

Table 5-2 Hematology in female rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection	ACQ		ACQ		ACQ	
				10	8	100	8	300	8
RBC	(10 ⁶ /mm ³)		7.284±0.628	7.441±0.621	6.900±0.282	6.626±0.491*			
WBC	(10 ³ /mm ³)		5.798±2.965	6.468±2.895	17.034±11.347*	21.670±13.238**			
Ht	(%)		41.85±2.86	42.50±2.56	41.00±1.52	39.70±2.50			
Hb	(g/dL)		14.94±1.19	15.11±0.93	14.08±0.55	13.48±0.87**			
Plat.	(10 ³ /mm ³)		1206.9±150.9	1227.5±113.9	1692.6±269.5**	1954.6±149.1**			
MCV	(fL)		57.60±2.77	57.21±2.13	20.41±0.47	20.36±0.66			
MCH	(pg)		20.54±0.78	20.35±0.77	20.41±0.47	20.36±0.66			
MCHC	(g/dL)		35.69±0.83	35.56±0.47	34.30±0.57**	33.96±0.66**			
Ret.	(%)		3.35±3.64	2.43±0.76	5.15±0.95	7.09±1.39**			
Eosino.	(10 ³ /mm ³)		0.036±0.021	0.055±0.034	0.044±0.031	0.084±0.048*			
Eosino.	(%)		0.68±0.45	0.75±0.40	0.28±0.15	0.41±0.20			
Baso.	(10 ³ /mm ³)		0.018±0.010	0.019±0.014	0.049±0.038	0.125±0.069**			
Baso.	(%)		0.26±0.11	0.25±0.09	0.26±0.11	0.58±0.13**			
Mono.	(10 ³ /mm ³)		0.148±0.125	0.114±0.071	0.440±0.228*	0.554±0.138**			
Mono.	(%)		2.20±1.25	1.73±0.68	3.00±1.75	3.04±1.19			
Lymph.	(10 ³ /mm ³)		3.464±1.745	4.553±2.419	4.119±1.601	8.114±2.214**			
Lymph.	(%)		61.29±7.62	68.45±11.17	28.84±10.35**	44.26±15.30*			
Neutro.	(10 ³ /mm ³)		2.088±1.190	1.691±0.673	12.239±9.987**	12.106±11.857**			
Neutro.	(%)		34.80±6.61	28.23±11.18	66.63±12.10**	48.05±17.12			
LUC	(10 ³ /mm ³)		0.046±0.032	0.041±0.032	0.144±0.102	0.685±0.407**			
LUC	(%)		0.76±0.35	0.63±0.30	1.00±0.77	3.65±2.16			
PT	(Sec)		7.78±0.32	7.94±0.69	10.21±2.43**	10.45±2.85**			
APTT	(Sec)		17.26±2.15	17.59±1.23	18.58±1.61	20.85±2.94**			

Values are expressed as the mean ± S.D.
 * P<0.05, ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Blood Chemistry

ASAT	(IU/L)	Aspartate aminotransferase
ALAT	(IU/L)	Alanine aminotransferase
ALP	(IU/L)	Alkaline phosphatase
LDH	(IU/L)	Lactate dehydrogenase
CPK	(IU/L)	Creatine phosphokinase
T.Bil.	(mg/dL)	Total bilirubin
T.Prot.	(g/dL)	Total protein
Albumin	(g/dL)	Albumin
T.Chol.	(mg/dL)	Total cholesterol
TGL	(mg/dL)	Triglyceride
Glucose	(mg/dL)	Glucose
BUN	(mg/dL)	Blood urea nitrogen
Creat.	(mg/dL)	Creatinine
IP	(mg/dL)	Inorganic phosphorus
Ca	(mg/dL)	Calcium
Na	(mEq/L)	Sodium
K	(mEq/L)	Potassium
Cl	(mEq/L)	Chloride
Protein fraction		
Albumin	(%)	Albumin
A1-glob.	(%)	Alpha-1 globulin
A2-glob.	(%)	Alpha-2 globulin
B-glob.	(%)	Beta globulin
G-glob.	(%)	Gamma globulin
A/G		Albumin / Globulin

Table 6-1 Blood chemistry in male rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection	ACQ		
				10	100	300
ASAT (IU/L)	366.9±453.0	8	188.9±54.1	256.3±177.6	149.3±35.2*	
ALAT (IU/L)	145.0±205.4	8	64.4±24.6	74.8±47.8	48.9±13.6	
ALP (IU/L)	808.1±133.7	8	840.4±153.1	1121.0±237.7	1010.4±518.5	
LDH (IU/L)	2853.5±988.4	8	1884.4±1021.6	1670.1±1040.6	1640.3±1464.3	
CPK (IU/L)	912.4±341.0	8	624.8±247.9	610.1±229.7	615.5±425.5	
T.Bil. (mg/dL)	0.058±0.013	8	0.059±0.019	0.054±0.020	0.049±0.018	
T.Prot. (g/dL)	5.09±0.16	8	5.06±0.18	4.78±0.14**	4.80±0.23*	
Albumin (g/dL)	3.96±0.14	8	3.95±0.17	3.10±0.30**	2.56±0.16**	
T.Chol. (mg/dL)	54.5±13.1	8	50.3±9.7	43.5±6.1	42.0±8.2*	
TGL (mg/dL)	16.6±5.1	8	14.6±5.2	11.3±3.0	18.9±6.5	
Glucose (mg/dL)	119.0±18.2	8	115.5±13.9	119.4±19.6	131.5±9.8	
BUN (mg/dL)	20.35±3.77	8	21.48±5.60	33.68±10.66**	30.79±6.52*	
Creat. (mg/dL)	0.178±0.022	8	0.176±0.022	0.206±0.023*	0.193±0.017	
IP (mg/dL)	8.814±0.704	8	8.744±0.634	8.259±1.084	8.235±0.541	
Ca (mg/dL)	9.11±0.32	8	9.16±0.24	8.46±0.35**	8.86±0.29	
Na (mEq/L)	143.0±1.2	8	143.4±1.2	145.6±1.6**	145.9±2.0**	
K (mEq/L)	3.88±0.20	8	3.90±0.19	4.16±0.30	4.05±0.39	
Cl (mEq/L)	104.9±2.0	8	105.4±0.9	109.9±1.6**	108.3±2.3**	
Albumin (%)	54.09±1.61	8	54.80±1.88	40.56±4.35	28.88±2.34**	
A1-glob. (%)	18.85±1.17	8	18.68±1.24	23.08±2.87*	29.10±3.74**	
A2-glob. (%)	7.56±0.58	8	7.61±0.60	11.91±2.29**	13.73±2.88**	
B-glob. (%)	14.86±0.43	8	15.16±0.65	21.18±1.98*	25.20±0.87**	
G-glob. (%)	4.64±0.72	8	3.75±0.72*	3.28±0.47**	3.10±0.31**	
A/G	1.180±0.075	8	1.218±0.091	0.690±0.128**	0.406±0.048**	

Values are expressed as the mean ± S.D.

* P<0.05 , ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Table 6-2 Blood chemistry in female rats

Group	Water for injection	ACQ		
		10	100	300
Dose (mg/kg)	8	8	8	8
GOT (IU/L)	200.6±87.0	196.5±40.2	251.9±72.2	414.8±311.3*
GPT (IU/L)	55.9±29.4	52.4±11.9	60.6±13.5	119.3±103.9**
ALP (IU/L)	473.5±89.7	494.8±139.3	820.5±244.5*	1275.5±664.7**
LDH (IU/L)	2053.8±752.1	2172.9±1574.8	3008.6±2279.2	2441.9±1722.1
CPK (IU/L)	669.9±188.0	767.8±548.6	989.0±512.7	1013.0±978.8
T.Bil. (mg/dL)	0.058±0.015	0.048±0.016	0.046±0.019	0.061±0.042
T.Prot. (g/dL)	5.44±0.21	5.38±0.38	4.60±0.23**	4.44±0.39**
Albumin (g/dL)	4.18±0.24	4.11±0.31	3.01±0.36**	2.36±0.28**
T.Chol. (mg/dL)	53.9±16.4	49.6±14.9	38.5±11.4	35.5±12.9*
TGL (mg/dL)	9.9±3.7	10.1±4.0	7.9±4.7	16.8±8.4
Glucose (mg/dL)	118.8±10.4	121.6±13.4	114.6±31.1	95.4±48.7
BUN (mg/dL)	31.35±8.66	36.98±19.75	60.86±11.99**	43.94±7.38
Creat. (mg/dL)	0.230±0.025	0.223±0.034	0.230±0.065	0.178±0.034*
IP (mg/dL)	8.104±0.841	8.794±0.942	9.049±1.207	8.538±0.683
Ca (mg/dL)	9.11±0.36	9.26±0.60	8.46±0.20*	8.75±0.58
Na (mEq/L)	143.4±1.3	144.0±0.5	144.9±3.7	144.8±3.5
K (mEq/L)	3.69±0.23	3.79±0.36	4.50±0.69*	5.10±1.33**
Cl (mEq/L)	107.6±1.8	108.5±2.7	113.0±2.6**	112.0±3.1**
Albumin (%)	54.34±2.30	55.36±2.43	42.01±6.77	29.73±3.37**
Al-glob. (%)	15.29±1.29	16.29±1.90	24.33±3.24**	30.49±2.56**
A2-glob. (%)	7.43±0.67	7.66±0.88	9.54±2.44	13.04±2.54**
B-glob. (%)	16.59±1.67	15.43±0.88	20.29±2.03**	23.60±1.09**
G-glob. (%)	6.36±1.13	5.26±1.05*	3.84±0.68**	3.15±0.50**
A/G	1.195±0.113	1.245±0.118	0.749±0.214	0.428±0.065**

Values are expressed as the mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Gross Autopsy Findings

Grade

- 0 : No abnormal changes
- 1 : Slight
- 2 : Moderate
- 3 : Marked
- P : Non-graded changes

Table 7-1 Gross autopsy findings in male rats

Findings	Group			Water for injection			ACQ 10			ACQ 100			ACQ 300				
	0	1	2	3	P	0	1	2	3	P	0	1	2	3	P		
Spleen Enlargement	8				0	8				0	8				0	5	3
Stomach Black focus, mucosa, glandular stomach	8				0	8				0	6				2	6	2
Lymph node (Renal) Enlargement	8				0	8				0	8				0	5	3
Application site Erosion/Ulcer	8				0	8				0	0				8	0	8
Red focus, subcutaneous tissue	8				0	8				0	8				0	7	1

Numerals represent the number of animals.

Table 7-2 Gross autopsy findings in female rats

Findings	Group	Water for injection						ACQ			ACQ					
		Dose (mg/kg)		Grade		10		100			300					
		0	1	2	3	P	0	1	2	3	P	0	1	2	3	P
Spleen Enlargement		8				0	8				0	8				4
Stomach Black focus, mucosa, glandular stomach		8				0	8				0	3			5	4
Lymph node (Renal) Enlargement		8				0	8				0	8			0	7
Application site Crust		8				0	5				3	8			0	8
Erosion/Ulcer		8				0	8				0	0			8	0

Numerals represent the number of animals.

Organ weight

Submand.
Epididym.
Sem. Vesic.

-R
-L
-R&L

Submandibular gland
Epididymis
Seminal vesicle

(Right)
(Left)
(Right and Left)

Table 8-1 Organ weight in male rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection		ACQ		ACQ		ACQ	
			8	8	10	8	100	8	300	8
Pituitary	(mg)		10.23±1.44	10.00±1.44	8.69±1.32	8.04±0.57**				
Thyroid-R	(mg)		8.23±1.71	7.03±1.52	7.11±1.87	7.56±1.47				
Thyroid-L	(mg)		8.04±1.70	7.34±1.40	6.18±1.47	6.73±1.49				
Thyroid-R&L	(mg)		16.26±2.60	14.36±2.20	13.29±2.53	14.30±2.78				
Adrenal-R	(mg)		26.41±4.76	26.50±3.89	30.95±1.95	32.83±5.42*				
Adrenal-L	(mg)		27.49±5.84	29.85±4.08	33.68±4.89*	36.66±4.86**				
Adrenal-R&L	(mg)		53.90±10.30	56.35±7.66	64.63±6.50*	69.49±8.43**				
Testis-R	(mg)		1417.5±117.5	1501.4±112.6	1327.3±124.6	1332.4±68.4				
Testis-L	(mg)		1398.9±105.3	1466.1±116.8	1345.8±135.7	1327.9±83.5				
Testis-R&L	(mg)		2816.4±218.3	2987.5±226.9	2673.0±243.2	2660.3±146.4				
Thymus	(mg)		424.3±86.2	331.1±74.6*	228.3±61.0**	288.6±56.8**				
Submand.-R	(mg)		259.6±17.7	269.6±23.7	228.6±19.5**	230.9±15.6*				
Submand.-L	(mg)		263.3±21.6	272.0±26.4	224.5±18.2**	224.1±18.3**				
Submand.-R&L	(mg)		522.9±38.8	541.6±49.3	453.1±36.9**	455.0±32.3**				
Spleen	(mg)		515.5±98.9	568.5±146.0	653.6±190.5	932.9±114.2**				
Brain	(mg)		1968.0±74.2	1976.1±60.5	1881.9±105.1	1899.5±55.1				
Heart	(mg)		1059.1±75.7	1025.3±56.1	901.0±81.2**	897.9±48.8**				
Lung	(mg)		1015.6±79.0	964.0±43.2	938.0±58.6	994.6±96.3				
Liver	(g)		7.953±0.803	7.493±0.326	6.225±0.738**	7.401±0.346				
Kidney-R	(mg)		1224.4±94.1	1185.8±94.9	1040.9±86.3**	1121.6±77.7				
Kidney-L	(mg)		1236.5±130.8	1158.3±82.4	1022.3±114.7**	1100.9±73.4*				
Kidney-R&L	(mg)		2460.9±220.0	2344.0±171.6	2063.1±198.0**	2222.5±148.9*				
Epididym.-R	(mg)		319.3±29.5	323.8±34.3	282.0±18.9*	287.3±18.6				
Epididym.-L	(mg)		306.4±29.9	317.3±45.0	277.5±23.0	285.8±23.5				
Epididym.-R&L	(mg)		625.6±58.4	641.0±77.4	559.5±39.1	573.0±40.3				
Sem. Vesic.	(mg)		812.1±132.9	889.3±139.4	551.3±100.0**	354.5±61.2**				
Prostate	(mg)		647.0±106.6	668.8±164.2	455.5±70.9*	415.6±21.1**				

Values are expressed as the mean ± S.D.
 * P<0.05 , ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Table 8-2 Organ weight in female rats

Group	Water for injection		ACQ		ACQ		ACQ	
	Dose (mg/kg)	N	10	8	100	8	300	8
Pituitary (mg)			10.11±1.69	10.71±1.33	9.08±1.32		9.10±1.31	
Thyroid-R (mg)			6.14±1.10	6.99±1.56	5.71±1.13		6.00±1.33	
Thyroid-L (mg)			5.13±1.43	5.56±1.63	4.74±1.27		5.44±2.15	
Thyroid-R&L (mg)			11.26±2.32	12.55±2.85	10.45±2.13		11.44±3.15	
Adrenal-R (mg)			32.08±3.93	34.01±3.37	38.24±4.31*		40.15±4.14**	
Adrenal-L (mg)			33.93±5.13	33.76±3.40	34.51±3.03		41.10±5.01**	
Adrenal-R&L (mg)			66.00±8.90	67.78±6.43	72.75±5.77		81.25±9.04**	
Ovary-R (mg)			32.60±3.53	35.23±4.77	23.86±5.28**		24.58±2.36**	
Ovary-L (mg)			28.95±5.37	37.75±7.48**	23.54±5.17		23.43±3.28	
Ovary-R&L (mg)			61.55±8.12	72.98±9.22*	47.40±9.57**		48.00±4.36**	
Thymus (mg)			286.3±105.3	336.6±33.6	180.4±27.9		212.8±71.8	
Submand.-R (mg)			171.8±19.1	174.9±21.9	153.3±20.5		152.3±17.5	
Submand.-L (mg)			170.8±26.5	175.1±21.6	146.9±18.9		149.9±15.6	
Submand.-R&L (mg)			342.5±44.5	350.0±43.1	300.1±39.0		302.1±32.6	
Spleen (mg)			364.5±52.4	361.0±51.0	459.4±161.0		798.0±183.0**	
Brain (mg)			1806.4±35.1	1822.8±82.7	1795.9±62.3		1761.9±68.1	
Heart (mg)			690.5±44.4	708.5±49.8	703.6±40.1		742.1±50.1	
Lung (mg)			750.8±68.9	786.1±65.1	770.9±44.3		862.4±51.3**	
Liver (g)			5.274±0.611	5.434±0.656	4.718±0.702		5.855±0.439	
Kidney-R (mg)			790.0±47.5	824.8±44.7	791.1±51.6		869.5±53.8**	
Kidney-L (mg)			759.9±34.3	785.1±30.3	746.1±63.5		851.8±40.0**	
Kidney-R&L (mg)			1549.9±66.2	1609.9±69.4	1537.3±107.9		1721.3±88.2**	
Uterus (mg)			423.4±255.7	353.0±80.8	341.6±398.8		228.4±148.6*	

Values are expressed as the mean ± S.D.
 * P<0.05, ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Table 8-3 Relative organ weight in male rats

Group	Dose (mg/kg)	N	Water for injection	ACQ		
				10	100	300
Pituitary	(mg/100gBW)	8	3.93±0.24	4.04±0.57	4.26±0.72	3.76±0.30
Thyroid-R	(mg/100gBW)	8	3.19±0.80	2.83±0.66	3.48±0.92	3.56±0.77
Thyroid-L	(mg/100gBW)	8	3.13±0.76	2.95±0.59	3.00±0.67	3.19±0.75
Thyroid-R&L	(mg/100gBW)	8	6.33±1.33	5.79±0.96	6.50±1.14	6.74±1.44
Adrenal-R	(mg/100gBW)	8	10.15±1.30	10.68±1.73	15.10±0.75**	15.39±2.82**
Adrenal-L	(mg/100gBW)	8	10.58±1.84	12.01±1.68	16.41±1.95**	17.21±2.63**
Adrenal-R&L	(mg/100gBW)	8	20.73±3.06	22.69±3.30	31.48±2.44**	32.63±4.66**
Testis-R	(mg/100gBW)	8	547.4±31.1	603.8±44.4	648.8±70.7**	623.8±38.9*
Testis-L	(mg/100gBW)	8	540.5±32.2	589.8±48.7	659.1±88.8**	621.6±45.3*
Testis-R&L	(mg/100gBW)	8	1088.0±60.7	1193.6±91.9	1308.0±153.3**	1245.4±81.8*
Thymus	(mg/100gBW)	8	163.1±27.9	133.1±29.2	110.9±27.4**	134.5±23.4
Submand.-R	(mg/100gBW)	8	100.5±7.9	108.4±7.6	111.6±9.4*	108.3±6.9
Submand.-L	(mg/100gBW)	8	102.0±10.7	109.4±9.2	109.6±7.9	105.0±9.9
Submand.-R&L	(mg/100gBW)	8	202.5±18.5	217.6±16.1	221.1±17.0	213.0±16.3
Spleen	(mg/100gBW)	8	197.5±26.7	229.0±61.3	318.0±86.6**	436.6±56.7**
Brain	(mg/100gBW)	8	764.3±79.9	795.6±43.2	920.5±78.6**	889.8±48.6**
Heart	(mg/100gBW)	8	409.5±25.1	413.4±37.3	439.4±33.2	420.8±30.9
Lung	(mg/100gBW)	8	392.0±12.9	387.9±21.5	457.6±18.3**	464.8±32.2**
Liver	(g/100gBW)	8	3.065±0.084	3.013±0.103	3.031±0.262	3.463±0.130**
Kidney-R	(mg/100gBW)	8	473.3±27.1	477.0±37.3	507.6±27.6	525.1±39.5*
Kidney-L	(mg/100gBW)	8	476.9±30.6	466.0±35.6	497.8±39.0	515.3±37.0
Kidney-R&L	(mg/100gBW)	8	949.9±53.0	943.0±70.6	1005.3±63.8	1040.4±75.6*
Epidid.-R	(mg/100gBW)	8	123.4±7.9	130.3±15.3	137.5±8.3	134.8±12.8
Epidid.-L	(mg/100gBW)	8	118.3±6.0	128.0±21.7	135.1±8.4*	134.0±14.9
Epidid.-R&L	(mg/100gBW)	8	241.5±15.4	258.3±36.6	272.8±14.7*	268.9±27.0
Sem. Vesic.	(mg/100gBW)	8	317.8±75.4	357.1±51.9	268.4±44.3	165.5±27.1**
Prostate	(mg/100gBW)	8	248.9±29.6	269.4±67.8	221.9±30.5	194.8±14.1**

Values are expressed as the mean ± S.D.

* P<0.05, ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

Table 8-4 Relative organ weight in female rats

Group	Water for injection	ACQ		
		10	100	300
Dose (mg/kg)	8	8	8	8
N	8	8	8	8
Pituitary (mg/100gBW)	6.18±0.86	6.30±0.90	6.04±0.95	5.68±0.86
Thyroid-R (mg/100gBW)	3.73±0.51	4.10±0.91	3.83±0.92	3.74±0.80
Thyroid-L (mg/100gBW)	3.13±0.75	3.25±0.92	3.16±1.00	3.35±1.25
Thyroid-R&L (mg/100gBW)	6.88±1.13	7.35±1.66	6.99±1.77	7.10±1.80
Adrenal-R (mg/100gBW)	19.74±2.75	19.93±1.80	25.55±4.05**	25.06±3.22**
Adrenal-L (mg/100gBW)	20.89±3.48	19.81±2.05	23.00±2.47	25.69±3.87*
Adrenal-R&L (mg/100gBW)	40.63±6.15	39.73±3.66	48.54±5.87*	50.75±7.04**
Ovary-R (mg/100gBW)	20.01±1.92	20.64±2.44	15.90±3.71**	15.33±1.78**
Ovary-L (mg/100gBW)	17.66±2.67	22.21±4.88*	15.64±3.38	14.61±2.30
Ovary-R&L (mg/100gBW)	37.68±3.87	42.86±5.88	31.55±6.48	29.95±3.39*
Thymus (mg/100gBW)	173.9±57.4	198.3±27.6	120.3±19.2	131.8±42.1
Submand.-R (mg/100gBW)	105.5±12.3	102.6±14.4	101.4±10.1	94.8±10.7
Submand.-L (mg/100gBW)	104.9±16.0	102.8±13.3	97.3±9.2	93.5±10.5
Submand.-R&L (mg/100gBW)	210.4±27.1	205.5±27.4	198.9±18.9	188.3±20.9
Spleen (mg/100gBW)	223.8±29.6	211.8±30.1	304.4±102.2	493.9±95.3**
Brain (mg/100gBW)	1111.4±74.6	1072.3±99.5	1195.3±70.3	1097.0±44.4
Heart (mg/100gBW)	423.6±18.7	416.5±40.6	468.0±28.6*	462.4±33.5
Lung (mg/100gBW)	460.5±36.9	463.0±53.6	512.9±33.3*	537.3±37.8**
Liver (g/100gBW)	3.231±0.311	3.183±0.357	3.133±0.423	3.640±0.199
Kidney-R (mg/100gBW)	486.6±52.3	485.5±49.9	526.0±29.5	542.0±42.5*
Kidney-L (mg/100gBW)	467.8±37.0	461.9±42.5	496.4±43.8	530.9±36.7*
Kidney-R&L (mg/100gBW)	954.3±85.4	947.4±90.8	1022.0±68.7	1072.8±76.6*
Uterus (mg/100gBW)	255.4±136.6	207.0±48.9	225.9±259.7	142.0±91.5*

Values are expressed as the mean ± S.D.
 * P<0.05, ** P<0.01 : Significantly different from Water for injection.

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 3. 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

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 桑原 真紀 （財）残留農薬研究所 毒性部病理研究室主任
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検索して無作用量を求めるため、雌雄の SD 系ラットを用い、各群 6 匹の動物の背部皮膚に ACQ を 0、1、10 及び 30 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、30 mg/kg 投与群では投与 6 日以降から適用部位に痂皮形成が雌雄全例に観察された。病理組織学的検査では、適用部位皮膚の表皮過形成がほぼ全例に認められ、雄 1 例には糜爛・潰瘍が観察された。10 mg/kg 投与群では、投与 17 日以降に適用部位の痂皮形成が認められ、組織学的には雄の半数例及び雌の全例に表皮過形成が認められた。1 mg/kg 投与群では、ACQ 投与に関連づけられる異常は認められなかった。

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

A. 研究目的

平成 18 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 4 週間反復経皮投与毒性試験を実施した。昨年度（平成 17 年度）は 13 週間反復経皮投与試験を計画したが、100 および 300 mg/kg 投与群では、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 週間終了時に投与を中止し、その時点で試験を終了した。その結果、ACQ には主要成分として塩化ベンザルコニウムが含まれており、それが強い皮膚刺激性および腐食性が示すことから、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（本報告書：12. ACQ のラットにおける 3 週間反復経皮投与毒性試験の分担研究報告書参照）。そのため、本研究では ACQ の 4 週間反復経皮

投与毒性を 100 mg/kg 以下の低い用量で実施し、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、無毒性量を求めることに主眼を置いた。

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摂餌量測定を実施した。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ー方式)、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 6 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) に収容した。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

平成 17 年度に実施した 3 週間反復経皮投与毒性試験結果を考慮し、本試験の高用量を 30 mg/kg と設定し、公比 3 倍で中間用量を 10 mg/kg、そして 1 mg/kg を低用量として設定した。これらの設定用量群 (0、1、10 及び 30 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき雌雄とも 6 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、1、10、30 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。懸濁後、0.33、3.33 および 10 mg/mL の濃度になるよう注射用水にて定容した。調製は局所排気装置内にて実施した。各濃度の投与液は被験物質保管所内冷蔵室（許容範囲；2～8℃）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、約 6 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 4 週間（28 日間）とした。

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 1 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 日個別に摂餌量を測定して、一日あたりの摂餌量を算出した。

9. 眼科学的検査

馴化期間中に 1 回雌雄の全馴化動物、投与終了時（4 週時）に対照群と高用量群（30 mg/kg 投与群）の全生存動物について、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。

10. 尿検査

投与終了時（4 週時）に各群の全生存動物について尿検査を実施した。検査動物を強制採取法により採尿した後、尿の色調を肉眼的に検査し、pH、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、尿潜血及びウロビリノーゲンの項目について自動尿分析器（Clinitek 200 +, Miles Labs., Inc.）にて測定した。

11. 血液学的検査

投与終了時（4 週時）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晚絶食させた。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

血液学的検査のための採血後、腹大動脈から採血し、遠心分離して得られた血清を用い、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)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンキナーゼ (CPK.)、総ビリルビン (T.Bil.)、総蛋白 (T.Prot.)、アルブミン (Albumin)、総コレステロール (T.Chol.)、トリグリセライド (TGL)、糖 (Glucose)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Creat.) 無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K) 及び塩素 (Cl)

また、蛋白分画 (アルブミン比率、 $\alpha 1$ -

$\alpha 2$ -、 β -、 γ -グロブリン比率) については自動電気泳動分析装置 (AES320、オリンパス光学株式会社) にて測定した。

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、骨および骨髓 (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、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 (両側)、卵巣 (両側)、子宮、膣、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、精嚢（両側）、卵巣（両側）、子宮

15. 病理組織学的検査

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を作製した。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鏡検した。なお、鏡検対象組織は対照群と高用量群は下記の全組織、中・低用量群については肉眼的異常部位を対象に病理組織学的検査を実施した。

組織標本対象臓器・組織：脳（大脳、小脳、橋および延髄）、脊髄（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、精嚢（左側）、卵巣（両側）、子宮、膣、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 の等分散検定を行ったその後、等分散の場合には、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、Dunnett 型の多重比較法（Miller 法）を用いて有意差の有無を判定した。尿検査の評価段階付きのデータについては Wilcoxon 順位和検定、尿色については Fisher 直接確率検定を対照群と被験物質各群との間で実施した。また、病理組織学的検査成績については Fisher 直接確立検定法を用い解析した。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）

30 mg/kg 投与群では、投与6日以降から適用部位に痂皮形成が雌雄全例に認められた。

10 mg/kg 投与群では、投与17日以降から適用部に痂皮形成が、雄の6例中3例と雌6例中6例（全例）に観察された。

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも異常は認められなかった。

2. 体重変化 (図 1、表 2)

1、10 及び 30 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有意な差はなかった。

3. 摂餌量 (図 2、表 3)

1、10 及び 30 mg/kg のいずれの投与群の雌雄においても摂餌量に有意な差はみられなかった。

4. 眼科学的検査成績 (表 4)

検査した 30 mg/kg 投与群の雌雄とも異常は認められなかった。

5. 尿検査成績 (表 5)

1、10 及び 30 mg/kg 投与群の雌雄とも有意な変化はなかった。

6. 血液学的検査成績 (表 6)

30 mg/kg 投与群では、網赤血球数の増加と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の短縮が雄に、好酸球比率の増加が雌に認められた。いずれの変化も背景データの範囲内あるいは 1 例の逸脱値の影響であったため、偶発的な変化と判断した。

1 及び 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有意な変化はなかった。

7. 血液生化学的検査成績 (表 7)

30 mg/kg 投与群では、雄においてアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT) が有意に増加し、トリグリセライド (TGL) および無機リン (IP) が有意に減少した。一方、雌では α 2-グロブリン比率の増加が認められた。これらの変化は、いずれも背景データ

の正常範囲内あるいは 1 例の逸脱値の影響であったため、偶発的な変化と判断した。

1 及び 10 mg/kg 投与群の雌雄では、被験物質投与に関連付けられる有意な変化はなかった。

8. 剖検所見 (表 8)

30 mg/kg 投与群において、適用部位の痂皮形成が雌雄全例に認められた。

10 mg/kg 投与群では、痂皮形成が雄の 6 例中 3 例と雌 6 例中 6 例 (全例) に観察された。

1 mg/kg 投与群の雌雄では、肉眼的異常は観察されなかった。

9. 臓器重量 (表 9)

30 mg/kg 投与群において、雄で肝臓の絶対重量及び相対重量 (比体重値) の減少ならびに精巣の相対重量の増加が認められた。雌では、心臓の相対重量が減少した。

1 及び 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有意な変化はなかった。

10. 病理組織学的検査成績 (表 10)

30 mg/kg 投与群において、適用部位の表皮過形成が雄の 6 例中 5 例と雌の全例に認められた。雄の残り 1 例には適用部皮膚の糜爛/潰瘍が観察された。

10 mg/kg 投与群では、表皮過形成が雄の 6 例中 3 例と雌の全例に観察された。

1 mg/kg 投与群の雌雄では、肉眼的異常部位がなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

D. 考察

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²⁻⁵⁾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。

E. 結論

本実験条件下では、ラットに ACQ を 10 および 30 mg/kg の用量で反復経皮投与すると適用部位に痂皮形成、表皮過形成あるいは糜爛・潰瘍などの皮膚病変が誘発されることが判明した。1 mg/kg の用量では、いずれの検査項目にも異常がみられず、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) BIBR Working Group: Benzalkonium chloride. Toxicity profile. The British Industrial Biological Research Association, 1989.
- 3) Cutler RA and Drobeck HP: Toxicology of cationic surfactants. In: Cationic Surfactants, Vol. 4 (Chapter 15), Jungermann E (ed.), Marcel Dekker, New York, 1970.
- 4) Grosselin RE, Smith RP, and Hodge HC: Clinical Toxicology of Commercial Products (5th ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 5) Merianos JJ: Quaternary ammonium antimicrobial compounds (Chapter 13). In: Disinfection, Sterilisation, and Prevention (4th ed), Block S (ed.), Lea & Febiger, USA, 1991.

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

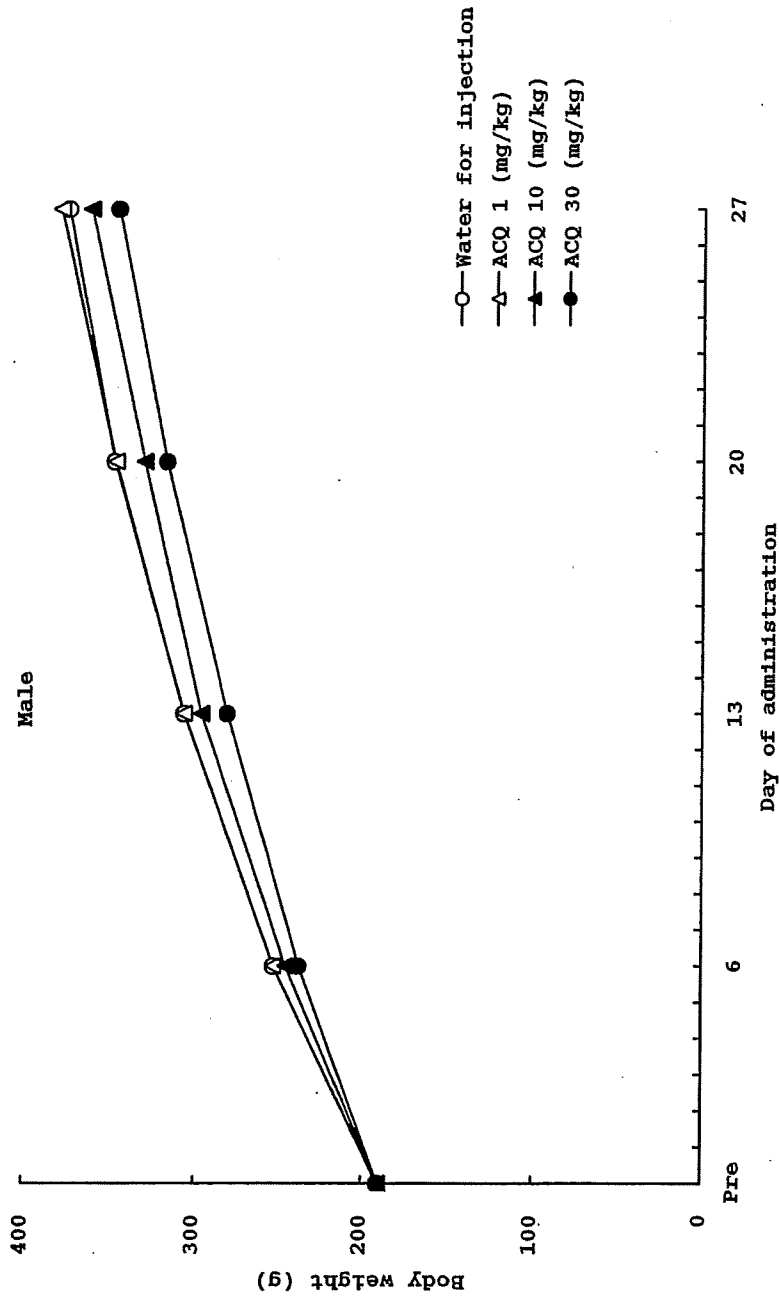


Figure 1-1 Changes of body weight in rats