

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390165

研究課題名(和文) 化学的・生物学的に多様な海産物由来のヒ素化合物のヒト体内動態とそのリスク評価

研究課題名(英文) Chemical and biological diversity of arsenic compounds derived from marine products:
Elucidation of their pharmacokinetics and metabolic activation

研究代表者

圓藤 吟史 (Endo, Ginji)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20160393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：バングラデシュヒ素汚染地域住民の尿を測定したところ、無機ヒ素とモノメチルアルソン酸の定量値の和は無機ヒ素曝露指標として最も優れていた。ワカメ摂取したボランティアの尿をHPLC-ICP-MS、HPLC-TOF-MSにて測定したところ、ジメチルアルシン酸、oxo-ジメチルアルシノエタノール、oxo-ジメチルアルシノ酢酸と複数の未同定ヒ素化合物が検出された。GC-MSを用いた尿中ヒ素の化学形態別分析法を開発した。ODSカラムを装着したHPLC-TOF-MSおよびGC-FPDを用いて測定した結果、ジメチルモノチオアルシン酸はGSHと反応し、安定なGSH複合体の形成を経て硫化水素の生成をもたらした。

研究成果の概要(英文)：From the results of arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh, the best biomarker of inorganic arsenics (iAs) exposure is urinary iAs and monomethylarsonic acid (MMA(V)) concentration. To evaluate the risk of dietary arsenic, we conducted wakame seaweed ingestion experiment. The detected urinary arsenic species were dimethylarsinic acid (DMA(V)), oxo-dimethylarsinoylethanol, oxo-dimethylarsinoylacetate, and some unidentified species. We developed and validated a GC-MS method to determine arsenic in urine. Analytical examination using HPLC-TOF-MS equipped with ODS column and GC-FPD showed that an in vitro reaction between dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA(V)) and GSH produced hydrogen sulfide via the generation of dimethylmonothioarsinic acid-GSH (DMMTA(V)-GSH) complex.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学・公衆衛生学

キーワード：食品 食の安全 リスク評価 ヒ素 海産物

1. 研究開始当初の背景

1990年以降、我々の一連の仕事を含めてヒ素の代謝、動物発癌実験での証拠、遺伝毒性での証拠、発癌メカニズムの一部が明らかになり、国際がん研究機関(IARC, 2004)はヒ素の化学形態によって毒性が異なり、DMA(V)の動物発癌性は明白であるとの結論に達している。それを受けて、IARC(2010)は、無機ヒ素(iAs)をヒトに対する発癌物質(グループ1)、iAsの代謝物であるメチルアルソン酸(MMA(V))およびジメチルアルシン酸(DMA(V))をヒトに対して発癌の可能性がある物質(グループ2B)、海産動食物に多く含まれるアルセノベタイン(AsBe)など代謝されないヒ素化合物をヒトに対する発癌性に分類できない物質(グループ3)とした。欧州食品安全機関(EFSA, 2009)はBMDL₀₁(1%過剰がん発生率に対するベンチマーク量下限値)として0.3~8 µg/kg bw/日を勧告した。さらに、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA, 2010)は肺癌に係るBMDL_{0.5}(0.5%過剰がん発生率に対するBMD下限値)として3.0(2~7) µg/kg bw/日を勧告した。

その後、我々は、次のような知見を提供してきた。

DMA(V)の還元代謝過程の中でジメチルヒ素フリーラジカル、ジメチルヒ素過酸化体などのジメチルヒ素活性種が生じ、これらがヒ素発癌の究極活性体となり得る可能性を動物試験ならびに*in vitro*実験より示してきた。(Yamanaka1991, 2001, 2003, 2004, 2008, 2009)

一般の日本人男性の尿からは、総ヒ素量、AsBe、DMA(V)が多く検出された(Hata 2007)。陰イオンカラムを用いると亜ヒ酸(As(III))のピークに隠れていた未知のヒ素化合物が検出されることが明らかになった

(Suzuki 2009)。ヒジキの多量摂取はハイリスクであった(Nakajima 2006)。

2. 研究の目的

以上の研究は、ヒ素の発がんは、iAs曝露により生体内でDMA(V)などのジメチルヒ素化合物に代謝され、その活性種、とりわけ、含硫メチルヒ素化合物の活性種がヒ素発がんの究極活性体となり得る可能性が示されるようになってきた。しかし、含硫メチル化ヒ素化合物は、iAs曝露者のみならず海産物を多食する者でも生体内で産生されることから、化学的・生物学的に多様なヒ素化合物を高濃度を含む海産物を摂取する者の健康リスクが懸念されている。それらの健康リスクを評価するために、含硫メチル化ヒ素化合物を合成し、代謝、作用機序を明らかにするとともに、化学形態別の曝露指標の確立、ヒトでの動態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

このことから以下の課題に取り込んだ。

- (1) 健康リスクを評価するに当たって、化学形態別の曝露指標の確立は欠かせない。バングラデシュヒ素汚染地域住民の尿を用いてiAs曝露の生物学的指標を求めた。iAs曝露者としてバングラデシュ・パブナ地区住民165夫妻を対象とし、ヒ素化合物は高速液体クロマトグラフと誘導結合プラズマ質量分析装置(HPLC-ICP-MS)を用いて測定した。
- (2) HPLC-ICP-MS法は高価であることから、ガスクロマトグラフ - 質量分析計(GC-MS)を用いた尿中ヒ素化合物の新しい化学形態別分析法を開発し、日常分析におけるGC-MS法の信頼性の評価のために、ヒ素曝露作業(59名)の尿を用いてHPLC-ICP-MS法と

GC-MS法との比較を行った。

- (3) ボランティアを公募し、特定のヒ素化合物濃度が高い食品(ワカメ)を摂取し、ヒト体内での吸収、代謝、蓄積、排泄に関する知見を得る。そのため、海産食品を1週間絶った後ワカメを摂取し、その後5日間の尿を採取した。その尿をHPLC-ICP-MSとHPLC-TOF-MSにより化学形態別分析を行った
- (4) 含硫メチル化ヒ素化合物であるジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA(V), $(\text{CH}_3)_2\text{AsS}(\text{OH})$)とグルタチオン (GSH)との反応機構を明らかにするため、生成されるヒ素化合物を、OHS カラムを装着したHPLC-ICP-MSならびにHPLC-TOF-MS等を用いて経時的に測定した。また生成される硫化水素 (H_2S)はGC-FPDを用いて同時に測定した。

4. 研究成果

- (1) 尿中のAs(III)、As(V)、MMA(V)およびDMA(V)量の中央値と(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)および88.6 (47.9-153.4) $\mu\text{gAs/L}$ であり、それらは互いに有意な相関を示したうえ、尿中のiAsとMMA(V)の和が飲料水中ヒ素濃度と最も良い相関を示した。また、アルセノベタイン、アルセノコリンは検出されなかった。この結果より、尿中の無機ヒ素とMMA(V)の和が海産物摂取の有無にかかわらずiAs曝露の生物学的指標として有用であることが明らかになり、iAs曝露の生物学的指標として最も優れていた。(Hata et al. 2012)
- (2) GC-MS法は従来法に比べて、廉価で汎用性が高いため、広く普及されるものと思われる。(Takeuchi et al. 2012)

HPLC-ICP-MS法とGC-MS法の測定値には良好な相関関係が認められ、GC-MS法の信頼性が確認された。

- (3) ワカメ摂取者の尿からDMA(V)、oxo-ジメチルアルシノエタノール、oxo-ジメチルアルシノ酢酸と複数の未同定ヒ素化合物が検出された。
- (4) DMA(V)はGSHとの反応により3価のDMA()またはそのGSH複合体 (DMA()-SG)を容易に生じるが、DMMTA(V)では、その分子中のAs原子は還元されることなく5価のままGSHと安定な複合体 (DMMTA(V)-SG)と H_2S が生成されることが確認された。このことからDMMTA(V)とGSHの反応速度が比較的ゆっくりとしたものであることが推定され、DMMTA(V)-SGはジメチルモノチオアルシンならびに H_2S の生成を介して、最終的には3価のジメチルヒ素であるDMA()-SG、DMA()、ジメチルジチオアルシン酸(DMDTA(V))へ変換していくものと推定され、毒性発現において重要な役割を演じている可能性が推察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kato K, Yamanaka K, Shimoda Y, Yamano Y, Nagano K, Hata A, Endo Y, Tachikawa M, Endo G. Arsine toxicity is induced by inhalation but not by percutaneous exposure in hairless mice. J Toxicol Sci. 2014;39(2):301-10. 査読

山中健三, 圓藤吟史: 食品に含まれるヒ素化合物の健康影響 - 有機ヒ素化合物の体内動態・毒性発現を中心として - . ファルマシア 2013; 49:43-47
依頼

Takeuchi A, Namera A, Kawasumi Y, Imanaka T, Sakui N, Ota H, Endo Y, Sumino K, Endo G. Development of an Analytical Method for the Determination of Arsenic in Urine by Gas Chromatography-mass spectrometry for Biological Monitoring of Exposure to Inorganic Arsenic. J Occup Health. 2012; 54(6): 434-440. 査読有

Hata A, Yamanaka K, Habib MA, Endo Y, Fujitani N, Endo G. Arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh. Environ Health Prev Med 2012; 17(3): 235-245 DOI: 10.1007/s12199-011-0247-5 査読有

[学会発表](計 18 件)

下田康代、王大朋、黒澤英俊、加藤孝一、立川真理子、圓藤陽子、圓藤吟史、山中健三、安艶: 中国人ヒ素曝露者の尿ならびに唾液試料に対するヒ素の化学形態別分析 .日本薬学会第 134 年会、熊本市, 2014.3.28 .

山中健三: ヒ素の代謝: 化学形態と生体影響 ジメチルヒ素を中心として . 第19回ヒ素シンポジウム, 福岡市 2013.11.16.

畑明寿、大和田真由、長谷川桃子、山中健三、黒澤英俊、山野優子、圓藤陽子、藤谷登、圓藤吟史: マグロおよびワカメ摂取後の尿中ヒ素代謝物第 19 回ヒ素シンポジウム 福岡市 2013.11.16.

Takeuchi A, Namera A, Kawasumi Y, Imanaka T, Sakui N, Ota H, Endo Y, Sumino K, Endo G. Development of

analytical method for biological monitoring of inorganic arsenic exposure using gas chromatography-mass spectrometry. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23,2013.

Yamano Y, Nagano K, Yamanaka K, Hata A, Nakadate T, Endo Y, Endo G: *In vivo* study of arsine exposure in hairless mice: percutaneous absorption vs. whole-body inhalation. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23,2013.

Yamauchi T, Yamano Y, Yamanaka K, Hata A, Kuroda Y, Endo Y, Endo G. Possible Production of arsenic adduct due to the exposure of mouse preserved blood to arsine *in vitro*. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23, 2013.

Hata A, Yamanaka K, Kurosawa H, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of seafood. Environment and Health –Bridging South, North, East and West Conference of ISEE, ISES and ISIAQ, Basel, Switzerland. Aug. 19–23, 2013.

下田康代、加藤孝一、山野優子、畑明寿、立川真理子、圓藤陽子、圓藤吟史、山中健三: 無機アルシンの溶血機序:

ヘモグロビン - ヒ素付加体形成の可能性. 日本薬学会第133年会 パシフィコ横浜 2013.3.30.

畑明寿, 山中健三, 圓藤吟史, 山野優子, 羽場亮太, 藤谷登, 圓藤陽子: ワカメ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究. 第18回ヒ素シンポジウム 宮崎県宮崎市、宮日ホール2012.11.24.

黒澤英俊, 下田康代, 畑明寿, 山野優子, 加藤孝一, 立川真理子, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三: グルタチオンに依存したジメチルモノチオアルシン酸の代謝活性化. 第18回ヒ素シンポジウム 宮崎県宮崎市、宮日ホール2012.11.24.

竹内靖人, 奈女良昭, 川澄八重子, 今中努志, 佐久井徳広, 太田裕一, 圓藤陽子, 住野公昭, 圓藤吟史: GC-MSによる尿中ヒ素化合物の分析法の開発. 第18回ヒ素シンポジウム 宮崎県宮崎市、宮日ホール2012.11.24.

竹内靖人, 奈女良昭, 川澄八重子, 今中努志, 佐久井徳広, 太田裕一, 圓藤陽子, 住野公昭, 圓藤吟史: 生物学的モニタリングのためのGC-MSによる尿中ヒ素化合物の分析法の開発. 第52回近畿産業衛生学会 和歌山市 2012.11.17.

Yamanaka K, Yamano Y, Yoshimura Y, Shimoda Y, Endo Y, Endo G, Speciation analysis of arsenic compounds in the serum and urine of a patient with acute arsine poisoning. 16th International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET 2012), Angelicum Conference Centre, Rome, Italy. Sep 27, 2012.

Hata A, Yamanaka K, Endo G, Yamano Y, Haba R, Fujitani N, Endo

Y: Arsenic metabolites in humans after ingestion of wakame seaweed. 16th International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET 2012), Angelicum Conference Centre, Rome, Italy. Sep 26, 2012.

山中健三, 下田康代, 星井政志, 加藤孝, 立川真理子, 畑明寿, 圓藤陽子, 圓藤吟史: ジメチルチオアルシン酸の毒性発現に係る代謝機構について. 日本薬学会第132年会 札幌市2012.3.28-31.

畑明寿, 山中健三, 山野優子, 圓藤陽子, 藤谷登, 圓藤吟史: マグロ摂取後の尿中ヒ素代謝物に関する研究. 第17回ヒ素シンポジウム: つくば市 2011.11.19 -20.

Yamanaka K, Hata A, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G: A study of the extraction of arsenic from seafood for speciation analysis. International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH) Antalya, Turkey. Oct 16-21, 2011

Hata A, Yamanaka K, Yamano Y, Endo Y, Fujitani N, Endo G: Arsenic metabolism in human urine after ingestion of sashimi tuna fish. International Society for Environmental Epidemiology (ISEE) Barcelona, Spain. Sep 13-16, 2011

〔図書〕(計0件)

〔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

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

山野 優子 (YAMANO Yuko)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：30167580

立川 真理子 (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

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

竹内 靖人 (TAKEUCHI Akito)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20631360

(3)連携研究者

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

山内 武紀 (YAMAUCHI Takenori)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40576287

下田 康代 (SHIMODA Yasuyo)

日本大学・薬学部・大学院生

黒澤 英俊 (KUROSAWA Hidetoshi)

日本大学・薬学部・客員研究員