

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 圓藤 吟史 (えんどう ぎんじ)



大阪市立大学大学院医学研究科 産業医学分野 教授

1981年 3月 名古屋市立大学医学部卒業
1983年 4月 大阪市立大学助手 (医学部衛生学講座)
1987年 10月 大阪市立大学講師 (医学部環境衛生学講座)
1989年 3月 大阪市立大学医学博士取得
1990年 4月 大阪市立大学助教授 (医学部環境衛生学講座)
1993年 4月 大阪市立大学教授 (医学部環境衛生学講座) (現職)
2002年 4月 大阪市立大学大学院教授 (医学研究科産業医学分野) (現職)

日本産業衛生学会 (理事長)、日本産業精神保健学会 (理事)、内閣府食品安全委員会 (専門委員)、大阪労働局 (労働衛生指導医)、日本医師会産業保健委員会 (委員)、大阪府医師会産業保健医部会 (副部会長)

<研究成果概要>

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、主な海産食品中のヒ素化合物である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と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。

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

ヒ素及び主なヒ素化合物

- ヒ素 (arsenic, As): 半金属元素で, 食品, 水, 土壌及び大気に広く存在する
- ヒ素の分類
 1. 単体ヒ素: 灰色, 黄色, 黒色の三種の同素体
 2. 無機ヒ素化合物
 3. 有機ヒ素化合物

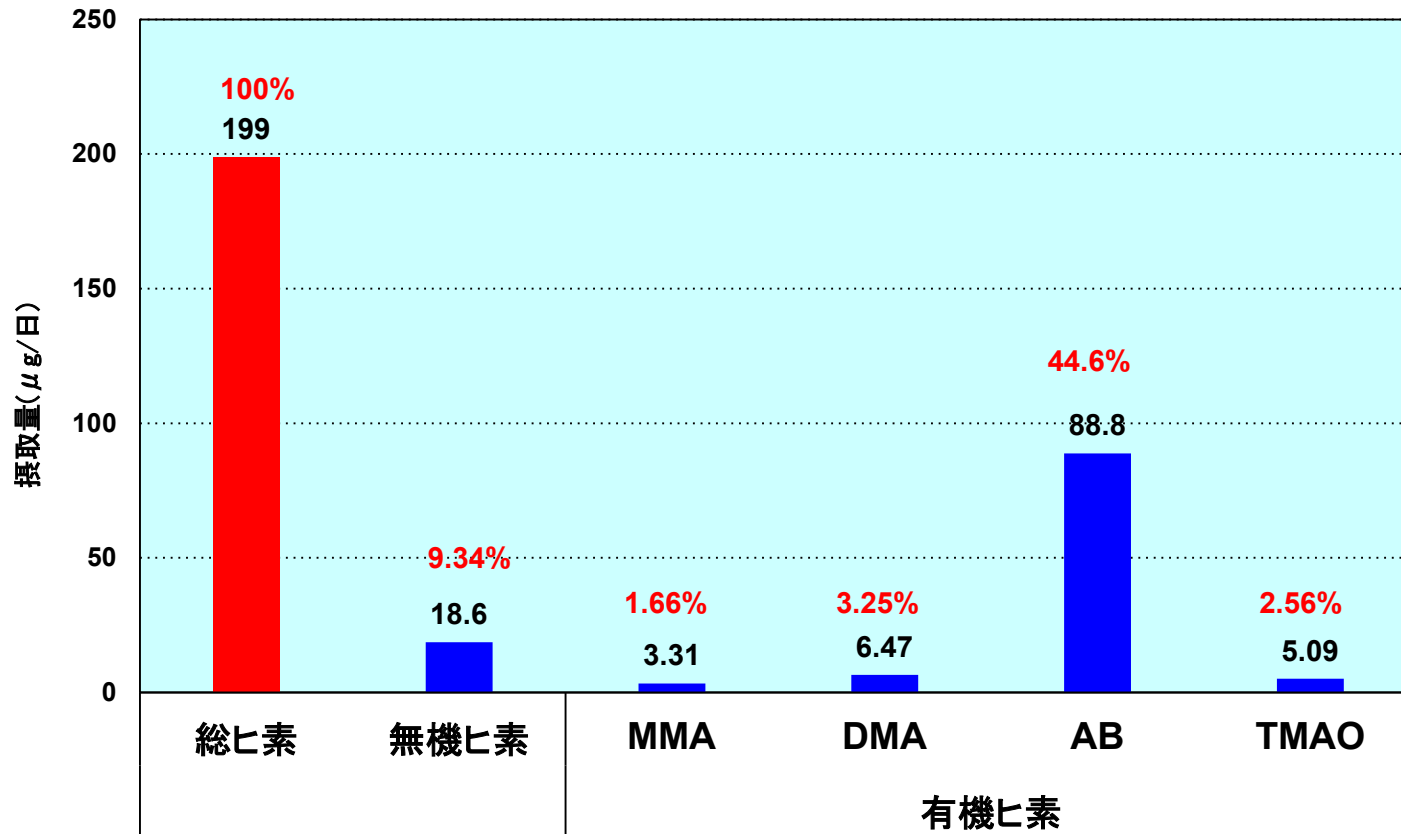
無機ヒ素化合物	
Arsenic trioxide	As_2O_3
Arsenous acid (Arsenite)	As^{III}
Arsenic pentoxide	As_2O_5
Arsenic acid (Arsenate)	As^{V}

有機ヒ素化合物	
Monomethylarsonic acid	MMA^{V}
Monomethylarsonous acid	MMA^{III}
Dimethylarsinic acid	DMA^{V}
Dimethylarsinous acid	DMA^{III}
Trimethylarsine oxide	TMAO
Dimethylmonothioarsinic acid	DMMTA
Arsine	AsH_3
Arsenobetaine	AsB
Arsenosugar	AsSug
Arsenolipid	AsLipid

ヒ素のヒトへのばく露経路

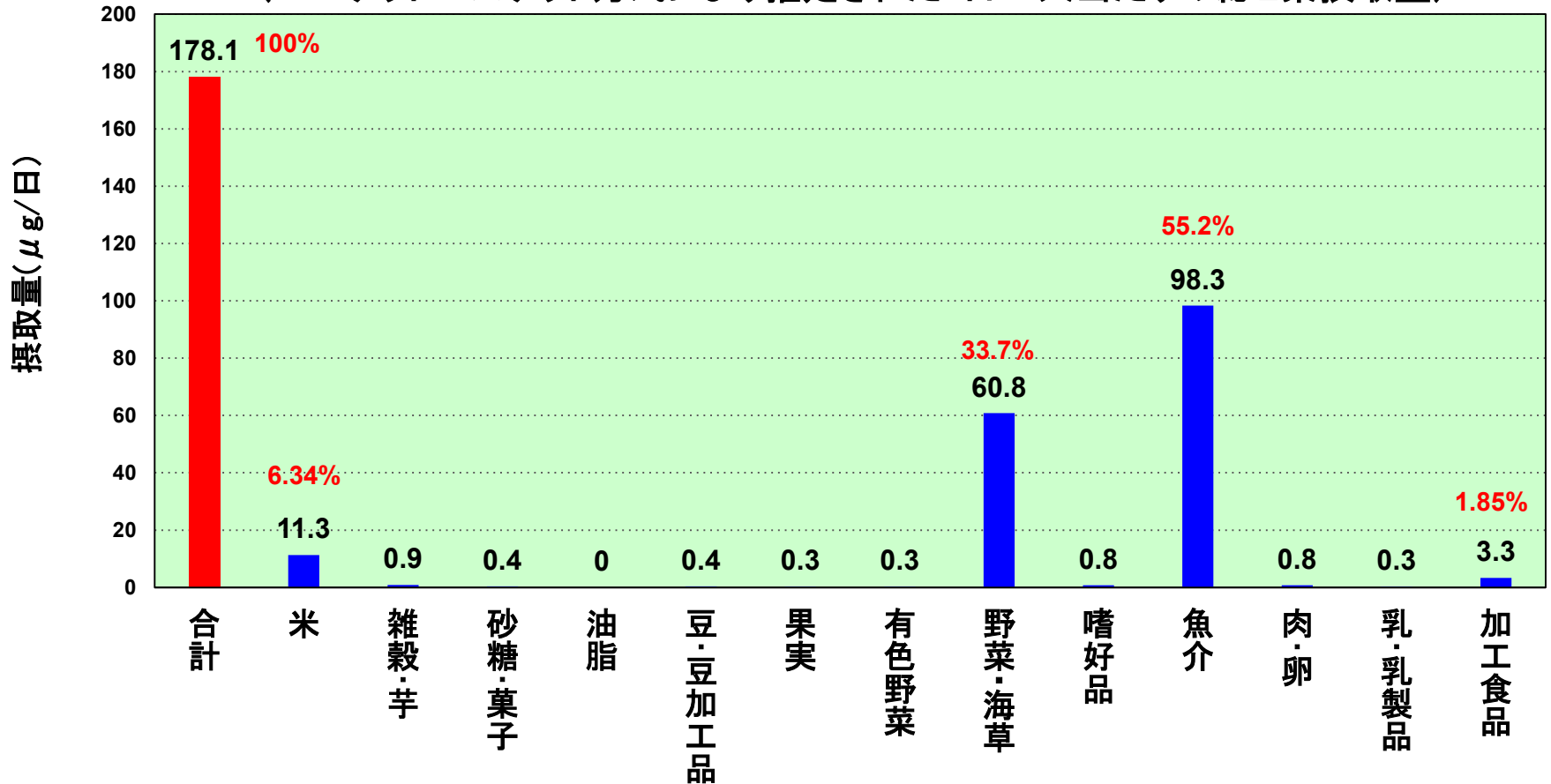
(1日・1人当たりのヒ素化合物摂取量)

- ❖ 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



食物中のヒ素

(マーケットバスケット方式により推定された1日・1人当たりの総ヒ素摂取量)



❖ 食物中に含まれるヒ素の化学形態は食物の種類によって異なるが、ヒ素を多く含むのが魚介類及び海藻類である。

- ・ ヒジキ: 5価の無機ヒ素化合物
- ・ その他の海藻類及び魚介類:
AsBe、DMA^V、アルセノシュガーおよびアルセノリピッド

(平成 14~23年度厚生労働科学研究の結果を元に、農林水産省が計算)

ヒ素の毒性

➤ ヒ素の毒性は化学形態や化学構造の違いにより異なる.

マウスにおける経口LD₅₀

- ・ As₂O₃: 39 mg/kg
- ・ MMA^V: 916mg/kg
- ・ DMA^V: 648mg/kg
- ・ AsBe: 10g/kg

➤ 無機ヒ素化合物 > 有機ヒ素化合物、3価ヒ素 > 5価ヒ素

➤ ヒ素によるヒト健康被害のほとんどは無機ヒ素のばく露が原因

急性ヒ素中毒

急性ヒ素中毒の多くは、服毒自殺や無機ヒ素が混入した飲食物の摂取により起こる

経口:

- 数分から数時間に悪心、嘔吐、腹痛、下痢等の急性胃腸症候群が出現する
- 重篤な場合: 著明な腹痛、激しい嘔吐、水溶性下痢をきたし、脱水によるショック、筋痙攣、心筋障害、腎障害が出現し、早い場合には24時間以内に循環不全で死亡する
- 筋の委縮、運動失調、上下肢末端の知覚異常を伴う末梢神経障害や多発神経炎

経気道(アルシingasへのばく露):

急性溶血症状、吐き気、嘔吐、頭痛、腹痛、血尿、黄疸

慢性ヒ素中毒(非腫瘍性病変-1)

主にヒ素に汚染された飲料水を長期間飲用した地域の住民で報告されている

- 一般症状: 脱力感, 易疲労感, 食欲減退, 体重減少, 易刺激性
- 皮膚病変: ヒ素の長期暴露の最も鋭敏なエンドポイント接触皮膚炎
 1. ヒ素黒皮症(色素沈着)
 2. 色素脱失
 3. 手掌足底の角化症



色素沈着・脱失



角化症

慢性ヒ素中毒(非腫瘍性病変-2)

➤ 血管障害:

- 末梢血管炎症:先端紫藍症, レイノー現象
- 烏脚病:台湾風土病、ヒ素慢性曝露による重度の閉塞性動脈硬化症
- 井戸水のヒ素濃度と飲用期間に相関して虚血性心疾患、脳血管系障害がみられた

➤ 貧血

➤ 門脈性肝硬変

➤ 腎障害

➤ 経気道曝露:

- 鼻中隔:炎症、びらん、壊死→穿孔
- 慢性気管支炎



わが国の主なヒ素中毒事件

➤ 森永ヒ素ミルク中毒事件(1955年)

製造工程でヒ素が混入され、130名が死亡し12000人が被害を受けた

➤ 宮崎県土呂久地区(1972年)・島根県笹ヶ谷地区の慢性ヒ素中毒症(1974年)

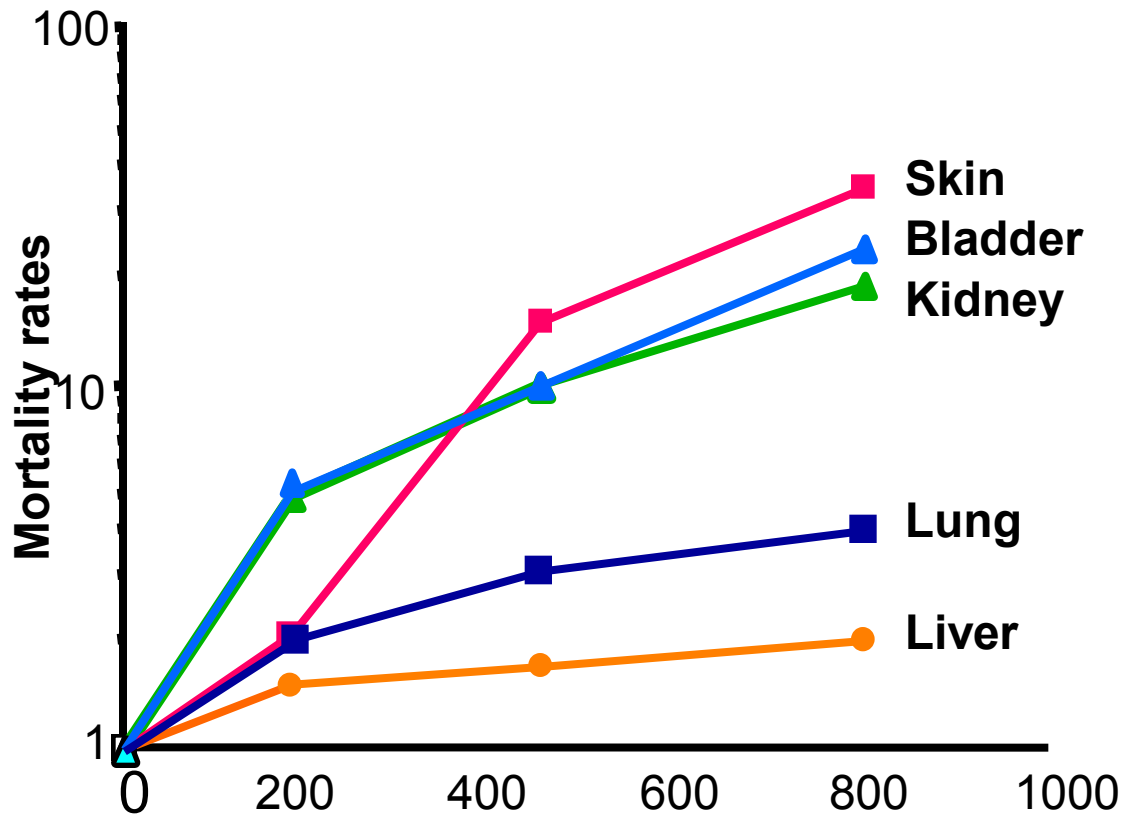
ヒ素鉱山による慢性ヒ素中毒症で、公害被害者救済法の指定を受けた

➤ 和歌山ヒ素事件(1998年)

自治会の夏祭りで亜ヒ酸がカレーに混入され、4人が死亡、63人が急性ヒ素中毒になった。

ヒ素の発がん性

皮膚がん、肺がん、膀胱がんなどの発生↑



井戸水中ヒ素濃度 (µg/liter)

癌死亡の割合, 1973-1986, 台湾烏脚病多発地域

ヒ素の発がん性

- ❖ ホーレル水で1年以上治療した患者に皮膚がん発生
- ❖ 砒素汚染井戸水の飲用による皮膚がんの多発(アルゼンチン・コルドバ地方、台湾・南西地区)
- ❖ 職業曝露
 - 銅精錬所作業者の肺がん(アメリカ)
 - 砒素含有金鉱山の労働者の肺がん(南アフリカ)
 - ブドウ栽培労働者の肝がん(ドイツ)

ヒ素の発がん性の問題

International Agency for Research on Cancer
(IARC、1987年)

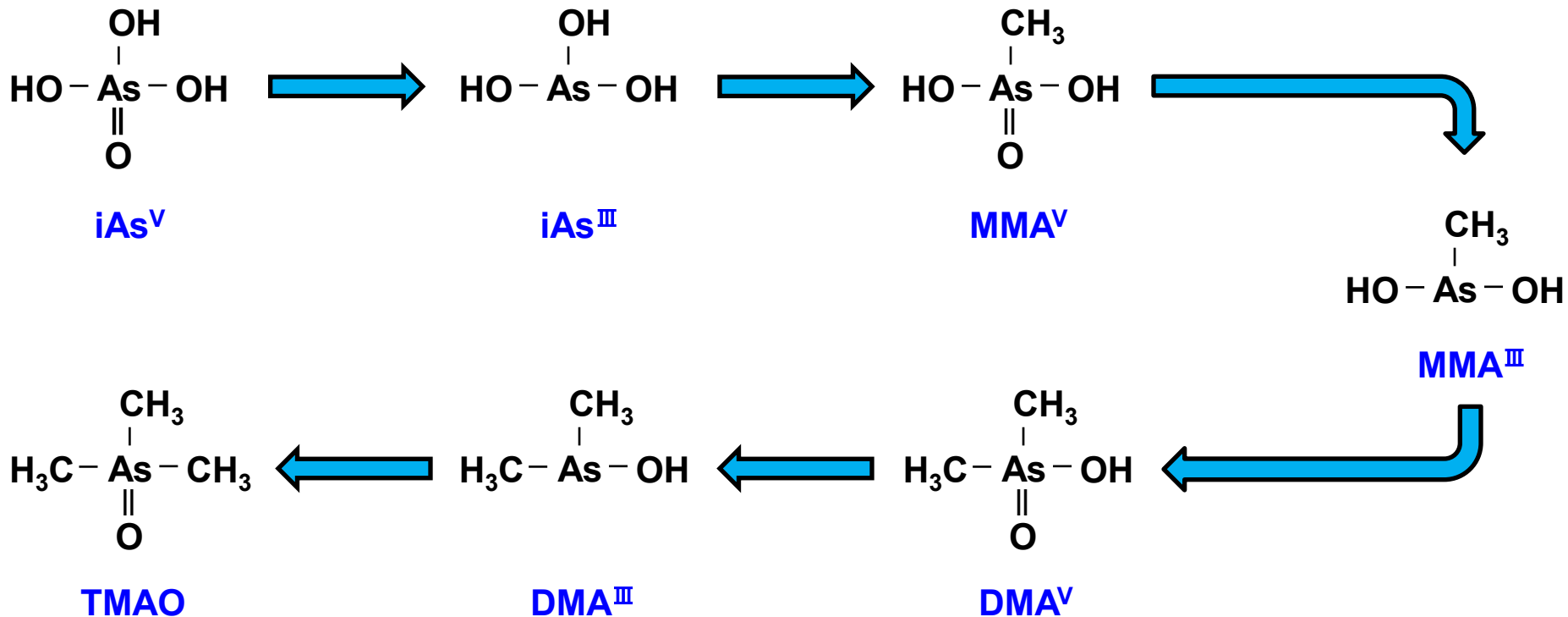
疫学的にヒ素ばく露と発がんの
因果関係は明確である



実験動物におけるヒ素の発がん性
はまだ明確ではない。

動物モデルによる発がん機序解明
が項目

無機ヒ素とヒトの皮膚がん、肺がんとの因果関係を
認める評価を下す



iAs^V: arsenate

iAs^{III}: arsenite

MMA^V: monomethylarsonic acid

MMA^{III}: monomethylarsonous acid

DMA^V: dimethylarsonic acid

DMA^{III}: dimethylarsonous acid

TMAO: trimethylarsine oxide

無機ヒ素の代謝経路

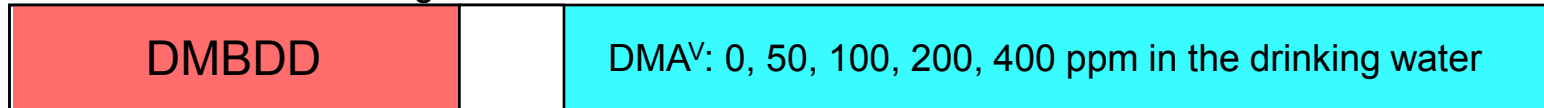
ヒ素化合物の培養細胞に対する毒性

	As ^V	As ^{III}	MMA ^V	DMA ^V	TMAO	AsBe
毒性	+++	++++	++	+	±	-
核分裂阻止	+	-	+++	++	+	-
4倍体形成	-	-	-	++	++	-
変異原性	-	-	-	-	-	-

DMA^Vの発がん修飾作用の検討 (ラット中期多臓器発がん性試験法)



Initiation with five carcinogens

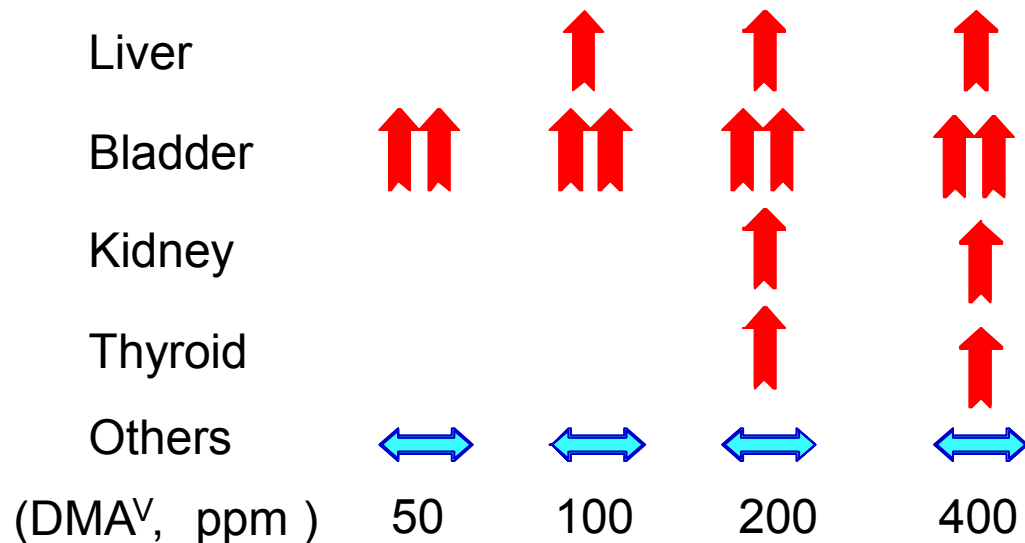


Target organs of DMBDD (DEN, MNU, BBN, DMH, DHPN)

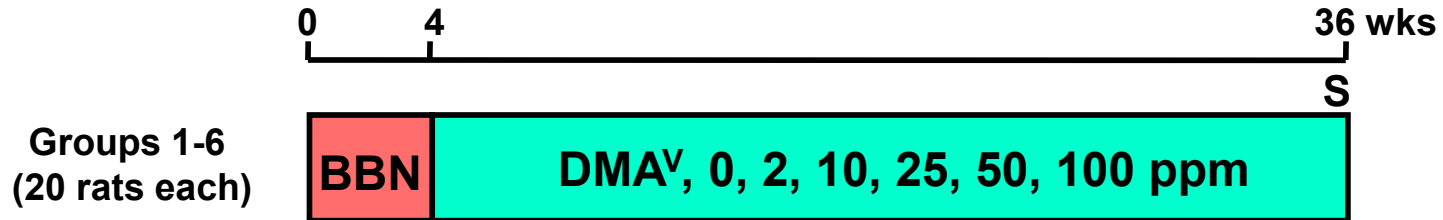
DEN: Liver, kidney; MNU: Forestomach, mammary gland, urinary bladder, thyroid

BBN: Urinary bladder; DMH: Intestinal tract; DHPN: Lung, kidney, thyroid

Enhancement of carcinogenesis by DMA^V (v.s. 0 ppm DMA^V group)



DMAの膀胱発がん修飾作用の検討 (ラット二段階膀胱発がんモデル)

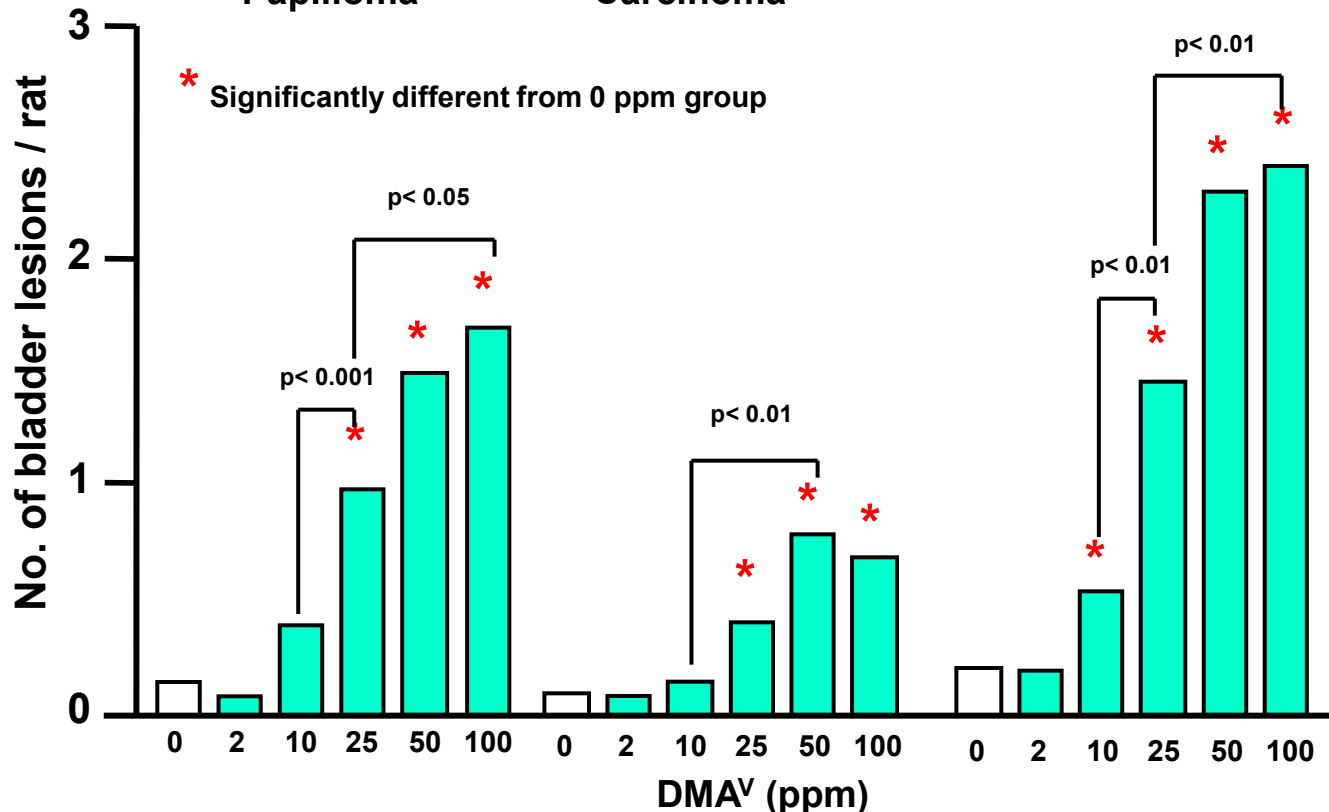


Animal: Male F344 rats, 6-week-old

Papilloma

Carcinoma

Tumor
(papilloma + carcinoma)

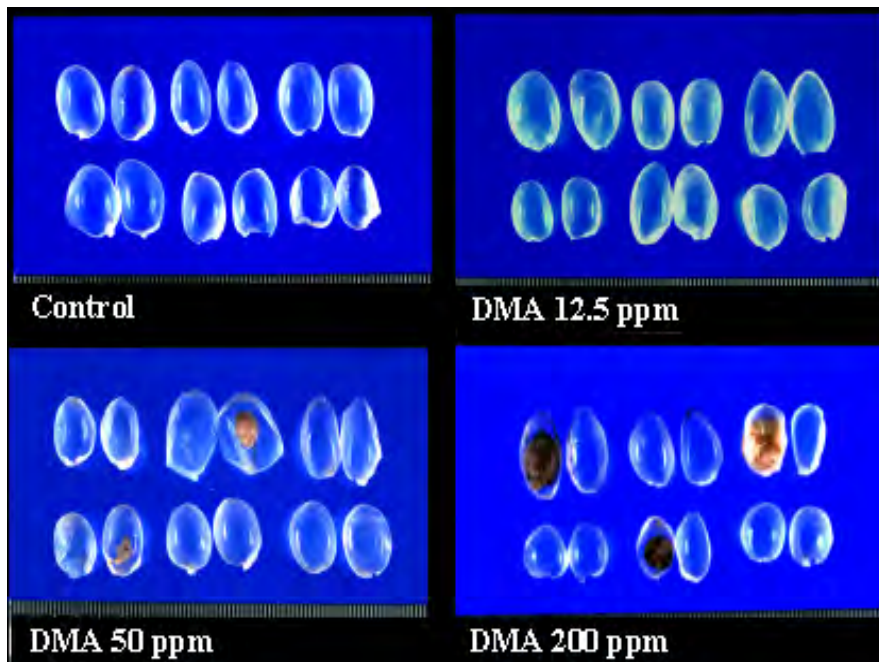


DMA^V の膀胱発がん性の証明 (2年間発がん性試験)

0 104 Wks

DMA^V (0, 12.5, 50, 200 ppm in drinking water)

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



Incidence of urinary bladder tumors

DMA ^V (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



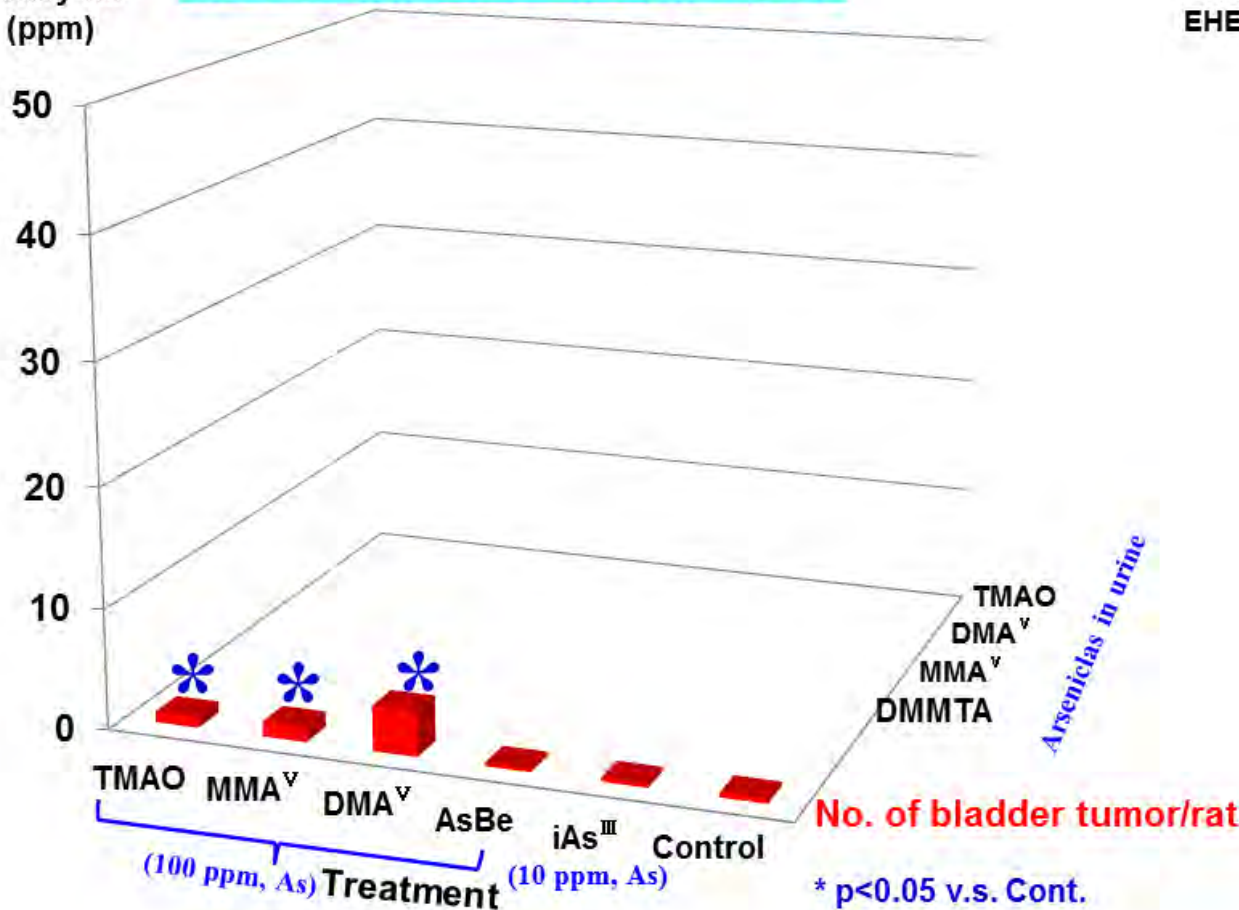
Groups 1-6
(15)



膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

Urinary As
(ppm)



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

0 4 6 8 38 wks

Groups 1-6
(15)

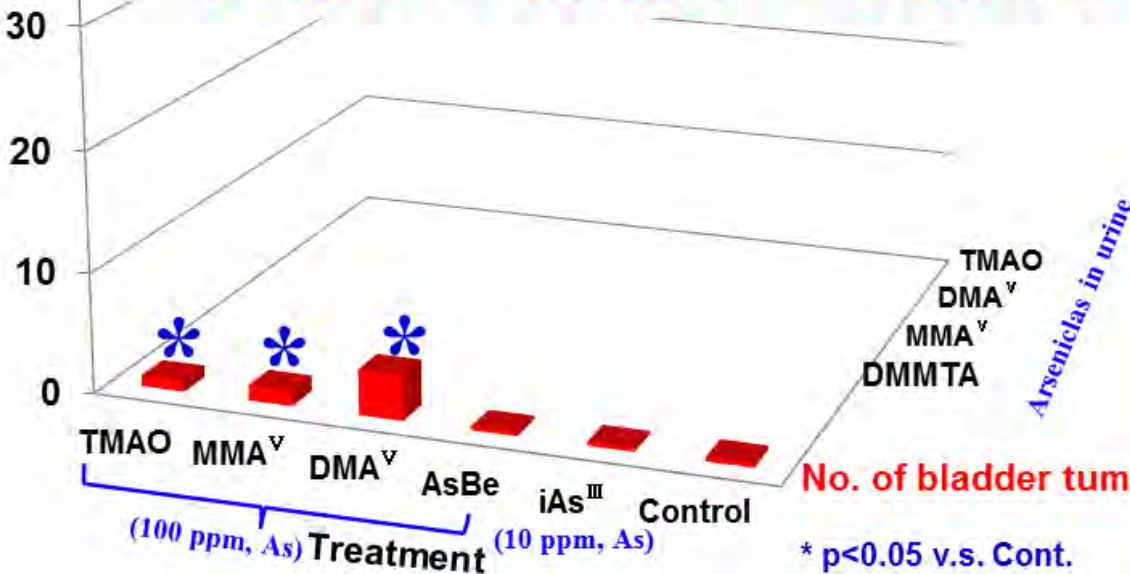


膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

Urinary As
(ppm)

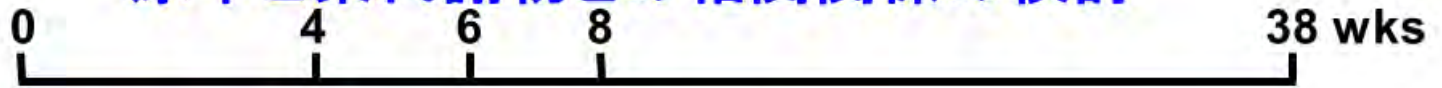
DMA^V > MMA^V > TMAO



No. of bladder tumor/rat

* p<0.05 v.s. Cont.

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

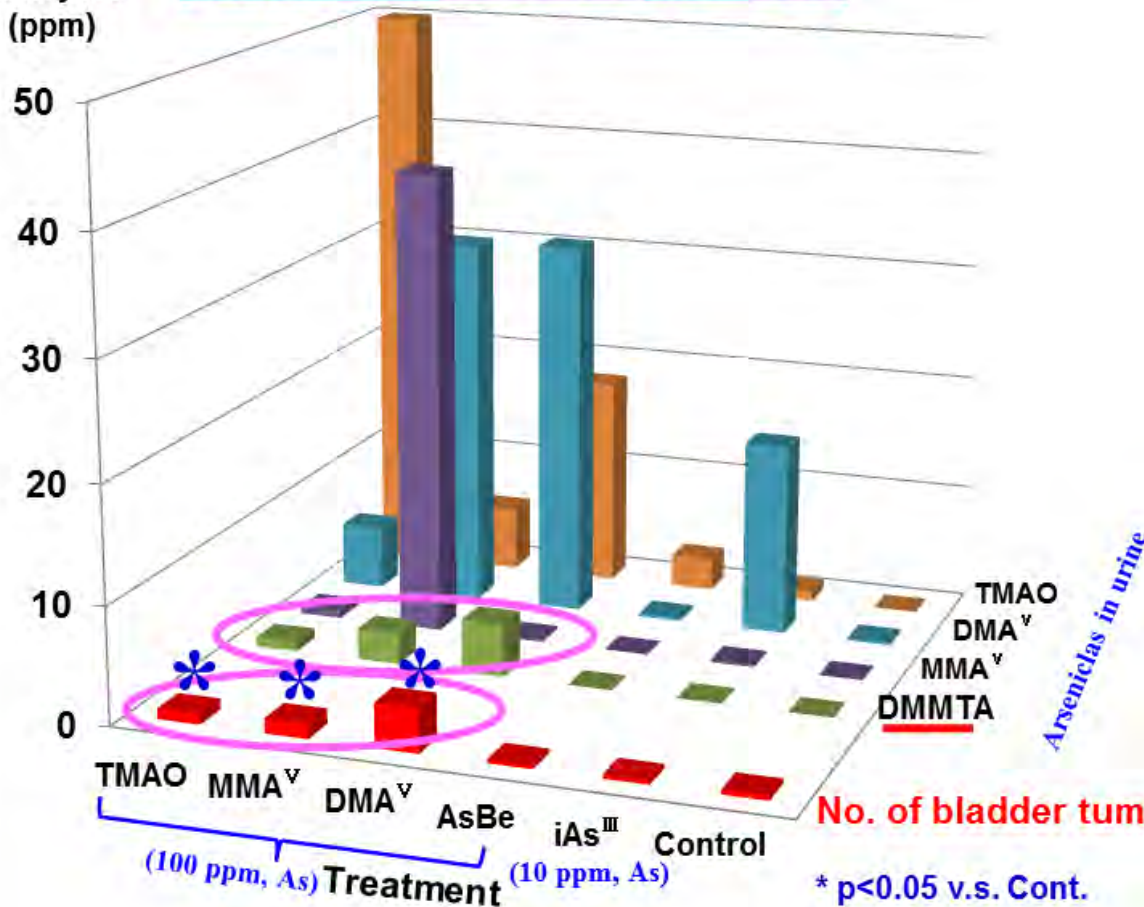


Groups 1-6
(15)



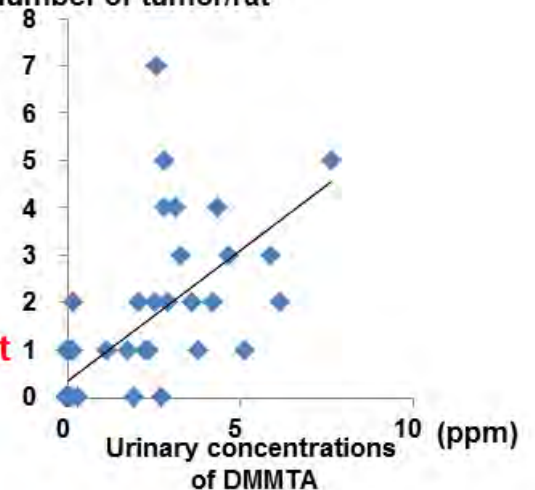
膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Urinary As
(ppm)



Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

Number of tumor/rat



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

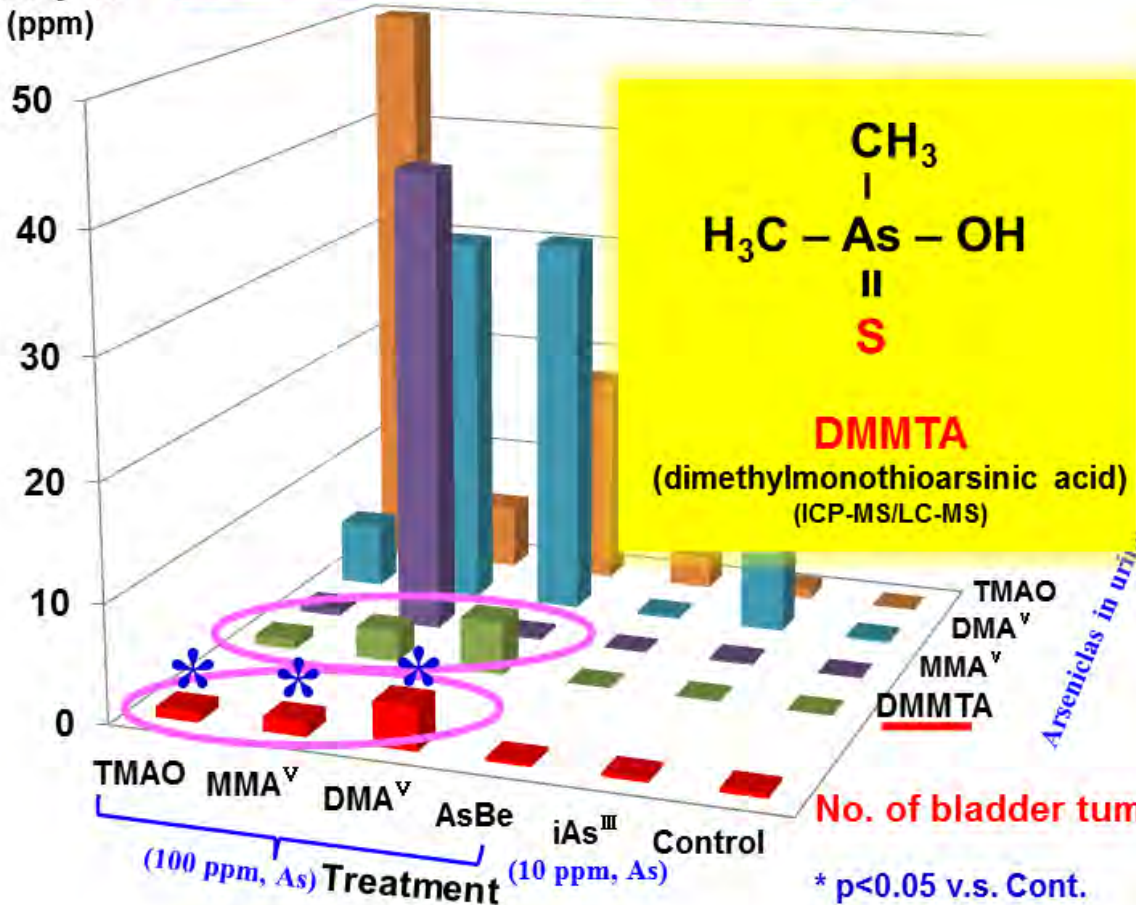
0 4 6 8 38 wks

Groups 1-6
(15)

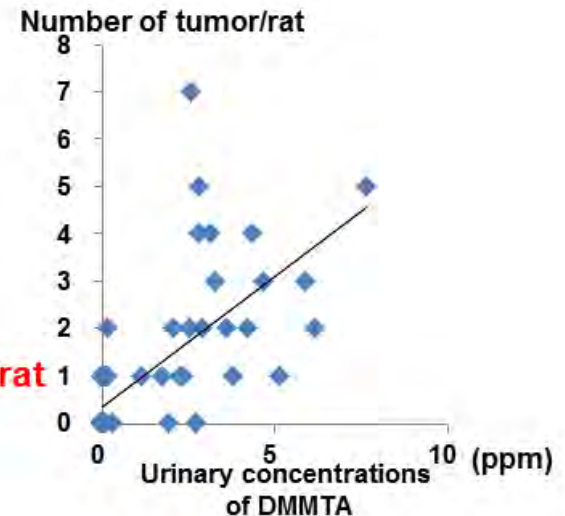


膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Urinary As
(ppm)



Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine



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



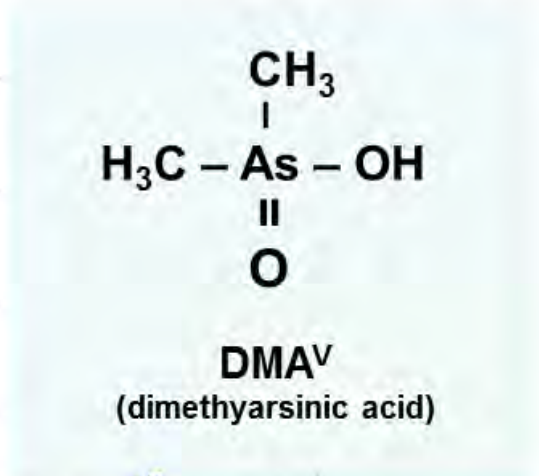
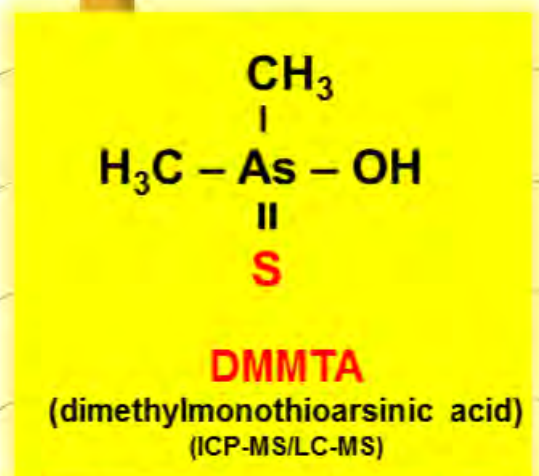
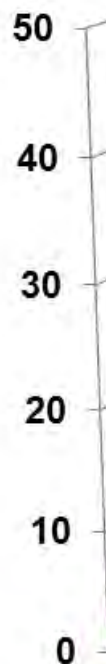
Groups 1-6
(15)



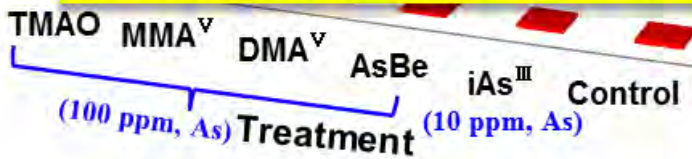
膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

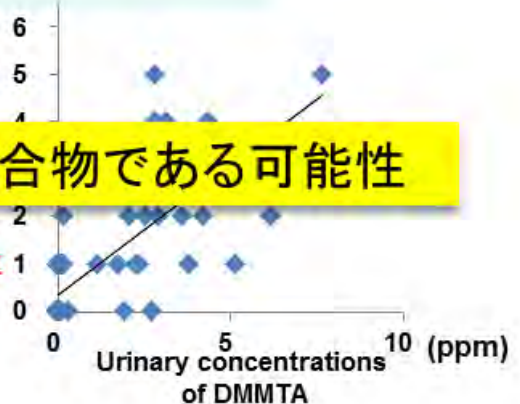
Urinary As
(ppm)



DMMTA:膀胱発がんに関連する共通のヒ素化合物である可能性

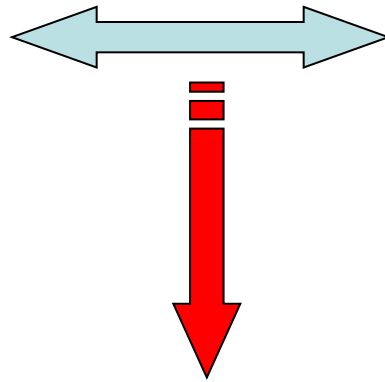


No. of bladder tumor/rat
* p<0.05 v.s. Cont.



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

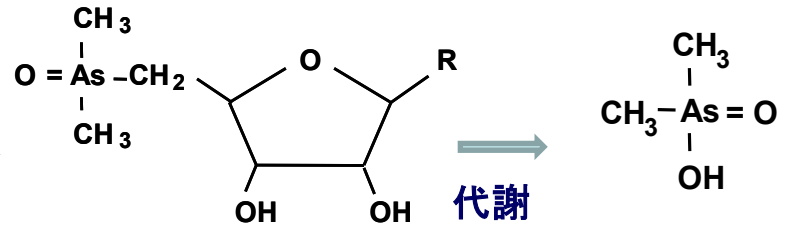
アルセノシュガー(AsSugs)

❖ 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

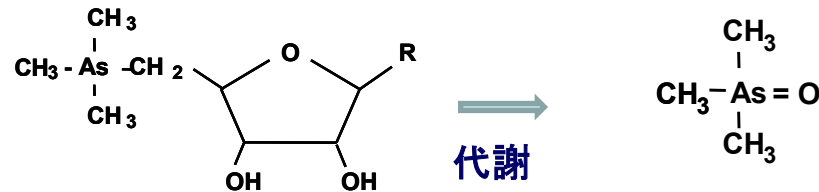
❖ しかし、AsSugsの代謝の過程での作用については明らかでない

❖ 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)

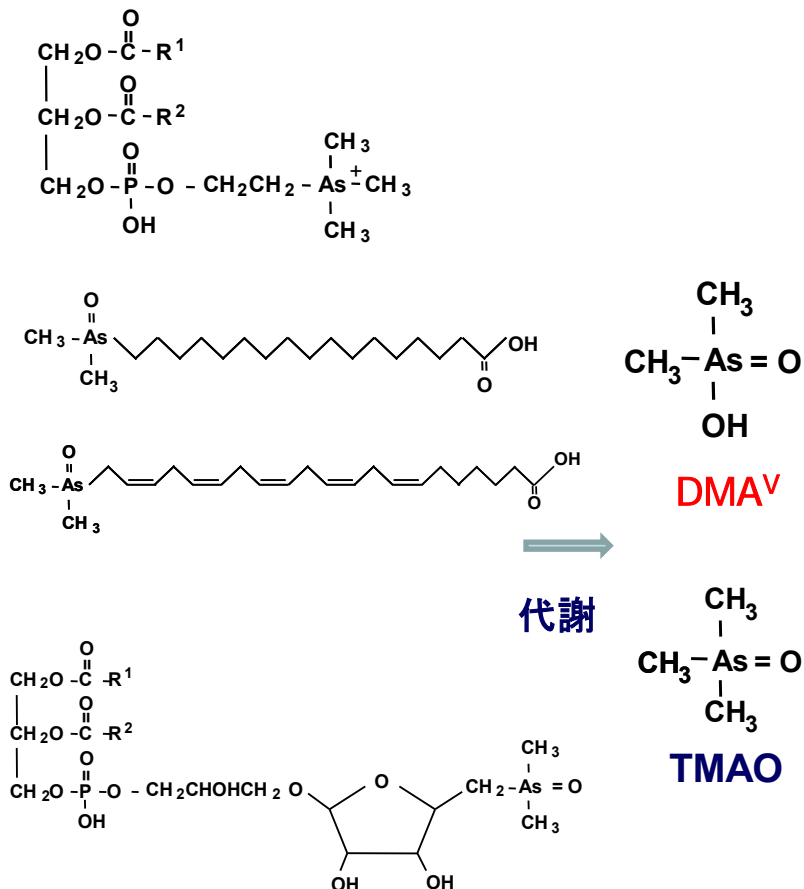


トリメチル態4種

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

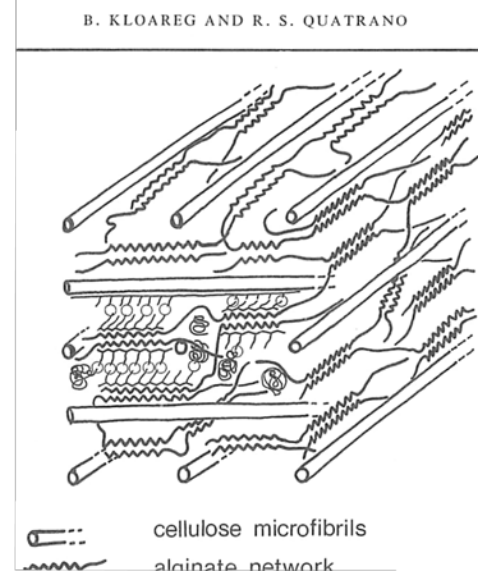


リン脂質型、炭化水素型あるいは脂肪酸型のAsLipids

研究項目

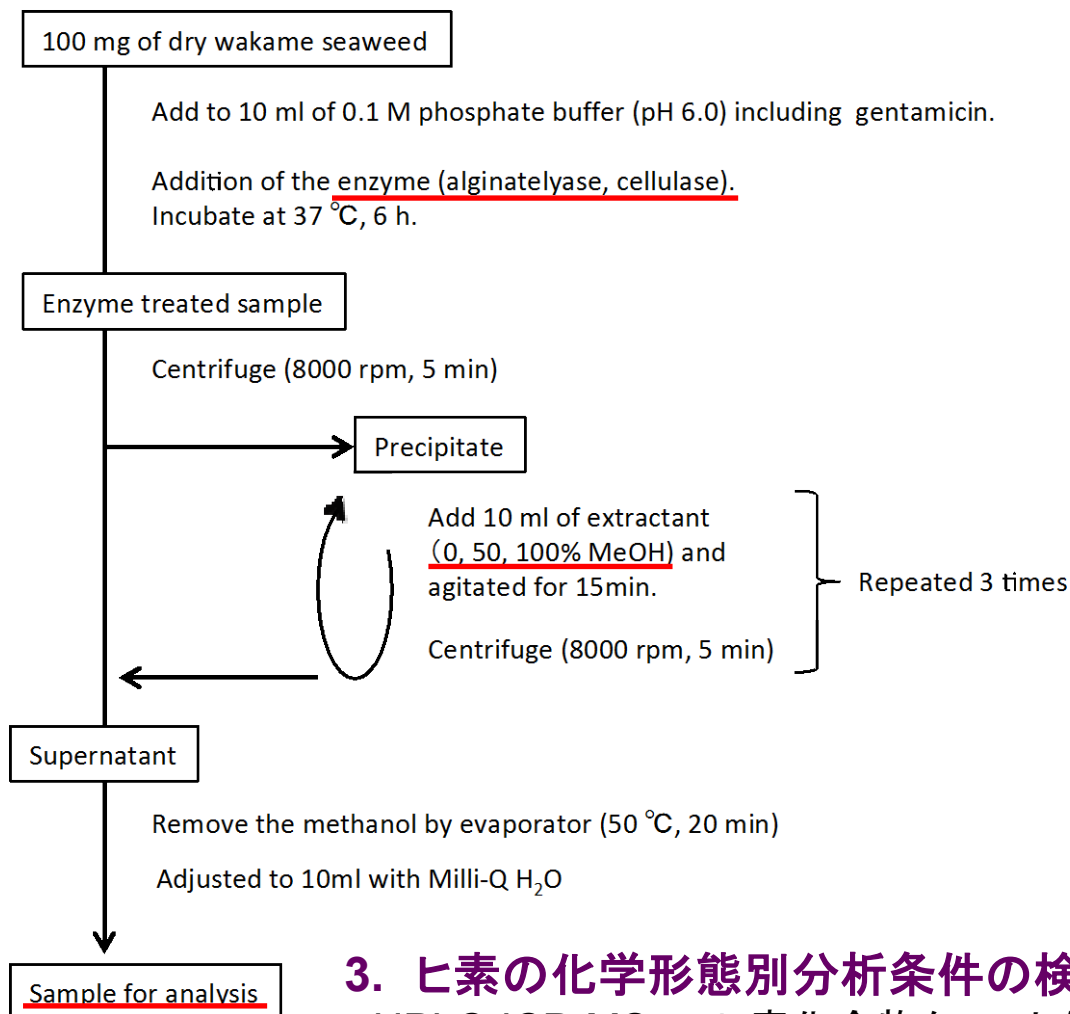
1. 食用海産動植物に含まれるAsSugsおよびAsLipidsの抽出法の検討
2. 食用海産動物に含まれるヒ素化合物の検討
3. AsSugsおよびAsLipidsの標準品の化学合成
4. ボランティアによるAsSugs含有食品摂取と尿中ヒ素代謝物との出納
5. 研究項目5: AsSugsおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価
6. 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝と毒性試験
7. 食品摂取によるヒ素の発がんを含めた毒性発現のリスク低減法の検討

- 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。日常的に摂取されているワカメもその1つであり、今回の研究の被験食品とした。
- 先行研究におけるワカメからのヒ素抽出率は5~49%と低い。
- 海藻に含まれるAsSugsの同定と定量を行うためには、①AsSugsの化学形態を壊さない化学的に温和な抽出条件であること、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が必要である。
- ヒ素抽出率を高めるため、細胞壁の構造に注目した。
- 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。
- 温和な条件で細胞壁を分解するため、アルギン酸とセルラーゼ酵素を用いた検討を行った。



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	Alginate lyase	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

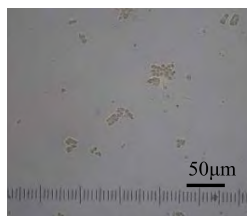
HPLC-TOF-MS ⇒ 未同定ヒ素の同定

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. 酵素処理条件の検討



A(+), C(-)



A(+), C(+)

両方の酵素処理を行ったサンプル(A(+), C(+))では細胞壁が分解され、細胞の大半が浮遊した状態で観察された。

2. 抽出溶媒の検討

抽出溶媒メタノール濃度による総ヒ素抽出率の変化

MeOH concentration	Percentage of acid digestion (%), Mean ± SD	
	A(-) C(-)	A(+), C(+)
0%	22.5 ± 1.1	48.3 ± 0.5
50%	21.8 ± 0.9	58.7 ± 4.1
100%	28.1 ± 0.2	88.8 ± 8.4

抽出率は粉碎ワカメの湿式灰化サンプルの分析値(25.50 mg/kg dry)を100%として計算

酵素処理による総ヒ素溶出率の変化

Enzyme treatment	Eluted arsenic (mg/kg dry)		Percentage of acid digestion (%)
	Mean	SD	
A(-) C(-)	4.4	0.93	17.1
A(-) C(+)	5.8	0.14	22.5
A(+), C(-)	8.0	0.18	31.1
A(+), C(+)	11.6	0.56	45.0

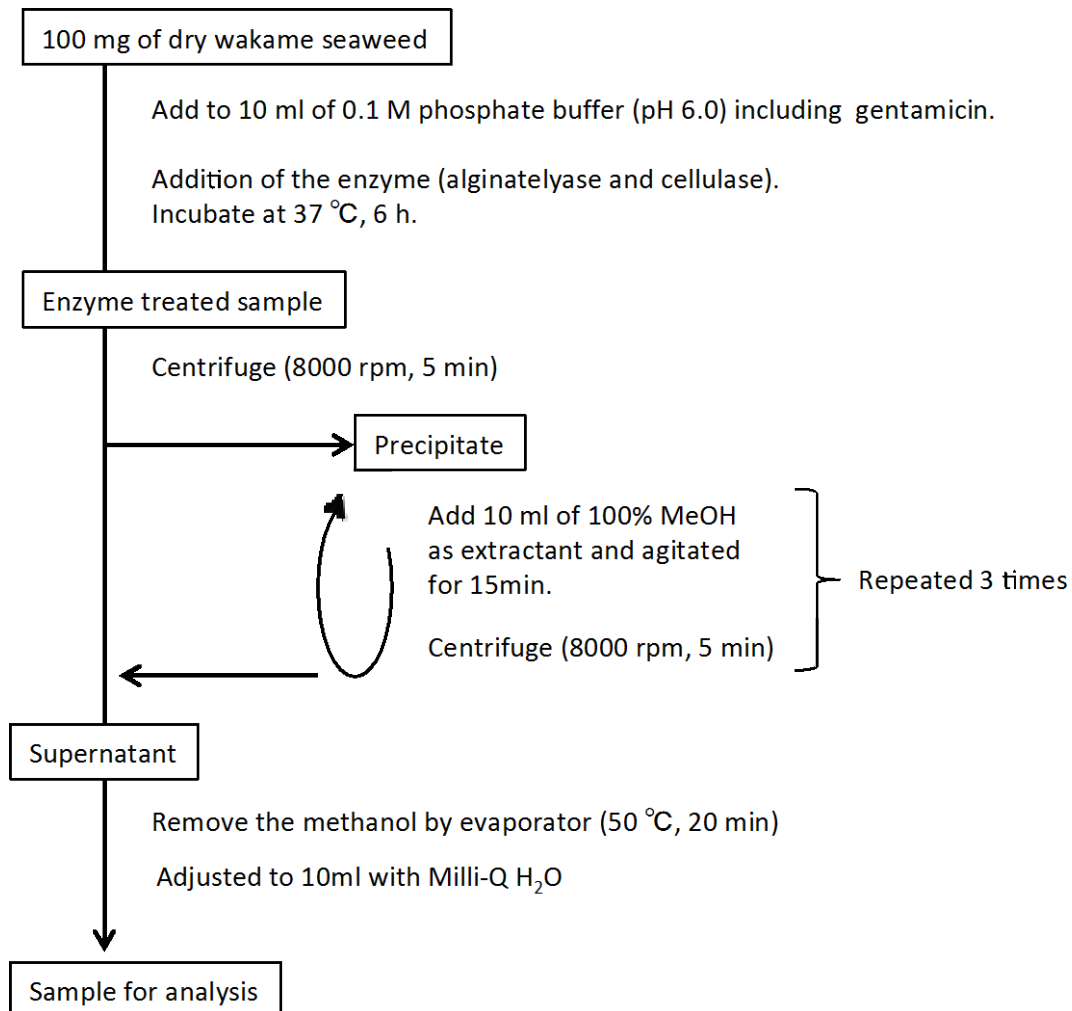
酵素処理溶液中の総ヒ素量
 溶出率は粉碎ワカメの湿式灰化サンプルの分析値(25.50 mg/kg dry)を100%として計算

総ヒ素抽出率が最も高くなった条件

- ・ 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

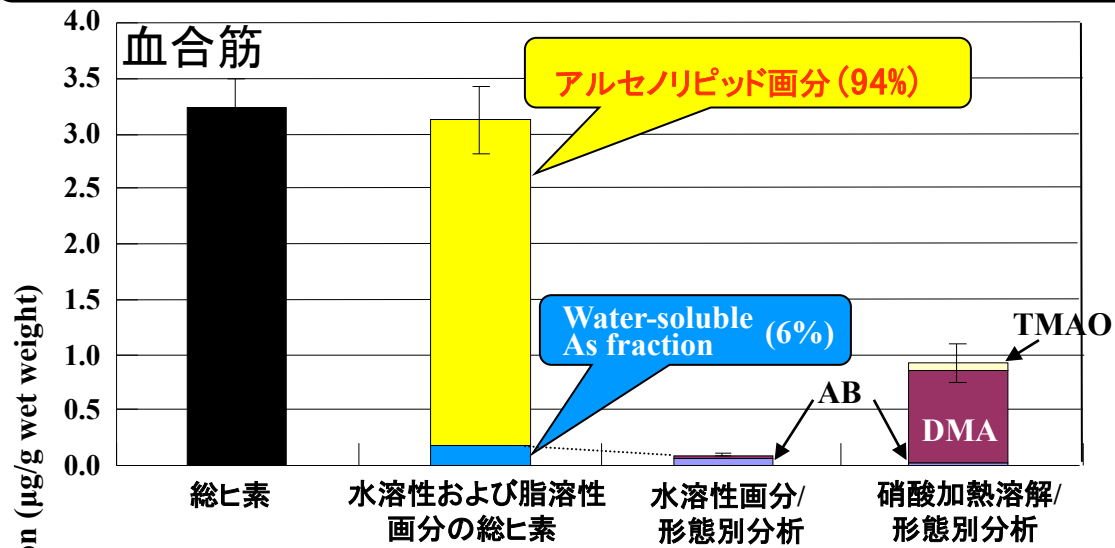
A(+), C(+), 100% MeOH抽出サンプルを化学形態別分析に使用する

ワカメなどの褐藻類における最適ヒ素抽出条件



研究項目 1-2: 食用海産動植物に含まれるAsSugs、AsLipidsの抽出法の検討

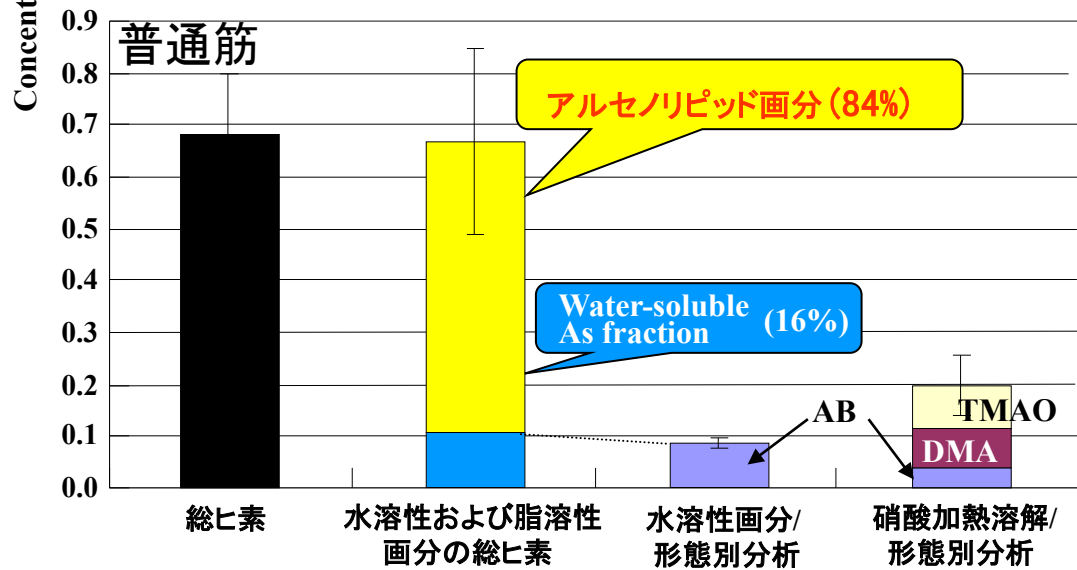
サンマ筋肉に存在するヒ素化合物は主に脂溶性である



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DMAおよびTMAOが主要なヒ素化合物として検出された。



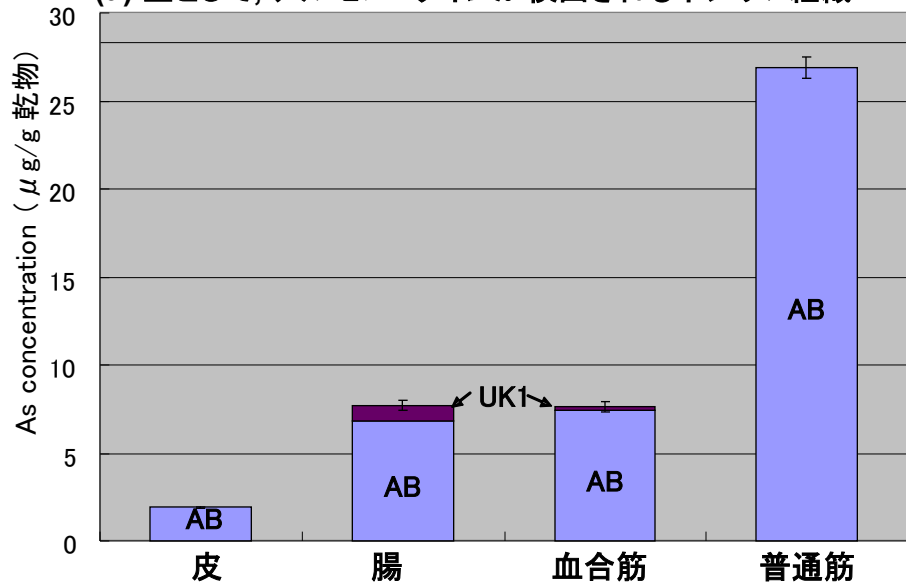
サンマの筋肉に存在するヒ素は、主にDMA含有AsLipidsあるいはTMAO含有AsLipidsとして存在している。

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).

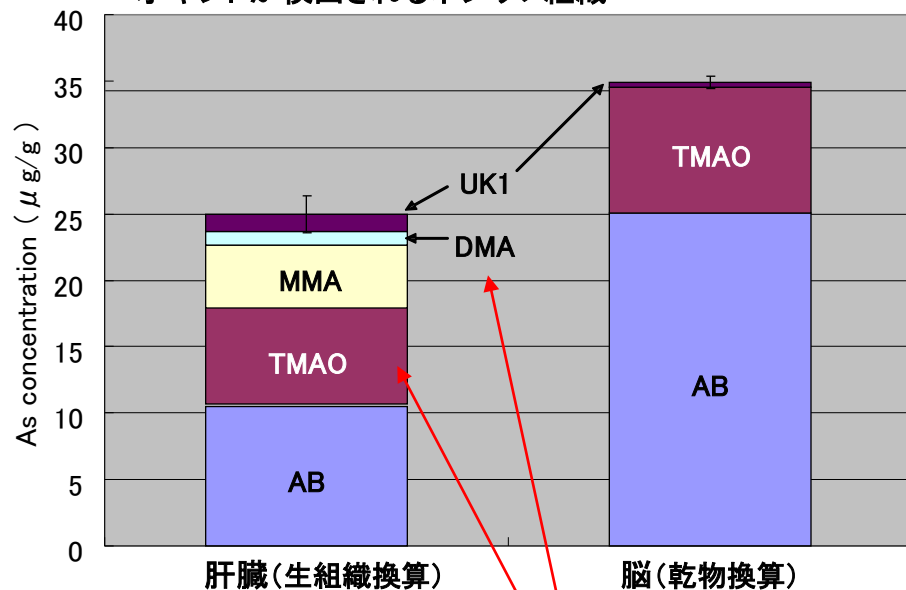
(筋肉における形態別分析法, 硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法; 水溶性画分の抽出法, Folchの方法)

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, 比較的少量のトリメチルアルシノキシドが検出されるホシザメ組織

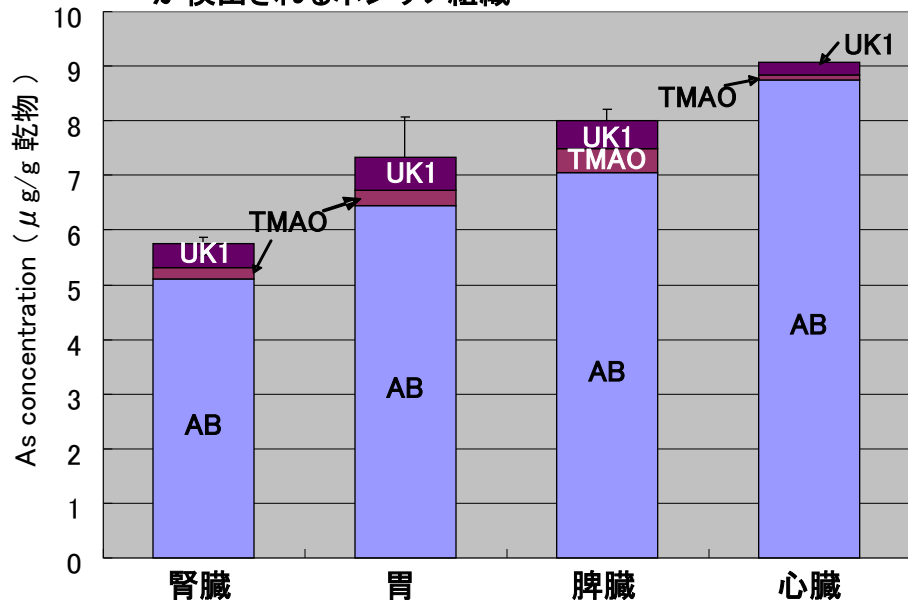


肝臓の場合, 普通筋と同様, 水溶性画分からは, 実質的にアルセノベタインのみが検出される。したがって, DMAやTMAOは, 硝酸加熱溶解処理により, DMAA含有AsLipidsやTMAO含有AsLipids から誘導されたと示唆された。

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ノキシドが検出されるホシザメ組織



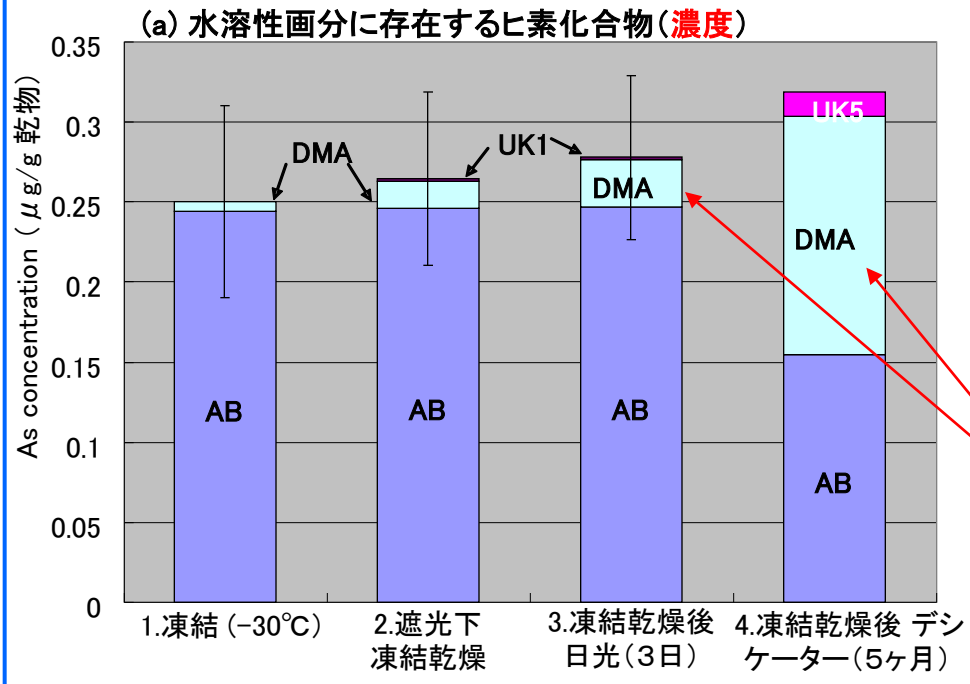
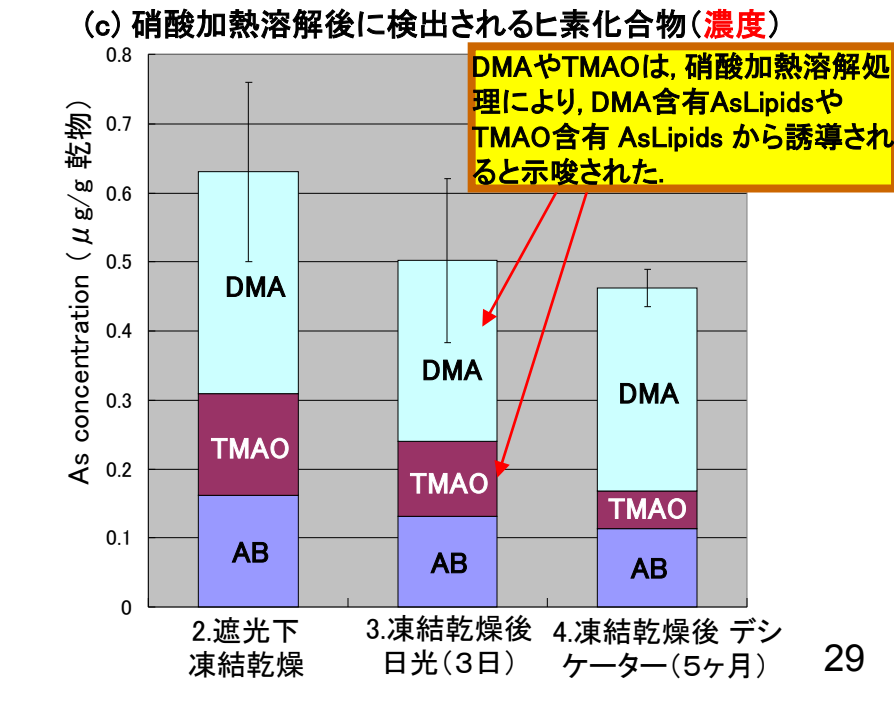
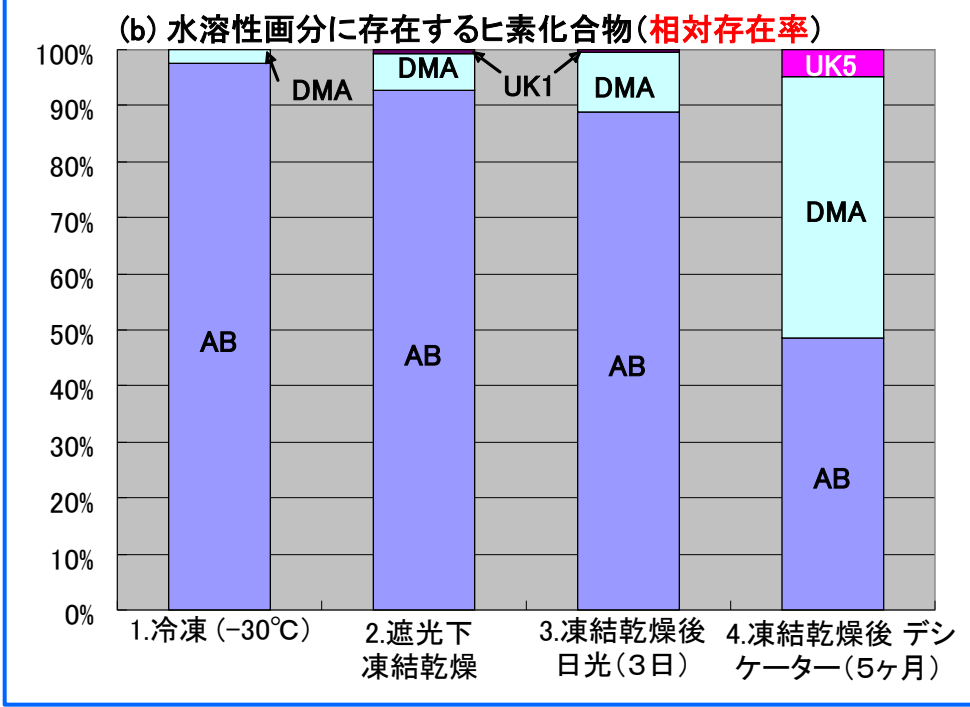


図2. マイワシ普通筋に存在するヒ素化合物の濃度と組成に及ぼす, 1. 凍結貯蔵, 2. 遮光下の凍結乾燥, 3. 凍結乾燥後の日光曝露(3日間), および 4. 凍結乾燥後のガラス製デシケータ中での保存(5ヶ月間、実験台上)の影響 (n=3).
(形態別分析法, HPLC-ICP-MS法; 水溶性画分の抽出法, Folchの方法)

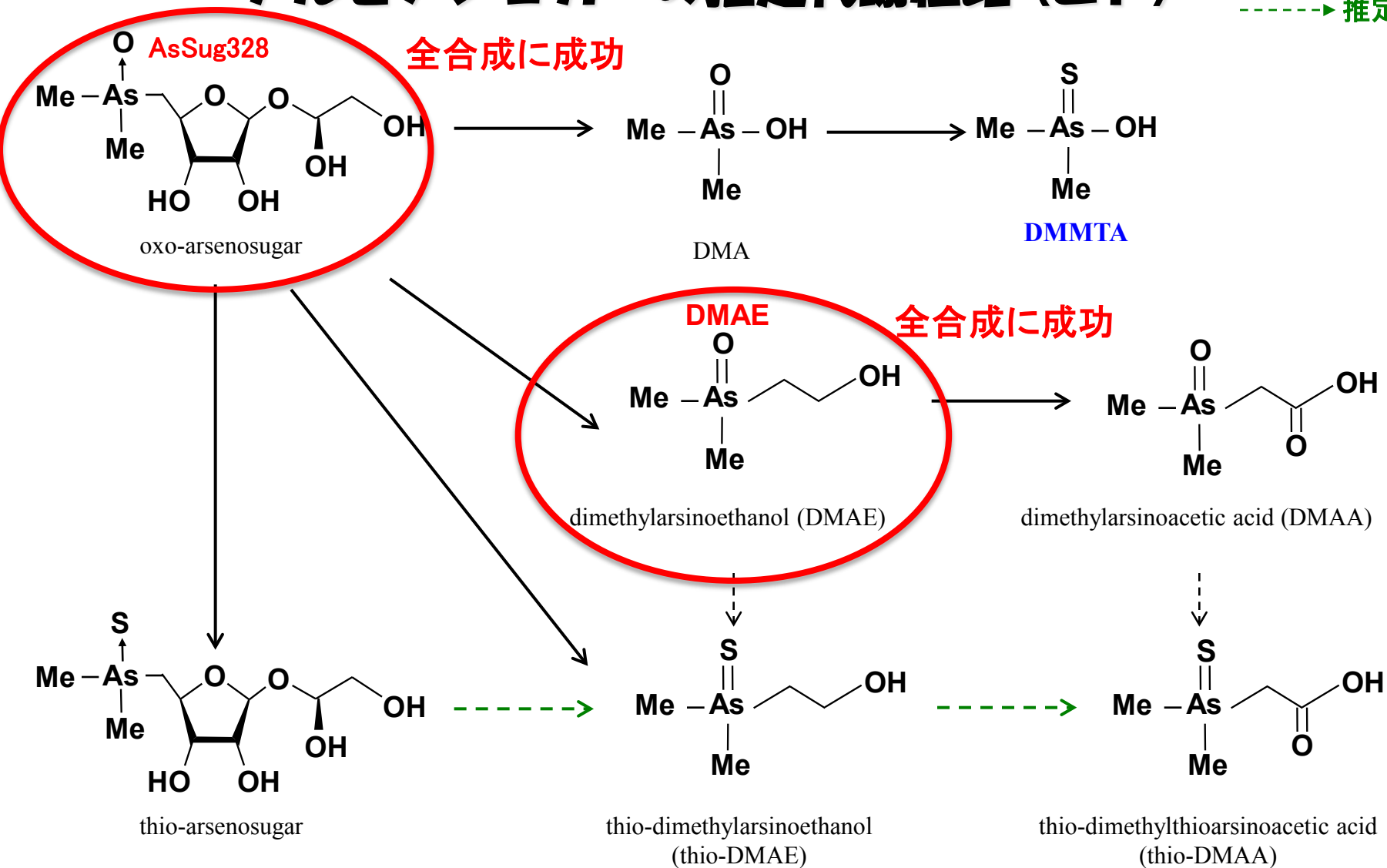
魚肉の貯蔵中に, 日光や自己消化により,
 1. DMAはAsLipidsから誘導される
 2. DMAはアルセノベタインから誘導された可能性も否定できなかった.



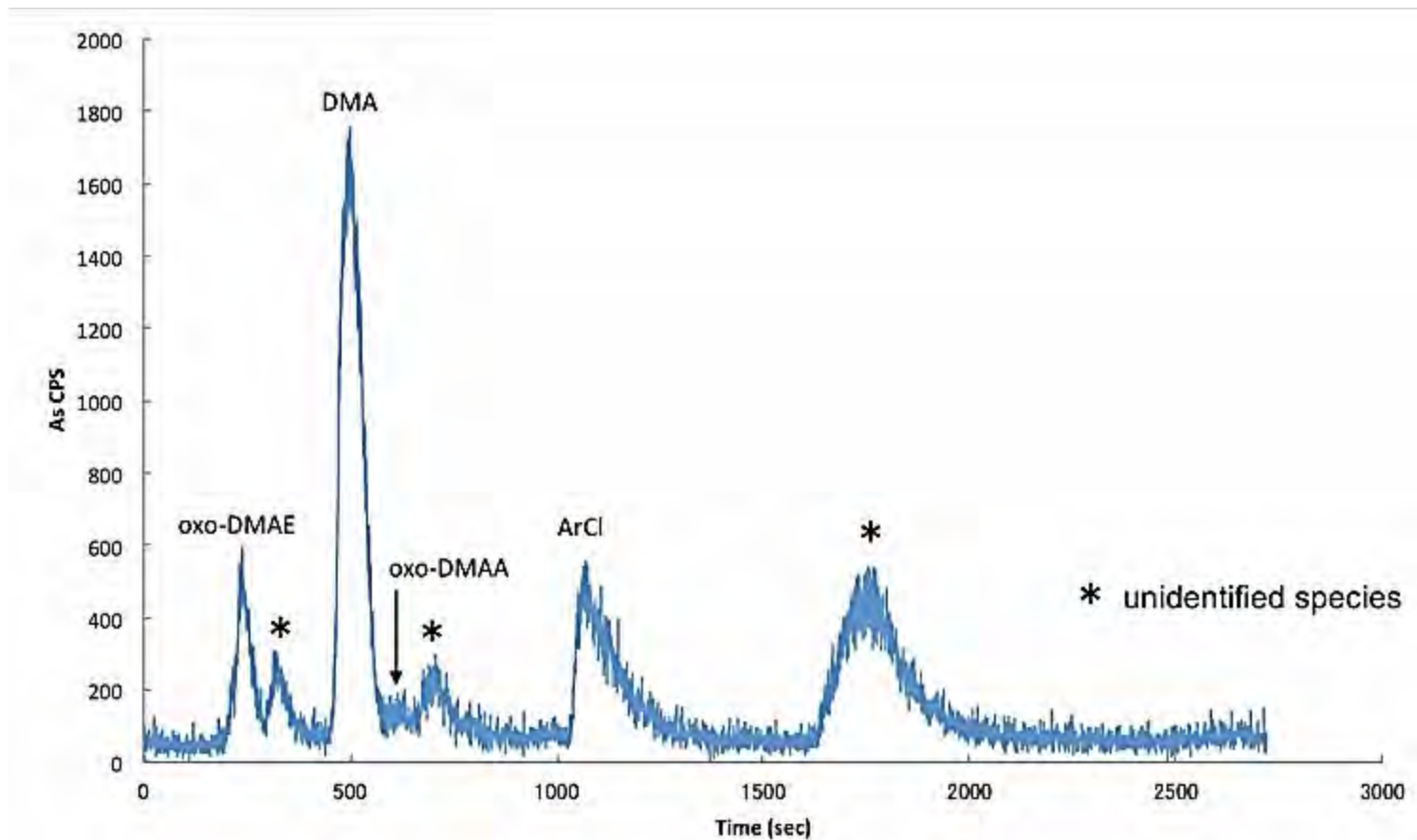
アルセノシュガーの推定代謝経路 (ヒト)

—→ 確定経路

- - - - -→ 推定経路



摂取24h後



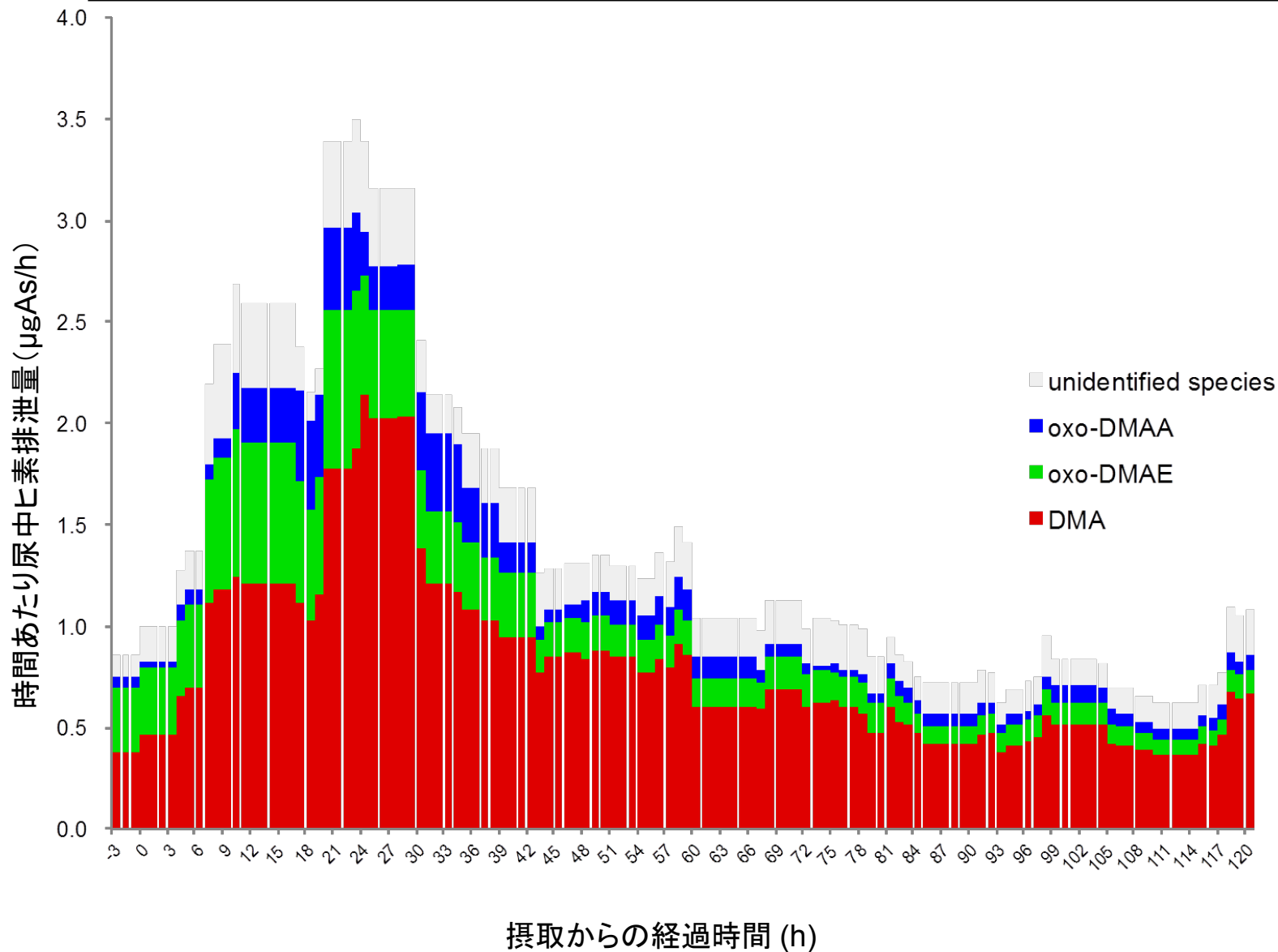
HPLC-ICP-MS分析、陰イオン交換カラムPRP-X100使用

oxo-DMAE:oxo-dimethylarsenoethanol

oxo-DMAA:oxo-dimethylarsenoacetate

これらはHPLC-TOF-MS分析で質量数を確認

ワカメ摂取者 時間あたり尿中ヒ素排泄量(5名の平均値)



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。

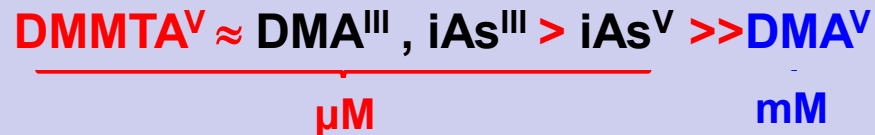
課題

- 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トの発現の検討

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



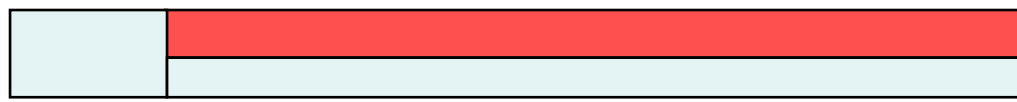
- DMMTA^VのLC₅₀は、iAs^V、iAs^{III}、DMA^{III}と同程度で、発がん性のあるDMA^Vに比べてはるかに強い細胞毒性を示した。
- DMMTA^Vは細胞非存在下では安定していたが、細胞存在下ではDMA^Vへの変換がみられた。
- DMMTA^Vは染色体異常試験で陽性（構造異常および数的異常）を示した。Ames試験では陰性である。

in vivo

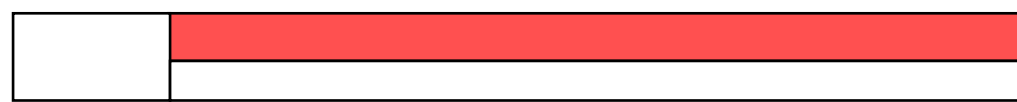
DMMTAの産生経路の検討



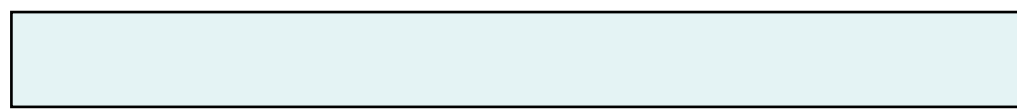
抗生物質+DMA^V






DMA^V



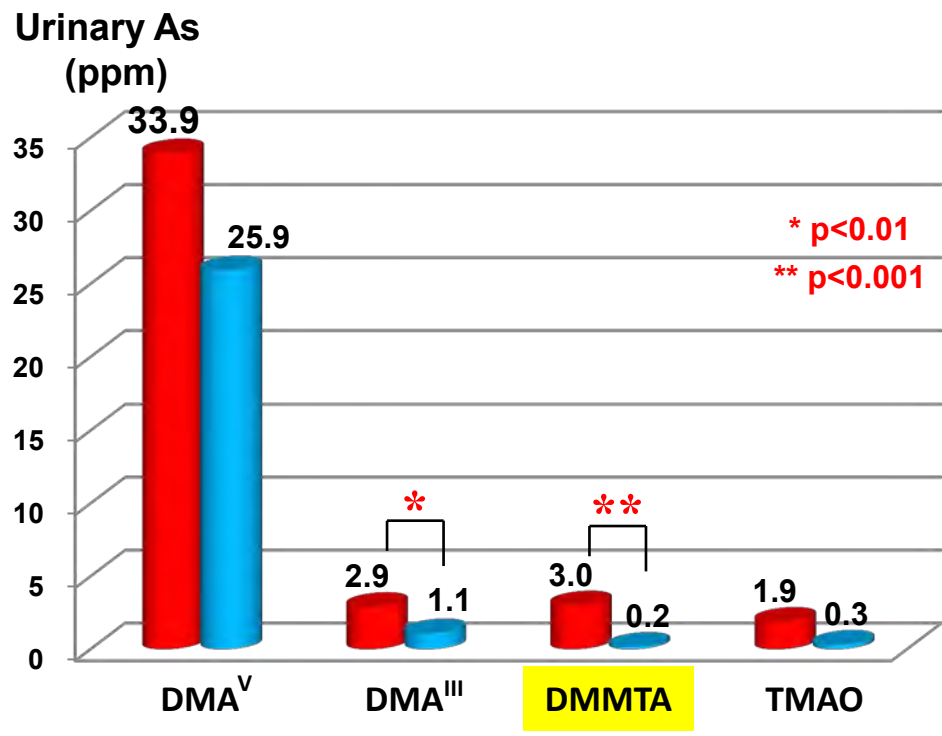
抗生物質



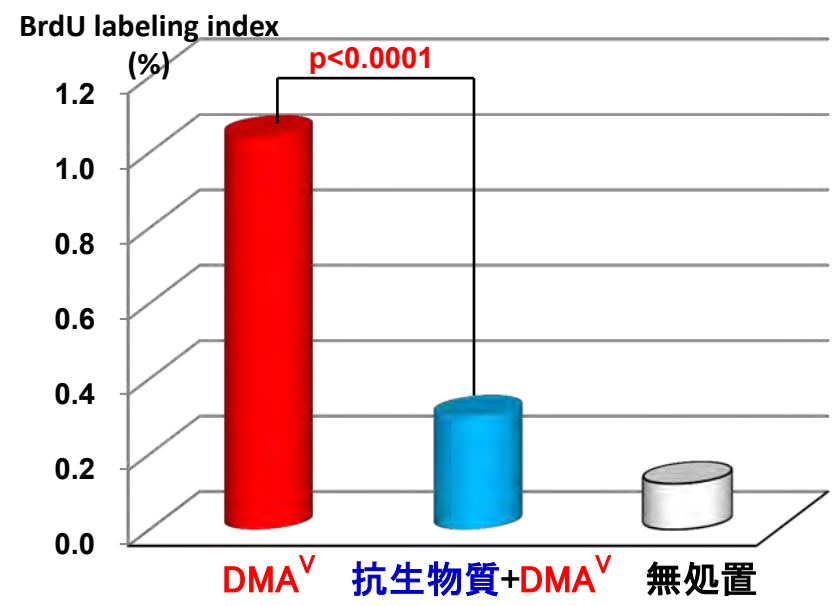
-  ネオマイシン2mg/ml、飲水投与
-  DMA^V 100ppm、混餌投与
-  水道水

- 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

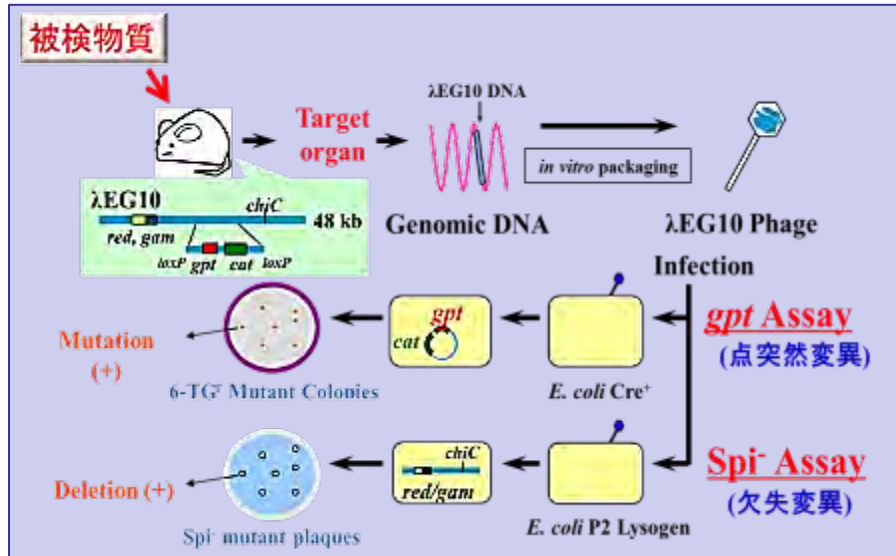


尿中ヒ素化合物濃度



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



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

0 13週

対照群

被検物質投与群

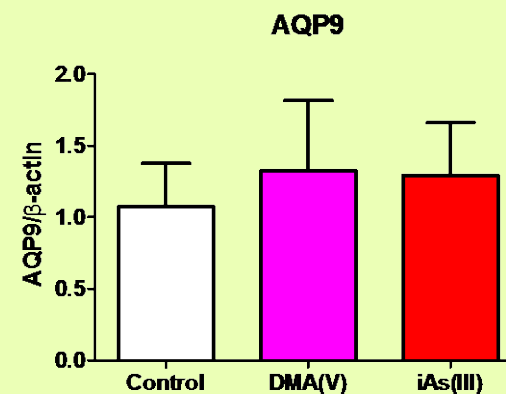
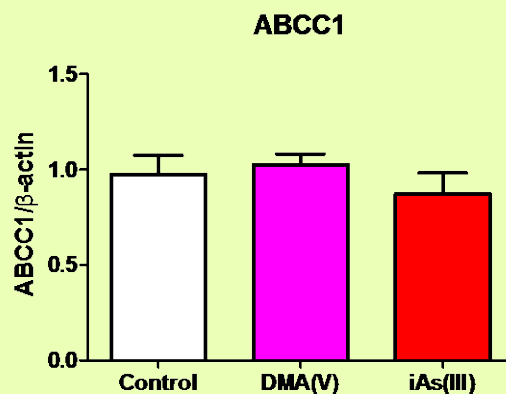
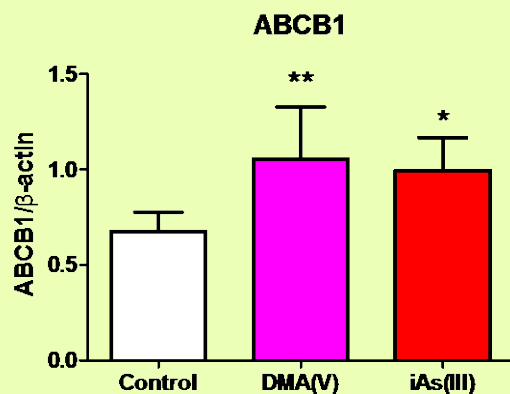
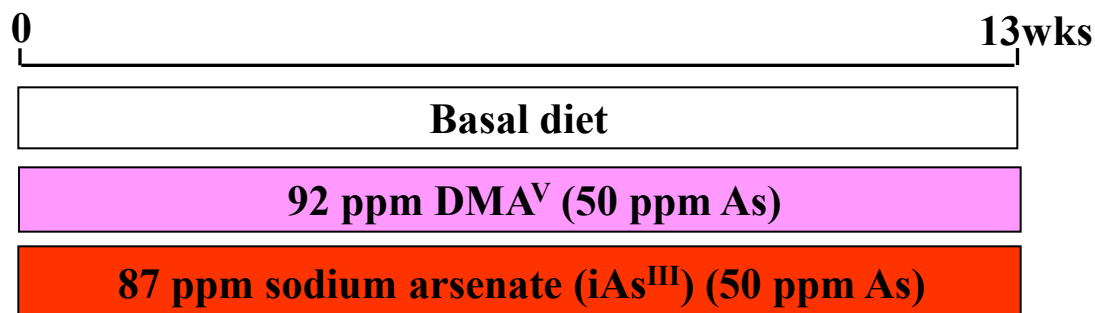
動物: F344 *gpt* deltaラット

*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

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

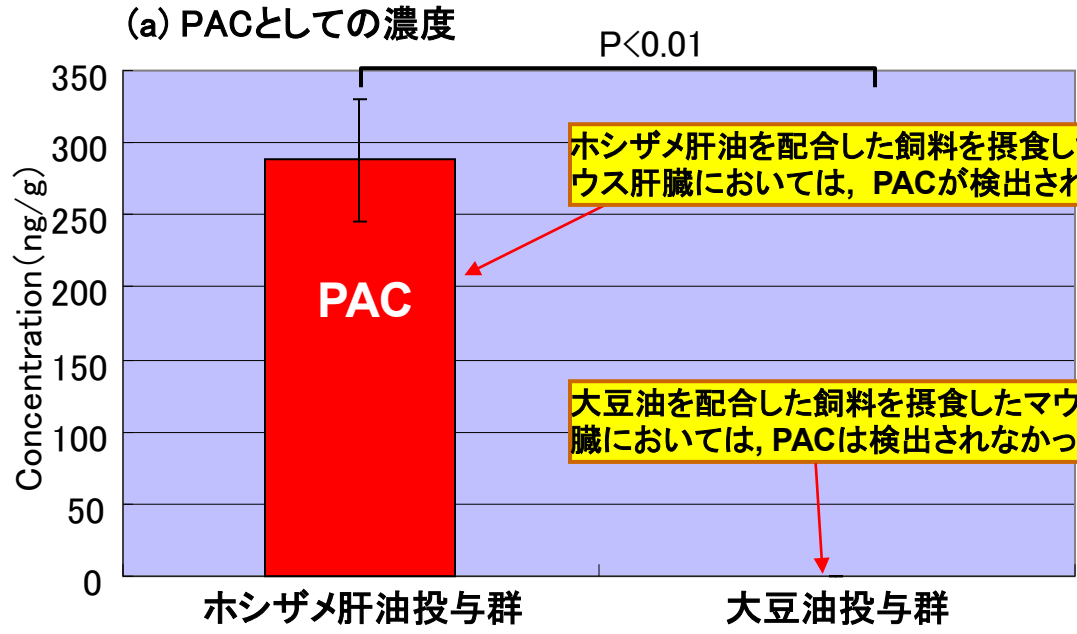
③ DMA^VおよびiAs^{III}投与F344ラット膀胱粘膜におけるヒ素トランスポーターの発現の検討



*p<0.05 vs. control
** p<0.01 vs. control

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

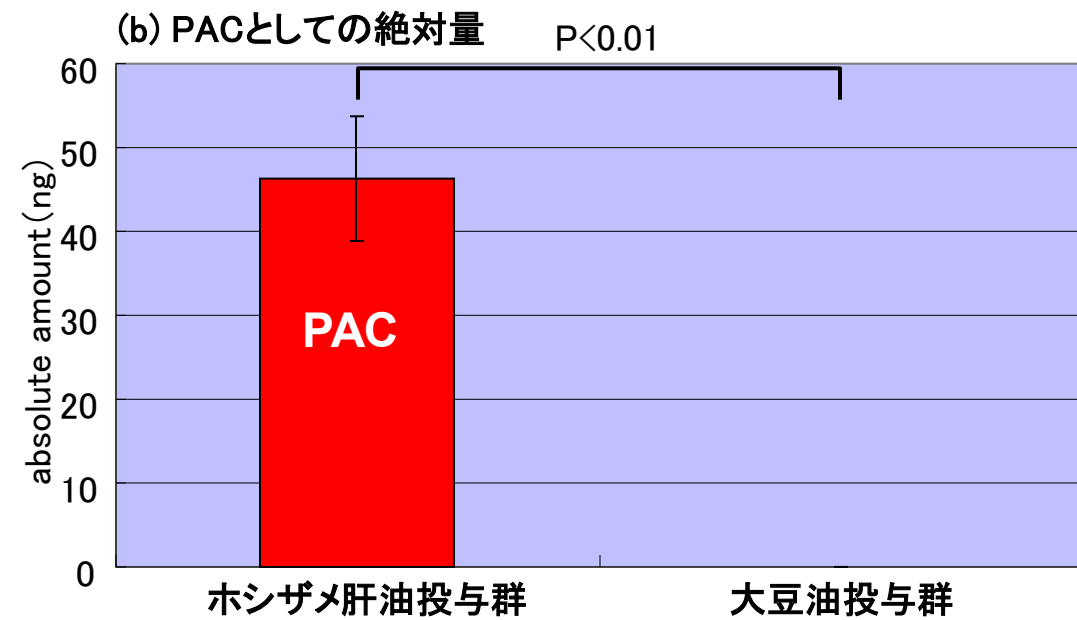


ホシザメ肝油を配合した飼料を摂食したマウス肝臓においては, PACが検出された.

大豆油を配合した飼料を摂食したマウス肝臓においては, PACは検出されなかった.

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

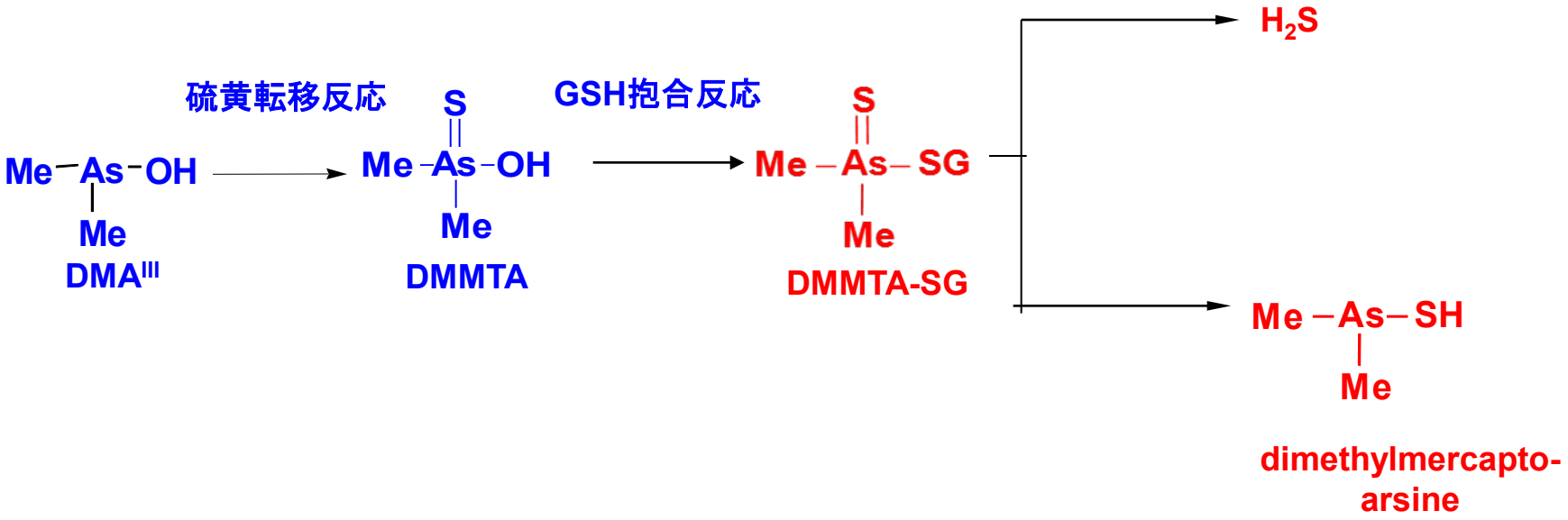
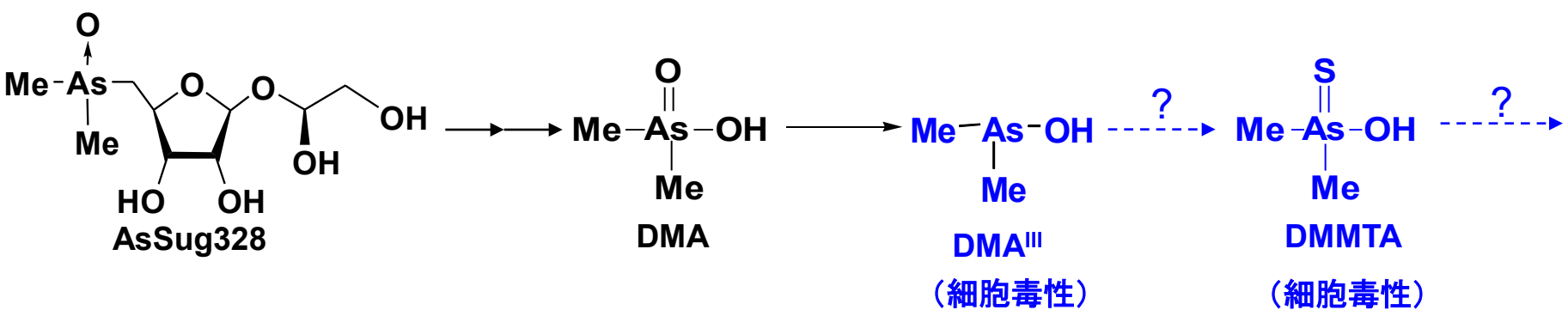
今回用いた分析法は, 他組織でのPACの動態を検討する上でも, 有効な方法になると予想される



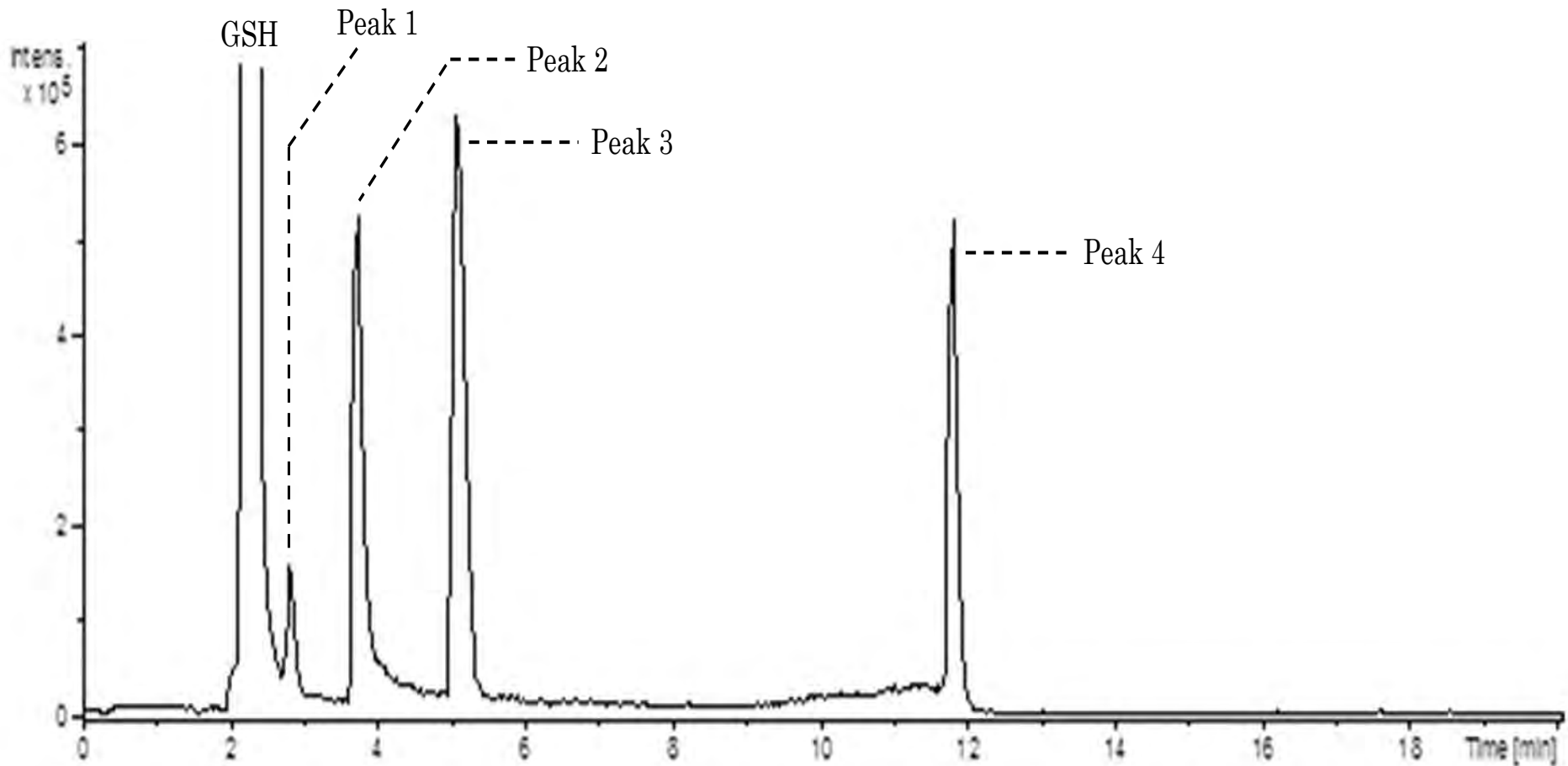
ホシザメ肝油配合 (4%) 飼料を摂食させたマウスの肝臓に存在する, (a) ホスファチジルアルセノコリン(PAC)濃度, および (b) 絶対量 (n=3). (14日間連続摂食の例)

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.

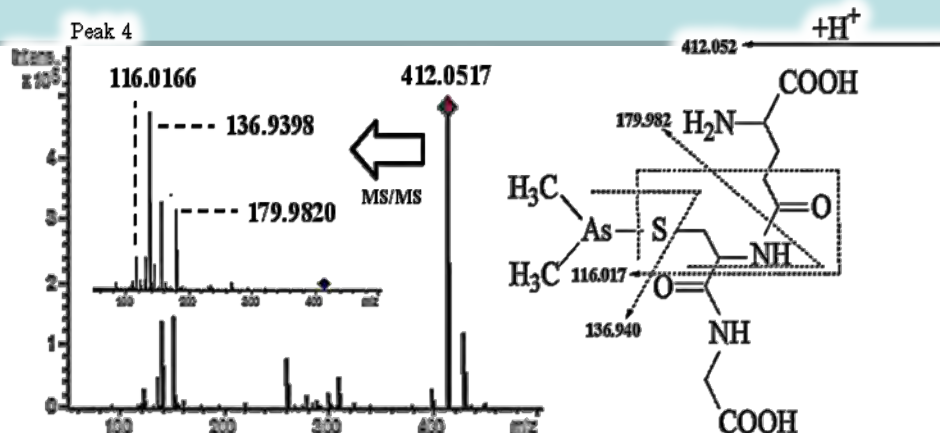
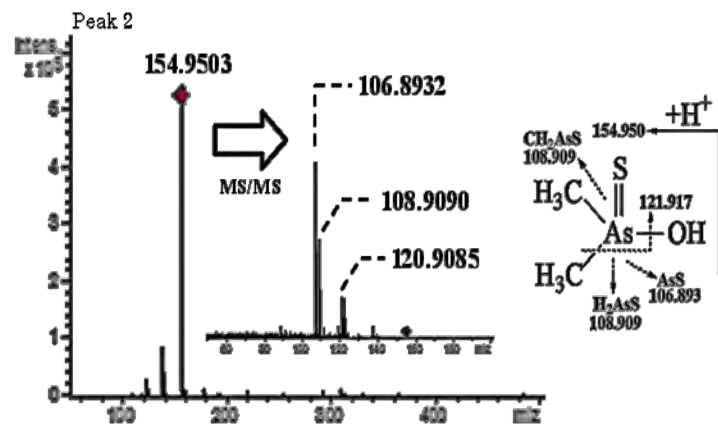
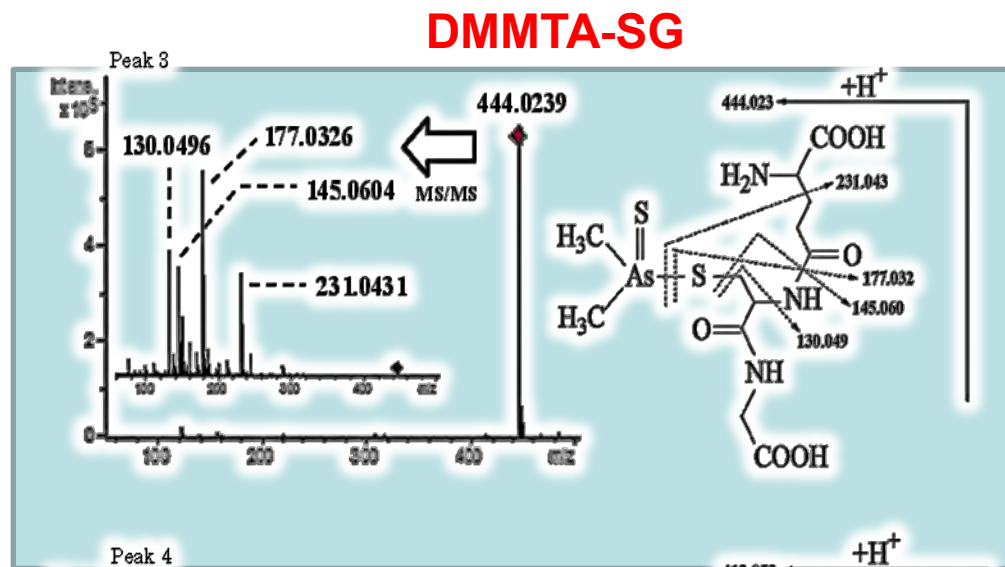
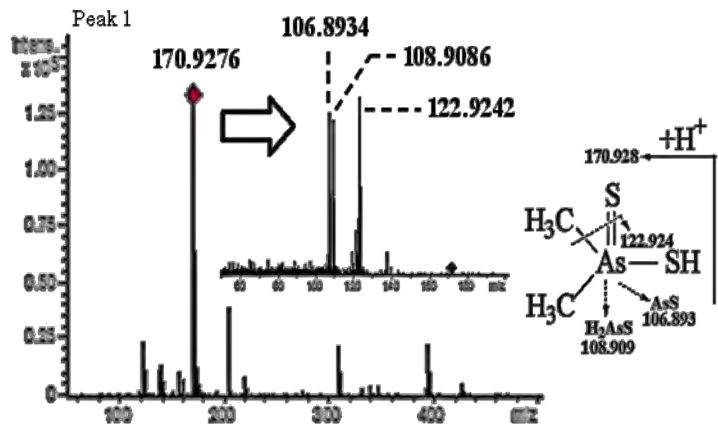
アルセノシュガーから腸内生成するジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA)の生成経路とその毒性の可能性



DMMTAおよびGSHの *in vitro* 反応生成物の HPLCクロマトグラム



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方法を用いた検討

□ 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:

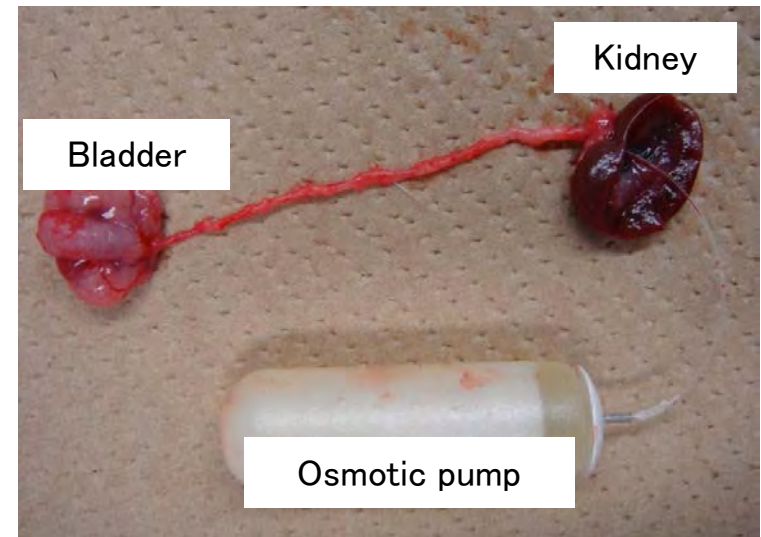
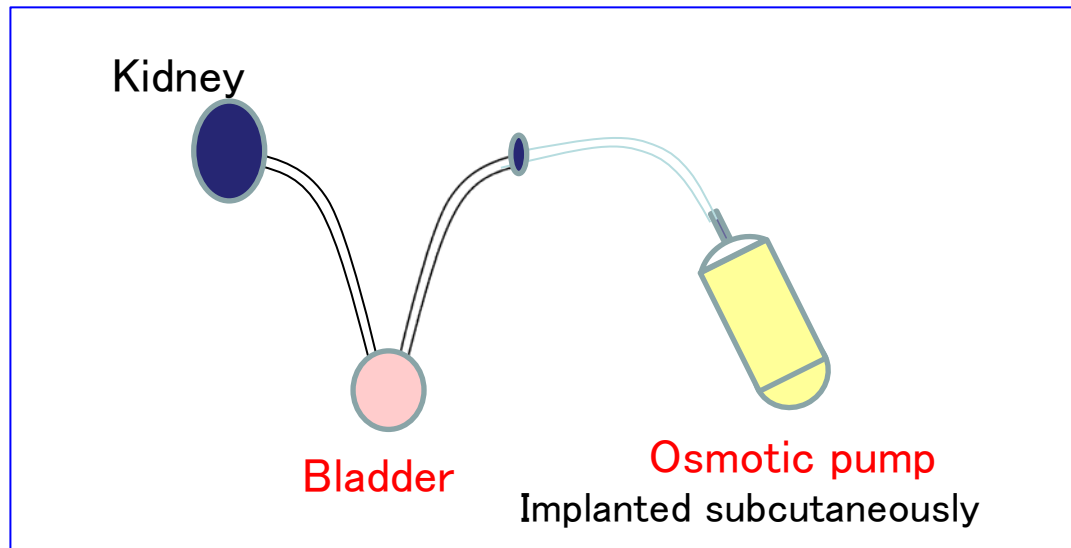
1. 尿中・膀胱粘膜内のヒ素代謝産物の経時的測定
2. DMMTAの膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討(*gpt* assay、*Spi*⁻ assay)
3. 病理学的解析



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

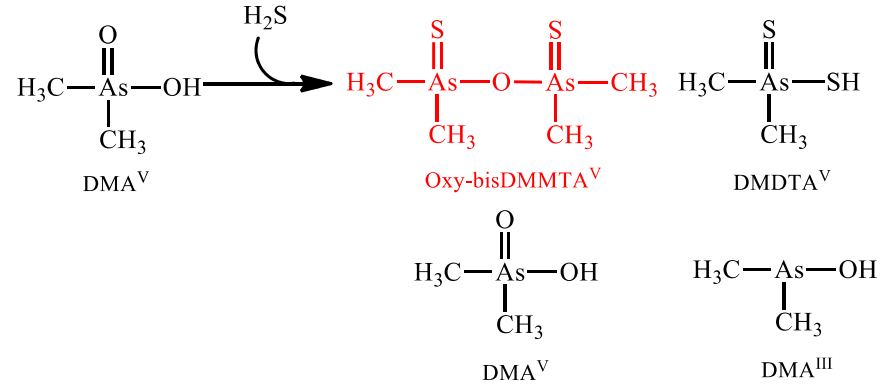
❖ 方法

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.

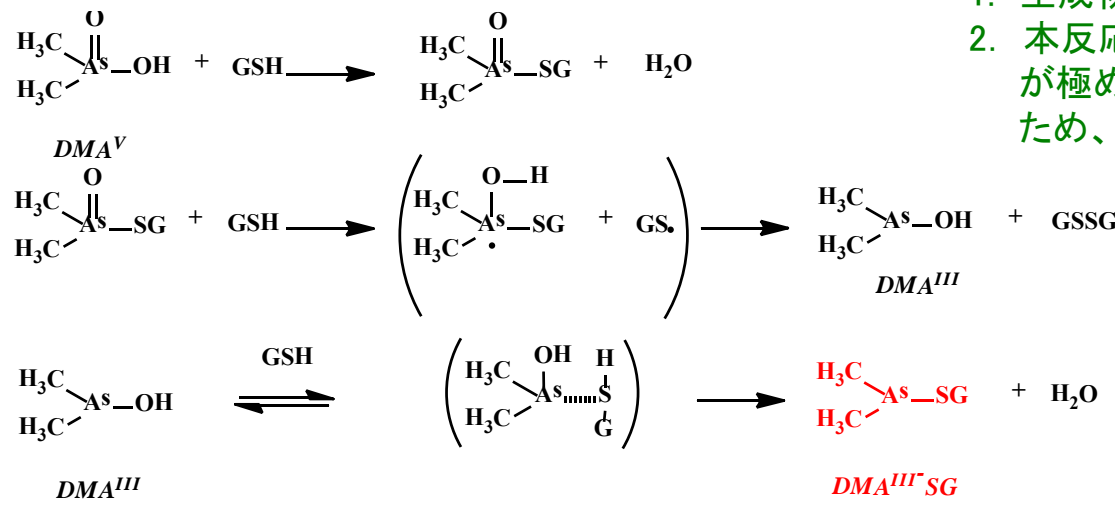


問題点

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っ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/誘導活性を示します
- 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の中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