

## 無機ヒ素化合物のヒト培養細胞に及ぼす影響

Effect of Inorganic Arsenic Compound on Human Cells

奥井 登代 藤原 美定\*

Toyo Okui, Yoshisada Fujiwara

\*神戸大学医学部

Kobe University School of Medicine

### 諸 言

ヒ素化合物は古くから農工業に広く使用されている。ヒ素化合物の発癌実験は動物等を用いて多数試みられたが<sup>1), 2)</sup>、明確な結論は得られていない。しかしながら、ヒ素化合物にはばく露された製練労働者や農薬工場の従事者等に呼吸器癌や皮膚癌が多く発生していることが報告されている。<sup>3), 4)</sup> 1980年、IARC (International Agency for Research on Cancer)<sup>5)</sup>はこれまでの疫学調査および実験の結果を再検討して、無機ヒ素化合物を用いた発癌試験では発癌性の有無を結論できないが、ヒトの皮膚および肺に対する発癌物質であると結論した。Furst A.<sup>6)</sup>は、この疫学的な証拠と動物実験の結果の相違はヒ素化合物が発癌物質というよりは、むしろ助発癌物質として作用しているためではないかと提案している。また Rossman T. G. ら<sup>7)</sup>は、E. coli の変異株を用いて、三価ヒ素化合物がDNA修復を阻害することを認め、ヒ素が助発癌物質として作用する可能性を示した。

本報では、我々はヒト正常線維芽細胞およびDNA修復能を欠損した色素性乾皮症患者の線維芽細胞(XP細胞)を用いて、三価無機ヒ素化合物である三酸化ヒ素の細胞毒性、およびDNA修復におよぼす影響について検討した。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 細胞および細胞培養

細胞はヒト正常細胞NHSF34、色素性乾皮症細胞XP190S(A群)を用いた。培養液は牛胎児血清10%を含むMEM(GIBCO製)培養液を使用した。細胞は炭酸ガス濃度5%の炭酸ガス培養器中で培養した。

#### 2. 細胞毒性

直径10cmのプラスチックシャーレに播種した細胞が対数増殖期に達した時、細胞をトリプシンで処理し、1,000～15,000個の細胞を直径6cmのプラスチックシャーレにそれぞれ播種した。細胞がシャーレに接着するまで4時間培養を行った後、種々濃度の三酸化ヒ素を加えた培養液で24時間培養した。この後、PBSでシャーレを洗浄し、生成したコロニーを10%ホルマリン(PBS)で固定し、クリスタルバイオレットで染色し、数を計測した。

#### 3. 細胞の紫外線(UV)致死およびX線致死におよぼすヒ素の影響

前述したコロニー形成法に従い、シャーレに細胞を播種し、4時間培養後UV殺菌灯(15W, 1J/m<sup>2</sup>)を用いて種々線量のUVを照射した。照射後、直ちに三酸化ヒ素0.5あるいは1.0μg/mlを含む培養液をシャーレに加え、24時間培養し、細胞の生存率を求めた。X線致死におよぼす三酸化ヒ素の影響は東芝KXC18(160V, 250mA)を用いて、UV照射実験と同様の方法で調べた。

#### 4. 不定期DNA合成の検出

ヒト正常細胞を直径3.5cmのプラスチックシャーレにいれたカバーガラス上に播種し、4時間培養後、2.4, 6および12J/m<sup>2</sup>のUV照射を行った。照射後、直ちに<sup>3</sup>H-チミジン(5μCi/ml), 2.5mMのハイドロキシウレアおよび三酸化ヒ素(1.5および10μg/ml)を含む培養液を加え培養した。4時間後、シャーレをPBSで洗浄し、カルノア(メチルアルコール:酢酸=3:1)で細胞を固定し、カバーガラスをスライドグラスに接着した後、オートラジオグラフィ用乳剤(サクラNR-II)を塗布した。2週間の露光後現像し、ギムザ染色を行い、核中のグレイン数を顕微鏡下で計測した。

## 結 果

### 1. 細胞毒性

ヒト正常細胞およびXP細胞における三酸化ヒ素の細胞毒性をFig. 1に示した。

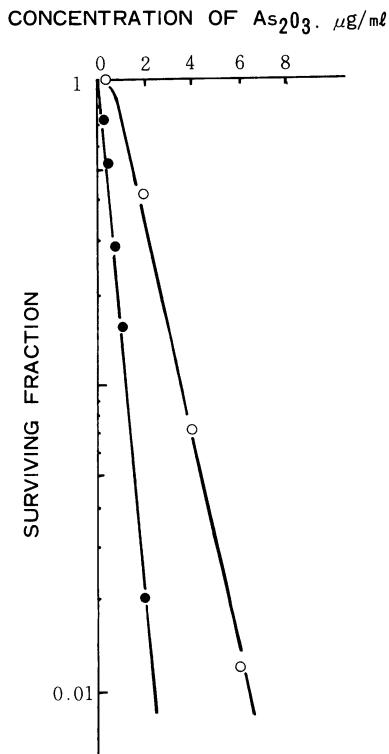


Fig. 1 Lethal effects of arsenic trioxide on human cells.

Cells were incubated with arsenic trioxide for 24 hrs.

○: NHSF34  
●: XP19OS

ID<sub>50</sub> (50%致死量) は正常細胞で1.8μg/ml、XP細胞では0.5μg/mlであり、XP細胞は正常細胞に比較して、三酸化ヒ素により高い感受性を示した。

### 3. 三酸化ヒ素の紫外線致死増感効果

Fig. 2にUV照射後、三酸化ヒ素で処理したヒト正常細胞およびXP細胞の生存曲線を示した。

細胞をUV照射後三酸化ヒ素で処理することにより、正常細胞では、生存曲線の傾きが大きくなり、UV致死増感が認められた。一方XP細胞では、三酸化ヒ素のUV致死への影響はほとんど認められなかった。Table 1にそれぞ

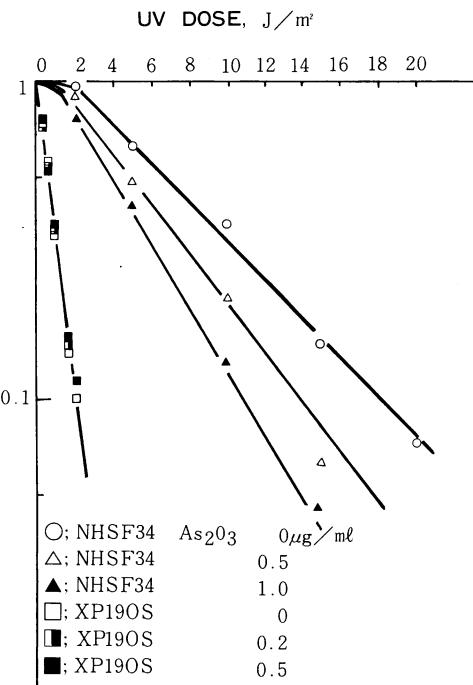


Fig. 2 Effects of Arsenic trioxide on survival of UV-irradiated human cells.

れのD<sub>0</sub>値（平均致死線量）D<sub>q</sub>値（類閾値線量）を示した。UV照射後1μg/mlの三酸化ヒ素で処理すると、正常細胞ではUV照射のみの場合と比較してD<sub>0</sub>値が3/5に、D<sub>q</sub>値は1/10に減少した。D<sub>q</sub>値はUVによる損傷の修復、すなわちDNA修復の度合に依存する値であり、D<sub>q</sub>値の減少は三酸化ヒ素によるDNA修復の阻害を示唆している。XP細胞ではUV照射とUV照射プラス三酸化ヒ素処理の場合を比較して、D<sub>0</sub>、D<sub>q</sub>値ともにほとんど差が認められなかった。

Table 1. Effects of arsenic trioxide on D<sub>0</sub> and D<sub>q</sub> of UV-irradiated human cells.

Cells	Normal human cells			cells	
	UV	UV+As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	UV+As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	UV	UV+As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	0.5 μg/ml	1.0 μg/ml	0.5 μg/ml	0.38	0.38
D <sub>0</sub> J/m <sup>2</sup>	5.1	3.5	2.9	0.39	0.38
D <sub>q</sub> J/m <sup>2</sup>	2.01	1.39	0.19	0	0

次に正常細胞のX線照射による生存曲線をFig. 3に示した。

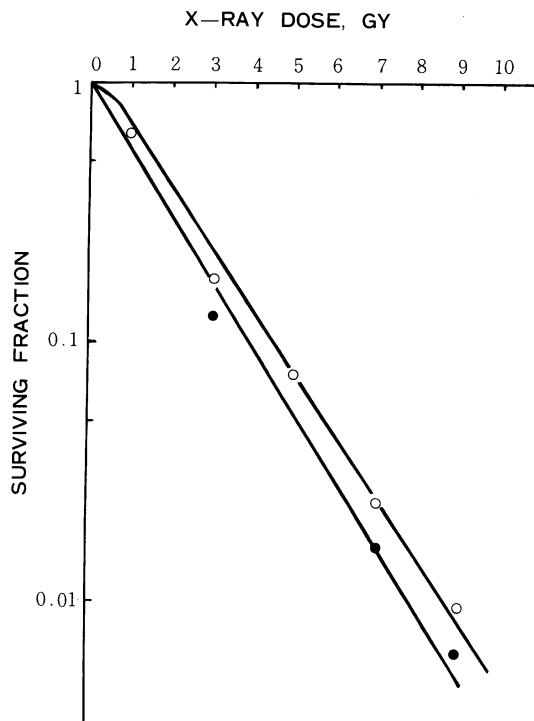


Fig. 3 Effects of arsenic trioxide on survival of X-ray-irradiated normal human cells.

○; NHSF34 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0 μg/ml  
●; NHSF34 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1.0 μg/ml

X線照射後三酸化ヒ素を添加しても生存曲線はほとんど変化がなく、D<sub>0</sub>、D<sub>q</sub>値ともX線照射のみの場合とほぼ同様の値であり、三酸化ヒ素はX線致死増感効果を示さなかった。(Table 2)。

Table 2 Effect of arsenic trioxide on D<sub>0</sub> and D<sub>q</sub> of X-ray irradiated human cells.

	X-ray	X-ray+As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 1.0 μg/ml
D <sub>0</sub> Gy	1.98	1.73
D <sub>q</sub> Gy	0.045	0

### 3. 不定期DNA合成(UDSの検出)

DNAに損傷が生じると、直ちに修復のためDNA合成(不定期DNA合成)が行われ、Fig. 4に示すように細胞の核内にグレインが観察される。Fig. 5にUV照射およびUV照射後に三酸化ヒ素で処理したヒト正常細胞の核内のグレイン数を示す。

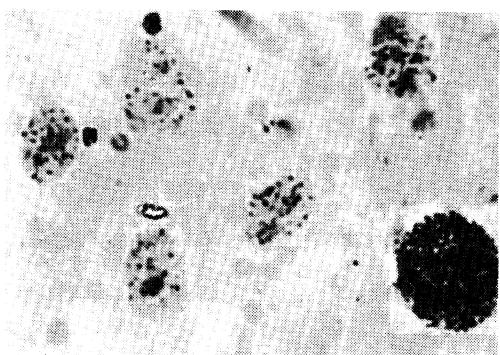


Fig. 4 Autoradiograms of human cells

Cells were incubated with <sup>3</sup>H-TdR (5 μCi/ml) for 4 hrs after UV-irradiation (2.4 J/m<sup>2</sup>)

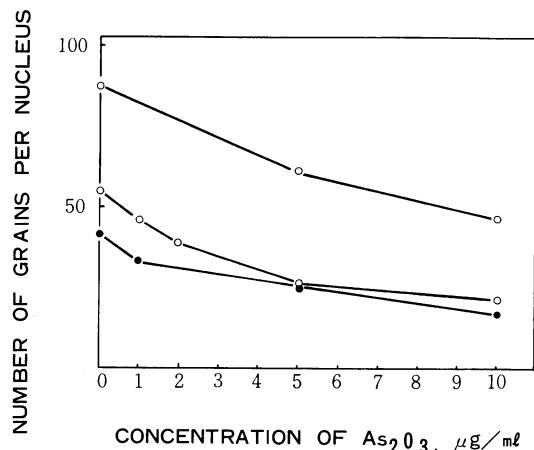


Fig. 5 Effects of arsenic trioxide on UDS in UV-irradiated cells.

○; 12 J/m<sup>2</sup>      □; 6 J/m<sup>2</sup>      ●; 2.4 J/m<sup>2</sup>

UV照射線量の増加に伴い、グレイン数が増加した。UV照射後、三酸化ヒ素で処理すると、UV照射した細胞と比較してグレイン数が減少し、UDSが阻害されることが示唆された。三酸化ヒ素の処理濃度が高いほどUDS阻害の程度も大きくなる傾向を示した。一方、三酸化ヒ素の単独処理では、UDSは検出できなかった。

### 考 察

我々はDNAの除去修復欠損株であるXP細胞を実験に用いることにより、無機ヒ素化合物のDNAに及ぼす影響について興味ある知見を得た。

三酸化ヒ素は24時間処理で、ヒト正常細胞におけるID<sub>50</sub>値が1.8 μg/mlと比較的強い細胞毒性を示した。XP細胞の

ID<sub>50</sub>値は正常細胞の約 $\frac{1}{4}$ であった。この結果は三酸化ヒ素が、DNAに損傷を与えることを、その損傷の一部は除去修復によって修復されることを示唆している。一方、三酸化ヒ素は、4時間処理では細胞のDNA損傷に伴う不定期DNA合成を誘発しないことが認められた。これは三酸化ヒ素がDNA合成を阻害することを示唆している。このように三酸化ヒ素はDNAに異なる二つの作用を及ぼすことが考えられる。

紫外線致死に及ぼす三酸化ヒ素の影響を調べた結果、正常細胞では明らかな三酸化ヒ素のUV致死増感作用が認められた。UV照射による生存曲線から得られるD<sub>q</sub>値が三酸化ヒ素の処理により大きく減少したことから、ヒ素がUV照射により生じるDNA修復を阻害することが示唆された。一方、XP細胞ではヒ素のUV致死増感がほとんど認められなかった。またUDS検出実験の結果、UV照射により生じるUDSがヒ素により阻害されることがわかった。これらの結果は、三酸化ヒ素がUVによるDNA損傷の修復過程の中で、除去修復過程を特異的に阻害することを示唆している。X線はUV照射によるDNA損傷であるピリミジンダイマーの生成とは異なるDNA鎖切断等のDNA損傷を生じるため、細胞のDNAの修復過程もUV照射の場合とは異なる。そのためXP細胞はX線に高感性を示さない<sup>8)</sup>。三酸化ヒ素もまた正常細胞のX線致死に対して増感作用を示さなかった。このことは三酸化ヒ素の除去修復阻害作用を支持する。Rossman T.G.ら<sup>7),9)</sup>は大腸菌の変異株を用いた実験において三価ヒ素化合物、亜ヒ酸ナトリウムのDNA修復阻害作用を報告している。高濃度(1mM)の亜ヒ酸ナトリウムは複製後修復を、低濃度(100mM)の亜ヒ酸ナトリウムは除去修復を阻害した。本実験の結果、哺乳動物細胞においても三価ヒ素化合物はより低い濃度(0.5~1.0μg/ml=2.5~5μM)で、DNAの除去修復を阻害することが示唆された。Yang L.L.<sup>10)</sup>は、ヒト細胞に化学突然変異原物質を作用させ、細胞のDNA損傷の除去修復が十分に行われずにDNA複製期にはいると細胞毒性とともに突然変異誘発の頻度が上昇することを認めている。また除去修復欠損XP患者に皮膚癌が多発し、<sup>11)</sup>XP細胞ではUVや突然変異原物質により正常細胞に比較して高い頻度の突然変異が誘発される。<sup>12)</sup>これらのことから、DNAの除去修復欠損は突然変異誘発率を高め、三酸化ヒ素はDNAの除去修復を阻害することにより助発癌作用を示すのではないかと推論される。

## 結語

無機ヒ素化合物の哺乳動物細胞に及ぼす影響を明らかにするために三酸化ヒ素の細胞毒性とDNA修復に及ぼす影

響を調べて次の結果が得られた。

1. 三酸化ヒ素はヒト細胞において高い細胞毒性を示した。ID<sub>50</sub>値は1.8μg/mlであった。DNA除去修復欠損株XP細胞はヒト正常細胞に比較してID<sub>50</sub>値で約 $\frac{1}{4}$ と、高い感受性を示した。
2. 正常細胞を紫外線照射した後、三酸化ヒ素で処理すると、三酸化ヒ素の紫外線(UV)致死増感効果が認められた。一方XP細胞では三酸化ヒ素による紫外線致死増感効果は認められなかった。
3. ヒト正常細胞を用いて三酸化ヒ素のX線致死に及ぼす三酸化ヒ素の影響を調べたが、ヒ素のX線致死増感作用は認められなかった。
4. 三酸化ヒ素は単独では不定期DNA合成(UDS)を誘発しなかったが、紫外線で誘発されたUDSを阻害した。

これらの結果から無機三価ヒ素化合物は、哺乳動物細胞のDNA除去修復を阻害することが示唆された。

## 引用文献

- 1) Hueper W.C. et al.: Arch Environ Health, **5**, 445 (1962)
- 2) Milner J.E. et al.: Environ. Health, **18**, 7 (1969)
- 3) Hill A.B. et al.: Br. J. Ind. Med., **5**, 1 (1948)
- 4) Yeh S.: Human Pathol., **4**, 469 (1973)
- 5) IARC: Monograph Evalu. Carcinogenic Rish, **23**, 39 (1980)
- 6) Furst A.: Arsenic Industrial Biomedical Environmental Perspectives, **151**, Van Nostrand Reinhold (1982)
- 7) Rossman T.G. et al.: Environ. Health Perspect., **19**, 229 (1977)
- 8) Cleaver J.E. et al.: J. Radiat. Biol., **18**, 557 (1970)
- 9) Rossman T.G. et al.: Mutation Res., **91**, 207 (1982)
- 10) Yang L.L.: Mutation Res., **94**, 435 (1982)
- 11) Cleaver J.E.: Progress in Genetic Toxicology, **29** (1977)
- 12) Maher V.M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 2613 (1982)

## 欧文要約

The effects of arsenic trioxide on cytotoxicity in human cells and DNA repair in UV-irradiated

human cells were studied by means of colonyforming ability and unscheduled DNA synthesis(UDS)using a cellular autoradiography.

The ID<sub>50</sub> value of arsenic trioxide for normal human cells was  $1.8\mu\text{g}/\text{ml}$ . However, arsenic trioxide exerted more lethal effect on Xeqoderma Pigmentosum (XP) cells than on normal human cells. Post-UV arsenic trioxide treatment potentiated cell-killing by reducing the Do and Dq in normal cells. On the other hand, XP cells exhibited no obvious reduction in Do by arsenic trioxide. Further, arsenic trioxide had little effect on X-ray-killing in human cells.

The level of UDS was decreased by 4-hr-post-UV arsenic trioxide treatment.

These results suggest that arsenic trioxide inhibits excision repair of DNA damage in human cells.