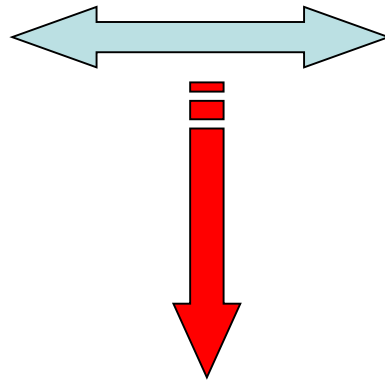


アルセノシュガー、アルセノリピッド を含有する食品摂取による健康リスク評価

主任研究者	圓藤吟史	大阪市立大学大学院医学研究科産業医学
分担研究者	山中健三	日本大学薬学部環境衛生学
分担研究者	花岡研一	水産大学校水産学研究科
分担研究者	鰐淵英機	大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学
分担研究者	畑 明寿	千葉科学大学危機管理学部

ヒ素の発がん性の評価 (IARC, 2004年)

疫学的にヒ素ばく露と発がんの因果関係は明確



実験動物におけるDMA^Vの発がん性は明確

無機ヒ素とヒトの皮膚がん、肺がん、**膀胱がん**との因果関係を認める評価を下す。

日本人が日常的に摂取する食用海産動植物に含有される**アルセノシュガー**および**アルセノリピッド**などの有機ヒ素化合物に対する安全性評価は十分でない

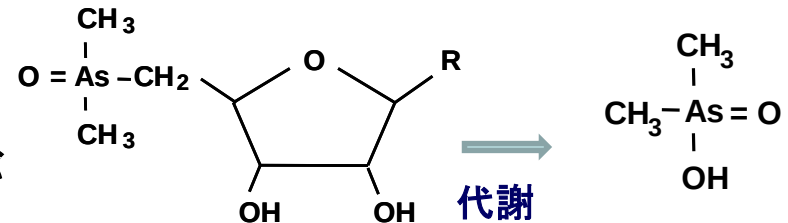
アルセノシュガー(AsSugs)

❖ アルセノシュガーは、褐藻類＞紅藻類＞緑藻類の高濃度順に多く含まれる

❖ これまでAsSugsそのものについては毒性が低いと報告されてきた

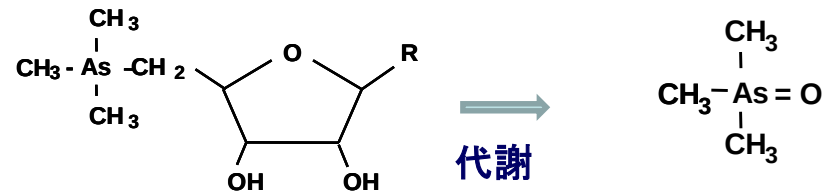
❖ しかし、AsSugsの代謝の過程での作用については明らかでない

❖ AsSugsの大部分は市販の標準がなく、実際の環境試料から抽出、精製、同定作業を行って標準物質を持たないと確実な分析ができない状況にある



ジメチル態12種

ジメチルアルシン酸 (DMA^V)

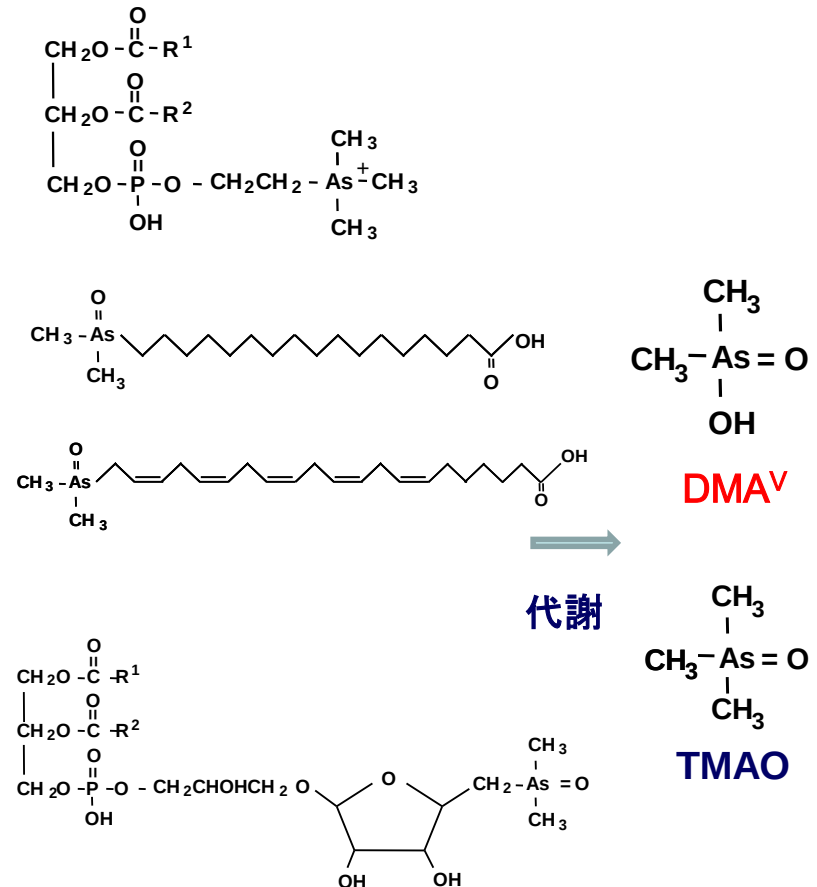


トリメチル態4種

トリメチルアルシンオキシド (TMAO)

アルセノリピッド (AsLipids)

- ❖ AsLipidsは、脂溶性ヒ素化合物の代表的な存在で、海産動植物に普遍的に存在すると予想される
- ❖ 数種類の存在が認められているものの、そのほかは構造解析に至っていない
- ❖ DMA^V、TMAOの生成が予想される
- ❖ しかしながら、これら代謝過程が未解明であり、その安全性についても未だほとんど解明されていない
- ❖ 市販の標準がなく、実際の環境試料から抽出、精製、同定作業を行って標準物質を持たないと確実な分析ができない状況にある

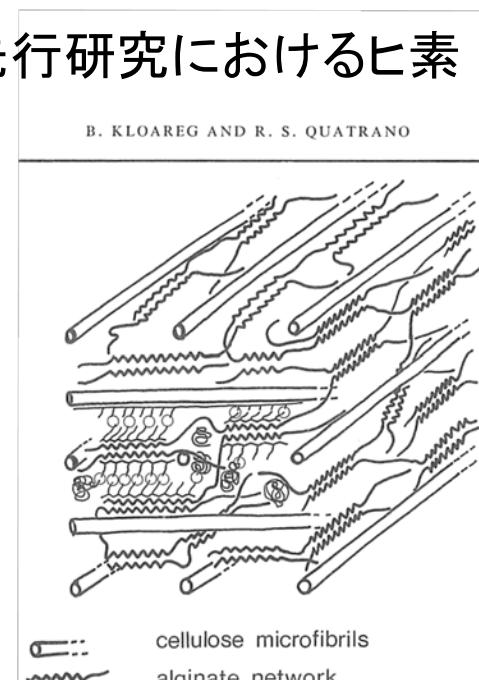


リン脂質型、炭化水素型あるいは脂肪酸型のAsLipids

研究項目

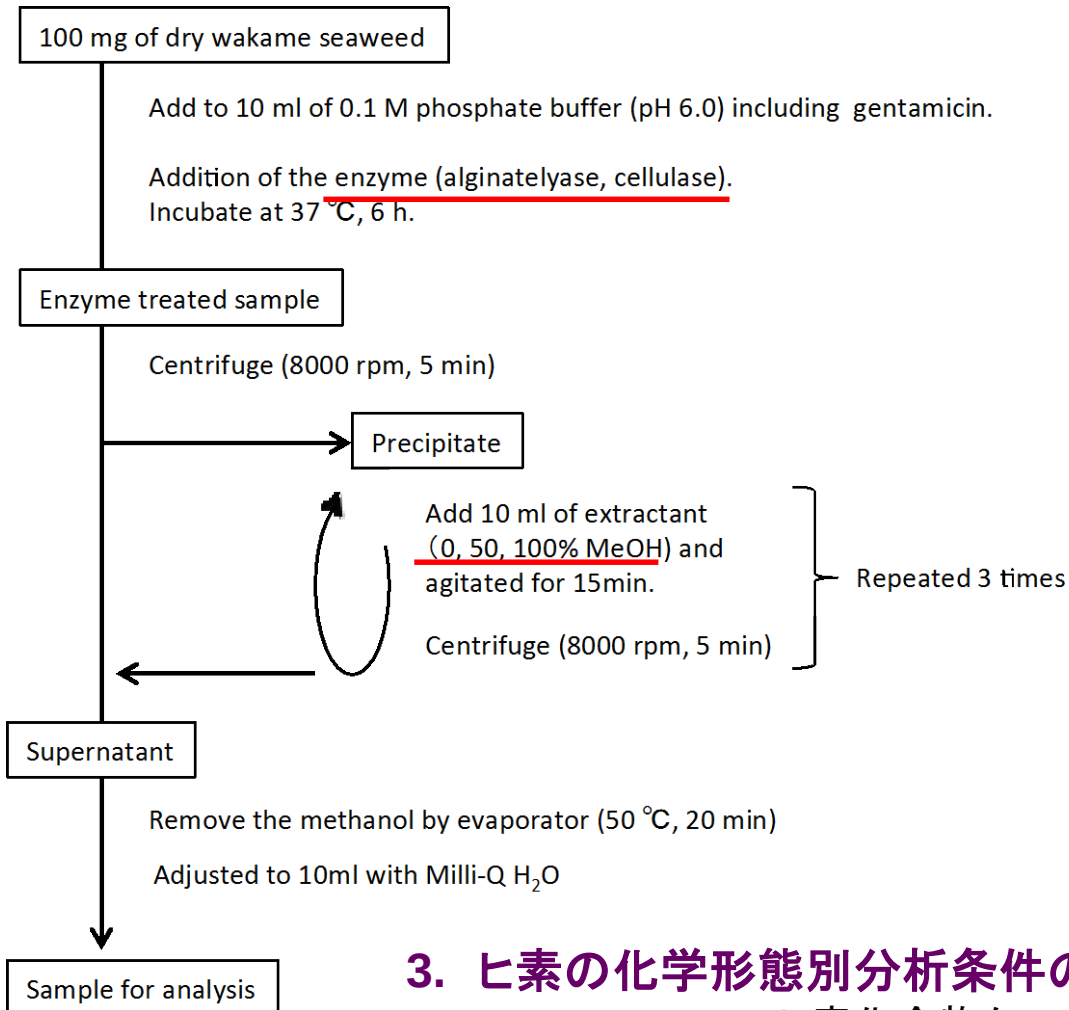
1. 食用海産動植物に含まれるAsSugsおよびAsLipidsの抽出法の検討
2. 食用海産動物に含まれるヒ素化合物の検討
3. AsSugsおよびAsLipidsの標準品の化学合成
4. ボランティアによるAsSugs含有食品摂取と尿中ヒ素代謝物との出納
5. 研究項目5: AsSugsおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価
6. 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝と毒性試験
7. 食品摂取によるヒ素の発がんを含めた毒性発現のリスク低減法の検討

- AsSugsは多様な化学形態をとり、海藻に豊富に含まれている。
- 食用海藻に含まれるAsSugsの定量は十分には行われていない。
- 海藻に含まれるAsSugsの同定と定量を行うためには次の条件が必要となる。
 - ① AsSugsの化学形態を壊さない化学的に温和な条件で抽出できること
 - ② 分析装置の定量感度を満たす十分な濃度が得られること
- 被験食品として用いたワカメ(*Undaria pinnatifida*)は、先行研究におけるヒ素抽出率が5～49%と低い。
- 褐藻類の細胞壁はセルロース骨格の隙間に粘性多糖類であるアルギン酸が充填され、強固に細胞を保護している。
- この構造がヒ素抽出を妨げている可能性がある。
- 本研究では、次の検討を実施した。
 - ① アルギン酸及びセルロース分解酵素を用いた化学的に温和な条件での細胞壁分解
 - ② ワカメからのAsSugs抽出に適した溶媒の検討



褐藻類 細胞壁構造の仮説モデル
Kloareg et al.(1986)

ワカメからのヒ素抽出条件の検討



1. 酵素処理条件の検討

条件	Alginatellyase	Cellulase
①	—	—
②	—	+
③	+	—
④	+	+

2. 抽出溶媒の検討

0, 50, 100% メタノール

3. ヒ素の化学形態別分析条件の検討

HPLC-ICP-MS ⇒ ヒ素化合物クロマトグラムの取得、ヒ素化合物の定量

HPLC-TOF-MS ⇒ 未同定ヒ素の同定

各ヒ素化合物を分離でき、ICP-MS、TOF-MSの両方に導入可能なHPLC条件を確立する必要がある

1. 酵素処理の検討

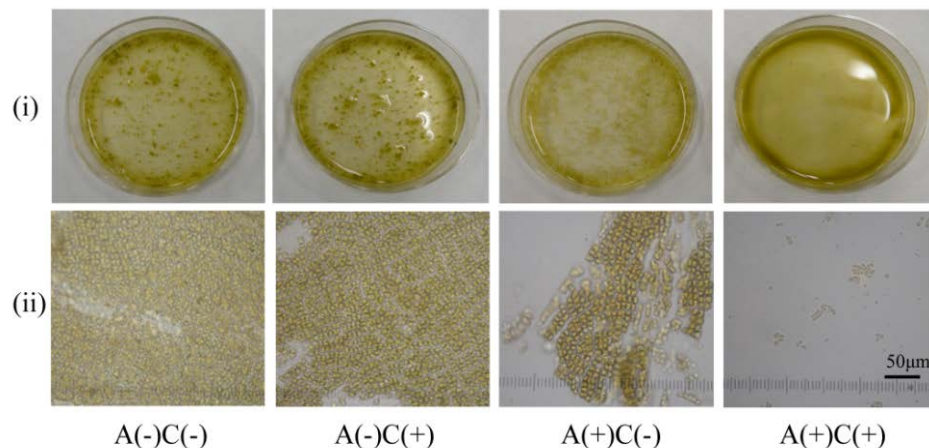


Table 2. Elution rates of arsenic compounds following enzymatic treatment

Enzymatic treatment	Elution rate (%, $n = 5$, Mean $\pm$ SD)
A(-)C(-)	17.2 $\pm$ 3.7
A(-)C(+)	22.6 $\pm$ 0.6
A(+)C(-)	31.2 $\pm$ 0.7
A(+)C(+)	45.5 $\pm$ 2.2

A: Alginate lyase, C: Cellulase

The elution rates were calculated based on the total arsenic concentration obtained following acid digestion (25.50 mg/kg dry *wakame*).

Fig. 1. *Wakame* seaweed after enzymatic treatment observed directly (i) and under an optical microscope (ii).

2. 抽出溶媒の検討(メタノール濃度の検討)

Table 3. Extraction rates of arsenic compounds in different methanol (MeOH) concentrations

MeOH concentration	Extraction rate (% , $n = 3$, Mean $\pm$ SD)	
	A(-)C(-)	A(+)C(+)
0%	22.5 $\pm$ 1.1	48.3 $\pm$ 0.5
50%	21.8 $\pm$ 0.9	58.7 $\pm$ 4.1
100%	28.1 $\pm$ 0.2	88.8 $\pm$ 8.4

A: Alginate lyase, C: Cellulase

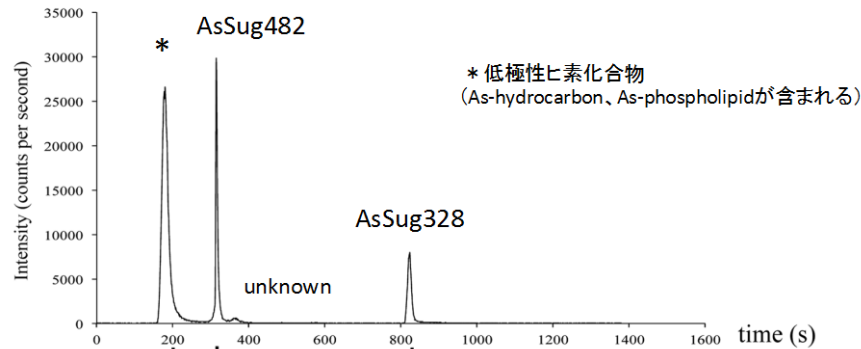
The extraction rates were calculated based on the total arsenic concentration obtained following acid digestion (25.50 mg/kg dry *wakame*).

最もヒ素抽出率が高い条件

- ・ 酵素処理: アルギン酸リアーゼ & セルラーゼ処理
- ・ 抽出溶媒: 100%メタノール

抽出液中ヒ素の化学形態別分析

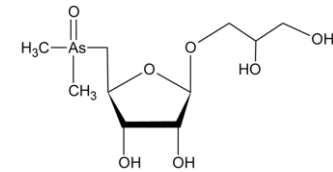
(i) HPLC-ICP-MS



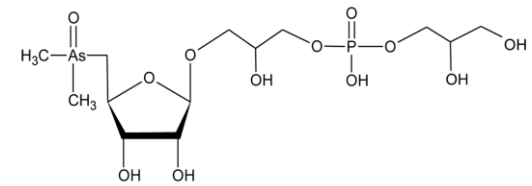
(ii) HPLC-TOF-MS



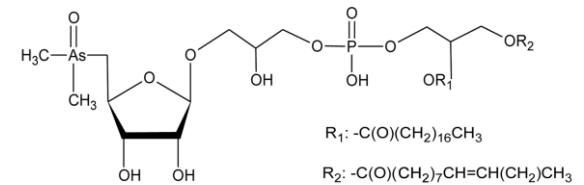
Fig. 2. High performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) (i) and HPLC-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-Q-TOF-MS) (ii) chromatograms of the different arsenic species detected in *wakame* extract by using a cation exchange column.



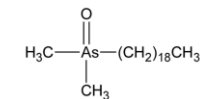
AsSug 328 ($C_{10}H_{21}O_7As$)



AsSug 482 ($C_{13}H_{28}O_{12}PAs$)



As-PL 1012 ($C_{49}H_{94}O_{14}PAs$)



As-HC 388 ($C_{21}H_{45}OAs$)

Fig. 3. Structures of the four arsenic species detected in *wakame* extract using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-Q-TOF-MS).

HPLC-ICP-MSで検出されたヒ素化合物の化学構造をHPLC-TOF-MSにて解析した結果、AsSug328と482、低極性ヒ素化合物(As-hydrocarbon、As-phospholipid)であることが確認された。

ワカメなどの褐藻類における最適ヒ素抽出条件

酵素処理行程

溶媒抽出行程

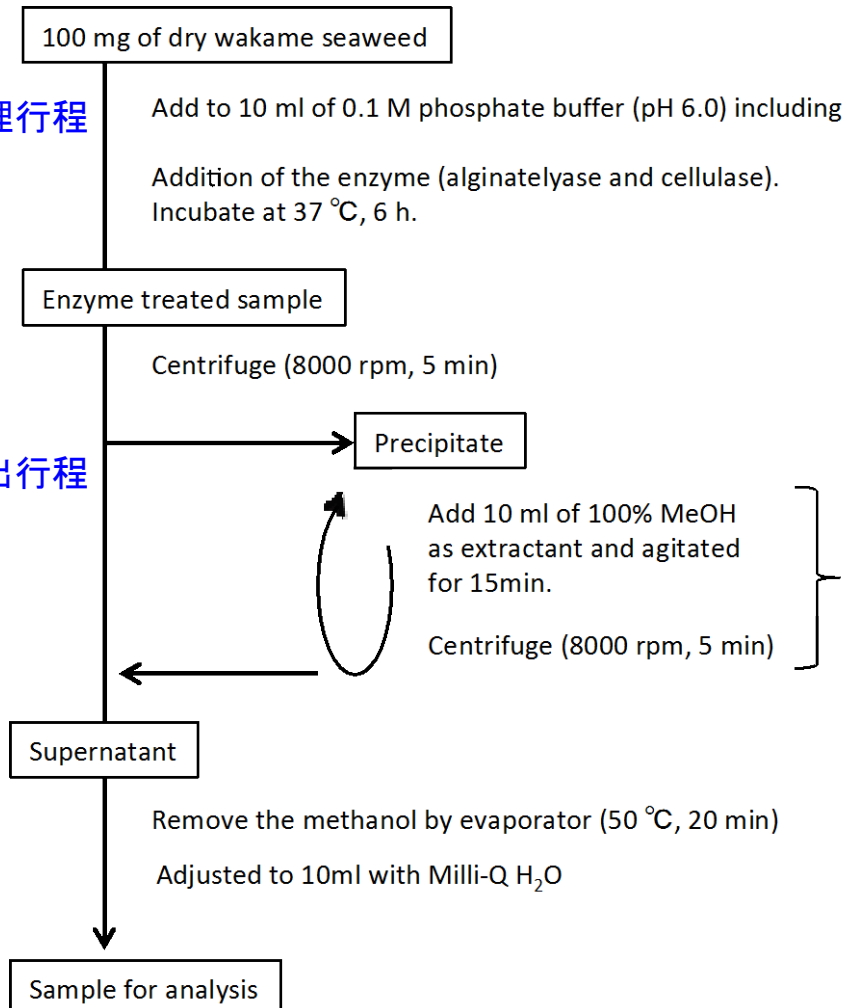


Table 2. Elution rates of arsenic compounds following enzymatic treatment

Enzymatic treatment	Elution rate (%, n = 5, Mean ±SD)
A(-)C(-)	17.2 ± 3.7
A(-)C(+)	22.6 ± 0.6
A(+)C(-)	31.2 ± 0.7
A(+)C(+)	45.5 ± 2.2

A: Alginate lyase, C: Cellulase

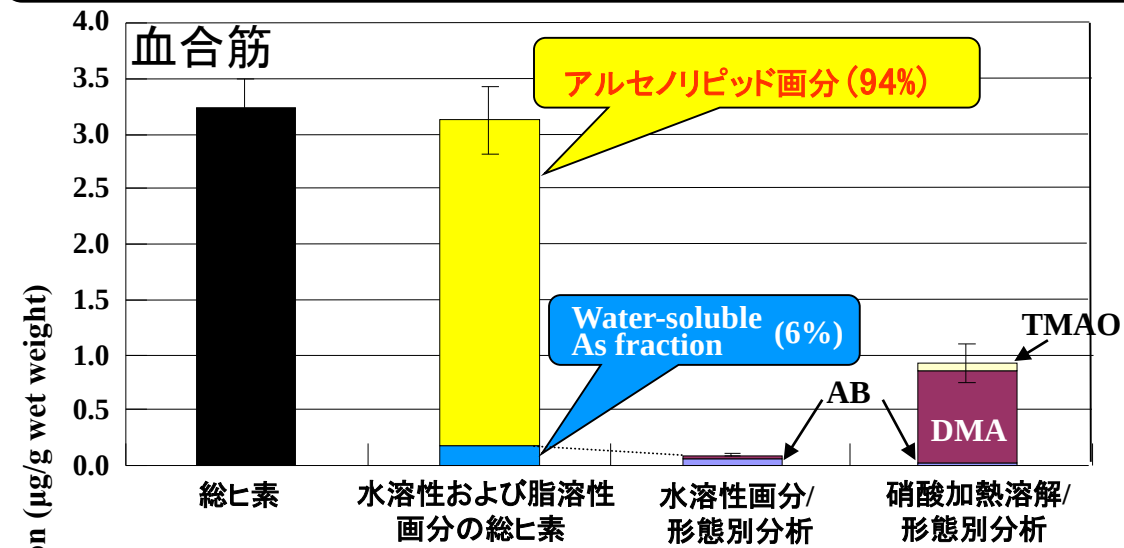
The elution rates were calculated based on the total arsenic concentration obtained following acid digestion (25.50 mg/kg dry wakame).

今回開発した抽出法

- 化学的に温和な条件で約90%のヒ素化合物をワカメから抽出することが可能。
- 特殊な技術や器具を必要とせず簡便に実施できる。
- ワカメと同様の細胞壁をもつ海藻にも応用できる可能性がある。

研究項目 1-2: 食用海産動植物に含まれるAsLipidsの抽出法の検討

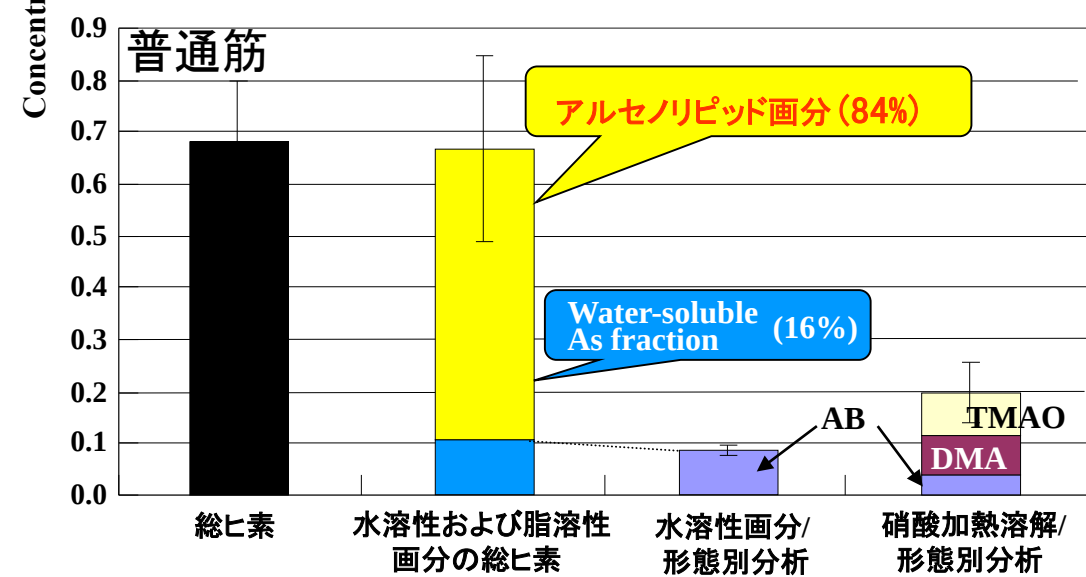
サンマ筋肉に存在するヒ素化合物は主に脂溶性である



サンマ(9月漁獲)の血合筋および普通筋における総ヒ素濃度は、それぞれ3.23±0.26 μg/g (湿重量)および0.68±0.11 μg/g(湿重量)であり、血合筋で5倍程度高かった。

この総ヒ素のうち、血合筋においては約94%、普通筋においては約84%が脂溶性ヒ素化合物画分に検出された。

硝酸加熱溶解/形態別分析の結果、ABの他にDMAAおよびTMAOが主要なヒ素化合物として検出された。



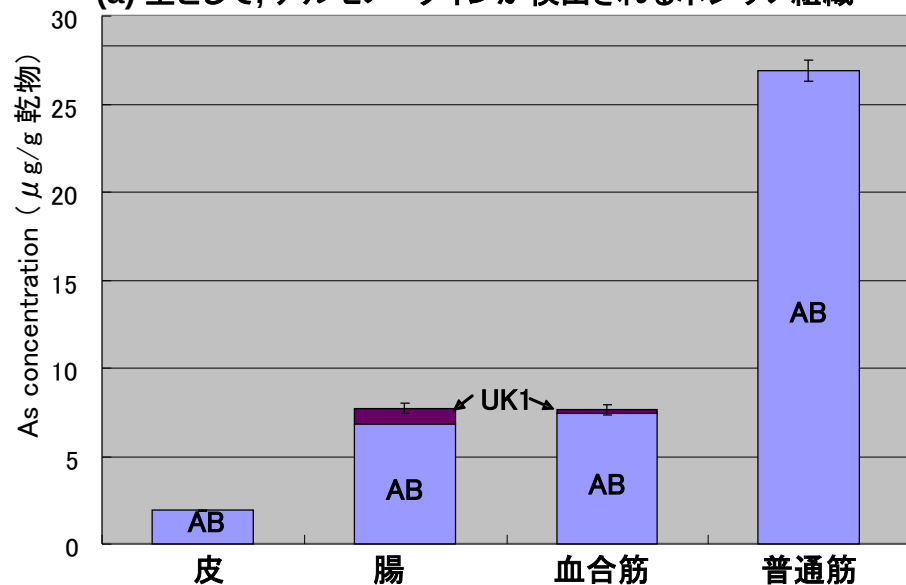
サンマの筋肉に存在するヒ素は、主にDMA含有AsLipidsあるいはTMAO含有AsLipidsとして存在している。

サンマ血合筋および普通筋に存在するヒ素、あるいはそれらの水溶性画分に存在するヒ素の形態別分析 (n=3).

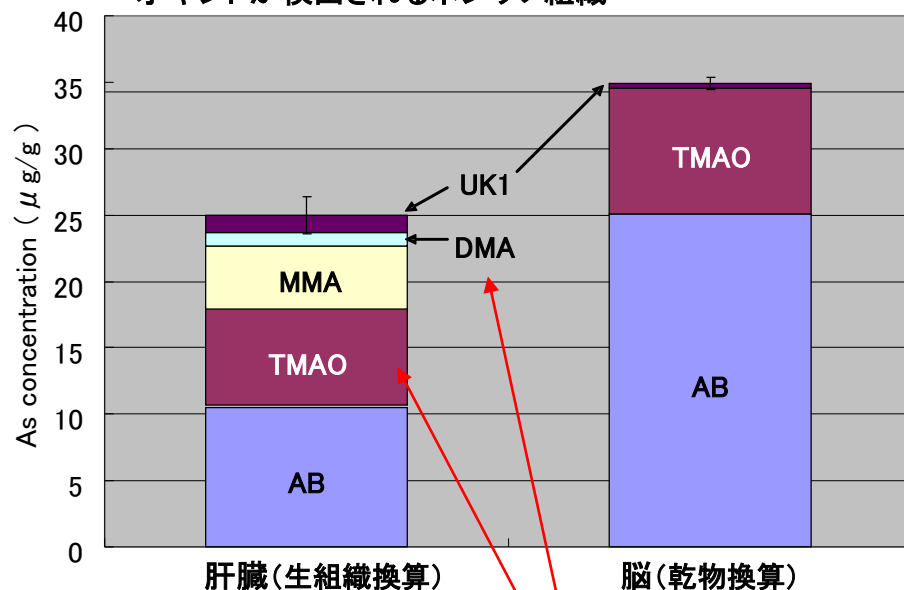
(筋肉における形態別分析法, 硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法; 水溶性画分の抽出法, Folchの方法)

研究項目2: 食用海産動物に含まれるヒ素化合物の検討

(a) 主として、アルセノベタインが検出されるホシザメ組織



(c) アルセノベタインの他, 比較的多量のトリメチルアルシンオキシドが検出されるホシザメ組織

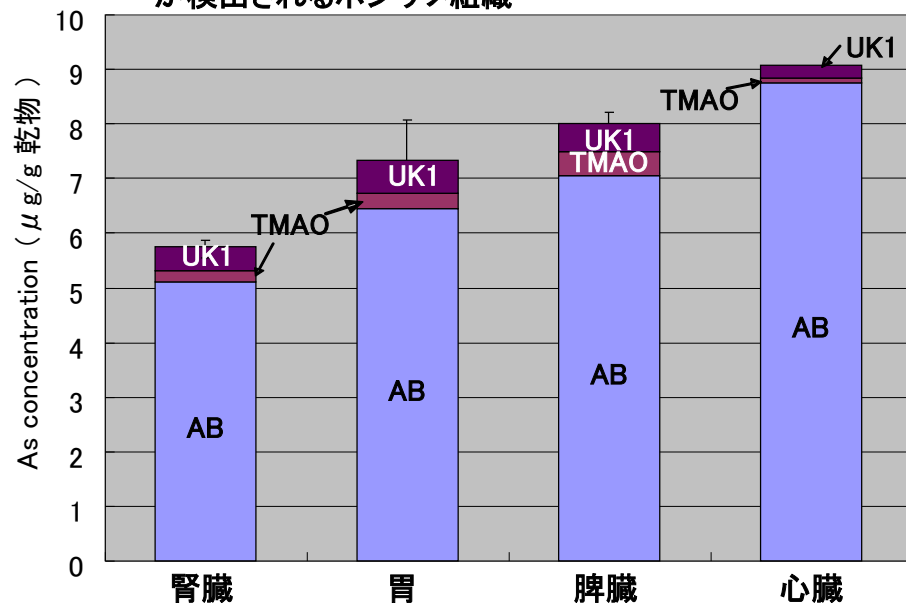


肝臓の場合, 普通筋と同様, 水溶性画分からは, 実質的にアルセノベタインのみが検出される。したがって, DMAやTMAOは, 硝酸加熱溶解処理により, DMAA含有AsLipidsやTMAO含有AsLipids から誘導されたと示唆された。

肝臓や脳に存在する高濃度のTMAO含有AsLipidsには、安全学的あるいは比較生化学的な興味と共に、機能学的な興味も持たれた。

ホシザメにおける10種の組織に存在するヒ素化合物(n=3)
(形態別分析法: 硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法)

(b) アルセノベタインの他, 少量のトリメチルアルシンオキシドが検出されるホシザメ組織



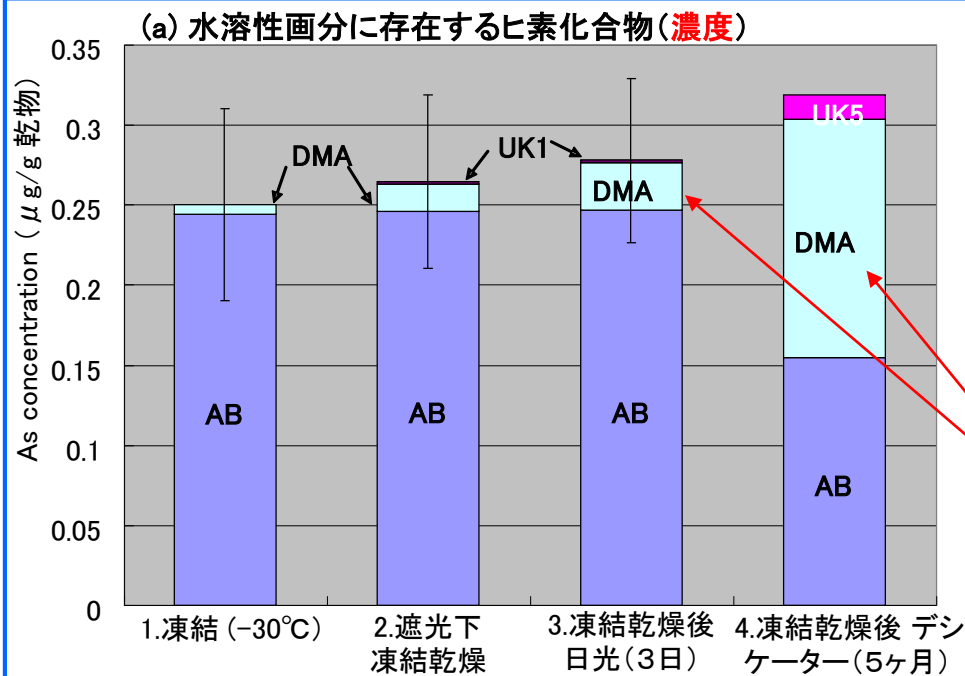
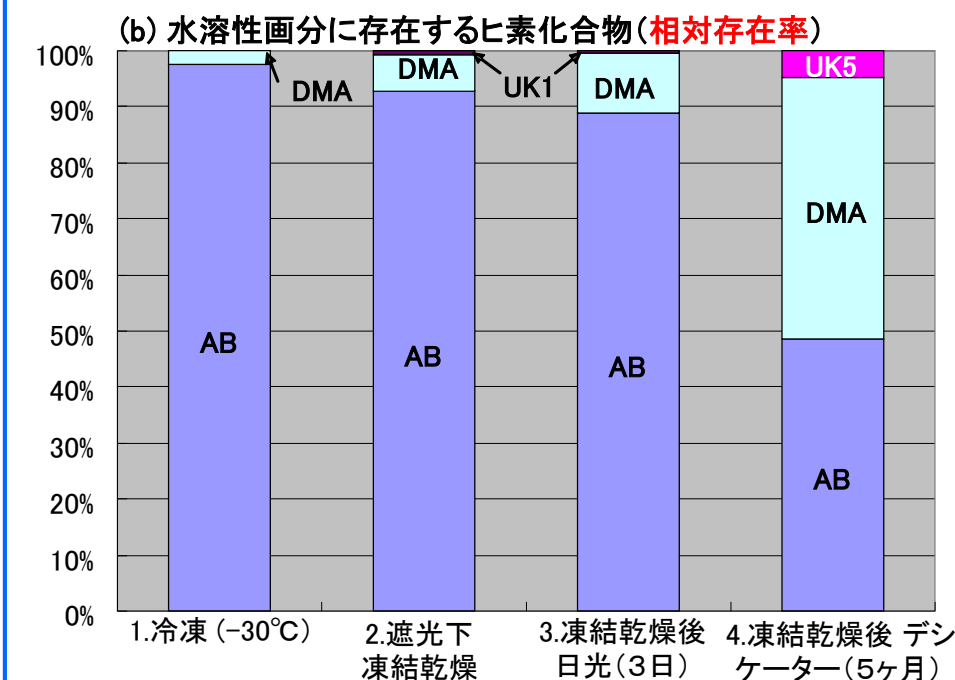


図2. マイワシ普通筋に存在するヒ素化合物の濃度と組成に及ぼす, 1. 凍結貯蔵, 2. 遮光下の凍結乾燥, 3. 凍結乾燥後の日光曝露(3日間), および 4. 凍結乾燥後のガラス製デシケーター中での保存(5ヶ月間、実験台上)の影響 (n=3).

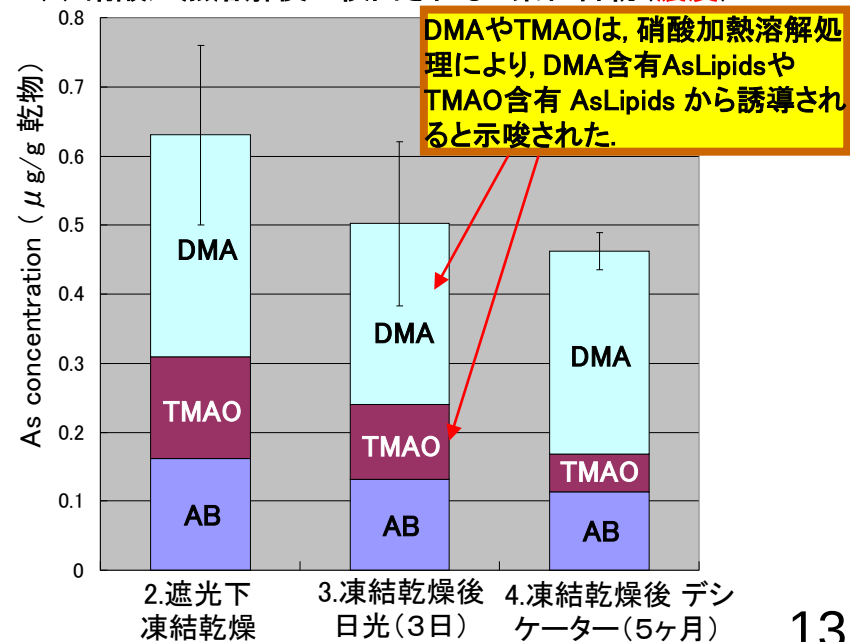
(形態別分析法, HPLC-ICP-MS法; 水溶性画分の抽出法, Folchの方法)

魚肉の貯蔵中に, 日光や自己消化により,

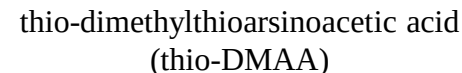
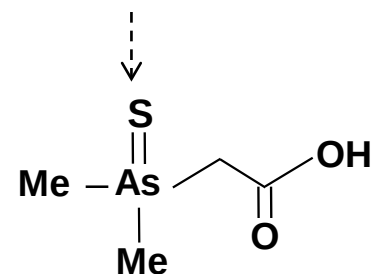
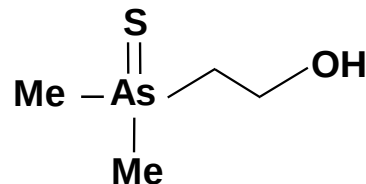
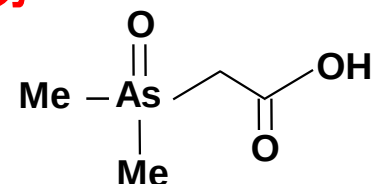
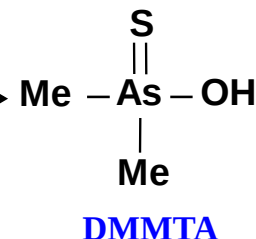
1. **DMA**はAsLipidsから誘導される
2. **DMA**はアルセノベタインから誘導された可能性も否定できなかった.



(c) 硝酸加熱溶解後に検出されるヒ素化合物(濃度)



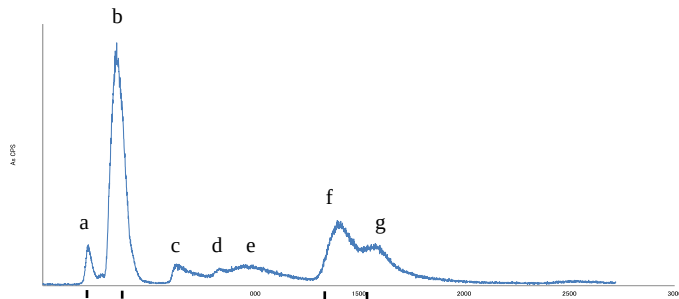
?



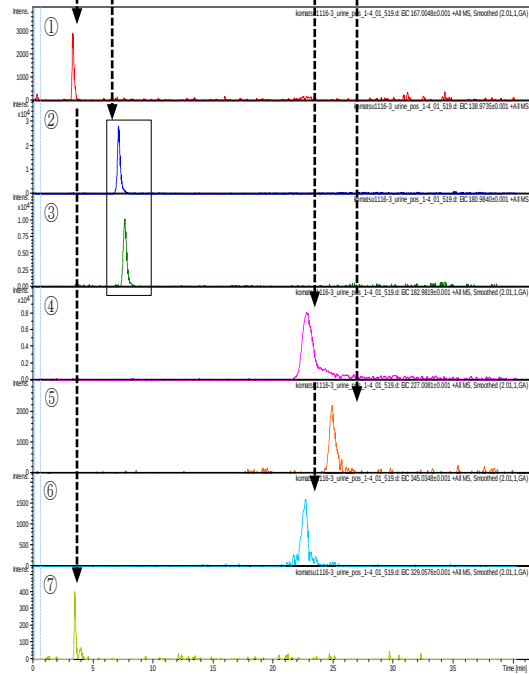
研究項目4: ボランティアによるAsSugs含有食品摂取と尿中ヒ素代謝物との出納

- 5名のボランティアがAsSugs含有食品としてワカメを摂取した。
- 摂取したワカメにはAsSug328、AsSug482、As-hydrocarbon、As-phospholipidが含まれる。
- 摂取後の尿を5日間採取し、代謝物の分析を行った。

HPLC-ICP-MS



HPLC-TOF-MS



m/z 167.00

m/z 138.97

m/z 180.98

m/z 182.98

m/z 227.00

m/z 345.03

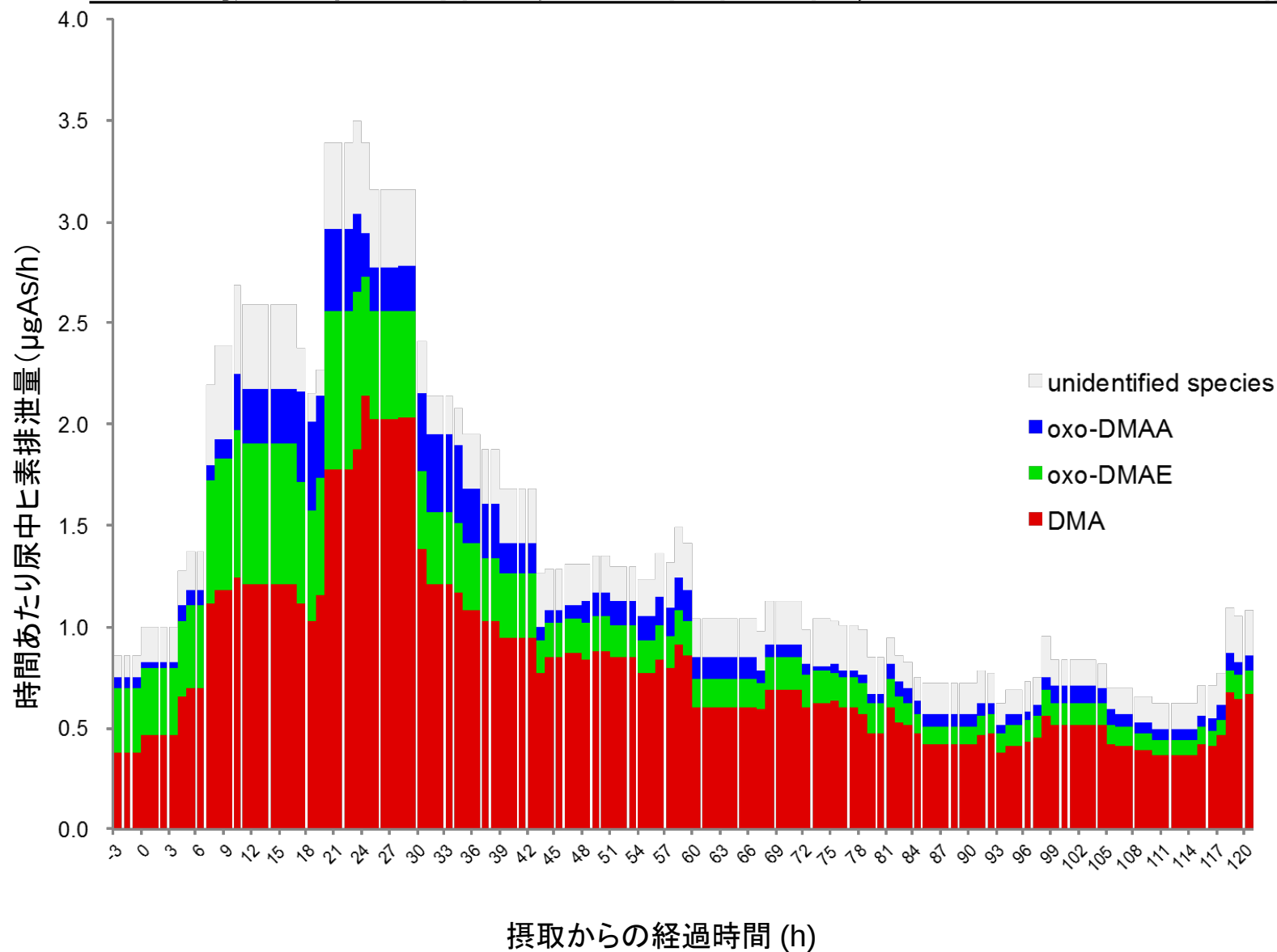
m/z 329.05

peak	推定された化合物
a	oxo-DMAE * AsSug328
b	DMA * oxo-DMAA *
c	Unidentified
d	Unidentified
e	Unidentified
f	thio-DMAE * thio-Gly
g	thio-U

* : 精密質量測定とMS/MSフラグメント解析により同定
他は精密質量の一致のみを確認

尿からAsSug482、As-hydrocarbon、
As-phospholipidは検出されなかった。
。

ワカメ摂取者 時間あたり尿中ヒ素排泄量(5名の平均値)



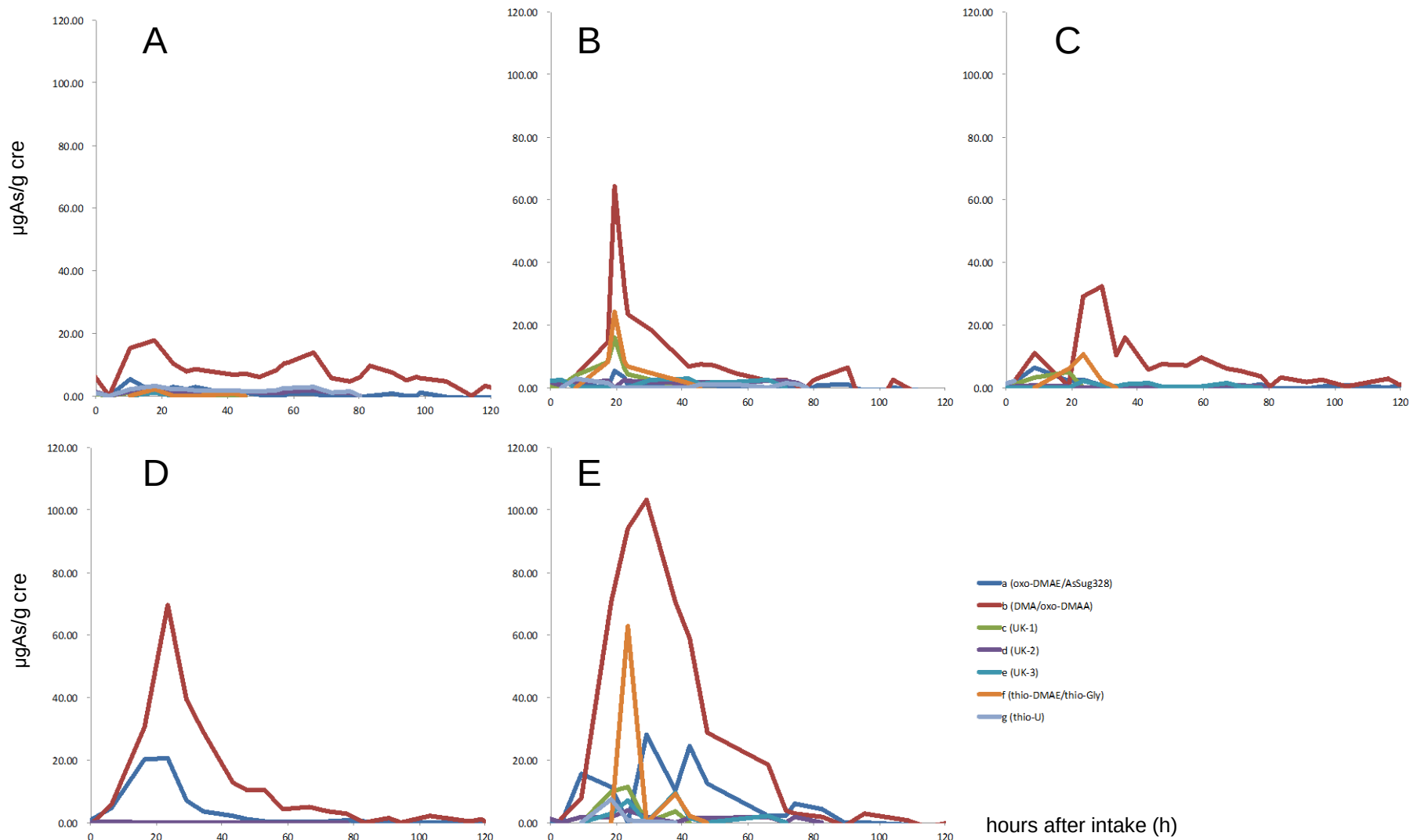
ワカメ摂取後5日間で尿中排泄されたヒ素

volunteer	% of T-As							% of ingested As	
	a (oxo-DMAE/AsSug328)	b (DMA/oxo-DMAA)	c (UK-1)	d (UK-2)	e (UK-3)	f (thio-DMAE/thio-Gly)	g (thio-U)	sum of As	T-As
A	5.3	40.7	1.1	7.8	0.4	2.8	5.8	63.8	16.8
B	18.9	33.4	2.4	2.0	3.3	2.7	0.1	62.8	42.5
C	5.5	36.3	3.3	3.7	2.8	3.8	2.4	57.8	33.1
D	5.9	42.4	4.0	3.4	1.3	4.1	2.4	63.6	31.8
E	6.4	31.1	7.9	2.0	2.0	0.5	1.2	51.0	36.3
average	8.4	36.8	3.8	3.8	2.0	2.8	2.4	59.8	32.1
SD	5.3	4.3	2.3	2.1	1.0	1.3	1.9	4.9	8.5

The ingested arsenic was calculated to be 588.04 µg.

- ワカメから摂取したヒ素(588.04µg)の16.8 - 42.5%が尿中に排泄された。
- そのうちDMA/oxo-DMAAの割合が最も高く(36.8%)、続いてoxo-DMAE/AsSug328(8.4%)であった。

尿中ヒ素濃度の経時変化



- ワカメ摂取からおよそ20時間後に尿中ヒ素濃度はピークとなった。
- DMA/oxo-DMAAの生物学的半減期は約16時間であった。

背景

- ❖ AsSugsおよびAsLipidsの代謝過程でDMA^Vが生成される。
- ❖ DMA^Vはラット膀胱に膀胱発がん性を有する。
- ❖ DMA^Vの代謝物であるジメチルモノチオアルシン酸(DMMTA)がDMA^Vの膀胱発がん性に関与することが示唆された。

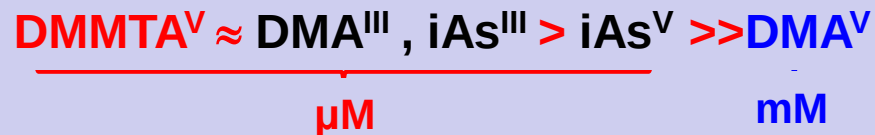
課題

- ① DMMTAの*in vitro*遺伝毒性、膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討、および産生経路の解明
- ② DMA^VおよびiAs^{III}の膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討
- ③ DMA^VおよびiAs^{III}投与F344ラット膀胱粘膜におけるヒ素トランスポーターの発現の検討

① DMMTAの*in vitro*遺伝毒性、膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討、および産生経路の解明

in vitro

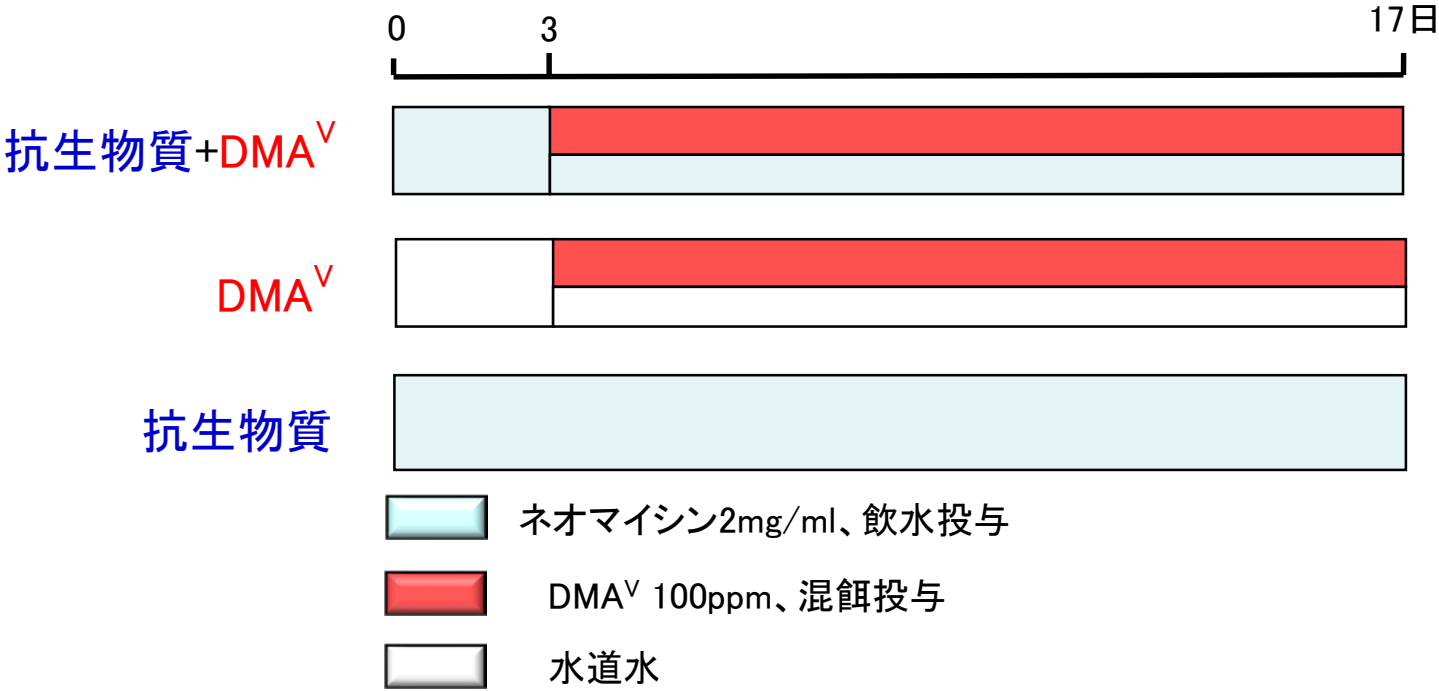
ヒトおよびラットの培養膀胱上皮細胞における: DMMTA^VのLD50



- DMMTA^VのLC₅₀は、iAs^V、iAs^{III}、DMA^{III}と同程度で、発がん性のあるDMA^Vに比べてはるかに強い細胞毒性を示した。
- DMMTA^Vは細胞非存在下では安定していたが、細胞存在下ではDMA^Vへの変換がみられた。
- DMMTA^Vは染色体異常試験で陽性（構造異常および数的異常）を示した。Ames 試験では陰性である。

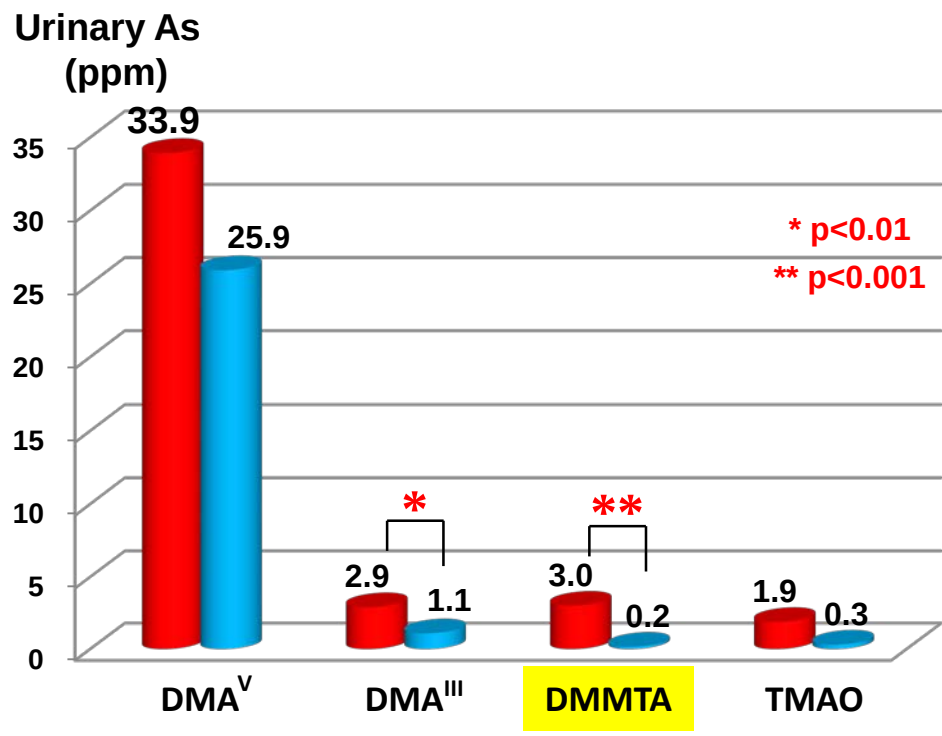
in vivo

DMMTAの産生経路の検討

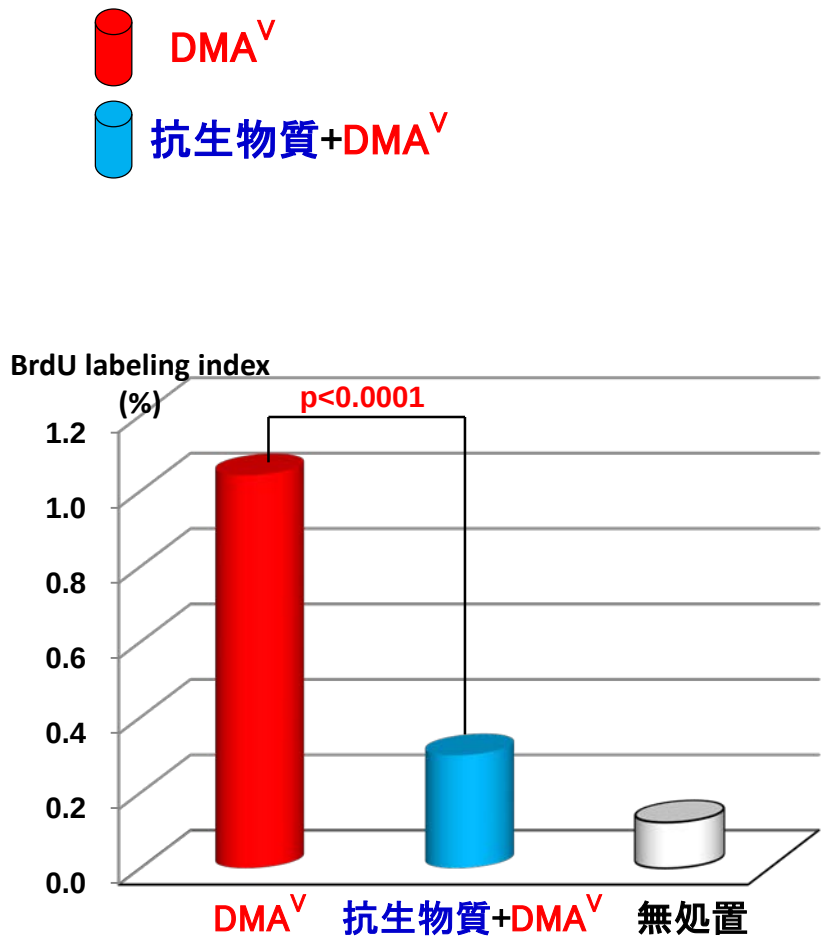


- 動物: 6週齢、雌性F344、 30 匹(各群10匹ずつ)
- 基礎飼料: AIN-93 粉末
- 測定項目:
 - 尿中ヒ素濃度
 - 膀胱粘膜上皮細胞増殖能(BrdU標識率)

研究項目5: AsSugsおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価

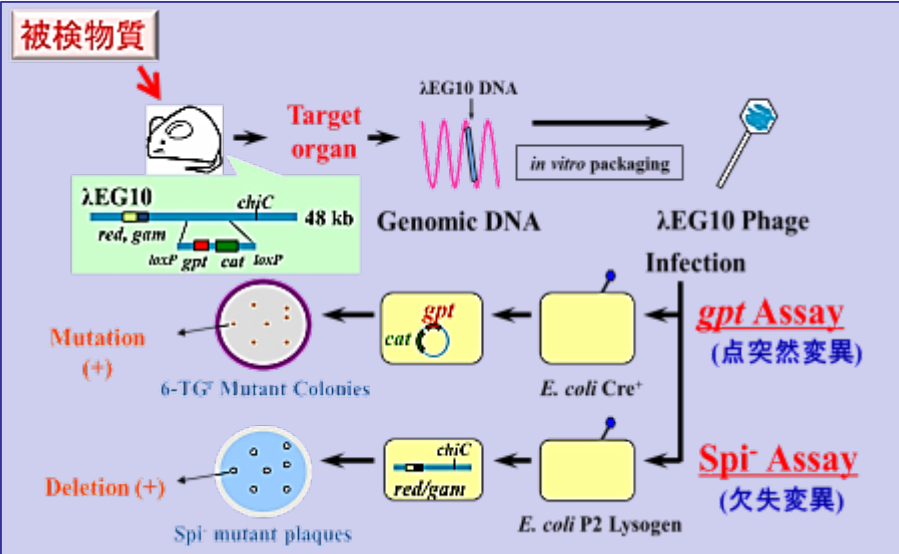


尿中ヒ素化合物濃度



膀胱上皮細胞増殖能

② DMA^VおよびiAs^{III}の膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討



*in vivo*変異原性および発がん性を臓器特異的にかつ包括的に評価できる

従来DNA抽出法
膀胱粘膜などの微小组織の解析が困難

改良DNA抽出法
膀胱粘膜などの微小组織の解析が可能

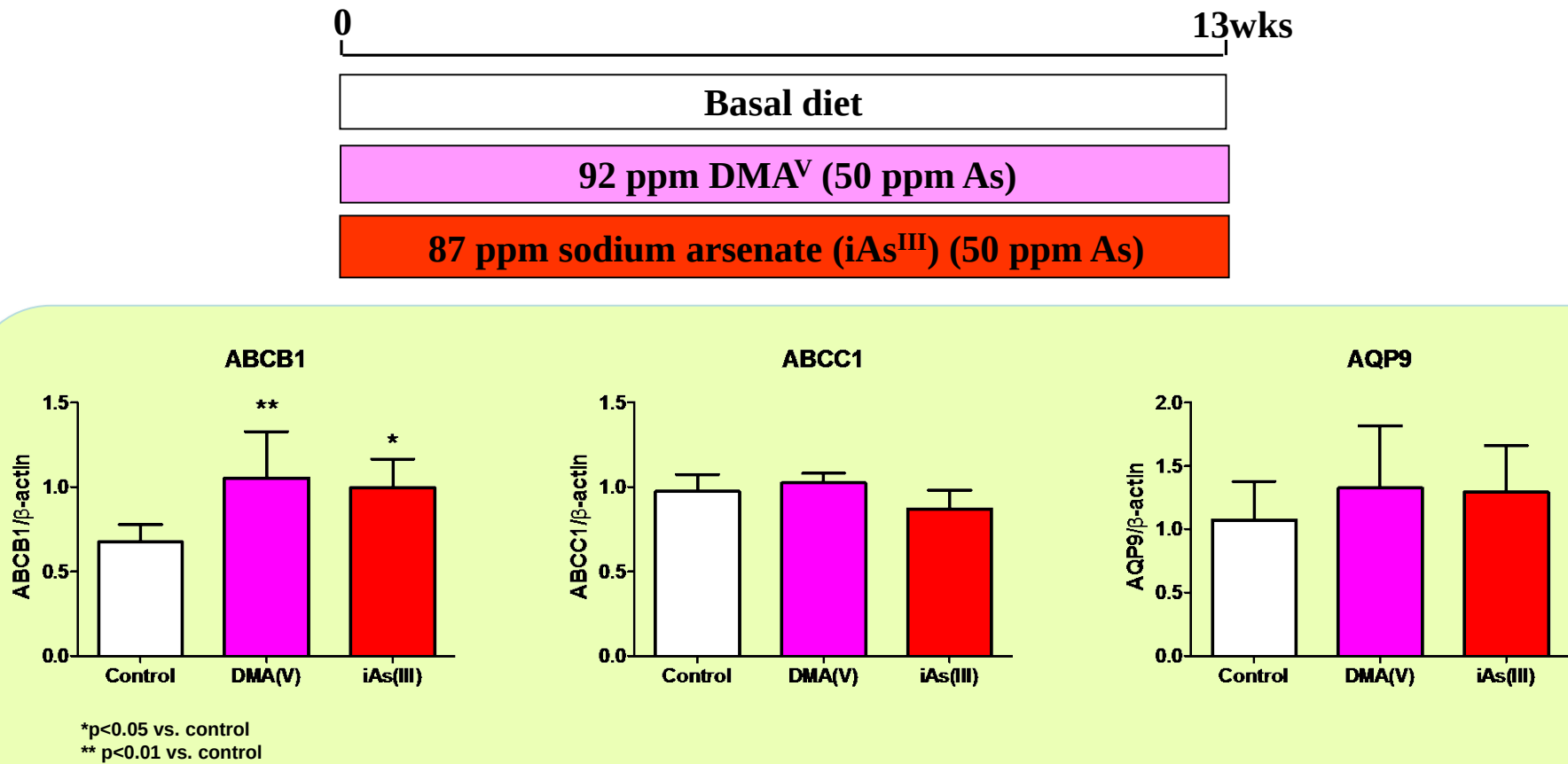


動物: F344 *gpt* deltaラット

被検物質	膀胱粘膜における変異原性
N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (変異原性膀胱発がん物質)	陽性
Sodium ascorbate (非変異原性膀胱発がん促進物質)	陰性
iAs ^{III}	陰性
DMA ^V	陰性

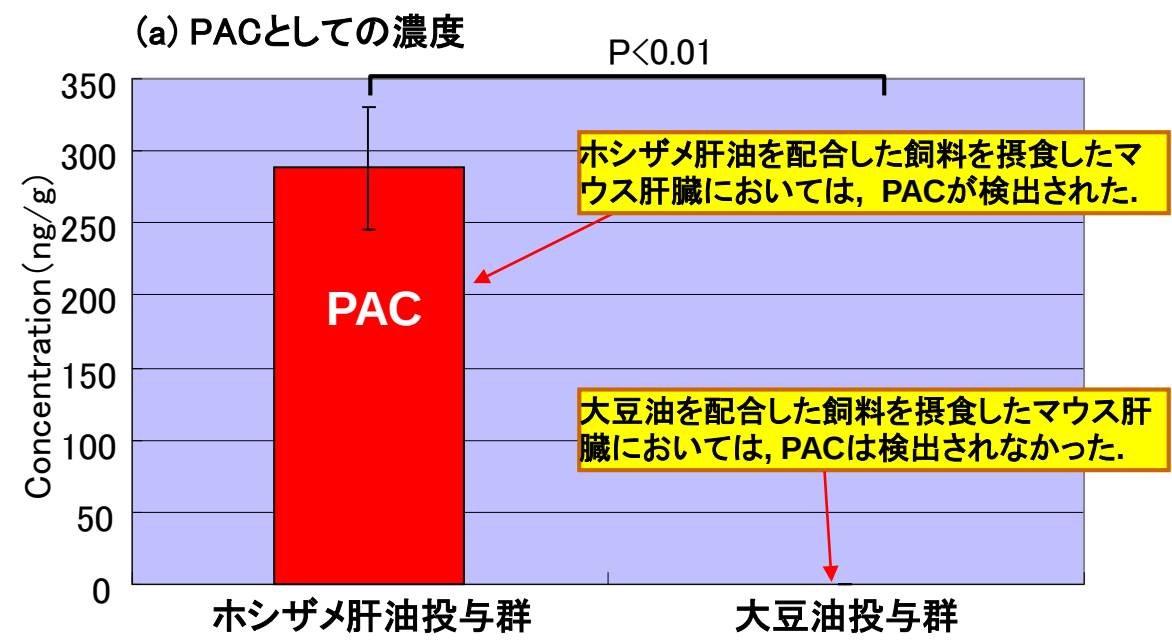
本試験法は食品中ヒ素化合物のリスク評価に有用である

③ DMA^VおよびiAs^{III}投与F344ラット膀胱粘膜におけるヒ素トランスポーターの発現の検討



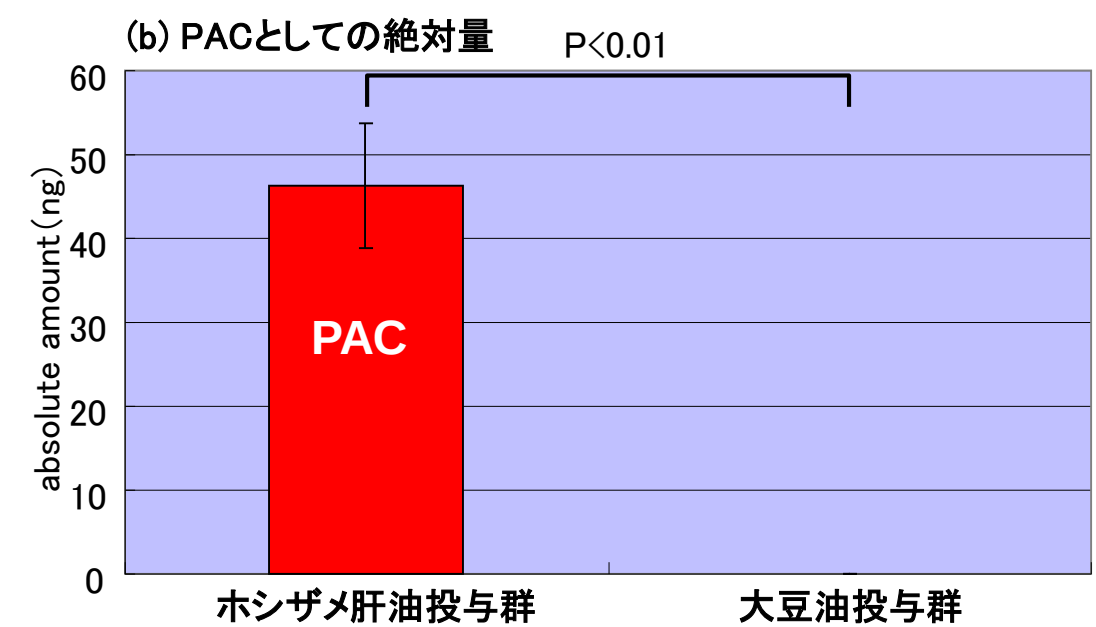
- 1. ラット膀胱粘膜において、DMA^VおよびiAs^{III}の代謝にABCB1が関与する可能性が示唆された。
- 2. この結果がラット膀胱粘膜におけるヒ素発がんメカニズムの解明に寄与できるものと考えられる。

研究項目5: AsSugsおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価



ホシザメ肝油中のホスファチジルアルセノコリン(PAC)はマウスの肝臓に移行する

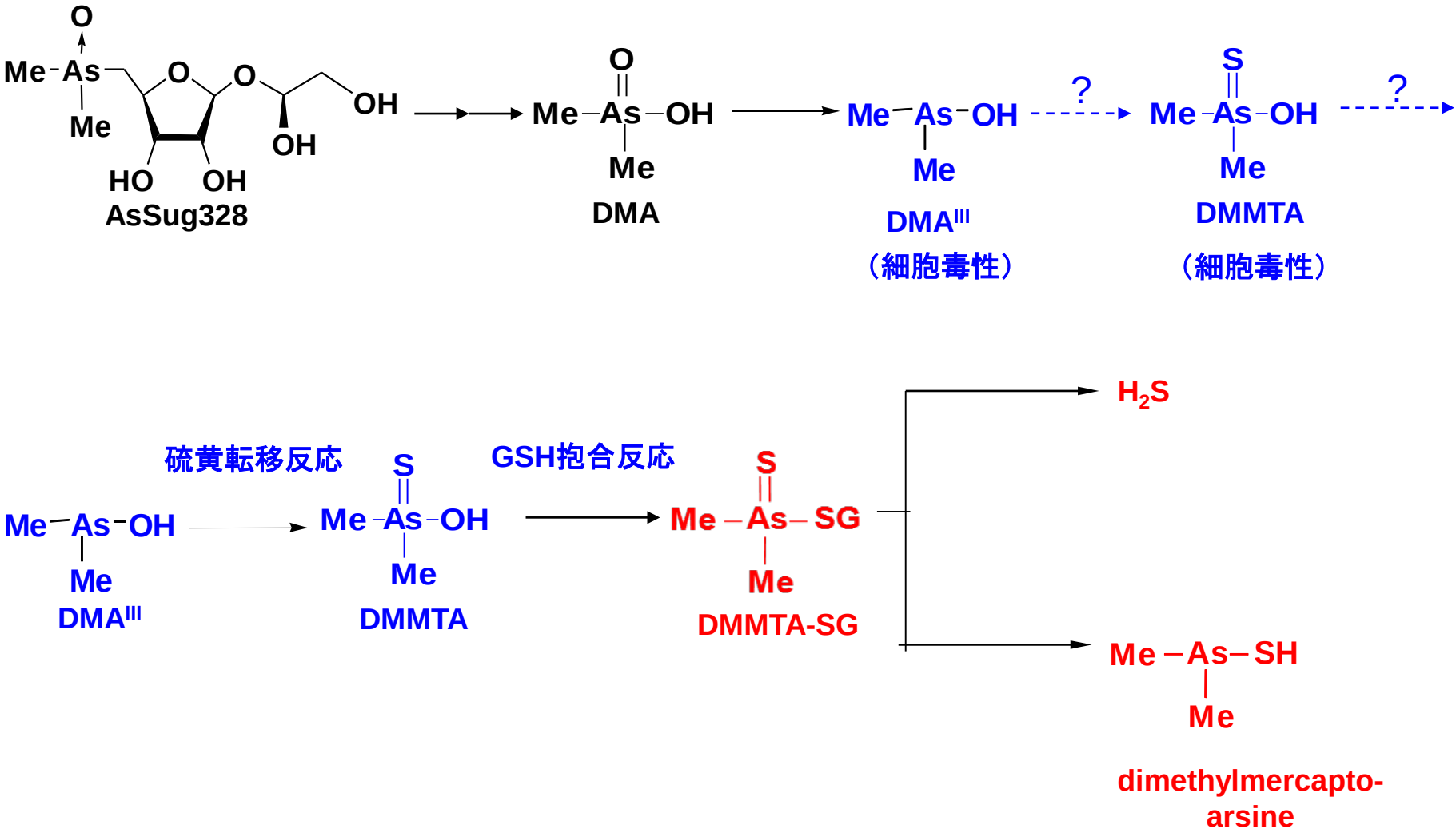
今回用いた分析法は, 他組織でのPACの動態を検討する上でも, 有効な方法になると予想される



ホシザメ肝油配合 (4%) 飼料を摂食させたマウスの肝臓に存在する, (a) ホスファチジルアルセノコリン(PAC) 濃度, および (b) 絶対量 (n=3). (14日間連続摂食の例)

PACの検出法: Dawson の方法によるアルカリ不安定画分を HPLC-ICP-MS分析し, PACから誘導されるグリセリルホスホリルアルセノコリンを定量.

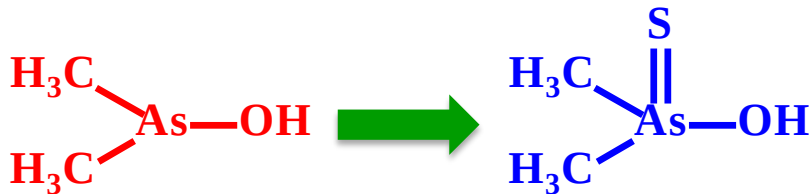
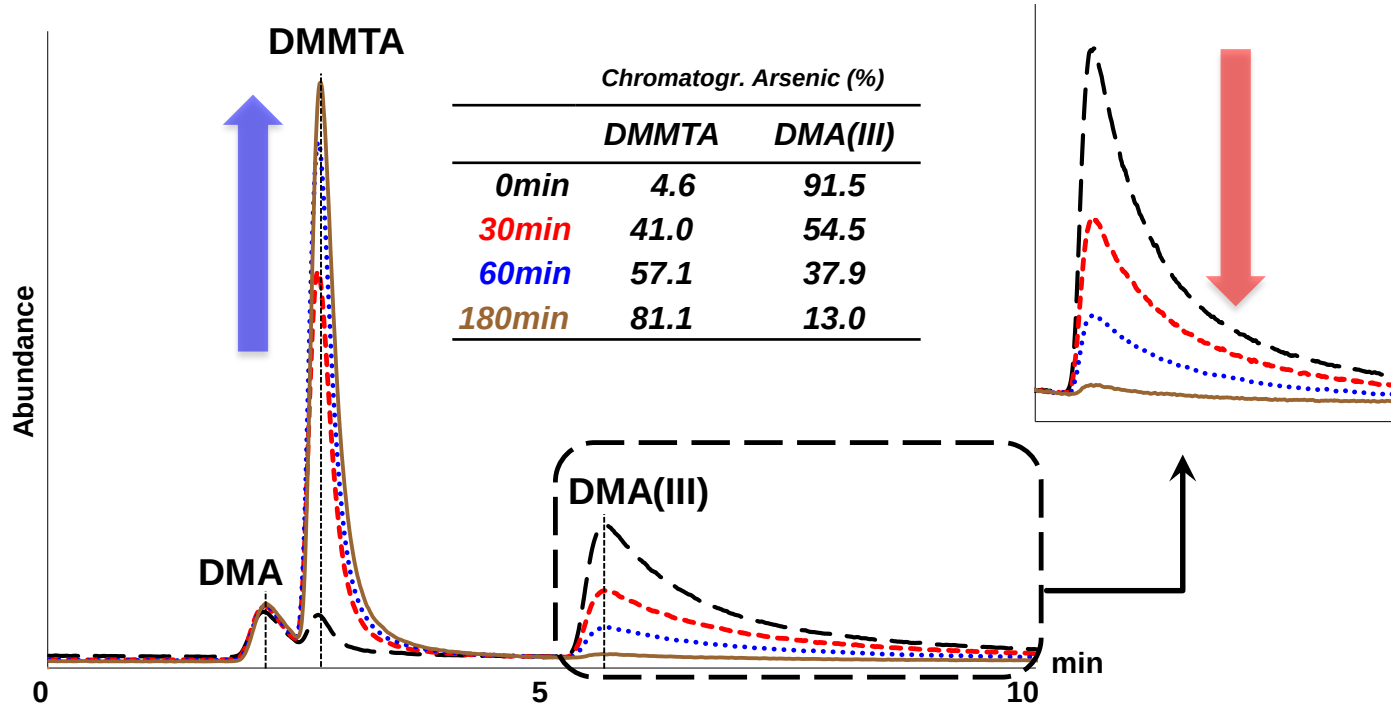
アルセノシュガーから腸内生成するジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA) の生成経路とその毒性の可能性



生体内におけるヒ素化合物の代謝機構

イオウ転移酵素 (ロダネーゼ) の関与

$\text{DMA}^{\text{III}} + \text{sulfurtransferase} \rightarrow$ **thiolation**



生体内におけるヒ素化合物の代謝機構

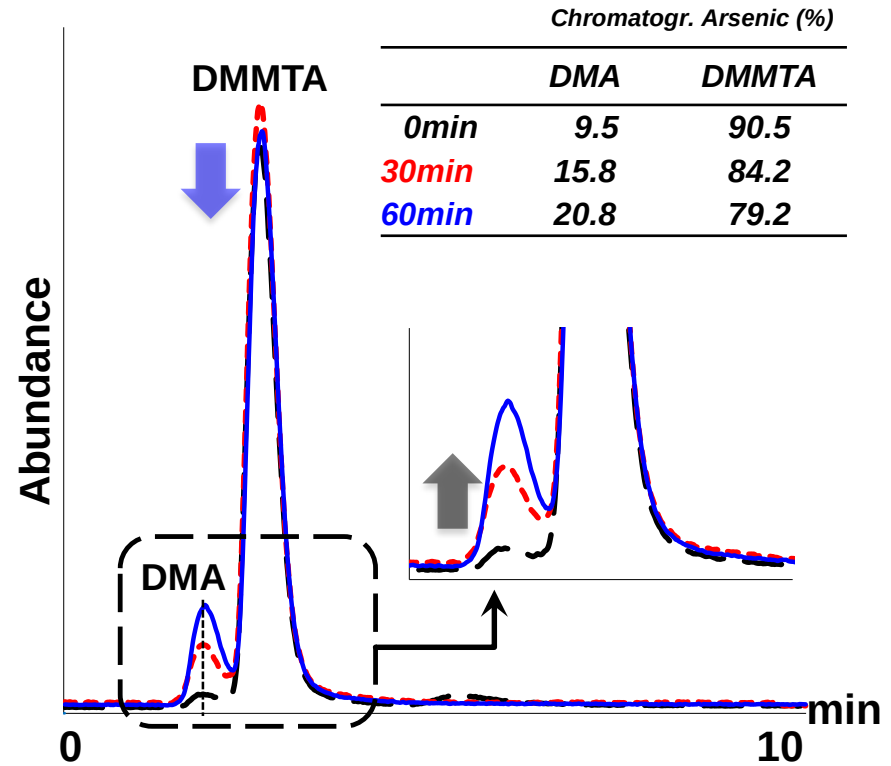
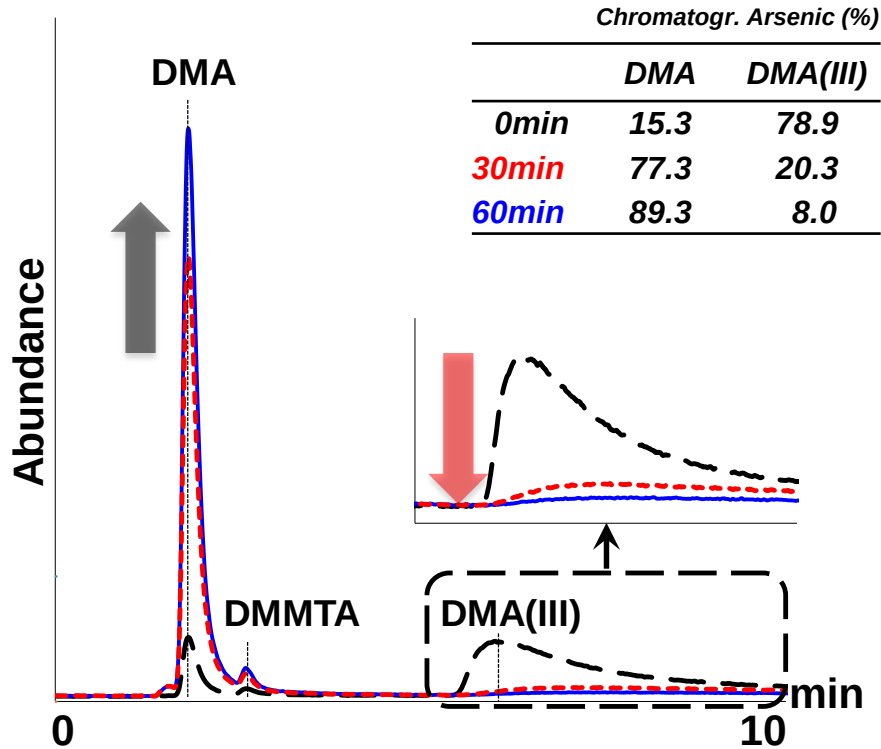
モノオキシゲナーゼの関与

DMA^{III}+S9m $\xrightarrow{\text{oxidation}}$

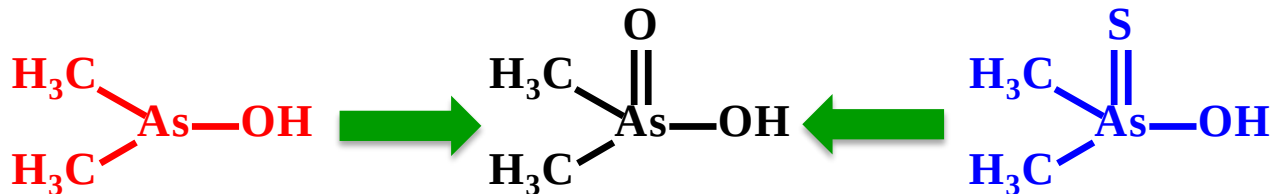
ix

DMMTA^V+S9m $\xrightarrow{\text{oxidative desulfuration}}$

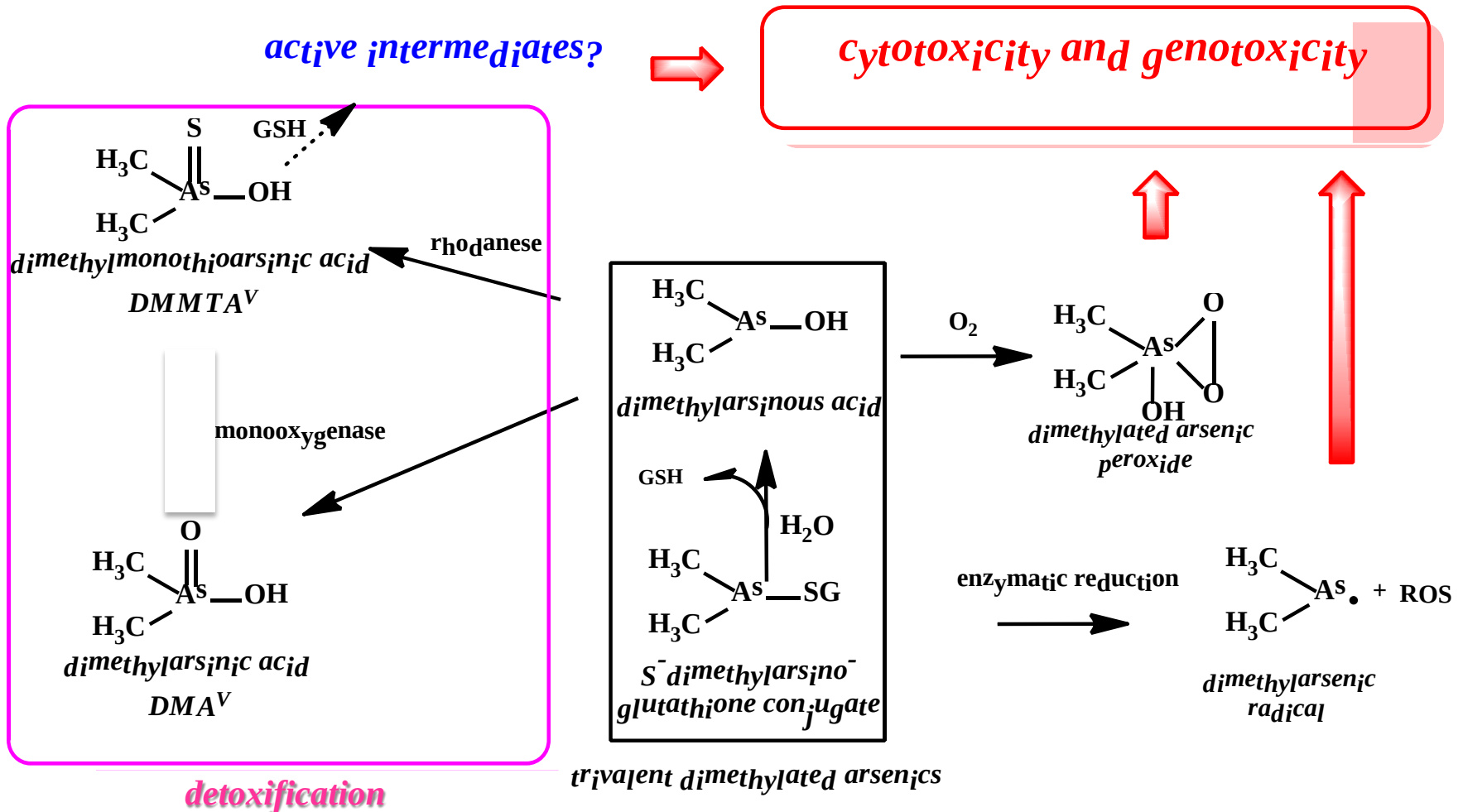
ix



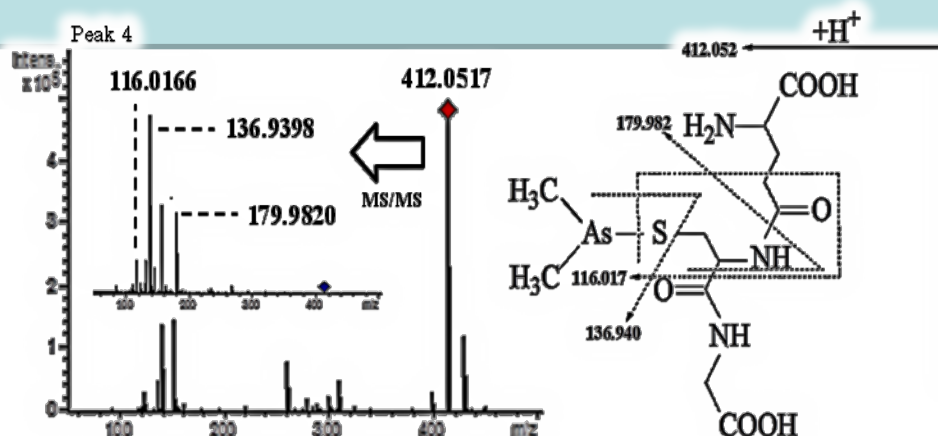
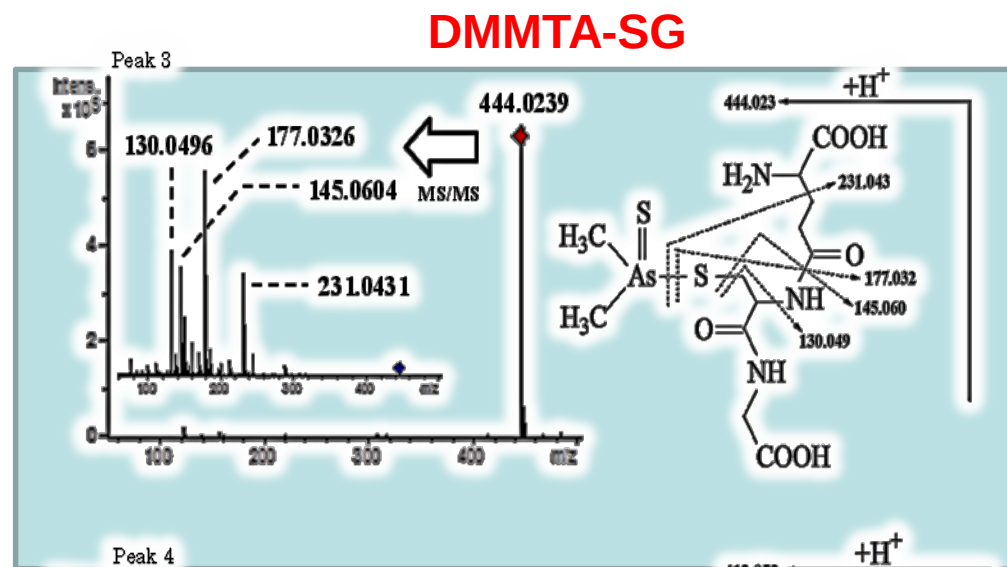
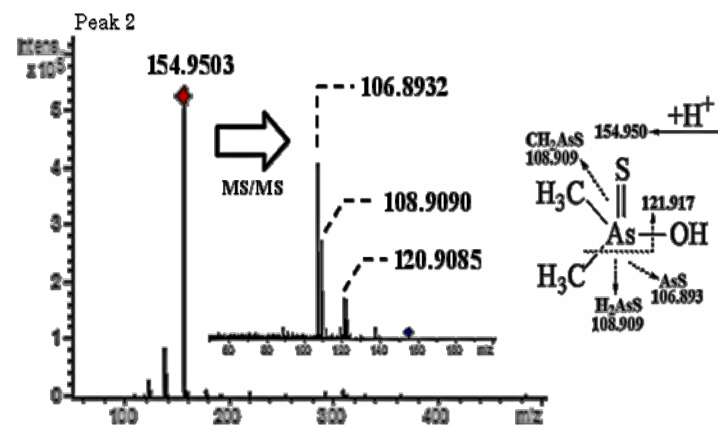
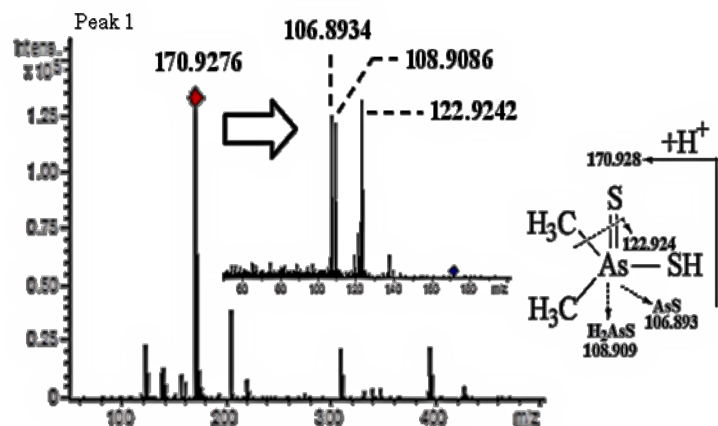
detoxification ?



ジメチルヒ素の代謝機序 —解毒と代謝活性化—



DMMTAの生体チオールとの代謝 -HPLC-TOFMSによる検討-



食品安全委員会では、食品中のヒ素について自ら評価を行い、2013年12月に食品健康影響評価の結果を厚生労働大臣ならびに農林水産大臣に通知した。評価書作成に当たって、圓藤吟史、鰐淵英機は汚染物質専門調査会専門委員として、花岡研一、山中健三は専門参考人として参画した。

成果

食品安全委員会: 化学物質・汚染物質評価書 食品中のヒ素. 2013.12

食品安全委員会セミナー「ヒ素に関する最新知見について」

コーディネーター 佐藤 洋 食品安全委員会委員長代理

講演1 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: Dr. Kevin Francesconi 教授

講演2 海産物におけるヒ素に関する知見について

水産大学校水産学研究科: 花岡 研一教授

講演3 食品中の無機ヒ素の健康影響について

～食品中のヒ素に係る食品健康影響評価(案)～

化学物質・汚染物質専門調査会: 圓藤 吟史専門委員

本研究で得られた成果

- ✓ AsSugsおよびAsLipidsの抽出法の確立
- ✓ AsSug328およびその代謝物の全合成に成功
- ✓ アルセノシュガーおよびアルセノリピッド代謝過程でDMA^Vが生成される
- ✓ ワカメ摂取後の主な尿中ヒ素代謝物にはDMA^Vである
- ✓ DMA^Vは生体内で一部、腸内細菌によりDMMTAに代謝され、尿中に存在する
- ✓ 膀胱上皮細胞に対してDMMTAは、膀胱発がん物質であるDMA^Vに比べてはるかに強い細胞毒性を有する
- ✓ *in vitro*において、DMMTAは染色体異常試験で陽性である

DMMTAはGSH存在下、3価ジメチルヒ素と同程度の毒性を示すことが報告されていることから、今後、DMMTAの代謝活性化機序について検討する必要がある。

DMMTAはDMA^V誘発ラット膀胱発がんにおける究極発がん物質のひとつである可能性が示唆された

DMMTAに対するリスク評価が食品中有機ヒ素化合物の健康影響評価に必要かつ不可欠

食品中ヒ素の代謝物DMMTAの発がん性に関する研究 (H26-27年度)

目的:

DMMTAおよび関連有機ヒ素化合物の体内動態、遺伝毒性および発がん性の有無を明らかにする

研究課題

1. DMMTAのF344 *gpt* deltaラット膀胱粘膜における変異原性および発がん性の検討
2. iAs^{III}およびDMA^V投与C57BL/6マウスにおけるDMMTA産生の検討
3. iAs^{III}およびDMA^VのINK4a/ARF 欠損マウスにおける発がん性の検討
4. DMMTAならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成
5. 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験

課題1 DMMTAのF344 *gpt* deltaラット膀胱粘膜における変異原性および発がん性の検討

DMMTAの経尿道的膀胱内投与法を用いた検討

□ 予備試験

F344ラットにDMMTAの経尿道的膀胱内直接注入(投与時間:30分/回)

- 
1. 膀胱粘膜の病理学的評価
 2. DMMTAの膀胱内の代謝動態の解析
(尿中および膀胱粘膜内のヒ素代謝産物の測定)

DMMTAの投与量および投与回数などの設定

□ 本試験

F344 *gpt* deltaラットに、DMMTAの経尿道的膀胱内直接注入

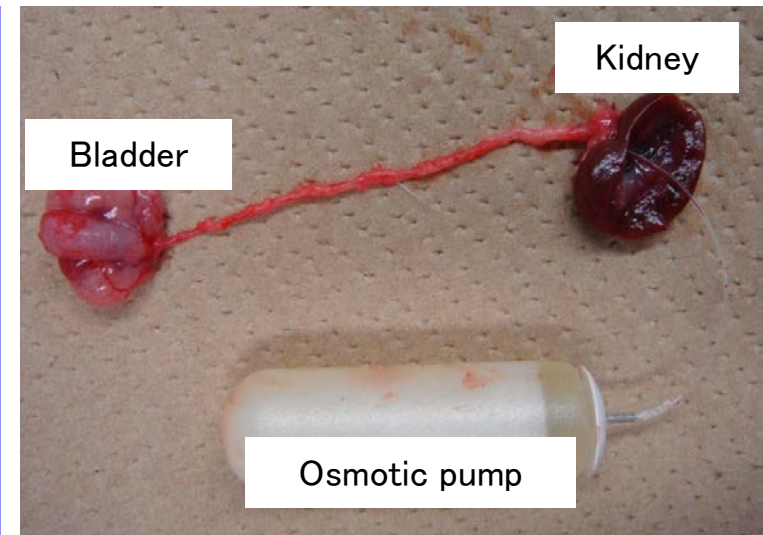
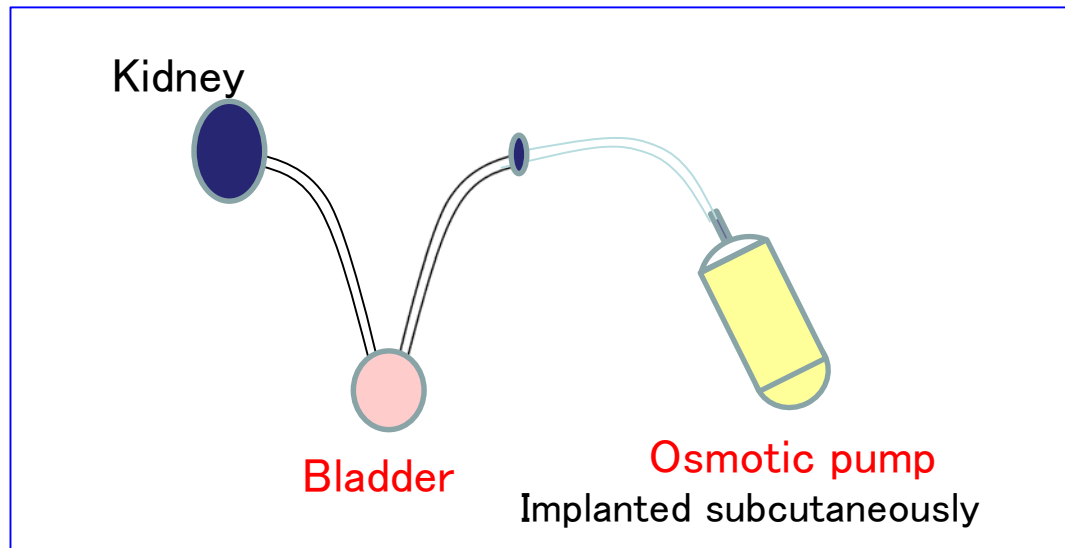
□ 膀胱における検討項目:

1. 尿中・膀胱粘膜内のヒ素代謝産物の経時的測定
2. DMMTAの膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討(*gpt* assay、Spi⁻ assay)
3. 病理学的解析

DMMTAの体内動態、遺伝毒性および発がん性の有無を明らかにする

課題1 DMMTAのF344 *gpt* deltaラット膀胱粘膜における変異原性および発がん性の検討

DMMTAの経尿管的長期間膀胱内投与法を用いた検討 (投与時間:2週間/回)



浸透圧ポンプ :ALZET[®] Osmotic mini-pump: 2ML2 (5.0 μ L/h, 2 weeks)

□ 予備試験(F344ラット)

DMMTAの投与量と投与回数の設定

□ 本試験(F344 *gpt* deltaラット)

DMMTAの体内動態、遺伝毒性および発がん性の有無を明らかにする

課題2 iAs^{III}およびDMA^V投与C57BL/6マウスにおけるDMMTA産生の検討

❖ 背景

- ・ マウスは経胎盤ばく露以外の経路でヒ素発がん到低感受性
- ・ ヒ素投与マウスの尿中ヒ素代謝物に関する知見は少ない

❖ 目的

マウスのヒ素発がん低感受性とDMMTAとの関連性を検討する

❖ 方法

C57BL/6マウスにiAs^{III}およびDMA^Vを飲水投与し、尿中および糞中における投与に由来するDMMTAを測定する

課題3 iAs^{III}およびDMA^VのINK4a/ARF欠損マウスにおける発がん性の検討(鰐渕)

❖ 背景

- ・ マウスは経胎盤ばく露以外の経路でヒ素発がん到低感受性
- ・ ヒト材料および培養細胞を用いた研究でヒ素発がん性にp16^{INK4a}、p14^{ARF}などのがん抑制遺伝子の不活性化が関与していると示唆されているが、動物モデルではまだ証明されていない
- ・ INK4a/ARF欠損マウスはp16^{INK4a}/p14^{ARF} のダブル欠損マウス

❖ 目的

1. iAs^{III}およびDMA^VのINK4a/ARF 欠損マウスにおける発がん性を明らかにする
2. マウスにおけるヒ素発がん性の証明を試みる

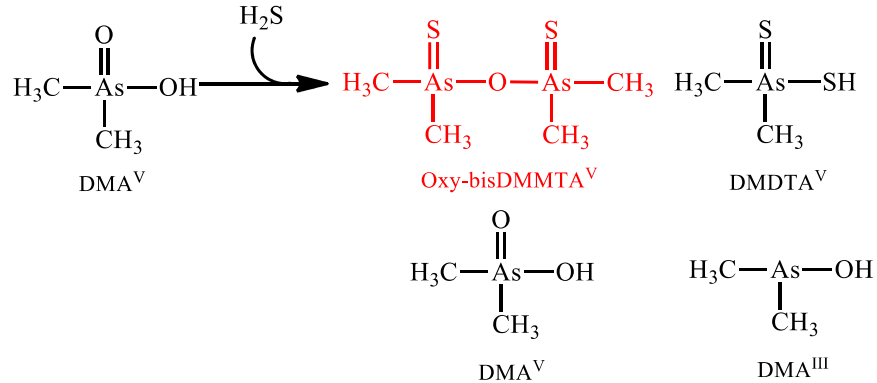
❖ 方法

1. INK4a/Arf -/-および+/-欠損マウスを用いて、iAs^{III}およびDMA^Vの飲水投与による発がん性試験を行う
2. 発がん性が認められた臓器における発がんメカニズムの解析を行う。

課題4 DMMTAならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成

①DMMTA合成

文献: MW Fricke et al. Chem Res Toxicol 2005,18(12):1821-9.



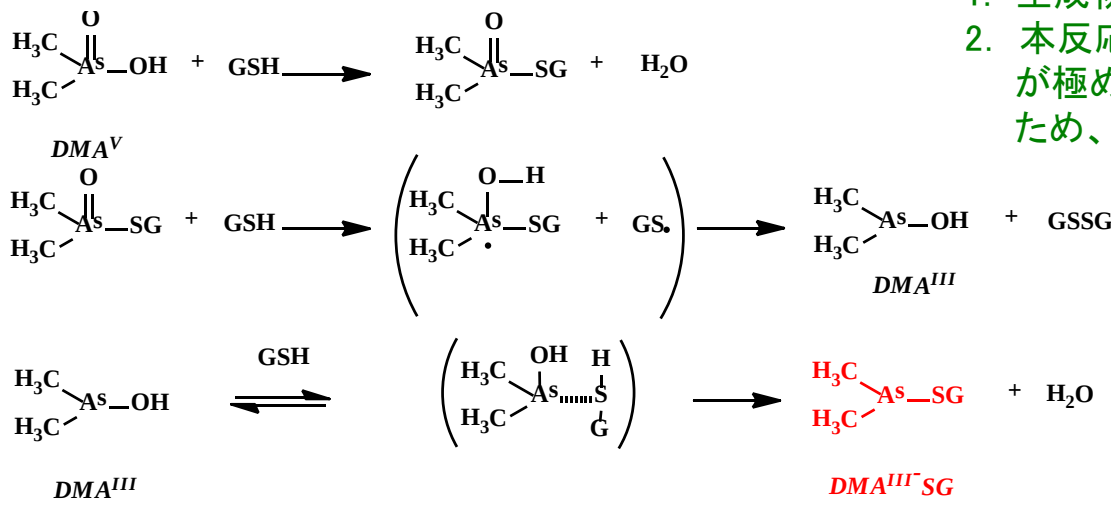
問題点

1. 高濃度硫化水素を使用、生成物も含めて毒性が強いので大量合成に不適
2. 本反応では不純物が多い
3. クロロホルムで抽出、ヘキサン/メタノール再結晶する

ため、無水DMMTA^V(oxy-bisDMMTA^V)が得られるが収率が悪く、結晶多形を示し、溶解性や物理化学的安定性が異なる可能性がある

②DMA^{III}-SG合成

文献: WR Cullen et al. J Inorg Biochem 1984, 21:179-194.



問題点

1. 生成物は毒性が強いので大量合成に不適
2. 本反応では不純物が多い。また、目的生成物の極性が極めて高く、かつpH7以上で容易に加水分解するため、高純度品が得られない

両化合物ともに分離精製法も含めて高い回収率に特化した合成法の開発を目指すとともに、活性中間代謝物が代謝実験から推定された場合、その合成も鋭意行う。

課題5 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験

1. 無細胞系での検討から発展的な検討の必要が生じた場合、ヒト肝細胞由来でCYPなどの薬物代謝酵素活性が高いヒト肝培養細胞株Hepa-RGまたはヒトiPS細胞から樹立した肝細胞を用いてより詳細な代謝経路の推定を行う

ReproHepato: ヒトiPS細胞由来肝細胞(凍結)

ヒト初代肝細胞に近い細胞機能を実現したヒトiPS細胞由来肝細胞を、世界で初めて商用供給いたします

リプロセルは、世界で初めてヒトiPS細胞由来肝細胞を製品化致しました。ReproHepatoはヒト初代培養肝細胞に近い細胞機能を持した正常分化細胞であり、同時に安定した大量供給を実現する製品です。この度発売したCYP3A4誘導試験に適した製品(Type 1)に続き、他のCYP(Cytochrome P450)アイソザイム試験にも最適化された製品を順次開発・発売いたします。

- ヒトiPS細胞由来のCYP陽性肝細胞です
- ヒト初代肝細胞に近いCYP(3A4/1A2/2C9/2C19)活性/誘導性を示します
- 安定供給可能でロット差が小さい肝細胞です
- 機能を保持したまま長期間の培養が可能です
- CYP受託アッセイサービスも承ります
- CYP2D6酵素活性の高い製品も開発中



ReproHepatoは分化した肝細胞の製品です。製品に添付の培地で6日間培養した後、CYPアッセイにご使用になれます。

※: 凍結細胞は、お受け取り後-80℃に保管して下さい。細胞を液体窒素で保管すると生存率が低下する場合があります。

株式会社リプロセルホームページより

肝の薬剤代謝酵素による影響評価向けに、ヒトiPS細胞から分化させた肝細胞が市販されている

- 1) 培養肝細胞を使用し、AsSugsあるいはAsLipidsの間代謝物と考えられているDMA^V、DMA^{III}、DMMTAに対する肝薬物代謝酵素群の影響(ヒ素化学形態の変化ならびにCYPなど薬物代謝酵素発現量の変化など)をみる。
- 2) ヒ素化学形態の変化はHPLC-ICP-MS、HPLC-TOFMS等を用いて分析する

2. ヒト培養肝細胞を用い、合成したDMMTA、DMA^{III}等のヒ素化合物について、Hepa-RG株を用いた細胞毒性試験を実施する。さらに結果次第では、マウスリンフォーマT/Kアッセイ(MLA)、コメットアッセイ等の遺伝毒性試験を行う予定である

期待される成果

DMMTAおよび関連有機ヒ素化合物の
体内動態の解明、遺伝毒性および発がん性の有無の確認



有機ヒ素の安全性評価



ヒ素発がんのメカニズムの解明



食品に由来する有機ヒ素の健康影響評価に大いに貢献