

機関番号：10107

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20406014

研究課題名 (和文) 排泄促進による解毒と飲水中砒素の無毒化による総合的な慢性砒素中毒の改善・予防対策に関する研究

研究課題名 (英文) Comprehensive improvement and prevention of arsenic toxicity by the detoxication via acceleration of excretion from body and the detoxifying of arsenic in drinking water.

研究代表者

吉田 貴彦 (YOSHIDA TAKAHIKO)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90200998

研究成果の概要 (和文)：

ブロッコリー (B) 粉末を作成しハムスター及び健常ボランティアに摂取させ、ヒ素の代謝と排泄を評価した。また、環境ヒ素の無毒化について検討した。B 粉末摂取によりメチル化の亢進と尿中への排泄促進が確認された。一方、生体には必須金属の喪失や生化学的検査に異常を認めなく、B 粉末のヒ素解毒効果が確認された。無機ヒ素は還元下でビタミン B12 の作用により無毒のアルセノベタインに変換可能で無害化出来る事が確認された。以上より、慢性ヒ素中毒の症状改善と予防への手がかりが得られた。

研究成果の概要 (英文)：

Originally manufactured broccoli (B) powder was treated to hamster and healthy volunteer and evaluated metabolism and excretion of arsenic. Secondly, detoxifying process of environmental arsenic was investigated. B powder enhanced methylation and excretion into urine of arsenic. At the same time, there was no obvious effect on the deprivation of essential minerals and the abnormalities of chemical values. Inorganic arsenic was possible to convert to arsenobataine, innocuous arsenic form, under reductive condition with vitamin B12 action. Our results will be helpful for setting up the comprehensive countermeasures, improvement of symptoms and prevention of new victims among the arsenic contaminated area.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：砒素、排泄促進、解毒、無毒化、改善予防

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

1990年代より、世界的規模で砒素汚染飲料水が原因となる慢性砒素中毒が発生している。その規模は数千万人で、手掌・足底角化症によるQOL低下、皮膚癌等の悪性腫瘍の発生等住民の健康被害、社会的負担は極めて大きい。

我々の研究グループは、飲料水の水源を変えることで砒素曝露量を軽減させた集団の症状の消長について継続調査してきた。砒素曝露軽減によって一部の症状（皮膚症状、末梢循環障害、など）が改善される事を明らかにし、中国全国での改水事業の展開に根拠を与えることとなった。しかし、1年、5年、10年後のフォローアップ調査により、曝露軽減だけでは症状改善が緩慢なことが判明し、代謝排泄の促進など更なる介入が必要となった。また、汚染地域によっては砒素濃度の低い水源の確保が容易でなく、飲水中の砒素の除去・無毒化について検討する必要があるが生じている。世界的な慢性砒素中毒地域において症状改善および新たな中毒の発生予防のために、上述2つの予防対策が緊急に必要なものである。

2. 研究の目的

ブロッコリ発芽体に多く含有される sulphoraphan (S) に解毒・細胞外排泄促進の機能が在る事が明らかとされ、本研究グループでも肝細胞からの砒素の排泄促進効果を確認している。しかし、試薬としての S は高価であり、S の砒素排泄効果を *in vivo* で検証する事は困難である。そこで高価な S に替えてブロッコリを粉末加工し動物実験での投与実験を経て、人での砒素排出促進の検証を試みることを計画した。

また、飲水中に含まれ慢性砒素中毒を生ずる原因となる砒素形態は無機砒素である。一方、吸収後に代謝されて生ずるモノメチル砒素 (MMA) とジメチル砒素 (DMA) にも有害性が報告されていることから、より安全で慢性砒素中毒を起こさない化学形態の砒素に変換し環境中の砒素を無毒化・除去する技術の確立をもう一つの目的とした。

以上の2つの手法を組合せ、慢性砒素中毒の症状改善と新たな中毒発生予防の実効性の高い総合的な対策を立てることを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) ブロッコリ粉末の作成

S を投与する形態としてブロッコリ粉

末を作成した。動物実験にはブロッコリ発芽体、また、ヒト被験者実験にはブロッコリ成株を原料に試料を作成した。

① ブロッコリ発芽体の粉末

村上農園のスーパー・スプラウトを市中にて購入し、粉末試料を作成した。

② ブロッコリ成株の粉末

粉末化は3回行い、作成条件を変え S の含有量等を検討した。基本は、ブロッコリ青汁の製造法に準拠した。

1) 原料ブロッコリ

検体1は、東川町産の花芽および上中部茎を用いた。検体2は、芽室町産の一般流通状態の部分を用いた。検体3は、東川町産の花芽および上部茎を用いた。

2) 作成方法

チップ状に細切した後、検体1は水洗浄、検体2は水洗浄後に一般的な殺菌処理(熱水浸漬)、検体3は水洗浄後に殺菌処理(水酸化カルシウム溶液に浸漬)し再洗浄した。その後、凍結乾燥し粉末に加工した。

3) 細菌検査

ヒト実験に用いるブロッコリ成株の粉末試料は、食品衛生法に準拠した方法により、食品加工企業においてマニュアルに則って細菌検査を行った。

(2) ブロッコリ粉末の摂食介入試験による砒素排泄促進効果の検討

① ハムスターを用いた実験

実験動物にブロッコリ粉末 (B) 添加飼料を事前に摂取させ、無機ヒ素を単回投与した後、メチル化と発癌に関連する酸化的 DAN 損傷に対する影響を検討した。

8週齢の雄性シリアン・ゴールデン・ハムスターを2群に分け、三酸化二ヒ素 (As) +B 投与群を実験群 (As+B 群)、As のみ投与群を対照群 (As 単独投与群) とした。B 投与は固形飼料に重量比 0.5% で添加し、S 推定摂取量が約 320 μ g/day/匹となるように1週間事前投与し、対照群は通常固形飼料を与えた。As は両群とも 7.5mg ヒ素/kg を1回経口投与した。As 投与前と投与後 1、5、10 日目に肝臓と尿を採取した。尿中ヒ素の化学形態別分析は無前処理にて超低温捕集-還元気化-原子吸光光度法により、無機ヒ素 (iAs)、モノメチル化ヒ素 (MMA)、ジメチル化ヒ素 (DMA) を測定し、尿中クレアチニン補正した。肝臓中の GSH 律速酵素 γ -Glutamylcysteine synthetas (γ -GCS)、GSH 転移酵素 Glutathione S-transferase alpha 1 (GSTA1)、Glutathione S-transferase M1 (GSTM1)、生体防御反応マーカー Heme-Oxygenase-1 (HO-1) は Western blot 法で解析した。

② ヒト被験者による実験

各人が飲食を介して体内に蓄積しているであろうヒ素を含む重金属の尿中排泄を指標としてブロッコリ粉末摂取によるヒ素排泄・代謝促進の効果を検証した。

健常ボランティア(男性6名)に青汁として製造したブロッコリ粉末(検体1)5gを1日1回14日間連続摂取させた。海藻類の制限以外、魚介類を含めて特に食事制限を求めなかった。

ブロッコリ粉末摂取初日(0日)、摂取8日目(7日)の摂取前および14日目の翌日(15日)に、末梢血を得て全血および血清を凍結保存した。早朝起床尿を避けた随時尿を、摂取初日(0日)、1、4、7、10、14日に採取し測定まで凍結保存した。血液生化学検査項目は、総タンパク、アルブミン、AST(GOT)、ALT(GPT)、LDH、ALP、 γ -GTP、クレアチン(CRE)、尿酸(UA)、尿素窒素(BUN)、グリコアルブミン、中性脂肪(TG)、総コレステロール(T-cho)、HDL-cho、LDL-choである。血清中金属は、Na、Cl、K、Mg、Ca、P、Fe、Cu、Zn、Se、Mn、Niを測定した。

④ 飲水中砒素の無毒化の検討

無機ヒ素から、日本学術会議が無毒化ヒ素の候補とするアルセノバタイン(AsB)への変換の条件等につき検討した。

1) AsBの合成

三酸化二ヒ素(As)に還元剤条件下でビタミンB₁₂を作用させAsBに転換させた。反応温度は100℃以下で数時間である。

2) 細胞毒性試験

陽性対象にAsを用い、Asから合成したAsB試料について細胞毒性を試験した。細胞はHeLaとHL-60で、Cell counting kit-8(CCK-8)にて毒性評価した。アポトーシス指標の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H₂DCFDAにより染色し蛍光顕微鏡で観察した。さらにV79に6日間As₂O₃とAsBを曝露し、コロニー形成試験を行った。

4. 研究成果

(1) ブロッコリ粉末の作成

動物実験にはブロッコリ発芽体を原料に、また、ヒト実験にはブロッコリ成株を原料にブロッコリ粉末を作成した。

①細菌検査

ヒト被験者に用いるブロッコリ成株の粉末試料について、食品衛生法に準拠した方法により試料中の細菌検査を行い次表の結果が得られたが、いずれも食品衛生法の基準を満たすものであった。

		大腸菌群	一般生菌数(個/g)
検体1	BGLB	陰性	4.7×10^2
	DESO	陰性	
検体2	BGLB	陰性	1.9×10^3
	DESO	陰性	
検体3	BGLB	陰性	5.7×10^3
	DESO	陽性	
(2.0 × 10 ³ 、E. coli 陰性)			

②ブロッコリ粉末中のS濃度

各ブロッコリ試料中のS含有量について分析した結果を以下に示す。

発芽体 48.0mg/100g 湿重量

成株検体1 19.6mg/100g 湿重量

成株検体2 0.38mg/100g 湿重量

成株検体3 27.6mg/100g 湿重量

発芽体が高く、成株では低めであった。粉体作成の条件により含有量に差があった。

③ブロッコリ粉末中のビタミン含有量

成株ブロッコリについて、緑黄色野菜作物に豊富なビタミン類を測定した。

作成条件により、ビタミン含有量に相

表 成株検体中ビタミン類の含有量

	濃度	検体1	検体2	検体3
ビタミンA				
β -ベータカロテン当量	(μ g/100g)	3980	7820	3050
α -カロテン	(μ g/100g)	30	-	20
β -カロテン	(μ g/100g)	3960	7820	3040
レチノール当量	(μ g/100g)	332	652	254
チアミン(ビタミンB1)	(mg/100g)	0.38	0.54	0.45
リボフラビン(ビタミンB2)	(mg/100g)	0.75	0.91	1.20
総アスコルビン酸(ビタミンC)	(mg/100g)	747	685	294
ビタミンE				
α -トコフェロール	(mg/100g)	3.8	9.1	2.8
β -トコフェロール		-	-	-
γ -トコフェロール	(mg/100g)	1.9	3.2	1.4
δ -トコフェロール		-	-	-

違があったが、一定の傾向はなかった。

(2) ブロッコリ粉末の摂食介入試験による砒素排泄促進効果の検討

① ハムスターを用いた実験

ハムスターにAs投与後、iAs、MMA、DMAが尿中から検出された。尿中総ヒ素濃度(IMD:iAs+MMA+DMA)に占めるDMA濃度は、As投与後1日目において実験群36%、対照群26%と、統計学的に有意(p<0.001)であった。ブロッコリ投与により無機ヒ素が早期から最終代謝産物であるDMAに変換されたと考えられる。

血中還元型グルタチオン(GSH)濃度は実験群で高かった。Western blot法解析による肝臓中 γ -GCSの発現量は両群ともにAs投与後1日目において減少したが、実験群の方が全経過日数において僅かに強く発現が認められた。すなわち、ブロッコリ投与により γ -GCS発現が促進されることが示唆された。また、GSTA1において

は実験群に発現が認められたが、GSTM1 には両群に差は認められなかった。

HO-1 は両群ともに As 投与後 1 日目において発現が認められたが、実験群がより強く S による抗酸化力の上昇が示唆された。また、DNA 損傷の指標となる 8-OHdG は尿中及び肝臓中で初期に B 添加飼料群で一過性に高かったが長期的には低下した。

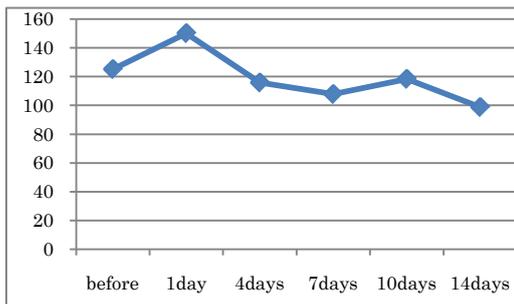
以上から、ブロッコリの無機ヒ素のメチル化と、弱いながら尿中への体外排泄の促進作用が確認された。さらにブロッコリには生体防御反応である抗酸化作用を上昇させる作用があることが示唆された。

② 健常ボラティアによる実験

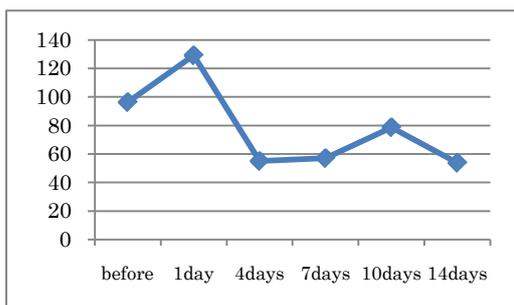
ブロッコリ粉末摂取中に特に異常を訴える者はなかった。

尿中金属類の測定の結果、ブロッコリ粉末の摂取により、砒素は尿中への排泄がやや増加する傾向が示唆された。この傾向は、特に総砒素と魚介類から最も一般的に摂取されるアルセノベタイン (AsB) で顕著であった。また、無機ヒ素のメチル化に関しては、摂取後 7、10 日目頃にはやや増強される事が示唆された。

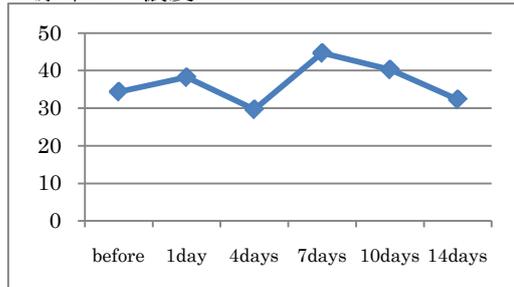
尿中総ヒ素濃度



尿中アルセノベタイン濃度

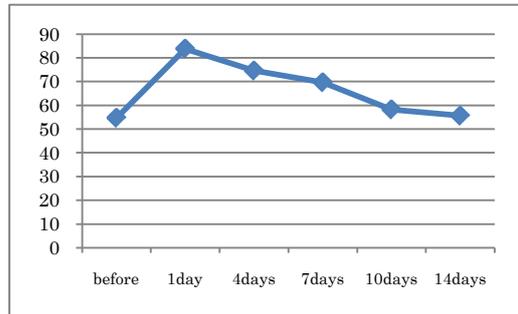


尿中 DMA 濃度

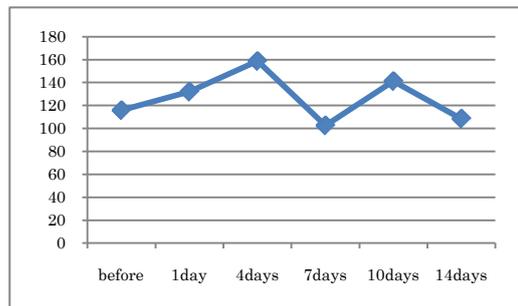


カルシウム (Ca)、セレン (Se)、亜鉛 (Zn) について過剰排泄は見られなかった。それ以外の金属元素については、個人差が強く一定の傾向は見られなかった。

尿中カルシウム濃度

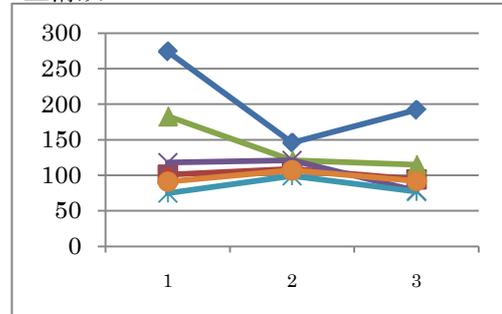


尿中亜鉛濃度

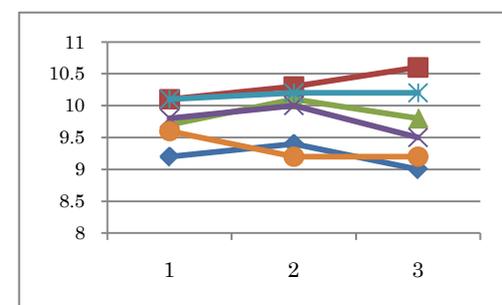


末梢血金属類の測定の結果、鉄 (Fe)、カルシウム (Ca)、リン (P) などの必須金属類の血液濃度の低下は見られなかった。

血清鉄

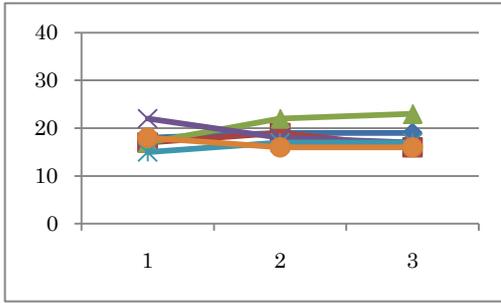


血清カルシウム

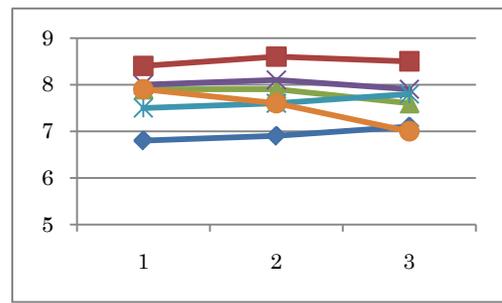


さらに、血液生化学的検査において肝臓、腎臓への影響は見られなかった。

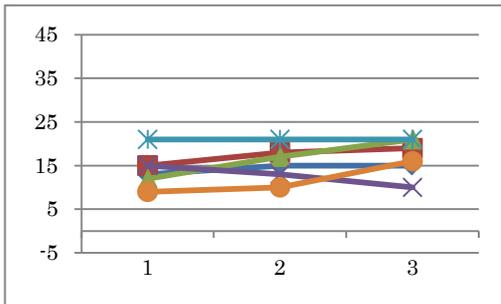
血清 AST GOT



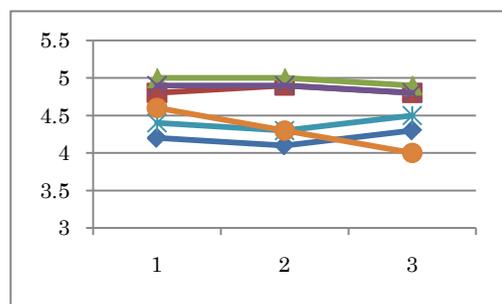
血清総タンパク質



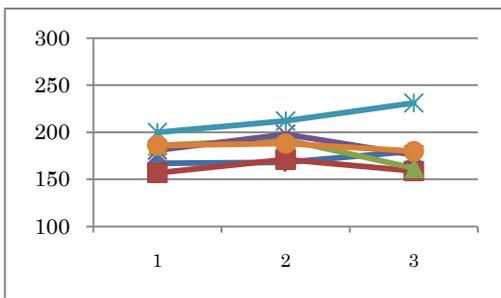
血清 ALT GTP



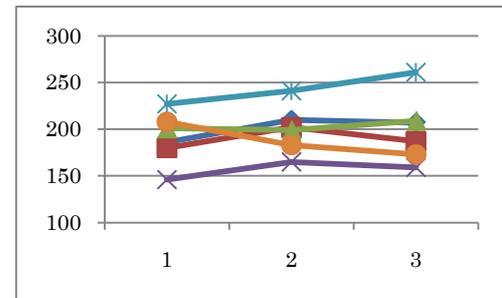
血清アルブミン



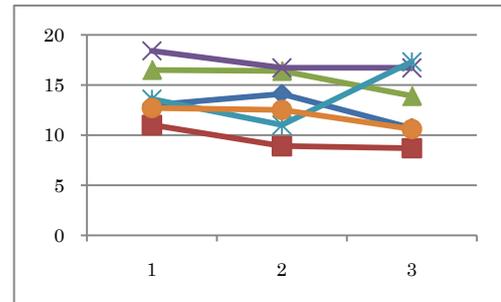
血清 LDH



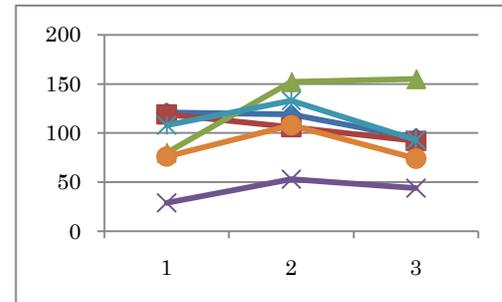
血清総コレステロール



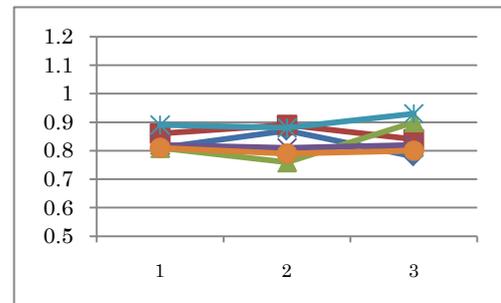
血清 BUN



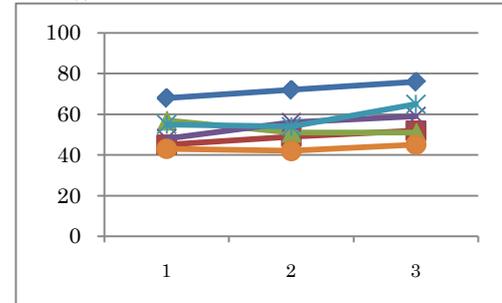
血清中性脂肪



血清クレアチニン



血清 HDL コレステロール



その他、主要な血液生化学検査に何らの影響も与えないことが確認された。

以上の結果およびブロッコリ粉末摂取、*in vitro* での報告とから総合的に判断す

ると、Sの投与は、ヒト体内において無機ヒ素のメチル化が促進されるとともに尿を介した体外排泄が促進されることが確認され解毒に有効であることが確認される一方で、必須金属の体外への喪失の危険性は認められず、S摂取による健康に対する安全性が確認された。

(3) 飲水中砒素の無毒化による慢性砒素中毒予防の検討

合成 AsB の細胞毒性試験の結果は、CCK-8 で測定した HeLa および HL-60 細胞の生存率は陽性対象の As で濃度依存的に低下するのに対し合成 AsB では低下が減弱された。V79 細胞の 6 日間曝露でも同様の結果であった。また、As はクロマチン凝縮、DNA ラダー形成、Caspase-3/7 活性量の増加を示したのに対し、AsB ではこれらの現象は見られなかった。さらに、As では活性酸素種の発生が認められたが、AsB では認められなかった。

無機の 3 価と 5 価ヒ素は AsB への合成が可能であり、実験的に無機ヒ素から合成した AsB は無毒であることが確認できた。しかしヒ素化合物の多様性から、最終的に AsB を合成するには、その対象物ごとに工夫が必要となるため、効率化や経済性の問題が残り、さらなる研究が必要と考える。一方、従来のヒ素の廃棄物処理として一般的な隔離に対して、AsB による廃棄処理には厳密な処分場ではなく自然還元も可能かもしれない。

(4) まとめ

ハムスターと健常ボランティアのヒトでの検証から、S にはヒ素の代謝促進と排泄促進に効果のあることが分かった。特に B 粉末には他の植物由来の成分もある事から、総合的な解毒効果があることも推測された。次いで、世界の汚染地域では必ずしもヒ素の汚染度合が低い飲料水が簡単に入手できるとは限らなく、そうした飲料水を浄化した際に除去されるヒ素は新たな環境汚染減となり得る。そこでヒ素を毒性の低い化合物に変換させることで安全な廃棄を可能とする方法について検討した。三酸化ヒ素、ガリウムヒ素、ヒ素化学兵器のヒ素化合物から、還元剤の存在下でビタミン B12 を作用させ、トリメチルアルシンオキドを経て、アルセノベタイン (AsB) に変換させた。この AsB には、アポトーシス、活性酸素誘導など酸化ストレスなどの毒性は見られなかったことから、無毒化の最終産物となり得る事が確認された。

今回の研究によって、慢性ヒ素中毒の症状改善と予防への総合的な対策立案に資する手がかりが得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

内村彩子、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、2010 年 5 月 11 日、仙台市

寺中彩葉、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、2010 年 5 月 11 日、仙台市

岩立有加、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、第 83 回日本産業衛生学会、2010 年 5 月 28 日、福井市

内村彩子、無機ヒ素のメチル化に対する機能性食品の効果と生体防御、第 19 回日本臨床環境医学会、2010 年 7 月 2 日、東京都港区

内村彩子、無機ヒ素のメチル化と生体防御反応に対するスルフォラフアンの効果、第 16 回ヒ素シンポジウム、2011 年 2 月 6 日、旭川市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 貴彦 (YOSIDA TAKAHIKO)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90200998

(2) 研究分担者

山内 博 (YAMAUTI HIROSI)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：90081661

(3) 連携研究者

角 大悟 (SUMI DAIGO)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：30400683

西條 泰明 (SAIJYOU YASUAKI)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：70360906

伊藤 俊弘 (ITOU TOSHIRO)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：20271760

杉岡 良彦 (SUGIOKA YOSHIKO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398747

中木 良彦 (NAKAGI YOSHIKO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90322908