

Table 10-3 Relative organ weight in male rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection				CCA			
			10	8	100	300	1000	300	1000	1000
Pituitary	(mg/100gBW)		3.64±0.47	3.54±0.41	3.32±0.65	3.66±0.61				
Thyroid-R	(mg/100gBW)		2.69±0.69	2.91±0.71	2.82±0.39	2.92±1.64				
Thyroid-L	(mg/100gBW)		2.85±0.97	2.39±0.90	2.96±0.38	3.10±1.02				
Thyroid-R&L	(mg/100gBW)		5.54±1.59	5.29±1.54	5.78±0.73	6.02±2.31				
Adrenal-R	(mg/100gBW)		8.60±1.37	9.36±1.12	9.76±0.29	14.54±3.50				
Adrenal-L	(mg/100gBW)		9.39±1.12	9.91±1.16	10.50±0.43	17.54±2.96				
Adrenal-R&L	(mg/100gBW)		17.99±2.38	19.30±2.21	20.26±0.39	32.06±4.55				
Testis-R	(mg/100gBW)		465.5±133.2	500.8±52.7	489.8±45.5	586.6±67.9				
Testis-L	(mg/100gBW)		486.5±127.4	489.3±46.1	483.8±48.3	582.8±61.2				
Testis-R&L	(mg/100gBW)		951.9±254.7	990.0±97.5	973.0±92.6	1169.4±123.6				
Thymus	(mg/100gBW)		80.0±21.4	78.3±12.6	74.8±12.6	65.2±36.6				
Submand.-R	(mg/100gBW)		91.1±8.5	88.5±11.4	82.0±6.2	84.8±11.4				
Submand.-L	(mg/100gBW)		92.1±9.2	87.4±7.9	82.8±8.1	80.6±10.9				
Submand.-R&L	(mg/100gBW)		183.1±17.5	175.8±19.2	165.2±14.0	165.6±22.1				
Spleen	(mg/100gBW)		169.8±10.4	182.3±18.8	318.2±35.2**	328.2±145.1				
Brain	(mg/100gBW)		643.6±82.3	620.0±70.1	649.4±57.5	820.4±87.7				
Heart	(mg/100gBW)		368.9±28.8	374.1±34.7	403.0±43.8	440.6±52.0				
Lung	(mg/100gBW)		348.8±20.6	330.0±34.0	345.2±26.2	421.8±41.6				
Liver	(g/100gBW)		2.689±0.137	2.690±0.093	3.384±0.305**	4.032±0.444				
Kidney-R	(mg/100gBW)		431.3±30.4	417.6±32.0	643.0±208.0*	851.2±145.5				
Kidney-L	(mg/100gBW)		422.5±20.7	407.1±32.6	666.0±212.3*	832.6±103.7				
Kidney-R&L	(mg/100gBW)		853.9±47.6	824.9±62.1	1309.2±420.1*	1683.8±243.7				
Epidiid.-R	(mg/100gBW)		165.6±35.3	173.6±19.4	163.2±22.7	127.6±20.1				
Epidiid.-L	(mg/100gBW)		167.3±33.6	175.3±19.2	168.2±22.0	122.2±17.5				
Epidiid.-R&L	(mg/100gBW)		332.8±66.6	348.8±38.0	331.4±44.4	250.2±37.0				
Sem. Vesic.	(mg/100gBW)		355.1±72.9	346.0±62.8	263.2±56.9*	204.8±65.5				
Prostate	(mg/100gBW)		280.4±52.4	280.4±56.9	215.4±16.5	151.6±40.4				

Values are expressed as the mean ± S.D.  
 Statistical analyses were not performed at 300 mg/kg.  
 \* P<0.05, \*\* P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Table 10-4 Relative organ weight in female rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection	CCA		CCA		CCA	
				10	8	100	7	300	0
Pituitary	(mg/100gBW)		6.89±0.89	7.23±1.01	6.21±0.92				
Thyroid-R	(mg/100gBW)		3.68±0.66	3.68±1.11	3.81±0.45				
Thyroid-L	(mg/100gBW)		3.18±1.05	3.43±1.07	3.03±0.41				
Thyroid-R&L	(mg/100gBW)		6.85±1.60	7.08±2.12	6.83±0.80				
Adrenal-R	(mg/100gBW)		16.25±2.69	16.68±2.12	18.80±2.96				
Adrenal-L	(mg/100gBW)		17.61±3.07	18.40±3.54	19.37±3.71				
Adrenal-R&L	(mg/100gBW)		33.85±5.70	35.08±5.54	38.20±6.00				
Ovary-R	(mg/100gBW)		16.74±1.73	18.56±3.39	14.33±4.73				
Ovary-L	(mg/100gBW)		16.34±2.67	17.35±3.35	13.39±4.40				
Ovary-R&L	(mg/100gBW)		33.06±2.86	36.01±4.95	27.69±9.03				
Thymus	(mg/100gBW)		119.4±28.9	116.0±24.2	79.6±24.2*				
Submand.-R	(mg/100gBW)		97.6±8.9	94.8±6.2	91.3±7.7				
Submand.-L	(mg/100gBW)		95.0±7.1	95.4±7.2	93.9±11.2				
Submand.-R&L	(mg/100gBW)		192.5±15.7	190.4±12.6	185.3±18.6				
Spleen	(mg/100gBW)		196.0±24.4	205.5±21.9	288.9±35.1**				
Brain	(mg/100gBW)		964.8±58.5	961.5±99.9	908.9±54.0				
Heart	(mg/100gBW)		404.5±29.2	423.0±34.1	470.4±27.6**				
Lung	(mg/100gBW)		437.0±23.8	443.4±37.4	417.7±32.9				
Liver	(g/100gBW)		2.820±0.100	2.960±0.146	3.791±0.109**				
Kidney-R	(mg/100gBW)		437.6±22.6	443.5±29.4	637.9±66.4**				
Kidney-L	(mg/100gBW)		418.8±17.9	435.8±38.6	627.6±96.9**				
Kidney-R&L	(mg/100gBW)		856.4±34.5	879.3±65.3	1265.1±156.4**				
Uterus	(mg/100gBW)		186.0±26.0	236.0±134.2	125.4±49.8				

Values are expressed as the mean ± S.D.  
 Statistical analyses were not performed at 300 mg/kg.  
 \* P<0.05, \*\* P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Table 11- 1 Hepatic oxidative stress marker - Group mean values in male rats after 4 or 8 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		Lipid peroxide content (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0 (8 weeks)	8	Mean	556	13.51
		S.D.	207	4.23
10 (8 weeks)	8	Mean	606	11.07
		S.D.	333	4.21
100 (8 weeks)	5	Mean	454	9.65
		S.D.	203	6.38
300 (4 weeks)	5	Mean	162 **	6.94
		S.D.	27	2.85

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 11- 2 Hepatic oxidative stress marker - Group mean values in female rats after 8 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		Lipid peroxide content (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0	8	Mean	573	8.43
		S.D.	176	2.63
10	8	Mean	680	7.68
		S.D.	366	2.36
100	7	Mean	229 **	176.51 **
		S.D.	67	66.45

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 12 - 1 Normalized values of metallothionein mRNA in the liver - Group mean values in male rats after 4 or 8 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		MT-1 (Ratio to GAPDH)	MT-2 (Ratio to GAPDH)
0 ( 8 weeks )	8	Mean	6.76	8.82
		S.D.	3.15	4.15
10 ( 8 weeks )	8	Mean	7.86	9.44
		S.D.	1.46	2.35
100 ( 8 weeks )	5	Mean	8.85	11.07
		S.D.	3.09	5.38
300 ( 4 weeks )	5	Mean	23.07 **	29.62 *
		S.D.	12.23	17.86

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 12 - 2 Normalized values of metallothionein mRNA in the liver - Group mean values in female rats after 8 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		MT-1 (Ratio to GAPDH)	MT-2 (Ratio to GAPDH)
0	8	Mean	5.61	7.46
		S.D.	1.56	1.99
10	8	Mean	4.66	5.07
		S.D.	1.26	1.71
100	7	Mean	13.92 **	24.62 *
		S.D.	3.63	8.94

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 4 週間反復経口神経・免疫毒性試験

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
分担研究者	首藤康文	(財)残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室主任
協力研究者	竹内幸子	(財)残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	藤江秀彰	(財)残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	松本 力	(財)残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室
	林 宏一	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	福山朋季	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

4 週間反復経口投与試験において、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。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤であるクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）をラットに 4 週間にわたって連続強制経口投与し、その神経毒性作用および免疫毒性作用を検索した。

Guideline, OPPTS 870.7800) 2) の毒性試験ガイドラインに従い、以下の条件で実施した。本試験は、CCA のラットにおける 4 週間反復経口毒性試験に神経毒性および免疫毒性検査項目を加え、神経・免疫毒性併合試験として実施した。

B. 研究方法

試験方法は平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知「農薬の登録申請に係わる試験成績について」<sup>1)</sup> および 1998 年 8 月の米国環境保護庁「Immunotoxicity (Health Effects Test

1. 被験物質

本試験の被験物質はクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）であり、クロム・銅およびヒ素の各構成成分の配合比は酸化クロム（VI 価、純度 98%、関東化学（株））35.3%、酸化銅（II 価、純度 99.3%、

関東化学(株) 19.6%および酸化ヒ素(V価、純度91.9%、キシダ化学(株)) 45.1%であった。受領した被験物質は低湿度(40%以下)、室温(許容範囲:15~30℃)の環境下にて保管した。

## 2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに6週齢にて購入し、1週間以上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業研究所に定める倫理規定に従い実施した。

## 3. 試験群

本試験は CCA の4週間反復経口毒性試験に神経毒性および免疫毒性検査項目を加

え、神経・免疫毒性併合試験として実施した。設定用量は0、8、40 および 80 mg/kg の4用量とした。主群では1用量につき雌雄とも10匹の動物を使用した。また、羊赤血球を抗原として投与する抗体価測定のため衛星群(Immunized group)を追加し、1用量につき8匹の雄動物を使用した。

## 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。投与液は投与前に室温に戻して使用した。

## 5. 体重

主群および衛星群の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、全動物について最終解剖前あるいは死亡発見時に最終体重を測定した。

## 6. 動物の観察

主群および衛星群の全動物について、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. 詳細な状態の観察

主群の全生存動物について、詳細な状態の観察を投与開始前 1 回と投与期間中毎週 1 回、午前のほぼ一定の時刻に実施した。観察は、ケージ内あるいは外（オープンフィールド）で以下の項目を対象に実施し、それらの程度をスコアリングして記録した。

ケージ内観察項目：体位/姿勢異常、呼吸状態、攣縮、振戦、痙攣

ハンドリングでの観察項目：警戒性、攻撃性、眼球突出、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、粘膜（蒼白～充血）、分泌物・付着物（眼、鼻、口などからの分泌物）、筋緊張（筋収縮性）、取り扱いに対する反応、瞳孔径の変化

オープンフィールドでの観察項目：常同行動（首振り、旋回、身繕いなど）、異常行動（自傷行動、異常発声、後ずさりなど）、被毛の状態（被毛粗剛、立毛）、皮膚色（蒼白～充血）、探索行動、歩様異常（運動協調性を含む、よろめき歩行、ひきずり歩行、後肢麻痺など）、立ち上がり姿勢（回数）、糞個数、糞の状態、尿の状態

## 8. 神経機能検査

投与 4 週時に 1 回、主群の全生存動物について以下の項目の機能検査を実施した。

観察項目：自発運動量、握力（前肢、後肢）、感覚運動反応（位置視覚、接近反応、聴覚反応、触覚反応、痛覚反応、空中立ち直り反射）

自発運動量は、遠赤外線方式の検出器（SUPER MEX®）を装着した運動量測定装置（室町機械株式会社）を用いて連続 1 時間、10 分ごとに測定した。握力はラット握力測定器 CPU gauge Model-9505（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて測

定した。感覚運動反応の各項目は以下の方法で行い、正常あるいは通常範囲を“0”に設定した尺度基準を用いてスコアリングした。位置視覚では、動物の尾部を持ち垂直にぶら下げた状態で、平面に近づけて行った際の前肢を伸ばすタイミングを判定した。接近反応では、動物の正面に検査棒をゆっくりと近づけた際の反応を判定した。触覚反応では、動物の背部をピンセットで軽く触れた際の反応を判定した。痛覚反応では、動物の尾部をピンセットで挟んだ際の反応を判定した。聴覚反応では、動物の背後で突然クリッカーを鳴らした際の反応を判定した。空中立ち直り反射では、動物を仰向けに持ち上げて約 20 cm の高さから落下させた際の着地の姿勢を判定した。

## 9. 胸腺および脾臓の細胞数計測

4 週間反復投与後の主群の全生存動物について、エーテルの麻酔下で放血屠殺し剖検した後、胸腺および脾臓の半分について細胞懸濁液を調製し、胸腺および脾臓の細胞数計測の免疫学的検査に供試した。

胸腺および脾臓の半分（胸腺では右側）を重量測定した後、5%牛胎児血清（FCS; Fatal Calf Serum）添加のリン酸緩衝液（PBS; Phosphate Buffered Saline）に氷冷下で浸し、胸腺と脾臓のそれぞれについて時計皿上でステンレス鋼製のメッシュを用いて細胞懸濁液を調製した。脾臓細胞懸濁液については、遠心分離後の脾臓細胞を 0.85%の塩化アンモニウム水溶液に懸濁し、室温で 10 分間静置し、赤血球を溶解させた。次いで、遠心分離し、細胞塊を 5%FCS 添加 PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を調製した。胸腺細胞懸濁液については赤血球溶解

の操作を行わず、5%FCS 添加 PBS で洗浄し、細胞懸濁液を調製した。

胸腺および脾臓の細胞懸濁液の一部試料について、総合血液学検査装置アドヴィア 120 (Bayer Corporation) を用いてリンパ球数を計測した。また、細胞懸濁液の調製に用いた臓器重量に基づき、臓器 mg 単位あたりの細胞数と各臓器あたりの細胞数を算出した。

#### 10. フローサイトメトリー解析

前項の細胞数計測にて調製した各細胞懸濁液の一部試料について、反応抗体との非特異的結合を防ぐため、約  $1 \times 10^7$  の胸腺ないし脾臓細胞を 20% 山羊血清添加 PBS にて 4℃ で 10 分間培養した。遠心分離後、5%FCS 添加 PBS で洗浄し、 $1 \times 10^6$  の胸腺ないし脾臓細胞について以下の蛍光標識抗ラット細胞膜表面抗原の抗体 (BD PharMingen) を用いて 4℃ で 30 分間培養・染色した。T 細胞のリンパ球サブセットの解析では、FITC 標識抗ラット CD3 抗体、PE 標識抗ラット CD8 抗体および Cy-Chrome 標識抗ラット CD4 抗体を使用した。B 細胞の解析では Cy-Chrome 標識抗ラット CD45RA 抗体を、NK 細胞の解析では PE 標識抗ラット NKR P1A 抗体を使用した。染色後、PBS で洗浄した後、FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いてリンパ球サブセットを解析した。胸腺リンパ球サブセット解析においては、未成熟胸腺細胞のダブルネガティブ細胞 (CD4-CD8-) およびダブルポジティブ細胞 (CD4+CD8+) について、また成熟胸腺細胞のヘルパー T 細胞 (CD4+CD8-) および細胞傷害性 T 細胞 (CD4-CD8+) に

ついて解析した。脾臓リンパ球サブセット解析においては、汎 T 細胞 (CD3+)、汎 B 細胞 (CD45RA+)、ヘルパー T 細胞 (CD4+CD8-)、細胞傷害性 T 細胞 (CD4-CD8+) および Natural killer 細胞 (NK 細胞; NKR P1A+) について解析した。各リンパ球サブセットの対象細胞集団は、フローサイトメーターの解析で得られた各細胞集団の統計値 (%) に細胞数を乗じて、対象細胞集団の細胞数として表した。

#### 11. 免疫グロブリン抗体価の測定

衛星群の雄動物について、4 週間投与終了後最終屠殺 (採血) の 6 日前に、 $2 \times 10^8$  のヒツジ赤血球 (SRBC, Sheep Red Blood Cell, (株) 日本生物材料センター) をエーテル麻酔下でラットに 0.5mL 静脈内投与した。採血はエーテル麻酔下で後大静脈より行い、血清を採取した後、測定時まで凍結保存 (-70℃ 以下) した。血清中のヒツジ赤血球特異的免疫グロブリン M クラス抗体 (抗ヒツジ赤血球免疫グロブリン M 抗体) の抗体価を「Method in Immunotoxicology」に記載された Temple らの方法<sup>3)</sup> に従い、酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。測定には BD OptEIA™ Reagent Set B (BD) を使用した。まず、ヒツジ赤血球を溶解した 0.1M の炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 9.5) を抗原液として、マイクロプレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ入れ、1 時間室温で培養後、冷蔵庫にて一晩静置した。翌日 200  $\mu$ L のアッセイ希釈液 (10% 牛胎児血清添加リン酸緩衝液) を用い 2 時間室温で培養してブロッキングを行った後、各血清試料の希釈液を各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ入れ、2 時間室温で培養した。各個体の血清はアッセイ希釈液を用い

4倍希釈で7段階希釈した(4~16384倍希釈)。次に15000倍希釈のアフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットIgM抗体(Rockland Inc.)を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ入れ、2時間室温で培養した。TMB発色液(TMB, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine)を各ウェルに100 $\mu$ Lずつ入れ、20分間室温に静置後、50 $\mu$ Lの反応停止液(1Mリン酸)を添加して反応を停止した。マイクロプレートリーダー(ナルジェヌンクインターナショナル株式会社)を用い450nmのフィルターでマイクロプレートの吸光度を測定した。なお、コーティングの段階から発色溶液注入の各段階まで洗浄液(0.05% Tween20 添加リン酸緩衝液)を用いて2~5回洗浄した。抗体価は、吸光度が0.5を示す血清の希釈倍率をもって表した。

#### 12. 臓器重量

4週間反復投与終了後、主群および衛星群の全生存動物について、剖検後に脳(主群動物のみ)、胸腺および脾臓の固定前の重量(絶対重量)を測定した。また、最終体重から比体重値(相対重量)を算出した。

#### 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。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。主群の剖検所見はCCAの反復経口投与毒性試験にて記載した。

剖検時に衛星群の全動物から胸腺、脾臓、リンパ節(頸部および腸間膜)および肉眼的異常部位を採取し、10%中性緩衝ホルマ

リン液で固定した。

#### 14. 病理組織学的検査

衛星群の全動物から採取した胸腺、脾臓、リンパ節(頸部および腸間膜)および肉眼的異常部位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。

#### 15. 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。

運動量、握力、体重検査項目、細胞数、フローサイトメトリー解析によるリンパ球、免疫グロブリン抗体価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無を判定した。詳細な状態の観察所見および感覚運動反応のスコアについては、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。ただし、詳細な状態の観察における糞の状態および尿の状態については有意差検定を実施しなかった。死亡率ならびに一般状態の観察所

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. 体重

平均体重を表 1 と 2 に示す。

主群および衛星群において、80 mg/kg 投与群の雄に投与 1 週から 4 週にかけて体重増加抑制が認められた。体重増加抑制は主群の 40 mg/kg 投与群の雄にも投与 4 週に認められた。

### 2. 死亡および一般状態

一般状態観察結果を表 3 と 4 に示す。

80 mg/kg 投与群の主群の雄 1 例と衛星群の雄 1 例が、それぞれ投与 1 週に死亡した。一般状態の観察において、鎮静が主群の 80 mg/kg 投与群の雌雄に統計学的に高頻度に認められた。また、80 および 40 mg/kg 投与群の雌では腹部と外陰部の汚れないし湿潤が有意に増加した。

### 3. 詳細な状態の観察

詳細な状態の観察結果を表 5 と 6 に示す。

ケージ内観察項目：対照群および CCA 投与群の全動物が正常値を示した。

ハンドリングでの観察項目：80 mg/kg 投与群の雄で投与 1 週に筋緊張低下を示す動物の発生頻度が有意に増加した。筋緊張を除くその他の観察項目において、対照群および CCA 投与群の全動物が正常値を示し、異常所見は認められなかった。

オープンフィールドでの観察項目：80 mg/kg 投与群の雌雄において、投与 2 週から 4 週に探索行動の有意な減少（発現頻

度）あるいは減少傾向が認められた。40 mg/kg 投与群の雌雄においても、探索行動の減少傾向（発現頻度）が認められた。また、80 mg/kg 投与群において、立ち上がり回数の有意な減少が雄では投与 4 週に、雌では投与 2 週から 4 週に認められた。40 mg/kg 投与群においても、立ち上がり回数の減少が雌雄とも投与 4 週に認められた。

### 4. 神経機能検査

神経機能検査結果を表 7 と 8 に示す。

自発運動量の有意な減少が、雄では 40 および 80 mg/kg 投与群で測定開始直後の 10 分間に観察された。一方、雌では 80 mg/kg 投与群で測定開始直後の 10～30 分間に、40 mg/kg 投与群で測定開始直後の 10 分間にそれぞれ認められ、総自発運動量も有意に減少した。CCA 投与群の前肢と後肢の握力および感覚運動反応測定項目には、対照群と比べ有意な変化はなかった。

### 5. 臓器重量およびリンパ球細胞数

臓器重量の結果を表 9 と 10 に、リンパ球細胞数の結果を表 11 と 12 に示す。

脳重量：雄において、40 mg/kg 投与群で絶対脳重量値の有意な減少がみられ、80 mg/kg 投与群で相対脳重量値の有意な増加が認められた。いずれも、体重増加抑制に関連した変化であると考えられた。一方、40 および 80 mg/kg 投与群の雌では、脳重量の絶対と相対重量値とも有意に減少した。

胸腺重量：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物（主群および衛星群とも）で、そして 8、40 および 80 mg/kg 投与群の雌動物で胸腺重量の絶対と相対重量値ともそれぞれ用量相関性に有意に減少した。

脾臓重量：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物（主群および衛星群とも）で脾臓重量の絶対重量値が有意に減少した。

リンパ球細胞数：40 および 80 mg/kg 投与群の雄では、ラット当たりの胸腺細胞数および単位重量当たりの胸腺細胞数とも有意に減少した。一方雌動物では、ラット当たりの胸腺細胞数の減少が 8、40 および 80 mg/kg 投与群で、単位重量当たりの胸腺細胞数の減少が 80 mg/kg 投与群で観察された。また、単位重量当たりの脾臓細胞数の増加が 40 mg/kg 投与群の雌に認められた。

#### 6. フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析の結果を表 13 と 14 に示す。

胸腺リンパ球サブセット：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞（DP 細胞；CD4+CD8+）とダブルネガティブ細胞（DN 細胞；CD4-CD8-）、そして成熟胸腺細胞のヘルパー T 細胞および細胞障害性 T 細胞の各リンパ球細胞群に対照群と比較して有意な減少が認められた。一方雌動物では、未成熟胸腺細胞の DP 細胞が 8、40 および 80 mg/kg 投与群で用量相関性に有意に減少し、成熟胸腺細胞のヘルパー T 細胞および細胞障害性 T 細胞が 80 mg/kg 投与群で減少した。

脾臓リンパ球サブセット：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、NK 細胞が対照群と比較して有意に減少した。雌では、40 mg/kg 投与群に汎 B 細胞の偶発的な増加が認められた。

#### 7. 免疫グロブリン抗体価

免疫グロブリン抗体価の結果を表 15 に示す。

いずれの CCA 投与群においても、対照群と比較してヒツジ赤血球に対する免疫グロブリン M 抗体価に有意な差は認められなかった。個体ごとの獲得免疫抗体価についてみると、対照群のいずれの個体も 1024 倍希釈に吸光度 0.5 以上の値を示し、抗体価は 1024 倍以上であった。しかし、40 mg/kg 投与群の雄 2 例および 80 mg/kg 投与群の雄 1 例が、1024 倍以下のそれぞれ 757 倍、430 倍および 488 倍であり、低い抗体価を示した。

#### 8. 剖検所見および病理組織学的所見

衛星群の剖検所見および病理組織学的所見を表 16 と 17 に示す。

剖検所見では、40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、小腸の内腔拡張および大腸の膨満が統計学的に高頻度に観察された。また、統計学的に有意ではないものの、リンパ節の赤色化を示す個体の発生頻度の増加が 80 mg/kg 投与群の雄動物に認められた。

病理組織学的所見では、40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、腸管膜リンパ節の洞内赤血球増加を示す像が統計学的に高頻度に観察された。また、統計学的に有意ではないものの、脾臓の軽度な胚中心未発達を示す個体が 40 mg/kg 投与群の 2 例と 80 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。

#### D. 考察

本試験では、4 週間反復経口投与試験において、CCA の神経および免疫系への影響

の有無について検索した。神経毒性学的影響を検索する行動観察や神経機能検査(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。これらの指標は、いずれも異所での行動量の減少を示唆する変化と考えられた。また、これらの行動指標の異常は、雌の脳重量の減少とも関連しているものと推測された。故に、CCAの経口投与での神経系への影響が示唆された。

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、これらの個体は脾臓の胚中心が未発達であった。これらの結果から、CCAの経口投与での免疫系への影響が示されたものと考えられる。

#### E. 結論

4週間反復経口投与の実験条件下において、CCAの経口投与での神経系および免疫系へ影響があるものと結論された。

#### F. 引用文献

- 1) 農薬の登録申請に係わる試験成績について、(監修)農林水産省、12農産第8147号(平成12年11月24日)
- 2) US Environmental Protection Agency Health Effects Test Guideline, OPPTS 870.7800: Immunotoxicity. August

1998.

- 3) Temple L. et. al.: Volume 1 Chapter 9 ELISA to measure SRBC-specific serum IgM: Method and data evaluation In: Method in Immunotoxicology, edited by Burleson G.R., Dean J.H., and Munson A.E., pp. 137-157, Wiley-Liss Inc., New York, 1995.

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 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

Table 1 - 1                      Body weight - Group mean values in male rats

Dose (mg/kg/day)		Week					(g)
		0 <sup>a</sup>	1	2	3	4	
0	Mean	177	220	257	284	302	
	S.D.	6	9	16	18	20	
	N	10	10	10	10	10	
8	Mean	177	221	259	286	304	
	S.D.	5	11	16	18	19	
	N	10	10	10	10	10	
40	Mean	178	214	250	270	280 *	
	S.D.	6	11	11	15	15	
	N	10	10	10	10	10	
80	Mean	177	198 **	233 **	256 **	265 **	
	S.D.	6	14	13	14	17	
	N	10	9	9	9	9	

<sup>a</sup>: Week before initiation of treatment.

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

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

Table 1 - 2                      Body weight - Group mean values in male rats  
 Immunized group

Dose (mg/kg/day)		Week					(g)
		0 <sup>a</sup>	1	2	3	4	
0	Mean	195	239	271	292	313	
	S.D.	7	10	13	17	20	
	N	8	8	8	8	8	
8	Mean	196	238	272	295	317	
	S.D.	7	9	11	12	14	
	N	8	8	8	8	8	
40	Mean	196	233	268	287	303	
	S.D.	7	9	16	19	26	
	N	8	8	8	8	8	
80	Mean	195	209 **	241 **	264 **	279 **	
	S.D.	7	14	13	18	17	
	N	8	7	7	7	7	

<sup>a</sup>: Week before initiation of treatment.

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

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



Table 2 Body weight - Group mean values in female rats

Dose (mg/kg/day)		Week					(g)
		0 <sup>a</sup>	1	2	3	4	
0	Mean	137	154	174	188	198	
	S.D.	6	7	9	8	8	
	N	10	10	10	10	10	
8	Mean	137	156	177	192	201	
	S.D.	5	7	7	8	9	
	N	10	10	10	10	10	
40	Mean	137	156	180	193	203	
	S.D.	5	8	8	8	11	
	N	10	10	10	10	10	
80	Mean	137	148	171	189	199	
	S.D.	5	11	8	6	7	
	N	10	10	10	10	10	

<sup>a</sup>: Week before initiation of treatment.

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

Table 3 - 1 General clinical observation - Incidence of signs in male rats

Clinical signs	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	Number of animals examined	10	10	10	10
No abnormalities detected		10	9	10	2
Consciousness/Nervous system:					
Sedation		0	0	0	5 *
Skin:					
Scab		0	1	0	0
Fur:					
Loss of fur		0	0	0	1
Abdominal region: Soiled fur		0	0	0	1
Mouth:					
Salivation		0	0	0	3

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

Table 3 - 2 General clinical observation - Incidence of signs in male rats

Immunized group		0	8	40	80
Clinical signs	Dose (mg/kg/day)				
	Number of animals examined	8	8	8	8
No abnormalities detected		8	8	5	6
Consciousness/Nervous system:					
Sedation		0	0	0	1
Excretion:					
Loose stool		0	0	0	1
Mouth (oral cavity):					
Salivation		0	0	3	1

Table 4 General clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical signs	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
	Number of animals examined	10	10	10	10
No abnormalities detected		7	9	4	3
Consciousness/Nervous system:					
Sedation		0	0	1	4 *
Skin:					
Scab		3	0	0	0
Fur:					
Loss of fur		0	1	1	3
Perioral region: Soiled fur		0	0	1	1
Abdominal and external genital region: Wetted/Soiled fur		0	0	6 **	5 *
Mouth:					
Salivation		0	0	3	2

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