

## 海洋魚介類に含まれる有機ヒ素化合物、 アルセノベタインの骨髄細胞に及ぼす影響

櫻井 照明, 貝瀬 利一, 松原 チヨ, 藤原 祺多夫  
(東京薬科大学・生命科学部・環境衛生化学教室\*)

### The Effect of Arsenobetaine on Murine Bone Marrow Cells

Teruaki SAKURAI, Toshikazu KAISE, Chiyo MATSUBARA and Kitao FUJIWARA  
*Laboratory of Environmental Chemistry, School of Life Science,  
Tokyo University of Pharmacy and Life Science*

In this study, we observed the biological effects of arsenobetaine (AsBe), which is a major organic arsenic compound in marine animals, using murine bone marrow (BM) cells *in vitro*. Interestingly, AsBe significantly enhanced the viability of BM cells during a 72-h incubation at doses of  $\mu\text{M}$ -mM level. AsBe increased the numbers of survived adherent cells after a 72-h incubation, but it did not induce potent proliferation of BM cells as determined by colony-forming assay.

ヒ素は種々の化学形態をとって天然に広く存在し、その強い毒作用は古来より良く知られる。近年ではバングラデシュやインドのベンガル州で地層から無機ヒ素が井戸水に浸出し、それを恒的に飲用していた住民に重篤な慢性ヒ素中毒が起きている<sup>1)</sup>。また中国の内モンゴル自治区では、燃料である石炭に多量に含まれていたヒ素が粉塵となって食物に付着し、それを摂取していた住民にやはり慢性ヒ素中毒が発症し、新たな環境問題となっている<sup>2)</sup>。我が国でも和歌山で無機ヒ素を使った保険金殺人事件が起きた事は記憶に新しい。一方で、ヒ素はかつては我が国や欧州で白鮮症の治療に用いられていた経緯があるなど、作用機序は未解明ではあるが、ユニークな生理活性を持つ事も知られる。最近では中国と日本の共同研究グループにより、無機ヒ素 (arsenite) の白血病に対する抗癌作用が実証され、大きな話題となった<sup>3,4)</sup>。我々は以前より、魚介類や海藻などの海産食品 (海洋生物) に多量にヒ素が含まれている点に着目し、その存在化学形態の解析と毒性について検討してきた。海産食品に含まれるヒ素の量は、食品の乾燥重量 1g あたり、ヒ素原子 (As) として平均で約 50  $\mu\text{g}$  も含まれており、この量は、例えば魚を

---

\*所在地：東京都八王子市堀之内1432-1 (〒192-0392)

1匹食べれば十分急性中毒になり得る量である<sup>5)</sup>。しかし、海産食品を食べて実際にヒ素中毒になったという例はなく、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<sup>6-10)</sup>。これらの研究によると、ワカメ、コンブなどの海藻には、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<sup>6)</sup>、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<sup>7,8)</sup>。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<sup>9,10)</sup>。

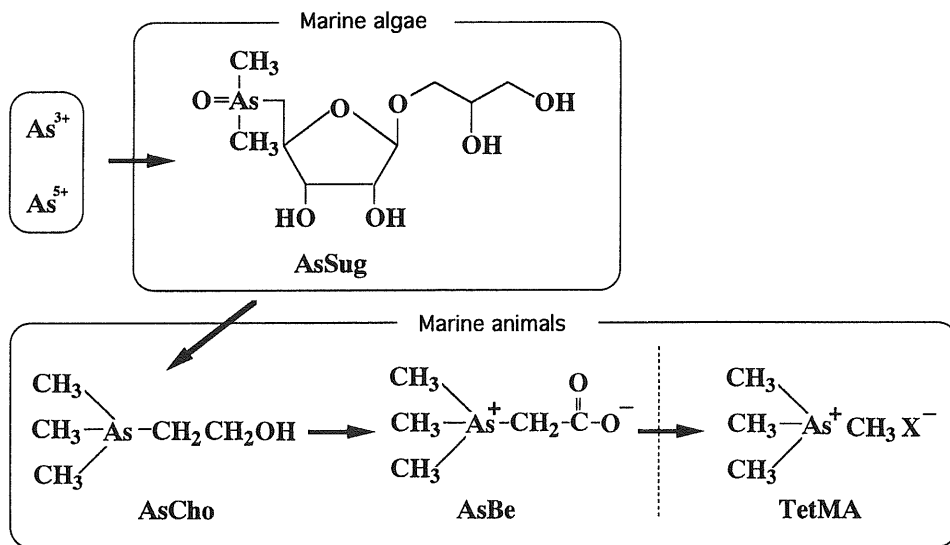


Fig. 1 Arsenic compounds in marine organisms.

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、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、これらの有機ヒ素化合物の毒性は無機ヒ素に比べて極めて低い事を証明し<sup>11-15)</sup>、同時にいくつかのユニークな生理活性を有する事を明らかにしてきた<sup>12,13,14)</sup>。本論文では海洋動物に最も多く含まれるヒ素化合物であるAsBeの、マウス骨髄細胞に対する*in vitro*での細胞生存率上昇作用について述べる。

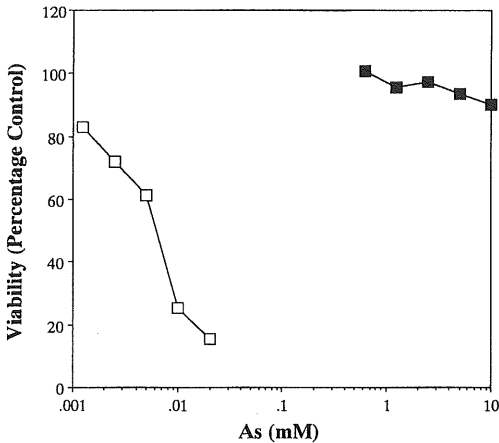
## 実験方法

AsBeは既報に従い研究室で合成し<sup>7)</sup>、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

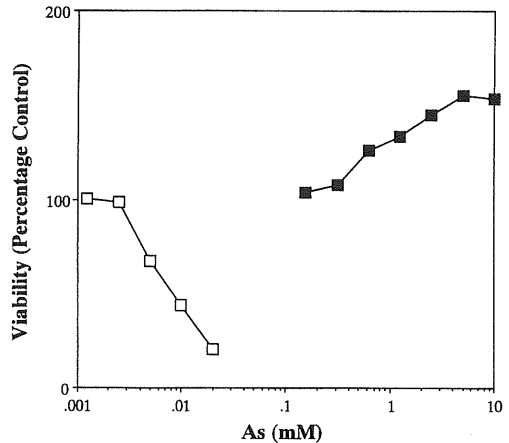
ナトリウム (arsenite) は、市販されているものを、2回再結晶処理をして用いた。これらのヒ素化合物は、ガスクロマトグラフ/マススペクトル分析及び、薄層クロマトグラフ分析により、純度は99.9 %以上であり、リムルテストによりエンドトキシンは全く含まれていない事を確認した。マウスの胸腺細胞、骨髓細胞は、SPF環境下で飼育した雄性CDF<sub>1</sub>マウスより、既報に準じて採取し<sup>16)</sup>、10%の牛胎児血清を含むMEM液体培地中で培養した。ヒ素化合物の細胞毒性はアラマーブルー (AB)法<sup>17)</sup>により検討した。骨髓細胞のコロニー形成能はメチルセルロース法により検討した<sup>16)</sup>。

## 結果と考察

CDF<sub>1</sub>マウス由来の胸腺細胞、骨髓細胞を、種々の濃度の arsenite 或いは AsBe 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、これらの細胞に強い毒性を示し、細胞生存率50%抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) は約5 $\mu$ Mであった (Fig. 2, 3)。



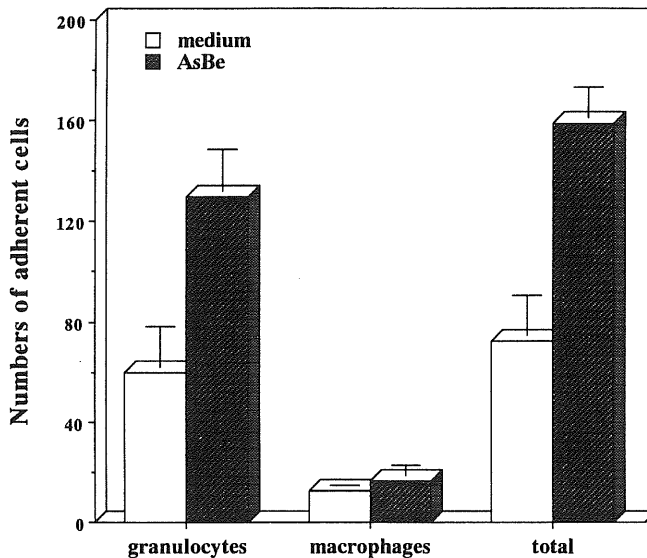
**Fig. 2** Effect of arsenicals on the viability of thymocytes. Thymocytes isolated from CDF<sub>1</sub> mice were incubated with various doses of sodium arsenite (□), AsBe (■) or medium alone for 72 h at 37°C, and the viability of the cells was determined by AB assay. Results are expressed as arithmetic mean (n=4), and all S.D. values were < 12.5%.



**Fig. 3** Effect of arsenicals on the viability of bone marrow cells. Bone marrow cells isolated from CDF<sub>1</sub> mice were incubated with various doses of sodium arsenite (□), AsBe (■) or medium alone for 72 h at 37°C, and the viability of the cells was determined by AB assay. Results are expressed as arithmetic mean (n=4), and all S.D. values were < 25.0%.

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 AsBe は、いずれの細胞に対しても、10mM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, 3)。骨髓細胞においては、むしろ AsBe 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、AsBe の濃度が500 $\mu$ M以上でコントロールに比べて約2倍の細胞生存率が観察された (Fig. 3)。骨髓細胞

を7日間培養する長期培養系では、培地のみで培養したコントロール群では殆ど全ての細胞が死滅したのに対し、10mMのAsBeを添加した群では多くの細胞が生き残り、未成熟な骨髓細胞から付着性のある大型の細胞に分化していた (data not shown)。AsBe (10mM) と共に骨髓細胞を72時間培養し、出現した付着性大型細胞をDiff Quik染色をして観察したところ、AsBeの添加はコントロールに比して特に好中球数の増加が顕著であった (Fig. 4)。



**Fig. 4** Effect of AsBe on the numbers of adherent cells generated from cultured bone marrow cells. Bone marrow cells isolated from CDF<sub>1</sub> mice were incubated with 10 mM AsBe or medium alone on 96-well tissue culture plates for 72 h 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 after the Diff Quik staining. Results are expressed as arithmetic mean  $\pm$  S.D. of triplicate dishes.

次にAsBeに骨髓細胞を増殖させる作用があるか否か、骨髓細胞のコロニー形成能を観察する事で検討した。マウスから採取した骨髓細胞を1%のメチルセルロースを含んだ半固形培地中で3cm $\phi$ のシャーレを用いて ( $5 \times 10^5$  cells/ml/dish) 7日間培養し、出現した細胞コロニー数を顕微鏡下で数えた。その結果、AsBe (10mM) を添加して培養した群ではコロニー形成は全く観察されなかったのに対し ( $0.0 \pm 0.0$  colonies/dish, n=3), 正の対象として用いたマウス顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子 (10U/ml) を添加して培養した群では多くのコロニーが観察された ( $71.3 \pm 13.9$  colonies/dish, n=3)。この事からAsBeは何らかのメカニズムで骨髓細胞の付着性を増加、および生存率を上昇させ、結果的に生き残った細胞がより成熟度の高い好中球などに分化したものと推測された。

以上より、海洋動物に含まれる主要なトリメチルヒ素化合物AsBeは、マウスの胸腺細胞、骨髓細胞に

対して *in vitro* では全く毒性を示さない事が明らかとなった。我々は以前, AsBeはマウスの腹腔マクロファージ, 肺胞マクロファージ, 脾臓リンパ球, パイエル板リンパ球に対しても *in vitro* で毒性を示さない事を確認しており<sup>11,12)</sup>, *in vivo* における急性毒性も殆ど認められなかった事を考え合わせると<sup>18)</sup>, AsBeは食品衛生上ほぼ無害であると考えられる。一方で, 我々が日常的に食品として摂取している魚介類に多量に含まれているAsBeから, 上記の様に骨髓細胞の生存率を上昇させるというユニークな生理活性が見い出された事は非常に興味深い。或いは海洋魚介類の機能性食品としての新たな活用につながる事も考えられる。今後は, *in vitro* で示されたこの作用が*in vivo* でも有効か否か検討すると同時に, その作用メカニズムを解明していく予定である。

## 文 献

- 1) 安藤正典, 真柄泰基 (1997) 資源環境対策33 : 113
- 2) 大木 章, 中島常憲 (2000) Arsenic Letter 5 : 8
- 3) Chen, G-Q., X-G. Shi, W. Tang, S-M. Xiong, J. Zhu, X. Cai, Z-G. Han, J-H. Ni, G-Y. Shi, P-M. Jia, M-M. Liu, K-L. He, C. Niu, J. Ma, P. Zhang, T-D, Zhang, P. Paul, T. Naoe, K. Kitamura, W. Miller, S.Waxman, Z-Y. Wang, H. De The, S-J. Chen and Z. Chen (1997) Blood 89 : 3345
- 4) Shen, Z-X., G-Q. Chen, J-H. Ni, X-S. Li, S-M. Xiong, Q-Y. Qiu, J. Zhu, W. Tang, G-L. Sun, K-Q. Yang, Y. Chen, L. Zhou, Z-W. Fang, Y-T. Wang, J. Ma, P. Zhang, T-D. Zhang, S-J. Chen and Z-Y. Wang (1997) Blood 89 : 3354
- 5) Kaise, T., K. Hanaoka, S. Tagawa, T. Hirayama, and S. Fukui (1988) Appl. Organomet. Chem. 2 : 339
- 6) Edmonds, J.S. and K.A. Francesconi (1981) Nature (London) 289 : 602
- 7) Edmonds, J.S., K.A. Francesconi, J.R. Cannon, C.L. Raston, B.W. Skelton, and A.H. White (1977) Tetrahedron. Lett. 18 : 1543
- 8) Kaise, T., H. Yamauchi, T. Hirayama, and S. Fukui (1988) Appl. Organomet. Chem. 2 : 539
- 9) Shiomi, K., Y. Kakehashi, H. Yamanaka and T. Kikuchi (1987) Appl. Organomet. Chem. 1 : 177
- 10) Shiomi, K., M. Aoyama, H. Yamanaka, and T. Kikuchi (1988) Comp. Biochem. Physiol. 90C : 361
- 11) Sakurai, T., T. Kaise, and C. Matsubara, (1996) Appl. Organomet. Chem. 10 : 727
- 12) 櫻井照明, 貝瀬利一, 松原チヨ (1996) 微量栄養素研究13 : 161
- 13) Sakurai, T., T. Kaise, T. Ochi, T. Saitoh and C. Matsubara (1997) Toxicology 122 : 205
- 14) 櫻井照明, 貝瀬利一, 松原チヨ (1998) 微量栄養素研究15 : 155
- 15) Sakurai, T., T. Kaise, T. Saitoh and C. Matsubara, (1999) Appl. Organomet. Chem. 13 : 101
- 16) Sakurai, T., K. Hashimoto, I. Suzuki, N. Ohno, S. Oikawa, A. Masuda and T. Yadomae (1992) Int. J. Immunopharmac. 14 : 821
- 17) Sakurai, T., T. Kaise, and C. Matsubara, (1998) Chem. Res. Toxicol. 11 : 273
- 18) Kaise, T., S. Watanabe, and K. Itoh (1985) Chemosphere 14 : 1327