

## 4 . 動物実験等による DPAA の毒性

### 4.1 急性毒性

DPAA の急性毒性については、NIOSH( 米国国立労働安全衛生研究所 )の RTECS ( Registry of Toxic Effects of Chemical Substances ) にマウスに単回経口投与したときの半数致死濃度 ( LD<sub>50</sub> ) として 17 mg/kg という値が収録されていたが<sup>12)</sup>、これはロシアの図書を引用したチェコの毒性データ集が出典となっており、同データ集を確認したところ、MoDL = 0.017 g/kg<sup>13)</sup> と記載されていた。MoDL は mouse oral dosis letalis ( マウス経口致死量 ) の略で、マウスに 17 mg/kg を経口投与した時に死亡がみられたということの意味しており、致死率は不明 ( LD<sub>50</sub> は間違い ) であった。なお、これをヒ素換算すると、DPAA の分子量が 262.14、ヒ素の原子量が 74.92 であるため、4.9 mgAs/kg ( = 17 ÷ 262.14 × 74.92 ) となる。

LD<sub>50</sub> に関しては、値のみの報告という論文も多く、毒性の概要を知る上では有用であっても、信頼性の評価が困難な場合が少なくない。このため、信頼性があると思われる WHO ( 2001 ) の EHC 224 に収録された無機ヒ素化合物の LD<sub>50</sub> を表 4-1 に、有機ヒ素化合物の LD<sub>50</sub> を表 4-2 に示す<sup>14)</sup>。

無機ヒ素化合物についてみると、亜ヒ酸 ( 強制経口投与 ) の 20 mg/kg、亜ヒ酸ナトリウムの ( 筋肉内注射 ) の 14 mg/kg が最小レベルの LD<sub>50</sub> であるが、亜ヒ酸では餌に混ぜて投与した場合には約 10 倍、ゼラチンカプセルに入れて投与した場合には約 20 倍大きく、投与方法による差が大きい。

一方、無機ヒ素化合物の代謝産物であるモノメチルアルソン酸 ( MMA ) やジメチルアルシン酸 ( DMAA )、トリメチルアルシンオキサイド ( TMAO )、海藻などに多く含まれるアルセノベタインなどの有機ヒ素化合物の LD<sub>50</sub> は無機ヒ素化合物の値よりも概ね 10 倍以上大きい。MMA では雌ラットの齢、DMA ではラットの性の違いで LD<sub>50</sub> に倍以上の差がみられている。

表 4-1 EHC 224 に収録のあった無機ヒ素化合物の LD<sub>50</sub> ( 急性 )

無機ヒ素化合物	動物種	齢	性	経路	LD <sub>50</sub> (mgAs/kg)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	出典
亜ヒ酸	マウス	幼若	雄	経口	26-39	34.1-52.5	Harrison <i>et al.</i> (1958)
亜ヒ酸	マウス	離乳児	雄	経口	26	34.5	Kaise <i>et al.</i> (1985)
亜ヒ酸	ラット	成体	雄・雌	経口	15	20	Harrison <i>et al.</i> (1958)
亜ヒ酸	ラット	成体	雄・雌	経口 <sup>a</sup>	145	188	Harrison <i>et al.</i> (1958)
亜ヒ酸	ラット	成体	雄・雌	経口 <sup>b</sup>	293	385	Done & Peart (1971)
亜ヒ酸ナトリウム	ラット	成体	雄・雌	経口 <sup>b</sup>	24	42	Done & Peart (1971)
亜ヒ酸ナトリウム	マウス	幼若	雄	筋肉内	8	14	Bencko <i>et al.</i> (1978)
ヒ酸ナトリウム	マウス	幼若	雄	筋肉内	21	87	Bencko <i>et al.</i> (1978)
亜ヒ酸ナトリウム	ラット	幼若	不明	腹腔内	4-5 <sup>c</sup>	9.7-10.9 <sup>c</sup>	Franke & Moxon (1936)
ヒ酸ナトリウム	ラット	幼若	不明	腹腔内	14-18 <sup>c</sup>	34-44 <sup>c</sup>	Franke & Moxon (1936)
ヒ酸カルシウム	ラット	成体	雌	経口	53	298	Gaines (1960)
ヒ酸鉛	ラット	成体	雌	経口	231	1,050	Gaines (1960)
ヒ酸カルシウム	ラット	成体	雌	経皮	> 400	> 2,400	Gaines (1960)
ヒ酸鉛	ラット	成体	雌	経皮	> 500	> 2,400	Gaines (1960)

注： a は餌に混ぜて投与、 b はゼラチンカプセルに入れて投与した試験、 c は LD<sub>75</sub> 値を示す。

経口；強制経口投与 ( a、b 以外 )、筋肉内；筋肉内注射、腹腔内；腹腔内投与、経皮；皮膚塗布

表 4-2 EHC 224 に収録のあった有機ヒ素化合物の LD<sub>50</sub> (急性)

有機ヒ素化合物	動物種	齢	性	経路	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	出典
MMA	ラット	成体	雄	経口	1,101	Gaines & Linder (1986)
MMA	ラット	成体	雌	経口	961	Gaines & Linder (1986)
MMA	ラット	離乳児	雌	経口	> 2,200	Gaines & Linder (1986)
MMA	マウス	離乳児	雄	経口	1,800	Kaise <i>et al.</i> (1989)
DMAA	ラット	成体	雄	経口	1,315	Gaines & Linder (1986)
DMAA	ラット	成体	雌	経口	644	Gaines & Linder (1986)
DMAA	ラット	離乳児	雄	経口	1,433	Gaines & Linder (1986)
DMAA	マウス	離乳児	雄	経口	1,800	Kaise <i>et al.</i> (1989)
TMO	マウス	離乳児	雄	経口	10,600	Kaise <i>et al.</i> (1989)
アルセバチン	マウス	離乳児	雄	経口	>10,000	Kaise <i>et al.</i> (1985)
テトラメチルアルミニウムクワイト*	マウス	離乳児	雄	経口	580	Shiomi <i>et al.</i> (1988b)
テトラメチルアルミニウムイタイト	マウス	離乳児	雄	経口	890	Shiomi <i>et al.</i> (1988b)

DPAA は自然界には通常存在しない有機ヒ素化合物で、そのばく露は DPAA を含む井戸水の飲用にはほぼ限られることから、飲水投与による LD<sub>50</sub> の比較が望まれるが、そのようなデータは得られなかった。

#### 4.2 短～中期毒性

DPAA を反復経口投与した一般毒性試験結果の概要を付録の別表 1 に示す。また、DPAA の関連物質であるモノフェニルアルソン酸 (MPAA) の結果を別表 2 に、フェニルメチルアルシン酸 (PMAA) の結果を別表 3 に示す。

ラットでは 5 mg/kg/day を 28 日間強制経口投与すると雄は 10 匹中 3 匹 (以下、3/10 匹と記載する。このち 1 匹は事故死、1 匹は回復期間 3 日目)、雌は 6/10 匹が死亡したが<sup>3)</sup>、雄マウスでは 5 mg/kg/day を 5 週間強制経口投与しても死亡はなく<sup>15, 16)</sup>、さらにマウスの標準的な飲水量 0.19 L/kg/day<sup>17)</sup> による用量換算値ではあったが、飲水に添加して経口投与した雄マウスでは約 6、19 mg/kg/day の 27 週間経口投与でも死亡はそれぞれ 1/10 匹、3/10 匹と少なかった。

神経系への影響は高用量群のラット<sup>3)</sup>、マウス<sup>15, 16, 18, 19)</sup>、サル<sup>11, 20)</sup> でそれぞれ認められている。しかし、5 mg/kg/day の経口投与でラットには 15 日目から雌雄のほぼ全数で神経学的異常 (振戦) が現れたが<sup>3)</sup>、マウスでの出現は遅く、約 5 週間後になって全数にみられた<sup>15)</sup>。また、2 mg/kg/day の経口投与で雄ラットには 71 日目から神経学的異常 (振戦) が現れ、78 日目以降は約半数でみられるようになったが、雌ラットには神経学的異常の出現はなく<sup>3)</sup>、雌サルでは 2 mg/kg/day の 100 日間の経口投与で 1/2 匹にミオクローヌス様の症状が投与後に複数回みられただけであった<sup>11, 20)</sup>。

また、肝臓への影響については、ラットでは 28 日間経口投与の 5 mg/kg/day 群、91 日間経口投与の 2 mg/kg/day 群、マウスでは 5 週間経口投与の 5 mg/kg/day 群で GOT や GPT、ALP、総ビリルビンなどの肝臓及び胆道系障害を示唆する数値の上昇や肝臓組織の変性がみられている<sup>3, 15)</sup>。しかし、サルでは 2 mg/kg/day の 100 日間の経口投与でもこれらの数値に異常はなかった<sup>11, 20)</sup>。

ラットでは 28 日間経口投与の 1.2、5 mg/kg/day 群、91 日間経口投与の 2 mg/kg/day 群で赤血球数

やヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低下などの貧血傾向がみられた。しかし、28日間投与では血液の酸素運搬能低下を代償する網赤血球数の増加はみられず、骨髄の造血細胞数が減少していたのに対し、91日間投与では網赤血球数は増加したものの骨髄に異常はなく、相反する反応を示していた<sup>3)</sup>。一方、サルでは2 mg/kg/dayの100日間経口投与でも血液への影響はみられていない<sup>11,20)</sup>。

この他、ラットでは28日間経口投与の5 mg/kg/day群、91日間経口投与の2 mg/kg/day群で胸腺への影響が認められ、免疫系への影響を精査するために実施したリンパ球サブセット解析ではDPAAに起因した変化は認められなかった<sup>3)</sup>。

これらのことから、DPAAの主要な標的組織は中枢・末梢神経系、肝臓、血液と考えられたが、DPAAの毒性には種差があり、ラットの感受性が最も高く、血液影響もラットに特異的であることが示唆された。

DPAA投与中止後の回復性については、ラットの28日間経口投与、91日間経口投与の試験で回復期間終了時にはDPAAによって発現した変化のほとんどで、消失、変化の程度や発現の減少がみられ、回復性が認められたことから、回復性は良好と考えられた。ラットの28日間投与では5 mg/kg/day群で14日間の回復期間終了時にも1/2匹に振戦がみられたが、91日間投与の2 mg/kg/day群では2週間内に振戦は消失した<sup>3)</sup>。

DPAAの関連物質であるMPAAの28日間経口投与では、中枢・末梢神経系への影響は最高用量群(15 mg/kg/day)の2/10匹で死亡前日に振戦がみられただけであり、PMAAの28日間経口投与では最高用量群(5 mg/kg/day)でも中枢・末梢神経系への影響はみられなかったが、肝臓への影響がともに最高用量群でみられた。これらの結果から、DPAA及び関連物質の毒性を比較すると、DPAA > PMAA > MPAAの順であった<sup>3)</sup>。

なお、経皮吸収による影響については、1,000 mg/kg/dayという高用量での7日間皮膚塗布で黄色尿や肝臓の腫大などのDPAAによると考えられる毒性作用はみられたが、中枢・末梢神経系への影響は出現しなかった<sup>3)</sup>。

#### 4.3 生殖・発生毒性(次世代への影響)

DPAAの生殖・発生毒性(次世代への影響)試験結果の概要を付録の別表4に示した。

ラットでは外表系や内臓系、骨格系の奇形や変異の発生率に有意な増加はなく<sup>3)</sup>、サル<sup>11)</sup>でも形態異常はみられていないことから、DPAAには催奇形性はないものと考えられた。

生殖能に対する影響については、交尾前14日から交尾期間を経て妊娠7日目まで強制経口投与したラットの3 mg/kg/day群で状態悪化に伴う二次的な交尾率の低下がみられたが、受胎率には影響はなかった。また、初期胚発生への影響として黄体数、着床数及び生存胚数の低下、早期死亡胚数、着床前後ならびに総胚死亡率の増加が認められ、原因として雌雄の状態悪化に伴う変化と雌雄生殖器官への直接的・間接的な影響により生じた変化の可能性が考えられた<sup>3)</sup>。

妊娠期及び授乳期に母体を介してDPAAにばく露された新生児に対する影響については、ラットでは生存率や一般状態、体重、生後形態分化、反射反応性、運動協調機能、学習機能、生殖機能のいずれにも影響はなかった。妊娠7日目から分娩を経て授乳20日目まで強制経口投与したラット

の児 (F<sub>1</sub>) で、生後 4~5 週齢時に実施したオープンフィールド試験における行動検査結果 (立ち上がり数、身繕い数) は雄では最低用量の 0.1 mg/kg/day 群でも有意に低く、雌で差はなかったが、8~9 週齢時に別の児で実施した試験では雄の 0.3、1 mg/kg/day 群、雌の 0.1、0.3 mg/kg/day 群で立ち上がり数が有意に低かった。実験動物におけるオープンフィールド試験の結果の解釈については、各測定指標の意味づけや評価方法も確定的なものとはいえず、F<sub>1</sub> 雌の 8~9 週齢時の結果は用量に依存したものでなかったことから、本試験結果の解釈には十分な留意が必要であると考えられた<sup>3)</sup>。妊娠 50 日目から出産までの約 100 日間に 1 mg/kg/day を強制経口投与してばく露させたサルの児で、生後 30~40 日に実施した神経機能検査 (握力、疼痛反応、聴覚反応、瞳孔反応) に影響はみられなかった<sup>11)</sup>。一方、授乳期間を通して 5 mg/L の濃度で親に飲水投与し、母乳を介して DPAA をばく露させたマウスの児では、7 週齢以降に実施した回転棒試験で 7 日間のトレーニング日数に伴う成績の向上 (回転棒から落下するまでの時間の延長、落下回数の減少) は対照群に比べて劣り、明暗試験法及び高架式十字迷路試験で不安感受性の亢進がみられたと報告されている<sup>19)</sup>。マウスでは母乳を介した DPAA の影響として児の情動性の変化が示唆されているが、ラットでは乳汁を介した DPAA の移行は多くないことから、他の行動試験方法などを組み合わせた総合的な評価が必要と考えられた。

新生児期に DPAA を投与した時の影響については、生後 4 日齢のラットに 28 日間強制経口投与した試験で、0.3、1 mg/kg/day 群の雄の赤血球数が有意に低かったが、赤血球の変化は軽微なもので、正常と考えられる範囲を逸脱するようなものではなく、この時期は赤血球数が急激に増加する時期に当たるが、造血系器官への影響や代償作用による変化もみられなかった。この他には、1 mg/kg/day 群の雌雄で肝臓組織、雌で体重や肝臓重量への影響などがみられたが、中枢・末梢神経系への影響の出現はなく、DPAA は若齢動物に対して特別に強い毒性作用を有するとは考えられなかった<sup>3)</sup>。

#### 4.4 遺伝子傷害性

*in vitro* 試験系では、ネズミチフス菌 (TA100、TA1535、TA98、TA1537)、大腸菌 (WP2*uvrA*/pKM101) の 5 菌株を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化系 (S9 mix) 添加の有無にかかわらず陰性の結果が得られ、DPAA は変異原性を有さないと考えられた<sup>3)</sup>。

チャイニーズハムスター肺細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた染色体異常試験では、S9 mix 添加の有無によらず染色体構造異常を誘発し、染色体構造異常の D<sub>20</sub> 値 (分裂中期細胞の 20% に異常を誘発させるために必要な用量) は短時間処理法の S9 mix 無添加の条件下で 0.93 mg/mL、S9 mix 添加の条件下で 0.92~0.99 mg/mL、連続処理法 24 時間処理で 0.11 mg/mL であった。しかし、数的異常については、短時間処理法 S9 mix 添加の条件下で用量依存性のない誘発がみられたが、その他の条件で数的異常細胞の出現頻度は 5% 未満であった<sup>3)</sup>。また、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞株 (V79 細胞) でも 24、48 時間処理の高濃度域で染色体構造異常を誘発したが、それほど高頻度ではなかった。数的異常については 24 時間処理で誘発されなかったが、48 時間処理では低い頻度で誘発がみられた。なお、有糸分裂指数の上昇を引き起こした条件では、時間及び濃度依存的に

分裂期細胞の中心体異常及びこれらに関連した紡錘体異常の誘発がみられた<sup>21,22)</sup>。

*in vivo* 試験系では、雌雄に DPAA を経口投与して実施した小核試験では、骨髓細胞の小核頻度は対照群と有意差がなく、DPAA は小核誘発性を有さない（陰性）と考えられた<sup>3)</sup>。

#### 4.5 細胞毒性

これまで、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）といったあか剤（くしゃみ剤）成分そのもの、その関連物質の DPAA、MPAA、PMAA などの有機ヒ素化合物に関する情報は限られたものしかなく、これらの毒性について同一の生物種・試験系により同一機関で試験し、相対的に評価した事例は少なかった。このため、あか剤とその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の合計 18 種類のヒ素化合物について毒性試験を行い、それらの毒性を相対的に比較することとした。この場合、ラットなどの実験動物を用いて死亡をエンドポイントにした急性毒性試験の実施も考えられたが、評価の主目的が毒性の相対比較であること、ヒ素の毒性は細胞内のチオール（SH）基との結合による細胞代謝の阻害と考えられることなどから、動物愛護の精神も考慮し、細胞毒性試験により評価を行うこととした。

細胞毒性試験では幾つかの細胞種を候補としたが、再現性や取り扱い性を考慮し、最も多用されている細胞種の一つであるヒト子宮頸癌細胞株（HeLa 細胞）を採用し、異なった濃度でヒ素化合物を含む培地で HeLa 細胞を 24 時間培養した後、細胞内脱水素酵素活性を測定した<sup>23)</sup>。

各ヒ素化合物について、細胞内脱水素酵素活性の阻害曲線より算出した 50% 阻害濃度（IC<sub>50</sub>）及び DPAA の IC<sub>50</sub> を基準とした相対毒性（DPAA の IC<sub>50</sub> / ヒ素化合物の IC<sub>50</sub>）を表 4-3、図 4-1 に示す。

HeLa 細胞では、DPAA の細胞毒性は無機ヒ素化合物の代謝物である有機ヒ素化合物のジメチルアルシン酸（DMAA）とほぼ同じであり、ヒ素化合物の原子価状態（三価及び五価）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。

このように、三価のヒ素化合物の方が DPAA を含む五価のヒ素化合物の細胞毒性よりも高いという結果は、図 4-2 に示したラット心臓微小血管内皮細胞株（RHMVEC 細胞）<sup>24)</sup>、マウス初代肝細胞<sup>25)</sup> を用いた細胞毒性試験でも認められている。RHMVEC 細胞では、HeLa 細胞に比べて一般的に細胞毒性は強く現れていたが、DPAA の細胞毒性は五価の無機ヒ素化合物（ヒ酸ナトリウム）と同程度であり、マウス初代肝細胞では五価と三価の無機ヒ素化合物の間であった。

また、RHMVEC 細胞、マウス初代肝細胞に対する細胞毒性と細胞内ヒ素取り込み量の検討では両者の間に良い相関がみられ、五価に比べて三価のヒ素化合物の細胞毒性が高いのは、三価のヒ素化合物の細胞内への取り込み率が高いことに起因しているものと考えられている<sup>24,25)</sup>。

表 4-3 細胞毒性試験結果 (HeLa 細胞)

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	ジフェニルクロロアルシン(DA)	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> AsCl	三価	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	三価	0.567	280
関連する有機ヒ素化合物	<b>ジフェニルアルシン酸(DPAA)</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>AsO<sub>2</sub></b>	<b>五価</b>	<b>157</b>	<b>1</b>
	モノフェニルアルソン酸(MPAA)	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> AsO <sub>3</sub>	五価	> 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	三価	0.0557	2,800
	ビス(ジフェニルアルシ)オキシド(BDPAO)	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> As <sub>2</sub> O	三価	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>	五価	25.2	6.2
	トリフェニルアルシン(TPA)	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> As	三価	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	五価	460	0.34
無機ヒ素化合物	三酸化二ヒ素(亜ヒ酸)	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	三価	1.64	96
	亜ヒ酸ナトリウム	NaAsO <sub>2</sub>	三価	1.68	93
	五酸化二ヒ素(ヒ酸)	As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	五価	26.9	5.8
	ヒ酸カルシウム	Ca <sub>3</sub> As <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	五価	> 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	五価	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>3</sub> AsO <sub>3</sub>	五価	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>	五価	151	1.0
	アルセノベタイン(AsBe)	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> AsO <sub>2</sub>	五価	- <sup>2)</sup>	- <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>	五価	1,410	0.11

注：1) DPAA の IC50 を 1 としたときの相対値で、有効数字 2 ケタで表示した。

2) 最大濃度でも 20% 以上の細胞内脱水素酵素活性阻害がないため、IC50 が算出されなかった。

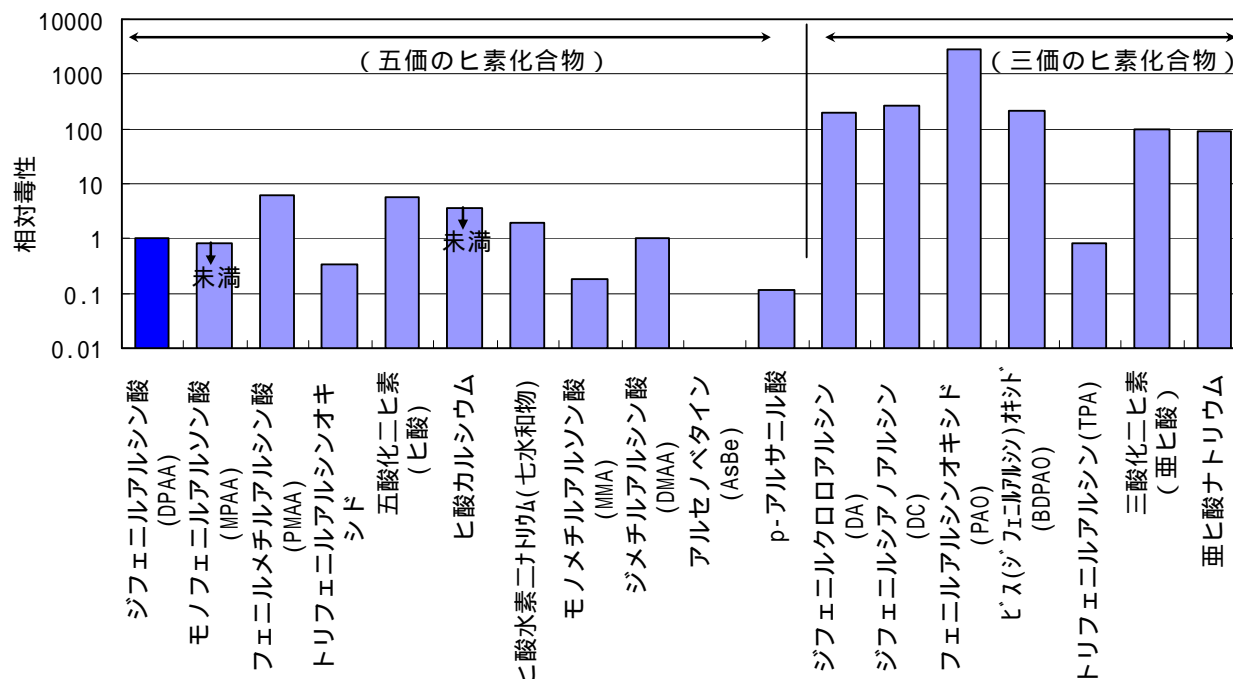


図 4-1 ヒ素化合物の HeLa 細胞に対する相対毒性 (DPAA の細胞毒性に対する相対値)

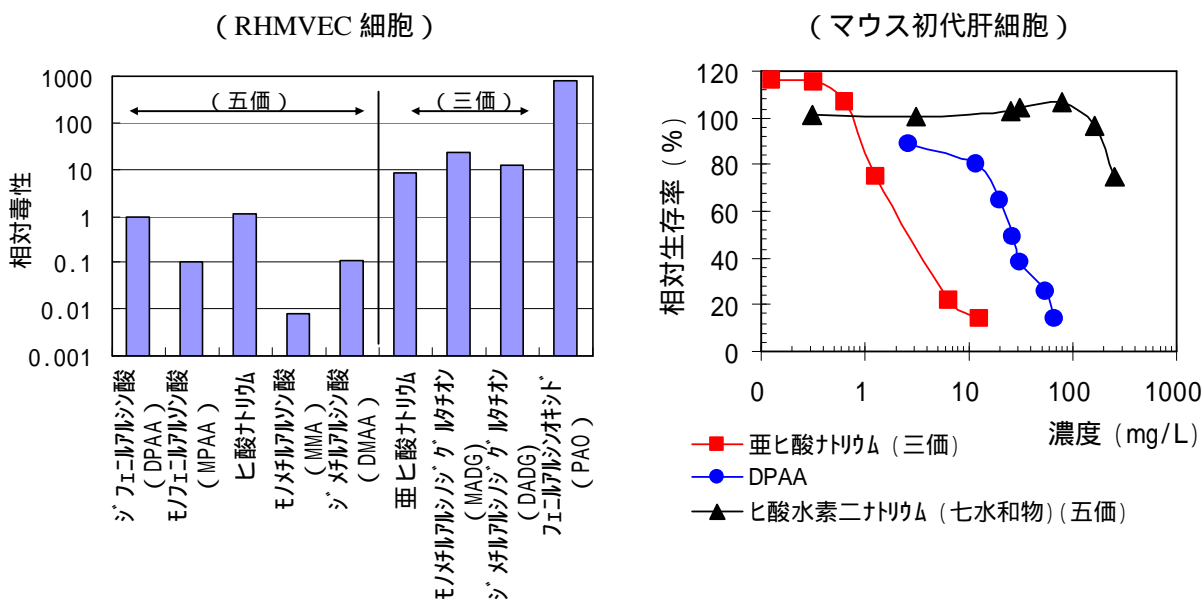


図 4-2 RHMVEC 細胞及びマウス初代肝細胞に対するヒ素化合物の相対毒性

無機ヒ素化合物の主要な尿中代謝物はモノメチルアルシニン酸 (MAA)、ジメチルアルシニン酸 (DMAA) であるが、ヒ素とグルタチオンの複合体が胆汁中に排泄されることがラットで認められており<sup>26, 27, 28, 29, 30, 31, 32</sup>、三価に還元されたヒ素とグルタチオンの複合体を中間代謝物とした代謝経路が新しく推定されている<sup>31</sup>。グルタチオンとは、生体内の酸化還元反応に関与するとともに、有害化学物質とグルタチオン抱合を形成して細胞外に排出する解毒作用にも関与する物質で、細胞外にも存在するが、細胞内には 100~1,000 倍高濃度で含まれている。

ヒトの肝癌細胞株 (HepG2 細胞) を用いた試験では、細胞内グルタチオン (GSH) の枯渇処理は DPAA や DMAA の細胞毒性を低下させ、三価の無機ヒ素の細胞毒性を増強したが、培養液への GSH 添加は無機ヒ素の細胞毒性を低下させ、DPAA の細胞毒性を増強し、GSH が DPAA の細胞毒性を修飾することが示唆された<sup>21, 22</sup>。このため、DPAA とグルタチオンの複合体 (DPA-GS; ヒ素は三価) を合成して細胞毒性を検討した結果、DPA-GS の細胞毒性は DPAA の約 1,000 倍高く、細胞内 GSH の枯渇処理で増強され、培養液への GSH 添加で低下した<sup>33, 34, 35</sup>。DPA-GS の細胞内への取り込みは DPAA に比べて早く、また量も約 10 倍多く、GSH の添加で取り込みは顕著に抑制され、枯渇処理で増加した。一方、DPAA の細胞内取り込み量は GSH の枯渇処理や添加の影響を受けなかったことから、GSH による DPAA の細胞毒性の変化は DPAA の細胞内取り込み量が変化したことによるものではなかった。培養液中の DPA-GS は GSH 存在下では比較的安定であるが、非存在下では不安定で急速に分解されるため、DPA-GS の分解によって生じた毒性・細胞透過性の高い不安定な中間体が細胞毒性の原因物質ではないかと考えられている<sup>34, 36</sup>。

また、DPAA をばく露した HepG2 細胞のタンパク質を網羅的に解析した結果、唯一発現の低下したタンパク質は興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の供給に関わる重要な酵素であるグルタミナーゼ (GAC) であり、その発現量は濃度、時間に依存して低下し、グルタミン酸産生における

主要酵素と考えられているリン酸活性化型グルタミナーゼ（PAG）の活性低下を伴っていた。GACの低下はヒトの子宮頸癌細胞株（HeLa）や神経芽細胞腫株（SH-SY5Y）でもみられたが、三価の無機ヒ素やジメチルヒ素化合物ではGACの発現に有意な変化はなかったことから、DPAAによるGACの選択的阻害がDPAAの脳神経系への影響に関連している可能性が示唆されている<sup>37,38)</sup>。

一方、DPAA 15 mg/kg を単回又は 5 mg/kg/day を 5 週間強制経口投与した ICR マウスの脳で唯一みられた組織病理学的変化は小脳のプルキンエ細胞を主とした核濃縮で、ニトロ化ストレス及び酸化ストレスに対する陽性反応を示したプルキンエ細胞の頻度は大きく増加していた。また、2.5 ~ 15 mg/kg を単回投与した 24 時間後の酸化ストレスは小脳で用量に依存して有意に増加したが、大脳などの他の組織での増加はなく、小脳では活性酸素種を消去するグルタチオンペルオキシダーゼ活性の有意な上昇もみられた。これらの結果と三価のジフェニルヒ素化合物やジメチルヒ素化合物を用いた *in vitro* 試験の結果から、DPAA が還元されてできた三価のジフェニルヒ素化合物が小脳で酸素分子の存在下に小脳皮質に豊富にある一酸化窒素と反応してニトロ化ストレスを誘発する活性種を生じるメカニズムが示唆され、酸化性ストレスについてもこの活性種に起因する可能性が考えられた。一酸化窒素は小脳の神経調節と血液循環に関係する重要な細胞内及び細胞間の分子メッセンジャーであるため、DPAA による小脳の機能障害は酸化ストレス及びニトロ化ストレスによるプルキンエ細胞の損傷やプルキンエ細胞内の一酸化窒素濃度の低下にもとづくものと考えられ、一酸化窒素濃度の低下にともなう小脳の血流量低下も合理的に説明できるとされている<sup>16)</sup>。

#### 4.6 長期毒性

DPAA を長期間投与した動物実験の情報は得られなかった。

環境省では今後、ラットを用いた長期毒性試験を実施する予定である。