

II 毒性研究班

[1] 毒性研究班全体研究報告

【毒性研究班班員】

	氏名	所属	役職名	研究テーマ
班長	平野 靖史郎	国立環境研究所環境健康研究領域 健康指標研究室	室長	
班員	鈴木 和夫	千葉大学大学院薬学研究院 衛生化学教室	教授	ジフェニルアル シン酸等の体内 分布と化学形態 に関する研究
	越智 崇文	帝京大学薬学部衛生薬学講座 毒性学教室	教授	ジフェニルアル シン酸等の標的 分子種と薬剤に よる毒性修飾作 用に関する研究
	吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科 実験動物学教室	教授	ジフェニルアル シン酸等を投与 したサルの行動 影響調査

【毒性研究班研究概要】

ジフェニルアルシン酸 (DPAA) 等に汚染した井戸水を摂取することによる健康影響をより詳細に明らかにするため、実験動物や培養細胞を用いた毒性学的研究を行った。本研究班ではジフェニルアルシン酸等と生体構成成分との相互作用や、ジフェニルアルシン酸等の毒性発現機構などを中心に研究し、以下の研究サブテーマに着手した。

ジフェニルアルシン酸等の体内分布と化学形態に関する研究
ジフェニルアルシン酸等の標的分子種と薬剤による毒性修飾作用に関する研究
ジフェニルアルシン酸等を投与したサルへの行動影響調査

サブテーマ においては、ジフェニルアルシン酸をラットに経口投与し、各臓器への分布と、体液、臓器中のヒ素の化学形態をプラズマ質量分析計を用いて測定することにより、ジフェニルアルシン酸の代謝過程を明らかにすることを目的としている。これまでに、ラットを用いジフェ

ニルアルシン酸単回、及び反復経口投与後の体内分布とその化学形態に関して検討を行い、その動態・分布・代謝等を既に報告されている有機・無機ヒ素化合物と比較検討をもとに、ジフェニルアルシン酸は生体への吸収率は高いが、各臓器への分布濃度は低く、またジフェニルアルシン酸の高い脂溶性に起因すると考えられる脳への選択的な分布が見られることを明らかにしてきた。また代謝物に関して、投与したジフェニルアルシン酸は大部分が未変化体として尿中に排泄されたが、微量の代謝物も検出されることを報告してきた。今年度は、その代謝物について詳細な検討を行った。その結果、ジフェニルアルシン酸はそのほとんどが最終的には未変化体としてジフェニルアルシン酸のまま尿中排泄されるが、ごくわずかながら生体内で芳香環水酸化などの代謝を受けることが示された。

サブテーマ では、生体内におけるジフェニルアルシン酸の標的分子種を明らかにすることを目的として、ジフェニルアルシン酸の毒性に対するチオール化合物、特にグルタチオンの役割を培養ヒト肝細胞とラット血管内皮細胞を用いて調べた。ジフェニルアルシン酸とグルタチオンとの複合体であるDPA (GS) を合成して細胞毒性を調べたところ、このグルタチオン複合体はジフェニルアルシン酸の約1,000倍の強毒性を示した。また、DPA (GS) は血清不含培地中では bis (diphenylarsine) oxide (BDPAO) に転換されることを明らかにした。細胞内グルタチオンの枯渇はDPA (GS) 及びBDPAOの細胞毒性を促進した。一方、細胞内グルタチオンの枯渇は、有機ヒ素化合物の1置換体であるアルソン酸類の細胞毒性を著しく高めたが、ジフェニルアルシン酸やフェニルメチルアルシン酸、あるいはジメチルアルシン酸などの2置換体であるアルソン酸類の細胞毒性をむしろ軽減することがわかった。また、細胞内GSHの枯渇は、酸化ストレスのマーカーであるヘムオキシゲナーゼ-1を誘導するとともに、DPAAのヘムオキシゲナーゼ-1の誘導も相加的に上昇させたことより、アルソン酸類の細胞障害性は、ヒ素の酸化作用によるものではないことが示唆された。

サブテーマ では、ジフェニルアルシン酸のヒトにおけるリスク評価を行うに際し、ヒトに近縁な実験動物であるサル類におけるジフェニルアルシン酸の毒性を明らかにすることを目的として、カニクイザルを用いたジフェニルアルシン酸の発達期への影響、特に胎生期ばく露個体の生後の行動発達に与える影響を評価した。平成16年度から17年度にかけて成熟カニクイザルメスをを用いた予試験の結果では、体重、摂餌量及び一般的血液生化学値にジフェニルアルシン酸の影響は見られなかったが、2.0mg/kg/day、0.8mg/kg/dayの投与群の一部にミオクローヌス症状が認められた。この結果を踏まえ、次世代行動毒性を評価するための濃度を1.0mg/kg/dayに設定した。1群8頭の妊娠カニクイザルを用意し、妊娠50日目から分娩まで約100日間の妊娠期ばく露実験を行ったが現在のところDPAA投与による明確な影響は観察されていない。

サブテーマ ~ の研究により、ジフェニルアルシン酸の体内動態と代謝、並びに毒性発現機構等が明らかになりつつあり、また、神経行動毒性を指標とした健康リスク評価のための基礎的データも整いつつある。以下に、 ~ の各研究におけるレポートを掲載する。

[2] テーマ別研究報告

[2 . 1] ジフェニルアルシン酸等の体内分布と化学形態に関する研究

主任研究者：鈴木 和夫（千葉大学大学院薬学研究院 教授）

研究協力者：鈴木 紀行（千葉大学大学院薬学研究院 助手）

1 概要

本研究ではラットを用い DPAA 単回、及び反復経口投与後の体内分布とその化学形態に関して検討を行い、その動態・分布・代謝等を既に報告されている有機・無機ヒ素化合物^{1)~6)}と比較検討を行った。その結果、昨年度までに DPAA は生体への吸収率は高いが、各臓器への分布濃度は低く、また DPAA の高い脂溶性に起因すると考えられる脳への選択的な分布が見られることが示された。また代謝に関して、投与した DPAA は大部分が未変化体として尿中に排泄されたが、微量の代謝物も検出された。そこで平成 17 年度には、その代謝物について検討を行った。その結果、DPAA はそのほとんどが最終的には未変化体として DPAA のまま尿中排泄されるが、ごくわずかながら生体内で芳香環水酸化などの代謝を受けることが示された。

2 目的

飲用井戸水より検出されたフェニルアルシン化合物は通常自然界には存在せず、毒性学的な情報は少ない。毒性発現のプロセスを導くためには生体分布とその化学形態を明らかに示し、その上で化合物により誘導される biological/toxicological action を理解する必要がある。そこで、本研究ではラットを用い DPAA を経口投与した後の吸収、分布、代謝、排泄に関して検討を行った。

3 方法

3.1 試薬

過酸化水素、硝酸、塩酸、酢酸アンモニウム、酢酸、28%アンモニア水、塩化ナトリウム、炭酸カリウム、塩化メチレン、ジメチルホルムアミド、ヨードメタンは和光純薬（大阪）より購入した。

TRIZMA®BASE、phosphate buffered saline、meta-chloroperbenzoic acid（mCPBA）（meso-tetrakis（pentafluorophenyl）porphinato）iron（III）chloride[Fe（TPFPP）Cl] は、Sigma（St.Louis、USA）より購入した。DPAA は環境省の管理下で DPAA に係わる研究グループへ頒布された。DPAA は 20 µgAs/mL の濃度で溶解し投与液とした。

3.2 ICP MS 及び HPLC の条件

ICP MS は HP4500、Agilent 7500（横川アナリティカルシステムズ、八王子）を用いた。HPLC pump は PU713（GL サイエンス、東京）column は Shodex GS 220HQ（7.5mm×300mm）（昭和電工、東京）を用い、elution buffer は 50 mM ammonium acetate（pH 6.5、25℃）もしくは 50 mM ammonium acetate（pH 6.0、25℃）を用いた。

3.3 ラットへの DPAA 反復投与

5 週齢の雄性 Wistar ラットを日本クレア（東京）より購入した。搬入後 1 週間馴化飼育後実験に用いた。実験開始までは、標準試料（CE-2、日本クレア）を自由摂取させ、飲料水は水道水を自由摂取させた。実験開始後は、（2 匹/群）を代謝ケージに入れ飲料水として DPAA 投与液 20 µgAs/mL（ヒ素換算量）を自由摂取させ、24 時間ごとの蓄積尿を 12 日間採取し分析を行った。

3.4 代謝物の誘導体化

DPAA 及びその代謝物を含む尿サンプル 5 mL をウレアーゼ処理し、凍結乾燥によって粉末を得た。その粉末をジメチルホルムアミドに溶解し、ヨードメタン、炭酸カリウムを加え 12 時間攪拌した。その後反応液に 2 N NaOH を加えヒ酸エステルを切断し、中和、希釈後 HPLC-ICPMS にて反応生成物の分析を行った。

3.5 P450 様酸化反応による DPAA 代謝反応の推定

DPAA 5 µM、Fe (TPFPP) Cl 1 µM を塩化メチレンに溶解し、0 から 100 µM の mCPBA を加え P450 様酸化反応を行った。反応液は一旦エバポレーターにより乾固し、少量の DMF と精製水により希釈し分析を行った。

4 結果及び考察

4.1 反復投与条件で見られるラット尿中 DPAA 代謝物

昨年度の単回投与実験において報告したように、DPAA はそのほとんどが未変化体として尿中に排泄される。しかしながら、反復投与においては 4 日後以降の尿中にはごく僅かながら未知の代謝物が 2 種存在した（図 1、U1、U2 と呼ぶ）。

投与開始直後には見られず、時間経過とともに増加していくことから、何らかの代謝酵素の誘導が考えられる。また、保持時間が短くなっていることは、column の特性と考え合わせると親水性が増加するような代謝が示唆される。そこからまずは DPAA の脱フェニルによる MPAA の生成を想定した。しかしながら、この U1 及び U2 は MPAA 及びその尿中代謝物とはピークが重ならず、DPAA は脱フェニル化を受けないことが分かった。

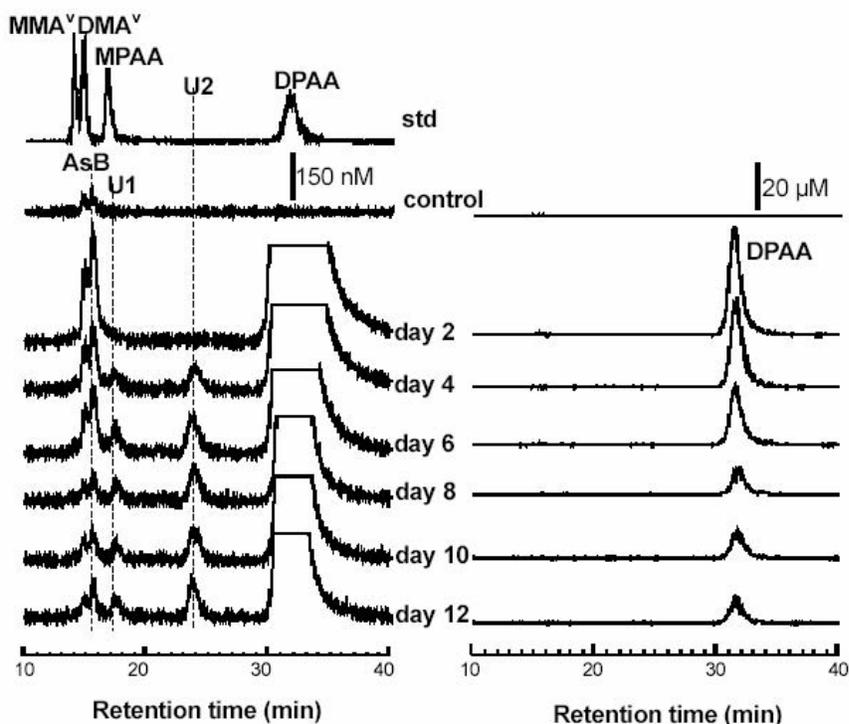


図1 DPAA反復投与におけるラットの尿中ヒ素の化学形態分析

4.2 代謝物の誘導体化

代謝物の官能基について情報を得るために、方法に示す手順にて尿中代謝物のメチル化を行った。その結果、図2に示すように、U1、U2ピークのシフト（U1 → U1'、U2メチル化体のピークは得られず、メチル化によってDPAAと重なってしまったと考えられる）が起こり、塩基に安定なメチル化体、すなわちフェノールエーテル等が生成したことが示唆された。このことから、もとのU1、U2は芳香環に水酸化を受けた代謝物であったと推測される。

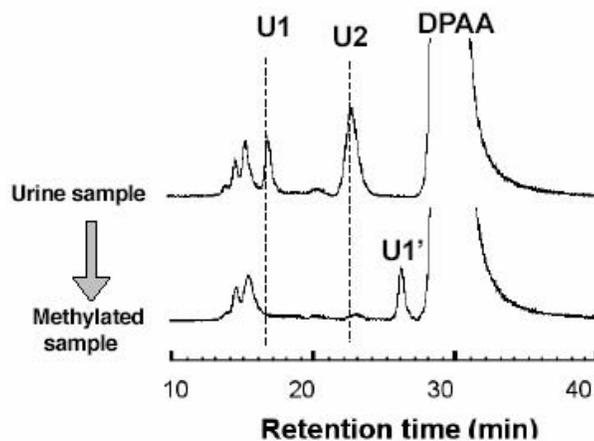


図2 DPAA代謝物のメチル化誘導体

4.3 P450 様酸化反応による DPAA 代謝反応の推定

DPAA が実際に P450 による芳香環水酸化を受けるのかという点について検討を行った。CYP を含む肝ミクロソーム画分を用いて P450 による代謝を評価するのが一般的であるが、DPAA はタンパク質との親和性が高く、DPAA 代謝物を遊離させるために高濃度の過酸化水素を加えると代謝物が分解してしまうおそれがあるため、本実験では P450 様の酸化系として汎用される合成ヘム錯体 Fe(TPFPP) Cl/mCPBA 酸化系⁷⁾を用いて P450 による DPAA の代謝の評価を行った。Fe(TPFPP) Cl/mCPBA 酸化系は、図 3 に示すような機構によってシトクロム P450 様の酸化反応を触媒する。この酸化反応系によって DPAA の酸化を行ったところ、図 4 に示すように Terminal oxidant である mCPBA が 20 当量までの範囲において単一の酸化生成物が得られ、この生成した芳香環水酸化体は U1 と一致した。U2 に相当する反応物は得られなかった。U2 は芳香環水酸化体がさらに抱合反応等の代謝を受けたものと推測される。

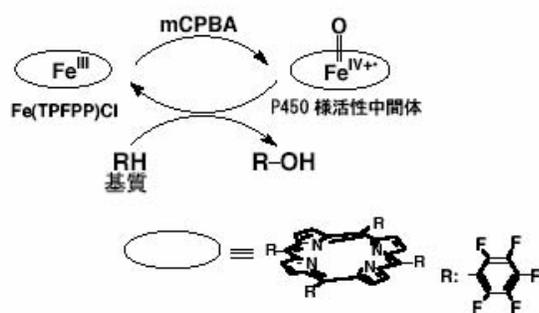


図 3 合成ヘムによるP450様酸化反応

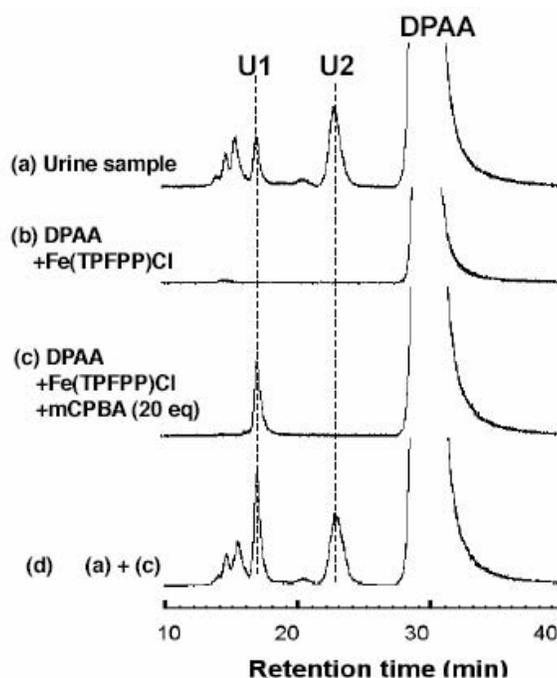


図 4 P450 様酸化系による酸化反応生成物と DPAA 由来尿中代謝物

5 結 語

DPAA の反復投与条件下において、わずかながら尿中に DPAA に由来する代謝物が認められた。これは水酸化体及びその誘導体であることが示唆された。これら DPAA 代謝物は、もとの DPAA とは動態・分布や毒性発現が異なる可能性が考えられる。

参 考 文 献

- 1) Lerman S., Clarkson T.W. : The metabolism of arsenite and arsenate by the rat, *Fundam. Appl. Toxicol*, 3, 309-314, 1983.
- 2) Lu M., Wang H., Li X.F., Lu X., Cullen W.R., Arnold L.L., Cohen S.M., Le X.C. : Evidence of hemoglobin binding to arsenic as a basis for the accumulation of arsenic in rat blood, *Chem. Res. Toxicol*, 17, 1733-1742, 2004.
- 3) Hughes M.F., Menache M., Thompson D.J. : Dose-dependent disposition of sodium arsenate in mice following acute oral exposure, *Fundam. Appl. Toxicol*, 22, 80-89, 1994.
- 4) Yamauchi H., Yamamura Y. : Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 74, 134-140, 1984.
- 5) Rodriguez V.M., Carrizales L., Jimenez-Capdeville M.E., Dufour, L., Giordano, M. : The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat, *Brain Res. Bull*, 55, 301-308, 2001.
- 6) Rodriguez V.M., Carrizales L., Mendoza M.S., Fajardo O.R., Giordano M. : Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat, *Neurotoxicol. Teratol*, 24, 743-750, 2002.
- 7) Ortiz de Montellano, P.R. Ed. : *Cytochrome P-450: structure, Mechanism, and Biochemistry*, Plenum: New York, 1986.

[2.2] ジフェニルアルシン酸等の標的分子種と薬剤による毒性修飾 作用に関する研究

主任研究者：平野 靖史郎（国立環境研究所環境健康研究領域健康指標研究室
室長）
分担研究者：越智 崇文（帝京大学薬学部衛生薬学講座毒性学教室 教授）
研究協力者：小林 弥生（国立環境研究所環境健康研究領域健康指標研究室
研究員）

1 概要

生体内におけるジフェニルアルシン酸（DPAA）の標的分子種を明らかにすることを目的として、DPAAの毒性に対するチオール化合物、特にグルタチオン（GSH）の役割を *in vitro* の実験系を用いて調べた。

実験（1）では、培養ヒト肝細胞（hepG2）を用いて、DPAAとGSHとの反応生成物の毒性に関して検討した。細胞に取り込まれたDPAAはGSHと複合体を生じることが考えられることから、DPA（GS）を合成して細胞毒性を調べたところ、DPAAの約1,000倍の強毒性を示した。このとき、DPAAは培養培地中で安定であったが、DPA（GS）は不安定で、蛋白結合型ヒ素（Protein-As）に変化した。しかし、GSH存在下ではDPA（GS）は安定に保たれ、その結果protein-Asへの転換が減少した。また、DPA（GS）は血清不含培地中ではbis（diphenylarsine）oxide（BDPAO）に転換された。BDPAOは茨城県神栖市（旧神栖町）の井水中にも検出されたヒ素化合物であるが、血清含有培地中では非常に不安定な物質であり、protein-Asの増加を伴って消失した。一方GSHの存在は、BDPAOのDPA（GS）への転換を促進する一方で、BDPAOのprotein-Asへの転換を抑えた。細胞内GSHの枯渇はDPA（GS）及びBDPAOの細胞毒性を促進した。また、培地中へのGSHの添加はDPA（GS）とBDPAOの毒作用を顕著に抑制した。培地中のヒ素の動態とこれに関連した細胞毒性の研究により、GSHはDPA（GS）やBDPAOのような毒性中間体の形成調節に役割を有することが示唆された。

実験（2）ではラット血管内皮細胞を用いてDPAAとフェニルメチルアルシン酸（PMAA）の細胞毒性発現に関するチオール化合物の影響について調べた。細胞内GSHの枯渇は、有機ヒ素化合物の1置換体であるアルソン酸類の細胞毒性を著しく高めたが、DPAAやPMAA、あるいはジメチルアルシン酸などの2置換体であるアルシン酸類の細胞毒性をむしろ軽減することが分かった。また、細胞内GSHの枯渇は、酸化的ストレスのマーカであるヘムオキシゲナーゼ-1を誘導するとともに、DPAAのヘムオキシゲナーゼ-1の誘導も相加的に上昇させたことより、アルソン酸類の細胞障害性は、ヒ素の酸化作用によるものではないことが示唆された。

(1) ジフェニルアルシン酸から毒性中間体の形成の調節における グルタチオンの役割に関する研究

越智 崇文 (帝京大学薬学部衛生薬学講座毒性学教室 教授)

2 目的

DPAA 及び他のヒ素化合物の血中あるいは細胞培養用培地中における動態は、細胞毒性と密接に関連するものであり、したがって毒性の全体像理解のため詳細な検討が必要である。これに関連して、我々は、細胞内 GSH の枯渇は DPAA の毒作用を軽減し、また、GSH の添加は DPAA の細胞毒性を顕著に促進することを明らかにした。この結果は、GSH は DPAA が細胞毒性を発現する上で必要な要因であることを示唆するものであり、したがって、ヒ素化合物の化学形態の分析と毒性の両方から DPAA と GSH の相互作用を研究することが重要である。本研究では、まず DPAA と GSH の相互作用により生じる複合体 DPA (GS) を HPLC/ESI-MS により分析した。また、その細胞毒性を GSH 枯渇細胞を用いて、また GSH 添加の影響と併せて検討した。さらに、細胞内標的と相互作用しうるヒ素の反応性本体あるいは中間体に関する情報を得るため、培養培地中での DPAA、DPA (GS)、BDPAO の動態変化とその結果生じる蛋白結合ヒ素 (protein-bound As) について検討を行った。

3 方法

DPAA (0.1mM) と GSH (1 mM) を種々の時間 38 で反応後、反応生成物の分析を HPLC/ESI-MS により行った。また、細胞培養用培地中のヒ素化合物の化学形態分析は HPLC/ICP-MS により行った。96-well plate に 2×10^4 cells/well で HepG2 細胞を播種し、1 日前培養後、1 mM L-buthionine-SR-sulfoximine (BSO) で 6 時間処理を行い GSH を枯渇した。その後、細胞を DPAA、BDPAO、DPA (GS) で 24 時間処理し、細胞毒性を WST-8 法 (Cell Counting Kit-8、Wako) により行った。

4 結果

4.1 DPAA と GSH の反応生成物の同定

DPAA と GSH の反応生成物の HPLC/ESI-MS による質量分析により示されたシグナルは、それぞれ GSH (m/z 308 and 615)、GSSG (m/z 307 and 613)、DPAA (m/z 263) 及び未確認化合物 (m/z 536) であった。図 1 に示すように、DPAA と GSH の反応の間に、DPAA は GSH の急激な GSSG への酸化を伴って減少し、その一方で未確認化合物が出現した。この未確認化合物のプロトン化分子イオンピークは m/z 536 で、これにより GSH 抱合化 DPAA の存在が示唆された。ESI-TOF-MS による精密質量分析の結果、プロトン化分子イオンは m/z 536.0837 に観察され、DPA (GS) の元素組成は $C_{22}H_{26}O_6N_3AsS$ とされた。図 2 に DPA (GS) の予想される構造を示す。

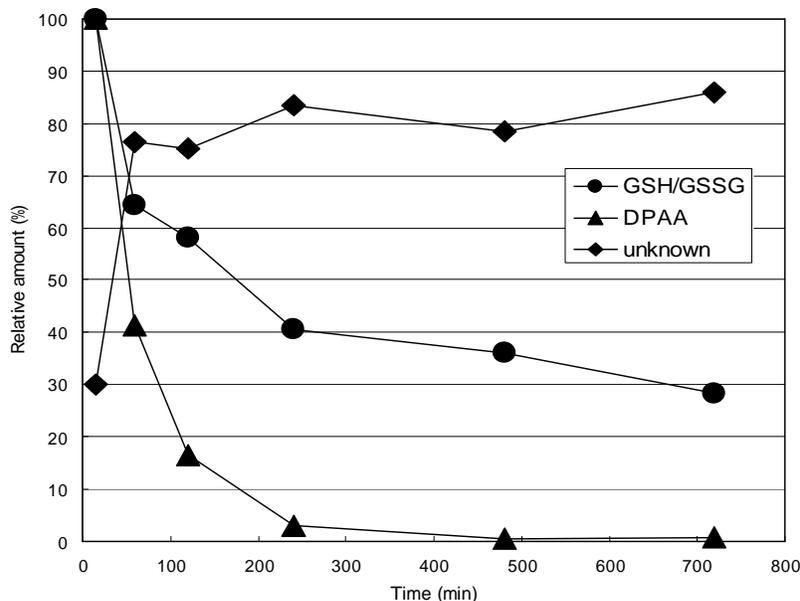


図1 DPAA と GSH の反応後の GSH、GSSG、DPAA 及び未知化合物の推移

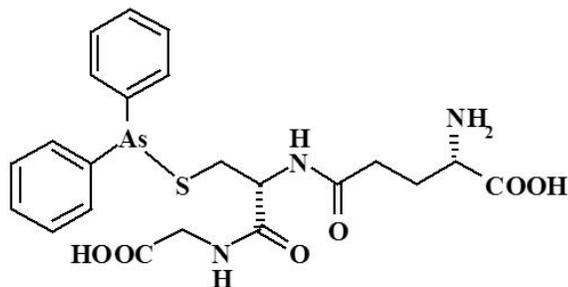


図2 DPA (GS) の構造

4.2 培地中における DPAA、DPA (GS)、BDPAO の動態

10%牛胎児血清を含む培地中の DPAA、DPA (GS)、BDPAO の動態を、それらによる毒性との関連を明らかにする目的で検討した。図3にヒ素標準溶液の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを示した。図4 (a) に示すように、DPAA のクロマトグラムは培地中で 37-120 分のインキュベーションにより変化しなかった。図4 (b) に示すように、DPA (GS) は培地中で不安定であり、10 分間のインキュベーションにより消失し、その一方で蛋白結合ヒ素 protein-bound As が出現した。この protein-bound As は培地中では少なくとも 2 時間安定であった。一方、図4 (c) に示すように、DPA (GS) を血清不含培地中でインキュベートすると、血清含有培地中と同様の速度で消失したが、BDPAO の出現を伴った。また、図4 (d) に示すように、BDPAO は培地に添加後 1 分以内に消失したが、この消失とは逆に protein-bound As が出現し、2 時間安定に保たれた。

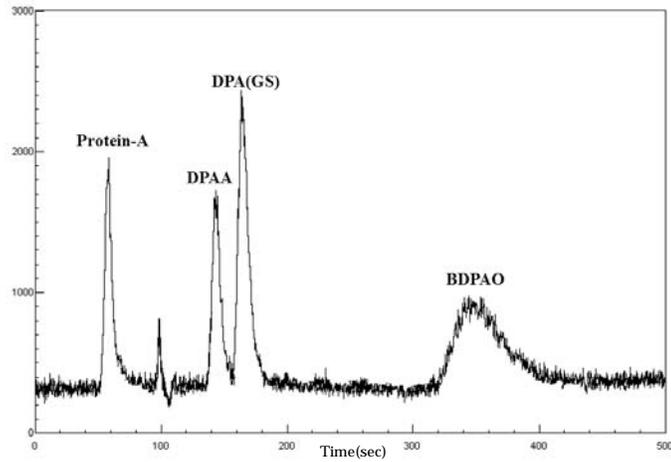


図3 ヒ素化合物の HPLC/ICP-MS クロマトグラム

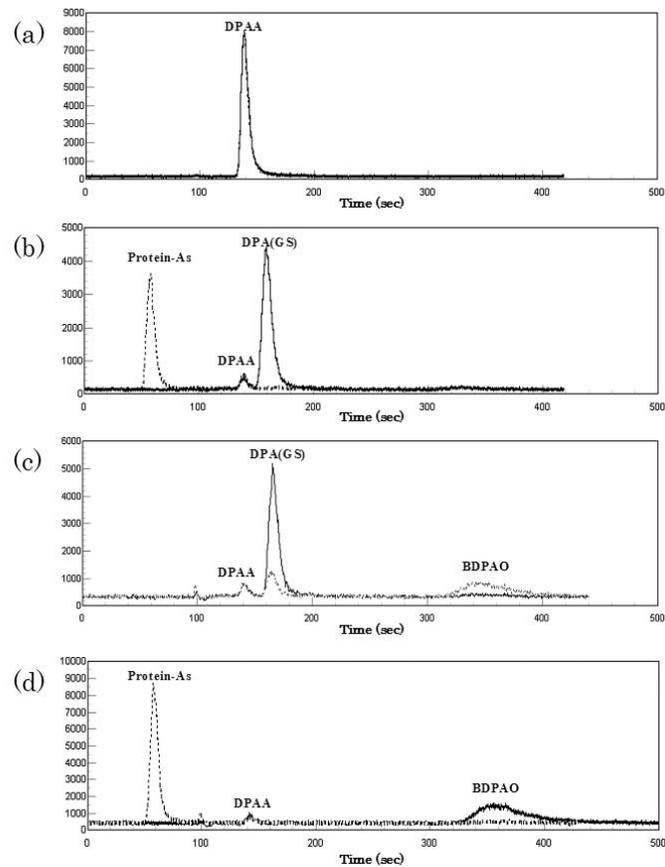


図4 培地に添加する前後のヒ素化合物のクロマトグラム

- (a) 実線：DPAA のクロマトグラム、破線：DPAA を培地中で 120 分インキュベーションした後のクロマトグラム
- (b) 実線：DPA (GS) のクロマトグラム、破線：培地中で 10 分インキュベーション
- (c) 実線：DPA (GS) のクロマトグラム、破線：血清不含培地中で 5 分インキュベーション
- (d) 実線：BDPAO のクロマトグラム、破線：培地中でインキュベーション 40 秒後

4.3 GSHの存在、非存在下、培地中におけるDPA(GS)、BDPAOの動態

GSHの存在及び非存在下、培地中におけるDPA(GS)、BDPAOの動態を調べた。図5aに示すように、DPA(GS)は5 mM GSHを含む培地で15分間安定に存在し、その後いくらか減少したものの2時間まで検出された。一方、GSH非存在下、DPA(GS)はprotein-Asの増加を伴って急速に減少した(図5b)。BDPAOの動態については、図6aに示したように、GSHの存在下、添加後急速に減少し、それとは逆にDPA(GS)が上昇した。また、上昇したDPA(GS)はその後徐々にprotein-Asの上昇とともに減少した。BDPAOは、GSH不含培地でインキュベートすると急速に減少し、その逆にprotein-Asの増加が観察された(図6b)。

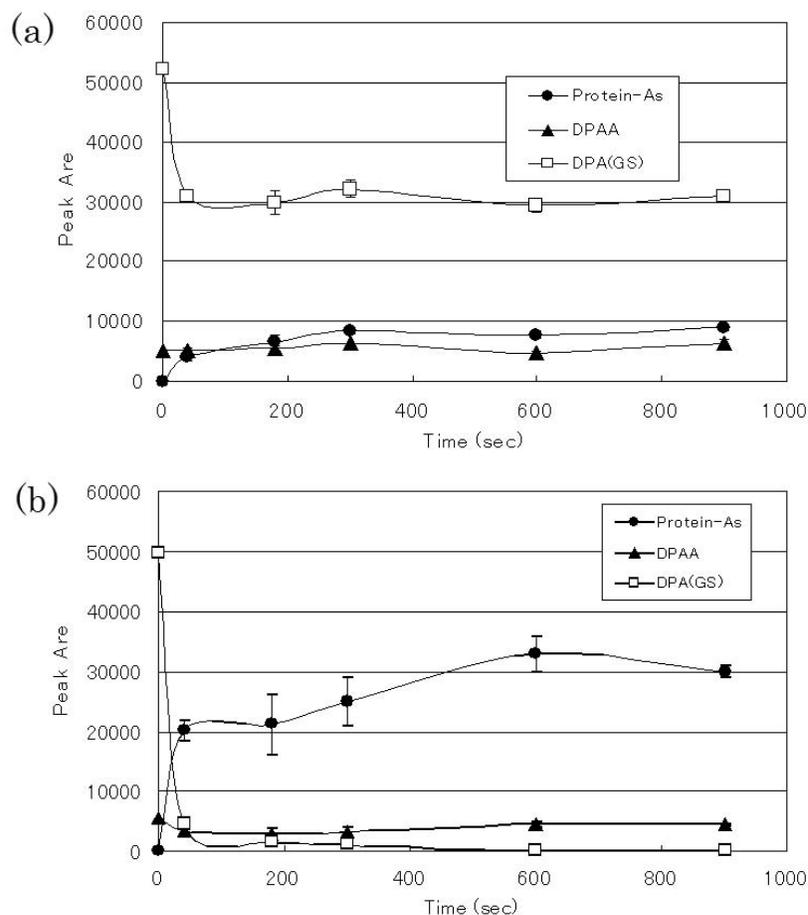


図5 GSH存在、非存在下培地中のDPA(GS)の動態
1 μ M DPA(GS)を5 mM GSH存在(a)、非存在(b)下種々の時間37で
インキュベートした後、ヒ素分子種の分析を行った。

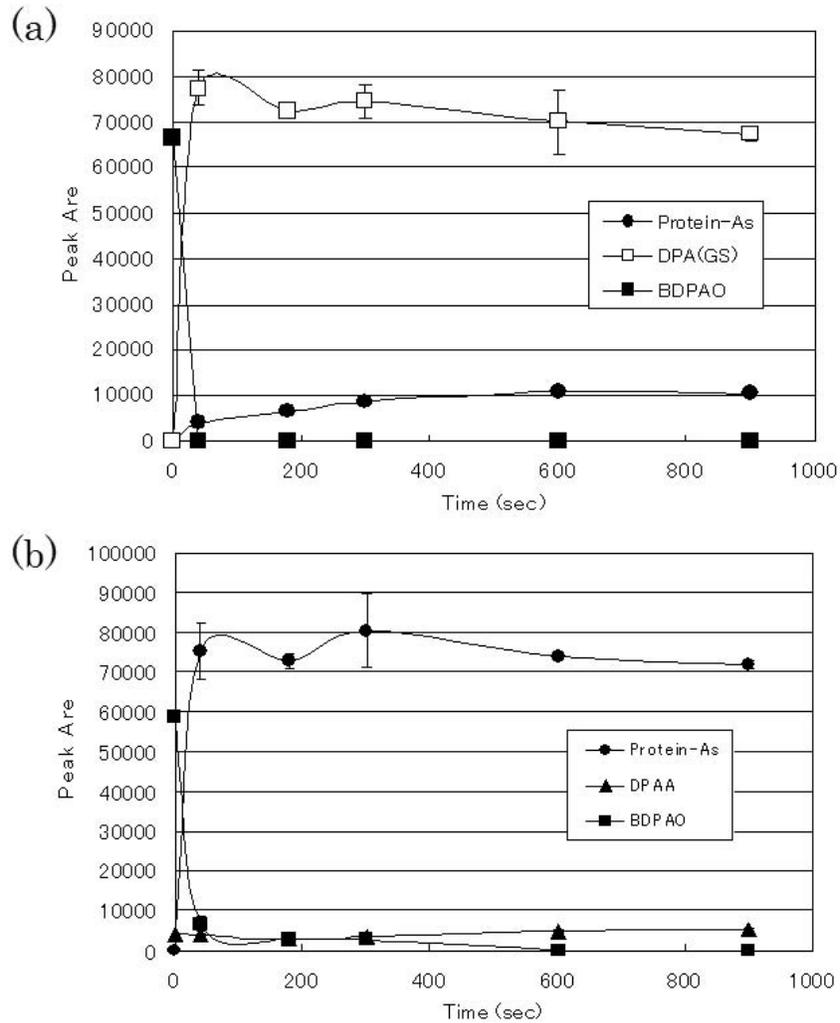


図6 GSH存在、非存在下培地中のBDPAOの動態
 1 μ M BDPAOを5 mM GSH存在(a)、非存在(b)下種々の時間37で
 インキュベートした後、ヒ素分子種の分析を行った。

4.4 ヒ素化合物の細胞毒性に対するGSH枯渇の影響

GSH枯渇、非枯渇細胞に対するDPA(GS)の細胞毒性を神栖市井水中に検出されたDPAA、BDPAOと比較した。図7に示したように、DPA(GS)はDPAAより約1,000倍強く、BDPAOの毒性とほぼ同じであった。一方、BDPAOとDPA(GS)の細胞毒性に対するGSH枯渇の影響を調べたところ、GSH枯渇はBDPAO及びDPA(GS)の毒性を非枯渇細胞に対する毒性レベルの2~3倍に促進した。