

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15859

研究課題名(和文)海産物中有機ヒ素化合物の毒性に対する調理形態や代謝の影響および毒性軽減の探索

研究課題名(英文)Evaluation of effects of cooking form and metabolism on toxicity of organic arsenic compounds in marine products and toxicity reduction

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、海藻類や魚介類に含有する有機ヒ素化合物の生体影響が懸念され、また食事の仕方を加味した生体影響の解明は不十分である。本研究では、国内産の昆布や海苔を研究対象として、ヒ素の化学形態や毒性を解明し、さらに調理や胃腸での消化など物理・化学的作用も検討した。昆布や海苔のアルセノシユガーは、調理温度及び胃内消化酵素などからの影響は認められず、どの実験条件でも無機ヒ素への変換がなく、毒性の増加は確認されなかった。国際社会にて問題となっている、妊婦(胎児)や乳幼児において食事からのヒ素摂取と脳機能障害に関する懸念に対して、本研究の成果は当該問題に対して社会的意義を持つと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、海産物中有機ヒ素化合物の毒性評価と調理形態による安全性に係わる学術的情報が得られた。これらの研究成果は、国際食となった「和食」の安全性や海産物を多食することによる相対的な体内ヒ素摂取の増加において、予防医療の視点から重要な情報を提供したと判断する。これらの研究成果は生活習慣病の予防に対して海産物摂取が増加している国際社会への貢献にも寄与し、社会的意義を持つ研究であった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the presence of organic arsenic compounds such as arsenolipids and arsenosugars in seaweeds and seafood has been clarified, but the biological effects of dietary intake are not fully understood. In this study, we carried out cytotoxicity tests on organic arsenic compounds in marine products and attempted to elucidate chemical changes and toxicity changes during the cooking process and gastrointestinal digestion. Regarding arsenosugars, the characteristics of arsenic species in Kombu and Nori were clarified, and it was clarified that there was no increase in toxicity caused by cooking or physical or chemical treatment in the stomach. Regarding the concerns about arsenic intake from the diet and brain dysfunction in pregnant women (fetuses) and infants which are international issues, we consider that the results of this study have social significance to the problems.

研究分野：社会医学

キーワード：ヒ素 有機ヒ素化合物 アルセノシユガー 和食 安全性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

職業性、環境汚染、食品汚染などによるヒ素暴露からの健康障害(急性・慢性ヒ素中毒、発がん性)は無機ヒ素が原因であった。しかし、近年の研究から、海洋生物に有機ヒ素が高濃度に含まれている実態が明らかになり、一方、海産食品由来の有機ヒ素化合物の摂取による健康リスクに関する研究は不十分の状況にある。

現代社会において、生活習慣病の予防対策の一つとして魚から ω -3脂肪酸(DHA, EPA)の摂取はFAO/WHOにより推奨されている。また、食物繊維やミネラルなどの必須栄養素が含まれる海藻類を食材とするヘルシーな食事として日本食が国際的に普及している。これらのことから、本来食材の利用の少ない海藻類を摂取する機会の増加傾向がある。このような現状において、有機ヒ素化合物の摂取は果たして安全であるかについて、未知な毒性と生体影響に関する研究が求められている。

2. 研究の目的

水溶性有機ヒ素化合物である arsenosugars は 1981 年、褐藻(*Ecklonia radiata*)の水溶性成分から初めて確認された。その後、構造骨格の側鎖が異なる 20 種以上の arsenosugars が確認され、その中で arsenosugar-Gly, arsenosugar-PO₄, arsenosugar-SO₃, arsenosugar-SO₄ など 4 種類が最も多く検出される傾向も明らかになった。海藻類における arsenosugars の起源は、海藻類が海水中の無機ヒ素(iAs)を直接吸収し生合成するとの推測がある。一方、脂溶性有機ヒ素化合物 arsenolipids はこれまで海洋生物から arsenic-containing hydrocarbons (AsHCs)、arsenic-containing fatty acids (AsFAs)、arsenic-containing phospholipids (AsPLs)、arsenic-containing phosphatidylcholines (AsPCs)など 4 グループの化学構造が解明されていた。このように、食材の海藻類や魚介類には arsenosugars や arsenolipids など有機ヒ素化合物の存在が明らかになった。

これまでの代謝実験では、ヒトにて確認されている arsenosugars の代謝物はジメチルアルシン酸(DMA)を主体に 6 種類、そして、その中で thio-DMA の存在が証明されている。この thio-DMA は iAs (III) よりも強い細胞毒性を発現する結果が目ざされている。さらに、最近、ドイツ、オーストリアなどの研究チームは動物実験の結果から、有機ヒ素化合物は血液脳関門の構造や機能、そして脳中枢神経に影響する可能性を指摘した。和食の国際的な普及や、栄養学的な視点から魚や海藻類の摂取が推奨されているが、海産物中のヒ素の毒性リスクを理解する必要がある。

食材中の有機ヒ素化合物について、調理過程及び胃腸での消化における化学・物理的变化や毒性に関する情報は国際的に少ない。本研究では、海産物中の有機ヒ素化合物及びその代謝物を含めた細胞毒性試験を実施し、さらに調理形態や胃腸での消化酵素などの作用からの毒性変化について検証した。

3. 研究の方法

(1) 研究対象とヒ素分析

和食の食材として国内で生産された 3 地域(利尻、羅臼、日高)の昆布、及び 2 地域(木更津、有明)を用いた。昆布は 50g、海苔は 10g を秤量して、それぞれ超純水 1L を加え arsenosugars を室温で 8 時間かけ抽出した。

arsenosugars の測定は anion-exchange column (PRP-X100, Hamilton)を装着した HPLC-ICP-MS (ELAN DRC-e, PerkinElmer 社製)にて行った arsenosugars (arsenosugar-Gly, -PO₄, -SO₃, -SO₄)の標準物質は Dr.Francesconi による提供品を用いた。

(2) 細胞毒性評価

研究対象

三酸化二ヒ素(iAs(III)、NMLJ CRM3003-a、産総研)10 μ M、ジメチルアルシン酸(DMA(V)、ナカライ)50-500 μ M を対照群として用いた。arsenosugars は市販の有明産海苔から抽出し、濃縮して実験に用いた。

培養細胞

ヒト膀胱がん細胞株 T24 細胞(RCB2536)は理化学研究所から譲渡されたものを使用した。DMEM 培地(08459-35、ナカライ)に 10%FBS を添加した培地を用いて 37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。

ウエスタンブロッティング法による評価

3 種類のヒ素化合物に 48 時間暴露した T24 細胞を CelLytic M (Sigma-Aldrich)により全タンパク質を抽出した。NuPAGE gel (Thermo Fisher Scientific)にて電気泳動し、その後ポリフッ化ビリニデン膜(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 抗体(E-8, Santa Cruz Biotechnology)、Cleaved Caspase-3 抗体(9664, Cell Signaling Technology)およびインターナルコントロール GAPDH 抗体(6C5, Santa Cruz Biotechnology)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)または Anti-rabbit IgG AP (sc-2007, Santa Cruz Biotechnology)を用い

て、アルカリフォスファターゼ発色剤 SIGMAFAST BCIP/NBT により検出した。

(3) 加熱調理と消化酵素分解による処理条件

塩化ナトリウム 2.0g と塩酸 7.0mL を混合し、超純水で容量を 1L に調整して、人工胃液を調製した。消化酵素液は、調製した人工胃液 100mL にブタ由来のペプシン 2g を添加して調製した。羅臼産昆布を用いて 50g を秤量して、超純水 1L を加え arsenosugars を室温で 8 時間かけて抽出し被検試料を作成した。被検試料を 3 分割し、10mL ファルコン試験管に入れ、煮沸処理は恒温槽にて 100°C、人工胃液や消化酵素（ペプシン）を添加した試料は 37°C の恒温槽内にて、それぞれ 1 時間の処理を行った。arsenosugars の測定は（1）と同様な方法で実施した。

4. 研究成果

(1) 市販の昆布と海苔から検出した arsenosugars のヒ素種について

日本国内で生産されている昆布と海苔について、arsenosugars のヒ素種を比較検討した結果を図 1 に示した(引用文献)。昆布中の arsenosugars のヒ素種に有意な地域差はなく、主なヒ素種が arsenosugar-Gly、これに arsenosugar-PO₄ と -SO₃ も検出、しかし、arsenosugar-SO₄ は共通して不検出であった。同様の試験を海苔について実施した結果、検出した主なヒ素種は arsenosugar-Gly と -SO₃ であり、arsenosugar-SO₄ と -PO₄ は共通して不検出であった。

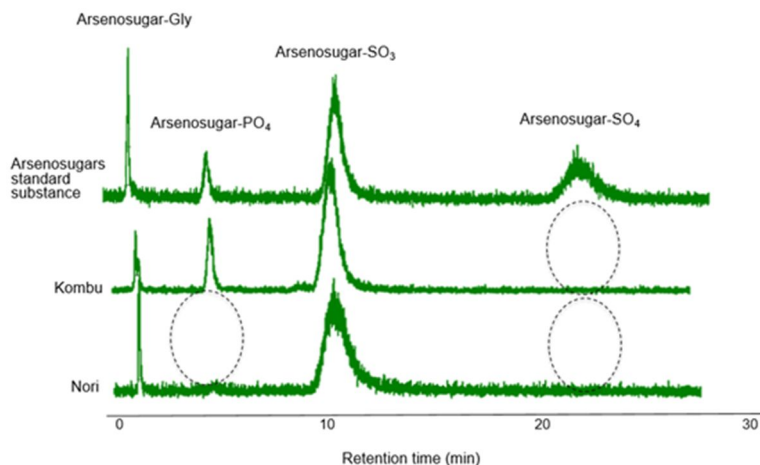


図 1 市販の昆布と海苔から検出した arsenosugars のヒ素種の特徴(引用文献)

(2) アポトーシス関連タンパク質の評価

T24 細胞に対して iAs(III)、DMA、そして海苔から抽出した arsenosugars をそれぞれ添加し、暴露 48 時間後の Caspase-3、Cleaved Caspase-3、GAPDH についてウエスタンブロット法にて評価した。Cleaved Caspase-3 の結果から、iAs(III)は明確な発現が認められ、DMA は濃度依存的に発現が認められた。それに対して海苔由来の arsenosugars は対照群の iAs(III)に比べ明確に毒性が低い結果を示し、さらに最終代謝物である DMA の毒性に類似する結果であり、すなわち、海苔の arsenosugars は懸念する毒性が弱いことが明らかになった。

(3) arsenosugars に対する加熱調理と消化酵素分解による評価

市販の昆布から水抽出による arsenosugars を研究材料に作製し、加熱調理と消化酵素分解による変化を検討した。昆布を超純水に室温で 8 時間浸し、arsenosugars を抽出後、沸騰水（100°C）、人工胃液（pH1.2）、消化酵素（ペプシン）にてそれぞれ 1 時間処理した。その結果、3 条件において arsenosugars は、iAs や DMA への分解がなく、調理や胃内での物理的や化学的な作用に対して影響されにくいことが確認された(図 2、引用文献)。arsenosugars の iAs への分解が生じない結果は、海藻類に対する安全性の一つの情報になると考える。

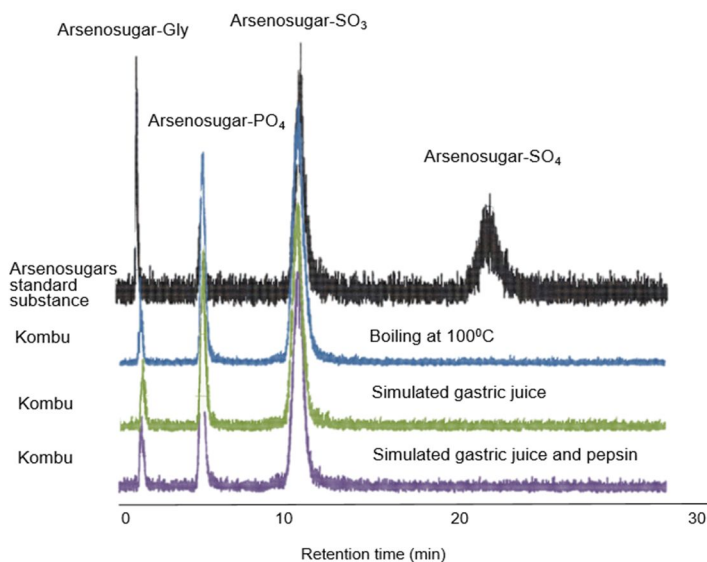


図 2 昆布中の arsenosugars に対する沸騰水（100°C）、人工胃液（pH1.2）、消化酵素（ペプシン）による処理後の変化(引用文献)

(4) まとめ

本研究では、昆布や海苔に含有している arsenosugars に対して細胞毒性試験を実施し、さらに、調理過程及び胃腸での消化など

を想定した物理・化学的作用が原因する毒性変化について解明を試みた。食材に使用される昆布や海苔に含有する arsenosugars 濃度は数十 ppm であり、これまで毒性や生体影響が懸念されていた。しかし、本研究から、iAs より遙かに毒性は低く、また、ヒト体内での iAs の最終代謝産物である DMA の毒性に類似することも明らかになった。一方、海藻食材中の arsenosugars に対する加熱処理や胃酸での分解などで、急性や慢性ヒ素中毒の原因である iAs が生成されるのではないかと、これまで懸念と議論が存在した。これらの問題に対して、本研究から明確な科学的検証が実施され、安全性は担保されることなどを明らかにした。和食食材である海藻類を食する機会は国際的に広く普及する現在、本研究の役割は社会的な意義を持つものと考えられる。

<引用文献>

Cao Y, Takata A, Hitomi T, Yamauchi H. Metabolism and Toxicity of Organic Arsenic Compounds in Marine Organisms. In: Yamauchi H, Sun G (eds), Arsenic Contamination in Asia. Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine. Springer, Singapore, 2019: 119-136.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yang Cao, Ayako Takata, Toshiaki Hitomi and Hiroshi Yamauchi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 18
3. 書名 Arsenic contamination in Asia: Metabolism and toxicity of organic arsenic compounds in marine organisms	

1. 著者名 Hiroshi Yamauchi, Ayako Takata, Yang Cao and Koichiro Nakamura	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 13
3. 書名 Arsenic contamination in Asia: The development and purposes of arsenic detoxification technology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----