

Latest findings on organic arsenic in foods

Kevin A. Francesconi

Institute of Chemistry – Analytical Chemistry
University of Graz
Austria

*Food Safety Commission
Tokyo
22 November 2013*

食品中の有機ヒ素に関する最新の知見

オーストリア グラーツ大学
化学・分析化学研究所

ケビン A. フランチェスコーニ

食品安全委員会 東京 2013年11月22日

Overview

- Why investigate arsenic in food?
- The analytical methods
- Inorganic arsenic and organic arsenic
- Why is there so much organic arsenic in sea foods?
- Metabolism of organic arsenic species
- Cytotoxicity of arsanosugars & arsenolipids

論点

- なぜ食品中のヒ素を調査するのか
- 分析手法
- 無機ヒ素と有機ヒ素
- なぜ海産食品の有機ヒ素濃度は高いのか
- 有機ヒ素化合物の代謝
- ヒ素糖およびヒ素脂質の細胞毒性

Arsenic in the environment & food

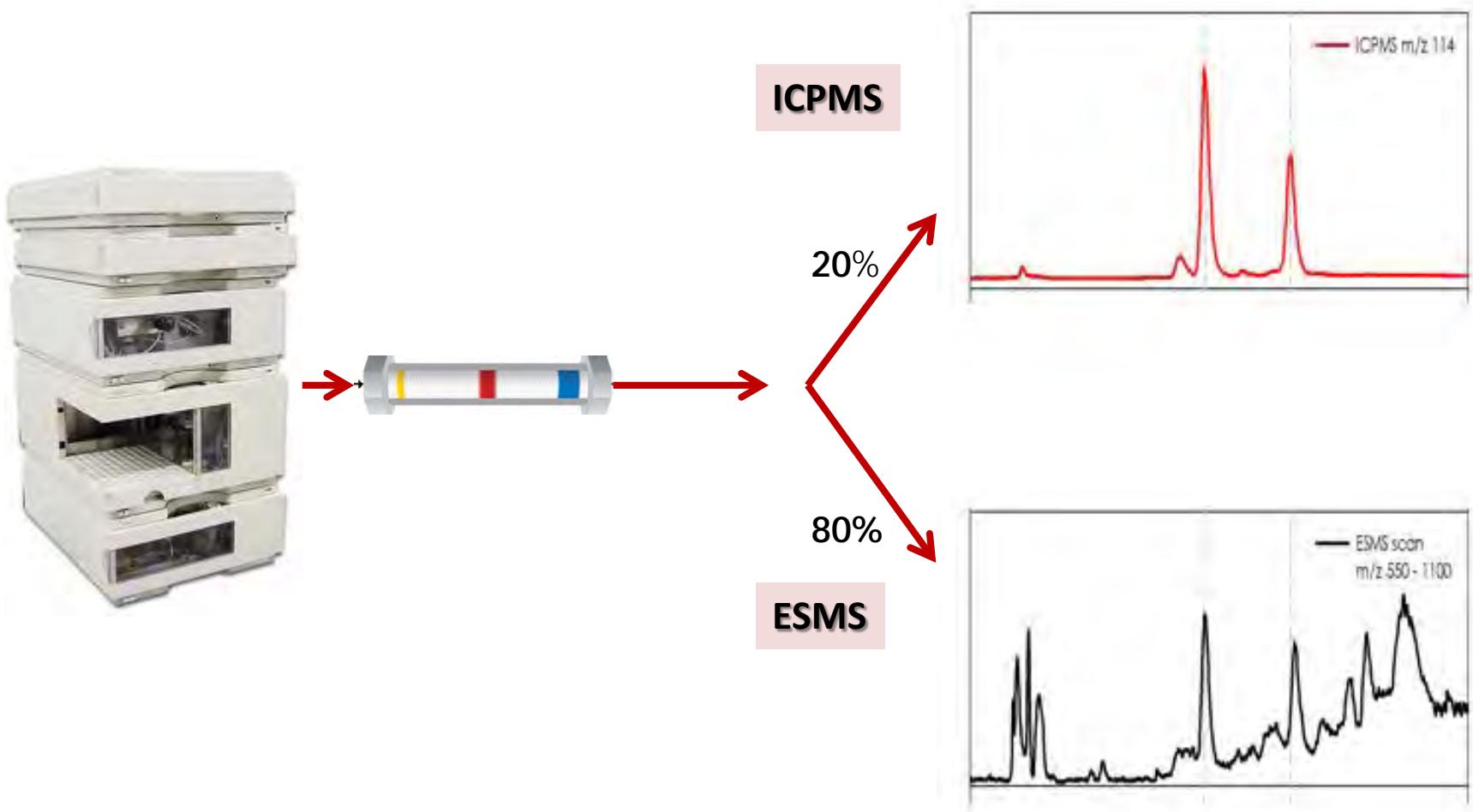
- Understand the natural situation
- Understand human impact on the natural situation
- Understand the toxic issues – arsenic speciation & metabolism
- Provide reliable analytical data to frame sensible regulations for arsenic in food to protect our health and the food industry

環境並びに食品中のヒ素

- ヒ素に関して自然の状況を理解する
- 自然の状況に与える人間活動の影響を理解する
- ヒ素の毒性に係る問題を理解する—ヒ素の様々な分子形態と代謝
- 食品中のヒ素に対する適切な規制の構築に必要な信頼できる分析データを提供することにより、我々の健康と食品産業を保護する

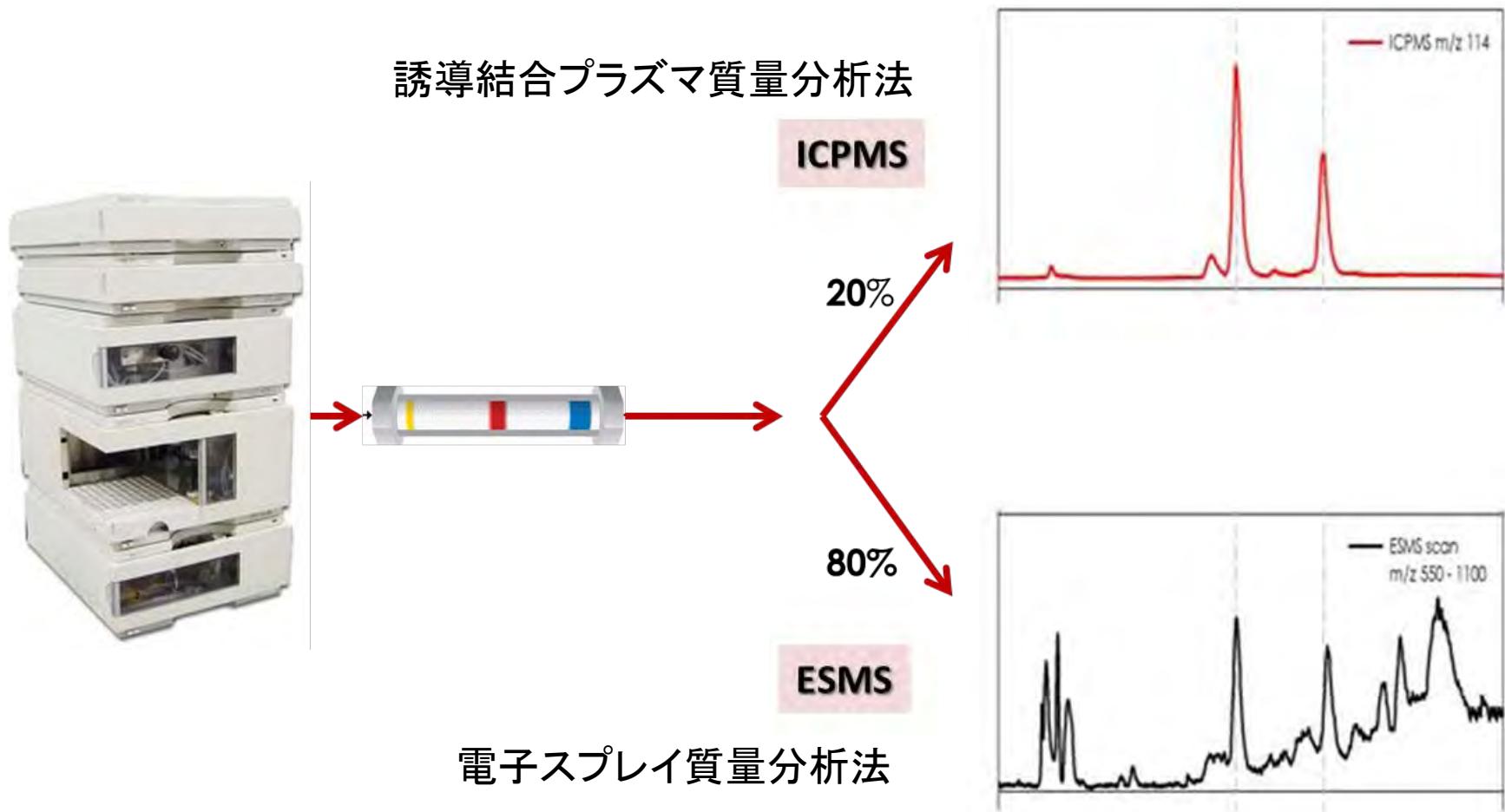
Modern methods for measuring arsenic species

HPLC/mass spectrometry



最新のヒ素化合物分析手法

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法



Inorganic arsenic (iAs): A potent human carcinogen!



- iAs in drinking water: A major global environmental problem ("safe" <10 µg/L)
- iAs – Cancers, cardiovascular disease, diabetes*?
- iAs in food? Organoarsenic species?
- Mode of toxic action unknown: Methylated intermediates are probably central to arsenic toxicity

*Gribble et al (2012), Am J Epidemiol 176(10):865-74.

無機ヒ素(iAs):ヒトに対して強い発がん物質である！

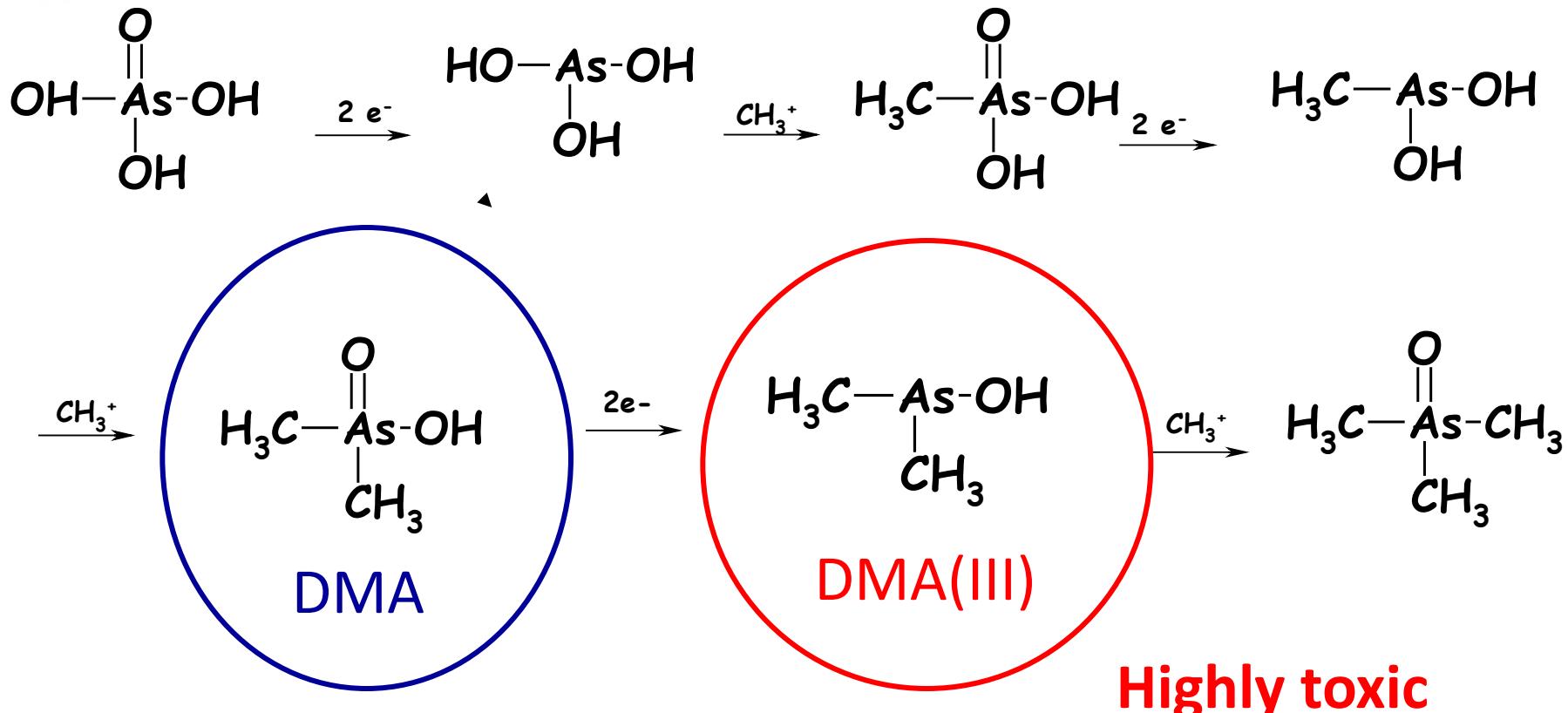


- 飲料水に含まれる無機ヒ素は: 地球規模の主要な環境問題 (“安全” $<10 \mu\text{g/L}$)
- 無機ヒ素 – がん、心血管疾患、糖尿病 * ?
- 食品中には無機ヒ素？ 有機ヒ素化合物？
- 未知の毒作用様式: メチル化された中間体がヒ素の毒作用の因となる主要物質と考えられる

*Gribble et al (2012), Am J Epidemiol 176(10):865-74.



Inorganic As metabolism

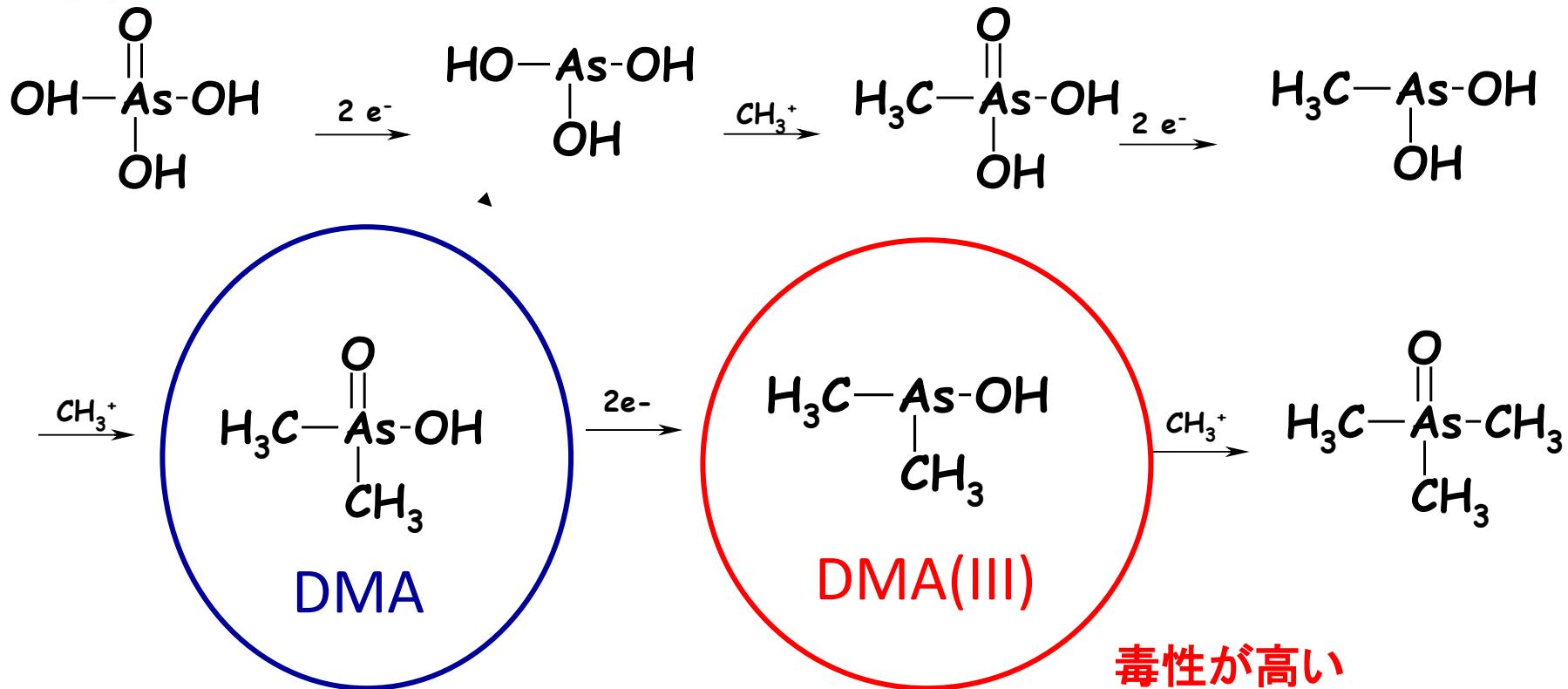


Later, we will see DMA again when we discuss organic arsenic metabolism

adapted from Challenger (1945) Chem Rev 36:315



無機ヒ素の代謝



後に有機ヒ素の代謝を解説するときに、再びDMA（ジメチルアルシン酸）について述べる。

adapted from Challenger (1945) Chem Rev 36:315

Arsenic in foods: some typical values

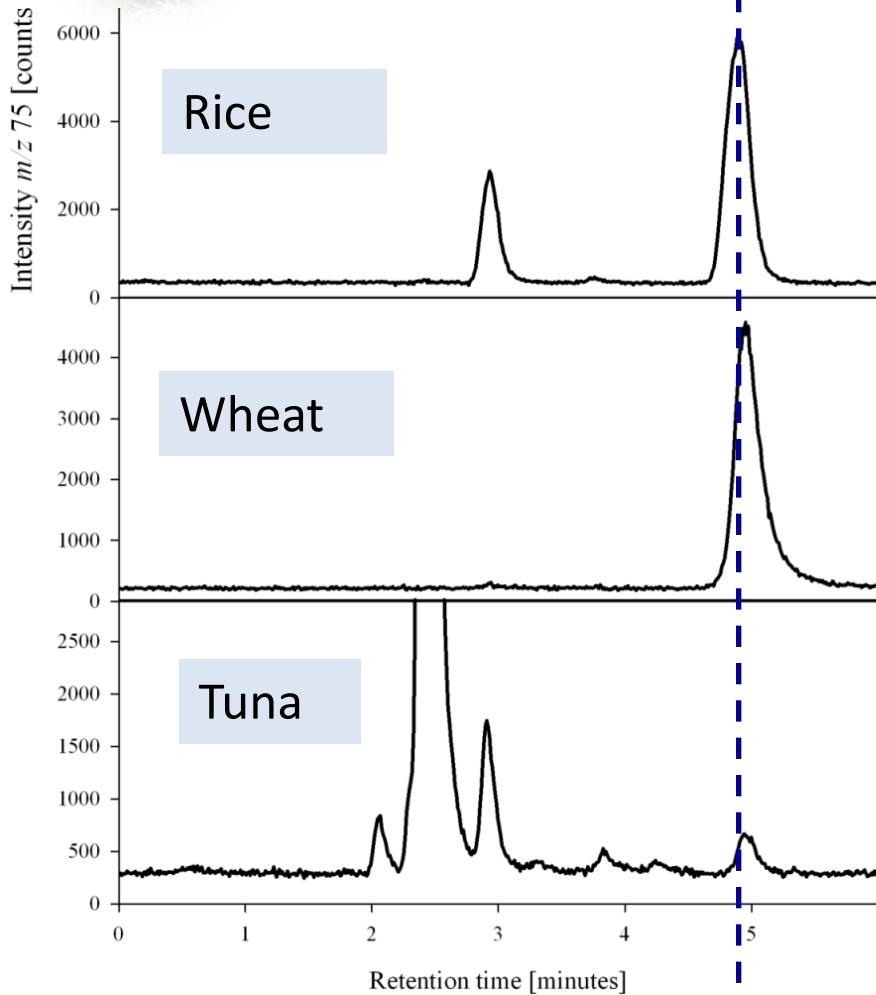
<u>Food type</u>	<u>µg As/g (wet wt)</u>
Fruit & vegetables	0.002 – 0.02*
Dairy products	0.002 – 0.02*
Meat & offal	0.003 - 0.03*
Rice	0.05 – 1.0
Freshwater fish	0.1 – 1.0
Seafood	2 – 20

*SCOOP (2004), EU Task 3.2.11

食品中のヒ素: 代表的な含有量

食品の種類	$\mu\text{g As/g}$ (湿重量)
果物・野菜類	0.002 – 0.02*
乳製品	0.002 – 0.02*
肉及び内臓	0.003 - 0.03*
米	0.05 – 1.0
淡水魚	0.1 – 1.0
海産物	2 – 20

*SCOOP (2004), EU Task 3.2.11



Arsenic species in rice, wheat & fish

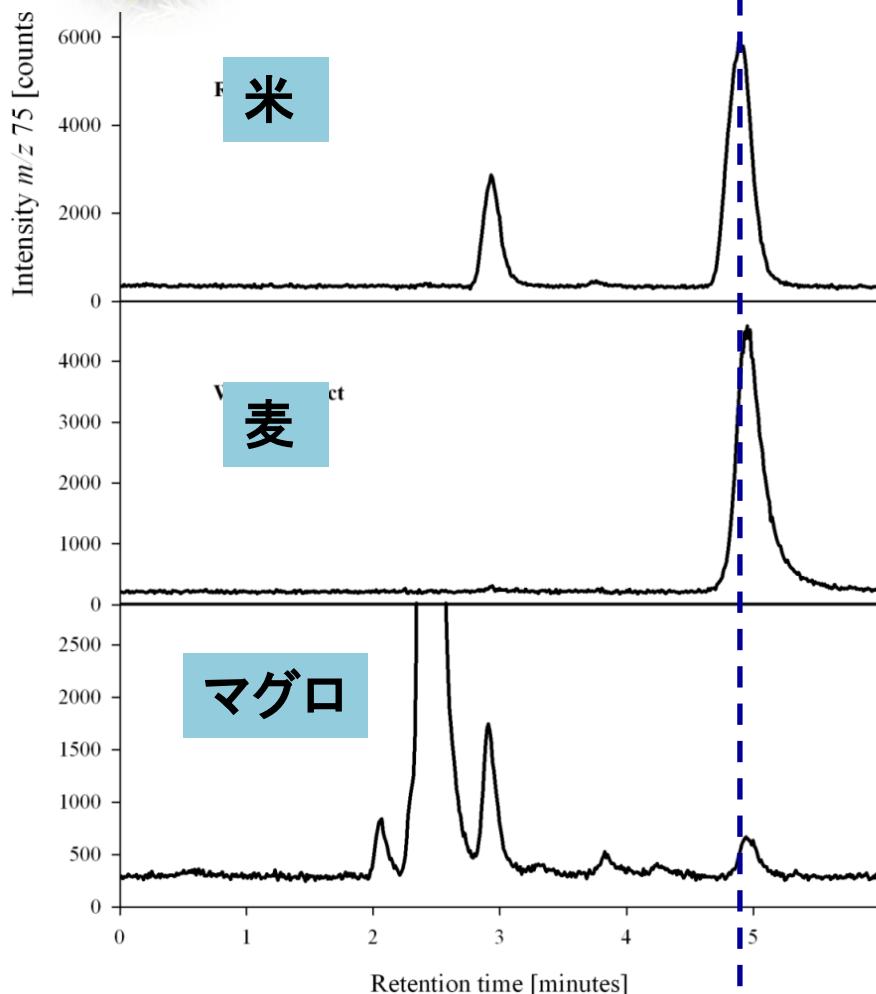
Inorganic arsenic (iAs) is a major species in rice and wheat

But in tuna iAs is minor. >95% of arsenic is present as **organic arsenic**



iAs

コメ、麦、及び魚に含まれる ヒ素の分子形態



米・麦に含まれるヒ素は、
主として無機ヒ素(iAs)の形で
存在する。

しかし、マグロではiAsは少なく、
95%以上のヒ素が**有機ヒ素**の
形で存在する。

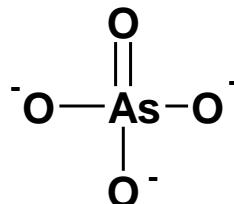
Raber et al (2012), Food Chem, 134:524-532

Arsenic species in seafood

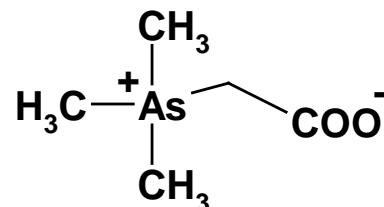
> 80 naturally occurring As species



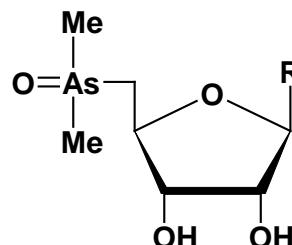
- ## • iAS - trace



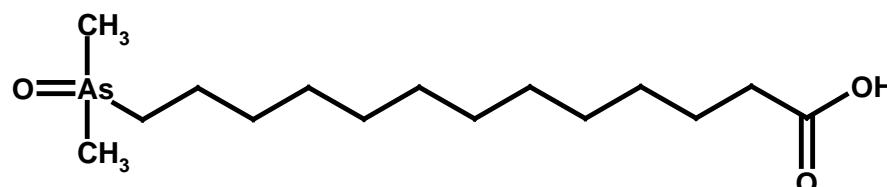
- Arsenobetaine



- Arsenosugars



- Arsenolipids



Rumpler et al (2008) *Angew. Chemie*, 47:2665-2667

Taleshi et al (2010) Environ Sci & Technol. 44:1478-1483

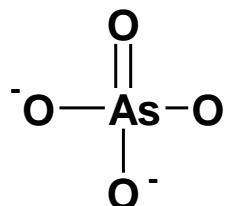
García-Salgado et al (2012), Environ Chem , 9:63-66

海産物中のヒ素の分子形態

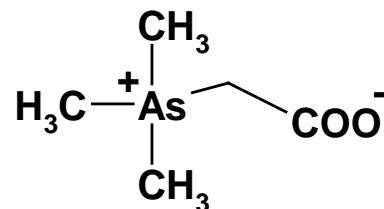
80種類以上のヒ素化合物が天然に存在



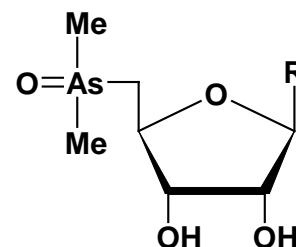
- iAs - trace(微量)



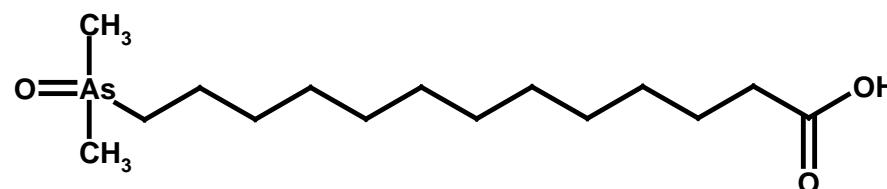
- Arsenobetaine
(アルセノベタイン)



- Arsenosugars
(砒素糖)



- Arsenolipids
(砒素脂質)

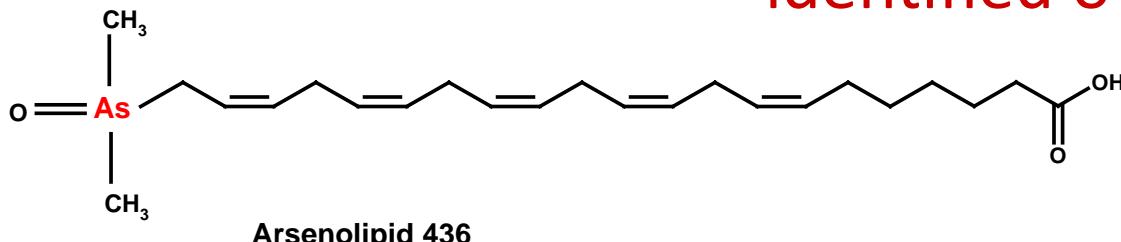
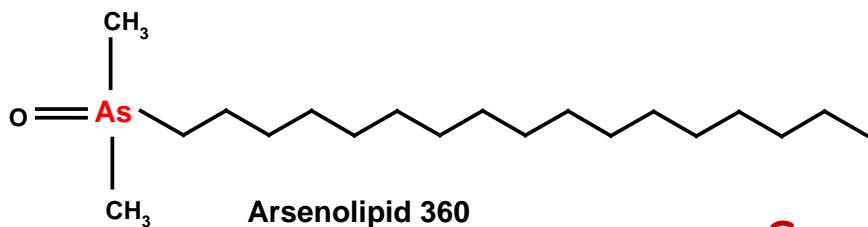
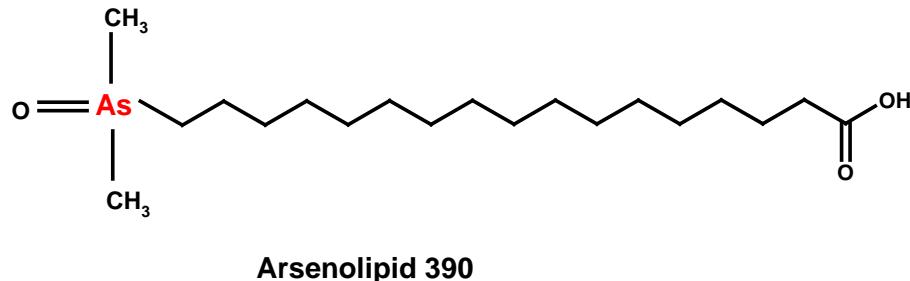
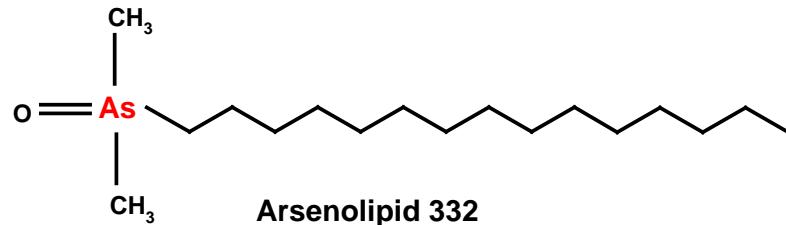


Rumpler et al (2008) *Angew. Chemie*, 47:2665-2667.

Taleshi et al (2010) Environ Sci & Technol, 44:1478-1483

García-Salgado et al (2012), Environ Chem , 9:63-66

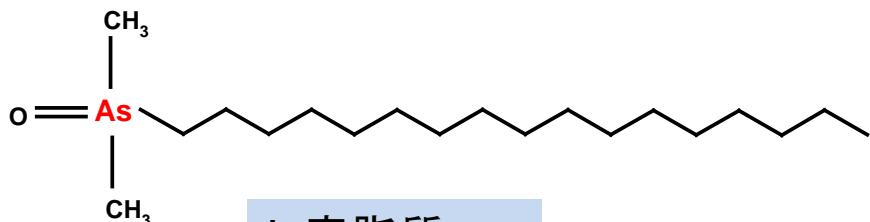
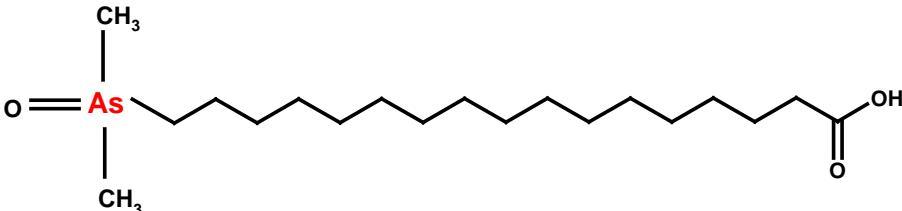
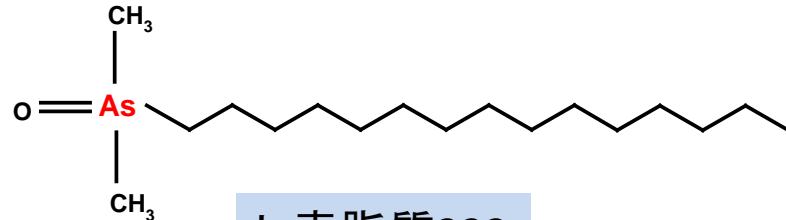
Arsenolipids in marine samples



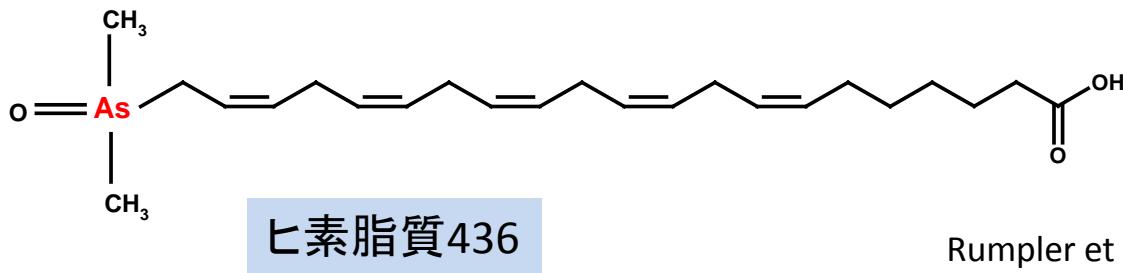
Some of the arsenolipids (>30)
identified over the last 5 years

- Rumpler et al (2008), *Angew. Chemie, Intl Ed.* 47:2665
Taleshi, et al (2008) , *Chem. Commun.*, 39: 4706-4707
Arroyo-Abad et al (2010), *Talanta*, 82:38-43
Amayo et al (2011), *Anal. Chem.*, in press

海産物に含まれるヒ素脂質類

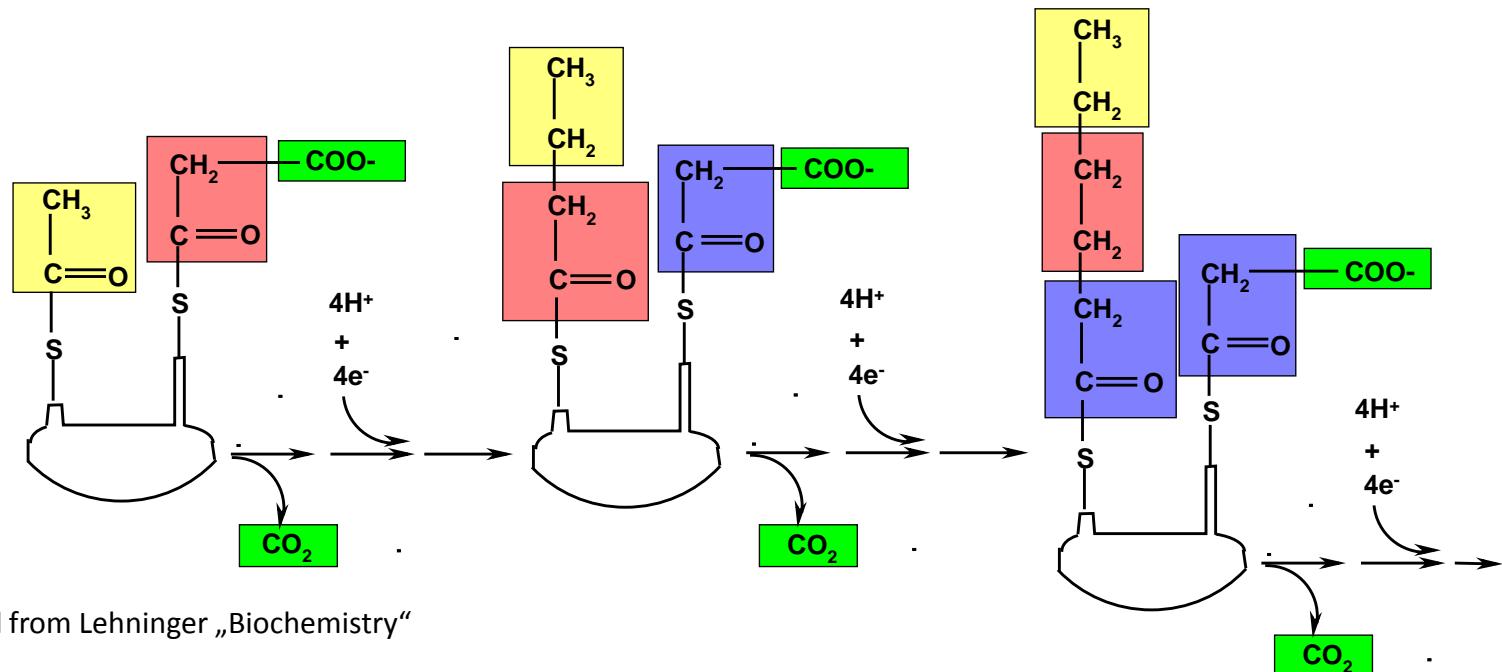


30種を超えるヒ素脂質が最近5年の間に同定されている



Rumpler et al (2008), *Angew. Chemie, Int'l Ed.* 47:2665
Taleshi, et al (2008) , *Chem. Commun.*, 39: 4706-4707
Arroyo-Abad et al (2010), *Talanta*, 82:38-43
Amayo et al (2011), *Anal. Chem.*, in press

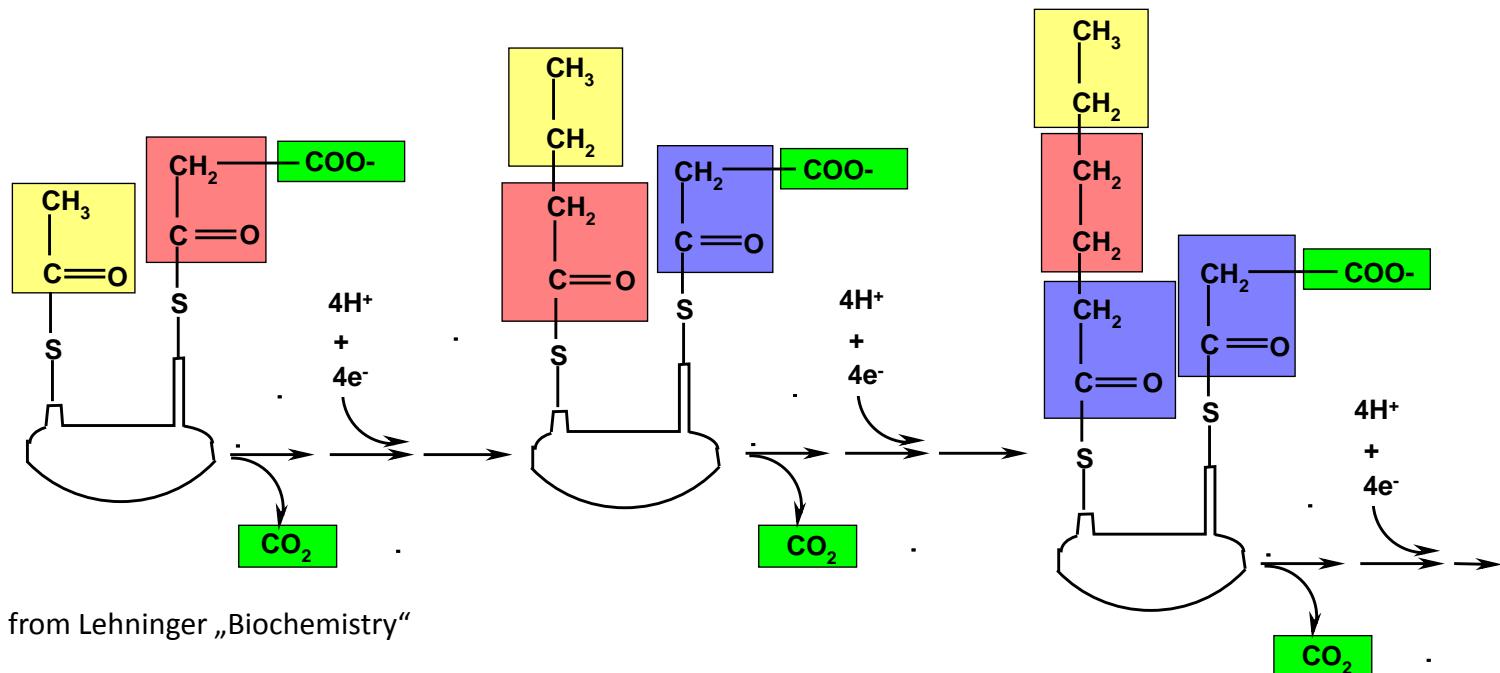
Fatty acid synthesis



Adapted from Lehninger „Biochemistry“

- Fatty acids built up by sequential addition of two-carbon units derived from acetyl CoA
- Prediction: for every fatty acid there will be an Arsenic fatty acids – biosynthetic infidelity?

脂肪酸合成



Adapted from Lehninger „Biochemistry“

- 脂肪酸は、炭素鎖にアセチルCoA から供給される炭素2個ずつ増加して生合成される。
- 予測として、全ての脂肪酸にヒ素結合型のヒ素脂肪酸が存在すると予測される — 生合成の非忠実性によるものか？

Arsenolipids in Japanese foods!



日本の食品に含まれるヒ素脂質！



Arsenolipids in sashimi tuna

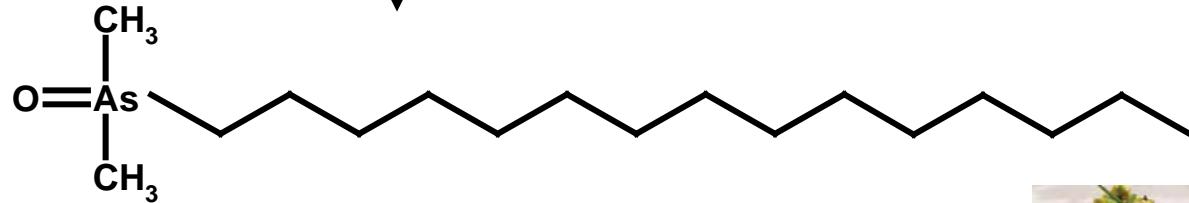


Tuna, 6 mg As/kg

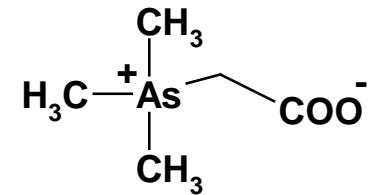


Fat-soluble

Water-soluble



ca 50% is lipid As



Currently investigating the uptake, cytotoxicity & biotransformation of arsenolipids with Prof Tanja Schwerdtle (Uni Potsdam)

マグロの刺身に含まれるヒ素脂質

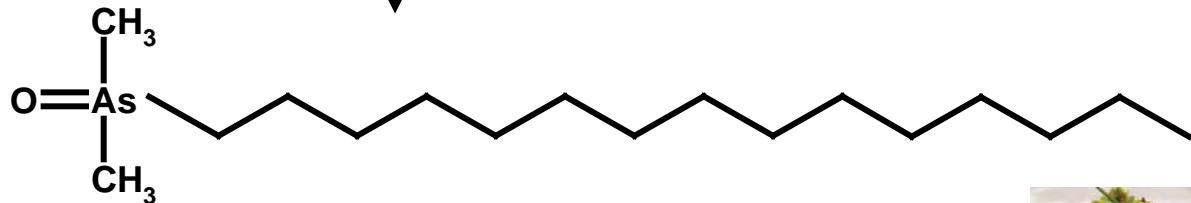


マグロに含まれるヒ素
6 mg As/kg

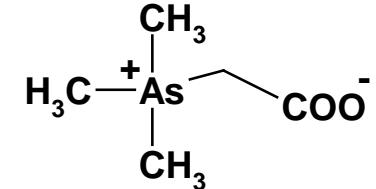


脂溶性

水溶性

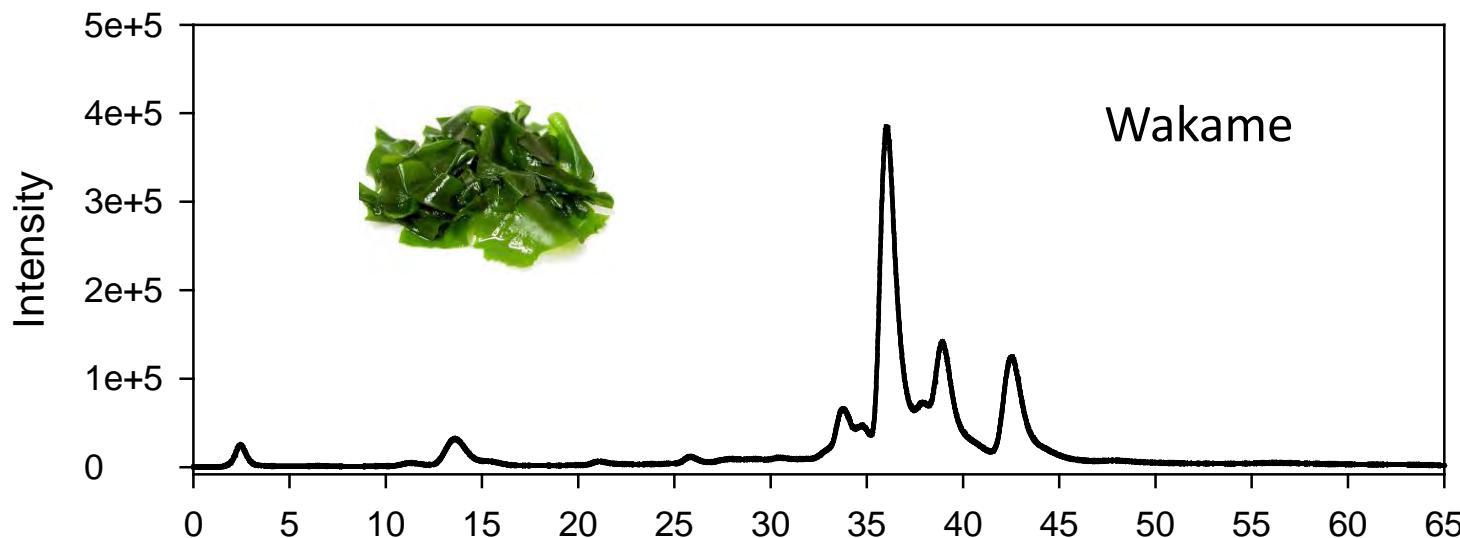
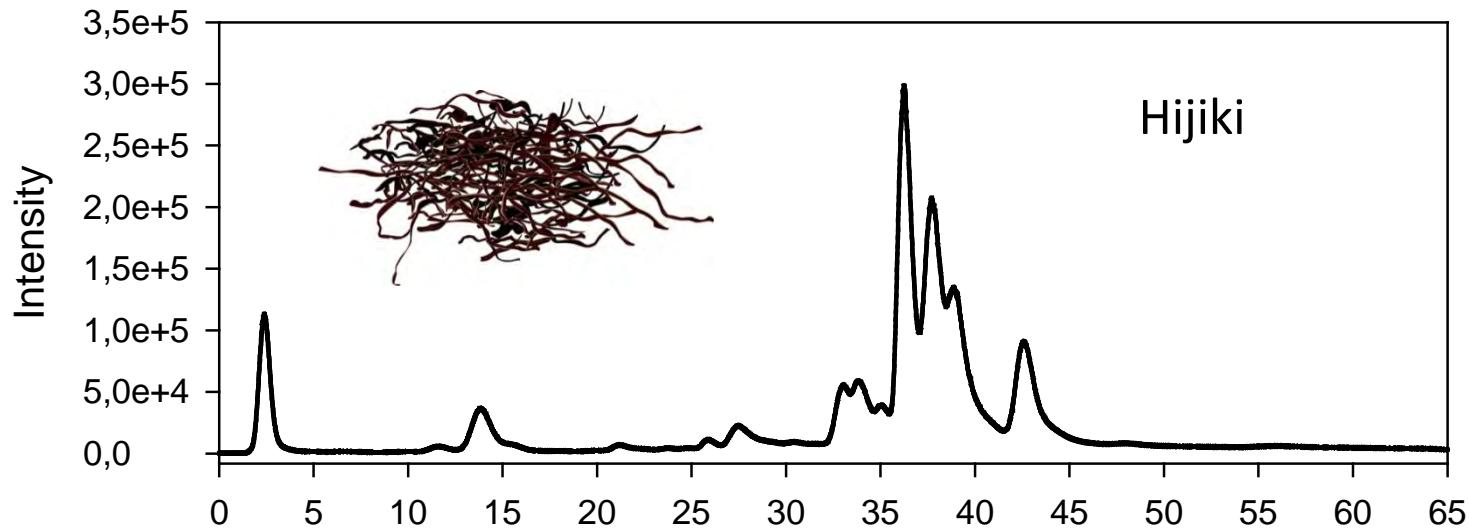


約50%は、ヒ素脂質である

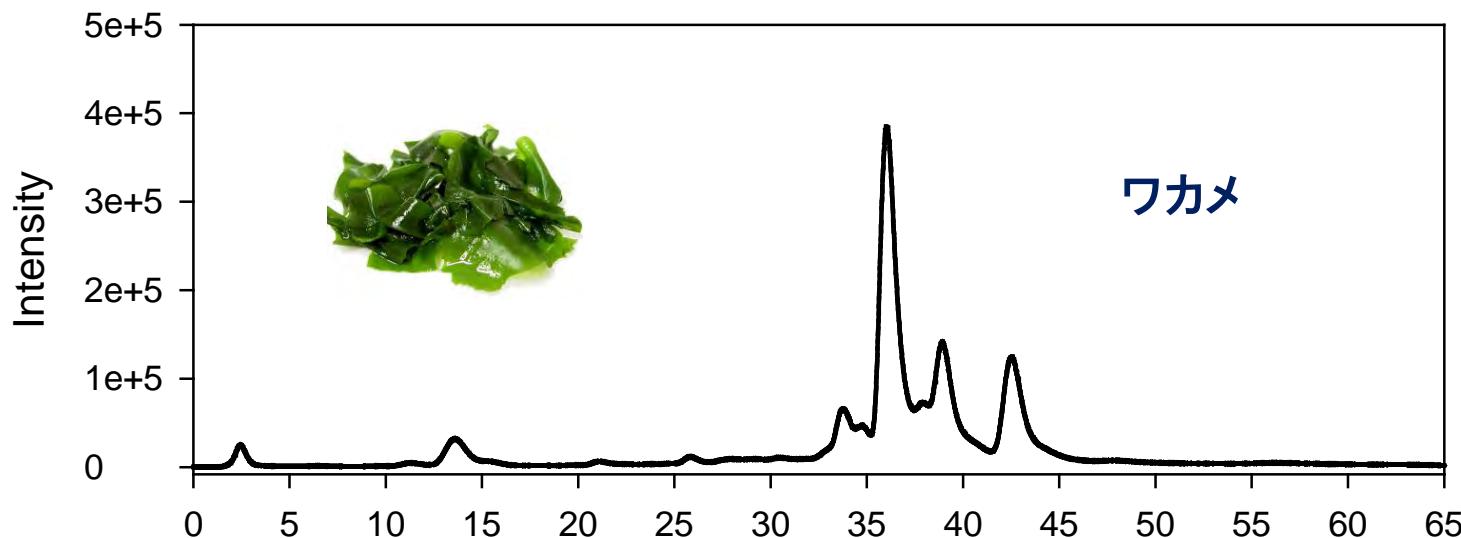
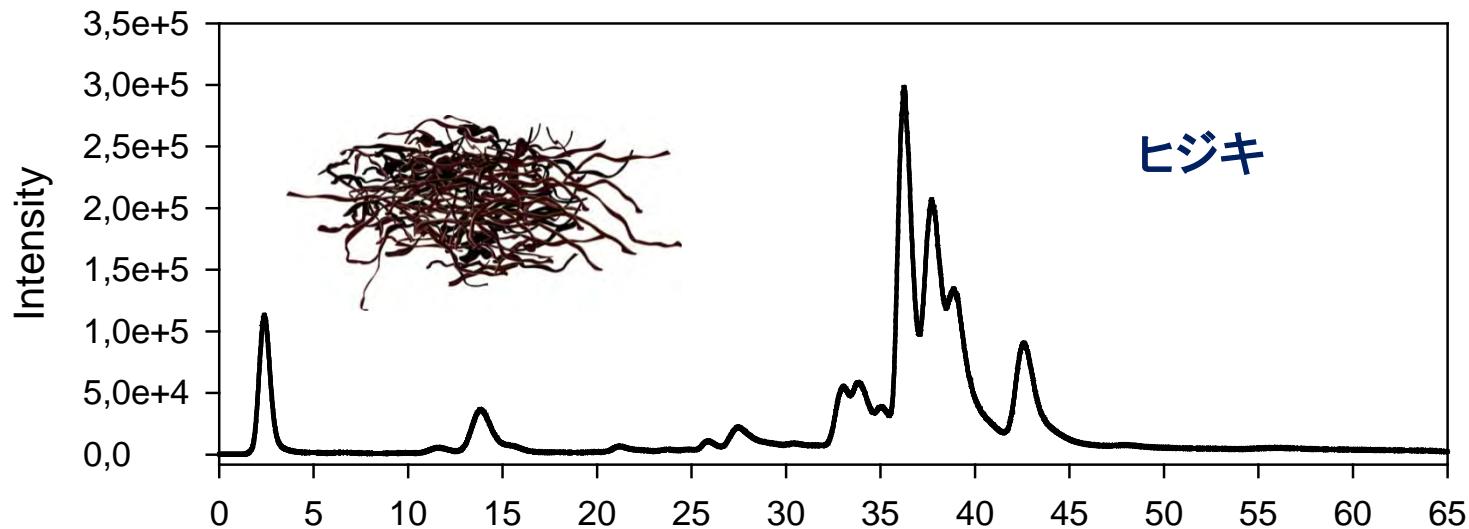


現在、ヒ素脂質の吸収、細胞毒性及び生体内変化に関して、
Prof Tanja Schwerdtle (Potsdam 大学)との共同研究が進んでいる

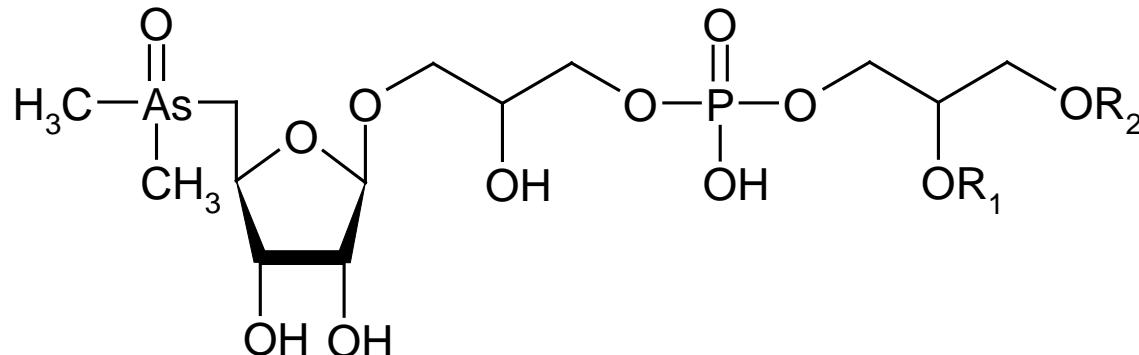
HPLC/ICPMS: Hijiki & Wakame



HPLC/ICPMSによるヒジキとワカメのヒ素測定



New arsenolipids (phospholipids)



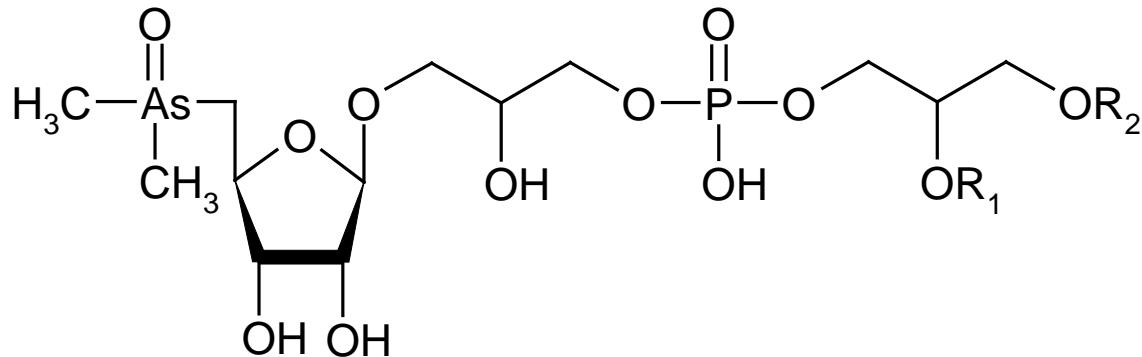
Arsenosugar-phospholipids

Approx 20 new compounds have been identified in the last 2 years by high resolution mass spectrometry

These lipid compounds probably degrade to arsanosugars in marine samples

García-Salgado (2012), *Environ Chem* 9:63-66
Raab et al (2013) *Anal Chem*, 85:2817–2824

新しいヒ素脂質(リン脂質)



過去2年間に、高解析能質量分析法によって、およそ20種類の新しいヒ素脂質化合物が同定されている。

それらの脂質化合物は、海産物食品中でおそらくヒ素糖に変化する。

García-Salgado (2012), *Environ Chem* 9:63-66
Raab et al (2013) *Anal Chem*, 85:2817–2824

Overview

- Why investigate arsenic in food?
- The analytical methods
- Inorganic arsenic and organic arsenic
- **Why is there so much organic arsenic in sea foods?**
- Metabolism of organic arsenic species
- Cytotoxicity of arsenosugars & arsenolipids

論点

- ・なぜ食品中のヒ素を調査するのか
- ・分析手法
- ・無機ヒ素と有機ヒ素
- ・なぜ海産食品の有機ヒ素濃度は高いのか
- ・有機ヒ素化合物の代謝
- ・ヒ素糖およびヒ素脂質の細胞毒性

Why so much arsenic in sea foods?

Group 15



The answer probably lies in the fact that **As** chemistry has similarities to **N** and **P** chemistry

Group 15 in the Periodic Table

なぜ海産食品の有機ヒ素濃度は高いのか

Group 15



ヒ素の化学は、窒素及びリンの化学と類似しているという事実に、その答えがあると思われる。

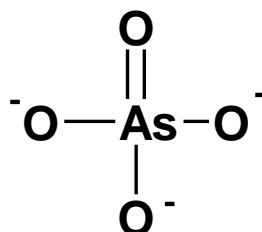
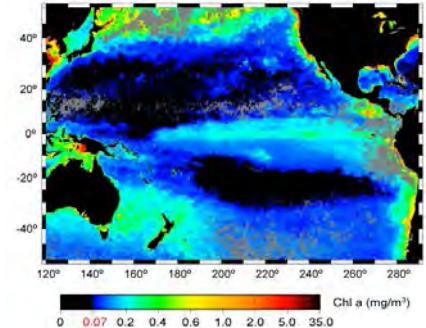
この三つの元素は、周期律表で
第15グループに属する

Arsenate & phosphate

Concentrations in seawater

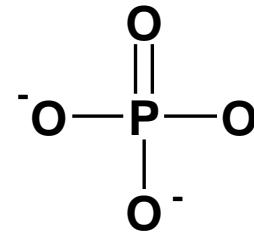
$$[\text{Arsenate}] = 0.01 - 0.02 \mu\text{M}$$

$$[\text{Phosphate}] = 0.02 - 3 \mu\text{M}$$



$$\text{pK}_{2a} = 6.77$$

H_2AsO_4^- ionic
radius 2.48 Å



$$\text{pK}_{2a} = 7.21$$

H_2PO_4^- ionic
radius 2.38 Å

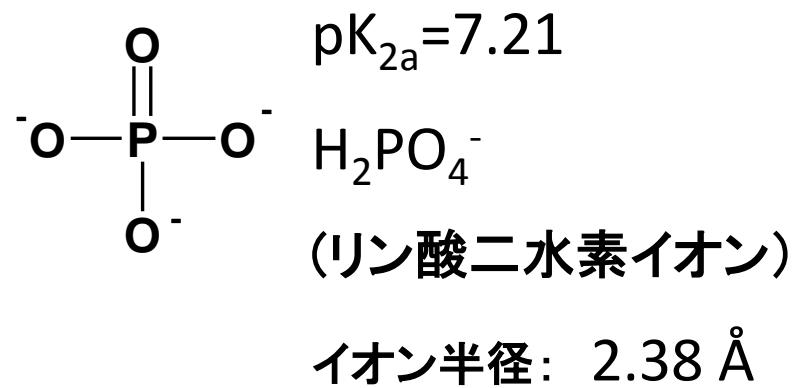
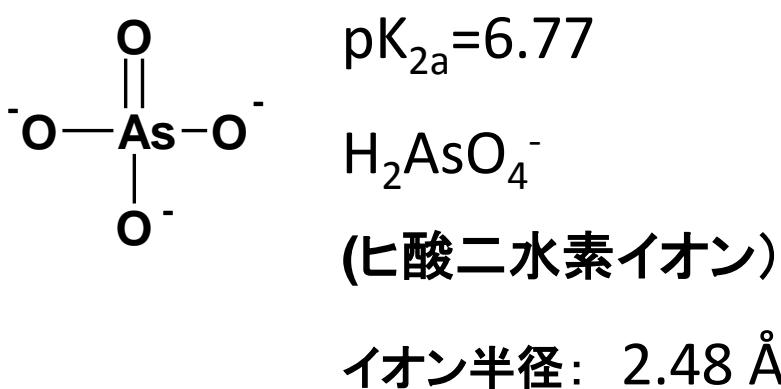
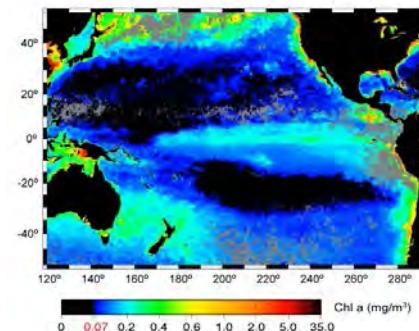
Arsenate enters the organism (algae) by phosphate uptake systems (the algae are unable to distinguish AsO_4^{3-} from PO_4^{3-})

ヒ酸塩とリン酸塩の類似点

海水中の濃度

$$[\text{ヒ酸塩}] = 0.01 - 0.02 \mu\text{M}$$

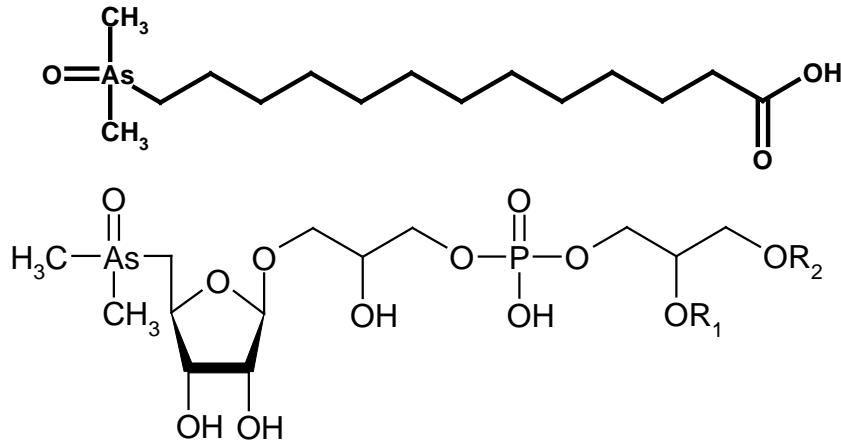
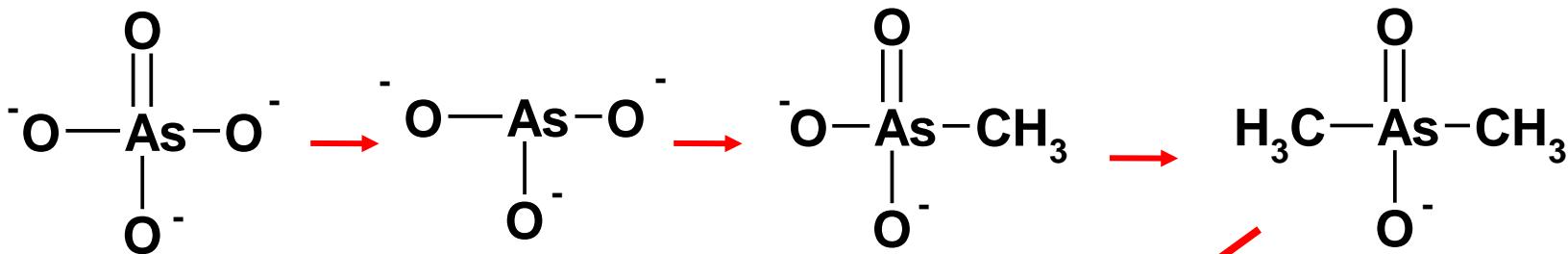
$$[\text{リン酸塩}] = 0.02 - 3 \mu\text{M}$$



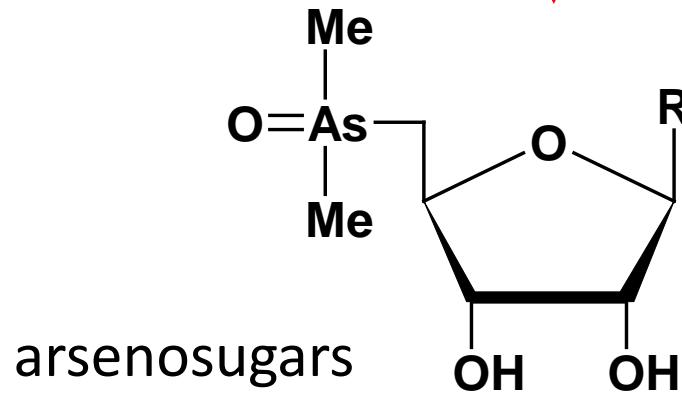
ヒ酸塩は、リン酸塩取り込み機構を介して生物(藻類)に入っていく。

藻類はヒ酸(AsO_4^{3-})とリン酸(PO_4^{3-})を識別できない。

Biotransformation (detoxification?) of arsenate by algae

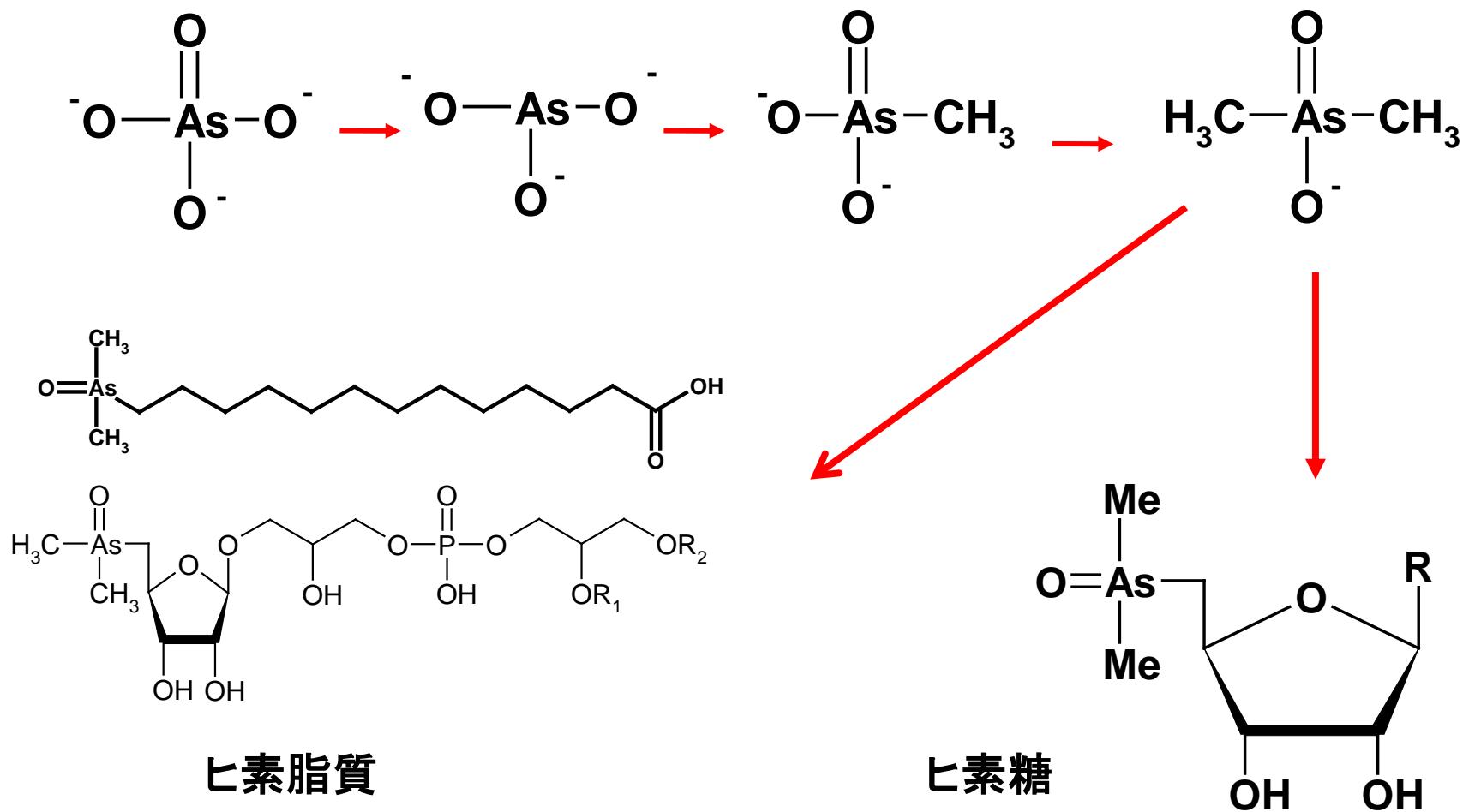


arsenolipids

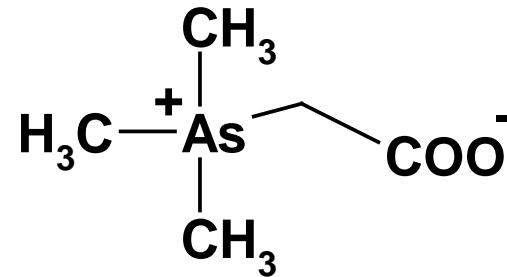
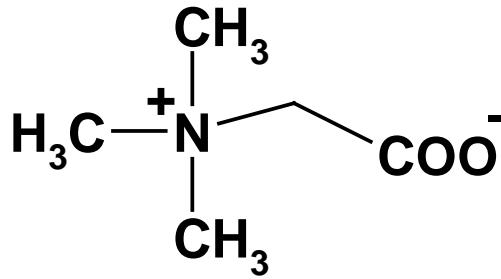




藻類によるヒ酸塩イオンの 生体内変化(解毒?)

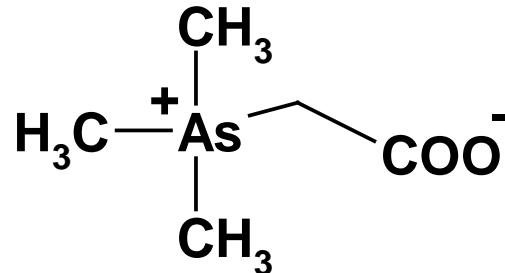
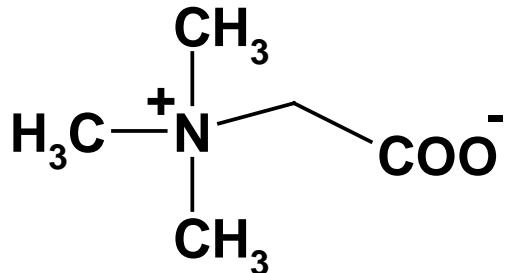


Glycine betaine & arsenobetaine



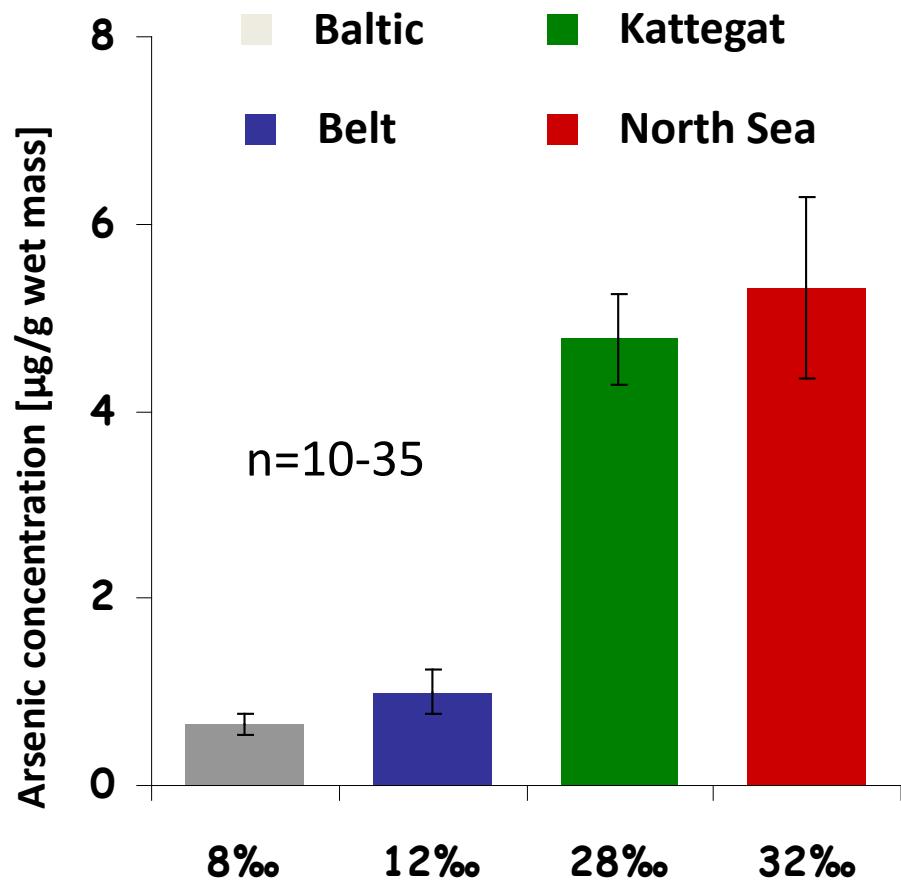
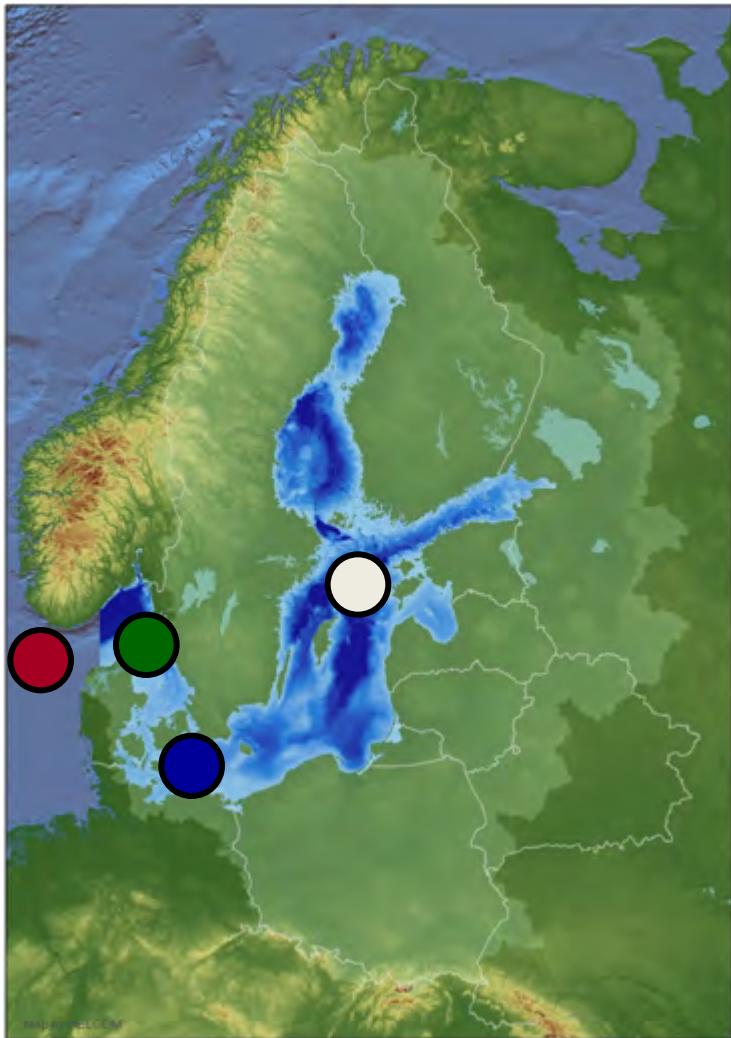
- Glycine betaine is taken up cells to maintain osmotic balance
- Glycine betaine levels increase with salinity
- Does arsenobetaine behave the same way?

グリシンベタインとアルセノベタイン



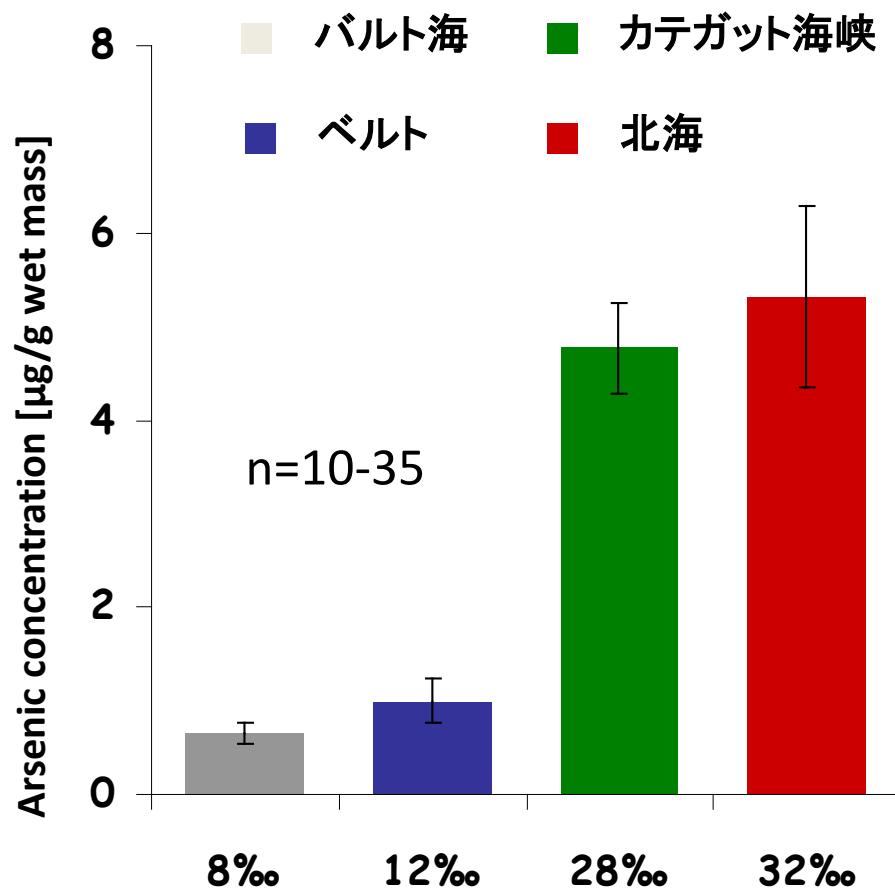
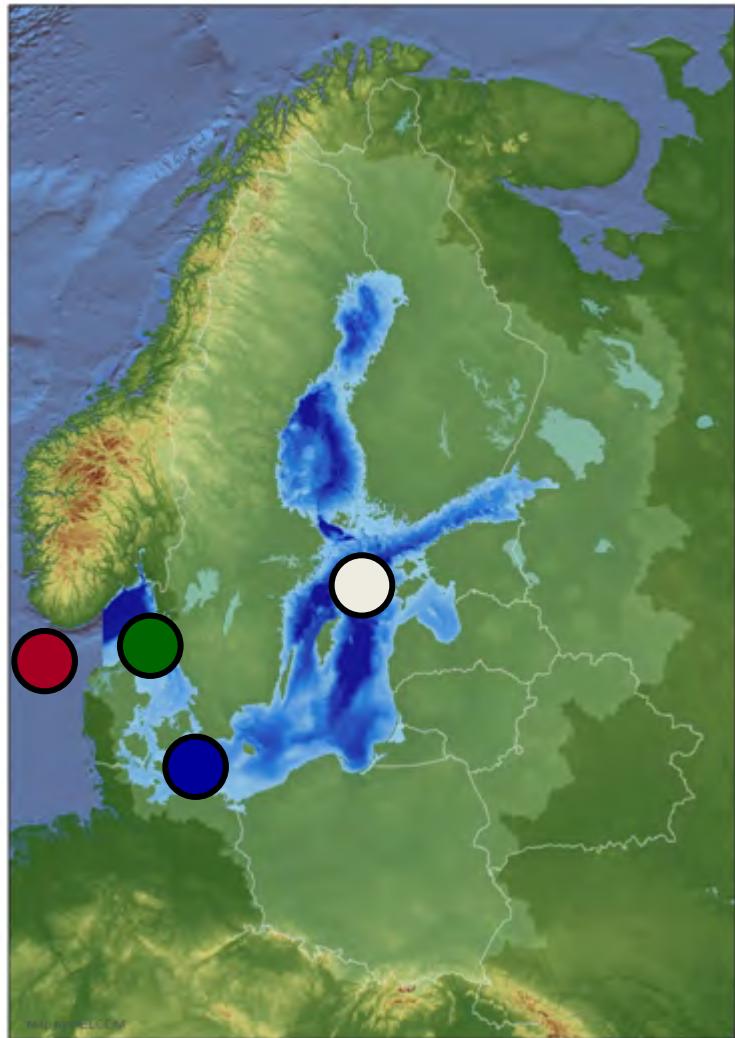
- グリシンベタインは細胞に取り込まれて、浸透圧バランスの維持に働く
- グリシンベタインの細胞内濃度は塩度とともに上昇する
- アルセノベタインは、グリシンベタインと同じような挙動をするのだろうか？

[As] in cod: Relation to salinity



Larsen & Francesconi (2003), J. Mar Biol Ass UK, 83:283

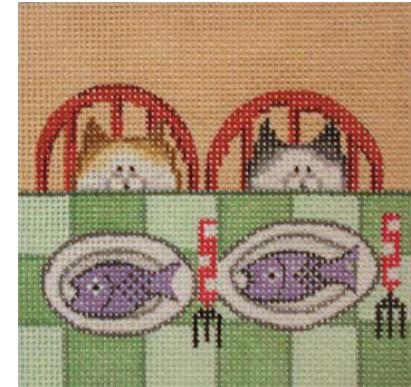
タラに含まれるヒ素(As): 塩度との関係



Larsen & Francesconi (2003), J. Mar Biol Ass UK, 83:283 42

Metabolism of organic arsenic

Changes that take place after the dinner table



Human metabolism

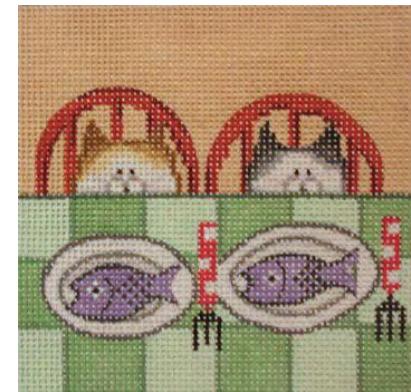
- Uptake
- Disposition
- Biotransformation
- Elimination



**Arsenic
metabolites**

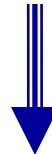
有機ヒ素化合物の代謝

ディナー テーブル(食事)の後に進む変化



ヒトにおける代謝

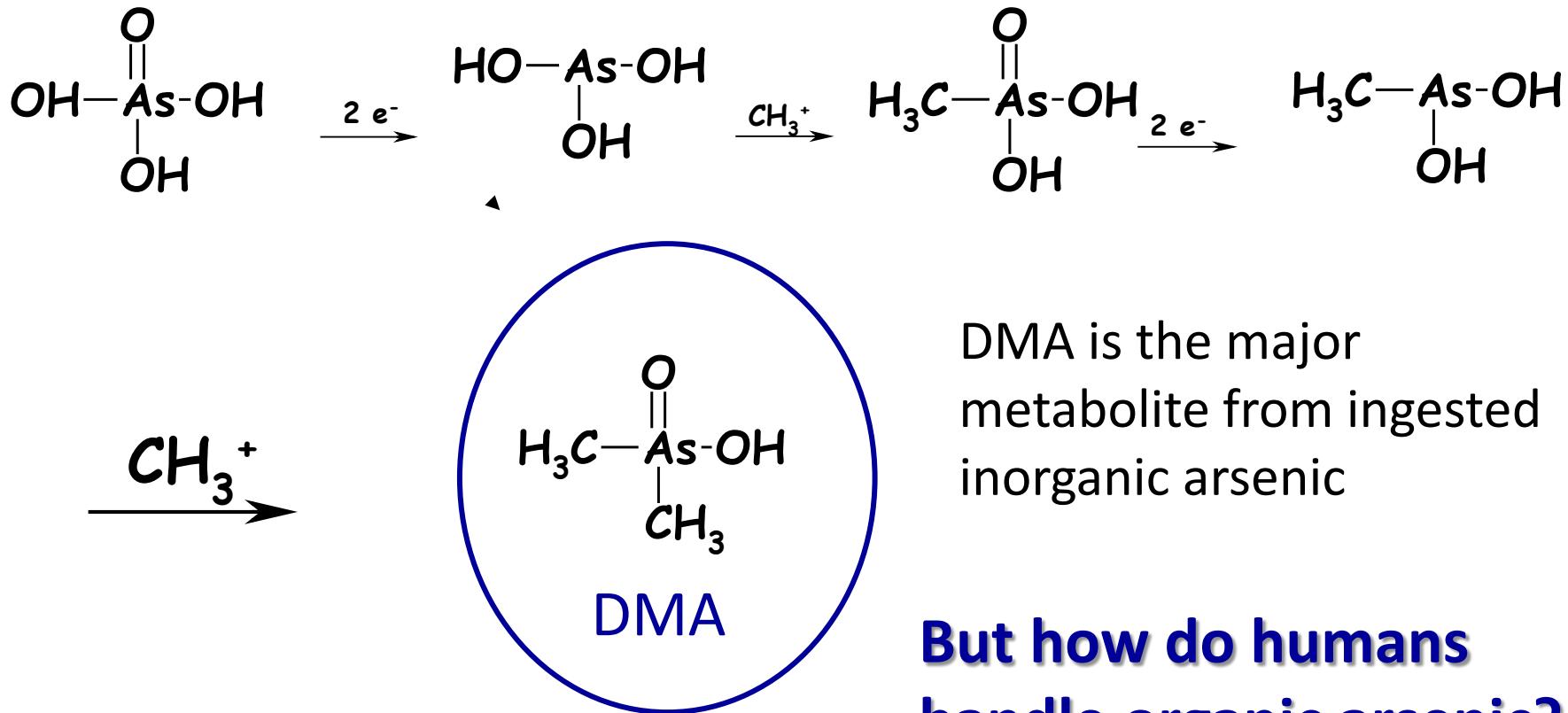
- 取り込み
- 分布
- 生体内変化
- 除去



ヒ素
代謝物



We know that humans convert iAs into DMA

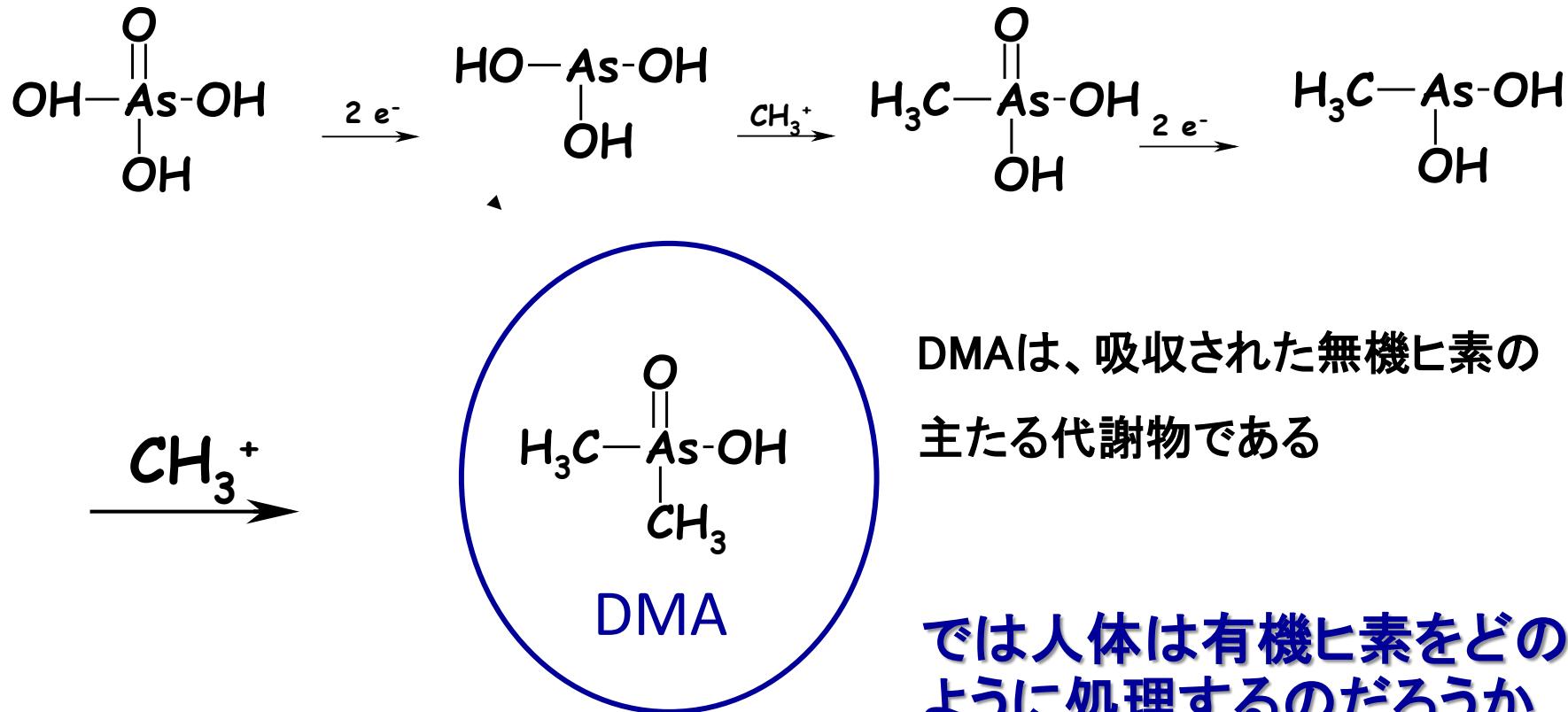


DMA is the major metabolite from ingested inorganic arsenic

But how do humans handle organic arsenic?



ヒトは無機ヒ素(iAs)を DMA(ジメチルアルシン酸)に変換する

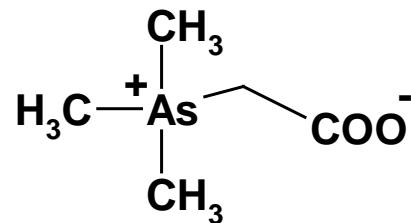


DMAは、吸収された無機ヒ素の
主たる代謝物である

では人体は有機ヒ素をどの
ように処理するのだろうか

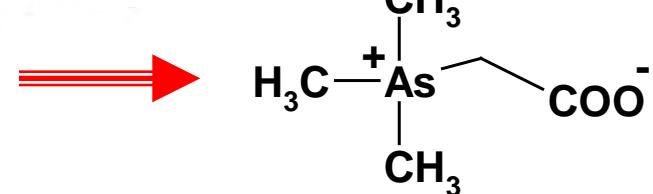
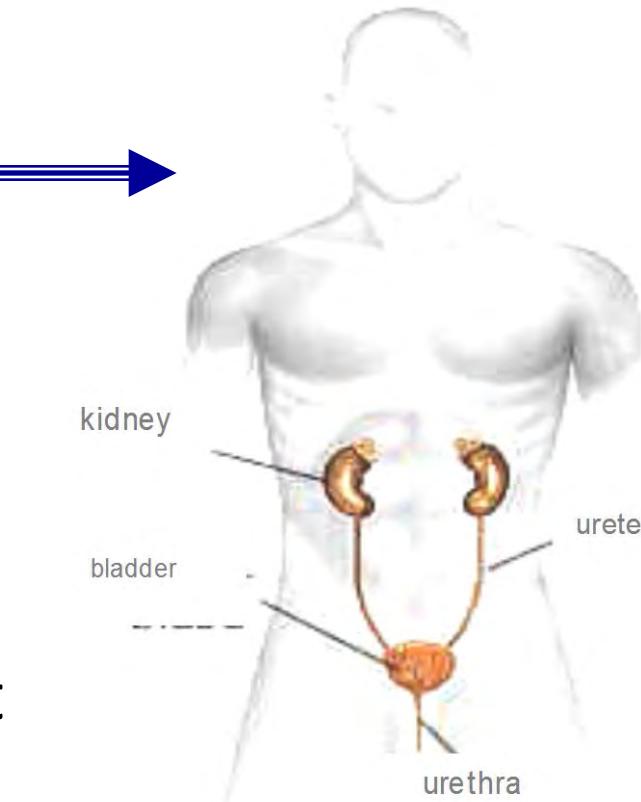
adapted from Challenger (1945) Chem Rev 36:315

Arsenobetaine - IN and OUT

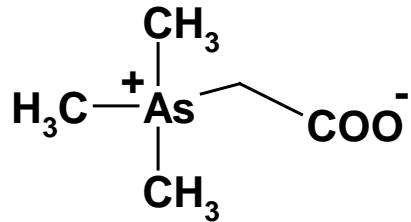


arsenobetaine

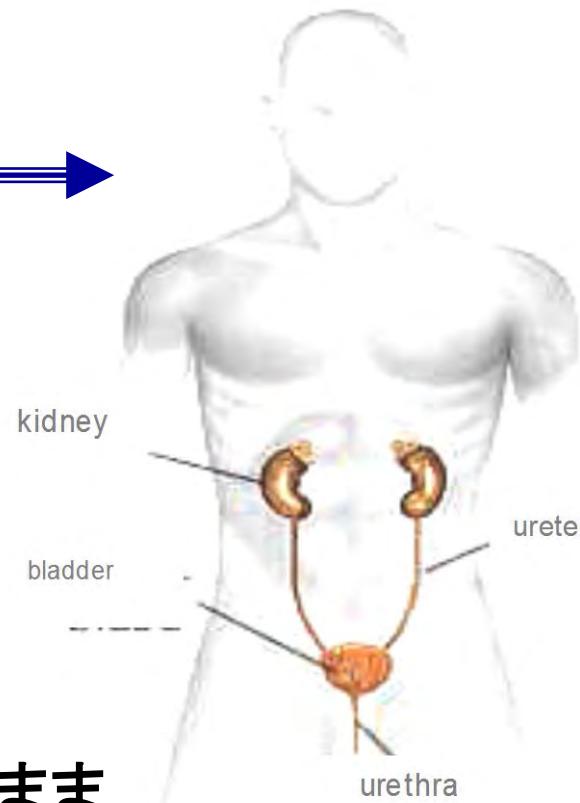
- Taken up
- Metabolically inert
- Excreted in urine – essentially unchanged



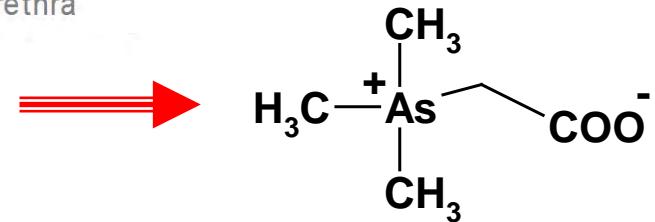
アルセノベタイン — 吸収と排泄



アルセノベタイン



- ・ 吸収
- ・ 代謝を受けない
- ・ 変化しない化学構造のまま
尿中に排泄される





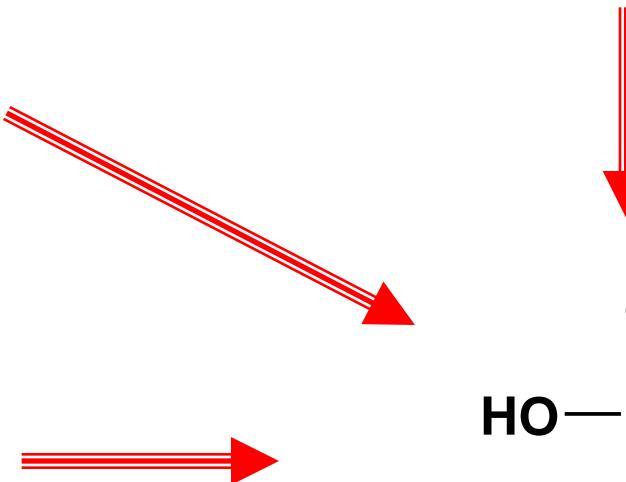
inorganic arsenic



arsenolipids



arsenosugars



Dimethylarsinate (DMA)
is the major metabolite
in all cases



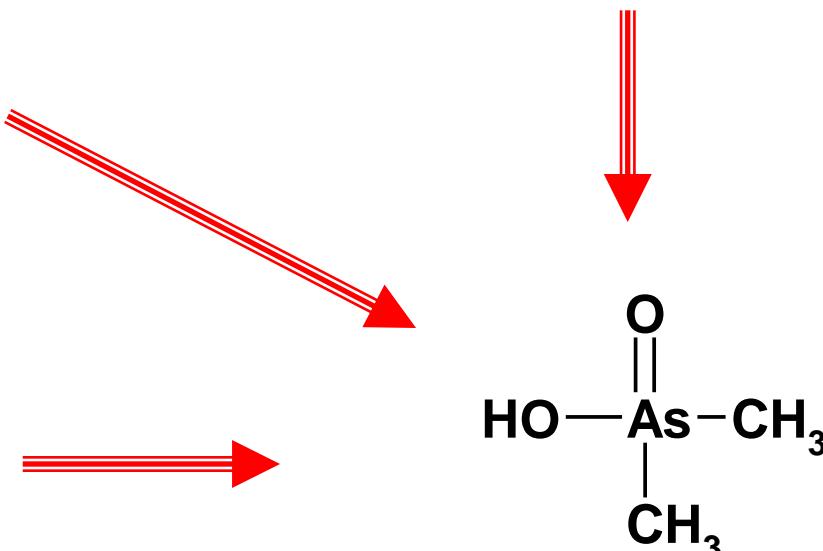
無機ヒ素



ヒ素脂質



ヒ素糖



ジメチルアルシン酸 (DMA)は
共通の主要な代謝産物である

Cytotoxicity of arenosugars & arsenolipids

- A joint project with the University of Potsdam (Prof Tanja Schwerdtle)
- Synthesis of arenosugars & arsenolipids
- Uptake by & toxicity to bladder & liver cells
- Investigate biotransformation of arsenolipids

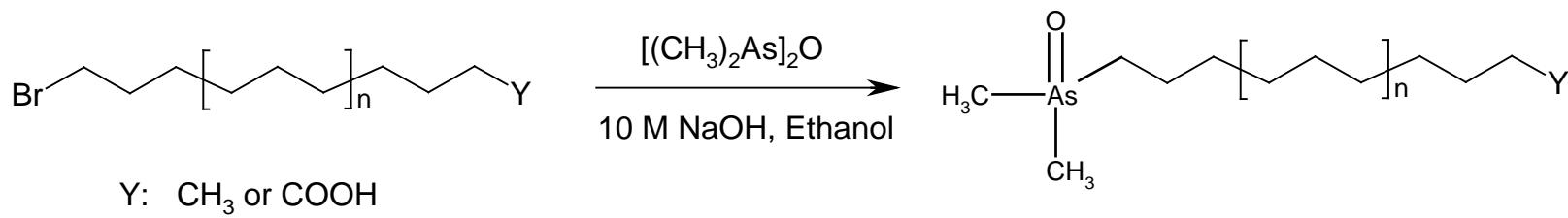
Arenosugars shown to have no significant toxicity

ヒ素糖とヒ素脂質の細胞毒性

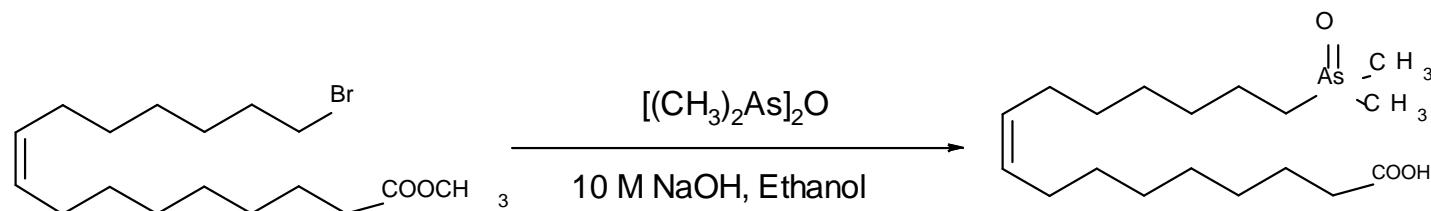
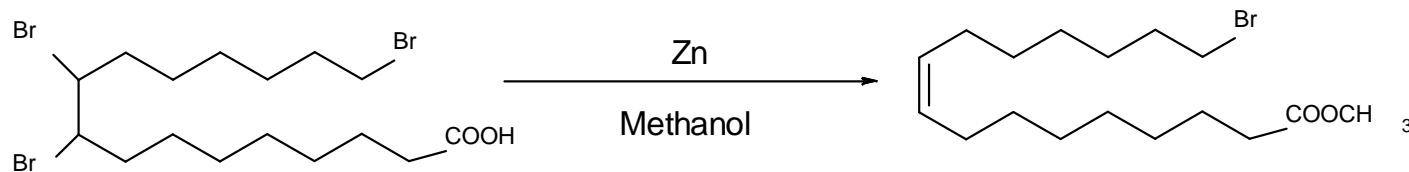
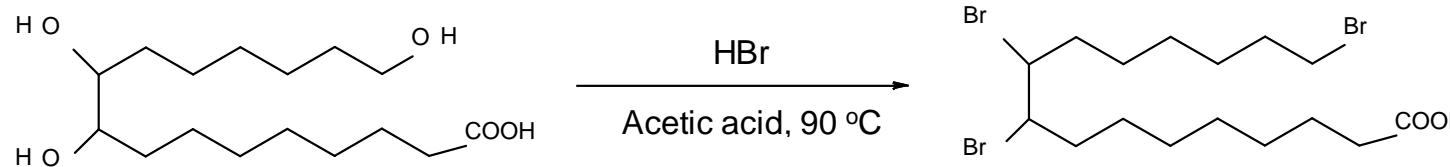
- Prof Tanja Schwerdtle (Potsdam 大学)との共同研究プロジェクト
- ヒ素糖およびヒ素脂質の合成
- 膀胱と肝細胞による取り込みと細胞毒性
- ヒ素脂質の生体内変化の研究

ヒ素糖には有意な毒性は無いことが示された

Synthesis of arsenolipids

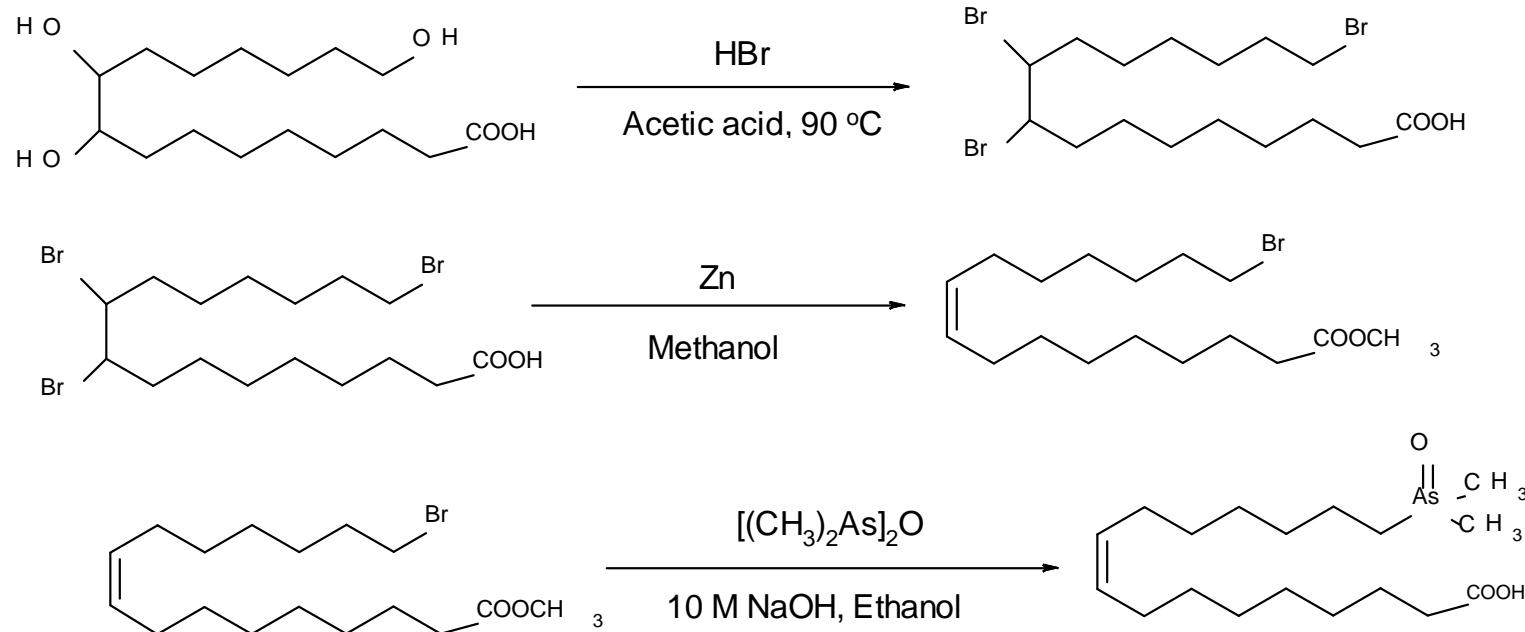
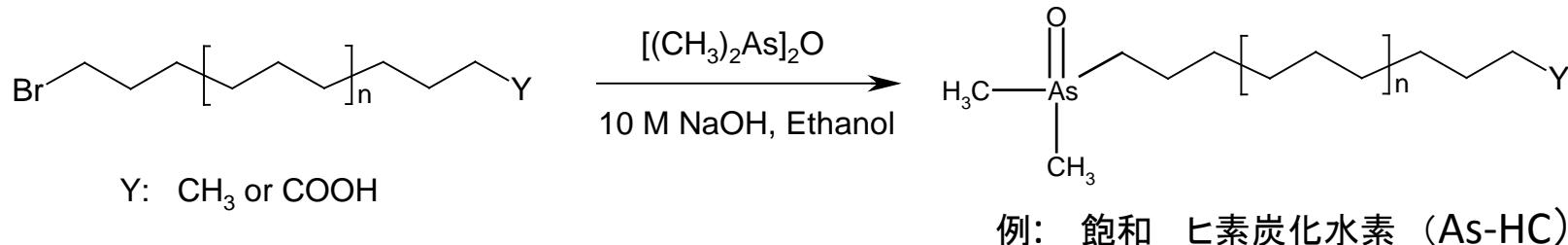


Example: saturated As-HC



Example: unsaturated As-FA

ヒ素脂質の合成反応



例: 不飽和 ヒ素脂肪酸 (As-FA)

Toxicological screening

- human non-metabolising bladder cells (UROtsa)
- metabolically active liver cells (HepG2)
- short term studies
 - quantification of viable cells & cell vitality
- long term studies
 - quantification of cell division
- genotoxicity studies
- bioavailability studies
 - uptake of arsenic compounds

This & the following slides were provided
by Sören Meyer, Uni Potsdam

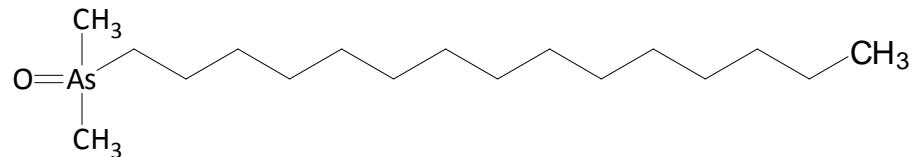
毒生物学的スクリーニング

- 代謝活性も持たないヒト膀胱細胞 (UROtsa)
- 代謝活性を持つ肝細胞(HepG2)
- 短期的研究
 - 生存可能な細胞と細胞の生存
- 長期的研究
 - 細胞分裂の定量化
- 遺伝毒性研究
- バイオアベイラビリティ(生物学的利用能)研究
 - ヒ素化合物の吸収取り込み

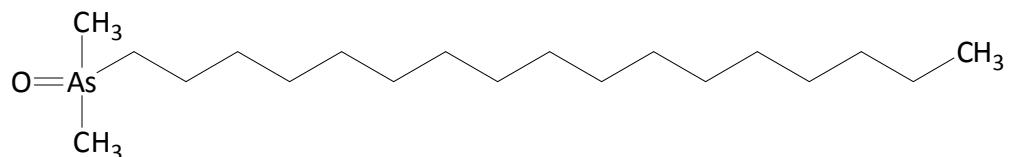
本スライド、および以降のスライドは
Sören Meyer, Uni Potsdam から供与された

Arsenolipids: – toxicity test arsenicals

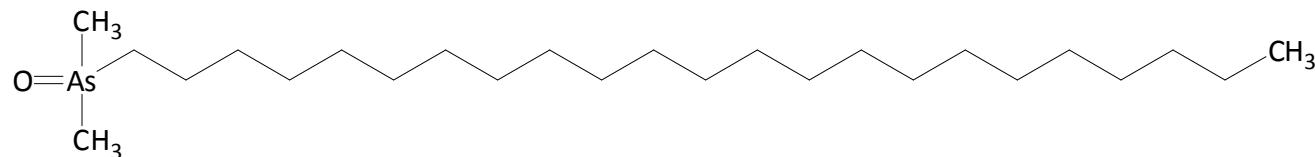
AsHC 332



AsHC 360

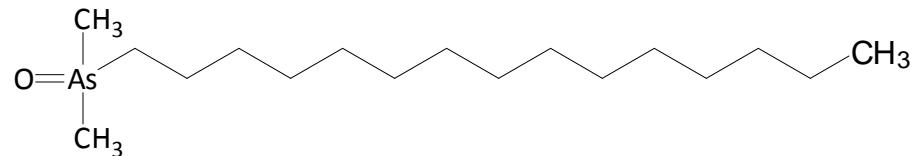


AsHC 444

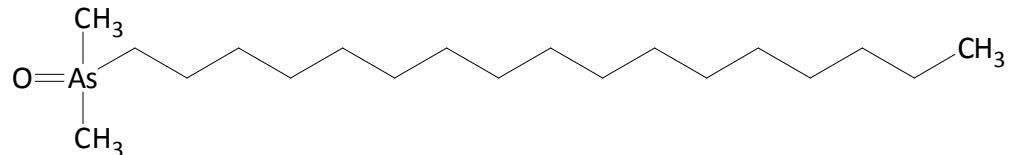


ヒ素脂質： 毒性をテストしたヒ素炭化水素類

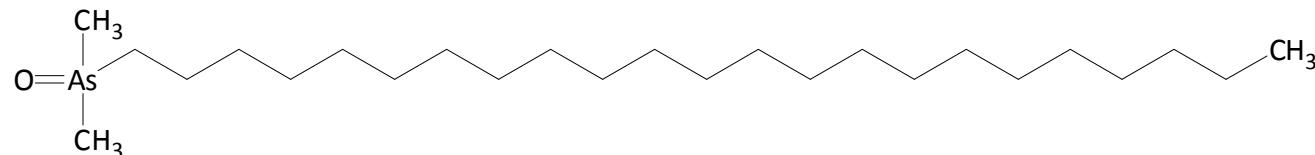
AsHC 332



AsHC 360

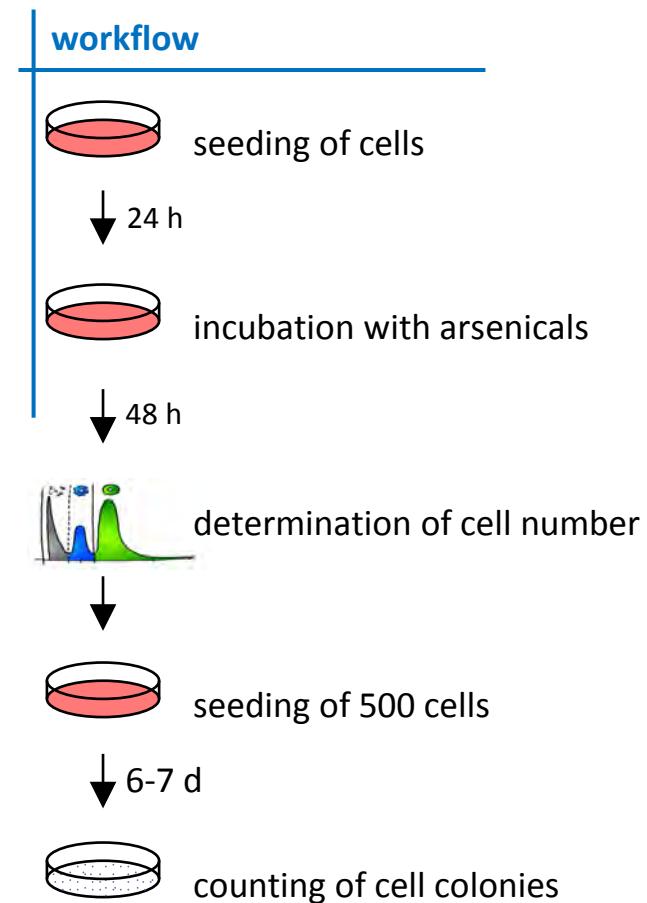
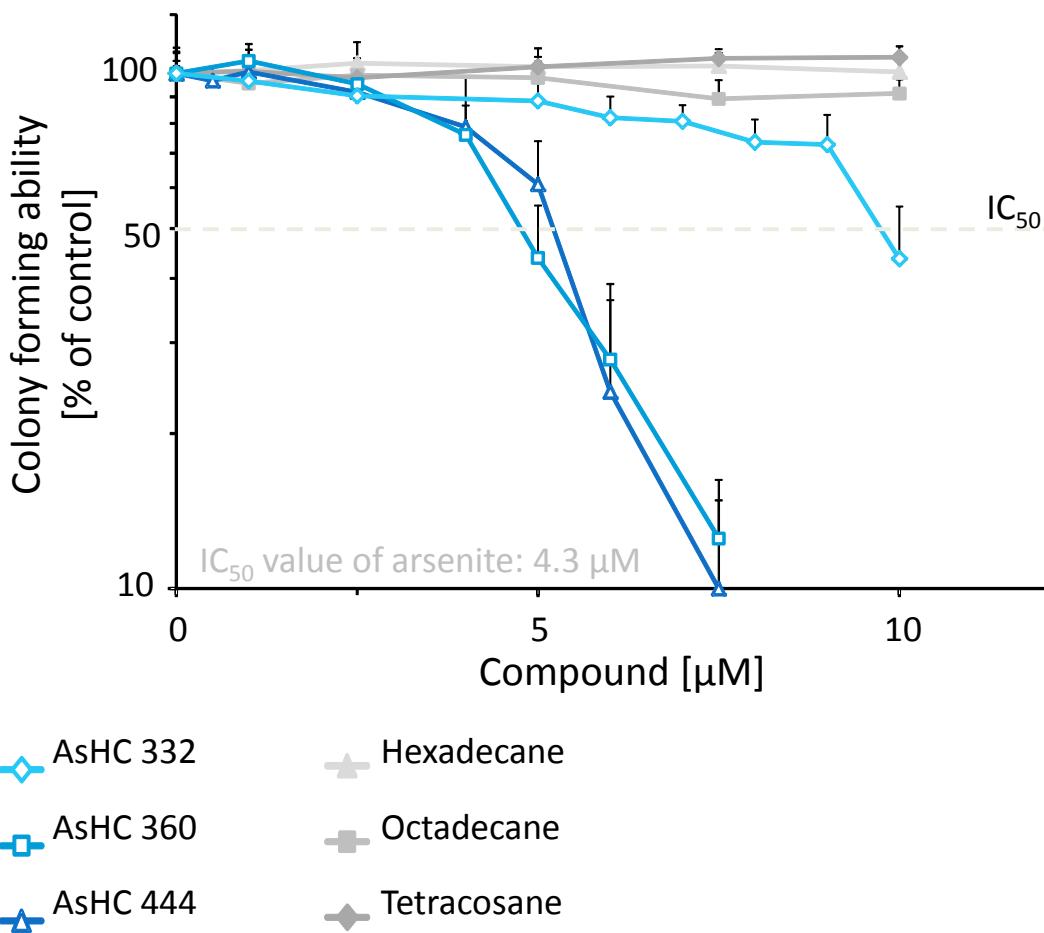


AsHC 444



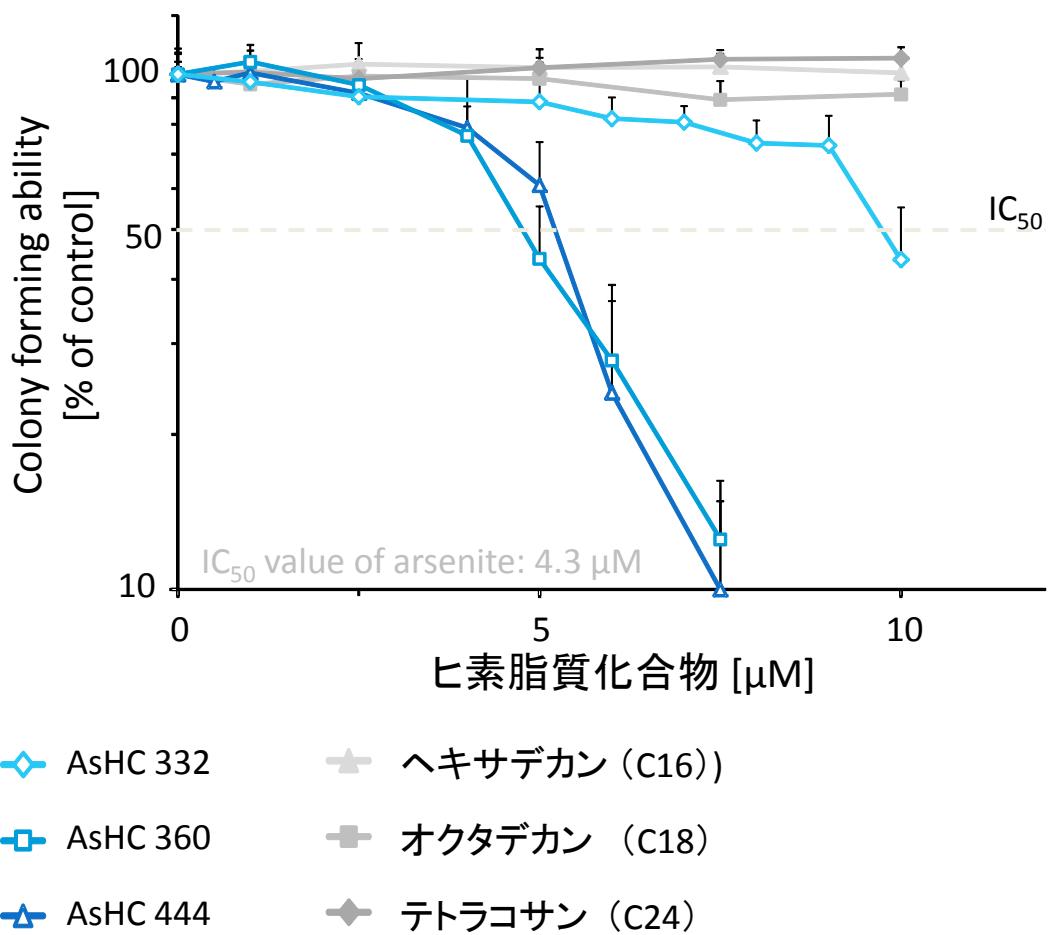
Toxicity in bladder cells (UROtsa)

- most sensitive endpoint: colony forming ability

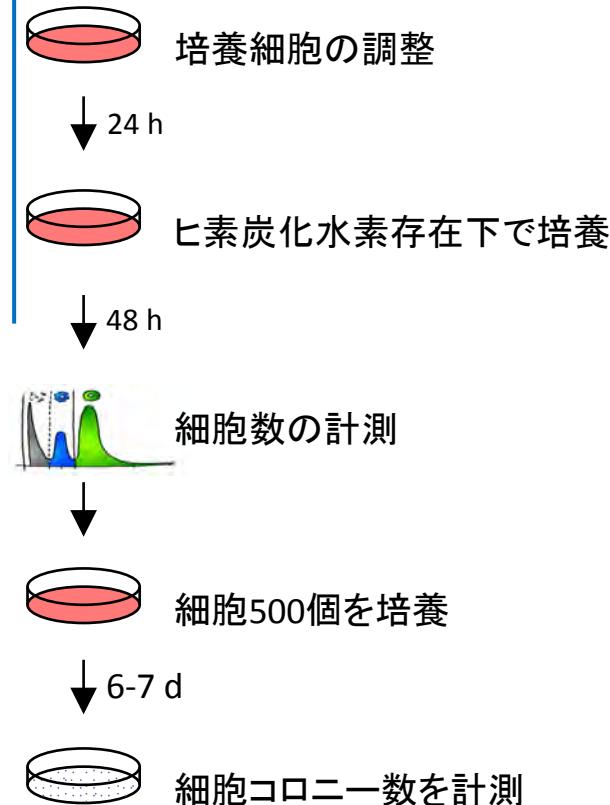


膀胱細胞(UROtsa) にみられる毒性

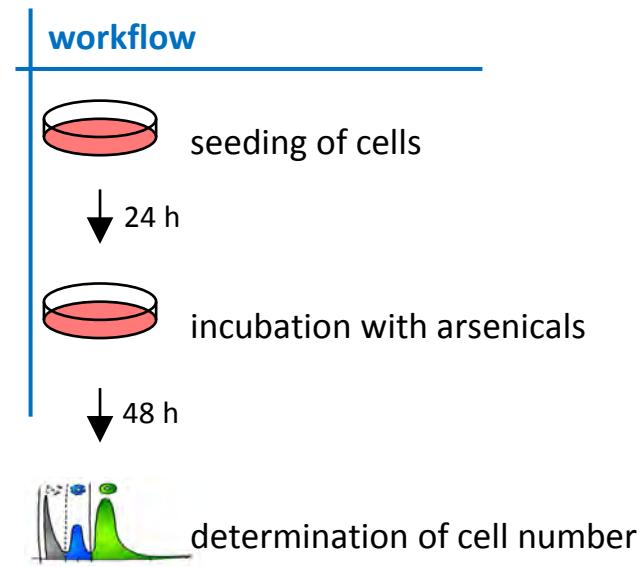
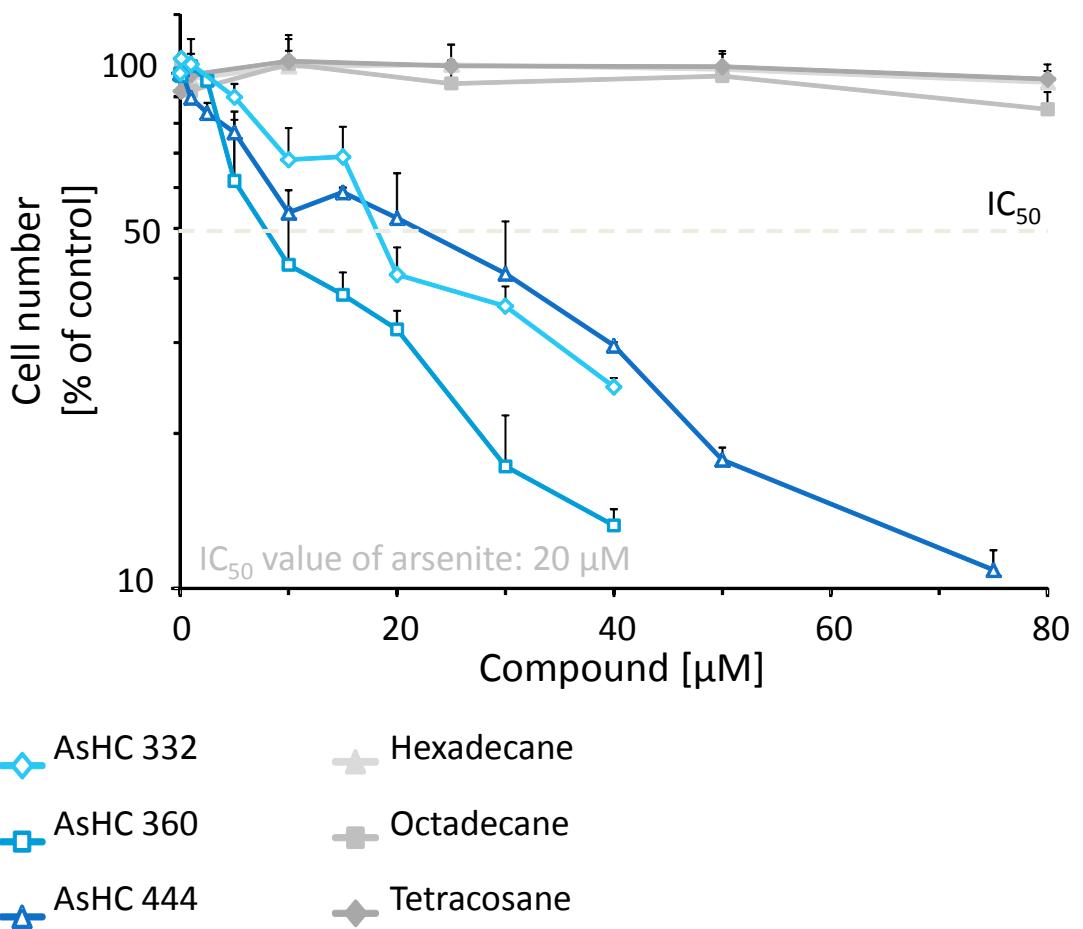
最も高感度なエンドポイント：コロニー形成能



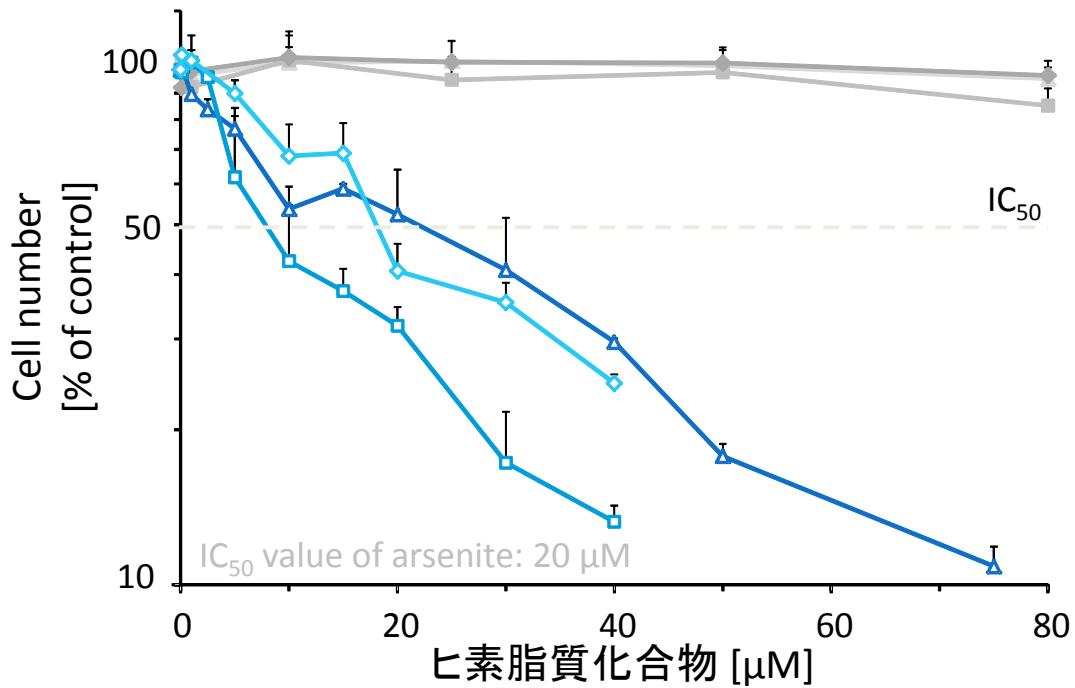
実験室における検査手順



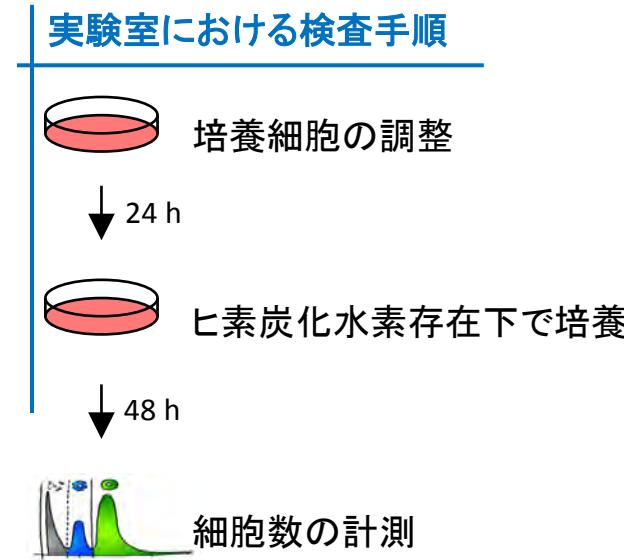
Toxicity in liver cells (HepG2)



肝細胞(HepG2) にみられる毒性



- ◆ AsHC 332
- AsHC 360
- ▲ AsHC 444
- ✚ ヘキサデカン (C16)
- ✚ オクタデカン (C18)
- ◆ テトラコサン (C24)



Cellular bioavailability (UROtsa cells)

incubation concentration (μM)	0	0.1	1	5	10
AsHC 332	0.5	4.8	47.0	324.7	399.9
AsHC 360	0.5	10.7	97.9	860.1	2196.2
AsHC 444	0.5	9.6	47.9	321.5	705.5

細胞レベルの生体利用度(UROtsa cells)

培養濃度 (μ M)	0	0.1	1	5	10
AsHC 332	0.5	4.8	47.0	324.7	399.9
AsHC 360	0.5	10.7	97.9	860.1	2196.2
AsHC 444	0.5	9.6	47.9	321.5	705.5

Summary of toxicity studies

- Arsenic-containing hydrocarbons show a high cellular toxicity in human cells
 - cytotoxic effects are in the range of effects induced by arsenite
- They are bioavailable and can strongly accumulate up to 400-fold in relation to the incubation concentration
- Neither micronuclei nor oxidative DNA damages are induced
 - no genotoxic effects are observable

毒性試験結果のまとめ

- ヒ素含有炭化水素類(ヒ素炭化水素類)は、ヒト由来の細胞には高い細胞毒性を示す。
 - 細胞毒性作用は、亜ヒ酸塩の細胞毒性作用の範囲である。
- ヒ素炭化水素類は細胞に吸収されて、培養濃度に比例して400倍の濃度にまで蓄積されることが可能である。
- ヒ素炭化水素類は、小核も酸化的DNA損傷も、いずれも引き起こさない。
 - 遺伝毒性は認められない。

Concluding comments

- Legislation is needed for arsenic in food
- This legislation should consider the major arsenic species, their different bioavailability and toxicity
- Analytical methods are needed to reliably quantify the various arsenic species
- Further work is required to support the preliminary data showing toxicity of some arsenolipids.

結論

- 食品中のヒ素に対する規制が必要
- その法律は、主要なヒ素化合物について、化合物によって生体利用度が異なり、毒性が異なることを考慮したものでなければいけない。
- 種々のヒ素化合物を定量できる、信頼度の高い分析方法が必要である。
- 数種のヒ素脂質について、予備的実験で示された毒性データを支持するためには、さらに研究が必要である。

Acknowledgements

Mojtaba S. Taleshi

Georg Raber

Tanja Schwerdtle

Sören Meyer

Walter Goessler

Sara Garcia-Salgado

Alice Rumppler

Kenneth Jensen

John Edmonds

Austrian Science Fund (FWF Projects I550-N17 & P23761-N17)

Acknowledgements

Mojtaba S. Taleshi

Georg Raber

Tanja Schwerdtle

Sören Meyer

Walter Goessler

Sara Garcia-Salgado

Alice Rumppler

Kenneth Jensen

John Edmonds

Austrian Science Fund (FWF Projects I550-N17 & P23761-N17)