

Appendix 3 Individual clinical observation in toxicity test

Test	Substance	Dose (mg/kg)	Animal number	Time after the administration				
				1	3	5	24	48 (hr)
Toxicity test	ACQ	125	11	—	—	—	—	—
			12	—	—	—	—	—
			13	—	—	—	—	—
		250	14	D	D, L, P	Lo, P, T	Fd	
			15	—	—	—	—	—
			16	—	—	—	—	—
		500	17	P	P	A, P	—	—
			18	P	P	P, S	P	P
			19	Ls, P	P	A, P	—	—
		1000	20	—	P	P	P	P
			21	—	P	A, P	P	Fd
			22	—	—	D, E, P	P	P

- : No abnormalities detected.
- A : Abdominal distention.
- D : Decrease in spontaneous motor activity.
- E : Excitement.
- Fd : Found dead.
- L : Lacrimation.
- Lo : Loss of spontaneous motor activity.
- Ls : Loose stool.
- P : Piloerection.
- S : Soiled fur (perioral region).
- T : Tremor.

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

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（一般毒性および神経・免疫毒性併合試験）

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
分担研究者	首藤康文	（財）	残留農薬研究所	毒性部神経毒性研究室主任
協力研究者	榎本秋子	（財）	残留農薬研究所	毒性部病理研究室主任
	千葉裕子	（財）	残留農薬研究所	毒性部病理研究室技術担当室長
	小嶋五百合	（財）	残留農薬研究所	毒性部病理研究室研究員
	林 宏一	（財）	残留農薬研究所	毒性部免疫・急性毒性研究室
	武田眞記夫	（財）	残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室長
	大塚亮一	（財）	残留農薬研究所	毒性部分子毒性研究室研究員

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。

A. 研究目的

現在の使用量の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）をラットに4週間にわたって反復経口投与し、その際に生じる一

般毒性、神経毒性および免疫毒性を検索し、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、医薬品毒性試験法ガイドライン（薬審1第24号、1989年）、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（薬新薬第88号、1993年）、医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン（医薬審第1019号、1998年）、反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について（医薬審第655号、1999年）、医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインの改正について（医薬審第1831号、2000年）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<sup>1)</sup>。受領した被験物質は、湿度40%以下、温度は室温（許容範囲：15～30℃）条件下で保管した。

### 2. 試験動物

日本クレア株式会社富士生育場（静岡県）で生産されたWistar Hannover系SPFラット（Br1Han:WIST@Jcl[GALAS]）を一般毒性試験用に雌雄各47匹、免疫毒性試験用に雄を37匹購入し、6日間試験環境に馴化した後、7週齢で試験に用いた。馴化期間中毎日一般状態を観察し、この期間中眼科学

的検査および詳細な一般状態の観察を実施した。動物は温度22 ± 3℃、湿度50 ± 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。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で一般毒性試験には雌雄各10匹、免疫毒性試験用は雄8匹を各用量群にそれぞれ配分し、群分けを実施した。群分け後の個体識別は耳鑑札法で行なった。基礎飼料には保証飼料MF粉末（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製粉末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

当該試験に先立ち、各群5匹ずつの雌性Wistar Hannover系SPFラットを用いて0、10、30、100および300 mg/kgの用量で7日間の反復強制経口投与による予備試験を実施した。その結果、300 mg/kg投与群において、投与3日に1例死亡した。同群の臓器重量検査にて胸腺の絶対・相対重量の減少および副腎の絶対重量の増加が観察され、血液学的検査にて血小板および白血球数の増加が観察された。また、剖検所見では胃および腸の膨満が4例全例に、胸腺の萎縮が2例に、腺胃部出血点散在と前胃粘膜剥離が1例ずつに観察された。100 mg/kg

以下の投与群では統計学的に有意な変化はみられなかった。本予備試験結果に基づいて、明らかな毒性変化が惹起されることが考えられる 200 mg/kg を最高用量に、最小の毒性変化が予想される 40 mg/kg を中間用量に設定した。また、無毒性が予想される 8 mg/kg を低用量に設定した。加えて、対照群 (0 mg/kg) を設定した。これらの設定用量群 (0、8、40 および 200 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき主試験用に雌雄とも 10 匹、免疫グロブリン抗体価測定用に雄 8 匹の動物を使用して試験を開始したが、雄の 200 mg/kg において投与 4 日までに死亡が認められたため、投与 5 日から設定用量を 100 mg/kg に下げて試験を継続した。1 週間遅れで投与を開始した雌では、試験開始時から高用量を 100 mg/kg とした。被験物質の投与は週 7 日 4 週間連続して行った。

#### 4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、8、40、200 あるいは 100 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、酸化銅は純度によって、塩化ベンザルコニウムは含有量によって調製濃度の換算を実施した。投与容量は 4 mL/kg とした。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、注射用水 (大塚薬品株式会社、東京都) を加え懸濁させた。懸濁後、8、40 および 200 あるいは 100 mg/kg の各用量にてそれぞれ 2.0、10.0 および 50 あるいは 25 mg/mL の濃度になるように注射用水にて定容した。また、対照群の投与液は注射用水とした。各濃度の投与液は小分けし、冷蔵・遮光 (5℃) 条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

#### 5. 一般状態の観察

全動物について、投与期間中 1 日 2 回瀕死状態ないし死亡の有無を、1 日 1 回被験物質投与後に一般状態を観察した。瀕死状態の動物は動物愛護および人道的配慮から安楽死させた。この切迫殺動物のデータは死亡例と同様に扱った。

#### 6. 詳細な状態の観察

主試験用の全生存動物について、詳細な状態の観察を投与開始前 1 回と投与期間中毎週 1 回、午前のほぼ一定の時刻に実施した。観察は、ケージ内あるいは外 (オープンフィールド) で以下の項目を対象に実施し、それらの程度をスコアリングして記録した。

詳細な状態の観察項目：体位/姿勢、呼吸状態、攣縮、振戦、痙攣、警戒性、攻撃性、眼球突出、眼瞼閉鎖、流涙、流涎、粘膜、分泌物/付着物、筋緊張、取り扱いに対する反応、瞳孔径の変化、常同行動、異常行動、被毛の状態、皮膚色、探索行動、歩様異常、立ち上がり姿勢、糞の個数、糞の状態及び尿の状態

#### 7. 神経機能検査

主試験用の全生存動物について、投与 4 週時に 1 回、感覚運動反応 (位置視覚、接近反応、触覚反応、痛覚反応、聴覚反応および空中立ち直り反射) 検査、OECD 方式ラット握力測定器 (室町機械株式会社) を用いた前肢及び後肢握力測定、遠赤外線方式の検出器 (SUPER MEX®) を装着した自発運動測定システム (室町機械株式会社) を用いた自発運動量測定を実施した。

## 8. 体重

全動物について、投与開始時およびその後毎週毎週 1 回体重を測定した。また、全動物について殺処分前あるいは死亡発見時に最終体重を測定した。

## 9. 摂餌量

主試験用の全生存動物について、全ケージについて、毎週 1 回原則として連続 3 日分または 4 日分のケージ別摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中にそれぞれのケージ内で生存した動物の延べ数で除し、ケージ毎に 1 日 1 匹あたりの摂餌量（ケージ別平均摂餌量）を算出した。

## 10. 食餌効率

主試験用の全用量群について、投与開始後毎週、群平均体重増加量をそれぞれの群平均摂餌量で除して群平均食餌効率（%で表示）を雌雄別に算出した。

## 11. 眼科学的検査

主試験用の動物について、馴化期間中に雌雄の全馴化動物および投与 4 週時に雌雄の全生存動物について、ハロゲン検眼鏡（株式会社ナイツ）による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では、眼球、眼瞼、結膜、角膜、前眼房、瞳孔、虹彩、水晶体／硝子体および眼底を観察した。

## 12. 尿検査

主試験用の全生存動物について、投与 4 週時に尿検査を実施した。各検査動物を個体別採尿ケージに入れて自然排泄により得られた新鮮尿を用いて、尿比重、ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質、

ウロビリノーゲンおよび尿沈渣の項目について検査した。また、動物を同ケージに一晩入れて蓄積尿を採取し、尿色と尿量を検査した。尿比重は手持屈折計（株式会社アタゴ）で測定した。ブドウ糖、ビリルビン、ケトン体、潜血、pH、蛋白質およびウロビリノーゲンは、試験紙マルティスティックス®SG（バイエルメディカル株式会社）の呈色の程度を、クリニテック®50（バイエルメディカル株式会社）で準定量的に計測した。尿沈渣は鏡検した。

## 13. 血液学的検査

主試験用の全生存動物について、4 週間反復投与終了後に血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晩絶食させた。動物をエーテル麻酔下で開腹し、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（PLT）、網赤血球数（Retics）、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（N）、リンパ球（L）、単球（M）、好酸球（E）、好塩基球（B）、大型非染色球（LUC）

血液凝固能を調べるために、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）の測定検査も実施した。

#### 14. 血液生化学的検査

主試験用の全生存動物について4週間反復投与終了後に前項の血液学的検査で採取した血液試料をヘパリン処理した血漿を用い、以下の項目をJCA-BM1250自動分析装置にて測定した。

測定項目(略号): アルカリホスファターゼ(ALP)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGTP)、クレアチニン(Creat)、尿素窒素(BUN)、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グロブリン(Glob)、アルブミン/グロブリン比(A/G ratio)、血糖(Gluc)、総コレステロール(T.Chol)、トリグリセライド(TG)、総ビリルビン(T.Bil)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、無機リン(P)、カリウム(K)および塩素(Cl)

#### 15. 免疫学的検査

主試験用の全生存動物について、4週間反復投与終了後に胸腺および脾臓の半分について重量を測定し、免疫学的検査に供試した。免疫学的検査では、総合血液学検査装置アドヴィア120(Bayer Corporation)を用いた胸腺および脾臓の細胞数計測及びFACS Calibur(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用いたフローサイトメトリ解析(リンパ球サブセット解析)を実施した。

#### 16. 免疫グロブリン抗体価の測定

免疫グロブリン抗体価測定用の全生存動物について、4週間投与終了後最終屠殺(採血)の6日前に、 $2 \times 10^8$ のヒツジ赤血球

(SRBC, Seep Red Blood Cell, (株)日本生物材料センター)をエーテル麻酔下でラットに0.5mL静脈内投与した。採血はエーテル麻酔下で後大静脈より行い、血清を採取した後測定時まで凍結保存( $-70^{\circ}\text{C}$ 以下)した。血清中のヒツジ赤血球特異的免疫グロブリンMクラス抗体(抗ヒツジ赤血球免疫グロブリンM抗体)の抗体価は、BD OptEIA™ Reagent Set B(BD)を使用して酵素免疫測定法(ELISA)<sup>2)</sup>で測定し、吸光度が0.5を示す血清の希釈倍率をもって表した。

#### 17. 臓器重量

主試験用の全生存動物について、4週間反復投与終了後に剖検し、以下の臓器の固定前の重量(絶対重量)を測定して最終体重から比体重値(相対重量)を算出した。測定項目: 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(腹葉)、精囊・凝固線(両側)、卵巣(両側)、子宮

#### 18. 剖検および組織採取

主試験用の動物について、投与期間中の死亡動物を含めた全動物について剖検を実施した。4週間反復投与終了後の計画殺動物は、エーテルの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。

さらに病理学的精査が必要となる可能性を考慮して、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、肺について

はホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。また、精巣はFSA液（ホルマリン・ショ糖・酢酸混合液）で5~7日間固定した後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

採取した臓器及び組織：脳（大脳、小脳、橋および延髄）、脊髄（頸部、胸部および腰部）、坐骨神経（片側）、下垂体、胸腺（右側半分）、甲状腺および上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾臓（半分）、骨および骨髄（胸骨、片側大腿骨および頸部、胸部、腰部椎骨）、膝関節（片側）、リンパ節（頸部および腸間膜）、心臓、大動脈、唾液腺（顎下腺および舌下腺）、食道、胃（前胃および腺胃）、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、頭部（鼻腔、副鼻腔、口腔粘膜および中耳を含む）、舌、咽頭、喉頭、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（腹葉）、精囊（両側）、凝固腺（両側）、卵巣（両側）、子宮（頸部を含む）、瞳、眼球（両側）、ハーダー腺（両側）、下腿三頭筋（片側）、皮膚（腰背部）、乳腺（腹部）および肉眼的異常部位

#### 19. 肝臓の酸化ストレス(活性酸素関連物質)の測定

4週間反復投与終了後の主試験用計画殺動物より採取した肝組織（凍結試料）を用い、過酸化脂質および8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）の測定を実施した。

過酸化脂質の測定では凍結試料の一部から肝ホモジネートを調製し、TBA法により分光光度計（UV-2200、島津製作所）にて過酸化物の吸光度を測定し、過酸化脂質濃度

を算出した。8-OH-dGの測定では凍結試料の一部からDNAを抽出し、8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）測定用ELISAキット（日本油脂株式会社）を用い肝組織中の8-OH-dG濃度を測定した。

#### 20. 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。

運動量、握力、体重、摂餌量、尿比重、尿量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、胸腺および脾臓の細胞数、フローサイトメトリーによるリンパ球、免疫グロブリン抗体価、臓器重量、過酸化脂質量および8-OH-dG量のデータについては、先ずBartlettの等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、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の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlettの等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、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対照群と各投与群間における平均順位の有義差の有無を判定した。

詳細な状態の観察所見および感覚運動反応のスコアならびに尿検査項目（尿比重、尿量を除く）については、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、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対照群と各投与群間における平均順位の有差の有無を判定した。ただし、詳細な状態の観察における糞の状態および尿の状態については有意差検定を実施しなかった。

死亡率ならびに一般状態の観察所見、眼科学的検査所見および剖検所見の発生頻度については、Fisher の直接確率計算法（片側検定）を用いて解析した。

## C. 研究結果

### 1. 死亡率

200 mg/kg で投与を開始した雄の高用量群では投与 4 日までに、主試験用の動物で 10 匹中 2 匹、免疫グロブリン抗体価測定用動物で 8 匹中 1 匹が死亡したため、投与 5 日から 100 mg/kg に用量を下げた。雌では高用量群を 100 mg/kg として投与を開始した。高用量群（雄 200/100 mg/kg、雌 100 mg/kg）における投与 4 週の累積死亡率は、雄の主試験用動物で 4/10、抗体価測定用動物で 5/8、雌の主試験用動物で 1/10 だった。対照群（0 mg/kg）およびその他の用量群（雌雄とも、低用量群は 8 mg/kg、中用量群は 40 mg/kg）では死亡例は認められなかった。

### 2. 一般状態

高用量群では、雄の主試験用動物で異常呼吸音、軟便および口周囲部被毛の汚れが、抗体価測定用動物で筋力低下の発生頻度が有意に増加した。その他、雄で消瘦、横臥位、腹部膨満、自発運動低下、努力性呼吸、混迷、鎮静、体温低下、外陰部被毛の汚れ、眼瞼下垂および流涎が、雌で腹部膨満、異常呼吸音、鎮静、筋力低下、体温低下、眼瞼下垂および流涎が散見され

た。

中用量および低用量群では、雌雄とも一般状態に異常はなかった。

### 3. 詳細な状態の観察

詳細な状態の観察の結果、探索行動、立ち上がり姿勢および糞の個数に有意差が散見されたが、いずれも用量相関性がないあるいは単発的である等の理由から、被験物質投与に関連付けられる変化ではなかった。

### 4. 神経機能検査成績

投与 4 週時に行った神経機能検査では、高用量群の雄で測定開始から 10 分間および 60 分間合計の自発運動量が有意に減少した。また、高用量群の雌で前肢の握力が有意に増加した。

中および低用量群の雌雄には有意な変化はなかった。

### 5. 体重変化

高用量群の雄では主試験用動物で投与期間を通して有意に低下した。抗体価測定用動物では有意な低下は投与 1 週のみだったが投与期間を通して低い値で推移した。

高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では有意な変化はなかった。

### 6. 摂餌量

高用量群の雄では、投与 1 から 3 週にかけて有意に減少した。

高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では有意な変化はなかった。

### 7. 食餌効率

高用量群の雌で効率が若干高かったが、全ての群で大きな違いは認められなかった。



## 8. 眼科学的検査成績

雌雄とも異常は認められなかった。

## 9. 尿検査成績

高用量群の雄で尿比重の有意な低下およびケトン体の有意な低下が認められた。

高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では有意な変化はなかった。

## 10. 血液学的検査成績

血液学的検査では、ヘマトクリット値と血色素量の減少、血小板数と網状赤血球数の増加およびプロトロンビン時間の短縮が高用量群の雄に認められた。

高用量群の雌および中、低用量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。

## 11. 血液生化学的検査成績

血液生化学的検査では、中および高用量群の雄および高用量群の雌において総蛋白（アルブミン・グロブリン）値の有意な減少が認められた。さらに、高用量群の雄にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の有意な増加が、雌でカリウムの有意な増加が観察された。

中用量の雌および低用量の雌雄では有意な変化は認められなかった。

## 12. 免疫学的検査成績

免疫学的検査では、高用量群の雄に汎T細胞数の減少がみられ、中および高用量群の雌に汎B細胞数の増加が観察された。中用量群の雌および低用量群の雌雄では有意な変化はなかつ

た。

雄における免疫グロブリン抗体価測定では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

## 13. 臓器重量

脳、心臓および肝臓に有意差が散見されたが、いずれも用量相関性がないあるいは絶対および相対重量の変化が一致しない等の理由から、被験物質投与に関連付けられる変化ではなかった。

## 14. 剖検所見

高用量群の雄において小腸腔拡張の発生頻度が有意に増加した。その他、肺、消化管などに所見が散見されたが、高用量群の雌および中、低用量群の雌雄では、被験物質投与に関連付けられる肉眼的異常は観察されなかった。

## 15. 肝臓の酸化ストレス(活性酸素関連物質)の測定成績

肝臓の酸化ストレスマーカーの解析では、高用量群の雌雄において酸化的DNA損傷の産物である8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の増加ないし増加傾向が認められた。また、高用量群の雄に過酸化脂質の減少が認められた。

中および低用量群の雌雄においては有意な変化は認められなかった。

## D. 考察

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価を行うことを目的に、昨年（平成16年）度はクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）を対象にして、ラットの反復経口投与毒性試験および反復経口投与神経・免疫毒性試験を実施した。平成17年度

は、CCA に代わって現在使用量の多い銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) を対象にラットの反復経口投与毒性試験を実施し、その一般毒性、神経毒性および免疫毒性を評価した。ACQ は代表的種類のひとつである ACQ-1 (銅 55.6%+アルキルアンモニウム 44.4%)<sup>1)</sup> を 0、1、8 および 80 mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットに 7 週齢から 4 週間に亘り毎日強制経口投与し、臨床症状観察、機能検査、眼科学的検査、尿検査、血液・生化学検査、免疫学的検査および病理学的検査を含む諸検査を実施した。

**一般毒性:** 一般状態の観察において高用量群で、削瘦、横臥位、混迷、鎮静、体温低下、筋力低下、自発運動低下、異常呼吸音、努力性呼吸、眼瞼下垂、流涎、腹部膨満、口周囲部被毛の汚れ、外陰部被毛の汚れ、軟便が認められたが、これらの症状は殆どが死亡時に観察されていることおよび高用量群の雄では体重抑制および摂餌量の低下が認められたことから、一般状態の悪化を示す非特異的な所見であると考えられた。

血液学的検査では、高用量群の雄でヘマトクリット値と血色素量の減少、血小板数と網状赤血球数の増加およびプロトロンビン時間の短縮が認められ、貧血状態を示唆していた。血液生化学的検査では、中および高用量群の雄および高用量群の雌において総蛋白 (アルブミン・グロブリン) 値が減少し、低蛋白血症が認められた。また、高用量群では雌雄ともに肝臓の酸化ストレス (8-OHdG) の増加がみられ、雄では肝障害を示唆する逸脱酵素 (AST/ALT) の上昇が認められた。

尿検査では、高用量群の雄で尿比重およびケトン体の有意な低下が認められたが、pH およびその他の尿検査項目には異常がなかったこ

とから、毒性学的意義は低いと解釈された。

剖検所見では、高用量群の雄で認められた小腸腔拡張は、ACQ の成分である銅の消化管に対する作用<sup>2)</sup> およびアルキルアンモニウムの刺激性<sup>4)</sup> に起因する変化であると考えられた。

**神経毒性:** スコアリングによる詳細な状態の観察の結果、ACQ 投与に関連すると思われる神経症状は認められなかった。

投与 4 週時に行った神経機能検査では、高用量群の雄で測定開始から 10 分間および 60 分間合計の自発運動量が有意に減少したが、この群では多数の死亡が認められたことから、一般状態の悪化による非特異的な変化であると考えた。また、高用量群の雌で前肢の握力が有意に増加したが、後肢握力に変化はなく、その他の興奮および筋緊張の亢進を示唆する症状も認められなかったことから、偶発的な変化であると考えられた。

よって、本実験条件下では ACQ によって特異的な神経毒性は認められなかった。

**免疫毒性:** 高用量群の雄に汎 T 細胞の減少がみられた。また、中および高用量群の雌で汎 B 細胞の増加が見られたものの、本所見は一般的に細胞集団の減少に毒性学的意義がある指標であると考えられ、毒性学的意義はないと判断された。

よって、中および低用量群では、ACQ による特異的な免疫毒性作用は認められないと考えられた。

## E. 結論

ラットに ACQ を 100 mg/kg 前後の高用量で反復経口投与すると血液、肝臓あるいは免疫系に影響を及ぼす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。

#### 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) Temple L et. al.: Volume 1 Chapter 9  
ELISA to measure SRBC-specific  
serum IgM: Method and data  
evaluation. In: Method in  
Immunotoxicology, (Burleson GR,  
Dean JH, and Munson AE eds.),  
Wiley-Liss Inc., New York, pp 137-157,  
1995.
- 3) Pizarro F, Oliver M, Uauy R,  
Contreras P, Rebelo A, and Gidi V:  
Acute gastrointestinal effects of  
graded levels of copper in drinking  
water. Environmental Health  
Perspectives, 107(2): 117-121, 1999.
- 4) Arugonda SK: Quaternary  
ammonium compounds. International  
programme on chemical safety  
poisons information monograph G022  
(Group PIM) chemical, 1999.

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

#### 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 4. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）のラットにおける  
3週間反復経皮投与毒性試験

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

試験方法は平成元年9月11日付け薬審1第24号厚生省薬務局通知「医薬品毒性試験ガイドライン」および平成5年8月10日付け薬新第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<sup>1)</sup>。

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℃)で保管した。

#### 2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社(滋賀県)で生産されたSprague-Dawley系SPFラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに5週齢で購入し、1週間試験環境に馴化した後、6週齢にて試験に供試した。馴化期間中毎日一般状態を観察し、この期間中眼科学的検査および詳細な一般状態の観察を実施した。動物は温度19~25℃、湿度30~70%、換気回数15回/時間(オールフレッシュエア一方式)、照明時間12時間/日(午前6時点灯、午後6時消灯)に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、雌雄別々に体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に雌雄8匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後、各群の動物を1匹ずつステンレス鋼製個別ケージ(D32.5cm x W19.5cm x H18cm)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

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

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

#### 4. 被験物質投与液の調製

各用量(0、10、100、300mg/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3mL/kgとした。最初に、所定量の酸化銅(Ⅱ)および50%塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水(大塚薬品株式会社)を加え、ス

ターラーで懸濁させた。溶解させた。懸濁後、3.33、33.3 および 100 mg/mL の濃度になるよう注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。各濃度の投与液は7日間分小分けし、冷蔵・遮光（5℃）条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

#### 5. 投与方法および投与期間

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

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

#### 6. 動物の観察

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

#### 7. 体重

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

#### 8. 摂餌量

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

#### 9. 眼科学的検査

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

#### 10. 尿検査

予定されていたが、試験の短縮に伴う日程的な問題で実施しなかった。

#### 11. 血液学的検査

投与終了時（投与20日）に各群の生存動物全例について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晩絶食させた。動物をペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液の腹腔内投与による麻酔下で開腹し、凝固検査用に3.8 w/v% クエン酸ナトリウム水溶液添加の注射筒を、その他の検査用に無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。

血液学的検査は、EDTA 処理した血液試料を用いて、以下の項目について総合血液学検査装置アドヴィア 120 (Bayer Corporation) で測定した。

測定項目 (略号): ヘマトクリット値 (Ht)、血色素量 (Hb)、赤血球数 (RBC)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数 (Plat.)、網赤血球数 (Ret.)、白血球数 (WBC) および白血球のディファレンシャルカウント; 好中球 (Neutro.)、リンパ球 (Lymph.)、単球 (Mono.)、好酸球 (Eosino.)、好塩基球 (Baso.)、大型非染色球 (LUC)

血液凝固能については、全自動血液凝固測定装置 (CA-5000、シスメックス株式会社) を用いプロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。

## 12. 血液生化学的検査

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

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

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

## 13. 剖検および組織採取

全動物について剖検を実施した。ペントバルビタールナトリウム水溶液の腹腔内投与による深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。

剖検時に全動物から以下の臓器および組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし、眼球及び視神経はホルムアルデヒド・グルタールアルデヒド混合液で、精巣はブアン液で固定した。

採取した臓器及び組織: 脳 (大脳、小脳、橋および延髄)、脊髓 (胸部)、坐骨神経 (両側)、下垂体、胸腺、甲状腺および上皮小体 (両側)、副腎 (両側)、脾臓、骨および骨髄 (胸骨、両側大腿骨)、顎下リンパ節 (両側)、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈 (胸部)、唾液腺 (顎下腺および舌下腺)、食道、胃 (前胃および腺胃)、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、舌、気管、肺 (気管支を含む)、腎臓 (両側)、膀胱、精巣 (両側)、精巣上体 (両側)、前立腺、精囊 (両側)、卵巣 (両側)、子宮、膈、涙腺 (両側)、眼球 (視神経を含む、両側)、ハーダー腺 (両側)、大腿四頭筋 (両側)、乳腺および皮膚 (乳頭を含む)、投与部位 (背部皮膚) および肉眼的異常部位

## 14. 臓器重量

全動物について、剖検後、以下の臓器の固定前の重量 (絶対重量) を測定し、最終体重から比体重値 (相対重量) を算出した。測定臓器: 脳、下垂体、胸腺、甲状腺 (上

皮小体を含む、両側)、心臓、肺、肝臓、腎臓(両側)、脾臓、副腎(両側)、唾液腺(両側の顎下腺・舌下腺を合わせたもの)、精巣(両側)、精巣上体(両側)、前立腺、精嚢(両側)、卵巣(両側)、子宮

#### 15. 病理組織標本作製

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

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

#### 16. 肝機能検査のための組織採取

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

#### 17. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質

投与群間の統計学的有意差の有無を危険率5%および1%レベルで解析した。

体重、摂餌量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目および臓器重量のデータについては、先ず Bartlett の等分散検定を行なったその後、等分散の場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnnett 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、Dunnnett 型の多重比較法を用いて平均順位の有無を判定した。これらの検定および計算には MUSCOT 統計解析ソフトウェア(ユックムス株式会社)を使用して行った。一般状態(臨床症状)、眼検査および剖検所見については統計検定を実施しなかった。

### C. 研究結果

#### 1. 臨床症状および死亡率

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

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



## 2. 体重変化

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

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

## 3. 摂餌量

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

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも摂餌量に異常はみられなかった。

## 4. 眼科学的検査成績

試験の短縮に伴い、投与期間中の眼検査は実施しなかった。

## 5. 尿検査

試験の短縮に伴い、投与期間中の尿検査は実施しなかった。

## 6. 血液学的検査成績

300 および 100 mg/kg 投与群では、雌雄とも赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht) および平均赤血球血色素濃度 (MCHC) が有意に減少あるいは減少傾向を示した。この貧血所見に伴い、血小板および網赤血球数が増加した。加えて、雌雄とも総白血球 (WBC) が増加し、ディファレンシャルカウントでは単球と好中球の増加ならびにリンパ球の減少がみられた。また、高用量群の雌では、好酸球が増加した。その他、中・高用量群において血液凝固系の

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

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも被験物質投与に関連付けられる変化は認められなかった。

## 7. 血液生化学的検査成績

300 および 100 mg/kg 投与群では、雌雄ともアルブミン、総蛋白、 $\gamma$ -グロブリンおよび総コレステロールが有意に減少した。加えて、 $\alpha/\beta$ -グロブリンの増加を伴う A/G 比の低下ならびに尿素窒素 (BUN) と塩素 (Cl) の増加が認められた。その他、雄ではナトリウム (Na) が有意に増加し、雌ではアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アルカリホスファターゼ (ALP) およびカリウム (K) が有意に増加あるいは増加傾向を示した。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも $\gamma$ -グロブリンが有意に減少した。

## 8. 剖検所見

300 mg/kg 投与群では、雌雄とも全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が観察され、脾臓の腫大、腺胃粘膜の黒色斑 (出血斑)、腎部リンパ節の腫大が散見された。

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

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

## 9. 臓器重量

300 mg/kg 投与群では、雌雄とも副腎と脾臓の絶対・相対（比体重値）重量がともに有意に増加し、加えて、肝臓、腎臓および肺の相対重量が増加あるいは増加傾向を示し、胸腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。その他、雄では脳および精巣の相対重量が増加し、精嚢および前立腺の絶対・相対重量がともに有意に減少した。一方、雌では卵巣および子宮の絶対・相対重量がともに有意に減少した。

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

10 mg/kg 投与群では、雄において軽度ながら胸腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。雌では特に異常はなかった。

### D. 考察

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価を行うことを目的に、平成 17 年度では、CCA に代わり現在使用量が多い、銅・アリキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）を対象に、ラットの反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では、当初 ACQ を 0、10、100 および 300 mg/kg の用量で SD 系ラットの雌雄動物の背部皮膚に毎日 24 時間、13 週間に亘り反復投与し、臨床症状、死

亡率、眼検査、尿検査、血液・生化学検査、病理検査を含む諸検査を実施する予定であった。しかしながら、300 および 100 mg/kg 投与群において投与 5 日以降に適用部位の皮膚の状態が悪化し、投与 3 週時には重度の糜爛・潰瘍あるいは出血が観察されたため、科学的かつ倫理的に投与の継続は不可能と判断し、投与 3 週終了時に投与を中止し、その時点で全例を安楽死せしめ試験を終了した。

体重および摂餌量では、300 および 100 mg/kg 投与群の雄において摂餌量の減少を伴う軽度の体重増加抑制が認められた。

血液学的検査では、300 および 100 mg/kg 投与群において雌雄とも貧血が認められ、それに伴い血小板および網赤血球数が増加した。加えて、雌雄とも総白血球数（WBC）が増加し、ディファレンシャルカウントでは単球と好中球の増加がみられた。貧血の成因については適用部位の糜爛・潰瘍にともなう出血が主な原因と考えられ、WBC の増加は同部位の炎症に対する生体反応と解釈した。なお、中・高用量群では血液凝固系のプロトロンビン時間（PT）と活性化部分トロンボプラスチン（APTT）が統計学的に有意な変動を示したが、雄では短縮、雌では延長と変動方向が雌雄で異なり、かつ、測定値を固体別に解析した場合、いずれも背景データの正常範囲内にあったことから、偶発所見と解釈した。

血液生化学的検査では、300 および 100 mg/kg 投与群において雌雄ともアルブミン、総蛋白、 $\gamma$ -グロブリンおよび総コレステロールが有意に減少した。加えて、 $\alpha/\beta$ -グロブリンの増加を伴う A/G 比の低下ならびに尿素窒素（BUN）と塩素（Cl）の増加が認められた。加えて、雄ではナトリウム（Na）が有意に増加し、雌ではアスパラギン酸アミノトランス

フェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、アルカリホスファターゼ (ALP) およびカリウム (K) が有意に増加あるいは増加傾向を示した。低蛋白・低コレステロール血症に関しては、おそらく適用部位の糜爛・潰瘍、出血などに伴う一般状態の悪化に起因するものと推察した。特に血中のアルブミンは急性炎症性疾患あるいは外傷などのストレスによって減少することが知られている<sup>2)</sup>。また、アルブミンが減少する際には、代償的にグロブリンが増加し A/G 比が低下することが知られている<sup>3)</sup>。BUN の上昇については、後述する腎重量の増加と関連した変化と推察され、腎障害を示唆する所見と考えられた。雌にみられた ASAT、ALAT および ALP 活性の上昇は肝実質傷害を反映する所見であり、本剤の肝臓への影響が示唆された。電解質 (Cl、Na、K) の変動に関しては、適用部位の皮膚 (糜爛・潰瘍、出血) および腎 (重量増加) の状態に関連して変化したものと考えられた。皮膚および腎臓はともに電解質バランスに影響を及ぼす重要な器官である<sup>4)</sup>。なお、10 mg/kg 投与群では、雌雄とも $\gamma$ -グロブリンが有意に減少した。同変化は中・高用量群においても観察され、用量依存性がみられたことから被験物質投与の影響と判断された。

剖検所見では、300 および 100mg/kg 投与群では、雌雄とも全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が観察され、脾臓の腫大、腺胃粘膜の黒色斑 (出血斑) あるいは腎部リンパ節の腫大が散見された。10 mg/kg 投与群では、適用部の皮膚に痂皮形成が雌の 3/8 例に認められた。これらの肉眼病変の内、適用部位の皮膚病変は本剤の有効成分である塩化ベンザルコニウムの刺激性<sup>5)</sup>に起因するものと

考えられた。脾臓の腫大は貧血に対する造血反応を、腎部リンパ節の腫大は適用部位の炎症に対する生体反応を反映する所見としてそれぞれ解釈された。腺胃粘膜の黒色斑は出血巣と推察され、ストレス性変化のひとつと考えられた。

臓器重量では、300 および 100 mg/kg 投与群において、雌雄とも副腎と脾臓の絶対・相対 (比体重値) 重量ならびに腎臓および肺の相対重量が有意に増加あるいは増加傾向を示し、加えて、胸腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。その他、雄では脳および精巣の相対重量が増加し、精囊および前立腺の絶対・相対重量がともに有意に減少した。一方、雌では卵巣および子宮の絶対・相対重量がともに有意に減少あるいは減少傾向を示した。10 mg/kg 投与群では、雄において軽度ながら胸腺の絶対・相対重量が有意に減少あるいは減少傾向を示した。これらの変化の内、副腎、脾臓および腎臓の重量増加についてはそれぞれ対応所見 (副腎ではストレス、脾臓では貧血、腎臓では尿素窒素の上昇および電解質の変動) がみられ、被験物質投与の影響と考えられる。胸腺、精囊、前立腺、卵巣、子宮の重量減少は、単に体重減少に伴う二次的変化とも考えられたが、雌では明らかな体重減少がみられなかったことから、胸腺、卵巣および子宮の重量減少については被験物質の直接的影響も否定できなかった。一方、中・高用量群の雄にみられた脳および精巣の相対重量増加は体重減少に伴う二次的変化<sup>9,10)</sup>と推察した。

以上の結果から、ACQ の反復経皮投与試験では 100 mg/kg 以上の用量は最大耐量 (MTD) を超えており、不適切であると判断された。

## E. 結論

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

## F. 引用文献

- 1) 日本工業規格:木材防腐剤に関する基準 JIS K 1570、2004.
- 2) 榎林郁之介:血清蛋白と蛋白電気泳動、異常値の出るメカニズム (第2版)、河合忠・玄番昭夫・屋形稔編、医学書院、東京、pp.89-94、1993年
- 3) 中村良一:血液の化学的性状(第5節)、家畜内科診断学、中村良一著、養賢堂、東京、pp.281-289、1967年
- 4) 河合忠:水・電解質バランス、異常値の出るメカニズム (第2版)、河合忠・玄番昭夫・屋形稔編、医学書院、東京、pp.125-133、1993年
- 5) BIBR Working Group: Benzalkonium chloride. Toxicity profile. The British Industrial Biological Research Association, 1989.
- 6) Cutler RA and Drobeck HP: Toxicology of cationic surfactants. In: Cationic Surfactants, Vol. 4 (Chapter 15), Jungermann E (ed.), Marcel Dekker, New York, 1970.
- 7) Grosselin RE, Smith RP, and Hodge HC: Clinical Toxicology of Commercial Products (5<sup>th</sup> ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 8) Merianos JJ: Quaternary ammonium antimicrobial compounds (Chapter 13). In: Disinfection, Sterilisation,

and Prevention (4<sup>th</sup> ed), Block S (ed.), Lea & Febiger, USA, 1991.

- 9) Feron VJ, deGroot AP, Spanjers MT, and Til HP: An Evaluation of the criterion "organ weight" under conditions of growth retardation. *Fd Cosmet Toxicol* 11: 85-94, 1973.
- 10) Oishi S, Oishi H, and Hiraga K: The effect of food restriction for 4 weeks on common toxicity parameters in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 47: 15-22, 1979.

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし