

第 23 回ヒ素シンポジウム 日程表

12月7日(木)

12月8日(金)

11:15 12:15	理事会 中会議室
----------------	----------

12:40 12:50 14:20	開会の挨拶 一般演題 I I - 1~6
-------------------------	--------------------------------

14:25 15:05 15:05 15:45	特別講演 I Yan An "Regulative role of transcription factor Nrf2 in arsenic-induced human keratinocytes transformation" 特別講演 II Jingbo Pi "Involvement of adaptive antioxidant response in arsenic-induced pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance"
----------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

15:55 17:40	ミニシンポジウム "健康リスクが懸念される金属"
----------------	---------------------------------

18:00 20:00	懇親会 スペインバル Bond
----------------	------------------------

9:00 10:15	一般演題 II II - 1~5
---------------	-------------------------

10:20 11:00	特別講演 III Narenmandula Hua "The role of zinc finger motifs in induction of nucleoplasmic PML toward nuclear matrix by arsenic trioxide"
----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

11:10 12:25 12:25 12:40	一般演題 III III - 1~5 総会・授賞式 閉会の挨拶
----------------------------------	----------------------------------------------

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 11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 11月	東京	黒岩 貴芳	産業技術総合研究所
23	2017年 12月	つくば	熊谷 嘉人	筑波大学

ご挨拶

この度、2017年12月7日、8日の2日間にわたり、つくばイノベーションプラザ（茨城県つくば市）において、第23回ヒ素シンポジウムを開催できる運びとなりました。ヒ素研究会会員の皆様をはじめとして、関係各位の御協力を賜りましたこと、ここに深く御礼申し上げます。

1983年から医学、薬学、工学、農学、水産学等の幅広い分野でヒ素に興味を持つ研究者たちがヒ素研究会を結成し、シンポジウムを開催してまいりました。本シンポジウムでは、ヒ素の毒性・生体影響、代謝、分析法、生態系での分布や化学形態、環境からの除去などに関する研究発表や情報交換などを通じて親交を深め、我が国におけるヒ素の研究の発展に寄与してまいりました。

特別講演として、Yan AN 教授（Medical College of Soochow University）、Pi JB 教授（China Medical University） および Narenmandula H 教授（Zhejiang University）の研究者に、ヒ素に対する生体応答の最新知見についてご講演いただきます。

第23回ヒ素シンポジウムでは、（半）金属に関する分野融合を鑑みて、ヒ素以外の生体に影響を及ぼす有害金属に関する情報交換も行います。この機会に分野を問わず、会員外の方も含め多数の皆様に、まだまだ謎多きヒ素の世界にご興味を持っていただけましたら幸いです。

平成29年12月吉日

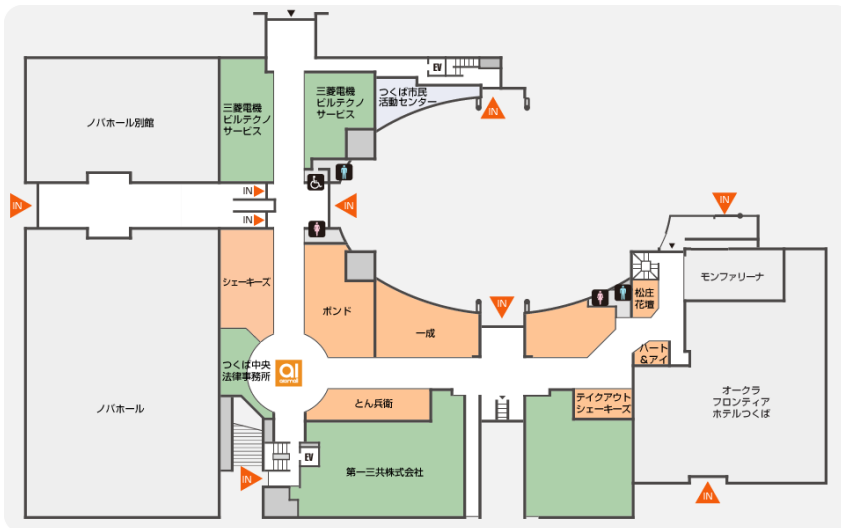
第23回ヒ素シンポジウム大会長 熊谷嘉人

会場のご案内

会場 : つくばイノベーションプラザ
 つくば市吾妻 1-10-1



懇親会会場 : スペインバル Bond
 つくば市吾妻 1-10-1 つくばセンタービル 1F アイアイモール内



一般発表者および座長の皆様へ

【一般発表者の皆様へ】

- ・ 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。
- ・ 発表はパワーポイントで行っていただきます。ご自分の PC をご使用いただき、操作は各自でお願いいたします。または、事務局が用意した PC (Mac 版 PowerPoint 2011) で発表される先生は事前に受付に発表用ファイルをご持参いただくようお願いいたします。
- ・ 持参される USB ファイルは、ファイル名の頭に演題番号をつけ、必ず最新定義ファイルでウイルススキャンを行ってください。

【座長の皆様へ】

- ・ セッション開始 15 分前に次座長席にご着席ください。
- ・ セッション開始の 30 分前までに、受付にて出席の確認をお願いいたします。
- ・ 時間通り進行するために、一般発表合計時間は厳守してくださるようお願いいたします。

プログラム

理事会

11:15~12:15 つくばイノベーションプラザ 中会議室

1 日目 12 月 7 日 (木)

12:40~12:50 開会の挨拶
熊谷嘉人 (筑波大学 医学医療系)

一般演題 I (発表 12 分、質疑応答 3 分)

12:50~14:20 座長 平野靖史郎 (国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター)
下田康代 (日本大学 薬学部)

- I-1 ジメチルヒ素化合物によるミトコンドリア経路のアポトーシス誘発機構について
○下田康代¹, 黒澤英俊^{1,2}, 加藤孝一¹, 畑 明寿³, 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
- I-2 マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の
発がん性およびその機序
○藤岡正喜, 魏民, 奥野高裕, 熊田賢次, 梯アンナ, 大石裕司, 鰐淵英機
大阪市立大学大学院 医学研究科 分子病理
- I-3 Thio-DMA^Vによる分裂期蓄積作用に対するグルタチオンの影響
○北加代子, 重留夏海, 関口匠, 山本早織, 鈴木俊英
帝京大学薬学部
- I-4 酵母およびヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞における亜ヒ酸による
ペントースリン酸経路関連遺伝子の転写抑制機構
○高橋勉^{1,2}, 田中裕士¹, 中野毅¹, 黄基旭², 永沼章², 藤原泰之¹
¹東京薬科大学薬学部・公衆衛生学, ²東北大学大学院薬学研究科・生体防御薬学
- I-5 非ボディ PML の卵子成熟における機能解析
○宇田川理, 平野靖史郎
国立環境研究所

プログラム

一般演題 I (発表 12 分、質疑応答 3 分)

- I-6 ゼブラフィッシュモデルの活用により発見した毒性の低い
Nrf2 活性化剤の亜ヒ酸毒性軽減効果
○布施雄士, 遠藤優佳, Vu Thanh Nguyen, 小林麻己人
筑波大学医学医療系

特別講演 I

14:25~15:05 座長 山中健三 (日本大学 薬学部)

Regulative role of transcription factor Nrf2 in arsenic-induced human keratinocytes transformation
Yan An (Medical College of Soochow University)

特別講演 II

15:05~15:45 座長 遠山千春 (筑波大学 医学医療系)

Involvement of adaptive antioxidant response in arsenic-induced pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance
Pi Jingbo (China Medical University)

ミニシンポジウム～健康リスクが懸念される金属～ (発表質疑応答含 20 分)

15:55~17:40 座長 鰐淵英機 (大阪市立大学大学院 医学研究科)

熊谷嘉人 (筑波大学 医学医療系)

- 1 メチル水銀毒性発現に関わる代謝物質の同定とその機能解析
○黄 基旭
東北大学大学院薬学研究科
- 2 アンチモンおよびテルル含有ハイブリッド分子の細胞毒性と
バイオオルガノメタリクス研究への活用
○鍛冶 利幸
東京理科大学薬学部環境健康学研究室
- 3 バイオセレン化合物のケミカルメタロミクス
○鈴木紀行、小椋康光
千葉大学大学院薬学研究院

プログラム

- 4 放射光 X 線分析を利用したヒ素および重金属類の植物内動態解析
○保倉明子
東京電機大学工学部

- 5 核内受容体を介した有機スズ化合物の生体影響
○中西 剛
岐阜薬科大学 衛生学研究室

- 6 総合討論

18:00 懇親会 (スペインバル Bond)

2 日目 12 月 8 日 (金)

一般演題 II (発表 12 分、質疑応答 3 分)

9:00~10:15 座長 角大悟 (徳島文理大学)

阿草哲郎 (熊本県立大学 環境共生学部)

II - 1 ICP-MS によるヒ素化合物分析のためのカラム組み込み型ネブライザー開発

○宮下振一¹, 高江祥², 藤井紳一郎¹, 高津章子¹, 梅村知也², 稲垣和三¹

¹国立研究開発法人産業技術総合研究所, ²東京薬科大学

II - 2 模擬的消化環境におけるアルセノシュガー-328 の化学形態変化

○大友祐輝¹, 長谷川桃子¹, 畑明寿¹, 山中健三², 圓藤吟史³, 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中災防大阪労働衛生総合センター

II - 3 ミャンマーにおける地下水ヒ素汚染の実態

○阿草哲郎¹, 村上理佳子¹, 木村直登¹, 大曲遼¹, 内山幸子¹, 中田晴彦², Nyunt Phay³

¹熊本県立大学・環境共生学部, ²熊本大学・理学部, ³Pathein University

II - 4 血管内皮細胞の金属毒性を軽減するヘパラン硫酸プロテオグリカン分子種

○吉田映子, 風見麻依, 鍛冶利幸

東理大・薬

II - 5 玄米中総ヒ素・カドミウム濃度に対する出穂前後 3 週間の水管理の週間寄与率

○戸上和樹¹, 三浦憲蔵², 永田修¹

¹農研機構東北農研, ²日本土壌協会

特別講演 III

10:20~11:00 座長 鈴木紀行 (千葉大学大学院 薬学研究院)

The role of zinc finger motifs in induction of nucleoplasmic PML toward nuclear matrix by arsenic trioxide

Narenmandula Hua (Zhejiang University)

プログラム

一般演題 III (発表 12分、質疑応答 3分)

11:10~12:25 座長 黒岩貴芳 (国立研究開発法人産業技術総合研究所)

小林弥生 (国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター)

III - 1 モンゴル産ゼオライトの化学修飾によるヒ素および重金属の吸着除去
○塩盛弘一郎¹, ドルゴルマー ムンフバト², バヤンジャルガル オチロホヤグ²
¹宮崎大学工学教育研究部, ²モンゴル国立大学工学・応用科学

III - 2 水稻根の鉄プラークへのヒ素の集積と形態に鉄資材がおよぼす影響
○山口紀子¹, 大倉利明¹, 彦野安津子¹, 山口弘¹, 橋本洋平², 牧野知之¹
¹農研機構・農業環境変動研究センター, ²東京農工大学

III - 3 コメ中無機ヒ素の簡易分析
○馬場浩司¹, 川崎晃², 阿部薫¹, 荒尾知人³
¹農研機構農業環境変動研究センター, ²農研機構高度解析センター,
³農研機構中央農業研究センター

III - 4 亜ヒ酸を曝露した MDM2^{-/-}HEK 細胞における PML の細胞核内動態
○平野靖史郎, 宇田川理, 小林弥生, 加藤綾華
国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター

III - 5 亜ヒ酸によるナチュラルキラー細胞の細胞障害性に対する抑制作用の検討
○角 大悟, 津山博匡, 小川智子, 原田久美, 姫野誠一郎
徳島文理大学薬学部

12:25~12:40 総会・授賞式・閉会の挨拶
熊谷嘉人 (筑波大学 医学医療系)

特別講演

Regulative role of transcription factor Nrf2 in arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes and bronchial epithelial cells

Yan An

School of Public Health, Medical College of Soochow University, China

It is well known that long-term exposure of arsenite leads to human skin cancer, but the underlying mechanisms of carcinogenesis remain obscure. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant response represents a critical cellular defense mechanism, however, emerging data suggest that constitutive activation of Nrf2 is associated with cancer development, progression and chemotherapy resistance. However, the role and reason of Nrf2 continuous accumulates in cancer cells remains to be fully understood.

By establishing transformed human keratinocyte (Hacat) cells and bronchial epithelial (HBE) cells via chronic arsenite treatment, we showed that, in acquiring this malignant phenotype, continuous low level of ROS and sustained enhancement of Nrf2 and its target antioxidant enzyme levels were observed in the later-stage of arsenite-induced cell transformation. The downregulation of Keap1 level may be responsible for the over-activation of Nrf2 and its target enzymes.

To validate these observations, firstly, Nrf2 was knocked down in arsenite-transformed Hacat and HBE cells by siRNA transfection, and the levels of Nrf2 and its target antioxidant enzymes, ROS, cell proliferation, migration and colony formation were determined following these treatments. Results showed that blocked Nrf2 expression significantly reduced Nrf2 and its target antioxidant enzyme levels, restored ROS levels, and eventually suppressed cell proliferation, migration, and colony formation of the transformed cells.

Further, we also revealed that hypermethylation of Keap1 gene promoter region induced by DNA methyltransferases-3 (DNMT-3) leading to inactivation of its function was responsible for constitutive activation of Nrf2 and its target enzymes.

The expression of Keap1 protein was restored in arsenite-transformed cells by treatment with a DNA methyltransferases inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC), and protein levels of Nrf2 and colony formation were then determined after these treatments. Results showed that enhancement of Keap1 expression by 5-Aza-dC significantly reduced Nrf2 and its target antioxidant enzyme levels, and that in turn suppressed cell proliferation and colony formation of the transformed cells.

Taken together, the results of the study strongly suggested that loss of Keap1 function by hypermethylation of its promoter region leading to the continuous activation of Nrf2 and its target antioxidant enzymes led to the over-depletion of intracellular ROS levels, which contributed to arsenite-induced malignant transformation.

特別講演 I

【御 略 歷】

Name: Yan An M.D., Ph.D., Prof.

Positions:

- 2008- Professor, Department of Toxicology School of Public Health Medical College of Soochow University
- 2008-2005 Professor, Department of Radiation Effects, Institute for Radiation Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences
- 2005-1996 Research Assistant Professor, Department of Life Science China Institute for Radiation Protection

Education

- 2005 PhD, Nihon University College of Pharmacy
- 2001 PhD, Jilin University Norman Bethune Medical College
- 1996 MS, China Institute for Radiation Protection, 1996
- 1993 BMED, Shanxi Medical University, 1993

Honors and awards

- 2011, Third Prize for The study on Carcinogenic Mechanisms of Arsenics- Metabolic methylation of arsenic-induced oxidative stress (*Science & Technology Advancement Award of Shandong province*)
- 2009, Poster award for A case-control study on relationship between arsenic in drinking water and skin lesions in endemic arsenism area of Shanxi province, China (*The 5th International Congress of Asia Society of Toxicology (ASIATOX-V)*)
- 2008, *The introduction of a shortage talents of high-level personnel funded projects in Suzhou city*
- 2008, *The 8th Youth of Sciences & Technology award of Shandong province*
- 2011, The National Outstanding Youth Scientists and Technicians Award for Carcinogenic Mechanisms of Arsenics- Metabolic methylation of arsenic-induced oxidative stress (*The 2nd Session of National Chinese Youth Scholar Science and Technology Forum of Chinese Society of Toxicology (CST)*)
- 2005, Import of foreign talent in Shandong province (*Human Resources and Social Security Department of Shandong province*)
- 2005-2000, *Japanese Government (MONBUKAGAKUSHO: MEXT) Scholarship*
- 2002, The 2nd class award for The Study on Judging Criterion of Public Nuisance Disease (*National Defense Sciences & Technology Award,*)
- 2001, Excellent achievement award on Judging Criterion of Public Nuisance Disease (*State Environmental Protection Administration of China*)
- 1998, The 3rd class award for The study on The Morphometric Study of ¹³¹I-Induced Injury in Rat Thyroid (*Science & Technology Advancement Award of Ministry of Nucleus Industry of China*)

Paradoxical roles of CNC-bZIP proteins NRF2 and NRF1 in arsenic-induced dysfunction in pancreatic β -cells and adipocytes

Jingqi Fu¹, Yongyong Hou¹, Peng Xue¹, Huihui Wang¹, Yuanyuan Xu¹, Qiang Zhang², Jingbo Pi¹

¹Program of Environmental Toxicology, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110122, China

²Department of Environmental Health, Rollins School of Public Health, Emory University, Atlanta, Georgia, 30322, USA

Environmental arsenic exposure is a worldwide public health problem. Chronic exposure to high levels of inorganic arsenic (iAs) is associated with many human ailments including cancer, skin disorders, vascular diseases and type 2 diabetes (T2D). Nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) and NRF1 are CNC-bZIP transcription factors that are master regulators in the cellular adaptive response to various stress insults, in particular oxidative stress. Although cytotoxic, reactive oxygen species (ROS) also function as important intracellular signaling molecules to activate cellular responses to a variety of physiological stimuli, including glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in pancreatic β -cells and insulin action in insulin responsive cells. Therefore, we propose that NRF2/1-mediated antioxidant response plays paradoxical roles in β -cell function and insulin signaling transduction: (1) It protects the cells from oxidative damage and possible cell death, thus minimizing oxidative damage-related impairment in insulin secretion and action; (2) Since ROS signaling triggered by glucose and insulin could be an important component involved in insulin secretion and action, the induction of endogenous antioxidants in the presence of oxidative stress may blunt the signals, resulting in reduced GSIS and insulin resistance. iAs and its methylated trivalent metabolites are potent oxidative stressors and robustly activate NRF2/1-mediated antioxidant response, but at the levels typically observed in human exposures, they are not likely to reach cytotoxic concentrations sufficient to cause overt oxidative damage, especially when endogenous antioxidant enzymes can be actively induced. Therefore, blockade of ROS signaling in premise 2 is potentially more relevant to the etiology of T2D in the context of low-level environmental iAs exposure, whereas premise 1 might be associated with protecting cells from acute toxicity induced by high doses of arsenic.

White adipose tissue (WAT) is an active organ that stores and releases energy, maintains glucose homeostasis, and secretes a variety of factors that influence appetite, insulin sensitivity, and inflammation. Disturbance of adipogenesis and WAT function is associated with insulin resistance, which plays an early pathogenic role in the development of T2D. iAs and its trivalent methylated metabolites inhibit adipogenesis and impair WAT function. However, the underlying mechanism remains elusive. In our recent studies we found that iAs substantially induces the protein expression of

特別講演 II

long isoforms of NRF1 (L-NRF1) in a variety of types of cells, including preadipocytes during the early stage of adipogenesis. Moreover, L-NRF1 negatively regulates the expression of PPAR γ , a regulator of terminal adipogenic differentiation and adipose function. In contrast, short isoforms of NRF1 (S-NRF1) derived from alternative splicing and/or posttranslational modification play fundamental roles in promoting adipogenesis. Phenotypic analysis of fat-specific *Nrf1*-knockout mice showed that NRF1 are essential in the development of WAT. It appears that iAs-induced L-NRF1 disturbs the normal function of S-NRF1 leading to the effects of arsenic on adipogenesis and insulin sensitivity. Our studies highlight the importance of NRF2/1 in pancreatic β -cells and adipocytes and provide insight into the effects of iAs exposure on insulin secretion and action and thus the mechanism(s) of iAs-induced T2D.

【御 略 歴】

Jingbo Pi, MD, Ph.D.

Dr. Pi received M.D. (1990) and M.S. in Occupational Health (1995) from China Medical University, and Ph.D. in Medical Sciences from The University of Tsukuba, Japan in 2002. He had postdoctoral training at NIEHS, USA (2002-2004) and The Hamner Institutes for Health Sciences, USA (2004-2006). He worked as a Research Investigator, Assistant Investigator and Associate Investigator at The Hamner Institutes for Health Sciences (2006-2013). In 2013, Dr. Pi was recruited as a professor of China Medical University, and since then he has been serving as the Dean of School of Public Health, China Medical University. In 2008, Dr. Pi received the Outstanding New Environmental Scientist (ONES) Award, NIEHS, USA. Dr. Pi's research focus is on environmental oxidative stress and metabolic disorders. He has authored/co-authored 88 peer-reviewed papers with more than 4500 citations and with RG score and h-index of 39.38 and 38, respectively. Dr. Pi has served as a board member and president of Stem Cell Specialty Section, SOT, USA, and currently is an Associate Editor of *Toxicology and Applied Pharmacology* and *Toxicology Reports*.

The role of zinc finger motifs in induction of nucleoplasmic PML toward nuclear matrix by arsenic trioxide

Hua Naranmadura^{1,2}

¹Department of Toxicology, School of Medicine and Public health,
Zhejiang University ²College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University,
Hangzhou, China

Objectives: Arsenic trioxide (As₂O₃) has recently been become one of the most effective drugs for treatment of patient with acute promyelocytic leukemia (APL), and its molecular mechanism was largely investigated. Moreover, it has been reported that As₂O₃ could directly bind to cysteine residues of Zinc finger motifs (i.e., replace the Zinc ions) in the RING finger-B Box-Coiled Coil (RBCC) domain of PML-RAR α (P/R) fusion protein, which results in enhanced SUMOylation/Ubiquitination and degradation of PML-RAR α fusion protein leading to clinical remission. However, little is known about the molecular mechanisms of how arsenic trioxide induced the PML-RAR α fusion protein degradation. In the current study, we have emphasized the role of Zinc ions in Zinc finger motifs of PML protein solubility changes by arsenic exposure.

Methods: NB4 cells, PML and PML-RAR α -transfected HeLa cells were used in the current study. Western blotting analysis was used to detect proteins expression. Confocal Laser Scanning Microscopy was used to determine the PML-NBs formation and their distributions. HPLC-ICP/MS was used to detect intracellular arsenic concentrations.

Results: When PML or P/R-transfected HeLa cells were pretreated with zinc ion chelator, PML proteins are unable to shift from soluble to insoluble fraction after exposure to arsenic. Additionally, disruption of Zinc finger motifs by site directed mutagenesis resulted in inhibition of PML protein solubility changes. These results indicating that the zinc ions as well as integrity of Zinc finger motifs may exert vital roles in PML proteins solubility changes.

Conclusions: Our findings demonstrated that integrity of zinc finger motifs is necessary for PML protein degradation by arsenic trioxide.

【御略歴】

Hua Narenmandula (Assistant Dean, School of Medicine) is professor in Department of Toxicology, School of Medicine and Public Health at Zhejiang University, China. He received his Ph.D degree in pharmacology and toxicology from Chiba University (Japan) and conducted his postdoctoral work at the University of Alberta (Canada). He is currently focusing on several topics; arsenic toxicity and arsenic anticancer effects, arsenic metabolism pathway in body and the role of AS3MT expression in arsenic treatment in patients with acute promyelocytic leukemia (APL), etc. He had applied his theoretical and practical knowledge regarding methodology and investigation to practical research settings by publishing many selected innovative research results in "Oncotarget", "Toxicological Sciences", "Archives of Toxicology", "Chemical Research in Toxicology", "Toxicology and Applied Pharmacology", "Drug Metabolism and Disposition", "Metallomics" along with other inventive publications. He has remarkably published 50 SCI papers in international authoritative journals. He also serves as on editorial boards of Chemical Research in Toxicology, Toxicology and Applied Pharmacology and Toxicology Letters.

ミニシンポジウム

~健康リスクが懸念される金属~

メチル水銀毒性発現に関わる代謝物質の同定とその機能解析

黄 基旭

東北大学大学院薬学研究科

メチル水銀による中枢神経障害に関わる分子機構は未だ明らかになっていない。一方、生体内には、DNA や RNA、蛋白質といった高分子の他にも、比較的 low-molecular weight である糖リン酸やアミノ酸、核酸、有機酸といった物質も多く含まれている。生体全体の働きを理解するためには、これら低分子代謝物質を解析することも必要である。最近、我々はメチル水銀を投与したマウスの脳中で存在量の変動する代謝物質をメタボローム解析によって解析し、ポリアミンの一種であるプトレシンのレベルが有意に上昇することを見出した。また、メチル水銀は脳よりも肝臓および腎臓中に高濃度に蓄積するにも関わらず、メチル水銀によるプトレシン濃度上昇は脳組織に特異的に認められることも見出している。メチル水銀によるプトレシン濃度の上昇はマウス神経幹細胞由来の C17.2 細胞でも認められ、さらに、同細胞においてプトレシンの培地中への添加がメチル水銀毒性を軽減することも明らかになった。プトレシン合成酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) の活性がメチル水銀によってマウス脳内および C17.2 細胞において上昇することも確認している。一方、生体内ポリアミンの大半を占めるスペルミジンおよびスペルミンはプトレシンから合成されることが知られているが、メチル水銀投与によってマウス脳内のスペルミジンおよびスペルミンのレベルは変動せず、さらに、これらのポリアミンを培地に添加してもメチル水銀毒性の軽減作用は認められなかった。これまでプトレシンはポリアミン合成系における中間代謝物質として考えられてきたが、我々の検討によりプトレシン自身が有する未知の機能がメチル水銀毒性の軽減に関与している可能性が示唆されており、本知見について紹介する。

Identification of low-molecular metabolites related to methylmercury toxicity and its functional analysis

Gi-Wook HWANG

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

Metabolomic analysis is a functional tool concerned with the high-throughput identification, quantification and characterization of low-molecule metabolites. Moreover, this analysis can aid the mechanistic elucidation of toxicological changes and is also a means to identify potential biochemical markers of toxicity. Therefore, we performed metabolomic analysis in cerebellum of mouse treated with methylmercury and investigated the relationship between methylmercury toxicity and significantly changed metabolites.

アンチモンおよびテルル含有ハイブリッド分子の細胞毒性とバイオオルガノメタリクス研究への活用

○鍛冶 利幸

東京理科大学薬学部環境健康学研究室

1 はじめに

有機化合物と無機化合物の特性を併せ持つ化合物を有機-無機ハイブリッド分子と呼ぶ。具体的には、有機金属化合物と金属錯体化合物のことである。ハイブリッド分子が科学の世界で注目されたのは、Grignard や Wittig などの先駆的化学者が分子変換反応にハイブリッド分子を活用して成功したことによる。現在、有機元素化学は飛躍的な発展を遂げている。一方、生命科学におけるハイブリッド分子の活用戦略は存在しなかった。すなわち、ハイブリッド分子の評価はあくまで合成試薬としてのものであり、生命科学への貢献は皆無無に等しい状況が続いていた。

演者らはハイブリッド分子には生命科学研究に活用できる可能性があると考えた。

第一に、ハイブリッド分子では金属の導入によって分子の三次元構造が大きく変化している。逆に分子構造に組み込まれることによって金属の状態も変化している。さらに分子構造と金属が相互作用する結果、双方の生物活性が修飾される可能性がある。

第二に、純粋な有機化合物や無機化合物では容易でない特定のタンパク質の活性化や阻害が、ハイブリッド分子では容易に起こる可能性がある。

第三に、金属を弱い結合で組み込んだハイブリッド分子では、活性化に金属を必要とするタンパク質に金属を特異的に受け渡すドナーとして機能する可能性がある。

以上に述べたハイブリッド分子の特異な生物活性を利用して、ハイブリッド分子を生体機能解析ツールとして活用する研究戦略—バイオオルガノメタリクス—を立ち上げた。この研究戦略はあらゆる元素を縦横無尽に活用して生命科学研究を推進しようとする新しい研究戦略である。

2 結果と考察

バイオオルガノメタリクスによって、以下の興味深い結果を得ている。

(1) 有機ビスマス化合物と有機アンチモン化合物の細胞毒性について、無機態では弱い細胞毒性しか示さないビスマスが分子構造に組み込まれたとき強い細胞毒性を示した。ところが同じ分子構造を持つ有機アンチモン化合物にはそのような細胞毒性は認められなかった。この違いは、細胞内への蓄積量に依存していた。組み込まれた金属の無機態における細胞毒性からハイブリッド分子の細胞毒性は推測できないことが示唆された。

(2) 有機テルル化合物である Diphenylditelluride とそのセレンおよびイオウ置換体についても検討した。その結果、Diphenyldi-telluride が開裂して求核性を持ち、それがタンパク質と結合して細胞内に入ってミトコンドリアに集積し、そこで標的タンパク質に対して毒性

ミニシンポジウム 2

を発現することが示唆された。

(3) 有機アンチモン化合物 Tris(pentafluorophenyl)stibane を分子プローブとして血管内皮細胞のメタロチオネイン誘導を介在する細胞内シグナル経路を解析し、MT 遺伝子の発現はアイソフォームごとに異なり、MT-1 の誘導には MTF-1-MRE 経路だけでなく Nrf2-ARE 経路が関与するのに対し、MT-2 の誘導には MTF-1-MRE 経路の活性化のみが関与することが示された。MT アイソフォームには機能分化はないとされてきたが、実はある（あった）のかもしれないと考えている。

3 終わりに

現在、バイオオルガノメタリクスは、「ハイブリッド分子の生物活性を決める特定元素の役割を理解し生命科学研究に活用する」バイオ元素戦略として発展している。その詳細について紹介し議論したい。

Cytotoxicity and application of organic-inorganic hybrid molecules containing antimony or tellurium to bioorganometallics studies

Toshiyuki Kaji

Department of Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

Bioorganometallics is a research strategy of biology that uses organic-inorganic hybrid molecules. The molecules are expected to exhibit useful bioactivities based on the unique structure formed by interaction between the organic structure and intramolecular metal(s) as well as specific cytotoxicity. There are two types of studies of bioorganometallics; one is to reveal the specific cytotoxicity of organic-inorganic hybrid molecules and the other is to use organic-inorganic hybrid molecules to analyze biological systems. In this presentation, I introduce our recent studies performed from the viewpoints of these two types of bioorganometallics studies.

バイオセレン化合物のケミカルメタロミクス

○鈴木紀行¹、小椋康光¹

¹千葉大学大学院薬学研究院

1 はじめに

6族元素であるセレンは、金属元素と典型元素の物理化学的性質を併有する元素であり、有機合成化学や材料化学の分野において有用な元素として注目されている。またセレンは動物にとっては必須元素であり、生物体内で化学形態を変えながら代謝されていくという典型元素としての特性と金属元素としての特性から、極めて特異な生理的機能を発揮している。なかでも特筆すべき特徴としてあげられるのが、他の金属元素とは異なり、セレノシステイン、すなわちシステインの硫黄原子がセレンに置き換わったアミノ酸として、グルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシシンレダクターゼなど25種類のセレンタンパク質の一次構造に組み込まれていることである。ゆえにセレノシステインは“21番目のアミノ酸”と称されている。しかしながら、生体内での存在量が極微量であることと、栄養量と毒性用量との差が小さいことなどから、その代謝の全容はいまだ明らかになっていない部分も多い。

ヒ素と同様にセレンは半金属であり、多くのセレン含有有機化合物が知られている。そしてそれらセレン化合物の動態、毒性や代謝、またそれらの総体としての栄養学的価値はその化学形態に大きく依存するため、その検討に当たっては化学形態の違いに着目する必要がある。そのため我々のグループは、多くのセレン化合物やその標識化合物を合成し、LC-ICP-MS、高空間分解能イメージング質量分析法、⁷⁷Se-NMRなど様々な分析法を用いて、生体内のセレンの動きを定量的に解析しその代謝マップの完成を目指した研究を行なって来た。またセレンは、その特異な性質から、生体機能性分子に組み込むことで今までにない新しい機能を発揮する合成小分子を創生することも可能となる。我々のグループは、蛍光団や光分解性保護基にセレンを含む官能基を組み込むことで、天然には存在しない新規セレン化合物をデザイン・合成し、その生体内での機能の評価を行なって来た。以上のように、化学を手段として用いて行われるメタロミクス研究を“ケミカルメタロミクス”と称し、その最近の知見について報告する。

2 方法

上述のように、我々は主にセレンの毒性・代謝に関わる研究と、セレンを含む新規機能性分子の開発に関する研究を行ってきた。

前者については、セレノアミノ酸、セレン糖、メチル化セレン化合物などの動植物や環境中に存在するセレン化合物、またその同位体標識化合物を合成し、培養細胞や実験動物に投与することでその代謝を定量的に解析し、また動態をイメージングによって直接的に観測した。

後者に関しては、まず蛍光団にセレノール基やジセレニド基を導入し、その酸化還元反応

を蛍光変化のスイッチとする新規活性酸素種プローブをデザイン・合成しその機能の評価を行った。また、培養細胞やマウスより採取した好中球を用いたバイオイメージングを行った。次に不安定なセレン化合物を光感受性保護基に組み込むことで安定化し、光照射によって活性なセレン化合物を遊離する、いわゆる caged セレン化合物のデザイン・合成を行い、その光化学的特性の検討を行った。

3 結果・考察

毒性・代謝に関しては、安定同位体標識プローブを用いた代謝分析により、定量的な解析が可能であることを示した。また高空間分解能イメージング質量分析法を用いて、セレン源の由来ごとに局在の異なるセレノプロテイン生合成の可視化に成功した。二次元 NMR によるバイオセレンウムの分析では、HPLC や質量分析法では検出の難しい不安定なセレン化合物も分析可能であることを示した。またセレン含有新規機能性分子の開発に関しては、セレノール基が蛍光発光のスイッチとして機能する新しい蛍光プローブの開発に成功し、また生体内のセレン代謝の中心に位置する活性セレン化合物 selenide を特異的に検出する蛍光プローブの開発も行った。さらに、caged セレンを用いることで時間・空間特異的にセレン化合物を生体に負荷することができることを示した。

セレンはその典型元素的性質からケミカルメタロミクス研究を展開するのにもっとも適した元素であると考えられるが、同様の性質を有するアンチモン・ヒ素・テルルといったメタロイド元素に関しても同様の研究展開が可能であると考えている。

Chemical metallomics of bioselenocompounds

Noriyuki Suzuki¹, Yasumitsu Ogra¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Selenium (Se) is an essential element in animals, because Se is required as the active center of selenoproteins, but can become highly toxic when ingested in an amount that exceeds the nutritional level. Se is an element belonging to the same group 16 on the periodic table, and has chemically and biologically ambivalent characteristics; it has similar chemical properties to sulfur as a typical element, yet possesses chemical properties characteristic of a metal. Based on these properties, we performed Se studies of toxicity, kinetics, bioimaging, and development of Se containing-functional molecules, named “chemical metallomics” studies.

放射光 X 線分析を利用したヒ素および重金属類の植物内動態解析

○保倉明子¹

¹東京電機大学工学部

1 はじめに

植物を用いた環境浄化技術“ファイトレメディエーション”が注目を集めている。なかでも、ヒ素汚染土壌で栽培されたモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) は、地上部にヒ素を高蓄積するため、その植物体内におけるヒ素の無毒化機構はとても興味深い。我々は放射光 X 線分析を利用し、植物組織におけるヒ素や有害重金属の分布を可視化するとともに、これらの元素の化学形態の変化の解明を目指している。本講演では、ヒ素やセレン、クロム、水銀などの有害元素を添加して栽培したシダにおける元素の動態についての研究成果を紹介したい。

2 方法

1/10 園芸試験場処方培養液で培養したモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) を実験に用いた。ヒ素、セレン、クロム、水銀などの有害元素を添加して一定期間栽培した植物体を、根、茎、葉の部位別にわけ、それぞれ凍結乾燥後、粉碎・均質化した。加圧成型した 10 mm φ の錠剤を、元素の定量分析および X 線吸収分光法による化学形態解析に用いた。一方、根の先端、根の基部、中軸、羽片について、クライオミクロトームを用いて厚さ約 60 μm の切片を作成し、放射光 X 線マイクロビームを用いて、元素マッピングを行なった。さらに元素蓄積部位における化学形態解析も実施した。

3 結果と考察

セレン酸ナトリウム ([Se] = 50 ppm) を含む培養液で栽培したところ、添加日数が長くなるにつれてシダの各部位における Se 蓄積濃度も増加し、14 日後には根において約 1,700 ppm、羽片では 400 ppm となった。また根において取り込まれた Se の約 40% がセレンメチオニン SeMet やメチルセレンシステイン MeSeCys のような Se(-II)へと還元されていることが示された。地上部の中軸や羽片でも Se(-II)へと還元されていたが、いずれの部位でも、蓄積された Se の大部分は添加した Se(VI)のままであった。このように Se は毒性の高いセレン酸のまま取り込まれていることがわかった。

Se(VI)添加 7 日間後のモエジマシダの根の先端では、表皮、皮層、中心柱の維管束とほぼすべての細胞壁に Se が多く蓄積され、一方、木質化が進んでいる根の基部では、皮層の細胞壁にはあまり蓄積されていなかった。また地上部（中軸と羽片）では維管束部分にセレンが検出されており、主に根の先端から取り込まれた Se が維管束を通して地上部まで輸送・蓄積されていることが明らかとなった。さらに根の表皮で既に Se の一部は還元され低酸化数の化学種になっていることが示された。

モエジマシダにヒ素を添加すると、葉において高蓄積されるのに対し、セレン、クロム、

ミニシンポジウム 4

水銀を添加した場合は、いずれの元素も根において高蓄積されていた。ヒ素の取り込み・輸送とは異なる機構であると推定される。今後はシダ体内における各化学種を詳細に同定し、取り込みに伴う化学形態の変化を追跡していきたい。

Study on Accumulation mechanism of arsenic and heavy metals in plants by using
synchrotron radiation X-ray analyses

Akiko Hokura¹

¹School of Engineering, Tokyo Denki University

The aim is to elucidate the accumulation mechanism of arsenic, selenium, chromium, and mercury in fern, *Pteris vittata* L. We explored chemical speciation of these toxic elements. The elemental distributions in the fern were visualized by micro-XRF imaging.

核内受容体を介した有機スズ化合物の生体影響

中西 剛

岐阜薬科大学 衛生学研究室

重金属は生物に対し強い毒性を示すものが多いが、一般的にこのような低分子化合物の毒性は作用点が多岐に渡っており、分子レベルでの毒性発現機構の解明は困難であることが多い。近年の内分泌かく乱物質問題で話題となった Tributyltin (TBT) や Triphenyltin (TPT) などの有機スズ化合物は、一部の巻貝類の雌において雄の性徴発達を示すインポセックスと呼ばれる特徴的な生殖毒性を誘導するが、その作用機構はアロマターゼなどのアンドロゲン代謝酵素を阻害すると考えられていた。

一方で我々は、ヒトの発生段階におけるこれらの化学物質の影響を検討するために、ヒト胎盤の内分泌機能に着目した検討を行ってきた。ヒト絨毛細胞株の内分泌機能に対する有機スズ化合物の影響について検討したところ、TBT と TPT はヒト絨毛性ゴナドトロピンやエストロゲン産生等を上昇させ、またその上昇は mRNA の発現上昇を伴うものであった¹⁻³⁾。本結果は、これまでに貝類で予想されていた結果とは全く異なっていた。

そこで我々は、有機スズ化合物の作用機構についてさらに詳細な検討を行った。その結果、TBT および TPT は、核内受容体である retinoid X receptor (RXR) と peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の強力なアゴニストとして作用を有することを見出した^{4,5)}。TBT や TPT の各核内受容体に対する結合や転写活性化には、スズ原子と受容体の特定のシステイン残基の存在が必要不可欠であり、またスズ原子は特定のシステイン残基とイオン結合を形成していることも明らかになった^{6,7)}。さらにヒト胎盤における有機スズ化合物の内分泌かく乱作用や巻貝類のインポセックスは、これらの核内受容体を介したものであることも明らかとなった⁸⁾。以上の結果は、有機スズ化合物の毒性にはこれらの核内受容体を介した作用が極めて重要であることを示している。

本講演では、有機スズ化合物の核内受容体を介したヒトの健康影響についても議論を深めたい。

Biological impacts of organotin compounds via nuclear receptor signaling

Tsuyoshi Nakanishi

Laboratory of Hygienic Chemistry & Molecular Toxicology,
Gifu Pharmaceutical University

Organotin compounds were widely used as antifouling biocides for ships and fishing nets, agricultural fungicides and rodent repellents. These widespread uses have resulted in the release of increasing amounts of organotins into the environment. In aquatic invertebrates, particularly marine gastropods, organotin compounds, such as tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT), induce irreversible sexual abnormalities in females at nanomolar levels. Although it had been theorized that these compounds act as potential competitive inhibitors of aromatase which converts androgen to estrogen, and then increase levels of unconverted androgens in gastropods, their effective concentrations for aromatase inhibition are much higher (at micromolar levels). Contrary to the theory of organotin-induced aromatase inhibition in gastropods, we found that, in human choriocarcinoma cells, these compounds markedly enhance estradiol biosynthesis along with the increase of both aromatase activity at nanomolar levels¹⁻³). Apparently, these phenomena caused by organotins are contradictory, but we identified that TBT and TPT cause both phenomena to act as nanomolar agonists for retinoid X receptor (RXR) and/or peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ which are members of the nuclear receptor superfamily^{2), 4-8}). In addition, our findings suggest that these organotin compounds potentially have some impact on living organisms that have ligand-responsive RXR and PPAR γ . In the symposium, I will discuss the possible involvement of nuclear receptors in the biological impacts of organotin compounds.

References:

- 1) Nakanishi T *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 87:2830-7 (2002)
- 2) Nakanishi T *et al.*, *Mol Endocrinol* 19:2502-16 (2005)
- 3) Nakanishi T *et al.*, *Biochem Pharmacol* 71:1349-57 (2006)
- 4) Kanayama T *et al.*, *Mol Pharmacol* 67:766-74 (2005)
- 5) Hiromori Y *et al.*, *Chem Biol Interact* 180:238-44 (2009)
- 6) Harada S *et al.*, *Sci Rep* 5:8520 (2015)
- 7) Hiromori Y *et al.*, *Metallomics* 7:1180-8 (2015)
- 8) Castro LFC *et al.*, *Aquat Toxicol* 85:57-66 (2007)

一般演題

一 般 演 題

ジメチルヒ素化合物によるミトコンドリア経路のアポトーシス

誘発機構について

○下田康代¹, 黒澤英俊^{1,2}, 加藤孝一¹, 畑 明寿³, 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

1 はじめに

前年度の本会において、ジメチルモノチオアルシン酸(DMMTA^V)の毒性発現には、その主要代謝物であり毒性の本体と考えられているジメチル亜ヒ酸(DMA^{III})のみならず DMMTA^V から生成する多様な活性代謝物が関与する可能性を報告した。特に、DMMTA^V の曝露では caspase-8 を介したアポトーシス誘発を見出し、DMA^{III} 曝露とは異なることを明らかにした。今回、DMMTA^V によるアポトーシス機構についてさらに詳細を明らかにするため、caspase-8 ならびに 9 の活性化に関与するミトコンドリア経路のアポトーシス関連タンパクの発現および挙動を調べた。

2 方法

ヒト肝腫瘍由来細胞株 (HepaRG) 細胞に対して、WST-8 法により細胞内脱水素酵素活性が 70%維持される濃度、DMMTA^V 20 μ M および DMA^{III} 5 μ M をそれぞれ 12~48 時間(37°C、5% CO₂、湿度 100%)曝露後、細胞からタンパク質を抽出し、10 または 15% アクリルアミドゲルで電気泳動後、Bcl-2 ファミリータンパク(BID、Bax、Bcl-2) を Western blot 法により検出した。

3 結果

DMMTA^V 曝露細胞において曝露 36~48 時間後に BID の活性化を示す断片である truncated BID (tBID、15 kDa)が経時的に増加した。一方、DMA^{III} 曝露細胞ではいずれの時間においても BID の断片化は検出されなかった。Bax の発現量は DMMTA^V、DMA^{III} 曝露とも変化が見られなかったが、Bax の活性化を示す 18 kDa の断片が認められた。DMMTA^V 曝露細胞では経時的な活性化が観察されたが、DMA^{III} 曝露細胞では曝露初期段階から顕著に認められた。また、Bcl-2 の発現量は DMMTA^V、DMA^{III} 曝露とも経時的に減少傾向が見られたが、DMA^{III} 曝露の方がより顕著に減少していた。

4 考察

DMMTA^V および DMA^{III} 曝露は、いずれもミトコンドリア膜の Bax の活性化および Bcl-2 の抑制を介してアポトーシスを誘発していることが示唆された。しかしながら、

Bax、Bcl-2 とともに DMMTA^V と DMA^{III} 曝露後の発現・抑制には経時的差異が認められた。一方、DMMTA^V 曝露において tBID が観察され、DMA^{III} 曝露では tBID は認められなかったことから、前回報告したように、DMMTA^V 曝露による毒性発現には、その毒性の本体と推定されている DMA^{III} のみならず DMMTA^V から生成した多様な活性代謝物の寄与が推定され、caspase-8 を介したアポトーシスカスケードの活性化が関与する可能性が示唆された(図 1)。

DMMTA^V 曝露による caspase-8 の活性化機構については、現在、検討中である。

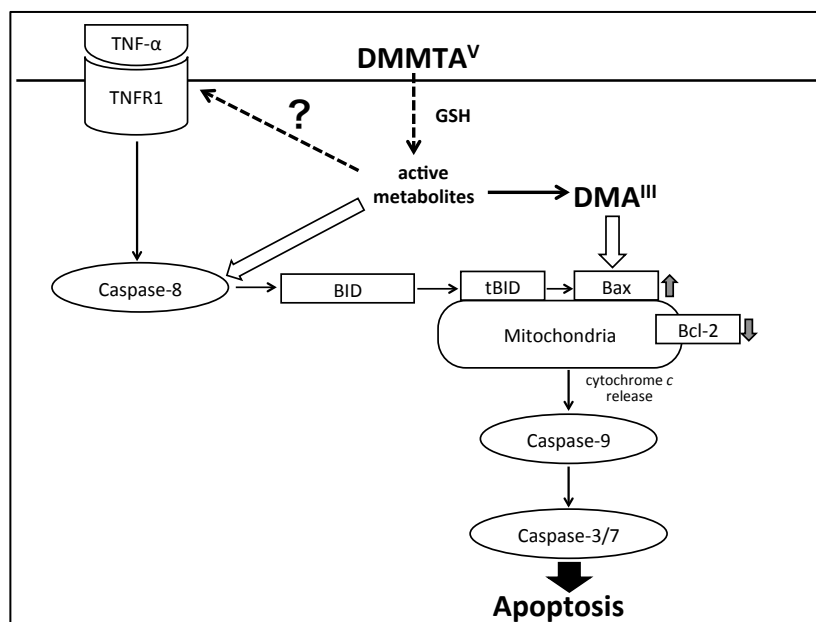


図 1 ジメチルヒ素化合物のアポトーシス誘導機構(推定)

Caspase-8-dependent apoptosis induction in metabolic activation process of dimethylmonothioarsinic acid

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

¹School of Pharmacy, Nihon University, ²Criminal Investigation Laboratory, Metropolitan Police Department, ³Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science

The induction of apoptosis via the mitochondrial damage by dimethylarsenicals is well-known, but, the mechanisms still remain unclear. We revealed that the cleavage of BID by caspase-8 mediates mitochondrial control of apoptosis in metabolic activation process of dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA^V). The present study suggests the possibility of a new mechanism of apoptosis by dimethylarsenicals.

マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発

がん性およびその機序

○藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、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

本邦において、ヒ素の主要な曝露源は食用の海産動植物であり、これらに多く含まれる有機ヒ素化合物の健康影響評価が求められている。疫学的にヒトのヒ素発がんの主要原因と推察される無機ヒ素化合物の主な体内代謝物である Dimethylarsinic acid (以下、DMA)の経胎盤曝露による発がんリスクに関する知見は未だ報告されていない。一方、無機ヒ素は成熟マウスに発がん性を示さないが、胎仔期に曝露した仔マウスが成熟後、肝臓、肺、副腎および卵巣に発がん性を引き起こすことが報告されていることから、DMAの経胎盤曝露による仔マウスの発がん影響について早急に検討する必要がある。

そこで、本研究はDMAの経胎盤曝露による仔マウスへの発がん影響について検討を行った。さらに、メカニズム解析を目的としたDMAの経胎盤曝露による雄性新生仔マウス肺における影響について検討を行った。

2 方法

妊娠期の雌マウスにDMAを0、200 ppmの用量で飲水投与し、経胎盤曝露により作製した仔雌雄マウスを84週齢まで無処置で経過観察し、解剖の後、発がん性を検索した。さらにメカニズム解析を目的として、経胎盤曝露により作製した雄性新生仔マウス肺を採取し、種々の解析を行った。

3 結果

病理組織学的解析の結果、DMA曝露群の雄仔マウスでは、肺細胞がんおよび総肺腫瘍（腺腫＋腺癌）が有意に増加した。さらにDMA曝露群の雄仔マウスでは、肝細胞がんが有意に増加し、総肝腫瘍（肝細胞腺腫＋肝細胞がん）も増加傾向が認められた。一方、DMA曝露群の雌仔マウスでは、肝腫瘍および肺腫瘍の発生に影響は認められなかった。

雄性マウス新生仔肺を用いた解析の結果、DMA投与群においてKi67陽性率の有意な増加がみられた。またHPLC/ICP-MSによる肺におけるヒ素の定量的形態別解析の結果、無処置群と比較してTMAOの有意な変動がみられなかったのに対して、DMMTAおよびDMDTAが有意に増加していることが明らかとなった。さらにその代謝過程でS-adenosylmethionine (SAM)が有意に増加していること、ヒストンメチル基転移酵素であ

る G9a の発現増加、ヒストン H3K9me3 が有意に増加していることが明らかとなった。

4 考察

以上の結果から、DMA の経胎盤曝露で雄仔マウスにおいて肺発がんおよび肝発がんを誘発する可能性が示された。さらに、肺および肝臓は無機ヒ素の経胎盤曝露の標的臓器でもあること、DMA は無機ヒ素の主要な体内代謝物であることから、DMA が無機ヒ素の経胎盤曝露による発がん性に関与することが強く示唆された。また、そのメカニズムとして、ヒ素の代謝過程で生じた SAM の増大によるヒストン H3K9me3 の増加が示唆された。

Study of the mechanism of carcinogenesis by prenatal exposure to dimethylarsinic acid in mice

Masaki Fujioka, Min Gi, Takahiro Okuno, Kenji Kumada, Anna Kakehashi,
Yuji Oishi, Hideki Wanibuchi
Department of Molecular Pathology,
Osaka city university graduate school of medicine

Accumulating evidence indicates that prenatal exposure to inorganic arsenic, a human carcinogen, can subsequently cause cancer in adulthood in mice. DMA is a major metabolite of inorganic arsenic and organic arsenic compounds contained in food. However, little is known about the carcinogenic risk of prenatal DMA exposure.

The purpose of the present study is to determine the carcinogenic effects of prenatal DMA exposure in CD1 mice and to clarify the mechanism of carcinogenesis by prenatal exposure of DMA in male neonatal mice.

Pregnant CD1 mice were given 0 or 200 ppm DMA in drinking water from gestation day 8 to 18. Offspring were observed for up to 84 weeks of age. And male newborn mice prepared by transplacental exposure and various analyzes described below were performed.

In male offspring, incidence of liver and lung tumor were significantly increased in the prenatal DMA exposure group. There were not increases in the liver and lung tumor in the DMA-exposed female offspring mice.

These results show that exposure of pregnant CD1 mice to DMA through the drinking water induce hepatocarcinogenesis and lung carcinogenesis in male offspring. And the mechanism of lung carcinogenesis was revealed that histone H3K9me3 was increased in neonatal male mice lung prenatal exposed to DMA. In addition, involved as its mechanism suggested that SAM increase caused by metabolic process of arsenic.

Thio-DMA^Vによる分裂期蓄積作用に対するグルタチオンの影響

○北加代子、重留夏海、関口匠、山本早織、鈴木俊英

帝京大学薬学部

1 はじめに

Thio dimethylarsinic acid (Thio-DMA^V)はヒトのヒ素代謝物の一つとして同定された5価の有機ヒ素化合物である。これまで当研究室では、Thio-DMA^Vが多核細胞の出現や染色体の構造および数的異常を引き起こすことや、細胞周期のチェックポイント機構の一つである紡錘体チェックポイントを活性化して細胞を分裂期(M期)に蓄積させることを報告している。M期に蓄積し続けた細胞はその後アポトーシスによって細胞死に導かれるが、これまでThio-DMA^Vがどのようにして紡錘体チェックポイント活性化させるのかそのメカニズムは不明であった。細胞内のグルタチオン(GSH)は一般的にヒ素の毒性発現に対しては防御的に働くと考えられているが、Thio-DMA^Vによる細胞毒性に対しては、むしろ増強させる可能性も報告されている。そこで本研究では、Thio-DMA^VによるM期蓄積作用に対するGSHの影響について検討した。

2 方法

ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞を用い、GSHの合成経路の阻害剤や、GSHの合成材料となるN-アセチルシステイン(NAC)を加えて細胞内のGSH濃度を変化させた時のThio-DMA^Vによる応答性を観察した。紡錘体チェックポイントの活性化はBubR1のリン酸化レベルを、またM期蓄積作用はcyclin B1の発現量を指標にWestern blot法で評価した。分裂期紡錘体の形成の様子はβ-tubulinに対する抗体を用いた免疫染色法を使用した。

3 結果

グルタチオン合成阻害剤L-Buthionine sulfoximine (BSO)で細胞内GSHレベルを低下させた細胞と、NACを投与してGSHレベルを上昇させた細胞にThio-DMA^Vを処理したところ、GSHレベルが低い細胞ではBubR1のリン酸化が抑制され、GSHを増加させた細胞ではBubR1のリン酸化が僅かながら亢進した。*In vitro* 微小管重合実験で微小管の重合に対する影響を調べたところ、Thio-DMA^V単独では何の影響も示さなかったのに対し、GSHと併用した場合には微小管の重合が顕著に抑制された。微小管の重合阻害作用は、既知の微小管重合阻害剤ビンクリスチンと同程度であった。一方、培地中にThio-DMA^VとGSHあるいはNACを同時添加した場合、HeLa細胞はM期に蓄積しなくなり、BubR1のリン酸化も認められなくなった。さらに、Thio-DMA^Vで予め処理して一旦M期に蓄積させた細胞に、途中からGSHやNACを添加した場合も、添加2時間

目以後から M 期の細胞が殆どみられなくなり、BubR1 のリン酸化も抑制された。そこでタイムラプス観察で M 期の細胞が GSH や NAC 添加後にどのように変化するか観察したところ、M 期に留まっていた細胞の殆どが分裂を再開し、しかもその分裂パターンは不均等な 2 極分裂や、3 極分裂が多数を占めた。

4 考察

Thio-DMA^V は細胞内に取り込まれた後、細胞内の GSH と反応して微小管重合阻害作用を発揮することによって、紡錘体チェックポイントを作動させ、細胞を分裂期に蓄積させていると推察された。しかし、培地中に十分な GSH が存在している時には M 期の蓄積や BubR1 のリン酸化が見られなくなり、細胞外の GSH は Thio-DMA^V の細胞内への取り込みを抑制、あるいは別のメカニズムによって Thio-DMA^V による作用を減弱させている可能性が示唆された。しかし、Thio-DMA によって一旦 M 期に蓄積した細胞に対して GSH は、分裂再開作用を発揮し、染色体数の不安定化の原因となる異常分裂を引き起こす可能性が示唆された。

Effects of glutathione on the Thio-DMA-induced mitotic cell accumulation

Kayoko Kita, Natsumi Shigetome, Takumi Sekiguchi, Saori Yamamoto, Toshihide Suzuki
Faculty of Pharma-Science, Teikyo University

Thio-dimethylarsinic acid (Thio-DMA^V) has been known as one of the methyl metabolites of inorganic arsenic compounds. Previously, we have showed that Thio-DMA^V accumulates cells in mitotic phase by activation of spindle assembly checkpoint (SAC). However, exact mechanisms of Thio-DMA^V-induced mitotic cell accumulation were not fully understood. In the present study, we found that intracellular GSH affected the Thio-DMA^V-induced activation of SAC through the inhibition of microtubules polymerization. On the other hand, extracellular GSH inactivated the SAC and promoted the abnormal cell division when the GSH was added after treatment with Thio-DMA^V. These results indicated that intra- or extracellular level of GSH might determine the responsiveness to Thio-DMA^V.

酵母およびヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞における亜ヒ酸による

ペントースリン酸経路関連遺伝子の転写抑制機構

○高橋 勉^{1,2}, 田中裕士¹, 中野 毅¹, 黄 基旭², 永沼 章², 藤原泰之¹

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

1 はじめに

我々は、真核生物モデルとして有用な出芽酵母を用いた検討により、亜ヒ酸耐性因子として糖代謝に関わる転写因子 Mig1 を見出している。Mig1 の転写活性が亜ヒ酸によって抑制されることも明らかにしており、Mig1 が亜ヒ酸毒性発現機構において重要な役割を果たしていると考えられる。ヒトにおいては Mig1 と相同性が高い転写因子として Wilms tumor 1 (WT1) が知られているが、亜ヒ酸毒性との関係性については検討されていない。本研究では、酵母およびヒト培養細胞を用いて、亜ヒ酸毒性発現機構における転写因子 Mig1 および WT1 の役割について検討した。

2 方法

ヒト培養細胞として、子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用いた。酵母および HeLa 細胞における各遺伝子の発現レベルは、real-time PCR 法によって測定した。また、WT1 タンパク質の核内レベルは、核画分中の WT1 のレベルを Western blot 法によって測定した。

3 結果および考察

我々は、酵母において亜ヒ酸が酵母のペントースリン酸経路関連遺伝子の発現を抑制することによって核酸合成を低下させ、その結果として細胞毒性を発現することも明らかにしている。そこで、Mig1 とペントースリン酸経路との関係性を調べたところ、Mig1 の欠損がペントースリン酸経路関連遺伝子の発現レベルを有意に低下させることが明らかとなった。亜ヒ酸が Mig1 を不活性化することも確認していることから、亜ヒ酸は Mig1 依存的な転写機構を阻害することによって、ペントースリン酸経路を抑制して、細胞毒性を発現している可能性が考えられる。

次に、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を亜ヒ酸で処理したところ、亜ヒ酸の処理濃度依存的に WT1 の標的遺伝子 (GAS1, QPRT) の発現レベルが低下することが判明した。亜ヒ酸処理によって核内の WT1 レベルが低下したことから、亜ヒ酸は WT1 の核内レベルを低下させることによって、その下流遺伝子の発現を抑制している可能性が考えられた。また、亜ヒ酸処理によって、ペントースリン酸経路関連遺伝子の発現レベルの有意な低下が認められた。さらに、WT1 のノックダウンによってペントースリン酸経路関連酵素の遺伝子発現が低下することも判明した。したがって、亜ヒ酸が WT1 の転写活

性を低下させることによってペントースリン酸経路を抑制し、細胞毒性を発現している可能性が考えられる。現在、亜ヒ酸毒性発現における WT1 とペントースリン酸経路との関係性について解析を進めている。

Arsenite negatively regulates expression of genes involved in pentose phosphate pathway
in yeast cells and human cervical carcinoma HeLa cells.

Tsutomu Takahashi^{1,2}, Hiroshi Tanaka¹, Tsuyoshi Nakano¹, Gi-Wook Hwang²,
Akira Naganuma², Yasuyuki Fujiwara¹

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

We previously found arsenite might inhibit synthesis of nucleic acids through repression of genes involved in pentose phosphate pathway (PPP) in yeast cells. In this study, we found that Mig1, a transcription factor, regulates genes involved in PPP. Arsenite inhibited transcriptional activity of Mig1, suggesting that arsenite might inhibit PPP through repression of transcriptional activity of Mig1 in yeast cells. In human cells, Wilms tumor 1 (WT1) is known as a transcription factor with high homology to Mig1, but the relationship with arsenite toxicity has not been studied. In this study, we found that arsenite repressed expression of WT1-targeted genes (GAS1, QPRT) in human cervical carcinoma HeLa cells. We also found arsenite decreased the level of WT1 in the nuclear fraction. Arsenite negatively regulated expression of genes involved in PPP in HeLa cells. Knockdown of WT1 by siRNA decreased the expression of PPP-related genes, suggesting that WT1 is involved in transcriptional expression of PPP-related genes. These results suggest that arsenite might inhibit PPP through repression of transcriptional activity of WT1 in HeLa cells.

非ボディ PML の卵子成熟における機能解析

○宇田川理・平野靖史郎¹

¹ 国立環境研究所

1 はじめに

PML (ProMyelocytic Leukemia) は哺乳動物細胞の有糸分裂間期核内においてボディを形成することが知られている。近年、分裂期や細胞質局在型アイソフォーム等の研究から「ボディでない PML」の新たな機能への関心が寄せられている。体を構成するすべての細胞は卵子・受精胚から発生しているが、その一方で PML 核内ボディが受精胚のどの発生段階から出現するのかさえはっきりとしていない。pml 欠損マウスの生殖細胞の形成過程 (減数分裂) に関する表現型は研究されておらず、卵子/着床前胚における PML または PML 核内ボディの役割はまだ知られていない。マウスではヒトの 7 つよりも少なく 2 つのアイソフォームが知られており、マウス卵子における PML mRNA の発現量は、受精前の卵子において最も高く受精後胚盤胞までの着床前胚の成長に伴い、徐々に発現量が低下することが報告されている。一方で、PML 核内ボディは受精後の 2 細胞胚あるいは 8 細胞胚で初めて検出される、など報告によって意見が分かれている。そこで本研究では、受精後の胚における PML の出現時期の解析、並びに受精前の成熟卵子内における「ボディでない PML」の機能解析を試みた。昨年の本研究会において PML が成熟中の卵子において染色体を包むような局在を示す事、染色体配置の安定化に寄与する事を発表した。今回はその詳細についての続報である。

2 方法

まず染色体近傍における PML の局在に関し、抗 PML 抗体と金コロイド粒子を使用した免疫電顕法により調べた。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) を単離後 α MEM 培地中で 20 時間培養し、減数分裂が再開し核膜が崩壊した Metaphase I 卵 (MI 卵) 及び受精可能なレベルまで減数分裂が進行した Metaphase II 卵 (MII 卵) を電顕解析に用いた。次に PML の局在について、既知の染色体近傍タンパク複合体 Chromosomal Passenger Complex (CPC) への依存性を調べるため、同様に単離した GV 卵を CPC 阻害剤として知られる 5-Iodotubercidin (5-Itu) の存在下で 8 時間培養した。このように得た MI 卵について、CPC 構成因子 Survivin 及び初期エンドソームマーカー EEA1 に対する抗体を用いた蛍光抗体染色により PML の局在について調べた。さらに受精後の様々な発育段階にある胚の核内における PML ボディの有無を調べるため、C57BL/6J マウスを強制排卵させて得た Metaphase II 卵 (MII 卵) に対し媒精し、120 時間程度培養した。各胚を固定後、既知の PML 核内ボディ局在タンパクとして知られる small ubiquitin-like modifiers (SUMO2/3) や death-associated protein 6 (Daxx) に対する抗体を用いた蛍光抗体染色により検出した。

3 結果

MI 卵染色体の近傍において PML 陽性の金コロイドは、不定形の凝集体様に分布しており、MII 卵では染色体上に局在する卵子も存在した。次に、5-Itu 処理により Survivin の散逸が確認された MI 卵染色体の近傍においても PML の局在性は変化しなかった。また核膜が崩壊した MI 卵細胞質において PML の局在は初期エンドソームとは全く重ならなかった。最後に、受精後のコンパクション時期（8 細胞期-桑実胚付近）の胚核内において明瞭な PML 陽性のボディが出現した。ボディのシグナルは SUMO2/3 や Daxx の dot 状のシグナルとよく共局在した。

4 考察

有糸分裂において PML 核内ボディは、(核膜崩壊後の) 分裂中期において凝縮した染色体から離れ、細胞質において初期エンドソームに繫留された形で集積する (*mitotic assemblies of PML proteins, MAPPs*) ことが報告されている。今回の我々の結果は、生殖細胞に特異的な減数分裂期の染色体近傍において、PML が未知の分子的特性を介して染色体の安定性に寄与する事を示唆した。PML 核内ボディは受精後各割球の分裂が盛んになる時期に初めて出現する事から、受精前の卵子成熟期における「ボディでない PML」には特有の機能が存在する事が示唆された。我々はヒ素の生殖毒性について研究しており、亜慢性的にヒ素（亜ヒ酸）をマウスに対して曝露するモデルにおいて、卵巣から採取した卵子から腹腔内投与後 1 時間で約 3.1 $\mu\text{g As/g}$ 卵巣湿重量（卵巣全体での検出量の約 30%に相当）ものヒ素が検出されること、墮胎率が増大すること、また培養卵子を用いた *in vitro* の毒性解析では MI, II 卵子における紡錘体形成過程に悪影響を生じることが本研究会で既に発表している。ヒ素は産仔に関わる胎盤の細胞・卵巣濾胞細胞・子宮の細胞などに対しても影響を及ぼすことが知られており、卵子および受精胚（生殖細胞）に特異的なヒ素の標的となる分子機構の解明が望まれる。

Non-body PML in the meiotic maturation of oocytes

Osamu Udagawa and Seishiro Hirano¹

¹National Institute for Environmental Studies

In the present study, we demonstrated that "non-body PML" in the oocyte peri-chromosomally accumulates and is involved in the maintenance of the meiotic spindles during the meiotic maturation. Also we re-evaluated the controversial issue on the first appearance of the PML nuclear bodies (PML-NBs) in the fertilized embryo. We found that PML-NBs appear in the nucleus of each blastomere at around compaction, especially evident in embryos completed the compaction.

ゼブラフィッシュモデルの活用により発見した 毒性の低い Nrf2 活性化剤の亜ヒ酸毒性軽減効果

○布施雄士、遠藤優佳、Vu Thanh Nguyen、小林麻己人
筑波大学医学医療系

1 はじめに

生体防御機構 Nrf2 システムの薬剤による活性化は、酸化ストレスや環境中に存在する重金属などの毒性を軽減できることが期待されている。しかしながら、これまで私たちは、薬剤によって安全に Nrf2 システムを活性化する難しさを経験してきた。ブロッコリースプラウトなどの野菜に含まれる Nrf2 活性化剤サルフォラフェンは、酸化ストレス（過酸化水素）に対する抵抗性を強力に賦与する (Mukaigasa *et al.* 2012 *Mol Cell Biol*) が、亜ヒ酸ナトリウムとの組み合わせでは、Nrf2 非依存的な複合毒性を発揮する場合があることを発見した (Fuse *et al.* 2016 *Toxicol Appl Pharmacol*)。このことは、特定のストレス条件下においては、Nrf2 活性化剤の毒性が増強されてしまう可能性を示しているため、安全に利用できる Nrf2 活性化剤を開発する必要がある。

そこで本研究では、近年創薬分野でさかんな既存薬再開発 (Drug repositioning) という戦略からアイデアを得て、人体に対する安全性がある程度担保されている既承認薬に着目した。Nrf2 の活性化が報告されている薬について、酸化ストレスや亜ヒ酸に対する生体防御賦与効果と毒性について検証した。

2 方法

Nrf2 活性化が報告されている 2 つの既承認薬、多発性硬化症の治療薬ジメチルフマル酸および関節リウマチの治療薬オーラノフィンの効果を検証した。モデルとして、*in vivo* での毒性および薬効評価を簡単に行えるゼブラフィッシュ胚を活用した。受精後 3.5 日胚を、各薬剤で 12 時間前処理し、その後受精後 4 日目の時点からストレス（過酸化水素や亜ヒ酸ナトリウム）に曝露して、12 時間おきに生存率を解析した。野生型とともに、Nrf2 変異型ゼブラフィッシュ系統 (*nrf2a^{m318}*) を利用することにより、薬効の Nrf2 依存性を遺伝学的に確かめた。遺伝子発現解析は、*in situ hybridization* 法により行い、Nrf2 活性化剤による遺伝子誘導を評価した。

3 結果

まず、候補薬剤が酸化ストレスへの抵抗性を賦与するか調べるため、野生型ゼブラフィッシュ胚をそれぞれの薬剤で前処理後、過酸化水素曝露を行い、生存率の解析を行った。ジメチルフマル酸は、明瞭に酸化ストレス抵抗性を与えなかったが、オーラノフィ

ンは、過酸化水素曝露後の胚の生存率を顕著に上昇させた。

次に、Nrf2 変異型ゼブラフィッシュ系統を用いて、オーラノフィンのストレス抵抗性賦与効果が、Nrf2 活性化によるものか検証した。オーラノフィン処理後、*gstp1* などの Nrf2 標的遺伝子は、野生型やヘテロ変異型胚 (*nrf2a^{fh318/+}*) では誘導されたが、ホモ変異型胚 (*nrf2a^{fh318/fh318}*) ではみとめられなかった。また、オーラノフィンは、ホモ変異型胚に対して、過酸化水素に対する抵抗性を賦与できなかつたため、オーラノフィンによる抵抗性の上昇は、Nrf2 活性化によるものであることが明らかになった。

さらに、オーラノフィンによる Nrf2 活性化が、亜ヒ酸の毒性軽減に応用可能であるか検証した。オーラノフィン前処理は、サルフォラフェンでみられたような毒性を発揮することなく、亜ヒ酸ナトリウム曝露後の胚の生存率を改善した。また、Nrf2 変異型系統の解析から、この効果は Nrf2 依存的であることが確かめられた。

4 考察

既存薬オーラノフィンによる Nrf2 活性化は、酸化ストレスやヒ素化合物の毒性を軽減できる可能性が示された。また、既存薬の中から薬効のある化合物を探すという戦略は、特定のストレス状況下で生じてしまう薬の毒性を回避するアプローチとしても有効であることが示唆された。

Attenuation of arsenite toxicity by a low-toxic Nrf2 activator that was discovered by the use of a zebrafish model

Yuji Fuse, Yuka Endo, Vu Thanh Nguyen, Makoto Kobayashi

Faculty of Medicine, University of Tsukuba

Pharmacological activation of the Nrf2 system is anticipated to be applied to the prevention of health problems caused by oxidative stress and environmental chemicals including arsenic. However, we previously found that it is not easy to activate the Nrf2 system safely: a well-used Nrf2 activator sulforaphane exerted a combinatorial toxic effect with sodium arsenite. To circumvent the toxicity problem, we adopted a strategy of “drug repositioning” and explored relatively safe Nrf2 activators using a zebrafish model. We found that auranofin, an approved drug for rheumatoid arthritis, attenuated arsenite toxicity without any obvious combinatorial toxic effects. Auranofin may have wide applications in chemical- and oxidative stress-related health problems.

ICP-MS によるヒ素化合物分析のためのカラム組み込み型

ネブライザー開発

○宮下 振一¹、高江 祥²、藤井 紳一郎¹、高津 章子¹、梅村 知也²、稲垣 和三¹

¹国立研究開発法人産業技術総合研究所、²東京薬科大学

1 はじめに

現在、農学、医学、生命科学などの様々な研究領域や産業界では、金属化合物の定性・定量分析を目的として、HPLC-ICP-MS による化合物の分離検出が行われている。しかしながら、 $\mu\text{L}/\text{min}$ レベルの低流量での化合物分離においては、多数の配管接続部のデッドボリュームの存在による試料液の拡散（ピーク形状の悪化）や、ボイドボリュームの存在による分離化合物の拡散（ピーク幅の拡大）といった課題がある。これらの課題の解決方法としては、分離カラムをネブライザー自体に組み込むことで一体化させることが挙げられ、その実現によって試料液及び分離化合物の拡散の抑制が期待できる。また、ネブライザーに組み込む分離カラムとして、三次元的に連通した空孔を有する多孔質体（モノリス）を担体とするモノリスカラムを用いることにより、粒子充填型カラムでは困難なカラム切断面を通じた開放系への高圧送液が可能となり、さらに、モノリスが有する高い流体透過性と優れた物質移動効率から、低圧損での高速・高性能分離の実現も期待できる。

本研究では、試作したモノリスカラム組み込み型ネブライザーの性能評価結果、並びに、ヒ素化合物分離分析への応用結果について報告する。

2 方法

固定相にジエチルアミノ基を有する弱塩基性陰イオン交換ポリマーモノリスカラム（内径 0.53 mm、長さ 15 cm）を *in situ* 重合法によって作製した。また、固定相にオクタデシル基を有する逆相系シリカモノリスカラム（内径 0.2 mm、長さ 25 cm）を購入した。両カラムは、先端部に孔径 35 μm のグリッドメッシュを有するグリッドネブライザーボディ（先端穴径 0.2 mm）に組み込んだ。

試作ネブライザーの性能評価として、ガス流量 1 L/min での噴霧液滴のサイズ分布評価、並びに、ICP-MS 装置装着時におけるピーク形状の繰り返し精度評価及び感度特性評価を行った。また、ヒ素化合物分離への応用として、4 種類の水溶性ヒ素化合物（亜ヒ酸、ヒ酸、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸）を対象とした分離検出を試行した。

3 結果及び考察

試作ネブライザーによる噴霧液滴のサイズ分布を測定した結果、例えば弱塩基性陰イオン交換ポリマーモノリスカラム一体型ネブライザーでは、流量 0.02 mL/min でのザウター平均径 ($D_{3,2}$) は 3.6 μm 、体積メジアン径 (D_{50}) は 3.9 μm であった。汎用的なネブライザー (Glass Expansion 社製 MicroMist、0.1 mL/min アップテイクモデル) では、流量 0.2 mL/min での $D_{3,2}$ は 10.7 μm 、 D_{50} は 24.4 μm であったことから、試作ネブライザーはより微細な液滴の噴霧が可能であることが明らかとなった。本発表では、現在実施しているその他の性能評価の結果、並びに、ヒ素化合物分離分析への応用結果についても報告する。

Development of a Separation Column-Integrated Nebulizer for Speciation Analysis by ICP-MS

Shin-ichi Miyashita¹, Sho Takae², Shin-ichiro Fujii¹, Akiko Takatsu¹, Tomonari Umemura², Kazumi Inagaki¹

¹National Metrology Institute of Japan (NMIJ)/AIST

²Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

HPLC-ICP-MS has been widely used as a tool for metal speciation analysis in various research fields and industries. However, in separation of metal compounds at low flow rates ($\mu\text{L}/\text{min}$ level), diffusion of sample solution due to the presence of dead volume at many tubing connections and diffusion of separated compounds due to the presence of void volume. One possible approach to solve these problems is to integrate a separation column into a nebulizer for aerosol generation, which would result in suppressing the diffusion of sample solution and separated compound. While it is difficult to integrate a commercially-available packed column itself into a nebulizer, a monolithic column is potentially capable of being integrated into a nebulizer due to its characteristics of structure. In addition, a monolithic column has the characteristics of low flow-resistance and excellent mass transfer, which allows for high-speed and high-performance separation at high flow rates with minimal loss of column efficiency.

In this study, we report on the performance evaluation results of prototypes of monolith column-integrated nebulizers, and the application results on arsenic speciation analysis.

模擬的消化環境におけるアルセノシュガー328の化学形態変化

○大友 祐輝¹、長谷川 桃子¹、畑 明寿¹、山中 健三²、圓藤 吟史³、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中災防大阪労働衛生総合センター

1 はじめに

海産食品はヒ素含有量が比較的多いことから健康リスク評価が求められている。海産食品に含まれるヒ素化合物は、ヒジキなどの例外を除いては有機ヒ素化合物がその大半を占め、魚介類はアルセノベタイン (AsBe) やアルセノリピッド (AsLipid)、海藻類はアルセノシュガー(AsSug)や AsLipid などの有機ヒ素化合物を多く含んでいる。AsSug や AsLipid はヒト体内で主にジメチルアルシン酸(DMA)などのジメチルヒ素化合物へと代謝されることが知られている。また AsSug を経口摂取した者の尿からヒ素発がんへの関与が疑われているジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA) が検出されていることから、AsSug や AsLipid の代謝経路と発がん性の関連が注目されている。しかしながら、AsSug、AsLipid から DMA への代謝については不明な点が多い。そこで本研究では、AsSug の代謝に関する知見を得るため、模擬的消化環境における AsSug328 の化学形態変化を観察した。

2 方法

被験試料である AsSug328 は Traar ら (Tetrahedron Lett. 2006) の方法に基づき合成した。模擬的消化環境は胃液、胆汁・膵液、腸内細菌液の3相とした。AsSug328 溶液に模擬胃液を加え 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胆汁・膵液を加え 30 分間振盪した。可能な限り嫌気状態を維持するためアルゴン置換を行った後、腸内細菌液を添加し 24 時間振盪した。なお腸内細菌液は新鮮なヒト糞便から採取し添加直前に調整した。各相の終了時にサンプリングを行い、HPLC-ICP-MS で化学形態別分析を行った。HPLC におけるヒ素化合物分離には、陽イオン交換カラムと陰イオン交換カラムを用いた。ヒ酸 (AsV)、亜ヒ酸 (AsIII)、モノメチルアルソン酸 (MMA)、DMA、DMMTA、AsSug328 の各標準物質と溶出時間が一致しないヒ素化合物が生じた際には、HPLC-TOF-MS による化学組成の解析を行った。

3 結果

AsSug328 の模擬胃液への曝露の結果、AsSug328 は減少し、これに代わり未知のヒ素化合物ピークが検出された (peak A)。peak A の成分について HPLC-TOF-MS で解析した結果、AsSug254 と AsSug269 の2種類のヒ素化合物が認められた。模擬胆汁・膵液へ

の曝露の結果、胃液曝露時とは反対に peak A は減少し、AsSug328 が増加した。腸内細菌液への曝露の結果、AsSug328 は減少し、これに代わって新たな未知ヒ素化合物のピークが検出された (peak B)。同サンプルを分離性状の異なるカラムで分析したところ、peak B には複数のヒ素化合物が含まれることがわかった。HPLC-TOF-MS 解析の結果、peak B に含まれるヒ素化合物の 1 つはチオ型 AsSug328 であった。上記 3 相の模擬的消化環境下での実験により、AsSug328 から DMA が生じることはなかった。また、AsV、AsIII、MMA、DMMTA も生じなかった。

4 考察

模擬的消化環境下において AsSug328 は 5-デオキシリボフラノース骨格部分は概ね維持されており、AsSug254、AsSug269、チオ型 AsSug328 のほか幾つかの未同定ヒ素化合物には変化したが、DMA へは変換されなかった。AsSug328 及びその代謝物は消化管で吸収された後、肝臓などにおいて DMA へと代謝されている可能性が考えられる。

Metabolism of arsenosugar 328 in *in vitro* artificial gastrointestinal system

Yuki Otomo¹, Momoko Hasegawa¹, Akihisa Hata¹,
Kenzo Yamanaka², Ginji Endo³, Noboru Fujitani¹

¹ Graduate School of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science,

²School of Pharmacy, Nihon University, ³ Osaka Occupational Health Service Center, Japan
Industrial Safety and Health Association

Seaweeds consumed as food contain large amounts of various arsenic compounds, mostly arsenosugar (AsSug) and arsenolipid (AsLipid). AsSug and AsLipid are metabolized into a possible carcinogen of dimethylarsinic acid (DMA). We tried to clarify the metabolism of the AsSug in gastrointestinal tract using an *in vitro* artificial gastrointestinal system.

AsSug328 was incubated at 37°C in gastric juice for 4 h, then in intestinal juice (containing bile extract and pancreatin) for 0.5 h, and finally in enteric bacteria solution (prepared using fresh feces obtained from a healthy male adult) for 24 h. Changes of the arsenic compounds after artificial digestion were analyzed by HPLC-ICP-MS and HPLC-TOF-MS.

After artificial digestion, not DMA but several AsSugs including thio-AsSug and an unidentified arsenic compound were detected. Therefore, AsSug328 and its 5-deoxyribofuranose-containing metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract and then metabolically converted to DMA in liver.

ミャンマーにおける地下水ヒ素汚染の実態

○阿草哲郎¹、村上理佳子¹、木村直登¹、大曲遼¹、内山幸子¹、中田晴彦²、Nyunt Phay³

¹熊本県立大学・環境共生学部、²熊本大学・理学部、³Patheon University

1 はじめに

地下水のヒ素汚染は、世界規模で大きな公衆衛生問題となっている。推定では、世界で2億を超える人々が、世界保健機関（WHO）が定めた飲用水の基準値（10 µg/L）以上のヒ素を含む地下水を飲用していると言われている。地下水の飲用を介して慢性的にヒ素曝露を受けた人々は、皮膚障害やがんなどの様々な症状に苦しめられている。そのため、世界全体でヒ素汚染の科学的な手法に基づいた実態調査と代替水源・ヒ素除去システムの開発が急務となっている。

ミャンマーは、アジアの中でも貧しい国である一方、近年経済成長著しい国でもある。しかし、上水道は十分普及しておらず、多くの地域で地下水が利用されている。その地下水がヒ素で汚染されている可能性がある。ヒマラヤ山脈由来の完新世の新沖積帯水層はヒ素の汚染源と考えられており、この地域を起源とするガンジス川やメコン川等の大河流域では地下水のヒ素汚染が顕在化している。ミャンマーにも、ヒマラヤを起源とするエーヤワディ川が流れており、地質学的にみてヒ素汚染が存在することが示唆されている。実際、最近の研究で、同河川流域の地下水から高濃度のヒ素が検出されており、ヒ素汚染の存在が初めて明らかとなった。しかしながら、それらの調査結果はサンプル数も少なく、また内容も断片的であるため、さらなる検証と広範囲なモニタリング調査が求められる。

そこで本研究では、ミャンマーのエーヤワディ川流域における地下水のヒ素汚染の実態解明を試みた。また、ヒ素以外のその他の微量元素についても分析し、地下水の複合汚染についても調査した。

2 試料と方法

2015年12月および2016年12月に、ミャンマーのエーヤワディ川流域中部および南部で地下水（ $n=49$ ）を採取した。採取時に、地元住民から地下水（井戸）の深度、利用歴、利用方法についての情報を得た。また、比較のため、河川水（ $n=1$ ）、水道水（ $n=9$ ）、ボトル水（ $n=1$ ）も採取した。各種水サンプルを0.20 µmのフィルターでろ過・非ろ過したものに分け、硝酸添加後、ヒ素濃度を誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）で定量した。また、ヒ素以外の微量元素についても同様にICP-MSで分析した。

3 結果と考察

分析の結果、地下水中ヒ素濃度は、 $<0.01 - 209$ µg/Lの範囲であった。ほぼ全ての水

サンプルにおいて、ヒ素は溶存態として存在していた。WHOによる飲用水の安全基準値と比較したところ、全サンプルの28%が基準値を超過していた。さらに、水道水でさえも、この基準値を上回るサンプルがあった。以上のことから、これらの水を飲用する地域住民に、ヒ素曝露による健康リスクが懸念される。

次に、地理的分布をみると、ヒ素汚染のホットスポットは特定の地域に集約しているのではなく、各地に広く点在していることが明らかとなった。また、井戸の深さ15–60 mの地下水から高濃度のヒ素が検出されており、この深度に何かしらヒ素を豊富に含む帯水層が存在していることが示唆された。

ヒ素以外の他の微量元素も分析したところ、マンガンやウランについても、いくつかの地点からWHOの基準値を上回る濃度が検出された。とくに、ヒ素とマンガン、ヒ素とウランによる複合汚染も見つかったことから、ミャンマーの人々における地下水を介した複合曝露による健康リスクが大きな関心事となった。

Contamination status by arsenic in groundwater from Myanmar

Tetsuro Agusa¹, Rikako Murakami¹, Naoto Kimura¹, Ryo Omagari¹,
Yukiko Uchiyama¹, Haruhiko Nakata², Nyunt Phay³

¹Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto,
Japan

²Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, Japan

³Patheingyi University, Myanmar

We conducted monitoring survey of arsenic (As) pollution in groundwater from Myanmar. Groundwater, tap water, river water, and bottle water samples were collected in the middle and southern parts of Myanmar in December 2015 and 2016. Concentrations of As and other trace elements in those samples were measured with an inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS). Concentration of As in groundwater was in the range of <0.01 – 209 µg/L. We found that about 28% of groundwater samples collected in our sampling had over the safe level (10 µg/l) for As in drinking water established by WHO. Interestingly, high concentrations of As were also detected in some tap water samples, indicating that those public waters are not suitable for drinking. Geographical distribution of As in groundwater revealed that hot spots of As contamination were widely dispersed, not concentrated in a certain area. Relatively high concentrations of As were detected in groundwater from 15 – 60 m depth. For other metals, manganese (Mn) and uranium (U) levels in some groundwater contaminated by As were also higher than the WHO guideline values. Therefore, human health risks of multi-elemental exposure through drinking of groundwater are of great concern in Myanmar.

血管内皮細胞において重金属の毒性を軽減するヘパラン硫酸

プロテオグリカン分子種

○ 吉田映子, 風見麻依, 鍛冶利幸
東京理大・薬

1 はじめに

血管内皮細胞は、血管のトーンや血液凝固線溶系を調節するだけでなく、血液と血管内皮下組織を隔てる障壁として機能している。環境中に存在するヒ素、鉛、メチル水銀やカドミウムによる器官毒性の表現型は多様であるが、その器官毒性の発現には血管毒性、つまり血管内皮細胞に対するこれら化合物による毒性の二次的な影響であることは無視できない。したがって、内皮細胞に対するカドミウムの細胞毒性発現を決定づける因子およびそのメカニズムの解明はカドミウムの器官毒性の理解に重要である。

一方、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) はコアタンパク質にヘパラン硫酸糖鎖が共有結合した複合糖質であり、内皮細胞において多様な機能を発現している。内皮細胞に高く発現する HSPGs として、細胞外マトリックスに存在する大型分子種パールカン、細胞膜貫通型の小型分子種シンデカン-1 およびシンデカン-4 が知られている。本研究の目的は、内皮細胞毒性を修飾する HSPG 分子種を同定し、その修飾のメカニズムを明らかにすることである。

2 方法

細胞はウシ大動脈内皮細胞を、siRNA および高発現ベクターの導入はリポフェクション法を用いた。内皮細胞へはヒ素、鉛、メチル水銀およびカドミウムを曝露した。細胞傷害性はギムザ染色による形態学的観察および乳酸脱水素酵素 (LDH) の逸脱量、遺伝子発現は real time RT-PCR 法、タンパク質発現は Western Blot 法にて評価した。細胞内のカドミウム蓄積量は ICP-MS を用いて測定した。

3 結果および考察

内皮細胞に多く存在するパールカン、シンデカン-1 またはシンデカン-4 siRNA を導入し、それぞれを発現抑制した細胞にヒ素、メチル水銀およびカドミウムを曝露すると、発現抑制細胞における内皮細胞傷害が顕著に上昇した。一方、鉛による細胞傷害はこれらプロテオグリカン分子種の発現変動に影響しなかった。なかでも、これらプロテオグリカン分子種を発現抑制したことにより、カドミウムによる内皮細胞傷害が特に増強していたことから、カドミウムによる内皮細胞毒性を修飾するプロテオグリカン分子種について詳細な検討をすることとした。

内皮細胞にパールカン、シンデカン-1、シンデカン-4 を高発現させたところ、シンデカン-1 およびシンデカン-4 を高発現した細胞において、カドミウムによる細胞傷害が

顕著に低減した。パールカン高発現細胞ではカドミウムによる細胞毒性に対する抑制効果は認められなかったのは、内皮細胞においてパールカンが恒常的に高く発現しているためと考えられる。カドミウムの細胞毒性は細胞内蓄積量に依存するため、パールカン、シンデカン-1, およびシンデカン-4 発現抑制細胞におけるカドミウムの蓄積量を検討したところ、いずれの細胞においてもカドミウムの細胞内金属蓄積量が増大していた。しかしながら、本条件下におけるカドミウムによるメタロチオネインアイソフォーム-MT1A, MT1E および MT2-の転写誘導は、パールカン、シンデカン-1, およびシンデカン-4 発現抑制の影響を受けなかった。カドミウムを細胞内へ輸送する金属輸送体 ZIP8 の発現量は、パールカン、シンデカン-1, およびシンデカン-4 発現抑制細胞において、カドミウムによる ZIP8 mRNA の発現誘導がさらに上昇していた。さらに、これらの発現抑制細胞において Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) の発現が増強していた。我々は、FGF-2 が内皮細胞におけるカドミウム毒性を増強する因子であることを報告している (Fujiwara *et al.*, Arch. Toxicol., 2014)。したがって、パールカン、シンデカン-1, およびシンデカン-4 発現抑制による内皮細胞のカドミウム毒性の増強は、金属輸送体 ZIP8 の発現上昇に伴う細胞内カドミウム蓄積量の増大と、FGF-2 の発現上昇による内皮細胞のカドミウム感受性の増大によるものと推察される。

以上、本研究により血管内皮細胞に発現するパールカン、シンデカン-1, およびシンデカン-4 がカドミウムだけでなくヒ素やメチル水銀に対する防御因子として機能し得ることが示された。特にカドミウムは細胞内カドミウムの蓄積減少を介してカドミウムの内皮細胞毒性を軽減する HSPG 分子種であることを明らかにした。

Heparan sulfate proteoglycans that protect vascular endothelial cells from various metals cytotoxicity

Eiko Yoshida, Mai Kazami, Toshiyuki Kaji

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science

Vascular toxicity is important for understanding the organ toxicity of various metals. In the present study, we found that three types of heparan sulfate proteoglycans —perlecan, syndecan-1, and syndecan-4— protect against the cytotoxicity of arsenite, cadmium, and methylmercury cytotoxicity in vascular endothelial cells.

玄米中総ヒ素・カドミウム濃度に対する

出穂前後3週間の水管理の週間寄与率

○戸上和樹¹、三浦憲蔵²、永田修¹

¹農研機構東北農研、²日本土壌協会

1 はじめに

玄米中の無機ヒ素濃度は湛水による還元的土壌条件、カドミウム濃度は落水による酸化的土壌条件で増加するトレードオフの関係にある。これまでに出穂前後3週間の3湛4落（3日湛水、4日落水）の水管理を行うことにより品質や収量に悪影響をおよぼさずにヒ素濃度の低減が可能として現在、実証試験が行われている。しかし、合計6週間にわたる水管理は生産者にとって負担が大きい。本研究では、出穂前後の水管理の影響を1週間単位で詳細に解析し、玄米中のヒ素・カドミウム濃度低減技術における水管理期間短縮の可能性を検討した。

2 方法

土壌（グライ低地土、1 M 塩酸抽出ヒ素濃度: 21.1 mg kg⁻¹、0.1 M 塩酸抽出カドミウム濃度: 2.6 mg kg⁻¹）と化成肥料（窒素、リン、カリ 0.5 g/ポット）を1/5000 aポットに充填し、ひとめぼれ、コシヒカリ、タカナリの3品種を移植後、出穂3週間前まで栽培した。その後、出穂前後3週間のうちの1週間の水管理（湛水、落水の2水準）を要因とし、L12直交表に従い湛水または落水させた（Table 1）。湛水から落水の移行は、ポットの排水孔から排水し、落水から湛水の移行は、還元が進行しやすいよう底面灌水により土壌中の空気除去するように湛水させた。試験は降雨の影響がないポット栽培試験室において3反復で行った。また、同期間における土壌の深さ5、10 cmの酸化還元電位（Eh）を測定した。収穫した玄米は微粉砕した後、硝酸加圧分解し、玄米中総ヒ素・カドミウム濃度を測定した。

3 結果および考察

常時湛水区のEhは、-200 mVでほぼ一定であったが、湛水と落水が繰り返されると湛水時のEhは、-150~100 mVの範囲で推移した。玄米収量は多収品種のタカナリが最も高く、コシヒカリ、ひとめぼれの順となった。玄米中総ヒ素濃度は湛水で増加、落水で減少したのに対し、カドミウム濃度は逆の傾向となった。時期別にみるとヒ素濃度はひとめぼれで-14~21日（出穂前はマイナスで表記）、コシヒカリで-5~16日、タカナリで-5~23日（Fig.1）、カドミウム濃度はひとめぼれで-14~14日、コシヒカリで2~16日、タカナリで-12~16日にかけて水管理において有意差が認められた。算出した寄与率は、

すべての品種でヒ素、カドミウムとも出穂前より出穂後の方が高く、玄米中ヒ素・カドミウム濃度は出穂後3週間の水管理の影響を大きく受けることが示された。

Table 1 L12 直交表による試験設計

処理区ID	3週前	2週前	1週前	出穂0週	1週後	2週後	3週後	
T1								湛水
T2								落水
T3								
T4								湛水
T5								落水
T6								湛水
T7								落水
T8								湛水
T9								落水
T10								湛水
T11								落水
T12								湛水

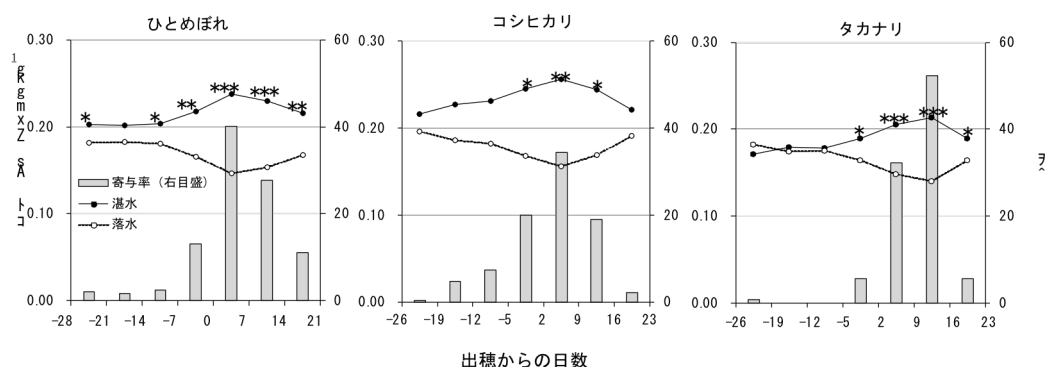


Fig.1 玄米中総ヒ素濃度に対する水管理の影響

棒グラフは寄与率. 出穂からの日数で負の値は、出穂前を示す. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001

Influence of water management for 3 weeks before and after heading on arsenic and cadmium contents in unpolished rice

Kazuki Togami¹, Kenzo Miura², Osamu Nagata¹

¹NARO Tohoku Agricultural Research Center, ²Japan Soil association

Irrigation water management for 3 weeks before and after heading is important to reduce As and Cd contents in unpolished rice. However, the water management for a total of 6 weeks is burden to rice farmer. To shorten the duration of that, we analyzed the influence of weekly water management for 3 weeks before and after heading by pot cultivation test corresponding to L12 orthogonal table. The contribution rate calculated suggests that the water management after heading suffices to reduce As and Cd contents.

モンゴル産ゼオライトの化学修飾による

ヒ素および重金属の吸着除去

○塩盛弘一郎¹、ドルゴルマー ムンフバト²、バヤンジャルガル オチロホヤグ²

¹宮崎大学工学教育研究部、²モンゴル国立大学工学・応用科学部

1 はじめに

モンゴルは、銅、モリブデンや石炭などに加え天然ゼオライトや粘土鉱物などを多量産出する。天然ゼオライトは低コストで吸着材として優れた特性を有していることから、鉱山廃水や産業廃水に含まれる重金属等の吸着除去への応用が期待されている。本研究ではモンゴル産の天然ゼオライトによる Cd(II)、Pb(II)および Zn(II)の吸着および酸化マグネシウム/硝酸により化学修飾したゼオライトによる As(V)の吸着について明らかにした。

2 方法

天然ゼオライトは、モンゴル国 Dornogovi province の Tsagaan Tsav (TS.TS) と Tushleg (TUSH)の堆積地で採取された2種類を用い、粉碎、53 μ m以下に篩い分け、373Kで乾燥後に使用した。ゼオライトの化学修飾は、30mLの1.0 N 硝酸水溶液に3gのゼオライトと3gのMgOを加え、20h 攪拌後、ろ過、蒸留水洗浄、乾燥することにより行った。吸着操作は、回分法により行い、1-20mg/Lの金属イオンを含む水溶液にゼオライト加え、303Kで24h 吸着させた後にろ過した。水溶液中の金属イオン濃度をICP-AESで測定し、吸着前後の濃度変化より吸着量を求めた。ゼオライトは、SEMとEDXによる表面分析、XRDによる結晶構造解析、BET法による細孔分布分析を行った。

3 結果

用いた2種類のゼオライトは、XRDよりClinoptilolite型のゼオライトであった。BET法による細孔分布分析の結果をTable 1に示す。どちらもほぼ同じの比表面積と細孔構造を有しておりメソ多孔体であることがわかった。

天然ゼオライトへのCd(II)、Pb(II)およびZn(II)の吸着量と水相濃度との関係をFig. 1に示す。どちらのゼオライトもPb(II)の吸着量が低濃度から非常に高く、Pb(II)の吸着剤として優れていることがわかった。一方、Cd(II)およびZn(II)の吸着量は水相の濃度が高くなっても増加しなかった。

Table 1 BET surface area analysis of the zeolite samples

Property	TS.TS-ZEO	TUSH-ZEO
BET surface area [m ² /g]	34.51	26.95
Average pore diameter [nm]	8.36	9.86
Total pore volume [cm ³ /g]	0.072	0.066

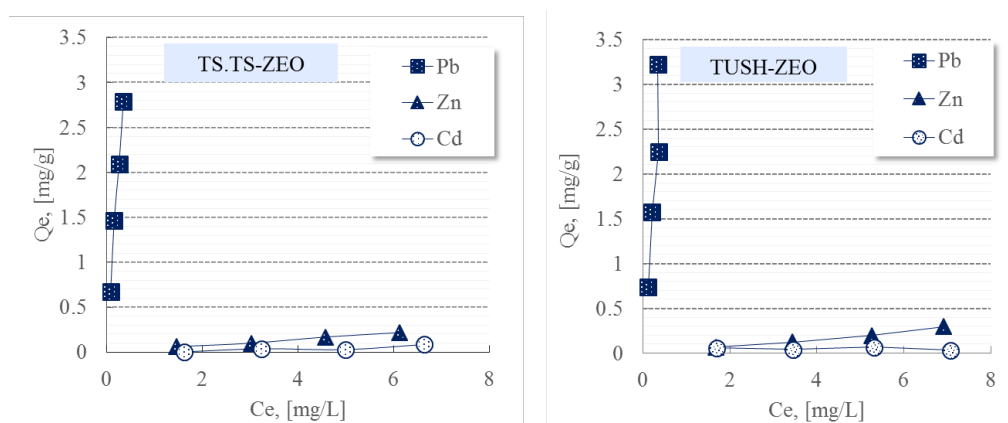


Fig. 1 Adsorption isotherms of heavy metals with natural zeolites

酸化マグネシウム/硝酸により化学修飾したゼオライトは、XRDの結果、ゼオライト構造が変化し、MgOHのピークが観察された。化学修飾したゼオライトによるAs(V)の吸着結果をTable 2に示す。化学修飾しない場合はAs(V)の吸着は非常に少ないが、化学修飾することによりAs(V)の吸着は飛躍的に高くなった。

Table 2 Arsenic (V) adsorption by natural and MgO modified zeolites

Sample ID	Sample state	Arsenic(V) adsorption [mg/g]	Adsorption efficiency [%]
TUSH-ZEO	Unmodified	0.018	36.0
	Modified	0.569	97.3

Adsorption of arsenic and heavy metals with chemically modified zeolite produced from Mongolia

Koichiro Shiomori¹, Dolgormaa Munkhbat², Bayanjargal Ochirkhuyag²

¹Faculty of Engineering, University of Miyazaki

²Faculty of Engineering and Applied Sciences, National University of Mongolia

The structural characteristic and the adsorption properties of heavy metals on Mongolian natural zeolites were investigated. The samples were confirmed as Heulandite group of Clinoptilolite type zeolite by XRD. According to BET surface analysis, natural zeolites have mesoporous type of pore. The adsorption ability of natural zeolite is high effective for lead ion in acidic aqueous solution and the order of heavy metal selectivity was $Pb^{2+} \gg Zn^{2+} > Cd^{2+}$. The adsorption performance of As(V) is significantly increased by modification with MgO on natural zeolite.

水稻根の鉄プラークへのヒ素の集積と形態に鉄資材がおよぼす影響

○山口紀子¹、大倉利明¹、彦野安津子¹、山口弘¹、橋本洋平²、牧野知之¹

¹農研機構・農業環境変動研究センター、²東京農工大学

1 はじめに

水田土壌が全体的に還元状態にあっても、イネの根の近傍は局所的に酸化的である。根の通気組織を通じて地上部から酸素が、根の近傍に供給されるからである。土壌中の鉄鉱物の還元溶解により土壌溶液に溶出した2価鉄イオンは、根の近傍の酸化的領域で、鉄(水)酸化物として沈殿する。このようにして根に沈着した鉄鉱物は、鉄プラークとよばれる。ヒ素吸着能の高いフェリハイドライトなどを主成分とする鉄プラークにより、根の近傍にはヒ素が集積することが知られている (Khan et al. 2016)。また、鉄資材を水田土壌に施用することで、土壌が還元状態にあってもイネへのヒ素の吸収を抑制できることが示されている (Makino et al. 2016)。本研究では、イネの根近傍に沈着した鉄プラークへのヒ素の集積および集積したヒ素の化学形態が、土壌への鉄資材添加によりどのような影響を受けるかを明らかにすることを目的とした。

2 方法

水田土壌に鉄資材(フェリハイドライト)を混合し、コシヒカリを常時湛水条件で栽培した。中干期および収穫期に落水し、落水直後および落水1週間後、1ヵ月後(収穫期のみ)に土壌および根を表層から0~3 cm および6~9 cmの深さより採取した。土壌および根は液体窒素で急速冷凍し、凍結乾燥した。凍結乾燥した土壌および根から酸性シュウ酸塩抽出法により低結晶性鉄鉱物を溶解し、溶出液中の鉄、ヒ素濃度をICP-OESおよびICPMSにより定量した。土壌および鉄プラークが付着した根に含まれるヒ素の形態別分布割合をX線吸収スペクトル微細構造(XANES)により分析した。また、3~6 cmの深さより採取した土壌より土壌薄片を作成し、根の近傍における鉄プラークの沈着状況を顕微鏡観察した。

3 結果と考察

鉄プラーク上の酸性シュウ酸塩抽出As/Fe比は、バルク土壌に比べて高く、鉄プラーク上の鉄鉱物にヒ素が集積していることが示された。XANES分析の結果、鉄プラーク上では、ジメチルアルシン酸(DMA)の割合がバルク土壌に比べて高く、無機ヒ素だけでなく、有機態ヒ素もアイロンプラークに集積することが示された。

鉄プラーク上の酸性シュウ酸塩抽出As/Fe比は、鉄資材の混合により減少した。これは、鉄プラークの根への沈着量が鉄資材添加により増加したことに加え、土壌溶液中ヒ素濃度が減少していたことが原因であると考えられた。鉄資材の添加により、鉄プラーク

ク上の酸性シュウ酸塩抽出 As/Fe 比は減少したが、無機ヒ素および DMA の存在割合には差がなかった。また、落水後の亜ヒ酸からヒ酸への酸化速度についても、鉄資材の添加の影響は小さかった。鉄資材は、土壌溶液へのヒ素溶出を抑制することで根圏へのヒ素の移行を抑制していることが明らかになった。

引用文献

Khan, N. et al. Root iron plaque on wetland plants as a dynamic pool of nutrients and contaminants. In *Advances in agronomy*, 2016; Vol. 138, pp 1-96.

Makino, T et al. Simultaneous decrease of arsenic and cadmium in rice (*Oryza sativa* L.) plants cultivated under submerged field conditions by the application of iron-bearing materials. *Soil Science and Plant Nutrition* 2016, 62, 340-348.

Effects of iron amendments on the accumulation and speciation of arsenic on the iron plaque around rice roots.

Noriko Yamaguchi¹, Toshiaki Ohkura¹, Atsuko Hikono¹, Hiroshi Yamaguchi¹, Yohey Hashimoto², Tomoyuki Makino¹

¹ Institute for Agro-Environmental Science, NARO,

² BASE, Tokyo University of Agriculture and Technology

Even when the paddy soil matrix is predominantly under reductive condition, the rice rhizosphere is partially oxic because O₂ is supplied through the root aerenchyma. Therefore, Fe²⁺ dissolved in the soil solution due to the reductive dissolution of Fe minerals in soil deposited as ferric (hydr)oxide around the rice roots. This deposited Fe (hydr)oxide is referred to as iron plaque. Iron plaque is known to have a function to accumulate As. Applications of Fe-bearing materials are one of the effective countermeasure for decreasing the dissolution of As in soil under reductive conditions. In this study, we investigated the effects of Fe amendments on the accumulation and speciation of As associated with Fe plaques. The application of Fe amendments caused decreased concentration of As in soil solution thereby amounts of As associated with iron plaque was decreased due to the application of Fe amendments. Arsenic K-edge X-ray absorption near edge structure (XANES) revealed that proportion of arsenite did not differ between the bulk soil and iron plaque. On the other hand, a larger proportion of dimethylarsinic acid was found on the iron plaque than soil matrix regardless of the application of Fe amendments.

コメ中無機ヒ素の簡易分析

○馬場浩司¹、川崎晃²、阿部薫¹、荒尾知人³

¹農研機構農業環境変動研究センター、²農研機構高度解析センター、

³農研機構中央農業研究センター

1 はじめに

コメは他の農産物に比べ無機ヒ素濃度が高く、日本人の主食であることから、無機ヒ素の主要な摂取源となっている。無機ヒ素の摂取量を低減するには、生産段階でコメに含まれる無機ヒ素濃度を低減することが重要であり、低減技術の開発とあわせて、詳細な国内実態の把握が求められている。現在、コメ中無機ヒ素の分析には高価な分析装置を用いる必要がある。本講演では市販の試薬、汎用機器を用いて安価・簡易に比色定量する手法を紹介する。

2 方法

- ① 酸性溶液中の無機ヒ素に亜鉛を添加しアルシン（水素化ヒ素）を発生させ硝酸銀と反応させる **Gutzeit** 法を基本とし、より簡便におこなうための器材を検討した。
- ② **Gutzeit** 法でヒ酸から直接アルシンを生成できる添加剤を検討した。
- ③ **Gutzeit** 法に適したコメからの無機ヒ素抽出方法を検討した。
- ④ コメに含まれる有機ヒ素からの呈色を評価した。
- ⑤ 多種のコメ試料の測定から分析法の最適化をおこなった。

3 結果

- ① 揮発性有機物分析用の **VOA** バイアルが反応容器に適しており、キャップの内側に円形にカットしたろ紙を固定するだけで **Gutzeit** 法に利用できた。フラットヘッドスキャナーを使い呈色画像を読み取り画像の **RGB** 解析した結果、**B** 値が無機ヒ素濃度と相関が高くかつ呈色後の退色も緩やかであることを見出した。
- ② モリブデン酸ナトリウムやタングステン酸ナトリウムを反応液に添加することにより、ヒ酸でも効率よく呈色できた。
- ③ **Gutzeit** 法で無機ヒ素と同じように呈色する硫化物については、抽出溶媒に過酸化水素を用い抽出中に酸化させることで干渉が抑制できた。
- ④ コメ中の主要な有機ヒ素であるジメチルアルシン酸については、実際の含有濃度より大幅に高い **0.4 mg/kg** 相当の添加試験においても呈色を確認できなかった。モノメチルアルソン酸 (**MMA**) についても同様に試験した結果、同濃度のヒ酸の 7 割相当の呈色を与えた。
- ⑤ 多種のコメ試料を用いて最適化した簡易分析法について、認証物質による真度の

確認、添加回収試験（コメ中無機ヒ素濃度 0.1 mg/kg 及び 0.4 mg/kg）での回収率と精度の確認をおこない、食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの目標値である真度、回収率 80 - 110%、RSD10%未満を満足していることを確認した。

4 考察

本簡易分析法は 1 分析当たり 100 円前後で分析でき、抽出後は 1 時間程度で分析結果が得られる。MMA でも呈色するがコメ中にはほとんど含まれておらず問題になることは無い。無機ヒ素簡易分析用として市販されているキットもあるが、コメ抽出液にそのまま対応できるものはほとんど無く、コメ中無機ヒ素のスクリーニングに利用できると報告されているキットも毒性の高い水銀や酢酸鉛を用いており、反応容器も特殊なものを利用している。特に今年度水俣条約が発効し今後水銀を使った分析は一層難しいものになることから、本簡易分析法の有効性がさらに高まると考えられる。今後は室間共同試験を通じて機器分析法との代替可能性を検証したい。

Simplified and Low-cost Analysis of Inorganic Arsenic in Rice

Koji Baba¹, Akira Kawasaki², Kaoru Abe¹, Tomohito Arai³

¹Institute for Agro-Environmental Sciences, National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

²Advanced Analysis Center, NARO

³Central Region Agricultural Research Center, NARO

We introduce a simplified and low-cost analysis of inorganic arsenic in rice. The analytical method is based on Gutzeit method without mercury bromide, which is often used in Gutzeit method but highly toxic. Inorganic arsenic was extracted with diluted hydrogen peroxide solution. In the extraction process, sulfide ion, which is a major interference in Gutzeit method, was oxidized. There was no significant difference between our method and HPLC-ICPMS.

亜ヒ酸を曝露した MDM2^{-/-}HEK 細胞における PML の細胞核内動態

○平野靖史郎・宇田川理・小林弥生・加藤綾華
国立環境研究所, 環境リスク・健康研究センター

1. はじめに

亜ヒ酸は、難治性の急性前骨髄性白血病(APL)に対して顕著な治癒効果を示すことが知られているが、その機序は、亜ヒ酸が ProMyelocytic Leukemia (PML) に作用して PML の SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier)化を促進するためであると考えられている。PML は、p53 の 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)を制御することにより、間接的ではあるが p53 を安定化させる作用を有していることから、PML 自体は癌抑制遺伝子であると考えられている。本研究では、細胞内における亜ヒ酸の PML に対する作用に MDM2 がどのように関与しているか明らかにするため、ゲノム編集により MDM2 をノックアウトさせた細胞を用いて、亜ヒ酸を曝露した HEK 細胞における PML の核内動態について調べた。

2. 方法

PML の内在性に乏しい HEK293 細胞、PML-VI を安定発現させた HEK293 細胞 (HEKPML)、CRISPR/Cas9 システムを用いて MDM2 を knockout した HEK293 細胞 (293-MDM2)、293-MDM2 細胞に PML-VI を安定に発現させた細胞 (-MDM2+PML) を用いた。これら 4 種の細胞の増殖能、ならびに亜ヒ酸の細胞障害性を、WST-8 法を用いて測定した。また、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の変化を調べた。HEK293、HEKPML、293-MDM2、-MDM2+PML 細胞に亜ヒ酸 (3 μ M, 100 μ M) を曝露し、細胞のタンパク質を RIPA 可溶性と RIPA 不溶性画分に分け、それぞれの分画における PML、SUMO2/3、MDM2、p53 の変化をウェスタンブロット法を用いて調べた。亜ヒ酸を曝露した HEKPML と -MDM2+PML 細胞における PML の細胞内局在性については、蛍光免疫染色法で調べた。

3. 結果

MDM2 を knockout した 293-MDM2、-MDM2+PML 細胞は、HEK293 や HEKPML 細胞に比べサイズが大きく、細胞増殖速度も低下していた。293-MDM2、-MDM2+PML 細胞は、HEK293 や HEKPML 細胞に比べ、亜ヒ酸の細胞障害性に対して耐性を示した。亜ヒ酸を曝露した 293-MDM2、-MDM2+PML 細胞では、caspase-3/7 活性が上昇していたが、亜ヒ酸の細胞障害性に caspase inhibitors の効果が見られなかった。亜ヒ酸を曝露した HEKPML 細胞では、これまでも報告してきたように、PML が RIPA に不溶性となるとともに SUMO 化が観察された。-MDM2+PML 細胞においても、HEKPML 細胞と同様、亜ヒ酸を曝露により PML の不溶化と SUMO 化が観察された。PML は核内タンパク質

であるが、一部核外にも観察されることが蛍光免疫染色により確認された。亜ヒ酸を曝露することにより、HEKPML 細胞における核外 PML の割合は上昇した。通常の培養条件下においては、-MDM2+PML 細胞の核外 PML の割合は HEKPML 細胞に比較して高かったが、HEKPML 細胞とは異なり、亜ヒ酸の曝露により核外 PML の割合が変化することはなかった。

4. 考察

PML は、核内の NB (Nuclear Bodies) に局在することが知られているタンパク質である。また、システインに富む RING フィンガードメインを有しており、亜ヒ酸と反応して SUMO 化が起こることも知られている。MDM2 は p53 をユビキチン化して分解を促進することが知られているが、PML は MDM2 を抑制することにより p53 の作用を高め、癌抑制作用を示すのではないかと考えられている。亜ヒ酸を曝露した細胞において、PML が RIPA 可溶性から不溶性へと変化することをこれまでも明らかにしているが、今回の MDM2 を欠損した細胞を用いた研究では、MDM2 は PML の不溶化や SUMO 化など、亜ヒ酸による生化学的変化にはあまり影響していないことが分かった。しかし、MDM2 を欠損した細胞では、PML の核外存在割合が多くなっていることから、細胞内において PML と MDM2 との何らかの相互作用はあるものと推測される。今回用いた細胞の caspase-3 活性が亜ヒ酸の添加により上昇したことより、アポトーシスが疑われたが、caspase 阻害剤による細胞障害軽減効果は見られなかった。したがって、亜ヒ酸による細胞死はアポトーシス以外の機構に因るものと考えられるが、HEK 以外の細胞を用いてこれらのことを確認する必要がある。

Intranuclear dynamics of PML in MDM2^{-/-} HEK cells following exposure to arsenite.

Seishiro Hirano, Osamu Udagawa, Yayoi Kobayashi, and Ayaka Kato
National Institute for Environmental Studies

HEK293, HEKPML (stably transfected with PML VI), 293-MDM2 (MDM2^{-/-} HEK293), and -MDM2+PML (MDM2^{-/-} HEK293 cells stably transfected with PML VI) cells were used in the present study. The MDM2 knockout decreased the growth rate of both HEK293 and HEKPML cells. However, the MDM2^{-/-} cells were more resistant to arsenite than parental cells. The solubility changes in RIPA and the SUMOylation of PML were induced by arsenite in -MDM2+PML cells as well as in HEKPML cells. Immunofluorescence staining analyses revealed that extranuclear PML was more abundant in -MDM2+PML cells than HEKPML cells, suggesting that MDM2 affects the intranuclear localization of PML. These results suggest that the arsenite-dependent biochemical modification of PML occurs irrespective of MDM2 in HEK cells, whereas MDM2 interacts with PML in the cells.

亜ヒ酸によるナチュラルキラー細胞の細胞障害性に対する

抑制作用の検討

○角 大悟¹、津山博匡¹、小川智子¹、原田久美¹、姫野誠一郎¹¹徳島文理大学薬学部

1 はじめに

慢性的なヒ素化合物の曝露により、多臓器にがんが発生することがわかってるが、その機序についてはよくわかっていない。一方、がん免疫を担うナチュラルキラー (NK) 細胞には細胞表面に抑制性受容体ならびに攻撃性受容体が発現していることで、特異的にがん細胞を認識し、アポトーシスに向かわせることが明らかとなっている。このような受容体を介したがん細胞の攻撃作用の他に NK 細胞はサイトカインを放出することで、がん細胞を攻撃することや、NK 細胞自身の活性化を促すことが明らかとなっている。本研究では、ヒ素化合物による発がんの機序の一端を明らかにすることを目的として、NK 細胞が持つ「がん細胞への細胞障害活性」に対するヒ素化合物の影響について検討した。

2 方法

細胞：ヒト NK 由来培養 NK92 細胞を使用した。マウス NK 細胞：C57Bl6J マウス脾臓から **negative selection** 法を用いて NK 細胞を採取した。細胞毒性：alamarBlue を用いて検出した。細胞障害性：NK92 細胞とヒト白血病由来 K562 細胞、マウス NK 細胞とマウス白血病由来 YAC-1 細胞を共培養した後、障害を受けた K562、YAC-1 細胞の割合をフローサイトメトリーで検出した。mRNA 発現量：RT-qPCR 法にて検討した。培地中サイトカイン量：Multiplex、ELISA にて検出した。

3 結果

NK 細胞による細胞障害性は IL-2 により活性化されることがわかっている。そこで、IL-2 存在下での NK92 細胞の細胞障害活性について検討した。あらかじめ IL-2 を添加した NK92 細胞と K562 細胞とを 1:1 から 5:1 の割合で共培養し、4 時間後に障害を受けた K562 細胞の割合を測定した。その結果、IL-2 を添加していない NK92 細胞と比較して IL-2 を添加した NK92 細胞では、NK92 細胞の増加に伴い K562 細胞に対する細胞障害性の活性化が検出された。次に、IL-2 により活性化される NK92 細胞の細胞障害活性に対する亜ヒ酸の影響を検討した。その結果、亜ヒ酸に曝露された NK92 細胞では、IL-2 により活性化される NK92 細胞の細胞障害活性が抑制されていた。

IL-2 による NK92 細胞の細胞障害性の活性化に対する亜ヒ酸の抑制作用の機序を明らかにするために、まず IL-2 により発現が変動する遺伝子群を同定した。NK 細胞の細胞

障害性に関わる 88 種類の mRNA 量を検討したところ、IL-2 により発現量が 2 倍以上上昇したものは 10 種類、半分以下に減少したものは 8 種類であった。IL-2 により発現量が上昇したサイトカインには IFN-g、攻撃因子である granzymeB と perforin1 が含まれていた。これらの因子の発現に対する亜ヒ酸の影響を検討したところ、亜ヒ酸により granzymeB の mRNA 量が有意に減少した。一方、IL-2 により発現量が減少した抑制性受容体 KIR2DL3 について検討したところ、亜ヒ酸により KIR2DL3 mRNA 量は有意に上昇した。次にサイトカイン誘導に対する亜ヒ酸の影響について検討するために、IL-2 により培地への遊離量の変動するサイトカインを同定した。その結果、IL-2 により NK92 細胞から、IFN-g、IL-6、IL-10、TNF-b の遊離が増加した。これらのサイトカイン遊離に対する亜ヒ酸の影響を検討したところ、TNF-b の遊離量が亜ヒ酸により抑制された。

NK92 細胞を使用した結果を踏まえ、マウス NK 細胞の細胞障害活性に対する亜ヒ酸の影響を検討した。脾臓から採取したマウス NK 細胞を使用したところ、IL-2 による細胞障害活性の活性化を亜ヒ酸は有意に抑制した。その機序を探る目的で、マウス NK 細胞から遊離されるサイトカインについて Multiplex にて検討したところ、IL-2 により IFN-g、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、GM-CSF、TNF-a 遊離量が顕著に増加した。これらのサイトカイン量に対する亜ヒ酸の影響を検討したところ、IFN-g の遊離量に対してのみ亜ヒ酸が抑制作用を示した。

4 考察

培養 NK92 細胞、マウス NK 細胞を用いた検討によって亜ヒ酸は、攻撃因子や抑制性受容体の発現量を変動させる、さらにサイトカインの遊離量に影響を与えることで NK 細胞が有す細胞障害性を抑制していることが示唆された。

Inhibitory effects of arsenite on cytotoxic activity to cancer cells of natural killer cells

Daigo Sumi¹, Hiromasa Tsuyama¹, Tomoko Ogawa¹,
Kumi Harada¹, Seiichiro Himeno¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University

We found that the reduction of cytotoxic activity to cancer cells of natural killer cells by arsenite exposure. As its mechanism, we suggested that arsenite decreased the levels of granzymeB, the attacking factor, increased the levels of KIR2DL3, the inhibitory receptor, and affects the levels of cytokines release.

大会組織

実行委員会

大会長・実行委員長	熊谷 嘉人	筑波大学医学医療系	環境生物学研究室
実行委員	安孫子 ユミ	筑波大学医学医療系	環境生物学研究室
実行委員	広瀬 玲子	筑波大学医学医療系	環境生物学研究室

事務局

〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1

筑波大学 健康医科学イノベーション棟 307 環境生物学研究室

TEL : 029-853-3297

e-mail : 23assymposium.h29@gmail.com

HP : http://www.md.tsukuba.ac.jp/environmental_medicine/index.html

第23回ヒ素シンポジウム ホームページ

http://www.md.tsukuba.ac.jp/environmental_medicine/As-sympo2017/index.html

日本ヒ素研究会 ホームページ

<http://www.arsenic-sci-soc.jp/>

プログラム発行

第23回ヒ素シンポジウム 事務局