

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 17 年度分担研究報告書

2. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のマウスにおける皮膚感作性試験  
（Local Lymph Node Assay）

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 福山朋季 （財） 残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室  
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

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の皮膚感作性試験を、8 週齢の CBA 系 SPF マウスの雌性動物を用いて、OECD の毒性試験指針 429：Skin sensitization・Local Lymph Node Assay（LLNA 法）に従って実施した。投与群として、0、0.3、1、3、10%の 5 濃度の CCA を設定し、1 群 5 例のマウスを用いた。各濃度の CCA を 3 日間両耳後方に経皮投与し、2 日後に BrdU（200 mg/kg）溶液を腹腔内投与した。2 時間後に両耳下リンパ節を摘出し、重量および細胞数を測定した。リンパ球細胞増殖活性は ELISA 法にて測定した。その結果、CCA の 3 および 10%投与群において、リンパ節重量および細胞数の増加が観察された。リンパ球細胞増殖活性検査では、CCA 0.3%以上の全投与群にて、用量相関性の細胞増殖活性の増加が認められた。これらの結果から、CCA の皮膚感作性は、陽性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・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）について、マウスの Local Lymph Node Assay（LLNA 法）により皮膚感作性を検索し、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 2002 年 4 月 24 日付け経済協力開発機構の毒性試験指針「OECD Guideline for the testing of chemicals. Guideline 429: Skin sensitization・Local

Lymph Node Assay」<sup>1)</sup>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）<sup>1)</sup>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<sub>3</sub>、純度 98%）35.3%、酸化銅（CuO、純度 99.3%）19.6%および酸化ヒ素（As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、純度 91.9%）45.1%であった。これらの被験物質の入手先は、ク

ロム及び銅は東京化成工業（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℃）条件下で保管した。

## 2. 試験動物

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近交系 SPF マウス（CBA/JnCrIj）の雌動物を用いた。CBA/Jn マウスは接触性過敏症研究によく用いられ<sup>2)</sup>、Guideline により使用が定められている動物種である。試験動物は 7 週齢にて購入し、8 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、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 ± 3℃、湿度 50 ± 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個別飼育した。投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法により群分けを実施した。基礎飼料には保証飼料 MF 粉末型（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製バスケット型給餌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

本試験に先駆けて実施されたクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける急性経口<sup>3)</sup>、急性経皮<sup>4)</sup>及び培養皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験<sup>5)</sup>の結果に基づいて、経皮及び経口経路にて毒性の起こらない濃度及び腐食性が認められない濃度と想定される CCA の 10%濃度を最高用量として選択した。

そこで、試験では 10%濃度から公比 3 にて 0、0.3、1、3 及び 10 % の 5 濃度の CCA を設定した。

## 4. 被験物質投与液の調製

各濃度（0.3、1、3、10 %）の被験物質投与液を投与前に 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。最初に、所定量の酸化クロムおよび酸化ヒ素を秤量し、アセトン/オリーブオイル（アセトン（和光純薬工業株式会社、大阪府）：オリーブオイル（和光純薬工業株式会社、大阪府） = 4 : 1）を加え懸濁させた。次に、所定量の酸化銅を加えて超音波処理し、懸濁させた。懸濁後アセトン/オリーブオイルにて定容した。調製はドラフト室にて実施した。対照群の投与液はアセトン/オリーブオイルとした。各濃度の投与液は各投与日用に小分けし、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. 被験物質の投与

各濃度の被験物質投与液を両耳後方に 3 日間経皮投与した。被験物質投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、ピペットを用いて左右の耳介後方に 25  $\mu$ L ずつ経皮投与を行った。

## 6. 体重

全動物について、初回被験物質投与直前及び最終解剖日に体重を測定した。

## 7. 剖検及び組織採取

最終解剖予定時刻の 2 時間前に動物の腹腔内に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma Chemical Co., Missouri, USA) を投与した。BrdU の投与量は体重 1 kg あたり 200 mg (投与用量は 10 mL/kg) とした。BrdU の投与の 2 時間後、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。各動物より両側の耳下リンパ節を採取し、その重量を測定した。重量測定後、リンパ球細胞の細胞懸濁液とした。

## 8. 細胞懸濁液の調製

リン酸緩衝液 (PBS) に浸水したリンパ節を眼科鉗にて細切し、さらにナイロンメッシュ (75 µm メッシュ) 上で搗りつぶし、単細胞懸濁液を得た。次に細胞懸濁液を PBS にて遠心分離 (1400rpm; 10min) により洗浄して 1mL の細胞懸濁液とした。

## 9. リンパ球細胞数測定

細胞懸濁液の一部試料について、コールターカウンター Z2 (ベックマン・コールター (株)、東京) を用いてリンパ球数を計数した。

## 10. リンパ球細胞の増殖活性検査

リンパ球細胞数の測定後、 $1 \times 10^5$ /well となるように各細胞懸濁液を PBS にて希釈し、細胞活性測定用試料とした。BrdU で標識したリンパ球細胞増殖<sup>®</sup>の定量には Cell Proliferation ELISA, BrdU kit

(Boehringer Mannheim Corp, Indianapolis, USA) を用いた。希釈した細胞懸濁試料をマイクロプレート (Corning Inc. NY, USA) に貼り付け、Fix-Denat solution にて 30 分間室温で固定した。固定後、抗 BrdU 抗体 90 分間室温で培養し、洗浄後 TMB 溶液にて呈色反応させた。各試料の反応液を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、東京都) にて 450nm の吸光度にて測定した。

## 11. 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、リンパ節重量、リンパ球細胞数および細胞増殖活性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。詳細な症状の観察結果および機能検査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。

## C. 研究結果

LLNA の試験結果を表 1 に示す。

## 1. 体重

いずれの投与群においても被験物質投与の影響と考えられるような体重減少は認められなかった。

## 2. リンパ節重量及びリンパ球細胞数

CCA の 3 及び 10% 投与群で、対照群と比べ有意なリンパ節重量及びリンパ球細胞数の増加が認められた。

## 3. リンパ球細胞増殖活性

CCA の 0.3、1、3 及び 10% 投与群で対照群と比べて有意なリンパ球細胞増殖活性の増加が認められた。

## 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、CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の皮膚感作性を検索した。

リンパ節重量及び細胞数測定では、3 及び 10% 投与群で増加が認められた。BrdU を用いた ELISA 法による細胞増殖活性検査においても、CCA 0.3%、1%、3% および 10% 投与群でリンパ球細胞増殖活性の増加が認められた。

リンパ節重量、細胞数および細胞増殖活性がいずれも CCA 投与群で増加していること、増加が用量相関性に認められることから CCA の LLNA 法における皮膚感作性は陽性と判断した。

## E. 結論

CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、クロム・銅・ヒ素化

合物系木材防腐剤 (CCA) の皮膚感作性を検索した。本実験条件下において、CCA に皮膚感作性は陽性であると結論した。

## F. 引用文献

- 1) Penha J, Catilu V, and Tolaymat T: Generation, use, disposal, and management option for CCA-treated wood. Florida Center for Solid and Hazardous Waste Management, Florida, USA, Report #98-1, pp. 1-54, 1998.
- 2) Dean JH, et al. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, Regulatory Toxicology and Pharmacology 34,258-273 2001.
- 3) 小坂忠司: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける急性経口投与毒性試験、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、2005 年
- 4) 小坂忠司: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける急性経皮投与毒性試験、厚生労働化学研究費補助金 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、2006 年
- 5) 小坂忠司: 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、厚生労働化学研究費補助金 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、2005年

- 6) Takeyoshi, M., K. Yamasaki, et al. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation, Toxicology Letters 119(3), 203-208 2001.

#### 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 LLNA results in CBA strain female mice**

| Group no. | Dose     |      | Final BW (g) | Lymph node weight (mg) | Cell number ( $\times 10^6$ ) | Cell proloferation (BrdU intake) ( $\times 10^5$ cells/well) |
|-----------|----------|------|--------------|------------------------|-------------------------------|--|
| 1         | 0        | Mean | 21.2         | 4.4                    | 3.97                          | 0.487  |
|           |          | S.D. | 2.4          | 0.4                    | 1.08                          | 0.144  |
| 2         | CCA 0.3% | Mean | 21.4         | 4.4                    | 4.08                          | 1.185 **   |
|           |          | S.D. | 1.6          | 0.6                    | 1.15                          | 0.355  |
| 3         | CCA 1%   | Mean | 23.0         | 7.0                    | 9.06                          | 1.127 **   |
|           |          | S.D. | 2.4          | 0.9                    | 2.15                          | 0.353  |
| 4         | CCA 3%   | Mean | 21.7         | 9.6 *                  | 12.54 *                       | 1.350 **   |
|           |          | S.D. | 1.1          | 0.5                    | 3.28                          | 0.210  |
| 5         | CCA 10%  | Mean | 21.8         | 11.7 **                | 14.80 **                      | 1.686 **   |
|           |          | S.D. | 1.7          | 2.0                    | 4.37                          | 0.259  |

S.D.: Standard deviation.

Significantly different from Group 1 : \*,  $p \leq 0.05$  ; \*\*,  $p \leq 0.01$  (Dunnett-test).

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 17 年度分担研究報告書

3. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける  
4 週間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 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）の反復経皮投与試験における適用時間の差による影響を確認するため、CCA を 0、10、100 および 300 mg/kg の用量で SD 系雌性ラットの背部皮膚に毎日 6 時間、4 週間に亘り反復投与し、昨年度（平成 16 年度）の 1 日 24 時間暴露の実験結果と比較した。その結果、300 mg/kg 投与群では自発運動の減少、歩行異常あるいは後肢麻痺が認められ、投与 12 日までに全例が死亡した。100 mg/kg 投与群では、死亡例はなかったが、適用部位の皮膚にびらん・潰瘍が観察され、貧血、白血球増多症、低蛋白血漿および血清 AST、トリグリセライド、カリウムの上昇認められた。また、同群では肝・腎・脾の重量増加がみられ、脳重量が減少傾向を示した。10 mg/kg 投与群では、CCA 投与に関連づけられる異常は特に認められなかった。これらの変化は、平成 16 年度に実施した反復経皮投与試験（適用時間：24 時間/日）の結果と比較し、程度的には軽減される傾向にあったが、質的にはほぼ一致し、適用時間の差（6 時間 vs 24 時間）による影響は比較的小さいことが確認された。

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目的に、平成 17 年度では、昨年度に引き続き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）<sup>1-4</sup>を対象にラットを用い 4 週間の反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では、経皮

投与における適用時間の差（昨年度 24 時間に対し今年度 6 時間）による毒性発現の違いの有無を比較検討することに主眼を置いた。

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) <sup>1)</sup> 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 ( $\text{CrO}_3$ 、純度 98%) 35.3%、酸化銅 ( $\text{CuO}$ 、純度 99.3%) 19.6% および酸化ヒ素 ( $\text{As}_2\text{O}_5$ 、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°C) 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) の雌性動物を用いた。供試動物は 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°C、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、体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に 6 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 (D 32.5 cm x W 19.5 cm x H 18 cm) 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、薬物動態調査用の 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

昨年度 (平成 16 年度) に実施した 8 週間反復経皮投与毒性試験結果を考慮し、300mg/kg を最高用量として設定し、公比 3 倍で中間用量を 100 mg/kg、そして無毒性量としての予想で 10 mg/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 mg/kg) の各用量群に 6 匹の雌性動物を使用した。

### 4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、10、100、300 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 3 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、100、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（5 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（ニチバンメデイカル株式会社）にて固定し、1日あたり約6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。

#### 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1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回全馴化動物、投与4週時には対照群と高用量群（100 mg/kg）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週時に各群の生存動物（0、10および100 mg/kg 投与群）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週間終了時に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 ADVIA120（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に供した動物の腹大動脈から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 (日本電子株式会社) 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)、 $\gamma$ -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。途中死亡例については、発見時に速やかに剖検した。

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、卵巣 (両側)、子宮、膈、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 週間終了後の各群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）、卵巣（両側）、子宮

途中死亡動物（300 mg/kg 群）についても、計画殺動物と同様に上記の臓器重量を測定し、比体重値（相対重量）を算出した。

#### 15. 病理組織標本作製

投与 4 週後の計画殺動物（対照群および 100 mg/kg 投与群）全例ならびに途中死亡動物（300 mg/kg 投与群）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。鏡検は現在実施中。

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、脾臓、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、卵巣（両側）、子宮、靨、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

#### 16. CCA の薬物動態調査（トキシコキネティクス）用サンプル採取

投与 4 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 0、10 および 100 mg/kg 群の計画殺動物から採取された血清サンプルの一部を CCA の分析用としてディープフリーザー（-70℃以下）にて保管した。また、投与 4 週後の各群の計画殺動物から肝臓の一部（左葉、右葉および尾状葉）と脂肪組織（腎周囲）を採取し、ディープフリーザー（-70℃以下）にて保管し、将来の CCA の分析に備えた。

#### 17. 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）

300 mg/kg 投与群では、投与 5 日～12 日目の間に全例が死亡した。これらの動物のうち、3 例に自発運動の減少が死亡前日あるいは死亡当日にみられ、そのうち 1 例に流涙、後肢麻痺、歩行異常、体温低下、皮膚の蒼白化および適用部位に痂皮が観察された。また、別の 1 例では排便量の減少がみられた。

100 mg/kg 投与群では、投与 6 日以降において適用部位の痂皮形成が全例にみられた。

10 mg/kg 投与群では、投与 2 週以降において軽度ながら 4 例に適用部位の痂皮形成が認められ、うち 1 例は投与終了時までには回復した。

### 2. 摂餌量（図 1、表 3）

300 mg/kg 投与群では、投与 1 週時から摂餌量が顕著に減少した。

100 及び 10 mg/kg 投与群では、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（図 2、表 4）

300 mg/kg 投与群では、投与 1 週時から体重減少がみられた。

100 mg/kg 投与群では、投与 1 週時に軽度の体重増加抑制がみられたが、以降は対照群と比べ差はなかった。

10 mg/kg 投与群では、体重変化に異常は認められなかった。

### 4. 眼検査成績（表 5）

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）

300 mg/kg 投与群では、全例が投与 1～2 週時に死亡したため尿検査は実施しなかった。

100 および 10 mg/kg 投与群では、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）

300 mg/kg 投与群では、投与 1～2 週時に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、投与 4 週時の検査においてヘマトクリット値 (Ht)、血色素量 (Hb) および平均赤血球容積 (MCV) が減少し、小球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.) が増加した。

10 mg/kg 投与群では、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。

### 7. 血液生化学的検査成績（表 8）

300 mg/kg 投与群では、投与 1～2 週時に全例が死亡したため、血液生化学検査を実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、投与 4 週時の検査においてアルブミン (Albumin) の減少に伴う総蛋白 (T.Prot.) の減少がみられ、A/G 比が減少した。また、トリグリセライド (TGL)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT) およびカリウム (K) が

増加した。

10 mg/kg 投与群では、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。

#### 8. 剖検所見 (表 9)

300 mg/kg 投与群では、投与 1~2 週時に全例が死亡した。剖検の結果、ほぼ全例に脾臓の萎縮が認められ、約半数例に被験物質適用部位を含む全身性の皮下水腫、適用部位皮下織の黒色化が観察された。その他、少数例に背部骨格筋の黒色化および腹腔内臓器の癒着が観察された。

100 mg/kg 投与群では、投与 4 週後の計画殺動物において約半数例に適用部位のびらん・潰瘍が、また、同部位皮下織の黒色化・硬結および背部骨格筋の黒色化が観察された。その他、少数例に腰部リンパ節の腫大が観察された。

10 mg/kg 投与群では、被験物質投与に関連付けられる肉眼的異常は認められなかった。

#### 9. 臓器重量 (表 10)

300 mg/kg 投与群では、投与 1~2 週時に全例が死亡したが、各動物の剖検時に計画殺動物と同様に臓器重量を測定した。その結果、肺、肝臓、腎臓および副腎の重量が背景データに比べ増加傾向を示し、逆に、脾臓および胸腺の重量が減少した。

100 mg/kg 投与群では、投与 4 週時後の計画殺動物において肝臓、腎臓および脾臓の相対重量が対照群に比べ有意に増加し、絶対重量も増加傾向を示した。また、脳の絶対重量の有意な減少と相対重量の減少傾向が認められた。

10 mg/kg 投与群では、被験物質投与に関連した臓器重量変動は認められなかった。

#### D. 考察

平成 17 年度では、昨年度に引き続きクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) を対象に雌性ラットを用い 0、10、100、および 300 mg/kg の用量で 4 週間の反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では、経皮投与における適用時間の差 (昨年度 24 時間に対し今年度 6 時間) による毒性発現の違いの有無を比較検討することに主眼を置いた。

臨床症状および死亡率では、300 mg/kg 投与群において投与初期から自発運動の低下、歩行異常、後肢麻痺、体温低下等が認められ、投与開始後 2 週間以内に全例が死亡した。剖検の結果、これらの死亡動物のほぼ全例に脾臓の萎縮が認められ、約半数例に適用部位を含む全身性の皮下水腫、適用部位皮下織の黒色化が観察された。その他、少数例に背部骨格筋の黒色化および腹腔内臓器の癒着が観察された。死因としては全身性の水腫 (循環障害) が考えられ、おそらく皮膚から吸収された CCA の有効成分クロム (腎毒性物質)、銅 (消化管障害物質) およびヒ素 (神経系、心血管系、肝臓および消化管に対する毒性物質) の複合作用<sup>5)</sup>に起因するものと推察した。なお、100 mg/kg 投与群では、死亡例はなかったが、投与 6 日以降に適用部位の痂皮形成が全例にみられた。

体重変化では、300 mg/kg 投与群において投与 1 週時に摂餌量の減少を伴う体重減少がみられた。100 mg/kg 投与群においても投与 1 週時に軽度の体重増加抑制が認められたが、その後回復した。

眼検査および尿検査では、10 および 100mg/kg 投与群ともに CCA 投与に関連付けられる異常は認められなかった。

血液学的検査では、100 mg/kg 投与群において小球性貧血がみられ、これに伴い網赤血球数あるいは血小板数が増加した。また、同群ではリンパ球の増加を伴う総白血球数（WBC）の増加が認められた。上記の貧血に関しては、CCA の主成分のひとつであり、造血器系への影響が示唆<sup>6)</sup>されているヒ素により誘発されたものと推察した。リンパ球の増加を伴う WBC の増加については、被験物質適用部位の皮膚において投与初期から痂皮形成が認められ、剖検時にはびらん・潰瘍が観察されたことから、CCA に起因する炎症性変化に付随する二次的変化と考えられた。

血液生化学的検査では、100 mg/kg 以上の投与群においてアルブミン（Albumin）の減少に伴う総蛋白（T.Prot.）の減少がみられ、A/G 比が減少した。また、トリグリセライド（TGL）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）およびカリウム（K）が増加した。これらの変化は概ね肝・腎障害を反映する所見であり、後述する臓器重量増加と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、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<sup>8)</sup>。

剖検所見では、前述の如く 300mg/kg 投与群の死亡動物のほぼ全例に脾臓の萎縮が認められ、約半数例に適用部位を含む全身性の皮下水腫、適用部位皮下織の黒色化が観察された。その他、少数例に背部骨格筋の黒色化および腹腔内臓器の癒着が観察された。100 mg/kg 投与群では、投与 4 週後の計画殺動物

において約半数例に適用部位のびらん・潰瘍が、また、同部位皮下織の黒色化・硬結および背部骨格筋の黒色化が観察された。その他、少数例に腰部リンパ節の腫大が観察された。これらの変化は、昨年度の反復経皮投与試験においても観察されており、CCA の構成成分であるクロム、銅およびヒ素の毒作用<sup>5-7)</sup>に起因するものと考えられた。ただし、適用部位の皮下織あるいは背部骨格筋の変色については、経皮投与されたクロム、銅およびヒ素の吸収過程における組織の色彩的変化であり毒性所見とは異なるものと思われた。また、リンパ節の腫大はおそらく炎症に対する二次的変化と推察した。

臓器重量では、300 mg/kg 投与群において肺、肝臓、腎臓および副腎の重量が増加傾向を示し、逆に、脾臓および胸腺の重量が減少した。100 mg/kg 投与群では、肝臓、腎臓および脾臓の相対重量が有意に増加し、絶対重量も増加傾向を示した。また、脳の絶対重量の有意な減少と相対重量の減少傾向が認められた。これらの変化のうち、肝重量の増加はヒ素の作用により、腎重量増加についてはクロムの毒性作用<sup>9)</sup>に起因するものと推測した。一方、脳重量および胸腺重量の減少については CCA の神経・免疫系への影響を反映する所見とも考えられた。100mg/kg の脾臓の重量増加に関しては、前述の貧血あるいは適用部位のびらん・潰瘍に対する反応所見（髄外造血亢進）と推察した。

以上の様に、今回認められた種々の変化は、平成 16 年度に実施した反復経皮毒性試験（適用時間：24 時間/日）の結果と比較し、程度的には軽減される傾向にあったが、質的にはほぼ一致し、適用時間の差（6 時間 vs 24 時間）に比べ毒性発現の違いは比較的小さい

ことが確認された。

#### E. 結論

本実験条件下では、CCA をラットに反復経皮投与した場合、皮下水腫、貧血、肝・腎障害を誘発し、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可能性が示唆された。これらの結果は、昨年度の実験結果と質的にほぼ一致した。

#### F. 引用文献

- 1) Penha J, Catilu V, and Tolaymat 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) McMahon 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) 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.
- 6) 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.
- 7) Hostynek JJ, Hinz RS, Lorence CR, Price M, and Guy RH: Metals and the skin. Critical Reviews in Toxicology, 23(2): 171-235, 1993.
- 8) 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.

#### 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

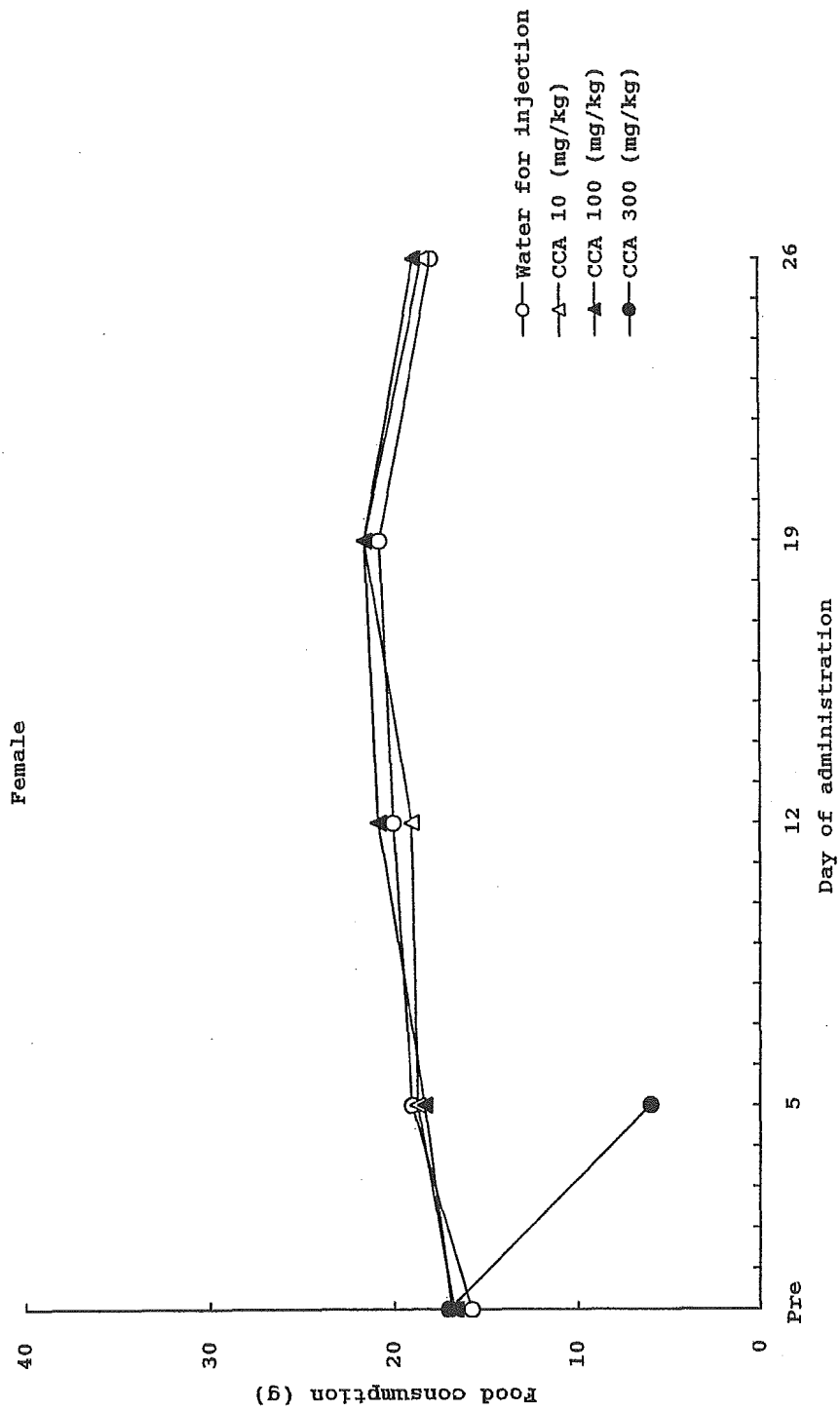


Figure 1 Changes of food consumption in rats



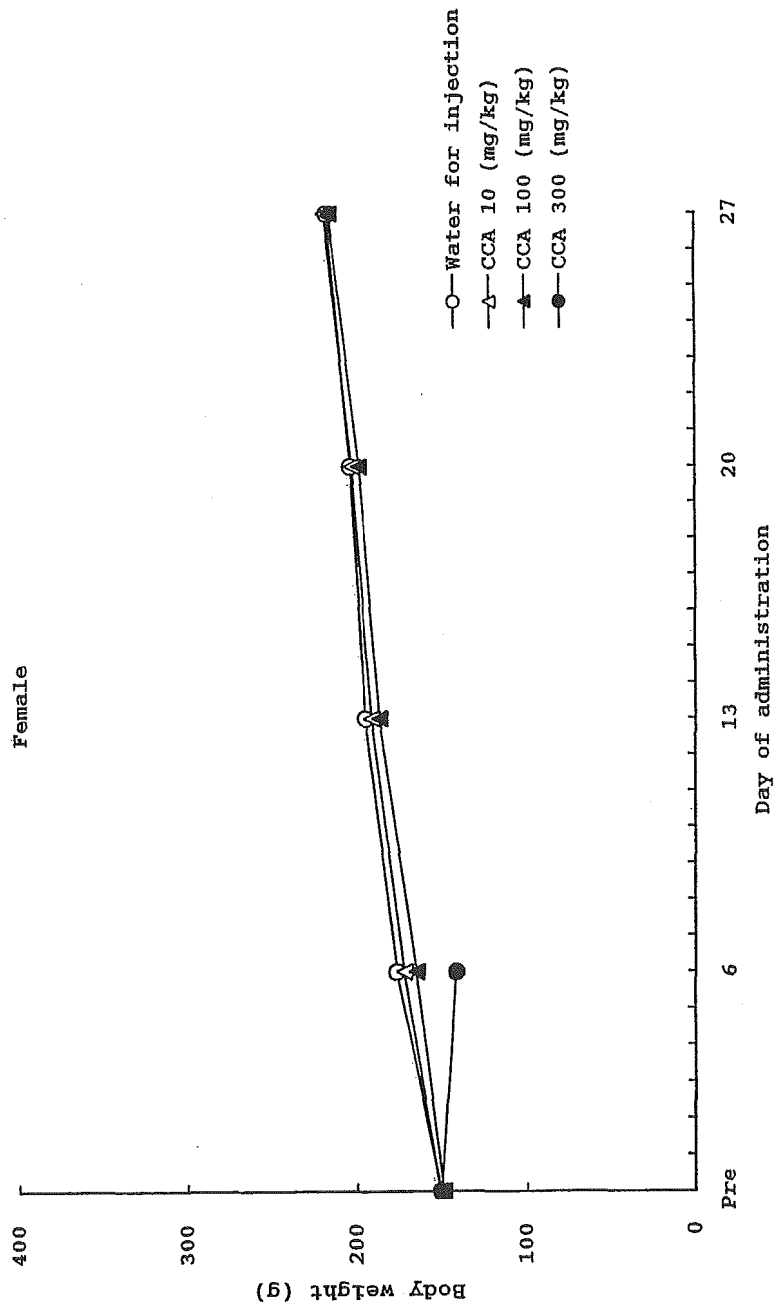


Figure 2 Changes of body weight in rats

Table 1 Interim deaths in rats

Study No. : SBL94-84

| Group               | Dose      | Female |      |
|---------------------|-----------|--------|------|
| Water for injection |           | 0/6    | 0%   |
| CCA                 | 10 mg/kg  | 0/6    | 0%   |
| CCA                 | 100 mg/kg | 0/6    | 0%   |
| CCA                 | 300 mg/kg | 6/6    | 100% |

Clinical Sign

Grade

- 0 : No abnormal signs
- 1 : Slight
- 2 : Moderate
- 3 : Severe
- + : Non-graded clinical signs

Table 2-1 Clinical signs in female rats

| Group | Dose (mg/kg)                     | Grade | Water for injection |   |       | CCA |   |       | CCA |   |       | CCA |   |       |
|-------|----------------------------------|-------|---------------------|---|-------|-----|---|-------|-----|---|-------|-----|---|-------|
|       |                                  |       | 0                   | 1 | 2 3 + | 0   | 1 | 2 3 + | 0   | 1 | 2 3 + | 0   | 1 | 2 3 + |
| Day   | Item                             |       |                     |   |       |     |   |       |     |   |       |     |   |       |
| 0     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 1     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 2     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 3     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 4     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 5     | Decrease in spontaneous activity |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 0     |
|       | Decrease in stool volume         |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
|       | Death                            |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 4     |
| 6     | Death                            |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
| 7     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 1     |
| 8     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 1     |
| 9     | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 1     |
| 10    | Abnormal gait                    |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
| 11    | Decrease in spontaneous activity |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 0     |
|       | Paralysis of hindleg             |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
|       | Hypothermia                      |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
|       | Blanching skin or pale skin      |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
|       | Lacrimation                      |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
| 12    | Death                            |       | 6                   | 0 | 0     | 0   | 6 | 0     | 0   | 0 | 6     | 0   | 0 | 1     |
| 13    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 14    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 15    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 16    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 17    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 18    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 19    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |
| 20    | No abnormal signs                |       | 6                   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     | 6   | 6 | 6     |

Numerals represent the number of animals.