

.....

# 第21回ヒ素シンポジウム

## 講演要旨集

.....



開催日：2015年11月14日(土)・15日(日)

会 場：徳島文理大学 国際会議場  
(徳島市山城町西浜傍示180)

主 催：日本ヒ素研究会

## 第 2 1 回ヒ素シンポジウム

主催：日本ヒ素研究会

開催日：2015年11月14日（土）・15日（日）

会場：徳島文理大学国際会議場（徳島県徳島市山城町西浜傍示 180）

特別講演 1：馬 建鋒（岡山大学資源植物科学研究所）

“イネにおけるヒ素の輸送機構”

特別講演 2：直江 知樹（国立病院機構 名古屋医療センター）

“急性前骨髄球性白血病：治療の今昔”

テクニカル・セミナー：行成 雅一（アジレント・テクノロジー株式会社）

“ICP-MS による As の分析は、本当に正しいのか？”

### シンポジウム日程

11月14日（土）（1日目）

13:15 ~ 13:20	開会の辞
13:20 ~ 15:05	一般講演 1（1-1 ~ 1-7）
15:15 ~ 15:55	一般講演 2（1-8 ~ 1-9）
16:05 ~ 17:05	特別講演 1
17:05 ~ 18:05	特別講演 2
18:20 ~ 20:00	懇親会（徳島文理大学内パウゼ） 奨励賞表彰

11月15日（日）（2日目）

9:00 ~ 10:00	一般講演 3（2-1 ~ 2-4）
10:10 ~ 10:55	テクニカル・セミナー
11:00 ~ 12:00	一般講演 4（2-5 ~ 2-8）
12:00 ~ 12:25	総会

## 大会組織

### 実行委員会

大会長・実行委員長	姫野 誠一郎	徳島文理大学薬学部
実行委員	角 大悟	徳島文理大学薬学部
実行委員	藤代 瞳	徳島文理大学薬学部

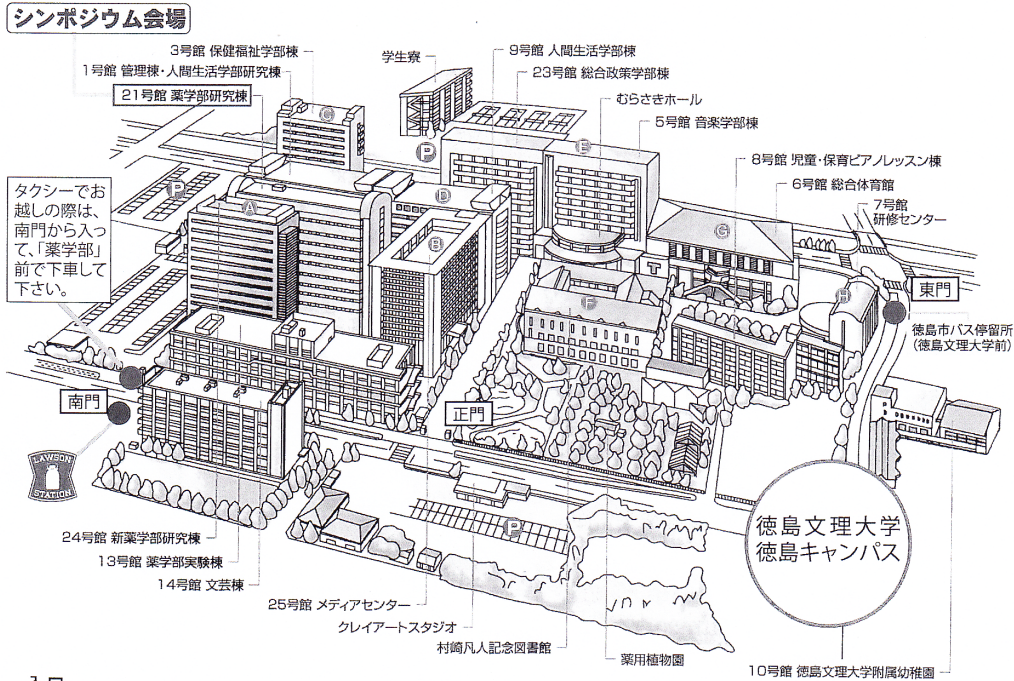
### 事務局

角 大悟  
徳島文理大学薬学部 衛生化学講座内  
〒770-8514  
徳島市山城町西浜傍示 180  
Tel: 088-602-8461, Fax: 088-655-3051  
e-mail: arsenic2015@ph.bunri-u.ac.jp

## ヒ素シンポジウム 開催地・歴代会長

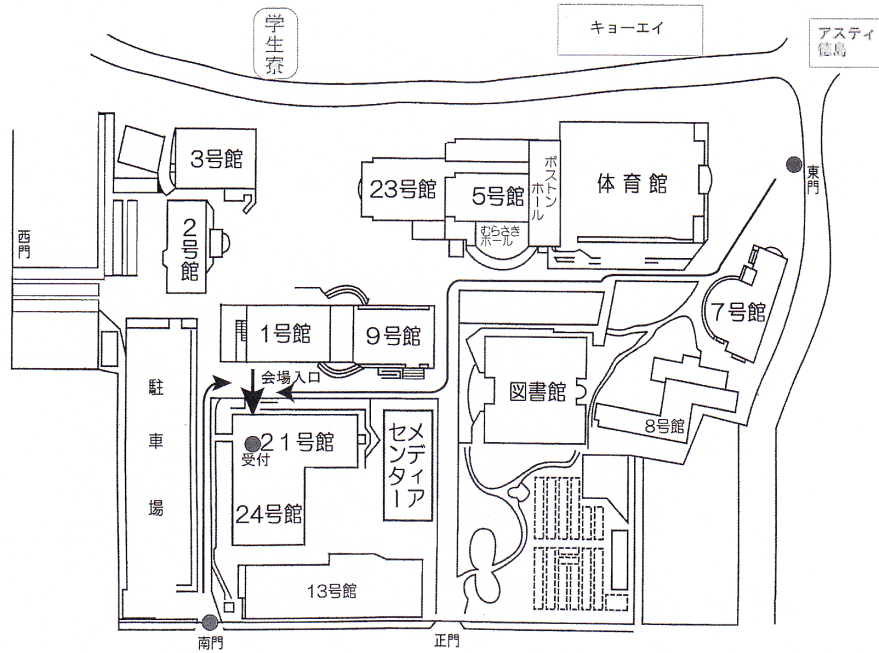
回	年次		開催地	大会長	
				氏名	所属
1	1983年	11月	静岡	松任 茂樹	東海大学短期大学部
2	1985年	11月	静岡	松任 茂樹	東海大学短期大学部
3	1987年	11月	鹿児島	前田 滋	鹿児島大学
4	1989年	11月	東京	菊池 武昭	東京水産大学
5	1991年	11月	下関	田川 昭治	水産大学校
6	1993年	11月	神奈川	山村 行夫	聖マリアンナ大学
7	1995年	11月	福岡	井上 尚英	九州大学
8	1997年	11月	大阪	圓藤 吟史	大阪市立大学
9	1999年	11月	広島	山岡 到保	中国工業技術研究所
10	2001年	11月	東京	貝瀬 利一	東京薬科大学
11	2003年	10月	札幌	神 和夫	北海道立衛生研究所
12	2005年	11月	岩手	千葉 啓子	岩手県立大学短期大学部
13	2007年	11月	静岡	松任 茂樹	東海大学短期大学部
14	2008年	11月	東京	山内 博	北里大学
15	2009年	11月	大阪	鰐淵 英機	大阪市立大学
16	2011年	2月	旭川	吉田 貴彦	旭川医科大学
17	2011年	11月	つくば	平野 靖史郎	国立環境研究所
18	2012年	11月	宮崎	塩盛 弘一郎	宮崎大学
19	2013年	11月	福岡	久永 明	福岡県立大学
20	2014年	12月	千葉	山中 健三	日本大学
21	2015年	11月	徳島	姫野 誠一郎	徳島文理大学
22	2016年		つくば	黒岩 貴芳	産業技術総合研究所

# 徳島文理大学徳島キャンパス 構内案内図

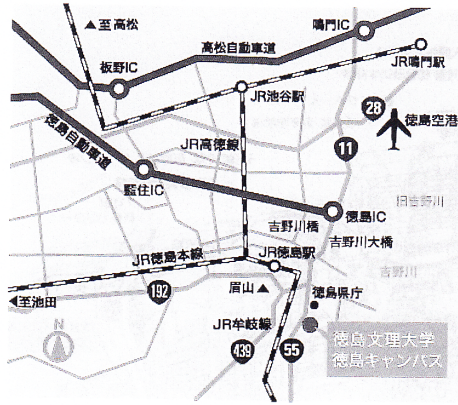


## 入口

- 市バスは東門の「徳島文理大学前」に着きます。学内を通して21号館会場までお越し下さい。
- タクシー等でお越しの際は南門から学内に入って下さい。



# シンポジウム会場までのアクセスマップ



- 航空機（徳島あわおどり空港着）
- 東京（羽田）より1時間10分（6便）
  - 中部国際空港より1時間（1便）
  - 福岡空港より1時間10分（2便）

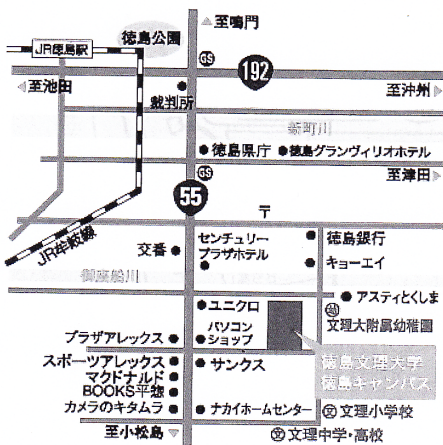
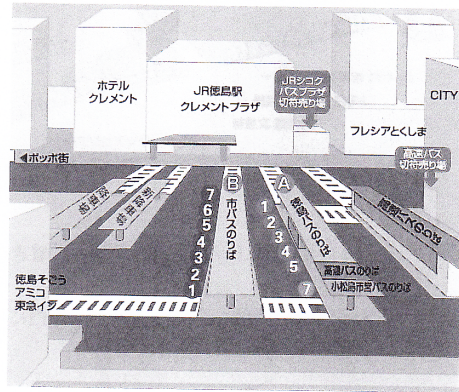
徳島あわおどり空港より  
 タクシーで大学まで約30分  
 空港バスでJR徳島駅まで約25分

フェリー  
 和歌山から徳島港まで2時間

## 高速バス

各方面からの高速バスは、徳島駅前降車場に着きます。

- 大阪（梅田）より2時間25分（1日88便）
- 神戸（三宮）より1時間50分（1日62便）
- 関西空港より2時間45分（1日20便）
- 京都より2時間50分（1日14便）
- 岡山より2時間30分（1日6便）
- 高知より2時間40分（1日8便）
- 松山より3時間10分（1日14便）
- 高松より1時間30分（1日24便）



## 市内バス

徳島市バスは、③番乗り場から9または22の「山城町行」で、「文理大学前」あるいは「文理大学正門前」下車、または23の「アスティとくしま行」で終点下車。料金200円、約20分。

## タクシー

「文理大学南門から入って薬学部前まで」とお伝え下さい。南門の前にはローソンがありますので目印にしてください。

JR徳島駅から約10分

## 一般講演発表者および座長の皆様へ

### 1 一般講演の発表者の皆様へ

- 発表時間：発表12分、討論3分、合計15分です。  
(一般講演2のみ発表15分、討論5分、合計20分)
- 座長の指示に従い、発表時間を厳守していただきますようお願い致します。
- 発表の30分前までに、受付にて出席の確認をお願い致します。
- 発表はパワーポイントで行っていただきます。発表用スライドはWindowsかMacintoshのPowerPointで作成の上、シンポジウム会場にUSBをご持参ください。ファイル名には、演題番号(1-1)をつけてください。
- 会場のパソコン(Windows)にはPowerPoint 2013をインストールしてあります。本バージョンで正しく映写されることをご確認の上、USBをご持参ください。また、Macintoshもご用意しておきますが、PowerPoint 2016がインストールしてありますので、ご注意ください。
- ご自身のMacintoshでの発表をご希望の方は、PCおよびコネクタをご持参ください。

### 2 座長の皆様へ

- 次座長の方は、予定時間の10分前までにご指定の席に御着席ください。

姫野 誠一郎 (徳島文理大学薬学部)

13:20~14:20 座長:阿草 哲郎 (熊本県立大学環境共生学部)

1-1 尿認証標準物質中ヒ素化合物濃度

○小栗 朋子<sup>1</sup>, 吉永 淳<sup>2</sup>, 田尾 博明<sup>3</sup>, 中里 哲也<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 東京大学・大学院新領域創成科学研究科 (現 名古屋市立大学),

<sup>2</sup> 東京大学・大学院新領域創成科学研究科, <sup>3</sup> 産業技術総合研究所

1-2 無機ヒ素曝露の生物学的モニタリング指標値の検討

○畑 明寿<sup>1</sup>, 黒澤 英俊<sup>2,3</sup>, Mohamed Ahsan Habib<sup>4</sup>, 圓藤 陽子<sup>5</sup>, 山中 健三<sup>2</sup>,

藤谷 登<sup>1</sup>, 圓藤 吟史<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 千葉科学大学・危機管理学部, <sup>2</sup> 日本大学薬学部, <sup>3</sup> 警視庁・科学捜査研究所,

<sup>4</sup> 労働科学研究所, <sup>5</sup> 関西ろうさい病院・産業中毒研究センター

1-3 亜ヒ酸毒性発現機構におけるペントースリン酸経路の関与

○高橋 勉<sup>1,2</sup>, 佐竹 翔平<sup>2</sup>, 黄 基旭<sup>2</sup>, 藤原 泰之<sup>1</sup>, 永沼 章<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京薬科大学薬学部・公衆衛生学教室,

<sup>2</sup> 東北大学大学院薬学研究科・生体防御薬学分野

1-4 培養小脳アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレス、MAP キナーゼ活性化、および神経・血管作動性サイトカイン産生

○根岸 隆之<sup>1</sup>, 浅井 椋大<sup>1</sup>, 金平 朋子<sup>1</sup>, 小嶋 幹也<sup>1</sup>, 阪口 文香<sup>1</sup>, 高畑 和明<sup>1</sup>,

青山 洋平<sup>1</sup>, 新垣 梨奈<sup>1</sup>, 松本 真実<sup>1</sup>, 吉田 光<sup>1</sup>, 吉田 謙二<sup>1</sup>, 湯川 和典<sup>1</sup>,

田代 朋子<sup>2</sup>, 平野 靖史郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 名城大学薬学部・生理学, <sup>2</sup> 青山学院大学・理工学部, <sup>3</sup> 国立環境研究所



14:20～15:05 座長：角 大悟（徳島文理大学薬学部）

---

1-5 マウスに静注した *S*-dimethylarsino-glutathione の代謝的動態

○加藤 綾華<sup>1</sup>, 小林 弥生<sup>1,2</sup>, 宇田川 理<sup>2</sup>, 平野 靖史郎<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>千葉大学大学院・医学薬学府, <sup>2</sup>国立環境研究所

1-6 マウス卵子の質と PML に着目した亜ヒ酸の雌生殖毒性解析

○宇田川 理<sup>1</sup>, 加藤 綾華<sup>2</sup>, 小林 弥生<sup>1,2</sup>, 平野 靖史郎<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>国立環境研究所, <sup>2</sup>千葉大学大学院・医学薬学府

1-7 バングラデシュ住民の慢性的ヒ素曝露と血液ゲノムにおける DNA メチル化に関する検討

○鈴木 武博<sup>1</sup>, Md. Khaled Hossain<sup>2</sup>, 姫野 誠一郎<sup>3</sup>, 野原 恵子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立環境研究所・環境健康研究センター, <sup>2</sup>ラジシャヒ大学・生化学・分子生物学部門, <sup>3</sup>徳島文理大学薬学部・衛生化学

休憩 15:05 ～ 15:15

◆ 一般講演2（発表15分、質疑5分）

15:15～15:55 座長：吉田 貴彦（旭川医科大学医学部）

---

1-8 カドミウム極低吸収性稲品種「コシヒカリ環1号」によるコメ中のヒ素とカドミウムの同時低減技術の開発

石川 覚<sup>1</sup>, ○荒尾 知人<sup>1</sup>, 牧野 知之<sup>1</sup>, 安部 匡<sup>1</sup>, 伊藤 正志<sup>2</sup>, 原田 浩司<sup>3</sup>, 中田 均<sup>4</sup>, 西田 一平<sup>5</sup>, 西村 誠<sup>6</sup>, 徳永 哲夫<sup>7</sup>, 白尾 謙典<sup>8</sup>, 吉澤 比英子<sup>9</sup>, 松山 稔<sup>10</sup>

<sup>1</sup>農環研, <sup>2</sup>秋田農試, <sup>3</sup>千葉農総セ, <sup>4</sup>富山農総セ, <sup>5</sup>奈良農研セ, <sup>6</sup>滋賀農技セ,

<sup>7</sup>山口農総セ, <sup>8</sup>熊本農研セ, <sup>9</sup>栃木農試, <sup>10</sup>兵庫農総セ

1-9 レチノイン酸による HL-60 細胞の分化誘導作用に対する亜ヒ酸製剤の有用性

○角 大悟<sup>1</sup>, 鈴川和巳<sup>2</sup>, 姫野誠一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大学薬学部・衛生化学, <sup>2</sup>筑波大学・医学部

休憩 15:55 ~ 16:05

◆特別講演 1

16:05~17:05 座長：姫野 誠一郎（徳島文理大学薬学部）

イネにおけるヒ素の輸送機構

馬 建鋒（岡山大学資源植物科学研究所）

◆特別講演 2

17:05~18:05 座長：平野 靖史郎（国立環境研究所）

急性前骨髄球性白血病：治療の今昔

直江 知樹（国立病院機構 名古屋医療センター）

## ◆一般講演3(発表12分、質疑3分)

9:00~10:00 座長:小林 弥生(国立環境研究所)

## 2-1 メタボローム解析を用いたベトナムの地下水ヒ素汚染地域住民の影響評価

○阿草 哲郎<sup>1</sup>, 江口 哲史<sup>2</sup>, 國頭 恭<sup>3</sup>, Tue, N.M.<sup>4</sup>, Lan, V.T.M.<sup>5</sup>, Minh, T.B.<sup>6</sup>, Trang, P.T.K.<sup>5</sup>, 高橋 真<sup>7</sup>, Viet, P.H.<sup>5</sup>, 田辺 信介<sup>4</sup>, 岩田 久人<sup>4</sup><sup>1</sup>熊本県立大学・環境共生学部, <sup>2</sup>千葉大学・医学部, <sup>3</sup>信州大学・理学部, <sup>4</sup>愛媛大学・沿岸環境科学研究センター, <sup>5</sup>Research Center for Environmental Technology and Sustainable Development (CETASD), Hanoi University of Science, Vietnam National University, Vietnam, <sup>6</sup>Faculty of Chemistry, Hanoi University of Science, Vietnam National University, Vietnam, <sup>7</sup>愛媛大学・農学部

## 2-2 メコン川流域の淡水魚に含まれるヒ素の化学形態と摂取量

○姫野誠一郎<sup>1</sup>, 藤森千鶴<sup>1</sup>, 宮高透喜<sup>1</sup>, Suthipong Sthiannopkao<sup>2</sup><sup>1</sup>徳島文理大学薬学部・衛生化学, <sup>2</sup>東亜大学・環境科学部

## 2-3 3価無機ヒ素 [iAs(III)] による遺伝子誘導へのヒストン H3 修飾の関与について

○鈴木 俊英, 北 加代子, 越智 崇文

帝京大学薬学部・毒性学

## 2-4 紡錘体チェックポイントタンパク BubR1 はチオジメチルアルシン酸による分裂期蓄積とアポトーシス誘導に関与する

○北 加代子, 安積 奈々美, 鈴木 俊英, 越智 崇文

帝京大学薬学部・毒性学

休憩 10:00 ~ 10:10

◆テクニカル・セミナー

10:10～10:55 座長：姫野 誠一郎（徳島文理大学薬学部）

ICP-MSによるAsの分析は、本当に正しいのか？

行成 雅一（アジレント・テクノロジー株式会社）

休憩 10:55 ～ 11:00

◆一般講演4（発表12分、質疑3分）

11:00～12:00 座長：北 加代子（帝京大学薬学部）

2-5 ヒ素とセレンの赤血球への取り込みに関する相互作用

○小林 弥生<sup>1</sup>、鈴木 紀行<sup>2</sup>、小椋 康光<sup>2</sup>、平野 靖史郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 国立環境研究所・環境健康研究センター、<sup>2</sup> 千葉大学大学院薬学研究院・予防薬学、<sup>3</sup> 国立環境研究所・環境リスク研究センター

2-6 ジメチルヒ素化合物の毒性発現に対する cytochrome P450 の影響

下田康代<sup>1</sup>、○加藤孝一<sup>1</sup>、黒澤英俊<sup>1,2</sup>、畑 明寿<sup>3</sup>、圓藤陽子<sup>4</sup>、圓藤吟史<sup>5</sup>、  
山中健三<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 日本大学薬学部、<sup>2</sup> 警視庁・科学捜査研究所、<sup>3</sup> 千葉科学大学危機管理学部、<sup>4</sup> 関西ろうさい病院、<sup>5</sup> 大阪市立大学大学院

2-7 三酸化ヒ素感受性決定要因の多様性について

○信國 好俊、升本 順子、沼本 通孝

広島大学原爆放射線医科学研究所・ゲノム障害病理

2-8 亜ヒ酸を曝露した細胞における PML の SUMO 化と PML 核内小体タンパク質の変化

○平野 靖史郎<sup>1,2</sup>、但野 美保子<sup>1</sup>、小林 弥生<sup>1,2</sup>、宇田川 理<sup>1</sup>、  
加藤 綾華<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 国立環境研究所、<sup>2</sup> 千葉大学大学院・医学薬学府

◆総会

12:00 ～ 12:25

# 特別講演

## イネにおけるヒ素の輸送機構

馬 建鋒

岡山大学資源植物科学研究所

ヒ素は極めて毒性の強い元素で、急性毒性だけでなく、微量でも継続的に摂取することによって慢性毒性を生じます。バングラデシュやインド西ベンガル地方などを始めとする世界各地では、地下水のヒ素汚染は深刻な環境汚染問題となっており、数千万人に及ぶ人々が慢性中毒と発ガンリスクに曝されています。またこれらの地域ではヒ素汚染水を米などの農作物の灌漑水として用いているため、コメをはじめとする農作物のヒ素汚染が非常に大きな問題となっています。今年7月、国連の食品規格機関であるコーデックス委員会は精米中のヒ素の最大許容量(0.2mg/kg)を採択しました。したがって、主食である米のヒ素濃度を軽減させることは健康上非常に重要です。

### 1. イネのヒ素吸収機構

イネは他の穀物に比べヒ素を蓄積しやすい性質があります。これは水田環境では土壌中のヒ素が五価のヒ酸  $As(V)$  から三価の亜ヒ酸  $As(III)$  に還元され、土壌溶液中の濃度が増加します。それに加え、亜ヒ酸がイネのケイ酸内向き輸送体  $Lsi1$  と外向き輸送体  $Lsi2$  を介して吸収されるからです (Ma et al., 2008)。 $Lsi1$  と  $Lsi2$  はともに根の外皮細胞と内皮細胞に局在していますが、 $Lsi1$  が細胞の遠心側、 $Lsi2$  が細胞の向心側に偏在しています (Ma et al., 2006; 2007)。亜ヒ酸はケイ酸と同じく pH9 以下で無電荷の形態で存在し、また分子サイズも似ていることから、ケイ酸の輸送体を使って吸収されます。 $Lsi1$  と  $Lsi2$  の協調的な働きにより、土壌溶液中の亜ヒ酸は根の中心柱まで運ばれます(図1)。イネはケイ素集積植物として知られ、 $Lsi1$  と  $Lsi2$  の働きが他のイネ科作物と比べ高いため、亜ヒ酸の吸収も高くなる故です。この性質を利用して、ケイ酸質肥料を施与すると、ワラと米中のヒ素濃度が減少されることが実証されています(Li et al., 2009b)。また  $Lsi1$  は亜ヒ酸だけではなく、メチル化されたヒ素 (MMA と DMA) の吸収にも関与しています (Li et al., 2009a)。MMA と DMA はかつて除草剤や殺虫剤として使われていました。

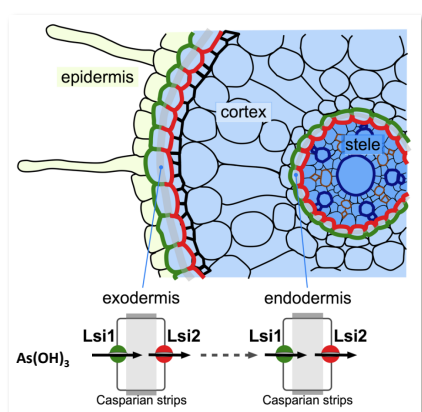


図1 イネの根における亜ヒ酸吸収機構

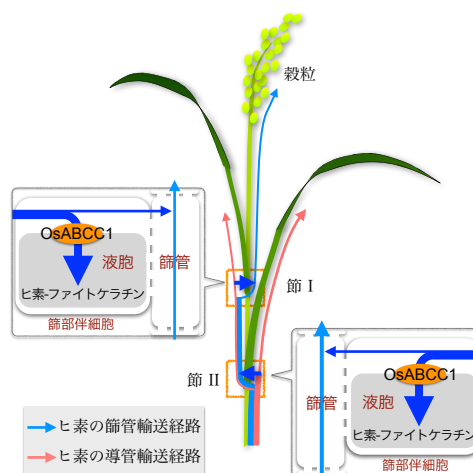


図2 節におけるヒ素の分配機構

さらに Lsi1 は亜ヒ酸の根外への排出にも関与しており、その寄与率は 20%程度です(Zhao et al., 2009)。

Lsi1 はアクアポリンの NIP サブファミリーに属しますが、その輸送基質特異性を検討した結果、四つのアミノ酸からなる selectivity filter の内、第 2 ヘリックス (H2) のアミノ酸が変異しても、ケイ酸や亜ヒ酸に対する輸送活性は変わりませんでした (Mitani et al., 2011)。しかし、H5 のアミノ酸を変異させると、ケイ酸に対する輸送活性はなくなりますが、亜ヒ酸に対する輸送活性は部分的に残っていました。これらのことは H5 のアミノ酸残基は輸送基質の選択性に重要な役割を果たしていることを示しています。

## 2. イネのヒ素分配機構

根で吸収されたヒ素は導管を通して地上部に運ばれ、最終的に節で種子への分配を行います。最近我々は節で発現するケイ酸輸送体 Lsi2 と ABC トランスポーターの一つである OsABCC1 が種子へのヒ素の集積に関与していることを明らかにしました (Chen et al., 2015; Song et al., 2014)。OsABCC1 輸送体タンパク質はイネの細胞の液胞膜上に局在し、ヒ素を液胞に隔離する働きがあります(図 2)。さらに、ヒ素は液胞内で、ファイトケラチン (植物がアミノ酸から合成するキレート化合物) と安定的に結合することで無毒化されます。OsABCC1 輸送体タンパク質は維管束の篩管に隣接する篩部伴細胞を中心にイネの全身で構成的に発現しますが特に発達した維管束が集中する節において多く見られます。イネは篩部伴細胞の液胞へとヒ素を隔離することで、篩管を通して穀粒へと運ばれるヒ素の転流を効果的に抑制します。この働きにより、玄米中のヒ素蓄積は、OsABCC1 遺伝子が壊れた変異体イネに比べて正常なイネでは 13~18 分の 1 に減少しました。

## 引用文献

- (1) Chen, Y., Moore, K. L., Miller, A. J., McGrath, S. P., Ma, J. F. and Zhao, F. J. 2015. The role of nodes in arsenic storage and distribution in rice. *J. Exp. Bot.* 66 : 3717-3724.
- (2) Li, R. Y., Ago, Y., Liu, W. J., Mitani, N., Feldmann, J., McGrath, S. P., Ma, J. F. and Zhao, F. J. 2009a. The rice aquaporin Lsi1 mediates uptake of methylated arsenic species. *Plant Physiol.* 150: 2071-2080.
- (3) Li, R. Y., Stroud, J. L., Ma, J. F., McGrath, S. P. and Zhao, F. J. 2009b. Mitigation of arsenic accumulation in rice with water management and silicon fertilization. *Environ. Sci. Technol.* 43: 3778-3783.
- (4) Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. and Yano, M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691.
- (5) Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M. and Yano, M. 2007. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448: 209-211
- (6) Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X. Y., Su, Y. H., McGrath, S. and Zhao, F. J. 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9931-9935.
- (7) Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Zhao, F. J. and Ma, J. F. 2011. Aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron and arsenic. *J. Exp. Bot.* 62: 4391-4398.
- (8) Song, W. Y., Yamaki, T., Yamaji, N., Ko, D., Jung, K. H., Fujii-Kashino, M., An, G., Martinoia, E., Lee, Y. and Ma, J. F. 2014. A rice ABC transporter, OsABCC1, reduces arsenic accumulation in the grain. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 15699-15704.
- (9) Zhao, F. J., Ago, Y., Mitani, N., Li, R. Y., Su, Y. H., Yamaji, N., McGrath, S. P. and Ma, J. F. 2010. The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots. *New Phytol.* 186: 392-399

## 急性前骨髄球性白血病：治療の今昔

直江知樹

国立病院機構 名古屋医療センター

亜ヒ酸（三酸化二ヒ素）は毒薬としてまた薬としての長い歴史を有している。白血病に対して有効な治療法がない戦前、欧米や我が国で、慢性骨髄性白血病の著しい白血球増加を抑制する唯一の薬物療法として亜ヒ酸療法が行われていた。しかし戦後マスタードガスに端を発するアルキル化剤が開発されるとともに、亜ヒ酸療法は忘れ去られていった。再び脚光を浴びるきっかけは、1996年上海第二医科大学グループが急性前骨髄球性白血病（APL）に対して亜ヒ酸が臨床的に有効であることを一流誌 **BLOOD** に発表したことにあった。このグループは後述のオールトランスレチノイン酸（ATRA）が APL に有効であることを報告していただけない “Miracle Poison” として世界中から注目を集めた。しかし実際の実験はハルピン医科大学のグループであり、1992年発行の中国中西医结合雑誌 にその第一報が掲載されている。

米国では直ちに追試が行われ、1998年、難治性又は再発した APL 患者に対する亜ヒ酸の有効性が **New England Journal of Medicine** に報告された。これを受けて、2000年に米国、2002年に欧州で承認となった。我が国では厚生省がん助成金「成人難治性白血病に対する治療法の開発と標準的治療法確立に関する研究」班の研究として臨床試験が実施され、完全寛解率 78%（11/14例）と米国と同様の高い有効性が認められた。我が国は 2004年に難治性又は再発した APL に対して承認されている。欧米や中国では初回治療から ATRA と亜砒酸が併用されており、極めて高い奏効率と生存率が報告されてきている。我が国でも亜ヒ酸の適応を未治療 APL に広げるよう、学会から当局へ要望中である。

亜ヒ酸が APL にのみ高い有効性を示すことから、その作用機序にも大きな関心が寄せられた。上述の上海第二医科大学や我々のグループは、亜砒酸が低濃度では APL 細胞の分化誘導を、高濃度ではアポトーシスを誘導すること、APL での特異的な融合転写因子 PML-RAR $\alpha$  の分解を促進することを見出していた。



しかし亜ヒ酸の標的分子は不明であった。我々は長年の亜ヒ酸療法を繰り返すうちに耐性となった APL 症例を経験し、この症例における PML-RAR $\alpha$ の解析から、亜ヒ酸は直接 PML-RAR $\alpha$ を標的とした治療法であることを提唱するにいたった。

振り返ってみれば、APL は私にとって白血病研究の原点ともいべき白血病であった。1990年に当時の上司であった大野竜三先生から APL の研究を薦めていただいたことが契機で、発症機構から新規薬剤開発、臨床試験まで数多くのプロジェクトに関わらせてもらった。講演では亜ヒ酸も含めこれまでの研究を紹介したい。

# テクニカル・セミナー

## ICP-MSによるAsの分析は、本当に正しいのか？

アジレント・テクノロジー株式会社  
プラズマ分光営業部 ICP-MS グループ  
シニアスペシャリスト 行成 雅一

### 【はじめに】

ICP-MSは、1983年に登場し、既に32年が経過する。発売当初は、様々な多原子イオン干渉の問題（質量数90以下の元素に多く干渉する。）から、Cd、Pb等の高質量数元素の分析に限定されていた。もちろん、As、Seの分析は、不可能だった。

しかし、1992年にコリジョン・リアクション技術が登場し、従来問題であった多原子イオン干渉の問題が解決され、ほぼ全ての元素の分析が可能になった。このコリジョン・リアクション技術により、ICP-MSによる元素分析は、飛躍的に進化し、現在では全世界で、年間約2,000台の市場規模までになっている。

また、様々な公定法（環境基準、水道基準等）にも採用され、As、Seを含む微量元素分析は、ICP-MSが主流となっている。

### 【Asの定量結果に対し問題発生】

平成24年度環境省統一精度管理調査で実施されたAsの分析値に関し、ICP-MSの分析結果が、真値に対し、かなり高い値を示す結果となった。一方、ICP発光水素化物発生法および原子吸光水素化物発生法の分析結果は、妥当な結果となった。

一般的に、ICP-MSが正しいと考えてしまうが、大きな落とし穴があった。環境省環境調査研修所の藤森先生の報告によると、ICP-MSの場合、試料中に含まれていた希土類元素（Sm、Nd）の2価イオンがAsに干渉することを確認した。

### 【問題解決法】

希土類元素の2価イオン干渉除去方法は、現在、3種類の手法が開発されている。一つ目は、藤森先生によって開発された希土類元素除去技術、二つ目は、アジレントが開発したICP-MS/MSによるマスシフト法、三つ目は、同じくアジレントが開発したハーフマス干渉補正式法である。本セミナーでは、Asの定量結果の問題点およびこれらの解決法を詳しく紹介する。

# 一般講演

## 尿認証標準物質中ヒ素化合物濃度

○小栗朋子<sup>1</sup>, 吉永淳<sup>2</sup>, 田尾博明<sup>3</sup>, 中里哲也<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 東京大学 (現 名古屋市立大学), <sup>2</sup> 東京大学, <sup>3</sup> 産業技術総合研究所

### 1 はじめに

無機ヒ素 (iAs) は摂取後、その大部分が速やかに尿中へ排泄されること、iAs 曝露量と尿中濃度には相関があること (Landrigan et al., 1982.; Calderon et al., 1999) から、健康影響評価における曝露のバイオマーカーとして尿中 iAs 代謝産物濃度は有力な候補であり、これまで職業曝露や地下水汚染地域における疫学調査などの環境曝露の評価において広く用いられている (Orloff et al., 2009)。そうした曝露調査を行うにあたり、尿中 iAs 代謝産物に値付けされた認証標準物質が入手可能となれば、尿試料のルーチン分析の精度管理に有用である。

本研究では、日本人の尿を材料に作成された認証標準物質のヒ素分析を 3 種類の異なる分析条件の LC-ICPMS 法により行い、得られた定量値と文献値から、尿認証標準物質中ヒ素化合物濃度の策定を試みたので報告する。

### 2 方法

尿認証標準物質 (NIES CRM No. 18 Human Urine) (以下、尿 CRM とする) は調製後、純水を用いて 5 倍希釈したものを検液とした。検液中ヒ素化合物分析は LC1: 水素化物発生法を用いた LC-ICPMS 法、LC2: LC-ICPMS 法、LC3: 光酸化/水素化物発生法を用いた LC-ICPMS 法の 3 種類とした。LC1, 2 ではイオン対クロマトグラフィー (Narukawa et al., 2006)、LC3 ではイオン排除およびイオン交換クロマトグラフィーによる LC-ICPMS 法 (Nakazato and Tao, 2006) を用いた。

### 3 結果および考察

本研究では、iAs の曝露指標である尿中 As(V), As(III), MMA 濃度と、DMA, AB, TMA<sub>5</sub>O について定量を行った。1 ng As/g 標準液の繰り返し測定による併行精度は各ヒ素化合物で 2.0 - 2.7 % と良好であった。S/N = 3 より算出した検出下限は尿中濃度に換算すると、LC1 で 0.26-0.46、LC2 で 1.2-2.6、LC3 で 0.12-0.82 ng As/mL であった。尿 CRM 中ヒ素化合物の測定精度 (n=3) は 0.6 - 6.0% と良好であった。尿 CRM 中 DMA, AB の定量値は LC1-3 それぞれで、認証値 36±9, 69±12 ng As/mL と不確かさの範囲内で一致した (表)。その他の各ヒ素化合物濃度については認証値が付与されていないことから、他分析機関の測定値 (表, Lab2) および既往文献値 (Nakazato et al., 2000; Sloth

et al., 2004; Yoshinaga et al., 2000) を比較したところ、ばらつきの範囲内であった。

As(V), As(III)の定量値はLC1, 2 では測定のばらつきの範囲内で一致し、LC3 については若干差があったもののその差は小さかった。MMA はばらつきの範囲で一致した。3 種類の分析条件により得られた定量値が比較的良い一致を示したことから、尿 CRM 中ヒ素化合物の 3 つの定量値は相互に確認され、各分析法による定量値の信頼性も検証されたことになる。得られた結果をもとに計算した尿 CRM 中ヒ素化合物濃度の平均値 (95%信頼区間) は、As(V) 0.79 (0.14), As(III) 2.1 (0.1), MMA 2.4 (0.1) ng As/mL であった。

表 NIES CRM No.18 ヒ尿中ヒ素濃度(ng As/mL)

Lab ID	分析条件	As(V)	As(III)	MMA	DMA	AB	TMA <sub>5</sub> O	参考文献
1	LC1	0.720±0.035	2.08±0.12	2.41±0.06	34.8±1.4	-	-	This study
	LC2	0.716±0.043	2.12±0.06	2.44±0.14	32.3±1.4	68.2±2.8	-	
	LC3	0.929±0.027	2.21±0.10	2.30±0.03	31.3±0.8	64.1±0.3	3.75±0.09	
2	LC4	1.1±0.0	2.0±0.0	3.0±0.4	40.0±2.1	67.7±2.6	4.1±0.5	Lab.2
3	LC5	定量せず	定量せず	2.0±0.4	35.0±0.3	74±1	-	Nakazato et al. (2000)
	LC6	0.62±0.03	2.32±0.09	2.95±0.06	38±1	-	-	
	LC7	0.66±0.03	2.50±0.05	2.8±0.1	-	-	-	
4	LC8	0.91±0.02	2.2±0.1	2.6±0.1	39±2	-	-	Sloth et al. (2004)
	LC9	-	-	-	35±1	68±4	0.27±0.02	
共同分析		0.6-11.4	2.3-7.1	2.2-5.4	<b>36±9</b>	<b>69±12</b>	-	Yoshinaga et al. (2000)

※太字は認証値

※LC4-9はそれぞれ異なるLC条件を示す

Concentrations of arsenic species in a human urine certified reference material. .

Tomoko Oguri<sup>1</sup>, Jun Yoshinaga<sup>2</sup>, Hiroaki Tao<sup>3</sup>, Tetsuya Nakazato<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The University of Tokyo (currently Nagoya City University), <sup>2</sup>The University of Tokyo, <sup>3</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Inorganic arsenic [iAs: As(III) and As(V)] concentrations in a certified reference material of human urine (NIES CRM No.18 Human urine) were determined by liquid chromatography-ICP mass spectrometry with three different LC conditions and with or without a hydride generation system. Concentrations of DMA and AB detected by LC-1, 2, and 3 were in good agreement with the certified values of the CRM. The analytical results of iAs and MMA in the CRM by the three LC-ICP-MS conditions were consistent each other and the mean and 95% CI of the concentrations were 0.79 (0.14), 2.1(0.1) and 2.4 (0.1) ng As/mL for As(V), As(III) and MMA, respectively. The values may be useful as a target value in the quality control of urinary As speciation analysis,

## 無機ヒ素曝露の生物学的モニタリング指標値の検討

○畑 明寿<sup>1</sup>, 黒澤 英俊<sup>2, 3</sup>, Mohamed Ahsan Habib<sup>4</sup>,

圓藤 陽子<sup>5</sup>, 山中 健三<sup>2</sup>, 藤谷 登<sup>1</sup>, 圓藤 吟史<sup>4</sup>

<sup>1</sup>千葉科学大学・危機管理学部, <sup>2</sup>日本大学・薬学部, <sup>3</sup>警視庁・科学捜査研究所,

<sup>4</sup>労働科学研究所, <sup>5</sup>関西ろうさい病院・産業中毒研究センター

### 1 はじめに

無機ヒ素 (iAs) は体内でモノメチルアルソン酸 (MMA)、ジメチルアルシン酸 (DMA) に代謝され iAs とともに尿中に排泄される。そのため米国やドイツでは尿中 iAs と MMA、DMA の合計値 (iAs+MMA+DMA) が職業性 iAs 曝露の生物学的モニタリングに利用されている。しかし DMA は海産食品の摂取によっても多量に排泄されることから、わが国における特殊健康診断では DMA を除き、iAs と MMA の合計値 (iAs+MMA) が用いられている。今回我々はバングラデシュ人民共和国と日本における尿中ヒ素化学形態別分析値を基に、日本に適した iAs+MMA 指標値の検討を行った。

### 2 方法

先に報告したバングラデシュ人民共和国の地下水 iAs 汚染地域住民 165 組の夫妻 (Hata et al., 2012) および福岡県北九州市の職業性 iAs 曝露のない男性労働者 172 名 (Suzuki et al., 2009) の尿中形態別ヒ素濃度値を用いた。バングラデシュの被験者には海産食品摂取の習慣がないことを確認しており、尿中ヒ素の化学形態別分析はイオン交換カラムを用いた HPLC-ICP-MS 法で行った。

### 3 結果および考察

バングラデシュ住民尿からは 3 価 (AsIII) と 5 価 (AsV) の無機ヒ素、MMA、DMA が検出された。魚介類に多く含まれる AsBe は検出されなかったことから、食品からの有機ヒ素曝露は殆どないと考えられる。x = iAs+MMA+DMA、y = iAs+MMA として散布図を作成すると良好な相関が得られ ( $r = 0.962$ ,  $p < 0.0001$ )、近似直線の回帰式は  $\log y = 1.038 \log x - 0.658$  となった。職業性 iAs 曝露のない日本人尿からは AsIII、AsV、MMA、DMA、AsBe、その他有機ヒ素化合物が検出された (表 1)。iAs+MMA の中央値と 95%tile 値はそれぞれ 4.4 と 12.6  $\mu\text{g As/L}$  であった。彼らの尿中ヒ素は主に食事由来することから、職業性曝露のバックグラウンド値には 95%tile 値である 12.6  $\mu\text{g As/L}$  を用いることが妥当であると考えた。吸引空気量 10 $\text{m}^3/8$  時間、ヒ素吸収率 60%、尿中排泄率 60%、尿中ヒ素濃度の日内変動なし、尿量 1.2L と仮定し、厚生労働省が定めるヒ素の管理濃度 (3  $\mu\text{g As/m}^3$ ) 環境下で 8 時間労働した場合の尿中 iAs+MMA+DMA

を求めると 9.0  $\mu\text{g As/L}$  となる。この値を前述の回帰式に代入すると iAs+MMA は 2.15  $\mu\text{g As/L}$  となった。この値に日本人の iAs+MMA バックグラウンド値を加えると 14.8  $\mu\text{g As/L}$  となる。

表 1. 無機ヒ素曝露のない日本人 172 名の尿中ヒ素化合物の分布(Suzuki et al., 2009)

	AsIII	AsV	MMA	DMA	AsBe	others	T-As	iAs+MMA
Median	1.5	ND	2.3	41.1	74.5	4.1	132.2	4.4
95%tile	5.4	1.7	6.2	109.2	243.7	23.7	368.4	12.6

(単位 :  $\mu\text{g As/L}$ 、others : その他の有機ヒ素化合物、T-As : 総ヒ素)

#### 4 まとめ

3  $\mu\text{g As/m}^3$  の iAs 曝露における尿中 iAs+MMA 指標値として 14.8  $\mu\text{g As/L}$  が妥当であると考えられる。

#### Biological indicator of inorganic arsenic exposure excluding dimethylarsinic acid

Akihisa Hata<sup>1</sup>, Hidetoshi Kurosawa<sup>2,3</sup>, Mohamed Ahsan Habib<sup>4</sup>,  
Yoko Endo<sup>5</sup>, Kenzo Yamanaka<sup>2</sup>, Noboru Fujitani<sup>1</sup>, and Ginji Endo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, <sup>2</sup>School of Pharmacy, Nihon University, <sup>3</sup>Criminal Investigation Laboratory, Metropolitan Police Department, <sup>4</sup>The Institute for Science of Labour, <sup>5</sup>Research Center for Occupational Poisoning, Kansai Rosai Hospital

The sum of urinary inorganic arsenic (iAs), monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) has been used for the biological monitoring of occupational exposure to iAs. DMA is not an adequate index because high DMA levels are present in the urine following seafood intake. Therefore we estimated the urinary iAs+MMA concentration corresponding to iAs exposure. We used our previous urinary arsenic data obtained from Bangladeshis with oral iAs exposure and Japanese without occupational iAs exposure. IAs, MMA, and DMA but not arsenobetaine was detected in the urine of Bangladeshis. The correlation between  $x = \text{iAs+MMA+DMA}$  and  $y = \text{iAs+MMA}$  was obtained as  $\log(y) = 1.038 \log(x) - 0.658$  ( $r = 0.962$ ,  $p < 0.0001$ ). Using the regression formula, the iAs+MMA value was calculated as 2.15  $\mu\text{g As/L}$  corresponding to 3  $\mu\text{g As/m}^3$  of exposure. In the urine of Japanese, the 95th percentile of the iAs+MMA is 12.6  $\mu\text{g As/L}$ , and we think this value a background value. The sum of the calculated value and the background value can be used as a biological indicator of iAs exposure. We propose 14.8  $\mu\text{g As/L}$  of urinary iAs+MMA as biological indicators of 3  $\mu\text{g As/m}^3$  of iAs exposure in Japan.



## 亜ヒ酸毒性発現機構におけるペントースリン酸経路の関与

○高橋 勉<sup>1,2</sup>, 佐竹翔平<sup>2</sup>, 黄 基旭<sup>2</sup>, 藤原泰之<sup>1</sup>, 永沼 章<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京薬科大学薬学部・公衆衛生学, <sup>2</sup>東北大学大学院薬学研究家・生体防御薬学

### 1. はじめに

我々はヒ素毒性の発現機構を明らかにするため、有用な真核生物モデルである出芽酵母を用いて、ヒ素化合物の一種である亜ヒ酸に対する感受性決定に関与する遺伝子群の全容解明を目指している。これまでに、酵母の全 6,000 種の遺伝子のうち、欠損可能な約 5,000 種については、遺伝子欠損酵母株ライブラリーを用いて検索を行い、亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子を多数同定してきた。しかし、酵母の生存に必須な遺伝子についての検討は行っていない。そこで本研究では、生存に必須な遺伝子がそれぞれノックダウンされた酵母ライブラリーを用いて、亜ヒ酸感受性に影響を与える必須遺伝子の検索を行った。

### 2. 方法

亜ヒ酸感受性決定に関わる必須遺伝子の検索：必須遺伝子（878 種）の発現をそれぞれ抑制した酵母を一株ずつ、親株が増殖可能な亜ヒ酸濃度下で培養し、48 時間後に増殖があまり認められない酵母株を亜ヒ酸高感受性株とした。亜ヒ酸が遺伝子発現レベルに与える影響：亜ヒ酸存在下で培養した酵母から総 RNA を抽出し、逆転写反応によって得られた cDNA を用いて定量 PCR 法を行い、亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子の発現量を調べた。亜ヒ酸処理時の核酸合成量の測定：D-[<sup>14</sup>C(U)]-グルコースおよび亜ヒ酸を含む培地で培養した酵母から RNA を抽出し、液体シンチレーションカウンターを用い、RNA に取り込まれた <sup>14</sup>C の量を測定した。

### 3. 結果および考察

スクリーニングの結果、発現を抑制することで酵母の亜ヒ酸に対する感受性が増強される遺伝子として 7 種が同定され、その中にはペントースリン酸経路に関わるリボース-5-リン酸ケトールイソメラーゼをコードする *RKII* が含まれていた。ペントースリン酸経路は酸化的段階と非酸化的段階に大別され、前者は NADPH の産生、後者は核酸合成に必要なリボース-5-リン酸などの産生にそれぞれ関与することが知られている。しかしながら、これまでに亜ヒ酸毒性とペントースリン酸経路の関連性について検討された例はほとんどない。そこで、ペントースリン酸経路と亜ヒ酸毒性との関係を調べたところ、*RKII* と同様に非酸化的段階に関わる酵素 (*RPE1*, *TKL1* および *TAL1*) を欠損させた酵

母も高い亜ヒ酸感受性を示した。一方、酸化段階に関わる酵素を欠損させた酵母は亜ヒ酸高感受性を示さなかった。したがって、ペントースリン酸経路の非酸化的段階で産生される代謝物が亜ヒ酸の毒性軽減に関与していると考えられる。また、亜ヒ酸処理によって非酸化的段階に関わる酵素の発現レベルが低下することも判明した。以上の結果からペントースリン酸経路の非酸化的段階の抑制が、亜ヒ酸毒性発現において重要な役割を果たしていると考えられる。また、細胞内でリボキナーゼによってリン酸化されリボース-5-リン酸となる D-リボースを培地中に添加すると亜ヒ酸毒性が顕著に軽減されることが明らかとなった、したがって、亜ヒ酸がペントースリン酸経路のうち、非酸化的段階に関わる遺伝子の発現を抑制し、その結果として細胞内のリボース-5-リン酸の量が減少する可能性が考えられる。実際に亜ヒ酸処理によって、リボース-5-リン酸から合成される RNA のレベルが著しく低下することが確認された。したがって、亜ヒ酸はペントースリン酸経路を抑制することで細胞内リボース-5-リン酸レベルを低下させ、その結果核酸合成を阻害する可能性が考えられる。

#### Involvement of pentose phosphate pathway in arsenite toxicity

Tsutomu Takahashi<sup>1,2</sup>, Shohei Satake<sup>2</sup>, Gi-Wook Hwang<sup>2</sup>,

Yasuyuki Fujiwara<sup>1</sup>, Akira Naganuma<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Health, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, <sup>2</sup>Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

To identify the genes involved in arsenite toxicity, we performed a screen for determinants of sensitivity of cells to arsenite using DAmP yeast library (Open Biosystems) which has decreased expression of each essential gene through mRNA perturbation. As a result, we found that knockdown of *RKII*, an enzyme in pentose phosphate pathway (PPP), increased sensitivity of yeast cells to arsenite. We also found that disruption of genes involved in non-oxidative branch of PPP enhanced arsenite toxicity. Arsenite repressed expression of genes involved in non-oxidative branch of PPP, which is important for generating ribose-5-phosphate. Addition of D-ribose, a precursor of ribose-5-phosphate, to culture medium decreased the toxicity of arsenite in yeast cells. Furthermore, arsenite repressed synthesis of RNA from ribose-5-phosphate. These results suggest that arsenite might inhibit synthesis of nucleic acids through repression of non-oxidative branch of PPP.

## 培養小脳アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレス、MAP キナーゼ活性化、および神経・血管作動性サイトカイン産生

○根岸 隆之<sup>1</sup>, 浅井 椋大<sup>1</sup>, 金平 朋子<sup>1</sup>, 小嶋 幹也<sup>1</sup>, 阪口 文香<sup>1</sup>, 高畑 和明<sup>1</sup>, 青山 洋平<sup>1</sup>, 新垣 梨奈<sup>1</sup>, 松本 真実<sup>1</sup>, 吉田 光<sup>1</sup>, 吉田 謙二<sup>1</sup>, 湯川 和典<sup>1</sup>, 田代 朋子<sup>2</sup>, 平野 靖史郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup>名城大学薬学部・生理学, <sup>2</sup>青山学院大学理工学部, <sup>3</sup>国立環境研究所

### 1 はじめに

ジフェニルアルシン酸 (DPAA) は旧日本軍の毒ガスを合成する際の中間原料または分解産物と言われており、2003 年に茨城県神栖市 (当時神栖町) において発生した井戸水のヒ素汚染事故 (当時検出濃度最高 4.5 mgAs/L) の主たる物質である。DPAA に汚染された井戸水を使用していた住民には小脳症状を主徴とする神経症状がみられ、また臨床所見としては脳血流量の低下や眼球運動の異常がみられた。我々は DPAA が神経症状を引き起こす毒性学的メカニズムを解明するために、これまでにラット小脳神経系細胞初代培養 (神経細胞とアストロサイトの混合培養系) を用いて、DPAA の細胞毒性 ( $LC_{50} = 30 \mu M$ )、アストロサイトにおける酸化ストレス応答因子 (Hemeoxygenase-1 (HO-1)、Hsp70、Sod1) の発現上昇、および神経・血管作動性ペプチドの発現上昇を報告し (Negishi *et al.*, 2012)、また DPAA の発達期亜急性神経毒性としてラットにおける可逆性の多動と非可逆性の学習障害を報告した (Negishi *et al.*, 2013)。本研究ではこれまでの知見をもとに、選択的に培養したアストロサイトで生じる DPAA の影響を *in vitro* で分子生物学的に詳細に検討した。

### 2 方法

本研究ではまずラット新生仔小脳を分散培養し、アストロサイトの血清含有培養液中での増殖能力の高さを利用し、その後継代を繰り返すことでアストロサイトを選択的に培養した。培養小脳アストロサイトは最終継代後 48 時間血清含有培養液で接着を完了させたのちに無血清培養液に交換しさらに 48 時間培養した。その後 DPAA 含有無血清培養液で培養することで DPAA にばく露した。細胞毒性は細胞生存率および細胞死を定量し、培養液中のサイトカイン市販の ELISA キットを用い測定し、タンパク質の発現量とそのリン酸化の量は Western blotting 法による検出と定量により行った。

### 3 結果および考察

培養アストロサイトにおいて DPAA の 96 時間ばく露による細胞毒性は  $LC_{50}$  として約  $50 \mu M$  であった。また、 $10 \mu M$  程度の DPAA はアストロサイトに顕著な細胞死をもたらさず、むしろ細胞増殖を促した。また、DPAA ( $10 \mu M$ ) はばく露後 24 時間から 48 時間ほどの時間を経て培養アストロサイトにおける HO-1 や Hsp70 の発現上昇を引き起こした。そして神経・血管作動性ペプチドについても DPAA ( $10 \mu M$ , 96 時間) による MCP-1、adrenomedullin、FGF2、CXCL1、および IL-6 の培養液中への放出が見られた。続いて、細胞の増殖・分化、生存・細胞死、そして種々の遺伝子発現調節等の細胞機能に重要な働きを有する MAP キナーゼに注目したところ、主要な 3 つの

MAP キナーゼである ERK1/2、p38MAPK、および SAPK/JNK の全てが DPAA (10  $\mu$ M、96 時間) によりリン酸化亢進 (活性化) していた。そこでさらに MAP キナーゼカスケードの下流で遺伝子発現調節を行う転写因子として知られる CREB、c-Jun、および c-Fos を評価したところ、CREB のリン酸化亢進と c-Jun および c-Fos の発現上昇およびそのリン酸化が見られた。これらの結果から DPAA ばく露時の脳内ではアストロサイトの異常活性化が生じている可能性が考えられる。

・参考文献

Developmental subchronic exposure to diphenylarsinic acid induced increased exploratory behavior, impaired learning behavior, and decreased cerebellar glutathione concentration in rats. Negishi T, Matsunaga Y, Kobayashi Y, Hirano S, Tashiro T. *Toxicol Sci.* 2013 Dec;136(2):478-86

Diphenylarsinic acid increased the synthesis and release of neuroactive and vasoactive peptides in rat cerebellar astrocytes. Negishi T, Takahashi M, Matsunaga Y, Hirano S, Tashiro T. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 Jun;71(6):468-79.

Diphenylarsinic acid and reactive astrocytes: activation of MAP kinases, release of neuroactive and vasoactive cytokines, upregulation of transcription factors

Takayuki Negishi<sup>1</sup>, Ryota Asai<sup>1</sup>, Tomoko Kanehira<sup>1</sup>, Mikiya Kojima<sup>1</sup>,  
Fumika Sakaguchi<sup>1</sup>, Kazuaki Takahata<sup>1</sup>, Yohei Aoyama<sup>1</sup>, Rina Arakaki<sup>1</sup>,  
Mami Matsumoto<sup>1</sup>, Hikari Yoshida<sup>1</sup>, Kenji Yoshida<sup>1</sup>, Kazunori Yukawa<sup>1</sup>,  
Tomoko Tashiro<sup>2</sup>, Seishiro Hirano<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University,

<sup>2</sup> Department of Chemistry and Biological Science, Aoyama Gakuin University,

<sup>3</sup> Research Center for Environmental Risk, NIES

Diphenylarsinic acid (DPAA) was a compound detected in the arsenic poisoning occurred in Kamisu, Ibaraki, Japan, where people developed neurological, mostly cerebellar, symptoms and dysregulation of regional cerebral blood flow. In the present study, we evaluated adverse effect of DPAA *in vitro* on astrocytes, major brain glial cell supporting neuron. In cultured rat cerebellar astrocytes, DPAA at 10  $\mu$ M for 96 h could promote cell proliferation, increase protein expression of anti-oxidative stress protein, and induce release of cytokines. Furthermore, DPAA could fairly increase phosphorylation of ERK1/2, p38MAPK, and SAPK/JNK, and subsequent induction and/or phosphorylation of transcription factors Nrf2, CREB, c-Jun, and c-Fos in cultured rat cerebellar astrocytes. These results suggest that, in cerebellum exposed to DPAA, irregular secretion of these brain- and/or vaso-active cytokines and disrupted transcriptional regulation by reckless activation of MAP kinase-transcription factor pathway in astrocytes would become the direct/indirect cause of functional abnormality in surrounding brain cells including neurons.

## マウスに静注した S-dimethylarsino-glutathione の代謝的動態

○加藤 綾華<sup>1</sup>, 小林弥生<sup>1,2</sup>, 宇田川理<sup>3</sup>, 平野靖史郎<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>千葉大学大学院 医学薬学府 <sup>2</sup>国立環境研究所 環境健康研究センター

<sup>3</sup>国立環境研究所 環境リスク研究センター

### 1. 目的

近年、生体内に取り込まれた無機ヒ素化合物は、酸化、還元、メチル化、グルタチオン抱合等が複雑に絡み合っており代謝されていると考えられている。ジメチルヒ素の GSH 抱合体 S-dimethylarsino-glutathione ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As<sup>III</sup>(GS);DMAG) は無機ヒ素の代謝の過程で生成されると推定されている<sup>1)</sup>が、これまでのところ生体内で DMAG は検出されていない。一方で、近年 DMAG は末梢性 T 細胞リンパ腫の治験薬として国際的に第 I 相試験、第 II 相試験が行われている。しかしその作用機序や代謝経路は不明である。以前我々は DMAG または亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO<sub>2</sub>; iAs(III)) をマウスに尾静脈投与し、投与 1 時間後の各組織の総ヒ素濃度を調べた。結果として DMAG 投与では肺に、iAs(III)では肝臓にヒ素が多く分布していることが明らかとなった。また血漿中でのヒ素の化学形態を確認したところ、両群ともにジメチルアルシン酸 (DMA(V)) と同じ保持時間に高いピークが検出された。本研究では投与直後の DMAG の代謝的動態を解明するため、投与後 5 分の体内分布と血漿中のヒ素の化学形態を明らかにするとともに、iAs(III)投与後の結果と比較することを目的とした。

### 2. 方法

8 週齢の C57 BL/6J 雄性マウスに DMAG または iAs(III)を 0.5mg As/ kg b.w.の用量で単回尾静脈投与した。投与 5 分後に解剖し、大脳、小脳、肺、肝臓、腎臓、全血を採取し灰化処理後 ICP MS で総ヒ素濃度を測定した。血漿は全血を採取後ただちに遠心分離し採取した。得られた血漿の一部を溶離液で 2 倍希釈し、HPLC-ICP MS でヒ素の化学形態を測定した。分離にはサイズ排除クロマトグラフィーモード主体の GS-220 HQ (shodex) カラムを用い、溶離液として 50mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH7.4)を使用、20μL を注入量とし、流速 0.5mL/min、カラムオープン温度 25°Cで溶出した。

### 3. 結果および考察

投与直後のヒ素の体内分布と血漿中でのヒ素の化学形態を調べるため、投与 5 分後に解剖し各組織中および血液を採取した。主として濃度分布は DMAG 群では肺と肝臓に、iAs(III)群では肝臓において高い値を示した。投与 1 時間後には、投与 5 分後に比べてヒ素濃度が低下していたことから、DMAG 投与直後に肝臓に取り込まれたヒ素は、比較的速やかに肝臓から排出されることが示唆された。HPLC-ICP MS 法によるヒ素の化学形

態別分析の結果から、DMAG 群においては、カラムの保持時間約 10 分のところに血漿中の成分に結合していると推定されるヒ素のピークが検出された。DMAG は生理学的 pH では不安定なため、ジメチルアルソン酸 (DMA(III)) に加水分解されることが推定される。DMA(III)はタンパク質との結合性が高いと報告されていることから、保持時間約 10 分に検出されたピークは、血漿中の成分に結合した DMA(III)に由来する可能性が示唆される。一方 iAs(III)群では iAs(III)と同じ保持時間、iAs(V)と同じ保持時間にピークが検出されたが、血漿中の成分に結合していると推定されるヒ素のピークはほとんど確認できなかった。投与後 1 時間後には DMA(V)が主要な代謝物として検出されたことから、iAs(III)投与 5 分後では血漿中で検出可能な量のジメチル化体が生成していないと考えられる。無機ヒ素においては代謝過程で様々な化学形態のヒ素化合物が生成されるため、*in vivo* において毒性が高いことが推察される。一方 DMAG を投与した群では短時間の投与において既に血漿の成分に結合しているため、血漿の成分に結合していることが重要であることが考えられる。この投与後短時間における血漿中のヒ素の形態の違いによって DMAG と iAs(III)の毒性や薬効において非常に重要な役割を担っていることが示唆される。

#### Metabolic behavior of intravenously injected *S*-dimethylarsino-glutathione in mice

Ayaka Kato<sup>1</sup>, Yayoi Kobayashi<sup>1,2</sup>, Osamu Udagawa<sup>2</sup>, Seishiro Hirano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Grad. School of Med & Pharm. Sci. Chiba University,

<sup>2</sup> National Institute for Environmental Studies

Methylated metabolites of arsenic are implicated both in toxicological effects and medical treatment of arsenicals. *S*-dimethylarsino-glutathione (DMAG), which is considered to be an unstable intermediate of inorganic arsenic<sup>1)</sup>, was intravenously injected in mice and distributions of arsenic to blood and tissues were investigated. We also investigated chemical species of arsenic in blood plasma using HPLC-ICPMS. We found differences in tissue distribution of arsenic between sodium arsenite- and DMAG-treated groups and a larger amount of arsenic was accumulated in the lung and brain in the latter group. A large peak was observed at an early retention time (about 10 min) in the HPLC-ICPMS speciation analysis of arsenic in blood plasma obtained from DMAG-injected but not sodium arsenite-injected mice.

<sup>1)</sup> Hayakawa, T., Y. Kobayashi, et al. (2004). "A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19." *Archives of Toxicology* **79**(4): 183-191.

## マウス卵子の質と PML に着目した亜ヒ酸の雌生殖毒性解析

○宇田川理<sup>1</sup>・加藤綾華<sup>2</sup>・小林弥生<sup>1,2</sup>・平野靖史郎<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>国立環境研究所, <sup>2</sup>千葉大学大学院・医学薬学府

### 1. はじめに

慢性的なヒ素摂取による皮膚ガンは代表的な健康影響として知られているが、一方で近年墮胎や死産の発生率が增大するといった疫学データが報告されてきている。亜ヒ酸やヒ酸の生殖毒性に関する研究は古くから行われているが、亜ヒ酸が卵子及び胚の細胞内において毒性を発現する詳細な分子機構は依然として明らかになっていない。毒としての側面とは反対に亜ヒ酸は急性前骨髄性白血病 (APL) の特効薬として知られている。APL の病因は ProMyelocytic Leukemia (PML) の dominant negative 体である PML-RAR $\alpha$  であることが知られているが、亜ヒ酸は PML を翻訳後修飾のひとつである Small Ubiquitin-like MOdifier (SUMO) 化を経て、ubiquitin-proteasome 系により分解へ導くことが提唱されている。本研究ではマウス卵子に *in vivo*, *in vitro* で亜ヒ酸を曝露して、卵子への直接的なヒ素到達の有無や PML の性質を調べた。

### 2. 方法

まず、C57BL/6Jマウスに対し亜ヒ酸ナトリウムを8 mg/kg b.w.で単回腹腔内へ投与し、1, 4.5, 24時間後に卵巣から卵子 (卵母細胞) を単離した。ヒ素の定量は灰化处理後に ICP-MSを用いた。次に、同投与量で1日おきに計2週間に渉り反復腹腔内投与を行い、性周期、卵巣ステロイド値、産仔の数・大きさ・性成熟度を調べた。また、妊娠時の胚形成を調べた。一方、単離した卵子を*in vitro*で成熟させ、PMLの局在及び、紡錘糸形成を蛍光抗体染色法により検出し、培地中の亜ヒ酸濃度と卵子成熟率の相関性を検討した。最後に、精子と受精前後の卵子/受精胚におけるPMLの局在を蛍光抗体染色法により検出した。

### 3. 結果

まず、投与1時間後において卵巣で検出されたヒ素量の約30%程度が卵子 (卵母細胞) において検出された。投与24時間後においては卵巣からもほとんど検出されなかった。次に、個体への反復投与では、卵巣ステロイド (エストラジオール、プロゲステロン) 値が亜ヒ酸投与群で有意に減少がみられたものの性周期や、産仔数・産仔の大きさ・仔雄の精子運動能・仔雌の排卵能には変化がみられなかった。また、亜ヒ酸投与群では仔の着床位置が左右でやや偏る傾向がみられ、墮胎が25%の妊娠個体でみられた。一方、

卵子内で PML はクロマチンを包むような形状で局在していた。培地中の亜ヒ酸濃度が 3  $\mu\text{M}$  では卵子成熟が開始したことを示す卵核胞崩壊には影響なかったが、以降の紡錘糸形成が強く阻害された。最後に、受精直後の受精胚において PML は母親由来の凝集核周辺を取り囲むように局在していた。その後受精後 16 時間の 1 細胞期では父親由来の核クロマチンに対しても局在が観察された。

#### 4. 考察

亜ヒ酸は卵巣内に存在する卵子（卵母細胞）に到達しており、到達した亜ヒ酸は卵子の質を低下させ得ることわかった。また代表的なヒ素結合タンパク質である PML は卵子において核成熟と関連した局在変化みられ、クロマチン構造形成への関与が示唆された。特に受精前後で雌性クロマチンから雄性クロマチンに受け渡される特殊な性質を有することがわかった。これらの結果と *In vivo* でみられた受精胚の質低下との関連を詳細に調べることで、新たな亜ヒ酸の雌生殖毒性発現機構並びに PML の機能に迫りたい。

Arsenic toxicity on female reproduction in mice; molecular examination on how oocyte quality contributes.

Osamu Udagawa<sup>1</sup>, Ayaka Kato<sup>2</sup>, Yayoi Kobayashi<sup>1,2</sup>, and Seishiro Hirano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Environmental Studies, <sup>2</sup>Graduate School of Chiba University

Whereas many literatures have pointed the carcinogenicity of arsenite, recent epidemiological progresses have revealed its non-carcinogenic effect on female reproduction: increasing odds for abortion and stillbirth. Thus, at first we have isolated oocytes and measured the amount of arsenic and found that oocytes are indeed challenged with arsenite. Next we have focused our attention on PML in the oocyte/embryo as a promising target of arsenite to operate within the oocyte/embryo. We found that PML uniquely localizes along the chromatin and condenses in a manner similar to that of chromatin. Further we found the maternal inheritance of PML in the fertilizing embryo. Finally, we found that arsenite exposure affects quality of oocyte such as the meiotic capacity *in vitro*, but no apparent effect on fertility except for the quality/viability of embryos at maternally NOAEL dose level previously reported.



# バングラデシュ住民の慢性的ヒ素曝露と血液ゲノムにおける DNA メチル化に関する検討

○鈴木武博<sup>1</sup>, Khaled Hossain<sup>2</sup>, 姫野誠一郎<sup>3</sup>, 野原恵子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立環境研究所・環境健康研究センター, <sup>2</sup>ラジシャヒ大学・生化学分子生物学部門,

<sup>3</sup>徳島文理大学薬学部・衛生化学

## 1 はじめに

中国、インド、バングラデシュなど東南アジアをはじめ世界各国で、天然由来の無機ヒ素の摂取による慢性中毒が発生し、大きな環境問題となっている。近年、無機ヒ素による DNA メチル化変化などのエピジェネティック変化を介した生体影響が報告されている。DNA メチル化変化は、環境化学物質の曝露マーカーとしての応用可能性も期待されている。本研究では、様々な疾患との関連が報告されている LINE-1 に着目し、バングラデシュのヒ素汚染が住民の LINE-1 の DNA メチル化に与える影響を検討した。

## 2 方法

バングラデシュにおいて、ヒ素汚染地域の住民（男性 93 名、女性 83 名）と、非ヒ素汚染地域の住民（男性 34 名、女性 29 名）を対象とした。住民が普段飲料水として使用している井戸から水を採取し、住民から血液と爪を採取した。採取にあたっては、Rajshahi 大学倫理委員会の承認、および、住民個人から同意を得ている。また、年齢、性別、BMI、喫煙の有無を聞き取り調査した。飲料水および爪中の総ヒ素濃度は ICP-MS で測定した。血液から調製したゲノム DNA をバイサルファイト処理し、LINE-1 領域の DNA メチル化率（LINE-1 メチル化率）をパイロシークエンサーで測定した。得られた LINE-1 メチル化率をヒ素汚染地域と非汚染地域で比較し、また飲料水中及び爪のヒ素濃度との対応関係を調べた。

## 3 結果および考察

LINE-1 メチル化率は、非汚染地域と比較してヒ素汚染地域の住民で有意に減少した。また、LINE-1 メチル化率と、飲水および爪中のヒ素濃度との間に、有意な逆相関が認められた。ヒ素曝露と LINE-1 メチル化率の逆相関は、関連する共変量である年齢、性別、BMI、喫煙で調整しても、統計的に有意であった。さらに、女性においては、飲水および爪中のヒ素濃度が LINE-1 メチル化率と有意な相関を示したが、男性では示さなかったことから、性別はヒ素曝露と LINE-1 メチル化率の重要な交絡因子であることが明らかになった。以上の結果から、慢性的なヒ素曝露は血液ゲノムの LINE-1 メチル化

率と逆相関を示すこと、および、ヒ素曝露が関連した LINE-1 メチル化率は男性よりも女性で感受性が高いことが示された。今後は、疾患との関連も含めて詳細な解析を行う予定である。

Investigation of the relationship between chronic arsenic exposure and DNA methylation levels of LINE-1 in genomic DNA derived from human blood through a cross sectional study in Bangladesh

Takehiro Suzuki<sup>1</sup>, Khaled Hossain<sup>2</sup>, Seiichiro Himeno<sup>3</sup>, Keiko Nohara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies,

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Rajshahi University, Bangladesh

<sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University

We explored the relationship between chronic arsenic exposure and DNA methylation levels of at long interspersed nuclear element 1 (LINE-1) in blood genomic DNA through a cross-sectional study. A total of 239 human subjects, 176 from arsenic-endemic and 63 from non-endemic areas in rural Bangladesh, were recruited for this study. Arsenic concentrations in the drinking water and nails of the study subjects were measured by ICP-MS, and LINE-1 methylation levels were determined by bisulfite pyrosequencing.

We found that LINE-1 methylation levels were significantly lower in arsenic-endemic population than those in non-endemic population. There were also significant negative correlations of drinking water and nail arsenic concentrations with LINE-1 methylation levels. Inverse relationships of arsenic exposure with methylation levels were also significant even after adjusting for relevant covariates including age, sex, BMI and smoking. Furthermore in linear regression analysis, it was observed that sex is a significant confounder in the arsenic-induced LINE-1 methylation, and subsequent analysis indicated that drinking water and nail arsenic concentrations were significantly correlated with LINE-1 methylation in females but not in males. Taken together, the results of this study indicated that chronic arsenic exposure was inversely associated with LINE-1 methylation, and females were more susceptible to arsenic-induced LINE-1 methylation than males.

## カドミウム極低吸収性稲品種「コシヒカリ環1号」によるコメ中の ヒ素とカドミウムの同時低減技術の開発

石川 覚<sup>1</sup>, ○荒尾知人<sup>1</sup>, 牧野知之<sup>1</sup>, 安部 匡<sup>1</sup>, 伊藤 正志<sup>2</sup>, 原田 浩司<sup>3</sup>, 中田 均<sup>4</sup>, 西田 一平<sup>5</sup>, 西村 誠<sup>6</sup>, 徳永 哲夫<sup>7</sup>, 白尾 謙典<sup>8</sup>, 吉澤 比英子<sup>9</sup>, 松山 稔<sup>10</sup>  
<sup>1</sup>農環研, <sup>2</sup>秋田農試, <sup>3</sup>千葉農総セ, <sup>4</sup>富山農総セ, <sup>5</sup>奈良農研セ, <sup>6</sup>滋賀農技セ, <sup>7</sup>山口農総セ,  
<sup>8</sup>熊本農研セ, <sup>9</sup>栃木農試, <sup>10</sup>兵庫農総セ

### 1 はじめに

水田土壌中のヒ素は湛水による土壌の酸化還元電位の低下（嫌気状態）に伴い、亜硫酸として溶出し、それが水稲に吸収される。一方、落水などによる土壌の酸化状態はヒ素の溶出を抑制するが、カドミウムの溶出を引き起こし、水稲のカドミウム吸収が高まる。このように水稲栽培においてヒ素とカドミウムはトレードオフの関係にあり、両元素を同時に低減することは困難である。我々は以前カドミウムをほとんど吸収しない水稲品種「コシヒカリ環1号」を育成し、この品種を節水などの土壌が酸化状態状態で栽培することでヒ素とカドミウムの同時低減が可能になると考えた。本発表では、複数の現地圃場で「コシヒカリ環1号」を栽培し、水管理の違いによるヒ素とカドミウムのトレードオフについて調査したので、報告する。

### 2 方法

コシヒカリおよびコシヒカリ環1号を2013年と2014年に東北から九州に至る9カ所の現地水田圃場で栽培した。水管理はカドミウム対策用等で実施されている湛水管理、田面水の消失と共に入水を繰り返す間断灌漑管理、田面水の消失後土壌表面が乾燥してから入水する節水管理を実施した。各試験圃場の土壌理化学性、栽培期間中の土壌の酸化還元電位（土壌 Eh）、土壌溶液中のヒ素・カドミウム濃度、玄米・稲わらのヒ素、カドミウムおよび重金属濃度、生育・収量、玄米品質等の各調査を行った。

### 3 結果および考察

生育期間中の土壌 Eh は各圃場でばらつきはあるものの、節水区>間断灌漑区>湛水区で推移し、節水区でより酸化状態状態になった。土壌 Eh の変化に対応するように、土壌溶液中のヒ素濃度は湛水区で高まり、カドミウム濃度は節水区で上昇した。玄米や稲わらのヒ素濃度は品種にかかわらず、湛水区>間断区>節水区の順であった。一方、コシヒカリのカドミウム濃度は節水区で有意に上昇したが、コシヒカリ環1号はいずれの水管理においてもほとんど検出されなかった。玄米収量は両品種共に節水区でやや低

下する傾向にあったが、有意ではなかった。玄米品質も節水区で低下する傾向が認められた。コシヒカリ環 1 号はマンガン輸送体である OsNramp5 の機能が欠損した変異体であるため、コシヒカリに比べて有意にマンガン濃度が減少した。しかし、玄米収量への影響はほとんど認められなかった。これらの結果から、コシヒカリ環 1 号の節水栽培はヒ素とカドミウムの同時低減に有効であることが証明された。

#### Development of the technique for reducing simultaneously arsenic and cadmium in rice grains by using a low-cadmium cultivar Koshihikari Kan No.1

S. Ishikawa<sup>1</sup>, T. Arao<sup>1</sup>, T. Makino<sup>1</sup>, T. Abe<sup>1</sup>, M. Itoh<sup>2</sup>, K. Harada<sup>3</sup>, H. Nakada<sup>4</sup>, I. Nishida<sup>5</sup>, M. Nishimura<sup>6</sup>, T. Tokunaga<sup>7</sup>, K. Shirao<sup>8</sup>, C. Yoshizawa<sup>9</sup>, M. Matsuyama<sup>10</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Agro-Environmental Sciences, <sup>2</sup>Akita Prefectural Agricultural Experiment Station, <sup>3</sup>Chiba Prefectural Agriculture and Forestry Research Center, <sup>4</sup>Toyama Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, <sup>5</sup>Nara Prefecture Agricultural Research and Development Center, <sup>6</sup>Shiga Prefecture Agricultural Technology Promotion Center, <sup>7</sup>Yamaguchi Prefectural Technology Center for Agricultural and Forestry, <sup>8</sup>Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center, <sup>9</sup>Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station, <sup>10</sup>Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries

In general, flooding conditions increases grain As concentrations in rice, whereas drainage increases Cd concentrations. Thus, there is a tradeoff between As and Cd uptake by rice depending on the type of water management. On the other hand, we previously produced the rice cultivar “Koshihikari Kan1 (KK1)” that do not accumulate Cd in the grains. Using this cultivar, we tested the effects of water managements to reduce simultaneously Cd and As in the grains.

Two cultivars, Koshihikari (KSH) and Koshihikari Kan1 (KK1) were cultivated in 9 experimental sites in Japan. These cultivars were exposed to 3 types of water regimes: 1) flooded (FLD), 2) alternate wet and dry conditions (AWD), and 3) water-saving conditions (WAS).

The grain As levels were highest in FLD, followed by AWD and WAS in all sites, whereas the grain Cd levels of KSH were opposite results. The grain Cd levels of KK1 were below a detection limit irrespective of water regimes in all sites. Although AWD or WAS somewhat decreased grain yields, the use of KK1 under such conditions is thought to be the best way to reduce simultaneously Cd and As in rice grains.

# レチノイン酸による HL-60 細胞の分化誘導作用に対する亜ヒ酸製剤 の有用性

○角 大悟<sup>1</sup>, 鈴川 和巳<sup>2</sup>, 姫野 誠一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大学薬学部・衛生化学, <sup>2</sup>筑波大学医学部

## 1 はじめに

亜ヒ酸製剤 (ATO) は, 再発性・難治性急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬として本邦で 2004 年に薬価収載されたが, 本剤の APL に対する作用機序は不明な点が多い. APL の第一選択薬である all トランス-レチノイン酸 (ATRA) は高い寛解率を示す一方, 耐性を生じやすいことが知られており他剤との併用が望まれる. そこで本発表では, 白血病治療における ATO と ATRA の併用療法の有効性について基礎的な知見を得るために, 培養ヒト白血病細胞の分化を指標に検討を行った.

## 2 方法

細胞: ヒト急性骨髄球性白血病 HL60 細胞を用いた.

HL60 細胞の分化: Nitro Blue Tetrazolium (NBT) の還元により得られる不溶性 NBT ホルマザンを吸光度 570 nm にて測定, また CD11b の細胞表面での発現を Flow Cytometry で測定した.

mRNA 発現量: 半定量的 RT-PCR および real-time qPCR にて検討した.

タンパク質発現量: ウェスタンブロットおよび ELISA 法で検出した.

マイクロアレイ解析: Agilent 社 Human GE 4 × 44 v2 2 color を使用した

## 3 結果および考察

ATRA による HL-60 細胞の分化誘導に対して ATO が相乗作用を示すかどうかについて, 細胞表面上の CD11b 発現を用い検討したところ, ATRA 単独に比べて ATO を共添加すると分化が有意に亢進した. 次に我々は, ATO により増強された分化誘導作用に係る分子を同定するために, マイクロアレイ解析を行った. ATRA 単独および ATO + ATRA を添加した細胞を解析したところ, ATO により 2 倍以上の発現減少を示した遺伝子は 13 種, 一方 2 倍以上の上昇を示した 71 種の遺伝子が検出された. ATO により発現減少を示した遺伝子群のなかで proteinase-3 (PRTN3) について検討を行ったところ, ATRA 単独添加に比べて ATO との共添加により PRTN3 のタンパク質の発現量はさらに減少した. PRTN3 は転写因子 Sp1 を負に制御していることから Sp1 のタンパク質発現を検討したところ, ATRA 単独添加に比べて, ATO との共添加によりさらに Sp1 の発現量

は上昇した. 一方, ATO により発現上昇を示した遺伝子群のなかで, IL-1 $\beta$  について検討を行ったところ, ATRA 単独添加に比べて ATO との共添加により培地中 IL-1 $\beta$  タンパク質量は上昇していた. 以上の結果から, ATO は ATRA との共添加によって細胞分化に関わる因子の発現を変化させることで, ATRA による分化誘導作用を増強させることが明らかとなった.

## Arsenic trioxide augments all-*trans* retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells

Daigo Sumi<sup>1</sup>, Kazumi Suzukawa<sup>2</sup>, Seiichiro Himeno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University,

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Tsukuba

All-*trans* retinoic acid (ATRA) is used to treat patients with acute promyelocytic leukemia (APL) due to its ability to resume the differentiation of APL cells. Recently, clinical trials have been started to evaluate ATRA plus arsenic trioxide (ATO) as a combination treatment for APL patients. However, although this combination has shown promising results in experimental studies, little is known about the detailed mechanisms underlying its efficacy. We therefore investigated the effects of this combination on the differentiation and differentiation-related gene expression in HL-60 cells. ATRA-induced differentiation of HL-60 cells was augmented by co-treatment with ATO, while no effect was observed by ATO treatment alone. A microarray analysis showed that ATRA plus ATO treatment markedly down-regulated the expression of proteinase 3 (PRTN3), which is involved in the differentiation arrest of APL cells, compared with treatment with ATRA alone. The PRTN3 mRNA level was suppressed by treatment with ATRA alone, and then further suppressed by co-treatment with ATO, accompanied by a concomitant increase in Sp1 protein, which is known to facilitate differentiation. The expression levels of azurocidin, telomerase reverse transcriptase, ferritin, and interleukin-1 $\beta$  were also altered by co-treatment with ATO. These results suggest that co-treatment with ATO synergistically enhances ATRA-induced differentiation of HL-60 cells by altering the expression of genes involved in cell differentiation.

## メタボローム解析を用いたベトナムの地下水ヒ素汚染地域住民の 影響評価

○阿草哲郎<sup>1</sup>, 江口哲史<sup>2</sup>, 國頭 恭<sup>3</sup>, Nguyen Minh Tue<sup>4</sup>, Vi Thi Mai Lan<sup>5</sup>, Tu Binh Minh<sup>6</sup>,  
Pham Thi Kim Trang<sup>5</sup>, 高橋 真<sup>7</sup>, Pham Hung Viet<sup>5</sup>, 田辺信介<sup>4</sup>, 岩田久人<sup>4</sup>

<sup>1</sup>熊本県立大学・環境共生学部, <sup>2</sup>千葉大学・予防医学センター, <sup>3</sup>信州大学・理学部, <sup>4</sup>愛媛大学・沿岸環境科学研究センター, <sup>5</sup>Research Center for Environmental Technology and Sustainable Development (CETASD), Hanoi University of Science, Vietnam National University, Vietnam, <sup>6</sup>Faculty of Chemistry, Hanoi University of Science, Vietnam National University, Vietnam, <sup>7</sup>愛媛大学・農学部

### 1 はじめに

ヒ素は発がん物質として知られている。ここ数十年の間、天然由来のヒ素による地下水汚染は世界規模で問題となっており、とくに地下水を飲用している途上国において、多くの住民に皮膚障害・がんなどの症状が現れている。近年、東南アジアにおいても地下水のヒ素汚染が報告されており、WHOの基準値(10 µg/L)を超える濃度のヒ素が地下水から検出されている。しかしながら、地下水を利用している地域住民を対象とした調査報告は少なかった。我々は、これまでに東南アジアを中心に地下水のヒ素汚染を調査し、ヒトへの曝露実態とヒ素代謝能力の感受性、毒性影響について明らかにしたが、ヒ素の影響メカニズムについては未解明であった。

メタボロームは、アミノ酸や糖、脂質などを含む低分子量の代謝物の総体である。この解析により、網羅的に生体内における代謝物の動態に関する情報を得ることができるため、近年、化学物質による影響評価や新規バイオマーカー特定のためのツールとして開拓されつつある。ヒ素のメタボローム解析に関しては、これまでに実験動物レベルで数多く実施されているが、ヒトを対象とした研究例はほとんどない。そこで本研究は、ベトナムのヒ素汚染地域住民を対象に尿中ヒ素化合物および代謝物を分析し、両者の関連を明らかにすることでヒ素曝露による住民への健康影響を評価した。

### 2 試料および方法

ベトナム北部・Red River Deltaの集落から地下水と住民の尿を採取した。なお本研究は、愛媛大学医学部倫理委員会の承認および試料提供者のインフォームドコンセントを得て実施した。採取した試料は、愛媛大学沿岸環境科学研究センターの生物環境試料バンク(es-BANK)にて-25°Cで保存した。

ヒ素の化学分析は、ICP-MSで地下水中総ヒ素を、HPLC/ICP-MSで尿中ヒ素化合物(亜

ヒ酸 (As[III])、ヒ酸 (As[V])、monomethylarsonic acid (MMA)、dimethylarsinic acid (DMA)、arsenobetaine (AB)) をそれぞれ定量した。メタボローム解析には HILIC-MS/MS を用い、尿中の 262 代謝物を測定した。

### 3 結果および考察

本研究対象地域の地下水中ヒ素濃度は  $<0.1 - 67 \mu\text{g/l}$  であり、地下水から WHO の飲料水の安全基準値 ( $10 \mu\text{g/L}$ ) を超える濃度のヒ素が検出された。地域住民の尿中総ヒ素化合物濃度は  $20.0 - 220 \mu\text{g/g creatinine}$  であり、飲用水中総ヒ素濃度とヒト尿中総ヒ素化合物、DMA、MMA、As[III]、As[V]濃度間に有意な正の相関関係が得られた。このことから、地下水を経由した地域住民のヒ素曝露が示唆された。

メタボローム解析の結果、尿中 DMA・MMA 濃度の増加にともない、尿中 choline 濃度も有意に増加することがわかった。また、尿中 2-ketohaxanoic acid・anthranilate は、それぞれ尿中 As[III]と正の相関を示したのに対し、尿中 As[V]とは逆に負の相関を示したことから、両代謝物は無機ヒ素の酸化・還元に関与することが示唆された。

#### Health assessment of residents from arsenic-contaminated groundwater areas in Vietnam by using metabolome analysis

Tetsuro Agusa<sup>1</sup>, Akifumi Eguchi<sup>2</sup>, Takashi Kunito<sup>3</sup>, Nguyen Minh Tue<sup>4</sup>,  
Vi Thi Mai<sup>5</sup>, Tu Binh Minh<sup>6</sup>, Pham Thi Kim Trang<sup>5</sup>, Shin Takahashi<sup>7</sup>,  
Pham Hung Viet<sup>5</sup>, Shinsuke Tanabe<sup>4</sup>, Hisato Iwata<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, Japan, <sup>2</sup> Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University, Japan, <sup>3</sup> Faculty of Science, Shinshu University, Japan, <sup>4</sup> Center for Marine Environmental Studies (CMES), Ehime University, Japan, <sup>5</sup> Research Center for Environmental Technology and Sustainable Development (CETASD), Hanoi University of Science, Vietnam National University, Vietnam, <sup>6</sup> Faculty of Chemistry, Hanoi University of Science, Vietnam National University, Vietnam, <sup>7</sup> Faculty of Agriculture, Ehime University

To assess the health effects by arsenic exposure, this study performed metabolome analysis in residents from arsenic-contaminated groundwater areas in Vietnam. Total arsenic concentration in groundwater was in the range of  $<0.1 - 67 \mu\text{g/L}$ . Concentrations of total arsenic, dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid (MMA), arsenite (As[III]), and arsenate (As[V]) in human urine were positively correlated with total arsenic levels in the groundwater, indicating that groundwater is the significant source of arsenic exposure for local residents. Metabolome analysis revealed that urinary choline concentration increased with urinary DMA and MMA concentrations. 2-ketohaxanoic acid and anthranilate in urine showed positive correlation with As[III], while the opposite trend was observed for As[V].



## メコン川流域の淡水魚に含まれるヒ素の化学形態と摂取量

○姫野誠一郎<sup>1</sup>, 藤森千鶴<sup>1</sup>, 宮高透喜<sup>1</sup>, Suthipong Sthiannopkao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大学薬学部・衛生化学,<sup>2</sup>東亜大学・環境科学部

### 1. はじめに

これまで魚介類のヒ素化合物の化学形態については、主に海産魚介類を中心に検討されてきた。カンボジアの人々のタンパク質摂取源の約80%は魚由来であり、さらにそのほとんどをメコン川流域の淡水魚に依存している。本研究者はこれまでカンボジアのメコン川下流のヒ素汚染地帯で住民から毛髪、尿、爪、飲料水などを採取し、ヒ素汚染の実態について調べてきた。その過程で、魚介類、特に淡水魚から摂取するヒ素化合物の化学形態と摂取量を評価する必要性を強く認識した。

### 2. 方法

調査地域： ベトナムとの国境に近いメコン川流域の4村落（Kampong Toul, KT; Chang Kaoh, CK; Preak Chrov, PC; Sambour, PS）。魚介類の採取： カンボジア水産局の協力を得て、カンボジア住民が多く摂取するメコン川流域の淡水魚40種、および、市場で入手可能な海産魚20種を採取した。ヒ素濃度と化学形態の解析： 採取した魚介類の可食部を試料とし、硝酸で湿式灰化して総ヒ素濃度をICP-MSで測定した。また、凍結乾燥した試料の水/メタノール抽出画分をHPLC（カラムはCAPCELL PAKC18 MGS5 (Shiseido)を使用）で分離後、ICP-MSで8種類のヒ素化合物を分離定量した。魚介類摂取量調査： 4つの村落の住民に聞き取り調査を行い、上記の魚種の1週間あたりの摂取量を調べた。

### 2. 結果と考察

カンボジア住民が多く摂取する40種類の淡水魚について総ヒ素濃度を測定した結果、1種類（sea pangasiid catfish, *Pangasius krempfi*）を除いて非常に低い値であった。sea pangasiid catfishは回遊魚であり、採取時期には海にいる時期であったので、海でとれたものが川の周辺の市場に紛れていたと考えられる。残りの39種類の淡水魚中総ヒ素濃度の平均は0.087 ppmであった。これは海産魚20種類の総ヒ素平均濃度（4.24 ppm）の約1/50であった。

しかし、個々の魚に含まれるヒ素濃度が低いものの、淡水魚の摂取量は非常に多い。そこで、魚種ごとの摂取量調査の結果から、魚種ごとのヒ素の総摂取量を計算した。その結果、雷魚の仲間（striped snakehead, *Channa striata*）やティラピア（Tilapia, *Oreochromis*

*niloticus*) からのヒ素摂取量は 50  $\mu\text{g}$ /週/人を超えていた。調査したすべての魚種を合計すると、海産魚由来のヒ素摂取量よりも淡水魚由来のヒ素摂取量の方が多かった。

淡水魚の総ヒ素濃度が非常に低い最大の理由はアルセノベタインの含量が低いことである。それ以外のヒ素化合物は非常に多様であった。魚種によっては trimethylarsine oxide や arsenocholine の濃度が高いものもあった。また、無機ヒ素のピークも検出された。そこで、各魚種の無機ヒ素 (3 価+5 価) 濃度にそれぞれの摂取量をかけることで、魚種ごとの無機ヒ素摂取量を求めた。その結果、ティラピアや siamese mud carp

(*Cirrhinus siamensis*) からの無機ヒ素摂取量が 2  $\mu\text{g}$ /人/週という高い値を示した。すべての魚種の値を合計すると、調査した 4 村落の平均として、14  $\mu\text{g}$ /人/週の無機ヒ素を淡水魚から摂取していることがわかった。一方、WHO のガイドライン (10 ppb) と同じ濃度の井戸水を 2L/日で摂取すると約 140  $\mu\text{g}$ /人/週となる。したがって、淡水魚由来の無機ヒ素摂取量は、カンボジア住民の無機ヒ素の摂取量全体に対して大きな影響は与えていないものと考えられる。今後、井戸水、魚介類、米、野菜からのヒ素摂取の全体像を把握するため、さらに総合的な調査が必要である。

#### Evaluation of weekly intakes of each form of arsenicals from freshwater fish among the residents living along the Mekong River

Seiichiro Himeno<sup>1</sup>, Chizuru Tomori<sup>1</sup>, Hideki Miyataka<sup>1</sup>,  
Suthipong Sthiannopkao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, <sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Dong-A University (Korea)

To evaluate arsenic intake from freshwater fish among the residents living along the Mekong River, we collected 40 species of freshwater fish in the Mekong River. We also performed a questionnaire study to obtain weekly intake of each species of freshwater fish among the residents. An average concentration of total arsenic in freshwater fish was 0.087 ppm, 1/50 of that of marine fish. We calculated the average levels of weekly intake per person for total arsenic, and found that the total arsenic intake from freshwater fish was higher than that from marine fish. We also calculated the average levels of weekly intake per person for inorganic arsenic, and found that the inorganic arsenic intake among the residents was 14  $\mu\text{g}$ /week/person. This level was about one tenth of expected inorganic arsenic intake from tube-well water which contains 10 ppb inorganic arsenic (WHO guideline).

## 3 価無機ヒ素 [iAs(III)] による遺伝子誘導へのヒストン H3 修飾の

## 関与について

○鈴木 俊英, 北 加代子, 越智 崇文  
帝京大学薬学部・毒性学

## 1 はじめに

これまでわれわれの研究室では、培養細胞系において 3 価無機ヒ素 [iAs(III)] が多数の遺伝子の発現を誘導するとともに、ヒストン H3 を修飾することを明らかにしてきた。間期の細胞でヒストンが修飾を受けると、修飾の種類・部位によってクロマチン構造が弛緩したり、凝集したりすることにより、遺伝子の発現が制御されることが知られている。ヒストン H3 のリン酸化部位の 1 つである Ser10 を修飾されない Ala に置換すると、iAs(III)による *EGR-1*、*FOS*、*IL8* の誘導が抑制されたことから、これらの遺伝子の誘導にはヒストン H3 (Ser10) のリン酸化が関与していることが推測された。

iAs(III)によるヒストン H3 の修飾は、Lys9 のジメチル化 (H3K9me2)、Lys9 のトリメチル化 (H3K9me3)、Ser10 のリン酸化 (H3S10p)、Thr11 のリン酸化 (H3T11p)、Lys9 トリメチル化+Ser10 リン酸化 (H3K9me3S10p) でも確認しており、これらの修飾が iAs(III)により誘導される遺伝子の発現に関与しているか否かに興味を持たれた。

そこで本研究では、iAs(III)による遺伝子誘導とヒストン修飾の関係を明らかにするため、iAs(III)により修飾されるヒストン H3 の特異抗体を用いて ChIP アッセイを行い、誘導される遺伝子近傍のヒストン修飾について検討を行った。また、レポーターアッセイを行い、iAs(III)による遺伝子誘導に係わる転写因子を明らかに、その転写因子結合配列が巻き付いているヒストンの修飾との関連を検討した。

## 2 方法

- ChIP アッセイ [SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit(CST)] : 20  $\mu$  M の iAs(III) で 3hr 処理した HeLa 細胞について  $\alpha$ -H3K9me2、 $\alpha$ -H3S10p、 $\alpha$ -H3T11p、 $\alpha$ -H3K9me3S10p で免疫沈降し、*FOS*、*EGR1*、*IL8* 遺伝子の転写因子結合配列をはさんだプライマーを作成し、リアルタイム PCR で定量した。
- レポーターアッセイ [Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)] : *FOS*、*EGR1* の長さの異なるプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼベクターを作成し、iAs(III)による *FOS*、*EGR1* の誘導に関与する転写因子結合配列を検討した。
- 免疫蛍光染色 :  $\alpha$ -H3K9me2、 $\alpha$ -H3S10p、 $\alpha$ -H3T11p、 $\alpha$ -H3K9me3S10p を用いて免疫蛍光染色を行い、iAs(III)による修飾ヒストン H3 の細胞内局在を検討した。

### 3 結果および考察

ChIP アッセイの結果より、iAs(III)により *FOS* の転写開始点近傍(-28~202)と転写開始点上流(-279~-208)、および *EGR1* の転写開始点直前(-126~-21)の配列が巻き付くヒストン H3 が修飾 (H3S10p、H3K9me3S10p) されていることが明らかとなった。一方、レポーターアッセイの結果より、iAs(III)による *FOS* の誘導は転写開始点上流(-800~-200)、*EGR1* の誘導は転写開始点直前(-150~-70)の配列に結合する転写因子が関与していることが明らかとなり、これは ChIP アッセイで確認した修飾されたヒストン H3 が巻き付いている部位とほぼ一致していた。また免疫蛍光染色の結果より、H3S10p および H3K9me3S10p は、iAs(III)処理により間期の細胞でドット状のシグナルが観察されたことから、iAs(III)は細胞内の特定のヒストンを修飾していることが明らかとなった。今回の結果を考えあわせると、iAs(III)は *FOS*、*EGR1* プロモーター領域の特定の転写因子結合配列近傍のヒストン H3 を修飾し、これらの遺伝子の発現を誘導していることが示唆された。*FOS*、*EGR1* は細胞の分化や増殖に関与する転写因子であり、iAs(III)の細胞毒性や発がん性などへの関与にも興味を持たれる。

Trivalent inorganic arsenite [iAs(III)] induced histone H3 modification and its effects on gene expression

Toshihide Suzuki, Kayoko Kita, Takafumi Ochi  
Faculty of Pharma-Science, Teikyo University

Previously, we revealed that the possible participation of histone H3 phosphorylation in mRNA expression of *FOS*, *EGR1* and *IL8* by iAs(III). In this study, we further investigated in detail whether histone H3 modification is concerned with gene expression by iAs(III). The results indicated that iAs(III) modified histone H3 (H3S10p and H3K9me3S10p) where the specific promoter region of *FOS* and *EGR1* were wound around. Furthermore, these promoter region were the almost corresponded to the transcription factor binding site which is concerned in induction of *FOS* and *EGR1* by iAs(III). As intracellular localization of H3S10p and H3K9me3S10p was limited in a specific site, iAs(III) modified specific histone H3 which wind around promoter region of *FOS* and *EGR1*, and then might be induced mRNA expression of these genes. These transcription factors further induce downstream effector proteins, which may play an important role in the iAs(III) cytotoxicity and one of the possible cause of iAs(III) carcinogenicity.

・H3S10p: phospho(Ser10)-histone H3,

・H3K9me3S10p: trimethyl(Lys9)+ phospho(Ser10)-histone H3

## 紡錘体チェックポイントタンパク BubR1 はチオジメチルアルシン酸 による分裂期蓄積とアポトーシス誘導に関与する

○北 加代子, 安積奈々美, 鈴木俊英, 越智崇文  
帝京大学薬学部・毒性学

### 1 はじめに

Thio-dimethylarsinic acid (Thio-DMA)は、ヒトの尿中ヒ素代謝物として同定された物質であり、ヒ素のメチル化代謝の過程で生成することが知られている。これまで我々は Thio-DMA の毒性発現機構の解明を試み、その過程で Thio-DMA が HeLa 細胞を分裂期 (M 期)に蓄積させる作用があることを見出してきた。しかし、HepG2 細胞では Thio-DMA による M 期蓄積作用が弱く、細胞間で Thio-DMA に対する応答性が異なる可能性が推察された。さらに、M 期に蓄積した HeLa 細胞はそのままアポトーシス様の細胞死を迎えるのに対し、HepG2 細胞ではあまり死滅せず生存し続ける傾向がみられ、Thio-DMA による M 期蓄積の有無がアポトーシス様の細胞死に関与する可能性が推察された。M 期では、赤道面に整列した娘染色体が中心体から伸びた紡錘体によって均等に分配され、新たな娘細胞が生じるダイナミックな変化がみられるが、細胞内には娘染色体の均等な分配を保証するため、紡錘体チェックポイント機構が存在する。紡錘体チェックポイントには p53CDC(CDC20)や BubR1、Mad2 といったタンパクが関与しており、チェックポイント作動時にはこれらのタンパクが複合体を形成して inhibitory complex を形成し、細胞を M 期中期に留めることが知られている。そこで、これらの因子の発現量を調べたところ、HepG2 細胞は HeLa 細胞に比べ、BubR1 の発現レベルが低く、BubR1 の発現量の違いが Thio-DMA による M 期細胞の蓄積に影響を与えていると推察された。そこで本研究では、Thio-DMA によるアポトーシスの誘導に紡錘体チェックポイントタンパク BubR1 が関与するのか解明するとともに、紡錘体チェックポイントの作動の有無が Thio-DMA の毒性発現にどのように関与しているのか解明することを目的とした。

### 2 方法

BubR1 をノックダウンした HeLa 細胞を Thio-DMA で処理し、ウエスタンブロット法で各タンパクの発現レベルを検討した。アポトーシスの誘導は Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の切断を指標とした。また、紡錘体チェックポイントの作動は BubR1 のリン酸化と CDC20 に対する抗体を用いた免疫沈降法により、Mad2 と CDC20 の結合、すなわち inhibitory complex の形成の有無を指標にした。また M 期の蓄積は

cyclin B1 の発現量と mitotic index の増加を指標にした。

### 3 結果および考察

HeLa 細胞を Thio-DMA で処理したところ、濃度および時間依存的に cyclin B1 の蓄積と BubR1 のリン酸化、および inhibitory complex の形成が認められ、Thio-DMA は紡錘体チェックポイントを作動させ、細胞を M 期に蓄積させることが判明した。さらに M 期蓄積に伴い PARP の切断が亢進しており、通常の HeLa 細胞では、M 期蓄積によってアポトーシスが誘導されることが判明した。一方、BubR1 ノックダウン細胞では、PARP の切断はみられたもののその程度は低く、アポトーシスが抑制された。また inhibitory complex の形成も認められなかった。さらに、Thio-DMA により、G1 期サイクリンが恒常的に発現しており、細胞周期が M 期に入らないかあるいは M 期から次の周期へ進みやすくなった可能性が考えられた。そこで、Thio-DMA 処理後の BubR1 ノックダウン細胞の DNA 量を調べたところ、通常の HeLa 細胞同様、Thio-DMA 処理によって 4N 細胞が増加していた。しかし、通常の HeLa 細胞に比べ、cyclin B1 positive な 4N 細胞の割合が低下しており、細胞分裂を経ずに次の細胞周期へ移行する細胞の割合が増加して可能性が示唆された。さらに興味深いことに、BubR1 ノックダウン細胞は、通常の HeLa 細胞が生存できない濃度の Thio-DMA 存在下でも生存を可能にした。以上の結果から、紡錘体チェックポイントは、Thio-DMA によって誘発された異常細胞を排除するための重要な防御機構であり、BubR1 は Thio-DMA による異常細胞の出現を左右する key 分子である可能性が示唆された。

BubR1 plays an essential role for thio-DMA-induced mitotic cell accumulation and apoptotic cell death

Kayoko Kita, Nanami Asaka, Toshihide Suzuki, Takafumi Ochi  
Faculty of Pharma-Science, Teikyo University

In the present study, we showed that thio-dimethylarsinic acid (thio-DMA)-induced mitotic cell accumulation were accompanied with apoptotic cell death, and BubR1, which is one of the components of spindle assembly checkpoint (SAC) proteins, plays an important role for these process. In the BubR1 knock-down cells, whereas mitotic accumulation and apoptotic cell death were suppressed, the increase of the living cell which have abnormal DNA, were observed after treatment with thio-DMA. More interestingly, BubR1 knock-down cells could survive in the medium containing higher thio-DMA that a normal cell could not survive. These results suggested that thio-DMA induced-apoptotic cell death by activating of SAC, is one of the protective mechanisms for preventing the abnormal cell accumulation.

## ヒ素とセレンの赤血球への取り込みに関する相互作用

○小林 弥生<sup>1</sup>, 鈴木 紀行<sup>2</sup>, 小椋 康光<sup>2</sup>, 平野 靖史郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人国立環境研究所・環境健康研究センター, <sup>2</sup> 千葉大学大学院薬学研究  
院・予防薬学, <sup>3</sup> 国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク研究センター

### 1 はじめに

我々は以前、生体内におけるヒ素 (As) とセレン (Se) の相互作用を明らかにすることを目的とし、ヒ酸 ( $iAs^V$ ) と亜セレン酸 ( $iSe^{IV}$ ) をラットに同時投与した時の胆汁中への As と Se の排泄を調べた。その結果、それぞれの単独投与群と比較し、同時投与群で胆汁中への排泄が両元素とも増加していることが分かった。ウサギを用いた実験では、胆汁中へ排泄される化学形態は seleno bis(S-glutathionyl)arsinium ion ( $[(GS)_2AsSe]^-$ ) であり、赤血球に取り込まれた  $iSe^{IV}$  と亜ヒ酸 ( $iAs^{III}$ ) から  $[(GS)_2AsSe]^-$  が形成され肝臓を経て胆汁中へ排泄されると報告されている (Chem. Res. Toxicol. 2006, 19, 601)。本研究ではラット赤血球への取り込みに対する As と Se の相互作用を明らかにすることを目的とした。

### 2 方法

精製食で成育させた 13~15 週齢の雄性 SD ラットから全血を得た後 10% 赤血球懸濁液を作製した。赤血球への各元素の取り込み率は 10% 赤血球懸濁液を 8,000g で 10 秒間遠心し、得られた上清の総 As および総 Se 濃度を ICPMS で測定し算出した。実験①: Tris-HCl buffered saline (TBS) で調製した最終濃度 10% 赤血球懸濁液に対し、 $iAs^V$ 、 $iAs^{III}$ 、 $iSe^{IV}$ 、既報に従って合成した  $[(GS)_2AsSe]^-$ 、GSH と band3 の阻害剤 DIDS の存在または非存在下で 37°C における赤血球への As と Se の取り込みを調べた。実験②: As と Se の赤血球における分布を調べるため、反応終了後の 10% 赤血球懸濁液上清、TBS で洗浄して再調製した 10% 赤血球懸濁液、低張液で溶血させた 10% 赤血球溶血液中の各元素の濃度を測定した。実験③:  $iSe^{IV}$  と  $iAs^{III}$  同時曝露時の赤血球への  $iAs^{III}$  の取り込みのメカニズムを推定するため、 $iSe^{IV}$  を取り込ませた赤血球懸濁液を作製した。この赤血球懸濁液に血漿、 $iAs^{III}$ 、 $iAs^{III}$ +血漿を添加し、上清中の As および Se の回収率を求めた。

### 3 結果および考察

実験①:  $iAs^V$  は赤血球にほとんど取り込まれなかったが、 $iAs^{III}$  はわずかに取り込まれ、GSH の添加により取り込みが低下した。 $iSe^{IV}$  は band3 によって赤血球に取り込まれることが知られている。 $iSe^{IV}$  は迅速に赤血球に取り込まれ、GSH および DIDS の添加によって取り込みが有意に低下した。 $iAs^V$  と  $iSe^{IV}$  の同時曝露では Se は取り込まれたが、As はほとんど取り込まれなかった。一方、 $iAs^{III}$  と  $iSe^{IV}$  の同時曝露では、 $iAs^{III}$

の単独曝露時と比較して、赤血球への As の取り込みが有意に上昇し、Se の取り込みから少し遅れて As が取り込まれていることが分かった。また、GSH および DIDS の添加によって As、Se とともに取り込みが阻害された。これは、GSH の添加によって Se の GSH 抱合体が生成したことで、DIDS が band3 に結合することによって iSe<sup>IV</sup> が赤血球に取り込まれなかったことが原因と考えられ、この iSe<sup>IV</sup> の取り込み阻害により、iAs<sup>III</sup> の取り込みも低下したと推定される。[(GS)<sub>2</sub>AsSe]-は赤血球に比較的迅速に取り込まれ、GSH の添加によって取り込みは阻害されたが、DIDS の影響はほとんど見られなかった。GSH 抱合体は細胞や赤血球中へは取り込まれないと考えられることから、加水分解された[(OH)<sub>2</sub>AsSe]-のような化学形態で赤血球へ取り込まれたと推定される。また、DIDS の影響がほとんどみられなかったことから、[(OH)<sub>2</sub>AsSe]-の取り込みに関する band3 の寄与はほぼ無いものと推定される。 実験②：10%赤血球懸濁液と 10%赤血球溶血液中の元素の総濃度測定結果から、As も Se もほとんどが赤血球内に取り込まれており赤血球膜への結合は低いことが分かった。 実験③：iSe<sup>IV</sup> を取り込ませた赤血球懸濁液に iAs<sup>III</sup> を曝露した結果、iAs<sup>III</sup> 曝露群の上清中 Se の回収率が対照群と比較し低下していた。赤血球に取り込まれた iSe<sup>IV</sup> は赤血球内の GSH によってセレナイド (HSe<sup>-</sup>) まで還元されると考えられている。懸濁液に血漿を添加すると、赤血球外に放出された HSe<sup>-</sup> が血漿タンパク質に結合し赤血球への再分布が抑制されることから、上清中 Se の回収率は対照群と比較し上昇したと考えられる。この時同時に iAs<sup>III</sup> が存在すると、その回収率は iAs<sup>III</sup> 非存在下と比較し低下した。一方、血漿存在または非存在下で iAs<sup>III</sup> 曝露時の上清中 As の回収率を比較したところ、血漿存在時には As の回収率が上昇していることが明らかとなったことから、HSe<sup>-</sup> との反応に血漿タンパク質と iAs<sup>III</sup> が競合していることが示唆された。以上のことから、生体内において HSe<sup>-</sup> と iAs<sup>III</sup> が反応することが推定されたが、反応生成物の同定および生物学的意義に関しては、さらなる研究が必要と考えられる。

## Interaction of arsenic and selenium and the uptake of those elements in red blood cells

Yayoi Kobayashi<sup>1</sup>, Noriyuki Suzuki<sup>2</sup>, Yasumitsu Ogra<sup>2</sup>, Seishiro Hirano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies (NIES), <sup>2</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University,

<sup>3</sup>Center for Environmental Risk Research, NIES

The uptake of arsenic and selenium in red blood cells (RBCs) was investigated after co-exposure of rat RBCs to selenite and either arsenite, or arsenate. Only the combination of arsenite and selenite increased uptake of those elements compared to exposure to arsenite or selenite alone. Selenide, a reduction product of selenite, may be involved in the enhanced uptake by forming As-Se complex.



## ジメチルヒ素化合物の毒性発現に対する cytochrome P450 の影響

下田康代<sup>1</sup>、○加藤孝一<sup>1</sup>、黒澤英俊<sup>1,2</sup>、畑 明寿<sup>3</sup>、圓藤陽子<sup>4</sup>、  
圓藤吟史<sup>5</sup>、山中健三<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 日本大薬、<sup>2</sup> 警視庁科捜研、<sup>3</sup> 千葉科学大危機管理、<sup>4</sup> 関西労災病院、<sup>5</sup> 労働科学研

ジメチルヒ素化合物はその代謝過程で多様な化学形態に変化する。その中で、ジメチル亜ヒ酸(DMA<sup>III</sup>)とならび強い毒性を有するジメチルチオアルシン酸(DMMTAV)の生体内での生成に近年注目が集まっている。当研究グループは、硫黄転移酵素 rhodanese により DMA<sup>III</sup> が DMMTAV に変換されることを報告<sup>1)</sup>したが、DMMTAV の毒性発現および解毒機構については不明な点が多く残されている。今回、毒性の高いこれらのジメチルヒ素化合物の代謝・毒性機序を解明するために、cytochrome P450 (CYPs)活性をはじめとする薬物代謝能の一部を維持したヒト肝腫瘍由来(HepaRG)細胞を用いてジメチルヒ素化合物の細胞毒性を評価するとともに、ラット肝代謝系ホモジネート(S9mix)添加によるジメチルヒ素化合物の代謝変換生成物の化学形態を HPLC-ICP-MS を用い分析した。その結果、DMA<sup>III</sup> および DMMTAV は CYPs をはじめとする肝代謝系酵素により DMA<sup>V</sup> に変換される代謝機序の存在を明らかにした。

### 実験方法

#### HepaRG 細胞におけるジメチルヒ素化合物の毒性評価

HepaRG 細胞は Williams E 培地(10% FBS、insulin、hydrocortisone を含む)により 2 週間培養した後、培地に 2% DMSO を添加しさらに 2 週間培養することによりヒト肝細胞様に分化させた。この細胞における CYPs の誘導について、mRNA 量を SYBR<sup>®</sup>-Green により、酵素活性を P450-Glo<sup>™</sup> (Promega)により測定した。

ジメチルアルシン酸(DMA<sup>V</sup>)、ジメチルヒ素-グルタチオン複合体(DMA<sup>III</sup>-SG)、DMMTAV を DMSO 処理および未処理 HepaRG 細胞に 24 時間曝露し、WST-8 kit (Dojindo) により細胞毒性を評価した。

#### S9mix を用いた肝代謝系における DMA<sup>III</sup> および DMMTAV の代謝変換

DMA<sup>III</sup>-SG および DMMTAV 溶液(最終濃度 10 μM)にラット肝由来 S9mix (Kikkoman Biochemifa Co.)を加えて 37°C でインキュベーションした。反応溶液は 10,000 rpm、1 分間遠心した後、0.22 μm シリンジフィルターで濾過し、SunFire<sup>™</sup> (Waters)カラムを装着し

た HPLC-ICP-MS (HPLC: Agilent HP1100、ICP-MS: 7500a)を用いて、ヒ素の化学形態別分析を行った。

## 結果および考察

### ジメチルヒ素化合物の細胞毒性評価

DMSO 未処理 HepaRG 細胞を用いた細胞毒性評価において、DMA<sup>III</sup> および DMMTA<sup>V</sup> 処理ではともに 2~50  $\mu$ M の濃度依存的に viability の低下を示したが、DMA<sup>V</sup> 処理では細胞毒性はほとんど認められなかった。一方、DMSO 処理細胞の CYPs の mRNA 量を測定したところ CYP3A4、CYP2B6 および CYP2E1 など未処理細胞と比較して約 10 倍の発現量の増加が、また、酵素活性においても CYP3A4 で約 7 倍の増加が認められた。さらに、これらの細胞を用いて、ジメチルヒ素化合物の毒性を比較した結果、DMSO 処理細胞、すなわち、CYPs 活性保持細胞において DMA<sup>III</sup> および DMMTA<sup>V</sup> の細胞毒性の軽減が認められた。この毒性軽減効果は CYP3A4 阻害剤である ketoconazole によって顕著に低下した。

### DMA<sup>III</sup> および DMMTA<sup>V</sup> の *in vitro* 代謝変換

DMA<sup>III</sup>-SG 溶液に S9mix を添加したところ、反応時間経過に伴い DMA<sup>III</sup> 量の減少と DMA<sup>V</sup> の増加が観察された。また、DMMTA<sup>V</sup> においても DMA<sup>III</sup> の場合と同様に経時的な DMA<sup>V</sup> 生成量の増加が認められた。さらに、これらの経時的な DMA<sup>V</sup> 生成の増加は ketoconazole の添加により減少した。

これらのことから、CYPs は毒性の高い DMA<sup>III</sup> および DMMTA<sup>V</sup> の DMA<sup>V</sup> への変換を介して毒性軽減的に働くことが示唆された。

## 参考文献

- 1) Shimoda Y, Kurosawa H, Kato K, Endo Y, Yamanaka K, Endo G. Proposal for novel metabolic pathway of highly toxic dimethylated arsenics accompanied by enzymatic sulfuration, desulfuration and oxidation. J Trace Elem Med Biol. (2015) 129-136.

### Effect of cytochrome P450 on the toxicity of dimethylarsenicals

Shimoda Y, Kato K, Kurosawa H, Hata A, Endo Y, Endo G, Yamanaka K.

Recently, DMA<sup>III</sup> and DMMTA<sup>V</sup>, metabolites of DMA<sup>V</sup>, are paid to attention because of their higher toxicity. The purpose of the present study was to clarify influence of cytochrome P450 (CYPs) on the cytotoxicity induced by these arsenicals. *In vitro* experiments suggest that the cytotoxicity of DMA<sup>III</sup> and DMMTA<sup>V</sup> is reduced via the conversion into DMA<sup>V</sup> by hepatic metabolic enzymes including CYPs.

## 三酸化ヒ素感受性決定要因の多様性について

○信國好俊、升本順子、沼本通孝  
広島大学原爆放射線医科学研究所 ゲノム障害病理

【目的】三酸化ヒ素感受性に関与する遺伝子群の探索を通して、三酸化ヒ素感受性決定要因の解明を目指す。

【背景】ヒ素の生体影響については、動物実験、細胞実験、生化学的解析など様々な方法で研究が進められ、これまでも多くの知見が得られてきた。しかし、その毒性発現や標的分子、感受性決定の分子機構については未だ十分には理解されていない。

我々はこれまで大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた機能遺伝子群の系統的解明法の検討と開発を行ってきた。これは random mutagenesis による遺伝学的解析法の1つで、ジーントラップ法で遺伝子を破壊した変異細胞ライブラリーの中から、特定の表現型を持つ変異細胞を単離できれば、その変異の責任遺伝子の解明が可能になる (Nobukuni et al, JBC, 2005、Nobukuni et al, Jpn J Hyg, 2005)。このゲノム機能学的解析法によって三酸化ヒ素感受性に関与する遺伝子群を明らかにすることができるのではないかと考え検討を進めた。

【方法】①大規模ジーントラップ挿入変異 CHO 細胞ライブラリーの中から、三酸化ヒ素処理 (40  $\mu$  M, 3 時間) でも生存しうる細胞を、三酸化ヒ素感受性低下変異細胞として単離した。② ヒ素感受性低下変異細胞でトラップ(同時に破壊)された遺伝子を 5'-RACE 法で増幅後、シーケンス/BLAST 解析によって同定した。③ いくつかの遺伝子については、miRNA(microRNA)を用いたドキシサイクリン誘導性遺伝子ノックダウン細胞を作製し、三酸化ヒ素感受性等についての検討を行った。

【結果及び考察】これまでも、三酸化ヒ素感受性ならび細胞毒性に関するいくつかの要因が報告されてきたが、今回、ゲノム機能学的スクリーニングから、それらとは別の新規の要因の存在が示唆された。

## Diversity of the Factors Determining the Sensitivity to Arsenic Trioxide

Yoshitaka Nobukuni, Junko Masumoto, Michitaka Numoto  
Department of Human Genetics, RIRBM, Hiroshima University

### BACKGROUND

Biological effects of arsenic have been well studied. However, the target molecules of the arsenic and the molecular mechanisms determining the susceptibility to arsenic are not fully understood yet. We have been developing a genetic screening system to elucidate the obligate genes using the large-scale gene-trap mammalian mutant cell library (Nobukuni et al, JBC, 2005, Nobukuni et al, Jpn J Hyg, 2005). To investigate the molecular mechanisms underlying the arsenic toxicity, we conducted the functional genetic screening of the genes involved in the susceptibility to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

### METHODS

① The mutant cells which can survive after the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment (40 μM, 3 hours) were isolated from a large-scale gene-trap insertional mutants library. ② The trapped (disrupted) genes in the mutant cells were identified by 5'-RACE-sequencing analyses and BLAST search.

### RESULTS and DISCUSSION

To date, a number of factors related to arsenic trioxide susceptibility and cytotoxicity have been reported. Apart from those factors, involvements of the other novel factors were suggested from the functional genomic screening.

## 亜ヒ酸を曝露した細胞における PML の SUMO 化と PML 核内小体 タンパク質の変化

○平野靖史郎<sup>1,2</sup>・但野美保子<sup>1</sup>・小林弥生<sup>1,2</sup>・宇田川理<sup>1</sup>・加藤綾華<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>国立環境研究所, <sup>2</sup>千葉大学大学院・医学薬学府

### 1. はじめに

急性前骨髄性白血病の病因となる ProMyelocytic Leukemia (PML) の dominant negative 体である PML-RARA は、亜ヒ酸の曝露により分解されることが知られている。その機序として、まず PML が Small Ubiquitin-like MOdifier (SUMO) により修飾され、その後の ubiquitin-proteasome 系により SUMO 化 PML が分解されることが提唱されている。我々はこれまでの結果から、細胞に取込まれた亜ヒ酸により PML が構造的変化を起し、この変化が核内に存在するタンパク質と PML との不溶性構造体の形成を促進させ、その後に PML の SUMO 化が進行するという作業仮説を立て研究を進めている。本研究では、血液細胞株や PML を遺伝子導入した細胞を亜ヒ酸に曝露して、PML の SUMO 化機構の解明と関連する核内タンパク質の解析をおこなった。

### 2. 方法

PML安定発現HEK293細胞 (HEK-PML)、RING fingerドメインを欠失変異させた PMLを安定的に発現するHEK293細胞 (HEK-PML $\Delta$ RING) の他、ヒト血液細胞株である Jurkat、HL60、K562細胞を用いた。HEK-PML、HEK-PML $\Delta$ RING細胞のRIPA可溶画分より、anti-DDDDK-tag pAb-agaroseを用いてPMLとPML $\Delta$ RINGを精製して、SUMO2 conjugation kit を用いた in vitro SUMO化反応に供した。亜ヒ酸 (3 $\mu$ M) やMDM2-p53の結合阻害剤であるNutlin-3 (10 $\mu$ M) を曝露した細胞よりRIPA可溶性と不溶性画分タンパク質を抽出し、PML、SUMO、MDM2、Daxx、p53の量的変化をウェスタンブロット法で測定した。また、亜ヒ酸に曝露したHEK-PML細胞を固定後、0.1%のTriton X-100で処理し、抗PML抗体と抗MDM2、あるいは抗Daxx抗体で蛍光二重染色した後に核をDAPIで対比染色して検鏡した。Jurkat、HL60、K562細胞をIFN $\alpha$ で刺激し、これらの細胞における内在性のPMLが、亜ヒ酸を曝露することにより、HEK-PMLの場合と同様にPMLがRIPA不溶性となりSUMO化を受けることを、ウェスタンブロット法を用いて確認した。

### 3. 結果

SUMO2 conjugation kit を用いた in vitro SUMO 化反応において、PML や PML $\Delta$ RING は亜ヒ酸の存在に依存せず、SUMO 化を受けることが確認された。このことは、細胞に亜ヒ酸を曝露した時に実際に観察される PML の SUMO 化反応が、亜ヒ酸による PML

の構造変化の後、PML 核内小体内に SUMO 化に必要な酵素や因子がリクルートされることで進行する可能性を示している。PML 核内小体のタンパク質であることが知られている MDM2 や Daxx は、亜ヒ酸を曝露した HEK-PML において PML と共局在性を示したが、この効果は Nutlin-3 の存在化でより鮮明に観察された。RIPA 可溶性・不溶性に分けたウェスタンブロットの解析では、PML が MDM2 と極めて近い細胞内動態を示すものの、Daxx とは異なる動きをしていることが分かった。Jurkat や HL60 細胞では、内在性の PML の発現量が IFN $\alpha$  の刺激により上昇した。これらの血液細胞においても、HEK-PML 細胞の場合と同様に、亜ヒ酸の曝露により PML の RIPA 不溶性変化や SUMO 化反応が起こることを確認した。

#### 4. 考察

ユビキチン E3 リガーゼである MDM2 は、核内においてアポトーシス促進因子である p53 と結合することによりその分解を促進し、PML は MDM2 と結合することにより p53 の ubiquitin-proteasome による分解を抑制しているものと考えられている。本研究における *in vitro* SUMO 化反応の結果は、亜ヒ酸が PML の SUMO 化を直接昂進させるのではなく、PML 核内小体において PML が SUMO 化を受けやすい微小環境が形成されることにより PML の SUMO 化が進行する可能性を示唆している。Pml は p53 とともに癌抑制遺伝子として知られているが、これは、PML が PML 核内小体において MDM2 に作用して p53 の分解を抑制することによるものと考えられる。亜ヒ酸は、PML-RARA が病因である急性前骨髄性白血病だけでなく、nucleoplasmin-1 変異型の急性骨髄性白血病細胞にも選択性の高いアポトーシスを誘導することが報告されており、亜ヒ酸が核内のタンパク質相互作用に及ぼす影響を詳細に調べることは重要である。

SUMOylation of PML and changes in PML nuclear body proteins in arsenite-exposed cells.

○Seishiro Hirano<sup>1,2</sup>, Mihoko Tadano<sup>1</sup>, Yayoi Kobayashi<sup>1,2</sup>, Osamu Udagawa<sup>1</sup>, and Ayaka Kato<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>National Institute for Environmental Studies, <sup>2</sup>Graduate School of Chiba University

Promyelocytic leukemia (PML) and its RING-deleted mutant protein (RING $\Delta$ PML) were purified and served for *in vitro* SUMOylation reaction. Both forms were SUMOylated either in the presence or absence of arsenite *in vitro*, suggesting that arsenite may first modify PML, re-arrange PML nuclear body microenvironment, and initiate PML SUMOylation in the cells. MDM2, a repressor of p53, was colocalized with PML in arsenite-exposed HEK-PML cells. PML, but not RING $\Delta$ PML, was converted from RIPA-soluble form to RIPA-insoluble form and also SUMOylated by arsenite. MDM2 responded to arsenite similarly as PML, suggesting that PML and MDM2 are associated in PML nuclear body.

# 謝 辞

アステック株式会社

日新器械株式会社

四国理科株式会社

四国八洲株式会社

グライナージャパン株式会社

エイコーサイエンス株式会社

和光純薬株式会社

本シンポジウムの開催にあたり、上記の各社よりご支援を賜りました。ここに衷心より御礼申し上げます。

第21回ヒ素シンポジウム

大会長 姫野 誠一郎

# ヒ素分析のトータルソリューションを提供

マイクロウェーブによる前処理から原子蛍光法 (AFS) による測定まで

≫ 多検体同時処理可能！

## マイクロ波試料前処理装置

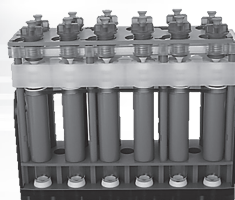
**SCP SCIENCE**

Providing Innovative Solutions to Analytical Chemists



### NOVAWAVE SAの主な特徴

- 多品種・多検体同時処理
- 安全機能を各種搭載
- 独自のラックと容器セット
- 使いやすいソフトウェア



シンプルなラックと容器

Program	Digestion	Methods	Reports	Utilities	Diagnostic	Login				
Cycle: Cycle 1	Rack ID: Rack 1									
Method: EPA 3052	Method time: 02:36					Stop				
Status: Digestion										
150	100	145	144	144	141	144	140	138	97	141
250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
02:31:27										02:37:27

各容器温度をモニター

≫ ヒ素を高感度かつ正確に測定可能！

## ヒ素形態別分析システム

**PSA**

PSANALYTICAL LTD



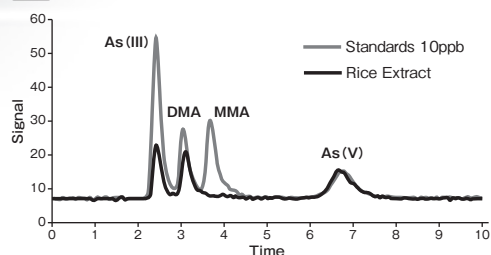
### エクスカリバーの主な特徴

- 水素化物発生-原子蛍光法
- 検出限界10ppt
- コンパクトかつ安価
- オンラインUV予備処理による前処理なし  
トータルヒ素測定
- HPLCと組み合わせで形態別分析が可能

表 認証値の比較

	認証値	AFSによる測定値
NIST 1568a Rice Flour (左図)	290 ± 30 (ng/g)	As(III): 58 ± 2 (ng/g) DMA : 160 ± 8 (ng/g) As(V): 79 ± 3 (ng/g)
Oyster Tissue SRM 1566a	13.4 ± 1.9 (ug/g)	13.3 ± 1.0 (ug/g)
Poplar leaves GBW-07604	370 ± 60 (ng/g)	391 ± 48 (ng/g)
Human Hair GBW-07601	280 ± 40 (ng/g)	269 ± 15 (ng/g)
Hard Drinking Water ERM-CA011b	10.15 ± 0.34 (ng/ml)	9.97 (ng/ml)

図 お米中のヒ素スペシエーション分析



詳細はお問い合わせください



[www.astechcorp.co.jp/indexChem.html](http://www.astechcorp.co.jp/indexChem.html)



E-mail: [unicchem@astechcorp.co.jp](mailto:unicchem@astechcorp.co.jp)

**アステック** 株式会社  
応用化学事業部

本社 〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 4-39-7 高田馬場 21ビル  
TEL.03-3366-0811 (代) FAX.03-3365-5577  
大阪営業所 〒531-0074 大阪市北区本庄東 1-1-10 ライズ 88 2F  
TEL.06-6375-5852 (代) FAX.06-6375-5845





よりよい地域医療のために

人と人を繋ぐ最先端へ



## 日新器械株式会社

NISSHIN INSTRUMENT CO.,LTD.

本 社

〒771-1156 徳島市応神町応神産業団地12番1  
TEL 088-641-5111 FAX 088-641-5511

埼玉営業所

〒350-1205 埼玉県日高市原宿字中台309-7  
TEL 0429-85-9061 FAX 0429-85-9063



私たちは  
ライフサイエンスの  
発展により  
「優しさ」の心が  
あふれることを  
目指しております。

<http://www.shikokurika.co.jp>



四国理科株式会社

SHIKOKURIKA CO.,LTD.

本社 〒781-5103 高知県高知市大津乙1067番地6  
TEL: 088-866-5000 FAX: 088-866-5015  
kochi@shikokurika.co.jp

徳島営業所 〒771-1201 徳島県板野郡藍住町奥野字山畑39-3  
TEL: 088-693-4660 FAX: 088-693-4661  
tokushima@shikokurika.co.jp

香川営業所 〒761-0313 香川県高松市下田井町25番地2  
TEL: 088-840-7727 FAX: 088-840-7728  
kagawa@shikokurika.co.jp

愛媛営業所 〒790-0924 愛媛県松山市南久米町798-7  
TEL: 089-907-3130 FAX: 089-907-3140  
ehime@shikokurika.co.jp

地域の発展と豊かな環境を目指し、我々は進化します

# 四国八洲薬品株式会社

[www.shikoku-yashima.co.jp](http://www.shikoku-yashima.co.jp)

本社 〒770-0873 徳島県徳島市東沖洲2丁目17番地  
TEL (088)664-6321(代表)  
高松営業所 〒761-0301 香川県高松市林町148-19  
TEL (087)815-1111(代表)  
松山営業所 〒791-1102 愛媛県松山市来住町1445番1  
TEL (089)960-0260(代表)  
新居浜営業所 〒792-0050 愛媛県新居浜市萩生545-3  
TEL (0897)43-8001(代表)  
高知営業所 〒780-0082 高知県高知市南川添21番13号  
TEL (088)884-8881(代表)

## 取扱品目

試験、研究用試薬  
一般試薬、輸入試薬  
体外診断薬  
化成品及び工業薬品  
医薬品及び動物薬品  
試験研究用分析機器、器材  
バイオ関連機器、器材  
臨床検査用機器、器材  
コンピューターのハードウェアとソフトウェア

(株)グライナー・ジヤパンはオールマイティー(研究用器材、試薬、  
受託サービス)の製品群でおお客様の研究推進を支えます

## プラスチック製品



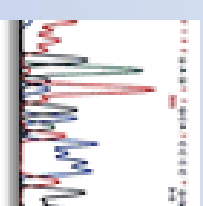
プラスチック製品  
遠心チューブ、ピペット、HTSプレート  
培養器材、保存用チューブなど

## 分子生物用試薬



DNAポリメラーゼ、核酸精製kit

## 受託サービス



オリゴDNA, RNA、シークエンス解析  
次世代シークエンス、人工遺伝子、  
ゲノム編集、ペプチド合成

株式会社グライナー・ジヤパン

〒107-0052 東京都港区赤坂2-17-44

TEL : 03-3505-8875 FAX : 03-3505-8945

<http://www.greiner-bio-one.co.jp>

細胞生物学、神経生化学、免疫・組織化学、分子生物学、プロテオミクス研究、糖質研究 e t c、

生命科学の研究に欠かせない試薬、  
機器の情報提供に積極的に取り組んでいます



# 株式会社エイコーサイエンス

〒773-0001 徳島県小松島市小松島町字中筋 6-10  
TEL 0885-33-1705 FAX 0885-33-0627  
E-mail [info@eikousci.com](mailto:info@eikousci.com)

第21回ヒ素シンポジウム  
講演要旨集

---

2015年11月1日 発行

編集： 第21回ヒ素シンポジウム実行委員会  
〒770-8514  
徳島県徳島市山城町西浜傍示180  
徳島文理大学薬学部 衛生化学講座内  
TEL: 088-602-8459  
FAX: 088-655-3051  
E-mail: arsenic2015@ph.buri-u.ac.jp  
HP: <http://p.bunri-u.ac.jp/as2015/>  
編集責任者： 姫野 誠一郎

印刷： 協業組合徳島印刷センター  
〒770-8056  
徳島県問屋町165番地  
TEL 088-625-0135  
FAX 088-622-0734

---