

ヒ素化合物のラット赤血球への移行

前橋 浩, 山口由理子, 都筑新太郎

松本歯科大学 歯科薬理学教室 (主任 前橋 浩 教授)

Binding of Arsenic to Erythrocytes of Rats *in vivo* and *in vitro*

HIROSHI MAHASHI, YURIKO YAMAGUCHI and SHINTARO TSUZUKI

Department of Dental Pharmacology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. H. Maehashi)

Summary

In measuring the osmotic fragility of rat erythrocytes by centrifugation using coil planet centrifuge, it was found that arsenic trioxide given orally to rats caused a significant increase in the osmotic fragility. However, *in vitro* tests on the erythrocytes in which one ml of blood was incubated with arsenic trioxide equivalent to 2~500 μ g of arsenic at 37°C for 1 hr, no significant changes were observed. Monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid, known as metabolites of inorganic arsenic, induced no significant changes in the osmotic fragility *in vitro* tests on erythrocytes.

The arsenic concentration in erythrocytes was measured in the tests *in vitro* and *in vivo* using flameless atomic absorption spectrometry. When arsenic was given orally to rats, more than 90% of arsenic in whole blood was found in erythrocytes. However, *in vitro* tests, only 30.4~47.5% was detected on erythrocytes even after 6 hrs incubation. These results obtained in relation to arsenic concentration may explain the effect of the arsenic on the osmotic fragility of rat erythrocytes.

緒 言

三酸化ヒ素は経口投与によって、ラットの赤血球膜浸透圧抵抗を低下させることがCPC法を用いた実験によって示された¹⁾。しかし、ラットの血液に三酸化ヒ素を添加して、*in vitro*で膜抵抗に対する作用をみたが、その場合は何も変化は認

められなかった。そこで三酸化ヒ素の体内代謝物に膜抵抗を低下させるものがあるかどうかを *in vivo* 及び *in vitro* 実験を行って調べたが、ヒ素の体内代謝物²⁾といわれるヒ酸塩、モノメチルヒ酸塩、ジメチルヒ酸塩には膜抵抗に変化を生ずるものはなかった。ただヒ酸ナトリウムに極く軽度の膜抵抗の低下作用が認められたが三酸化ヒ素の作用には及ばないので、これらのことから三酸化ヒ素の膜抵抗の低下作用は、直接作用であろうと考

えられる⁶⁾。

ラットでは血中ヒ素の大部分は赤血球に含まれるといわれ、これが膜抵抗に低下をもたらす原因であると思われる。そこで今回は、*in vivo* 実験と *in vitro* 実験におけるヒ素の赤血球への移行についてヒ素の測定を行って、両者に差異があるかどうかを調べた。

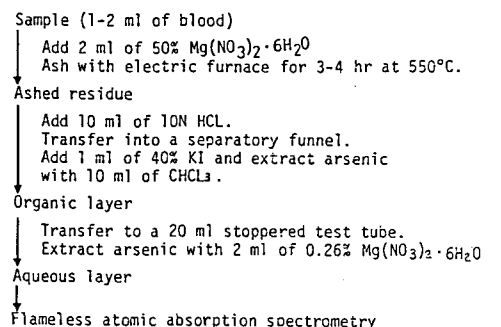
実験方法

1. *in vivo* 実験：ウィスター系ラットの雄(体重 200 g 前後)に後述する4種のヒ素化合物を、三酸化ヒ素の場合はヒ素として 15 mg/kg、他の化合物ではヒ素として 20 mg/kg を経口投与した。投与後5～6時間および24時間にエーテル麻酔下で心採血によって得た血液をヒ素測定の試料とした。

2. *in vitro* 実験：ウィスター系ラットの雄(体重 200 g 前後)からエーテル麻酔下で心採血によって得た血液の一定量にヒ素化合物をヒ素として 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように加え、直ちに37°C で1～6時間インキュベートした。インキュベーションの間は15～30分の間隔で血液を攪拌した。ヒ素の測定は1時間、3時間および6時間インキュベートした血液をそれぞれ試料として行った。

3. ヒ素の測定

in vivo 実験、*in vitro* 実験とも、試料とする血液を遠心(3000 rpm, 30分)して血漿と血球に分離し、血球は生理食塩水で2回洗浄した後、石崎および片岡³⁾の方法に従い Fig. 1 に示す方法で、硝酸マグネシウムを加えて電気炉で灰化した。灰化後塩酸に溶解し、これをクロロホルムで抽出し



(*Quoted from a monograph by Ishizaki and Kataoka³⁾.)

Fig. 1 : Flow chart for determination of arsenic in blood*

て、さらに硝酸マグネシウム液に逆抽出したものをフレイムレス原子吸光法によってヒ素量を測定した。測定条件は Table 1 に示す通りであり、島津 AA-640-13 型原子吸光分光分析装置およびグラファイトファーンネス・アトマイザー、GFA-3 を用いて測定を行なった。

4. ヒ素化合物

ヒ素化合物として三酸化ヒ素、 As_2O_3 (半井化学)、ヒ酸ナトリウム $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (半井化学)、モノメチルヒ酸ナトリウム、 $\text{Na}_2\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MMAA と略す) (Pfaltz & Bauer 社)、ジメチルヒ酸ナトリウム、 $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (DMAA と略す) (半井化学) を使用した。

Table 1 : Conditions for measurement.

Apparatus	: Shimadzu AA-640-13 B.G.C. -D ₂ Lamp Graphite Furnace Atomizer (GFA-3)
Light source	: Hamamatsu hollow cathode lamp of As
Wave length	: 197.2 nm
Lamp current	: 6 mA
Ar gas	: 1.5 l/min.
Drying	: 150°C, 20s
Ashing	: 700°C, 20s
Atomizing	: 2400°C, 5s

実験結果

三酸化ヒ素は 20 mg/kg の経口投与では24時間までに死亡するラットがあらわれたので、これのみ 15 mg/kg を投与し、他のヒ素化合物は 20 mg/kg を投与した。4種のヒ素化合物を投与した後の血中濃度は Table 2 に示すように三酸化ヒ素が投与量が少ないにもかかわらずもっとも高かった。24時間後の値は、三酸化ヒ素投与群はヒ酸ナトリウム投与群と大差はなかったが、他の2種のメチル化ヒ素と比較して2～4倍も高かった。いずれの投与群もヒ素は5～6時間後で90%以上、24時間後には99%以上が血球に検出された (Table 2, Fig. 2)。これに対し *in vitro* 実験における血球への移行をみると、インキュベーションの時間とともにヒ素の血球への移行は増加するが、6時間後でも MMAA 群の47.5%がもっとも多く血球に検出された例であった (Table 3, Fig. 3)。このように *in vitro* 実験と *in vivo* 実験でヒ素の血球への移行に大きな差異が認められた。

Table 2 : Arsenic concentration in blood of rats (in vivo tests^{a)})

(μg/ml of blood and concentration % in whole blood)

Arsenic compound (dose)	No. of rat	5-6 hr ^{b)}		24 hr ^{b)}
Arsenic trioxide (15 mg/kg)	4-5	Plasma	0.27±0.06 0.70%	0.04±0.04 0.03%
		Red blood cell	38.05±1.00 99.30%	114.20±3.92 99.97%
MMAA ^{c)} (20 mg/kg)	3	Plasma	0.38±0.24 1.89%	0.13±0.11 0.26%
		Red blood cell	19.70±4.53 98.11%	28.30±3.79 99.54%
DMAA ^{d)} (20 mg/kg)	5	Plasma	1.35±1.52 2.13%	0.29±0.23 0.50%
		Red blood cell	20.33±6.72 93.77%	58.33±7.41 99.50%
Sodium arsenate (20 mg/kg)	3	Plasma	0.61±0.08 2.13%	0.27±0.10 0.31%
		Red blood cell	28.00±6.87 97.87%	87.33±16.88 99.69%

a) Arsenic compounds were given orally to rats. b) Time after administration.
c) Monomethylarsonic acid. d) Dimethylarsinic acid.

Table 3 : Arsenic concentrations in blood of rats (in vitro tests^{a)})

(μg/ml of blood and concentration % in whole blood)

Arsenic compound	No. of sample	1 hr ^{b)}		3 hr ^{b)}	6 hr ^{b)}
Arsenic trioxide	4	Plasma	75.40±6.82 73.7%	67.28±6.32 71.2%	60.65±7.30 69.6%
		Red blood cell	26.33±3.34 26.3%	27.28±6.65 28.8%	30.00±8.14 30.4%
MMAA ^{c)}	4	Plasma	64.50±2.96 76.2%	57.75±1.79 62.0%	49.50±8.34 52.5%
		Red blood cell	20.75±9.45 23.8%	37.50±15.30 38.0%	44.50±13.80 47.5%
DMAA ^{d)}	3	Plasma	78.67±4.01 79.6%	60.33±3.27 61.1%	71.00±25.02 66.4%
		Red blood cell	20.17±0.51 20.4%	38.42±1.45 38.9%	33.50±2.21 40.2%
Sodium arsenate	3	Plasma	75.67±1.15 79.4%	63.67±6.96 62.9%	60.00±0.82 59.7%
		Red blood cell	19.67±0.24 20.6%	37.33±2.32 37.1%	40.58±2.04 40.3%

a) One ml of blood was incubated with arsenic compound equivalent to 100μg of As 37°C for 1-6 hr. b) Incubation time. c) Monomethylarsonic acid. d) Dimethylarsinic acid.

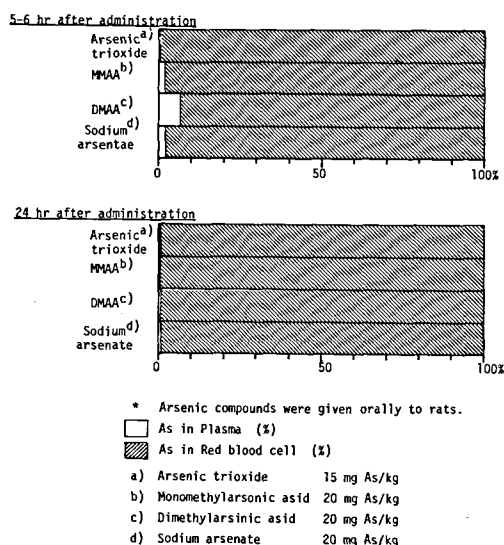


Fig. 2 : Distribution of arsenic in blood of rats (in vivo tests*)

考 察

4種のヒ素化合物を経口投与し、5～6時間後および24時間後に血中濃度を測定した結果、いずれも総血中ヒ素量の90%以上が血球に含まれていた。このうち三酸化ヒ素投与群は投与量が少ないにもかかわらず、もっとも高い血中濃度を示し、ヒ酸ナトリウム投与群はこれに次ぐ血中濃度となった。MMAAやDMAA投与群では低い血中濃度であった。これら4種のヒ素化合物の吸収、排泄を相互に比較した報告はみあたらないが、無機ヒ素投与群とメチル化ヒ素投与群の血中濃度の差は5～6時間ですでにあらわれているので、恐らくメチル化ヒ素の吸収は少なかったとみられる。これらの化合物の毒性については三酸化ヒ素がもっともつよく、ヒ酸ナトリウムがこれに次ぎ、メチル化ヒ素の毒性は低い。このようなことと今回示された血中濃度とはよく相関していると思われる。

in vitro におけるヒ素の血球への移行は in vivo と比較すると極めて低く、6時間のインキュベーションでも MMAA 群がもっとも多かったが、それでも総血中ヒ素量の47.5%が赤血球に検出されたにすぎなかった。インキュベーション1時間値と6時間値を比較しても約2倍の増加にす

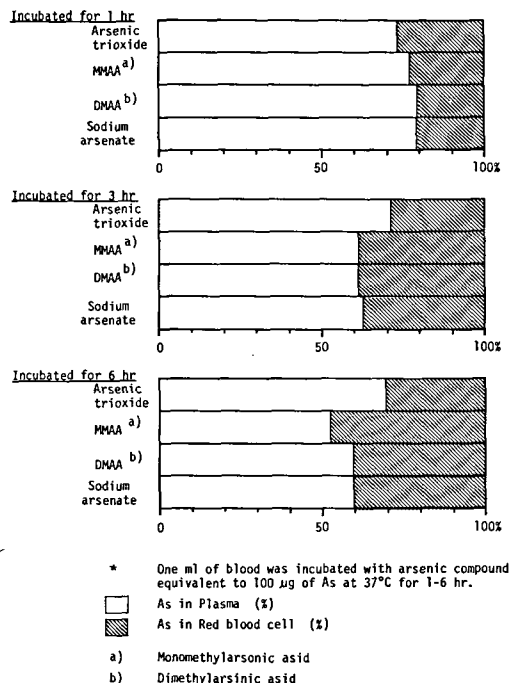


Fig. 3 : Distribution of arsenic in blood of rats (in vitro tests*)

ぎず、インキュベーション時間の延長による血球への移行の増加はあまり期待できない。

ヒト血液を用いた実験ではあるがメチル水銀について in vitro 実験を行った例⁵⁾ではインキュベーション15分ですでに90%以上が赤血球へ取り込まれたという。このようなことから、ヒ素の場合 in vivo における血球移行には特別なしくみが存在するのかもしれない。

Vahter⁴⁾はラットおよびマウスの血液を用いて、3価ヒ素As(III)と5価ヒ素As(V)の in vitro における血球への移行を調べている。それによると、1時間のインキュベーションでラットの場合、As(III)が57%に対しAs(V)は7%、マウスでもAs(III)が52%に対しAs(V)は11%とラットとマウスとの間にヒ素の血球移行率に差はなかった。しかしAs(V)の移行率が著者らの成績と比較して著しく低い。この実験ではヒ素の添加量が記されていないので、著者らの成績との相違の理由はわからない。しかしいずれにしても in vitro におけるヒ素の血球への移行が少ないことを示しているといえる。

石崎²⁾によると赤血球に見いだされたヒ素は大部分が血球内にあり、膜にはあまり検出されなかったという。したがってヒ素が血球膜を通過する過程で膜酵素に何らかの作用を及ぼし、膜抵抗の低下をもたらすと考えられる。in vivo 実験と in vitro 実験において三酸化ヒ素の赤血球膜浸透圧抵抗の低下作用に一致した成績が得られなかったのは、ヒ素化合物の赤血球への移行のしくみに関して両者に質的な違いがあるのかもしれない。

ま と め

三酸化ヒ素、ヒ酸ナトリウム、モノメチルヒ酸ナトリウム、ジメチルヒ酸ナトリウムの4種のヒ素化合物についてラット赤血球への移行を in vivo および in vitro 実験を行って調べた。その結果、in vivo 実験においては、ヒ素は経口投与5～6時間後で血中総ヒ素量の90%以上、24時間後では99%以上が赤血球に検出されたのに対し、in vitro 実験では6時間のインキュベーションに

よって30.4%～47.5%が血球に移行したにすぎなかった。

文 献

- 1) Crecelius, E. A. (1977) Changes in the chemical speciation of arsenic following injection by man. Environ. Health Perspect. 19: 147—150.
- 2) 石崎睦雄 (1980) ヒ素化合物の生体内動向について。日衛誌, 35: 584—596.
- 3) 石崎睦雄, 片岡不士雄 (1977) 炭素管アトマイザー無炎原子吸光法による血中ヒ素の分析法。産業医学, 19: 136—137.
- 4) Vahter, M. (1981) Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. Environ. Res. 25: 286—293.
- 5) 佐野憲一, 山口誠哉, 下條信弘, 広田良夫 (1981) in vitro 実験による正常人血液中での水銀の血漿, 赤血球への分布, 日衛誌, 36: 483.
- 6) 都筑新太郎, 山口由理子, 前橋 浩, 徳植進 (1980) ヒ素化合物による赤血球膜浸透圧抵抗の変化。松本歯学, 6: 173—178.