

海産食品に含まれる有機ヒ素化合物, アルセノコリンの細胞毒性について

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)

Study for *in vitro* Cytotoxicity of Arsenocholine, an Organic Arsenic Compound in Seafood

Teruaki Sakurai, Toshikazu Kaise and Chiyo Matsubara

Laboratory of Environmental Chemistry, School of Life Science,
Tokyo University of Pharmacy and Life Science

In this study, we examined the *in vitro* cytotoxic effects of an organic arsenic compound containing in seafood, trimethyl (2-hydroxyethyl) - arsonium cation, namely arsenocholine (AsCho), on murine splenocytes, thymocytes and bone marrow (BM) cells comparing with those of an inorganic arsenical, sodium arsenite using synthesized pure material. Sodium arsenite showed strong cytotoxicity on all of these cells, and its IC_{50} was 5-6 μ M. In contrast, AsCho had no cytotoxicity on these cells even at concentrations over 10 mM, and it slightly enhanced the viability of BM cells at doses over 100 μ M. It is interesting that this unique biological effect was found in AsCho, an organic arsenic compound containing in some marine animals which are daily ingested as seafood in many countries.

ヒ素は様々な化学形態で環境中に広く存在し、毒性が非常に強い反面、かつては感染症や白血病の治療に汎用されていた経緯があるなど、種々の生理活性をも持ち合わせている。我々は以前より、海産食品（海洋生物）に多量にヒ素が含まれている点に注目し、その存在化学形態の解析と毒性の有無について研究をしてきた。海産食品に含まれるヒ素の量は、食品1gあたり、ヒ素原子（As）として平均で約50 μ g含まれており、この量は、例えばエビを1匹食べれば十分急性ヒ素中毒になり得る量である¹⁾。しかし、海産食品を食べてヒ素中毒になったという例は報告されていないので、ヒ素は海洋生物の体内で、猛毒の無機ヒ素から毒性の低い有機化合物へ代謝変換され蓄積されていると推定されていた。1970

*所在地：東京都八王子市堀之内1432-1（〒192-0392）

年代の後半から1990年代にかけて、我々を含め、いくつかの研究グループにより次々と海洋生物中のヒ素化合物の化学構造が明らかとされた²⁻⁶⁾。これらの研究によると、ワカメ、コンブなどの海洋植物には、アルセノシュガー (AsSug) と呼ばれるジメチルヒ素化合物が主たるヒ素化合物として存在しており²⁾、エビ、カニ、貝、魚などの海洋動物には、アルセノコリン (AsCho)、アルセノベタイン (AsBe) と呼ばれるトリメチルヒ素化合物が主な化合物として存在していた^{3),4)}。また、ハマグリのエラやアメフラシの体表面など、ある種の海洋動物の特殊な部位からは、テトラメチルヒ素化合物 (TetMA) も見つかった (Fig. 1)^{5),6)}。

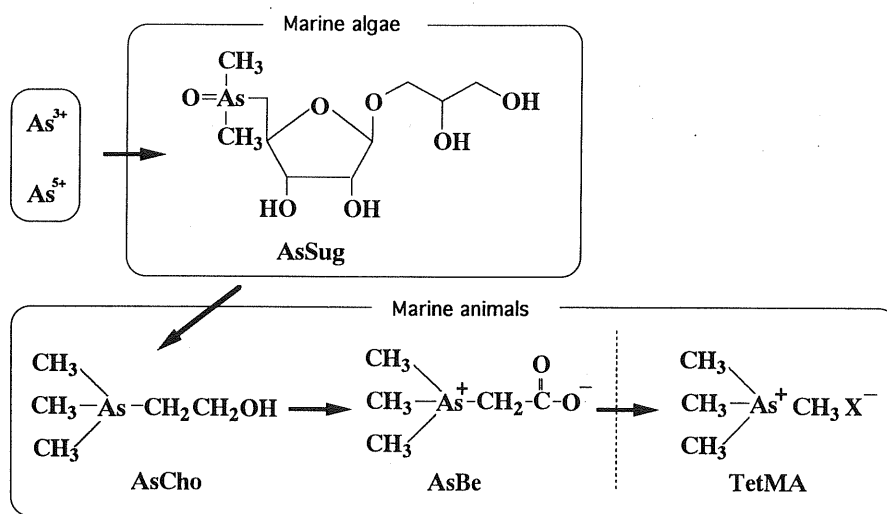


Fig. 1. Arsenic compounds in marine organisms.

我が国は四方を海に囲まれる海洋国であり、他の国に比較して、海産食品の摂取量は多い。従って、海産食品に高濃度に含まれるヒ素化合物の毒性を検討する事は、食品衛生上きわめて重要な事である。そこで我々は、次に、海洋生物に含まれる有機ヒ素化合物を自ら化学合成し、哺乳動物に対する毒性の有無を世界に先駆けて検討してきた。その結果、海洋動物に最も多く含まれるAsBeは、*in vitro*でも*in vivo*でも全く毒性を示さず、食品衛生上無害である事が確認されたが^{7),8)}、同じく海洋動物に含まれるAsChoには*in vivo*で極く弱い毒性が認められ (マウスに経口投与した場合の $LD_{50} = 6.54 \text{ g/kg}$)⁹⁾、食品衛生上の安全性が懸念されていた。そこで本研究では、化学合成したAsChoを用い、マウスの各種免疫細胞に対する細胞毒性を*in vitro*において検討した。

実験方法

AsChoは既報に従い研究室で合成¹⁰⁾、アセトニトリルで2回再結晶処理をしてから実験に用いた。対照に用いた亜ヒ酸ナトリウム (arsenite) は、市販されているものを、水で2回再結晶処理をした。これらのヒ素化合物は、ガスクロマトグラフ/マススペクトル分析及び、薄層クロマトグラフ分析により、純度は99.9%以上であり、リムルステストによりエンドトキシンは全く含まれていない事を確認し

た。マウスの脾臓リンパ球 (splenocyte), 胸腺細胞 (thymocyte), 骨髄細胞 (bone marrow cell ; BM cell) 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¹¹⁾, 10%の牛胎児血清を含む MEM 液体培地中で培養した。ヒ素化合物の細胞毒性はアラマブルー (AB) 法¹²⁾ により検討した。

結果と考察

CDF₁ マウス由来の splenocyte, thymocyte, BM cell を, 種々の濃度の arsenite 或いは AsCho と共に 72時間培養し, ヒ素化合物の細胞毒性を AB 法で検討したところ, 無機ヒ素化合物である arsenite は, 全ての細胞に強い毒性を示し, 細胞生存率50%抑制濃度 (IC₅₀) は約 5 μ M であった (Fig. 2-4)。

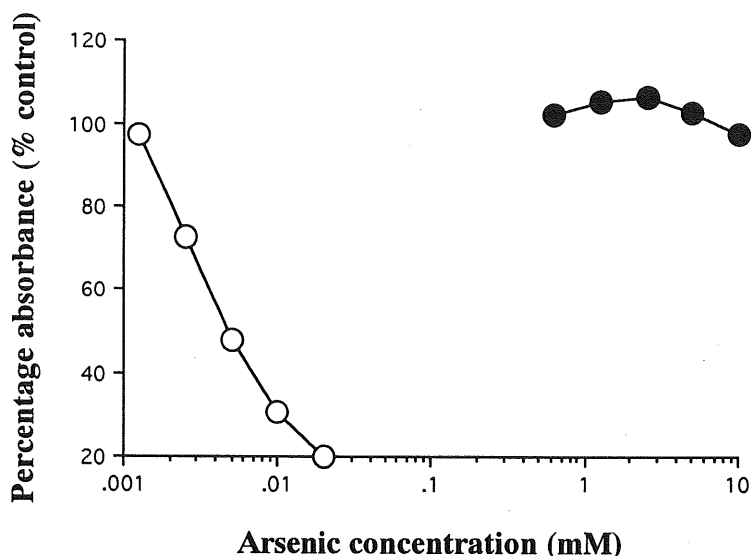


Fig. 2. Effect of arsenicals on the viability of splenocytes. Splenocytes isolated from CDF₁ mice were incubated with various doses of sodium arsenite (○), AsCho (●) or medium alone for 72h at 37°C, and the viability of the cells was determined by AB assay.

これに対し, 海洋動物に含まれるトリメチルヒ素化合物である AsCho は, いずれの細胞に対しても, 10 mM 以上の濃度を加えても全く細胞毒性を示さなかった (Fig. 2-4)。BM cell においては, むしろ AsCho の添加は, 培地のみで培養したコントロールと比較して細胞の生存率を上昇させる傾向にあり, AsCho の濃度が 100 μ M 以上でコントロールに比べて1.2倍から1.3倍の細胞生存率が観察された (Fig. 4)。また, AsCho と共に72時間培養した BM cell では, 培養フラスコの底に付着 (adherent) する性質を持つマクロファージや好中球などの食細胞の数が, コントロールに比べて約 2 倍に増加していた (Fig. 5)。

以上より, 海洋動物に含まれるトリメチルヒ素化合物 AsCho は, マウスの splenocyte, thymocyte,

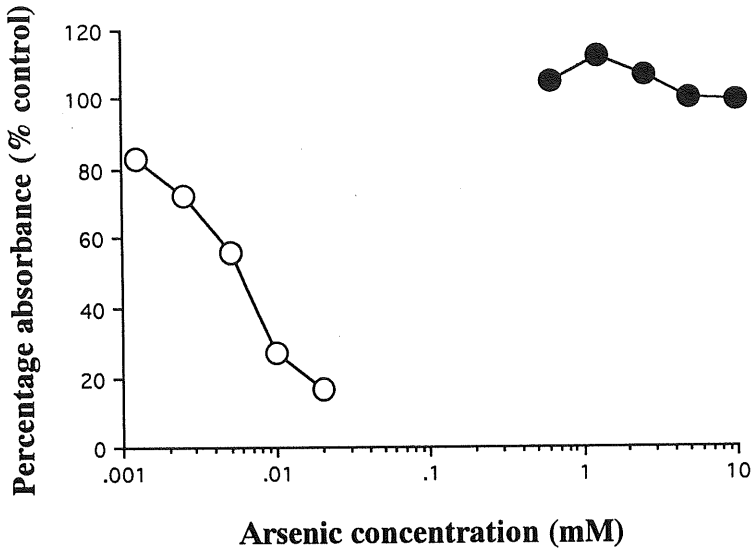


Fig. 3. Effect of arsenicals on the viability of thymocytes. Thymocytes isolated from CDF₁ mice were incubated with various doses of sodium arsenite (○), AsCho (●) or medium alone for 72h at 37°C, and the viability of the cells was determined by AB assay.

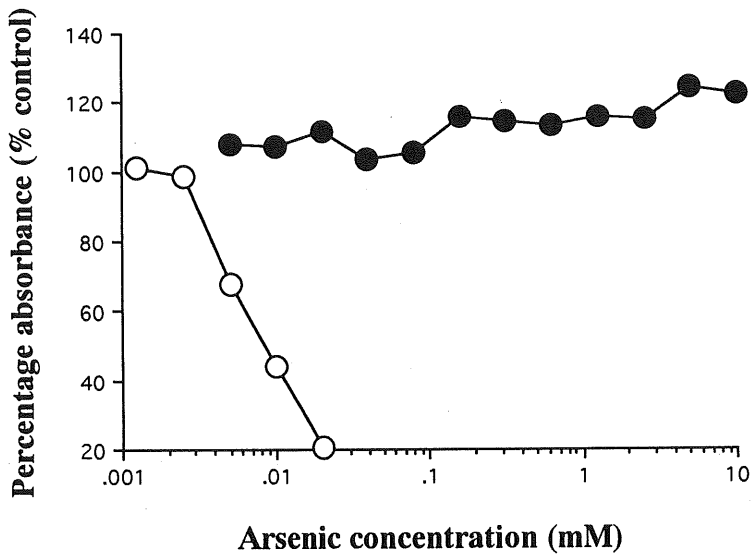


Fig. 4. Effect of arsenicals on the viability of BM cells. BM cells isolated from CDF₁ mice were incubated with various doses of sodium arsenite (○), AsCho (●) or medium alone for 72h at 37°C, and the viability of the cells was determined by AB assay.

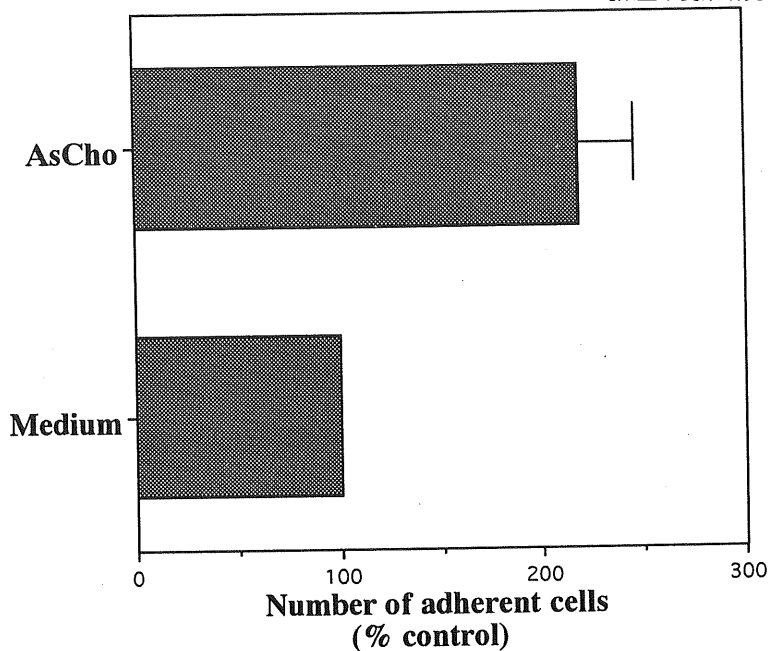


Fig. 5. Effect of AsCho on the adherent ability of BM cells. BM cells isolated from CDF₁ mice were incubated with 10mM AsCho or medium alone on 96-well tissue culture plates for 72h at 37°C. After the incubation, the wells were washed twice by warmed PBS to remove any nonadherent cells, and the remaining adherent cells on the culture plates were counted under the microscope. Results are expressed as arithmetic mean \pm S.D. of triplicate dishes.

BM cell に対して *in vitro* では毒性を全く示さない事が明らかとなった。我々は以前、AsCho はマウスのマクロファージに対しても *in vitro* で毒性は示さない事を確認しており^{8),13)}, *in vivo* における急性毒性も極めて低かった事を考えれば (マウスに経口投与した場合の LD₅₀ = 6.54 g/kg)⁹⁾, AsCho は食品衛生上殆ど無害である考えられる。しかし近年、微量の化学物質を長期間摂取する事により、人体に様々な影響を及ぼすいわゆる「環境ホルモン」の概念が注目されており、今後はこの方面からのヒ素化合物の生体への影響の解析が必要と思われる。事実、既に我々は海洋植物に含まれるジメチルヒ素化合物、AsSug から、細胞種特異的な弱い細胞毒性を見い出しており (マウスの肺胞マクロファージにおける IC₅₀ = 8 mM)¹⁴⁾, また、ハマグリのエラなどから見い出された TetMA からは、*in vitro* では殆ど毒性はないが *in vivo* では毒性があるという、一見矛盾したデータを得ている (マウスに経口投与した場合の LD₅₀ = 890 mg/kg)^{8),15)}。本研究で示した通り、AsCho からも BM cell の生存率を上昇させる作用が、弱い作用ではあるが、見い出された事から、海産食品に含まれる有機ヒ素化合物の生体影響を、生理活性の有無を踏まえながら、さらに詳細に検討していく必要があると思われる。

文 献

- 1) Kaise, T., K. Hanaoka, S. Tagawa, T. Hirayama, and S. Fukui (1988) Appl. Organomet. Chem. 2 :

339.

- 2) Edmonds, J.S. and K.A. Francesconi (1981) *Nature (London)* 289 : 602.
- 3) Edmonds, J.S., K.A. Francesconi, J.R. Cannon, C.L. Raston, B.W. Skelton, and A.H. White (1977) *Tetrahedron. Lett.* 18 : 1543.
- 4) Kaise, T., H. Yamauchi, T. Hirayama, and S. Fukui (1988) *Appl. Organomet. Chem.* 2 : 539.
- 5) Shiomi, K., Y. Kakehashi, H. Yamanaka and T. Kikuchi (1987) *Appl. Organomet. Chem.* 1 : 177.
- 6) Shiomi, K., M. Aoyama, H. Yamanaka, and T. Kikuchi (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* 90C : 361.
- 7) Kaise, T., S. Watanabe, and K. Itoh (1985) *Chemosphere* 14 : 1327.
- 8) Sakurai, T., T. Kaise, and C. Matsubara, (1996) *Appl. Organomet. Chem.* 10 : 727.
- 9) Kaise, T., Y. Horiguchi, S. Fukui, K. Shiomi, M. Chino and T. Kikuchi (1992) *Appl. Organomet. Chem.* 6 : 369.
- 10) Saaman, S. (1978) : Band XIII/8. in *Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie*, George Thieme Verlag, Stuttgart : pp. 402.
- 11) Sakurai, T., K. Hasimoto, I. Suzuki, N. Ohno, S. Oikawa, A. Masuda and T. Yadomae (1992) *Int. J. Immunopharmac.* 14 : 821.
- 12) Ahmed, S.A., R.M. Gogal Jr. and J.E. Walsh (1994) *J. Immunological Methods* 170 : 211.
- 13) 櫻井照明, 貝瀬利一, 松原チヨ (1996) *微量栄養素研究*, 13 : 161.
- 14) Sakurai, T., T. Kaise, T. Ochi, T. Saitoh and C. Matsubara (1997) *Toxicology* 122 : 205.
- 15) Sakurai, T., T. Kaise, T. Saitoh and C. Matsubara, *Appl. Organomet. Chem.* in press.