

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 16～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 原田 孝則

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

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	

分担研究報告書：

1. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける急性経口毒性試験	24
小坂忠司	
2. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける急性経皮毒性試験	28
小坂忠司	
3. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のヒト皮膚3次元モデルにおける皮膚腐食性試験	32
小坂忠司	
4. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のマウスにおける皮膚感作性試験 (Local Lymph Node Assay)	35
小坂忠司	
5. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の細菌を用いる復帰突然変異試験	41
松元郷六	
6. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のマウスを用いる小核試験	47
松元郷六	
7. 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週間反復経口投与毒性試験	54
原田孝則	
8. 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週間反復経口神経・免疫毒性試験	66
原田孝則	
9. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の幼若ラットにおける4週間反復経口投与毒性試験 (一般毒性・神経・免疫毒性併合試験)	74
首藤康文・小坂忠司	

10. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットにおける8週間 反復経皮投与毒性試験	85
原田孝則	
11. 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	98
原田孝則	
12. 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)	108
原田孝則	
13. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のSKH-1ヘアレスマウス における中期皮膚発がん性試験	115
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	125
原田孝則	
15. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) 処理木材からの有効成分の 土壌汚染状況調査	133
原田孝則	
16. 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 急性経口毒性試験	138
小坂忠司	
17. 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 急性経口毒性試験 (追加試験)	141
小坂忠司	
18. 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 急性経皮毒性試験	145
小坂忠司	
19. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) の <i>in vitro</i> ヒト皮膚 三次元モデルにおける皮膚腐食性試験	149
小坂忠司	
20. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) のマウスにおける 皮膚感作性試験 (Local Lymph Node Assay)	152
小坂忠司	
21. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) の培養細胞を用いる コメットアッセイ	157
松元郷六	

22. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) のマウスを用いる 小核試験	167
松元郷六	
23. 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 週間反復経口投与毒性試験 (一般毒性・神経・免疫毒性併合試験)	177
原田孝則	
24. 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	187
原田孝則	
25. 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	196
原田孝則	
26. 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 急性経口毒性試験	203
小坂忠司	
27. 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 急性経皮毒性試験	207
小坂忠司	
28. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の <i>in vitro</i> ヒト皮膚 三次元モデルにおける皮膚腐食性試験	210
小坂忠司	
29. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のマウスにおける 皮膚感作性試験 (Local Lymph Node Assay)	213
小坂忠司	
30. 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	218
松元郷六	
31. 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	228
松元郷六	
32. 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	238
小坂忠司・首藤康文	
33. 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	249
原田孝則	

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関しては、現在論文化を進めているものの未だ出版物に至っていないため一覧表の添付なし。

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関しては、現在論文化を進めているものの未だ出版物に至っていないため別刷等の添付なし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 16～18 年度 総合研究報告書

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

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) 系化合物を対象に実験動物を用い、急性毒性、反復投与毒性あるいは発がん性試験を含む種々の毒性試験を実施した。また、CCA については反復投与毒性試験における肝メタロチオネイン発現の投与経路差（経口：抑制、経皮：亢進）を分子生物学的に検索した。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。また、CCA は変異原性陽性（クロム・ヒ素の複合作用）で、紫外線照射による皮膚発がんに対し促進効果を示し、その効果には酸化ストレスの関与が大きな要因として考えられた。一方、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。なお、反復投与試験における無毒性量 (NOAEL) は、経口では ACQ 8 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。急性毒性試験では、CCA は経口で、ACQ は経皮でそれぞれ劇物に相当する半致死量 (LD50 値) を示したが、それ以外の条件下ではいずれも普通物相当であった。

分担研究者

小坂忠司 財団法人 残留農薬研究所
毒性部免疫・急性毒性研究室長
首藤康文 財団法人 残留農薬研究所
毒性部神経毒性研究室長
松元郷六 財団法人 残留農薬研究所
毒性部遺伝毒性研究室長

研究協力者

川勝尚夫 財団法人 残留農薬研究所
毒性部動物管理室長
石塚勝美 財団法人 残留農薬研究所
毒性部動物管理室
中島信明 財団法人 残留農薬研究所
毒性部病理研究室長

千葉裕子 財団法人 残留農薬研究所
毒性部病理研究室
技術担当室長

榎本秋子 財団法人 残留農薬研究所
毒性部病理研究室主任

桑原真紀 財団法人 残留農薬研究所
毒性部病理研究室主任

小嶋五百合 財団法人 残留農薬研究所
毒性部病理研究室
主任研究員

竹内幸子 財団法人 残留農薬研究所
毒性部病理研究室研究員

高橋尚史 財団法人 残留農薬研究所
毒性部病理研究室研究員

武田眞記夫 財団法人 残留農薬研究所
毒性部分子毒性研究室長

大塚亮一 財団法人 残留農薬研究所
毒性部分子毒性研究室
研究員

和田邦生 財団法人 残留農薬研究所
毒性部遺伝毒性研究室
研究員

竹澤祐造 財団法人 残留農薬研究所
毒性部遺伝毒性研究室

阿部美咲樹 財団法人 残留農薬研究所
毒性部遺伝毒性研究室

藤江秀彰 財団法人 残留農薬研究所
毒性部神経毒性研究室

松本力 財団法人 残留農薬研究所
毒性部神経毒性研究室

上田英夫 財団法人 残留農薬研究所
毒性部免疫・急性毒性研究室
主任

福山朋季 財団法人 残留農薬研究所
毒性部免疫・急性毒性研究室
研究員

林宏一 財団法人 残留農薬研究所
毒性部免疫・急性毒性研究室

高橋義博 株式会社 新日本科学
安全性研究所

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16～18年度の3カ年に亘り代表的木材防腐剤であるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤(CCA)^{1,4)}、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤(ACQ)⁵⁾及びアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤(AAC)⁵⁾を対象に種々の毒性試験：急性経口、急性経皮、皮膚腐食性、皮膚感作性、遺伝毒性(エームス、コメット、小核試験)、反復経口毒性、反復経皮毒性及び中期皮膚発がん性試験)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分子生物学的手法を用い検索し、加えて、CCA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

被験物質として過去に使用量の多かったCCAと現在使用量の多いACQ及びAACの3剤を使用した。各剤の組成を以下に示す。

CCA：CCA 2号(CCA-type B)¹⁾ [構成

成分配合比：酸化クロム (CrO₃、純度 98%) 35.3%、酸化銅 (CuO、純度 99.3%) 19.6% および酸化ヒ素 (As₂O₅、純度 91.9%) 45.1%]

ACQ：薬剤配合[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%]

AAC：有効成分としてジデシルジメチルアンモニウムクロリド (didecyl dimethylammonium chloride)

上記の 3 剤を対象に以下の毒性試験を実施した。

1. CCA のラット急性経口毒性試験

Wistar Hannover (GALAS) 系および SD 系 (Crj:CD(SD)IGS) の 2 系統のラットを用い、各系統雌雄各 5 匹の動物 (8 週齢) に CCA を 33、100、300 および 900 mg/kg の用量 (公比 3) で単回強制経口投与し、死亡率に基づく Moving Average 法により半致死量 (LD50 値) を 95%信頼限界で算出した。

2. CCA のラット急性経皮毒性試験

雌雄の Sprague-Dawley (Crj: CD(SD)) 系ラットを用いて、CCA 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 2 週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. CCA 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の市販キット (EpiDerm™ Human Skin Model System、倉敷紡績株式会社) を用い、CCA 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 CCA 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. CCA のマウス皮膚感作性試験

CCA 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、10% の 5 濃度の CCA を設定し、1 群 5 例のマウスを用いた。各濃度の CCA を 3 日間両耳後方に経皮投与し、2 日後に BrdU (200 mg/kg) 溶液を腹腔内投与した。2 時間後に両耳下リンパ節を摘出し、重量および細胞数を測定した。リンパ球細胞増殖活性は ELISA 法にて測定した。

5. CCA の細菌を用いる復帰突然変異試験

大腸菌 (WP2 *uvrA*/pKM101) およびネズミチフス菌 (TA100 および TA98) を用い、代謝活性化系の有無の両条件下で CCA の復帰突然変異試験 (Ames 試験) を実施した。CCA の用量は、1 プレート当たり 1.2~5000 μg で、プレインキュベーション法に従って試験を実施した。

6. CCA のマウスを用いる小核試験

CCA の哺乳動物に対する染色体異常誘発

性を検索するため、マウスの小核試験を実施した。供試動物として ICR 系マウス (Crj:CD-1) の雄性動物 (7 週齢) を用い、CCA を 0、25、50 および 100 mg/kg の用量で各群 5 匹の動物に単回強制経口投与した。また、陽性対照群を 1 群設け、陽性対照物質のマイトマイシン C を 10 mg/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と陰性対照群から、それぞれ大腿骨骨髓を採取し、骨髓塗末標本を作製し、多染性赤血球中の小核出現率を算出した。

7. CCA のラット 4 週間反復経口投与毒性試験

Wistar Hannover (GALAS) 系ラットを用い、各群雌雄各 10 匹の動物 (7 週齢) に、CCA を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で 4 週間に亘り毎日強制経口投与した。検査項目としては、臨床症状、死亡率、体重、摂餌量、食餌効率、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。また、肝臓については酸化ストレスの測定および金属結合蛋白メタロチオネインの遺伝子解析 (mRNA 量の測定) を実施した。

8. CCA のラット 4 週間反復経口神経・免疫毒性試験

Wistar Hannover (GALAS) 系ラット (Br) を用い、各群雌雄各 10 匹の動物 (7 週齢) に、CCA を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で 4 週間に亘り毎日強制経口投与し、神経・免疫系への影響を検索した。検査項目としては、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。

9. CCA の幼若ラット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 (Br) の幼若動物 (4 週齢) を用い、各群雌雄各 13 匹の動物に、CCA を 0、1、8 および 80 mg/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。

10. CCA のラット 8 週間反復経皮投与毒性試験

SD 系ラット (Crj:CD(SD)IGS) を用い、各群雌雄各 8 匹の動物 (6 週齢) の背部皮膚 (4 cm x 5 cm) に、CCA を 0、10、100、300 および 1000 mg/kg の用量で 8 週間に亘り毎日 1 回 (24 時間)、反復適用した。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。また、肝臓については酸化ストレスの測定および金属結合蛋白メタロチオネインの遺伝子解析 (mRNA 量の測定) を実施した。

11. 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学的検査を行った。

12. 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。

13. CCA の SKH-1 ヘアレスマウス中期皮膚発がん性試験

米国 Charles River Laboratories (MA, U.S.A.) で生産された SKH-1 ヘアレスマウス (CrI:SKH1-hrBR) を用いて CCA の催腫瘍性を確認した。本系マウスは中波長紫外線 (UVB) 照射により高率に皮膚腫瘍を誘発することから、この特性を利用して CCA の UVB による皮膚発がんに及ぼす影

響を検索した。本試験では、9 週齢の雌性動物に週 3 回 UVB を照射するとともに、CCA を 0、1、10 および 90 ppm の用量で 28 週間混餌投与し、皮膚腫瘍の数および大きさを毎週観察した。また、UVB 非照射群として無処置対照群および CCA 90 ppm 単独投与群も設けた。発生した皮膚腫瘍は全て病理組織学的に検索した。

14. CCA のラット反復経口・経皮投与毒性試験：肝メタロチオネインの遺伝子解析

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。

15. 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。

16. ACQ のラット急性経口毒性試験

急性経口毒性を Wistar Hannover 系 (GALAS) ラットを用いて検索した。各群

3匹の雌性動物（7週齢）にACQを100、300、1000 mg/kgの3用量設定し、単回強制経口投与した。投与後2週間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。

17. ACQのラット急性経口毒性試験（追加試験）

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 mg/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。

18. 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 mg/kgの1用量、雌は500、1000および2000 mg/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。

19. ACQ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⁷⁾の市販キット（EpiDermTM Human Skin Model System、倉敷紡績株式会社）を用い、ACQ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CCA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。

20. 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)⁷⁾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³H-methyl-Thymidine (20 μ 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（³H-methyl-Thymidine取り込み量）の測定を行った。

21. ACQ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、ACQのコメットアッセイを実施した。5000 μ g/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36.4~100 μ g/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 μ 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、% Migrated DNA, Tail Length, Tail Momentを求めた。

22. ACQ のマウスを用いる小核試験

ACQ 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 (CrIj:CD1) の雄性動物 (7 週齢) を用い、ACQ を 37.5、75 および 150 mg/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 mg/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。

23. ACQ のラット 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 系 (GALAS) ラット (Br) を用い、各群雌雄各 10 匹の動物に、ACQ を 0、8、40 および 200(雄)/100(雌) mg/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、眼検査、尿検査、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。

24. 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。

25. ACQ のラット 4 週間反復投与毒性試験

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。

26. 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。

27. 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。

28. 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⁶⁾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。

29. 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)⁷⁾ 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 ³H-methyl-Thymidine (20 μ 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 (³H-methyl-Thymidine 取り込み量) の測定を行った。

30. 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 μ g/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 μ g/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 μ 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。

31. 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 (CrIj:CD1) の雄性動物 (7 週齢) を用い、ACQ を 37.5、75 および 150 mg/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 mg/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。

32. AAC のラット 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 mg/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。

33. 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 cm x 5 cm) に、AAC を 0、1、10 及び 100 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。

C. 研究結果及び考察

1. CCA のラット急性経口毒性試験

Wistar 系および SD 系の 2 系統のラットを用いて CCA の急性経口毒性を検索した。各群雌雄各 5 匹の動物に CCA を 33、100、300、900 mg/kg の 4 用量 (公比 3) で単回強制経口投与した。Moving Average 法にて算出した LD50 値 (95%信頼限界) は、Wistar 系ラットでは、雄で 112 mg/kg (61~208 mg/kg)、雌で 72 mg/kg (43~119 mg/kg) であり、SD 系ラットでは雄で 173 mg/kg (173~173 mg/kg)、雌で 90 mg/kg (48~167 mg/kg) であった。本実験条件下において、CCA の急性経口毒性は OECD¹⁰⁾ の定める GHS (Globally Harmonized System) カテゴリーの 3 と判定され、毒物劇物法の分類では劇物に相当する LD50 値の範囲であると結論された。

2. CCA のラット急性経皮毒性試験

SD 系ラットを用いて、CCA 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た。その結果、死亡率は雄 2000 mg/kg 投与群で 0/5、雌 1000 mg/kg 投与群で 0/5、雌 2000 mg/kg 投与群で 5/5 (全例死亡) であった。従って、本実験条件下における CCA の急性経皮毒性は、OECD の定める GHS カテゴリーの 4 (1000-2000 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 値の範囲であると結論された。

3. CCA の *in vitro* 皮膚腐食性試験

ヒト皮膚三次元モデルを用いて CCA の皮膚腐食性を検索した。前培養した皮膚モデルに CCA を 3 分間および 60 分間暴露し、MTT 法により生存率を計算した。CCA の構成成分のうち、酸化クロムおよび酸化ヒ素では皮膚腐食性が認められた。CCA の皮膚腐食性は 3 分間暴露で陽性であり、60 分間暴露で疑陽性であった。本実験条件下において、CCA の皮膚腐食性は疑陽性ないし陽性の区分に相当すると判定された。

4. CCA のマウス皮膚感作性試験

CCA の皮膚感作性試験を、8 週齢の CBA 系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、10% の 5 濃度の CCA を設定し、1 群 5 例のマウスを用いた。各濃度の CCA を 3 日間両耳後方に経皮投与し、2 日後に BrdU (200 mg/kg) 溶液を腹腔内投与した。2 時間後に両耳下リンパ節を摘出し、重量および細胞

数を測定した。リンパ球細胞増殖活性は ELISA 法にて測定した。その結果、CCA の 3 および 10% 投与群において、リンパ節重量および細胞数の増加が観察された。リンパ球細胞増殖活性検査では、CCA 0.3% 以上の全投与群にて、用量相関性の細胞増殖活性の増加が認められた。これらの結果から、CCA の皮膚感作性は、陽性であると結論された。

5. CCA の細菌を用いる復帰突然変異試験

CCA の突然変異誘発性を調査するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を行った。1.2~5000 μg /プレートの用量でプレインキュベーション法に従って実験したところ、大腸菌 (WP2 *uvrA*/pKM101) ならびにネズミチフス菌 (TA100 および TA98) で、代謝活性化系の有無に関わらず、明らかな変異コロニー数の増加が認められた。この増加の原因としては、強い変異原性を示すことが既に知られている CCA の構成成分であるクロムの作用^⑥が考えられた。よって、CCA の細菌に対する突然変異誘発性は陽性と判断された。

6. CCA のマウスを用いる小核試験

CCA 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、マウスを用いる小核試験を行った。最大耐量である 100 mg/kg を最高用量に、中用量 (50 mg/kg) および低用量 (25 mg/kg) を設定し、単回の強制経口投与を行った。投与 24 および 48 時間後に骨髓塗抹標本を作製し、多染色赤血球中の小核出現頻度を求めた。その結果、100 mg/kg 群では投与 24 および 48 時間後に小核出現頻度がわずかに増加した。

しかし、その増加は陰性対照群と比べて統計学的に有意ではなかった。よって、CCA のマウス骨髓における小核誘発性は疑陽性と判定された。その原因としては、CCA の構成成分であるヒ素の作用^⑦が関与しているものと推察した。

7. CCA のラット 4 週間反復経口投与毒性試験

CCA の反復経口投与毒性を検索するため、CCA を 0、8、40 および 80 mg/kg の用量で雌雄の Wistar 系ラットに 4 週間に亘り毎日反復強制経口投与した。その結果、高用量群において雌雄とも沈静化および流涎が認められ、雄 1 例が死亡した。加えて、雌では腹部・外陰部被毛の汚れも観察され、中間用量群においても同様な症状がみられた。血液・生化学的検査では、高用量群の雌雄および中間用量群の雌において小球性低色素性貧血、リンパ球あるいは単球の増加を伴う総白血球数の増加、プロトロンビン時間の短縮、低蛋白血症、高コレステロール血症、血漿電解質の変動等が認められ、高用量群の雄では尿素窒素および総ビリルビンが増加した。これらの変化のうち、貧血等の血液学的変化は、おそらく造血器系への影響が示唆されているヒ素により誘発されたものと推察した。一方、生化学的変化については概ね腎機能障害を示唆する所見であり、クロムによる毒性効果が疑われた。剖検所見では、中・高用量群の雌雄において十二指腸の腔拡張および盲腸の膨満が観察され、肝・腎臓重量の増加および胸腺重量の減少がみられた。また、雄では肺重量が増加し、雌では脳重量が減少した。なお、胸腺重量の減少は低用量の雌でも認

められた。病理組織学的検査では、高用量群の雌雄において前胃粘膜角化亢進、小腸粘膜上皮過形成、腎尿細管褐色色素沈着が観察され、雌では肝細胞肥大も認められた。加えて、雌の肝臓では酸化ストレスの産物である 8-OHdG が増加した。一方、肝メタロチオネインの遺伝子発現は雌雄とも抑制された。この原因については DNA プロモーター領域のメチル化が関与している可能性が示唆された（第 14 項参照）。

以上の結果から、CCA をラットに反復経口投与した場合、血液、肝臓、腎臓および消化管に毒性を発現することが判明し、その程度は雌の方が強い傾向にあった。また、CCA は神経・免疫系に対しても影響を及ぼす可能性が示唆された。

8. CCA のラット 4 週間反復経口神経・免疫毒性試験

ラットの 4 週間反復経口投与試験を実施し、CCA の神経系および免疫系への影響について検索した。その結果、神経機能検査（FOB）では、40 および 80 mg/kg 群の雌雄に探索行動、立ち上がり回数および自発運動量の減少が観察された。免疫学的検査では、40 および 80 mg/kg 群の雄あるいは雌において胸腺重量が減少し、胸腺細胞数の減少、未成熟胸腺細胞のダブルポジティブ細胞（CD4+CD8+）の減少および成熟胸腺細胞のヘルパー T 細胞と細胞傷害性 T 細胞の減少が観察された。また、抗羊赤血球抗体価の低下を示す個体が 40 および 80 mg/kg 群の少数例に認められた。

これらの結果から、CCA の経口投与での神経系および免疫系への影響が示唆された。

9. CCA の幼若ラット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）

CCA の幼若動物に対する一般毒性、神経毒性および免疫毒性を検索するため、CCA を、0、1、8 および 80 mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットの幼若動物に 4 週間に亘り毎日強制経口投与した。その結果、詳細な症状の観察では、80 mg/kg 投与群の雌雄および 8 mg/kg 投与群の雄で活動性の減少が観察された。加えて、80 mg/kg 投与群の雌では、立ち上がり回数が減少し、機能検査においても測定開始後 10 分間での自発運動量が減少し、探索行動の抑制が示唆された。剖検所見では、80 mg/kg 投与群の雌雄で胸腺および脾臓重の減少が認められた。免疫学的検査では、80 mg/kg 投与群の雌雄で胸腺および脾臓重量が減少し、胸腺ないし脾臓の T 細胞数の減少が認められた。これらの結果は、成熟ラットを用いた実験結果（前項 7、8 参照）と一致し、CCA を幼若ラットに反復経口投与した場合においても、8 mg/kg 以上の用量では神経系および免疫系に対し影響を及ぼす可能性が示唆された。なお、1 mg/kg 投与群では毒性影響は特に認められなかった。

10. CCA のラット 8 週間反復経皮投与毒性試験

CCA の反復経皮投与毒性を明らかにするため、CCA を 0、10、100、300 および 1000 mg/kg の用量で雌雄の SD 系ラットの背部皮膚に 8 週間に亘り反復投与した。その結果、100 mg/kg 以上の投与群において、自発運動の低下や後肢麻痺が認められ、用量依存性に死亡率が増加した。これらの中毒

症状は、おそらくヒ素の神経毒性作用に起因するものと推察した。臨床検査では、尿蛋白・ビリルビンの増加、小球性低色素性貧血、低アルブミン血症、高コレステロール・トリグリセライド血症、血漿電解質の変動（P、Na、Kの増加、Caの減少）が認められた。一般に腎疾患（機能障害）時、特にネフローゼ症候群では、血中のアルブミンが減少するため低比重リポ蛋白が増加し高コレステロール血症を呈し、重度の場合には肝での超低比重リポ蛋白の産生も亢進するため高トリグリセライド血症を招来することが知られている。また、腎機能が障害されると糸球体濾過率が低下するため血中のリン値が増加し、電解質のバランス維持のためカルシウムは逆に減少することが知られている。従って、上記の生化学的変化は、CCA投与（特にクロム）により腎障害が誘発され、その結果として招来されたものと推察した。

剖検所見では、皮下水腫、胸・腹水の増量、胸腺の萎縮・水腫、肝白色班、腎臓の腫大・退色、消化管内容物の黒色化が観察された。臓器重量では、肝臓、腎臓および脾臓の重量が増加し、胸腺の重量が減少した。また、雌では脳重量が減少し、心重量が増加した。加えて、肝臓では酸化ストレスの産物である8-OHdGが増加し、メタロチオネインの遺伝子発現が亢進（mRNA量の増加）した。

以上の結果から、CCAをラットに反復経皮投与した場合、皮下水腫、胸・腹水症、貧血、肝・腎障害を誘発し、100 mg/kg以上は致死用量であることが判明した。また、CCAは神経・免疫系、消化器系あるいは循環器系へも影響を及ぼす可能性が示唆された。

11. 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、前項10（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。

12. CCAのラット4週間反復経皮投与毒性試験（追加試験）

CCAの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、CCAの構成成分であるクロム、銅およびヒ素の毒作用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。

13. CCAのSKH-1ヘアレスマウス中期皮膚発がん性試験

CCAの催腫瘍性を確認するため、SKH-1ヘアレスマウスを用い、雌性動物の皮膚に紫外線（UVB）を照射するとともに、CCAを0、1、10および90 ppmの用量で28週間混餌経口投与し、UVB照射誘発皮膚発がんに対するCCA投与の影響の有無について検索した。その結果、CCA投与群では、用量依存性に皮膚腫瘍の発生（数および大きさともに）が増加し、病理組織学的にも悪性度の高い低・中分化型扁平上皮癌が観察された。皮膚の酸化ストレスの測定では、

CCA投与群において用量相関性に8-OHdG量（DNAの酸化ストレスマーカー）の増加が認められた。以上の結果から、CCAはUVB誘発皮膚発がんを促進することが判明し、その効果は構成成分のヒ素あるいはクロムの作用に起因するものと推察した。また、そのプロモーション作用には酸化的DNA傷害が関与している可能性が示唆された。

14. CCAのラット反復経口・経皮投与毒性試験：肝メタロチオネインの遺伝子解析

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, α type と

Glutathione-S-transferase, μ 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 のメチル化維持に参与する遺伝子 (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。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。

15. 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 ^a	< 0.05	—	< 0.01
農耕地(田) ^b	—	< 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。

16. ACQ のラット急性経口毒性試験

Wistar 系ラットの雌性動物を用いて、ACQ の急性経口毒性を検索した。各群 3 匹の動物を使用し、ACQ を 100、300、1000 mg/kg の 3 用量設定し、単回強制経口投与した。試験の結果、LD50 値の範囲は、300 ~ 1000mg/kg であり、OECD の定める GHS カテゴリーの 4 (300-2000mg/kg) に位置し、毒物劇物法の分類では普通物に相当する LD50 値の範囲であると結論された。

17. ACQ のラット急性経口毒性試験 (追加試験)

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 520 mg/kg (95%信頼限界は算出不能) であり、性差はみられなかった。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相当の LD50 値の範囲であった。

18. 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。

19. ACQ の in vitro 皮膚腐食性試験

ヒト皮膚三次元モデル (in vitro) を用いて、ACQ の皮膚腐食性を検索した。前培養した皮膚モデルに CCA を 3 分間および 60 分間暴露し、MTT 法により生存率を計算した。ACQ の皮膚腐食性は 3 分間暴露で陽性であり、60 分暴露で擬陽性であった。本実験条件下において、ACQ は腐食性陽性ないし強度刺激性の区分に相当すると判定された。