

マウスにおける  
*S*-dimethylarsino-glutathione の  
代謝的動態

加藤 綾華

千葉大学大学院医学薬学府  
先端医学薬学専攻

2017 年

## 【目次】

目次 .....	1
諸言 .....	2
略語一覧 .....	8
1. ヒ素化合物投与後のマウスにおける体内分布・排泄	
序論 .....	9
実験方法 .....	12
結果	
1-1; 投与24時間後における分布・排泄 .....	17
1-2; 投与1時間後における分布・化学形態分析(血液).....	19
1-3; 投与5分後における分布・化学形態分析(肺・肝臓・血液).....	24
考察 .....	31
2. マウス血漿中におけるヒ素結合成分の同定	
序論 .....	34
実験方法 .....	35
結果	
2-1-1; DMAG または <i>iAs</i> <sup>III</sup> の血漿直接反応時におけるヒ素の化学形態 .....	38
2-1-2; DMAG と血漿の直接反応時におけるヒ素のタンパクへの結合 .....	40
2-2; DMAG の血漿分画ごとの反応性 .....	42
2-3; アルブミンを除去した血漿におけるヒ素の化学形態 .....	44
考察 .....	47
総括 .....	49
文献 .....	50
謝辞 .....	55
主論文目録 .....	56

## 【諸言】

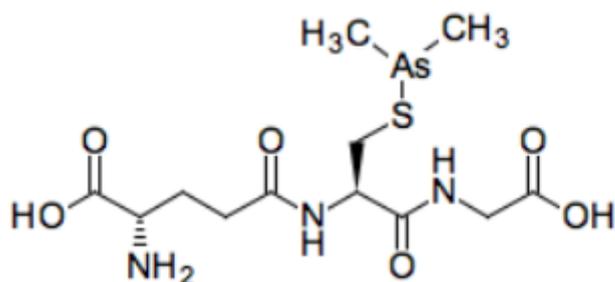
ヒ素は原子番号33、リンやアンチモン、ビスマスと同族である第15族元素のひとつである。IRACにおけるクラス1の発癌性物質（ヒトに発癌作用が認められるもの）として指定されている。単離されたのは13世紀、アルベルトゥス・マグヌスが成功させており、古くから認知されている化合物である。無味無臭かつ容易に単離できる化合物であったため、毒殺の道具としても有名で、よく世界各国で貴族の政権争いにおいて使用されてきたという逸話もある。

地下水の汚染も世界各地で問題視されている。海底由来の地層が高濃度のヒ素を含有している場合があり、該当する地層近くにある地下水を生活用水にしたために、使用した住民たちが高濃度のヒ素を日常的に摂取することにより色素沈着や角化症などの皮膚症状や、しびれなどの神経障害を主とした慢性ヒ素中毒症状を発症した。バングラデッシュや中国などで特に問題となっている (WHO 2004)。

健康を害したり脅かしたりする一方で、治療をする術がないとされていた病気に対する治療薬としても使用されてきた。代表的なものとして、サンバルサンと三酸化二ヒ素 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) が挙げられる。有機ヒ素化合物であるサンバルサンは日本人ともかかわりが深く、開発者であるエールリッヒ博士と共同で研究を行っていたのが日本人である秦佐八郎博士である。抗菌薬が単離される戦前において梅毒とトリパノソーマにおける唯一の治療薬として使用されていた（現在は副作用が問題視されているため医療用としては使用されていない）。当時はヒ素同士が二重結合をしている二量体だと考えられていたが、ヒ素同士の二重結合を作りにくいことが分かってきたため、サンバルサンの化学構造が三量体、もしくは五量体を作る多量体である説が提唱された (Lloyd et al. 2005)。

無機ヒ素化合物である  $\text{As}_2\text{O}_3$  は、再発または初期治療が無効の急性前骨髄球性白血病（APL）の治療薬として、欧米で広く使用されている。日本でも2004年に承認され、使用されている。単独での奏効率も約87%と高く、初期治療薬であるレチノイド製剤と併用により未治療時においても単独と同等もしくはそれ以上の奏効率との報告がされており (Estey et al. 2006)、欧米では実際に臨床で使用されているが、一方で約半数の患者に QT 延長という重篤な副作用が確認されるとの報告もある (Rust and Soignet 2001)。

このように、治療薬、特に抗がん剤としてのヒ素化合物に再び注目が集まっている。有機ヒ素化合物における薬理作用も注目されている。3 価のジメチル化体に GSH が結合した化合物 S-dimethylarsino-glutathione (DMAG...商品名 ; Darinaparsin) が現在、再発・難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL) の治療薬として治験が行われている (Figure 1)。



**Figure 1.** Structural formula of S-dimethylarsino-glutathione

DMAG が治験薬の候補として挙げられた背景としては、治療において  $\text{As}_2\text{O}_3$  の使用により QT 延長という心臓の重篤な副作用が約半数で出てしまい、治療途中で投与を中断せざるを得ない患者が少なくなかったことから、有機ヒ素が無機ヒ素より毒性が低いという定説の下、白血病治療において副作用を減弱し、より治療効果を高める化合物の使用を目指したことによる。その際 NCI-60 を使用した *in vitro* スクリーニングにおいて、100 種類以上の有機ヒ素化合物から得られた化合物が DMAG である。

DMAG は *in vitro* において  $\text{As}_2\text{O}_3$  と比較するとより高い感受性があり、白血病、骨

髄腫、リンパ腫のような血液がん、また固形癌にも高い抗腫瘍効果が確認された化合物である (Golemovic 2003)。

*In vivo* でも同様に、抗がん作用を有しており、白血病細胞を移植したマウスに 9 日間 DMAG の腹腔内投与を行うと、生存率を 64 % 上昇させたことが報告されている (Golemovic 2003)。このような経緯を経て DMAG は治験薬として本格的に臨床試験が開始され、現在再発・難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫 ( Peripheral T-cell lymphoma , PTCL ) の治療薬として治験が行われている。

PTCL は、悪性リンパ腫に分類される。悪性リンパ腫は世界で年間35万人罹患するといわれる血液のがんで Hodgkin's と non-Hodgkin's と大きく 2 つに分けられる。さらにまた non-Hodgkin's は細胞により B 細胞リンパ腫と T 細胞リンパ腫、悪性度により高程度・中程度・低程度に分けられる。近年では化学療法や放射線治療に加え、モノクローナル抗体 ( B 細胞リンパ腫におけるリツキシマブなど )、血液幹細胞移植が進歩し、全体的に生存率は上がってきているが、特に B 細胞リンパ腫においては生存率が飛躍的に上昇した。

PTCL は non-Hodgkin's の T 細胞における中悪性度リンパ腫に分類され、中悪性度リンパ腫の約12%の割合を占めていると言われている。成熟した T 細胞・NK 細胞における病態は 24 に分類されているが、まず、分類が特定できるものと分類が特定できないもの (NOS) に分けられる。主な病態としては非特定型末梢性 T 細胞リンパ腫 ( PTCL-NOS )、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 ( AITL )、ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫 ( ALCL )、ALK 陰性未分化大細胞リンパ腫の 4 種である。国によって発生するリンパ腫の種類や患者数は異なっている。日本では B 細胞リンパ腫の患者が T 細胞リンパ腫の患者より多いとされているが、九州・沖縄に集中して成人性 T 細胞リンパ腫 ( ATL ) 患者が多いため、T 細胞リンパ腫の罹患率が他の国々と比べ高くなっている。ALCL は化学療法である CHOP ( シクロフォスファミド、ドキシソルビシン、

ビンクリスチン、プレドニゾロン) 療法で効果が認められており予後は良好だが、他 3つの病態については治療法が確立されておらず、他のリンパ腫と同じように CHOP 療法が初期治療として行われるが、効果が薄く、寛解しても再発することが多いため、予後がとても悪い疾患である。

DMAG のような化学療法の新規治療薬に加え、発現している CD の分類に基づいたモノクローナル抗体での治療も検討されているが (Agostinelli et al. 2008) 、そのような血液がんが含まれている再発・難治性の悪性リンパ腫 (Hodgkin's 7 人と non-Hodgkin's 22 人で合計 29 人) に対する DMAG の臨床試験が行われた。投与量として DMAG を  $300 \text{ mg/m}^2$  を 5 日間連続投与し、23 日間休薬を 1 サイクルとして 1~20 サイクル行った場合、効果が現れた病態はいずれも non-Hodgkin's リンパ腫の部類に入るびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) と、今回の臨床試験の適応対象になった末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL) であった。特に PTCL の患者においては、治療評価の可能な 7 名中 4 名の患者に DMAG の治療効果が見られ、寛解が 1 人、不確定寛解 (血中にはがん細胞が存在していなかったが、リンパ節に腫瘍が残っていた) が 1 人、病変不変が 2 人であった。また、病変不変の 1 人は臨床試験が終了するまで DMAG の治療を受けており、生存もしていた (26.2 か月)。副作用においては、化学療法剤で頻発する血液学的副作用である好中球減少症は 29 人中 3 人で、そのうち重篤になりうる発熱性好中球減少症は 1 人であった。また QT 延長に関しては 6 人に症状が出たが一過性のもので、DMAG に関連性は少ないとみられ、心毒性はかなり低いことが示唆された。また、その他の消化器系や神経系の副作用も現れたが、重篤なものは無かった。血漿中の総ヒ素濃度も休薬期間後には投与前のベースラインに戻っていることが分かった (Hosein et al. 2012) 。そのため DMAG は PTCL の治療薬として治験が行われることになった。

その後の日本・韓国合同の PTCL（PTCL-NOS 16 名、AITL 6 名、ALK 陰性未分化大細胞リンパ腫 1 名）を対象にした第 I 相試験では、200 mg/m<sup>2</sup> を 1 日 1 回 4 日間連続投与し 23 日休薬、300 mg/m<sup>2</sup> を 1 日 1 回 5 日間連続投与し 23 日休薬、300 mg/m<sup>2</sup> を 1 日 1 回 5 日間連続投与し 16 日休薬という 3 種類のコースに患者を振り分け、同じコースを最低 2 サイクル行った患者 14 名のうち 4 名に寛解もしくは部分寛解が見られ、また病変不変と診断された 6 名のうち 5 名が腫瘍の縮小傾向が見られていた。また副作用として肝障害が 1 人、3 人が血液学的副作用の好中球減少症を発症したが、QT 延長を示した患者はいなかった (Kim et al. 2015)。

上記の臨床試験の結果より、難病とされる PTCL にとって DMAG は期待の新薬であり、欧米では希少疾病医薬品として指定されてもいる。世界中で第 II 相試験が行われており、日本では 2016 年 4 月から開始された。また、すでに DMAG は様々な臨床試験が行われており、固形腫瘍においては、治療抵抗性で転移のみられる癌

(Tsimberidou et al. 2009) や肝細胞癌 (Wu et al. 2010) 等に行われた。癌が進行しなかった患者が一部見られたが (Tsimberidou et al. 2009)、著効な縮小効果を示す知見は得られなかった (Tsimberidou et al. 2009; Wu et al. 2010)。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> が低濃度 (0.5 ~ 2 μM) で NB 4 細胞の promyelocytic leukaemia protein (PML) に作用し、SUMO 化を促進して PML-RAR $\alpha$  を分解、細胞分化を誘導するのに対して、そのような兆候が見られなかったという報告があることから、DMAG は As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> とは違う抗白血病作用を有している可能性が高い。また、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 抵抗性の細胞に DMAG を添加して反応させるとアポトーシスを誘導するという報告もある (Diaz et al. 2008)。外来性の GSH やシステインが DMAG の細胞内への取り込みを阻害すること、または細胞内の GSH 量の増加を招くことによって、DMAG による細胞死が抑制されたとの報告があるが (Matulis et al. 2009)、生体内において、どのような作用機序を有しているのか明らかになっていない。

一方、DMAG はヒ素のGSH抱合を使用した代謝における中間体のひとつ（Figure 1-1）としても考えられている。DMAG からグルタチオンが外れて3価のジメチル化ヒ素（DMA<sup>III</sup>）となり、最終的に5価のジメチル化ヒ素（DMA<sup>V</sup>）になるとされている（Hayakawa et al. 2004）。またDMAG 自体の代謝経路はほとんど明らかになっておらず、ヒ素の代謝経路解明においても重要な化合物でもある。

そこで本研究ではヒ素の代謝経路の解明、DMAG の薬効や毒性の作用機序の解明を目指し、静注投与時における体内分布、また体内のヒ素の化学形態に注目し検討を行った。また、3価の無機ヒ素化合物である亜ヒ酸ナトリウム（iAs<sup>III</sup>）と比較した場合における、分布や代謝、毒性や薬効の差異を調べることにより未知の副作用を予測することが可能な有用な情報を提供することを目指した。

【略語一覧】

iAs<sup>III</sup> ; inorganic arsenic (III )

iAs<sup>V</sup> ; inorganic arsenic (V )

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ; arsenic trioxide

ATG ; arsenic triglutathione

DMAG ; *S*-dimethylarsino-glutathione

DMA<sup>III</sup> ; dimethylarsinous acid

DMA<sup>V</sup> ; dimethylarsenic acid

DMMTA<sup>V</sup> ; dimethylmonothioarsinic acid

GSH ; glutathione ( reduced form)

GSSG ; glutathione disulfide

HPLC ; high performance liquid chromatography

ICP-MS ; inductively coupled plasma mass spectrometry

MADG; monomethylarsonic diglutathione

MMA<sup>III</sup> ; monomethyl arsonous acid

MMA<sup>V</sup> ; monomethyl arsenic acid

PTCL ; peripheral T-cell lymphoma

## 1. ヒ素化合物投与後のマウスにおける体内分布・排泄

【序論】一般的にヒ素は無機ヒ素が有機ヒ素より毒性が強く、また3価が5価より毒性が強いとされてきた。以前から無機ヒ素は『酸化メチル化』反応を介して代謝が行われ (Challenger 1945)、メチル化は毒性を低減させる代謝機構だと考えられてきた (Braman and Foreback 1973)。しかし *in vitro* における実験で、3価の無機ヒ素より DMA<sup>III</sup>の細胞毒性がより強いことが判明し (Styblo et al. 2000)、メチル化が必ずしも毒性軽減機構とは限らないことが分かってきた。そのため、3価や5価の無機ヒ素の代謝経路の解明は、ヒ素の毒としての性質、また薬としての性質を確認するうえにおいてとても重要である。

ヒトにおける無機ヒ素の代謝は酸化、還元、硫化、グルタチオン抱合など様々な反応を受けた後、最終的にジメチルの5価である DMA<sup>V</sup>になる。主に尿中に排泄されるが、一部は胆汁中にも排泄される。GSHに抱合されて代謝される経路 (Figure 1-1) である『還元的メチル化』 (Hayakawa et al. 2004) では、無機ヒ素は細胞内に取り込まれたのち速やかにGSHに抱合され tri-glutathione 化する。そのうち2つのGSHがメチル基に変換され、MADG、DMAGと変換されていき、最終的に DMA<sup>V</sup>へ代謝されていく。この経路における代謝中間体として生成されるうちのひとつと考えられているのが DMAG である。しかし ATG、MADG はラットにヒ素化合物を投与した際の胆汁中で確認されているが (Cui et al. 2004)、DMAG はとても不安定な物質で容易に分解される (Raab et al. 2004) ため、生体試料で検出することが出来たという知見は報告されていない。

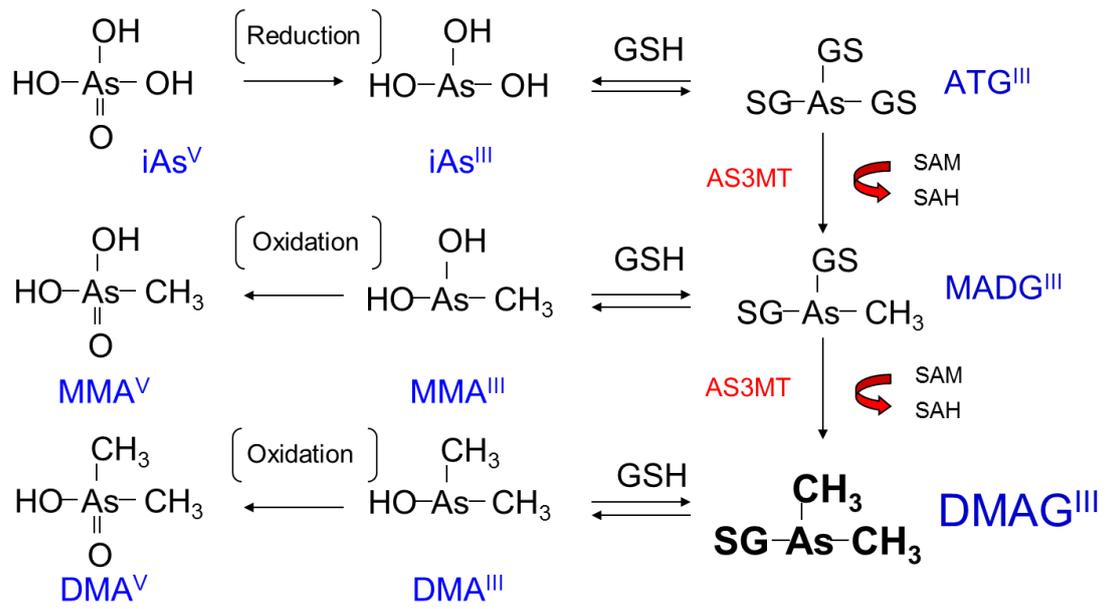
DMAG における *in vitro* の毒性はとても強く、DMA<sup>III</sup>と同等かそれ以上とされているが (Hirano and Kobayashi 2006; Styblo et al. 2000)、毒性の本態は必ずしも明らかになっておらず、また、*in vitro* 実験において DMAG を添加したウェルとは異なる周囲の

ウェルの細胞が死滅するなど、ガス様の物質が生成したことでしか説明できない挙動も示されている (Hirano and Kobayashi 2006)。

しかし、マウスに静脈投与した際、単回投与の場合はLD<sub>50</sub>値がiAs<sup>III</sup>の 35 倍、5 日連続投与になるとLD<sub>50</sub>値がiAs<sup>III</sup>の50倍にもなるとの報告されており (Golemovic 2003)、生体内に投与した場合は、無機ヒ素に比べて比較的毒性が低い化合物であると考えられる。しかし、どうして *in vivo* と *in vitro* における毒性が大きく違うのか、明らかになっていない。

諸言でも述べた通り、リンパ腫全般において臨床試験を行った際に、2 種類の non-Hodgkin's リンパ腫で治療効果があり、特に治療効果が顕著であったものの、治療法が未だ確立できていない疾患が、予後不良な難治性の PTCL であった。そのため PTCL を対象として、DMAG の治験が開始された (Hosein et al. 2012)。しかし、*in vivo* における知見が乏しく、作用機序、体内動態、代謝機構は十分に明らかになっておらず、実用化において作用機序、代謝機構の解明が喫緊の課題となっている。

本研究では DMAG を静注投与したマウスの体内動態から迫っていくことによって薬効や薬理作用、毒性の解明の一助を見つけ出すこと、また未知の副作用の予測において、有益な情報を提供することを目指した。



**Figure 1 - 1** Glutathione conjugated pathways of arsenic

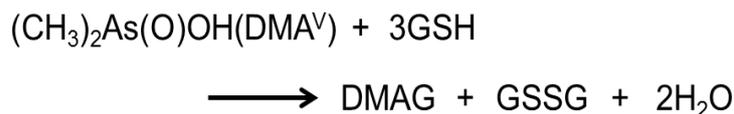
## 【実験方法】

### 試薬

NaAsO<sub>2</sub>（亜ヒ酸ナトリウムとして）、DMA<sup>V</sup>（カコジル酸として）はSigma-Aldrich社から購入した。グルタチオン（還元型）、硝酸（HNO<sub>3</sub>）、過酸化水素（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）、イソフルラン（isoflurane）は和光から購入した。ソムノペンチル Somnopentyl<sup>®</sup> (pentobarbital sodium)は共立製薬で購入した。0.44 μm-pore membrane filter はミリポアから購入した。

### DMAG の合成

脱気し窒素置換したMQ水 10 mL にグルタチオンとDMA<sup>V</sup>を mol 数として 3:1（6 mmol : 2 mmol）の割合で添加し窒素気流下で一晩混合した。その後上清を 1 mL ごとに 2 mL エッペンへ分注し、ependolf真空濃縮遠心機の脱水モードで熱をかけないよう約 4 時間稼働させ半粘性の物質になるまで水分を取り除いた。その後冷メタノールを 500 μL 添加し、サンプル密閉式超音波破碎装置で 30 分攪拌した後、約 11,000 x g で 10 分遠心し、上清を 2 mL のチューブに取り出した。この抽出方法を 3 回行い、メタノール全容を濃縮遠心機でほとんど取り除いた後、残渣をデシケーターで脱気した後一晩乾燥させた(Cullen et al. 1984)。以下を DMAG とし、デシケーターで保存し 2 週間以内に使用した。DMAG 投与液は用時調製を行った。



DMAG と不純物の存在確認には LC-MS を使用した。HPLC は SHIMAZHU の送液ユニット LC-20AB、検出器 SPD-M20A、オーブン CTO-20AC を使用した。MS 装置は

LCMS-2010 EV を使用した。DMAG の分子量約 411 であるシグナル強度を確認して、DMAG が合成をされていることを確認した。また不純物である GSSG の分子量約 611 であるシグナル強度も確認し、検出されないことを確認した。

## 動物

日本クレアから購入した 7 週齢の C57BL/6J マウスを使用した。湿度 50 % 、22~25 °C で調整され、明暗を 12 時間周期 (7 :00 ~ 19 :00) で切替えた飼育室で 1 週間飼育してから使用した。国立環境研究所実験動物委員会の承認を経て、国立環境研究所動物実験施設利用マニュアルに基づき委託業者に依頼し飼育を行った。

8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに合成した DMAG または  $iAs^{III}$  を kg 体重、ヒ素として 0.1 mg または 0.5 mg を isoflurane 麻酔下、単回尾静注投与を行い、24 時間後、1 時間後にペントバルビタール麻酔下において、全血を採取、その後大脳、小脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、骨 (大腿骨)、皮膚、筋肉を摘出した。投与 24 時間後のマウスからは、糞および尿も回収した。また血漿は全血を採取後ただちに 1600 x g 、10 分間遠心し、上清の血漿を採取した。臓器は 0.1 g または全量を、全血または血漿は 0.03 mL または 0.05 mL を採取して湿式灰化を行った。また投与 5 分後においては、全血を採取後、大脳、小脳、肺、肝臓、腎臓を摘出した。対照群の動物には、同様に生理食塩水を投与した。1 群あたり 5 匹の動物を用いた。

## 総ヒ素濃度測定と化学形態分析

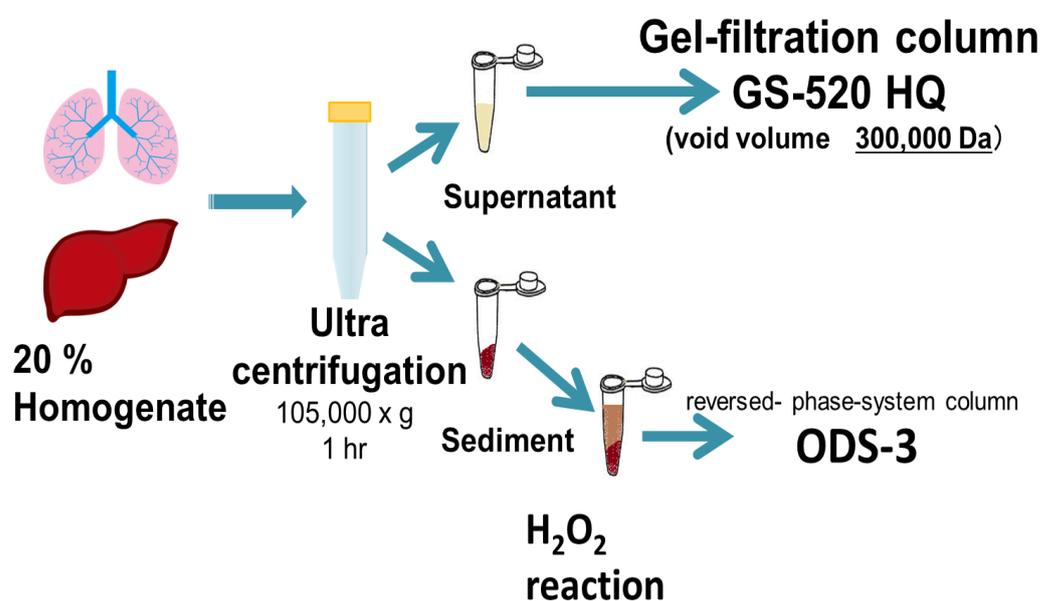
生体試料は、 $HNO_3$  600  $\mu L$  を添加し 90 °C で一晩以上加温し試料を溶解させた。その後  $H_2O_2$  200  $\mu L$  を加えさらに 90 °C で 1 晩加温した後、130 °C に上昇させ約 8 時間かけて酸分解した。完全に冷却した後 濃度を調節するため 3 mL 、もしくは 5 mL に

MQでメスアップし、各臓器で選定した希釈倍率にて（1倍、5倍、25倍、50倍）さらに希釈した後、誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）により総ヒ素濃度を計測した。ICP-MSはAgilent 7500 cx または Agilent 8800 を使用した。

糞は前処理として -30 °Cで一晩以上凍結させた後に、凍結真空乾燥機で水分を除去した。その後乳鉢で粉碎し、均一の試料とした。そのうちの0.1 gに対して、硝酸を600 µL 添加し1晩室温で反応させた後、前述と同様の灰化処理を行った。血漿については、DMAG もしくはiAs<sup>III</sup>を体重あたりヒ素として0.5 mg/kgの用量を尾静注投与して1時間後、または5分後におけるマウス血漿を採取後、ただちにカラム溶離液を使用して2倍希釈を行った。0.44 µm フィルターでろ過した後高速液体クロマトグラフィー（HPLC）-ICP-MSで化学形態を確認した。分離においてサイズ排除クロマトグラフィーモード主体のGS-220 HQ（shodex）カラムを用い、溶離液として50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4) を使用、20 µL を注入量とし、流速0.5 mL/min、カラムオープン温度25 °Cで溶出した。HPLCはSHIMAZHUの送液ユニットLC-20AB、検出器SPD-M20A、オープンCTO-20ACを使用した。ICP-MSはAgilent 7500 cx または Agilent 8800を使用した。

肺、肝臓のホモジネートは、投与5分後に摘出した臓器を、窒素置換したトリス硝酸バッファーに250 mMのグルコースを加えたものを使用して、窒素気流下で各臓器の重量が20%のホモジネートを作製した。その後100,000 x gで1時間遠心分離した後、上清と沈殿物に分離した。ホモジネートとホモジネート上清はICP-MSで総ヒ素濃度を予め測定し、上清に約8割ヒ素が回収されることを確認している。上清はそのまま0.44 µmのフィルターでろ過した後、サイズ排除クロマトグラフィーモード主体で排除限界が分子量約300,000のGS-520 HQカラムを用いてHPLC-ICP-MSを行った。また沈殿物はバッファーで3回洗浄して上清を除去した後、72°C、30分間インキュベーターで酵素を失活させた。その後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を500µL加えて3時間室温下で反応させ、

タンパクなどと結合しているヒ素化合物を溶出させた。反応溶液の上清を逆相カラムである ODS-3 を用い、溶離液として 3 mM malonic acid + 5 mM tetrabutyl ammonium hydroxid + 5 % Methanol (pH 7.4) を使用して、20  $\mu$ L を注入量とし、流速 0.8 mL/min、カラムオープン温度 25  $^{\circ}$ C で溶出した (Figure 1 - 2)。HPLC は、SHIMAZHU の送液ユニット LC-20AB、検出器 SPD-M20A、オープン CTO-20AC を使用した。ICP-MS は Agilent 8800 を使用した。



**Figure 1 - 2** Methods for the preparation of organ samples and speciation of arsenic.

### 統計

データは平均  $\pm$  SD で表した。統計は一元配置分散分析法 (分散分析) 後、Tukey's *post-hoc test* によって行なった。また、 $p < 0.05$  の場合を統計学的に有意差ありとした。

### ICP-MS

ICP-MS のパラメーターは以下の通り設定した (Table 1 - 1)。

**Table 1 - 1** ICP-MS 7500 cx and 8800 parameters employed

<b>ICP-MS 7500 cx</b>	
Radio-frequency power (W)	1550
Plasma gas flow rate (L/min.)	0.92
Makeup gas flow rate (L/min.)	0.28
Nebulizer flow rate (L/min.)	0.1
Omega lens voltage (V)	1.2
Octapole RF(V)	180
Acquisition time (min.)	11.42
Dwell time (s)	0.04

<b>ICP-MS 8800 (O<sub>2</sub> mode)</b>	
Radio-frequency power (W)	1550
Plasma gas flow rate (L/min.)	1.03
Oxygen gas flow rate (L/min.)	0.03
Nebulizer flow rate (L/min.)	0.1
Omega lens voltage (V)	9.1
Octapole RF(V)	200
Acquisition time (min.)	0.309
Dwell time (s)	0.1

## 【結果】

### 1-1 投与24時間後における分布・排泄

本研究において DMAG の分布・排泄がどのように行われているか、ヒ素の化学形態がどのようになっているのか調べるため、各ヒ素化合物をヒ素として体重あたり 0.5 mg/kg を単回尾静注投与したマウスにおいて投与24時間後における臓器、組織、排泄物の総ヒ素濃度から体内分布・排泄を調べることを目的とした。また、3価の無機ヒ素である  $iAs^{III}$  も同条件で行い比較した。

ヒ素として体重あたり 0.5 mg/kg の用量の DMAG または  $iAs^{III}$  を単回尾静注投与して24時間後、臓器、血液、尿、糞を回収し、総ヒ素濃度を測定、投与したヒ素量に対して、尿・糞中および各臓器から回収できたヒ素量の割合を概算すると、Table 1-2 からわかるように DMAG 投与群では  $93.0 \pm 11.7\%$ 、 $iAs^{III}$  では  $80.3 \pm 17.0\%$  であった。

DMAG 投与群では、尿中に  $76.6\% \pm 11.8\%$ 、糞中に  $8.02\% \pm 3.45\%$  のヒ素が回収された。 $iAs^{III}$  投与群では、尿中に  $68.5\% \pm 18.7\%$ 、糞中に  $8.19\% \pm 3.76\%$  のヒ素が回収された。両群とも、尿、糞の合計で約70%以上のヒ素量を有していたことから、どちらのヒ素化合物も概ね24時間以内にほぼ体外に排泄されていることが示唆された。また、代謝臓器である肝臓もふくめた臓器や血液には、投与24時間後にはほとんどヒ素が残存していないことが分かった。 $iAs^{III}$  投与群と DMAG 投与群を比較したとき、各臓器や尿、糞に有意な分布の差は見られなかったが、DMAG 投与群の方が  $iAs^{III}$  投与群に比べて尿に排泄されやすい傾向が見られた。

**Table 1 - 2** Recovery of arsenic at 24 hr after intravenous injection of S-dimethylarsino-glutathione (DMAG) or sodium arsenite (iAs<sup>III</sup>) at a dose of 0.5 mg As/kg body weight.

Recovery of As (% of dose)						
	lung	liver	urine	feces	others	total
0.5 mg As/kg DMAG	0.045 ±0.019	1.11 ±0.76	76.6 ±11.8	8.02 ±3.45	6.56 ±1.31	93.0 ±11.7
0.5 mg As/kg iAs <sup>III</sup>	0.046 ±0.103	0.604 ±0.60	68.5 ±18.7	8.19 ±3.76	2.06 ± 0.74	80.3 ±17.0

Data are presented as mean ± SD.

Others: cerebellum + cerebrum + heart + spleen + kidney + testis + bone + skin + muscle + whole blood + plasma

## 1-2 投与1時間後における分布・化学形態分析（血液）

前述の実験から、DMAG も $iAs^{III}$ も24時間以内に体内から概ね排泄されていることが示唆された。そのため、分布・代謝を確認するためには比較的早い時間での確認が必要と考えた。ヒトの臨床試験においては1時間かけて点滴投与されていることから、点滴投与が終了する投与1時間後の体内分布を確認することとした。また血液がんの効果があることをふまえ、血液中におけるヒ素の化学形態が薬理作用に影響すると想定し、体重あたりヒ素として0.5 mg/kgの用量のヒ素化合物を投与した血漿中における化学形態を各ヒ素投与群で比較した。また、濃度を低減して投与する場合をふまえ、投与量をヒ素として0.1 mg/kgとした実験も合わせて実施した。

まず、ヒ素として0.1 mg/kgまたは0.5 mg/kgの用量の各ヒ素化合物をそれぞれ尾静注投与した1時間後のマウスにおける各臓器、血液の総ヒ素濃度について調べた。Table 1-3において、体重あたりヒ素として0.1 mgの $iAs^{III}$ 投与群とDMAG投与群のヒ素の体内分布を比較したところ、すべての臓器、血液において有意な差は見られなかった。ヒ素として0.5 mg/kgの用量の $iAs^{III}$ 投与群とDMAG投与群のヒ素の体内分布を比較したところ、ヒ素の体内分布においてDMAG投与群では肺と脳、特に小脳において $iAs^{III}$ 投与群と比べて有意に総ヒ素濃度が上昇していた。それとは対照的に、肝臓においてDMAG投与群では $iAs^{III}$ 投与群より有意にヒ素濃度が低下していた。またその他の臓器においては統計学的に有意な差は見られなかった。

Table 1-4におけるヒ素の回収率においても同様に、DMAG投与群は肺と脳、特に小脳において $iAs^{III}$ 投与群と比べて有意に上昇していた。またそれとは対照的に、肝臓におけるヒ素の回収率はDMAG投与群では $iAs^{III}$ 投与群より有意に低下していた。

Figure 1-3に示したように、ヒ素として0.5 mg/kgの用量を投与したマウス血漿のヒ素の化学形態別分析において、上から2段目のcontrol群（b）ではarsenobetaineと同じ保持時間のピークが主なピークとして検出された。Arsenobetaineは、魚介類に多く

含まれており、動物に投与されても化学構造が変わらない状態で排泄され、毒性がとも低いことで知られている (Kaise et al. 1985)。今回のマウスの食餌には魚粉が含まれているため、食餌由来の arsenobetaine が検出されたと考えられる。上から3段目の  $iAs^{III}$  投与群 (c) では  $iAs^V$  と  $DMA^V$  と同じ保持時間のピークが検出された。投与した化合物である  $iAs^{III}$  のピークは検出されなかった。最下段の DMAG 投与群 (d) では  $DMA^V$  と同じ保持時間のピークが検出された。投与した化合物である DMAG のピークは検出されなかった。興味深いことに、 $iAs^{III}$  投与群、DMAG 投与群ともに保持時間約10分のところに標品では確認できない未同定のピークが確認された。ここで使用したカラムでは、分子量 3,000 以上の物質が保持時間約10分に void として1本のピークで検出される。このことから、今回の未同定のピークは、分子量 3,000 以上の血漿中成分にヒ素が結合しているピークだと考えられる。

**Table 1 - 3** Concentrations of arsenic in the organs and blood at 1 hr after intravenous injection of S-dimethylarsino-glutathione (DMAG) or sodium arsenite (iAs<sup>III</sup>) at doses of 0.1 and 0.5 mg As/kg body weight.

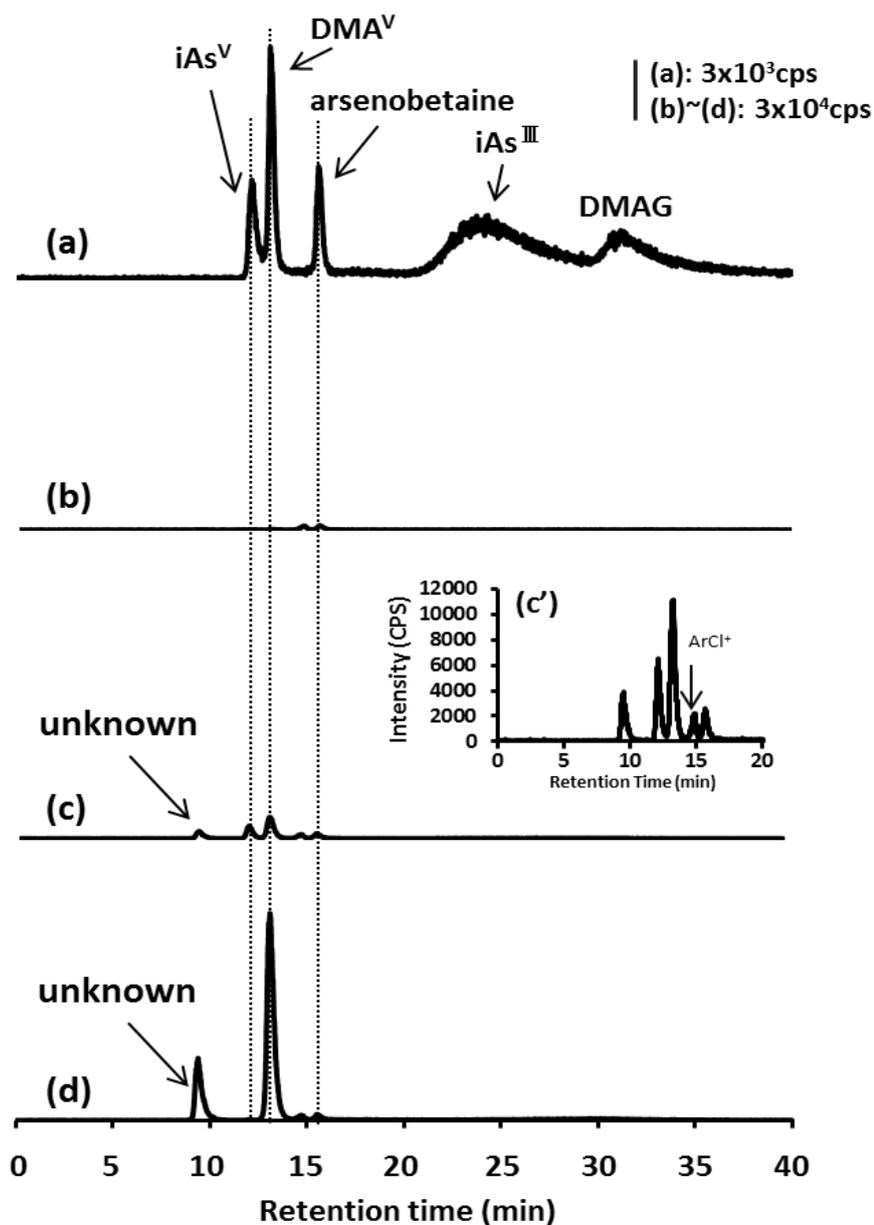
Concentrations of arsenic (ng/g)													
	cerebrum	cerebellum	lung	heart	liver	spleen	kidney	testis	bone	skin	muscle	whole blood	plasma
control	11.7 ±5.2	18.2 ±3.3	46.6 ±4.7	34.0 ±5.1	42.6 ±10.4	24.0 ±4.4	312.6 ±289	33.4 ±17.0	63.2 ±77.9	38.2 ±29.0	53.5 ±58.6	31.2 ±4.1	32.7 ±3.8
0.1 mg As/kg DMAG	30.9 ±5.9	39.3 ±5.0	387.4 ±80.5	91.1 ±2.8	220.8 ±7.5	82.1 ±6.8	317.4 ±54.0	36.6 ±14.6	84.5 ±20.1	41.8 ±12.3	47.1 ±5.5	85.3 ±24.4	106.0 ±15.7
0.1 mg As/kg iAs <sup>III</sup>	33.5 ±12.2	36.5 ±3.3	191.7 ±17.5	97.4 ±6.2	217.1 ±12.3	120.0 ±17.1	486.5 ±66.2	38.6 ±5.5	59.6 ±29.9	80.2 ±39.6	50.6 ±7.0	160.0 ±24.4	209.4 ±19.6
0.5 mg As/kg DMAG	176.2 ±68.8	171.2* ±34.7	1989* ±423	402.6 ±77.6	869.3* ±158	346.0 ±61.2	1302 ±319	94.6 ±15.6	315.4 ±103	176.4 ±47.7	221.3 ±25.8	337.9 ±100	345.9 ±64.5
0.5 mg As/kg iAs <sup>III</sup>	73.4 ±61.4	54.9 ±10.0	803.5 ±63.7	433.3 ±46.2	1600 ±427.2	422.9 ±41.1	1417 ±189	71.0 ±12.3	196.6 ±56.4	207.8 ±53.7	168.1 ±21.8	233.5 ±17.9	277.9 ±118.4

Data are presented as mean ± SD. \*, Significantly different from the corresponding iAs<sup>III</sup> -treated group (p<0.05).

**Table 1 - 4** Recovery of arsenic in the organs and blood at 1 hr after intravenous injection of *S*-dimethylarsino-glutathione (DMAG) or sodium arsenite (iAs<sup>III</sup>).

		Recovery of As (% of the dose )													
		cerebrum	cerebellum	lung	heart	liver	spleen	kidney	testis	bone	skin	muscle	whole blood	plasma	Total
0.1 mg As/kg DMAG		0.29 ±0.1	0.07 ±0.02	1.77 ±0.24	0.26 ±0.03	8.50 ±0.92	0.16 ±0.03	0.85 ±1.49	0.05 ±0.02	0.05 ±0.11	0.02 ±0.08	2.39 ±5.43	3.68 ±1.77	2.69 ±0.53	20.8 ±7.51
0.1 mg As/kg iAs <sup>III</sup>		0.29 ±0.16	0.06 ±0.02	0.69 ±0.19	0.30 ±0.09	7.39 ±0.87	0.28 ±0.12	2.32 ±0.64	0.01 ±0.04	0.06 ±0.004	0.06 ±0.04	2.01 ±3.28	8.26 ±1.72	5.83 ±1.05	27.6 ±5.02
0.5 mg As/kg DMAG		0.46 ±0.21	0.08* ±0.03	2.08* ±0.48	0.33 ±0.07	7.49* ±1.52	0.17 ±0.04	2.37 ±0.80	0.10 ±0.06	0.12 ±0.04	0.07 ±0.02	7.67 ±2.08	4.32 ±1.60	2.40 ±0.5	27.7 ±6.68
0.5 mg As/kg iAs <sup>III</sup>		0.18 ±0.18	0.02 ±0.01	0.79 ±0.08	0.37 ±0.03	14.3 ±3.45	0.20 ±0.03	2.67 ±0.23	0.07 ±0.02	0.05 ±0.02	0.18 ±0.08	5.88 ±1.63	2.74 ±0.21	1.81 ±0.91	29.3 ±4.02

Data are presented as mean ± SD. \*, Significantly different from the corresponding iAs<sup>III</sup> -treated group (p<0.05).



**Figure 1 - 3** HPLC-ICP-MS elution profiles of arsenic in plasma. The blood was obtained 1 hr after intravenous injection of DMAG or  $iAs^{III}$  in mice. column, GS-220HQ; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, 50 mM Tris- $HNO_3$  (pH 7.4); temperature, 25 °C; injection volume, 20  $\mu$ L; ICP-MS, Agilent 7500 cx was used for 1 hr group and 5 minutes control, Agilent 8800 was used for 5 minutes  $iAs^{III}$  and DMAG. The vertical bar indicates the intensity of ICP-MS as counts per second (cps). (a) Arsenic standard solution (b) Control, (c)  $iAs^{III}$ , (c') Inset; 10-fold magnification of (c), (d) DMAG

### 1-3 投与5分後における分布・化学形態分析（肺・肝臓・血液）

Table 1-3、1-4の結果から、投与1時間においてヒ素は相対的に DMAG 投与群では肺と脳（特に小脳）に有意に多く分布しており、iAs<sup>III</sup>投与群では肝臓に有意に多く分布していることが分かった。また Figure 1-3 で示したように DMAG 投与群の血漿では DMA<sup>V</sup>が検出され、また iAs<sup>III</sup>投与群でもわずかではあるが DMA<sup>V</sup>が検出されたことから、既に無機ヒ素投与群で一部ヒ素が代謝されていることが示唆された。

代謝の影響をできる限り排除して、iAs<sup>III</sup>と DMAG におけるヒ素の分布の影響を調べるためには、投与後さらに短い時間で確認することが必要と考えた。分布の差がより顕著であった体重あたりヒ素投与量として0.5 mg/kgの用量を用いて、投与直後である投与5分後にマウスを解剖した。また、血漿のヒ素の化学形態別分析の結果から臓器分布の差異に関する情報を得られる可能性を考え、肺と肝臓における化学形態の分析も行った。Table 1-5、Table 1-6で示したように、各ヒ素化合物をヒ素として0.5 mg/kgの用量を投与した5分後のマウスにおいて、投与1時間後と比べて同様に DMAG 投与群では肺と脳、また iAs<sup>III</sup>投与群では肝臓において相対的に濃度が有意に多く分布していたが、その傾向はさらに顕著に見られた。また全血・血漿において投与1時間では有意な差は見られなかったが、投与5分後においては DMAG 投与群が相対的に多く分布していることがわかった。

Figure 1-4の血漿中において、iAs<sup>III</sup>投与群（c）では投与1時間後と違い、DMA<sup>V</sup>と同じ保持時間のピークが検出されず、未同定のピークもほとんど検出することが出来なかったが、投与したヒ素化合物である iAs<sup>III</sup>と同じ保持時間のピークが検出された。

また DMAG 投与群（d）では投与5分後においても投与1時間と同様に保持時間約10分のところに未同定のピークとともに DMA<sup>V</sup>のピークも検出された。投与した化合物である DMAG もわずかながら検出された。

臓器のホモジネート上清の分析において、Figure 1-5で示したように、肺（右側）では $iAs^{III}$ 投与群（c）で、わずかに $DMA^V$ と $iAs^V$ のピークが検出された。DMAG投与群（d）においては $DMA^V$ のみが検出された。肝臓（左側）では $iAs^{III}$ 投与群では、 $iAs^{III}$ のピークが主なピークとして存在していた。DMAG投与群では $DMA^V$ と同じ保持時間のピークが検出された。また両投与群共に未同定のヒ素のピークが検出された。特に $iAs^{III}$ 投与群では複数の未同定のピークが検出された。このピークはいずれも保持時間約15分までに検出されていることから、タンパクなどの高分子化合物と結合しているヒ素が検出されたことが示唆される。

不溶性画分の分析では、試料を過酸化水素で反応させているため全てのヒ素化合物が5価に酸化されて検出されてくる。そのため今回検出されたピークの多くはタンパク質に結合していた3価の化合物であると推定される。Figure 1-6に示したように

DMAG投与群（d）では肺・肝臓ともに $DMA^V$ が主に検出された。 $iAs^{III}$ 投与群においても（c）肺・肝臓ともに $iAs^V$ と $MMA^V$ が検出された。以上ことより、沈殿物にはDMAG投与群に $DMA^{III}$ が、 $iAs^{III}$ 投与群に $iAs^{III}$ や $MMA^{III}$ が存在していたことが示唆された。

**Table 1 - 5** Concentrations of arsenic in the organs and blood at 5 min after intravenous injection of *S*-dimethylarsino-glutathione (DMAG) or inorganic sodium arsenite (iAs<sup>III</sup>) at a dose of 0.5 mg As/kg body weight.

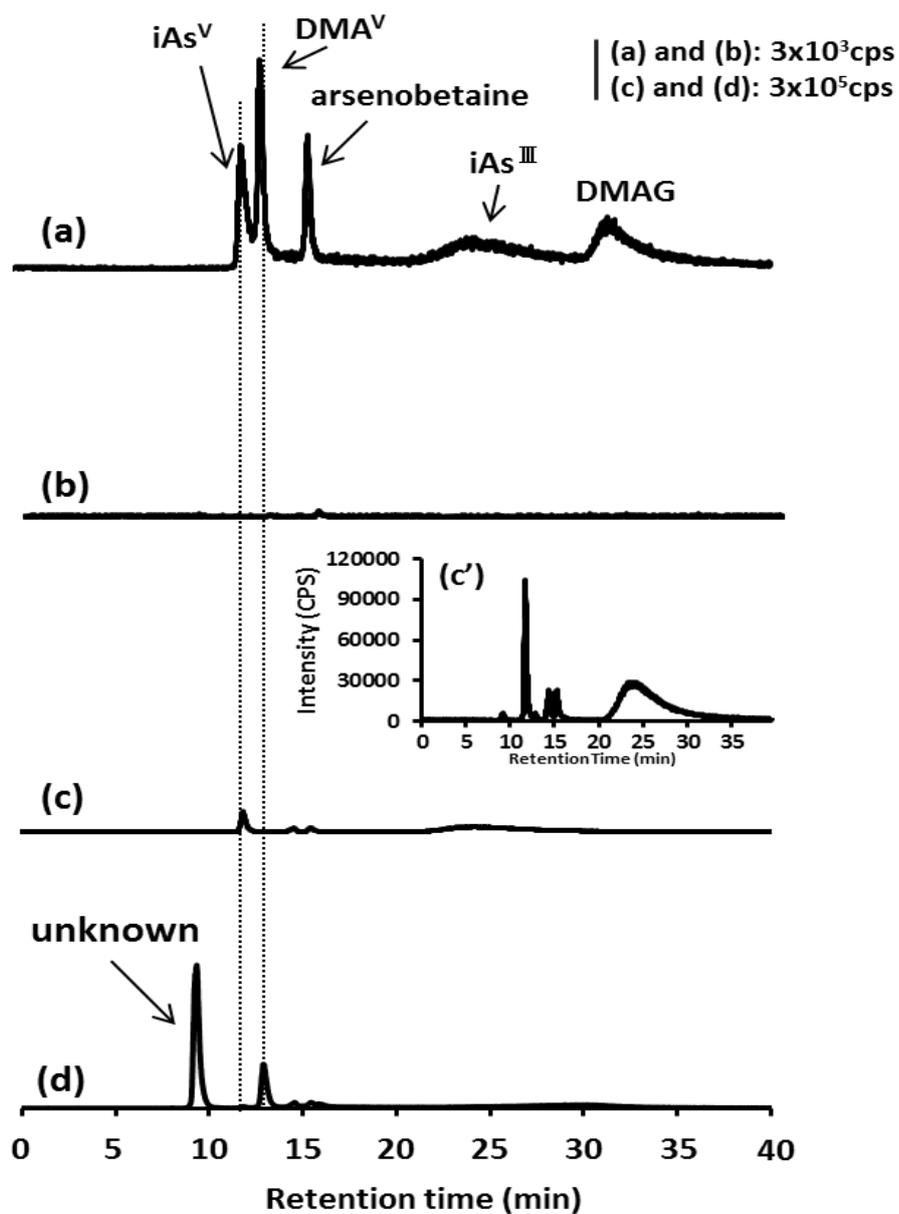
	Concentration of arsenic (ng/g)						
	cerebrum	cerebellum	lung	liver	whole blood	Plasma	kidney
control	0.5 ±0.3	1.2 ±0.9	12.8 ±26.4	2.6 ±5.8	14.9 ±30.8	1.9 ±4.3	N.D.
0.5mg As/kg DMAG	67.6* ±4.9	75.1* ±9.7	2035* ±472	1457* ±105	216.0* ±37.3	268.7* ±138	1342 ±165
0.5mg As/kg iAs <sup>III</sup>	10.1 ±2.0	6.6 ±1.7	634.5 ±56.8	2974 ±521	124.9 ±14.1	66.5 ±13.9	1730 ±431

Data are presented as mean ± SD. \*, Significantly different from the iAs<sup>III</sup> -treated group (p<0.05). N.D., not detectable.

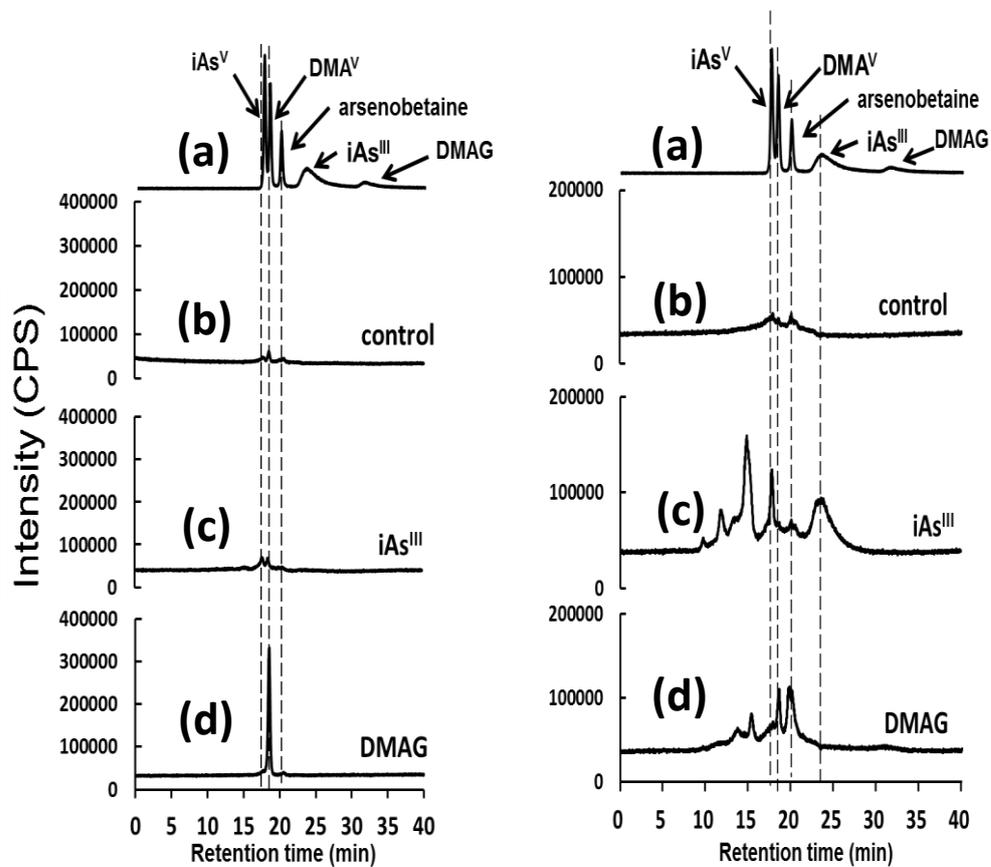
**Table 1 - 6** Recovery of arsenic in the organs and blood at 5 min after intravenous injection of *S*-dimethylarsino-glutathione (DMAG) or inorganic sodium arsenite (iAs<sup>III</sup>).

Recovery of arsenic (% of dose)								
	cerebrum	cerebellum	lung	liver	whole blood	plasma	kidney	total
0.5 mg As/kg DMAG	0.23* ±0.015	0.06* ±0.03	3.6* ±1.8	19.6* ±9.4	3.6* ±0.4	2.3* ±1.0	4.4 ±2.0	33.6 ±6.72
0.5 mg As/kg iAs <sup>III</sup>	0.03 ±0.009	0.004 ±0.026	0.9 ±1.2	36.6 ±11.0	1.8 ±0.2	0.5 ±0.1	5.0 ±1.6	44.8 ±13.4

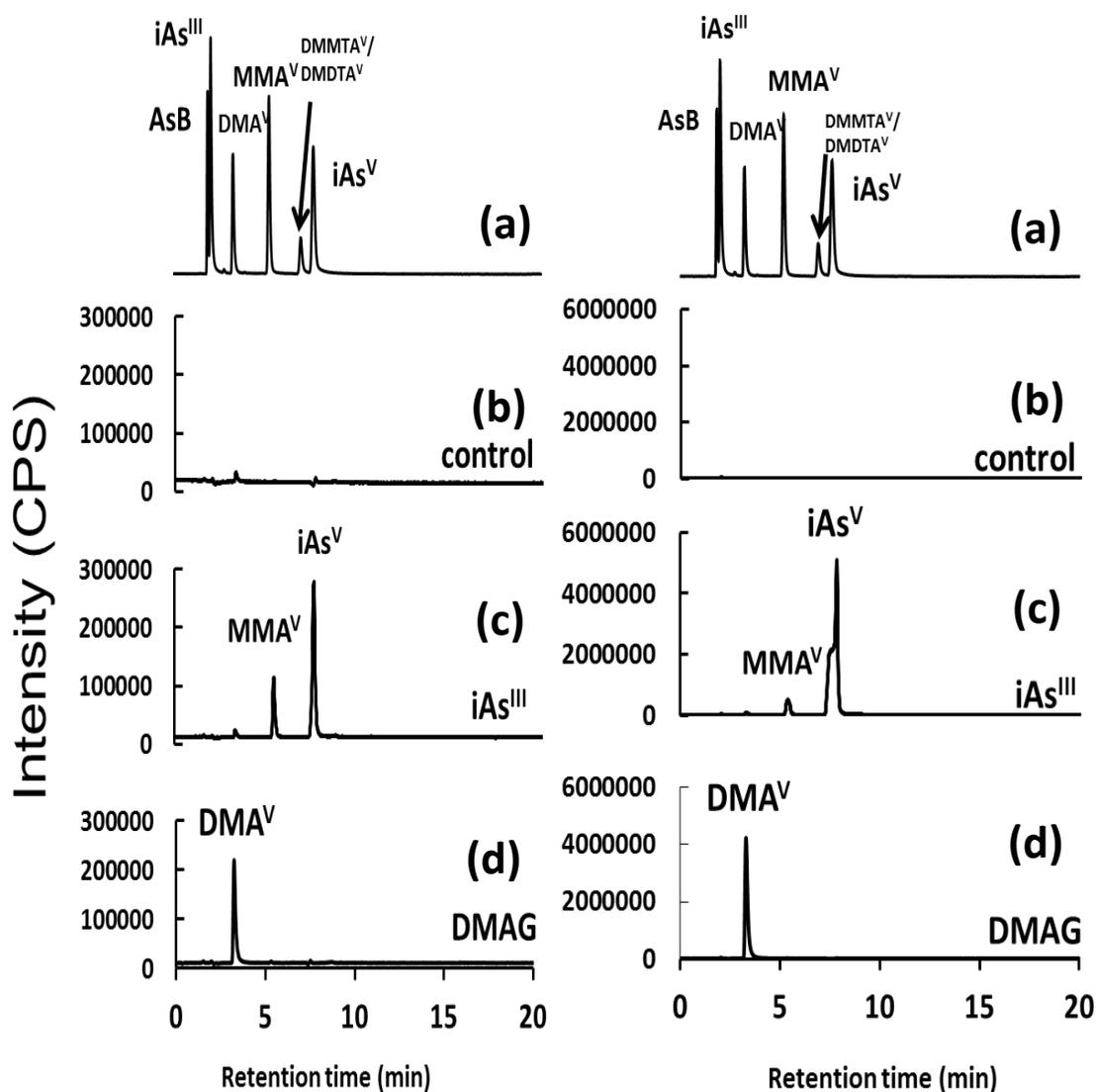
Data are presented as mean ± SD. \*, Significantly different from the iAs<sup>III</sup> -treated group (p<0.05).



**Figure 1-4.** HPLC-ICP-MS elution profiles of arsenic in plasma. The blood was obtained 5 minutes after intravenous injection of  $DMAG$  or  $iAs^{III}$  in mice. column, GS-220HQ; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, 50 mM Tris- $HNO_3$  (pH 7.4); temperature, 25 °C; injection volume, 20  $\mu$ L; ICP-MS, Agilent 7500 cx was used 5 minutes control, Agilent 8800 was used for 5 minutes  $iAs^{III}$  and  $DMAG$ . The vertical bar indicates the intensity of ICP-MS as counts per second (cps). (a) Arsenic standard solution (b) Control, (c)  $iAs^{III}$ , (c') Inset; 10-fold magnification of (c), (d)  $DMAG$



**Figure 1 - 5** HPLC-ICP-MS elution profiles of arsenic in soluble fraction of lung (left) and liver (right). The organs were obtained 5 minutes after intravenous injection of DMAG or  $iAs^{III}$  in mice. column, GS-520HQ; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, 50 mM Tris- $HNO_3$  (pH 7.4); temperature, 25 °C; injection volume, 20  $\mu$ L; ICP-MS, Agilent 8800. (a) arsenic standard solution, (b) control, (c)  $iAs^{III}$ , (d) DMAG.



**Figure 1 - 6** HPLC-ICP-MS elution profiles of arsenic in sediment of lung (left) and liver (right). The organs was obtained 5 minutes after intravenous injection of DMAG or  $iAs^{III}$  in mice. column, ODS-3; flow rate, 0.8 mL/min; eluent, 3 mM malonic acid + 5 mM tetrabutyl ammonium hydroxide + 5 % Methanol ; temperature, 25 °C; injection volume, 20  $\mu$ L; ICP-MS, Agilent 8800. (a) Arsenic standard solution (b)

## 【考察】

これまでの結果をまとめると、Table 1-3 で示したように、DMAG、 $iAs^{III}$ とも単回尾静注投与した場合、24時間以内で速やかに尿、糞中にほとんど排泄されていることがわかった。そのため単回投与においてほとんどヒ素は蓄積せず、速やかに排泄されていることが考えられる。また今回の投与条件ではDMAGは $iAs^{III}$ より尿中へ排泄される傾向がみられた。

$iAs^{III}$ の細胞内への排泄に関しては水の取り込み機構であるaquaglyceroporin (AQP) の9 (Carbrey et al. 2009) や、薬物を細胞外に排泄する Multi-drug resistant proteins (MRPs)、特にMRP 1 (Lorico et al. 1997) や MRP 1a/1b (Liu et al. 2002) が関与していると考えられている。しかしDMAGはMRP-1の発現減少が起こっても排泄阻害を受けないことが報告されている(Diaz et al. 2008)が、知見が十分でないために今後の課題の一つである。

Table 1-3 ~ 1-6 で示したように、ヒ素の分布としては投与5分後、1時間後で肺・脳に、 $iAs^{III}$ に比べ相対的に多く分布していた。脳においては、DMAGはジメチル化ヒ素であるため脂溶性が $iAs^{III}$ と比べると高くなる。またGSHから酵素によってグルタミン酸とグリシンが外れるとシステインを有している構造になる。そのためシステインが結合したメチル水銀がメチオニンと似た構造になるため取り込みやすくなるのと同様に、血液脳関門を通過しやすいと考えることも可能である(Liu et al. 2008)。ヒ素化合物においても、ジフェニルアルシン酸は脳に緩徐に移行し(Naranmandura et al. 2009)、ジフェニルアルシン酸を含んだ水を長期間飲み続けると中枢神経障害が現れるという報告がされている(Umezu et al. 2012)。肺においては前述したようにDMAGは*in vitro*ではガス体のような挙動を示していた(Hirano and Kobayashi 2006)。そのため体内でも肺から一部がガス体として呼気中に出ている可能性も考えられる。

Figure 1-5 の右側(c)、(d)で示したように、肝臓においては両群共に保持時間が比較的短いところに未同定のピークが検出されたが、DMAG投与群では1つのみ検

出された。iAs<sup>III</sup>投与群では複数のピークが検出されたことから、iAs<sup>III</sup>を投与した場合にはヒ素が肝臓中に存在する複数の高分子成分に結合しており、このことがiAs<sup>III</sup>投与群が DMAG 投与群にくらべてヒ素の濃度が有意に高くなった理由の一つと考えられる。

実際、全身に転移した癌患者を対象とした DMAG の第 I 相試験において、縮小した例はなかったが、被験者40人のうち7人が癌の浸潤が停止した。原発部位は大腸や腎臓であったが、浸潤が停止した7人のうち6人において肺への転移が確認されていたとの報告もある (Tsimberidou et al. 2009) 。 本研究において、DMAG 投与群ではヒ素が肺に多く分布していたが、このことが固形癌における治験結果と関連している可能性がある。また、肝細胞癌における DMAG の第 II 相試験では効果が現れなかったと報告されている (Wu et al. 2010) 。

しかしながら分布が多いからといって薬効を示すものとは限らない。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> はAPL以外のがんには生体内において有効ではないことが分かっている。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> は他のがんに対しても *in vitro* では効果があることが知られていた。しかし生体内へ投与するとAPL以外のがん、固形癌などに対する抗がん作用は現れず、毒性しか現れなかったとの報告がある (Rehman and Naranmandura 2013) 。 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> は毒性が強いため PML に対して低濃度で効果を発揮するためAPLの治療薬としては使用可能だが、その他のがんに対しては、薬効よりも毒性が先に現れてしまうため、薬としての使用が難しいと考えられる。

Figure 1 - 5、1 - 6で示したように、投与直後の肺、肝臓中のヒ素の化学形態においては、DMAG 投与群ではホモジネート上清ではDMA<sup>V</sup>として存在していることが確認された。DMAG は酸化や代謝を受け、速やかにDMA<sup>V</sup>になることが示唆される。

iAs<sup>III</sup>は臓器に一度取り込まれてから代謝を受けると推測されるため、投与直後では代謝が十分に進んでおらず、かつ生体内で比較的安定して存在するためにiAs<sup>III</sup>が検出さ

れたものと考えられる。しかし Figure 1-6 (c) で見られるように投与 5 分後ですでに MMA が存在していたことから一部は代謝を受けていたこともあわせて確認できる。Figure 1-3、1-4 に示したように、血漿では DMAG 投与群 (d) において投与 5 分後においても、1 時間後においても保持時間約 10 分のところに未同定のヒ素のピークが検出された。このヒ素のピークは分子量 3,000 以上の高分子の成分とヒ素が結合していたことを示している。投与 5 分後において有意に DMAG の血液中の総ヒ素の分布が iAs<sup>III</sup> 投与群より多くなっていた (Table 1-5、1-6) ことから、血液におけるヒ素の滞留に保持時間約 10 分のピークが関係している可能性が考えられる。

## 2. マウス血漿中におけるヒ素結合成分の同定

### 【序論】

DMAG と  $iAs^{III}$  を投与したマウスにおいて、特に投与直後における血漿中の化学形態に差異が現れていることがこれまでの実験 (Figure 1 - 3, 1 - 4) でわかった。すでに薬物として使用されている  $As_2O_3$  では場合によって副作用である QT 延長が早くに現れてしまうことがあるため、継続しての使用が不可能になることも多い。また心臓の悪い患者には使用できないといった制約もある治療薬である。しかし、DMAG は  $iAs^{III}$  の 50 倍もの用量の  $LD_{50}$  を有しており、また心毒性や QT 延長という  $As_2O_3$  で問題となっている副作用は報告されなかった (Berenson et al. 2006)。そのため固形癌に対しても臨床試験も行われた (Tsimberidou et al. 2009)。

これまでの結果で分かった血漿中のヒ素と結合している未同定の成分において、ヒ素の滞留や毒性・薬効に関わっている可能性がある。そのため、血漿中においてヒ素が結合している成分を同定することが代謝、薬効双方の観点において重要であると考えた。そこで、血漿に直接添加した際の各ヒ素化合物の化学形態を確認するとともに、ヒ素の結合成分の同定を目指した。

## 【実験方法】

### 試薬

iAs<sup>III</sup>（亜ヒ酸ナトリウム）、DMA<sup>V</sup>（カコジル酸として）はSigma-Aldrich社から購入した。グルタチオン（還元型）、硝酸（HNO<sub>3</sub>）、過酸化水素（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）、イソフルラン（isoflurane）は和光から購入した。ソムノペンチルSomnopentyl<sup>®</sup>（pentobarbital sodium）は共立製薬で購入した。0.44 μm-pore membrane filter はミリポアから購入した。BCA Proteins Assay Kit は Thermo 社のものを、BioMag<sup>®</sup> ProMax Albumin Removal Kit は polyscience 社のものを用意した。DMAG は前述の通りに合成し、使用した。

### 動物

日本クレアから購入した7週齢のC57BL/6Jマウスを使用した。動物の飼育環境などは、前述の通りである。国立環境研究所実験動物委員会の承認を経て、国立環境研究所動物実験施設利用マニュアルに基づき委託業者に依頼し飼育を行った。C57BL/6J雄性マウスにペントバルビタール麻酔下において採血を行い、ただちに1600 x g 10分間の遠心を行い血漿を採取した。

### ヒ素の化学形態分析

分離においてサイズ排除クロマトグラフィーモード主体のGS-220 HQ（shodex）カラムまたはGS-520 HQ（shodex）を用い、溶離液として50 mM Tris-HNO<sub>3</sub>（pH 7.4）を使用、20 μLを注入量とし、主に流速0.5 mL/minまたは1.0 mL/min、カラムオープン温度25 °Cで溶出した。HPLCはSHIMAZHUの送液ユニットLC-20AB、検出器SPD-M20A、オープンCTO-20ACを使用した。ICP-MSはAgilent 7500 cxまたはAgilent 8800を使用した。

2-1-1 の DMAG または $iAs^{III}$ の血漿直接反応時におけるヒ素の化学形態に関する研究では、何も処置を施していない C57 BL/6 J 雄性マウスから血液を採取し血漿を回収した。その後 DMAG または $iAs^{III}$ をヒ素として最終濃度 50ppb になるように血漿に添加し、37 °C で 1 時間加温した。カラム溶離液を使用して 2 倍希釈を行い、0.44  $\mu m$  フィルターでろ過した後 HPLC-ICP-MS で化学形態を確認した。分離においてサイズ排除クロマトグラフィーモード主体のGS-220 HQ (shodex) (排除限界 ; 分子量 3,000 ) カラムを用い、溶離液として 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH7.4) を使用、20  $\mu L$  を注入量とし、流速 0.5 mL/min、カラムオープン温度 25 °C で溶出した。ICP-MS は Agilent 7500 cx で測定した。

2-1-2 DMAG と血漿の直接反応時におけるヒ素のタンパクへの結合に関する研究では、未処理の血漿に DMAG または $iAs^{III}$ をヒ素として最終濃度 50ppb になるように添加し、37 °C で 1 時間加温した。カラム溶離液を使用して 2 倍希釈を行った。0.44  $\mu m$  フィルターでろ過した後 HPLC-ICP-MS でヒ素および硫黄の化学形態を確認した。分離においてサイズ排除クロマトグラフィーモード主体のGS-520 HQ (shodex) (排除限界 ; 分子量 300,000 ) カラムを用い、溶離液として 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4) を使用、20  $\mu L$  を注入量とし、流速 1.0 mL/min、カラムオープン温度 25 °C で溶出した。ICP-MS は Agilent 7500 cx を使用した。

2-2の DMAG の血漿分画ごとの反応性に関する研究では、まず、GS-520 HQ で見られる UV での分画を 3 か所 (fraction #1; 8~14 min fraction #2; 14~15 min fraction #3; 15~17 min ) に分け、UV を確認しながら窒素気流下で分画ごとに採取した。分画ごとのタンパク量を BCA 法で定量した。タンパク量を 0.01 g に統一し、溶液内に最終濃度がヒ素として 50 ppb となるように DMAG を添加し、1 時間、37 °C で加温し反応させた。0.44  $\mu m$  フィルターでろ過した後 HPLC-ICP-MS でヒ素の化学形態を確認した。分離においてサイズ排除クロマトグラフィーモード主体のGS-520 HQ (shodex)

カラムを用い、溶離液として 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4) を使用、20 μL を注入量とし、流速0.5 mL/min、カラムオープン温度 25 °Cで溶出した。ICP-MS は Agilent 8800 を使用した。

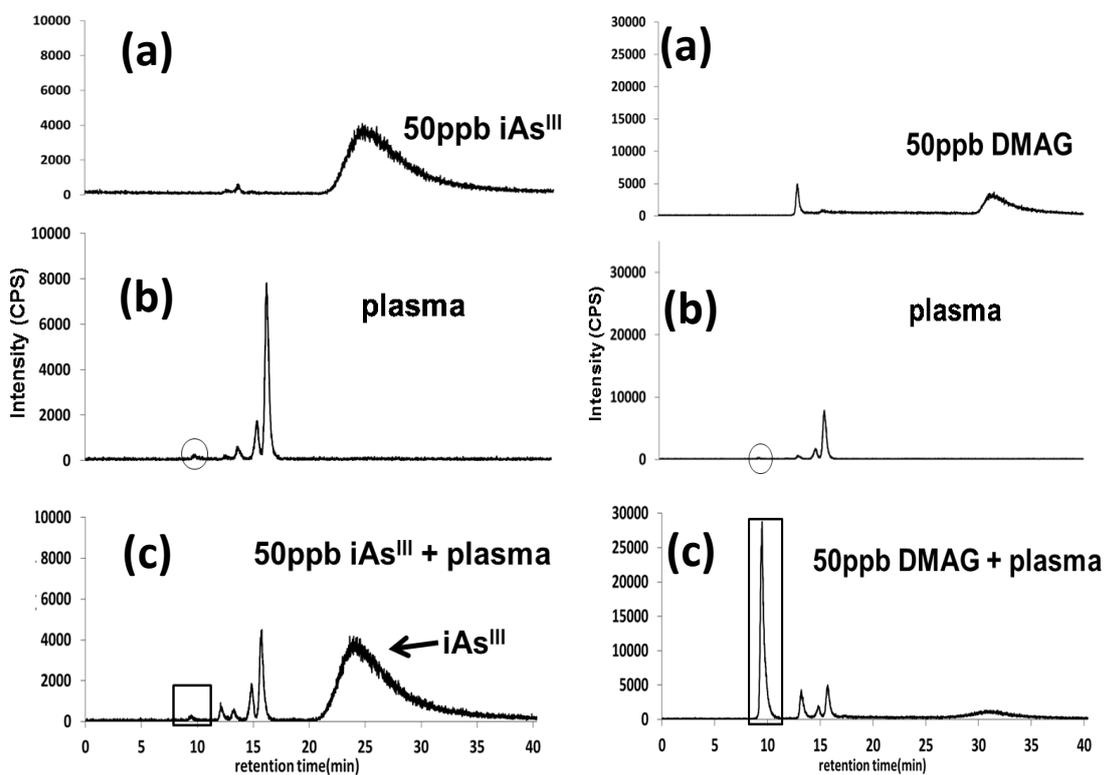
2-3のアルブミンを除去した血漿におけるヒ素の化学形態分析に関する研究では、最初に、未処理の血漿に BioMag<sup>®</sup> ProMax Albumin Removal Kit を使用し、アルブミンを除去した。操作方法を簡単に説明すると、アルブミン除去液を加え反応させた後マグネットビーズを添加して攪拌しながら10分室温で放置し、アルブミン以外を吸着させた後、ビーズを洗浄した。そのビーズに溶離液を加えて10分反応させた後、上清を採取した。その溶液をアルブミン除去血漿溶液とした。また、きちんとアルブミンの除去がされているかの確認はHPLC-ICPMSでの硫黄のピークの確認と SDS-PAGEで行った。アルブミンを除去した血漿溶液に DMAG がヒ素として 50ppb となるように添加し37°C、1時間加温し反応させた。0.44 μm フィルターでろ過した後 HPLC-ICP-MS でヒ素の化学形態を確認した。分離においてサイズ排除クロマトグラフィーモード主体のGS-520 HQ (shodex) カラムを用い、溶離液として 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4) を使用、20 μL を注入量とし、流速0.5 mL/min、カラムオープン温度 25 °Cで溶出した。ICP-MS は Agilent 8800 を使用した。

## 【結果】

### 2-1-1 DMAG または $iAs^{III}$ の血漿直接反応時におけるヒ素の化学形態

血漿のヒ素の化学形態分析を行ったところ、DMAG と $iAs^{III}$ 投与群両群において約10分におけるヒ素のピークが見られた。しかし、保持時間約10分のピークに結合しているヒ素が、DMAG 由来、 $iAs^{III}$ 由来のどのような化学形態であるのか直接確認することが出来なかった。そのため代謝の影響を極力排除した血漿中での反応を確認するため、*in vitro*で血漿に直接的に添加した際の化学形態を確認した。

各ヒ素化合物をヒ素として50 ppb 血漿に直接添加し37°C 1時間で加温した場合において、Figure 2-1 から、図の右側、(c)DMAG を直接添加した血漿では保持時間約10分における未同定のピークが検出された。そのためDMAG を投与した場合、臓器による代謝を受けなくてもヒ素が血漿中の成分に結合し、保持時間約10分のピークが検出されることが示唆された。一方、図の左側、(c)  $iAs^{III}$ を直接添加した血漿では $iAs^{III}$ のピークが(a)の $iAs^{III}$ のみのピークと比べて $iAs^{III}$ のピークの大きさがほとんど変わらない状態で存在しており、約10分の保持時間に出現する未同定のピークは(b)の $iAs^{III}$ を添加していない血漿のピークとほぼ同等の大きさであった。そのため、*in vivo*において、投与1時間後に検出された未同定のピークは $iAs^{III}$ がそのまま結合しているのではなく、 $iAs^{III}$ が臓器中で代謝され、代謝物が該当の高分子成分と結合し血漿中で検出されたものと考えることができる。



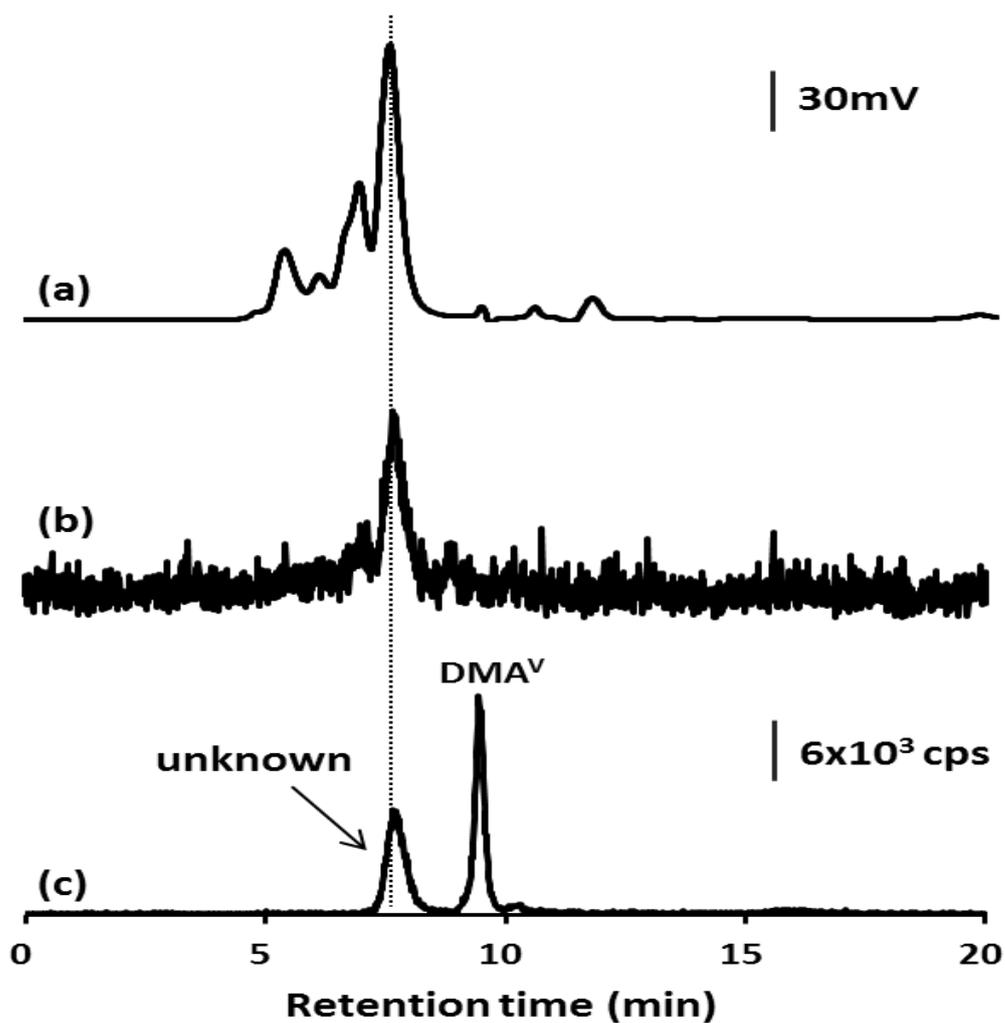
**Figure 2 - 1** HPLC-ICP-MS elution profiles of arsenic in plasma.

An aliquot of blood plasma obtained from untreated mice was mixed with iAs<sup>III</sup> (left) or DMAG (right) *in vitro* at a final concentration of 50 ppb As and incubated for 1 hr at 37°C. column, GS-220HQ; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4); temperature, 25 °C; injection volume, 20 µL; ICP-MS, Agilent

7500 cx. (a) 50 ppb arsenic solution, (b) non-treated plasma, (c) arsenic added plasma.

## 2-1-2 DMAG と血漿の直接反応時におけるヒ素のタンパクへの結合

*In vivo*、*in vitro* 双方における血漿中の化学形態を確認したところ DMAG 投与群において 約10分の void にヒ素のピークが大きく確認された。GS-220HQ は排除限界の分子量が 3,000 であるため、そのピークの化合物が分子量 3,000 以上であることしか確認できない。そのため同じ系統のカラムで排除限界が分子量 300,000 のカラムを使用し、あらためてヒ素のピークの確認し同定することを目指した。また、化合物の同定のために、ICP-MS による硫黄のピークと UV280 nm の吸収波長を同時に観察した。前実験と同様の条件で、カラムを排除限界が分子量 300,000 のものに変えて測定しても、Figure 2-2で示すようにヒ素のクロマトグラム (c) に出てくる未同定のヒ素のピークは1つのみであった。排除限界が変わってもピークが1つということは分子量 3,000 以上にある多くの高分子成分などに非特異的に結合しているのではなく、未同定のピーク中の成分に対して、ヒ素が特異的に結合している可能性が考えられた。また未同定のヒ素のピーク (c) は硫黄のピーク (b) と 280 nm の UV 吸収波長 (a) に検出されたピークと同じ保持時間に検出されるピークであった。また、牛の血清アルブミン (BSA) を上記と同じカラムで硫黄と UV280 nm の吸収波長のピークを計測すると、今回の未同定のピークとほぼ同じ保持時間であった。



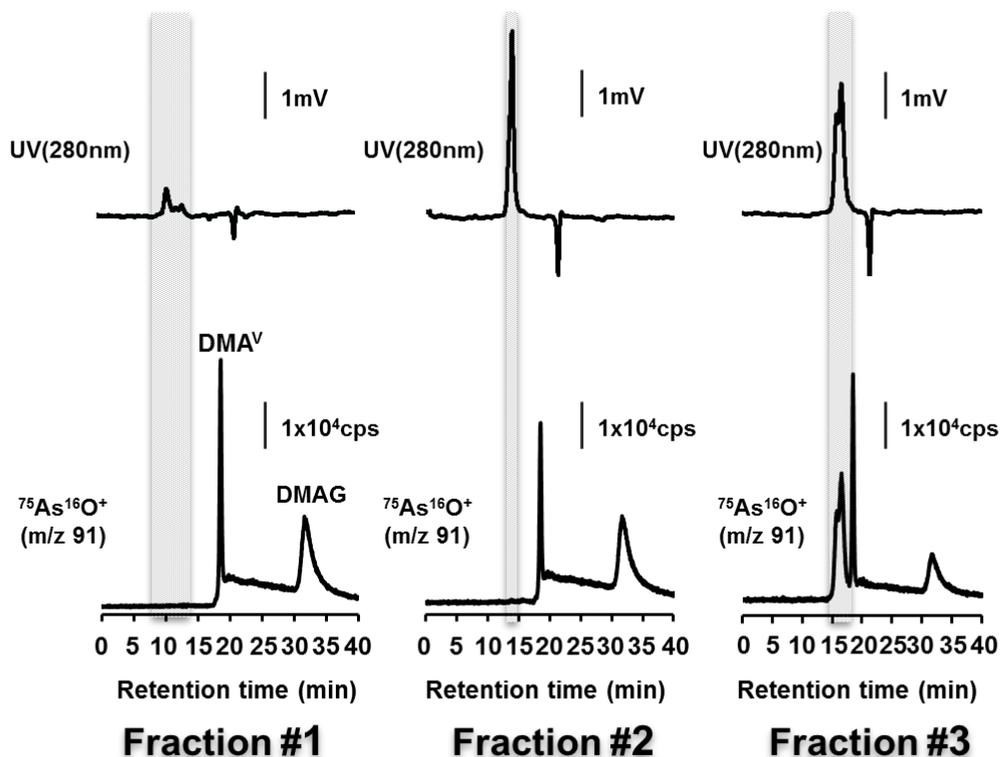
**Figure 2 -2.** HPLC-ICP-MS elution profiles of arsenic and sulfur aligned with the UV absorbance (280 nm) in plasma.

An aliquot of blood plasma obtained from untreated mice was mixed with DMAG *in vitro* at a final concentration of 50 ppb As and incubated for 1 hr at 37°C. column, GS-520HQ; flow rate, 1.0 mL/min; eluent, 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4); temperature, 25 °C; injection volume, 20 µL; ICP-MS, Agilent 7500 cx. (a) UV absorbance at 280 nm, (b) <sup>32</sup>S<sup>+</sup> (m/z 34), (c) <sup>75</sup>As<sup>+</sup> (m/z 75).

## 2-2 DMAG の血漿分画ごとの反応性

GS-520 HQ カラムにおいても未同定のピークは1つだけ検出された。流速を変更して行ってもピークの分離は認められなかった。また、UV 280 nm の吸収波長において、当該のピークの前後に複数のピークが検出されていた。未同定のピークに特異性が存在するのかが確認するため、流出液を時間ごとに3分画に分けて取り出し、タンパクの量を調整後、DMAG を添加してどの分画にヒ素が結合しているのか確認した。

Figure 2-3 から、採取した分画にそれぞれヒ素として50 ppb の DMAG を37°C、1時間加温させると、どの画分においても（Fraction #1~#3）ヒ素のピーク（下段）においてはDMA<sup>V</sup>と DMAG と同じ保持時間のピークが検出された。しかしヒ素とUV 280 nm の吸収波長（上段）と一致するピークが検出されたのは、分画の3番（Fraction #3）においてのみだった。分画1番、2番ではそれぞれ分取した時と同じ時間のUV 280 nm の吸収波長と一致するヒ素のピークは検出されなかった。今回の結果から分画の3番目に特異的にヒ素が結合する成分が含まれていることが示唆された。



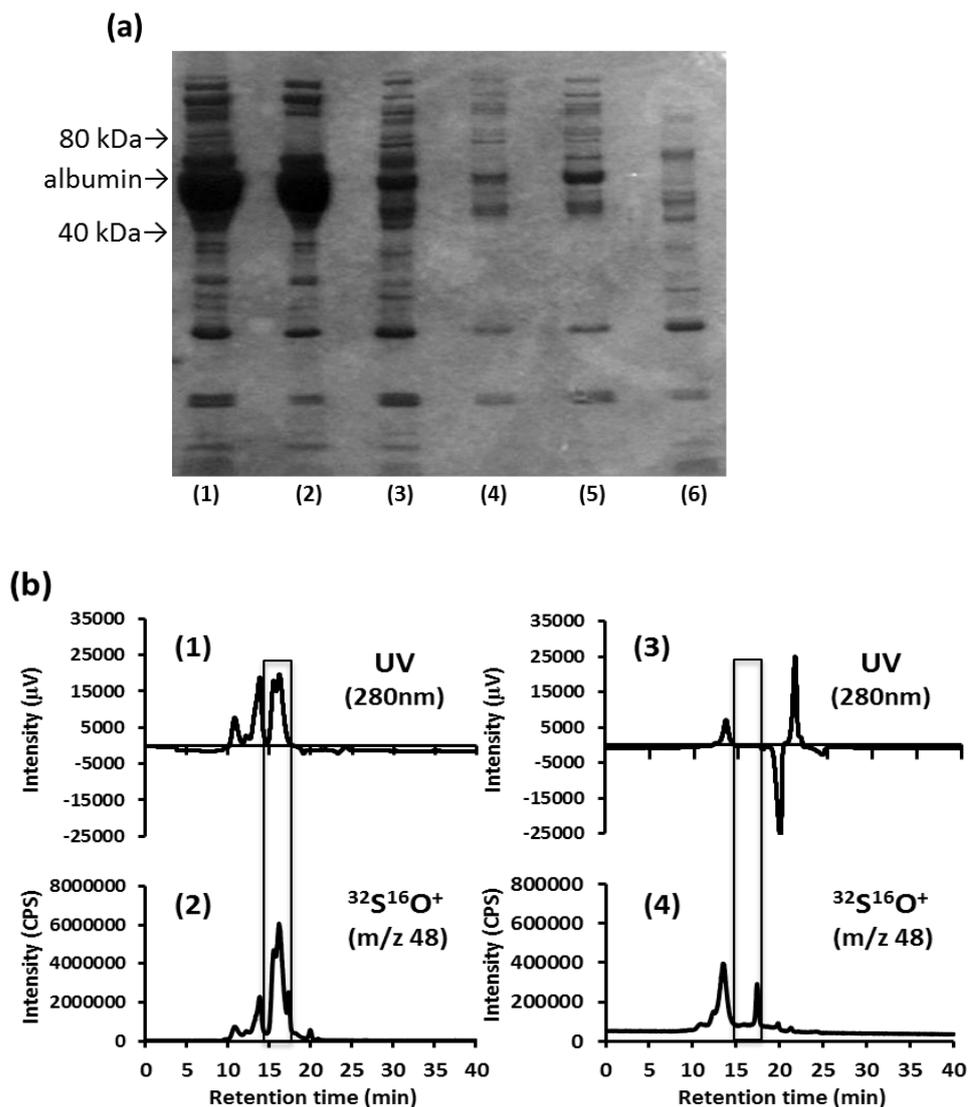
**Figure 2-3.** HPLC-ICP-MS elution profiles of arsenic aligned with each UV absorbance (280 nm) in the fractionated plasma for the detection of DMAG-binding plasma components.

The fractionated plasma samples (Fraction 1~3) were mixed with DMAG *in vitro* with DMAG and incubated for 1 hr at 37°C. column, GS-520HQ; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4); temperature, 25 °C; injection volume, 20 µL; ICP-MS, Agilent 8800. (a) UV at 280 nm for Fraction 1, (b)  $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$  for Fraction 1, (c) UV at 280 nm for Fraction 2, (d)  $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$  for Fraction 2, (e) UV at 280 nm for Fraction 3, (f)  $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$  for Fraction 3.

### 2-3 アルブミンを除去した血漿におけるヒ素の化学形態分析

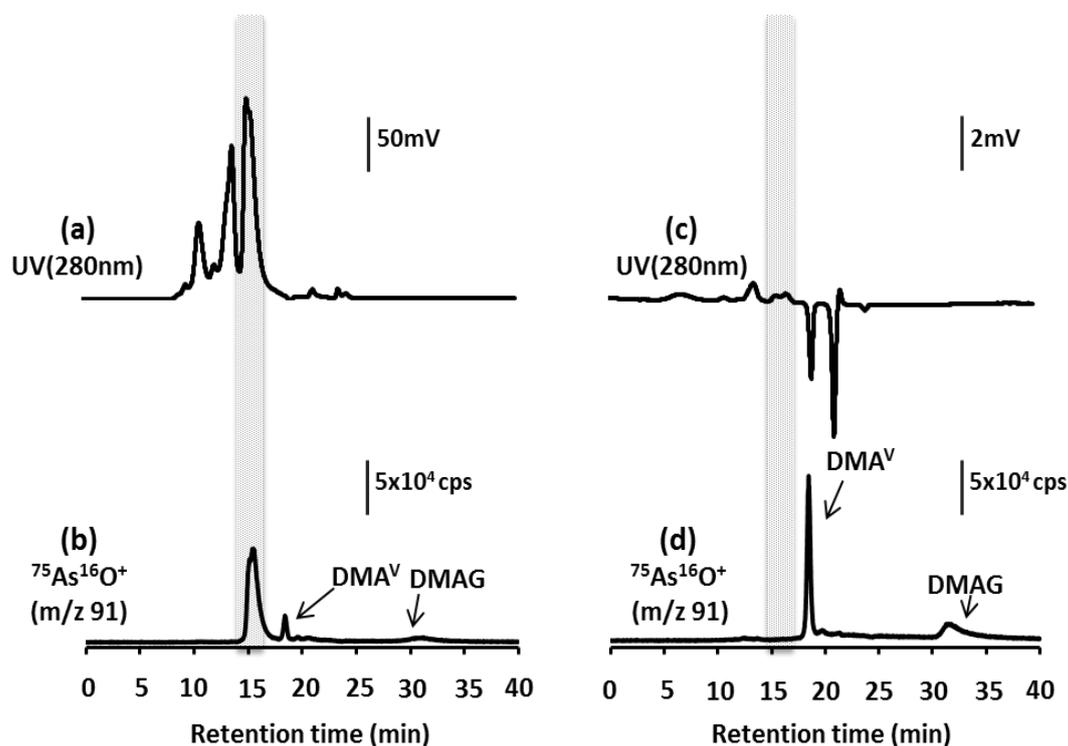
未同定のピークの分子量を調べたところ、同じGS-520 HQカラムを用いて同条件で分析したところ、BSAとほぼ同じ保持時間に溶出されていたことから、DMAGと反応した成分は、分子量約60,000~70,000であることが推測された。そこで分子量の近いアルブミンに注目し、アルブミンを除去したマウス血漿で、未同定のピークが消失するのかを調べた。

Figure 2-4 で、今回使用したアルブミン除去キットで概ねアルブミンが除去されていることがSDS-PAGE (a)における(1)と(4)とHPLC-ICP-MS (b)で確認された。Figure 2-5 から、未処置の血漿ではUV吸収でも確認された保持時間15~17分に現れる未同定のピークが(a)、(b)、アルブミンを除去した血漿溶液においては検出されなかった(c)、(d)。そのため血漿中でDMAGが結合しているのはアルブミンであることが強く示唆された。



**Figure 2 - 4.** Confirmation of albumin removal by SDS-PAGE (a) and HPLC-ICP-MS (b).

(a) The gel (4-12%) was stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) after electrophoresis. (1) Ten-fold diluted untreated control plasma, (2) Supernatant after reaction with separation beads, (3) Proteins remained on the separation beads after washing; The beads were directly boiled with SDS sample buffer for 5 min. (4) Supernatant in the elution buffer (50  $\mu\text{L}$ ), (5) Supernatant in the elution buffer (100  $\mu\text{L}$ ), (6) Proteins remained after elution; The beads were directly boiled with SDS sample buffer for 5 min. (b) HPLC-ICP-MS elution profiles of sulfur ( $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ ) aligned with the UV absorbance at 280 nm. The peak (15-17min) disappeared in the albumin-depleted plasma. column, GS-520HQ; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, 50 mM Tris- $\text{HNO}_3$  (pH 7.4); temperature, 25  $^\circ\text{C}$ ; injection volume, 20  $\mu\text{L}$ . (1) UV at 280 nm of the untreated plasma, (2)  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  of the untreated plasma (3) UV at 280 nm of the albumin-depleted plasma, (4)  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  of the albumin-depleted plasma.



**Figure 2 - 5.** Changes in the elution profile of arsenic and UV absorbance (280 nm) after depletion of albumin.

The untreated plasma and the albumin-depleted plasma were mixed with DMAG and incubated for 1 hr at 37°C. The untreated plasma was diluted 10 times with the eluent buffer before injection. column, GS-520HQ; flow rate, 0.5 mL/min; eluent, 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4); temperature, 25 °C; injection volume, 20 µL;

ICP-MS, Agilent 8800. (a) UV at 280 nm of the untreated plasma, (b)  $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$  of the untreated plasma (c) UV at 280 nm of the albumin-depleted plasma, (d)  $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$  of the albumin-depleted plasma.

## 【考察】

Figure 2 - 5 より、DMAG は投与直後において、直ちにアルブミンに結合するということが明らかになった。3 価のヒ素化合物は 5 価のヒ素化合物より、タンパクに結合しやすいことが知られている (Mizumura et al. 2010) 。このことは毒性にも関与していると考えられ、特にDMA<sup>V</sup>はほとんどタンパクと反応することがないため毒性が低いと考えられている。DMAG は 3 価のジメチル化体のヒ素にGSHが結合している化合物であるため、5 価よりタンパク質に結合しやすいと考えられる。

iAs<sup>III</sup>投与 1 時間後において、Figure 1 - 3(c) で血漿中にわずかではあるが同じ保持時間のピークを検出されたのは、Figure 2 - 1 図の左側、(c) iAs<sup>III</sup>の一部がDMA<sup>III</sup>に代謝されたため (Hayakawa et al. 2004) 、そのことに由来するヒ素のピークがわずかに検出された可能性が考えられる。血漿中における iAs<sup>III</sup> 投与群と DMAG 投与群でのヒ素の化学形態の違いは、代謝されるiAs<sup>III</sup>が代謝に伴い、様々な化学形態を経由することによって由来するものと考えられる。また様々な代謝物が生成されることで毒性の高い活性代謝物も生成されることにより、毒性も高くなると考えられる。

DMAG はアルブミンに結合することで、DMAG の毒性を軽減していると考えられる。実際に毒性を軽減させる目的で、アルブミンとiAs<sup>III</sup>を架橋させたものをマウスの膀胱癌モデルに腹腔内大動脈からカニューレで投与すると、毒性が実際に軽減され、腫瘍の縮小作用もあったという報告がある (Li et al. 2015)。また DMAG は酸化されるとDMA<sup>V</sup>になるため、比較的速やかにDMA<sup>V</sup>に代謝され排泄されることで、臓器や正常細胞に比較的毒性が現れにくいことが推測される。

DMAG の毒性の本態は、DMA<sup>III</sup>であることが推測されている。前述したように、細胞実験で外部からGSHやシステインを添加すると毒性が軽減される報告がされている (Matulis et al. 2009) 。DMA<sup>III</sup>が PTCL のがん細胞と何らかの反応、もしくは取り込み機構と拮抗することにより、抗がん剤として機能すると予想される。しかし生体内に

においてどのように作用しているのか、また PTCL にどのようにして効果があるのかの知見は乏しいため、今後薬としてどのように生体と作用していくのかを調べていくことが重要である。また、DMAG を投与したマウスでの尿中のヒ素の化学形態を確認した際、主要なピークとしてDMA<sup>V</sup>が検出されていたことから、投与24時間後には、アルブミンとの結合が外れ、DMA<sup>V</sup>となって排泄されていることが考えられる。

DMAG の細胞への取り込み機構や代謝機構の解明に関する議論はこれからの課題でもあるが、現在において *in vitro* では DMAG のGSHのシステインが2つ結合した構造のシスチンになり、dimethylarsino-cystine (DMAC)としてシスチントランスポーターで認識されて細胞内に取り込まれるという報告がある (Garnier et al. 2014)。実際にシスチントランスポーターを過剰発現している癌細胞では抗がん作用が増強されたという報告もある (Garnier et al. 2014)。また細胞に曝露させた場合の代謝物として

DMMTA<sup>V</sup> にグルタチオンが結合した DMMTA<sup>V</sup>(GS) が代謝物として一部生成されるという報告もある (Yehiayan et al. 2014)。近年、DMMTA<sup>V</sup> は毒性が他の5価のヒ素化合物より強く、DMA<sup>III</sup>と同等の毒性を持っていると認識されてきているが

(Naranmandura et al. 2007)、DMMTA<sup>V</sup>(GS)はDMMTA<sup>V</sup>よりは毒性が低いとされている。代謝物に関してもまだ知見が十分ではないので、より詳細な知見が必要である。

## 【総括】

本研究において、Table 1-3 ~ Table 1-6 から、DMAG は $iAs^{III}$ と比べ肺と脳に分布しやすく、Figure 2-5 から、血漿中で速やかにアルブミンに結合していることが示唆された。また肺、肝臓で一部 $DMA^V$ となっており、し、投与24時間後には概ね排泄されていることが明らかになった。

GSH抱合で代謝される無機ヒ素の代謝経路において、DMAG は $DMA^V$ に代謝される直前の中間体であるため、 $iAs^{III}$ のように複数の代謝のプロセスを通過せずに比較的速やかに $DMA^V$ となり排泄されることが推測された。DMAG はアルブミンに結合することで、DMAG の毒性を軽減させ、*in vivo*において比較的安全に投与できる可能性が考えられる。

$iAs^{III}$ においては、臓器に取り込まれ、様々な代謝のプロセスを経ることで、様々な形態のヒ素化合物が生成され体内に分布していく。本来の毒性に加えて代謝活性体の毒性が顕在化してくるため、総合的に毒性が高くなることが考えられる。

DMAG の副作用として重篤なものは報告されていないが、めまいやふらつきなどの中枢神経症状、呼吸器の障害が報告されている (Hosein et al. 2012; Tsimberidou et al. 2009) 。一方、 $As_2O_3$ ではそのような副作用症状は見られないことから (Rust and Soignet 2001)、今回明らかになった DMAG 、 $iAs^{III}$ の総ヒ素濃度の分布の差異が副作用の予測や作用機序解明に関係していると考えられる。

また、DMAG の毒性が、*in vitro*とは異なり、生体内に投与した場合には $iAs^{III}$ より毒性が低いため、抗癌作用のある濃度まで投与できる可能性が考えられる。今回の体内分布のデータは、これからの臨床試験に応用出来る資料になりうると考える。

【文献】

- Agostinelli, C., Piccaluga, P.P., Went, P., Rossi, M., Gazzola, A., Righi, S., Sista, T., Campidelli, C., Zinzani, P.L. and Falini, B. 2008. Peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified: the stuff of genes, dreams and therapies. *J Clin Pathol* 61, 1160-1167.
- Berenson, J.R., Boccia, R.V.V., Hussein, M.A., Belch, A., Boise, L., Schwartz, B., Gale, R.P. and Kornblau, S.M. 2006. Phase-1 study of ZIO-101: A new organic arsenic active in acute myelogenous leukemia (AML) and multiple myeloma (MM). *Blood* 108, 556a-556a.
- Braman, R.S. and Foreback, C.C. 1973. Methylated Forms of Arsenic in Environment. *Science* 182, 1247-1249.
- Carbrey, J., Song, L., Zhou, Y., Yoshinaga, M., Rojek, A., Wang, Y., Liu, Y., Lujan, H., DiCarlo, S., Nielsen, S., Rosen, B., Agre, P. and Mukhopadhyay, R. 2009. Reduced arsenic clearance and increased toxicity in aquaglyceroporin-9-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15956-15960.
- Challenger, F. 1945. Biological Methylation. *Chem Rev* 36, 315-361.
- Cui, X., Kobayashi, Y., Hayakawa, T. and Hirano, S. 2004. Arsenic speciation in bile and urine following oral and intravenous exposure to inorganic and organic arsenics in rats. *Toxicol Sci* 82, 478-487.
- Cullen, W.R., Cullen, B.C., McBride, J. and Reglinski. 1984. The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications. *J Inorg Biochem* 21, 179-193.

Diaz, Z., Mann, K., Marcoux, S., Kourelis, M., Colombo, M., Komarnitsky, P. and Miller, W. 2008. A novel arsenical has antitumor activity toward As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-resistant and MRP1/ABCC1-overexpressing cell lines. *Leukemia* 22, 1853-1863.

Estey, E., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Faderl, S., Verstovsek, S., Jones, D. and Kantarjian, H. 2006. Use of all-trans retinoic acid plus arsenic trioxide as an alternative to chemotherapy in untreated acute promyelocytic leukemia. *Blood* 107, 3469-3473.

Garnier, N., Redstone, G.G.J., Dahabieh, M.S., Nichol, J.N., del Rincon, S.V., Gu, Y., Bohle, D.S., Sun, Y., Conklin, D.S., Mann, K.K. and Miller, W.H. 2014. The Novel Arsenical Darinaparsin Is Transported by Cystine Importing Systems. *Mol Pharmacol* 85, 576-585.

Golemovic, M., Kantarjian, H., Orsolic, N., Zingaro, R., Gao, Z., Cheng, Z., Johansen, M., Duzkale, H., Tinkey, P., Lembo, T., Van Pelt, C., Trissel, AL., Giles, F., Cortes, J., Freireich, EJ. and Verstovsek, S. 2003. Development of an organic arsenic derivative as a therapy for leukemia [abstract]. *Blood*, 45th ASH Meeting.

Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X. and Hirano, S. 2004. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* 79, 183-191.

Hirano, S. and Kobayashi, Y. 2006. Cytotoxic effects of S-(dimethylarsino)-glutathione: A putative intermediate metabolite of inorganic arsenicals. *Toxicology* 227, 45-52.

Hosein, P., Craig, M., Tallman, M., Boccia, R., Hamilton, B., Lewis, J. and Lossos, I. 2012. A multicenter phase II study of darinaparsin in relapsed or refractory Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 87, 111-114.

Kaise, T., Watanabe, S. and Itoh, K. 1985. The Acute Toxicity of Arsenobetaine. *Chemosphere* 14, 1327-1332.

Kim, W.S., Ogura, M., Uchida, T., Uike, N., Abe, Y., Ishizawa, K., Okitsu, Y., Tobinai, K., Nagahama, F., Sonehara, Y. and Nagai, H. 2015. Two Phase I and Pharmacokinetic Studies of Darinaparsin (Organic Arsenic Compound) in Japanese and Korean Patients with Relapsed or Refractory (R/R) Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL). *Blood* 126.

Li, Y.L., Yu, G.P., Li, Q.X., Wang, W.L., Shen, X.Q., Liu, H. and Liu, R.J. 2015. Construction of a BALB/c-Nu Mouse Model of Invasive Bladder Carcinoma and Preliminary Studies on the Treatment of Bladder Tumors through Internal Iliac Arterial Infusion of Albumin-Bound Arsenic Trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). *Plos One* 10.

Liu, J., Liu, Y., Powell, D., Waalkes, M. and Klaassen, C. 2002. Multidrug-resistance *mdr1a/1b* double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. *Toxicology* 170, 55-62.

Liu, J., Shi, J.-Z., Yu, L.-M., Goyer, R. and Waalkes, M. 2008. Mercury in traditional medicines: is cinnabar toxicologically similar to common mercurials? *Exp Biol Med* 233, 810-817.

Lloyd, N.C., Morgan, H.W., Nicholson, B.K. and Ronimus, R.S. 2005. The composition of Ehrlich's salvarsan: resolution of a century-old debate. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 941-944.

Lorico, A., Rappa, G., Finch, R.A., Yang, D., Flavell, R.A. and Sartorelli, A.C. 1997. Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res* 57, 5238-5242.

- Matulis, S.M., Morales, A.A., Yehiayan, L., Croutch, C., Gutman, D., Cai, Y., Lee, K.P. and Boise, L.H. 2009. Darinaparsin induces a unique cellular response and is active in an arsenic trioxide-resistant myeloma cell line. *Molecular Cancer Therapeutics* 8, 1197-1206.
- Mizumura, A., Watanabe, T., Kobayashi, Y. and Hirano, S. 2010. Identification of arsenite-and arsenic diglutathione-binding proteins in human hepatocarcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 242, 119-125.
- Naranmandura, H., Ibata, K. and Suzuki, K.T. 2007. Toxicity of dimethylmonothioarsinic acid toward human epidermoid carcinoma A431 cells. *Chem Res Toxicol* 20, 1120-1125.
- Naranmandura, H., Suzuki, N., Takano, J., McKnight-Whitford, T., Ogra, Y., Suzuki, K.T. and Le, X.C. 2009. Systemic distribution and speciation of diphenylarsinic acid fed to rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 237, 214-220.
- Raab, A., Meharg, A.A., Jaspars, M., Genney, D.R. and Feldmann, J. 2004. Arsenic–glutathione complexes—their stability in solution and during separation by different HPLC modes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 183-190.
- Rehman, K. and Naranmandura, H. 2013. Double-edged effects of arsenic compounds: anticancer and carcinogenic effects. *Curr Drug Metab* 14, 1029-1041.
- Rust, D.M. and Soignet, S.L. 2001. Risk/benefit profile of arsenic trioxide. *Oncologist* 6 Suppl 2, 29-32.
- Styblo, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R. and Thomas, D.J. 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* 74, 289-299.

Tsimberidou, A.M., Camacho, L.H., Verstovsek, S., Ng, C., Hong, D.S., Uehara, C.K., Gutierrez, C., Daring, S., Stevens, J., Komarnitsky, P.B., Schwartz, B. and Kurzrock, R. 2009. A phase I clinical trial of darinaparsin in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 15, 4769-4776.

Umezu, T., Nakamiya, K., Kita, K., Ochi, T., Shibata, Y. and Morita, M. 2012. Diphenylarsinic acid produces behavioral effects in mice relevant to symptoms observed in citizens who ingested polluted well water. *Neurotoxicol Teratol* 34, 143-151.

WHO. 2004. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans 1-477.

Wu, J., Henderson, C., Feun, L., Van Veldhuizen, P., Gold, P., Zheng, H., Ryan, T., Blaszkowsky, L.S., Chen, H., Costa, M., Rosenzweig, B., Nierodzik, M., Hochster, H., Muggia, F., Abbadessa, G., Lewis, J. and Zhu, A.X. 2010. Phase II study of darinaparsin in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs* 28, 670-676.

Yehiayan, L., Stice, S., Liu, G., Matulis, S., Boise, L.H. and Cai, Y. 2014. Dimethylarsinothioyl Glutathione as a Metabolite in Human Multiple Myeloma Cell Lines upon Exposure to Darinaparsin. *Chem Res Toxicol* 27, 754-764.

## 【謝辞】

本研究を進めるにあたり、終始懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました千葉大学大学院 環境リスク研究室 平野 靖史郎 教授（国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 副センター長）、ならびに小林 弥生 准教授（国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 曝露動態研究室 主任研究員）に、謹んで感謝の意を表します。

また、国立環境研究所 統合化健康リスク研究室 宇田川 理 先生、古山 昭子 先生、環境リスク研究室 副顧問（環境リスク・健康研究センター） 青木 康展 教授には随時適切な御助言を頂き、深く感謝致します。

本論文作成に当たり、御校閲とご指導を賜りました千葉大学大学院 医学薬学府 小椋 康光 教授、戸井田 敏彦 教授、伊藤 晃成 教授に深く御礼を申し上げます。

同じ研究室で実験を行い、何かと励ましてくださいました国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター統合化健康リスク研究室の皆様方に感謝致します。

実験動物の管理をしてくださったアニマルケアの方々、機器使用・測定の際にご協力いただいた計測センター基盤計測化学研究室の方々にも深く感謝致します。

最後に絶えず応援してくれた友人達、家族に心から感謝致します。

## 【主論文目録】

本学位論文内容は下記の論文による。

1. Kato, A., Kobayashi, Y., Udagawa, O., and Hirano, S. (2017) Pharmacodynamics of S-dimethylarsino-glutathione, a putative metabolic intermediate of inorganic arsenic, in mice. *Biochem. Pharmacol.* 126: 79–86. doi: 10.1016/j.bcp.2016.11.020.
2. Hirano, S., Tadano, M., Kobayashi, Y., Udagawa O., and Kato, A. (2015) Solubility Shift and SUMOylation of Promyelocytic Leukemia (PML) Protein in Response to Arsenic (III) and Fate of the SUMOylated PML. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 287:191-201. doi: 10.1016/j.taap.2015.05.018.

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 小椋 康光

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 戸井田 敏彦

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 伊藤 晃成