6$ 、 $1.2<$ ($\mu\text{g/L}$)のそれぞれ5段階とした。

皮膚症状発現に関して、MMA濃度は最も大きなオッズ比を示し有意性も認められたが、DMA濃度は1を割る値を示した。

血中砒素の化学形態別濃度と角化症ないし色素異常症のいずれかの皮膚症状の重症度との関連について図10に示した。MMAが皮膚症状の重症度および症状発現率との間に最も良好な量反応関係が見出された。次いでiAsにおいて比較的良好な量反応関係が見出されたが、DMAにおいては量反応関係は明確でなかった。

以上より、皮膚症状発現に対して砒素の化学形態別には血中MMA濃度が最も多く寄与することが示唆された。すなわち第一段階砒素メチル化

が進む一方で、第二段階砒素メチル化の進行の良くない個体においては体内にMMAが貯留し、皮膚症状の発現に関与することが示唆された。

皮膚症状の有症について性差が存在したことから、性別の砒素メチル化能について検討した。その結果、血液中形態別砒素濃度を基に計算推定した第一段階砒素メチル化は男性で女性に比して高い一方、第二段階砒素メチル化能は男性で女性に比して低かった(図11)。尿中形態別砒素濃度を基に計算推定したメチル化能においては、第二段階砒素メチル化能は男性で女性に比して低かったものの、第一段階砒素メチル化は男女間で差が無かった(図12)。メチル化能の強さについて血液および尿のサンプルで計算推定された値についてそれぞれの相関について検討した。男性のみにおいての相関図を図13に示した。第一段階砒素メチル化能、第二段階砒素メチル化能の双方において有意の相関が認められた。一方、女性のみにおいての相関は、第二段階砒素メチル化能のみに有意な相関が認められた(図14)。

3) 砒素曝露軽減による砒素関連皮膚症状改善効果

包頭市缶房菅村において低砒素濃度井戸水の配管による給水が 1999 年 8 月末に開始された。この飲料水の水源は中砒素濃度は 0.037ppm であった。0.037ppm の値は WHO や日本の水道水基準 0.01ppm を上回るが、中国の基準 0.05ppm を下回るものである。包頭市衛生部より全村民に水道水を飲用・調理用に使うべきことが通知された。

飲料水の改善による砒素曝露の軽減が開始された 6 ヶ月後と 1 年後に皮膚症状の改善を中心に、初回同様の調査を実施した。皮膚症状の変化について飲料水改善前の撮影写真と比較しての皮膚診察の様子を写真 6 に示す。砒素曝露指標として尿中砒素濃度の飲料水改善による砒素曝露軽減の前後での比較を図 15 に示す。1 年後の調査において、改善後では改善前に比して有意に尿中砒素濃度が低下することがわかった。

飲料水改善による砒素曝露軽減に

伴う皮膚所見の変化について代表的な症例を写真 7、8、9 に示した。さらに皮膚病変につき飲料水の変更の前後での比較が可能であった例について図 16 にまとめた。手掌角化症に関して症例 33 例中の改善 20 例、変化無し 11 例、増悪 2 例であった。足底角化症について症例 31 例中改善 10 例、変化無し 12 例、増悪 9 例であった。色素異常につき症例 21 例中で改善 14 例、変化無し 6 例、増悪 1 例であった。総じて改善傾向にあることがわかる。特に調査時点まで高砒素濃度の曝露を継続していたものほど改善することがわかる (図 17、18、19)。これは当然のことであり、既に低濃度砒素井戸水を飲用していたものはほぼ 2 年間の間に改善が進んだものと思われ、さらなる改善が緩やかとなったために変化量が乏しくなり「変化無し」と判定される事となった可能性が高い。

飲料水改善から 5 年後の再調査では、転居、村外への出稼ぎなどのため比較可能な対象者が少なく、25 例にとどまった。このうち飲料水改善 1 年後からさらに改善が見られた例

は、手掌角化症 2 例、足底角化症 5 例、色素異常症 3 例に過ぎず、むしろ増悪した者もそれぞれ、1、4、9 例見られた。

飲料水改善後に増悪した例は、改善前の検査にて症状の無かった者ないし軽い症状のみが見られた者に多かった。さらに、飲料水改善 1 年後に改善が見られないかあるいは増悪した例について詳細に検討を加えた結果、そうした例においては飲料水改善時点で既に砒素濃度の低い飲料水を用いていた者が 17 例であり、飲料水改善まで高濃度の砒素を曝露受けていた者が 2 例であった。すなわち既に各自の努力によって砒素曝露が一定期間継続されており、ある程度の症状の改善が進んだ結果として、さらなる改善が見られなかった可能性が高い。また、症状が改善された例においても、改善 1 年後に改善があっても 5 年後にはさらなる改善が見られない場合が多かった。

以上のことから、症状の発現には比較的時間を要し、飲料水の改善によって砒素曝露が軽減ないし停止された後にも症状が進行する可能性の

あること。また、砒素曝露の軽減によって達成される皮膚症状の改善は、砒素曝露軽減の直後の 1 年間ほどは比較的早くに進む一方、その後の改善の進行は緩徐であり、症状の大幅な改善には相当の時間を要するものと考えられる。



図1 慢性砒素中毒フィールド調査地図



Mild case; tiny nodules or papules.



Moderate case; fused keratotic region, increased thickness of corneous layer, semi-transparent hard skin



Sever case; increase the thickness with irregular surface or piling up of accumulated corneous layer

写真1 手掌角化症の症状度

Palm hyperkeratosis;
sever case

Localized in force applying area. (-) ▷

Spread into other area. (0) ▷

Spread into whole palm. (+) ▽

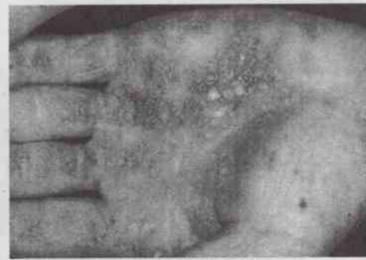
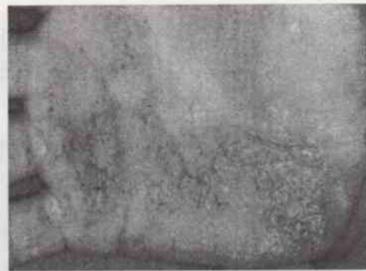
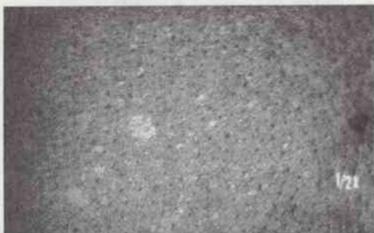


写真2 手掌角化症の病変範囲を考慮した
細症状度の例(重症例による)



Mild case; mottled spots of
pigmentation or
depigmentation

Moderate case; diffuse dark
pigmentation



Sever case; typical dyspigmentation,
rain drops shape mottled depigmentation
on diffuse pigmentation.

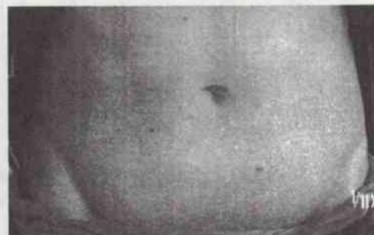


写真3 皮膚色素異常症の症状度

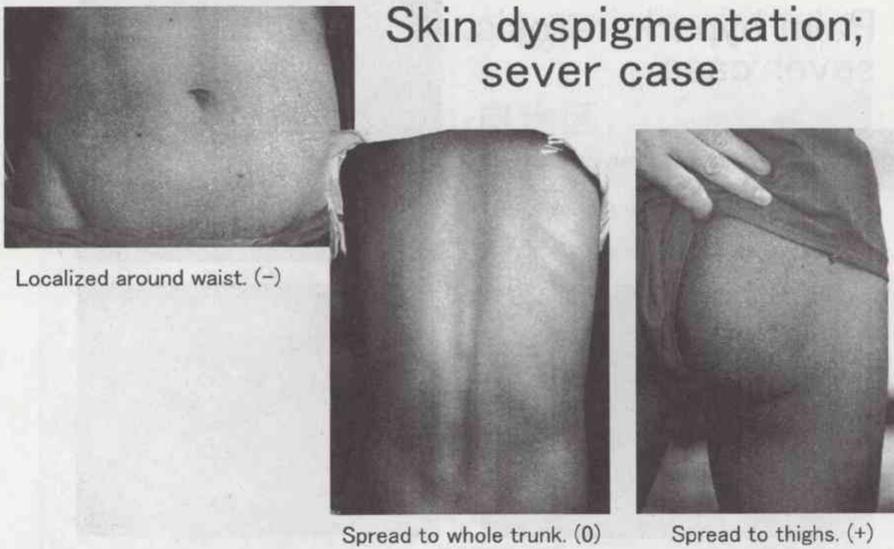


写真4 色素異常症の病変範囲を考慮した
細症状度の例(重症例による)

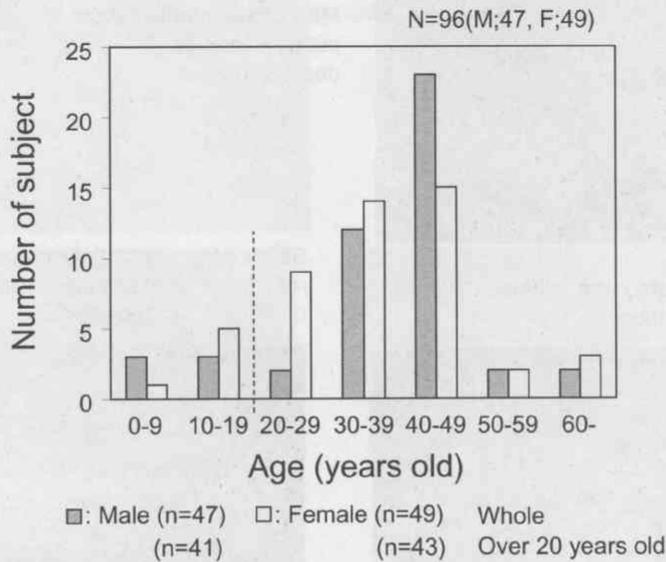
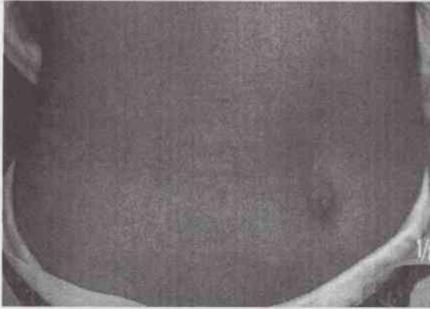


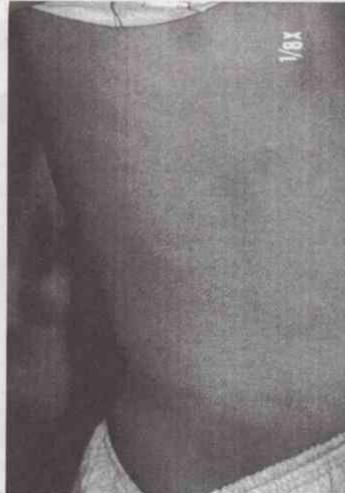
図2 調査対象者の年齢分布

Skin lesion in trunk; specific for young cases

Atopic skin like or bird skin like skin lesion. Sometime it is surrounded by small white spot.



Localized around waist.



Spread to chest.

写真5 若年者に多く見られる皮膚病変

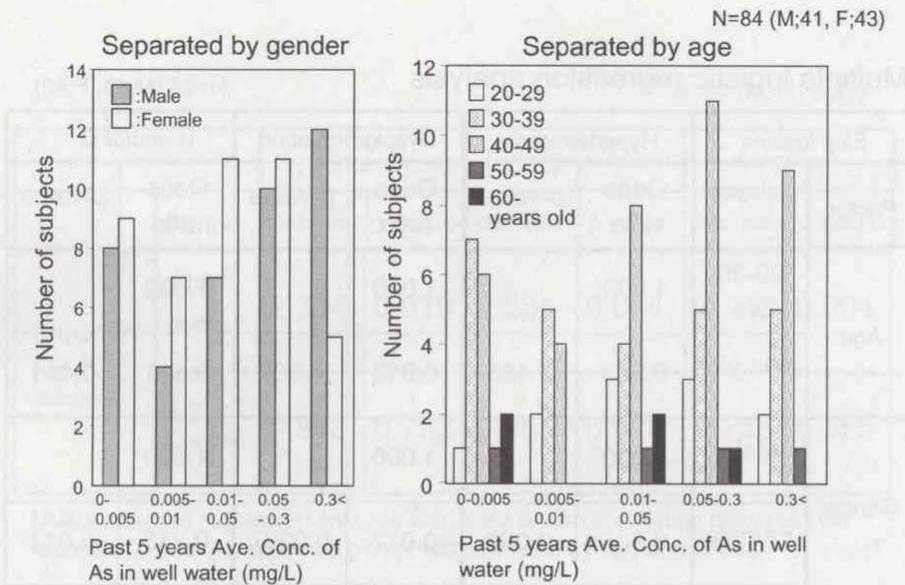


図3 調査対象者の過去5年間の平均飲水中砒素濃度の分布状況

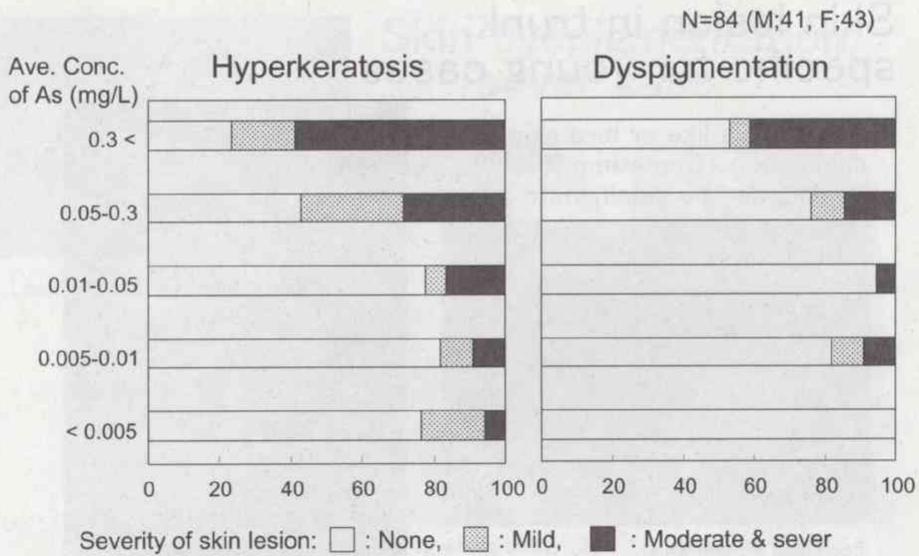


図4 過去5年間の飲水井戸水中の砒素濃度ごとの皮膚症状の重症度別有症率

Multiple logistic regression analysis

N=84 (M;41, F;43)

| Skin lesions | | Hyperkeratosis | | Dyspigmentation | | H and/or D | |
|--------------|-----------|----------------|---------|-----------------|---------|------------|---------|
| Factor | Category | Odds ratio | p-value | Odds ratio | p-value | Odds ratio | p-value |
| Age | 20-39 y/o | 1.000 | | 1.000 | | 1.000 | |
| | 40< y/o | 0.653 | 0.483 | 0.912 | 0.907 | 0.611 | 0.411 |
| Gender | Male | 1.000 | | 1.000 | | 1.000 | |
| | Female | 0.305 | 0.053 | 0.077 | 0.0227 | 0.215 | 0.011 |

図5 皮膚症状と年齢、性別との相関

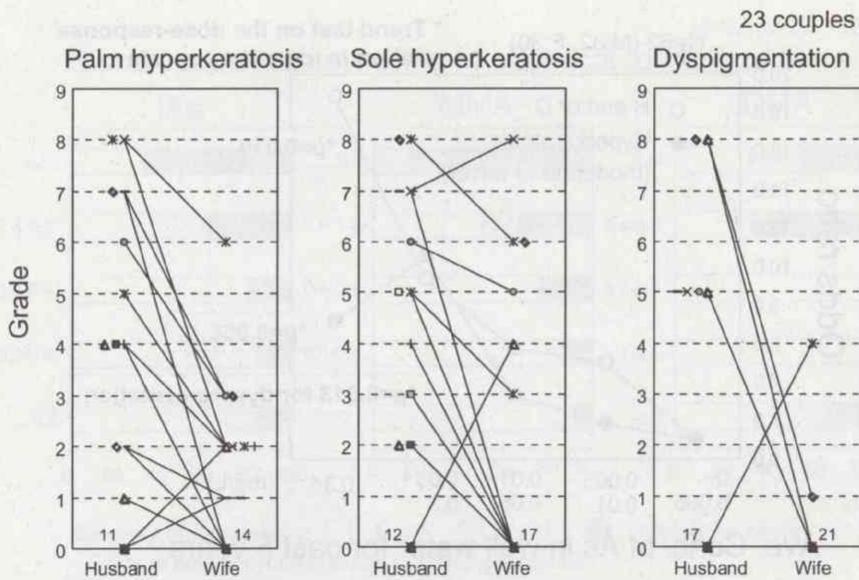


図6 同一の飲料水を飲用する夫婦における皮膚症状の重症度の対比

N=84 (M;41, F;43)

| | | Hyperkeratosis | | Dyspigmentation | | K and/or H | |
|------------------------------------|---------------------|----------------|---------|-----------------|---------|------------|---------|
| Period | | Odds ratio | p-value | Odds ratio | p-value | Odds ratio | p-value |
| Exposure (with 5 categories) | past 5 years | 2.384 | 0.019 | 2.534 | 0.084 | 2.936 | 0.004 |
| | previous 5 years | 0.918 | 0.762 | 0.966 | 0.928 | 0.758 | 0.325 |

Multiple logistic regression analysis was done on the correlation between skin lesions and past As exposure period with adjusted by age and gender.

図7 過去10年間の5年毎の砒素曝露濃度と皮膚症状との関連

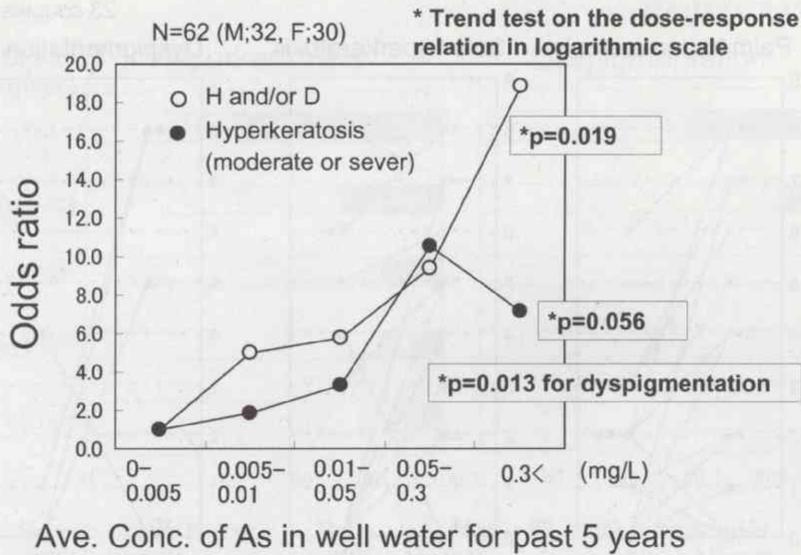


図8 過去5年間の飲水中砒素濃度が皮膚症状発現に及ぼす影響

N=62 (M;32, F;30)

| Species of As | Odds ratio | p-value |
|--------------------------------------|------------|---------|
| Blood iAs conc. (in 5 categories) | 1.533 | 0.3673 |
| Blood MMA conc. (in 5 categories) | 4.133 | 0.0356 |
| Blood DMA conc. (in 5 categories) | 0.321 | 0.0845 |

Odds ratios were adjusted for age and gender.

Existence of moderate or severe skin lesions were taken in the skin lesion.

図9 血中化学形態別砒素濃度と皮膚症状の相関

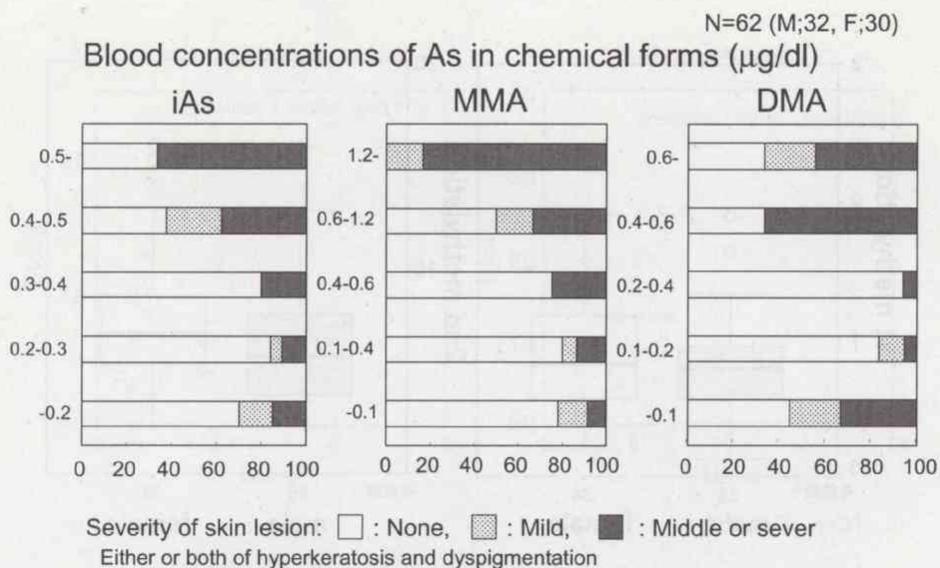


図10 化学形態別血中砒素の濃度と皮膚症状の重症度との相関

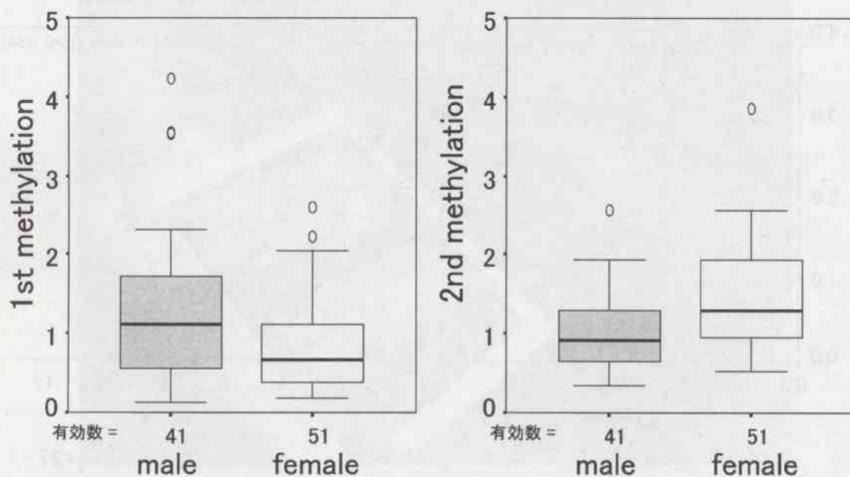


図11 血液中化学形態別砒素から推定される砒素メチル化能の性差

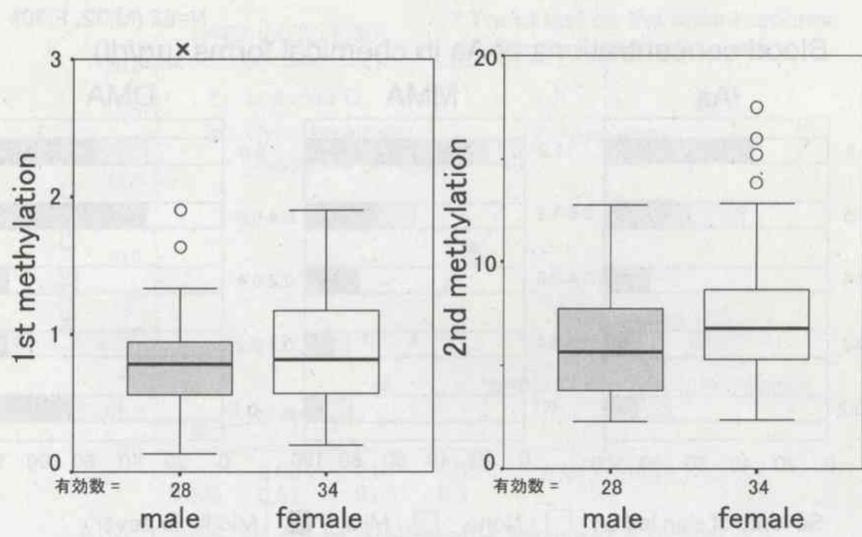


図12 尿中化学形態別砒素から推定される
砒素メチル化能の性差

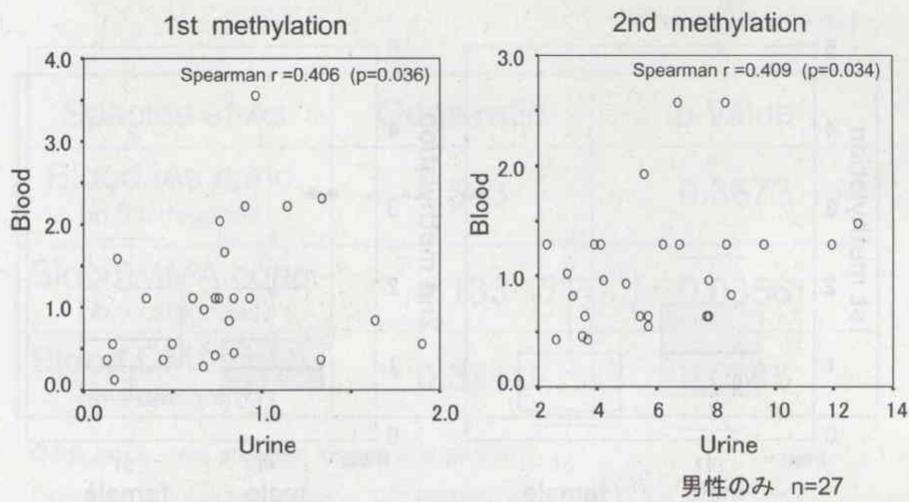


図13 血液・尿試料による推定メチル化能間の相関
男性のみ n=27

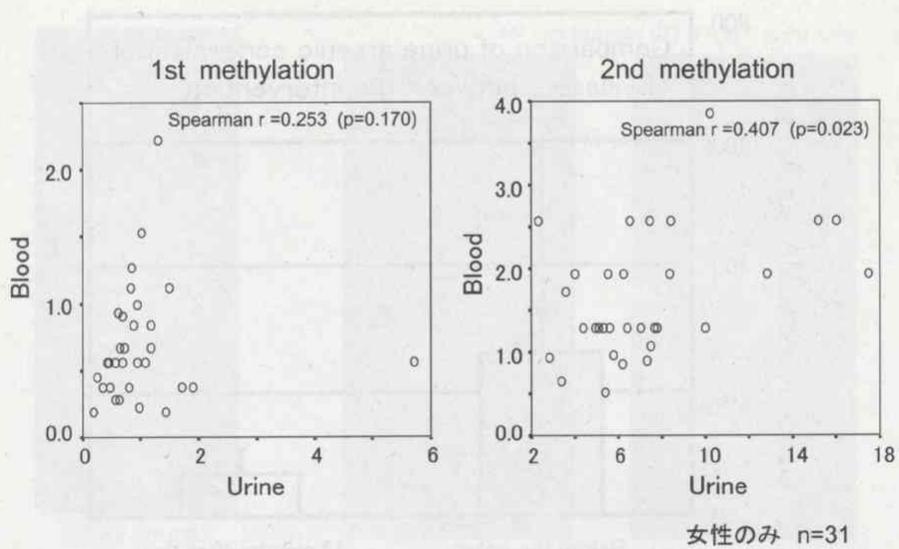
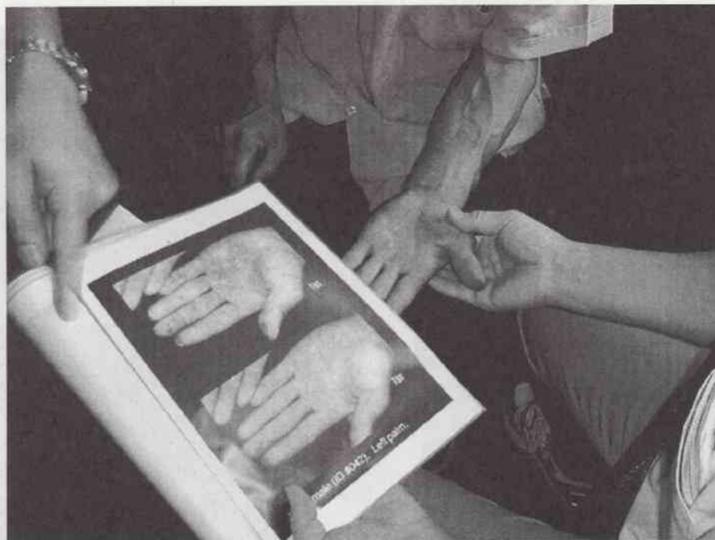


図14 血液・尿試料による推定メチル化能間の相関



Follow up examinations of villagers at 12 months after the intervention by comparison with former photographs.

写真6 症状改善の追跡調査

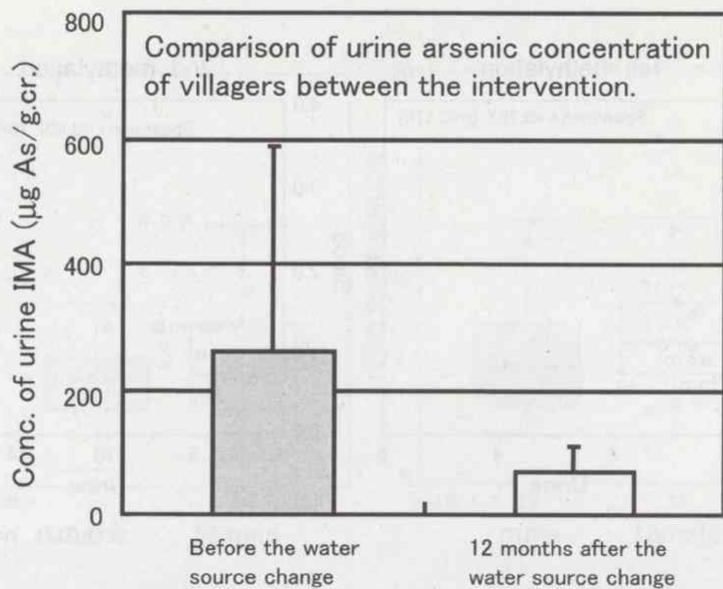


図15 飲料水改善前後での尿中砒素濃度の比較

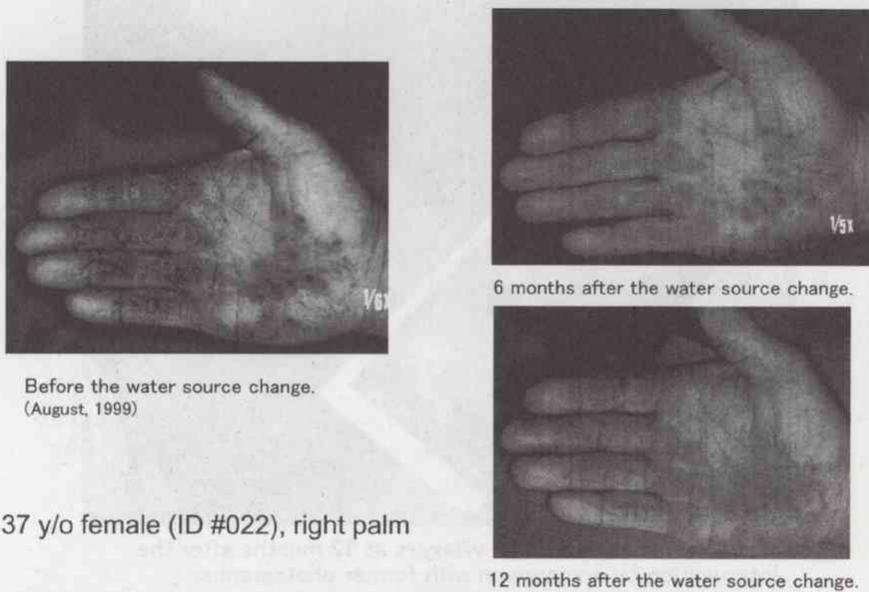


写真7 改水による手掌角化症の改善

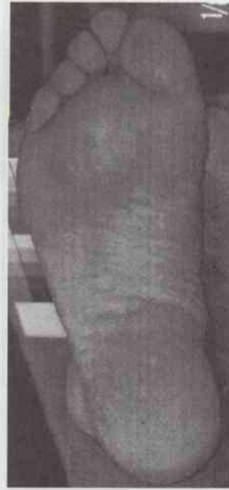
42 y/o female (ID #106), right sole.



Before the water source change.
(August, 1999)

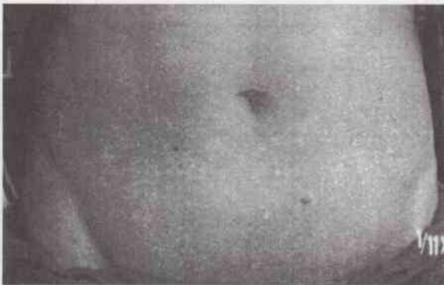


6 months after the water source change.

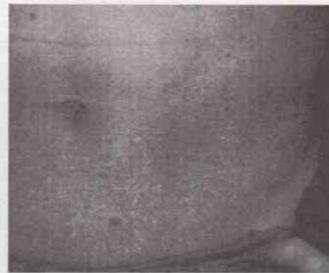


12 months after the water source change.

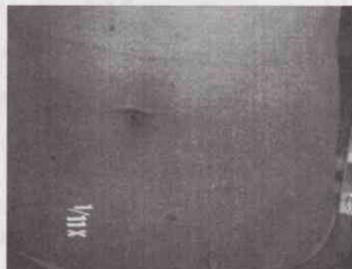
写真8 改水による足底角化症の改善



Before the water source change.
(August, 1999)



6 months after the water source change.



12 months after the water source change.

47 y/o male (ID #119), abdomen.

写真9 改水による皮膚色素異常症の改善

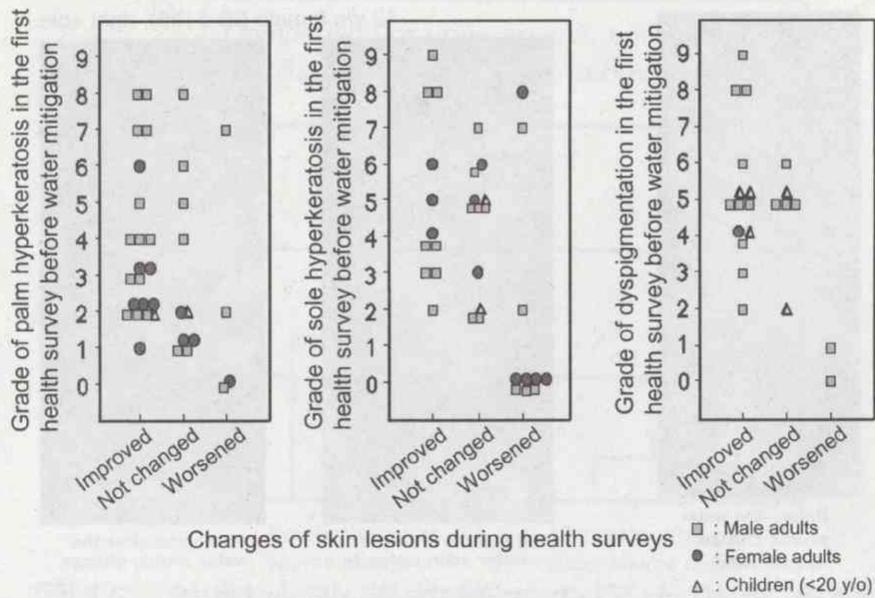


図16 改水による皮膚症状の改善のまとめ

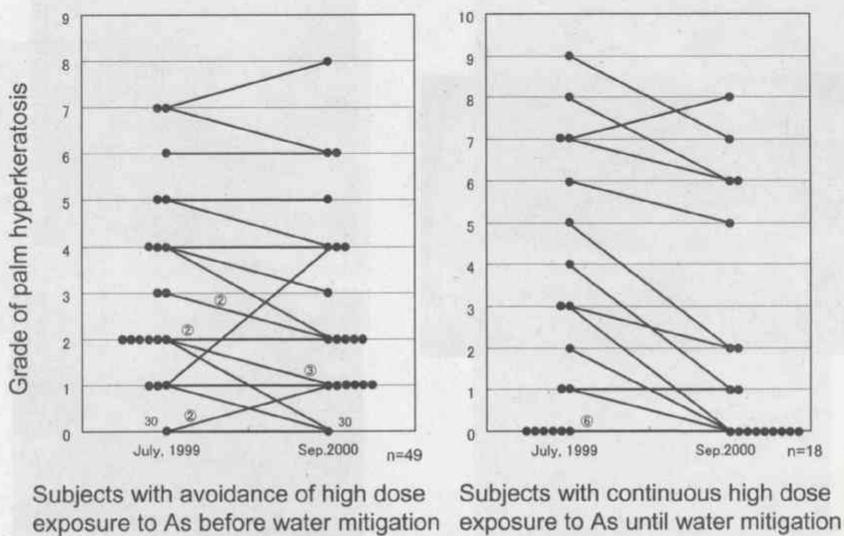


図17 改水による手掌角化症の変化に対する直前までの砒素曝露状況の影響

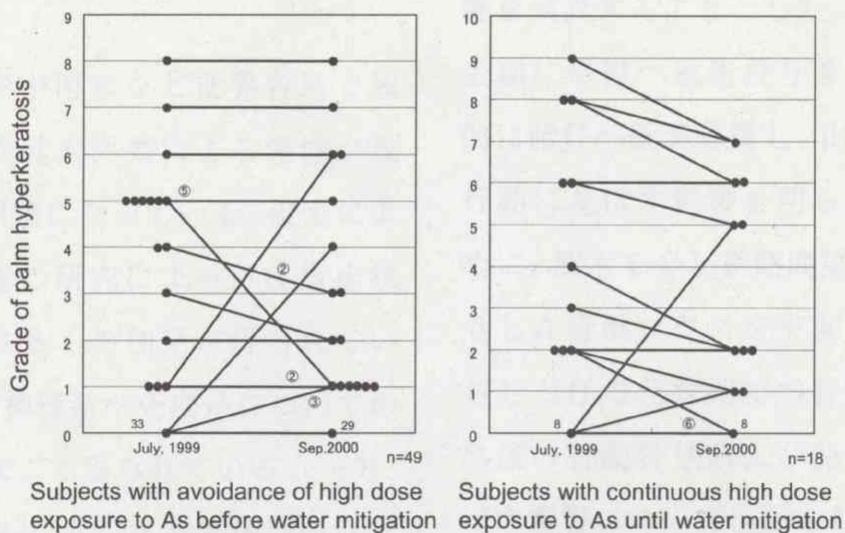


図18 改水による足底角化症の変化に対する直前までの砒素曝露状況の影響

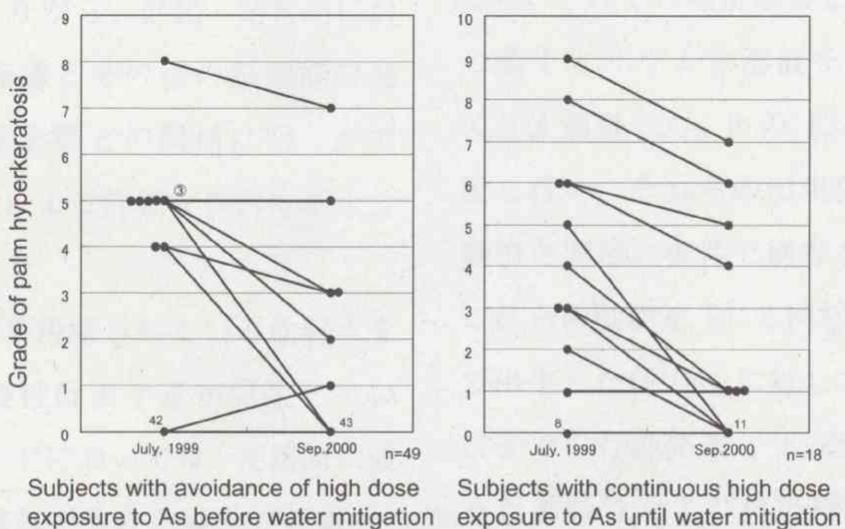


図19 改水による色素異常症の変化に対する直前までの砒素曝露状況の影響

Ⅲ. 動物実験による行動・学習試験

アジアや中南米など世界各地で地下水の無機砒素汚染による慢性中毒が深刻な問題になっている。砒素による慢性中毒の研究によって皮膚症状や発癌では多くの知見が得られているが、中枢神経系や免疫系についての研究報告はごく限られている。一方、胎児期や乳児期にある生体は脳血管関門 (blood brain barrier, BBB) が未熟なために多くの有害物質がこれを通過して脳内へ容易に侵入し得ると考えられる。同時期に曝露する砒素も同様の動態をとるものと考えられる。しかしながら、分化・発育期における砒素曝露とその後の脳機能の発達に及ぼす影響との関係は明らかでなく、実験による詳細な検討も不十分である。

今回、砒素汚染されている飲料水を飲用して慢性砒素中毒が発生しているフィールドにおいては、長期間に渡って砒素曝露を受けた女性が妊娠し、その妊娠中にも砒素曝露が継続されることから、同様の条件を動物実験で設定し、出生仔の行動発育、精神行動

および免疫応答を指標として生体影響を検討することとした。そこで、胎生期に母獣へ砒素投与を行い経胎盤的に胎仔へ砒素曝露し、出生後の仔の行動に及ぼす影響を明らかにするために、飲水を介し長期間無機砒素を投与した母獣マウスを交配させて出生させた仔の発育期での行動発達と成熟後の行動特性および免疫機能に及ぼす影響について検討を行った。

1) 方法

実験には C57BL/6NCrj マウスを使用した。8週齢まで通常飼育した後、動物 (P) を対照群および砒素投与群に分け、それぞれ蒸留水および 10ppm 亜ヒ酸ナトリウム水溶液を飲料水として与え飼育した。P の 12 週齢時に交配を行い、それらの出生仔 (F1) も親動物と同様の条件で飼育を行なった。これらの動物を F1 と同様に交配させて出生した仔 (F2) に対して生後 14 日目までの行動発達と 8 週齢時における行動特性および免疫機能について検討を行った。なお妊娠中も砒素曝露を継続した。実験計画の概要について図 20 に示した。

a. 行動発達試験

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）に準じて行った。測定日は、生後 1、4、6、8、10、12 および 14 日目とした。測定項目は、立ち直り反射、断崖落下回避反応、ピボットティング、歩行運動、背地走性試験、握り反射、握力、体重とした。

b. オープンフィールド検査

8 週齢時に 2 分間のオープンフィールド検査を行った。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（区画線を越えて移動した回数）、Latency（検査開始から移動開始までの潜時）、Path（総移動距離）、Velocity（移動速度）について計測した。

c. T 水迷路試験

オープンフィールド検査終了後に、学習行動試験として T 水迷路試験を行った。スタート枝につながる分岐枝

の両側末端部の水面下 1cm にプラットフォームを設置し、被験マウスの初回チャレンジの際に到達した側のプラットフォームを取り除き、その後継続して 4 回行うチャレンジを 1 試行とし、毎日 1 試行を 3 日間連続して行った。4 日目にプラットフォームを反対側に置き換える逆転試行を行った。達成の評価指標としてゴール到達時間を測定した。

2) 結果

10ppm 亜硫酸ナトリウム (NaArO_2) の長期飲水投与による母獣の出産への影響は認められなかった（表 1）。出生後の仔の体重増加には砒素曝露の影響は無かった（図 21、22）。出生仔の行動・発達試験では、ほとんどの項目で砒素曝露による影響は観察されなかった（図 23-29）。8 週齢におけるオープンフィールドテストでは雌雄とも砒素曝露により潜時の延長が観察された（表 2、3）。T 型水迷路試験では、雌においてプラットフォーム到達時間が延長する傾向がみられたものの統計的有意差は得られなかった（図 30、31）。

以上より、飲水を介した長期砒素曝露は、出生仔の記憶・学習よりは情動系の発達に影響することを示唆する結果が示されたものの、今後より詳細な検討を行う必要があると考えられる。

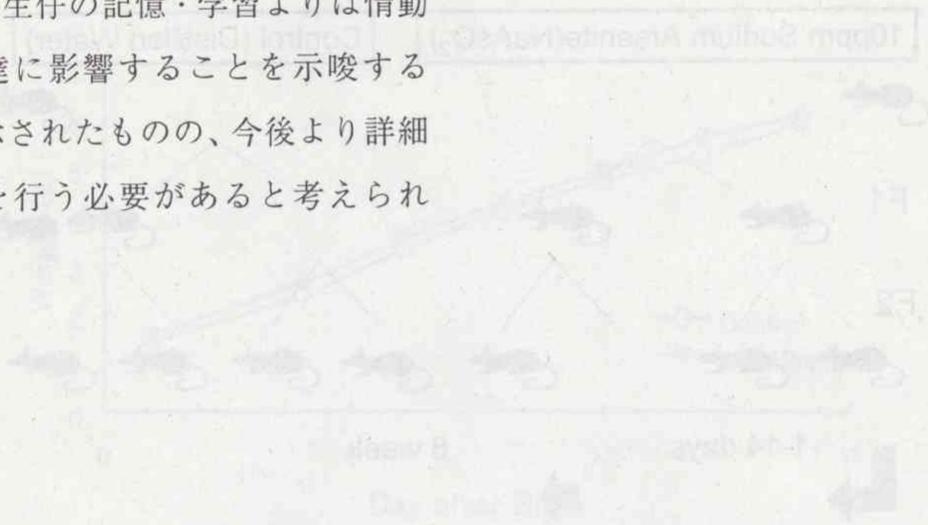


図21 出生後要約の飼育計画の図

出生後の体重変化のまとめ

| Control | AS (10ppm) | 出生率 |
|------------|------------|-----|
| 27.8 ± 0.7 | 27.8 ± 0.7 | 出生率 |
| 27.8 ± 0.7 | 27.8 ± 0.7 | 出生率 |
| 27.8 ± 0.7 | 27.8 ± 0.7 | 出生率 |
| 27.8 ± 0.7 | 27.8 ± 0.7 | 出生率 |

図22 出生後の体重変化(%)

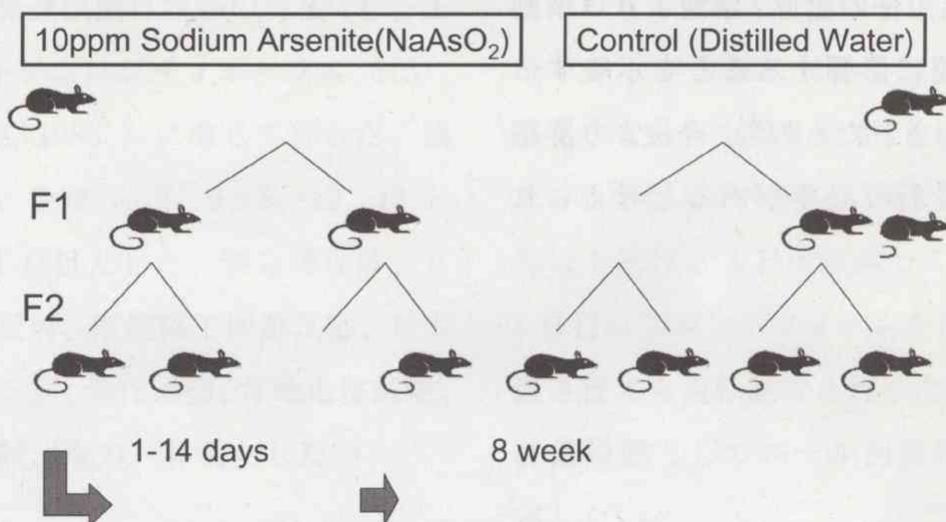


図20 実験計画の概要

表1 F1によるAs曝露の出産への影響

| | Control | As (NaAsO ₂) |
|------------------|---------------|--------------------------|
| 出産率 | 71.4% (10/14) | 77.8% (7/9) |
| 母獣1匹あたりの 出産匹数 | 5.60±2.23 匹 | 6.29±1.11 匹 |
| オスの出産割合 | 55.4% | 59.1% |

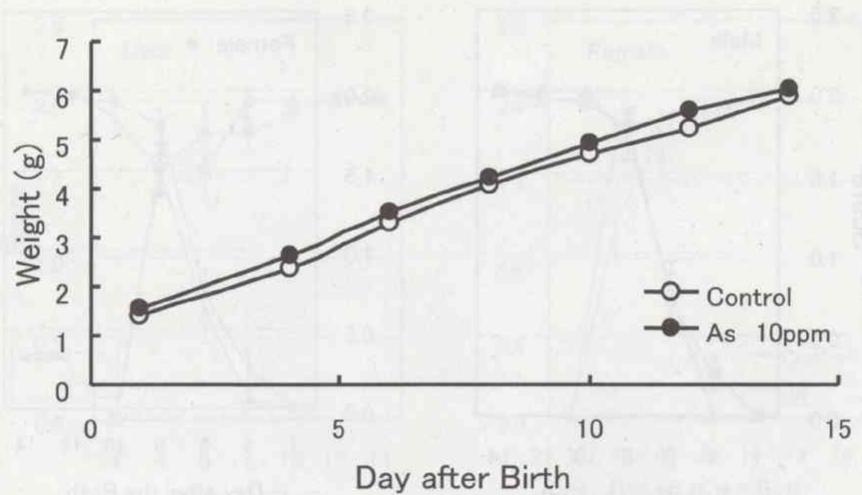


図21 出生後の体重変化(オス)

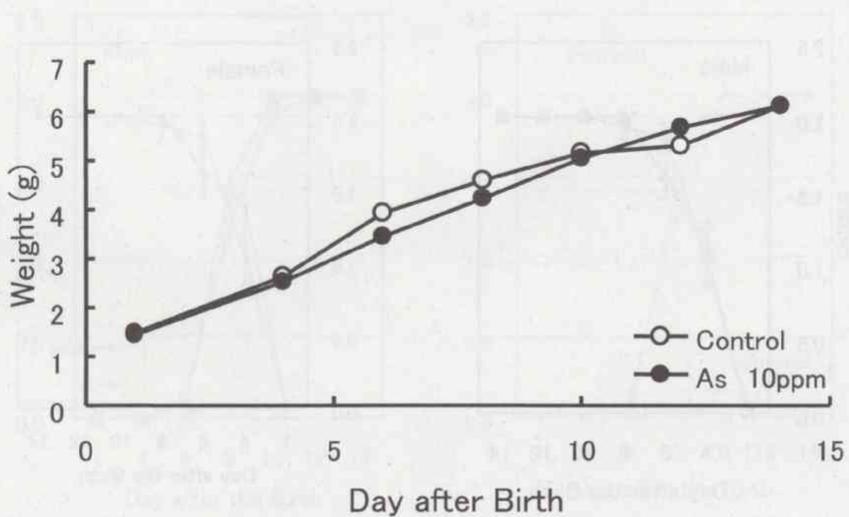
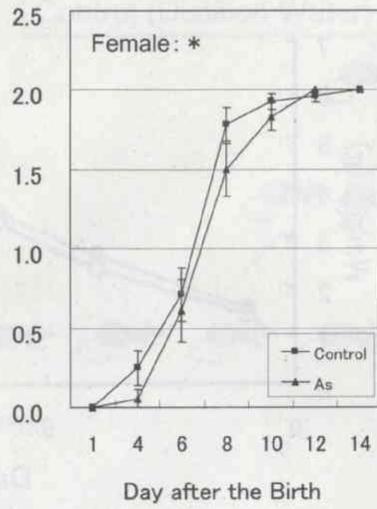
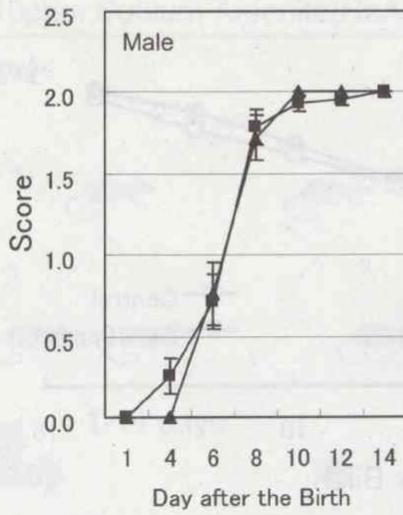
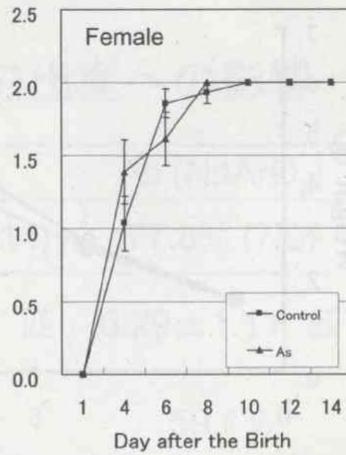
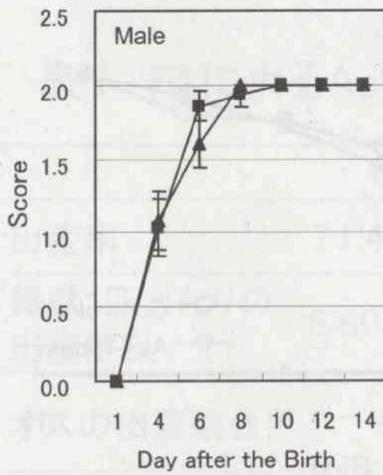


図22 出生後の体重変化(メス)



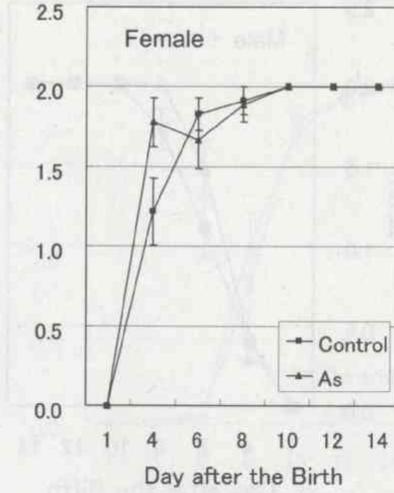
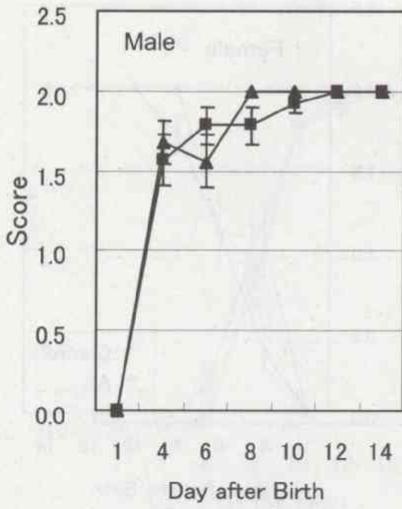
mean \pm SE, *: $p < 0.05$ by t-test

☒23 Righting Reflex



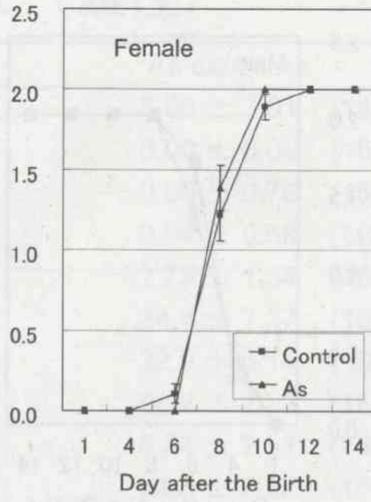
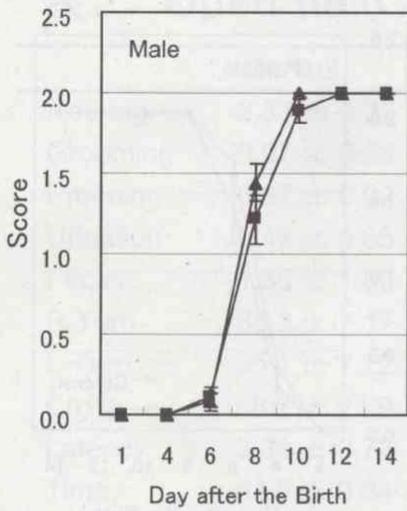
mean \pm SE

☒24 Cliff Avoidance



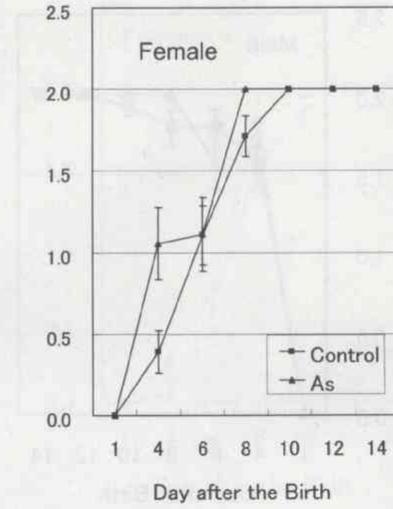
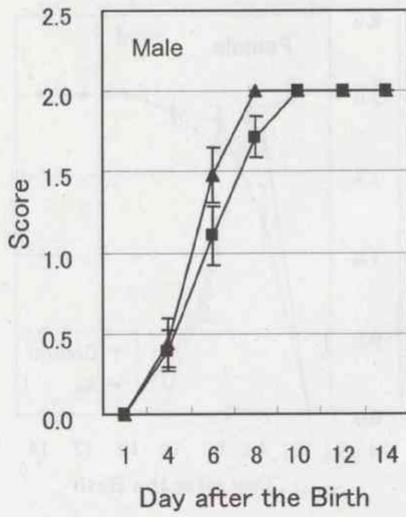
mean \pm SE
 mean \pm SE, *: $p < 0.05$ by t-test

☒ 25 Pivoting



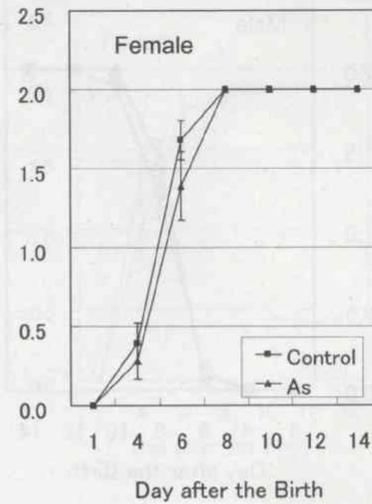
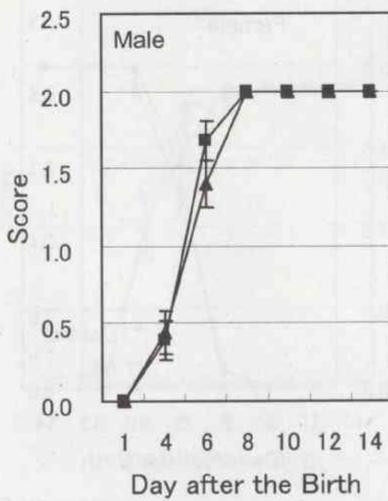
mean \pm SE
 mean \pm SE, *: $p < 0.05$ by t-test

☒ 26 Walking



mean \pm SE

☒27 Negative Geotaxis



mean \pm SE

☒28 Grasping Reflex

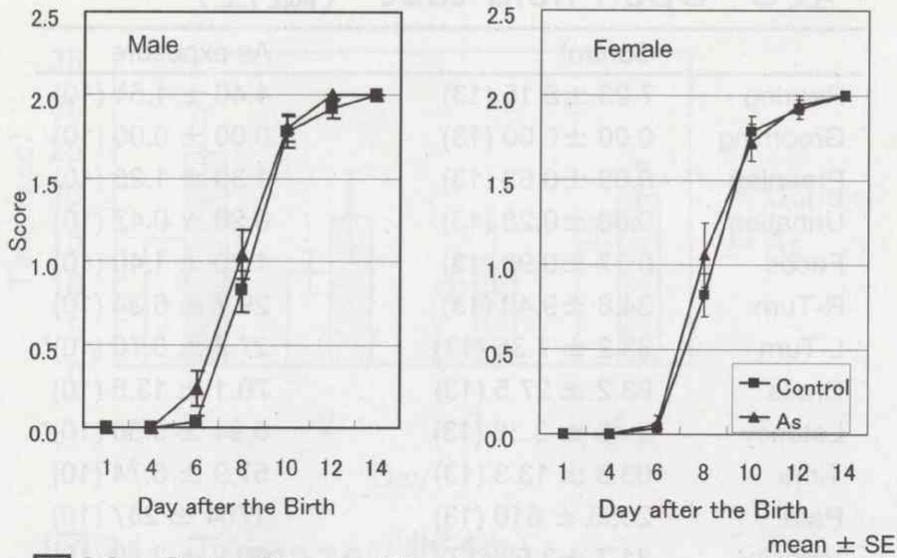


図29 Grip Strength

表2 Open field test (雄性)

| | 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 t-test

表3 Open field test (雌性)

| | 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 t-test

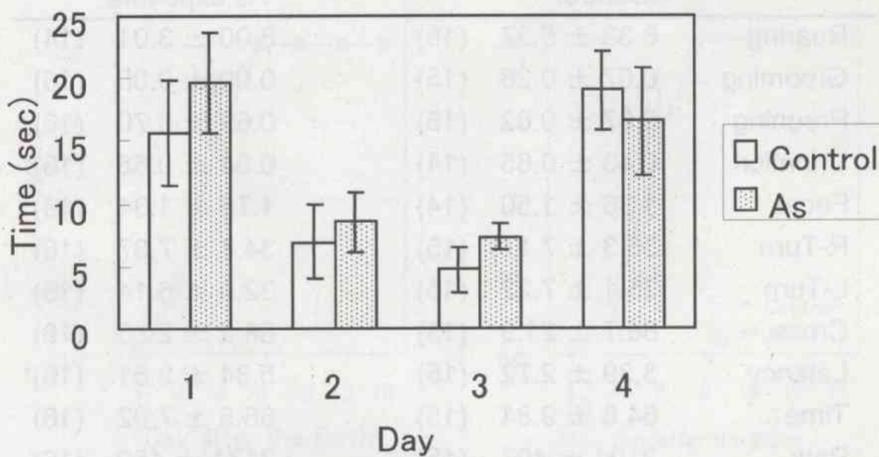


图30 T-maze (雄性)

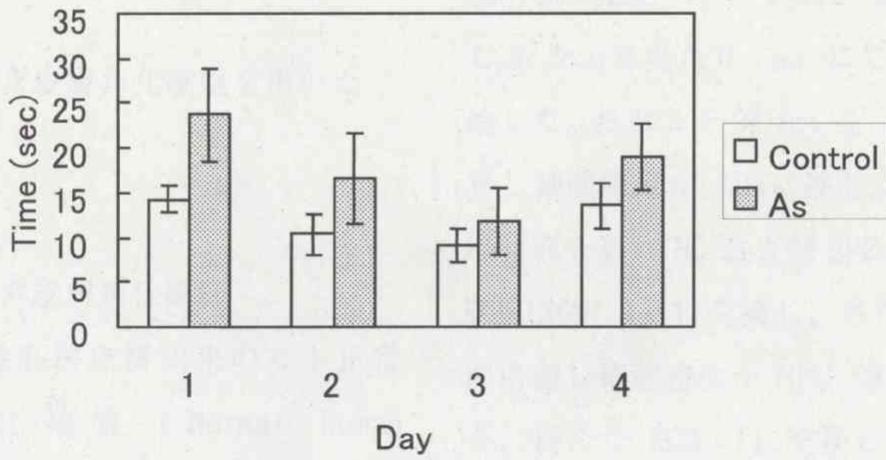


図31 T-maze (雌性)

IV. 研究室における培養細胞を用いた実験

1. ヒト正常皮膚角化細胞を用いた実験

1) ヒト正常皮膚角化細胞

成人女性乳房皮膚由来のヒト正常皮膚角化細胞 (Normal human epidermal keratinocytes, NHEK) を Clonetics Corp. (San Diego, CA) から購入し、常法に基づいて培養し液体窒素にて分注凍結保存した。実験に際して、凍結細胞を解凍し常法に基づいて、25cm² プラスチック培養フラスコにて、ヒドロコチゾン (HC) を添加したケラチノサイト培養液 (keratinocytes growth medium, KGM, Clonetics Corp.) にて、1 ないし 3 回の継代培養を行った。

KGM を用いた前培養によって増殖させ必要数となった NHEK を、24 穴プラスチック・カルチャープレート (Costar Corp., Cambridge, MA) に HC および牛下垂体抽出液 (bovine pituitary extract, BPE) を添加した

完全基本ケラチノサイト培養液 (complete keratinocyte basal medium, KBM) にて 4×10^4 /ml に調整し 1 ウェル当たり 1 ml にて培養を開始した。おおよそ 24 ないし 48 時間培養し細胞密度が 50% に達した時点で、培養液を新に HC および BPE を除いた KGM (KGM(-)) に交換し、さらに 24 時間培養し細胞密度が 70% に達したものを、新たな KGM(-) に交換し実験に用いた。BPE を除く理由は TGF α が含まれているために、この後の実験系に不都合を与えるためであり、HC を除くのはサイトカインの産生を阻害させないためである。培養上清中のサイトカインの測定を行う実験系では 24 時間の培養を、また細胞での mRNA 発現量の測定を行う実験系では 1 時間培養を行った。

同様に 1.5×10^4 /ml/ウェルで培養を上記方法と同様に行い、細胞密度がおおよそ 40% となった培養系を細胞障害活性の検討に用いた。

2) 砒素の添加

3 価の無機砒素である亜砒酸ナトリウム (Sigma Chemical Co., St. Luis,

MO)を、0.85%塩化ナトリウム水溶液にて50mMに調整した後フィルターを通して除菌した。滅菌0.85%塩化ナトリウム水溶液にて希釈した。それぞれの培養系に、1ウェルあたり20 μ lの砒素希釈液を添加することによって目的の砒素濃度とした。なお、対照群には同量の滅菌0.85%塩化ナトリウム水溶液を添加した。砒素水溶液は実験ごとに作成した。

3) 砒素による細胞毒性の検討

砒素添加24時間後に培養上清を得てLDHを測定した。また、培養細胞をトリプシン処理によってカルチャープレートより剥離させ、PBS(-)にて洗浄後に0.05%生理食塩水トリパンブルー処理を行い、青染細胞、非染細胞を顕微鏡下に計測した。

4) 砒素による細胞障害性の検討

KGM(-)にて砒素添加培養を都合31時間行う。培養中には培養系に通常照明があたらないよう注意をした。培養開始時に5 μ Mの5-brom-2'-deoxyuridine(BrdU)(Sigma Chemical Corp.)を添加し、さらに培養終了5時

間前に10 μ lのColcemid(GIBCO Grand Island, NY)を添加した。培養終了後、1条件あたり4ウェルをプールし試料とした。培養上清を除去しPBS(-)にて洗浄した後、トリプシン処理(Clonetics Corp.)にて付着細胞の全てをカルチャープレートから剥離し小試験管に回収した。トリプシン中和液(Clonetics Corp.)にてカルチャープレートに残った細胞を回収し同じ試験管に回収した。細胞浮遊液を遠沈し、上清を捨てた後に細胞膜を膨潤破壊するために低張液に浮遊させて処理を行った。細胞核を70%エタノールと30%酢酸混合液にて遠沈、再浮遊を3回繰り返して洗浄固定の操作を行った。

エタノールで洗浄したスライドグラスに、細胞核浮遊液を滴下・乾燥させた。1条件あたり2つの試料を作成し、完全に乾燥させた後に、蛍光・ギムザ染色を行った。スライドグラス上の細胞核に蒸留水で50 μ g/mlに調整したHoechst 33258 fluorochrome(Sigma Chemical Corp.)を浸潤させカバーグラスをかぶせて室温にて15分間処理を行い、引き続きMcIlvaine

緩衝液 (pH 8.0) を浸潤させカバーガラスをかぶせて、50℃、紫外線照射下にて 25 分間処理を行った。処理終了後に蒸留水にてスライドガラスを洗浄し、4% (v/v) の Oarlock Giemsa (ME Diagnostics) 染色液にて適切な時間染色を行った。完全に乾燥の後に、スライドガラスに封入財 (Permount) を滴下しカバーガラスにて封入した。

細胞分裂像を顕微鏡下に観察し、有糸分裂中期にある核の数の全体数に対する比率を mitotic index として求め細胞増殖活性を評価した。2 枚のスライドガラスにて 1 条件あたり 2000 個の核を測定した。また、娘染色体交換数 (Sister chromatid exchange, SCE) を 1 条件あたり 25 個の第二分裂期にある核の染色体を観察・計測して平均の値を求めた。

5) 抗サイトカイン抗体

GM-CSF および TGF α のオートカインとしての作用の有無を検証するためのブロック試験においては、抗ヒト GM-CSF 抗体 (Anti-GM-CSF Neutralizing Antibody, #AB-215-NA) および抗ヒト TGF α 抗体 (Anti-Human

TGF α Neutralizing Antibody, #AB-239-NA) を R&D systems (Minneapolis, MN, USA) から購入し、最終濃度が 50% 中和量の 5 倍となるように適度に希釈した抗体の 25 μ l を培養系に添加した。

6) サイトカイン量の測定

培養終了後、培養上清を回収し膜フィルターにてろ過しサイトカイン測定に供した。また、サイトカインの細胞内貯蔵量を測定する実験では、培養上清除去後に 1ml の 0.1% Triton X-100 液を培養系に注入し、30 ないし 40 分間、室温処理を行い、遠心分離の後に上清を細胞溶解液として測定に供した。それぞれのサンプルは測定まで、-80℃にて凍結保存した。

IL-1 α 、IL-8、GM-CSF は R&D Systems の ELISA キット (QuantikineTM Immunoassay; human IL-1 α 、human IL-8、human GM-CSF) で、TGF α は Oncomembrane Inc. の ELISA キット (Human Transforming Growth Factor- α 、Seattle, WA, USA) にて測定した。また、IL-6 および TNF α はバイオアッセイにて測定した。IL-6 は 7TD1 細胞

を用いてヘキサミニダーゼ法によって測定し、TNF 活性は L929 細胞に対する傷害活性によって定量的に測定した。

7) 結果

NHEK に対する砒素の細胞障害活性について表 4 に示す。5 μ m を上回る濃度で細胞障害活性が見られ、50 μ m 以上ではほぼ全ての細胞が死滅した。LDH は死滅する細胞が多い濃度にあつては良い指標ではないためと思われる。表 5 に NHEK の増殖に対する砒素の影響を mitotic index として示す。比較的低濃度砒素によって増殖活性の亢進が観察された。同時に観察した娘染色体交換は砒素濃度が高いほど多くなり、これは今までの多くの報告と一致し、発癌への寄与の可能性が再確認された。

NHEK に対する砒素のサイトカイン産生への影響を表 6 にまとめ、培養上清中のサイトカイン濃度を示す。培養上清中のサイトカイン濃度については細胞外への排出の有無が影響することから、培養上清と細胞内のサイトカイン濃度を比較するため

に GM-CSF および IL- α について、培養上清と細胞破壊後の遠心上清中のサイトカイン濃度を比較測定した (図 32、33)。GM-CSF は産生されたほとんどのものが細胞外に排出されるに対して、IL-1 α についてはほとんどが排出されないことがわかった。ここには示さないが、GM-CSF には細胞増殖活性があることが知られているために、NHEK に GM-CSF を添加して培養したところ、増殖が亢進された。そこで、培養時間ごとの砒素の添加および培養上清中の GM-CSF を経時的に測定した (図 34)。砒素の存在があるかぎり GM-CS 産生が継続することと、砒素を除去しても数時間程度は GM-CS の産生が持続することがわかった。mRNA の発現も同様の傾向を示し、GM-CSF は砒素による NHEK 増殖亢進に大きな役割を担うことがわかった。

2. マウス線維芽細胞を用いた実験

研究代表者らはマウスに砒素を飲料水を介して投与する研究において、マウス皮膚の缺での切開の際に抵抗感が増す事を見いだした。砒素曝露

マウスの皮膚の病理標本の観察によつて、真皮層内膠原線維径の肥厚と皮下脂肪層内の膠原線維の増加が見られたことから、膠原線維の増加が皮膚の硬さをもたらしている事が示唆された。そこで、線維芽細胞に対する砒素の増殖活性について検討した。

亢進することがわかった。フィールドで慢性砒素中毒患者にみられる角化症の発現に、表皮角化細胞ばかりでなく真皮層の線維芽細胞の増殖と同細胞が産生するコラーゲンとそれによって構成される抗原線維の増加が関与する可能性が示唆され、今後の検討課題である。

1) 3T3 細胞株

マウス胎児由来線維芽細胞 3T3 細胞株の継代培養系からトリプシン処理により細胞回収。トリパンプルー細胞カウント後、 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整後、スライド・チャンバー (2 チャンバー) に 1ml ずつ分注して培養した。

2) BrDU 吸収と染色

BrDU-ペルオキシダーゼを細胞培養系に添加し、その後、基質を添加し発色させ、顕微鏡下に染色陽性細胞を全細胞に対する比として測定した。

3) 結果

砒素の線維芽細胞に対する増殖活性への影響について表 7 に示した。1、 $4 \mu\text{m}$ において弱いながら増殖活性が

表 4 ヒト正常角化細胞に対する砒素の細胞障害活性

| Exp. | Concentration μM | cell viability ^a (%) | LDH (U) |
|------|---------------------|------------------------------------|------------|
| I | 0.0 | 97.3 | 2.59 |
| | 0.1 | 93.6 | 2.58 |
| | 0.5 | 91.9 | 1.78 |
| | 1.0 | 89.8 | 2.33 |
| | 5.0 | 74.5 | 1.18 |
| | 10.0 | 50.6 | 2.70 |
| | 50.0 | 0.0 | 7.75 |
| | 100.0 | 0.0 | 3.71 |
| | 500.0 | 0.0 | 9.92 |
| II | 0.0 | ND | 2.89 |
| | 0.5 | ND | 1.64 |
| | 1.0 | ND | 2.13 |
| | 2.0 | ND | 3.14 |
| | 4.0 | ND | 1.01 |
| | 8.0 | ND | 2.79 |

Each data were presented as average of duplicate.

^a Cell viability was counted by Trypan blue exclusion.

ND: Not determined

表5 ヒト正常皮膚角化細胞に対する砒素の増殖活性及び
娘染色体交換数への影響

| Conc. of As (μ M) | Mitotic Index | Mean of SCE /chromosome in metaphase nuclei |
|---------------------------|------------------|--|
| 0 | 1.25, 1.50 | 8.92, 8.24 |
| 12.5 | 2.25, 2.60 | 7.80, 8.08 |
| 25 | 2.40, 2.80 | 8.76, 8.68 |
| 50 | 1.95, 3.20 | 8.68, 8.40 |
| 100 | 2.70, 2.70 | 9.44, 7.44 |
| 200 | 1.80, 2.75 | 8.48, 8.44 |
| 0 | 1.33, 2.08 | 10.0, 10.2 |
| 0.5 | 2.03, 2.58 | ND |
| 1 | 2.06, 2.49 | 10.9, 11.9 |
| 2 | 1.02, 1.07 | 10.5, 11.8 |
| 4 | 0.72, 0.81 | 13.0, 14.7 |
| 8 | 0.19, 0.53 | ND |

Each value was presented as each individual sample pooled of two cultures.

ND: not determined.

表6 ヒト正常皮膚角化細胞に対する砒素のサイトカイン産生への影響

| Exp. | Conc of As (μ M) | Conc. of cytokines | | | | |
|------|--------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------|-------------------------|
| | | TNF α (U/ml) | IL-6 (pg/ml) | IL-1 α (pg/ml) | GM-CSF (pg/ml) | TGF α (pg/ml) |
| I | 0 | 0.05 | 29.6 | 2.93 | 41.9 | 15.8 |
| | 0.1 | 0.07 | 30.4 | 3.72 | 43.6 | 18.0 |
| | 0.5 | 0.15 | 29.2 | 4.26 | 41.8 | 18.5 |
| | 1 | 0.08 | 96.4 | 4.53 | 56.5 | 18.1 |
| | 5 | 0.0 | 17.8 | 4.66 | 105.7 | 17.8 |
| | 10 | 0.0 | 0.0 | 7.33 | 194.5 | 18.0 |
| II | 0 | 0.12 | 20.1 | 10.5 | 36.8 | ND |
| | 0.5 | 0.14 | 22.9 | 11.1 | 43.6 | ND |
| | 1 | 0.14 | 18.4 | 10.1 | 49.4 | ND |
| | 2 | 0.18 | 15.8 | 13.7 | 67.8 | ND |
| | 4 | 0.22 | 56.8 | 12.6 | 82.3 | ND |
| | 8 | 0.21 | 58.1 | 15.0 | 143.2 | ND |

Each data were presented as average of duplicate.

ND: Not determined

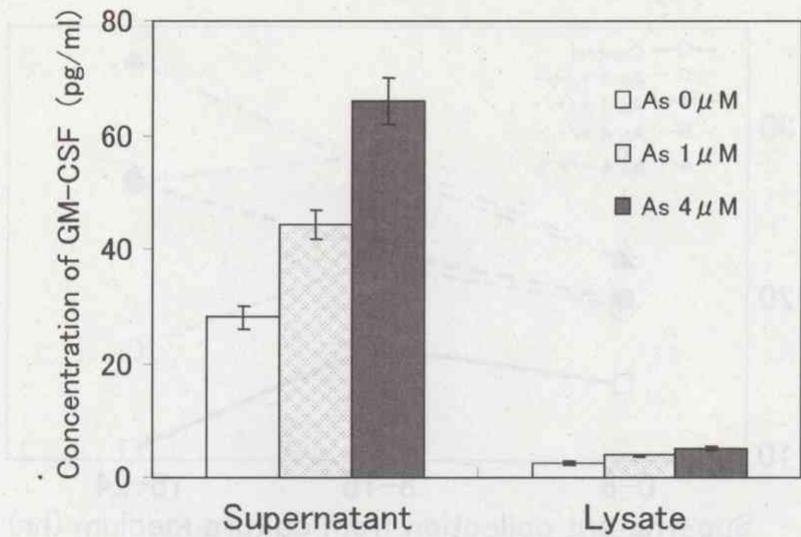


図32 正常ヒト角化細胞におけるGM-CSF産生に対する砒素の影響

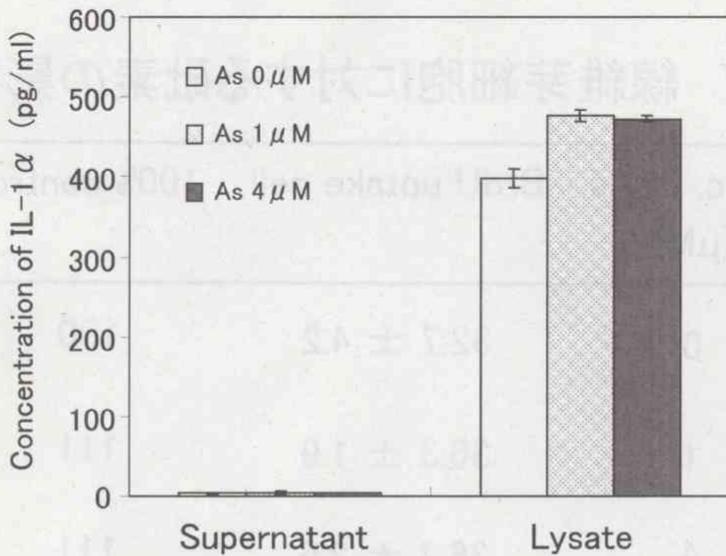


図33 正常ヒト角化細胞におけるIL-1 α 産生に対する砒素の影響

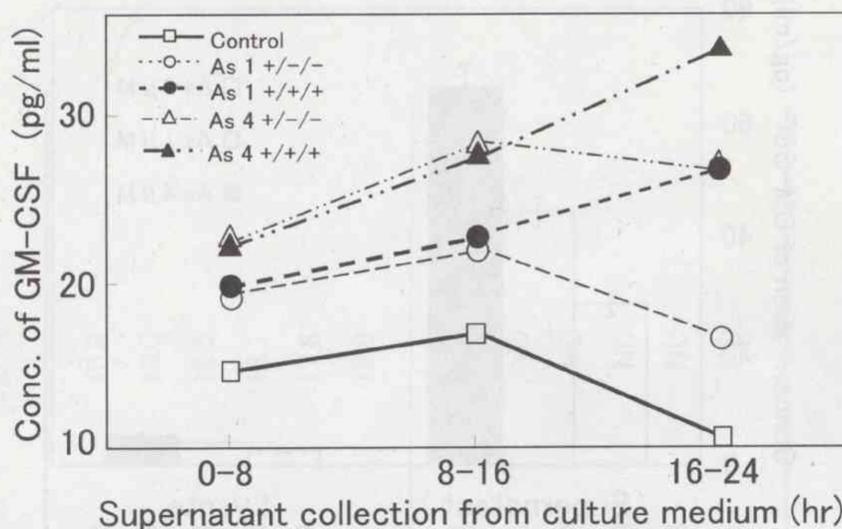


図34 培養時間ごとの正常ヒト皮膚角化細胞からのGM-CSF産生に対する砒素の影響

表7 線維芽細胞に対する砒素の影響

| Conc. of As (μM) | BrdU uptake cell | 100% control |
|----------------------------------|------------------|--------------|
| 0 | 32.7 ± 4.2 | 100 |
| 1 | 36.3 ± 1.9 | 111 |
| 4 | 36.2 ± 2.6 | 111 |