

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  $\mu$ m メッシュ) 上で揺りつぶし、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) にて洗浄して 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>6)</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無の有無を判定した。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 proliferation (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

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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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<sup>1)</sup>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：	$\text{CrO}_3$
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： 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<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
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 (OD<sub>660</sub>) を測定し、1×10<sup>9</sup> 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 (ロシユ・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 MgCl<sub>2</sub>、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）

NaN<sub>3</sub>： 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、NaN<sub>3</sub>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

プレインキュベーション法を用いた<sup>2, 3)</sup>。代謝活性化によらない場合は滅菌小試験管に 100 mM ナトリウムーリン酸緩衝液 (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°C 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°C で 20 分間振盪した。いずれも 45°C 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°C 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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>、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<sup>4)</sup>。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<sup>7) 8)</sup>。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<sup>9) 10)</sup>：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ると考えられている。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. Zanicchi (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

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

分担研究報告書

6. 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を作製し、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 Schmid<sup>1)</sup>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：  $\text{CrO}_3$   
 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：  $\text{CuO}$   
 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：  $\text{As}_2\text{O}_5$   
 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： キンダ化学株式会社  
 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 34.4 g および 34.2 g 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 力価マイトマイシン 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<sup>2)</sup>。

## 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<sup>3)</sup> (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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>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 ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) 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、Wild<sup>6)</sup> は、クロム酸カリウム ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , 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<sup>7)</sup>。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 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ,  $\text{AsCl}_3$ ,  $\text{NaAsO}_2$ ) や五価ヒ素 ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) 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)<sup>8)</sup>。また、Arsenic acid ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ , 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<sup>9)</sup>。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-staining method in the micronucleus test, Mutation Res., 64, 45~46
- 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-

guchi, (1994) Assessment of the human carcinogens arsenic acid and arsenic trichloride in the mouse micronucleus assay. MMS communications, 2, 117-121.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

分担研究報告書

7. 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

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	川勝 尚夫	（財）残留農薬研究所	毒性部動物管理室
	小嶋五百合	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	高橋 尚史	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	千葉 裕子	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	中島 信明	（財）残留農薬研究所	毒性部病理研究室
	武田真記夫	（財）残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の反復経口投与毒性を検索するため、CCA を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で雌雄の Wistar 系ラットに 8 週間に亘り毎日強制傾向投与した。その結果、高用量群において雌雄とも沈静化および流涎が認められ、雄 1 例が死亡した。加えて、雌では腹部・外陰部被毛の汚れも観察され、中間用量群においても同様な症状がみられた。臨床検査では、高用量群の雌雄および中間用量群の雌において貧血、白血球数の増加、プロトロンビン時間の短縮、低蛋白血症、高コレステロール血症、血漿電解質の変動等が認められ、高用量群の雄では尿素窒素および総ビリルビンが増加した。剖検所見では、中・高用量群の雌雄において十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が観察され、肝・腎臓重量の増加および胸腺重量の減少がみられた。また、雄では肺重量が増加し、雌では脳重量が減少した。なお、胸腺重量の減少は低用量の雌でも認められた。病理組織学的検査では、高用量群の雌雄において前胃粘膜角化亢進、小腸粘膜上皮過形成、腎尿細管褐色色素沈着が観察され、雌では肝細胞肥大も認められた。加えて、雌の肝臓では酸化ストレスの産物である 8-OHdG が増加した。以上の結果から、CCA をラットに反復経口投与した場合、血液、肝臓、腎臓および消化管に毒性を発現することが判明し、また、CCA は神経・免疫系に対しても影響を及ぼす可能性が示唆された。

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）<sup>1)</sup>をラットに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」及び平成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」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)を用いた。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)、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])の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに6週齢で購入し、9ないし10日間試験環境に馴化した後、7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 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、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、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10匹ずつ配分し、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

当該試験に先立ち、各群3ないし4匹ずつの雄性Wistar Hannover系SPFラットを用いて7日間(0、40および80 mg/kg)および14日間(0、100および150 mg/kg)の反復強制経口投与による予備試験を実施した。その結果、14日間の予備試験において、150 mg/kg投与群では投与1週時に2例の死亡例が認められた。100 mg/kg投与群では、投与1および2週時に体重増加抑制が観察され、心臓、甲状腺および胸腺の絶対重量の減少が観察された。また、ヘマトクリット値、ヘモグロビン、クレアチニンおよび血糖の減少と白血球数の増加が観察された。7日間の予備試験において、80 mg/kg投与群では、投与1週時に体重増加抑制が観察され、胸腺および脾臓の絶対・相対重量の減少と肝臓の相対重量の増加が