

E. 結論

CCA 処理木材の設置から 20 年以上経過した鉄道沿線、公園、民家の庭の土壌を採取し、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、特に問題となる分析値は認められなかった。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

F. 引用文献

- 1) 首藤康文・小坂忠司：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、「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」、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 17 年度総括・分担研究報告書、pp.65-134、2006 年 3 月
- 2) 原田孝則：クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）のラットにおける 4 週間反復経皮投与毒性試験、「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」、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 年度総括・分担研究報告書、15 章、2007 年 3 月

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

表1. 土壌中の金属類の定量結果 (mg/kg)

検体	乾燥重量あたり			風乾重量あたり			風乾土壌 含水率 (%)
	総ヒ素	クロム	銅	総ヒ素	クロム	銅	
A	<0.01	0.29	2.6	<0.01	0.26	2.4	9.2
B	0.04	0.14	3.3	0.04	0.14	3.2	2.2
C	0.12	0.29	0.73	0.12	0.28	0.71	2.6

A : 鉄道沿線、B : 公園、C : 民家の庭

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

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

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

Wistar 系ラットの雌性動物を用いて、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経口毒性を検索した。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。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤で銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性毒性を検索した。

B. 研究方法

試験方法は平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知「農薬の登録申請に係わる試験成績について」の「毒性に関する試験成績を作成するに当たっての指針」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質は、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）であ

り、銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅（II価、純度99.3%、関東化学（株））55.6%およびアルキルアンモニウム（塩化ベンザルコニウム、純度50%、和光純薬工業（株）/Avocado Research Chemicals Ltd）44.4%であった。受領した被験物質は湿度40%以下の状態にて室温（許容範囲：15～30℃）で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場で生産されたWistar Hannover系SPFラット（BrlHan:WIST@Jcl[GALAS]）の雌動物を用いた。供試動物は6週齢にて購入し、7日間試験環境に馴化した後、7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 3 匹ずつ配分し使用した。飼料には保証飼料である固型飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、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

試験群には 100、300 および 1000 mg/kg の 3 用量を設定した。1 用量につき 3 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量（100、300 および 1000 mg/kg）の被験物質投与液を投与前に調製した。投与液の調製に際し、成分ごとに純度による調製濃度の換算を実施した。投与容量は 4 mL/kg とした。所定量の銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水（大塚製薬株式会社）を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。

5. 投与方法

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、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。

死亡率は、100、300 および 1000 mg/kg 群の順にそれぞれ 0/3、1/3 および 3/3 であった。

これらの死亡率から、LD50 値の範囲は、300~1000mg/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。

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。

300 および 1000mg/kg 投与群で認められた死亡動物において、沈静、筋力低下、体温低下、流涎、口周囲部および外陰部被毛の汚れ等が認められた。観察終了時（投与 14 日目）まで生存した動物では、毒性徴候を示す臨床症状は観察されなかった。

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、胃のガス貯留および赤色あるいは黒色内容物、腸管の液状貯留物が認められた。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

ACQ の急性経口毒性を検索するために、Wistar Hannover 系雌ラットについて検索した。臨床症状の観察では、沈静、筋力低下、体温低下、流涎、口周囲部の被毛の汚れおよび外陰部の被毛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いてしばしば認められる、消化管の変化が観察された。これらのことから、ACQ 投与に起因する特徴的な所見は認められなかった。

ACQ 投与における死亡率は 100、300 および 1000mg/kg 投与群の順にそれぞれ 0/3、1/3 および 3/3 であった。よって Wistar hannover 系雌ラットの LD50 値の範囲は 300~1000mg/kg であると考えられた。

この結果は、OECD（経済協力開発機構）の定める GHS（Globally Harmonised System）カテゴリ 2⁴（LD50 値は

300-2000mg/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。

E. 結論

本実験条件下において、ACQ の急性経口毒性は OECD の定める GHS カテゴリ 4 に位置し、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 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adapted: December 17, 2001.

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

17. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経口毒性試験
（追加試験）

分担研究者	小坂忠司	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室長
協力研究者	上田英夫	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室主任
	林 宏一	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	福山朋季	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室研究員

研究要旨

Wistar Hannover 系雌雄ラットを用いて銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経口毒性を検索した。各群 5 匹の動物を使用し、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。その結果、Moving Average 法にて算出した LD50 値は、雌雄ともに 520 mg/kg であった。

従って、本実験条件下における ACQ の急性経口毒性 (LD50 値) は OECD の定める GHS カテゴリー 4 (300-2000 mg/kg) に位置し、毒物劇物法の分類では普通物に相当すると結論された。

A. 研究目的

平成 17 年度では、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経口毒性試験を雌性ラットを用いて実施した。平成 18 年度では、ACQ の急性毒性作用の性差を確認するため雌雄動物を用いて実施した。

B. 研究方法

試験方法は平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知「農薬の登録申請に係わる試験成績について」の「毒性に関する試験成績を作成するに当たっての指針」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質は、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）であり、銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅（Ⅱ価、純度 99.3%、関東化学（株））55.6%およびアルキルアンモニウム（塩化ベンザルコニウム、純度 50%、和光純薬工業（株）/Avocado Research Chemicals Ltd）44.4%であった。受領した被験物質は湿度 40%以下の状態にて室温（許容範囲：15～30℃）で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場で生産さ

を用いた。供試動物は7週齢にて購入し、7日間試験環境に馴化した後、8週齢にて試験に供した。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間（オールフレッシュエアー方式）、照明時間 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、各用量群に 5 匹ずつ配分し使用した。飼料には保証飼料である固型飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水（常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

試験群には雌雄とも 100、300 および 900 mg/kg の 3 用量を設定した。1 用量につき 5 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量（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 4 mL/kg とした。所定量の銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水（大塚製薬株式会社）を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。

5. 投与方法

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。観察期間は雄で投与後 14 日間、雌では投与後 21 日間とした。なお、観察期間は投与後 14 日間を予定していたが、雌では 14 日の体重測定で体重減少を示す個体が認められたため、観察期間を 7 日間（投与後 21 日）延長した。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7（雌雄）、14 日（雌雄）、21 日（雌）および死亡発見時（雌雄）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 日あるいは 21 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。また、14 日目の体重測定で体重減少を示した個体は、状態が著しく悪化したため、切迫殺し、同様の検査を実施した。

9. 半数致死量（LD50 値）の算出

観察終了時までの累積死亡率に基づき、雌雄それぞれの LD50 値を Moveing 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。

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、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、雌雄ともに 520 mg/kg (95%信頼限界は算出不能) であった。

2. 臨床症状

臨床症状の結果を表 2 に示す。

死亡した動物において、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が認められた。

投与後 14 日の観察以降に切迫殺された雌では、異常呼吸音および重度の消瘦が観察された。

観察終了時まで生存した動物では、300mg/kg 投与群の雌に異常呼吸音が認められた。

3. 体重測定

体重測定結果を表 3 に示す。

雄の生存動物は、試験期間を通じて、投与前の体重値と比べて順調に増加した。

雌では、投与 14 日の体重値に 1 例において投与前の体重値と比べ減少が認められた。よって、試験期間を 7 日間 (投与 21 日) 延長した。投与後 14 日目に体重が減少した個体は、状態が著しく悪化したため、切迫殺した。その他の生存例では、試験期間と同じ、投与前の体重と比較して順調に増加した。

4. 剖検所見

剖検所見を表 4 に示す。

死亡例の肉眼的所見として、胸水貯留、前胃部の白色化、胃の液状貯留物、腸管の液状貯留物および水腫、鼻吻部および外陰部の被毛の汚れが認められた。

切迫殺した動物では、胃および腸管のガス貯留が認められた。

観察終了時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

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。以上のように、呼吸器および消化管へ影響は認められたが、ACQ に特徴的な所見は認められなかった。

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、雌雄ともに 520 mg/kg (95%信頼限界は算出不能) であり、性差は認められなかった。

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、ACQ の急性経口毒性は雌雄とも OECD の定める GHS カテゴリー4 に位置し、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) 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
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

18. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経皮毒性試験

分担研究者	小坂忠司	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室長
協力研究者	上田英夫	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室主任
	林 宏一	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	福山朋季	(財)残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室研究員

研究要旨

Wistar Hannover 系雌雄ラットを用いて銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経皮毒性を検索した。各群 5 匹の動物を使用し、雄では 2000 mg/kg の 1 用量、雌では 500、1000 および 2000mg/kg の 3 用量を設定し、24 時間閉鎖経皮暴露した。その結果、雄では限度用量にて死亡例が認められなかった。雌の死亡率は 500、1000、2000 mg/kg 用量群の順に 0/5、3/5、5/5 であり、Moving Average 法にて算出した LD50 値は、933 mg (95%信頼限界 631-1380 mg/kg) であった。

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

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤で銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の急性経皮毒性を検索した。

B. 研究方法

試験方法は平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知「農薬の登録申請に係わる試験成績について」の「毒性に関する試験成績を作成するに当たっての指針」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質は、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）であり、銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅（II 価、純度 99.3%、関東化学（株））55.6%およびアルキルアンモニウム（塩化ベンザルコニウム、純度 50%、和光純薬工業（株）/Avocado Research Chemicals Ltd）44.4%であった。受領した被験物質は湿度 40%以下の状態にて室温（許容範囲：15～30℃）で保管した。

2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場で生産さ

れた Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrIHan:WIST@Jcl[GALAS]) の雌雄動物を用いた。供試動物は 7 週齢にて購入し、7 日間以上試験環境に馴化した後、8 週齢にて試験に供した。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエア方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、各用量群に 5 匹ずつ配分し使用した。飼料には保証飼料である固型飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社) を用い、ステンレス鋼製給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水 (常総市) をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

予備試験の結果に基づき、雄では 2000 mg/kg の 1 用量を、雌では 500、1000 及び 2000mg/kg の 3 用量を設定した。1 用量につき 5 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (500、1000 及び 2000 mg/kg) の被験物質投与液を投与前に調製した。投与液の調製に際し、成分ごとに純度による調製濃度の換算を実施した。投与容量は、4 mL/kg とした。投与液は、所定量の銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水 (大塚製薬株式会社) を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。

5. 投与方法

投与前日に、動物の背部中央を電気バリカンにて剪毛した。被験物質投与液は、粘着シートに載せたパット (オカモト MS パット; 三共株式会社) の上に、所定量均質に広げた。準備したパットを被験物質が接するように動物に貼り、さらに胴体をサージカルテープで巻いた。暴露時間は、24 時間とした。暴露終了後、貼り付け部位に残存する被験物質は、微温湯でできる限り除去した。

6. 臨床症状の観察

投与当日は投与後 1 および 4 時間後に、翌日から観察期間終了時までには 1 日 1 回、死亡の有無および動物の外貌、外皮、姿勢、行動、呼吸、意識、神経症徴候、体温、排泄等について詳細に観察した。観察期間は 14 日間とした。

7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7 日及び最終解剖時に個体別に測定した。

8. 剖検

死亡動物は発見時に、観察期間終了後の生存動物は、エーテル麻酔により安楽死させ、解剖して肉眼的異常の有無を検索した。

9. 半数致死量 (LD50 値) の算出

観察終了時までの累積死亡率に基づき、雌雄それぞれの LD50 値の範囲を決定した。

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

C. 研究結果

1. 死亡率およびLD50値

死亡率を表1に示す。

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

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

2. 臨床症状

臨床症状の結果を表2に示す。

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

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

3. 体重測定

体重測定結果を表3に示す。

生存動物では、投与後7日および観察終了時（投与後14日）の体重は、投与前と比較して順調に増加した。

4. 剖検所見

剖検所見を表4に示す。

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

観察終了時に実施した生存例では、2000

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

D. 考察

ACQの急性経皮毒性を検索するために、Wistar Hannover系雌雄ラットについて検索した。死亡した動物では、臨床症状として、一般状態の悪化を示す円背位、起立不能、混迷、自発運動の低下、振戦、呼吸緩徐、体温低下及び流涙などが観察された。剖検所見として、毒性試験でしばしば認められる消化管の変化と投与部位皮膚の浮腫が観察された。

観察終了時まで生存した雌雄において、投与部位皮膚に肥厚、硬化、暗調化、鱗屑などの投与部位に刺激性を示唆する所見が認められた。

死亡率は、雄では0/5（死亡例なし）、雌では500、1000、2000mg/kg用量群の順に0/5、3/5、5/5例であった。このことは、ACQの急性経皮毒性に雌雄差があり、雌に感受性があることを明瞭に示している。雌の死亡率に基づいて算出したLD50値は、933 mg（95%信頼限界631-1380 mg/kg）であった。

この結果からACQの急性経皮毒性（LD50値）は、OECD（経済協力開発機構）の定めるGHS（Globally Harmonised System）カテゴリー3（200-1000 mg/kg）⁴と判定され、毒物劇物法の分類では劇物に相当すると考えられた。

E. 結論

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

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

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

F. 引用文献

- 1) 農薬の登録申請に係わる試験成績について, (監修) 農林水産省, 12 農産第 8147号 (平成 12年 11月 24日)
- 2) Thompson WR, Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose. I. Fundamental formulas, estimation of error, and relation to other methods. *Bacterial Rev* 11: 115-145 (1947).
- 3) Weil CS, Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. *Biometrics* 8: 249-263 (1952).
- 4) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 434: Acute dermal Toxicity - Fixed dose procedure. Pdapted: May 14, 2004 (1st version).

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし

厚生労働省化学研究費補助金（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

19. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の *in vitro*
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 (*in vitro*) を用いて、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) の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。

A. 研究目的

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、現在使用量の多い代表的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) 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

本試験の被験物質は、銅・アルキルアン

モニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) であり、銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅 (Ⅱ 価、純度 99.3%、関東化学 (株)) 55.6% およびアルキルアンモニウム (塩化ベンザルコニウム、純度 50%、和光純薬工業 (株) /Avocado Research Chemicals Ltd) 44.4% であった。受領した被験物質は湿度 40% 以下の状態にて室温 (許容範囲: 15~30℃) で保管した。

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 ACQ 懸濁液を投与前に調製した。投与液の調製に際し、成分ごとの純度による調製濃度の換算をして実施した。所定量の銅および塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水(大塚製薬株式会社)を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。陽性対照物質の水酸化カリウム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、陰性対照群処置区と陽性対照群処置区を設けた。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%に調製したACQおよびを100 μLずつ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-diphen

yltetrazolium 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2 mL 加えてモデルを浸漬させ、冷暗所(4℃の冷蔵庫)で1晩(約15時間)静置し、MTTホルマザンを抽出した。抽出液をよく攪拌し、マイクロプレートリーダー(ナルジェヌンク株式会社)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要請と判定した。

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。

ACQ 処置によるヒト皮膚三次元モデル細胞生存率は、3分暴露で40.8%、60分暴露で35.9%であった。この生存率の皮膚腐食性を判定した結果、3分暴露では陽性、60分暴露では疑陽性(50%未満)であった。

D. 考察

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、皮膚刺激性を検索した。その結果、3分暴露では

皮膚腐食性と判定された。一方、60分暴露では、疑陽性（50%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³⁾、強度の刺激性が示唆された。本試験条件下において銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) は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。

E. 結論 ヒト皮膚三次元モデルを用いて ACQ の皮膚腐食性を検索した。本実験条件下において、ACQ の皮膚腐食性ないし強度刺激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.
- 3) Prediction of Human Skin Irritancy Using a Cultured Human Skin Model: Comparison of Chemical Application Procedures and Development of a Novel Chemical Application Procedure Using the Vitorlife-skin model. Noriyuki M, Katsuyasu M, Shin-ichiro M Hajime K, Satoru N,

and Hiroaki K. Altern. Animal Test Experiment. Prediction of Human Skin Irritancy. 9(1), 1-10 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

20. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の皮膚感作性試験

分担研究者 小坂忠司 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室長
協力研究者 福山朋季 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室研究員
上田英夫 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室主任

研究要旨

銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の皮膚感作性試験を、8週齢のCBA系SPFマウスの雌性動物を用いて、OECDの毒性試験指針429: Skin sensitization・Local Lymph Node Assay（LLNA法）に従って実施した。投与群として、0、0.3、1、3%の4濃度のACQを設定し、1群5例のマウスを用いた。各濃度の投与液を3日間両耳後方に経皮投与し、3日後に³H-methyl-Thymidine（20 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。その結果、リンパ節重量、リンパ球細胞生存性及びリンパ球細胞増殖活性は、1及び3%投与群において有意な増加が認められた。また、リンパ球細胞増殖活性において、溶媒対照群との比で算出されるSimulation Indexでは、0.3、1及び3%投与群において3以上を示した。これらの結果から、ACQの皮膚感作性は、陽性であると結論された。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤である銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）について、マウスのLocal Lymph Node Assay法（LLNA法）により皮膚感作性を検索し、リスク評価に必要な基礎的毒性情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

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

Lymph Node Assay」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質は、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤木材防腐剤（ACQ）であり、銅及びアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅（II価、純度99.3%、関東化学（株）55.6%及びアルキルアンモニウム（塩化ベンザルコニウム、純度50%、和光純薬工業（株）/Avocado Research Chemicals Ltd）44.4%であった。受領した被験物質は湿度40%以

下の状態にて室温（許容範囲：15～30°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²⁾ 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³⁾、急性経皮⁴⁾及び培養皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験⁵⁾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°C）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 μL 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 ^3H -methyl-Thymidine (^3H -TdR、GE Healthcare Bioscience Ltd、東京都)

を投与した。 $^3\text{H}\cdot\text{TdR}$ の投与量はマウス 1 匹あたり 20 μci とした。 $^3\text{H}\cdot\text{TdR}$ 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 μm メッシュ) 上で搗りつぶし、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 μL) 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 μL) と CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (100 μL) を白色マイクロプレート (Nulge 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。⁶⁾

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。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。

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 24th 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