

用量の順にそれぞれ、雄では 0/5、1/5 および 4/5 で、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。

2. 臨床症状

臨床症状の結果を表 2 に示す。

死亡した動物において、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、軟便および鼻吻部、口周囲部、外陰部、肛門周囲部の被毛の汚れが認められた。14 日の観察以降に切迫殺を実施した雌動物では、重度の削瘦と異常歩行が観察された。

観察終了時まで生存した動物では、いずれの投与群でも異常呼吸音が散見され、300 mg/kg 投与群の雌雄では、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た。

3. 体重測定

体重測定結果を表 3 に示す。

雄動物の生存例において、300 および 900 mg/kg 投与群では、投与後 7 日の体重は、投与前の体重と比較して減少したが、14 日には増加した。

雌動物の生存例では、300 mg/kg 投与群に、投与後 7 日および 14 日の体重に減少を示す個体が散見された。よって、観察期間を 7 日間 (投与後 21 日まで) 延長した。投与後 14 日に減少した個体は、その後重

度の削瘦が認められ、予後不良と判断し、切迫殺した。その他の生存例では、投与後 21 日には増加した。

4. 剖検所見

剖検所見を表 4 に示す。

死亡例の肉眼的所見として、肺の赤色化、胸腺萎縮、前胃部の白色化および肥厚、胃の液状内容物あるいはガスの貯留、腸管の液状貯留物と水腫、腹水貯留、腹腔内臓器の癒着および鼻吻部、口周囲部、外陰部の被毛の汚れが認められた。

切迫殺した雌動物では、前胃部の肥厚、腹腔臓器の癒着などが認められた。

観察終了時に行った生存動物の剖検では、前胃部の肥厚、腹腔臓器の癒着および脾臓の腫大が認められた。

D. 考察

AAC の急性経口毒性を検索するために、Wistar Hannover 系雌雄ラットについて検索した。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、眼脂等がみとめられた。剖検所見としては、急性毒性試験でしばしばみとめられる、消化管の変化が観察された。これらの結果から、消化管への刺激性変化は認められたが、AAC の特徴的な毒性所見は認められなかった。

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) 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。

E. 結論

本実験条件下において、AAC の急性経口毒性は OECD の定める GHS カテゴリー 4 に位置し、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) Thompson WR, Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose. I. Fundamental formulas, estimation of error, and relation to other methods. *Bacterial Rev* 11: 115-145 (1947).
- 3) Weil CS, Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. *Biometrics* 8: 249-263 (1952).
- 4) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method.

Adapted: December 17, 2001.

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 - Male rats

Dose (mg/kg)	Time after administration										Final mortality	
	30 min	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-14 days		
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5 ^a
300	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1 / 5
900	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	4 / 5

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

Table 1 - 2 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Time after administration											Final mortality					
	30 min	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7	8-16	17		18-21days				
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 ^a
300	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	5
900	0	0	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	5

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

Table 2 - 1 Clinical observation - Incidence of signs in male rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)					
	100		300		900	
Fate	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	5	1	4	4	1
No abnormalities detected	-	5	0	0	0	0
Emaciation	-	0	0	0	0	1
Hunchback position	-	0	0	3	4	1
Sedation	-	0	1	4	2	1
Decrease in spontaneous motor activity	-	0	0	0	2	1
Abnormal respiratory sound	-	0	0	1	1	0
Hypothermia	-	0	0	2	0	0
Abdominal distention	-	0	0	1	0	1
Eye discharge	-	0	0	0	0	1
Salivation	-	0	0	0	1	0
Soiled fur in the nasorostral region	-	0	0	4	2	1
Soiled fur in the perioral region	-	0	0	4	2	1
Wetted/Soiled fur in the external genital region	-	0	0	1	1	0
Soiled fur in the perianal region	-	0	1	4	4	1
Loose stool	-	0	0	0	3	0

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

Table 2 - 2 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)					
	100		300		900	
	fd	tk	fd/ke	tk	fd	tk
No. of animals examined						
No abnormalities detected	-	4	0	0	0	-
Emaciation	-	0	1	0	1	-
Hunchback position	-	0	1	3	5	-
Sedation	-	0	0	0	2	-
Decrease in spontaneous motor activity	-	0	0	1	1	-
Abnormal gait	-	0	1	0	0	-
Bradypnea	-	0	1	0	1	-
Abnormal respiratory sound	-	1	0	1	1	-
Labored respiration	-	0	0	1	0	-
Hypothermia	-	0	0	0	1	-
Abdominal distention	-	0	0	1	0	-
Lacrimation	-	0	0	0	2	-
Eye discharge	-	0	0	0	1	-
Salivation	-	0	0	0	1	-
Soiled fur in the nasorostral region	-	0	1	3	2	-
Soiled fur in the perioral region	-	0	1	2	3	-
Wetted/Soiled fur in the external genital region	-	0	1	2	2	-
Soiled fur in the perianal region	-	0	0	0	5	-
Loose stool	-	0	1	0	4	-

Fate: fd, found dead; ke, killed in extremis; tk, terminal kill.

Table 3 - 1 Body weight - Individual values in male rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	14
100	1	215	269	303
	2	214	275	306
	3	222	286	325
	4	218	273	309
	5	218	274	304
	Mean	217	275	309
	N	5	5	5
300	6	211	(199)	
	7	218	197 *	248
	8	218	179 *	248
	9	217	192 *	260
	10	219	214 *	269
	Mean	217	196	256
	N	5	4	4
900	11	214	(198)	
	12	220	(187)	
	13	215	(186)	
	14	218	171 *	243
	15	218	(203)	
	Mean	217	171	243
	N	5	1	1

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

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

N: Number of animals examined.

Table 3 - 2 Body weight - Individual values in female rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	(g)		
			Days after administration		
			7	14	21
100	101	150	177	192	198
	102	150	181	200	207
	103	146	174	178	185
	104	147	171	182	185
	105	159	183	197	202
	Mean	150	177	190	195
	N	5	5	5	5
300	106	148	170	189	198
	107	150	155	142 *	(122)
	108	150	(139)		
	109	146	166	185	203
	110	151	143 *	180	208
	Mean	149	159	174	203
	N	5	4	4	3
900	111	151	(142)		
	112	156	(112)		
	113	148	(121)		
	114	146	(134)		
	115	150	(142)		
	Mean	150			
	N	5			

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

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

N: Number of animals examined.

Table 4 - 1 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in male rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)					
	100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	5	1	3	4	1
No abnormalities detected	-	2	0	0	0	0
Lung: Red in color	-	0	0	0	0	2
Thymus: Atrophy	-	0	0	0	0	1
Fore stomach: White in color	-	0	0	4	1	1
Fore stomach: Hyperplasia	-	3	0	4	0	1
Stomach: Distended with liquid	-	0	1	0	3	0
Stomach: Distended with gas	-	0	0	0	1	0
Intestine: Edema	-	0	1	0	0	0
Intestine: Distended with liquid	-	0	1	0	4	0
Small intestine: Red/black contents	-	0	0	0	1	0
Spleen: Enlargement	-	0	0	2	0	1
Adrenal gland: Enlargement	-	0	0	0	1	0
Mesenteric lymph nodes: Enlargement	-	0	0	0	1	0
Liver: White spot	-	0	0	0	2	0
Spleen: White spot	-	0	0	0	2	0
Abdominal cavity: Ascites	-	0	1	0	1	0
Abdominal organs: Adhesion	-	0	0	4	1	1
Soiled fur: nasorostral region	-	0	0	0	1	0
Soiled fur: perioral region	-	0	1	0	1	0
Soiled fur: external genital region	-	0	1	0	4	0

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

Table 4 - 2 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)					
	100		300		900	
Fate	fd	tk	fd/ke	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	5	2	3	5	0
No abnormalities detected	-	2	0	0	0	-
Thymus: Atrophy	-	0	0	0	1	-
Fore stomach: White in color	-	2	1	3	2	-
Fore stomach: Hyperplasia	-	3	1	3	0	-
Stomach: Distended with liquid	-	0	1	0	4	-
Stomach: Distended with gas	-	0	0	0	1	-
Intestine: Edema	-	0	0	0	1	-
Intestine: Distended with liquid	-	0	1	0	4	-
Small intestine: Red in color	-	0	0	0	2	-
Caecum: Distended with gas	-	0	0	0	1	-
Abdominal organs: Adhesion	-	0	1	2	0	-
Soiled fur:nasorostral region	-	0	1	0	0	-
Soiled fur:perioral region	-	0	0	0	2	-
Soiled fur:external genital region	-	0	1	0	5	-

Fate: fd, found dead; ke, killed in extremis; 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 18 年度分担研究報告書

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

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化合物系木材防腐剤（AAC）の急性経皮毒性を検索した。各群 5 匹の動物を使用し、雄では 2000 mg/kg の 1 用量、雌では 1000 および 2000 mg/kg の 2 用量を設定し、24 時間閉鎖経皮暴露した。その結果、雌雄とも限度用量にて死亡例は認められなかった。

従って、本実験条件下における AAC の急性経皮毒性（LD50 値）は、雌雄とも 2000mg 以上であり、OECD の定める GHS カテゴリー-5（2000 mg/kg 以上）、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」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 日間以上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℃、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 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、雄では 2000 mg/kg の用量を、雌では 1000 および 2000 mg/kg の 2 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 (1000 および 2000 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

投与前日に、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ト (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。準備したパット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、貼り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 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。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7 日目および最終解剖時に個体別に測定した。

8. 剖検

全動物について、観察期間終了時に、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

投与後 8 日から被験物質投与部位皮膚の剥離による糜爛が散見され、動物愛護の立場から、投与後 9 日に観察終了とした。

1. 死亡率および LD50 値

死亡率を表 1 に示す。

雌雄ともにいずれの投与群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 LD50 値は、2000 mg/kg 以上であると考えられた。

2. 臨床症状

臨床症状の結果を表 2 に示す。

全ての動物に、投与部位の肥厚、暗調化および硬化が観察された。さらに、皮膚の剥離による糜爛が散見された。

3. 体重測定

体重測定結果を表 3 に示す。

全ての動物において、投与後 7 日および最終解剖時（投与後 9 日）の体重は、投与前の体重と比較して順調に増加した。

4. 剖検所見

剖検所見を表 4 に示す。

全ての動物に背部投与部位の糜爛ないし潰瘍が認められた。さらに、2000 mg/kg 投与群の雌雄に脾臓の腫大が認められた。

D. 考察

AAC の急性経皮毒性を検索するために、Wistar Hannover 系雌雄ラットについて検索した。

臨床症状の観察では、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。終了時の剖検では、皮膚所見のほかに 2000 mg/kg 投与群の雌雄に脾臓の腫大が観察された。これらの結果から、投与部位への強度の刺激性変化が観察された。限度用量において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 2 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。

E. 結論

本実験条件下において、AAC の急性経皮毒性 (LD50 値) は OECD の定める GHS カテゴリー 5 (2000 mg/kg 以上) に位置し、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. Pdapted: 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
3. その他
なし

Table 1 - 1 Mortality - Male rats

Dose (mg/kg)	Time after administration									Final mortality				
	1	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7		8	9 days		
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 ^a

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

Table 1 - 2 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Time after administration									Final mortality				
	1	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7		8	9 days		
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 ^a
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

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

Table 2 - 1 Clinical observation - Incidence of signs in male rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)	
	fd	tk
	0	5
No abnormalities detected	-	0
Back skin (patched area):		
Thickening	-	5
Hardening	-	5
Dark in color	-	5
Erosion/ulcer	-	4

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

Table 2 - 2 Clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical sign	Dose (mg/kg)		2000		1000	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	5	0	5	0	5
No abnormalities detected	-	0	-	0	-	0
Back skin (patched area):						
Thickening	-	5	-	5	-	5
Hardening	-	5	-	5	-	5
Dark in color	-	5	-	5	-	5
Erosion/ulcer	-	0	-	0	-	1

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

Table 3 - 1 Body weight - Individual values in male rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	9
			(g)	
2000	1	249	250	255
	2	236	254	258
	3	233	236	248
	4	244	239	249
	5	239	239	244
	Mean	240	244	251
	N	5	5	5

N: Number of animals examined.

Table 3 - 2 Body weight - Individual values in female rats

Dose (mg/kg)	Animal number	Before administration	Days after administration	
			7	9
			(g)	
2000	101	162	176	186
	102	160	178	185
	103	160	168	175
	104	173	184	186
	105	166	178	180
	Mean	164	177	182
	N	5	5	5
1000	106	163	181	180
	107	165	183	183
	108	160	179	178
	109	166	179	184
	110	161	184	185
	Mean	163	181	182
	N	5	5	5

N: Number of animals examined.

Table 4 - 1 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in male rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)	
	fd	tk
No. of animals examined	0	5
No abnormalities detected	-	0
Spleen: Enlargement	-	5
Back skin (patched area): Erosion/ulcer	-	5

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