

観察された。また、網状赤血球数の減少と血中尿素窒素および血糖の増加が観察された。40 mg/kg 投与群では、統計学的に有意な変化はみられなかった。これらの予備試験結果に基づいて、明らかな毒性変化が惹起されると考えられる 80 mg/kg を最高用量に、その 1/2 用量の 40 mg/kg を中間用量に、また、無毒性が予想される 8 mg/kg を低用量に設定した。これらの設定用量群 (0、8、40 および 80 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき雌雄とも 10 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、8、40、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. 投与方法

各用量群の投与液を胃ゾンデ (Disporsable 経口ゾンデ、有限会社フチガミ機械店、京都) を用い、毎日 1 回、週 7 日、4 週間に亘り強制経口投与した。投与容量は 1 匹当たり 6 mL/kg とし、対照群の動物には注射用水のみを投与した。

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 回被験物質投与後に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

全ケージについて、毎週 1 回原則として連続 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。

9. 食餌効率

全用量群について、投与開始後毎週、群平均体重増加量をそれぞれの群平均摂餌量で除して群平均食餌効率 (% で表示) を雌雄別に算出した。

10. 眼科学的検査

馴化期間中に雌雄の全馴化動物および投与 4 週時に雌雄の全生存動物について、ハロゲン検眼鏡 (株式会社ナイツ) による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では、眼球、眼瞼、結膜、角膜、前眼房、瞳孔、虹彩、水晶体/硝子体および眼底を観察した。

11. 尿検査

投与 4 週時に、各群の全生存動物について尿検査を実施した。各検査動物を個体別

採尿ケージに入れて自然排泄により得られた新鮮尿を用いて、尿比重、ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質、ウロビリノーゲンおよび尿沈渣の項目について検査した。また、動物を同ケージに一晩入れて蓄積尿を採取し、尿色と尿量を検査した。尿比重は手持屈折計（株式会社アタゴ）で測定した。ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質およびウロビリノーゲンは、試験紙マルティスティックス®SG（バイエルメディカル株式会社）の呈色の程度を、クリニテック®50（バイエルメディカル株式会社）で準定量的に計測した。尿沈渣は鏡検した。

12. 血液学的検査

4週間反復投与終了後に、各群の全生存動物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。

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、メイグリュンワルド・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。

13. 血液生化学的検査

4週間反復投与終了後に、各群の全生存動物について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ぺプチダーゼ（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）

14. 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。4週間反復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、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、精巣は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（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（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、胸部、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、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、精巣（両側）、精巣上体（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）、膾、眼球（両側）、ハーダー腺（両側）、下腿三頭筋（片側）、皮膚（腰背部）、乳腺（腹部）および肉眼的異常部位

15. 臓器重量

4週間反復投与終了後に、各群雌雄全例について、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、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（腹葉）、精囊・凝固腺（両側）、卵巣（両側）、子宮

16. 病理組織学的検査

対照群および高用量（80 mg/kg）群の全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。

病理組織学的検査の臓器および組織：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（両側）、上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾臓、骨および骨髄（胸骨、片側大腿骨および椎骨3カ所）、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、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、鼻腔、舌、咽頭、喉頭、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（腹葉）、精囊（両側）、凝固腺（両側）、卵巣（両側）、子宮（角部および頸部）、膾、眼球（網膜および視神経を含む、両側）、ハーダー腺（両側）、下腿三頭筋（片側）、膝関節（片側）、皮膚（腰背部）、乳腺（腹部）および肉眼的異常部位

17. CCA の薬物動態検査 (トキシコキネテイクス)

投与 4 週後の計画殺動物から採取された血液サンプルの一部 (各群雌雄各 1~3 例) および肝臓サンプル (80 mg/kg 群の雌雄各 3 例) を CCA の分析に供した。これらのサンプルの分析は財団法人日本食品分析センター多摩研究所 (東京) に依頼した。ただし、同分析は今年度中に完了しなかったため、結果については次年度の報告書に掲載予定である。

18. 肝臓の酸化ストレス (活性酸素関連物質) の測定

4 週間反復投与終了後の計画殺動物より採取した肝組織 (凍結試料) 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-OH-dG) 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肝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-OH-dG 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-OH-dG) 測定用 ELISA キット (日本油脂株式会社) を用い肝組織中の 8-OH-dG 濃度を測定した。

19. 肝臓のメタロチオネイン mRNA の定量

4 週間反復投与終了後の計画殺動物より採取した凍結肝臓サンプルの一部から、Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit (STRATAGENE、アメリカ、カリフォルニア州) を用い、total RNA を抽出した。得られた RNA の定量には分光光度計 GeneQuantpro (アマシャム・バイオサイ

エンス、東京都) を用いた。

RNA を 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製し、1 μg を 50 μL の系で TaqMan Reverse Transcription Reagent (アプライド・バイオシステム、東京都) および PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ、東京都) を用い逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

PRISM 7700 (アプライド・バイオシステム) を用い、Real-time PCR 法による cDNA の増幅曲線から、mRNA 発現量を定量解析した。発現量を標準化するために、内部標準として GAPDH を用いた (

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)。GAPDH の Real-time PCR 反応には TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライド・バイオシステム) および TaqMan Rodent GAPDH Reagents (アプライド・バイオシステム) を用いた。メタロチオネインの Real-time PCR 反応には SYBR Green PCR Master Mix (アプライド・バイオシステム) および以下に示すプライマー・セットを用いた。これらのプライマー・セットは Nippon EGT (富山県) から購入した。

Metallothionein I (MT I)

Forward:

TTCACCAGATCTCGGAATGGA

Reverse:

ACACAGCCCTGGGCACAT

Metallothionein II (MT II)

Forward:

ACTGCCGCCTCCATTCG

Reverse:

GCAGCCCTGGGAGCACTT

定量用のスタンダードとして PCR 産物を精製して用い、塩基配列および濃度から

モル濃度を算出した。

Real-time PCR 反応は 95℃、10 分間インキュベーション後、95℃15 秒、60℃60 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で行った。

MT I および II の mRNA 発現量は GAPDH の発現量で標準化 (GAPDH に対する比率) し、normalized value として表した。

20. 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、尿比重、尿量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、過酸化脂質量、8-OHdG 量、メタロチオネイン mRNA の発現量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、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。尿検査項目 (尿比重、尿量を除く) 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、眼科学的検査所見、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. 臨床症状および死亡率

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも約半数の動物に沈静化が認められ、流涎を示す個体が散見された。また、雌では半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが観察された。死亡率では、投与 1 週時に雄 1 例が死亡したが、雌では死亡例はなかった。

40 mg/kg 投与群では、雄には異常はなかったが、雌では約半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが認められ、流涎を示す個体が散見された。なお、死亡動物は雌雄ともなかった。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも臨床症状に異常はなく、死亡例もなかった。

2. 体重変化

80 mg/kg 投与群では、雄の体重が投与第 1 週時から対照群に比べ有意に低い (10%前後) 値で投与終了時まで推移した。しかし、雌では特に異常はなかった。

40 mg/kg 投与群では、雄の体重が対照群に比べ軽微 (5%前後) ながら低値を保って推移し、投与 4 週時に統計学的有意差も認められた。しかし、雌では異常はなかった。

8 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。

3. 摂餌量

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 1 週時に摂餌量が対照群に比べ顕著 (40-45%) に減少し、その後徐々に回復するものの、投与期間中の総平均値で約 20%減少した。

40 mg/kg 投与群では、高用量群と同様に雌雄の摂餌量が投与 1 週時から軽度ながら有意 (21-27%) に減少し、総平均値では対照群に比べ 10%前後の低値を示した。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群との間に差はなかった。

4. 食餌効率

80 mg/kg 投与群では、雌の食餌効率が対照群に比べ 27%高値を示したが、雄の値は対照群と同等であった。

40 mg/kg 投与群では、雌の食餌効率が対照群に比べ 23%高値を示したが、雄では差はなかった。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも食餌効率は対照群と同等であった。

5. 眼検査成績

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用量群においても認められなかった。

6. 尿検査成績

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも尿量が増加し、蛋白が減少した。

40 および 8 mg/kg 投与群では、雌において尿量が増加傾向にあり、蛋白の減少がみられたが、雄では特に異常はなかった。

7. 血液学的検査成績

80 mg/kg 投与群では、雌においてヘマトクリット値 (Ht)、血色素量 (Hb)、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) が有意に減少し、小球性低色素性貧血が認められた。雄においても Hb、MCH、MCHC

が有意に減少し、軽微ながら貧血傾向がみられた。また、雌雄ともプロトロンビン時間 (PT) の短縮および白血球数 (WBC) の有意な増加がみられ、雌では血小板数 (PLT) と網赤血球数 (Retics) も有意に増加した。白血球のデイファレンシャルカウントでは、雌雄ともリンパ球と単球が有意に増加した。また、雌について実施した骨髓塗末検査では、赤芽球 (Erb) および肥満細胞 (Mast) の増加ならびにリンパ球 (Lym)、好中球 (Neut)、細網細胞 (Reti)、骨髓球系/赤芽球系比 (M/E ratio) の減少がみられた。

40 mg/kg 投与群では、雌において Hb、MCV、MCH、MCHC が有意に減少し、貧血傾向がみられたが、雄では貧血は観察されなかった。また、雌雄とも PT の短縮およびリンパ球の増加を伴う WBC の増加がみられ、雌では PLT と Retics が有意に増加した。

8 mg/kg 投与群では、雌において PLT の増加がみられた他は、雌雄とも特に異常は認められなかった。

8. 血液生化学的検査成績

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも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、総コレステロール (T.Chol) が有意に増加した。加えて、雄では尿素窒素 (BUN)、総ビリルビン (T.Bil) およびリン (P) の有意な増加がみられ、アルカリホスファターゼ (ALP) および血糖値 (Gluc) が有意に減少した。一方、雌では γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP)、Gluc、トリグリセライド (TG)、カリウム (K) が有意に増加し、塩素 (Cl) が減少した。

40 mg/kg 投与群では、雄において ALP および Gluc が有意に減少し、雌ではアルブミ

ン・グロブリンの減少を伴う TP および Cl の減少がみられ、P および K が有意に上昇した。

8 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変化はみられなかった。

9. 剖検所見

80 mg/kg 投与群では、投与4週後の計画殺動物において十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が雌雄とも全例に認められ、雄では肺の斑点を示す個体が有意に増加した。また、試験途中で死亡した雄1例では、水溶性の消化管内容物が観察された。

40 mg/kg 投与群では、雌雄とも全例に十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が観察された。

8 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。

10. 臓器重量

80 mg/kg 投与群では、雄において胸腺、前立腺および精囊・凝固腺の絶対重量・相対重量(比体重値)がともに有意に減少し、肺、肝臓および腎臓の相対重量が有意に増加した。一方、雌では脳、下垂体および胸腺の絶対・相対重量が有意に減少し、肝臓および腎臓の絶対・相対重量がともに有意に増加した。

40 mg/kg 投与群では、雄において胸腺の絶対・相対重量の有意な減少と肺の相対重量の有意な増加が認められ、雌では脳、下垂体および胸腺の絶対・相対重量の有意な減少ならびに肝臓と腎臓の絶対・相対重量の有意な増加が認められた。

8 mg/kg 投与群では、雌において胸腺の絶対・相対重量が有意に減少したが、雄では有

意な変化は認められなかった。

11. 病理組織学的検査成績

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも前胃粘膜角化亢進、十二指腸粘膜上皮過形成、空・回腸粘膜上皮過形成、直腸粘膜杯細胞肥大、腎臓近位尿細管上皮褐色色素沈着および腸管膜リンパ節洞内血液滞留が高頻度に観察された。また、雌では全例にびまん性肝細胞肥大が認められた。

40 および 8 mg/kg 投与群では、組織学的検査は未完了で、現在検索中。

12. 肝臓の酸化ストレス測定成績

80 mg/kg 投与群では、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)含量が雄では有意に減少し、雌では逆に有意に増加した。一方、過酸化脂質には雌雄とも異常はなかった。

40 mg/kg 投与群では、雄において8-OHdGが有意に減少したが、雌では異常はなかった。

8 mg/kg 投与群では、雌雄とも過酸化脂質あるいは8-OHdGには異常はなかった。

13. 肝臓のメタロチオネイン遺伝子解析

80 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓におけるメタロチオネインの遺伝子発現が有意に抑制された。

40 および 8 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓におけるメタロチオネインの遺伝子発現は対照群と同等であり、異常は認められなかった。

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、平成 16 年度では、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クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) ¹⁴⁾ を対象に反復経口投与毒性を実施した。本研究では、CCA の代表的薬剤種である CCA type B¹⁾ (CrO₃ 35.3% + CuO 19.6% + As₂O₅ 45.1%) を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で雌雄の Wistar 系ラットに毎日 1 回、4 週間に亘り反復強制経口投与し、臨床症状観察、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。

臨床症状および死亡率では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも約半数の動物に沈静化が認められ、流涎を示す個体が散見された。また、雌では半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが観察された。死亡率では、投与 1 週時に雄 1 例が死亡したが、雌では死亡例はなかった。また、40 mg/kg 投与群では、雄には異常はなかったが、雌では約半数の動物に腹部・外陰部被毛の汚れが認められ、流涎を示す個体が散見された。これらの臨床症状発現は CCA 投与に起因するものと考えられるが、その作用機序は不明である。

体重変化では、40 mg/kg 以上の投与群の特に雄において摂餌量の減少を伴う軽度の体重増加抑制が認められた。一方、雌では摂餌量は減少傾向にあったが、体重への影響は認められず、食餌効率は対照群よりも高値を示した。

眼検査では、雌雄ともいずれの用量群においても CCA 投与に関連付けられる異常は認められなかった。

尿検査では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも尿量が増加し、蛋白が減少し、40 および 8 mg/kg 投与群の雌においても同様な

傾向がみられた。これらの変化は CCA 投与の影響とも考えられるが、その毒性学的意味は不明である。

血液学的検査では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも小球性低色素性貧血がみられ、これに伴い雌では網赤血球数あるいは血小板数が増加した。また、同群では雌雄ともリンパ球および単球の増加を伴う総白血球数 (WBC) の増加がみられ、血液凝固系因子のプロトロンビン時間 (PT) の短縮も認められた。また、40 mg/kg 投与群でも特に雌において軽度ながら同様な変化がみられた。これらの血液学的変化に関しては、CCA の主成分のひとつであり、造血管系への影響が示唆¹⁵⁾されているヒ素により誘発されたものと推察した。なお、PT の短縮に関しては、その毒性学的意味は不明である。

血液生化学的検査では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも低蛋白血症および高コレステロール血症が認められ、加えて、雄では尿素窒素 (BUN)、総ビリルビン (T.Bil) およびリン (P) が増加が、雌ではγ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP)、血糖 (Gluc)、トリグリセライド (TG)、カリウム (K) の増加および塩素 (Cl) の減少が観察された。また、40 mg/kg 投与群の雌においても低蛋白血症および Cl の減少がみられ、P および K が有意に上昇した。これらの変化は、概ね腎機能障害を反映する所見であり、後述する腎臓の重量増加と病理所見に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⁸⁾。また、腎機能が障害されると糸球体濾過率が低下するため血中のリン値が増加し、電解質のバランスに影響を及ぼすことが知られている。

剖検所見では、80 mg/kg 投与群の計画殺動物において十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が雌雄とも全例に認められた。また、試験途中で死亡した雄 1 例では、水溶性の消化管内容物が観察された。40 mg/kg 投与群では、雌雄とも全例に十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が観察された。これらの変化は、いずれも被験物質投与の影響を反映する所見であり、CCA の構成成分であるクロム、銅およびヒ素の毒作用^{5,7)}に起因するものと考えられ、CCA の消化器系への影響が示唆された。

臓器重量では、80 mg/kg 投与群では、雄において胸腺、前立腺および精囊・凝固腺の重量が減少し、肺、肝臓および腎臓の重量が増加した。一方、雌では脳、下垂体および胸腺の重量が減少し、肝臓および腎臓の重量がともに増加した。40 mg/kg 投与群では、雄において胸腺重量の減少と肺重量の増加が認められ、雌では脳、下垂体および胸腺の重量減少ならびに肝臓と腎臓の重量増加が認められた。8 mg/kg 投与群では、雌において胸腺の重量が減少したが、雄では有意な変化は認められなかった。これらの変化のうち、肝重量の増加はおそらくヒ素の作用により、腎重量増加についてはクロムの毒性作用⁶⁾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考えられた。その他の臓器重量変動に関しては体重増加抑制に伴う二次的变化かあるいは炎症性変化を反映する所見と推察した。

病理組織学的検査では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも前胃粘膜角化亢進、十二指腸粘膜上皮過形成、空・回腸粘膜上皮過形成、直腸粘膜杯細胞肥大、腎臓近位尿管上皮褐色色素沈着および腸管膜リンパ節洞内血液滞留が高頻度に観察された。また、雌では全例にびまん性肝細胞肥大が認められた。これらの組織学的変化は、概ね前述の剖検所見あるいは臓器重量変動と一致し、CCA 投与に起因する変化と考えられた。

肝臓の酸化ストレスの測定では、80 mg/kg 投与群の雌において DNA への酸化ストレスの産物である 8-ヒドロキシグアノシン (8-OHdG) の増加が認められ、CCA の酸化ストレス産生能が示唆された。ただし、確実な結論を得るためには今後の幅広い研究成果が待たれる。

一方、肝臓におけるメタロチオネイン (金属結合蛋白) の遺伝子解析では、80 mg/kg 投与群において雌雄とも同遺伝子発現量 (mRNA 量) が低下した。しかし、同変化の毒性学的意味は不明である。

E. 結論

本実験条件下では、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対し毒性を発現するものと結論された。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。

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

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

8. 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

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
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
協力研究者	竹内幸子	(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
	松本 力	(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
	福山朋季	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

4週間反復経口投与試験において、CCAの神経系および免疫系への影響について検索した。その結果、神経機能検査(FOB)では、40および80 mg/kg群の雌雄に探索行動、立ち上がり回数および自発運動量の減少が観察された。免疫学的検査では、40および80 mg/kg群の雄あるいは雌において胸腺重量が減少し、胸腺細胞数の減少、未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞(CD4+CD8+)の減少および成熟胸腺細胞のヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の減少が観察された。また、抗羊赤血球抗体価の低下を示す個体が40および80 mg/kg群の少数例に認められた。これらの結果から、CCAの経口投与での神経系および免疫系への影響が示唆された。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤であるクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤(CCA)をラットに4週間にわたって連続強制経口投与し、その神経毒性作用および免疫毒性作用を検索した。

Guideline, OPPTS 870.7800)」²⁾の毒性試験ガイドラインに従い、以下の条件で実施した。本試験は、CCAのラットにおける4週間反復経口毒性試験に神経毒性および免疫毒性検査項目を加え、神経・免疫毒性併合試験として実施した。

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「農薬の登録申請に係わる試験成績について」¹⁾および1998年8月の米国環境保護庁「Immunotoxicity (Health Effects Test

1. 被験物質

本試験の被験物質はクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤(CCA)であり、クロム・銅およびヒ素の各構成成分の配合比は酸化クロム(VI価、純度98%、関東化学(株))35.3%、酸化銅(II価、純度99.3%、

関東化学（株） 19.6%および酸化ヒ素（V価、純度 91.9%、キシダ化学（株） 45.1%であった。受領した被験物質は低湿度（40%以下）、室温（許容範囲：15～30℃）の環境下にて保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場で生産された 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 週齢にて購入し、1 週間以上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ー方式）、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

本試験は CCA の 4 週間反復経口毒性試験に神経毒性および免疫毒性検査項目を加

え、神経・免疫毒性併合試験として実施した。設定用量は 0、8、40 および 80 mg/kg の 4 用量とした。主群では 1 用量につき雌雄とも 10 匹の動物を使用した。また、羊赤血球を抗原として投与する抗体価測定のため衛星群 (Immunized group) を追加し、1 用量につき 8 匹の雄動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、8、40、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°C) 条件下にて保存した。投与液は投与前に室温に戻して使用した。

5. 体重

主群および衛星群の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、全動物について最終解剖前あるいは死亡発見時に最終体重を測定した。

6. 動物の観察

主群および衛星群の全動物について、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 回被験物質投与後に一般状態を観察した。

7. 詳細な状態の観察

主群の全生存動物について、詳細な状態の観察を投与開始前 1 回と投与期間中毎週 1 回、午前のほぼ一定の時刻に実施した。観察は、ケージ内あるいは外（オープンフィールド）で以下の項目を対象に実施し、それらの程度をスコアリングして記録した。

ケージ内観察項目：体位/姿勢異常、呼吸状態、攣縮、振戦、痙攣

ハンドリングでの観察項目：警戒性、攻撃性、眼球突出、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、粘膜（蒼白～充血）、分泌物・付着物（眼、鼻、口などからの分泌物）、筋緊張（筋収縮性）、取り扱いに対する反応、瞳孔径の変化

オープンフィールドでの観察項目：常同行動（首振り、旋回、身繕いなど）、異常行動（自傷行動、異常発声、後ずさりなど）、被毛の状態（被毛粗剛、立毛）、皮膚色（蒼白～充血）、探索行動、歩様異常（運動協調性を含む、よろめき歩行、ひきずり歩行、後肢麻痺など）、立ち上がり姿勢（回数）、糞個数、糞の状態、尿の状態

8. 神経機能検査

投与 4 週時に 1 回、主群の全生存動物について以下の項目の機能検査を実施した。

観察項目：自発運動量、握力（前肢、後肢）、感覚運動反応（位置視覚、接近反応、聴覚反応、触覚反応、痛覚反応、空中立ち直り反射）

自発運動量は、遠赤外線方式の検出器（SUPER MEX®）を装着した運動量測定装置（室町機械株式会社）を用いて連続 1 時間、10 分ごとに測定した。握力はラット握力測定器 CPU gauge Model-9505（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて測

定した。感覚運動反応の各項目は以下の方法で行い、正常あるいは通常範囲を“0”に設定した尺度基準を用いてスコアリングした。位置視覚では、動物の尾部を持ち垂直にぶら下げた状態で、平面に近づけて行った際の前肢を伸ばすタイミングを判定した。接近反応では、動物の正面に検査棒をゆっくりと近づけた際の反応を判定した。触覚反応では、動物の背部をピンセットで軽く触れた際の反応を判定した。痛覚反応では、動物の尾部をピンセットで挟んだ際の反応を判定した。聴覚反応では、動物の背後で突然クリッカーを鳴らした際の反応を判定した。空中立ち直り反射では、動物を仰向けに持ち上げて約 20 cm の高さから落下させた際の着地の姿勢を判定した。

9. 胸腺および脾臓の細胞数計測

4 週間反復投与後の主群の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後、胸腺および脾臓の半分について細胞懸濁液を調製し、胸腺および脾臓の細胞数計測の免疫学的検査に供試した。

胸腺および脾臓の半分（胸腺では右側）を重量測定した後、5%牛胎児血清（FCS; Fatal Calf Serum）添加のリン酸緩衝液（PBS; Phosphate Buffered Saline）に氷冷下で浸し、胸腺と脾臓のそれぞれについて時計皿上でステンレス鋼製のメッシュを用いて細胞懸濁液を調製した。脾臓細胞懸濁液については、遠心分離後の脾臓細胞を 0.85%の塩化アンモニウム水溶液に懸濁し、室温で 10 分間静置し、赤血球を溶解させた。次いで、遠心分離し、細胞塊を 5%FCS 添加 PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を調製した。胸腺細胞懸濁液については赤血球溶解

の操作を行わず、5%FCS 添加 PBS で洗浄し、細胞懸濁液を調製した。

胸腺および脾臓の細胞懸濁液の一部試料について、総合血液学検査装置アドヴィア 120 (Bayer Corporation) を用いてリンパ球数を計測した。また、細胞懸濁液の調製に用いた臓器重量に基づき、臓器 mg 単位あたりの細胞数と各臓器あたりの細胞数を算出した。

10. フローサイトメトリー解析

前項の細胞数計測にて調製した各細胞懸濁液の一部試料について、反応抗体との非特異的結合を防ぐため、約 1×10^7 の胸腺ないし脾臓細胞を 20% 山羊血清添加 PBS にて 4°C で 10 分間培養した。遠心分離後、5%FCS 添加 PBS で洗浄し、 1×10^6 の胸腺ないし脾臓細胞について以下の蛍光標識抗ラット細胞膜表面抗原の抗体 (BD PharMingen) を用いて 4°C で 30 分間培養・染色した。T 細胞のリンパ球サブセットの解析では、FITC 標識抗ラット CD3 抗体、PE 標識抗ラット CD8 抗体および Cy-Chrome 標識抗ラット CD4 抗体を使用した。B 細胞の解析では Cy-Chrome 標識抗ラット CD45RA 抗体を、NK 細胞の解析では PE 標識抗ラット NKR P1A 抗体を使用した。染色後、PBS で洗浄した後、FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いてリンパ球サブセットを解析した。胸腺リンパ球サブセット解析においては、未成熟胸腺細胞のダブルネガティブ細胞 (CD4 \cdot CD8 \cdot) およびダブルポジティブ細胞 (CD4+CD8+) について、また成熟胸腺細胞のヘルパーT 細胞 (CD4+CD8 \cdot) および細胞傷害性 T 細胞 (CD4 \cdot CD8+) に

ついて解析した。脾臓リンパ球サブセット解析においては、汎 T 細胞 (CD3+)、汎 B 細胞 (CD45RA+)、ヘルパー T 細胞 (CD4+CD8 \cdot)、細胞傷害性 T 細胞 (CD4 \cdot CD8+) および Natural killer 細胞 (NK 細胞; NKR P1A+) について解析した。各リンパ球サブセットの対象細胞集団は、フローサイトメーターの解析で得られた各細胞集団の統計値 (%) に細胞数を乗じて、対象細胞集団の細胞数として表した。

11. 免疫グロブリン抗体価の測定

衛星群の雄動物について、4 週間投与終了後最終屠殺 (採血) の 6 日前に、 2×10^8 のヒツジ赤血球 (SRBC, Seep Red Blood Cell, 株) 日本生物材料センター) をエーテル麻酔下でラットに 0.5mL 静脈内投与した。採血はエーテル麻酔下で後大静脈より行い、血清を採取した後、測定時まで凍結保存 (-70°C 以下) した。血清中のヒツジ赤血球特異的免疫グロブリン M クラス抗体 (抗ヒツジ赤血球免疫グロブリン M 抗体) の抗体価を「Method in Immunotoxicology」に記載された Temple らの方法³⁾ に従い、酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。測定には BD OptEIATM Reagent Set B (BD) を使用した。まず、ヒツジ赤血球を溶解した 0.1M の炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 9.5) を抗原液として、マイクロプレートの各ウェルに 100 μL ずつ入れ、1 時間室温で培養後、冷蔵庫にて一晩静置した。翌日 200 μL のアッセイ希釈液 (10% 牛胎児血清添加リン酸緩衝液) を用い 2 時間室温で培養してブロッキングを行った後、各血清試料の希釈液を各ウェルに 100 μL ずつ入れ、2 時間室温で培養した。各個体の血清はアッセイ希釈液を用い

4倍希釈で7段階希釈した(4~16384倍希釈)。次に15000倍希釈のアフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットIgM抗体(Rockland Inc.)を各ウェルに100 μ Lずつ入れ、2時間室温で培養した。TMB発色液(TMB, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine)を各ウェルに100 μ Lずつ入れ、20分間室温に静置後、50 μ Lの反応停止液(1Mリン酸)を添加して反応を停止した。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)を用い450nmのフィルターでマイクロプレートの吸光度を測定した。なお、コーティングの段階から発色溶液注入の各段階まで洗浄液洗浄液(0.05% Tween20 添加リン酸緩衝液)を用いて2~5回洗浄した。抗体価は、吸光度が0.5を示す血清の希釈倍率をもって表した。

12. 臓器重量

4週間反復投与終了後、主群および衛星群の全生存動物について、剖検後に脳(主群動物のみ)、胸腺および脾臓の固定前の重量(絶対重量)を測定した。また、最終体重から比体重値(相対重量)を算出した。

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。4週間反復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・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。主群の剖検所見はCCAの反復経口投与毒性試験にて記載した。

剖検時に衛星群の全動物から胸腺、脾臓、リンパ節(頸部および腸間膜)および肉眼的異常部位を採取し、10%中性緩衝ホルマ

リン液で固定した。

14. 病理組織学的検査

衛星群の全動物から採取した胸腺、脾臓、リンパ節(頸部および腸間膜)および肉眼的異常部位を対象にして病理組織学的検査を実施した。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。

15. 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。

運動量、握力、体重検査項目、細胞数、フローサイトメトリー解析によるリンパ球、免疫グロブリン抗体価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。詳細な状態の観察所見および感覚運動反応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。ただし、詳細な状態の観察における糞の状態および尿の状態については有意差検定を実施しなかった。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. 体重

主群および衛星群において、80 mg/kg 投与群の雄に投与 1 週から 4 週にかけて体重増加抑制が認められた。体重増加抑制は主群の 40 mg/kg 投与群の雄にも投与 4 週に認められた。

2. 死亡および一般状態

80 mg/kg 投与群の主群の雄 1 例と衛星群の雄 1 例が、それぞれ投与 1 週に死亡した。一般状態の観察において、鎮静が主群の 80 mg/kg 投与群の雌雄に統計学的に高頻度に認められた。また、80 および 40 mg/kg 投与群の雌では腹部と外陰部の汚れないし湿潤が有意に増加した。

3. 詳細な状態の観察

ケージ内観察項目：対照群および CCA 投与群の全動物が正常値を示した。

ハンドリングでの観察項目：80 mg/kg 投与群の雄で投与 1 週に筋緊張低下を示す動物の発生頻度が有意に増加した。筋緊張を除くその他の観察項目において、対照群および CCA 投与群の全動物が正常値を示し、異常所見は認められなかった。

オープンフィールドでの観察項目：80 mg/kg 投与群の雌雄において、投与 2 週から 4 週に探索行動の有意な減少（発現頻度）あるいは減少傾向が認められた。40 mg/kg 投与群の雌雄においても、探索行動の減少傾向（発現頻度）が認められた。ま

た、80 mg/kg 投与群において、立ち上がり回数の有意な減少が雄では投与 4 週に、雌では投与 2 週から 4 週に認められた。40 mg/kg 投与群においても、立ち上がり回数の減少が雌雄とも投与 4 週に認められた。

4. 神経機能検査

自発運動量の有意な減少が、雄では 40 および 80 mg/kg 投与群で測定開始直後の 10 分間に観察された。一方、雌では 80 mg/kg 投与群で測定開始直後の 10~30 分間に、40 mg/kg 投与群で測定開始直後の 10 分間にそれぞれ認められ、総自発運動量も有意に減少した。CCA 投与群の前肢と後肢の握力および感覚運動反応測定項目には、対照群と比べ有意な変化はなかった。

5. 臓器重量およびリンパ球細胞数

脳重量：雄において、40 mg/kg 投与群で絶対脳重量値の有意な減少がみられ、80 mg/kg 投与群で相対脳重量値の有意な増加が認められた。いずれも、体重増加抑制に関連した変化であると考えられた。一方、40 および 80 mg/kg 投与群の雌では、脳重量の絶対と相対重量値とも有意に減少した。

胸腺重量：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物（主群および衛星群とも）で、そして 8、40 および 80 mg/kg 投与群の雌動物で胸腺重量の絶対と相対重量値ともそれぞれ用量相関性に有意に減少した。

脾臓重量：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物（主群および衛星群とも）で脾臓重量の絶対重量値が有意に減少した。

リンパ球細胞数：40 および 80 mg/kg 投与群の雄では、ラット当たりの胸腺細胞数および単位重量当たりの胸腺細胞数とも有

意に減少した。一方雌動物では、ラット当たりの胸腺細胞数の減少が 8、40 および 80 mg/kg 投与群で、単位重量当たりの胸腺細胞数の減少が 80 mg/kg 投与群で観察された。また、単位重量当たりの脾臓細胞数の増加が 40 mg/kg 投与群の雌に認められた。

6. フローサイトメトリー解析

胸腺リンパ球サブセット：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞 (DP 細胞；CD4+CD8+) とダブルネガティブ細胞 (DN 細胞；CD4-CD8-)、そして成熟胸腺細胞のヘルパーT 細胞および細胞障害性 T 細胞の各リンパ球細胞群に対照群と比較して有意な減少が認められた。一方雌動物では、未成熟胸腺細胞の DP 細胞が 8、40 および 80 mg/kg 投与群で用量相関性に有意に減少し、成熟胸腺細胞のヘルパーT 細胞および細胞障害性 T 細胞が 80 mg/kg 投与群で減少した。

脾臓リンパ球サブセット：40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、NK 細胞が対照群と比較して有意に減少した。雌では、40 mg/kg 投与群に汎 B 細胞の偶発的な増加が認められた。

7. 免疫グロブリン抗体価

いずれの CCA 投与群においても、対照群と比較してヒツジ赤血球に対する免疫グロブリン M 抗体価に有意な差は認められなかった。個体ごとの獲得免疫抗体価についてみると、対照群のいずれの個体も 1024 倍希釈に吸光度 0.5 以上の値を示し、抗体価は 1024 倍以上であった。しかし、40 mg/kg

投与群の雄 2 例および 80 mg/kg 投与群の雄 1 例が、1024 倍以下のそれぞれ 757 倍、430 倍および 488 倍であり、低い抗体価を示した。

8. 剖検所見および病理組織学的所見

剖検所見では、40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、小腸の内腔拡張および大腸の膨満が統計学的に高頻度に観察された。また、統計学的に有意ではないものの、リンパ節の赤色化を示す個体の発生頻度の増加が 80 mg/kg 投与群の雄動物に認められた。

病理組織学的所見では、40 および 80 mg/kg 投与群の雄動物において、腸管膜リンパ節の洞内赤血球増加を示す像が統計学的に高頻度に観察された。また、統計学的に有意ではないものの、脾臓の軽度な胚中心未発達を示す個体が 40 mg/kg 投与群の 2 例と 80 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。

D. 考察

本試験では、4 週間反復経口投与試験において、CCA の神経および免疫系への影響の有無について検索した。神経毒性学的影響を検索する行動観察や神経機能検査 (FOB) では、40 および 80 mg/kg 群の雌雄に探索行動、立ち上がり回数および自発運動量の減少が観察された。これらの指標は、いずれも異所での行動量の減少を示唆する変化と考えられた。また、これらの行動指標の異常は、雌の脳重量の減少とも関連しているものと推測された。故に、CCA の経口投与での神経系への影響が示唆された。

免疫学的検査では、40 および 80 mg/kg

群の雄あるいは雌において胸腺重量が減少し、胸腺細胞数の減少、未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞（CD4+CD8+）の減少および成熟胸腺細胞のヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の減少が観察された。また、抗羊赤血球抗体価の低下を示す個体が40および80 mg/kg群の少数例に認められ、これらの個体は脾臓の胚中心が未発達であった。これらの結果から、CCAの経口投与での免疫系への影響が示されたものと考えられる。

E. 結論

4週間反復経口投与の実験条件下において、CCAの経口投与での神経系および免疫系へ影響があるものと結論された。

F. 引用文献

- 1) 農薬の登録申請に係わる試験成績について、(監修)農林水産省、12農産第8147号（平成12年11月24日）
- 2) US Environmental Protection Agency Health Effects Test Guideline, OPPTS 870.7800: Immunotoxicity. August 1998.
- 3) Temple L. et. al.: Volume 1 Chapter 9 ELISA to measure SRBC-specific serum IgM: Method and data evaluation In: Method in Immunotoxicology, edited by Burleson G.R., Dean J.H., and Munson A.E., pp. 137-157, Wiley-Liss Inc., New York, 1995.

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

9. 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 (Br1Han: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ー方式)、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