

アクロレインのラットを用いた吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0816

CAS No. 107-02-8

2016 年 3 月 17 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 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～Q2	
FIGURES	1～6	
PHOTOGRAPHS	1～6	
APPENDICES	1-1～3	

標題

アクロレインのラットを用いた吸入によるがん原性試験

試験目的

アクロレインをラットに 104 週間全身暴露し、がん原性を検索した。

試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準」に準拠し、OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 2009 年 9 月 7 日採択）を参考にして実施した。

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 12 月 25 日付け、労働省告示第 120 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指針」及び平成 24 年 4 月 25 日付け、中央労働災害防止協会規程第 17 号「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」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審査、承認（承認番号 0021）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

アクロレインのラットを用いた吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0816

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	3
I-1 被験物質の性状等	3
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式及び分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質の使用ロット等	3
I-3 被験物質の特性	4
I-3-1 同一性	4
I-3-2 安定性	4
I-4 試験動物	4
II 試験方法	5
II-1 投与	5
II-1-1 投与経路	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整	6
II-1-7 被験物質濃度の測定	6
II-2 動物管理	6
II-2-1 各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法	7
II-2-3 飼育条件	7
(1) 飼育環境	7
(2) 飼料	8
(3) 飲水	8

Ⅱ－3 観察・検査項目及び方法	8
Ⅱ－3－1 動物の生死及び一般状態の観察	8
Ⅱ－3－2 体重測定	8
Ⅱ－3－3 摂餌量測定	8
Ⅱ－3－4 血液学的検査	8
Ⅱ－3－5 血液生化学的検査	9
Ⅱ－3－6 尿検査	9
Ⅱ－3－7 病理学的検査	9
(1) 肉眼的観察	9
(2) 臓器重量	9
(3) 病理組織学的検査	9
Ⅱ－4 数値処理と統計方法	10
Ⅱ－4－1 数値の取り扱いと表示	10
Ⅱ－4－2 統計処理	10
Ⅲ 試験成績	12
Ⅲ－1 生死状況	12
Ⅲ－2 一般状態	12
Ⅲ－3 体重	12
Ⅲ－4 摂餌量	13
Ⅲ－5 血液学的検査	13
Ⅲ－6 血液生化学的検査	13
Ⅲ－7 尿検査	13
Ⅲ－8 病理学的検査	14
Ⅲ－8－1 肉眼的観察	14
Ⅲ－8－2 臓器重量	14
Ⅲ－8－3 病理組織学的検査	14
Ⅲ－8－4 死因	17
Ⅳ 考察及びまとめ	18
Ⅳ－1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	18
Ⅳ－2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	18
Ⅳ－3 その他の影響	19

V	結論	20
VI	文献	21
VII	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	23

要約

アクロレインのがん原性を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による 2 年間（104 週間）の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群雌雄とも 50 匹とし、合計 400 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 104 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、0.5、及び 2 ppm 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、解剖時の肉眼的観察、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、動物の生存率は雌の 2 ppm 群で投与期間の終盤、低下した。一般状態では、雌雄ともアクロレインの影響と思われる所見はみられなかった。体重は、雌雄の 2 ppm 群で増加の抑制がみられ、雌雄とも投与期間を通じて対照群より低値、またはやや低値で推移した。摂餌量は、雄では 2 ppm 群で投与期間を通じて、雌は 2 ppm 群で投与 14 週まで、それぞれ対照群より低値であった。

病理組織学的検査では、雌雄とも鼻腔に腫瘍の発生が認められた。

鼻腔では、扁平上皮癌の発生が 2 ppm 群で雄 1 匹、雌 2 匹に認められた。扁平上皮癌は、雌雄とも当センターのヒストリカルコントロールデータでは発生のみられない極めて稀な腫瘍である。さらに、腫瘍の前段階と考えられる呼吸上皮の扁平上皮化生と移行上皮過形成の発生増加が雌雄の 2 ppm 群にみられた。

また、雌では鼻腔に横紋筋腫の発生が 2 ppm 群で 4 匹に認められた。横紋筋腫も当センターのヒストリカルコントロールデータでは発生のみられない極めて稀な腫瘍である。さらに、嗅上皮の粘膜固有層には、腫瘍の前段階と考えられる横紋筋増殖の発生増加が 2 ppm 群にみられた。

雌では、鼻腔の扁平上皮癌と横紋筋腫を合わせると 2 ppm 群で 6 匹に腫瘍が認められた。

非腫瘍性病変としては、雌雄とも鼻腔に影響がみられた。鼻腔では、呼吸上皮（炎症、扁平上皮化生、移行上皮過形成、杯細胞過形成）、嗅上皮（呼吸上皮化生、萎縮、エオジン好性変化（雄））、固有層の腺（呼吸上皮化生）、嗅上皮の粘膜固有層（浮腫、横紋筋の増殖）及び甲介（癒着）に暴露の影響がみられた。これらの影響がみられた濃度は、雌雄とも 2 ppm であった。

以上のように、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、アクロレインの 2 年間（104 週間）にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雌雄とも鼻腔に扁平上皮癌の発生が認められた。また、雌では鼻腔に横紋筋腫の発生が認められた。これらの腫瘍の発生は雌雄ラットに対するがん原性を示す証拠と考えられた。

アクロレインのがん原性試験における主な腫瘍発生（ラット 雄）

	投 与 濃 度 (ppm)		0	0.1	0.5	2	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良 性 腫 瘍	皮下組織	線維腫	8	1 *	4	3		↓
	肺	細気管支－肺胞上皮腺腫	4	4	4	3		
	脾臓	島細胞腺腫	4	5	0	6		
	下垂体	腺腫	10	8	11 a)	3 *		
	甲状腺	C－細胞腺腫	8	10	8	10		
	副腎	褐色細胞腫	6	0 *	3	1		
	精巣	間細胞腫	40	43	41	46		
悪 性 腫 瘍	鼻腔	扁平上皮癌	0	0	0	1		
	脾臓	単核球性白血病	2	5	7	1		
	脾臓	島細胞腺癌	2	1	3	2		
	甲状腺	C－細胞癌	4	0	2	0		
	腹膜	中皮腫	1	0	1	3		

a) : 検査動物数 49 匹

アクロレインのがん原性試験における主な腫瘍発生（ラット 雌）

	投 与 濃 度 (ppm)		0	0.1	0.5	2	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良 性 腫 瘍	鼻腔	横紋筋腫	0	0	0	4	↑↑	↑↑
	肝臓	肝細胞腺腫	0	1	3	0		
	下垂体	腺腫	14	15	20	17	↑	
	甲状腺	C－細胞腺腫	12	10	6	8		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	7	7	4	10		
	乳腺	線維腺腫	4	6	2	3		
	陰核腺	腺腫	1	2	3	2		
悪 性 腫 瘍	鼻腔	扁平上皮癌	0	0	0	2		
	脾臓	単核球性白血病	5	6	4	3		
	下垂体	腺癌	0	2	1	0		
	甲状腺	C－細胞癌	1	0	4	2		
	子宮	腺癌	3	1	0	1		
	鼻腔	横紋筋腫+扁平上皮癌	0	0	0	6 *	↑↑	↑↑

* : $p \leq 0.05$ で有意

** : $p \leq 0.01$ で有意

(Fisher 検定)

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加

↑↑ : $p \leq 0.01$ で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓ : $p \leq 0.05$ で有意減少

↓↓ : $p \leq 0.01$ で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-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

I-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

I-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 °C)

沸 点： 52.6 °C

蒸 気 圧： 274 mmHg (25 °C)

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

I-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： 98.3 % (東京化成工業(株)検査成績データ)

使用ロット番号： FNRHH

I-3 被験物質の特性

I-3-1 同一性

被験物質の同一性は、被験物質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。

I-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(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。

I-4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター）の F344/DuCrIjCrIj ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 222 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 200 匹（群構成時体重範囲、雄：109～130g、雌：89～102g）を選別し、試験に用いた。

なお、F344/DuCrIjCrIj ラット（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。

II 試験方法

II-1 投与

II-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。

II-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。

II-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104週間とし、計491回の暴露を行った。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、0.1、0.5及び2 ppm（体積比 v/v）の3段階（公比4、小数点以下第2位四捨五入）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。

II-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、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献3）及びOECD化学品テストガイドライン451（発癌性試験）（文献4）に従い、2年間（104週間）とした。

投与濃度は13週間試験（試験番号0782）の結果（文献5）をもとに決定した。13週間試験は0（対照群）、0.1、0.3、1、2、3 ppm（v/v）の濃度で行った。その結果、動物の死亡はみられなかったが、3 ppm 群では雌雄に体重増加の抑制がみられ、一般状態で雌雄に異常呼吸音がみられた。また、臓器重量では雌雄の胸腺の重量低下、病理組織学的検査では雌雄の鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺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、雄で68%、雌で87%であることから、雌雄とも3 ppm はがん原性試験における最大耐量を越えると思われる。2 ppm 群は、体重増加の抑制がみられ

たが、最終体重は対照群に対し、雄で88%、雌で93%であり、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、鼻咽頭、喉頭に3 ppm 群と同様の変化がみられ、胸腺重量に低下がみられた。しかし、鼻腔等の病理組織変化は動物の生存に影響を及ぼすものではなく、胸腺の重量変化も軽度なものであった。これらの結果より、がん原性試験の最高濃度は2 ppm 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 6）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2 ppm とし、以下、0.5 ppm、0.1 ppm（公比4、小数点以下第2位四捨五入）と決定した。

II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質供給装置の発生容器内の被験物質を恒温槽で一定温度に保ちながら、窒素（99.99%）のバブリングにより蒸発させた。この被験物質の蒸気を清浄空気と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に加熱し、一定濃度にした後、一定量を各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。

II-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-14B）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（（平均値－設定濃度）／設定濃度×100）が 0.5%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が 1.0%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た。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

群 名 称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対 照 群	50 匹（1001～1050）	50 匹（2001～2050）
0.1 ppm 群	50 匹（1101～1150）	50 匹（2101～2150）
0.5 ppm 群	50 匹（1201～1250）	50 匹（2201～2250）
2 ppm 群	50 匹（1301～1350）	50 匹（2301～2350）

II-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 7）。

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ーによる色素塗布、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（501 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。

II-2-3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（517・518 室）で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（501 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； $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ＜517 室； $23.1 \pm 0.0^{\circ}\text{C}$ 、518 室； $22.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$

吸入試験室； $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ＜501 室； $22.0 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$

吸入チャンバー内； $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 検疫室； $55 \pm 15\%$ ＜517 室； $54 \pm 1\%$ 、518 室； $55 \pm 1\%$

吸入チャンバー内； $50 \pm 20\%$

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；15～17 回／時

吸入試験室；7～9 回／時

吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回／時

圧 力 : 吸入チャンバー内 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

ケージへの動物の収容方法 : 検疫期間；群飼（5 匹）、馴化・投与期間；単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

検疫期間；ステンレス製群飼網ケージ（340(W)×294(D)×176(H) mm/5 匹）

馴化期間；ステンレス製 6 連網ケージ（125(W)×216(D)×176(H) mm/匹）

投与期間；ステンレス製 5 連網ケージ（150(W)×216(D)×176(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)千葉工場製造の CRF-1固型 (30kGy- γ 線照射滅菌飼料)を自由摂取させた。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。

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)から分析データ入手し、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、自動給水ノズルから自由摂取させた。

飲水の水質については、試験施設として3ヶ月ごとに実施している水質検査((財)食品薬品安全センター秦野研究所に依頼)で、建築物衛生法施行規則第4条に基づく水質基準に適合していることを確認し、その記録は保管した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-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。

II-3-2 体重測定

体重測定は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)行った。定期解剖日には絶食後の体重(搬出時体重)を測定した。

また、死亡及び瀕死の動物は、飼育室からの搬出時に体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始後14週間は週1回、それ以降は4週に1回(104週にも測定)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。

II-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、イソフルラン麻酔下で開腹し、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

II-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、イソフルラン麻酔下で開腹し、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、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

II-3-6 尿検査

投与 104 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（マルティスティックス、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、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

II-3-7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について肉眼的に観察を行った。なお、瀕死動物及び定期解剖動物はイソフルラン麻酔下で腹大動脈を切断し、放血することで安楽死させた。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について、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：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・エオジン染色を行い、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 8）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、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、陰、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

II-4 数値処理と統計方法

II-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、整数値の 1 の位まで測定し、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。

II-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うち非腫瘍性病変については、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、 χ^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 χ^2 検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担腫瘍臓器数について、Peto 検定（文献 9）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテキスト(注)を用いて、死亡率法（コンテキスト 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテキスト 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法＋有病率法（コンテキスト 0～4 の総計で検定）を行った。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、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。

注： Peto 検定に用いるコンテキスト

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思いが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍

4：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 及び FIGURE 1, 2 に示した。

—雄—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：41 匹（82%）、0.1 ppm 群：40 匹（80%）、0.5 ppm 群：37 匹（74%）、2 ppm 群：42 匹（84%）であった。

—雌—

投与期間の終盤、2 ppm 群の生存率が低下した。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：43 匹（86%）、0.1 ppm 群：42 匹（84%）、0.5 ppm 群：41 匹（82%）、2 ppm 群：34 匹（68%）であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 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。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE D 1～4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

—雄—

2 ppm 群では投与開始週より体重増加に抑制がみられ、投与期間を通じて対照群より低値で推移した。また、0.1 ppm 群は投与 9 週から 30 週及び投与期間終盤に対照群よりやや低値であった。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 0.1 ppm 群：96%、0.5 ppm 群：99%、2 ppm 群：88%であった。

—雌—

2 ppm 群では投与開始週より体重増加に抑制がみられ、投与期間を通じて対照群より低値またはやや低値で推移した。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 0.1 ppm 群：101%、0.5 ppm 群：98%、2 ppm 群：95%であった。

Ⅲ－４ 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1～4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

－雄－

2 ppm 群は投与期間を通じて対照群より低値であった。

－雌－

2 ppm 群は投与開始から投与 14 週まで対照群より低値であった。

Ⅲ－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－

MCV と MCH の低値が 2 ppm 群にみられた。

－雌－

血小板数の高値が 2 ppm 群にみられた。

Ⅲ－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－

AST、ALT、ALP の高値及び総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、クレアチニン、カルシウムの低値が 2 ppm 群でみられた。

その他、A/G 比とクロールの高値が 2 ppm 群でみられたが、それぞれ変化が少なく被験物質の影響と考えなかった。

－雌－

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、グルコースの低値と尿素窒素の高値が 0.5 ppm 群で、LDH の高値が 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。

Ⅲ－７ 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

－雄－

蛋白陽性度の減少が 2 ppm 群でみられた。

—雌—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、蛋白陽性度の増加が 0.1 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応したものではなかった。

III-8 病理学的検査

III-8-1 肉眼的観察

解剖時の肉眼的観察結果を TABLE I 1, 2 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる所見の増加は認められなかった。

III-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—

脾臓と肝臓の実重量と体重比の低値が 2 ppm 群でみられた。また、腎臓の実重量の低値が全投与群でみられたが、それぞれの体重比には変化はみられなかった。

その他、2 ppm 群で副腎の実重量の低値、心臓、肺、脳の体重比の高値がみられたが、これらの変化は 2 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。また、精巣の体重比の高値が 0.5 ppm 群で、脳の体重比の高値が 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。

—雌—

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 群で肺の体重比の高値がみられたが、この変化は 2 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。

III-8-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE L 1, 2 に、統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）の結果を TABLE M 1, 2 に示し、本項で取り上げた腫瘍については、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ（検査総匹数と腫瘍発生匹数、試験ごとの平均発生率(%)と発生率（最小%～最大%））を TABLE N 1, 2 に示した。また、非腫瘍性病変は TABLE O 1, 2 に、転移性病変は TABLE P 1, 2 に示した。さらに、病理組織所見の代表例を写真 1～6 に示した。

—雄—

1) 腫瘍性病変

<鼻腔>

扁平上皮癌の発生が 2 ppm 群に 1 匹 (2%) 認められた。扁平上皮癌は当センターのヒストリカルコントロールデータにはみられない (検査総匹数 599 匹、腫瘍発生匹数 0 匹) 極めて稀な腫瘍である。扁平上皮癌は、腫瘍細胞の異型が明らかであり、扁平上皮における正常な層状分化の過程を取らない増殖を示した。

2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

呼吸上皮、嗅上皮、固有層の腺、嗅上皮の固有層及び骨 (甲介) に病変の増加が観察された。

呼吸上皮には、炎症、扁平上皮化生、移行上皮過形成及び杯細胞過形成の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、これらの病変の程度は軽度から中等度であった。嗅上皮には、エオジン好性変化、呼吸上皮化生及び萎縮の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、エオジン好性変化の程度は軽度から重度、呼吸上皮化生と萎縮の程度は軽度から中等度であった。呼吸上皮や嗅上皮の固有層に分布する腺には、呼吸上皮化生の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、病変の程度は軽度から重度であった。また、嗅上皮の粘膜固有層には、浮腫と横紋筋の増殖の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、これらの病変の程度は軽度から中等度であった。さらに、甲介の癒着の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、病変の程度は軽度であった。また、鼻腔には異物性炎症の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、この病変の程度は軽度から中等度であった。

移行上皮の過形成は線毛を持たない呼吸上皮細胞の増殖であり、過形成には壊死や変性、炎症性細胞浸潤を伴っていた。嗅上皮粘膜の固有層に認められた浮腫と横紋筋の増殖は、鼻腔の中ほどの第 2 レベルの背側で認められるものが多かった。横紋筋の増殖では、横紋筋組織にみられる横紋が確認された。

<その他>

0.1 ppm 群では眼球に白内障の程度の増強がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。また、肝臓の好酸性小増殖巣が 0.1 と 2 ppm 群で発生匹数の減少、腎臓の慢性腎症が 2 ppm 群で程度の減弱がみられた。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<鼻腔>

扁平上皮癌の発生が 2 ppm 群に 2 匹 (4%) 認められた。扁平上皮癌は当センターのヒス

トリカルコントロールデータにはみられない（検査総匹数 600 匹、腫瘍発生匹数 0 匹）極めて稀な腫瘍である。扁平上皮癌の形態は、雄と同様であった。

また、横紋筋腫の発生が Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。横紋筋腫は、当センターのヒストリカルコントロールデータにはみられない（検査総匹数 600 匹、腫瘍発生匹数 0 匹）極めて稀な腫瘍であるが、本試験における横紋筋腫の発生は 2 ppm 群で 4 匹（8%）であった。従って、横紋筋腫の発生増加は被験物質の暴露によるものと考えられた。横紋筋腫は鼻腔の中ほどの第 2 レベルの背側にある嗅上皮の固有層に認められ、横紋を有する横紋筋組織が塊状に増殖する形態を示していた。

なお、上記の鼻腔に認められた腫瘍（扁平上皮癌と横紋筋腫）を合わせた発生は 2 ppm 群で 6 匹となり、Peto 検定（有病率法、死亡率法＋有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2 ppm 群で増加を示した。

<下垂体>

腺腫の発生は Peto 検定（死亡率法）で増加傾向を示した。しかしながら、その発生は 0 ppm 群 14 匹（28%）、0.1 ppm 群 15 匹（30%）、0.5 ppm 群 20 匹（40%）、2 ppm 群 17 匹（34%）であり、いずれもヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 22%～最大 42%、平均発生率 27.5%）内であり、また、投与濃度に対応した増加ではなかった。従って、腺腫の発生増加は、被験物質の暴露によるものとは判断しなかった。

2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

呼吸上皮、嗅上皮、固有層の腺、嗅上皮の固有層及び骨（甲介）に病変の増加が観察された。

呼吸上皮には、炎症、扁平上皮化生、移行上皮過形成及び杯細胞過形成の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、炎症と扁平上皮化生の程度は軽度から中等度、移行上皮過形成と杯細胞過形成の程度は軽度であった。嗅上皮には、呼吸上皮化生と萎縮の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、萎縮の程度は軽度から重度、呼吸上皮化生の程度は軽度から中等度であった。呼吸上皮や嗅上皮の固有層に分布する腺には、呼吸上皮化生の程度の増強が 2 ppm 群で認められ、この病変の程度は軽度から重度であった。嗅上皮の粘膜固有層には、浮腫の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、病変の程度は軽度であった。また、嗅上皮の粘膜固有層には、横紋筋の増殖の発生が 2 ppm 群で認められ、病変の程度は軽度から重度であった。さらに、甲介の癒着の発生が 2 ppm 群で認められ、病変の程度は軽度であった。また、鼻腔には異物性炎症の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められ、この病変の程度は軽度から中等度であった。

鼻腔に認められた病変の形態はいずれも雄と同様であった。また、固有層に認められた横紋筋の増殖は、横紋筋腫の発生と同じ部位に認められた。

<その他>

鼻腔の呼吸上皮のエオジン好性変化は全投与群で、腎臓の慢性腎症と眼球の白内障は 2 ppm 群でそれぞれ発生匹数が減少した。

III-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE Q 1, 2 に示した。

—雌雄—

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられなかった。

IV 考察及びまとめ

アクロレインのラットを用いた 2 年間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：0、0.1、0.5 及び 2 ppm）を行った結果、雌雄の投与群に鼻腔の腫瘍の発生がみられた。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

動物の生存率は、雌の 2 ppm 群で投与期間の終盤、やや低下した。一般状態では、雌雄ともアクロレインの影響と思われる所見はみられなかった。

体重は、雌雄の 2 ppm 群で増加の抑制がみられ、雄は投与期間を通じて対照群より低値、雌は投与期間を通じて対照群より低値またはやや低値で推移した。摂餌量は、雄では 2 ppm 群で投与期間を通じて、雌は 2 ppm 群で投与 14 週まで、それぞれ対照群より低値であった。

IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

雌雄とも、鼻腔に腫瘍の発生が認められた。

鼻腔に扁平上皮癌の発生が 2 ppm 群で雄 1 匹、雌 2 匹に認められた。扁平上皮癌は扁平上皮由来の悪性腫瘍であり、当センターのヒストリカルコントロールデータでは、雌雄とも発生のみられない（雄：検査総匹数 599 匹、腫瘍発生匹数 0 匹、雌：検査総匹数 600 匹、腫瘍発生匹数 0 匹）極めて稀な腫瘍である。なお、当センターで実施したがん原性試験の対照群、雄 3148 匹、雌 2947 匹でも発生がみられていない。さらに、腫瘍の前段階と考えられる（文献 10、11）呼吸上皮の扁平上皮化生と移行上皮過形成の発生増加が雌雄の 2 ppm 群にみられた。

また、雌では鼻腔に横紋筋腫の発生が 2 ppm 群で 4 匹に認められた。横紋筋腫は横紋筋組織由来の良性腫瘍であり、その発生は増加傾向（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定）を示した。横紋筋腫も当センターのヒストリカルコントロールデータでは発生のみられない（検査総匹数 600 匹、腫瘍発生匹数 0 匹）極めて稀な腫瘍である。さらに、嗅上皮の粘膜固有層には、腫瘍の前段階と考えられる横紋筋増殖の発生増加が 2 ppm 群にみられた。この横紋筋の増殖は、横紋筋が本来、存在しない部位に認められ、極めて稀な変化であるが、横紋筋腫の増殖形態と極めて類似していることから、腫瘍に関連する変化と考えた。

従って、雌雄の鼻腔の扁平上皮癌の発生及び雌の鼻腔の横紋筋腫の発生は、雌雄ラットに対するがん原性を示す証拠と考えられた。

なお、雄でも鼻腔の嗅上皮の粘膜固有層には、腫瘍の前段階と考えられる横紋筋増殖の発生増加が 2 ppm 群にみられたが、腫瘍の発生には至らなかった。

IV-3 その他の影響

血液学的検査では、雄で MCV と MCH の低値が 2 ppm 群に、雌で血小板数の高値が 2 ppm 群にみられた。血液生化学的検査では、雄で AST、ALT、ALP の高値及び総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、クレアチニン、カルシウムの低値が 2 ppm 群でみられた。また、尿検査では、雄で蛋白陽性度の減少が 2 ppm 群でみられた。血液、尿の検査とも変化がみられたのは 2 ppm 群であったが、それらの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。

解剖時の肉眼的観察ではアクロレインの影響と思われる所見の増加は認められなかった。臓器重量では、雄で脾臓と肝臓の重量低下（実重量と体重比）が 2 ppm 群で、腎臓の重量低下（実重量）が全投与群でみられたが、脾臓、肝臓、腎臓には関連すると思われる病理組織学的変化はみられなかった。

病理組織学的検査では雌雄とも鼻腔に影響がみられた。鼻腔では、呼吸上皮の炎症、扁平上皮化生、移行上皮過形成、杯細胞過形成、嗅上皮の呼吸上皮化生、萎縮、固有層の腺の呼吸上皮化生、嗅上皮の粘膜固有層の浮腫、横紋筋の増殖及び甲介の癒着の発生匹数の増加または程度の増強が雌雄の 2 ppm 群で認められた。また、雄では嗅上皮のエオジン好性変化の発生匹数の増加が 2 ppm 群で認められた。

呼吸上皮の炎症は傷害を示す変化であり、呼吸上皮の扁平上皮化生は傷害に対する修復や慢性炎症に伴って認められる変化である（文献 11）。また、嗅上皮にも傷害による萎縮と傷害の修復である呼吸上皮化生が認められた。嗅上皮や腺の呼吸上皮化生は傷害を受けた上皮の修復像としてみられることが知られている（文献 10、11）。粘膜固有層の浮腫は、萎縮や呼吸上皮化生を起こした嗅上皮の固有層に認められ、横紋筋の増殖が起きた部位にみられた。

以上のように、アクロレインの暴露による傷害は鼻腔の上皮やその固有層及び甲介にかけてみられ、上皮や固有層においてはその傷害に伴った修復反応や腫瘍に関連する変化がみられた。なお、雄で増加した嗅上皮のエオジン好性変化は、加齢性変化として高齢ラットの発生増加が報告されている（文献 8）。本試験でみられた嗅上皮のエオジン好性変化の増加は、加齢性変化をアクロレインの暴露が増強したものと考えられた。

本試験の予備試験として当センターで実施した 13 週間試験（文献 5）では、アクロレインの鼻腔への毒性影響は、傷害性変化とそれに対する修復性変化（上皮の再生、扁平上皮化生、過形成等）が雌雄とも 1 ppm 群まで認められた。104 週間吸入試験では、鼻腔への毒性影響は、2 ppm 群のみに認められ、0.5 ppm 以下の群には認められなかった。

V 結論

F344/DuCrIcrlj ラットを用いて、アクロレインの 2 年間（104 週間）にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、以下の結論を得た。

雌雄とも鼻腔に扁平上皮癌の発生が認められた。また、雌では鼻腔に横紋筋腫の発生が認められた。これらの腫瘍の発生は雌雄ラットに対するがん原性を示す証拠と考えられた。

VI 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. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準.
基発第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日.
4. OECD. 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
5. 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.
6. ACGIH. 2001. Acrolein. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. ACGIH
7. 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.
8. 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.
9. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2: 311-426.
10. 長野嘉介. 2000. 各論 1 章, 上部気道. 毒性病理組織学 (日本毒性病理学会編). 名古屋: 日本毒性病理学会, 99-116.

11. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, March T, Nagano K, Pino M, Rittinghausen S, Rosenbruch M, Tellier P, Wohrmann T. 2009. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicol Pathol* 37: 5S-73S.

VII 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。