

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者	原田 孝則	財団法人	残留農薬研究所	毒性部
分担研究者	小坂 忠司	財団法人	残留農薬研究所	毒性部
	首藤 康文	財団法人	残留農薬研究所	毒性部
	松元 郷六	財団法人	残留農薬研究所	毒性部

平成17（2005）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究	1
原田孝則	

II. 分担研究報告

1. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける 反復経口投与毒性試験	9
原田孝則	
2. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける 反復経皮投与毒性試験	71
原田孝則	
3. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の4週間反復経口 神経・免疫毒性試験	145
小坂忠司・首藤康文	
4. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の急性経口毒性試験	195
小坂忠司	
5. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のヒト皮膚三次元モデル における皮膚腐食性試験	215
小坂忠司	
6. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の細菌を用いる 復帰突然変異試験	219
松本郷六	
7. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のマウスを用いる 小核試験	233
松本郷六	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 16 年度総括研究報告書

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

主任研究者 原田 孝則 （財）残留農薬研究所 毒性部長

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のリスク評価に必要な基礎的毒性情報を収集することを目的に、種々の毒性試験を実施した。その結果、ラットを用いた反復投与試験では、経口・経皮のいずれの経路においても、CCA は血液、肝臓、腎臓および消化器系に対して毒性を発現し、加えて、神経・免疫系にも影響を及ぼすことが示唆された。また、反復投与試験における最大耐量は、ラットでは 100 mg/kg 前後であると判断された。一方、ラットの急性経口毒性試験では、Moving Average 法にて算出された半致死用量に基づき、CCA は OECD の定める GHS カテゴリー 3 (LD50: 50-300 mg/kg) に分類されることが判明した。ヒト皮膚三次元モデルを用いた CCA の皮膚腐食性試験では、陽性あるいは疑陽性と判定された。CCA の遺伝毒性に関しては、Ames 試験における細菌に対する突然変異誘発性は陽性であり、マウスの小核試験における染色体異常誘発性は疑陽性であると結論された。

分担研究者

小坂忠司 （財）残留農薬研究所 毒性部
免疫・急性毒性研究室長
首藤康文 （財）残留農薬研究所 毒性部
神経毒性研究室主任
松本郷六 （財）残留農薬研究所 毒性部
遺伝毒性研究室長

剤として使用される化学物質のリスク評価については、欧米諸国では既に調査が進められているが、検索対象化学物質の種類が多い上に、複数の物質が混在していることから、未検索な部分も多く今後の幅広い調査・研究が必要である。従って、本研究では、木材防腐剤として使用される化学物質の毒性試験を実施し、リスク評価に必要な基礎的毒性情報を収集することを目的とした。平成 16 年度では、過去の使用量が最も多く、ヒト健康、特に子供への健康影響が懸念される代表的な木材防腐剤であるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）¹⁴⁾を対象に種々の毒性試験（反復

A. 研究目的

木材防腐剤は、家屋の土台、柱、テラス等の建築資材の他、公園の遊具、海岸遊歩道の棧橋などに広く利用されており、我々の生活環境において種々の経路を介してヒトに暴露される可能性がある。木材防腐

経口毒性試験、反復経皮毒性試験、反復経口神経・免疫毒性試験、急性経口毒性試験、皮膚腐食性試験および遺伝毒性試験)を実施した。

B. 研究方法

平成 16 年度では、被験物質としてクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の代表的薬剤配合種である CCA 2 号 (CCA-type B) ¹⁾を用い、以下の毒性試験を実施した。なお、同被験物質の各構成成分の配合比は、酸化クロム (CrO₃、純度 98%) 35.3%、酸化銅 (CuO、純度 99.3%) 19.6%および酸化ヒ素 (As₂O₅、純度 91.9%) 45.1%であった。

1. ラットの 4 週間反復経口投与毒性試験

Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) を用い、各群雌雄各 10 匹の動物 (7 週齢) に、CCA を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で 4 週間に亘り毎日強制経口投与した。検査項目としては、臨床症状、死亡率、体重、摂餌量、食餌効率、眼検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、剖検および病理組織学的検査を行った。また、肝臓については酸化ストレスの測定および金属結合蛋白メタロチオネインの遺伝子解析 (mRNA 量の測定) を実施した。

2. ラットの 8 週間反復経皮投与毒性試験

SD 系 SPF ラット (Crj:CD(SD)IGS) を用い、各群雌雄各 8 匹の動物 (6 週齢) の背部皮膚 (4 cm x 5 cm) に、CCA を 0、10、100、300 および 1000 mg/kg の用量で 8 週間に亘り毎日 1 回 (24 時間)、反復適用し

た。検査項目としては、臨床症状、死亡率、体重、摂餌量、眼検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、剖検および病理組織標本作製を行った。また、肝臓については酸化ストレスの測定および金属結合蛋白メタロチオネインの遺伝子解析 (mRNA 量の測定) を実施した。

3. ラットの 4 週間反復経口投与神経・免疫毒性試験

Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) を用い、各群雌雄各 10 匹の動物 (7 週齢) に、CCA を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で 4 週間に亘り毎日強制経口投与し、神経・免疫系への影響を検索した。検査項目としては、神経系への影響を配慮した詳細な臨床症状観察および神経機能検査ならびに免疫毒性を検出するための胸腺・脾臓の細胞数計測、フローサイトメトリー解析および免疫グロブリン抗体価の測定を行った。

4. ラットの急性経口毒性試験

Wistar 系 (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) および SD 系 (Crj:CD(SD)IGS) の 2 系統のラットを用い、各系統雌雄各 5 匹の動物 (8 週齢) に CCA を 33、100、300 および 900 mg/kg の用量 (公比 3) で単回強制経口投与し、死亡率に基づく Moving Average 法により半致死量 (LD50 値) を 95%信頼限界で算出した。

5. 皮膚腐食性試験

動物を用いる皮膚腐食性試験の代替法として開発され、既にバリデーシヨンの完了したヒト皮膚三次元モデル ²⁾の市販キット

(EpiDerm™ Human Skin Model System、倉敷紡績株式会社)を用い、CCAの皮膚腐食性を検索した。腐食性の評価は、前培養した皮膚モデルにCCAを3分間および60分間暴露し、MTT法により培養細胞の生存率を算出することにより行った。

6. 細菌を用いる復帰突然変異試験

大腸菌(WP2 *uvrA/pKM101*)およびネズミチフス菌(TA100 および TA98)を用い、代謝活性化系の有無の両条件下でCCAの復帰突然変異試験(Ames試験)を実施した。CCAの用量は、1プレート当たり1.2~5000 μ gで、プレインキュベーション法に従って試験を実施した。

7. マウスを用いる小核試験

CCAの哺乳動物に対する染色体異常誘発性を検索するため、マウスの小核試験を実施した。供試動物としてICR系マウス(Crj:CD-1)の雄性動物(7週齢)を用い、CCAを0、25、50および100 mg/kgの用量で各群5匹の動物に単回強制経口投与した。また、陽性対照群を1群設け、陽性対照物質のマイトマイシンCを10 mg/kgの用量で同様に経口投与した。投与24時間後に全群から、また、投与48時間後には高用量群と陰性対照群から、それぞれ大腿骨骨髓を採取し、骨髓塗末標本作製し、多染性赤血球中の小核出現率を算出した。

C. 研究結果及び考察

1. ラットの4週間反復経口投与毒性試験

CCAの反復経口投与毒性を検索するため、CCAを0、8、40および80 mg/kgの用量で雌雄のWistar系ラットに4週間に亘り毎

日反復強制経口投与した。その結果、高用量群において雌雄とも沈静化および流涎が認められ、雄1例が死亡した。加えて、雌では腹部・外陰部被毛の汚れも観察され、中間用量群においても同様な症状がみられた。血液・生化学的検査では、高用量群の雌雄および中間用量群の雌において小球性低色素性貧血、リンパ球あるいは単球の増加を伴う総白血球数の増加、プロトロンビン時間の短縮、低蛋白血症、高コレステロール血症、血漿電解質の変動等が認められ、高用量群の雄では尿素窒素および総ビリルビンが増加した。これらの変化のうち、貧血等の血液学的変化は、おそらく造血器系への影響が示唆されているヒ素⁹⁾により誘発されたものと推察した。一方、生化学的変化については概ね腎機能障害を示唆する所見⁹⁾であり、クロムによる毒性効果⁷⁾が疑われた。剖検所見では、中・高用量群の雌雄において十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が観察され、肝・腎臓重量の増加および胸腺重量の減少がみられた。また、雄では肺重量が増加し、雌では脳重量が減少した。なお、胸腺重量の減少は低用量の雌でも認められた。病理組織学的検査では、高用量群の雌雄において前胃粘膜角化亢進、小腸粘膜上皮過形成、腎尿細管褐色色素沈着が観察され、雌では肝細胞肥大も認められた。加えて、雌の肝臓では酸化ストレスの産物である8-OHdGが増加した。

以上の結果から、CCAをラットに反復経口投与した場合、血液、肝臓、腎臓および消化管に毒性を発現することが判明し、その程度は雌の方が強い傾向にあった。また、CCAは神経・免疫系に対しても影響を及ぼす可能性が示唆された。

2. ラットの8週間反復経皮投与毒性試験

CCAの反復経皮投与毒性を明らかにするため、CCAを0、10、100、300および1000 mg/kgの用量で雌雄のSD系ラットの背部皮膚に8週間に亘り反復投与した。その結果、100 mg/kg以上の投与群において、自発運動の低下や後肢麻痺が認められ、用量依存性に死亡率が増加した。これらの中毒症状は、おそらくヒ素の神経毒性作用^{6,8)}に起因するものと推察した。臨床検査では、尿蛋白・ビリルビンの増加、小球性低色素性貧血、低アルブミン血症、高コレステロール・トリグリセライド血症、血漿電解質の変動(P、Na、Kの増加、Caの減少)が認められた。一般に腎疾患(機能障害)時、特にネフローゼ症候群では、血中のアルブミンが減少するため低比重リポ蛋白が増加し高コレステロール血症を呈し、重度の場合には肝での超低比重リポ蛋白の産生も亢進するため高トリグリセライド血症を招来することが知られている⁹⁾。また、腎機能が障害されると糸球体濾過率が低下するため血中のリン値が増加し、電解質のバランス維持のためカルシウムは逆に減少することが知られている。従って、上記の生化学的変化は、CCA投与(特にクロム)により腎障害が誘発され、その結果として招来されたものと推察した。

剖検所見では、皮下水腫、胸・腹水の増量、胸腺の萎縮・水腫、肝白色班、腎臓の腫大・退色、消化管内容物の黒色化が観察された。臓器重量では、肝臓、腎臓および脾臓の重量が増加し、胸腺の重量が減少した。また、雌では脳重量が減少し、心重量が増加した。加えて、肝臓では酸化ストレスの産物である8-OHdGが増加し、メタロ

チオネインの遺伝子発現が亢進(mRNA量の増加)した。

以上の結果から、CCAをラットに反復経皮投与した場合、皮下水腫、胸・腹水症、貧血、肝・腎障害を誘発し、100 mg/kg以上は致死用量であることが判明した。また、CCAは神経・免疫系、消化器系あるいは循環器系へも影響を及ぼす可能性が示唆された。

3. ラットの4週間反復経口投与神経・免疫毒性試験

ラットの4週間反復経口投与試験を実施し、CCAの神経系および免疫系への影響について検索した。その結果、神経機能検査(FOB)では、40および80 mg/kg群の雌雄に探索行動、立ち上がり回数および自発運動量の減少が観察された。免疫学的検査では、40および80 mg/kg群の雄あるいは雌において胸腺重量が減少し、胸腺細胞数の減少、未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞(CD4+CD8+)の減少および成熟胸腺細胞のヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の減少が観察された。また、抗羊赤血球抗体価の低下を示す個体が40および80 mg/kg群の少数例に認められた。

これらの結果から、CCAの経口投与での神経系および免疫系への影響が示唆された。

4. ラットの急性経口毒性試験

Wistar系およびSD系の2系統のラットを用いてCCAの急性経口毒性を検索した。各群雌雄各5匹の動物にCCAを33、100、300、900 mg/kgの4用量(公比3)で単回強制経口投与した。Moving Average法にて算出したLD50値(95%信頼限界)は、

Wistar系ラットでは、雄で112 mg/kg (61~208 mg/kg)、雌で72 mg/kg (43~119 mg/kg)であり、SD系ラットでは雄で173 mg/kg (173~173 mg/kg)、雌で90 mg/kg (48~167 mg/kg)であった。本実験条件下において、CCAの急性経口毒性はOECD¹⁰⁾の定めるGHS (Globally Harmonized System) カテゴリーの3と判定され、毒物劇物法の分類では劇物に相当するLD50値の範囲であると結論された。

5. 皮膚腐食性試験

ヒト皮膚三次元モデルを用いてCCAの皮膚腐食性を検索した。前培養した皮膚モデルにCCAを3分間および60分間暴露し、MTT法により生存率を計算した。CCAの構成成分のうち、酸化クロムおよび酸化ヒ素では皮膚腐食性が認められた。CCAの皮膚腐食性は3分間暴露で陽性であり、60分間暴露で疑陽性であった。本実験条件下において、CCAの皮膚腐食性は疑陽性ないし陽性の区分に相当すると判定された。

6. 細菌を用いる復帰突然変異試験

CCAの突然変異誘発性を調査するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を行った。1.2~5000 µg/プレートの用量でプレインキュベーション法に従って実験したところ、大腸菌(WP2 *uvrA*/pKM101)ならびにネズミチフス菌(TA100 および TA98)で、代謝活性化系の有無に関わらず、明らかな変異コロニー数の増加が認められた。この増加の原因としては、強い変異原性を示すことが既に知られているCCAの構成成分であるクロム¹¹⁾の作用が考えられた。よって、CCAの細菌に対する突然変異誘発性は

陽性と判断された。

7. マウスを用いる小核試験

CCAの哺乳動物に対する*in vivo*染色体異常誘発性を調査するため、マウスを用いる小核試験を行った。最大耐量である100 mg/kgを最高用量に、中用量(50 mg/kg)および低用量(25 mg/kg)を設定し、単回の強制経口投与を行った。投与24および48時間後に骨髓塗抹標本を作製し、多染性赤血球中の小核出現頻度を求めた。その結果、100 mg/kg群では投与24および48時間後に小核出現頻度がわずかに増加した。しかし、その増加は陰性対照群と比べて統計学的に有意ではなかった。よって、CCAのマウス骨髓における小核誘発性は疑陽性と判定された。その原因としては、CCAの構成成分であるヒ素の作用¹²⁾が関与しているものと推察した。

D. 結論

本実験条件下では、CCAをラットに反復経口あるいは経皮投与した場合、いずれの経路においても血液、肝臓、腎臓および消化器系に対し毒性を発現することが判明し、100 mg/kg前後が最大耐量であると結論された。また、CCAは神経・免疫系にも影響を及ぼすことが示唆された。CCAのラットにおける急性経口毒性は、OECDの定めるGSH カテゴリー3 (LD50: 50-300 mg/kg)に分類され、また、皮膚腐食性に関しては陽性あるいは疑陽性と判定された。CCAの遺伝毒性については、細菌に対する突然変異誘発性は陽性であり、マウス骨髓における小核誘発性は疑陽性と結論された。

E. 引用文献

- 1) Penha J, Catilu V, and Tblaymat T: Generation, use, disposal, and management options for CCA-treated wood. Florida Center for Solid and Hazardous Waste Management, Florida, USA, Report #98-1, pp. 1-54, 1998.
- 2) Odiott O and Roberts SM: Preliminary evaluation of the non-dietary hazard and exposure to children from contact with chromated copper arsenate (CCA)-treated wood playground structures and CCA-contaminated soil. FIFRA Scientific Advisory Panel (SAP), SAP Report #2001-12, pp. 1-63, 2001.
- 3) Aviado D, Dang W, Elkassabany N, Jakob W, Jensen J, Montague K, Mostaghimi S, Quick B, Shamin N, and Vaughan: Children's exposure to CCA-treated wood playground equipment and CCA-contaminated soil. In: FIFRA Scientific Advisory Panel Background Document, US EPA, pp.1-54, 2001.
- 4) McMahan TF and Chen J: Hazard identification and toxicology endpoint selection for inorganic arsenic and inorganic chromium. In: FIFRA Scientific Advisory Panel Background Document, US EPA, pp. 1-36, 2001.
- 5) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In vitro* Skin Corrosion – Human Skin Model Test, 2004.
- 6) Gwaltney-Brant SM: Heavy metals. In: Handbook of Toxicologic Pathology (Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, eds.), Academic Press, San Diego, pp. 701-733, 2002.
- 7) Goyer RA and Clarkson TW: Toxic effects of metals. In: Casarett & Doull's Toxicology (Klaassen CD, ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 811-867, 2001.
- 8) Hostynek JJ, Hinz RS, Lorence CR, Price M, and Guy RH: Metals and the skin. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(2): 171-235, 1993.
- 9) 河合忠: 血液化学検査、異常値の出るメカニズム (河合忠・玄番昭夫・尾形稔編)、医学書院、東京、pp.79-133、1993.
- 10) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 2001.
- 11) De Flora S, Bagnasco M, Serra D, and Zanacchi P: Genotoxicity of chromium compounds: A review. *Mutation Res* 238: 99-172, 1990.
- 12) Kondo Y, Nakajima E, Nito S, Asano Y, Ariyuki F, and Higashiguchi T: Assessment of the human carcinogens arsenic acid and arsenic trichloride in the mouse micronucleus assay. *MMS Communications* 2: 117-121, 1994.

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 16 年度分担研究報告書

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける反復経口投与毒性試験

分担研究者	原田 孝則	（財）残留農薬研究所	毒性部長
協力研究者	川勝 尚夫	（財）残留農薬研究所	毒性部動物管理室
	小嶋五百合	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	高橋 尚史	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	千葉 裕子	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	中島 信明	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	武田眞記夫	（財）残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の反復経口投与毒性を検索するため、CCA を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で雌雄の Wistar 系ラットに 8 週間に亘り毎日強制傾向投与した。その結果、高用量群において雌雄とも沈静化および流涎が認められ、雄 1 例が死亡した。加えて、雌では腹部・外陰部被毛の汚れも観察され、中間用量群においても同様な症状がみられた。臨床検査では、高用量群の雌雄および中間用量群の雌において貧血、白血球数の増加、プロトロンビン時間の短縮、低蛋白血症、高コレステロール血症、血漿電解質の変動等が認められ、高用量群の雄では尿素窒素および総ビリルビンが増加した。剖検所見では、中・高用量群の雌雄において十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が観察され、肝・腎臓重量の増加および胸腺重量の減少がみられた。また、雄では肺重量が増加し、雌では脳重量が減少した。なお、胸腺重量の減少は低用量の雌でも認められた。病理組織学的検査では、高用量群の雌雄において前胃粘膜角化亢進、小腸粘膜上皮過形成、腎尿細管褐色色素沈着が観察され、雌では肝細胞肥大も認められた。加えて、雌の肝臓では酸化ストレスの産物である 8-OHdG が増加した。以上の結果から、CCA をラットに反復経口投与した場合、血液、肝臓、腎臓および消化管に毒性を発現することが判明し、また、CCA は神経・免疫系に対しても影響を及ぼす可能性が示唆された。

A. 研究目的

過去に使用量の最も多い代表的な木材防腐剤であるクロム・銅・ヒ素化合物系木材

防腐剤（CCA）をラットに 4 週間にわたって反復経口投与し、その際に生じる毒性変化を検索し、リスク評価に必要な基礎的

毒性情報を得る事を目的とした。

B. 研究方法

試験方法は平成元年9月11日付け薬審1第24号厚生省薬務局通知「医薬品毒性試験ガイドライン」及び平成5年8月10日付け薬新薬第88号厚生省薬務局通知「単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質として、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の代表的種類のひとつである CCA2 号 (CCA-type B) を使用した。同被験物質の有効成分であるクロム・銅およびヒ素の各構成成分配合比は酸化クロム (CrO_3 、純度 98%) 35.3%、酸化銅 (CuO 、純度 99.3%) 19.6% および酸化ヒ素 (As_2O_5 、純度 91.9%) 45.1% であった。これらの被験物質の入手先は、クロム及び銅は関東化学株式会社 (東京)、ヒ素はキシダ化学株式会社 (大阪) より入手した。受領した被験物質は、湿度 40% 以下、温度は室温 (許容範囲: 15~30°C) 条件下で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場 (静岡県) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (Br/Han:WIST@Jcl[GALAS]) の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに 6 週齢で購入し、9 ないし 10 日間試験環境に馴化した後、7 週齢にて試験に供試した。馴化期間中毎日一般状態を観察し、この期間中眼科学的検査および詳細な一般状態の観察を実施した。動物は温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度

$50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエアー方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、雌雄別々に体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に雌雄 10 匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後の個体識別は耳鑑札法で行なった。基礎飼料には保証飼料 MF 粉末 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用い、ステンレス鋼製粉末給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムによって殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

当該試験に先立ち、各群 3 ないし 4 匹ずつの雄性 Wistar Hannover 系 SPF ラットを用いて 7 日間 (0, 40 および 80 mg/kg) および 14 日間 (0, 100 および 150 mg/kg) の反復強制経口投与による予備試験を実施した。その結果、14 日間の予備試験において、150 mg/kg 投与群では投与 1 週時に 2 例の死亡例が認められた。100 mg/kg 投与群では、投与 1 および 2 週時に体重増加抑制が観察され、心臓、甲状腺および胸腺の絶対重量の減少が観察された。また、ヘマトクリット値、ヘモグロビン、クレアチニンおよび血糖の減少と白血球数の増加が観察された。7 日間の予備試験において、80 mg/kg 投与群では、投与 1 週時に体重増加抑制が観察され、胸腺および脾臓の絶対・相対重量の減少と肝臓の相対重量の増加が

観察された。また、網状赤血球数の減少と血中尿素窒素および血糖の増加が観察された。40 mg/kg 投与群では、統計学的に有意な変化はみられなかった。これらの予備試験結果に基づいて、明らかな毒性変化が惹起されると考えられる 80 mg/kg を最高用量に、その 1/2 用量の 40 mg/kg を中間用量に、また、無毒性が予想される 8 mg/kg を低用量に設定した。これらの設定用量群 (0、8、40 および 80 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき雌雄とも 10 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、8、40、80 mg/kg) の被験物質投与液を週に 1 回調製した。投与液の調製に際し、成分ごとに純度による調製濃度の換算を実施した。投与容量は 6 mL/kg とした。最初に、所定量の酸化クロムおよび酸化ヒ素を秤量し、注射用水 (大塚薬品株式会社) を加え溶解させた。溶解後、所定量の酸化銅を加えて超音波処理し、懸濁させた。懸濁後注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。各濃度の投与液は 7 日間分小分けし、冷蔵・遮光 (5℃) 条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

5. 投与方法

各用量群の投与液を胃ゾンデ (Disporsable 経口ゾンデ、有限会社フチガミ機械店、京都) を用い、毎日 1 回、週 7 日、4 週間に亘り強制経口投与した。投与容量は 1 匹当たり 6 mL/kg とし、対照群の動物には注射用水のみを投与した。

6. 動物の観察

全動物について、投与期間中 1 日 2 回瀕死状態ないし死亡の有無を、1 日 1 回被験物質投与後に一般状態を観察した。

7. 体重

全生存動物について、投与開始時およびその後毎週 1 回体重を測定した。また、全動物について殺処分前あるいは死亡発見時に最終体重を測定した。

8. 摂餌量

全ケージについて、毎週 1 回原則として連続 3 日分または 4 日分のケージ別摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中にそれぞれのケージ内で生存した動物の延べ数で除し、ケージ毎に 1 日 1 匹あたりの摂餌量 (ケージ別平均摂餌量) を算出した。

9. 食餌効率

全用量群について、投与開始後毎週、群平均体重増加量をそれぞれの群平均摂餌量で除して群平均食餌効率 (% で表示) を雌雄別に算出した。

10. 眼科学的検査

馴化期間中に雌雄の全馴化動物および投与 4 週時に雌雄の全生存動物について、ハロゲン検眼鏡 (株式会社ナイツ) による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では、眼球、眼瞼、結膜、角膜、前眼房、瞳孔、虹彩、水晶体/硝子体および眼底を観察した。

11. 尿検査

投与 4 週時に、各群の全生存動物について尿検査を実施した。各検査動物を個体別

採尿ケージに入れて自然排泄により得られた新鮮尿を用いて、尿比重、ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質、ウロビリノーゲンおよび尿沈渣の項目について検査した。また、動物を同ケージに一晩入れて蓄積尿を採取し、尿色と尿量を検査した。尿比重は手持屈折計（株式会社アタゴ）で測定した。ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質およびウロビリノーゲンは、試験紙マルティスティックス®SG（バイエルメディカル株式会社）の呈色の程度を、クリニテック®50（バイエルメディカル株式会社）で準定量的に計測した。尿沈渣は鏡検した。

12. 血液学的検査

4週間反復投与終了後に、各群の全生存動物について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晩絶食させた。動物をエーテル麻酔下で開腹し、無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。

血液学的検査は、EDTA 処理した血液試料を用いて、以下の項目について総合血液学検査装置アドヴィア 120（Bayer Corporation）で測定した。

測定項目（略号）：ヘマトクリット値（Ht）、血色素量（Hb）、赤血球数（RBC）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数（PLT）、網赤血球数（Retics）、白血球数（WBC）および白血球のディファレンシャルカウント；好中球（N）、リンパ球（L）、単球（M）、好酸球（E）、好塩基球（B）、大型非染色球（LUC）

血液凝固能については、全自動血液凝固測定装置（CA-5000、シスメックス株式会

社）を用い、プロトロンビン時間（PT）および活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を測定した。

4週間投与終了後の全生存動物の大腿骨から骨髓を採取し、アドヴィア 120 を用いて骨髓有核細胞数の測定を行なうと同時に、メイグリュンワルド・ギムザ染色を施した塗抹標本を作製した。また、被験物質による造血器系への影響が疑われたため、雌の対照群と高用量群について骨髓細胞形態検査を実施した。骨髓細胞形態検査では、塗抹標本を鏡検して、骨髓細胞の構成比（%）を求め、骨髓有核細胞数を乗じてそれぞれの実数を算出した。

13. 血液生化学的検査

4週間反復投与終了後に、各群の全生存動物について前項の血液学的検査で採取した血液試料をヘパリン処理した血漿を用い、以下の項目を JCA-BM1250 自動分析装置にて測定した。

測定項目（略号）：アルカリホスファターゼ（ALP）、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT）、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GGTP）、クレアチニン（Creat）、尿素窒素（BUN）、総蛋白（TP）、アルブミン（Alb）、グロブリン（Glob）、アルブミン/グロブリン比（A/G ratio）、血糖（Gluc）、総コレステロール（T.Chol）、トリグリセライド（TG）、総ビリルビン（T.Bil）、カルシウム（Ca）、無機リン（P）、無機リン（P）、カリウム（K）および塩素（Cl）

14. 剖検および組織採取

投与期間中の死亡動物を含めた全動物について剖検を実施した。4週間反復投与終了後の計画殺動物は、エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。

剖検時に全動物から以下の臓器および組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし、肺についてはホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。また、精巣はFSA液(ホルマリン・ショ糖・酢酸混合液)で5~7日間固定した後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

採取した臓器及び組織：脳(大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄(頸部、胸部および腰部)、坐骨神経(片側)、下垂体、胸腺(右側半分)、甲状腺および上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓(半分)、骨および骨髄(胸骨、片側大腿骨および頸部、胸部、腰部椎骨)、膝関節(片側)、リンパ節(頸部および腸間膜)、心臓、大動脈、唾液腺(顎下腺および舌下腺)、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、頭部(鼻腔、副鼻腔、口腔粘膜および中耳を含む)、舌、咽頭、喉頭、気管、肺(気管支を含む)、腎臓(両側)、膀胱、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺(腹葉)、精囊(両側)、凝固腺(両側)、卵巣(両側)、子宮(頸部を含む)、膣、眼球(両側)、ハーダー腺(両側)、下腿三頭筋(片側)、皮膚(腰背部)、乳腺(腹部)および肉眼的異常部位

15. 臓器重量

4週間反復投与終了後に、各群雌雄全例について、剖検後、以下の臓器の固定前の

重量(絶対重量)を測定し、最終体重から比体重値(相対重量)を算出した。

測定項目：脳、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体を含む、両側)、心臓、肺、肝臓、腎臓(両側)、脾臓、副腎(両側)、唾液腺(両側の顎下腺・舌下腺を合わせたもの)、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺(腹葉)、精囊・凝固腺(両側)、卵巣(両側)、子宮

16. 病理組織学的検査

対照群および高用量(80 mg/kg)群の全動物から採取した以下に示す臓器・組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。標本は常法に従ってパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、顕微鏡にて観察した。

病理組織学的検査の臓器および組織：脳(大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄(頸部、胸部および腰部)、坐骨神経(片側)、下垂体、胸腺、甲状腺(両側)、上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓、骨および骨髄(胸骨、片側大腿骨および椎骨3カ所)、リンパ節(頸部および腸間膜)、心臓、大動脈、唾液腺(顎下腺および舌下腺)、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、鼻腔、舌、咽頭、喉頭、気管、肺(気管支を含む)、腎臓(両側)、膀胱、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺(腹葉)、精囊(両側)、凝固腺(両側)、卵巣(両側)、子宮(角部および頸部)、膣、眼球(網膜および視神経を含む、両側)、ハーダー腺(両側)、下腿三頭筋(片側)、膝関節(片側)、皮膚(腰背部)、乳腺(腹部)および肉眼的異常部位

17. CCAの薬物動態検査(トキシコキネティクス)

投与4週後の計画殺動物から採取された血液サンプルの一部(各群雌雄各1~3例)および肝臓サンプル(80 mg/kg 群の雌雄各3例)をCCAの分析に供した。これらのサンプルの分析は財団法人日本食品分析センター多摩研究所(東京)に依頼した。ただし、同分析は今年度中に完了しなかったため、結果については次年度の報告書に掲載予定である。

18. 肝臓の酸化ストレス(活性酸素関連物質)の測定

4週間反復投与終了後の計画殺動物より採取した肝組織(凍結試料)を用い、過酸化脂質および8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)の測定を実施した。

過酸化脂質の測定では、凍結試料の一部から肝ホモジネートを調製し、TBA法により分光光度計(UV-2200、島津製作所)にて過酸化物の吸光度を測定し、過酸化脂質濃度を算出した。8-OH-dGの測定では凍結試料の一部からDNAを抽出し、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)測定用ELISAキット(日本油脂株式会社)を用い肝組織中の8-OH-dG濃度を測定した。

19. 肝臓のメタロチオネイン mRNA の定量

4週間反復投与終了後の計画殺動物より採取した凍結肝臓サンプルの一部から、Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit (STRATAGENE、アメリカ、カリフォルニア州)を用い、total RNAを抽出した。得られたRNAの定量には分光光度計GeneQuantpro(アマシャム・バイオサイ

エンス、東京都)を用いた。

RNAを0.1 µg/µLに調製し、1 µgを50 µLの系でTaqMan Reverse Transcription Reagent(アプライド・バイオシステム、東京都)およびPCR Thermal Cycler MP(タカラバイオ、東京都)を用い逆転写反応を行い、cDNAを作製した。

PRISM 7700(アプライド・バイオシステム)を用い、Real-time PCR法によるcDNAの増幅曲線から、mRNA発現量を定量解析した。発現量を標準化するために、内部標準としてGAPDHを用いた(GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)。GAPDHのReal-time PCR反応にはTaqMan Universal PCR Master Mix(アプライド・バイオシステム)およびTaqMan Rodent GAPDH Reagents(アプライド・バイオシステム)を用いた。メタロチオネインのReal-time PCR反応にはSYBR Green PCR Master Mix(アプライド・バイオシステム)および以下に示すプライマー・セットを用いた。これらのプライマー・セットはNippon EGT(富山県)から購入した。

Metallothionein I (MT I)

Forward:

TTCACCAGATCTCGGAATGGA

Reverse:

ACACAGCCCTGGGCACAT

Metallothionein II (MT II)

Forward:

ACTGCCGCCTCCATTCG

Reverse:

GCAGCCCTGGGAGCACTT

定量用のスタンダードとしてPCR産物を精製して用い、塩基配列および濃度から

モル濃度を算出した。

Real-time PCR 反応は 95℃、10 分間インキュベーション後、95℃15 秒、60℃60 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で行った。

MT I および II の mRNA 発現量は GAPDH の発現量で標準化 (GAPDH に対する比率) し、normalized value として表した。

20. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5%および 1%レベルで解析した。

体重、摂餌量、尿比重、尿量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、過酸化脂質量、8-OHdG 量、メタロチオネイン mRNA の発現量および臓器重量のデータについては、先ず Bartlett の等分散検定を行なったその後、等分散の場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett の多重比較法により対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて平均順位の有義差の有無を判定した。尿検査項目 (尿比重、尿量を除く) については、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。死亡率ならびに一般状態の観察所見、眼科学的検査所見、剖検所見および病理組織学的所見の発生頻度については、

Fisher の直接確率計算法 (片側検定) を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 臨床症状および死亡率 (表 1-4)

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも約半数の動物に沈静化が認められ、流涎を示す個体が散見された。また、雌では半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが観察された。死亡率では、投与 1 週時に雄 1 例が死亡したが、雌では死亡例はなかった。

40 mg/kg 投与群では、雄には異常はなかったが、雌では約半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが認められ、流涎を示す個体が散見された。なお、死亡動物は雌雄ともなかった。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも臨床症状に異常はなく、死亡例もなかった。

2. 体重変化 (表 5、6)

80 mg/kg 投与群では、雄の体重が投与第 1 週時から対照群に比べ有意に低い (10%前後) 値で投与終了時まで推移した。しかし、雌では特に異常はなかった。

40 mg/kg 投与群では、雄の体重が対照群に比べ軽微 (5%前後) ながら低値を保って推移し、投与 4 週時に統計学的有意差も認められた。しかし、雌では異常はなかった。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも体重変化に異常は認められなかった。

3. 摂餌量 (表 7、8)

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 1 週時に摂餌量が対照群に比べ顕著 (40-45%) に減少し、その後徐々に回復するものの、投与期間中の総平均値で約 20%減少した。

40 mg/kg 投与群では、高用量群と同様に雌雄の摂餌量が投与 1 週時から軽度ながら有意 (21-27%) に減少し、総平均値では対照群に比べ 10%前後の低値を示した。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群との間に差はなかった。

4. 食餌効率 (表 9、10)

80 mg/kg 投与群では、雌の食餌効率が対照群に比べ 27%高値を示したが、雄の値は対照群と同等であった。

40 mg/kg 投与群では、雌の食餌効率が対照群に比べ 23%高値を示したが、雄では差はなかった。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも食餌効率は対照群と同等であった。

5. 眼検査成績 (表 12、13)

雌雄とも被験物質投与に関連付けられる異常はいずれの用量群においても認められなかった。

6. 尿検査成績 (表 13、14)

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも尿量が増加し、蛋白が減少した。

40 および 8 mg/kg 投与群では、雌において尿量が増加傾向にあり、蛋白の減少がみられたが、雄では特に異常はなかった。

7. 血液学的検査成績 (表 15、16)

80 mg/kg 投与群では、雌においてヘマトクリット値 (Ht)、血色素量 (Hb)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) が有意に減少し、小球性低色素性貧血が認められた。雄においても Hb、MCH、MCHC

が有意に減少し、軽微ながら貧血傾向がみられた。また、雌雄ともプロトロンビン時間 (PT) の短縮および白血球数 (WBC) の有意な増加がみられ、雌では血小板数 (PLT) と網赤血球数 (Retics) も有意に増加した。白血球のデイファレンシャルカウントでは、雌雄ともリンパ球と単球が有意に増加した。また、雌について実施した骨髄塗末検査では、赤芽球 (Erb) および肥満細胞 (Mast) の増加ならびにリンパ球 (Lym)、好中球 (Neut)、細網細胞 (Reti)、骨髄球系/赤芽球系比 (M/E ratio) の減少がみられた。

40 mg/kg 投与群では、雌において Hb、MCV、MCH、MCHC が有意に減少し、貧血傾向がみられたが、雄では貧血は観察されなかった。また、雌雄とも PT の短縮およびリンパ球の増加を伴う WBC の増加がみられ、雌では PLT と Retics が有意に増加した。

8 mg/kg 投与群では、雌において PLT の増加がみられた他は、雌雄とも特に異常は認められなかった。

8. 血液生化学的検査成績 (表 17、18)

80 mg/kg 投与群では、雌雄ともアルブミンとグロブリンの減少に伴う総蛋白 (TP) の減少がみられ、総コレステロール (T.Chol) が有意に増加した。加えて、雄では尿素窒素 (BUN)、総ビリルビン (T.Bil) およびリン (P) の有意な増加がみられ、アルカリホスファターゼ (ALP) および血糖値 (Gluc) が有意に減少した。一方、雌では γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP)、Gluc、トリグリセライド (TG)、カリウム (K) が有意に増加し、塩素 (Cl) が減少した。

40 mg/kg 投与群では、雄において ALP および Gluc が有意に減少し、雌ではアルブミ

ン・グロブリンの減少を伴う TP および Cl の減少がみられ、P および K が有意に上昇した。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも被験物質投与に関連付けられる変化はみられなかった。

9. 剖検所見 (表 19、20)

80 mg/kg 投与群では、投与 4 週後の計画殺動物において十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が雌雄とも全例に認められ、雄では肺の班点を示す個体が有意に増加した。また、試験途中で死亡した雄 1 例では、水溶性の消化管内容物が観察された。

40 mg/kg 投与群では、雌雄とも全例に十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が観察された。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも被験物質投与に関連付けられる肉眼的異常は観察されなかった。

10. 臓器重量 (表 21、22)

80 mg/kg 投与群では、雄において胸腺、前立腺および精囊・凝固腺の絶対重量・相対重量 (比体重値) がともに有意に減少し、肺、肝臓および腎臓の相対重量が有意に増加した。一方、雌では脳、下垂体および胸腺の絶対・相対重量が有意に減少し、肝臓および腎臓の絶対・相対重量がともに有意に増加した。

40 mg/kg 投与群では、雄において胸腺の絶対・相対重量の有意な減少と肺の相対重量の有意な増加が認められ、雌では脳、下垂体および胸腺の絶対・相対重量の有意な減少ならびに肝臓と腎臓の絶対・相対重量の有意な増加が認められた。

8 mg/kg 投与群では、雌において胸腺の絶対・相対重量が有意に減少したが、雄では有

意な変化は認められなかった。

11. 病理組織学的検査成績 (表 23、24)

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも前胃粘膜角化亢進、十二指腸粘膜上皮過形成、空・回腸粘膜上皮過形成、直腸粘膜杯細胞肥大、腎臓近位尿細管上皮褐色色素沈着および腸管膜リンパ節洞内血液滞留が高頻度に観察された。また、雌では全例にびまん性肝細胞肥大が認められた。

40 および 8 mg/kg 投与群では、組織学的検査は未完了で、現在検索中。

12. 肝臓の酸化ストレス測定成績 (表 25、26)

80 mg/kg 投与群では、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 含量が雄では有意に減少し、雌では逆に有意に増加した。一方、過酸化脂質には雌雄とも異常はなかった。

40 mg/kg 投与群では、雄において 8-OHdG が有意に減少したが、雌では異常はなかった。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも過酸化脂質あるいは 8-OHdG には異常はなかった。

13. 肝臓のメタロチオネイン遺伝子解析 (表 27、28)

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓におけるメタロチオネインの遺伝子発現が有意に抑制された。

40 および 8 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓におけるメタロチオネインの遺伝子発現は対照群と同等であり、異常は認められなかった。

D. 考察

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価を行うことを目的に、平成16年度では、過去に使用量が多く、ヒト、特に子供への健康影響が懸念されるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) ¹⁴⁾ を対象に反復経口投与毒性を実施した。本研究では、CCA の代表的薬剤種である CCA type B¹⁾ (CrO₃ 35.3% + CuO 19.6% + As₂O₅ 45.1%) を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で雌雄の Wistar 系ラットに毎日 1 回、4 週間に亘り反復強制経口投与し、臨床症状観察、眼検査、尿検査、血液・生化学検査、病理検査を含む諸検査を実施した。

臨床症状および死亡率では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも約半数の動物に沈静化が認められ、流涎を示す個体が散見された。また、雌では半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが観察された。死亡率では、投与 1 週時に雄 1 例が死亡したが、雌では死亡例はなかった。また、40 mg/kg 投与群では、雄には異常はなかったが、雌では約半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが認められ、流涎を示す個体が散見された。これらの臨床症状発現は CCA 投与に起因するものと考えられるが、その作用機序は不明である。

体重変化では、40 mg/kg 以上の投与群の特に雄において摂餌量の減少を伴う軽度の体重増加抑制が認められた。一方、雌では摂餌量は減少傾向にあったが、体重への影響は認められず、食餌効率は対照群よりも高値を示した。

眼検査では、雌雄ともいずれの用量群においても CCA 投与に関連付けられる異常は認められなかった。

尿検査では、80 mg/kg 投与群において雌

雄とも尿量が増加し、蛋白が減少し、40 および 8 mg/kg 投与群の雌においても同様な傾向がみられた。これらの変化は CCA 投与の影響とも考えられるが、その毒性学的意味は不明である。

血液学的検査では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも小球性低色素性貧血がみられ、これに伴い雌では網赤血球数あるいは血小板数が増加した。また、同群では雌雄ともリンパ球および単球の増加を伴う総白血球数 (WBC) の増加がみられ、血液凝固系因子のプロトロンビン時間 (PT) の短縮も認められた。また、40 mg/kg 投与群でも特に雌において軽度ながら同様な変化がみられた。これらの血液学的変化に関しては、CCA の主成分のひとつであり、造血器系への影響が示唆¹⁵⁾されているヒ素により誘発されたものと推察した。なお、PT の短縮に関しては、その毒性学的意味は不明である。

血液生化学的検査では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも低蛋白血症および高コレステロール血症が認められ、加えて、雄では尿素窒素 (BUN)、総ビリルビン (T.Bil) およびリン (P) が増加が、雌ではγ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP)、血糖 (Gluc)、トリグリセライド (TG)、カリウム (K) の増加および塩素 (Cl) の減少が観察された。また、40 mg/kg 投与群の雌においても低蛋白血症および Cl の減少がみられ、P および K が有意に上昇した。これらの変化は、概ね腎機能障害を反映する所見であり、後述する腎臓の重量増加と病理所見に関連する変化と推察した。一般に腎疾患 (機能障害) 時、特にネフローゼ症候群では、血中のアルブミンが減少するため低比重リポ蛋白が増加し高コレステロール血症を呈し、