

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）の細菌を用いる復帰突然変異試験

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長
協力研究者 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
竹澤 祐造 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

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。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。

A. 研究目的

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤
（CCA）の細菌に対する突然変異誘発性
の有無を検索した。

CCA は国内で使用される木材防腐剤の
中で過去に最も使用量が多く、リスク評価
の急がれる資材である。

1. 被験物質

被験物質 CCA は以下の 3 化合物の混合物
である。各構成成分の配合比は以下の通り
であった。

酸化クロム（VI）	35.3%
酸化銅（II）	19.6%
酸化ヒ素（V）	45.1%

B. 研究方法

試験は Ames らの方法¹⁾および国内外の
各種毒性試験指針（経済協力開発機構、
OECD Guidelines、No. 471、1997 年；
厚生労働省、告示第 67 号、1997 年；農林
水産省、12 農産第 8147 号、2-1-19-1、2000
年等）に示された方法を参考に、以下の条
件で実施した。

構成成分-1

名称：	酸化クロム（VI）
CAS No：	1333-82-0
組成式：	CrO ₃
分子量：	99.99
外観：	暗褐色結晶
溶解性：	水、アルコール、エー

純度： テルに易溶
 98%
ロット番号： 601F1650
製造元： 関東化学株式会社
注意事項： 吸湿性、潮解性あり

構成成分-2

名称： 酸化銅 (II)
CAS No： 1317-38-0
組成式： CuO
分子量： 79.55
外観： 黒色微細粉末
溶解性： 水に不溶
純度： 99.3%
ロット番号： 204G1471
製造元： 関東化学株式会社

構成成分-3

名称： 酸化ヒ素 (V)
CAS No： 1303-28-2
組成式： As₂O₅
分子量： 229.84
外観： 白色固体
溶解性： 水に易溶
純度： 91.9%
ロット番号： M99649K
製造元： キシダ化学株式会社
注意事項： 潮解性あり

以上3物質は室温(湿度40%以下)の被験物質保管庫で保存した。

2. 試験菌株

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98、TA100、TA1535、TA1537 および大腸菌 (*Escherichia coli*)

WP2uvrA/pKM101 の5菌株を用いた。テスト菌株は以下の遺伝的特性を有していた。

- ① ヒスチジン要求性(ネズミチフス菌)
トリプトファン要求性(大腸菌)
- ② 紫外線感受性
- ③ ネズミチフス菌におけるクリスタルバイオレット感受性
- ④ TA100、TA98株およびWP2uvrA/pKM101株におけるアンピシリン耐性

試験開始時に-80℃で凍結保存した保存菌液を解冻し、ニュートリエントブロス液体培地(Oxoid nutrient broth No. 2, Oxoid Ltd.)に接種し、37℃で約8時間振盪培養した。分光光度計で吸光度(OD₆₆₀)を測定し、1×10⁹生菌数/mL以上の菌懸濁液であることを確認した。

3. S9 Mix の調製

S9はフェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導したSprague-Dawleyラットの肝臓より調製された市販品(キッコーマン株式会社)を用いた。S9 Mixは、S9にコファクター(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を加えて、4 mM NADPH、4 mM NADH、5 mM グルコース-6-リン酸、8 mM MgCl₂、33 mM KCl、100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)、10% S9の組成になるよう調製した。

4. 被験物質溶液の調製

被験物質溶液の調製には滅菌水(Simpli Lab(日本ミリポア株式会社)を用いて製造した純水を滅菌したもの)を用いた。まず始めに、最高濃度の被験物質溶液を調製するため、所定量の酸化クロムと酸化ヒ素を

秤量し、滅菌水を加え溶解させた。次に、所定量の酸化銅を加えて約 10 分間の超音波処理を行い、懸濁させた。懸濁後、段階希釈により低濃度の被験物質溶液を調製した。なお、調製の際、成分ごとに純度補正を行った。また、酸化クロムや酸化ヒ素は吸湿性があるため、秤量室の湿度を 40% 以下に保って秤量した。

5. 陰性対照および陽性対照

陰性対照（溶媒対照）物質として滅菌水を用いた。陽性対照物質として以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2： 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド（和光純薬工業株式会社）

2-AA： 2-アミノアントラセン（和光純薬工業株式会社）

NaN₃： アジ化ナトリウム（和光純薬工業株式会社）

9-AA： 9-アミノアクリジン塩酸塩（Aldrich Chemical Co., Inc.）

AF-2、9-AA および 2-AA はジメチルスルホキシドに溶解させ、NaN₃ は滅菌水に溶解させて用いた。

6. 用量設定試験

代謝活性化による場合とよらない場合で用量設定試験を行った。用量設定試験では、毒性試験指針で定められた最高用量である 5000 μg/プレート を最高用量として、公比 4 で 7 用量（1.2、4.9、19.5、78.1、313、1250、5000 μg/プレート）を設定した。試験は被験物質処理群、陰性対照群、および陽性対照群のすべての用量について 2 枚の

プレートで実施した。

7. 本試験

代謝活性化による場合とよらない場合で本試験を行った。本試験の最高用量は、用量設定試験において生育阻害が認められた最低用量を選択した。ただし、代謝活性化による場合では 5000 μg/プレート を最高用量とした。すべての菌株において公比 2 で 7 用量を設定した。本試験は被験物質処理群、陰性対照群、および陽性対照群のすべての用量について 2 枚のプレートで実施した。

8. 処理方法

ブレインキュベーション法を用いた^{2, 3)}。代謝活性化によらない場合は滅菌小試験管に 100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、前培養した菌懸濁液 0.1 mL および被験物質溶液 0.1 mL を分注し、37℃ で 20 分間振盪した。一方、代謝活性化による場合は S9 Mix 0.5 mL、菌懸濁液 0.1 mL および被験物質溶液 0.1 mL を分注し、37℃ で 20 分間振盪した。いずれも 45℃ で保温したアミノ酸添加軟寒天液 2 mL を加え、良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地（クリメディア AM-N 培地、オリエンタル酵母工業株式会社）に広げた。37℃ で 48 時間培養後、コロニーアナライザー（PCA-11DA、システムサイエンス株式会社）を用いて復帰変異コロニー数を計測した。同時に、被験物質の析出を肉眼で、菌の生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。

9. 判定基準

次の 3 つの条件が満たされた場合「陽性」と判定した。すなわち、①復帰変異コロニー

一数が陰性対照値の 2 倍以上に増加する。
②その増加に用量相関性が認められる。③
用量設定試験と本試験の結果に再現性が見
られる。

一方、用量設定試験と本試験のいずれの
用量においても、復帰変異コロニー数が
陰性対照群のコロニー数の 2 倍より少な
い場合は「陰性」と判定した。

10. 倫理面への配慮

本研究は細菌を材料とした *in vitro* 実験
研究であり、人や動物を研究対象として用
いていないため、人権擁護や動物愛護など
の観点において倫理上の問題は全くない。

C. 研究結果

1. 用量設定試験

用量設定試験の結果を表 1 に示す。代謝
活性化系の有無にかかわらず、すべての用
量において被験物質の析出は観察されな
かった。

代謝活性化によらない場合、比較的低下
用量で菌に対する毒性が認められた。すなわ
ち、すべての菌株で、78.1~1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$
から生育阻害が観察された。一方、代
謝活性化による場合、菌に対する毒性が軽
減され、すべての菌株で、1250 または 5000
 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量ではじめて生育阻害が
観察された。

復帰変異コロニー数に関しては、代謝活
性化によらない場合の TA100、TA98、およ
び WP2 *uvrA/pKM101* 株で、陰性対照群に
比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増
加が認められた。また、代謝活性化による
場合の TA100 および WP2 *uvrA/pKM101*
株においても、陰性対照群に比べて 2 倍以

上の復帰変異コロニー数の増加が認められ
た。一方、TA1535 および TA1537 株では
明確な復帰変異コロニー数の増加は認めら
れなかった。

2. 本試験

本試験の結果を表 2 に示す。また用量-
反応曲線を図 1~5 に示す。代謝活性化系の
有無にかかわらず、すべての用量において
被験物質の析出は観察されなかった。

代謝活性化によらない場合、ネズミチフ
ス菌では 39.1~156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から生育
阻害が観察された。大腸菌では最高用量
(1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)で生育阻害が観察さ
れた。一方、代謝活性化による場合では、
1250 または 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量
ではじめて生育阻害が観察された。

復帰変異コロニー数に関しては、代謝活
性化の有無にかかわらず、TA100、TA98、
および WP2 *uvrA/pKM101* 株で、陰性対照
群に比べて 2 倍以上の復帰変異コロニー数
の増加が認められた。その増加には明らか
な用量相関性も認められた (図 1, 3, 5)。

また、代謝活性化によらない場合の
TA1537 株でも陰性対照群に比べて 2.0 倍の
復帰変異コロニー数の増加が認められた。

D. 考察

本試験において、代謝活性化の有無にかか
わらず、TA100、TA98、および WP2
uvrA/pKM101 株で明らかな復帰変異コロニ
ー数の増加が認められた。よって、CCA は、
直接的に (代謝酵素を必要とせずに) AT 塩
基対置換型 (WP2 *uvrA/pKM101*)、GC 塩基
対置換型 (TA100)、およびフレームシフト
型 (TA98) 遺伝子突然変異を誘発する混合

物であることが明らかとなった。

最も陽性反応の高かった菌株は大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 株であり、その比活性 (被験物質 1 mg あたりが誘発する変異コロニー数) は 18,875 であった (表 3)。これは比較的強い変異原物質であることを示している。

陽性を示した上記 3 菌株に共通する点は、いずれも pKM101 プラスミドを保有している点である。pKM101 プラスミドには SOS 修復遺伝子が存在していることから、CCA の変異原性は SOS 修復系を介して誘発されていることが示唆される。さらに CCA の変異原性の大きな特徴として、S9 の有無により細胞毒性が大きく変化する点である。すなわち、S9 を添加した系では細胞毒性が大きく低減された。また、比活性も S9 Mix と比べて +S9 Mix の方が低いことから (表 3)、代謝活性化系存在下では変異原活性も大きく低下することが示された。

CCA を構成する 3 つの成分の内、CCA の変異原性に寄与している物質がどれかを考察する必要がある。まず、銅 (II) は大腸菌を用いた DNA 損傷試験 (Rec-assay) で陰性であり⁴⁾、また哺乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験でも陰性である⁵⁾。それに対して、ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験では弱い陽性であると報告されているが⁶⁾、やや信頼性の低いデータである。よって、銅 (II) には恐らく変異原性はないものと考えられる。

次に、ヒ素 (V) は Rec-assay で陽性の報告がある⁴⁾。しかし、大腸菌やネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験では陰性である^{7, 8)}。よって、CCA の変異原性にヒ素 (V) は関与していないと推定できる。

それに対してクロム (VI) は強い陽性を示すことが既に知られており、以下のような特徴を持つ^{9, 10)}：ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験で陽性反応を示す (ただし、TA1535 株では陰性)。反応性の強さの順は、TA102 > TA100 > TA97 > TA92 > TA1978 > TA98 > TA1538 > TA1537 である。フレームシフト型より塩基置換型の変異を強く誘発し、GC 塩基対 (TA100) や AT 塩基対 (TA102) の両方で遺伝子突然変異を引き起こす。いずれにせよ、pKM101 を保有する株で強く変異が検出されることから、error-prone 型 DNA 修復系 (SOS 修復系) を介して変異が誘発されたと考えられている。また、その変異誘発能は NADPH、NADH、または S9 存在下では減少することも知られている。本研究における CCA の結果は、まさに上記のクロム (VI) の特徴と一致する。よって、CCA の遺伝子突然変異誘発性は、構成成分の一つであるクロム (VI) の変異原性が強く反映したものであると判断できる。

E. 結論

本実験条件下において、CCA の細菌に対する突然変異誘発性は陽性であると結論した。その主要な原因は、構成成分のクロム (VI) の変異原性であると考えられる。

F. 引用文献

- 1) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.

- 2) Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, S. Venitt and E. Zeiger (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
- 3) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura (1980) Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.), *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Springer-Verlag, pp. 273-285.
- 4) Nishioka, H. (1975) Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutation Res.*, 31, 185-189.
- 5) 梅田誠 (1980) 金属の変異原性・形質転換性、変異原と毒性、12、44-53.
- 6) Hollstein M, J. McCann, F.A. Angelosanto and W.W. Nichols (1979) Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Res.*, 65, 133-226.
- 7) Kligerman, A.D., C.L. Doerr, A.H. Tennant, K. Harrington-Brock, J.W. Allen, E. Winkfield, P. Poorman-Allen, B. Kundu, K. Funasaka, B.C. Roop, M.J. Mass, and D.M. DeMarini (2003) Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 192-205.
- 8) Abdullaev, F.I., R. Rivera-Luna, A. Garcia-Carranca, F. Ayala-Fierro and J.J. Espinosa-Aguirre (2001) Cytotoxic effect of three arsenic compounds in HeLa human tumor and bacterial cells. *Mutation Res.*, 493, 31-38.
- 9) De Flora, S., M. Bagnasco, D. Serra and P. Zanacchi (1990) Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Res.*, 238, 99-172.
- 10) IARC (1990) *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 49.
- 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

表1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: CCA

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	112 125 (119)	12 6 (9)	103 88 (96)	19 16 (18)	7 12 (10)	
	1.2	113 109 (111)	4 10 (7)	116 148 (132)	15 19 (17)	10 7 (9)	
	4.9	130 120 (125)	7 11 (9)	182 168 (175)	19 14 (17)	11 5 (8)	
	19.5	169 185 (177)	17 10 (14)	367 398 (383)	40 42 (41)	12 17 (15)	
	78.1	442 489 (466)	16 5 (11)	1285 1331 (1308)	34 39 (37)	2* 3* (3)	
	313	0* 56* (28)	0* 0* (0)	1710 1676 (1693)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	1250	0* 0* (0)	0* 0* (0)	1* 20* (11)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	5000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	127 114 (121)	11 7 (9)	118 175 (147)	17 19 (18)	12 7 (10)	
	1.2	107 137 (122)	3 8 (6)	134 161 (148)	30 13 (22)	12 11 (12)	
	4.9	119 152 (136)	14 6 (10)	158 157 (158)	22 26 (24)	14 16 (15)	
	19.5	106 110 (108)	7 8 (8)	121 162 (142)	16 23 (20)	7 13 (10)	
	78.1	103 98 (101)	7 5 (6)	178 161 (170)	20 20 (20)	11 19 (15)	
	313	146 145 (146)	13 9 (11)	344 319 (332)	29 28 (29)	10 14 (12)	
	1250	1339 1049 (1194)	0* 0* (0)	1862 1859 (1861)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	5000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	26* 28* (27)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
陽性対照	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	445 437 (441)	468 478 (473)	1171 1137 (1154)	374 386 (380)	608 799 (704)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	519 548 (534)	104 119 (112)	547 553 (550)	190 181 (186)	92 106 (99)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニコロ-2-フリル)アクリルアミド

2-AA : 2-アミノアントレン

 NaN_3 : ナジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

() : 内の数値は平均値

* : 菌株の生育阻害を認める

表2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称: CCA

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	117 128 (123)	5 11 (8)	92 101 (97)	21 15 (18)	7 11 (9)	
	4.9	129 135 (132)	5 7 (6)	/	19 17 (18)	7 9 (8)	
	9.8	151 159 (155)	7 14 (11)	/	21 23 (22)	14 10 (12)	
	19.5	206 220 (213)	15 10 (13)	359 395 (377)	42 43 (43)	16 19 (18)	
	39.1	280 276 (278)	12 16 (14)	860 809 (835)	49 40 (45)	10* 19* (15)	
	78.1	580 554 (567)	4 5 (5)	1492 1514 (1503)	9 13 (11)	0* 4* (2)	
	156	97* 74* (86)	0* 0* (0)	1813 1796 (1805)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	313	0* 0* (0)	0* 0* (0)	1857 1826 (1842)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	625	/	/	1078 1114 (1096)	/	/	
	1250	/	/	7* 71* (39)	/	/	
	+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	147 101 (124)	12 6 (9)	145 140 (143)	22 20 (21)	7 13 (10)
78.1		108 111 (110)	10 8 (9)	193 146 (170)	24 15 (20)	8 16 (12)	
156		144 147 (146)	8 10 (9)	184 217 (201)	23 22 (23)	16 18 (17)	
313		149 128 (139)	12 6 (9)	285 261 (273)	28 38 (33)	17 10 (14)	
625		594 575 (585)	11 13 (12)	1453 1542 (1498)	101 82 (92)	13 13 (13)	
1250		1346 1492 (1419)	0* 0* (0)	2004 2171 (2088)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
2500		0* 0* (0)	0* 0* (0)	25* 8* (17)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
5000		0* 0* (0)	0* 0* (0)	43* 41* (42)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
陽性対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	459 521 (490)	410 403 (407)	1125 1119 (1122)	388 391 (390)	448 469 (459)
		コロニー数/プレート	544 629 (587)	129 117 (123)	551 642 (597)	163 190 (177)	139 138 (139)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2-AA : 2-アミノアントレン

 NaN_3 : ナジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

() : 内の数値は平均値

* : 菌株の生育阻害を認める

表 3

比 活 性

被験物質名：CCA

	菌 株 名	-S9 Mix		+S9 Mix	
		比活性	計算に用いた 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	比活性	計算に用いた 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
用 量 設 定 試 験	TA100	4443	78.1	858	1250
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	15519	78.1	1371	1250
	TA98	1179	19.5	—	—
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	5685	78.1	1036	1250
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	18875	39.1	2168	625
	TA98	1282	19.5	114	625
	TA1537	462	19.5	—	—

比活性：被験物質 1mg 当たりの誘発復帰変異コロニー数。すなわち溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示す用量において、下式より計算して得た値の最大値。

$$\frac{(\text{被験物質群の復帰変異コロニー数}) - (\text{溶媒対照群の復帰変異コロニー数})}{\text{用量 (mg/プレート)}}$$

用量 (mg/プレート)

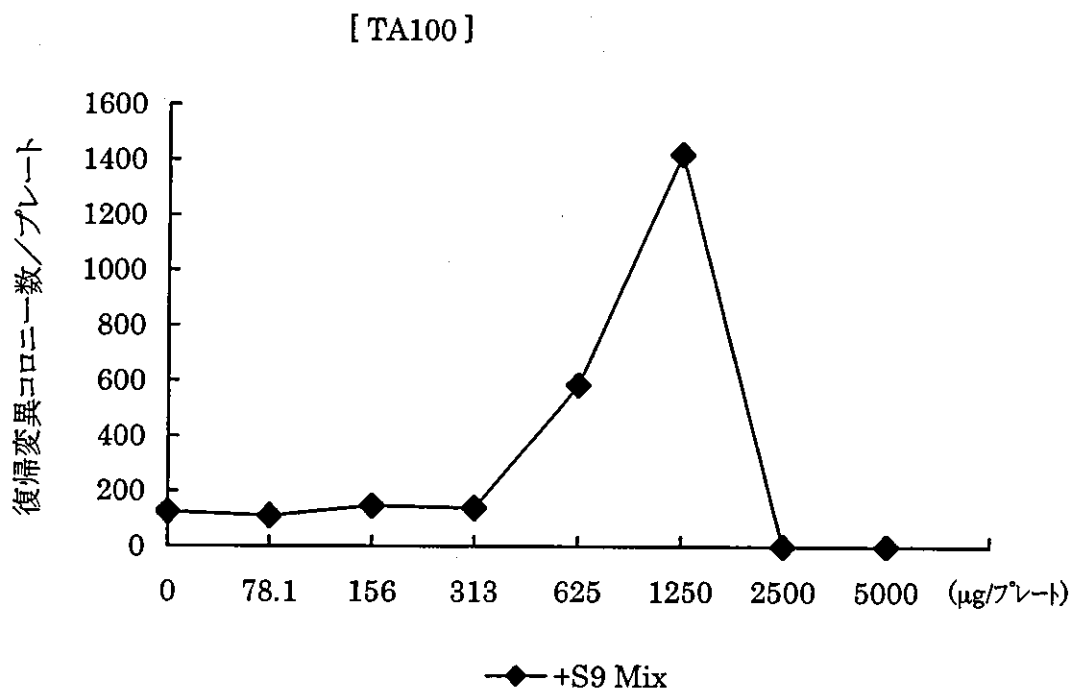
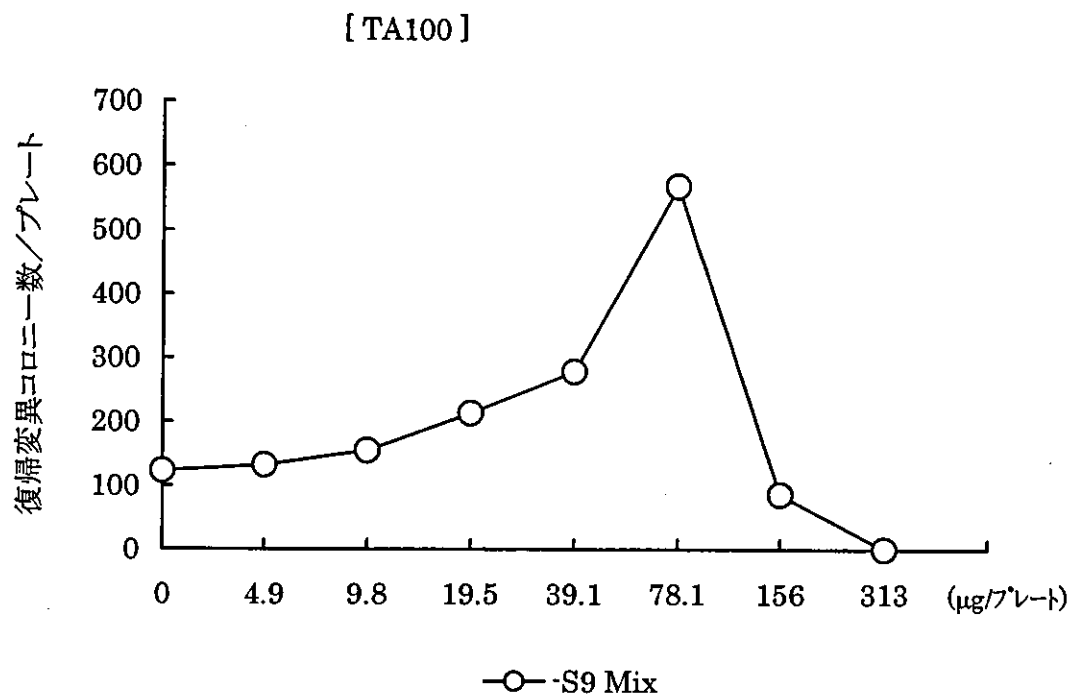


図1 用量-反応曲線 (本試験, TA100株)

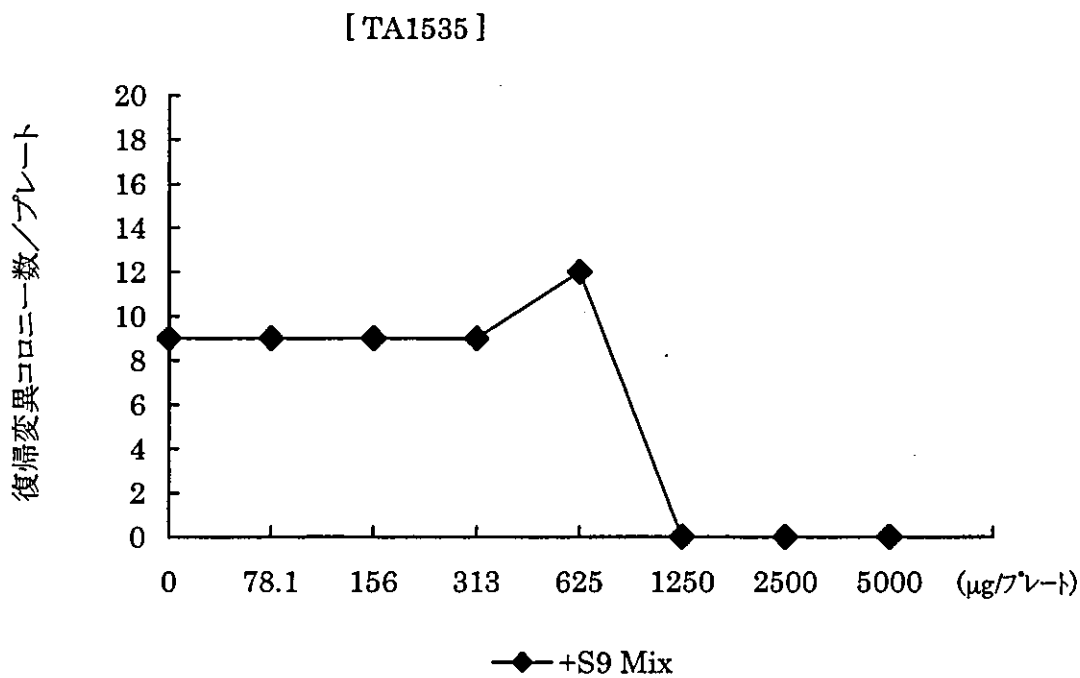
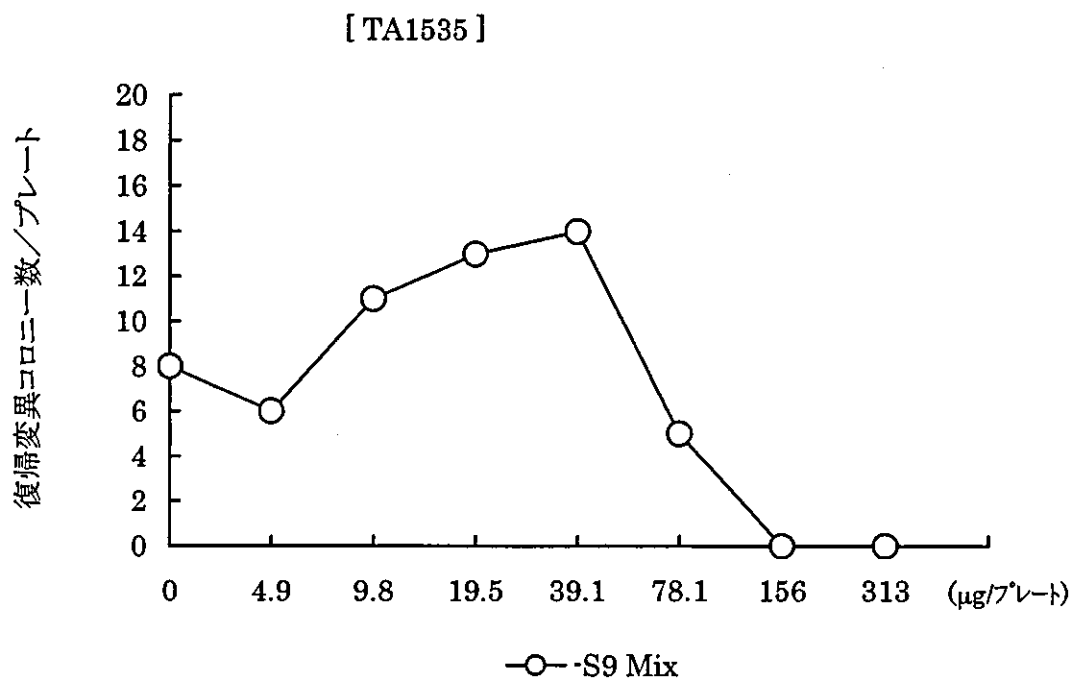


図2 用量-反応曲線 (本試験, TA1535株)

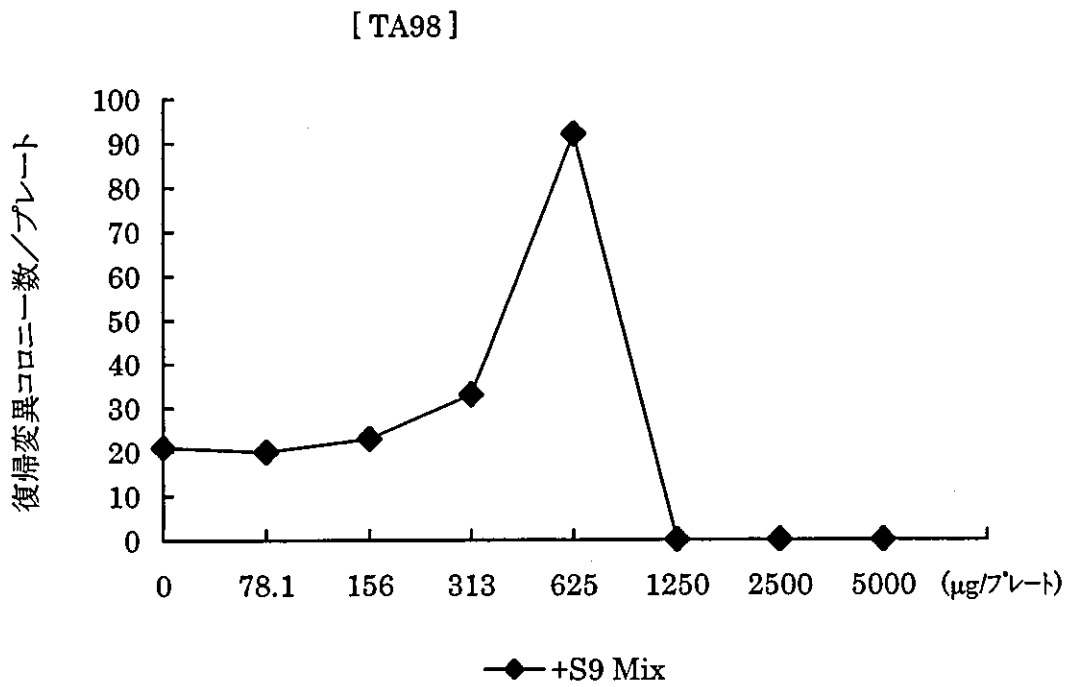
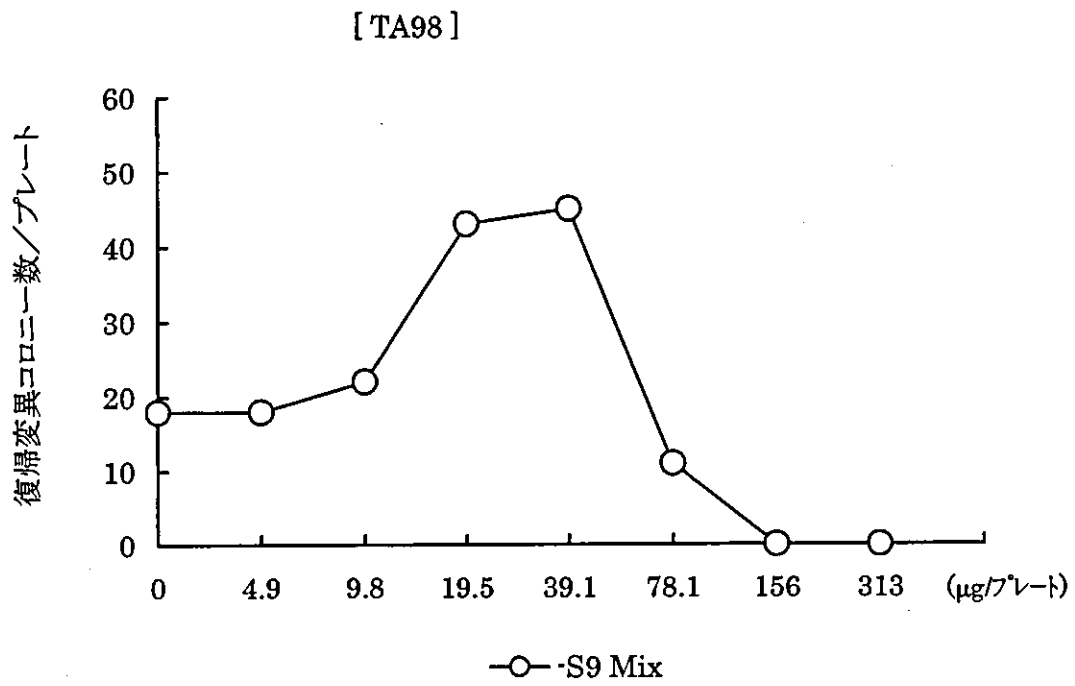


図3 用量-反応曲線 (本試験, TA98株)

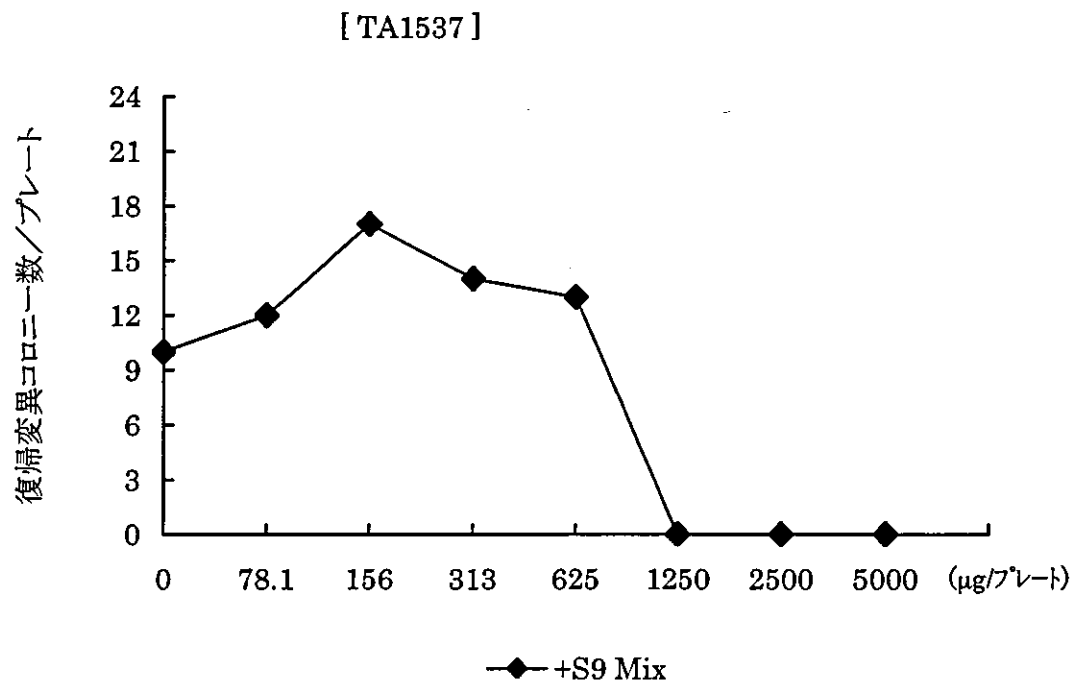
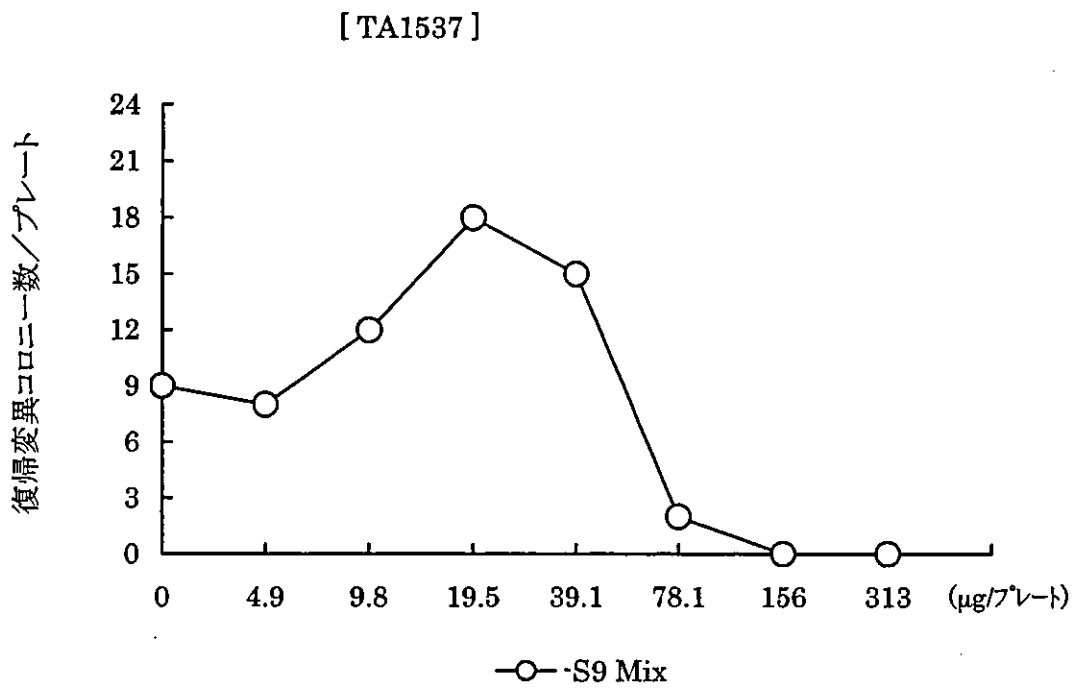


図4 用量-反応曲線 (本試験, TA1537株)

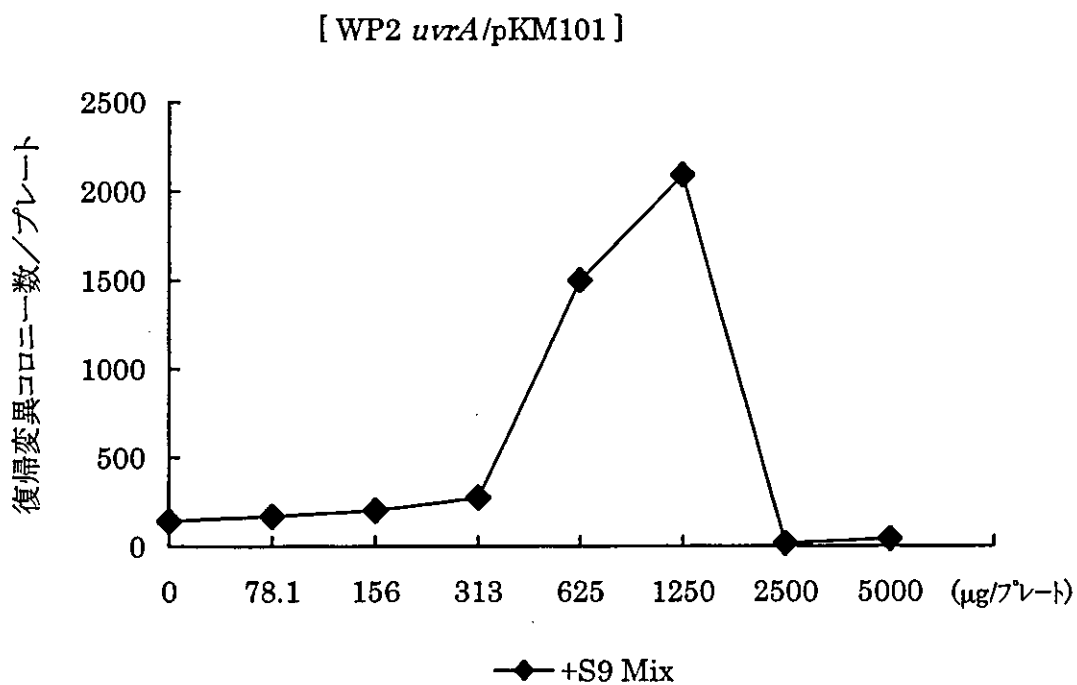
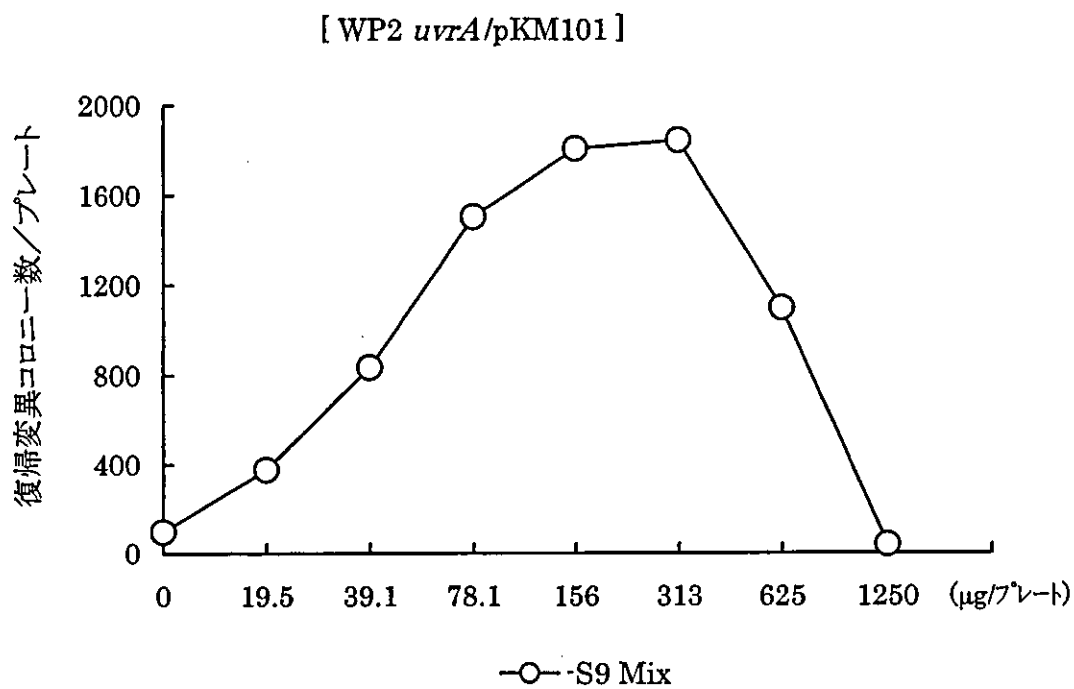


図5 用量-反応曲線 (本試験, WP2 *uvrA*/pKM101株)

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）のマウスを用いる小核試験

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長
協力研究者 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
竹澤 祐造 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

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。

A. 研究目的

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のマウス骨髓における小核誘発性の有無を検索した。

CCA は国内で使用される木材防腐剤の中で過去に最も使用量が多く、リスク評価の急がれる資材である。

B. 研究方法

試験方法は Schmid¹⁾および国内外の各種毒性試験指針（経済協力開発機構、OECD Guidelines、No. 474、1997 年；薬事法、医薬審第 1604 号、1999 年；農林水産省、12 農産第 8147 号、2-1-19-3、2000

年等）に示された方法を参考に、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

被験物質 CCA は以下の 3 化合物の混合物である。各構成成分の配合比は以下の通りであった。

酸化クロム（VI）	35.3%
酸化銅（II）	19.6%
酸化ヒ素（V）	45.1%

構成成分-1

名称：	酸化クロム（VI）
CAS No：	1333-82-0

組成式： CrO_3
分子量： 99.99
外観： 暗褐色結晶
溶解性： 水、アルコール、エーテル易溶
純度： 98%
ロット番号： 601F1650
製造元： 関東化学株式会社
注意事項： 吸湿性、潮解性あり

構成成分-2

名称： 酸化銅 (II)
CAS No： 1317-38-0
組成式： CuO
分子量： 79.55
外観： 黒色微細粉末
溶解性： 水に不溶
純度： 99.3%
ロット番号： 204G1471
製造元： 関東化学株式会社

構成成分-3

名称： 酸化ヒ素 (V)
CAS No： 1303-28-2
組成式： As_2O_5
分子量： 229.84
外観： 白色固体
溶解性： 水に易溶
純度： 91.9%
ロット番号： M99649K
製造元： キシダ化学株式会社
注意事項： 潮解性あり

以上3物質は室温（湿度40%以下）の被験物質保管庫で保存した。

2. 使用動物

SPFのICR系 (Crj:CD-1) 雄マウス (6週齢) を日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターより購入した。入荷後7日間の馴化期間を設け、7週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験における被験物質投与開始日の使用マウスの平均体重はそれぞれ34.4gおよび34.2gであった。

3. 飼育条件

動物は以下の環境に設定された動物飼育室 (動物室115) で飼育した。

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)

金網床アルミニウム製ケージ (215W×330D×180H mm) に3または5匹の動物を収容した。各ケージはステンレス鋼製可動ラックに収容した。

動物の群分けは入荷時に動物を無作為に各ケージに分配することで行った。ただし、投与日の各個体の体重が、平均体重の $\pm 20\%$ を超えないことを確認して用いた。ケージ内での各個体の識別は、ピクリン酸飽和70%エタノール溶液を用いて被毛の一部を染色することで行った。

供試動物には、保証飼料であるMF固型 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由に摂取させた。また、急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんを用いて自由に摂取させた。

4. 被験物質溶液の調製

被験物質溶液の調製には滅菌水 (Simpli Lab (日本ミリポア株式会社) を用いて製造した純水を滅菌したもの) を用いた。まず始めに、最高濃度の被験物質溶液を調製するため、所定量の酸化クロムと酸化ヒ素を秤量し、滅菌水を加えて完全に溶解させた。次に、所定量の酸化銅を加えて約 10 分間の超音波処理を行い、均一に懸濁させた。懸濁後、段階希釈により低濃度の被験物質溶液を調製した。

調製の際、成分ごとに純度補正を行った。また、酸化クロムや酸化ヒ素は吸湿性があるため、秤量室の湿度を 40% 以下に保って秤量した。なお、被験物質溶液は保存せず、投与日ごとに新しく調製した。

5. 陽性対照物質溶液の調製

マイトマイシン注用 (2 mg カ価マイトマイシン C/バイアル、協和醗酵工業株式会社) に純水を加えて溶解させ、1.0 mg/mL のマイトマイシン C 溶液を投与直前に調製した。

6. 投与方法

被験物質投与群、陰性対照群、および陽性対照群のすべての動物に対し、10 mL/kg の容量で胃ゾンデを用いて単回の強制経口投与を行った。個々の動物に対する投与容量は、投与日の体重から算出した。なお、投与前後、それぞれ約 3 時間の絶食を行った。

7. 毒性試験

供試動物の被験物質単回投与に対する最大耐量を求めるため毒性試験を行った。被

験物質は 50、1000、200、400、および 800 mg/kg の 5 用量を設定した。用量あたり 3 匹の動物に投与し、投与後 48 時間までの一般状態の観察を行った。

8. 小核試験

毒性試験の結果に基づき、投与用量は 25、50、および 100 mg/kg の 3 用量を設定した (理由は後述)。供試動物数は 1 群 5 匹の動物を用いた。さらに陰性対照群および陽性対照群を設定した。陰性対照群には純水を 10 mL/kg の容量で投与した。陽性対照群はマイトマイシン C を 10 mg/kg の用量で投与した。

投与 24 時間後にすべての被験物質投与群、陰性対照群、および陽性対照群から骨髓採取を行った。また、投与 48 時間後には被験物質投与群の最高用量群および陰性対照群から骨髓採取を行った。

9. 小核標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を捨てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させ、骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。標本には暗号化したコード番号を記載した。標本を室温で十分に空気乾燥させた後、メタノールで 5 分間固定し、3% ギムザ液 (メルク社製ギムザ溶液を pH6.8 リン酸緩衝液で希釈) で約 30 分間、室温で染色した²⁾。

10. 小核標本の観察

1 動物につき1枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下1000倍にて赤血球の観察を行った。小核を有する多染性赤血球の出現頻度を求めるため多染性赤血球を2000個観察した。また、多染性赤血球の割合を求めるため、赤血球を多染性と正染性に区別しながら1000個観察した。

11. 統計方法

小核を有する多染性赤血球の出現頻度についての統計学的解析には、Kastenbaum・Bowmanの数表³⁾(被験物質投与群)およびカイ二乗検定(陽性対照群)を用いた。一方、多染性赤血球の割合についての統計学的解析にはWilcoxonの順位和検定を行った。

12. 判定基準

少なくとも1つの被験物質投与群で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められれば陽性と判断した。一方、いずれの被験物質投与群においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

13. 倫理面への配慮

本研究は実験動物としてマウスを用いているが、財団法人残留農薬研究所の実験動物保護管理規定を遵守しており、動物愛護の観点において十分配慮がされている。また、人を研究対象として用いていないため、人権擁護の観点において倫理上の問題は全くない。

C. 研究結果

1. 毒性試験成績

毒性試験の成績をAppendix 1に示す。投与後48時間までに50および100 mg/kg群に死亡例の発生はなかった。しかし、200 mg/kg群では3例中2例、400および800 mg/kg群では全例の死亡が確認された。

一般症状においては、全用量群に立毛が観察された。200 mg/kg以上の用量では自発運動低下も認められた。さらに400および800 mg/kg群では自発運動消失および軟便も観察された(Appendix 3)。

以上の結果より、供試動物のCCA単回投与に対する最大耐量は100 mg/kgと考えられ、小核試験の最高用量は100 mg/kgに設定した。

2. 小核試験成績

すべての被験物質投与群で試験期間中に死亡例の発生は認められなかった(Appendix 1)。一般状態においては、100 mg/kg群に立毛(10例中7例)が観察された(Appendix 4)。

小核試験の成績と統計学的解析の結果をTable 1に、個別別成績および投与日の体重をAppendix 2に示した。投与24時間後の陰性対照群における小核出現頻度は0.27%であった。それに対して被験物質投与群の小核出現頻度は0.30~0.42%であり、用量に依存してやや増加する傾向が認められた。しかし、それは統計学的に有意な増加ではなかった。

投与48時間後の陰性対照群における小核出現頻度は、投与24時間後のそれと同じく0.27%であった。それに対して100 mg/kg群の小核出現頻度は0.43%を示し、

24 時間後と同様に少し増加した。しかし、それは統計学的に有意な増加ではなかった。

投与 24 時間後の 100 mg/kg 群において多染性赤血球の割合に減少が認められた。投与 48 時間後においてはさらに顕著で、陰性対照群の約 1/2 まで減少した (Table 1)。この結果は CCA には明らかな骨髄増殖抑制効果があることを示している。

D. 考察

投与 24 時間および 48 時間において、統計学的に有意な小核出現頻度の増加は認められなかった。しかし、投与 24 時間後では用量に依存した僅かな増加がみられ、また、48 時間後においても 24 時間後と同程度の増加が認められたことから、これら僅かな増加は偶発的なものとは考えにくい。よって、CCA は小核誘発性において全くの陰性とは言えず、弱い陽性=疑陽性であると判断するのが妥当であろう。

そこで、CCA を構成する 3 つの成分の内、CCA の弱い小核誘発性に寄与している物質が何かを考察する。

銅 (II) の小核誘発性に関する報告はこれまでのところ見当たらない。In vitro 染色体異常誘発性についても報告がない。しかし、大腸菌を用いた DNA 損傷試験 (Rec-assay) で陰性であり⁴⁾、また哺乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験でも陰性である⁵⁾ことから、染色体異常誘発性や小核誘発性も陰性であると推測される。

次にクロム (VI) の小核誘発性であるが、CCA の構成成分である三酸化クロムを直接、小核試験した報告はこれまでのところ

ない。しかし、三酸化クロムはクロム酸ナトリウム、二クロム酸ナトリウム、二クロム酸アンモニウム、二クロム酸カリウムなどと同様、水へ溶解した後、クロム酸イオン (CrO_4^{2-}) または二クロム酸イオン ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) を放出する。この 2 つのイオンは水中で平衡を保ち、共通の作用性を示す。よって、クロム酸や二クロム酸の毒性は、三酸化クロムの毒性と見なすことができる。そこでクロム酸や二クロム酸の小核誘発性を文献調査してみると、Wild⁶⁾は、クロム酸カリウム (K_2CrO_4 , 6 価) やクロム酸二カリウム ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 6 価) をマウスに腹腔内投与し、小核誘発性が陽性であることを示している。興味深いことに、投与経路を変えて、クロム酸カリウムをマウスに経口投与した場合、小核の誘発は認められなくなる⁷⁾。本研究では経口投与を選択したので、CCA で観察された小核はクロム (VI) によって誘発されたものではないと考えられる。

ヒ素にも次のような in vitro 染色体異常誘発性や小核誘発性のあることが知られている。三価ヒ素 (As_2O_3 , AsCl_3 , NaAsO_2) や五価ヒ素 (As_2O_5 , H_2AsO_4 , Na_2HAsO_4) はヒトリンパ球培養細胞に染色体異常を誘発する (三価の方が高い染色体異常誘発率を示す)⁸⁾。また、Arsenic acid (H_3AsO_4 , 五価) を 20 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与し、弱い小核の出現 (0.42%) が観察されている⁹⁾。ヒ素については投与経路による毒性の感受性の変化は知られておらず、経口投与によっても同様に弱い小核誘発性を示すものと推測される。

以上の考察から、CCA の弱い小核誘発性

はヒ素 (V) の弱い小核誘発性が反映されたものであると判断された。

CCA 投与 48 時間後、多染性赤血球の割合が明らかに減少し、骨髄増殖抑制が認められた。クロム (VI) には骨髄抑制を引き起こす作用のあることが既に知られていることから、CCA で観察された骨髄抑制はクロム (VI) が原因であると思われる。

本研究から、CCA は弱いながらも *in vivo* 染色体異常誘発性を有していると考えられる。また、復帰突然変異試験でも強い陽性の結果が得られていることから (本事業において実施)、遺伝子 DNA に突然変異を誘発する作用も有している。よって、CCA そのものには明らかな遺伝毒性があると判断できる。本研究結果は今後の CCA のリスク評価を行う上で、貴重な基礎データとなり得るだろう。

E. 結論

本実験条件下では、CCA のマウス骨髄細胞における小核誘発性は疑陽性であると結論した。その原因は構成成分であるヒ素 (V) の弱い小核誘発性が関与しているものと推測される。

F. 引用文献

- 1) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis, in : A. Hollaender (Ed.) Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, vol. 4, Plenum. New York, PP. 31~54.
- 2) Gollapudi, B. and O.P. Kamra. (1979) Application of a simple Giemsa
- 3) Kastenbaum, M.A. and K.O. Bowman. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutation Res., 9, 527~549.
- 4) Nishioka, H. (1975) Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. Mutation Res., 31, 185-189.
- 5) 梅田誠 (1980) 金属の変異原性・形質転換性、変異原と毒性、12、44-53.
- 6) Wild, D. (1978) Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by the micronucleus test. Mutat Res., 56, 319-327.
- 7) Shindo, Y., Y. Toyoda, K. Kawamura, M. Kurebe, H. Shimada, C. Hattori and S. Satake (1989) Micronucleus test with potassium chromate (VI) administered intraperitoneally and orally to mice. Mutation Res., 223, 403-406.
- 8) 佐谷戸安好、中室克彦 (1980) 金属化合物の染色体異常誘起性、変異原と毒性、12、34-43.
- 9) Kondo, Y., E. Nakajima, S. Nito, Y. Asano, F. Ariyuki and T. Higashi-