

下の状態にて室温（許容範囲：15～30℃）で保管した。

## 2. 試験動物

日本チャールスリバー株式会社厚木飼育センターで生産された近交系 SPF マウス（CBA/JnCrIj）の雌性動物を用いた。CBA/Jn マウスは接触性過敏症研究によく用いられ<sup>2)</sup> Guideline により使用が定められている動物種である。試験動物は7週齢にて購入し、8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個別飼育した。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により群分けを実施した。基礎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

本試験に先駆けて実施された銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）のラットにおける急性経口<sup>3)</sup>、急性経皮<sup>4)</sup>及び培養皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験<sup>5)</sup>の結果に基づいて、経皮及び経口経路にて毒性の起こらない濃度及び腐食性が認められない濃度と想定される ACQ の 3%濃

度を最高用量として選択した。

そこで、試験では 3%濃度から公比 3 にて 0、0.3、1 および 3%の 4 濃度の ACQ を設定した。

## 4. 被験物質投与液の調製

各濃度（0、0.3、1、3%）の被験物質投与液を投与前に 1 回調製した。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。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、アセトン/オリーブオイル（アセトン（和光純薬工業株式会社、大阪府）：オリーブオイル（和光純薬工業株式会社、大阪府）=4：1）を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。対照群の投与液はアセトン/オリーブオイルとした。各濃度の投与液は各投与日用に小分け、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. 被験物質の投与

各被験物質の被験物質投与液を両耳後方に 3 日間経皮投与した。被験物質投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、ピペットを用いて左右の耳介後方に 25  $\mu\text{L}$  ずつ経皮投与を行った。

## 6. 体重

全動物について、初回被験物質投与直前及び最終解剖日に体重を測定した。

## 7. 剖検及び組織採取

最終解剖予定時刻の 5 時間前に動物の尾静脈内に  $^3\text{H}$ -methyl-Thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR、GE Healthcare Bioscience Ltd、東京都)

を投与した。 $^3\text{H}\text{-TdR}$  の投与量はマウス 1 匹あたり 20  $\mu\text{ci}$  とした。 $^3\text{H}\text{-TdR}$  投与の 5 時間後、全生存動物についてエーテルの麻酔下で放血屠殺し、剖検を実施した。各動物より両側の耳下リンパ節を採取し、その重量を測定した。重量測定後、リンパ球細胞の細胞懸濁液とした。

#### 8. 細胞懸濁液の調製

リン酸緩衝液 (PBS) に浸水したリンパ節をナイロンメッシュ (75 $\mu\text{m}$  メッシュ) 上で揺りつぶし、単細胞懸濁液を得た。次に細胞懸濁液を遠心分離 (1300rpm; 5min) により洗浄し、PBS にて 5mL の細胞懸濁液とした。

#### 9. リンパ球細胞生存性

細胞懸濁液の一部試料 (100 $\mu\text{L}$ ) について、細胞内 ATP 活性を測定することにより、リンパ球細胞の生存性を評価した。細胞内 ATP 活性の測定には、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ、東京都) を用いた。細胞懸濁液の一部試料 (100 $\mu\text{L}$ ) と CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (100 $\mu\text{L}$ ) を白色マイクロプレート (Nalge Nunc International K.K., 東京都) に添加し、10 分間室温で培養した。その後、マイクロプレートルミノメーター (TR717、Berthold Japan, co. ltd., 東京都) にて発光量を測定した。

#### 10. リンパ球細胞増殖活性

細胞懸濁液を遠心分離 (1300rpm; 5min) により洗浄し、5%トリクロロ酢酸溶液 (TCA、和光純薬工業株式会社、大阪府)

にて 3mL の細胞懸濁液とした。冷蔵・遮光 (4°C) 条件下にて 18 時間静置し、細胞を裸化させた。18 時間後、遠心分離 (1300rpm; 5min) により洗浄し、再度 TCA にて 1mL の細胞懸濁液とした。得られた細胞懸濁液をシンチレーションバイアルに移し、Atomlight (株式会社パーキンエルマージャパン、東京都) を 9mL 加えてよく攪拌した。この細胞懸濁液について、液体シンチレーションカウンター (LC-5100、アロカ株式会社、東京都) により細胞増殖活性を測定した。

#### 11. 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%及び 1%レベルで解析した。

体重、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のデータについては、先ず Bartlett の等分散分析を行ったその後、等分散の場合には、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、Dunnett の多重比較法により対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、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、Dunnett 型の多重比較法を用いて平均順位の有意差の有無を判定した。

#### 12. Stimulation index (SI) の算出

細胞増殖活性測定データについて、その平均値をもとに、次式により Stimulation index (SI) を求める。

SI = 各投与群の細胞増殖活性平均値 / 溶媒対照群の細胞増殖活性平均値

一般的に、SI が 3 以上であると陽性と判定する。<sup>6)</sup>

### C. 研究結果

LLNA の試験結果を表 1 に示す。

#### 1. 体重

いずれの投与群においても被験物質投与の影響と考えられるような体重減少は認められなかった。

#### 2. リンパ節重量

ACQ の 1 及び 3% 投与群で、対照群と比べ有意なリンパ節重量の増加が認められた。

#### 3. リンパ球細胞生存性

ACQ の 1 及び 3% 投与群で、対照群と比べ有意な ATP 活性の増加が認められた。

#### 4. リンパ球細胞増殖活性

ACQ の 1 及び 3% 投与群で、対照群と比べ有意なリンパ球細胞増殖活性の増加が認められた。また、SI 値は ACQ 0.3、1 及び 3% 投与群において 3 以上を示していた。

### 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事を目的に、CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、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。

### E. 結論

CBA/Jn マウスを用いた Local Lymph Node Assay 法により、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) の皮膚感作性を検索した。本実験条件下において、ACQ の皮膚感作性は陽性であると結論した。

### F. 引用文献

- 1) OECD, 2002. OECD Guideline for the Testing of Chemicals; Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Guideline 429. Paris, adopted 24<sup>th</sup> April 2002.
- 2) 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.
- 3) 小坂忠司:アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) のラットにおける急性経口投与毒性試験、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、2006年

3. その他  
なし

4) 小坂忠司: アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) のラットにおける急性経皮投与毒性試験、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、2006年

5) 小坂忠司: アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) のヒト皮膚三次元モデルにおける皮膚腐食性試験、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、2006年

6) Gerberick, G. F., Robinson, M. K., Ryan, C. A., Dearman, R. J., Kimber, I., Basketter, D. A., Wright, Z., and Marks, J. G. (2001). Contact allergenic potency: correlation of human and local lymph node assay data. *Am J Contact Dermat* 12, 156-161.

#### 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

Table 1 LLNA results in female mice

Group no.	Dose	Final BW (g)	Lymph node weight (mg)	ATP activity (RLU)	Cellular proliferation (DPM/mouse)	Stimulation Index
1	0	Mean	3.4	55938	100.7	1.0
		S.D.	0.7	25615	87.5	
2	ACQ 0.3 %	Mean	4.6	109535	630.2	6.3
		S.D.	0.8	61254	355.4	
3	ACQ 1 %	Mean	7.8 **	234504 *	2761.0 **	27.4
		S.D.	0.6	124690	1340.0	
4	ACQ 3 %	Mean	9.1 **	383174 **	5003.0 **	49.7
		S.D.	1.5	101106	1669.0	

S.D.: Standard deviation.

Stimulation Index is the ratio of the mean of actual measurements for each test substance treatment group against that of the vehicle treatment control group. Significantly different from control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test): \* , p <= 0.05; \*\* , p <= 0.01.

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 2. 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

分担研究者 原田 孝則 （財）残留農薬研究所 毒性部長  
協力研究者 高橋 尚史 （財）残留農薬研究所 毒性部病理研究室研究員  
高橋 義博 （株）新日本科学 安全性研究所

**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）の反復経皮投与毒性を明らかにするため、雌雄の SD 系ラットを用い、各群 8 匹の動物の背部皮膚に ACQ を 0、10、100 及び 300 mg/kg の用量で毎日 24 時間適用し、13 週間に亘り反復経皮投与する予定で実験が開始された。しかし、100 及び 300 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 5 日以降に適用部位の皮膚状態が悪化し、投与 3 週時には出血あるいは重度のびらん・潰瘍が観察されたため、倫理上（動物愛護）の観点から投与 3 週終了時に投与を中止し、試験を終了した。ACQ には主要成分として皮膚刺激性・腐食性を有する塩化ベンザルコニウムが含まれていることから、反復経皮投与試験では 100 mg/kg 以下の低い用量で試験群を設定することが適切であると結論された。

**A. 研究目的**

平成 17 年度では、CCA に代わって現在使用量が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）を対象に、ラットを用い反復経皮投与試験を実施した。ただし、投与期間は当初の予定では 13 週間であったが、投与 5 日以降に中・高用量群において被験物質適用部位の皮膚の状態が悪化したため、動物愛護の観点から投与 3 週終了時に投与を中止し、試験を終了した。なお、平成 17 年度の報告では、飼育関連項目以外

は検査未了でデータが掲載されていなかったため、平成 18 年度では改めて全ての検査データを網羅した形の報告書を作成し直した。

**B. 研究方法**

試験方法は平成元年 9 月 11 日付け薬審 1 第 24 号厚生省薬務局通知「医薬品毒性試験ガイドライン」および平成 5 年 8 月 10 日付け薬新薬第 88 号厚生省薬務局通知「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」および農薬の毒性試験ガイドライ

ン「12農産第8147号、平成12年11月24日付け」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、被験物質保管所内常温室デシケータ内 (許容温度: 16~24°C) で保管した。

### 2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社 (滋賀県) で生産された Sprague-Dawley 系 SPF ラット (Crj: CD (SD) IGS) の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに 5 週齢で購入し、1 週間試験環境に馴化した後、6 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、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 19~25°C、湿度 30~70%、換気回数 15 回/時間 (オールフレッシュエア方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 6 時点灯、午後 6 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、雌雄別々に体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に雌雄 8 匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後、各群の動物を 1 匹ずつステンレス鋼製個別ケージ (D 32.5 cm x W 19.5 cm x H 18 cm) に收容した。動物の個

体識別は耳パンチ法で行なった。基礎飼料には固形飼料 CE-2 (日本クレア株式会社) を用い、動物に自由に摂取させた。ただし、剖検前日の午後 5 時前後より絶食とした。飲料水は、水道法水質基準に適合した水を自動給水装置 (Edstrom Industries, Inc.) を用いて自由に摂取させた。

### 3. 試験群

本試験に先立ち、用量設定のための予備試験を実施した。予備試験では 7 週齢の雌性ラットを用い、0、300 および 1000 mg/kg の 3 用量で、各群 2 匹の動物の背部皮膚に 1 日 24 時間閉鎖貼付し、7 日間に亘り反復経皮投与した。その結果、両投与群では適用部位の皮膚肥厚が認められ、剖検時に 1000 mg/kg 群では胸腺重量の減少と肝・脾の重量増加がみられ、300 mg/kg 群では脾臓の重量が増加した。

上記の予備試験結果を考慮し、本試験の最高用量を 300 mg/kg として設定し、公比 3 倍で中間用量を 100 mg/kg、そして無毒性量としての予想で 10 mg/kg を最低用量として設定した。これらの設定用量群 (0、10、100、および 300 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき雌雄とも 8 匹の動物を使用した。

### 4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、10、100、300 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、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 3 mL/kg とした。最初に、所定量の酸化銅 (II) および 50% 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) を加え、ス

ターラーで懸濁させた。溶解させた。懸濁後、3.33、33.3 および 100 mg/mL の濃度になるよう注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。各濃度の投与液は7日間分小分けし、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. 投与方法および投与期間

投与開始前日に各動物の背部（5 cm x 5 cm）を電気バリカンで剃毛し、適用部位を確保した。投与日には、剃毛部皮膚に各用量群の投与液（対照群は注射用水）を均一に塗布し、塗布部位をパラフィルム及びリント布で覆い、非刺激性テープ（株式会社ジェイ・エム・エス）と粘着性伸縮包帯（ニチバンメディカル株式会社）にて固定し、1日あたり約24時間閉塞適用した。投与は1日1回、週7日間行った。なお、剃毛は原則として週2回行い、その際には塗布部位の皮膚を刺激しないように配慮した。

投与期間は当初13週間を予定していたが、投与3週時に中・高用量群において適用部位の皮膚の状態が潰瘍形成などで悪化したため、投与継続は科学的かつ動物愛護の観点からも不適切と判断され、投与3週終了時点（投与20日）で投与を中止し、試験を終了した。

#### 6. 動物の観察

全動物について、投与期間中1日2回（投与前に1回、投与後約2時間に1回）以上と剖検日に1回、瀕死状態ないし死亡の有無および一般状態を観察した。

#### 7. 体重

全生存動物について、投与開始時およびその後毎週1回体重を測定した。また、全動物について殺処分前に最終体重を測定した。

#### 8. 摂餌量

全動物について、毎週1回、個体別摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中の延べ日数で除し、用量群毎に1日1匹あたりの摂餌量（群別平均摂餌量）を算出した。

#### 9. 眼科学的検査

馴化期間中に1回雌雄の全馴化動物について、眼科学的検査を行った。検査には、肉眼（ペンライト使用）およびスリットランプ（コーワ SL-14、有限会社幸田電子）により前眼部および中間透光体を観察し、眼底検査については額带式双眼倒像検眼鏡（ID-10、株式会社トプコン）を用いて行った。ただし、投与期間中に予定されていた眼検査については、試験の短縮に伴う日程の問題で実施しなかった。

#### 10. 尿検査

予定されていたが、試験の短縮に伴う日程的な問題で実施しなかった。

#### 11. 血液学的検査

投与終了時（投与20日）に各群の生存動物全例について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。動物をペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液の腹腔内投与による麻酔下で開腹し、凝固検査用に3.8 w/v%クエン酸ナトリウム水溶液添加の注射筒を、その他の検査用に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 (Plat.)、網赤血球数 (Ret.)、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 (Neutro.)、リンパ球 (Lymph.)、単球 (Mono.)、好酸球 (Eosino.)、好塩基球 (Baso.)、大型非染色球 (LUC)

血液凝固能については、全自動血液凝固測定装置 (CA-5000、シスメックス株式会社) を用い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) を測定した。

## 12. 血液生化学的検査

前項の血液学的検査で採取した各群の血液試料の血清を用い、以下の項目を JCA-BM8 自動分析装置 (日本電子株式会社) にて測定した。

測定項目 (略号): アルカリホスファターゼ (ALP)、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)、 $\gamma$ -グルタミルトランスパプチダーゼ (G-GTP)、クレアチニン (Creat.)、尿素窒素 (BUN)、総蛋白 (T.Prot.)、アルブミン (Albumin)、グロブリン (Globlin)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、血糖 (Glucose)、総コレステロール (T.Chol.)、トリグリセライド (TGL)、総ビリルビン (T.Bil.)、カルシウム (Ca)、

無機リン (IP)、ナトリウム (Na)、カリウム (K) および塩素 (Cl)

## 13. 剖検および組織採取

全動物について剖検を実施した。ペントバルビタールナトリウム水溶液の腹腔内投与による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。

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、眼球及び視神経はホルムアルデヒド・グルタールアルデヒド混合液で、精巣はブアン液で固定した。

採取した臓器及び組織: 脳 (大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄 (胸部)、坐骨神経 (両側)、下垂体、胸腺、甲状腺および上皮小体 (両側)、副腎 (両側)、脾臓、骨および骨髄 (胸骨、両側大腿骨)、顎下リンパ節 (両側)、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈 (胸部)、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、舌、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、精囊 (両側)、卵巣 (両側)、子宮、膈、涙腺 (両側)、眼球 (視神経を含む、両側)、ハーダー腺 (両側)、大腿四頭筋 (両側)、乳腺および皮膚 (乳頭を含む)、投与部位 (背部皮膚) および肉眼的異常部位

## 14. 臓器重量

全動物について、剖検後、以下の臓器の固定前の重量 (絶対重量) を測定し、最終体重から比体重値 (相対重量) を算出した。測定臓器: 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)、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺、精囊(両側)、卵巣(両側)、子宮

#### 15. 病理組織標本作製

供試動物全例から採取した以下に示す臓器・組織を対象にして病理組織標本作製した。標本は常法に従ってパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

組織標本対象臓器・組織：脳(大脳、小脳、橋および延髄)、脊髓(胸部)、坐骨神経(左側)、下垂体、胸腺、甲状腺(両側)、上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓、骨および骨髓(胸骨、左側大腿骨)、顎下リンパ節(左側)、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈(胸部)、唾液腺(顎下腺および舌下腺)、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、脾臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、舌、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、精囊(左側)、卵巣(両側)、子宮、陰、涙腺(両側)、眼球(視神経を含む、両側)、ハーダー腺(両側)、大腿四頭筋(左側)、皮膚(左胸部)、乳腺(雌のみ)、投与部位(背部皮膚)および肉眼的異常部位

#### 16. 肝機能検査のための組織採取

供試動物全例から肝臓の左葉を採取し、超低温フリーザー(-70℃以下)で保管し、将来の検索に備えた。

#### 17. 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。

体重、摂餌量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目および臓器重量のデータについては、先ず Bartlett の等分散検定を行なったその後、等分散の場合には、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、Dunnett の多重比較法により対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、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、Dunnett 型の多重比較法を用いて平均順位の有意差の有無を判定した。これらの検定および計算には MUSCOT 統計解析ソフトウェア(ユックムス株式会社)を使用して行った。一般状態(臨床症状)、眼検査および剖検所見については統計検定を実施しなかった。

### C. 研究結果

#### 1. 臨床症状および死亡率(表1)

300 および 100 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与5日あるいは6日以降に適用部の皮膚が肥厚し、その状態は日々悪化し、投与3週時には重度のびらん・潰瘍あるいは出血がみられたため、投与の継続が不能と判断し、加えて、倫理的観点(動物愛護)から投与を中止し、投与3週終了時点(投与20日)で試験を終了するに至った。

10 mg/kg 投与群では、投与3週時に雄1例および雌3例の適用部位に軽度の痂皮形成が認められた。

## 2. 体重変化 (図 1、表 2)

300 および 100 mg/kg 投与群では、雄において体重増加抑制が認められ、対照群に比べ 15%前後の低値を示したが、雌では特に異常はなかった。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と比べ投与期間中の体重変化に差はなかった。

## 3. 摂餌量 (図 2、表 3)

300 および 100 mg/kg 投与群では、雄において投与 1 週時の摂餌量が減少したが、その後回復した。雌の摂餌量は対照群に比べ特に差異はなかった。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも摂餌量に異常はみられなかった。

## 4. 眼科学的検査成績 (表 4)

試験の短縮に伴い、投与期間中の眼検査は実施しなかった。

## 5. 尿検査

試験の短縮に伴い、投与期間中の尿検査は実施しなかった。

## 6. 血液学的検査成績 (表 5)

300 および 100 mg/kg 投与群では、雌雄とも赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht) および平均赤血球色素濃度 (MCHC) が有意に減少あるいは減少傾向を示した。この貧血所見に伴い、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 (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ならびにリンパ球の減少がみられた。また、高用量群の雌では、好酸球が増加した。その他、中・高用量群において血液凝固系の

プロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン (APTT) の短縮が雄で、延長が雌でそれぞれ認められた。

10 mg/kg 投与群では、雌雄と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。

## 7. 血液生化学的検査成績 (表 6)

300 および 100 mg/kg 投与群では、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。その他、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。

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。

## 8. 剖検所見 (表 7)

300 mg/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)、腎部リンパ節の腫大が散見された。

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が認められ、腺胃粘膜の黒色斑が雄で 2/8 例に、雌では 5/8 例に観察された。

10 mg/kg 投与群では、適用部位皮膚の痂皮形成が雌の 3/8 例に認められた。雄では、特に異常は観察されなかった。

## 9. 臓器重量 (表 8)

300 mg/kg 投与群では、雌雄とも副腎と脾臓の絶対・相対 (比体重値) 重量がともに有意に増加し、加えて、肝臓、腎臓および肺の相対重量が増加あるいは増加傾向を示し、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、精嚢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した。

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも副腎および脾臓の絶対・相対重量ならびに肺および腎臓の相対重量が有意に増加あるいは増加傾向を示した。加えて、胸腺の絶対・相対重量が雌雄とも有意に減少あるいは減少傾向を示した。その他、雄では精嚢および前立腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示し、脳および精巣の相対重量が有意に増加した。雌では、卵巣の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。

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。雌では特に異常はなかった。

## 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、平成 17 年度では、CCA に代わり現在使用量が多い、銅・アリキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) を対象に、ラットの反復経皮投与と毒性試験を実施した。本研究では、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。なお、中・高用量群では血液凝固系のプロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン (APTT) が統計学的に有意な変動を示したが、雄では短縮、雌では延長と変動方向が雌雄で異なり、かつ、測定値を固体別に解析した場合、いずれも背景データの正常範囲内にあったことから、偶発所見と解釈した。

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。加えて、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>2)</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>3)</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>4)</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>5-8)</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>9,10)</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。

## E. 結論

本実験条件下では、ACQ をラットに反復経皮投与する場合、本剤の皮膚刺激性・腐食性を考慮し、100 mg/kg 以下の用量設定で実施するのが適切であると結論された。

## 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) 楼林郁之介: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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) BIBR Working Group: Benzalkonium chloride. Toxicity profile. The British Industrial Biological Research Association, 1989.
- 6) Cutler RA and Drobeck HP: Toxicology of cationic surfactants. In: Cationic Surfactants, Vol. 4 (Chapter 15), Jungermann E (ed.), Marcel Dekker, New York, 1970.
- 7) Grosselin RE, Smith RP, and Hodge HC: Clinical Toxicology of Commercial Products (5<sup>th</sup> ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 8) 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.

- 9) 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.
- 10) 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.

## 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

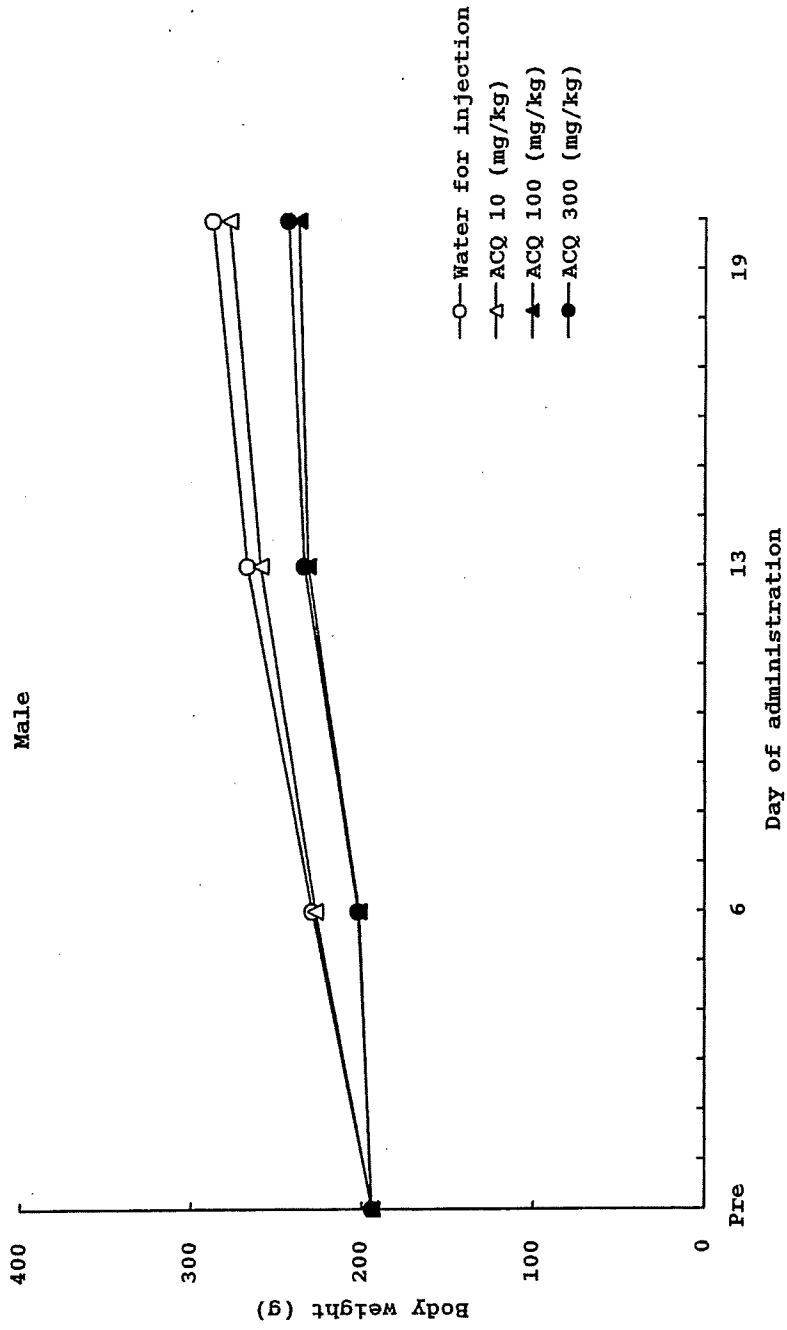


Figure 1-1 Changes of body weight in rats

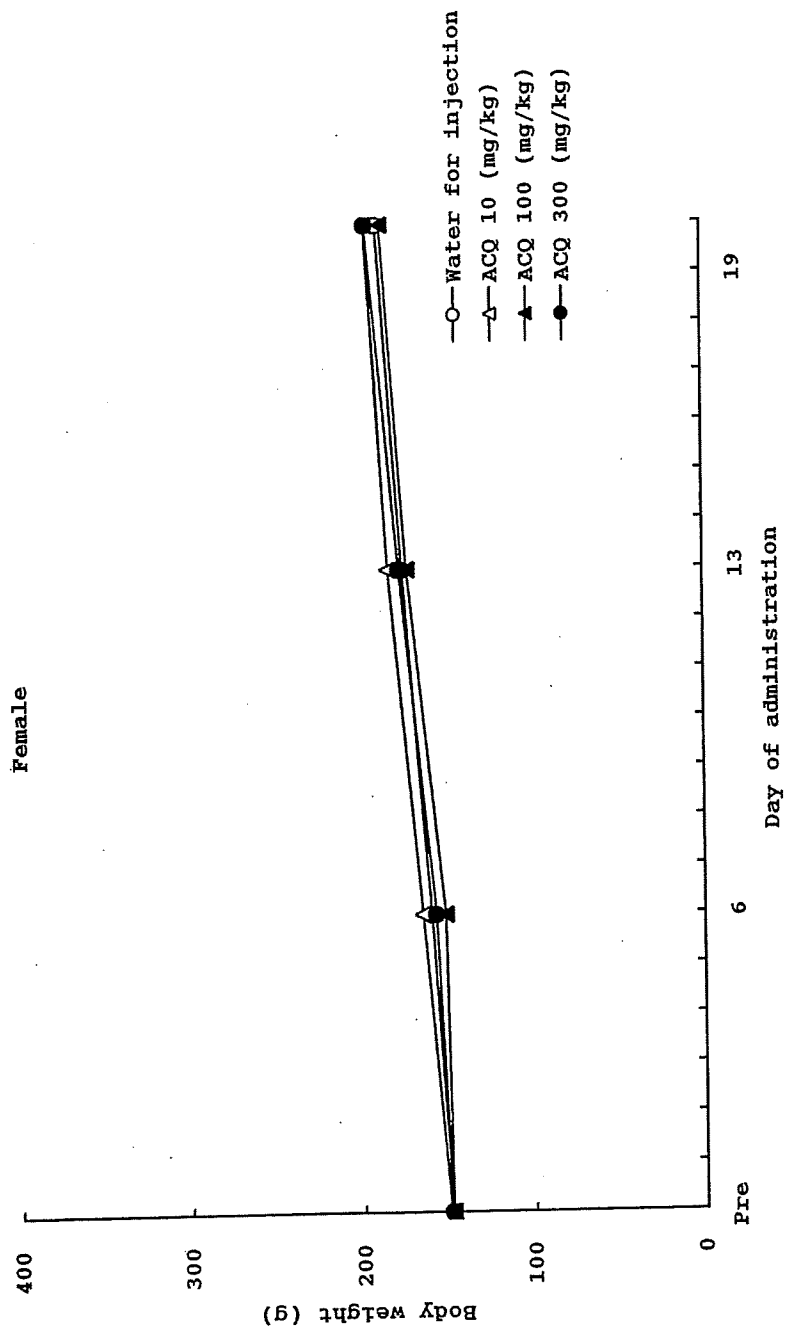


Figure 1-2 Changes of body weight in rats



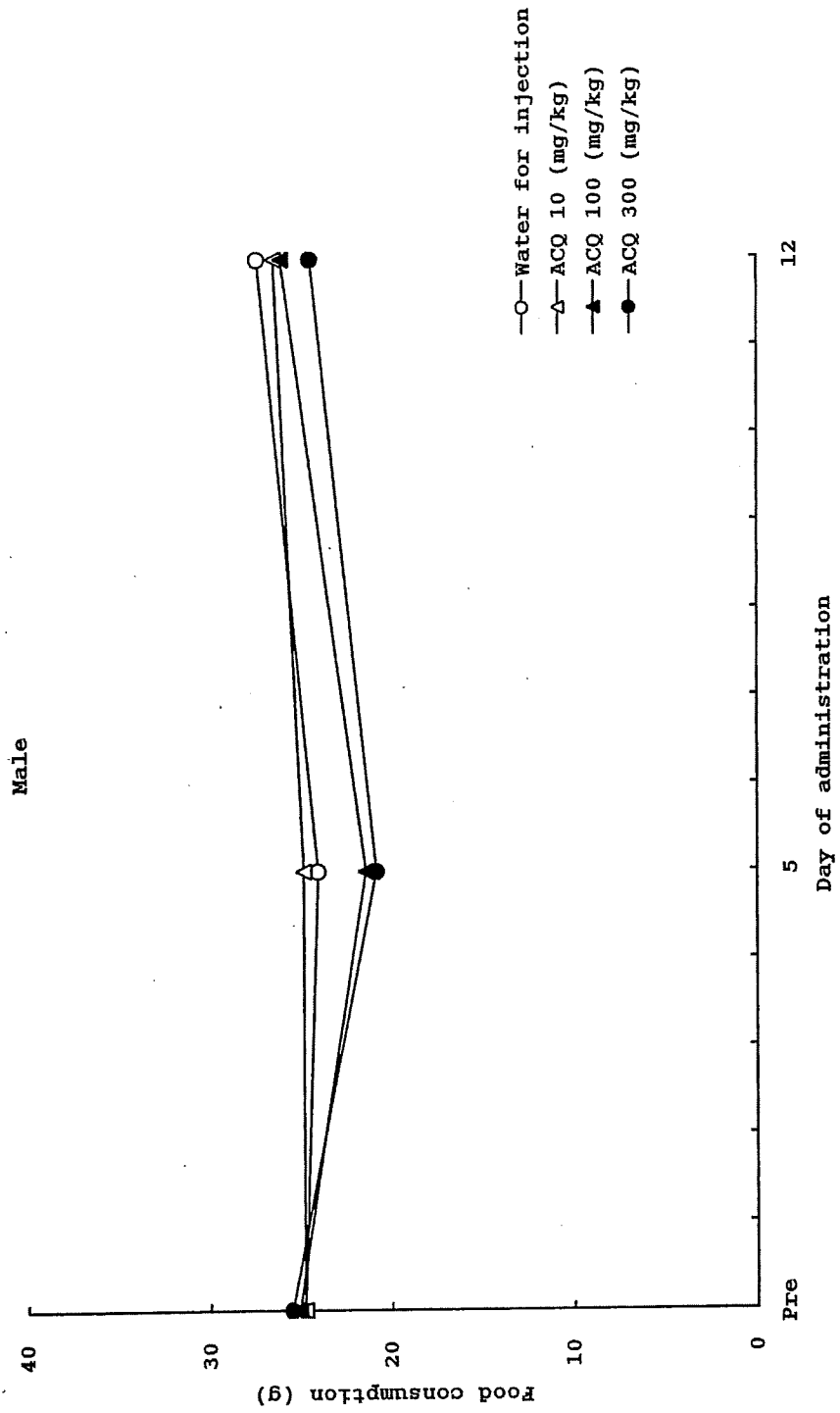


Figure 2-1 Changes of food consumption in rats

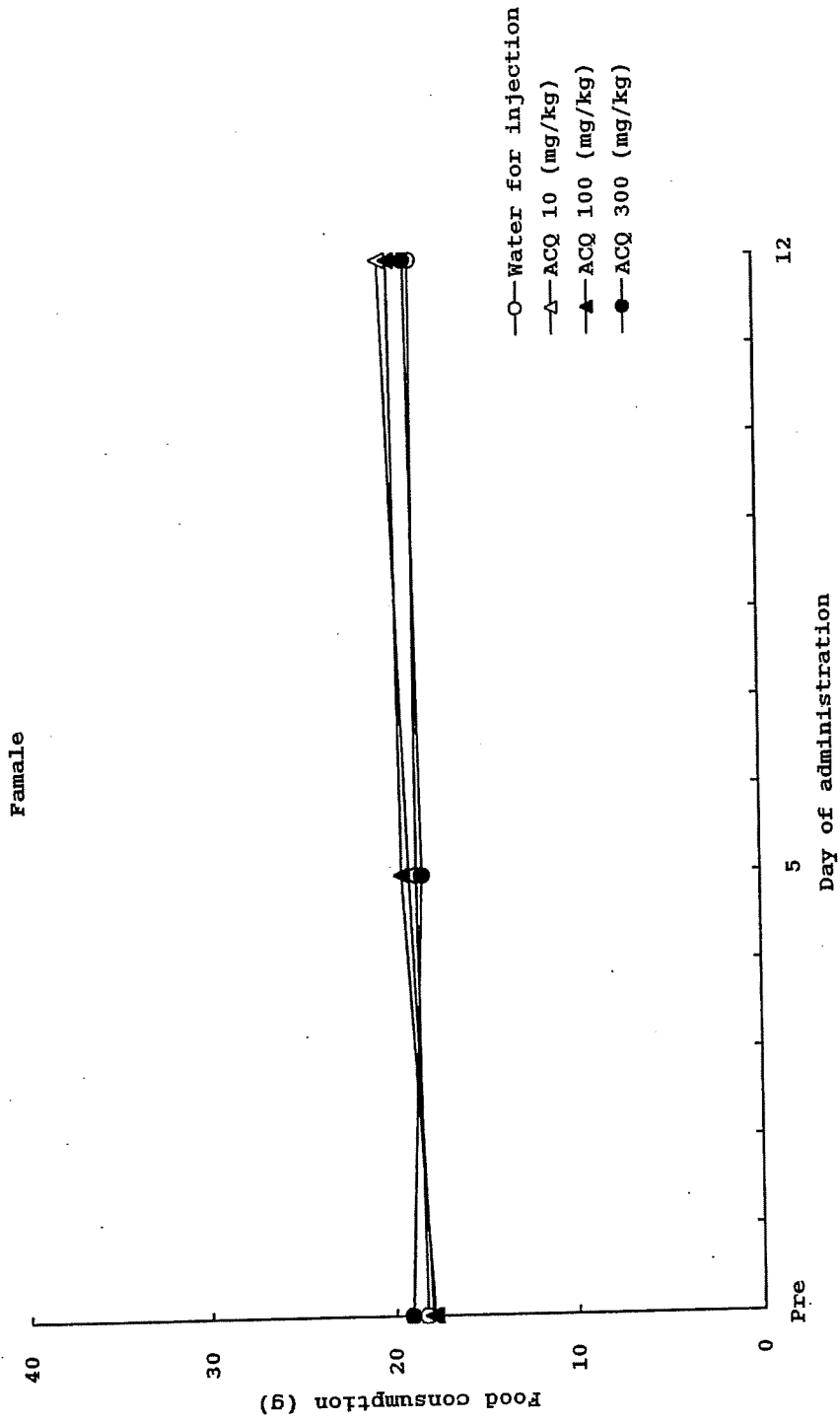


Figure 2-2 Changes of food consumption in rats

Clinical Sign

Grade

- 0 : No abnormal signs
- 1 : Slight
- 2 : Moderate
- 3 : Severe
- + : Non-graded clinical signs

Table 1-1 Clinical signs in male rats

Group	Dose(mg/kg)	Grade	Water for injection			ACQ			ACQ			
			0	1	2 3 +	0	1	2 3 +	0	1	2 3 +	
Day	Item											
0	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
3	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
4	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
5	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
6	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
7	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
8	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
9	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
10	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
11	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
12	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
13	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
14	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
15	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
16	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
17	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
18	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
19	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
20	No abnormal signs		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Numerals represent the number of animals.