

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	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（課題番号：1102）（研究期間：平成23年度～平成25年度）
主任研究者名	研究者名：圓藤 吟史 所属機関：大阪市立大学大学院医学研究科

アルセノシュガー (AsSugs) あるいはヒ素脂質 (AsLipid) を含有する食品を摂取することによるヒ素の健康リスクを評価するために研究を行った。

「食用海産動植物に含まれるAsSugs、AsLipidの効果的な抽出法の検討」においては、ワカメを用いた酵素処置による抽出法を検討したところ、セルラーゼとアルギン酸リアーゼによる細胞壁分解とエタノール抽出で高い回収率を得た。なお、脂溶性ヒ素化合物の抽出のためにFolch法を使用した。

「AsSugsとその中間代謝物の化学合成」においては、海産食品中の主なヒ素化合物であるAsSug328の合成を試み、9つの反応ステップからなるAsSug328と、有毒な中間代謝物であるジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA) の合成法を確立した。

「食品中のAsSugsの化学形態と定量分析」においては、ワカメ中のAsSugsの同定はLC/MS/MSとLC-TOF-MSを用いて行い、ワカメ、カタクチイワシ及びマグロ中のヒ素化合物の定量はHPLC-ICP-MSを用いてヒ素形態別分析を行った。

「ボランティアへのAsSugs含有食品摂取と尿中代謝物の出納」においては、5人のボランティアにワカメを摂取させ、LC-TOF-MSとHPLC-ICP-MSにより尿中ヒ素化合物の同定と定量を行った結果、ヒ素摂取量0.06mgのうち、尿に30%が排出されたことが確認された。また、尿にジメチルアルシン酸 (DMA)、オキシジメチルアルシニルエタノール(オキシDMAE)、オキシジメチルアルセノアセテート(オキシDMAA)とチオDMAEが特定された。

「動物におけるAsSugsとその中間代謝物の安全性評価」においては、gpt deltaラットを用いてin vivo突然変異試験を実施した結果、DMA及び亜ヒ酸投与で有意な点及び欠失突然変異は誘発されなかった。また、DMMTAが尿中から膀胱上皮細胞内に取り込まれることが確認された。

「培養細胞を用いたAsSugs由来の中間代謝物の試験管内の分析」においては、ヒ素代謝物質の細胞障害性試験はMYP3と1T1細胞を用いて行った。無細胞試験管内でAsSugsから有毒な代謝物質の代謝を明らかにした。代謝物質の分析はHPLC-ICP-MSとHPLC-TOF-MSを用いて行った。その結果、DMMTAは最も有毒なヒ素代謝物質で、DMMTAのLC50（半数致死濃度）はMYP3細胞が4.6 μ M、1T1細胞が5.4 μ Mであった。DMMTAはグルタチオン (GSH) との反応によりDMMTA-SG結合体に変化し、次に硫黄原子を含んだ三価のジメチル化ヒ素と硫化水素に変化した。

「食品摂取による発がんリスクの低減法の検討」においては、遺伝子毒性テスト、動物実験による無機と有機のヒ素化合物の毒性、疫学的調査研究、国際機関による評価について情報収集を行い、知見を取りまとめた。これらの知見は、食品安全委員会における食品

中のヒ素のリスク評価書作成に活用された。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	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（研究期間：平成23年度～平成25年度）
主任研究者名	所属：大阪市立大学大学院医学研究科 氏名：圓藤 吟史（研究課題番号：1102）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成23年4月1日～平成26年3月31日

2 研究目的

アルセノシュガー（AsSugs）、アルセノリピッド（AsLipids）から代謝生成する中間体やメチルヒ素化合物の毒性を十分考慮に入れて、形態別ヒ素の暴露状況と健康リスクを評価する。

研究項目1：食用海産動植物に含まれる AsSugs、AsLipids の抽出法の検討（圓藤、山中、花岡、畑）

個別課題：堅固な細胞壁を形成する植物に含まれる AsSugs、抽出法の検討（圓藤、中、畑）

食用海産動植物には AsSugs あるいは AsLipids を多く含んだもの、脂の豊富なもの、細胞壁の堅固なものなど特徴がある。特にワカメは、堅固な細胞質を形成しているため、抽出が困難であり、また過激な分解法を用いると、AsSugs が分解される。そのため、ワカメの化学形態別の正確な分析はなされてこなかった。そこで、物理的粉碎法、抽出溶媒、セルラーゼなどによる分解効果について検討し、化学形態別の正確な分析法を開発する。

個別課題：カタクチイワシ加工品に存在するヒ素化合物（花岡）

カタクチイワシ加工品（煮干し）を試料としたこと背景は、次の2点である。①平成23年度の本事業で、魚肉中のジメチルアルシン酸（DMAA）含量は、乾燥処理、日光処理あるいは自己消化により増大することを見出した。さらに、このDMAAは、DMAA含有AsLipidsから誘導されるのみでなく、アルセノベタイン（AB）からも誘導されることが示唆された。②平成24年9月、A社製「ペット用減塩にぼし」の一部から、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令（平成二十一年四月二十八日農林水産省・環境省令第一号）に定めるヒ素含有量の規制値（15 μ g/g = 15ppm）を超えるヒ素が検出された。このため、同社は、自主回収を行った。

ここでは、カタクチイワシ加工品に、どのようなヒ素化合物が存在しているかあるいは誘導されているかを明らかにすることを目的とした。

個別課題：魚類の高脂質含量組織における硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS分析（花岡）

水溶性ヒ素化合物のみならずAsLipidsの構造について検討を行う上でも、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法は有用な方法である。しかし、当研究室において、脂質含量の高い食品に本法を適用した場合にはヒ素抽出率の低下が認められてきた。そこで、本研究で

は、魚類の高脂質含量組織から硝酸加熱抽出を行った際のヒ素抽出率に及ぼす、添加硝酸量の影響を検討した。

個別課題：サンマにおけるヒ素化合物の分布および化学形態に及ぼす漁獲時期や直火処理の影響（花岡）

日本における代表的食用魚としてサンマに着目し、サンマの普通筋および血合筋に含まれるAsLipids等について検討することを目的とした。また、それらヒ素化合物における季節変動および加熱による影響についても検討を行った。

研究項目 2：AsSugsの標準品およびその中間代謝物の化学合成（山中）

食品中から検出される AsSugs を合成する。

AsSugs の中間代謝物として報告されている 3 価ヒ素型、チオヒ素型、ジメチルアルシノエタノール、ジメチルアルシノ酢酸などの合成についても検討する。

研究項目 3：AsSugsの同定、定量分析（花岡、畑）

個別課題：AsSugsの化学形態の同定（畑）

分離性状の異なる複数のカラムを用いて液体クロマトグラフィー-誘導結合プラズマ質量分析法（HPLC-ICP-MS 法）や液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS 分析）等により抽出液中の AsSugsの化学形態を同定し、食品中含有量を明らかにする。

個別課題：非抽出性”ヒ素化合物の検討（花岡）

海藻からヒ素化合物を抽出する場合、ヒ素抽出率の低いことが知られている。そこで、海藻に存在するいわゆる“非抽出性”ヒ素化合物はどのような形態をとっているのかを明らかにする。

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排泄量との出納（圓藤、山中、畑）

ボランティアにより AsSugsが高濃度で含有する食品を摂取し、尿中ヒ素排泄量との出納を見る。

研究項目 5：AsSugおよび AsLipids の動物を用いた安全性評価（鰐淵、花岡）

個別課題名：ヒ素膀胱発がんの原因物質の検索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討（鰐淵）

これまでに我々は、AsSugs および AsLipids の代謝物である DMA^Vの代謝産物について液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマイオン質量分析装置（LC-ICP-MS）を用いて、新規代謝物質である DMMTA^Vを同定してきた。

また、ラット二段階膀胱発がん性試験で、尿中 DMMTA^Vの濃度と膀胱腫瘍促進作用に相関関係がみられ、DMMTA^Vのヒ素発がんへの関与が疑われた。そこで今回、膀胱尿路上皮における DMMTA^Vの影響、ならびに DMMTA^Vの産生経路の解明について検討した。

個別課題名：AsSugs および AsLipids の代謝物である DMA^V、iAs^{III}の *in vivo* 変異原性の検討（鰐淵）

有機ヒ素化合物であるDMA^Vおよび無機ヒ素化合物であるiAs^{III}の膀胱粘膜および肝臓における*in vivo*変異原性を明らかにすることを目的とした。

個別課題名：DMA^Vおよび iAs^{III}投与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（鰐淵）

ラット膀胱中期発がん性試験を実施し、DMA^Vおよび iAs^{III}によるヒ素トランスポーターの発現変動を検討するために、雄性 F344 ラットを *in vivo* 変異原性評価試験と同様に DMA^V 飲水投与し、剖検後、膀胱粘膜より mRNA を抽出し、ヒ素トランスポーターとして知られる ABC トランスポーター(ABCB1、ABCC1、ABCC2)の発現について解析を行った。

個別課題名：ホシザメ肝臓に存在する脂溶性ヒ素化合物のマウスにおける体内動態（花岡）

2013年度までの研究において、マウス肝臓へのホシザメ肝臓由来ホスファチジルアルセノコリン (PAC) 残留率は、複数回 (14日) 投与群が単回 (1日) 投与群を大きく下回り、投与総量に応じた増加は観察されなかった。しかし、複数回投与後のPAC絶対量は、単回投与後のそれを上回る傾向にあった。そこで、今回は残留したPACのその後について検討するため、単回投与後にPACを含まない試料を投与することで、PACの動態について検討した。

研究項目 6：腸内細菌や培養細胞を用いた代謝試験（圓藤、山中、畑）

ジメチルモノチオアルシン酸 (DMTA)は AsSug328 摂取者から検出され、ジメチルアルシン酸 (DMA)から代謝され、ヒ素代謝物の中で強い毒性が疑われている。そこで今回、DMTA の代謝活性化ならびに毒性発現機序をさらに明らかにするため、微生物を用いた復帰突然変異原性試験等を実施するとともに、DMTA 毒性発現に係る代謝物の分析を行った。

研究項目 7：食品摂取によるヒ素の発癌を含めた毒性発現のリスク低減法の検討（圓藤、山中、花岡、鰐淵）

以上から AsSugsおよびAsLipids を含有する食品摂取による健康リスクを総合評価する。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名 (所属機関名)
食用海産動植物に含まれる AsSugs、AsLipids の抽出法の検討	堅固な細胞壁を形成する植物に含まれる AsSugs、抽出法の検討	大阪市立大学 圓藤吟史 日本大学 山中健三 千葉科学大学 畑 明寿
	カタクチイワシ加工品に存在するヒ素化合物	水産大学校 花岡研一
	魚類の高脂質含量組織における硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS 分析	水産大学校 花岡研一
	サンマにおけるヒ素化合物の分布および化学形態に及ぼす漁獲時期や直火処理の影響	水産大学校 花岡研一
AsSugs の標準品および	AsSugs の標準品およびそ	日本大学 山中健三

その中間代謝物の化学合成	の中間代謝物の化学合成	
AsSugsの同定、定量分析	AsSugsの同定、定量分析	千葉科学大学 畑 明寿
	非抽出性”ヒ素化合物の検討	水産大学校 花岡研一
ボランティアによるAsSugs含有食品摂取と尿中ヒ素排泄量との出納	ボランティアによるAsSugs含有食品摂取と尿中ヒ素排泄量との出納	大阪市立大学 圓藤吟史 日本大学 山中健三 千葉科学大学 畑 明寿
AsSugおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価	ヒ素膀胱発がんの原因物質の検索:新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討	大阪市立大学 鰐淵英機
	AsSugsおよびAsLipidsの代謝物であるDMA ^V 、iAs ^{III} の <i>in vivo</i> 変異原性の検討	大阪市立大学 鰐淵英機
	DMA ^V およびiAs ^{III} 投与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 (鰐淵)	大阪市立大学 鰐淵英機
	ホシザメ肝臓に存在する脂溶性ヒ素化合物のマウスにおける体内動態	水産大学校 花岡研一
腸内細菌や培養細胞を用いた代謝試験	腸内細菌や培養細胞を用いた代謝試験	大阪市立大学 圓藤吟史 千葉科学大学 畑 明寿 日本大学 山中健三
食品摂取によるヒ素の発癌を含めた毒性発現のリスク低減法の検討	食品摂取によるヒ素の発癌を含めた毒性発現のリスク低減法の検討	大阪市立大学 圓藤吟史 日本大学 山中健三 水産大学校 花岡研一 大阪市立大学 鰐淵英機

4 倫理面への配慮について

- (1) ボランティアを対象にした、食事由来のヒ素摂取と排泄の関係をみる研究は、通常の食事から選択するため健康影響は考えられない。しかし、ヒトにおける研究であるため倫理委員会に申請し承諾を得ている（千葉科学大学 ヒトを対象とする研究に関する倫理審査委員会 承認番号22-4、ならびに日本大学薬学部 課題番号07-001）。ボランティアに十分に説明し、インフォームドコンセントを得る。また疫学研究に関する倫理指針（平成20年文部科学省・厚生労働省）及び細則に従う。

- (2) 動物実験に関する倫理審査を大阪市立大学ならびに日本大学において受け、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、実験動物の飼養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 研究内容及び方法

研究項目 1：食用海産動植物に含まれる AsSugs、AsLipids の抽出法の検討（圓藤、山中、花岡、畑）

個別課題：堅固な細胞壁を形成する植物に含まれる AsSugs、抽出法の検討（圓藤、山中、畑）

- i. 細胞壁の堅固な食用海産植物としてワカメを選定する。
- ii. 物理的粉碎法として、ビーズ破碎法、振とう法、超音波破碎法がある。これらの優劣について検討する。
- iii. 抽出溶媒を選択する。
- iv. ワカメのような細胞壁を形成する植物に対して、セルラーゼなどによる分解効果について検討する。

個別課題：カタクチイワシ加工品に存在するヒ素化合物（花岡）

試料：製造元の異なる市販のカタクチイワシ乾燥品、6種（以下、A, B, C, D, E, Fと呼称する）を試料として用いた。それぞれ乳鉢で細かく砕いた後、分析に用いた。**総ヒ素量の定量**：それぞれの試料0.2~0.3 gに、超微量分析用硝酸（69%）を6 ml添加した後、マイクロ波分解装置で分解（800Wで40分）した。その後、この分解溶液に超純水を加えて40 mlに定容し、誘導プラズマ-質量分析法（ICP-MS）を用いて試料中の総ヒ素濃度を測定した。

硝酸加熱溶解HPLC-ICP-MS法：各試料0.1 gに、超微量分析用硝酸を1 ml添加し、80℃で1時間加熱してヒ素化合物を抽出した。この抽出液について、HPLC-ICP-MSによるヒ素化合物の形態別分析を行った。

個別課題：魚類の高脂質含量組織における硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS分析（花岡）

試料：鮮魚店で購入した新鮮クロマグロの高脂質含量部位（大トロ）およびキアンコウの肝臓を用いた。**総ヒ素量の定量**：それぞれの試料0.2~0.3 gに、超微量分析用硝酸（69%）を6 ml添加した後、マイクロ波分解装置で分解（800Wで40分）した。その後、この分解溶液に超純水を加えて40 mlに定容し、誘導プラズマ-質量分析法（ICP-MS）を用いて試料中の総ヒ素濃度を測定した。**ヒ素化合物の抽出**：Folchの方法（クロロホルム-メタノール（2:1））により、ヒ素化合物を抽出した。また、その上層（水相）を水溶性ヒ素化合物画分、下層（クロロホルム相）を脂溶性ヒ素化合物画分として実験に供した。**硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法**：各試料0.1 gに、超微量分析用硝酸を1 ml添加し、80℃で1時間加熱してヒ素化合物を抽出した。この抽出液について、HPLC-ICP-MSによるヒ素化合物の形態別分析を行った。

個別課題：サンマにおけるヒ素化合物の分布および化学形態に及ぼす漁獲時期や直火処

理の影響（花岡）

試料：秋期（9月）あるいは冬期（12月）に市販の新鮮なサンマを購入し、試料として用いた。昨年度までの研究で、試料に凍結乾燥等の前処理を施すと、場合によっては脂溶性ヒ素化合物から水溶性ヒ素化合物への変換等を起こすことが明らかになった。このため、今回は各実験とも試料を生のまま用いた。加熱による影響を検討する場合には、木炭による直火で15分ほど焼いた。

総ヒ素量の定量：それぞれの試料0.2～0.3 gに、超微量分析用硝酸（69%）を6 ml添加した後、マイクロ波分解装置で分解（800Wで40分）した。その後、この分解溶液に超純水を加えて40 mlに定容し、誘導プラズマ質量分析法（ICP-MS）を用いて試料中の総ヒ素濃度を測定した。

ヒ素化合物の抽出：Folchの方法（クロロホルム-メタノール（2:1））により、ヒ素化合物を抽出した。また、その上層（水相）を水溶性ヒ素化合物画分、下層（クロロホルム相）を脂溶性ヒ素化合物画分として実験に供した。硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法：各試料0.1 gに、超微量分析用硝酸を1 ml添加し、80℃で1時間加熱してヒ素化合物を抽出した。この抽出液について、HPLC-ICP-MSによるヒ素化合物の形態別分析を行った。

研究項目2：AsSugsの標準品およびその中間代謝物の化学合成（山中）

- ① 食品中から検出されるAsSugsを合成する。
- ② AsSugsの中間代謝物として報告されている3価ヒ素型、チオヒ素型、ジメチルアルシノエタノール、ジメチルアルシノ酢酸などの合成についても検討する。

研究項目3：AsSugsの化学形態を同定し、定量分析を行う。（花岡、畑）

個別課題：AsSugsの化学形態の同定（畑）

分離性状の異なる複数のカラムを用いてHPLC-ICP-MS分析、LC/MS/MS分析等により抽出液中AsSugsの化学構造を同定し、食品中含有量を明らかにする。

分析カラムには陽イオン交換、陰イオン交換、C18カラムを用いAsSugsの分離条件検討を行なっている。また食品抽出液中に含まれる夾雑物の除去およびAsSugsの濃縮を目的に固相抽出条件の検討を行う。

個別課題：非抽出性”ヒ素化合物の検討（花岡）

試料：スーパーで購入した芽ヒジキ乾燥品および日高コンブ乾燥品を用いた。どの試料においても凍結乾燥後、乳鉢で粉碎したものを実験に供した。総ヒ素量の定量：それぞれの試料0.2～0.3 gに、超微量分析用硝酸（69%）を6 ml添加した後、マイクロ波分解装置で分解（800Wで40分）した。その後、この分解溶液に超純水を加えて40 mlに定容し、誘導プラズマ質量分析法（ICP-MS）を用いて試料中の総ヒ素濃度を測定した。ヒ素化合物の抽出：Folchの方法（クロロホルム-メタノール（2:1））により、ヒ素化合物を抽出した。また、その上層（水相）を水溶性ヒ素化合物画分、下層（クロロホルム相）を脂溶性ヒ素化合物画分として実験に供した。硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法：各試料0.1 gに、超微量分析用硝酸を1 ml添加し、80℃で1時間加熱してヒ素化合物を抽出した。この抽出液について、HPLC-ICP-MSによるヒ素化合物の形態別分析を行った。

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排泄量との出納（圓藤、山中、畑）

- ① ボランティアを公募し、実験計画を十分に説明し、インフォームドコンセントを得る。
- ② 海産物を一切含まない献立を作成する。ボランティアは、5 日間にわたり海産物を含まない食事を摂り、1 日一回定時に採尿する。
- ③ 産地、季節が明らかな AsSugs を多く含む海産物（ワカメ）を一般的な調理法で調理し摂取する。ボランティアは通常の食事量を超えない一定量（ワカメ 300 g）を 1 回の食事で摂取する。
- ④ 食事は陰膳方式で採取し、分析に供する。
- ⑤ ボランティアは摂取後から 5 日間、全ての尿を採取する。この期間中の食事も海産物を一切含まないものとする。
- ⑥ ワカメおよび尿中ヒ素化合物は HPLC-ICP-MS を用い化学形態別に定量する。
- ⑦ 摂取した海産物中の化学形態別ヒ素含有量と尿中ヒ素量とを比較し、吸収、代謝、排泄に要する時間に関して検討する。

研究項目 5 : AsSugs および AsLipids の動物を用いた安全性評価（鰯、花岡）

個別課題名：ヒ素膀胱発がんの原因物質の検索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討（鰯）

【実験 1】ラット膀胱上皮細胞である MYP3 とヒト膀胱上皮細胞である 1T1 を用いて、DMMTA^V、iAs^V、iAs^{III}、MMA^V、DMA^V、dimethylarsinous acid (DMA^{III}) の半数致死濃度 (LC50) を算出した。また、細胞の存在下および非存在下での DMMTA^V の安定性を確認するため、LC50 時の培地中ヒ素濃度を、LC-ICP-MS で化学形態別に測定した。

【実験 2】10 週齢の雄性 SD ラットを用いて、麻酔下で採集した尿にヒ素濃度 5 ppm となるように iAs^V、DMA^V、DMMTA^V をそれぞれ添加し、尿管および尿道を結紮した後に、直前に調製した尿を膀胱内に直接注入した。2 時間後、回収した尿および膀胱上皮細胞破砕液中ヒ素濃度を LC-ICP-MS で化学形態別に測定した。また、膀胱上皮細胞におけるがん関連遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法を用いて検索した。

【実験 3】10 週齢の雄性 SD ラットを 3 群に分け、浸透圧ポンプを用いて尿管からそれぞれ生理食塩水、DMMTA^V、DMA^V を持続投与した。2 週間後、尿中および膀胱上皮内のヒ素濃度を LC-ICP-MS で化学形態別に測定した。また、膀胱上皮におけるがん関連遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法を用いて検索した。

【実験 4】10 週齢の雄性 SD ラットに、DMA^V を強制経口投与し胆汁中のヒ素濃度を、LC-ICP-MS で化学形態別に測定した。

【実験 5】6 週齢の F344 ラットに抗生物質(ネオマイシン 2mg/ml 飲水)3 日間投与後に DMA^V (100ppmAs 飲水)1 日投与する群と、DMA^V (100ppmAs 飲水)1 日のみ投与する群の 2 群に分け尿中ヒ素濃度を、LC-ICP-MS で化学形態別に測定した。

【実験 6】抗生物質(ネオマイシン 2mg/ml 飲水)+DMA^V (100ppmAs 混餌)、DMA^V(100ppmAs 混餌)単独、抗生物質(ネオマイシン 2mg/ml 飲水)単独 2 週間投与する群の 3 群に分け、尿中ヒ素濃度及び、5-bromo-2'-deoxy-uridine(BrdU)を指標とした細胞増殖を検討した。

個別課題名：AsSugs および AsLipids の代謝物である DMA^V、iAs^{III} の *in vivo* 変異原性の検討（鰯）

動物は雄性 *gpt delta* F344 ラット 58 匹を用いた。実験開始時より無処置群、92 ppm DMA^V (50 ppm As) 飲水投与群、87 ppm sodium arsenate (iAs^{III}) (50 ppm As) 飲水投与群、陽性対照群として既知の膀胱発がん物質である 0.05% BBN 飲水投与群、陰性対照群として非膀胱発がん物質である 5.0% アスコルビン酸ナトリウム混餌投与群の 5 群に分けて 13 週まで飼育し、剖検を行った。膀胱粘膜および肝臓より genomic DNA を抽出し、突然変異を評価する *gpt* assay および欠失変異を評価する Spi assay をそれぞれ行い、変異原性の有無の評価を行った。さらに *gpt* assay では得られた変異体についてキャピラリーシーケンサーで変異スペクトラムの解析を行った。

個別課題名：DMA^Vおよび iAs^{III}投与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（鰐淵）

ラット膀胱中期発がん性試験を実施し、DMA^Vおよび iAs^{III}によるヒ素トランスポーターの発現変動を検討するために、動物は雄性 F344 ラット 30 匹を *in vivo* 変異原性評価試験と同様に無処置群、92 ppm DMA^V(50 ppm As) 飲水投与群、87 ppm iAs^{III} (50 ppm As) 飲水投与群にそれぞれ分け、10 週齢時より試験を開始し 13 週間飼育を行った。剖検後、膀胱粘膜より mRNA を抽出し、ヒ素トランスポーターとして知られる ABC トランスポーター(ABCB1、ABCC1、ABCC2)の発現について解析を行った。

個別課題名：ホシザメ肝臓に存在する脂溶性ヒ素化合物のマウスにおける体内動態（花岡）

ホシザメ肝油特殊配合飼料および大豆油特殊配合飼料の調製：生鮮ホシザメの肝臓から総脂質を Folch の方法により抽出した。本研究に用いる動物飼料は、添加油以外からのヒ素およびヒ素化合物の混入を避けるため、精製飼料 AIN-93M（オリエンタル酵母工業株式会社製）を基に、製造時に油脂（4 g / 100 g）を添加しないものを購入して用いた。これに、ホシザメ肝油または大豆サラダ油を 4 g / 100 g となるように添加した。マウス：オスの Sea : ddY マウス（9 週齢）を用いた。

各試験群と特殊配合飼料の投与：マウスの飼育は、水産大学校動物飼育室にて非無菌的環境下（室温：24～26℃、照明：明暗各 12 時間）で行った。マウス 10 匹をホシザメ肝油群 5 匹および大豆油群 5 匹に分け、すべて単独飼育とした。ホシザメ肝油/AIN-93M または大豆油/AIN-93M を各 5 g ずつそれぞれの群に与え 24 時間飼育した。その後、精製飼料 AIN - 93M（粉末）5 g に戻して、両群に与え 13 日間飼育した。それぞれ、投与期間終了後に 24 時間絶食させたのち、解剖を行った。

総ヒ素量の定量：それぞれの試料 0.2～0.3 g に、超微量分析用硝酸（69%）を 6 ml 添加した後、マイクロ波分解装置で分解（800W で 40 分）した。その後、この分解溶液に超純水を加えて 40 ml に定容し、誘導プラズマ質量分析法（ICP-MS）を用いて試料中の総ヒ素濃度を測定した。

ヒ素化合物の抽出：Folch の方法（クロロホルム・メタノール（2:1））により、ヒ素化合物を抽出した。また、その上層（水相）を水溶性ヒ素化合物画分、下層（クロロホルム相）を脂溶性ヒ素化合物画分として実験に供した。

ヒ素の形態別分析：HPLC-ICP-MS 法を用いた。

PAC の定量：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 HPLC-ICP-MS 法により定量した。

研究項目 6：腸内細菌や培養細胞を用いた代謝試験を行う。（山中、畑）

無水 DMTA は Fricke らの報告(Chem Res Toxicol, 2005)に従い合成した。DMTA の毒性は V79 細胞を用いた WST-1 法による細胞毒性試験、染色体異常試験、ならびにネズミチフス菌等を用いた復帰突然変異原性試験により評価した。さらに、DMTA 曝露した V79 細胞の培養液中の DMTA 代謝物を HPLC-ICP-MS ならびに FID-GC を用いて分析した。

研究項目 7：食品摂取によるヒ素の発癌を含めた毒性発現のリスク低減法の検討（圓藤）

食品安全委員会化学物質・汚染物質専門調査会において、圓藤吟史、鰐淵英機は専門委員として、山中建三、花岡研一は専門参考人として参加し、「食品中のヒ素」の評価書を作成にあたった。その作業の中で次のことを検討した。

無機ヒ素、AsSugs、AsLipids それぞれの暴露、体内動態、遺伝毒性、分子機構、種差を考慮してリスク評価を行う。水溶性および脂溶性ヒ素化合物の抽出条件を検討する。

無機ヒ素化合物の実験動物等における影響、有機ヒ素化合物、3機ヒ素と有機ヒ素を合わせたヒト及び実験動物等における遺伝毒性、国際機関等の評価について整理した。

次に、ヒ素に曝露した集団での疫学的知見について収集し、評価した。

さらに、ヒ素の遺伝毒性試験についてレビューし、検討する。

2 研究成果、考察、今後の課題

研究項目 1：食用海産動植物に含まれる AsSugs、AsLipids の抽出法の検討（圓藤、山中、花岡、畑）

個別課題：堅固な細胞壁を形成する植物に含まれる AsSugs、抽出法の検討（圓藤、山中、畑）

ワカメ等の含有 AsSugs の化学形態に影響を及ぼさない抽出条件として、酵素による細胞壁分解条件の検討を行なった。細胞壁分解酵素であるセルラーゼ、アルギン酸分解酵素であるアルギン酸リアーゼを用い、温和な条件下で効率的にヒ素化合物を抽出することができた。市販の乾燥ワカメ抽出液から AsSug328 及び 482 を確認した。なお物理的抽出には細胞破碎ビーズ処理を行うことにより回収率が安定した。抽出溶媒にはメタノールが適していた。（2013 年度）

化学的に温和な条件での有機ヒ素化合物の抽出法検討を行った。これまでの研究でセルロース分解酵素処理とビーズ破碎により細胞壁を破壊することで抽出率が向上することが判明した。今年度は抽出率を安定させるための検討を行った。抽出率が不安定になる要因の一つとしてワカメの粘性成分が影響していると考えられたことから、海藻に含まれる粘性多糖類を分解する酵素を数種類用いて検討を行った。セルラーゼによる前処理と共に粘性多糖類分解酵素による処理を行った結果、抽出液の粘性が低下した。この前処理により抽出率は安定し、総ヒ素量の 80%以上を安定して抽出することが可能となった。抽出液の HPLC-ICP-MS 分析の結果、AsSug328 のほか、少なくとも 4 種類の未同定ヒ素化合物が検出された。抽出率が向上したことで未同定ヒ素化合物の収量が増加したことから、これらの LC-MS による分析が可能となった。なお、酵素による前処理は粘性多糖類を含む他の褐藻類からの有機ヒ素化合物抽出にも応用可能であると考えられる。

個別課題：カタクチイワシ加工品に存在するヒ素化合物（花岡）

各市販乾燥品の総ヒ素濃度は、試料の体長や産地により異なり、3 $\mu\text{g/g}$ 程度から14 $\mu\text{g/g}$ 程度であった。また、体長の小さいものほど総ヒ素濃度の低い傾向が認められた。

形態別分析の結果、どの試料においても、アルセノベタイン(AB)、トリメチルアルシンオキシド (TMAO) およびDMAAが共通して検出された。これら3種のヒ素化合物濃度の合計は、総ヒ素濃度の90 %以上を占めた。また、各ヒ素化合物濃度の総ヒ素濃度に占める割合は、ABで42.7 % (試料-B) ~65.1 % (試料-E)、TMAOで20.0 % (試料-A) ~41.2 % (試料-E)、DMAAで3.8 % (試料-C) ~23.9 % (試料-D)であった(図-1)。ただし、DMAAの場合、どの試料においても、総ヒ素濃度の高低に関わりなく、0.5から0.6 $\mu\text{g/g}$ 程度の濃度で検出された。これら3種のヒ素化合物以外では、試料-Fを除く各試料から、微量あるいは少量の無機ヒ素 (As(V)) が検出された。この他、いくつかの試料から、微量のアルセノコリン、テトラメチルアルソニウムイオン等が検出された。

本研究では、ヒ素化合物の抽出に硝酸を用いているため、検出されたDMAAやTMAOは脂溶性ヒ素化合物、すなわち、ジメチル態の脂溶性ヒ素化合物やトリメチル態の脂溶性ヒ素化合物から誘導されたと推定した。これを確認するために、今後、Folchの方法(クロロホルム-メタノール抽出)に準じて水溶性ヒ素化合物を抽出して分析を行う予定である。また、試料-Fを除いて無機ヒ素が検出された。本研究で用いた抽出法、すなわち硝酸加熱溶解法の条件では、有機ヒ素化合物から無機ヒ素の誘導は起こらない。したがって、この無機ヒ素は製品中に含まれていたと結論した。

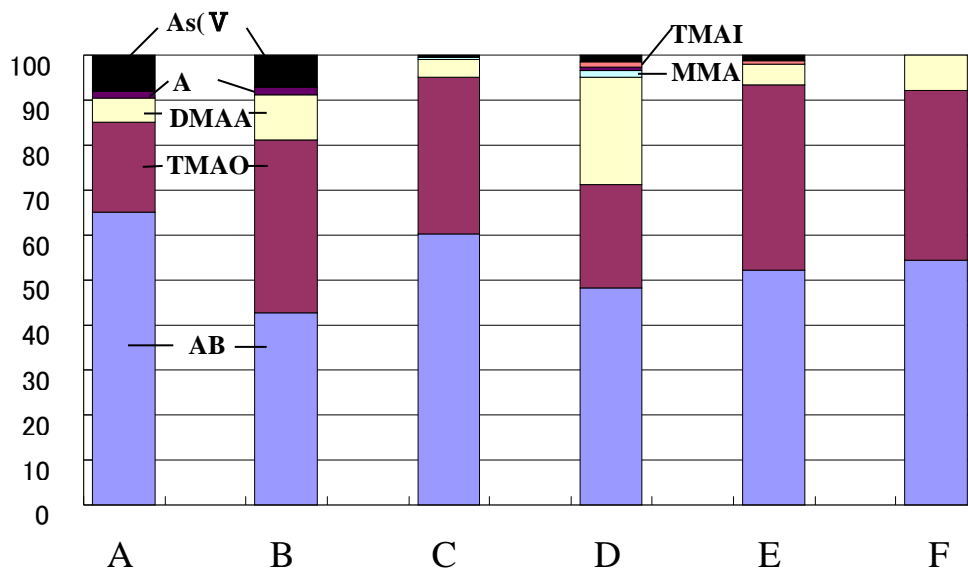


図-1. 6種のカタクチイワシ加工品において、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法で検出されたヒ素化合物の相対存在率。

試料A、B、CおよびDにおいて硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により検出されたDMAA濃度とFolch/脂溶性画分の総ヒ素濃度がほぼ一致した。また、どの試料におい

ても硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により検出されたDMAAの約34%しかFolch/水溶性画分から検出されなかった。以上のことから、今回のカタクチイワシ加工品から検出されたDMAAの多くは遊離ではなく、ジメチル態の脂溶性ヒ素化合物から硝酸加熱溶解処理により誘導されたか、Folchの方法で抽出されないいわゆるジメチル態の“非抽出性”ヒ素化合物（クロロホルム-メタノール非抽出性）から同様に誘導されたと推測した。

一方、このDMAAと同様、どの試料においても、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により検出されたトリメチルアルシンオキシド（TMAO）濃度に比較して水溶性画分からのTMAO濃度は低かった。すなわち、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により試料全体から抽出・分析した場合の約38%程度であった。このことから、今回のカタクチイワシ加工品から検出されたTMAOの多くは遊離のTMAOではなく、トリメチル態の脂溶性ヒ素化合物から硝酸加熱溶解処理により誘導されたか、トリメチル態の“非抽出性”ヒ素化合物から同様に誘導されたと推測した。

さらに、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により今回のカタクチイワシ加工品から検出されたAs（V）濃度に比較して、水溶性画分から検出されたAs（V）濃度は11%以下だった。このことから、As（V）がFolchの方法では十分に抽出されず、残渣に残存していると推測された。

また、今回の実験で用いたカタクチイワシの加工品6種のいずれからも、「愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令」で定められた基準値（15 $\mu\text{g/g}$ ）以上のヒ素は検出されなかった。一方で、5種の加工品からは硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法によりAs（V）が検出された。しかし、検出されたAs（V）の濃度はいずれも低く、食品衛生学上問題ないと判断した。すなわち、現在取り下げられているもののFAO/WHO合同食品添加物専門家会議（JECFA）の定めた無機ヒ素の暫定耐容週間摂取量（PTWI：15 $\mu\text{g/kg}$ 体重/週）と比較して、上記のAs（V）濃度は十分に低かった。

つづいて、As（V）、DMAAおよびTMAOがFolch/脂溶性画分に存在しているかFolch/抽出残渣に残存しているか確認するため、残渣に含まれる“クロロホルム-メタノール非抽出性”ヒ素化合物について硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法で検討した。試料としては、Folch/抽出残渣に残存するヒ素の濃度が高く、かつAs（V）濃度も高かったカタクチイワシ試料3種（A、BおよびC）を用い、その残渣について硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法による形態別分析を行い、クロロホルム-メタノール非抽出性”ヒ素化合物について検討した。

その結果、各試料において、Folch/抽出残渣から検出された主なヒ素化合物はTMAOおよびAs（V）であった。ただし、このTMAOの濃度（飼料A: 2.2 $\mu\text{g/g}$ （乾重量）、煮干B: 1.4 $\mu\text{g/g}$ （乾重量）、煮干C: 1.2 $\mu\text{g/g}$ （乾重量））はどの試料においても試料全体から硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法で検出されたTMAOの濃度（試料A: 5.4 $\mu\text{g/g}$ （乾重量）、試料B: 2.1 $\mu\text{g/g}$ （乾重量）、試料C: 2.4 $\mu\text{g/g}$ （乾重量））より低かった。この他、すべての試料からDMAA、試料Bからは少量のABも検出された。

以上のことから、実験に用いたカタクチイワシの試料3種において、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により抽出・検出されたTMAOは、①遊離のTMAO（水溶性）、②トリメチル態の脂溶性ヒ素化合物から誘導されたTMAOおよび③Folchの方法で抽出

されない“クロロホルム-メタノール非抽出性”の化合物から硝酸加熱溶解処理により抽出されたTMAOの三者からなると考えた。また、この“クロロホルム-メタノール非抽出性”のトリメチル態ヒ素化合物としては、1. Folchの方法では抽出されない状態から、硝酸加熱溶解処理により遊離したTMAOそのもの、あるいは 2.硝酸加熱溶解処理により誘導されたトリメチル態ヒ素化合物と推測した。一方、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により抽出・検出されたAs (V) は、上記の1の理由、すなわち硝酸加熱溶解処理により遊離したと推測した。

個別課題：魚類の高脂質含量組織における硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS 分析（花岡）

まず、クロマグロの大トロ（脂質含量：52.2%）について、硝酸添加量として通常の1 ml の他、3 ml、5 ml および 7 ml で、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS 法を行った。その結果、抽出率の改善が認められた。すなわち、抽出率は通常の硝酸 1 ml 添加時での 24.9%から 7 ml 添加時の 49.8%まで上昇した。つづいて、キアコウの肝臓（脂質含量：40.4%）においても同様に硝酸添加量を変えて分析を行った。その結果、硝酸添加量の増大にともない、抽出率の改善が認められた。すなわち、抽出率は通常の硝酸 1 ml 添加時の 75.0%から 7 ml 添加時の 90.6%まで上昇した（図1）。これらのことから、限界も認められるものの添加硝酸量を増大させることの有効性は明らかであった。

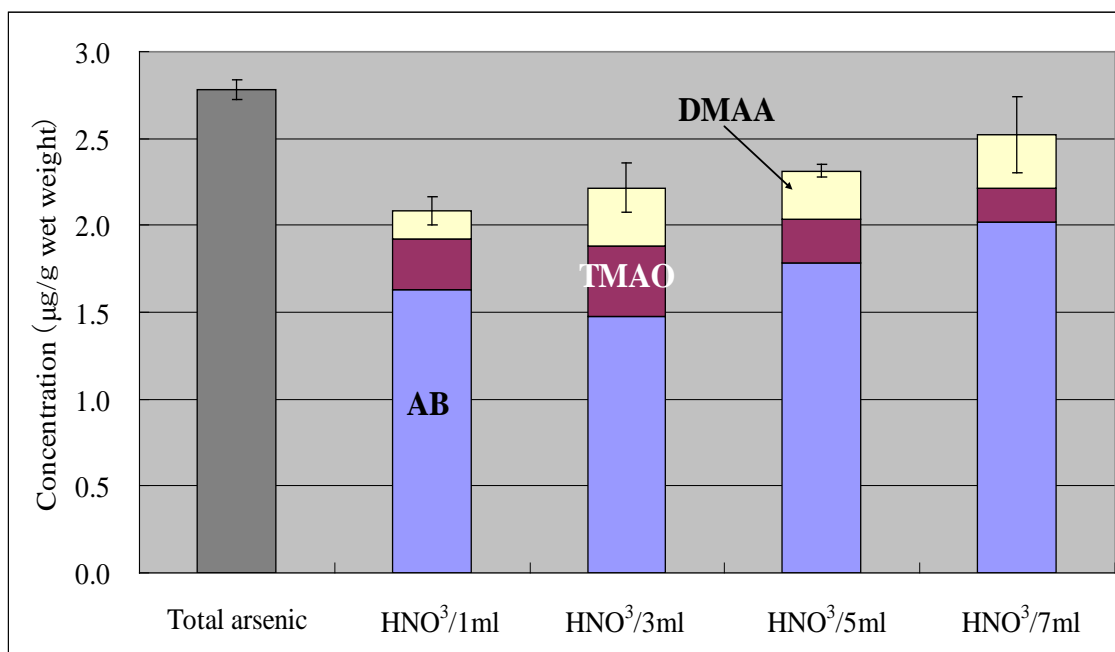


図1. キアコウ肝臓の硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS分析において、硝酸添加量がヒ素化合物の抽出率に及ぼす影響。

AB, arsenobetaine; TMAO, trimethylarsineoxide; DMAA, dimethylarsinic acid.

個別課題：サンマにおけるヒ素化合物の分布および化学形態に及ぼす漁獲時期や直火処理の影響（花岡）

9月購入のサンマ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±0.11μg/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。すなわち、秋期に漁獲されたサンマの筋肉におけるヒ素は主に脂溶性の化合物すなわちAsLipidsとして存在していることを明らかにした(図2)。

つづいて、それぞれの水溶性ヒ素化合物画分についてHPLC-ICP-MSによる形態別分析を行った結果、どちらの筋肉においてもヒ素は主にABとして存在していた(図2)。一方、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS分析を行った結果、ABの他、DMAAおよびTMAOが検出された(図2)。これらは水溶性ヒ素化合物画分から検出された濃度より明らかに高かったことから、ジメチル態あるいはトリメチル態のAsLipidsから誘導されたと結論した。

サンマ筋肉において、主要なヒ素化合物として存在するAsLipidsがどのような形態をとっているかについて、今後検討する予定である。ただし、どのような形態をとっているにしても、日本人が古くから食してきたサンマを通し、日常的にAsLipidsを取り込んできたことについてはそれらの機能性との関わりでも極めて興味深かった。

つづいて、冬期(12月)に漁獲されたサンマについても同様の分析をおこなった。その結果、普通筋および血合筋ともに、総ヒ素濃度においては秋期の場合と大きな差異はなかった。一方、分画されたFolch/水溶性画分およびFolch/脂溶性画分の各総ヒ素濃度における相対的な比率に差異が認められた。すなわち、血合筋および普通筋のどちらにおいても、冬期におけるFolch/水溶性画分/総ヒ素の占める比率の方が、秋期におけるFolch/水溶性画分/総ヒ素のそれより高かった。このような、漁獲時期の差異による水溶性および脂溶性ヒ素化合物濃度の相対的な変動(季節変動)は餌料生物や生理状態の差異に関することも予想され、極めて興味深かった。また、秋期に漁獲されたサンマを食べる場合、冬期に漁獲されたサンマを食べるより、AsLipidsの体内への取込が大きいと推測された。

次に、サンマに存在するヒ素化合物に及ぼす加熱の影響について検討するため、冬期に漁獲されたサンマを木炭による直火で15分ほど焼いた後、分析に供した。その結果、普通筋の総ヒ素においては、サンマ/生とサンマ/焼との間に差異は認められなかった。しかし、血合筋の総ヒ素は、サンマ/生よりサンマ/焼で低かった。また、直火処理後の水溶性画分において、普通筋および血合筋でAB濃度の減少とDMAAおよびMMA濃度の増大が認められた。さらに、TMAIとAs(V)の誘導も認められた。これらについては、ヒ素化合物の熱分解温度が関わっていると考えた。すなわち、今回使用した木炭の炎(600~1000℃程度)により、AB(分解温度:約300℃)およびAsLipidsからの変換が起こったと推測した。しかし、検出されたAs(V)の濃度はいずれも低く(5 ng/g(湿重量)以下)、通常の焼き加減で直火処理する場合には食品衛生学上問題ないと判断した。

サンマ筋肉に存在するヒ素化合物は主に脂溶性である

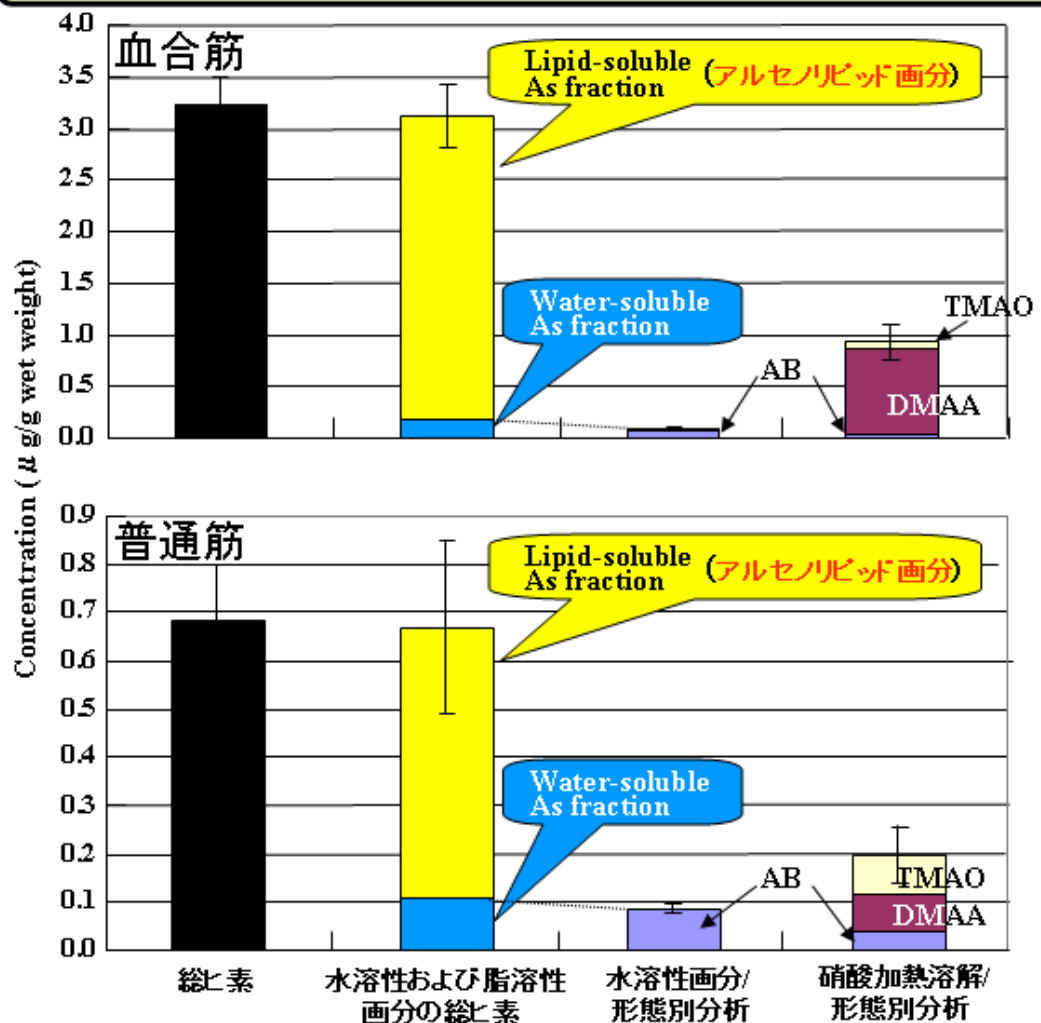


図2. サンマ血合筋および普通筋において、水溶性ヒ素化合物画分/ HPLC-ICP-MS分析および硝酸加熱溶解

画分/HPLC-ICP-MS分析によって検出されたヒ素化合物.

AB, arsenobetaine; TMAO, trimethylarsineoxide; DMAA, dimethylarsinic acid

研究項目2 : AsSugsの標準品およびその中間代謝物の化学合成 (山中)

3価AsのAsSugs、硫黄含有AsSugs、中間代謝物として推定されるジメチルアルシノエタノールについては、微量合成が達成された。

海藻中に含まれる多様なヒ素糖の中で、存在量も多く、かつヒ素糖の基本骨格を有するAsSug 328の合成を試みた。企図した合成法は、リボースの水酸基をアセチル化保護した物質からスタートし、9ステップ反応により目的のAsSug 328を得ることが論理的に可能である。実際に、小スケールの合成では生物試験や分析標準品に耐える1gスケールの合成品を得ることができた (2011年度成果, 最終収率20%)。

以上の分子量328のAsSugを基本とした、AsSugsの合成は、2012年度からは動物試験

用の大量合成を試みているが、AsSugs328の合成は、9段階もの反応過程があり、合成過程の多さ、かつ反応後半過程で得られる化合物の極性の高さ故の高純度精製が困難なため、大量合成作業が妨げられている。2013年度はAsSug328の合成方法を抜本的に見直すとともに、精製方法の改善により高収率での合成を目指した結果、反応スケールの変更、個別合成過程での溶媒の変更、精製過程でのアルコール耐性Sephadex LH-20を用いることで最終産物の収率を約3倍上昇させることに成功した。

以上の結果から、比較的高収率で合成できることが可能となったことから、AsSug328を数百gオーダーで合成・精製することで、発がん性を中心とした動物試験を鋭意行い、水溶性有機ヒ素化合物の代表であるAsSugsのリスク評価が可能となった。さらに中間代謝物として推定されているジメチルアルシノエタノールやジメチルアルシノ酢酸などの微量合成も成功していることから、標準品としてAsSugのメタロミクス解析を行う上でも大変重要な価値があり、代謝・毒性発現の全体像を明らかにすることが可能となった。

研究項目3：AsSugsの同定、定量分析（花岡、畑）

個別課題：AsSugsの化学形態の同定（畑）

海藻中AsSugsのHPLC-ICP-MSおよびHPLC-TOF-MS分析に適した条件の検討を行い、ワカメ抽出液に含まれるAsSugsの同定を行った。昨年に引き続きHPLCによるAsSugs分離条件を確立するため陽イオン交換と陰イオン交換カラムを用い移動相の検討を行った結果、それぞれのカラムにおけるAsSugs分析条件を確立した。ワカメ抽出液のHPLC-ICP-MS分析の結果、AsSug328のほか、少なくとも4種類の未同定ヒ素化合物が検出された。同HPLC条件のもとHPLC-TOF-MS分析を行った結果、HPLC-ICP-MSクロマトグラムに見られた4つのピーク位置に分子量388のarsenic-hydrocarbon (As-HC388)、分子量1012のarsenosugar-phospholipid (AsSug-PL1012)、AsSug482、AsSug391、AsSug328の質量数と一致するイオンが認められた。AsSug482以外はイオン強度不足と夾雑物の影響によりMS/MS測定ができず化合物の特定には至らなかった。この結果を受け、夾雑物の除去と濃縮を行うため固相抽出法の検討を行った。現在、シリカゲル系イオン交換固相を利用することにより目的ヒ素化合物の濃縮を行い、再度HPLC-TOF-MS分析を実施している。

個別課題：非抽出性”ヒ素化合物の検討（花岡）

ICP-MS法により両試料について総ヒ素を定量した結果、芽ヒジキで91.4 µg/g（乾重量）、日高コンブで20.1 µg/g（乾重量）であった。さらに、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により両試料についてヒ素の形態別分析を行った。その結果、芽ヒジキおよび日高コンブのどちらにおいても、As(V)、DMAA、UK（未知ヒ素化合物）3およびUK4が検出された。この他、日高コンブからはTMAOも検出された。次に、HPLC-ICP-MS法による各Folch/水溶性画分の分析を行った結果、両試料で共通してAs(V)およびUK3が検出された。また、芽ヒジキからDMAAおよびUK4、日高コンブからUK5が検出された。

これらの結果から、芽ヒジキにおいて試料全体から検出されたAs(V)は遊離の水溶性ヒ素化合物としてだけでなく、上述のカタクチイワシの場合と同様、Folchの方法で抽出できない“クロロホルム-メタノール非抽出性”の状態では組織中に存在していると予想された。また、日高コンブのFolch/水溶性画分からは、DMAAが検出されなかった。こ

のため、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により検出されたDMAAは、①ジメチル態のアルセノシュガー、②ジメチル態の脂溶性ヒ素化合物あるいは ③ジメチル態の“クロロホルム-メタノール非抽出性”ヒ素化合物から誘導されたと推測した。

つづいて、芽ヒジキおよび日高コンブに存在する“クロロホルム-メタノール非抽出性”ヒ素化合物について検討するため、硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法によりFolch/抽出残渣におけるヒ素化合物の形態別分析を行った。その結果、Folch/抽出残渣から検出された主なヒ素化合物は芽ヒジキにおいてAs(V)、日高コンブにおいてDMAAおよびUK3であった。この他、日高コンブからUK4が検出された。

以上のことから、まず、日高コンブにおいて硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により抽出・検出されたUK3は水溶性ヒ素化合物としてだけでなく、Folchの方法では抽出されない“クロロホルム-メタノール非抽出性”の状態が存在すると推測された。また、芽ヒジキにおいて硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法により抽出・検出されたAs(V)の大部分は生体成分への吸着等によりFolchの方法では抽出されない状態から、硝酸加熱処理により遊離したと推測した。いずれにしても、食品中の無機ヒ素を測定する場合には、従来のクロロホルム-メタノールやメタノール-水による抽出では不完全と結論した。

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排泄量との出納（圓藤、山中、畑）

2012年度までに実施したボランティアによるワカメ摂取実験で得られた尿サンプル5名分をHPLC-ICP-MSにて分析した。未同定ヒ素化合物についてはHPLC-TOF-MSにより同定を行った。尿中総ヒ素分析の結果、ワカメ摂取後5日間の尿中ヒ素排泄量は被験者間のばらつきが大きく、摂取したヒ素のうち尿中排泄されたヒ素の割合は14～42%となった。化学形態別分析による尿中ヒ素の内訳はDMAが最も多く51～75%、続いてoxo-DMAEの7～22%、oxo-DMAAの5～15%となった、この他に少なくとも4種類のヒ素化合物が認められ残りを占めた。各尿中ヒ素化合物の濃度（クレアチニン補正值）がピークとなった時間は、DMAは18～29時間後、oxo-DMAEは9～29時間後、oxo-DMAAは18～59時間後であった。また各ヒ素化合物の尿中濃度の生物学的半減期は、DMAが18時間、oxo-DMAEは7時間、oxo-DMAAは16時間となった。以上の結果より、ワカメに含まれるAsSugsなどの有機ヒ素化合物が代謝され尿中に排泄されるまでの時間とその排泄量には個人差があることが確認された。

研究項目5：AsSugおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価（鰐淵、花岡）

個別課題名：ヒ素膀胱発がんの原因物質の検索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討（鰐淵）

【実験1】DMMTAV、iAs^V、iAs^{III}、MMAV、DMAV、DMA^{III}のLC50は、MYP3ではそれぞれ、4.6μM、47.9μM、3.2μM、7.7mM、2.7mM、1.1μM、1T1ではそれぞれ5.4μM、81.7μM、25.5μM、6.1mM、1.4mM、4.1μMとなり。DMAVよりはるかに細胞毒性が高くDMMTAVは無機ヒ素と同程度の毒性がみられた。また、DMMTAVは細胞非存在下では安定していたが、細胞存在下ではDMAVへの変換がみられた。

【実験2】*in vitro*においても、膀胱上皮内において、DMMTAVのDMAVへの変換がみられた。

【実験3】ヒ素化合物投与2時間後の膀胱上皮細胞破碎液中ヒ素濃度について検討した結

果、iAs^{III}投与群では iAs^{III}、DMA^Vがそれぞれ 35.5、64.5%検出された。DMA^V投与群では 88.5%が投与時の形態で検出された。DMMTA^V投与群では 37.3%が投与時の形態で、56.3%が DMA^Vで検出された。また、尿中および膀胱上皮細胞破碎液中のどちらにおいても、DMA^Vおよび DMMTA^V投与群で DMA^{III}が検出された。また、膀胱がんの早期検出マーカーである Oncomodulin が、DMMTA^V投与群で上昇していた。

【実験 4】胆汁中から DMA^Vおよび DMMTA^Vが検出された。また DMMTA^Vは DMA^Vより遅れて検出された。したがって、DMMTA^Vは腸内循環を経た代謝によって産生される可能性が示唆された。

【実験 5】抗生物質で腸内細菌叢を破壊した群において DMMTA^Vの尿中濃度の有意な減少がみられた。したがって、DMMTA^Vは腸内細菌叢によって産生される可能性が示唆された。

【実験 6】抗生物質+DMA^V投与群において、尿中 DMA^V濃度の有意な減少がみられ、それに伴い細胞増殖は有意に低下していた。

個別課題名：AsSugs および AsLipids の代謝物である DMA^V、iAs^{III}の *in vivo* 変異原性の検討（鰐淵）

gpt assayおよび*Spi* assayの結果、無処置群と比較してBBN投与群で有意な変異体頻度の増加が認められたものの、アスコルビン酸ナトリウム投与群では変異体頻度の有意な変化は認められなかった。

*gpt delta*ラットを用いたDMA^V・iAs^{III}の*in vivo*変異原性の解析で、膀胱粘膜においてDMA^VおよびiAs^{III}投与が変異体頻度の変化を誘発しないことを明らかにした。

*gpt*変異体についてスペクトラム解析を行った。その結果、DMA^V・iAs^{III}投与群いずれについても無処置群と比較して有意な変異スペクトラムが認められなかった。

さらに、DMA^Vは肝臓に対して発がん促進作用を有することから、ラット肝臓についても同様に解析を行った。その結果、DMA^V、iAs^{III}投与群ともに無処置群と比較して有意な変異体頻度の変化はみられなかった。また肝臓にて得られた変異体について変異スペクトラム解析を行った結果、DMA^V・iAs^{III}投与群いずれについても有意な変異スペクトラムが認められなかった。

個別課題名：DMA^Vおよび iAs^{III}投与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（鰐淵）

剖検後、得られた膀胱粘膜より mRNA を抽出し、真核生物においてヒ素トランスポーターとして報告されている ABC トランスポーター(ABCB1、ABCC1、ABCC2 など)の発現について定量的 RT-PCR 法にて解析を行った。その結果、DMA^Vおよび iAs^{III}投与群いずれについても ABCB1 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。

・研究全体の成果、考察及び結論

DMMTA^Vは、発がん性の認められるDMA^Vよりはるかに細胞毒性が高く、ヒ素化合物の毒性および発がん性に関与することが示唆された。また、DMMTA^Vは腸内細菌によってDMA^Vから産生され、DMA^Vの膀胱発がん性に関与する事が明らかとなった。以上の結果より、DMMTA^VはDMA^V誘発ラット膀胱発がんにおける原因物質のひとつであると考えられた。

また、DMA^V、iAs^{III}の *in vivo* 変異原性について検討した結果、DMA^V、iAs^{III}はラッ

ト膀胱粘膜および肝臓において *in vivo* 変異原性を有さないことが初めて明らかとなった。*gpt delta* ラットを用いた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と考えられる。ラット膀胱粘膜において、DMAVおよびiAs^{III}の代謝に ABCB1 が関与する可能性が示唆された。本研究、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。

以上の、研究全体の成果、考察及び結論としては、DMMTA^Vは、発がん性の認められる DMAVよりはるかに細胞毒性が高く、ヒ素化合物の毒性および発がん性に関与することが示唆された。また、DMMTA^Vは腸内細菌によって DMAVから産生され、DMAVの膀胱発がん性に関与する事が明らかとなった。以上の結果より、DMMTA^Vは DMAV誘発ラット膀胱発がんにおける原因物質のひとつであると考えられた。

また、DMAV、iAs^{III}の*in vivo*変異原性について検討した結果、DMAV、iAs^{III}はラット膀胱粘膜および肝臓において*in vivo*変異原性を有さないことが初めて明らかとなった。*gpt delta*ラットを用いた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と考えられる。ラット膀胱粘膜において、DMAVおよびiAs^{III}の代謝にABCB1が関与する可能性が示唆された。本研究、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。

個別課題名：ホシザメ肝臓に存在する脂溶性ヒ素化合物のマウスにおける体内動態（花岡）

ホシザメ肝油群のうち、1日投与後に摘出された肝臓、および1日投与後に13日間 AIN-93Mで飼育した後に摘出された（餌戻し／ホシザメ肝油群）肝臓における、総脂質中のPAC濃度およびPAC絶対量を比較することにより、肝臓に残留したPACの動態について考察した。

まず、マウス肝臓中のPAC濃度は、単回／ホシザメ肝油群で 229 ± 63 ng/g (n=5)、餌戻し／ホシザメ肝油群で 0 ng/g (n=3)であり、有意差があった ($P < 0.005$) (図2上)。また、マウス肝臓中のPAC絶対量は、単回／ホシザメ肝油群で 48.2 ± 28.3 ng (n=5)、餌戻し／ホシザメ肝油群で 0 ng (n=3)であり、有意差があった ($P < 0.05$) (図2下)。一方、ホシザメ肝油由来PAC残留率においては、単回／ホシザメ肝油群で 18.3 ± 0.5 % (n=5)、餌戻し／ホシザメ肝油群で 0 % (n=3)であった。

以上の結果から、マウスの肝臓においては、単回投与により約 48.2 ng程度のPACが集積しても、少なくとも投与中止後14日経過すれば、本研究の検出限界以下に減少することが確認された。

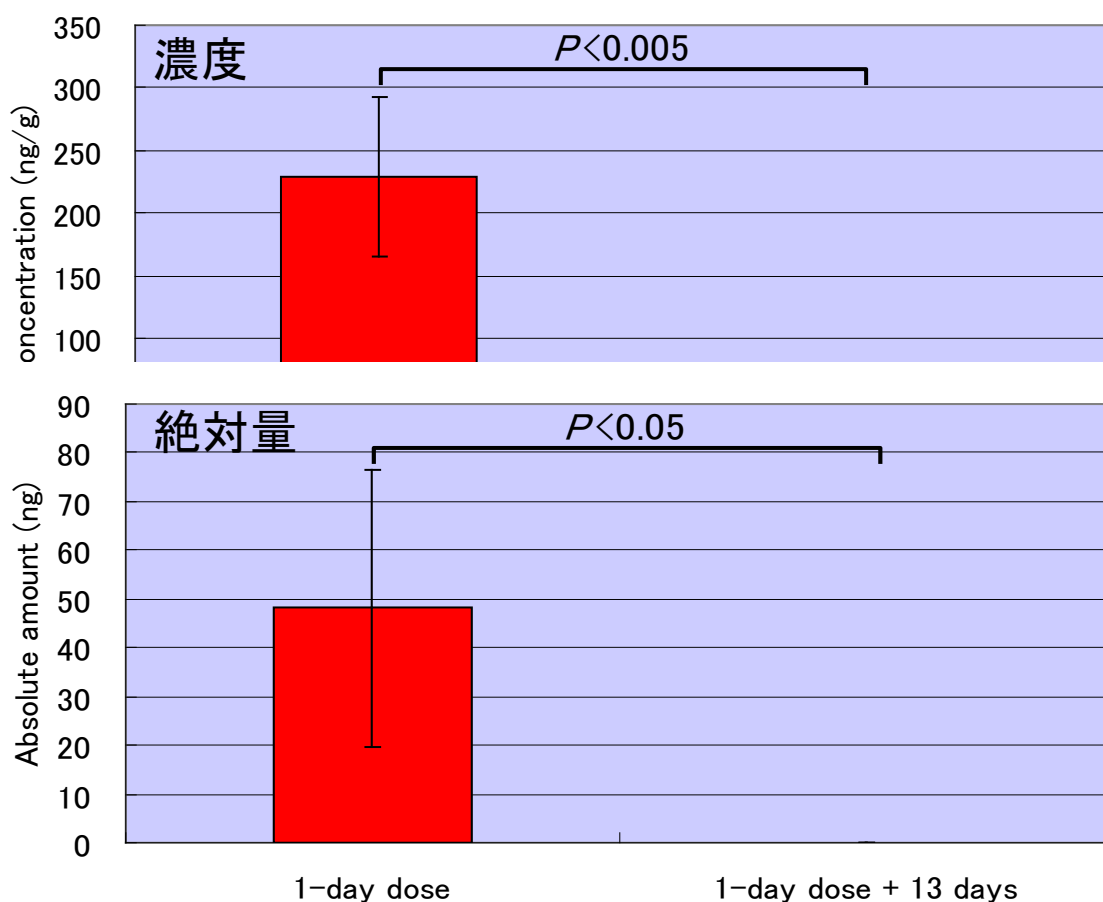


図3. ホシザメ肝油添加飼料を1日投与後のマウス肝臓（左）および同試料を1日投与後に精製飼料（ホシザメ肝油添加飼料）を13日間投与したマウス肝臓（右）におけるホスファチジルアルセノコリン濃度および絶対量。

研究項目6：腸内細菌や培養細胞を用いた代謝試験（圓藤、山中、畑）

V79細胞を用いた細胞毒性試験ならびに染色体異常試験において、DMTAの毒性はGSHの存在で増強された。一方、これまでに、多くのヒ素化合物が細菌を用いた復帰変異原性に対して陰性と結論づけられてきたが、DMTAはS-9(+)で陽性結果を示した。加えて、V79細胞の培養液からは未知の含硫ヒ素化合物が検出された。

以上の結果から、DMTAの遺伝毒性は代謝過程で生成する3価ジメチルヒ素のみならず未知の含硫ヒ素化合物が関与する可能性が示唆された。

AsSug328摂取者から検出されているジメチルモノチオアルシン酸(DMTA)は、DMAから代謝されると考えられ、ヒ素代謝物の中で強い毒性が疑われている。今回、DMTAに関しては、SH基との相互作用により毒性が増強されるとの可能性が示唆されており、実際、細胞毒性や遺伝毒性がGSHにより増強することを培養細胞で検討した。さらに、その代謝メカニズムを明らかにするために*in vitro*代謝実験を行い、個々の代謝物の同定ならびに定量をHPLC-ICP-MS、HPLC-TOF-MS、GC-MSなどの高感度分析装置を用いて検討した。その結果、3価DMA(DMAIII)以外にも硫化水素やメルカプトアル

シンなどの毒性の強い代謝物の生成が推定された。

以上の結果から、DMTA の遺伝毒性は代謝過程で生成する 3 価ジメチルヒ素のみならず未知の含硫ヒ素化合物が関与する可能性が示唆された。

研究項目 7：食品摂取によるヒ素の発癌を含めた毒性発現のリスク低減法の検討（圓藤、山中、花岡、鰐淵）

ヒ素化合物は、一般環境下においては、主に食品と飲料水から摂取される。食品中には無機及び有機ヒ素化合物が含まれ、飲料水中には主として無機ヒ素が含まれている。海藻においては、50 パーセントで 20 $\mu\text{g/g}$ 程度、95 パーセントで 140 $\mu\text{g/g}$ 超と、高いヒ素濃度が示された。95 パーセントで魚類では 30 $\mu\text{g/g}$ 以上、貝類では 40 $\mu\text{g/g}$ 以上であったが、無機ヒ素としては、75 パーセントでも 0.1 $\mu\text{g/g}$ 程度であったと報告されている（Uneyama et al. 2007）。

アルセノシュガーは、海藻における主要なヒ素化合物である。海藻中の総ヒ素濃度は、一般に褐藻類 > 紅藻類 > 緑藻類の順に高い。また、その主要な化学形態は通常アルセノシュガーである。褐藻類ヒバマタ目ホンダワラ科に属するヒジキ、アカモク、オオバモクといった海藻では、ヒ酸などの無機ヒ素の割合が高い（Francesconi and Edmonds 1997）。一般的に流通している乾燥ヒジキの総ヒ素濃度は平均値が約 110 $\mu\text{g As/g}$ 、最大値が約 154 $\mu\text{g As/g}$ とされている（FSA 2004; Almela et al. 2006; 小川ら 2006）。ホンダワラ科以外の海藻では、アルセノシュガーなどの有機ヒ素の割合が高い（Sakurai et al. 1997; Andrewes et al. 2004）。

ヒトの有機ヒ素の経口摂取による消化管からの吸収に関するデータは極めて少ない（EFSA 2009a）。Buchet ら（1981）が実施した、ボランティアを対象にした MMA(V) 又は DMA(V) のいずれかのヒ素の単一経口投与量（500 $\mu\text{g As}$ ）を摂取した研究では、4 日後までに尿中に排泄されたヒ素量はそれぞれ摂取用量の 78% 及び 75% であり、5 価有機ヒ素化合物の消化管吸収は > 75% であることが示唆されている。

AsSugs については、Francesconi ら（2002）が、男性ボランティア 1 名において AsSugs の摂取 4 日後に約 80% が尿中に排泄されることを報告している。しかし、尿中排泄に基づく最近のデータからは、AsSugs の吸収には極めて大きな個人差があることが示唆されている（Raml et al. 2009）。

海産物由来のヒ素代謝の報告は動物試験でも少ない AsSugs 含有量が高い海藻を常食とするヒツジの尿中及び血中ヒ素を形態別に分析した結果、尿中及び血中の主な代謝物は DMA(V) であり、尿、血、臓器及び羊毛におけるヒ素濃度はヒ素非曝露のヒツジと比較して高い値を示した（Feldmann et al. 2000）。さらに、マウス盲腸細菌叢及び盲腸組織を用いて AsSugs の生体内変換について検討した結果、細菌叢を加えた反応混合液（37°C、1 時間）では 95% の AsSugs がチオ体に変換されたが、盲腸組織のみではチオ体への変換率は低かった（37°C 48 時間 77%）（Conklin et al. 2006）。AsSugs を摂取したヒトの尿中代謝物として、DMA(V) のほかチオ-DMA(V)、チオ-ジメチルアルセノエタノール（DMAE）、チオ-アルセノシュガーなどが検出されたが、これらの尿中ヒ素代謝物は DMA(V) を除いて高濃度曝露（10 mM）においても細胞毒性は認められなかった（Raml et al. 2005）。

脂溶性有機ヒ素化合物である AsLipids は、ヒトの体内で DMA (V) に代謝される（Raml et al. 2009; Schmeisser et al. 2006）。

AsSugs やAsLipidsの生体影響についてはほとんど明らかにされていない。AsSugs やAsLipidsの生体内での代謝を考慮して、更なる検討が必要である。

ヒ素の遺伝毒性試験、無機ヒ素化合物の実験動物等における影響、有機ヒ素化合物、3機ヒ素と有機ヒ素を合わせたヒト及び実験動物等における遺伝毒性、国際機関等の評価について整理し、ヒ素に曝露した集団での疫学的知見について収集し、評価し、ヒ素の評価書を作成した。

その結果、食品安全委員会は健康影響評価結果について、「無機ヒ素曝露により、ヒトにおいて発がん（肺癌、膀胱癌等）が認められ、また染色体異常等の遺伝毒性が認められているが、現在得られている知見からは、ヒ素の直接的なDNAへの影響の有無について判断することはできない。またヒ素による発がんメカニズムについて、現時点においては知見が不足しており、発がん曝露における閾値の有無について判断できる状況にないと判断した。」としている。

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

1. 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.* 2011;17(3):235-45
 2. 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.
- #### 2 本研究を基にした学会発表の実績
1. 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)*, Sep 13-16, 2011 in Barcelona, Spain
 2. 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)*, Oct 16-21,2011 in Antalya, Turkey
 3. 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 年 11 月 19 -20 日
 4. 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 年 3 月 28-31 日
 5. 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、宮崎市 2012年11月24日
 6. 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、宮崎市 2012年11月24日

7. Hata A, Yamanaka K, Endo G, Yamano Y, Haba R, Fujitani N and 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, September 26, 2012.
8. 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年11月16日,
9. 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年11月16日
10. Akihisa Hata, Kenzo Yamanaka, Hidetoshi Kurosawa, Yuko Yamano, Yoko Endo, Noboru Fujitani, Ginji Endo: ARSENIC METABOLITES IN HUMAN URINE AFTER INGESTION OF SEAFOOD. Conference on Environment & Health Basel 2013, August 20.
11. 下田康代、王大朋、黒澤英俊、加藤孝一、立川眞理子、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, 平成26年3月28日.
12. 鰐淵英機, 魏民: ヒ素ばく露と発がんリスク-動物モデルを用いた発がん機序の解明 -, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋市 2011年10月
13. Hideki Wanibuchi, Min Wei, Anna Kakehashi, Shotaro Yamano : Animal model for arsenic carcinogen. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 仙台市 2012年7月
14. 藤岡正喜, 魏民, 山野莊太郎, 岡部恭子, 奥村真衣, 武下正憲、鰐淵英機、*gpt delta* ラットを用いた膀胱粘膜における *in vivo* 変異原性評価法の確立: 第71回日本がん学会学術総会、札幌市 2012年9月
15. 藤岡正喜, 魏民, 山野莊太郎, 岡部恭子, 福永賢輝, 謝曉利, 鰐淵英機:ラット膀胱発がん物質 DMA^Vの *in vivo* 変異原性の検討、第29回日本毒性病理学会総会、つくば市 2013年1月
16. 藤岡正喜, 魏民, 山野莊太郎, 奥村真衣, 下村衣里, 梯アンナ, 鰐淵英機: Evaluation of *in vivo* mutagenicity of DMA^V and iAs^{III} in *gpt delta* rats、第72回日本癌学会学術総会、横浜市 2013年10月
17. 下村衣里, 藤岡正喜, 魏民, 山野莊太郎, 梯アンナ, 串田昌彦, 鰐淵英機: DMA^Vおよび iAs^{III}のラット膀胱、肝臓における変異原性の解析、第30回日本毒性病理学会総会、徳島市 2014年1月
18. 古田和也, 筒井雄基, 野田里美, 町田倫子, 臼井将勝, 花岡研一: 数種の海産物に含まれる水溶性および脂溶性ヒ素化合物の検討, 第17回ヒ素シンポジウム, つくば市, 2011.
19. 町田倫子, 小西玄治, 古田和也, 臼井将勝, 花岡研一:クロマグロ筋肉に存在する脂溶性ヒ素化合物のマウスにおける体内動態, 第17回ヒ素シンポジウム, つくば市, 2011.
20. 白石直也, 松本 駿, 臼井将勝, 花岡研一: 数種カタクチイワシ加工品中のヒ素化合物,

第18回ヒ素シンポジウム, 宮崎市, 2012.

21. 白石直也, 臼井将勝, 花岡研一: 魚類の高脂質含量組織における硝酸抽出 - HPLC - ICP-MS分析. 第19回ヒ素シンポジウム, 福岡市, 2013.
 22. Shiraishi N, Usui M, Hanaoka K: Arsenic compounds in several commercial dried anchovies. 19th Joint International Symposium between Pukyong National University and National Fisheries University, Busan, 2013.
-
- 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 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	食品には多くの AsSugs や AsLipids が含まれており、リスク評価が待たれる。
2 研究目標の達成度	5	AsSugs や AsLipids について、多面的に取り組み多くの成果を挙げた。
3 研究成果の有用性	5	これらの成果の一部は、ヒ素のリスク評価に用いられる
合計	15	多くの分担者により多面的に取り組むことができた
総合コメント		

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。