

機関番号：82101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790155

研究課題名 (和文) ヒ素の体内動態に関する分析毒性学的研究

研究課題名 (英文) A study on analytical toxicology of metabolism of arsenic

研究代表者

小林 弥生 (KOBAYASHI YAYOI)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・研究員

研究者番号：00391102

研究成果の概要 (和文) : 当該研究は、ヒ素の酸化がヒ素の解毒に関与していると推定し、ヒ素の代謝と体内動態を分析的、毒性学的手法を用いて明らかにし、ヒ素の毒性軽減および毒性発現機構について、生体内におけるヒ素の酸化還元状態とメチル化という観点から解明することを目的としている。ヒ素の代謝にはグルタチオン (GSH) が重要な役割を担っている。ヒ素 (As) -GSH 抱合体の分解および酸化における GGT の役割を *in vitro* で調べたところ、GGT により As-GSH 抱合体は毒性の高い3価ヒ素化合物へと分解することが分かった。また、GSH の分解に関与する γ -glutamyl transpeptidase (GGT) の新規阻害剤を用いて、ヒ素代謝における GGT の役割を調べたところ尿中に As-GSH 抱合体が検出されることが分かった。GGT の活性阻害により、血漿および腎臓の GSH 濃度が有意に上昇していた。As-GSH 抱合体の腸管吸収における実験から、胆汁排泄された As-GSH 抱合体は腸管から再吸収され、各臓器に分布する他、再度胆汁へ排泄されることが分かった。これらの結果から、GGT の活性阻害による GSH 濃度の上昇が、ヒ素の解毒機構と関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : It has been reported that iAs^{III} administered intravenously is excreted into bile as arsenic-glutathione (As-GSH) complexes such as arsenic triglutathione (ATG) and methylarsenic diglutathione (MADG). Glutathione plays an important role in the metabolism of arsenic. MADG, but not ATG, was decomposed by γ -glutamyl transpeptidase (GGT). After biliary excretion ATG may be hydrolyzed to toxic iAs^{III} rather than decomposed by GGT. The influence of GGT on an excretion of arsenic was investigated. As-GSH complexes were found in urine of rats treated with a GGT inhibitor, but not with saline (control group). These results suggest that concentration increasing of GSH caused by inhibition of GGT plays important role in the detoxification of arsenic.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ヒ素、代謝、解毒、酸化還元状態、メチル化、HPLC-ICP-MS、LC-MS

1. 研究開始当初の背景
途上国最大の環境問題のひとつにもなって

いる無機ヒ素化合物は、発癌を含む多臓器疾患を起こすことが知られている毒物である。

ヒ素化合物の毒性は一般的に5価よりも3価、有機よりも無機ヒ素化合物の方が高いと報告されている。ヒ素により発癌に至ることは疫学的調査から明らかになっており、ヒ素の代謝過程で生成する中間体が究極発癌物質であると考えられているが、毒性の本質は未だに不明のままである。生体内に取り込まれたヒ素化合物はメチル化代謝され、体外に排泄されると考えられているが、メチル化においては解毒機構か毒性発現機構かという点で注目され議論の対象となっている。このように、ヒ素の代謝機構に関しても未だに不明である。ヒ素はその化学形によって、細胞内への取り込み、排泄、毒性などが大きく異なる。ヒ素の毒性発現および解毒機構を明らかにするためには、ヒ素代謝物の化学形を出来るだけ正確に分析し、出発物質のみならず、代謝物も含めた毒性評価を行う分析毒性学的研究が必要不可欠となる。ヒ素に関する研究において、その代謝と体内動態を明らかにすることは、ヒ素の毒性発現機構を推定し、その毒性を軽減するための重要な情報を与えるものとする。そこで、ヒ素の代謝と体内動態について、分析毒性学的手法を用いて明らかにし、ヒ素の毒性軽減および毒性発現機構について、生体内におけるヒ素の酸化還元状態とメチル化という観点から解明することを目的として当該研究の着想に至った。

2. 研究の目的

当該研究は、ヒ素の酸化がヒ素の解毒に関与していると推定し、ヒ素の代謝と体内動態を分析的、毒性学的手法を用いて明らかにし、ヒ素の毒性軽減および毒性発現機構について、生体内におけるヒ素の酸化還元状態とメチル化という観点から解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ヒ素化合物と GSH の同時測定の検討と LC-MS との比較：ヒ素および硫黄の分析は ICP-MS と LC-MS を用いて行い、両者の感度、再現性、汎用性などを比較し、測定条件を検討した。

(2) ヒ素-グルタチオン (As-GSH) 抱合体の分解および酸化における γ -glutamyl transpeptidase (GGT) の影響：As-GSH 抱合体の分解、および酸化に関する GGT の役割を *in vitro* で調べた。50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中で 100 μ g As/ml の arsenic triglutathione (ATG) および methylarsenic diglutathione (MADG) を 1 U/ml GGT と共に 0、5、10、30、60、90 および 120 分間 37°C で加温した。反応は 1 mM のパソフェナントロ

リンジスルホン酸二ナトリウム水和物を含む 1% ギ酸水溶液を添加させることで停止させ、反応溶液を LC-MS で測定した。

(3) ヒ素代謝における GGT の役割：ヒ素代謝における GGT の役割について解明することを目的とし、GGT の新規阻害剤を GGs Top™ を 25 μ mol/kg.b.w. の用量でラットに尾静脈投与した後、1 時間後にヒ酸ナトリウムを 1.0 mg As/kg.b.w. の用量で尾静脈投与し、経時的に血液、臓器、尿および糞を採取した。ヒ素の総濃度測定は ICP-MS で、と化学形態別分析は HPLC-ICP-MS で測定を行い、GGT の阻害剤の非存在化におけるヒ素の代謝と比較した。

(4) As-GSH 抱合体の赤血球への取り込み TBS buffer で 20% 赤血球懸濁液を調整し、最終濃度 1 ppm になるように As-GSH 抱合体を添加する。37°C で 0 (添加直後)、30 秒、1、2、5、10、30、60、120、180 分加温し、遠心した後、buffer 上清中のヒ素濃度を測定した。また、20% 赤血球懸濁液に As-GSH 抱合体を添加して 37°C で 1 時間反応させ、HPLC-ICP-MS によりヒ素の化学形態を測定した。

(5) 腸管再吸収後のヒ素の動態：再吸収後のヒ素の動態を明らかにする為にラットに 5 mM の GSH 存在または非存在下で As-GSH 抱合体を 1.0 mg As/kg.b.w. の用量で胆管を介して腸管に投与した。投与はインフュージョンポンプを用いて、100 μ l /min の流速で導入した。30 分間隔で氷上にて胆汁を採取し、3 時間後に血液および肝臓を採取した。

4. 研究成果

(1) 様々な条件検討を行ったが、硫黄の高感度分析は現在達成出来ておらず、また酸素を導入することによりヒ素の感度が低下した。一方、LC-MS は ICP-MS と比較して定量性に欠けることがデメリットとして挙げられる為、今後さらなる検討を行う必要がある。以上の結果から、現在のところ ICP-MS および LC-MS を併用して代謝物の同定および定量を行うことが望ましいと示唆された。

(2) GGT と ATG および MADG との反応は、LC-MS を用いて As-GSH 抱合体とその分解物を測定することにより評価した。ATG においては、50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中で、3 価無機ヒ素化合物へと迅速に加水分解された。一方、MADG に関しては、経時的に溶液中の MADG が減少し、GGT により As-GSH 抱合体からグルタミン酸が切断された事を示す質量数が得られた (Fig. 1)。このことから、少なくとも GGT は MADG がより毒性の高い 3 価メチルヒ素化合物へと分解する過程

において重要な働きをしていることが示唆された。

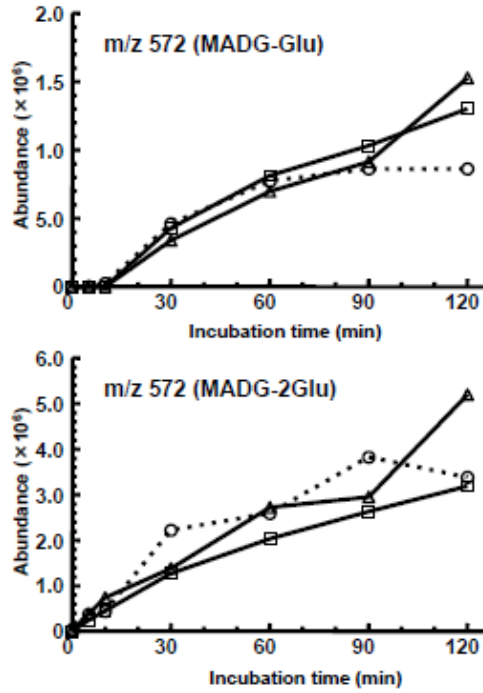


Fig. 1. Time-dependent breakdown products of synthetic MADG by GGT

(3) GGT の阻害剤投与群と生理食塩水投与群を比較したところ、血液および臓器中のヒ素の分布にはほとんど変化がみられなかった。しかしながら、GGT の阻害剤をラットに投与した際には、尿中に As-GSH 抱合体が検出されることが分かった (Fig. 2b)。これらのことから、GGT はヒ素の排泄量に関してはあまり影響を与えないものの、体内におけるヒ素 GSH 抱合体の安定性には密接に関係していることが明らかとなり、GGT の活性阻害による GSH 濃度の上昇が、ヒ素の解毒機構と関連する可能性が示唆された。

(4) Fig.3 は赤血球懸濁液を遠心し、その上清中のヒ素濃度を経時的に示した図である。この赤血球へのヒ素化合物の取り込みに関する実験からは、ジメチルヒ素の GSH 抱合体 (DMAG) およびモノメチルヒ素の GSH 抱合体 (MADG) が無機ヒ素の GSH 抱合体と比較し、迅速に赤血球に取り込まれていることが分かった。

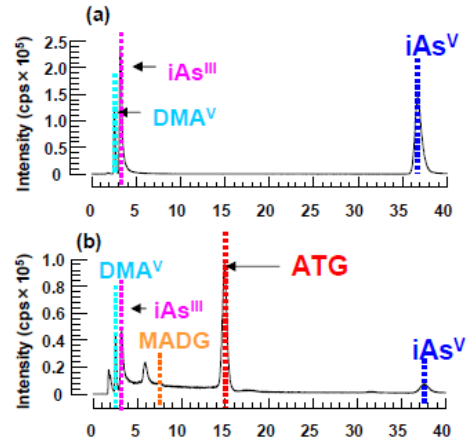


Fig. 2. Elution profiles of arsenic compounds in urine. Rats were pretreated intravenously with (a) saline or (b) GGT inhibitor.

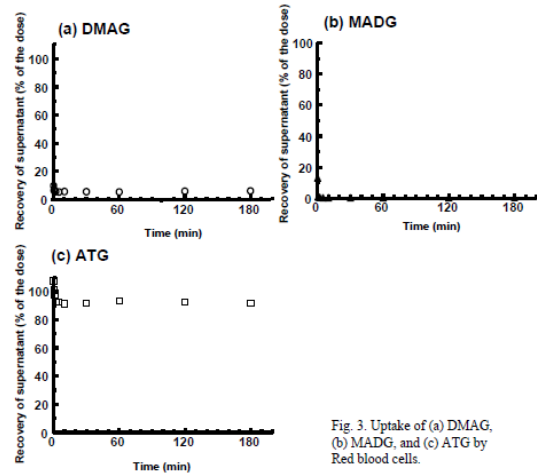


Fig. 3. Uptake of (a) DMAG, (b) MADG, and (c) ATG by Red blood cells.

(5) 3価無機ヒ素化合物のグルタチオン抱合体 (ATG) と3価モノメチルヒ素化合物のグルタチオン抱合体 (MADG) を比較すると、胆汁中へのヒ素の排泄量は ATG 投与群が MADG 投与群と比較して有意に高かった。胆汁中のヒ素の化学形態別分析の結果、ATG は腸管から吸収された後、メチル化され、主として MADG として胆汁中に再度排泄されることが分かった。GSH 存在群と非存在群でのヒ素の体内動態にはほぼ同様だったことから、腸内で GGT による分解や加水分解を経て、再吸収されると示唆された。また、今回ヒ素の胆汁排泄および体内分布には個体差がみられたが、その原因は調査中である。

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2件)

- ① Kobayashi Y, Elucidation of the metabolic pathway of selenium and arsenic by analytical toxicology (2010) Journal of Health Science, 56, 154-160
- ② Kobayashi Y, Hirano S, Effects of endogenous hydrogen peroxide and glutathione on the stability of arsenic metabolites in rat bile (2008) Toxicology and Applied Pharmacology, 232, 33-40.

[学会発表] (計3件)

- ① 小林弥生、ヒ素-グルタチオン抱合体の体外排泄に関する γ -GTP の影響、第37回日本トキシコロジー学会学術年会、平成22年6月17日、沖縄コンベンションセンター
- ② 山城彩花、小林弥生、平野靖史郎、ヒ素-グルタチオン抱合体排泄に及ぼす γ -GTP の影響、フォーラム2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成21年11月6日、沖縄コンベンションセンター
- ③ 小林弥生、平野靖史郎、ラット胆汁中ヒ素代謝物におけるグルタチオンと過酸化水素の役割、第1回メタロミクス研究フォーラム、平成20年11月28日、昭和女子大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弥生 (KOBAYASHI YAYOI)
独立行政法人国立環境研究所・
環境健康研究領域・研究員
研究者番号: 00391102

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし