

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790167

研究課題名(和文)ヒ素化合物の吸収および排泄に関する腸内細菌の役割

研究課題名(英文)The role of intestinal microflora on the absorption and excretion of arsenic compounds.

研究代表者

小林 弥生 (Kobayashi, Yayoi)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号：00391102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌によるヒ素の代謝を化学形態別分析によって明らかにし、ヒ素化合物の吸収および排泄に関する腸内細菌の役割について明らかにすることを目的とした。抗生物質処理したラットと無処理ラット(対照群)に、ジメチルアルシン酸を経口投与すると、対照群と比較して、抗生物質投与群の肝臓へのヒ素の蓄積は有意に低下し、抗生物質投与群において、含硫ヒ素化合物の生成が有意に低下していることが分かった。また、ラットにアルセノコリンを経口投与すると、糞中に未同定ヒ素化合物が検出された。以上のことから、ヒ素の吸収、代謝、排泄に腸内細菌が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It remains unclear how intestinal microflora affects the absorption, metabolism, and excretion of arsenicals. The antibiotics or distilled water (control group) were given to rats in drinking water for 7 days before oral administration of dimethylarsinic acid. Distribution of arsenic in the liver of rats that treated with antibiotics decreased significantly as compared with the control group. The thio-arsenicals were found in the urine of control rats, and the generation of these arsenicals was reduced in antibiotics-treated rats. In another experiment, unknown arsenic compound was found in fecal extract of rats that administered orally with arsenocholine. These results suggest the possibility that absorption, metabolism, and excretion of arsenicals are affected by intestinal microflora.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ヒ素 腸内細菌 代謝 HPLC-ICP-MS LC-MS

1. 研究開始当初の背景

途上国最大の環境問題のひとつにもなっている無機ヒ素化合物は、発癌も含む多臓器疾患を起こすことが知られている毒物であるが、その毒性発現機構は未だ明らかになっていない。齧歯類の小腸や盲腸内の細菌により、無機ヒ素化合物がメチル化されたり、メチルヒ素化合物が脱メチルされることが報告されている。また、ヒ素汚染地区住民の尿中からジメチルアルシン酸 (DMA^V) の酸素が一つ硫黄に置き換わった含硫ジメチルヒ素化合物、ジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA^V) が検出され、DMMTA^V は無機ヒ素よりも毒性が高く、この DMMTA^V の生成に腸内細菌の関与が示唆されている。さらに最近、合成したヒ素糖を用いたヒト体内での代謝に関する研究が報告され、ヒ素の排泄に関して大きな個体差があることが明らかとなった。有害物質の毒性発現および解毒機構を明らかにするためには、有害物質の毒性評価のみならず、同時に生体内における有害物質の化学形を安定かつ高感度に分析して毒性評価を行う分析毒性的研究を行うことが必要不可欠である。

腸内細菌叢は、宿主の老化、アレルギー、免疫、感染や発癌に密接に関連していると言われていることから、哺乳類におけるヒ素化合物の代謝を考える際に、腸内細菌による代謝も考慮に入れる必要がある。腸内細菌によるヒ素の代謝がヒ素化合物の吸収および排泄に関与し、ヒ素の感受性要因となっている可能性も考えられる。そこで、腸内細菌によるヒ素の代謝を化学形態別分析によって明らかにし、ヒ素の吸収および排泄との関連性を明らかにすべく、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

メタロイドに属するヒ素は、その化学形によって吸収・排泄・毒性が大きく異なる。ヒ素は腸内細菌によっても代謝を受けることから、腸内細菌によるヒ素の代謝が、ヒ素の吸収や排泄に密接に関係していると推定した。当該研究においては、ヒ素の代謝と体内動態について分析毒性的手法を用いて明らかにし、ヒ素化合物の吸収および排泄に関する腸内細菌の役割について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒ素化合物の高感度一斉分析条件の検討

ヒ素の体内動態を明らかにするためには、生体内におけるヒ素の化学形を安定かつ高感度に測定することが必要不可欠である。腸内細菌によるヒ素の代謝物には含硫ヒ素化合物も含まれることから、これらを含めたヒ素化合物を安定かつ迅速に測定可能なカラムや溶離液の検索を行い、高感度ヒ素化合物一斉分析を検討した。

(2) 抗生物質処理、および無処理ラットにおけるジメチルアルシン酸の体内動態

抗生物質または精製水を1週間自由摂取させた5週齢の雄性 Spring-Dawley (SD) ラットに対し、50 mgAs/kg body weight の用量で DMA^V を経口投与後、3日間代謝ケージにて尿と糞を採取した。糞は凍結乾燥後に粉碎し均一にした。また、50 mM 酢酸アンモニウムを用いて糞中のヒ素化合物を抽出した。投与3日後に解剖し、血液および肝臓を採取した。血液は1,600gで10分間遠心し、血漿を得た。試料中の総ヒ素濃度は、硝酸と過酸化水素で湿式灰化後、ICPMSで測定した。

(3) 海産物由来有機ヒ素化合物経口投与後のラットにおけるヒ素の体内動態

腸内細菌によるヒ素の代謝を考慮する上で、食物に含まれるヒ素化合物の代謝を明らかにすることは重要である。そこで、海産物由来の有機ヒ素化合物をラットに経口投与し、ヒ素の体内動態を調べた。

通常のラット飼料中に含まれるヒ素濃度は高く、餌由来のヒ素が臓器中ヒ素濃度の測定値に影響を与えるため、ヒ素の体内動態を調べる上において大きな障害となっていた。そこで、精製飼料を用いることにより体内ヒ素バックグラウンド値を減少させた9週齢の雄性 SD ラットに対し1.0 mgAs/kg body weight の用量でアルセノベタイン (AB)、アルセノコリン (AC)、DMA^V、TMAO^V を経口投与し、2日間代謝ケージにて尿と糞を採取した。糞は凍結乾燥後に粉碎した。また、50 mM 酢酸アンモニウムを用いて糞中のヒ素化合物を抽出した。投与2日後に解剖し、血液および肝臓を採取した。血液は1,600gで10分間遠心し、血漿を得た。試料中の総ヒ素濃度は、硝酸と過酸化水素で湿式灰化後、ICPMSで測定した。

(4) アルセノコリン投与後の糞中ヒ素化合物の化学的性質について

アルセノコリン投与後の糞抽出液に検出された未同定ヒ素化合物を明らかにすることを目的として、LC-MSに導入した。しかしながら、未同定ヒ素化合物が低濃度だった為、同定出来なかった。そこで、未同定ヒ素化合物の化学的性質を調べるため、糞抽出液を熱処理および過酸化水素処理し、処理前後のヒ素の化学形態別分析を行った。

(5) アルセノコリンとアルセノベタインの胆汁排泄について

海産物由来有機ヒ素化合物経口投与後のラットにおけるヒ素の体内動態の結果から、ABとACの代謝に相違がみられ、AC群の糞中に未同定ヒ素化合物が検出された(研究成果(3))。これまでに、ABは胆汁排泄されることが報告されているが、ACの胆汁排泄に関する報告はない。胆汁中に排泄されるヒ素化合物が糞中未同定ヒ素化合物に関与すると

推定し、AB と AC の胆汁排泄を明らかにすることを目的とした。

精製食を用いて飼育した SD ラットに対して麻酔下で胆管カニューレーションを施した後、30 分間氷上で胆汁を採取した。その後 1.0 mgAs/kg body weight の用量で AB または AC を経口投与し、30 分毎に 4 時間まで胆汁を採取した。胆汁中の総ヒ素濃度は ICPMS で測定し、化学形態別分析は HPLC-ICPMS 法にておこなった。

4. 研究成果

(1) ヒ素化合物の高感度一斉分析条件の検討

ヒ素化合物の測定は、高速液体クロマトグラム - 誘導結合プラズマ質量分析法を用いた。検討したカラムの条件を以下に示す。

条件 1)

カラム: Asahipak GS220HQ
 溶離液: 50 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5)
 流速: 0.5 ml/min
 温度: 25
 注入量: 20 μ l

条件 2)

カラム: Shodex RSpak NN-614
 溶離液: 5 mM HNO₃+8 mM NH₄NO₃ (pH 2.4)
 流速: 0.5 ml/min
 温度: 25
 注入量: 20 μ l

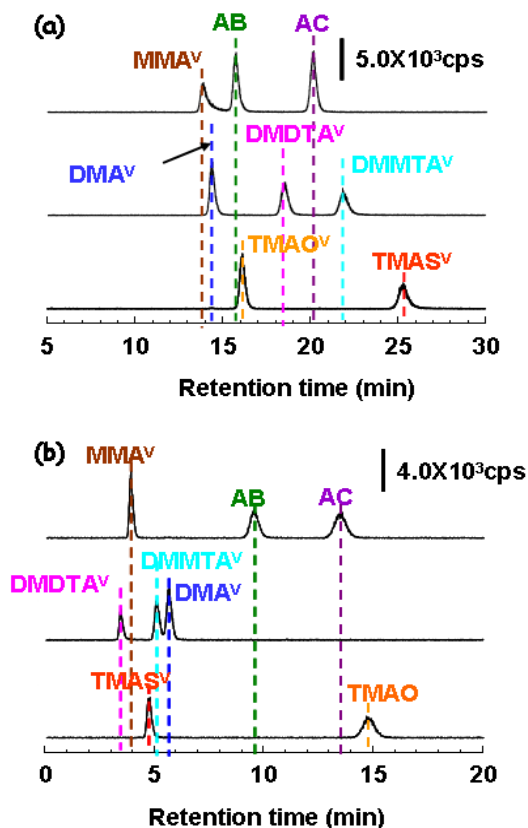


Fig 1 Elution profiles of authentic arsenicals on (a) gel filtration or (b) cation-exchange columns. The vertical bars indicate the level of detection (counts per second). DMA^V: dimethylarsinic acid; AB: arsenobetaine; AC: arsenocholine; TMAO^V: trimethylarsine oxide; DMMTA^V: dimethylmonothioarsinic acid; DMDTA^V: dimethyldithioarsinic acid; TMA^S: trimethylarsine sulfide.

条件 1) では、アルセノベタイン (AB) とトリメチルアルシンオキシド (TMAO^V) の保持時間が近く (Fig.1a)、条件 2) では、ジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA^V) とトリメチルアルシンスルフィド (TMA^S) (Fig.2a) の保持時間が近く、分離が困難であったため、必要に応じて、2 種類のカラムを使い分ける事にした。

(2) 抗生物質処理、および無処理ラットにおけるジメチルアルシン酸の体内動態

全血中、および血漿中の総ヒ素濃度に有意差はみられなかったが、対照群と比較して、抗生物質投与群の方がヒ素の分布は低かった。抗生物質投与群の肝臓中のヒ素の分布は、対照群と比較して有意に低かった。尿中へのヒ素の排泄は両群共に 1 日目が最も高く、3 日目が最も低かった。尿中ヒ素濃度は両群間に有意差がみられなかった。両群共に糞中へのヒ素の排泄も尿同様に経日的に低下した。一日目は有意差はみられなかったものの、対照群の方が抗生物質投与群よりも糞中ヒ素濃度が高かった。2 日目は両群ともに同程度のヒ素濃度であった。3 日目のヒ素濃度は抗生物質群の方が対照群と比較して有意に高かった。尿、糞への排泄は個体差が大きかった。

主要な尿中ヒ素化合物は、両群共に DMA^V だった。対照群は DMMTA^V、ジメチルジチオアルシン酸 (DMDTA^V) またわずかに TMA^S が検出された。一日目は DMMTA^V の方が DMDTA^V よりも多く排泄され、2 日目、3 日目はその逆の結果だった。一方、抗生物質投与群はわずかに DMMTA^V が検出されたのみだった。糞抽出物中の主要なヒ素化合物も尿同様、両群共に DMA^V だった。対照群の糞中ヒ素化合物は DMMTA^V と DMDTA^V であり、TMA^S は検出されなかった。DMMTA^V と DMDTA^V の排泄量は 3 日間通じて DMMTA^V の方が多かった。一方、抗生物質投与群はわずかに DMMTA^V が検出されたのみだった。

これらの結果から、DMMTA^V、DMA^V および TMA^S の生成には腸内細菌の関与が示唆された。対照群と比較して、抗生物質群の方が低かったが、3 日間の尿および糞中へのヒ素の排泄は両群でほとんど差がみられないことから、抗生物質群は対照群と比較して、ヒ素の腸管からの吸収率が低下している可能性が考えられた。

(3) 海産物由来有機ヒ素化合物経口投与後のラットにおけるヒ素の体内動態

DMA^V 投与群では、投与したヒ素の 72% が赤血球へ分布していた。AB と AC は 1% 未満であり、TMAO^V は対照群とほとんど差がなかった。血漿中へのヒ素の分布は AB は投与量の 0.6%、AC は 0.7%、DMA^V は 0.1% 以下だった。肝臓中へのヒ素の分布は、対照群と比較して AC 投与群のみ有意に高かった。尿へのヒ素の排泄は対照群と AC 群以外のヒ素投与群で、2 日目

と比較して1日目が有意に高かった。尿中への2日間の総排泄は投与量に対して、AB、AC、DMA^V、TMAO^V投与群の順に、約72%、60%、17%、100%となり、TMAO^V投与群に関しては、投与したヒ素のほとんどが1日目に排泄されていた。糞へのヒ素の総排泄は投与量に対して、AB、AC、DMA^V、TMAO^V投与群の順に、約0.2%、0.5%、18%、0.07%となり、DMA^V以外のヒ素投与群におけるヒ素の主要な排泄経路は尿であることが分かった。一方でDMA^V投与群に関しては、尿と糞にほぼ同程度のヒ素が排泄されることが分かった。

ヒ素の化学形態別分析の結果、AB、AC投与群の血漿および赤血球溶血液中ではABが主要なヒ素化合物であり、DMA^V群は血漿および赤血球溶血液中のタンパク質に結合していると考えられるヒ素のピークが検出された。尿中ヒ素の化学形態分析の結果、AB、AC投与群においては、ABが主要なヒ素化合物であり、TMAO^V投与群ではTMAO^Vが約97%、約3%がTMA^sとして排泄されていた。DMA^V投与群では、DMA^Vが主要なヒ素化合物として検出されたが、その他、多い順にDMMTA^V、DMDTA^V、TMAO^V、TMA^sも検出された。DMMTA^VとDMDTA^Vの排泄量はほぼ同程度だった。一方、糞抽出液中の結果から、AB投与群ではABのみが検出され、AC投与群では、多い順に未同定ヒ素化合物、AB、ACが検出された。DMA^V投与群では、尿同様にDMA^Vが主要なヒ素化合物として検出されたが、その他、多い順にDMMTA^V、TMAO^V、TMA^s、DMDTA^Vも検出された。TMAO^V投与群の糞への排泄量はわずかであるが、TMAO^Vの他、TMA^sとAC投与群と同様に未同定ヒ素化合物が検出された。

これらの事から、DMA^Vの体内動態はその他の有機ヒ素化合物とは異なることが明らかとなった。また、AC投与群の糞抽出液から未同定ヒ素化合物が検出されたことから、ACの代謝に腸内細菌が関与している可能性が示唆された。

(4) アルセノコリン投与後の糞中ヒ素化合物の化学的性質について

AC投与群の糞抽出液の化学的性質を調べるために、糞抽出液の熱処理および過酸化水素処理を行い、ヒ素の化学形態別分析を行った。その結果、未同定ヒ素化合物は熱および過酸化水素に対して安定であることが明らかとなった (Fig. 2)。

(5) アルセノコリントアルセノベタインの胆汁排泄について

AB、AC投与群の胆汁中ヒ素の化学形態別分析を行ったところ、両群共にABが検出された。これまでに、ABは胆汁排泄されないことが報告されているが、本実験において、ABも胆汁中に排泄されることが明らかとなった。しかしながら、AC群投与時も胆汁中にはABとわずかにACが検出されるのみだったことから、糞中未同定ヒ素化合物に関与する可能性は低いと示唆された。

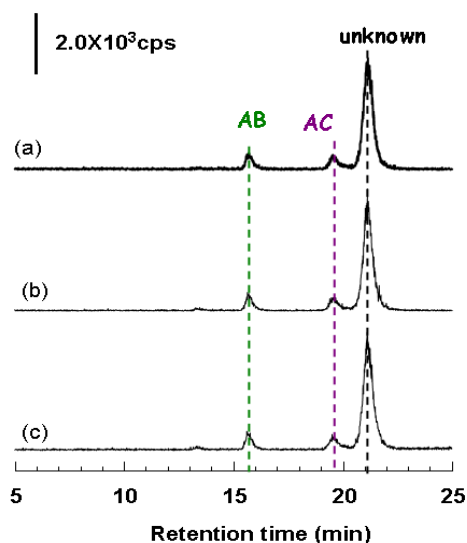


Fig.2. Arsenical elution profile of (a) non-, (b) heat-, (c) heat- and H₂O₂-treated fecal extracts of rats orally administered with AC. The vertical bar indicates the level of detection (counts per second).

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Kobayashi Y., Mizumura A., Yamashiro A., Hirano S. (2013) Implication of relationship between arsenic toxicity and arsenic metabolites. X ISTERH 2013, November 18-22, Tokyo.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弥生 (KOBAYASHI YAYOI)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号：00391102