

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460176

研究課題名(和文)食品中ヒ素化合物の代謝と生体影響に関するメタロミクス解析

研究課題名(英文)Metalloomic analysis to elucidate the metabolism and biological effects of arsenic compounds contained in Seafood

研究代表者

山中 健三 (YAMANAKA, Kenzo)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：50182572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食品の中でも特にヒ素含有量の多い海産物中ヒ素化合物の分析方法を確立した。また、海産物中のヒ素化合物の中間代謝物で毒性の高いことで知られるジメチルモノチオアルシン酸(DMMTA)に着目し、細胞毒性試験および毒性発現機構の推定を行った結果、DMMTAの毒性発現にはGSHが深く関与しており、その機構にはGSHにより代謝生成する複数の化合物が関与している可能性を明らかにした。本研究の成果は、食品由来するヒ素化合物のリスク評価に大変有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have reported an analytical methods for arsenic compounds in seafood, among foodstuffs. In addition, we have focused on our attention to dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA), which is known as an intermediate metabolite of arsenic compounds in seafood and an high toxic metabolite. Concerning cytotoxicity and toxic mechanism of DMMTA, we found that the toxicity of DMMTA deeply involved GSH and that clarified the possibility that multiple metabolites produced by GSH are involved in the mechanism. The results seem to be very useful for risk assessment of arsenic compounds derived from seafood.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ジメチルモノチオアルシン酸 メタロミクス解析 アルセノシュガー 腸内細菌 代謝 ジメチル亜ヒ酸 グルタチオン ジメチルメルカプトアルシン

## 1 . 研究開始当初の背景

(1)海産物中に存在する主要なヒ素化合物であるアルセノシュガー類・アルセノ脂質 , およびその代謝物の化学形態は非常に多様である<sup>1,2</sup> . そのため構造が不明な化合物も多く , 標準品を得ることが困難であることから代謝・毒性に関する研究は進んでいない . これは食品中ヒ素化合物の安全性評価を行う上で大きな問題である .

(2)ヒトにおけるアルセノシュガー類の代謝物の一つであるジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA)は毒性が強いことで知られているが<sup>3</sup> , 代謝や毒性発現機構について不明な点が多い . この詳細を明らかにすることは , ヒ素の発癌機構の解明のみならず食品中ヒ素の安全性評価を行う上でも必須である .

## 2 . 研究の目的

(1)代謝と毒性発現機構の解明にあたっては , 海産物中および代謝物中のヒ素化合物の化学形態別分析が必須である . そのため海産物からのヒ素化合物の抽出方法ならびに標準品の合成方法 , および HPLC-ICP-MS , HPLC-TOFMS などを駆使したメタロミクス解析手法の確立を目指した .

(2)DMMTA について , 培養細胞および無細胞実験系を用いてその代謝および毒性発現機構の詳細を明らかにすることを目指した . これにより , ヒ素の毒性研究における最重要課題である発癌機構の解明に有用な知見を得るとともに , 食品中ヒ素の安全性評価に必要な知見を得ることが可能であると考えた .

## 3 . 研究の方法

(1)代謝と毒性発現機構の解明にあたっては , 海産物中および代謝物中のヒ素化合物の化学形態別分析が必須である . そのため

の海産物からのヒ素化合物の抽出方法ならびに標準品の合成方法 , および HPLC-ICP-MS , HPLC-TOFMS などを駆使したメタロミクス解析手法の確立を目指した .

(2)DMMTA について , 培養細胞および無細胞実験系を用いてその代謝および毒性発現機構の詳細を明らかにすることを目指した . これにより , ヒ素の毒性研究における最重要課題である発癌機構の解明に有用な知見を得るとともに , 食品中ヒ素の安全性評価に必要な知見を得ることが可能であると考えた .

## 4 . 研究成果

(1)DMMTA の GSH による代謝機序の推定合成した DMMTA と GSH を無細胞系で反応させ , 反応生成物を HPLC-ICP-MS , HPLC-TOFMS , GC-MS を駆使して同定するとともに , HPLC-FPD , GC-FPD を用いて生成量の経時変化を調べた . その結果 , DMMTA は , 同様にアルセノシュガー類の代謝物として知られるジメチルアルシン酸 ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ )とは異なる代謝機序を取ることが示唆された . すなわち ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ は GSH と反応することでジメチル亜ヒ酸 ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ )または  $\text{DMA}^{\text{III}}$ -GSH 複合体を形成するが(図 1 中段) , DMMTA の場合は比較的安定した 5 価のジメチルヒ素である DMMTA-GSH 複合体を形成し , その後 , 経時的にジメチルメルカプトアルシン ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ -SH) , 硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) , ジメチルジチオアルシン酸 (DMDTA) ,  $\text{DMA}^{\text{III}}$ または  $\text{DMA}^{\text{III}}$ -GSH 複合体に変換されることが明らかになった (図 1) .

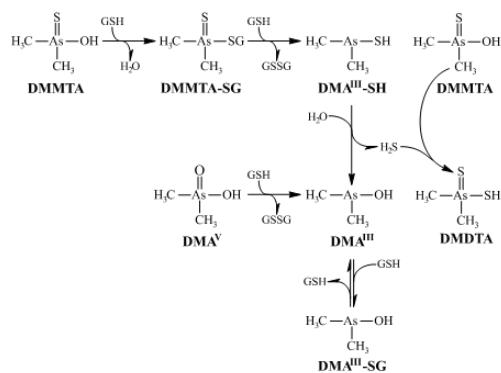


図1 推定されるDMMTAのGSHによる代謝機序<sup>4</sup>

以上から、DMMTAはGSHとの反応により、毒性の本体と推察されているDMA<sup>III</sup>のみならず、DMA<sup>III</sup>-SH、H<sub>2</sub>Sなど様々な化合物を代謝生成し、これらの化合物が複合的にDMMTAの毒性発現に関与している可能性が示唆された。本成果はJournal of Trace Elements in Medicine and Biology, vol.33 (2016)に掲載された。

#### (2)DMMTAのGSHによる代謝物の毒性への関与ならびに細胞死の機構

ヒト肝腫瘍細胞 HepaRG 細胞に対して、GSH 生合成阻害剤 BSO を処理した後、DMMTA を 24 時間曝露し、細胞毒性を WST-8 法ならびに細胞内 ATP 量で評価した。その結果、細胞内 GSH 量の低下にともないDMMTAの細胞毒性が抑制されたことから、毒性発現にはGSHによる代謝活性化機構の関与が示唆された。また、アポトーシスの実行カスパーゼであるカスパーゼ 3/7 の活性を測定したところ、DMMTA 曝露によりカスパーゼ 3/7 の活性が増加したことから、DMMTAによる細胞毒性にはアポトーシス機構が関与している可能性も示唆された。さらに、GSH 存在下 DMMTA から代謝生成する DMA<sup>III</sup>の毒性に対して、同様に代謝生成する H<sub>2</sub>Sの影響を調べたところ、WST-8、細胞内 ATP 量、カスパーゼ 3/7 活性のいずれの指標においても、DMA<sup>III</sup>による細胞毒性はH<sub>2</sub>Sにより抑制される傾

向がみられた。以上から、本項(1)でも述べたように、DMMTAの毒性発現機構においては、毒性の本体と推察されているDMA<sup>III</sup>のみならず、GSHによる代謝過程で生成するH<sub>2</sub>SやDMA<sup>III</sup>-SHなどの代謝物も深く関与している可能性が示された。

#### (3)海産物からのヒ素抽出法の検討

食用ワカメからの効率的なヒ素抽出法を開発した。具体的には、ワカメなど褐藻類に多く含まれる多糖類・アルギン酸を分解する腸内細菌酵素による前処理を行うことにより、化学的に温和な条件で効率良くヒ素化合物を抽出できる方法を確立した。本抽出方法は、ワカメと類似した細胞構成成分を有する海藻類の分析に広く応用可能であるうえ、酸・アルカリや高温下での処理を必要とする従来法と比して、化合物の化学形態に与える影響が小さいと推測されるため、海産物、特に海藻中ヒ素化合物の形態別分析を行う際に大変有用な方法であると考えられる。

#### (4)アルセノシュガー類の標準品の合成および関連代謝物等の分析法の確立

アルセノシュガー類の初発原料の合成方法を確立した。併せて、アルセノシュガー類およびその代謝物の分析についてもHPLC-ICP-MSならびにHPLC-TOFMSを用いた分析法を確立した。

#### <引用文献>

- 1 J. Feldman and E. M. Krupp. Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars—a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs?. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2011) 399(5): 1735–1741.
- 2 R.Raml et al., Individual Variability in the Human Metabolism of

an Arsenic-Containing Carbohydrate, 2',3'-Dihydroxypropyl-5-deoxy-5-dimethylarsinoyl-β-D-ribose, a Naturally Occurring Arsenical in Seafood. Chemical Research in Toxicology (2009) 22(9):1534-1540.

3 F. Ebert et al., Toxicological properties of the thiolated inorganic arsenic and arsenosugar metabolite thio-dimethylarsinic acid in human bladder cells. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology (2014) 28(2):138-146.

4 H. Kurosawa et al., A novel metabolic activation associated with glutathione in dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA<sup>V</sup>)-induced toxicity obtained from in vitro reaction of DMMTA<sup>V</sup> with glutathione. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology (2016) 33(2):87-94.

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)

H. Kurosawa, Yasuyo Shimoda, Momofumi Miura, Koichi Kato, Kenzo Yamanaka, Akihisa Hata, Yuko Yamano, Yoko Endo, Ginji Endo, A novel metabolic activation associated with glutathione in dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA<sup>V</sup>)-induced toxicity obtained from in vitro reaction of DMMTA<sup>V</sup> with glutathione. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology (2016) 33(2):87-94.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 1. 下田康代, 黒澤英俊, 加藤孝二, 畑明寿, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三. ジメチルモノチオアルシン酸の Caspase-8 を介したアポトーシスの

誘発, 日本薬学会第 137 年会 (2017.3.27, 仙台国際センター, 宮城, 仙台).

2. 下田康代, 黒澤英俊, 加藤孝一, 畑明寿, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三. ジメチルチオヒ素化合物の毒性発現におけるグルタチオンの役割, 第 22 回ヒ素シンポジウム (2016.11.18, 国立研究開発法人産業技術総合研究所・臨海副都心センター別館 東京・江東).

3. Akihisa Hata, Momoko Hasegawa, Hidetoshi Kurosawa, Kenzo Yamanaka, Yuko Yamano, Yoko Endo, Noboru Fujitani, Ginji Endo. Improving the efficiency of organoarsenic extraction from edible seaweeds, The International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH)2015, (2015.10.20, Sheraton Dubrovnik Riviera Hotel, Croatia, Dubrovnik).

4. 山中健三. 食品中ジメチルヒ素の毒性発現における加硫化または第硫化代謝の異議, 第 59 回日本薬学海関東支部大会シンポジウム: 発がんのリスクとがん治療: その分子メカニズム(招待講演) (2015.9.12, 日本大学薬学部, 千葉, 船橋).

5. 下田康代, 黒澤英俊, 加藤孝一, 立川真理子, 畑明寿, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三. ヒト肝細胞株 HepaRG を用いたジメチルヒ素化合物の細胞毒性評価, 日本薬学会第 135 年会 (2015.3.28, サンポ ホール, 兵庫, 神戸).

6. 長谷川桃子, 畑明寿, 黒澤英俊, 山中健三, 山野優子, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 藤谷登. ワカメに含まれる有機ヒ素化合物抽出法の検討, 第 20 回ヒ素シンポジウム (2014.12.6, 千葉科学大学, 千葉・銚子).

〔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 0 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  
<https://www.pha.nihon-u.ac.jp/academics/laboratory/oyo/environmental-toxicology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山中 健三 (YAMANAKA, Kenzo)  
日本大学・薬学部・教授  
研究者番号：5 0 1 8 2 5 7 2

### (2) 研究分担者

畑 明寿 (HATA, Akihisa)  
千葉科学大学・危機管理学部・講師  
研究者番号：1 0 4 3 3 6 9 0

圓藤 吟史 (ENDO, Ginji)  
公益財団法人大原記念労働科学研究所・研究部・客員研究員  
研究者番号：2 0 1 6 0 3 9 3

加藤 孝一 (KATO, Koichi)  
日本大学・薬学部・教授  
研究者番号：6 0 2 4 6 9 3 1