

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

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

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

研究要旨

銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の反復経皮投与毒性を検索して無作用量を求めるため、雌雄のSD系ラットを用い、各群6匹の動物の背部皮膚にACQを0、1、10及び30 mg/kgの用量で毎日6時間適用し、4週間に亘り反復経皮投与した。その結果、30 mg/kg投与群では投与6日以降から適用部位に痂皮形成が雌雄全例に観察された。病理組織学的検査では、適用部位皮膚の表皮過形成がほぼ全例に認められ、雄1例には糜爛・潰瘍が観察された。10 mg/kg投与群では、投与17日以降に適用部位の痂皮形成が認められ、組織学的には雄の半数例及び雌の全例に表皮過形成が認められた。1 mg/kg投与群では、ACQ投与に関連づけられる異常は認められなかった。

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

A. 研究目的

平成18年度では、CCAに代わって現在使用量が多い代表的な木材防腐剤である銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）を対象に、ラットを用い4週間反復経皮投与毒性試験を実施した。昨年度（平成17年度）は13週間反復経皮投与試験を計画したが、100および300 mg/kg投与群では、適用部位の皮膚状態が悪化し、投与3週時には出血あるいは重度のびらん・潰瘍が観察されたため、倫理上（動物

愛護）の観点から投与3週間終了時に投与を中止し、その時点で試験を終了した。その結果、ACQには主要成分として塩化ベンザルコニウムが含まれており、それが強い皮膚刺激性および腐食性が示すことから、反復経皮投与試験では100 mg/kg以下の低い用量で試験群を設定することが適切であると結論された（本報告書：12. ACQのラットにおける3週間反復経皮投与毒性試験の分担研究報告書参照）。そのため、本研究ではACQの4週間反復経皮

投与毒性を 100 mg/kg 以下の低い用量で実施し、リスク評価に必要な基礎的毒性情報を得る事を目的とし、無毒性量を求めることに主眼を置いた。

## B. 研究方法

試験方法は平成元年 9 月 11 日付け薬審 1 第 24 号厚生省薬務局通知「医薬品毒性試験ガイドライン」および平成 5 年 8 月 10 日付け薬新薬第 88 号厚生省薬務局通知「単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」および農薬の毒性試験ガイドライン「12 農産第 8147 号、平成 12 年 11 月 24 日付け」に従い、以下の条件で実施した。

### 1. 被験物質

本試験の被験物質として、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ-1) を使用した。同被験物質の有効成分である銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅 (II 価、純度 99.3%、関東化学 (株)) 55.6% およびアルキルアンモニウム (塩化ベンザルコニウム、純度 50%、和光純薬工業 (株) /Avocado Research Chemicals Ltd) 44.4% とした<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摂餌量測定を実施した。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ー方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 6 時点灯、午後 6 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、雌雄別々に体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に雌雄 6 匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後、各群の動物を 1 匹ずつステンレス鋼製個別ケージ (D 32.5 cm x W 19.5 cm x H 18 cm) に収容した。動物の個体識別は耳パンチ法で行なった。基礎飼料には固形飼料 CE-2 (日本クレア株式会社) を用い、動物に自由に摂取させた。ただし、剖検前日の午後 5 時前後より絶食とした。飲料水は、水道法水質基準に適合した水を自動給水装置 (Edstrom Industries, Inc.) を用いて自由に摂取させた。

### 3. 試験群

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

### 4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、1、10、30 mg/kg) の被験物質投与液を週に 1 回調製した。投与液の調製に際し、成分ごとに純度による調製濃度の換算を実施した。投与容量は 3 mL/kg とした。最初に、所定量の酸化銅 (II) および 50%塩化ベンザルコニウムを秤量し、

注射用水（大塚薬品株式会社）を加え、スターラーで懸濁させた。懸濁後、0.33、3.33 および 10 mg/mL の濃度になるよう注射用水にて定容した。調製は局所排気装置内にて実施した。各濃度の投与液は被験物質保管所内冷蔵室（許容範囲；2～8℃）にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

#### 5. 投与方法および投与期間

投与開始前日に各動物の背部（5 cm x 5 cm）を電気バリカンで剃毛し、適用部位を確保した。投与日には、剃毛部皮膚に各用量群の投与液（対照群は注射用水）を均一に塗布し、塗布部位をパラフィルム及びリント布で覆い、非刺激性テープ（株式会社ジェイ・エム・エス）と粘着性伸縮包帯（ニチバンメディカル株式会社）にて固定し、約 6 時間閉塞適用した。投与は 1 日 1 回、週 7 日間行った。なお、剃毛は原則として週 2 回行い、その際には塗布部位の皮膚を刺激しないように配慮した。投与期間は 4 週間（28 日間）とした。

#### 6. 動物の観察

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

#### 7. 体重

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

#### 8. 摂餌量

全動物について、毎週 1 日個別に摂餌量を測定して、一日あたりの摂餌量を算出した。

#### 9. 眼科学的検査

馴化期間中に 1 回雌雄の全馴化動物、投与終了時（4 週時）に対照群と高用量群（30 mg/kg 投与群）の全生存動物について、眼科学的検査を行った。検査には、肉眼（ペンライト使用）およびスリットランプ（コーワ SL-14、有限会社幸田電子）により前眼部および中間透光体を観察し、眼底検査については額带式双眼倒像検眼鏡（ID-10、株式会社トプコン）を用いて行った。

#### 10. 尿検査

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

#### 11. 血液学的検査

投与終了時（4 週時）に各群の生存動物全例について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晩絶食させた。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

血液学的検査のための採血後、腹大動脈から採血し、遠心分離して得られた血清を用い、以下の項目をJCA-BM8自動分析装置(日本電子株式会社)にて測定した。

測定項目(略号):アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALAT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、乳酸脱水素酵素(LDH)、クレアチンキナーゼ(CPK.)、総ビリルビン(T.Bil.)、総蛋白(T.Prot.)、アルブミン(Albumin)、総コレステロール(T.Chol.)、トリグリセライド(TGL)、糖(Glucose)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Creat.)無機リン(IP)、カルシウム(Ca)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)及び塩素(Cl)

また、蛋白分画(アルブミン比率、 $\alpha$ 1-

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

## 13. 剖検および組織採取

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

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

採取した臓器及び組織:脳(大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄(胸部)、坐骨神経(両側)、下垂体、胸腺、甲状腺および上皮小体(両側)、副腎(両側)、脾臓、骨および骨髓(胸骨、両側大腿骨)、顎下リンパ節(両側)、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈(胸部)、唾液腺(顎下腺および舌下腺)、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、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、陰、涙腺(両側)、眼球(視神経を含む、両側)、ハーダー腺(両側)、大腿四頭筋(両側)、乳腺および皮膚(乳頭を含む)、投与部位(背部皮膚)および肉眼的異常部位

## 14. 臓器重量

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

測定臓器：脳、下垂体、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む、両側）、心臓、肺、肝臓、腎臓（両側）、脾臓、副腎（両側）、唾液腺（両側の顎下腺・舌下腺を合わせたもの）、精巣（両側）、精巣上体（両側）、前立腺、精嚢（両側）、卵巣（両側）、子宮

#### 15. 病理組織学的検査

供試動物全例から採取した以下に示す臓器・組織を対象にして病理組織標本を作製した。標本は常法に従ってパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。なお、鏡検対象組織は対照群と高用量群は下記の全組織、中・低用量群については肉眼的異常部位を対象に病理組織学的検査を実施した。

組織標本対象臓器・組織：脳（大脳、小脳、橋および延髄）、脊髄（胸部）、坐骨神経（左側）、下垂体、胸腺、甲状腺（両側）、上皮小体（両側）、副腎（両側）、脾臓、骨および骨髄（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、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、精嚢（左側）、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（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、Dunnett の多重比較法により対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、Dunnett 型の多重比較法（Miller 法）を用いて有意差の有無を判定した。尿検査の評価段階付きのデータについては Wilcoxon 順位和検定、尿色については Fisher 直接確率検定を対照群と被験物質各群との間で実施した。また、病理組織学的検査成績については Fisher 直接確立検定法を用い解析した。これらの検定および計算には MUSCOT 統計解析ソフトウェア（ユックムス株式会社）を使用して行った。一般状態（臨床症状）、眼検査および剖検所見については統計検定を実施しなかった。

### C. 研究結果

#### 1. 臨床症状および死亡率

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

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

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも異常は認められなかった。

## 2. 体重変化

1、10 及び 30 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と比べ投与期間中の体重変化に有意な差はなかった。

## 3. 摂餌量

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

## 4. 眼科学的検査成績

検査した 30 mg/kg 投与群の雌雄とも異常は認められなかった。

## 5. 尿検査成績

1、10 及び 30 mg/kg 投与群の雌雄とも有意な変化はなかった。

## 6. 血液学的検査成績

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

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

## 7. 血液生化学的検査成績

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

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

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

## 8. 剖検所見

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

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

1 mg/kg 投与群の雌雄では、肉眼的異常は観察されなかった。

## 9. 臓器重量

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

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

## 10. 病理組織学的検査成績

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

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

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

#### D. 考察

ラット用い ACQ の 4 週間反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では ACQ を 0、1、10 及び 30 mg/kg の用量で SD 系ラットの雌雄動物の背部皮膚に毎日 6 時間、28 日間に亘り反復投与し、臨床症状、死亡率、眼検査、尿検査、血液・生化学検査、病理検査を含む諸検査を実施した。

30 mg/kg 投与群において、投与 6 日以降から適用部位に痂皮形成が雌雄の全例に認められた。本所見は、病理組織学的検査で適用部皮膚の表皮過形成と診断され、そのうち雄 1 例では糜爛・潰瘍も観察された。同様の変化は、10mg/kg 投与群の雌雄にも観察された。同群の雄 1 例にびらん/潰瘍が認められた。この適用部位の皮膚病変は、ACQ の主要成分である塩化ベンザルコニウムの刺激性<sup>2-5)</sup>に起因する変化であると考えられた。その他、中・高用量群では肝臓、精巣あるいは心臓の重量に統計学的に有意な変動がみられたが、組織学的に特に異常がなかったことから、偶発所見と解釈した。なお、1 mg/kg 投与群では、いずれの検査項目においても被験物質投与に関連付けられる変化は認められなかった。

#### E. 結論

本実験条件下では、ラットに ACQ を 10 および 30 mg/kg の用量で反復経皮投与すると適用部位に痂皮形成、表皮過形成あるいは糜爛・潰瘍などの皮膚病変が誘発されることが判明した。1 mg/kg の用量では、いずれの検査項目にも異常がみられず、無毒性量 (NOAEL) と判定された。

#### F. 引用文献

- 1) 日本工業規格: 木材防腐剤に関する基準 JIS K 1570、2004.
- 2) BIBR Working Group: Benzalkonium chloride. Toxicity profile. The British Industrial Biological Research Association, 1989.
- 3) Cutler RA and Drobeck HP: Toxicology of cationic surfactants. In: Cationic Surfactants, Vol. 4 (Chapter 15), Jungermann E (ed.), Marcel Dekker, New York, 1970.
- 4) Grosselin RE, Smith RP, and Hodge HC: Clinical Toxicology of Commercial Products (5<sup>th</sup> ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 5) 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.

#### 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

26. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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員

研究要旨

Wistar Hannover 系雌雄ラットを用いてアルキルアンモニウム系木材防腐剤（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。Moving Average 法にて算出した 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。

従って、本実験条件下における AAC 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

代表的な木材防腐剤でアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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」<sup>1)</sup>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、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のジデシルジ

メチルアンモニウムクロリド（Didecyl dimethylammonium chloride、和光純薬工業株式会社）である。含量は、マクロケルダール法による窒素量から算出した場合 82.2 %、硝酸銀滴定法による塩素イオン量から算出した場合 87.2 %であり、水分量は 1.3%であった。受領した被験物質は冷蔵庫（許容範囲 1~10℃）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]）の雌雄動物を用いた。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 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。投与容量は 4 mL/kg とした。投与液は、純度換算を実施せずに、所定量の被験物質を秤量し、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 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。観察期間は雄動物で投与後 14 日間、雌動物で投与後 21 日間とした。雌動物では、投与後 14 日に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 日まで）延長した。

### 7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7、14 日、21 日（雌動物）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。

投与後 14 日に体重減少を示した雌動物は、その後顕著な消瘦が認められたため、予後不良と判断し、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 Moving Average 法<sup>2,3)</sup>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

用量の順にそれぞれ、雄では 0/5、1/5 および 4/5 で、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。

## 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、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、軟便および鼻吻部、口周囲部、外陰部、肛門周囲部の被毛の汚れが認められた。14 日の観察以降に切迫殺を実施した雌動物では、重度の削瘦と異常歩行が観察された。

観察終了時まで生存した動物では、いずれの投与群でも異常呼吸音が散見され、300 mg/kg 投与群の雌雄では、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た。

## 3. 体重測定

体重測定結果を表 3 に示す。

雄動物の生存例において、300 および 900 mg/kg 投与群では、投与後 7 日の体重は、投与前の体重と比較して減少したが、14 日には増加した。

雌動物の生存例では、300 mg/kg 投与群に、投与後 7 日および 14 日の体重に減少を示す個体が散見された。よって、観察期間を 7 日間 (投与後 21 日まで) 延長した。投与後 14 日に減少した個体は、その後重

度の削瘦が認められ、予後不良と判断し、切迫殺した。その他の生存例では、投与後 21 日には増加した。

## 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、肺の赤色化、胸腺萎縮、前胃部の白色化および肥厚、胃の液状内容物あるいはガスの貯留、腸管の液状貯留物と水腫、腹水貯留、腹腔内臓器の癒着および鼻吻部、口周囲部、外陰部の被毛の汚れが認められた。

切迫殺した雌動物では、前胃部の肥厚、腹腔臓器の癒着などが認められた。

観察終了時に行った生存動物の剖検では、前胃部の肥厚、腹腔臓器の癒着および脾臓の腫大が認められた。

## D. 考察

AAC の急性経口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。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、眼脂等がみとめられた。剖検所見としては、急性毒性試験でしばしばみとめられる、消化管の変化が観察された。これらの結果から、消化管への刺激性変化は認められたが、AAC の特徴的な毒性所見は認められなかった。

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。

#### E. 結論

本実験条件下において、AAC の急性経口毒性は 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. Bacteriol 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

27. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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 1000 および 2000 mg/kg の 2 用量を設定し、24 時間閉鎖経皮暴露した。その結果、雌雄とも限度用量にて死亡例は認められなかった。

従って、本実験条件下における AAC の急性経皮毒性（LD50 値）は、雌雄とも 2000mg 以上であり、OECD の定める GHS カテゴリー 5 (2000 mg/kg 以上)、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

代表的な木材防腐剤でアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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」<sup>1)</sup>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、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のジデシルジメチルアンモニウムクロリド（Didecyl

dimethylammonium chloride、和光純薬工業株式会社）である。含量は、マクロケルダール法による窒素量から算出した場合 82.2 %、硝酸銀滴定法による塩素イオン量から算出した場合 87.2 %であり、水分量は 1.3%であった。受領した被験物質は冷蔵庫（許容範囲 1~10℃）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 ± 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。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、雄では 2000 mg/kg の用量を、雌では 1000 および 2000 mg/kg の 2 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 (1000 および 2000 mg/kg) の被験物質投与液を投与前に調製した。投与容量は、4 mL/kg とした。投与液は、純度換算を実施せずに、所定量の被験物質を秤量し、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 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。

### 7. 体重

体重は、被験物質投与直前、投与後 7 日目および最終解剖時に個体別に測定した。

### 8. 剖検

全動物について、観察期間終了時に、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。

## C. 研究結果

投与後 8 日から被験物質投与部位皮膚の剥離による糜爛が散見され、動物愛護の立場から、投与後 9 日に観察終了とした。

### 1. 死亡率および LD50 値

死亡率を表 1 に示す。

雌雄ともにいずれの投与群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 LD50 値は、2000 mg/kg 以上であると考えられた。

## 2. 臨床症状

臨床症状の結果を表 2 に示す。

全ての動物に、投与部位の肥厚、暗調化および硬化が観察された。さらに、皮膚の剥離による糜爛が散見された。

## 3. 体重測定

体重測定結果を表 3 に示す。

全ての動物において、投与後 7 日および最終解剖時（投与後 9 日）の体重は、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。

全ての動物に背部投与部位の糜爛ないし潰瘍が認められた。さらに、2000 mg/kg 投与群の雌雄に脾臓の腫大が認められた。

## D. 考察

AAC 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。

臨床症状の観察では、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。終了時の剖検では、皮膚所見のほかに 2000 mg/kg 投与群の雌雄に脾臓の腫大が観察された。これらの結果から、投与部位への強度の刺激性変化が観察された。限度用量において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 2<sup>5</sup> 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。

## E. 結論

本実験条件下において、AAC の急性経皮毒性 (LD50 値) は OECD の定める GHS カテゴリー 5 (2000 mg/kg 以上) 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 434: Acute dermal Toxicity – Fixed dose procedure. Pdapted: May 14, 2004 (1<sup>st</sup> 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
3. その他  
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

28. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の  
ヒト皮膚3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アルキルアンモニウム化合物系防腐剤（AAC）の皮膚腐食性を検索した。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 法により生存率を計算した。AAC 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。

従って、本実験条件下において、AAC 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、木材防腐剤であるアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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」<sup>1)</sup>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、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のジデシルジ

メチルアンモニウムクロリド（Didecyl dimethylammonium chloride、和光純薬工業株式会社）である。含量は、マクロケルダール法による窒素量から算出した場合 82.2 %、硝酸銀滴定法による塩素イオン量から算出した場合 87.2 %であり、水分量は 1.3%であった。受領した被験物質は冷蔵庫（許容範囲 1~10℃）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<sup>2)</sup>である。

### 3. 被験物質投与液の調製

50%濃度の AAC 懸濁液を投与前に調製した。調製は、所定量の被験物質を秤量し、注射用水(大塚製薬株式会社)を加え定容、溶解させた。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%CO<sub>2</sub>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AACを100 μLずつ3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% CO<sub>2</sub>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<sup>3)</sup>に従った。すなわち、生存率が3分暴露で50%未満、もしくは60分暴露で15%未満の場合には皮膚腐食性陽性と判定した。

## 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。

AAC 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25.4%、60分暴露で19.0%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(15%以上20%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(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<sup>3)</sup>、強度の刺激性が示唆された。本試験条件下において、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のAAC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 AAC の皮膚腐食性を検索した。本実験条件下において、AAC 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

29. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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

アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（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) 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。各濃度の投与液を 3 日間両耳後方に経皮投与し、3 日後に  $^3\text{H}$ -methyl-Thymidine (20 $\mu\text{Ci}$  / 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 ( $^3\text{H}$ -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、0.3 及び 1% 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、0.1、0.3、及び 1% 投与群において 3 以上を示した。これらの結果から、AAC 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アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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」<sup>1)</sup> 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、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のジデシルジメチルアンモニウムクロリド (Didecyl dimethylammonium chloride、和光純薬工業株式会社) である。含量は、マクロケルダール法による窒素量から算出した場合 82.2 %、硝酸銀滴定法による塩素イオン量

から算出した場合 87.2 % であり、水分量は 1.3% であった。受領した被験物質は冷蔵庫（許容範囲 1~10℃）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<sup>2)</sup> 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業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<sup>3)</sup>、急性経皮<sup>4)</sup>及び培養皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験<sup>5)</sup>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 AAC の 1%濃度を最高用量として選択した。

そこで、試験では 1%濃度から公比 3 にて 0、0.01、0.03、0.1、0.3 および 1%の 6 濃度の AAC を設定した。

## 4. 被験物質投与液の調製

各濃度（0、0.01、0.03、0.1、0.3、1%）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、純度換算を実施せず、所定量の被験物質を秤量し、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に小分け、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. 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  $\mu\text{L}$  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  $^3\text{H}$ -methyl-Thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR、GE Healthcare Bioscience Ltd、東京都)

を投与した。<sup>3</sup>H-TdR の投与量はマウス 1 匹あたり 20  $\mu$ ci とした。<sup>3</sup>H-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 $\mu$ m 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 $\mu$ L) 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 $\mu$ L) と CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (100 $\mu$ L) 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%および 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義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。