

ヒ素曝露人群における健康リスクの予測・早期診断法の探索

研究者氏名□□教授 馬 寧

日本所属機関□□鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部

共同研究者名□□助手 大西 志保

日本所属機関□□鈴鹿医療科学大学・薬学部

中国研究者氏名□□教授 裴 秋玲

中国所属機関□□中国山西医科大学・公衆衛生学院

要 旨

中国やバングラデシュなどアジアの国では地下水のヒ素汚染が深刻化しており、その飲用によるヒトへの曝露と健康被害が大きな社会問題となっている。慢性ヒ素中毒で最も重大な問題はがんであるが、曝露期間は 20 数年を経過しており、本格的ながん発症の顕在化までにヒ素による発がんのメカニズム、リスク評価、予防対策などの研究が特に重要である。本研究では、ヒ素汚染地域の各家庭にある飲用井戸水を採集し、ヒ素濃度を解析した。該当地域住民を対象に、生活環境・居住歴・職歴に関するアンケートを行い、ヒ素曝露状況を解析した。ヒ素以外の発がんリスクとして飲酒・喫煙歴などに関するアンケートも併せて行った。また現地医院の協力を得て皮膚検診を行い、臨床試料（血液・尿）および臨床データを収集した。尿中のヒ素濃度と酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG 量を測定し、皮膚病理変化および生活習慣（喫煙、飲酒、外出習慣など）との関係を解析した。その結果、長期低濃度ヒ素曝露群では、尿中のヒ素濃度と 8-OHdG 量が高く、飲用地下水中のヒ素濃度と尿中 8-OHdG 量に高い相関性があることが明らかになった。ヒト皮膚細胞をヒ素含有培地中で長期培養したところ、細胞周期が G2/M と S 期にシフトして細胞増殖が促進するとともに、ソフトアガーにおけるコロニー形成率の上昇（足場依存性の低下）がみられた。またコロニー形成率上昇と相関して、がん幹細胞マーカーである CD44v6 の発現が上昇していた。このヒ素処理細胞をヌードマウスに接種したところ、腫瘍形成を確認した。以上のように、ヒ素曝露は、酸化的 DNA 損傷、がん幹細胞生成、細胞増殖、足場依存性の喪失を引き起こし、腫瘍形成能を獲得し、がん発症に関与する可能性が示された。

Key Words ヒ素、汚染、発がん、酸化ストレス、8-OHdG、腫瘍形成

緒 言

国際がん研究機関（IARC）は、ヒ素およびヒ素化合物がヒトへの発がん性に十分な証拠があるとしてグループ 1 と評価している。地下地層にヒ素が含まれる地域は世界各地に点在し、ヒ素の自然環境汚染・ヒトへの健康影響が深刻である。中国やバングラデシュなどアジアの国では地下水のヒ素汚染が深刻化しており、その飲用によるヒトへの曝露と健康被害が大きな社会問題となっている。Rodríguez-Lado L 氏は 2013 年 8 月に米サイエンス誌に中国では 2000 万人近くがヒ素に汚染された地下水を飲んでいるとの研究結果を発表した¹。高濃度のヒ素を含む水を飲み続けると慢性ヒ素中毒となり、皮膚の色素異常や角化症などの特徴的な症状のほか、消化器、泌尿器、循環器、神経などに非特異的な障害があらわれ、多彩な炎症疾患やがんの多発が見られる。高濃度ヒ素曝露者が、インド・バングラデシュ・ネパールで約 3500 万人と言われている。慢性ヒ素中毒で最も重大な問題はがんであり、曝露歴は 20 数年を経過中であり、本格的ながん発症の顕在化までにヒ素による発がんのメカニズム、リスク評価、予防対策などの研究が特に重要である。近年、地下水のヒ素汚染による大規模

な健康障害が中国、バングラデシュ、インドで報告され、一部の地域では安全な水供給の施策を行ってきた。しかし、安全な給水システムは飲料水が対象であり、野菜・食料の現地栽培生産には引き続きヒ素汚染地下水が使用されており、ヒ素汚染問題に対する根本的な解決はみられていない。そこで本研究では、中国山西省のヒ素汚染地域を中心に、ヒトへのヒ素曝露実態調査を実施し、ヒ素による健康障害の早期マーカーの解析を試みた。

実態調査は中国山西省において地下水のヒ素汚染がみられる地域にて行った。疫学調査および生体試料収集は、山西医科大学予防医学学院を拠点とし、山西医科大学の裴秋玲教授（毒理学講座主任）の協力を得て行った。実験・解析は鈴鹿医療科学大学で行った。

対象と方法

(1) ヒ素曝露状況に関する試料収集

中国山西省のヒ素汚染地域住民を対象に、生活環境・居住歴・職歴に関するアンケートを行い、各家庭にある飲用井戸水を採集した。またヒ素以外の発がんリスクとして飲酒・喫煙歴などに関するアンケートも併せて行った。

(2) ヒ素関連疾患患者の生体試料収集

インフォームド・コンセントの得られた住民を対象とし、現地医院の協力を得て皮膚検診を行い、臨床試料（血液・尿）および臨床データを得た。

(3) ヒ素濃度測定および中毒状況の診断

飲用水は原子吸光分析を行い、ヒ素濃度を測定した。尿は、クレアチニンを基準としてヒ素濃度および酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG 量を解析した。血液・皮膚組織は、病理染色・生化学分析を行い、ヒ素曝露・中毒状況・マーカーの解析を行った。赤血球膜タンパクである CD35 および band3 の抗体、また、8-ニトログアニンおよび酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG の抗体などを用いて、染色・測定を行い、赤血球膜タンパクの変化・DNA 損傷を解析した。

(4) 培養細胞・マウスを用いたヒ素曝露影響解析

ヒト正常上皮由来の不老化細胞株 HaCaT 細胞は微量ヒ素を含む培地中で長期培養し、ヒ素曝露による形質変化を解析した。また形質転換がみられた細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を確認した。

成果と考察

本研究では、ヒ素汚染地域に長期間居住し、出稼ぎなどによる非汚染地域への外出が少ない住民として、対象地域の女性 54 人を調査対象とした。対象者を飲用地下水のヒ素濃度によって 3 群に分類したところ、高ヒ素濃度群（ヒ素濃度 50.00 μ g/L 以上）は 15 人、中ヒ素濃度群（ヒ素濃度 30.00–50.00 μ g/L）は 19 人、低ヒ素濃度群（ヒ素濃度 10.00–29.00 μ g/L）は 20 人であった。また、飲用水にヒ素汚染が見られず、生活の経済的水準が同様である隣接村から、18 名の健康女性を対照群とし、比較解析を行った。その結果、低ヒ素濃度群においても、尿中のヒ素濃度と 8-OHdG 量が対照群に比べて有意に高いことが示された（表 1）。飲用地下水中のヒ素濃度と尿中 8-OHdG 量、および尿中ヒ素濃度と尿中 8-OHdG 量の間に高い相関性があることが明らかになった（図 1）。

表1: ヒ素曝露人群と対照人群の飲用水ヒ素、尿中ヒ素及び尿8-OHdG量の比較

組	n (人数)	水 (µg/L)	尿ヒ素 (µg/g Cr)	尿8-OHdG (ng/mg Cr)
対照群	18	<10	4.61±2.38	2.09±0.97
ヒ素曝露群	54	33.63±3.67*	24.05±6.61*	12.16±2.88*

* $P<0.05$.

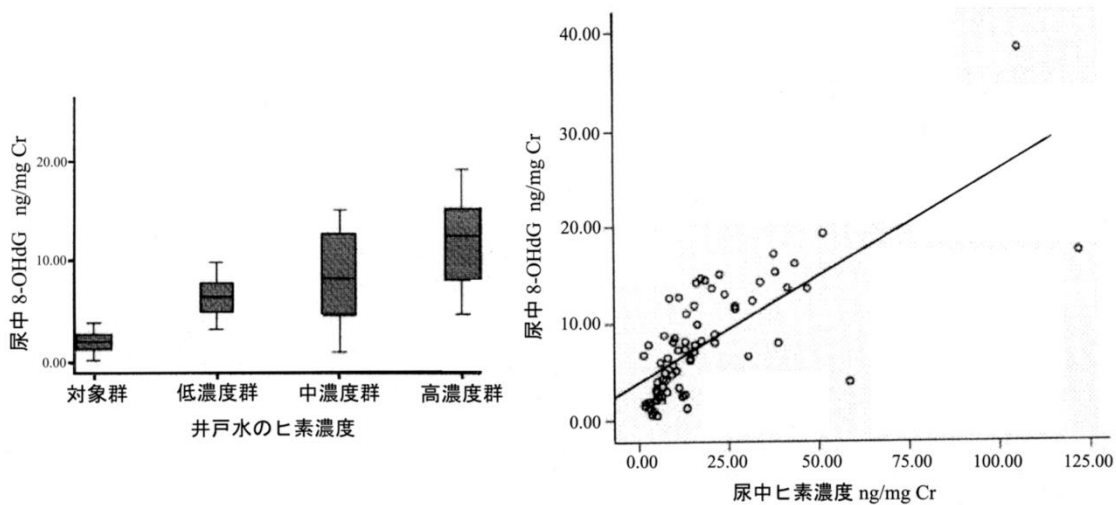


図1: 尿中8-OHdGと尿中ヒ素・井戸水のヒ素濃度の関係

尿中 8-OHdG と皮膚病理変化の程度との関係を解析したところ、飲用水中のヒ素濃度が高い群ほど皮膚色素脱失・沈着および角化など病理変化発生の上昇が観察された（図2、表2）。また、末梢血塗抹標本では多核白血球の核に 8-OHdG の強い免疫陽性反応を確認し、皮膚の病理損傷程度との関連性が高いことが明らかになった²。尿中ヒ素濃度の高い群で 8-OHdG 量が高かったことから、ヒ素曝露の高い住民は DNA 酸化損傷の可能性がある、ヒ素による発がんなどの毒性発現リスクが高いことが示唆された。



図2. 慢性ヒ素曝露住民にみられる角化症。

表2: 尿中 8-OHdGと皮膚損傷の関連性

8-OHdG濃度 (ng/mgCr)	各群の人数	皮膚損傷人数	皮膚損傷%
4.68 (低ヒ素濃度群)	18	7	38.9
7.94 (中ヒ素濃度群)	18	12	66.7
11.07(高ヒ素濃度群)	18	15	83.3

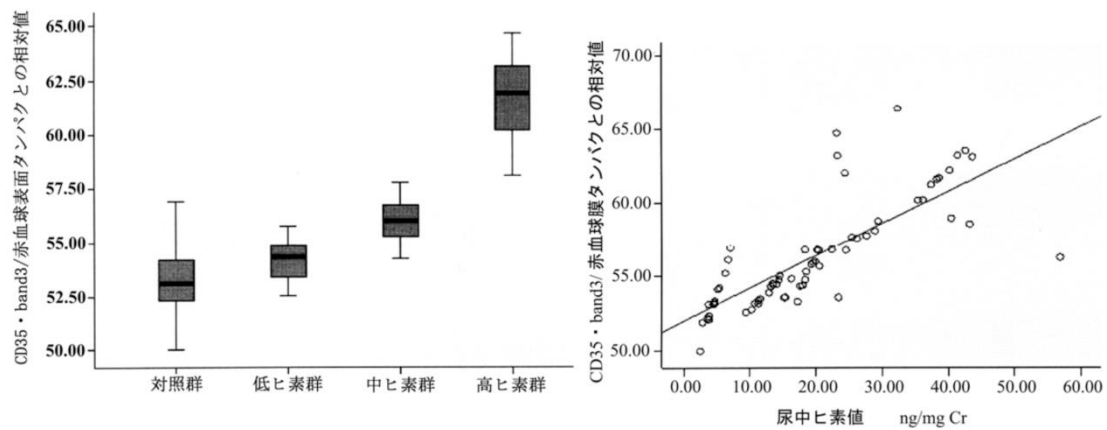


図3: 末梢血CD35・band3とヒ素濃度の関係

赤血球膜タンパク質に対する CD35 量および band3 量は、ヒ素曝露が高い群ほど有意に上昇していた ($P>0.05$) (図 3)。CD35 と band3 抗体を用いて、赤血球膜における CD35 と band3 の発現を解析したところ、中ヒ素濃度群で強い免疫反応を確認した (図 4)。

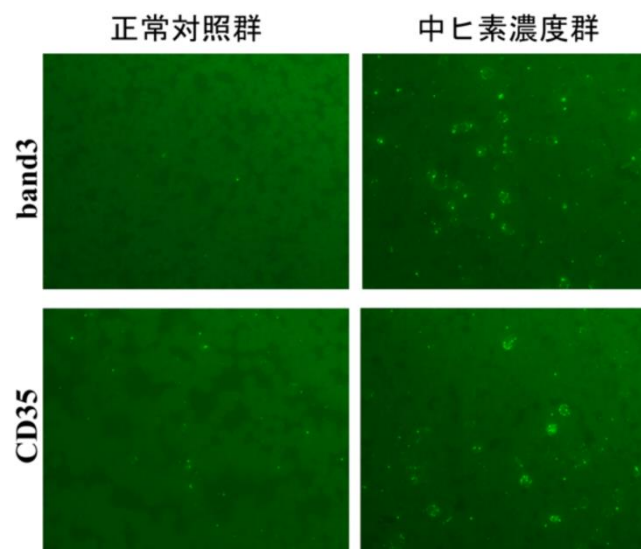


図 4: 末梢血の赤血球 CD35 と band3 免疫染色図。

慢性的なヒ素曝露により、ヒトの皮膚に扁平上皮がんを含む様々な障害を引き起こす。我々は、ヒト表皮角化細胞由来 HaCaT 細胞をヒ素 0.05ppm を含む培地中で 18 週間培養した後、ヌードマウスに接種することにより、腫瘍を形成させることに成功している。これは、ヒ素の低濃度長期曝露により、ヒト皮膚細胞が腫瘍形成能を獲得することを示しており、ヒ素発がんの解析に大変有用なモデルである。ヒ素処理細胞をソフトアガーを用いたコロニー形成法、FACS により解析し、また同細胞とマウス腫瘍組織について、幹細胞マーカー、がん抑制遺伝子 p53、転写因子 NF- κ B の発現をウェスタンブロット、免疫染色により解析した。ヒ素含有培地中で長期培養することにより、細胞周期が G2/M と S 期にシフトするとともに、細胞増殖の促進とソフトアガーにおけるコロニー形成率の上昇がみられ、足場依存性を失って異常増殖することが明らかとなった。またコロニー形成率上昇と相関して、がん幹細胞マーカーである CD44v6 の発現が上昇していた。ヒ素処理細胞をヌードマウスに接種して形成した腫瘍組織では、p53、NF- κ B および CD44v6 の発現が高く、NF- κ B の発現誘導を介した CD44v6 の発現が、ヒ素発がん重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、ヒ素曝露ヒト皮膚細胞においてがん幹細胞の増殖やがん抑制遺伝子が多く見いだされることを明らかにした³。今後は、これらをバイオマーカーとし、末梢血の赤血球膜タンパクマーカーである CD35 と band3 を組み合わせて解析することにより、慢性的な低濃度のヒ素曝露による皮膚がん発症の高精度なリスク評価を行い、がん予防・診断法の確立をめざす計画である。

参考文献：

1. Rodriguez-Lado L, Sun G, Berg M, Zhang Q, Xue H, Zheng Q, Johnson CA. Groundwater arsenic contamination throughout. China. Science. 2013 Aug 23;341(6148):866-868.
2. Pei Q, Ma N, Zhang J, Xu W, Li Y, Ma Z, Li Y, Tian F, Zhang W, Mu J, Li Y, Wang D, Liu H, Yang M, Ma C, Yun F. Oxidative DNA damage of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, selectively induced by chronic arsenic exposure, is associated with extent of arsenic-related skin lesions. Toxicol Appl Pharmacol. 2013 Jan 1;266(1):143-9.
3. Huang S, Guo S, Guo F, Yang Q, Xiao X, Murata M, Ohnishi S, Kawanishi S, Ma N: CD44v6 expression in human skin keratinocytes as a possible mechanism for carcinogenesis associated with chronic arsenic exposure. Eur J Histochem. 2013, Jan 14;57(1):e1

作成日：2014 年 3 月 10 日