

主論文の要旨

Oral exposure to arsenic causes hearing loss in young people aged 12-29 years and in young mice

〔ヒ素の経口曝露は12-29歳の若年者と若年マウスの難聴を誘発する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
社会生命科学講座 環境労働衛生学分野

(指導：加藤 昌志 教授)

李 香

【緒言】

ヒ素 (As) に汚染された井戸水の飲水により誘発される健康リスクが世界中で問題となっている。過去の疫学研究によると、As汚染地域で生活する10歳の子供は、非汚染地域の同年齢の子供と比較して、難聴の発症リスクが高い事が単変量解析により示されている。過去の実験研究では、モルモットにAsを2ヶ月間腹腔内投与すると、内耳コルチ器の形態異常が誘発される事が報告されている。しかしながら、ヒトやマウスにおいて、Asの飲水曝露が難聴を誘発するか報告されていない。また、Asの飲水曝露により内耳にAsが蓄積するか分かっていない。

本研究は、若年者を対象にした疫学研究と若年マウスを対象にした実験研究を実施し、Asの飲水曝露により難聴が誘発されるか解析した。

【方法】

疫学研究では、12-29歳のバングラデシュの健常者を対象に (Table 1)、水道水 (Asレベル: $0.6 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$) を飲料水として使用している被検者を対照群 ($n = 29$) とし、20.6, 53.8, 221.0 and 22.2 $\mu\text{g/L}$ のAs濃度の汚染井戸水を飲料水として共用している被検者を曝露群 ($n = 48$) とし以下の測定を実施した。純音聴力検査、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いた生体サンプル中のAsレベルの測定、アンケート調査を実施した。本研究では、8と12 kHzの聴力レベルが環境因子に影響される事が報告されている事から、1と4 kHzに加えて8と12 kHzの聴力レベルも測定した。ICP-MS測定により得られた生体サンプル中のAsレベルと聴力レベルの相関を解析した。多変量解析では、聴力異常の有無を従属変数、Asレベルを独立変数としてロジスティック回帰分析を行い、年齢、喫煙歴等を交絡因子として調整オッズ比を算出した。解析ソフトはJMP Pro (version 11.0.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

実験研究では、1ヶ月齢のマウス (hairless mice having C57BL/6J background; Hoshino Laboratory Animal, Inc.) を対象に以下の実験を実施した。Asを22.5 mg/Lの投与量で2ヶ月間曝露した。曝露前後で聴性脳幹反応 (ABR) 測定を行い、聴力を評価した。内耳のAs蓄積量は、曝露後に採取した内耳を上述の方法で灰化し、ICP-MSを用いて測定した。

コルチ器の器官培養では、生後4-6日のC57BL6/J系統のマウスから内耳を採取し、実体顕微鏡下で骨包を取り除いた後に、DMEM培地 (low glucose, 10% FBSと10 $\mu\text{g/mL}$ のampicillinを添加) にて培養した。曝露群では、0.3 $\mu\text{g/mL}$ のAsを培地に添加して2-3日間曝露した。曝露後に、ラセン神経節と軸索は抗neurofilament-200抗体を用いた免疫染色で検出し、有毛細胞はファロイジン染色により検出し、陽性細胞数をカウントした。

【結果】

若年者を対象にした疫学研究により、曝露群のツメ、毛髪、および尿中のAsレベル

は、対照群と比較して有意に高値を示す事が分かった(Figure 1)。曝露群の聴力レベルは対象群と比較して有意に4、8、12 kHzの聴力レベルが低下した (Figure 2)。多変量解析では、対照群と比較して曝露群の4 kHzの聴力異常の調整オッズ比は7.60 (95% 信頼区間: 1.56, 57.88)、8 kHzの聴力異常の調整オッズ比は5.00 (95% 信頼区間: 1.48, 18.90)、12 kHzの聴力異常の調整オッズ比は8.72(95% 信頼区間: 2.09, 47.77) で有意であった (Table 2)。

次に、疫学研究で得られた結果を検証する為に、マウスを対象にAs飲水曝露実験を行った。その結果、曝露前は両群とも同等の聴力レベルであったが、曝露後の曝露群では、対象群と比較して、4、12、20、および32 kHzの聴力レベルが有意に低下した (Figure 3)。また、曝露群の内耳のAs蓄積量は0.3 $\mu\text{g/g}$ を示し、対象群と比較して有意に増加した (Figure 4)。

最後に、*in vivo*曝露実験で得られた内耳のAs蓄積レベルと同等の0.3 $\mu\text{g/mL}$ の用量で内耳コルチ器を対象に*ex vivo*曝露実験を行った。曝露2日後と3日後において、有毛細胞の数に変化は観られなかったが、曝露群の聴神経繊維とラセン神経節の数は対照群と比較して有意に減少した (Figure 5)。

【考察】

世界中の多くの人々が飲用井戸水の As 汚染による健康被害に直面しており、As の飲水曝露による健康リスク評価の構築は急務である。若年者を対象にした我々の疫学研究において、As の飲水曝露群では難聴のリスクが有意に高い事が、年齢や喫煙歴などの交絡因子で調整した多変量解析により明らかになった。また、若年マウスを対象にした実験研究により、As を飲水曝露すると内耳に As が蓄積し、難聴を誘発する事が分かった。つまり、本研究により As の飲水曝露は若年層の難聴の危険因子である事が分かった。

今回の実験研究では、過去の論文を参考に 22.5 mg/L の As 濃度で飲水曝露実験を行った。今回の疫学研究で検出された As 汚染井戸水の As 最高濃度は 221 $\mu\text{g/L}$ で、この濃度は実験研究で用いた曝露量と比較すると約 100 分の 1 であった。一方、我々の疫学研究によると As 汚染井戸水の飲水期間 (曝露期間) と聴力レベルは負の相関を示した事から、曝露期間および体重も考慮して算出した「As 総曝露量」をヒトとマウスの間で比較した。その結果、ヒトとマウスの As 総曝露量はそれぞれ 34 mg/kg、281 mg/kg と算出され、その差は小さくなったものの、今回の実験で曝露されたマウスの As 総量はヒトと比較して約 8 倍で、依然として高い値であった。今後、22.5 mg/L よりも少ない As 曝露量で検証する事が重要であると思われる。

コルチ器の器官培養法を用いた As 曝露実験では、*in vivo*曝露実験で得られた内耳の As 蓄積量と同じ As 曝露量で、ラセン神経節は形態異常を示したが、有毛細胞の形態異常は観察されなかった。このことから、As の飲水曝露による難聴の原因として、内耳コルチ器のラセン神経節の形態異常が一因である事が示唆された。過去の報告では、As 曝露により末梢神経系の脱髄やアポトーシスが誘発される事が示されている。

聴神経系においても、同様の影響が観られるか解析を進める必要がある。

【結語】

疫学研究と実験研究を融合したアプローチにより、As の飲水曝露は若年のヒトとマウスで難聴を誘発するリスクファクターである事が分かった。若年者の聴覚障害は生活の質（QOL）に多大な影響を及ぼす事から、今後、As の飲水曝露のリスクを軽減する対策を構築する事が重要である。