

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08058

研究課題名(和文) 分析化学的手法に立脚したヒ素脂質の代謝および毒性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the metabolism and toxicity mechanism of arsenolipids by analytical chemistry techniques

研究代表者

小林 弥生 (Kobayashi, Yayoi)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素脂質の生体内における代謝および毒性に関する報告は非常に少ない。そこで、ヒ素含有炭化水素2種類(AsHC332およびAsHC360)とヒ素含有脂肪酸1種類(AsFA418)を合成し、マウスに強制経口投与してヒ素の排泄と体内分布について調べ、ジメチルアルシン酸(DMAV)とトリメチルアルシンオキシド(TMAOV)と比較した。全群において、24時間以内に投与量の約77-94%のヒ素が尿と糞から排泄された。AsHC332およびAsHC360群の脳への分布は、DMAV群よりも約2倍および4倍高いことが分かった。このことから、ヒ素含有炭化水素が血液脳関門を通過して輸送される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Less information is available on the metabolism and toxicity of arsenolipids in mammals. Thus, we synthesized arsenic-containing hydrocarbon 332 (C₁₇H₃₈AsO) (AsHC332), 360 (AsHC360) (C₁₉H₄₂AsO) and arsenic fatty acid 418 (C₂₁H₄₄AsO₃) (AsFA418), and compared the tissue distribution and excretion of these arsenolipids with those of dimethylarsinic acid (DMAV) and trimethyl arsine oxide (TMAOV) after oral administration in mice. Approximately 77 to 94% of the dose were excreted from urine and feces in one day in the all groups. It was found that the recoveries of arsenic in the brain of AsHC332-, AsHC360-treated group, but not AsFA418-treated group, were higher than that of DMAV-treated group, namely, approximately 2 and 4 times, respectively. The higher accumulation of arsenic originating AsHC332 and AsHC360 in brain suggests that AsHC is easier permeable across the blood-brain barrier than DMAV.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ヒ素脂質 化学形態別分析 HPLC-ICP-MS LC-MS 体内動態 代謝 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

ヒ素は地殻中に広く分布しており、火山活動等の自然現象や微生物による土壌からの溶出等の生命現象により環境中に放出される為、土壌や水中には天然由来のヒ素が含まれている。このため、食品や飲料水にはヒ素が含まれており、それらを通じてヒ素は体内にヒ素を摂取している。海産物中には多くのヒ素化合物が含まれており、日本人が食品を通じて摂取するヒ素の主要な曝露源となっている。ヒジキを除く海産物中の無機ヒ素含有量は微量であり、そのほとんどが有機ヒ素化合物として存在する。これまで魚介類中のヒ素の主要な化学形態は、毒性の低いアルセノベタインであると認識されていたが、最近、50種以上のヒ素脂質が同定され、マグロの刺身に含まれるヒ素の約50%はヒ素脂質であるとの報告もある(Taleshi M et al. (2010) Environ. Sci. Technol., 44, 1478-1483)。また、ヒ素糖とリン脂質が結合した新しいヒ素含有リン脂質も同定されている。このように、近年、高分解能質量分析器による分析技術の向上により、ヒ素脂質が次々に報告されているが、それらヒ素脂質の生体内における代謝および毒性に関する報告は非常に少ない。

最近、ヒ素脂質の *in vitro* における毒性に関して報告があり (Meyer S et al. (2014) Metallomics, 6, 1023-1033)、その中で著者らは代謝活性を持つ肝細胞と代謝活性を持たない膀胱細胞に合成したヒ素脂質を曝露しているが、生体への吸収に至るまでの過程でヒ素脂質は分解および代謝され生体内に分布すると推定される為、実際の生体内でのヒ素脂質の分解・代謝を考慮した毒性評価を行う本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、代表者が現在までに遂行してきた分析毒性的手法を用いた類金属の代謝機構の解明によって得られた成果を基に、海産物に含まれるヒ素脂質の生体内代謝機構および毒性発現機構の解明について研究を遂行し、将来的に環境および食品中のヒ素の健康リスク評価に貢献することを目指して、まずは本研究においてその基盤となる研究を遂行するため、(1)ヒ素脂質および水溶性ヒ素化合物の分析手法の検討(2)試料からのヒ素脂質の安定かつ効率的な抽出法の確立(3)模擬消化液によるヒ素脂質の抽出法の検討および分解物の同定(4)齧歯類を用いたヒ素脂質の体内動態の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒ素脂質および水溶性ヒ素化合物の分析手法の検討

(1)-1 ヒ素脂質の合成

まずは、カラフトシヤモから検出され、毒性も高いと報告されているヒ素含有炭化水素 AsHC360 に着目し、既報 (Taleshi M et al.

(2014) Organometallics, 33, 1397-1403) を参考にして Arsenic hydrocarbon360 (AsHC360) (図1) の合成を行った。

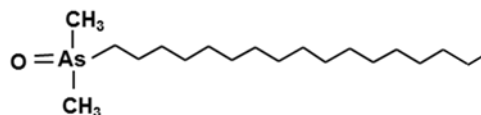


図1 AsHC360の構造式

(1)-2 AsHC360 の測定条件の検討

HPLC の条件と ICPMS の測定条件をそれぞれ表1と表2に示した。

表1 HPLC の条件

HPLC	SHIMADZU prominence
column	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5-micron)
column temp.	30
buffer A	0.1% formic acid in water
buffer B	0.1% formic acid in MeOH
flow rate	0.2 mL/min
gradient	0-3min: 30% B, 25min: 100% B, 25-35min: 100% B, 45min: 30% B, 45-60min: 30% B

表2 ICP-MS 測定条件

ICP-MS	8800 ICPQQQ (Agilent)
mode	organic mode (20 mL/min 50% O ₂ (Ar/O ₂ =1:1))
RF power	1550 W
carrier gas	0.78 L/min
reaction mode	O ₂ (30% O ₂)
mass recoded	Ga (71), Ge(72), Ge(74), Te(125), As(75→91)

(1)-3 水溶性ヒ素化合物の測定条件の検討

陽イオン交換カラムおよびゲルろ過カラムを使用した際の HPLC の条件と ICPMS の測定条件をそれぞれ表3、4と5に示した。

表3 陽イオン交換カラム使用時の HPLC の条件

HPLC	SHIMADZU prominence
column	Rspak NN-614 (cation exchange column) (6.0 mm × 150 mm, 10-micron)
column temp.	25
buffer	5 mM HNO ₃ +8 mMNH ₄ NO ₃ (pH 2.44)
flow rate	0.8 mL/min

表4 ゲルろ過カラム使用時の HPLC の条件

HPLC	SHIMADZU prominence
column	GS220HQ (gel-filtration based multi-mode column) (7.5 mm × 300 mm, 6-micron)
column temp.	25
buffer	50 mM Tris-HNO ₃ (pH 7.4)
flow rate	0.5 mL/min

表5 ICP-MS 測定条件

ICPMS	8800 ICPQQQ (Agilent)
RF power	1550 W
carrier gas	1.03 L/min
reaction mode	O ₂ (30%O ₂)
mass recoded	Ga (71), As(75→91), S(32→48)

(2) 試料からのヒ素脂質の安定かつ効率的な抽出法の確立

含有している総ヒ素濃度およびアルセノベタイン(AB)濃度が保証されているメカジキ魚肉粉末(NMIJ CRM 7403-a)以下、CRMと記載する)にAsHC360を添加し、CRMからのヒ素化合物の抽出とAsHC360の添加回収実験を行った。CRM0.1gにメタノールに溶解したヒ素として737.7ngのAsHC360を添加した。試料に5mLの混合有機溶媒(容積比として1のメタノールに対して、容積比として2のジクロロメタン、クロロホルム、トルエン、アセトン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、アセトニトリル、n=3)を添加し、室温で1時間、1分間に150回振とうさせた。1時間後に室温、3,000gで10分間遠心し、上清を得た。得られた上清中の総ヒ素濃度はICP-MSにて、またHPLC-ICP-MS法にて、抽出した試料中のヒ素の化学形態別分析を行った。分離条件は表1に従った。

(3) 模擬消化液によるヒ素脂質の抽出法の検討および分解物の同定

模擬消化液は既報(Maulvault A. L et al. (2011) Food Chem. Toxicol., 49, 2808)を参考にして作製した。

CRMと合成AsHC360の模擬消化液によるヒ素化合物の分解とヒ素の回収実験を行った。CRM0.1gまたはメタノールに溶解したヒ素として437ngのAsHC360、あるいはCRMとAsHC360の混合試料に対して、模擬唾液0.4mL、模擬胃液0.96mL、模擬腸液0.96mLおよび模擬胆汁0.48mLを添加し、それぞれ37で5分、2時間、5分および2時間振とうした。試料は各ステップn=3で行った。反応後、4、10,000gで10分間遠心し上清を得た。得られた上清中の総ヒ素濃度はICP-MSにて、またHPLC-ICPMS法にて、抽出した試料中のヒ素の化学形態別分析を行った。分離条件は表1に従った。

(4) 齧歯類を用いたヒ素脂質の体内動態の解明

(4)-1 予備試験

齧歯類通常餌中に含まれる魚粉由来のヒ素の摂取を避けるため、離乳前の2週齢から6週齢になるまで精製食で育成させた雄性C57BL/6Jマウス1群5匹に対して、0.5mg As/kg b.w.のAsHC360またはジメチルアルシン酸(DMA^V)をオリーブオイルに混和して単回強制経口投与し、代謝ケージを用いて、24時間にわたり尿と糞を採取した。投与24時間後に麻酔下で心採血した後、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、腸、精巣、筋肉、骨、皮膚を採取した。糞は凍結乾燥した後メノウ製すり鉢で粉碎して均一化した。対照群には、オリーブオイルのみを投与した。生体試料中の総ヒ素濃度は、試料を硝酸と過酸化水素で湿式灰化した後、ICP-MSで測定した。尿中ヒ素の化学形態別分析は陽イオン交換カラムを装着したHPLC-ICP-MS法にて行った。分離条件は表3に従った。

(4)-2 本試験

(4)-2-1 ヒ素脂質の合成

AsHC360に加え、それより側鎖の短いAsHC332(図2)、Arsenic fatty acid 418(AsFA418)(図3)に関しても、既報(Taleshi M et al. (2014) Organometallics, 33, 1397-1403)を参考にして合成した。

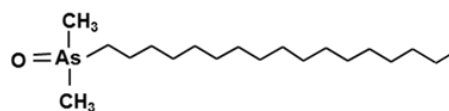


図2 AsHC332の構造式

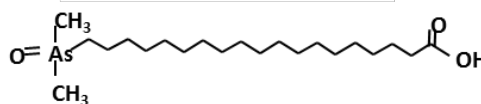


図3 AsFA418の構造式

(4)-2-2 動物実験

予備試験同様、離乳前の2週齢から6週齢になるまで精製食で成育させた雄性C57BL/6J マウス1群5匹に対して、0.5 mg As/kg b.w.のAsHC332、AsHC360、AsFA418、DMA^Vまたはトリメチルアルシンオキシド(TMAO^V)をオリーブオイルに混和して単回強制経口投与し、代謝ケージを用いて、24時間にわたり尿と糞を採取した。投与24時間後に麻酔下で心採血した後、予備試験の結果を考慮し、脳、肝臓、腎臓、筋肉、骨および皮膚を採取した。糞は凍結乾燥した後メノウ製すり鉢で粉碎して均一化した。対照群には、オリーブオイルのみを投与した。生体試料中の総ヒ素濃度は、試料を硝酸と過酸化水素で湿式灰化した後、ICP-MSで測定した。尿中ヒ素の化学形態別分析は陽イオン交換カラムを装着したHPLC-ICP-MS法にて行った。陽イオン交換カラムの分離条件は表3に従った。

4. 研究成果

(1)ヒ素脂質および水溶性ヒ素化合物の分析手法の検討

HPLC-IC-MSによるAsHC360の測定結果を図4に示した。AsHC360単独であれば、条件を変更させ測定時間を短縮可能であるが、実試料中には多種類のヒ素脂質が存在すると推定されるため、各ヒ素脂質の分離が必要である。カラムの性質上、AsHC360よりも早い時間に脂肪酸が、遅い時間にリン脂質が溶出すると推定される(Glabonjat R. A et al. (2014) Anal. Chem., 86, 10282)。分析時間を短縮させかつ各ヒ素化合物を分離する条件をさらに検討する必要があると考えられる。

海産物試料中には水溶性ヒ素化合物が含まれており、また模擬消化液によるヒ素脂質の分解過程で水溶性ヒ素化合物が生成する可能性があるため、水溶性ヒ素化合物の測定条件も検討した。陽イオン交換カラムおよびゲルろ過カラムで分離した各ヒ素化合物のクロマトグラムをそれぞれ図5と図6に示した。陽イオン交換カラムにおいては5価の無機ヒ素(iAs^V)と5価のモノメチルヒ素(MMA^V) MMA^Vとジメチルヒ素の2つの酸素が硫黄に置き換わったDMDTA^V、3価無機ヒ素化合物(iAs^{III})とジメチルヒ素の1つの酸素が硫黄に置き換わったDMMTA^Vの保持時間が非常に近く分離が困難である(図5)。また、ゲルろ過カラムでは、DMMTA^Vとアルセノベタイン(AB)、TMAO^Vが、iAs^{III}はアルセノコリン(AC)との保持時間が非常に近く分離が困難であり、さらにiAs^{III}はブロードとなっている(図6)。そのため、水溶性ヒ素の同定には2種類のカラムを使い分けて行う必要性があると示唆される。

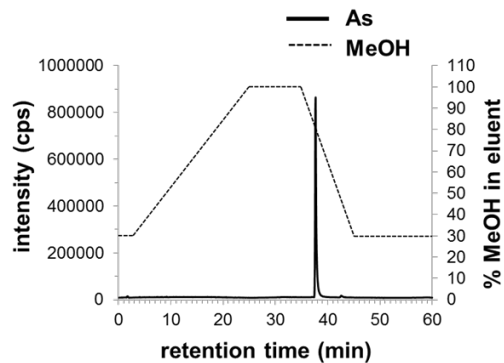


図4 HPLC-ICP-MSによる合成AsHC360の測定

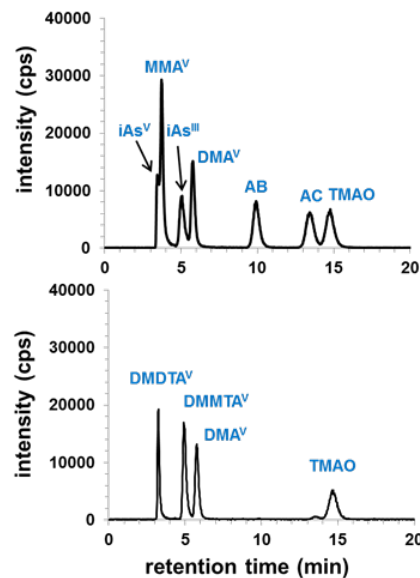


図5 陽イオン交換カラムによる水溶性ヒ素化合物の測定

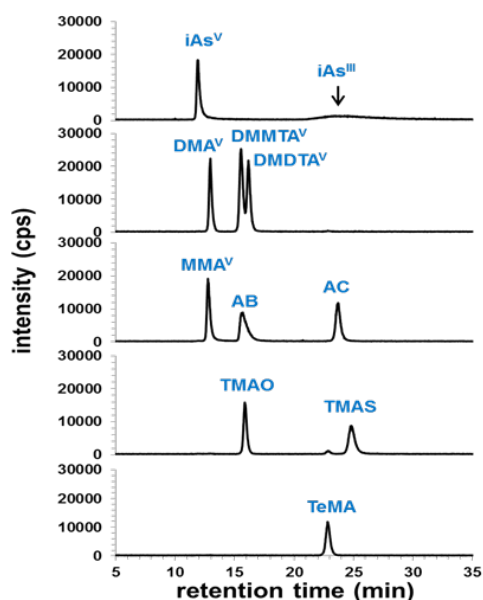


図6 ゲルろ過カラムによる水溶性ヒ素化合物の測定

(2) 試料からのヒ素脂質の安定かつ効率的な抽出法の確立

CRM 0.1 g にメタノールに溶解したヒ素として 737.7 ng の AsHC360 を添加し、各混合有機溶媒中のヒ素の抽出効率を検討した結果を図 7 に示した。また、アセトニトリル/メタノール混合溶媒での抽出溶液中ヒ素の化学形態別分析の結果を図 8 に示した。ジエチルエーテル以外はすべて 100%に近い回収率となった(図 7)。合成 AsHC360 がメタノールに可溶であることから回収率が高かったと推定されるが、実試料中でさらなる詳細な検討が必要であると示唆される。また、抽出溶液の HPLC-ICP-MS の結果から、添加した AsHC360 は安定に回収された事が分かった(図 8)。また、図 8 のポイドに溶出される水溶性ヒ素化合物は、カチオン交換カラムで AB であることを確認しており、CRM に含まれる AB も安定に抽出できる事を確認した。

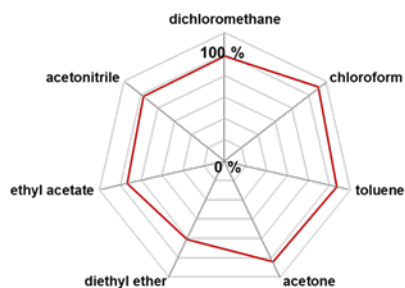


図7 各混合有機溶媒(各有機溶媒/メタノール=2/1(v/v))におけるCRM中ヒ素化合物と合成AsHC360の抽出効率の比較

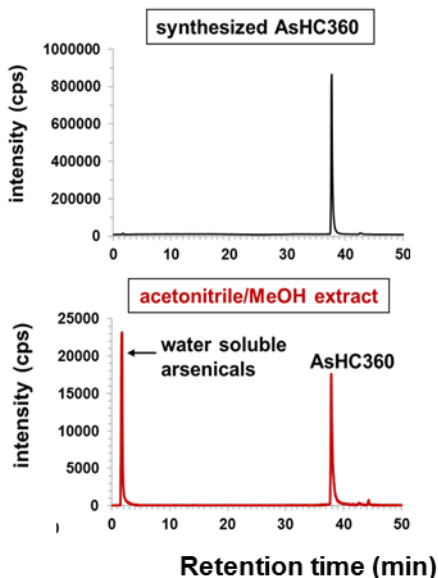


図8 合成AsHC360とアセトニトリル/メタノール混合有機溶媒で抽出したCRM中ヒ素化合物とAsHC360のクロマトグラム

(3) 模擬消化液によるヒ素脂質の抽出法の検討および分解物の同定

各ステップにおけるヒ素の回収率を図 9 に示した。CRM 中のヒ素化合物はほとんどが AB であることが分かっている。AB は唾液で 60%が抽出され、さらに胃で約 90%が可溶態になっていることが分かった。HPLC-ICP-MS の結果から AB のまま抽出されていることが分かった。合成 AsHC360 は唾液や胃液では可溶態にはならず、腸液で可溶態となった。HPLC-ICP-MS の結果からほとんどが AsHC360 として検出され、模擬消化液では分解されにくいことが分かった。

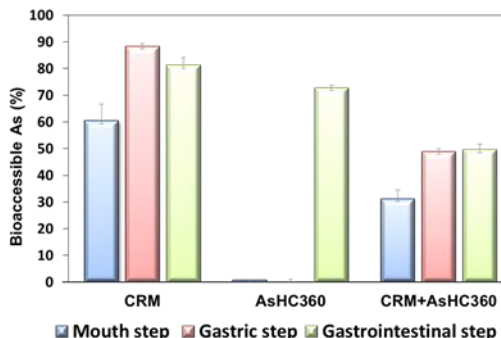


図9 模擬消化液によるヒ素の抽出

(4) 齧歯類を用いたヒ素脂質の体内動態の解明

まず AsHC360 と DMA^V をもちいて予備試験を行った。AsHC360 および DMA^V 投与 24 時間後には、投与量に対して約 57%および 77%のヒ素が尿中に排泄された。一方、糞への排泄は両群とも 24 時間で投与量の約 8%であった。腸内容物と腸組織を含めた十二指腸から直腸までの投与量に対するヒ素の回収率は AsHC360 群で約 0.4%、DMA^V 群で約 1%であった。全血、尿、糞、各組織も含めた投与量に対するヒ素の回収率は AsHC360 および DMA^V 群でそれぞれ約 68%および 88%だった。これらの結果から、AsHC360 は DMA^V と比較し、その他の組織中に広く分布することが推定された。組織中における投与量に対するヒ素の分布の割合を両群で比較したところ、AsHC360 群では DMA^V 群よりも肝臓で約 2.6 倍、腎臓で約 2.6 倍、脳においては約 5 倍高かった(図 10)。これらのことは、AsHC360 が血液脳関門を通過して輸送されることを示唆している。投与したヒ素の回収率から、本試験で採取する臓器は脳、肝臓、腎臓、筋肉、骨、皮膚とした。AsHC360 投与群の尿中ヒ素化合物の化学形態別分析の結果から、主に DMA^V として尿中に排泄されていたが、その他にも未同定のヒ素化合物が検出された(図 11)。

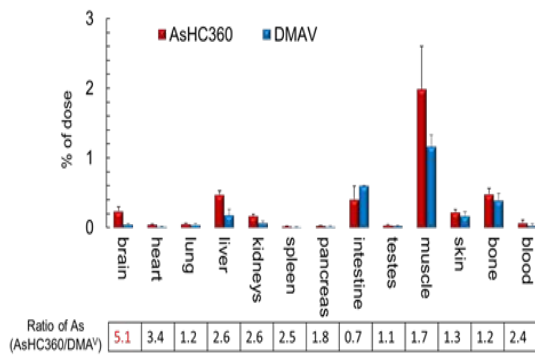


図10 ヒ素化合物投与24時間後のヒ素の分布

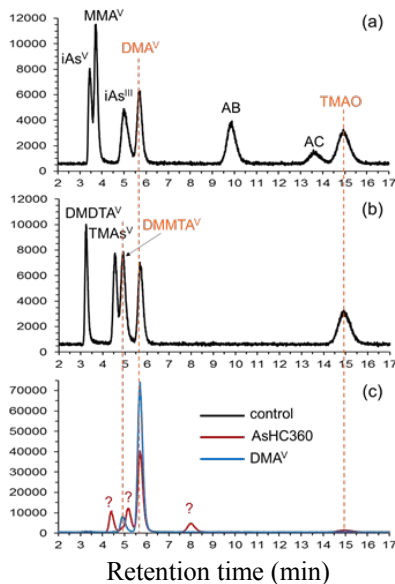


図11 ヒ素標準物質 (a, b) および24時間蓄積尿 (c) のクロマトグラム

予備試験の結果を踏まえ、ヒ素含有炭化水素2種類(C17H38AsO; AsHC332, C19H42AsO; AsHC360) およびヒ素含有脂肪酸1種類(C21H44AsO3, AsFA418)をマウスに経口投与し、各ヒ素脂質の組織分布と排泄をジメチルアルシン酸(DMA^V)およびトリメチルアルシノキサイド(TMAO^V)と比較した。全投与群で24時間以内に投与量の約77~94%が尿と糞から排泄されていた。TMAO^V群における脳へのヒ素の分布は対照群と同程度であった。AsFA418投与群の脳へのヒ素の分布はDMA^V群の約半分だった。一方、AsHC332およびAsHC360投与群の脳内へのヒ素の分布はDMA^V群と比較し、それぞれ約2倍、4倍となっていた(図12)。ヒ素含有炭化水素の脳内へのヒ素の蓄積は、ヒ素含有炭化水素が血液脳関門を通過して輸送される可能性を示唆している。尿中のヒ素の化学形態別分析の結果、生体内に摂取されたヒ素脂質AsHC332、AsHC360、AsFA418全てが予備試験と同様(図11)にDMA^Vと3つの未同定ヒ素化合物に分解・代謝されていることが分かった。

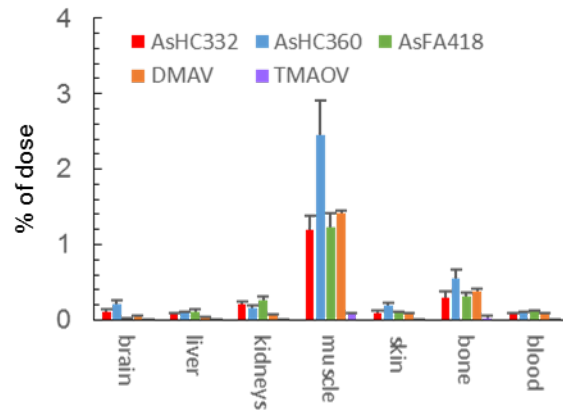


図12ヒ素化合物投与24時間後のヒ素の分布

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3件)

小林弥生, 鈴木紀行, 小椋康光, 平野靖史郎 (2017) 質量分析法に基づくヒ素脂質の代謝および毒性機構の解明 第2報 ~ヒ素脂質経口投与後のマウスにおけるヒ素の分布と排泄~. フォーラム2017 衛生薬学・環境トキシコロジー

Kobayashi Y., Suzuki N., Ogra Y., Hirano S. (2017) Distribution and excretion of arsenic in mice after oral administration of arsenolipid. The 6th International Symposium on Metallomics

小林弥生, 鈴木紀行, 小椋康光, 平野靖史郎 (2016) 質量分析法に基づくヒ素脂質の代謝および毒性機構の解明 第1報 ~分析および抽出手法の検討~, フォーラム2016: 衛生薬学・環境トキシコロジー

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弥生 (KOBAYASHI, Yayoi)
国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
研究者番号: 00391102

(2) 研究分担者

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

鈴木 紀行 (SUZUKI, Noriyuki)
千葉大学大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 10376379