

ヒ素研究におけるフィールドサイエンスと実験科学の融合

熊谷 嘉人

A Fusion of Field and Laboratory Studies in the Investigation of Arsenic

Yoshito KUMAGAI

Doctoral Programs in Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences,
University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

(Received June 1, 2009)

Arsenic is ubiquitously distributed in nature throughout Earth's crust and thus the major source of exposure to this metalloid for the general population is naturally polluted drinking water from wells. In East Asia, more than 30 million people are chronically exposed to arsenic. Interestingly, the manifestations of vascular diseases caused by prolonged exposure to arsenic are consistent with those induced by impaired production of endothelium-derived nitric oxide (NO). However, no information has been available on the relation between NO synthesis and chronic arsenic poisoning in humans. A cross-sectional study in an endemic area of chronic arsenic poisoning in Inner Mongolia and experimental animal studies indicated that long-term exposure to arsenic by drinking water causes reduction of NO production in endothelial cells. Subsequent examinations with rabbits showed that decreased NO production during arsenic exposure is, at least in part, due to an "uncoupling" of endothelial NO synthase evoked by decreased levels of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH₄), a cofactor of the enzyme, leading to endothelial dysfunction. Furthermore, an intervention study in the area of chronic arsenic poisoning in Inner Mongolia suggested that decreased NO levels and peripheral vascular disease in arsenosis patients can be reversed by exposure cessation. In our cellular experiments, we found that arsenic exposure causes adaptive responses against oxidative stress and arsenic cytotoxicity through Nrf2 activation. This review summarizes the results of our recent studies on a fusion of field and laboratory studies on the chronic arsenic poisoning and cellular protection against the metalloid.

Key words—arsenic; nitric oxide; oxidative stress

1. はじめに

衛生薬学とはヒトの健康と健全な環境維持をめざす総合科学であり、主に保健衛生、栄養と食品衛生化学、ヒトと環境に大別される。私は筑波大学において、学部は医学類、修士課程は生命環境科学研究科環境科学専攻及び博士課程は人間総合科学研究科生命システム医学専攻に所属している。衛生薬学出身者が医学と環境科学において貢献できる教育研究とは何か？研究室は環境医学という看板であることから、特にヒトと環境に注目して、薬学で学んだ知識・技術を最大限に発揮して独自の教育研究に務めてきた。医学での“症状→診断→治療”という問題

解決に向かうプロセスは、環境科学でも同様な研究方法がとられており、両分野は共通性がある。数年間の試行錯誤の結果、得られた1つの結論は「フィールドサイエンスと実験科学の融合」に立脚した教育研究スタイルは医学と環境科学に共通な言語となり得るということであった。衛生薬学で学んだ環境衛生学、毒性学、疫学、分析化学、衛生試験法等の知識・技術は、症状と診断を検討する上で必要不可欠である。治療に関しては、臨床という立場でなく栄養化学、食品化学の知識・技術により機能性食品による毒性軽減というアプローチで介入研究に貢献できる。Figure 1にわれわれの研究戦略を示す。本総説では、ヒ素を研究対象として得た最近10年間の研究成果を紹介する。

2. 慢性ヒ素中毒と生体内一酸化窒素(NO)産生

ヒ素は自然界に広範に存在する半金属(メタロイ

筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻(〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1)

e-mail: yk-em-tu@md.tsukuba.ac.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会学術振興賞を記念して記述されたものである。

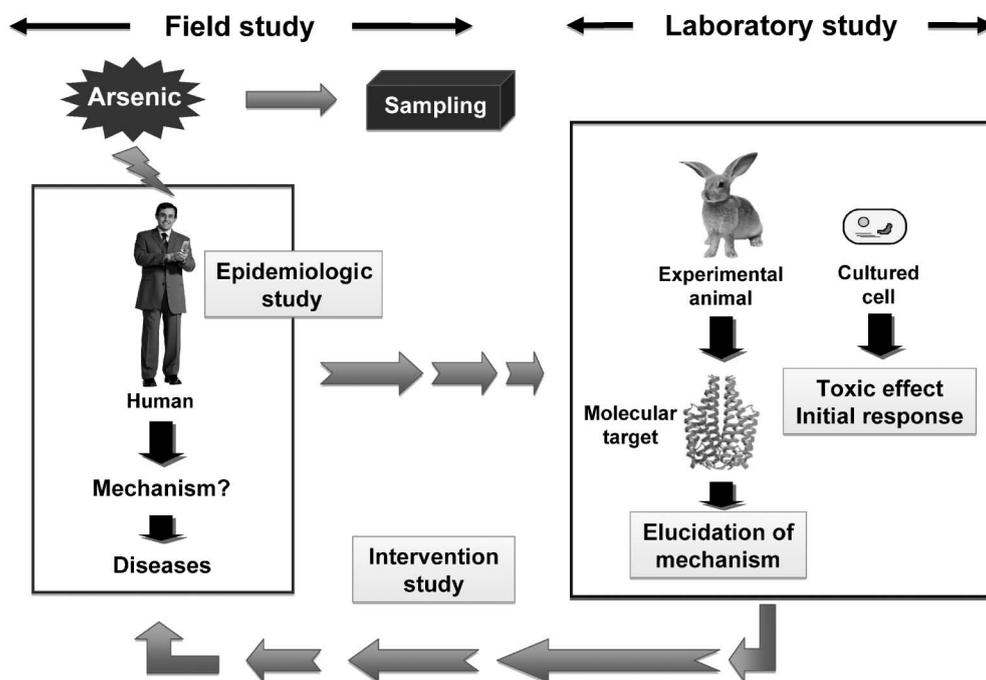


Fig. 1. A Strategy for a Fusion of Field and Laboratory Studies in the Investigation of Arsenic

ド)で、その汚染は地球規模でみられている。アジアではバングラディッシュ、インド西部ベンガル地方、中国、タイ、ミャンマー、ベトナムなどが慢性ヒ素汚染地域として知られている。^{1,2)} 中国の慢性ヒ素汚染は主に飲料水を介する中毒、ヒ素を高濃度含んだ石炭燃焼からの吸入曝露と乾燥食物に付着したヒ素の経口摂取による中毒、及び職場環境中での吸入曝露に由来する中毒の3つに分類することができる。特に中国では地下水の飲用による地域性ヒ素中毒が深刻で、1990年初めには重点的な予防・治療対象の地方病の1つとして指定されている。これまでの報告によると、中国の慢性ヒ素汚染地域でのヒ素曝露人口は200万人以上にのぼり、そのうち数万人のヒ素中毒患者が発生していると推定されている。地域性ヒ素中毒のうち、内モンゴル自治区、山西省、新疆ウイグル自治区や台湾では井戸水の飲用に起因するヒ素中毒が多い。

一般にヒトが慢性的にヒ素に曝露されると、色素沈着、色素脱落、手のひら及び足の裏の角質変性のような皮膚疾患、レイノー症候群のような末梢血管障害、台湾に代表される重度の動脈硬化症である烏脚病や高血圧症等の循環器疾患や種々のがんが生じる。^{3,4)} しかし、これらの中毒症状の発症機序は明らかにされていない。

中国の慢性ヒ素中毒の発症は、鄧小平らによる文化大革命の開放政策に深く関係している。無機ヒ素は、自然環境中では硫黄や鉄と安定な複合体を形成して地殻に存在しているが、鉱物の風化作用や温泉などの自然現象を介して地下水中に混入する機会が多い。⁵⁾ したがって、文化大革命の解放後に感染症防止や農業用水の確保を目的として、各家庭で井戸を掘ることが可能になったことが、慢性ヒ素中毒の発症に係わるヒ素曝露の開始時期(1970年代後半)と考えられている。

以上より、東アジアの慢性ヒ素汚染地域ではヒ素を多量に含む岩盤が多いことに加えて、そこで生じた人為的現象が本環境汚染の主因と言えよう。ヒ素の慢性中毒は、生活を豊かにしようとする反面、思いもしない環境負荷を受けてしまったという皮肉な話である。

生体内で産生される一酸化窒素(NO)は、1987年に“血管内皮由来弛緩因子”として発見されて以



熊谷嘉人

1959年佐賀県生まれ。1988年福岡大学大学院薬学研究科博士課程薬学専攻修了薬学博士、カリフォルニア大学ロサンゼルス校医学部分子薬理に3年間留学、国立環境研究所主任研究員を経て、2003年12月より教授。専門分野は分子毒性学及び環境医学。

来、世界中で精力的な研究が行われ、1998年にはノーベル医学・生理学賞受賞の対象となった。このガス状シグナル分子は、NO合成酵素(NOS)によりアミノ酸の1種であるアルギニンから産生され、神経伝達や血管調節に重要な働きを担っている。⁶⁾そのため、生体内NOの生成減少は神経障害や循環器疾患に関係する。⁷⁾また、生体内NO産生が低下すると、活性酸素種(ROS)の濃度が上昇して酸化ストレスが惹起されることが培養細胞や動物実験の検討から示唆されている。⁸⁾興味深い点は、慢性ヒ素曝露でみられる循環器疾患の症状が、血管調節に重要な役割を担っているNOの産生低下で観察される疾患の症状に酷似していることである。そこでわれわれは、「慢性ヒ素中毒で観察される末梢血管障害や循環器疾患は生体内NO産生の低下によるのではないか」という作業仮説を構築し、生体内ヒ素濃度とNOとの量-反応関係を明らかにすることを目的として、中国の地域性慢性ヒ素汚染地域において断面調査を行った。⁹⁾

3. フィールドサイエンス：慢性ヒ素曝露による生体内NO産生低下と酸化ストレス

われわれは、中国内モンゴル自治区五原県住人に対してインフォームドコンセントを行い、慢性ヒ素曝露患者として33名(男性21名、女性12名)及び対照として10名(男女5名)を抽出した。慢性ヒ素曝露患者群は什巴/銀定図に在住の11家族からのボランティアからなり、年齢は13-73歳(平均年齢42歳)であった。世界保健機構のヒ素の飲料水基準値は0.01 µg/mlであるのに対して、飲水型慢性ヒ素汚染が深刻な中国での当該基準値は0.05 µg/

mlに設定されている。われわれが調査した住民が使用している井戸水のヒ素濃度は $0.41 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ であり、その大部分が5価の無機ヒ素であった。対照群は什巴/銀定図から35 km離れた沙河在住の5家族からのボランティアからなる。年齢は23-68歳(平均年齢37歳)で、彼らが使用している井戸水のヒ素濃度は $0.02 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ と中国の飲料水基準値を下回っていた。両群はおよそ15 m程度の深さの井戸を使用し、食を含めた生活環境は共に似ており、対象者はいずれも出稼ぎ等により村を離れることのない人々であった。また、井戸の使用期間は平均18年程度であった。ヒ素曝露群の住民において、色素沈着、色素脱落、手足の角質変性、末梢血管障害等の症状が認められたが、対照群ではこれらの症状を示す住民は全くいなかった。⁹⁾

慢性ヒ素曝露群の血液中ヒ素濃度の平均値は、対照群のその約6倍高い値を示した(Fig. 2)。一方、ヒ素曝露群の血清中NO代謝物濃度は対照群のその約半分まで低下しており、血清中NO代謝物濃度は血中ヒ素濃度に逆相関した(Fig. 2)。⁹⁾また、慢性ヒ素曝露群の血液中グルタチオン濃度は対照群より有意に減少し、ヒ素曝露群の血清中LPO量(酸化ストレスの指標)は対照群より有意に高かった。¹⁰⁾以上より、ヒトが慢性的にヒ素に曝露されると、生体内NO産生が低下するだけでなく、酸化ストレスが生じている事実が明らかとなった。

4. 実験科学：慢性ヒ素曝露によるNO産生低下及び酸化ストレスのメカニズム

正常時では、血管内皮型NOS(eNOS)から産生

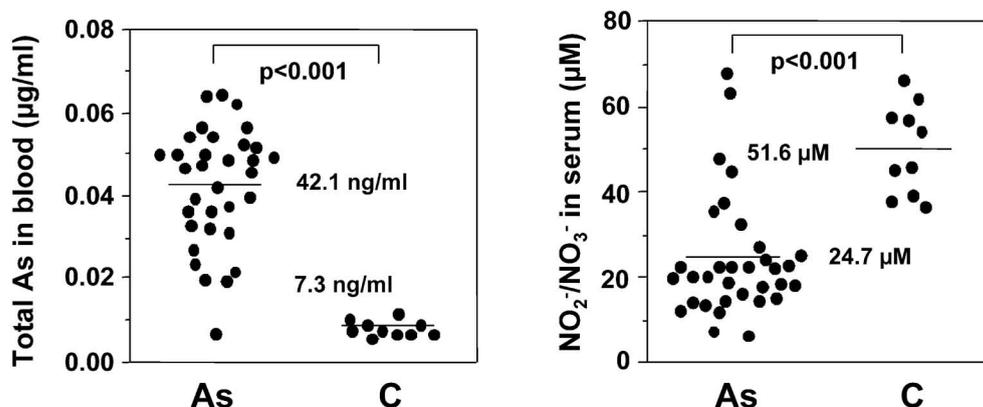


Fig. 2. Levels of Arsenic and Systemic NO Production in Control (C) and Arsenic-exposed Groups (As). Systemic NO production was determined by levels of its oxidation products, nitrite/nitrate in serum of subjects examined. Modified from Pi *et al.*⁹⁾

される NO は血管調節に重要な役割を担っている。しかし、なんらかの原因でアルギニンや NOS の補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (BH₄) の生体内濃度が低下すると、eNOS からの NO 産生量は低下し、代わりに酸化ストレスの原因であるスーパーオキシドや過酸化水素のような ROS を生成することが知られている。¹¹⁾ そこでわれわれは、「慢性ヒ素汚染地域で観察されるヒトにおける酸化ストレスや NO 産生低下は、慢性ヒ素曝露による eNOS の機能障害によるのではないか」という作業仮説に基づき、ヒ素代謝がヒトと酷似しているウサギに 5 価無機ヒ素 (5 μg/ml) を長期間飲水させて種々の検討を行った。¹²⁾

その結果、Fig. 3 に示す通り、無機ヒ素曝露の初期段階では、定常時よりむしろ生体内 NO 産生量の増加が観察された。このことは、NO/cGMP シグナルの上昇を介した無機ヒ素に対する生体の初期応答が生じたことを示唆している。一方、ヒ素曝露後 18 週目における血漿中 NO 代謝物量は、曝露群が対照群の約 75% まで低下した。一方、尿中過酸化水素量は、曝露群が対照群の 1.2 倍有意に高い値を示した。¹²⁾ 慢性ヒ素曝露による酸化ストレスは、肝臓中のグルタチオン還元酵素及びチオレドキシ

還元酵素活性の低下によって支持された。¹³⁾ このような条件下、生体内アルギニン量については両群共に差はみられなかったが、ヒ素曝露群の生体内 BH₄ 濃度は対照群の約 60% まで減少していた。¹²⁾ 正常時では、ウサギの大動脈血管は細胞内カルシウム増加に伴い、NOS の活性化による NO 産生に起因して血管平滑筋の弛緩がみられる。ところが、慢性的にヒ素を飲水したウサギの大動脈血管は細胞内カルシウム増加により一過性の血管収縮が観察された。¹⁴⁾ この血管収縮は、スーパーオキシドの消去剤や NOS 阻害剤をそれぞれ前処置することで消失した。¹²⁾

以上の結果より、5 価の無機ヒ素をウサギに慢性飲水させると、ヒトの場合と同様に生体内 NO 産生量の低下及び酸化ストレスが生じることが明らかとなった (Fig. 3)。同条件下において、組織中 BH₄ 量の低下が観察されることから、eNOS は補酵素 BH₄ の濃度低下に由来する“uncoupling reaction”を生じ、NO の代わりに血管収縮因子であるスーパーオキシドを産生することが示唆された (Fig. 3)。さらに、血管内皮細胞の酵素液を用いた結果より、無機ヒ素の親電子代謝物であるモノメチル 3 価ヒ素の eNOS への共有結合が本酵素活性低

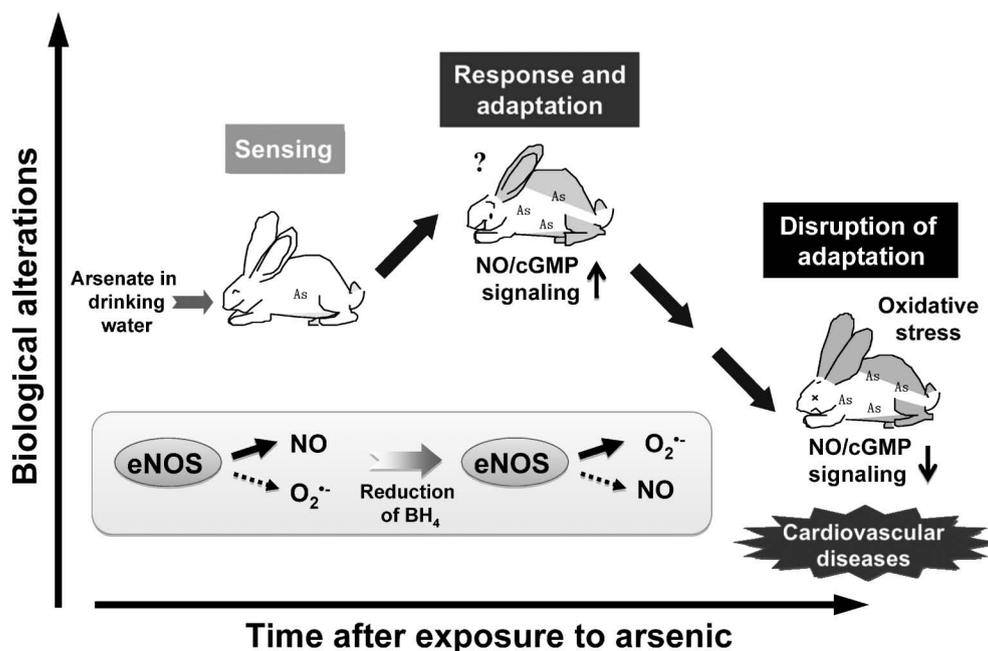


Fig. 3. Initial Response and Adaptation against the Metalloid and Disruption of Adaptation through NO/cGMP Signaling during Prolonged Exposure of Rabbits to Arsenate

cGMP, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate; eNOS, endothelial NO synthase; O₂⁻, superoxide.

下に起因する NO 産生低下に関係することも示した。¹⁵⁾

5. フィールドサイエンス：慢性ヒ素汚染地域での介入研究

われわれは、内モンゴル自治区における慢性ヒ素汚染地域の住民に対して、一定期間環境基準値以下の井戸水に改水することで慢性ヒ素中毒が改善されるか否かを調べる介入研究を行った。¹⁶⁾ 内モンゴル自治区衛生局の協力により、これまで使用していた井戸から中国の環境基準値以下のヒ素を含む井戸を見出し、1年間慢性ヒ素中毒患者に供給した。その結果、井戸水の改水に伴い、血中及び尿中ヒ素濃度は顕著に低下した。このような条件下において、数名の例外を除いて慢性ヒ素曝露により低下した生体内 NO 産生（この場合は尿中 cGMP 量を指標）は増加した (Fig. 4)。また、末梢血管障害の軽減だけでなく、手のひらの角質変性も改善された。¹⁶⁾ これらの介入研究の成果は、井戸水の改水が慢性ヒ素汚染地域での中毒症状の改善と予防対策に貢献できることを示唆している。

6. 実験科学：ヒ素に対する細胞応答と転写因子 Nrf2 の役割

ヒ素を細胞に曝露すると、MAP キナーゼ等のシグナル伝達系に作用して AP-1 や NF- κ B 等の転写因子の活性化（抑制）を引き起し関連遺伝子群の発現制御を攪乱する。^{17,18)} その効果は、細胞の種類や曝露量に応じて細胞増殖やアポトーシスを生じるために“the paradox of arsenic”と呼ばれている。ヒ素の細胞毒性の1つが酸化ストレスの惹起であるこ

とは、抗酸化タンパク質 HO-1 や抗酸化物質グルタチオンの合成律速酵素の発現誘導という細胞の初期応答や酸化的 DNA 損傷から理解できる。ところが、飲水を介してヒ素に長期間曝露されたヒトの赤血球中グルタチオン濃度が対照群のその半分程度まで低下している事実¹⁰⁾ は、ヒ素の慢性曝露により生体の当該金属に対する適応破綻が生じていることを示唆している (Fig. 3)。一方、ヒ素は細胞内に取り込まれるとメチル化及びグルタチオン抱合を受け、MRP 等のトランスポーターを介して細胞外に排泄されるが、^{19,20)} グルタチオンの枯渇やトランスポーターのブロックにより、細胞内ヒ素濃度は上昇してその細胞毒性は増加する。²¹⁾ このことは、ヒ素の毒性発現には細胞内の蓄積が重要であり、ヒ素の解毒代謝系を亢進させて細胞内ヒ素濃度を軽減させると、ヒ素の中毒症状は緩和される可能性を示唆している。

しかしながら、ヒ素によって生じる酸化ストレス並びにヒ素の解毒・排泄を制御する機構は明らかにされていなかった。そこで、われわれは異物代謝と酸化ストレス応答系の制御機構において中心的役割を演じている“Nrf2-Keap1 システム”に着目した。

定常時において、塩基性領域-ロイシンジッパー型転写因子である Nrf2 は Keap1 によって細胞質にトラップされると同時に、ユビキチン・プロテアソーム系による速いタンパク質分解を受けている。しかし、細胞が酸化ストレスを生じる化合物に曝露されると、ROS により Keap1 の反応性システイン残基は酸化修飾され、Keap1 のコンフォメーション変化が生じて、Keap1 と Nrf2 の相互作用は減弱する。その結果、Nrf2 は核に移行して小 Maf 群因子とヘテロ二量体を形成し、抗酸化応答配列 (anti-oxidant responsive element, ARE) に結合して下流の転写を活性化する。^{22,23)}

無機ヒ素をヒト皮膚由来 HaCaT 細胞やマウス骨芽由来 MC3T3-E1 細胞に曝露すると、濃度依存的に転写因子 Nrf2 は活性化された。^{24,25)} その結果、抗酸化タンパク質である HO-1, PrxI 及び A170 だけでなく、無機ヒ素の細胞外排泄亢進に係る GCL (グルタチオン合成の律速酵素)、GST (グルタチオン転移酵素) 及び MRP1 (グルタチオン抱合体を排泄するトランスポーター) のような下流遺伝子群の転写活性化が生じた。同様な Nrf2 の活性化

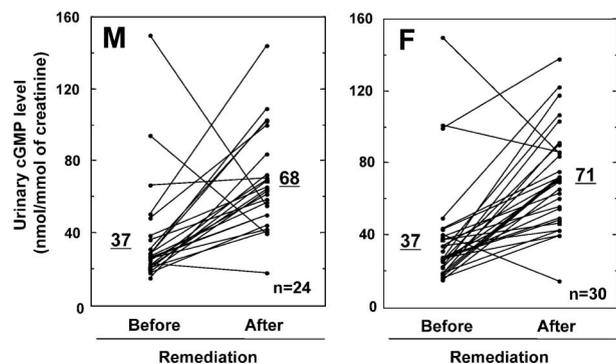


Fig. 4. Systemic NO Production in Untreated Chronic Arsenosis Patients before and after the Switch to Low-arsenic Drinking Water

M, male; F, female. Modified from Pi *et al.*¹⁶⁾

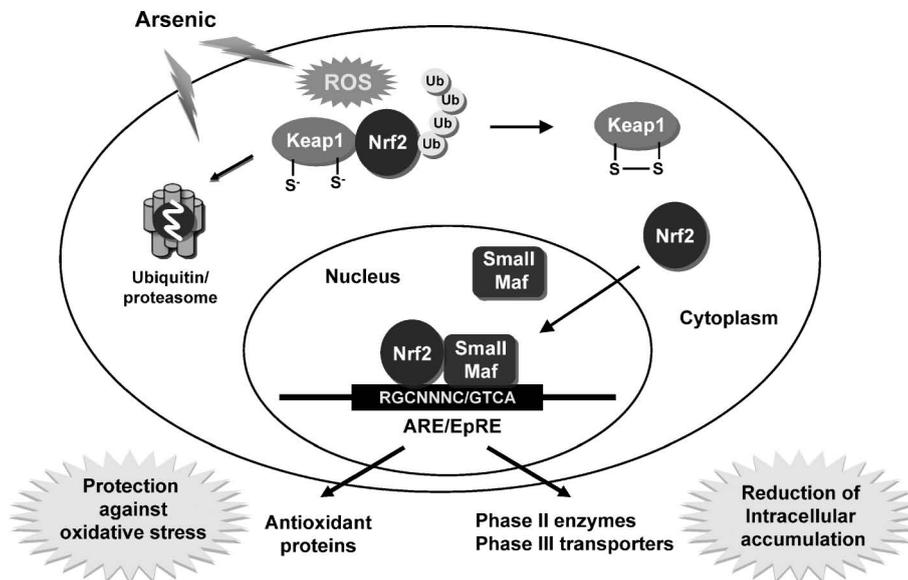


Fig. 5. Cellular Response to Arsenic Through the Nrf2/Keap1 System
 Nrf2, NF-E2-related factor 2; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; Ub, ubiquitin.

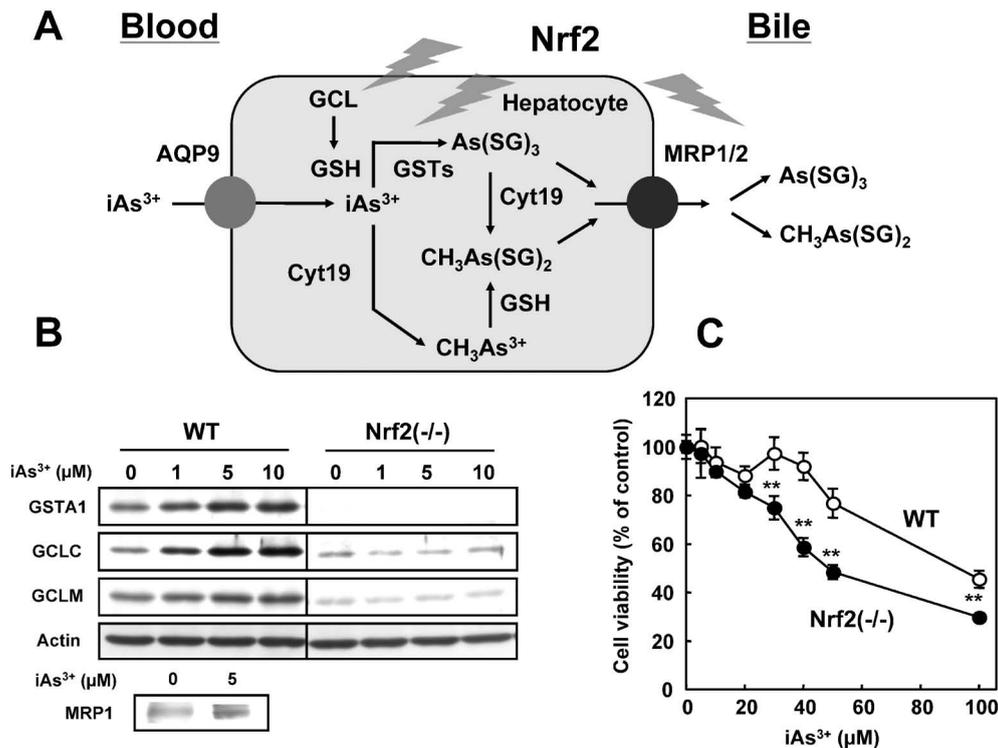


Fig. 6. Biotransformation of Arsenic and Protective Role of Nrf2 against Arsenic-induced Cytotoxicity
 (A) Proposed pathways of transporters for uptake and efflux of arsenite and enzymes responsible for arsenic excretion into extracellular space in hepatocytes. iAs³⁺, inorganic arsenite; As(SG)₃, arsenite triglutathione; Cyt19, arsenic methyltransferase; GCL, glutamate cysteine ligase; GSTs, glutathione S-transferases; GSH, glutathione; AQP9, aquaglyceroporin 9; MRP, multidrug resistance-associated protein. Proteins (orange) are coordinately regulated by Nrf2. (B) Western blot analysis of the downstream proteins regulated by Nrf2 during exposure of primary mouse hepatocytes to inorganic arsenite. GCLC, GCL catalytic subunit; GCLM, GCL modifier subunit. (C) MTT assay following exposure of primary mouse hepatocytes to inorganic arsenite. ***p*<0.01. Modified from Kumagai and Sumi.²⁸⁾

は、茨城県神栖市の地下水汚染で見い出されたジフェニルアルシン酸のような有機ヒ素でも観察された。²⁶⁾ HaCaT 細胞を用いた研究より、ヒ素曝露による Nrf2 活性化には、少なくとも過酸化水素のような ROS の細胞内産生増加が関係することが明らかとなった。²⁵⁾ また、無機ヒ素（あるいはその代謝物）がユビキチン・プロテアソーム系を阻害することで、結果的に Nrf2 の分解抑制に伴い本転写因子の核内移行が亢進することも示唆された（新開ら、未発表データ）。われわれが得た結果を基にして、ヒ素曝露に対する Nrf2 活性化を介した細胞応答を Fig. 5 に示す。Nrf2 活性化を介した抗酸化タンパク質群の発現誘導は、酸化ストレスに対する細胞応答である可能性が高い。

Fig. 6(A) に示す通り、無機ヒ素（3 価）は AQP9 のようなチャンネルを介して肝細胞に取り込まれ、²⁷⁾ Cyt19 によりメチル化及び第 2 相異物代謝酵素群の 1 つである GST によりグルタチオン抱合をそれぞれ受ける。特に、グルタチオン抱合体は MRP1/2 のような第 3 相トランスポーターを介し

て細胞外へ排泄される。²⁸⁾ マウス初代肝細胞において、Nrf2 欠損により無機ヒ素の解毒・排泄に係わる GCL, GST 及び MRP1 の定常レベルでの発現量の顕著な低下だけでなく、無機ヒ素による発現誘導能も消失していることが明らかとなった [Fig. 6 (B)]. このような Nrf2 で統括的に制御されている下流タンパク質の発現抑制によって、ヒ素に対する感受性を増大させた [Fig. 6(C)].²⁸⁾ 一方、ブロッコリースプラウトに含まれている Nrf2 活性化剤スルフォラファン [Fig. 7(A)] を事前に初代肝細胞に処理して GCL, GST 及び MRP1 を発現誘導しておく [Fig. 7(B)], 無機ヒ素単独曝露と比較して細胞内ヒ素濃度は低下し、細胞毒性は軽減されることが明らかとなった [Figs. 7(C) and (D)].²⁹⁾ 以上より、ヒ素による Nrf2 活性化は酸化ストレスの防御だけでなく、ヒ素の細胞外排泄の亢進に重要な役割を演じている転写因子であることが示された。

7. おわりに

フィールドサイエンスにおいて、中国内モンゴル自治区の慢性ヒ素汚染地域での介入研究で得られた

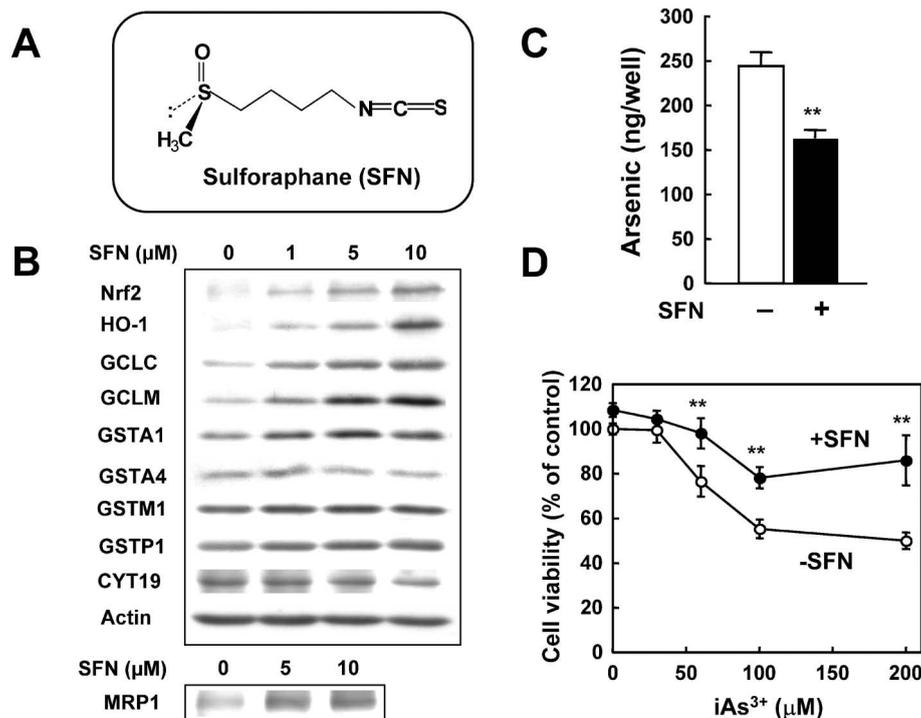


Fig. 7. Sulforaphane, a Nrf2 Activator, Suppresses Cellular Accumulation of Arsenic and Its Cytotoxicity in Primary Mouse Hepatocytes

(A) Structure of sulforaphane. (B) Sulforaphane-mediated activation of Nrf2 and up-regulation of the downstream gene products in primary mouse hepatocytes. HO-1, heme oxygenase-1. (C) Effect of sulforaphane on arsenic accumulation in the cells. Cells were incubated with either DMSO (0.1%) or sulforaphane (5 μM) for 24 h prior to exposure with 5 μM inorganic arsenite for 24 h. Each value represents the means ± S.D. ***p* < 0.01 vs. DMSO. (D) Effect of sulforaphane on inorganic arsenite-induced cytotoxicity in the cells. Cells were incubated with either DMSO (○) or 5 μM sulforaphane (●) for 24 h prior to the exposure to the indicated inorganic arsenite concentrations. Each value represents the means ± S.D. ***p* < 0.01 vs. DMSO. Modified from Kumagai and Sumi.²⁸⁾

重要なことは、生体内ヒ素濃度を低下させると慢性ヒ素曝露による中毒症状は改善されるという事実を示せたことである。しかし、水源や費用等の諸問題を考慮すると、ヒ素汚染が多発している東アジア全域に対して井戸水改水を網羅的に実施することは不可能であることから、日々摂取しているヒ素を効率良く体外に排泄するシステムも見い出すことが重要であると思われる。一方、実験科学で得られた成果は、無機ヒ素の細胞内濃度低下に係わる転写因子としての Nrf2 の重要性を示せたことであり、スルフォラファンのような植物由来の Nrf2 活性化剤を使用した動物実験、さらには慢性ヒ素汚染地域住民に対する介入研究に対して貴重な情報を提供したと言えよう。

謝辞 本研究のフィールドサイエンスは中国医科大学公衆衛生院、中国内モンゴル自治区衛生局、聖マリアンナ大学医学部予防医学、旭川医科大学衛生学及び東海大学医学部環境保健学との共同により行った。また、本研究の実験科学は、筑波大学環境医学研究室で行った研究であり、下條信弘名誉教授及び当該研究室の皆様へ感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Nordstrom D. K., *Science*, **296**, 2143–2145 (2002).
- 2) Shinkai Y., Truc D. V., Sumi D., Canh D., Kumagai Y., *J. Health Sci.*, **53**, 344–346 (2007).
- 3) Engel R. R., Hopenhayn-Rich C., Receveur O., Smith A. H., *Epidemiol. Rev.*, **16**, 184–209 (1994).
- 4) Chen C. J., Hsueh Y. M., Lai M. S., Shyu M. P., Chen S. Y., Wu M. M., Kuo T. L., Tai T. U., *Hypertension*, **25**, 53–60 (1995).
- 5) Smedley P. L., Kinniburgh D. G., *Appl. Geochem.*, **17**, 517–568 (2002).
- 6) Nathan C., *FASEB J.*, **6**, 3051–3064 (1992).
- 7) Umans J. G., Levi R., *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 771–790 (1995).
- 8) Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., Kihara Y., *Circ. J.*, **73**, 411–418 (2009).
- 9) Pi J. B., Kumagai Y., Sun G. F., Yamauchi H., Yoshida T., Iso H., Endo A., Yu L. A., Yuki K., Miyauchi T., Shimojo N., *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1137–1142 (2000).
- 10) Pi J. B., Yamauchi H., Kumagai Y., Sun G. F., Yoshida T., Aikawa H., Hopenhayn-Rich C., Shimojo N., *Environ. Health Perspect.*, **110**, 331–336 (2002).
- 11) Reif A., Fröhlich L. G., Kotsonis P., Frey A., Bömmel H. M., Wink D. A., Pfeleiderer W., Schmidt H. H., *J. Biol. Chem.*, **274**, 24921–24929 (1999).
- 12) Pi J. B., Horiguchi S., Sun Y., Nikaido M., Shimojo N., Hayashi T., Yamauchi H., Sun G. F., Itoh K., Yamamoto M., Waalkes M. P., Kumagai Y., *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 102–113 (2003).
- 13) Nikaido M., Pi J. B., Kumagai Y., Yamauchi H., Taguchi K., Horiguchi S., Sun Y., Sun G. F., Shimojo N., *Environ. Toxicol.*, **18**, 306–311 (2003).
- 14) Kumagai Y., Pi J. B., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **198**, 450–457, (2004).
- 15) Sumi D., Taguchi K., Sun Y., Shinkai Y., Kumagai Y., *J. Health Sci.*, **52**, 728–730 (2005).
- 16) Pi J. B., Yamauchi H., Sun G. F., Yoshida T., Aikawa H., Fujimoto W., Iso H., Cui R. Z., Kumagai Y., *Environ. Health Perspect.*, **113**, 339–341 (2005).
- 17) Wijeweera J. B., Gandolfi A. J., Parrish A., Lantz R. C., *Toxicol. Sci.*, **61**, 283–294 (2001).
- 18) Huang C., Bode A. M., Chen N. Y., Ma W. Y., Li J., Nomura M., Dong Z., *Anticancer Res.*, **21**, 261–267 (2001).
- 19) Kala S. V., Neely M. W., Kala G., Prater C. I., Atwood D. W., Rice J. S., Lieberman M. W., *J. Biol. Chem.*, **275**, 33404–33408 (2000).
- 20) Leslie E. M., Haimeur A., Waalkes M. P., *J. Biol. Chem.*, **279**, 32700–32708 (2004).
- 21) Liu J., Chen H., Miller D. S., Saavedra J. E., Keefer L. K., Johnson D. R., Klaassen C. D., Waalkes M. P., *Mol. Pharmacol.*, **60**, 302–309 (2001).
- 22) Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313–322 (1997).
- 23) Motohashi H., Yamamoto M., *Trends Mol. Med.*, **10**, 549–557 (2004).

-
- 24) Aono J., Yanagawa T., Itoh K., Li B. J., Yoshida H., Kumagai Y., Yamamoto M., Ishii T., *Environ. Health Perspect.*, **305**, 271–277 (2003).
- 25) Pi J. B., Qu W., Reece J. M., Kumagai Y., Waalkes M. P., *Exp. Cell. Res.*, **290**, 234–245 (2003).
- 26) Sumi D., Manji A., Shinkai Y., Toyama T., Kumagai Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **223**, 218–224 (2007).
- 27) Shinkai Y., Sumi D., Toyama T., Kaji T., Kumagai Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**, 232–236 (2009).
- 28) Kumagai Y., Sumi D., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 243–262, (2007).
- 29) Shinkai Y., Sumi D., Fukami I., Ishii T., Kumagai Y., *FEBS Lett.*, **580**, 1771–1774 (2006).