

製に際し、成分ごとに純度による調製濃度の換算を実施した。投与容量は6 mL/kgとした。最初に、所定量の酸化クロムおよび酸化ヒ素を秤量し、注射用水（大塚薬品株式会社）を加え溶解させた。溶解後、所定量の酸化銅を加えて超音波処理し、懸濁させた。懸濁後注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。各濃度の投与液は7日間分小分けし、冷蔵・遮光（5℃）条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

5. 一般状態の観察

全動物について、投与期間中1日2回瀕死状態ないし死亡の有無を、1日1回被験物質投与前に一般状態を観察した。

6. 詳細な症状観察

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

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

7. 機能検査

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

8. 体重

全動物について、投与開始時およびその後毎週毎週2回（投与週の満了日およびその3日後）体重を測定した。また、全動物について殺処分前あるいは死亡発見時に最終体重を測定した。

9. 摂餌量

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

10. 血液学的検査

4週間反復投与終了後に、神経病理学的検査に供しなかった神経毒性試験用動物および免疫毒性試験補充用動物（各群8匹/性）について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晚絶食させた。動物をエーテル麻酔下で開腹し、無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。

血液学的検査は、EDTA処理した血液試料を用いて、以下の項目について総合血液学検査装置アドヴィア120（Bayer

Corporation) で測定した。

測定項目 (略号): ヘマトクリット値 (Ht)、血色素量 (Hb)、赤血球数 (RBC)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT)、網赤血球数 (Retics)、白血球数 (WBC) および白血球のディファレンシャルカウント; 好中球 (N)、リンパ球 (L)、単球 (M)、好酸球 (E)、好塩基球 (B)、大型非染色球 (LUC)

血液凝固能を調べるために、プロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の測定検査も実施した。

4 週間投与終了後の全生存動物の大腿骨から骨髓を採取し、アドヴィア 120 を用いて骨髓有核細胞数の測定を行なうと同時に、メイグリュンワルド・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。

11. 血液生化学的検査

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

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

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

12. 免疫学的検査

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

13. 剖検および組織採取

13-1. 神経病理学的検査用動物

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

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

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

13-2. 免疫毒性学的検査用動物

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

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

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

14. 臓器重量

免疫学的検査用動物（各群8匹/性）について、剖検後、以下の臓器の固定前の重量（絶対重量）を測定し、最終体重から比体重値（相対重量）を算出した。

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

15. 神経病理組織学的検査

対照群および高用量（80 mg/kg）群の神経病理学的検査用動物から採取した以下に示す臓器・組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。坐骨神経および脛骨神経は樹脂包埋後、厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を施して、その他の組織はパラフィン包埋後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、顕微鏡にて観察した。

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

16. 病理組織学的検査

対照群および高用量（80 mg/kg）群の免

疫学的検査用動物から採取した以下に示す臓器・組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。標本はパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、顕微鏡にて観察した。

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

17. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5%および 1%レベルで解析した。

活動性（詳細な症状観察）、自発運動量、握力、体重、体温、着地時開脚幅、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、臓器重量および摂餌量のデータについては、先ず Bartlett の等分散検定を行なったその後、等分散の場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、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を判定した。詳

細な症状の観察結果および機能検査のスコアについては、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。死亡率ならびに一般状態の観察所見、剖検所見および病理組織学的所見の発生頻度については、Fisher の直接確率計算法（片側検定）を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 一般状態および死亡率

いずれの投与群においても死亡例は認められなかった。

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

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

2. 詳細な症状観察

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

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

8 mg/kg 投与群では、雄で投与 4 の活動性が有意に減少した。

1 mg/kg 投与群では、雌雄ともに有意な変化はなかった。

3. 機能検査

投与 4 週時に行った機能検査では、80

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

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

4. 体重変化

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

8 および 1 mg/kg 投与群では、雌雄とも体重変化に異常は認められなかった。

5. 摂餌量

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

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

6. 血液学的検査成績

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

8 mg/kg 投与群では、有意な変化は認められなかった。

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

に異常は認められなかった。

7. 血液生化学的検査成績

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

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

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

8. 免疫学的検査成績

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

8 mg/kg 投与群では、雄で動物あたりの胸

腺細胞数と胸腺の DP 細胞が有意に減少したが、その程度は極軽度であった。

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

9. 臓器重量

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

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

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

10. 剖検所見

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

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

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも被験物質投与に関連付けられる肉眼的異常は観察されなかった。

11. 病理組織学的検査成績

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

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

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

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも被験物質投与に関連付けられる病理組織学的異常は観察されなかった。

12. 神経病理組織学的検査成績

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

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 引用文献

- 1) Penha J, Catilu V, and Tolaymat T: Generation, use, disposal, and management option for CCA-treated wood. Florida Center for Solid and Hazardous Waste Management, Florida, USA, Report #98-1, pp. 1-54, 1998.
- 2) 原田孝則: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける反復経口投与毒性試験、厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究、2005年
- 3) 小坂忠司, 首藤康文: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の4週間反復経口神経・免疫毒性試験、厚生労働化学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究、2005年
- 4) Odiott O and Roberts SM: Preliminary evaluation of the non-dietary hazard and exposure to children from contact with chromated copper arsenate (CCA)-treated wood playground structures and CCA-contaminated soil. FIFRA Scientific Advisory Panel (SPA), SPA Report #2001-12, pp.1-63, 2001
- 5) Avido D, Dang W, Elkassabany N, Jakob W, Jensen J, Montague K, Mostaghimi S, Quick B, Shamin N, and Vaughan: Children's exposure to CCA-treated wood playground equipment and CCA-contaminated soil. In: FIFRA Scientific Advisory Panel Background Document, US EPA, pp. 1-54, 2001.
- 6) McMahon TF and Chen J: Hazard identification and toxicology endpoint selection for inorganic arsenic and inorganic chromium. In: FIFRA Scientific Advisory Panel Background Document, US EPA, pp. 1-36, 2001.
- 7) Goyer RA and Clarkson TW: Toxic effects of metals. In: Casarett & Doull's Toxicology (Klassen CD, ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 811-867, 2001.
- 8) 平野靖史: 有害化学物質に対する暴露指標と感受性要因に関する研究、国立環境研究所ニュース、21(6)、2000年
- 9) 岸玲子: 生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する研究、厚生労働科学研究費補助金 生活安全総合研究事業、2000年

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

10. 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皮投与毒性試験

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 武田真紀夫 （財）残留農薬研究所 毒性部分子毒性研究室
高橋 尚史 （財）残留農薬研究所 毒性部病理研究室
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）の反復経皮投与毒性を明らかにするため、CCA を 0、10、100、300 および 1000 mg/kg の用量で雌雄の SD 系ラットの背部皮膚に 8 週間に亘り反復投与した。その結果、100 mg/kg 以上の投与群において、自発運動の低下や後肢麻痺が認められ、用量依存性に死亡率が増加した。臨床検査では、尿蛋白・ビリルビンの増加、貧血、低アルブミン血症、高コレステロール・トリグリセライド血症、血漿電解質の変動（P、Na、K の増加、Ca の減少）が認められた。剖検所見では、皮下水腫、胸・腹水の増量、胸腺の萎縮・水腫、肝白色斑、腎臓の腫大・退色、消化管内容物の黒色化が観察された。臓器重量では、肝臓、腎臓および脾臓の重量が増加し、胸腺の重量が減少した。また、雌では脳重量が減少し、心重量が増加した。加えて、肝臓では酸化ストレスの産物である 8-OHdG が増加し、メタロチオネインの遺伝子発現が亢進（mRNA 量の増加）した。以上の結果から、CCA をラットに反復経皮投与した場合、皮下水腫、胸・腹水症、貧血、肝・腎障害を誘発し、100 mg/kg 以上は致死用量であることが判明した。また、CCA は神経・免疫系、消化器系あるいは循環器系へも影響を及ぼす可能性が示唆された。

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⁾を対象に種々の毒性試験を実施した。本研究では、

CCA をラットに反復経皮投与した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。なお、投与期間は当初の予定では 13 週間であったが、高用量群において被験物質適用部位の皮膚の状態が悪化したため、動物愛護の観点から投与期間を 8 週間に短縮して試験を終了した。

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」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詳細な一般状態の観察を実施した。

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一方式)、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 8 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、4 時間蓄尿採取時および剖検前日の午後 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

農薬の毒性試験ガイドラインに定める投与量としての上限量 1000mg/kg を最高用量として設定し、公比 3 倍で中間用量を 300 と 100 mg/kg、そして無毒性量としての予想で 10 mg/kg を最低用量として設定した。これらの設定用量群 (0、10、100、300 および 1000 mg/kg の 5 用量) の各用量群につき雌雄とも 8 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、10、100、300、1000 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、333、99.9、33.3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. 投与方法および投与期間

投与開始前日に各動物の背部(4 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、1日あたり約24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。

投与期間は当初13週間を予定していたが、適用部位の皮膚の状態が潰瘍形成などで悪化したため、投与継続は科学的かつ動物愛護の観点からも不適切と判断され、8週間に短縮して試験を終了した。また、300 mg/kg投与群については、投与3週時までに雌の全例が死亡したため、雄の生存動物を投与4週時に屠殺し諸検査を実施した。

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2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あるいは死亡発見時に最終体重を測定した。

8. 摂餌量

全動物について、毎週1回、個体別摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中の延べ日数で除し、用量群毎に1日1匹あたりの摂餌量(群別平均摂餌量)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4週時に300 mg/kg投与群の全生存動物および投与8週時に対照群と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4週時に300 mg/kg投与群の全生存動物について、また、投与8週時に0、10および100 mg/kg投与群の生存動物全例について尿検査を実施した。検査には各動物から強制採尿法により得られた新鮮尿を用いて、色調、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、尿潜血およびウロビリノーゲンについて検査した。色調は肉眼で、その他の項目は自動尿分析器(Clinitek 200+, Miles Labs., Inc.)にて測定した。

11. 血液学的検査

投与 4 週時に 300 mg/kg 投与群の全生存動物について、また、投与 8 週時に 0、10 および 100 mg/kg 投与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晩絶食させた。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

前項の血液学的検査で採取した各群の血液試料の血清を用い、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（ASAT）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（G-GTP）、クレアチニン（Creat.）、尿素窒素（BUN）、総蛋白（T.Prot.）、アルブミン（Albumin）、グロブリン（Globlin）、アルブミン/グロブリン比（A/G）、血糖（Glucose）、総コレステロール（T.Chol.）、トリグリセライド（TGL）、総ビリルビン（T.Bil.）、カルシウム（Ca）、無機リン（IP）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）および塩素（Cl）

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。投与 4 週間（300 mg/kg 群）あるいは 8 週間（0、10、100 mg/kg 群）投与終了後の計画殺動物は、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、精嚢(両側)、卵巣(両側)、子宮、膣、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

投与4週間あるいは8週間終了後の計画殺動物について、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、精嚢(両側)、卵巣(両側)、子宮

15. 病理組織標本作製

投与4週後の計画殺動物(300 mg/kg投与群)全例、投与8週後の計画殺動物(対照群および100 mg/kg群)全例ならびに各用量群の死亡・切迫殺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。

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、骨および骨髓(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、膣、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

なお、上記の臓器・組織の病理組織学的検査は今年度中に完了出来なかったため、次年度に報告予定。

16. CCAの薬物動態検査(トキシコキネティクス)

投与8週時に0、10および100 mg/kg群の生存動物を代謝ケージに入れ4時間尿(蓄尿)を採取した。採取した尿サンプルは将来の分析のため冷凍庫(-10℃以下)にて保存した。

投与4週後の300 mg/kg群の計画殺動物(雄)および同群の切迫殺動物(雌)ならびに投与8週後の0、10および100 mg/kg群の計画殺動物(雌雄)から採取された血漿サンプルの一部(各群雌雄各1~3例)をCCAの分析に供した。また、投与8週後の100 mg/kg群の計画殺動物(雌雄)から採取された肝臓の一部(雌雄各3例)をCCAの分析に供した。なお、これらの血漿および肝臓サンプルのCCA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。

17. 肝臓の酸化ストレス（活性酸素関連物質）の測定

投与4週間（300 mg/kg 群の雄）および8週間（0、10、100 mg/kg 群の雌雄）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。

18. 肝臓のメタロチオネイン mRNA の定量

投与4週間（300 mg/kg 群の雄）および8週間（0、10、100 mg/kg 群の雌雄）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 µg/µL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GADPHの発現量で標準化（GAPDHに対する比率）し、normalized valueとして表した。

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、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意差の有無を判定した。尿検査項目の評価段階付きデータについては、Wilcoxon 順位和検定、尿色については Fisher 直接確立検定を対照群と各被験物質投与群との間で実施した。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

1000 mg/kg 投与群では、投与初期から自発運動の低下、失調歩行あるいは外陰部の汚れが認められ、雌雄とも投与開始後1週間以内に全例が死亡した。

300 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与2週時以降に自発運動の低下、後肢麻痺、赤色鼻漏、皮膚蒼白、体温低下などが認められ、投与開始後3週間以内に雄の3/8例が、雌では全例が死亡あるいは容態悪化のため切迫殺された。このため雄の生存動物は投与4週時の終了時点で屠殺し、諸検査を実施した。

100 mg/kg 投与群では、投与6週時に雄1例が、また、投与8週時に雄2例および雌1例がそれぞれ死亡した。これらの動物は生前（投与5週時以降）に自発運動の低下、後肢麻痺あるいは体温低下を示した。

10 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異常は認められず、死亡例もなかった。

なお、被験物質適用部位の皮膚の状態については、100 mg/kg 以上の投与群では投与1週時から痂皮形成が認められ、長期間暴露された100 mg/kg 投与群では投与8週時には潰瘍形成など皮膚の状態が悪化したため、投与部位として不適切な状態となり、かつ、動物愛護の観点から、投与期間を当初の予定の13週間から8週間に短縮して試験を終了した。10 mg/kg 投与群では、雄では投与5週以降、雌では2週時以降に軽度の痂皮形成が少数例の動物に観察された。

2. 摂餌量

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため、摂餌量の評価は出来なかった。

300 mg/kg 投与群では、雌雄とも1週時から摂餌量が対照群に比べ22~48%減少したが、雌では投与2週時には回復した。

100 mg/kg 投与群では、雄の摂餌量が軽度（15%前後）に減少したが、雌では対照群と

同等であった。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と比べ投与期間中の摂餌量に差はなかった。

3. 体重変化

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため、体重変化については評価できなかった。

300 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低値（10%前後）保って推移した。しかし、雌では特に異常はなかった。

100 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たが、雌では異常はなかった。

10 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。

4. 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。

5. 尿検査成績

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に死亡したため尿検査は実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、雄の4週時の検査において尿蛋白、糖およびビリルビンの増加傾向が認められた。雌においては投与3週時までに全例が死亡したため検査を実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも尿蛋白およびビリルビンの増加がみられ、雄では糖も増加傾向を示した。

10 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異常は認められなかった。

6. 血液学的検査成績

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため、血液検査は実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、雄の投与4週時の検査において赤血球数（RBC）、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）が減少し、小球性低色素性貧血が認められた。加えて、網赤血球数（Ret.）、血小板数（Plat.）および白血球数（WBC）が増加した。白血球のディファレンシャルカウントでは、リンパ球（Lymph.）、好中球（Neutro.）および単球（Mono.）の増加と好酸球（Eosino.）の減少がみられた。また、凝固系因子のプロトロンビン時間（PT）の短縮傾向が認められた。なお、雌は投与3週時までに全例が死亡したため血液検査は実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、雌雄ともHt、Hb、MCV、MCHおよびMCHCが有意に減少し、300 mg/kg 投与群と同様の小球性低色素性貧血がみられた。また、雌雄ともRet.、Plat. およびWBCの有意な増加あるいは増加傾向がみられた。白血球のディファレンシャルカウントでは、Nuetro. およびMono. の有意な増加あるいは増加傾向がみられ、加えて、雄ではLymph.が増加し、雌ではEosino.が減少した。

10 mg/kg 投与群では、雌雄ともいずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。

7. 血液生化学的検査成績

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため、血液生化学検査を実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、雄の投与4週時の検査においてアルブミン (Albumin) の減少に伴う総蛋白 (T.Prot.) の減少がみられ、A/G 比が減少した。また、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (G-GTP)、総コレステロール (T.Chol.)、トリグリセライド (TGL)、血糖 (Glucose)、グロブリン (Globlin)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Creat.)、無機リン (IP) およびカリウム (K) が増加した。加えて、総ビリルビン (T.Bil.) およびカルシウム (Ca) が減少した。雌については投与3週時まで全例が死亡したため、血液生化学検査は実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、300 mg/kg 投与群と同様に雌雄とも Albumin の減少に伴い T.Prot. が有意に減少し、A/G 比も減少した。また、雌雄とも T.Bil. および Ca が減少し、T.Chol.、TGL、Glucose、Globlin、BUN、IP、Na および K の有意な増加あるいは増加傾向がみられた。その他、雄ではアルカリホスファターゼ (ALP) が有意に減少し、雌では逆に有意に上昇した。

10 mg/kg 投与群では、雌雄ともいずれの検査項目においても有意な変化は認められなかった。

8. 剖検所見

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡した。剖検の結果、雌雄ともほぼ全例に被験物質適用部位を含む全身性の皮下水腫、適用部位皮下織の黒色化、背

部骨格筋の黒色化および胸腺の水腫が観察された。また、雌雄とも肝臓に白色斑点が散見された。

300 mg/kg 投与群では、投与開始後3週間以内に雄の3/8例が、雌では全例が死亡あるいは容態悪化のため切迫殺された。これらの死亡・切迫殺例の剖検では、雌雄とも全身性皮下水腫、胸水、腹水、胸膜・腹膜の斑点、胸腺の萎縮、肺の斑点、消化管内容物黒色化、肝臓の白色斑点、腎臓の退色あるいは表面粗造、背部骨格筋の白色あるいは黒色化、適用部位皮下織の白色化あるいは水腫がしばしば観察された。その他、雄では精嚢・前立腺の萎縮が、雌では胸腺の水腫あるいは脾臓の萎縮が散見された。一方、同群雄の投与4週後の計画殺動物では、全例に適用部位皮下織の白色化および背部骨格筋の白色化が観察され、また、半数以上の動物に胸腺の萎縮、腺胃粘膜の黒色斑点、肝臓の白色斑点、腎臓の退色・腫大、縦隔膜リンパ節の腫大が観察された。その他、少数例ではあるが、胸水、腹水、皮下水腫、精嚢・前立腺の萎縮、腎部リンパ節の腫大等が散見された。

100 mg/kg 投与群では、投与6週時に雄1例が、また、投与8週時に雄2例および雌1例がそれぞれ死亡した。これらの死亡例の剖検では、雄において皮下水腫、腹水、胸膜・腹膜の白色斑点、胸腺の萎縮、消化管内容物の黒色化、脾臓の白色斑点、腎臓の腫大・退色、尿管拡張、膀胱粘膜の赤色化、縦隔・腎部リンパ節腫大、背部骨格筋の白色化あるいは黒色化、適用部位の皮下織の白色・黒色化あるいは水腫が観察された。雌の死亡例では、胸腺の萎縮、腎臓の腫大、背部骨格筋の白色化および適用部位皮下織の白色化が認められた。一方、投与8週後の計画殺動物では、

雌雄ともほぼ全例に適用部位の皮下織の白色化、背部骨格筋の白色化および縦隔・腎部リンパ節の腫大が観察された。また、雄では胸腺の萎縮および腎臓の腫大・退色が、雌では肺の黒色斑点、腹腔癒着あるいは腺胃粘膜黒色化が散見された。

10 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認められなかった。

9. 臓器重量

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため、臓器重量測定は実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、投与4週時に計画殺された雄において肝臓、腎臓、脾臓および副腎の絶対・相対重量がともに増加し、胸腺、精巣上体、前立腺および精嚢の絶対重量・相対重量（比体重値）がともに減少した。雌については投与3週時まで全例が死亡あるいは切迫殺されたため臓器重量測定は実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓、腎臓および脾臓の絶対・相対重量が有意に増加し、胸腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。加えて、雄では前立腺および精嚢の有意な減少あるいは減少傾向がみられ、雌では心臓の絶対・相対重量が有意に増加し、脳の前立腺の絶対重量の有意な減少と相対重量の減少傾向が認められた。

10 mg/kg 投与群では、雌雄ともに被験物質投与に関連付けられる臓器重量変動は認められなかった。

10. 病理組織学的検査

病理組織学的検査は未完了で、現在検索中

のため、組織学的所見は次年度に報告予定。

11. 肝臓の酸化ストレス測定成績

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため酸化ストレスの測定は実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、投与4週時に計画殺された雄において過酸化脂質量が有意に減少した。雌については投与3週時まで全例が死亡あるいは切迫されたため酸化ストレスの測定は実施しなかった。

100 mg/kg 投与群では、雌において過酸化脂質量が有意に減少し、8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OHdG）含量が有意に増加した。しかし、雄では有意な変化は認められなかった。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓のストレスマーカーには異常は認められなかった。

12. 肝臓のメタロチオネイン遺伝子解析

1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与1週時に全例が死亡したため、メタロチオネインの遺伝子解析は実施しなかった。

300 mg/kg 投与群では、投与4週時に計画殺された雄において、肝臓のメタロチオネインの遺伝子発現（mRNA 量）が有意に増加した。雌については、投与3週時まで全例が死亡あるいは切迫されたため、同遺伝子解析は実施しなかった。

100 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（mRNA 量）が有意に増加（雌）あるいは増加傾向（雄）を示した。

10 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量は対照群

と同等であった。

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) ^{1,4)} を対象に反復経皮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, 10, 100, 300 および 1000 mg/kg の用量で雌雄の SD 系ラットの背部皮膚に毎日 1 回、8 週間に亘り反復投与し、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、100 mg/kg 以上の投与群において自発運動の低下および後肢麻痺が認められ、1000 mg/kg 投与群では雌雄とも投与開始後 1 週間以内に全例が死亡し、300 mg/kg 投与群では投与 3 週時までに雄の 3/8 例と雌全例が死亡あるいは容態悪化のため切迫殺された。剖検の結果、これらの死亡・切迫殺動物において皮下水腫、胸水・腹水症、胸腺の萎縮・水腫、消化管内容物の黒色化、肝白色斑点、腎臓の腫大・退色、背部骨格筋の変色 (白色・黒色) あるいは被験物質適用部位皮下織の変色および水腫等が観察され、死因としては全身性の水腫 (循環障害)、肝・腎障害および消化管障害が考えられた。これらの変化は、上記の後肢麻痺を含め、おそらく皮膚から吸収された CCA の有効成分クロム (腎毒性物質)、銅 (消化管障害物質) およびヒ素 (神経系、心血管系、肝臓および消化管に対する毒性物質) の複合作用 ^{5,7)} に起因するものと推察した。

体重変化では、100 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。

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、100 mg/kg 以上の投与群において雌雄とも尿蛋白、ビリルビンあるいは糖の増加がみられ、腎機能障害が疑われた。事実、これらの動物の剖検時において腎腫大・退色がみとめられ、腎重量が増加した。同変化は、おそらく CCA 中のクロムの作用 ⁶⁾ に起因するものと解釈した。

血液学的検査では、100 mg/kg 以上の投与群において雌雄とも小球性低色素性貧血がみられ、これに伴い網赤血球数あるいは血小板数が増加した。また、これらの用量群では好中球あるいはリンパ球の増加を伴う総白血球数 (WBC) の増加がみられ、300 mg/kg 投与群では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。上記の貧血に関しては、CCA の主成分のひとつであり、造血器系への影響が示唆 ⁸⁾ されているヒ素により誘発されたものと推察した。好中球・リンパ球の増加を伴う WBC の増加については、被験物質適用部位の皮膚において投与初期から痂皮形成がみられ、また、暴露期間の延長に伴い潰瘍や皮下水腫など炎症性変化がみられたことから、CCA に起因する炎症性変化付随する二次的変化と考えられた。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、100 mg/kg 以上の投与群において雌雄とも低蛋白血症 (アルブミンの減少) がみられ、また、総コレステロール (T.Chol.)、トリグリセライド (TGL)、