

メタクリル酸ブチルのラットを用いた
吸入による 13 週間毒性試験報告書

試験番号：0829

CAS No. 97-88-1

2015 年 3 月 23 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～L 2
FIGURES	1～4
APPENDICES	1-1～3

標題

メタクリル酸ブチルのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験

試験目的

メタクリル酸ブチル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、メタクリル酸ブチルをラットに 13 週間全身暴露（経気道投与）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 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、平成 25 年 3 月 28 日改正、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

メタクリル酸ブチルのラットを用いた
吸入による 13 週間毒性試験報告書

試験番号：0829

本文

本文目次

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

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 尿検査	8
Ⅱ－3－5 血液学的検査	8
Ⅱ－3－6 血液生化学的検査	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	11
Ⅲ－1 生死状況	11
Ⅲ－2 一般状態	11
Ⅲ－3 体重	11
Ⅲ－4 摂餌量	11
Ⅲ－5 血液学的検査	12
Ⅲ－6 血液生化学的検査	12
Ⅲ－7 尿検査	12
Ⅲ－8 病理学的検査	13
Ⅲ－8－1 肉眼的観察	13
Ⅲ－8－2 臓器重量	13
Ⅲ－8－3 病理組織学的検査	13
Ⅳ 考察及びまとめ	15
Ⅳ－1 用量－反応関係	15
Ⅳ－2 無毒性量 (NOAEL)	16
Ⅳ－3 がん原性試験の濃度決定	16

V	文献	18
VI	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	19

要約

メタクリル酸ブチルのがん原性を検索する目的でF344/DuCrIjラット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、メタクリル酸ブチルを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)、63、125、250、500及び1000 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、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。

メタクリル酸ブチルの暴露の結果、雌雄とも全群で動物の死亡はみられず、一般状態観察でも影響は認められなかった。体重増加の抑制が、1000 ppm群の雄では投与期間を通して、雌では投与8週目以降認められた。摂餌量も雌雄の1000 ppm群でほぼ投与期間を通して低値であった。

血液学的検査では、雌雄とも軽度の貧血(赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値等)が認められ、赤血球数とヘマトクリット値への影響は雌雄とも125 ppm群までみられた。血液生化学検査では、摂餌量の減少と関連する変化と考えられるアルブミンの低値(雌の500 ppm以上の群)と総蛋白の低値(雌雄の1000 ppm群)がみられた。その他、いくつかの項目で変化がみられたが、被験物質暴露に関連すると考えられる病理組織学的変化はみられなかった。

病理学的検査の肉眼的観察では、雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。臓器重量では、胸腺の実重量(雄の500 ppm以上の群)と体重比(雄の1000 ppm群)が低値を示し、腎臓の体重比(雄の125 ppm以上の群、雌の500 ppm以上の群)が高値を示した。

病理組織学的検査では、被験物質暴露による影響は鼻腔にのみ認められた。1000 ppm群では、雌雄とも鼻腔の嗅上皮に空胞変性と再生性の変化が認められた。また、雌では嗅上皮の萎縮と呼吸上皮の炎症がみられた。鼻腔への影響は雌雄とも125 ppm群までみられた。その他の臓器、組織には被験物質暴露の影響と考えら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、本試験におけるメタクリル酸ブチルのラットに対する13週間吸入暴露による無毒性量(NOEL)は、血液系と鼻腔への影響をエンドポイントとして63 ppmであると考えられた。また、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも最高濃度を500 ppmとし、以下、125 ppm、30 ppmと決定した。

I 試験材料

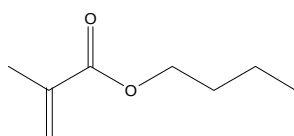
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : メタクリル酸ブチル (Butyl methacrylate)
別 名 : n-ブチルメタクリレート
C A S N o . : 97-88-1

I-1-2 構造式及び分子量 (文献 1、2)

構 造 式 :



分 子 量 : 142.20

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1、2)

性 状 : 無色透明の液体
比 重 : 0.8936 (20°C)
沸 点 : 160°C
蒸 気 圧 : 2.12 mmHg (25°C)
溶 解 性 : エタノール、エチルエーテルに可溶。水に800mg/L (25°C) 溶解
保 管 条 件 : 室温、暗所に保管

I-2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 和光純薬工業(株)
規 格 : 和光一級
純 度 : 99.8 % (和光純薬工業(株)検査成績データ)
ロ ッ ト 番 号 : AWK4433

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) にて測定した。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 3) と同じフラグメントピークを示し、被験物質はメタクリル酸ブチルであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示す。

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 に示す。

I-4 試験動物

動物は、メタクリル酸ブチル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) の F344/DuCrI CrIj ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 72 匹を 4 週齢で導入し、検疫を 7 日間、馴化を 8 日間実施した後、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: 106~120 g、雌: 89~98 g) を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCrI CrIj 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13週間とし、計61回の暴露を行った。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、63、125、250、500及び1000 ppm（体積比 v/v）の5段階（公比2）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。

投与時間はOECD化学品テストガイドライン413（文献4）に従い1日6時間とした。

投与濃度は2週間試験（試験番号0818）の結果をもとに決定した（文献5）。2週間試験は、0（対照群）、63、125、250、500及び1000 ppmの濃度で行った。その結果、雌雄ともすべての投与群で動物の死亡は認められなかった。1000 ppm群では、雄で体重増加抑制（最終体重は対照群に対して93%）が認められたが、一般状態観察、解剖時の肉眼的観察及び臓器重量では、雌雄とも投与による影響は認められなかった。血液学的検査では、雌雄で血小板数の低値、雄でASTとALTの高値が認められた。病理組織学的検査では、雌雄とも鼻腔の呼吸上皮に炎症と扁平上皮化生が、雄の嗅上皮に壊死がみられたが、いずれも

軽度の変化であった。また、雌雄ともそれらの傷害性変化に続発した再生性の変化がみられた。500 ppm 群では、雌で血小板数の低値、雌雄で鼻腔の呼吸上皮に再生性変化がみられたのみであった。250 ppm 以下の群では、被験物質投与による変化は認められなかった。これらのことから、13 週間試験の最高濃度は軽度な毒性影響が認められた 1000 ppm が適切と考えた。

従って、13 週間試験の投与濃度は 1000 ppm を最高濃度として、以下、500、250、125 及び 63 ppm（公比 2、少数点以下第 1 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（柴田科学(株)特注）の発生容器内の被験物質を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のパ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（搬送空気）と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却、再加熱し、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-14A）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分毎に測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示す。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 0.4 %以内、変動係数（ $\text{標準偏差} / \text{平均値} \times 100$ ）が 0.5 %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。

Ⅱ－２ 動物管理

Ⅱ－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。

群 番 号	群 名 称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対 照 群	10 匹 (1001～1010)	10 匹 (2001～2010)
1	63 ppm群	10 匹 (1101～1110)	10 匹 (2101～2110)
2	125 ppm群	10 匹 (1201～1210)	10 匹 (2201～2210)
3	250 ppm群	10 匹 (1301～1310)	10 匹 (2301～2310)
4	500 ppm群	10 匹 (1401～1410)	10 匹 (2401～2410)
5	1000 ppm群	10 匹 (1501～1510)	10 匹 (2501～2510)

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 6）。

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（検疫 606 室、馴化・投与 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。

Ⅱ－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 に示す。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; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ <606 室; $22.9 \pm 0.0^{\circ}\text{C}$ >
 吸入試験室; $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ <604 室; $21.3 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ >
 吸入チャンバー内; $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$
 湿 度 : 検疫室; $55 \pm 15\%$ <606 室; $54 \pm 1\%$ >
 吸入試験室; $55 \pm 15\%$ <604 室; $60 \pm 2\%$ >
 吸入チャンバー内; $30 \sim 70\%$ (ただし、被験物質の湿度センサーへの
 付着により、正常な測定ができないため、投与群の湿度は暴露中及び暴
 露終了後 1 時間まで測定しなかった。)
 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 ; 10 ± 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 ($170(\text{W}) \times 294(\text{D}) \times 176(\text{H}) \text{ mm/匹}$)
 馴化期間; ステンレス製 6 連網ケージ ($125(\text{W}) \times 216(\text{D}) \times 176(\text{H}) \text{ mm/匹}$)
 投与期間; ステンレス製 5 連網ケージ ($150(\text{W}) \times 216(\text{D}) \times 176(\text{H}) \text{ mm/匹}$)

(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 CR-LPF 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絶食させた。

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。

(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。

なお、飲水は、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

週 1 回、全動物について、吸入暴露前の一般状態を詳細に観察した。その他の日は、暴露日は吸入暴露前に、非暴露日は午前中に生死及び瀕死を確認した。

II-3-2 体重測定

週 1 回、全動物について、吸入暴露前の体重を測定した。また、定期解剖日には絶食後の体重（搬出時体重）を測定した。なお、投与 10 週目（10 週-7 日）に体重の測定ミスがあり、10 週目（10 週-7 日）の全データを不採用として、11 週-3 日に体重を追加測定した。従って、11 週目の体重値は、11 週-3 日と 11 週-7 日のデータを報告書に記載した。（IV節参照）

II-3-3 摂餌量測定

週 1 回、全動物について、給餌量及び残餌量を測定し、1 日当たりの摂餌量を算出した。

II-3-4 尿検査

投与 13 週まで生存した採尿可能な動物から、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-3-5 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、剖検直前にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記※印検査項目）に採血した。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、クエン酸ナトリウム入り採血管の血液は遠心分離し、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 に示す。

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、※プロトロンビン時間、※活性化部分トロンボプラスチン時間、白血球数、白血球分類

Ⅱ－3－6 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、剖検直前にイソフルラン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 に示す。

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－3－7 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、定期解剖動物はイソフルラン麻酔下で採血後、腹大動脈を切断、放血することで安楽死させた。

(2) 臓器重量

定期解剖時の生存動物について、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 ヶ所の横断面で切り出し（文献 7）、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、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 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 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、 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。

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。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 に示す。

—雌雄—

全群で動物の死亡はみられなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示す。

—雌雄—

被験物質暴露によると考えられる一般状態への影響はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

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

—雄—

1000 ppm 群では、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、63 ppm 群：100 %、125 ppm 群：100 %、250 ppm 群：100 %、500 ppm 群：96 %、1000 ppm 群：87 %であった。

—雌—

1000 ppm 群では、投与 8 週目以降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、63 ppm 群：99 %、125 ppm 群：105 %、250 ppm 群：102 %、500 ppm 群：97 %、1000 ppm 群：90 %であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1～4 及び FIGURE 3, 4 に示す。

—雄—

1000 ppm 群では、ほぼ投与期間を通して摂餌量の低値がみられた。

13 週間の平均摂餌量は、対照群：16.5 g、63 ppm 群：16.7 g、125 ppm 群：16.5 g、250 ppm 群：16.3 g、500 ppm 群：16.3 g、1000 ppm 群：14.8 g であった。

—雌—

1000 ppm 群では、ほぼ投与期間を通して摂餌量の低値がみられた。

13 週間の平均摂餌量は、対照群：10.8 g、63 ppm 群：10.8 g、125 ppm 群：11.4 g、250

ppm 群：11.2 g、500 ppm 群：10.7 g、1000 ppm 群：9.7 g 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 に示す。

—雄—

赤血球数の低値が 125 ppm 以上の群でみられた。なお、ヘモグロビン濃度は 250 ppm 群と 1000 ppm 群で、ヘマトクリット値は 125、250 及び 1000 ppm 群で低値であった。また、MCV の高値が 500 ppm 以上の群で、MCH の高値が 1000 ppm 群でみられた。

—雌—

赤血球数の低値が 125、250 及び 500 ppm 群でみられた。なお、ヘマトクリット値は 125 ppm 群と 500 ppm 群で低値、網赤血球比は 125 ppm 群で高値であった。また、血小板数の低値、並びにプロトロンビン時間の延長が 1000 ppm 群でみられた。

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 の低値が 500 ppm 以上の群でみられた。また、カリウムの高値、並びに、総蛋白、総コレステロール、リン脂質、CK 及びカルシウムの低値が 1000 ppm 群でみられた。

その他、LDH の低値が 500 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

アルブミンの低値が 500 ppm 以上の群でみられた。また、総ビリルビン、ALP 及びカリウムの高値、並びに、総蛋白、CK 及びカルシウムの低値が 1000 ppm 群でみられた。

その他、トリグリセライドの低値が 125 ppm 群と 250 ppm 群で、ALT の低値が 125 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

III-7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示す。

—雌雄—

被験物質暴露によると考えられる影響はみられなかった。

Ⅲ－８ 病理学的検査

Ⅲ－８－１ 肉眼的観察

定期解剖時の肉眼的所見を TABLE I 1, 2 に示す。

－雌雄－

被験物質暴露の影響と考えられる所見はみられなかった。

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 に示す。

－雄－

胸腺で実重量の低値が 500 ppm 以上の群で、体重比の低値が 1000 ppm 群でみられた。また、腎臓で体重比の高値が 125 ppm 以上の群でみられた。

その他、1000 ppm 群ではいくつか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 1000 ppm 群の搬出時体重の低値に起因する変化と考えられる。

－雌－

腎臓で体重比の高値が 500 ppm 以上の群でみられた。

その他、1000 ppm 群ではいくつか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 1000 ppm 群の搬出時体重の低値に起因する変化と考えられる。また、125 ppm 群と 250 ppm 群ではいくつかの臓器で実重量や体重比の高値がみられたが、125 ppm 群と 250 ppm 群の搬出時体重は対照群より高値であり、これに起因する変化と考えられる。

Ⅲ－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－

被験物質暴露による影響は鼻腔（嗅上皮）に認められた。

[1000 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（中等度 10 匹）と再生（軽度 10 匹）の発生増加が認められた。

[500 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（軽度 10 匹）の発生増加が認められた。

[250 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（軽度 9 匹）の発生増加が認められた。

[125 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（軽度 8 匹）の発生増加が認められた。

[63 ppm 群]

被験物質暴露によると考えられる所見はみられなかった。

—雌—

被験物質暴露による影響は鼻腔（嗅上皮、呼吸上皮）に認められた。

[1000 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（中等度 10 匹）と再生（軽度 8 匹）の発生増加、及び萎縮（軽度 1 匹）が認められた。また、呼吸上皮の炎症（軽度 4 匹）がみられた。

[500 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（軽度 9 匹、中等度 1 匹）と萎縮（軽度 7 匹）の発生増加が認められた。また、呼吸上皮に炎症（軽度 1 匹）がみられた。

[250 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（軽度 9 匹）の発生増加と萎縮（軽度 5 匹）が認められた。また、呼吸上皮に炎症（軽度 2 匹）がみられた。

[125 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（軽度 4 匹）と萎縮（軽度 3 匹）、呼吸上皮に炎症（軽度 1 匹、中等度 1 匹）がみられた。

[63 ppm 群]

鼻腔の嗅上皮に空胞変性（軽度 2 匹）と萎縮（軽度 2 匹）、呼吸上皮に炎症（軽度 2 匹）がみられた。

[対照群]

対照群の鼻腔にも、嗅上皮の萎縮（軽度 1 匹）と呼吸上皮の炎症（軽度 1 匹）がみられた。

IV 考察及びまとめ

メタクリル酸ブチルのがん原性を検索する目的で、F344/DuCrI CrIj ラット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、メタクリル酸ブチルの投与濃度は、0(対照群)、63、125、250、500及び1000 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、肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

IV-1 用量-反応関係

メタクリル酸ブチルの暴露の結果、雌雄とも全群で動物の死亡はみられず、一般状態の観察でも被験物質暴露による影響は認められなかった。体重増加の抑制が、1000 ppm群の雄では投与期間を通して、雌では投与8週目以降認められた。1000 ppm群の最終体重は対照群に対し、雄では87%、雌では90%であった。摂餌量は、雌雄とも1000 ppm群でほぼ投与期間を通して低値がみられた。

血液学的検査では、雌雄とも軽度の貧血が認められた。雄では赤血球数の低値が125 ppm以上の群で、ヘモグロビン濃度の低値が250 ppm群と1000 ppm群で、ヘマトクリット値の低値が125、250及び1000 ppm群でみられた。雌では赤血球数の低値が125、250及び500 ppm群で、ヘマトクリット値の低値が125 ppm群と500 ppm群で、網赤血球比の高値が125 ppm群で高値みられた。なお、これらの変化の程度は、投与濃度に対応した低下を示さず同程度であった。また、500 ppm以上の群で雄にMCVの高値、1000 ppm群では雄にMCHの高値、雌に血小板数の低値とプロトロンビン時間の延長がみられた。

血液生化学検査では、雄でASTの低値が500 ppm以上の群で、カリウムの高値及び総蛋白、総コレステロール、リン脂質、CK、カルシウムの低値が1000 ppm群でみられた。雌ではアルブミンの低値が500 ppm以上の群で、総ビリルビン、ALP、カリウムの高値及び総蛋白、CK、カルシウムの低値が1000 ppm群でみられた。アルブミンの低値(雌の500 ppm以上の群)と蛋白の低値(雌雄の1000 ppm群)は、摂餌量の減少と関連する変化と考えられるが、その他の変化と関連すると考えられる病理組織学的変化はみられず、毒性学的意義については不明であった。

病理学的検査の肉眼的観察では、雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。臓器重量では、雄で胸腺の実重量が500 ppm以上の群で、体重比が1000 ppm群で低値を示し、腎臓の体重比が125 ppm以上の群で高値を示した。雌では腎臓の体重比が

500ppm 以上の群で高値を示したが、病理組織学的検査では胸腺や腎臓に変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、被験物質暴露による影響は鼻腔のみに認められた。1000 ppm 群では、雌雄とも鼻腔の嗅上皮に空胞変性と傷害部位の修復を示す再生性の変化が認められた。このうち空胞変性は雄の 125 ppm 群と雌の 250 ppm 群まで発生増加が認められ、雌の 125 ppm 群でも統計学的には有意でないものの、発生が多かった。さらに雌ではすべての投与群で嗅上皮の萎縮と呼吸上皮の炎症がみられたが、統計学的に有意な発生増加が認められたのは雌 500 ppm 群における嗅上皮の萎縮のみであった。なお、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮の炎症は、雌の対照群でも各 1 例の発生がみられている。これらの鼻腔への影響は、メタクリル酸ブチルの刺激性によるものと考えられた。ラットへの単回あるいは反復吸入暴露で気道への刺激性が報告されており、ウサギでは皮膚や眼に対する刺激性が報告されている（文献 8）。本試験の濃度設定試験として実施した 2 週間吸入毒性試験（文献 5）では、鼻腔への影響は雌雄とも 500 ppm までみられたが、本試験では 13 週間暴露により、さらに低濃度まで影響が認められている。その他の臓器、組織には被験物質暴露の影響と考えられる病理組織学的変化は認められなかった。

IV-2 無毒性量（NOAEL）

メタクリル酸ブチルのラットへの 13 週間吸入暴露により、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、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、血液系への影響及び病理組織学的検査で鼻腔への影響は、雌雄とも 125 ppm までみられた。63 ppm では、暴露に関連した明らかな毒性影響は雌雄とも認められなかった。従って、本試験におけるメタクリル酸ブチルのラットに対する 13 週間吸入暴露による無毒性量（NOAEL）は、血液系と鼻腔への影響をエンドポイントとして 63 ppm であると考えられた。

IV-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。

本試験では雌雄とも動物の死亡及び一般状態の変化はみられなかった。しかし、1000 ppm 群では、雌雄で体重増加の抑制（対照群に対し、雄 87%、雌 90%）がみられ、摂餌量も多くの週で低値であった。また、臓器重量は体重増加の抑制に伴い、多くの臓器で低値が認められた。血液学的検査では、軽度の貧血（赤血球数等の低値）が認められ、赤血球数とヘマトクリット値への影響は雌雄とも 125 ppm 群までみられた。病理組織学的検査では、被験物質の刺激に起因すると考えられる変化が鼻腔に認められ、鼻腔への影響は雌雄の 125 ppm までみられた。従って、1000 ppm は体重増加の抑制や摂餌量の低値から、がん原性試験の最高濃度としては高いと考えられた。一方、500 ppm 群では、雌雄とも軽度の貧血

と雄で胸腺重量の低下が認められたが、体重は対照群とほぼ同程度に推移し、鼻腔への影響は 1000 ppm 群よりも減弱した。

従って、がん原性試験の最高濃度として刺激性物質の 2 年間投与を考えると、500 ppm が妥当であると判断した。また、最低濃度については、63 ppm では毒性影響は認められなかったものの、投与期間が 2 年間の長期にわたることから、63 ppm 以下が適切であると考えられた。

以上のことから、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも最高濃度を 500 ppm とし、以下、125 ppm、30 ppm と決定した。

V 文献

- 1) U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substance Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> [accessed 2014/12/11]
- 2) 化学工業日報社. 2014. 2014 年版 16514 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 378.
- 3) McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
- 4) OECD. 2009. OECD Guideline for The Testing of Chemicals 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study. 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. メタクリル酸ブチルのラット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
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) ECETOC. 1996. n-Butyl Methacrylate, Isobutyl Methacrylate. JACC Report No.36. Brussels: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.

VI 予見することのできなかっ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ったこと

投与 10 週目（10 週-7 日）に体重の測定ミスがあり異常データが記録された。

10 週目（10 週-7 日）の全データを不採用として、11 週-3 日に体重の追加測定を行った。
従って、11 週目の体重値は、11 週-3 日と 11 週-7 日のデータを報告書に採用した。

9 週目から 11 週目にかけての個体ごとの体重推移に影響はみられないことから、試験の最終評価に与える影響はないと判断した。