

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	AAC	50	11	—	—	—	—	—
			12	—	—	—	—	—
			13	—	—	—	—	—
		100	14	—	—	—	—	—
			15	—	—	—	—	—
			16	—	—	—	—	—
		200	17	—	—	A	A,D,P	A,D,P
			18	—	—	—	A,D,P	A,D,P
			19	—	A,P	A,D,P	A,D,L,P	A,L,Lo,H,P
		400	20	—	—	—	A,Lo	Lo
			21	—	A,P	P	Fd	
			22	—	—	P	A,Lo,P,H	Fd
		800	23	—	A,P	A,D,P	Fd	
			24	—	A,P	D,P	Lo,H	Fd
			25	—	A,P	A,D,P	Fd	

- : No abnormalities detected.
- A : Abdominal distention.
- D : Decrease in spontaneous motor activity.
- Fd : Found dead.
- L : Labored respiration.
- Lo : Loss of spontaneous motor activity.
- P : Piloerection.
- H : Hypothermia.

Appendix 4 Individual clinical observation in micronucleus test

Test	Substance	Dose (mg/kg)	Animal number	Time after the administration				
				1	3	5	24	48 (hr)
Micronucleus test	Vehicle (Pure water)	0	111	—	—	—	—	—E
			112	—	—	—	—	—E
			113	—	—	—	—	—E
			114	—	—	—	—	—E
			115	—	—	—	—	—E
	AAC	37.5	121	—	—	—	—	—E
			122	—	—	—	—	—E
			123	—	—	—	—	—E
			124	—	—	—	—	—E
			125	—	—	—	—	—E
		75	126	—	—	—	—	—E
			127	—	—	—	—	—E
			128	—	P	P	P,E	
			129	—	—	—	—	—E
			130	—	—	—	—	—E
	150	136	—	—	—	—	—E	
		137	—	—	—	—	—E	
		138	D	D,L	D,L,H,P	Fd		
		139	—	—	—	—	—E	
		140	—	—	—	—	—E	
	Mitomycin C	10	141	—	—	—	—	—E
			142	—	—	—	—	—E
			143	—	—	—	—	—E
			144	—	—	—	—	—E
			145	—	—	—	—	—E
	Vehicle (Pure water)	0	116	—	—	—	—	—E
			117	—	—	—	—	—E
			118	—	—	—	—	—E
			119	—	—	—	—	—E
			120	—	—	—	—	—E
	AAC	150	131	—	—	—	—	—E
			132	—	—	—	—	—E
133			—	—	—	—	—E	
134			—	—	—	—	—E	
135			—	—	—	—	—E	
AAC (Satellite)	150	146	—	—	—	—	—T	
		147	—	P	—	—	—T	
		148	P	P	—	—	—E	
		149	—	—	—	—	—T	
		150	—	P	P	—	P,T	

- : No abnormalities detected.
- D : Decrease in spontaneous motor activity.
- E : Euthanatized for sampling.
- Fd : Found dead.
- L : Labored respiration.
- H : Hypothermia.
- P : Piloerection.
- T : Terminal kill without sampling.

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

32. 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4週間  
反復経口投与毒性試験（一般毒性及び神経・免疫毒性併合試験）

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
	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	毒性部病理研究室主任研究員
	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

アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）のラットにおける一般毒性、神経毒性及び免疫毒性を検索するため、AAC を、0、1、8 及び 40 mg/kg の用量で、雌雄の Wistar 系ラットに 4 週間に亘り毎日強制経口投与した。その結果、高用量群では雌雄ともに投与初期から腹部膨満、異常呼吸音、鼻・外陰部周囲の汚れなどが認められ、それに伴い一般状態が悪化し、約半数例が死亡した。同様な症状は少数例ながら中用量群においても観察され、雌では 1 例が死亡した。病理組織学的検査では、高用量群の雌雄において胸腺・脾臓の萎縮（B 及び T 細胞数の減少）、気道系の炎症及び前胃のびらん・潰瘍あるいは十二指腸粘膜過形成が認められた。鼻腔の炎症は中用量群の雌においても観察された。低用量群では、AAC 投与に関連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、AAC を経口的に投与すると消化管及び気道系に傷害を惹起することが示唆された。なお、本実験条件下では 8 mg/kg 前後が最大耐量（MTD）であり、無毒性量（NOAEL）は雌雄とも 1 mg/kg 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アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）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、神経毒性及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、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（静岡県）で生産されたWistar Hannover系SPFラット（Br/Han: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40匹、雌47匹購入し、雄では10日間、雌では8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及

び詳細な一般状態の観察を実施した。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。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、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

当該試験に先立ち、各群6匹ずつの雄性Wistar Hannover系SPFラットを用いて0、10、30、100、300及び1000 mg/kgの6用量で14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、100 mg/kg以上の投与群において半数例以上が死亡ないし切迫殺された。臓器重量測定において、10 mg/kg投与群で腎臓の相対重量値に有意な減少がみられた。この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40 mg/kgを最高用量に、最小の毒性変化が予想される8 mg/kgを中間用量に設定した。また、無毒性が予想される1 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、1、8 及び 40 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 匹の動物を使用した。

本試験の主試験用動物の免疫学的検査において、幼若胸腺細胞 (DP 細胞) 及び細胞傷害性 T 細胞の減少が全投与群 (1、8 及び 40 mg/kg) の雌動物に用量依存性に認められた。そのため、雌動物についても免疫グロブリン抗体価を検索する必要性が生じたことから、免疫グロブリン抗体価測定用の雌追加群 (0、0.2、1、8 及び 24 mg/kg の 5 用量) を設けた、各用量群につき雌 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、0.2、1、8、24 及び 40 mg/kg) の被験物質投与液を週に 1 回調製した。投与液調製時の含量換算は行わなかった。投与容量は 4 mL/kg とした。所定量の被験物質を秤量し、注射用水 (大塚薬品株式会社、東京都) を加え定容し、溶解させた。0.2、1、8、24 及び 40 mg/kg の各用量の濃度は、それぞれ 0.05、0.25、2.0、6.0 及び 10.0 mg/mL である。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及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、聴覚反応及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、投与開始時及びその後毎週毎週 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及び投与 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／硝子体及び眼底を観察した。

#### 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、ウロビリノーゲン及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、蛋白質及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）及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）及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）、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) 及び塩素 (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及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) を用いた胸腺及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ー解析 (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, Sheep 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℃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. 剖検及び病理組織学的検査

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。

剖検時に全動物から以下の臓器及び組織を採取し、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、橋及び延髄)、脊髄 (頸部、胸部及び腰部)、坐骨神経 (片側)、下垂体、胸腺 (右側半分)、甲状腺及び上皮小体 (両側)、副腎 (両側)、脾臓 (半分)、骨及び骨髓 (胸骨、片側大腿骨及び頸部、胸部、腰部椎骨)、膝関節 (片側)、リンパ節 (頸部及び腸間膜)、心臓、

大動脈、唾液腺（顎下腺及び舌下腺）、食道、胃（前胃及び腺胃）、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、口腔粘膜及び中耳を含む）、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）、精嚢（両側）、凝固腺（両側）、卵巣（両側）、子宮（頸部を含む）、膣、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）及び肉眼的異常部位

病理組織学的検査は、対照群と高用量群については上記の全臓器・組織を対象に、中・低用量群では標的組織と肉眼的異常部位について行った。組織標本は、上記の固定組織から定法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。

#### 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、過酸化脂質及び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及び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、胸腺及び脾臓の細胞数、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、過酸化脂質量及び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無の有無を判定した。

詳細な状態の観察所見及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無の有無を判定した。ただし、詳細な状態の観察における糞の状態及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、眼科学的検査所見及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

高用量群（40 mg/kg）において、雄では投与 1 週から死亡例が認められ、投与 4 週の累積死亡率は主試験用の動物で 10 匹中 6 匹、免疫グロブリン抗体価測定用動物で 8 匹中 5 匹であった。同群の雌では投与 2 週から死亡例が認められ、累積死亡率は主試験用の動物で 10 匹中 5 匹であった。また、免疫グロブリン抗体価測定用の雌動物では高用量群（24 mg/kg）で 8 匹中 1 匹が、主試験用の雌動物では中間用量群（8 mg/kg）で 10 匹中 1 匹が死亡した。

### 2. 一般状態

高用量群（40 mg/kg）では、雄の主試験用動物で腹部膨満、異常呼吸音、体温低下、鼻周囲部及び外陰部被毛の汚れが、抗体価測定用動物で腹部膨満、異常呼吸音、軟便及び外陰部被毛の汚れの発生頻度が有意に増加した。その他、鎮静及び流涎が散見された。雌では、消瘦、腹部膨満、異常呼吸音、体温低下及び外陰部被毛の汚れの発生頻度が有意に増加した。その他、軟便、鼻・口周囲部の汚れが散見された。

中間用量群（8 mg/kg）では、雌雄の少数例に異常呼吸音が認められ、死亡した雌の 1 例では消瘦、腹部膨満及び軟便が観察された。

低用量群（1mg/kg）では、雌雄とも一般状態に異常はなかった。

### 2. 詳細な状態の観察

詳細な状態の観察の結果、高用量群（40 mg/kg）では、雌において探索行動の有意な減少が投与 4 週に、立ち上がり姿勢の有意な減少が投与 3 週に観察された。雄では特に異常はみられなかった。

その他の用量群では、排尿回数に有意差が観察されたが、用量相関性がないか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いと判断された。

### 3. 神経機能検査成績

投与 4 週時に行った神経機能検査（FOB）では、雌雄ともいずれの用量群においても異常は認められなかった。

### 4. 体重変化

高用量群（40 mg/kg）において、雄では抗体価測定用動物で投与 2 週より、雌では主試験用動物で投与 3 週より有意に低下（対照群に比べ約 15% 減）した。

中（8 mg/kg）及び低用量群（1 mg/kg）では、雌雄とも有意な変化はなかった。

### 5. 摂餌量

高用量群（40 mg/kg）では、雌雄とも投与期間中の摂餌量が有意に減少あるいは減少傾向（対照群に比べ 10-20%前後の減少）を示した。

中用量群（8 mg/kg）では、雌の摂餌量に有意な減少（対照群に比べ約 10%減）がみられたが、雄では異常はなかった。

低用量群（1 mg/kg）では、雌雄とも摂餌量に異常はみられなかった。

### 6. 食餌効率

高用量群（40 mg/kg）の食餌効率が雌雄とも減少傾向にあったが、投与期間中の平均値に

においては雄では対照群に比べ大きな違いは認められなかった。

その他の用量群では、雌雄とも特に異常はみられなかった。

#### 7. 眼科学的検査成績

いずれの用量群においても投与4週時の検査において雌雄とも異常は認められなかった。

#### 8. 尿検査成績

雌雄ともいずれの用量群においても尿検査値に異常はみられなかった。

#### 9. 血液学的検査成績

高用量群 (40 mg/kg) では、雌において赤血球数及び単球の増加が認められたが、雄では異常はなかった。

その他の用量群では、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. 血液生化学的検査成績

高用量群 (40 mg/kg) では、雄において総蛋白とアルブミン値の有意な減少が、雌ではカリウムと塩素の有意な減少が観察された。

その他の用量群では、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。

#### 11. 免疫学的検査成績

高用量群 (40 mg/kg) では、雌において胸腺及び脾臓細胞数の減少が観察された。さらに、フローサイトメトリーによる解析では、雌において胸腺の幼若細胞数 (DN 細胞) とヘルパー T 細胞数の減少がみられ、脾臓では汎 T 細胞数、汎 B 細胞数、ヘルパー T 細胞数及び細胞傷害性 T 細胞数の減少が観察された。一方、雄ではいずれの検査項目においても異常はみられなかった。

中 (8 mg/kg) 及び低用量群 (1 mg/kg) では、雌において胸腺の幼若細胞数 (DP 細胞) 及び細胞傷害性 T 細胞数の減少が観察されたが、雄では異常はなかった。

免疫グロブリン抗体価測定では、雌雄とも被験物質投与に関連すると考えられる変化はいずれの用量群においても認められなかった。

#### 12. 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、雌雄とも有意な変化はいずれの用量群においても認められなかった。

#### 13. 臓器重量

高用量群 (40 mg/kg) では、雌において胸腺の絶対・相対 (比体重値) 重量がともに有意に減少した。その他にも種々の臓器に統計学的に有意な変動がみられたが、体重減少に伴う絶対重量の減少あるいは相対重量の増加であり、被験物質投与に起因すると考えられる変化ではなかった。

その他の用量群では、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。

#### 14. 剖検所見

高用量群 (40 mg/kg) では、雌雄とも消瘦、胸腺及び脾臓の萎縮、胃・消化管膨満 (腔内ガスあるいは液状物充満) あるいは肛門周囲の汚れなどの肉眼所見が認められ、特に途中死亡・切迫殺動物において顕著であった。

その他の用量群では、雌雄とも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. 病理組織学的検査成績

高用量群 (40 mg/kg) では、雌雄とも胸腺及び脾臓の萎縮、鼻炎、前胃のびらん・潰瘍の発生頻度が有意に増加した。その他、雄では喉頭炎、気管炎及び肺炎の発生頻度が、雌では十二指腸の粘膜上皮過形成の発生頻度が増加した。

中用量群 (8 mg/kg) では、雌において鼻炎の発生頻度が増加した。雄では、有意な変化はみられなかった。

低用量群 (1 mg/kg) では、雌雄とも被験物質投与に関連付けられる有意な所見は観察されなかった。

#### 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、平成 16 及び 17 年度でクロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤 (CCA) 及び銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) を対象にして、ラットの反復経口投与毒性試験を実施した。平成 18 年度では、さらに CCA の代替剤であるアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) 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、神経毒性及び免疫毒性を検索した。AAC (第 4 級アンモニウム塩のジデシルジメチルアンモニウムクロリド (DDAC)) を 0、1、8 及び 40 mg/kg の用量 (免疫グロブリン抗体価測定用の雌動物追加群では 0、0.2、1、8 及び 24 mg/kg) 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、免疫学的検査及び病理学的検査を含む諸検査を実施した。その結果について以下のように考察した。

一般毒性：臨床症状及び死亡率では、中・高

用量群の雌雄において投与初期から腹部膨満、異常呼吸音、体温低下、鼻周囲部被毛の汚れ、外陰部被毛の汚れあるいは軟便等が認められ、高用量群では雌雄とも約半数例が、中用量群では雌 1 例がそれぞれ死亡した。これらの症状は、AAC の有効成分ジデシルジメチルアンモニウムクロリド (DDAC) の四級アンモニウム系化合物の毒性情報<sup>3)5)</sup>と一致し、本剤投与の影響と考えられた。

体重変化では、高用量群において雌雄とも摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が認められた。中用量群においても雌の摂餌量が軽度に減少したが、体重への影響はみられなかった。

血液・生化学的検査では、高用量群において雄ではアルブミンの減少を伴う低蛋白血症が認められ、雌では赤血球数と単球の増加ならびにカリウムと塩素の減少がみられた。これらの検査値の変動は摂餌量の減少に伴う体重増加抑制など一般状態の悪化に伴う二次的変化と推察した。

剖検所見では、高用量群において雌雄とも消瘦、胸腺・脾臓の萎縮 (重量減少)、胃・消化管の膨満あるいは肛門周囲の汚れなどが観察され、特に途中死亡動物において顕著であった。これらの肉眼変化は前述の臨床症状とも一致し、AAC 投与の影響を反映する所見と考えられた。

病理組織学的検査では、高用量群の雌雄において胸腺・脾臓の萎縮、鼻炎、前胃の糜爛・潰瘍が観察され、加えて、雄では喉頭・気管・肺の炎症が、雌では十二指腸粘膜上皮過形成が有意に増加した。これらの組織学的変化の内、前胃の糜爛・潰瘍及び十二指腸粘膜の過形成は、AAC の有効成分である四級アンモニウム系化合物 DDAC に起因する変化と考えられた。四級アンモニウム系化合物は、粘膜刺激性を有す

るため、経口的に曝露されると胃・消化管粘膜の出血、潰瘍あるいは細胞増殖の亢進が惹起されることが報告されている<sup>3)5)</sup>。加えて、ヒトでは声門（喉頭）や肺に浮腫が誘発されることが報告されている<sup>3)5)</sup>。従って、高用量群にみられた上記の気道系の炎症も本剤投与の影響を反映する所見と推察した。胸腺・脾臓の萎縮に関しては、摂餌量の減少を伴う体重増加抑制や消化管障害に伴う一般状態の悪化あるいはストレスによる変化と考えられ、本剤の免疫系への影響を反映する所見ではないと推察した（免疫毒性の項参照）。

**神経毒性:** スコアリングによる詳細な状態の観察の結果、高用量群の雌で探索行動や立ち上がり姿勢の減少がみられたものの、一般状態の悪化に伴う二次的变化であると考えられた。また、投与4週時に行った神経機能検査では、AAC投与による変化はいずれの用量群においても認められなかった。よって、本実験条件下ではAAC投与に起因すると考えられる特異的な神経毒性はみられなかった。

**免疫毒性:** 全投与群の雌に胸腺細胞数（幼若胸腺細胞及び細胞傷害性T細胞）の減少がみられたものの、末梢リンパ組織の脾臓における汎B細胞及び汎T細胞集団の減少が高用量群にのみ観察された。従って、中及び低用量群での胸腺細胞集団の減少は毒性学的意義がないものと考えられた。また、免疫グロブリン抗体価ではいずれの投与群にも変化はみられなかった。

上記の結果から、AACによる特異的な免疫毒性作用は認められないものと判断された。

## E. 結論

ラットにAACを40 mg/kgの高用量で反復経口投与すると消化管あるいは気道系に傷害が惹起され、一般状態の悪化を招き、

死亡することが判明した。また、本実験条件下では8 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。

## 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, (Burlison GR, Dean JH, and Munson AE eds.), Wiley-Liss Inc., New York, pp 137-157, 1995.
- 3) BIBR Working Group: Benzalkonium chloride. Toxicity profile. The British Industrial Biological Research Association, 1989.
- 4) Cutler RA and Drobeck HP: Toxicology of cationic surfactants. In: Cationic Surfactants, Vol. 4 (Chapter 15), Jungermann E (ed.), Marcel Dekker, New York, 1970.
- 5) Grosselin RE, Smith RP, and Hodge HC: Clinical Toxicology of Commercial Products (5<sup>th</sup> ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.

## 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

33. 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  
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 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

アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の反復経皮投与毒性を検索するため、雌雄のSD系ラットを用い、各群6匹の背部皮膚にACCを0、1、10及び100 mg/kgの用量で毎日6時間適用し、4週間に亘り反復経皮投与した。その結果、高用量群では雌雄とも投与3日以降に適用部位の皮膚状態が悪化し、投与2週時には出血、重度のびらん・潰瘍が観察されたため、倫理上の観点から4週時（投与22日）に同群の動物全例を途中切迫殺した。その他の投与群の動物については、投与28日後に屠殺し、諸検査を実施した。体重変化では、高用量群の雄において摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が認められた。血液学的検査では、高用量群の雌雄において貧血、血小板、網赤血球、好中球及び単球の増加が認められ、中用量群では雌において網赤血球と単球の増加がみられた。血液生化学的検査では、高用量群の雌雄においてアルブミンの減少を伴う低蛋白血症及び低コレステロール・トリグリセライド血症がみられ、グロブリン及び尿素窒素値が上昇した。中用量群では、雄にアルブミンと総コレステロールの減少が、雌ではグロブリンの上昇がみられた。剖検所見では、雌雄とも中・高用量の適用部位の皮膚に落屑、糜爛あるいは出血が認められた。臓器重量では、雌雄とも高用量群では腎臓、脾臓及び副腎の重量が、中用量群では脾臓と副腎の重量がそれぞれ増加した。病理組織学的検査では、雌雄とも高用量群のほぼ全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍、骨髄の造血亢進及び胸腺の皮質リンパ球壊死（アポトーシス）が観察された。加えて、腎臓の近位尿管拡張及び副腎の皮質細胞肥大が高頻度に認められ、脾臓の髓外造血亢進、適用部位皮膚の表皮細胞過形成、腺胃の糜爛・潰瘍、十二指腸炎が散見された。中用量群では、適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が高頻度に観察され、同部位表皮細胞過形成が雌雄の少数例に認められた。1 mg/kg投与群では、AAC投与に関連づけられる異常は認められなかった。これらの結果から、本実験条件下では10 mg/kgが最大耐量（MTD）であり、無毒性量（NOAEL）は雌雄とも1 mg/kgであると判定された。

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ア

ルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）を対象に、ラットを用い4週間反復経皮投与し、その際に生じる一般毒性、

神経毒性及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」及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、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、被験物質保管所内冷蔵庫（許容温度：2～8℃）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

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1では雄性ラットを用い、0、30、300及び1000mg/kgの4用量で、各群1ないし2匹の動物の背部皮膚に1日24時間閉鎖貼付し、10日間に亘り反復経皮投与した。その結果、1000mg/kg群では投与3日に一般状態悪化のため切迫殺した。300mg/kg群では体重増加抑制ならびに適用部位の皮膚肥厚とびらんが認められ、剖検では脾臓の腫大（脾臓重量増加）がみられた。予備試験2では0、30及び60mg/kgの3用量で、各群2匹の動物16日間に亘り反復経皮投与した。その結果、30及び60mg/kg群では体重変化、臨床症状、剖検所見、血液学的検査及び臓器重量の各検査に変化はみられなかった。

上記の予備試験結果を考慮し、本試験の

最高用量を 100 mg/kg として設定し、公比 10 倍で中間用量を 10 mg/kg、そして 1 mg/kg を最低用量として設定した。これらの設定用量群（0、1、10 及び 100 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、100 mg/kg）の被験物質投与液を週に 1 回調製した。投与液調製時の含量換算は行わなかった。投与容量は 3 mL/kg とした。所定量の被験物質を秤量し、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、0.33、3.33 及び 33.3 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ビント布で覆い、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 28 日間とした。ただし、高用量群（100 mg/kg 投与群）については適用部位の皮膚の状態

が悪化したため、倫理上の観点より投与 22 日の時点で投与を終了し、安楽死せしめた。その他の投与群については予定通り 28 日間投与終了後に屠殺した。

#### 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及び一般状態を観察した。

#### 7. 体重

全生存動物について、投与開始時及びその後毎週 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 4 週時（投与 25 日）に対照群と中用量群（10 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。なお、4 週時の検査は当初は高用量群（100 mg/kg 投与群）の動物を対象に行う予定であったが、同群の動物は適用部位の皮膚の悪化に伴い倫理上の観点から 4 週時（投与 25 日）の検査前に全例屠殺されたため、対象を変更し中用量群の動物について検査を行った。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 4 週時 (投与 26 日) 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。ただし、高用量群の動物については前項で述べた理由により尿検査を行わなかった。

#### 11. 血液学的検査

投与終了時 (投与 28 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。ただし、高用量群の動物については前項で述べた理由により投与期間を短縮したため投与 22 日に血液検査を実施した。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・後大静脈を切斷して放血により安樂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、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（両側）、卵巣（両側）、子宮、膣、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。ただし、低用量群（1 mg/kg 投与群）については、肉眼的に被験物質投与に関連付けられる異常が認められなかったため、組織学的検査は実施しなかった。

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、膣、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。

#### 19. 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、尿の色については 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。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

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 3 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 2 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 4 週時 (投与 22 日) に全例を安楽死せしめ試験を終了した。ただし、その他の投与群 (中・低用量群) については予定通り 28 日間の投与満了後に試験を終了した。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 6 日以降から適用部の皮膚肥厚が、加えて、投与 18 日以降から適用部位に痂皮形成が認められたが、途中死亡・切迫殺例はなかった。

1 mg/kg 投与群では、被験物質投与に関連付けられる異常は認められず、途中死亡・切迫殺動物もみられなかった。

### 2. 体重変化

100 mg/kg 投与群では、雄において体重増加抑制が認められ、投与 4 週時では対照群に比べ 20%前後の低値を示した。一方、雌では特に異常はなかった。

10 及び 1mg/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

100 及び 10 mg/kg 投与群では、雄において投与 1 ないし 2 週に摂餌量が有意に減少したが、その後は回復し有意差はみられなかった。一方、雌では対照群と比べ摂餌量に差はなかった。

1 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と同等の摂餌量であった。

### 4. 眼科学的検査成績

100 mg/kg 投与群では、適用部位の皮膚の状態が悪化し検査前に全例殺処分されたため検査は行わなかった。

10 及び 1 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異常は認められなかった。

### 5. 尿検査成績

100 mg/kg 投与群では、適用部位の皮膚の状態が悪化し検査前に全例殺処分されたため検査は行わなかった。

10 及び 1 mg/kg 投与群では、雌雄とも有意な変化はなかった。

### 6. 血液学的検査成績

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 (Ht) 値が減少し、軽度の貧血がみられた。これに伴い血小板 (Plat) 及び網赤血球数 (Ret) が増加した。白血球のディファレンシャルカウントでは、雌雄とも好中球及び単球の増加と好酸球及びリンパ球の減少がみられ、雌では総白血球数 (WBC) が増加した。

10 mg/kg 投与群では、雌において総白血球数、網赤血球数及び単球数の増加が認められた。一方、雄では異常はなかった。

1 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

100 mg/kg 投与群では、雌雄ともアルブミン、総蛋白、総コレステロール及びトリグリセライドの減少がみられ、グロブリン及び尿素窒素値が上昇した。

10 mg/kg 投与群では、雄においてアルブミン、総蛋白及び総コレステロール (T.Chol.) の減少がみられ、雌ではグロブリンが増加した。

1 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認められなかった。

#### 8. 剖検所見

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも適用部位の皮膚に落屑、出血及び糜爛が全例に認められた。

10 mg/kg 投与群において、適用部位の皮膚に出血が雄では5例に、雌では全例に認められた。

1 mg/kg 投与群の雌雄では、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。

#### 9. 臓器重量

100 mg/kg 投与群では、雌雄とも腎臓、脾臓、副腎及び脳<sup>1</sup>の相対重量 (比体重値) が増加し、加えて、雄では精巢の相対重量も増加した。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも脾臓及び副腎の相対重量が有意に増加あるいは増加傾向を示した。

1 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なかった。

#### 10. 病理組織学的検査成績

100 mg/kg 投与群では、雌雄のほぼ全例に適用部位皮膚の糜爛・潰瘍、骨髓 (胸骨および大腿骨) の造血亢進及び胸腺の皮質リンパ球壊死 (アポトーシス) が観察された。加えて、腎臓の近位尿細管曲部腔拡張が雌雄とも6例中4例に、副腎の皮質細胞肥大が雄の6例中3例と雌の6例中5例に認められた。その他、脾臓の髓外造血亢進が雌雄とも6例中2例に、適用部位皮膚の表皮細胞過形成が雄の1例に、腺胃の糜爛・潰瘍と十二指腸炎が雌の1例にそれぞれ観察された。

10 mg/kg 投与群では、適用部位皮膚の糜爛・潰瘍が雄の6例中5例と雌の6例中4例に観察され、同部位皮膚表皮細胞過形成が雄1例及び雌2例に認められた。

1 mg/kg 投与群では、雌雄では被験物質投与に関連付けられる肉眼的異常が観察されなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

#### D. 考察

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18年度では、CCAに代わり現在使用量が多い、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC)