

## 無機ヒ素の胸腺に対する *in vivo* 急性毒性

櫻井 照明, 藤原 祺多夫

(東京薬科大学・生命科学部・環境衛生化学研究室\*)

### Evaluation of *in vivo* acute thymus-toxicity of inorganic arsenite using murine models

Teruaki SAKURAI, and Kitao FUJIWARA

Laboratory of Environmental Chemistry, School of Life Science,

Tokyo University of Pharmacy and Life Science

It has been well known that inorganic arsenicals are potent toxicants and carcinogens in humans and most animals. However, immunotoxic effects of them have not been well studied. In this study, we observed *in vivo* acute immunotoxicity of an inorganic arsenical, sodium arsenite, using murine models. Sodium arsenite was administered intraperitoneally into male CDF<sub>1</sub> mice aged 4 weeks at doses of 1.25–8.0 mg/kg (body weight) on day 0, and the effect of arsenite on thymus of these mice was assessed until day 8. As results, a half numbers of mice were died when 8 mg/kg of arsenite were administered. The mice body weights were decreased significantly by arsenite in a dose dependent manner at doses of 1.25–4.0 mg/kg on days 1–2, and it returned to the control level on day 4. Administered arsenite was distributed into thymus; the maximum arsenic concentrations were detected on day 1 and they dropped slowly to the control level during 8 days. The thymus weight was significantly decreased by arsenite at doses of 4 mg/kg on days 1–4, and they returned to the control levels on day 8. 4-mg/kg arsenite also decreased significantly the numbers of thymocytes of mice temporarily on day 1. Furthermore, the thymocyte blastogenesis of these mice was significantly inhibited by 4 mg/kg arsenite on day 1. Taken together, arsenite has significant *in vivo* immunotoxicity both quantitatively and qualitatively on thymus, and the thymus is one of very sensitive immune organs to arsenic inhalations.

近年、アジアの未開発地域において、ヒ素が混入した地下水などの摂取による慢性ヒ素中毒が大きな社会問題となっている<sup>1)</sup>。慢性ヒ素中毒の中期では炎症症状が高い頻度で観察される事が良く知られる<sup>2)</sup>。炎症は慢性ヒ素中毒の最終的な症状である発癌の中間段階として位置付けられており、ヒ素が患者の免疫機構に何らかの影響を与えている事を示唆する。しかし、ヒ素摂取が免疫系にどのような影響を与えるのか、その詳細は殆ど明らかにされていない。今回我々は、マウスに無機ヒ素を腹腔内投与する *in vivo* 急性免疫毒性モデルを用い、化学物質の影響を受け易い免疫臓器である胸腺に、ヒ素が *in vivo* でどのような影響を及ぼすのか検討した。

#### 実験方法

亜ヒ酸ナトリウム (arsenite; NaAsO<sub>2</sub>) は市販されているものを2回再結晶処理して用いた。GC/MS及びTLCにより純度は99.9%以上であることを確認し、またリムルテストにより endotoxin は検出されないことを確認した。マウスは

\*所在地：東京都八王子市堀之内1432-1 (〒192-0392)

SPF環境下で飼育した4週齢の雄性CDF<sub>1</sub>マウスを使用した。胸腺中の総ヒ素量は、胸腺を硫酸処理した後、原子吸光法(AAS)で測定した。胸腺細胞の機能は、ヒ素投与後にマウスから既報に準じて胸腺細胞を採取し、幼若化反応を測定する事で評価した<sup>3)</sup>。

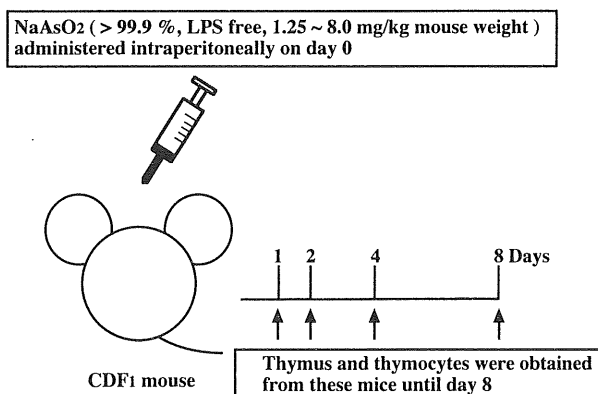


Fig. 1 Administration schedule of arsenite.

### 結果と考察

マウスの体重1 kg当たり1.25~8.0 mgのarseniteを単回腹腔内投与したところ、8.0 mg/kgの投与量では翌日までに約半数のマウスが死亡したが、4.0 mg/kg以下の投与量では、投与後16日目まで全てのマウスが生存した。マウスの体重はarseniteの濃度(1.25~4.0 mg/kg)依存的に、投与後1日目から2日目にかけて、生理食塩水のみを腹腔内投与したcontrol群に比べて有意に減少し、4日目にcontrolレベルに戻った。以上の結果を踏まえ、以降の実験はarsenite 4.0 mg/kgを単回腹腔内投与する実験系を用いて行った。

Arsenite 4.0 mg/kgを単回腹腔内投与したところ、投与後1日目をピークとして胸腺におけるヒ素濃度の増加が観察され、その後徐々に減少した。しかし投与後8日目においてもcontrol群に比べて高いヒ素濃度が維持されていた。

胸腺重量は、arsenite投与後1日目から4日目にかけて減少し、8日目にcontrolレベルに戻った。胸腺細胞の数はarseniteの投与後1日目に一時的に減少したが、2日目にはcontrolレベルに戻った。また、arsenite 4.0 mg/kgの単回腹腔内投与は、投与後1日目における胸腺細胞の幼若化反応を有意に抑制した。

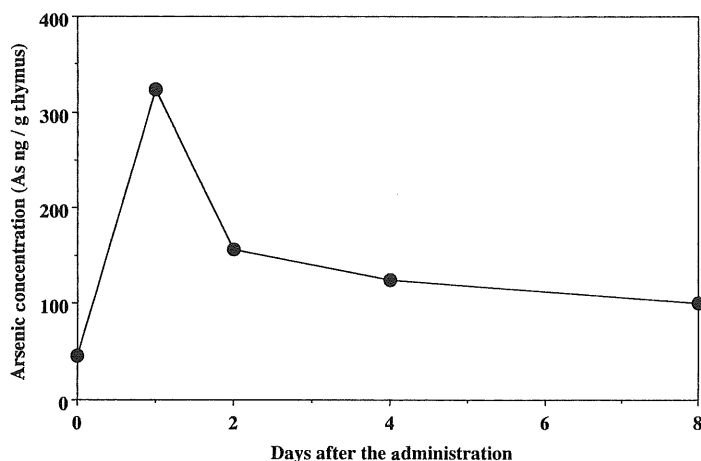
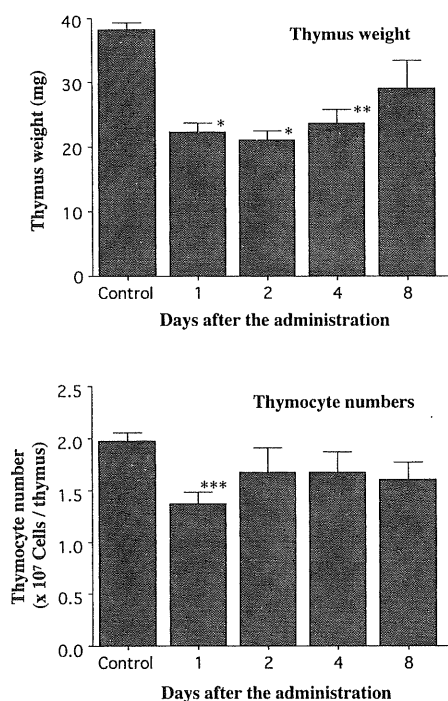


Fig. 2 The time course of arsenic distribution in mouse thymus after the intraperitoneal administration of arsenite. Arsenite (4.0 mg/kg) was administered intraperitoneally into CDF<sub>1</sub> mice on day 0, and the arsenic concentrations of thymus of these mice were observed by AAS until day 8.



**Fig. 3** Effect of arsenite administered intraperitoneally on the thymus weights and the thymocyte numbers of mice. Arsenite (4.0 mg/kg) was administered intraperitoneally into CDF<sub>1</sub> mice on day 0, and the thymus weights and the thymocyte numbers of these mice were assessed until day 8. \* $p < 0.001$  compared with the control mice which were treated with saline alone ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.05$ .

**Table 1** Effect of arsenite administered intraperitoneally on the thymocyte blastogenesis of mice

Arsenite treatment	Reagents	Thymocyte blastogenesis [% Absorbance (% Control) ]
-	-	100.0 ± 7.3
-	+ Con A	210.3 ± 34.9
+	-	54.7 ± 11.2*
+	+ Con A	175.1 ± 79.9

Arsenite (4.0 mg/kg) was administered intraperitoneally into CDF<sub>1</sub> mice on day 0, and the thymocyte blastogenesis of these mice were assessed on day 1. \* $p < 0.05$  compared with the control mice which were treated with saline alone ( $n = 3$ ).

以上より、高濃度の無機ヒ素を一度に全身的に投与（腹腔内投与）した場合、ヒ素は胸腺などのsystemic immune siteに一時的に分布し、その免疫機能を抑制した後、速やかに排出される事が明らかとなった。もう一つの主要なsystemic immune siteである脾臓でも同様の急性免疫毒性が示された<sup>4)</sup>。しかしパイエル板、肺、骨髄など他の免疫臓器では、投与されたヒ素がそれらの臓器に移行したにも関わらず、著名な免疫毒性は観察されなかった<sup>4)</sup>。これらの結果は免疫臓器の種類によりヒ素の影響を受け易い臓器と、受け難い臓器のある事を示唆した。しかし、今回行った急性免疫毒性実験系では、単純な臓器（細胞）毒性は観察できるが、慢性ヒ素中毒患者で観られる様な炎症症状は観察し難い。今後は今回の研究結果を踏まえ、低濃度の無機ヒ素を複数回投与する実験モデルや、経口投与の実験モデルなどで同様の検討を行い、慢性ヒ素中毒の発症過程における免疫機構の変化を*in vivo*の実験系で適格に把握する必要があると思われる。

## 文 献

- 1) 櫻井照明 (2001) Arsenic Letter 6 : 10.
- 2) Sakurai, T (2002) Biomed. Res. Trace Elements 13: 167.
- 3) Sakurai, T, Fujiwara K (2001) Br. J. Pharmacol. 132: 143.
- 4) 櫻井照明, 落合将之, 小島力, 太田宇海, 藤原禎多夫 (2002) Biomed. Res. Trace Elements 13 : 264.