HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Arsenic speciation of arsine-exposed blood samples by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and As-adduct, a possible indicator of ASH3 exposure

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 東川, 佳靖 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1957

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第　４６６号	学位授与年月日	平成 21 年 6 月 19 日
氏　　名	東　川　佳　靖		
論文題目	Arsenic speciation of arsine-exposed blood samples by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and As-adduct, a possible indicator of ASH3 exposure （アルシン曝露血液試料の高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計によるヒ素化学形態別分析とアルシン曝露の指標物質となるヒ素付加体）		

博士（医学） 東 川 佳 靖

論文題目

Arsenic speciation of arsine-exposed blood samples by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and As-adduct, a possible indicator of AsH_3 exposure

（アルシン曝露血液試料の高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計によるヒ素化学形態別分析とアルシン曝露の指標物質となるヒ素付加体）

論文の内容の要旨

［はじめに］

アルシン（AsH_3）は、毒物及び劇物取締法により毒物に指定される無色の気体である。金属の酸処理または精錬時に不純物であるヒ素から発生する AsH_3 ガスを吸引するといった中毒事故が散見されている。吸引後数時間以内に起こる溶血は、AsH_3 中毒症状の特徴となっているものの、そのメカニズムについては完全には解明されていない。また、AsH_3 吸引後の尿中代謝物に関する報告はあるが、ヒトの血液中ヒ素化合物の化学形態に関しては、十分な検討はなされていない。

ヒ素化合物は、自然界においても広く存在し、その化学形態により毒性が大きく異なる。食餌を介して毒性の低いヒ素化合物を日常的に摂取する場合もあるため、生体試料から中毒状態の判定を行うには、ヒ素の化学形態別分析が不可欠である。

本研究では、急性中毒状況を想定した AsH_3 添加血液を作製し、高速液体クロマトグラフ－誘導結合プラズマ質量分析装置（HPLC-ICP-MS）を用いて血液中ヒ素化合物の化学形態別分析を行った。

［実験材料ならびに方法］

試薬：モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、トリメチルアルシンオキシド及びテトラメチルアルソニウムは、トリケミカル研究所製のものを用い、ヒ素標準液（1,000 mgAs/L）には、和光純薬工業の JCSS 認定品を用いた。三酸化二ヒ素、ヒ酸水素二ナトリウム七水和物、その他の試薬については、いずれも和光純薬工業の特級品及び特級相当品を用いた。

添加実験用の血液は、AsH_3 や亜ヒ酸に曝露されていない健常人から採取し、ヘパリン処理したものを用いた。

操作：AsH_3 添加血液試料の作製は、日本工業規格 K0102-1998 の 61.1 ジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法に記載する装置及び操作法を参考にして行った。すなわち、水素化ヒ素発生瓶から発生する AsH_3 ガスで血液 5 mL を 10 分間バブリングし、室温（23 ℃）下で 90 分間静置させたものを添加血液試料とした。

血球成分と血漿成分との分離は、約 1,600×g で 10 分間遠心分離して行った。

試料の除タンパク操作には、東ソー製 ULTRACENT-10（分画分子量：10 kDa）限外ろ過カートリッジを用いた。ろ液及び試料溶液は、Milli-Q 水で適宜希釈して分析に供した。

ヒ素の化学形態別分析には、アジレントテクノロジー社製の Agilent 1100 型 HPLC と Agilent 4500 plus 型 ICP-MS をオンラインで接続した装置を用いた。

［結果及び考察］

血液は、AsH_3 添加直後では溶血を認めなかったが、室温下 90 分間静置後には、一部溶血を認めた。これは、急性中毒患者の症状と一致した現象であった。AsH_3 の水に対する溶解度は約 0.7 g/L と低く、血液に対する AsH_3 の吸収量は不明であるが、吸収された AsH_3 が赤血球に作用して溶血を引き起こしたものと考えられる。

AsH_3 添加血液試料の血漿画分について、ヒ素の化学形態別分析を行った結果、亜ヒ酸（AsⅢ）のほかに保持時間 1.1 分付近で未同定ヒ素化合物が検出された。この血漿画分を限外ろ過したところ、未同定ヒ素化合物は消失し、AsⅢのみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は分子量 1 万程度以上の物質であると推定された。ここで検出された AsⅢは、AsH_3 の酸化分解物であると考えられる。

次に、未同定ヒ素化合物の由来を検討するために、ブランク血液の血漿画分について、同様に AsH_3 を添加して化学形態別分析を行った。その結果、未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、未同定ヒ素化合物は血漿成分ではなく、血球成分に由来することが示された。

さらに、AsⅢが未同定ヒ素化合物の生成に関与するかを検討するため、ブランク血液に AsⅢを添加し、室温下 90 分放置後の血漿画分について分析を行った。その結果、溶血は認められず、AsⅢのみを検出し未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、血漿成分及び AsⅢは未同定ヒ素化合物の生成に関与しないものと考えられた。

また、蒸留水で予め溶血させたブランク血液に AsⅢを添加し、血漿画分を分析した結果、AsⅢのみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は AsⅢと血球由来成分とが反応したものではないことが示された。

以上の結果を総合すると、AsH_3 添加により生じた未同定ヒ素化合物は、血球に由来する分子量 1 万程度以上の成分にヒ素化合物が付加したものであり、血漿成分及び AsH_3 の分解物である AsⅢは、未同定ヒ素化合物の生成に関与しないことが示唆された。最近、AsH_3 を in vitro で添加してもヘモグロビン及びグロビン鎖とはヒ素付加体を生じないとの報告がある。今回検出された未同定ヒ素化合物の由来を特定するにはさらに検討する必要があるが、本化合物は血液試料から急性 AsH_3 中毒を判定する際の指標の一つになると思われる。

［結論］

AsH_3 添加血液試料を作製し、その血漿画分に含まれるヒ素化合物を HPLC-ICP-MS により分析したところ、未同定ヒ素化合物が検出された。これは、分子量 1 万以上の血球由来成分にヒ素化合物が付加したものであり、血液試料から急性 AsH_3 中毒を判定する指標の一つになると考えられた。

論文審査の結果の要旨

アルシン（AsH_3）は毒物及び劇物取締法により毒物に指定される無色の気体であり、亜鉛、銅、カドミウムなどの非鉄金属の精錬時に、これらの金属に不純物として含まれる微量のヒ素が酸との反応によって危険量の AsH_3 を生成することがあり、AsH_3 中毒を予測できない場合が多い。実際、工場における作業従事者の AsH_3 ガス吸入による死亡事故が報告されている。AsH_3 中毒では吸入後数時間以内に起こる溶血が特徴的であるが、そのメカニズムについては解明されていない。

これまで、AsH_3 吸入後の尿中代謝物の分析に関して幾つかの報告があるが、ヒト血液中のヒ素化合物の分析、特に化学形態別分析に関する報告はない。ヒ素化合物は様々な化学形態で自然界に広く存在し、その毒性も化学形態に依存する。食餌を介してヒ素化合物を摂取することもあるため、生体試料から中毒状態の判定を行うにはヒ素化合物の化学形態別分析が不可欠である。

申請者は，急性中毒症状を想定した AsH_3 添加血液試料を作製し、高速液体クロマトグラフィー－誘導結合プラズマ質量分析法（HPLC-ICPMS）を用いて血液中ヒ素化合物の化学形態別分析を行い、興味深い知見を得た。

ヒト血液に AsH_3 発生装置を用いて AsH_3 を添加した直後では溶血が認められなかったが、90 分静置後に一部溶血が認められた。これは、急性中毒患者の症状と一致した現象である。

AsH_3 を全血試料に添加した後に遠心分離して得られた血漿画分についてヒ素化合物の HPLC-ICPMS 分析を行った結果、亜ヒ酸（As（Ⅲ））のピークの前にヒ素化合物（保持時間 1.1 分、以後、未同定ヒ素化合物という）のピークが検出された。この血漿画分を限外ろ過膜（分画分子量 10 kDa）で処理すると、As（Ⅲ）の前のピークは消滅し、As（Ⅲ）のみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は分子量 1 万程度以上の物質であると推定された。ここで検出された As（Ⅲ）は AsH_3 の酸化によって生じると考えられた。

次に、血液の血漿画分のみに AsH_3 を添加して HPLC-ICPMS により化学形態別分析を行った。その結果、全血試料に AsH_3 を添加したときに見られた未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、未同定ヒ素化合物は血漿成分ではなく、血球成分に由来することが示された。

さらに、As（Ⅲ）が未同定ヒ素化合物の生成に関与しているかを調べるために、全血試料に As（Ⅲ）を添加し、室温下 90 分放置後の血漿画分について分析を行った。その結果、全血試料に As（Ⅲ）を添加しても溶血は認められず、HPLC-ICPMS 分析では As（Ⅲ）のみが検出され、未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、血漿成分及び As（Ⅲ）は未同定ヒ素化合物の生成に関与しないものと考えられた。

また、蒸留水を用いてあらかじめ溶血させた血液に As（Ⅲ）を添加し、血漿画分を HPLC-ICPMS 分析した結果、As（Ⅲ）のみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は As（Ⅲ）と血球由来成分が反応して生じたものではないことが示された。

以上の結果から、AsH_3 添加により生じた未同定ヒ素化合物は、血球に由来する分子量 1 万程度以上の成分にヒ素化合物が付加したものであり、血漿成分及び AsH_3 の酸化物である As（Ⅲ）は未同定ヒ素化合物の生成に関与しないことが示唆された。本研究で検出された未同定ヒ素化合物の由来を特定するにはさらに詳細な検討が必要であるが、審査委員会では血液試料の HPLC-ICPMS 分析により発見された未同定ヒ素化合物が不測の事故において発生した急性 AsH_3 中毒を判定する際の重要な指標になり得ることを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

1) 未同定ヒ素化合物の経時変化
2) 研究結果から予想される未同定ヒ素化合物の化学的性質について
3) 未同定ヒ素化合物を同定するために考えられる分析方法について
4) ヒ素化合物の HPLC 分離機構について
5) HPLC 溶離液の最適化と溶質の電荷について
6) ICPMS の *m/z* の選択について

7) 化学形態別分析に HPLC-MS を適用した場合との比較について
8) ICPMS と ICP 発光分析法の感度比較について
9) ICP イオン化の特徴について
10) AsH_3 中毒の判定が必要とされる事態について
11) HPLC-ICPMS の分析値の再現性について
12) As（Ⅲ）が AsH_3 の酸化生成物と考えられる理由について
13) ヒ素化合物の化学構造と化学形態による毒性の違いについて
14) AsH_3 中毒の過去の事故例について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　　藤本　忠蔵
　　副査　　梅村　和夫　　副査　　瀬藤　光利