

Table 23 - 1 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	10	10	10	9
Mammary gland :	[N=]	10	NE	NE	8
Not in section		0	-	-	1
Bone marrow(vertebra) :	[N=]	10	NE	NE	9
Hematopoiesis, decreased		0	-	-	1
Bone marrow(sternum) :	[N=]	10	NE	NE	9
Hematopoiesis, decreased		0	-	-	2
Bone marrow(femur) :	[N=]	10	NE	NE	9
Hematopoiesis, decreased		0	-	-	2
Thymus :	[N=]	10	NE	NE	9
Lymphoid atrophy/depletion		0	-	-	3
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	10	NE	NE	9
Sinus erythrocytosis		0	-	-	7 **
Lung :	[N=]	10	NE	NE	9
Hemorrhage		2	-	-	6
Pneumonia		0	-	-	2
Forestomach :	[N=]	10	NE	NE	9
Hyperkeratosis		0	-	-	7 **
Glandular stomach :	[N=]	10	NE	NE	9
Erosion/ulcer		0	-	-	1
Duodenum :	[N=]	10	NE	NE	9
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	9 **
Jejunum :	[N=]	10	NE	NE	9
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	9 **
Ileum :	[N=]	10	NE	NE	9
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	9 **
Rectum :	[N=]	10	NE	NE	9
Hypertrophy, goblet cell		0	-	-	5 *
Liver :	[N=]	10	NE	NE	9
Necrosis, hepatocyte, focal		0	-	-	1
Proliferation, bile duct		0	-	-	1
Microgranuloma		2	-	-	0
Pancreas :	[N=]	10	NE	NE	9
Atrophy, acinar cell		1	-	-	0
Kidney :	[N=]	10	NE	NE	9
Dilatation, pelvis		1	-	-	0
Deposition, brown pigment, proximal tubular cell		0	-	-	9 **
Epididymis :	[N=]	10	NE	NE	9
Sperm granuloma		0	-	-	2
Prostate :	[N=]	10	NE	NE	9
Prostatitis		1	-	-	2
Pituitary :	[N=]	10	NE	NE	9
Cyst, anterior lobe		0	-	-	1
Thyroid :	[N=]	10	NE	NE	9
Hydropic degeneration, follicular cell		2	-	-	0
Harderian gland :	[N=]	10	NE	NE	9
Cellular infiltration, mononuclear cell		0	-	-	1
Skin(fumbo-dorsal) :	[N=]	10	NE	NE	9

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

NE: Not examined.

Table 23 - 2 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	10	10	10	9
<Continued from previous page>					
Spleen :	[N=]	10	NE	NE	9
Lymph node(cervical) :	[N=]	10	NE	NE	9
Bone(vertebra) :	[N=]	10	NE	NE	9
Bone(sternum) :	[N=]	10	NE	NE	9
Bone(femur) :	[N=]	10	NE	NE	9
Joint(knee) :	[N=]	10	NE	NE	9
Muscle(m. triceps surae) :	[N=]	10	NE	NE	9
Nasal cavity :	[N=]	10	NE	NE	9
Larynx :	[N=]	10	NE	NE	9
Trachea :	[N=]	10	NE	NE	9
Heart :	[N=]	10	NE	NE	9
Artery(aorta) :	[N=]	10	NE	NE	9
Tongue :	[N=]	10	NE	NE	9
Sublingual gland :	[N=]	10	NE	NE	9
Submandibular gland :	[N=]	10	NE	NE	9
Pharynx :	[N=]	10	NE	NE	9
Esophagus :	[N=]	10	NE	NE	9
Cecum :	[N=]	10	NE	NE	9
Colon :	[N=]	10	NE	NE	9
Urinary bladder :	[N=]	10	NE	NE	9
Testis :	[N=]	10	NE	NE	9
Seminal vesicle :	[N=]	10	NE	NE	9
Coagulating gland :	[N=]	10	NE	NE	9
Parathyroid :	[N=]	10	NE	NE	9
Adrenal :	[N=]	10	NE	NE	9
Cerebrum :	[N=]	10	NE	NE	9
Cerebellum :	[N=]	10	NE	NE	9
Pons :	[N=]	10	NE	NE	9
Medulla oblongata :	[N=]	10	NE	NE	9
Spinal cord(cervical) :	[N=]	10	NE	NE	9
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	10	NE	NE	9
Spinal cord(lumbar) :	[N=]	10	NE	NE	9
Nerve(sciatic) :	[N=]	10	NE	NE	9
Eye :	[N=]	10	NE	NE	9

[N=]: Number of animals examined at the site.

NE: Not examined.

Table 23 - 3 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Killed *in extremis* or found dead

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	0	0	0	1
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	0	0	0	1
Sinus erythrocytosis		-	-	-	1
Testis :	[N=]	0	0	0	1
Spermatogenesis, decreased		-	-	-	1
Epididymis :	[N=]	0	0	0	1
Oligospermia		-	-	-	1
Skin(lumbo-dorsal) :	[N=]	0	0	0	1
Mammary gland :	[N=]	0	0	0	1
Bone marrow(vertebra) :	[N=]	0	0	0	1
Bone marrow(sternum) :	[N=]	0	0	0	1
Bone marrow(femur) :	[N=]	0	0	0	1
Spleen :	[N=]	0	0	0	1
Thymus :	[N=]	0	0	0	1
Lymph node(cervical) :	[N=]	0	0	0	1
Bone(vertebra) :	[N=]	0	0	0	1
Bone(sternum) :	[N=]	0	0	0	1
Bone(femur) :	[N=]	0	0	0	1
Joint(knee) :	[N=]	0	0	0	1
Muscle(m. triceps surae) :	[N=]	0	0	0	1
Nasal cavity :	[N=]	0	0	0	1
Larynx :	[N=]	0	0	0	1
Trachea :	[N=]	0	0	0	1
Lung :	[N=]	0	0	0	1
Heart :	[N=]	0	0	0	1
Artery(aorta) :	[N=]	0	0	0	1
Tongue :	[N=]	0	0	0	1
Sublingual gland :	[N=]	0	0	0	1
Submandibular gland :	[N=]	0	0	0	1
Pharynx :	[N=]	0	0	0	1
Esophagus :	[N=]	0	0	0	1
Forestomach :	[N=]	0	0	0	1
Glandular stomach :	[N=]	0	0	0	1
Duodenum :	[N=]	0	0	0	1
Jejunum :	[N=]	0	0	0	1
Ileum :	[N=]	0	0	0	1
Cecum :	[N=]	0	0	0	1
Colon :	[N=]	0	0	0	1
Rectum :	[N=]	0	0	0	1
Liver :	[N=]	0	0	0	1
Pancreas :	[N=]	0	0	0	1
Kidney :	[N=]	0	0	0	1
Urinary bladder :	[N=]	0	0	0	1
Seminal vesicle :	[N=]	0	0	0	1
Coagulating gland :	[N=]	0	0	0	1
Prostate :	[N=]	0	0	0	1

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

Table 23 - 4 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Killed *in extremis* or found dead

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	0	0	0	1
<Continued from previous page>					
Pituitary :	[N=]	0	0	0	1
Thyroid :	[N=]	0	0	0	1
Parathyroid :	[N=]	0	0	0	1
Adrenal :	[N=]	0	0	0	1
Cerebrum :	[N=]	0	0	0	1
Cerebellum :	[N=]	0	0	0	1
Pons :	[N=]	0	0	0	1
Medulla oblongata :	[N=]	0	0	0	1
Spinal cord(cervical) :	[N=]	0	0	0	1
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	0	0	0	1
Spinal cord(lumbar) :	[N=]	0	0	0	1
Nerve(sciatic) :	[N=]	0	0	0	1
Eye :	[N=]	0	0	0	1
Harderian gland :	[N=]	0	0	0	1

[N=]: Number of animals examined at the site.

Table 23 - 5 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
All animals examined

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	10	10	10	10
Mammary gland :	[N=]	10	NE	NE	9
Not in section		0	-	-	1
Bone marrow(vertebra) :	[N=]	10	NE	NE	10
Hematopoiesis, decreased		0	-	-	1
Bone marrow(sternum) :	[N=]	10	NE	NE	10
Hematopoiesis, decreased		0	-	-	2
Bone marrow(femur) :	[N=]	10	NE	NE	10
Hematopoiesis, decreased		0	-	-	2
Thymus :	[N=]	10	NE	NE	10
Lymphoid atrophy/depletion		0	-	-	3
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	10	NE	NE	10
Sinus erythrocytosis		0	-	-	8 **
Lung :	[N=]	10	NE	NE	10
Hemorrhage		2	-	-	6
Pneumonia		0	-	-	2
Forestomach :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperkeratosis		0	-	-	7 **
Glandular stomach :	[N=]	10	NE	NE	10
Erosion/ulcer		0	-	-	1
Duodenum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	9 **
Jejunum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	9 **
Ileum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	9 **
Rectum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hypertrophy, goblet cell		0	-	-	5 *
Liver :	[N=]	10	NE	NE	10
Necrosis, hepatocyte, focal		0	-	-	1
Proliferation, bile duct		0	-	-	1
Microgranuloma		2	-	-	0
Pancreas :	[N=]	10	NE	NE	10
Atrophy, acinar cell		1	-	-	0
Kidney :	[N=]	10	NE	NE	10
Dilatation, pelvis		1	-	-	0
Deposition, brown pigment, proximal tubular cell		0	-	-	9 **
Testis :	[N=]	10	NE	NE	10
Spermatogenesis, decreased		0	-	-	1
Epididymis :	[N=]	10	NE	NE	10
Oligospermia		0	-	-	1
Sperm granuloma		0	-	-	2
Prostate :	[N=]	10	NE	NE	10
Prostatitis		1	-	-	2
Pituitary :	[N=]	10	NE	NE	10
Cyst, anterior lobe		0	-	-	1

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

NE: Not examined.

Table 23 - 6 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
All animals examined

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	10	10	10	10
<Continued from previous page>					
Thyroid :	[N=]	10	NE	NE	10
Hydropic degeneration, follicular cell		2	-	-	0
Harderian gland :	[N=]	10	NE	NE	10
Cellular infiltration, mononuclear cell		0	-	-	1
Skin(lumbo-dorsal) :	[N=]	10	NE	NE	10
Spleen :	[N=]	10	NE	NE	10
Lymph node(cervical) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone(vertebra) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone(sternum) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone(femur) :	[N=]	10	NE	NE	10
Joint(knee) :	[N=]	10	NE	NE	10
Muscle(m. triceps surae) :	[N=]	10	NE	NE	10
Nasal cavity :	[N=]	10	NE	NE	10
Larynx :	[N=]	10	NE	NE	10
Trachea :	[N=]	10	NE	NE	10
Heart :	[N=]	10	NE	NE	10
Artery(aorta) :	[N=]	10	NE	NE	10
Tongue :	[N=]	10	NE	NE	10
Sublingual gland :	[N=]	10	NE	NE	10
Submandibular gland :	[N=]	10	NE	NE	10
Pharynx :	[N=]	10	NE	NE	10
Esophagus :	[N=]	10	NE	NE	10
Cecum :	[N=]	10	NE	NE	10
Colon :	[N=]	10	NE	NE	10
Urinary bladder :	[N=]	10	NE	NE	10
Seminal vesicle :	[N=]	10	NE	NE	10
Coagulating gland :	[N=]	10	NE	NE	10
Parathyroid :	[N=]	10	NE	NE	10
Adrenal :	[N=]	10	NE	NE	10
Cerebrum :	[N=]	10	NE	NE	10
Cerebellum :	[N=]	10	NE	NE	10
Pons :	[N=]	10	NE	NE	10
Medulla oblongata :	[N=]	10	NE	NE	10
Spinal cord(cervical) :	[N=]	10	NE	NE	10
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	10	NE	NE	10
Spinal cord(lumbar) :	[N=]	10	NE	NE	10
Nerve(sciatic) :	[N=]	10	NE	NE	10
Eye :	[N=]	10	NE	NE	10

[N=]: Number of animals examined at the site.

NE: Not examined.

Table 24 - 1 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	10	10	10	10
Skin(other sites) :	[N=]	0 a	NE	NE	3 a
Atrophy, hair follicle		-	-	-	1
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	10	NE	NE	10
Sinus erythrocytosis		1	-	-	8 **
Lung :	[N=]	10	NE	NE	10
Hemorrhage		4	-	-	5
Pneumonia		1	-	-	0
Forestomach :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperkeratosis		0	-	-	4 *
Duodenum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	9 **
Jejunum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	10 **
Ileum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	8 **
Rectum :	[N=]	10	NE	NE	10
Hypertrophy, goblet cell		0	-	-	4 *
Liver :	[N=]	10	NE	NE	10
Necrosis, hepatocyte, focal		0	-	-	1
Hypertrophy, hepatocyte, diffuse		0	-	-	10 **
Proliferation, bile duct		0	-	-	1
Common bile duct :	[N=]	0 a	NE	NE	1 a
Erosion/ulcer		-	-	-	1
Kidney :	[N=]	10	NE	NE	10
Luminal dilatation, renal tubule		1	-	-	0
Dilatation, pelvis		1	-	-	0
Calcification, cortico-medullary junction		2	-	-	1
Deposition, brown pigment, proximal tubular cell		0	-	-	10 **
Pituitary :	[N=]	10	NE	NE	10
Cyst, anterior lobe		1	-	-	1
Cyst, intermediate lobe		1	-	-	1
Thyroid :	[N=]	10	NE	NE	10
Hydropic degeneration, follicular cell		0	-	-	1
Skin(lumbo-dorsal) :	[N=]	10	NE	NE	10
Mammary gland :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone marrow(vertebra) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone marrow(sternum) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone marrow(femur) :	[N=]	10	NE	NE	10
Spleen :	[N=]	10	NE	NE	10
Thymus :	[N=]	10	NE	NE	10
Lymph node(cervical) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone(vertebra) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone(sternum) :	[N=]	10	NE	NE	10
Bone(femur) :	[N=]	10	NE	NE	10
Joint(knee) :	[N=]	10	NE	NE	10

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

Tissue(other sites): Tissues sampled from region(s) not designated in the protocol.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

NE: Not examined.

Table 24 - 2 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	No. of animals examined	10	10	10	10
<Continued from previous page>					
Muscle(m. triceps surae) :	[N=]	10	NE	NE	10
Nasal cavity :	[N=]	10	NE	NE	10
Larynx :	[N=]	10	NE	NE	10
Trachea :	[N=]	10	NE	NE	10
Heart :	[N=]	10	NE	NE	10
Artery(aorta) :	[N=]	10	NE	NE	10
Tongue :	[N=]	10	NE	NE	10
Sublingual gland :	[N=]	10	NE	NE	10
Submandibular gland :	[N=]	10	NE	NE	10
Pharynx :	[N=]	10	NE	NE	10
Esophagus :	[N=]	10	NE	NE	10
Glandular stomach :	[N=]	10	NE	NE	10
Cecum :	[N=]	10	NE	NE	10
Colon :	[N=]	10	NE	NE	10
Pancreas :	[N=]	10	NE	NE	10
Urinary bladder :	[N=]	10	NE	NE	10
Ovary :	[N=]	10	NE	NE	10
Vagina :	[N=]	10	NE	NE	10
Uterine horn :	[N=]	10	NE	NE	10
Uterine cervix :	[N=]	10	NE	NE	10
Parathyroid :	[N=]	10	NE	NE	10
Adrenal :	[N=]	10	NE	NE	10
Cerebrum :	[N=]	10	NE	NE	10
Cerebellum :	[N=]	10	NE	NE	10
Pons :	[N=]	10	NE	NE	10
Medulla oblongata :	[N=]	10	NE	NE	10
Spinal cord(cervical) :	[N=]	10	NE	NE	10
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	10	NE	NE	10
Spinal cord(lumbar) :	[N=]	10	NE	NE	10
Nerve(sciatic) :	[N=]	10	NE	NE	10
Eye :	[N=]	10	NE	NE	10
Harderian gland :	[N=]	10	NE	NE	10

[N=]: Number of animals examined at the site.

NE: Not examined.

Table 25

Hepatic oxidative stress marker - Group mean values in male rats
After 28 days of treatment

(IET 04-0095)

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined: LPO (8-OH)		Lipid peroxide contents (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0	10 (6)	Mean	408	8.1
		S.D.	249	2.0
8	10 (6)	Mean	460	5.7
		S.D.	193	1.0
40	10 (6)	Mean	448	4.7 **
		S.D.	144	0.8
80	9 (6)	Mean	252	5.1 *
		S.D.	109	2.4

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from the control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test):*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 26

Hepatic oxidative stress marker - Group mean values in female rats
After 28 days of treatment

(IET 04-0095)

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined: LPO (8-OH)		Lipid peroxide contents (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0	10 (6)	Mean	345	6.9
		S.D.	240	1.9
8	10 (6)	Mean	413	10.0
		S.D.	196	5.4
40	10 (6)	Mean	548	9.2
		S.D.	218	1.6
80	10 (6)	Mean	427	14.1 **
		S.D.	212	2.6

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from the control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test):*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 27 Normalized values of metallothionein mRNA in the liver - Group (IET 04-0095)
 mean values in male rats after 28 days of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		MT-1 (Ratio to GAPDH)	MT-2 (Ratio to GAPDH)
0	8	Mean	3.45	2.35
		S.D.	1.68	2.12
8	8	Mean	2.76	1.45
		S.D.	0.82	0.42
40	8	Mean	3.06	1.56
		S.D.	1.45	1.10
80	8	Mean	1.59 *	0.70 *
		S.D.	1.03	0.51

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from the control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test):*, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 28

Normalized values of metallothionein mRNA in the liver - Group (IET 04-0095)
 mean values in female rats after 28 days of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		MT-1 (Ratio to GAPDH)	MT-2 (Ratio to GAPDH)
0	8	Mean	3.79	4.41
		S.D.	1.04	1.62
8	8	Mean	4.58	5.69
		S.D.	1.72	1.61
40	8	Mean	2.91	2.99
		S.D.	1.02	1.48
80	8	Mean	1.92 *	1.81 **
		S.D.	1.13	1.18

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from the control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test):*, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

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皮投与毒性試験

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 武田真紀夫 （財）残留農薬研究所 毒性部分子毒性研究室
高橋 尚史 （財）残留農薬研究所 毒性部病理研究室
高橋 義博 （株）新日本科学 安全性研究所

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（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。臨床検査では、尿蛋白・ビリルビンの増加、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。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。

A. 研究目的

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、ヒトの健康、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）¹⁻⁴を対象に種々の毒性試験を実施した。本研究では、

CCA をラットに反復経皮投与した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。なお、投与期間は当初の予定では 13 週間であったが、高用量群において被験物質適用部位の皮膚の状態が悪化したため、動物愛護の観点から投与期間を 8 週間に短縮して試験を終了した。

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」および平成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」および農薬の毒性試験ガイドライン「12農産第8147号、平成12年11月24日付け」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)の中から代表的薬剤配合種のひとつであるCCA-2号(CCA-type B)を選択し、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(東京都)、ヒ素はキシダ化学株式会社(大阪府)より入手した。受領した被験物質は、被験物質保管所内常温室デシケータ内(許容温度:16~24℃)で保管した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社(滋賀県)で生産されたSprague-Dawley系SPFラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに5週齢で購入し、1週間試験環境に馴化した後、6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19~25℃、湿度30~70%、換気回数15回/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6時点灯、午後6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8匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後、各群の動物を1匹ずつステンレス鋼製個別ケージ(D32.5cm x W19.5cm x H18cm)に収容した。動物の個体識別は耳パンチ法で行なった。基礎飼料には固形飼料CE-2(日本クレア株式会社)を用い、動物に自由に摂取させた。ただし、4時間蓄尿採取時および剖検前日の午後5時前後より絶食とした。飲料水は、水道法水質基準に適合した水を自動給水装置(Edstrom Industries, Inc.)を用いて自由に摂取させた。

3. 試験群

農薬の毒性試験ガイドラインに定める投与量としての上限用量1000mg/kgを最高用量として設定し、公比3倍で中間用量を300と100mg/kg、そして無毒性量としての予想で10mg/kgを最低用量として設定した。これらの設定用量群(0、10、100、300および1000mg/kgの5用量)の各用量群につき雌雄とも8匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量(0、10、100、300、1000mg/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3mL/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、333、99.9、33.3 および 3.33 mg/mL の濃度になるよう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. 投与方法および投与期間

投与開始前日に各動物の背部(4 cm x 5 cm)を電気バリカンで剃毛し、適用部位を確保した。投与日には、剃毛部皮膚に各用量群の投与液(対照群は注射用水)を均一に塗布し、塗布部位をパラフィルム及びプリント布で覆い、非刺激性テープ(株式会社ジェイ・エム・エス)と粘着性伸縮包帯(ニチバンメディカル株式会社)にて固定し、1日あたり約24時間閉塞適用した。投与は1日1回、週7日間行った。なお、剃毛は原則として週2回行い、その際には塗布部位の皮膚を刺激しないように配慮した。

投与期間は当初13週間を予定していたが、適用部位の皮膚の状態が潰瘍形成などで悪化したため、投与継続は科学的かつ動物愛護の観点からも不適切と判断され、8週間に短縮して試験を終了した。また、300 mg/kg 投与群については、投与3週時までに雌の全例が死亡したため、雄の生存動物を投与4週時に屠殺し諸検査を実施した。

6. 動物の観察

全動物について、投与期間中1日2回(投与前に1回、投与後約2時間に1回)以上と剖検日に1回、瀕死状態ないし死亡の有無および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

全動物について、毎週1回、個体別摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中の延べ日数で除し、用量群毎に1日1匹あたりの摂餌量(群別平均摂餌量)を算出した。

9. 眼科学的検査

馴化期間中に1回雌雄の全馴化動物、投与4週時に300 mg/kg 投与群の全生存動物および投与8週時に対照群と100 mg/kg 投与群の全生存動物について、眼科学的検査を行った。検査には、肉眼(ペンライト使用)およびスリットランプ(コーワSL-14、有限会社幸田電子)により前眼部および中間透光体を観察し、眼底検査については額带式双眼倒像検眼鏡(ID-10、株式会社トプコン)を用いて行った。

10. 尿検査

投与4週時に300 mg/kg 投与群の全生存動物について、また、投与8週時に0、10および100 mg/kg 投与群の生存動物全例について尿検査を実施した。検査には各動物から強制採尿法により得られた新鮮尿を用いて、色調、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、尿潜血およびウロビリノーゲンについて検査した。色調は肉眼で、その他の項目は自動尿分析器(Clinitek 200+, Miles Labs., Inc.)にて測定した。

11. 血液学的検査

投与 4 週時に 300 mg/kg 投与群の全生存動物について、また、投与 8 週時に 0、10 および 100 mg/kg 投与群の生存動物全例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。動物をペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液の腹腔内投与による麻酔下で開腹し、凝固検査用に 3.8 w/v%クエン酸ナトリウム水溶液添加の注射筒を、その他の検査用に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（Plat.）、網赤血球数（Ret.）、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（Neutro.）、リンパ球（Lymph.）、単球（Mono.）、好酸球（Eosino.）、好塩基球（Baso.）、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。

12. 血液生化学的検査

前項の血液学的検査で採取した各群の血液試料の血清を用い、以下の項目を JCA-BM8 自動分析装置（日本電子株式

社）にて測定した。

測定項目（略号）：アルカリホスファターゼ（ALP）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（G-GTP）、クレアチニン（Creat.）、尿素窒素（BUN）、総蛋白（T.Prot.）、アルブミン（Albumin）、グロブリン（Globlin）、アルブミン/グロブリン比（A/G）、血糖（Glucose）、総コレステロール（T.Chol.）、トリグリセライド（TGL）、総ビリルビン（T.Bil.）、カルシウム（Ca）、無機リン（IP）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）および塩素（Cl）

13. 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。投与 4 週間（300 mg/kg 群）あるいは 8 週間（0、10、100 mg/kg 群）投与終了後の計画殺動物は、ペントバルビタールナトリウム水溶液の腹腔内投与による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、眼球及び視神経はホルムアルデヒド・グルタールアルデヒド混合液で、精巣はブアン液で固定した。

採取した臓器及び組織：脳（大脳、小脳、橋および延髄）、脊髄（胸部）、坐骨神経（両側）、下垂体、胸腺、甲状腺および上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾臓、骨および骨髓（胸骨、両側大腿骨）、顎下リンパ節（両側）、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈（胸部）、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、舌、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、精囊(両側)、卵巣(両側)、子宮、膣、涙腺(両側)、眼球(視神経を含む、両側)、ハーダー腺(両側)、大腿四頭筋(両側)、乳腺および皮膚(乳頭を含む)、投与部位(背部皮膚)および肉眼的異常部位

14. 臓器重量

投与4週間あるいは8週間終了後の計画殺動物について、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。

測定臓器: 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、精囊(両側)、卵巣(両側)、子宮

15. 病理組織標本作製

投与4週後の計画殺動物(300 mg/kg 投与群)全例、投与8週後の計画殺動物(対照群および100 mg/kg 群)全例ならびに各用量群の死亡・切迫殺動物全例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標本作製した。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。

組織標本対象臓器・組織: 脳(大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄(胸部)、坐骨神経(左側)、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、左側大腿骨)、顎下リ

ンパ節(左側)、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈(胸部)、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、舌、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、精囊(左側)、卵巣(両側)、子宮、膣、涙腺(両側)、眼球(視神経を含む、両側)、ハーダー腺(両側)、大腿四頭筋(左側)、皮膚(左胸部)、乳腺(雌のみ)、投与部位(背部皮膚)および肉眼的異常部位

なお、上記の臓器・組織の病理組織学的検査は今年度中に完了出来なかったため、次年度に報告予定。

16. CCAの薬物動態検査(トキシコキネティクス)

投与8週時に0、10および100 mg/kg 群の生存動物を代謝ケージに入れ4時間尿(蓄尿)を採取した。採取した尿サンプルは将来の分析のため冷凍庫(-10℃以下)にて保存した。

投与4週後の300 mg/kg 群の計画殺動物(雄)および同群の切迫殺動物(雌)ならびに投与8週後の0、10および100 mg/kg 群の計画殺動物(雌雄)から採取された血漿サンプルの一部(各群雌雄各1~3例)をCCAの分析に供した。また、投与8週後の100 mg/kg 群の計画殺動物(雌雄)から採取された肝臓の一部(雌雄各3例)をCCAの分析に供した。なお、これらの血漿および肝臓サンプルのCCA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。

17. 肝臓の酸化ストレス（活性酸素関連物質）の測定

投与4週間（300 mg/kg 群の雄）および8週間（0、10、100 mg/kg 群の雌雄）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。

18. 肝臓のメタロチオネイン mRNA の定量

投与4週間（300 mg/kg 群の雄）および8週間（0、10、100 mg/kg 群の雌雄）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:

ACTGCCGCCTCCATTCCG

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GADPHの発現量で標準化（GAPDHに対する比率）し、normalized valueとして表した。

19. 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、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、Dunnnett 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、Dunnnett 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。尿検査項目の評価段階付きデータについては、Wilcoxon 順位和検定、尿色については Fisher 直接確立検定を対照群と各被験物質投与群との間で実施した。これらの検定および計算には MUSCOT 統計解析ソフトウェア（ユックムス株式会社）を使用して行った。一般状態（臨床症状）、眼検査および剖検所見については統計検定を実施しなかった。

C. 研究結果

1. 臨床症状および死亡率（表1、2）

1000 mg/kg 投与群では、投与初期から自発運動の低下、失調歩行あるいは外陰部の汚れが認められ、雌雄とも投与開始後1週間以内に全例が死亡した。

300 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与2週時以降に自発運動の低下、後肢麻痺、赤色鼻漏、皮膚蒼白、体温低下などが認められ、投与開始後3週間以内に雄の3/8例が、雌では全例が死亡あるいは容態悪化のため切迫殺された。このため雄の生存動物は投与4週時の終了時点で屠殺し、諸検査を実施した。

100 mg/kg 投与群では、投与6週時に雄1例が、また、投与8週時に雄2例および雌1例がそれぞれ死亡した。これらの動物は生前（投与5週時以降）に自発運動の低下、後肢麻痺あるいは体温低下を示した。

10 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異常は認められず、死亡例もなかった。

なお、被験物質適用部位の皮膚の状態については、100 mg/kg 以上の投与群では投与1週時から痂皮形成が認められ、長期間暴露された100 mg/kg 投与群では投与8週時には潰瘍形成など皮膚の状態が悪化したため、投与部位として不適切な状態となり、かつ、動物愛護の観点から、投与期間を当初の予定の13週間から8週間に短縮して試験を終了した。10 mg/kg 投与群では、雄では投与5週以降、雌では2週時以降に軽度の痂皮形成が少数例の動物に観察された。

2. 摂餌量（表3）

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため、摂餌量の評価は出来なかった。

300 mg/kg 投与群では、雌雄とも1週時から摂餌量が対照群に比べ22~48%減少したが、雌では投与2週時には回復した。

100 mg/kg 投与群では、雄の摂餌量が軽度（15%前後）に減少したが、雌では対照群と

同等であった。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と比べ投与期間中の摂餌量に差はなかった。

3. 体重変化 (表 4)

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 1 週時に全例が死亡したため、体重変化については評価できなかった。

300 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低値 (10%前後) 保って推移した。しかし、雌では特に異常はなかった。

100 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たが、雌では異常はなかった。

10 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。

4. 眼検査成績 (表 5)

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。

5. 尿検査成績 (表 6)

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 1 週時に死亡したため尿検査は実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、雄の 4 週時の検査において尿蛋白、糖およびビリルビンの増加傾向が認められた。雌においては投与 3 週時まで全例が死亡したため検査を実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも尿蛋白およびビリルビンの増加がみられ、雄では糖も増加傾向を示した。

10 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異常は認められなかった。

6. 血液学的検査成績 (表 7)

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 1 週時に全例が死亡したため、血液検査は実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、雄の投与 4 週時の検査において赤血球数 (RBC)、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) が減少し、小球性低色素性貧血が認められた。加えて、網赤血球数 (Ret.)、血小板数 (Plat.) および白血球数 (WBC) が増加した。白血球のディファレンシャルカウントでは、リンパ球 (Lymph.)、好中球 (Neutro.) および単球 (Mono.) の増加と好酸球 (Eosino.) の減少がみられた。また、凝固系因子のプロトロンビン時間 (PT) の短縮傾向が認められた。なお、雌は投与 3 週時まで全例が死亡したため血液検査は実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも Ht、Hb、MCV、MCH および MCHC が有意に減少し、300 mg/kg 投与群と同様の小球性低色素性貧血がみられた。また、雌雄とも Ret.、Plat. および WBC の有意な増加あるいは増加傾向がみられた。白血球のディファレンシャルカウントでは、Neutro. および Mono. の有意な増加あるいは増加傾向がみられ、加えて、雄では Lymph. が増加し、雌では Eosino. が減少した。

10 mg/kg 投与群では、雌雄ともいずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。