

機関番号：32525

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790558

研究課題名 (和文) 尿管および腸管上皮細胞におけるヒ素化合物の吸収と代謝動態に関する研究

研究課題名 (英文) The absorption and metabolism of arsenic species in intestinal and tubular epithelial cells.

研究代表者

畑 明寿 (HATA AKIHISA)

千葉科学大学・危機管理学部・助手

研究者番号：10433690

研究成果の概要 (和文) : MDCK 細胞と Caco-2 細胞は共にヒ酸、亜ヒ酸、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、トリメチルアルシンオキシド、アルセノコリン、アルセノベタインの7種の化学形態を変化させなかった。MDCK 細胞を用いた尿管上皮モデルにおける上記7種ヒ素化合物の膜透過性は、クレアチニンの1~2.5倍高かった。魚類と海藻類中のヒ素化合物は、溶媒として50%メタノール、物理的抽出法として細胞破碎ビーズを使用することで効率的に抽出することができた。

研究成果の概要 (英文) : MDCK cells and Caco-2 cells did not alter the chemical form of arsenate, arsenite, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid, trimethylarsine oxide, arsenocholine, and arsenobetaine. The permeability of these 7 arsenic species was studied in a renal tubular epithelial model comprising MDCK monolayer, and was found to be 1-2.5-times higher than that of creatinine. The arsenic compounds in fish and seaweeds were effectively extracted using 50% methanol (extractant) and bead-beating tube (physical extraction method).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：arsenic, speciation, biological monitoring, seafood, occupational exposure, urine, renal tubule

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ヒ素は多様な化学形態をもち、その化学的性質や毒性も様々である。無機ヒ素は飲料水、海産物の一部、職業性からの曝露が、有機ヒ素は主に海産物からの曝露を考える必要がある。また代謝により、体内での化学形態の変化も考慮する必要がある。代謝中間体の毒性など未だ不明点は多くあるが、ヒ素曝露リスクの評価には、化学的性質が多様なヒ素化合物に対応できるバイオモニタリング法の充実が不可欠である。

2. 研究の目的

(1) ヒトにおいては、摂取した無機ヒ素の6~8割がメチル化されると考えられており、無機ヒ素曝露者における中心的なヒ素代謝機構である。従来、無機ヒ素のメチル化は急性毒性の高い無機ヒ素の無毒化機構と考えられていたが、メチル化中間体は変異原性が高く、動物実験においては発がん性が認められ、現在ではメチル化がヒ素の毒性を高めていると考えられている。この無機ヒ素メチル化は肝臓での代謝を中心に研究されており、その他の臓器における代謝の研究は少ない。また有機ヒ素に関しては、海産物中に糖や脂質が結合したヒ素化合物が含まれており、代謝により化学形態が変化し、その中間産物に変異原性を持つ可能性も指摘されている。そこで、肝細胞以外でのヒ素代謝の有無を調べることを目的に検討を行う。また標準品が市販されていない海産物中ヒ素化合物を用いた研究を行うため、海産物中からのヒ素化合物抽出法の検討を行う。

(2) 一般的に、ヒ素曝露バイオモニタリングにはスポット尿が用いられる。そのためヒ素濃度はクレアチニン補正值で表されることがある。しかしながら、尿中にみられるヒ素化合物が腎においてクレアチニンと同様の挙動を示すことは証明されておらず慣例的に行われている。信頼性の高いヒ素曝露バイオモニタリングを行なうためには、尿細管における各ヒ素化合物の吸収動態について研究を行い、クレアチニン補正の有効性を検証する必要がある。そこで尿細管上皮モデルにおけるヒ素化合物の透過性試験を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞材料として、尿細管上皮細胞(MDCK)、腸管上皮細胞(Caco-2)細胞の2種の培養細胞株を用いた。試験に供したヒ素化合物は、ヒ酸(AsV)、亜ヒ酸(AsIII)、モノメチルアルソン酸(MMA)、ジメチルアルシン酸(DMA)、トリメチルアルシンオキサイド(TMAO)、アルセノコリン(AsCho)、アルセノベタイン(AsBe)の7種とした。各ヒ素化合物の細胞傷害性試験を行い傷害の生じな

い濃度に曝露濃度を設定した。ヒ素化合物への曝露は3時間行い、HPLC-ICP-MSにより培養液中のヒ素化合物の濃度と化学形態を確認した。

海産物中ヒ素抽出法の検討として、食用の魚介類と海藻類を試料とし、抽出溶媒と物理的抽出法の最適な方法の検討を行なった。抽出溶媒としてはメタノールと水の混合溶媒を用いた。物理的抽出法としては振とう、超音波破碎、細胞破碎ビーズ法を用いた検討を行った。抽出物はICP-MSを用いて分析を行い回収率と化学形態の分析を行った。

(2) MDCK細胞をトランスウェル上で培養したものを尿細管上皮モデルとし透過性試験を行った。試験に供したヒ素化合物は上記の7種で、これらヒ素化合物と共に尿素とクレアチニンを尿細管上皮モデル膜の管腔側に添加し、3時間後に基底膜側の培養液を回収した。HPPLC-ICP-MSを用い透過したヒ素濃度及び化学形態分析を、尿素とクレアチニンは市販キットを用いて測定を行った。

4. 研究成果

(1) 回収した培養液のHPLC-ICP-MS分析の結果、MDCK、Caco-2ともに7種のヒ素化合物の化学形態を変化させることはなかった。海産物からの抽出法の検討の結果、魚介類では抽出溶媒に50%エタノール、物理的抽出法に細胞破碎ビーズを使用した場合に高い回収率が得られた。海藻類は酵素を用いた前処理を行なうことで回収率が向上する結果が得られた。本抽出法は化学的に温かかつ加熱行程が無いことから、分解され易いと想定される糖や脂質の結合したヒ素化合物の抽出に適した方法であると考えられる。HPLC-ICP-MS分析の結果、未知の化学形態のヒ素化合物を複数含んでいるが培養細胞での研究に用いることが可能であると考えられる。

(2) 膜透過性試験の結果、7種のヒ素化合物のPapp値は $1.6\sim 3.4\times 10^{-6}$ cm/secの範囲となった。また尿素とクレアチニンの値はそれぞれ、7.38と 1.33×10^{-6} cm/secとなった。ヒ素の透過性を尿素およびクレアチニンと比較したところ、ヒ素の透過性は尿素の0.2~0.4倍、クレアチニンの1.0~2.5倍であった。今回実験に供したヒ素化合物はMDCK細胞の単層膜をクレアチニンと同等から2.5倍程度透過することが判明した。従って実際の尿細管においても再吸収を受ける可能性があるものの、その吸収動態は比較的クレアチニンに近いという可能性が示唆された。今後、より生体に近い条件で検証を進める必要があるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) 畑 明寿, 圓藤 陽子, 山中 健三,
藤谷 登, 圓藤 吟史. 海産物の化
学形態別ヒ素分析-抽出法の検討.
第 16 回ヒ素シンポジウム, 2011 年 2
月 5-6 日, 旭川市・サンアザレア
- (2) 畑 明寿. 尿細管および腸管上
皮細胞におけるヒ素化合物の吸収
と代謝動態に関する研究. 第 81
回日本衛生学会学術総会 連携研究
会「若手研究者が取り組む新しい毒
性研究」, 2011 年 3 月 25-28 日, 東
京都・昭和大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑 明寿 (HATA AKIHISA)
千葉科学大学・危機管理学部・助手
研究者番号：10433690