

令和元年6月20日現在

機関番号：27401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05887

研究課題名(和文) AS3MT遺伝子多型がもたらすヒ素代謝能の人種差の解明

研究課題名(英文) Ethnic difference in metabolic capacity of arsenic by AS3MT genetic polymorphisms

研究代表者

阿草 哲郎 (Agusa, Tetsuro)

熊本県立大学・環境共生学部・准教授

研究者番号：50403853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、以下のことが明らかとなった。本研究の実験条件(ヒ素濃度100 µg/L、6ヶ月の飲水曝露)において、マウスではヒ素-代謝-毒性の関係を明確にすることができなかった。ミャンマーの地下水から高濃度のヒ素ならびマンガン、ウランが検出され、これら元素による複合汚染とヒトへの影響が危惧された。フィリピン人・ミャンマー人のヒ素代謝酵素AS3MT遺伝子多型をみたところ、ヒ素代謝能力の高いタイプが多い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

本研究によって、ヒ素のリスクに関する知見が深化・拡大されるとともに、科学的根拠に基づいた新たなリスク評価の指針を提供することができる。例えば、本研究によって得られた遺伝子情報から、ヒ素に対する感受性に合わせた飲料水のヒ素濃度の基準値を定めることができる。また、そうした知見は、とくに途上国において優先的にヒ素汚染の除去対策に取り組むべき地域の選定にも役立つであろう。

途上国現地ではヒ素の専門家が少なく、分析機器・試薬・技術も不十分なことから、現地政府・住民から海外の研究者への調査の要望も多い。本成果は途上国の公衆衛生・環境改善にも有益であり、国際社会的にも大きな貢献をもたらすものである。

研究成果の概要(英文)：This study revealed following things; 1) under this experimental condition (drinking exposure with 100 µg As/L for six months), relationship between arsenic exposure, metabolism, and toxicity was not clear in mice. 2) High concentrations of arsenic, manganese, and uranium were detected in groundwater from several areas in Myanmar, suggesting multi-elemental contamination and its human health risk. 3) AS3MT genetic polymorphism in Filipino and Burmese showed high frequency of the genotype with high metabolic capacity of arsenic.

研究分野：環境毒性化学

キーワード：ヒ素 地下水 遺伝子多型 AS3MT 代謝能力 感受性 途上国 民族差

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地下水のヒ素汚染は、世界各地、とくにバングラデシュやインドの西ベンガルで大きな公衆衛生上の問題となっている。申請者はこれまでに東南アジア(ベトナム・カンボジア・ラオス・タイ)における地下水のヒ素汚染を明らかにしてきた。その研究の中で、興味深い結果が得られた。すなわち、調査地域の中でヒ素曝露量は汚染の深刻なバングラデシュに匹敵するレベルであるにも関わらず、住民には慢性ヒ素中毒の症状がほとんどみられていないことである。この原因として、東南アジアの人々における地下水の利用スタイルの違い等の環境要因やヒ素代謝能の遺伝的な差等の要因が考えられた。ここで、各人種のヒ素代謝能に注目すると、ベトナム・カンボジア人では代謝能が強く、インド・ガーナ人では弱いことが申請者の予備的調査でわかった。また、先行研究において、ヒ素代謝能の弱い人ほどがん等の発症リスクが高いと報告されている。以上のことから、ヒ素の代謝能力は毒性発現に大きく関与しており、代謝能力の人種差が我々の結果に効いていると推察された。

そこでまず遺伝的要因がヒ素代謝に関係するのかどうかを検証するため、ベトナム人を対象にヒ素代謝(メチル化)酵素である AS3MT の一塩基多型(SNP)を判定した。その結果、ヒ素代謝の感受性に関与する AS3MT の SNPs を特定し、そのほとんどがイントロンに存在することを初めて明らかにした。以上のことから、ベトナム人においても AS3MT の SNP がヒ素代謝能力に強く関係していることが判明した。

しかしながら、次のことがさらなる課題となった。つまり、ヒ素代謝の人種差は、AS3MT のどの多型の組み合わせによってもたらされているのか?、AS3MT のイントロン領域の多型は近年報告されたスプライシングバリエーションの生成と関係があるのか?、実際に AS3MT 多型がもたらすヒ素代謝能の変動は、その後のヒ素による毒性発現に関与するのかどうか?、である。また、ヒ素は主に肝臓で代謝されるが、現状ヒトにおけるヒ素代謝能は尿中ヒ素化合物組成で評価している。一方で、肝臓におけるヒ素の毒性も、尿や血液でしか評価することができない。すなわち、ヒトにおいて実際に肝臓で生じている代謝や毒性影響、あるいはそれらに関連するパスウェイを尿や血液をマーカーとしてみるのが妥当かどうか?について検証する必要性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒ素代謝(メチル化)酵素である AS3MT の活性とヒ素代謝物組成、毒性影響にはどのような関連性があるのか?、AS3MT 遺伝子多型・スプライシングバリエーションがどのようにヒ素代謝能力に作用するのか?、そして各人種の AS3MT 遺伝情報からヒ素代謝能力を予測できるかどうか?、について究明することである。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いた慢性ヒ素曝露試験

C57BL/6 マウス(オス、5週齢)を自由飲水でそれぞれ 0 µg/L(コントロール群)、10 µg/L(低濃度群)、100 µg/L(高濃度群)の亜ヒ酸濃度に6ヶ月間曝露させた。その後、マウスを解剖し、肝臓等の臓器・血液・尿を採取した。なお、本実験は熊本県立大学動物実験委員会の認可を得て実施した。

凍結乾燥・粉碎した肝臓をマイクロ波前処理装置で硝酸加熱分解した後、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いてヒ素およびその他の微量元素の濃度を測定した。尿および肝臓の酸化ストレス(8-OHdG)の分析には、ELISA キットを用いた。

(2) 途上国におけるヒ素汚染の実態解明

2015年12月および2016年12月に、ミャンマーのエーヤワディ川流域中部および南部で地下水を採取した。地下水との比較のため、河川水、水道水、ボトル水もそれぞれ採取した。各種水サンプルは、硝酸を添加後、27元素をICP-MSで定量した。また、2地域で地域住民の毛髪も採取することができた。毛髪サンプルは、マイクロ波-硝酸加熱分解をおこない、ICP-MSで元素を定量した。なお、ヒトにおける調査は、熊本県立大学の生命倫理委員会の認可を得て実施している。

また、2019年3月にバングラデシュ西部で地下水を採取することができたので、先と同様に硝酸処理後、ICP-MSで元素分析をおこなった。

(3) AS3MT の遺伝子多型およびスプライシングバリエーションの判定

本実験は愛媛大学及び熊本県立大学生命倫理委員会の承認の下、被験者からインフォームドコンセントを得て実施した。AS3MT の遺伝子多型については、フィリピン人、ミャンマー人及びガーナ人を対象とした。フィリピン人は血液、ミャンマー人は口腔細胞、ガーナ人は尿サンプルをそれぞれDNA抽出に用いた。

遺伝子型判定においては、AS3MT の SNP M287T、T>C (rs11191439) を対象とした。この SNP は 287 番のアミノ酸がメチオニン (ATG) からスレオニン (ACG) に変異しているものであり、スレオニン型は AS3MT 活性が低いことが知られている。抽出した DNA を用い、PCR で標的遺伝子を増幅、制限酵素処理した。その後、ポリアクリルアミド電気泳動を用いて遺伝子型を判定した。

AS3MT スプライシングバリエントについては、ミャンマー人を対象とした。口腔細胞から RNA を抽出・逆転写させた後、スプライシングバリエントを PCR で増幅させ、アガロース電気泳動によって判定した。

4. 研究成果

(1) マウスを用いた慢性ヒ素曝露試験

各群のマウスの体重および飲水量、体重に対する臓器重量比を比較したところ、有意な差は認められなかった。ヒ素分析の結果、ヒ素曝露に伴う肝臓中ヒ素濃度の増加は認められなかった。8-OHdG 濃度は、尿・肝臓ともに各群で有意な差は認められなかった。また、肝臓と尿との 8-OHdG 濃度の間にも、有意な相関は得られなかった (Fig. 1)。以上、本研究で設定した曝露濃度・期間ではマウスにヒ素の蓄積や酸化ストレスが生じていないことから、マウスはヒトよりもヒ素に対して強く、ヒトのモデルとしてはあまり相応しくないと考えられた。

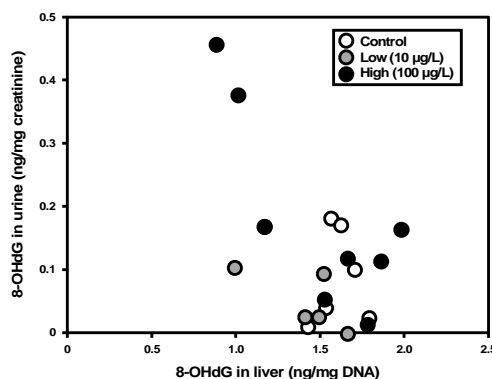


Fig. 1. Relationship between 8-OHdG concentration in liver and urine of arsenic-exposed mice

しかし、肝臓におけるヒ素以外の微量元素に着目したところ、ヒ素曝露に伴いアルミニウム、クロム、バリウムが減少し、その反対にアンチモンは増加した。これらの原因は现阶段において不明であるが、ヒ素曝露により肝臓の微量元素の動態が変化したものと推察された。

(2) 途上国におけるヒ素汚染の実態解明

ミャンマーの水サンプル中のヒ素濃度は、<math><0.01 - 209 \mu\text{g/L}</math> であり、全サンプルの 28% が WHO による飲用水の基準値を超過していた (Fig. 2)。興味深いことに、水道水でさえもこの基準値を上回るサンプルがあった (Fig. 2)。以上のことから、これらの水を飲用する地域住民に、ヒ素曝露とそれに伴う健康リスクが懸念された。とくに、地下水ヒ素汚染地域の住民の毛髪中ヒ素濃度は皮膚障害の閾値を超えるレベルであった。

また、ヒ素以外にマンガンやウランも、いくつかの地点から WHO の基準値を上回る濃度が検出された。とくに、ヒ素とマンガン、ヒ素とウランによる複合汚染も見つかったことから、ミャンマーの人々における地下水を介した複合曝露による健康リスクが大きな関心事となった。実際、ヒト毛髪からヒ素だけでなくウランも高濃度で検出されており、地域住民におけるヒ素・ウランの複合曝露の影響が懸念された。

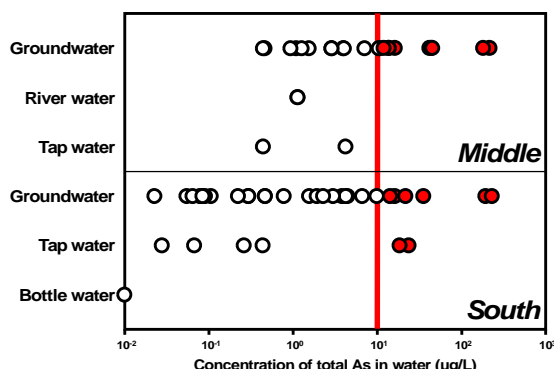


Fig. 2. Concentration of total As in water samples collected from middle and south parts of Myanmar. Vertical bold line means a guideline value of As for drinking water by WHO (2008).

次にバングラデシュの水分析の結果、WHO の基準値の 300 倍以上のヒ素を含む地下水もあり、ヒ素汚染の深刻度が明らかになった。また、実際の調査で、ヒ素中毒特異的な症状、すなわち角化症・皮膚がん等の皮膚障害を患っている人たちが多くいた。現在、これら地域の人々からサンプル提供を依頼しており、ヒトの曝露実態ならびに影響、感受性評価の研究を展開する予定でいる。

(3) AS3MT の遺伝子多型およびスプライシングバリエントの判定

AS3MT 遺伝子多型については、ミャンマー人、フィリピン人、ガーナ人を対象とした。その結果、ミャンマー人とフィリピン人のヒ素代謝はアジアタイプ、すなわちメチル化能が高いタイプが多いと判定された。興味深いことに、今回調査したガーナ人はアフリカタイプではなく、アジアタイプであった。ガーナの中にも多民族が存在していることから、今回調査したガ

一人でも、ヒ素代謝の強い民族を選択的にサンプリングしていた可能性もある。いずれにせよ、サンプル数が少ないこともあり、さらに大規模な調査を進める必要がある。

AS3MT スプライシングバリエーションについては、残念ながら RNA のコンディションが悪く、明瞭な結果を得ることができなかった。これについては RNA の精製、再度 RNA サンプルの入手等の手段を考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Asante, K.A., Amoyaw-Osei, Y., Agusa, T. (2019) E-waste recycling in Africa: risks and opportunities. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 18, 109-117. DOI: 10.1016/j.cogsc.2019.04.001 査読有

Nishimura, C., Suzuki, G., Matsukami, H., Agusa, T., Takaoka, M., Takahashi, S., Tue, N. M., Viet, P. H., Tanabe, S., Takigami, H., Fujimori, T. (2018) Soil Pollution by Chlorobenzenes and Polychlorinated Biphenyls from an Electronic Waste Recycling Area in Northern Vietnam. *International Journal of Environment and Pollution*, 63, 4, 283-297. DOI: 10.1504/IJEP.2018.097863 査読有

Ochiai, M., Iida, M., Agusa, T., Takaguchi, K., Fujiic, S., Nomiyama, K., Iwata, H. (2018) Effects of 4-Hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (4-OH-CB107) on Liver Transcriptome in Rats: Implication in the Disruption of Circadian Rhythm and Fatty Acid Metabolism. *Toxicological Sciences*, 165, 1, 118-130. DOI: 10.1093/toxsci/kfy123 査読有

Fujimori, T., Taniguchi, M., Agusa, T., Shiota, K., Takaoka, M., Yoshida, A., Terazono, A., Ballesteros Jr, F.C. Takigami, H. (2018) Effect of lead speciation on its oral bioaccessibility in surface dust and soil of electronic-wastes recycling sites. *Journal of Hazardous Materials*, 341, 363-372. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.07.066 査読有

Hoang, V.A.T, Do, H.T.T., Agusa, T., Koriyama, C., Akiba, S., Ishibashi, Y., Sakamoto, M., Yamamoto, M. (2017) Hair mercury levels in relation to fish consumption among Vietnamese in Hanoi. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42, 5, 651-662. DOI: 10.2131/jts.42.651 査読有

Nguyen, H.T., Lauan Tsuchiya, M.C., Yoo, J., Iida, M., Agusa, T., Hirano, M., Kim, E.-Y., Miyazaki, T., Nose, M., Iwata, H. (2017) Strain differences in the proteome of dioxin-sensitive and -resistant mice treated with 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin. *Archives of Toxicology*, 4, 1763-1782. DOI: 10.1007/s00204-016-1834-4 査読有

Iida, M., Fujii, S., Uchida, M., Nakamura, H., Kagami, Y., Agusa, T., Hirano, M., Bak, S.-M., Kim, E.-Y., Iwata, H. (2016) Identification of aryl hydrocarbon receptor signaling pathways altered in TCDD-treated red seabream embryos by transcriptome analysis. *Aquatic Toxicology* 177, 156-170. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.05.014 査読有

Fujimori, T., Eguchi, A., Agusa, T., Tue, N.M., Suzuki, G., Takahashi, S., Viet, P.H., Tanabe, S., Takigami, H. (2016) Lead contamination in surface soil on roads from used lead-acid battery recycling in Northern Vietnam, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 18/4, 599-607. DOI: 10.1007/s10163-016-0527-7 査読有

〔学会発表〕(計 30 件)

阿草哲郎, 下田優里, 網田有彩, 松本遙加, 石橋美奈子, 児玉亜佑美, (2019) 熊本県天草沿岸における海ごみおよびマイクロプラスチック汚染の実態, 第 28 回環境化学討論会.

阿草哲郎, 島津一平, 河原恵 (2019) マウスを用いた慢性ヒ素曝露の影響評価とヒトへの応用, 第 28 回環境化学討論会.

Agusa, T., Murakami, R., Kimura, N., Omagari, R., Uchiyama, Y., Arizono, K., Nakata, H., Phay, N. (2018) Environmental Contamination by Metals in Myanmar: Case Study of Arsenic in Groundwater. Joint Seminar on Environmental Chemistry for Collaboration Research between Myanmar and Japan.

Shimoda, Y., Oda, A., Matsumoto, Y., Kitahara, K., Nakata, H., Agusa, T. (2018) Microplastic Pollution Originated from Drifted Wastes of Coastal Areas in Kumamoto. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Kohara, M., Oda, A., Shimoda, Y., Nakata, H., Ueno, D., Agusa, T. (2018) Environmental Effects by Disaster Waste Caused by the Kumamoto Earthquake. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Fukuhara, K., Yoshida, A., Ballesteros, F.C., Hayama, S., Takuma, K., Agusa, T. (2018) Genotype Distribution of Arsenic Metabolic Enzymes in Asian Population. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Oda, A., Tsugeki, N.K., Kuwae, M., Tanabe, S., Agusa, T. (2018) Transboundary Pollution by Heavy Metals in East Asia and Its effect on Cetaceans. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Agusa, T., Murakami, R., Kimura, N., Uchiyama, Y., Omagari, R., Ueda, H., Yoshida, M., Kawasaki, C., Arizono, K., Phay, N., Nakata, H. (2018) Contamination by Arsenic and Other Metals in Groundwater from Myanmar. 5th International Arsenic Symposium in Miyazaki ~ Environmental Impact and Health Hazards ~.

阿草哲郎, 村上理佳子, 木村直登, 大曲遼, 内山幸子, 有蘭幸司, 中田晴彦, Phay Nyunt (2018) ミャンマーにおける地下水微量元素汚染の実態, 第 27 回環境化学討論会.

阿草哲郎 (2018) Chemical pollution and its health effects in residents from developing countries using metallomics approach, 第 20 回 LaMer 特別講演会.

阿草哲郎, 木村直登, 石井絵理, 橋本美穂, 村上理佳子, 内山幸子, 有蘭幸司, 細野高啓, 中田晴彦 (2017) 2016 年熊本地震で地下水の水質はどう変わったか?, 第 4 回国公私 3 大学環境フォーラム.

阿草哲郎, 村上理佳子, 木村直登, 大曲遼, 内山幸子, 中田晴彦, Nyunt Phay (2017) ミャンマーにおける地下水ヒ素汚染の実態, 第 23 回ヒ素シンポジウム.

Takuma, K., Uchiyama, Y., Agusa, T. (2017) Why Does Sweetfish (*Plecoglossus altivelis*) Accumulate Mercury? Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Shimazu, I., Kawahara, M., Uchiyama, Y., Agusa, T. (2017) Assessment of Toxicity of Chronic Arsenic Exposure Using Mice and Its Application to Humans. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Sakamoto, A., Tsugeki, N.K., Kuwae, M., Inoue J., Nakata, H., Uchiyama, Y., Agusa, T. (2017) Transboundary Pollution by Mercury and Identification of Its Pollution Sources in East Asia. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Aikoh, Y., Kimura, N., Murakami, R., Ishii, E., Hashimoto, M., Uchiyama, Y., Hosono, T., Nakata, H., Agusa, T. (2017) Assessment of Ecological Impacts in Shirakawa River Damaged from a Landslide Caused by the Kumamoto Earthquake. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

Agusa, T., Murakami, R., Kimura, N., Uchiyama, Y., Omagari, R., Ueda, H., Yoshida, M., Kawasaki, C., Arizono, K., Phay, N., Nakata, H. (2017) Contamination by Arsenic and Other Trace Elements in Groundwater from Myanmar. 2017 Eastern Asia Conference for Water Environmental Issue.

Agusa, T., Nakata, H., Iwata, H., Tanabe, S. (2017) Arsenic Pollution in Southeast Asia. Japan - Taiwan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

阿草哲郎, 木村直登, 石井絵理, 橋本美穂, 村上理佳子, 内山幸子, 有蘭幸司, 細野高啓, 中田晴彦 (2017) 2016 年熊本地震による地下水質への影響: 微量元素編, 第 26 回環境化学討論会.

Kimura, N., Murakami, R., Ishii, E., Hashimoto, M., Uchiyama, Y., Hosono, T., Nakata, H., Agusa, T. (2016) Trace elements in groundwater after The 2016 Kumamoto Earthquakes. Third Myanmar - Japan International Symposium.

⑳ Murakami, R., Omagari, R., Uchiyama, Y., Nakata, H., Phay, N., Agusa, T. (2016) Water pollution by trace elements in Myanmar. Third Myanmar - Japan International Symposium.

㉑ 阿草哲郎, 江口哲史, 國頭 恭, Tue, N.M., Lan, V.T.M., Minh, T.B., Trang, P.T.K., 高橋 真, Viet, P.H., 田辺信介, 岩田久人 (2016) メタボローム解析を用いたベトナムの地下水ヒ素汚染地域住民の影響評価: 第 2 報, 第 22 回ヒ素シンポジウム.

㉒ 阿草哲郎 (2016) ベトナムの地下水ヒ素汚染とヒトへの曝露, 環境毒性化学とメダカに関する研究会 around 九州.

㉓ Murakami, R., Omagari, R., Uchiyama, Y., Nakata, H., Phay, N., Agusa, T. (2016) Chemical pollution in water environment in Myanmar. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

㉔ Kimura, N., Murakami, R., Ishii, E., Hashimoto, M., Uchiyama, Y., Hosono, T., Nakata, H., Agusa, T. (2016) Urgent survey on groundwater pollution caused by The 2016 Kumamoto Earthquakes. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

㉕ Hayama, S., Uchiyama, Y., Sudaryanto, A., Yoshida, A., Oguchi, M., Terazono, A., Skandaril, Tanabe, A., Agusa, T. (2016) Mercury pollution at small-scale gold mining and e-waste recycling areas in Indonesia. Taiwan-Japan International Symposium on Environmental Science, Technology and Management.

㉖ Agusa, T., Takigami, H., Fujimori, T., Eguchi, A., Bekki, K., Yoshida, A., Terazono, A., Ha, N.N., Asante, K.A., Biney, C.A., Agyekum, W.A., Bello, M., Ramu, K., Ballesteros Jr., F.C., Bulbule, K.A., Parthasaraty, P., Takahashi, S., Subramanian, A., Iwata, H., Tanabe, S. (2016) Contamination by trace elements associated with e-waste recycling processes in developing countries. 2016 1st Eastern Asia Conference for Sustainable Economy (EACSE).

㉗ 阿草哲郎, 江口哲史, Tue, N.M., Lan, V.T.M., Minh, T.B., Trang, P.T.K., 高橋 真, Viet, P.H., 田

辺信介, 岩田久人 (2016) メタボロミクスを用いたヒ素汚染地域住民の影響評価, 第 25 回環境化学討論会.

- ②⑨ Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S. (2016) Arsenic exposure and arsenic methylation capacity in residents of Asian countries. International Symposium on Environment and Resource Recycling Technology 2016 (Invited)
- ③⑩ Agusa, T. (2016) Brief Introduction of Studies on Contamination by Metals in Asian Countries. First Workshop on Indoor Air Pollution and Advanced Air Pollution Control Technologies (invited).

〔図書〕(計 1 件)

Kobayashi, Y., Agusa, T. (2018) Arsenic Metabolism and Toxicity in Humans and Animals: Racial and Species Differences In Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Hiroshi Yamauchi and Guifan Sun (Eds): Arsenic Contamination in Asia, Springer Nature, p.13-28.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0097650/?lang=japanese>