

Table 1 - 2 Mortality - Female rats

Dose (mg/kg)	Time after administration										Final mortality			
	30 min	4 hrs	1	2	3	4	5	6	7-14	15		16-21days		
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5 ^a
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
900	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	100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	5	0	5	5	0
No abnormalities detected	-	5	-	5	0	-
Hunchback position	-	0	-	0	2	-
Sedation	-	0	-	0	2	-
Abnormal respiratory sound	-	0	-	0	3	-
Abdominal distention	-	0	-	0	1	-
Lacrimation	-	0	-	0	1	-
Salivation	-	0	-	0	5	-

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	
Fate	fd/ke	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	1	4	0	5	5	0
No abnormalities detected	0	4	-	3	0	-
Emaciation	1	0	-	0	0	-
Hunchback position	0	0	-	0	3	-
Anastasia	0	0	-	0	1	-
Decrease in spontaneous motor activity	1	0	-	0	0	-
Abnormal respiratory sound	1	0	-	2	3	-
Hypothermia	0	0	-	0	1	-
Abdominal distention	1	0	-	0	0	-
Lacrimation	0	0	-	0	1	-
Salivation	0	0	-	0	2	-
Loose stool	0	0	-	0	1	-
Soiled fur in the perianal region	1	0	-	0	2	-

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	210	275	315
	2	203	260	289
	3	203	263	294
	4	199	255	273
	5	213	276	305
	Mean	206	266	295
	N	5	5	5
300	6	202	256	293
	7	202	253	298
	8	207	270	301
	9	213	270	303
	10	203	266	316
	Mean	205	263	302
	N	5	5	5
900	11	206	(196)	
	12	207	(198)	
	13	203	(204)	
	14	213	(190)	
	15	201	(202)	
	Mean	206		
	N	5		

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

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	14	21
100	101	141	176	196	206
	102	137	168	178	194
	103	139	163	174	184
	104	135	150	123 *	(120)
	105	144	168	184	193
	Mean	139	165	171	194
	N	5	5	5	4
300	106	135	164	171	171
	107	135	169	189	199
	108	140	173	194	206
	109	141	171	174	185
	110	139	167	183	193
	Mean	138	169	182	191
	N	5	5	5	5
900	111	139	(134)		
	112	141	(135)		
	113	138	(137)		
	114	142	(135)		
	115	135	(133)		
	Mean	139			
	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	100		300		900	
	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	5	0	5	5	0
No abnormalities detected	-	5	-	5	0	-
Thoracic cavity: Hydrothorax	-	0	-	0	1	-
Fore stomach: White in color	-	0	-	0	5	-
Stomach: Distended with liquid	-	0	-	0	5	-
Intestine: Edema	-	0	-	0	5	-
Intestine: Distended with liquid	-	0	-	0	5	-
Soiled fur:nasorostral region	-	0	-	0	1	-
Soiled fur:external genital region	-	0	-	0	2	-

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	
	fd/ke	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	1	4	0	5	5	0
No abnormalities detected	0	4	-	5	0	-
Thoracic cavity: Hydrothorax	0	0	-	0	1	-
Fore stomach: White in color	0	0	-	0	5	-
Stomach: Distended with liquid	0	0	-	0	5	-
Stomach: Distended with gas	1	0	-	0	0	-
Intestine: Edema	0	0	-	0	4	-
Intestine: Distended with liquid	0	0	-	0	5	-
Intestine: Distended with gas	1	0	-	0	0	-
Soiled fur:perioral region	0	0	-	0	2	-
Soiled fur:external genital region	0	0	-	0	4	-

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

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

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 500、1000 および 2000mg/kg の 3 用量を設定し、24 時間閉鎖経皮暴露した。その結果、雄では限度用量にて死亡例が認められなかった。雌の死亡率は 500、1000、2000 mg/kg 用量群の順に 0/5、3/5、5/5 であり、Moving Average 法にて算出した LD50 値は、933 mg (95%信頼限界 631-1380 mg/kg) であった。

従って、本実験条件下における ACQ の急性経皮毒性(LD50 値)は、OECD の定める GHS カテゴリー-3 (200-1000 mg/kg) に位置し、毒物劇物法の分類では劇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、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。

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

予備試験の結果に基づき、雄では 2000 mg/kg の 1 用量を、雌では 500、1000 及び 2000mg/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 (500、1000 及び 2000 mg/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、4 mL/kg とした。投与液は、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。

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 14 日間とした。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7 日及び最終解剖時に個体別に測定した。

8. 剖検

死亡動物は発見時に、観察期間終了後の生存動物は、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。

死亡例が認められた雌については、Moveing Average 法^{2,3)}にて LD50 値を算出した。

C. 研究結果

1. 死亡率およびLD50値

死亡率を表1に示す。

雄では、試験期間と通じて死亡例は認められなかった。よって、雄のLD50値は2000 mg/kg以上である。

雌では、500、1000及び2000 mg/kg投与群の順に0/5、3/5、5/5であった。この結果から、Moving average法により算出した雌のLD50値は、933mg（95%信頼限界631-1380 mg/kg）であった。

2. 臨床症状

臨床症状の結果を表2に示す。

死亡した雌動物では、円背位、起立不能、混迷、自発運動低下、振戦、呼吸緩徐、体温低下、流涙が観察された。

生存例において、1000及び2000 mg/kg投与群では投与部位の肥厚、硬化、暗調化および創傷が認められた。500 mg/kg投与群では鱗屑が認められた。

3. 体重測定

体重測定結果を表3に示す。

生存動物では、投与後7日および観察終了時（投与後14日）の体重は、投与前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。

死亡した動物では、投与部位の背部皮膚の浮腫と肥厚、腺胃部の赤色/黒色斑、小腸の赤色化、小腸の赤色あるいは黒色内容物、脾臓の腫大および脾臓の小型化が認められた。

観察終了時に実施した生存例では、2000

mg/kg投与群の雄及び1000 mg/kg投与群の雌に、投与部位の肥厚および暗調化が認められた。

D. 考察

ACQ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。死亡した動物では、臨床症状として、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。剖検所見として、毒性試験でしばしば認められる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において、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。このことは、ACQの急性経皮毒性に雌雄差があり、雌に感受性があることを明瞭に示している。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。

この結果から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-3（200-1000 mg/kg）⁴⁾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。

E. 結論

本実験条件下において、ACQの急性経皮毒性（LD50値）はOECDの定めるGHSカ

テゴリー3 (200-1000 mg/kg)に位置し、毒物劇物法の分類の劇物に相当するLD50値の範囲であると結論された。

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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 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

Table 1 - 1 Mortality - Male rats

Dose (mg/kg)	Time after administration								Final mortality				
	1	4 hrs	1	2	3	4	5	6		7	8-14 days		
2000	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	8-14 days
2000	0	0	4	1							5 / 5 ^a
1000	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	3 / 5
500	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)		No. of animals examined
	fd	tk	
	2000		
	0	5	
No abnormalities detected	-	0	
Sedation	-	1	
Back skin (patched area):			
Thickening	-	5	
Hardening	-	5	
Dark in color	-	5	
Erosion/ulcer	-	1	
Wound	-	1	

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		500	
Fate	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	5	0	3	2	0	5
No abnormalities detected	3	-	0	0	-	0
Hunchback position	1	-	0	0	-	0
Anastasia	1	-	1	0	-	0
Stupor	0	-	1	0	-	0
Decrease in spontaneous motor activity	1	-	3	2	-	0
Tremor	1	-	3	0	-	0
Bradypnea	0	-	1	0	-	0
Hypothermia	2	-	3	2	-	0
Lacrimation	0	-	1	0	-	0
Back skin (patched area):						
Thickening	0	-	0	2	-	1
Hardening	0	-	0	2	-	0
Dark in color	0	-	0	2	-	0
Scale	0	-	0	0	-	5
Wound	0	-	0	1	-	0

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	14
2000	1	227	236	289
	2	231	238	278
	3	223	224	249
	4	237	251	284
	5	230	245	289
	Mean	230	239	278
	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	
			(g)	
			7	14
2000	101	152	(141)	
	102	149	(133)	
	103	164	(149)	
	104	153	(146)	
	105	158	(145)	
	Mean	155		
	N	5		
1000	106	155	(136)	
	107	149	164	184
	108	154	(150)	
	109	149	(137)	
	110	163	170	190
	Mean	154	167	187
	N	5	2	2
500	111	163	185	199
	112	160	172	194
	113	149	159	167
	114	147	164	176
	115	147	154	170
	Mean	153	167	181
	N	5	5	5

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

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
Back skin (patched area): Thickening	-	5
Dark in color	-	5

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

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

Site and lesion	Dose (mg/kg)					
	2000		1000		500	
Fate	fd	tk	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	5	0	3	2	0	5
No abnormalities detected	0	-	0	0	-	5
Glandular stomach: Red/black spots	1	-	2	0	-	0
Small intestine: Red in color	1	-	1	0	-	0
Small intestine: Red/black contents	1	-	2	0	-	0
Spleen: Enlargement	1	-	0	0	-	0
Spleen: Small in size	0	-	2	0	-	0
Back skin (patched area): Thickening	0	-	2	2	-	0
Dark in color	0	-	0	2	-	0
Edema	5	-	1	0	-	0

Fate: fd, found dead; 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

1 1. 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

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 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
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

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) 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。各濃度の投与液を 3 日間両耳後方に経皮投与し、3 日後に ^3H -methyl-Thymidine (20 μci / 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 (^3H -methyl-Thymidine 取り込み量) の測定を行った。その結果、リンパ節重量、リンパ球細胞生存性及びリンパ球細胞増殖活性は、1 及び 3%投与群において有意な増加が認められた。また、リンパ球細胞増殖活性において、溶媒対照群との比で算出される Simulation Index では、0.3、1 及び 3%投与群において 3 以上を示した。これらの結果から、ACQ の皮膚感作性は、陽性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銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）について、マウスの Local Lymph Node Assay 法（LLNA 法）により皮膚感作性を検索し、リスク評価に必要な基礎的毒性情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

試験方法は 2002 年 4 月 24 日付け経済協力開発機構の毒性試験指針「OECD Guideline for the testing of chemicals. Guideline 429: Skin sensitization - Local

Lymph Node Assay」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木材防腐剤（ACQ）であり、銅及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%及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