

アクロレインのマウスを用いた吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0783

CAS No. 107-02-8

2013年3月18日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試験資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A~L	2
FIGURES	1~4	
APPENDICES	1-1~3	

標題

アクロレインのマウスを用いた吸入による 13 週間毒性試験

試験目的

アクロレインの吸入によるがん原性試験の投与濃度を決定する予備試験として、アクロレインをマウスに 13 週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 413 (亜慢性吸入毒性: 90 日試験 2009 年 9 月 7 日採択) を参考に実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP)」 (一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) に準じて実施した。

動物福祉

本試験は、平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針」及び平成 18 年 11 月 27 日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞が関 1-2-2

アクロレインのマウスを用いた吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0783

本文

本文目次

	頁
要約	1
試験材料	2
- 1 被験物質の性状等	2
- 1 - 1 名称等	2
- 1 - 2 構造式及び分子量	2
- 1 - 3 物理化学的性状等	2
- 2 被験物質の使用ロット等	2
- 3 被験物質の特性	3
- 3 - 1 同一性	3
- 3 - 2 安定性	3
- 4 試験動物	3
試験方法	4
- 1 投与	4
- 1 - 1 投与経路	4
- 1 - 2 被験物質の投与方法	4
- 1 - 3 投与期間	4
- 1 - 4 投与濃度	4
- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	4
- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整	5
- 1 - 7 被験物質濃度の測定	5
- 2 動物管理	5
- 2 - 1 各群の使用動物数	5
- 2 - 2 群分け及び個体識別方法	6
- 2 - 3 飼育条件	6
(1) 飼育環境	6
(2) 飼料	7
(3) 飲水	7

- 3	観察・検査項目及び方法	7
- 3 - 1	動物の生死及び一般状態の観察	7
- 3 - 2	体重測定	7
- 3 - 3	摂餌量測定	8
- 3 - 4	血液学的検査	8
- 3 - 5	血液生化学的検査	8
- 3 - 6	尿検査	8
- 3 - 7	病理学的検査	8
(1)	剖検	8
(2)	臓器重量	9
(3)	病理組織学的検査	9
- 4	数値処理と統計方法	9
- 4 - 1	数値の取り扱いと表示	9
- 4 - 2	統計処理	10
	試験成績	11
- 1	生死状況	11
- 2	一般状態	11
- 3	体重	11
- 4	摂餌量	11
- 5	血液学的検査	12
- 6	血液生化学的検査	12
- 7	尿検査	12
- 8	病理学的検査	13
- 8 - 1	剖検	13
- 8 - 2	臓器重量	13
- 8 - 3	病理組織学的検査	13
	考察及びまとめ	16
- 1	用量 - 反応関係	16
- 2	無毒性量 (NOAEL)	17
- 3	がん原性試験の濃度決定	18

文献 19

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計
画書に従わなかつたこと 20

要約

アクロレインのがん原性を検索する目的で B6D2F1/CrIj マウスを用いた吸入による 2 年間 (104 週間) の試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験 (13 週間試験) を実施した。

本試験は、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 120 匹を用いた。被験物質の投与は、アクロレインを 1 日 6 時間、1 週 5 日間で 13 週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、0.1、0.3、1、2 及び 3 ppm (v/v) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

アクロレインの暴露の結果、動物の死亡はみられなかった。一般状態の観察では、雌の 3 ppm 群で異常呼吸音がみられた。また、体重増加の抑制が投与期間を通して、雄の 2 ppm 以上の群と雌の 3 ppm 群でみられた。摂餌量は、雌雄の 3 ppm 群で低値であった。

血液学的検査では、雄で赤血球数、ヘマトクリット値の高値が 3 ppm 群で、雌で MCH の低値が 3 ppm 群でみられた。血液生化学的検査では、雄で総ビリルビンの高値及びトリグリセライドの低値が 2 ppm 以上の群で、リン脂質の低値が 3 ppm 群でみられた。雌では A/G 比と ALP の高値が 3 ppm 群でみられた。尿検査では雌で pH の上昇が 3 ppm 群でみられた。

病理学的検査のうち、剖検では雌雄とも特記すべき変化はみられなかった。臓器重量では、雌で脾臓と肝臓の重量低下が 3 ppm 群でみられた。

病理組織学的検査では、鼻腔と鼻咽頭にアクロレインの影響と考えられる萎縮、炎症、再生、化生、過形成等の変化がみられた。3 ppm 群と 2 ppm 群では鼻腔から鼻咽頭に、1 ppm 群では鼻腔に種々の所見がみられた。0.3 ppm 以下の群には、雌雄ともアクロレインの明らかな毒性影響は認められなかった。その他の器官、組織にはアクロレインの影響と思われる病理組織学的変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験におけるアクロレインのマウスに対する 13 週間吸入暴露による無毒性量 (NOAEL) は、鼻腔への影響をエンドポイントとして 0.3 ppm であると考えられた。また、がん原性試験は雌雄とも最高濃度を 1.6 ppm とし、以下、0.4 ppm、0.1 ppm (公比 4) と決定した。

試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

名 称 : アクロレイン (Acrolein)

別 名 : アクリルアルデヒド、2-プロペナール

CAS No. : 107-02-8

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 : $\text{CH}_2=\text{CHCHO}$

分 子 量 : 56.06

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色～淡黄色の透明液体

比 重 : 0.8389 (20)

沸 点 : 52.6

蒸 気 圧 : 274 mmHg (25)

溶 解 性 : エタノール、エーテル、アセトンに可溶、クロロホルムに微溶

保 管 条 件 : 冷蔵、暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 東京化成工業(株)

規 格 : 1 級

純 度 : 99.2 % (東京化成工業(株)検査成績データ)

使用ロット番号 : KOLRO

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、そのマススペクトルを質量分析計（(株)日立製作所 M-80B）を用いて測定し、その測定値を文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献 2）と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、被験物質はアクロレインであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1- 1 に示した。

- 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後にそのガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジーズ(株) 5890A）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

- 4 試験動物

動物は、アクロレインのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の B6D2F1/Crlj マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 72 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 60 匹（群構成時体重範囲、雄：22.1～25.6g、雌：18.1～20.3g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に B6D2F1/Crlj マウス（SPF）を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

試験方法

- 1 投与

- 1 - 1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

- 1 - 2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

- 1 - 3 投与期間

投与期間は、1日6時間、原則として1週5日の暴露で13週間とし、計61回の暴露を行った。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、0.1、0.3、1、2及び3 ppm（体積比 v/v）の5段階に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間はがん原性試験の投与濃度を決定するため、週5日の暴露で13週間とした。

投与濃度は、アクロレインをマウスに吸入暴露した2週間毒性試験（試験番号 0777）の結果（文献 3）をもとに決定した。2週間試験は、0（対照群）、0.1、0.3、1、3及び10 ppmの濃度で行った。その結果、雌雄とも10 ppm群で動物の死亡がみられたが、3 ppm以下の群では死亡はみられなかった。3 ppm群では、雌雄とも体重増加の抑制、摂餌量の低下、雄に一般状態の変化（異常呼吸音等）がみられた。また、病理組織学的検査では、雌雄とも鼻腔（嗅上皮、呼吸上皮）、鼻咽頭管にアクロレインの刺激性によると思われる変化がみられた。しかし、3 ppm群の摂餌量の低下は2週目には回復傾向にあり、一般状態の変化は雄の少数例であった。また、3 ppm群の病理組織学的検査でみられた変化は、

10 ppm 群より軽度であり、直ちに動物の生死に関わるものではなかった。これらのことから、13 週間試験の最高濃度は 3 ppm が適切と考えた。13 週間試験の最低濃度については、2 週間試験で 0.3 ppm 以下でアクロレインの影響がみられなかったことから、投与期間が延長しても、2 週間試験の最低濃度と同じ 0.1 ppm が適切と考えた。

従って、13 週間試験の投与濃度は 3 ppm を最高濃度として、以下、公比 3 で 1 ppm、0.3 ppm、0.1 ppm を設定し、さらに高濃度群におけるアクロレインの影響を検索するため、3 ppm と 1 ppm の間に 2 ppm を設定した。

- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質を高千穂化学工業(株)に依頼し、窒素ベースでガスボンベ(容量: 47L)に 528 ~ 561 ppm の濃度で充填した。このボンベより得た被験物質を清浄空気と混合し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はガスクロマトグラフで監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように被験物質の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

- 1 - 7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフ((株)島津製作所 GC-14A)により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分ごとに測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差($(\text{平均値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$)が 2.0%以内、変動係数(標準偏差 / 平均値 $\times 100$)が 3.3%以内であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

- 2 動物管理

- 2 - 1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 10 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群名称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対照群	10匹（1001～1010）	10匹（2001～2010）
0.1 ppm群	10匹（1101～1110）	10匹（2101～2110）
0.3 ppm群	10匹（1201～1210）	10匹（2201～2210）
1 ppm群	10匹（1301～1310）	10匹（2301～2310）
2 ppm群	10匹（1401～1410）	10匹（2401～2410）
3 ppm群	10匹（1501～1510）	10匹（2501～2510）

- 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した（文献 4）。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室（604 室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

- 2 - 3 飼育条件

（1）飼育環境

検疫期間中は検疫室（606 室）で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（604 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値 ± 標準偏差）を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温度： 検疫室； 23 ± 2 < 606 室； 23.0 ± 0.1 >
吸入試験室； 21 ± 2 < 604 室； 19.9 ± 0.3 >
吸入チャンバー内；20～24

湿度： 検疫室； $55 \pm 15\%$ < 606 室； $53 \pm 1\%$ >
吸入試験室； $55 \pm 15\%$ < 604 室； $62 \pm 2\%$ >
吸入チャンバー内；30～70%

明暗サイクル： 12 時間点灯(8:00～20:00) / 12 時間消灯(20:00～8:00)

換気回数 : 検疫室・吸入試験室 ; 15 ~ 17 回 / 時
 吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回 / 時
 圧 力 : 吸入チャンバー内 ; 0 ~ - 15 × 10Pa
 ケージへの動物の収容方法 : 単飼
 ケージの材質・形状・寸法等 :
 検疫期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ (112(W) × 212(D) × 120(H) mm / 匹)
 馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (95(W) × 116(D) × 120(H) mm / 匹)
 投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (100(W) × 116(D) × 120(H) mm / 匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30kGy- 線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株) から分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

(3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川県秦野市落合 729-5) に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

- 3 観察・検査項目及び方法

- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

- 3 - 2 体重測定

体重測定は週 1 回行った。また、定期解剖動物の搬出時にも体重 (搬出時体重) を測定した。

- 3 - 3 摂餌量測定

摂餌量は週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

- 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

- 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

- 3 - 6 尿検査

投与 13 週の検査時まで生存した動物から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（ウロラブスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

- 3 - 7 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

全動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

なお、鼻腔については切歯の後端（レベル1）、切歯乳頭（レベル2）、第一臼歯の前端（レベル3）の3ヶ所（文献5）で切り出し（横断）、検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

- 4 数値処理と統計方法

- 4 - 1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで測定し、小数点以下第 3 位を四捨五入して小数点以下第 2 位までを表示した。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と桁数により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

- 4 - 2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較を行った。

病理組織学的検査の非腫瘍性病変は、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1～4 に分け、²検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との²検定を行った。

各検定は 5%の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5%及び 1%の有意水準の表示を行った。

試験成績

- 1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

動物の死亡はみられなかった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C に示した。

- 雄 -

被験物質の影響と思われる所見はみられなかった。

- 雌 -

3 ppm 群で投与 2 週から 8 週にかけて、異常呼吸音が 1~3 匹にみられた。

- 3 体重

体重の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 1, 2 に示した。

- 雄 -

2 ppm 以上の群で投与期間を通して、体重増加の抑制がみられた。また、1 ppm 以下の群においても、投与 3 から 4 週以後、対照群に比べやや低値であったが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

投与群の最終体重は対照群に対し、0.1 ppm 群：94%、0.3 ppm 群：93%、1 ppm 群：95%、2 ppm 群：84%、3 ppm 群：75%であった。

- 雌 -

3 ppm 群で投与期間を通して、体重増加の抑制がみられた。

投与群の最終体重は対照群に対し、0.1 ppm 群：101%、0.3 ppm 群：104%、1 ppm 群：102%、2 ppm 群：99%、3 ppm 群：84%であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

- 雄 -

3 ppm 群で投与期間を通して、摂餌量が低値あった。

13 週間の平均摂餌量は、対照群：4.5 g、0.1 ppm 群：4.5 g、0.3 ppm 群：4.5 g、1 ppm

群：4.4 g、2 ppm 群：4.2 g、3 ppm 群：3.5 g であった。

- 雌 -

3 ppm 群で投与期間を通して、摂餌量が低値あった。

13 週間の平均摂餌量は、対照群：4.5 g、0.1 ppm 群：4.3 g、0.3 ppm 群：4.4 g、1 ppm 群：4.5 g、2 ppm 群：4.2 g、3 ppm 群：3.3 g であった。

- 5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

- 雄 -

赤血球数、ヘマトクリット値の高値が 3 ppm 群でみられた。

- 雌 -

MCH の低値が 3 ppm 群でみられた。

- 6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

- 雄 -

総ビリルビンの高値及びトリグリセライドの低値が 2 ppm 以上の群で、リン脂質の低値が 3 ppm 群でみられた。

その他、総蛋白とアルブミンの低値が 0.3 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応したものではなく、被験物質の影響とは考えなかった。

- 雌 -

A/G 比と ALP の高値が 3 ppm 群でみられた。

その他、A/G 比の低値が 0.1 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応したものではなく、被験物質の影響とは考えなかった。

- 7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

pH の上昇が 3 ppm 群でみられた。

- 8 病理学的検査

- 8 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

被験物質の影響と思われる所見はみられなかった。

- 8 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

- 雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、2 ppm 以上の群では多くの臓器で実重量の低値や体重比の高値がみられたが、これらの変化は 2 ppm 以上の群の搬出時体重の低値によるものと思われる。また、0.3 ppm 群では、胸腺の実重量の低値及び脾臓の体重比の高値がみられたが、これらの変化も 0.3 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。

- 雌 -

脾臓と肝臓の実重量と体重比の低値が 3 ppm 群でみられた。

その他、3 ppm 群では卵巣、心臓、腎臓、脳の実重量の低値、肺、脳の体重比の高値がみられたが、これらの変化は 3 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。

- 8 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE L 1, 2 に示した。

雄

呼吸器系（鼻腔、鼻咽頭）に被験物質の影響がみられた。

[3 ppm 群]

鼻腔と鼻咽頭に変化がみられた。

鼻腔では呼吸部と嗅部に被験物質の影響がみられた。呼吸部では、鼻腔の内腔に滲出液の貯留が認められ、好中球の浸潤が目立つ滲出液（以下、化膿性滲出液）の貯留（軽度～中等度）が 7 匹、好中球の浸潤がほとんどない滲出液（以下、非化膿性滲出液）の貯留（軽度～中等度）が 4 匹であった。また、甲介の萎縮（中等度）が 10 匹、血管拡張（軽度）が 10 匹、鼻腺の呼吸上皮化生（軽度）が 6 匹に認められた。呼吸部を構成する移行上皮と呼吸上皮では、移行上皮に再生（軽度）と過形成（重度）が各 10 匹、扁平上皮化生（軽度～中

等度)が7匹、呼吸上皮には炎症性細胞浸潤(軽度)が3匹、再生(中等度)と過形成(軽度)が各10匹、扁平上皮化生(軽度)が2匹に認められた。嗅部では鼻腔の内腔に滲出液の貯留が認められ、化膿性滲出液の貯留(軽度)が1匹、非化膿性滲出液の貯留(中等度~重度)が10匹に認められた。嗅部を構成する嗅上皮では、炎症性細胞浸潤(軽度)が2匹、萎縮(重度)が10匹、呼吸上皮化生(軽度)が9匹に認められた。また、嗅上皮の下に存在する嗅神経の萎縮(中等度)と嗅腺の萎縮(重度)が各10匹に認められた。

鼻咽頭では、鼻咽頭管上皮の再生(中等度~重度)が10匹に認められた。

[2 ppm 群]

鼻腔と鼻咽頭に変化がみられた。

鼻腔では呼吸部と嗅部に被験物質の影響がみられた。呼吸部では、甲介の萎縮(軽度)が10匹、血管拡張(軽度)が3匹に認められた。呼吸部の移行上皮と呼吸上皮では、移行上皮に再生(軽度)と過形成(重度)が各10匹、扁平上皮化生(軽度)が8匹に認められ、呼吸上皮に再生(中等度)と過形成(軽度)が各10匹、扁平上皮化生(軽度)が4匹、エオジン好性変化(軽度)が2匹に認められた。嗅部では鼻腔の内腔に非化膿性滲出液の貯留(中等度)が1匹に認められた。嗅部の嗅上皮では、萎縮(軽度)、再生(軽度)、呼吸上皮化生(軽度)が各2匹に認められた。また、嗅上皮の下に存在する嗅神経の萎縮(軽度)が4匹に認められた。

鼻咽頭では、上皮の再生(軽度)が6匹に認められた。

[1 ppm 群]

鼻腔の呼吸部に変化がみられた。呼吸部の移行上皮に再生(軽度)と過形成(軽度)が各10匹、呼吸上皮に再生(中等度)と過形成(軽度)が各10匹、エオジン好性変化(軽度)が4匹に認められた。

[0.3 ppm 群]

被験物質の影響を認めなかった。

[0.1 ppm 群]

被験物質の影響を認めなかった。

雌

呼吸器系(鼻腔、鼻咽頭)に被験物質の影響がみられた。

[3 ppm 群]

鼻腔と鼻咽頭に変化がみられた。

鼻腔では呼吸部と嗅部に被験物質の影響がみられた。呼吸部では、鼻腔の内腔に滲出液の貯留が認められ、化膿性滲出液の貯留(軽度)が1匹、非化膿性滲出液の貯留(軽度~中等度)が6匹であった。また、甲介の萎縮(中等度)が10匹、血管拡張(軽度)が8匹、鼻腺の呼吸上皮化生(軽度)が3匹に認められた。呼吸部の移行上皮と呼吸上皮では、移行上皮に再生(軽度)と過形成(重度)、扁平上皮化生(軽度~中等度)が各10匹に認められ、呼吸上皮に再生(中等度)と過形成(軽度)が各10匹、扁平上皮化生(軽度)が7

匹、エオジン好性変化（軽度）が3匹に認められた。嗅部では鼻腔の内腔に非化膿性滲出液の貯留（重度）が10匹に認められた。嗅部の嗅上皮では、萎縮（重度）と呼吸上皮化生（軽度）が各10匹に認められた。また、嗅上皮の下に存在する嗅神経の萎縮（中等度）と嗅腺の萎縮（重度）が各10匹に認められた。

鼻咽頭では、上皮の再生（中等度～重度）が10匹に認められた。

[2 ppm 群]

鼻腔と鼻咽頭に変化がみられた。

鼻腔では呼吸部と嗅部に被験物質の影響がみられた。呼吸部では、甲介の萎縮（軽度～中等度）が9匹、血管拡張（軽度）が4匹、鼻腺の呼吸上皮化生（軽度）が1匹に認められた。呼吸部の移行上皮と呼吸上皮では、移行上皮に再生（軽度）と過形成（重度）が各10匹、扁平上皮化生（軽度）が3匹に認められ、呼吸上皮に再生（中等度～重度）と過形成（軽度）が各10匹、扁平上皮化生（軽度）が6匹、エオジン好性変化（軽度）が3匹に認められた。嗅部では鼻腔の内腔に非化膿性滲出液の貯留（中等度）が4匹に認められた。嗅部の嗅上皮では、炎症性細胞浸潤（軽度）が1匹、萎縮（軽度～中等度）が6匹、呼吸上皮化生（軽度）が6匹に認められた。また、嗅上皮の下に存在する嗅腺の萎縮（中等度）が4匹と嗅神経の萎縮（軽度）が6匹に認められた。

鼻咽頭では、上皮の再生（軽度）が9匹に認められた。

[1 ppm 群]

鼻腔の呼吸部に変化がみられた。呼吸部の移行上皮に再生（軽度）と過形成（中等度）が各10匹に認められ、呼吸上皮に炎症性細胞浸潤（軽度）が8匹、再生（中等度）が10匹、過形成（軽度）が7匹、エオジン好性変化（軽度～中等度）が9匹に認められた。

[0.3 ppm 群]

鼻腔の呼吸部に変化がみられた。呼吸部の呼吸上皮にエオジン好性変化（軽度）が6匹に認められた。

[0.1 ppm 群]

鼻腔の呼吸部に変化がみられた。呼吸部の呼吸上皮にエオジン好性変化（軽度）が4匹に認められた。

考察及びまとめ

アクロレインのがん原性を検索する目的で、B6D2F1/Crlj マウスを用いた吸入による2年間(104週間)の試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験(13週間試験)を実施した。

本試験は、投与群5群、対照群1群の計6群(各群雌雄各10匹)を設け、アクロレインの投与濃度は、0(対照群)、0.1、0.3、1、2及び3 ppm(v/v)とした。投与期間は1日6時間、1週5日間の投与(全身暴露による経気道投与)で13週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、尿検査を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

- 1 用量 - 反応関係

アクロレインの暴露の結果、動物の死亡はみられなかった。一般状態の観察では、雌の3 ppm群で異常呼吸音がみられた。また、体重増加の抑制が投与期間を通して、雄の2 ppm以上の群と雌の3 ppm群でみられ、最終体重はそれぞれの対照群に対し、雄の2 ppm群は84%、3 ppm群は75%、雌の3 ppm群は84%であった。なお、雄の1 ppm以下の群でも、体重は対照群に比べやや低値で推移したが、投与濃度に対応した変化ではなく、アクロレインとの関係は明らかではなかった。摂餌量は、雌雄の3 ppm群で低値であった。

血液学的検査では、雄で赤血球数、ヘマトクリット値の高値が3 ppm群で、雌でMCHの低値が3 ppm群でみられた。本試験と同時に行ったアクロレインのラットを用いた吸入による13週間毒性試験(文献6)でも、雄の3 ppm群で赤血球数やヘマトクリット値の高値がみられたが、ラットの試験と同様に本試験でも病理組織学的検査では血液系への影響を示唆する変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、雄で総ビリルビンの高値及びトリグリセライドの低値が2 ppm以上の群で、リン脂質の低値が3 ppm群でみられた。雌ではA/G比とALPの高値が3 ppm群でみられた。また、尿検査では雌でpHの上昇が3 ppm群でみられた。しかし、血液生化学的検査及び尿検査でみられた変化に関連すると思われる病理組織学的所見は認められなかった。

病理学的検査のうち、剖検では雌雄ともアクロレインの影響と思われる変化はみられなかった。臓器重量では、雌で脾臓と肝臓の重量低下が3 ppm群でみられた。

病理組織学的検査では、鼻腔と鼻咽頭にアクロレインの影響がみられた。3 ppm群と2 ppm群では鼻腔から鼻咽頭に、1 ppmでは鼻腔のみにアクロレインの毒性影響がみられた。

3 ppm群では雌雄とも鼻腔と鼻咽頭に変化がみられた。鼻腔では、内腔に滲出液(化膿性滲出液を含む)の貯留、甲介の萎縮、血管拡張、鼻腺の呼吸上皮化生が認められ、移行上皮

や呼吸上皮では、再生、過形成、扁平上皮化生、炎症性細胞浸潤(雄)、エオジン好性変化(雌)が認められた。嗅上皮では、萎縮、呼吸上皮化生、炎症性細胞浸潤(雄)が認められ、また、嗅上皮の下に存在する嗅神経の萎縮と嗅腺の萎縮が認められた。これらの変化の程度は軽度から重度であった。鼻腔では呼吸部と嗅部にアクロレインの影響がみられ、アクロレインによる傷害性変化と上皮の再生や過形成、扁平上皮化生等の修復性の変化がみられた。鼻咽頭では鼻咽頭管上皮の再生が認められ、雌雄ともその程度は中等度から重度であった。

鼻腔への毒性影響は雌雄とも 1 ppm 群までみられた。2 ppm 群では 3 ppm 群と同様に鼻腔の呼吸部と嗅部にアクロレインの影響がみられた。2 ppm 群の変化は 3 ppm 群より軽度であったが、特に嗅部へのアクロレインの影響が 3 ppm 群に比べ軽度であった。1 ppm 群の鼻腔では、アクロレインの影響は呼吸部のみとなり、所見の数も減少し、ほとんどが修復性の変化であったが、雌雄とも全例に移行上皮の再生(軽度)と過形成(軽度から中等度)及び呼吸上皮の再生(中等度)がみられ、鼻腔では 1 ppm 群まで、アクロレインによる傷害に対し、活発な修復が行われていたことが示された。なお、雌では 0.3 ppm 群と 0.1 ppm 群に呼吸上皮のエオジン好性変化(軽度)が認められたが、この変化は高濃度群よりも 1 ppm 群で最も多くみられ、その程度も強く(軽度から中等度)投与濃度との対応がみられないことから、有害性変化とは考えなかった。

鼻咽頭の変化は雌雄とも 2 ppm 群までみられた。2 ppm 群でも 3 ppm 群と同様に上皮の再生が認められたが、雌雄ともその変化は 3 ppm 群より軽度であった。

なお、重量低下がみられた脾臓と肝臓は病理組織学的に雌雄とも変化はみられなかった。

以上のように、マウスへのアクロレインの 13 週間の暴露により、鼻腔と鼻咽頭にアクロレインの影響がみられ、鼻腔への毒性影響は雌雄とも 1 ppm の濃度までみられた。

その他の器官、組織にはアクロレインの影響と思われる病理組織学的変化は認められなかった。

- 2 無毒性量 (NOAEL)

アクロレインのマウスへの 13 週間吸入暴露により、投与群では、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量及び病理組織学的検査に変化がみられた。その中で病理組織学的検査においては、1 ppm 群まで鼻腔に毒性影響がみられた。0.3 ppm 以下の群では、暴露に関連した明らかな毒性影響は認められなかった。従って、本試験におけるアクロレインのマウスに対する 13 週間吸入暴露による無毒性量 (NOAEL) は、鼻腔への影響をエンドポイントとして 0.3 ppm であると考えられた。

- 3 がん原性試験の濃度決定

本試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では各群とも動物の死亡はみられなかったが、3 ppm 群では雌雄に、2 ppm 群では雄に体重増加の抑制がみられ、一般状態では3 ppm 群の雌に異常呼気音がみられた。また、病理組織学的検査では2 ppm 以上の群の雌雄の鼻腔、鼻咽頭に炎症及び上皮の再生、過形成と化生等がみられた。特に、最終体重は対照群に対し、3 ppm 群の雄で75%、雌で84%、2 ppm 群の雄で84%であることから、2 ppm 以上の濃度はがん原性試験における最大耐量を越えると思われた。1 ppm 群は、雄で軽度の体重増加の抑制がみられたが、最終体重は対照群に対し95%であり、雌雄とも一般状態に変化はみられなかった。また、病理組織学的検査では雌雄の鼻腔に変化がみられたが、動物の生存に影響を及ぼすものではなかった。これらの結果より、がん原性試験の最高濃度は1 ppm と 2 ppm の中間の濃度が妥当と考えられた。また、がん原性試験の最低濃度は米国 ACGIH から勧告されている TLV・天井値(文献7)0.1 ppm を考慮した。以上のことから、がん原性試験は雌雄とも最高濃度を 1.6 ppm とし、以下、0.4 ppm、0.1 ppm (公比4)と決定した。

文献

1. U.S. National Library of Medicine, Specialized Information Services 2007. Acrolein. Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search> [accessed 2011/01/06].
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
3. 日本バイオアッセイ研究センター. 2011. アクロレインのマウスを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書. 神奈川:中央労働災害防止協会. 日本バイオアッセイ研究センター
4. 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療14: 7285-7302.
5. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp Toxic Pathol* 49: 97-104.
6. 日本バイオアッセイ研究センター. 2013. アクロレインのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験報告書. 神奈川:中央労働災害防止協会. 日本バイオアッセイ研究センター
7. ACGIH. 2001. Acrolein. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. ACGIH

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。