

20. ACQ のマウス皮膚感作性試験

CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、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。³H-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。

21. ACQ の培養細胞を用いるコメットアッセイ

ACQ の DNA 損傷誘発性を調査するため、培養細胞を用いるコメットアッセイを行った。ACQ 処理により、観察可能な用量の最高用量群においてのみ DNA 損傷細胞の有意な増加が認められた。しかし、細胞毒性が観察されており、さらに上の用量では毒性により観察不能であったことから、これらの DNA 損傷は、被験物質の細胞毒性に起因する二次的な作用の可能性が考えられた。よって、ACQ の培養細胞に対する DNA 損傷誘発性は陰性と判断された。

22. ACQ のマウスを用いる小核試験

ACQ の哺乳動物に対する *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 150 mg/kg を最高用量に、中用量 (75 mg/kg)

および低用量 (37.5 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 時間後に骨髄塗抹標本を作製し、多染性赤血球中の小核出現頻度を求めた。顕微鏡観察の結果、ACQ のマウス骨髄における小核誘発性は陰性であり、*in vivo* 染色体異常誘発性は無いものと判断された。

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)

ACQ のラットにおける一般毒性、神経毒性および免疫毒性を検索するため、ACQ を、0、8、40 および 200(雄)/100(雌) mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットに 4 週間に亘り毎日強制経口投与した。その結果、高用量群 (雄では投与 5 日以降 100mg/kg に減少) では雌雄ともに一般状態の悪化に伴い少数例ながら死亡がみられた。同群の生存動物では、雌雄ともに低蛋白血症及び肝臓の酸化ストレス (8-OHdG) の増加が観察され、雄では体重増加抑制、貧血、T 細胞数の減少、小腸腔拡張及び肝臓の逸脱酵素 (ALT/AST) の上昇が認められた。中用量群では、雄に血漿蛋白の減少が観察された。低用量群では、ACQ 投与に関連づけられる異常は特に認められなかった。これらの結果から、高用量の ACQ に暴露されると血液、肝臓あるいは免疫系に影響を受ける可能性が示唆された。また、本実験条件下では 100 mg/kg 前後が最大耐量 (MTD) であり、8 mg/kg は無毒性量 (NOAEL) と判定された。

24. ACQ のラット 3 週間反復経皮投与毒性試験

ラットを用い ACQ の反復経皮投与毒性試

験を実施した。本研究は、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。

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、 γ -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、 α/β -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。また、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。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。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。なお、10 mg/kg 投与群では、雌雄とも γ -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 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。

25. ACQ のラット 4 週間反復投与毒性試験 ラットを用い 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⁸⁻¹¹⁾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 ACQ 投与に関連付けられる変化は認められなかった。以上の結果から、本実験条件下では ACQ の最大耐量（MTD）は 30 mg/kg 前後であり、無毒性量（NOAEL）は 1 mg/kg と判定された。

26. AAC のラット急性経口毒性試験

Wistar Hannover 系ラットの雌雄動物を用い AAC の急性経口毒性を検索した。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、眼脂等が観察された。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。

27. AAC のラット急性経皮毒性試験

AAC の急性経皮毒性を Wistar Hannover 系ラットの雌雄動物を用い検索した。臨床症状では、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。剖検では、皮膚所見の他に 2000 mg/kg 投与群の雌雄に脾臓の腫大が観察された。なお、限度用量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 1-5 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。

28. AAC の *in vitro* 皮膚腐食性試験

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、AAC の皮膚腐食性・刺激性を検索した。その結果、

3 分暴露では皮膚腐食性陽性と判定され、60 分暴露では疑陽性 (15%以上 20%未満) であった。この反応は、Sodium lauryl sulfate (SLS) と同程度の反応性であり、強度の刺激性が示唆された。本試験条件下において、AAC は皮膚腐食性陽性あるいは強度の刺激性物質の区分に相当すると判定された。

29. AAC のマウス皮膚感作性試験

CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、AAC の皮膚感作性を検索した。リンパ節重量測定では 0.3 及び 1%投与群、リンパ球細胞の生存性測定では 0.1、0.3 及び 1%投与群で有意な増加が認められた。³H-TdR を用いたリンパ球細胞の増殖活性測定では、0.3 及び 1%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、0.1、0.3、及び 1%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 AAC 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 以上を示していることから、AAC の LLNA 法における皮膚感作性は陽性と判断した。

30. AAC の培養細胞を用いるコメットアッセイ

AAC の DNA 損傷誘発性を調査するため、培養細胞を用いコメットアッセイを行った。用量設定試験結果から、本試験での用量は 7.3、10.2、14.3、20、28 µg/mL とした。その結果、7.3、10.2、14.3 µg/mL の用量では DNA 損傷は認められなかったが、20、28 µg/mL の用量では DNA 損傷細胞の有意な増加が認められた。しかし、

これらの用量では細胞毒性が確認されたため、出現した DNA 損傷は被験物質の細胞毒性に起因する二次的な作用と判断した。従って、AAC の培養細胞に対する DNA 損傷誘発性は陰性と判断された。

31. AAC のマウスを用いる小核試験

AAC の哺乳動物に対する *in vivo* 染色体異常誘発性を調査するため、マウスを用い小核試験を行った。最大耐量である 150 mg/kg を最高用量に、中用量 (75 mg/kg) 及び低用量 (37.5 mg/kg) を設定し、単回の強制経口投与を行った。投与後 24 及び 48 時間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、いずれの用量においても小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。従って、AAC の *in vivo* 染色体異常誘発性は無いものと判断された。

32. AAC のラットにおける 4 週間反復経口投与毒性試験 (一般毒性及び神経・免疫毒性併合試験)

AAC のラットにおける一般毒性、神経毒性及び免疫毒性を検索するため、AAC を、0、1、8 及び 40 mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットに 4 週間に亘り毎日強制経口投与した。その結果、高用量群では雌雄ともに投与初期から腹部膨満、異常呼吸音、鼻・外陰部周囲の汚れなどが認められ、それに伴い一般状態が悪化し、約半数例が死亡した。同様な症状は少数例ながら中用量群においても観察され、雌では 1 例が死亡した。病理組織学的検査では、高用量群の雌雄において胸腺・脾臓の萎縮 (B 及び T 細胞数の減少)、気道系の炎症及び前胃のびらん・潰瘍あるいは十二指腸粘膜過形成が

認められた。鼻腔の炎症は中用量群の雌においても観察された。低用量群では、AAC 投与に関連付けられる異常は特に認められなかった。これらの結果から、AAC を経口的に投与すると消化管及び気道系に傷害を惹起することが示唆された。なお、本実験条件下では 8 mg/kg 前後が最大耐量 (MTD) であり、無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに 1 mg/kg と判定された。

33. AAC のラット 4 週間反復経皮投与毒性試験

AAC の反復経皮投与毒性を検索するため、雌雄の SD 系ラットを用い、各群 6 匹の背部皮膚に AAC を 0、1、10 及び 100 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、高用量群では雌雄とも投与 3 日以降に適用部位の皮膚状態が悪化し、投与 2 週時には出血、重度のびらん・潰瘍が観察されたため、倫理上の観点から 4 週時 (投与 22 日) に同群の動物全例を途中切迫殺した。その他の投与群の動物については、投与 28 日後に屠殺し、諸検査を実施した。体重変化では、高用量群の雄において摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が認められた。血液学的検査では、高用量群の雌雄において貧血、血小板、網赤血球、好中球及び単球の増加が認められ、中用量群では雌において網赤血球と単球の増加がみられた。血液生化学的検査では、高用量群の雌雄においてアルブミンの減少を伴う低蛋白血症及び低コレステロール・トリグリセライド血症がみられ、グロブリン及び尿素窒素値が上昇した。中用量群では、雄にアルブミンと総コレステロールの減少が、雌ではグロブリンの上昇がみられ

た。剖検所見では、雌雄とも中・高用量の適用部位の皮膚に落屑、糜爛あるいは出血が認められた。臓器重量では、雌雄とも高用量群では腎臓、脾臓及び副腎の重量が、中用量群では脾臓と副腎の重量がそれぞれ増加した。病理組織学的検査では、雌雄とも高用量群のほぼ全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍、骨髄の造血亢進及び胸腺の皮質リンパ球壊死(アポトーシス)が観察された。加えて、腎臓の近位尿細管拡張及び副腎の皮質細胞肥大が高頻度に認められ、脾臓の髄外造血亢進、適用部位皮膚の表皮細胞過形成、腺胃の糜爛・潰瘍、十二指腸炎が散見された。中用量群では、適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が高頻度に観察され、同部位表皮細胞過形成が雌雄の少数例に認められた。1 mg/kg 投与群では、AAC 投与に関連付けられる異常は認められなかった。これらの結果から、本実験条件下では 10 mg/kg が最大耐量 (MTD) であり、無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 1 mg/kg であると判定された。

D. 結論

代表的木材防腐剤である AAC、ACQ、CCA は、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 は紫外線照射による皮膚発がんを促進した。遺伝毒性では、CCA のみが陽性(クロム・ヒ素の複合作用)で、他は陰性であった。反復投与試験における無毒性量 (NOAEL) は、経口では ACQ8 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。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。

E. 引用文献

- 1) Penha J, Catilu V, and Tolaymat T: Generation, use, disposal, and management options for CCA-treated wood. Florida Center for Solid and Hazardous Waste Management, Florida, USA, Report #98-1, pp. 1-54, 1998.
- 2) Odiott O and Roberts SM: Preliminary evaluation of the non-dietary hazard and exposure to children from contact with chromated copper arsenate (CCA)-treated wood playground structures and CCA-contaminated soil. FIFRA Scientific Advisory Panel (SAP), SAP Report #2001-12, pp. 1-63, 2001.
- 3) Aviado D, Dang W, Elkassabany N, Jakob W, Jensen J, Montague K, Mostaghimi S, Quick B, Shamin N, and Vaughan: Children's exposure to CCA-treated wood playground equipment and CCA-contaminated soil. In: FIFRA Scientific Advisory Panel Background Document, US EPA, pp.1-54, 2001.
- 4) McMahon TF and Chen J: Hazard identification and toxicology endpoint selection for inorganic arsenic and inorganic chromium. In: FIFRA Scientific Advisory Panel Background Document, US EPA, pp.

1-36, 2001.

- 5) 日本工業規格:木材防腐剤に関する基準 JIS K 1570、2004.
- 6) De Flora S, Bagnasco M, Serra D, and Zanicchi P: Genotoxicity of chromium compounds: A review. *Mutation Res* 238: 99-172, 1990.
- 7) Kondo Y, Nakajima E, Nito S, Asano Y, Ariyuki F, and Higashiguchi T: Assessment of the human carcinogens arsenic acid and arsenic trichloride in the mouse micronucleus assay. *MMS Communications* 2: 117-121, 1994.
- 8) BIBR Working Group: Benzalkonium chloride. Toxicity profile. The British Industrial Biological Research Association, 1989.
- 9) Cutler RA and Drobeck HP: Toxicology of cationic surfactants. In: *Cationic Surfactants*, Vol. 4 (Chapter 15), Jungermann E (ed.), Marcel Dekker, New York, 1970.
- 10) Grosselin RE, Smith RP, and Hodge HC: *Clinical Toxicology of Commercial Products* (5th ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 11) Merianos JJ: Quaternary ammonium antimicrobial compounds (Chapter 13). In: *Disinfection, Sterilisation, and Prevention* (4th ed), Block S (ed.), Lea & Febiger, USA, 1991.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 桑原真紀、小坂忠司、首藤康文、藤江 秀彰、松本力、林宏一、福山朋季、高橋尚史、竹内幸子、中島信明、原田孝則: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の幼若ラットの神経・免疫系に対する影響、第 22 回毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006

2) 竹内幸子、小坂忠司、首藤康文、藤江 秀彰、松本力、林宏一、福山朋季、高橋尚史、桑原真紀、榎本秋子、中島信明、原田孝則: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) の成熟ラットの神経・免疫系に対する影響、第 22 回毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006

3) 中島信明、川勝尚夫、小嶋五百合、武田真記夫、榎本秋子、桑原真紀、竹内幸子、高橋尚史、原田孝則: クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) のラットに対する連続経口投与の影響、第 22 回毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006

4) 高橋尚史、石塚勝美、川勝尚夫、小坂忠司、山口悟、大塚亮一、武田真記夫、竹内幸子、桑原真紀、榎本秋子、中島信明、原田孝則: 紫外線による皮膚発がんに対するクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) 暴露の増強効果、第 22 回日本毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006

5) Takahashi N, Nakashima N, Ohtsuka R, Takeda M, and Harada T: Chromated copper arsenate (CCA) used as a wood preservative enhances the skin carcinogenesis induced by ultraviolet B

(UVB) radiation, 25th STP Annual Meeting,
Vancouver, 2006

6) 小嶋小百合、佐々木淳矢、中島信明、
原田孝則：ラットにおけるクロム・銅・ヒ素
化合物系木材防腐剤 (CCA) の造血器系毒性、
第 33 回日本トキシコロジー学会学術集会、
名古屋、2006

7) 上田英夫、福山朋季、林宏一、田島由
香里、藤江秀彰、林豊、配島淳子、首藤康文、
小坂忠司、原田孝則：クロム・銅・ヒ素化
合物系木材防腐剤 (CCA) の皮膚感作性評価、
第 13 回日本免疫毒性学会学術集会、倉敷、
2006

8) 高橋尚史、山口悟、大塚亮一、武田眞
記夫、竹内幸子、桑原真紀、榎本秋子、北澤
利明、中島信明、原田孝則：クロム・銅・ヒ
素化合物系木材防腐剤 (CCA) による皮膚発
がん増強効果に関する分子生物学的解析、第
23 回日本毒性病理学会学術集会、東京、2007

G. 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

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

分担研究報告書

1. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の急性経口毒性試験

| | | | |
|-------|------|------------|-----------------|
| 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 |

研究要旨

2系統のラットを用いて CCA の急性経口毒性を検索した。雌雄 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 Hannover 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 OECD の定める GHS 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。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤であるクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）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つての指針」に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

日本試験の被験物質はクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）であり、

クロム・銅およびヒ素の各構成成分の配合比は酸化クロム（VI 価、純度 98%、関東化学（株））35.3%、酸化銅（II 価、純度 99.3%、関東化学（株））19.6%および酸化ヒ素（V 価、純度 91.9%、キシダ化学（株））45.1%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育場で生産された Wistar Hannover 系 SPF ラット（BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]）および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 SD 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7週齢にて購入し、7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飼育した。馴化終了後、雌雄別々に無作為にコンピューターで作成した乱数表を用いて各用量群に雌雄 5 匹ずつ配分した。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、急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムによって殺菌した井戸水を、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

Wistar Hannover 系雄ラットを用いた 14 日間反復強制経口投与による予備試験において、150 mg/kg 投与群で投与 1 週に 2 例の死亡例が認められた。そこで、予備試験の成績に基づき、33、100、300 および 900 mg/kg の 4 用量（公比 3）を設定した。1 用量につき雌雄とも 5 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量（33、100、300 および 900 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 6

mL/kg とした。最初に、所定量の酸化クロムおよび酸化ヒ素を秤量し、注射用水（大塚薬品株式会社）を加え溶解させた。溶解後、所定量の酸化銅を加えて超音波処理し、懸濁させた。懸濁後注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。

5. 投与方法

動物を投与前日の夕方より投与約 3 時間後まで絶食させた。投与液をスターラーで攪拌して均質な状態に保ち、注射筒内に吸い上げ胃ゾンデを用いて 1 回経口投与した。

6. 臨床症状の観察

投与当日は投与後 30 分および 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。観察期間は投与後 14 日間とした。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7、14 日および死亡発見時に個体別に測定した。

8. 剖検

死亡動物は発見時に、観察期間終了時（投与後 14 日）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（投与後 14 日間）までの累積死亡率に基づき、雌雄それぞれの LD50 値および 95%信頼限界を Moving Average 法^{2,3)}により算出した。

C. 研究結果

1. 死亡率およびLD50値

死亡率を表1に示す。

Wistar Hannover系ラットの死亡率は、33、100、300および900 mg/kg群の順にそれぞれ雄で0/5、2/5、5/5および5/5、雌で0/5、4/5、5/5および5/5であった。SD系ラットの死亡率は、33、100、300および900 mg/kg群の順にそれぞれ雄で0/5、0/5、5/5および5/5、雌で0/5、3/5、5/5および5/5であった。

これらの死亡率にもとづいて Moving Average法によりLD50値(95%信頼限界)を算出した。Wistar Hannover系ラットのLD50値(95%信頼限界)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。

2. 体重測定

体重測定結果を表2に示す。

投与後7日および14日の全生存例の体重値は、投与前の体重値と比べて順調に増加していた。

3. 臨床症状

臨床症状の結果を表3に示す。

Wistar Hannover系およびSD系ラットの雌雄に、腹臥位、円背位、沈静、自発運動低下もしくは消失、呼吸緩除、筋力低下、肛門周囲部の汚れおよび軟便が認められた。さらにWistar Hannover系ラットでは、昏迷、昏睡および流涎が認められた。

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、Wistar Hannover系およびSD系ラットの雌雄で肺の赤色化、胃のガスおよび液状貯留物、腸管の赤色化および水腫、肝臓の赤色化、口周囲部ないし肛門周囲部の汚れが認められた。観察終了時(投与14日)に行った生存動物の剖検では、肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

CCAの急性経口毒性を検索するために、Wistar HannoverおよびSD系ラットの2系統について雌雄それぞれ検索した。臨床症状の観察では、2系統のラットの雌雄ともに腹臥位、円背位、昏迷、沈静、自発運動低下もしくは消失、呼吸緩除、筋力低下、流涎、肛門周囲部の汚れ等の一般状態の悪化を示す症状が認められた。死亡例の剖検では、主として急性毒性試験における死亡例でしばしば認められる、肺および消化管の変化が観察された。これらのことから、特にCCA投与に起因する特徴的な所見は認められなかった。

CCAのラットにおける急性経口毒性試験から得られたLD50値は、Wistar Hannover系ラットでは、雄で112 mg/kg、雌で72 mg/kgであり、SD系ラットでは、雄で173 mg/kg、雌で90 mg/kgであった。いずれの系統のラットもLD50値は100 mg/kg前後の値であったものの、雌のLD50値は雄のそれと比べ低い値であった。このことから、急性経口毒性では雌性での高感受性が示唆された。しかし、発現した臨床症状および剖検所見においては明らかな雌雄差

は認められなかった。

なし

CCA のラットにおける急経口性毒性は、OECD（経済協力開発機構）の定める GHS（Globally Harmonised System）カテゴリ一⁴の 3（LD50 値は 50-300 mg/kg）と判定され、毒物劇物法の分類では劇物に相当する LD50 値の範囲であった。

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

E. 結論

本実験条件下において、CCA の急性経口毒性は OECD の定める GHS カテゴリの 3 と判定され、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 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adapted: December 17, 2001.

G. 研究発表

1. 論文発表

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

分担研究報告書

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

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

研究要旨

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。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤であるクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）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

本試験の被験物質はクロム・銅およびヒ

素化合物系木材防腐剤（CCA）であり、クロム・銅およびヒ素の各構成成分の配合比は酸化クロム（VI価、純度98%、関東化学（株））35.3%、酸化銅（II価、純度99.3%、関東化学（株））19.6%および酸化ヒ素（V価、純度91.9%、キシダ化学（株））45.1%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Sprague-Dawley系SPFラット（CrI:CD(SD)）の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに5.5週齢にて

購入し、13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飼育した。馴化終了後、各用量群に雌雄 5 匹ずつ配分した。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、急速濾過・活性炭吸着装置を通した後、次亜塩素酸ナトリウムによって殺菌した井戸水を、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

予備試験として、雄に 2000mg/kg 、雌に 1000mg/kg の CCA を 24 時間閉鎖経皮暴露し、その反応を 7 日間観察した。結果、雌雄ともに死亡例は認められなかったものの、雌において、投与 7 日目に体重減少および剖検所見として、腎臓の腫大および類白色斑散在が認められた。よって、この試験成績に基づき、雄は 2000mg/kg の 1 用量を、雌では 1000 および 2000mg/kg の 2 用量を設定した。1 用量につき雌雄とも 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 2000mg/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 4mL/kg とした。最初に、所定量の酸化クロムおよび酸化ヒ素を秤量し、注射用水（大塚薬品株式会社）を加え溶解させた。溶解後、所定量の酸化銅を加えて超音波処理し、懸濁させた。懸濁後注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。

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ド（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。準備したパッド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、張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。観察期間は投与後 14 日間とした。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7、14 日および死亡発見時に個体別に測定した。

8. 剖検

死亡動物は発見時に、観察期間終了時（投与後 14 日）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 (投与後 14 日間) 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

1. 死亡率および LD50 値

死亡率を表 1 に示す。

累積死亡率は、雄の 2000mg/kg 投与群が 0/5、雌の 1000mg/kg 投与群が 0/5、2000mg/kg 投与群が 5/5 (全例死亡) であった。

これらの死亡率に基づいた LD50 値の範囲は、雄では 2000 mg/kg 以上、雌では 1000 ~2000 mg/kg であると考えられた。

2. 体重測定

体重測定結果を表 2 に示す。

雄では投与後 7 および 14 日目の測定では、全生存例で投与前の値と比べて順調に増加していた。雌では、7 日目に 1 例体重減少が認められたが、14 日目には全例増加した。

3. 臨床症状

臨床症状の結果を表 3 に示す。

雌において、削瘦、腹臥位、円背位、混迷、沈静、自発運動の消失、痙攣、振戦、努力性呼吸、体温低下、皮膚色蒼白化、鼻吻部被毛の汚れ、背部痂皮 (暴露部位) および眼瞼下垂が認められた。雄では、毒性徴候を示す臨床症状は認められなかった。

4. 剖検所見

剖検所見を表 4 に示す。

雌に認められた死亡例の肉眼的所見として、胸水貯留、胃の液状貯留物、腸管および大腸の黒色内容物、肝臓の腫大および類白色点散在、腎臓の退色、腹水貯留、副腎の腫大、外陰部被毛の汚れおよび投与部位の皮下血管新生あるいは発赤が認められた。観察終了時 (投与 14 日) に行った生存動物の剖検では、雌の 1000mg/kg 投与群で腎臓の腫大および退色が認められた。雄では、肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

CCA の急性経皮毒性を検索するために、SD 系雌雄ラットについて検索した。雌では、被験物質暴露部位に痂皮形成および皮下の血管新生あるいは発赤が認められた。その他の臨床症状として、一般状態の悪化時を示す、削瘦、腹臥位、円背位、混迷、沈静、自発運動の消失、努力性呼吸、体温低下、皮膚色蒼白化、鼻吻部被毛の汚れおよび眼瞼下垂等が、神経症状として振戦および痙攣等が観察された。死亡例の剖検では、消化管の変化、肝臓の腫大、腎臓の退色が認められた。観察終了時の動物においても、腎臓の退色および腫大が認められた。このことから、腎臓の変化は、CCA 投与に起因することが示唆された。一方、雄動物には、毒性徴候を示す臨床症状および死亡は認められなかった。

累積死亡率は、LD50 値の範囲は、雄で 2000mg/kg 以上、雌で 1000~2000 mg/kg であった。このことから、CCA の急性経皮毒性は、雌雄差が認められ、雌性で高感受性であった。

CCA のラットにおける急性経皮毒性は、

OECD（経済協力開発機構）の定める GHS（Globally Harmonised System）カテゴリ 3. その他
一²の 4（LD50 値は 1000・2000 mg/kg）と なし
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、CCA の急性経皮毒性は OECD の定める GHS カテゴリの 4 と判定され、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. Adapted: 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

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

分担研究報告書

3. クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の
ヒト皮膚三次元モデルにおける皮膚腐食性試験

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 林 宏一 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

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。

A. 研究目的

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、代表的な木材防腐剤であるクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の皮膚腐食性を検索した。

B. 研究方法

試験方法は 2004 年 4 月 13 日付け経済協力開発機構の毒性試験指針「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In Vitro* Skin Corrosion - Human Skin Model Test」¹⁾ に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質および陽性対照物質

本試験の被験物質はクロム・銅およびヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）であり、クロム・銅およびヒ素の各構成成分の配合比は酸化クロム（VI 価、純度 98%、関東化学

（株））35.3%、酸化銅（II 価、純度 99.3%、関東化学（株））19.6%および酸化ヒ素（V 価、純度 91.9%、キシダ化学（株））45.1%であった。また、CCA の構成成分単剤についても検査対象とした。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。

陽性対照物質は、皮膚腐食性が確認されている 10%水酸化カリウム溶液（KOH、関東化学株式会社）を用いた。

2. 試験皮膚モデル

ヒト皮膚三次元モデル（EpiDerm™ human skin model system、倉敷紡績株式会社）を用いた。ヒト皮膚三次元モデルは搬入後、使用時まで冷蔵庫にて保管した。本ヒト皮膚三次元モデルの EpiDerm™ は米国の代替法検証組織の ICCVAM でインビトロの皮膚腐食性試験として検証された

モデル²⁾である。

3. 被験物質投与液の調製

50%濃度の CCA 懸濁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。最初に、所定量の酸化クロムおよび酸化ヒ素を秤量し、注射用水（大塚薬品株式会社）を加え懸濁させた。次に、所定量の酸化銅を加えて超音波処理し、懸濁させた。懸濁後注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。

CCA の各構成成分についても調製した。酸化クロムは注射用水に溶解させ、50%濃度の水溶液を調製した。酸化ヒ素は注射用水を加えて超音波処理し、50%濃度の懸濁液を調製した。酸化銅はそのまま使用した。陽性対照物質の水酸化カリウム溶液は注射用水に溶解させ、10%濃度の水溶液を調製した。

4. 試験方法

試験実施に先立って、培養液にてヒト皮膚三次元モデル（以後、モデルと記載）を約1時間37℃で5%CO₂条件下にて前培養した。モデルの反応性を確認するため、陰性対照物質処置区と陽性対照物質処置区を設けた。陰性対照物質には注射用水を、陽性対照物質には10%水酸化カリウム溶液を用いた。

50%濃度に調製した CCA、酸化クロムおよび酸化ヒ素の 100 μL を各物質ごとに2個のモデルに処置した。酸化銅は 100 mg をそのまま2個のモデルに処置した。各処置物質の暴露時間は、3分間および60分間とした。暴露後、リン酸緩衝液（PBS、イ

ンビトロジェン株式会社）で洗浄した後、生細胞の定量化のため培養液に溶解させた 0.5 mg/mL 濃度の MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma 社) を 0.3 mL 加えて、37℃で3時間培養した。以上の37℃での培養は5%CO₂インキュベーター（三洋電機（株））を用いた。培養後、PBS で洗浄し、イソプロパノール（和光純薬株式会社）を2mL加えてモデルを浸漬させ、冷暗所（4℃の冷蔵庫）で1晩静置し、MTT ホルマザンを抽出した。抽出液をよく攪拌し、浮遊物を遠心分離（1500rpm、5分、4℃）して取り除いた後、マイクロプレートリーダー（ナルジェン株式会社）を用いて540 nm で吸光度を測定した。測定値より、以下の計算式を用いてモデル細胞の生存率を計算した。

生存率(%) = (処理モデルの吸光度・補正值吸光度) / (陰性対照群の吸光度・補正值吸光度) × 100

判定；各測定値の生存率から、皮膚腐食性を判定した。判定は OECD の試験ガイドライン 431 に示された基準³⁾に従った。すなわち、生存率が3分暴露50%未満もしくは60分暴露15%未満で皮膚腐食性が陽性と判定した。

C. 研究結果

1. 皮膚腐食性成績

皮膚腐食性成績を表1に示す。

CCA 処置によるヒト皮膚三次元モデル細胞の生存率は、3分暴露で48%、60分暴露で18%であった。この生存率の皮膚腐食性を判定した結果、3分暴露では皮膚腐食性が陽性、60分暴露では疑陽性（15%

付近)であった。

一方、酸化クロム処置によるヒト皮膚三次元モデル細胞の生存率は、3分暴露で10%、60分暴露で3%、酸化ヒ素では3分暴露で15%、60分暴露で6%、酸化銅では3分暴露で91%、60分暴露で84%であった。これらの結果から、CCAの各成分の皮膚腐食性は、酸化クロムおよび酸化ヒ素が陽性、酸化銅が陰性と判定された。

D. 考察

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤(CCA)の皮膚腐食性を検索した。その結果、3分暴露では皮膚腐食性が陽性、60分暴露では疑陽性(15%付近)であった。本試験において、3分間暴露で陽性反応が認められたことから、CCAの皮膚腐食性は陽性であると推測された。一方、CCAの構成成分のうち、酸化クロムおよび酸化ヒ素の皮膚腐食性は陽性であるものの、酸化銅の皮膚腐食性は陰性であった。

本試験において金属酸化物の複合体である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。

なお、陰性および陽性対照物質における皮膚腐食性は当研究所の管理範囲内であり、本試験の信頼性を保証するものであった。

E. 結論

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。本実験条件下において、CCAの皮膚腐食性疑陽性ないし陽性の区分に相当すると判定された。

F. 引用文献

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In Vitro* Skin Corrosion - Human Skin Model Test. Adapted: April 13, 2004.
- 2) ICCVAM Evaluation of EPISKIN, Epiderm (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: In vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. Research Triangle Park, NC, National Institute of Environmental Health Sciences. June 2002.

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

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

分担研究報告書

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）

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
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

クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（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。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。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤であるクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）について、マウスの Local Lymph Node Assay（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事を目的とした。

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

本試験の被験物質として、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）の代表的種類のひとつである CCA2 号（CCA・type B）¹⁾を使用した。同被験物質の有効成分であるクロム・銅およびヒ素の各構成成分配合比は酸化クロム（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%であった。これらの被験物質の入手先は、ク