

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	室長	毒性研究班総括 ジフェニルアルシン酸（DPAA）の胆汁排泄と腸肝循環阻害に関する研究 フェニル化ヒ素に結合するタンパク質の検索
班員	越智 崇文	帝京大学	教授	ジフェニルアルシン酸（DPAA）によるグルタミナーゼ発現低下機構ならびにバイオマーカーとしての応用に関する研究
班員	玉岡 晃	筑波大学	教授	カニクイザルにおけるジフェニルアルシン酸（DPAA）の中樞神経影響
班員	鱒淵 英機	大阪市立大学	教授	ジフェニルアルシン酸（DPAA）の長期毒性に関する予備研究
分担研究者	石井 一弘	筑波大学・人間総合科学研究科	講師	
	小林 弥生	国立環境研究所	研究員	
	北 加代子	帝京大学薬学部	助手	
	魏 民	大阪市立大学大学院医学研究科	講師	
	梯 アンナ	大阪市立大学大学院医学研究科	助教	

【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し、また体内に蓄積したDPAAの体外排泄を促進する薬剤の検索を目的として研究

を進めた。

また、DPAAの長期影響や脳代謝機能に及ぼす影響についてはこれまで調べられてこなかった
ので、H19年度からは新たに2研究課題が増えた。H19年度における本研究班の研究サブテーマ
は以下の5課題である。

- ① フェニルアルシン酸の胆汁排泄と腸肝循環阻害に関する研究
- ② フェニル化ヒ素に結合するタンパク質の検索
- ③ DPAAによるグルタミナーゼ発現低下機構ならびにバイオマーカーとしての応用に関する研究
- ④ カニクイザルにおけるDPAAの中樞神経影響
- ⑤ DPAAの長期毒性に関する予備研究

サブテーマ①では、これまで飼料由来のヒ素によりラットの体内ヒ素バックグランド値が高くなり、その結果としてヒ素の体内動態の解析を難しくしていたが、精製飼料を用いることによりヒ素バックグランド値を減少させること、胆汁酸排泄剤であるコレスミドの存在、非存在下において経口摂取したDPAAの体内動態を調べたところ、コレスミドの存在により、ヒ素投与後2日目と3日目の尿中ヒ素排泄が低下したことから、薬剤によりDPAAの体外排泄が促進されたものと考えられることを報告する。

サブテーマ②と③では、生体内においてフェニル化ヒ素と結合するタンパク質、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研究を進めた。前者の実験では、3価に還元された有機ヒ素化合物に結合するタンパク質を同定することに成功した。

後者の実験では、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と phosphate-activated glutaminase (PAG) 活性の低下が見られたことを前年度報告しているが、今年度は、in vivoでDPAAにばく露したマウスの脳内においてもPAG活性の低下が認められとことを報告する。

サブテーマ④では、ラットを用いた中期毒性試験において、DPAAはdiethylnitrosamineでイニシエーション処置したラットにおいて、肝発がん促進作用を有することが示唆された。一方、酸化損傷的DNA傷害はDPAAの肝発がん性には関与しないことを示唆する結果を得た。サブテーマ⑤では、サルにDPAAを経口投与し、経時的にPETを撮影することにより、DPAAが脳の代謝機能に及ぼす影響を調べる研究が進行中である。

以下に、①～⑤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) の胆汁排泄と腸肝循環阻害に関する研究

主任研究者：平野 靖史郎 (国立環境研究所環境リスク研究センター 室長)

研究分担者：小林 弥生 (国立環境研究所環境健康研究領域 研究員)

：石井 一弘 (筑波大学人間総合科学研究科 講師)

研究分担者：水村 綾乃 (千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻 修士2年)

：渡辺 喬之 (千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻 修士1年)

1 概要

通常のラット飼料中に含まれるヒ素濃度が高く、餌由来のヒ素が臓器中ヒ素濃度の測定値に著しい影響を与えるため、ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の体内動態を調べる上において大きな障害となっていた。ここでは精製飼料を用いることによりラットの体内ヒ素バックグランド値を減少させ、排泄促進剤の存在、非存在下における経口摂取した DPAA の体内動態を調べた。その結果、排泄促進剤の存在により、ヒ素投与後 2 日目と 3 日目の尿中ヒ素排泄が低下したことから、糞中への排泄が促進される可能性が示唆された。

2 目的

DPAA を経口投与したラットに胆管増生をはじめとした肝障害が生じることが報告されている。体内に摂取された DPAA の一部は胆汁排泄されることが示唆されているが、胆汁中の DPAA、あるいは DPAA 代謝物は定量的に測定されていない。体外排泄が促進されれば DPAA の解毒剤としての効果が期待される為、本研究では、DPAA を投与したラットに、胆汁酸排泄促進剤を投与することにより、DPAA の体外排泄を促進させることが可能かどうか調べることを目的とした。

3 方法

3.1

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

3.2 動物

(1) ラット赤血球におけるヒ素蓄積に関する餌の影響

2 週齢の雄性ラットを母獣と共に購入し、授乳中でもある 1 週間の馴化中から、通常食群と精製食群に分けた。各群を経時的に解剖し、ヘパリンの入った真空採血管を用いて血液を採取した。採取した全血は 1,600 g で 10 分間遠心し、血球と血漿とに分離した。各試料は硝酸と過酸化水素によって湿式灰化し、総ヒ素濃度を ICP MS により測定した。

(2) 排泄促進剤を用いた DPAA の体外排泄に関する研究

2週齢の雄性ラットを母獣と共に購入し、授乳中でもある1週間の馴化中から5週齢になるまで精製食を与えて飼育した。1群4匹の5週齢ラットに対し、2群に精製食、2群にコレステリド混餌食（排泄促進剤であるコレステリドを3%含む精製食）を与え、1週間飼育したのち滅菌した脱イオン水または1.0 mg As/kg b.w.の用量でDPAAを経口投与し、3日間代謝ケージにて飼育した。3日間にわたり代謝ケージにて、24時間ごとに尿および糞を採取し、3日後に解剖を行い、血液および肝臓を採取した。血液の採取はヘパリンの入った真空採血管および血液凝固剤の入った真空採血管を用いて採取した。採取した血液を1,600 gで10分間遠心し、血漿あるいは血清を得た。全血、血漿、肝臓は硝酸と過酸化水素によって湿式灰化し、総ヒ素濃度をICP MSにより測定した。また、血清を用いてAST、ALT、 γ GTP、総コレステロールおよびLDLコレステロールを測定した。なお、コレステリド混餌食のDPAA投与群において、投与数分後に死亡が確認された為に、この群に関しては1群3匹で実験を行った。

3. 3 ヒ素の測定

各試料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。また、尿およ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

(1) ラット赤血球におけるヒ素蓄積に関する餌の影響（図1）

図1に全血および血漿中のヒ素濃度を示した。ラット納入時（2週齢）をWeek -1、離乳時（3週齢）をWeek 0とし、Week 3（6週齢）まで経時的に試料を採取した。精製食および通常食のヒ素濃度はそれぞれ7.65、700 ppbだった。飲水は検出限界以下だった。離乳1週間後（Week 1, 4週齢）には、血液および臓器中において、通常食群と比較し精製食群でヒ素濃度が有意に低下した（図1）。

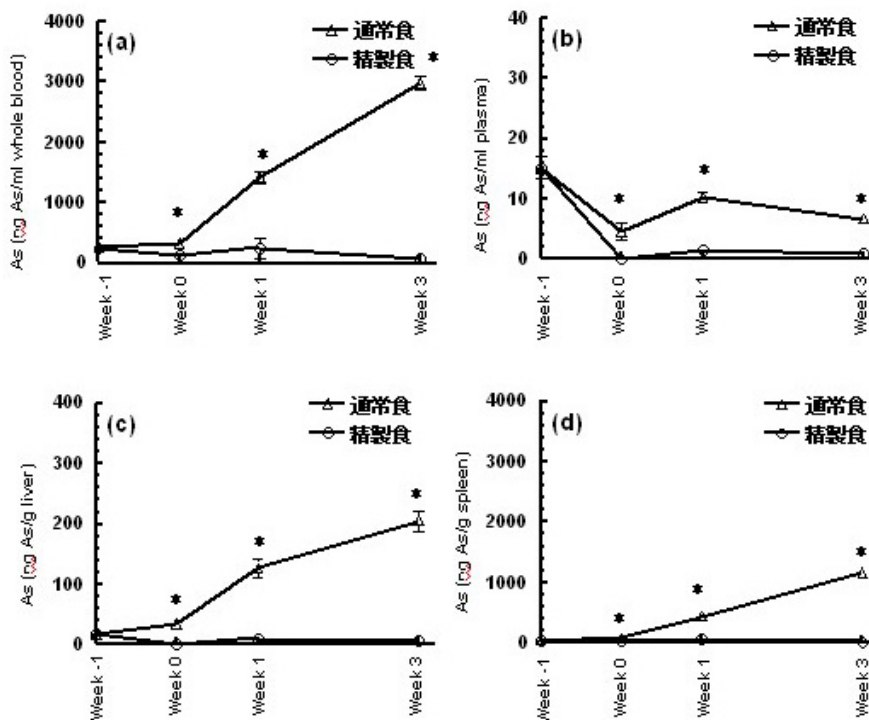
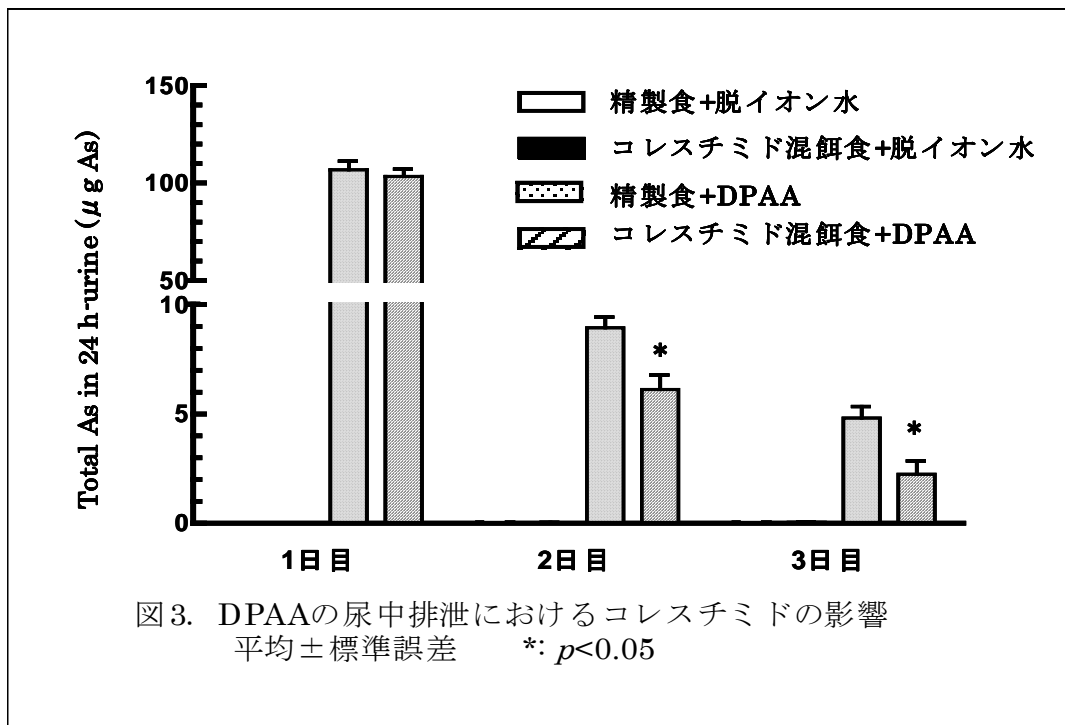
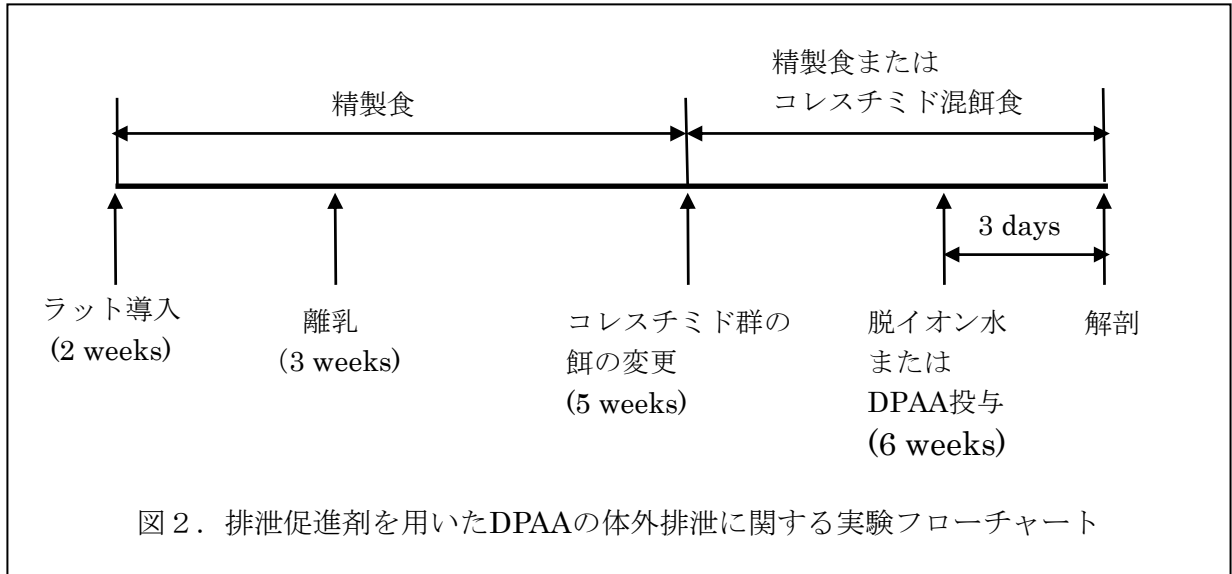


図1. 餌による全血 (a)、血漿 (b)、肝臓 (c) および脾臓 (d) 中の総ヒ素濃度の変化
平均±標準誤差

*: $p < 0.05$

(2) 排泄促進剤を用いた DPAA の体外排泄に関する研究

図2に実験のフローチャートを示した。図3には、滅菌した脱イオン水または DPAA を強制経口投与してから3日後まで、24時間毎に採取した尿中における総ヒ素量を示した。滅菌した脱イオン水を投与した各対照群における24時間のヒ素尿中排泄量は $0.1 \mu\text{g}$ 以下であった。精製食で飼育していたラットに対しDPAAを投与した群では(精製食+DPAA投与群)、1日目から3日目の尿中ヒ素排泄の割合は投与量に対して順に、52%、4.3%、2.3%となった。一方、コレステリド混餌食で飼育していたラットに対しDPAAを投与した群では(コレステリド混餌食+DPAA投与群)、51%、3.0%、1.1%となった。精製食+DPAA投与群とコレステリド混餌食+DPAA投与群において、1日目のヒ素排泄量はほとんど変化がなかったが、2日目、3日目では精製食群に比べ、コレステリド混餌群のヒ素排泄量が有意に低下した(図3)。



血液生化学の結果を表 1 に示した。今回の投与量においては、ヒ素投与による肝臓障害は検出されなかった。総コレステロールおよび LDL の結果から、精製食群とコレスチミド混餌食群に有意差はみられなかったが、コレスチミド混餌食群の方が低い傾向になっていた (表 1)。

表 1 血液生化学検査における餌またはヒ素投与の影響

	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	総コレステロール (mg/dL)	LDL (mg/dL)
精製食+水	106±11.0	21.5±1.32	2 \geq	68.5±4.90	9.75±1.55
コレスチミド混餌食+水	77.3±2.78	31.3±4.15	2 \geq	65.8±11.1	4.50±0.645
精製食+DPAA	67.0±3.32	17.3±1.65	2 \geq	79.0±9.10	8.75±1.49
コレスチミド混餌食+DPAA	73.0±3.00	25.7±5.84	2 \geq	58.7±9.21	4.33±0.333

5 考 察

通常用いられているラットの飼料は高濃度のヒ素が含まれている。この餌由来のヒ素は臓器中ヒ素濃度の測定値に著しい影響を与えるため、DPAA の体内動態を調べる上において大きな障害となっていた。本研究では、ラットの体内ヒ素バックグランド値を減少させる為、ラットに通常食と蛋白源を魚粉からカゼインに変更した精製食を与え飼育した。その結果、離乳 1 週間後 (Week 1, 4 週齢) には、血液および臓器中において、通常食群と比較し精製食群でヒ素濃度が有意に低下した (図 1)。血漿中のヒ素濃度は両群共に低濃度であったことから (図 1b)、通常食群の全血中におけるヒ素の蓄積は主として赤血球中であると示唆された。得られた結果から、以降の実験は授乳中でもある 1 週間の馴化中から 6 週齢になるまで精製食で飼育したラットを使用することとした。

コレスチミドは陰イオン交換樹脂製剤であり、腸管内で胆汁酸を吸着することにより、コレステロールの異化を促進し、その結果血清のコレステロール低下作用を示すと考えられている¹⁻³。今回の結果では、精製食群とコレスチミド混餌食群において、血清中の総コレステロールおよび LDL コレステロールには有意差はみられなかった。両群共にコレステロール値が定常状態の為、有意な差はみられなかったと考えられるが、コレスチミド混餌食群の方が低い傾向にあった (表 1)。コレスチミドはヒトにおいて、ダイオキシンの排泄を促進することが報告されている⁴。図 3 の結果から、コレスチミド混餌食群において、投与後 2 日目以降で尿中排泄が精製食群と比較し、有意に低下したことが明らかとなった。このことから、コレスチミドが胆汁へ排泄されたヒ素を腸管内で吸着、糞への排泄を促進した為に尿中への排泄が低下したと示唆された。

参 考 文 献

- 1) 三津家正之 他：薬理と治療, 24 (Suppl.4), S-577 (1996)
- 2) 三津家正之 他：薬理と治療, 24 (Suppl.4), S-585 (1996)
- 3) 島田浩志 他：薬理と治療, 24 (Suppl.4), S-601 (1996)
- 4) Sakurai, K., Todaka, E., Saito, Y and Mori, C, Internal Medicine, 43, 792-795 (2004)

[2.2] フェニル化ヒ素に結合するタンパク質の検索

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：小林 弥生（国立環境研究所環境健康研究領域 研究員）
研究分担者：水村 綾乃（千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻 修士2年）
：渡辺 喬之（千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻 修士1年）

1 概要

ヒ素は、自然界および生体内で、3価 (As^{III}) と 5価 (As^{V}) として存在しており、 As^{III} の方がより毒性が強いことが知られている。また、体内では5価のヒ素が3価に還元され毒性を発現するものと考えられている。

本来、ジフェニルアルシン酸 (DPAA) は5価であるが、体内に摂取されたのち3価に変換され蛋白などに結合することも考えられる。5価と3価のヒ素の毒性の違いは、細胞や組織におけるタンパク質との反応性にあると考えられる。ここではフェニルヒ素アフィニティー担体を作製し、ヒ素に特異的な結合をするタンパク質を調べ、DPAAの毒性発現機構を推定する。

2 目的

ヒ素化合物の毒性発現における初期反応は、標的細胞の成分や組織の蛋白をはじめとした生体分子との結合として捉えることができる。ここでは、モノフェニルアルソン酸を基本骨格としたヒ素化合物を活性エステルとの反応により担体に結合させ、モノフェニルアルソン酸を3価に還元するなどの処理を行なった後、生体成分と反応させることにより、フェニル化ヒ素と反応性の高い生体分子を単離・同定することを目的とした。

3 方法

活性エステル-NHS基の付いた Sepharose に p-arsanilic acid ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{As}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})_2$) をカップリングさせ、5価ヒ素アフィニティー担体を作製した。さらに、GSHで還元し、3価ヒ素アフィニティー担体を作製した。3価および5価フェニルヒ素アフィニティー担体に、HepG2 (ヒト肝がん細胞) を Bioruptor により超音波処理した調整した細胞可溶性画分、あるいはマウス肝臓ホモジネートを遠心して得られた上清を、それぞれアフィニティー担体とインキュベートし、ヒ素に結合したタンパク質を溶出させ、電気泳動を行い蛋白を分離した後、マススペクトルを用いてフェニル化ヒ素に対する蛋白を同定した。以下に、詳細について記述する。

試薬

NHS-activated Sepharose 4 fast flow
monoPAA ($\text{C}_6\text{H}_5\text{As}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})_2$)
PAO ($\text{C}_6\text{H}_5\text{As}^{\text{III}}\text{O}$)
p-arsanilic acid ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{As}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})_2$)
GSH
GSSG
DTT
Ethanol

Amersham Biosciences AB, Sweden
Tokyo Kasei Kogyo co.,LTD.
SIGMA, MO
Alfa Aesar
Wako, Osaka
Wako, Osaka
SIGMA, MO
Wako, Osaka

formic acid	Wako, Osaka
Dulbecco's Modified Eagle Medium (high glucose)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Penicillin-Streptomycin, liquid	Invitrogen, Carlsbad, CA
fetal bovine serum	Hyclone, UT
D-PBS (-)	Wako, Osaka
TRYPsin .05% EDTA	Invitrogen, Carlsbad, CA
BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible	PIERCE, Rockford, MA
NuPAGE Novex Bis-Tris Gel 4-12% 1.0 mm 12 well	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE Novex Bis-Tris Gel 4-12% 1.0 mm 2D well	Invitrogen, Carlsbad, CA
pH 3-10 IEF Gel, 1.0mm, 10well	Invitrogen, Carlsbad, CA
IEF Buffer kit pH 3-10	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, CA
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA
SERVA® IEF Marker 3-10, Liquid Mix	Invitrogen, Carlsbad, CA
EZBlue Gel Staining Reagent	SIGMA, MO
One Step Protein Gel Staining Reagent, InstantBlue	COSMO BIO CO.,LTD

使用器具・機器

LCMS	LCMS-2010 EV	SHIMADZU, Kyoto
Reverse phase column		Cell Seed, Tokyo
	Aqua Way™ philic HG120-5-70629-4 (4.6 mm (I.D.) × 150 mm (L))	
CO ₂ incubator	10-0212 AG	Ikemoto Rika Kogyo, Tokyo
細胞破碎装置	BIORUPTOR® UCD-250	COSMO BIO CO.,LTD
Ultracentrifuge	Optima™L-90K, SW 32.1 Ti Rotors	Beckman Coulter
Amicon® Ultra 5000MWCO		Millipore, Bedford, MA
Microcon® YM-3		Millipore, Bedford, MA

細胞と実験動物

HepG2 (ヒト肝がん由来) 細胞	RIKEN, Yokohama
--------------------	-----------------

実験操作

1) HepG2 (ヒト肝がん) 細胞の培養

100 unit/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% FBS を含む DMEM 培地で、37°C, 5%CO₂ 下で培養した。細胞は、cell strainer 70 µm (BD Falcon) を用いてろ過後、1×10⁵/ml 個となるよう懸濁し、cell culture dish (100 mm×20 mm, Corning, NY) に播種し、ほぼコンフルエントとなるまで培養し、回収および継代を繰り返した。

2) 可溶性画分の調製

回収した HepG2 細胞は、protease inhibitor cocktail を 1 µl 添加した PBS 100 µl に懸濁した。懸濁液を細胞破碎装置で超音波処理 10 秒, 休止 20 秒を 1 セットとして、25 セット繰り返した。ディフクティック染色で細胞破碎を確認後、15,000 g, 4°C, 3 分間の遠心分離を行った。得られた上清をさらに 150,000 g, 4°C, 65 分間で超遠心し、得られた上清を HepG2 可溶性画分とし、-30°C

で保存した。

3) 5価ヒ素アフィニティー担体 As (V) -Sephrose の合成方法の検討

NHS-activated Sepharose 4 fast flow のプロトコールを参考に行った。P-arsanilic acid ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{As}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})_2$) を 126 mM phosphate buffer (pH7.2) に溶解して 60 mM に調製し、coupling solution とした。16-23 μmol NHS/mlgel を含む NHS-activated Sepharose (以下、担体という) を軽くピペッティングしてから分取し、担体の 10 倍量の冷 1 mM HCl で洗浄した。HCl を除去し、coupling solution を加え、リトマス試験紙で中性を確認後、カップリング反応を行った。反応条件は、モル濃度比 NHS:As=1:5, 室温 (20°C), 3 時間を基本として、モル濃度比を NHS:As=1:1, 1:15、反応時間を 0.5 時間, overnight、反応時の温度を 4, 50 °C とそれぞれ変化させ、ヒ素結合の収率が最も高い条件を検討した。反応終了後、150 mM Tris buffer (pH8.5) を 20 ml 加えて 2 時間静置した。2 時間後、100 g, 4°C, 3 分間遠心分離し、上清を除去後、担体の 3 倍量の 150 mM Tris buffer (pH8.5) で担体を 10 回洗浄し、全体量が 5 ml となるよう 20% ethanol 中に保存した。

4) Control-Sepharose の作製

上記 As (V) -Sephrose の合成と同様に行った。ただし、p-arsanilic acid coupling solution の代わりに 150 mM Tris buffer (pH8.5) を用いて、カップリング反応を行った。

5) 3価ヒ素アフィニティー担体 As (III) -Sephrose の作製

真空ポンプで脱気後、窒素ガスで残存ガスを十分に置換した脱イオン水 (以下、脱気水という) に GSH を 15 mg/ml になるように溶解した。作製した As (V) -Sephrose から ethanol を除去し、脱気水で 3 回洗浄した。15 mg/ml GSH を加えてピペッティングし、4°C, overnight で振とうして、As (V) -Sephrose を還元し As (III) -Sephrose を作製した。

6) ヒ素アフィニティー担体と HepG2 細胞可溶性画分との反応性

As (V) または As (III) -Sephrose をサスペンションしてからエッペンチューブに 800 μl 取り、100 g, 4°C で 3 分間遠心分離し、上清を除去後、脱気水で 3 回洗浄した。残った 400 μl の担体に 20 mg/ml HepG2 細胞可溶性画分を 400 μl 加え、気泡が立たないように軽くピペッティングし、100 rpm、室温で 1 時間インキュベートした。反応途中、Sephrose が沈降しないように、15 分毎にピペッティングを行った。反応終了後、100 g, 4°C, 3 分間遠心分離し、上清を unbound 分画とした。残った Sepharose を PBS で 3 回洗浄し、SDS sample buffer で抽出後、SDS-PAGE で分離し、CBB で染色して、Control-Sephrose および担体に結合しなかったタンパク質と比較した。

7) As (III) -Sephrose に結合した HepG2 細胞可溶性画分の解析

DTT 溶出液を、Microcon® YM-3 を用いて、14,000 g, 4°C, 80 分間遠心分離し、分子量 3,000 以下の物質を除去した後、BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible でタンパク質を定量した。等電点電気泳動で分離し、目的のタンパク質部分のレーンを切り取り、二次元電気泳動で解析した。染色は CBB 染色液を用いた。

8) 目的タンパク質の同定解析

二次元電気泳動像の unbound 分画と DTT 溶出液 (bound) 間でタンパク量の差が明らかであったスポットを切り取った。CBB 染色ゲルを水/MeOH=50/50 溶液で脱色し、トリプシンによるゲル内消化、ペプチド抽出後、MALDI-MS/MS および MASCOT により同定した。

同定した As (III) 結合性タンパク質および GSH 存在下における As (III) 結合性タンパク質については、アミノ酸残基の hydrophobic, neutral, hydrophilic の割合 (%) を GENETYX-MAC を

用いて算出した。

4 結果

1) As (V) -Sepharose と HepG2 細胞可溶性画分との反応性

Control-Sepharose と比較すると、As (V) -Sepharose に特異的に結合したタンパク質は観察されなかった (図1)。

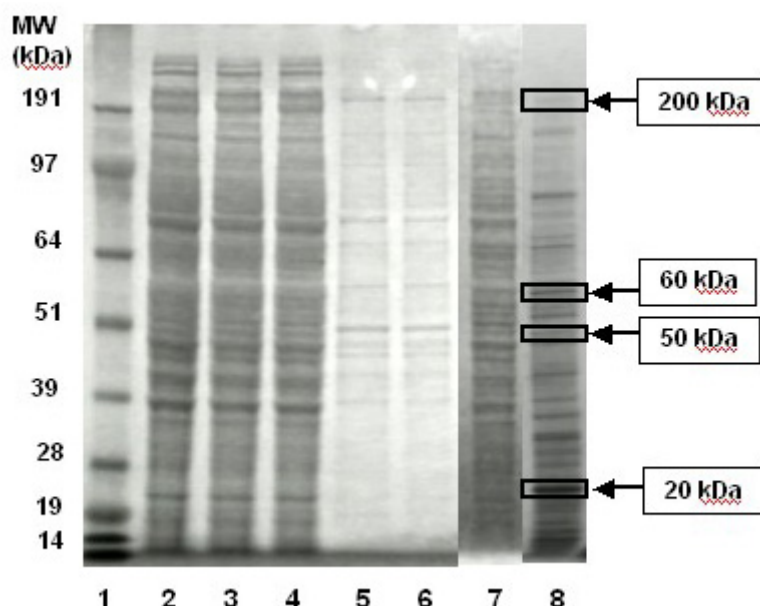


図1 SDS-PAGE 電気泳動によるAs(V)-Sepharose と As(III)-Sepharose に結合するHepG2 細胞可溶性分画の解析

Lane 1. marker, 2. original sup, 3. unbound of control, 4. unbound of As(V),
5. extract of control, 6. extract of As(V), 7. unbound of As(III), 8. extract of As(III)

2) As (III) -Sepharose と HepG2 細胞可溶性画分との反応性

As (V) -Sepharose および As (III) -Sepharose で行った肝上清中タンパクとの反応性の違いを図1に示す。As (V) に特異的に結合するタンパク質はほとんど見られなかったのに対して、As (III) に特異的に結合したタンパク質のバンドをいくつか確認することができた。HepG2 可溶性画分におけるこれらのタンパク質の分子量は、約 200kDa, 60kDa, 50kDa, 20kDa であった。

二次元電気泳動の結果を図2に示す。

unboundとDTT eluate (=bound) 間で大きな差が見られたスポット (a), (b), (c) のタンパク質について同定を行った。As (III) -Sepharoseに結合しなかった主なタンパク質は、calreticulin precursor [Homo sapiens] (MW:48283, pI=4.29)、結合した主なタンパク質は、enhancer protein (MW:22455, pI=8.16) とprotein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens] (MW:46512, pI=4.95) (図2、表1-1) であった。

いずれのタンパク質もアミノ酸配列にシステインを1個以上持っている。しかし、結合したタンパク質は、全アミノ酸数に対するシステイン数の割合が1%を超えているのに対し、結合しなかったタンパク質では1%に満たっていない (表1-1)。今回、解析を行ったAs (III) 結合性タンパク質は、いずれも全アミノ酸数に対するシステイン数の割合が1%を超え、親水性アミノ酸残基よりも疎水性アミノ酸残基を多く持っていることがわかった (表1-2)。

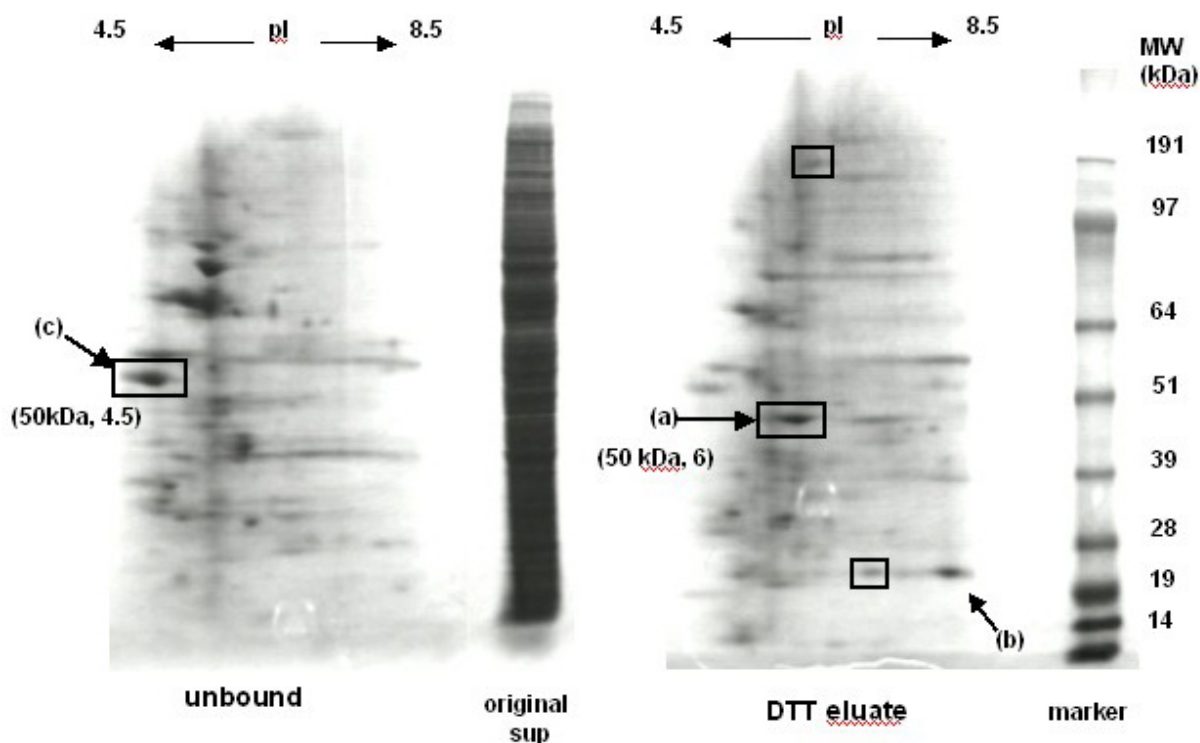


図2 2次元電気泳動によるAs(III)-Sepharose 結合タンパク質の解析

表1-1 MALDI-MS/MSによるof As(III)-Sepharose 結合タンパク質の同定結果

Spot name	LOCUS No.	Accession# (NCBIhr)	name	pI	molecular weight	number of AA	number of Cys	% of Cys
(a)	AAB50217	gi 710248	protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]	4.95	46512	421	6	1.43
(b)	AAA50464	gi 440306	enhancer protein	8.16	22455	199	6	3.02
(c)	NP_004334	gi 4757900	calreticulin precursor [Homo sapiens]	4.14	48283	417	3	0.72

表1-2 GENETYX-MACによるAs(III)-Sepharose 結合タンパク質のタンパク質解析

LOCUS No.	Accession# (NCBIhr)	name	Hydrophobic (%)	Neutral (%)	Hydrophilic (%)
AAB50217	gi 710248	protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]	50.12	18.53	31.35
AAA50464	gi 440306	enhancer protein	50.25	21.11	28.64
NP-004334	gi 4757900	calreticulin precursor [Homo sapiens]	40.29	16.55	43.17

5 考 察

As (V) -Sepharose 作製において、Sepharose に存在する-NHS 基と As は、1 : 1 でカップリングするが、As (V) -Sepharose の収率は [反応前の結合している-NHS 基 (mol) に対する、反応後の Sepharose に結合した As 量 (mol) の割合]、6.99%と低かったが、作製したヒ素アフィニティ担体を用いて、十分なタンパク質との反応性が観察された。

As (V) に結合するタンパク質として、pyruvate kinase M2 [1]などが報告されているが、本研究における HepG2 可溶性画分には As (V) に結合するタンパク質は観察されなかった。

一方、As (III) 結合性タンパク質は、GSH 存在の有無に関わらず、HepG2 可溶性画分に観察された。As (III) -Sepharose に結合したタンパク質は、DTT により完全に溶出されたが、GSH, PBS, PAO では一部しか溶出されなかった。以上のことから、肝細胞のタンパク質は、As (III) にのみチオール基を介して特異的に結合していると考えられる。このことが As (III) と As (V) の毒性や体内蓄積量の違いに関与していると考えられる。

As (III) 結合性タンパク質のうち同定されたものは、enhancer protein (MW:22455, pI=8.16)、protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens] (MW:46512, pI=4.95)であった。どちらのタンパク質もアミノ酸配列にシステイン残基を 6 個持ち、全アミノ酸数に対する割合はそれぞれ 3.02%, 1.43%であった (表 1-1)。また、親水性アミノ酸よりも疎水性のアミノ酸の割合が高い。

一方、As (III) に結合しなかった主なタンパク質を同定した結果、calreticulin precursor [Homo sapiens] (MW:48283, pI=4.29) であることがわかった。システイン残基を 3 個持つが、全アミノ酸数に対する割合は、0.72%である。また、疎水性アミノ酸よりも親水性アミノ酸の割合が高い (表 1-2)。

GSH 非存在下における As (III) 結合性タンパク質のうち、protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]では、-CysGlyHisCys-という配列が 2 カ所に存在し、これは、As (III) に結合することがわかっているチオレドキシンの -CysGlyProCys- 残基に似た配列であるといえる。チオレドキシンの高度に保存された-CysGlyProCys- 配列の 2 つのビシナルなシステインに結合することで安定な複合体を形成できると報告されている[2]ことから、protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]の As (III) との結合部位は、-CysGlyHisCys-残基と推察される。また、もう一方の As (III) 結合性タンパク質の enhancer protein の As (III) との結合部位は-CysCys-だと考えられる。以前、当研究室において As (III) はグルタチオン抱合された形で Cyt19 や SAM によって還元され、代謝されていくというヒ素の新しい代謝経路が提唱された[3]が、本研究で As (III) が GSH 存在下、グルタチオン抱合された形で結合するタンパク質の存在が示された。

以上のことから、As (III) への結合は、GSH 存在の有無に関わらず、全アミノ酸残基に対するシステイン残基の割合が 1%以上で、かつ、親水性アミノ酸残基よりも疎水性アミノ酸残基を多く持つことが必要であると考えられる。また、As (III) 結合性タンパク質を探索する際は、GSH 存在の有無にわけて研究していくことが必要であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Huang, R. N., Yeh, H. Y., Cheng, S. C., Chow, L. P. and Lee, T. C. (2000) Arsanilic acid-Sepharose chromatography of pyruvate kinase from KB cells. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 740, 109-116.
- 2) Wang, Z., Zhang, H., Li, X. F. and Le, X. C. (2007) Study of interactions between arsenicals and thioredoxins (human and E. coli) using mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 3658-3666.
- 3) Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X. and Hirano, S. (2005) A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* 79, 183-191.

[2.3] ジフェニルアルシン酸 (DPAA) によるグルタミナーゼ発現低下機構 並びにバイオマーカーとしての応用に関する研究

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)
分担研究者：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

神栖市におけるヒ素健康影響の全体像を理解するうえで、ジフェニルアルシン酸 (DPAA) など井戸水中に検出されたヒ素化合物の毒性標的分子の解明が必要である。そのため、ヒ素化合物ばく露実験動物の脳組織およびヒト細胞のタンパク質の網羅的解析により健康影響の発現に関係する分子種を明らかにすることが重要であり、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ことになる。昨年度までのアプローチ、即ち DPAA 処理培養ヒト細胞蛋白の二次元電気泳動及び質量分析により、対照に比べ顕著な発現低下を示すタンパク質グルタミナーゼ (GA) を明らかにした。GA は、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の供給に関わる重要な酵素であり、DPAA によるその発現異常は神栖市におけるヒ素ばく露者の中枢神経症状発現機構に関連して興味もたれる。そこで GA に焦点を合わせ、次の研究を通じて DPAA による GA 発現変化のヒ素健康影響に於ける意義を考えたい。

(実験1) 井戸水中に検出された DPAA 以外のヒ素化合物の培養ヒト細胞 GA に対する影響
(実験2) DPAA 長期投与実験動物の脳内 GA 変化

2 (実験1) 井戸水中に検出された DPAA 以外のヒ素化合物の培養ヒト細胞 GA に対する影響

2.1 方法

リン酸-活性化グルタミナーゼ活性の測定

リン酸-活性化グルタミナーゼ活性は Heini et al. (1987) による方法に基づき、反応の結果グルタミンから遊離したアンモニアを σ -phthaldialdehyde と反応させ測定した。即ち、細胞抽出液を反応 buffer (100 mM potassium phosphate, 171 mM glutamine, 1.5 mM ammonium chloride and 10% ethylenglycol, pH8.0) に添加し 37 °C で 12 分間インキュベートした。反応は 7% trichloroacetic acid を加えて停止し、10 分間冷却した。その後、5,000 x g で 10 分間遠心して上清を分離し、0.45ml の σ -phthalaldehyde / mercaptoethanol reagent (0.2 M potassium phosphate, pH7.4, containing 4 mM mercaptoethanol and 10.4 mM σ -phthaldialdehyde) と反応させた。反応液は室温で 45 分間暗所に置いた後、spectrophotometer を用いて 410nm の吸収を測定した。

Immunoblotting

細胞タンパク (20 μ g/lane) を 10% SDS-PAGE により分離した後 PVDF membrane に転写した。PVDF 膜は 5% スキムミルクでブロックした後、rabbit polyclonal anti-KGA/GAC antiserum と 4 °C、6 h インキュベートした。次いで、プロットは TBS-T で洗浄後 抗 rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA) coupled to horseradish peroxidase と室温で一時間反応させた。洗浄後、膜は ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. NJ, USA) を用いてタンパクの検出を行った。

2. 2 結果

種々ヒ素化合物の構造 (図1)

DPAA, ビス (ジフェニルアルシン) オキシド (BDPAO) およびフェニルアルソン酸 (PAA) は神栖市の井戸水中に検出され、フェニルメチルアルシン酸 (PMAA) は神栖市の汚染地域で栽培された米中に検出された。

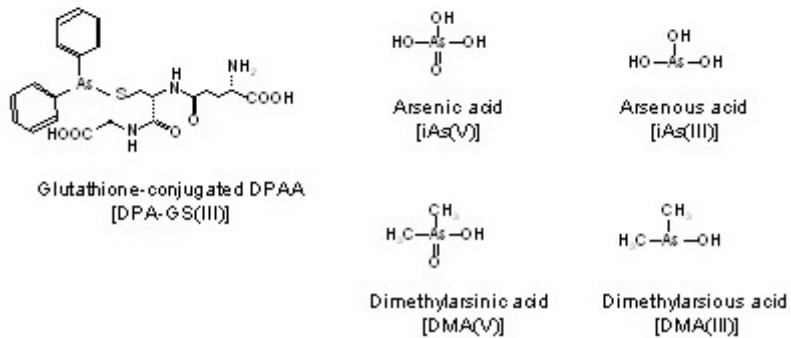
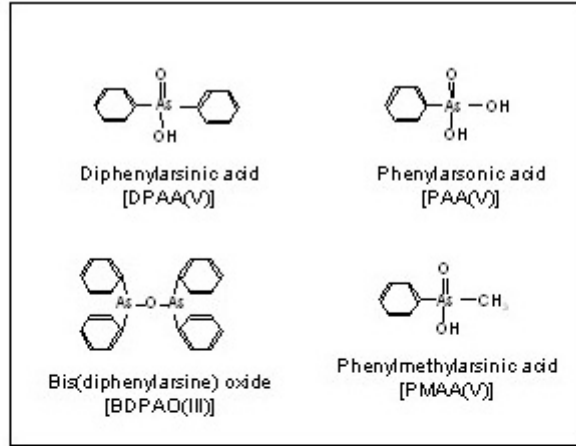


図1 神栖市の井戸水および米中に検出されたヒ素化合物とその他のヒ素化合物の構造

培養ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 に対するフェニルヒ素化合物の毒性

96-well plate に 2×10^4 cells /well で播種後 24 時間前培養を行い、種々ヒ素化合物で 24 時間処理を行った後、WST-8 法により細胞毒性を測定した。(図 2) の結果より、ヒ素化合物の HepG2 細胞に対する LC_{50} 値は $697 \mu\text{M}$ (DPAA), $741 \mu\text{M}$ (PAA), $2.6 \mu\text{M}$ (BDPAO), $386 \mu\text{M}$ (PMAA) and $3.1 \mu\text{M}$ (DPA-GS) であった。一方、グルタミナーゼの測定に適したヒ素化合物濃度を選択するため、80%以上の生存率を示す濃度として以下の条件を定めた。即ち DPAA および PAA は 0~500 μM , PMAA は 0~125 μM , BDPAO は 0~1.5 μM , DPA-GS は 0~2 μM (DPA-GS) とした。

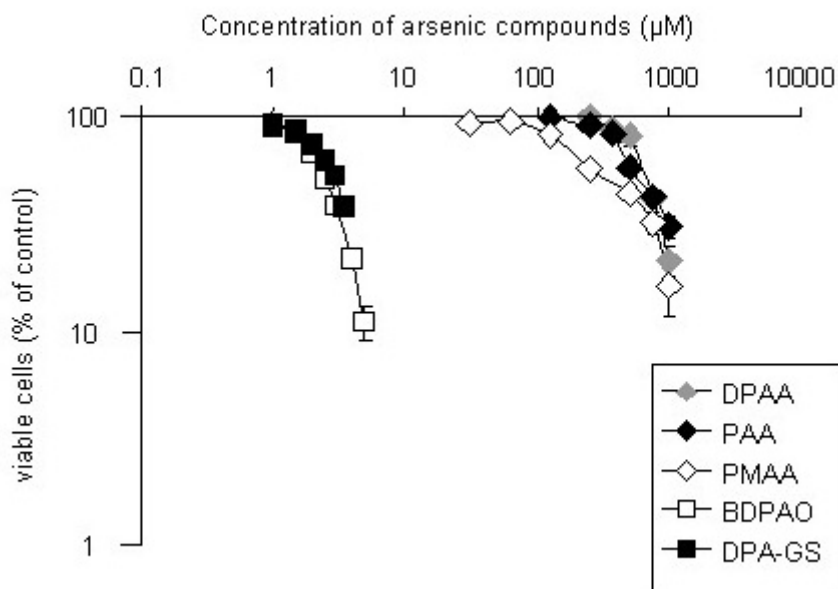


図 2 HepG2細胞に対するヒ素化合物の毒性

神栖市の井戸水中に検出されたヒ素化合物による HepG2 細胞グルタミナーゼ C (GAC) タンパクの発現およびリン酸-活性化グルタミナーゼ (PAG) 活性の抑制

(図 3) に示すように、細胞の DPAA ($\sim 500 \mu\text{M}$) 24 時間処理により濃度依存性の GAC タンパクの発現抑制および PAG 活性の抑制が観察された。また (図 4) に示すように、DPAA と同様に PAA および PMAA 処理によっても濃度依存性の GAC タンパクの発現抑制および PAG 活性の抑制が観察された。しかし、BDPAO にはこのような抑制作用はみられなかった。

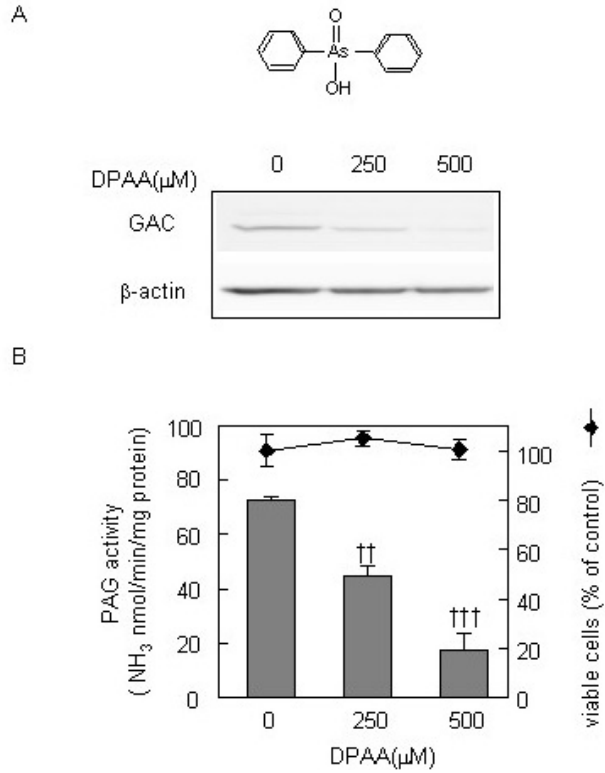


図3 HepG2細胞GACタンパクおよびPAG活性に対するDPAAの影響

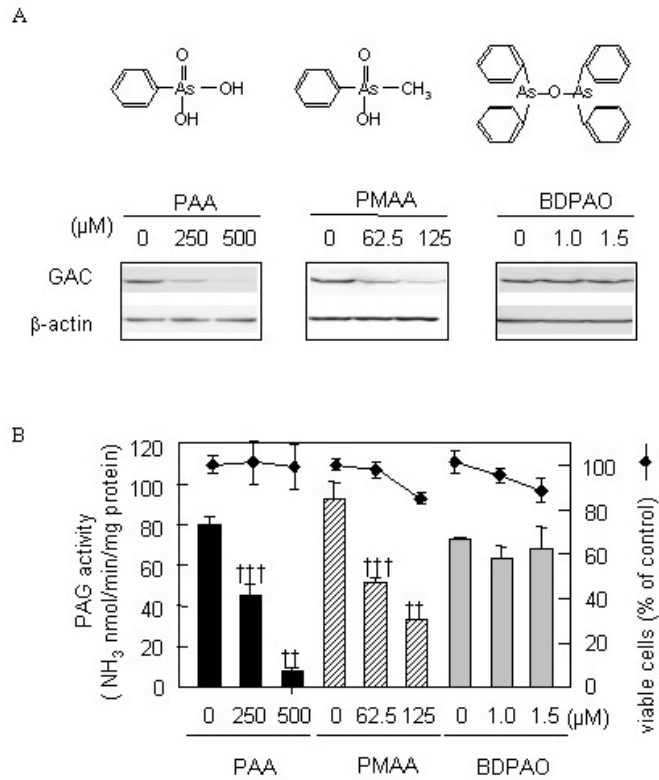


図4 HepG2細胞GACタンパクおよびPAG活性に対する神栖の井戸水中および米中に検出されたヒ素化合物の影響

HepG2 細胞グルタミナーゼ C (GAC) タンパクの発現およびリン酸-活性化グルタミナーゼ (PAG) 活性に対するその他のヒ素化合物の影響

神栖市の井戸水中に検出されたヒ素化合物以外のヒ素化合物（無機ヒ素およびメチル化代謝物）のグルタミナーゼに対する影響を調べたところ、(図5)に示すように、iAs(V) 500 μM および iAs(III) 20 μM 24 時間処理において PAG 活性の低下が観察されたが、GAC レベルに変化はなかった。またメチル化代謝物には、GAC レベルおよび PAG 活性のいずれに対しても抑制作用がみられなかった。

(図6)は DPAA の GSH 複合体 (DPA-GS) のグルタミナーゼに対する作用を示す。Fig.2 に示したように、DPA-GS は DPAA に比べ千倍強毒性物質である。しかし、GAC レベルおよび PAG 活性のいずれに対しても抑制作用を示さなかった。

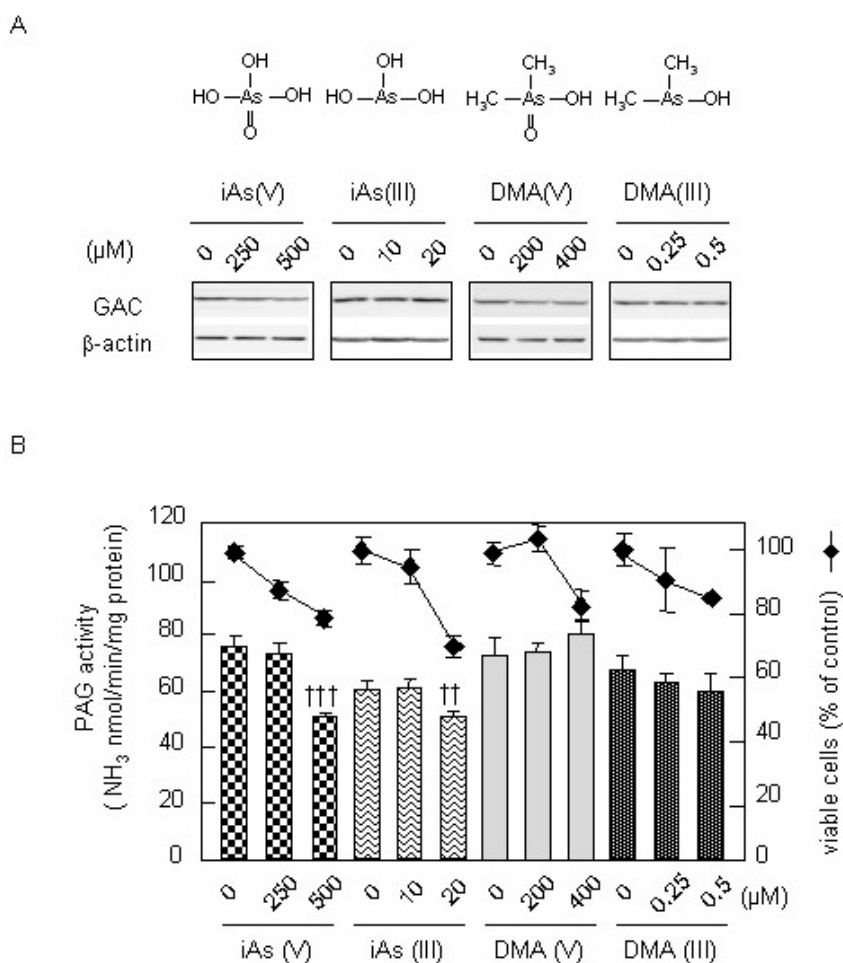
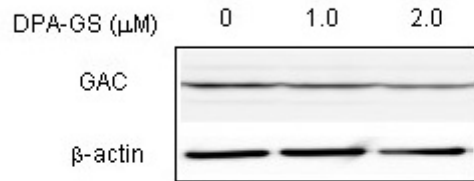
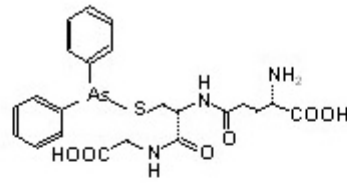


図5 HepG2細胞GACタンパクおよびPAG活性に対する無機ヒ素およびメチル化代謝物の影響

A



B

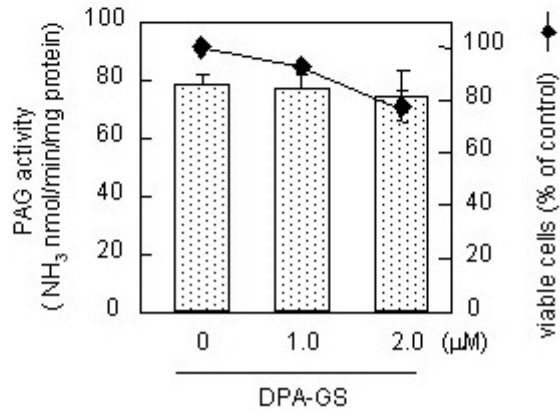


図6 HepG2細胞GACタンパクおよびPAG活性に対するDPAAのGSH複合体(DPA-GS)の影響

HepG2 細胞グルタミナーゼ C (GAC) タンパクの発現およびリン酸-活性化グルタミナーゼ (PAG) 活性の抑制に必要なヒ素化合物の構造

(図7)はDPAA, PAA, PMAAの構造の一部(水酸基)をメチル基で置換、あるいはPAAのパラ位にアミノ基を導入した化合物を示した。(図8)と(図9)に示すように、メチル置換されたヒ素化合物DPMAO, PDMAOおよびパラ位アミノ基を有する化合物(アルサニル酸)は、いずれもGACレベルおよびPAG活性の抑制作用を示さなかった。

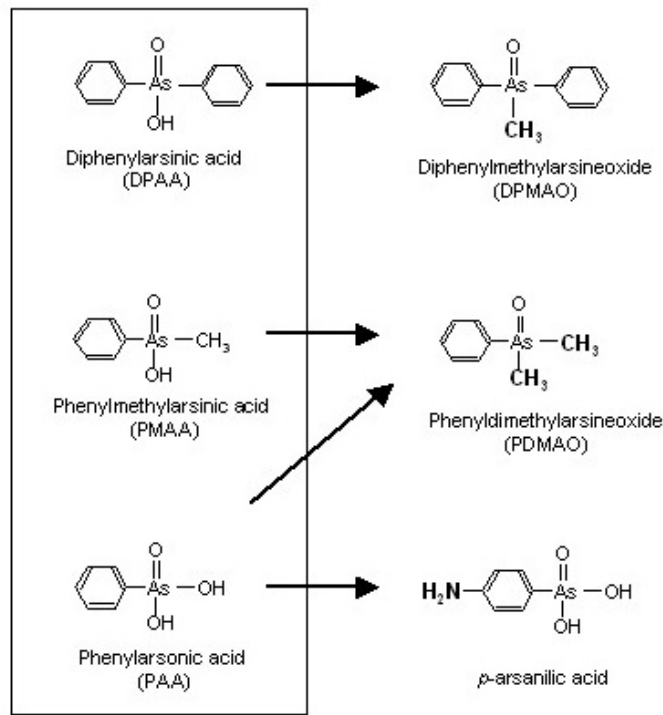


図7 フェニルヒ素化合物の構造修飾

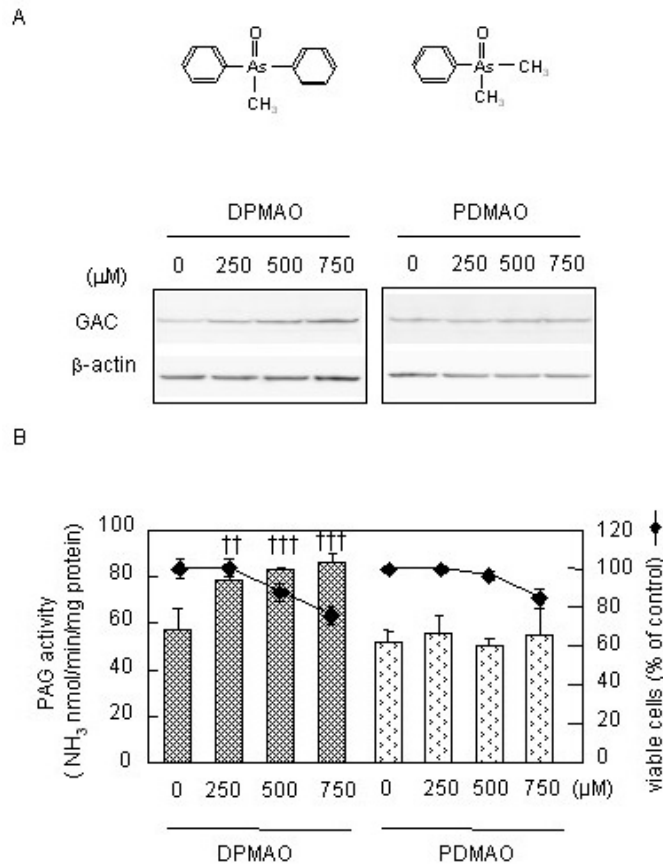


図8 HepG2細胞GACタンパクおよびPAG活性に対するDPMAOおよびPDMAO24時間処理の影響

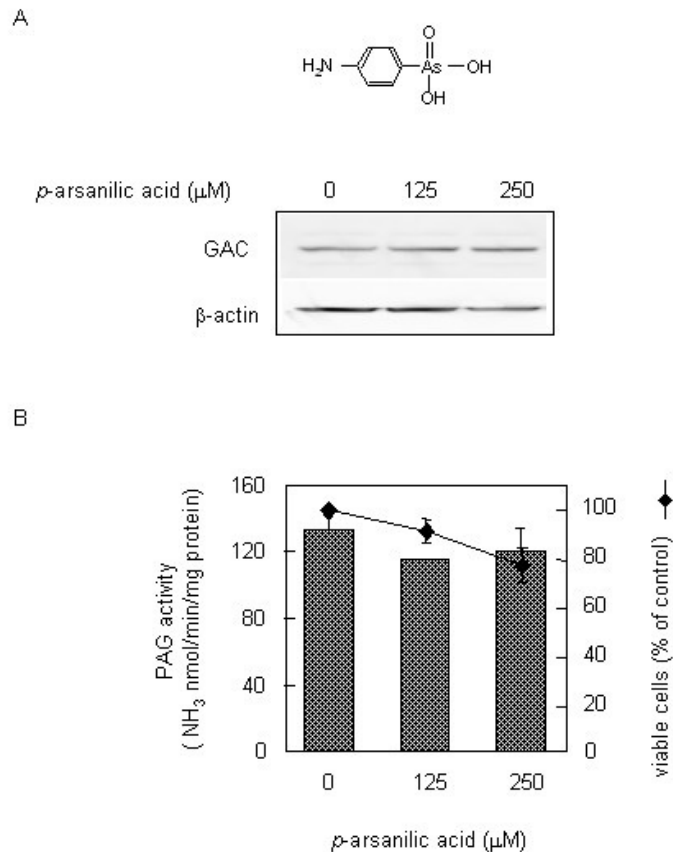


図9 HepG2細胞GACタンパクおよびPAG活性に対するアルサニル酸24時間処理の影響

2.3 まとめ

培養ヒト細胞の DPAA 処理により発現が顕著に低下するタンパクとしてグルタミナーゼが同定された。そこで神栖市に於ける健康影響の全体像理解のため glutaminase C (GAC) および phosphate-activated glutaminase (PAG) activity に対する井戸水中および米中に検出されたものを含む様々なヒ素化合物の影響を検討した。その結果、井戸水中に検出された DPAA, PAA および米中に検出された PMAA が濃度依存的に GAC タンパク および PAG 活性 を抑制することが明らかになった。

一方、[iAs (V)]、[iAs (III)]、無機ヒ素のメチル化代謝物、dimethylarsinic acid DMA (V) and dimethylarsinous acid DMA (III) , および井戸水中に検出された強毒性ヒ素化合物 bis (diphenylarsine) oxide [BDPAO (III)] には抑制作用は観察されなかった。同様に、DPAA の GSH 複合体で、強毒性の DPA-GS (III) にもグルタミナーゼ抑制作用はみられなかった。また、DPAA, PAA および PMAA の水酸基をメチル置換された diphenylmethylarsine oxide (DPMAO) と phenyldimethylarsine oxide (PDMAO) および PAA のパラ位にアミノ基を導入したアルサニル酸にはグルタミナーゼに対する抑制作用はみられなかった。これらの結果は、少なくともフェニル基と水酸基がヒ素化合物によるグルタミナーゼの抑制には必要であることを示唆するものである。さらに、神栖市の井戸水中および米中に検出されたヒ素のみがグルタミナーゼの抑制に効果的であるという事実はヒ素健康影響の原因を考えるとときに重要な示唆を与える。

3 (実験2) DPAA 長期投与実験動物の脳内 GA 変化

3.1 方法

DPAA の投与方法および小脳 PAG 活性の測定

実験動物は8週齢の ICR 系雄性マウスを使用した。DPAA の投与は飲料水からの自由摂取とし、一群あたり 18 匹のマウスに 0, 7.5, 15 および 30ppm の DPAA を含む水道水を摂取させた。また、投与期間は 12, 24 および 48 週間とし、投与後のマウス (一群あたり 6 匹) から小脳を分離し、最終的に小脳のミトコンドリア抽出液を PAG 活性の測定サンプルとした。なお PAG 活性の測定方法は前述の手順に従った。

3.2 結果

DPAA 長期投与マウス小脳内リン酸-活性化グルタミンナーゼ (PAG) 活性変化

種々の濃度の DPAA を摂取させたマウスから小脳を分離し、ミトコンドリア画分中の PAG 活性を測定したところ、30ppm、24 週間投与群において、PAG 活性の有意な低下が認められた (図 10)。

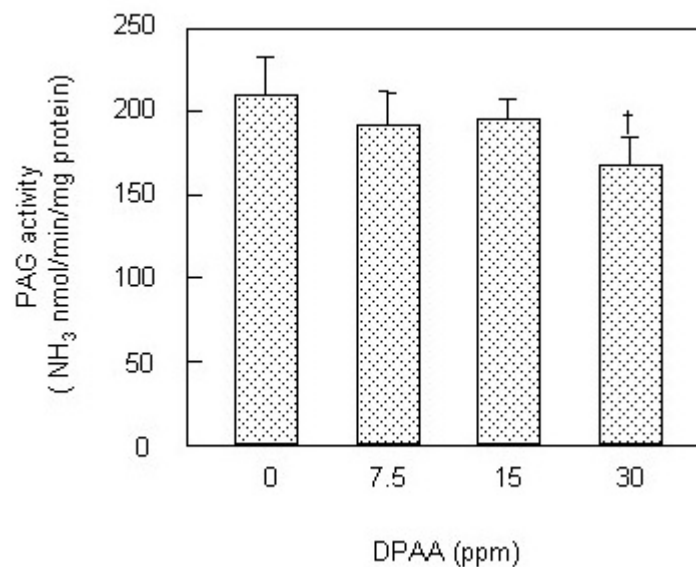


図 10 ICR マウス小脳におけるリン酸-活性化グルタミンナーゼ活性に対する DPAA24 週間処理の影響

3.3 解釈

30ppm の DPAA を 24 週間投与したマウスの小脳において PAG 活性の有意な低下が認められたが、低下の程度は対照群の値の約 20%であった。この程度の PAG 活性の低下が実際にグルタミン酸作動性神経伝達やマウスの行動に影響を与えているかどうか不明であるが、*in vitro* の結果が *in vivo* でも再現される可能性が認められた点は意義があると考えられる。現時点では 24 週間投与のデータまでであるが、マウスへの DPAA 投与は現在も継続している。48 週間投与時においてさらに PAG 活性の低下が認められるようであるならば、DPAA による中枢神経症状の発症にグルタミンナーゼ発現低下が関係する可能性をより強固に裏付けられると思われる。

[2.4] カニクイザルにおけるジフェニルアルシン酸 (DPAA) の中枢神経影響

主任研究者：玉岡 晃 (筑波大学人間総合科学研究科臨床医学系神経内科 教授)
分担研究者：柴田 康行 (国立環境研究所化学環境研究領域 領域長)
：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)
：石井 一弘 (筑波大学人間総合科学研究科臨床医学系神経内科 講師)
：岩崎 信明 (茨城県立医療大学附属病院小児科 准教授)
：石井 賢二 (東京都老人総合研究所ポジトロン医学研究施設 施設長)

1 概要

ジフェニルアルシン酸 (以下、「DPAA」) の標的臓器の1つは中枢神経であり、中枢神経への DPAA 残留性も高い。特に脳幹・小脳において DPAA 蓄積量が多い。ヒトの急性毒性症状が主に小脳、脳幹症状であること、脳血流低下、脳糖代謝低下が同脳部位に認められることから、DPAA が小脳、脳幹に特に蓄積しやすいことが、ヒトにおける症状、症候として出現していると考えられる。DPAA の中枢神経内蓄積に関する知見は、ラットにおける実験が殆どであった。しかし、最近、カニクイザルを用いた DPAA 投与実験において、ラットより明らかに長期間に亘り、DPAA が中枢神経系に蓄積していることが明らかになった。同時に脳血流や脳糖代謝の低下も観察されていることより、DPAA が脳内に長期間留まり脳機能に影響を与えていることが強く疑われている。齧歯類を使った実験だけでヒトの DPAA 蓄積性、生体影響や脳機能影響を推察し、議論することが困難であると考えられたため、霊長類のカニクイザルを用いた実験を計画し、予備実験で行った結果を強化し、さらに12ヵ月にも及ぶ長期に亘る DPAA の中枢神経系に及ぼす影響を陽電子放出断層撮像法 (以下、「PET」) で明らかにすることを試みる。

2 目的

今回の研究では、ヒトに近い霊長類のカニクイザルを用いて、ヒトばく露と近似の1mg/kg/dayを28日間連続で経口投与して、中枢神経内 DPAA 残留性を定量し、PETにて DPAA の中枢神経系に対する長期影響を明らかにすることが目的である。同時に血中 DPAA 濃度の測定を行い、血中半減期などを調べ、ヒトの結果と比較する。カニクイザルでの中枢神経系 DPAA 残留性の結果や PET 所見は、DPAA ばく露を受けたヒトにおける脳 PET、脳血流スペクト所見の解釈や DPAA の長期健康影響を推察するに際して、重要な知見を与えてくれる。

3 方法

本年度はカニクイザル8匹のA群 (雄1匹、雌1匹)、B群 (雄1匹、雌1匹)、C群 (雄1匹、雌1匹)、D群 (雄1匹、雌1匹) で以下の実験を行い、同様の実験を平成20年度にも施行して、各群4匹、カニクイザル総計16匹で実験を行う。長期追跡群の実験を優先し、途中死亡が長期追跡群に生じた場合には順次、短期群 (A、B群) からC、D群へ補填する。(下図参照)

3.1 カニクイザルにおけるジフェニルアルシン酸 (DPAA) の行動毒性

カニクイザルにDPAA (トリケミカル社製、1 mg/kg/day、28日間) を三菱安全科学研究所 (鹿島研究所) で経口投与し、投与期間中の行動変化や症状発現の有無を観察する。DPAA 投与後1ヶ月以降、6ヶ月後、12ヶ月後のカニクイザルの長期行動観察ならびに飼育・長期

管理はハムリー株式会社で行われる。DPAAの中枢神経影響を明らかにする。（下図参照）

3. 2 動物用PETを用いたイメージング解析

A群（2匹）、B群（2匹）、C群（2匹）、D群（2匹）のDPAA投与カニクイザルを浜松ホトニクス株式会社中央研究所に移送し、陽電子放出断層撮像法（PET）を用いて、DPAA投与前、DPAA投与直後、投与後1ヵ月、投与後6ヵ月、投与後12ヵ月での脳血流、脳糖代謝を測定する。（下図参照）

[¹⁵O] H₂Oの標識薬剤で脳各部位の脳血流を計測し、[¹⁸F] FDGで脳各部の糖代謝を測定する。測定後は画像解析ソフトにて統計解析を行い、有意な脳内変化部位を明らかにする予定である。

3. 3 血清および臓器中ジフェニルアルシン酸（DPAA）とその代謝物の定量分析

DPAA投与前、投与直後、投与後1週間後、2週間後、4週間後、8週間後、16週間後、24週間後、36週間後、48週間後に各群の個体から約1 mLの採血を行い、遠心分離後に血清を-80℃で保存する。A群（2匹）DPAA投与直後に、B群（2匹）DPAA投与後1ヵ月に、C群（2匹）DPAA投与後6ヵ月に、D群（2匹）DPAA投与後12ヵ月に脳PET施行する。さらに、中枢神経系へのDPAA残留性を確認するために、測定後に安楽死させて各中枢神経部位（小脳、脳幹、前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、脊髄）や各臓器（肺、肝臓、腎臓、膵臓など）の試料を採取する。（下図参照）

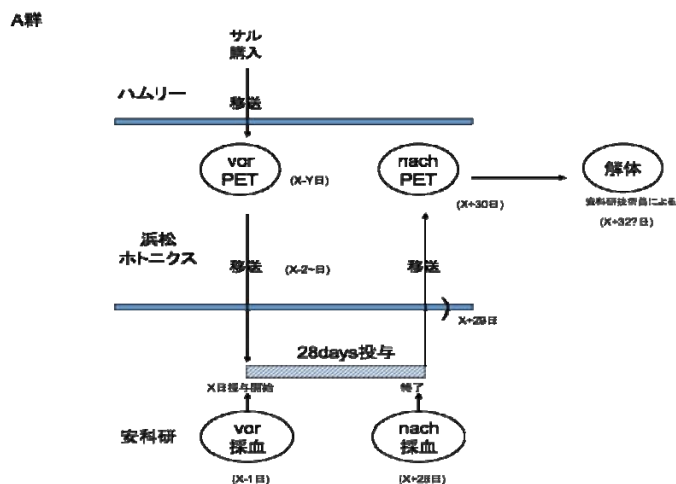
電子顕微鏡用試料と光学顕微鏡用試料を作成し、残りを生化学分析用試料として、測定時まで-80℃にて凍結保存する。血清中および臓器中DPAAとその代謝物の測定は凍結試料を融解後にアルカリ分解、エーテル抽出し、濃硝酸で分解した後に固相抽出を行う。サンプルをLC-ICP/MSまたはLC/MS/MSで定量する。

3. 4 ジフェニルアルシン酸（DPAA）ばく露による病理組織所見の解析

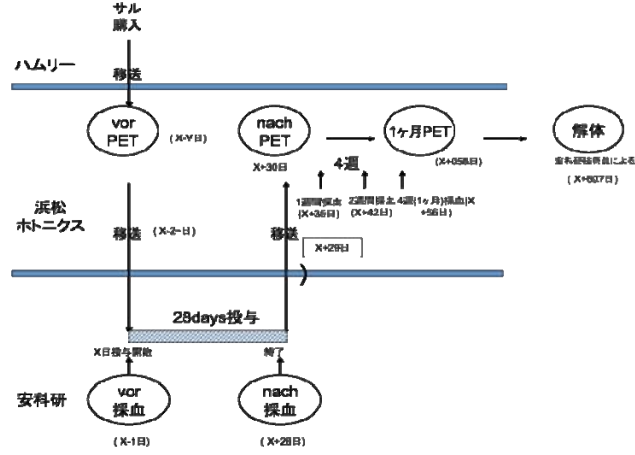
光学顕微標本はホルマリン液で固定し、病理標本を作成して組織学的変化の有無を観察する。各臓器、特に大脳各部位、基底核、脳幹各部、小脳、脊髄における神経細胞死やグリア細胞の反応性変化をHE染色、髄鞘染色、鍍銀染色を行い調べる、さらに必要であれば目的蛋白に対する免疫染色を行う。さらに2.5%グルタルアルデヒド+0.1%パラフォルムアルデヒド固定、脱水後のオスミウム酸による後固定し、超薄切片を作成し、電子顕微鏡で神経細胞の細胞内器官の変化を調べる。

4 結果・考察

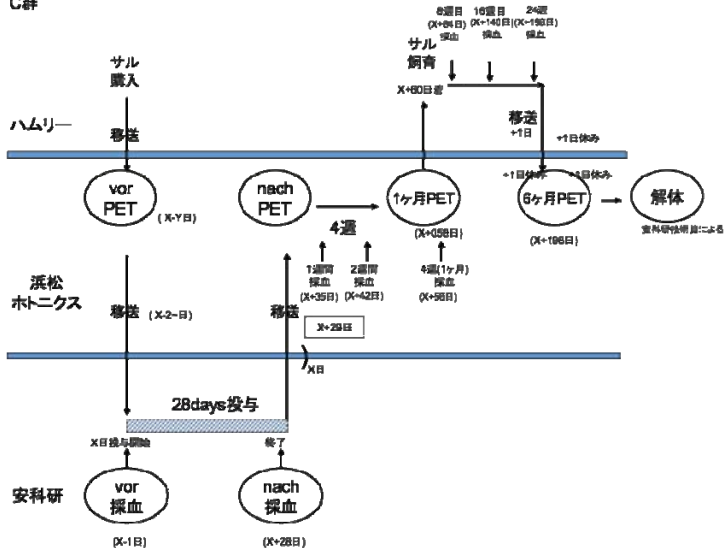
計画進行中であり、結果はまだない。



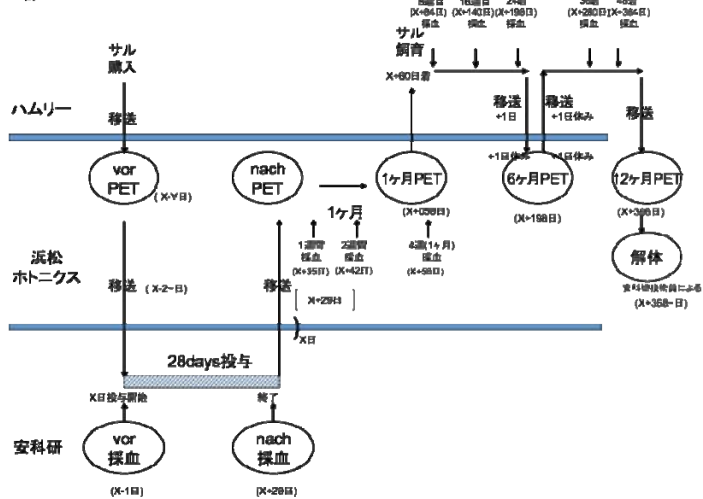
B群



C群



D群



[2.5] ジフェニルアルシン酸 (DPAA) の長期毒性に関する予備研究

主任研究者：鰐淵 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)
分担研究者：魏 民 (大阪市立大学大学院医学研究科 講師)
：梯 アンナ (大阪市立大学大学院医学研究科 助教)
研究協力者：森村 圭一郎 (大阪市立大学大学院医学研究科 講師)
：土井 賢一郎 (大阪市立大学大学院医学研究科 博士研究員)
：植松 真美 (大阪市立大学大学院医学研究科 修士課程大学院学生)
：加藤 あゆみ (大阪市立大学大学院医学研究科 修士課程大学院学生)
：大西 真里子 (大阪市立大学大学院医学研究科 修士課程大学院学生)
：山野 荘太郎 (大阪市立大学大学院医学研究科 修士課程大学院学生)
：山中 健三 (日本大学薬学部 教授)

1 概要

有機ヒ素化合物であるジフェニルアルシン酸 (以下「DPAA」という) の神経毒性はよく知られているが、その発がん性に関する知見はまだ報告されていない。本研究では、DPAA の肝発がん修飾作用の有無をラット中期毒性試験 (ラット肝中期発がん性試験法) を用いて検討した。

DPAA の用量設定の予備試験では、6 週齢の雄性 F344 ラットを 4 群に分け、それぞれ DPAA を 0、5、25、50 ppm の濃度で 21 週間飲水投与した。その結果、25 および 50 ppm では強い毒性が見られたため、ラット肝中期発がん性試験の DPAA の最高用量を 20 ppm に設定した。ラット肝中期発がん性試験では、6 週齢の雄性 F344 ラットを 6 群に分け、第 1~4 群にはイニシエーション処置として diethylnitrosamine (以下「DEN」という) を一回腹腔内投与した。一方、第 5~6 群には溶媒である生理食塩水を投与した。2 週後、第 1~4 群にはそれぞれ DPAA を 0、5、10、20 ppm の濃度で 6 週間飲水投与した。また、第 5、6 群には 0 あるいは 20 ppm DPAA を飲水投与した。いずれの群も実験第 3 週目に 2/3 部分肝切除を行った。実験開始 8 週後に屠殺し、肝の前がん病変の指標である胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (以下 GST-P という) 陽性細胞巢の個数及び面積を定量的に解析した。その結果、DEN 処置群において、20 ppm DPAA 群では DEN 単独投与群に比較して肝 GST-P 陽性細胞巢の単位面積当たりの数および面積ともに有意に増加した。DEN 無処置群において、対照群および 20 ppm DPAA 群には GST-P 陽性細胞巢の発生は認められなかった。また、DEN 処置の有無にかかわらず、20 ppm DPAA 群では CYP1B1 の mRNA 発現量が有意に増加した。一方、DPAA は酸化的 DNA 傷害の指標である 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (以下 8-OHdG という) 形成レベルに影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、DPAA はラット肝発がん促進作用を有することが示唆された。また、CYP1B1 の誘導が DPAA の肝発がん促進作用機序に関与する可能性が推察された。一方、酸化的 DNA 傷害は DPAA の肝発がん性には関与しないことが示唆された。

2 目的

ラット中期毒性試験 (ラット肝中期発がん性試験法¹⁻³⁾) を用いて、DPAA を 0、5、10、20 ppm の濃度で 6 週間飲水投与し、その肝発がん促進作用の有無を明らかにする。

3 方法

3.1 DPAA用量設定の予備試験

6週齢の雄性F344ラット20匹（日本チャールズ・リバー株）を4群（各群5匹ずつ）に分け、DPAAを0、5、25、50 ppmの濃度で21週間飲水投した。全動物は、一般状態を毎日観察し、週1回体重を測定した。

3.2 ラット中期毒性試験（ラット肝中期発がん性試験）

実験デザインを（図1）に示した。6週齢の雄性F344ラット100匹（日本チャールズ・リバー株）を6群に分け、実験開始当日に、DENを生理食塩液に溶解（40mg/ml）し、第1～4群（各群20匹ずつ）の動物に対して体重kg当たり200mgの用量で1回腹腔内投与した。第5～6群（各群10匹ずつ）には溶媒である生理食塩液のみを同様に腹腔内投与した。実験第3週から第8週までの6週間、第1～4群にDPAAをそれぞれ5、10、20 ppmの濃度で飲料水で投与した。対照群（第1および6群）には水道水のみを投与した。また、実験第3週経過時（被験物質投与開始1週間後）には全動物についてエーテル麻酔下で肝臓の左葉および中間葉を切除する、2/3肝部分切除術を施行した。全動物は、一般状態を毎日観察し、週1回体重および飲水量を測定した。1日あたりのDPAA摂取量（mg/kg/day）は、その結果より算出した。投与期間終了後、エーテル麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血による屠殺後、剖検した。採取した血液は血液学および血清生化学検査を行った。剖検時、肝臓は重量測定後、一部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。残りの組織は液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。固定した肝臓はパラフィンブロック作製後HE標本を作製し、病理組織学的検索を行った。また、ラット肝の前がん病変の指標であるGST-P陽性細胞巣を免疫組織化学的に染色した。直径0.2mm以上のGST-P陽性細胞巣の個数及び面積を、病理標本画像解析装置IPAP-WIN（住化テクノサービス株）を用いて計測した。凍結肝組織は酸化的DNA障害の指標である8-OHdGの形成レベル、および異物代謝酵素であるシトクロムP450各分子種のmRNA発現量の検索を行った。

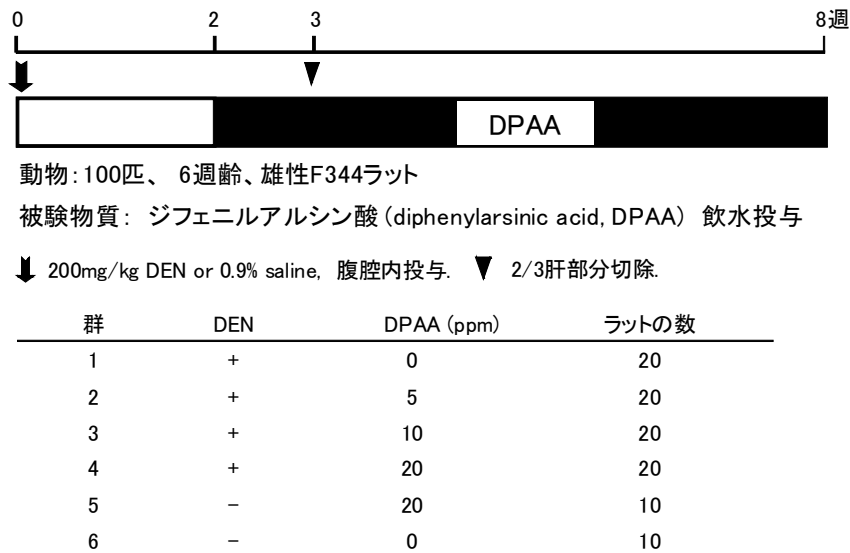


図1 ラット肝中期発がん性試験法

3.3 8-OHdGの即測定

DNA中8-OHdG量は、組織からDNAを抽出した後、EC-detectorと組み合わせた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定し、10⁵グアノシン残基当たりの数値に換算して求めた。

3. 4 倫理面への配慮

動物の取り扱いについては大阪市立大学実験動物飼育規定に順守し、屠殺時にはエーテル麻酔を用いて行い、十分に動物愛護上の配慮を行った。

4 結果

4. 1 DPAA用量設定のための予備試験

体重増加曲線を（図2）に示した。50 ppmの投与群において、投与開始後2週に5匹中に1匹が死亡した。また、強い体重の増加抑制が見られたため、3週以降は投与濃度を25 ppmに変更した。25 ppm投与群においては、投与開始後3週から体重の有意な低下が認められた。したがって、ラット肝中期発がん性試験の投与用量は、肝部分切除術の影響を考慮すると、最高用量を20 ppmとし、以下公比2で10、5の計3用量を設定した。また、水道水のみ投与する対照群を設けた。なお、いずれの群においても痙攣、振顫等などの神経症状は見られなかった。

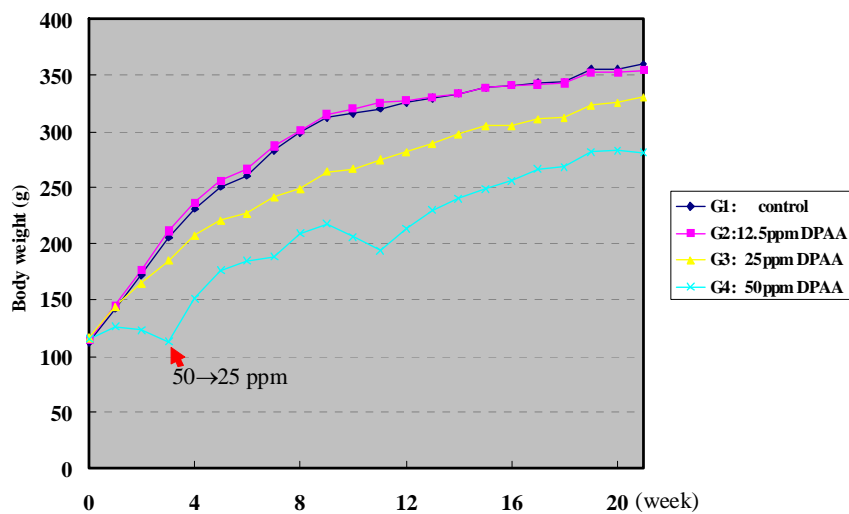


図2 体重増加曲線（予備試験）

4. 2 ラット中期毒性試験（ラット肝中期発がん性試験）

肝部分切除術後、第1、3、4、5群にそれぞれ3、4、3、1匹が死亡した。剖検の結果、これらの動物の死因は肝部分切除術時の技術的影響と考えた。実験期間を通じて、いずれの群においても痙攣、振顫等などの神経症状は見られなかった。

最終体重、肝臓重量およびDPAA摂取量を（表1）に示した。DEN処置各群（第1～4群）の最終体重は、DEN非処置の各群（第5及び6群）と比較して低値を示したが、各群間には統計学的な差は無かった。肝臓の絶対および相対重量は、DEN処置の有無にかかわらず、20 ppm DPAA群において、それぞれの対照群（第1及び6群）と比較して有意な高値を示した。DPAA摂取量は投与量に相関して増加した。

表1 最終体重、肝臓重量およびDPAA摂取量（ラット肝中期発がん性試験）

Group	DEN	DPAA (ppm)	Final No. of rats	Final body weight (g)	Liver weight		Intake of DPAA (mg/kg/day)
					Absolute (g)	Relative (%)	
1	+	0	17	258 ± 14	8.0 ± 0.6	3.2 ± 0.1	0
2	+	5	20	259 ± 11	8.0 ± 0.4	3.1 ± 0.1	0.5
3	+	10	16	260 ± 10	8.3 ± 0.6	3.2 ± 0.2	0.9
4	+	20	17	249 ± 10	8.9 ± 0.7 [◇]	3.6 ± 0.2 [◇]	1.6
5	-	20	9	263 ± 11	9.8 ± 0.7 ^δ	3.7 ± 0.3 ^δ	1.6
6	-	0	10	268 ± 12	8.5 ± 0.6	3.2 ± 0.1	0

[◇] Significantly different from group 1.

^δ Significantly different from group 6.

血液生化学的検査において（表2）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（γ-GTP）、およびロイシン・アミノ・ペプチターゼ（LAP）はDEN処置の有無にかかわらず、20 ppm DPAA群で有意に上昇した。アスハラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）とアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）では変動はなかった。

表2 DPAA の肝機能に及ぼす影響（ラット肝中期発がん性試験）

Group	DEN	(ppm)	AST	ALT	ALP	γ-GTP	LAP
1	+	0	112 ± 12	59 ± 6	937 ± 11	1.2 ± 0.4	155 ± 7
2	+	5	107 ± 15	54 ± 5	940 ± 54	1.1 ± 0.3	150 ± 6
3	+	10	104 ± 17	54 ± 5	896 ± 63	1.2 ± 0.4	157 ± 6
4	+	20	89 ± 15	48 ± 5	1137 ± 168 [◇]	2.1 ± 1.0 [◇]	168 ± 8 [◇]
5	-	20	93 ± 15	50 ± 8	1630 ± 457 ^δ	2.1 ± 1.1 ^δ	175 ± 9 ^δ
6	-	0	106 ± 18	61 ± 12	946 ± 58	1.3 ± 0.5	158 ± 7

[◇] Significantly different from group 1.

^δ Significantly different from group 6.

病理組織学的検査において、肝臓では、胆管増生およびグリソン鞘の炎症性細胞浸潤がDEN処置の有無にかかわらず、20 ppm DPAA群の全例に認められた（図3）。

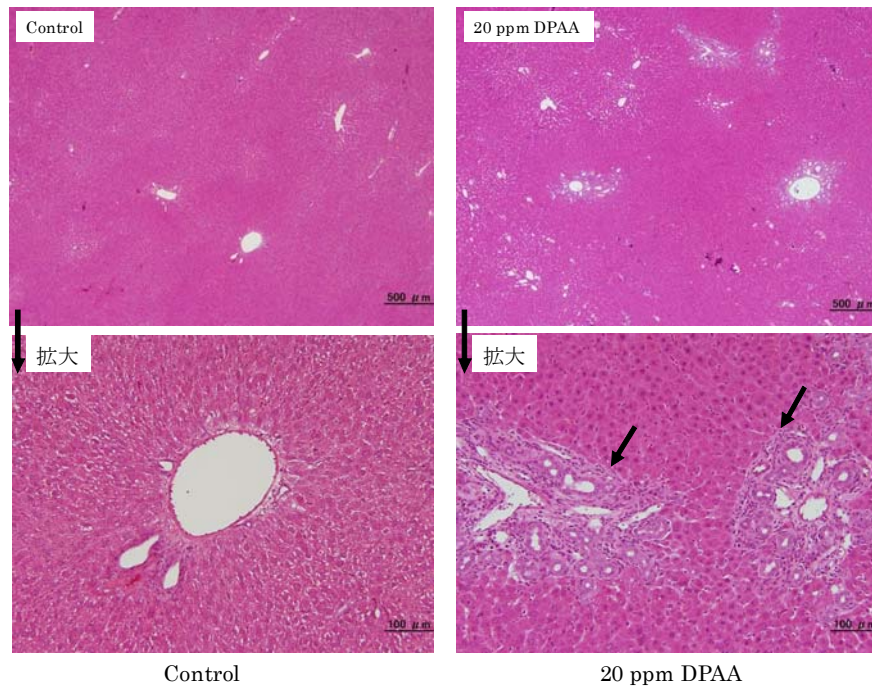


図3 肝臓の病理組織像（ラット肝中期発がん性試験）

肝臓におけるGST-P陽性細胞巢の発生を（図4）に示した。DEN処置群において、20 ppm DPAA群（第4群）では対照群（第1群）と比較してGST-P陽性細胞巢の単位面積当たりの数および面積ともに有意な高値を認めた。DEN無処置群において、20 ppm DPAA群（第5群）及び対照群（第6群）ではGST-P陽性細胞巢は観察されなかった。

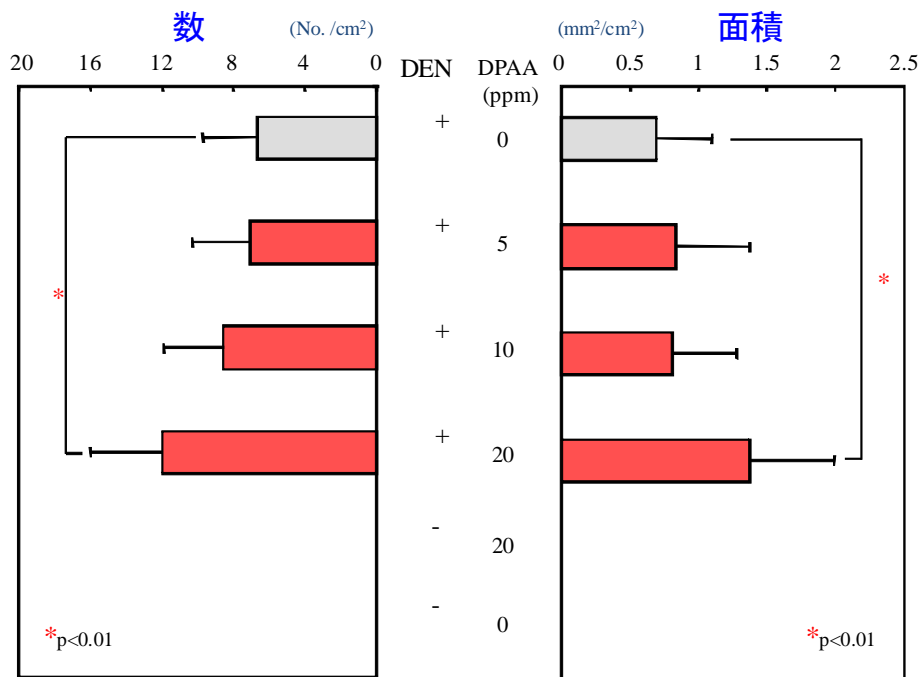


図4 肝臓におけるGST-P陽性細胞巢の発生（ラット肝中期発がん性試験）

P450各分子種のmRNA発現量をリアルタイムPT-PCR方を用いて検索した結果(表3)、DEN処置群において、20 ppm DPAA群では対照群(第1群)と比較して、CYP1B1発現量の有意な増加、CYP2A2、CYP2C2、CYP3A1およびCYP3A2の有意な低下が認められた。DEN非処置群において、20 ppm DPAA群では対照群(第6)と比較して、CYP1B1発現量の有意な増加、CYP2A2、CYP2C2およびCYP3A2の有意な低下が認められた。

肝臓における8-OHdGの形成レベルを検索した結果、各群間には統計学的な差は無かった。

表3 肝臓におけるシトクロムP450各分子種のmRNA発現

DEN	Folds (v.s. DEN alone)			Folds (v.s. Con.)
	+	+	+	-
DPAA	5 ppm	10 ppm	20 ppm	20 ppm
Cyp1B1	1	1.1	7.4*	8.6**
Cyp2A2	0.9	0.9	0.6*	0.5**
Cyp2C2	1.0	1.0	0.4*	0.2**
Cyp3A1	1.0	1.0	0.6*	0.6**
Cyp3A2	0.9	0.8	0.5*	0.6
Cyp1A1	0.8	0.9	1.1	1.9
Cyp1A2	1.0	1.0	0.8	0.6
Cyp2A1	0.9	0.9	0.9	0.9
Cyp2B1	0.9	1.1	0.9	1.1
Cyp2B2	1.0	1.1	0.8	0.9
Cyp2C6	1.0	1.1	1.1	1.1
Cyp2C7	0.9	1	0.6	0.5
Cyp2E1	1	0.9	0.8	0.8

* p<0.05 v.s. DNE alone group. ** p<0.05 v.s. control group

5 考察

有機ヒ素化合物であるDPAAの神経毒性はよく知られているが、その発がん性に関する知見はまだ報告されていない。本研究では、GST-P陽性細胞巢を指標としたラット中期毒性試験(ラット肝中期発がん性試験法)により、DPAAの肝発がん促進作用の有無を検索した。肝臓の絶対および相対重量は、DEN処置の有無にかかわらず、20 ppm DPAAにおいて、それぞれの対照群と比較して有意な高値を示した。また、免疫組織化学的なGST-P陽性細胞巢の定量的解析において、DPAAは20 ppm (1.6 mg/kg/day)の用量でGST-P陽性細胞巢の数および面積で対照群と比較して有意な増加を示した。なお、血清中の γ -GTP値の上昇は、肝臓におけるGST-P陽性細胞巢の出現と関連することが知られている⁴⁻⁶⁾。以上のことから、DPAAが肝発がん促進作用を有することが示唆された。

環境中に存在する発がん物質の多くは生体内で代謝的に活性化されてその作用を発揮することが知られている。この反応に関与する薬物代謝酵素の中にシトクロムP450(総称をP450、各分子種をCYP)と呼ばれる一群の酵素がある⁷⁾。DEN処置の有無にかかわらず、20 ppm DPAA群ではCYP1B1のmRNA発現量が有意に増加したことから、DPAAの肝発がん促進作用機序にCYP1B1の誘導が関与する可能性が推察された。一方、酸化的DNA傷害はDPAAの肝発がん促進作用には関与しないことが判明した。

以上より、DPAAがラット肝発がん促進作用を有することが示唆された。今後、DPAAの発がん性を確認するための長期の発がん性試験を行なうべきであると考えられた。

参 考 文 献

- 1) Ito, N., Tsuda, H., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T., Uwagawa, S., Kagawa, M., Ogiso, T., Masui, T. and et al. (1988) Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats--an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*, 9, 387-94.
- 2) Shirai, T. (1997) A medium-term rat liver bioassay as a rapid in vivo test for carcinogenic potential: a historical review of model development and summary of results from 291 tests. *Toxicol Pathol*, 25, 453-60.
- 3) Ito, N., Tamano, S. and Shirai, T. (2003) A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci*, 94, 3-8.
- 4) Zawirska, B. and Bednarz, W. (1981) The particular traits of carcinogenesis induced in Wistar rats by aflatoxin B₁. III. Porphyrins and the activity of gamma-glutamyltranspeptidase in primary hepatomas and in their tissue of origin. *Neoplasma*, 28, 35-49.
- 5) Ho, Y.S. and Lin, J.K. (1994) N-nitroso-2-acetylaminofluorene: a direct-acting carcinogen inducing hepatocellular carcinoma in Sprague-Dawley rats. *Jpn J Cancer Res*, 85, 794-800.
- 6) Yang, C.F., Liu, J., Wasser, S., Shen, H.M., Tan, C.E. and Ong, C.N. (2000) Inhibition of ebselen on aflatoxin B (1) -induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats. *Carcinogenesis*, 21, 2237-43.
- 7) Nebert, D.W. and Dalton, T.P. (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 6, 947-60.

