

Table 1-1 Mortality in males of Wistar Hannover rats

Dose (mg/kg)	Time after administration										Final mortality
	30 min	3	4 hrs	1	2	3	4	5	6 - 14days		
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5 ^a
100	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2 / 5
300	0	1	0	4							5 / 5
900	0	5									5 / 5

^a: Cumulative number of animals found dead during the observation period per number of animals treated.

Table 1-2 Mortality in females of Wistar Hannover rats

Dose (mg/kg)	Time after administration							Final mortality		
	30 min	3	4 hrs	1	2	3	4		5	6 - 14days
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5 ^a
100	0	1	0	3	0	0	0	0	0	4 / 5
300	0	2	0	3						5 / 5
900	0	5								5 / 5

^a: Cumulative number of animals found dead during the observation period per number of animals treated.

Table 1-3 Mortality in males of SD rats

Dose (mg/kg)	30 min	Time after administration								Final mortality
		3	4 hrs	1	2	3	4	5	6 - 14days	
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5 ^a
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5
300	0	0	0	4	1					5 / 5
900	0	5								5 / 5

^a: Cumulative number of animals found dead during the observation period per number of animals treated.

Table 1-4 Mortality in females of SD rats

Dose (mg/kg)	Time after administration										Final mortality	
	30 min	3	4 hrs	1	2	3	4	5	6 - 14days			
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5 ^a
100	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3 / 5
300	0	1	3	1								5 / 5
900	0	5										5 / 5

^a: Cumulative number of animals found dead during the observation period per number of animals treated.

Table 2-1 Body weight - Individual values in males of Wistar Hannover rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	14
33	1	205	254	284
	2	209	261	290
	3	209	272	305
	4	205	273	312
	5	212	270	294
	Mean	208	266	297
	N	5	5	5
100	6	210	243	284
	7	200	(202)	-
	8	204	230	272
	9	194	(192)	-
	10	218	258	311
	Mean	205	244	289
	N	5	3	3
300	11	214	(210)	-
	12	209	(201)	-
	13	205	(195)	-
	14	195	(191)	-
	15	207	(204)	-
	Mean	206	-	-
	N	5	-	-
900	16	204	(207)	-
	17	200	(200)	-
	18	201	(203)	-
	19	207	(208)	-
	20	219	(221)	-
	Mean	206	-	-
	N	5	-	-

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

*: Body weight loss when compared with the pre-administration value.

Table 2-2 Body weight - Individual values in females of Wistar Hannover rats

(g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	14
33	101	148	198	211
	102	146	175	191
	103	153	185	194
	104	154	187	200
	105	146	185	200
	Mean	149	186	199
	N	5	5	5
100	106	138	(133)	-
	107	137	(135)	-
	108	141	(139)	-
	109	147	(141)	-
	110	154	183	196
	Mean	143	183	196
	N	5	1	1
300	111	139	(134)	-
	112	139	(136)	-
	113	147	(145)	-
	114	147	(144)	-
	115	155	(151)	-
	Mean	145	-	-
	N	5	-	-
900	116	141	(138)	-
	117	146	(148)	-
	118	141	(140)	-
	119	146	(145)	-
	120	149	(148)	-
	Mean	145	-	-
	N	5	-	-

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

*: Body weight loss when compared with the pre-administration value.

Table 2-3 Body weight - Individual values in males of SD rats

(g)

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	14
33	1	283	366	404
	2	270	331	356
	3	284	372	426
	4	276	346	391
	5	280	360	399
	Mean N	279 5	355 5	395 5
100	6	233	290	331
	7	241	273	303
	8	241	299	328
	9	240	293	316
	10	249	263	282
	Mean N	241 5	284 5	312 5
300	11	243	(236)	-
	12	239	(229)	-
	13	245	(229)	-
	14	231	(215)	-
	15	249	(240)	-
	Mean N	241 5	- -	- -
900	16	246	(242)	-
	17	233	(230)	-
	18	241	(242)	-
	19	231	(226)	-
	20	249	(249)	-
	Mean N	240 5	- -	- -

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

*: Body weight loss when compared with the pre-administration value.

Table 2-4 Body weight - Individual values in females of SD rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	14
33	101	185	220	237
	102	180	217	233
	103	185	229	241
	104	182	235	256
	105	186	217	235
	Mean N	184 5	224 5	240 5
100	106	186	(183)	-
	107	185	(181)	-
	108	179	205	221
	109	184	(180)	-
	110	193	222	245
	Mean N	185 5	214 2	233 2
300	111	176	(171)	-
	112	178	(172)	-
	113	187	(183)	-
	114	180	(172)	-
	115	193	(182)	-
	Mean N	183 5	- -	- -
900	116	183	(179)	-
	117	182	(179)	-
	118	178	(176)	-
	119	188	(188)	-
	120	190	(187)	-
	Mean N	184 5	- -	- -

(): Body weight at death, which was eliminated from the calculation for the mean value.

*: Body weight loss when compared with the pre-administration value.

Table 3 - 1 Clinical observation - Incidence of signs in males of Wistar Hannover rats

Clinical sign	33		100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk
Number of animals examined	-	5	2	3	5	-	5	-
No abnormalities detected	-	5	0	0	0	-	0	-
Prone position	-	0	0	0	4	-	5	-
Hunchback position	-	0	2	3	0	-	0	-
Coma	-	0	0	0	1	-	0	-
Sedation	-	0	2	3	5	-	5	-
Decrease in spontaneous motor activity	-	0	2	3	5	-	5	-
Loss of spontaneous motor activity	-	0	0	0	3	-	0	-
Muscle weakness	-	0	0	0	0	-	5	-
Bradypnea	-	0	1	3	5	-	5	-
Soiled fur in the perianal region	-	0	0	1	4	-	0	-
Loose stool	-	0	0	1	4	-	0	-
Salivation	-	0	0	0	4	-	0	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 3 - 2 Clinical observation - Incidence of signs in females of Wistar Hannover rats

Clinical sign	33		100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk
Number of animals examined	-	5	4	1	5	-	5	-
No abnormalities detected	-	5	0	0	0	-	0	-
Prone position	-	0	1	0	5	-	5	-
Hunchback position	-	0	4	1	1	-	0	-
Stupor	-	0	0	0	0	-	0	-
Coma	-	0	0	0	1	-	0	-
Sedation	-	0	2	0	5	-	5	-
Decrease in spontaneous motor activity	-	0	2	0	5	-	0	-
Loss of spontaneous motor activity	-	0	1	0	1	-	0	-
Muscle weakness	-	0	0	0	1	-	0	-
Bradypnea	-	0	2	0	2	-	5	-
Soiled fur in the perianal region	-	0	1	0	3	-	0	-
Loose stool	-	0	1	0	3	-	0	-
Salivation	-	0	1	0	1	-	2	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 3 - 3 Clinical observation - Incidence of signs in males of SD rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)								
	33		100		300		900		
Fate	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk	
Number of animals examined	-	5	-	5	5	-	5	5	-
No abnormalities detected	-	5	-	0	0	-	0	0	-
Prone position	-	0	-	2	3	-	5	5	-
Hunchback position	-	0	-	5	3	-	0	0	-
Sedation	-	0	-	4	5	-	5	5	-
Decrease in spontaneous motor activity	-	0	-	5	5	-	5	5	-
Muscle weakness	-	0	-	0	0	-	5	5	-
Bradypnea	-	0	-	2	3	-	5	5	-
Soiled fur in the perianal region	-	0	-	5	4	-	0	0	-
Loose stool	-	0	-	5	4	-	0	0	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 3 - 4 Clinical observation - Incidence of signs in females of SD rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)		100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk
Number of animals examined	-	5	3	2	5	-	5	-
No abnormalities detected	-	5	0	0	0	-	0	-
Prone position	-	0	0	0	0	-	5	-
Hunchback position	-	0	3	2	4	-	0	-
Sedation	-	0	1	0	1	-	5	-
Decrease in spontaneous motor activity	-	0	3	2	4	-	5	-
Bradypnea	-	0	0	0	2	-	5	-
Soiled fur in the perianal region	-	0	0	1	3	-	1	-
Loose stool	-	0	0	1	3	-	1	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 4 - 1 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in males of Wistar Hannover rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)							
	33		100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk
Number of animals examined	-	5	2	3	5	-	5	-
No abnormalities detected	-	5	0	3	0	-	0	-
Lung: Red in color	-	0	0	0	0	-	1	-
Stomach: Distended with liquid	-	0	2	0	5	-	0	-
Stomach: Distended with gas	-	0	2	0	5	-	0	-
Intestine: Red in color	-	0	0	0	4	-	4	-
Intestine: Edema	-	0	2	0	4	-	5	-
Liver: Red in color	-	0	0	0	2	-	0	-
Soiled fur: Perioral region	-	0	0	0	2	-	1	-
Soiled fur: Perianal region	-	0	1	0	5	-	0	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 4 - 2 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in females of Wistar Hannover rats

Site and Lesion	33		100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk
Dose (mg/kg)								
Fate								
Number of animals examined	-	5	4	1	5	-	5	-
No abnormalities detected	-	5	0	1	0	-	0	-
Lung: Red in color	-	0	3	0	3	-	1	-
Stomach: Distended with liquid	-	0	4	0	5	-	5	-
Stomach: Distended with gas	-	0	4	0	5	-	5	-
Intestine: Red in color	-	0	2	0	3	-	4	-
Intestine: Edema	-	0	1	0	4	-	5	-
Liver: Red in color	-	0	0	0	0	-	5	-
Soiled fur: Perioral region	-	0	2	0	3	-	2	-
Soiled fur: Perianal region	-	0	3	0	5	-	4	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 4 - 3 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in males of SD rats

Site and lesion	33		100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk
Dose (mg/kg)	33		100		300		900	
Fate								
Number of animals examined	-	5	-	5	5	-	5	-
No abnormalities detected	-	5	-	5	0	-	0	-
Lung: Red in color	-	0	-	0	1	-	5	-
Stomach: Distended with liquid	-	0	-	0	5	-	5	-
Stomach: Distended with gas	-	0	-	0	5	-	5	-
Intestine: Red in color	-	0	-	0	3	-	5	-
Intestine: Edema	-	0	-	0	5	-	4	-
Liver: Red in color	-	0	-	0	0	-	5	-
Soiled fur: Perioral region	-	0	-	0	2	-	3	-
Soiled fur: Perianal region	-	0	-	0	5	-	5	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

Table 4 - 4 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in females of SD rats

Site and lesion	33		100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk
<u>Dose (mg/kg)</u>								
<u>Fate</u>								
Number of animals examined	-	5	3	2	5	-	5	-
No abnormalities detected	-	5	0	2	0	-	0	-
Lung: Red in color	-	0	1	0	4	-	5	-
Stomach: Distended with liquid	-	0	3	0	5	-	5	-
Stomach: Distended with gas	-	0	3	0	5	-	5	-
Intestine: Red in color	-	0	1	0	1	-	5	-
Intestine: Edema	-	0	3	0	4	-	3	-
Liver: Red in color	-	0	0	0	1	-	5	-
Soiled fur: Perioral region	-	0	0	0	1	-	2	-
Soiled fur: Perianal region	-	0	1	0	5	-	4	-

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 16 年度分担研究報告書
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

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 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

ヒト皮膚三次元モデルを用いて CCA の皮膚腐食性を検索した。前培養した皮膚モデルに CCA を 3 分間および 60 分間暴露し、MTT 法により生存率を計算した。CCA の構成成分のうち、酸化クロムおよび酸化ヒ素では皮膚腐食性が認められた。CCA の皮膚腐食性は 3 分間暴露で陽性であり、60 分間暴露で疑陽性であった。本実験条件下において、CCA の皮膚腐食性は疑陽性ないし陽性の区分に相当すると判定された。

A. 研究目的

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、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）の皮膚腐食性を検索した。

B. 研究方法

試験方法は 2004 年 4 月 13 日付け経済協力開発機構の毒性試験指針「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In Vitro* Skin Corrosion - Human Skin Model Test」¹⁾ に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質および陽性対照物質

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。また、CCA の構成成分単剤についても検査対象とした。受領した被験物質は湿度 40% 以下の状態にて室温（許容範囲：15~30℃）で保管した。

陽性対照物質は、皮膚腐食性が確認されている 10%水酸化カリウム溶液（KOH、関東化学株式会社）を用いた。

2. 試験皮膚モデル

ヒト皮膚三次元モデル（EpiDermTM human skin model system、倉敷紡績株式会社）を用いた。ヒト皮膚三次元モデルは搬入後、使用時まで冷蔵庫にて保管した。本ヒト皮膚三次元モデルの EpiDermTM は米国の代替法検証組織の ICCVAM でインビトロの皮膚腐食性試験として検証された

モデル²⁾である。

3. 被験物質投与液の調製

50%濃度の CCA 懸濁液を投与前に調製した。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、注射用水（大塚薬品株式会社）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。懸濁後注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。

CCA の各構成成分についても調製した。酸化クロムは注射用水に溶解させ、50%濃度の水溶液を調製した。酸化ヒ素は注射用水を加えて超音波処理し、50%濃度の懸濁液を調製した。酸化銅はそのまま使用した。陽性対照物質の水酸化カリウム溶液は注射用水に溶解させ、10%濃度の水溶液を調製した。

4. 試験方法

試験実施に先立って、培養液にてヒト皮膚三次元モデル（以後、モデルと記載）を約1時間37℃で5%CO₂条件下にて前培養した。モデルの反応性を確認するため、陰性対照物質処置区と陽性対照物質処置区を設けた。陰性対照物質には注射用水を、陽性対照物質には10%水酸化カリウム溶液を用いた。

50%濃度に調製した CCA、酸化クロムおよび酸化ヒ素の 100 μL を各物質ごとに2個のモデルに処置した。酸化銅は 100 mg をそのまま2個のモデルに処置した。各処置物質の暴露時間は、3分間および60分間とした。暴露後、リン酸緩衝液（PBS、イ

ンピトロジェン株式会社）で洗浄した後、生細胞の定量化のため培養液に溶解させた 0.5 mg/mL 濃度の MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma 社) を 0.3 mL 加えて、37℃で3時間培養した。以上の37℃での培養は5% CO₂ インキュベーター（三洋電機（株））を用いた。培養後、PBS で洗浄し、イソプロパノール（和光純薬株式会社）を2 mL 加えてモデルを浸漬させ、冷暗所（4℃の冷蔵庫）で1晩静置し、MTT ホルマザンを抽出した。抽出液をよく攪拌し、浮遊物を遠心分離（1500rpm、5分、4℃）して取り除いた後、マイクロプレートリーダー（ナルジェヌンク株式会社）を用いて540 nm で吸光度を測定した。測定値より、以下の計算式を用いてモデル細胞の生存率を計算した。

$$\text{生存率(\%)} = (\text{処理モデルの吸光度} - \text{補正值吸光度}) / (\text{陰性対照群の吸光度} - \text{補正值吸光度}) \times 100$$

判定；各測定値の生存率から、皮膚腐食性を判定した。判定は OECD の試験ガイドライン 431 に示された基準³⁾に従った。すなわち、生存率が3分暴露50%未満もしくは60分暴露15%未満で皮膚腐食性が陽性と判定した。

C. 研究結果

1. 皮膚腐食性成績

皮膚腐食性成績を表1に示す。

CCA 処置によるヒト皮膚三次元モデル細胞の生存率は、3分暴露で48%、60分暴露で18%であった。この生存率の皮膚腐食性を判定した結果、3分暴露では皮膚腐食性が陽性、60分暴露では疑陽性（15%

付近)であった。

一方、酸化クロム処置よるヒト皮膚三次元モデル細胞の生存率は、3分暴露で10%、60分暴露で3%、酸化ヒ素では3分暴露で15%、60分暴露で6%、酸化銅では3分暴露で91%、60分暴露で84%であった。これらの結果から、CCAの各成分の皮膚腐食性は、酸化クロムおよび酸化ヒ素が陽性、酸化銅が陰性と判定された。

D. 考察

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤(CCA)の皮膚腐食性を検索した。その結果、3分暴露では皮膚腐食性が陽性、60分暴露では疑陽性(15%付近)であった。本試験において、3分間暴露で陽性反応が認められたことから、CCAの皮膚腐食性は陽性であると推測された。一方、CCAの構成成分のうち、酸化クロムおよび酸化ヒ素の皮膚腐食性は陽性であるものの、酸化銅の皮膚腐食性は陰性であった。

本試験において金属酸化物の複合体であるCCAの皮膚腐食性は、疑陽性ないし陽性の区分に相当すると判定された。

なお、陰性および陽性対照物質における皮膚腐食性は当研究所の管理範囲内であり、本試験の信頼性を保証するものであった。

E. 結論

ヒト皮膚三次元モデルを用いてCCAの皮膚腐食性を検索した。本実験条件下において、CCAの皮膚腐食性疑陽性ないし陽性の区分に相当すると判定された。

F. 引用文献

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In Vitro* Skin Corrosion - Human Skin Model Test. Adapted: April 13, 2004.
- 2) ICCVAM Evaluation of EPISKIN, Epiderm (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: In vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. Research Triangle Park, NC, National Institute of Environmental Health Sciences. June 2002.

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

表 1

	3分暴露		60分暴露		判定1	判定2
	吸光度	生存率 (%)	吸光度	生存率 (%)		
陰性対照	0.847	-	0.847	-		
陽性対照	0.197	23	0.105	12	+	+
CCA	0.407	48	0.155	18	+	-
酸化銅	0.775	91	0.708	84	-	-
酸化クロム	0.088	10	0.027	3	+	+
酸化ヒ素	0.129	15	0.048	6	+	+

判定1;+陽性(3分暴露時 生存率<50%)

判定2;+陽性(60分暴露時 生存率<15%)