

## 有機ヒ素化合物の細胞毒性試験の結果について

### 1. 目的

茨城県神栖市や神奈川県平塚市の地下水等からジフェニルアルシン酸 (DPAA) 等の有機ヒ素化合物が検出されているが、あか剤 (くしゃみ剤) 成分そのものであるジフェニルクロロアルシン (DA) やジフェニルシアノアルシン (DC) を含め、関連する有機ヒ素化合物の毒性を同一の試験系により相対的に評価した事例は少ない。

そこで、あか剤に関連する有機ヒ素化合物、無機ヒ素化合物及びその代謝物である有機ヒ素化合物等を用いて細胞毒性試験を実施し、IC50値 (50% Inhibition Concentration: 細胞内脱水素酵素活性の50%阻害濃度) により相対的な毒性評価を試みた。

### 2. 試験概要

ヒ素化合物等によって生じる細胞毒性を評価するため、ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa) に異なる濃度の被験物質を含む培地を加えて24時間培養した後、市販の細胞増殖測定キット (WST-8法) を用いて細胞内脱水素酵素活性を計測した。

WST-8は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性ホルマザンを生成する。生成されるホルマザン量は細胞内脱水素酵素活性に依存し、それらは直線的な比例関係にある。被験物質の毒性によって細胞増殖が抑制された場合、あるいは、細胞死が誘発され細胞数が減少した場合には、ホルマザン生成量が減少する。したがって、このホルマザンの生成量を吸光度 (450nm) により測定することで、対照群に対する相対的な生細胞数を測定することができる。

本試験では、あか剤に関連する有機ヒ素化合物、無機ヒ素化合物及びその代謝物である有機ヒ素化合物等について細胞毒性試験を実施し、測定された吸光度を被験物質濃度の対数についてプロットし、対照群に対して吸光度が50%となる濃度 (IC50値) を算出した。

### 3. 細胞毒性試験結果

細胞毒性試験から得られた阻害曲線より算出したIC50値及びジフェニルアルシン酸 (DPAA) のIC50値を基準とした相対毒性値を表-1に示す。

ヒ素化合物の原子価状態 (三価および五価) で毒性を比較したところ、明らかに五価に比べて三価のヒ素化合物の方が毒性が強い結果であった。

なお、細胞毒性試験における各物質の安定性については、三価の有機ヒ素化合物であるDA、DC、BDPAOおよびPAOは調整液 (DMSO) 中では24時間安定であるが、培地に添加した後は、DAはBDPAOを経てDPAAに、DCはDA・BDPAOを経てDPAAに、BDPAOはDPAAにそれぞれ分解することが確認された。また、PAOについても、培地に添加した後は濃度が低下したことから、速やかにPAAに分解するものと考えられる。

表－1 細胞毒性試験結果

分類	化合物名	化学式	As の価数	IC50 (mg/L)	相対毒性 <sup>1)</sup>
あか剤 及び関連する 有機ヒ素化合物	ジフェニルクロロアルシン (DA)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> AsCl	Ⅲ	0.801	200
	ジフェニルシアノアルシン (DC)	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> AsN	Ⅲ	0.567	280
	ジフェニルアルシン酸 (DPAA)	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> AsO <sub>2</sub>	V	157	1
	フェニルアルソン酸 (PAA)	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> AsO <sub>3</sub>	V	>201	<0.78
	フェニルアルシンオキシド (PAO)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> AsO	Ⅲ	0.0557	2800
	ビス(ジフェニルアルシン)オキシド (BDPAO)	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> As <sub>2</sub> O	Ⅲ	0.707	220
	フェニルメチルアルシン酸 (PMAA)	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> AsO <sub>2</sub>	V	25.2	6.2
	トリフェニルアルシン (TPA)	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> As	Ⅲ	200	0.78
	トリフェニルアルシンオキシド (TPAO)	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> AsO	V	460	0.34
無機ヒ素化合物	亜ヒ酸	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Ⅲ	1.64	96
	亜ヒ酸ナトリウム	NaAsO <sub>2</sub>	Ⅲ	1.68	93
	五酸化二ヒ素(ヒ酸)	As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	V	26.9	5.8
	ヒ酸カルシウム	Ca <sub>3</sub> As <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	V	>42.2	<3.7
	ヒ酸水素二ナトリウム(七水和物)	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	V	83.6	1.9
無機ヒ素化合物 の代謝物である 有機ヒ素化合物	モノメチルアルソン酸 (MMA)	CH <sub>5</sub> AsO <sub>3</sub>	V	886	0.18
	ジメチルアルシン酸 (DMAA)	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> AsO <sub>3</sub>	V	151	1.0
	アルセノベタイン (AsBe)	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> AsO <sub>2</sub>	V	算出されず <sup>2)</sup>	—
かつて飼料添加剤 として使用された 有機ヒ素化合物	p-アルサニル酸	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> AsNO <sub>3</sub>	V	1410	0.11

1) DPAA の IC50 値を 1 としたときの相対値で、有効数字 2 ケタで表示

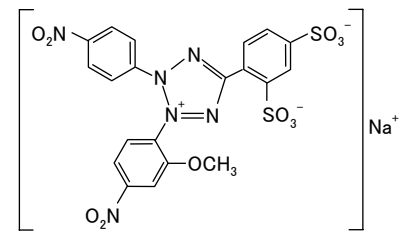
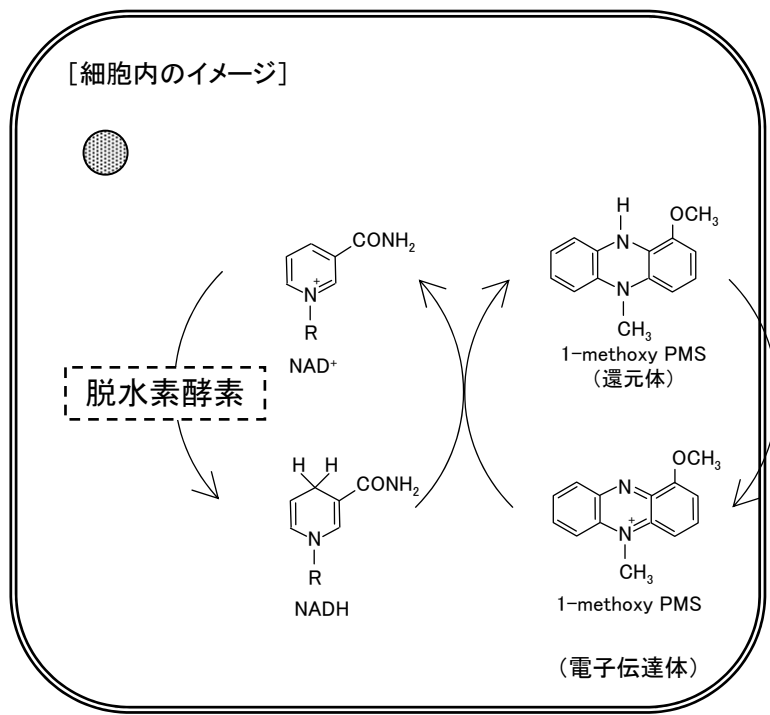
2) 被験物質最大濃度で 20% 以上の細胞内脱水素酵素活性阻害がないため、IC50 が算出されず

3) 別途実施したラットを用いた毒性試験では、DPAA、PAA、PMAA をそれぞれ 28 日間反復経口投与した結果、無影響量 (NOEL) はそれぞれ 0.3mg/kg/day、5.0mg/kg/day、1.2mg/kg/day であった

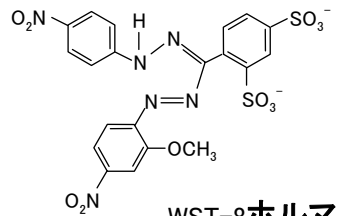
# 細胞毒性試験の原理

## ①細胞活性(生細胞数)の測定

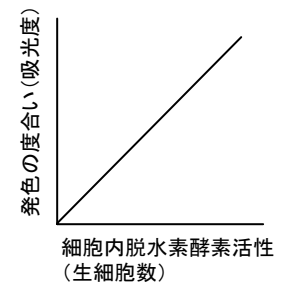
### WST-8法による 細胞内脱水素酵素活性の計測



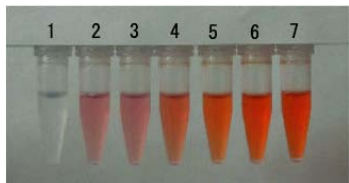
**WST-8 ;**テトラゾリウム塩  
(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)- 5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)



**WST-8ホルマザン**  
(水溶性のホルマザン色素: 橙色に発色)



※ ホルマザン発色例

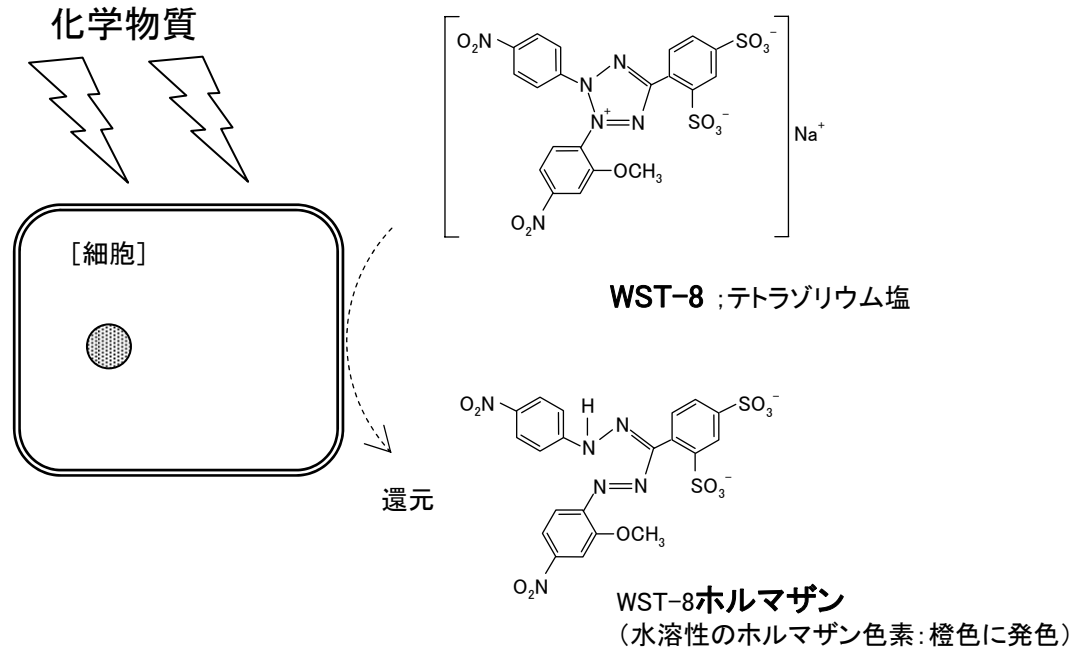


少 ← ホルマザンの量 → 多

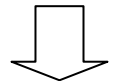
発色の度合い(ホルマザン量)を測定  
= 細胞内脱水素酵素活性を相対的に測定

# 細胞毒性試験の原理

## ②毒性の相対的な測定



- 細胞に化学物質を作用させる
- 変化無し(細胞は元気なまま) -----> ホルマザン量は変わらない
  - 毒性がある(細胞が弱る) -----> ホルマザン量が減少する
  - 毒性が強い(細胞が非常に弱る・死ぬ) ----> ホルマザン量が大幅に減少する

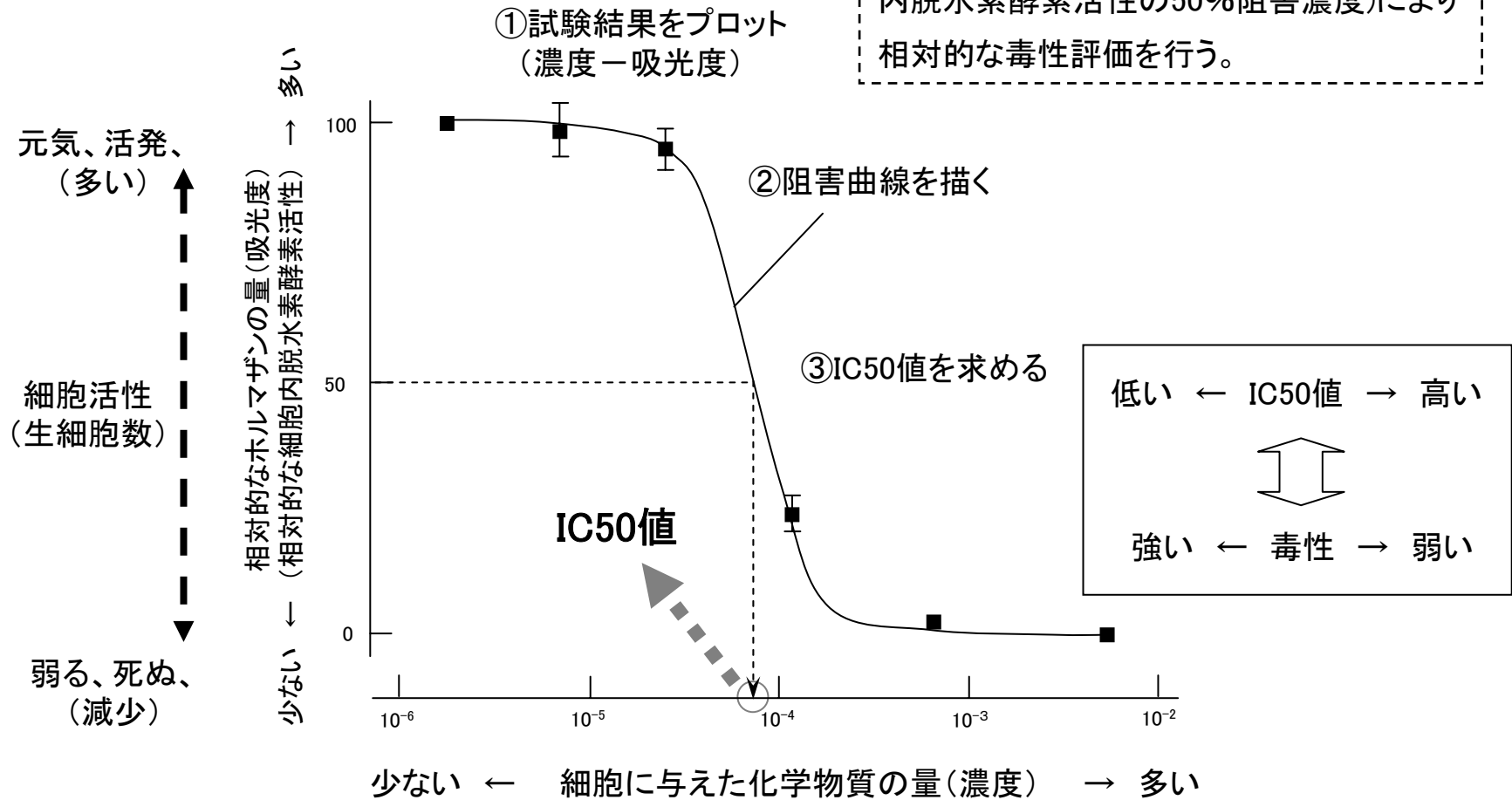


毒性を相対的に評価できる

# 細胞毒性試験の原理

## ③毒性の相対的な評価

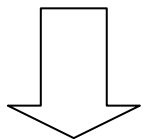
IC50値(50% Inhibition Concentration: 細胞内脱水素酵素活性の50%阻害濃度)により相対的な毒性評価を行う。



# 細胞毒性試験の概要

96穴プレートにHeLa細胞を播種※

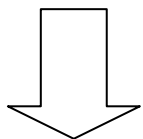
※培地: 10%FBS(牛胎児血清)を  
添加したEMEM培地



24時間培養

被験物質※のばく露

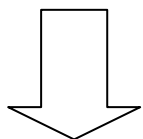
※有機ヒ素化合物  
もしくは無機ヒ素化合物



24時間培養

検出試薬※添加

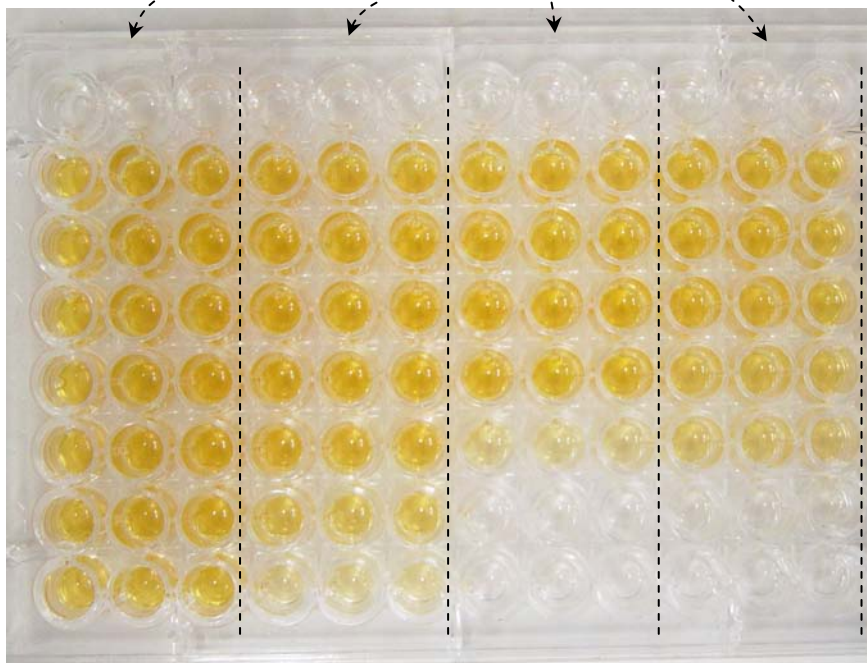
※WST-8および  
1-methoxy PMS



2時間培養

吸光度測定 (450 nm)

ヒ素化合物の種類によって発色状況が変化していることが確認できる



←培地のみ

←添加せず(空白)

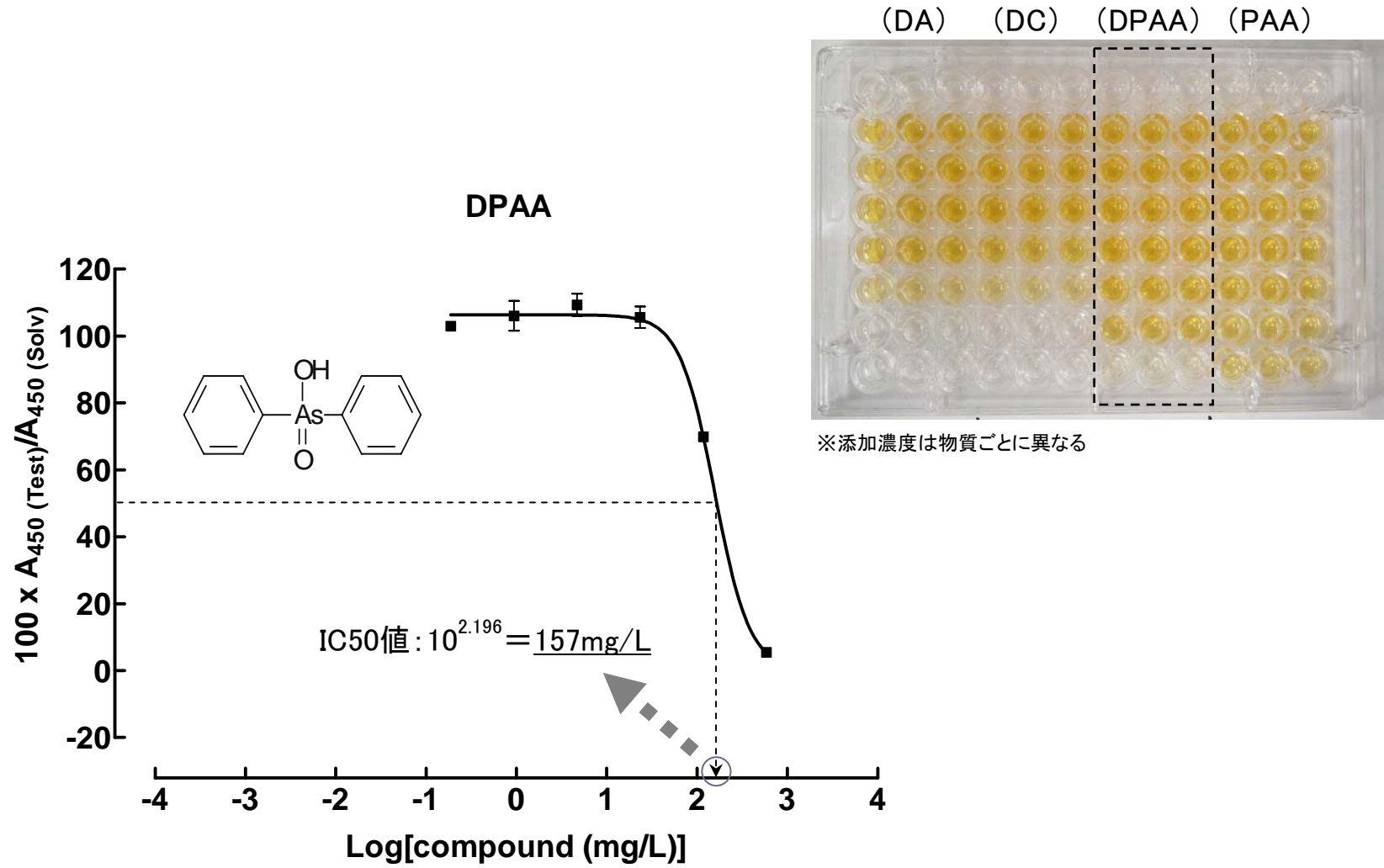
←添加量が少ない  
(低濃度)

(ヒ素化合物の添加量)

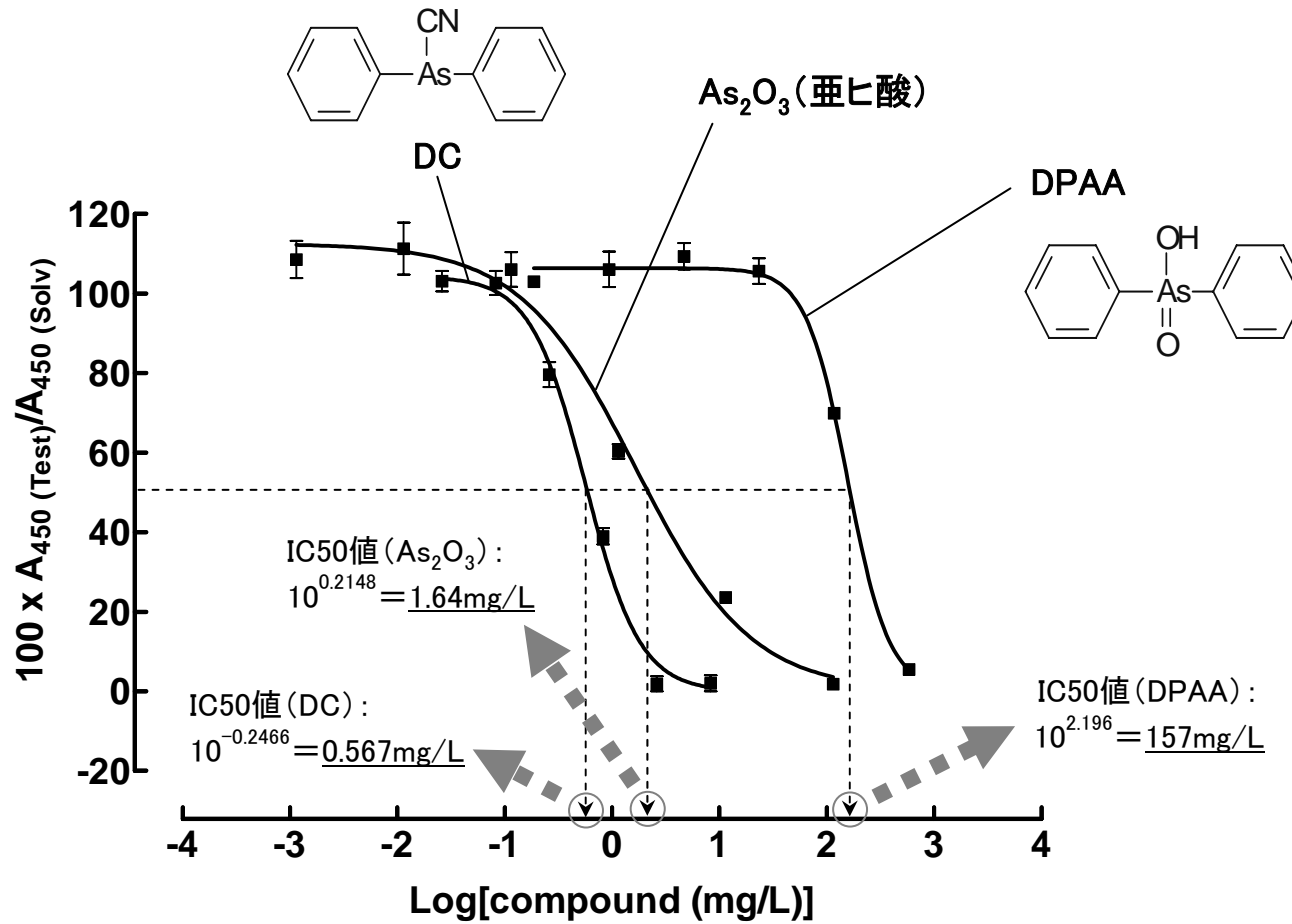
←添加量が多い  
(高濃度)

検出試薬添加2時間後の発色状況

# 試験結果 —DPAAの阻害曲線とIC50値—



# 試験結果 — 阻害曲線とIC50値の比較例 —

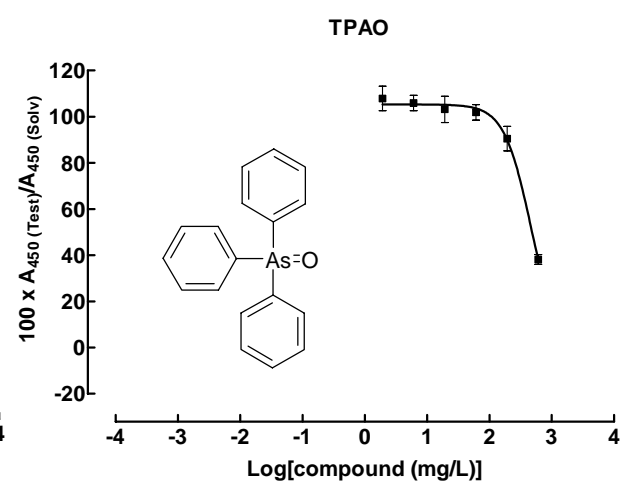
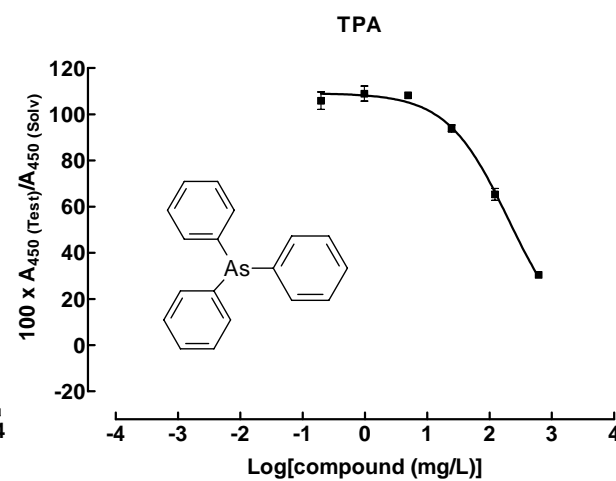
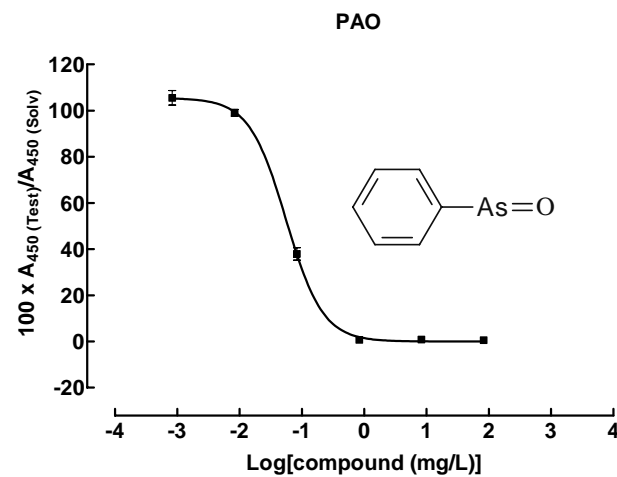
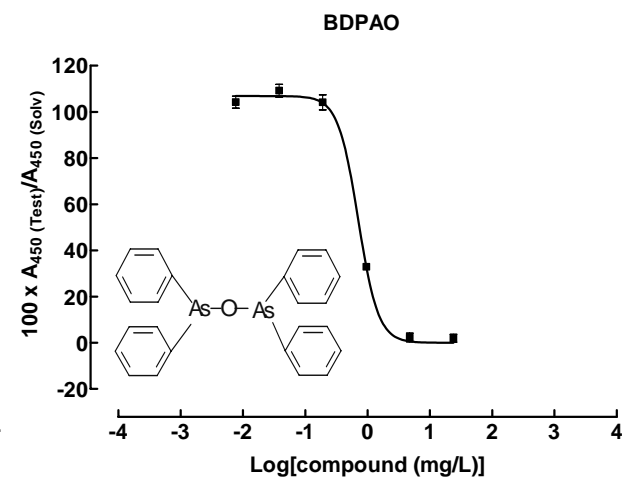
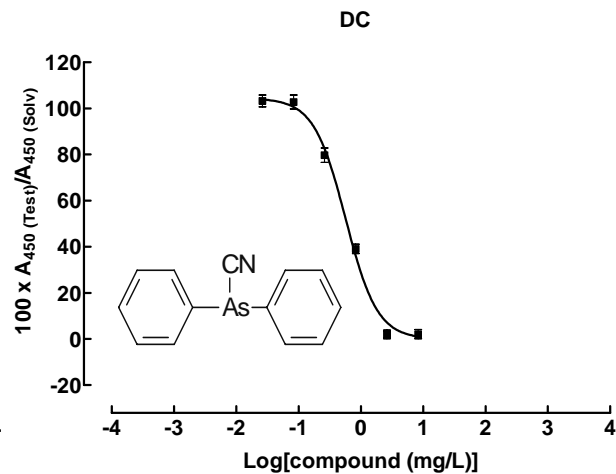
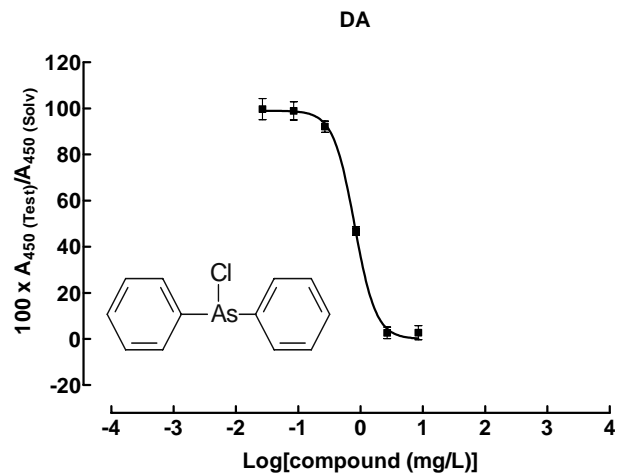


IC50値が低くなる  
← 毒性が強くなる



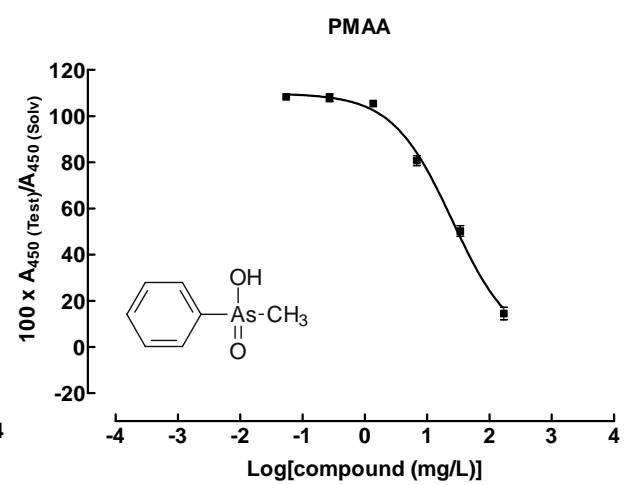
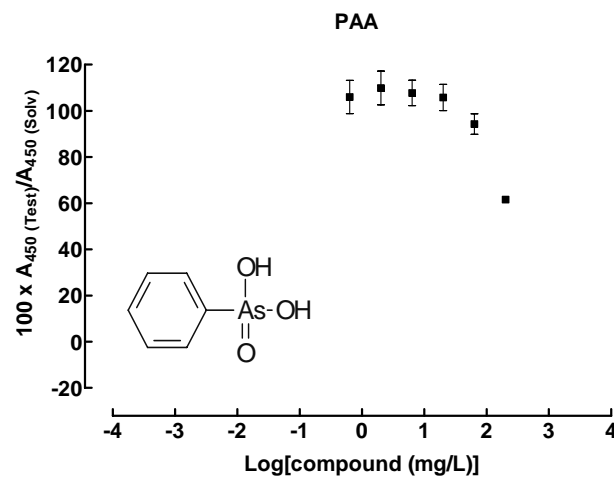
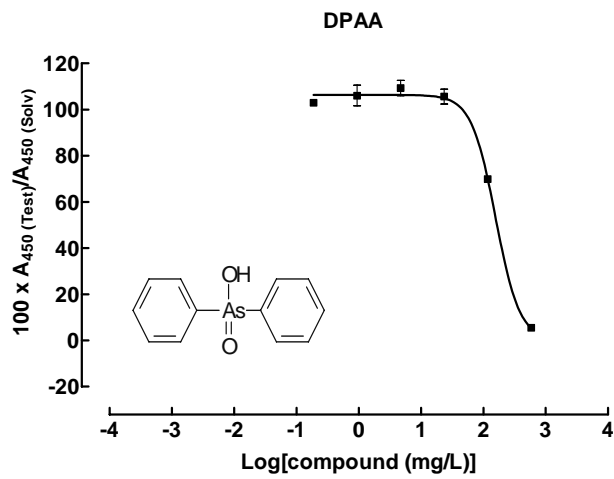
# 試験結果 一阻害曲線一

## あか剤及び関連する有機ヒ素化合物



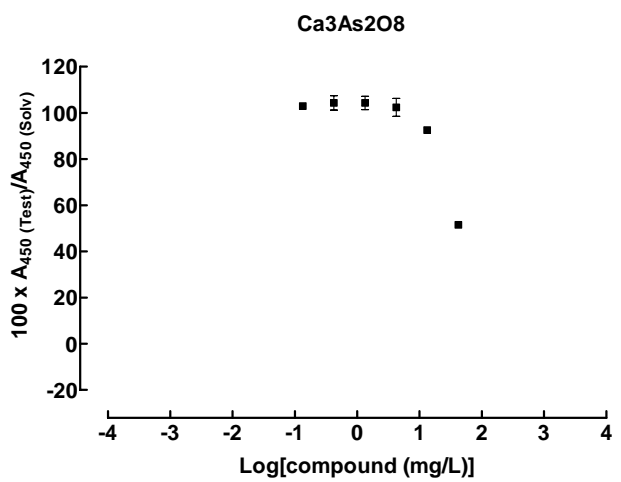
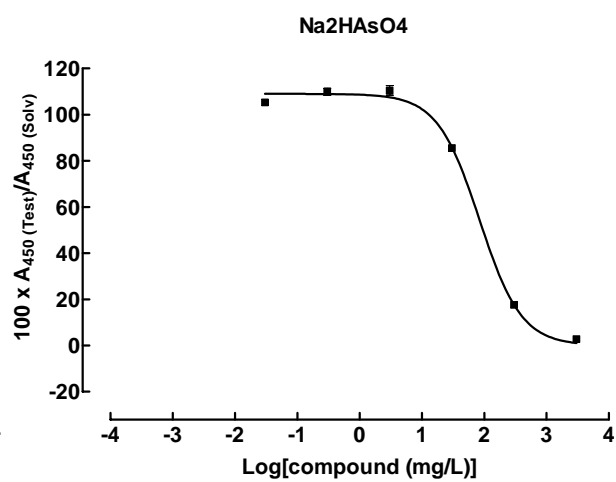
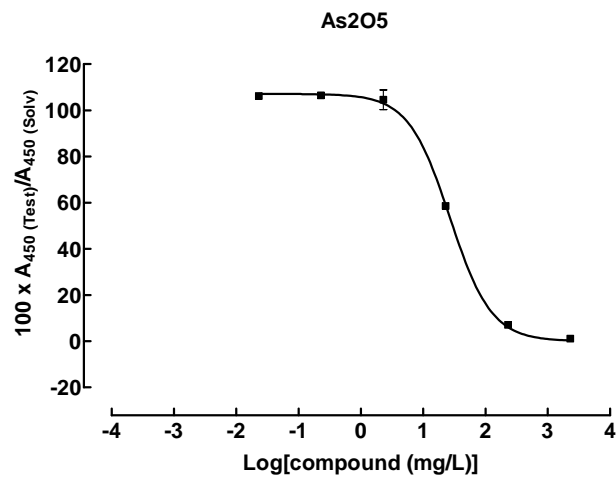
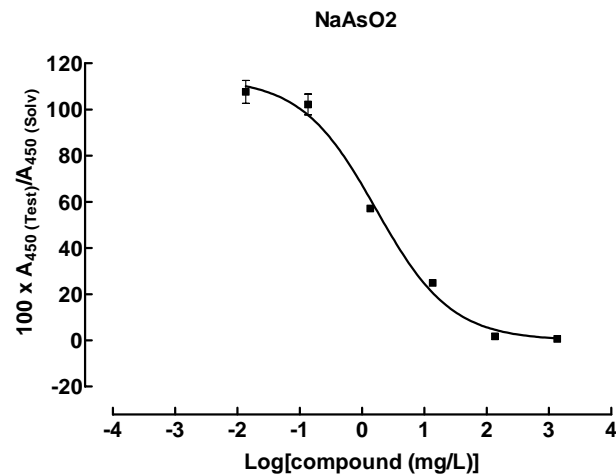
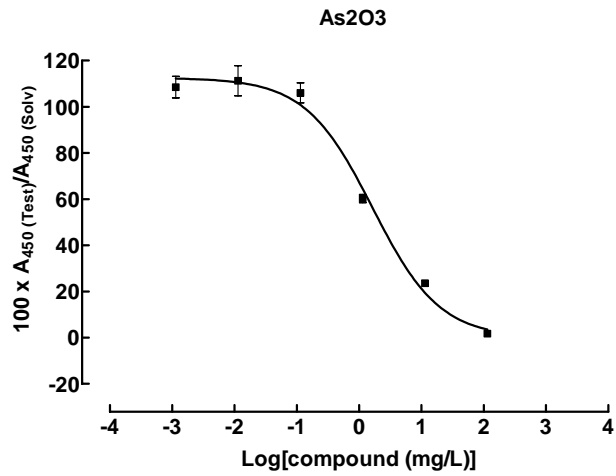
# 試験結果 一阻害曲線一

## あか剤及び関連する有機ヒ素化合物(続き)



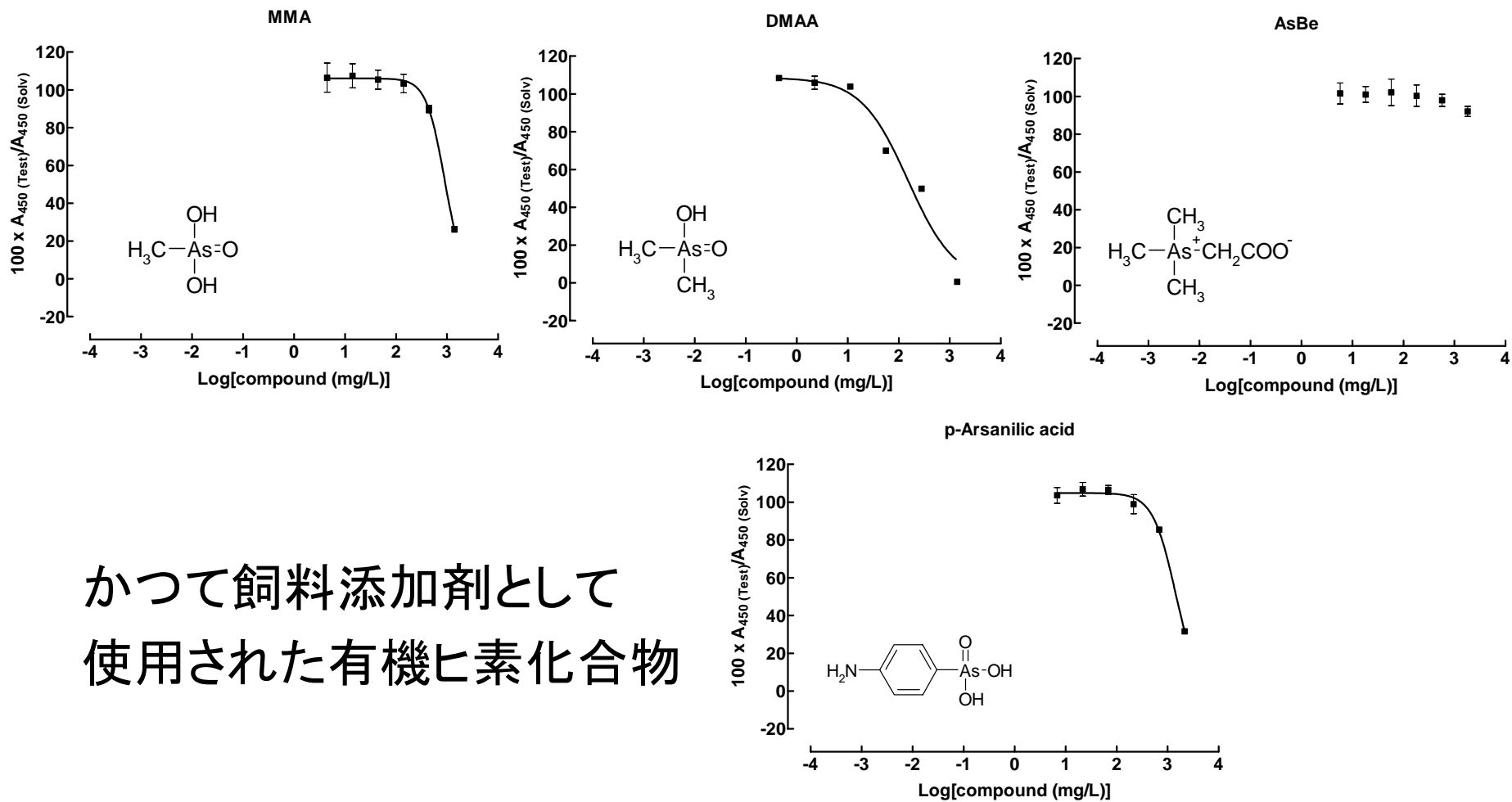
# 試驗結果 — 阻害曲線 —

## 無機砒素化合物



# 試験結果 ー阻害曲線ー

## 無機ヒ素化合物の代謝物である有機ヒ素化合物



かつて飼料添加剤として  
使用された有機ヒ素化合物