

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 以上で陽性であると判定する。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

AAC の 0.3 及び 1% 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

AAC の 0.1、0.3 及び 1% 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

AAC の 0.3 及び 1% 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 AAC 0.1、0.3、及び 1% 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、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の皮膚感作性を検索し

た。

リンパ節重量測定は 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 以上を示していた。

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。

E. 結論

CBA/Jn マウスを用いた Local Lymph Node Assay 法により、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の皮膚感作性を検索した。本実験条件下において、AAC 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 (AAC) 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、2007年
- 4) 小坂忠司:アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のラットにおける急性経皮投与毒性試験、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、2007年
- 5) 小坂忠司:アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のヒト皮膚三次元モデルにおける皮膚腐食性試験、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、2007年
- 6) Gerberick, G. F., Robinson, M. K., Ryan, C. A., Dearman, R. J., Kimber, I., Basketter, D. A., Wright, Z., and Marks, J. G. (2001). Contact allergenic potency: correlation of human and local lymph node assay data. *Am J Contact Dermat* 12, 156-161.

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

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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

30. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の培養細胞を用いる
コメットアッセイ

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長
協力研究者 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室研究員
竹澤 祐造 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

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 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。用量設定試験により、本試験で用いる用量は 7.3、10.2、14.3、20、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。その結果、7.3、10.2、14.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では DNA 損傷は認められなかった。20、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。よって、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。

A. 研究目的

国内で使用される木材防腐剤は主に 3 種類に分けられる。すなわち、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤(CCA)、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤(ACQ)、およびアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤(AAC)である。我々はこれまでに CCA と ACQ の遺伝毒性を明らかにして来た。本年度は AAC に的を絞ってその遺伝毒性を調査することにした。

本研究では、DNA 損傷誘発性の有無を調査するため、培養細胞を用いるコメットアッセイを行った。

B. 研究方法

試験は Hartmann らのガイドライン¹⁾および Sasaki らの方法²⁾を参考にし、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

名称： Didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC)
ロット番号： DPJ0013
純度： 82.2～87.2%
CAS Reg No.： 7173-51-5
製造元： 和光純薬工業株式会社
入手日： 2006年 8月 14日

注意事項： 吸湿性、刺激性、感作性あり
保存条件： 冷暗所（許容範囲：1～10℃）
分子量： 362.08
示性式： C₂₂H₄₈ClN

2. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL³ を用いた。供試細胞は、37℃、5% 二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガスインキュベーターで組織培養用ファルコンプレートを用いて培養した。培養液は 10% の割合で非働化新生仔牛血清（HyClone Laboratories, Inc.）を含む MEM 培地（Gibco BRL）に、ペニシリン-ストربتマイシン（100 IU/mL、100 µg/mL、Gibco BRL）、L-グルタミン（2 mM、Gibco BRL）を添加したものを使い、継代時には 0.25% トリプシン溶液（Gibco BRL）を用いて細胞をプレートより剥離した。

3. 被験物質溶液の調製

AAC は生理食塩液（大塚製薬株式会社）に溶かしたところ、均一な懸濁状態となった。よって用量設定試験には生理食塩液を用いた。用量設定試験後、AAC は純水に変化なく溶解したことが判明したため、本試験の溶媒には滅菌した純水を用いた。なお、純度換算は行わなかった。

4. 陰性対照および陽性対照

本試験は陰性対照（溶媒対照）物質として滅菌した純水を用いた。陽性対照物質として 4-ニトロキノリン-1 オキシド（4-NQO、和光純薬工業株式会社）をジメチルスルホ

キシド（和光純薬工業株式会社）に溶解させて用いた。

5. 用量設定試験（細胞増殖抑制試験）

細胞増殖抑制試験では、3621 µg/mL（10 mM）を最高用量とし、公比 2 で 9 用量を設定した。陰性（溶媒）対照群には溶媒のみを 1% 添加した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートを用いた。

細胞を 1.5×10⁵ 個/プレートの割合で組織培養用 6 cm プレートに播種し、48 時間後、被験物質溶液を 1 時間処理した。

各処理法とも培養終了後に培地を捨て、PBS で二回洗浄し、10%ホルマリン液で 10 分間固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液にて 10 分間室温で染色した。染色後、単層培養細胞密度計（オリンパス光学株式会社）を用いて細胞密度を計測し、陰性対照群に対する細胞増殖率を求めた。

6. 本試験（コメットアッセイ）

使用シャーレ、播種細胞数、培地量、処理前の培養時間、被験物質溶液添加量、被験物質処理時間は 5. 用量設定試験と同様に行った。陽性対照は 1% となるよう添加した。被験物質処理後、培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄後、スライド標本作製した。

7. スライド標本の作製

トリプシンにより細胞を回収し、遠心した。上清を棄てた後、適量のホモジナイズ液（75mM NaCl、30mM EDTA2Na）で細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液と低融点寒天（PBS に Low melting point agar（ナカライテスク株式会社）を 0.75% で融解したもの）を 10:75 で混和し、あらかじめ Normal

melting point agar (ナカライテスク株式会社)をコーティングしておいたスライドガラス上に均等に広げた。冷却により寒天を固めた後、冷却した細胞溶解液 (2.5M NaCl、100mM EDTA2Na、10mM Tris base、1% Triton X-100、10% DMSO、pH10)に浸した。1シャーレあたり2枚のスライド標本作製した。細胞溶解液に一時間以上浸した後、電気泳動槽(株式会社マリソル)上で4°Cに冷却した電気泳動液 (300mM NaOH、1mM EDTA2Na、pH >13)によりスライドガラスを20分間浸し、冷蔵暗所でアンワインディングを行った。その後直ちに電気泳動を開始した。泳動条件は25V、270~300mA、4°C、20分、暗所であった。電気泳動が終了後、冷却した中和液(Tris base pH7.5)に5分浸し、過剰なアルカリを中和した。処理が終了したらスライドガラスをエタノールに浸し、脱水し、コード化した後、エチジウムブロマイド (20 µg/mL)で染色し観察した。

8. コメット像の分析

各スライドガラスあたり50個、各濃度あたり200個のコメット像をCCDカメラでPCに画像を取り込み、Komet5.5(Kinetic Imaging Limited)により画像解析を行った。計測したパラメーターは% Tail DNA、Tail length、Olive tail momentであった。

9. コメットアッセイの統計解析

陰性対照群と処理群の間でOne-way Anovaを用いた。被験物質投与群に有意な差が認められた場合はDunnettの多重検定を行った。陰性対照群と陽性対照群はAspin-Welchのt検定を行った。なお、い

ずれの検定法も有意水準を5%以下に設定した。

10. 本試験における細胞毒性試験

コメットアッセイと同時に細胞毒性を評価するためサテライト群を設け、増殖抑制試験を行った。サテライト群の使用シャーレ、播種細胞数、培地量、処理前の培養時間、被験物質溶液添加量、被験物質処理時間、固定・染色方法などは、5. 用量設定試験と同様に行った。

また、ATPを測定し細胞毒性を評価した。使用シャーレ、播種細胞数、培地量、処理前の培養時間、被験物質溶液添加量、被験物質処理時間などは、5. 用量設定試験と同様に行った。ATPを測定した用量は陰性対照群、20 µg/mL群、陽性対照群であった。被験物質処理後、培養液を捨て、PBSで2回洗浄後、トリプシンにより細胞を回収し、冷メタノールによりATPを抽出した。抽出したATPはルミテスター(キッコーマン株式会社)を用いて発光量として検出し、陰性対照群と比較した。

11. 倫理面への配慮

本研究は培養細胞を材料とした*in vitro*実験研究であり、人や動物を研究対象として用いていないため、人権擁護や動物愛護などの観点において倫理上の問題はない。

C. 研究結果

1. 用量設定試験(細胞増殖抑制試験)

用量設定試験の結果をTable1に示す。

14.14 µg/mLでは細胞増殖率が79%、28.29 µg/mLの濃度では細胞増殖率が41%となり、それ以上の濃度では細胞は死滅し

ていたと考えられた。なお、細胞死の影響により 56.58 µg/mL 以上の濃度では用量と細胞増殖率との相関性は認められなかった。

以上の結果から、本試験の最高用量は 28 µg/mL とした。

2. 本試験

本試験の結果を Table2 に示し、DNA 損傷を示すパラメーターをグラフ化したものを Figure1 に示す。また、観察した各スライドグラスの結果を Appendix1 に示す。

その結果、28 µg/mL 群では、DNA 損傷の 3 つのパラメーター (% Tail DNA、Tail length、Olive tail moment) 全てに有意な差が認められた。同時にモノセレーターの計測による細胞増殖率も 66% であり細胞毒性が認められた。

20 µg/mL 群では DNA 損傷を示す 3 つのパラメーター全てに有意な増加が認められた。モノセレーターの計測による細胞増殖率は 96% であり、細胞毒性は認められなかった。この用量では細胞内 ATP を計測した結果、陰性対照群と比べ、11.6% まで ATP が減少していた。その他の用量群では DNA 損傷に有意な差は認められなかった。

一方、陽性対照群(4NQO)では陰性対照群に比べ、細胞増殖率は 86%、ATP は 91.7% であり、細胞毒性を示さなかったが、DNA 損傷を示す 3 つのパラメーター全てに有意に高い値が得られた。

D. 考察

本試験では、20 および 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、細胞死と DNA 損傷は関連が

あるため、DNA 損傷が現れた場合、細胞毒性を考慮しなくてはならない。文献上、コントロールと比べ 30% 以上細胞生存率が低下する用量での試験結果は一般的に避けられてきた⁴⁾との報告がある。細胞毒性試験において 20 µg/mL の結果は 96% の細胞増殖率であり、細胞毒性は認められなかった。しかし、顕微鏡下の観察では細胞の変形が認められていた。そこで細胞内 ATP を計測した結果、陰性対照群と比べ、11.6% まで ATP が減少していた。したがって細胞は残っているものの、それは死細胞であると判断できた。28 µg/mL の用量では細胞毒性試験において 66% の細胞増殖率であり、細胞死が示唆された。よって、20 および 28 µg/mL の用量では被験物質の細胞毒性に起因する DNA 損傷がおこっていると判断した。なお、用量設定試験より溶媒を滅菌水に変更したが、本試験は細胞毒性が現れる高用量まで試験が行われたことが、細胞毒性試験により確認された。

以上から AAC の DNA 損傷性は陰性であると判断した。また、AAC の *in vivo* 小核試験でも陰性の結果が得られている(本年度事業において実施)。このことから AAC に明らかな遺伝毒性は無いものと判断できる。本研究結果は今後の AAC のリスク評価を行う上で、貴重な基礎データとなり得るだろう。

E. 結論

本実験条件下において、AAC の培養細胞に対する DNA 損傷誘発性は陰性であると結論した。

F. 引用文献

- 1) Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud V. and Tice R.R. (2003) 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 18(1);45~51.
- 2) Sasaki, YF., Tsuda, S., Izumiyama, F., and Nishidate, E. (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutation Res.* 388(1);33~44.
- 3) Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970) A new cell derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann*, 61: 161-167.
- 4) Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu JC. and Sasaki YF. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35(3), 206-21.

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

Table 1. Dose range-finding test (Preliminary growth inhibition test)

Test substance : AAC

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative cell growth (%)		Mean (%)
Solvent control (PS 1.0%)	100	100	100
14.14	77	81	79
28.29	42	39	41
56.58	125	130	128
113.2	138	141	140
226.3	159	158	159
452.6	138 ^{b)}	163 ^{b)}	151 ^{b)}
905.3	133 ^{b)}	163 ^{b)}	148 ^{b)}
1811	241 ^{b)}	313 ^{b)}	264 ^{b)}
3621	272 ^{b)}	290 ^{b)}	281 ^{b)}

PS : Physiological saline

a) : CHL cells were treated with the test substance for 1 hour.

b) : Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment.

Table 2. Summary of results

Test substance: AAC

Concentration (µg/mL)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment		Relative cell growth (%)	Cell viability (ATP)(%)	Judgement
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.			
Solvent control	4.90	0.96	16.68	5.18	0.59	0.16	100	100	Negative
7.3	6.47	1.16	16.76	7.68	0.72	0.28	108	-	Negative
10.2	5.95	0.81	16.53	2.92	0.72	0.17	111	-	Negative
14.3	5.48	1.30	15.95	4.04	0.67	0.20	113	-	Negative
20	12.33	2.81 ^{**}	29.91	2.83 [*]	2.14	0.64 ^{**}	96	11.6	Cytotoxicity
28	12.73	1.84 ^{**}	30.69	7.60 [*]	2.40	0.69 ^{**}	66	-	Cytotoxicity
4NQO 0.25	13.28	2.29 ^{aa}	34.12	9.96 ^a	2.57	0.73 ^a	86	91.7	Positive

200 cells were scored from each doses.

* :p<0.05 Dunnet test

** :p<0.01 Dunnet test

^a:p<0.05 Aspin-welch t-test

^{aa}:p<0.01 Aspin-welch t-test

-: not done

4NQO:4-nitroquinoline-1-oxide

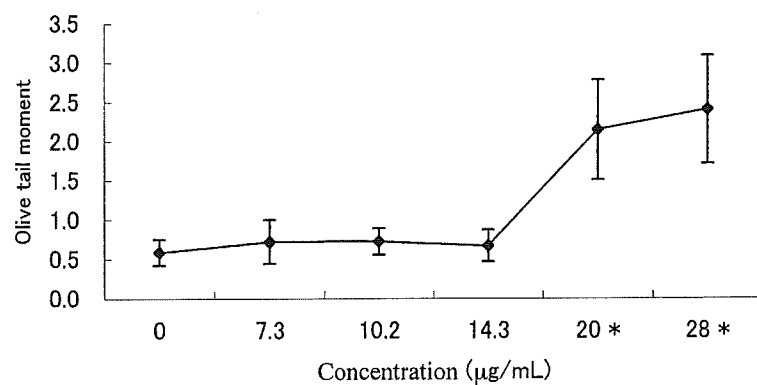
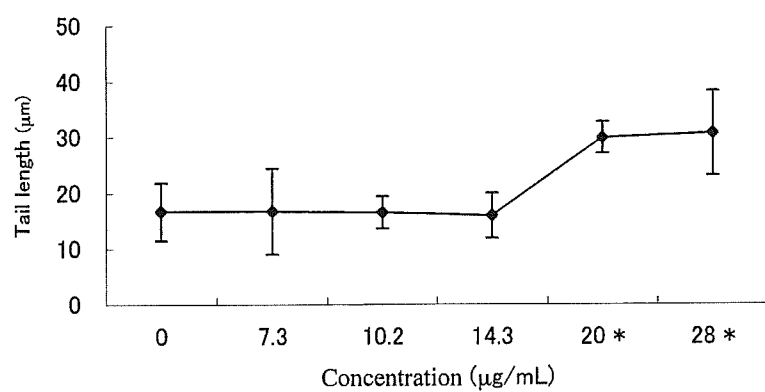
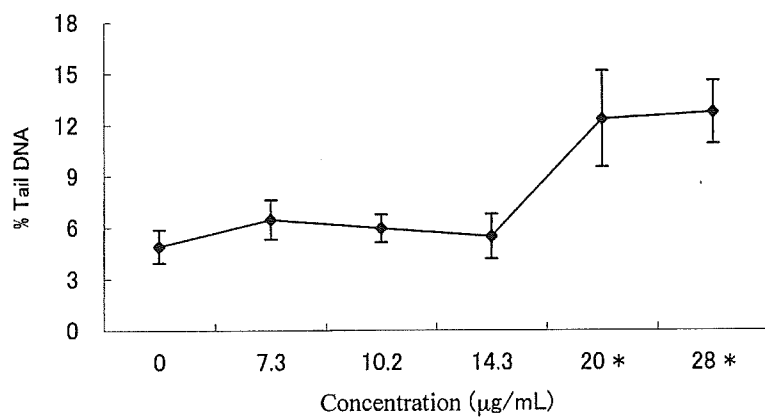


Fig. 1. The effects of AAC on CHL cells in comet assay. The induction of DNA damage at 20 and 28 µg/mL (*) was associated with cell death. Data are means \pm S.D. (n=4).

Appendix 1. Individual values of comet assay

Test substance: AAC

Concentration (µg/mL)	Code number	% Tail DNA	Tail length	Olive tail moment
Solvent control (Pure water)	35	4.14	12.10	0.42
	25	4.33	12.29	0.52
	61	4.86	21.14	0.62
	28	6.27	21.20	0.80
7.3	48	5.76	9.01	0.42
	41	5.46	11.63	0.57
	38	6.61	21.19	0.85
	4	8.05	25.19	1.05
10.2	8	5.04	13.40	0.50
	23	6.61	17.96	0.82
	5	5.50	14.90	0.70
	51	6.66	19.87	0.88
14.3	42	4.00	12.80	0.39
	33	6.42	13.38	0.75
	60	6.70	21.64	0.86
	56	4.78	15.99	0.67
20	12	15.11	28.98	2.75
	47	14.38	26.61	2.62
	43	9.63	30.76	1.48
	6	10.21	33.31	1.72
28	54	11.13	22.00	1.72
	17	11.66	26.63	1.99
	15	15.27	36.99	3.26
	37	12.84	37.13	2.62
Positive control 4NQO 0.25	10	10.96	27.22	2.02
	32	11.68	25.55	1.99
	55	15.13	36.51	2.73
	53	15.37	47.19	3.54

4NQO:4-nitroquinoline-1-oxide

Table 1. Dose range-finding test (Preliminary growth inhibition test)

Test substance : AAC

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative cell growth (%)		Mean (%)
Solvent control (PS 1.0%)	100	100	100
14.14	77	81	79
28.29	42	39	41
56.58	125	130	128
113.2	138	141	140
226.3	159	158	159
452.6	138 ^{b)}	163 ^{b)}	151 ^{b)}
905.3	133 ^{b)}	163 ^{b)}	148 ^{b)}
1811	241 ^{b)}	313 ^{b)}	264 ^{b)}
3621	272 ^{b)}	290 ^{b)}	281 ^{b)}

PS : Physiological saline

a) : CHL cells were treated with the test substance for 1 hour.

b) : Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment.

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 1. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）のマウスを用いる小核試験

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長
協力研究者 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室研究員
竹澤 祐造 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

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）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、多染性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。よって、AAC の *in vivo* 染色体異常誘発性は無いものと判断された。

A. 研究目的

国内で使用される木材防腐剤は主に 3 種類に分けられる。すなわち、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤（CCA）、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）、およびアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）である。我々はこれまでに CCA と ACQ の遺伝毒性を明らかにして来た。本年度は AAC に的を絞ってその遺伝毒性を調査することにした。

本研究では、哺乳動物の染色体への影響を明らかにするため、マウスを用いた小核試験を実施した。

B. 研究方法

試験方法は Schmid¹⁾および国内外の各

種毒性試験指針（経済協力開発機構、OECD Guidelines、No. 474、1997 年；薬事法、医薬審第 1604 号、1999 年；農林水産省、12 農産第 8147 号、2-1-19-3、2000 年等）に示された方法を参考に、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

被験物質 AAC の情報および特性を以下に示す。

名称： Didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC)

ロット番号： DPJ0013

純度： 82.2～87.2%

CAS Reg No. : 7173-51-5
製造元 : 和光純薬工業株式会社
入手日 : 2006年 8月 14日
注意事項 : 吸湿性あり
保存条件 : 冷暗所 (許容範囲 : 1~10℃)

2. 使用動物

SPF の ICR 系 (Crj:CD1) 雄マウス (6週齢) を日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターより購入した。入荷後 7 日間の馴化期間を設け、7 週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験における被験物質投与日の使用マウスの平均体重はそれぞれ 32.6 g および 32.4 g であった。

3. 飼育条件

動物は以下の環境に設定された動物飼育室 (動物室115) で飼育した。

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)

金網床アルミニウム製ケージ (215W×
330D×180H mm) に 3 または 5 匹の動物を
収容した。各ケージはステンレス鋼製可動
ラックに収容した。

動物の群分けは入荷時に動物を無作為に
各ケージに分配することで行った。ただし、
投与日の各個体の体重が、平均体重の±20%
を超えないことを確認して用いた。ケージ
内での各個体の識別は、ピクリン酸飽和
70%エタノール溶液を用いて被毛の一部を
染色することで行った。

供試動物には、保証飼料である MF 固型
(オリエンタル酵母工業株式会社) を自由
に摂取させた。また、市上水 (茨城県常総
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。

4. 被験物質溶液の調製

被験物質溶液の調製には純水 (Simpli
Lab (日本ミリポア株式会社) を用いた。各
の濃度の被験物質投与液は、最高濃度の投
与液を段階希釈により調製した。調製は投
与日に行い、残余はそのつど廃棄した。な
お、純度換算は行わなかった。

5. 陽性対照物質溶液の調製

マイトマイシン注用 (2 mg カバマイトマ
イシン C/バイアル、協和醗酵工業株式会
社) に純水を加えて溶解させ、1.0 mg/mL
のマイトマイシン C 溶液を投与直前に調製
した。

6. 投与方法

被験物質投与群、陰性対照群、および陽
性対照群のすべての動物に対し、10 mL/kg
の容量で胃ゾンデを用いて単回の強制経口
投与を行った。個々の動物に対する投与容
量は、投与日の体重から算出した。なお、
投与前後、それぞれ約 3 時間の絶食を行っ
た。

7. 毒性試験

供試動物の被験物質単回投与に対する最
大耐量を求めるため毒性試験を行った。被
験物質は 50、100、200、400、および 800
mg/kg の 5 用量を設定した。用量あたり 3
匹の動物に投与し、投与後 48 時間までの一

般状態の観察を行った。

8. 小核試験

毒性試験の結果に基づき、投与用量は 37.5、75、および 150 mg/kg の 3 用量を設定した（理由は後述）。供試動物数は 1 群 5 匹の動物を用いた。ただし、投与後 24 時間の最高用量（150 mg/kg）群で死亡例が 1 例認められたためサテライト群を設け、5 匹の予備動物を用意した。さらに陰性対照群および陽性対照群を設定した。陰性対照群には純水を 10 mL/kg の容量で投与した。陽性対照群はマイトマイシン C を 10 mg/kg の用量で投与した。

投与後 24 時間にすべての被験物質投与群、陰性対照群、および陽性対照群から骨髓採取を行った。また、投与後 48 時間には被験物質投与群の最高用量群および陰性対照群から骨髓採取を行った。

9. 小核標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を捨てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させ、骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。標本には暗号化したコード番号を記載した。標本を室温で十分に空気乾燥させた後、メタノールで 5 分間固定し、3% ギムザ液（メルク社製ギムザ溶液を pH6.8 リン酸緩衝液で希釈）で約 30 分間、室温で染色した²⁾。

10. 小核標本の観察

1 動物につき 1 枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下 1000 倍にて赤血球の観察を行った。小核を有する多染性赤血球の出現頻度を求めるため多染性赤血球を 2000 個観察した。また、多染性赤血球の割合を求めるため、赤血球を多染性と正染性に区別しながら 1000 個観察した。

11. 統計方法

小核を有する多染性赤血球の出現頻度についての統計学的解析には、Kastenbaum・Bowman の数表³⁾（被験物質投与群）およびカイ二乗検定（陽性対照群）を用いた。一方、多染性赤血球の割合についての統計学的解析には Wilcoxon の順位和検定を行った。

12. 判定基準

少なくとも 1 つの被験物質投与群で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められれば陽性と判断した。一方、いずれの被験物質投与群においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

13. 倫理面への配慮

本研究は実験動物としてマウスを用いているが、財団法人残留農薬研究所の実験動物保護管理規定を遵守しており、動物愛護の観点において十分配慮がされている。また、人を研究対象として用いていないため、人権擁護の観点において倫理上の問題は全くなかった。

C. 研究結果

1. 毒性試験成績

毒性試験の成績を Appendix 1 に示す。投与後 48 時間までに 50、100 および 200 mg/kg 群に死亡例の発生はなかった。しかし、400 mg/kg 群では 3 例中 2 例、800 mg/kg 群では 3 例中全例の死亡が確認された。観察された一般症状として、自発運動低下、努力性呼吸、自発運動消失、立毛、腹部膨満、および体温低下が観察された (Appendix 3)。

死亡例が発生しなかった最大用量は 200 mg/kg であった。しかし、200 mg/kg 群には腹部膨満、自発運動消失などの激しい毒性症状が現れており、死亡例が発生しても不思議ではない用量であることから、これよりも低い用量が望ましい。しかし、100 mg/kg 群ではまったく症状がないことから中間の 150 mg/kg を AAC 単回投与に対する最大耐量と判断し、小核試験の最高用量を 150 mg/kg に設定した。

2. 小核試験成績

試験期間中、最高用量の 150 mg/kg 群で 15 例中 1 例に死亡が認められた (Appendix 1)。一般状態においては 75 mg/kg 群に立毛が認められ、150 mg/kg 群に立毛、自発運動低下、努力性呼吸および体温低下が認められた。

小核試験の成績と統計学的解析の結果を Table 1 に、個体別成績および投与日の体重を Appendix 2 に示した。投与後 24 時間の陰性対照群における小核出現頻度は 0.25% であった。それに対して被験物質投与群の小核出現頻度は 0.24~0.34% であり、有意な増加は認められなかった。

投与後 48 時間の陰性対照群における小核出現頻度は 0.21% であった。それに対して 150 mg/kg 群の小核出現頻度は 0.18% であり、投与後 24 時間と同様に有意な増加は認められなかった。

また、多染性赤血球の割合においても、投与後 24 および 48 時間において有意な減少は認められず、AAC に骨髄増殖抑制効果はないものと考えられた (Table 1)。

D. 考察

本試験の最高用量群ではサテライト群も含めて 15 例中 1 例に死亡が認められたことから、十分に高い用量で試験が実施されたことが分かる。その結果、投与後 24 時間および 48 時間において、統計学的に有意な小核出現頻度の増加が認められなかったことから、AAC の *in vivo* 小核誘発性は陰性であることが示された。

AAC、すなわち DDAC は、第 4 級アンモニウム塩のカチオン界面活性剤であり、薬効分類としては塩化ベンザルコニウムと同じ逆性石鹼にあたる。DDAC の遺伝毒性については国内外の専門誌には報告されていない。しかし、DDAC は動物用医薬品として承認され、畜・鶏舎の消毒、畜・鶏体の消毒、家畜診療領域などで使用されている。種々の毒性試験が実施されており、非公開かつ古いデータではあるが復帰突然変異試験や小核試験では陰性の結果が得られている。本実験はそれを裏付ける結果と言えよう。

本研究の結果より、AAC には *in vivo* 染色体異常誘発性は無いことが明らかとなった。また、*in vitro* コメットアッセイでも陰性の結果が得られていることから (本年度

事業において実施)、AACはDNA損傷作用も有していないことが示された。よって、AAC (DDAC) には明らかな遺伝毒性は無いものと結論した。

E. 結論

AACはマウス骨髄細胞において小核の誘発は認められず、よって、*in vivo* 染色体異常誘発性は陰性であると結論した。

F. 引用文献

- 1) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis, In : A. Hollaender (Ed.) Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, vol. 4, Plenum. New York, PP. 31~54.
- 2) Gollapudi, B. and Kamra, O.P. (1979) Application of a simple Giemsa-staining method in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 64, 45~46
- 3) Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, 9, 527~549.
- 4) <http://nval.go.jp/vet-cop/sub4/ammonium.htm>

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1 Summary of results - micronucleus test

Sampling time (hr)	Substance	Dose (mg/kg)	No. of mice	MNPCE / PCE (%)		PCE / (PCE+NCE) (%)	
				Mean \pm SD (range)	S ^{KC}	Mean \pm SD (range)	S ^W
24	Vehicle (Pure water)	0	5	0.25 \pm 0.11 (0.10 ~ 0.35)	—	55.0 \pm 7.2 (45.2 ~ 65.3)	—
		37.5	5	0.28 \pm 0.06 (0.20 ~ 0.35)	N.S.	52.6 \pm 4.0 (46.1 ~ 55.8)	N.S.
	AAC	75	5	0.24 \pm 0.11 (0.15 ~ 0.40)	N.S.	59.4 \pm 6.2 (51.8 ~ 65.6)	N.S.
		150	5	0.34 \pm 0.12 (0.15 ~ 0.45)	N.S.	52.3 \pm 6.4 (46.4 ~ 62.4)	N.S.
48	Mitomycin C	10	5	5.35 \pm 3.20 (1.70 ~ 9.10)	***	45.7 \pm 6.8 (39.3 ~ 56.2)	N.S.
		Vehicle (Pure water)	5	0.21 \pm 0.09 (0.10 ~ 0.30)	—	52.3 \pm 8.4 (44.0 ~ 66.4)	—
	AAC	150	5	0.18 \pm 0.16 (0.00 ~ 0.40)	N.S.	51.8 \pm 6.8 (41.1 ~ 57.5)	N.S.

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.

SD : Standard deviation.

S^{KC} : Statistical analysis using the tables of Kastenbaum-Bowman or a chi-square test.

S^W : Statistical analysis using Wilcoxon's sum of ranks test.

N.S. : Not significantly different from the concurrent vehicle control ($p \geq 0.05$).

*** : Significantly different from the concurrent vehicle control at $p \leq 0.001$.

Appendix 1 Mortality in toxicity and micronucleus tests

Test	Substance	Dose (mg/kg)	Mortality
Toxicity test	AAC	50	0 / 3
		100	0 / 3
		200	0 / 3
		400	2 / 3
		800	3 / 3
Micronucleus test	Vehicle	0	0 / 10
	AAC	37.5	0 / 5
		75	0 / 5
		150	1 / 15
	Mitomycin C	10	0 / 5

Mortality : Number of death / Number of animals dosed.

Vehicle : Pure water.

Appendix 2 Individual values of micronucleus test

Sampling time (hr)	Substance	Dose (mg/kg)	Animal number	B.W. (g)	MNPCE/PCE (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)
24	Vehicle (Pure water)	0	111	30.4	0.10	45.2
			112	34.1	0.20	65.3
			113	29.1	0.35	56.3
			114	30.1	0.35	55.0
			115	33.7	0.25	53.4
	AAC	37.5	121	33.0	0.30	55.8
			122	31.7	0.35	46.1
			123	32.9	0.30	51.7
			124	34.5	0.25	54.3
			125	30.5	0.20	55.2
		75	126	31.7	0.15	59.2
			127	34.7	0.20	54.7
			128	34.4	0.15	51.8
			129	33.2	0.40	65.5
			130	32.6	0.30	65.6
	150	136	34.3	0.15	51.0	
		137	30.8	0.30	47.8	
		148	35.1	0.45	54.1	
		139	33.1	0.35	46.4	
		140	31.7	0.45	62.4	
Mitomycin C	10	141	33.0	1.70	56.2	
		142	32.3	9.10	39.9	
		143	34.0	7.45	45.6	
		144	31.3	6.10	39.3	
		145	31.0	2.40	47.3	
48	Vehicle (Pure water)	0	116	31.3	0.30	66.4
			117	32.3	0.15	52.1
			118	33.0	0.20	48.6
			119	34.1	0.30	50.6
			120	26.6	0.10	44.0
	AAC	150	131	30.3	0.10	57.4
			132	31.8	0.40	41.1
			133	30.9	0.00	57.5
			134	36.8	0.10	53.0
			135	34.9	0.30	50.0

BW : Body weight at the day of dosing.

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE : Polychromatic erythrocytes.

NCE : Normochromatic erythrocytes.