

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 18 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 19 (2007) 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. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の急性経口毒性試験 .....	17
小坂忠司	
2. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の急性経皮毒性試験 .....	29
小坂忠司	
3. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のヒト皮膚3次元モデルにおける 皮膚腐食性試験 .....	41
小坂忠司	
4. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の皮膚感作性試験 .....	45
小坂忠司	
5. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の培養細胞を用いる コメットアッセイ .....	51
松元郷六	
6. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のマウスを用いる 小核試験 .....	61
松元郷六	
7. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のラットにおける 4週間反復経口投与毒性試験 (一般毒性及び神経・免疫毒性併合試験) .....	71
小坂忠司・首藤康文	
8. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のラットにおける 4週間反復経皮投与毒性試験 .....	175
原田孝則	

9. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の 急性経口毒性試験	257
小坂忠司	
10. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の 急性経皮毒性試験	269
小坂忠司	
11. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の 皮膚感作性試験	281
小坂忠司	
12. 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 3週間反復経皮投与毒性試験	287
原田孝則	
13. 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週間反復経皮投与毒性試験	335
原田孝則	
14. 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	395
原田孝則	
15. 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（追加試験）	437
原田孝則	
16. 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	491
原田孝則	
17. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の処理木材からの 有効成分の土壤汚染状況調査	503
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 18 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長
	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

代表的木材防腐剤であるアルキルアンモニウム (AAC)、銅・アルキルアンモニウム (ACQ) 及びクロム・銅・ヒ素 (CCA) 系化合物を対象に種々の毒性試験を実施するとともに、CCA については肝メタロチオネイン発現の投与経路差を検索した。その結果、AAC、ACQ、CCA のいずれも皮膚感作性及び腐食性を示し、ラットを用いた反復経口・経皮投与試験では両経路ともに血液、肝臓、腎臓、消化管あるいは神経・免疫系に影響を及ぼすことが判明した。反復投与試験における無毒性量 (NOEL) は、経口では ACQ8 mg/kg、他の 2 剤は 1 mg/kg で、経皮経路では 3 剤ともに 1 mg/kg であると判定された。遺伝毒性では、CCA のみが陽性 (クロム・ヒ素の複合作用) で、他は陰性であった。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。

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 18 年度では、平成 16・17 年度に引き続きクロム・銅・ヒ素化合物系木材

防腐剤 (CCA) <sup>1)4)</sup> の反復経皮毒性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) <sup>5)</sup> 及びアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) <sup>5)</sup> を対象に種々の毒性試験 (ACQ: 急性経口・経皮毒性、皮膚感作性及び反復経皮毒性試験; AAC: 急性経口・経皮毒性、皮膚腐食性・感作性、遺伝毒性及び反復経口・経皮毒性試験) を実施した。また、CCA については肝メタロチオネイン

発現の投与経路差を検索し、処理木材からの有効成分の土壤汚染状況を調査した。

## B. 研究方法

平成18年度では、被験物質としてAAC、ACQ及びCCAの3剤を対象に以下の毒性試験を実施した。AACは有効成分のジデシルジメチルアンモニウムクロリド(didecyl dimethylammonium chloride)を、ACQは平成17年度と同じ薬剤配合種[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%]をそれぞれ被験物質として用いた。また、CCAについては平成16・17年度と同じ薬剤配合種であるCCA2号(CCA-type B)の構成成分配合比:酸化クロム(CrO<sub>3</sub>、純度98%)35.3%、酸化銅(CuO、純度99.3%)19.6%および酸化ヒ素(As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、純度91.9%)45.1%]を用いた。

### 1. AACのラット急性経口毒性試験

雌雄のWistar Hannover (GALAS)系ラットを用いて、AACの急性経口毒性を検索した。各群5匹の動物を使用し、雌雄ともAACを100、300、900 mg/kgの3用量設定し、単回強制経口投与した。投与後の観察期間は、雄では14日間、雌では21日間とし、Moving Average法にてLD50値を算出した。

### 2. AACのラット急性経皮毒性試験

雌雄のWistar Hannover (GALAS)系ラットを用いて、AAC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9日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。

### 3. AAC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<sup>®</sup>の市販キット(EpiDerm™ Human Skin Model System、倉敷紡績株式会社)を用い、AAC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AAC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。

### 4. AACのマウス皮膚感作性試験

AAC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)<sup>7)</sup>に従って実施した。投与群として、0、0.01、0.03、0.1、0.3、1%の6濃度のAACを設定し、1群5例のマウスを用いた。各濃度のAACを3日間両耳後方に経皮投与し、3日後に<sup>3</sup>H-methyl-Thymidine (20μCi / animal)溶液を尾静脈内投与した。5時間後に両耳下リンパ節を摘出し、リンパ節重量、リンパ球細胞生存性(ATP活性)及びリンパ球細胞増殖活性(<sup>3</sup>H-methyl-Thymidine取り込み量)の測定を行った。

### 5. AAC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、AAC のコメットアッセイを実施した。3621  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 7.3 ~ 28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{M}$  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、% Tail DNA, Tail length, Olive tail moment を求めた。

#### 6. AAC のマウスを用いる小核試験

AAC 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 (Crj:CD1) の雄性動物 (7 週齢) を用い、ACQ を 37.5、75 および 150  $\text{mg}/\text{kg}$  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  $\text{mg}/\text{kg}$  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。

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

Wistar Hannover (GALAS) 系ラットの雌雄動物 (7 週齢) を用い、各群雌雄各 6 匹の動物に、AAC を 0、1、8 および 40  $\text{mg}/\text{kg}$  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。

#### 8. AAC のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験

SD 系ラット (Crj:CD(SD)IGS) の雌雄動物を用い、各群 6 匹の動物 (6 週齢) の背部皮膚 (5  $\text{cm} \times 5 \text{cm}$ ) に、AAC を 0、1、10 及び 100  $\text{mg}/\text{kg}$  の用量で毎日 6 時間、4 週間に亘り反復経皮投与した。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学的検査を行った。

#### 9. ACQ のラット急性経口毒性試験

雌雄の Wistar Hannover 系 (GALAS) ラットを用いて ACQ の急性経口毒性を検索した。各群 5 匹の動物 (8 週齢) を用い、雌雄とも ACQ を 100、300、900  $\text{mg}/\text{kg}$  の 3 用量設定し、単回強制経口投与した。投与後、雄では 14 日間、雌では 21 日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。

#### 10. ACQ のラット急性経皮毒性試験

雌雄の Wistar Hannover (GALAS) 系ラットを用いて、ACQ 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  $\text{mg}/\text{kg}$  の 1 用量、雌は 500、1000 および 2000  $\text{mg}/\text{kg}$  の 3 用量を設定して、24 時間

閉鎖経皮暴露し、その後 14 日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。

#### 11. ACQ のマウス皮膚感作性試験

ACQ 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) <sup>7)</sup> に従って実施した。投与群として、0、0.3、1、3% の 4 濃度の ACQ を設定し、1 群 5 例のマウスを用いた。各濃度の ACQ を 3 日間両耳後方に経皮投与し、3 日後に <sup>3</sup>H-methyl-Thymidine (20 $\mu$ ci / animal) 溶液を尾静脈内投与した。5 時間後に両耳下リンパ節を摘出し、リンパ節重量、リンパ球細胞生存性 (ATP 活性) 及びリンパ球細胞増殖活性 (<sup>3</sup>H-methyl-Thymidine 取り込み量) の測定を行った。

#### 12. ACQ のラット 3 週間反復経皮投与毒性試験

雌雄の SD 系ラット (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、3 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した。なお、本試験結果の一部は、平成 17 年度の報告書に掲載されたが、多くの検査が未完了であったので平成 18 年度に改めて全ての検査結果について報告する。

#### 13. ACQ のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験

SD 系ラット (Crj:CD(SD)IGS) の雌雄動物を用い、各群 6 匹の動物 (6 週齢) の背部皮膚 (5 cm x 5 cm) に、AAC を 0、1、10 及び 30 mg/kg の用量で毎日 6 時間、4 週間に亘り反復経皮投与した。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学的検査を行った。

#### 14. 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、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。なお、本試験結果は平成 17 年度の報告書に既に掲載されているが、病理組織学的検査が未完了であったので、その検査結果を含め改めて平成 18 年度に報告する。

#### 15. CCA のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験 (追加試験)

SD 系ラット (Crj:CD(SD)IGS) の雌雄動物を用い、各群 6 匹の動物 (6 週齢) の背部皮膚 (5 cm x 5 cm) に、CCA を 0、1 及び 10 mg/kg の用量で毎日 6 時間、4 週間に

亙り反復経皮投与した。、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学的検査を行った。

#### 16. CCA のラット反復経口・経皮投与毒性試験における肝メタロチオネインの遺伝子解析

CCA のラット反復経口・経皮投与毒性試験における肝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）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。

#### 17. CCA 処理木材からの有効成分の土壤汚染状況調査

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）の土壤（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。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. AAC のラット急性経口毒性試験

Wistar Hannover 系ラットの雌雄動物を用い AAC の急性経口毒性を検索した。臨床症状の観察では、異常呼吸音と鼻吻部、口周囲部、外陰部および肛門周囲部の被毛の

汚れが認められ、死亡した動物では、一般状態の悪化を示す、削瘦、円背位、沈静、自発運動低下、呼吸緩徐、異常呼吸音、努力性呼吸、体温低下、腹部膨満、流涎、流涙、眼脂等が観察された。死亡率は、100、300 および 900 mg/kg 用量群の順にそれぞれ、雄では 0/5、1/5 および 4/5、雌では 0/5、2/5 および 5/5 であった。これらの死亡率に基づいて Moving Average 法により算出した LD50 値は、雄では 520 mg/kg（95%信頼限界 212-1273 mg/kg）、雌では 335 mg/kg（95%信頼限界 180-623 mg/kg）であった。この結果から、OECD（経済協力開発機構）の定める GHS（Globally Harmonised System）<sup>8)</sup> カテゴリー 4（LD50 値は 300-2000 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。

#### 2. AAC のラット急性経皮毒性試験

AAC の急性経皮毒性を Wistar Hannover 系ラットの雌雄動物を用い検索した。臨床症状では、投与部位の肥厚、暗調化、硬化および糜爛が観察された。その他の毒性徴候および体重増加抑制が認められなかったため、AAC の毒性影響は消失したと判断し、動物愛護の立場から投与後 9 日に観察終了とした。剖検では、皮膚所見の他に 2000 mg/kg 投与群の雌雄に脾臓の腫大が観察された。なお、限度用量においても死亡例は認められなかった。この結果から、AAC の急性経皮毒性（LD50 値）は、OECD（経済協力開発機構）の定める GHS（Globally Harmonised System） カテゴリー 5 と判定され、毒物劇物法の分類では普通物に相当すると考えられた。



### 3. AAC の *in vitro* 皮膚腐食性試験

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、AAC の皮膚腐食性・刺激性を検索した。その結果、3 分暴露では皮膚腐食性陽性と判定され、60 分暴露では疑陽性（15%以上 20%未満）であった。この反応は、Sodium lauryl sulfate (SLS) <sup>9)</sup> と同程度の反応性であり、強度の刺激性が示唆された。本試験条件下において、AAC は皮膚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。

### 4. AAC のマウス皮膚感作性試験

CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、AAC の皮膚感作性を検索した。リンパ節重量測定では 0.3 及び 1% 投与群、リンパ球細胞の生存性測定では 0.1、0.3 及び 1% 投与群で有意な増加が認められた。<sup>3</sup>H-TdR を用いたリンパ球細胞の増殖活性測定では、0.3 及び 1% 投与群で有意な増加が認められ、溶媒対照群との比で算出される Simulation Index は、0.1、0.3、及び 1% 投与群において 3 以上を示した。リンパ節重量、リンパ球細胞の生存性およびリンパ球細胞の増殖活性がいずれも AAC 投与群で増加していること、増加が用量相関性であること、SI 値が 3 以上を示していることから、AAC の LLNA 法における皮膚感作性は陽性と判断した。

### 5. AAC の培養細胞を用いるコメットアッセイ

AAC の DNA 損傷誘発性を調査するため、培養細胞を用いコメットアッセイを行った。用量設定試験結果から、本試験での用量は 7.3、10.2、14.3、20、28 µg/mL とした。その結果、7.3、10.2、14.3 µg/mL

の用量では DNA 損傷は認められなかったが、20、28 µg/mL の用量では DNA 損傷細胞の有意な増加が認められた。しかし、これらの用量では細胞毒性が確認されたため、出現した 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判断した。従って、AAC の培養細胞に対する DNA 損傷誘発性は陰性と判断された。

### 6. AAC のマウスを用いる小核試験

AAC 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）及び低用量（37.5 mg/kg）を設定し、単回の強制経口投与を行った。投与後 24 及び 48 時間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。その結果、いずれの用量においても小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。従って、AAC の *in vivo* 染色体異常誘発性は無いものと判断された。

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

AAC のラットにおける一般毒性、神経毒性及び免疫毒性を検索するため、AAC を、0、1、8 及び 40 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、高用量群では雌雄ともに投与初期から腹部膨満、異常呼吸音、鼻・外陰部周囲の汚れなどが認められ、それに伴い一般状態が悪化し、約半数例が死亡した。同様な症状は少数例ながら中用量群においても観察され、雌では 1 例が死亡した。病理組織学的検査では、高用量群の

雌雄において胸腺・脾臓の萎縮（B 及び T 細胞数の減少）、気道系の炎症及び前胃のびらん・潰瘍あるいは十二指腸粘膜過形成が認められた。鼻腔の炎症は中用量群の雌においても観察された。低用量群では、AAC 投与に関連付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、AAC を経口的に投与すると消化管及び気道系に傷害を惹起することが示唆された。なお、本実験条件下では 8 mg/kg 前後が最大耐量（MTD）であり、無毒性量（NOAEL）は雌雄ともに 1 mg/kg と判定された。

#### 8. AAC のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験

AAC の反復経皮投与毒性を検索するため、雌雄の SD 系ラットを用い、各群 6 匹の背部皮膚に ACC を 0、1、10 及び 100 mg/kg の用量で毎日 6 時間適用し、4 週間に亘り反復経皮投与した。その結果、高用量群では雌雄とも投与 3 日以降に適用部位の皮膚状態が悪化し、投与 2 週時には出血、重度のびらん・潰瘍が観察されたため、倫理上の観点から 4 週時（投与 22 日）に同群の動物全例を途中切迫殺した。その他の投与群の動物については、投与 28 日後に屠殺し、諸検査を実施した。体重変化では、高用量群の雄において摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が認められた。血液学的検査では、高用量群の雌雄において貧血、血小板、網赤血球、好中球及び単球の増加が認められ、中用量群では雌において網赤血球と単球の増加がみられた。血液生化学的検査では、高用量群の雌雄においてアルブミンの減少を伴う低蛋白血症及び低コレステロール・トリグリセライド血症がみられ、グロブリ

ン及び尿素窒素値が上昇した。中用量群では、雄にアルブミンと総コレステロールの減少が、雌ではグロブリンの上昇がみられた。剖検所見では、雌雄とも中・高用量の適用部位の皮膚に落屑、糜爛あるいは出血が認められた。臓器重量では、雌雄とも高用量群では腎臓、脾臓及び副腎の重量が、中用量群では脾臓と副腎の重量がそれぞれ増加した。病理組織学的検査では、雌雄とも高用量群のほぼ全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍、骨髄の造血亢進及び胸腺の皮質リンパ球壊死（アポトーシス）が観察された。加えて、腎臓の近位尿細管拡張及び副腎の皮質細胞肥大が高頻度に認められ、脾臓の髓外造血亢進、適用部位皮膚の表皮細胞過形成、腺胃の糜爛・潰瘍、十二指腸炎が散見された。中用量群では、適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が高頻度に観察され、同部位表皮細胞過形成が雌雄の少数例に認められた。1 mg/kg 投与群では、AAC 投与に関連づけられる異常は認められなかった。これらの結果から、本実験条件下では 10 mg/kg が最大耐量（MTD）であり、無毒性量（NOAEL）は雌雄とも 1 mg/kg であると判定された。

#### 9. ACQ のラット急性経口毒性試験

ACQ の急性経口毒性について、Wistar Hannover 系ラットの雌雄動物を用い検索した。臨床症状として、死亡した動物では、一般状態の悪化を示す、円背位、起立不能、沈静、自発運動低下、異常呼吸音、体温低下、腹部膨満、流涎、流涙、軟便および肛門周囲部の被毛の汚れ等が認められた。剖検所見では、急性毒性試験でしばしば観察される消化管の変化が認められた。さらに、雌の途中切迫殺動物では、消化管へのガス

貯留が顕著であり、上部気道障害が示唆された。死亡率は、100、300 および 900 mg/kg 群の順にそれぞれ、雄では 0/5、0/5 および 5/5 で、雌では 1/5、0/5 および 5/5 であった。

これらの死亡率に基づいて Moving Average 法により算出した LD50 値は、雌雄ともに 520 mg/kg (95%信頼限界は算出不能) であり、性差は認められなかった。この結果から、OECD (経済協力開発機構) の定める GHS (Globally Harmonised System) カテゴリー4 (LD50 値は 300-2000 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。

#### 10. ACQ のラット急性経皮毒性試験

ACQ の急性経皮毒性を Wistar Hannover 系ラットの雌雄を用い検索した。臨床症状において、死亡した動物では一般状態の悪化を示す円背位、起立不能、混迷、自発運動の低下、振戦、呼吸緩徐、体温低下及び流涙などが観察された。剖検所見では、消化管の変化と投与部位皮膚の浮腫が観察された。観察終了時まで生存した雌雄では、投与部位皮膚に肥厚、硬化、暗調化、鱗屑などの投与部位に刺激性を示唆する所見が認められた。死亡率は、雄では 0/5 (死亡例なし)、雌では 500、1000、2000mg/kg 用量群の順に 0/5、3/5、5/5 例であった。このことから、ACQ の急性経皮毒性には性差があり、雌の方が感受性が高いことが示唆された。雌の死亡率に基づいて算出した LD50 値は、933 mg (95%信頼限界 631-1380 mg/kg) であった。従って、ACQ の急性経皮毒性 (LD50 値) は、OECD (経済協力開発機構) の定める GHS (Globally

Harmonised System) カテゴリー 3 (200-1000 mg/kg) と判定され、毒物劇物法の分類では劇物に相当すると考えられた。

#### 11. ACQ のマウス皮膚感作性試験

CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、ACQ の皮膚感作性を検索した。リンパ節重量及びリンパ球細胞の生存性測定では 1 及び 3% 投与群で有意な増加が認められた。<sup>3</sup>H-TdR を用いたリンパ球細胞の増殖活性測定では、1 及び 3% 投与群で有意な増加が認められ、溶媒対照群との比で算出される Simulation Index は、0.3、1、及び 3% 投与群において 3 以上を示した。リンパ節重量、リンパ球細胞の生存性およびリンパ球細胞の増殖活性がいずれも ACQ 投与群で増加していること、増加が用量相関性であること、SI 値が 3 以上を示したことから、ACQ の LLNA 法における皮膚感作性は陽性と判断した。

#### 12. ACQ のラット 3 週間反復経皮投与毒性試験

ラットを用い ACQ の反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究 (平成 17 年度計画) では、当初 ACQ を 0、10、100 および 300 mg/kg の用量で SD 系ラットの雌雄動物の背部皮膚に毎日 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。しかしながら、300 および 100 mg/kg 投与群において投与 5 日以降に適用部位の皮膚の状態が悪化し、投与 3 週時には重度の糜爛・潰瘍あるいは出血が観察されたため、科学的かつ倫理的に投与の継続は不可能と判断し、投与 3 週終了時に投与を中止

し、その時点で全例を安楽死せしめ試験を終了した。体重および摂餌量では、300 および 100 mg/kg 投与群の雄において摂餌量の減少を伴う軽度の体重増加抑制が認められた。

血液学的検査では、300 および 100 mg/kg 投与群において雌雄とも貧血が認められ、それに伴い血小板および網赤血球数が増加した。加えて、雌雄とも総白血球数 (WBC) が増加し、ディファレンシャルカウントでは単球と好中球の増加がみられた。貧血の成因については適用部位の糜爛・潰瘍にともなう出血が主な原因と考えられ、WBC の増加は同部位の炎症に対する生体反応と解釈した。

血液生化学的検査では、300 および 100 mg/kg 投与群において雌雄ともアルブミン、総蛋白、 $\gamma$ -グロブリンおよび総コレステロールが有意に減少した。加えて、 $\alpha/\beta$ -グロブリンの増加を伴う A/G 比の低下ならびに尿素窒素 (BUN) と塩素 (Cl) の増加が認められた。また、雄ではナトリウム (Na) が有意に増加し、雌ではアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アルカリホスファターゼ (ALP) およびカリウム (K) が有意に増加あるいは増加傾向を示した。低蛋白・低コレステロール血症に関しては、おそらく適用部位の糜爛・潰瘍、出血などに伴う一般状態の悪化に起因するものと推察した。特に血中のアルブミンは急性炎症性疾患あるいは外傷などのストレスによって減少することが知られている<sup>10)</sup>。また、アルブミンが減少する際には、代償的にグロブリンが増加し A/G 比が低下することが知られている<sup>11)</sup>。BUN の上昇については、後述する腎重量の増加と関連した変化と推察され、腎障害を示唆する所見と考えられた。雌にみられた ASAT、

ALAT および ALP 活性の上昇は肝実質傷害を反映する所見であり、本剤の肝臓への影響が示唆された。電解質 (Cl, Na, K) の変動に関しては、適用部位の皮膚 (糜爛・潰瘍、出血) および腎 (重量増加) の状態に関連して変化したものと考えられた。皮膚および腎臓はともに電解質バランスに影響を及ぼす重要な器官である<sup>12)</sup>。なお、10 mg/kg 投与群では、雌雄とも $\gamma$ -グロブリンが有意に減少した。同変化は中・高用量群においても観察され、用量依存性がみられたことから被験物質投与の影響と判断された。

剖検所見では、300 および 100mg/kg 投与群では、雌雄とも全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が観察され、脾臓の腫大、腺胃粘膜の黒色斑 (出血斑) あるいは腎部リンパ節の腫大が散見された。10 mg/kg 投与群では、適用部の皮膚に痂皮形成が雌の 3/8 例に認められた。これらの肉眼病変の内、適用部位の皮膚病変は本剤の有効成分である塩化ベンザルコニウムの刺激性<sup>13-16)</sup>に起因するものと考えられた。脾臓の腫大は貧血に対する造血反応を、腎部リンパ節の腫大は適用部位の炎症に対する生体反応を反映する所見としてそれぞれ解釈された。腺胃粘膜の黒色斑は出血巣と推察され、ストレス性変化のひとつと考えられた。

臓器重量では、300 および 100 mg/kg 投与群において、雌雄とも副腎と脾臓の絶対・相対 (比体重値) 重量ならびに腎臓および肺の相対重量が有意に増加あるいは増加傾向を示し、加えて、胸腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。その他、雄では脳および精巣の相対重量が増加し、精囊および前立腺の絶対・相対重量がともに有意に減少した。一方、雌では卵巣および子宮

の絶対・相対重量がともに有意に減少あるいは減少傾向を示した。10 mg/kg 投与群では、雄において軽度ながら胸腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。これらの変化の内、副腎、脾臓および腎臓の重量増加についてはそれぞれ対応所見（副腎ではストレス、脾臓では貧血、腎臓では尿素窒素の上昇および電解質の変動）がみられ、被験物質投与の影響と考えられる。胸腺、精囊、前立腺、卵巣、子宮の重量減少は、単に体重減少に伴う二次的変化とも考えられたが、雌では明らかな体重減少がみられなかったことから、胸腺、卵巣および子宮の重量減少については被験物質の直接的影響も否定できなかった。一方、中・高用量群の雄にみられた脳および精巣の相対重量増加は体重減少に伴う二次的変化<sup>17,18)</sup>と推察した。

以上の結果から、ACQ の反復経皮投与試験では 100 mg/kg 以上の用量は最大耐量 (MTD) を超えており、不適切であると判断された。

### 13. ACQ のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験

ラット用い ACQ の 4 週間反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では ACQ を 0、1、10 及び 30 mg/kg の用量で SD 系ラットの雌雄動物の背部皮膚に毎日 6 時間、28 日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した。

30 mg/kg 投与群において、投与 6 日以降から適用部位に痂皮形成が雌雄の全例に認められた。本所見は、病理組織学的検査で適用部位皮膚の表皮過形成と診断され、そのうち雄 1 例では糜爛・潰瘍も観察された。同様の変化

は、10mg/kg 投与群の雌雄にも観察された。同群の雄 1 例にびらん・潰瘍が認められた。この適用部位の皮膚病変は、ACQ の主要成分である塩化ベンザルコニウムの刺激性<sup>13-16)</sup>に起因する変化であると考えられた。その他、中・高用量群では肝臓、精巣あるいは心臓の重量に統計学的に有意な変動がみられたが、組織学的に特に異常がなかったことから、偶発所見と解釈した。なお、1 mg/kg 投与群では、いずれの検査項目においても被験物質投与に関連付けられる変化は認められなかった。

以上の結果から、本実験条件下では ACQ の最大耐量 (MTD) は 30 mg/kg 前後であり、無毒性量 (NOAEL) は 1 mg/kg と判定された。

### 14. 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、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、脾の重量増加および脳重量の減少傾向がみられた。病理組織学的には、適用部位皮膚のびらん・潰瘍および炎症、骨髄・脾臓の造血亢進、腎臓の尿細管拡張が観察さ

れたが、肝臓、脳では特に異常は認められなかった。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。これらの変化は、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。

#### 15. CCA のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験（追加試験）

平成 17 年度に引き続き CCA を対象にして、無作用量を求めることに主眼を置き、ラットを用いて 4 週間の反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では、CCA を 0、1 及び 10 mg/kg の用量で SD 系ラットの雌雄動物の背部皮膚に毎日 6 時間、4 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した。

10 mg/kg 投与群では、投与 5 日から適用部位の皮膚に痂皮形成が認められ、投与 2 週時以降には雌雄の全例に観察された。4 週間投与終了後の剖検時には、ほぼ全例に適用部位から出血が認められ、組織学的にびらん・潰瘍が観察された。血液学的には、雌において網赤血球と単球の増加が認められ、上記の皮膚病変に対する生体反応と考えられた。また、アルブミンの減少とグロブリンの増加に関しても適用部位皮膚のびらん・潰瘍に起因する変化と推察した。これらの変化は、平成 17 年度の反復経皮投与試験においても観察されており、CCA の構成成分であるクロム、銅およびヒ素の毒作用<sup>19-21)</sup>に起因するものと考えられた。

1mg/kg 投与群では、雌雄とも被験物質投与

に関連付けられる異常はいずれの検査項目においても観察されなかった。

以上の結果から、本実験条件下では CCA の無毒性量（NOAEL）は雌雄とも 1 mg/kg と判定された。

#### 16. CCA のラット反復経口・経皮投与毒性試験における肝メタロチオネインの遺伝子解析

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、経皮曝露では亢進傾向（up-regulation）を示し、平成 16 年度の研究結果と一致した。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。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>19,20</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。

#### 17. CCA 処理木材からの有効成分の土壤汚染状況調査

本研究は、代表的な木材防腐剤である CCA で処理された木材からの有効成分（クロム、銅、ヒ素）の土壤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）の土壤を採取し、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壤中の濃度（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、土壤環境基準値（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。

土壤環境基準値（mg/kg or L）			
土壤	クロム	銅	ヒ素
一般土壤 <sup>a</sup>	< 0.05	—	< 0.01
農耕地(田) <sup>b</sup>	—	< 125	< 15

a：検液 1L 当たり、b：土壤 1kg 当たり

また、CCA の無毒性量が 1mg/kg（我々の実験結果）であることを考慮すると、今回調査した土壤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。

#### D. 結論

代表的木材防腐剤である AAC、ACQ、CCA は、いずれも皮膚感作性及び腐食性を示し、ラットを用いた反復経口・経皮投与

試験では両経路ともに血液、肝臓、腎臓、消化管あるいは神経・免疫系に影響を及ぼすことが判明した。反復投与試験における無毒性量 (NOAEL) は、経口では ACQ8 mg/kg、他の2剤は 1 mg/kg で、経皮経路では3剤ともに 1 mg/kg であると判定された。遺伝毒性では、CCAのみが陽性(クロム・ヒ素の複合作用)で、他は陰性であった。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。

#### 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) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In vitro* Skin Corrosion – Human Skin Model Test, 2004.
- 7) 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
- 8) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adapted: December 17, 2001.
- 9) 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



- 10) 榎林郁之介：血清蛋白と蛋白電気泳動、異常値の出るメカニズム（第2版）、河合忠・玄番昭夫・屋形稔編、医学書院、東京、pp.89-94、1993年
- 11) 中村良一：血液の化学的性状（第5節）、家畜内科診断学、中村良一著、養賢堂、東京、pp.281-289、1967年
- 12) 河合忠：水・電解質バランス、異常値の出るメカニズム（第2版）、河合忠・玄番昭夫・屋形稔編、医学書院、東京、pp.125-133、1993年
- 13) BIBR Working Group: Benzalkonium chloride. Toxicity profile. The British Industrial Biological Research Association, 1989.
- 14) Cutler RA and Drobeck HP: Toxicology of cationic surfactants. In: Cationic Surfactants, Vol. 4 (Chapter 15), Jungermann E (ed.), Marcel Dekker, New York, 1970.
- 15) Grosselin RE, Smith RP, and Hodge HC: Clinical Toxicology of Commercial Products (5<sup>th</sup> ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 16) Merianos JJ: Quaternary ammonium antimicrobial compounds (Chapter 13). In: Disinfection, Sterilisation, and Prevention (4<sup>th</sup> ed), Block S (ed.), Lea & Febiger, USA, 1991.
- 17) Feron VJ, deGroot AP, Spanjers MT, and Til HP: An Evaluation of the criterion "organ weight" under conditions of growth retardation. *Fd Cosmet Toxicol* 11: 85-94, 1973.
- 18) Oishi S, Oishi H, and Hiraga K: The effect of food restriction for 4 weeks on common toxicity parameters in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 47: 15-22, 1979.
- 19) 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.
- 20) 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.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 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：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、第22回毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006年

2) 竹内幸子、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、桑原真紀、榎本秋子、中島信明、原田孝則：クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の成熟ラットの神経・免疫系に対する影響、第22回毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006年

3) 中島信明、川勝尚夫、小嶋五百合、武田真記夫、榎本秋子、桑原真紀、竹内幸子、高橋尚史、原田孝則：クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットに対する連続経口投与の影響、第 22 回毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006 年

4) 高橋尚史、石塚勝美、川勝尚夫、小坂忠司、山口悟、大塚亮一、武田真記夫、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

5) Takahashi N, Nakashima N, Ohtsuka R, Takeda M, and Harada T: Chromated copper arsenate (CCA) used as a wood preservative enhances the skin carcinogenesis induced by ultraviolet B (UVB) radiation. 25<sup>th</sup> STP Annual Meeting, Vancouver, 2006

6) 小嶋小百合、佐々木淳矢、中島信明、原田孝則：ラットにおけるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の造血器系毒性、第 33 回日本トキシコロジー学会学術集会、名古屋、2006 年

7) 上田英夫、福山朋季、林宏一、田島由香里、藤江秀彰、林豊、配島淳子、首藤康文、小坂忠司、原田孝則：クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の皮膚感作性評価、第 13 回日本免疫毒性学会学術集会、倉敷、2006 年

8) 高橋尚史、山口悟、大塚亮一、武田真記夫、竹内幸子、桑原真紀、榎本秋子、北澤利明、中島信明、原田孝則：クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) による皮膚発がん増強効果に関する分子生物学的解析、第 23 回日本毒性病理学会学術集会、東京、2007 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 18 年度分担研究報告書

1. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の急性経口毒性試験

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員

研究要旨

Wistar Hannover 系雌雄ラットを用いてアルキルアンモニウム系木材防腐剤（AAC）の急性経口毒性を検索した。各群 5 匹の動物を使用し、雌雄とも AAC を 100、300、900 mg/kg の 3 用量設定し、単回強制経口投与した。Moving Average 法にて算出した LD50 値は、雄では 520 mg/kg（95%信頼限界 212-1273 mg/kg）、雌では 335 mg/kg（95%信頼限界 180-623 mg/kg）であった。

従って、本実験条件下における AAC の急性経口毒性（LD50 値）は OECD の定める GHS カテゴリー-4（300-2000 mg/kg）に位置し、毒物劇物法の分類では普通物に相当すると結論された。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤でアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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」<sup>1)</sup>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、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のジデシルジ

メチルアンモニウムクロリド（Didecyl dimethylammonium chloride、和光純薬工業株式会社）である。含量は、マクロケルダール法による窒素量から算出した場合 82.2 %、硝酸銀滴定法による塩素イオン量から算出した場合 87.2 %であり、水分量は 1.3%であった。受領した被験物質は冷蔵庫（許容範囲 1~10℃）で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット（BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]）の雌雄動物を用いた。供試動物は 7 週齢にて購入し、7 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  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、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、各用量群に 5 匹ずつ配分し使用した。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、市上水（常総市）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

試験群には雌雄とも 100、300 および 900 mg/kg の 3 用量を設定した。1 用量につき 5 匹の動物を使用した。

### 4. 被験物質投与液の調製

各用量（100、300 および 900 mg/kg）の被験物質投与液を投与前に調製した。投与容量は 4 mL/kg とした。投与液は、純度換算を実施せずに、所定量の被験物質を秤量し、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。

### 5. 投与方法

動物を投与前日の夕方より投与約 3 時間後まで絶食させた。投与液をスターラーで攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ胃ゾンデを用いて 1 回経口投与した。

### 6. 臨床症状の観察

投与当日は投与 30 分および 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。観察期間は雄動物で投与後 14 日間、雌動物で投与後 21 日間とした。雌動物では、投与後 14 日に体重減少を示す個体が認められたため、観察期間を 7 日間（投与後 21 日まで）延長した。

### 7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7、14 日、21 日（雌動物）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 日あるいは 21 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。

投与後 14 日に体重減少を示した雌動物は、その後顕著な消瘦が認められたため、予後不良と判断し、切迫殺し、同様の検査を実施した。

### 9. 半数致死量（LD50 値）の算出

観察終了時までの累積死亡率に基づき、雌雄それぞれの LD50 値を Moveing Average 法<sup>2,3)</sup>により算出した。

## C. 研究結果

### 1. 死亡率および LD50 値

死亡率を表 1 に示す。

死亡率は、100、300 および 900 mg/kg