

ヒ素化合物によるマクロファージの細胞毒性

櫻井 照明, 貝瀬 利一, 松原 チヨ

(*東京薬科大学・生命科学部・環境衛生化学教室)

Cytotoxicity of Inorganic and Methylated Arsenic Compounds in Murine Macrophages

Teruaki Sakurai, Toshikazu Kaise and Chiyo Matsubara

Laboratory of Environmental Chemistry, School of Life Science,

Tokyo University of Pharmacy and Life Science

In the present study, we demonstrated the cytotoxic effects of inorganic arsenicals, arsenite and arsenate, and organic arsenic compounds, monomethylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (DMAA) and trimethylarsine oxide (TMAO), which are metabolites of inorganic arsenicals in mammalian bodies, using murine peritoneal macrophages *in vitro*. Inorganic arsenicals, both arsenite and arsenate, were strongly toxic to macrophages, and their concentrations that decreased the number of surviving cells to 50% of that in untreated controls (IC_{50}) was 5 or $500\mu M$, respectively. These inorganic arsenicals mainly caused necrosis. In contrast, the cytotoxic effects of methylated arsenic compounds were much lower than those of inorganic arsenicals. The IC_{50} of DMAA was about 5 mM, and MAA and TMAO had no toxicity even at concentrations over 10 mM, and DMAA mainly induced apoptotic cell death. These data imply that methylation of inorganic arsenicals in mammalia play an important role to suppress both severe immunosuppression and inflammatory responses caused by inorganic arsenicals.

ヒ素は環境中に広く存在し毒作用が非常に強いことが知られる反面、かつては感染症や白血病の治療に使われるなど種々の薬理作用も合わせ持っている。また、微量必須元素の一つである可能性も示唆されている。自然界では通常3価(arsenite)或は5価の無機ヒ素(arsenate)として存在し、ホ乳類類の体内に入った場合は両者とも一度3価に還元されたのち順次メチル化を受けて methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (DMAA), trimethylarsine oxide (TMAO) へと変換される¹⁾。このメチル化は一般に一種の解毒機構と考えられているが、マウスを用いた急性毒性実験以外に毒性軽減につい

*所在地：東京都八王子市堀之内1432-1 (〒192-03)

ての詳細な生物学的検討は余りなされていない。

一方、インドとバングラデシュにまたがる西ベンガル地方において、近年、無機ヒ素が混入した地下水を飲用している住民の間で史上最悪とも云われる大規模なヒ素汚染が発生し問題となっている²⁾。被災民の多くは慢性ヒ素中毒に陥っており、従来より知られる皮膚の黒色癌の他に、肝臓や脾臓の肥大が観察されている。この事はヒ素の長期摂取により何等かの理由で宿主の免疫機構が破綻し、それに伴って癌化の促進や炎症が起きていることを想像させるが、ヒ素の免疫機構に与える影響についての報告は全くない。そこで今回我々は代表的な免疫細胞であり、且つ環境の変化に敏感に反応する細胞として知られるマクロファージを用い、ヒ素化合物の毒性をメチル基の有無との因果関係を踏まえて *in vitro* で観察した。

実験方法

亜ヒ酸ナトリウム (arsenite), ヒ酸ナトリウム (arsenate), DMAA は市販されているものを再結晶処理して用いた。MAA, TMAO は既報に準じて研究室で合成した¹⁾。これらのヒ素化合物は GC/MS 分析より純度は99.9%以上であり、リムルテストによりエンドトキシンは全く含まれていないことを確認した。マウス腹腔マクロファージは SPF 環境下で飼育した雄性 CDF₁ マウスより既報に準じて採取し³⁾, 10%の牛胎児血清を含む MEM 液体培地を用いて培養した。ヒ素化合物の細胞毒性はアラマブルー (AB) 法を用いて検討した。マクロファージからの窒素酸化物産生は Griess 法を用いて測定した。

結果と考察

種々のヒ素化合物の存在下、マクロファージを48時間培養し化合物の示す細胞毒性を検討したところ、arsenite 及び arsenate は、マクロファージに対して強い細胞毒性を示し、50%細胞生存阻害濃度 (IC₅₀ 値) はそれぞれ約 5μM, 500μM であった (Fig. 2)。これに対し、メチルヒ素化合物の毒性はきわめて低く DMAA の IC₅₀ 値は約 5mM であり (Fig. 2), MAA, TMAO は 10mM という高濃度でも有意な毒性を示さなかった (data not shown)。これらのデータは無機ヒ素はホ乳類の体内でメチル化される事により、その毒性が減弱する事を示し、我々が以前報告した経口投与による急性毒性実験の結果とほぼ同じであった¹⁾。

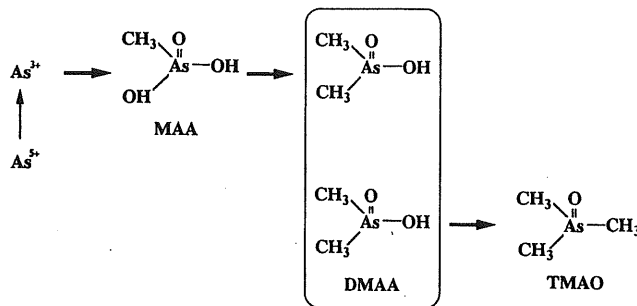


Fig. 1 Metabolism of arsenicals in mammalia.

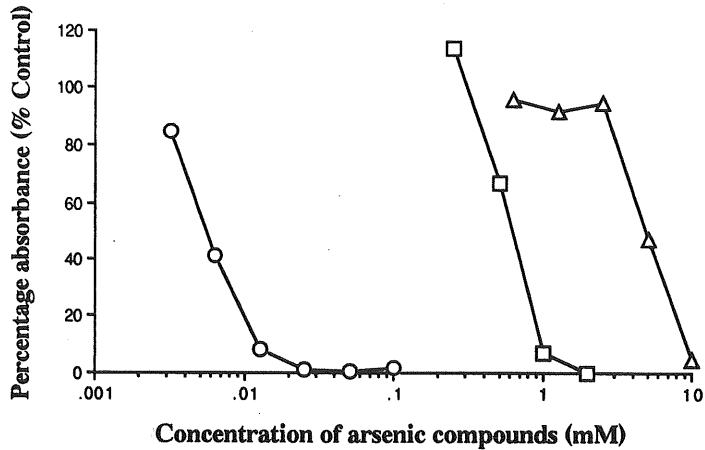


Fig. 2 Effects of arsenic compounds on viability of macrophages. Monolayers of peritoneal macrophages were incubated with various concentrations of arsenite (○), arsenate (□) or DMAA (△) for 48 h at 37°C, and the viability of cells was determined by measuring by AB assay.

興味ある事に、arsenite, arsenate によって誘導された細胞死のほとんどが necrosis 様であったのに対し (Fig. 3), DMAA によって誘導された細胞死は、ほぼ 100% apoptosis 様であった。10mM の DMAA と共に 48 時間培養したマクロファージは小さく萎縮した典型的な apoptosis 形態を示し (Fig. 3), これは Diff Quik 染色によるクロマチンの凝集, DNA の断片化, *in situ* terminaldeoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling 法によっても裏付けられた (data not shown)。一般に apoptosis は炎症を伴わない細胞死とされており, 無機ヒ素のホ乳類体内でのメチル化は IC₅₀ 値を上げるだけでなく apoptosis を誘導する事によって宿主の恒常性を維持するのに役立っているものと考えられる。

また IC₅₀ 値の 20% 濃度の各種ヒ素化合物でマクロファージを 48 時間培養し, 上清中に放出された窒素酸化物の量を測定したところ, 全てのヒ素化合物において産生の有意な減少が認められた。即ち MAA や TMAO といった比較的毒性の少ないヒ素化合物でも, マクロファージの機能には少なからず影響している事が明かとなった (Fig. 4)。

さらに, ヒ素化合物の細胞毒性の発現機構を調べるために, glutathione (GSH) の存在化, マクロファージを各種ヒ素化合物と共に 48 時間培養し, ヒ素化合物の細胞毒性を観察した。その結果, GSH の添加は arsenite 及び arsenate の毒性は 100% 抑制したが, DMAA の毒性は逆に増強した (Fig. 5)。また細胞内 GSH の涸渇剤である L-buthionine- [S,R]-sulfoximine (BSO) で前処理したマクロファージでは arsenite, arsenate の細胞毒性は増強され, DMAA の毒性は逆に抑制された (Fig. 5)。GSH と BSO の両者が存在する時は GSH の効果の方が優位であった。無機ヒ素はホ乳類の細胞に対して酸化ストレスを引き起こすことが知られており^{4), 5)}, 恐らく GSH のもつ還元作用で, 無機ヒ素により誘導された酸化反応が抑制され, 毒性を阻害したのであろう。また, GSH は直接ヒ素化合物に結合することも知られているので⁶⁾, GSH が無機ヒ素に結合することにより, その毒性を直接 mask している可能性も考え

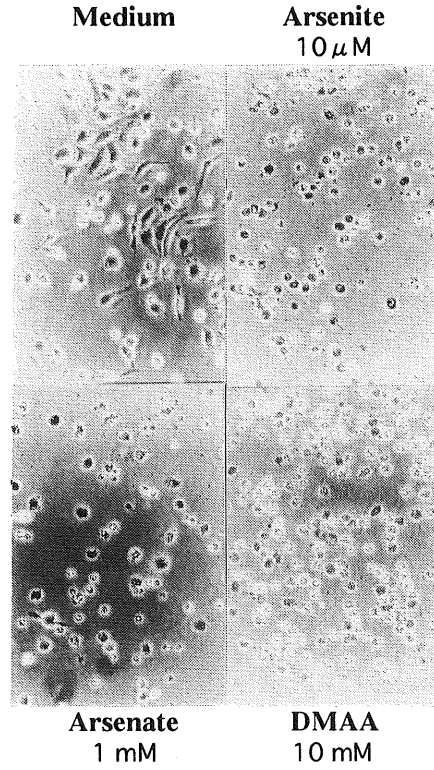


Fig. 3 Morphological changes of peritoneal macrophages by incubation with arsenic compounds for 48 h at 37°C.

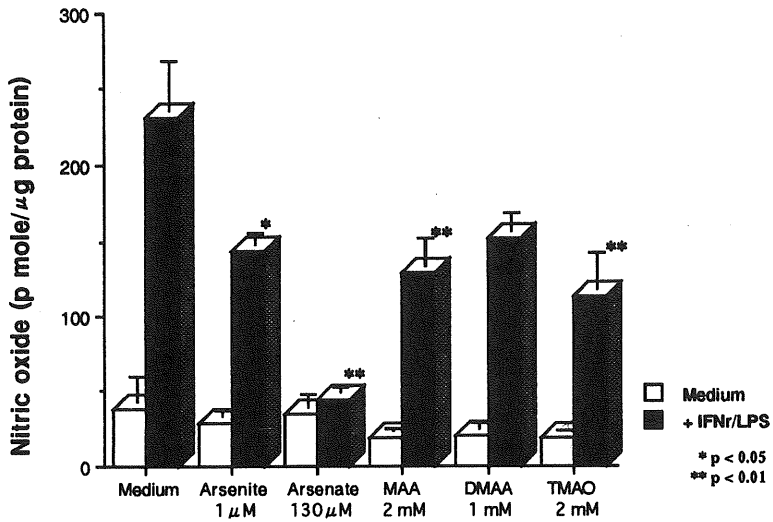


Fig. 4 Effects of arsenic compounds on nitric oxide production of peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were incubated with arsenic compounds or medium alone for 48 h at 37°C in the presence or absence of 100 U/ml murine recombinant interferon γ and 100 ng/ml lipopolysaccharide (0111: B4).

After the incubation period, nitric oxide concentrations in culture supernatants were measured by Griess reagent.

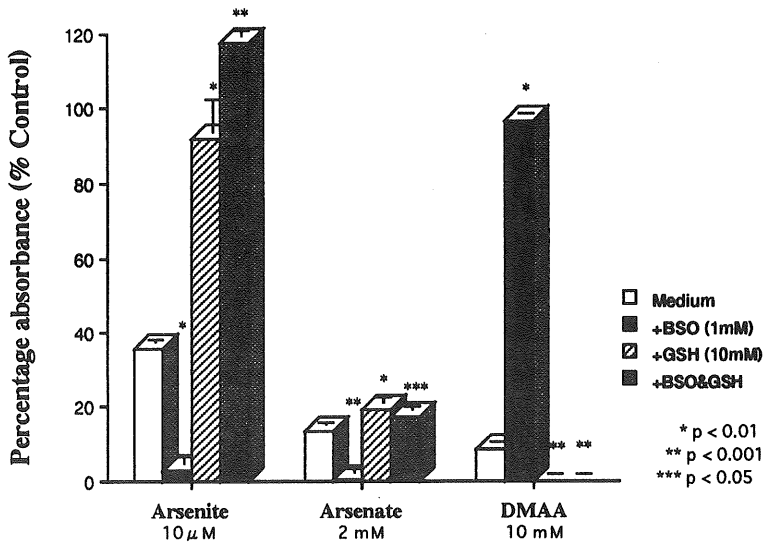


Fig. 5 Effect of GSH depletion or exogenous GSH on arsenic compounds induced cell death. Peritoneal macrophages were incubated with arsenic compounds in the presence or absence of 1 mM BSO and/or 10 mM GSH for 48 h at 37°C, and the viability of cells was determined by measuring by AB assay.

られる。また DMAA の細胞毒性発現には GSH の存在が必須であることが示唆されたが、現段階ではその詳しい機構は分かっていない。DMAA もまた GSH と結合するが⁶⁾、GSH により DMAA が還元されて、猛毒なジメチルアルシガスが発生するという単純な機構ではないらしい。

以上、我々は代表的な免疫細胞であるマクロファージを用いてヒ素化合物の免疫毒性を *in vitro* で検討した。無機ヒ素は強い細胞毒性を有しマクロファージに necrosis を誘導するが、メチルヒ素化合物はマクロファージの機能には影響を与えるものの、その毒作用は非常に弱く、細胞死が起こっても apoptosis を誘導することで炎症を抑制していることが明かとなった。西ベンガルの慢性ヒ素中毒患者に観られる炎症様所見は、恐らく長期的に摂取された無機ヒ素に対し患者体内でのメチル化が追いつかなくなり、その結果体内に無機ヒ素が蓄積して引き起こされた可能性が推定される。

文 献

- 1) Kaise, T., Hanaoka, K. and Tagawa, S. (1987) *Chemosphere* 16 : 2551
- 2) 安藤正典, 真柄泰基 (1997) *資源環境対策* 33 : 113
- 3) Sakurai, T., Ohno, N. and Yadomae, T. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* 40 : 2120.
- 4) Taketani, S., Sato, H., Yoshinaga, T., Tokunaga, R., Ishii, T. and Bannai, S. (1990) *J. Biochem.* 108 : 28.
- 5) Bannai, S., Sato, H., Ishii, T. and Taketani, S. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* 1092 : 175.
- 6) Delnomdedieu, M., Basti, M. M., Otvos, J. D. and Thomas, D. J. (1994) *Chem. -Bio. Interact.* 90, 139.