

Table 9-1 Gross autopsy findings in female rats

Findings	Group	Dose(mg/kg) Grade	Water for injection			CCA			CCA								
			0	1	2	3	P	0	1	2	3	P					
Kidney			0	1	2	3	P	0	1	2	3	P	0	1	2	3	P
Dilatation, renal pelvis		5	1	6				0	5					1			
Lymph node (Lumbar) Enlargement		6	0	6				0	5					1			
Skeletal muscle(back) Black		6	0	6				0	3					3			
Application site(subcutaneous*tissue) Black		6	0	6				0	3					3			
Induration		6	0	6				0	3					3			
Application site(back skin) Erosion/ulcer		6	0	6				0	2					4			

Numerals represent the number of animals.

Table 9-2 Gross autopsy findings in female rats (Interim deaths)

Findings	Group			Water for injection			CCA			CCA			
	Dose (mg/kg)	Grade		0	1	2	3	P	0	1	2	3	P
Abdominal cavity													
Adhesion, abdominal organs									5				1
Spleen													
Small size									1				5
Subcutaneous tissue													
Edema									3				3
Skeletal muscle (back)													
Black									4				2
Application site (subcutaneous*tissue)													
White focus									4				2
Black									5				1
Black focus									4				2

Numerals represent the number of animals.

Organ weight

-R (Right)
-L (Left)
-R&L (Right and Left)

Table 10-1 Organ weight in female rats

Group	Water for injection	CCA	CCA	CCA
Dose (mg/kg)		10	100	300
N	6	6	6	0
Pituitary (mg)	11.65±2.29	11.13±1.93	11.57±2.86	
Thyroid-R (mg)	7.27±1.85	5.93±1.66	7.90±1.31	
Thyroid-L (mg)	6.15±0.89	6.08±1.56	7.47±2.03	
Thyroid-R&L (mg)	13.43±2.32	12.02±1.36	15.37±3.05	
Adrenal-R (mg)	36.83±5.68	34.15±6.70	29.72±4.70	
Adrenal-L (mg)	38.60±5.66	37.02±5.98	33.18±5.25	
Adrenal-R&L (mg)	75.43±11.22	71.17±12.22	62.90±9.39	
Ovary-R (mg)	35.85±8.12	34.82±3.36	35.68±13.52	
Ovary-L (mg)	37.75±9.54	33.48±6.77	38.18±6.37	
Ovary-R&L (mg)	73.60±17.46	68.30±7.85	73.87±19.54	
Thymus (mg)	392.5±99.5	359.2±80.9	286.2±96.2	
Submand.-R (mg)	204.3±15.0	195.3±21.1	190.2±11.5	
Submand.-L (mg)	198.7±13.1	198.2±18.6	189.3±22.2	
Submand.-R&L (mg)	403.0±27.8	393.5±38.7	379.5±31.1	
Spleen (mg)	444.3±93.2	423.7±75.5	548.0±112.8	
Brain (mg)	1907.5±39.1	1836.0±77.5	1810.3±44.4*	
Heart (mg)	781.8±60.7	770.3±58.7	804.0±128.1	
Lung (mg)	855.5±36.8	912.3±80.3	898.3±65.9	
Liver (g)	5.865±0.423	6.110±0.523	6.535±0.706	
Kidney-R (mg)	847.3±86.0	833.5±86.0	972.5±94.7	
Kidney-L (mg)	851.5±86.9	837.7±90.8	954.8±102.9	
Kidney-R&L (mg)	1698.8±169.9	1671.2±175.0	1927.3±193.4	
Uterus (mg)	335.0±55.8	427.0±164.6	508.5±230.7	

Values are expressed as the mean ± S.D.

* P<0.05 : Significantly different from Water for injection.

Table 10-2 Relative organ weight in female rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection		CCA		CCA		CCA	
			10	6	100	6	300	0		
Pituitary	(mg/100gBW)		6.00±1.04	5.80±1.03	6.10±1.18					
Thyroid-R	(mg/100gBW)		3.77±0.96	3.07±0.81	4.18±0.54					
Thyroid-L	(mg/100gBW)		3.17±0.35	3.17±0.83	3.92±0.88					
Thyroid-R&L	(mg/100gBW)		6.93±1.19	6.23±0.53	8.13±1.17					
Adrenal-R	(mg/100gBW)		19.00±2.55	17.72±3.15	15.77±1.96					
Adrenal-L	(mg/100gBW)		19.92±2.61	19.18±2.38	17.62±2.00					
Adrenal-R&L	(mg/100gBW)		38.90±5.10	36.88±5.32	33.40±3.58					
Ovary-R	(mg/100gBW)		18.43±3.84	18.15±2.24	18.93±6.85					
Ovary-L	(mg/100gBW)		19.42±4.49	17.43±3.74	20.30±2.96					
Ovary-R&L	(mg/100gBW)		37.85±8.26	35.58±4.74	39.23±9.66					
Thymus	(mg/100gBW)		201.3±44.5	185.5±34.8	150.7±42.5					
Submand.-R	(mg/100gBW)		105.5±5.2	101.2±7.3	101.3±5.6					
Submand.-L	(mg/100gBW)		102.7±5.5	103.0±6.8	100.8±9.7					
Submand.-R&L	(mg/100gBW)		207.8±10.8	204.3±13.6	202.3±13.2					
Spleen	(mg/100gBW)		228.2±39.0	219.2±29.6	291.3±53.9*					
Brain	(mg/100gBW)		986.5±57.7	954.8±45.6	967.3±70.3					
Heart	(mg/100gBW)		403.3±20.8	399.7±15.3	425.8±44.2					
Lung	(mg/100gBW)		442.2±25.0	474.5±37.5	478.0±11.9					
Liver	(g/100gBW)		3.023±0.067	3.173±0.178	3.473±0.203**					
Kidney-R	(mg/100gBW)		436.7±28.8	433.0±36.7	517.2±25.0**					
Kidney-L	(mg/100gBW)		439.3±35.2	435.3±38.8	507.3±27.5**					
Kidney-R&L	(mg/100gBW)		875.8±62.0	868.0±74.1	1024.5±47.8**					
Uterus	(mg/100gBW)		173.2±29.2	222.3±84.3	265.0±103.3					

Values are expressed as the mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01: Significantly different from Water for injection.

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

4. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の幼若ラットにおける 4 週間
反復経口投与毒性試験（一般毒性および神経・免疫毒性併合試験）

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
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	桑原真紀	(財)	残留農薬研究所	毒性部病理研究室主任
	小嶋五百合	(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
	林 宏一	(財)	残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

幼若動物におけるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の一般毒性、神経毒性および免疫毒性を検索するため、CCA を、0、1、8 および 80 mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットの幼若動物に 4 週間に亘り毎日強制経口投与した。その結果、詳細な症状の観察では、80 mg/kg 群の雌雄および 8 mg/kg 群の雄で活動性の減少が観察された。加えて、80 mg/kg 群の雌では、立ち上がり回数が減少し、機能検査においても測定開始後 10 分間での自発運動量が減少し、探索行動の抑制が示唆された。剖検所見では、80 mg/kg 群の雌雄で胸腺および脾臓重の減少が認められた。免疫学的検査では、80 mg/kg 群の雌雄で胸腺および脾臓重量が減少し、胸腺ないし脾臓の T 細胞数の減少が認められた。これらの結果から、CCA を幼若ラットに 4 週間反復経口投与した場合、8 mg/kg 以上の用量では神経系および免疫系に対し影響を及ぼす可能性が示唆された。1 mg/kg 群では毒性影響は特に認められなかった。

A. 研究目的

過去に使用量の最も多い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⁾を幼若期のラットに 4 週間にわたって反復経口投与し、その際に生じる神経系および免疫系に関す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。

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「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針 2-1-12」及び 1998 年、

米国環境保護庁省「Health Effects Test Guideline、OPPTS 870.7800」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) ¹⁾ 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 (CrO₃、純度 98%) 35.3%、酸化銅 (CuO、純度 99.3%) 19.6% および酸化ヒ素 (As₂O₅、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°C) 条件下で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場 (静岡県) で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]) の哺育 13 および 14 日齢の親付き動物を雌雄各 60 匹 (12 腹) 購入し、哺育 20 日あるいは 21 日齢にて離乳後試験に用いた。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°C、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。投与開始の 1 ないしは 4 日前に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無

作為抽出法で神経毒性試験用に 10 匹および免疫毒性試験補充用に 3 匹を各用量群にそれぞれ配分し、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薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

当該試験に先行して実施した「クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける反復経口投与毒性試験」²⁾ および「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」³⁾ の結果に基づいて、本試験の高用量として 80 mg/kg/day を設定した。高用量以外の用量としては、用量-反応相関性に関するデータが得られるように 8 mg/kg/day を、さらに急性神経毒性および免疫毒性の無毒性量の把握を期して 1 mg/kg/day を設定した。また、無処置対照群 (0 mg/kg/day) を設定した。これらの設定用量群 (0、1、8 および 80 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき雌雄とも 13 匹の動物を使用した。(各動物の供試検査項目は表 1 参照)

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、1、8、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。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

5. 一般状態の観察

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回被験物質投与前に一般状態を観察した。

6. 詳細な症状観察

神経毒性試験用の動物について投与1、2、3および4週に、観察動物を無作為化して実施した。観察は、午前9時から12時の間に、動物の配分を知らされていない特別に訓練を受けた観察者が、ケージ内あるいは外（オープンフィールド）で以下の項目について尺度基準（スコア）に基づき実施した。

詳細な症状観察項目：体位/姿勢、呼吸状態、攣縮、振戦、痙攣、警戒性、攻撃性、眼球突出、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、粘膜、分泌物/付着物、筋緊張、取り扱いに対する反応、運動協調性、瞳孔径、瞳孔機能、常同、異常行動、被毛粗剛、立毛、皮膚色、活動性、探索行動、歩行異常、立ち上がり、糞の個数、糞の状態及び尿の状態

7. 機能検査

投与4週の詳細な症状観察と同時に、感覚運動反応（位置視覚、接近反応、触覚反応、痛覚反応、聴覚反応および空中立ち直り反射）検査、デジタル体温計（Physitemp Instruments Inc.）を用いた体温測定、OECD方式ラット握力測定器（室町機械株式会社）を用いた前肢及び後肢握力測定、着地時開脚幅測定、遠赤外線方式の検出器（SUPER MEX®）を装着した自発運動測定システム（室町機械株式会社）を用いた自発運動量測定を実施した。

8. 体重

全動物について、投与開始時およびその後毎週毎週2回（投与週の満了日およびその3日後）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。

9. 摂餌量

全動物について、毎週1回連続3日分の個体別摂餌量を測定した。各測定値を測定日数で除し、1日1匹あたりの摂餌量（個体別平均摂餌量）を算出した。

10. 血液学的検査

4週間反復投与終了後に、神経病理学的検査に供しなかった神経毒性試験用動物および免疫毒性試験補充用動物（各群8匹/性）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。動物をエーテル麻酔下で開腹し、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 (PLT)、網赤血球数 (Retics)、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 (N)、リンパ球 (L)、単球 (M)、好酸球 (E)、好塩基球 (B)、大型非染色球 (LUC)

血液凝固能を調べるために、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) の測定検査も実施した。

4 週間投与終了後の全生存動物の大腿骨から骨髓を採取し、アドヴィア 120 を用いて骨髓有核細胞数の測定を行なうと同時に、メイグリユンワルド・ギムザ染色を施した塗抹標本を作製した。また、被験物質による造血器系への影響が疑われたため、雌の対照群と高用量群について骨髓細胞形態検査を実施した。骨髓細胞形態検査では、塗抹標本を鏡検して、骨髓細胞の構成比 (%) を求め、骨髓有核細胞数を乗じてそれぞれの実数を算出した。

11. 血液生化学的検査

前項の血液学的検査で採取した血液試料をヘパリン処理した血漿を用い、以下の項目を JCA-BM1250 自動分析装置にて測定した。

測定項目 (略号): アルカリホスファターゼ (ALP)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP)、ク

レアチニン (Creat)、尿素窒素 (BUN)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、グロブリン (Glob)、アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio)、血糖 (Gluc)、総コレステロール (T.Chol)、トリグリセライド (TG)、総ビリルビン (T.Bil)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、無機リン (P)、カリウム (K) および塩素 (Cl)

12. 免疫学的検査

4 週間反復投与終了後に、神経病理学的検査に供しなかった神経毒性試験用動物および免疫毒性試験補充用動物合わせて各群 8 匹/性を免疫学的検査用動物として、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重量を測定し、免疫学的検査に供試した。免疫学的検査では、総合血液学検査装置アドヴィア 120 (Bayer Corporation) を用いた胸腺および脾臓の細胞数計測及び FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いたフローサイトメトリー解析 (リンパ球サブセット解析) を実施した。

13. 剖検および組織採取

13-1. 神経病理学的検査用動物

神経毒性試験用動物のうち各群各性 5 匹ずつを神経病理学的検査用に剖検した。剖検の対象とする動物は、詳細な症状観察および機能検査で異常が認められた動物の中から選出した。異常が認められた動物が 5 匹に満たなかった場合には、残りの動物の中から不足の匹数を選出した。動物は、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与 (50 mg/kg) により麻酔し、全身灌流固定の

後、剖検した。剖検時に以下の臓器・組織を取り出し、片側（原則として右側）の坐骨・脛骨神経は同固定液中、それ以外は10%中性緩衝ホルマリン液中でさらに浸漬固定した。

採取した臓器及び組織：脳（大脳、小脳、橋および延髄）、頭部（眼球および視神経を含む）、脊髄（頸部および腰部、脊髄神経節ならびに脊髄神経の前根・後根を含む）、坐骨神経（原則として右側）、脛骨神経（両側）、及び腓腹筋（両側）

13-2. 免疫毒性学的検査用動物

免疫学的検査用動物（各群8例/性）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、肺についてはホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。また、4週間反復投与終了後の計画殺動物の精巢はFSA液（ホルマリン-ショ糖-酢酸混合液）で5~7日間固定した後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

採取した臓器及び組織：脳、脊髄（頸部、胸部および腰部）、下垂体、胸腺（右側半分）、甲状腺および上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾臓（半分）、骨および骨髄（胸骨、片側大腿骨および頸部、腰部椎骨）、膝関節（片側）、リンパ節（頸部および腸間膜）、心臓、大動脈、唾液腺（顎下腺および舌下腺）、食道、胃（前胃および腺胃）、肝臓（中葉）、脾臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、頭部（鼻腔、副鼻腔、口腔粘膜および中耳を含む）、舌、咽頭、喉頭、気管、肺（気管支を含む）、腎臓（両側）、膀胱、精巢（両側）、精巢上体（両側）、前立腺（腹葉）、精囊（両側）、凝固腺（両側）、卵巣

（両側）、子宮（頸部を含む）、膈、眼球（両側）、ハーダー腺（両側）、皮膚（腰背部）、乳腺（腹部）及び肉眼的異常部

14. 臓器重量

免疫学的検査用動物（各群8匹/性）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。

測定項目：脳、下垂体、胸腺、心臓、肝臓、腎臓（両側）、脾臓、副腎（両側）、精巢（両側）、卵巣（両側）及び消化管

15. 神経病理組織学的検査

対照群および高用量（80 mg/kg）群の神経病理学的検査用動物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学的検査を実施した。坐骨神経および脛骨神経は樹脂包埋後、厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を施して、その他の組織はパラフィン包埋後、薄切し、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。

神経病理組織学的検査の臓器および組織：前脳（大脳皮質、基底核、海馬、視床、視床下部を含む）、中脳、小脳、橋、延髄、眼球（網膜を含む、両側）、視神経（両側）、脊髄*の頸膨大および腰膨大、脊髄神経節（頸部および腰部）、脊髄神経の前根および後根（頸部および腰部）、近位の坐骨神経（坐骨切痕部、片側）、近位の脛骨神経（膝部、片側）、脛骨神経の腓腹筋分岐部（片側）及び腓腹筋（片側）

16. 病理組織学的検査

対照群および高用量（80 mg/kg）群の免

疫学的検査用動物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学的検査を実施した。標本はパラフィン包埋し、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。

病理組織学的検査の臓器および組織：前脳（大脳皮質、基底核、海馬、視床、視床下部を含む）、中脳、小脳、橋、延髄、眼球（網膜を含む、両側）、視神経（両側）、脊髄*の頸膨大および腰膨大、脊髄神経節（頸部および腰部）、脊髄神経の前根および後根（頸部および腰部）、近位の坐骨神経*（坐骨切痕部、片側）、近位の脛骨神経*（膝部、片側）、脛骨神経の腓腹筋分岐部（片側）及び腓腹筋（片側）

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。

活動性（詳細な症状観察）、自発運動量、握力、体重、体温、着地時開脚幅、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、臓器重量および摂餌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。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. 一般状態および死亡率（表 1-4）

いずれの投与群においても死亡例は認められなかった。

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも全例で腹部膨満が認められた。また、雌雄ともに頸部脱毛および流涎を示す個体が散見された。

8 mg/kg および 1 mg/kg 投与群では、雌雄とも一般状態に異常はなかった。

2. 詳細な症状観察（表 5、6）

詳細な症状観察の結果、スコアの変動が認められた項目を表 5 および 6 に示す。表にない項目は全ての動物でスコア 0 あるいは N（観察不能）であった。

80 mg/kg 投与群では、雄で投与 2 および 4 週、雌で投与 1 から 4 週の活動性が有意に減少した。さらに雌では、投与 3 および 4 週の探索行動と投与 4 週の瞳孔反射が有意に減少した。

8 mg/kg 投与群では、雄で投与 4 の活動性が有意に減少した。

1 mg/kg 投与群では、雌雄ともに有意な変化はなかった。

3. 機能検査（表 7、8）

投与 4 週時に行った機能検査では、80

mg/kg 投与群の雌で測定開始から 10 分間の自発運動量が有意に減少した。

80 mg/kg 投与群の雄、8 および 1 mg/kg 投与群の雌雄には有意な変化はなかった。

4. 体重変化 (表 9、10)

80 mg/kg 投与群では、雄の体重が投与 27 日の測定で、雌の体重が投与 7 日の測定で有意に低下した。その他の時点において有意な差はなかったが、投与期間を通して対照群と比較して低い値で推移した。

8 および 1 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。

5. 摂餌量 (表 11、12)

80 mg/kg 投与群では、雄で投与 1 から 4 週、雌で投与 1 から 3 週にかけて対照群に比べ有意に減少した。

8 および 1 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群との間に差はなかった。

6. 血液学的検査成績 (表 13、14)

80 mg/kg 投与群では、雌雄ともに平均赤血球容積 (MCV) および平均赤血球血色素量 (MCH) が有意に減少した。さらに雄においてはプロトロンビン時間 (PT) の延長が、雌においてはヘマトクリット値 (Ht)、血色素量 (Hb)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) が有意に減少し、軽微ながら貧血傾向がみられた。また、雌では網赤血球数 (Retics) も有意に増加した。白血球のディファレンシャルカウントでは、雌雄ともリンパ球が有意に増加した。

8 mg/kg 投与群では、有意な変化は認められなかった。

1 mg/kg 投与群では、偶発的な有意差であると思われる Ht 増加の他には、雌雄とも特

に異常は認められなかった。

7. 血液生化学的検査成績 (表 15、16)

80 mg/kg 投与群では、雌雄ともにリン (P) の増加がみられた。さらに雄ではグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、尿素窒素 (BUN)、アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio) および総ビリルビン (T.Bil) の増加が、雌では γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGTP) の増加、クレアチニン (Creat) の減少、アルブミンとグロブリンの減少に伴う総蛋白 (TP) の減少がみられた。

8 mg/kg 投与群では、偶発的な変化であると思われる総コレステロール (T.Chol) の増加が雌で認められた以外に有意な変化はなかった。

1 mg/kg 投与群では、偶発的な変化であると思われる GGTP の減少が雄で認められた以外に有意な変化はなかった。

8. 免疫学的検査成績 (表 17-20)

80 mg/kg 投与群では、雌雄ともに動物あたりの胸腺および脾臓細胞数が減少した。また雄では胸腺重量あたりの細胞数も減少していた。フローサイトメーターによるリンパ球サブセット解析では、雌雄ともに胸腺の CD4 および CD8 ダブルポジティブ細胞 (DP)、ヘルパー T 細胞、細胞障害性 T 細胞および脾臓のヘルパー T 細胞が減少した。さらに雄では胸腺のダブルネガティブ細胞 (DN)、脾臓の汎 T 細胞、細胞障害性 T 細胞およびナチュラルキラー細胞 (NK) が、雌では脾臓の汎 B 細胞が減少した。

8 mg/kg 投与群では、雄で動物あたりの胸

腺細胞数と胸腺の DP 細胞が有意に減少したが、その程度は極軽度であった。

1 mg/kg 投与群では、偶発的変化と思われる胸腺重量あたりの細胞数の減少が雄で認められた以外に有意な変化はなかった。

9. 臓器重量 (表 21、22)

80 mg/kg 投与群では、最終体重は雄で有意に減少していた。雌雄の胸腺および脾臓の絶対および相対重量がともに減少し、雌雄の消化管の絶対および相対重量がともに増加した。脳は雌雄ともに絶対重量が低下したが雄の相対重量は増加した。下垂体は雌雄の絶対重量および雌の相対重量の低下が、心臓は雌の相対重量の増加が、肝臓は雌の絶対重量および雌雄の相対重量の増加が、卵巣は絶対および相対重量ともに減少した。

8 mg/kg 投与群では、雄の脾臓の相対重量が減少した以外に有意な変化はなかった。

1 mg/kg 投与群では、偶発的な有意差であると思われる脾臓の絶対重量の低下が認められた以外に有意な変化はなかった。

10. 剖検所見 (表 23、24)

80 mg/kg 投与群では、雌雄ともに胃の膨満、小腸の腔拡張、大腸の腔拡張および膨満が示す個体が有意に増加した。

8 mg/kg 投与群では、雌 2 例で小腸および大腸の腔拡張が認められた。

1 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肉眼的異常は観察されなかった。

11. 病理組織学的検査成績 (表 25、26)

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも空・回腸粘膜上皮過形成および直腸粘膜杯細胞肥大

の発生頻度が有意に増加した。さらに雄でびまん性肝細胞肥大および腺胃粘膜上皮過形成が、雌で脾臓濾胞小型化、前胃粘膜角化亢進および十二指腸粘膜上皮過形成の発生頻度が有意に増加した。

8 mg/kg 投与群では、肉眼的異常部位の組織学的検査で腺胃粘膜上皮過形成および空・回腸粘膜上皮過形成がそれぞれ雌 1 例で認められた。

1 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病理組織学的異常は観察されなかった。

12. 神経病理組織学的検査成績 (表 27、28)

80 mg/kg 投与群では、橋および近位坐骨神経において軽度な軸索変性がそれぞれ雄 1 例に認められた。雌の神経組織には変化が認められなかった。0 mg/kg 投与群では、中等度の眼球網膜萎縮が雌 1 例で、軽度の脊髄頸膨大部の軸索変性が雄 1 例で、軽度の近位坐骨神経の軸索変性が雌 1 例で認められた。

80 mg/kg 投与群の神経組織において被験物質投与に関連付けられる異常は観察されなかったため、8 および 1 mg/kg 投与群の神経病理組織学的検査は実施しなかった。

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、昨年 (平成 16 年) 度はクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) ^{1, 4, 6)} を対象にして、成熟ラットの反復経口投与毒性試験 ²⁾ および反復経口神経・免疫毒性試験 ³⁾ を実施した。CCA は過去に使用量が多く、ヒト特に子供への健康影響が懸念されるため、平成 17 年度は CCA の代表的種類のひとつである CCA type

B¹⁾ (CrO₃ 35.3% + CuO 19.6% + As₂O₅ 45.1%) を 0, 1, 8 および 80 mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットに哺育 20 日あるいは 21 日齢にて離乳した直後から 4 週間に亘り毎日強制経口投与し、臨床症状観察、機能検査、血液・生化学検査、免疫学的検査、病理学的検査および神経病理組織学的検査を含む諸検査を実施した。

一般毒性：CCA 投与による影響として、貧血、リンパ球数の増加、肝臓に対する影響（重量増加、ALT および GGTP の増加、蛋白関連項目の減少）、腎臓に対する影響（尿素窒素および無機リンの増加）、消化管に対する影響（消化管の膨満、小腸の粘膜上皮過形成、直腸の杯細胞肥大）が観察された。これらの毒性影響は成熟ラットと同様のものであった。

成熟ラットの結果と比較して各検査項目の変動が小さい場合が多いこと、腎臓重量には影響がなく、肝臓では形態学的変化を認めなかったことなどから、幼若ラットでの CCA の毒性の程度は成熟ラットのものに比較して低い傾向があることが示された。CCA の構成成分であるヒ素は肝臓で代謝されて毒性を示す^{7,8)}が、幼若ラットでは肝臓の薬物代謝酵素が未熟である⁹⁾ことが毒性発現が弱かったことの要因のひとつとして考えられた。

神経毒性：80 mg/kg 群では、探索行動、立ち上がり姿勢および自発運動量が減少した。これらの変化は成熟ラットでみられたものと一致した。80 mg/kg 群の動物では消化管が高度に膨満し、その重量は対照群よりも 10 g 以上重かったことおよび投与期間終了時の絶食後の最終体重は雄で有意に減少していたことから、事実上、体重が減少してい

たと考えられる。さらに、血液・生化学検査においても貧血をはじめとする種々の変化が示唆された。その一方で、神経病理組織学的検査においては異常が認められなかった。これらのことから、80 mg/kg 群では、全身状態の悪化による非特異的な行動抑制が発現した可能性も考えられた。しかしながら、消化管の異常が認められなかった 8 mg/kg 群の雄でも探索行動が減少したことから、CCA の神経毒性を否定することはできなかった。

免疫毒性：80 mg/kg 群では胸腺および脾臓の重量の減少が観察され、雌雄の胸腺では成熟および幼若 T 細胞の減少がみられ、雄の脾臓では T 細胞が、雌では B 細胞およびヘルパー T 細胞の減少が観察された。形態学的には脾臓に PALS の小型化が認められた。これらの変化は、成熟ラットで認められたものとはほぼ一致しており、CCA の免疫系への影響を示すものであると考えられた。週齢によるリンパ球サブセットの変化の差として、成熟ラットでは異常が認められなかった 8 mg/kg 群で雄の胸腺の相対重量および DP 細胞の減少が見られたが、これはより機能の活発な幼若ラットの胸腺に対し、CCA が強く影響したものと考えられた。

E. 結論

幼若動物における CCA の反復経口投与により惹起された一般毒性、神経毒性および免疫毒性変化は、成熟動物で観察されたものとはほぼ一致していたが、腎臓および肝臓に対する影響は成獣と比べて弱かった。なお、本実験条件下では、CCA を幼若ラットに 4 週間反復経口投与した場合、8 mg/kg 以上の用量では神経系および免疫系に対し影響を及

ぼす可能性が示唆された。1 mg/kg/day では影響が認められないと結論された。

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) 原田孝則：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
- 3) 小坂忠司, 首藤康文：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、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
- 4) 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 (SPA), SPA Report #2001-12, pp.1-63, 2001
- 5) Avido 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.
- 6) 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.
- 7) Goyer RA and Clarkson TW: Toxic effects of metals. In: Casarett & Doull's Toxicology (Klassen CD, ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 811-867, 2001.
- 8) 平野靖史：有害化学物質に対する暴露指標と感受性要因に関する研究、国立環境研究所ニュース、21(6)、2000年
- 9) 岸玲子：生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する研究、厚生労働科学研究費補助金 生活安全総合研究事業、2000年

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の幼若ラットの神経・免疫系に対する影響：桑原真紀、小坂忠司、首藤康文、藤江秀彰、松本力、林宏一、福山朋季、高橋尚史、竹内幸子、中島信明、原田孝則、第22回毒性病理学会学術集会 (2006年、鹿児島)

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. Fate of male rats.

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Fate	Day	Neurotoxic tests		Immunotoxic tests	Pathology ^a
				Functional tests	Neuropathology		
0	401			○	○		
	402			○	○		
	403			○	○		
	404			○		○	○
	405			○		○	○
	406			○	○		
	407	tk	28	○	○		
	408			○		○	○
	409			○		○	○
	410			○		○	○
	481					○	○
	482					○	○
	483					○	○
1	411			○	○		
	412			○	○		
	413			○		○	○
	414			○		○	○
	415			○		○	○
	416			○	○		
	417	tk	28	○	○		
	418			○	○		
	419			○		○	○
	420			○		○	○
	484					○	○
485					○	○	
486					○	○	
8	421			○	○		
	422			○	○		
	423			○		○	○
	424			○		○	○
	425			○		○	○
	426			○	○		
	427	tk	28	○	○		
	428			○	○		
	429			○		○	○
	430			○		○	○
	487					○	○
488					○	○	
489					○	○	
80	431			○	○		
	432			○	○		
	433			○	○		
	434			○		○	○
	435			○		○	○
	436			○	○		
	437	tk	28	○	○		
	438			○		○	○
	439			○		○	○
	440			○		○	○
	490					○	○
491					○	○	
492					○	○	

○; Subjected

^a; Hematology, blood biochemistry and histopathology.

Table 2. Fate of female rats.

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Fate	Day	Neurotoxic tests		Immunotoxic tests	Pathology ^a
				Functional tests	Neuropathology		
0	441			○	○		
	442			○	○		
	443			○	○		
	444			○		○	○
	445			○		○	○
	446			○	○		
	447	tk	28	○	○		
	448			○		○	○
	449			○		○	○
	450			○		○	○
	493					○	○
	494					○	○
	495					○	○
	1	451			○	○	
452				○	○		
453				○		○	○
454				○		○	○
455				○		○	○
456				○	○		
457		tk	28	○	○		
458				○	○		
459				○		○	○
460				○		○	○
496						○	○
497						○	○
498						○	○
8		461			○	○	
	462			○	○		
	463			○		○	○
	464			○		○	○
	465			○		○	○
	466			○	○		
	467	tk	28	○	○		
	468			○	○		
	469			○		○	○
	470			○		○	○
	499					○	○
	500					○	○
	501					○	○
	80	471			○	○	
472				○	○		
473				○	○		
474				○		○	○
475				○		○	○
476				○	○		
477		tk	28	○	○		
478				○		○	○
479				○		○	○
480				○		○	○
502						○	○
503						○	○
504						○	○

○; Subjected

^a; Hematology, blood biochemistry and histopathology.

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

Clinical signs	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
	No. of animals examined	13	13	13	13
No abnormalities detected		13	13	13	0
Posture/Body position:					
Abdominal distention		0	0	0	13 **
Fur(thoracic region):					
Loss of fur		0	0	0	1
Mouth:					
Salivation		0	0	0	1

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

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

Clinical signs	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
	No. of animals examined	13	13	13	13
No abnormalities detected		13	13	13	0
Posture/Body position:					
Abdominal distention		0	0	0	13 **
Fur(thoracic region):					
Loss of fur		0	0	0	2
Mouth:					
Salivation		0	0	0	3

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