

Table 18 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	8	Mean	3.035	0.552	128.9	20.9
		S.D.	0.469	0.050	23.3	5.0
1	8	Mean	3.227	0.618	133.0	19.3
		S.D.	0.408	0.070	25.3	3.0
8	8	Mean	3.213	0.603	139.8	21.2
		S.D.	0.170	0.063	22.3	3.4
80	8	Mean	2.971	0.584	79.9 **	14.8 **
		S.D.	0.330	0.070	22.7	3.7

^a: Number of lymphocytes/mg organ weight.

S.D.: Standard deviation.

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

Table 19 - 1 Flow cytometric analysis - Summary data in male rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of thymic lymphocyte(/rat)					
		Immature cells			Mature cells		
		DN cell (CD4-8-)	DP cell (CD4+8+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-8+)		
0	8	Mean	2.4	146.9	12.5	3.3	
		S.D.	1.0	17.8	2.5	0.6	
1	8	Mean	2.2	127.9	12.1	3.1	
		S.D.	0.5	22.3	2.2	0.6	
8	8	Mean	2.2	122.6 *	9.8	2.5	
		S.D.	0.6	21.3	2.7	1.0	
80	8	Mean	1.3 **	61.4 **	5.7 **	1.6 **	
		S.D.	0.4	13.0	1.7	0.4	

S.D.: Standard deviation.

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

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

Table 19 - 2 Flow cytometric analysis - Summary data in male rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of splenic lymphocyte(rat)					
		Pan-Tcell (CD3+)	Pan-Bcell (CD45RA+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-8+)	NK cell (NKR P1A+)	
0	8	2.6	5.4	4.9	2.4	0.7	
	Mean S.D.	0.8	1.1	1.3	0.6	0.2	
1	8	3.1	6.7	5.7	2.7	0.8	
	Mean S.D.	0.5	1.1	0.6	0.5	0.1	
8	8	2.7	5.9	4.8	2.6	0.8	
	Mean S.D.	0.9	1.4	1.3	0.7	0.3	
80	8	1.2 **	4.5	2.5 **	1.4 **	0.4 **	
	Mean S.D.	0.4	1.2	0.8	0.5	0.1	

S.D.: Standard deviation.

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

Table 20 - 1 Flow cytometric analysis - Summary data in female rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of thymic lymphocyte(/rat)					
		Immature cells			Mature cells		
		DN cell (CD4-8-)	DP cell (CD4+8+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-8+)		
0	8	Mean	1.1	72.9	5.3	2.3	
		S.D.	0.7	16.4	1.5	0.4	
1	8	Mean	1.0	79.3	5.1	2.0	
		S.D.	0.5	14.2	1.2	0.5	
8	8	Mean	1.0	83.1	5.8	2.3	
		S.D.	0.2	12.7	1.9	0.9	
80	8	Mean	0.7	41.7 **	3.2 *	1.4 *	
		S.D.	0.3	11.9	1.4	0.5	

S.D.: Standard deviation.

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

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

Table 20 - 2 Flow cytometric analysis - Summary data in female rats

Dose (mg/kg/day)	Number of animals examined	Number of splenic lymphocyte/(rat)						
		Pan-Tcell (CD3+)	Pan-Bcell (CD45RA+)	Helper-Tcell (CD4+8-)	Cytotoxic-Tcell (CD4-8+)	NK cell (NKR P1A+)		
0	8	Mean	6.9	7.8	2.4	1.1	3.5	
		S.D.	2.0	1.6	0.6	0.3	1.1	
1	8	Mean	6.3	6.9	2.1	1.0	3.8	
		S.D.	1.3	1.7	0.5	0.2	0.9	
8	8	Mean	7.2	7.2	2.6	1.3	3.5	
		S.D.	2.4	1.5	0.6	0.4	0.8	
80	8	Mean	5.1	4.8 **	1.5 **	0.8	3.1	
		S.D.	1.7	2.1	0.5	0.3	0.9	

S.D.: Standard deviation.

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

Table 21 - 1 Organ weight - Group mean values in male rats following 28-day oral administration; CCA

Dose (mg/kg/day)	Absolute weight at terminal kill												
	Body weight (g)	Brain (mg)	Pituitary gland (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (g)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenals (mg)	Testes (mg)	gastrointestinal tract (g)		
0	Mean	1767	7.2	631	713	6.04	1575	504	53.8	2435	16.8		
	S.D.	90	1.1	50	69	0.71	171	81	8.3	314	0.6		
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
1	Mean	1836	7.8	628	798	6.81	1773	559	62.4	2583	17.8		
	S.D.	49	1.0	85	90	0.84	259	51	12.2	174	2.2		
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
8	Mean	1773	7.2	548	747	6.32	1664	510	58.6	2384	17.4		
	S.D.	74	0.9	84	53	0.76	233	86	6.3	263	1.7		
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
80	Mean	1598 **	5.4 **	333 **	623 **	6.56	1405	319 **	47.5 **	2146	26.1 **		
	S.D.	88	1.1	54	85	1.11	201	70	9.9	234	3.5		
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

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

Table 21 - 2 Organ weight - Group mean values in male rats following 28-day oral administration; CCA

Relative weight to body weight(%) at terminal kill

Dose (mg/kg/day)	Pituitary										gastrointestinal tract
	Brain	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenals	Testes			
0	Mean	0.938	0.336	0.377	3.19	0.832	0.266	0.0284	1.28	8.91	
	S.D.	0.055	0.043	0.013	0.15	0.038	0.026	0.0026	0.06	0.75	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1	Mean	0.911	0.310	0.395	3.35	0.871	0.276	0.0306	1.28	8.76	
	S.D.	0.081	0.034	0.037	0.14	0.071	0.017	0.0040	0.07	0.64	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
8	Mean	0.925	0.286 *	0.389	3.28	0.862	0.264	0.0305	1.24	9.07	
	S.D.	0.050	0.043	0.019	0.25	0.063	0.036	0.0024	0.12	0.42	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
80	Mean	1.035 *	0.214 **	0.400	4.19 **	0.900	0.204 **	0.0305	1.38	16.80 **	
	S.D.	0.110	0.029	0.027	0.29	0.0490	0.0310	0.0054	0.08	1.98	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

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

Table 22 - 1 Organ weight - Group mean values in female rats following 28-day oral administration; CCA

Absolute weight at terminal kill

Dose (mg/kg/day)	Pituitary											gastrointestinal	
	Body weight (g)	Brain (mg)	Pituitary gland (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (g)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenals (mg)	Ovaries (mg)	tract	(g)	
0	Mean	136	1674	8.5	424	535	4.62	1221	376	61.4	69.4	14.2	
	S.D.	15	68	1.2	42	56	0.77	140	64	8.1	12.5	1.5	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
1	Mean	126	1606	7.9	409	504	4.20	1119	313 *	60.1	71.6	13.7	
	S.D.	12	43	1.3	41	51	0.42	116	41	5.7	14.1	0.5	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
8	Mean	135	1635	8.5	434	519	4.61	1224	350	60.5	73.0	14.4	
	S.D.	6	20	0.9	58	24	0.43	80	31	6.7	10.6	0.7	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
80	Mean	125	1498 **	5.8 **	265 **	541	5.53 **	1174 **	251 **	58.0 **	46.0 **	24.1 **	
	S.D.	4	37	0.7	57	32	0.36	96	46	6.9	15.5	3.9	
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

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

Table 22 - 2 Organ weight - Group mean values in female rats following 28-day oral administration; CCA

Relative weight to body weight(%) at terminal kill

Dose (mg/kg/day)	Pituitary										gastrointestinal tract
	Brain	Pituitary gland	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenals	Ovaries		
0	Mean	1.242	0.00622	0.316	0.395	3.39	0.900	0.276	0.0453	0.0509	10.46
	S.D.	0.104	0.00031	0.046	0.029	0.25	0.052	0.021	0.0048	0.0052	0.53
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1	Mean	1.285	0.00623	0.327	0.401	3.34	0.890	0.249	0.0479	0.0571	10.99
	S.D.	0.094	0.00079	0.029	0.021	0.12	0.026	0.024	0.0040	0.0103	1.00
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
8	Mean	1.214	0.00629	0.322	0.385	3.42	0.908	0.260	0.0448	0.0542	10.71
	S.D.	0.051	0.00053	0.038	0.014	0.26	0.050	0.027	0.0041	0.0081	0.52
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
80	Mean	1.200	0.00466 **	0.212 **	0.433 **	4.42 **	0.939	0.201 **	0.0464	0.0368 *	19.33 **
	S.D.	0.052	0.00053	0.043	0.022	0.25	0.0660	0.0360	0.0054	0.0123	3.29
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

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

Table 23 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
		No. of animals examined	13	13	13
Skin:	[N=]	13	13	13	13
Hair loss		0	0	0	1
Liver:	[N=]	13	13	13	13
Spot(s)		0	0	0	1
Stomach:	[N=]	13	13	13	13
Distention		0	0	0	4 *
Small intestine:	[N=]	13	13	13	13
Luminal dilatation		0	0	0	13 **
Large intestine:	[N=]	13	13	13	13
Luminal dilatation		0	0	0	11 **
Distention		0	0	0	12 **
Kidney:	[N=]	13	13	13	13
Pelvic dilatation		1	1	0	1
Testis:	[N=]	13	13	13	13
Small in size		0	0	1	0

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

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

Table 24 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
	No. of animals examined	13	13	13	13
Skin:	[N=]	13	13	13	13
Hair loss		0	0	0	2
Liver:	[N=]	13	13	13	13
Enlargement		0	0	0	1
Hepatodaiaphragmatic nodule		1	0	0	0
Stomach:	[N=]	13	13	13	13
Distention		0	0	0	8 **
Small intestine:	[N=]	13	13	13	13
Luminal dilatation		0	0	2	13 **
Large intestine:	[N=]	13	13	13	13
Luminal dilatation		0	0	0	7 **
Distention		0	0	2	11 **

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

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

Table 25 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male mice
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
	No. of animals examined	8	8	8	8
Spleen:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Small in size, follicle		0	-	-	4 *
Liver :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hypertrophy, hepatocellular, duffuse		0	-	-	6 **
Necrosis, hepatocyte, focal		0	-	-	2
Hyperplasia, bile duct		0	-	-	1
Forestomach:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hyperkeratosis		0	-	-	4 *
Duodenum:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	8 **
Jejunum:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	8 **
Illeum:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	-	5 *
Rectum:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hypertrophy, goblet cell		0	-	-	8 **
Kidney:	[N=]	8	1 a	0 a	8
Cyst, cortical		0	-	-	1
Dilatation, pelvis		1	1	-	1
Testis :	[N=]	0 a	0 a	1 a	0 a
Atrophy, seminiferous tubule		-	-	1	-
Bone marrow(sternum) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Bone marrow(femur) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Thymus:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Lymph node(cervical) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Lung:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Glandular stomach:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Cecum:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Colon:	[N=]	8	0 a	0 a	8

[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: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 26 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female mice
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
	No. of animals examined	8	8	8	8
Liver :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hepatodiaphragmatic nodule		1	-	-	0
Forestomach:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hyperkeratosis		0	-	-	3
Edema, submucousa		0	-	-	1
Glandular stomach:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Edema, submucousa		2	-	-	0
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	1	8 **
Jejunum:	[N=]	8	0 a	2 a	8
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	1	8 **
Illeum:	[N=]	8	0 a	2 a	8
Hyperplasia, mucosal epithelial cell		0	-	1	6 **
Rectum:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Hypertrophy, goblet cell		0	-	-	7 **
Kidney :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Dilatation, pelvis		1	-	-	0
Skin(others) :	[N=]	0 a	0 a	0 a	1 a
Bone marrow(sternum) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Bone marrow(femur) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Spleen:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Thymus:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Lymph node(cervical) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	8	0 a	0 a	8
Lung:	[N=]	8	0 a	0 a	8
Cecum:	[N=]	8	0 a	2 a	8
Colon:	[N=]	8	0 a	0 a	8

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

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

Tissue(other sites): Tissues sampled from region(s) not designated in the protocol.

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

Table 27

Neuropathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
	No. of animals examined	5	5	5	5
Pons:	[N=]	5	0	0	5
Axonal degeneration, trapezoid body	+	0	-	-	1
	Total	0	-	-	1
		(0.0)	(-)	(-)	(0.2)
Spinal cord (cervical swelling):	[N=]	5	0	0	5
Axonal degeneration	+	1	-	-	0
	Total	1	-	-	0
		(0.2)	(-)	(-)	(0)
Sciatic nerve (proximal):	[N=]	5	0	0	5
Axonal degeneration	+	0	-	-	1
	Total	0	-	-	1
		(0)	(-)	(-)	(0.2)
Forebrain:	[N=]	5	0	0	5
Midbrain:	[N=]	5	0	0	5
Cerebellum:	[N=]	5	0	0	5
Medulla oblongata:	[N=]	5	0	0	5
Eye:	[N=]	5	0	0	5
Optic nerve:	[N=]	5	0	0	5
Spinal cord (lumbar swelling):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root ganglion (cervical):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root ganglion (lumbar):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root fiber (cervical):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root fiber (lumbar):	[N=]	5	0	0	5
Ventral root fiber (cervical):	[N=]	5	0	0	5
Ventral root fiber (lumbar):	[N=]	5	0	0	5
Tibial nerve (proximal):	[N=]	5	0	0	5
Tibial nerve (calf muscle branch):	[N=]	5	0	0	5
Calf muscle:	[N=]	5	0	0	5
No. of animals with lesions		1	-	-	2

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

Grade: +(1), minimal; ++(2), slight; +++(3), moderate; ++++(4), severe.

Number in parenthesis shows average grade.

Table 28

Neuropathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	1	8	80
	No. of animals examined	5	5	5	5
Eye:	[N=]	5	0	0	5
Atrophy, retina	++	1	-	-	0
	Total	1	-	-	0
		(0.4)	(-)	(-)	(0)
Sciatic nerve (proximal):	[N=]	5	0	0	5
Axonal degeneration	+	1	-	-	0
	Total	1	-	-	0
		(0.2)	(-)	(-)	(0)
Forebrain:	[N=]	5	0	0	5
Midbrain:	[N=]	5	0	0	5
Cerebellum:	[N=]	5	0	0	5
Pons:	[N=]	5	0	0	5
Medulla oblongata:	[N=]	5	0	0	5
Optic nerve:	[N=]	5	0	0	5
Spinal cord (cervical swelling):	[N=]	5	0	0	5
Spinal cord (lumbar swelling):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root ganglion (cervical):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root ganglion (lumbar):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root fiber (cervical):	[N=]	5	0	0	5
Dorsal root fiber (lumbar):	[N=]	5	0	0	5
Ventral root fiber (cervical):	[N=]	5	0	0	5
Ventral root fiber (lumbar):	[N=]	5	0	0	5
Tibial nerve (proximal):	[N=]	5	0	0	5
Tibial nerve (calf muscle branch):	[N=]	5	0	0	5
Calf muscle:	[N=]	5	0	0	5
No. of animals with lesions		2	-	-	0

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

Grade: +(1), minimal; ++(2), slight; +++(3), moderate; ++++(4), severe.

Number in parenthesis shows average grade.

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

5. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の SKH-1 ヘアレスマウスにおける
中期皮膚発がん性試験

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	毒性部病理研究室研究員
	中島 信明	(財)残留農薬研究所	毒性部病理研究室長
	千葉 裕子	(財)残留農薬研究所	毒性部病理研究室技術担当室長
	小嶋小百合	(財)残留農薬研究所	毒性部病理研究室研究員
	武田眞記夫	(財)残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室長
	大塚 亮一	(財)残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室研究員
	川勝 尚夫	(財)残留農薬研究所	毒性部動物管理室長
	石塚 勝美	(財)残留農薬研究所	毒性部動物管理室

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の催腫瘍性を確認するため、SKH-1 ヘアレスマウスを用い、雌性動物の皮膚に紫外線（UVB）を照射するとともに、CCA を 0、1、10 および 90 ppm の用量で 28 週間混餌経口投与し、UVB 照射誘発皮膚発がんに対する CCA 投与の影響の有無について検索した。その結果、CCA 投与群では、用量依存性に皮膚腫瘍の発生（数および大きさともに）が増加し、病理組織学的にも悪性度の高い低・中分化型扁平上皮癌が観察された。皮膚の酸化ストレスの測定では、CCA 投与群において用量相関性に 8-OHdG 量（DNA の酸化ストレスマーカー）の増加が認められた。以上の結果から、CCA は UVB 誘発皮膚発がんを促進し、そのプロモーション効果には酸化的 DNA 傷害が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒ素はヒトにおいて皮膚に発がん性が認められている。また、ヘアレスマウスでは、ヒ素あるいはクロムを飲水投与すると中波長紫外線（UVB）による皮膚発がんが増強されることが報告されている^{1,2)}。そこで本研究では、ヘアレスマウスに UVB を

照射するとともにクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）を 28 週間にわたって混餌投与し、UVB による皮膚発がんに対する CCA の増強作用の有無について検索した。

B. 研究方法

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)³⁾ 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_3 、純度 98%) 35.3%、酸化銅 (CuO 、純度 99.3%) 19.6% および酸化ヒ素 (As_2O_5 、純度 91.9%) 45.1% であった。これらの被験物質の入手先は、クロムおよび銅は関東化学株式会社 (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

Charles River Laboratories (MA, U.S.A.) で生産された雌性の SKH-1 ヘアレスマウス (CrI: SKH1-hrBR) を用いた。SKH-1 ヘアレスマウスは紫外線を長期暴露することによって高率に皮膚がんを作出することができ、皮膚発がん性の検索によく用いられているマウス系統である。供試動物は 8 週齢にて購入し、5 日間試験環境に馴化した後、9 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 $24 \pm 3^\circ\text{C}$ 、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、体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に 23 匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後は耳ピアスを装着し、ピアスの色と

番号で個体を識別した。基礎飼料には保証飼料ガンマ線照射 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および紫外線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

当該試験に先立って、各群 4 ないし 5 匹の雌性 SKH-1 ヘアレスマウスを用い、14 日間反復強制経口投与毒性試験を実施した。試験群としては無処置の対照群と UVB 照射群を設定し、UVB 照射群には UVB 照射とともに CCA を 0、10、30、100 mg/kg の用量で投与した。その結果、投与 7 日以内に UVB+CCA 0 および 30 mg/kg 群で各 1 例の、UVB+CCA 100 mg/kg 群では 2 例の死亡が認められた。UVB+CCA 100 mg/kg 群で死亡した 2 例では摂餌量の減少も観察され、被験物質投与の影響が疑われたため、8 日目からは最高用量 100 mg/kg を 60 mg/kg に変更した。14 日間投与終了時、UVB+CCA 100/60 mg/kg 群では、ヘマトクリット値、血色素量および赤血球数の減少が観察された。また、剖検時に胃および盲腸の膨満と小腸の腔拡張が全例に認められ、消化管の絶対、相対重量の増加が観察された。消化管重量は UVB+CCA 30 mg/kg 群でも増加傾向を示した。以上の結果に基づいて、当該試験では UVB 照射群における CCA の最高用量を被験物質投与に

よる死亡が観察されないと考えられる 90 ppm (10 mg/kg に相当) とし、以下、公比を約 10 として 10 および 1 ppm 群を設定した。また UVB 非照射群として、無処置対照群および CCA 90 ppm 群も設けた。設定した試験群 (0, 90, UVB+0, UVB+1, UVB+10 および UVB+90 ppm) は 6 用量群であり、1 群につき 23 匹の雌性動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

当該試験で用いる被験物質混合飼料の調製は、投与開始前に 1 回、試験期間中は 4 週に 1 回の頻度で行なった。飼料調製時、90 および 10 ppm については、酸化クロム、酸化銅および酸化ヒ素の必要量を少量の基礎飼料と乳鉢内で予備混合し、プレミックスを作製した。次に、このプレミックスを残りの基礎飼料に加え、調製飼料中で各構成成分が均一となるように攪拌機 HP-60 (関東混合機工業株式会社、東京都) で攪拌した。なお、調製に必要な各構成成分量の算出に当たっては、成分ごとに純度による補正を実施した。1 ppm については、10 ppm 調製飼料を 10 倍希釈する方法で調製した。また、無処置対照群および UVB+CCA 0 ppm 群に対しては基礎飼料をそのまま与えた。調製飼料は、低温 (約 4°C) 遮光条件下で 5 週間密閉保管後、動物室環境下で開封 14 日間以内に使用した。

5. UVB 照射

被験物質投与開始 2 週間後から、UVB 照射群 (4 用量群) の全ての動物に週 3 回 (月、水、金)、 1.0 kJ/m^2 ($0.33 \text{ kJ/m}^2/\text{min}$ 、3 分)

の強さで UVB を照射した。

6. 動物の観察

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 回一般状態を観察した。また、皮膚に注目した詳細な観察を少なくとも毎週 1 回実施し、皮膚腫瘍が観察された場合には、その位置、数および大きさについて記録した。

7. 体重

全生存動物について、投与開始時、投与 1 週から 13 週までは毎週 1 回および投与 16 週から投与終了時 (28 週時) までは 4 週に 1 回の頻度で体重を測定した。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. 摂餌量および被験物質摂取量

全ケージについて、投与 1 週から 13 週までは毎週 1 回、投与 16 週から 28 週までは 4 週に 1 回の頻度で、連続 3 日分または 4 日分のケージ別摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中にそれぞれのケージ内で生存した動物の延べ数で除し、ケージ毎に 1 日 1 匹あたりの摂餌量 (ケージ別平均摂餌量) を算出した。これらのケージ別摂餌量から各週の群平均摂餌量 (g/mouse/day) を求めた。また投与期間中の各週の平均被験物質摂取量 (mg/kg/day) を、以下の式を用いて算出した。

各週の群平均被験物質摂取量 = 各週の群平均摂餌量 × 設定濃度 ÷ 各週の群平均体重

9. 血液学的検査

28週間投与終了後に、各群 10匹ずつを対象として血液学的検査を実施した。動物をエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈よりヘパリン処理した注射筒を用いて採血を行なった。

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)

10. 血液生化学的検査

28週間投与終了後に、各群 10匹ずつを対象として、前項の血液学的検査で述べたヘパリン処理後の各採取血液より得られた血漿を用い、以下の項目を JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社、東京都) 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 (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、 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)、

11. 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。28週間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、放血により安楽死させた後に剖検した。

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、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。皮膚については、冷 PBS になじませた後、ろ紙に貼り付け固定した。

採取した臓器および組織: 脳 (大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄 (頸部、胸部および腰部)、坐骨神経 (片側)、下垂体、胸腺、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 (胸骨および片側大腿骨)、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)、胆のう、膵臓、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、卵巣 (両側)、子宮 (頸部を含む)、膺、眼球 (両側)、ハーダー腺 (両側)、下腿三頭筋 (片側)、皮膚 (背側および腹側)、肉眼的異常部位

12. 臓器重量

28週間投与終了後に、各群 10匹ずつを対象として、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、肝臓（胆のうを含む）、腎臓（両側）、脾臓、消化管（胃～直腸、膵臓および腸間膜リンパ節を含む）

13. 病理組織学的検査

各群 10 匹ずつについて、採取した以下に示す臓器・組織を対象に病理組織学的検査を実施した。

病理組織学的検査の臓器および組織：肝臓（胆のうを含む中葉）、脾臓（2カ所）、腎臓（両側）、肺（左葉および右後葉）、皮膚（腰背部および腹部）、

肉眼的異常部位に関しては全動物について病理組織学的検査を実施した。ただし皮膚の腫瘍、びらんについては、UVB+CCA 0 ppm 群および UVB+CCA 90 ppm 群の 10 匹ずつについてのみ検査を実施した。

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。

14. 肝臓および皮膚の酸化ストレス（活性酸素関連物質）の測定

28 週間投与終了後の各群 8 匹ずつを対象として、採取した肝臓および背側皮膚（皮膚腫瘍の存在しない部分）の凍結サンプルを用い、過酸化脂質および 8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OHdG）の測定を実施した。

過酸化脂質の測定では、凍結試料の一部からホモジネートを調製し、TBA 法により分光光度計（UV-2200、島津製作所）にて過酸化物の吸光度を測定し、過酸化脂質濃度を算出した。8-OHdG の測定では凍結試料の一部から DNA を抽出し、8-ヒドロ

キシデオキシグアノシン（8-OHdG）測定用 ELISA キット（日本油脂株式会社）を用い肝および皮膚組織中の 8-OHdG 濃度を測定した。

15. 有意差検定

各検査項目について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。

UVB 照射群については、UVB+CCA 0 ppm 群と他の群との間で有意差検定を実施した。

体重、摂餌量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、臓器重量、過酸化脂質量および 8-OHdG 量のデータについては、まず 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 の多重比較法を実施して UVB+CCA 0 ppm 群と他の各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 UVB+CCA 0 ppm 群と他の各群間における平均順位の有意差の有無を判定した。皮膚腫瘍の数および大きさのデータについては、ノンパラメトリック法による Dunnett 型の多重比較法を用いて、UVB+CCA 0 ppm 群と他の各群間における平均順位の有意差の有無を判定した。皮膚腫瘍の病理組織学的検査所見の発生頻度については、Mann-Whitney の *U* 検定を用いて、UVB+CCA 0 ppm 群と UVB+CCA