

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

本試験の被験物質として、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の代表的種類のひとつである CCA2 号 (CCA-type B)<sup>3)</sup> 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 ( $\text{CrO}_3$ 、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、クロムおよび銅は関東化学株式会社 (東京)、ヒ素はキシダ化学株式会社 (大阪) より入手した。受領した被験物質は、湿度 40% 以下、温度は室温 (許容範囲: 15~30°C) 条件下で保管した。

### 2. 試験動物

Charles River Laboratories (MA, U.S.A.) で生産された雌性の SKH-1 ヘアレスマウス (CrI: SKH1-hrBR) を用いた。SKH-1 ヘアレスマウスは紫外線を長期暴露することによって高率に皮膚がんを作出することができ、皮膚発がん性の検索によく用いられているマウス系統である。供試動物は 8 週齢にて購入し、5 日間試験環境に馴化した後、9 週齢にて試験に供試した。馴化期間中毎日、一般状態を観察した。動物は温度  $24 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエアー方式)、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、体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に 23 匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後は耳ピアスを装着し、ピアスの色と

番号で個体を識別した。基礎飼料には保証飼料ガンマ線照射 MF 粉末 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用い、ステンレス鋼製粉末給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムおよび紫外線によって殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

### 3. 試験群

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

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

#### 4. 被験物質投与液の調製

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

#### 5. UVB 照射

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

の強さで UVB を照射した。

#### 6. 動物の観察

全動物について、投与期間中 1 日 2 回瀕死状態ないし死亡の有無を、1 日 1 回一般状態を観察した。また、皮膚に注目した詳細な観察を少なくとも毎週 1 回実施し、皮膚腫瘍が観察された場合には、その位置、数および大きさについて記録した。

#### 7. 体重

全生存動物について、投与開始時、投与 1 週から 13 週までは毎週 1 回および投与 16 週から投与終了時 (28 週時) までは 4 週に 1 回の頻度で体重を測定した。また、全動物について殺処分前あるいは死亡発見時に最終体重を測定した。

#### 8. 摂餌量および被験物質摂取量

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

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

## 9. 血液学的検査

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

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

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

## 10. 血液生化学的検査

28週間投与終了後に、各群 10匹ずつを対象として、前項の血液学的検査で述べたヘパリン処理後の各採取血液より得られた血漿を用い、以下の項目を JCA-BM1250 自動分析装置(日本電子株式会社、東京都)にて測定した。

測定項目(略号):アルカリホスファターゼ(ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGTP)、クレアチニン(Creat)、尿素窒素(BUN)、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glob)、アルブミン/グロブリン比(A/G ratio)、血糖(Gluc)、総コレステロール(T.Chol)、ト

リグリセライド(TG)、総ビリルビン(T.Bil)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、

## 11. 剖検および組織採取

投与期間中の死亡動物を含めた全動物について剖検を実施した。28週間投与終了後の計画殺動物は、エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断し、放血により安楽死させた後に剖検した。

剖検時に全動物から以下の臓器および組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし、肺についてはホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。皮膚については、冷 PBS になじませた後、ろ紙に貼り付け固定した。

採取した臓器および組織:脳(大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄(頸部、胸部および腰部)、坐骨神経(片側)、下垂体、胸腺、甲状腺および上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓(半分)、骨および骨髄(胸骨および片側大腿骨)、膝関節(片側)、リンパ節(頸部および腸間膜)、心臓、大動脈、唾液腺(顎下腺および舌下腺)、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓(中葉)、胆のう、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、頭部(鼻腔、副鼻腔、口腔粘膜および中耳を含む)、舌、咽頭、喉頭、気管、肺(気管支を含む)、腎臓(両側)、膀胱、卵巣(両側)、子宮(頸部を含む)、膾、眼球(両側)、ハーダー腺(両側)、下腿三頭筋(片側)、皮膚(背側および腹側)、肉眼的異常部位

## 12. 臓器重量

28週間投与終了後に、各群 10匹ずつを対象として、剖検後、以下の臓器の固定前の重量(絶対重量)を測定し、最終体重か

ら比体重値（相対重量）を算出した。

測定項目：脳、肝臓（胆のうを含む）、腎臓（両側）、脾臓、消化管（胃～直腸、膵臓および腸間膜リンパ節を含む）

### 13. 病理組織学的検査

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

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

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

標本は常法に従ってパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、顕微鏡にて観察した。

### 14. 肝臓および皮膚の酸化ストレス（活性酸素関連物質）の測定

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

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

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

### 15. 有意差検定

各検査項目について統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1% レベルで解析した。

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

体重、摂餌量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、臓器重量、過酸化脂質量および 8-OHdG 量のデータについては、まず Bartlett の等分散検定を行なった。その後、等分散の場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnnett の多重比較法を実施して UVB+CCA 0 ppm 群と他の各群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnnett 型の多重比較法を用いて UVB+CCA 0 ppm 群と他の各群間における平均順位の有無の有無を判定した。皮膚腫瘍の数および大きさのデータについては、ノンパラメトリック法による Dunnnett 型の多重比較法を用いて、UVB+CCA 0 ppm 群と他の各群間における平均順位の有無の有無を判定した。皮膚腫瘍の病理組織学的検査所見の発生頻度については、Mann-Whitney の *U* 検定を用いて、UVB+CCA 0 ppm 群と UVB+CCA

90 ppm 群間で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、担皮膚腫瘍動物数、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。

無処置対照群と CCA 90 ppm 群間および無処置対照群と UVB+CCA 0 ppm 群間の有意差検定は、体重、摂餌量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、臓器重量、過酸化脂質量および 8-OHdG 量のデータについては、まず F 検定によって 2 群の等分散性を評価し、分散が等しい場合には Student の *t* 検定、等しくない場合は Aspin-Welch の検定を行なった。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. 死亡率および臨床症状

投与 19 週時に CCA 90 ppm 群の 1 例が死亡したが、他の群において死亡例は認められなかった。

臨床症状に関しては UVB+CCA 0 ppm 群で、無処置対照群と比較し、皮膚のびらん／潰瘍の発生頻度が統計学的に有意に増加した。また、眼球混濁の発生頻度に増加傾向が認められた。

UVB 照射群内では、UVB+CCA 90 ppm 群で、UVB+CCA 0 ppm 群と比較し、皮膚のびらん／潰瘍の発生頻度の統計学的に有意な減少が認められた。

### 2. 皮膚腫瘍の観察

全 UVB 照射群で、皮膚腫瘍の発生が観察

された。皮膚腫瘍の数は UVB+CCA 10 ppm 群において、投与 18 週に統計学的に有意な増加が認められた。また投与 20 週を過ぎたあたりから、UVB+CCA 1、10 および 90 ppm 群において、UVB+CCA 0 ppm 群と比較し、統計学的に有意ではないものの用量に伴って増加傾向が観察された。担皮膚腫瘍動物数は UVB+CCA 10 および 90 ppm 群において、それぞれ投与 18 および 17 週時に統計学的に有意な増加が認められた。しかし試験期間全体として、UVB+CCA 1、10 および 90 ppm 群において、UVB+CCA 0 ppm 群と比較し、皮膚腫瘍の発生に明らかな早期化は認められなかった。投与 28 週時の皮膚腫瘍の大きさ（直径）は、UVB+CCA 10 および 90 ppm 群において、UVB+CCA 0 ppm 群と比較し、統計学的に有意に増加した。無処置対照群および CCA 90 ppm 群には皮膚腫瘍の発生は認められなかった。

### 3. 体重変化

いずれの用量群においても無処置対照群と比較し、明らかな差は認められなかった。

### 4. 摂餌量および被験物質摂取量

UVB+CCA 0 ppm 群において、無処置対照群と比較し、摂餌量の統計学的に有意な増加が投与 3、10、13、24 および 28 週時に認められた。

UVB 照射群内においては、明らかな差は認められなかった。

平均体重、平均摂餌量および被験物質の設定濃度より算出した CCA の摂取量（投与期間を通じた総平均被験物質摂取量）を以下に示す。

総平均被験物質摂取量（単位：mg/kg/日）

| 用量（ppm）  | 総平均被験物質摂取量 |
|----------|------------|
| 90       | 11.10      |
| UVB + 1  | 0.134      |
| UVB + 10 | 1.30       |
| UVB + 90 | 12.0       |

#### 5. 血液学的検査成績

UVB+CCA 0 ppm 群では、無処置対照群と比較し、ヘマトクリット値（Ht）、血色素量（Hb）、赤血球数（RBC）および平均赤血球血色素濃度（MCHC）が統計学的に有意に減少し、網赤血球数（Retics）および白血球数（WBC）が有意に増加した。白血球のディファレンシャルカウントでは、リンパ球数（L）、好中球数（N）および好塩基球数（B）の有意な増加が認められた。

UVB 照射群内では、UVB+CCA 90 ppm 群において、UVB+CCA 0 ppm 群に比較して Hb、RBC の有意な減少が認められ、CCA 投与により UVB 照射による貧血の増強が観察された。

#### 6. 血液生化学的検査成績

UVB+CCA 0 ppm 群では、無処置対照群と比較し、アルカリホスファターゼ（ALP）、クレアチニン（Creat）および血糖（Gluc）の統計学的に有意な減少がみられ、尿素窒素（BUN）およびカルシウム（Ca）の有意な増加が認められた。

UVB 照射群内においては、明らかな差は認められなかった。

#### 7. 剖検所見

UVB+CCA 0 ppm 群では、投与 28 週後の計画殺動物において、無処置対照群と比

較し、皮膚のびらん／潰瘍、脾臓およびリンパ節（主に腋窩および単径）の腫大の発生頻度が統計学的に有意に増加した。また肝臓の硬化および眼球混濁の発生頻度に増加傾向が認められた。

UVB 照射群内においては、UVB+CCA 90 ppm 群で、UVB+CCA 0 ppm 群に比較し、皮膚のびらん／潰瘍の発生頻度が有意に減少した。

CCA 90 ppm 群で死亡した 1 例には、胸腺の腫大および縦隔リンパ節の腫大が観察された。

#### 8. 臓器重量

UVB+CCA 0 ppm 群では、無処置対照群と比較し、脾臓の絶対重量・相対重量（比体重値）ならびに肺および腎臓の相対重量の統計学的に有意な増加が認められた。

UVB 照射群内では、UVB+CCA 1、10 および 90 ppm 群において、統計学的有意差は認められないが、脾臓の絶対および相対重量の用量に依存した増加傾向が観察された。

#### 9. 病理組織学的検査成績

UVB+CCA 0 ppm 群では、投与 28 週後の計画殺動物において、無処置対照群と比較し、腰背部皮膚の表皮過形成および脾臓の髓外造血亢進の発生頻度が統計学的に有意に増加した。またリンパ節炎、肝臓の髓外造血亢進、眼球の角膜上皮過形成および角膜炎の発生頻度に増加傾向が認められた。

UVB 照射群内においては、発生頻度および程度に明らかな差は認められなかった。

CCA 90 ppm 群で死亡した 1 例は、悪性リンパ腫と診断された。

## 10. 皮膚腫瘍の病理組織学的検査

UVB+CCA 0 および 90 ppm 群に観察された皮膚腫瘍について、組織学的検査を実施したところ、大部分の腫瘍が扁平上皮癌と診断された。そこで、扁平上皮癌の分化の程度により 3 型に分類した結果、UVB+CCA 90 ppm 群において統計学的に有意な低、中分化型扁平上皮癌の増加および高分化型扁平上皮癌の減少が認められ、悪性度の増強が示された。

## 11. 酸化ストレス測定成績

肝臓において、UVB+CCA 0 ppm 群では、無処置対照群と比較し、過酸化脂質の統計学的に有意な減少が認められた。一方、8-OHdG 量には変化はみられなかった。

UVB 照射群内においては、過酸化脂質および 8-OHdG 量ともに変化は認められなかった。

背側皮膚において、UVB+CCA 0 ppm 群では、無処置対照群と比較し、8-OHdG 量の統計学的に有意な減少が認められた。一方、過酸化脂質には変化はみられなかった。

UVB 照射群内では、UVB+CCA 10 および 90 ppm 群において、UVB+CCA 0 ppm 群に比較し、8-OHdG 量の統計学的に有意な増加が認められた。一方、過酸化脂質には変化はみられなかった。

## D. 考察

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) は、疫学的に皮膚発がん性が指摘されているヒ素を含有することから CCA 暴露による皮膚発がんリスクが危惧される。そこで本研究では、雌性 SKH-1 ヘア

レスマウスに週 3 回 UVB を照射するとともに CCA を 0、1、10 および 90 ppm の用量で 28 週間混餌投与し、UVB による皮膚発がんに対する CCA の増強作用の有無について検索した。

CCA 90 ppm 群では、1 例の死亡が認められた。病理組織学的検査の結果、この個体の死因は悪性リンパ腫と診断された。この腫瘍の発生は同群でこの個体のみであり、認められた死亡は、被験物質投与によらない偶発的な変化であると考えられた。その他の検査において、被験物質投与の影響は認められなかった。

UVB+CCA 0 ppm 群では、UVB を照射したことによる様々な変化が観察された。臨床症状では皮膚のびらん／潰瘍および眼球混濁の発生頻度が増加し、組織学的に扁平上皮癌と診断された皮膚腫瘍が多数発生した。摂餌量は一時的に増加した週がみられたが、継続的な変化ではなかった。血液学的検査では、貧血がみられ、これに伴い網赤血球数の増加が認められた。またリンパ球、好中球および好塩基球の増加を伴う白血球数の増加が認められた。これらの変化は、多数認められた皮膚腫瘍の自壊による出血ならびに炎症反応に伴う変化であると考えられた。血液生化学的变化では、アルカリホスファターゼ、クレアチニンおよび血糖の減少がみられ、尿素窒素およびカルシウムの有意な増加が認められた。臓器重量では脾臓の絶対および相対重量の増加がみられ、これは以下に述べる剖検時の腫大および組織学的検査における髄外造血亢進に相当した。また肺および腎臓の相対重量の増加が認められた。剖検では、皮膚腫瘍の発生に伴い皮膚のびらん／潰瘍がみられた。また皮膚腫瘍の自壊による出血な

らびに炎症反応に伴う変化として、組織学的に髓外造血亢進像を示す脾臓の腫大、リンパ節炎を示すリンパ節の腫大、好中球の浸潤を伴う壊死を示す肝臓の硬化が認められた。眼球混濁は組織学的には眼球的角膜上皮過形成および角膜炎に相当した。以上に述べた変化に加え病理組織学的検査では、皮膚腫瘍の認められない部分の腰背部皮膚において表皮過形成がみられ、肝臓では髓外造血亢進の発生頻度が増加した。酸化ストレスの測定では肝臓において過酸化脂質の減少がみられ、背側皮膚においては 8-OHdG 量の減少が認められた。

UVB 照射群内の比較において、CCA 投与の影響と考えられる以下の変化が観察された。UVB 照射によりみられた皮膚腫瘍について、その数は被験物質投与 20 週を過ぎたあたりから、CCA の用量に伴って増加傾向が観察された。担皮膚腫瘍動物数は UVB+CCA 10 および 90 ppm 群において、一時的な増加が認められたが、試験期間全体としては、CCA 投与による皮膚腫瘍の発生のみらかな早期化は認められなかった。投与 28 週時の皮膚腫瘍の大きさ（直径）は CCA の用量相関性に増加が認められた。以上の結果より CCA は UVB による皮膚発がんを増強することが示された。

血液学的検査では CCA 投与により UVB 照射による貧血の増強が観察された。臓器重量測定においては、脾臓の絶対および相対重量の用量に依存した増加傾向が観察された。UVB+CCA 0 ppm 群でみられた貧血およびこれに伴う脾臓の重量増加は、皮膚腫瘍の発生に伴ってみられた所見であると考えられた。よって CCA 投与群にみられたこれらの増強変化は、CCA 投与により皮膚

腫瘍の発生数および大きさが増加したことに起因する 2 次的変化であると考えられた。

UVB+CCA 90 ppm 群に観察された皮膚腫瘍は病理組織学的検査の結果、大部分が扁平上皮癌と診断されたが、詳細な検索により低、中分化型扁平上皮癌の増加および高分化型扁平上皮癌の減少が認められた。すなわち CCA 投与による発生腫瘍の悪性度の増強が示された。このことは UVB+CCA 90 ppm 群に皮膚腫瘍の大きさの増加がみられることと関連すると考えられた。

背部皮膚における酸化ストレスの測定では、CCA 投与群において用量相関性に 8-OHdG 量の増加が認められた。このことから CCA による皮膚発がん増強効果には酸化 DNA 傷害が関与する可能性が示唆された。

その他の変化として UVB+CCA 90 ppm 群では、臨床症状および剖検所見において、皮膚のびらん/潰瘍の発生頻度の減少が認められた。本所見は、皮膚腫瘍の発生に伴って観察された所見であるが、前述したように皮膚腫瘍は UVB+CCA 90 ppm 群で増加している。よってびらん/潰瘍の発生頻度の減少は偶発的な変化であると考えられた。

## E. 結論

本実験条件下では、CCA は UVB による皮膚発がんを増強し、その増強効果には酸化的 DNA 傷害が関与する可能性が示唆された。

## F. 引用文献

- 1) Burns FJ, Uddin AN, Wu F, Nadas A, and Rossman TG: Arsenic-induced enhancement of ultraviolet radiation carcinogenesis in mouse skin: a dose-response study. *Environ Health*



- Perspect、 112(5): 599-603、 2004.
- 2) Davidson T、 Kluz T、 Burns F、  
Rossman T、 Zhang Q、 Uddin A、  
Nadas A、 and Costa M: Exposure to  
chromium (VI) in the drinking water  
increases susceptibility to UV-induced  
skin tumors in hairless mice. Toxicol  
Appl Pharmacol、 196(3): 431-437、  
2004.
- 3) 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. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 高橋尚史、石塚勝美、川勝尚夫、小坂忠  
司、山口悟、大塚亮一、武田眞記夫、竹  
内幸子、桑原真紀、榎本秋子、中島信明、  
原田孝則：紫外線による皮膚発がんに対  
するクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐  
剤（CCA）暴露の増強効果、第 22 回日  
本毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006  
年。

#### H. 知的財産権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

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

1 4. 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・経皮投与毒性  
試験：肝メタロチオネインの遺伝子解析

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 武田眞記夫 （財）残留農薬研究所 毒性部分子毒性研究室長  
大塚 亮一 （財）残留農薬研究所 毒性部分子毒性研究室研究員

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットを用いた反復経口・経皮投与試験における肝メタロチオネインの遺伝子発現の曝露経路差を検索するため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析及び real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析を実施した。加えて、反復経口投与試験で認められた metallothionein 1 の遺伝子発現抑制（平成 16 年度報告）のメカニズムを検索するため免疫沈降法による DNA プロモーター領域のメチル化の解析を実施した。その結果、肝臓の網羅的遺伝子解析では、経口・経皮の両経路で共通した遺伝子発現は alpha-1-acid glycoprotein のみで、CCA 暴露に起因する遺伝子発現は曝露経路によりかなり異なることが示唆された。また、経口曝露ではグルタチオン関連遺伝子の発現亢進が認められ、CCA による肝グルタチオン枯渇の可能性が示唆された。経口曝露による肝遺伝子発現の定量解析では、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）関連遺伝子の発現亢進及び DNA のメチル化維持に關与する遺伝子の発現抑制が認められた。一方、メタロチオネインの DNA プロモーター領域のメチル化解析では、CCA の高用量経口投与群において Histone H3K4 のメチル化が対照群に比べ約 7 倍低い値を示した。このことから、CCA の経口曝露では DNA プロモーター領域の Histone H3K4 が脱メチル化され、その結果としてメタロチオネインの発現が抑制（down-regulation）される可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、平成 16 年度に実施したクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットを用いた反復経口・経皮投与毒性試験<sup>1,2)</sup>において認められた肝メタロチオネインの遺伝子発現の曝露経路による差異（経口経路では抑制、経皮経路では亢進）

の原因を明らかにすることを目的に実施された。

B. 研究方法

CCA の反復経口・経皮曝露ラットの肝臓におけるメタロチオネインの遺伝子発現の経路差を検索する目的で、マイクロアレイ

による網羅的遺伝子解析ならびに real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析を実施した。加えて、反復経口投与試験で認められた metallothionein 1 の遺伝子発現抑制（平成 16 年度報告）<sup>1)</sup> のメカニズムを検索するため免疫沈降法による DNA プロモーター領域のメチル化の解析を実施した。以下に材料及び方法を示す。

#### 1. マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

平成 16 年度に実施したラットにおける CCA の反復経口投与毒性試験 (IET04-0095)<sup>1)</sup> および反復経皮投与毒性試験 (SBL94-83)<sup>2)</sup> から得られた肝サンプルを用いてマイクロアレイによる網羅的解析を実施した。供試サンプルは、両曝露経路とも 4 週間曝露後の高用量群（経口：80 mg/kg、経皮：100 mg/kg）及び対照群の雌性ラットの肝臓から抽出した total RNA サンプルを使用した。各曝露経路の各群あたり 3 枚のアレイスライド (IntelliGene、タカラバイオ株式会社、滋賀県) を用いた。スライド間の誤差を補正するために、リファレンスとして対照群のサンプルをプールし、Cy3 色素で標識した。また、サンプルとして高用量群および対照群から各 3 種類の mixed sample を作製し、Cy5 色素で標識した<sup>3)</sup>。Cy3 標識リファレンスおよび Cy5 標識サンプルを混合し、アレイスライドでハイブリダイゼーションさせた後、ScanArray lite (Perkin-Elmer Bioscience Japan、東京都) で解析し、2 倍以上もしくは 0.5 倍以下の差を採用した。

#### 2. Real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析

前項 1. のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析結果から、CCA の経口暴露による肝臓への影響として glutathione の枯渇の可能性が示唆されたので、反復経口投与毒性試験<sup>1)</sup> の各用量群の雌性ラットの肝 total RNA サンプルに関して、Real-time PCR 法を用いグルタチオンの枯渇および低メチル化 (CCA の構成成分であるヒ素の影響の可能性が高い) に関連する以下の遺伝子の定量解析を実施した。

##### ① Glutathione-S-transferase, type Yb (accession No.; X78847)

Forward primer:

GGACCCAGGCATTGTGGA

Reverse primer:

CAGGCTGAAGAACTTCTCACTGT

TaqMan probe:

TTCCCTCTGCTAAAGGCCCTGAGAACC

##### ② Glutathione-S-transferase, alpha type 2 (accession No.; NM\_017013)

Forward primer:

TTTGATGAGAAGTTTATACAGAGTCCAGA

Reverse primer:

ACCATGGGCACTTGGTCAA

TaqMan probe:

TGGAAAAGCTAAAGAAAGACGGGAATTTGA

##### ③ Glutathione-S-transferase pi1 (accession No.; NM\_012577)

Forward primer:

TTCACCAGATCTCGGAATGGA

Reverse primer:

ACACAGCCCTGGGCACAT

TaqMan probe:

CTCCAGCTCCTGCGGCTGCAA

④11-zinc finger protein CCCTC-binding factor (accession No.; NM\_031824)

Forward primer:

GTCCCCACTGTGACACTGTCA

Reverse primer:

ACACAGCATCACAGTAGCGACAT

TaqMan probe:

AGTGATTTGGGTGTCCACTTGAGAAAGCA

⑤ DNA Methyltransferase 1 (accession No.; NW\_053354)

Forward primer:

ACCAGGCAGACCACCATCA

Reverse primer:

TGCGTTTCCCTTTTCAGAGTCT

TaqMan probe:

TCACTTCAAGGGTCCCGCTAAACGG

⑥ DNA Methyltransferase 2 (accession No.; NW\_001031643)

Forward primer:

AGAAATTGCAAATCTCCTGGGAT

Reverse primer:

CAGCCGGTAACGCTGCTT

TaqMan probe:

TCCTCCAGAATTTGGGTTTCTGAGAAGA

(1)スタンダードの調製

各プライマーセットを用い、それぞれの遺伝子に対応する定量解析用のスタンダードを作製した。肝臓から抽出した total RNA を 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  に調製し、0.5  $\mu\text{g}$  を 50  $\mu\text{L}$  反応系で TaqMan RT reagents (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)を用い逆転写した。それぞれの遺伝子ごとに、cDNA、上記プライマーセット、AmpliTaq Gold PCR Master Mix に Pyrogard 水 (ミ

リポア株式会社、東京都) を加え 50  $\mu\text{L}$  に調製し、PCR サーマルサイクラー (タカラバイオ株式会社、東京都) を用い PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を QIAGEN Quick PCR Purification Kit (株式会社キアゲン) を用い精製し、濃度確認後、終濃度 10 nM に調製し、使用時まで  $-70^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存した。

(2)逆転写反応

定量解析用の cDNA として、肝臓から抽出した total RNA を 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  に調製し、0.4  $\mu\text{g}$  を 40  $\mu\text{L}$  反応系で TaqMan RT reagents を用い逆転写し、使用時まで  $-70^{\circ}\text{C}$  以下で凍結保存した。

(3)定量的 PCR 反応 (

スタンダードの 10 段階希釈系列を作製し、連続する 5 点を用いた。スタンダード系列もしくは cDNA にプローブ・プライマーセット、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)、Pyrogard 水を加え 25  $\mu\text{L}$  に調製し、PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用い定量的 PCR 反応を実施した。

3. メタルチオネインの DNA プロモーター領域のメチル化解析

CCA の反復経口投与毒性試験<sup>1)</sup>の高用量群 (80 mg/kg) と対照群の雌性ラットの肝臓について、metallothionein 1 の遺伝子発現抑制 (平成 16 年度報告書) メカニズムを検索するために、免疫沈降法によるプロモーター解析を実施した。

(1)メチル化 DNA の免疫沈降

肝臓から抽出した DNA をサンプルとして用い、Methylated DNA Capture Kit (Epigentek Group Incorporation, NY, USA)によりメチル化 DNA の免疫沈降を実施した。Bioruptor (コズモバイオ、東京都)を用い、2 µg の DNA を、power : high、on : 20 秒、off : 1 分間、7 サイクルの条件で超音波切断した。切断 DNA の一部を input DNA とし、残りにキット付属の抗メチル化シトシン抗体を加え、免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルおよび input DNA サンプルからキット付属のスピンカラムを用い DNA を精製した。

#### (2)メチル化 histone H3/K4 の免疫沈降

凍結肝臓サンプル (最高用量群および対照群) を用い、Tissue Methyl-Histone H3/K4 ChIP Kit (Epigentek Group Incorporation, NY, USA)によりメチル化 histone H3/K4 の免疫沈降を実施した。20 mg の肝組織をホルムアルデヒド (和光、東京都) で 10 分間クロスリンクし、Bioruptor (コズモバイオ、東京都)を用い、クロスリンクしたサンプルを、power : middle、on : 30 秒、off : 1 分間、6 サイクルの条件で超音波切断した。切断サンプルの一部を input DNA とし、残りにキット付属の抗メチル化 histone H3/K4 抗体を加え、免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルおよび input DNA サンプルからキット付属のスピンカラムを用い DNA を精製した。

#### (3)定量的 PCR

図 1 に示すように、ラット metallothionein 1 のプロモーターからエクソン 1 を含む領域に CpG island が存在し、

TaqMan probe をその中に一つ (TaqMan probe 2)、さらに、その 5' 側に一つ (TaqMan probe 1) 以下の配列で設計した。

#### ①TaqMan probe 1

Forward primer:

GGCATAATCATCATATCGCACAGT

Reverse primer:

CATTGGTTTCACGCGTACTCAGA

TaqMan probe:

AGGTCCTATAACAGTTAAGC

#### ②TaqMan probe 2

Forward primer:

GAGAGCAGACTGTCCGCTAAGC

Reverse primer:

GTGAATCTGGAGCAACGGTGTA

TaqMan probe:

CATCCCGACTTCAGC

#### (4)スタンダードの調製

各プライマーセットを用い、それぞれの DNA 領域に対応する定量解析用のスタンダードを作製した。肝臓から抽出した DNA を 0.1 µg / µL に調製し、上記プライマーセット、AmpliTaq Gold PCR Master Mix に Pyrogard 水 (ミリポア株式会社、東京都) を加え 50 µL に調製し、PCR サーマルサイクラー (タカラバイオ株式会社、東京都) を用い PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を QIAGEN Quick PCR Purification Kit (株式会社キアゲン) を用い精製し、濃度確認後、終濃度 10 nM に調製し、使用時まで -70°C 以下で凍結保存した。

#### (5)定量的 PCR 反応

スタンダードの 10 段階希釈系列を作製

し、連続する 5 点を用いた。スタンダード系列もしくはサンプル DNA にプローブ・プライマーセット、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)、Pyrogard 水を加え 25  $\mu$ L に調製し、PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用い定量的 PCR 反応を実施した。メチル化の頻度は、免疫沈降サンプル中の標的 DNA 量と input DNA サンプル中の標的 DNA 量との割合 (%) で算出した。

#### 4. 有意差検定

遺伝子の定量的解析結果について、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。なお、2 群間の比較においては Student's t-test を用い解析した。

対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の判定は、危険率 5% および 1% レベルで行った。

### C. 研究結果

#### 1. マイクロアレイによる肝臓の網羅的遺伝子解析

反復経口・経皮曝露ラットの肝臓から抽出

した total RNA サンプルを用いマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を実施した結果、両経路で共通した遺伝子発現は肝障害マーカーのひとつである alpha-1-acid glycoprotein のみであった。メタロチオネインの遺伝子発現に関しては、経口曝露では抑制傾向 (down-regulation) を、経皮曝露では軽微ながら up-regulation の傾向を示した。その他、経口曝露では Glutathione-S-transferase\_alpha\_type と Glutathione-S-transferase\_mu\_type\_2 (Yb2) の発現亢進が認められ、CCA 曝露による肝グルタチオン枯渇の可能性が示唆された。

#### 2. Real-time PCR 法による発現遺伝子の定量解析

前項 1. のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析結果から、CCA の経口曝露による肝臓への影響として glutathione の枯渇の可能性が示唆されたので、反復経口投与毒性試験<sup>1)</sup>の各用量群の雌性ラットの肝 total RNA サンプルに関して、Real-time PCR 法を用いグルタチオンの枯渇および低メチル化 (CCA の構成成分であるヒ素による影響の可能性が高い) に関連する遺伝子の定量解析を実施した。

その結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) ファミリーに属する遺伝子 (GSTP1, GSTYb, GSTa2) の発現亢進 (up-regulation) 及び DNA のメチル化維持に関与する遺伝子 (Dnmt 1, Dnmt 2, CTCF) の発現抑制 (down-regulation) が中・高用量群において認められた。

#### 3. メタロチオネインの DNA プロモーター

#### 領域のメチル化解析

メタルチオネインのDNAプロモーター領域には全長600 bp以上のCpG islandが存在し、それより上流部位を認識するTagMan probe set (MT-1)ならびにCpG islandに含まれる部位を認識するTagMan probe set (MT-2)を用い、メチル化の解析を実施した。その結果、対照群及び高用量群(80 mg/kg)ともに、この領域におけるメチル化は低いことが判明した。

そこで、さらにメタルチオネインのDNAプロモーター領域のHistone H3K4のメチル化をクロマチン免疫沈降法(ChIP法)を用い解析した。その結果、同メチル化は対照群13.4%に対し高用量群(80 mg/kg)では2.0%であった。

#### D. 考察

CCAの反復経口・経皮曝露ラットの肝臓におけるメタルチオネインの遺伝子発現の経路差を検索する目的で、マイクロアレイによる網羅的解析ならびにreal-time PCR法による発現遺伝子の定量解析を実施した。加えて、反復経口投与試験で認められたmetallothionein 1の遺伝子発現抑制(平成16年度報告)のメカニズムを検索するため免疫沈降法によるDNAプロモーター領域のメチル化の解析を実施した。

マイクロアレイによる肝total RNAサンプルの網羅的遺伝子解析では、反復経口・経皮の両経路で共通した遺伝子発現は肝障害マーカーのひとつであるalpha-1-acid glycoproteinのみであった。このことは、CCA曝露に起因する肝臓の遺伝子発現は基本的に曝露経路(経口 vs 経皮)により大きく異なることを示唆しているものと解釈さ

れた。一方、メタルチオネインの遺伝子発現に関しては、経口曝露では抑制傾向(down-regulation)を、経皮曝露では軽微ながら亢進傾向(up-regulation)を示し、平成16年度の研究結果<sup>1,2)</sup>と一致した。その他、経口曝露ではGlutathione-S-transferase, alpha\_typeとGlutathione-S-transferase, mu\_type\_2(Yb2)の発現亢進が認められ、CCA曝露による肝グルタチオン枯渇の可能性が示唆された。

Real-time PCR法による反復経口曝露ラットの肝遺伝子発現の定量解析では、グルタチオンの枯渇および低メチル化(CCAの構成成分であるヒ素による影響の可能性が高い)に関連する遺伝子の定量解析を実施した。その結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)ファミリーに属する遺伝子(GSTP1, GSTYb, GSTa2)の発現亢進(up-regulation)及びDNAのメチル化維持に参与する遺伝子(Dnmt 1, Dnmt 2, CTCF)の発現抑制(down-regulation)が中・高用量群において認められた。CCAの構成成分であるヒ素は、SH基切断によりグルタチオンの枯渇あるいはメチル基との結合によるDNAの低メチル化を招来することが知られている<sup>4,5)</sup>。従って、上記のGST及びメチル化関連遺伝子発現はヒ素による影響を反映した変化と考えられた。

メタルチオネインのDNAプロモーター領域の解析では、CpG islandより上流部位を認識するTagMan probe set (MT-1)ならびにCpG islandに含まれる部位を認識するTagMan probe set (MT-2)を用い、メチル化の解析を実施した。その結果、対照群及び高用量群(80 mg/kg)ともに、この領域におけるメチル化は低いことが判明した。一

方、Histone H3K4 のメチル化をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用い解析した結果、同メチル化は対照群 13.4% に対し高用量群 (80 mg/kg) では 2.0% であった。このことから、CCA の経口投与により DNA プロモーター領域の Histone H3K4 が脱メチル化され、その結果としてメタルチオネインの発現が抑制 (down-regulation) された可能性が推察された。

#### E. 結論

CCA 曝露による肝臓メタロチオネイン発現の経路差 (経口で抑制、経皮で亢進) に関しては、メタロチオネインの DNA プロモーター領域の Histone H3K4 のメチル化が関与している可能性が示唆された。

#### F. 引用文献

- 1) 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、「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」、厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業、平成 16 年度総括・分担研究報告書、pp.9-70、2005 年 3 月
- 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皮投与毒性試験、「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」、厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業、平成 16 年度総括・分担研究報告書、pp.71-144、2005 年 3 月
- 3) Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM,

Peng V, Ngai J, and Speed TP: Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acid Research* 30(4): 2-10, 2002

- 4) 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.
- 5) 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.

#### G. 研究発表

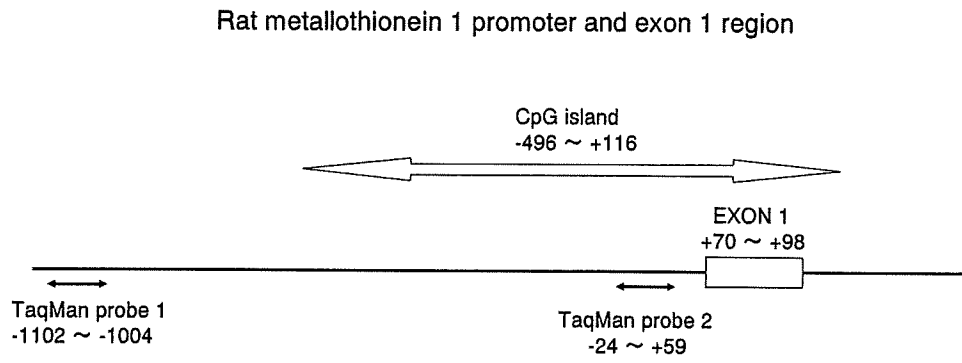
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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



図 1. ラット・メタロチオネイン 1 のプロモーターおよびエクソン 1 領域の模式



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

15. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）処理木材からの有効成分の  
土壌汚染状況調査

分担研究者 原田孝則（財）残留農薬研究所 毒性部長

研究要旨

CCA 処理木材からの環境汚染状況を把握するため、処理木材の設置から 20 年以上経過した鉄道沿線（枕木）、公園の遊具直下、民家の庭（鉄道の枕木をガーデニングに再利用）の土壌を採取し、有効成分の銅、クロム、ヒ素について定量分析を行った。その結果、土壌（乾燥土壌）中の濃度（mg/kg）は、鉄道沿線で銅 2.6、クロム 0.29、ヒ素 0.01 以下、公園では銅 3.3、クロム 0.14、ヒ素 0.04、民家で銅 0.73、クロム 0.29、ヒ素 0.12 であった。これらの値は、概ね土壌環境基準値に合致し、大きく逸脱するものはなく、特に問題は認められなかった。

A. 研究目的

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）で処理された木材からの有効成分（クロム、銅、ヒ素）の土壌への汚染状況を調査することを目的とした。

採取した土壌サンプルについて、室温で 1 週間放置したものを風乾土とした。

②含水率の測定

風乾土について 105 °C で 2 時間加熱前後の重量を測定し、含水率を算出した。

B. 研究方法

CCA 処理木材の設置から 20 年以上経過した鉄道沿線（枕木）、公園の遊具直下、民家の庭（鉄道の枕木をガーデニングに再利用）の土壌（各場所につき 1 点ずつ）を採取し、有効成分の銅、クロム、ヒ素について定量分析を行った。

③土壌抽出液の調製

風乾土 10 g を 100 ml のポリエチレン製容器に秤量し、0.1 mol/L 塩酸 50 ml を加えて 30 °C で 1 時間振とう抽出し、その抽出液をろ紙（No.5A[東洋濾紙株式会社]）でろ過し、土壌抽出液とした。

1. 土壌の前処理

①風乾土の調製

2. 土壌中のクロム及び銅の定量試験

①試料溶液の調製

土壌抽出液を試料溶液とした。

## ②標準溶液の調製

市販のクロム標準液(Cr100  $\mu\text{g/ml}$ )及び銅標準液(Cu100  $\mu\text{g/ml}$ )を1%硝酸で希釈してクロムの0.0、0.01、0.05、0.1及び0.5  $\mu\text{g/ml}$ 溶液並びに銅の0.0、0.05、0.1、0.5及び1.0  $\mu\text{g/ml}$ 溶液を作成し、標準溶液とした。

## ③誘導結合プラズマ発光分析装置によるクロム及び銅の測定

試料溶液及び標準溶液について、内部標準液としてインジウムを4  $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、誘導結合プラズマ発光分析装置により測定を行い、標準溶液の発光強度と各元素の濃度により作成された検量線から試料溶液中の各元素濃度を求め、風乾土及び乾燥重量あたりの各元素の含有量を求めた。

## ④誘導結合プラズマ発光分析装置操作条件

装置：Optima 5300DV[株式会社 パーキンエルマージャパン]  
高周波出力：1,300 W  
ガス流量：プラズマガス(アルゴン) 15 L/min  
補助ガス(アルゴン) 0.2 L/min  
キャリアーガス(アルゴン) 0.70 L/min  
試料導入量：1.50 mL/min  
ネブライザー：同軸型ネブライザー  
プラズマ観測位：軸方向  
測定波長：クロム 267.716 nm : 銅  
324.752 nm : インジウム 230.606 nm

## 3. 土壤中の総ヒ素の測定

### ①試料溶液の調製

土壌抽出液 5~25 ml をケルダールフラスコにとり、硝酸 10 ml を加え、緩やかに加熱した。放冷後、硫酸 5 ml を加え、液が無色~微黄色になるまで加熱し、その後、過塩素酸 2 ml を加え、硫酸の白煙が発生するまで加熱した。放冷後、飽和しゅう酸アンモニウム溶液 15 ml を加え、再び硫酸の白煙が発生するまで加熱した。放冷後、この液を水 20 ml を用いてメスフラスコに移し、40%よう化カリウム溶液 5 ml を加え 30 分間放置した後、10%アスコルビン酸溶液 5 ml 及び水を加えて正確に 50 ml としたものを試験溶液とした。

### ②標準溶液の調製

市販のヒ素標準液(As100  $\mu\text{g/ml}$ )を水で希釈して 0.1  $\mu\text{g/ml}$  のヒ素標準溶液を作成し、その 1.0、2.0、4.0、8.0 及び 16.0 ml をメスフラスコにとり、水 20 ml 及び硫酸 10 ml を加えて室温同様になるまで放冷した後、40%よう化カリウム溶液 10 ml を加え 30 分間放置し、10%アスコルビン酸溶液 10 ml 及び水を加えて正確に 100 ml とし(0.0、1.0、2.0、4.0、8.0 及び 16 ng/ml に相当)、標準溶液とした。

### ③水素化物発生原子吸光光度法による総ヒ素の測定

試験溶液及び標準溶液について、次の条件で水素化物発生原子吸光光度法により測定を行い、標準溶液の吸光度から作成された検量線から検体のヒ素含有量を求めた。

### ④水素化物発生原子吸光光度計操作条件

装置：原子吸光光度計；Spectr AA220  
[バリアンテクノロジー ジャパン リミテ

ッド]

還元気化装置：VGA-77[バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド]

還元条件：塩酸(5+1)溶液及び0.1%水素化ほう素ナトリウム・0.5%水酸化ナトリ

ウム溶液をペリスタルティックポンプを用いて混和し、発生した水素

化ひ素を925℃の石英製加熱セルに導入

電熱式温度コントローラー：ETC-60

[バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド]

導入ガス：アルゴン

ランプ：ヒ素中空陰極ランプ

波長：193.7 nm

### C. 研究結果

鉄道沿線、公園及び民家の庭から採取された土壌中のクロム、銅、ヒ素の定量分析結果を表1に示す。

土壌の乾燥重量当たりの各項目の濃度(mg/kg)は以下の如くである。

| 採取場所 | クロム  | 銅    | ヒ素    |
|------|------|------|-------|
| 鉄道沿線 | 0.29 | 2.6  | <0.01 |
| 公園   | 0.14 | 3.3  | 0.04  |
| 民家   | 0.29 | 0.73 | 0.12  |

また、土壌の風乾重量当たりの各項目の分析値(mg/kg)を以下に要約する。

| 採取場所      | クロム  | 銅    | ヒ素    |
|-----------|------|------|-------|
| 鉄道沿線(9.2) | 0.26 | 2.4  | <0.01 |
| 公園(2.2)   | 0.14 | 3.2  | 0.04  |
| 民家(2.6)   | 0.28 | 0.71 | 0.12  |

(n)：風乾土壌含水率(%)

### D. 考察

本研究は、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)で処理された木材からの有効成分(クロム、銅、ヒ素)の土壌への汚染状況を調査することを目的に実施された。

CCA処理木材の設置から20年以上経過した鉄道沿線(枕木)、公園の遊具直下、民家の庭(鉄道の枕木をガーデニングに再利用)の土壌を採取し、有効成分のクロム、銅、ヒ素について定量分析を行った。その結果、乾燥重量当たりの土壌中の濃度(mg/kg)は、鉄道沿線で銅2.6、クロム0.29、ヒ素0.01以下、公園では銅3.3、クロム0.14、ヒ素0.04、民家で銅0.73、クロム0.29、ヒ素0.12であった。これらの分析結果は、土壌環境基準値(環境省令第29号、平成14年12月16日)に比べ高値を示すものもあったが、大きく逸脱するものはなかった。同環境基準値を以下に示す。

土壌環境基準値(mg/kg or L)

| 土壌                  | クロム   | 銅    | ヒ素    |
|---------------------|-------|------|-------|
| 一般土壌 <sup>a</sup>   | <0.05 | —    | <0.01 |
| 農耕地(田) <sup>b</sup> | —     | <125 | <15   |

a：検液1L当たり、b：土壌1kg当たり

また、CCAの無毒性量が1mg/kg(我々の実験結果)<sup>1,2)</sup>であることを考慮すると、今回調査した土壌中の分析値はヒト健康影響を及ぼすレベルではないと判断された。