

Table 3 Body weight - Individual values in female rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	(g)	
			Days after administration	
			7	14
100	1	124	159	177
	2	119	155	174
	3	117	146	161
	Mean	120	153	171
	N	3	3	3
300	4	122	(106)	
	5	118	153	153
	6	116	148	148
	Mean	119	151	151
	N	3	2	2
1000	7	119	(120)	
	8	117	(111)	
	9	115	(111)	
	Mean	117		
	N	3		

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

N: Number of animals examined.

Table 4 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)					
	100		300		1000	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	3	1	2	3	0
No abnormalities detected	-	3	0	2	0	-
Stomach: Red/black contents	-	0	1	0	3	-
Stomach: Distended with gas	-	0	1	0	3	-
Intestine: Distended with liquid	-	0	1	0	3	-

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

厚生労働省化学研究費補助金（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

平成 17 年度分担研究報告書

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

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 (*in vitro*) を用いて、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（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。

A. 研究目的

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、現在使用量の多い代表的木材防腐剤である銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）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

本試験の被験物質は、銅・アルキルアン

モニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）であり、銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅（Ⅱ価、純度 99.3%、関東化学（株））55.6%およびアルキルアンモニウム（塩化ベンザルコニウム、純度 50%、和光純薬工業（株）/Avocado Research Chemicals Ltd）44.4%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。

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（EpiDerm™

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 EpiDerm™ 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 ACQ 懸濁液を投与前に調製した。投与液の調製に際し、成分ごとの純度による調製濃度の換算をして実施した。所定量の銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水(大塚製薬株式会社)を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。陽性対照物質の水酸化カリウム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°C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、陰性対照群処置区と陽性対照群処置区を設けた。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%に調製したACQおよびを100 μLずつ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、インビ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-diphen-

yltetrazolium bromide、Sigma社)を0.3 mL 加えて、37°Cで3時間培養した。以上の37°C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°Cの冷蔵庫)で1晩(約15時間)静置し、MTTホルマザンを抽出した。抽出液をよく攪拌し、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。

生存率(%)=(処理モデルの吸光度-補正值吸光度)/(陰性対照群の吸光度-補正值吸光度)×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要請と判定した。

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。

ACQ 処置によるヒト皮膚三次元モデル細胞生存率は、3分暴露で40.8%、60分暴露で35.9%であった。この生存率の皮膚腐食性を判定した結果、3分暴露では陽性、60分暴露では疑陽性(50%未満)であった。

D. 考察

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、皮膚刺激性を検索した。その結果、3分暴露では

皮膚腐食性と判定された。一方、60分暴露では、疑陽性（50%未満）であった。この反応は、Sodium lauryl sulfate (SLS) と同程度の反応性であり³⁾、強度の刺激性が示唆された。本試験条件下において銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) は腐食性陽性あるいは強度の刺激性物質の区分に相当すると判定された。

E. 結論 ヒト皮膚三次元モデルを用いて ACQ の皮膚腐食性を検索した。本実験条件下において、ACQ の皮膚腐食性ないし強度刺激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.
- 3) Prediction of Human Skin Irritancy Using a Cultured Human Skin Model: Comparison of Chemical Application Procedures and Development of a Novel Chemical Application Procedure Using the Vitorlife-skin model. Noriyuki M, Katsuyasu M, Shin-ichiro M, Hajime K, Satoru N,

and Hiroaki K. Altern. Animal Test Experiment. Prediction of Human Skin Irritancy. 9(1), 1-10 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 皮膚腐食性成績

	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 (%)		
陰性对照	0.893	-	0.883	-		
陽性对照	0.284	31.8	0.132	14.9	+	+
ACQ	0.364	40.8	0.317	35.9	+	-

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%)

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

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

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長
協力研究者 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

研究要旨

銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（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。

A. 研究目的

国内で使用される木材防腐剤として過去に最も多かったものはクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）であったが、環境への汚染が懸念され、現在は CCA に代わって銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）が多く使用されている。ACQ は毒性の分類では「普通物」に属しているが、遺伝毒性に関する詳細な報告は見当たらない。そこで、DNA 損傷誘発性の有無を調査するため、培養細胞を用いるコメットアッセイを行った。

B. 研究方法

試験は Hartmann らのガイドライン¹⁾および Sasaki らの方法²⁾を参考に、Helma らの³⁾画像解析ソフトを用いて、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

被験物質 ACQ は以下の 2 化合物の混合物である。各構成成分の配合比は以下の通りであった。

酸化銅（II）	55.6%
塩化ベンザルコニウム	44.4%

構成成分-1

名称： 酸化銅（Ⅱ）
ロット番号： 204G1471
純度： 99.3%
受領日： 2004年9月29日
保存条件： 室温
保存場所： 財団法人残留農薬研究所免疫毒性実験室
試薬保管庫（許容範囲：15～30℃

構成成分-2

名称： 塩化ベンザルコニウム
ロット番号： C6331A
含量： 50%
受領日： 2005年9月29日
保存条件： 室温
保存場所： 財団法人残留農薬研究所神経毒性実験室
試薬保管庫（許容範囲：15～30℃

2. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL⁴ を用いた。供試細胞は、37℃、5% 二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガスインキュベーターで組織培養用ファルコンプレートをを用いて培養した。培養液は、新生仔牛血清（Gibco BRL）10%を含むイーグル MEM 培地（Gibco BRL、pH 指示薬フェノールレッド含有）を用いた。

3. 被験物質懸濁液の調製

被験物質懸濁液の調製には 0.5%メチルセルロース（信越化学工業株式会社）水溶液

を用いた。まず始めに、被験物質懸濁液を調製するため、所定量の酸化銅を秤量し、さらに所定量の塩化ベンザルコニウムを加えた。そこに溶媒を加え懸濁させた。懸濁後、段階希釈により低濃度の被験物質懸濁液を調製した。コメットアッセイ本試験の調製濃度は薄いため、50 mg/mL の懸濁液を作製後、50 倍に希釈した後、段階希釈を行った。なお、調製の際、成分ごとに純度補正を行った。

4. 陰性対照および陽性対照

陰性対照（溶媒対照）物質として 0.5%メチルセルロース水溶液を用いた。陽性対照物質として 4-NQO（4-ニトロキノリン-1 オキシド、和光純薬工業株式会社）をジメチルスルホキシド（和光純薬工業株式会社）に溶解させて用いた。

5. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験は 5000 µg/mL を最高用量とし、公比 2 で 9 用量を設定した。陰性（溶媒）対照群には溶媒のみを 10%添加した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートをを用いた。

細胞を 1×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 6 cm プレートに播種し、48 時間培養した。被験物質懸濁液を 1 時間処理した。

各処理法とも培養終了後に培地を捨て、PBS で二回洗浄し、エタノールで 5 分間固定し、5%ギムザ液（メルク社製ギムザ液を pH 6.8 リン酸緩衝液で希釈）にて 30 分間（室温）染色した。染色後、単層培養細胞密度計（オリンパス光学株式会社）を用いて細胞密度を計測し、溶媒対照群に対する細胞増殖率を求めた。

6. コメットアッセイ

組織培養用 10 cm プレートに細胞を播種した。培養液量は 10 mL とした。48 時間後、種々の濃度の被験物質懸濁液を最終培地濃度が 10% となるよう添加した。ただし陽性対照は 1% となるよう添加した。被験物質添加から 1 時間後、培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄後、スライド標本を作製した。

7. スライド標本の作製

プロナーゼ（科研製薬株式会社）により細胞を回収した後、上清を棄てた後、適量のホモジナイズ液 (75mM NaCl, 30mM EDTA2Na) で細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液と Low melting point agar (ナカライテスク株式会社) を混和し、細胞を含んだ寒天を、あらかじめ Normal melting point agar (ナカライテスク株式会社) をコーティングしておいたスライドガラス上に均等に広げた。冷却により寒天を固めた後、冷却した細胞溶解液 (2.5M NaCl, 100mM EDTA2Na, 10mM Tris base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH10) に浸した。1 シャーレあたり 2 枚のスライド標本を作製した。細胞溶解液に一時間以上浸した後、電気泳動槽 (株式会社マリソル) 上で、4°C に冷却した電気泳動液 (300mM NaOH, 1mM EDTA2Na, pH >13) により、スライドガラスを 20 分間浸し、冷蔵暗所でアンワインディングを行った。その後直ちに電気泳動を開始した。泳動条件は 25V, 270~300mA, 4°C, 20 分, 暗所であった。電気泳動が終了したら、冷却した中和液 (Tris base pH7.5) に 5 分浸し、過剰なアルカリを中和した。処理が終了したらスライドガラスをエタノールに浸し、脱水し、エチジウムブロマイ

ド (20 µg/mL) で染色し観察した。

8. コメット像の分析

各スライドガラスあたり 50 個、各濃度あたり 200 個のコメット像を顕微鏡観察した。計測したパラメーターは % Migrated DNA, Tail Length, Tail Moment であった。

9. コメットアッセイの統計解析

陰性対照群と処理群の間で One-way Anova を用いた。被験物質投与群に有意な差が認められた場合は Dunnett の多重検定を行った。陰性対照群と陽性対照群は Aspin-Welch の t 検定を行った。なお、いずれの検定法も有意水準を 5% 以下に設定した。

10. 倫理面への配慮

本研究は培養細胞を材料とした *in vitro* 実験研究であり、人や動物を研究対象として用いていないため、人権擁護や動物愛護などの観点において倫理上の問題は全くない。

C. 研究結果

1. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験の結果を Table1 に示す。さらに用量と細胞増殖率との関係を Figure1 に示す。

39.1 µg/mL 以上の濃度で析出が認められた。また 78.1 µg/mL では増殖率が 65%、156 µg/mL の濃度では増殖率が 24% となりそれ以上の濃度では細胞は死滅していたと考えられた。なお、細胞死と析出の影響により 313 µg/mL 以上の濃度では、用量と細胞増殖率との相関性は認められな

った。

以上の結果から、コメットアッセイの最高用量は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

2. コメットアッセイ

結果を Table2 に示し、観察したスライドグラスの結果を Appendix1 に示す。その結果、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では、強い細胞毒性により観察が不可能であった。次に濃度が高い 71.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では溶媒対照群に比べて Tail length および Tail moment に有意な増加が認められた。その他の用量群では有意な差は認められなかった。一方、陽性対照群 (4NQO) では、有意に高い値が得られた。

D. 考察

ACQ 処理により、観察可能な用量の最高用量群 (71.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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、この用量では増殖抑制と、細胞の変形が観察された。よって細胞毒性による DNA 損傷の可能性も考えなければならない。

細胞死と DNA 損傷は関連があるため、コントロールと比べ 30%以上細胞生存率が低下する用量での試験結果は一般的に避けられてきた ⁵⁾との報告がある。増殖抑制試験において 71.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 付近の結果は 65%の細胞増殖率である (濃度 78.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。コメットアッセイにおける 71.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度においても 65%程度の細胞増殖率が起こっていたと考えられる。また、細胞増殖率が 70%以上と考えられる 51, 36.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では DNA 損傷は観察されていない。したがって、71.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での DNA 損傷は、被験物質の細胞毒性に起因する二次的な作用と考えられる。

また、ACQ は銅(II)と塩化ベンザルコニウムからなる混合物であるので、両物質にも遺伝毒性がどうか文献的に調査した。まず銅(II)であるが、大腸菌を用いた DNA 損傷試験 (Rec-assay) が陰性であり ⁶⁾、また哺乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験でも陰性である ⁷⁾。しかし、*in vitro* 染色体異常誘発性や *in vivo* 小核誘発性に関する報告はこれまでのところ無い。

次に塩化ベンザルコニウムであるが、ネズミチフス菌 TA100 と TA98 株を用いた復帰突然変異試験が実施されており (最高用量 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$)、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった ⁸⁾。また、ネズミチフス菌 TA1535/pSK1002 株を用いた *umu* 試験も実施されている ⁹⁾。最高用量は 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった。*in vitro* 染色体異常誘発性に関してはシリアンハムスター胎児培養細胞を用いて検討されている ¹⁰⁾。0.8 - 30 μM (0.3 - 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の濃度で 24 時間連続処理を行ったところ、染色体異常の誘発は認められていない。したがって、銅(II)や塩化ベンザルコニウムにおいて遺伝毒性誘発の報告はない。

以上から ACQ の DNA 損傷性は陰性であると判断した。また、ACQ の *in vivo* 小核試験でも陰性の結果が得られている (本年度事業において実施)。このことから ACQ に明らかな遺伝毒性は無いものと判断できる。本研究結果は今後の ACQ のリスク評価を行う上で、貴重な基礎データとなり得るだろう。

E. 結論

本実験条件下において、ACQ の培養細胞に対する DNA 損傷誘発性は陰性であると結論した。

F. 引用文献

- 1) Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R.R. Tice (2003) 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 18(1);45~51.
- 2) Sasaki, YF., S. Tsuda, F. Izumiyama and E. Nishidate (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutation Res.* 388(1);33~44.
- 3) Helma, C. and M. Uhl (2000) A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay, *Mutation Res.*,466(1);9~15.
- 4) Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970) A new cell derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann*, 61: 161-167.
- 5) Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu JC. and Sasaki YF. (2000) Single cell gel/comet

assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35(3), 206-21.

- 6) Nishioka, H. (1975) Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat. Res.*, 31, 185-189.
- 7) 梅田誠 (1980) 金属の変異原性・形質転換性、変異原と毒性、12、44-53.
- 8) Sakagami, Y., Yamasaki, K., Yokoyama, H., Ose, Y., and Sato, T. (1988) DNA repair test of disinfectants by liquid rec-assay. *Mutat. Res.*, 193:21-30.
- 9) Sakagami, Y., Yamazaki, H., Ogasawara, N., Yokoyama, H., Ose, Y., and Sato, T. (1988) The evaluation of genotoxic activities of disinfectants and their metabolites by *umu* test. *Mutat. Res.*, 209:155-160.
- 10) Hikiba, H., Watanabe, E., Barrett, J.C., and Tsutsui, T. (2005) Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 97:146-152.

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

Table 1 Preliminary growth inhibition test

Test substance : ACQ

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative cell growth (%)		
	plate 1	plate 2	Average
Solvent control (0.5% MC)	100	100	100
19.5	101	100	101
39.1	†	102	100
78.1	†	66	65
156	†	28	24
313	†	100	100
625	†	114	110
1250	†	128	124
2500	†	171	169
5000	†	507	488

MC : Methylcellulose.

CHL/IU cells were treated with the test substance for 1 hour.

† : The precipitation was observed immediately after addition of the test substance solution.

Table2 Summary of results

Sampling time (hr)	Substance	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	No. of slides	% Migrated DNA		Tail Length		Tail Moment	
				Mean	\pm S.D.	Mean	\pm S.D.	Mean	\pm S.D.
1	Vehicle (0.5%MC)	0	4	10.98	\pm 1.81	13.94	\pm 6.24	266.86	\pm 181.02
	ACQ	36.4	4	8.11	\pm 1.19	17.37	\pm 2.50	189.11	\pm 43.37
		51	4	10.49	\pm 3.29	20.22	\pm 4.60	329.93	\pm 205.50
		71.4	4	15.27	\pm 4.97	29.87 ^b	\pm 7.27	845.97 ^a	\pm 402.47
		100 ^{e)}	4						
		4NQO	28M	4	22.44 ^c	\pm 3.82	51.70 ^d	\pm 7.87	1429.08 ^c

MC : Methylcellulose

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

a: $p < 0.05$, Dunnett test

b: $p < 0.01$, Dunnett test

c: $p < 0.01$, Aspin-Welch t-test

c: $p < 0.01$, Aspin-Welch t-test

d: $p < 0.001$, Aspin-Welch t-test

e: No comet preparations because of cytotoxicity.

The precipitation was observed at all doses.

Appendix 1 Individual values of Comet assay

Test substance : ACQ

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	% Migrated DNA		Tail Length		Tail Moment	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
0.5%MC	10.7	4.1	9.1	12.9	123.3	265.6
	8.5	7.7	15.1	18.2	242.7	508.0
	12.3	7.5	9.2	12.4	173.1	394.9
	12.4	13.5	22.3	20.8	528.3	1406.7
36.4	6.9	4.3	14.4	11.8	132.3	182.5
	7.9	5.8	16.4	15.0	179.3	332.4
	9.8	4.7	18.5	16.3	229.4	287.6
	7.9	5.0	20.2	13.7	215.4	246.7
51	10.4	5.2	17.2	12.2	209.1	299.0
	7.9	7.1	19.0	22.4	290.5	508.9
	8.6	4.6	17.6	13.4	189.0	246.7
	15.2	12.5	27.0	21.0	631.1	963.3
71.4	12.4	15.0	22.8	25.1	604.2	1589.9
	9.8	8.6	25.7	23.1	417.2	661.5
	20.3	18.0	39.2	30.9	1278.4	2325.1
	18.5	17.5	31.8	31.5	1084.0	2106.2
100 ^{a)}						
4NQO 2 μM	20.4	9.8	49.9	20.4	1183.2	902.5
	24.9	15.9	58.1	26.0	1804.6	1834.1
	26.4	15.6	57.5	21.9	1801.7	1800.4
	18.1	11.3	41.3	18.4	926.8	1044.1

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

The precipitation was observed at all doses.

^{a)}: No comet preparations because of cytotoxicity.

1 hour treatment

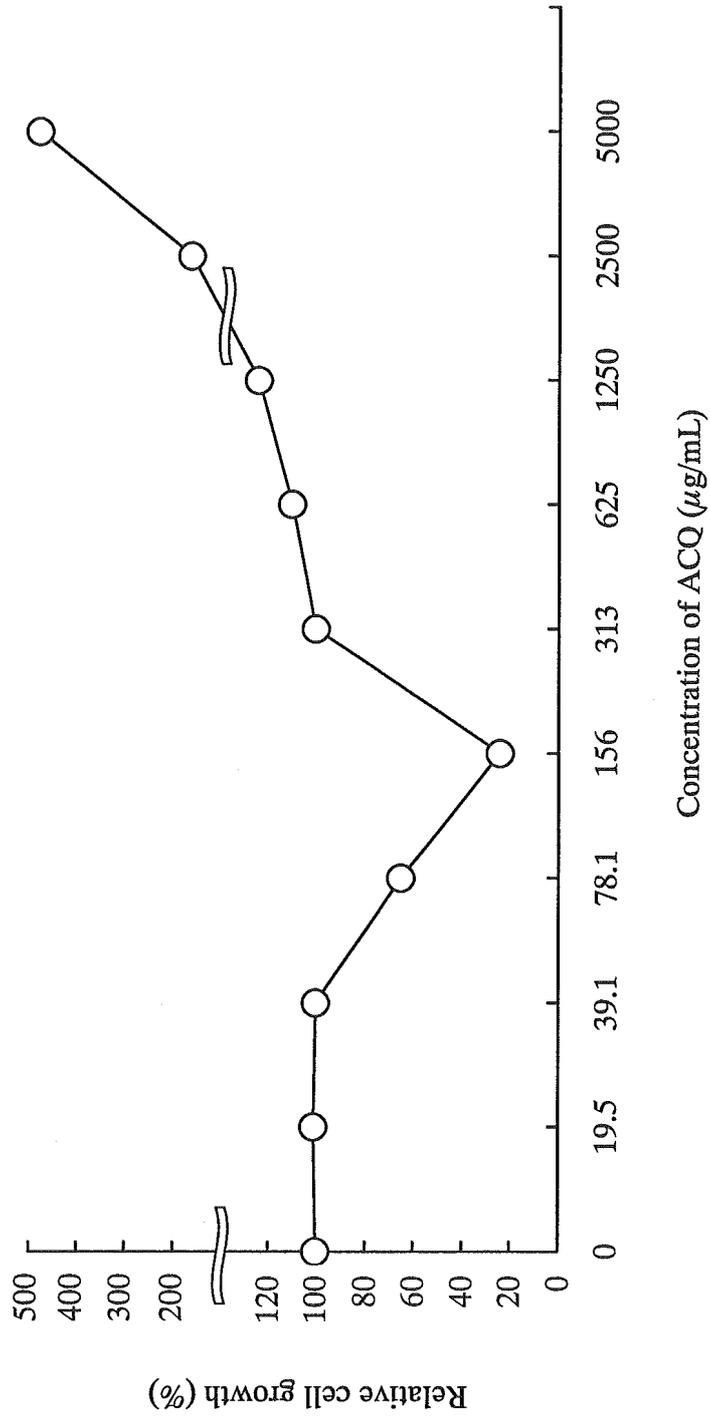


Fig. 1. Relative cell growth

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

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

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長
協力研究者 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
竹澤 祐造 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

研究要旨

銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（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を作製し、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。

A. 研究目的

国内で使用される木材防腐剤として過去に最も多かったものはクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）であったが、環境への汚染が懸念され、現在は CCA に代わって銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）が多く使用されている。ACQ は毒性の分類では「普通物」に属しているが、遺伝毒性に関する詳細な報告は見当たらない。そこで、哺乳類の染色体への影響を調べるため、マウスを用いた小核試験を実施した。

B. 研究方法

試験方法は Schmid¹⁾ および国内外の各種毒性試験指針（経済協力開発機構、OECD Guidelines、No. 474、1997 年；薬事法、医薬審第 1604 号、1999 年；農林水産省、12 農産第 8147 号、2-1-19-3、2000 年等）に示された方法を参考に、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

被験物質 ACQ は以下の 2 化合物の混合物である。各構成成分の配合比は以下の通りであった。

酸化銅（Ⅱ）	55.6%
塩化ベンザルコニウム	44.4%

構成成分-1

名称： 酸化銅（Ⅱ）
CAS No： 1317-38-0
組成式： CuO
分子量： 79.55
外観： 黒色微細粉末
溶解性： 水に不溶
純度： 99.3%
ロット番号： 204G1471
製造元： 関東化学株式会社
保存条件： 室温（許容範囲：15～30℃）

構成成分-2

名称： 塩化ベンザルコニウム
CAS No： 8001-54-5
分子量： 約 350
外観： 無色液体
溶解性： 水溶性
ロット番号： C6331A
製造元： Alfa Aesar社
含量： 50%
保存条件： 室温（許容範囲：15～30℃）

2. 使用動物

SPF の ICR 系 (CrIj:CD1) 雄マウス (6 週齢) を日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターより購入した。入荷後 7 または 8 日間の馴化期間を設け、7 週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験における被験物質投与日の使用マウスの平均体重はそれぞれ 33.0 g および 32.5 g であった。

3. 飼育条件

動物は以下の環境に設定された動物飼育室（動物室115）で飼育した。

温度： 22±3℃

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）

金網床アルミニウム製ケージ（215W×330D×180H mm）に 3 または 5 匹の動物を収容した。各ケージはステンレス鋼製可動ラックに収容した。

動物の群分けは入荷時に動物を無作為に各ケージに分配することで行った。ただし、投与日の各個体の体重が、平均体重の±20%を超えないことを確認して用いた。ケージ内での各個体の識別は、ピクリン酸飽和 70%エタノール溶液を用いて被毛の一部を染色することで行った。

供試動物には、保証飼料である MF 固型（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由に摂取させた。また、急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんを用いて自由に摂取させた。

4. 被験物質溶液の調製

被験物質溶液の調製には滅菌水（Simpli Lab（日本ミリポア株式会社）を用いて製造した純水を滅菌したもの）を用いた。まず始めに、最高濃度の被験物質溶液を調製するため、所定量の酸化銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、両者を混合させた。十分に懸濁後、滅菌水を加えて目的の用量までメスアップした。懸濁後、段階希釈に

より低濃度の被験物質溶液を調製した。

調製の際、成分ごとに純度補正を行った。なお、被験物質溶液は保存せず、投与日ごとに新しく調製した。

5. 陽性対照物質溶液の調製

マイトマイシン注用（2 mg カ価マイトマイシン C/バイアル、協和醗酵工業株式会社）に純水を加えて溶解させ、1.0 mg/mL のマイトマイシン C 溶液を投与直前に調製した。

6. 投与方法

被験物質投与群、陰性対照群、および陽性対照群のすべての動物に対し、10 mL/kg の容量で胃ゾンデを用いて単回の強制経口投与を行った。個々の動物に対する投与容量は、投与日の体重から算出した。なお、投与前後、それぞれ約 3 時間の絶食を行った。

7. 毒性試験

供試動物の被験物質単回投与に対する最大耐量を求めるため毒性試験を行った。被験物質は 125、250、500、および 1000 mg/kg の 4 用量を設定した。用量あたり 3 匹の動物に投与し、投与後 48 時間までの一般状態の観察を行った。

8. 小核試験

毒性試験の結果に基づき、投与用量は 37.5、75、および 150 mg/kg の 3 用量を設定した（理由は後述）。供試動物数は 1 群 5 匹の動物を用いた。さらに陰性対照群および陽性対照群を設定した。陰性対照群には純水を 10 mL/kg の容量で投与した。陽性

対照群はマイトマイシン C を 10 mg/kg の用量で投与した。

投与 24 時間後にすべての被験物質投与群、陰性対照群、および陽性対照群から骨髓採取を行った。また、投与 48 時間後には被験物質投与群の最高用量群および陰性対照群から骨髓採取を行った。

9. 小核標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を捨てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させ、骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。標本には暗号化したコード番号を記載した。標本を室温で十分に空気乾燥させた後、メタノールで 5 分間固定し、3% ギムザ液（メルク社製ギムザ溶液を pH6.8 リン酸緩衝液で希釈）で約 30 分間、室温で染色した²⁾。

10. 小核標本の観察

1 動物につき 1 枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下 1000 倍にて赤血球の観察を行った。小核を有する多染性赤血球の出現頻度を求めるため多染性赤血球を 2000 個観察した。また、多染性赤血球の割合を求めるため、赤血球を多染性と正染性に区別しながら 1000 個観察した。

11. 統計方法

小核を有する多染性赤血球の出現頻度についての統計学的解析には、Kastenbaum

・Bowman の数表³⁾ (被験物質投与群) およびカイ二乗検定 (陽性対照群) を用いた。一方、多染性赤血球の割合についての統計学的解析には Wilcoxon の順位和検定を行った。

12. 判定基準

少なくとも1つの被験物質投与群で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められれば陽性と判断した。一方、いずれの被験物質投与群においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

13. 倫理面への配慮

本研究は実験動物としてマウスを用いているが、財団法人残留農薬研究所の実験動物保護管理規定を遵守しており、動物愛護の観点において十分配慮がされている。また、人を研究対象として用いていないため、人権擁護の観点において倫理上の問題は全くない。

C. 研究結果

1. 毒性試験成績

毒性試験の成績を Appendix 1 に示す。投与48時間後までに125および500 mg/kg 群に死亡例の発生はなかった。しかし、250および1000 mg/kg 群では3例中1例の死亡が確認された。観察された一般症状として、自発運動低下、自発運動失調、振戦、立毛、口周部の被毛の汚れ、流涙、腹部膨満、および軟便が観察された (Appendix 3)。

死亡例が発生しなかった最大用量は500 mg/kg であった。しかし、500 mg/kg 群に

は腹部膨満などの激しい毒性症状が現れており、死亡例が発生しても不思議ではない用量であった。よって、死亡例が確実に発生しない最大用量は125 mg/kg と見なされた。一方、死亡例が発生した最小用量は250 mg/kg であった。この結果から、供試動物の ACQ 単回投与に対する最大耐量は125~250 mg/kg の間であると判断し、小核試験の最高用量を150 mg/kg に設定した。

2. 小核試験成績

すべての被験物質投与群で試験期間中に死亡例の発生は認められず (Appendix 1)、また、一般状態においても全く異常は認められなかった。

小核試験の成績と統計学的解析の結果を Table 1 に、個体別成績および投与日の体重を Appendix 2 に示した。投与24時間後の陰性対照群における小核出現頻度は0.19%であった。それに対して被験物質投与群の小核出現頻度は0.24~0.27%であり、有意な増加は認められなかった。

投与48時間後の陰性対照群における小核出現頻度は、投与24時間後のそれと同じく0.19%であった。それに対して150 mg/kg 群の小核出現頻度は0.16%を示し、24時間後と同様に有意な増加は認められなかった。

また、多染性赤血球の割合においても、投与24および48時間後において有意な減少は認められず、ACQ に骨髄増殖抑制効果はないものと考えられた (Table 1)。

D. 考察

投与24時間および48時間において、統計学的に有意な小核出現頻度の増加は認