

アクロレインのマウスを用いた吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0817

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～Q2	
FIGURES	1～6	
PHOTOGRAPHS	1～6	
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がん原性試験

試験目的

アクロレインを雄マウスに 93 週間、雌マウスに 99 週間、それぞれ全身暴露し、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

アクロレインのマウスを用いた吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0817

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	9
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	10
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	16
Ⅳ 考察及びまとめ	17
Ⅳ－1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	17
Ⅳ－2 腫瘍性及び腫瘍関連病変	17
Ⅳ－3 その他の影響	17

V	結論	19
VI	文献	20
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	22

要約

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雄マウス 93 週間、雌マウス 99 週間の試験を実施した。なお、試験期間は雌雄とも 104 週間の予定であったが、対照群の生存率が 25%を下回ったため、試験期間を短縮した。

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 日間で雄マウス 93 週間、雌マウス 99 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、0.4 及び 1.6 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、動物の生存率及び一般状態に雌雄ともアクロレインの影響はみられなかった。なお、雌雄とも腎臓病変とアミロイドの沈着による死亡の増加により、各群で生存率が低下した。体重は、雌雄の 1.6 ppm 群で増加に抑制がみられ、雄は投与期間を通じて対照群より低値、雌は投与 82 週まで対照群よりやや低値で推移した。摂餌量は、雄では 1.6 ppm 群が投与 26 週以降、雌は 1.6 ppm 群が投与 18 週以降、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、雌で鼻腔に腫瘍の発生増加が認められた。雄では腫瘍の発生増加はみられなかった。

雌では、1.6 ppm 群で鼻腔に腺腫の発生増加が認められた。また、腫瘍の前段階と考えられる呼吸上皮の過形成の発生増加が 0.4 ppm 以上の群にみられた。雄では、鼻腔に腫瘍の前段階と考えられる呼吸上皮や移行上皮の過形成の発生増加が 1.6 ppm 群にみられたが、腫瘍の発生増加には至らなかった。

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、再生、過形成、扁平上皮化生、エオジン好性変化、移行上皮の過形成）、嗅上皮（呼吸上皮化生、萎縮）、固有層の腺（呼吸上皮化生）、鼻腔内（滲出液貯留）及び甲介（癒着、萎縮）に暴露の影響がみられ、また、少数ではあるが中隔欠損もみられた。これらの影響がみられた濃度は、雄ではいずれも 1.6 ppm、雌では呼吸上皮の炎症と過形成は 0.4 ppm 以上、その他の病変は 1.6 ppm であった。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いて、アクロレインの雄 93 週間、雌 99 週間の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。

雄では、腫瘍の発生増加は認められず、アクロレインの雄マウスに対するがん原性はなかった。

雌では、鼻腔の腺腫の発生増加が認められ、この腫瘍の発生増加は雌マウス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（マウス 雄）

	投 与 濃 度 (ppm)		0	0.1	0.4	1.6	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良 性 腫 瘍	鼻腔	腺腫	0	0	0	1		
	肝臓	血管腫	0	4	2	1		
	肝臓	肝細胞腺腫	4	1	3	3		
悪 性 腫 瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	1	3	2	4		

アクロレインのがん原性試験における主な腫瘍発生（マウス 雌）

	投 与 濃 度 (ppm)		0	0.1	0.4	1.6	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良 性 腫 瘍	鼻腔	腺腫	0	0	0	16 **	↑↑	↑↑
	肺	細気管支－肺胞上皮腺腫	1	3	0	0		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	1	1	2	3		
悪 性 腫 瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	12	8	6	17		↑
	肝臓	組織球性肉腫	0	2	0	3		
	子宮	組織球性肉腫	6	13	14 *	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 B6D2F1/Crlj マウス（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：22.1～25.4g、雌：18.0～21.2g）を選別し、試験に用いた。

なお、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。

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、雄は93週間、雌は99週間とし、雄は計440回、雌は計466回の暴露を行った。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、0.1、0.4及び1.6 ppm（体積比 v/v）の3段階（公比4）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。しかし、雄では投与93週に、雌は投与99週に対照群の生存動物数が25%を下回った。対照群の定期解剖時の動物数を確保するため、雄の投与を93週、雌の投与を99週で終了し、動物を解剖した。

投与濃度は13週間試験（試験番号0783）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、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 群の雌に異常呼吸音がみられた。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2 ppm 群と同様の変化がみられたが、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1.6 ppm とし、以下、0.4 ppm、0.1 ppm（公比4）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、その平均値は設定濃度どおりで、変動係数（標準偏差／平均値×100）が 0.6%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）
0.4 ppm 群	50 匹（1201～1250）	50 匹（2201～2250）
1.6 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（502 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（502 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； $23.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、518 室； $22.7 \pm 0.0^{\circ}\text{C}$ ＞

吸入試験室； $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ＜502 室； $21.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ＞

吸入チャンバー内； $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 検疫室； $55 \pm 15\%$ ＜517 室； $53 \pm 1\%$ 、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 : 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)から分析データを入手し、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（雄は 93 週、雌は 99 週にも測定）を行った。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、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、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

雄は投与 91 週、雌は投与 97 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（ウロラプスティックス、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

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、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

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、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。

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クス(注)を用いて、死亡率法（コンテクス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテクス 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（コンテクス 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クス

- 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 だと思うが、確かでない腫瘍
- 3：多分 4 だと思うが、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。なお、腎臓病変とアミロイドの沈着による死亡の増加により、各群で生存率が低下した。

各群の 93 週における生存動物数（生存率）は、対照群：11 匹（22%）、0.1 ppm 群：15 匹（30%）、0.4 ppm 群：14 匹（28%）、1.6 ppm 群：15 匹（30%）であった。

—雌—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。なお、腎臓病変とアミロイドの沈着による死亡の増加により、各群で生存率が低下した。

各群の 99 週における生存動物数（生存率）は、対照群：11 匹（22%）、0.1 ppm 群：18 匹（36%）、0.4 ppm 群：14 匹（28%）、1.6 ppm 群：19 匹（38%）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—

1.6 ppm 群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 3 週から 18 週にかけて対照群よりやや低値であったが、その後、回復した。

最終計測日（93 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 0.1 ppm 群：89%、0.4 ppm 群：95%、1.6 ppm 群：83%であった。

—雌—

1.6 ppm 群は投与開始週より体重増加に抑制がみられ、投与 82 週まで対照群よりやや低値で推移した。また、0.1 ppm 群は投与 2 週から 14 週にかけて対照群よりやや低値であったが、その後、回復した。

最終計測日（99 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 0.1 ppm 群：104%、0.4 ppm 群：111%、1.6 ppm 群：101%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—

1.6 ppm 群は投与 26 週以降、対照群より低値であった。

—雌—

1.6 ppm 群は投与 18 週以降、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。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

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—

トリグリセライドの低値と CK の高値が 1.6 ppm 群でみられた。

その他、トリグリセライドの低値、CK の高値が 0.1 ppm 群でもみられたが、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。

III-7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

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－

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、1.6 ppm 群で肝臓の実重量の低値、副腎と肺の体重比の高値がみられたが、これらの変化は 1.6 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。

－雌－

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

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>

腺腫の発生が 1.6 ppm 群に 1 匹（2%）認められた。しかしながら、1.6 ppm 群の腺腫の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 0%～最大 2%、平均発生率 0.2%）内であった。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、鼻腔内及び骨（甲介、中隔）に病変の増加が観察された。

呼吸上皮には、エオジン好性変化、炎症、再生、過形成の発生匹数の増加が 1.6 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。また、扁平上皮化生と移行上皮過形成の発生匹数の増加が 1.6 ppm 群で認められ、これらの病変の程度はいずれも軽度であった。嗅上皮には、呼吸上皮化生と萎縮の発生匹数の増加が 1.6 ppm 群で認められ、呼吸上皮化生の程度は軽度から中等度、萎縮の程度は軽度であった。さらに、呼吸上皮や嗅上皮の固有層に分布する腺の呼吸上皮化生の発生増加と程度の増強が 1.6 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。鼻腔内には滲出液の発生匹数の増加が 1.6 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。また、甲介の萎縮と癒着の発生匹数の増加が 1.6 ppm 群で認められ、これらの病変の程度はいずれも軽度であった。上記に加え、中隔欠損が 1.6 ppm 群に 2 匹みられ、程度は軽度であった。なお、呼吸上皮の過形成は線毛を持つ呼吸上皮細胞の増殖、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、これらの上皮過形成には壊死や変性、または炎症性細胞浸潤を伴っていた。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<鼻腔>

腺腫の発生は Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 1.6 ppm 群に増加がみられた。腺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 500 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 1.6 ppm 群の腺腫の発生は 16 匹（32%）であった。従って、腺腫の発生増加は被験物質の暴露によるものと考えられた。腺腫は鼻腔先端側に位置する第 1 レベルの中隔の線毛を待つ呼吸上皮分布領域にみられ、腫瘍細胞は鼻腔内に突出する乳頭状増殖や固有層内に増殖する形態を示していた。

<リンパ節>

悪性リンパ腫の発生は Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。しかしながら、1.6 ppm 群における悪性リンパ腫の発生（17 匹、34%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 28%～最大 46%、平均発生率 33.8%）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、悪性リンパ腫の発生増加は、被験物質の暴露によるものとは判断しなかった。

<子宮>

組織球性肉腫の発生は Fisher 検定で 0.4 ppm 群に増加がみられた。しかしながら、0.4

ppm 群における組織球性肉腫の発生（14 匹、28%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 18%～最大 34%、平均発生率 22.8%）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、組織球性肉腫の発生増加は、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、鼻腔内及び骨（甲介骨、中隔）に病変の増加が観察された。

呼吸上皮には、炎症と過形成の発生匹数の増加が 0.4 ppm と 1.6 ppm 群で認められ、再生と扁平上皮化生の発生匹数の増加が 1.6 ppm 群で認められた。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、呼吸上皮化生の発生匹数の増加と程度の増強が 1.6 ppm 群で認められ、病変の程度は軽度から中等度であった。また萎縮の発生匹数の増加が 1.6 ppm 群で認められ、その程度はいずれも軽度であった。さらに、呼吸上皮や嗅上皮の固有層に分布する腺の呼吸上皮化生の発生増加と程度の増強が 1.6 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。鼻腔内には滲出液の発生匹数の増加が 1.6 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。上記に加えて、1.6 ppm 群では、甲介骨の癒着が 3 匹、萎縮が 1 匹、中隔欠損が 2 匹に認められ、これらの病変の程度はいずれも軽度であった。呼吸上皮と移行上皮の過形成は雄と同様の形態を示した。また、呼吸上皮の過形成がみられた部位は主に腺腫のみられた部位と同じ鼻腔先端側に位置する第 1 レベルの中隔であった。

<その他>

0.4 ppm 群で腺胃の過形成、0.1 ppm 群で卵巣の萎縮の程度の増強がみられたが、それぞれ投与濃度に対応した変化ではなかった。また、卵巣のアミロイド沈着の程度が 1.6 ppm 群で減弱した。

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。

なお、雌雄とも対照群を含めた全ての群において、腎臓病変とアミロイドーシスによる死亡が多くみられた。腎臓病変による死亡は腎硬化症、糸球体へのアミロイド沈着、乳頭壊死等によるものであり、アミロイドーシスによる死亡は多臓器へのアミロイド沈着、特に心臓や肺への沈着によるものであった。

IV 考察及びまとめ

アクロレインのマウスを用いた、雄 93 週間、雌 99 週間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：0、0.1、0.4 及び 1.6 ppm）を行った結果、雌の投与群に鼻腔の腫瘍の発生増加がみられた。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

動物の生存率には、雌雄とも投与群にアクロレインの影響はみられなかった。なお、腎臓病変とアミロイドの沈着による死亡の増加により、雌雄とも各群で生存率が低下した。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 1.6 ppm 群で増加に抑制がみられ、雄は投与期間を通じて対照群より低値、雌は投与 82 週まで対照群よりやや低値で推移した。摂餌量は、雄では 1.6 ppm 群が投与 26 週以降、雌は 1.6 ppm 群が投与 18 週以降、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

雌では、鼻腔に腫瘍の発生増加が認められた。一方、雄では腫瘍の発生増加はみられなかった。

雌では、鼻腔に腺腫の発生増加が認められた。腺腫は呼吸上皮や鼻腺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、Fisher 検定で 1.6 ppm 群に増加がみられた。腺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極めてまれな腫瘍であるが、1.6 ppm 群の腺腫の発生は 16 匹であった。さらに、腫瘍の前段階と考えられる（文献 10、11）呼吸上皮過形成の発生増加が 0.4 ppm 以上の群にみられた。従って、鼻腔の腺腫の発生増加は雌のマウスに対するがん原性を示す証拠と考えられた。

なお、雄では、鼻腔に腫瘍の前段階と考えられる（文献 10、11）呼吸上皮や移行上皮の過形成の発生増加が 1.6 ppm 群にみられたが、腫瘍の発生増加には至らなかった。

IV-3 その他の影響

血液学的検査、尿検査及び病理学的検査の肉眼的観察と臓器重量では、雌雄とも被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。血液生化学的検査では、雄にトリグリセライドの低値と CK の高値が 1.6 ppm 群でみられたのみであった。

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、再生、過形成、扁平上皮化生、エオジン好性変化、移行上皮の過形成、嗅上皮の呼吸上皮化生と萎縮、固有層の腺の呼吸上皮化生、鼻腔内の滲出液貯留、甲介の癒着と萎縮の発生匹数の増加または

程度の増強がみられた。また、少数ではあるが中隔欠損もみられた。これらの影響がみられた濃度は、雄ではいずれも 1.6 ppm であり、雌では呼吸上皮の炎症と過形成は 0.4 ppm 以上、その他の病変は 1.6 ppm であった。

呼吸上皮には傷害を示す変化として炎症が認められた。呼吸上皮の再生は傷害の修復による変化であり、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、嗅上皮にも傷害を示す変化として萎縮が認められた。嗅上皮や固有層の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おり（文献 10、11）、呼吸上皮化生は傷害に伴った修復反応と考えられた。さらに、甲介の萎縮や中隔欠損は傷害性の変化であり、アクロレインの暴露による傷害性変化は鼻腔の骨に達していた。従って、アクロレインの暴露による傷害は鼻腔の上皮から骨にかけてみられ、上皮や固有層においてはその傷害に伴った修復反応がみられた。なお、雄に呼吸上皮のエオジン好性変化の発生匹数の増加が認められたが、エオジン好性変化は加齢性変化として高齢のマウスでの発生増加が報告されている（文献 8）。本試験でみられた呼吸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、鼻腔の呼吸上皮（再生、過形成、扁平上皮化生、炎症性細胞浸潤、エオジン好性変化）、嗅上皮（萎縮、呼吸上皮化生、炎症性細胞浸潤、嗅神経と嗅腺の萎縮）、鼻腔内（滲出液の貯留）及び甲介（萎縮）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 群までみられた。13 週間試験でみられたこれらの病変は、アクロレイン暴露による鼻腔への傷害とそれに対する修復による変化であり、本試験（雄 93 週間、雌 99 週間試験）でみられた鼻腔の病変も同様の機作による変化であった。13 週間試験で 1 ppm 群までみられた呼吸上皮の炎症や過形成は、本試験の雌（99 週間試験）では 0.4 ppm 群までみられており、暴露期間の延長により鼻腔の呼吸上皮への影響がさらに低い濃度までみられた。

なお、本試験においては、雌雄とも腎臓病変とアミロイドの沈着による死亡の増加により、各群で生存率が低下した。当初、試験期間は雌雄とも 2 年間（104 週間）を予定していたが、雄では投与 93 週に、雌は投与 99 週にそれぞれ対照群の生存率が 25% を下回った。対照群の定期解剖時の動物数を確保するため、雄の投与を 93 週、雌の投与を 99 週で終了し、動物を解剖した。

V 結論

B6D2F1/Crlj マウスを用いて、アクロレインの雄 93 週間、雌 99 週間の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。

雄では、腫瘍の発生増加は認められず、アクロレインの雄マウスに対するがん原性はなかった。

雌では、鼻腔の腺腫の発生増加が認められ、この腫瘍の発生増加は雌マウス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. アクロレインのマウス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。