

2005 01153A

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者	原田 孝則	財団法人	残留農薬研究所	毒性部
分担研究者	小坂 忠司	財団法人	残留農薬研究所	毒性部
	首藤 康文	財団法人	残留農薬研究所	毒性部
	松元 郷六	財団法人	残留農薬研究所	毒性部

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

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	1
原田孝則	

II. 分担研究報告

1. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける 急性経皮毒性試験	11
小坂忠司	
2. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のマウスにおける 皮膚感作性試験 (Local Lymph Node Assay)	19
小坂忠司	
3. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける 4週間反復経皮投与毒性試験	25
原田孝則	
4. 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)	65
首藤康文・小坂忠司	
5. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のSKH-1ヘアレスマウス における中期皮膚発がん性試験	135
原田孝則	
6. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) のラットにおける 急性経口毒性試験	175
小坂忠司	
7. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) のin vitroヒト皮膚 三次元モデルにおける皮膚腐食性試験	183
小坂忠司	

8. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の培養細胞を用いる
コメットアッセイ 187
松本郷六
9. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）のマウスを用いる
小核試験 197
松本郷六
10. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）のラットにおける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） 207
小坂忠司・首藤康文
11. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）のラットにおける
反復経皮投与毒性試験 283
原田孝則

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 17 年度総括研究報告書

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

主任研究者	原田 孝則	(財)残留農薬研究所	毒性部長
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
	首藤 康文	(財)残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室主任
	松元 郷六	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室長

研究要旨

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）及び CCA の代替剤として現在使用量の多い銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）を対象に種々の毒性試験を実施した。その結果、CCA ついては、ラットの急性毒性における半致死量（LD50）は、経口では OECD の GHS カテゴリー 3（50-300 mg/kg）に、経皮では カテゴリー 4（1000-2000 mg/kg）にそれぞれ位置した。皮膚感作性は陽性、皮膚腐食性は陽性・疑陽性、遺伝毒性は Ames 試験陽性、マウス小核試験疑陽性であった。ラットの反復経口・経皮投与試験では、100 mg/kg 前後が CCA の最大耐量（MTD）と考えられ、両経路とも血液、肝臓、腎臓、神経あるいは免疫系への影響がみられ、成熟及び幼若動物ともに同様な結果が得られた。マウスの中期皮膚発がんモデルでは、紫外線誘発皮膚発がんに対する CCA のプロモーション効果が確認された。一方、ACQ に関しては、ラットの急性経口毒性における LD50 の範囲は 300-1000 mg/kg で、OECD の GHS カテゴリー 4（300-2000 mg/kg）に位置した。ACQ の皮膚腐食性は陽性・疑陽性で、遺伝毒性に関しては、コメットアッセイ及び小核試験ともに陰性であった。ラットの反復経口投与試験では、200/100 mg/kg 群では血液、肝臓あるいは免疫系に影響がみられ、少数例ながら死亡例も観察されたことから、100 mg/kg 前後が最大耐量であると考えられた。なお、8 mg/kg は無毒性量と判定された。ラットの反復経皮投与試験では、ACQ は強い皮膚刺激性・腐食性を示すため 100mg/k 以上の用量は不適切であると結論された。

A. 研究目的

木材防腐剤は、家屋の土台、柱、テラス等の建築資材の他、公園の遊具、海岸遊歩道の栈橋などに広く利用されており、我々の生活環境において種々の経路を介して

ヒトに暴露される可能性がある。本研究では、木材防腐剤として使用される化学物質の毒性試験を実施し、リスク評価に必要な基礎的毒性情報を収集することを目的とした。平成 17 年度では、昨年度に引き続

きクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) ¹⁻⁴⁾ の毒性試験 (急性経皮毒性、皮膚感作性、反復経皮毒性、幼若動物を用いた反復経口毒性およびマウス中期皮膚発がんモデル試験) を継続するとともに、CCA の代替剤として現在広く使用されている銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) ⁵⁾ を対象に種々の毒性試験 (急性経口毒性、皮膚腐食性、遺伝毒性、反復経口毒性および反復経皮毒性試験) を実施した。

B. 研究方法

平成 17 年度では、被験物質としてクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) および銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) の 2 剤を対象に以下の毒性試験を実施した。CCA については昨年度と同じ薬剤配合種である CCA 2 号 (CCA-type B) ¹⁾ [構成成分配合比: 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%] を用いた。また、ACQ についても代表的薬剤配合種 [構成成分配合比: 酸化銅 (CuO , 純度 99.3%) 55.6% および塩化ベンザルコニウム (純度 50%) 44.4%] を被験物質として用いた。

1. CCA のラット急性経皮毒性試験

雌雄の Sprague-Dawley (Crj: CD(SD)) 系ラットを用いて、CCA の急性経皮毒性を検索した。各群 5 匹の動物に対し、雄は 2000 mg/kg の 1 用量、雌は 1000 および 2000 mg/kg の 2 用量を設定して、24 時間閉鎖経皮暴露し、その後 2 週間に亘り毎日動物の症状および死亡の有無を観察した。累積死

亡率に基づき半致死量 (LD50) の範囲を決定した。

2. CCA のマウス皮膚感作性試験

CCA の皮膚感作性試験を、8 週齢の CBA 系 SPF マウスの雌性動物を用いて、OECD の毒性試験指針 429 : Skin sensitization-Local Lymph Node Assay (LLNA 法) ⁶⁾ に従って実施した。投与群として、0、0.3、1、3、10% の 5 濃度の CCA を設定し、1 群 5 例のマウスを用いた。各濃度の CCA を 3 日間両耳後方に経皮投与し、2 日後に BrdU (200 mg/kg) 溶液を腹腔内投与した。2 時間後に両耳下リンパ節を摘出し、重量および細胞数を測定した。リンパ球細胞増殖活性は ELISA 法にて測定した。

3. CCA のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験

CCA の反復経皮投与試験における適用時間の差による影響を確認するため、SD 系雌性ラット (Crj: CD(SD)IGS) を用い、各群 6 匹の動物 (6 週齢) の背部皮膚 (5 cm x 5 cm) に、CCA を 0、10、100 および 300 mg/kg の用量で毎日 6 時間、4 週間に亘り反復投与し、昨年度 (平成 16 年度) の 1 日 24 時間暴露の実験結果と比較した。検査項目としては、臨床症状、死亡率、体重、摂餌量、眼検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、剖検および病理組織標本作製を行った。

4. CCA の幼若ラットにおける 4 週間反復経口投与毒性試験 (一般毒性及び神経・免疫毒性併合試験)

Wistar Hannover 系ラット

(BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) の幼若動物 (4 週齢) を用い、各群雌雄各 13 匹の動物に、CCA を 0、1、8 および 80 mg/kg の用量で 4 週間に亘り毎日強制経口投与し、一般毒性および神経・免疫系への影響を検索した。検査項目としては、一般毒性試験項目 (体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査) に加え、神経系への影響を配慮した詳細な臨床症状観察および神経機能検査ならびに免疫毒性を検出するための胸腺・脾臓の細胞数計測、フローサイトメトリー解析および免疫グロブリン抗体価の測定を行った。

5. CCA のマウス中期皮膚発がん性試験

米国 Charles River Laboratories (MA, U.S.A.) で生産された SKH-1 ヘアレスマウス (CrI: SKH1-*hrBR*) を用いて CCA の催腫瘍性を確認した。本系マウスは中波長紫外線 (UVB) 照射により高率に皮膚腫瘍を誘発することから、この特性を利用して CCA の UVB による皮膚発がんおよび影響を検索した。本試験では、9 週齢の雌性動物に週 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、皮膚腫瘍の数および大きさを毎週観察した。また、UVB 非照射群として無処置対照群および CCA 90 ppm 単独投与群も設けた。発生した皮膚腫瘍は全て病理組織学的に検索した。

6. ACQ のラット急性経口毒性試験

急性経口毒性を Wistar Hannover 系 (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) ラットを用いて検索した。各群 3 匹の雌性動物 (7 週齢) に ACQ を 100、300、1000 mg/kg の 3

用量設定し、単回強制経口投与した。投与後 2 週間に亘り毎日動物の症状を観察するとともに、死亡の有無を確認し、累積死亡率に基づき半致死量 (LD50) の範囲を決定した。

7. ACQ の in vitro 皮膚腐食性試験

動物を用いる皮膚腐食性試験の代替法として開発され、既にバリデーションの完了したヒト皮膚三次元モデル⁷⁾の市販キット (EpiDerm™ Human Skin Model System, 倉敷紡績株式会社) を用い、ACQ の皮膚腐食性を検索した。腐食性の評価は、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 法により培養細胞の生存率を算出することにより行った。

8. ACQ の培養細胞を用いるコメットアッセイ

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL を用い、ACQ のコメットアッセイを実施した。5000 µg/mL を最高用量とした用量設定試験 (細胞増殖抑制試験) の結果から、本試験の用量は 36.4~100 µg/mL とした。陽性対照群には 4-ニトロキノリン-1 オキシド (4-NQO) を 2 µM で処理した。各用量で 1 時間処理した後、細胞を寒天に包埋してスライド標本とし、pH13 にて電気泳動を行った。各用量あたり 200 個の細胞核を観察し、% Migrated DNA, Tail Length, Tail Moment を求めた。

9. ACQ のマウスを用いる小核試験

ACQ の哺乳動物に対する染色体異常誘発性を検索するため、マウス小核試験を実施した。供試動物として ICR 系マウス

(CrIj:CD1)の雄性動物(7週齢)を用い、ACQを37.5、75および150 mg/kgの3用量で各群5匹の動物に単回強制経口投与した。陽性対照群にはマイトマイシンCを10 mg/kgの用量で同様に経口投与した。投与24時間後に全群から、また、投与48時間後には高用量群から骨髓塗末標本を作製し、多染性赤血球2000個中の小核出現頻度を求めた。

10. ACQのラット4週間反復経口投与毒性試験(一般毒性及び神経・免疫併合試験)

Wistar Hannover系ラット(BrlHan:WIST@Jcl[GALAS])を用い、各群雌雄各10匹の動物に、ACQを0、8、40および200(雄)/100(雌) mg/kgの用量で、4週間に亘り毎日強制経口投与し、一般毒性および神経・免疫系への影響を検索した。検査項目としては、一般毒性試験項目(体重、摂餌量、眼検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査)に加え、神経系への影響を配慮した詳細な臨床症状観察および神経機能検査ならびに免疫毒性を検出するための胸腺・脾臓の細胞数計測、フローサイトメトリー解析および免疫グロブリン抗体価の測定を行った。

11. ACQのラット反復経皮投与毒性試験

雌雄のSD系雌性ラット(Crj:CD(SD)IGS)を用い、各群8匹の動物(6週齢)の背部皮膚(5 cm x 5 cm)に、ACQを0、10、100および300 mg/kgの用量で毎日24時間、13週間に亘り反復投与し、臨床症状、死亡率、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する予定であった。しかし、投与開始後3週間

経過した時点で中・高用量群の適用部位における皮膚の状態が悪化したため、投与4週時に投与を中止し、動物愛護の観点から試験を終了した。

C. 研究結果及び考察

1. CCAのラット急性経皮毒性試験

SD系ラットを用いて、CCAの急性経皮毒性を検索した。各群5匹の動物に対し、雄は2000 mg/kgの1用量、雌は1000および2000 mg/kgの2用量を設定して、24時間閉鎖経皮暴露した。その結果、死亡率は雄2000 mg/kg投与群で0/5、雌1000 mg/kg投与群で0/5、雌2000 mg/kg投与群で5/5(全例死亡)であった。従って、本実験条件下におけるCCAの急性経皮毒性は、OECDの定めるGHSカテゴリーの4(1000-2000 mg/kg)と判定され、毒物劇物法の分類では普通物に相当するLD50値の範囲であると結論された。

2. CCAのマウス皮膚感作性試験

CCAの皮膚感作性試験を、8週齢のCBA系マウスの雌性動物を用いて、OECDの毒性試験指針429: Skin sensitization- Local Lymph Node Assay (LLNA法)⁶⁾に従って実施した。投与群として、0、0.3、1、3、10%の5濃度のCCAを設定し、1群5例のマウスを用いた。各濃度のCCAを3日間両耳後方に経皮投与し、2日後にBrdU(200 mg/kg)溶液を腹腔内投与した。2時間後に両耳下リンパ節を摘出し、重量および細胞数を測定した。リンパ球細胞増殖活性はELISA法にて測定した。その結果、CCAの3および10%投与群において、リンパ節重量および細胞数の増加が観察された。リン

パル細胞増殖活性検査では、CCA 0.3%以上の全投与群にて、用量相関性の細胞増殖活性の増加が認められた。これらの結果から、CCA の皮膚感作性は、陽性であると結論された。

3. CCA のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験

CCA の反復経皮投与試験における適用時間の差による影響を確認するため、CCA を 0、10、100 および 300 mg/kg の用量で SD 系雌性ラットの背部皮膚に毎日 6 時間、4 週間に亘り反復投与し、昨年度（平成 16 年度）の 1 日 24 時間暴露の実験結果と比較した。その結果、300 mg/kg 投与群では自発運動の減少、歩行異常あるいは後肢麻痺が認められ、投与 12 日までに全例が死亡した。100 mg/kg 投与群では、死亡例はなかったが、適用部位の皮膚にびらん・潰瘍が観察され、貧血、白血球増多症、低蛋白血漿および血清 AST、トリグリセライド、カリウムの上昇認められた。また、同群では肝・腎・脾の重量増加がみられ、脳重量が減少傾向を示した。これらの変化は、おそらく CCA の主要成分であるヒ素あるいはクロムの毒性作用⁸⁻¹⁰)に起因するものと推察した。10 mg/kg 投与群では、CCA 投与に関連づけられる異常は特に認められなかった。今回認められた毒性変化は、平成 16 年度に実施した反復経皮投与試験（適用時間：24 時間/日）の結果と比較し、程度的には軽減される傾向にあったが、質的にはほぼ一致し、適用時間の差（6 時間 vs 24 時間）による影響は比較的小さいことが確認された。

4. CCA の幼若ラットにおける 4 週間反復経口投与毒性試験（一般毒性及び神経・免疫毒性併合試験）

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 投与群の雌雄および 8 mg/kg 投与群の雄で活動性の減少が観察された。加えて、80 mg/kg 投与群の雌では、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 投与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 投与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。これらの結果は、昨年度の成熟ラットを用いた実験結果と一致し、CCA を幼若ラットに反復経口投与した場合においても、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。なお、1 mg/kg 投与群では毒性影響は特に認められなかった。

5. CCA のマウス中期皮膚発がん性試験

CCA の催腫瘍性を確認するため、SKH-1 ヘアレスマウスを用い、雌性動物の皮膚に紫外線（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 週間混餌経口投与し、UVB 照射誘発皮膚発がんに対する CCA 投与の影響の有無について検索した。その結果、CCA 投与群では、用量依存性に皮膚腫瘍の発生（数および大

きさともに)が増加し、病理組織学的にも悪性度の高い低・中分化型扁平上皮癌が観察された。皮膚の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(DNAの酸化ストレスマーカー)の増加が認められた。以上の結果から、CCAはUVB誘発皮膚癌を促進することが判明し、その効果は構成成分のヒ素あるいはクロムの作用^{11,12)}に起因するものと推察した。また、そのプロモーション作用には酸化的DNA傷害が関与している可能性が示唆された。

6. ACQのラット急性経口毒性試験

Wistar系ラットの雌性動物を用いて、銅・ACQの急性経口毒性を検索した。各群3匹の動物を使用し、ACQを100、300、1000 mg/kgの3用量設定し、単回強制経口投与した。試験の結果、LD50値の範囲は、300~1000mg/kgであり、OECDの定めるGHSカテゴリーの4(300-2000mg/kg)に位置し、毒物劇物法の分類では普通物に相当するLD50値の範囲であると結論された。

7. ACQのin vitro皮膚腐食性試験

ヒト皮膚三次元モデル(in vitro)を用いて、ACQ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。ACQの皮膚腐食性は3分間暴露で陽性であり、60分暴露で擬陽性であった。本実験条件下において、ACQは腐食性陽性ないし強度刺激性の区分に相当すると判定された。

8. ACQの培養細胞を用いるコメットアッ

セイ

ACQのDNA損傷誘発性を調査するため、培養細胞を用いるコメットアッセイを行った。ACQ処理により、観察可能な用量の最高用量群においてのみDNA損傷細胞の有意な増加が認められた。しかし、細胞毒性が観察されており、さらに上の用量では毒性により観察不能であったことから、これらのDNA損傷は、被験物質の細胞毒性に起因する二次的な作用の可能性が考えられた。よって、ACQの培養細胞に対するDNA損傷誘発性は陰性と判断された。

9. ACQのマウスを用いる小核試験

ACQの哺乳動物に対するin vivo染色体異常誘発性を調査するため、マウスを用いる小核試験を行った。最大耐量である150 mg/kgを最高用量に、中用量(75 mg/kg)および低用量(37.5 mg/kg)を設定し、単回の強制経口投与を行った。投与24および48時間後に骨髓塗抹標本作製し、多染性赤血球中の小核出現頻度を求めた。顕微鏡観察の結果、ACQのマウス骨髓における小核誘発性は陰性であり、in vivo染色体異常誘発性は無いものと判断された。

10. ACQのラット4週間反復経口投与毒性試験(一般毒性及び神経・免疫併合試験)

ACQのラットにおける一般毒性、神経毒性および免疫毒性を検索するため、ACQを、0、8、40および200(雄)/100(雌) mg/kgの用量で、雌雄のWistar系ラットに4週間に亘り毎日強制経口投与した。その結果、高用量群(雄では投与5日以降100mg/kgに減少)では雌雄ともに一般状態の悪化に伴い少数例ながら死亡がみられた。同群の生

存動物では、雌雄ともに低蛋白血症及び肝臓の酸化ストレス (8-OHdG) の増加が観察され、雄では体重増加抑制、貧血、T 細胞数の減少、小腸腔拡張及び肝臓の逸脱酵素 (ALT/AST) の上昇が認められた。中用量群では、雄に血漿蛋白の減少が観察された。低用量群では、ACQ 投与に関連づけられる異常は特に認められなかった。これらの結果から、高用量の ACQ に暴露されると血液、肝臓あるいは免疫系に影響を受ける可能性が示唆された。また、本実験条件下では 100 mg/kg 前後が最大耐量 (MTD) であり、8 mg/kg は無毒性量 (NOAEL) と判定された。

11. ACQ のラット反復経皮投与毒性試験

ACQ の反復経皮投与毒性を明らかにするため、雌雄の SD 系ラットを用い、各群 8 匹の動物の背部皮膚に ACQ を 0、10、100 及び 300 mg/kg の用量で毎日 24 時間適用し、13 週間に亘り反復経皮投与する予定で実験が開始された。しかし、100 および 300 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 5 日以降に適用部位の皮膚状態が悪化し、投与 3 週時には出血あるいは重度のびらん・潰瘍が観察されたため、倫理上 (動物愛護) の観点から 4 週時に投与を中止し、試験を終了した。ACQ には主要成分として塩化ベンザルコニウムが含まれており、今年度に並行して実施した皮膚腐食性試験 (ヒト皮膚三次元モデル) の結果から、強い皮膚刺激性および腐食性が示唆されたことから、反復投与試験では 100 mg/kg 以下の低い用量で試験群を設定することが適切であると結論された。

D. 結論

CCA および ACQ を対象に種々の毒性試験を実施した。その結果、CCA ついては、ラットの急性毒性における半致死量 (LD50) は、経口では OECD の GHS カテゴリー 3 (50-300 mg/kg) に、経皮では カテゴリー 4 (1000-2000 mg/kg) にそれぞれ位置した。皮膚感作性は陽性、皮膚腐食性は疑陽性・陽性、遺伝毒性は Ames 試験陽性、マウス小核試験疑陽性であった。ラットの反復経口・経皮投与試験では、100 mg/kg 前後が CCA の最大耐量 (MTD) と考えられ、両経路とも血液、肝臓、腎臓、神経あるいは免疫系への影響がみられ、成熟及び幼若動物ともに同様な結果が得られた。マウスの中期皮膚発がんモデルでは、紫外線誘発皮膚発がんに対する CCA のプロモーション効果が確認された。一方、ACQ に関しては、ラットの急性経口毒性における LD50 の範囲は 300-1000 mg/kg で、OECD の GHS カテゴリー 4 (300-2000 mg/kg) に位置し、皮膚腐食性は陽性・疑陽性で、遺伝毒性に関しては、コメットアッセイ及び小核試験ともに陰性であった。ラットの反復経口投与試験では、血液、肝臓あるいは免疫系への影響がみられ、100 mg/kg 前後が最大耐量であり、8 mg/kg は無毒性量と判定された。ラットの反復経皮投与試験では、ACQ は強い皮膚刺激性・腐食性を示すため 100mg/k 以上の用量は不適切であると結論された。

E. 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) 日本工業規格:木材防腐剤に関する基準 JIS K 1570、2004.
 - 6) Dean JH, et al. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, Regulatory Toxicology and Pharmacology 34,258-273 2001
 - 7) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In vitro* Skin Corrosion – Human Skin Model Test, 2004.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) Hostynek JJ, Hinz RS, Lorence CR, Price M, and Guy RH: Metals and the skin. Critical Reviews in Toxicology, 23(2): 171-235, 1993
 - 11) 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.
 - 12) 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.
- F. 研究発表
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
(1) 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）

（2）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。

G. 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

平成 17 年度分担研究報告書

1. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける急性経皮毒性試験

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
協力研究者 上田英夫 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室主任
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

SD 系ラットを用いて、CCA の急性経皮毒性を検索した。各群 5 匹の動物に対し、雄は 2000 mg/kg の 1 用量、雌は 1000 および 2000 mg/kg の 2 用量を設定して、24 時間閉鎖経皮暴露した。その結果、死亡率は雄 2000 mg/kg 投与群で 0/5、雌 1000 mg/kg 投与群で 0/5、雌 2000 mg/kg 投与群で 5/5（全例死亡）であった。従って、本実験条件下における CCA の急性経皮毒性は、OECD の定める GHS カテゴリーの 4（1000-2000 mg/kg）と判定され、毒物劇物法の分類では普通物に相当する LD50 値の範囲であると結論された。

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）の急性毒性を検索した。

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」の「毒性に関する試験成績を作成するに当たっての指針」¹⁾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湿度 40%以下の状態にて室温（許容範囲：15～30℃）で保管した。

2. 試験動物

日本チャールスリバー株式会社厚木飼育センターで生産された Sprague-Dawley 系 SPF ラット（CrI:CD(SD)）の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに 5.5 週齢にて

購入し、13 日間試験環境に馴化した後、8 週齢にて試験に供試した。馴化期間中毎日一般状態を観察した。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飼育した。馴化終了後、各用量群に雌雄 5 匹ずつ配分した。飼料には保証飼料である固型飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製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

予備試験として、雄に 2000mg/kg、雌に 1000mg/kg の CCA を 24 時間閉鎖経皮暴露し、その反応を 7 日間観察した。結果、雌雄ともに死亡例は認められなかったものの、雌において、投与 7 日目に体重減少および剖検所見として、腎臓の腫大および類白色斑散在が認められた。よって、この試験成績に基づき、雄は 2000mg/kg の 1 用量を、雌では 1000 および 2000mg/kg の 2 用量を設定した。1 用量につき雌雄とも 5 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量（1000 および 2000mg/kg）の被験物質投与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。投与容量は 4mL/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。

5. 投与方法

投与の前日に、動物の背部中央を電気バリカンにて剪毛した。被験物質投与液は、粘着シートに載せたパッド（オカモト MS パット；三共株式会社）の上に、所定量均質に広げた。準備したパッドを被験物質が接するように動物に貼り、さらに胴体をサージカルテープで巻いた。暴露時間は、24 時間とした。暴露終了後、張付け部位に残存する被験物質は、微温湯でできる限り除去した。

6. 臨床症状の観察

投与当日は投与後 1 および 4 時間後に、翌日から観察期間終了時までには 1 日 1 回、死亡の有無および動物の外貌、外皮、姿勢、行動、呼吸、意識、神経症徴候、体温、排泄等について詳細に観察した。観察期間は投与後 14 日間とした。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7、14 日および死亡発見時に個体別に測定した。

8. 剖検

死亡動物は発見時に、観察期間終了時（投与後 14 日）の生存動物はエーテル麻酔により安楽死させ、解剖して肉眼的異常の有無

を検索した。

9. 半数致死量 (LD50 値) の算出

観察終了時 (投与後 14 日間) までの累積死亡率に基づき、雌雄それぞれの LD50 値の範囲を決定した。

C. 研究結果

1. 死亡率および LD50 値

死亡率を表 1 に示す。

累積死亡率は、雄の 2000mg/kg 投与群が 0/5、雌の 1000mg/kg 投与群が 0/5、2000mg/kg 投与群が 5/5 (全例死亡) であった。これらの死亡率に基づいた LD50 値の範囲は、雄では 2000 mg/kg 以上、雌では 1000 ~2000 mg/kg であると考えられた。

2. 体重測定

体重測定結果を表 2 に示す。

雄では投与後 7 および 14 日目の測定では、全生存例で投与前の値と比べて順調に増加していた。雌では、7 日目に 1 例体重減少が認められたが、14 日目には全例増加した。

3. 臨床症状

臨床症状の結果を表 3 に示す。

雌において、削瘦、腹臥位、円背位、混迷、沈静、自発運動の消失、痙攣、振戦、努力性呼吸、体温低下、皮膚色蒼白化、鼻吻部被毛の汚れ、背部痂皮 (暴露部位) および眼瞼下垂が認められた。雄では、毒性徴候を示す臨床症状は認められなかった。

4. 剖検所見

剖検所見を表 4 に示す。

雌に認められた死亡例の肉眼的所見として、胸水貯留、胃の液状貯留物、腸管および大腸の黒色内容物、肝臓の腫大および類白色点散在、腎臓の退色、腹水貯留、副腎の腫大、外陰部被毛の汚れおよび投与部位の皮下血管新生あるいは発赤が認められた。観察終了時 (投与 14 日) に行った生存動物の剖検では、雌の 1000mg/kg 投与群で腎臓の腫大および退色が認められた。雄では、肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

CCA の急性経皮毒性を検索するために、SD 系雌雄ラットについて検索した。雌では、被験物質暴露部位に痂皮形成および皮下の血管新生あるいは発赤が認められた。その他の臨床症状として、一般状態の悪化時を示す、削瘦、腹臥位、円背位、混迷、沈静、自発運動の消失、努力性呼吸、体温低下、皮膚色蒼白化、鼻吻部被毛の汚れおよび眼瞼下垂等が、神経症状として振戦および痙攣等が観察された。死亡例の剖検では、消化管の変化、肝臓の腫大、腎臓の退色が認められた。観察終了時の動物においても、腎臓の退色および腫大が認められた。このことから、腎臓の変化は、CCA 投与に起因することが示唆された。一方、雄動物には、毒性徴候を示す臨床症状および死亡は認められなかった。

累積死亡率は、LD50 値の範囲は、雄で 2000mg/kg 以上、雌で 1000~2000 mg/kg であった。このことから、CCA の急性経皮毒性は、雌雄差が認められ、雌性で高感受性であった。

CCA のラットにおける急性経皮毒性は、

OECD（経済協力開発機構）の定める GHS（Globally Harmonised System）カテゴリ 1-2 の 4（LD50 値は 1000-2000 mg/kg）と判定され、毒物劇物法の分類では普通物に相当する LD50 値の範囲であった。

3. その他
なし

E. 結論

本実験条件下において、CCA の急性経皮毒性は OECD の定める GHS カテゴリの 4 と判定され、毒物劇物法の分類の普通物に相当する LD50 値の範囲であると結論された。

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) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 434: Acute dermal Toxicity - Fixed dose procedure. Adapted: May 14, 2004.(1st version)

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

Table 1 Mortality

Sex	Dose (mg/kg)	Time after administration										Final mortality	
		1	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-14 days		
Male	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5 ^a
Female	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5
	2000	0	0	4	0	0	0	0	0	1			5 / 5

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

Table 2 Clinical observation - Incidence of signs in rats

Clinical sign	Sex		Male		Female			
	Dose (mg/kg)	Fate	2000		1000			
			fd	tk	fd	tk		
No. of animals examined			0	5	0	5	5	0
No abnormalities detected			-	5	-	1	0	-
Emaciation			-	0	-	1	1	-
Prone position			-	0	-	0	1	-
Hunchback position			-	0	-	4	5	-
Stupor			-	0	-	0	1	-
Sedation			-	0	-	0	5	-
Loss of spontaneous motor activity			-	0	-	0	1	-
Convulsion			-	0	-	0	1	-
Tremor			-	0	-	1	0	-
Labored respiration			-	0	-	0	1	-
Hypothermia			-	0	-	0	5	-
Pale-colored skin			-	0	-	0	1	-
Soiled fur in the nasorostral region			-	0	-	1	0	-
Scab in the dorsal region(patch area)			-	0	-	1	0	-
Ptosis			-	0	-	1	5	-

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

Table 3 Body weight - Individual values in rats

(g)

Sex	Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
				7	14
Male	2000	1	286	334	377
		2	274	327	391
		3	251	293	339
		4	264	314	355
		5	249	292	342
		Mean	265	312	361
		N	5	5	5
Female	1000	101	224	245	258
		102	209	191	241
		103	202	221	253
		104	196	232	254
		105	188	191	231
		Mean	204	216	247
	N	5	5	5	
	2000	106	215	(210)	
		107	205	(196)	
		108	201	(160)	
		109	197	(189)	
110		191	(183)		
Mean	202				
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.

N: Number of animals examined.

Table 4 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in rats

Site and lesion	Sex		Male		Female			
	Dose (mg/kg)	Fate	2000		1000			
			fd	tk	fd	tk		
No. of animals examined			0	5	0	5	5	0
No abnormalities detected			-	5	-	4	0	-
Thoracic cavity: Hydrothorax			-	0	-	0	1	-
Stomach: Distended with liquid			-	0	-	0	1	-
Intestine: Black contents			-	0	-	0	1	-
Large intestine: Black contents			-	0	-	0	1	-
Liver: Enlargement			-	0	-	0	4	-
Liver: Off-white spots			-	0	-	0	4	-
Kidney: Pale in color			-	0	-	1	1	-
Kidney: Enlargement			-	0	-	1	0	-
Abdominal cavity: Ascites			-	0	-	0	1	-
Adrenal gland: Enlargement			-	0	-	0	1	-
Soiled fur in the external genital region			-	0	-	0	4	-
Subcutaneous vascularization/hyperemia in the dorsal region (patched area)			-	0	-	0	4	-

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