

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（LD₅₀）として 17 mg/kg という値が収録されていたが²⁸⁾、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/kg²⁹⁾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（LD₅₀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。

LD₅₀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 LD₅₀を表 4-1 に、有機ヒ素化合物の LD₅₀を表 4-2 に示す³⁰⁾。

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 LD₅₀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）、海産物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 LD₅₀は無機ヒ素化合物の値よりも概ね 10 倍以上大きいが、MMA では雌ラットの齢、DMA ではラットの性の違いで LD₅₀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 LD₅₀（急性）

無機ヒ素化合物	動物種	齢	性	経路	LD ₅₀ (mgAs/kg)	LD ₅₀ (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 ^a	145	188	Harrison <i>et al.</i> (1958)
亜ヒ酸	ラット	成体	雄・雌	経口 ^b	293	385	Done & Peart (1971)
亜ヒ酸ナトリウム	ラット	成体	雄・雌	経口 ^b	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 ^c	9.7-10.9 ^c	Franke & Moxon (1936)
ヒ酸ナトリウム	ラット	幼若	不明	腹腔内	14-18 ^c	34-44 ^c	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 LD₇₅ 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 LD₅₀ (急性)

有機ヒ素化合物	動物種	齢	性	経路	LD ₅₀ (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)
テトラメチルアルソニウムクロライド	マウス	離乳児	雄	経口	580	Shiomi <i>et al.</i> (1988b)
テトラメチルアルソニウムイodate	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あり、そのばく露は DPAA を含む井戸水の飲用にほぼ限られることから、飲水投与による LD₅₀ 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 を反復投与した一般毒性試験（短～中期毒性）結果の概要を付録の別表 1 に示した。

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 に示した。

ラットでは DPAA 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⁴⁾、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^{31,32)}、50 ppm の濃度で飲水に添加して雌雄各 10 匹のマウスに 28 日間投与（飲水投与。雄 8.7 mg/kg/day、雌 9.9 mg/kg/day）した試験では雌 1 匹の死亡であった³³⁾。

神経系への影響（行動の変化を含む）は高用量を投与した群のラット^{4,34-36)}、マウス^{31,32,37-39)}、カニクイザル^{22,40)}で報告されている。しかし、5 mg/kg/day の経口投与でラットには 10～15 日でほぼ全数に神経学的異常（振戦）が現れたが^{4,34)}、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るようになった³¹⁾。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⁴⁾、雄ラットへの飲水投与（1.8 mg/kg/day）では 21 週間の投与でも振戦などの神経症状はみられなかった⁴¹⁾。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り^{22,40)}、妊娠 50 日の雌サルに 1 mg/kg/day を約 100 日間経口投与した試験²²⁾、雌雄のサルに 1 mg/kg/day を 28 日間経口投与した試験¹⁶⁾では行動の変化や神経症状はなかった。

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 28 日間飲水投与の 5.3 mg/kg/day 以上の群、5 週間経口投与の 5 mg/kg/day 群で重量の増加、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、肝臓組織の変性がみられている^{4,31,33}。サルでは 2 mg/kg/day の 100 日間の経口投与でもこれらの酵素活性の数値に異常はなかったが^{22,40}、1 mg/kg/day を 28 日間経口投与した雌雄のサルでは組織の変性（胆管増生、グリソン鞘の炎症性細胞浸潤）がみられた⁴²。

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⁴。マウスでは 28 日間飲水投与の雌の 9.9 mg/kg/day 群で貧血傾向がみられたが、雌の 5.3 mg/kg/day 群や雄の 8.7 mg/kg/day 群には血液への影響はなかった³³。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^{22,40}。

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みられたが、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⁴。

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、行動の変化や神経症状の出現はなく、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⁴。

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、肝臓及び胆道系、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かった。

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⁴。

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⁴。

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⁴⁾。

4.3 長期毒性

DPAA を反復投与した一般毒性試験（長期毒性）結果の概要を付録の別表 4 に示した。

雌雄のラットに 0、5、10、20 ppm の濃度で DPAA を 1 年間飲水投与した試験では、飲水量から求めた投与量は雄で 0、0.26、0.48、0.95 mg/kg/day、雌で 0、0.35、0.70、1.35 mg/kg/day であり、いずれの群にも一般状態への影響はなく、神経症状は出現しなかった。20 ppm 群の雌で肝臓及び脾臓の重量増加、ALP、 γ -GTP の上昇に有意差を認め、雌雄の全数で総胆管の拡張や上皮過形成、開口部の狭窄がみられた。なお、20 ppm 群でみられた雄の血小板増加、雌のヘマトクリット値減少は有意差のある変化であったが、どちらにも用量相関性がなく、変動も軽微なため、毒性学的意義は乏しいと考えられた^{43,44)}。

また、雌雄のラットに 0、5、10、20 ppm の濃度で DPAA を 2 年間飲水投与した試験では、飲水量から求めた投与量は雄で 0、0.23、0.45、0.91 mg/kg/day、雌で 0、0.32、0.65、1.3 mg/kg/day であり、いずれの群にも神経症状の出現はなかったが、20 ppm 群の雌で黄疸がみられ、同群の雌で生存率、雌雄で最終体重は有意に低かった。肝臓の絶対重量及び相対重量は雄の 10 ppm 以上の群及び雌の 20 ppm 群で有意に増加した。死亡又は瀕死となって屠殺した 20 ppm 群の雌 33/51 匹で総胆管開口部の狭窄とそれによる総胆管の拡張、肝内胆管の増生がみられ、79 週までに死亡又は瀕死となって屠殺した 20 ppm 群の雄 4 匹中の 3 匹でも総胆管の拡張がみられた^{43,45)}。

雌雄のマウスに 0、6.25、12.5、25 ppm の濃度で DPAA を 52 週間飲水投与した試験では、飲水量から求めた投与量は雄で 0、0.75、1.57、3.17 mg/kg/day、雌で 0、1.05、2.74、4.79 mg/kg/day であり、いずれの群にも一般状態への影響はなく、神経症状の出現はなかった。25 ppm 群の雄で腎臓の絶対重量及び相対重量の有意な増加、雌（8/10 匹）で胆管増生を認めた。雌ではこの他にも 12.5 ppm 群の 1/10 匹、25 ppm 群の 4/10 匹で慢性胆管炎、12.5 ppm 群の 2/10 匹で胆管増生、25 ppm 群の 2/10 匹で多発性肝細胞壊死がみられたが、いずれも有意差のある変化ではなかった⁴⁶⁾。

また、雌雄のマウスに 0、6.25、12.5、25 ppm の濃度で DPAA を 78 週間（1.5 年間）飲水投与した試験では、飲水量から求めた投与量は雄で 0、0.69、1.46、3.03 mg/kg/day、雌で 0、1.09、2.49、5.43 mg/kg/day であり、いずれの群にも一般状態への影響はなく、神経症状の出現はなかった。25 ppm 群の雌雄で体重増加の有意な抑制、雌で生存率の有意な低下がみられ、12.5 ppm 群の雌でも体重増加の有意な抑制がみられた。なお、生存率の低下は過度の毛繕いによる皮膚炎、飲水量の増加に伴う DPAA 摂取量の増加などが原因と考えられた⁴⁷⁾。妊娠 8 日から出産、授乳期まで 0、25 ppm の濃度で DPAA を飲水投与し、離乳後は母マウスと同様に 84 週齢まで飲水投与した結果、25 ppm 群の雌雄で体重増加の有意な抑制、雄で精巣相対重量の有意な増加がみられた⁴⁸⁻⁵⁰⁾。

このように、短～中期間の DPAA 投与（1.2～9.9 mg/kg/day）でラットやマウスにみられた血液（貧血）、神経系、肝臓及び胆道系への影響のうち、長期間の DPAA 投与（0.66～4.79 mg/kg/day）で認めた影響は肝臓及び胆道系への影響だけであった。

4.4 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 5 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⁴⁾、サルでも形態異常はみられていないことから²²⁾、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、3 mg/kg/day 群では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みられたが、原因として雌雄の状態悪化に伴う変化と雌雄生殖器への直接的・間接的な影響により生じた変化の可能性が考えられた⁴⁾。

雌マウスに 0、12.5、25 ppm の濃度で DPAA を妊娠 8 日から妊娠 18 日まで飲水投与した結果、出産率、産児数、離乳率に影響はなく、肉眼的観察において明らかな先天性異常所見もなかった⁴⁸⁾。

出産後の母ラットに 0、20 ppm の濃度で DPAA を飲水投与し、母乳を介して生後 1 日から 21 日（離乳）まで DPAA をばく露し、離乳後は母ラットと同様に 12 週齢まで飲水投与した DD 群、6 週齢まで DPAA を飲水投与した後に水道水を 6 週間投与した DC 群、水道水を 6 週齢まで飲水投与した後に DPAA を 6 週間飲水投与した CD 群、水道水を 12 週齢まで投与した CC 群を設定して 6 週齢時、12 週齢時に 2 種類の行動試験を実施した試験では、DPAA の摂取量は授乳期の母ラットで 5.6 mg/kg/day、4~6 週齢の児で 3.1 mg/kg/day、6~12 週齢の児で 2.1~2.2 mg/kg/day であった。その結果、児には DPAA 投与による体重増加の抑制がみられ、オープンフィールド試験では 6 週齢の DC 群及び DD 群、12 週齢の CD 群、DD 群で総移動距離、中央領域への進入回数が有意に増加した。受動的回避学習試験では 6 週齢の DC 群、DD 群、12 週齢の CD 群、DC 群、DD 群で電気刺激のある暗室に入るまでの時間が有意に短かったことから、6 週間の回復期間があった DC 群ではオープンフィールド試験の成績に回復がみられたものの、受動的回避学習試験の成績には回復はみられなかった^{51, 52)}。

また、5 ppm の濃度で DPAA を飲水投与した母マウスの母乳を介して授乳期に DPAA をばく露したマウスの児では、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³⁷⁾。

一方、雌ラットの妊娠期及び授乳期に 0~1 mg/kg/day を強制経口投与し、母体を介して DPAA をばく露した新生児に対する影響については、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 (F₁) を用いて生後 4~5 週齢時に実施したオープンフィールド試験では、測定項目（行動潜時、区画移動数、立ち上がり回数、身繕い又は洗顔回数、脱糞数、排尿回数）のうち、雄では最低用量の 0.1 mg/kg/day 群を含めた全ての投与群で立ち上がり回数と身繕い又は洗顔回数が有意に減少したが、雌では最高用量の 1 mg/kg/day 群を含めた全ての投与群でいずれの項目にも有意な影響はなかった。しかし、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 群で立ち上がり回数が有意に減少した。このため、

妊娠 7 日目から 0、0.01、0.03、0.1 mg/kg/day を同様に経口投与したラットの児で 4、8 週齢にオープンフィールド試験を実施して再検討した結果、4 週齢の試験時に 0.1 mg/kg/day 群の雌で立ち上がり回数が有意に減少した以外には、いずれの群の検査項目にも有意な差はなく、初回の試験時に 0.1 mg/kg/day 群でみられた 4 週齢時の変化は雌雄が逆転し、8 週齢の変化には再現性がなかった。オープンフィールド試験は、神経毒性・発達神経毒性の評価において、活動性や探索行動を測定する試験としてしばしば用いられるものの、スクリーニング試験として位置付けられるものであり、各測定項目の意味付けは困難であるが、0.03 mg/kg/day では同試験で通常使用されるいずれの測定項目にも影響のないことが確認された⁴⁾。

また、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²²⁾。

なお、行動試験の報告例は多いが、その成績は一般状態の悪化など、種々の影響も受けた可能性があり、試験結果のヒトへの外挿は困難であることに留意が必要である。

4.5 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⁴⁾。

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 D₂₀ 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⁴⁾。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^{53, 54)}。

in vivo 試験系では、ラットの雌雄に DPAA を経口投与して実施した小核試験では、骨髄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⁴⁾。

4.6 発がん性

DPAA を反復投与した発がん性試験結果の概要を付録の別表 6 に示した。

雌雄のラットに 0、5、10、20 ppm の濃度で DPAA を 2 年間飲水投与した結果、腫瘍の発生率に有意な増加はなかった⁴⁵⁾。また、雌雄のマウスに 0、6.25、12.5、25 ppm の濃度で DPAA を 1.5 年間飲水投与した結果、腫瘍の発生率に有意な増加はなかった⁴⁷⁾。このため、慢性ばく露による発が

ん性試験の結果から、DPAA にはラット及びマウスに対して発がん性はないと判断された^{45,47)}。

一方、妊娠期の CD1 マウスに無機ヒ素を経口投与すると、成熟した児の雄で肝臓、肺、副腎、雌で卵巣、子宮、副腎の腫瘍が有意に発生することが報告されている^{55,56)}。さらに妊娠前から妊娠期、授乳期を通して経口投与し、離乳後も母マウスと同様に児に投与を続けると雄では胆嚢、雌では肝臓でも腫瘍の発生率に有意な増加がみられるようになり、雌では胎児期のみならず露に比べて、肺腺癌が約 3 倍、肝細胞癌が約 6 倍、子宮腺癌が約 3.5 倍増加したと報告されている⁵⁷⁾。

このため、CD1 マウスの雌に 0、12.5、25 ppm の濃度で DPAA を妊娠 8 日から妊娠 18 日まで飲水投与し、得られた児を 84 週齢まで飼育する経胎盤ばく露群、25 ppm を妊娠 8 日から出産、授乳期を通して投与し、離乳後は母マウスと同様に 84 週齢まで飲水投与した一生涯ばく露群を設定して腫瘍の発生状況を試験した。

その結果、一生涯ばく露群の雌雄及び経胎盤ばく露群の雌では腫瘍の発生率に有意な増加はなかった。経胎盤ばく露群の雄では肝細胞腺腫の発生率に有意な増加はなかったが、25 ppm 群で肝細胞癌の発生率に有意な増加がみられ、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生率は 12.5 ppm 以上の群で有意に増加したものの、その発生率には用量依存性がみられず、自然発生の範囲内であった。このため、経胎盤ばく露の雄に着目し、6.25 ppm を追加し 1 群の匹数を約 2 倍に増やして再試験したところ、6.25 ppm 群、12.5 ppm 群では腫瘍の発生率に有意な増加はなかったが、25 ppm 群で肝細胞腺腫の発生率が有意に増加し、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生率も有意に高くなったものの、この再試験での発生率は、初回試験における発生率と大差なく、自然発生の範囲内であった⁵⁸⁻⁶¹⁾。このように、DPAA のばく露による腫瘍の発生については、経胎盤ばく露群の雄の肝臓に限られ、経胎盤ばく露群の雄のその他の臓器や、経胎盤ばく露群の雌、一生涯ばく露群の雌雄にはなかったことから、無機ヒ素の試験結果と大きく異なっていた。また、肝腫瘍については自然発生の範囲内にある変化であったことから、この系統の雄マウスに特有のメカニズムによる可能性も考えられ、ヒトへの外挿性についても不明であることから、結果の解釈には発生メカニズムとヒトへの外挿性の有無を明らかにする必要があると考えられた。

なお、雄ラットに発がん物質のジエチルニトロソアミン (DEN) 0、200 mg/kg を腹腔内投与した 2 週間後から 0、5、10、20 ppm の濃度で DPAA の飲水投与を開始し、DPAA 投与開始の 1 週間後に肝臓の 2/3 を部分切除して 6 週間 DPAA の投与を続けた結果、肝臓の前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢は DEN 処置群でのみ観察され、DEN 処置した 20 ppm (1.6 mg/kg/day) 群でその数と面積は有意に増加した^{41,62)}。また、標的臓器が異なる 5 種類の発がん物質を 4 週間にわたって雄ラットに投与し、5 週目から DPAA を 0、10、20 ppm の濃度で 27 週間飲水投与した結果、20 ppm 群の肝臓で GST-P 陽性細胞巢の数と面積、胆管腫の発生率と発生数が有意に増加した。しかし、その他の標的臓器 (膀胱、肺、甲状腺、大腸) では DPAA 投与による有意な変化はみられなかった。これらの結果から、他の発がん物質によるラットの肝臓及び胆道系に対する発がん作用を促進する作用 (プロモーション作用) が DPAA にはあると考えられた^{41,46,47,63)}。

4.7 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⁶⁴⁾。

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 (IC₅₀) 及び DPAA の IC₅₀ を基準とした相対毒性 (DPAA の IC₅₀/ヒ素化合物の IC₅₀) を表 4-3、図 4-1 に示す。

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	IC ₅₀ (mg/L)	相対毒性 ^a
あか剤	ジフェニルクロロアルシン(DA)	C ₁₂ H ₁₀ AsCl	三価	0.801	200
	ジフェニルシアノアルシン(DC)	C ₁₃ H ₁₀ AsN	三価	0.567	280
関連する有機ヒ素化合物	ジフェニルアルシン酸(DPAA)	C₁₂H₁₁AsO₂	五価	157	1
	モノフェニルアルソン酸(MPAA)	C ₆ H ₇ AsO ₃	五価	> 201	< 0.78
	フェニルアルシンオキシド(PAO)	C ₆ H ₅ AsO	三価	0.0557	2,800
	ビス(ジフェニルアルシン)オキシド ⁺ (BDPAO)	C ₂₄ H ₂₀ As ₂ O	三価	0.707	220
	フェニルメチルアルシン酸(PMAA)	C ₇ H ₉ AsO ₂	五価	25.2	6.2
	トリフェニルアルシン(TPA)	C ₁₈ H ₁₅ As	三価	200	0.78
	トリフェニルアルシンオキシド(TPAO)	C ₁₈ H ₁₅ AsO	五価	460	0.34
無機ヒ素化合物	三酸化二ヒ素 (亜ヒ酸)	As ₂ O ₃	三価	1.64	96
	亜ヒ酸ナトリウム	NaAsO ₂	三価	1.68	93
	五酸化二ヒ素(ヒ酸)	As ₂ O ₅	五価	26.9	5.8
	ヒ酸カルシウム	Ca ₃ As ₂ O ₈	五価	> 42.2	< 3.7
	ヒ酸水素二ナトリウム(七水和物)	Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ 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 ₅ AsO ₃	五価	886	0.18
	ジメチルアルシン酸(DMAA)	C ₂ H ₇ AsO ₃	五価	151	1.0
	アルセノベタイン(AsBe)	C ₅ H ₁₁ AsO ₂	五価	— ^b	— ^b
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 ₆ H ₈ AsNO ₃	五価	1,410	0.11

注：a) 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。

b) 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。

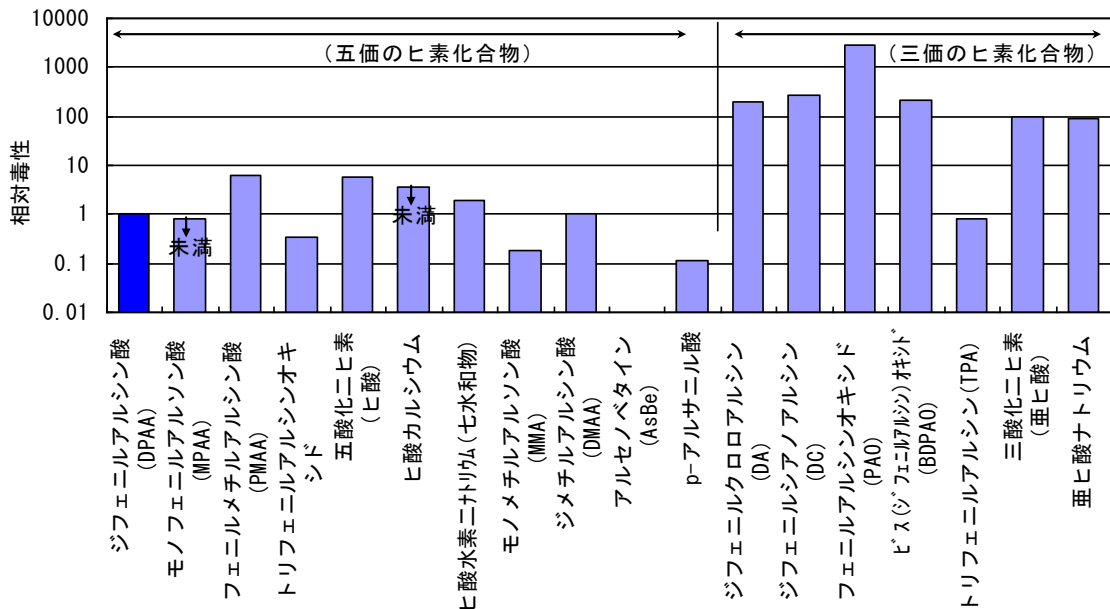


図 4-1 ヒ素化合物の HeLa 細胞に対する相対毒性 (DPAA の細胞毒性に対する相対値)

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ニン酸 (DMAA) とほぼ同じであり、ヒ素化合物の酸化状態 (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は強いという結果であった。

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)⁶⁵⁾、マウス初代肝細胞⁶⁶⁾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 細胞に比べて全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^{65,66)}。

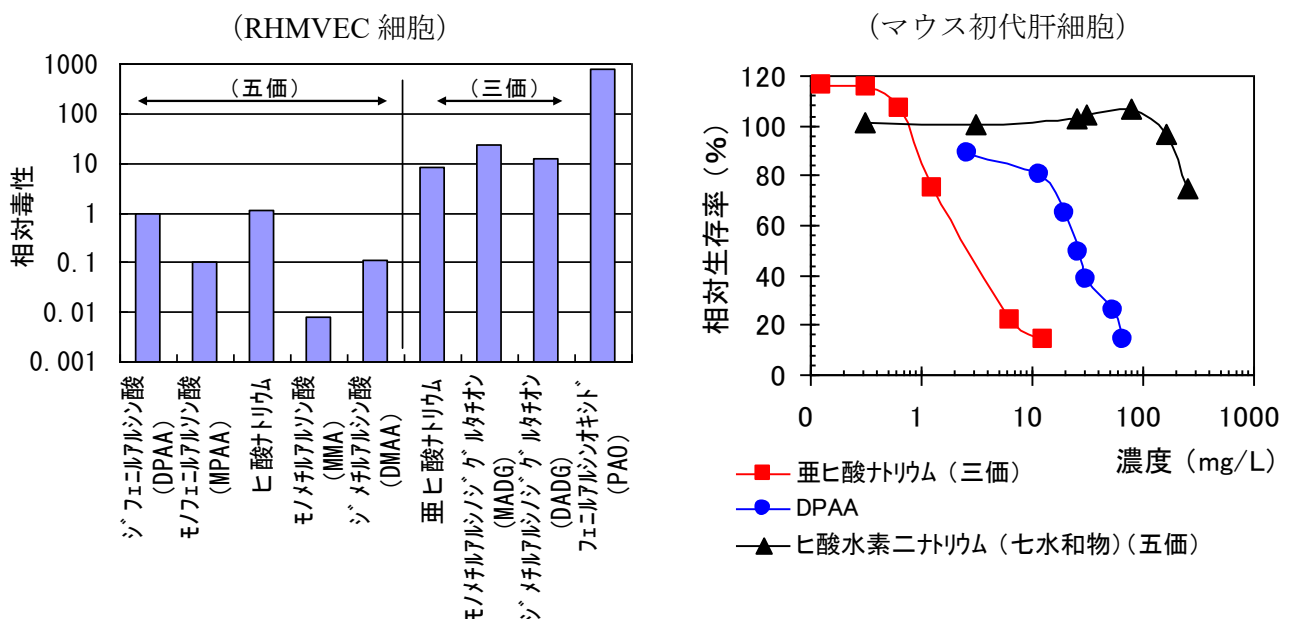


図 4-2 RHMVEC 細胞及びマウス初代肝細胞に対するヒ素化合物の相対毒性

4.8 グルタチオン抱合体の代謝と毒性

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ン酸 (MAA)、ジメチルアルシン酸 (DMAA) であるが、ヒ素とグルタチオン (GSH) 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⁶⁷⁻⁷³⁾、三価に還元されたヒ素と GSH 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⁷²⁾。GSH 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あり、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 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 DPAA の細胞毒性を増強し、GSH 枯渇によって増強された無機ヒ素の細胞毒性を低下させ、GSH が DPAA の細胞毒性を修飾することが示唆された^{53,54)}。このため、DPAG (DPAA と GSH の抱合体。ヒ素は三価) を合成して細胞毒性を検討した結果、DPAG 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⁷⁴⁻⁷⁶⁾。DPAG 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 の添加や枯渇処理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増変したことによるものではなかった。培養液中の DPAG 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、DPAG 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^{75,77)}。

飼料中のヒ素濃度を低減させた精製飼料を投与し、体内ヒ素バックグラウンド値を減少させたラットに DPAA 1 mgAs/kg を単回経口投与した試験では、胆汁中から DPAA と共に DPAG が検出され、胆汁中に排泄されたヒ素化合物のうち、約 85~95%が DPAG であった。また、精製飼料投与ラットの血液を用いた試験から、五価の DPAA と比較し、三価の DPAG の方が迅速に赤血球に取り込まれていることが分かった。このことは、DPAG が加水分解され、グルタチオン抱合がはずれることにより生成した三価のジフェニルヒ素化合物が赤血球中のタンパク質と結合したと考えられることから、生体内で、より生体物質との反応性が高い三価のジフェニルヒ素化合物へと DPAA がグルタチオンを介して還元されることが示唆された^{20,21)}。

GSH 及び GSH 抱合体の代謝分解に係わる酵素 (γ -GTP) の阻害剤 (GGsTopTM) による影響をラットで検討した結果、対照群の尿中からは DPAA のみが検出されたのに対して、GGsTopTM 投与群の尿中からは DPAA 以外にも DPAG が検出された。これは、GGsTopTM 投与群の腎臓では γ -GTP 活性が有意に低下し、GSH 濃度は有意に増加していたことから、DPAG が安定して尿中に排泄されたものと考えられた。このため、 γ -GTP 活性阻害剤による効率的な GSH 濃度の増加はヒ素の毒性軽減に寄与する可能性が示唆された⁷⁸⁾。

DPAA と N-アセチルシステイン (NAC) の同時投与によってラットの体重減少が完全に抑制された⁷⁹⁾。NAC 及び GSH はともに構造内に SH 基を持つ抗酸化物質であるが、ヒ素の毒性は細胞内の SH 基との結合による細胞代謝の障害と考えられることから、DPAA の As と NAC の SH 基が結合

して DPAA の毒性を低減させた結果と考えられた。

これらのことより、体内に吸収された DPAA は、肝臓において GSH により三価のジフェニルヒ素化合物である DPAG に変換されるが、DPAG が加水分解をうけグルタチオン抱合が外れた時に、生体と強く反応し、ひいては肝障害などを起こすものと推察される。

4.9 神経系への影響機序

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ンナーゼ (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型グルタミンナーゼ (PAG) の活性低下を伴っていた。グルタミンナーゼ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^{80,81)}、HepG2 細胞では DPAA 以外にも MPAA や PMAA で抑制作用がみられたが、三価の無機ヒ素やジメチルヒ素化合物、BDPAO、DPAG、DPAA や MPAA、PMAA の水酸基をメチル基で置換した化合物 (DPMAO、PDMAO)、MPAA のフェニル基にアミノ基を導入した化合物 (*p*-アルサニル酸) では有意な変化はなかった。このため、少なくともフェニル基と水酸基がヒ素化合物によるグルタミンナーゼの抑制には必要であることを示唆するものと考えられ、DPAA による脳神経系への影響に関与している可能性が示唆された⁸²⁾。しかし、ラット胎児大脳皮質細胞 (初代培養) でグルタミンナーゼの発現抑制を認めたものの、0、7.5、15、30 ppm の濃度で DPAA を 49 週間まで飲水投与したマウスで行動異常と小脳内グルタミンナーゼ活性低下の関係を明確にすることはできなかった⁸³⁾。

20 ppm の濃度で出生後 12 週間 DPAA を飲水投与したラットの小脳でグルタミン酸受容体の有意な発現低下と GSH 合成酵素の発現に変化はないものの GSH 濃度の有意な減少がみられた⁵²⁾。

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ま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³²⁾。

ラットの小脳細胞 (神経細胞、アストロサイト等の混合培養) に DPAA を 48 時間ばく露したところ、約 30 μ M の濃度で細胞数は 50%減少したが、ヒ酸水素二ナトリウムでは 100 μ M のばく露で

も有意な細胞毒性はなかった。しかし、神経芽細胞腫株 (Neuro2a) では 100 μ M の DPAA でも約 30%程度の細胞数減少に留まり、100 μ M のヒ酸水素ナトリウムでは約 80%の減少がみられたことから、細胞によって DPAA に対する感受性は異なると考えられる。また、小脳細胞 (神経細胞、アストロサイト等の混合培養) に 50 μ M の DPAA を 48 時間ばく露したところ、細胞数は 70%減少したが、抗酸化剤である *N*-アセチルシステイン (NAC) を添加すると 20%の減少に軽減された⁸⁴⁾。

DPAA をばく露したラットの小脳神経系細胞 (初代培養) について網羅的遺伝子発現解析を行った結果、酸化ストレス応答遺伝子、血管収縮作用を有する分泌性ペプチド遺伝子 (Neuropeptide Y)、血管新生に重要な役割を果たす分泌性ペプチド遺伝子 (FGF-2) で有意な発現上昇がアストロサイトで観察された。また 100 ppm の濃度で DPAA を 21 日間飲水投与 (約 5 mg/kg/day) した 12 週齢ラットの小脳でも同様の結果が得られた^{34,36)}。

そこで、小脳神経系細胞からアストロサイトを主とする培養系を確立し、DPAA ばく露の影響を評価した結果、これらの遺伝子の発現上昇及び細胞外へのペプチド分泌上昇がみられた³⁵⁾。この他にも血管拡張性ペプチド遺伝子ではあるが前駆体の一部が脳内血圧上昇作用を有する遺伝子 (アドレノメジュリン) にも同様の変化がみられ³⁵⁾、細胞内情報伝達システムを担うタンパク質リン酸化酵素の異常活性化もみられた^{52,85)}。これらのアストロサイトにおける DPAA の影響は NAC の添加によりほぼ全て抑制された。また、DPAA はアストロサイトにおいて GSH の異常放出を引き起こし細胞内 GSH を枯渇させた。さらに GSH 合成阻害剤の添加によって GSH を枯渇させると DPAA の影響が抑制された⁷⁹⁾。

これらの結果から、脳内に侵入した DPAA はアストロサイト内で酸化ストレスの上昇と同時に神経・血管作動性ペプチドの産生・分泌異常、タンパク質リン酸化酵素の異常活性化を引き起こし、神経症状の発症や脳血流量変化に寄与する可能性が示唆された⁷⁹⁾。また、DPAA に関連する有機ヒ素化合物のフェニルメチルアルシン酸 (PMAA)、モノフェニルアルソン酸 (MPAA)、フェニルジメチルアルシンオキシド (PDMAO)、ジフェニルメチルアルシンオキシド (DPMAO) を DPAA と同様にばく露したところ、PMAA のみが DPAA と同様の影響を示したが、その程度は DPAA に比べると小さかったことから、神経系への影響は DPAA によるものと考えられた^{8,86)}。

DPAA がラット小脳由来アストロサイトに与える生物学的影響として、細胞内のタンパク質リン酸化による情報伝達システムの要である分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAP キナーゼ) というリン酸化酵素の異常活性化が示されたが⁸⁷⁾、この MAP キナーゼの阻害剤を用いて薬理的に DPAA による MAP キナーゼの異常活性化の役割を評価したところ、MAP キナーゼは DPAA による酸化ストレス応答因子の発現上昇、転写因子の発現上昇、および神経・血管作動性ペプチドの放出を制御していることが明らかとなった^{88,89)}。

以上の結果は主にラット小脳由来アストロサイトで得られたものであったことから、ヒト由来の株化細胞を用いて DPAA による細胞生物学的影響の評価を試みた。使用した細胞株は T98G (グリア芽細胞腫)、U251MG (グリア芽細胞腫)、1321N1 (アストロサイトーマ)、SK-N-SH (神経芽細胞腫)、HepG2 (肝癌由来細胞)、MCF7 (乳腺癌由来細胞)、A549 (肺癌由来細胞) であり、まずは細胞増殖促進効果について評価した。その結果、DPAA ばく露によって細胞増殖促進が強くみられた

のは、T98G 及び U251MG であり、弱いながらみられたのは、1321N1 及び HepG2 であった。他の細胞では DPAA による細胞増殖促進効果はみられなかった。つまり、DPAA の影響は細胞種により変化し得るものであり、今回評価した細胞種の中では特にグリア細胞が感受性の高い細胞であることが明らかとなった⁹⁰⁾。さらに、ヒト小脳由来アストロサイトはラット小脳由来アストロサイトに比べ DPAA の影響に対する抵抗性が高かった^{91,92)}。一方で、DPAA による細胞生物学的影響については、DPAA が MAP キナーゼやプロテインキナーゼの異常活性化を引き起こすことにより細胞内のリン酸化シグナル伝達が破綻することが要因であることが明らかとなった^{92,93)}。

そして、DPAA の神経系への影響に対する予防的・治療的薬物を提案するために、アストロサイトの異常活性化を指標として探索したところ、抗酸化剤よりもチオール基を有する重金属キレート剤であるジメルカプトコハク酸 (DMSA) や D-ペニシラミンが DPAA による細胞内の異常活性化を抑制する薬物として有効であることが示唆された⁹⁴⁾。

また、神経の変性疾患に関連する物質の一つであるタウ・タンパク質の脳内への蓄積は神経細胞の機能障害の原因となることが考えられていることからヒトのタウ遺伝子を導入したマウス神経芽細胞腫株 (Neuro2a) を用いて検討した結果、DPAA の添加によってタウ遺伝子の発現が増加し、タウ・タンパク質が増加したことから、このメカニズムによる影響の可能性が示唆された⁹⁵⁾。

さらに、DPAA 投与後のマウス脳内における神経伝達物質の変化についてマイクロダイアリシス法を用いて検討した研究では、強制経口投与したマウスの脳 (線条体の透析液) で、ドパミンレベルが 4 mg/kg 以下の投与量で増加し、投与量 8 mg/kg 以上の投与量で減少する現象が観察された^{7, 18)}。