

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310045

研究課題名(和文)無機砒素毒性発現における性差の機序と毒性学的意義の解明

研究課題名(英文) Mechanism of sex-related difference and its toxicological significance in the toxic manifestation of inorganic arsenic

研究代表者

渡辺 知保 (Watanabe, Chiho)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70220902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：無機砒素による地下水汚染の健康リスク人口は世界で数千万人といわれる。無機砒素毒性の大きな特徴として個人間・集団間で毒性に対する感受性に大きな違いがあることが挙げられるが、その違いは、性別・遺伝子の多型・栄養状態など多くの要因と関連していることが示されている。本研究は、各要因とも無機砒素を体が代謝する能力の違いとして説明できるということを仮説として、フィールド調査、実験研究を併用して検討を行った。フィールド調査は南アジアのヒ素汚染地域3カ所を実施し、その結果、何を毒性指標とするかによって性差も異なること、毒性の強い中間代謝物の割合がセレン濃度とは負の相関をしめすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Population at health risk posed by exposure to inorganic arsenic in the groundwater is estimated to be more than 50 million in the world. One of the striking features of inorganic arsenic toxicity is its distinct inter-individual and inter-population variation, which is associated with sex, genetic characteristics, and nutrition. We hypothesized that the effects of all of these susceptibility-associated factors can be ascribable to the difference in arsenic metabolism, and tried to prove this using both field survey and experimental approach. In the field we have conducted survey in three arsenic-contamination sites in South Asia. Major findings included that sex-associated difference in toxic manifestation of arsenic depended on the outcome that we are observing, and that the proportion of the most toxic metabolites (MMA) showed negative correlation with the concentration of selenium.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：人体有害物質 無機砒素 毒性への感受性 遺伝子多型 セレン 性差 フィールド調査 実験研究

無機砒素(iAs)による地下水の汚染と、それによって引き起こされる様々な健康被害(各種のがん、循環器障害、皮膚症状、糖尿病、呼吸器疾患など)は、1990年代中期よりアジア・中南米諸国から報告が相次ぐようになり、リスク人口数千万に及ぶ大きな問題となっている。規模と被害の重篤さからみて、極めて緊急な解決を要する問題であるが、現行のiAsのリスク評価は、データ精度や曝露推定などの上で多くの未解明な点を残したまま行われ、リスク管理を行うための科学的根拠を持ったゴールが定まっていなかった。

慢性iAs曝露のリスク評価が難しい理由として、砒素毒性に顕著な集団間差・個体間差があること、すなわち、性・栄養状態・遺伝的多型などによって、砒素曝露の程度が同じであっても、毒性影響が大きく異なることが挙げられよう。このような差を生ずる一つの原因が、体内におけるiAsの代謝である。iAsは、吸収された後に2段階に渡ってメチル化されるが、この代謝によって生ずる個々の砒素化合物の毒性が著しく異なるため、代謝能の差が毒性の差となる可能性が以前から指摘されてきた。特に、Stybloら(2002)が複数の実験系を用いて、代謝経路の途中で生ずる3価のモノメチル砒素の毒性が極めて強いことを示したことで砒素代謝の見方は大きく変化した。また、疫学的にも、尿中の砒素代謝物にモノメチル砒素の占める割合が高い方が毒性への感受性が高いということが指摘され始めた。

研究開始時期までに、代表者らのグループは(a)南アジアの砒素汚染地域において、男性が女性よりも砒素の皮膚毒性に高感受性であること(Watanabeら, *Environ. Health Perspect.*, 2001, 女性の中では経口避妊薬使用者が砒素による酸化ストレス昂進作用に耐性であることを報告し、砒素代謝プロファイルの性差を確認した。(b)南アジアの砒素汚染地域において、GSTT1, M1の欠損したヒトではiAsの代謝(メチル化)能力が低下することを示した。(c)南アジアの砒素汚染地域において、低栄養状態で砒素の皮膚毒性が増悪すること(Maharjanら, *JCEH*, 2007)、また微量栄養素のセレン(Se)のキネティクスおよび毒性に影響を及ぼすこと(Miyazakiら, *JHS*, 2002)を報告した。動物実験においては、Seの欠乏状態のみで砒素毒性が表れるモデル(Miyazakiら, *Toxicology*, 2005)を示した。(a)については、砒素毒性の性差が代謝の性差と対応する可能性が報告(Lindbergら, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008)された。

2. 研究の目的

毒性に対する感受性要因が存在することは、毒性の発現経路にこれらの要因がかかわることを示しており、その関わり方を解明することによって、リスク評価の精度を上げること、さらには、砒素毒性の発現機序の解明の手がかりを得ることも可能である。例えば、メチル水銀のキネティクスの解明あるいはダイオキシン毒性の機序の解明において、こうした個体差の存在が利用されてきた。本研究では、上述した砒素毒性に対する性・遺伝的多型(生体側要因)とエネルギーおよびセレン栄養(環境側要因)による感受性の差に着目し、これらの異なる要因による感受性の差がメチル化代謝能力の差によって一元的に説明できるという仮説を検証することを当初の目的とした。その上で、メチル化代謝能を織り込んだリスク評価のあり方を提言することを最終的な目的とした。

このことによって、砒素のリスク評価における不確定係数(安全係数)の中で、個体差・集団間差に起因する部分を縮小することができれば、評価の精度を高め得る。一方で、代謝能力の差で説明できない感受性のバラツキを明確にし、その要因を明らかにすることによって、毒性軽減につながるさらなる研究を展開できることが期待された。

3. 研究の方法

本研究では、フィールド調査と細胞および動物を用いた実験的研究を進めた。

(1) フィールド調査では、砒素汚染の知られる複数の地域で、感受性の差にかかわる要因を検討した。実際には、バングラデシュ2地域(南西部・中央部)およびネパール低地(テライ地方)を対象とし、この他にすでにバングラデシュ北西部で収集してあったサンプルを用いた検討も行なった。特に砒素代謝の差を反映すると考えられている尿中砒素代謝物の排泄プロファイルを検討した。砒素毒性のエンドポイントは、酸化ストレスの昂進、皮膚症状など一般的に用いられている指標の他に、胎児期曝露が免疫機能に及ぼす影響についての評価も試みた。本研究で検討対象とする要因のひとつである性差については、多くの場合性ホルモンが関与するため、乳幼児などでは性差が顕著でない場合がある。感受性要因として、性・遺伝的多型およびエネルギー・セレン栄養の4要因(生体側2要因、環境側2要因)をとりあげた。

(2) 実験研究では、主として砒素毒性のメカニズムにかかわる経路の同定と、遺伝子発現への影響について、最初に複数の細胞を用いた実験、ついでマウスを用いた *in vivo* での検討を行った。

(3)なお、調査研究・実験研究のいずれも、関係する研究機関の研究倫理委員会において承認を得ておこなった。バングラデシュ・ネパールでの調査に関しては相手国の研究倫理審査を担当する機関からも承認を得ておこなった。

4. 研究成果

(1) 主要な研究成果

フィールド調査：南アジアの砒素汚染地域4カ所を対象に調査を実施した。ただし、このうち1カ所の調査自体は本研究の開始以前に終了しており、本研究では保存されていた試料の解析のみを行なった。

・バングラデシュ南西部の砒素汚染地域では、尿中8-OHdGならびに

15-F2t-isoprostaneを指標として酸化ストレスについて検討を行なった。これらの酸化ストレスマーカーと砒素の曝露レベルとの間には予想された通り正の有意な相関を認めた。尿中砒素濃度（砒素曝露指標）で調整した場合、女性が男性よりも酸化ストレスマーカーにおいて有意に高値を示した。皮膚症状については、我々のバングラデシュにおける調査を含めて、男性が女性より重篤な症状を示すことが知られており、性差という点では今回の結果とは逆であった。一方で、既存の報告と同様、メチル化代謝については女性の方がメチル化の最終段階であるジメチル化代謝物の割合が有意に高く、男性と比較してメチル化能に優れている結果であった。これは、皮膚症状の性差を検証したバングラデシュ北西部で得られた結果と一致していた。これらの結果をまとめると、毒性の性差は、メチル化代謝能の性差で説明される場合（皮膚症状）とそうでない場合（酸化ストレス）があり、当初に予想したような一元的な関係が成立しない例があることが明らかになった。

砒素のメチル化代謝ならびに酸化ストレスにかかわる遺伝子の中で、砒素毒性への影響が報告されている20余りの一塩基多型（SNP）について、酸化ストレスおよびメチル化代謝との関連を検討したところ、統計的にメチル化代謝を修飾するSNPの中に、その効果が性に依存するものが存在することを示唆する結果が得られた。遺伝子多型が有害物質への感受性に及ぼす効果が、その個体の他の属性に依存することは、環境-遺伝の関係の複雑さを示している。

・バングラデシュ中央部の砒素汚染地域において3つの中規模都市の病院産婦人科の協力を得て母児200組余りの出生コホートを構築し、尿・血液を採取した。尿中砒素の分析

により曝露程度を確認するとともに、母体血および臍帯血中の免疫グロブリン（IgG）濃度を測定して、砒素曝露の影響を検討した。対象集団は中等度の砒素曝露があり、曝露の程度には大きな個人差が認められた。この結果、砒素曝露によって母体血中のIgG濃度は有意に高くなる一方、臍帯血中のIgG濃度には全く影響がなかった。この結果、母体血中と臍帯血中のIgG濃度には通常期待されるような相関が認められなかった。以上より、砒素曝露が何らかの機序によってIgG濃度を上げる一方で、胎盤を通じての移行にも影響する可能性が示唆された。本調査に関しては、出生コホートを6ヶ月間に渡って、感染状況の調査を継続し、生体サンプルを採取したため、本報告書執筆時点で、試料解析が終了していない。

・バングラデシュ北西部の砒素汚染地域において収集され、研究代表者の研究室に保存してあった尿・血漿試料（n=127, 男67, 女60, 成人）をあらたに解析し、これらの試料中におけるセレンと砒素の濃度を測定し、両者の関連について検討を行った。異なる生体試料間の結果を比較すると、尿・血漿中の濃度は、砒素については強い正の相関、セレンについては弱い相関（いずれも有意）を認めた。砒素とセレンとの関連をみると、血漿中では両者は有意な負の相関を示し、尿中砒素と血漿中のセレンには有意な負の相関があり、あるいは尿中セレンと血漿中砒素という異なる試料間でも有意な負の相関を認めたが、尿中では両者の相関は認められなかった。尿中の両者の関係は、砒素の曝露レベルに依存しており、砒素が低濃度の時は正の、高濃度の時は負の、それぞれ有意な相関を示すことが明らかとなった。

・尿中における砒素の各メチル代謝産物の割合とセレンとの関係を見ると、モノメチル化された代謝物の割合が、血漿中・尿中のセレンとは負の相関（ただし $p < 0.1$ ）を示した。モノメチル化された砒素のうち砒素が3価をとるものは、細胞などを用いたアッセイ系では無機砒素に匹敵する程度に毒性が強いことが知られており、セレンの存在によってこの強毒の化学種の量が抑えられるという解釈と矛盾はしないが、これを仮説して今後検証して行く必要があるだろう。

・ネパール低地テライ地方の砒素汚染地域において、地域住民200名を対象として砒素汚染への曝露状況調査を実施した。尿（n=200）・唾液（N=125）を、成人住民より採取した。また、住民が使用している井戸水

のサンプルも収集した。尿中砒素濃度をICP-MSで測定した結果、平均濃度は600 $\mu\text{g/g}$ クレアチニン(範囲29-5,700)と極めて高く、対象集団で砒素曝露の起きていることが確認された。尿中セレン濃度は平均で16 $\mu\text{g/g}$ (範囲2-39) クレアチニンであり、バングラデシュにおける複数の対象地域とほぼ同程度で、国際比較のレベルではやや低値であった。両者の濃度については、バングラデシュ西北部集団での観察と同じく非線形的な関係が示唆され、砒素の曝露がセレン代謝に影響をおよぼす事が示唆された。また、その他の微量元素・汚染元素に着いても測定を実施した。HPLC-ICP-MSを用いて尿中砒素の分別定量を行なったところ、無機17%、モノメチルアルソン酸13%、ジメチルアルシン酸69%であり、バングラデシュとほぼ同じ割合であった。

ネパール低地については先行研究の結果からセレンの低値を予想していたが、バングラデシュとそれほど変わらない結果であった。ただし、砒素曝露レベルは予想より高く、バングラデシュの中で曝露の高い地域のさらに倍程度であった。本研究で得られた結果から、砒素の曝露レベルに依存して様々な生体応答が変化するため、こうした曝露レベルの違いが結果に影響を与えている可能性には留意する必要がある。

実験的検討

実験的アプローチとしては、感受性の差の基礎となる砒素の毒性発現機構を検討した後、*in vivo* の系において、毒性発現におけるバイオマーカーを検討し、個体差を評価する指標を探索した。

・ラット腎臓由来の細胞株を用いて、ユビキチン関連遺伝子(Ube2dファミリー)の発現およびp53の細胞内蓄積とアポトーシス誘導を検討したところ、亜ヒ酸による細胞毒性の誘発は、カドミウムと毒性発現の経路を少なくとも一部共有していることが判明した。

・ヒト由来の腎近位尿管細胞および脳血管内皮細胞を用いて、亜ヒ酸がp53の細胞内タンパク質レベル並びにUBE2Dファミリーの遺伝子発現に与える影響を検討したところ、いずれの細胞種においても、p53タンパク質が増加・蓄積する一方で、UBE2Dファミリー遺伝子の発現低下は示されなかった。

以上の結果から、無機砒素は細胞特異的な経路を介してp53タンパク質レベルを増加させる可能性が考えられた。

・近交系 C57BL/6J マウスを砒素(Na_2AsO_2 ; 12 mg As/kg 体重/日 x 7日間, 経口)に曝露し、性差に着目して肝・腎の毒性と肝臓における

遺伝子の発現プロファイル調べた。As 群は、投与 3, 4, 5 日後の体重が雄においてのみ有意な低値を示したが、投与完了後の体重低下は認められなかった。一方で、投与完了後には、雌雄ともに肝・腎の重量が有意に増加していた。臓器毒性を反映する血清中 GOT, GPT, BUN などには砒素投与の影響は認めなかった。肝臓の遺伝子発現プロファイルでは、発現が増加(>2.0 倍)した遺伝子が雄で 22, 雌で 23 あり、このうち 4 遺伝子のみが共通して増加していた。増加した遺伝子群には、グルタチオン S 転移酵素(GST)のアイソザイムをコードする遺伝子が 2 つ含まれていた。これらのアイソザイムは欠損により砒素の代謝プロファイルを変えることがバングラデシュのサンプル解析の結果から得られており、注目に値する。一方で発現が低下(<0.5 倍)した遺伝子はオスで 27, メスで 25 あって、このうち 3 遺伝子が共通して低下していた。共通して低下した遺伝子には、ヘモグロビンのサブユニットをコードする遺伝子が 2 件見出された。少なくとも変動した遺伝子の数という点では性差は顕著ではなかったが、今後、性特異的に変動の見られた遺伝子についても、定量的 PCR などで変動を確認する必要がある。これらをヒトにおいて観察された SNP の結果とも対応させていくことも必要になる。

(2) 本研究成果の位置づけおよび今後の展望

本研究は、フィールドと実験的検討を併用し、無機砒素毒性への感受性要因についての検討を行なった。当初予想した、メチル化代謝能の違いによって全ての感受性要因を説明できるという仮説は、エンドポイントによって性差も異なることが明確になったことで、全く成立しないか、あるいはメチル化代謝能の違いが、エンドポイントによって毒性軽減と増悪の両方に作用し得る可能性を示唆したと言える。リスク評価という立場から見ると、いずれのエンドポイントが最も敏感に出現するかが問題となるので、本研究のような例は、性など生体側の属性によって採用すべきエンドポイントが異なる可能性も示している。

バングラデシュ北西部のデータによって、セレンが砒素のメチル化代謝に影響を与える可能性が示された。この点は、今後ネパールの試料を用いて同様の検討を予定している。また、砒素曝露条件でのセレンの挙動についても、非線形の応答であることが示唆された(投稿中)。このような非線形の応答は、毒性学的にはある意味で当然とも

言えるが、毒性物質の種類を問わず、研究が進んでいない分野と言えよう。

遺伝的要因については、SNPによる代謝への影響について検討した。一部のSNPの効果が性依存的であるという観察については、さらなる検討が必要であるが、確立されれば、有害物への感受性を考える上では重要であると考えられる。本研究では、異なる調査地の異なる集団において、比較可能な調査が行われた点に大きな強みがある。報告書執筆時点で未解析のデータもあり、さらに解析を進めていく。一方で、マウスにおける比較的高い濃度における遺伝子発現の変動との対応も今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Ping Han Ser, Bilkis Banu, Fatema Jebunnesa, Kaneez Fatema, Nasrin Rosy, Rabeya Yasmin, Hana Furusawa, Liaquat Ali, Akhtar Ahmad, Chiho Watanabe, PhD. Arsenic exposure increases maternal but not cord serum immunoglobulin G level in Bangladesh *Pediatrics International* (2014, in press) (査読有)

[学会発表](計6件)

1. 松野佑真 古澤華 稲岡司 渡辺知保 バングラデシュのヒ素汚染地域住民における血漿中・尿中のヒ素およびセレン濃度の関連 第78回日本民族衛生学会総会, 2013年11月, 佐賀.
2. Satoh M., Lee J.Y., Tokumoto M., Fujiwara Y., Watanabe C. Effects of Arsenic on Expressions of Ube2d Family and Accumulation of p53 in Renal Tubular Cells and Vascular Endothelial Cells. The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology. San Antonio, Texas. USA. March 2013.
3. Sultana N et al. Inorganic Arsenic-induced Oxidative Stress among Bangladeshi Population Exposed to High Arsenic through drinking water. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology. July 19, 2012, Sendai.
4. Satoh M., Lee J.Y., Tokumoto M., Fujiwara Y., Watanabe C. Effects of Arsenic on Expressions of Ube2d Family and Accumulation of p53 in NRK-52E Cells and HK-2 Cells. The XIII International

Congress of Toxicology. Seoul, Korea. July 2013.

5. Satoh M. et al. Arsenic induces p53-dependent apoptosis through the down-regulation of Ube2d family genes in renal tubular cells. The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology. 2012.3.13, San Francisco, CA, USA.
6. Sultana N et al. The Role of Gender in Inorganic Arsenic Induced Oxidative Stress Among Bangladeshi Population Exposed to High Arsenic Through Drinking Water. ISEE 2011 Conference, September 13-16, 2011, Barcelona – Spain.

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 知保 (Watanabe Chiho) 東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70220902

(2)研究分担者

佐藤 雅彦 (Satoh Masahiko) 愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号: 20256390

稲岡 司 (Inaoka Tsukasa) 佐賀大学・農学部・教授

研究者番号: 60176386

古澤 華 (清水華) (Furusawa (Shimizu) Hana) 東京大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 80401032