

# 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

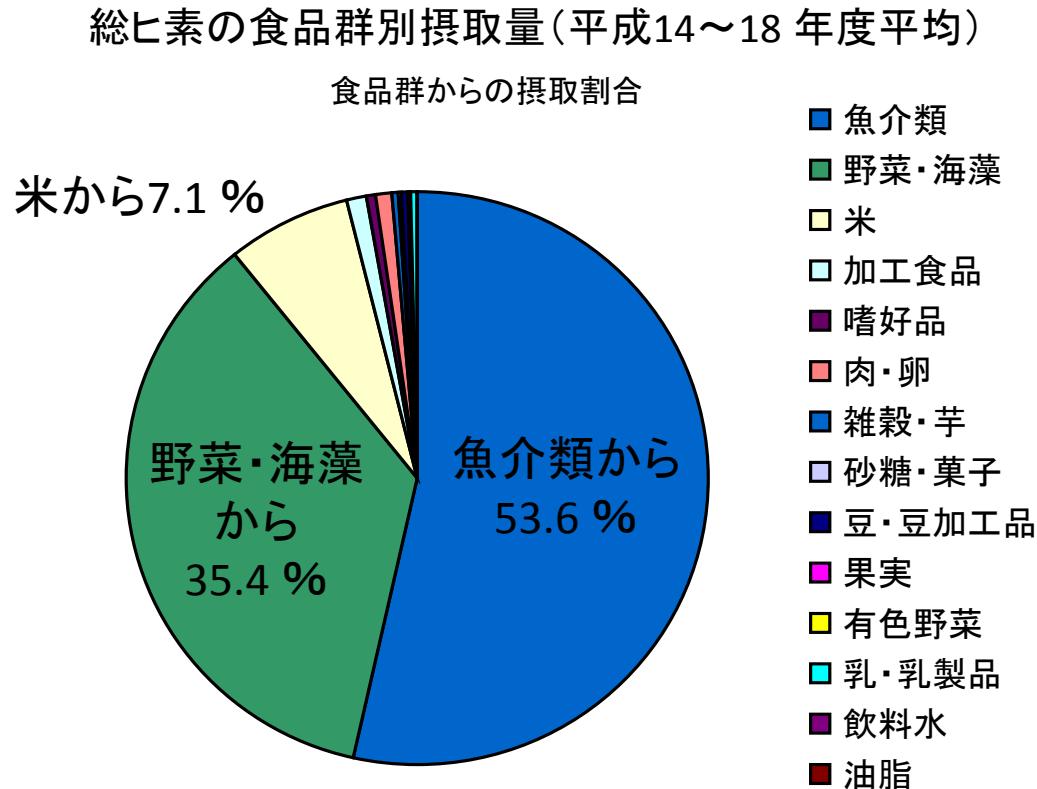
主任研究者 鰐渕英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学

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 畠 明寿 千葉科学大学危機管理学部

# 食品群からの摂取割合

魚介類から53.6 %、野菜・海藻から35.4 %、米から7.1 %で、90 %近くを魚介類と海藻が占め、農産物では米からの摂取寄与が比較的大きい。



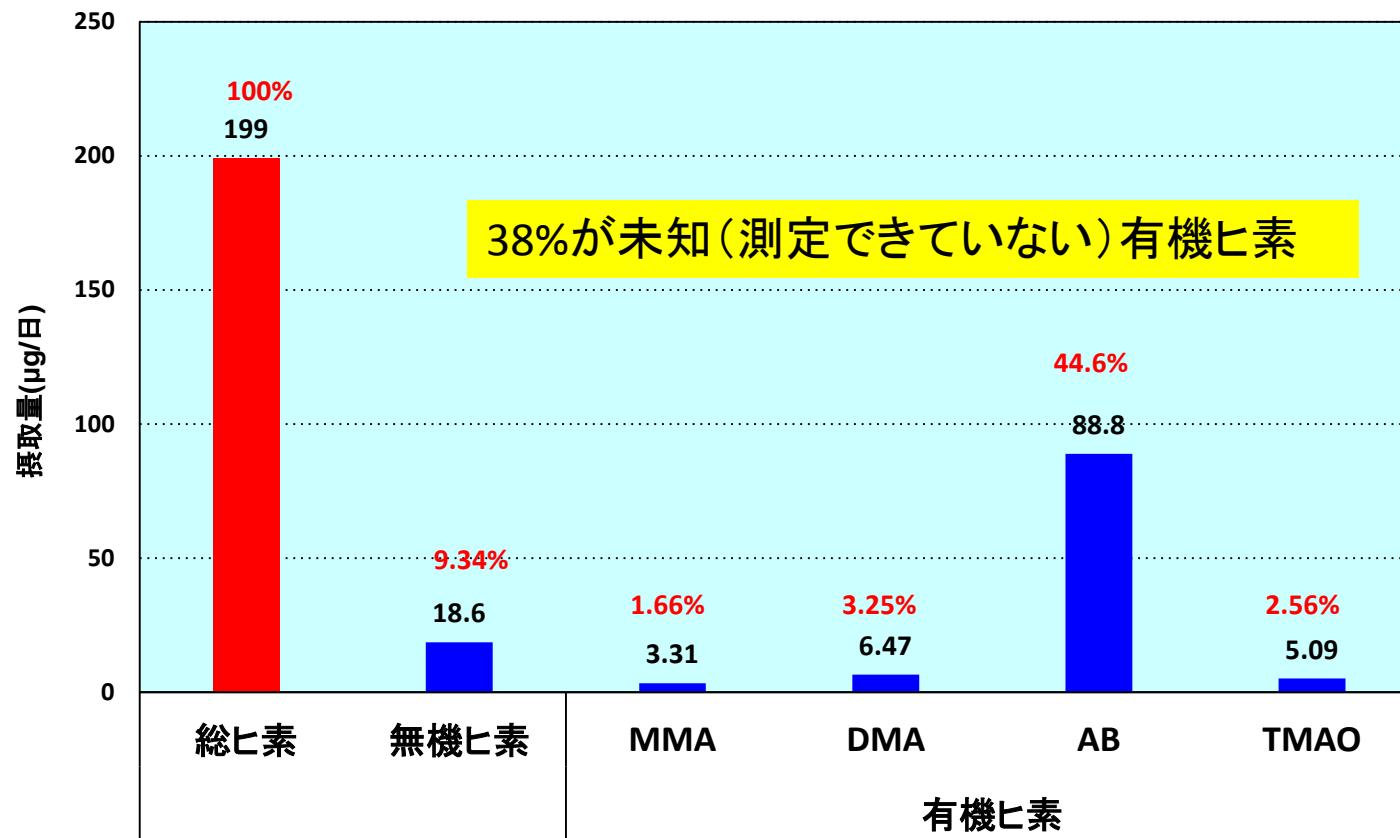
マーケットバスケット方式

出典; トータルダイエット調査結果(厚生労働省)

# ヒ素のヒトへのばく露経路

(1日・1人当たりのヒ素化合物摂取量)

- ❖ 主として飲料水及び食物を摂取することによる経口ばく露
- ❖ 呼吸による大気からの吸入ばく露:わずか



# 尿中ヒ素の形態別分析

海外の研究データと比べても、尿中のDMA、AsBeは高値

単位:  $\mu\text{g As/L}$

Study	値	As(Ⅲ)	As(V)	MMA	DMA	AsBe	others	Total As
Hata et al.2007 (日本) 210人男性	中央値	3.5	0.1	3.1	42.6	61.3	5.2	141.3
	平均値	6.7	0.6	4.5	54.0	97.0	9.3	173.3
Apostoli et al.1999 (イタリア) コントロール群39人男性 (シーフードの消費は少ない)	中央値	0.3		0.9	5.2	9.5		10.6
Tsuji et al.2005 (米国) 439人(206人男性、233人女性)	平均値	0.78	0.46	2.5				15.7*

\*形態別分析したAsは3.9

# 生物及び食品中のヒ素の化学形態と含有量

- 飲料水 (水道水は0.01ppm以下、ヒ素汚染地域の井戸水や温泉水は高濃度)
  - 主に無機ヒ素化合物
- 海産物 (数ppmから百数十ppm)
  - 海産植物(海藻など)
    - 主に有機ヒ素化合物(アルセノシュガー)
    - ヒジキなどには無機ヒ素化合物
  - 海産動物(魚、貝など)
    - 主に有機ヒ素化合物(アルセノベタイン(AsBe), アルセノリピッド)
- 農畜産物 (1ppm以下だが植物は土壤中のヒ素濃度に影響を受ける)
  - 無機ヒ素および有機ヒ素化合物

# 海産動植物由来のヒ素代謝

- 海産植物

## アルセノシュガー

DMA(V)、ジメチルアルセノエタノール(DMAE)などに代謝変換され、尿中排泄される(Ma and Le 1998; Francesconi et al. 2002; Heinrich-Ramm et al. 2002)。

- 海産動物

## AsBe

大部分は代謝されず摂取後速やかに排泄される。

## アルセノリピッド

代謝はまだ十分解析できていない

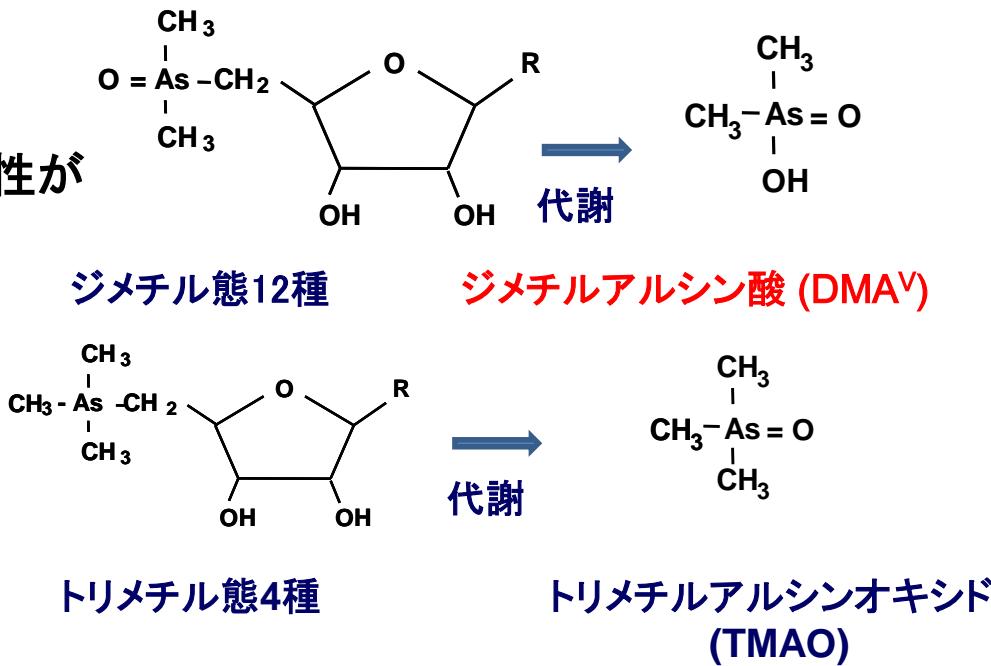
# アルセノシュガー(AsSugs)

- ❖ 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してきた

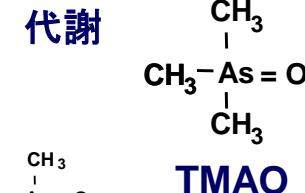
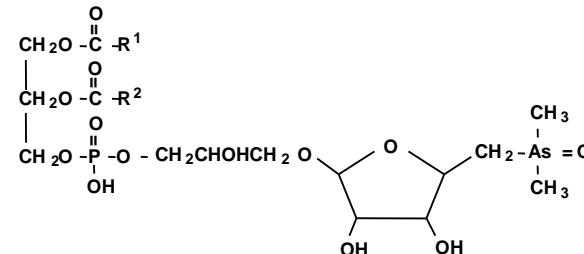
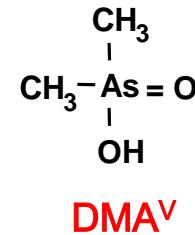
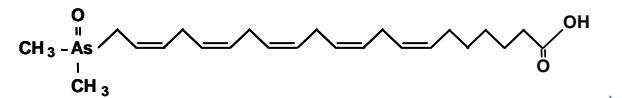
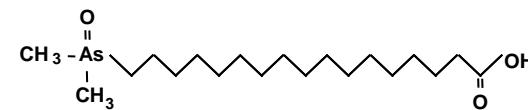
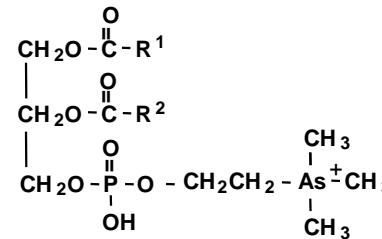
- ❖ しかし、AsSugsの代謝の過程での作用については明らかでない

- ❖ 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

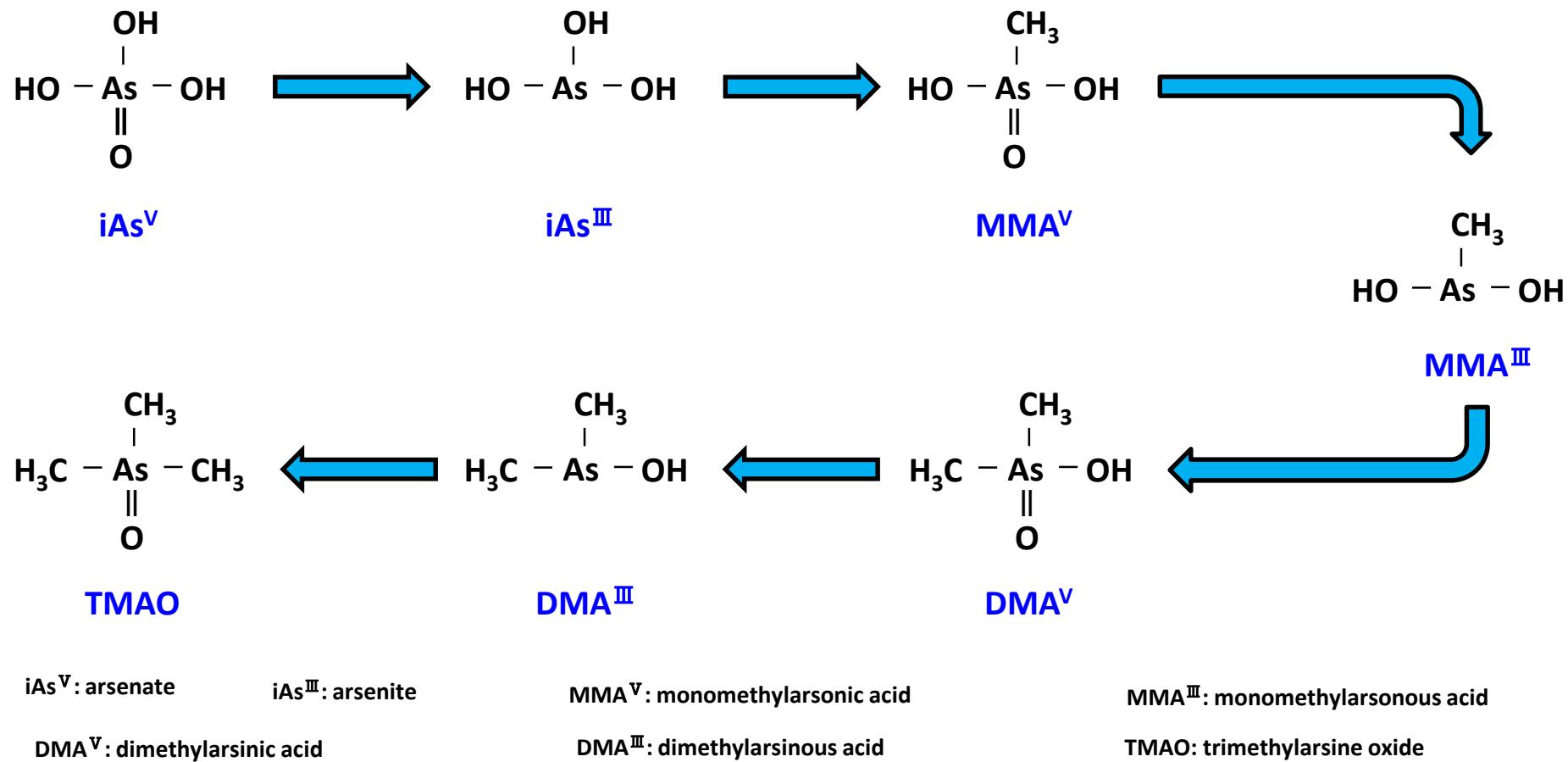


# アルセノリピッド(AsLipids)

- ❖ 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<sup>V</sup>、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



## 無機ヒ素の代謝経路

# ヒ素化合物の培養細胞に対する毒性

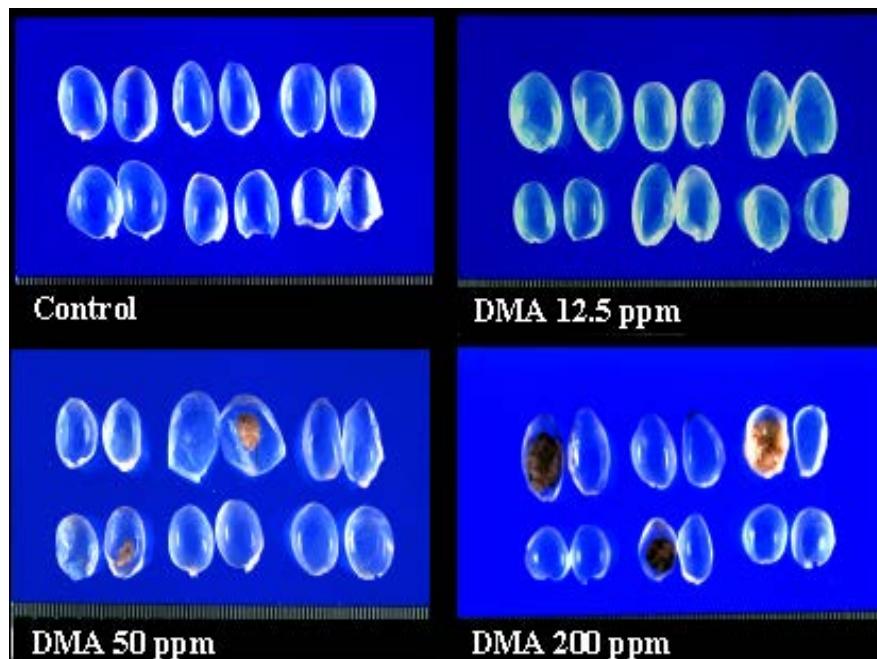
	As <sup>V</sup>	As <sup>III</sup>	MMA <sup>V</sup>	DMA <sup>V</sup>	TMAO	AsBe
毒性	+++	++++	++	+	±	-
核分裂阻止	+	-	+++	++	+	-
4倍体形成	-	-	-	++	++	-
変異原性	-	-	-	-	-	-

# DMA<sup>V</sup> の膀胱発がん性の証明 (2年間発がん性試験)

0 104 Wks

DMA<sup>V</sup> (0, 12.5, 50, 200 ppm in drinking water)

Animal: 10-week-old, 144 male F344 rats



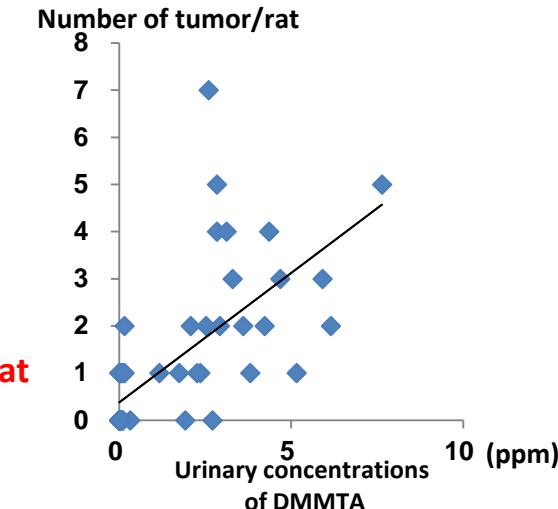
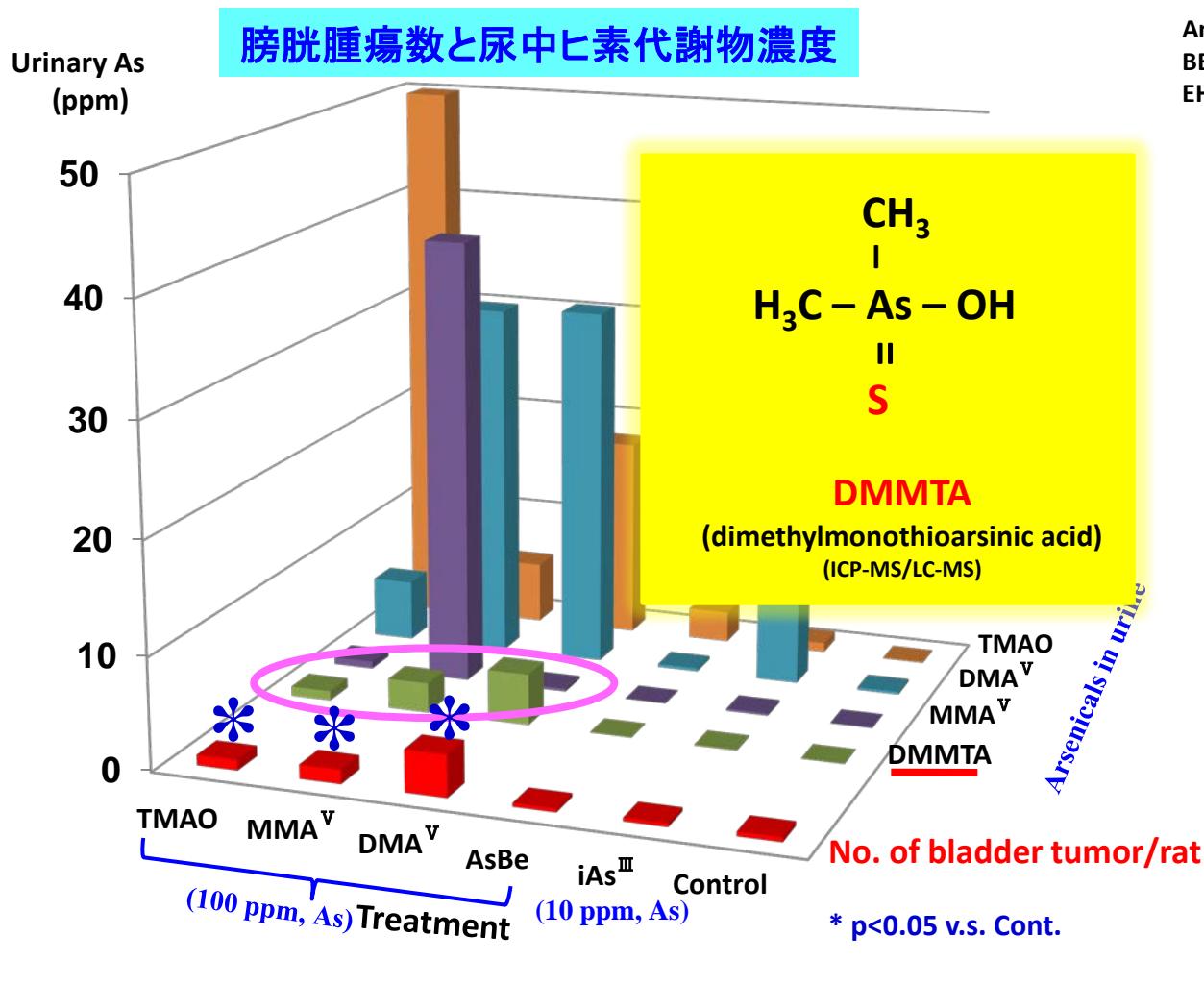
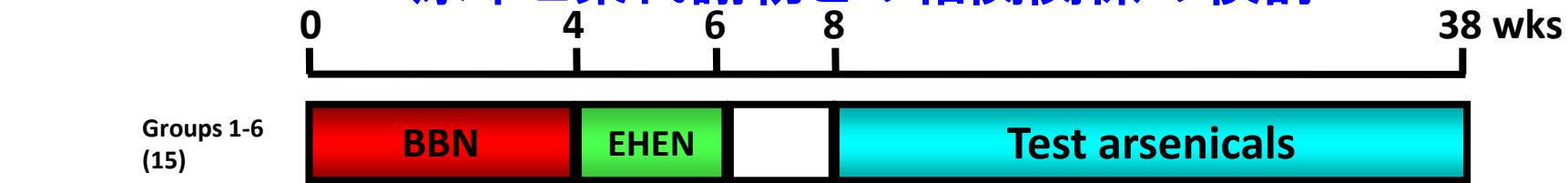
Incidence of urinary bladder tumors

DMA <sup>V</sup> (ppm)	Incidence(%)		
	Papilloma	Carcinoma	Total
0	0	0	0
12.5	0	0	0
50	2 (6)	6 (19)*	8 (26)*
100	2 (6)	12 (39)*	12 (39)*

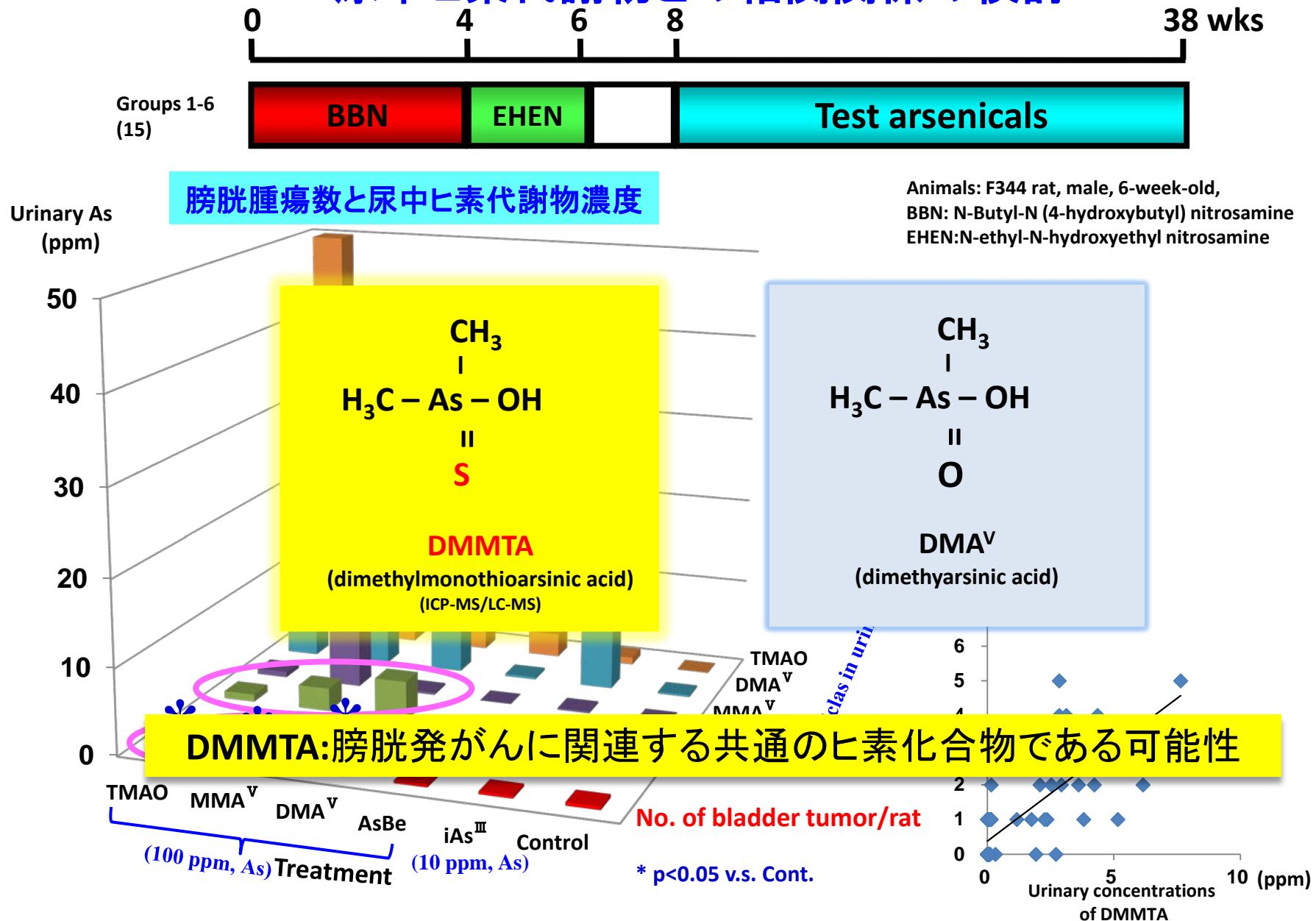
\*: Significantly different from 0 ppm group.

Macroscopic view of urinary bladders

# ラット膀胱がんにおける各ヒ素化合物のプロモーション作用および 尿中ヒ素代謝物との相関関係の検討



# ラット膀胱がんにおける各ヒ素化合物のプロモーション作用および 尿中ヒ素代謝物との相関関係の検討



# 背景

- ❖ 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

## 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」

- ✓ アルセノシュガーおよびアルセノリピッド代謝過程でジメチルアルシン酸(DMA<sup>V</sup>)が生成される
- ✓ ワカメ摂取後の主な尿中ヒ素代謝物はにジメチルアルシン酸(DMA<sup>V</sup>)である
- ✓ DMA<sup>V</sup>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<sup>V</sup>)に代謝され、尿中に存在する
- ✓ 膀胱上皮細胞に対してDMMTA<sup>V</sup>は、膀胱発がん物質であるDMA<sup>V</sup>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<sup>V</sup>は染色体異常試験で陽性である

DMMTA<sup>V</sup>はDMA<sup>V</sup>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<sup>V</sup>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

# 研究目的

DMMTA<sup>V</sup>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<sup>V</sup>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（鰐済）
2. iAs<sup>III</sup>およびDMA<sup>V</sup>投与C57BL/6マウスにおけるDMMTA<sup>V</sup>産生の検討（鰐済）
3. iAs<sup>III</sup>およびDMA<sup>V</sup>のINK4a/ARF 欠損マウスにおける発がん性の検討（鰐済）
4. DMMTA<sup>V</sup>ならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成（山中）
5. 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験（山中、畠）

# 課題1 DMMTA<sup>V</sup>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（鰐渕）

## 背景

DMMTA<sup>V</sup>の*in vivo*変異原性およびそれと発がん性との関連についての検討まだなされていない

## 解析における難点

1. DMMTA<sup>V</sup>を経口投与するとそのほとんどがDMA<sup>V</sup>に変換され、標的臓器の膀胱には多くは届きにくい
2. DMMTA<sup>V</sup>の代謝経路の上流のヒ素化合物を投与せずに、直接にDMMTA<sup>V</sup>の毒性を評価できる実験系が確立されていない

# 課題1 DMMTA<sup>V</sup>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（鰐渕）

## DMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内投与法を用いた検討

雌F344ラットにDMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接投与

単回投与試験

反復投与試験



### DMMTA<sup>V</sup>の投与量、投与回数および投与期間などの設定

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)



雌F344 *gpt delta*ラットに、DMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接投与

□ 膀胱における検討項目：

1. DMMTA<sup>V</sup>の膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討 (*gpt assay*、*Spi<sup>-</sup> assay*)
2. 病理学的解析



DMMTA<sup>V</sup>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

# 雌F344ラットにDMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接投与試験

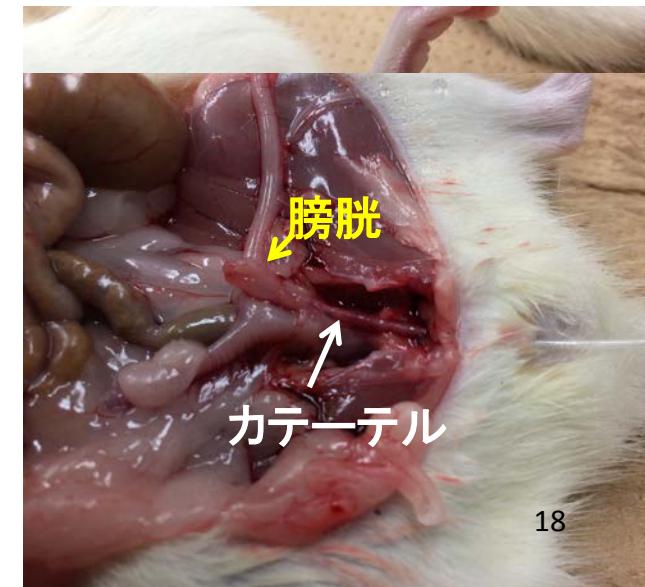
## 実験1：単回投与試験

- ✧ 目的:DMMTA<sup>V</sup>の投与量、処置時間及び膀胱内におけるDMMTA<sup>V</sup>の安定性の検討
- ✧ 動物:雌性F344ラット、10週齢 21匹
- ✧ 投与プロトコール

1. 強制排尿により尿を採取する（膀胱を空虚状態）
2. 得られた尿にヒ素化合物を添加する
  - ①対照群(無処置尿)(3匹)
  - ②DMMTA<sup>V</sup> 35ppm群(5匹) (発がん用量DMA<sup>V</sup>(184 ppm)投与ラットの尿中DMMTA<sup>V</sup>濃度:3.6 ppm)
  - ③DMMTA<sup>V</sup> 70ppm群(5匹)
  - ④DMA<sup>V</sup> 70ppm群(3匹)
3. ソムノペンチル麻酔下で、経尿道的に膀胱へカテーテルを挿入
4. ヒ素化合物添加尿150ul膀胱内注入
5. 1時間あるいは3時間後解剖
  - 膀胱内尿量を測定、採取
  - 膀胱粘膜を洗浄後、採取(超音波破碎法)

### ✧ ヒ素代謝物測定

1. 尿
2. 膀胱粘膜洗浄液
3. 膀胱粘膜(膀胱粘膜破碎液の上清)
4. 膀胱粘膜破碎液の沈殿物(破碎後組織残骸)



# 実験1 単回投与試験

## ヒ素代謝物測定結果

### DMMTA<sup>V</sup>単回投与

曝露時間 回数

Control 1時間 3  
35ppm 1時間 5  
70ppm 1時間 5  
3時間 5

### DMMTA<sup>V</sup>

尿中総量(ug)  
(回収率:尿中総量/投与量)

濃度(ppm)

0  
4.0 ± 0.7 (74.4%)  
8.0 ± 1.2 (71.0%)  
8.9 ± 1.6 (76.3%)

### 尿

### DMA<sup>V</sup>

濃度 (ppm)

0.07 ± 0.02  
0.08 ± 0.04  
0.11 ± 0.08\*  
0.21 ± 0.13\*

### DMA<sup>III</sup>

濃度 (ppm)

0.029 ± 0.000  
0.131 ± 0.112\*  
0.219 ± 0.033\*  
0.181 ± 0.044

## 膀胱粘膜

### DMMTA<sup>V</sup>

匹数  
組織中総量(ug)  
(回収率:組織中総量/投与量)

0  
0.01 ± 0.003 (0.24%)  
0.02 ± 0.01 (0.15%)  
0.02 ± 0.01 (0.19%)

### DMA<sup>V</sup>

組織中総量(ug)

0.003 ± 0.003  
0.001 ± 0  
0.002 ± 0.001  
0.002 ± 0.001

### DMA<sup>III</sup>

組織中総量(ug)

0.043 ± 0.007  
0.031 ± 0.007  
0.031 ± 0.006  
0.051 ± 0.018

### DMA<sup>V</sup>単回投与

匹数

### DMMTA<sup>V</sup>

濃度(ppm)

Control 1時間 3  
70ppm 1時間 3

0  
0.06 ± 0.03

### 尿

### DMA<sup>V</sup>

尿中総量(ug)  
(回収率:尿中総量/投与量)

0.027 ± 0.002  
10.48 ± 0.31 (97.5%)\*

### DMA<sup>III</sup>

濃度 (ppm)

0.07 ± 0.02  
20.35 ± 8.64\*

### DMA<sup>III</sup>

濃度 (ppm)

0.029 ± 0.000  
0.339 ± 0.208

## 膀胱粘膜

### DMMTA<sup>V</sup>

匹数

組織中総量(ug)

Control 1時間 3  
70ppm 1時間 3

0  
0.006 ± 0.002

### DMA<sup>V</sup>

組織中総量(ug)

0.003 ± 0.003  
0.005 ± 0.001

### DMA<sup>III</sup>

組織中総量(ug)

0.043 ± 0.007  
0.007 ± 0.004

\* Significantly different from the respective control

すべての膀胱粘膜洗浄液と破碎後組織残骸:DMMTA<sup>V</sup>とDMA<sup>V</sup>の濃度は検出限界以下

DMMTA<sup>V</sup>単回投与(1、3時間後)

- ❖ 尿中DMMTA濃度は投与量に依存する( $70 \text{ ppm} > 35\text{ppm}$ )。
- ❖ 70 ppm DMMTA投与群:
  - ✧ 3時間まで尿中ヒ素化合物の殆どはDMMTA<sup>V</sup>で、DMA<sup>V</sup>及びDMA<sup>III</sup>は微量であった。
  - ✧ 1時間での尿中DMMTA<sup>V</sup>濃度と比較して3時間では、尿量増加による濃度の低下がみられたが、尿中DMMTA<sup>V</sup>の総量はほぼ同じであった。
- ❖ 膀胱粘膜内では、DMMTA<sup>V</sup>がごく微量であり、その量は投与量に依存するが、3時間までに変動はみられなかった。なお、DMA<sup>V</sup>とDMA<sup>III</sup>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。

DMA<sup>V</sup>単回投与(1時間後)

- ❖ 70 ppm DMA投与群において、尿中ヒ素化合物の殆どはDMA<sup>V</sup>であった。DMA<sup>III</sup>は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。
- ❖ 膀胱粘膜内では、DMMTA<sup>V</sup>がごく微量であった。なお、DMA<sup>V</sup>とDMA<sup>III</sup>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。

本法を用いることで直接的にDMMTA<sup>V</sup>の変異原性を評価できる

# 雌F344ラットにおけるDMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接注入試験

## 実験2：4週間反復投与試験

✧ 動物：雌性F344ラット、10週齢、50匹（採尿群：20匹、実験群：10匹ずつ）

✧ 投与プロトコール

1. 強制排尿により尿を採取する
2. 得られた尿にヒ素化合物を添加する
  - ①対照群（無処置尿）
  - ②DMMTA<sup>V</sup> 70ppm群
  - ③DMA<sup>V</sup> 70ppm群
3. ソムノペンチル麻酔下で、経尿道的に膀胱へカテーテルを挿入
4. ヒ素化合物添加尿150ul膀胱内注入
5. 週に2回、4週間で合計8回投与
6. 最終投与24時間後解剖

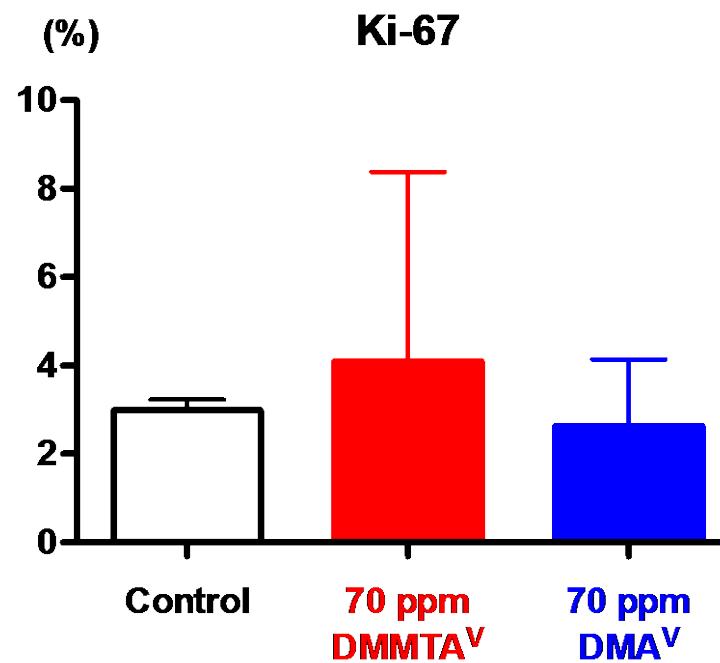
✧ 解析項目

1. 膀胱の病理学的解析(H.E.)
2. 膀胱粘膜の細胞増殖能(Ki-67)

# 雌F344ラットにおけるDMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接注入試験 4週間反復投与試験の結果

✧ 膀胱の病理学的解析(H.E.)：投与による変化は認められなかった

✧ 膀胱粘膜における細胞増殖能



# 雌F344ラットにおけるDMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接注入試験

## 実験3: 6週間反復投与試験

✧ 動物: 雌性F344ラット、10週齢、50匹(採尿群: 20匹、実験群: 10匹ずつ)

✧ 投与プロトコール

1. 強制排尿により尿を採取する
2. 得られた尿にヒ素化合物を添加する
  - ① 対照群(無処置尿)
  - ② DMMTA<sup>V</sup> 70ppm群
  - ③ DMA<sup>V</sup> 70ppm群
3. ソムノペンチル麻酔下で、経尿道的に膀胱へカテーテルを挿入
4. ヒ素化合物添加尿150ul膀胱内注入
5. 週に2回、6週間で合計12回投与
6. 最終投与24時間後解剖

✧ 解析項目

1. 膀胱の病理学的解析(H.E.)

## 雌F344ラットにおけるDMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接注入試験

### 6週間反復投与試験の結果

- ◆ 対照群を含めて全ての群の半数以上の動物に、肉眼的血尿と膀胱結石が認められた。



経尿道的膀胱内直接投与法で、4週間の投与は最適である

# 雌F344*gpt delta*ラットにおける DMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接注入試験

## 4週間反復投与試験

✧ 動物: 雌性*gpt delta*F344ラット、10週齢、30匹(各群:15匹ずつ)

✧ 投与プロトコール

1. 強制排尿により尿を採取する(野生型採尿群:20匹)
2. 得られた尿にヒ素化合物を添加する

①対照群(無処置尿)

②DMMTA<sup>V</sup> 70ppm群

ソムノペンチル麻酔下で、経尿道的に膀胱へカテーテルを挿入

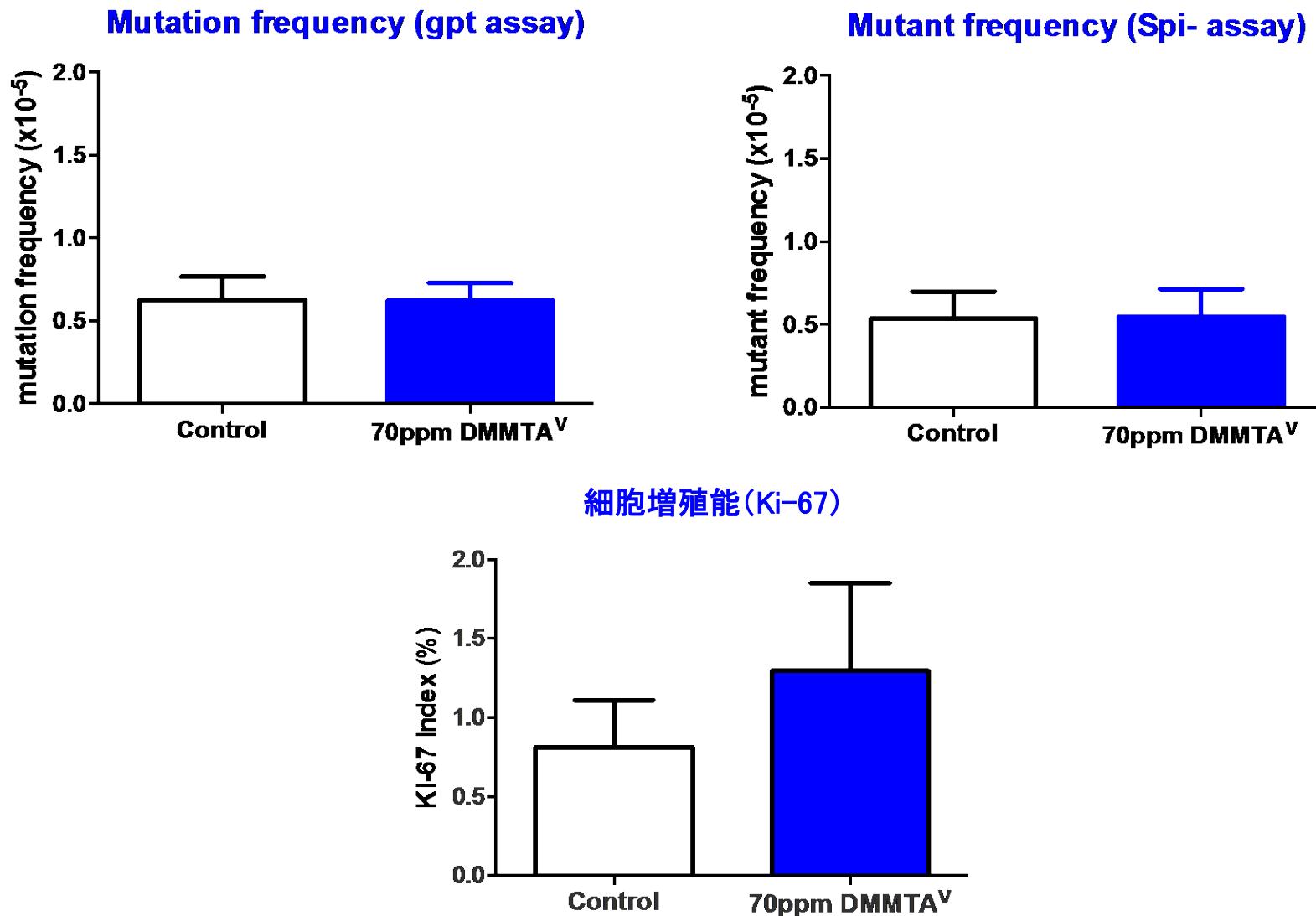
3. ヒ素化合物添加尿150ul膀胱内注入
4. 週に2回、4週間で合計8回投与
5. 最終投与24時間後解剖

✧ 解析項目

1. DMMTA<sup>V</sup>の膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討(*gpt assay*、*Spi<sup>-</sup> assay*)
2. 膀胱粘膜の細胞増殖能(Ki-67)

雌F344*gpt delta*ラットにおける  
DMMTA<sup>V</sup>の経尿道的膀胱内直接注入試験

4週間反復投与試験の結果



# 課題1 DMMTA<sup>V</sup>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（鰐渕）

## 結論

1. ラット膀胱内に直接DMMTA<sup>V</sup>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<sup>V</sup>そのものによる影響を直接的に検討できる実験系を確立した。
2. DMMTA<sup>V</sup>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。
3. DMMTA<sup>V</sup>が細胞増殖を惹起することが示唆された。

# 課題2 iAs<sup>III</sup>およびDMA<sup>V</sup>投与マウス及びラットにおけるDMMTA<sup>V</sup>産生の検討（鰐渕）

## DMA<sup>V</sup>飲水投与後の尿中ヒ素代謝物と糞中ヒ素代謝物の比較

❖ 目的：マウスのヒ素発がん低感受性とDMMTA<sup>V</sup>との関連性を検討する

### ❖ 動物

雄性C57BL/6マウス 15匹（各群5匹ずつ）  
雄性F344ラット 15匹（各群5匹ずつ）

### ❖ 飲水投与

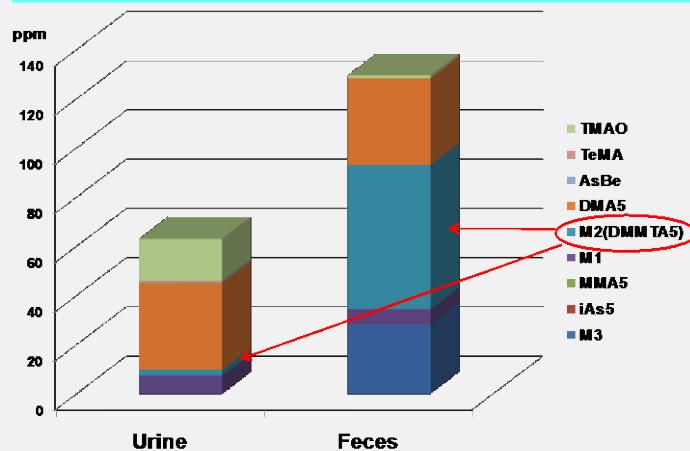
- DMA<sup>V</sup>: 0, 100 ppm, 4週間
- iAs<sup>III</sup>: 0, 100 ppm, 4週間

### ❖ 解析項目

1. 尿中及び糞中ヒ素代謝物
2. 膀胱の病理学的解析(H.E.)
3. 膀胱粘膜の細胞増殖能(Ki-67)

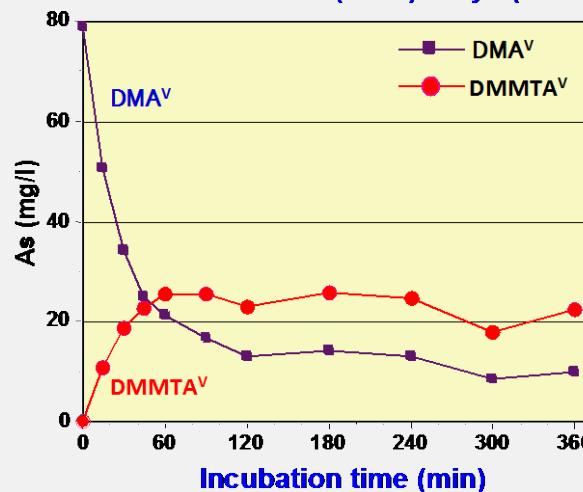
### 背景：これまでのラットを用いた検討結果

DMA<sup>V</sup>(200 ppm)飲水投与後の尿中ヒ素代謝物と糞中ヒ素代謝物の比較(20週)



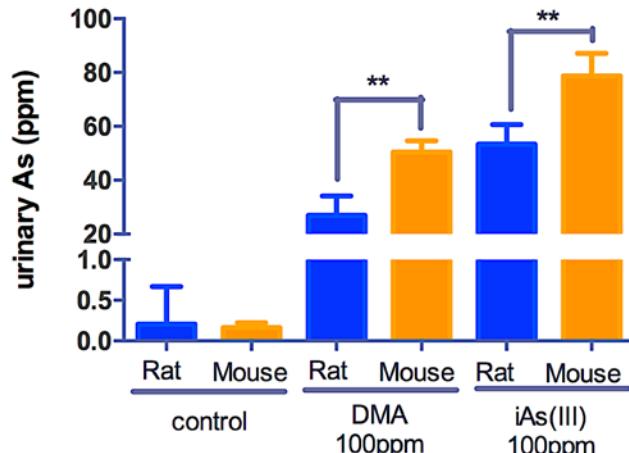
大腸菌A3-6によるDMA<sup>V</sup> → DMMTA<sup>V</sup>変換

E. coli A3-6 + DMA<sup>V</sup> (1mM) + Cys (2mM)

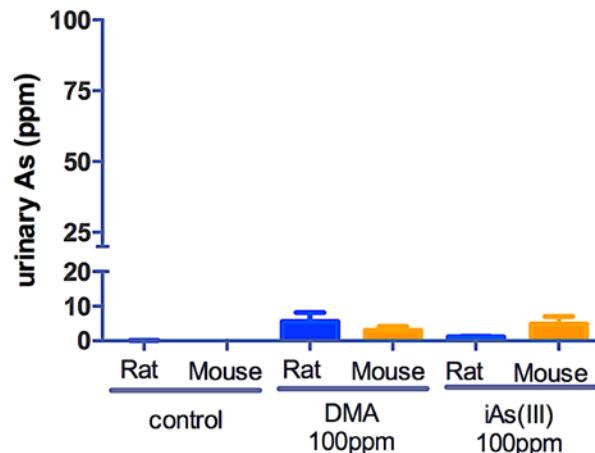


## 尿中ヒ素代謝物

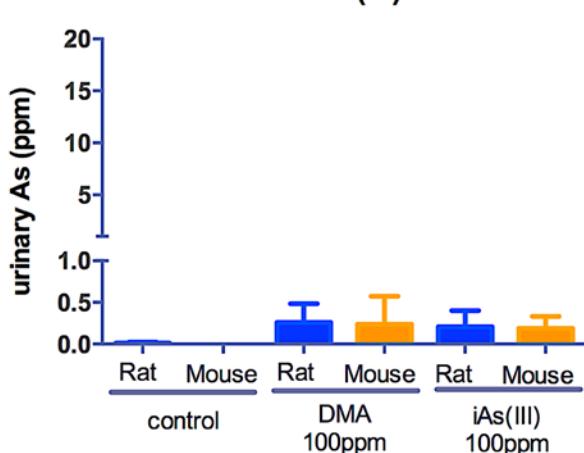
DMA(V)



DMMTA

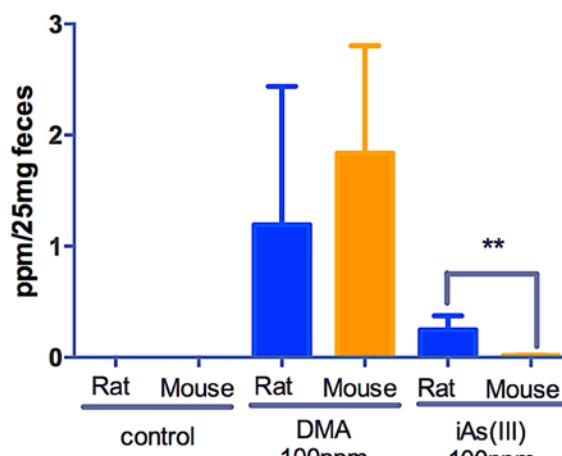


DMA(III)

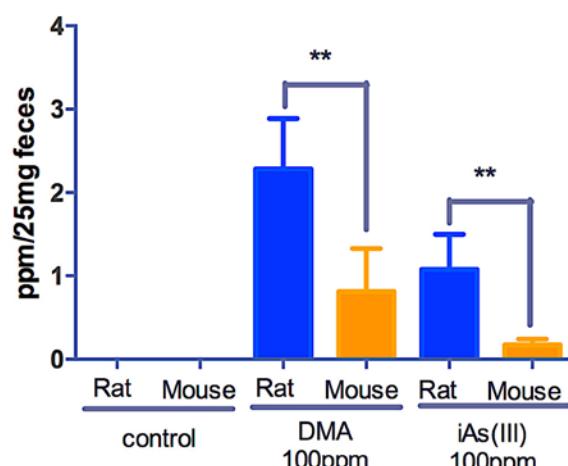


## 糞中ヒ素代謝物

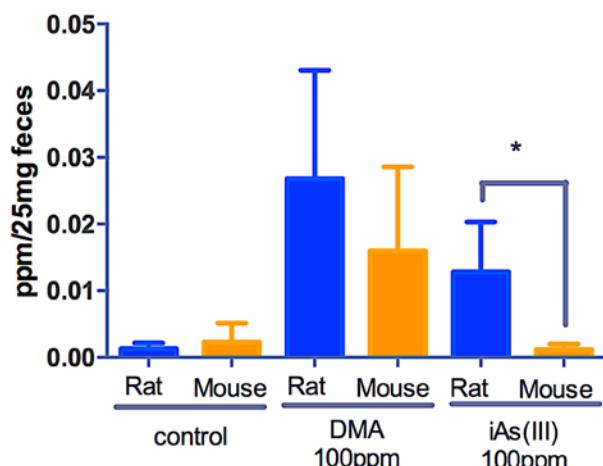
DMA(V)



DMMTA

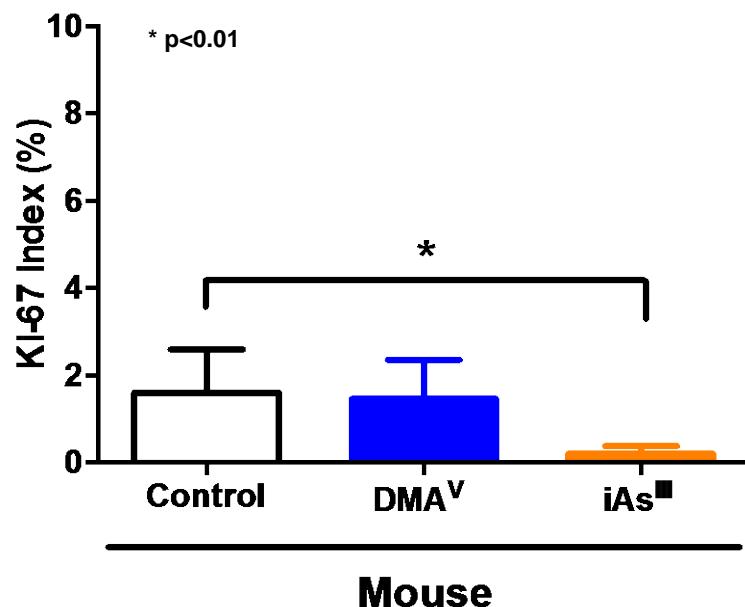
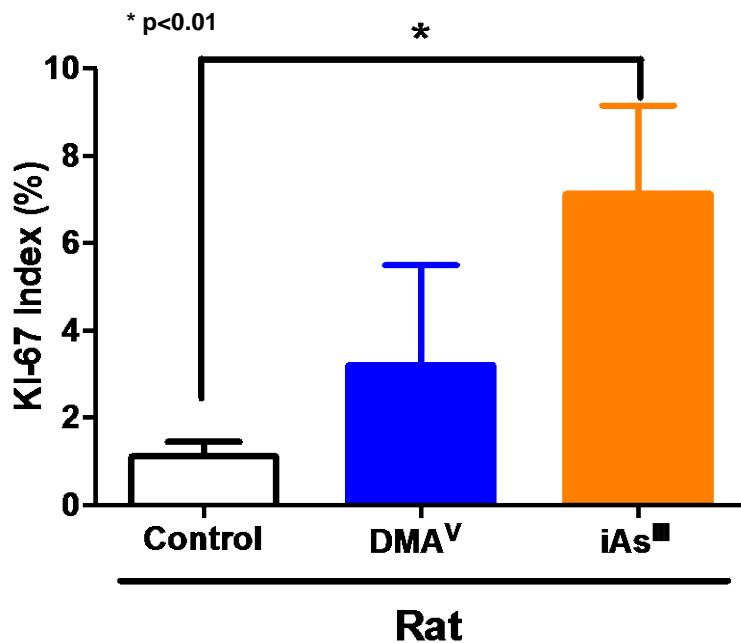


DMA(III)



\* p<0.05, \*\*p<0.01

### 膀胱粘膜における細胞増殖能(Ki-67)



### 結論

1. ラット・マウス共にヒ素投与によってDMMTA<sup>V</sup>が產生されていることが明らかになった。
2. ヒ素の細胞増殖促進作用に対してラットがマウスより高感受性を示したが、尿中DMMTA<sup>V</sup>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。

# 課題3 iAs<sup>III</sup>および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)

## ❖ 背景

- マウスは経胎盤ばく露以外の経路でヒ素発がんに低感受性
- 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<sup>INK4a</sup>、p19<sup>ARF</sup>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:p16<sup>INK4a</sup>/p19<sup>ARF</sup> のダブル欠損マウス  
BBN誘発膀胱発がんに高感受性を示す

## ❖ 目的

1. iAs<sup>III</sup>およびDMA<sup>V</sup>のINK4a/Arf 欠損マウスにおける発がん性を明らかにする
2. ヒ素発がんにおけるp16<sup>INK4a</sup>/p19<sup>ARF</sup>の役割を明らかにする

## ❖ 方法

1. INK4a/Arf -/- および +/- 欠損マウスを用いて、iAs<sup>III</sup>およびDMA<sup>V</sup>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

## ❖ 進捗状況:

1. 平成27年度に実施した4週間投与試験では、膀胱においてヒ素化合物投与による影響は認められなかった
2. 発がん性試験は現在進行中である

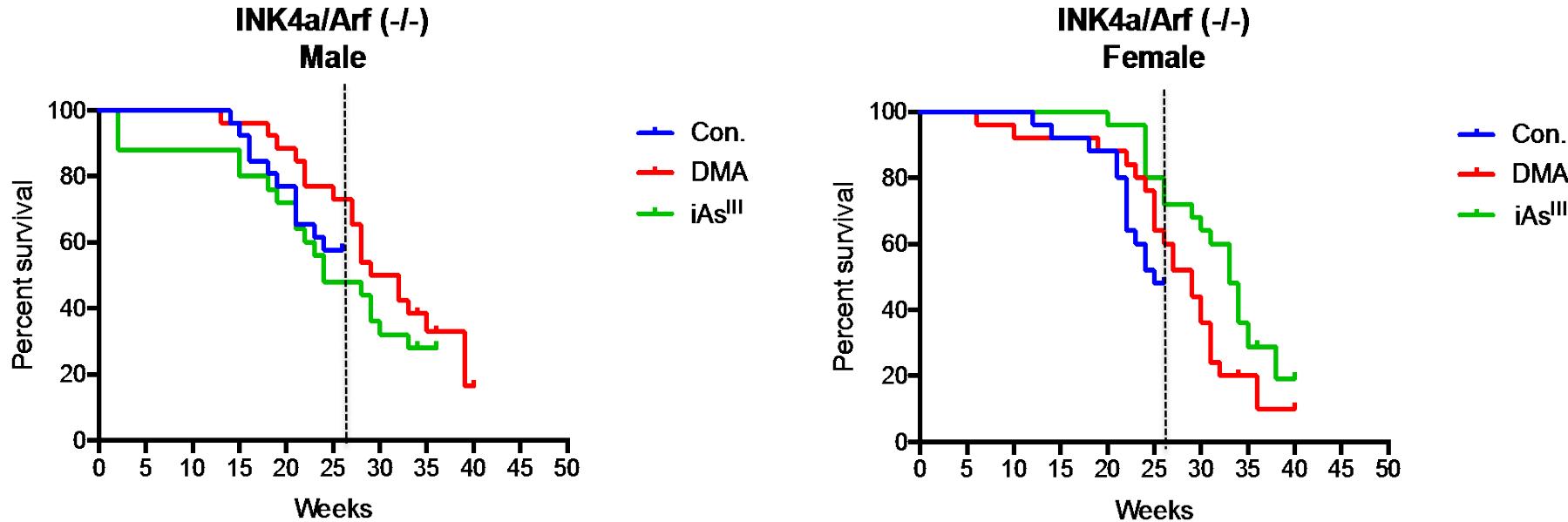
## 進行中の発がん性試験(合計461匹)

	INK4a/Arf (+/+)		INK4a/Arf (+/-)		INK4a/Arf (-/-)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
200ppm DMA <sup>V</sup>	25	25	25	27	26	25
150 ppm* iAs <sup>III</sup>	25	26	25	26	25	25
Control	27	25	28	25	26	25

\*As con.: 86 ppm

- INK4a/ARF遺伝子のホモ欠損型、ヘテロ欠損型および野生型にDMA<sup>V</sup>とSodium *meta*-arsenite (iAs<sup>III</sup>)をそれぞれ200ppm、150ppmの濃度で実験開始時より飲水投与する
- 対照群に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

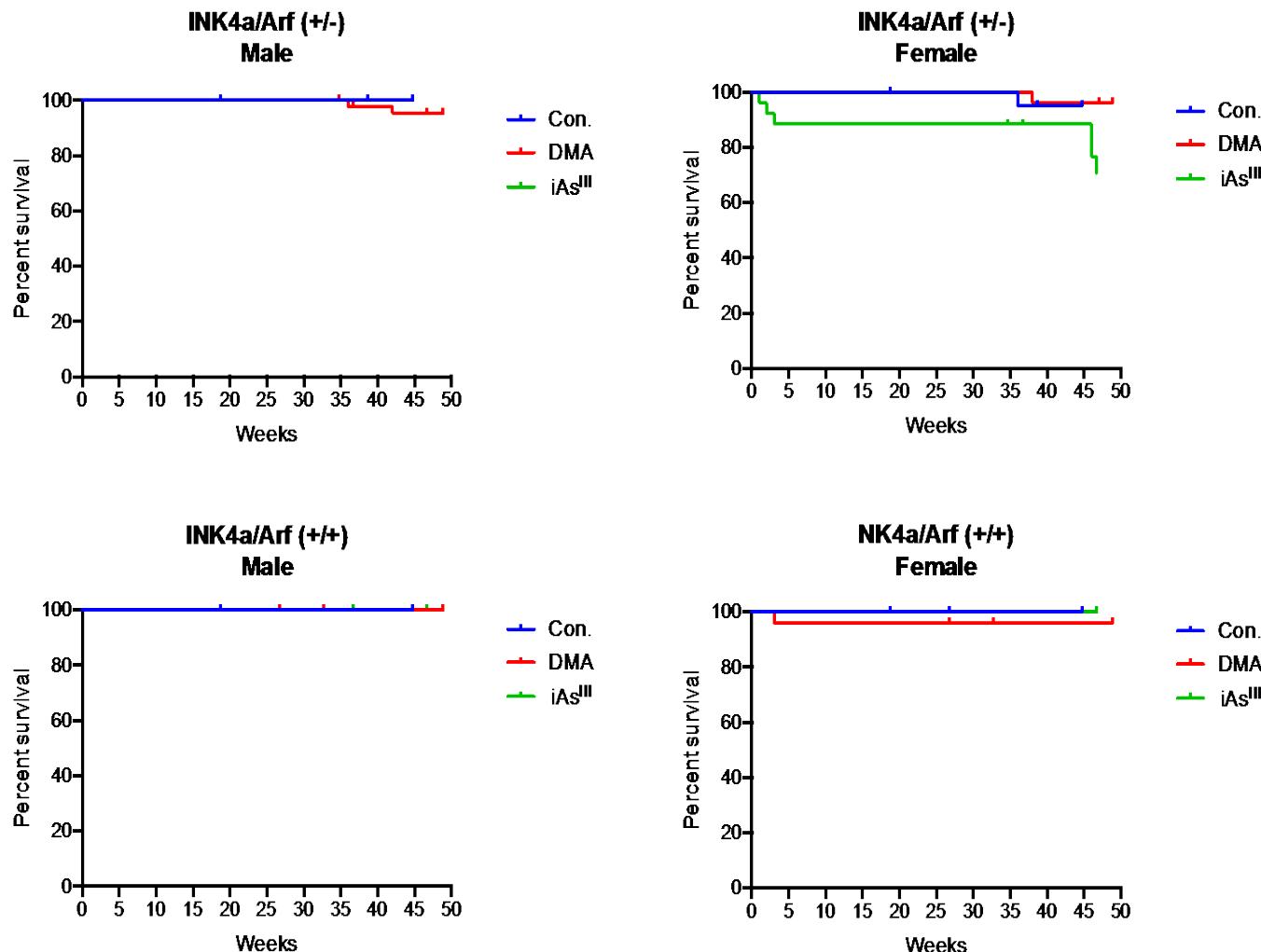
## 生存率と死亡原因 (INK4a/Arf (-/-))



- 実験開始後26週時点においては、各群間における生存率の有意な差は認められなかった
- 主な死因は組織球肉腫(肝臓)、悪性リンパ腫、軟部肉腫であったが、26週時点においては、対照群に比較して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
- 実験開始後40週に実験が終了する予定

## 生存率

### INK4a/Arf (+/-), (+/+)

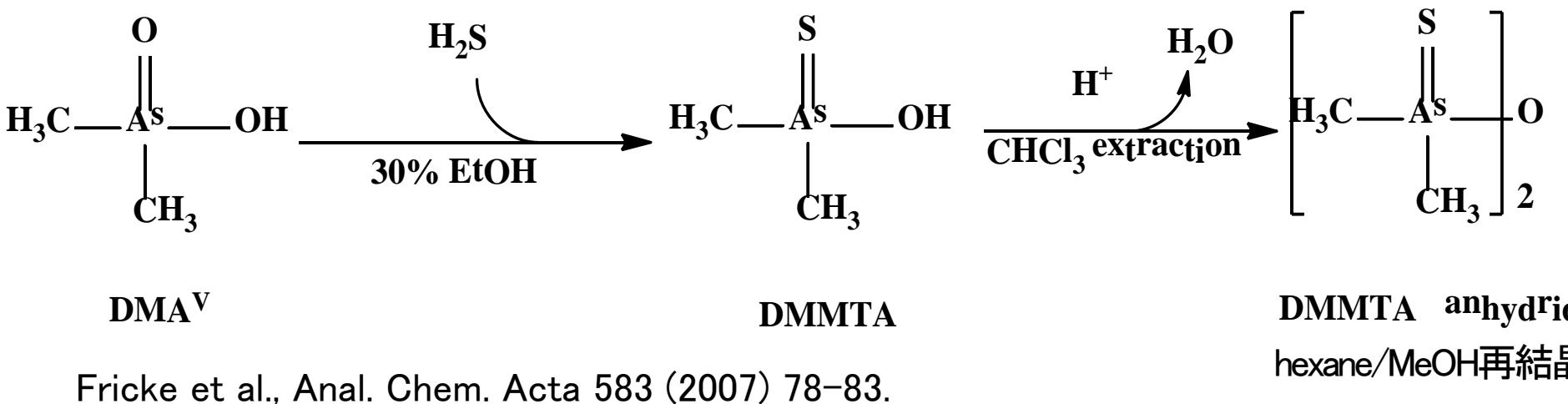


- 実験開始後78週に実験が終了する予定

# 課題4 DMMTA<sup>V</sup>ならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成(山中)

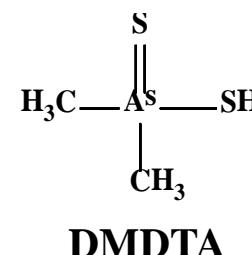
## ジメチルモノチオアルシン酸(DMMTA)合成とその問題点

### 既知合成法



### 問題点

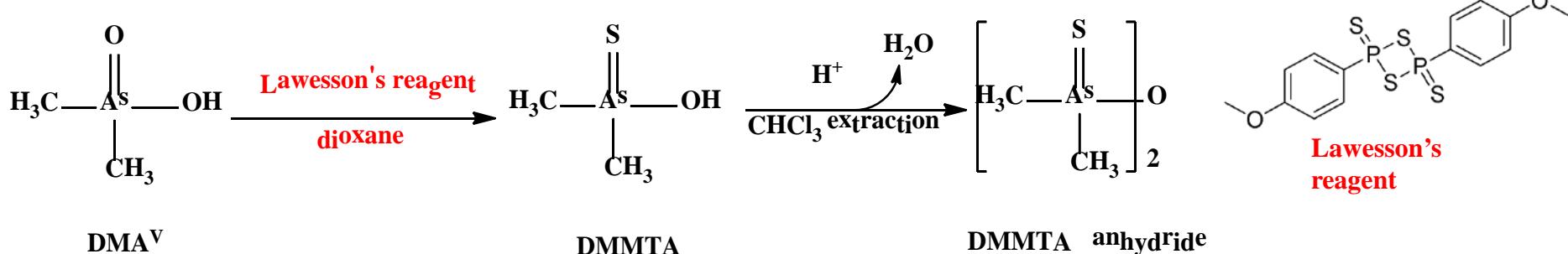
- hexane/MeOH再結晶は不純物が多い  
[原料DMA<sup>V</sup>、ジメチルジチオアルシン酸(DMDTA)、イオウ单体、DMA<sup>III</sup>など] → 再結晶法を含めた精製方法の改善
- 大量の硫化水素を使用するため、合成スケールの拡大が困難



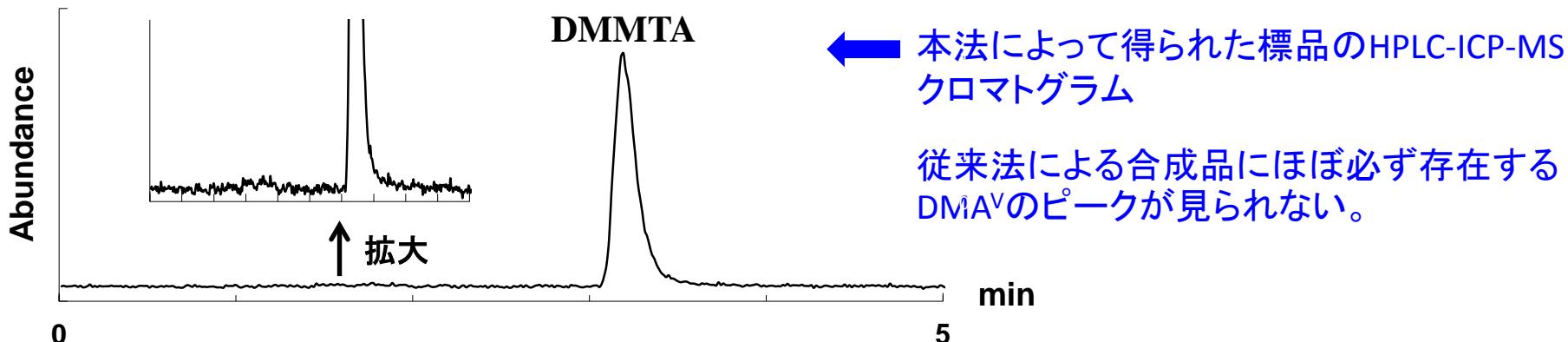
# 課題4 DMMTA<sup>V</sup>ならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成(山中)

## 無水DMMTA<sup>V</sup>精製法の検討

加硫化剤ローソン試薬によるDMMTAの新規合成法を適応。



酸化アルミニウムカラムによる部分精製後、hexane/CHCl<sub>3</sub>による再結晶。



1. 本合成・精製法は、生体試料分析における標準物質として利用可能な高純度DMMTAのグラムオーダーでの合成に適応できた。
2. 毒性が強い物質のため大量合成は困難と判断した。

### 目的

- アルセノシュガー(AsSug)からDMMTAへの代謝機序、膀胱上皮におけるヒ素の浸透については情報が不足している。そこで、模擬的な消化管環境におけるAsSugの化学形態変化、および膀胱粘膜上皮におけるヒ素化合物の透過性について試験を行った。
- 膀胱がん発症の関与が疑われているDMMTAの代謝機序について、無細胞系ならびに培養細胞を用いて詳細に検討し、併せて毒性評価を行った。

### 実験方法

- ヒ素化合物の化学形態分析にはHPLC-ICP-MSおよびHPLC-TOFMSを用いた。また、DMMTA代謝物の揮発性代謝物の同定にはGC-FPDおよびGC-MSを用いた。
- ヒ素の透過性評価はトランスウェル上に培養したラット膀胱上皮細胞(MYP-3)を用いた。
- DMMTAの代謝機序については、GSHとの反応に基づく無細胞系で検討した。
- HepaRG細胞を用いてDMMTAについての細胞毒性評価を実施した。

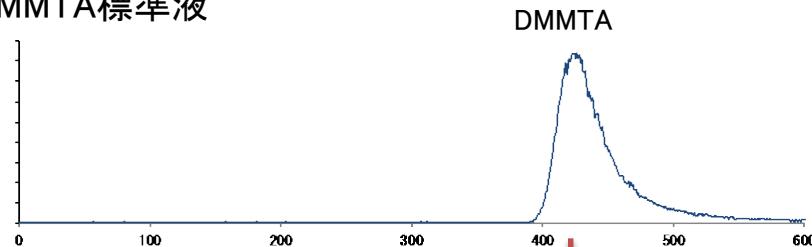
# 課題5 培養細胞や腸内細菌を用いたDMMTAの代謝・毒性試験(山中、畠)

## 1. 人工消化液およびヒト腸内細菌叢を用いたAsSug代謝実験

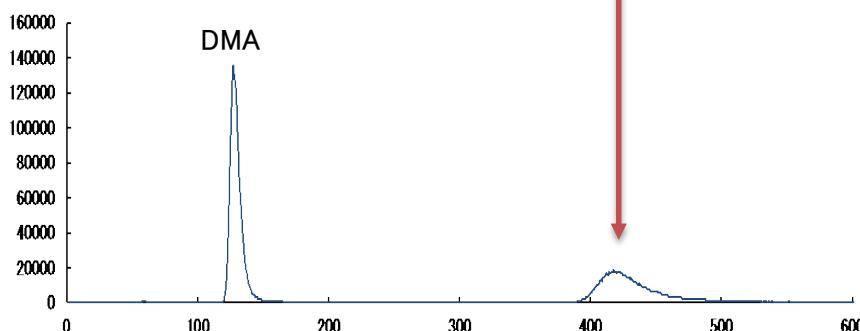
### ヒト腸内細菌存在下でのDMAのDMMTAへの変化

- ヒト糞便から腸内細菌叢を採取。
- 腸内細菌懸濁液にDMAを添加し嫌気条件下でインキュベート( $37^{\circ}\text{C}$ , 24時間)。
- 複数のカラムを用いてHPLC-ICP-MS分析を行った。
- 腸内細菌存在下で、添加したDMAの約10%がDMMTAに変化することを確認した。

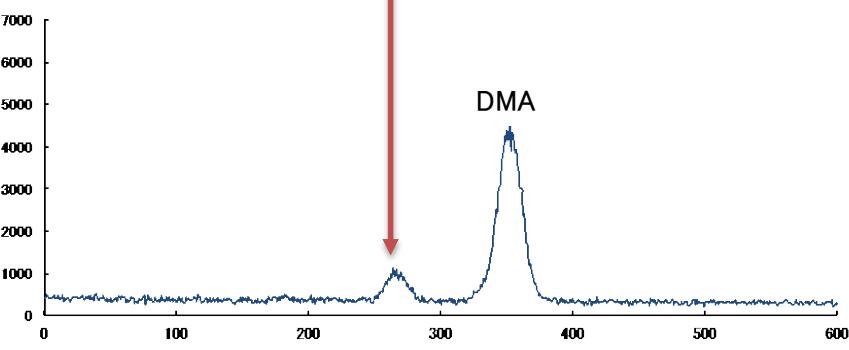
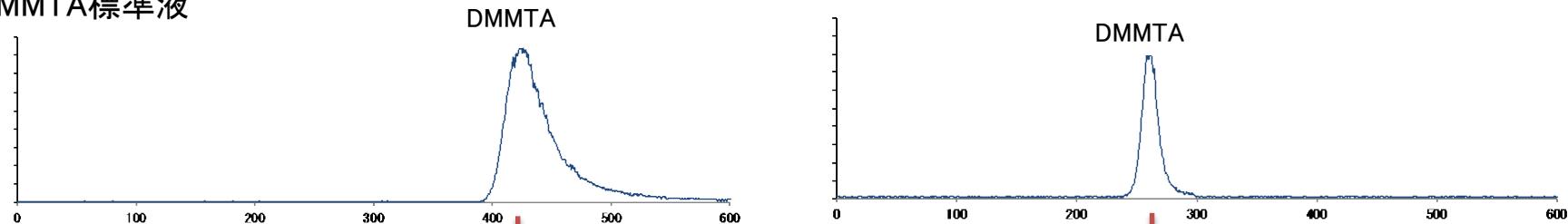
DMMTA標準液



DMA+腸内細菌叢(24h培養)



HPLC-ICP-MSクロマトグラム(陰イオン交換カラム使用)

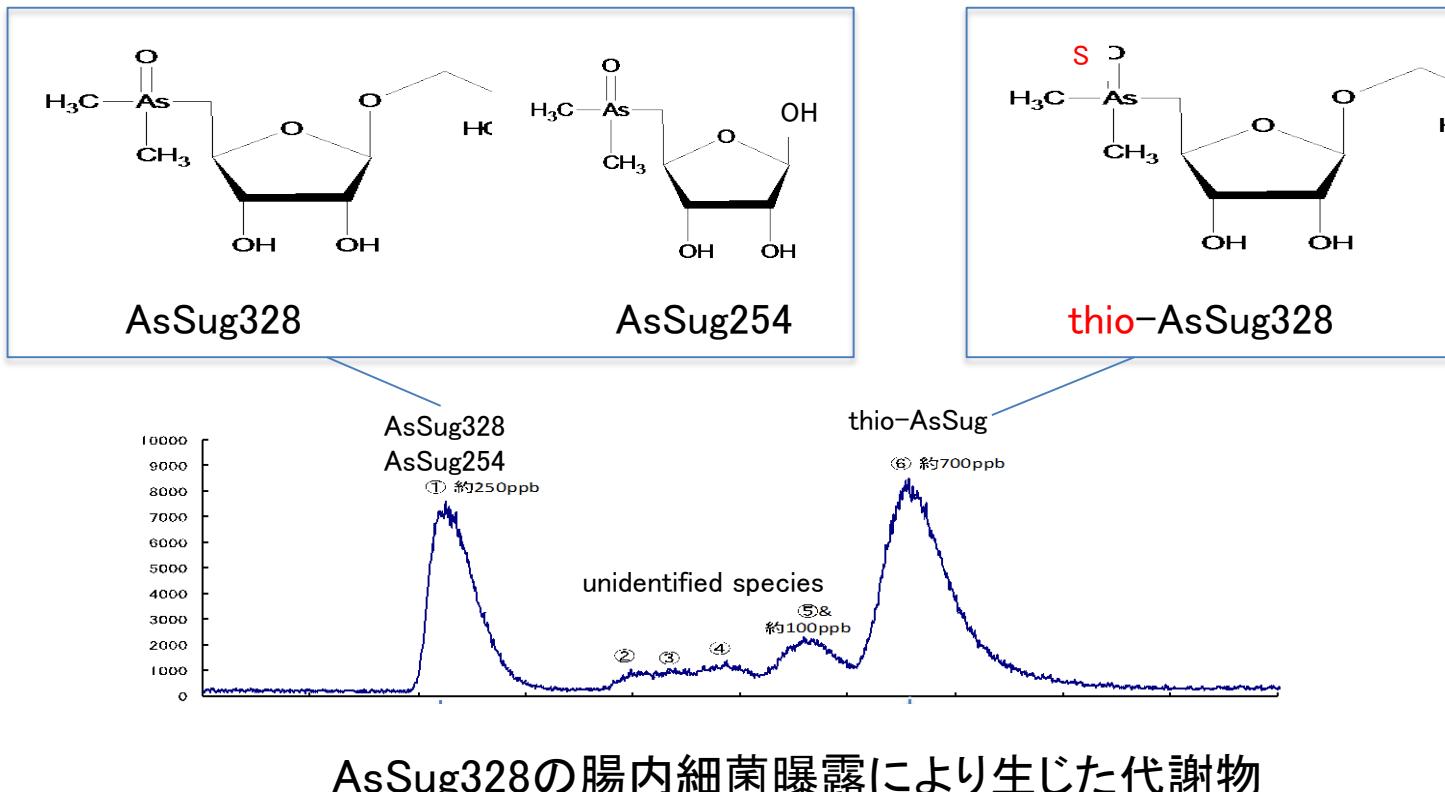


(陽イオン交換カラム使用)

## 1 人工消化液およびヒト腸内細菌叢を用いたAsSug代謝実験

### 人工消化液・ヒト腸内細菌存在下でのAsSugの変化

- 模擬胃液により、AsSug328はAsSug254へと分解された。
- 胆汁抽出物とパンクレアチンはAsSug328に変化を与えたなかった。
- ヒト腸内細菌への曝露では、AsSug328はAsSug254、チオ型のAsSug328、数種類の未同定ヒ素に変化した。未同定ヒ素化合物に関しては更なる解析が必要である。

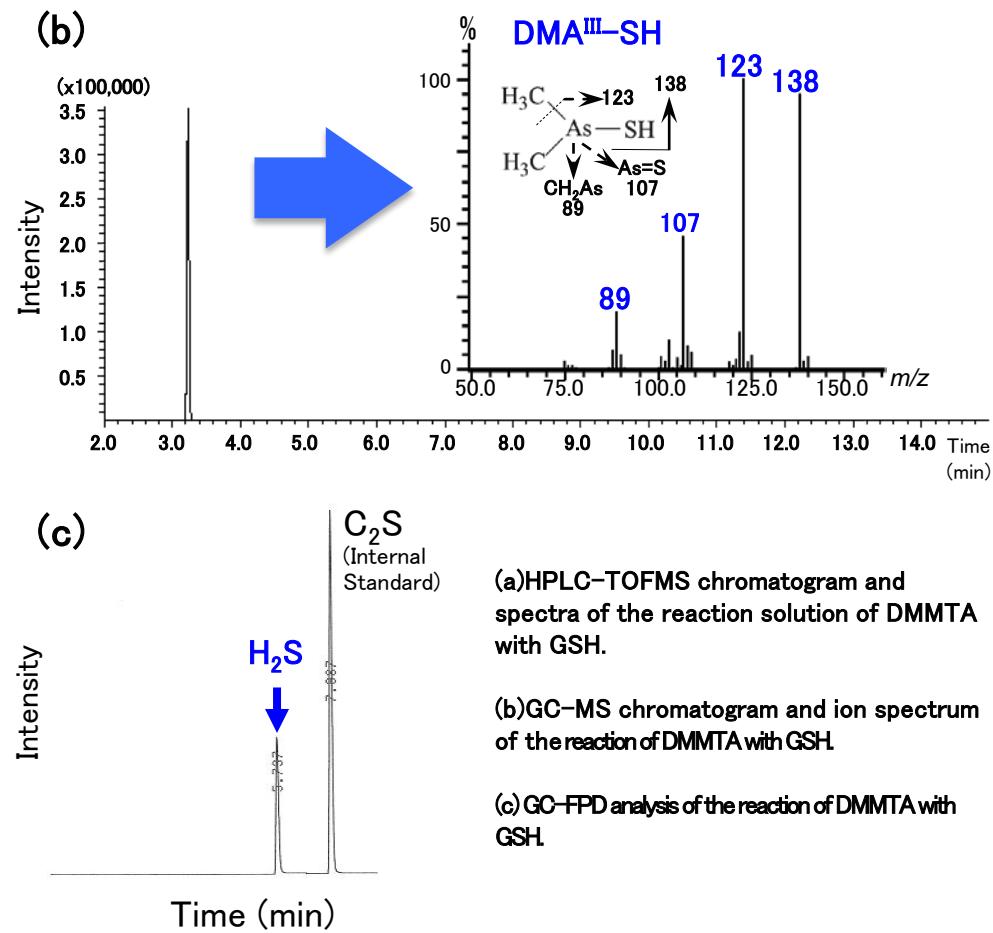
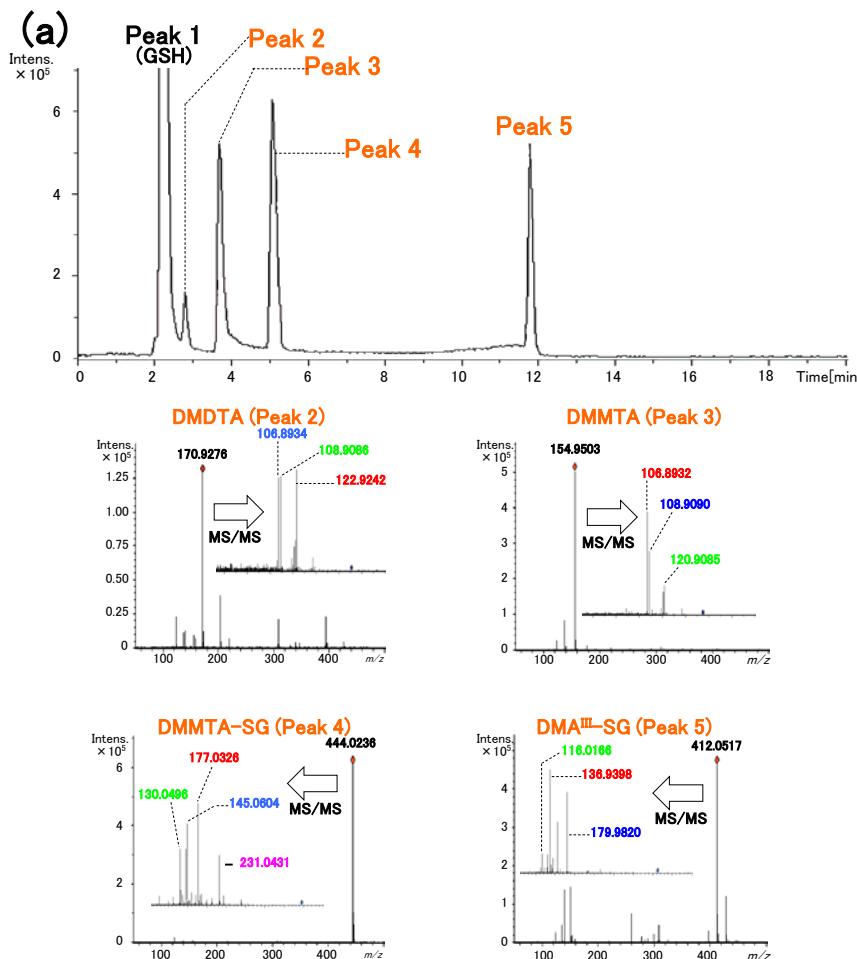


# 課題5 培養細胞や腸内細菌を用いたDMMTAの代謝・毒性試験(山中、畠)

## 2 無細胞系におけるDMMTAの代謝変換

### 方法

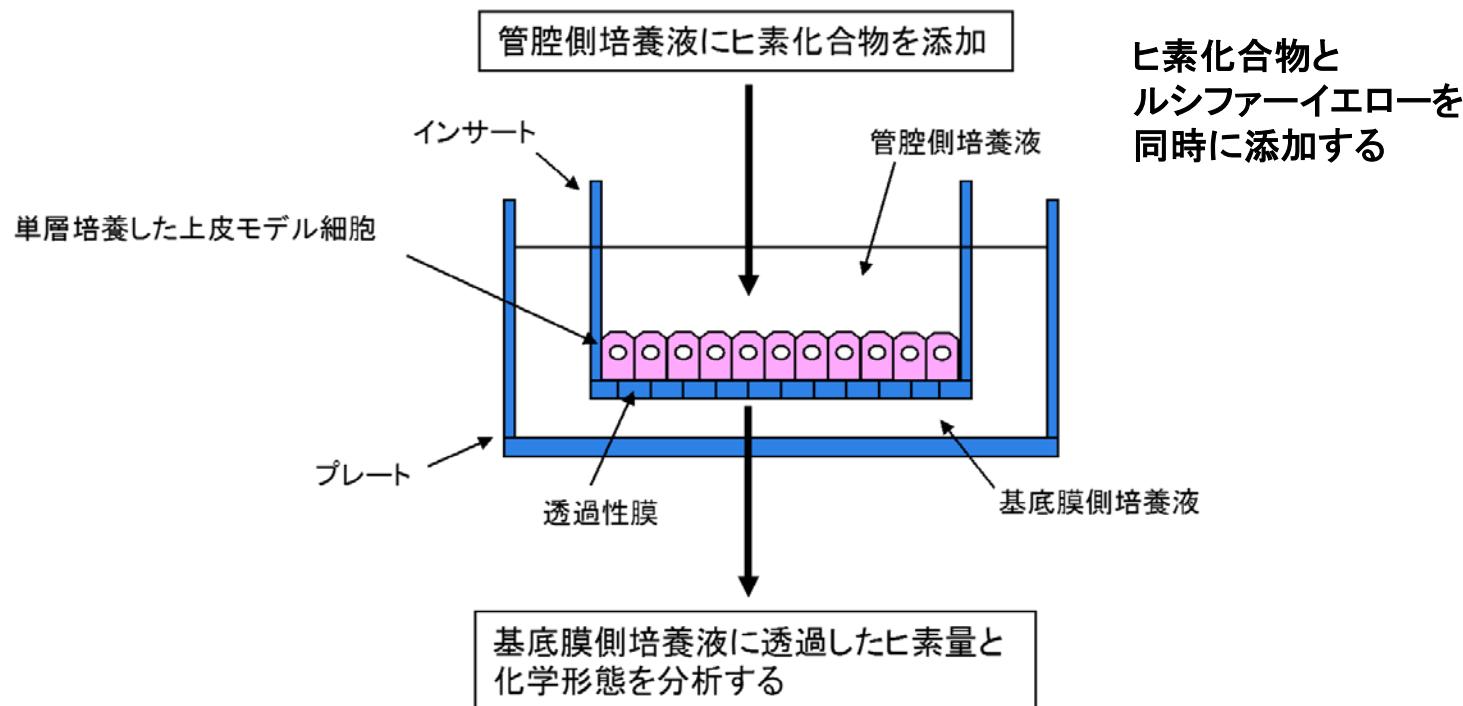
DMMTAおよびGSHを酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5.0)中、40°Cでインキュベーションした後、HPLC-TOFMS、GS-MSならびにGC-FPDにて反応生成物の分析を行った。



DMMTAの代謝活性化にはGSH等の生体低分子チオール化合物が必要

## 3 ラット膀胱上皮細胞におけるヒ素透過性の検討

- 上層に添加したヒ素化合物の数%が下層へと透過した(12時間曝露)。
- 今回の検討において、ラット膀胱上皮細胞の*iAs<sup>III</sup>*およびDMA<sup>V</sup>の見かけの膜透過係数は、 $5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}$  cm/s 程度であった。
- 透過したヒ素に化学形態変化はみられなかった。
- タイトジャンクション開閉のマーカーであるルシファーイエローの膜透過はみられなかったことから、曝露試験中はタイトジャンクションは閉じた状態であったといえる。
- 従って、*iAs<sup>III</sup>*およびDMA<sup>V</sup>は、タイトジャンクション経由ではなく、細胞内に取り込まれた後に下層に到達していると考えられる。



# 課題5 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験(山中、畠)

## 4. HepaRG細胞を用いたヒ素化合物の毒性評価

### HepaRG細胞

肝臓癌およびC型肝炎に罹患した女性患者の肝腫瘍細胞由来細胞株で、培地に2% DMSOを添加して培養すると肝細胞様および胆管様細胞に分化。

トランスポーター、薬物による酵素誘導能(CYP)など、ヒト肝細胞の各機能を保持・発現しているため、ヒト初代肝細胞の代替として利用可能。

### 方法

肝細胞様に分化したHepaRG細胞にDMA<sup>V</sup>、DMA<sup>III</sup>-SG、およびDMMTA溶液を24時間作用させ、Cell Counting Kit-8を用いて細胞生存率を測定した。また、2% DMSO処理後のCYPのmRNA発現量をRT-PCRを用いて測定した。

### Cytotoxicity(surviving % of control)

		Arsenicals ( $\mu\text{M}$ )			
		5	10	20	50
DMA <sup>III</sup> -SG	DMSO (+)	79.1± 7.9	66.3± 5.7	26.0± 1.6	24.0± 0.7
	DMSO (-)	62.9± 2.1	60.5± 2.3	23.1± 1.3	15.7± 0.2
DMMTA	DMSO (+)	95.6±10.1	97.0± 3.2	82.9± 6.6	81.0± 1.2
	DMSO (-)	93.2± 4.8	87.2± 4.5	60.2± 4.6	57.7± 4.7
DMA <sup>V</sup>	DMSO (+)	97.8± 4.4	99.4± 7.9	96.9± 6.4	104.2± 4.5
	DMSO (-)	95.2± 9.4	86.7± 7.2	83.3±11.6	74.2±14.2

### mRNA expression level of CYPs

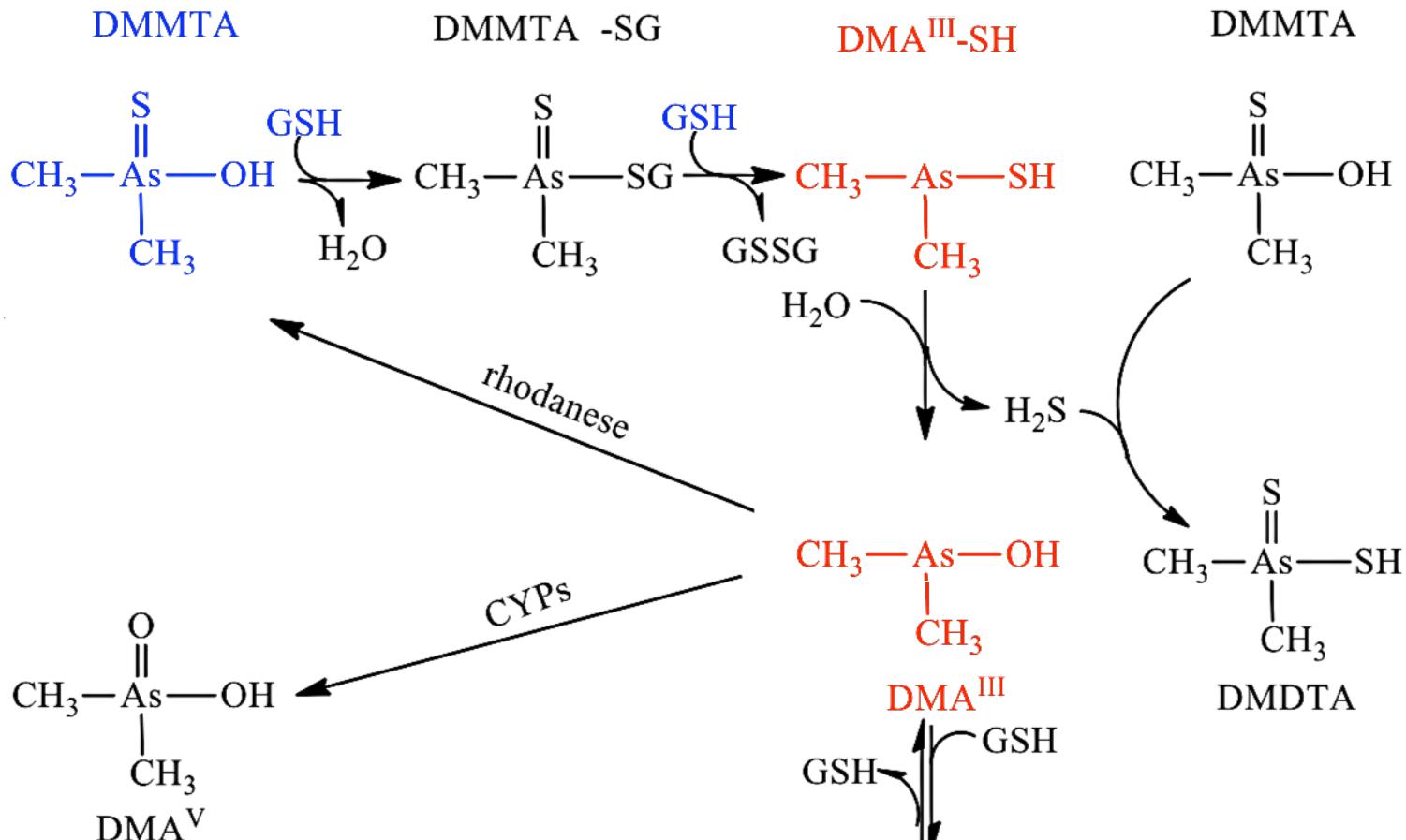
	DMSO (+)	DMSO (-)	Fold
CYP1A1	11.7±1.6	3.4±0.1	3.4
CYP1A2	11.2±0.4	2.6±0.4	4.3
CYP2B6	11.5±1.4	1.0±0.2	11.5
CYP2E1	12.4±2.3	1.2±0.1	10.3
CYP3A4	10.3±0.6	0.8±0.2	12.9

Nomalization: ACTB, n=3

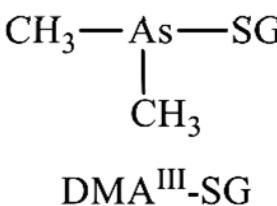
% of control ± SD, n=4

DMSO(+)→CYP発現量増加 →→ DMA<sup>III</sup>およびDMMTA代謝物(DMA<sup>III</sup>含む)の毒性軽減

# 課題5 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験(山中、畠)



- ✓ DMMTAの毒性本体と考えられる代謝物DMA<sup>III</sup>に対して、CYPならびに硫黄転移酵素は細胞毒性を軽減する可能性を示唆した。
- ✓ DMMTAの中間代謝物としてDMA<sup>III</sup>-SH(ジメチルメルカプトアルシン)の存在をGC-MS分析より推定した。本代謝物はDMA<sup>III</sup>と同様、高い反応性を有することが推定されるため、毒性評価が急務である。但し、揮発性が高く、合成・精製は極めて困難と思われる。



# 主な研究成果

## 課題1 DMMTA<sup>V</sup>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

- ◇ 経尿道的膀胱内直接投与法で直接的にDMMTA<sup>V</sup>の変異原性及び発がん性を評価できた。
- ◇ DMMTA<sup>V</sup>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。

## 課題2 iAs<sup>III</sup>およびDMA<sup>V</sup>投与C57BL/6マウスにおけるDMMTA<sup>V</sup>産生の検討

## 課題3 iAs<sup>III</sup>およびDMA<sup>V</sup>のINK4a/ARF 欠損マウスにおける発がん性の検討

- ◇ 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<sup>V</sup>の尿中濃度よりも、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。
- ◇ 発がん高感受性であるINK4a/ARF 欠損マウスを用いた検討はヒ素の発がん性評価に有用な情報を提供できる。

## 課題4 DMMTA<sup>V</sup>ならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成

- ◇ DMMTA<sup>V</sup>の高純度品の新規合成法の開発に成功した。

## 課題5 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験

- ◇ ヒト腸内細菌存在下で、DMA<sup>V</sup>からDMMTA<sup>V</sup>への変化が確認された。
- ◇ DMMTA<sup>V</sup>の肝毒性の発現にGSHとCYPが関与する可能性が示唆された。

# 国内外の学術誌投稿の状況

- 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<sup>V</sup>)-induced toxicity obtained from in vitro reaction of DMMTA<sup>V</sup> 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* (58), 196–200, 2016.
- ⑥ Masaki Fujioka, Min Gi, Satoko Kawachi, Kumiko Tatsumi, Naomi Ishii, Kenichiro Doi, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi: Examination of in vivo mutagenicity of sodium arsenite and dimethylarsinic acid in gpt delta rats. *J Environ Sci.*, 2016.

## 論文投稿準備中

Min Gi and Hideki Wanibuchi et al: Comparison of urinary arsenic metabolites between rats and mice (2017年3月, *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*へ投稿予定).

Masaki Fujioka and Hideki Wanibuchi et al: : Examination of in vivo mutagenicity of dimethylmonothioarsenic acid in gpt delta rats. (2017 年6月, *J Environ Sci.*へ投稿予定).