

Table 7 - 3 Functional observation - Summary data in male rats
Sensorimotor responses at 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg)	Score	Visual placing	Approach response	Auditory response	Touch response	Pain response	Aerial righting reflex
0	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	10	10	10	10	10	9
	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0
8	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	10	10	10	10	10	10
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0
40	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	10	10	10	10	10	10
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0
80	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	9	9	9	9	9	9
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0

Table 8 - 1 Functional observation - Summary data in female rats
 Motor activity at 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg)	No. of animals examined		Counts/10 min						Total
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
0	10	Mean	1517	947	698	438	308	341	4248
		S.D.	262	421	426	470	464	278	1753
8	10	Mean	1432	994	525	217	180	148	3497
		S.D.	341	444	383	315	261	211	1227
40	10	Mean	1054 *	607	444	319	271	152	2847
		S.D.	123	225	224	187	239	257	879
80	10	Mean	599 **	219 **	170 **	38	56	80	1161 **
		S.D.	193	86	154	45	73	118	418

S.D.: Standard deviation.

Significantly different

Table 8 - 2 Functional observation - Summary data in female rats
 Grip strength at 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg)	No. of animals examined			Forelimb	Hindlimb
		Mean	S.D.		
0	10	Mean		531	260
		S.D.		70	31
8	10	Mean		540	255
		S.D.		69	25
40	10	Mean		567	271
		S.D.		32	33
80	10	Mean		529	261
		S.D.		83	22

S.D.: Standard deviation.

Table 8 - 3 Functional observation - Summary data in female rats
Sensorimotor responses at 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg)	Score	Visual placing	Approach response	Auditory response	Touch response	Pain response	Aerial righting reflex
0	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	10	10	10	10	10	10
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0
8	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	10	10	10	10	10	10
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0
40	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	10	10	10	10	10	10
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0
80	-2		0	0	0	0	
	-1		0	0	0	0	
	0	10	10	10	10	10	10
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3						0

Table 9 - 1 Organ weight - Group mean values in male rats
At terminal kill after 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	Body weight (g)	Brain		Thymus		Spleen	
		Absolute (mg)	Relative (%)	Absolute (mg)	Relative (%)	Absolute (mg)	Relative (%)
0	Mean	1920	0.686	460	0.164	567	0.202
	S.D.	67	0.028	72	0.022	73	0.024
	N	10	10	10	10	10	10
8	Mean	1947	0.691	432	0.153	536	0.189
	S.D.	91	0.032	100	0.033	77	0.021
	N	10	10	10	10	10	10
40	Mean	1820 *	0.704	343 **	0.132 *	475 *	0.183
	S.D.	76	0.058	38	0.011	77	0.024
	N	10	10	10	10	10	10
80	Mean	1864 **	0.764 **	318 **	0.129 *	449 **	0.183
	S.D.	77	0.048	99	0.035	65	0.023
	N	9	9	9	9	9	9

Relative weight = (organ weight/body weight x 1000) x 100

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

Significantly different from control: *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 9 - 2 Organ weight - Group mean values in male rats
At terminal kill after 4 weeks of treatment
Immunized group

Dose (mg/kg/day)		Body weight		Thymus		Spleen	
		(g)	(g)	Absolute (mg)	Relative (%)	Absolute (mg)	Relative (%)
0	Mean	313	456	456	0.145	643	0.205
	S.D.	20	74	74	0.016	66	0.016
	N	8	8	8	8	8	8
8	Mean	317	408	408	0.128	630	0.198
	S.D.	14	70	70	0.018	79	0.023
	N	8	8	8	8	8	8
40	Mean	303	368 *	368 *	0.121 *	544 *	0.180
	S.D.	26	57	57	0.016	52	0.018
	N	8	8	8	8	8	8
80	Mean	279 **	337 **	337 **	0.120 *	527 **	0.189
	S.D.	17	59	59	0.016	53	0.018
	N	7	7	7	7	7	7

Relative weight= (organ weight/body weight x 1000) x 100

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

Significantly different from control: *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

Table 10 Organ weight - Group mean values in female rats
At terminal kill after 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	Body weight (g)	Brain		Thymus		Spleen		
		Absolute (mg)	Relative (%)	Absolute (mg)	Relative (%)	Absolute (mg)	Relative (%)	
0	Mean	186	1806	0.973	424	0.228	422	0.227
	S.D.	8	70	0.051	43	0.020	52	0.029
	N	10	10	10	10	10	10	10
8	Mean	187	1802	0.964	358 *	0.192 *	438	0.234
	S.D.	8	54	0.029	40	0.024	46	0.023
	N	10	10	10	10	10	10	10
40	Mean	187	1722 **	0.924 *	311 **	0.166 **	406	0.218
	S.D.	11	41	0.041	70	0.034	38	0.016
	N	10	10	10	10	10	10	10
80	Mean	182	1680 **	0.925 *	242 **	0.133 **	385	0.212
	S.D.	7	60	0.036	52	0.029	41	0.019
	N	10	10	10	10	10	10	10

Relative weight = (organ weight/body weight x 1000) x 100

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

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

Table 11

Cellularity - Group mean values in male rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined		/mg ($\times 10^6$) ^a		/rat ($\times 10^7$)	
			Thymus	Spleen	Thymus	Spleen
0	10	Mean	2.343	0.832	108.4	47.5
		S.D.	0.219	0.111	24.9	10.0
8	10	Mean	2.167	0.833	96.0	44.7
		S.D.	0.352	0.102	35.7	8.6
40	10	Mean	1.848 **	0.810	63.2 **	38.6
		S.D.	0.116	0.105	7.8	9.0
80	9	Mean	1.661 **	0.845	56.7 **	38.3
		S.D.	0.465	0.146	34.4	9.6

^a: Number of lymphocytes/mg organ weight.

S.D.: Standard deviation.

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

Table 12 Cellularity - Group mean values in female rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined		/mg ($\times 10^6$) ^a		/rat ($\times 10^7$)	
			Thymus	Spleen	Thymus	Spleen
0	10	Mean	2.396	0.744	101.7	31.3
		S.D.	0.240	0.072	15.4	4.3
8	10	Mean	2.308	0.777	83.0 *	34.3
		S.D.	0.220	0.093	14.8	6.9
40	10	Mean	2.185	0.876 **	68.5 **	35.6
		S.D.	0.151	0.088	18.8	4.5
80	10	Mean	1.855 **	0.819	45.4 **	31.7
		S.D.	0.304	0.088	13.8	5.7

^a: Number of lymphocytes/mg organ weight.

S.D.: Standard deviation.

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

Table 13 - 1 Summary - Flow cytometric analysis of thymic lymphocytes in male rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of thymic lymphocyte($\times 10^7$ /rat)					
		Immature cells			Mature cells		
		DN cell (CD4-8-)	DP cell (CD4+8+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-8+)		
0	10	Mean	1.8	54.9	6.6	2.9	
		S.D.	0.5	11.5	1.5	1.0	
8	10	Mean	1.5	49.7	5.4	2.3	
		S.D.	0.4	20.0	1.5	0.7	
40	10	Mean	1.1 **	30.8 **	4.2 **	1.7 *	
		S.D.	0.2	3.8	1.1	0.4	
80	9	Mean	1.1 **	25.9 **	3.8 **	1.7 **	
		S.D.	0.4	14.5	2.1	1.1	

S.D.: Standard deviation.

Immature cells: DN; Double negative, DP; Double positive.

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

Table 13 - 2 Summary - Flow cytometric analysis of splenic lymphocytes in male rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of splenic lymphocyte($\times 10^7$ /rat)					
		Pan-Tcell (CD3+)	Pan-Bcell (CD45RA+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-8+)	NK cell (NKR P1A+)	
0	10	Mean	9.7	6.6	8.3	3.6	1.4
		S.D.	2.9	1.3	2.1	1.0	0.4
8	10	Mean	8.0	6.3	6.7	2.9	1.4
		S.D.	2.2	1.4	2.0	0.6	0.4
40	10	Mean	8.1	5.8	7.0	3.0	0.9 *
		S.D.	2.7	1.7	2.7	1.2	0.4
80	9	Mean	7.4	6.1	6.0	3.0	0.8 *
		S.D.	2.3	1.8	1.5	1.2	0.4

S.D.: Standard deviation.

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

Table 14 - 1 Summary - Flow cytometric analysis of thymic lymphocytes in female rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of thymic lymphocyte($\times 10^7$ /rat)					
		Immature cells			Mature cells		
		DN cell (CD4-8-)	DP cell (CD4+8+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-8+)		
0	10	Mean	1.2	48.8	5.9	2.0	
		S.D.	0.1	8.6	1.7	0.4	
8	10	Mean	1.0	36.3 **	5.2	1.8	
		S.D.	0.2	9.6	1.9	0.6	
40	10	Mean	1.1	28.8 **	4.1	1.4	
		S.D.	0.2	9.0	1.3	0.6	
80	10	Mean	1.0	18.5 **	3.3 **	1.0 **	
		S.D.	0.3	6.3	1.5	0.6	

S.D.: Standard deviation.

Immature cells: DN; Double negative, DP; Double positive.

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

Table 14 - 2 Summary - Flow cytometric analysis of splenic lymphocytes in female rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of splenic lymphocyte($\times 10^7$ /rat)					
		Pan-Tcell (CD3+)	Pan-Bcell (CD45RA+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4+8+)	NK cell (NKR P1A+)	
0	10	Mean	4.8	4.8	4.8	1.9	0.9
		S.D.	1.0	1.1	1.2	0.5	0.2
8	10	Mean	4.8	5.4	5.0	2.1	0.9
		S.D.	1.3	1.4	1.5	0.6	0.2
40	10	Mean	5.9	6.5 **	4.2	2.0	0.8
		S.D.	1.3	1.0	0.8	0.5	0.2
80	10	Mean	5.1	5.8	3.6	1.7	0.8
		S.D.	1.6	1.3	1.3	0.5	0.2

S.D.: Standard deviation.

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

Table 15 Anti-SRBC IgM antibody titers - Group mean values in male rats
 Immunized group

Dose (mg/kg/day)		IgM antibody titer (Serum dilution)
0	Mean	1870.9
	S.D.	708.7
	N	8
8	Mean	2857.7
	S.D.	1865.0
	N	8
40	Mean	1516.4
	S.D.	655.5
	N	8
80	Mean	2237.3
	S.D.	1509.4
	N	7

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

Table 16 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment
Immunized group

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined			
		0	8	40	80
		8	8	8	7
Small intestine :	[N=]	8	8	8	7
Luminal dilatation		0	0	8 **	7 **
Large intestine :	[N=]	8	8	8	7
Distention		0	0	8 **	7 **
Lymph node :	[N=]	8	8	8	7
Red in color		0	0	0	3

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

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

Table 17 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment
Immunized group

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	80
		No. of animals examined			
Thymus :	[N=]	8	8	8	7
Increased lymphophagocytosis, cortical		0	1	0	0
Lymphoid atrophy/depletion		0	0	1	1
Spleen :	[N=]	8	8	8	7
Underdevelopment, germinal center		0	0	2	1
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	8	8	8	7
Sinus erythrocytosis		0	0	5 *	6 **
Duodenum :	[N=]	0 a	0 a	8 a	7 a
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		-	-	8	7
Lymph node(cervical) :	[N=]	8	8	8	7
Cecum :	[N=]	0 a	0 a	8 a	7 a

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

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

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

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）の急性経口毒性試験

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
協力研究者 上田英夫 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室主任
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

2 系統のラットを用いて CCA の急性経口毒性を検索した。雌雄 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 Hannover 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 OECD の定める GHS 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。

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）の急性毒性を検索した。

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」の「毒性に関する試験成績を作成するに当たつての指針」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

日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湿度 40%以下の状態にて室温（許容範囲：15~30℃）で保管した。

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]）および日本チャールスリバー株式会社厚木飼育センターで生産された SD 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7週齢にて購入し、7日間試験環境に馴化した後、8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、雌雄別々に無作為にコンピューターで作成した乱数表を用いて各用量群に雌雄 5 匹ずつ配分した。飼料には保証飼料である固型飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製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

Wistar Hannover 系雄ラットを用いた 14 日間反復強制経口投与による予備試験において、150 mg/kg 投与群で投与 1 週に 2 例の死亡例が認められた。そこで、予備試験の成績に基づき、33、100、300 および 900 mg/kg の 4 用量（公比 3）を設定した。1 用量につき雌雄とも 5 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量（33、100、300 および 900 mg/kg）の被験物質投与液を投与前に調製した。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。

5. 投与方法

動物を投与前日の夕方より投与約 3 時間後まで絶食させた。投与液をスターラーで攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ胃ソングを用いて 1 回経口投与した。

6. 臨床症状の観察

投与当日は投与後 30 分および 4 時間後に、翌日から観察期間終了時までには 1 日 1 回、死亡の有無および動物の外貌、外皮、姿勢、行動、呼吸、意識、神経症徴候、体温、排泄等について詳細に観察した。観察期間は投与後 14 日間とした。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7、14 日および死亡発見時に個体別に測定した。

8. 剖検

死亡動物は発見時に、観察期間終了時（投与後 14 日）の生存動物はエーテル麻酔により安楽死させ、解剖して肉眼的異常の有無を検索した。

9. 半数致死量（LD50 値）の算出

観察終了時（投与後 14 日間）までの累積死亡率に基づき、雌雄それぞれの LD50 値および 95% 信頼限界を Moving Average 法²⁻³⁾により算出した。

C. 研究結果

1. 死亡率およびLD50値

死亡率を表1に示す。

Wistar Hannover系ラットの死亡率は、33、100、300および900 mg/kg群の順にそれぞれ雄で0/5、2/5、5/5および5/5、雌で0/5、4/5、5/5および5/5であった。SD系ラットの死亡率は、33、100、300および900 mg/kg群の順にそれぞれ雄で0/5、0/5、5/5および5/5、雌で0/5、3/5、5/5および5/5であった。

これらの死亡率にもとづいてMoving Average法によりLD50値(95%信頼限界)を算出した。Wistar Hannover系ラットのLD50値(95%信頼限界)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。

2. 体重測定

体重測定結果を表2に示す。

投与後7日および14日の全生存例の体重値は、投与前の体重値と比べて順調に増加していた。

3. 臨床症状

臨床症状の結果を表3に示す。

Wistar Hannover系およびSD系ラットの雌雄に、腹臥位、円背位、沈静、自発運動低下もしくは消失、呼吸緩除、筋力低下、肛門周囲部の汚れおよび軟便が認められた。さらにWistar Hannover系ラットでは、昏迷、昏睡および流涎が認められた。

4. 剖検所見

剖検所見を表4に示す。

死亡例の肉眼的所見として、Wistar Hannover系およびSD系ラットの雌雄で肺の赤色化、胃のガスおよび液状貯留物、腸管の赤色化および水腫、肝臓の赤色化、口周囲部ないし肛門周囲部の汚れが認められた。観察終了時(投与14日)に行った生存動物の剖検では、肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

CCAの急性経口毒性を検索するために、Wistar HannoverおよびSD系ラットの2系統について雌雄それぞれ検索した。臨床症状の観察では、2系統のラットの雌雄ともに腹臥位、円背位、昏迷、沈静、自発運動低下もしくは消失、呼吸緩除、筋力低下、流涎、肛門周囲部の汚れ等の一般状態の悪化を示す症状が認められた。死亡例の剖検では、主として急性毒性試験における死亡例でしばしば認められる、肺および消化管の変化が観察された。これらのことから、特にCCA投与に起因する特徴的な所見は認められなかった。

CCAのラットにおける急性経口毒性試験から得られたLD50値は、Wistar Hannover系ラットでは、雄で112 mg/kg、雌で72 mg/kgであり、SD系ラットでは、雄で173 mg/kg、雌で90 mg/kgであった。いずれの系統のラットもLD50値は100 mg/kg前後の値であったものの、雌のLD50値は雄のそれと比べ低い値であった。このことから、急性経口毒性では雌性での高感受性が示唆された。しかし、発現した臨床症状および剖検所見においては明らかな雌雄差

は認められなかった。

なし

CCA のラットにおける急経口毒性は、OECD (経済協力開発機構) の定める GHS (Globally Harmonised System) カテゴリー 3 (LD50 値は 50-300 mg/kg) と判定され、毒物劇物法の分類では劇物に相当する LD50 値の範囲であった。

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

E. 結論

本実験条件下において、CCA の急性経口毒性は OECD の定める GHS カテゴリーの 3 と判定され、毒物劇物法の分類の劇物に相当する LD50 値の範囲であると結論された。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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) Thompson WR, Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose. I. Fundamental formulas, estimation of error, and relation to other methods. *Bacterial Rev* 11: 115-145 (1947).
- 3) Weil CS, Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. *Biometrics* 8: 249-263 (1952).
- 4) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adapted: December 17, 2001.

G. 研究発表

1. 論文発表