

## ヒ素化合物の暴露によるマクロファージの機能変化

櫻井 照明, 貝瀬 利一\*, 藤原 祺多夫

(東京薬科大学・生命科学部・環境衛生化学研究室\*\*)

### Effects of Arsenic Compounds on Murine Macrophage Functions *in vitro*

Teruaki SAKURAI, Toshikazu KAISE, and Kitao FUJIWARA

Laboratory of Environmental Chemistry, School of Life Science,

Tokyo University of Pharmacy and Life Science

In this study, we observed the effects of both inorganic and organic arsenic compounds on immune functions of murine peritoneal macrophages (PMs) *in vitro*. An inorganic arsenic compound, arsenite, was strongly toxic to PMs, and the concentration of it that decreased in the number of surviving cells to 50 % of that in untreated controls ( $IC_{50}$ ) was  $8.5 \mu M$  when the cells were incubated with arsenite in the presence of recombinant murine interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ; 10 U/ml) and lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/ml) for 48 h. Also, arsenite induced necrosis in PMs, inhibited strongly the nitric oxide secretion from PMs, and markedly enhanced the secretion of an inflammatory cytokine, interleukin  $1\alpha$  (IL- $1\alpha$ ), from these cells during the induction of cell death. In contrast, the cytotoxicity of an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (DMA), which is the final methylated metabolite of inorganic arsenic compounds in humans, is very weak;  $IC_{50}$  value of DMA was 3 mM. Interestingly, DMA selectively induced apoptosis in PMs and decreased in the secretion of IL- $1\alpha$  from these cells, although it inhibited NO secretion. Taken together, the methylation of inorganic arsenic compounds in humans plays an important role in suppression of severe immunosuppression and inflammatory responses caused by inorganic arsenic compounds.

ヒ素は様々な化学形態をとって自然界に広く存在し、その強い毒性は古来より良く知られる。近年ではインド、バングラデシュ、中国などのアジアの貧困地域において、地層から井戸水に浸出した無機ヒ素を飲用していた地域住民に重篤な慢性ヒ素中毒が起き、世界的な社会問題となっている<sup>1)</sup>。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（亜ヒ酸）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>2,3)</sup>。無機ヒ素は哺乳動物の体内に入ると速やかに酵素反応による段階的なメチル化を受け、モノメチルアルソン酸 (MAA)、ジメチルアルシン酸 (DMA) へと順次変換される。ヒトを始め多くの哺乳動物ではDMAが最終代謝産物であるとされるが、ラットやハムスターなど一部の動物ではさらにメチル化を受けてトリメチルアルシンオキシサイド (TMAO) にまで変換される (Fig.1)。一般にこのメチル化代謝は、一種の解毒機構であると思われていた。何故なら、動物を用いた急性毒性試験、或いは培養細胞を用いた *in vitro* の毒性試験で、MAA, DMA, TMAO の毒性は無機ヒ素に比べて極めて低く、MAA, TMAO に至っては殆ど毒性が無い事が明らかにされたからである<sup>1)</sup>。しかしその後、我が国の研究者により DMA には有意な遺伝子毒性や発癌作用のある事が *in vivo*, *in vitro* の両面から報告され<sup>4,5)</sup>,

\*現在の所属：東京薬科大学・生命科学部・環境動態化学研究室

\*\*所在地：東京都八王子市堀之内 1432-1 (〒192-0392)

ヒ素のメチル化代謝が本当に解毒機構なのか議論されるに至った。我々は以前より、未だ明確でないヒ素化合物の免疫毒性に着目し研究していた所、マウスの腹腔マクロファージ (PM) を用いた *in vitro* 細胞毒性試験で、無機ヒ素 (亜ヒ酸) は低濃度 ( $\mu\text{M}$  レベル) で細胞にネクローシスを誘発するが、DMA は低濃度では毒性を示さず、高濃度 ( $\text{mM}$  レベル) でアポトーシスを選択的に誘導する事を明らかにした<sup>6)</sup>。この研究成果は、ヒ素のメチル化代謝は無機ヒ素による強い細胞毒性とネクローシスに伴う炎症反応の誘起を防ぐ一種の解毒機構である可能性を示唆した。本研究では、亜ヒ酸と DMA 暴露による PM 機能に及ぼす影響を観察する事で、哺乳動物におけるヒ素のメチル化代謝の真の役割をさらに検証した。

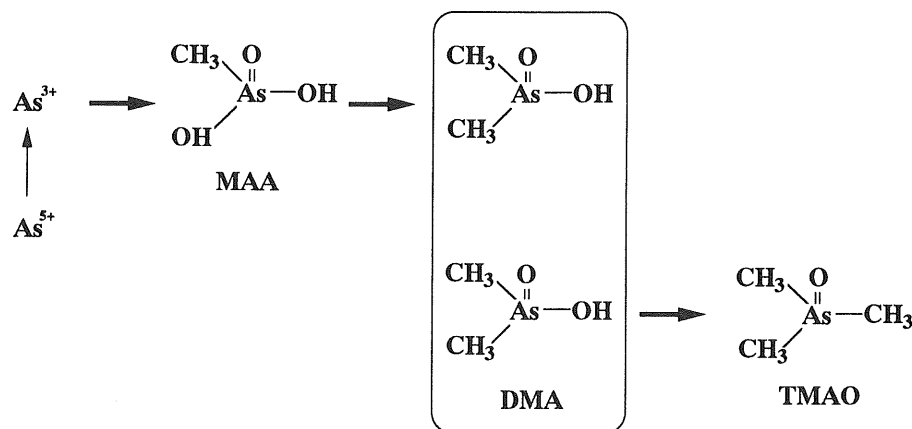


Fig. 1 Metabolism of arsenic compounds in mammalia.

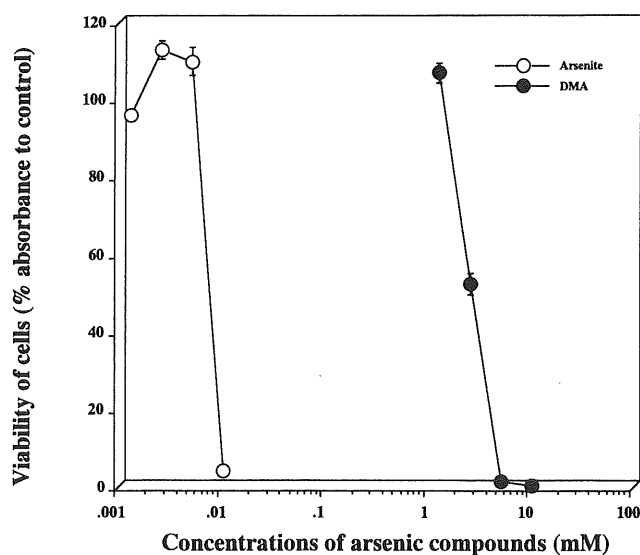
### 実験方法

亜ヒ酸ナトリウム及びDMA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%以上であった。レコンビナントマウスインターフェロン $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) 及びリポポリサッカライド (LPS, 0111; B4) は市販されているものを用いた。PMはSPF環境下で飼育した雄性ICRマウスより、既報に準じて採取し<sup>6)</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ブルー (AB) 法<sup>6)</sup>により検討した。PM培養上清中の酸化窒素 (NO) 濃度はグリース法で<sup>7)</sup>, インターロイキン1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 濃度はELISA法で測定した<sup>7)</sup>。

### 結果と考察

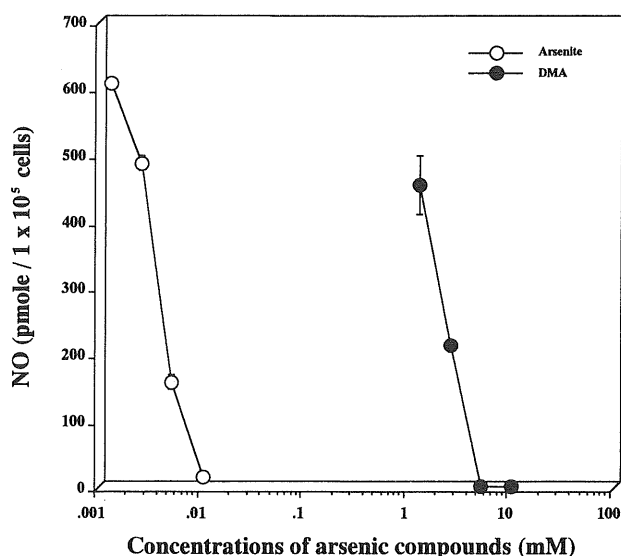
PMをマクロファージ機能の活性化剤であるIFN  $\gamma$  (10U/ml) とLPS (100 ng/ml) の共存下、種々の濃度の亜ヒ酸、或いはDMAと共に48時間培養し、ヒ素化合物の細胞毒性をAB法で検討したところ、無機ヒ素化合物である亜ヒ酸は、PMに強い毒性を示し、細胞生存率50%抑制濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は8.5  $\mu\text{M}$ であった (Fig. 2)。一方、無機ヒ素のヒトでの最終メチル化代謝産物であるDMAは、 $\mu\text{M}$ レベルでは細胞毒性を示さず、 $\text{mM}$ レベルで弱い毒性を示し、 $\text{IC}_{50}$ 値は3mMであった (Fig. 2)。これらの結果は、IFN  $\gamma$  とLPSの非存在下で行った実験結果とほぼ同じであり<sup>6)</sup>, また、PMの形態変化、DNAの断片化、TUNEL染色により、亜ヒ酸により誘導された細胞死の80%がネクローシスで、残りの20%がアポトーシスであり、DMAにより誘導された細胞死は100%アポトーシスであった (データ示さず)。

次に、ヒ素化合物の暴露によるPM機能に及ぼす影響を検討した。PM機能の活性化剤としてIFN  $\gamma$  とLPSでPMを刺激し、そこにヒ素化合物を暴露する事で、PM機能への各ヒ素化合物の影響を検討した。NOはマクロファージから産生放出される代表的なラジカル因子で、マクロファージが腫瘍細胞や細菌などを処理する際に直接的な攻撃因子として働く。従ってマクロファージのNO産生能力の低下は免疫機能の低下を意味する。IFN  $\gamma$  (10U/ml) とLPS (100 ng/ml) のみでPMを48時間培養した場合、培養上清中に産生放出されたNOは  $836.8 \pm 32.9 \text{ pmole}/1 \times 10^5 \text{ cells}$  ( $n=3$ )



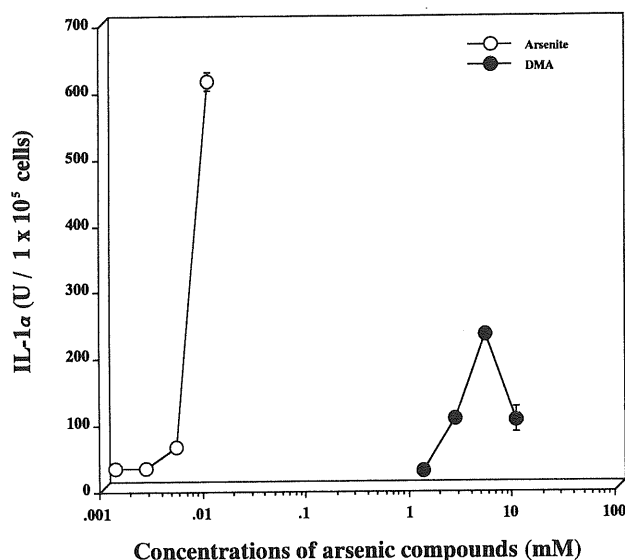
**Fig. 2** Cytotoxicity of arsenic compounds in murine PMs. PMs isolated from ICR mice were incubated with arsenite (○) or DMA (●) in the presence of 10 U/ml IFN  $\gamma$  and 100 ng/ml LPS for 48 h at 37 °C, and the viability of the cells was determined by AB assay. One representative experiment out of three similar performed is given. Results are expressed as arithmetic mean  $\pm$  SD of triplicate dishes.

であった。ここに亜ヒ酸を添加したところ、Fig. 2でまだ細胞毒性が示されなかった濃度 (1  $\mu$ M) からNO産生を濃度依存的に強く抑制した。一方、DMAはFig. 2で示された細胞毒性曲線とほぼ同様の濃度で (mMレベルで)、濃度依存的にNO産生を抑制した (Fig. 3)。これらの実験結果は、亜ヒ酸、DMAの両者ともに免疫抑制作用を有するが、その作用は亜ヒ酸の方がDMAより圧倒的に強い事を示唆している。尚、IFN  $\gamma$  とLPSの非存在下でPMを培養した場合は、どの条件下でもNOは全く産生放出されなかった (データ示さず)。



**Fig. 3** Effect of arsenic compounds on NO secretion from murine PMs. PMs isolated from ICR mice were incubated with arsenite (○) or DMA (●) in the presence of 10 U/ml IFN  $\gamma$  and 100 ng/ml LPS for 48 h at 37 °C, and the concentrations of NO in the culture supernatants of PMs were determined by Griess assay. One representative experiment out of three similar performed is given. Results are expressed as arithmetic mean  $\pm$  SD of triplicate dishes.

マクロファージから産生放出されるIL-1を始めとするサイトカインは、リンパ球など他の免疫細胞に対して活性化シグナルとして働くと同時に、直接的に腫瘍細胞を攻撃するなど、通常は正の免疫因子として働いている。しかし何等の理由で過剰に産生放出されると、生体に強い炎症反応を惹起する事が知られる。IFN  $\gamma$  (10U/ml) と LPS (100 ng/ml) の共存下でPMを48時間培養した場合、培養上清中に産生放出されたIL-1  $\alpha$  は  $47.2 \pm 7.1$  U/ $1 \times 10^5$  cells (n=3) であった (コントロール)。ここに亜ヒ酸を添加したところ、Fig. 2で細胞死が誘導されるのに比例して、濃度依存的に培養上清中のIL-1  $\alpha$  濃度を増加させた (Fig. 4)。これは、亜ヒ酸によってPMにネクロシスが誘導されるのに伴い、細胞内容物が細胞外に放出された結果であると考えられる。しかし、亜ヒ酸10  $\mu$ MをPMに暴露した時に放出されたIL-1  $\alpha$  の量は  $609.8 \pm 14.2$  U/ $1 \times 10^5$  cells (n=3) にも達し、ヒ素化合物を添加しなかった場合に比べ約13倍と異常に高く、単にIFN  $\gamma$  とLPSの刺激で細胞内に貯ったIL-1  $\alpha$  が放出された量とは考えにくい (通常、活性化マクロファージが産生したIL-1  $\alpha$  の50%が速やかに細胞外に放出され、細胞内と細胞膜結合型を合わせたIL-1  $\alpha$  量は全体の約半分程度とされる)。また、同じIFN  $\gamma$  とLPSによる活性化刺激系でも、Fig. 3で示した様に亜ヒ酸の暴露でNO産生系は抑制されたのに対し、IL-1  $\alpha$  産生系は亜ヒ酸で抑制されず、むしろ増加する傾向にあった。断言はできないが、或いは亜ヒ酸がIL-1  $\alpha$  産生系に正に作用している可能性も考えられる。まだ基礎実験レベルではあるが、我々は亜ヒ酸の暴露がPMのIL-1  $\alpha$  のmRNAの発現を増大させる実験結果を得ており、今後さらに詳細な実験を重ねる必要がある。一方、DMAの暴露は、1.25 mMから5 mMの濃度で、やはりPMからのIL-1  $\alpha$  の産生放出を濃度依存的に、最大でコントロールの約5倍まで増加させたが、PMに完全にアポトーシスが誘導される10 mMでは、5 mMに比べ逆に産生放出が抑えられた (Fig. 4)。この実験結果は、アポトーシスは細胞内容物の放出を余り伴わない“良い”細胞死である事に矛盾しない。尚、IFN  $\gamma$  とLPSの非存在下でPMを培養した場合、コントロールで  $4.3 \pm 0.4$  U/ $1 \times 10^5$  cells (n=3) のIL-1  $\alpha$  がPMの細胞外に放出され、亜ヒ酸の暴露では濃度依存的に最大でコントロールの約2倍のIL-1  $\alpha$  が放出されたが、DMAの暴露では著大な変化は観察されなかった。



**Fig. 4** Effect of arsenic compounds on IL-1  $\alpha$  secretion from murine PMs. PMs isolated from ICR mice were incubated with arsenite (○) or DMA (●) in the presence of 10 U/ml IFN  $\gamma$  and 100 ng/ml LPS for 48 h at 37 °C, and the concentrations of IL-1  $\alpha$  in the culture supernatants of PMs were determined by ELISA. One representative experiment out of three similar performed is given. Results are expressed as arithmetic mean  $\pm$  SD of triplicate dishes.

マクロファージは癌細胞や細菌などの異物を貪食処理してリンパ球に抗原提示をし、また様々な液性因子を細胞外に産生放出して異物を直接的、間接的に攻撃する重要な免疫細胞である。しかし、液性因子が必要以上に放出されると、

周囲に炎症反応が誘起される。今回の実験結果より、無機ヒ素はマクロファージに対し $\mu\text{M}$ レベルでNO産生能の低下を伴う強い毒性（免疫抑制）を示し、同時に細胞にネクロシスを引き起こしてIL-1 $\alpha$ などの炎症性因子を周囲に異常に撹散らし、生体を炎症状態に導くものと推定された。一方で無機ヒ素が哺乳動物の体内でメチル化を受けた代謝産物であるDMAは、マクロファージに対する毒性が非常に弱く、mMレベルで細胞死を誘導するものの、それは炎症を伴わないアポトーシスである事が明らかとなった。即ち無機ヒ素のメチル化は、生体を無機ヒ素による免疫機能の低下と炎症反応の誘起から護る“善”の代謝反応であると考えられる。インドや中国の慢性ヒ素中毒患者に観られる肝臓癌、膀胱癌、肺癌、皮膚癌などの癌や、肝臓肥大、脾臓肥大などの炎症様症状は、無機ヒ素を長期間摂取した事より、何等かのメカニズムでこのメチル化代謝が正常に働かなくなり、結果的に各臓器に無機ヒ素が蓄積して誘導されているものと推測される。

## 文 献

- 1) 櫻井照明 (2001) Arsenic Letter 6 : 10.
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) Yamanaka, K., K. Ohtsubo, A. Hasegawa, H. Hayashi, H. Ohji, M. Kanisawa, S. Okada (1996) Carcinogenesis 17 : 767
- 5) Wei, M., H. Wanibuchi, S. Yamamoto, W. Li, S. Fukushima (1999) Carcinogenesis 20 : 1873
- 6) Sakurai, T., T. Kaise, and C. Matsubara (1998) Chem. Res. Toxicol. 11 : 273
- 7) Sakurai, T., N. Ohno, T. Yadomae (1996) J. Leukocyte Biol. 60 : 118