

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390173

研究課題名（和文） ヒ素の化学形態別摂取による発癌リスク評価
—新規発癌機序を含めた学際的アプローチ—研究課題名（英文） Cancer risk assessment for ingested arsenic species:
Interdisciplinary approach to new mechanism of carcinogenesis

研究代表者

圓藤 吟史 (ENDO GINJI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20160393

研究成果の概要（和文）：アルシンはヒトで速やかに亜ヒ酸に、次いでモノメチルアルソン酸（MMA）、ジメチルアルシン酸に代謝された。無機ヒ素曝露のバイオマーカーとして無機ヒ素+MMAが有効であった。HPLC-MS/MS と HPLC-ICP-MS 解析は海藻のアルセノ糖を含むヒ素化合物を正確に測定することができた。ジメチルアルシン酸の還元体は紡錘体形成と細胞質分裂を阻害し、多核細胞の形成を誘導した。ジメチルアルシンは酵素で容易に形成された。腸内細菌叢により代謝生成するジメチルモノチオアルシン酸は、ラット膀胱発がんにおける原因物質であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Arsine is quickly metabolized to arsenite and then to dimethylarsinic acid (DMA) via monomethylarsonic acid (MMA) in humans. The best biomarker of inorganic arsenic (iAs) exposure is urinary iAs + MMA concentration. We developed an analytical method that used HPLC-ICP-MS together with HPLC-MS/MS, which could measure precisely an arsenic compound including the arsenosugar of seaweed. A carcinogenic action of DMA may be due to the arsine radicals produced through $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, which is enzymatically reduced from $(\text{CH}_3)_2\text{As-SG}$. Dimethylarsinous acid inhibits not only formation of the normal mitotic spindle but cytokinesis and induces the formation of multinuclear cells. Dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA) is produced from DMA by intestinal bacteria flora and DMMTA is an ultimate carcinogen in DMA-induced rat bladder carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 5,700,000 | 1,710,000 | 7,410,000 |
| 2009年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 2010年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,900,000 | 4,170,000 | 18,070,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境中毒・ヒ素・環境汚染・食品安全・発癌・リスク・細胞周期・ジメチルアルシン酸

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒ素の化学形態別の毒性研究が進み、究極発癌の化学形態とその発癌機序が次第に明らかになってきた。

しかしながら、アルシン中毒、無機ヒ素 (iAs) 曝露、食品からのアルセノ糖 (AsSugs) の摂取など、ヒトは様々なヒ素化合物の曝露を受けており、それぞれ発がんリスクが異なると思われる。そこで学際的アプローチとして、疫学研究、症例研究、食品分析、*in vivo*, *in vitro* での新規発癌機序に関する研究を行い、それらを総合してリスク評価を行うことが求められる。

2. 研究の目的

(1) アルシンは半導体産業で広く用いられ、その毒性は溶血性が強いことは知られている。しかし、生体内での挙動は明らかにされていない。そこでアルシン中毒の症例から、曝露と代謝、生体内での作用の関係を明らかにする。

(2) 有機ヒ素化合物曝露のないバングラデシュのヒ素汚染地区住民の尿中ヒ素の測定から、iAs とモノメチルアルソン酸 (MMA) の合計が無機ヒ素曝露のバイオマーカーとして用いることができることを明らかにする。

(3) 陰イオン交換カラムを用いて迅速かつ効果的なヒト尿中ヒ素形態別 HPLC-ICP-MS 分析法を開発し、日本人無機ヒ素非曝露者の尿中ヒ素濃度標準値を検討する。

(4) 食用褐藻 (ヒジキ、学名 *Hijikia fusiforme*) は iAs の含有量が高いだけでなく、様々な AsSugs を含んでいる。AsSugs は哺乳類でジメチルアルシン酸 (DMA) に代謝される。DMA はげっ歯類で発癌性が証明されているが、海藻摂取のリスク評価を正確に行うためには、iAs と同様 AsSugs を評価する必要がある。

ある。

(5) ジメチルアルシン酸の還元体 3 価ジメチルヒ素 (DMAIII) の遺伝毒性を明らかにする。

(6) DMA の発がん性におけるジメチルアルシン生成の可能性とその役割について明らかにする。

(7) ジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA) は発がん性と、強い細胞毒性が示されている。DMMTA の産生経路の解明と、膀胱上皮細胞に与える影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) ガリウムヒ素を原料とするリサイクル工場で発生したアルシン中毒症例について、血清および尿中のヒ素の形態別分析を HPLC-ICP-MS を用いて行った。

(2) バングラデシュのヒ素汚染地域に 5 年以上住む 165 組の夫婦の尿と飲料水を採取し、HPLC-ICP-MS で分析した。

(3) 男性ヒ素非曝露者 172 名 (平均年齢 46.5 ± 13.6 歳) を対象に、陰イオンカラム (Dionex IonPac AS22) を用いて HPLC-ICP-MS 分析を行い、陽イオンカラムを用いた方法と比較した。

(4) 市販の乾燥したヒジキ 7 製品と生ヒジキ 2 製品を分析した。総ヒ素は酸で分解した後、ダイナミック反応セル (DRC) モードで ICP-MS により測定した。水抽出後、HPLC-MS/MS での正イオンモード多反応モニタリングを行い、ヒ素スペシエーション分析は HPLC-ICP-MS により行った。

(5) V79 細胞用いて DMAIII の 4 倍体形成能、多核の形成能、有糸分裂の停止、分裂指数を観察した。また、分裂細胞のローダミン-ファロイジン染色で異常アクチンを観察した。

(6) DMA からジメチルアルシンの生体内生成機構を推定するとともに、マウスにジメチ

ルアルシンを投与し肺腫瘍形成の分析を行った。

(7)10週齢雄性SDラットにDMAを強制経口投与し、胆汁中のヒ素濃度をHPLC-ICP-MSで形態別に測定した。6週齢F344ラットにネオマイシン2mg/ml飲水、3日間投与あり群、なし群にDMA(100ppmAs飲水)を投与し形態別に測定した。抗生物質+DMA群、抗生物質群、DMA群に分け、尿中ヒ素濃度とBrdUを指標に細胞増殖を検討した。

4. 研究成果

(1)患者は20代男性。仕事を終えた3時間後に血尿に気づき、体調が悪化したため34時間後に来院し、緊急入院した。入院時、貧血、血尿、腎、肝機能障害が認められた。輸液と4単位の赤血球輸血を行い、臨床症状は、5日後に、飛躍的に改善した。血清中の総ヒ素量は入院時が244.8 μ g/L、退院時が97.1 μ g/Lであった。形態別分析では、血清および尿中にアルシン代謝に由来する4種類ヒ素化合物が検出された。入院時、血清中の亜ヒ酸(AsIII)、ヒ酸(AsV)、MMAおよびDMAの濃度は、それぞれ45.8、5.2、17.9、9.3 μ g/Lであった。AsIII、AsV、MMA濃度は減少し、それらの生物学的半減期(BHL)はそれぞれ30.1、43.0、96.3時間であった。一方、DMA濃度は増加した。退院時、尿中のAsIII、AsV、MMA、DMAの濃度は、それぞれ384.5、20.8、547.4、1816.3 μ g/gクレアチニンであった。これらの尿中濃度は、その後低下し、BHLは15日であった。

(2)飲料水のiAsは中央値が55 μ gAs/L、範囲が<0.5–332 μ gAs/Lであった。形態別分析で尿中のAsIII、AsV、MMA、DMAの中央値と範囲はそれぞれ16.8(7.7–32.3)、1.8(<0.5–3.3)、13.7(5.6–25.0)、88.6(47.9–153.4) μ gAs/Lであった。アルセノベタイン

(AsBe)、アルセノコリンは検出されなかった。4つのヒ素化合物は互いに直線的な関係が見られた。尿中の総ヒ素量は飲料水濃度と相関があった。無機ヒ素曝露のバイオマーカーとして尿中のiAs+MMAを用いることが可能であると考えられた。

(3)陰イオンカラムを用いた方法では、10分以内でAsBe、DMA、AsIII、MMA、AsVの形態別分析が可能であった。172名の尿中AsV、AsIII、MMA、iAsとMMAの合計の95%タイルは1.7、5.4、6.2、12.6 μ gAs/Lであった。無機ヒ素曝露の生物学的モニタリングとしてのiAs+MMAについて、95%上限値として12.6 μ gAs/Lを提案した。

(4)酸分解によって得られた9試料の総ヒ素量(A-TAs)は37.1–118.6 μ gAs/g乾燥重量(DW)の範囲で、水抽出された総ヒ素量(W-TAs)は18.4–81.0 μ gAs/gDWの範囲であった。水抽出された無機ヒ素(W-iAs)のA-TAsに対する割合は24.5–60.1%の範囲であった。主成分はAsVで、すべての試料から8.9–70.5 μ gAs/gDWの範囲で検出された。分子量408の硫酸エステル型ジメチルアルセノ糖(AsSug 408)はAsSugsの中で最も高いピークが検出された。水抽出AsSugs(W-AsS)のA-TAsに対する割合は3.7–27.6%と推定された。ヒジキ製品中A-TAs、W-iAsとW-AsS量は様々である。HPLC-MS/MSはHPLC-ICP-MSよりも敏感にAsSugsを検出した。無機ヒ素はHPLC-MS/MSでは検出できない可能性があるため、HPLC-MS/MSとHPLC-ICP-MSのコンビネーション解析は海藻製品のヒ素化合物を正確に測定し、AsSugsの毒性を評価するために必要である。

(5)DMAIIIは1.25 μ Mの濃度で4倍体と多核の形成を強く誘導した。有糸分裂の停止のため分裂指数は2.5 μ MのDMAIIIで最も強

く観察された。また、異常アクチンが DMAIII 処理した分裂細胞のローダミン-ファロイジン染色で観察された。これらのことから DMAIII は正常の紡錘体形成を阻害するだけでなく、細胞質分裂を阻害し、多核細胞の形成を誘導することが示唆された。

(6) ジメチルアルシンは DMA-GSH から酵素で容易に形成された。マウス肺で腫瘍形成に働き、DNA 付加物を形成する機能を持っていることが明らかにされた。

(7)胆汁からDMAおよびDMMTAが検出された。抗生物質前投与群で、DMMTAの尿中濃度の減少がみられた。抗生物質+DMA群でDMMTAの尿中濃度の減少がみられ、膀胱上皮細胞の増殖が低下した。DMMTAは、DMA誘発ラット膀胱発がんにおける原因物質であると考えられた。

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 4 件)

- (1) Yoshimura Y, Endo Y, Shimoda Y, Yamanaka K, Endo G. Acute arsine poisoning confirmed by speciation analysis of arsenic compounds in the plasma and urine by HPLC-ICP-MS. J Occup Health. 2011;53(1):45-9. 査読有
- (2) Shimoda Y, Suzuki Y, Endo Y, Kato K, Tachikawa M, Endo G, Yamanaka K. Speciation analysis of arsenics in commercial Hijiki by high performance liquid chromatography-tandem-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. J Health Science. 2010; 56:47-56 査読有
- (3) Suzuki Y, Shimoda Y, Endo Y, Hata A, Yamanaka K, Endo G. Rapid and effective speciation analysis of arsenic

compounds in human urine using anion-exchange columns in HPLC-ICP-MS. J Occup Health. 2009;51(4):380-5. 査読有

- (4) Kitamura M, Kuroda K, Endo G. Dimethylarsinous acid disturbs cytokinesis. Bull Environ Contam Toxicol. 2009 ;83(1):15-8. 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- (1) 圓藤吟史, 畑明寿, 圓藤陽子, 山中健三, 藤谷登. 海産物の化学形態別ヒ素分析における抽出法の検討. 第 81 回日本衛生学会 2011 年 3 月 25-28 日, 東京都・昭和大学
- (2) 圓藤吟史. 国内外の食品中重金属の耐容摂取量-ヒ素. 第 81 回日本衛生学会 2011 年 3 月 25-28 日, 東京都・昭和大学
- (3) 下田康代, 山中健三, 加藤孝一, 立川真理子, 圓藤陽子, 圓藤吟史. 含硫メチル化ヒ素の酵素的生成とその動態に関する in vitro 実験での検討, 第 16 回ヒ素シンポジウム, 2011 年 2 月 5-6 日, 旭川市・サンアザレア
- (4) 畑明寿, 圓藤陽子, 山中健三, 藤谷登, 圓藤吟史. 海産物の化学形態別ヒ素分析—抽出法の検討, 第 16 回ヒ素シンポジウム, 2011 年 2 月 5-6 日, 旭川市・サンアザレア
- (5) 金川明裕, 魏民, 吉田香, 圓藤吟史, 鰐淵英機. ヒ素膀胱発がんの原因物質の検索: 新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討, 第 16 回ヒ素シンポジウム, 2011 年 2 月 5-6 日, 旭川市・サンアザレア
- (6) 金川明裕, 魏民, 田尻正喜, 吉田香, 圓藤吟史, 鰐淵英機. DMAV 誘発ラット膀胱発癌における DMMTAV の役割 代謝経路の解明及び、膀胱上皮細胞に与える影響の検討. 第 27 回日本毒性病理学会. 2011 年 1 月 27-28 日. 大阪市・大阪国際交流センター

- (7) 圓藤吟史. ヒ素の発がんリスク評価、第 21 回日本微量元素学会、2010 年 7 月 3-4 日、京都市・京都大学百周年時計台記念館
- (8) 畑明寿, 圓藤陽子, Habib M.A, 山中健三, 藤谷登, 圓藤吟史. バングラデシュ人民共和国・ヒ素汚染地区住民の尿中形態別ヒ素濃度について、第 80 回日本衛生学会総会、2010 年 5 月 9-11 日、仙台市・国際センター
- (9) 下田康代, 加藤孝一, 立川真理子, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三. ジメチルチオヒ素化合物の代謝生成機構. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 28-30 日, 岡山市・岡山コンベンションセンター
- (10) 菅直人, 金川明裕, 山田貴宣, 吉田香, 圓藤吟史, 魏民, 鰐淵英機. 膀胱尿路上皮における dimethylmonothioarsinic acid の影響. 第 26 回日本毒性病理学会. 2010 年 2 月 2-4 日. 金沢市・金沢県立音楽堂.
- (11) 金川明裕, 菅直人, 吉田香, 圓藤吟史, 森聖, 魏民, 鰐淵英機. ジメチルアルシン酸の代謝経路の解明. 第 26 回日本毒性病理学会. 2010 年 2 月 2-4 日. 金沢市・金沢県立音楽堂.
- (12) 下田康代, 山中健三, 加藤孝一, 圓藤陽子, 圓藤吟史. 発癌に関与するジメチルヒ素の赤血球内動態、第 15 回ヒ素シンポジウム、2009 年 11 月 29 日、大阪市・大阪市立大学
- (13) 鈴木芳宏, 下田康代, 圓藤陽子, 畑明寿, 山中健三, 圓藤吟史. 陰イオン交換カラムを用いた迅速かつ効果的なヒト尿中ヒ素形態別 HPLC-ICP-MS 分析法の開発と日本人無機ヒ素非曝露者の尿中ヒ素濃度基準値の検討、第 57 回日本職業・災害医学会学術大会、2009 年 11 月 21 日、高槻市・高槻現代劇場
- (14) 圓藤吟史. 食品摂取によるヒ素の健康被害を防ぐために、第 31 回日本臨床栄養学会・第 30 回日本臨床栄養協会総会、2009 年 9 月 19 日、神戸市・神戸国際会議場
- (15) Shimoda Y, Suzuki Y, Endo Y, Kato K, Tachikawa M, Ogawa M, Endo G, Yamanaka K. Speciation analysis of arsenics in commercial edible brown alga (Hijiki: *Hijikia fusiforme*) by an HPLC-MS/MS and an HPLC-ICP-MS, International Society for Environmental Epidemiology 21st annual Conference. 2009 年 8 月 28 日、Dublin, Ireland
- (16) Suzuki Y, Shimoda Y, Endo Y, Hata A, Yamanaka K, Endo G. Speciation analysis of arsenic compounds in healthy human urine by HPLC-ICP-MS for the evaluation of occupational inorganic arsenic exposure, International Society for Environmental Epidemiology 21st annual Conference, 2009 年 8 月 28 日、Dublin, Ireland
- (17) 下田康代, 山中健三, 加藤孝一, 圓藤陽子, 圓藤吟史. 生体内生成するジメチルアルシン輸送体分子としての赤血球の役割、第 20 回日本微量元素学会、2009 年 7 月 3 日、東京都新宿区・京王プラザホテル
- (18) 鈴木芳宏, 圓藤陽子, 小川真規, 圓藤吟史. ヒト尿中ヒ素の形態別分析から求めた生物学的ヒ素曝露評価値の提案(または妥当性)、第 82 回日本産業衛生学会、2009 年 5 月 21 日、福岡市・福岡国際会議場
- (19) 圓藤吟史. 有害大気汚染物質の環境リスク評価の実際 ヒ素及びヒ素化合物に係る健康リスク評価について、第 79 回日本衛生学会学術総会、2009 年 4 月 1 日、東京都港区・北里大学白金キャンパス
- (20) 畑明寿, 圓藤陽子, MA ハビブ, 鈴木芳宏, 小川真規, 山中健三, 藤谷登, 圓藤吟史. 尿中(iAs+MMA)値を用いた職業性無機ヒ素曝露バイオモニタリングの検討. 第 14 回ヒ素シンポジウム. 2008 年 11 月 29 日、東京都港区・北里大学白金キャンパス

(21) 下田康代, 鈴木芳宏, 圓藤陽子, 小川真規, 立川眞理子, 加藤孝一, 圓藤吟史, 山中健三, ヒジキ中ヒ素化合物の形態別分析-アルセノシュガー分析を中心として. 第 14 回ヒ素シンポジウム, 2008 年 11 月 29 日, 東京都港区・北里大学白金キャンパス

(22) Endo G, Hata A, Nakajima Y, Endo Y, Risk assessment on arsenic in seafood, 国際危機管理シンポジウム, 2008 年 9 月 16 日, 銚子市・千葉科学大学

(23) Endo Y, Ogawa M, Suzuki Y, Endo G, Risk management in occupational health, 国際危機管理シンポジウム, 2008 年 9 月 13-16 日, 銚子市・千葉科学大学

(24) 圓藤吟史, 環境及び食事からのヒ素曝露と発癌リスク評価, 第 17 回環境化学討論会, 2008 年 6 月 11 日, 神戸市・神戸国際会議場

(25) Hata A, Endo Y, Habib A, Nakajima Y, Matsuda M, Ogawa M, Fujitani N, Endo G. Validation of urinary total arsenic determination and comparison with speciation analysis, 2nd International Congress, Arsenic in the environment, 2008 年 5 月 21-23 日, Valencia, Spain

[図書] (計 2 件)

① 圓藤吟史, 山中健三, 花岡研二; ヒ素, in 足立吟也(監修編集代表). レアメタル便覧, 丸善株式会社, 2011, III pp.588-595, 1800

② 圓藤吟史, 萩原聡, 巽典之, 事例で学ぶ一般健診・特殊健診マニュアル 改訂第 2 版, 宇宙堂八木書店 (克誠堂出版), 2008, 236

[その他]

ホームページ等

<http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/20390173>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

圓藤 吟史 (ENDO GINJI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 20160393

(2) 研究分担者

山中 健三 (YAMANAKA KENZO)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号: 50182572

藤谷 登 (FUJITANI NOBORU)

千葉科学大学・危機管理学部・教授

研究者番号: 10156888

圓藤 陽子 (ENDO YOKO)

独立行政法人労働者健康福祉機構・関西労災病院・産業中毒研究センター長

研究者番号: 50193438

(H21→H22: 研究協力者)

立川 眞理子 (TACHIKAWA MARIKO)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号: 90139098

畑 明寿 (HATA AKIHISA)

千葉科学大学・危機管理学部・助教

研究者番号: 10433690

(3) 連携研究者

下田 康代 (SHIMODA YASUYO)

日本大学・大学院薬学研究科・後期博士課程大学院生

研究者番号: