

ヒ素およびヒ素を含む木材防腐剤
による酸化ストレス関連毒性
に関する病理学的研究

2022 年

東京農工大学大学院農学府共同獣医学専攻

高橋 尚史

ヒ素およびヒ素を含む木材防腐剤
による酸化ストレス関連毒性
に関する病理学的研究

高橋 尚史

【目次】

序 論	4
略語説明	6
第1章 膀胱内投与法を用いたヒ素尿中代謝物ジメチルアルシン酸による 毒性影響の検索および抗酸化剤の増強作用	8
諸 言	9
材料および方法	11
結 果	15
考 察	17
小 括	20
第2章 クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤のラットにおける 一般毒性の検索	21
緒 言	22
材料および方法	25
結 果	28
考 察	32
小 括	37
第3章 クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤による肝毒性の発現機序解明	38
緒 言	39
材料および方法	40
結 果	45

考 察	49
小 括	54
結 論	55
謝 辞	57
文 献	58
図 表	74

序 論

ヒ素は環境中および食品中に広く存在し、皮膚疾患や神経疾患、免疫抑制、皮膚、肺、腎臓、肝臓および膀胱における発がんなど種々の健康被害をもたらすことが知られている。特に井戸水の汚染による慢性ヒ素中毒は、東南アジア、中南米を中心に大きな環境問題の一つになっている。またヒ素は過去にその毒性の強さを利用して、木材防腐剤の成分として使用されていたことから、大量の建築廃木材による環境汚染も懸念されている。このようにヒ素は身の回りに常に存在し、健康被害を起こす可能性があるため、生体への影響を正しく評価するための毒性作用機序の解明は重要な課題である。本研究では、ヒ素およびヒ素を含む木材防腐剤の毒性影響について、特に酸化ストレスに着目し、その毒性メカニズムの解明を試みた。

第 1 章では、ヒ素による膀胱発がんメカニズムについて検討した。ヒ素化合物は、自然界では無機および有機態で存在しており、飲料水中には主として無機ヒ素化合物が含まれている。無機ヒ素は体内に吸収されるとメチル化代謝され、尿中へ排泄される [Aposhian et al., 2004; Thomas et al., 2004]。その主要な尿中代謝物であるジメチルアルシン酸 [DMA(V)] は、ヒトにおけるヒ素の膀胱発がん重要な役割を果たすと考えられている [Wei et al., 2002]。DMA(V) をラットに経口投与すると肝臓において代謝され、より毒性の強いジメチル亜ヒ酸 [DMA(III)] が生成され、膀胱がんが誘発されることが報告されている [Salnikow and Zhitkovich, 2008; Wanibuchi et al., 1996; Yamamoto et al., 1995]。第 1 章では、ラットにおける膀胱内投与法を確立し、DMA(V) を膀胱内へ投与することにより、DMA(V) 自体が肝臓での代謝を介さずに直接、膀胱に及ぼす影響を評価した。また酸化ストレスの関与を検討するため抗酸化剤である *N*-アセチルシステイン (NAC) の低用量あるいは高用量を併せて膀胱内投与する群を設けた。

第 2 章では、ヒ素を含む木材防腐剤であるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) に着目した。CCA は過去に世界中の木材建造物で広く使用されていたため、

現在でもそれらの多くが撤去されずに残存している。2011年に発生した東日本大震災では、住宅土台に使用されたCCA処理木材が災害廃棄物として大量に発生し、その廃材からのヒ素等の流出およびそれに伴うヒトへの曝露が懸念された。このような状況にも関わらず、CCAの毒性評価は構成要素のクロム (CrO_3)、銅 (CuO)、ヒ素 (As_2O_5) それぞれの毒性情報を参考になされているに留まり、CCA全体としての毒性は基本情報すら乏しい。そこで一般的な毒性情報を得る目的で雌雄のラットを用い、CCAの4週間反復経口投与試験を実施した。

第3章では、ヒ素曝露によるヒトの肝障害・肝発がんを考慮し、第2章で明らかとなったCCA投与による酸化ストレスの増加を伴う雌の肝毒性に着目した。ヒ素の毒性発現にはその代謝過程が深く関与しており、肝臓はヒ素のメチル化代謝の主要な臓器である。そのため第3章では、肝臓において免疫組織化学的検索、網羅的遺伝子発現解析およびDNAメチル化解析を実施し、CCA誘発肝毒性の発現機序解明を試みた。

略語説明

3-NT	3-ニトロチロシン
4-HNE	4-ヒドロキシ-2-ノネナール
8-OHdG	8-ヒドロキシデオキシグアノシン
A/G ratio	アルブミン/グロブリン比
Alb	アルブミン
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
As(III)	亜ヒ酸
As(V)	ヒ酸
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BUN	血中尿素窒素
CCA	クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤
Cdkn1b/p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CGI	CpG アイランド
CHCMm	成熟赤血球細胞性ヘモグロビン濃度平均
CHCMt	全赤血球細胞性ヘモグロビン濃度平均
Chr	網状赤血球あたりのヘモグロビン含量
Cl	塩素
Ctcf	CCCTC-binding factor
CTL	対照群
Cy3	cyanine 3
Cy5	cyanine 5
DMA	ジメチル化ヒ素
DMA(III)	ジメチル亜ヒ酸
DMA(V)	ジメチルアルシン酸
DMT1	2 価金属トランスポーター1
Dnmt	DNA メチル基転移酵素
Dnmt1	DNA methyltransferase 1
Dnmt3a	DNA methyltransferase 3 alpha
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGTP	γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ
Glob	グロブリン
Gluc	血糖
GSH	グルタチオン
GSSG	グルタチオンジスルフィド
GST	グルタチオン S 転移酵素
Gsta2	glutathione S-transferase alpha 2
Gsta3	glutathione S-transferase alpha 3

H&E	ヘマトキシリン・エオジン
Hb	ヘモグロビン濃度
HDW	赤血球血色素濃度分布幅
HSP	熱ショックタンパク質
Ht	ヘマトクリット値
iAs	無機ヒ素
K	カリウム
LI	標識率
MCH	平均赤血球血色素量
MCHC	平均赤血球血色素濃度
MCVm	成熟赤血球平均赤血球容積
MCVr	網状赤血球平均赤血球容積
MCVt	全赤血球平均赤血球容積
MeDIP	メチル化 DNA 免疫沈降法
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1
MMA	モノメチル化ヒ素
MMA(III)	モノメチル亜ヒ酸
MMA(V)	モノメチルアルソン酸
Mt1	metallothionein 1
NAC	N-アセチルシステイン
P	無機リン
PCNA	増殖細胞核抗原
PSSG	S-グルタチオン化タンパク質
RDW	赤血球容積分布幅
Retics	網状赤血球数
SAM	S-アデノシルメチオニン
SOD	スーパーオキシドディスムターゼ
T.Bil	総ビリルビン
T.Chol	総コレステロール
TG	トリグリセライド
TMA	トリメチル化ヒ素
TP	総蛋白
TSS	転写開始点
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling

第 1 章 膀胱内投与法を用いたヒ素尿中代謝物ジメチルアルシン酸による
毒性影響の検索および抗酸化剤の増強作用

諸 言

無機ヒ素 (iAs) を含む飲料水の摂取によって生じる慢性ヒ素中毒は、世界的な公衆衛生上の懸念となっている [Yoshida et al., 2004]。3 価および 5 価の iAs である亜ヒ酸 [As(III)]、ヒ酸 [As(V)]、その 3 価のモノメチル化体であるモノメチル亜ヒ酸 [MMA(III)] およびジメチル化体である DMA(III) への曝露が皮膚、肺、腎臓、肝臓および膀胱の癌の発生と関連していることを示す証拠が蓄積されている [Tapio and Grosche, 2006]。しかし、ヒ素の作用機序については、その詳細は解明されていない [Cohen et al., 2007]。

iAs は腸から容易に吸収され、肝臓で酵素によりメチル化され、モノメチルアルソン酸 [MMA(V)] や DMA(V) といった有機態のヒ素となり、いずれも主要代謝物として尿中に排泄される。DMA(V) は、ラット膀胱に発がん性を示すことが報告されており [Cohen et al., 2007; Salnikow and Zhitkovich, 2008; Wanibuchi et al., 1996; Yamamoto et al., 1995]、DMA(V) の曝露はヒトに対するヒ素の膀胱発がんリスクに関連すると考えられる [Wei et al., 2002]。したがって、DMA(V) を用いたラット膀胱発がんモデルは、ヒ素による発がん機序を明らかにするのに有用なモデルである。このモデルでは、発がんの作用機序として、DMA(III) を含む反応性代謝物の生成による細胞毒性が関連することが知られており [Salnikow and Zhitkovich, 2008]、その後、再生性過形成、最終的に腫瘍形成に至ると考えられている [Arnold et al., 1999]。また、酸化ストレスは、尿中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) がヒト [Yamauchi et al., 2004] およびラット [Kinoshita et al., 2007] におけるヒ素曝露の主要なマーカーになっていることから、ヒ素における発がん作用機序との関連が *in vitro* および *in vivo* ともに非常に注目されている。興味深いことに抗酸化剤であるアスコルビン酸および NAC は、*in vitro* でラット膀胱上皮細胞 MYP3 における DMA(V) 誘発細胞毒性を抑制することが報告されており、DMA(V) の毒性発現には酸化ストレスの関与が示唆される [Wei et al., 2005]。NAC は含硫アミノ酸システインの誘導体であり、システインから強力な

抗酸化作用を有するグルタチオン (GSH) への変換の中間体でもあるため、細胞内の還元型 GSH 濃度を高めることにより、自然の抗酸化防御力を増強することが知られている [Atmaca, 2004]。

雌性ラットを用いた化学物質の膀胱内投与法は、膀胱における細胞毒性、細胞増殖、腫瘍誘発メカニズムを解明する上で適切かつ信頼性の高い方法である [Hasegawa et al., 1990; Lijinsky et al., 1992; Masutomi et al., 2001; Shibata et al., 1990]。膀胱への局所投与は、全身投与と異なり、特定の代謝物が膀胱に直接作用するかを評価することができる。本研究では、膀胱内投与法を用いて、ヒ素の主要尿中代謝物である DMA(V) が直接、尿路上皮へ及ぼす影響を検索し、NAC 投与が DMA(V) による細胞毒性および細胞増殖を修飾するか否かを検討した。

材料および方法

被験物質

DMA(V) (純度 98%以上) および NAC (純度 99%以上) は, Sigma-Aldrich (セントルイス, ミズーリ州, 米国) から購入した。DMA(V) と NAC は, 膀胱内投与の直前に生理食塩水に溶解した。DMA(V) および NAC 投与液の調製直後の pH は, それぞれ約 6 および 2 であり, NAC についてはラットの一般的な尿 pH 値 (5~8) を参考に, 水酸化ナトリウム水溶液を添加して, pH をほぼ中性に調整した後, 使用した。DMA(V) と NAC の同時投与群の投与液には, DMA(V) と NAC の等量混合液を適切な濃度に調製したものをを用いた。

供試動物

雌性 F344/DuCrIj ラット (9 週齢) を日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川) から入手した。本系統は, DMA(V) のラット発がん性試験に使用された系統であるためこれを選択した [Cohen et al., 2007]。実験開始前に 1 週間の検疫・馴化期間を設けた。動物は温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$, 換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエア法), 照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。1 ケージに 1 匹のラットを収容し, 固型飼料 (オリエンタル MF, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) と水道水を自由に摂取させた。すべての動物実験は, 日本実験動物学会発行の「動物実験指針」[JALAS, 1987] および残留農薬研究所の動物実験倫理規程に従い実施した。

実験デザイン

1 週間の検疫・馴化期間を設け, 動物の一般状態, 体重変化に異常のないことを確認した。試験開始時に全動物を無作為に無処置群 1 群, 処置群 6 群の計 7 群に分けた。処置群には, NAC 1.6 mg/kg (低用量) (N=4), NAC 90 mg/kg (高用量) (N=4),

DMA(V) 10 mg/kg (N=6) , DMA(V) 10 mg/kg+NAC (低用量) (N=6) , DMA(V) 10 mg/kg+NAC (高用量) (N=5) , 溶媒対照群 (生理食塩水) (N=4) を設けた。膀胱内投与は、以前の報告を参考に行った [Masutomi et al., 2001]。まず、ペントバルビタール麻酔 (30 mg/kg, i.p.) 下で下腹部を軽く圧迫して膀胱内に残存する尿を排出させた。次にマウス用フレキシブル経口ゾンデ (日本クレア株式会社, 静岡) の先に装着したカテーテル (外径 0.61 mm, 内径 0.28 mm ; 株式会社夏目製作所, 東京) を尿道から膀胱に導入し, 注射筒を用いて上記の被験物質を注入した。膀胱内投与は 4 名の投与者で実施した。試験に先立ち, 投与に用いるカテーテルおよび膀胱内投与の手技について十分に検討し, 投与訓練を繰り返し行った上で試験を実施した。投与容量は 1 mL/kg 体重とした。投与 2 時間後, 麻酔下のラットの尿道から膀胱内の溶液を強制排尿させた。膀胱内投与は 3 日間隔で 2 回 (0 時間および 72 時間) 実施した。対照として, 膀胱内投与を行わない無処置対照群 (N=4) を設けた。予備実験として, 0.1, 1, 10 および 100 mg/kg の DMA(V) を雌性ラット (各群 N=1) の膀胱内に 1 回 2 時間投与した。その結果, 膀胱に軽度の炎症を引き起こす 10 mg/kg の DMA(V) を本試験の投与用量とした。NAC の投与用量は, 過去に報告された以下の *in vitro* 試験の結果に基づいて体重当りの投与量を算出した。ラット膀胱上皮細胞 MYP3 を用いた *in vitro* 試験において, NAC は DMA(V) 誘発細胞毒性を 1 mM の濃度で抑制した [Wei et al., 2005]。今回の試験は *in vivo* 試験であり, 曝露時間が 2 時間と短いことを考慮し, 約 10 倍量に相当する 1.6 mg/kg を低用量に, 約 500 倍量に相当する 90 mg/kg を高用量に設定した。試験期間中, 動物の一般状態を観察し, 体重測定を行った。

全ての動物は, ジエチルエーテル麻酔下で 2 回目の投与の 1 日後に安楽殺した。ジエチルエーテル麻酔は, 残留農薬研究所の動物実験倫理規程において, 2011 年以降, 推奨されていないが, 本章における試験は規定改訂前に実施された。安楽殺の 1 時間前に, 全動物に 100 mg/kg の 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU ; Sigma-Aldrich) を腹腔内投与した [Shibata et al., 1990]。剖検時, 膀胱に 10% 中性緩衝ホルマリンを注入して適

度に膨らませ、さらに同固定液で 24 時間浸漬固定した。膀胱は縦断方向で切り出し、常法に従ってパラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色して、病理組織学的検査を行った。

免疫組織化学的検索および陽性反応の解析

免疫組織化学的検索は、Dako EnVision キット (Dako, グロストロップ, デンマーク) を用いて実施した。すべての動物から得たパラフィン切片を用い、BrdU に対するモノクローナル抗体 (1000 倍; M0744; Dako) で免疫組織化学染色を行った。また、NAC (低用量) 群および DMA(V)+NAC (低用量) 群を除く他の群の選択した 4 匹の動物について、以下のモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った: p44/42 MAPK (ERK1/2) (200 倍; #9102; Cell Signaling Technology, ダンバース, マサチューセッツ州, 米国), リン酸化 p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (100 倍; #4376; Cell Signaling Technology), サイクリン D1 (100 倍; #2926; Cell Signaling Technology), 3-ニトロチロシン (3-NT) (50 倍; ALX-804-505-C050; Alexis Biochemicals, サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国), 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) (20 倍; MHN-020P; 日本老化制御研究所, 静岡)。BrdU については、切片をプロテイナーゼ K 溶液 (Dako) で 15 分前処理した後、4N 塩酸に 20 分浸漬した。その他は 0.1M クエン酸緩衝液 (pH6.0) で 10 分間マイクロウェーブ前処理を行った。陽性反応は 3,3'-ジアミノベンチジンで可視化し、核染色にはヘマトキシリンを用いた。BrdU の陽性対照としてすべての動物の十二指腸を使用し、全動物から陽性反応が得られた。陰性対照は一次抗体の代わりにリン酸緩衝生理食塩水を用いて確認した。BrdU 陽性の尿路上皮細胞の比率を算出するため、1000 個の尿路上皮細胞を光学顕微鏡下で無作為にカウントした。カテーテル挿入による機械的損傷の影響が疑われる膀胱頸部の BrdU 陽性細胞は、カウントの対象から除外した。BrdU 標識率 (LI) は、標識された核の数をカウントされた核の総数 (1000 個) で割ることにより算出し、結果はパーセントで表した。3-NT

と 4-HNE については、免疫染色強度を半定量解析した。すべての切片を同条件で染色し、測定はイメージアナライザー（ニレコ，東京）を用いて行った [Yoshida et al., 2001]。各標本について 5 視野を無作為に選択して測定した。

統計解析

BrdU LI, 3-NT および 4-HNE の解析データは平均値±標準偏差で示し，データは Holm の多重比較検定（両側検定）を用いて解析した。また病理組織学的所見の発生率は，フィッシャーの正確確率検定（片側検定）を用いて解析した。有意水準は 5% 以下に設定した。

結 果

膀胱の病理組織学的検査

Table 1 に病理組織学的検査の結果を示す。投与期間中、動物の一般状態および体重には明らかな異常は認められなかった。溶媒対照群 (Figure 1A) , NAC (低用量) 群, 無処置対照群では, 病理組織学的変化は観察されなかった。DMA(V) 投与群では 6 匹中 1 匹, NAC (高用量) 群では 4 匹中 1 匹に, 尿路上皮および粘膜下層への好中球浸潤を主体とする軽度な炎症が認められた (Figure 1B, C) 。DMA(V) と NAC (低用量または高用量) を同時投与したラットでは, それぞれ 6 匹中 4 匹, 5 匹中 3 匹で軽度から中等度の炎症反応が観察され, DMA(V) と NAC (高用量) を同時投与した 5 匹中 2 匹では尿路上皮の過形成も認められた。1 匹は結節状過形成 (Figure 1D) , もう 1 匹は乳頭状過形成 (Figure 1E) であり, 粘膜下層の水腫と出血を伴っていた。また, 結節状過形成や乳頭状過形成の周囲には, び慢性の単純性過形成がみられた。単純性過形成を含む尿路上皮細胞過形成を示した領域は膀胱の縦断面において約半分を占めた。他の投与群では単純性過形成を含む増殖性病変は認められず, これらの過形成性病変は DMA(V) と NAC (高用量) の同時投与に起因するものと考えられた。

細胞増殖活性の解析と細胞増殖シグナルに関する免疫組織化学的検索

細胞増殖活性を評価するため, 膀胱における BrdU 陽性尿路上皮細胞数をカウントした。NAC (低用量) 群では, 尿路上皮細胞の BrdU LI の増加は観察されなかった。DMA(V) 投与群または NAC (高用量) 群では, BrdU LI が溶媒対照群に比べ有意に増加した (Figure 2A-D) 。DMA(V) と NAC (高用量または低用量) の同時投与群では, BrdU LI が顕著に増加し, これらの群における増加は, 溶媒対照群または DMA(V) 投与群と比較して統計学的に有意であった (Figure 2A, E) 。これらの結果から, DMA(V) により誘発された細胞増殖を NAC (高用量または低用量) が促進することが示された。溶媒対照群の BrdU LI ($1.6\% \pm 2.0\%$) は, 無処置群 ($0.3\% \pm 0.2\%$) よりわずかに

高かったが、この差異は統計学的に有意ではなかった。

DMA(V) および NAC の同時投与群において細胞増殖活性の明らかな増加が観察されたため、免疫組織化学染色を用いて細胞増殖に関連するシグナル伝達を検索した。溶媒対照群の正常な尿路上皮細胞では、ERK1/2 の陽性反応が顕著であったが、リン酸化 ERK1/2 の陽性反応は限局的であった (Figure 3A, C)。同様の陽性反応は、DMA(V) および NAC (高用量) 群を含む他の処置群の正常尿路上皮細胞でも観察された。よって、これらの群の正常尿路上皮細胞では、ERK1/2 を発現していたが、そのほとんどが活性化 (リン酸化) されていない状態であると考えられた。一方、DMA(V) および NAC (高用量) の同時投与群では、尿路上皮細胞過形成領域において ERK1/2 およびリン酸化 ERK1/2 両方の著しい陽性反応が観察された (Figure 3B, D)。リン酸化された ERK1/2 の一部では、核内移行している像も観察された (Figure 3D)。また、MAPK/ERK カスケードの下流に位置するサイクリン D1 の陽性反応は、リン酸化 ERK1/2 の陽性反応が得られた尿路上皮細胞過形成の領域でのみ核内に観察された (Figure 3E, F)。これらの結果から、ERK1/2 の活性化およびサイクリン D1 の発現が過形成領域に観察されることが示された。

酸化ストレスマーカーの半定量的解析

酸化ストレスが細胞増殖に関係するかを免疫組織学的に検討した。タンパク質の酸化的損傷を示すバイオマーカーとして知られる 3-NT の免疫染色強度は、DMA(V) 投与群または NAC (高用量) 群で、溶媒対照群に比べわずかに上昇した (Figure 4A-D)。DMA(V) と NAC (高用量) の同時投与により 3-NT の免疫染色強度はさらに増強され、溶媒対照群または NAC (高用量) 群と比較して統計学的に有意であった (Figure 4A, E)。一方、過酸化脂質の主要産物である 4-HNE の免疫染色強度は、いずれの投与群においても溶媒対照群との間に明確な差は認められなかった。

考 察

本章では、ヒ素による膀胱発がんメカニズムについて、主要尿中代謝物である DMA(V) に着目し、膀胱内投与法を用いて、DMA(V) 自体が直接、膀胱に及ぼす影響について評価した。また DMA(V) の及ぼす影響に酸化ストレスが関与するかを抗酸化剤である NAC を用いて検討した。

病理組織学的検査の結果、DMA(V) の膀胱内投与により、弱いながらも炎症が惹起され、細胞増殖活性の亢進が認められた。これらの影響には、タンパク質の酸化的損傷を示す 3-NT の増加を伴っていた。DMA(V) を用いたラット膀胱発がんモデルでは、前述の通り、発がんの作用機序として、DMA(III) を含む反応性代謝物の生成による細胞毒性が関連することが知られているが [Salnikow and Zhitkovich, 2008]、本研究結果から DMA(V) 自体にも尿路上皮傷害および引き続く細胞増殖活性の亢進を誘発するポテンシャルがあることが示唆された。

ラットの膀胱における DMA(V) 誘発発がん作用の機序として、酸化ストレスの関与が提唱されており、本研究においてもそれを裏付けるような結果が得られた。そこで、抗酸化物質である NAC を膀胱内に同時投与することにより、DMA(V) による膀胱傷害を抑制するかどうかを検討した。その結果、予想に反し、NAC との同時投与により DMA(V) 誘発の炎症と細胞増殖が促進され、最終的に乳頭状／結節状過形成が形成されることが示された。これらの変化は、免疫組織化学的検索で示したように、酸化ストレスマーカー 3-NT の増加と活性化された ERK1/2 およびサイクリン D1 の発現増加を伴っていた。細胞増殖の制御に中心的な役割を果たすことが知られる MAPK/ERK シグナルの発現上昇は、ヒトにおける膀胱腫瘍形成の初期変化と一致し [Mo et al., 2007]、ヒト尿路上皮細胞におけるサイクリン D1 の持続的発現を正に制御している [Huang et al., 2011]。また、ERK シグナルは、酸化ストレスや分裂促進刺激によって活性化されることが知られている [Luster and Simeonova, 2004]。したがって、これらの結果は、酸化ストレスを介した ERK の活性化が、DMA(V) 誘発の尿路上皮

傷害および増殖に対する NAC の増強作用に重要な役割を担っていることを示唆している。

NAC と GSH はともにチオール基 (-SH) を有する化合物であり、それらが酸化障害から生体を保護するメカニズムとして、ヒドロキシラジカルを直接捕捉することが示唆されている。一方、チオールと反応性ラジカルとの相互作用によってチールラジカルが生成されることも知られている [Sagrista et al., 2002]。Aitio は、酸化ストレスが関連するとされるヒトの疾患における NAC の悪影響についてレビューしている [Aitio, 2006]。例えば、吸入した NAC は慢性閉塞性肺疾患患者のヒドロキシペルオキシド生成を促進した [Szkudlarek et al., 2004]。また、健康なボランティアに 1.2 あるいは 2.4 g/日の NAC を経口投与したところ、グルタチオンジスルフィド (GSSG ; 酸化型グルタチオン) の血中濃度がコントロールより高くなり、GSH および GSH/GSSG 比の低下が認められた。これらのことから、NAC は使用量によって、おそらく酸化促進剤として作用すると考えられる [Kleinveld et al., 1992]。興味深いことに、エタノールの曝露時の NAC の前投与ではなく後投与は、脂質過酸化の増加を伴うエタノール誘発急性肝障害を悪化させた [Wang AL et al., 2006]。本研究では、単独投与の場合、低用量ではなく、高用量の NAC 投与のみでも炎症と細胞増殖を誘発したことから、本研究の条件下では高用量の NAC は酸化促進剤として作用したことが示唆された。DMA(V) と NAC の同時投与では、相加的に酸化ストレスを誘発し、結果として膀胱上皮により深刻な傷害を与えることになったと推察された。

また、増強作用の機序としては、NAC が還元剤として DMA(V) から反応性代謝物を生成している可能性も考えられる。ヒ素の代謝過程は、その毒性および発がん性にとって極めて重要である。細胞内に入ると、As(V) は酵素的に還元され、As(V) よりも反応性の高い As(III) となる。As(III) はメチル基の付加により酸化的にメチル化され [MMA(V)]、また 3 価に還元され [MMA(III)]、同様の反応を繰り返して DMA(V) と DMA(III) に代謝され、これが最も活性の高い代謝産物となる [Aposhian et al., 2004;

Thomas et al., 2004]。GSH は DMA(V) から DMA(III) と同様に DMA-GSH 結合体の生成を仲介し、最終的に反応性の高いラジカル等 (dimethylarsenic peroxide, dimethylarsenic radical, dimethylarsenic peroxy radical) を生成する [Yamanaka et al., 2004]。NAC は GSH の前駆体であることから、膀胱内環境において DMA(V) の還元を促進することで反応性代謝物の生成を促進し、その酸化促進作用と抗酸化作用のバランスを損ねた結果、より多くの酸化ストレスが誘発された可能性が示唆された。また、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-オメガは、GSH の存在下で MMA(V) と DMA(V) の還元を触媒する [Aposhian et al., 2004]。この酵素は、ハムスター [Sampayo-Reyes et al., 2000] やマウス [Chowdhury et al., 2006] において、他の組織よりも膀胱に高い分布を示すことが知られている。

以上のようにラット膀胱に DMA(V) を膀胱内投与したところ、DMA(V) 自体による尿路上皮傷害および増殖促進作用が確認され、NAC はそれらの反応を促進することが示された。DMA(V) に対する NAC の増悪作用については、2つの可能性が考えられた。第一に NAC が酸化促進剤として作用する可能性、第二に NAC が DMA(V) から反応性代謝産物の生成を促進する可能性である。膀胱における DMA(V) の作用機序におけるこの抗酸化剤の役割を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

小 括

本章では、雌性ラットの膀胱にヒ素の主要な尿中代謝物である DMA(V) を膀胱内投与したところ、DMA(V) 自体にも 3-NT の増加を伴う尿路上皮傷害および引き続く細胞増殖活性の亢進を誘発するポテンシャルがあることが示唆された。抗酸化剤 NAC 投与が DMA(V) によるこれらの影響を抑制するか否かを検討したところ、DMA(V) による尿路上皮傷害および増殖に対して NAC は抗酸化作用ではなく、酸化促進作用を示すことが示唆された。DMA(V) に対する NAC の増悪作用の機序については、NAC が酸化促進剤として作用する可能性あるいは NAC が DMA(V) から反応性代謝産物の生成を促進する可能性が考えられた。

第2章 クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤のラットにおける一般毒性の検索

緒 言

第2章では、ヒ素を含む木材防腐剤であるCCAに着目した。CCAは害虫や菌類から木材製品を保護するために家屋の土台部分、公共の木製遊具、花壇、デッキやフェンスなどの屋外住宅構造物に長い間広く使用されてきた [Morais et al., 2021]。しかし、ヒ素を含むCCAは人体への影響が懸念されるため、米国環境保護庁は2003年に、「CCA製造業者は家庭用のCCA処理木材の製造を自主的に中止し、新しい代替木材防腐剤を使用した木材製品を消費者に提供することを決定した」と発表し、2004年以降、米国ではCCA処理された木材は住宅周辺外構部材として使用されなくなった [岩崎, 2008; Katz and Salem, 2005; US EPA]。日本では、1960年代初頭に導入されて以来CCA処理木材の市場は急速に拡大し、1980年代半ばから10年間にわたって木材防腐剤の市場シェアを席卷したが、1997年1月に工場からのヒ素の排水基準が0.3 mg/Lから0.1 mg/Lに改定されたのを契機に、全国の製造工場で一斉にCCAの使用が断念され、新規保存剤に転換した [岩崎, 2003]。他の多くの国でも、木材防腐剤としてのCCAの使用は制限されている [Englot, 2006]。しかしながら、CCA処理木材を使用した構造物はまだ多く残存し、CCAは処理木材中に最大10-40年間残存する可能性があるため [McQueen and Stevens, 1998]、将来にわたって、CCA処理木材から流出するヒ素やクロムにヒトが曝露される可能性が残っている。CCAに含まれる金属は通常、酸化物の形状で存在し、木材内部に加圧注入処理されることで使用される [Hingston et al., 2001]。注入されたCCAは木材に強固に結合するため、当初、毒性のリスクは低いと考えられていたが、実際には土壌、地下水、大気中に放出される可能性があることが指摘されている [Dickey, 2003; Kim et al., 2007; Rahman et al., 2004]。例えば、降雨にさらされたCCA処理デッキを用いた実験では、ヒ素の高い流出が確認され、3年間のモニタリングでCCA処理木材に当初含まれていた量から13%のヒ素が溶出し、CCA処理デッキが降雨にさらされると、流出および土壌中のヒ素濃度が高くなることが示された [Shibata et al., 2007]。また、CCA処理された遊具の下の表面土壌を設置後16

年目と 26 年目で比較すると、10 年間でヒ素の濃度が上昇しており、遊具が子供への高い曝露源となっている可能性がある [Deramos et al., 2019]。

CCA の環境曝露によるヒトへの毒性は、一般的な環境下ではヒトが曝露されるレベルは極めて低いと考えられる。しかし、CCA への偶発的な曝露がヒトの健康に影響を与える可能性を示唆するデータもいくつか報告されている。Peters らは、暖房のために小型ストーブで CCA 処理木材を燃やしたある家族が、3 年間にわたり、特に冬期に神経症状や内科的疾患を繰り返したと報告している [Peters et al., 1984]。また、同じ著者らは、木材工場の労働者が CCA 処理木材の燃焼や製材により、血液疾患、皮膚疾患、神経心理学的疾患を発症したことを報告している [Peters et al., 1986]。加えて東日本大震災のような自然災害は、CCA のヒトへの曝露を増加させる可能性がある。2011 年 3 月 11 日の地震とそれに続く津波により、CCA 処理木材を含む大量の木材ガレキが発生し、ヒ素、クロム、銅などの CCA 中の元素が環境中に拡散した可能性が指摘されている [Ohgami et al., 2015; Shibata et al., 2012]。東日本大震災後の現地調査において、回収した 233 本の木材破片の元素を測定したところ、クロム $10,000 \pm 8869$ mg/kg、銅 2064 ± 1319 mg/kg、ヒ素 3380 ± 2328 mg/kg を含む CCA 処理木材が 5 本 (2.1%) 検出された [Ohgami et al., 2015]。環境省が実施した震災被災地における土壌の環境モニタリング調査では、宮城県内の 70 地点で調査した結果、CCA 処理木材由来かどうかは不明であるが、25 地点 (35.7%) で土壌溶出基準 (0.01 mg/L) を超えるヒ素の測定値 (0.011~0.15 mg/L) が検出された [環境省, 2012]。さらに、ハリケーン・カトリーナで発生した木材ガレキのヒ素の測定結果についても、ニューオーリンズで同様の報告がある [Dubey et al., 2007]。これらの基準値を超えるヒ素が直ちに人体に危害を及ぼすものではないが、CCA の偶発的な高濃度曝露に対するリスク評価のための情報を得ることは極めて重要である。

CCA に含まれる 3 つの化学物質はそれぞれ個別に消化器系、呼吸器系、泌尿器系、神経系、循環器系、免疫系および皮膚に毒性を示すが [Abernathy et al., 1999; Frantzen,

1998; Matos et al., 2013; Ryan et al., 2000; Schäfer et al., 1999], CCA 全体としての毒性は、ラットでの急性毒性および催奇形性が報告されているものの [Mason and Edwards, 1989; Mason et al., 1989], 基本的な毒性情報はまだまだ乏しい。以前、私が所属する研究グループは CCA の免疫系に対する影響、特にアレルギーに関して、局所リンパ節試験法を用いて CCA が皮膚感作性を有することを報告した [Fukuyama et al., 2008]。本章では、CCA のリスク評価に有用な基礎的な毒性情報を提供するため、偶発的な高用量での CCA 曝露を想定し、最大耐量でのラット 4 週間強制経口投与試験を実施し、CCA の一般毒性を検討した。

材料および方法

化学物質

市販の CCA にはヒ素，クロムおよび銅の混合比が異なる 3 種類が存在し，タイプ A，B，C と呼ばれている [Hingston et al., 2001]。本実験では，酸化ヒ素 (As_2O_5)，酸化クロム (CrO_3)，および酸化銅 (CuO) をそれぞれ 45.1%，35.3%，および 19.6% 含む CCA タイプ B を使用した [American Wood Preservers Association, 2005]。タイプ B は広く使用されており，3 種類の中で最もヒ素の含有量が多いためこれを選択した。酸化ヒ素は岸田化学 (大阪) から購入し，酸化クロムおよび酸化銅は関東化学 (東京) から購入した。投与液の調製は，まず酸化ヒ素および酸化クロムを注射用水 (株式会社大塚製薬工場，徳島) に溶解し，これに酸化銅を懸濁させる方法で行った。

供試動物

6 週齢の雌雄 Wistar Hannover SPF (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) ラットを日本クレア株式会社から購入した。本系統については，毒性評価に重要な背景データが豊富であるためこれを選択した。動物は温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ，湿度 $50 \pm 20\%$ ，換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエア法)，照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯，午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。1 ケージに 2 匹のラットを収容し，飼料は市販の MF 粉末 (オリエンタル酵母工業株式会社) を与え，水道水は自由に摂取させた。すべての動物は日本実験動物学会発行の「動物実験指針」[JALAS, 1987] および残留農薬研究所の動物実験倫理規程に従って取り扱われた。

実験デザイン

9 ないし 10 日間の検疫・馴化期間後，健康な動物を雌雄それぞれ各群 10 匹の 4 群に群分けした。被験物質の投与は，7 週齢で開始した。用量設定試験の結果に基づき，CCA の投与用量は 0，8，40 および 80 mg/kg/日とし，胃ゾンデを用い，1 日 1 回，週

7日間、4週間にわたり連続強制経口投与した。

血液中の総クロム，銅，ヒ素量の分析

4週間投与終了後，対照群の雌雄各1匹およびCCA投与群の雌雄各3匹から血液を採取し，血漿サンプルを用いて，誘導結合プラズマ質量分析法（Agilent 7500ce ICP-MS，Agilent Technologies，サンタクララ，カリフォルニア州，米国）および水素化物発生原子吸光光度法（Spectr AA220，Varian，パロアルト，カリフォルニア州，米国）で総クロム，銅，ヒ素のレベルを測定した。分析には，内部標準としてイットリウムを使用した。

臨床症状観察，体重および摂餌量測定

試験期間中，すべての動物について毎日臨床症状を観察し，体重と摂餌量を毎週測定した。

眼科学的検査，尿検査，血液および血液生化学的検査

投与4週に全生存動物について，ハロゲン検眼鏡（株式会社ナイツ，東京）による観察を含む眼科学的検査および尿検査を実施した [Kojima et al., 2009]。尿検査では，各検査動物を個体別採尿ケージに入れて自然排泄により得られた新鮮尿を用いて，尿比重，ブドウ糖，ビリルビン，ケトン体，潜血，pH，蛋白質，ウロビリノーゲンおよび尿沈渣の項目について，また動物を同ケージに一晩入れて蓄積尿を採取し，尿色と尿量を検査した。尿検査の前に絶食は行わず，ラットは尿サンプリングの間，自由に餌と水を摂取した。4週間投与終了後に全生存動物について，血液および血液生化学的検査を，既報の方法に従い実施した [Kojima et al., 2009]。血液サンプルは，一晩絶食させた後，ジエチルエーテル麻酔下で各動物の後大静脈から採取した。ジエチルエーテル麻酔は，残留農薬研究所の動物実験倫理規程において，2011年以降，推奨され

ていないが、本章における試験は規定改訂前に実施された。

臓器重量測定および病理学的検査

4週間投与終了後の剖検で、全生存動物について、脳、下垂体、甲状腺、心臓、肺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、唾液腺、精巣、精巣上体、前立腺、精囊／凝固腺（SV／CG）、卵巣、子宮の絶対重量を測定し、最終体重から比体重値（相対重量）を算出した。全身臓器は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、常法に従ってパラフィン包埋、H&E染色を施し、病理組織学的検査を行った。また腎臓において観察された褐色色素を同定するため、シュモール反応とベルリンブルー染色を実施した。

酸化ストレス測定

4週間投与終了後、各群6匹から採取した肝臓試料を用いて、8-OHdG量を測定した。過酸化脂質含量の測定は、全生存動物から得た肝臓を用いて実施した。測定は以前に報告された方法に従い実施した [Harada et al., 2003]。

統計解析

すべてのデータは、平均値±標準偏差で表した。体重、摂餌量、尿検査、血液および血液生化学的検査項目、臓器重量、酸化ストレスに関するデータは、Dunnettの多重比較検定法（両側検定）を用いて対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。臨床症状、眼科学的所見、病理学的所見の発生頻度の評価には、フィッシャーの正確確率検定（片側検定）を用いた。有意水準は5%以下に設定した。

結 果

血液中の総クロム, 銅, ヒ素量の分析

CCA 投与群では, すべての用量でクロムおよびヒ素が検出されたが, 対照群では検出されなかった (Figure 5A, B)。血漿中では, ヒ素はクロムの約 10 倍高い値で検出された。CCA 投与群の血漿中の銅レベルは, 対照群と同等であった。

臨床症状観察, 体重および摂餌量測定

投与期間中, 80 mg/kg/日を投与した雄ラットおよび 40 mg/kg/日以上を投与した雌ラットにおいて, 鎮静, 流涎, 腹部または外陰部の被毛の汚れが認められた (Table 2)。80 mg/kg/日群の雄 1 匹は, 投与 1 週で死亡したが, 死因は不明であった。80 mg/kg/日群の雄の体重は, 投与期間を通じて有意な低値を示し, 40 mg/kg/日群の雄でも投与 4 週に有意な低値がみられた (Figure 6)。これらの群では, 体重増加量の減少に一致して, 摂餌量の減少が顕著であった (Figure 7A)。一方, 80 および 40 mg/kg/日群の雌では, 投与初期に摂餌量の減少がみられたが (Figure 7B), 投与期間を通じて体重の推移は対照群と同様であった (Figure 6)。

眼科学的検査, 尿検査

眼科学的検査では, 雌雄いずれの投与群においても, 投与に関連した変化は認められなかった。尿検査では, 80 mg/kg/日群の雌雄で有意な尿比重の低値がみられた (雄, 対照群 1.033 ± 0.011 , 高用量群 1.018 ± 0.012 , $p \leq 0.05$; 雌, 対照群 1.038 ± 0.019 , 高用量群 1.016 ± 0.009 , $p \leq 0.01$)。この変化には, 尿タンパク, ケトン体の減少, 尿量の増加 (雄, 対照群 13.4 ± 3.1 mL/日, 高用量群 23.0 ± 13.7 mL/日; 雌, 対照群 10.4 ± 5.9 mL/日, 高用量群 25.1 ± 15.2 mL/日, $p \leq 0.01$) を伴っていた。尿タンパクの有意な低値は, 40 および 8 mg/kg/日群の雌でも観察された。雌雄いずれの投与群においても, 尿 pH に有意な変化は認められなかった。

血液学的検査

Table 3, Figure 8 および 9 に血液学的検査の結果を示す。80 mg/kg/日群の雌雄および 40 mg/kg/日群の雌では、ヘモグロビン濃度 (Hb) , 平均赤血球血色素量 (MCH) および平均赤血球血色素濃度 (MCHC) が有意に低下した (Table 3, Figure 8A, B) 。 Hb の低下は、80 mg/kg/日群の雌雄で、全赤血球 (CHCMt) あるいは成熟赤血球 (CHCMm) の細胞性ヘモグロビン濃度平均の有意な低下でも示された (Figure 8C, D) 。また 80 mg/kg/日群の雌雄および 40 mg/kg/日群の雌では、全赤血球 (MCVt) および成熟赤血球 (MCVm) の平均赤血球容積の有意な減少あるいは減少傾向が観察された (Figure 8E, F) 。80 mg/kg/日群の雌では、ヘマトクリット値 (Ht) の有意な減少もみられた。さらに 80 および 40 mg/kg/日群の雌では、網状赤血球数 (Retics) が対照群に比べ有意に増加し、80 mg/kg/日群では網状赤血球における平均赤血球容積 (MCVr) と網状赤血球あたりのヘモグロビン含量 (Chr) が雌雄で有意に減少した (Figure 9A-D) 。以上の結果から CCA 投与によりヘモグロビン合成障害に起因する小球性・低色素性貧血が誘発されたことが示唆された。これらの変化と一致して、80 mg/kg/日群の雌雄および 40 mg/kg/日群の雌では、赤血球容積分布幅 (RDW) あるいは赤血球血色素濃度分布幅 (HDW) の有意な増加が認められた (Table 3) 。80 および 40 mg/kg/日群では、雌雄で総白血球数およびリンパ球数の有意な増加がみられ、80 mg/kg/日群の雄で好中球数、雌雄で単球数の有意な増加が認められ、同群の雌では好酸球数が有意に減少した (Table 3) 。40 mg/kg/日群の雄および 8 mg/kg/日群の雌では、一部のパラメータに有意な変動がみられたが、貧血 (Ht, Hb および赤血球数の減少) は認められず、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

血液生化学的検査

Table 4 に血液生化学的検査の結果を示す。80 mg/kg/日群の雄あるいは雌で γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP) , 総コレステロール (T.Chol) , 血中尿素窒素

(BUN) , トリグリセライド (TG) および総ビリルビン (T.Bil) が有意に増加または増加傾向を示し, 肝毒性を示す GGTP および T.Bil は雄より雌で高値であった。また, 統計学的有意差は認められなかったが, 80 mg/kg/日群の雌雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) が高値を示した。これら AST および ALT の変動は, 極めて高値を示した雄および雌 1 匹 (AST, 雄 267 および雌 400 U/L ; ALT, 雄 203 および雌 87 U/L) に依存してみられ, これらの動物では対応する病理組織学的変化 (肝臓の中等度の限局性肝細胞壊死および胆管過形成) を伴っていた。これらは雌雄各 1 匹のみの変化であったが, 観察された組織学的変化の程度が, 通常同週齢の対照群に観察される程度を明らかに超えており, CCA 投与に起因した変化であると考えられた。80 mg/kg/日群の雌雄では, 総蛋白 (TP) , アルブミン (Alb) およびグロブリン (Glob) の有意な低下がみられ, アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio) の増加も認められた。同様のタンパクに関する所見は, 40 mg/kg/日群の雌でも観察された。血糖 (Gluc) は 80 および 40 mg/kg/日群の雄で有意な減少, 80 mg/kg/日群の雌で有意な増加が認められた。電解質では, 80 および 40 mg/kg/日群の雌で, 無機リン (P) およびカリウム (K) の有意な増加および塩素 (Cl) の有意な減少がみられ, 80 mg/kg/日群の雄では P の有意な増加が認められた。その他の有意な変化は偶発的なものであり, 毒性学的意義はないと考えられた。

臓器重量測定および病理学的検査

4 週間投与終了後の剖検では, 80 および 40 mg/kg/日群の雌雄で, 十二指腸の腔拡張と盲腸の膨満が認められた。消化管では, 80, 40 あるいは 8 mg/kg/日群の雌雄で, 病理組織学的に前胃の角化亢進, 小腸の粘膜上皮細胞過形成, 直腸の杯細胞肥大が観察された (Table 5, Figure 10A-D) 。角化亢進は, 主に前胃と腺胃の境界部に認められた。小腸の粘膜上皮細胞過形成は絨毛長の増加に対応し, その変化は十二指腸, 空腸, 回腸でほぼ同等であった。陰窩の深さには明らかな差は認められなかった。消化

管病変と同時に、腸間膜リンパ節に洞内赤血球増加を認め、消化管にびらん、潰瘍、炎症は観察されなかったが、出血が起こっていた可能性が示唆された。臓器重量測定 (Table 6) では、80 および 40 mg/kg/日群の雌で、肝臓および腎臓の絶対および相対重量が有意に増加し、病理組織学的には、それぞれび慢性肝細胞肥大および近位尿細管褐色色素沈着が観察された (Figure 11A-D)。80 mg/kg/日群の雄では、肝臓および腎臓の相対重量が有意に増加し、腎臓には雌と同じ病変が認められた。近位尿細管に沈着した褐色色素はシュモール反応に陽性、ベルリンブルー染色に陰性であり、リポフスチンであると考えられた (Figure 11C, D)。膀胱には、雌雄いずれの投与群においても、投与に関連した変化はみられなかった。80 および 40 mg/kg/日群の雌雄で胸腺の絶対および相対重量は有意に減少し、同様の変化は、8 mg/kg/日群の雌でも観察された。病理組織学的に 80 mg/kg/日群の雄で胸腺の皮質萎縮が少数認められた。また、80 および 40 mg/kg/日群の雌では、脳および下垂体の絶対および相対重量が有意に減少したが、対応する病理組織学的所見は認められなかった。その他、雄でみられた臓器重量の変動は、体重増加抑制に伴う二次的变化と考えられた。

酸化ストレス測定

80 mg/kg/日群の雌では、肝臓における 8-OHdG レベルが有意に増加し、80 および 40 mg/kg/日群の雄では、有意に減少した (Figure 12A)。また、80 mg/kg/日群の雄では過酸化脂質含量が低値を示したが、統計学的有意差はみられなかった (Figure 12B)。

考 察

本章では、CCA のリスク評価に有用な基礎的な毒性情報を得る目的で、ラットを用い 4 週間反復強制経口投与試験を実施したところ、鎮静および流涎といった特異的な臨床症状がみられ、小球性低色素性貧血、血糖および脂質の変動、肝臓、腎臓、消化管および胸腺への毒性影響が誘発されることが明らかとなった。投与 1 週に 80 mg/kg/日群の雄 1 匹が死亡し、摂餌量の低下を伴う体重減少も 80 および 40 mg/kg/日群の雄のみで認められたため、一般毒性影響は雌より雄で重篤であった。しかし、毒性プロファイルは雌雄ともに類似しており、これらの変化は、CCA に含まれる個々の金属の毒性またはそれらの複合作用により誘発されたと考えられた。血漿中の総クロム、銅、ヒ素量の分析を実施したところ、ヒ素およびクロムの濃度は用量相関性に増加し、特にヒ素はクロムの約 10 倍高い値が検出された。よって、ヒ素は CCA による全身毒性作用に大きく寄与していることが示唆された。As(V) または As(III) の経口投与により、これら iAs およびそのメチル化代謝物は、肝臓、腎臓および他の臓器へ分布する [Hughes et al., 2003; Kenyon et al., 2005; Rodríguez et al., 2005]。第 1 章でも述べたように、吸収された As(V) は、還元および酸化メチル化され、最終的に最も活性の高いジメチル化ヒ素 DMA(III) および DMA(V) に代謝される [Tapio and Grosche, 2006; Yamanaka et al., 2004]。ヒ素のメチル化過程には種差がみられることが知られており、ヒトは他の動物種に比べ比較的多くの MMA(V) を尿中に排泄することから、ヒ素のメチル化速度が遅いことが示唆され、このことが他の動物種よりヒ素の毒性に感受性が高い理由の一つと考えられている [Hughes, 2006]。ラットはヒ素を DMA にメチル化する効率が非常に高いが、生成された DMA の大部分は赤血球に保持されるため、尿中への排泄速度が遅い [Vahter, 2002]。このような代謝過程の種差は、被験物質の毒性作用をヒトに外挿する際に注意する必要がある。クロムの場合、Cr(VI) の還元により活性の高い中間体 Cr(V) および Cr(IV) が生成され、最終的に熱力学的に安定で毒性の低い Cr(III) が得られる [Carter, 1995; Salnikow and Zhitkovich, 2008]。

ヒ素およびクロムは、代謝される過程で酸化ストレスを発生させ、DNA やタンパク質の損傷、細胞応答を引き起こす。CCA 曝露後の肝臓における 8-OHdG レベルおよび過酸化脂質含量を測定したところ、雌の 80 mg/kg/日群で 8-OHdG レベルの有意な増加が示された。ヒ素またはクロムを曝露したラットでは、肝臓において酸化ストレスが誘導されることが知られている [Bashir et al., 2006; Bhadauria and Flora, 2007; Patlolla et al., 2009; Scibior and Zaporowska, 2007; Wang et al., 2006]。また抗酸化剤はマウス [Santra et al., 2007] およびラット [Abu El-Saad et al., 2016; Gupta and Flora, 2006] におけるヒ素誘発酸化ストレスおよび肝障害を抑制するという報告もある。本研究の血液生化学的検査（タンパクの低値、GGTP, T.Bil, AST および ALT の高値）および病理学的検査（肝重量増加およびび慢性肝細胞肥大）の結果から示唆される肝障害は、前述の一般毒性影響とは異なり、雄より雌で強い傾向があり、CCA による肝障害の性差には、酸化ストレスの違いが関与している可能性が疑われた。そこで次章では、分子病理学的手法を用いた詳細な肝毒性メカニズム解析を行うこととした。一方、80 および 40 mg/kg/日群の雄では、8-OHdG レベルが有意に減少し、80 mg/kg/日群の雄では過酸化脂質含量も低値を示した。これら酸化ストレスレベルの減少には、Cr(VI) 処理ラットで報告されたように、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) やカタラーゼなど他の抗酸化遺伝子の適応的誘導が関連している可能性が推測された [Patlolla et al., 2009]。

血液学的検査では、80 mg/kg/日群の雌雄、40 mg/kg/日群の雌で Hb, Ht, MCVt, MCH あるいは MCHC が低下し、小球性・低色素性貧血がみられた。低下した MCVm および MCVr は、成熟赤血球および網状赤血球が小型であることを示し、CHCM および CHr の評価により、ヘモグロビン量が少ない小型成熟赤血球および小型網状赤血球が末梢血中に循環していることが示された。CHCM は、個々の赤血球から直接測定した Hb の平均値で、Ht や Hb の測定誤差に影響を受けにくいパラメータとして知られる [Saw and Tham, 1988]。本研究では、CHCMm と CHr の値が CCA 投与により減少した

ことが明確に示され、CCA がヘモグロビン合成および赤血球の成熟を阻害した可能性が示唆された。CHr は網状赤血球ヘモグロビンへの鉄の取り込みを直接測定しており、造血過程での鉄欠乏を示す鋭敏な指標となる [Goodnough et al., 2000; Thomas and Thomas, 2002; Ullrich et al., 2005]。よって、ヘモグロビン合成阻害は、鉄欠乏により引き起こされた可能性が疑われた。Cr(VI) の 13 週間飲水投与試験では、ラットに鉄欠乏による小球性貧血が誘発される [Suh et al., 2014]。この変化には、①小腸内腔における Cr(VI) による鉄イオン酸化 (Fe^{2+} から Fe^{3+}) の増加、②十二指腸におけるトランスポーター、2 価金属トランスポーター1 (DMT1) およびトランスフェリン受容体 1 の発現上昇、さらに③鉄吸収およびヘムへの鉄結合を阻害する赤血球への Cr(VI) の取り込みが深く関連している。近年、腸管での鉄吸収の分子機構が解明され、DMT1 がトランスフェリンおよび非トランスフェリンからの鉄吸収に重要な役割を果たすこと、その変異体では腸管細胞での鉄吸収が低下して小球性低色素性貧血を呈することが明らかになった [Canonne-Hergaux et al., 2001; Fleming et al., 1998]。これらの報告は、後述する病理組織学的検査結果で示されるように、CCA のうちクロムが小腸の機能障害を通じて鉄欠乏性貧血を誘発した可能性を強く示唆するものであった。また、DMT1 が鉄や銅などの金属の輸送体として機能していることから [Wood and Han, 1998]、CCA の経口投与による銅の過剰曝露も小腸での鉄輸送を阻害した可能性があった。一方、鉄欠乏の最も一般的な原因は失血である。後述するように、本研究では消化管に様々な病理組織学的所見が認められ、消化管からの出血を示唆する腸間膜リンパ節における洞内赤血球増加（血液吸収像）が確認された。特に刺激性物質である CCA を経口投与したため、前胃は出血源となり得る。したがって、鉄欠乏性貧血の原因には出血による鉄の喪失が関与している可能性もあったが、貧血が認められた 40 mg/kg/日群の雌では、前胃に病理組織学的変化は認められず、消化管からの出血は CCA によりみられた鉄欠乏性貧血の主因ではないと推察された。

消化器系への影響は、病理組織学的検査において明確に示され、主にクロムに起因

するものと考えられた。クロムは発がん性物質であり、経口曝露ではラットの口腔、マウスの小腸をそれぞれ標的臓器としている [Stout et al., 2009]。マウスの小腸発がんにおいて、細胞毒性に対する再生性過形成は初期のキーイベントであると考えられている [Haney., 2015]。ラットの 13 週間試験でも、粘膜絨毛の萎縮/鈍化、粘膜上皮の単細胞壊死、粘膜固有層への組織球の浸潤に関連し、陰窩上皮過形成が観察された [Cullen et al., 2016]。絨毛の壊死とそれに続く絨毛の萎縮は、クロムの毒性によって絨毛上皮細胞が失われ、その後陰窩において代償的に再生性過形成が起こることを示唆した。この仮説は、放射光 X 線蛍光顕微鏡を用いてクロムが絨毛に分布しているが、陰窩には分布していないという知見によって裏付けられている [Thompson et al., 2015]。また、トキシコゲノミクス解析により、十二指腸の変化が酸化ストレス、細胞死、免疫反応、細胞増殖に関わる遺伝子発現と関連することが示された [Kopeck et al., 2012]。本研究では、病理組織学的検査において絨毛の壊死や陰窩上皮の過形成は明らかではなかったことから、CCA 投与により誘発された変化は、上記クロムの 13 週間試験で認められたものと比較して軽微であったことが示唆され、この差は試験デザイン、投与量、投与期間に依存したと考えられた。前胃の角化亢進および直腸の杯細胞肥大は、検索した限りにおいて、クロムの影響として報告されていない。前胃の角化亢進は、クロムの刺激性によりラットの口腔粘膜および舌に同様の影響がみられることとも一致しており [Stout et al., 2009]、前胃粘膜の保護作用と考えられた。直腸の杯細胞肥大の毒性学的意義は不明であるが、これもクロムの刺激性に関連して粘膜を粘液で保護する防衛反応である可能性があった。また、血液検査における白血球数の変化や腸間膜リンパ節における洞内赤血球増加は、CCA による上記の消化管病変との関連が疑われた。

CCA 投与による腎機能障害は、尿検査、血液生化学的検査（BUN の増加および電解質の変動）、臓器重量測定および病理組織学的検査の結果から示唆された。過去の報告から、CCA による腎毒性はクロムとヒ素によって引き起こされた可能性が考え

られ、その毒性発現メカニズムには抗酸化反応の破断が関与したかもしれない [Matos et al., 2013]。ヒトの症例報告では、ステンレス鋼の切断工として9年間働き、その間クロムを含む煙に曝露された46歳の男性は、高い血漿クロム濃度を伴う慢性間質性腎症を示した [Petersen et al., 1994]。ラットにCr(VI)を単回投与したところ、糸球体ろ過量の減少、近位および遠位尿細管機能障害を含む腎毒性が発現し、その一部は α -トコフェノール補給で抑制されたことから、Cr(VI)による酸化ストレスが関与していることが示唆された [Arreola-Mendoza et al., 2006]。これに一致して、Cr(VI)の単回投与後のラットの腎臓では、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン還元酵素およびカタラーゼ活性の減少による腎臓の抗酸化システムの破断が示されている [Pedraza-Chaverri et al., 2005]。ヒ素による腎毒性にも酸化ストレスが関与することが、ラット [Nandi et al., 2005; 2006] およびマウス [Kimura et al., 2005] で報告されている。本章における実験でも、近位尿細管におけるリポフスチン沈着が観察され、細胞内の脂質過酸化が亢進した状態である可能性が示唆され、病変の形成には酸化ストレスの関与が疑われた。ヒ素 [Kimura et al., 2005] およびクロム [Pedraza-Chaverri et al., 2005] の皮下投与の実験では、近位尿細管の壊死を含む重度の変化が報告されているが、本章における実験では、リポフスチン沈着が観察されたのみであり、実験条件により腎毒性の結果に差が生じることが示唆された。

以上のように、CCAの高用量曝露は、血液、肝臓、腎臓および消化管を含む複数の臓器に毒性を示すことが明らかとなった。これらの毒性は、それぞれの金属やその複合作用によるとみられ、作用機序には、特に雌においてヒ素やクロムによる酸化ストレスが関与している可能性が高いと考えられた。

小 括

第2章では、ヒ素を含む木材防腐剤であるCCAをラットに4週間曝露し、その一般毒性を明らかにした。CCAを投与したラットの血漿からは、ヒ素およびクロムが用量相関的に検出され、特にヒ素はクロムの約10倍のレベルで検出された。血漿中の銅レベルは、対照群と同等であった。CCA投与群の雌雄では、鎮静および流涎が認められ、雄では体重増加抑制がみられた。臨床病理学的には、雌雄で小球性低色素性貧血、血糖および脂質の変動、肝および腎機能障害が観察された。病理組織学的には、雌雄で前胃の角化亢進、小腸の粘膜上皮過形成、直腸の杯細胞肥大、腎臓の近位尿管リポフスチン沈着がみられた。雌では、8-OHdGの増加を伴うび慢性肝細胞肥大が観察された。胸腺重量は雌雄で減少し、雄では胸腺の皮質萎縮が少数例に認められた。これらの結果から、CCAはヒ素およびクロムの毒性により、主に血液、肝臓、腎臓、消化管に影響を及ぼすことが示唆された。

第3章 クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤による肝毒性の発現機序解明

緒 言

CCA は、ヒ素、クロム、銅を含むため、その生物学的影響は非常に複雑である。これらの成分は、消化管から吸収され肝臓に分布し、肝不全を引き起こす危険性がある [Morais et al., 2021; Katz et al., 2005]。ヒ素、クロム、銅それぞれの毒性評価は数多く報告されているが、CCA 全体としての毒性評価の報告はほとんどないため、第 2 章ではラットを用いて CCA の 4 週間反復毒性を検索した。その結果、CCA は主に小球性低色素性貧血、血糖および脂質の変動、肝臓、腎臓および消化管の障害を引き起こし、血漿中のヒ素濃度はクロムより 10 倍高いことが明らかになった。肝臓では、タンパクの低値、GGTP, T.Bil, AST および ALT の高値および肝細胞肥大を認め、これらの影響は雄より雌で顕著であった。このような CCA による肝障害の性差には、8-OHdG が雌で増加し、雄で減少したように酸化ストレスレベルの違いが関与している可能性が疑われたものの、CCA の肝毒性メカニズムは依然として不明なままであった。肝臓はヒ素のメチル化代謝の主要な臓器であり [Thomas et al., 2001; Watanabe and Hirano, 2013]、ヒ素による発がんの標的臓器である [Tokar et al., 2010]。ヒ素に曝露されると抗酸化酵素が減少し、肝臓に酸化ストレスが発生する [Xu et al., 2017]。本研究では、肝毒性メカニズムを解明するために、CCA 投与により顕著に肝毒性が誘発された雌ラットを対象として、肝細胞の細胞増殖とアポトーシスのバランスを検索し、抗酸化および DNA メチル化にかかわる遺伝子を含めた網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイと定量的 RT-PCR を用いて検討した。

材料および方法

組織サンプル

第2章で実施したCCAの4週間反復経口投与試験において採取した肝臓を用いた。0または80 mg/kg/日群の雌ラットから得た肝臓（中葉）を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定，常法に従ってパラフィン切片を作製し，免疫組織化学染色および terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling（TUNEL）に使用した。さらに，0，8，40 および 80 mg/kg/日群の雌あるいは雄ラットから得た肝臓（中葉以外の葉）の凍結試料を，ヒ素の分析，マイクロアレイ解析，定量 RT-PCR および DNA メチル化解析に使用した。

肝臓中のヒ素の分析

CCA 80 mg/kg/日群の雌雄各 3 匹の凍結肝臓試料を用い，高速液体クロマトグラフ（Agilent 1200 series, Agilent Technologies）および誘導結合プラズマ質量分析計（Agilent 7500ce ICP-MS, Agilent Technologies）で，As(V)，As(III)，モノメチル化ヒ素（MMA），ジメチル化ヒ素（DMA），およびトリメチル化ヒ素（TMA）の5種のヒ素を測定した。

免疫組織化学的検索，TUNEL および陽性反応の解析

免疫組織化学的検索は，第1章と同様の手順で行った。0 および 80 mg/kg/日群の動物番号の小さい順に雌各 6 匹を選択し，得られたパラフィン切片を用い，増殖細胞核抗原（PCNA）（100 倍；M0879；Dako）および GSH（100 倍；ab19534；Abcam，マサチューセッツ州，米国）に対するモノクローナル抗体で免疫組織化学染色を行った。酸化ストレス下で GSH は，S-グルタチオン化，すなわち反応性タンパク質のシステイン残基に GSH を結合させて，タンパクを酸化的損傷から保護することを介して，タンパク質の酸化還元制御に重要な役割を果たす [Giustarini et al., 2017]。そこで，抗

GSH 抗体を用いた免疫組織化学的手法により、肝臓の S-グルタチオン化タンパク質 (PSSG) を可視化した。切片は前処理として、0.1M クエン酸緩衝液 (pH6.0) で、121°C、5 分間オートクレーブ処理し、抗原賦活化を行った。TUNEL については、免疫組織化学染色で選択した同じ 6 匹の雌から得たパラフィン切片を、Apoptag peroxidase in situ apoptosis detection kit (Merck Millipore, マサチューセッツ州, 米国) を用いて、プロトコルに従い TUNEL 染色した。PCNA, TUNEL 染色ともに十二指腸を陽性対照とし、これらの染色から陽性反応を得た。陰性対照は一次抗体の代わりにリン酸緩衝生理食塩水を用いて確認した。PCNA または TUNEL 陽性肝細胞率を測定するために、既報 [Harada et al., 2003] に従い、1000 個の肝細胞を光学顕微鏡下において手動でカウントした。PCNA LI または TUNEL 標識率は、標識された核の数をカウントされた核の総数 (1000 個) で割ることにより算出し、結果はパーセントで表した。また PCNA と TUNEL の比率を算出した。GSH 染色標本は、肝小葉の陽性領域の広がりによって半定量的にグレード付けした (陽性領域: 軽度, 10%未満; 中等度, 10~50%; 重度, 50%以上)。

RNA と DNA の抽出

RNeasy Mini Kit (キアゲン株式会社, 東京) および DNeasy Tissue Kit (キアゲン株式会社) を用いて、雌の凍結肝臓サンプルから Total RNA および DNA をそれぞれ抽出した。RNA と DNA の濃度は、分光光度計 (GeneQuant pro; GE ヘルスケア・ジャパン, 東京) を用いて測定した。これらの核酸試料は、使用時まで -70°C で保存した。

マイクロアレイ解析

雌の肝臓を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイ解析は、0 mg/kg/日群と 80 mg/kg/日群の比較のため、3 枚のアレイスライドを用いた。スライド間のスケール差を調整するため、既報 [Yang et al., 2002] に従って、0 mg/kg/日群のサンプル

からプールしたコントロール RNA サンプルを調製し、各サンプルのリファレンスとして使用した。プールした 0 mg/kg/日の RNA サンプルから Cyanine 3 (Cy3) 標識リファレンスプローブを、0 および 80 mg/kg/日群の RNA から Cyanine 5 (Cy5) 標識サンプルプローブを蛍光ダイレクトラベルキット (GE ヘルスケアジャパン) を用いて合成し、サンプルプローブを作成した。Cy3 標識リファレンスプローブと Cy5 標識サンプルプローブを混合し、毒性発現に関連する約 2000 遺伝子を含む cDNA マイクロアレイ (IntelliGene, Rat Toxicology CHIP, タカラバイオ株式会社, 滋賀) にハイブリダイズさせた。マイクロアレイスライドは、マイクロアレイスキャナー (ScanArray lite; Perkin-Elmer Bioscience Japan, 東京) を用いてスキャンした。遺伝子発現解析は、以前の報告 [Yang et al., 2002] に従い、対照群と比較して 2 倍以上の変化を示した遺伝子を変動遺伝子として選択した。

定量的 RT-PCR 法によるマイクロアレイデータの検証

0, 8, 40 および 80 mg/kg/日群の全例の雌から得た肝臓サンプルを用いて、定量的 RT-PCR 法でマイクロアレイ解析データの検証を行った。マイクロアレイのデータに基づき、metallothionein 1 (*Mt1*), glutathione S-transferase alpha 2 (*Gsta2*), microsomal glutathione S-transferase 1 (*Mgst1*), cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (*Cdkn1b/p27*) および CCCTC-binding factor (*Ctcf*) の各遺伝子を選択し、測定した。またマイクロアレイの結果から、CCA 誘発肝毒性におけるグルタチオン S 転移酵素 (GST) および DNA メチル化の役割を確認するために、glutathione S-transferase alpha 3 (*Gsta3*), DNA methyltransferase 1 (*Dnmt1*) および DNA methyltransferase 3 alpha (*Dnmt3a*) の mRNA 発現レベルを追加検討した。各遺伝子に対応するプライマーおよびプローブセットはニッポンジーン (富山) から購入した。これらのセットの塩基配列を Table 7 に示す。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) を内部標準として使用し、プライマーとプローブのセットは、アプライドバイオシステムズジャパン株式会社 (東京) か

ら購入した。PCR スタンダードは、各遺伝子に対応するプライマーセットで増幅した PCR 産物から作成した。肝組織から抽出した total RNA を 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製し、調製した RNA 0.5 μg を TaqMan RT 試薬(アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)を用いて 50 μL の反応液中にて逆転写した。各遺伝子については、cDNA、プライマーセット、AmpliTaq Gold PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)を超純水(日本ミリポア株式会社, 東京)で 50 μL に調製し、サーマルサイクラー(タカラバイオ株式会社)で PCR 反応を実施した。その後、QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン株式会社)を用いて PCR 産物を精製し、分光光度計(GeneQuant pro)を用いて PCR 産物(DNA)の濃度を測定した。PCR 産物は各濃度、長さ、配列から計算して、超純水で 10 nM に調製し、これらのサンプルは使用するまでディープフリーザーで保存した。解析用サンプルは、肝臓組織から抽出した total RNA を 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製し、その 0.4 μg を TaqMan RT 試薬を用いて 40 μL の反応液中にて逆転写した。PCR スタンダードは、10 倍希釈液を調製し、連続 5 ポイント使用した。定量的リアルタイム PCR では、サンプルの cDNA あるいはスタンダード DNA の希釈液、プライマー/プローブセット、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)を超純水で 25 μL に調製し、ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)を用いて測定した。データは *Gapdh* の発現量に対する比率で示した。

メチル化 DNA 免疫沈降法および定量的 PCR

ラット *Mtl* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態を検証するため、メチル化 DNA 免疫沈降法 (MeDIP) と定量的 PCR 法を組み合わせ、メチル化 DNA を定量した。定量的 MeDIP-PCR は、0 および 80 mg/kg/日群の動物番号の小さい順に雌各 6 匹を選択し、肝臓を用いて実施した。メチル化 DNA は、Methylamp Methylated DNA Capture Kit (Epigentek Group Incorporation, ニューヨーク州, 米国)を用いて抽出した。

まず 2 μ g の DNA を Bioruptor™ (コスモ・バイオ株式会社, 東京) を用いて, 断片化した。この DNA の一部を 5-methylcytosine 抗体による免疫沈降に使用し (IP), その他をインプット DNA とした (Input)。IP と Input の試料から QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン株式会社) を用いて DNA を精製した。定量的 PCR は上記と同様に行った。CpG アイランド (CGI) は Methyl Primer Express (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) と CpGenome with the MethPrimer オンラインサービス (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) を用いて同定した。プライマーとプローブのセットは, バイオテクノロジージャパン (東京) から購入した。これらのセットの配列と転写開始点 (TSS) からの位置を Table 8 に示す。プライマーとプローブのセットは, ラット *Mtl* 遺伝子の TSS 上流約 1100bp にある non-CGI 部位 (nCGI), 1 番目の CGI (CGI1), TSS に近い 3 番目の CGI (CGI2) の DNA 配列をカバーするように 3 種類設計した。*Mtl* 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化状態は, IP と Input の比 (%) で表した。

統計解析

対照群と CCA 投与群における有意差の有無を以下のように判定した。mRNA の発現量については, Dunnett の多重比較検定法 (両側検定), PCNA LI, TUNEL 標識率, PCNA と TUNEL の比, MeDIP-PCR の結果については Student の *t* 検定または Aspin-Welch 検定 (両側検定) を用いた。GSH 免疫染色のグレードについては, Wilcoxon 順位和検定法 (両側検定) を用いた。有意水準は 5%以下に設定した。

結 果

肝臓中のヒ素の分析

ヒ素の代謝は毒性発現に重要なステップであるため [Thomas et al., 2001; Watanabe and Hirano, 2013], 80 mg/kg/日群の雌雄の肝臓試料中の As(V), As(III), MMA, DMA および TMA を測定した。その結果, DMA は As(V) に比べて雄で 5.8 倍, 雌で 3.1 倍高かった (Table 9)。DMA は雌雄ともほぼ同じ値であったが, As(V) と MMA は雌の方が雄より約 2 倍高かった。As(III) と MMA は, As(V) より低く, TMA は雌雄ともに検出されなかった。

細胞増殖およびアポトーシスの測定

肝小葉における PCNA および TUNEL 陽性肝細胞の分布は, 小葉内 (中心部, 中間帯, 周辺部) で差がなかったため, ランダムにカウントした (Figure 13A, B)。80 mg/kg/日群では, PCNA LI の平均値が対照群に比べ増加する傾向にあったが (対照群, 0.47%; 80 mg/kg/日群, 2.28%; Figure 13A-C), 統計学的有意差は検出されなかった。PCNA LI の高値は, 雌の 6 匹中 3 匹で認められた (Figure 13C)。80 mg/kg/日群の TUNEL 標識率は, 対照群に比べ減少する傾向にあった (対照群, 0.20%; 80 mg/kg/日群, 0.15%; Figure 13D)。したがって, PCNA と TUNEL の比は, 80 mg/kg/日群が対照群よりも明らかに高値であった (対照群, 2.28; 80mg/kg/日群, 14.58; Figure 13E)。PCNA と TUNEL の相関を対照群および 80 mg/kg/日群についてそれぞれ求めたところ, 相関係数は対照群および 80 mg/kg/日群でそれぞれ $r=0.714$ および 0.136 であった。この結果から, CCA 投与群では, 細胞増殖と細胞死のバランスが増殖の方向に傾いていることが示された。

GSH 免疫染色の半定量的解析

抗 GSH 抗体を用いた免疫組織化学的染色により, 肝臓の PSSG を可視化した。対

照群では中心静脈周辺にわずかに染色されるのみであったが、80 mg/kg/日群では肝小葉内の陽性領域が明らかに拡大した (Figure 14A, B)。GSH 免疫染色の染色強度のグレードは、対照群に比較し、80 mg/kg/日群で統計学的有意に高く (Table 10) , CCAにより肝臓の S-グルタチオン化タンパクが著しく上昇することが示唆された。

マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析では、対照群と比較して 2 倍以上の変動を示した遺伝子を 80 mg/kg/日群による変動遺伝子として選択した。マイクロアレイ解析で調べた約 2,000 個の遺伝子のうち、Table 11 に示すように、80 mg/kg/日群で 56 個の遺伝子が発現を増加させ、8 個の遺伝子が発現を減少させた。これらの遺伝子は抗酸化、GST、熱ショックタンパク質 (HSP) とユビキチン-プロテアソーム経路、DNA 修復、細胞増殖、細胞増殖の負の調節因子、アポトーシス、DNA メチル化、チトクローム P450、糖および脂質代謝、トランスポーター、ホルモン関連遺伝子ならびにその他のカテゴリーに分類された。

マイクロアレイでは、複数の抗酸化に関与する遺伝子 (*Gclm*, *Blvra*, *Prdx2*, *Car3*, *Rnh1*, *Prdx6*) が発現上昇し、メタロチオネイン *Mt1* の発現低下がみられた。80 mg/kg/日群では、*Mt1* の有意な減少が定量的 RT-PCR によっても確認された (Figure 15)。これら抗酸化に関連する遺伝子の変動と一致して、GST 関連遺伝子 (*Gsta2*, *Gstm5*, *Gst1*, *Mgst1*) の発現増加が認められた。4 つの遺伝子のうち 2 つの遺伝子の発現を定量的 RT-PCR で確認したところ、*Gsta2* と *Mgst1* の遺伝子発現は、80 および 40 mg/kg/日群で統計学的有意に増加した (Figure 15)。また、*Gsta3* はマイクロアレイの約 2000 遺伝子にリストされていなかったが、追加検討したところ、定量的 RT-PCR で発現が増加していることが確認された (Figure 15)。酸化ストレスによる細胞傷害を制御するメカニズムとしては、傷害タンパク質を修復する HSP の発現増加および傷害タンパク質を分解するユビキチン化に関わる遺伝子の発現増加も重要である [Leonard et al.,

2004]。80 mg/kg/日群では、HSP とユビキチン-プロテアソーム経路に関連する遺伝子 (*Ubb, Hspb3, Psmd4, Cryab, Tcpl, Psmc5, Dnaja1*) のマイクロアレイでの発現上昇が認められた。また、DNA 修復関連遺伝子 *Nudt1* が発現上昇した。*Nudt1* は、*Mth1* とも呼ばれる 18 kD の Nudix ピロホスファターゼで、ヌクレオチドプール中の酸化プリンデオキシリボヌクレオチド、8-oxo-dGTP および、出現頻度の低い 2-OH-dATP, 8-oxo-dATP を加水分解する [Maki and Sekiguchi, 1992]。したがって、*Nudt1* の発現増加は、第 2 章で見出された 8-OHdG の増加と同様に、CCA 処理された肝臓での酸化ストレスの増加を示唆するものであった。

多くの細胞増殖関連遺伝子 (*Pak1, Eif2s1, Ctgf, Camkk1, G3bp1, Stk39, Ptpn2, Plk1, Cdc25a, Wt1*) が発現上昇し、細胞増殖のネガティブ制御に関わる遺伝子 (*Crlf3, Cdkn1b/p27*) の変化もわずかに観測された。さらに、細胞増殖関連遺伝子である *Cdk1* が発現低下していた。80mg/kg/日群では、定量的 RT-PCR による検証により、*Cdkn1b/p27* の有意な増加が観察された (Figure 15)。アポトーシス関連遺伝子では、アポトーシス誘導に関する 2 つの遺伝子 (*Tmsb10, Pawr*) が発現上昇し、アポトーシス抑制に関する遺伝子 (*Igf1*) が発現低下していることが確認された。

DNA メチル化関連遺伝子としては、*Ctcf* が発現低下しており、80mg/kg/日群では、定量的 RT-PCR の検証により *Ctcf* の有意な減少が認められた (Figure 15)。さらに定量的 RT-PCR による追加検索の結果、*Dnmt1* および *Dnmt3a* が 80 および 40 mg/kg/日群で発現低下していることが明らかとなった (Figure 15)。

また様々な薬物代謝酵素遺伝子の発現も変動していた。チトクローム P450 の 6 つの遺伝子 (*Cyp51, Cyp3a23/3a1, Cyp2e1, Cyp2f4, Cyp11b2, Cyp2c22*) の発現が増加し、2 つの遺伝子 (*Cyp4b1, Cyp3a9*) の発現が減少していた。糖および脂質代謝に関連する 3 つの遺伝子 (*Dhcr7, Dpp4, Fabp5*) は発現増加し、1 つの遺伝子 *Apoa4* は発現減少していた。これらチトクローム P450, 糖・脂質代謝に関わる遺伝子変動は、第 2 章で雌ラットに観察された高血糖, 高コレステロール血症を伴う慢性肝細胞肥

大と関連している可能性があった。トランスポーターの 5 遺伝子 (*Slc29a1*, *Slc10a1*, *P2rx4*, *Slc17a7*, *P2rx1*) とホルモン関連の 3 遺伝子 (*Hsd11b1*, *Nr3c2*, *Pgrmc1*) は発現が上昇した。その他、免疫反応を含む様々な遺伝子が、発現上昇 (*Olr59*, *Mgp*, *Ebfl*, *Dusp6*, *Vps33b*, *Avpr1a*, *Mmp2*) または発現低下 (C3) した。

Mt1 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化解析

遺伝子発現解析の結果、*Mt1* mRNA は 80 mg/kg/日群で有意に発現が低下していることが明らかとなった。CCA が *Mt1* の発現をどのように抑制するかを調べるため、*Mt1* 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態を MeDIP-PCR 法により解析した。ラット *Mt1* 遺伝子の非 CGI 部位 (nCGI) 1 か所および CGI 部位 (CGI 1 および 2) 2 か所の DNA 配列をカバーする 3 種類のプライマーとプローブセットを設計した。予想に反して、80 mg/kg/日群では、調べた 3 か所すべての DNA メチル化状態が対照群と同等か相対的に低く、対照群および 80 mg/kg/日群のいずれも低メチル化状態であった (Figure 16)。

考 察

本章では、免疫組織化学的検索、網羅的遺伝子発現解析および DNA メチル化解析を実施し、CCA を投与された雌ラットの肝毒性メカニズムの解明を試みた。肝臓はヒ素の毒性標的として知られ、ヒトではヒ素曝露により肝臓が傷害され、その後、肝臓がんが発生する [Tokar et al., 2010]。ヒトのヒ素曝露や実験動物へのヒ素投与に関する研究では、肝臓において肝細胞変性、肝炎、線維化ならびに肝硬変が誘発されることが報告されている [Jomova et al., 2011]。第 2 章で、CCA 80 および 40 mg/kg/日を 4 週間反復経口投与したところ、雌にのみび慢性の肝細胞肥大が生じ、80 mg/kg/日では雌雄各 1 匹のみではあるが、血漿中の AST および ALT の高値を伴う限局性肝細胞壊死および胆管過形成がみられたことを明らかにした。さらに、雌は雄よりも顕著に肝毒性を示す血液生化学的パラメータの変動がみられた。CCA の肝毒性に関する性差は知られていないため、本研究では、80 mg/kg/日で 4 週間投与した雌雄の肝臓を用い、代謝物を含む 5 種のヒ素濃度を測定した。iAs は、ヒトおよび実験動物において酵素的にモノ、ジおよびトリメチル化 (MMA, DMA, TMA) され、肝臓で高濃度に検出される [Thomas et al., 2001; Watanabe and Hirano, 2013]。本研究では、反応性が高くヒ素毒性の原因となる DMA(III) と DMA(V) との比率は確認しなかったが、DMA が肝臓の主要代謝物であることが明らかとなった。雌の As(V) および MMA の濃度は雄より高かったことから、分布するヒ素の違いが肝臓の反応性の違いにつながったと推測された。As(V) および MMA 濃度が雌で雄より高い理由は明らかではないが、雌では As(III) を MMA に代謝するメチル化能力が雄より高く、As(V) を As(III) に還元するプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 活性が雄より低いなどのヒ素代謝における性差が関連している可能性が疑われた [Muhetaer et al., 2022]。

As(III) は、S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体として、ヒ素メチル化酵素 (AS3MT または Cyt19) によって順次メチル化され、MMA(V) と DMA(V) となる [Thomas et al., 2001; Watanabe and Hirano, 2013]。SAM は、DNA メチル化など、

他のほとんどの細胞内メチル化反応にも必要である [Baylin et al., 1998]。そのため、ラット肝上皮細胞を iAs に慢性的に曝露すると、SAM の枯渇が引き起こされ、悪性形質転換の際に DNA メチル化のグローバルな低下を引き起こす [Zhao et al., 1997]。iAs を慢性的に動物に曝露しても、同様に肝臓における DNA 低メチル化を生じさせる [Chen et al., 2004; Xie et al., 2004]。DNA のグローバルな低メチル化は、異常な遺伝子発現を促進することにより作用する発がんの最も重要な非遺伝毒性メカニズムの1つであり、肝発がんの原因因子となり得る [Watson and Goodman, 2002]。一方、ヒ素による遺伝子の転写調節領域における高メチル化は、がん抑制遺伝子の発現を抑制することが報告されている [Reichard and Puga, 2010]。従って、ヒ素の曝露は、様々な遺伝子座における低メチル化および高メチル化の両方と関連している可能性がある。本研究では、80 mg/kg/日群で *Mt1* mRNA の有意な減少が観察された。*Mt1* は細胞の自己防衛システムにおける重要な分子であり、そのシステイン残基は活性酸素種を消去することが報告されている [Thornalley and Vasák, 1985]。よって、*Mt1* mRNA の発現低下は CCA によって引き起こされた肝毒性に重要な役割を果たすと考えられた。*Mt1* はヒ素と直接結合することはできないが、活性酸素を除去することで保護因子として働く。Ghoshal らは、ラット肝細胞における *Mt1* 遺伝子発現の阻害は、遺伝子プロモーターの高メチル化に起因すると報告している [Ghoshal et al., 2000]。しかし本研究では、80 mg/kg/日群の雌の肝臓において、*Mt1* 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化に有意な変化は認められなかった。メチル基供与体 SAM からのメチル基は DNA メチル基転移酵素 (Dnmt) により DNA のシトシン残基に付加される。ヒ素は Dnmt の活性を変化させ、その結果、細胞内の DNA メチル化パターンを変化させるという報告がある [Reichard and Puga, 2010]。本研究で検索した DNA メチル化関連遺伝子では、*Ctcf*、*Dnmt1* および *Dnmt3a* が CCA 曝露により発現低下した。*Ctcf* は高度に保存されたジンクフィンガータンパクであり、転写因子として最もよく知られているが、DNA メチル化にも関与する。また、転写活性化因子、抑制因子、エンハンサーとプロ

モーターの間の情報伝達を遮断する絶縁体など様々な機能を有する [Chang et al., 2010; Rea et al., 2017]。興味深いことに、ヒ素は Ctf の DNA への結合を阻害することが示されている [Miao et al., 2015; Rojas et al., 2015]。Rea らは、*Dnmt* 遺伝子のプロモーター領域におけるヒ素による Ctf の阻害が、*Dnmt* の遺伝子発現を抑制することを報告している [Rea et al., 2017]。したがって、CCA による Ctf の阻害は、*Dnmt1* および *Dnmt3a* の遺伝子発現の抑制に関連する可能性があった。この *Dnmt1* と *Dnmt3a* の発現抑制は、*Mt1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態が比較的低いことと関連しているかもしれない。しかし、本研究では CCA が DNA メチル化とは無関係に *Mt1* 遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。CCA の成分の一つであるクロムに関して、Cr(VI) は、マウス胚線維芽細胞において、コアクチベーター p300 の転写能に影響を与えることにより、*Mt1* の転写を阻害する [Kimura et al., 2011]。CCA による *Mt1* の発現抑制メカニズムについては、ヒ素とクロムの複合作用も含め、さらなる研究が必要である。

臓器の維持には、細胞増殖と細胞死のバランスが重要である。ヒ素をラットに 8 週間飲水投与すると肝臓の容積を減少させ [Souza et al., 2018]、*in vitro* で肝細胞をヒ素に曝露するとアポトーシスの誘導と細胞増殖の抑制が引き起こされるとの報告がある [Bera et al., 2011; Rana et al., 2011]。これらの変化には、SOD やカタラーゼなどの抗酸化酵素の発現低下を伴い [Bera et al., 2011; Rana et al., 2011]、発生した酸化ストレスは、タンパク質、脂質、DNA など細胞の高分子を損傷する [Jomova et al., 2011]。またクロムもラットに 10 週間飲水投与すると、肝臓のアポトーシスを誘導することが知られている [Rafael et al., 2007]。一方、本章における研究では、CCA によって PCNA 標識率が増加し、TUNEL 標識率が減少することが示され、マイクロアレイ解析における細胞増殖、細胞増殖の負の調節因子およびアポトーシスに関する遺伝子発現の変動と関連して、細胞増殖と細胞死のバランスが増殖の方向に傾いていることが示唆された。細胞増殖とアポトーシスに関して、先行研究との相違の原因は不明であるが、

研究デザインや CCA 構成要素の複合作用に依存している可能性が考えられた。本研究では、抗酸化と GST に関連する遺伝子発現の変動がマイクロアレイにて観察され、定量的 RT-PCR でも確認された。よって、CCA を投与された雌ラットでは、CCA による酸化ストレスに関連してアポトーシスと細胞増殖のバランス調節に破断をきたし、肝毒性を発現した可能性が示唆され、これらの結果は、ヒ素曝露で報告されているように肝発がんに関連している可能性が考えられた [Tokar et al., 2010]。

第 2 章において、CCA は雌ラットの肝臓で 8-OHdG レベルを増加させ、おそらくヒ素とクロムを介した酸化ストレスに起因すると考えられた。マイクロアレイの結果、酸化ストレスの除去に関連する抗酸化に関与する遺伝子 (*Gclm*, *Blvra*, *Prdx2*, *Car3*, *Rnh1*, *Prdx6*) の発現増加が認められた。GSH も強い抗酸化力を持つが、本研究では 80 mg/kg/日群で肝臓にグルタチオン化タンパク質の増加が免疫組織化学的に観察され、還元型 GSH が消費されていることが示唆された [Giustarini et al., 2017]。この結果は、ヒ素を Wistar ラットの雄に経口投与すると、肝臓で GSH 濃度が有意に減少したという報告と一致した [Jomova et al., 2011]。さらに、GSH は 5 価のヒ素を 3 価のヒ素に還元する代謝反応において中心的な役割を果たしており、また代謝物を体外に排出するための抱合過程にも利用される [Stýblo et al., 2021; Wadgaonkar and Chen, 2021]。このような GSH が関わる種々の反応に関連して、グルタチオン合成の主要な律速酵素である glutamate cysteine ligase modifier subunit (*Gclm*) がマイクロアレイ解析で増加し、CCA による GSH 消費による GSH 合成系の増強が示唆された [Chen et al., 2013]。また、第 2 章の血液生化学的検査で示された GGTP の発現増加は、細胞外の GSH を分解し、システインを再取り込みして GSH を再合成する経路に関連している可能性があった [Chen et al., 2013]。GSH の恒常性の破断は、薬物、アルコール、食事、環境汚染物質によって引き起こされる肝疾患と関連がある [Xu et al., 2017; Chen et al., 2013]。したがって、雌ラットに観察された GSH の消費あるいは枯渇が CCA の肝毒性の主要な原因であった可能性が考えられた。GSH と酸化型 GSH の割合(すなわち GSH/GSSG

比) は、細胞増殖とアポトーシスに関する細胞シグナル伝達プロセスにとって重要であり [Giustarini et al., 2017], 本研究では十分検討できていないものの, CCA による GSH/GSSG 比の減少が細胞増殖と細胞死の不均衡を引き起こした可能性が示唆された。これら抗酸化関連の遺伝子変動に一致して, マイクロアレイと定量的 RT-PCR により, GST (*Gsta2*, *Gsta3*, *Gstm5*, *Gstl1*, *Mgst1*) 関連の遺伝子の発現増加が明らかとなった。新生児マウスの肝臓では, GST-mu, GST-pi, GST-alpha, GST-theta の発現が子宮内ヒ素曝露により増加した [Xie et al., 2007]。GST は大きな酵素群であり, 一部は GSH によるヒ素の抱合を触媒する [Xie et al., 2004; Liu et al., 2001; Leslie et al., 2004]。GST の発現および活性化, 特に GST-pi の増加は, ヒ素-SH 抱合体の細胞外への排出を増加させることにより, ヒ素への適応反応に重要な役割を果たす [Liu et al., 2001; Leslie et al., 2004]。また, ヒトにおける GST の発現は, ヒ素代謝の変化と関連しており [Chiou et al., 1997; Marnell et al., 2003], GST の多型は, ヒトのヒ素中毒の感受性因子である可能性が挙げられている [Marnell et al., 2003]。よって, GST 遺伝子発現の変動は, ヒ素の毒性発現に関連する重要な変化であることが示唆された。

以上のように, CCA を投与された雌ラットの肝臓では, 抗酸化, GST に関する遺伝子発現変動が起こるとともに, ヒ素の解毒代謝および活性酸素の除去のため, GSH の消費・枯渇が起こり, さらに *Mt1* の発現抑制によりレドックス制御に破断をきたし, 細胞増殖を誘導, 最終的に肝毒性を引き起こした可能性が示唆された。本研究の課題として, CCA 曝露による肝臓でのクロムおよび銅の代謝物の分布を確認していないことが挙げられる。ヒ素の飲水投与は, ラットの肝臓で Zn, Mg, Na, Ca, Cu の濃度も変化させることが知られている [Souza et al., 2018]。CCA の肝毒性のメカニズムをより深く理解するためには, ヒ素, クロムおよび銅による複合的な細胞応答に関する研究がさらに必要である。

小 括

第 3 章では、CCA を投与された雌ラットにおける肝毒性メカニズムの解明を試みた。雌雄の肝臓では、DMA が主要な代謝物であることが判明し、雌の As(V) および MMA の濃度は雄より高かったことから、分布するヒ素の違いが肝毒性の性差の原因のひとつと推察された。雌の肝臓では細胞増殖活性が増加するとともに、アポトーシスは抑制された。マイクロアレイ解析により、CCA は主に抗酸化、GST、HSP およびユビキチン-プロテアソーム経路、細胞増殖、DNA メチル化、チトクローム P450、糖および脂質代謝に関連する遺伝子発現を変動させることが明らかになった。このうち抗酸化に関わるメタロチオネインの発現抑制機序解明のため、*Mtl* 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化状態を解析したが、関連する変動はみられなかった。グルタチオン化タンパクは CCA の投与により増加し、還元型 GSH が消費されていることが示唆された。以上の結果から、CCA 投与後の雌の肝臓では、解毒代謝および活性酸素の消去のため、GSH が消費され枯渇し、さらにメタロチオネインの発現抑制によりレドックス制御の破断がおこり、細胞増殖を誘導し、肝毒性を誘発することが明らかとなった。

結 論

本研究では、ヒ素およびヒ素を含む木材防腐剤の毒性影響について、特に酸化ストレスに着目し、その毒性メカニズムの解明を試みた。

第1章では、ヒ素による膀胱発がんメカニズムについて検討した。雌性ラットの膀胱にヒ素の主要な尿中代謝物である DMA(V) を膀胱内投与し、DMA(V) 自体にも酸化ストレスの増加を伴う尿路上皮傷害および細胞増殖活性の亢進を誘発するポテンシャルがあることを明らかにした。抗酸化剤 NAC 投与が DMA(V) によるこれらの影響を抑制するかを検討したところ、予想に反し、DMA(V) による尿路上皮傷害および増殖作用を増悪化し、NAC は抗酸化作用ではなく、酸化促進作用を示すことが明らかになった。DMA(V) に対する NAC の増悪作用の機序については、NAC が酸化促進剤として作用する可能性あるいは NAC が DMA(V) から反応性代謝産物の生成を促進する可能性が考えられ、毒性発現におけるヒ素代謝の重要性が示された。

第2章では、ヒ素を含む木材防腐剤である CCA に着目し、CCA のリスク評価に有用な基礎的な毒性情報を提供するため、CCA を雌雄のラットに4週間曝露した後にみられる一般毒性を検索した。CCA を投与したラットの血漿からは、ヒ素およびクロムが用量相関性に検出され、特にヒ素はクロムの約10倍のレベルで検出された。CCA 投与群の雌雄では、鎮静および流涎が認められ、雄では体重増加抑制がみられた。臨床病理学的には、雌雄で小球性低色素性貧血、血糖および脂質の変動、肝および腎機能障害が観察された。病理組織学的には、雌雄で前胃の角化亢進、小腸の粘膜上皮過形成、直腸の杯細胞肥大、腎臓の近位尿細管リポフスチン沈着がみられた。雌では、8-OHdG の増加を伴うび慢性肝細胞肥大が観察された。胸腺重量は雌雄で減少し、雄では胸腺の皮質萎縮が少数例に認められた。これらの結果から、CCA はヒ素およびクロムの毒性により、主に血液、肝臓、腎臓、消化管に影響を及ぼすことが明らかとなった。

第3章では、CCA を投与された雌ラットにおける肝毒性メカニズムの解明を試み

た。雌雄の肝臓では、DMA が主要な代謝物であることが判明し、雌の As(V) および MMA の濃度は雄より高かったことから、分布するヒ素の違いが肝毒性の性差の原因のひとつと推察された。雌の肝臓では細胞増殖活性が増加するとともに、アポトーシスは抑制された。マイクロアレイ解析により、CCA は主に抗酸化、GST、HSP およびユビキチン-プロテアソーム経路、細胞増殖、DNA メチル化、チトクローム P450、糖および脂質代謝に関連する遺伝子発現を変動させることが明らかになった。このうち抗酸化に関わるメタロチオネインの発現抑制機序解明のため、*Mtl* 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化状態を解析したが、関連する変動はみられなかった。グルタチオン化タンパクは CCA の投与により増加し、還元型 GSH が消費されていることが示唆された。以上の結果から、CCA 投与後の雌の肝臓では、ヒ素の解毒代謝およびヒ素およびクロムにより生じた活性酸素の消去のため、GSH が消費され枯渇し、さらにメタロチオネインの発現抑制によりレドックス制御の破断がおり、細胞増殖を誘導し、肝毒性を誘発することが明らかとなった。

本研究では、ヒ素の主要代謝物の膀胱内投与により、肝臓での代謝をうけない状態での代謝物自体の影響を明らかにし、加えて抗酸化剤の併用による病態悪化を見出した。ヒ素を含む木材防腐剤についての研究では、CCA により誘発される種々の臓器影響を明らかにし、リスク評価上、有用な基礎情報を提供した。また、肝毒性発現には酸化ストレスが関与することを明らかにするとともに、ヒ素の代謝が毒性発現機序を理解するうえで重要であることを示した。CCA の毒性発現メカニズムをより深く理解するためには、ヒ素、クロムおよび銅による複合的な細胞応答に関するさらなる研究が必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に関して長年に渡るご指導、ご鞭撻を賜りました東京農工大学農学部共同獣医学科獣医病理学研究室 吉田敏則准教授に深甚たる謝意を表します。

本稿作成に際し、懇篤な御指導、御助言を賜りました、岩手大学農学部共同獣医学科実験動物学研究室 古市達哉教授、岩手大学農学部共同獣医学科比較薬理毒性学研究室 佐藤洋教授、東京農工大学農学部共同獣医学科獣医解剖学研究室 金田正弘准教授、東京農工大学農学部共同獣医学科獣医毒性学研究室 村上智亮准教授に深謝の意を表します。

本研究の全般にわたる親身な御指導と研究環境の提供にご配慮いただきました一般財団法人残留農薬研究所 原田孝則理事長，青山博昭理事，首藤康文毒性部長に深く感謝申し上げます。

実験の遂行にあたり多大なるご協力、ご助言を頂いた一般財団法人残留農薬研究所 小坂忠司博士，武田眞記夫博士，大塚亮一博士，山口悟技術主任，元残留農薬研究所 中島信明氏，榎本秋子氏，故桑原真紀氏，榎本幸子氏に感謝いたします。また，本研究は一般財団法人残留農薬研究所の多くの方々，特に病理研究室の皆様のご多大なる御協力がなければ成し得ませんでした。ここに心から感謝の意を表します。

最後に高橋美和，高橋優月，高橋綾花の公私にわたるご尽力に対する謝意を記す。

文 献

1. Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C and Waalkes M. (1999). Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Perspect.* **107**: 593–597.
2. Abu El-Saad AM, Al-Kahtani MA and Abdel-Moneim AM. (2016). *N*-acetylcysteine and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid alleviate oxidative stress and hepatic dysfunction induced by sodium arsenite in male rats. *Drug Des Devel Ther.* **10**: 3425–3434.
3. Aitio ML. (2006). *N*-acetylcysteine-passe-partout or much ado about nothing? *Br J Clin Pharmacol.* **61**: 5–15.
4. American Wood Preservers Association. (2005). American Wood Preservers Association Standards. AWPA. Selma, Alabama.
5. Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Sampayo-Reyes A and Wollenberg ML. (2004). A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol.* **198**: 327–335.
6. Arnold LL, Cano M, St John M, Eldan M, van Gemert M and Cohen SM. (1999). Effects of dietary dimethylarsinic acid on the urine and urothelium of rats. *Carcinogenesis.* **20**: 2171–2179.
7. Arreola-Mendoza L, Reyes JL, Melendez E, Martín D, Namorado MC, Sanchez E and Del Razo LM. (2006). Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology.* **218**: 237–246.
8. Atmaca G. (2004). Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J.* **45**: 776–788.
9. Bashir S, Sharma Y, Irshad M, Gupta SD and Dogra TD. (2006). Arsenic-induced cell death in liver and brain of experimental rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **98**: 38–43.

10. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM and Issa JP. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* **72**: 141–196.
11. Bera AK, Rana T, Bhattacharya D, Das S, Pan D and Das SK. (2011). Sodium arsenite-induced alteration in hepatocyte function of rat with special emphasis on superoxide dismutase expression pathway and its prevention by mushroom lectin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **109**: 240–244.
12. Bhadauria S and Flora SJ. (2007). Response of arsenic-induced oxidative stress, DNA damage, and metal imbalance to combined administration of DMSA and monoisoamyl-DMSA during chronic arsenic poisoning in rats. *Cell Biol Toxicol.* **23**: 91–104.
13. Canonne-Hergaux F, Zhang AS, Ponka P and Gros P. (2001). Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood.* **98**: 3823–3830.
14. Carter DE. (1995). Oxidation-reduction reactions of metal ions. *Environ Health Perspect.* **103**: 17–19.
15. Chang J, Zhang B, Heath H, Galjart N, Wang X and Milbrandt J. (2010). Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-regulated DNA methylation alters CCCTC-binding factor (CTCF)/cohesin binding and transcription at the BDNF locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**: 21836–21841.
16. Chen H, Li S, Liu J, Diwan BA, Barrett JC and Waalkes MP. (2004). Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* **25**: 1779–1786.
17. Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW and Vasiliou V. (2013). Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food Chem Toxicol.* **60**: 38–44.
18. Chiou HY, Hsueh YM, Hsieh LL, Hsu LI, Hsu YH, Hsieh FI, Wei ML, Chen HC, Yang

- HT, Leu LC, Chu TH, Chen-Wu C, Yang MH and Chen CJ. (1997). Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutat Res.* **386**: 197–207.
19. Chowdhury UK, Zakharyan RA, Hernandez A, Avram MD, Kopplin MJ and Aposhian HV. (2006). Glutathione-S-transferase-omega [MMA(V) reductase] knockout mice: enzyme and arsenic species concentrations in tissues after arsenate administration. *Toxicol Appl Pharmacol.* **216**: 446–457.
 20. Cohen SM, Ohnishi T, Arnold LL and Le XC. (2007). Arsenic-induced bladder cancer in an animal model. *Toxicol Appl Pharmacol.* **222**: 258–263.
 21. Cullen JM, Ward JM and Thompson CM. (2016). Reevaluation and classification of duodenal lesions in B6C3F1 mice and F344 rats from 4 studies of hexavalent chromium in drinking water. *Toxicol Pathol.* **44**: 279–289.
 22. Deramos King CM, Dozier CS, Campbell JL, Curry ED and Godri Pollitt KJ. (2019). Long-term leaching of arsenic from pressure-treated playground structures in the northeastern United States. *Sci Total Environ.* **656**: 834–842.
 23. Dickey P. (2003). Guide for Selecting Treated Wood. For The San Francisco Department of the Environment. Website:
<http://sfapproved.org/sites/default/files/files/general-files/SF%20Guide%20to%20Buy%20Treated%20Wood.%20Report%20by%20Dickey%209-2003.pdf> (accessed September 6, 2022)
 24. Dubey B, Townsend TG and Solo-Gabriele HM. (2007). Quantities of arsenic-treated wood in demolition debris generated by Hurricane Katrina. *Environ Sci Technol.* **41**: 1533–1536.
 25. Englot C. Treated wood-managing the risk. 2006; In: *Environmental Impacts of Treated Wood.* (Townsend TG and Solo-Gabriele H eds.) CRC Press, Boca Raton, FL.

26. Frantzen K. Chromium. 1998; pp. 51–54. In: Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology, 4th ed. (Harbison RD ed.) Mosby-Year Book, Inc., Missouri.
27. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD and Andrews NC. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 1148–1153.
28. Fukuyama T, Ueda H, Hayashi K, Tajima Y, Shuto Y, Kosaka T and Harada T. (2008). Sensitizing potential of chromated copper arsenate in local lymph node assays differs with the solvent used. *J Immunotoxicol*. **5**: 99–106.
29. Ghoshal K, Majumder S, Li Z, Dong X and Jacob ST. (2000). Suppression of metallothionein gene expression in a rat hepatoma because of promoter-specific DNA methylation. *J Biol Chem*. **275**: 539–547.
30. Giustarini D, Colombo G, Garavaglia ML, Astori E, Portinaro NM, Reggiani F, Badalamenti S, Aloisi AM, Santucci A, Rossi R, Milzani A and Dalle-Donne I. (2017). Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic Biol Med*. **112**: 360–375.
31. Goodnough LT, Skikne B and Brugnara C. (2000). Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood*. **96**: 823–833.
32. Gupta R and Flora SJ. (2006). Effect of *Centella asiatica* on arsenic induced oxidative stress and metal distribution in rats. *J Appl Toxicol*. **26**: 213–222.
33. Haney J Jr. (2015). Consideration of non-linear, non-threshold and threshold approaches for assessing the carcinogenicity of oral exposure to hexavalent chromium. *Regul Toxicol Pharmacol*. **73**: 834–852.
34. Harada T, Yamaguchi S, Ohtsuka R, Takeda M, Fujisawa H, Yoshida T, Enomoto A, Chiba Y, Fukumori J, Kojima S, Tomiyama N, Saka M, Ozaki M and Maita K. (2003). Mechanisms of promotion and progression of preneoplastic lesions in

- hepatocarcinogenesis by DDT in F344 rats. *Toxicol Pathol.* **31**: 87–98.
35. Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, Takahashi M and Hayashi Y. (1990). Urothelial damage and tumor initiation by urinary metabolites of sodium o-phenylphenate in the urinary bladder of female rats. *Jpn J Cancer Res.* **81**: 483–488.
 36. Hingston JA, Collins CD, Murphy RJ and Lester JN. (2001). Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: A review. *Environ Pollut.* **111**: 53–66.
 37. Huang YC, Hung WC, Chen WT, Jiang WH, Yu HS and Chai CY. (2011). Effects of MEK and DNMT inhibitors on arsenic-treated human uroepithelial cells in relation to Cyclin-D1 and p16. *Toxicol Lett.* **200**: 59–66.
 38. Hughes MF. (2006). Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ Health Perspect.* **114**: 1790–1796.
 39. Hughes MF, Kenyon EM, Edwards BC, Mitchell CT, Razo LM and Thomas DJ. (2003). Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol.* **191**: 202–210.
 40. 岩崎 克己. (2008). 米国の住宅周辺外構部材市場から CCA 系保存処理木材が排除された背景. *木材保存 (Wood Preservation)*. **34**: 2-12.
 41. 岩崎 克己. (2003). 我が国における CCA 木材保存剤の開発とその処理木材市場の盛衰の技術的背景. *木材保存 (Wood Preservation)*. **29**: 192-216.
 42. Japanese Association for Laboratory Animal Science (JALAS). (1987). Guidelines for animal experimentation. *Exp Anim.* **36**: 285–288.
 43. Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodes CJ and Valko M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol.* **31**: 95–107.
 44. 環境省 水・大気環境局 土壌環境課. (2012). 被災地における第 2 次土壌環境モニタリング調査結果 (第 1 報) の公表について. ウェブサイト:

<https://www.env.go.jp/content/900483300.pdf> (accessed September 6, 2022)

45. Katz SA and Salem H. (2005). Chemistry and toxicology of building timbers pressure-treated with chromated copper arsenate: a review. *J Appl Toxicol.* **25**: 1–7.
46. Kenyon EM, Del Razo LM and Hughes MF. (2005). Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in mice following acute oral administration of arsenate. *Toxicol Sci.* **85**: 468–475.
47. Kim H, Kim DJ, Koo JH, Park JG and Jang YC. (2007). Distribution and mobility of chromium, copper, and arsenic in soils collected near CCA-treated wood structures in Korea. *Sci Total Environ.* **374**: 273–281.
48. Kimura A, Ishida Y, Wada T, Yokoyama H, Mukaida N and Kondo T. (2005). MRP-1 expression levels determine strain-specific susceptibility to sodium arsenic-induced renal injury between C57BL/6 and BALB/c mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* **203**: 53–61.
49. Kimura T, Okumura F, Onodera A, Nakanishi T, Itoh N and Isobe M. (2011). Chromium (VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by modifying the transcription potential of the co-activator p300. *J Toxicol Sci.* **36**: 173–180.
50. Kinoshita A, Wanibuchi H, Wei M, Yunoki T and Fukushima S. (2007). Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell proliferation via generation of oxidative stress by organic arsenicals contributes to their carcinogenicity in the rat liver and bladder. *Toxicol Appl Pharmacol.* **221**: 295–305.
51. Kleinveld HA, Demacker PN and Stalenhoef AF. (1992). Failure of *N*-acetylcysteine to reduce low-density lipoprotein oxidizability in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* **43**: 639–642.
52. Kojima S, Sasaki J, Tomita M, Saka M, Ishizuka K, Kawakatsu H, Yoshida T, Kosaka T, Enomoto A, Nakashima N and Harada T. (2009). Multiple organ toxicity, including hypochromic anemia, following repeated dose oral administration of phenobarbital (PB)

- in rats. *J Toxicol Sci.* **34**: 527–39.
53. Kopec AK, Kim S, Forgacs AL, Zacharewski TR, Proctor DM, Harris MA, Haws LC and Thompson CM. (2012). Genome-wide gene expression effects in B6C3F1 mouse intestinal epithelia following 7 and 90days of exposure to hexavalent chromium in drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol.* **259**: 13–26.
 54. Leonard SS, Harris GK and Shi X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* **37**: 1921–1942.
 55. Leslie EM, Haimeur A and Waalkes MP. (2004). Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem.* **279**: 32700–32708.
 56. Lijinsky W, Thomas BJ and Kovatch RM. (1992). Systemic and local carcinogenesis by directly acting *N*-nitroso compounds given to rats by intravesicular administration. *Carcinogenesis.* **13**: 1101–1105.
 57. Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, Klaassen CD and Waalkes MP. (2001). Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol Pharmacol.* **60**: 302–309.
 58. Luster MI and Simeonova PP. (2004). Arsenic and urinary bladder cell proliferation. *Toxicol Appl Pharmacol.* **198**: 419–423.
 59. Maki H and Sekiguchi M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature.* **355**: 273–275.
 60. Marnell LL, Garcia-Vargas GG, Chowdhury UK, Zakharyan RA, Walsh B, Avram MD, Kopplin MJ, Cebrián ME, Silbergeld EK and Aposhian HV. (2003). Polymorphisms in the human monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem Res Toxicol.* **16**: 1507–1513.

61. Mason RW and Edwards IR. (1989). Acute toxicity of combinations of sodium dichromate, sodium arsenate and copper sulphate in the rat. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol.* **93**: 121–125.
62. Mason RW, Edwards IR and Fisher LC. (1989). Teratogenicity of combinations of sodium dichromate, sodium arsenate and copper sulphate in the rat. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol.* **93**: 407–411.
63. Masutomi N, Toyoda K, Shibutani M, Niho N, Uneyama C, Takahashi N and Hirose M. (2001). Toxic effects of benzyl and allyl isothiocyanates and benzyl-isoform specific metabolites in the urinary bladder after a single intravesical application to rats. *Toxicol Pathol.* **29**: 617–622.
64. Matos RC, Bessa M, Oliveira H, Gonçalves F, de Lourdes Pereira M and Nunes B. (2013). Mechanisms of kidney toxicity for chromium- and arsenic-based preservatives: potential involvement of a pro-oxidative pathway. *Environ Toxicol Pharmacol.* **36**: 929–936.
65. McQueen J and Stevens J. (1998). Disposal of CCA-treated wood. *For Prod J.* **48**: 86–91.
66. Miao Z, Wu L, Lu M, Meng X, Gao B, Qiao X, Zhang W and Xue D. (2015). Analysis of the transcriptional regulation of cancer-related genes by aberrant DNA methylation of the cis-regulation sites in the promoter region during hepatocyte carcinogenesis caused by arsenic. *Oncotarget.* **6**: 21493–21506.
67. Mo L, Zheng X, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Cordon-Cardo C, Sun TT and Wu XR. (2007). Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *J Clin Invest.* **117**: 314–325.
68. Morais S, Fonseca HMA, Oliveira SMR, Oliveira H, Gupta VK, Sharma B and de Lourdes Pereira M. (2021). Environmental and Health Hazards of Chromated Copper Arsenate-Treated Wood: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* **18**: 5518.
69. Muhetaer M, Yang M, Xia R, Lai Y and Wu J. (2022). Gender difference in arsenic

- biotransformation is an important metabolic basis for arsenic toxicity. *BMC Pharmacol Toxicol.* **23**: 15.
70. Nandi D, Patra RC and Swarup D. (2006). Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food Chem Toxicol.* **44**: 1579–1584.
 71. Nandi D, Patra RC and Swarup D. (2005). Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology.* **211**: 26–35.
 72. Ohgami N, Yamanoshita O, Thang ND, Yajima I, Nakano C, Wenting W, Ohnuma S and Kato M. (2015). Carcinogenic risk of chromium, copper and arsenic in CCA-treated wood. *Environ Pollut.* **206**: 456–460.
 73. Patlolla AK, Barnes C, Yedjou C, Velma VR and Tchounwou PB. (2009). Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol.* **24**: 66–73.
 74. Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Medina-Campos ON, Carvajal RC, Hernández-Pando R, Macías-Ruvalcaba NA, Maldonado PD, Salcedo MI, Tapia E, Saldívar L, Castilla ME and Ibarra-Rubio ME. (2005). Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol.* **6**: 4.
 75. Peters HA, Croft WA, Woolson EA, Darcey BA and Olson MA. (1986). Hematological, dermal and neuropsychological disease from burning and power sawing chromium-copper-arsenic (CCA)-treated wood. *Acta Pharmacol Toxicol.* **59**: 39–43.
 76. Peters HA, Croft WA, Woolson EA, Darcey BA and Olson MA. (1984). Seasonal arsenic exposure from burning chromium-copper-arsenate-treated wood. *JAMA.* **251**: 2393–2396.
 77. Petersen R, Mikkelsen S and Thomsen OF. (1994). Chronic interstitial nephropathy after

- plasma cutting in stainless steel. *Occup Environ Med.* **51**: 259–261.
78. Rafael AI, Almeida A, Santos P, Parreira I, Madeira VM, Alves R, Cabrita AM and Alpoim MC. (2007). A role for transforming growth factor-beta apoptotic signaling pathway in liver injury induced by ingestion of water contaminated with high levels of Cr(VI). *Toxicol Appl Pharmacol.* **224**: 163–173.
79. Rahman FA, Allan DL, Rosen CJ and Sadowsky MJ. (2004). Arsenic availability from chromated copper arsenate (CCA)-treated wood. *J Environ Qual.* **33**: 173–180.
80. Rana T, Bera AK, Das S, Bhattacharya D, Pan D, Bandyopadhyay S, De S and Das SK. (2011). Mushroom lectin protects arsenic induced apoptosis in hepatocytes of rodents. *Hum Exp Toxicol.* **30**: 307–317.
81. Rea M, Eckstein M, Eleazer R, Smith C and Fondufe-Mittendorf YN. (2017). Genome-wide DNA methylation reprogramming in response to inorganic arsenic links inhibition of CTCF binding, DNMT expression and cellular transformation. *Sci Rep.* **7**: 41474.
82. Reichard JF and Puga A. (2010). Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics.* **2**:87–104.
83. Rodríguez VM, Del Razo LM, Limón-Pacheco JH, Giordano M, Sánchez-Peña LC, Uribe-Querol E, Gutiérrez-Ospina G and Gonsbatt ME. (2005). Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol Sci.* **84**: 157–166.
84. Rojas D, Rager JE, Smeester L, Bailey KA, Drobná Z, Rubio-Andrade M, Stýblo M, García-Vargas G and Fry RC. (2015). Prenatal arsenic exposure and the epigenome: identifying sites of 5-methylcytosine alterations that predict functional changes in gene expression in newborn cord blood and subsequent birth outcomes. *Toxicol Sci.* **143**: 97–106.
85. Ryan PB, Huet N and MacIntosh DL. (2000). Longitudinal investigation of exposure to

- arsenic, cadmium, and lead in drinking water. *Environ Health Perspect.* **108**: 731–735.
86. Sagristá ML, García AE, Africa De Madariaga M and Mora M. (2002). Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds *N*-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radic Res.* **36**: 329–340.
87. Salnikow K and Zhitkovich A. (2008). Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol.* **21**: 28–44.
88. Sampayo-Reyes A, Zakharyan RA, Healy SM and Aposhian HV. (2000). Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue. *Chem Res Toxicol.* **13**: 1181–1186.
89. Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas A and Dhali GK. (2007). Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by *N*-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* **220**: 146–155.
90. Saw D and Tham KT. (1988). Clinical applications of an automated haematology analyzer. *J Hong Kong Med Assoc.* **40**: 219–222.
91. Schäfer SG, Dawes RLF, Elsenhans B, Forth W and Schümann K. Metals. 1999; pp. 755–804. In: *Toxicology.* (Marquardt H, Schäfer SG, McClellan R and Welsch F eds.) Academic Press, San Diego, California.
92. Scibior A and Zaporowska H. (2007). Effects of vanadium(V) and/or chromium(III) on L-ascorbic acid and glutathione as well as iron, zinc, and copper levels in rat liver and kidney. *J Toxicol Environ Health A.* **70**: 696–704.
93. Shibata MA, Hasegawa R, Kurata Y, Yamada M, Tamano S and Fukushima S. (1990). Bladder epithelial hyperplasia in F344 rats after intravesical instillation of the antitumor chemotherapeutic agents Adriamycin and mitomycin C. *Cancer Lett.* **49**: 41–49.
94. Shibata T, Solo-Gabriele H and Hata T. (2012). Disaster waste characteristics and

- radiation distribution as a result of the Great East Japan Earthquake. *Environ Sci Technol.* **46**: 3618–3624.
95. Shibata T, Solo-Gabriele HM, Fleming LE, Cai Y and Townsend TG. (2007). A mass balance approach for evaluating leachable arsenic and chromium from an in-service CCA-treated wood structure. *Sci Total Environ.* **372**: 624–635.
 96. Souza ACF, Marchesi SC, de Almeida Lima GD and Machado-Neves M. (2018). Effects of Arsenic Compounds on Microminerals Content and Antioxidant Enzyme Activities in Rat Liver. *Biol Trace Elem Res.* **183**: 305–313.
 97. Stout MD, Herbert RA, Kissling GE, Collins BJ, Travlos GS, Witt KL, Melnick RL, Abdo KM, Malarkey DE and Hooth MJ. (2009). Hexavalent chromium is carcinogenic to F344/N rats and B6C3F1 mice after chronic oral exposure. *Environ Health Perspect.* **117**: 716–722.
 98. Stýblo M, Venkatratnam A, Fry RC and Thomas DJ. (2021). Origins, fate, and actions of methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic: progress and prospects. *Arch Toxicol.* **95**: 1547–1572.
 99. Suh M, Thompson CM, Kirman CR, Carakostas MC, Haws LC, Harris MA and Proctor DM. (2014). High concentrations of hexavalent chromium in drinking water alter iron homeostasis in F344 rats and B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol.* **65**: 381–388.
 100. Szkudlarek U, Zdziechowski A, Witkowski K, Kasielski M, Luczyńska M, Luczyński R, Sarniak A and Nowak D. (2004). Effect of inhaled *N*-acetylcysteine on hydrogen peroxide exhalation in healthy subjects. *Pulm Pharmacol Ther.* **17**: 155–162.
 101. Tapio S and Grosche B. (2006). Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res.* **612**: 215–246.
 102. Thomas C and Thomas L. (2002). Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem.* **48**: 1066–1076.

103. Thomas DJ, Styblo M and Lin S. (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol.* **176**: 127–144.
104. Thomas DJ, Waters SB and Styblo M. (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol Appl Pharmacol.* **198**: 319–326.
105. Thompson CM, Wolf JC, Elbekai RH, Paranjpe MG, Seiter JM, Chappell MA, Tappero RV, Suh M, Proctor DM, Bichteler A, Haws LC and Harris MA. (2015). Duodenal crypt health following exposure to Cr(VI): Micronucleus scoring, γ -H2AX immunostaining, and synchrotron X-ray fluorescence microscopy. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* **789–790**: 61–66.
106. Thornalley PJ and Vasák M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta.* **827**: 36–44.
107. Tokar EJ, Benbrahim-Tallaa L, Ward JM, Lunn R, Sams RL 2nd and Waalkes MP. (2010). Cancer in experimental animals exposed to arsenic and arsenic compounds. *Crit Rev Toxicol.* **40**: 912–927.
108. Ullrich C, Wu A, Armsby C, Rieber S, Wingerter S, Brugnara C, Shapiro D and Bernstein H. (2005). Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA.* **294**: 924–930.
109. US Environmental Protection Agency (EPA). (Last updated on February 4, 2022). Chromated Arsenicals (CCA). Website: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/chromated-arsenicals-cca> (accessed September 6, 2022)
110. Vahter M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology.* **181–182**: 211–217.
111. Wadgaonkar P and Chen F. (2021). Connections between endoplasmic reticulum stress-associated unfolded protein response, mitochondria, and autophagy in arsenic-induced

- carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* **76**: 258–266.
112. Wang AL, Wang JP, Wang H, Chen YH, Zhao L, Wang LS, Wei W and Xu DX. (2006). A dual effect of *N*-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. *Hepatol Res.* **34**: 199–206.
113. Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X and Xu LH. (2006). Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology.* **228**: 16–23.
114. Wanibuchi H, Yamamoto S, Chen H, Yoshida K, Endo G, Hori T and Fukushima S. (1996). Promoting effects of dimethylarsinic acid on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* **17**: 2435–2439.
115. Watanabe T and Hirano S. (2013). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol.* **87**: 969–979.
116. Watson RE and Goodman JI. (2002). Effects of phenobarbital on DNA methylation in GC-rich regions of hepatic DNA from mice that exhibit different levels of susceptibility to liver tumorigenesis. *Toxicol Sci.* **68**: 51–58.
117. Wei M, Arnold L, Cano M and Cohen SM. (2005). Effects of co-administration of antioxidants and arsenicals on the rat urinary bladder epithelium. *Toxicol Sci.* **83**: 237–245.
118. Wei M, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Yoshida K, Endo G, Nakae D and Fukushima S. (2002). Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis.* **23**: 1387–1397.
119. Wood RJ and Han O. (1998). Recently identified molecular aspects of intestinal iron absorption. *J Nutr.* **128**: 1841–1844.
120. Xie Y, Liu J, Benbrahim-Tallaa L, Ward JM, Logsdon D, Diwan BA and Waalkes MP. (2007). Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice

- transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic. *Toxicology*. **236**: 7-15.
121. Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP and Germolec DR. (2004). Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect*. **112**: 1255–1263.
122. Xu M, Rui D, Yan Y, Xu S, Niu Q, Feng G, Wang Y, Li S and Jing M. (2017). Oxidative damage induced by arsenic in mice or rats: a systematic review and meta-analysis. *Biol Trace Elem Res*. **176**: 154–175.
123. Yamamoto S, Konishi Y, Matsuda T, Murai T, Shibata MA, Matsui-Yuasa I, Otani S, Kuroda K, Endo G and Fukushima S. (1995). Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res*. **55**: 1271–1276.
124. Yamanaka K, Kato K, Mizoi M, An Y, Takabayashi F, Nakano M, Hoshino M and Okada S. (2004). The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. **198**: 385–393.
125. Yamauchi H, Aminaka Y, Yoshida K, Sun G, Pi J and Waalkes MP. (2004). Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicol Appl Pharmacol*. **198**: 291–296.
126. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J and Speed TP. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*. **30**: e15.
127. Yoshida T, Tsutsumi T, Nagata S, Yoshida F, Maita K, Harada T and Ueno Y. (2001). Quantitative analysis of intralobular distribution of microcystin-LR in the mouse liver. *J*

- Toxicol Pathol. **14**: 205–212.
128. Yoshida T, Yamauchi H and Fan Sun G. (2004). Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol.* **198**: 243–252.
129. Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP and Waalkes MP. (1997). Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**: 10907–10912.

图 表

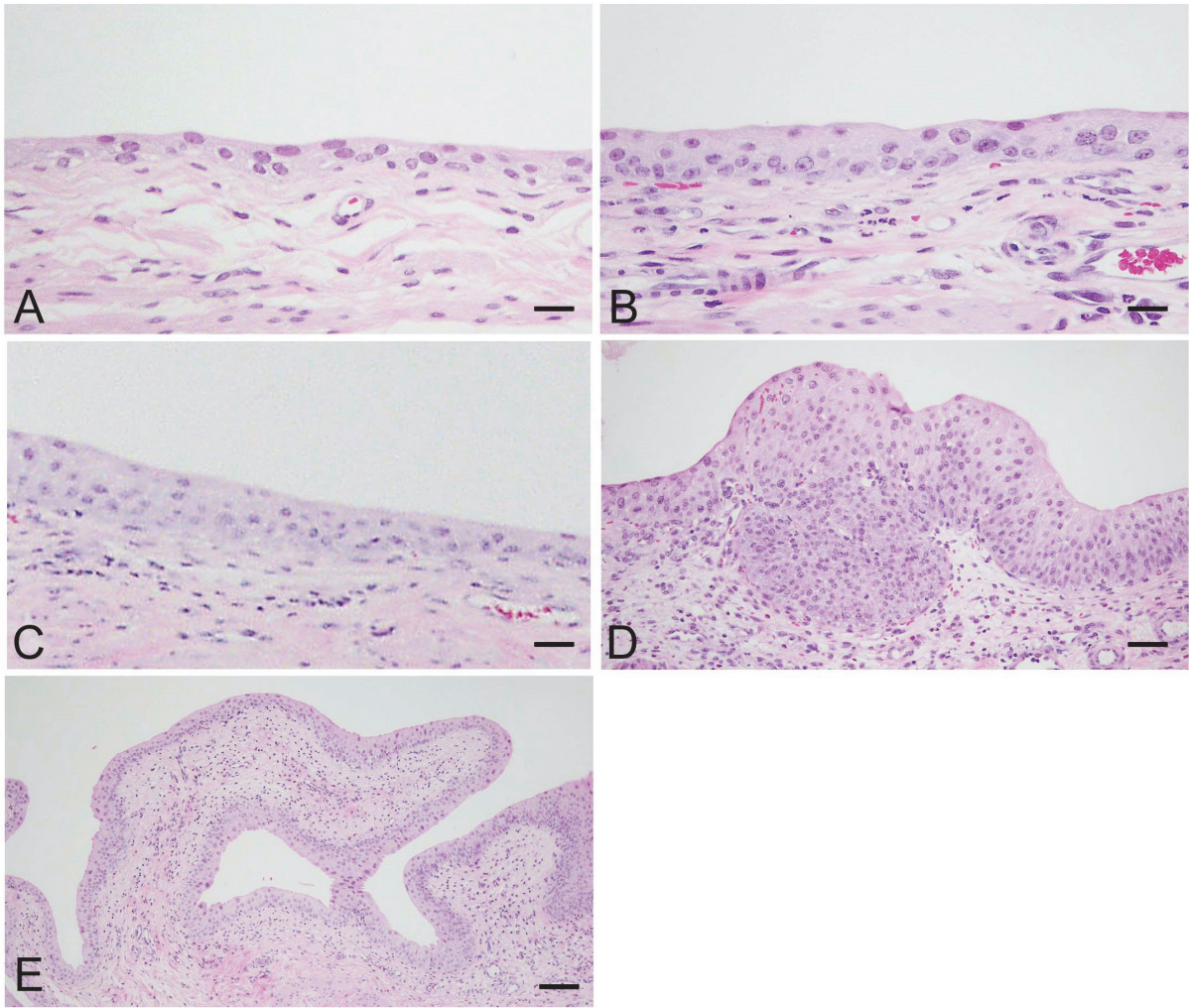


Figure 1. Representative histopathological changes in the urinary bladder, hematoxylin and eosin-stained. (A) Normal urothelial cells in the vehicle control group (scale bar = 18 μm). (B) Submucosal neutrophil infiltration in the NAC (high dose)-treated group (scale bar = 18 μm). (C) Submucosal neutrophil infiltration in the DMA(V)-treated group (scale bar = 18 μm). (D) Nodular urothelial cell hyperplasia in the group co-treated with DMA(V) and NAC (high dose) (scale bar = 100 μm). (E) Papillary urothelial cell hyperplasia in the group co-treated with DMA(V) and NAC (high dose) (scale bar = 270 μm).

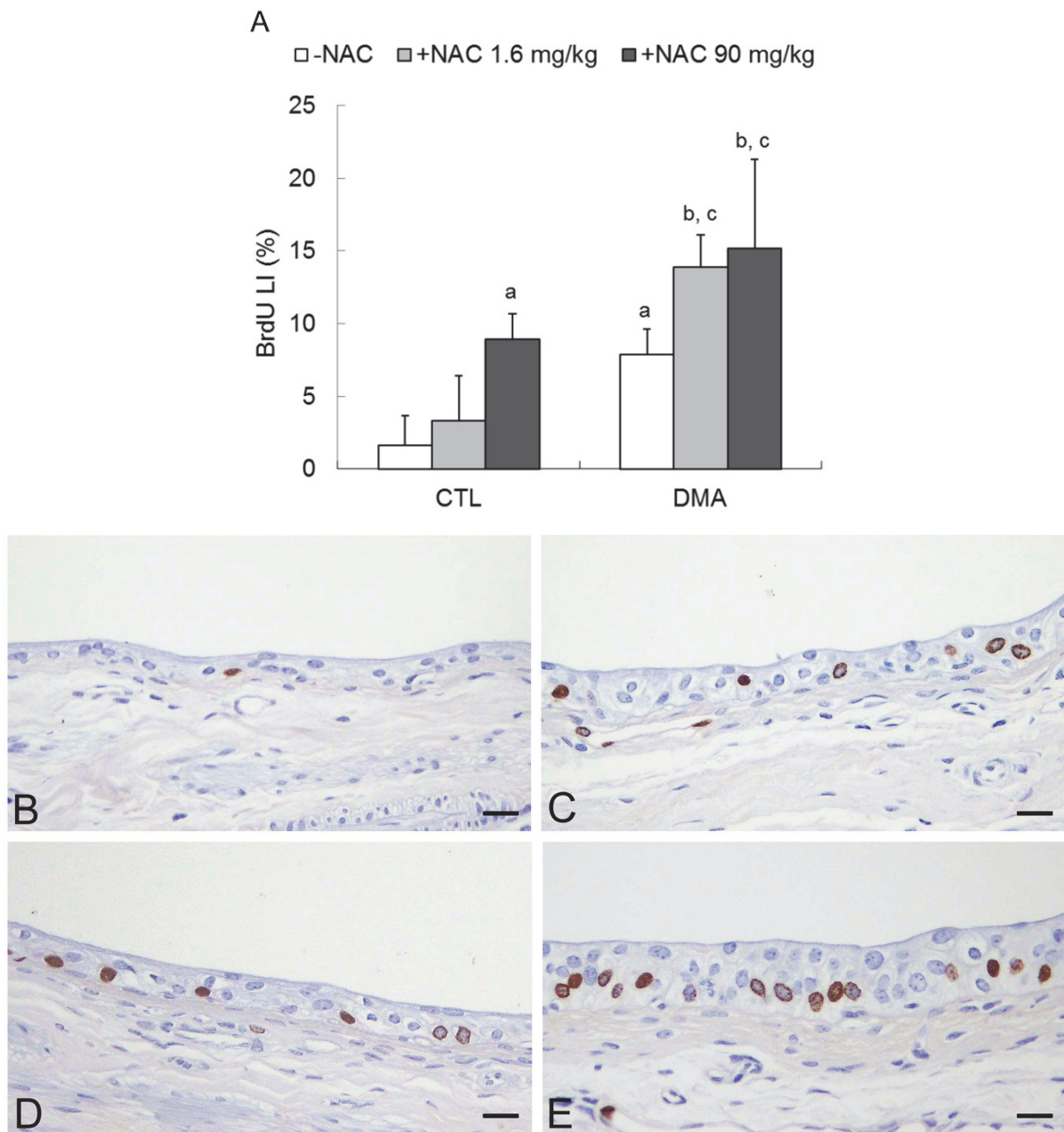


Figure 2. The BrdU labeling index and representative BrdU-positive urothelial cells in the urinary bladder. (A) The BrdU labeling index. Data are represented as the mean \pm S.D., and were analyzed by the Holm's multiple comparison test (a, $P \leq 0.05$ vs. vehicle control group; b, $P \leq 0.01$ vs. vehicle control group; c, $P \leq 0.05$ vs. DMA(V)-treated group). CTL, Control group; DMA, DMA(V)-treated group. (B) Normal urothelial cells in the vehicle control group. (C, D) Scattered BrdU-positive urothelial cells in the NAC (high dose) or DMA(V)-treated group. (E) Frequent BrdU-positive urothelial cells in the group co-treated with DMA(V) and NAC (high dose). Scale bar = 18 μ m.

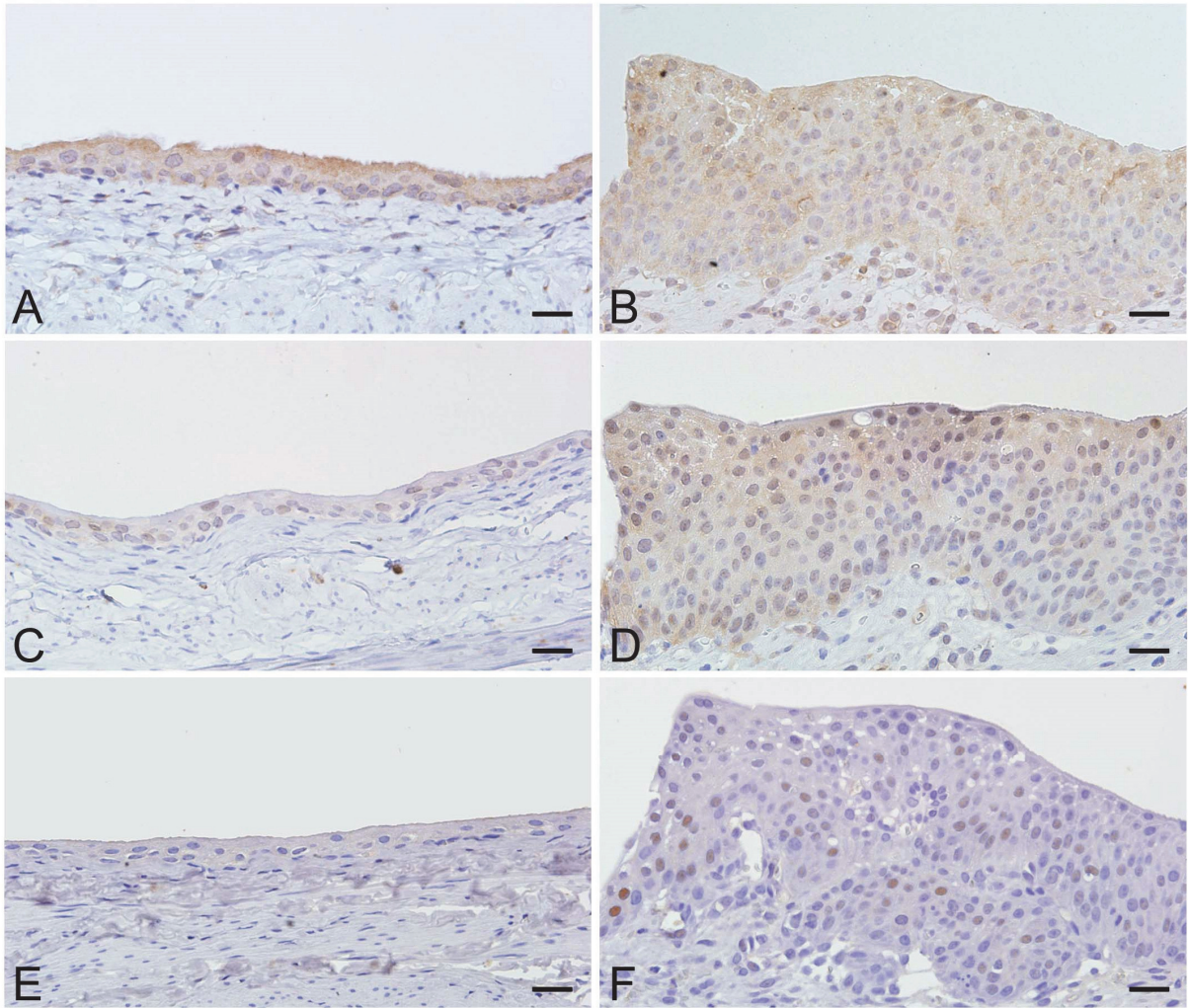


Figure 3. Representative immunostaining images of cell proliferation markers. (A, B) p44/42 MAPK (ERK1/2). Prominent positive reactions in normal urothelial cells in the vehicle control group (A) and in hyperplasia in the group co-treated with DMA(V) and NAC (high dose) (B). (C, D) Phosphorylated p44/42 MAPK (ERK1/2). Slightly focal positive reaction in normal urothelial cells in the vehicle control group (C) and prominent positive reaction in hyperplasia in the group co-treated with DMA(V) and NAC (high dose) (D). (E, F) Cyclin D1. No positive reaction in normal urothelial cells in the vehicle control group (E) and frequent cyclin D1-positive urothelial cells in hyperplasia in the group co-treated with DMA(V) and NAC (high dose) (F). Scale bar = 20 μ m.

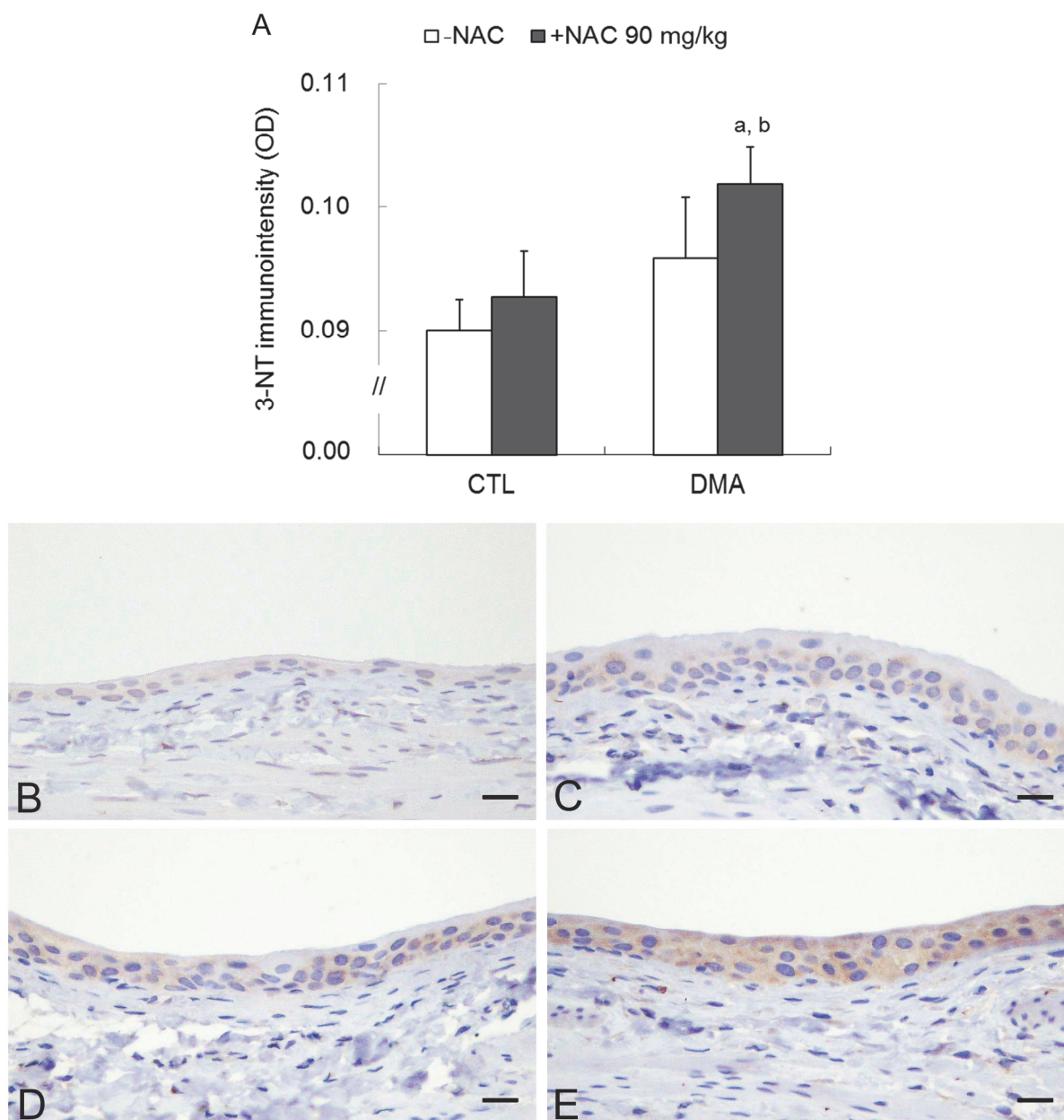


Figure 4. Analyses of oxidative stress marker 3-NT in the urinary bladder. (A) Immunointensity of 3-NT. Data are represented as the mean \pm S.D. and were analyzed by the Holm's multiple comparison test (a, $P \leq 0.01$ vs. vehicle control group; b, $P \leq 0.05$ vs. NAC (high dose)-treated group). CTL, Control group; DMA, DMA(V)-treated group. (B–E) Representative images of 3-NT immunostaining. (B) Very weak positive reactions in normal urothelial cells in the vehicle control group. (C,D) Weak positive reactions in the NAC (high dose) or DMA(V)-treated group. (E) Prominent positive reactions in the group co-treated with DMA(V) and NAC (high dose). Scale bar = 18 μ m.

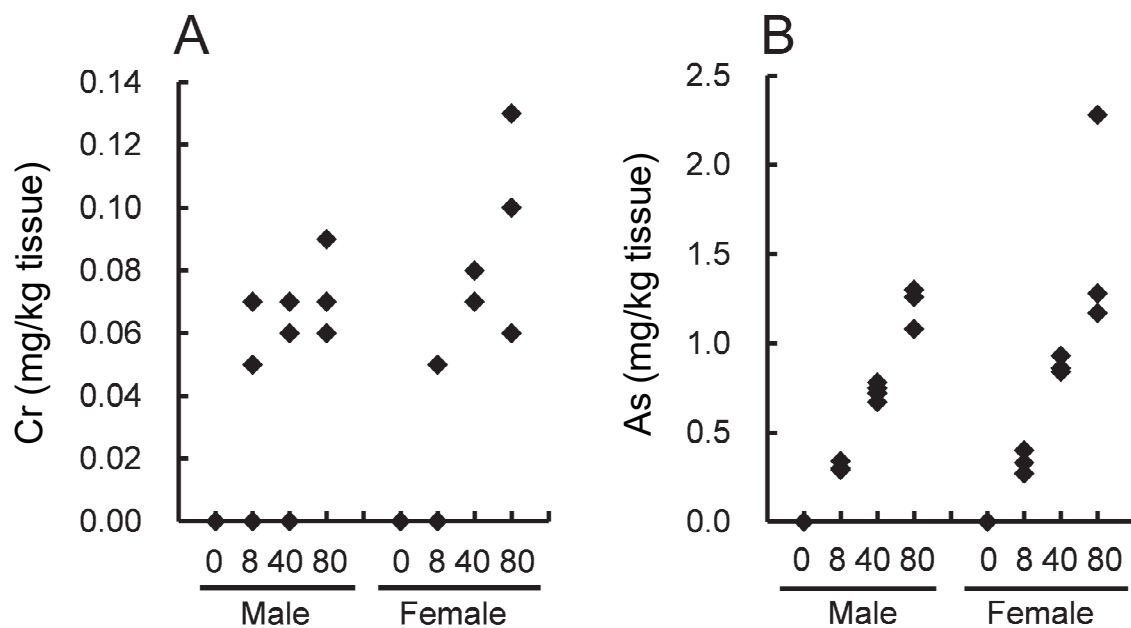


Figure 5. Plasma concentration of total Cr and As in rats treated with CCA at 0, 8, 40, and 80 mg/kg/day for 28 days. Blood samples were collected to determine the concentration of total Cr (A) and As (B). N=1 in the control group, and N=3 in each treated group for each sex.

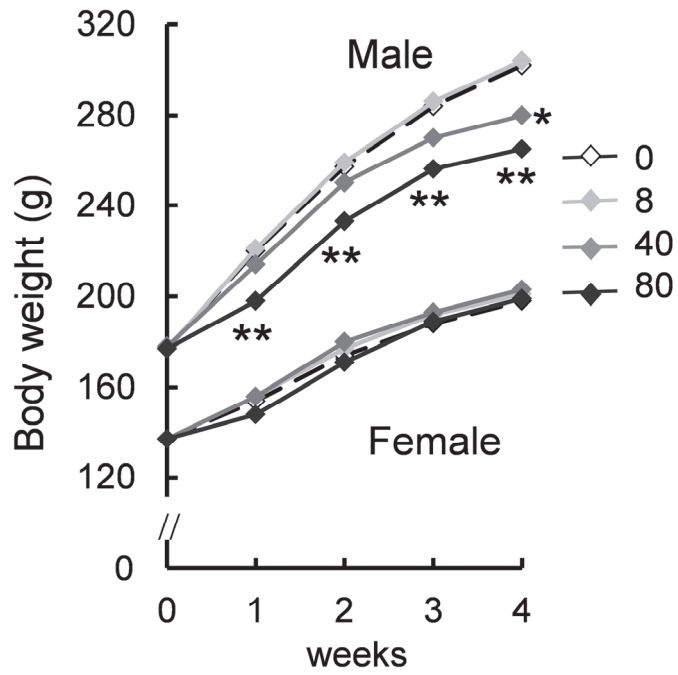


Figure 6. Time-course of body weight changes in rats treated with CCA at 0, 8, 40, and 80 mg/kg/day for 28 days. During the treatment, body weight was measured weekly. *, **: $p \leq 0.05$ or 0.01 versus control group by Dunnett's multiple comparison test.

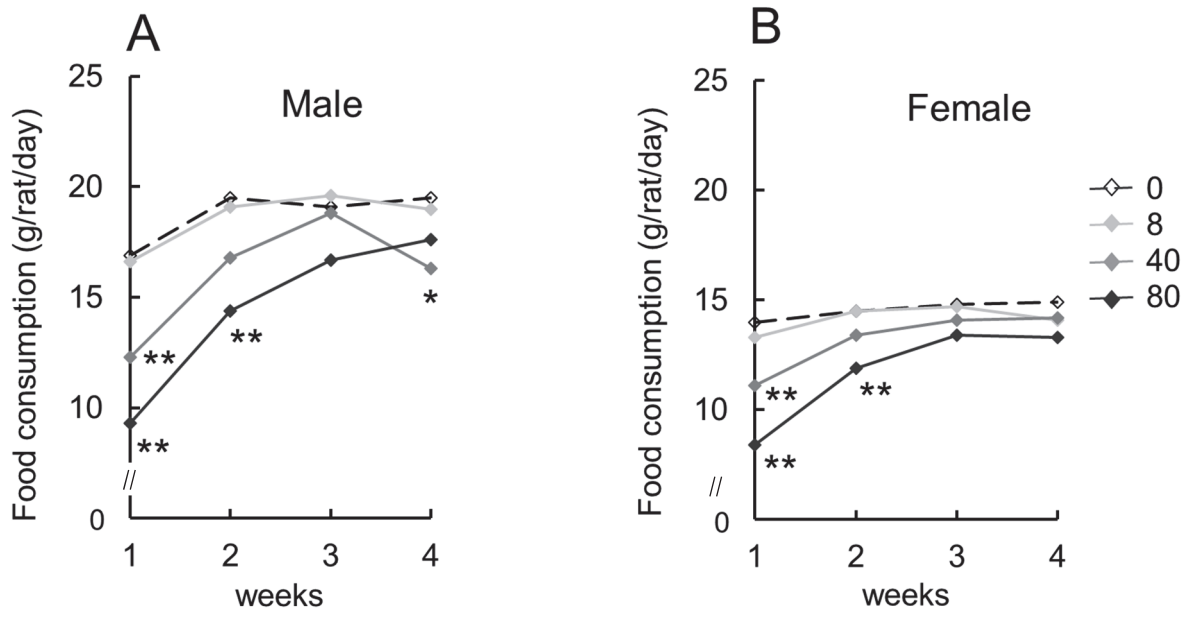


Figure 7. Time-course of food consumption in rats treated with CCA at 0, 8, 40, and 80 mg/kg/day for 28 days. During the treatment, food consumption was measured weekly in males (A) and females (B). *, **: $p \leq 0.05$ or 0.01 versus control group by Dunnett's multiple comparison test.

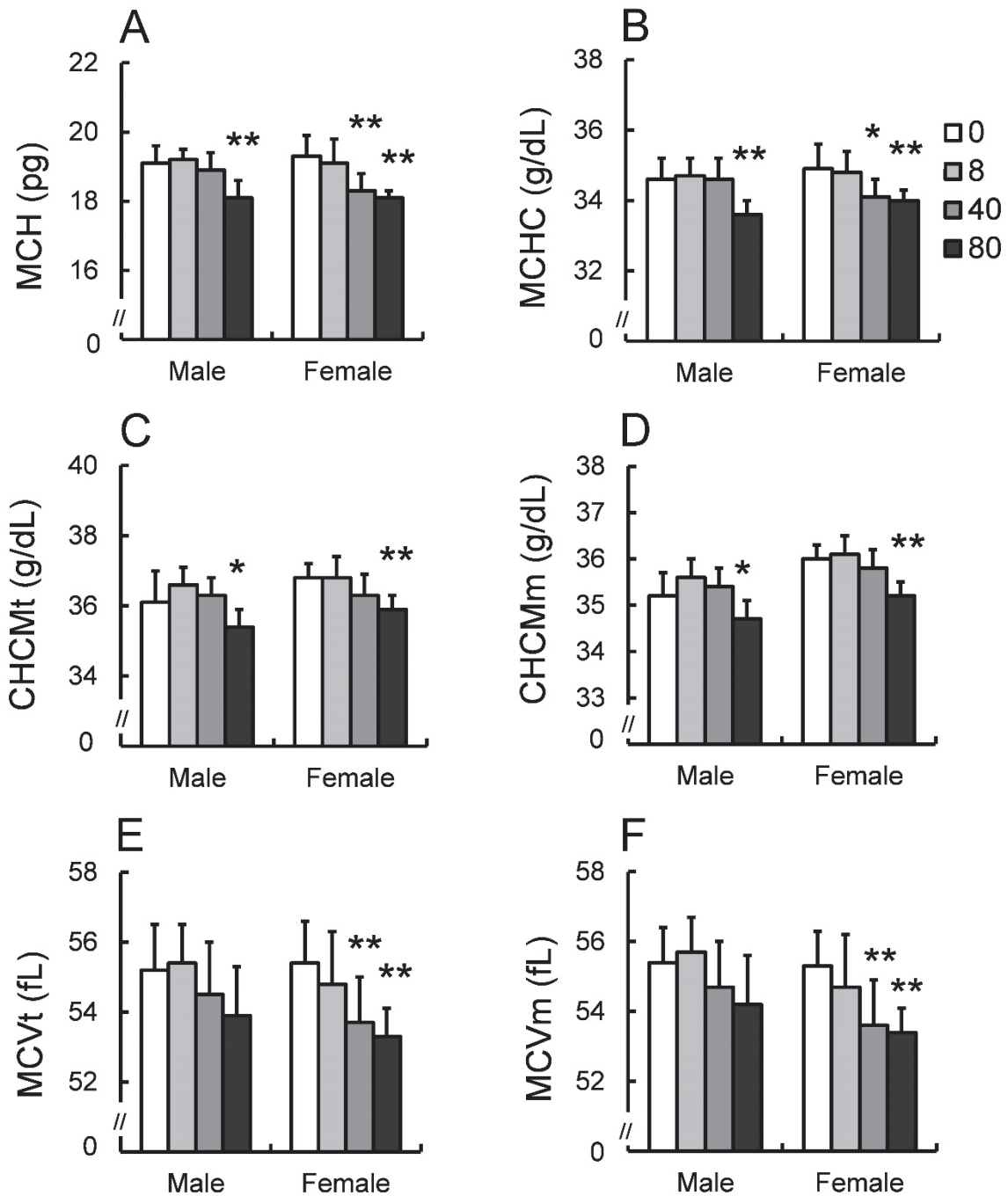


Figure 8. The levels of MCH, MCHC, CHCM, and MCV in rats treated with CCA at 0, 8, 40, and 80 mg/kg/day for 28 days. Blood samples were collected and subjected to hematology. (A) MCH; (B) MCHC; (C, E) CHCM and MCV in total erythrocyte (CHCMt and MCVt, respectively); and (D, F) CHCM and MCV in mature erythrocyte (CHCMm and MCVm, respectively). *, **: $p \leq 0.05$ or 0.01 versus control group by Dunnett's multiple comparison test.

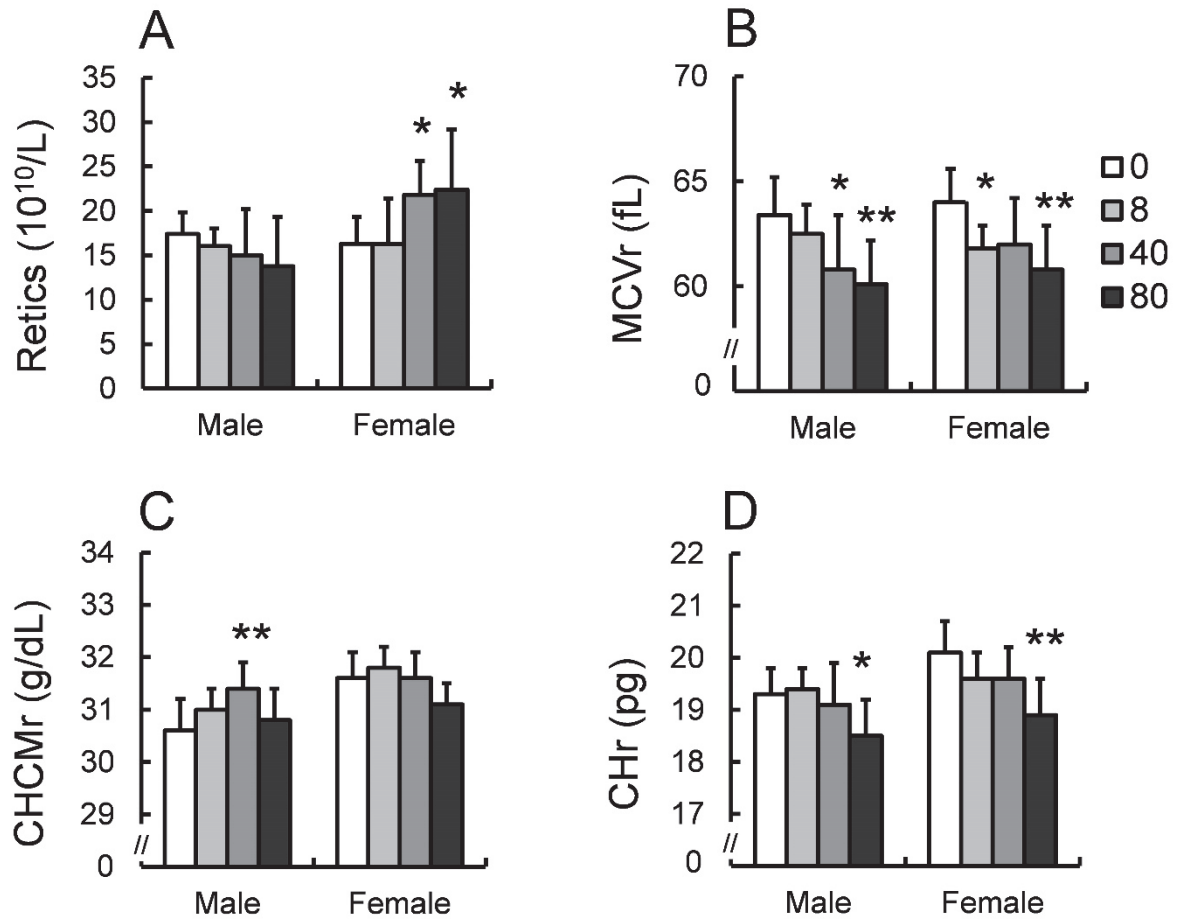


Figure 9. Reticulocyte analysis in rats treated with CCA at 0, 8, 40, and 80 mg/kg/day for 28 days. Blood samples were collected and subjected to hematological studies. (A) Reticulocyte count (Retics); (B) MCV in reticulocyte (MCVr); (C) CHCM in reticulocyte (CHCMr); and (D) Content of hemoglobin per reticulocyte (CHr). *, **: $p \leq 0.05$ or 0.01 versus control group by Dunnett's multiple comparison test.

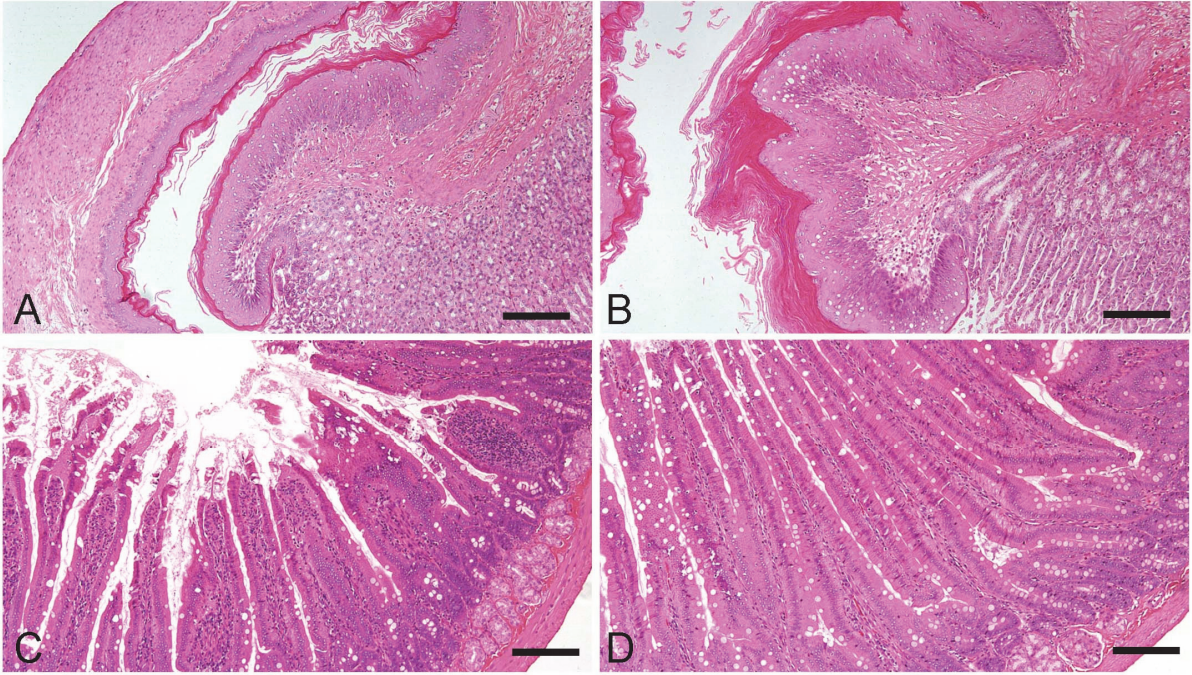


Figure 10. Representative images of histopathological lesions in rats treated with CCA. Micrographs of the forestomach (A and B) and duodenum (C and D) stained with H&E were obtained from rats orally administered CCA at 0 (A and C; Normal) and 80 mg/kg/day (B and D) for 28 days. (B) Hyperkeratosis of squamous epithelial cell; (D) Mucosal epithelial cell hyperplasia. Scale bar = 100 μm.

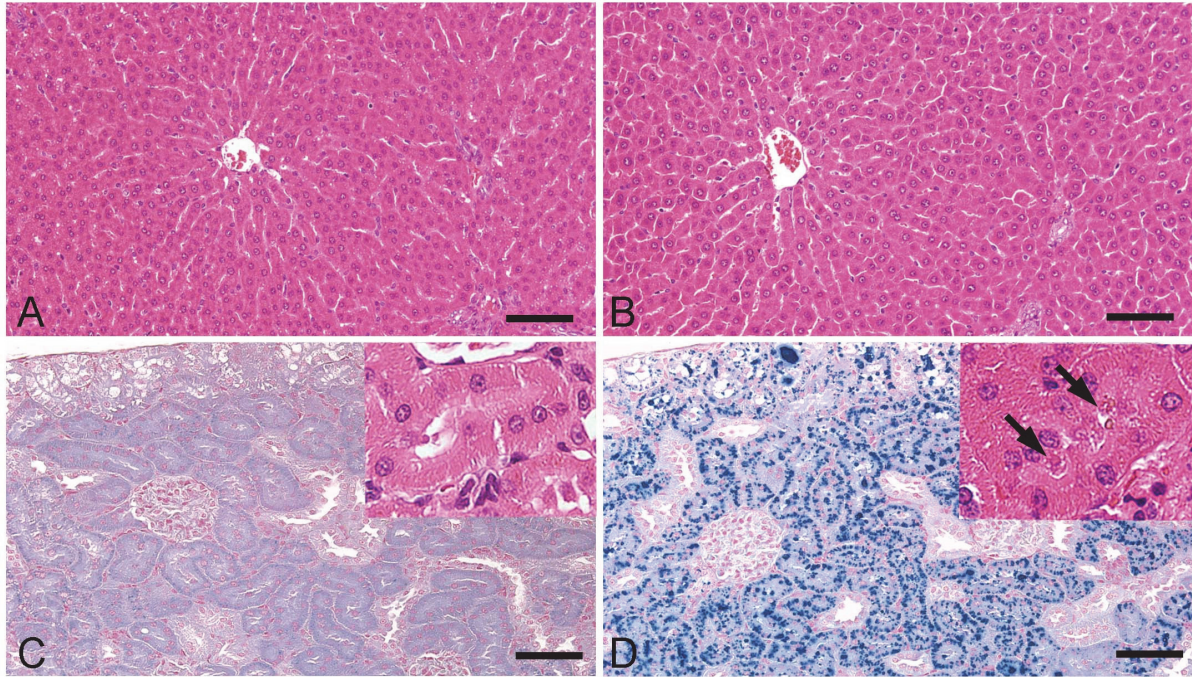


Figure 11. Representative images of histopathological lesions in rats treated with CCA. Micrographs of the liver (A and B) stained with H&E and of the kidneys (C and D) stained with Schmorl's reagent were obtained from rats orally administered CCA at 0 (A and C; Normal) and 80 mg/kg/day (B and D) for 28 days. (B) Diffuse hepatocellular hypertrophy; (D) Deposition of brown pigments stained positively in the proximal tubules. Inset (C and D): Representative images of the proximal tubule stained with H&E from CCA 0 (C) and 80 mg/kg/day (D). Arrows (D) show brown pigments deposited in proximal tubule. Scale bar = 50 μm .

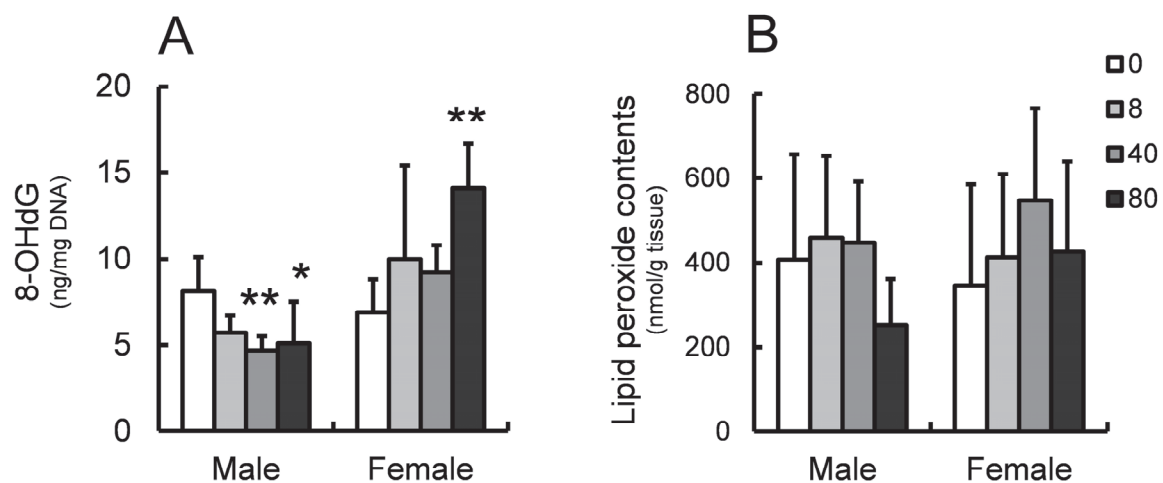


Figure 12. Determination of oxidative stress markers in rats treated with CCA at 0, 8, 40, and 80 mg/kg/day for 28 days. 8-OHdG (A) and lipid peroxide contents (B) in liver samples. *, **: $p \leq 0.05$ or 0.01 versus control group by Dunnett's multiple comparison test.

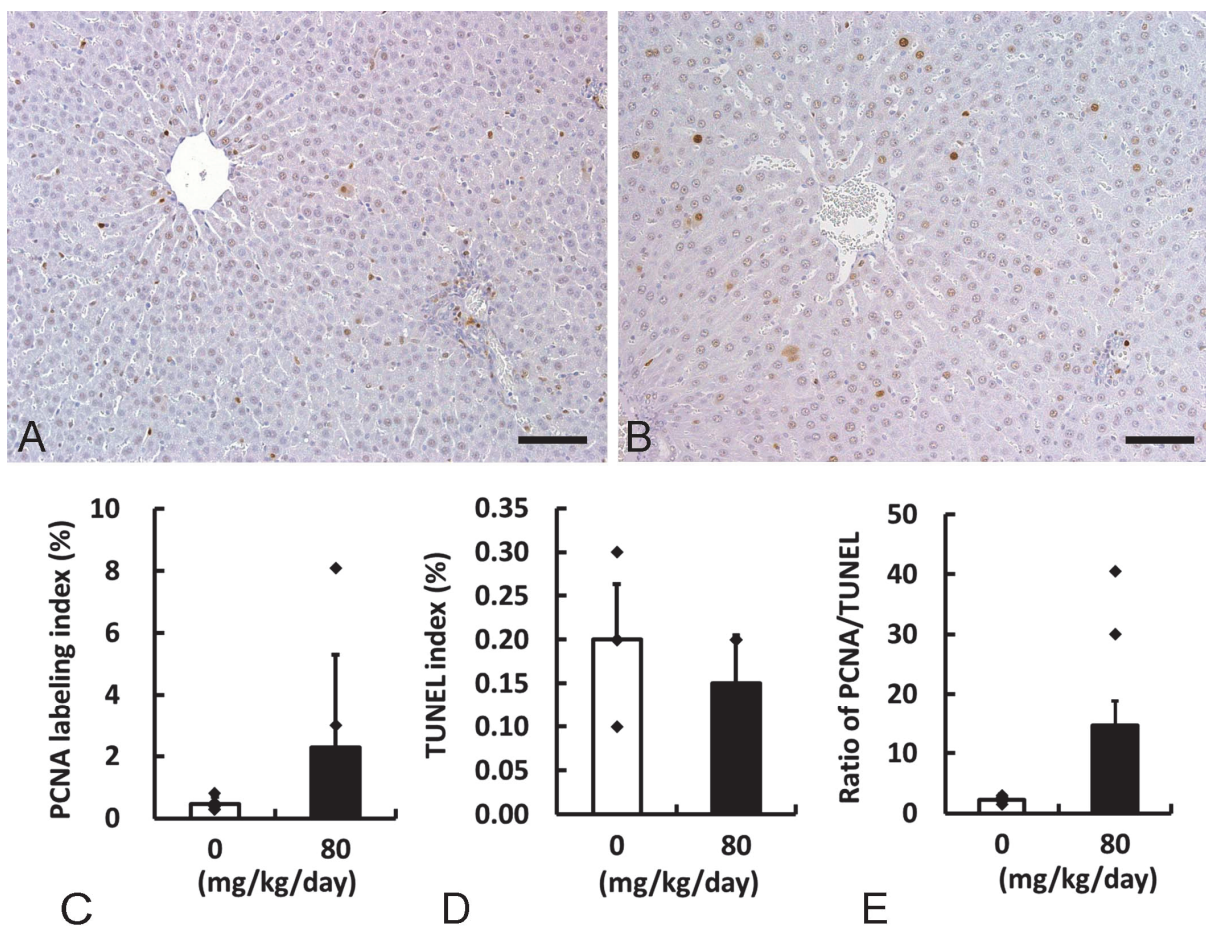


Figure 13. Cell proliferation and apoptosis in the liver of female rats treated with CCA at 0 and 80 mg/kg/day for 28 days. Representative image of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in control (A) and 80 mg/kg/day-treated female (B). Scale bar = 50 µm. Quantitative analysis in PCNA labeling index (C) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) index (D). Ratio of PCNA labeling and TUNEL indices are calculated (E). N=6.

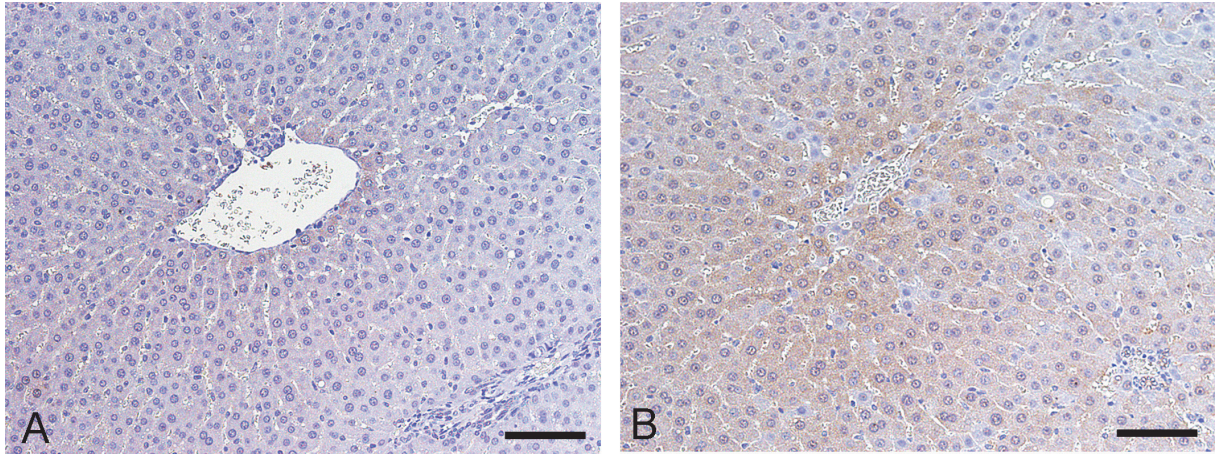


Figure 14. Representative images of glutathione immunostaining in the liver of female rats treated with CCA at 0 and 80 mg/kg/day for 28 days. (A) A control female. (B) An 80 mg/kg/day-treated female. Scale bar = 50 μ m.

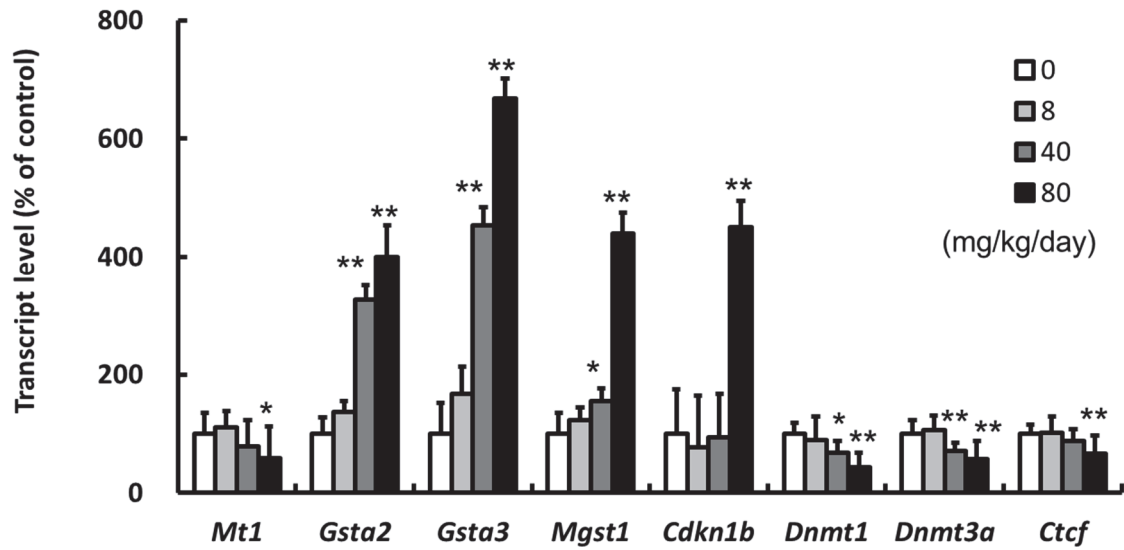


Figure 15. Transcriptional levels of genes related to antioxidant, GST, cell proliferation, and DNA methylation in the liver of female rats treated with CCA at 0, 8, 40, and 80 mg/kg/day for 28 days. The data consists of metallothionein 1 (*Mt1*), glutathione S-transferase alpha 2 (*Gsta2*), glutathione S-transferase alpha 3 (*Gsta3*), microsomal glutathione S-transferase 1 (*Mgst1*), cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (*Cdkn1b/p27*), DNA methyltransferase 1 (*Dnmt1*), DNA methyltransferase 3 alpha (*Dnmt3a*), and CCCTC-binding factor (*Ctcf*), and is presented as a percentage of the control levels. *, **: $p \leq 0.05$ or 0.01 versus control group by Dunnett's multiple comparison test. N=10.

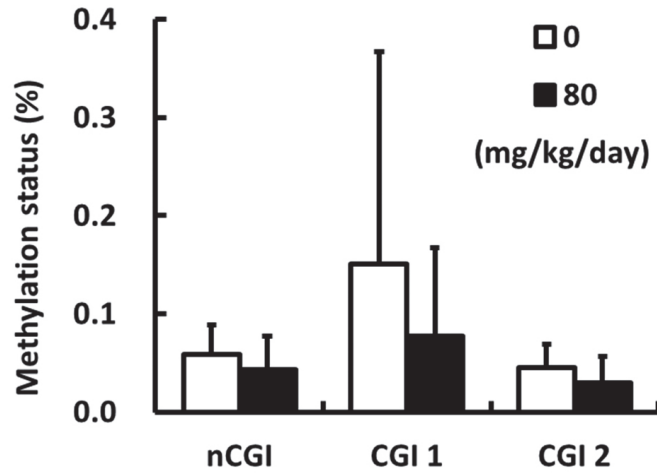


Figure 16. Methylation status in the promoter region of *Mtl*. The data are shown in the non-CGI site (nCGI), first CGI (CGI 1), and third CGI closest to the transcription start site (CGI 2). The female rats were orally treated with 0 or 80 mg/kg/day of CCA for 28 days. N=6.

Table 1. Histopathological findings in the urinary bladder.

Lesion	Group						
	CTL			DMA(V)			Untreated CTL
	-NAC	+NAC 1.6 mg/kg	+NAC 90 mg/kg	-NAC	+NAC 1.6 mg/kg	+NAC 90 mg/kg	
No. of animals examined	4	4	4	6	6	5	4
Inflammation	0	0	1	1	4	3	0
Urothelial cell hyperplasia	0	0	0	0	0	2	0

CTL, Control group; DMA(V), DMA(V)-treated group.

Table 2. Selected clinical signs from rats treated with CCA.

Sex	Clinical sign	Dose level (mg/kg/day)			
		0	8	40	80
Male		N= 10	10	10	10
	Consciousness: Sedation	0	0	0	5*
	Mouth: Salivation	1	0	0	3
	Fur: Soiled fur	0	0	0	1
Female		N= 10	10	10	10
	Consciousness: Sedation	0	0	1	4*
	Mouth: Salivation	0	0	3	2
	Fur: Soiled fur	0	0	6**	5*

Data represent incidence of each sign.

Significantly different from control : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (Fisher's exact probability test).

Table 3. Selected hematological parameters from rats treated with CCA.

Sex	Parameter	Dose level (mg/kg/day)			
		0	8	40	80
Male		N= 10	10	10	9
	Ht (%)	45.0 ± 1.8	45.7 ± 1.3	44.3 ± 1.0	43.9 ± 1.3
	Hb (g/dL)	15.5 ± 0.5	15.9 ± 0.4	15.3 ± 0.4	14.7 ± 0.4**
	RBC (10 ⁶ /μL)	8.14 ± 0.26	8.25 ± 0.21	8.13 ± 0.31	8.15 ± 0.16
	RDW (%)	12.2 ± 0.6	12.1 ± 0.2	12.9 ± 0.8	13.5 ± 0.5**
	HDW (g/dL)	2.40 ± 0.20	2.34 ± 0.07	2.47 ± 0.12	2.56 ± 0.23
	WBC (10 ³ /μL)	7.23 ± 1.22	9.01 ± 1.98	11.46 ± 2.09**	11.76 ± 2.17**
	Lymphocyte (10 ³ /μL)	5.80 ± 1.21	7.00 ± 1.69	9.47 ± 1.77**	9.45 ± 1.97**
	Neutrophil (10 ³ /μL)	1.16 ± 0.46	1.67 ± 0.79	1.60 ± 0.50	1.92 ± 0.48*
	Monocyte (10 ³ /μL)	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.18 ± 0.10**
	Eosinophil (10 ³ /μL)	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.04 ± 0.02
Female		N= 10	10	10	9
	Ht (%)	42.7 ± 1.3	43.1 ± 1.1	41.2 ± 1.2	40.6 ± 2.1*
	Hb (g/dL)	14.9 ± 0.5	15.0 ± 0.5	14.1 ± 0.5**	13.8 ± 0.8**
	RBC (10 ⁶ /μL)	7.70 ± 0.33	7.87 ± 0.22	7.69 ± 0.26	7.61 ± 0.44
	RDW (%)	12.0 ± 2.1	11.5 ± 0.7	12.5 ± 1.1	13.6 ± 1.1**
	HDW (g/dL)	2.19 ± 0.14	2.19 ± 0.14	2.44 ± 0.15**	2.63 ± 0.15**
	WBC (10 ³ /μL)	4.85 ± 1.09	5.28 ± 1.49	8.44 ± 1.68**	7.13 ± 1.83**
	Lymphocyte (10 ³ /μL)	3.81 ± 0.83	4.26 ± 1.25	7.41 ± 1.64**	6.14 ± 1.82**
	Neutrophil (10 ³ /μL)	0.88 ± 0.29	0.85 ± 0.31	0.82 ± 0.24	0.76 ± 0.23
	Monocyte (10 ³ /μL)	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.08**
	Eosinophil (10 ³ /μL)	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01**

Data represent mean and standard deviation.

Significantly different from control : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (Dunnett's multiple comparison test).

Table 4. Selected blood biochemistry parameters from rats treated with CCA.

Sex	Parameter	Dose level (mg/kg/day)			
		0	8	40	80
Male		N= 10	10	10	9
	ALP (U/L)	381 ± 58	355 ± 114	242 ± 42**	258 ± 137**
	AST (U/L)	73 ± 8	75 ± 9	72 ± 11	107 ± 62
	ALT (U/L)	26 ± 4	24 ± 4	27 ± 7	56 ± 56
	GGTP (U/L)	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	5 ± 12
	Creat (mg/dL)	0.32 ± 0.08	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.03 ± 0.06
	BUN (mg/dL)	17.6 ± 1.7	18.2 ± 2.9	19.4 ± 4.2	23.7 ± 4.7**
	TP (g/dL)	6.12 ± 0.28	6.14 ± 0.32	5.89 ± 0.25	5.49 ± 0.46**
	Alb (g/dL)	4.23 ± 0.19	4.23 ± 0.26	4.09 ± 0.19	3.83 ± 0.33**
	Glob (g/dL)	1.90 ± 0.11	1.92 ± 0.10	1.80 ± 0.08	1.67 ± 0.16**
	A/G ratio	2.23 ± 0.08	2.21 ± 0.13	2.27 ± 0.06	2.30 ± 0.15
	Gluc (mg/dL)	148 ± 19	145 ± 16	130 ± 11*	123 ± 16**
	T.Chol (mg/dL)	54 ± 7	60 ± 11	64 ± 9	75 ± 30*
	TG (mg/dL)	47 ± 24	65 ± 33	45 ± 16	44 ± 17
	T.Bil (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.04**
	P (mg/dL)	7.0 ± 0.8	7.2 ± 0.5	7.3 ± 0.5	7.7 ± 0.4*
	Na (mEq/L)	146.9 ± 1.4	146.3 ± 1.0	147.1 ± 1.3	145.9 ± 1.2
	K (mEq/L)	3.44 ± 0.33	3.38 ± 0.19	3.32 ± 0.13	3.38 ± 0.21
	Cl (mEq/L)	107.4 ± 0.9	106.7 ± 1.1	107.3 ± 1.0	107.1 ± 1.5
Female		N= 10	10	10	9
	ALP (U/L)	223 ± 66	190 ± 41	168 ± 51	164 ± 62
	AST (U/L)	70 ± 8	67 ± 6	56 ± 5**	95 ± 114
	ALT (U/L)	21 ± 1	15 ± 2**	15 ± 4**	25 ± 24
	GGTP (U/L)	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	9 ± 22**
	Creat (mg/dL)	0.31 ± 0.05	0.38 ± 0.07**	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.03
	BUN (mg/dL)	19.5 ± 3.1	25.0 ± 3.8*	24.2 ± 5.8	24.2 ± 4.3
	TP (g/dL)	6.03 ± 0.30	6.08 ± 0.20	5.45 ± 0.33**	5.28 ± 0.20**
	Alb (g/dL)	4.11 ± 0.19	4.16 ± 0.15	3.81 ± 0.19**	3.69 ± 0.12**
	Glob (g/dL)	1.92 ± 0.16	1.92 ± 0.11	1.65 ± 0.16**	1.60 ± 0.11**
	A/G ratio	2.15 ± 0.15	2.17 ± 0.14	2.32 ± 0.14*	2.32 ± 0.13*
	Gluc (mg/dL)	112 ± 18	107 ± 13	118 ± 13	137 ± 22**
	T.Chol (mg/dL)	51 ± 10	53 ± 12	61 ± 16	76 ± 34*
	TG (mg/dL)	16 ± 11	19 ± 9	28 ± 6	52 ± 20**
	T.Bil (mg/dL)	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.17 ± 0.33
	P (mg/dL)	5.8 ± 0.9	6.2 ± 0.5	7.4 ± 0.7**	7.9 ± 0.5**
	Na (mEq/L)	147.1 ± 1.1	147.6 ± 1.5	145.4 ± 2.2	145.9 ± 1.7
	K (mEq/L)	3.03 ± 0.22	3.18 ± 0.16	3.46 ± 0.25**	3.36 ± 0.24**
	Cl (mEq/L)	110.6 ± 1.0	110.6 ± 1.1	108.1 ± 1.0**	107.5 ± 2.0**

Data represent mean and standard deviation.

Significantly different from control : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (Dunnett's multiple comparison test).

Table 5. Selected histopathological lesions from rats treated with CCA.

Sex	Site and lesion	Dose level (mg/kg/day)			
		0	8	40	80
Male		N= 10	10	10	9
	Thymus: Atrophy, cortical	0	0	0	3
	Lymph node(mesenteric): Sinus erythrocytosis	0	0	3	8**
	Forestomach: Hyperkeratosis	0	0	1	7**
	Duodenum: Hyperplasia, mucosal epithelial cell	0	1	9**	9**
	Jejunum: Hyperplasia, mucosal epithelial cell	0	3	9**	9**
	Ileum: Hyperplasia, mucosal epithelial cell	0	3	9**	9**
	Rectum: Hypertrophy, goblet cell	0	0	1	5*
	Kidney: Deposition, brown pigment, proximal tubular cell	0	0	10**	9**
Female		N= 10	10	10	10
	Lymph node(mesenteric): Sinus erythrocytosis	1	0	5	8**
	Forestomach: Hyperkeratosis	0	0	0	4*
	Duodenum: Hyperplasia, mucosal epithelial cell	0	0	9**	9**
	Jejunum: Hyperplasia, mucosal epithelial cell	0	0	8**	10**
	Ileum: Hyperplasia, mucosal epithelial cell	0	1	6**	8**
	Rectum: Hypertrophy, goblet cell	0	0	0	4*
	Liver: Hypertrophy, hepatocyte, diffuse	0	0	10**	10**
	Kidney: Deposition, brown pigment, proximal tubular cell	0	0	10**	10**

Data represent incidence of each lesion.

Significantly different from control : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (Fisher's exact probability test).

Table 6. Selected organ weight from rats treated with CCA.

Sex	Parameter	Dose level (mg/kg/day)			
		0	8	40	80
Male	N=	10	10	10	9
	Brain (mg)	1920 ± 67	1947 ± 91	1820 ± 76*	1864 ± 77
	Brain (%)	0.686 ± 0.028	0.691 ± 0.032	0.704 ± 0.058	0.764 ± 0.048**
	Pituitary (mg)	8.2 ± 1.3	8.3 ± 1.5	7.5 ± 0.6	7.4 ± 0.6
	Pituitary (%)	0.0029 ± 0.0004	0.0030 ± 0.0004	0.0029 ± 0.0002	0.0030 ± 0.0003
	Lung (mg)	1190 ± 70	1211 ± 76	1213 ± 101	1212 ± 127
	Lung (%)	0.425 ± 0.026	0.430 ± 0.032	0.468 ± 0.031*	0.495 ± 0.045**
	Thymus (mg)	460 ± 72	432 ± 100	343 ± 38**	318 ± 99**
	Thymus (%)	0.164 ± 0.022	0.153 ± 0.033	0.132 ± 0.011*	0.129 ± 0.035*
	Liver (g)	7.87 ± 0.67	7.90 ± 0.70	7.92 ± 0.75	8.67 ± 1.03
	Liver (%)	2.81 ± 0.19	2.80 ± 0.15	3.05 ± 0.13	3.55 ± 0.47**
	Kidneys (mg)	1983 ± 81	2046 ± 164	1963 ± 138	1895 ± 233
	Kidneys (%)	0.708 ± 0.036	0.726 ± 0.050	0.758 ± 0.045	0.772 ± 0.056*
	Spleen (mg)	567 ± 73	536 ± 77	475 ± 77*	449 ± 65**
	Spleen (%)	0.202 ± 0.024	0.189 ± 0.021	0.183 ± 0.024	0.183 ± 0.023
	Prostate (mg)	304 ± 60	302 ± 42	253 ± 64	183 ± 29**
	Prostate (%)	0.109 ± 0.024	0.108 ± 0.016	0.097 ± 0.022	0.075 ± 0.013**
SV/CG (mg)	940 ± 157	939 ± 169	859 ± 187	632 ± 190**	
SV/CG (%)	0.337 ± 0.065	0.335 ± 0.068	0.332 ± 0.074	0.256 ± 0.066*	
Testes (mg)	3158 ± 209	3287 ± 250	3044 ± 195	3142 ± 262	
Testes (%)	1.13 ± 0.10	1.17 ± 0.10	1.17 ± 0.06	1.29 ± 0.12**	
Female	N=	10	10	10	10
	Brain (mg)	1806 ± 70	1802 ± 54	1722 ± 41**	1680 ± 60**
	Brain (%)	0.973 ± 0.051	0.964 ± 0.029	0.924 ± 0.041*	0.925 ± 0.036*
	Pituitary (mg)	11.4 ± 1.2	11.3 ± 1.6	9.7 ± 1.5*	9.3 ± 0.8**
	Pituitary (%)	0.0062 ± 0.0006	0.0060 ± 0.0007	0.0052 ± 0.0006**	0.0051 ± 0.0005**
	Lung (mg)	1047 ± 150	1045 ± 144	1080 ± 105	1048 ± 127
	Lung (%)	0.565 ± 0.085	0.559 ± 0.077	0.579 ± 0.047	0.578 ± 0.072
	Thymus (mg)	424 ± 43	358 ± 40*	311 ± 70**	242 ± 52**
	Thymus (%)	0.228 ± 0.020	0.192 ± 0.024*	0.166 ± 0.034**	0.133 ± 0.029**
	Liver (g)	5.05 ± 0.27	5.25 ± 0.39	6.76 ± 0.59**	7.53 ± 0.82**
	Liver (%)	2.72 ± 0.17	2.81 ± 0.17	3.62 ± 0.26**	4.16 ± 0.59**
	Kidneys (mg)	1446 ± 114	1476 ± 105	1608 ± 166*	1620 ± 125*
	Kidneys (%)	0.777 ± 0.043	0.789 ± 0.041	0.860 ± 0.043**	0.892 ± 0.073**
Spleen (mg)	422 ± 52	438 ± 46	406 ± 38	385 ± 41	
Spleen (%)	0.227 ± 0.029	0.234 ± 0.023	0.218 ± 0.016	0.212 ± 0.019	

Data represent mean and standard deviation.

Significantly different from control : *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ (Dunnett's multiple comparison test).

%; Relative organ weight to body weight.

Table 7. Primer and probe sets for quantitative RT-PCR.

Gene symbol	Sequence			Amplicon size (bp)
	Forward primer	Reverse primer	TaqMan probe	
<i>Mtl</i>	TTCACCAGATCTCGGAATGGA	ACACAGCCCTGGGCACAT	CTCCAGCTCCTGCGGCTGCAA	124
<i>Gsta2</i>	TTTGATGAGAAAGTTTATACAGAGTCCAGA	ACCATGGGCACCTTGGTCAA	TGGAAAAGCTAAAAGAAAAGACGGGAAATTTGA	86
<i>Gsta3</i>	GGACCCAGGCA TTGTGGA	CAGGCTGAAGAAA CTTC TCACTGT	TTCCCTCTGCTAAAGGCCCTGAGAAACC	92
<i>Mgst1</i>	AGTTCCCTTCGGACTGACGAGAA	GATACCGAGAAAAGGGAACGATGT	ACGCGTGCGAAGA GCCCACC	86
<i>Cdkn1b</i> (p27)	GGTCAAATCATGAAGAACTA	AGTCGAAAATCCACTTG	CTCGCTTCTTCCATATCTCGGCA	86
<i>Dnmt1</i>	ACCAGGCAGACCACCATCA	TGCGTTTCCCTTTTCAGAGTCT	TCACTCAAGGGTCCCGCTAAACGG	81
<i>Dnmt3a</i>	ATAAGCTGGAGTTGCAAGAGTGCT	CTTTATGGAGTTTGACCTGGTGGTA	CGGCAGAATAGCCCAAGTTCAGCAAAGTG	92
<i>Ctcf</i>	GTCCCCACTGTGACACTGTCA	ACACAGCATCACAGTAGCGACAT	AGTGATTTGGGTGTCCACTTGAGAAAAGCA	111

Table 8. Primer and probe sets for quantitative MeDIP-PCR.

Name	Location	Sequence			Amplicon size (bp)
		Forward primer	Reverse primer	TaqMan probe	
nCGI	(-)1172 - (-)1074	GGCATAATCAATCATATCGCACAGT	CATTGGTTCACGGCTACTCAGA	AGGTCCCTATAACAGTTAAGC	98
CGI1	(-)798 - (-)648	CGCTTCCTAGGTAAGCGCTCTAC	TCGCAACATATTCCCCACTCA	TAGAGCCGATGGCTAAA	151
CGI2	(-)94 - (-)11	GAGAGCAGACTGTCCGCTAAGC	GTGAATCTGGAGCAACGGTGTA	CATCCCCGACTTCAGC	84

Location indicates the position from the transcription start site.

Table 9. Arsenicals (mg/kg tissue) in liver samples from rats treated with 80 mg/kg/day of CCA.

Arsenicals	Male	Female
As(V)	0.55 ± 0.09	1.08 ± 0.49
As(III)	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.04
MMA	0.15 ± 0.02	0.26 ± 0.25
DMA	3.17 ± 0.37	3.40 ± 0.27
TMA	ND	ND

The data are shown as arsenate (As[V]), arsenite (As[III]), and methylated forms, monomethylated-arsenic (MMA), dimethylated-arsenic (DMA), and trimethylated-arsenic (TMA).

ND: Not detected.

Table 10. Semi-quantitative analysis of GSH immunostaining from female rats treated with CCA.

Grade	Dose level (mg/kg/day)	
	0	80
[N=]	[6]	[6]
+	3	0
++	3	1
+++	0	5
Statistical significance		**

[N=]: Number of animals examined.

Significantly different from control: **, $p \leq 0.01$ (Wilcoxon rank sum test).

Table 11. Microarray analysis of gene expression in the liver from female rats treated with 80 mg/kg/day of CCA.

Gene name	Gene symbol	Accession no.	Fold change
Antioxidant			
glutamate cysteine ligase, modifier subunit	<i>Gclm</i>	NM_017305	3.30
biliverdin reductase A	<i>Blvra</i>	NM_053850	2.94
peroxiredoxin 2	<i>Prdx2</i>	NM_017169	2.24
carbonic anhydrase 3	<i>Car3</i>	NM_019292	2.21
ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	<i>Rnh1</i>	NM_139105	2.17
peroxiredoxin 6	<i>Prdx6</i>	NM_053576	2.00
metallothionein 1	<i>Mt1</i>	NM_138826	0.47
Glutathione-S-transferase			
glutathione S-transferase alpha 2	<i>Gsta2</i>	NM_017013	2.95
glutathione S-transferase, mu 5	<i>Gstm5</i>	NM_172038	2.10
glutathione S-transferase theta 1	<i>Gstt1</i>	NM_053293	2.10
microsomal glutathione S-transferase 1	<i>Mgst1</i>	NM_134349	2.03
Heat shock proteins and ubiquitin-proteasome pathway			
ubiquitin B	<i>Ubb</i>	NM_138895	3.48
heat shock protein family B (small) member 3	<i>Hspb3</i>	NM_031750	2.70
proteasome 26S subunit, non-ATPase 4	<i>Psmc4</i>	NM_031331	2.64
crystallin, alpha B	<i>Cryab</i>	NM_012935	2.48
t-complex 1	<i>Tcp1</i>	NM_012670	2.29
proteasome 26S subunit, ATPase 5	<i>Psmc5</i>	NM_031149	2.15
DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1	<i>Dnaj1</i>	NM_022934	2.00
DNA repair			
nudix hydrolase 1	<i>Nudt1 (Mth1)</i>	NM_057120	2.52
Cell proliferation			
p21 (RAC1) activated kinase 1	<i>Pak1</i>	NM_017198	3.36
eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 alpha	<i>Eif2s1</i>	NM_019356	2.76
connective tissue growth factor	<i>Ctgf</i>	NM_022266	2.72
calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1	<i>Camkk1</i>	NM_031662	2.64
G3BP stress granule assembly factor 1	<i>G3bp1</i>	AB032425	2.63
serine threonine kinase 39	<i>Stk39</i>	NM_019362	2.38
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	<i>Ptpn2</i>	NM_053990	2.20
polo-like kinase 1	<i>Plk1</i>	NM_017100	2.20
cell division cycle 25A	<i>Cdc25a</i>	NM_133571	2.15
Wilms tumor 1	<i>Wt1</i>	NM_031534	2.08
cyclin-dependent kinase 1	<i>Cdk1</i>	NM_019296	0.41
Negative regulation of cell proliferation			
cytokine receptor-like factor 3	<i>Crlf3</i>	AF072835	2.52
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	<i>Cdkn1b (p27)</i>	NM_031762	2.15
Apoptosis			
thymosin, beta 10	<i>Tmsb10</i>	NM_021261	2.86
pro-apoptotic WT1 regulator	<i>Pawr</i>	NM_033485	2.09
insulin-like growth factor 1	<i>Igfl</i>	M15481	0.46

Table 11 (continued). Microarray analysis of gene expression in the liver from female rats treated with 80 mg/kg/day of CCA.

Gene name	Gene symbol	Accession no.	Fold change
DNA methylation			
CCCTC-binding factor	<i>Ctcf</i>	NM_031824	0.45
Cytochrome P450			
cytochrome P450, family 51	<i>Cyp51</i>	NM_012941	4.65
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 23/polypeptide 1	<i>Cyp3a23/3a1</i>	NM_013105	4.54
cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	<i>Cyp2e1</i>	NM_031543	3.50
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	<i>Cyp2f4</i>	NM_019303	2.10
cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 2	<i>Cyp11b2</i>	NM_012538	2.06
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 22	<i>Cyp2c22</i>	NM_138512	2.04
cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1	<i>Cyp4b1</i>	NM_016999	0.45
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 9	<i>Cyp3a9</i>	NM_147206	0.41
Glucose and lipid metabolism			
7-dehydrocholesterol reductase	<i>Dhcr7</i>	NM_022389	2.15
dipeptidylpeptidase 4	<i>Dpp4</i>	NM_012789	2.08
fatty acid binding protein 5, epidermal	<i>Fabp5</i>	NM_145878	2.00
apolipoprotein A4	<i>Apoa4</i>	NM_012737	0.39
Transporter			
solute carrier family 29 member 1	<i>Slc29a1</i>	NM_031684	3.42
solute carrier family 10 member 1	<i>Slc10a1</i>	NM_017047	3.36
purinergic receptor P2X 4	<i>P2rx4</i>	NM_031594	2.54
solute carrier family 17 member 7	<i>Slc17a7</i>	NM_053859	2.18
purinergic receptor P2X 1	<i>P2rx1</i>	NM_012997	2.00
Genes related to hormone			
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	<i>Hsd11b1</i>	NM_017080	3.36
nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	<i>Nr3c2</i>	NM_013131	2.31
progesterone receptor membrane component 1	<i>Pgrmc1</i>	NM_021766	2.09
Others			
olfactory receptor 59	<i>Olr59</i>	NM_173293	2.88
matrix Gla protein	<i>Mgp</i>	NM_012862	2.76
early B-cell factor 1	<i>Ebfl</i>	NM_053820	2.45
dual specificity phosphatase 6	<i>Dusp6</i>	NM_053883	2.08
VPS33B, late endosome and lysosome associated	<i>Vps33b</i>	NM_022286	2.00
arginine vasopressin receptor 1A	<i>Avpr1a</i>	NM_053019	2.00
matrix metalloproteinase 2	<i>Mmp2</i>	NM_031054	2.00
complement C3	<i>C3</i>	NM_016994	0.38