

## 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 環境リスク研究センター 環境ナノ生体影響研究室	室長	ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の体外排泄に関する研究
班員	石井 一弘	筑波大学 人間総合科学研究科	講師	
班員	越智 崇文	帝京大学薬学部	教授	ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の毒性標的分子の 探索に関する研究
研究協力者	小林 弥生	国立環境研究所	研究員	
	根岸 隆之	青山学院大学	研究員	
	北 加代子	帝京大学薬学部	助手	
	水村 綾乃	千葉大学薬学部	大学院M1	

### 【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り生じた健康影響をより詳細に明らかにするため、サルを用いたDPAAの体内分布と排泄量の測定、体外排泄を促進する薬剤の検索、培養細胞を用いた毒性学的研究を行った。平成18年度における本研究班の研究サブテーマは以下の2つである。

- ① DPAAの体外排泄に関する研究
- ② DPAAの毒性標的分子の探索に関する研究

サブテーマ①では、ヒトに近縁な実験動物であるサルにおけるDPAAの体内動態と排泄を明らかにすることを目的として、DPAAを経口投与したカニクイザルの血液、尿、糞、被毛、髄液などのヒ素の濃度を測定した。DPAAは赤血球中に蓄積しやすいこと、被毛には投与終了後もDPAAの濃度が上昇することなどが分かった。また、試験管レベルでの成績ではあるが、コレステロールの排泄促進剤として用いられているコレバインが、体内に蓄積したDPAAの排泄を促進させる可能性を示すデータも得られている。これらの実験データは、DPAAのヒトにおけるリスク

評価やリスクコミュニケーションのための有用な情報となるものと考えられる。

サブテーマ②では、生体内においてDPAAにより発現が変化する分子種を明らかにすることを目的として、DPAAで処理培養ヒト細胞蛋白の網羅的解析を行った。対照と異なる発現を示す4種の蛋白 (Cheparonin containing protein TCPa subunit2、aldehyde dehydrogenase 1、ribosomal protein P0、glutaminase C) のうち、唯一発現の低下した蛋白は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の供給に関わる重要酵素であるグルタミナーゼであった。DPAAをばく露したHepG2細胞において、グルタミナーゼの発現低下は phosphate-activated glutaminase (PAG) 活性の低下を伴った。中枢神経系ではPAGは神経伝達物質グルタミン酸産生における主要酵素と考えられていることから、グルタミナーゼの発現低下が、DPAAの脳神経系への影響に関連している可能性が示唆された。

サブテーマ①と②の研究により、DPAAの体内動態と代謝、並びに毒性発現機構等がさらに明らかになりつつある。以下に①と②の各研究における課題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 (DPAA) の体外排泄に関する研究

ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の体内動態については、これまでの研究によりある程度解明されてきた。

今回、DPAA の体外排泄に関する研究をヒトに近縁のサルを用いて進めた。

また、体内に蓄積された DPAA の排泄を促進させることが可能となれば、DPAA により影響を受けた地域住民の治療薬の開発にも繋がることが期待されることから、DPAA の体外排泄を促進させる薬剤方法についても研究を行った。

#### [2. 1. 1] ジフェニルアルシン酸 (DPAA) を経口投与したサルにおける DPAA の体外排泄

主任研究者：平野 靖史郎 (国立環境研究所環境リスク研究センター 室長)

研究協力者：小林 弥生 (国立環境研究所環境健康研究領域 研究員)

根岸 隆之 (青山学院大学理工学部化学生命化学科 研究員)

#### 1 概要

カニクイザルを用いてジフェニルアルシン酸 (DPAA) 反復投与時、反復投与終了後、単回投与時におけるヒ素の体内分布と排泄について調べた。DPAA を反復投与することにより赤血球中へヒ素が蓄積されることが確認された。DPAA 反復投与終了 198～237 日後には、血液、尿及び糞中のヒ素濃度は対照群とほぼ同程度であったが、体毛に関しては DPAA 反復投与中よりさらに蓄積していた。また DPAA 単回投与 1 時間及び 4 時間後の脳脊髄液中のヒ素濃度は、対照群と比較しそれぞれ約 1.5 倍、2.6 倍であったことから、DPAA は血液脳関門を通過し、脳内へ移行する可能性が示唆された。

#### 2 目的

ヒトにおける DPAA の代謝動態を予測する上で、DPAA にばく露した霊長類の試料を用いて研究する意義は大きい。本研究では、DPAA を反復、あるいは単回投与したサルにおいて、糞尿、血液、体毛等におけるヒ素濃度を測定することにより、DPAA の代謝的動態を調べることを目的とした。

### 3 方法

#### 3.1 試薬

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。過酸化水素及び硝酸は和光純薬から購入した原子吸光測定用、並びに有害金属測定用を用いた。

#### 3.2 動物

サルへの DPAA の投与、並びに試料のサンプリングは、新日本科学（株）内において行われた。

- (1) 妊娠動物を用いた DPAA の反復投与試験： 成熟した雌カニクイザル（体重 3～4kg）に対して妊娠 50 目から分娩までの約 100 日間（1 日 2 回、1 回目投与 6 時間後に 2 回目を投与）、経鼻カテーテルによって DPAA を 1.0 mg/kg/day（0.28 mg As/kg/day）の用量で経口投与した（DPAA 投与群、n=8）。対照群（n=5）には生理食塩水を投与した。血液は試料採取日の第 1 回目投与開始前と投与 1 時間後及び 4 時間後に採取した。採取した血液の一部は血球と血漿に分離した。尿は投与開始直後から 24 時間にわたり採取し、遠心して浮遊物を除いた。糞は投与開始直後から同日の第 2 回目投与直前（0～6 時間）と第 2 回目投与直後から翌日の第 1 回目投与開始前まで（6～24 時間）に分けて採取した。体毛はバリカンにて根元から約 2mm 以上を採取した。ここでのサンプルは投与開始後 41～91 日経過したカニクイザル個体から採取している。また、出産後（反復投与終了後）198～237 日経過した個体（n=6）についても、全血、血漿、6 時間尿、6 時間糞、体毛を採取した。
- (2) 経産動物を用いた DPAA の単回投与試験： 反復投与試験で使用した対照群 5 個体を DPAA 投与群（2.0 mg/kg/day、0.57 mg As mg/kg/day、n=3）と対照群（生理食塩水投与、n=2）に分けた。各試料は反復投与試験と同様に採取した。尿に関しては投与開始直後から同日の第 2 回目投与前（0～6 時間）と第 2 回目投与直後から翌日の 1 回目投与開始前まで（6～24 時間）に分けて採取した。また、投与 1 時間及び 4 時間後の脳脊髄液も採取した。

#### 3.3 ヒ素の測定

糞は凍結乾燥をして乾燥重量を測定した。乾燥した糞は乳鉢を用いて破碎し均一の粉末試料とした。採取した体毛は 1%SDS 溶液で 20 分間超音波洗浄し、その後数回超純水でリンスした後、さらに超音波で 10 分間×2 回リンスした。最後に超純水でリンスし 50℃で 3 時間乾燥した後、デシケーター内に入れ保存した<sup>1)</sup>。全血、血漿、脳脊髄液、体毛、尿及び処理済の糞は硝酸と過酸化水素（3:1（v:v））で湿式灰化し、誘導結合プラズマ質量分析計（ICP MS）（Agilent 7500：横川アナリティカルシステムズ）にて測定した。ヒ素の分布量は全血を体重の 6.5%として算出し、血球へのヒ素の分布は非妊娠雌カニクイザルの平均ヘマトクリット値（39.3±3.8%）<sup>2)</sup>を参考にして算出した。また、尿及び糞におけるヒ素濃度は実測重量を基に算出した。

### 4 結果

#### 4.1 DPAA の反復投与中及び投与終了後のサルにおけるヒ素の体内分布

図 1 に DPAA 反復投与（1.0 mg/kg/day、1 日 2 回投与）開始後 41～91 日経過した個体の全血（図 1 a）、及び血漿中（図 1 b）のヒ素の濃度を示した。グラフの縦軸は総ヒ素濃度、横軸は血液採取日の第 1 回目投与からの経過時間を示している。対照群においてもわずかながらヒ素が検出されたが、全血においては 1.56～2.38 ng/ml、血漿中においては 1.05～1.66 ng/ml であ

り、投与群に比べほぼ無視できる程度であった。ヘマトクリット参考値から算出した赤血球中へのヒ素の分布は 1.72~3.49 ng/ml となった。全血中のヒ素濃度を 100%とした時のヒ素の分布は血漿中に約 45%、赤血球中に約 55%、と算出された。対照群と比較して、DPAA を反復投与したサルにおいて高濃度のヒ素が赤血球中に蓄積していることが明らかとなった（全血：50.7 ± 2.70 ng/ml、血漿：24.4 ± 1.88 ng/ml、赤血球：91.3 ± 4.50 ng/ml）。全血中のヒ素濃度を 100%とした時のヒ素の分布は血漿中に約 29%、赤血球中に約 71%となり、DPAA は主に赤血球中により多く蓄積していた。1 日 2 回の反復投与実験中において、DPAA 投与 1 時間後の全血には 107 ± 11.5 ng/ml、4 時間後には 81.0 ± 7.95 ng/ml のヒ素が検出された。投与前（0 時間）の全血中のヒ素濃度により算出すると、DPAA 投与により投与 1 時間後には 56.4 ± 9.38 ng/ml、4 時間後には 30.2 ± 6.96 ng/ml のヒ素が全血中に分布しており、それぞれ投与量（ヒ素として 0.14 mg/kg）の 5.4%及び 4.0%であった。血漿中におけるヒ素の濃度は、投与 1 時間後及び 4 時間後ではそれぞれ 95.6 ± 14.0 ng/ml、64.0 ± 9.13 ng/ml となり、投与前の血漿中のヒ素濃度を補正して上昇分を算出すると 71.2 ± 12.7 ng/ml、39.5 ± 8.23 ng/ml となった。投与前の全血及び血漿中のヒ素濃度とヘマトクリット値より算出した赤血球中のヒ素濃度は、投与 1 時間後及び 4 時間後ではそれぞれ 33.7 ± 8.63 ng/ml、22.9 ± 8.09 ng/ml となった。全血中のヒ素濃度を 100%とした時のヒ素の分布は投与 1 時間後では血漿中に約 76%、赤血球中に約 24%、投与 4 時間後では血漿中に約 72%、赤血球中に約 28%となり、経口投与直後の DPAA は主として血漿中に存在しているものと考えられる。

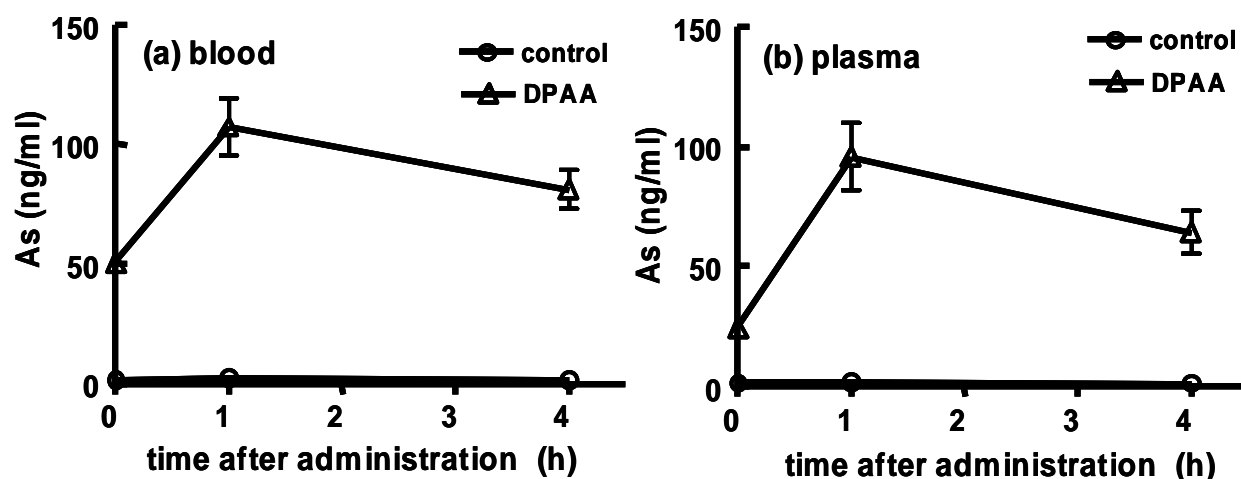


図1 DPAA 慢性ばく露試験中の個体に対する DPAA 投与時の全血 (a) 及び血漿 (b) 中におけるヒ素の経時的変化

図2には、尿 (図2 a)、糞 (図2 b) 及び体毛 (図2 c) 中におけるヒ素の分布を示した。24 時間蓄積尿中におけるヒ素の濃度は、対照群では 0.0325 ± 0.00338 µg/ml、DPAA 投与群においては 2.62 ± 0.277 µg/ml となった。採取量から算出した 1 日のヒ素の排泄量は対照群において 3.94 ± 1.15 µg、DPAA 投与群において 369 ± 26.1 µg となった。蓄積糞中におけるヒ素の濃度は、0~6 時間（採取日の 1 回目投与後から 2 回目投与前まで）、6~24 時間（採取日の 2 回目投与後から翌日の 1 回目投与前まで）の順に対照群では 0.663 ± 0.00380 µg/g、0.818 ± 0.0747 µg/g、DPAA 投与群においては 63.9 ± 10.1 µg/g、73.2 ± 10.5 µg/g となった。採取量から算出した 1 日のヒ素の排泄量は対照群において 5.79 ± 1.45 µg、DPAA 投与群において 545 ± 72.1 µg となった。41~91 日間の DPAA 反復投与により、対照群と比較し DPAA 投与群において体毛中に 5 倍のヒ素が蓄積していた（対照群：0.0720 ± 0.0106 µg/g、DPAA 投与群：0.367 ± 0.0479 µg/g）（図2 c）。

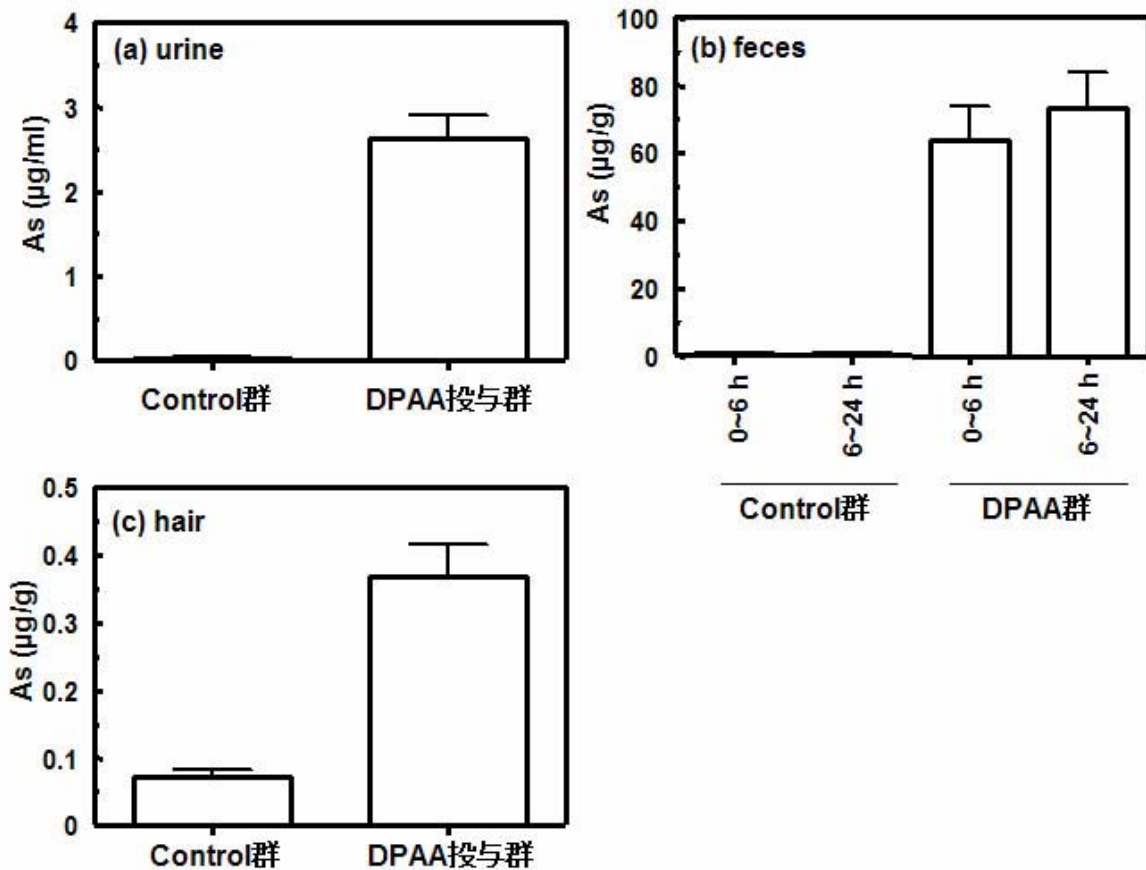


図2 DPAA 慢性ばく露試験中の個体に対する DPAA 投与時の尿 (a)、糞 (b) 及び体毛 (c) 中におけるヒ素の分布

図3には出産後（反復投与終了後）198～237日経過した個体の全血 (a)、血漿 (b)、6時間尿 (c)、6時間糞 (d) 及び体毛 (e) 中のヒ素の濃度を示した。比較できるように、全血、血漿及び体毛に関しては対照群と、DPAA 反復投与 41～91 日後におけるヒ素濃度を、尿及び糞に関しては対照群のヒ素濃度をグラフ内に併せて示した。投与終了後 198～237 日経過すると、全血中のヒ素濃度は  $3.89 \pm 0.402 \mu\text{g/ml}$  (図3 a)、血漿中では  $1.25 \pm 0.137 \mu\text{g/ml}$  (図3 b)、赤血球中では  $7.96 \pm 1.02 \mu\text{g/ml}$  となり反復投与により蓄積していたヒ素が血液中からはほぼ消失していることが確認された。この時の血液中におけるヒ素の分布割合は血漿中に約 20%、赤血球中に約 80%となった。尿 (図3 c) 及び糞 (図3 d) 中のヒ素濃度はそれぞれ  $0.0169 \pm 0.00517 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.663 \pm 0.038 \mu\text{g/g}$  となり対照群とほとんど差がなかった。一方、体毛中においては  $1.38 \pm 0.209 \mu\text{g/g}$  となりヒ素反復投与中の値と比較すると約 3.8 倍のヒ素が検出された (図3 e)。



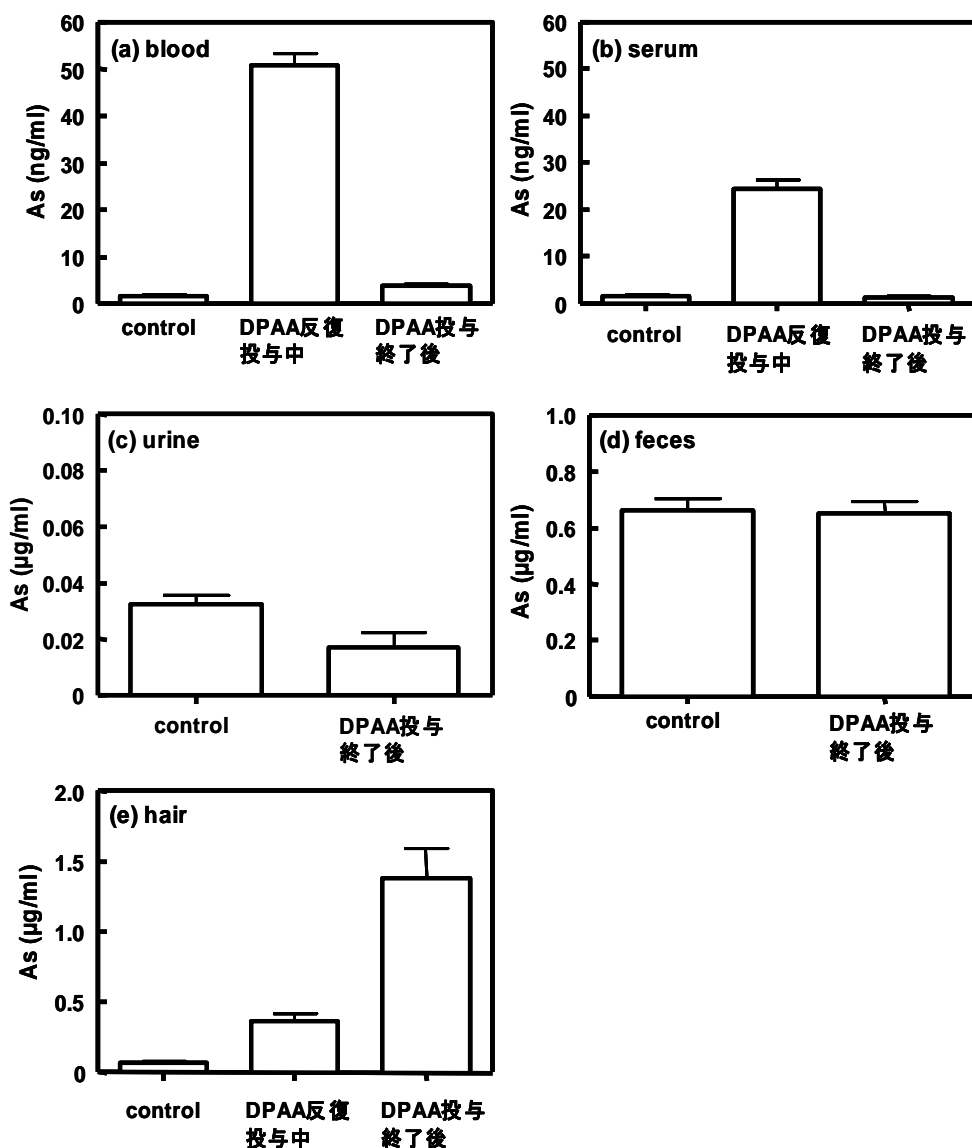


図3 DPAA 慢性ばく露試験終了後の個体に対する全血 (a)、血漿 (b) 尿 (c)、糞 (d) 及び体毛 (e) 中におけるヒ素の分布

#### 4. 2 DPAA 単回投与時のサルにおけるヒ素の体内分布

図4に2.0 mg/kg (0.57 mg As/kg) の用量でDPAAを単回経口投与した際の全血(図4a)、血漿(図4b)及び脳脊髄液(図4c)中のヒ素の経時的変化を示した。対照群の全血においては5.52~6.39 ng/ml、血漿中においては3.53~7.10 ng/mlのヒ素が検出された。ヘマトクリット参考値から算出した赤血球中へのヒ素の分布は5.30~8.59 ng/mlとなった。血液におけるヒ素の分布は血漿中に約52%、赤血球中に約48%となった。DPAA単回投与1時間後の全血には490±113 ng/ml、4時間後には336±100 ng/mlのヒ素が検出された。投与前(0時間)の全血中のヒ素濃度により算出すると、DPAA投与により投与1時間後には478±115 ng/ml、4時間後には325±104 ng/mlのヒ素が全血中に分布しており、それぞれ投与量(ヒ素として0.58 mg/kg)の5.3%及び3.6%となった。血漿中におけるヒ素の濃度は、投与1時間後及び4時間後ではそれぞれ653±152 ng/ml、452±125 ng/mlとなり、投与前の血漿中のヒ素濃度により算出すると649±151 ng/ml、448±125 ng/mlとなった。投与前の全血及び血漿中のヒ素濃度とヘマトクリット値より算出した赤血球中のヒ素濃度は、投与1時間後及び4時間後ではそれぞれ213

±58.9 ng/ml、133±85.8 ng/ml となった。血液中におけるヒ素の分布は投与 1 時間後では血漿中に約 83%、赤血球中に約 17%、投与 4 時間後では血漿中に約 86%、赤血球中に約 14% となり、投与直後の DPAA は主として血漿中に存在していたと考えられる。DPAA 投与 1 時間及び 4 時間後の脳脊髄液中のヒ素濃度は、それぞれ  $6.73 \pm 1.03$  ng/ml、 $12.3 \pm 1.94$  ng/ml となり、対照群と比較しそれぞれ約 1.5 倍、2.6 倍となった (図 4 c)。

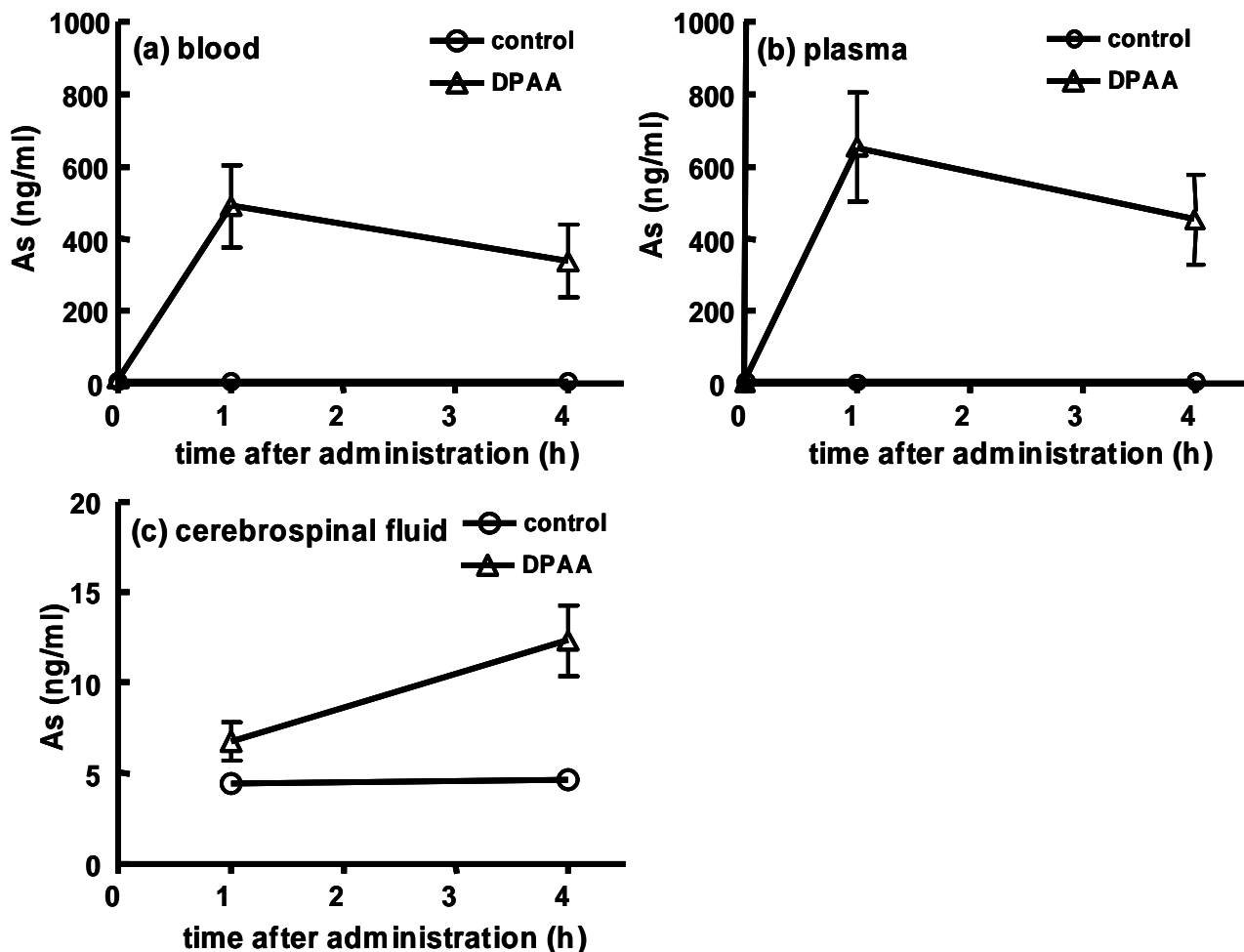


図 4 DPAA 単回投与時における全血 (a)、血漿 (b) 及び脳脊髄液 (c) 中におけるヒ素の経時的変化

図 5 には、尿 (図 5 a) 及び糞 (図 5 b) 中におけるヒ素の分布を示した。尿中におけるヒ素濃度は、対照群では 0~6 時間蓄積尿、6~24 時間蓄積尿の順に  $0.0369 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.0507 \mu\text{g/ml}$  となり、DPAA 投与群においては  $19.8 \pm 4.59 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.60 \pm 0.863 \mu\text{g/ml}$  となった (図 5 a)。採取量から算出した 1 日のヒ素の排泄量は対照群において  $6.93 \mu\text{g}$  となった。DPAA 投与群においては 0~6 時間で  $667 \pm 102 \mu\text{g}$ 、6~24 時間で  $106 \pm 32.6 \mu\text{g}$  となり、それぞれ投与量の約 35% 及び 5.9% が尿中に排泄されていることが分かった。糞中におけるヒ素濃度は、0~6 時間、6~24 時間の順に対照群では  $0.863 \mu\text{g/g}$ 、 $0.768 \mu\text{g/g}$ 、DPAA 投与群においては  $3.79 \mu\text{g/g}$ 、 $83.8 \mu\text{g/g}$  となった (図 5 b)。なお DPAA 投与群は 3 個体使用したが、採取から測定までの間に 1 個体分の糞試料が測定不能となったため、DPAA 投与群の糞に限り 2 個体の平均値を示した。採取量から算出した 1 日のヒ素の排泄量は対照群において  $3.99 \mu\text{g}$  となった。DPAA 投与群においては 0~6 時間で  $3.97 \mu\text{g}$ 、6~24 時間で  $316 \mu\text{g}$  となり、それぞれ投与量の約 0.2% 及び 17% が糞中に排泄されていた。

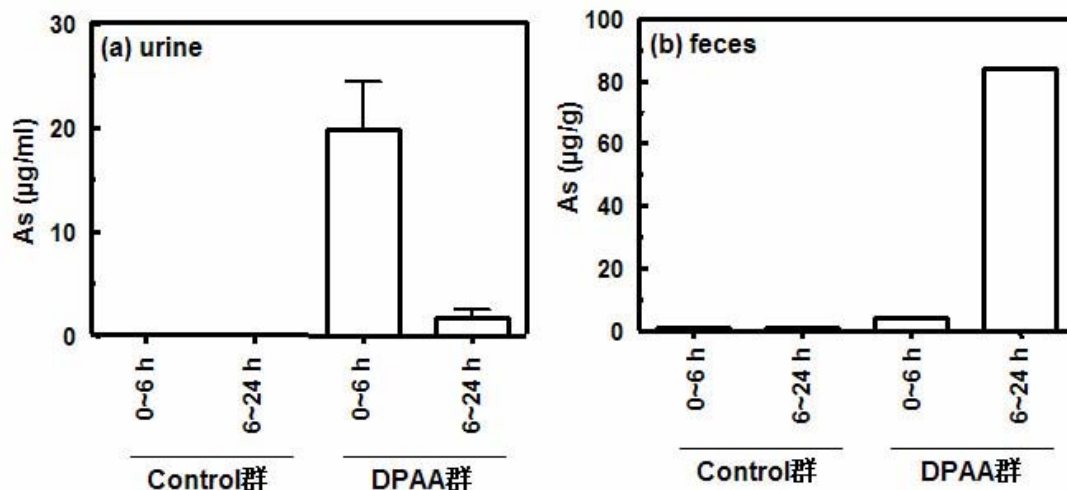


図5 DPAA 単回投与時における尿 (a) 及び糞 (b) 中におけるヒ素の分布

## 5 考 察

41~91 日間の DPAA 反復投与において高濃度のヒ素が血液中に検出されたが、赤血球中に約 71%が分布しており、DPAA は赤血球中に蓄積しやすいことが分かった (図 1)。一方、DPAA 単回投与におけるヒ素の分布は投与 1 時間後では赤血球中に約 17%、投与 4 時間後では約 14%であったことから (図 4)、投与直後における赤血球への蓄積はそれほど高くないが、反復投与することにより赤血球中へ蓄積することが示唆された。DPAA の反復投与終了後 198~237 日が経過すると、血液中におけるヒ素の蓄積は対照群とほぼ同じくらいにまで低下したが、赤血球中には約 80%が分布していた (図 3 a, b)。ラットにおいてジメチルヒ素 (DMA) が赤血球中に蓄積することは知られているが<sup>35)</sup>、サルにおいて DPAA が赤血球中へ蓄積しやすいことが分かった。

DPAA を反復投与したサルの体毛中においては、対照群と比較して約 5 倍のヒ素が蓄積しており (図 2 c)、投与終了後においては対照群と比較して約 19 倍ものヒ素が蓄積していた (図 3 e)。サルの赤血球の寿命は 86~105 日であることから<sup>6)</sup>、赤血球中に蓄積されていたヒ素が体毛中に再分布した可能性も考えうる。

DPAA を単回投与したサルにおいて、尿中からのヒ素の排泄は約 40% (図 5 a) であり、また糞中への排泄は約 17%であったことから (図 5 b)、24 時間以内に投与量の約 6 割の DPAA が体外に排泄されることが分かった。

DPAA 投与 1 時間及び 4 時間後の脳脊髄液中のヒ素濃度は、対照群と比較しそれぞれ約 1.5 倍、2.6 倍となった (図 4 c) ことから DPAA は血液脳関門を通過し、脳内へ移行しうることが示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) Shraim A, Cui X, Li S, Ng JC, Wang HP, Jin YL, Liu YC, Guo L, Li DS, Wang SQ, Zhang RZ, Hirano S: Arsenic speciation in the urine and hair of individuals exposed to airborne arsenic through coal-burning in Guizhou, PR China. *Toxicol Lett* 137: 35-48, 2003.
- 2) 医科学研究資源としてのカニクイザル、吉田高志、藤本浩二編、シュプリンガー・ジャパン (株)、2006年、89ページ

- 3) Lerman S, Clarkson TW: The Metabolism of Arsenite and Arsenate by the Rat. *Fund Appl Toxicol* 3: 309-314, 1983.
- 4) Vahter M, Marafante E, Dencker L: Tissue distribution and retention of <sup>74</sup>As-dimethylarsinic acid in mice and rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 13: 259-264, 1984.
- 5) Shiobara Y, Ogra Y, Suzuki KT: Animal species difference in the uptake of dimethylarsinous acid (DMA(III)) by red blood cells. *Chem Res Toxicol* 14: 1446-1452, 2001.
- 6) 血液学—ヒトと動物の接点、谷本義文著、清至書院、1982年、58ページ

## [2. 1. 2] 薬剤を用いたジフェニルアルシン酸 (DPAA) の体外排泄機構の解明

主任研究者：平野 靖史郎 (国立環境研究所環境リスク研究センター 室長)  
研究分担者：石井 一弘 (筑波大学人間総合科学研究科 講師)  
研究協力者：小林 弥生 (国立環境研究所環境健康研究領域 研究員)  
水村 綾乃 (千葉大学薬学部 大学院 M1)

### 1 概要

コレバインを緩衝溶液中で膨潤させ懸濁液とし、ジフェニルアルシン酸 (DPAA) を添加して DPAA のコレバインへの吸着量を *in vitro* で調べた。また、pH を変化させた反応や、比較のため三価と五価の無機ヒ素やモノフェニルアルソン酸を用いてヒ素化合物のコレバインへの吸着量を調べた実験の結果から、コレバインは陰イオン交換剤として DPAA を吸着しているものと推測された。

### 2 目的

体内に蓄積したヒ素化合物の排泄を促進するために、BAL、DMPS、DMSA 等の含チオール化合物が考えられる。しかし、これらの含チオール化合物はヒ素化合物をキレートする際に、比較的毒性の低い五価のヒ素化合物をより強毒性の三価のヒ素化合物に還元する可能性がある。

一方、体内に摂取された DPAA は胆汁に排泄されることが明らかにされており、経口薬剤により、胆汁内の DPAA を吸着できれば、腸肝循環を断ち切ることにより DPAA の糞中への排泄を促進させることが可能となる。ここでは、胆汁酸排泄促進剤であるコレバインの DPAA 吸着能を *in vitro* で調べ、コレバインの DPAA の排泄促進の可能性を検討することを目的とした。

### 3 方法

#### 3. 1 試薬の調製

すべての溶液は、Millipore water (Simpli Lab-UV ; Millipore, Japan、以下「蒸留水」と略す。)を用いて調製した。

**DPAA 溶液**：DPAA (トリケミカル研究所) 15 mg をビーカーに分取し、蒸留水 2.95 ml 及び 1 N NaOH 溶液 (容量分析用 ; 和光純薬) 0.05 ml を加え、超音波処理をして溶解させた。溶解後、0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter でろ過し、得られた溶液を stock solution (19 mM) とした。また蒸留水で希釈して 100ppm の溶液も調整した。

**モノフェニルアルソン酸 (monoPAA) 溶液**：monoPAA (東京化成工業) 20 mg をビーカーに分取し、蒸留水 5.0 ml を加え、超音波処理をして溶解させた。DPAA と同様にフィルターでろ過して stock solution (20 mM) とし、蒸留水で希釈して 100ppm とした。

**iAs (V) 溶液**：ヒ酸ナトリウム (Sigma) 常法に従い 100ppm 溶液を作製した。

**iAs (III) 溶液**：亜ヒ酸ナトリウム (Sigma) 常法に従い 100ppm 溶液を作製した。

**150mM ギ酸-トリメチルアミン溶液 (pH3.0)** : ギ酸 (試薬特級 ; 和光純薬) 6ml を 1000ml ビーカーに分取し、適量の蒸留水を加えておいた。pH メーターで pH を測定しながら、30%トリメチルアミン溶液(試薬;和光純薬)を加えた。pH が 3~3.5 で安定したらメスシリンダーに移し、蒸留水を加えて 1000ml とした。

**コレバイン懸濁液 (in PBS)** : コレバインミニ 83% (三菱ウェルファーマ) を 50mL のファルコンチューブに分取し、50mg/ml となるよう PBS (Sigma) を加え、振とうし、しばらく静置した後、均一になるよう懸濁させた。

**コレバイン懸濁液 (in ギ酸-トリメチルアミン溶液)** : コレバインミニ 83% (三菱ウェルファーマ) を 50mL のファルコンチューブに分取し、50mg/ml となるよう上記で調整したギ酸-トリメチルアミン溶液 (pH3.0) を加え振とうし、しばらく静置した後、均一になるよう懸濁させた。

**10 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 6.7)** : 酢酸アンモニウム (特級 ; 和光純薬) 0.771 g を 1000 ml の蒸留水に溶解し調整した。調整後、0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter でろ過し、脱気をして溶離液として用いた。

### 3. 2 操作方法

#### 3. 2. 1 コレバインと DPAA との反応条件の検討

1.5ml のエッペンチューブにコレバイン懸濁液 (in PBS) 0.5ml を分取し、19mM の DPAA 溶液 2.5、5.0、10 $\mu\text{l}$  をそれぞれ加え、よく攪拌後、37°C で 1 時間振とうし、インキュベートした。ただし、DPAA 溶液 5.0 $\mu\text{l}$  を加えたもののみ 37°C で 4 時間振とうしたインキュベートも行った。インキュベート後、遠心分離(10500 回転、25°C、10 分間)し、上清を 1mL 用シリンジに取り、0.45 $\mu\text{m}$  PVDF membrane (Millipore) フィルターでろ過し、新たなエッペンチューブに入れ、HPLC で測定するまで冷蔵庫 (4°C) に保存した。得られた溶液をサンプルとし、HPLC (LC-20AD ; Shimadzu, Japan) -UV (SPD-20A ; Shimadzu, Japan) system による分析を行った。溶離液の流速は 1.0 ml/min、各サンプルの注入量は 20 $\mu\text{l}$ 、カラムは HGB5120-5-50217-2 (CellSeed) として、262 nm にてピークの検出を行い、保持時間・ピーク面積・ピーク高さを求めた。また、比較対照としてコレバイン懸濁液の代わりに PBS を用いて同様に行った (n=4)。

#### 3. 2. 2 コレバインと DPAA、monoPAA、iAS (V)、iAs (III) との反応

1.5ml のエッペンチューブにコレバイン懸濁液 (in PBS) 0.5ml を分取し、100ppm の DPAA 溶液、monoPAA 溶液、iAs (V) 溶液、iAs (III) 溶液をそれぞれ 5 $\mu\text{l}$  ずつ別々に加え、よく攪拌後、37°C で 1 時間振とうし、インキュベートした。インキュベート後、遠心分離 (10500 回転、25°C、10 分間) し、上清を 1mL 用シリンジに取り、0.45 $\mu\text{m}$  PVDF membrane (Millipore) フィルターでろ過し、新たなエッペンチューブに保存した。それぞれ硝酸洗浄済み試験管にろ過した溶液を 50 $\mu\text{l}$  ずつ分取し、0.1mol/L HNO<sub>3</sub> 4950 $\mu\text{l}$  を加え、攪拌し、ヒ素濃度を ICP-MS により測定した。また比較対照としてコレバイン懸濁液の代わりに PBS を用いて同様に行った (n=4)。さらに blank として蒸留水のみ、PBS のみ、コレバイン懸濁液のみでの操作も行った (n=2)。

#### 3. 2. 2 コレバインと DPAA との反応における pH の影響

1.5ml のエッペンチューブにコレバイン懸濁液 (in ギ酸-トリメチルアミン溶液) を 0.5ml 分取し、100ppm の DPAA 溶液を 5 $\mu\text{l}$  加え、よく攪拌後、37°C で 1 時間振とうし、インキュベートした。インキュベート後、遠心分離 (10500 回転、25°C、10 分間) し、上清を 1mL 用シリンジに取り、0.45 $\mu\text{m}$  PVDF membrane (Millipore) フィルターで濾過し、新たなエッペンチュ

ープに保存した。硝酸洗浄済み試験管に濾過した溶液を 50 $\mu$ l 分取し、0.1mol/L HNO<sub>3</sub> 4950 $\mu$ l を加え 5ml とし、攪拌後、ヒ素濃度を ICP-MS により測定した。また比較対照としてコレバイン懸濁液の代わりにギ酸-トリメチルアミン溶液 (pH3.0) を用いて同様に行った (n=4)。さらに blank として蒸留水のみ、ギ酸-トリメチルアミン溶液 (pH3.0) のみ、コレバイン懸濁液のみでの操作も行った (n=4)。

#### 4 結果

コレバインと DPAA を反応させ、DPAA のコレバインへの吸着の条件を検討した。図 1 に示したように、溶液中の約 40% の DPAA がコレバインに吸着していたが、反応時間を 1 時間から 4 時間に延ばしても、吸着量の変化を認めなかったことから、吸着は 1 時間以内に平衡に達していると考えられる。また、コレバインに対するヒ素の混合比を変化させても、コレバインに吸着した DPAA と溶液に残存した DPAA との割合が変化しなかった (図 2)。また、コレバインは、DPAA の他、monoPAA や iAs (V) も同様に吸着したが、iAs (III) に関しては全く吸着効果が見られなかった (図 3)。一方、反応液の pH を下げて (pH=3) 同様の実験を行ったところ、コレバインへの DPAA の吸着は見られなくなった (図 4)。

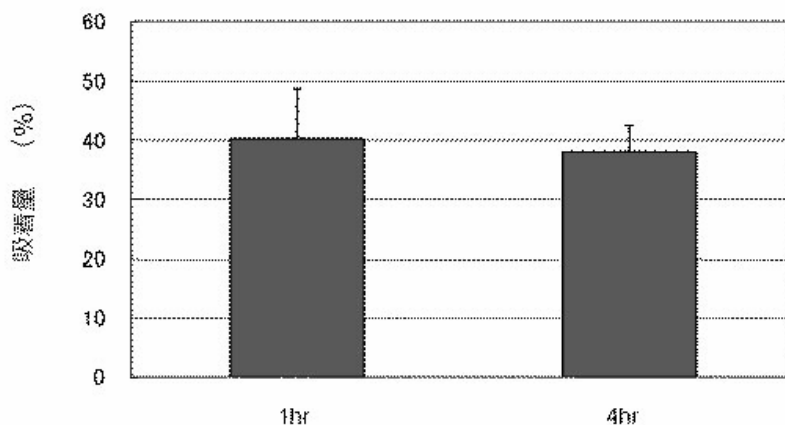


図 1 DPAA のコレバインへの吸着条件の検討 (時間)

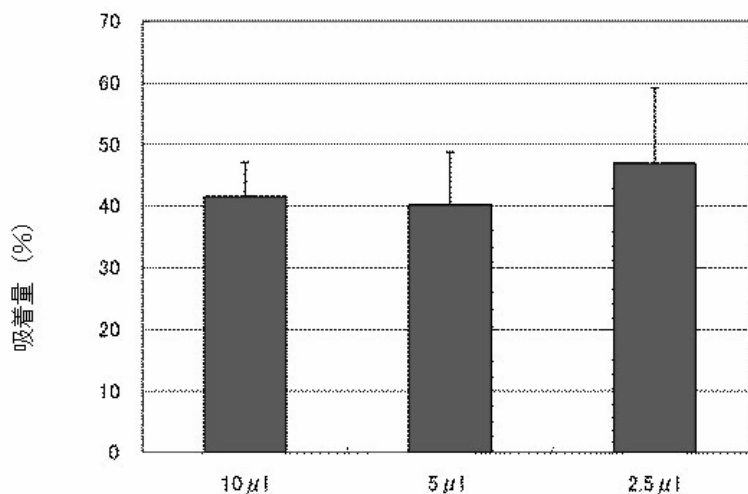


図 2 DPAA のコレバインへの吸着条件の検討 (混合比)

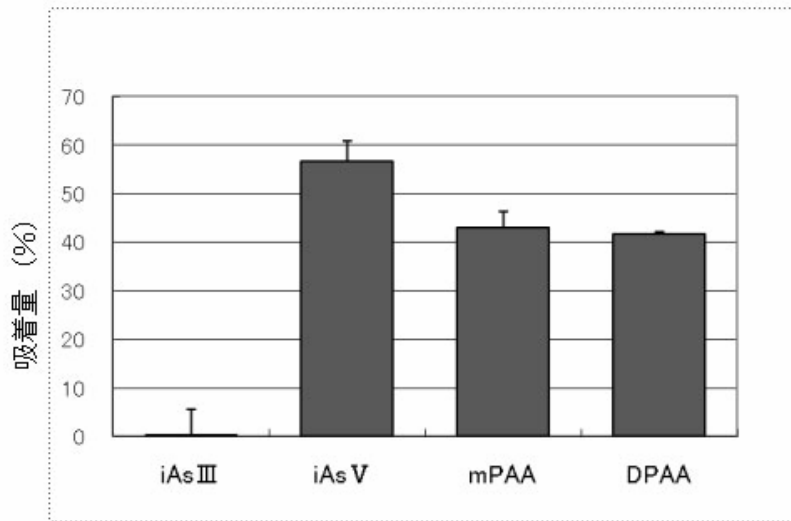


図3 コレバインに対する5種の無機ヒ素 (iAsV)、monoPAA、DPAAの吸着。pH=7

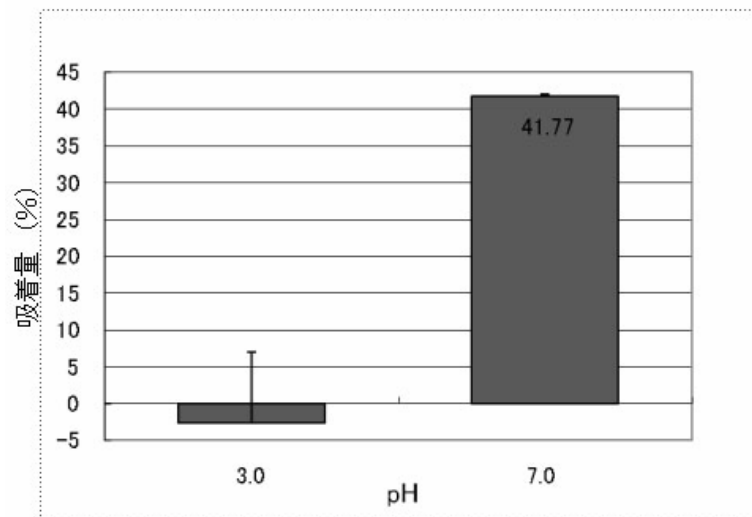
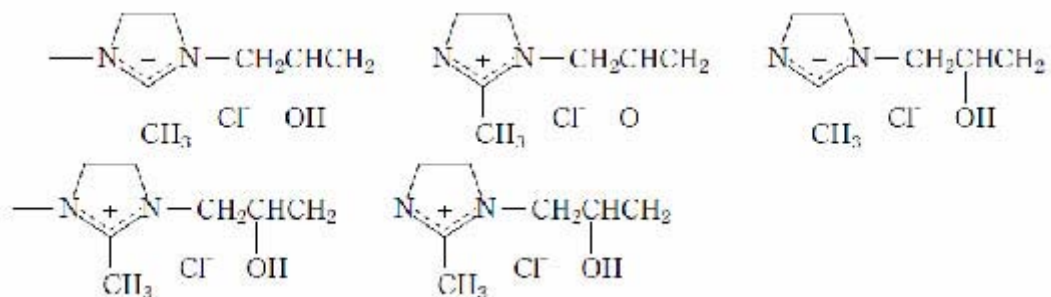


図4：異なる pH における DPAA のコレバインへの吸着

## 5 考察

コレバインの有効成分は以下に示されるコレスミドであるが、基本的に陰イオン交換性の薬剤であり、胆汁酸などの吸着に効果があるものと考えられる。





中性の溶液中で行った吸着実験では、一連のヒ素化合物の中でも、中性付近で陰イオンとなっている、DPAA、monoPAA、iAs (V) は、同様の吸着特性を示したが、中性付近ではイオンにチャージしていない iAs (III) はコレバインに吸着しなかった。また、DPAA についても、pKa より低い pH で反応させた場合に、コレバインへの吸着は認めなかったことから、ヒ素化合物のコレバインの吸着には、主として陰イオン交換基が機能していると考えられる。コレバインは、有機物であるダイオキシンの体外排泄にも効果があると報告されている<sup>1)</sup> ので、コレバインの有害化学物質吸着能に関しては、非イオン性の機構が働いている可能性も考え得るが、今回の実験結果からは、フェニル基を持ったヒ素化合物のコレバインへの吸着についてもコレスミドのイオン交換性の効果と考えることができる。コレバインは、高コレステロール血症の治療に用いられている薬剤であることから、コレバインが DPAA 排泄促進と解毒作用をもつ薬剤として実際に用いることが可能であることが示された。今回の実験では、ヒ素化合物に対してコレスミドが大過剰存在する条件下で、反応性の検討を行った。今後、コレバインと DPAA の吸着形態をさらに詳しく調べるとともに、コレスミドを用いた *in vivo* 実験において、DPAA の体外排泄効果があるかどうかさらに検討を加える必要がある。

#### 参 考 文 献

- 1) Internal Medicine, 43:792-795, 2004



## [ 2. 2 ] ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の毒性標的分子の探索に関する研究

主任研究者：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：北 加代子 (帝京大学薬学部衛生薬学講座毒性学教室 助教)

### 1 目的

茨城県神栖市(旧神栖町)におけるジフェニルアルシン酸(DPAA)等による健康影響を明らかにするうえで、DPAAをはじめとして、他に井水中に検出されているモノフェニルヒ素化合物(PAA)、ビスジフェニルアルシンオキシド(BDPAO)並びにDPAAの細胞内グルタチオン複合体であるDPA(GS)のヒト細胞に対する影響を、細胞内取り込み機構、細胞防御機構、さらに毒性標的分子の解明など毒性発現に関わる諸機構について多面的に解析することが重要である。既に多くのアプローチが行われ基礎的情報を得てきたが、なかでも極めて重要であり、その解明が臨床との接点になると思われる毒性標的分子の探索は急務である。すなわち、上記ヒ素化合物ばく露実験動物の脳組織及びヒト細胞の全蛋白質から発現変化を示すものをハイスループット分析により検出し、健康影響の発現に関係する分子種を明らかにすることは重要である。こうしたアプローチは、DPAA等の毒作用発現機序解明のみならず、健康影響に関連したバイオマーカーの発見として臨床応用の為の基礎データを提供するであろうし、毒性標的分子の解明により、その発現を改変した動物の利用を通じて治療薬開発への道が開かれると思われる。本研究では、DPAA処理した培養ヒト細胞HepG2の蛋白について二次元電気泳動を行い、対照細胞蛋白と発現の異なる蛋白の同定を行った。

### 2 方法

DPAA処理細胞蛋白を8M尿素等で抽出し、1次元目の等電点電気泳動及び2次元目のSDS電気泳動を行ったあと、銀染色により蛋白スポットを検出した。対照と異なる蛋白は蛋白分解酵素処理を行い、MALDI-TOF質量分析、PMFあるいはMS/MSにより同定した。同定に際して、Mascot データベース検索システムおよびNational Center for Biotechnology Informationのタンパク質配列データベースを利用した。

Kidney-type glutaminase (KGA)及びglutaminase C(GAC)に対する抗体の作製は、KGAとGAC isoformの配列380-393に相当するペプチド(SERESGDRNFAIGY)を合成し、KLHキャリアー蛋白との付加体を形成するためC末端にシステインを導入した後ウサギに免疫を行い、抗KGA/GAC抗体を得た。ポリクローナル抗KGA/GAC抗体を用いて、細胞グルタミナーゼの発現解析のため免疫蛍光染色及びImmunoblottingを行った。

Phosphate-activated glutaminase 活性の測定は、Curthoys and Lowry (1973)による方法に基づき、反応生成物グルタミン酸の測定により行った。

### 3 結果

#### 3. 1 DPAA処理及び未処理細胞蛋白の二次元電気泳動

約80%の生存率を示す条件のDPAA(500 $\mu$ M)で24時間処理後、細胞蛋白を抽出し二次元電気泳動解析を行い、処理及び未処理細胞間で蛋白スポットの泳動位置、染色強度を比較検討し

た。図 1 A は、DPAA 処理細胞に於ける 12kDa から 110kDa の分子量及び 5.3 と 6.5 の間の等電点を有する 600 以上のスポットを示しており、フレーム I~III 内の蛋白スポットを未処理細胞と比較した結果、フレーム I における蛋白 1 は DPAA ばく露により増加、同様にフレーム II の蛋白 3 は DPAA により増加、またフレーム III の蛋白 4 は新たに出現した。一方、フレーム II における蛋白 2 は DPAA 処理により消失した。

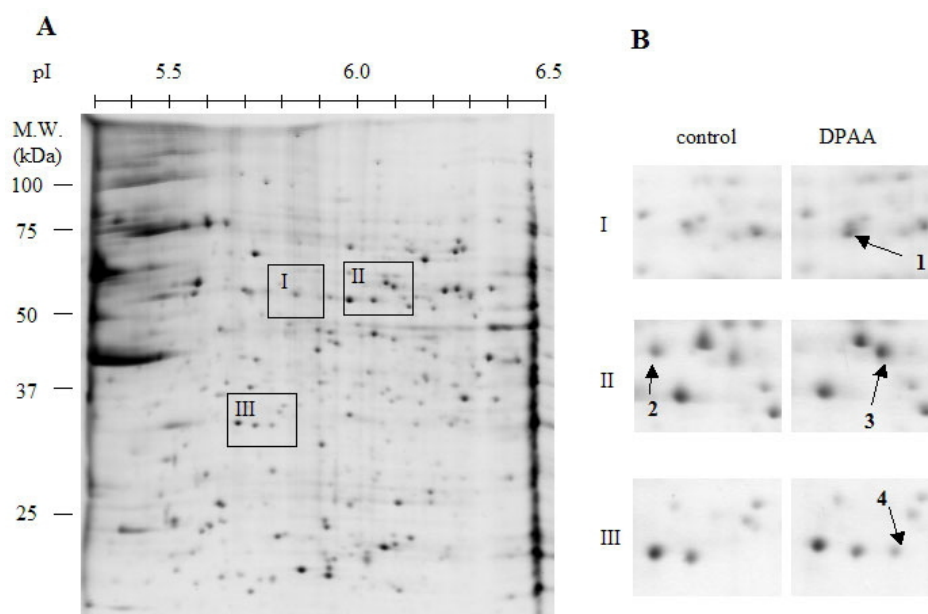


図 1 DPAA 処理及び対照 HepG2 細胞全蛋白の二次元電気泳動

- (A) 500 $\mu$ M DPAA 24 時間処理後、細胞蛋白を抽出し二次元電気泳動(2-DE)を行った。DPAA 処理及び対照細胞間の 2-DE profile の相違はパネル I~III に示される。
- (B) DPAA 処理及び対照細胞間の個々の蛋白の相違はそれぞれのパネル内の矢印で示される。

### 3. 2 2-DE において対照と異なる発現を示した蛋白の同定

上記フレーム内に示した蛋白 1~4 のスポットを切り出し、消化処理後、MALDI-TOF MS/PMF or MS/MS による分析の結果、表 1 に示したように、発現の上昇したのものとして chaperonin containing TCP-1 subunit2 (bata) , aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 及び ribosomal protein P0 が、また発現の減少した蛋白としてグルタミナーゼが明らかになった。

表 1 DPAA 処理により発現の変化した蛋白の MALDI-TOF MS/PMF or MS/MS による同定

Spot No.	Protein	Spot intensity <sup>a</sup>	Accession No.
1	Chaperonin containing TCP-1, subunit 2 (beta)	+	gi   54696794
2	Glutaminase	-	gi   10444080
3	Aldehyde dehydrogenase 1	+	gi   2183299
4	Ribosomal protein P0	+	gi   12654583

<sup>a</sup> Plus (+) means an increase in the relative spot intensity in the DPAA-exposed group relative to the untreated control group; minus (-) means a decrease in the relative spot intensity in the DPAA-exposed group relative to the untreated control group.

### 3. 3 Kidney-type glutaminase (KGA)及び glutaminase C (GAC)特異抗体の産生

図 1 B フレーム II の蛋白 2 の MALDI-TOF MS/PMF の結果、4 つのペプチド断片は GAC 及び kidney-type glutaminase (KGA)と一致した (図 2、表 2)。

KGA と GAC の両方に共通の領域である 380-393 peptides に対する抗体を作製し、これらの細胞内局在を調べたところ、図 3 に示すように、KGA/GAC は extra-nuclear fraction に斑点状に存在しており、ミトコンドリアシグナルと同一であった。

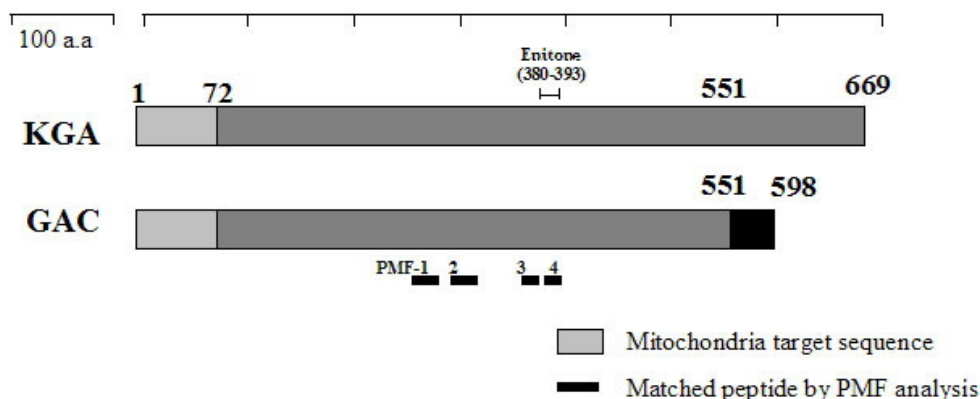


図 2 ヒト KGA 及び GAC のアミノ酸配列

相同領域は同じパターンの陰影で示される。KGA と GAC の両方を認識するポリクローナル抗体を peptide (380-393) に対して調製した。

表 2 PMF によるペプチド断片のアミノ酸配列解析

Fragment No.	position	sequence
PMF-1	256-272	FSPDLWGVSVCTVDGQR
PMF-2	293-307	YAI AVNDL GTE YVHR
PMF-3	365-382	MAGNE YVGF SNATF QSER
PMF-4	388-396	NFAIGYYLK

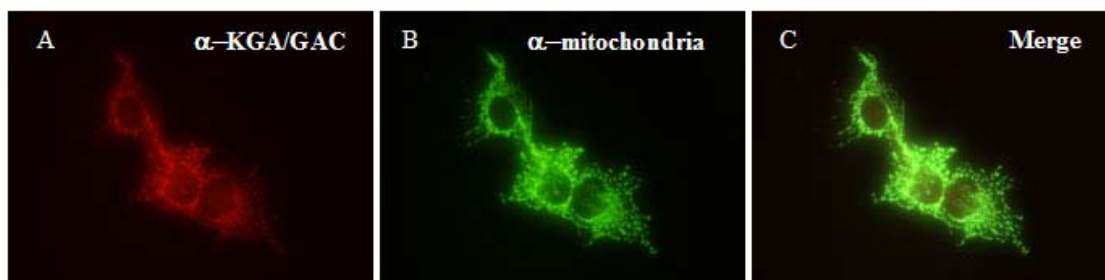


図 3 HepG2 細胞における KGA/GAC の局在  
anti-KGA/GAC (red, A), anti-mitochondria (green, B), Merge (yellow, C)

### 3. 4 GAC は DPAA 処理により濃度及び時間依存性に発現が低下する

HepG2 細胞の KGA/GAC 発現に対する DPAA の影響を調べたところ、図 4 A に示すように GAC が優先的に HepG2 で発現されており、その発現量は DPAA 24 時間処理により濃度依存的に減少した。一方、ミトコンドリア局在シグナルである 65kDa 蛋白及び peroxiredoxin III の発現は DPAA により低下しなかった。図 4 B は、500 $\mu$ M DPAA による処理時間依存性の GAC 発

現の低下を示す。

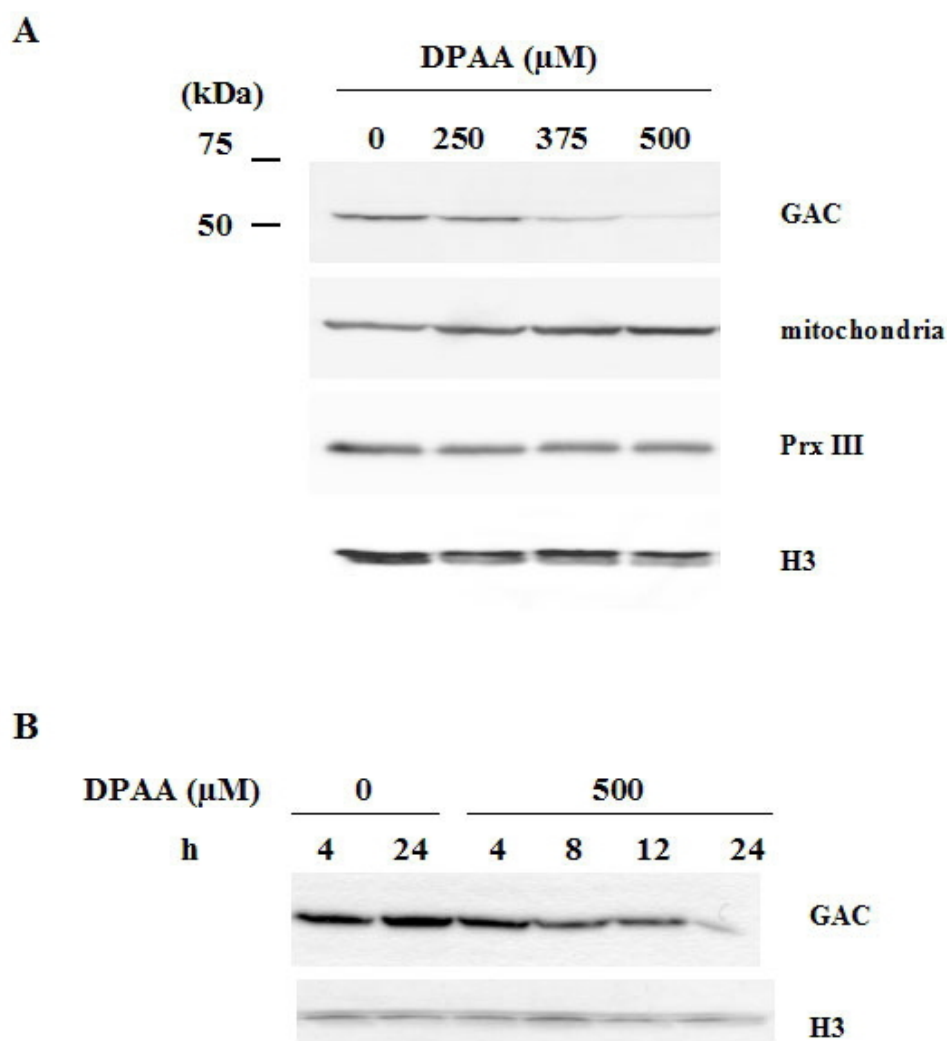


図4 HepG2 細胞による glutaminase C 発現に対する DPAA の影響  
(A) DPAA 24 時間処理 HepG2 細胞 GAC のイムノブロット  
(B) 500 $\mu$ M DPAA による GAC 発現低下の時間依存性  
PrxIII: ミトコンドリア蛋白 peroxiredoxin III  
H3: ヒストン H3

### 3. 5 HepG2 細胞の phosphate-activated glutaminase (PAG) 活性に対する DPAA の影響

KGA は、phosphate-activated glutaminase (PAG) の主たる isozyme といわれている。DPAA による GAC の阻害は PAG 活性に影響するかもしれない。そこで HepG2 細胞の PAG 活性に対する DPAA の影響を検討したところ、図5に示すように、250 $\mu$ M DPAA 24 時間処理により PAG 活性は対照の 60% に減少し、500 $\mu$ M DPAA 24 時間処理ではわずかに 8% の活性が観察された。一方、PAG 活性に対する DPAA の直接的阻害作用は観察されなかった。

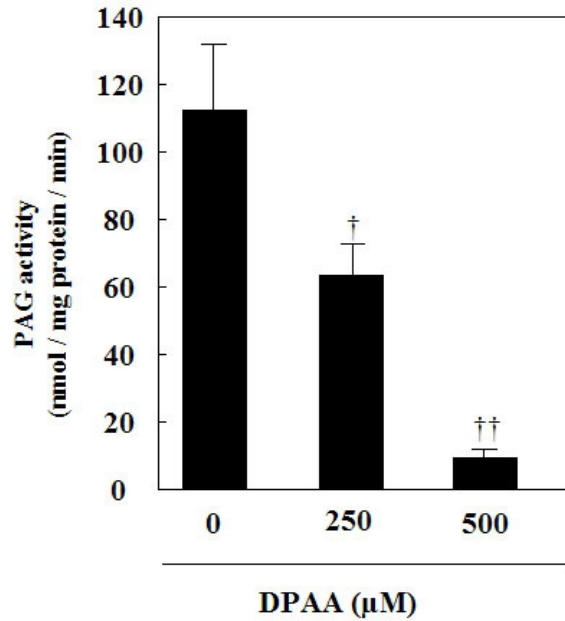
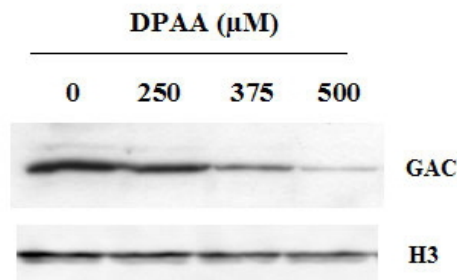


図5 HepG2 細胞の phosphate-activated glutaminase (PAG) 活性に対する DPAA の影響

### 3. 6 DPAA は HeLa 及び SH-SY5Y 細胞の GAC 発現を低下する

DPAA による HepG2 細胞における GAC 発現低下は HepG2 に特異的であるかどうかを明らかにするため、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞及びヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y に対しても検討を行った。その結果、図 6 A に示すように、HeLa における GAC 蛋白レベルは 250-500μM DPAA 24 時間処理により顕著に減少した。このとき、DPAA はヒストン H3 の発現には影響を及ぼさなかった。一方、SH-SY5Y 細胞の DPAA 24 時間処理では GAC の発現は影響を受けなかったが、処理を 48 時間に延長すると濃度依存性に発現レベルが減少した (図 6 B)。

#### A HeLa



#### B SH-SY5Y

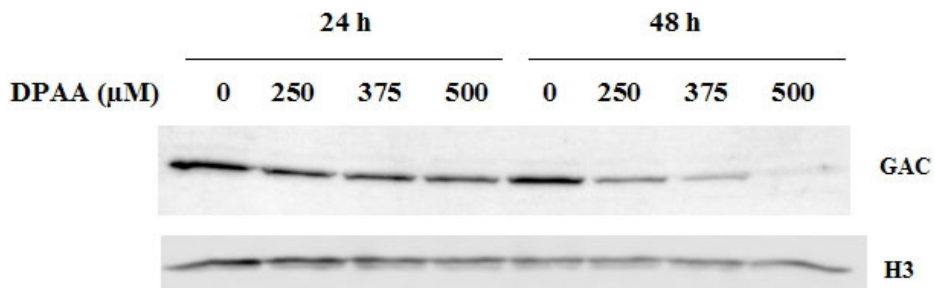


図6 HeLa 細胞及び SH-SY5Y 細胞の glutaminase C 発現に対する DPAA の影響

#### 4 考 察

DPAA 処理培養ヒト細胞蛋白の網羅的解析により、対照と異なる発現を示す 4 種の蛋白 (Chaperonin containing protein TCP-1 subunit2, aldehyde dehydrogenase 1, ribosomal protein P0, glutaminase C) を明らかにした。これらのうち、対照に対して唯一発現の低下した蛋白は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の供給に関わる重要酵素であるグルタミナーゼ (GA) であった。GA には 2 種類の主たるアイソザイム liver-type glutaminase (LGA) と kidney-type glutaminase (KGA) が存在し、さらに KGA のスプライシング変異体 GAC は 3 番目のアイソザイムとして知られる。KGA と GAC の共通領域を含むペプチドに対する抗体を作製し、細胞内局在を immunofluorescence により検討したところ、KGA、GAC のミトコンドリア局在性が明らかになった。また、GAC に相当する 58kDa のバンドは HepG2 細胞に於ける優先型であること、さらに、GAC レベルは DPAA 処理により処理濃度及び時間依存性に減少することがイムノブロット法により明らかになった。他に、DPAA による GAC 発現低下は、ミトコンドリアの輸送系の低下により示される様なミトコンドリア損傷に基づくものではないことも明らかになった。DPAA による GAC の発現低下機構について、現段階では GAC、KGA の mRNA レベルの変化は無く、従って、今後は翻訳後の変化に目を向ける必要がある。

DPAA による GAC 発現低下は HepG2 細胞における phosphate-activated glutaminase (PAG) 活性の低下を伴った。また、GAC の活性低下は HepG2 同様に SH-SY5Y や HeLa 細胞においても観察された。この結果は、飲食物を介して摂取された DPAA が種々のタイプの組織細胞 PAG に影響を及ぼし、PAG を介した代謝機能障害を来す可能性を示唆する。腎臓では、PAG は酸塩基バランスの調節に重要であり、代謝的アシドーシス状態においてアンモニアの産生をサポートするためにその活性が上昇する。一方、DPAA による PAG 活性の低下はアシドーシスの促進に繋がる可能性がある。

中枢神経系では、PAG は神経伝達物質グルタミン酸産生における主要酵素と考えられ、その活性は GABA 作動性皮質神経やアストロサイトよりグルタミン酸作動性小脳顆粒細胞と大脳皮質神経においてより高い。最近の PAG 遺伝子ノックアウトマウスを用いて神経機能に於ける PAG の役割を示した研究では、ノックアウトによるグルタミン酸作動性シナプスにおける神経伝達の低下、呼吸異常、行動異常、誕生後早期の死亡などが明らかにされている。

DPAA による GAC 発現異常と神栖市におけるヒ素健康影響に関して、ヒ素ばく露者の多くは小脳と脳幹における機能障害及び大脳機能障害を反映した神経症状を示しているが、GAC レベルや PGA 活性の低下を来しているか否かは明らかでない。今後は、DPAA 等処理動物の脳組織等の GAC 発現及び活性変化を明らかにし、続いて DPAA ばく露者の臨床試料等を用いた GAC 発現研究が必要になるであろう。また、GAC の発現及び活性の変化は神栖市における DPAA ばく露者に見られる神経症状と関連したバイオマーカーにもなりうる可能性が考えられ、今後の展開が一層期待される。