

められなかった。これはACQに *in vivo* 小核誘発性が無いことを示す結果であった。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、両物質にも小核誘発性が無いか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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>。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 µg/plate)、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であった<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。最高用量は5 µg/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<sup>8)</sup>。0.8・30 µM (0.3・11 µg/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。しかし、*in vivo* 小核誘発性に関する報告は見当たらない。

以上のように、銅(II)や塩化ベンザルコニウムにおける *in vivo* 遺伝毒性の知見はなく、ACQの小核誘発性も未知であったが、本研究の結果より、ACQには小核誘発性の無いことが明らかとなった。また、*in vitro* コメットアッセイでも陰性の結果が得られていることから(本年度事業において実施)、ACQはDNA損傷作用も有していないことが示された。よって、ACQそのものには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

ACQはマウス骨髄細胞において小核の誘発は認められず、よって、*in vivo* 染色体異常誘発性は陰性であると結論した。

## F. 引用文献

- 1) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis, in : A. Hollaender (Ed.) Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, vol. 4, Plenum. New York, PP. 31~54.
- 2) Gollapudi, B. and Kamra, O.P. (1979) Application of a simple Giemsa-staining method in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 64, 45~46
- 3) Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, 9, 527~549.
- 4) Nishioka, H. (1975) Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutat. Res.*, 31, 185-189.
- 5) 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.
- 6) 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.

- 7) 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.
- 8) 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. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

Table 1 Summary of results - micronucleus test

Sampling time (hr)	Substance	Dose (mg/kg)	No. of mice	MNPCE / PCE (%)		PCE / (PCE+NCE) (%)	
				Mean $\pm$ SD (range)	S <sup>KC</sup>	Mean $\pm$ SD (range)	S <sup>W</sup>
24	Vehicle (Pure water)	0	5	0.19 $\pm$ 0.15 ( 0.00 ~ 0.40 )	—	52.4 $\pm$ 3.5 ( 47.7 ~ 56.0 )	—
		37.5	5	0.27 $\pm$ 0.06 ( 0.20 ~ 0.35 )	N.S.	56.0 $\pm$ 6.3 ( 46.8 ~ 63.4 )	N.S.
	ACQ	75	5	0.27 $\pm$ 0.11 ( 0.20 ~ 0.45 )	N.S.	50.8 $\pm$ 7.1 ( 39.2 ~ 58.1 )	N.S.
		150	5	0.24 $\pm$ 0.10 ( 0.10 ~ 0.35 )	N.S.	58.6 $\pm$ 9.4 ( 45.5 ~ 67.7 )	N.S.
48	Mitomycin C	10	5	3.93 $\pm$ 1.81 ( 1.20 ~ 5.70 )	***	49.6 $\pm$ 6.3 ( 42.8 ~ 56.0 )	N.S.
		0	5	0.19 $\pm$ 0.13 ( 0.05 ~ 0.30 )	—	53.7 $\pm$ 7.3 ( 41.5 ~ 58.6 )	—
	ACQ	0	5	0.16 $\pm$ 0.05 ( 0.10 ~ 0.25 )	N.S.	48.3 $\pm$ 9.4 ( 37.6 ~ 60.2 )	N.S.
		150	5	0.16 $\pm$ 0.05 ( 0.10 ~ 0.25 )	N.S.	48.3 $\pm$ 9.4 ( 37.6 ~ 60.2 )	N.S.

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

SD : Standard deviation.

S<sup>KC</sup> : Statistical analysis using the tables of Kastenbaum-Bowman or a chi-square test.

S<sup>W</sup> : Statistical analysis using Wilcoxon's sum of ranks test.

N.S. : Not significantly different from the concurrent vehicle control ( $p \geq 0.05$ ).

\*\*\* : Significantly different from the concurrent vehicle control at  $p \leq 0.001$ .

Appendix 1 Mortality in toxicity and micronucleus tests

Test	Substance	Dose (mg/kg)	Mortality
Toxicity test	ACQ	125	0 / 3
		250	1 / 3
		500	0 / 3
		1000	1 / 3
Micronucleus test	Vehicle	0	0 / 10
	ACQ	37.5	0 / 5
		75	0 / 5
		150	0 / 10
	Mitomycin C	10	0 / 5

Mortality : Number of death / Number of animals dosed.

Vehicle : Pure water.

Appendix 2 Individual values of micronucleus test

Sampling time (hr)	Substance	Dose (mg/kg)	Animal number	B.W. (g)	MNPCE/PCE (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)
24	Vehicle (Pure water)	0	111	32.4	0.40	55.3
			112	31.4	0.15	50.3
			113	28.4	0.25	47.7
			114	32.4	0.15	56.0
			115	33.8	0.00	52.5
	ACQ	37.5	121	34.2	0.30	46.8
			122	33.0	0.35	53.0
			123	33.2	0.25	59.1
			124	32.3	0.20	63.4
			125	29.8	0.25	57.8
		75	126	33.6	0.45	49.8
			127	35.5	0.30	58.1
			128	33.5	0.20	53.4
			129	32.4	0.20	53.7
			130	30.2	0.20	39.2
	150	131	32.2	0.35	59.7	
		132	33.7	0.25	45.5	
		133	32.2	0.10	67.7	
		134	32.5	0.20	53.2	
		135	33.9	0.30	66.7	
Mitomycin C	10	141	32.1	4.65	50.2	
		142	32.2	1.20	56.0	
		143	33.2	3.05	55.4	
		144	32.7	5.70	43.5	
		145	32.9	5.05	42.8	
48	Vehicle (Pure water)	0	116	33.6	0.30	58.6
			117	32.4	0.25	52.1
			118	30.9	0.30	58.5
			119	29.8	0.05	41.5
			120	31.0	0.05	57.9
	ACQ	150	136	32.0	0.15	49.1
			137	32.8	0.10	37.6
			138	34.3	0.15	60.2
			139	32.0	0.15	40.3
			140	33.5	0.25	54.2

BW : Body weight at the day of dosing.

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

Appendix 3 Individual clinical observation in toxicity test

Test	Substance	Dose (mg/kg)	Animal number	Time after the administration				
				1	3	5	24	48 (hr)
Toxicity test	ACQ	125	11	—	—	—	—	—
			12	—	—	—	—	—
			13	—	—	—	—	—
		250	14	D	D, L, P	Lo, P, T	Fd	
			15	—	—	—	—	—
			16	—	—	—	—	—
		500	17	P	P	A, P	—	—
			18	P	P	P, S	P	P
			19	Ls, P	P	A, P	—	—
		1000	20	—	P	P	P	P
			21	—	P	A, P	P	Fd
			22	—	—	D, E, P	P	P

— : No abnormalities detected.

A : Abdominal distention.

D : Decrease in spontaneous motor activity.

E : Excitement.

Fd : Found dead.

L : Lacrimation.

Lo : Loss of spontaneous motor activity.

Ls : Loose stool.

P : Piloerection.

S : Soiled fur (perioral region).

T : Tremor.

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

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）

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
分担研究者	首藤康文	（財）	残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室主任
協力研究者	榎本秋子	（財）	残留農薬研究所	毒性部病理研究室主任
	千葉裕子	（財）	残留農薬研究所	毒性部病理研究室技術担当室長
	小嶋五百合	（財）	残留農薬研究所	毒性部病理研究室研究員
	林 宏一	（財）	残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	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

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。

A. 研究目的

現在の使用量の多い代表的な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）をラットに 4 週間にわたって反復経口投与し、その際に生じる一

般毒性、神経毒性および免疫毒性を検索し、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。

## B. 研究方法

試験方法は、医薬品毒性試験法ガイドライン（薬審1第24号、1989年）、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（薬新薬第88号、1993年）、医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン（医薬審第1019号、1998年）、反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について（医薬審第655号、1999年）、医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインの改正について（医薬審第1831号、2000年）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、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ-1）を使用した。同被験物質の有効成分である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%とした。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℃）条件下で保管した。

### 2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット（BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]）を一般毒性試験用に雌雄各47匹、免疫毒性試験用に雄を37匹購入し、6日間試験環境に馴化した後、7週齢で試験に用いた。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  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、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。投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法で一般毒性試験には雌雄各10匹、免疫毒性試験用は雄8匹を各用量群にそれぞれ配分し、群分けを実施した。群分け後の個体識別は耳鑑札法で行なった。基礎飼料には保証飼料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

当該試験に先立ち、各群5匹ずつの雌性 Wistar Hannover 系 SPF ラットを用いて0、10、30、100 および 300 mg/kg の用量で7日間の反復強制経口投与による予備試験を実施した。その結果、300 mg/kg 投与群において、投与3日に1例死亡した。同群の臓器重量検査にて胸腺の絶対・相対重量の減少および副腎の絶対重量の増加が観察され、血液学的検査にて血小板および白血球数の増加が観察された。また、剖検所見では胃および腸の膨満が4例全例に、胸腺の萎縮が2例に、腺胃部出血点散在と前胃粘膜剥離が1例ずつに観察された。100 mg/kg

以下の投与群では統計学的に有意な変化はみられなかった。本予備試験結果に基づいて、明らかな毒性変化が惹起されることが考えられる 200 mg/kg を最高用量に、最小の毒性変化が予想される 40 mg/kg を中間用量に設定した。また、無毒性が予想される 8 mg/kg を低用量に設定した。加えて、対照群 (0 mg/kg) を設定した。これらの設定用量群 (0、8、40 および 200 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき主試験用に雌雄とも 10 匹、免疫グロブリン抗体価測定用に雄 8 匹の動物を使用して試験を開始したが、雄の 200 mg/kg において投与 4 日までに死亡が認められたため、投与 5 日から設定用量を 100 mg/kg に下げた試験を継続した。1 週間遅れで投与を開始した雌では、試験開始時から高用量を 100 mg/kg とした。被験物質の投与は週 7 日 4 週間連続して行った。

#### 4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、8、40、200 あるいは 100 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、酸化銅は純度によって、塩化ベンザルコニウムは含有量によって調製濃度の換算を実施した。投与容量は 4 mL/kg とした。最初に、所定量の酸化銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水 (大塚薬品株式会社、東京都) を加え懸濁させた。懸濁後、8、40 および 200 あるいは 100 mg/kg の各用量にてそれぞれ 2.0、10.0 および 50 あるいは 25 mg/mL の濃度になるように注射用水にて定容した。また、対照群の投与液は注射用水とした。各濃度の投与液は小分けし、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 回被験物質投与後に一般状態を観察した。瀕死状態の動物は動物愛護および人道的配慮から安楽死させた。この切迫殺動物のデータは死亡例と同様に扱った。

#### 6. 詳細な状態の観察

主試験用の全生存動物について、詳細な状態の観察を投与開始前 1 回と投与期間中毎週 1 回、午前のほぼ一定の時刻に実施した。観察は、ケージ内あるいは外 (オープンフィールド) で以下の項目を対象に実施し、それらの程度をスコアリングして記録した。

詳細な状態の観察項目：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、瞳孔径の変化、常同行動、異常行動、被毛の状態、皮膚色、探索行動、歩様異常、立ち上がり姿勢、糞の個数、糞の状態及び尿の状態

#### 7. 神経機能検査

主試験用の全生存動物について、投与 4 週時に 1 回、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直り反射) 検査、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、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 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。

## 9. 摂餌量

主試験用の全生存動物について、全ケージについて、毎週 1 回原則として連続 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。

## 10. 食餌効率

主試験用の全用量群について、投与開始後毎週、群平均体重増加量をそれぞれの群平均摂餌量で除して群平均食餌効率（%で表示）を雌雄別に算出した。

## 11. 眼科学的検査

主試験用の動物について、馴化期間中に雌雄の全馴化動物および投与 4 週時に雌雄の全生存動物について、ハロゲン検眼鏡（株式会社ナイツ）による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では、眼球、眼瞼、結膜、角膜、前眼房、瞳孔、虹彩、水晶体／硝子体および眼底を観察した。

## 12. 尿検査

主試験用の全生存動物について、投与 4 週時に尿検査を実施した。各検査動物を個体別採尿ケージに入れて自然排泄により得られた新鮮尿を用いて、尿比重、ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質、

ウロビリノーゲンおよび尿沈渣の項目について検査した。また、動物を同ケージに一晩入れて蓄積尿を採取し、尿色と尿量を検査した。尿比重は手持屈折計（株式会社アタゴ）で測定した。ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質およびウロビリノーゲンは、試験紙マルティスティックス®SG（バイエルメディカル株式会社）の呈色の程度を、クリニテック®50（バイエルメディカル株式会社）で準定量的に計測した。尿沈渣は鏡検した。

## 13. 血液学的検査

主試験用の全生存動物について、4 週間反復投与終了後に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。

#### 14. 血液生化学的検査

主試験用の全生存動物について4週間反復投与終了後に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)、 $\gamma$ -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)、無機リン(P)、カリウム(K)および塩素(Cl)

#### 15. 免疫学的検査

主試験用の全生存動物について、4週間反復投与終了後に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。

#### 16. 免疫グロブリン抗体価の測定

免疫グロブリン抗体価測定用の全生存動物について、4週間投与終了後最終屠殺(採血)の6日前に、 $2 \times 10^8$ のヒツジ赤血球

(SRBC, Sheep Red Blood Cell, (株)日本生物材料センター)をエーテル麻酔下でラットに0.5mL静脈内投与した。採血はエーテル麻酔下で後大静脈より行い、血清を採取した後測定時まで凍結保存(-70℃以下)した。血清中のヒツジ赤血球特異的免疫グロブリンMクラス抗体(抗ヒツジ赤血球免疫グロブリンM抗体)の抗体価は、BD OptEIA™ Reagent Set B(BD)を使用して酵素免疫測定法(ELISA)<sup>2)</sup>で測定し、吸光度が0.5を示す血清の希釈倍率をもって表した。

#### 17. 臓器重量

主試験用の全生存動物について、4週間反復投与終了後に剖検し、以下の臓器の固定前の重量(絶対重量)を測定して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、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)、精巢(両側)、精巢上体(両側)、前立腺(腹葉)、精囊・凝固線(両側)、卵巣(両側)、子宮

#### 18. 剖検および組織採取

主試験用の動物について、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。4週間反復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・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。

さらに病理学的精査が必要となる可能性を考慮して、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。また、精巣はFSA液（ホルマリン・シヨ糖・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（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（右側半分）、甲状腺および上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾臓（半分）、骨および骨髓（胸骨、片側大腿骨および頸部、胸部、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、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、精巣（両側）、精巣上体（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）、膾、眼球（両側）、ハーダー腺（両側）、下腿三頭筋（片側）、皮膚（腰背部）、乳腺（腹部）および肉眼的異常部位

#### 19. 肝臓の酸化ストレス(活性酸素関連物質)の測定

4週間反復投与終了後の主試験用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。

#### 20. 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。

運動量、握力、体重、摂餌量、尿比重、尿量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、胸腺および脾臓の細胞数、フローサイトメトリーによるリンパ球、免疫グロブリン抗体価、臓器重量、過酸化脂質量および8-OH-dG量のデータについては、先ずBartlettの等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、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対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlettの等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、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対照群と各投与群間における平均順位の有義差の有無を判定した。

詳細な状態の観察所見および感覚運動反応のスコアならびに尿検査項目（尿比重、尿量を除く）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、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対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。ただし、詳細な状態の観察における糞の状態および尿の状態については有意差検定を実施しなかった。

死亡率ならびに一般状態の観察所見、眼科学的検査所見および剖検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（表 1、2）

200 mg/kg で投与を開始した雄の高用量群では投与 4 日までに、主試験用の動物で 10 匹中 2 匹、免疫グロブリン抗体価測定用動物で 8 匹中 1 匹が死亡したため、投与 5 日から 100 mg/kg に用量を下げた。雌では高用量群を 100 mg/kg とし投与を開始した。高用量群（雄 200/100 mg/kg、雌 100 mg/kg）における投与 4 週の累積死亡率は、雄の主試験用動物で 4/10、抗体価測定用動物で 5/8、雌の主試験用動物で 1/10 だった。対照群（0 mg/kg）およびその他の用量群（雌雄とも、低用量群は 8 mg/kg、中用量群は 40 mg/kg）では死亡例は認められなかった。

### 2. 一般状態（表 3、4）

高用量群では、雄の主試験用動物で異常呼吸音、軟便および口周囲部被毛の汚れが、抗体価測定用動物で筋力低下の発生頻度が有意に増加した。その他、雄で消瘦、横臥位、腹部膨満、自発運動低下、努力性呼吸、混迷、鎮静、体温低下、外陰部被毛の汚れ、眼瞼下垂および流涎が、雌で腹部膨満、異常呼吸音、鎮静、筋力低下、体温低下、眼瞼下垂および流涎が散見され

た。

中用量および低用量群では、雌雄とも一般状態に異常はなかった。

### 2. 詳細な状態の観察（表 5、6）

詳細な状態の観察の結果、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。

探索行動、立ち上がり姿勢および糞の個数に有意差が散見されたが、いずれも用量相関性がないあるいは単発的である等の理由から、被験物質投与に関連付けられる変化ではなかった。

### 3. 神経機能検査成績（表 7、8）

投与 4 週時に行った神経機能検査では、高用量群の雄で測定開始から 10 分間および 60 分間合計の自発運動量が有意に減少した。また、高用量群の雌で前肢の握力が有意に増加した。

中および低用量群の雌雄には有意な変化はなかった。

### 4. 体重変化（表 9、10）

高用量群の雄では主試験用動物で投与期間を通して有意に低下した。抗体価測定用動物では有意な低下は投与 1 週のみだったが投与期間を通して低い値で推移した。

高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では有意な変化はなかった。

### 5. 摂餌量（表 11、12）

高用量群の雄では、投与 1 から 3 週にかけて有意に減少した。

高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では有意な変化はなかった。

#### 6. 食餌効率 (表 13、14)

高用量群の雌で効率が若干高かったが、全ての群で大きな違いは認められなかった。

#### 7. 眼科学的検査成績 (表 15、16)

雌雄とも異常は認められなかった。

#### 8. 尿検査成績 (表 17、18)

高用量群の雄で尿比重の有意な低下およびケトン体の有意な低下が認められた。

高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では有意な変化はなかった。

#### 9. 血液学的検査成績 (表 19、20)

血液学的検査では、ヘマトクリット値と色素量の減少、血小板数と網状赤血球数の増加およびプロトロンビン時間の短縮が高用量群の雄に認められた。

高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では被験物質投与に関連付けられる有意な変化はなかった。

#### 10. 血液生化学的検査成績 (表 21、22)

血液生化学的検査では、中および高用量群の雄および高用量群の雌において総蛋白(アルブミン・グロブリン) 値の有意な減少が認められた。さらに、高用量群の雄にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の有意な増加が、雌でカリウムの有意な増加が観察された。

中用量の雌および低用量の雌雄では有意な変化は認められなかった。

#### 11. 免疫学的検査成績 (表 23-27)

免疫学的検査では、高用量群の雄に汎T細胞

数の減少がみられ、中および高用量群の雌に汎B細胞数の増加が観察された。中用量群の雌および低用量群の雌雄では有意な変化はなかった。

雄における免疫グロブリン抗体価測定では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

#### 12. 臓器重量 (表 28、29)

脳、心臓および肝臓に有意差が散見されたが、いずれも用量相関性がないあるいは絶対および相対重量の変化が一致しない等の理由から、被験物質投与に関連付けられる変化ではなかった。

#### 13. 剖検所見 (表 30、31)

高用量群の雄において小腸腔拡張の発生頻度が有意に増加した。その他、肺、消化管などに所見が散見されたが、高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では、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。

#### 15. 肝臓の酸化ストレス(活性酸素関連物質)の測定成績 (表 32、33)

肝臓の酸化ストレスマーカーの解析では、高用量群の雌雄において酸化的DNA損傷の産物である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の増加ないし増加傾向が認められた。また、高用量群の雄に過酸化脂質の減少が認められた。

中および低用量群の雌雄においては有意な変化は認められなかった。

#### 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)を対象にして、ラットの反復経口投与毒性試験および反復経口投与神経・免疫毒性試験を実施した。平成 17 年度は、CCA に代わっ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) を対象にラットの反復経口投与毒性試験を実施し、その一般毒性、神経毒性および免疫毒性を評価した。ACQ は代表的種類のひとつである ACQ-1 (銅 55.6%+アルキルアンモニウム 44.4%)<sup>1)</sup> を 0、1、8 および 80 mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットに 7 週齢から 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、眼科学的検査、尿検査、血液・生化学検査、免疫学的検査および病理学的検査を含む諸検査を実施した。

**一般毒性:** 一般状態の観察において高用量群で、消瘦、横臥位、混迷、鎮静、体温低下、筋力低下、自発運動低下、異常呼吸音、努力性呼吸、眼瞼下垂、流涎、腹部膨満、口周囲部被毛の汚れ、外陰部被毛の汚れ、軟便が認められたが、これらの症状は殆どが死亡時に観察されていることおよび高用量群の雄では体重抑制および摂餌量の低下が認められたことから、一般状態の悪化を示す非特異的な所見であると考えられた。

血液学的検査では、高用量群の雄でヘマトクリット値と色素量の減少、血小板数と網状赤血球数の増加およびプロトロンビン時間の短縮が認められ、貧血状態を示唆していた。血液生化学的検査では、中および高用量群の雄および高用量群の雌において総蛋白 (アルブミン・グロブリン) 値が減少し、低蛋白血症が認められた。また、高用量群では雌雄ともに肝臓の酸化ストレス (8-OHdG) の増加がみられ、雄では肝障害を示唆する逸脱酵素 (AST/ALT) の上昇が認められた。

尿検査では、高用量群の雄で尿比重およびケトン体の有意な低下が認められたが、pH およびその他の尿検査項目には異常がなかったことから、毒性学的意義は低いと解釈された。

剖検所見では、高用量群の雄で認められた小腸腔拡張は、ACQ の成分である銅の消化管に対する作用<sup>2)</sup> およびアルキルアンモニウムの刺激性<sup>4)</sup> に起因する変化であると考えられた。

**神経毒性:** スコアリングによる詳細な状態の観察の結果、ACQ 投与に関連すると考えられる神経症状は認められなかった。

投与 4 週時に行った神経機能検査では、高用量群の雄で測定開始から 10 分間および 60 分間合計の自発運動量が有意に減少したが、この群では多数の死亡が認められたことから、一般状態の悪化による非特異的な変化であると考えた。また、高用量群の雌で前肢の握力が有意に増加したが、後肢握力に変化はなく、その他の興奮および筋緊張の亢進を示唆する症状も認められなかったことから、偶発的な変化であると考えられた。

よって、本実験条件下では ACQ によって特異的な神経毒性は認められなかった。

**免疫毒性:** 高用量群の雄に汎 T 細胞の減少がみられた。また、中および高用量群の雌で汎 B 細胞の増加が見られたものの、本所見は一般的に細胞集団の減少に毒性学的意義がある指標であると考えられ、毒性学的意義はないと判断された。

よって、中および低用量群では、ACQ による特異的な免疫毒性作用は認められないと考えられた。

## E. 結論

ラットに ACQ を 100 mg/kg 前後の高用量で反復経口投与すると血液、肝臓あるい

は免疫系に影響を及ぼす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。

#### F. 引用文献

- 1) 日本工業規格: 木材防腐剤に関する基準 JIS K 1570、2004.
- 2) Temple L et. al.: Volume 1 Chapter 9 ELISA to measure SRBC-specific serum IgM: Method and data evaluation. In: Method in Immunotoxicology, (Burlison GR, Dean JH, and Munson AE eds.), Wiley-Liss Inc., New York, pp 137-157, 1995.
- 3) Pizarro F, Oliver M, Uauy R, Contreras P, Rebelo A, and Gidi V: Acute gastrointestinal effects of graded levels of copper in drinking water. Environmental Health Perspectives, 107(2): 117-121, 1999.
- 4) Arugonda SK: Quaternary ammonium compounds. International programme on chemical safety poisons information monograph G022 (Group PIM) chemical, 1999.

#### 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 - 1 Mortality - Cumulative death rates in male rats

Dose (mg/kg/day)	Week				
	1	2	3	4	5
0	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	0/10	0/10	0/10
8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
40	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
200/100	2/10	3/10	4/10	4/10	4/10

<sup>a</sup>: Cumulative number of animals found dead or killed *in extremis* during the treatment period.

<sup>b</sup>: Effective number of animals at each week.

Table 1 - 2 Mortality - Cumulative death rates in male rats  
Immunized group

Dose (mg/kg/day)	Week				
	1	2	3	4	5
0	0 <sup>a</sup> /8 <sup>b</sup>	0/8	0/8	0/8	0/8
8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
40	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
200/100	2/8	5/8	5/8	5/8	5/8

<sup>a</sup>: Cumulative number of animals found dead or killed *in extremis* during the treatment period.

<sup>b</sup>: Effective number of animals at each week.

Table 2 Mortality - Cumulative death rates in female rats

Dose (mg/kg/day)	Week				
	1	2	3	4	5
0	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	0/10	0/10	0/10
8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
40	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
100	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10

<sup>a</sup>: Cumulative number of animals found dead or killed *in extremis* during the treatment period.

<sup>b</sup>: Effective number of animals at each week.

Table 3 - 1 General clinical observation - Incidence of signs in male rats

Clinical signs	Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200/100
	No. of animals examined	10	10	10	10
No abnormalities detected		10	10	8	3
Appearance:					
Emaciation		0	0	0	1
Posture/Body position:					
Lateral position		0	0	0	1
Abdominal distention		0	0	0	1
Behavior:					
Decreased spontaneous motor activity		0	0	0	2
Respiration:					
Labored respiration		0	0	0	1
Abnormal respiratory sound		0	0	2	4 *
Consciousness/Nervous system:					
Stupor		0	0	0	1
Sedation		0	0	0	1
Muscle weakness		0	0	0	2
Body temperature:					
Hypothermy		0	0	0	2
Excretion:					
Loose stool		0	0	0	4 *
Fur :					
perioral region:Soiled fur		0	0	0	4 *
external genital region:Soiled fur		0	0	0	3
Eye/Eyelid (eyelid):					
Ptosis		0	0	0	1
Mouth (oral cavity):					
Salivation		0	0	0	1

Significantly different from control: \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ .