

研究課題名 (研究項目名)	有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明 (課題番号：1604) (2健康影響発現のメカニズムの解明 (3)食品中の微量化学物質・汚染物質のばく露と健康影響に関する研究 ②食品中のヒ素、水銀、カドミウム等のばく露量と健康影響に関する研究、特に有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明)
主任研究者	研究者名：鰐淵 英機 所属機関：大阪市立大学大学院医学研究科

## I 研究期間及び研究目的等

### 1 研究期間

平成 28 年度～平成 29 年度 (2 年間)

### 2 研究目的

ヒ素の発がん性については、疫学的に皮膚、肺、膀胱などで認められている。また、ヒ素は国際がん研究機関(IARC)の発がん性リスク分類において Group1(ヒトに対する発がん性が認められる)に分類される。これまでに我々は、ほ乳類における無機ヒ素化合物の主な代謝産物であり、細胞毒性は弱いが発染色体毒性の強い有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸(dimethyl arsenic acid、DMA<sup>V</sup>)に着目し、世界で初めて動物実験における DMA<sup>V</sup>の膀胱発がん性を明らかにしている。しかし、その発がん機序の詳細については未だ明らかとなっていないことから早期の解明が待たれている。近年、がん抑制遺伝子である INK4a/Arf の発現低下が無機ヒ素投与による肺がんで報告されており、さらに INK4a/Arf の発現抑制にはヒストン H3K9 のジメチル化が無機ヒ素投与群で増加することが明らかとなっている[Suzuki, T. and Nohara, K.. Journal of applied toxicology 33, 2013]。したがって、無機ヒ素による発がん機序に DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクス調節機構の関与が示唆されており、DMA<sup>V</sup>による発がん機序についてもエピジェネティックな異常の関与が疑われる。

また、DMA<sup>V</sup>の発がん性は成熟動物で確立されているものの、胎仔期ばく露による発がん性は未確立である。これまでに成熟マウスで発がん性を示さない無機ヒ素において、胎仔期ばく露の仔マウスの肝、下垂体、肺および卵巣に対して発がん性を示す報告があり[Waalkes, M.P. et al., Toxicology and Applied Pharmacology, 186, 2003]、そのメカニズムとしてエピジェネティックな異常があげられており[Nohara, K. et al., Toxicological sciences. 129, 2012]、DMA<sup>V</sup>の胎仔期ばく露による発がんリスク評価およびそのメカニズムの解明が急務であると考えられる。

本研究では、有機ヒ素化合物 DMA<sup>V</sup>による発がんメカニズムの解明および発がん過程におけるエピジェネティクスの関与についての検討を目的とした。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明	Dimethylarsinic acid (DMA <sup>V</sup> )誘発ラット膀胱発がんの各段階における遺伝子発現解析及びエピジェネティクス修飾異常の検索	鰐渕英機（大阪市立大学）
有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明	iAs <sup>III</sup> 及びDMA <sup>V</sup> のINK4a/Arf 欠損マウスにおける発がん性の検討	鰐渕英機（大阪市立大学）
有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明	妊娠期DMA <sup>V</sup> ばく露による発がん性の検討	魏 民（大阪市立大学）
有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明	生体をmimicした <i>in vitro</i> 系における食品中有機ヒ素化合物の分解生成物の同定および合成	小林弥生（国立環境研究所）
有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明	<i>in vitro</i> における分解生成物及び代謝物の毒性評価	小林弥生（国立環境研究所）

4 倫理面への配慮について

動物実験に関する倫理審査を大阪市立大学ならびに国立環境研究所において受け、承認された後に実験を開始するとともに、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）を遵守する。

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明

1) 個別課題名：Dimethylarsinic acid (DMA<sup>V</sup>)誘発ラット膀胱発がんの各段階における遺伝子発現解析及びエピジェネティクス修飾異常の検索（鰐渕 英機（大阪市立大学））

現在、無機ヒ素の発がん過程におけるエピジェネティクス異常に関する報告が散見されるが、有機ヒ素化合物に関するものは殆どないのが現状である。本研究では、DMA<sup>V</sup>誘発ラット膀胱発がんモデルで得られた膀胱腫瘍由来凍結サンプルおよび4週間DMA<sup>V</sup>投与膀胱サンプルを用いて、ヒ素誘発膀胱がん機序の解明およびヒ素発がんリスク評

価およびリスクマネジメントに有用なバイオマーカーの探索を行った。

DMA<sup>V</sup>誘発ラット膀胱発がん機序を明らかにするために、DMA<sup>V</sup>を4週間投与したラット膀胱粘膜上皮およびDMA<sup>V</sup>誘発ラット膀胱がんそれぞれよりRNAを抽出し、mRNAおよびmiRNAの網羅的解析を行った。発現変動がみられた遺伝子について、IPAソフトウェアによるパスウェイ解析およびパスウェイ関連因子の発現調節にかかわるmiRNAについて抽出した結果、腫瘍では過剰に発現しているパスウェイとしてWnt/beta-catenin シグナルおよびAryl hydrocarbon receptor シグナル (AhRシグナル) が、ばく露早期で強く抑制されているパスウェイとしてIL8シグナルが、それぞれ同定された。さらに、Wnt/beta-cateninシグナルおよびAhRシグナルにかかわるmiRNAとしてmiR199aが、IL-8シグナルに関与するmiRNAとしてmiR146aが同定された。以上の結果から、DMA<sup>V</sup>ばく露早期では発現に差がみられないAhRシグナルおよびWnt/beta-cateninシグナルが、miR199aの発現減少に伴ってシグナル活性が増大していること、またDMA<sup>V</sup>ばく露早期においてmiR146aの発現によってIL-8シグナルが抑制的に制御されていることがそれぞれ明らかとなった。

したがって、DMA<sup>V</sup>ばく露により誘発されたmicroRNAの発現異常といったエピジェネティックな異常が、DMA<sup>V</sup>誘発膀胱発がん機序としてばく露早期より関与していることが明らかとなった。

## 2) iAs<sup>III</sup>及びDMA<sup>V</sup>のINK4a/Arf 欠損マウスにおける発がん性の検討 (鰐淵 英機 (大阪市立大学))

がん抑制遺伝子INK4a/Arf (p16/14) 欠損マウスを用いたSodium *meta*-arsenite (iAs<sup>III</sup>) 及びDMA<sup>V</sup>の発がん性試験を実施した。INK4a/ARF遺伝子のホモ欠損型、ヘテロ欠損型および野生型にiAs<sup>III</sup>とDMA<sup>V</sup>をそれぞれ200ppm、150ppmの濃度で実験開始時より飲水投与している。また、対照群として水道水を同様に自由飲水させた。遺伝子型(ホモ欠損型、ヘテロ欠損型および野生型)、雌雄、投与物質2つ(iAs<sup>III</sup>及びDMA<sup>V</sup>)と対照群の計18群(3x2x3=18)をそれぞれ25~28匹、計461匹とした。

病理組織学的解析の結果、野生型の対照群と比較して、膀胱をはじめとする種々の臓器に対してヒ素の発がん性に関して有意な差はみられなかった。

したがって、マウスにおける無機ヒ素および有機ヒ素による発がん機序においてINK4a/Arfの欠損が関与しないことが明らかとなった。

## 3) 妊娠期DMA<sup>V</sup>ばく露による発がん性の検討 (魏 民 (大阪市立大学))

有機ヒ素化合物DMA<sup>V</sup>の経胎盤ばく露による発がんリスクに関する知見は未だ報告されていない。しかしながら、無機ヒ素の胎仔期ばく露によって、仔マウスが成熟後、肝臓、肺、副腎および卵巣に発がん性を引き起こすことが報告されていることから、無機ヒ素の主な生体内代謝物であるDMA<sup>V</sup>の経胎盤ばく露による仔マウスの発がん影響について早急に検討する必要がある。

そこで、本研究はDMA<sup>V</sup>の経胎盤ばく露による仔マウスへの発がん影響について検討を行った。さらに、メカニズム解析を目的としたDMA<sup>V</sup>の経胎盤ばく露による雄性新生仔マウス肺における影響について検討を行った。妊娠期の雌マウスにDMA<sup>V</sup>を0および

200 ppm の用量で飲水投与し、経胎盤ばく露により作製した仔雌雄マウスを 84 週齢まで無処置で経過観察し、解剖の後、発がん性を検索した。さらにメカニズム解析を目的として、経胎盤ばく露により作製した雄性新生仔マウス肺を採取し、種々の解析を行った。

病理組織学的解析の結果、DMA<sup>V</sup> ばく露群の雄仔マウスでは、肺細胞がんおよび総肺腫瘍（腺腫＋腺癌）が有意に増加した。さらに DMA<sup>V</sup> ばく露群の雄仔マウスでは、肝細胞がんが有意に増加し、総肝腫瘍（肝細胞腺腫＋肝細胞がん）も増加傾向が認められた。一方、DMA<sup>V</sup> ばく露群の雌仔マウスでは、肝腫瘍および肺腫瘍の発生に影響は認められなかった。

雄性マウス新生仔肺を用いた解析の結果、DMA<sup>V</sup> 投与群において Ki67 陽性率の有意な増加がみられた。また HPLC/ICP-MS による肺におけるヒ素の定量的形態別解析の結果、無処置群と比較してトリメチルアルシンオキシド（TMAO）の有意な変動がみられなかったのに対して、ジメチルモノチオアルシン酸（DMMTA<sup>V</sup>）およびジメチルジチオアルシン酸（DMDTA<sup>V</sup>）が有意に増加していることが明らかとなった。さらにその代謝過程で S-adenosylmethionine（SAM）が有意に増加していること、ヒストンメチル基転移酵素である G9a の発現増加、ヒストン H3K9me3 が有意に増加していることが明らかとなった。さらにヒストン H3K9me3 に対する標的因子を検索する目的で ChIP-seq を実施した結果、がん関連遺伝子である p53 の異常な活性化が bio informatics 解析により強く示唆された。

以上の結果から、DMA<sup>V</sup> の経胎盤ばく露で雄仔マウスにおいて肺発がんおよび肝発がんを誘発する可能性が示された。また、肺および肝臓は無機ヒ素の経胎盤ばく露の標的臓器でもあること、DMA<sup>V</sup> は無機ヒ素の主要な体内代謝物であることから、DMA<sup>V</sup> が無機ヒ素の経胎盤ばく露による発がん性に関与することが強く示唆された。さらに、DMA<sup>V</sup> に経胎盤ばく露した雄性新生仔マウス肺において、ヒストンメチル化異常が生じていることが明らかとなり、有機ヒ素化合物 DMA<sup>V</sup> の経胎盤ばく露による発がんメカニズムとしてエピジェネティックな異常の関与が明らかとなった。

#### 4) 生体を mimic した *in vitro* 系における食品中有機ヒ素化合物の分解生成物の同定および合成（小林弥生（国立環境研究所））

本項目はヒトの口腔、胃及び小腸の環境をmimicしたBioaccessibility評価系を構築し、*in vitro*による食品中有機ヒ素化合物の分解生成物を明らかにすることを目的とした。

まず、文献検索により、bioaccessible抽出法および有機ヒ素化合物の分析手法に関して情報収集を行った。bioaccessible抽出法に関してはFood and Chemical Toxicology 49 (2011)2808-2815を参考にして模擬消化液を作製し、37℃で口腔環境は5分、胃環境は2時間、小腸は十二指腸液で5分反応させた後、胆汁を添加しさらに2時間加温した。口腔、口腔＋胃および口腔＋胃＋小腸の3段階に分けて、bioaccessible抽出効率を総ヒ素濃度の測定をすることにより評価した。総ヒ素濃度の測定は濃硝酸および過酸化水素で酸分解した後、ガリウム、またはテルルを内標として、ICP-MSで内部標準法により測定した。各段階n=3で再現性を確認するため2回評価を行った。また、各

段階におけるヒ素の化学形態別分析をHPLC-ICP-MS法、LC-MS (/MS) により行った。

決定した抽出方法、測定条件を用いて、総ヒ素濃度が保証され、含有有機ヒ素化合物が文献によって報告されている NMIJCRM 7405-a ひじき粉末を用いて模擬消化液によるbioaccessible抽出評価を行った。その結果、口腔、口腔+胃、口腔+胃+小腸の順にヒ素の回収率は約43%、52%、76%となった（MQ水はそれぞれ約43%、58%、82%）。CRMは作成時に細胞壁が破壊されているので、比較的効率良くヒ素が回収されたと示唆される。陽イオン交換カラムを用いて各段階のbioaccessible抽出液中のヒ素の化学形態別分析を行ったところ、主要なヒ素化合物としてiAs<sup>V</sup>が検出され、わずかにDMA<sup>V</sup>と3つの未同定ヒ素化合物が検出された。しかしながら、MQ水抽出液との差異はみられず、また各消化段階でのヒ素の化学形態の変化もほとんどみられなかった。このことから、CRMひじき粉末中のヒ素化合物は小腸までの消化液では分解されないことが示唆され、腸内細菌での分解が推定された。さらに、陰イオン交換カラムを用いてbioaccessible抽出液のヒ素の化学形態別分析を行ったところ、iAs<sup>V</sup>、DMA<sup>V</sup>、MMA<sup>V</sup>、4つの未同定ヒ素化合物が検出された。これら市販の標準物質の無い未同定ヒ素化合物に関して、陰イオン交換カラムを装着したLC-MSにおいて分子量の測定を行った。その結果、 $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) = 329、393、409、483が検出された。これまでの報告から、それぞれ glycerol arsenosugar、sulfonate arsenosugar、sulfate arsenosugar、phosphate arsenosugarであると推定された。

無機ヒ素含有量がひじきと比較して低く、かつ試料中のヒ素濃度が保証されているノリ標準物質（GBW08521）に関しても、ひじき標準物質と同様の手法でbioaccessible抽出評価およびbioaccessible抽出液中のヒ素の化学形態別分析を行った。その結果、口腔、口腔+胃、口腔+胃+小腸の順にヒ素の回収率は約83%、82%、93%となった（MQ水はそれぞれ約81%、85%、89%）。ノリ標準物質中のヒ素化合物は口腔環境でも高い回収率であり、MQ水での抽出効率とほとんど差がみられなかった。陽イオンおよび陰イオン交換カラムを装着したHPLC-ICP-MS法で抽出液中のヒ素の化学形態別分析を行ったところ、市販の標準物質の無い2つの未同定ヒ素化合物とわずかにDMA<sup>V</sup>が検出された。陽イオン交換カラムを装着したLC-MSで2つの未同定ヒ素化合物の分子量の測定を行ったところ、主要な未同定ヒ素化合物はphosphate arsenosugarであることが推定された。もうひとつの未同定ヒ素化合物に関しては、低濃度のため同定には至らなかったが、カラムの保持時間から、glycerol arsenosugarであることが推測された。しかしながら、ひじき標準物質の結果同様、MQ水抽出液との差異はみられず、また各消化段階でのヒ素の化学形態の変化もほとんどみられなかったことから、ノリ標準物質中のヒ素化合物は小腸までの消化液では分解されないことが示唆された。

以上の結果から、有機ヒ素化合物の分解には腸内細菌が関与することが推定されたため、ノリ標準物質のbioaccessible抽出液をマウス盲腸内容物と反応させ、反応溶液中のヒ素の化学形態別分析を行った。精製食で育成させた雄性C57BL/6Jマウスを炭酸ガスで安楽死させた後、無菌的に盲腸を摘出し、嫌気的狀態を保持したチャンバー内で腸内容物を採取した。塩化カルシウム、硫化マグネシウム、リン酸二水素カリウム、炭酸水素ナトリウムおよび塩化ナトリウムで構成された溶液にマウス盲腸内容物を加え、盲腸内容物懸濁液を作製した。この懸濁液に対し、小腸環境まで反応させたノ

リ標準物質懸濁液を添加し、37°Cで24時間反応させた。なお反応は3匹のマウスを用いてn=3、再現性の確認の為に3回同様の操作を行った。24時間後に4°C、10,000gで10分間遠心し上清を得た。陽イオン交換カラムを装着したHPLC-ICP-MS法にて得られた上清中のヒ素の化学形態別分析を行った。その結果、盲腸内容物との反応により、市販の標準物質の無い未同定ヒ素化合物とMMA<sup>V</sup>と保持時間の一致するピークが検出された。陰イオン交換カラムを用いてヒ素の化学形態別分析を行ったところ、MMA<sup>V</sup>と保持時間の一致するピークは検出されず、ブロードなピークのみ検出された。このことから、陽イオン交換カラムで検出されたピークはMMA<sup>V</sup>ではなく、未同定ヒ素化合物であることが推定された。これまでの研究から、ヒ素糖を摂取した動物やヒトにおいて、DMA<sup>V</sup>が尿中の主要なヒ素化合物であることが報告されている。また、DMA<sup>V</sup>を経口投与したラットの尿から、ジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA<sup>V</sup>)、ジメチルジチオアルシン酸 (DMDTA<sup>V</sup>)、トリメチルアルシンオキサイド (TMAO<sup>V</sup>)、トリメチルアルシンサルファイド (TMS<sup>V</sup>) が検出されていることから (Kobayashi Y. *et al.* (2016) *Metals*, 6, 231-246.)、DMA<sup>V</sup>およびTMAO<sup>V</sup>に加え、DMMTA<sup>V</sup>、DMDTA<sup>V</sup>、TMS<sup>V</sup>を合成し、保持時間を確認したが、いずれも該当しなかった。そこで、盲腸内容物との反応ではヒ素糖の骨格は分解されず、糖の骨格に結合したジメチルヒ素の酸素が硫黄に変換された含硫ヒ素糖になっていると予想し、LC-MSにより未同定ヒ素化合物の分子量を測定した。しかしながら夾雑物が多く、また濃度も低いことから同定には至らなかった。

そこで、夾雑物の低下とLC-MSの測定可能な濃度の確保を目的として、合成glycerol arsenosugar (産業技術総合研究所、成川知弘博士より寄贈) を精製、濃縮し盲腸内容物と反応させた。操作手順は上記と同様に行い、反応時間は37°Cで0、0.5、1、2、24時間行うとともに、氷上で24時間反応させた溶液との比較も行った。陽イオン交換カラムを装着したHPLC-ICP-MSで反応溶液中のヒ素の化学形態別分析を行ったところ、37°Cで2時間まではglycerol arsenosugarの保持時間と同様のピークのみ検出され、24時間後には市販の標準物質が無い、未同定のヒ素化合物が検出された。また、0°Cで24時間反応させた溶液からは、glycerol arsenosugarのみで、反応生成物は検出されなかった。この未同定ヒ素化合物の分子量をLC-MSで測定したところ、 $m/z ([M+H]^+) = 345$  が検出され、ジメチルヒ素の酸素が硫黄に変換されたヒ素化合物であることが推測された。この推定を確認するため、LC-MS/MSでの測定を行った。その結果、collision energy 25および35eVにおいて $(CH_3)_2As=S$ と示唆される、 $m/z = 137$ が検出された。

以上のことから、海藻中に含まれるヒ素糖は消化液では分解されず、腸内細菌によって糖骨格を保ったまま糖の骨格に結合したジメチルヒ素の酸素が硫黄に変換された含硫ヒ素糖に変化することを明らかにした。

##### 5) *in vitro*における分解生成物及び代謝物の毒性評価 (小林弥生 (国立環境研究所))

個別研究課題4で同定した海藻類中ヒ素化合物、生体内分解生成物、及び腸内細菌による代謝物に関して培養細胞を用いて毒性評価を行うことにより、腸内細菌の関与も含めた食品中有機ヒ素化合物摂取後の毒性発現の原因となるヒ素化合物を検索することを目的とした。しかしながら、ヒ素糖は消化液や腸内細菌ではほとんど分解されず、糖骨格を保持していた。そこで、Jurkat細胞を用いて合成 glycerol arsenosugar

の細胞毒性に関し、亜ヒ酸ナトリウムと比較した。Jurkat 細胞は白血病（急性 T 細胞性）から確立された株であり、浮遊系の培養細胞としてよく知られている細胞である。

Jurkat 細胞を最終濃度  $1.0 \times 10^6$  個になるように調整し、ヒ素化合物を含まない対照群と最終濃度が  $50 \mu\text{M}$  になるように調整した合成 glycerol arsenosugar および亜ヒ酸ナトリウムを添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間加温した ( $n=5$ )。24 時間後に alamarBlue を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた後、励起波長  $544\text{nm}$  として、 $590\text{nm}$  の波長強度を測定した。その結果、対照群の生存率を 100% とした時、 $50 \mu\text{M}$  の glycerol arsenosugar 群の生存率は約 88%、一方、亜ヒ酸ナトリウム群では約 8% となった。このことから、glycerol arsenosugar の毒性は亜ヒ酸ナトリウムと比較し低いことが分かった。また、含硫ヒ素糖に関しては、過去の報告からその毒性はオキソ体とほぼ同程度であることは分かっている。

以上の結果から、盲腸内容物との反応で生成したと考えられる含硫ヒ素糖に関して、亜ヒ酸と比較しヒ素糖の毒性が低いことから、ヒ素糖摂取後の消化の過程において、ヒ素による消化器官への影響は低いことを裏付ける結果が得られた。

## (2) 研究全体の成果、考察及び結論

「成果及び考察」本研究は、有機ヒ素化合物による発がんメカニズムの解明を目的とし、種々の検討を行った。本研究で得られた成果は以下の通りである。

- 1) 現在、無機ヒ素の発がん過程におけるエピジェネティクス異常に関する報告が散見されるが、有機ヒ素化合物に関するものは殆どないのが現状である。本研究では、DMA<sup>V</sup> 誘発ラット膀胱がんを中心に中心的な役割を担うと考えられる mRNA 及び miRNA の同定を目的とした。その結果、AhR シグナルおよび Wnt/beta-catenin シグナルが、miR199a の発現減少に伴ってシグナル活性が DMA<sup>V</sup> ばく露によって増大していることが明らかとなった。さらに、miR146a の発現減少に伴う IL-8 シグナル抑制制御機構の破たんの関与が示唆された。したがって、DMA<sup>V</sup> ばく露により誘発された microRNA の発現異常といったエピジェネティックな異常が、DMA<sup>V</sup> 誘発膀胱がん機序としてばく露早期より関与していることが明らかとなった。
- 2) iAs<sup>III</sup> 及び DMA<sup>V</sup> の発がん高感受性 INK4a/Arf (p16/14) 欠損マウスを用いた発がん性試験を実施した。病理組織学的検索の結果、各群において散発的に悪性リンパ腫や皮下腫瘍などが認められたが、対照群と比較して iAs<sup>III</sup> 及び DMA<sup>V</sup> 投与群における発生頻度の有意な変化は認められなかった。また、種々の臓器における腫瘍の発生頻度および個数について、遺伝子表現型の違いによる差はみられなかった。以上の結果から、マウスにおいては、INK4a/Arf (p16/14) 欠損はヒ素発がん感受性に関与しないことが明らかになった。
- 3) マウスにおける DMA<sup>V</sup> の胎児期ばく露による発がん性を評価するために、長期試験を実施し 84 週齢時に剖検を行い、病理組織学的解析を行った結果、雄の DMA<sup>V</sup> 投与群で肺腺癌および肝細胞がんの有意な発生率の増加がみられた。しかし雌の DMA<sup>V</sup> 投与群では有意な変化はみられなかった。以上より、胎仔期(胎齢 8-18 日)に DMA<sup>V</sup> にばく露した雄性仔マウスはその成熟後、肺及び肝臓において腫瘍が生じることが明らかとなった。また、DMA<sup>V</sup> 経胎盤ばく露雄性新生仔肺を用いた解析の結果、無

処置群と比較して、DMA<sup>V</sup> 経胎盤ばく露群でヒストン H3K9me3 の有意な増加が確認された。さらに、ヒストン H3K9me3 による標的因子として、p53 の異常な活性化が示唆された。

以上の結果から、DMA<sup>V</sup> に経胎盤ばく露した雄性新生仔マウス肺において、ヒストンメチル化異常が生じていることが明らかとなり、有機ヒ素化合物 DMA<sup>V</sup> による発がんメカニズムとしてエピジェネティックな異常の関与が強く示唆された。

- 4) 模擬消化液を作製し、各段階でのヒ素化合物の化学形態別分析を HPLC-ICP-MS および LC-MS(/MS) で行いその構造を推定した。また、マウス盲腸内容物と反応させ、分析化学的手法により、反応生成物の構造を推定した。その結果、ヒ素糖は消化液では分解されず、腸内細菌によって糖骨格を保ったまま糖の骨格に結合したジメチルヒ素の酸素が硫黄に変換された含硫ヒ素糖に変化することを明らかにした。
- 5) 盲腸内容物との反応で生成したと考えられる含硫ヒ素糖に関しては、市販の標準物質が存在せず、過去の報告からオキソ体と比べても毒性はほぼ同じであることから合成 glycerol arsenosugar に焦点を絞って毒性試験を行った。亜ヒ酸と比較しヒ素糖の毒性は低いと、ヒ素糖摂取後の消化の過程において、ヒ素による消化器官への影響は低いことを裏付ける結果を得た。

### III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
  1. 鰐淵英機. 膀胱癌のリスク因子・発がん機序を基盤としたがん予防. がん予防学術大会 2016、名古屋（2016年7月）
  2. 小林弥生, 鈴木紀行, 小椋康光, 平野靖史郎. 質量分析法に基づくヒ素脂質の代謝および毒性機構の解明 第1報～分析および抽出手法の検討～, フォーラム 2016: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 東京(2016年)
  3. 魏 民、藤岡正喜、辰己久美子、山口貴嗣、北野光昭、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. Dimethylarsinic acid の胎仔期暴露における発がん性の検討. 第33回日本毒性病理学会総会および学術集会、大阪（2017年1月）
  4. 鰐淵英機. 実験的アプローチを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明. 第106回日本病理学会総会、東京（2017年4月）
  5. 鰐淵英機、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ. ヒ素の発がんリスク評価. 第44回日本毒性学会学術年会、神奈川（2017年7月）
  6. 藤岡正喜、魏 民、熊田賢次、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. CD1 マウスにおけるジメチルアルシン酸(DMA)の胎児期ばく露による発がん性. 第76回日本癌学会学術総会、神奈川（2017年9月）
  7. 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. マウス経胎

- 盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 23 回ヒ素シンポジウム、茨城 (2017 年 12 月)
8. 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄 (2018 年 1 月)
9. 熊田賢次、藤岡正喜、魏民、大石裕司、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序. 第 17 回分子予防環境医学研究会、三重 (2018 年 2 月)
10. 小林弥生, 平野靖史郎. 模擬消化液による海藻類標準試料溶出液中のヒ素の化学形態別分析. 日本薬学会 第 138 年会、石川 (2018 年 2 月)
- 3 特許及び特許出願の数と概要
- 4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

#### IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

##### 1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
<p>(1) DMA<sup>V</sup> 誘発ラット膀胱発がんの各段階における経時的遺伝子発現解析及びエピジェネティクス修飾異常の検索 (平成 28-29 年度)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DMA<sup>V</sup> の膀胱発がん性のメカニズムを明らかにすること。</li> <li>• ヒ素発がんリスク評価とリスクマネージメントに応用できるバイオマーカーの開発に寄与するデータ基盤が得られること。</li> </ul>	5	<p>DMA<sup>V</sup> 誘発ラット膀胱がんを中心に中心的な役割を担うと考えられるパスウェイとして、AhR シグナル、Wnt/beta-catenin シグナルおよび IL-8 シグナルが bio informatics 解析で明らかとなった。また、microRNA によるエピジェネティックな異常の関与が、DMA<sup>V</sup> 誘発膀胱発がん機序としてばく露早期より関与していることが明らかとなった。</p> <p>以上より、当初設定した到達目標を達成した。</p>
<p>(2) iAs<sup>III</sup> 及び DMA<sup>V</sup> の INK4a/Arf 欠損マウスにおける発がん性の検討 (平成 28-29 年度)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• がん抑制遺伝子である INK4a 及び ARF の不活性化とヒ素発がん性との関連性を明らかにすること。</li> <li>• マウスにおけるヒ素発が</li> </ul>	5	<p>マウスにおいては、INK4a/Arf (p16/14) 欠損はヒ素発がん感受性に関与しないことが明らかになった。</p> <p>以上より、当初設定した到達目標を達成した。</p>

<p>ん性に関する知見が得られること。</p>		
<p>(3) 妊娠期 DMA<sup>V</sup>ばく露による発がん性の検討 (平成 28-29 年度)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 妊娠期 DMA<sup>V</sup>ばく露が仔動物に対する発がん性の有無を明らかにすること。</li> <li>・ 妊娠期 DMA<sup>V</sup>ばく露が仔動物に発がん性が認められた場合、標的臓器における遺伝毒性の有無を明らかにすること。</li> <li>・ 妊娠期 DMA<sup>V</sup>ばく露による発がんリスク評価に必要な基礎データが得られること。</li> </ul>	5	<p>胎仔期に DMA<sup>V</sup>にばく露した雄性仔マウスはその成熟後、肺及び肝臓において腫瘍が生じることが明らかとなった。また、DMA<sup>V</sup>の経胎盤ばく露による発がんメカニズムとしてエピジェネティックな異常の関与が明らかとなった。</p> <p>以上より、当初設定した到達目標を達成した。</p>
<p>(4) 生体を mimic した <i>in vitro</i> 系における食品中有機ヒ素化合物の分解生成物の同定及び合成 (平成 28-29 年度)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ヒトの胃及び小腸の環境を mimic した Bioaccessibility 評価系を構築し、<i>in vitro</i> による食品中有機ヒ素化合物の分解生成物を明らかにすること。</li> <li>・ 腸内細菌による代謝も明らかにすること。</li> </ul>	5	<p>模擬消化液を作製し、各段階でのヒ素化合物の化学形態別分析を HPLC-ICP-MS および LC-MS(/MS) で行いその構造を推定した。また、マウス盲腸内容物と反応させ、分析化学的手法により、反応生成物の構造を推定した。その結果、ヒ素糖は消化液では分解されず、腸内細菌によって糖骨格を保ったまま糖の骨格に結合したジメチルヒ素の酸素が硫黄に変換された含硫ヒ素糖に変化することを明らかにした。</p> <p>以上より、当初設定した到達目標を達成した。</p>
<p>(5) <i>in vitro</i> における分解生成物及び代謝物の毒性評価 (平成 29 年度)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 培養細胞を用いて (4) で同定した生体内分解生成物、及び腸内細菌による代謝物に関して毒性評価を行うことにより、食品中有機ヒ素化合物摂取後の毒性発</li> </ul>	5	<p>盲腸内容物との反応で生成したと考えられる含硫ヒ素糖に関しては、市販の標準物質が存在せず、過去の報告からオキソ体と比べても毒性はほぼ同じであることから合成 glycerol arsenosugar に焦点を絞り毒性試験を行った。亜ヒ酸と比較しヒ素糖の毒性は低いため、ヒ素糖摂取後の消化の過程において、ヒ素による消化器官への影響は低いことを裏付ける結果を得た。</p>

現の原因となるヒ素化合物を検索すること。		以上より、当初設定した到達目標を達成した。
----------------------	--	-----------------------

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

## 2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	当初設定した到達目標を達成した。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究で得られた DMA <sup>V</sup> の発がん性とその発がん機序に関する知見、ならびに食品中有機ヒ素化合物の代謝動態の解明は食品に由来する有機ヒ素の健康影響評価に必要な不可欠で、大いに貢献できると期待される。
<p>総合コメント</p> <p>DMA<sup>V</sup>誘発膀胱がんおよびDMA<sup>V</sup>短期ばく露ラット膀胱粘膜上皮における網羅的遺伝子発現解析およびmicroRNAの解析の結果、DMA<sup>V</sup>ばく露の早期から発がんまで異常発現するがん関連遺伝子が同定され、さらにそれらがmicroRNAを介した制御を受けていることが示唆された。また、DMA<sup>V</sup>の経胎盤ばく露で雄仔マウスにおいて肺発がんおよび肝発がんを誘発する可能性が示された。そのメカニズムとしてヒストンメチル化異常が生じていることが明らかになった。以上の結果から、有機ヒ素化合物DMA<sup>V</sup>による発がんメカニズムとしてエピジェネティックな異常の関与が明らかになった。さらに、海藻中に含まれるヒ素糖は消化液および腸内細菌では分解されず、糖骨格を保ち、その毒性は亜ヒ酸ナトリウムと比較し低いことが明らかとなった。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。