

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食品中ヒ素の代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の発がん性に関する研究（課題番号：1407） （研究期間：平成26年度～平成27年度）
主任研究者名	研究者名：鰐淵 英機 所属機関：公立大学法人大阪市立大学

食用海産動植物には、種々のアルセノシュガーが主要な有機ヒ素化合物として存在し、代謝物としてジメチルアルシン酸 (DMA^{V}) が生成されることが明らかにされている。一方、我々はラットを用いた実験で、 DMA^{V} の膀胱発がん性を明らかにし、ヒ素の発がん性の実験的な証明の突破口を見出している。本研究は、 DMA^{V} の生体内代謝物であるジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA) をはじめとした有機ヒ素化合物の体内動態、遺伝毒性及び発がん性を明らかにすることを目的とし、種々の検討を行った。

はじめに、 DMMTA の *in vivo* における遺伝毒性及び発がん性の有無について検討するために、ラット膀胱における DMMTA の直接的な影響を検討できる投与試験系を確立した。さらに、*in vivo* 変異原性及び発がん性を臓器特異的かつ包括的に評価可能な F344 *gpt* delta ラットを用いた DMMTA のラット膀胱粘膜に対する影響について検討した結果、対照群に比して DMMTA がラット膀胱粘膜に対し細胞増殖を惹起したが、*in vivo* 変異原性を有さないことが明らかとなった。

次に、マウスのヒ素発がん低感受性と DMMTA 産生との関連について明らかにするために、C57BL/6 マウス及び F344 ラットに DMA^{V} 及び iAs^{III} を飲水投与し、尿中及び糞中におけるヒ素代謝物を比較検討した結果、ラット・マウス共にヒ素投与によって DMMTA が産生されていることが明らかになった。また、尿中 DMMTA の濃度はラット・マウス間で有意な差はみられなかったことから、ヒ素膀胱発がん感受性の種差は遺伝的背景の違いによるものであることが強く示唆された。

また、 DMMTA をはじめとした有機ヒ素化合物の詳細な代謝経路について、無細胞 *in vitro* 系を用いて検討した結果、ヒト腸内細菌叢ばく露により DMA^{V} より DMMTA が生じること、 DMA^{III} が硫黄転移酵素により DMMTA に容易に変換されること、 DMMTA 及び DMA^{III} は CYP などのモノオキシゲナーゼにより DMA^{V} へ変換されること、 DMMTA はグルタチオン (GSH) と反応し抱合体を形成した後に DMA^{III} 、硫化水素、ジメチルメルカプトアルシンなどに変換されることが明らかとなった。

以上の結果から、 DMMTA による肝毒性発現に GSH と CYP が関与することが示唆された。さらに、生体試料分析における標準物質としての高純度 DMMTA を合成するために、加硫化剤による新規合成・精製法を開発し、高純度 DMMTA を安定的に回収することが可能となった。

本研究で得られた DMMTA の代謝活性化機構、毒性と変異原性に関する知見ならびに DMMTA などのヒ素化合物の新規合成法の開発は食品に由来する有機ヒ素の健康影響評価に必要不可欠で、大いに貢献できると期待される。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食品中ヒ素の代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の発がん性に関する研究 (研究期間：平成26年度～平成27年度)
主任研究者名	所属：公立大学法人大阪市立大学 氏名：鰐淵 英機（研究課題番号：1407）

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間 平成26年度～平成27年度

2 研究目的

食用海産動植物には、種々のアルセノシュガーが主要な有機ヒ素化合物として存在し、体内に取り込まれ、代謝物としてジメチルアルシン酸（DMA^V）が生成されることが明らかにされている。一方、我々はラットを用いた実験で、DMA^Vの膀胱発がん性を明らかにし、困難であったヒ素の発がん性の実験的な証明の突破口を見出している。また、平成23-25年度食品健康影響評価技術研究「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」において、1) 食用海産動植物にDMA^Vが含まれること、2) DMA^Vは生体内で一部、腸内細菌によりジメチルモノチオアルシン酸（DMMTA）に代謝され、尿中に存在すること、3) 膀胱上皮細胞に対してDMMTAは、発がん性のあるDMA^Vに比べてはるかに強い細胞毒性を有すること、4) DMMTAはDMA^Vのラット膀胱発がん性に関与すること、5) *in vitro*において、DMMTAは染色体異常試験で陽性（構造異常および数的異常）を示すこと、6) ジメチル亜ヒ酸（DMA^{III}）からDMMTAの代謝生成経路ならびにその代謝活性化機序の概略などを明らかにしてきた。これらのことから、DMMTAがDMA^V誘発ラット膀胱発がんにおける究極発がん物質の1つである可能性が示唆された。したがって、DMMTAの代謝機序、遺伝毒性および発がん性について明らかにすることが、食品中の有機ヒ素の発がん性リスクを評価する上で最重要課題と考えられた。

本研究では、DMMTAをはじめとした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ことを目的とする。このために、① *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F344 *gpt* delta ラットを用いて、DMMTAの膀胱粘膜における変異原性および発がん性を検討する。② 腸内細菌、培養細胞さらに実験動物を用いた代謝・毒性試験を行い、DMMTAをはじめとした有機ヒ素化合物の詳細な代謝経路を解明する。③ DMMTAならびにDMA^{III}の高い回収率に特化した新規合成法の開発を行う。

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）
1. DMMTAの <i>g</i>	DMMTAの <i>gpt</i> deltaラット膀胱	鰐淵英機（大阪市立大学）

<i>pt delta</i> 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	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	iAs ^{III} およびDMA ^V 投与C57BL/6マウスにおけるDMMTA産生の検討	鰐渕英機（大阪市立大学）
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	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	鰐渕英機（大阪市立大学）
4. DMMTAならびに関連物質の高純度品の合成ならびに精製	1) DMMTAの新規合成法の開発	山中健三（日本大学）
	2) DMA ^{III} の新規合成法の開発	
	3) DMMTAの活性中間代謝物の合成法の開発	
5. 培養細胞や腸内細菌を用いたヒ素化合物の代謝・毒性試験	1) 無細胞系を用いたヒ素化合物の代謝活性化機構の検討	山中健三（日本大学） 畑 明寿（千葉科学大学）
	2) ヒト肝培養細胞を用いたヒ素化合物の代謝活性化機構の検討	
	3) ヒト肝培養細胞を用いたヒ素化合物の細胞毒性試験	
	4) DMMTAおよびDMA ^{III} の細胞膜透過性試験ならびに腸内代謝実験	畑 明寿（千葉科学大学）

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

研究項目 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 (研究担当者名 : 鰐淵英機 (所属機関名 : 大阪市立大学))

DMMTAはヒトならびに哺乳動物においてDMA^V以降の有機ヒ素代謝物であるが、その高い細胞毒性からヒ素による膀胱発がんの究極発がん物質として注目されている。しかしながら、DMMTAの*in vivo*における遺伝毒性および発がん性の有無については十分に明らかにされていないのが現状である。その原因としては、DMMTAを経口投与するとそのほとんどがDMA^Vに変換され、標的臓器の膀胱には多くは届きにくいことと、DMMTAの代謝経路の上流のヒ素化合物を投与せずに、直接にDMMTA^Vの毒性を評価できる実験系が確立されていないことが考えられる。本研究では*in vivo*における変異原性を臓器特異的に評価可能なF344 *gpt delta*ラットに、DMMTAの膀胱内直接投与を行うことで、DMMTAの膀胱粘膜における変異原性および発がん性を検討した。平成26年度では、DMMTAの投与量および投与期間を設定するために、雌性F344ラットにDMMTAの膀胱内直接投与を行い、DMMTAの膀胱内代謝動態の経時的な変化および膀胱粘膜への影響について検討した結果、投与後3時間まではDMMTAが膀胱内で安定して存在することが明らかとなった。一方、膀胱粘膜内においては、DMMTAが極めて微量であり、その量は投与量に依存するが、投与後3時間までに変動はみられなかった。なお、五価ヒ素化合物であるDMA^Vも非常に微量ながら検出されたが、投与群と対照群との間に差はみられなかった。

平成27年度では、同実験において尿中および膀胱粘膜におけるDMMTAの三価ヒ素への代謝の有無について検討した。その結果、DMA^{III}が投与量依存的に増加しているものの、その量は極めて微量であった。以上より、経尿道的膀胱内直接投与法で、被験ヒ素化合物が膀胱内で安定して存在することが明らかとなった。したがって、本法を用いることで膀胱におけるDMMTA^Vの毒性を直接的に評価できることが考えられた。さらに、本投与方法における最適な試験期間を検索するために6週間計12回投与を実施する試験系を実施した。動物は雌性F344ラットを用いて溶媒群、DMMTA^V 70ppm投与群、DMMTA^V 350ppm投与群、DMA^V 70ppm投与群の4群(各群30匹)を先の試験と同様に週2回の投与を行なった結果、カテーテル挿入による刺激などが原因と思われるアーチファクトが膀胱内および尿管でみられたため、本投与方法における試験期間には4週間が最適であることが明らかとなった。

以上の結果をもとに、F344 *gpt delta*ラットを用いた変異原性実験の投与方法を確立し、*in vivo*変異原性試験を実施した。変異原性試験の詳細を以下に記す。動物は10週齢の雌性F344 *gpt delta*ラット30匹を用いて、溶媒群およびDMMTA^V 70ppm投与群の2群で4週間の試験を実施した。なお、その際の投与方法については先の試験と同様に週2回、計8回の投与を実施した。また、試験期間中における体重変化および飲水量、摂餌量について、DMMTA^V投与による有意な変化はみられなかった。変異原性試験を実施するための膀胱粘膜由来genomic DNAを抽出し、点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を実施した。その結果、*gpt* assayにおいて、DMMTA^V投与群における変異頻度の有意な変化及びDMMTA^V特異的な変異スぺ

クトラは認められなかった。Spi assayについても同様に、DMMTAV投与による変異体頻度の有意な変化は認められなかった。さらに、DMMTAV投与による膀胱粘膜の増殖能を評価するためにKi67の免疫染色を実施し、膀胱粘膜におけるKi67陽性率について検討した結果、対照群と比較してDMMTA投与群において細胞増殖能の増加傾向がみられた。以上より、DMMTAがラット膀胱粘膜に対して*in vivo*変異原性を有さないことが明らかとなった。またDMMTAが細胞増殖を惹起することが示唆された。

研究項目 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 (研究担当者名：鰐淵英機（所属機関名：大阪市立大学）)

平成26年度では、マウスのヒ素発がん低感受性とDMMTAVとの関連性を検討するために、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の有無を検討した結果、予想に反していずれの投与群においても尿中および糞中からDMMTAが検出された。本年度では、ラットおよびマウスにおけるDMMTAV産生能およびその影響について比較するため、4週間試験系を実施し、iAs^{III}およびDMA^V代謝によるDMMTAの産生について検討を行った。詳細について以下に記す。動物は10週齢の雄性C57BL/6マウスおよびF344ラットをそれぞれ15匹ずつ用いて、無処置群およびDMA^V 100ppm飲水投与群、iAs^{III} 100ppm飲水投与群の3群を設定し、試験を実施した。なお、飼育期間第2週および第4週時に糞尿をそれぞれ回収した。ICP-MSを用いてヒ素形態別に定量的に解析を行った結果、ラット・マウス共にヒ素投与によってDMMTAが産生されていることが明らかになった。さらに、尿中DMMTAの濃度はラット・マウス間で有意な差はみられなかったことから、ヒ素膀胱発がん性の種差は尿路上皮におけるヒ素の輸送・取り込み機構及び発がん関連因子の違いによるものであることが強く示唆された。以上の結果から、ヒ素膀胱発がん性の種差は尿路上皮におけるヒ素の輸送・取り込み機構及び発がん関連因子の違いによるものであることが強く示唆された。今後、さらにラット・マウス膀胱上皮におけるヒ素トランスポーター及び発がん関連因子の発現について検討する予定である。

研究項目 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 (研究担当者名：鰐淵英機（所属機関名：大阪市立大学）)

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。本研究では、ヒ素発がんにおける p16^{INK4a} および p14^{ARF} の役割を明らかにすることを目的とし、INK4a/Arf 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。前年度動物飼育室にてウイルス感染が発生し、その対応のため、再度のクリーニングおよび検疫を実施した結果、発がん性試験進行が予定より遅れているが、平成 28 年度に目的達成できる。また、発がん性試験実施の遅れを補うため、4 週間短期発がん性試験を実施し、肝臓、肺、膀胱などにおける増殖性病変の検索あるいは細胞増殖能について検討した。その結果、iAs^{III} および DMA^V 投与による有意な変化はみられなかった。進行中の長期発がん性試験にて、iAs^{III} および DMA^V の INK4a/Arf 欠損マウスにおける発がん性について、その詳細を明らかにすることができる。

研究項目 4 : DMMTA ならびに関連物質の高純度品の合成ならびに精製

1) 個別課題名 : DMMTA の新規合成法の開発 (研究担当者名 : 山中健三 (所属機関名 : 日本大学))

平成26年度においてDMMTAについて、その合成過程で毒性の強い高濃度硫化水素ガスを用いた気—液反応を行うため、さらにDMMTA自身の毒性を考慮し、分離精製法も含めて高い回収率に特化した新規合成法の開発を目指した。DMMTA合成にともなう不純物、すなわちDMA^{III}、イオウ単体などを酸化アルミニウムカラム処理によって除去することが可能となり、その後、再結晶をすることで、HPLC-ICP-MS分析にも対応可能な高純度DMMTAを得ることができた。Frickeらの方法は、硫化水素ガスを30分間DMA^V/30%EtOH溶液に曝気させて、硫黄原子を導入する方法で危険が伴うとともに、合成スケールの拡大には不適である。また、DMA^{III}を中心とした不純物が多い。加硫剤であるローソン試薬によるDMMTAの新規合成法を適応した結果、DMMTA合成が比較的容易に行うことが可能となった。今年度は合成スケールの拡大を目指すことを行ってきたが、数十 g オーダーの合成も可能となった。さらに、酸化アルミニウムカラム処理による部分精製後、hexane/CHCl₃による再結晶を行うことで、少量ではあるが分析に耐えうる高純度品を得ることができた。

2) 個別課題名 : DMA^{III} の新規合成法の開発 (研究担当者名 : 山中健三 (所属機関名 : 日本大学))

上記個別課題名 1) 本年度の課題として、DMMTAの代謝前駆物質と考えられるジメチル亜ヒ酸—グルタチオン複合体 (DMA^{III}-SG) を毒性評価ならびに分析標品として高純度品の合成を行った結果、アルゴン置換グローブ合成ボックス内での反応により90-95%精製度の合成に成功した。合成スケールとしては、1-2 g オーダーが精製度を考慮した場合適当であった。

3) 個別課題名 : DMMTA の中間代謝物の合成法の開発 (研究担当者名 : 山中健三 (所属機関名 : 日本大学))

26 年度の実験経過、ならびに文献調査等から DMMTA の活性化機構の中で重要な役割を演じていると推定される中間代謝物を概ね把握することができた結果、27 年度はその微量合成法の確立を目指した。その結果、ジメチルメルカプトアルシン (CH₃)₂AsSH の部分合成 (揮発性が高く、強い毒性が予測されることから、精製のプロセスは断念した) 、ならびに GC-MS 法による分析法を見いだした。

研究項目 5 : 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験

1) 個別課題名 : 無細胞系を用いたヒ素化合物の代謝活性化機構の検討 (研究担当者名 : 山中健三 (所属機関名 : 日本大学) 、畑明寿 (所属機関名 : 千葉科学大学))

26 年度の結果に基づき、再現性の確認のため合成した DMMTA、DMA^{III}-SG を用いて、無細胞 *in vitro* 系での代謝活性化機構の推定を行った。HPLC-ICP-MS、HPLC-TOFMS、GC、GC-MS などを用いて代謝物を推定した結果、①DMA^{III} は硫黄転移酵

素により硫黄原子が付加され、DMMTA に容易に変換されること、②DMMTA ならびに DMA^{III} は CYP などのモノオキシゲナーゼにより DMA へ変換されること、③DMMTA は GSH と反応、結合して5価のヒ素として DMMTA-GSH 抱合体を形成するが、その後、経時的に DMA^{III}、硫化水素、ジメチルメルカプトアルシンなどに変換されることを昨年同様に確認できた。この成果は *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. vol.33 (2016) に掲載された。

2) 個別課題名：ヒト肝培養細胞を用いたヒ素化合物の代謝活性化機構の検討

(研究担当者名：山中健三(所属機関名：日本大学)、畑明寿(所属機関名：千葉科学大学))

上記1) 個別課題名：無細胞系を用いたヒ素化合物の代謝活性化機構の検討の結果に基づきヒト肝腫瘍細胞株 HepaRG 細胞を用いた細胞系での代謝活性化機序の検討を行った。その結果、研究項目名4で述べたように DMMTA の代謝活性化において GSH の関与が示唆され、GSH による還元的代謝過程で生成し、かつ、先行研究(H. Naranmandura et al., *Chem.Res.Toxicol.*, 24, 1586-96(2011))から推察されている DMA^{III} が DMMTA の毒性発現の本体の一つであることを推定した。

3) 個別課題名：ヒト肝培養細胞を用いたヒ素化合物の細胞毒性試験(研究担当者名：山中健三(所属機関名：日本大学)、畑明寿(所属機関名：千葉科学大学))

昨年以來、HepaRG細胞にDMMTA 溶液(0.5-100μM)ならびにその代謝物と推定されるDMA^{III}を24時間作用させ、WST-8法、ATP量を指標とした細胞毒性評価を行い、さらに、CYPのmRNA発現量をRT-PCRを用いて再度測定した。その結果、CYP発現量の増加に伴い、上記ヒ素化合物の細胞毒性は弱いながらも低下傾向がみられた。一方、GSHを枯渇した同細胞株を用いてこれらヒ素化合物の毒性を検討した結果、DMMTAの毒性は著しく低下したが、その代謝物であるDMA^{III}の場合には毒性指標に有意差はみられなかった。上記個別課題2) で述べたように、代謝活性化にGSHを伴う還元的活性化機序が関与すること、DMA^{III}からDMAへの一酸素原子添加代謝反応にCYPが関与することが、培養細胞レベルでの結果から推定された。今後の課題として、DMMTAの代謝活性化における遺伝毒性の有無を早急に検討する予定である。

4) 個別課題名：DMMAT および DMA^{III}の細胞膜透過試験ならびに腸内代謝実験(研究担当者名：山中健三(所属機関名：日本大学)、畑明寿(所属機関名：千葉科学大学))

26年度、DMA^Vをヒト腸内細菌叢にばく露させることにより DMMTA が生じることを確認した。しかしながら、食品に含まれる AsSug、AsLipid が代謝され DMA が生じる過程は不明である。これを明らかにするため消化管環境を模擬的に作成し、消化液、消化酵素、腸内細菌叢での代謝を調査している。人工胃液へのばく露では、AsSug328 は側鎖が切断され分子量の小さい AsSug へと分解されたが、DMA^Vは生じなかった。胆汁抽出物とパンクレアチンへのばく露では、AsSug328 に変化は生じなかった。嫌気条件下でのヒト腸内細菌へのばく露では、AsSug328 は AsSug254、

チオ型の AsSug328、数種類の未同定ヒ素に変化した。腸内細菌叢によるヒ素代謝については継続して検討を実施している。膀胱粘膜上皮におけるヒ素化合物の透過性について知見を得るため、トランスウェル上にラット膀胱上皮由来細胞を培養して膜透過性試験を行った。今回実施した条件下では 3 価無機ヒ素と DMA^V の見かけの膜透過性は共に $5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6} \text{cm/sec}$ 程度であった。その他のヒ素化合物についても継続して検討を行っている。

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

「成果及び考察」本研究は、DMMTA をはじめとした有機ヒ素化合物の体内動態、遺伝毒性および発がん性を明らかにすることを目的とした。本研究で得られた成果は以下の通りである。

- 1) DMMTA の *in vivo* における遺伝毒性および発がん性の有無について十分に明らかにされていないのが現状である。それは DMMTA を経口投与するとそのほとんどが DMA^V に変換され、標的臓器である膀胱に多くは届きにくいことと、DMMTA 代謝経路上流のヒ素化合物を投与せずに、直接に DMMTA の毒性を評価できる実験系が確立されていないことが原因であると考えられる。本研究で、ラット膀胱内に直接 DMMTA を投与することによりその代謝経路上流のヒ素化合物による影響を受けずに、DMMTA による影響を直接に検討できる実験系を確立した。さらに、*in vivo* 変異原性および発がん性を臓器特異的かつ包括的に評価可能な F344 *gpt delta* ラットを用いた本実験系において、DMMTA がラット膀胱粘膜に対し対照群に比して細胞増殖を惹起したが、DMMTA がラット膀胱粘膜に対して *in vivo* 変異原性を有さないことが明らかとなった。
- 2) ヒ素投与による膀胱発がんに対する感受性がラットよりもマウスで低いことが知られている。本研究で C57BL/6 マウスおよび F344 ラットに DMA^V および iAs^{III} を飲水投与し、尿中および糞中におけるヒ素代謝物を比較検討した。ラット・マウス共にヒ素投与によって DMMTA が産生されていることが明らかになった。さらに、尿中 DMMTA^V の濃度はラット・マウス間で有意な差はみられなかったことから、ヒ素膀胱発がん性の種差は尿路上皮におけるヒ素の輸送・取り込み機構及び発がん関連因子の違いによるものであることが強く示唆された。
- 3) DMMTA、DMA^{III}-SG を用いて、無細胞 *in vitro* 系での代謝活性化機構の推定を行った結果、①DMA^{III} は硫黄転移酵素により硫黄原子が付加され、DMMTA に容易に変換されること、②DMMTA ならびに DMA^{III} は CYP などのモノオキシゲナーゼにより DMA^V へ変換されること、③DMMTA はグルタチオン(GSH)と反応、結合して 5 価のヒ素として DMMTA-GSH 抱合体を形成するが、その後、経時的に DMA^{III}、硫化水素、ジメチルメルカプトアルシンなどに変換されることを確認できた。さらに、GSH を枯渇したヒト肝腫瘍細胞株 HepaRG 細胞を用いてこれらヒ素化合物の毒性を検討した結果、DMMTA の毒性は著しく低下したことが明らかとなった。なお、DMA^V をヒト腸内細菌叢にばく露させることにより DMMTA が生じることを確認した。
- 4) DMMTA の新規合成法の開発に成功し、DMMTA を数十 g オーダーで合成する

ことが可能となった。酸化アルミニウムカラム処理による部分精製、hexane/CHCl₃ による再結晶を行うことで、少量ではあるが分析に耐えうる高純度品を得ることができている。また、ジメチル亜ヒ酸-グルタチオン複合体 (DMA^{III}-SG) を 90-95%精製度の合成に成功した。

「結論」 DMMTA がラット膀胱粘膜に対して *in vivo* 変異原性を有さないことが初めて明らかとなった。また、ラットおよびマウスにおけるヒ素膀胱発がん性の種差は DMMTA 尿中濃度よりも、尿路上皮におけるヒ素の輸送・取り込み機構及び発がん関連因子の違いによるものであることが強く示唆された。さらに、DMMTA の代謝活性化および毒性の発現において GSH が重要な役割を担うことが明らかになった。加えて、DMMTA ならびに DMA^{III} の高純度品の新規合成法の開発に成功した。本研究で得られた DMMTA の代謝活性化機構、毒性と変異原性に関する知見、ならびに DMMTA などのヒ素化合物の新規合成法の開発は食品に由来する有機ヒ素の健康影響評価に必要不可欠で、大いに貢献できると期待される。

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 Akihisa Hata, Momoko Hasegawa, Hidetoshi Kurosawa, Kenzo Yamanaka, Yuko Yamano, Yoko Endo, Noboru Fujitani, Ginji Endo: Improving the Efficiency of Organoarsenic Extraction from Seaweeds. Food Safety, 2(4), 160-170, 2014.
- ② 藤岡正喜, 鰐渕英機: 身の回りの化学物質のリスク評価とリスク管理 食品中の汚染物質のリスク評価とリスク管理. Foods & Food Ingred J Jpn., 220(3) 217-222, 2015.
- ③ Hidetoshi Kurosawa, Yasuyo Shimoda, Motofumi Miura, Koichi Kato, Kenzo Yamanaka, Akihisa Hata, Yuko Yamano, Yoko Endo, Ginji Endo: A novel metabolic activation associated with glutathione in dimethylmonothioarsinic acid (DMMTA^V)-induced toxicity obtained from in vitro reaction of DMMTA^V with glutathione. J. Trace Elem. Med. Biol 33, 2016.
- ④ 藤岡正喜, 魏民, 鰐渕英機: 職業・環境発がん:メカニズムと病理 ヒ素中毒・発がんの機序と現状.病理と臨床 32(6) 638-642, 2014 年 6 月
- ⑤ Akihisa Hata, Hidetoshi Kurosawa, Yoko Endo, Kenzo Yamanaka, Noboru Fujitani, Ginji Endo: A biological indicator of inorganic arsenic exposure using the sum of urinary inorganic arsenic and monomethylarsonic acid concentrations. J Occup Health 2016; 58 (印刷中)

2 本研究を基にした学会発表の実績

1) シンポジウム講演

- ① 長谷川桃子, 畑明寿, 黒澤英俊, 山中健三, 山野優子, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 藤谷登: ワカメに含まれる有機ヒ素化合物抽出法の検討. 第20回ヒ素シンポジウム,

- 千葉県銚子市, 2014.
- ② 鰐淵英機：環境物質のリスクアセスメントと毒性病理学. 第32回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 高松, 2015.
 - ③ 魏民, 藤岡正喜, 立花大和, 鰐淵英機：実験的アプローチを用いた食品中ヒ素のリスク評価. シンポジウム-2「発がんのリスクとがん治療：その分子メカニズム」, 第59回日本薬学会関東支部大会～ヒトの健康を守る薬学：基礎・応用研究と実務の調和～, 船橋, 2015.
 - ④ 山中健三, 加藤孝一：食品中ジメチルヒ素の毒性発現における加硫化または脱硫化代謝の意義. シンポジウム-2「発がんのリスクとがん治療：その分子メカニズム」, 第59回日本薬学会関東支部大会～ヒトの健康を守る薬学：基礎・応用研究と実務の調和～, 船橋, 2015.
 - ⑤ 畑明寿, 長谷川桃子, 藤谷登, 圓藤陽子, 圓藤吟史：食品中有機ヒ素化合物の発がんリスク：代謝と腸内細菌の関与. シンポジウム-2「発がんのリスクとがん治療：その分子メカニズム」, 第59回日本薬学会関東支部大会～ヒトの健康を守る薬学：基礎・応用研究と実務の調和～, 船橋, 2015.
 - ⑥ 下田康代, 加藤孝一, 黒澤英俊, 畑明寿, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三：ジメチルヒ素化合物の毒性発現に対するcytochrome P450の影響. 第21回ヒ素シンポジウム, 徳島, 2015.
 - ⑦ 畑明寿, 黒澤英俊, 圓藤陽子, 山中健三, 藤谷登, 圓藤吟史：無機ヒ素ばく露の生物学的モニタリング指標値の検討. 第21回ヒ素シンポジウム, 徳島, 2015.
 - ⑧ 鰐淵英機, 魏民, 梯アンナ, 藤岡正喜：発がんモデルを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明. 日本薬学会第136年会、パシフィコ横浜, 2016.

2) その他

- ① 下田康代, 黒澤英俊, 加藤孝一, 立川真理子, 畑明寿, 圓藤陽子, 圓藤吟史, 山中健三：ヒト肝細胞株HepaRGを用いたジメチルヒ素化合物の細胞毒性評価. 日本薬学会 第135年会, 神戸, 2015.
- ② 下田 康代、黒澤 英俊、加藤 孝一、山中 健三：肝Cytochrome P450(CYP)によるジメチルヒ素の毒性軽減. 第59回日本薬学会関東支部大会～ヒトの健康を守る薬学：基礎・応用研究と実務の調和～, 船橋, 2015.
- ③ Akihisa Hata, Momoko Hasegawa, Hidetoshi Kurosawa, Kenzo Yamanaka, Yuko Yamano, Yoko Endo, Noboru Fujitani, Ginji Endo: Improving the efficiency of organoarsenic extraction from edible seaweeds. ISTERH2015, Dubrovnik, Croatia, 2015.

3 特許及び特許出願の数と概要 なし

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） なし

IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) DMMTA のラット膀胱粘膜における <i>in vivo</i> 変異原性の有無を明らかにする	5	目的は達成している。
(2) マウスのヒ素発がん低感受性と DMMTA との関連性を明らかにする	5	目的は達成している。
(3) iAs ^{III} および DMA の INK4a/Arf 欠損マウスにおける発がん性の評価	4	マウスの飼育施設のウイルス感染のため、長期発がん性試験が予定より遅れているが、平成 28 年度に目的達成できる。また、長期試験の遅れを補うために、短期発がん性試験を追加実施し、被験物質の短期投与による影響を明らかにした。
(4) DMMTA 高純度品の獲得：新規合成法ならびに精製法の開発	5	目的は達成している。
(5) DMMTA 推定代謝物である DMA ^{III} 、ジメチルメルカプトアルシンなどの合成	5	目的は達成している。
(6) DMMTA 推定代謝物の細胞毒性評価	5	目的は達成している。
(7) DMMTA をはじめとした有機ヒ素化合物の代謝経路解明	5	目的は達成している。

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	4	INK4a/Arf 欠損マウスを用いた発がん性試験は予定より遅れているが、他の研究目標をほぼ達成している。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究で得られた DMMTA の代謝活性化機構、毒性と変異原性に関する知見、ならびに DMMTA などのヒ素化合物の新規合成法の開発は食品に由来する有機ヒ素の健康影響評価に必要不可欠で、大いに貢献できると期待される。

総合コメント

食用海産動植物に多く含まれるアルセノシュガーおよびアルセノリピッド代謝過程で、強い毒性を有する DMMTA が生成される。しかしながら、DMMTA の発がん性を含めた有害性に関する知見は非常に乏しく、詳細は明らかとなっていない。本研究で得られた成果は DMMTA の発がん研究の空白を埋めるものと考えられる。

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。