

Table 6-4 Urinalysis in female rats

Group	Dose (mg/kg)	Water for injection	CCA	CCA	CCA
		Grade	10	100	300
Occult blood	4w	0	3	6	
		1	1		
		2			
		3	1		
		4	2		
Urobilinogen	4w	0	5	2	
		1	1	4	
		2			
		3			
		4			

Numerals represent the number of animals.
 Not significantly different from Water for injection.

Hematology

RBC	($10^6/\text{mm}^3$)	Number of red blood cells
WBC	($10^3/\text{mm}^3$)	Number of white blood cells
Ht	(%)	Hematocrit value
Hb	(g/dL)	Hemoglobin concentration
Plat.	($10^5/\text{mm}^3$)	Number of blood platelets
MCV	(fL)	Mean corpuscular volume
MCH	(pg)	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	(g/dL)	Mean corpuscular hemoglobin concentration
Ret. (%)	(%)	Reticulocyte ratio
Hemogram		
Eosino.	($10^3/\text{mm}^3$)	Number of eosinophilic leukocytes
Eosino.	(%)	Eosinophilic leukocyte ratio
Baso.	($10^3/\text{mm}^3$)	Number of basophilic leukocytes
Baso.	(%)	Basophilic leukocyte ratio
Mono.	($10^3/\text{mm}^3$)	Number of monocytes
Mono.	(%)	Monocyte ratio
Lymph.	($10^3/\text{mm}^3$)	Number of lymphocytes
Lymph.	(%)	Lymphocyte ratio
Neutro.	($10^3/\text{mm}^3$)	Number of neutrophilic leukocytes
Neutro.	(%)	Neutrophilic leukocyte ratio
LUC	($10^3/\text{mm}^3$)	Number of large unstained cells
LUC	(%)	Large unstained cell ratio
Blood coagulation test		
PT	(Sec)	Prothrombin time
APTT	(Sec)	Activated partial thromboplastin time

Table 7 Hematology in female rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection	CCA	CCA	CCA
			6	10	100	300
				6	6	0
RBC	(10 ⁶ /mm ³)		8.235±0.272	7.933±0.217	7.928±0.412	
WBC	(10 ³ /mm ³)		5.825±1.290	7.527±2.615	10.450±2.768**	
Ht	(%)		46.77±1.34	44.68±1.16	42.37±2.46**	
Hb	(g/dL)		16.48±0.31	16.03±0.45	14.70±1.12**	
Plat.	(10 ³ /mm ³)		1034.7±40.6	1200.0±136.0	1532.8±176.4**	
MCV	(fL)		56.78±1.24	56.37±1.27	53.47±2.76*	
MCH	(Pg)		20.03±0.52	20.27±0.52	18.58±1.39	
MCHC	(g/dL)		35.25±0.44	35.92±0.44	34.72±0.95	
Ret.	(%)		1.67±0.27	2.08±0.17	4.18±0.96**	
Eosino.	(10 ³ /mm ³)		0.108±0.054	0.148±0.102	0.072±0.027	
Eosino.	(%)		1.83±0.77	2.05±1.38	0.75±0.33*	
Baso.	(10 ³ /mm ³)		0.008±0.004	0.015±0.008	0.022±0.012*	
Baso.	(%)		0.13±0.05	0.17±0.08	0.18±0.12	
Mono.	(10 ³ /mm ³)		0.087±0.028	0.112±0.047	0.132±0.055	
Mono.	(%)		1.55±0.51	1.57±0.72	1.30±0.46	
Lymph.	(10 ³ /mm ³)		4.340±1.034	5.810±2.143	8.220±2.246**	
Lymph.	(%)		74.50±6.31	76.87±5.43	78.80±5.10	
Neutro.	(10 ³ /mm ³)		1.227±0.390	1.385±0.552	1.905±0.759	
Neutro.	(%)		21.05±5.43	18.65±4.13	18.05±5.09	
LUC	(10 ³ /mm ³)		0.053±0.015	0.055±0.028	0.102±0.051	
LUC	(%)		0.97±0.23	0.72±0.13	0.93±0.34	
PT	(Sec)		7.88±0.32	7.87±0.26	8.05±0.40	
APTT	(Sec)		17.55±1.21	17.42±0.71	17.90±0.53	

Values are expressed as the mean ± S.D.
 * P<0.05, ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Blood Chemistry

ASAT	(IU/L)	Aspartate aminotransferase
ALAT	(IU/L)	Alanine aminotransferase
ALP	(IU/L)	Alkaline phosphatase
G-GTP	(IU/L)	Gamma - glutamyl transpeptidase
T.Bil.	(mg/dL)	Total bilirubin
T.Prot.	(g/dL)	Total protein
Albumin	(g/dL)	Albumin
A/G		Albumin / Globulin
T.Chol.	(mg/dL)	Total cholesterol
TGL	(mg/dL)	Triglyceride
Glucose	(mg/dL)	Glucose
BUN	(mg/dL)	Blood urea nitrogen
Creat.	(mg/dL)	Creatinine
IP	(mg/dL)	Inorganic phosphorus
Ca	(mEq/L)	Calcium
Na	(mEq/L)	Sodium
K	(mEq/L)	Potassium
Cl	(mEq/L)	Chloride
Globlin	(g/dL)	Globlin

Table 8 Blood chemistry in female rats

Group	Water for injection	CCA	CCA	CCA
Dose (mg/kg)	N	10	100	300
	6	6	6	0
ASAT (IU/L)	106.8±15.2	102.0±15.2	139.5±30.4*	
ALAT (IU/L)	24.3±2.9	24.0±4.2	21.2±1.9	
ALP (IU/L)	432.3±60.1	378.2±73.2	308.7±19.5**	
G-GTP (IU/L)	1.3±1.0	1.8±1.3	1.7±1.2	
T.Bil. (mg/dL)	0.052±0.012	0.040±0.013	0.017±0.023**	
T.Prot. (g/dL)	5.65±0.26	5.75±0.14	5.33±0.22*	
Albumin (g/dL)	4.38±0.13	4.33±0.18	3.80±0.23**	
A/G	3.58±0.783	3.130±0.549	2.527±0.435*	
T.Chol. (mg/dL)	50.5±13.5	48.7±10.0	62.0±6.4	
TGL (mg/dL)	9.0±2.8	9.3±2.9	14.2±4.2*	
Glucose (mg/dL)	122.9±13.0	139.2±6.8*	138.2±10.7*	
BUN (mg/dL)	17.0±3.11	18.70±3.31	20.10±3.21	
Creat. (mg/dL)	0.225±0.021	0.232±0.041	0.190±0.026	
IP (mg/dL)	8.668±0.944	8.555±0.760	8.823±0.574	
Ca (mg/dL)	9.48±0.13	9.55±0.16	9.35±0.23	
Na (mEq/L)	143.8±0.8	143.3±0.8	143.5±1.0	
K (mEq/L)	3.58±0.21	3.68±0.26	4.28±0.21**	
Cl (mEq/L)	109.2±1.5	108.3±0.8	109.2±0.8	
Globlin (g/dL)	1.27±0.24	1.42±0.22	1.53±0.21	

Values are expressed as the mean ± S.D.

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

Gross Autopsy Findings

Grade

- 0 : No abnormal changes
- 1 : Slight
- 2 : Moderate
- 3 : Marked
- P : Non-graded changes

Table 9-1 Gross autopsy findings in female rats

Findings	Group			Water for injection			CCA			CCA			CCA					
	Dose (mg/kg)	Grade		0	1	2	3	P	0	1	2	3	P	0	1	2	3	P
Kidney Dilatation, renal pelvis	5			1	6	0	5	0	5	0	5	0	5	1				
Lymph node (Lumbar) Enlargement	6			0	6	0	5	0	5	0	5	0	5	1				
Skeletal muscle(back) Black	6			0	6	0	3	0	3	0	3	0	3	3				
Application site(subcutaneous*tissue) Black	6			0	6	0	3	0	3	0	3	0	3	3				
Induration	6			0	6	0	3	0	3	0	3	0	3	3				
Application site(back skin) Erosion/ulcer	6			0	6	0	2	0	2	0	2	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													
Black focus									5				1
									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	Dose (mg/kg)	N	Water for injection	CCA		CCA	
				10	6	100	6
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)	13.42±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	
			6	6	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.

Table 11 - 1 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	10	100	300
	No. of animals examined	6	6	6	0
Application site(dorsal skin) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Erosion/ulcer		0	-	3	-
Inflammation, suppurative		0	-	6 **	-
Bone marrow(sternum) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Hematopoiesis, increased		0	-	5 **	-
Bone marrow(femur) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Hematopoiesis, increased		0	-	4 *	-
Spleen :	[N=]	6	0 a	6	NE
Deposition, brown pigment		0	-	5 **	-
Hematopoiesis, extramedullary, increased		0	-	6 **	-
Thymus :	[N=]	6	0 a	6	NE
Necrosis, lymphocyte, cortical		0	-	2	-
Lymph node(other sites) :	[N=]	0 a	0 a	1 a	NE
Hyperplasia, plasma cell		-	-	1	-
Muscle(other sites) :	[N=]	0 a	0 a	3 a	NE
Inflammation, suppurative		-	-	3	-
Kidney :	[N=]	6	0 a	6	NE
Luminal dilatation, proximal tubule, pars recta		0	-	2	-
Dilatation, pelvis		1	-	1	-
Thyroid :	[N=]	6	0 a	6	NE
Ultimobranchial remnant		1	-	3	-
Skin(abdominal) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Mammary gland :	[N=]	6	0 a	6	NE
Lymph node(cervical) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Bone(sternum) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Bone(femur) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Muscle(m. quadriceps femoris) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Trachea :	[N=]	6	0 a	6	NE
Lung :	[N=]	6	0 a	6	NE
Heart :	[N=]	6	0 a	6	NE
Artery(aorta) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Tongue :	[N=]	6	0 a	6	NE
Sublingual gland :	[N=]	6	0 a	6	NE
Submandibular gland :	[N=]	6	0 a	6	NE
Esophagus :	[N=]	6	0 a	6	NE
Forestomach :	[N=]	6	0 a	6	NE
Glandular stomach :	[N=]	6	0 a	6	NE
Duodenum :	[N=]	6	0 a	6	NE
Jejunum :	[N=]	6	0 a	6	NE
Ileum :	[N=]	6	0 a	6	NE
Cecum :	[N=]	6	0 a	6	NE
Colon :	[N=]	6	0 a	6	NE
Rectum :	[N=]	6	0 a	6	NE
Liver :	[N=]	6	0 a	6	NE

<Continued on next page>

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

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

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

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

NE: Not examined.

Table 11 - 2 Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 4 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	10	100	300
	No. of animals examined	6	6	6	0
<Continued from previous page>					
Pancreas :	[N=]	6	0 a	6	NE
Urinary bladder :	[N=]	6	0 a	6	NE
Ovary :	[N=]	6	0 a	6	NE
Uterus :	[N=]	6	0 a	6	NE
Vagina :	[N=]	6	0 a	6	NE
Pituitary :	[N=]	6	0 a	6	NE
Parathyroid :	[N=]	6	0 a	6	NE
Adrenal :	[N=]	6	0 a	6	NE
Cerebrum :	[N=]	6	0 a	6	NE
Cerebellum :	[N=]	6	0 a	6	NE
Pons :	[N=]	6	0 a	6	NE
Medulla oblongata :	[N=]	6	0 a	6	NE
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Nerve(sciatic) :	[N=]	6	0 a	6	NE
Eye :	[N=]	6	0 a	6	NE
Lacrimal gland :	[N=]	6	0 a	6	NE
Harderian gland :	[N=]	6	0 a	6	NE

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

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

NE: Not examined.

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 18 年度分担研究報告書

15. 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（追加試験）

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
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）の反復経皮曝露における無毒性量を求めるため、雌雄の SD 系ラットを用い、各群 6 匹の動物の背部皮膚に CCA を 0、1 及び 10 mg/kg の用量で毎日 6 時間適用し、4 週間に亘り反復経皮投与した。10 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 5 日以降に適用部位に痂皮形成がみられ、投与終了時の剖検では出血も観察された。病理組織学的検査では、適用部皮膚のびらん/潰瘍が観察された。1 mg/kg 投与群では、CCA 投与に関連けられる異常は認められなかった。これらの結果から、本実験条件下における経皮曝露では、CCA の無毒性量（NOAEL）は雌雄とも 1mg/kg と判定された。

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、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）¹⁻⁴⁾を対象にラットを用い 4 週間の反復経皮投与毒性試験の追加試験を実施した。平成 17 年度は、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した。本研究の目的は、CCA の反復経皮曝露でのリスク評価に必要な基礎的毒性情報を収集することにあるが、本追加試験で

は無毒性量を求め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) ¹⁾ 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 (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) の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに 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摂餌量測定を実施した。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、雌雄別々に体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に雌雄 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、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

平成 17 年度に実施した 4 週間反復経皮投与毒性試験結果を考慮して、10mg/kg を高用量とし、無毒性量としての予想で 1 mg/kg を低用量として設定した。これらの設定用量群 (0、1、10 mg/kg) の各用量群に雌雄とも 6 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、1、10 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、0.33 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。各濃度の投与液は冷蔵・遮光 (5°C) 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(ニチバンメディカル株式会社)にて固定し、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。投与期間は28日間とした。

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に最終体重を測定した。

8. 摂餌量

全動物について、毎週1日個別に摂餌量を測定して、一日あたりの摂餌量を算出した。

9. 眼科学的検査

馴化期間中に1回雌雄の全馴化動物、投与終了時(4週時)に対照群と高用量群(100 mg/kg 投与群)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

投与終了時(4週時)に各群の全生存動物について尿検査を実施した。検査動物を強制採取法により採尿した後、尿の色調を肉眼的に検査し、pH、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、尿潜血及びウロビリノーゲンの項目について自動尿分析器(Clinitek 200+, Miles Labs., Inc.)にて測定した。

11. 血液学的検査

投与終了時(4週時)に各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晚絶食させた。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(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

血液学的検査のための採血後、腹大動脈から採血し、遠心分離して得られた血清を用い、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)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンキナーゼ (CPK.)、総ビリルビン (T.Bil.)、総蛋白 (T.Prot.)、アルブミン (Albumin)、総コレステロール (T.Chol.)、トリグリセライド (TGL)、糖 (Glucose)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Creat.) 無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K) 及び塩素 (Cl)

また、蛋白分画 (アルブミン比率、 $\alpha 1$ -、 $\alpha 2$ -、 β -、 γ -グロブリン比率) については自動電気泳動分析装置 (AES320、オリンパス光学株式会社) にて測定した。

13. 剖検および組織採取

全動物について剖検を実施した。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。

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・グルタルアルデヒド混合液で、精巣はブアン液で固定した。

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、精巣 (両側)、精巣上体 (両側)、前立腺、精囊 (両側)、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

全動物について、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)、精巣 (両側)、精巣上体 (両側)、前立腺、精囊 (両側)、卵巣 (両側)、子宮

15. 病理組織学的検査

供試動物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を作製した。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。鏡検は対照群と高用量群 (10 mg/kg 投与群) から採取した下記の臓器・組織について行った。

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、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、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺、精嚢(左側)、卵巣(両側)、子宮、陰、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. 肝機能検査のための組織採取

供試動物全例から肝臓の左葉を採取し、超低温フリーザー(-70℃以下)で保管し、将来の検索に備えた。

19. 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 の等分散検定を行なったその後、等分散の場合には、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、Dunnett 型の多重比較法(Miller 法)を用いて有意差の有無を判定した。尿検査の評価段階付きのデータについては Wilcoxon 順位和検定、尿の色については Fisher 直接確率検定を対照群と

被験物質各群との間で実施した。また、病理組織学的検査成績についても Fisher 直接確立検定法を用い解析した。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)

10 mg/kg 投与群では、投与5日から適用部皮膚に痂皮形成が認められ、投与2週時以降は雌雄の全例に観察された。

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも特に異常な症状はみられなかった。

2. 体重変化(図1、表2)

1 及び 10 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と比べ投与期間中の体重変化に差はなかった。

3. 摂餌量(図2、表3)

1 及び 10 mg/kg 投与群の雌雄では摂餌量に有意な変化はなかった。

4. 眼科学的検査成績(表4)

1 及び 10 mg/kg 投与群では、雌雄とも異常は認められなかった。

5. 尿検査成績(表5)

1 及び 10 mg/kg 投与群の雌雄では有意な変化はなかった。

6. 血液学的検査成績(表6)

10 mg/kg 投与群では、雌において網赤血

球数及び単球の増加ならびにプロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の短縮が認められた。一方、雄では異常はなかった。

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも種々の検査項目に統計学的有意差を伴う変動がみられたが、いずれも用量相関性あるいは対応所見に欠けることから、被験物質投与に関連付けられる変化ではないと判断した。

7. 血液生化学的検査成績 (表 7)

10 mg/kg 投与群では、雄において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)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンホスフォキナーゼ (CPK) 及びアルブミン (Albumin) の減少ならびに γ -グロブリン比率の増加がみられた。一方、雌では β -グロブリン比率の増加が認められた。

1 mg/kg 投与群では、雄において ALP の減少ならびに総ビリルビン (T.Bil) がみられた。雌では有意な変化はなかった。

8. 剖検所見 (表 8)

10 mg/kg 投与群では、適用部位の痂皮形成と出血が雄では 6 例中 1 例と 4 例に、雌では 6 例中 3 例と全例にそれぞれ認められた。

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも肉眼的異常は観察されなかった。

9. 臓器重量 (表 9)

1 及び 10 mg/kg 投与群において、雌雄とも有意な臓器重量変動は認められなかった。

10. 病理組織学的検査成績 (表 10)

10 mg/kg 投与群において、適用部位のびらん・潰瘍が雄の 6 例中 3 例と雌の 6 例全例に認められた。また、適用部位皮膚の表皮過形成が雄の 1 例に観察された。

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも肉眼的異常所見が認められなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

D. 考察

平成 18 年度では、平成 17 年度に引き続きクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) を対象にして、無作用量を求めることに主眼を置き、ラットを用いて 4 週間の反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では、CCA を 0、1 及び 10 mg/kg の用量で SD 系ラットの雌雄動物の背部皮膚に毎日 6 時間、4 週間に亘り反復投与し、臨床症状、死亡率、眼検査、尿検査、血液・生化学検査、病理検査を含む諸検査を実施した。

10 mg/kg 投与群では、投与 5 日から適用部位の皮膚に痂皮形成が認められ、投与 2 週時以降には雌雄の全例に観察された。4 週間投与終了後の剖検時には、ほぼ全例に適用部位から出血が認められ、組織学的にびらん・潰瘍が観察された。血液学的には、雌において網赤血球と単球の増加が認められ、上記の皮膚病変に対する生体反応と考えられた。また、アルブミンの減少とグロブリンの増加に関しても適用部位皮膚のびらん・潰瘍に起因する変化と推察した。これらの変化は、平成 17 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⁵⁷⁾に起因するものと考えられた。その他にも種々の検査項目に統計学的に有意な変化がみられたが、対応所見あるいは毒性学的意義に欠けることから偶発所見とみなし

た。

1mg/kg 投与群では、雌雄とも被験物質投与に関連付けられる異常はいずれの検査項目においても観察されなかった。

E. 結論

本実験条件下では、1 mg/kg は無毒性量 (NOAEL) と判定された。

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.

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