

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390174

研究課題名（和文）ヒ素中毒の予防と根絶を目的とする無機ヒ素の無害化処理に関する研究

研究課題名（英文）The study of detoxication of inorganic arsenic to aim at preventative and eradication of arsenic poisoning

研究代表者

山内 博 (YAMAUCHI HIROSHI)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：90081661

研究成果の概要（和文）：現在、アジアや中南米諸国では大規模な慢性ヒ素中毒が発生している。その原因として井戸水からの無機ヒ素の除去は行われているが、その集積した無機ヒ素の廃棄と保存方法が適切でないことから、新たな汚染源となり中毒が連続的に再発する悪循環が存在している。当該問題の解決の一つの方法として、無機ヒ素の無毒化処理の確立であり、無毒化ヒ素（アルセノベタイン；AsB）の人工合成物は安全性試験から無毒が証明された。この手法の普及や応用により、慢性ヒ素中毒の予防や改善、根絶が可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the cytotoxicity of arsenobataine (AsB) and discusses future detoxication treatment of inorganic arsenic for prevention and improvement of environmental arsenic poisoning. AsB was synthesized from arsenic trioxide and arsenic chemical warfare agent. The toxicity of all AsB was clearly decreased. Apoptosis and oxidant stress were induced by reactive oxygen species in arsenic trioxide, but not in AsB. Thus, synthesis of AsB from different inorganic arsenics appears to result in detoxified arsenic. Although this synthesis involves problems related to efficiency and economic potential, the back-to-nature treatment of AsB with no requirement of repository is expected. An awareness campaign on the international level and further research on AsB is required.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：予防医学、公衆衛生学、毒性学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ヒ素、ヒ素中毒、無毒化、アルセノベタイン

### 1. 研究開始当初の背景

現在、アジアと中南米諸国を中心とした推定の慢性ヒ素中毒患者は約5,000万人に達し、その原因は自然由来の無機ヒ素の井戸水汚染である。そのことから井戸水から無機ヒ素を除去する技術として砂濾過、フィルター、吸着剤、凝集剤等が用いられているが、集積

した高濃度の無機ヒ素の管理が適切でないことから、この高濃度無機ヒ素が新たな汚染源となり、慢性ヒ素中毒の再発症につながり、予防と改善の進展もない。他方、我が国も含めて先端産業ではヒ素系化合物半導体や液晶基板硝子の製造に猛毒の三酸化ヒ素が年間に約5万トン使用されている。EUの有害

物質規制により、未使用の無機ヒ素化合物が一般環境に過剰蓄積されることが予測されており、この猛毒のヒ素化合物に対する安全な管理システムを早急に確立する必要があり、達成されない場合、新たなヒ素による健康被害の危険性がある。さらに、日本と中国内には約 50 万発のヒ素化学兵器が存在し、その処理作業が稼働されると大量の無機ヒ素が生成され、この無機ヒ素の安全な処理対策も重要課題である。このように、自然環境汚染や職業性暴露、特殊事例であるがヒ素化学兵器自体および処理物からの無機ヒ素による健康影響を予防や改善、根絶する新たな思考力と技術が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究は急性・慢性ヒ素中毒の予防や根絶に効果が期待される無機ヒ素の新たな処理システムの確立と、その無害化ヒ素「アルセノベタイン (AsB)」の安全性試験について検討を試みた。無機ヒ素のメチル化に天然のヒ素メチル基転移酵素を応用し、無機ヒ素から AsB を人工的に合成し (図 1)、その細胞毒性試験を総合的に検討した。この無機ヒ素の無毒化システムは筆者が独自に考案したものである。従来存在しない無機ヒ素の無毒化システムを構築し、無機ヒ素による健康被害の防止や軽減に貢献できる新規の手法・技術、そして、無害化ヒ素の安全性を化学的に検証し、社会貢献を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) アルセノベタイン (AsB) の合成

AsB の合成：被験ヒ素は三酸化二ヒ素 ( $As_2O_3$ ) とヒ素化学兵器 (As-CW) から生成した。AsB の合成は、これらの無機ヒ素に還元剤の存在下でビタミン  $B_{12}$  を作用し、トリメチルアルシンオキシド (TMAO) をへて AsB に変換した。反応温度は  $100^{\circ}C$  以下、数時間である (図 1)。

### (2) AsB の細胞毒性試験

細胞毒性試験：被験試料は、2 種類の AsB、陽性対象として三酸化二ヒ素を用いた。細胞は HeLa (ヒト子宮頸がん細胞) と HL-60 (ヒト急性前骨髄性白血病細胞) を使い、Cell counting kit-8 (CCK-8) にて検査した。アポトーシスの指標とされるクロマチン凝縮はヘキスト 33422 による染色、DNA ラダー検出はアガロースゲル電気泳動、アポトーシス陽性マーカーである Caspase-3/7 の検出は Caspase-Glo 3/7 により行った。また細胞内活性酸素種は  $H_2DCFDA$  による染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。さらに V79 (チャイニーズハムスター肺由来細胞) に 6 日間  $As_2O_3$  と AsB を曝露し、コロニー形成試験を行った。

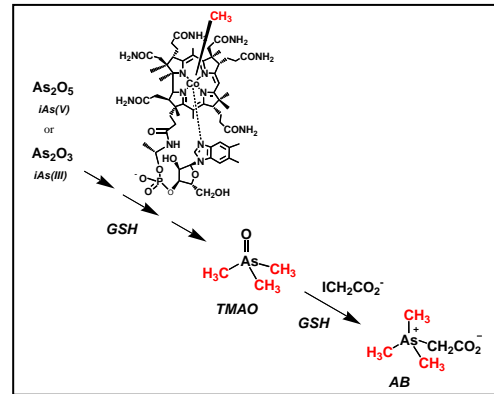


図 1 アルセノベタイン (AsB) の合成法

## 4. 研究成果

### (1) AsB の合成について

図 1 には AsB の合成過程を示した。メチル基供与体には、現状では天然ビタミン  $B_{12}$  を用いているが、諸外国から安価な製品の購入もあり、即効性の活動に使用が可能である。一方、還元型グルタチオン (GSH) は高価なことから代用品への変換が望まれる。現状においては実験室レベルでの達成であるが、社会への汎用を目指すことから、さらなる効率化と経済性が必要と考えている。

### (2) AsB は何故、無機ヒ素の無毒化物に相当するのか？

**無毒化ヒ素:アルセノベタイン(AsB)  $LD_{50}$  10g/kg**  
**無機ヒ素の毒性に比較して1/300のレベル**  
**無機ヒ素:三酸化ヒ素  $LD_{50}$  0.03g/kg**  
**発ガン性物質**

**AsB は体内蓄積性がなく、半減期は 3-5 時間、体内で他の形態へのヒ素に分解されず、急速に尿中排泄される。**

図 2 AsB の毒性、代謝、排泄

AsB は海洋性の魚介類に高濃度に含有しており、その濃度は 1-10ppm と高濃度である。AsB は海水中の低濃度の無機ヒ素の 5 価ヒ素を植物性プランクトンがメチル化し、動物性プランクトンが取り込み、アルセノ糖、アルセノコリンを経て生成される。しかし、AsB の生成は海洋生物の連携により生成される物で、哺乳動物では AsB は生成されない。本研究の無機ヒ素の無毒化処理システムの構築には、この海洋生物の役割を参考とした。

次に、何故、AsB が無毒化ヒ素として成り立つかについては、ヒトは魚介類から多量のヒ

素を日常的に摂取しているが、過去の経験則から判断しても、魚介類中ヒ素による健康被害は国際的にも認められない。1980年代、魚介類中ヒ素の化学構造が明らかにされ、さらに、毒性試験が実施され、AsBは無毒のヒ素として認識されている。

### (3) AsBの細胞毒性試験

HeLaとHL-60細胞を用いて2種類のAsBと三酸化二ヒ素の細胞毒性試験をCCK-8により行った。図3に示したように、AsBは三酸化二ヒ素に比較しても共通して明確に毒性を呈しなかった。

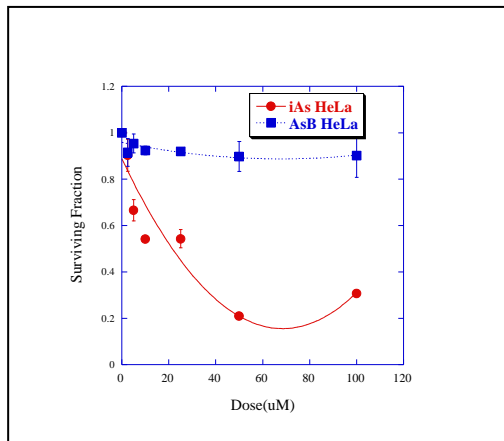


図3 HeLa細胞によるAsBと三酸化二ヒ素の細胞毒性 (CCK-8法による試験)

次に、AsBと三酸化二ヒ素のアポトーシス作用について検討した。アポトーシスの指標とされるクロマチン凝縮をヘキスト33422により染色して評価した。図4に示したように、三酸化二ヒ素(右側)ではアポトーシス細胞の出現が認められるが、しかし、AsB(左側)では一律に認められなかった。なお、HL-60細胞を用いた実験では三酸化二ヒ素群にアポトーシス小体も認められた。

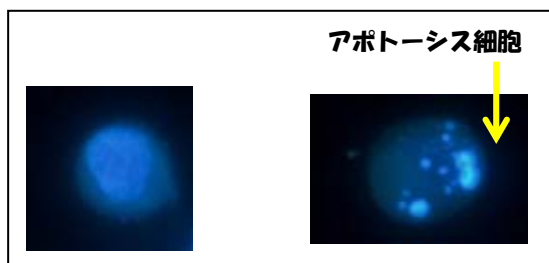


図4 HeLa細胞によるAsBと三酸化二ヒ素のアポトーシス細胞の検出比較

アガロースゲル電気泳動法によるDNAラダー検出:

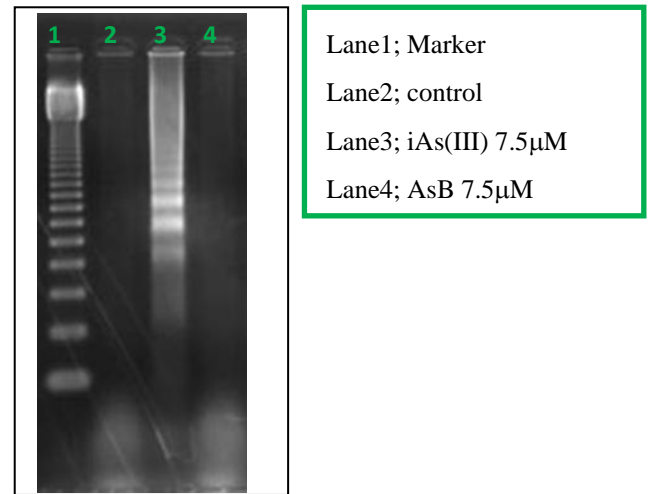


図5 HL-60細胞によるAsBと三酸化二ヒ素(iAsIII)によるDNAラダー検出の比較

三酸化二ヒ素(iAsIII)群からはDNAラダーが顕著に認められたが、これに対して、ACWから化学合成したAsBはDNAラダー検出がなく、DNA損傷への影響を認めなかった。

AsBと三酸化二ヒ素(iAsIII)による細胞内活性酸素種(ROS)の観察:

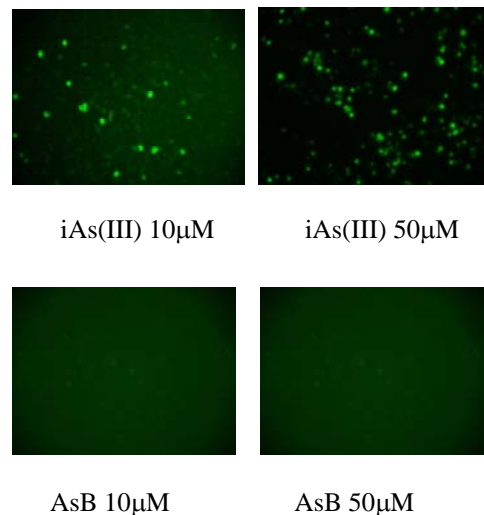


図6 HeLa細胞によるAsBと三酸化二ヒ素(iAsIII)による細胞内ROSの比較 (生細胞内に活性酸素種(ROS)が存在すると蛍光(緑色)を発する)

iAs(III)では濃度依存的に細胞内にROSの発生が認められた。一方、AsBではROSの有為

な発生は認められなかった。

## 結論

三酸化二ヒ素と As-CW から合成した AsB に対する細胞毒性試験を行った結果、どの AsB も共通して明確に減毒（無毒）されていた。三酸化二ヒ素にアポトーシスの誘導、活性酸素種の誘発による酸化ストレスなどが認められたが AsB にこの現象は認められなかった。すなわち、異なる無機ヒ素から合成した AsB は無毒化ヒ素である結果が示された。他方、AsB の合成には効率化や経済性の問題が課題としてあり、なお、AsB としての廃棄処理には処分場が不要な自然回帰の期待が望まれ、国際社会への啓蒙活動や研究の充実や拡大が必要と考える。

## 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 8 件）

- ① Sakai Y, Aminaka M, Takata A, Yamauchi H. (他 3 名、5 番目) Oxidative stress in mature rat testis and its developmental changes. *Dev Growth Differ.* 52, 657-663, (2010) 査読有
- ② Akimoto M, Nishimaki T, Arai Y, Uchinuma E, Yamauchi H. (他 6 名、5 番目) Hes1 regulates formations of the hypophyseal pars tuberalis and the hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 340, 509-521, (2010) 査読有
- ③ Nakamura K, Hisaeda Y, Pan L, Yamauchi H. Methyl transfer from a hydrophobic vitamin B12 derivative to arsenic trioxide. *J Organomet Chem*, 694, 916-921 (2009) 査読有
- ④ 山内博、高田礼子. 近年のヒ素による健康障害と動向. *中毒研究* 22, 197-205 (2009) 査読有
- ⑤ Fowler BA, Conner EA, Yamauchi H. Proteomic and metabolomic biomarkers for III-V semiconductors: and prospects for application to nano-materials. *Toxicol Appl Pharmacol*, 233, 110-115 (2008) 査読有
- ⑥ Nakamura K, Hisaeda Y, Pan L, Yamauchi H. Detoxification system for inorganic arsenic: transformation of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> into TMAO by vitamin B<sub>12</sub> derivatives and conversion of TMAO into arsenobetaine. *Chem Commun*, 41, 5122-5124 (2008) 査読有
- ⑦ Fukuda M, Yamauchi H, Aminaka M. (他 5

名、2 番目) The evaluation of oxidative DNA damage in children with brain damage using 8-hydroxydeoxyguanosine levels. *Brain Dev*, 30, 131-136 (2008) 査読有

- ⑧ Takigawa T, Yamauchi H, Ogino K. (他 5 名、4 番目) Association between serum gamma-glutamyltransferase and oxidative stress related factors *Hepatogastroenterology*, 55, 5-53 (2008) 査読有

〔学会発表〕（計 11 件）

- ① 山内博、無機ヒ素の無毒化処理：合成アルセノベタインの細胞毒性評価、第 81 回日本衛生学会学術総会、2011 年 3 月、東京都
- ② 山内博、無機ヒ素の無毒化処理の意義と将来、第 16 回ヒ素シンポジウム、2011 年 2 月、旭川市
- ③ 山内博、無機ヒ素のメチル化と生体防御反応に対するスルファラフアンの効果、第 16 回ヒ素シンポジウム、2011 年 2 月、旭川市
- ④ 山内博、無機ヒ素のメチル化に対する機能性食品（ブロッコリースプラウト）の効果と生体防御、第 80 回日本衛生学会学術総会、2010 年 3 月、仙台市
- ⑤ 山内博、無機ヒ素暴露による酸化的 DNA 損傷に対するスルフォラフアンの効果、第 80 回日本衛生学会学術総会、2010 年 3 月、仙台市
- ⑥ 山内博、無機ヒ素の無毒化処理：アルセノベタインの毒性評価、第 80 回日本衛生学会学術総会、2010 年 3 月、仙台市
- ⑦ 山内博、漁業従事者における一日の食事からのヒ素、カドミウム、鉛、スズ摂取量の検討、第 80 回日本衛生学会学術総会、2010 年 3 月、仙台市
- ⑧ 山内博、中国の慢性砒素中毒の疫学研究で解明されたこと、第 15 回ヒ素シンポジウム、2009 年 11 月、大阪市
- ⑨ 山内博、和歌山カレー毒物事件における集団急性ヒ素中毒、第 15 回ヒ素シンポジウム、2009 年 11 月、大阪市
- ⑩ 山内博、無機ヒ素のメチル化と酸化的 DNA 損傷に対するブロッコリースプラウトの効果について、第 15 回ヒ素シンポジウム、2009 年 11 月、大阪市
- ⑪ 山内博、漁業従事者とその家族における食事からの一日の総ヒ素摂取量と尿中ヒ素濃度について、第 14 回ヒ素シンポジウム、2008 年 11 月、東京都

〔図書〕（計3件）

- ① 高田礼子、山内 博. 本の泉社、ヒ素.  
改訂・分子予防環境医学、2010、672-680.
- ② 山内 博. 医学書院、ヒ素中毒. 新臨床  
内科学、2009、1552-1553 .
- ③ 山内博、高田礼子、シーエムシー出版、  
ヒ素. ミネラルの科学と最新応用技術、  
2008、359-370 .

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内 博 (YAMAUCHI HIROSHI)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：90081661

### (2) 研究分担者

久枝 良雄 (HISAEDA YOSHIO)  
九州大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：70150498

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

### (3) 連携研究者

なし