

平成30年6月13日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15382

研究課題名（和文）和食の食材に用いる海産物中有機ヒ素化合物の包括的毒性評価と毒性軽減効果の解明

研究課題名（英文）Evaluation of toxicity of organic arsenic compounds in marine products used for Japanese food and search of toxicity-reducing

研究代表者

高田 礼子（TAKATA, Ayako）

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：30321897

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年、低年齢者への無機ヒ素暴露からの脳機能障害が危惧されている。一方、和食の食材に使用する魚介類には脂質性ヒ素、また、海藻類にもアルセノシュガーや脂質性ヒ素が高濃度に含有し、それらの有機ヒ素化合物の異性体が多種存在する。有機ヒ素化合物は無機ヒ素に比較して生体影響に関する情報は乏しく、特に、妊娠期間や低年齢者への暴露と生体影響の解明は急務であると考えられている。本研究から、当該分野の解明に動物実験では検証する有機ヒ素化合物が多種であることや、大量の試験試料作製が困難である背景などもあり、新たな細胞毒性試験法による脳機能障害を評価する技術の創案が求められることなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In recent years, brain dysfunction due to inorganic arsenic (iAs) exposure to low-age people is concerned. On the other hand, arsenolipids is contained in seafood used for Japanese food, and arsenosugars and arsenolipids are also contained in seaweeds. There are many isomers in these organic arsenic compounds (organic-As). Organic-As have limited informations on biological effects compared to iAs. In particular, it is considered that research to elucidate the biological effects of organic-As exposure on pregnant women and infants is an urgent task. In this study, it can be inferred that there are many types of organic-As and it is difficult to carry out in animal experiments, and furthermore, preparation of a large amount of test samples becomes a problem. From this background, we clarified the basis for which the creation of a technique to evaluate brain dysfunction by a new cytotoxicity test method is required.

研究分野：予防医学

キーワード：ヒ素 有機ヒ素化合物 アルセノシュガー 脂質性ヒ素 和食 安全性 毒性軽減 脳機能障害

1. 研究開始当初の背景

国際社会はヒ素の毒性や発がん性を恐れ労働環境や飲料水の安全管理に努めた。これに対して、海洋生物にヒ素が高濃度に含有している実態を認識していたが、国際社会は海産食品由来のヒ素摂取による健康へのリスクを検証する必要性を長らく軽視してきた。1960年代には海洋生物に含有する高濃度のヒ素は無機ヒ素 (iAs) ではなく、水溶性や脂質性の有機ヒ素化合物 (organic-As) であることを理解し始めた。その後、1977年、Edmondsらは、ロックロブスターから arsenobetaine (AB)、1981年、海藻類から arsenosugars、そして、海藻類と fish oil から arsenolipids などの化学構造を明らかにした。

近年、生活習慣病の予防対策として魚に豊富に含有する 3-脂肪酸の摂取が推奨され、さらに、食物繊維やミネラルなどの必須栄養素として海藻類が注目されている。さらに、欧米社会において、寿司や和食が栄養面から健康食としての人気が増したことから、本来、食材に利用しないもしくは頻度の少ない海藻類の摂取機会の増加傾向が予想される。現在、海産食品由来の有機ヒ素化合物に関する生体影響は、研究の歴史が浅いことから iAs に比較して未知の問題が多く存在する。

2. 研究の目的

人が食する可能性のある海洋生物や海産食品に存在する有機ヒ素化合物の化学形態についての最近の研究結果から、arsenosugars は構造骨格の側鎖が異なる 20 種以上の異性体が確認され、その中で arsenosugars-Gly、arsenosugars-PO₄、arsenosugars-SO₃、arsenosugars-SO₄ など 4 種類が最も多く検出される傾向が明らかになった。我々は、国内産の海苔についてヒ素化合物の化学形態を解析した結果、主なヒ素種は arsenosugars-Gly と arsenosugars-SO₃ であり、一方 arsenosugars-SO₄ と arsenosugars-PO₄ は共通して検出されないことを明らかにしている。

また、Arsenosugars の代謝について、人と動物実験から、代謝物の主体はジメチルアルシン酸 (DMA) で、これに thio-DMA が含まれる。DMA は iAs の代謝物として共通し、そして、IARC の発がん分類でグループ 2B と評価され、iAs より急性毒性は低い傾向がある。しかし、thio-DMA は iAs よりも強い細胞毒性を発現する結果が注目され、マウスへの経口投与実験から DNA 損傷や酸化ストレスの増加、そして、神経行動障害や運動機能の低下などが認められている。

Arsenolipids に関しては、海洋生物から arsenic-containing hydrocarbons (AsHCs)、arsenic-containing fatty acids (AsFAs)、arsenic-containing phospholipids (AsPLs)、arsenic-containing phosphatidylcholines (AsPCs) など 4 群の化学構造が確認されてい

る。注目すべきは小動物での実験から、AsHCs は脳神経毒性を発現する可能性が示唆され、なお、この AsHCs はヒト母乳中からも検出された最新の報告もある。

このような背景から、和食の食材に使用する海産食品に含有する arsenosugars や arsenolipids などの有機ヒ素化合物について、安全な物質であると言及や結論してきた過去の情報を再確認し、安全性に関する科学的な情報を国内外にて共有化することが必要と考えている。

本研究では、有機ヒ素化合物の生体影響をどの様な実験方法にて検証すべきかの基礎的研究及び、当該研究における今後の研究プランなどを探索することを目的とした。実験には代表的な海産食品として海苔の arsenosugars を用い、また、化学試薬の三酸化二ヒ素と DMA などを用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 研究対象のヒ素化合物

陽性対照群として三酸化二ヒ素 (iAs^{III}、NMIJ CRM 3003-a、産総研) の 10 μM を用いた。対象群としてジメチルアルシン酸 (DMA、ナカライ) を 50 - 500 μM にて試験した。さらに、和食の食材として海苔中 arsenosugars の検証のため、市販の海苔 (有明産) から arsenosugars を抽出し、調理温度 (90 - 95 °C) にて濃縮して実験に用いた。海苔から抽出濃縮した arsenosugars は 200 μM (総ヒ素として) に調整して用いた。

(2) 培養細胞

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞 (RCB0007) およびヒト膀胱がん細胞株 T24 細胞 (RCB2536) は、理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室より譲渡されたものを使用した。培養は、DMEM 培地 (08459-35、ナカライ) に 10% 非働化牛胎仔血清 (FBS) を添加した培地を用い、37 °C、5% CO₂ 存在下で行った。

(3) 細胞毒性評価

一般毒性

ヒ素化合物の細胞毒性評価は、細胞の播種 24 時間後にヒ素化合物を添加し、72 時間後に Cell Counting Kit-8 (以下 CCK-8、同仁化学) およびトリパンブルー染色法にて行った。CCK-8 による評価法は、CCK-8 添加し、37 °C、5% CO₂ 存在下で 2 時間反応後の生細胞より生成されたホルマゼンをマイクロプレートリーダー (ARVO X4, PerkinElmer) で吸光度 450 nm を測定した。トリパンブルー染色法では、トリパンブルー処理により細胞を剥がし、トリパンブルー染色後に生細胞数の計測を行った。コントロールを 100% としてヒ素化合物の細胞毒性を評価した。

アポトーシス細胞 (Sub-G1) 解析
ヒ素化合物暴露 72 時間後、細胞を 70% エタ

ノールで固定し、Triton X-100 (ナカライ)、RNase (Sigma Aldrich)、Propidium iodide (以下 PI, Thermo Fisher Scientific) 混合液にて染色を行った。sub-G1 は、FACS Calibur cytometer (BD Bioscience) の CellQuest ソフトウェアを用いて解析を行った。

アポトーシス小体の観察

培地に Hoechst33342 溶液を加えて核染色を行い、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) で観察した。

アポトーシス関連タンパク質の評価

ヒ素化合物暴露 48 時間後、CellLytic M (SIGMA) により全タンパク質を抽出した。NuPAGE ゲル (Thermo Fisher Scientific) にて電気泳動し、その後、ポリフッ化ビニレン膜 (PVDF 膜, Millipore) に転写後、3%スキムミルクでブロッキング反応を行い、Caspase-3 (E-8, Santa Cruz Biotechnology) 抗体、Cleaved Caspase-3 (#9664, Cell Signaling Technology) 抗体およびインターナルコントロールとして GAPDH (6C5, Santa Cruz Biotechnology) 抗体を一次抗体として反応させた。二次抗体には Anti-mouse IgG AP (#7056S, Cell Signaling Technology) 抗体または Anti-rabbit IgG AP sc-2007, Santa Cruz Biotechnology) 抗体を用い、アルカリフォスファターゼ発色剤 SIGMAFAST BCIP/NBT (B5655, SIGMA) により検出した。

4. 研究成果

(1) 一般毒性

HeLa 細胞及び T24 細胞に対して iAs^{III} と DMA、海苔の arsenosugars をそれぞれに添加して、72 時間後に一般毒性を CCK-8 法 (図 1A、図 2A) とトリパンブルー染色法 (図 1B、図 2B) にて観察した。

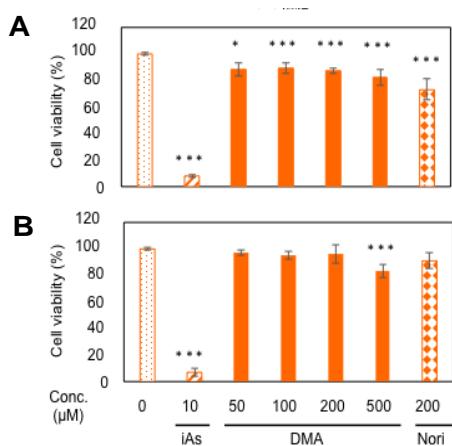


図 1 HeLa 細胞への iAs^{III} と DMA、海苔中 arsenosugars 添加後の一般毒性の比較
A. CCK-8 法; B. トリパンブルー染色法
*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$

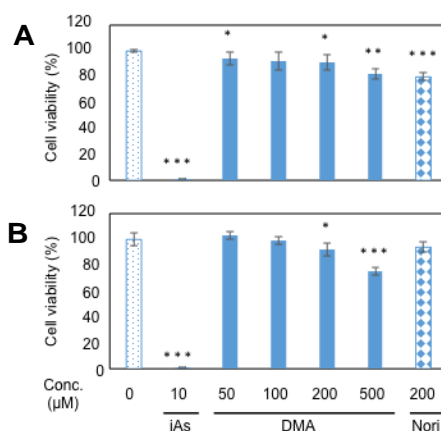


図 2 T24 細胞への iAs^{III} と DMA、海苔中 arsenosugars 添加後の一般毒性の比較
A. CCK-8 法; B. トリパンブルー染色法
*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$

図 1 と 2 に示したように、 iAs^{III} は明確に細胞毒性が共通して認められた。これに対して、arsenosugars の代謝物である DMA は添加濃度に依存的に毒性を認めるも、 iAs^{III} に比較して弱いことが明らかになった。

一方、海苔の arsenosugars は DMA と同レベルの毒性であることが両細胞の実験にて認められた。

なお、HeLa 細胞と T24 細胞におけるヒ素化合物の毒性評価に関する感受性については、T24 細胞が HeLa 細胞に比較してやや鋭敏である傾向が認められた。

(2) アポトーシス細胞 (Sub-G1) 解析とアポトーシス小体の観察

HeLa 細胞及び T24 細胞に対して iAs^{III} と DMA、海苔の arsenosugars をそれぞれに添加して、72 時間後に Sub-G1 期の細胞割合を測定した。

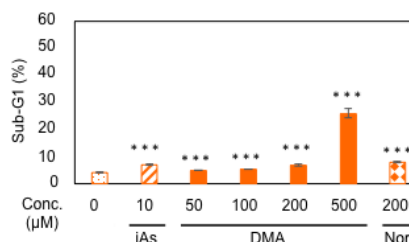


図 3 HeLa 細胞への iAs^{III} と DMA、海苔中 arsenosugars 添加後の Sub-G1 の比較
***, $p < 0.001$

HeLa 細胞への iAs^{III} と DMA、海苔中 arsenosugars 添加後の Sub-G1 期の細胞割合は、対照群に比較して共通して統計学的に有意な増加傾向であったが、しかし、500 μM DMA 群を除いて僅かな変化であった (図 3)。

これに対して、T24 細胞を用いた実験では (図 4) Sub-G1 期の細胞割合は、DMA が濃度依存的に増加傾向を認めた。しかし、海苔中 arsenosugars に有意な変化は認められなかった。

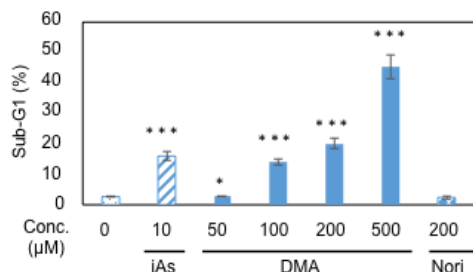


図 4 T24 細胞への iAs^{III} と DMA、海苔中 arsenosugars 添加後の Sub-G1 の比較
*, p < 0.05; ***, p < 0.001。

関連して、HeLa 細胞及び T24 細胞に 3 種類のヒ素を添加してアポトーシス小体の動態を観察した。アポトーシス小体は HeLa 細胞及び T24 細胞において共通に発現し (矢印の周辺) とくに、500 μM DMA では顕著な発現を認めた (図 5、6)。

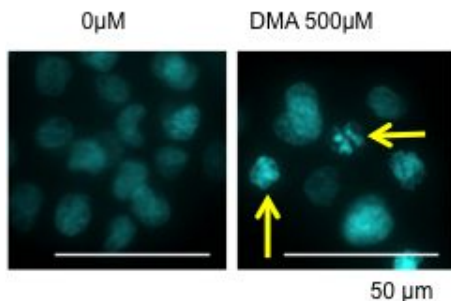


図 5 HeLa 細胞への DMA 添加後のアポトーシス小体の発現
矢印：アポトーシス小体

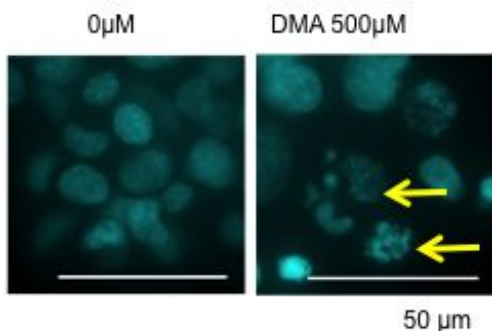


図 6 T24 細胞への DMA 添加後のアポトーシス小体の発現
矢印：アポトーシス小体

(3) アポトーシス関連タンパク質の評価

HeLa 細胞 (図 7) 及び T24 細胞 (図 8) に対して iAs^{III} と DMA、海苔の arsenosugars をそれぞれに添加して、48 時間後に Caspase-3、Cleaved Caspase-3、GAPDH を測定した。Cleaved Caspase-3 の結果から、陽性対照群の iAs^{III} は明確に発現を認め、DMA は濃度依存的に発現を認めた。海苔の arsenosugars は、iAs^{III} や 200 μM DMA に比較すると作用は弱いですが、しかし、無毒のヒ素化合物ではないことが示唆された。

なお、Cleaved Caspase-3 を指標にした場合、検査の感度は T24 細胞が HeLa 細胞に比較して鋭敏であることも明らかになった。

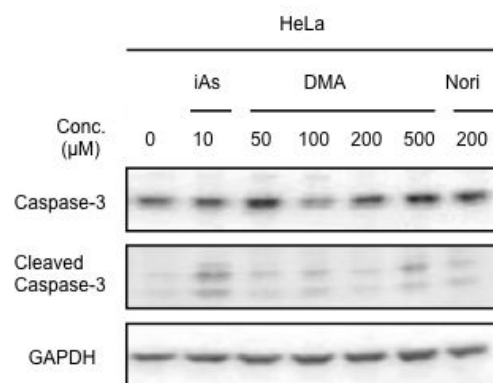


図 7 HeLa 細胞への iAs^{III} と DMA、海苔中 arsenosugars 添加後のアポトーシス関連タンパク質の動態

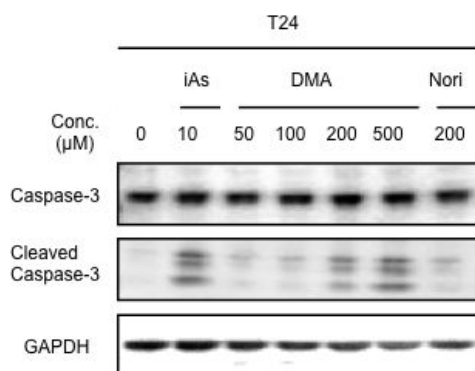


図 8 T24 細胞への iAs^{III} と DMA、海苔中 arsenosugars 添加後のアポトーシス関連タンパク質の動態

(4) まとめ

本研究の目的の一つに、人が食事から摂取するポピュラーな和食食材である海苔に含有する arsenosugars の毒性を評価した。その毒性は、現在知られているヒ素化合物のうち最も急性毒性が強かつ発がん性物質で

もある iAs^{III} と比較した。Arsenosugars の相対的な毒性は、いくつかの検査において共通して iAs^{III} に比較すると弱い傾向にあるが、無毒であると明確に示唆する結果は得られなかった。

今日、魚や海藻類は国際的に栄養学的な視点から継続的な摂取が推奨されている。しかし、魚や海藻類には arsenosugars や arsenolipids などの有機ヒ素化合物が高濃度に含有していることから、これらの有機ヒ素化合物の摂取に対する生体影響に強い関心が持たれている。当該問題の対象者は魚や海藻類を摂取する全ての成人や子供などである特徴があり、従来の iAs やメチルヒ素化合物とは異なる地球規模の暴露集団における問題と言える。

一方、従来のヒ素化合物暴露からの生体影響の研究は、急性・慢性ヒ素中毒、そして、発がん性の解明であった。しかしながら、有機ヒ素化合物の生体影響については、発がん性の検証は重要であるが、それ以上に、有機ヒ素化合物自体及びその代謝物による標的臓器・組織の特定や、障害の発症機序の解明が必要になる。研究の優先順位として、妊婦や乳幼児が有機ヒ素化合物を摂取した場合、特に、脳機能に対する影響を検証すべきと考える。

しかしながら、当該問題の解明に関する研究技術の難しさの一つに、有機ヒ素化合物が相当数の異性体を持っている実体が徐々に解明されており、多種類の研究対象物を作製準備する作業が難しい点が挙げられる。さらに、多くの動物に投与する試料量の確保は難しく、これらの問題点を考慮すると、動物実験での検証は極めて困難で非現実的であると考える。

このような背景から、今後、有機ヒ素化合物暴露からの生体影響の解明は、従来、確立していない人に外挿可能な新たな細胞による毒性試験法の開発・構築が望まれる。

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)

高田礼子、山内博．ヒ素の無毒化・アスベストの無害化及び恒久的隔離保存による健康影響の予防に向けての取り組み．産業医学ジャーナル、2017；40：52-58．(査読無)

〔学会発表〕(計1件)

人見敏明、曹洋、高田礼子、山内博．海産物中有機ヒ素化合物に対する基礎的毒性評価の検討 第87回日本衛生学会学術総会、2017年3月27日、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県宮崎市)．

〔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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 礼子 (TAKATA, Ayako)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：30321897

(2) 研究分担者

人見 敏明 (HITOMI, Toshiaki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90405275

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山内 博 (YAMAUCHI, Hiroshi)
聖マリアンナ医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：90081661

曹 洋 (CAO, Yang)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：70793751