

令和元年6月13日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05812

研究課題名(和文) 中国華東・中南地方における環境水中のアンチモンの化学形態調査と毒性発現機構の解析

研究課題名(英文) Speciation and toxicological study of antimony in the environmental water in eastern and mid-southern China

研究代表者

小椋 康光 (Ogra, Yasumitsu)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40292677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：アンチモンを含む15及び16族の類金属元素は、工業的に有用な元素であるが、他の重金属とは異なる毒性を発揮するものと想定される。本研究では、特に近年特定の地域で汚染が懸念されるアンチモンを中心に、環境中の動態と毒性の発現機構について解析を行うことを目的とした。アンチモンについては、汚染地域での化学形態の特定と、想定される3価及び5価の化合物について、変異原性、細胞内動態及び生体内動態を検討した。その結果、懸念される変異原性は確認されなかった。また細胞中ではアンチモンの動態に関する遺伝子の発現変動が見られた。さらにアンチモンの生体内動態については、動物種差が顕著であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

類金属元素は工業的に有用性が高い元素であるが、その毒性は十分に明らかになっていない。またレアメタルであるため、本来は地球上の限られた地域に偏在していた元素であるにもかかわらず、我々の生活圏に侵入してきた元素でもある。本研究では、環境中に存在し得る類金属の化学形態をまず明らかにするため、中国のアンチモン鉱山周辺の環境水中の分析を行い、その化学形態を特定し、その特定された化学形態が有する毒性を、発現メカニズムや変異原性という観点から明らかにした。これまで明らかになっていなかった類金属の毒性の一部が明らかになったことにより、有用性と有害性のトレードオフから脱却に貢献するという社会的意義が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The group 15 and 16 elements including antimony are industrially useful, and are expected to show the specific toxicity differing from heavy metals. In this study we aimed to reveal the environmental circulation of metalloids, and to clarify the mutagenicity, cellular metabolism, and toxicokinetics of metalloids, in particular, antimony which has the less information than other metalloids. There were no apparent mutagenicity of tri- and penta-valent antimony compounds. The treatments of tri- and penta-valent antimony compounds induced the several genes relating with the metalloid regulation. The species differences in the toxicokinetics of antimony among rodents were observed. These results indicate that metalloids show the unique toxicity, and it could be difficult to predict the metalloid toxicity against human due to the species differences.

研究分野：環境系薬学

キーワード：アンチモン テルル セレン ヒ素 中国 スペシエーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

14-16族に存在する元素のうち、金属と典型元素の中間的な物理化学的性質を有する元素は、類金属(あるいは半金属)元素とよばれ、そのユニークな性質から工業的に有用な元素が多く、レアメタルとして資源獲得競争の火種にもなっている。15族に属するアンチモン(Sb)は、相変化型DVDの記録層、プラスチックの難燃助剤や自動車のブレーキパッドなどといった我々の生活圏に広く浸透している製品に含まれている。アンチモンの世界産出量の80%以上は、中国の湖南省、広東省あるいは貴州省といった華東・中南地方で産出されており、最近ではレアアースやタングステンなどとともに輸出の総量規制がかけられたことでも話題になった。また感染症であるリーシュマニア症の治療薬として、発展途上国を中心として、安価であることからアンチモン製剤が使用されている。一方、16族のテルル(Te)も工業的な有用性が高く、Sb同様に相変化型DVDの記録層、ステンレス快削鋼の成分などに利用され、抗がん剤などの医薬品への応用も模索されている。またセレン(Se)については、工業的に有用であるだけでなく、動物にとっては必須元素であることも知られている。しかし、これらの類金属は一般に毒性を有する元素と認識されているものの、その詳細な毒性発現機構については明らかとなっていない点が多い。類金属は、いわゆる重金属とは異なり、類金属元素自身が炭素との共有結合を有するいわゆる有機金属化合物として代謝されるため、その代謝物が同定できれば(化学形態が特定できれば)、代謝過程を推定することができる。これまで、類金属の代謝や毒性発現機構を解明する研究に、微量な類金属含有成分の定性かつ定量的な分析が可能な化学形態別分析は大きな役割を果たしてきた。

これまでの研究代表者らの研究成果は、研究業績欄にも示した通り、化学形態別分析を主たる研究手法として、生体必須微量元素あるいは毒性元素の作用を解明すると同時に、生体内の微量元素に関する新たな分析法の開発も行ってきた。特に生体内で生合成される未知の類金属代謝物の同定に関しては、生体中に新奇の類金属含有糖や類金属含有アミノ酸などが存在することを明らかにするなど独自の成果を挙げてきた。また、培養細胞中の極微量の金属の化学形態別分析を行うなど、新たな分析法に関する成果も挙げてきた。

本研究は、研究代表者らがこれまでに展開してきた「化学形態別分析に基づく類金属元素の代謝機構の解明」の研究成果に立脚し、世界有数のアンチモン産出地域であり汚染地域における環境水中のアンチモンの化学形態別分析というフィールドワークに始まり、解毒代謝の分子基盤を解明し、創薬科学への展開を図ろうとするものである。すなわち本研究では、まず環境中に存在するアンチモンの化学種が、いかなる生体影響を發揮し、毒性を発現するのかということについて分子生物学と化学形態別分析に基づいた解析により解明し、アンチモンとヒ素、テルルあるいはセレンといった同族元素間及び隣接元素間の相互作用に着目し、応用研究を展開することを着想している。特に金属含有未知代謝物の同定といった研究代表者が得意としている方法を中心に据え、アンチモンという有用性と有害性を併有する元素に対し、環境毒学及び創薬科学という観点から研究を展開する。そして、今のところ顕在化はしていないものの、ヒ素のように甚大な健康影響が発生することを未然に防ぐことにも寄与したいと考えている、というのが研究開始当初の学術的背景である。

2. 研究の目的

本研究は、フィールドワークとそれに引き続くラボワークで構成している。

フィールドワークにおける到達目標は、現在世界有数のアンチモン産出地域である中国華東・中南地方で得られる環境水および飲料水中のアンチモンを化学形態別に定量することである。存在量の少ない化学形態のアンチモンは見逃されがちであるが、毒性を評価する上では、存在量の少ない化学形態も重要であるため、慎重に分析を行う必要があると認識している。また、リーシュマニア症の治療に用いられるアンチモン製剤についても以下の検討に含める。

ラボワークでは、環境中に存在する化学形態に応じた毒性評価、代謝過程の解明、毒性発現における種差の分子機構の解明を行う。特に15族あるいは16族元素のメチル化代謝の分子基盤の解明は本申請研究の期間内で完遂させる。毒性評価と代謝機構の解明では、代謝過程で生じる代謝物の中に、摂取した化学形態よりも毒性の高い代謝物が出現するかについて特に注目する。すなわち、「アンチモン毒性に代謝活性化は関与するか」という問いに明確に答えることを第一の目標とする。

アンチモンは、資源獲得競争の火種にもなるぐらい、人類にとって有用な元素であるものの、有用性が先行し、詳細な生体影響評価あるいは環境影響評価がなされていない。本研究で構想している化学形態別分析に立脚した生体影響評価を実施することにより、このような閉塞状況を打開することが可能となり、元素の有用性と有害性のトレードオフから脱却できると考えている。また類金属間の代謝における相互作用を利用し、新たな治療薬の開発や疾病の予防に役立てることを研究のアウトカムに据えている。本研究では、研究代表者の有する分析技術を利用して、他の研究グループでは得ることのできない環境毒学的知見の集積を図り、創薬科学や予防薬学という観点から人類へ還元するという意義を担っている。

研究代表者の有する分析技術は、主に二つあり、第一は、生体中に存在する未知の類金属代謝物について各種質量分析法を駆使して同定する手法を構築していることである。これまで化学的に合成され、精製されたモデル化合物を利用して、金属含有化合物を各種質量分析法に

より手法を紹介するような報告はあったものの、代表者は実際の生体試料という高マトリックス条件下の分析を数例にわたり報告した。第二は、従来の生体微量元素の化学形態別分析では、測定対象とする微量元素の存在量はまさに微量であるため、実験動物やヒトの尿、血液あるいは臓器抽出液など、比較的少量に得ることが可能な試料を測定できるのみであった。そこで代表者は、化学形態別分析に要する試料要求量を 100 nL に低減し、従来の分析と同等の分析が可能である手法を開発した。これにより培養細胞を測定対象とすることが可能となり、その結果、化学形態別分析と分子生物学的手法とを融合させた手法を利用可能である。これらの技術を駆使し、環境中の種々のアンチモン化合物とその生体影響についての解明を行う。

3. 研究の方法

1. 試料に含まれるアンチモンの化学形態別分析と同定

試料中に含まれると想定されるアンチモンの化学形態としては、環境水中であれば三酸化二アンチモン (Sb_2O_3)、五酸化二アンチモン (Sb_2O_5) あるいは塩化アンチモン (SbCl_5) が想定できる。これらの化学種はいずれも市販されているため、試料中の化学形態を同定するための標準物質として、利用した。しかし、市販の三酸化二アンチモン及び五酸化二アンチモンは、確かにアンチモンとしての純度は高いものの、相当量の三酸化二アンチモン及び五酸化二アンチモンが互いに混じり合っているため、同定用の標準物質として、化学形態毎に精製したアンチモン化合物が必要となる。両アンチモン化合物の分離方法については、イオン交換能とゲルろ過の効果を併有した HPLC カラムが有効であることから、標準物質として利用するため、分離した後の各アンチモン化合物の同定は ESI-MS-MS により行った。

実際の試料の分析は、まず HPLC と結合した ICP-MS により化学形態別分析を実施した。

2. アンチモン化合物の変異原性評価と生体内挙動に与える種差の影響評価

3 価、5 価の無機のアンチモン化合物とリーシュマニア症に用いられるアンチモン化合物について Ames 試験による変異原性の評価を行った。用いた菌株は、TA98 及び TA100 に加えて、酸化傷に鋭敏とされる TA1535 を用いた。

アンチモン化合物の生体内動態に与える種差の影響を評価するため、3 価及び 5 価のアンチモン化合物をラット及びハムスターに投与し、投与後のアンチモンの生体内分布と生体必須元素の存在量の変動を誘導結合プラズマ質量分析計により測定した。

3. 類金属のメチル化の分子機構の解明

ヒ素については arsenic (+3) methyltransferase (AS3MT) という酵素が、そのメチル化に関与することが示されているが、Sb、Te あるいは Se については、どのような酵素がそれらのメチル化に関与するのか明らかにされていない。Te は動物体内で確実にメチル化されることが示されているが、Sb については、メチル化されることの是非についても明らかになっていない。

そこで、確実にメチル化される Se について検討を開始し、類金属メチル化の分子機構を明らかにすることとした。そこで以下の項目を実施した。

- (1) リコンビナントのメチル化酵素を用いた *in vitro* 試験の実施：リコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* において Se をメチル化可能か、その酵素活性を化学形態分析により評価した。
- (2) thiopurine methyltransferase (TPMT) ノックダウン細胞における Se 感受性の評価：TPMT をノックダウンした細胞において、Se に対する感受性の变化を評価した。
- (3) TPMT 過発現細胞における Se 感受性の評価：上述(2)と表裏一体をなす項目であるが、これにより、より確実な結論を得ることとした。

4. 研究成果

1. アンチモンの化学形態別分析と生体影響評価

試料中に含まれる 3 価及び 5 価のアンチモン化合物は、陰イオン交換カラムを用いることにより、良好に分離できた。環境試料中のアンチモン化合物を測定するためには、試料の前処理法に改良を加え、回収率の向上を図る必要がある。

今回用いた 3 価、5 価及びリーシュマニア症の治療に用いられるアンチモン化合物は、いずれも明瞭な変異原性を示さなかった。一方、3 価のアンチモン化合物は、5 価のアンチモン化合物に比べ、細胞毒性が高いことが明らかとなった。3 価の方が 5 価よりも毒性が高いという点については、同族元素のヒ素と同じ傾向であった。

ヒ素では、ハムスターに比べてラットでは、著しく赤血球中にヒ素を蓄積することが知られているが、アンチモンについてもラットの方がハムスターよりもアンチモンを赤血球中に蓄積した。しかし、蓄積の程度はヒ素に比べてはるかに低く、種差という点では、ヒ素ほど大きくはなかった。アンチモンの投与により、一部の必須元素の生体内分布にかく乱が生じていると思われる成果が得られつつあるが、詳細は引き続き検討中である。

2. セレンのメチル化の分子機構の解明

ヒト組換え TPMT (rhTPMT) を作成し、セレンと反応させたところ、その反応溶液からはセレンのモノメチル化体とジメチル化体が検出された。また、別なメチル基転移酵素である

rhINMT をセレンと反応させたところ、その反応溶液からはメチル化体は検出されなかった。一方で rhTPMT と rhINMT の混合物をセレンと反応させたところ、トリメチル化体のみが検出された。

これらの結果から、TPMT はセレンのジメチル化体までの代謝過程に関与していること、INMT はジメチル化体からトリメチル化体までの代謝過程に関与していることが考えられた。

TPMT のノックダウンはセレンの感受性に影響を与えなかったが、TPMT を過剰発現させることにより、細胞のセレン耐性は増加した。また INMT の発現は、セレン耐性に影響を与えなかった。これらのことから、セレンの耐性には、メチル基転移酵素によるメチル化以外の耐性機構が存在することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)(全て査読有)

1. N. Roldán, D. Pizarro, F. Frézard, M. Bravo, M. Verdugo, N. Suzuki, Y. Ogra and W.E. Quiroz*: Analytical methodology for the simultaneous determination of NMG-Sb(V), iSb(V), and iSb(III) species by anion exchange liquid chromatography in Glucantime® and biological application in Wistar rat urine. *J. Anal. At. Spectrom.* (2019) **34**, 203-213, 10.1039/C8JA00273H
2. Z. Hu, C. Yixin, N. Suzuki, X. Guo, H. Xiong* and Y. Ogra*: Speciation of selenium in brown rice fertilized with selenite and effects of selenium fertilization on rice proteins. *Int. J. Mol. Sci.* (2018) **19**, 3494, 10.3390/ijms19113494
3. Z. Hu, A. Shiokawa, N. Suzuki, H. Xiong and Y. Ogra*: Evaluation of chemical species and bioaccessibility of selenium in dietary supplements. *Eur. Food Res. Technol.* (2019) **245**, 225–232, 10.1007/s00217-018-3155-8
4. Y. Ogra*, M. Shimizu, K. Takahashi and Y. Anan: Biotransformation of organic selenium compounds in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Metallomics* (2018) **10**, 1257-1263, 10.1039/C8MT00176F
5. K. Takahashi, N. Suzuki and Y. Ogra*: Effect of administration route and dose on metabolism of nine bioselenocompounds. *J. Trace Elem. Med. Biol.* (2018) **49**, 113-118, 10.1016/j.jtemb.2018.05.007
6. H. Kobayashi, N. Suzuki and Y. Ogra*: Mutagenicity comparison of nine bioselenocompounds in three *Salmonella typhimurium* strains. *Toxicol. Rep.* (2018) **5**, 220-223, 10.1016/j.toxrep.2018.01.005
7. Y. Ogra*: Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. *Metallomics* (2017) **9**, 435-441, DOI: 10.1039/C7MT00022G
8. K. Bierła, N. Suzuki, Y. Ogra, J. Szpunar* and R. Łobiński: Identification and determination of selenohomolanthionine - the major selenium compound in *Torula* yeast. *Food Chem.* (2017) **237**, 1196-1201 10.1016/j.foodchem.2017.06.042
9. K. Takahashi, N. Suzuki and Y. Ogra*: Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.* (2017) **18(3)**, 506-516 10.3390/ijms18030506
10. Y. Ogra*, Y. Ogihara and Y. Anan: Comparison of metabolism of inorganic and organic selenium species between two selenium accumulator plants, garlic and Indian mustard. *Metallomics* (2017) **9**, 61-68 10.1039/C6MT00128A
11. M. Verdugo, Y. Ogra, and W. Quiroz*: Mechanisms underlying the toxic effects of antimony species in human embryonic kidney cells (HEK-293) and their comparison with arsenic species. *J. Toxicol. Sci.* (2016) **41**, 783-792
12. Y. Ogra*, A. Tejima, N. Hatakeyama, M. Shiraiwa, S. Wu, T. Ishikawa, A. Yawata, Y. Anan and N. Suzuki: Changes in intracellular copper concentration and copper-regulating gene expression after PC12 differentiation into neurons. *Sci. Rep.* (2016) 6:33007 10.1038/srep33007
13. Y. Ogra*, S. Nagasaki, A. Yawata, Y. Anan, K. Hamada and A. Mizutani: Metallomics approach to changes in element concentration during differentiation from fibroblasts into adipocytes by element array analysis. *J. Toxicol. Sci.* (2016) **41**, 241-244

〔学会発表〕(計 4 件) 国際学会における招待講演を記載

1. Y. Ogra: Methylation of selenium -Molecular mechanisms for Se excretion-, Metals in Life Processes, December 5, 2018, Hong Kong
2. Y. Ogra: Selenometabolome: The riddles of unique selenometabolites. The 7th Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, November 12-17, 2017, Matsue, Japan
3. Y. Ogra: Toxicology of tellurium explored by speciation and identification of tellurometabolites. The 6th International Symposium on Metallomics, August 14-17, 2017, Vienna, Austria
4. Y. Ogra, K. Takahashi and N. Suzuki: Evaluation of naturally occurring selenocompounds on their nutritional availability. The International Selenium Seminar (ISS 2016), October 20-23, 2016, Guangzhou-Shenzhen, China

〔図書〕(計3件)

1. **Y. Ogra***, **Y. Anan** and **N. Suzuki**: Bioanalytical chemistry of selenium. In: *Selenium Molecular and Integrative Toxicology*, B. Michalke (ed.), Springer Nature, Switzerland, pp. 495-511 (2018), 978-3-319-95389-2
2. **Y. Ogra***: Speciation and identification of chalcogen-containing metabolites. In: *Metallomics - Recent Analytical Techniques and Applications -*, **Y. Ogra** and T. Hirata (eds.), Springer, Tokyo, pp. 43-61 (2017)
3. **N. Suzuki*** and **Y. Ogra**: ^{77}Se NMR spectroscopy for speciation analysis of selenium compounds. In: *Metallomics - Recent Analytical Techniques and Applications -*, **Y. Ogra** and T. Hirata (eds.), Springer, Tokyo, pp. 147-155 (2017)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yobou/index.html>

<https://researchmap.jp/read0052365/>

<https://orcid.org/0000-0002-8268-1828>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 紀行

ローマ字氏名：(SUZUKI, Noriyuki)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院薬学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10376379

研究分担者氏名：阿南 弥寿美

ローマ字氏名：(ANAN, Yasumi)

所属研究機関名：昭和薬科大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：40403860

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。