

|||||

第 22 回ヒ素シンポジウム

講演要旨集

|||||

開催日：2016年11月17日（木）・18日（金）

会 場：国立研究開発法人産業技術総合研究所
臨海副都心センター別館（東京都江東区青海 2-4-7）

主 催：日本ヒ素研究会

協 力：国立研究開発法人産業技術総合研究所

|||||

第 22 回ヒ素シンポジウム

講演要旨集

|||||



開催日：2016年11月17日（木）・18日（金）
会 場：国立研究開発法人産業技術総合研究所
臨海副都心センター別館（東京都江東区青海 2-4-7）
主 催：日本ヒ素研究会
協 力：国立研究開発法人産業技術総合研究所

第 2 2 回ヒ素シンポジウム

主 催：日本ヒ素研究会

開催日：2016年11月17日（木）・18日（金）

会 場：国立研究開発法人産業技術総合研究所臨海副都心センター別館
11階会議室（東京都江東区青海 2-4-7）

協 力：国立研究開発法人産業技術総合研究所

理事会：11月17日（木） 11:45 ～ 12:45

特別講演 1：Dr. Lee L. Yu（National Institute of Standards and Technology）

“Toxic arsenic in diet and dietary supplement: metrology research and development in support of current regulations”

（食事や栄養補助食品中の有毒なヒ素：現在の規制を支える計量学的研究開発）

特別講演 2：Dr. Zoltan Mester（National Research Council Canada）

“Arsenic speciation in certified reference materials”

（認証標準物質におけるヒ素のスペシエーション）

<シンポジウム日程>

11月17日（木）（1日目）

13:15	～	13:20	開会の辞
13:20	～	14:20	一般講演 1（1-1 ～ 1-4）
14:20	～	14:35	休憩
14:35	～	15:35	特別講演 1
15:35	～	16:35	特別講演 2
16:35	～	16:55	休憩
16:55	～	17:55	一般講演 2（1-5 ～ 1-8）
18:30	～	20:00	懇親会（テレコムセンタービル5F「i-house」）

11月18日（金）（2日目）

9:20	～	11:05	一般講演 3（2-1 ～ 2-7）
11:05	～	11:20	休憩
11:20	～	12:20	一般講演 4（2-8 ～ 2-11）
12:30	～	12:55	総会
12:55	～	13:00	閉会の辞

<大会組織>

◆ 実行委員会

大会長・実行委員長	黒岩貴芳	国立研究開発法人産業技術総合研究所
実行委員	成川知弘	国立研究開発法人産業技術総合研究所
実行委員	宮下振一	国立研究開発法人産業技術総合研究所

◆ 事務局

国立研究開発法人産業技術総合研究所
計量標準総合センター内
〒305-8563
茨城県つくば市梅園 1-1-1
Tel : 029-861-4873
E-mail : 2016_AsSymp-ml@aist. go. jp

- 第22回ヒ素シンポジウム ウェブサイト
<https://unit.aist.go.jp/mcml/rg-env/As-sympo2016/>
- 日本ヒ素研究会 ウェブサイト
<http://www.arsenic-sci-soc.jp/>

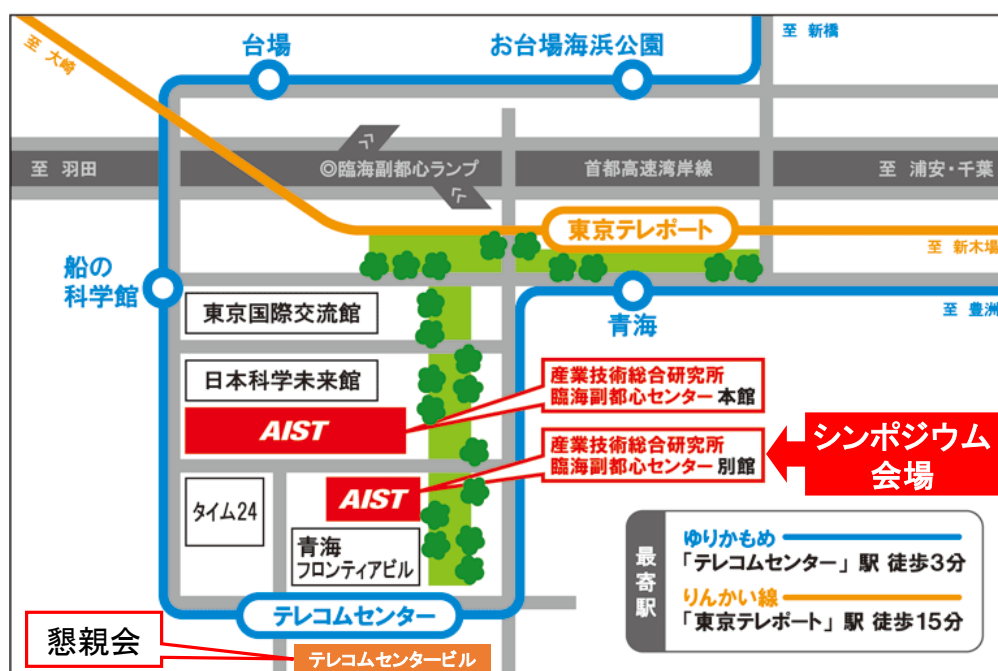
ヒ素シンポジウム 開催地・歴代大会長

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	2010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	11月	東京	黒岩 貴芳	産業技術総合研究所
23	2017年		つくば	熊谷 嘉人	筑波大学

<会場案内>

シンポジウム：国立研究開発法人産業技術総合研究所
臨海副都心センター別館（バイオ・IT 融合研究棟）11 階会議室

懇親会：テレコムセンタービル5階 レストラン「i-house」



◆ シンポジウム会場へのアクセス

➤ 電車のご案内

- ・新交通ゆりかもめ「テレコムセンター」駅下車 徒歩3分
- ・りんかい線「東京テレポート」駅下車 徒歩15分

➤ 羽田空港からお越しの場合

- ・空港からモノレール乗車
 - 「天王洲アイル」駅でりんかい線に乗り換え
 - 「東京テレポート駅」下車 徒歩15分

※りんかい線をご利用の場合、「東京テレポート」駅よりバスもご利用いただけます。

- ・「東京テレポート」駅より都営バス〔海01〕乗車
 - 「テレコムセンター駅前」バス停下車 徒歩約5分

一般講演発表者および座長の皆様へ

1. 一般講演発表者の皆様へ

- ・発表時間：発表12分、討論3分、合計15分です。
- ・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いたします。
- ・発表の30分前までに、受付にて出席の確認をお願いいたします。
- ・発表はご自身のPCをご持参の上、行ってください。Macintoshをご使用される方は、コネクタもご持参ください。
- ・ご自身のPCの使用が無理な方は、事務局が用意したPC（Windows版PowerPoint 2007）をご使用ください。発表用スライドはPowerPointで作成の上、シンポジウム会場にUSBメモリに保存してご持参いただき、受付でお渡しください。ファイル名には演題番号（例：1-1）を付けてください。
- ・ご自身のPCを使用される場合も、念のため発表用スライドをUSBメモリに保存してご持参ください。
- ・持参されるUSBメモリは、必ずウイルススキャンを行ってください。

2. 座長の皆様へ

- ・ご担当の30分前までに、受付にて出席の確認をお願いいたします。
- ・発表時間を厳守していただけるよう、進行をお願いいたします。

◆ 開会の辞 13:15 ~ 13:20

黒岩貴芳(産業技術総合研究所)

◆ 一般講演1(発表12分、質疑3分)

13:20 ~ 14:20 座長:平野靖史郎(国立環境研究所)

1-1 メコン川流域のヒ素汚染地における健康調査 -4年間のフォローアップ-

○姫野誠一郎¹, 廉馨¹, Suthipong Sthiannopkao²

¹徳島文理大学薬学部, ²東亜大学(韓国)

1-2 iAs^{III}およびDMA^V投与ラットおよびマウスにおける尿中ヒ素代謝物の検討

○鰐淵英機, 藤岡正喜, 魏民, 立花大和, 河内聡子, 梯アンナ

大阪市立大学大学院医学研究科・分子病理学

1-3 F344 *gpt delta* ラット膀胱粘膜および肝臓における iAs^{III} および DMA^V の *in vivo* 変異原性の検討

○藤岡正喜, 魏民, 河内聡子, 熊田賢次, 鰐淵英機

大阪市立大学大学院医学研究科・分子病理学

1-4 Daily intake of arsenolipid compounds in the Japanese: Estimation based on market basket survey

○Md Hasan Al Amin¹, Chan Xiong², Kevin A. Francesconi², 小栗朋³, 吉永淳⁴

¹東京大学, ²University of Graz, ³名古屋市立大学, ⁴東洋大学

休憩 14:20 ~ 14:35

◆ 特別講演 1

14:35 ~ 15:35 座長：成川知弘（産業技術総合研究所）

Toxic arsenic in diet and dietary supplement: metrology research and development in support of current regulations

（食事や栄養補助食品中の有毒なヒ素：現在の規制を支える計量学的研究開発）

Lee L. Yu (National Institute of Standards and Technology: NIST)

◆ 特別講演 2

15:35 ~ 16:35 座長：黒岩貴芳（産業技術総合研究所）

Arsenic speciation in certified reference materials

（認証標準物質におけるヒ素のスペシエーション）

Zoltan Mester (National Research Council Canada: NRC)

休憩 16:35 ~ 16:55

◆ 一般講演 2（発表12分、質疑3分）

16:55 ~ 17:55 座長：熊谷嘉人（筑波大学）

1-5 模擬消化液及び腸内細菌液におけるワカメからのヒ素溶出

○大友祐輝¹，長谷川桃子¹，畑明寿¹，山中健三²，圓藤陽子³，圓藤吟史⁴，藤谷登¹

¹千葉科学大学大学院・危機管理学研究科，²日本大学薬学部，³圓藤労働衛生コンサルタント事務所，⁴大原記念労働科学研究所

1-6 S-dimethylarsino-glutathione を投与したマウスにおける組織中のヒ素の動態

○加藤綾華¹，小林弥生^{1,2}，宇田川理²，平野靖史郎^{1,2}

¹千葉大学大学院・医学薬学府，²国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター

1-7 ヒ素結合タンパク質 PML は卵子成熟過程において染色体の配置を安定化する

○宇田川理¹, 塚本智史², 辰巳嵩征^{2,3}, 加藤綾華^{1,4}, 小林弥生^{1,4}, 平野靖史郎^{1,4}

¹国立環境研究所, ²放射線医学総合研究所, ³東京医科歯科大学大学院, ⁴千葉大学大学院・医学薬学府

1-8 HEK293 細胞における PML-MDM2 の機能と亜ヒ酸の影響

○平野靖史郎^{1,2}, 宇田川理¹, 加藤綾華², 小林弥生^{1,2}

¹国立環境研究所, ²千葉大学大学院・医学薬学府

プログラム

11月18日(金)(2日目)

◆ 一般講演3 (発表12分、質疑3分)

9:20 ~ 10:05 座長: 宮下振一 (産業技術総合研究所)

2-1 粒子添加法により調製した酸化水酸化鉄微粒子担持ポリアクリルアミドクラ
イオゲルの砒素吸着特性

○塩盛弘一郎¹, 黒住美沙¹, 清山史朗²

¹宮崎大学工学教育研究部, ²都城工業高等専門学校・物質工学科

2-2 磁性微粒子による As(III) および As(V) の吸着特性

○大榮 薫, 杉本匡弥, 若松あむ, 大島達也, 馬場由成

宮崎大学工学部

2-3 治療薬を用いた3価無機ヒ素の新規比色分析法に関する研究

○間中 淳, 恒川はるか, 高松さおり, 袋布昌幹

富山高等専門学校・物質化学工学科

10:05 ~ 11:05 座長：鱈淵英機（大阪市立大学）

2-4 亜ヒ酸によるリボース-5-リン酸合成に関わる遺伝子群の発現抑制

中野 毅, ○高橋 勉, 藤原泰之
東京薬科大学薬学部・公衆衛生学

2-5 ジメチルチオヒ素化合物の毒性発現におけるグルタチオンの役割

○下田 康代¹, 黒澤 英俊^{1,2}, 加藤 孝一¹, 畑 明寿³, 圓藤 陽子⁴, 圓藤 吟史⁵, 山中 健三¹
¹日本大学薬学部, ²警視庁科学捜査研究所, ³千葉科学大学・危機管理学部, ⁴圓藤労働衛生コンサルタント事務所, ⁵労働科学研究所

2-6 In vitro および in vivo で乳がん細胞 MDA-MB-231 に対する As^{III} とテトランドリンの単独・併用による抗腫瘍活性

○王 瀟¹, 姚 明江^{1,2}, 袁 博¹, 林 秀樹¹, 高木 教夫¹
¹東京薬科大学薬学部・応用生化学教室, ²中国中医科学院・西苑医院

2-7 *Coriandrum sativum* L. 葉抽出液中の脂肪族親電子物質による Nrf2 活性化および無機三価ヒ素の細胞毒性軽減

○安孫子ユミ¹, 溝河真衣², 里美綾香³, 熊谷嘉人^{1,2,3}
¹筑波大学医学医療系, ²筑波大学大学院・生命環境科学研究科, ³筑波大学大学院・ヒューマンバイオロジー学位プログラム

休憩 11:05 ~ 11:20

◆ 一般講演4（発表12分、質疑3分）

11:20 ~ 12:20 座長：小林弥生（国立環境研究所）

2-8 ヒ素等有害重金属の淡水生物への生態影響に対する共存物質の影響

○中島常憲, 本村知寛, 杉本貴哉, 高梨啓和, 大木 章
鹿児島大学大学院・理工学研究科

2-9 コメのヒ素濃度はOsPCS1によって制御される

林晋平^{1,2}, 倉俣正人¹, 安部匡¹, 高木宏樹^{3,4}, ○石川覚¹

¹農研機構農環研, ²農研機構生物機能部門, ³岩手生工研, ⁴石川県立大

2-10 ベトナムの地下水ヒ素汚染地域住民の影響評価：第2報

○阿草哲郎¹, 江口哲史², 國頭 恭³, Tue, N.M.⁴, Lan, V.T.M.⁵, Minh, T.B.⁶, Trang, P.T.K.⁵, 高橋 真⁷, Viet, P.H.⁵, 田辺信介⁴, 岩田久人⁴

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

2-11 中国の風土病としての慢性砒素中毒のフィールド調査20年

○吉田貴彦¹, 山内 博²

¹旭川医科大学・医学部, ²聖マリアンナ医科大学・医学部

◆ 総会	12:20 ~ 12:55
------	---------------

◆ 閉会の辞	12:55 ~ 13:00
--------	---------------

黒岩 貴芳 (産業技術総合研究所)

特別講演

Toxic arsenic in diet and dietary supplement: metrology research and development in support of current regulations

Lee L. Yu

National Institute of Standards and Technology (NIST)

E-mail: lee.yu@nist.gov

The United States has enacted a series of laws through the years to safeguard the public health regarding commercial diet and dietary supplements. The Nutrition Labeling and Education Act of 1990 requires that processed foods sold in the U.S. be labeled with specific nutrition information. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 amend the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act and established the frame work to regulate dietary supplements as food. The Food Safety Modernization Act (FSMA) enacted in 2011 aims to ensure the U.S. food supply is safe by shifting the focus from responding to contamination to preventing it. NIST developed suites of Standard Reference Materials (SRM) for food and dietary supplements to facilitate the implementation of regulatory measurements. Arsenic, the number one toxic substance on the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Priority List, is value assigned in nearly all of these SRMs. However, not all arsenicals are toxic or under regulatory scrutiny. The Food and Drug Administration (FDA), the Environmental Protection Agency (EPA), and the UN Food and Agriculture Organization and the World Health Organization (FAO/WHO) have converged on regulations and guidelines that focus only on inorganic arsenic, i.e., the sum of arsenic in the forms of arsenite (AsIII) of arsenate (AsV).

NIST has been developing several SRMs certified for arsenic species including AsIII and AsV for method validation and quality assurance in clinical, diet, and dietary supplement measurements. Starting with the development of reference materials for arsenic species in urine for biomonitoring measurements such as National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), we were contended with the lack of calibration standards, stability of arsenic species in the matrix, and the need to quantify multiple arsenic species in the matrix. The calibration problem was solved if the compound was commercially available. SI traceable calibration was established through the compound characterized for speciation and total arsenic using LC-ICP-MS and INAA, respectively. For a reference standard, the stability of each species and

the sample matrix must be evaluated. The stabilization of the reference material was achieved when the stable condition for each species was met. The development of a reference material for the measurement of arsenic species in apple juice was undertaken in response to the regulatory guideline issued by the FDA in 2013. The resulting SRM 3035 Arsenic Species in Apple Juice benefited from the prior research of arsenic species in urine regarding the stability and the measurement of the arsenic species. The value assignment of SRM 3035 was a collaboration between NIST and National Metrology Institute of Japan (NMIJ) who utilized reverse phase, cation exchange, and mixed bed ion exchange chromatography in the speciation measurements, which was a fairly comprehensive reflection of arsenic speciation techniques presently in use. In the development of a dietary supplement reference standard SRM 3232 Kelp Powder (*Thallus Laminariae*), the high total arsenic contents of the material at about 38 mg/kg was found questionable at best for use in assessing the safety and health benefits of kelp. The speciation of the arsenic in the kelp was evaluated via the extracts of the material. Arsenicals were identified based on the MSn spectra and accurate mass measurement of the precursor and product ions. Quantification of arsenicals was accomplished by INAA determination of arsenic in fractions of the LC eluent of the kelp extract to circumvent a lack of arsenical calibration standards. A procedure to identify and quantify the unknown species was thus developed; however, accounting for the speciation of all arsenic in the kelp remained a challenge because, as customary, only about 70% of the arsenic in kelp was extractable. The challenge was more acute with a new dietary supplement standard SRM 3398 Ginger Rhizome wherefrom 10% of the arsenic was extractable under mild conditions. Potential solutions to assess the speciation of the non-extractable arsenic will be discussed.

Arsenic speciation in certified reference materials

Zoltan Mester

National Research Council Canada (NRC Canada)

E-mail: zoltan.mester@nrc.ca

Development of certified reference materials for arsenic speciation have been in the focus research at NRC Canada for over thirty years. In the presentation an overview will be given on historic developments on arsenic speciation in marine organism and the latest results on novel reference materials for arsenic speciation will be discussed.

Speciation arsenic in river water (NRC SLRS-6) and sea water (NRC CASS-6, NASS-7) reference materials certified to contain low / sub ppb total As was performed. Methylated As species at the low ppt were observed using a HG-CT-ICP-MS system. The analytical process and the figures of merits will be presented and discussed.

Results will also be presented on the characterization of suit of three arsenobetaine-certified reference materials by quantitative NMR. We have synthesized an arsenobetaine bromide high-purity standard of natural isotopic composition (ABET-1) and two carbon-13-labeled isotopic standards (BBET-1 and CBET-1). Assignments of the chemical purity and isotopic composition are not trivial in the case of arsenobetaine, and in this study we utilized quantitative $^1\text{H-NMR}$ techniques for the determination of the mass fractions (chemical purity). The isotopic purity of all three standards was also assessed by NMR from the carbon-13 satellite signals. The standards are non-hygroscopic, highpurity (ca. 0.99 g/g), and the carbon-13 enrichment for both isotopic standards is $x(^{13}\text{C}) \approx 0.99$. These standards are designed for use as primary calibrators for mass spectrometric determination of arsenobetaine in environmental samples.

MEMO

MEMO

一般講演

メコン川流域のヒ素汚染地における健康調査 —4年間のフォローアップ—

○姫野 誠一郎¹、廉 馨¹、Suthipong Sthiannopkao²

¹徳島文理大学薬学部、²東亜大学（韓国）

1 はじめに

カンボジアのメコン川流域には、地下水中のヒ素濃度が 500 ppb を超えるヒ素汚染地帯が存在する。しかし、ほぼ同じ濃度のヒ素汚染があるバングラデシュなどに比べて、皮膚症状などの健康被害が少ないという特徴がある。また、水道施設の導入、フィルターの設置によって、過去 5 年間の井戸水からのヒ素摂取は大幅に減っていると推測される。世界各地のヒ素汚染地で井戸水の摂取が中止されているが、その後の追跡調査はほとんど行われていない。我々は、2012 年と 2016 年にカンボジア村落の同じ住民について皮膚症状の調査を行い、4 年間における変化を調べた。

2 方法

カンボジアのメコン川流域にある Chang Kaoh (CK)、Preak Chrov (PC)、Sambour (PS) の 3 村落において 2012 年 2 月にそれぞれ 50 名の住民から毛髪などの生体試料と井戸水の採取、皮膚症状の観察を行った。2016 年 2 月に、同じ村落を訪問し、前回の調査への参加者を対象に同様の調査を行った。2 回の調査において同一の観察者が皮膚症状を記録し、両手、両足のスコアを合計して皮膚症状のスコアとした。人体試料の採取についてはカンボジア政府の倫理委員会の許可を得ている。

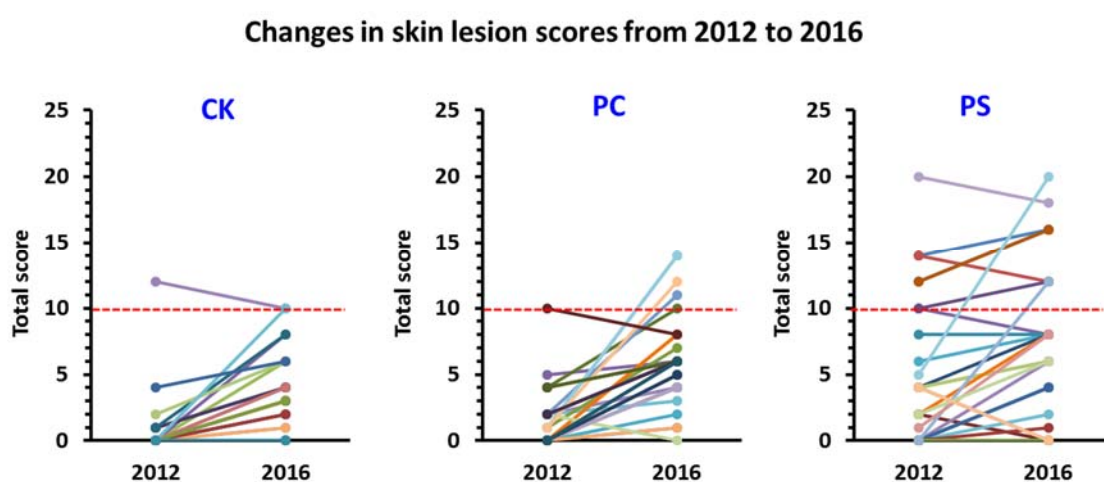
3 結果および考察

2012 年において、CK、PC ではほとんど皮膚症状 (score 10 以上) を示す住民がいなかったが、PS のみ皮膚症状を示す者が多かった。そのため、PS では井戸水用フィルターが導入され、2012 年の調査時点においても、すでにヒ素汚染された井戸水の飲用を中止していた。CK では約 10 年前にユニセフの支援で上水道が導入されていた。一方、PC では井戸水を飲まないようにとの指導はあったが、2012 年の調査時点で 50 名中 29 名がまだ井戸水を摂取していた。

2016 年の調査では、村から異動した者や連絡が取れなかった者を除き、CK 25 名、PC 39 名、PS 32 名を対象に同様の調査を行った。井戸水を飲まなくなっただけの期間は CK で約 10 年、PC、PS では約 5 年であった。しかし、調査対象者の皮膚症状の score は 4 年の間に上昇傾向を示していた (図)。特に、5-6 年前まで井戸水を摂取していた PC では、score 10 以上を示す者が増加していた。約 10 年前に水道が導入された CK においても、軽微な皮膚症状が 4 年間で増加している。PS では、元々 score 10 を超

える皮膚症状の者が多かったが、4年前には症状がほとんどなかった者にも軽微な皮膚症状が表れている。

3村落すべてで、5–10前までは約500 ppbのヒ素を含有する井戸水を10年以上使用していたので、過去のヒ素摂取による症状が徐々に出現している可能性が示唆される。しかし、毛髪中ヒ素濃度は2016年の時点でもCK 3.41 ± 3.01 ppm、PC 3.58 ± 2.64 ppm、PS 3.82 ± 2.25 ppmであり、4年前より低くなったものの、非汚染地域よりいまだに高い値を示している。これが、井戸水以外のヒ素汚染源を示唆するのか、過去に体内に蓄積したヒ素が継続的に毛髪に排出されているのか、今後の検討を要する。



Four-year follow-up study on health status of the residents in arsenic-contaminated areas alongside the Mekong River

Seiichiro Himeno¹, Lin Xian¹, Suthipong Sthiannopkao²

¹Laboratory of Molecular Nutrition and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University

²Faculty of Environmental Engineering, Dong-A University

Skin lesions and arsenic concentrations in water and hair were investigated in 2012 and 2016 among the same study participants in 3 Cambodian villages alongside the Mekong River where ground water is contaminated by arsenic. Due to the introduction of water-supplying system or filtering apparatus, the consumption of arsenic-contaminated tube-well water among the villagers decreased drastically during the last 5 – 10 year. However, the scores of skin lesions in the study participants increased during the last 4 years, suggesting the delayed effects of arsenic exposure on the development of skin lesions.

iAs^{III} および DMA^V 投与ラットおよびマウスにおける 尿中ヒ素代謝物の検討

○鰐淵英機、藤岡正喜、魏民、立花大和、河内聡子、梯アンナ
大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学

1 はじめに

これまでに我々は無機ヒ素化合物の代謝物の一つである有機ヒ素化合物の Dimethylarsinic acid (DMA^V) が、ラットにおいて膀胱発がん性を示すことを明らかにしている。また、その尿中代謝物について検討した結果、興味深いことに腫瘍発生個数に相関して dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA) が検出された。DMMTA は DMA^V の代謝物の 1 種であり、また DMMTA は発がん性の認められる DMA^V よりはるかに細胞毒性が強く、染色体毒性を有することが明らかとなっている。以上より、DMA^V 誘発膀胱がん過程にて DMMTA が重要な役割を担うことが示唆されている。しかし、マウスはヒ素発がんに低感受性であることから、ラットおよびマウス間で DMMTA 産生能に違いがあることが推測される。したがって、本研究ではラットおよびマウスに対して無機・有機ヒ素をそれぞれ飲水投与し、その尿中のヒ素代謝物について検討を行った。

2 方法

動物は 10 週齢雄性 F344 ラット 15 匹および C57BL/6 マウス 15 匹を用いた。実験開始時より無処置群、100 ppm DMA^V 飲水投与群、100ppm iAs^{III} 投与群の 3 群(各群 5 匹)に分けて 4 週間飼育し、剖検を行った。試験第 4 週時に早朝尿を採集し、そのヒ素代謝物について HPLC/ICP-MS にて解析を行った。さらに、膀胱について病理組織学的解析および免疫組織化学による細胞増殖能の検討を行った。

3 結果

ヒ素代謝物について検討した結果、尿においてラット DMA^V 投与群で TMAO > DMA^V > DMMTA > DMA^{III} の順で検出されたのに対して、ラット iAs^{III} 投与群では DMA^V > TMAO > DMMTA > iAs^V > iAs^{III} の順で多く検出された。マウス DMA 投与群では DMA^V > TMAO > DMMTA > DMA^{III}、iAs^{III} 投与群では DMA^V > DMMTA > TMAO > iAs^V > DMA^{III} の順で多く検出された。ラット・マウス間で DMMTA および DMA^{III} の有意な差はみられなかった。膀胱粘膜の細胞増殖能について Ki67 にて検討した結果、無処置群と比較してラットでは iAs^{III} 投与群で有意な増加が、DMA^V 投与群で増加傾向がみられた。対して、マウスでは無処置群と比較して iAs^{III} 投与群で有意な減少がみられ、DMA^V 投与群では Ki67 陽性率が無処置群と同程度であった。

さらに、ヒ素トランスポーターである *Abcc1*、*Abcc2* および *Aqp9* とヒ素メチル基転移酵素である *As3mt* の遺伝子発現について qPCR にて検討した結果、ラット・マウス共に *Abcc2* の有意な発現増加が *iAs^{III}* 投与群でみられた。ラットではその他に有意な発現変動がみられなかった。対して、マウスでは *iAs^{III}* 投与群で *Abcc1*、*Aqp9*、*As3mt* の有意な発現増加がみられた。

4 結論

ラット・マウス共にヒ素投与によって DMMTA が産生されていることが明らかになった。ヒ素の細胞増殖促進作用に対してラットがマウスより高感受性を示したが、尿中 DMMTA および *DMA^{III}* の濃度はラット・マウス間で有意な差はみられなかったこと、さらにヒ素トランスポーター遺伝子発現の差異がみられることから、ヒ素膀胱発がん性の種差は遺伝的背景の違いによるものである可能性が示唆された。

Comparision of urine metabolites of *iAs^{III}* and *DMA^V* in rats and mice

Hideki Wanibuchi Masaki Fujioka, Min Gi, Hirokazu Tachibana, Anna Kakehashi
Department of molecular pathology, Osaka city university graduate school of
medicine

DMA^V, a main metabolite of inorganic arsenic, is carcinogenic to the urinary bladder of rats but not mice. DMMTA, a metabolite of *DMA^V*, has strong cytotoxicity and clastogenic activity. Therefore, DMMTA may play an important role in the arsenic-induced bladder carcinogenesis. In this study, we compared the urinary concentration of DMMTA and other arsenical metabolites in rats and mice treated with *iAs^{III}* and *DMA^V*.

Ten weeks old male F344 rat and C57BL/6 mouse were divided into 3 groups and treated with 0 (Non treatment), 100ppm *DMA^V*, and 100ppm *iAs^{III}* for 4 weeks in the drinking water. In rats, urinary concentrations of arsenical metabolites, there were not significant differences in urinary concentrations of DMMTA and *DMA^{II}* between rats and mice. Moreover, the altered expression profiles of arsenic transporters were different between rats and mice. In conclusion, these results indicated that differences in expression of arsenic transporters in the urinary epithelium may be involved in the differences in susceptibility to the arsenic carcinogenicity in rats and mice.

F344 *gpt delta* ラット膀胱粘膜および肝臓における iAs^{III} および DMA^V の *in vivo* 変異原性の検討

○藤岡正喜、魏民、河内聡子、熊田賢次、鰐淵英機
大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学

1 はじめに

ヒ素は疫学的にヒトの膀胱と肝臓発がん物質であることが非常によく知られているが、その発がん機序の詳細については明らかとなっていない。 $Dimethylarsinic\ acid$ (DMA^V)は $Sodium\ arsenite$ (iAs^{III})の主要尿代謝物の一つであることが知られており、これまでの我々の研究で DMA^V がラット膀胱がんを誘発することが明らかとなっている。また、Ames 試験法による *in vitro* 変異原性試験では DMA^V と iAs^{III} は陰性であるが、染色体構造異常や数的異常を誘発することが報告されている。しかしながら、 DMA^V および iAs^{III} の動物モデルを用いた *in vivo* 変異原性は明らかとなっていない。そこで本研究の目的として、標的物質の代謝能や臓器特異性を反映した変異原性を評価可能な *gpt delta* F344 ラットを用いて、ラット膀胱粘膜上皮および肝臓で DMA^V および iAs^{III} の *in vivo* 変異原性について検討を行った。

2 方法

動物は 10 週齢雄性 *gpt delta* F344 ラット 36 匹を用いた。実験開始時より無処置群、92 ppm DMA^V (50 ppm As) 飲水投与群、87ppm iAs^{III} (50 ppm As) 飲水投与群の 3 群に分けて 13 週間飼育し、剖検を行った。剖検後、膀胱粘膜上皮および肝臓より genomic DNA を回収し、点突然変異を評価する *gpt assay* および欠失変異を評価する Spi^+ assay をそれぞれ行い、変異原性の有無の評価を行った。

3 結果

飼育期間中の一般状態について、無処置群と比較して試験第 2 週目より iAs^{III} 投与群で有意な体重増加抑制が試験最終週までみられた。*in vivo* 変異原性試験の結果、点突然変異を検出する *gpt assay* では、膀胱粘膜上皮では無処置群と比較して DMA^V 投与群および iAs^{III} 投与群のいずれも変異体頻度の有意な変動はみられなかった。また、同様に肝臓についても無処置群と比較してヒ素投与群で有意な変動はみられなかった。*gpt* 遺伝子の変異スペクトラムについて、膀胱粘膜上皮および肝臓でそれぞれ検討した結果、無処置群と比較して有意な変異スペクトラムの変化はみられなかった。

欠失変異を検出する Spi^+ assay の結果、無処置群と比較して DMA^V 投与群および iAs^{III} 投与群ともに変異頻度の有意な変動が膀胱粘膜上皮および肝臓いずれにもみられなかった。

したがって、DMA^Vおよび iAs^{III} がラット膀胱粘膜上皮および肝臓に対して *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなった。

4 結論

以上の結果から、本モデルにおいて DMA^V および iAs^{III} がラット膀胱粘膜上皮および肝臓において *in vivo* 変異原性を有さないことが初めて明らかとなった。また、本研究で得られた知見は、ヒ素誘発発がん過程における非遺伝毒性作用機序の重要性を支持する基礎的なデータを提供することができた。

Evaluation of *in vivo* mutagenicity of iAs^{III} and DMA^V in *gpt* delta F344 rat

Masaki Fujioka, Min Gi, Satoko Kawachi, Kenji Kumada,
Hideki Wanibuchi

Department of molecular pathology, Osaka city university graduate school of
medicine

DMA^V is a major urinary metabolite of iAs^{III} and induced urinary bladder cancers in rats. iAs^{III} and DMA^V are negative in *in vitro* mutagenicity tests. However, their *in vivo* mutagenicity has not been determined. The purpose of present study is to evaluate the *in vivo* mutagenicity of iAs^{III} and DMA^V in rat urinary bladder epithelium and liver using *gpt* delta F344 rats.

Ten weeks old male *gpt* delta F344 rats were divided into 3 groups and treated with 0, 92ppm DMA^V, and 87ppm iAs^{III} for 13 weeks in the drinking water. In the mutation assay, point mutations are detected in the *gpt* gene by 6-thioguanine selection and deletion mutations are identified in the red/gam genes by Spi⁻ selection.

Results of *gpt* assay and Spi⁻ assay showed that iAs^{III} and DMA^V had not effects on the mutant frequencies and mutation spectrum in urinary bladder epithelium and liver.

In this study, we examined for the first time *in vivo* mutagenicity of iAs^{III} and DMA^V in the urinary bladder epithelium and liver using *gpt* delta F344 rat and demonstrated that iAs^{III} and DMA^V are not mutagenic to these organs.

Daily intake of arsenolipid compounds in the Japanese: Estimation based on market basket survey

Md Hasan Al Amin¹, Chan Xiong², Kevin A. Francesconi², Tomoko Oguri³, and Jun Yoshinaga⁴

¹ University of Tokyo, ² University of Graz, ³ Nagoya City University, ⁴ Toyo University

Introduction:

Arsenolipids are lipid-soluble arsenic compounds present in different kinds of foods especially in marine foods. In toxicological study, some arsenolipids are shown to be toxic to human liver and bladder cells [1]. So there are emerging interests in evaluating the human health risk of arsenolipids particularly in populations who abundantly consume marine foods such as the Japanese. To this end, estimation of daily intake of arsenolipids is essential. We carried out market basket survey in Japan to (1) identify contributing source(s) of, and (2) estimate daily intake of arsenolipids.

Methods:

A total of 17 food composites, i.e., cereals, potatoes, sugars & sweeteners, pulses, nuts & seeds, vegetables, fruits, mushrooms, algae, fish & shellfish, meats, eggs, milks, oils & fats, confectioneries, beverages, and seasonings & spices, were prepared from 157 Japanese food items which were purchased in Shizuoka city, Japan in December 2015. A portion of food composites was freeze-dried individually and used for the analysis. Arsenolipids were extracted by solvent mixture (DCM + MeOH= 2+1, v/v) from the food composites. After purification, 12 arsenolipids were determined by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry/ electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ICPMS/ESIMS) [2].

Results and discussions:

Arsenolipids were detected in algae, and fish & shellfish of the 17 food composites at a concentration of 0.70-37.5 ng/g fresh weight. Figure 1 shows the chromatogram for the sample of fish & shellfish composite.

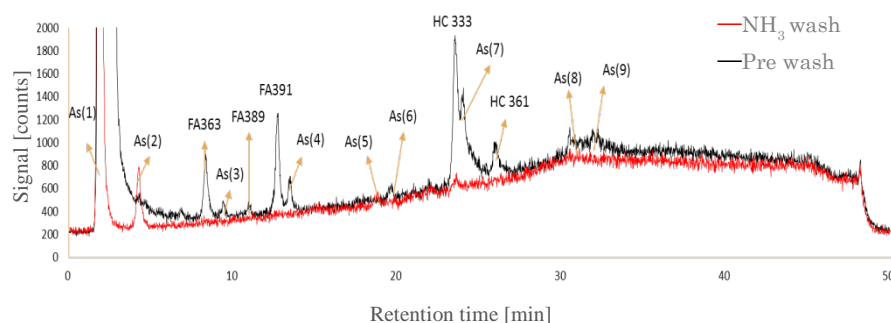


Figure-1: HPLC-ICPMS chromatograms of the extract from fish & shellfish composite

Among the different groups of arsenolipids (AsHCs, AsFAs, and AsPLs), the cytotoxic arsenolipids (AsHCs) were found at higher concentration than the others. The concentrations

of cytotoxic AsHC-332 and AsHC-360 in algae, and fish & shellfish were about 3.7 and 10, and 23 and 4.6 ng/g of fresh weight, respectively. Another cytotoxic AsHC 444 was not detected in any of the food composite.

Table 1 Estimated daily intake of cytotoxic arsenolipids (AsHCs) from food categories (ng/day)

Food categories	Cytotoxic Arsenolipids		
	AsHC-332	AsHC-360	AsHC-444
Cereals	<4.4	<4.4	<4.4
Potatoes	<2.0	<2.0	<2.0
Sugars and sweeteners	<10	<10	<10.
Pulses	<2.0	<2.0	<2.0
Nuts and seeds	<10	<10	<10
Vegetables	<0.9	<0.9	<0.9
Fruits	<1.5	<1.5	<1.5
Mushrooms	<0.8	<0.8	<0.8
Algae	40.5	113	<3.3
Fish and shellfish	1526	305	<3.1
Meats	<4.8	<4.8	<4.8
Eggs	<2.4	<2.4	<2.4
Milks	<1.6	<1.6	<1.6
Oils and fats	<10	<10	<10
Confectioneries	<8.9	<8.9	<8.9
Beverages	<10	<10	<10
Seasonings and spices	<3.6	<3.6	<3.6

Table 1 shows estimated daily intake of cytotoxic AsHCs compounds from each of the food category. For the AsHCs and total arsenolipids (AsHCs, AsFAs and AsPLs), the daily consumption of the Japanese was estimated at about 2.0 µg/person/day and 4.3 µg/person/day, respectively. Algae and fish & shellfish contributed to the total intake of arsenolipids.

[1] Meyer et al., *Metallomics* **2014**, 6: 1023 [2] Glabonjat et al., *Anal. Chem* **2014**, 86: 10282.

脂溶性ヒ素化合物の一日摂取量：マーケットバスケット法による推定

Md Hasan Al Amin¹, Chan Xiong², Kevin A. Francesconi², 小栗朋子³, 吉永淳⁴

¹ 東京大, ² University of Graz, ³ 名古屋市立大, ⁴ 東洋大

脂溶性ヒ素化合物 (As-lipid) が海産物に含まれていることが知られている。最近になっていくつかの化合物が無機ヒ素と同等レベルの細胞毒性を持つことが報告された。海産物を多食する日本人のリスク評価の基礎情報として、As-lipid の化合物ごとの一日摂取量と摂取源となる食品群の特定を目的として、マーケットバスケット法による試料収集と HPLC-ICPMS/ESIMS 法による分析を行った。17 食品群の分析の結果、藻類、魚介類の 2 群に As-lipid が検出された。細胞毒性のある 2 種の炭化水素型 As-lipid (AsHC-332, AsHC-360) の一日摂取量は、それぞれおよそ 1.6, 0.41 µg/人/日、またリン脂質型、脂肪酸型を含めた総 As-lipid 摂取量は 4.3 µg/人/日であると推定された。

模擬消化液及び腸内細菌液におけるワカメからのヒ素溶出

○大友 祐輝¹, 長谷川 桃子¹, 畑 明寿¹, 山中 健三²,

圓藤 陽子³, 圓藤 吟史⁴, 藤谷 登¹

¹千葉科学大学 大学院 危機管理学研究科, ²日本大学 薬学部,

³圓藤労働衛生コンサルタント事務所, ⁴大原記念労働科学研究所

1 はじめに

海藻中にはアルセノシュガー (AsSug) やアルセノリピッド (AsLipid) などの有機ヒ素化合物が含まれる。これらの有機ヒ素の一部は体内でジメチルアルシン酸等に代謝されることから、その健康リスク評価が急務とされている。しかしながら海産食品からの AsSug や AsLipid の溶出及び代謝のメカニズムは不明な点が多い。本研究では海藻からのヒ素溶出について知見を得るためワカメ (*Undaria pinnatifida*) を被験食品とし、模擬消化液および腸内細菌液における溶出試験を行った。また、ヒ素溶出に關与する腸内細菌の検索も試みたので報告する。

2 方法

被験ワカメに含まれる総ヒ素量は、湿式灰化したワカメの ICP-MS 分析により求めた。模擬消化液の調整は先行研究 (Laparra *et al.* 2003, Almela *et al.* 2004) を参考にを行った。胃相では、水戻したワカメに模擬胃液を加え 37°C で 4 時間振盪を行った。これを中和した後、ブタの胆汁及び膵臓抽出成分を含む模擬腸液を加え 30 分間振盪した。これにアルゴンガスによる脱気を行った後、腸内細菌液を添加し 24 時間振盪した。対照として腸内細菌非添加サンプルを作成した。腸内細菌液は新鮮なヒト糞便から採取し調整した。定期的にサンプリングを行い、ヒ素溶出量を ICP-MS で測定した。ワカメからのヒ素溶出に關与する細菌の検索には次世代シーケンス微生物相解析法を用いた。ワカメを栄養源として増殖した細菌がヒ素溶出に關与する可能性があると考え、腸内細菌液の添加直後と添加 24 時間後のサンプルを解析対象とした。細菌 DNA の抽出には Extrap Soil DNA kit Plus を使用した。16SrRNA 遺伝子の PCR 増幅、シーケンス解析、相同性検索、群集解析は外部の専門機関に委託した。

3 結果

被験食品であるワカメに含まれる総ヒ素量は、 30.2 ± 0.7 mg/kg dry (n=3) であった。この値を 100% として溶出率を算出した。模擬胃液添加 4 時間後のヒ素溶出率は $13.0 \pm$

0.8% (n=3)、模擬腸液添加 30 分後での累積溶出率は $18.6 \pm 5.2\%$ 、腸内細菌液添加 24 時間後での累積溶出率は $108 \pm 2.9\%$ となった。一方、腸内細菌非添加サンプルでは、24 時間後の累積溶出率は $30.8 \pm 0.6\%$ であった。

次世代シーケンス微生物相解析の結果、24 時間サンプルでは、*Bacteroides ovatus* の DNA が最も多く検出され、細菌 DNA 構成比の 61.9% を占めていた。これに次いで多く検出されたのは *Escherichia coli* で、5.5% であった。*B. ovatus* の DNA は腸内細菌液添加直後のサンプルからも検出されたが、その構成比は 0.8% と低く、他の腸内細菌が上位を占めた。

4 考察

B. ovatus はヒト腸内細菌叢に含まれるグラム陰性、偏性嫌気性菌の一種であり、海藻の細胞壁に含まれるアルギン酸等の粘性多糖類や、セルロースの分解酵素を産生することが報告されている。今回、模擬的な消化管環境において、ヒト腸内細菌の添加によりワカメからのヒ素溶出量増加がみられたが、これには *B. ovatus* が関与している可能性が示唆された。

Arsenic elution from brown seaweed in a simulated gastrointestinal tract

Yuki Otomo¹, Momoko Hasegawa¹, Akihisa Hata¹, Kenzo Yamanaka²,

Yoko Endo³, Ginji Endo⁴, Noboru Fujitani¹

¹ Chiba Institute of Science, ² School of Pharmacy, Nihon University,

³ Endo Occupational Health Consultant Office,

⁴ The Ohara Memorial Institute for Science of Labour

Seaweed contains organic arsenic compounds such as arsenosugar (AsSug) and arsenolipid (AsLipid). The mechanisms of elution and metabolism of these arsenics in the human gastrointestinal tract are not clearly understood. In the present study, we observed the amount of arsenic elution from wakame seaweed in a simulated gastrointestinal tract. Our results showed that the addition of human enteric bacteria increased the amount of eluted arsenic. During 24 hours after adding human enteric bacteria, *Bacteroides ovatus* largely increased. *B. ovatus*, a normal part of the human enteric microflora population, can break down viscous polysaccharides such as alginic acid from brown seaweed. Therefore, enteric bacteria such as *B. ovatus* may increase the quantity of arsenic that can be eluted from seaweed.

S-dimethylarsino-glutathione を投与したマウスにおける組織中のヒ素の動態

○加藤 綾華¹, 小林 弥生^{1,2}, 宇田川 理², 平野 靖史郎^{1,2}

¹千葉大院 医学薬学府, ²国立環境研 環境リスク・健康研究センター

1. はじめに

ヒ素は薬毒同源の化合物としてとても興味深い化合物である。無機ヒ素である三酸化二ヒ素 (As_2O_3) は難治性・再発急性前骨髄性白血病の治療薬として臨床で使用され 10 年以上経過したが、有機ヒ素化合物も薬物として注目をされている。3 価ジメチル化ヒ素化合物の S-dimethylarsino-glutathione ($(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{III}}(\text{GS})$; DMAG) は、無機ヒ素化合物の代謝中間体と推定されているが、これまでのところ生体試料中で検出されていない。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治験が行われており、日本でも本年度の 4 月より第 II 相試験が開始された。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_2 ; iAs^{III}) をマウスに尾静脈投与し、投与 5 分後と 1 時間後の各組織の総ヒ素濃度を調べた。結果として双方の時間においても DMAG 投与群では肺に、 iAs^{III} 投与群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 HPLC-ICPMS で確認したところ、投与後 1 時間では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、また投与後 5 分の DMAG 投与群においてタンパク質に結合したと考えられる未同定のヒ素のピークが検出された。本研究では DMAG を投与したマウス血漿中のヒ素結合成分を解明するため、血漿中のヒ素の化学形態を明らかにし、また血漿アルブミンに着目しヒ素化合物の結合成分を同定するために研究を行った。さらに、臓器中で検出されたヒ素が血液由来であるかどうかを確認するため投与後 1 時間後に脱血を行った後の臓器の総ヒ素濃度を測定した。

2. 方法

1. 全身灌流後における臓器中の総ヒ素分布

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに DMAG または iAs^{III} をヒ素として 0.5mg/kg 投与し 1 時間後に心採血を行った後、約 20mL の生理食塩水で全身灌流することにより脱血を行った。その後肝臓と肺を採取し肺は全量、肝臓は約 0.1g を濃硝酸と過酸化水素で湿式灰化し、ICPMS で総ヒ素濃度を測定した。

2. マウス血漿中のヒ素結合成分の同定

C57 BL/6J 雄性マウスから全血を採取後、ただちに遠心分離して血漿を採取した。血漿を、サイズ排除機能を主体とした GS-520HQ カラム (Shodex) を用いて 3 分画に分けて分取 (8~14 分、14~15 分、15~17 分) した。分離には、溶離液として 50 mM Tris- HNO_3 (pH7.4) を使用し、カラムオーブンを 25°C、流速を 0.5mL/min とした。それぞれの分画にヒ素が最終濃度 50ppb になるように DMAG を添加して 37°C で 1 時間加温振とう後 HPLC-ICP MS でヒ素の化学形態別分析を行った。また Promax[®]アルブミン除去キットを使用して血漿よ

りアルブミンを除去した後、同様の処理を行い、ヒ素の化学形態別分析を行った。ヒ素の化学形態別分析は血漿分画分取時と同条件で行った。

3. 結果

灌流を行ったマウスと、灌流を行っていないマウスの臓器中総ヒ素濃度を比較したところ、両群にほとんど差がみられなかったことから臓器中総ヒ素濃度における血液の関与は低いことが示唆された。

各血漿分画に DMAG を添加した実験では、共通して DMA^V、DMAG と同じ保持時間のピークが確認された。未同定のピークは 15~17 分に溶出される分画にのみ出現した。本分画に溶出されるのはアルブミンと同定されているため、キットを使用してアルブミンを除去した。アルブミンを除去した血漿においても、DMA^V、DMAG と同じ保持時間のピークが確認されたが、未同定のピークは確認されなかった。

4. 考察

灌流実験の測定の結果から臓器中のヒ素濃度における血液の関与は少なく、投与後 1 時間で速やかに DMAG が組織中に分布されている可能性が示唆される。

速やかに組織中にヒ素が分布されていることから、組織中のヒ素の化学形態を分析することが、組織中の代謝や毒性、薬理作用の出現を解明するのに重要だと考える。

マウス血漿中のヒ素結合成分において、DMAG は 15~17 分以外の分画成分には結合せず、血漿分画特異的に結合をしている可能性が示唆された。この保持時間はアルブミンの溶出画分に相当するが、血漿からキットを用いてアルブミンを除去した溶液に DMAG を添加したところ、15~17 分のピークが消失したところからアルブミン特異的に結合していることが確認できた。DMAG を添加し加温した後の血漿中における DMA^V のピークの高さはアルブミンの有無で大きく違うことから、アルブミンに結合することで速やかに DMA^V に酸化されてしまうことを防いでいる可能性が示唆された。

今後はアルブミンに結合することによる体内への影響、臓器中の化学形態を分析して毒性や薬理効果を解明するために研究をしていきたいと考えている。

Chemical form of arsenic in mice injected S-dimethylarsino-glutathione S-*in vitro* and *in vivo*

Ayaka Kato¹, Yayoi Kobayashi^{1,2}, Osamu Udagawa², and Seishiro Hirano^{1,2}

¹ Grad. School of Med & Pharm. Sci. Chiba University ² National Institute for Environmental Studies

Methylated metabolites of arsenic are implicated both in toxicological effects and medical treatment of arsenicals. S-dimethylarsino-glutathione ((CH₃)₂As^{III}(GS);DMAG) which is considered to be an unstable intermediate in the metabolic process of inorganic arsenic, is now under the phase II clinical trial test for Peripheral T-cell lymphoma (PTCL). We injected DMAG in mice and incubated DMAG with mice plasma *in vitro*. We found that DMAG bound to albumin in mice plasma and DMAG distributed to tissue 1 hour after-injection.

ヒ素結合タンパク質 PML は卵子成熟過程において 染色体の配置を安定化する

○宇田川理¹・塚本智史²・辰巳嵩征^{2,3}・加藤綾華^{1,4}・小林弥生^{1,4}・平野靖史郎^{1,4}

¹ 国立環境研究所, ² 放射線医学総合研究所, ³ 東京医科歯科大, ⁴ 千葉大院

1. はじめに

地下水のヒ素汚染は地球規模の問題であり、様々なガンの罹患リスクの増大が指摘されている。一方で近年疫学研究がすすみ、妊娠・出生への悪影響の中でも特に墮胎（突発性流産）へのリスクが最もヒ素汚染と相関すること等が報告されている (Quansah et al. (2015))。しかしながら、卵子の成熟に関しその詳細な標的や分子機構はわかっていない。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 体であり、染色体転座によって生ずる PML-RAR α であることが知られているが、亜ヒ酸は PML-moiety を標的にこれを分解へ導くことが提唱されている。これまでに我々はマウスの卵子成熟に対し、亜ヒ酸が紡錘体形成に影響を与える事、PML が凝集した染色体の近傍に局在する事を報告してきた。今回我々は、卵子成熟に伴う PML の時間依存的な局在変化を追跡するとともに、PML の発現抑制を行う事により PML の機能について調べた。

2. 方法

まず様々な成熟段階にある卵子を捕集するため、C57BL/6Jマウス卵巣から核膜がintactな減数分裂再開前の卵であるGerminal Vesicle卵 (GV卵) を単離した。次にGV卵を4, 20時間 α MEM培地中で培養した。これにより減数分裂再開の指標となる卵核胞が崩壊したGV-BreakDown卵 (GVBD卵), 受精可能なレベルまで減数分裂が進行したMetaphase II卵 (MII卵)をそれぞれ得た。またC57BL/6Jマウスを強制排卵させて得たMII卵に対し精子を混合し、HTF培地内で24時間培養する事で2細胞期胚を得た。PMLの局在は、各卵子・胚を固定後蛍光抗体染色により検出するとともに、PMLと血球細胞の知見を踏まえポジティブコントロールとして骨髄細胞を観察に用いた。骨髄細胞は、C57BL/6Jマウスから取り出した大腿骨の骨端を切断後、生理食塩水を用いて洗い出し、遠心分離を利用してスライドガラスに塗抹した後同様に蛍光抗体染色を行った。PMLの発現抑制はInvitrogen社のStealth siRNAをマイクロインジェクション法により卵子内へ注入することによって行った。受精以降におけるPMLの寄与を明らかにするために、媒精後3時間の時点でMII卵へ注入した。一方で受精前におけるPMLの寄与を明らかにするために、PML siRNAを注入したGV卵をホスホジエステラーゼ阻害剤3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)の存在下で一旦GV期に保持した。7時間後IBMXを除去し、減数分裂再開が可能な条件に変更した後さらに17時間培養を継続した。都合24時間の培養終了後、胚の観察・卵子の蛍光抗体染色 (α -tubulin) を行った。

3. 結果

GV-MII 卵子の核内において、PML は染色体を包むような局在を示した。また、2 細胞期胚においては、新たに形成された核膜の内膜直下に局在が見られた。一方で、大腿骨から得た塗抹標本中の骨髓細胞の核内において PML は、文献に多く見られるような dot 状の body 構造を示した。PML を受精後に発現抑制したところ、遜色なく胞胚期まで胚は成育した。一方、PML を受精前の GV 期に発現抑制したところコントロール群の 69.5% に対し、25.4% の卵が MII 期まで発育した。PML 発現抑制卵では、コントロール群の綺麗な紡錘型に対し、矮小な紡錘体や卵子の縁に紡錘体が圧迫されているような像が散見された。

4. 考察

PML の局在変動が核・染色体の成熟と相関が観られること、PML の発現抑制により紡錘体形成に起因すると見られる卵成熟不全が観察されることから、PML は卵子の成熟に不可欠な染色体配置を安定化し成育を促進する可能性が考えられる。卵子・胚において PML は、一般によく知られている「PML 核小体」的な dot 状の構造体としては存在していないようであり、これまでに明らかになっていない生殖細胞特有の機能を有する可能性が考えられる。前回発表の亜ヒ酸が紡錘体形成に影響を与える事を加味すると、未受精卵子内において亜ヒ酸結合性を有するタンパク (PML など) が、卵成熟に対して重要な細胞内構造の形成に関与しているため、紡錘体形成が結果として亜ヒ酸毒性の主要ターゲットの一つとなりうる可能性が示唆された。

[参考文献] Quansah et al. *Association of Arsenic with Adverse Pregnancy Outcomes/ Infant Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Environ. Health Perspect.* (2015) 123:412–421

Arsenite-binding protein PML promotes the proper spindle organization in maturing oocytes in mice

Osamu Udagawa¹, Satoshi Tsukamoto², Takayuki Tatsumi^{2,3}, Ayaka Kato^{1,4}, Yayoi Kobayashi^{1,4}, and Seishiro Hirano^{1,4}

¹National Institute for Environmental Studies, ²National Institute of Radiological Sciences, ³Graduate School of Tokyo Medical and Dental University, ⁴Graduate School of Chiba University

Severe contamination of groundwater sources with highly toxic inorganic arsenic (iAs) has been a worldwide concern. Besides carcinogenicity of iAs, recent progresses in epidemiology have also revealed its non-carcinogenic effect on female reproduction resulting in increased abortion rate as an adverse outcome. To understand the function of arsenite-binding protein in maturing oocytes, we focused on PML, the well-defined arsenite-binding protein. We found that PML localizes along the maturing chromosomes. Also, knocking down of PML in maturing oocytes showed the impaired spindle morphogenesis, suggesting the role of PML in the proper spindle formation on the meiotic maturation.

HEK293 細胞における PML-MDM2 の機能と亜ヒ酸の影響

○平野靖史郎^{1,2}・宇田川理¹・加藤綾華²・小林弥生^{1,2}

¹ 国立環境研究所, ² 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(APL)は、ProMyelocytic Leukemia (PML)の dominant negative 体である PML-RARA の生成が病因であること、亜ヒ酸の投与により顕著な APL の治療効果が認められることが知られているが、*PML* 自体は癌抑制遺伝子として機能しているものと考えられている。*PML* が癌抑制遺伝子として働く機構の一つとして、*PML* が E3 ユビキチンリガーゼで癌遺伝子産物でもある Mouse Double Minute 2 homolog (MDM2)を制御していることが挙げられる。本研究では、ゲノム編集により HEK293 細胞の MDM2 をノックアウトさせた細胞やさらに PML を強発現させた細胞を用いて、細胞における PML と MDM2 の機能を解析するとともに、亜ヒ酸の曝露がこれらの細胞に及ぼす影響について調べた。

2. 方法

PMLの内在性に乏しいHEK293細胞、PML安定発現HEK293細胞 (HEKPML) を用いた。また、MDM2 CRISPR/Cas9 KO plasmidとMDM2 homology- directed repair plasmidをHEK293細胞にco-transfectionしpuromycinを用いてMDM2 knockout安定株を作製した(293-MDM2)。HEK-PML細胞を用いて同様にMDM2のknockoutを試みたが、安定株が得られなかったため、293-MDM2細胞にPMLVI plasmidをtransfectして細胞を観察した。これらの細胞を用いて、増殖性を調べるとともに、亜ヒ酸の細胞障害性をWST-8法を用いて測定した。Pan-caspase inhibitor であるzVADやcaspase-3 inhibitorであるAcDEVD-CHO存在下に亜ヒ酸を曝露して細胞生存率を調べるとともに、ケミルミネッセンス法を用いてcaspase-3/7活性を測定した。HEK293、HEKPML、293-MDM2細胞に亜ヒ酸 (3 μM, 100 μM)を曝露し、細胞をRIPA可溶性と不溶性画分タンパク質を分画抽出して、PML、SUMO2/3、MDM2、p53の質的、かつ量的変化をウェスタンブロット法で測定した。

3. 結果

MDM2 を KO した 293-MDM2 細胞は、HEK293 や HEKPML 細胞に比べサイズが大きく、細胞増殖速度も有意に低下していた。PML VI を強発現させた 293-MDM2 細胞では、細胞増殖がほとんど起こらず、細胞が巨大化した。予想に反し、293-MDM2 細胞は、HEK293 や HEKPML 細胞に比べ亜ヒ酸に対してより耐性であった。293-MDM2 細胞では、亜ヒ酸の曝露により caspase-3/7 活性が上昇した。しかし、HEK293 や 293-MDM2 細胞にお

いては、亜ヒ酸の細胞障害性に caspase inhibitors の効果が見られなかったことより、アポトーシス以外の細胞死の機構が考えられる。亜ヒ酸を曝露した HEKPML 細胞では、これまでに報告したように、PML の不溶化と SUMO 化が観察された。MDM2 は PML を安定発現した HEKPML 細胞においてのみ、亜ヒ酸の作用により RIPA 可溶性から不溶性へと変化した。これらのことより、PML は MDM2 とは細胞内において強く相互作用しており、亜ヒ酸に曝露した細胞における MDM2 の質的变化は PML の不溶化/SUMO 化に依存しているものと考えられる。

4. 考察

癌遺伝子である MDM2 の KO マウスは胎生致死 (E5.5-6.5) であるにもかかわらず、癌抑制遺伝子 p53 を欠損したマウスでは MDM2 を欠損させても正常に成長することから、MDM2 は p53 依存的に転写活性等を制御しているものと考えられている。一方、PML は MDM2 を抑制することにより癌抑制作用を示すのではないかと考えられてきた。これまでに、亜ヒ酸を曝露した細胞において、PML が RIPA 可溶性から不溶化へと変化するを明らかにしている。今回の研究において、MDM2 が、PML が強発現している細胞においてのみ、亜ヒ酸に対して PML と同様の RIPA 不溶化の変化を示したことより、亜ヒ酸の曝露に伴う MDM2 の質的变化は、PML の変化に依存しているものと考えられる。また、MDM2 を欠損した 293-MDM2 細胞に PML を強発現させた場合に顕著な細胞形態変化が見られたことより、まだ知られていない PML の機能に対して MDM2 が抑制的に作用していることが推察される。

Functions of PML-MDM2 and effects of arsenite in HEK293 cells.

Seishiro Hirano^{1,2}, Osamu Udagawa¹, Ayaka Kato², and Yayoi Kobayashi^{1,2}

¹National Institute for Environmental Studies, ²Graduate School of Chiba University

We investigated effects of arsenite in HEK293, HEKPML (stably transfected with PML VI), and 293-MDM2 (MDM2-KO HEK293) cells. The growth of 293-MDM2 cells was much slower than that of HEK293 and HEKPML cells. However, 293-MDM2 cells were more resistant to arsenite than the other cells. Apoptosis was not the cytotoxic mechanism of arsenite in those cells, if any. Most MDM2 was recovered in RIPA-soluble fraction. However, when PML was overexpressed, MDM2 was changed from RIPA-soluble to RIPA-insoluble fraction by arsenite. Modification of MDM2 induced by arsenite was completely dependent on the expression of PML. Those results suggest that MDM2 and PML interact in the cells and PML regulates the function of MDM2 and *vice versa*.

粒子添加法により調製した酸化水酸化鉄微粒子担持 ポリアクリルアミドクライオゲルの砒素吸着特性

○塩盛弘一郎¹, 黒住美沙¹, 清山史朗²

¹宮崎大学・工学教育研究部, ²都城工業高等専門学校・物質工学科

1 はじめに

水溶性高分子を凍結状態で重合または架橋することで得られるクライオゲルは、多孔質で通液特性が良いことから、吸着材やフィルターなどの分離材料への応用が研究されている。このクライオゲルを化学修飾もしくは吸着能力を有する微粒子と複合化することにより新たな分離機能を発現させることが出来る。本研究では、あらかじめ調製した酸化水酸化鉄微粒子をポリアクリルアミド(PAA)クライオゲルの調製時に添加してAs(V)の吸着材の調製を行い、As(V)の平衡吸着およびカラムによる連続吸着を行った。

2 方法

2.1 沈殿物添加による酸化水酸化鉄担持 PAA クライオゲルの調製

FeCl₃水溶液とNa₂CO₃水溶液を混合して調製した酸化水酸化鉄沈殿物を、蒸留水に分散させ、アクリルアミド、ビスアクリルアミドおよびペルオキシ二硫酸アンモニウム水溶液を溶解し、0~1℃まで冷却後、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを加え、-15℃で一晩凍結・重合させ、酸化水酸化鉄担持 PAA クライオゲル(FeOOH 担持クライオゲル)を得た。得られたゲルは凍結乾燥を行い、乾燥重量と熱分解法により FeOOH 含有量を測定するとともに電子顕微鏡で観察した。

2.2 As(V)吸着平衡実験

調製した FeOOH 担持クライオゲルをサンプル管に入れ、As(V)水溶液を加え、48 時間振とうさせて吸着を行った。その後、溶液中の As 濃度を ICP で測定した。

2.3 カラムによる連続吸着実験

調製した FeOOH 担持 PAA クライオゲルを凍結乾燥させたものを切り刻み、6 mL シリンジに詰め、マイクロチューブポンプにより pH を調整した As(V)水溶液を SV 値が約 4 h⁻¹になるように流通させ、カラム出口の As(V)の濃度を ICP で測定した。同様の実験を、凍結せずに重合させた PAA ゲル(Gel F)を用いて行った。

3 結果および考察

3.1 FeOOH 担持 PAA クライオゲルによる As(V)吸着平衡

粒子添加法(Cryogel A)、含浸担持法で調製したクライオゲルおよび FeOOH 沈殿物の As(V)の吸着等温線を図 1 に示す。水相の As(V)濃度が低濃度から吸着量が高く、濃度が高くなるに従い吸着量は緩やかに増加し、さらに高濃度で吸着量がさらに増加した。

これは、鉄酸化物との沈殿形成による As(V)除去の等温線と類似しており、FeOOH 表面での沈殿形成も示唆される。粒子添加法クライオゲルは、含浸担持法クライオゲルおよび FeOOH 沈殿物よりも As(V)吸着量が高いことがわかった。

3. 2 FeOOH 担持クライオゲルのカラム連続 As(V)吸着

カラムによる連続吸着の破過曲線を図 2 に示す。粒子添加法による FeOOH 担持クライオゲル(Cryogel A)は、通液開始後は As(V)を全て吸着しており、約 100 mL 通液後に As(V)濃度が急に高くなり、その後、緩やかに段階的に増加した。一方、Gel F は、流通後すぐに As(V)濃度が高くなり始め、緩やかに増加した。この破過曲線より求めた As(V)の吸着量は約 53.5 mg/g-FeOOH であり、As(V)濃度 10 mg/L における平衡吸着量とほぼ同じであった。これらの結果は、クライオゲルに内包された FeOOH 微粒子による As(V)の吸着速度は早く、吸着等温線の低濃度での高い吸着量に対応していると考えられる。また、破過曲線が一樣に増加せず段階的に高くなったことから、As(V)の FeOOH 微粒子への吸着が多段階で進行していることが示唆される。

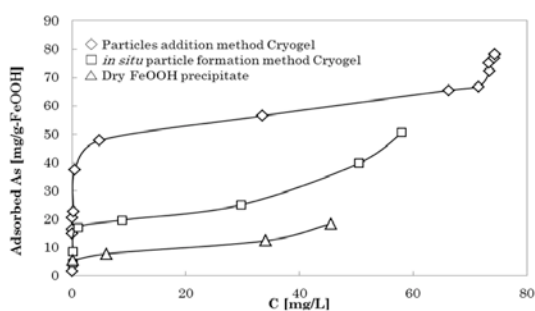


図 1 粒子添加法と含浸担持法による FeOOH 担持 PAA クライオゲルおよび FeOOH 沈殿物による As(V)の吸着等温線

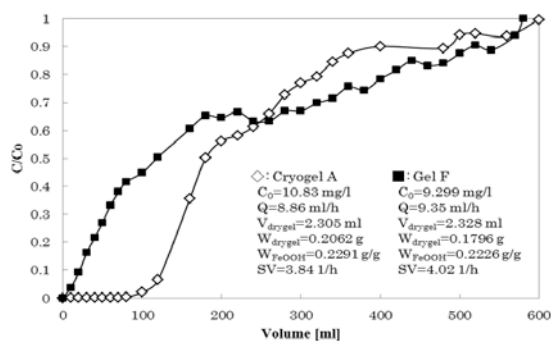


図 2 粒子添加法 FeOOH 担持 PAA クライオゲルによる As(V)のカラム連続吸着の破過曲線

Arsenic Adsorption Properties of Polyacrylamide Cryogels Containing Iron Hydroxide Oxide Nanoparticles by Particle Addition Method

Koichiro Shiomori¹, Misa Kurozumi¹, Shioro Kiyoyama²

¹Department of Applied Chemistry, University of Miyazaki,

²Department of Chemistry and Materials Technology, Miyakonjojo NCT

Polyacrylamide(PAA) cryogels containing FeOOH particles were prepared by the particle addition method. FeOOH particles were observed on a whole of the cryogel wall. The FeOOH cryogel successfully adsorbed a large amount of As(V) in the adsorption equilibrium and the continuous flow adsorption experiments. It was suggested that the FeOOH cryogel has a high adsorption rate of As(V) from the adsorption property in the column adsorption with continuous flow.

磁性微粒子による As(III)および As(V)の吸着特性

○大榮薫, 杉本匡弥, 若松あむ, 大島達也, 馬場由成
宮崎大学・工学部

1 はじめに

1990年代にインドやバングラデシュにおいて環境基準値 (0.01 mg/dm^3) を超える無機ヒ素が地下水から検出されて以来、世界中でヒ素汚染が社会問題になっている。地下水、土壌や工業廃水中の無機ヒ素の有効な処理法として吸着法がある。吸着材をカラムに充填した吸着塔に、汚染水を連続的に供給する固定相吸着が一般的だが、処理後の回収が困難であることから、家庭用タンクの溜め水などのバッチ処理には適さない。また、ヒ素の吸着性能は pH に影響されるため、高い吸着性能を示すためには汚染水の pH 調整が必要となる。

そこで本研究では、バッチ処理で磁石を用いた磁気回収が容易でかつヒ素汚染水の pH 領域で高い吸着性能を発現する吸着材としてフェライトに着目した。ヒ素と高い親和性をもつ酸化鉄と高い等電位点の金属酸化物を組み合わせることで pH の影響を受けにくい磁性微粒子を得た。これらの吸着材を用いて砒素に対する吸着特性を評価した。

2 方法

磁性微粒子 Co-Fe, Fe-Y は沈殿法により調製した。XRD 分析によりスピネル型構造のフェライトに同定された。ヒ素吸着実験はすべてバッチ法で行った。吸着材 10 mg に所定 pH に調整した 0.1 mM ヒ素溶液を 15 cm^3 加えて、120rpm で 303 K, 24 時間振とうした。メンブレンフィルターでろ過後、ろ液中のヒ素濃度を ICP-AES により測定した。また、ヒ素吸着前後の Co-Fe の等電位点(PZC)を調べるために各 pH のゼータ電位を測定した。

3 結果および考察

Co-Fe および Fe-Y による As(III)および As(V)吸着の pH 依存性を Fig.1 に示す。Co-Fe は As(III) を $5 < \text{pH} < 9$ 、As(V)を $\text{pH} < 8$ で 80%以上吸着した。Fe-Y は $7 < \text{pH} < 10$ で As(III)、 $5 < \text{pH} < 9$ で As(V)を 80%以上吸着した。いずれの磁性微粒子も広範囲の pH 領域でヒ素を除去できることが示された。各 pH における Co-Fe の表面電位におよぼす As(III)および As(V)吸着の影響を Fig.2 に示す。Co-Fe の等電位点 9.8 は、As(III)あるいは As(V)が吸着すると Co-Fe の表面電位は低下し、吸着後の PZC はいずれも低 pH 側へシフトした。Fig.3 は As(III) の吸着に及ぼす NaCl の影響を示す。As(III)の 1000 倍濃度の NaCl が存在しているにも関わらず、全 pH 領域において吸着率は低下しなかつた。

った。As(V)も同様の実験結果が得られた。従って、As(III)および As(V)は配位子交換型の内圏錯体を形成して Co-Fe に吸着されたと考えられる。

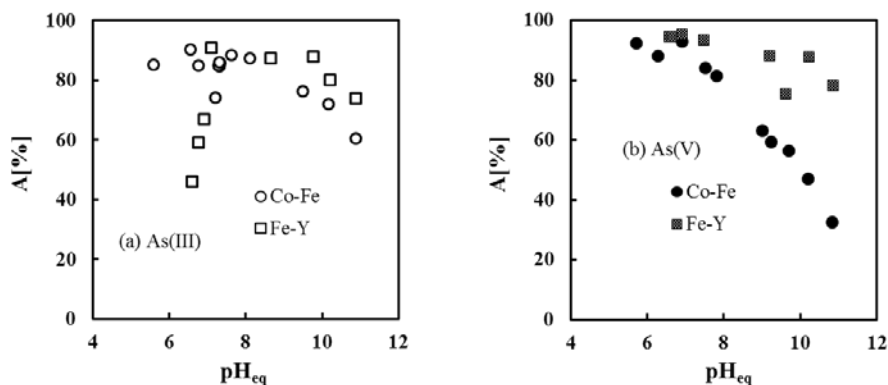


Fig.1 Effect of pH on adsorption percentage of (a) As(III) and (b) As(V) with Co-Fe and Fe-Y.

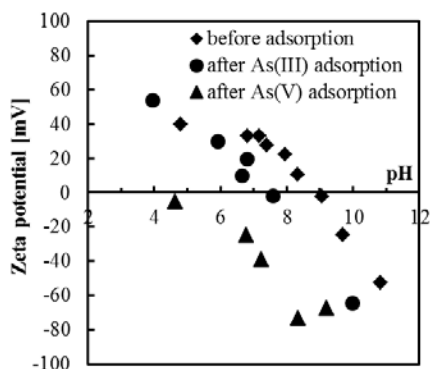


Fig.2 Effect of pH on zeta potential before and after As(III,V) adsorption with Co-Fe.

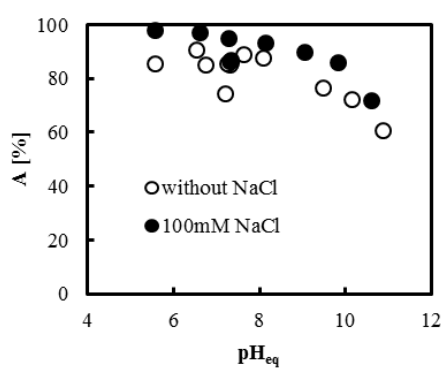


Fig.3 Effect of NaCl on adsorption of As(III) with Co-Fe.

Adsorption properties of As(III) and As(V) using magnetic nanoparticles

Kaoru Ohe, Masaya Sugimoto, Amu Wakamatsu, Tatsuya Oshima, Yoshinari Baba
Faculty of Engineering, University of Miyazaki

Magnetic nanoparticles, Co-Fe and Fe-Y were prepared to remove As(III) and As(V) from contaminated water. The nanoparticles adsorbed As(III) and As(V) more than 80% from water in $7 < \text{pH} < 9$. After the adsorption of As(III) and As(V), the zeta potential decreased and the point of zero charge (PZC) of Co-Fe shifted to the acidic side. The adsorptions of As(III) and As(V) did not decrease even in the presence of 100 mM NaCl. Therefore it appears that the adsorption mechanism of As(III) and As(V) using Co-Fe is due to the inner-sphere complex formation.

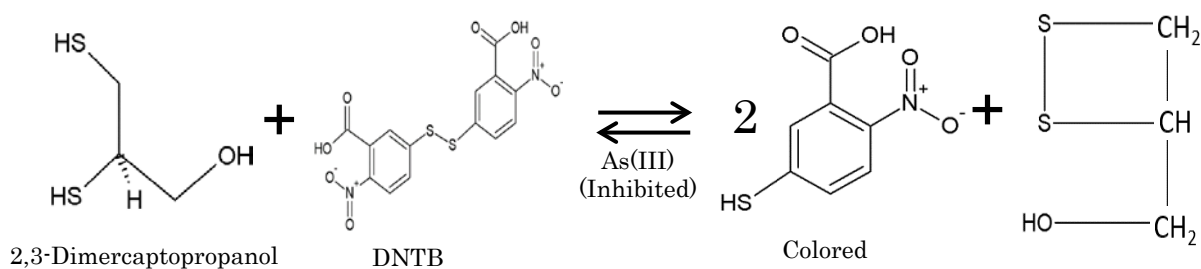
治療薬を用いた 3 価無機ヒ素の新規比色分析法に関する研究

○間中 淳, 恒川はるか, 高松さおり, 袋布昌幹
富山高等専門学校 物質化学工学科

1 はじめに

3 価の無機ヒ素(以下 As(III))はその毒性の高さから国内外において迅速・簡便に行える分析法が求められている。これまで有効な現場分析法として、モリブテンプルー比色法があるが、感度の低さや共存するりん酸イオンにおける妨害が課題となっていた。また、りん酸イオンの妨害を防ぐ方法として、水素化ヒ素法があるが、この手法は有毒なアルシン酸を発生させる必要があり、安全性の面において課題が残されていた。

演者らは、ヒ素中毒の治療薬として用いられているジチオール化合物である 2,3-ジメルカプトプロパノール(BAL)がヒ素との強い結合力を有することに着目した。りん酸緩衝液中で BAL がチオール化合物の比色試薬である 2,3-ジメルカプトプロパノールがチオール化合物の比色試薬である 5-(3-Carboxy-4-nitrophenyl)disulfanyl-2-nitro benzoic acid (DNTB)で発色することから、この呈色反応において As(III)を共存させると、その濃度に応じて色調が退色し、それによりヒ素濃度の比色分析が可能となると期待される。本報では、これらの知見に基づき、2,3-ジメルカプトプロパノールと DNTB を用いたりん酸イオンの影響を受けにくい新しい As(III)の比色分析法の構築を目的に検討を行った結果を報告する。



2 方法

試料溶液 3mL に 1×10^{-4} mol/L の BAL 3mL および 1×10^{-2} mol/L りん酸緩衝液 2mL, 純水 5mL を順次加える。この混合溶液 3mL に対して 1×10^{-2} mol/L DNTB 水溶液を 0.02 mL を加えた後、412 nm における吸光度を測定した。

3 結果および考察

試料濃度に応じて DNTB と BAL の呈色反応の色調が退色することが観察され、

Fig.1 に示すように 412 nm における吸光度の減少が見られた。本法により 0.1~2 mg/L の As(III) の定量が可能であり、検量線中央値における相対標準偏差は 8.8% であった。また、本法に対して 1~1000mg/L のりん酸イオンを共存させても測定値に変動は見られなかった。本法は、モリブテンプルー法よりも感度が高く、前処理なしにりん酸イオンの影響を受けないことから、現場分析法としての有用性が期待される。

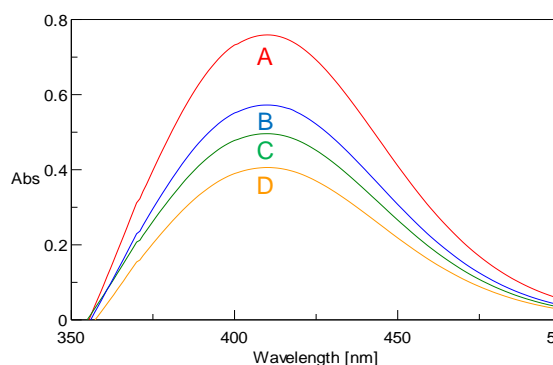


Fig.1 Absorption spectrum with trivalent inorganic arsenic [As(III)] = A: 0, B: 0.1, C: 1.0, D: 2.0 mg/L

New type Color Analysis for Trivalent Inorganic Arsenic using Therapeutic Agent

Atsushi Manaka, Haruka Tsunekawa, Saori Takamatsu, Masamoto Tafu
National Institute of Technology, Toyama College

Development of simple analysis for trivalent inorganic arsenic ion (As(III)) is desired because of its high toxicity. One of the effective simple analysis of As(III) is molybdenum blue colorimetry method. However, this method does not have satisfaction sensitivity, and phosphate ion interferes strongly against this color reaction. Arsenic hydride method is also useful method under presence of phosphate ion, but, this method generate toxic gas in procedure.

2,3-Dimercaptopropanol which is dithiol compound strongly bond with arsenic ion and widely used for therapeutic agent for arsenic poisoning. Concentration of 2,3-Dimercaptopropanol is able to analyzed by colorimetric method by using 5-(3-Carboxy-4-nitrophenyl) disulfanyl-2-nitrobenzoic acid (DNTB) which is color reagent for thiol compounds in phosphate buffer. Under presence of As(III), the color reaction is strongly interfered. Based on these findings, objective of this study is development of new type of color analysis for As(III) with 2,3-Dimercaptopropanol and DNTB.

As a result, absorbance at 412 nm was decreased with As(III) concentration, and 0.1 to 2 ppm of arsenic was able to be determined by the proposed method. The analytical result was not interfered by presence of 1000 mg/L of phosphate ion.

亜ヒ酸によるリボース-5-リン酸合成に関わる遺伝子群の発現抑制

中野 毅、○高橋 勉、藤原泰之
東京薬科大学薬学部・公衆衛生学

1. はじめに

我々は亜ヒ酸の毒性発現に関わる分子メカニズムを明らかにするため、真核生物モデルとして有用な出芽酵母を用いて、亜ヒ酸に対する感受性決定に関わる遺伝子群の検索を行い、欠損によって亜ヒ酸毒性を増強させる遺伝子としてペントースリン酸経路 (pentose phosphate pathway: PPP) に関わる遺伝子を複数同定している。ペントースリン酸経路は NADPH の産生や核酸合成に必要な糖の相互変換において重要な役割を果たすことが知られているが、亜ヒ酸毒性との関係については検討されていない。我々は、酵母において、亜ヒ酸がペントースリン酸経路に関わる遺伝子群の発現を抑制し、細胞毒性を示すことを明らかにしているが、ヒト細胞を用いた検討はされていない。本研究では、ヒト単球系 THP-1 細胞を用いて、亜ヒ酸毒性とペントースリン酸経路との関係について検討した。

2. 方法

THP-1 細胞の亜ヒ酸に対する感受性: THP-1 細胞を亜ヒ酸存在下で 24 時間培養後、Cell counting kit-8 を用いて細胞生存率を測定した。亜ヒ酸が PPP 関連因子の mRNA レベルに与える影響: 亜ヒ酸存在下 24 時間培養した THP-1 細胞から RNA を抽出し、PPP 関連因子の mRNA レベルをリアルタイム PCR 法によって測定した。亜ヒ酸が PPP 関連因子のタンパク質レベルに与える影響: 亜ヒ酸存在下 24 時間培養した THP-1 細胞における PPP の非酸化的段階関連因子 (Ribose 5-Phosphate Isomerase A: RPIA) のタンパク質レベルを抗 RPIA 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって測定した。

3. 結果および考察

亜ヒ酸がペントースリン酸経路関連遺伝子の発現レベルに及ぼす影響を検討したところ、NADPH の産生に関わる酸化的段階関連遺伝子 (PGLS および PGD) の mRNA 発現レベルはほとんど影響を受けなかった。一方、核酸合成に必要な糖の相互変換に関わる非酸化的段階関連遺伝子 (RPIA および TKT) の発現レベルは亜ヒ酸濃度依存的に低下した。また、RPIA に関しては、亜ヒ酸処理によってタンパク質レベルが低下することも確認された。非酸化的段階の主代謝物リボース-5-リン酸の前駆体である D-リボースを培地中に添加することによって亜ヒ酸毒性が顕著に減弱されることが明らかにな

った。一方、D-グルコースの添加は亜ヒ酸感受性にほとんど影響を与えなかったことから、亜ヒ酸毒性軽減作用はすべての糖に共通した作用ではなく、D-リボース特異的な作用である可能性が考えられる。以上の結果から、ヒト単球系 THP-1 細胞において、亜ヒ酸がペントースリン酸経路の非酸化の段階関連因子の発現を抑制することによって細胞の生存に必須なリボース-5-リン酸の細胞内レベルを低下させ、細胞毒性を発現させる可能性が考えられた。

Arsenite suppresses expression of genes involved in synthesis of ribose-5-phosphate in human acute monocytic leukemia THP-1 cells

Tsuyoshi Nakano, Tsutomu Takahashi, Yasuyuki Fujiwara

Department of Environmental Health, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Arsenic is a hazardous element that exists widely in the environment. Health hazards caused by arsenic pollution of ground water have been issues of global concern, especially in Southeast Asia. However, the detailed mechanisms that mediate arsenic toxicity remain unclear. In an effort to identify novel mechanisms responsible for toxicity of arsenite, we have searched for genes conferring cellular sensitivity against arsenite using budding yeast as a model eukaryote, and found that repression of genes involved in pentose phosphate pathway (PPP) increased sensitivity of yeast cells to arsenite. In this study, we found that arsenite repressed expression of genes involved in non-oxidative branch of PPP, which is important for generating ribose-5-phosphate in human acute monocytic leukemia THP-1 cells. We also found that addition of D-ribose, a precursor of ribose-5-phosphate, to culture medium decreased the toxicity of arsenite in THP-1 cells. These results suggest that arsenite might inhibit synthesis of ribose-5-phosphate through repression of genes involved in non-oxidative branch of PPP.

ジメチルチオヒ素化合物の毒性発現におけるグルタチオンの役割

○下田康代¹, 黒澤英俊^{1,2}, 加藤孝一¹, 畑 明寿³, 圓藤陽子⁴, 圓藤吟史⁵, 山中健三¹
¹ 日本大学薬学部, ² 警視庁科学捜査研究所, ³ 千葉科学大学危機管理学部,
⁴ 圓藤労働衛生コンサルタント事務所, ⁵ 労働科学研究所

1 はじめに

ジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA^V)の細胞毒性は GSH の存在により増強されることが報告されている^[1]が、その機構の詳細は明らかではない。我々はこれまで、DMMTA^Vは GSH と反応し、DMMTA^V 曝露による毒性の本体と推定されているジメチル亜ヒ酸(DMA^{III})のみならず、ジメチルメルカプトアルシンおよび近年生理活性物質として注目されている硫化水素(H₂S)などの SH donor が生成することを報告している^[2]。そこで今回、ヒト肝腫瘍(HepaRG)細胞を用い、DMMTA^V 曝露による毒性発現についてアポトーシスの誘発およびその関連酵素であるカスパーゼを中心に検討し、DMMTA^Vの毒性発現における GSH の役割について考察した。

2 方法

DMMTA^Vの毒性発現における細胞内 GSH の寄与

HepaRG 細胞に 1 mM L-buthionine sulfoximine (BSO)を 6 時間処理して細胞内 GSH 濃度を低下させた後、DMMTA^V を 24 時間 (37°C, 5% CO₂)曝露した。曝露後、細胞生存性を WST-8 法 (Cell Counting Kit-8, Dojindo)および細胞内 ATP 量の測定(CellTiter-Glo, Promega)により評価した。

DMMTA^V曝露によるアポトーシスの誘導およびその機序

HepaRG 細胞に DMMTA^Vあるいはその代謝物であるジメチル亜ヒ酸-グルタチオン抱合体(DMA^{III}-SG)を曝露し、アポトーシスの誘発についてアガロースゲル電気泳動法を用いた DNA 断片化によって検出した。次に、アポトーシス誘発機序を検討するため、細胞生存性とカスパーゼ 3/7 活性との関係を ApoLive-Glo (Promega)を用いて調べ、さらにカスパーゼ-8 および 9 活性を Caspase-Glo (Promega)で測定した。

3 結果および考察

細胞内 GSH 濃度を減少させた HepaRG 細胞では、DMMTA^V曝露による細胞生存性の低下が抑制され、GSH の存在による DMMTA^V 毒性の増強が示唆された。

次いで、細胞内 GSH 濃度が維持された細胞に DMA^{III}-SG、DMMTA^Vを曝露したところ、ともにアポトーシスに伴う DNA ラダーが検出された。このとき、いずれの化合物においてもカスパーゼ 3/7 活性の増大が見られた。また、DMMTA^V曝露においては、細胞生存性同様に、細

胞内 GSH 濃度の減少によりカスパーゼ 3/7 活性が抑制された。さらに、DMMTA^Vならびに DMA^{III}において、カスパーゼ 3/7 の活性化に関与するカスパーゼ-8 および 9 の活性測定を行った結果、カスパーゼ-9 活性は DMA^{III}、DMMTA^Vともに僅かに増加した。一方、カスパーゼ-8 は DMMTA^V曝露時のみ活性が増加した。

併せて、DMMTA^V のさらなる代謝過程で生成する化合物の影響について検討するため、DMA^{III}に対し H₂S を同時に曝露したところ、DMA^{III}の細胞毒性およびカスパーゼ活性はいずれも H₂S により抑制される傾向が見られた。

以上のことから、DMMTA^V の毒性発現において、細胞内 GSH 濃度は深く関与しており、DMMTA^Vより代謝生成する DMA^{III} が毒性発現機構において主要な役割を果たしていることが示唆された。加えて、ジメチルヒ素化合物の毒性発現には、代謝過程で生成する DMA^{III}のみならず DMMTA^Vの多様な代謝生成物が寄与しており、DMMTA^Vは DMA^{III}と異なるアポトーシス誘発機構を有する可能性が示唆された。

参考文献

- [1] Ochi T et al., Toxicol Appl Pharmacol 228 (2008) 59-67.
- [2] Kurosawa H et al., J Trace Elem Biol 33 (2016) 87-94.

Metabolic activation associated with glutathione in dimethylmonothioarsinic acid-induced toxicity

Shimoda Y¹, Kurosawa H^{1,2}, Kato K¹, Hata A³, Endo Y⁴, Endo G⁵, Yamanaka K¹

¹School of Pharmacy, Nihon University, ²Criminal Investigation Laboratory, Metropolitan Police Department, ³Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, ⁴Endo Occupational Health Consultant Office, ⁵The Institute for Science Labour

An ultimate substance in DMMTA^V-induced toxic actions is estimated to be DMA^{III} that is produced in the metabolic redox of DMMTA^V. With regards to the DMA^{III} toxicity, the apoptosis induced via oxidative stress has been proposed. However, the details are not fully understood. The present study suggests the possibility of a new mechanism of apoptosis by DMMTA^V.

In vitro および in vivo で乳がん細胞 MDA-MB-231 に対する As^{III} とテトランドリンの単独・併用による抗腫瘍活性

○王 瀟¹, 姚 明江^{1,2}, 袁 博¹, 林 秀樹¹, 高木 教夫¹

¹東京薬科大学・薬学部・応用生化学教室 ²中国中医科学院 西苑医院

1 はじめに

乳がんは世界中の女性においてよく報告されているがんであり、安全かつ効果のある治療薬の開発が強く求められている。Arsenite (As^{III})は再発性・難治性急性前骨髄球性白血病患者 (APL) の治療薬として用いられるが、その臨床応用の拡大が耐性および副作用により制限されている。漢方薬である粉防己 (ふんぼうい) 由来のテトランドリン (Tetra) はアルカロイドの一種であり、中国において臨床で抗炎症薬や抗利尿薬として使われている一方、がん細胞に対する殺細胞作用も報告されている。そこで、本研究は乳がん細胞 MDA-MB-231 およびその担がんモデルに対する As^{III} 単独および Tetra との併用による抗腫瘍効果と、そのメカニズムを調べることを目的とした。

2 方法

XTT および colony formation assay を用い、細胞増殖抑制効果を検討した。FACS と LDH アッセイにより細胞周期と細胞毒性誘導を検討した。Western blot および qPCR 法により、オートファジーおよび細胞周期に関連する遺伝子発現を評価した。MDA-MB-231 の担がんマウス腹腔内に薬物 As^{III} (2 mg/kg) と Tetra (20 mg/kg) をそれぞれ単独および併用で 1 日 1 回、11 週間連続投与し、継時的に腫瘍体積・動物体重を計量した。投与期間終了後の腫瘍重量も計量した。

3 結果および考察

MDA-MB-231 細胞における As^{III}、Tetra 単独処理による濃度依存的な殺細胞作用が観察され、両薬剤の併用により殺細胞作用の増強が認められた。また、両薬剤単独処理と比較し、併用処理では細胞周期に密接に関わる p21、p27 の発現がより強く誘導された。As^{III}、Tetra 単独・併用処理によるオートファジーの誘導、そして両薬剤による細胞毒性がオートファジーインヒビターである wortmannin の存在下で顕著に抑制されることが観察された。さらに、両薬剤の担がんマウス腹腔内への投与により、腫瘍増殖に対する抑制効果が観察されるとともに、投与群と非投与群の動物体重に明らかな変化はなかった。以上のことから、As^{III}、Tetra の併用投与は、乳がん治療に対する有望な治療法であることが示唆された。また、両薬剤の抗腫瘍活性に、オートファジー細胞死の誘導および細胞周期の arrest が関与することが考えられた。

Antitumor activity of arsenite and tetrandrine, alone and in combination, against breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro and in vivo

Xiao Wang¹, Mingjiang Yao^{1,2}, Bo Yuan¹, Hideki Hayashi¹, and Norio Takagi¹

¹ Department of Applied Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy & Life Sciences.

² Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences.

【Background and Aims】Breast cancer is an alarmingly common and serious health concern for women worldwide and efficient anti-tumor drugs with low toxicity is urgently needed. Arsenite (As^{III}) has been used to treat acute promyelocytic leukemia successfully, but its resistance and side effects limit its use, thus attempts have been made in drug combinations to overcome these deficits. Tetrandrine (Tetra), derived from *Stephania tetrandra*, has recently been reported to possess tumoricidal activity. The current study aimed to investigate the antitumor activity of As^{III} and Tetra, alone and in combination, using human triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 and its xenografts.

【Methods】 Cell growth inhibition was assessed by XTT assay and colony formation assay. Cell cycle arrest and cytotoxicity were analyzed by FACS and LDH assay, respectively. Effects of these reagents on the expression of genes related to autophagy and cell cycle arrest were investigated by quantitative real-time PCR and/or western blot. Xenografted mice received intraperitoneal once-daily dose of 2 mg/kg As^{III} and 20 mg/kg Tetra, alone or in combination, for 11 weeks, and the tumor volumes and body weight were monitored every day.

【Results and Discussion】 Dose-dependent cytotoxic effects were observed in MDA-MB-231 cells when treated with various concentrations of As^{III} or Tetra, and enhanced cytotoxic effects were further observed in their combination. The expression of p21 and p27 closely related to cell cycle arrest was upregulated by the treatment of As^{III} and Tetra, alone and in combination. Intriguingly, autophagy induction, and an abrogation of the combinatorial treatment-triggered cytotoxic effects by autophagy inhibitor, wortmannin, was observed in the treated cells. Importantly, in vivo study revealed that administration of As^{III} combined with Tetra resulted in a clear reduction in tumor growth in MDA-MB-231 xenografts without no alteration in the body weight between treated and untreated groups. These results suggest that combined application of As^{III} and Tetra is a potential therapeutic strategy in breast cancer, and that the antitumor activities of these reagents are partially attributed to their capability to induce autophagic cell death as well as the cell cycle arrest.

Coriandrum sativum L.葉抽出液中の脂肪族親電子物質による Nrf2 活性化および無機三価ヒ素の細胞毒性軽減

○安孫子ユミ¹、溝河真衣²、里美綾香³、熊谷嘉人^{1,2,3}

¹筑波大学医学医療系、²筑波大学大学院生命環境科学研究科、³筑波大学大学院ヒューマンバイオロジー学位プログラム

1 はじめに

香菜やパクチーと呼ばれる *Corianderum sativum* L. (*C.sativum*, CSL) の葉は、独特の芳香を有し、東南アジアを始めとする世界中の国々で広く摂取される。CSL 抽出液 (CSLE) は、第二相薬物代謝酵素群および第三相トランスポーター群を包括的に制御するため生体防御応答に重要な転写因子 Nrf2 を活性化するという報告はあるが、如何なる成分が本活性化に重要であるか不明である。また、当研究室の先行研究において、本システムの活性化が無機三価ヒ素 (iAsIII) の細胞毒性を軽減することを見出している。Nrf2 は、それを負に制御する Keap1 が親電子物質により修飾を受けると活性化することから、CSLE 中の親電子物質が本活性化に重要な役割を示し、本活性化を介して無機三価ヒ素の毒性を軽減すると想定される。そこで、本研究では、CSL 中の Nrf2 活性化成分を UPLC-MS^E 解析で同定し、無機三価ヒ素に対する細胞保護効果を示すことを目的とした。

2 方法

細胞：ヒト肝芽腫由来 HepG2 細胞を用いた。CSLE および脂肪族親電子物質へ曝露する 24 時間前に血清不含培地に交換した。CSLE の抽出および分取：ヘキササン抽出画分を分取用液体クロマトグラフィーで分離した。脂肪族親電子物質の同定：CSLE に含有されるアルデヒド基を DAIH で誘導体化し UPLC-MS^E 解析を行った。Keap1 への親電子修飾：細胞内および精製 Keap1 タンパク質への親電子修飾をビオチンマレイミド標識法 (BPM 法) により検出した。Nrf2 活性化および下流タンパク質の発現：ウエスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法にて検出した。細胞毒性：MTT 法で測定した。細胞内ヒ素濃度の測定：ICP-MS (ELAN DRC-e, Perkin Elmer 社) を用い、平野ら (Hirano S et al, Arch Toxicol, 2003) の方法に従った。

3 結果および考察

HepG2 細胞を CSLE に曝露した結果、Nrf2 の活性化が見られた。CSLE 中の Nrf2 活性化成分を同定するために、CSLE を分取用液体クロマトグラフィーにて I~V 分画に分離し、各分画に HepG2 細胞を曝露したところ、何れの分画でも Nrf2 の活性化が

見られた。この結果を支持するように、Iを除く何れの分画にも α, β 不飽和アルデヒド構造を持つ2-alkenalを基本骨格としたC₁₀~C₁₃の炭素数の異なる脂肪族親電子物質が含まれていたことが明らかになった。さらに、CSLEの構成比において主要な成分である(*E*)-2-decenal (C₁₀)と(*E*)-2-dodecenal (C₁₂)にHepG2細胞を曝露したところ、曝露濃度依存的なNrf2の活性化およびHO-1の誘導が認められた (Abiko Y et al, *J Agric Food Chem* 62, 10936-10944, 2014)。次に、CSLEおよび本脂肪族親電子物質は無機三価ヒ素の毒性を軽減するか否かを検討したところ、CSLEおよび本脂肪族親電子物質の前処理群は、対照群と比較して無機三価ヒ素による細胞毒性を有意に軽減した。

今回の検討から、*C. sativum*は、Nrf2活性化能を有する(*E*)-2-decenalや(*E*)-2-dodecenalのような2-アルケナールを基本骨格とした炭素数の異なる複数の脂肪族親電子物質を含有する植物であることが分かった。また、本研究で用いたUPLC-MS^E解析およびNrf2活性化の検討により、植物中の脂肪族親電子物質を容易に探索することが可能である。Nrf2の活性化は、無機三価ヒ素の解毒・排泄に関与する下流遺伝子群の発現を誘導することが知られている。CSLEおよび本脂肪族親電子物質は、本転写因子の活性化を介して無機三価ヒ素の解毒・排泄を促進することで、本細胞毒性を軽減するのかもしれない。

Nrf2 activation and protection from arsenite-induced toxicity by electrophiles
from *Coriandrum sativum* L. leaf extract in HepG2 cells

Yumi Abiko¹, Mai Mizokawa², Ayaka Satomi³, Yoshito Kumagai^{1,2,3}

¹Faculty of Medicine, University of Tsukuba

²Masters Program in Environmental Sciences, Graduate School of Environmental Sciences, University of Tsukuba

³Leading Graduate School Doctoral Program, PhD Program in Human Biology, University of Tsukuba

We found that there are aliphatic electrophiles, which possess different carbon number with α, β -unsaturated aldehyde moiety, such as (*E*)-2-decenal or (*E*)-2-dodecenal that can activate Nrf2 and reduce arsenic-induced cytotoxicity in *Coriandrum sativum* L. leaf extract.

ヒ素等有害重金属の淡水生物への生態影響に対する共存物質の影響

○中島常憲, 本村知寛, 杉本貴哉, 高梨啓和, 大木 章
鹿兒島大学大学院理工学研究科

1 はじめに

近年環境負荷低減の観点から、様々な廃棄物や未利用資源を原料とした再資源化材料が開発されており、その環境影響を評価して利用していく必要がある。再資源化材料の環境影響は、有害元素の含有量や溶出試験で評価されるが、オオミジンコ(*D. magna*)やヒメダカ(*O. latipes*)等の水生生物に対する生態影響についても評価すべきである。有害元素の生態影響は米国、EU等の様々な機関がデータベース化し公開しているが、再資源化材料などの生態影響について、具体的に評価する手法は確立されていない。このような材料の生態影響評価法を確立するには、試験における硬度や共存化学種の影響を明らかにする必要がある。本研究では、オオミジンコやヒメダカを用いる重金属の生態影響試験において共存化学種の影響を検討した。

2 方法

オオミジンコを用いる生態影響試験は OECD テストガイドライン 202 に記載されている方法に準拠して行い、遊泳阻害を受けた個体の割合により各重金属の暴露濃度（半数遊泳阻害濃度; EC₅₀[mg/L]）を算出し評価した。試験水は、ISO6341 に記載の人工調製水（以下 I 培地とする）を使用した。ヒメダカを用いる生態影響試験は OECD テストガイドライン 203 に記載されている方法に準拠して行い、同様に重金属の半数致死濃度; LC₅₀[mg/L]を算出し評価した。試験水には脱塩素水を使用した。

3 結果および考察

3.1 試験培地硬度および配位性化合物共存の影響

重金属のオオミジンコ急性毒性に対する培地硬度の影響を検討した結果を表 1 に示す。水相中でカチオン種として存在する Cu(II)、Pb(II)では、試験培地硬度が高くなるにつれて急性毒性が低減する傾向がみられた。カチオン種として存在する元素は、Ca チャネル等を介して生体内へ取り込まれるため影響を受けたと考えられる。また水相中でアニオン

表1 オオミジンコ急性毒性に対する培地硬度の影響

元素	水相での化学形態	硬度 [mg-CaCO ₃ /L]	
		250	70
		EC ₅₀ [mg-Metal/L]	
Cu(II)	Cu ²⁺	0.02	0.006
Pb(II)	Pb ²⁺	1.32	0.28
Hg(II)	Hg ²⁺	0.0028	0.0044
Sb(III)	-	4.7	4.1
Sb(V)	Sb(OH) ₆ ⁻	570	417
As(V)	HAsO ₄ ²⁻	2.5	2.75
Se(VI)	SeO ₄ ²⁻	1.2	1.7

種として存在する As(III), As(V)等は、培地硬度の影響をほとんど受けなかった。また水相に、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ニトリロ酢酸 (NTA)、イミノ二酢酸 (IDA) クエン酸といった配位性化合物を共存させた場合、Cu(II)、Zn(II)についてオオミジンコ急性毒性の低減が見られたが、As(V)や Se(VI)の場合は急性毒性に明確な変化はみられなかった。Cu(II)等は、EDTA 等と錯形成し生体への取り込み量が減少すると考えられるが、As(V)や Se(VI)は、水相中でオキソアニオンとして存在しているために、錯形成せずに生物体内への取込量に変化がなかったと考えられる。

3.2 水相に共存するアニオン種の影響

As(V)のヒメダカ急性毒性に対する Cl⁻, Br⁻, I⁻ 等のアニオン種の影響について検討した。図 1 に示すように、これらのアニオン種が共存すると As(V)の急性毒性が減少した。Sb(III)に対して同様の検討を行ったところ、同じようにアニオン種の共存により急性毒性が低減した。水中でオキソアニオン種として存在している As(V)や Sb(III) が水生生物体内にアニオンチャンネル等を介して生体内に取り込まれる際に、共存アニオン種と競合するためと考えられる。共存アニオン種により効果が異なるのは共存アニオン自身の毒性が関係すると思われる。

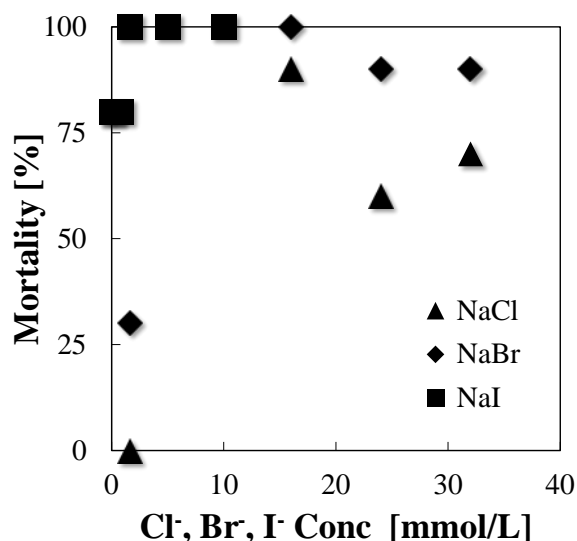


図1 As(V)のヒメダカ急性毒性に対するCl⁻, Br⁻, I⁻共存の影響; As(V)暴露濃度25 mg/L

Influence of coexisting compounds onto ecotoxicity of arsenic and other hazardous heavy metals for fresh water organisms

Tsunenori Nakajima, Tsunenori Nakajima, Tomohiro Motomura, Takaya Sugimoto,
Hirokazu Takanashi, and Akira Ohki
Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

Arsenic and other heavy metals show toxicities for freshwater organisms and the toxicity is influenced by the presence of coexisting compounds. In this study, the influence of hardness of medium, the presence of chelators and anion species on the ecotoxicity of arsenic and other hazardous heavy metals for fresh water organisms was examined. The acute toxicities of As(III) and Sb(III) which exists oxoanion species decreased with the presence of Cl⁻, Br⁻, and I⁻ anion. By contrast, hardness of medium and the presence of chelators affected to the acute toxicities of Cu(II) and other cationic elements for fresh water organisms, such as *D. magna* and *O. latipes*.

コメのヒ素濃度は OsPCS1 によって制御される

林晋平^{1,2}、倉俣正人¹、安部匡¹、高木宏樹^{3,4}、○石川覚¹

¹農研機構農環研、²農研機構生物機能部門、³岩手生工研、⁴石川県立大

1 はじめに

コーデックス委員会において、コメに含まれる無機ヒ素の最大基準値が議論され、2014年7月に精米は0.2 mg/kgに、本年6月に玄米は0.35 mg/kgになることが決定した。しかし玄米に関しては、ヒ素の汚染防止及び低減のための実施規範を実行して3年後に、その時点での実態データに基づいて、基準値を引き下げるための検討を行うという条件付きであるため、コメのヒ素濃度の低減化は農業生産上必須の課題と言える。

我々は、2年前の本シンポジウムにおいて、コシヒカリ変異体から玄米ヒ素濃度が著しく上昇した2個体 (*has-kmt1* と *has-kmt2*) を選抜し、*has-kmt1* は *OsABCC1* 遺伝子の変異であることを発表した。今回、*has-kmt2* 変異体の原因遺伝子がファイトケラチン (PC) 合成酵素遺伝子の一つである *OsPCS1* であることを突き止め、玄米のヒ素集積における *OsPCS1* の機能について解析したので、報告する。

2 方法

has-kmt2 の原因遺伝子を特定するため、ハバタキと交配した F2 個体を利用して map-based cloning を行った。加えて *has-kmt2* の全ゲノムシーケンスを行い、両結果を基に原因遺伝子 (*OsPCS1*) を特定した。PCS 遺伝子はイネに2つ (*OsPCS1* と *OsPCS2*) 存在するため、ネイティブプロモーターもしくは 35S プロモーターで野生型の *OsPCS1* と *OsPCS2* を *has-kmt2* で発現させた組換え個体を作製し、相補性試験を行った。さらに *OsPCS1* と *OsPCS2* の分子機能の違いを調べるため、大腸菌の組換えタンパク質を用いた PC 合成アッセイ試験を行った。

3 結果および考察

has-kmt2 ゲノムの全シーケンス決定により *OsPCS1* に3塩基の欠失が見つかった。植物の PCS オルソログと配列を比較したところ、この変異部位は高度に保存されており、PCS の機能に重要であると考えられた。ネイティブプロモーターで *OsPCS1* を発現させた株は、玄米へのヒ素集積がコシヒカリと同レベルになったことから、*has-kmt2* の原因遺伝子が *OsPCS1* であることが立証できた。一方、同じプロモーター制御下で *OsPCS2* を発現させた株はヒ素の蓄積に変化がなかった。また、予備的ではあるが、35S プロモーター制御下で *OsPCS1* を高発現させた株は、玄米へのヒ素集積が減少した。組換えタンパク質を用いた PC 合成アッセイ試験において、*OsPCS1* の PC 合

成能はカドミウムよりもヒ素の存在によって強く誘導された。以上の結果、2つの PCS のうち OsPCS1 が玄米のヒ素集積抑制に極めて重要であることがわかった。

OsPCS1 controls As concentration in rice grains.

Shimpei Hayashi^{1,2}, Masato Kuramata¹, Tadashi Abe¹, Hiroki Takagi^{3,4},

Satoru Ishikawa¹

¹Institute for Agro-Environmental Sciences, NARO, ²Institute of Agrobiological Sciences, NARO, ³Iwate Biotechnology Research Center,

⁴Ishikawa Prefectural University,

International criteria for inorganic As in rice grains has been decided to be 0.2mg/kg in polished rice and 0.35mg/kg in unpolished rice by the Codex. Because several percentages of rice produced in Japan exceeded the level of As, it is urgent matter to reduce As concentration in rice grains. We previously screened two high-As rice mutants (named *has-kmt1* and *has-kmt2*) and presented that *has-kmt1* is the mutation of *OsABCC1*, which encodes ABC transporter responsible for the vacuolar sequestration of As. In this meeting, we report that the mutation of *OsPCS1* is responsible gene for *has-kmt2* and discuss its roles for As reduction in rice grains.

ベトナムの地下水ヒ素汚染地域住民の影響評価：第2報

○阿草哲郎¹, 江口哲史², 國頭 恭³, Tue, N.M.⁴, Lan, V.T.M.⁵, Minh, T.B.⁶, Trang, P.T.K.⁵,
高橋 真⁷, Viet, P.H.⁵, 田辺信介⁴, 岩田久人⁴

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

1 はじめに

地下水のヒ素汚染は世界各地で大きな問題となっている。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。一方で、ヒ素曝露による健康影響のメカニズムの解明が課題となった。

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、本アプローチは化学物質による影響評価や新規バイオマーカー特定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いくつか実施されているが、ヒトを対象とした研究例はほとんどない。そこで我々は、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様々な代謝物を分析し、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てきた。本発表では、昨年度の当学会で発表した内容に新たなデータを追加し、第2報として報告する。

2 試料および方法

2006~2008年、ベトナム北部・Red River Deltaの集落において、地下水と地域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ている。採取した試料は、愛媛大学沿岸環境科学研究センター(CMES)の生物環境試料バンク(es-BANK)にて-25℃保存した。

地下水中総ヒ素はICP-MSで、ヒト尿中ヒ素化合物(亜ヒ酸(As[III])、ヒ酸(As[V])、モノメチルアルソン酸(MMA)、ジメチルアルシン酸(DMA)、アルセノベタイン(AB))はHPLC/ICP-MSでそれぞれ定量した。ヒト尿中の代謝物はHILIC-MS/MSを用いて測定し、ヒ素およびヒ素化合物濃度との関係を解析した。

3 結果および考察

分析の結果、本研究対象地域の地下水中ヒ素濃度は、<0.1–502 µg/Lであった。一部の地

下水から WHO の飲料水の安全基準値(10 µg/L)を超える濃度のヒ素が検出されており、飲用には不適切であることが確認された。また、地域住民の尿中総ヒ素化合物濃度は 20.0 – 397 µg/g creatinine であり、飲用水中ヒ素濃度とヒト尿中、DMA、MMA、無機ヒ素(As[III] + As[V])濃度の間には、それぞれ有意な正の相関関係が得られた。このことから、地下水の飲用を介した地域住民のヒ素曝露が示唆された。

ヒト尿を用いたメタボローム解析では、263 代謝物中 180 代謝物を検出することができた。その中でも、methionine sulfoxide、S-methyl-5-thioadenosine、fructose-1,6-bisphosphate、phosphoenolpyruvate、indoleacrylic acid は、DMA、MMA、As[III]と有意な負の相関を示したのに対し、As[V]とは正の相関を示した。また、全体として ABC トランスポーター系に関与する代謝物がヒ素曝露によって有意に変動しており、ヒ素の輸送・排泄への関与が示唆された。

Health assessment of residents from arsenic-contaminated groundwater areas in Vietnam by using metabolome analysis: The 2nd report

Tetsuro Agusa¹, Akifumi Eguchi², Takashi Kunito³, Nguyen Minh Tue⁴,
Vi Thi Mai Lan⁵, Tu Binh Minh⁶, Pham Thi Kim Trang⁵, Shin Takahashi⁷,
Pham Hung Viet⁵, Shinsuke Tanabe⁴, Hisato Iwata⁴

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

To assess the health effects by As exposure, this study performed metabolome analysis in residents from As-contaminated groundwater areas in Vietnam. Total As concentration in groundwater was in the range of <0.1 – 502 µg/L. Concentrations of dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid (MMA), inorganic As (arsenite (As[III]) + arsenate (As[V])) in human urine were positively correlated with total As levels in the groundwater, indicating that groundwater is the significant source of As exposure for local residents. Metabolome analysis revealed that urinary methionine sulfoxide, S-methyl-5-thioadenosine, fructose-1,6-bisphosphate, phosphoenolpyruvate, and indoleacrylic acid showed negative correlations with urinary DMA, MMA, and As[III], while the opposite trend was observed for As[V]. Furthermore, metabolites related to ABC transporter were significantly varied in residents from As-contaminated groundwater areas, suggesting significant transportation or excretion of As by the exposure.

中国の風土病としての慢性砒素中毒のフィールド調査 20年

○吉田貴彦¹, 山内 博²

¹旭川医科大学・医学部, ²聖マリアンナ医科大学・医学部

1 はじめに

演者らは、中国医科大学のグループと 1996 年から中国各地で慢性砒素中毒のフィールド調査を行ってきた。調査地域は内モンゴル、山西、遼寧、湖南、貴州と広範である。中毒発生原因は、①天然に砒素汚染された地下水の飲用による、②高砒素含有石炭の燃焼による室内空気汚染を介するなど一般住民に起こったもの、③砒素鉱山での粉塵や鉱石中砒素の精錬ヒュームへの職業性曝露と多様である。2016 年の調査から 20 年が経過した。そこで演者らが関わってきた慢性砒素中毒につき、その特徴を報告する。

2 中国における慢性砒素中毒の特徴

中国農村部では長年、井戸水を飲料水としてきた。古くからの広口井戸は深度 2～3 m の浅井戸で村落に数カ所あり共用である。これらは土壌による濾過効果が少ない上に開口のため異物混入しやすく不衛生であり、紐付き容器で水を汲上げ各戸に運ぶ手間があり不便であった。1970 年代後半に経済的ゆとりを得た住民は各戸にポンプ式のパイプ井戸を作った。これらは深度 10m 以上におよぶ深井戸である。これらは家屋に近く便利で、深度も深く開口部がないために細菌学的な衛生状態も良かった。WHO も消化管感染症の予防の観点から世界に対し表層水にかわり井戸水の使用を奨励していた。そのため、飲料水資源を深井戸に求める状況は世界的な傾向となった。1990 年代に入りポンプ式井戸を持つ家庭が増えた。ところがポンプ式井戸の使用開始から数年ほど経て皮膚病変を呈する住民が現れ始めた。新疆ウイグル自治区で最初の砒素中毒の患者が発見され、内モンゴル自治区でも赤峰市郊外で慢性砒素中毒の地域的発生が汚染井戸水を介する事が確認され、その後の全国的調査により各地で汚染井戸水の飲用による慢性中毒発生が知られるようになった。これらの地域は地層に含まれる砒素がある条件下に地下水に溶出、すなわち天然に砒素汚染された地下水脈が存在する地質的な特性がある。ここに深井戸使用という人為的条件が重なって初めて慢性砒素中毒が起った。従って砒素曝露の開始時期が特定できる場合が多い。皮膚症状の角化症、色素異常の現れ方は地域によって異なるが原因は定かでない。一方、一部の盆地などでは高砒素水脈が浅井戸に現れる地域があり、古くから砒素曝露があり慢性中毒が存在したと思われるが、中毒発生規模も小さく注目されず原因不明の風土病とされていた。同地域では砒素曝露歴が長い多発ポーエンや皮膚癌など進行した慢性砒素中毒患者が見られる。中国での飲料水からの砒素曝露人口は 200 万人以上、中毒患者 2 万人以上と推定される。

一方、貴州省の慢性中毒は砒素含有量の高い石炭燃焼が原因となる。石炭は調理、暖

房および食物乾燥に使用され、燃焼に伴う砒素ヒュームは室内空気を汚染し吸入される。また乾燥穀物に付着し摂取されて消化管吸収が生じる。同地域は石炭の露頭があり住民の石炭使用の歴史は長く、曝露者は約 20 万人に達するとされる。中国 CDC によれば石炭砒素含有量は 26.5~2116.7 mg/kg、室内空气中砒素濃度は 0.003~0.01 mg/m³ である。同地区の慢性中毒の特徴は、曝露歴が長いこともあり重度な角化症、ポーエン病、皮膚癌である。小児にも手掌の角化症を認めるなど、症状は飲水型の慢性ヒ素中毒患者より重篤な傾向がある。

筆者らは内モンゴル自治区包頭市缸房菅村において 1999 年から継続的に調査を行っている。同村では 300 程の深井戸があり砒素濃度が個々に異なる事を確認した。1999 年 8 月に水道水供給が開始され全村同時に砒素曝露が軽減される直前に横断的調査を行い、その後に継続的に砒素曝露軽減の効果についてフィールド調査を行っている。曝露軽減から半年、1、5、10 年後に小規模の調査を行った。今までに、曝露軽減により、末梢血管循環障害などは早期に改善される一方、皮膚症状の改善は緩慢であることが確認された。今年の調査により発癌の増加傾向が疑われ、詳細な調査を計画している。

3 結果および考察

現在のところ慢性砒素中毒に基づく皮膚悪性腫瘍の患者は中国においては多くはない。しかし、数百万人とも推定される圧倒的多数の砒素曝露者の曝露歴が 30 年に差し掛かる現在、今後多数の悪性腫瘍患者が発生することが懸念される。悪性腫瘍患者の大規模発生は大きな問題であり、リスク集団に対しての効果的検診による早期発見早期治療が必要であると考えられる。

Study on speciation analysis for arsenic compounds in rice

Takahiko Yoshida¹, Hiroshi Yamauchi²

¹Asahikawa Medical Univ. and ²Saint Marianna Medical Univ.

Author group had been conducting field research studies at several villages in China, mainly in Inner Mongolia from 1996. We established a cohort study in a farm village near Baotou, Inner Mongolia at 1999. In where, residents exposed to As at various doses for more than 10 years, then stop to expose by service of pipeline water. We operated the base line cross sectional study at just before the start of pipeline service with 132 volunteer participants from the residents. Then follow up researches were conducted at 6 months, 1, 5 and 10 years after the mitigation. Disturbance of peripheral circulation was improved early but skin symptoms remission required relatively long period by the reduction of As exposure. In this year we confirmed increasing tendency of malignancy occurrence among the exposed villagers, so effective screening of malignancy on them is necessary.

MEMO

MEMO

第 22 回ヒ素シンポジウム
講演要旨集

2016 年 11 月 10 日 発行

編集：第 22 回ヒ素シンポジウム実行委員会

〒305-8563

茨城県つくば市梅園 1-1-1

国立研究開発法人産業技術総合研究所

計量標準総合センター内

TEL：029-861-4873

E-mail：2016_AsSymp-m1@aist.go.jp

Website：https://unit.aist.go.jp/mcml/rg-env/As-sympo2016/

編集責任者：黒岩 貴芳

