

ブチルアルデヒドの rasH2 マウスを用いた
吸入による中期発がん性試験報告書

試験番号：0919

CAS No. 123-72-8

2020年11月27日

独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題
試験目的
試験法
GLP 対応
拡散防止措置及び動物福祉
厚生労働省担当課
試験施設及び運営管理者
試験日程
試験関係者一覧
試資料の保管
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付
陳述書
信頼性保証証明書
本文
TABLES	A ~ Q2
FIGURES	1 ~ 7
PHOTOGRAPHS	1 ~ 4
APPENDICES	1-1 ~ 14-2

（ APPENDIX 4-1 ~ 14-2（個体表）は、報告書添付の CD に収録）

標題

ブチルアルデヒドの rasH2 マウスを用いた吸入による中期発がん性試験

試験目的

本試験は、ブチルアルデヒドを遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) に 26 週間全身暴露 (経気道投与) し、その発がん原を検索した。

試験法

本試験は、「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」(平成 28 年度第 3 回発がん性評価ワーキンググループ:2017 年 3 月 1 日厚生労働省)に準拠して実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づく試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP) 」(昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正 平成 28 年 4 月 18 日厚生労働省告示第 208 号)に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択)を参考にして実施した。

拡散防止措置及び動物福祉

本試験は、「日本バイオアッセイ研究センターにおける遺伝子組換え生物使用実験安全管理規程」(平成 26 年 9 月 3 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日)及び「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 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)、「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」(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、最終改正平成 27 年 2 月 20 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、「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」(平成 24 年 4 月 25 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日)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遺伝子組換え生物使用実験安全委員会 (承認番号 2018-08) 及び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 (承認番号 0240)。

厚生労働省担当課

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

ブチルアルデヒドの rasH2 マウスを用いた
吸入による中期発がん性試験報告書

試験番号：0919

本文

本文目次

	頁
要約	1
試験材料	3
-1 被験物質の性状等	3
-1-1 名称等	3
-1-2 構造及び物理化学的性状	3
-1-3 物理化学的性状等	3
-2 被験物質等	3
-2-1 使用被験物質	3
-2-2 被験物質の製造量等	3
-2-3 被験物質の主な用途	4
-2-4 許容濃度等	4
-3 被験物質の特性	4
-3-1 同一性	4
-3-2 安定性	4
-4 試験動物	4
試験方法	5
-1 投与	5
-1-1 投与経路	5
-1-2 投与方法	5
-1-3 投与期間	5
-1-4 投与濃度	5
-1-5 投与経路、投与期間、投与時間及び投与濃度の設定理由	5
-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整	6
-1-7 被験物質濃度の測定	6
-2 動物管理	6
-2-1 群の構成及び各群の使用動物数	6
-2-2 群分け方法	7

-2-3	動物の個体識別	7
-2-4	動物飼育室、ならびに他試験及び異種動物との区別	7
-2-5	飼育条件	7
(1)	飼育環境	7
(2)	飼料	8
(3)	飲水	8
-3	観察・検査項目及び方法	8
-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	8
-3-2	体重測定	8
-3-3	摂餌量測定	9
-3-4	尿検査	9
-3-5	血液学的検査	9
-3-6	血液生化学的検査	9
-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
-3-8	病理ピアレビュー	10
-4	数値処理と統計方法	10
-4-1	数値の取り扱いと表示	10
-4-2	統計処理	11
	試験成績	12
-1	生存率	12
-2	一般状態	12
-3	体重	12
-4	摂餌量	13
-5	尿検査	13
-6	血液学的検査	13
-7	血液生化学的検査	14
-8	病理学的検査	14
-8-1	肉眼的観察	14
-8-2	臓器重量	15
-8-3	病理組織学的検査	15
(1)	腫瘍性病変	15

(2) 非腫瘍性病変	16
-8-4 死因	17
考察及びまとめ	18
-1 生存率、一般状態、体重等	18
-2 腫瘍性病変.....	18
-3 その他の影響	19
結論	20
文献	21
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

ブチルアルデヒドの発がん性を検索するために、ブチルアルデヒドを遺伝子改変マウス (**rasH2** マウス) に 26 週間全身吸入暴露 (経気道投与) した。

投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群 (各群: 雌雄とも 25 匹) を設け、ブチルアルデヒドの投与濃度は、0 (対照群)、300、1,000 及び 3,000 ppm (体積比 v/v) とし、1 日 6 時間、1 週 5 日間、26 週間暴露した。観察・検査項目として、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。

26 週間の暴露の結果、雌雄とも生存率、一般状態に投与の影響はみられなかったが、雌雄とも 3,000 ppm 群で投与早期から体重増加の抑制がみられ、暴露最終週の体重は、対照群を基準として雄は 86%、雌は 94% であった。摂餌量でも体重と対応した低値が雌雄の 3,000 ppm 群でみられた。血液学的検査で、雌雄とも 3,000 ppm 群に血小板数の低値がみられた。雄では、肉眼的観察で肺の白色斑や結節が認められ、病理組織学的検査で細気管支-肺胞上皮腺腫が各投与群に 2 匹、細気管支-肺胞上皮癌が 1 から 2 匹みられた。これらの肺腫瘍の発生に統計学的有意は示されなかったが、細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた肺腫瘍の発生匹数は、300 ppm 群 4 匹、1,000 ppm 群 3 匹、3,000 ppm 群 4 匹であり、当センターでこれまでに実施した **rasH2** マウスを用いた中期発がん性試験での自然発生の範囲(細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた腫瘍発生 3/25 匹) を 300 及び 3,000 ppm 群で超えたことから、雄 **rasH2** マウスでは、ブチルアルデヒドのがん原性を示す不確実な証拠 (**equivocal evidence of carcinogenic activity**) が得られたと判断した。

また、雌では、細気管支-肺胞上皮癌が対照群に 1 匹、1,000 ppm 群に 2 匹認められたが、ブチルアルデヒドの投与による腫瘍の増加は認められなかった。よって、雌 **rasH2** マウスではがん原性を示す証拠は得られなかった (**no evidence of carcinogenic activity**) と判断した。

以上より、遺伝子改変マウス (**rasH2** マウス) を用いて、ブチルアルデヒドの 26 週間の吸入による中期発がん性試験を行った結果、雄マウスでがん原性を示す不確実な証拠 (**equivocal evidence of carcinogenic activity**) が得られ、雌マウスではがん原性を示す証拠は得られなかった (**no evidence of carcinogenic activity**) と結論された。

ブチルアルデヒドのがん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雄)

投与濃度 (ppm)		0	300	1,000	3,000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
皮膚/付属器 肺	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	1		
	細気管支-肺胞上皮腺腫(A)	0	2	2	2		
	細気管支-肺胞上皮癌#(B) A	0	2	1	2		
	+B	0	4	3	4		
胃(前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	0	1	0		
肝臓	肝細胞腺腫	1	1	2	0		
胸腺	悪性リンパ腫#	2	0	0	0		
皮下組織	血管腫	0	0	0	1		
脾臓	血管腫	0	1	2	0		
	線維腫	0	0	0	1		
肝臓	血管腫	0	0	0	1		
全臓器	血管腫	0	1	2	2		

ブチルアルデヒドのがん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雌)

投与濃度 (ppm)		0	300	1,000	3,000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮癌#	1	0	2	0		
胃(前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	0	1	0		
胸腺	悪性リンパ腫#	0	0	1	0		
脾臓	血管腫(C)	2	0	0	0		
	血管肉腫#(D)	1	2	0	0		
	C+D	2	2	0	0		
腹膜	血管腫	0	1	0	0		
全臓器	血管腫	2	1	0	0		

: 悪性腫瘍

* : p 0.05 で有意

** : p 0.01 で有意

(Fisher 検定)

↑ : p 0.05 で有意増加

↑↑ : p 0.01 で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓ : p 0.05 で有意減少

↓↓ : p 0.01 で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

試験材料

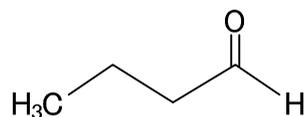
-1 被験物質の性状等

-1-1 名称等 (文献 1)

名 称 : ブチルアルデヒド (Butyraldehyde)
 別 名 : ブタナール (Butanal)
 CAS No. : 123-72-8
 被験物質番号 : 1262

-1-2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 式 : CH₃(CH₂)₂CHO
 分 子 量 : 72.1

-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 刺激臭のある無色の液体
 相対蒸気密度 : 2.5 (空気=1)
 沸 点 : 74.8
 蒸 気 圧 : 12.2 kPa (20)
 溶 解 性 : 7 g/100 mL (水)
 保 管 条 件 : 室温、暗所

-2 被験物質等

-2-1 使用被験物質 (文献 2)

製 造 元 : 富士フイルム和光純薬 (株)
 規 格 : 和光一級
 純 度 : 99.8%以上 (富士フイルム和光純薬(株)検査成績データ)
 ロ ッ ト 番 号 : APJ5267(純度:99.9%)、KCP5953(純度:99.8%)

-2-2 被験物質の製造量等 (文献 3)

ブチルアルデヒドの輸出・輸入数量 (2012) は、輸出量は 4,549 トン、輸入量は 4,462

トンで合計 **10,000** トン未満とされている。

－2－3 被験物質の主な用途（文献 3）

合成ゴム原料

－2－4 許容濃度・発がん性等（文献 1）

日本産業衛生学会；未評価

ACGIH；未評価

IARC；未評価

－3 被験物質の特性

－3－1 同一性

被験物質の同一性は、被験物質のマスペクトルを質量分析計（アジレントテクノロジーズ(株) 5973N）にて測定し、この測定値を文献値と比較することにより確認した（文献 4）。

その結果、被験物質のマスペクトルは文献値と同じ分子イオンピーク及びフラグメントピークを示し、被験物質はブチルアルデヒドであることを確認した。

それらの結果は **APPENDIX 1- 1** に示す。

－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** に示す。

－4 試験動物

動物は、日本クレア（株）（富士生育場）の **Jic:CB6F1-Tg rasH2@Jcl** マウス（**rasH2** マウス）（**SPF**）の雌雄を使用した。

雌雄各 **103** 匹を **6** 週齢で導入し、検疫を **6** 日間、馴化を **5** 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 **100** 匹（群分け時体重範囲、雄：**22.2**～**27.1 g**、雌：**17.5**～**23.1 g**）を試験に用いた。

なお、中期発がん性試験に **rasH2** マウスを選択した理由は、がん原性検索のための有用性が検証されていることによる（文献 5）。

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、1週5日の暴露（原則として土、日曜日は暴露しない）で、2019年1月29日～2019年7月29日までの26週間とした。

－1－4 投与濃度

投与濃度は、300、1,000及び3,000 ppm（体積比 v/v）の3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、投与時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、「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」（文献6）に準拠して26週間とした。

投与時間はOECD 化学品テストガイドライン 451(文献7)を参考に1日6時間とした。投与濃度は、雌雄の rasH2 マウス (non-Tg) を用いた4週間の中期がん原性試験予備試験（試験番号 0896）結果をもとに決定した。プチルアルデヒドを4週間、0(対照群)、100、300、1,000 及び 3,000 ppm（体積比 v/v）の濃度で暴露した結果、動物の死亡は認められず、一般状態の変化も観察されなかった。3,000 ppm 群の雌雄に僅かな体重増加の抑制が認められ、最終体重は対照群に対して、92%（雄）及び 93%（雌）であった。病理組織学的検査では、3,000 ppm 群の雌雄に呼吸上皮の扁平上皮化生及び嗅上皮の萎縮（雌では1,000 ppm 群でも）が認められた。これらの鼻腔の変化はいずれも軽度から中等度であった。その他、臓器重量、血液学的検査及び血液生化学的検査では特記すべき変化は認められなかった。以上のように、プチルアルデヒドの4週間吸入暴露の結果、最高投与群の3,000 ppm 群で体重増加の抑制及び鼻腔に病理組織学的変化がみられたが、毒性の程度は軽度と判断した。

したがって、**3,000 ppm** の濃度でブチルアルデヒドの **26** 週間試験を実施した場合でも、動物に重篤な変化は引き起こさないと考え、本試験の投与濃度は、**4** 週間の予備試験と同じ **3,000 ppm** を最高濃度とし、以下、**1,000**、**300 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(ブチルアルデヒド)の発生方法を **FIGURE 1** に示した。被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)の発生容器内のブチルアルデヒドを循環式恒温槽で加熱しながら、窒素バブリングにより蒸発させた。このブチルアルデヒド蒸気を循環式恒温槽で冷却、再加熱し、一定濃度にした後、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ブチルアルデヒド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-2014A**)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((平均値 設定濃度) / 設定濃度 × **100**) が **0.07** %以内、変動係数(標準偏差 / 平均値 × **100**) が **0.4** %以内であり、チャンバー内濃度は良好に管理された。

－2 動物管理

－2－1 群の構成及び各群の使用動物数

投与群 **3** 群及び対照群 **1** 群の計 **4** 群を設け、**1** 群当たり雌雄各 **25** 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
対照群	25 匹 (1001 ~ 1025)	25 匹 (2001 ~ 2025)
300 ppm群	25 匹 (1101 ~ 1125)	25 匹 (2101 ~ 2125)
1,000 ppm群	25 匹 (1201 ~ 1225)	25 匹 (2201 ~ 2225)
3,000 ppm群	25 匹 (1301 ~ 1325)	25 匹 (2301 ~ 2325)

－2－2 群分け方法

群分けは、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で、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 8）。

群分けにより除外された動物は、投与開始が確認されるまで飼育し、試験に使用する必要のなくなったことを確認後、本試験系より外し、他の実験に使用した。

－2－3 動物の個体識別

動物は、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をすることで、それ以降は、群分け時に耳パンチをすることで個体識別した。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

－2－4 動物飼育室、ならびに他試験及び異種動物との区別

動物は、バリア区域内の独立した室（検疫室：517・518 室、吸入試験室：511 室）に収容し、室の扉に試験番号、試験動物、飼育期間及び遺伝子改変動物飼育中を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

－2－5 飼育条件

（1）飼育環境

検疫期間中は、検疫室（517・518 室）、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（511 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 ± 2 < 517 室： 22.5 ± 0.2 >
< 518 室： 22.7 ± 0.0 >

吸 入 試 験 室； 21 ± 3 < 511 室： 20.9 ± 0.4 >
吸入チャンバー内； 23 ± 2

湿度： 検 疫 室； $55 \pm 15\%$ < 517 室： $54 \pm 1\%$ >
< 518 室： $55 \pm 0\%$ >

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；暴露中 6 ± 0.5 回/時、飼育中 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：個別飼育

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（ $112(\text{W}) \times 212(\text{D}) \times 120(\text{H}) \text{mm}$ /匹）

馴化・投与期間；ステンレス製5連網ケージ（ $100(\text{W}) \times 116(\text{D}) \times 120(\text{H}) \text{mm}$ /匹）

飼育機材（ラック、ケージ、餌箱、給水ノズル、作業台車等）の滅菌

：オートクレーブ滅菌（約120、15分以上）

（2）飼料

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造のCRF-1固型（ 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絶食させた。

試験に使用する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、確認した。

（3）飲水

飲水は、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。

飲水の水質は、動物試験施設として定期的（年2回）に実施している水道水の検査において、水道法に定められている水質基準に適合していることを確認した。

－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

全動物について、週1回、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1日1回、生死及び一般状態を観察した。瀕死状態の動物は、速やかに安楽死させた。

－3－2 体重測定

全動物について、投与開始後は週1回、投与前に体重測定を行った。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。

死亡及び瀕死状態の動物は、飼育室からの搬出時に体重を測定した。

－3－3 摂餌量測定

全動物について、投与開始後週 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 尿検査

投与期間終期まで生存していた採尿可能な動物から、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

－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、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、白血球数、白血球分類

－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、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、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

－3－7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について、肉眼的に病変の観察を行った。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。定期解剖動物は、解剖日の解剖動物数が同性各群間でほぼ同数となるよう、動物番号の若い順より割り当て 4 日間で実施した。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存していた動物について、下記に示す臓器の湿重量（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、下記の器官、組織を切り出し、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、光学顕微鏡により検査した。

皮膚、鼻腔(3箇所を横断)、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄(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、ハーダ腺、筋肉、骨(大腿骨、胸骨)、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

－3－8 病理ピアレビュー

病理組織診断の最終化後に外部専門家 4 名による病理ピアレビューを実施し、腫瘍性病変について確認を行った。

その結果、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫の 1 例(雄 3,000 ppm 群)を細気管支-肺胞上皮癌に変更した。

－4 数値処理と統計方法

－4－1 数値の取扱いと表示

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 2 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、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。

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 生存率

生存率を **TABLE B 1, 2** 及び **FIGURE 2, 3** に示した。

－雄－

投与群の生存率に投与の影響はみられなかった。

各群の 26 週における生存数（生存率）は、対照群：23 匹（92%）、300 ppm 群：25 匹（100%）、1,000 ppm 群：25 匹（100%）、3,000 ppm 群：25 匹（100%）であった。

－雌－

投与群の生存率に投与の影響はみられなかった。

各群の 26 週における生存数（生存率）は、対照群：24 匹（96%）、300 ppm 群：23 匹（92%）、1,000 ppm 群：24 匹（96%）、3,000 ppm 群：25 匹（100%）であった。

－2 一般状態

一般状態の観察結果を **TABLE C 1, 2** に示した。

－雄－

投与期間の 25 週から 26 週まで継続して、外部腫瘤（腹部）が 3,000 ppm 群で 1 匹みられたが、投与によるものとは考えなかった。

－雌－

投与期間の 20 週の観察で内部腫瘤（腹部）が 300 ppm 群で 1 匹みられ、この動物は 21 週に死亡した。また、26 週の観察で異常呼吸が 1,000 ppm 群で 1 匹観察された。しかし、上記の変化は、投与によるものとは考えなかった。

－3 体重

体重の推移を **TABLE D 1～4** 及び **FIGURE 4, 5** に示した。

－雄－

投与 3 週から投与期間を通して 3,000 ppm 群で体重増加の抑制がみられた。

最終計測日（26 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 300 ppm 群：98%、1,000 ppm 群：102%、3,000 ppm 群：86%であった。

—雌—

投与 3 週から投与期間を通して **3,000 ppm** 群で体重増加の抑制がみられた。また、**1,000 ppm** 群でも低値の週が散見されたが、投与期間終盤では対照群との間に有意差はみられなかった。

最終計測日(26 週)の各投与群の体重は、対照群に対して **300 ppm 群 : 100%**、**1,000 ppm 群 : 98%**、**3,000 ppm 群 : 94%**であった。

—4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1 ~ 4 及び FIGURE 6, 7 に示した。

—雄—

投与 3 週から投与期間を通して **3,000 ppm** 群で摂餌量の低値がみられた。

投与期間を通した 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群 : **4.4 g**、**300 ppm 群 : 4.4 g**、**1,000 ppm 群 : 4.4 g**、**3,000 ppm 群 : 3.7 g**であった。

—雌—

投与 5 週から投与期間を通して **3,000 ppm** 群で摂餌量の低値がみられた。

投与期間を通した 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群 : **3.9 g**、**300 ppm 群 : 4.0 g**、**1,000 ppm 群 : 3.9g**、**3,000 ppm 群 : 3.5 g**であった。

—5 尿検査

尿検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

—雄—

変化はみられなかった。

—雌—

蛋白及びケトン体の陽性度の増加が **3,000 ppm** 群でみられたが、病理組織学的検査では、これらと関連する病変は認められなかった。

—6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

—雄—

血小板数の低値が **3,000 ppm** 群でみられた。

—雌—

血小板数の低値ならびに白血球分類で好中球比の増加及びリンパ球比の減少が **3,000 ppm** 群でみられた。

—7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を **TABLE H 1, 2** に示した。

—雄—

総蛋白及びグルコースの高値が **300 ppm** 群でみられた。アルブミン、**A/G** 比、**ALP**、ナトリウム及びクロールの高値ならびに総コレステロール及びトリグリセライドの低値が **3,000 ppm** 群でみられた。**300 ppm** 群の変化は、投与濃度に対応していないことから毒性影響を示すものではないと考えた。**ALP** の高値は最高投与群での変化であり、骨や肝臓への影響が示唆されたが、病理組織学的検査で骨と肝臓に毒性影響を示す所見は認められず、**ALP** の高値についての毒性学的意義は不明であった。また、**3,000 ppm** 群での **ALP** 以外の変化については、変化の程度が僅かであることから明確な毒性影響を示すものではないと考えた。なお、対照群で **LDH** の異常値 (589 ± 1783 U/L) がみられたが、1匹に胸腺の悪性リンパ腫の多臓器転移がみられた影響によるもので、この動物を除いた対照群の **LDH** 値は 217 ± 26 U/L で、他の投与群 ($215 \pm 42 \sim 243 \pm 49$ U/L) との間に差は認められなかった。

—雌—

グルコースの高値が **3,000 ppm** 群でみられたが、その毒性学的な意義は不明であった。その他、同群でナトリウム及びクロールの高値ならびに総コレステロール及びリン脂質の低値がみられたが、変化の程度が僅かであることから毒性影響とは考えなかった。

—8 病理学的検査

—8-1 肉眼的観察

解剖時の肉眼的観察結果を **TABLE I 1, 2** に示す。

—雄—

肺の白色斑が対照及び **3,000 ppm** 群で各 1 匹認められた。また、肺の結節が **300 ppm** 群で 2 匹、**1,000 ppm** 群で 2 匹、**3,000 ppm** 群で 1 匹認められた。これらのうち投与群の所見は、病理組織学的検査で肺腫瘍であることが確認された。

—雌—

肺の結節が対照群で 1 匹、**1,000 ppm** 群で 2 匹認められた。これらは、病理組織学的検査

査で肺腫瘍であることが確認された。

－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 に示す。

－雄－

心臓、腎臓、脾臓、肝臓及び脳の実重量の低値が、3,000 ppm 群で認められた。また、同群の体重比で、副腎、精巣、肺及び脳の高値が認められた。これらの変化は、体重の低値に伴う変化と考えた。

－雌－

副腎、卵巣、心臓、脾臓、肝臓及び脳の実重量の低値が、3,000 ppm 群で認められた。また、同群の体重比では、肺及び腎臓の高値ならびに卵巣及び脾臓の低値が認められた。これらの変化は、体重の低値に伴う変化と考えた。

－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、坦腫瘍動物数を TABLE N 1, 2 に示す。また、転移性病変は TABLE O1, 2 に、非腫瘍性病変は TABLE P 1, 2 に示す。さらに、病理組織所見の代表例を PHOTOGRAPH 1~4 に示す。

(1) 腫瘍性病変

－雄－

< 肺 >

細気管支-肺胞上皮腺腫が投与群でみられた。各群の発生匹数 (発生率) は、対照群：0 匹 (0%)、300 ppm 群：2 匹 (8%)、1,000 ppm 群：2 匹 (8%)、3,000 ppm 群：2 匹 (8%) であった。

細気管支-肺胞上皮癌が投与群でみられた。各群の発生数(発生率)は、対照群：0 匹(0%)、300 ppm 群：2 匹(8%)、1,000 ppm 群：1 匹(4%)、3,000 ppm 群：2 匹(8%) であった。

また、細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた肺腫瘍の発生匹数 (発生率) は、対照群：0 匹 (0%)、300 ppm 群：4 匹 (16%)、1,000 ppm 群：3 匹 (12%)、3,000 ppm 群：4 匹 (16%) であった。腺腫、癌、及びこれらを合わせた肺腫瘍の発生に有意差は示されなかった。なお、細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌の両方を認めた個体はなかった。

< 肺以外の臓器 >

血管腫が皮下組織、脾臓及び肝臓にみられた。

皮下組織の血管腫の発生匹数(発生率)は、対照群:0匹(0%)、300 ppm 群:0匹(0%)、1,000 ppm 群:0匹(0%)、3,000 ppm 群:1匹(4%)であった。

脾臓の血管腫の発生匹数(発生率)は、対照群:0匹(0%)、300 ppm 群:1匹(4%)、1,000 ppm 群:2匹(8%)、3,000 ppm 群:0匹(0%)であった。

肝臓の血管腫の発生匹数(発生率)は、対照群:0匹(0%)、300 ppm 群:0匹(0%)、1,000 ppm 群:0匹(0%)、3,000 ppm 群:1匹(4%)であった。

以上、全臓器での血管腫の発生匹数(発生率)は、対照群:0匹(0%)、300 ppm 群:1匹(4%)、1,000 ppm 群:2匹(8%)、3,000 ppm 群:2匹(8%)であり、血管腫の有意な増加はみられなかった。

—雌—

< 肺 >

気管支-肺胞上皮癌が対照群で1匹(4%)、1,000 ppm 群で2匹(8%)みられた。

< 肺以外の臓器 >

300 ppm 群で脾臓の血管肉腫が2匹(8%)、腹膜の血管腫が1匹(4%)みられた。また、前胃の扁平上皮乳頭腫、胸腺の悪性リンパ腫が1,000 ppm 群で各1匹(4%)みられた。なお、対照群では脾臓の血管肉腫が1匹(4%)、血管腫が2匹(8%)みられた。

(2) 非腫瘍性病変

—雄—

鼻腔、気管及び肺に投与の影響が認められた。

< 鼻腔 >

鼻腔の呼吸部では、移行上皮に過形成(軽度)、呼吸上皮にエオジン好性変化(軽度から中等度)、炎症(軽度から中等度)及び扁平上皮化生(軽度)が認められ、それぞれ3,000 ppm 群で有意な増加が示された。

嗅部では、嗅上皮に萎縮(軽度から重度)及び呼吸上皮化生(軽度)ならびに滲出液(軽度から中等度)が認められ、これらは3,000 ppm 群で有意な増加が示された。また、嗅上皮の萎縮(軽度)は1,000 ppm 群でも有意に増加し、3,000 ppm 群では所見の発生匹数の増加と程度の増強がみられた。

以上の鼻腔所見は呼吸上皮のエオジン好性変化を除き、対照群では発生しなかった。

< 気管 >

気管上皮の空胞変性が3,000 ppm 群で4匹認められた。統計学的な有意差は示されなかったが、対照群を含め1,000 ppm 以下の群に発生しないことから投与の影響と判断した。

< 肺 >

細気管支の空胞変性が **300 ppm** 以上の群で有意に増加した。この所見は対照群での発生は認められないことから、投与の影響と判断した。

—雌—

鼻腔、気管及び肺に投与の影響が認められた。

< 鼻腔 >

鼻腔の呼吸部では、移行上皮に過形成（軽度）、呼吸上皮にエオジン好性変化（軽度から中等度）、炎症（軽度から中等度）及び扁平上皮化生（軽度）が認められ、それぞれ **3,000 ppm** 群で有意な増加が示された。また、滲出液（軽度）が **3,000 ppm** で少数例に認められた。

嗅部では、嗅上皮に萎縮（軽度から重度）及び呼吸上皮化生（軽度）ならびに浸出液（軽度から中等度）が認められ、これらの所見は **3,000 ppm** 群で有意な増加が示された。また、嗅上皮の萎縮と滲出液は **1,000 ppm** でも少数例に認められ（いずれも軽度、有意差なし）、**3,000 ppm** 群では所見の程度の増強もみられた。

甲介の萎縮（軽度）が **3,000 ppm** 群で有意な増加が示された。

以上の鼻腔所見は、呼吸上皮のエオジン好性変化を除き対照群での発生はなかったことから、投与の影響と判断した。

< 気管 >

統計学的な有意差は示されなかったが、気管上皮の空胞変性（軽度）が **3,000 ppm** 群で少数認められた。対照群を含め **1,000 ppm** 以下の群に同所見は認められなかったことから投与の影響と判断した。

< 肺 >

気管支上皮の空胞変性（軽度から中等度）が **300 ppm** 以上の群で有意に増加した。

—8—4 死因

病理学的にみた死亡 / 瀕死の原因を **TABLE Q 1, 2** に示す。

—雌雄—

投与群に特異的な病変あるいは腫瘍による死亡の増加は認められなかった。

考察及びまとめ

ブチルアルデヒドの発がん性を検索するために、ブチルアルデヒドを遺伝子改変マウス (**rasH2** マウス) に **26** 週間全身吸入暴露 (経気道投与) した。

投与群 **3** 群、対照群 **1** 群の計 **4** 群 (各群: 雌雄とも **25** 匹) を設け、ブチルアルデヒドの投与濃度は、**0** (対照群)、**300**、**1,000** 及び **3,000 ppm** (体積比 v/v) とし、**1** 日 **6** 時間、**1** 週 **5** 日間、**26** 週間暴露した。観察・検査項目として、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。

－1 生存率、一般状態、体重等

26 週間の暴露の結果、雌雄とも生存率、一般状態に投与の影響はみられなかったが、雌雄とも **3,000 ppm** 群で投与早期から体重増加の抑制がみられ、暴露最終週の体重は、対照群を基準として雄は **86%**、雌は **94%** であった。摂餌量でも体重と対応した低値が雌雄の **3,000 ppm** 群でみられた。血液学的検査で、雌雄とも **3,000 ppm** 群で血小板数の低値がみられた。

－2 腫瘍性病変

雄の投与群に、肉眼的観察で肺の白色斑や結節が認められ、病理組織学的検査で細気管支-肺胞上皮腺腫が各投与群に **2** 匹、細気管支-肺胞上皮癌が **1** から **2** 匹みられた。これらの肺腫瘍の発生に統計学的有意は示されなかったが、細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた肺腫瘍の発生匹数は、**300 ppm** 群 **4** 匹、**1,000 ppm** 群 **3** 匹、**3,000 ppm** 群 **4** 匹であり、当センターでこれまでに実施した **rasH2** マウスを用いた中期発がん性試験での自然発生の範囲(細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた腫瘍発生 **3/25** 匹) を **300** 及び **3,000 ppm** 群で超えたことから、雄 **rasH2** マウスでは、ブチルアルデヒドのがん原性を示す不確実な証拠 (**equivocal evidence of carcinogenic activity**) が得られたと判断した。

また、雌では、細気管支-肺胞上皮癌が対照群に **1** 匹、**1,000 ppm** 群に **2** 匹認められたが、ブチルアルデヒドの投与による腫瘍の増加は認められなかった。よって、雌 **rasH2** マウスでは、がん原性を示す証拠は得られなかった (**no evidence of carcinogenic activity**) と判断した。

－3 その他の影響

雌雄とも投与の影響が鼻腔、気管及び肺に認められた。

鼻腔では、雌雄の **3,000 ppm** 群で嗅上皮の萎縮（雄は **1,000 ppm** 以上の群）と呼吸上皮化生、呼吸上皮の炎症、エオジン好性変化及び扁平上皮化生、鼻腔嗅部の滲出液貯留、移行上皮の過形成が増加した。これらの病変は、鼻腔への傷害と修復あるいは炎症に伴う変化と考えられた。また、呼吸上皮の扁平上皮化生は、ブチルアルデヒドと同類のアセトアルデヒドやホルムアルデヒドの吸入暴露試験でも報告（文献 10）されており、本試験の濃度決のために実施した 4 週間毒性試験（文献 11）でも認められた。

さらに、肺では、雌雄の **300 ppm** 以上の群で気管支上皮の空胞変性が増加し、気管上皮でも空胞変性が認められた。本所見は、前述の 4 週間毒性試験（文献 11）では認められておらず、本試験で初めて示された。また、ブチルアルデヒド以外の 26 週試験では認められていないことから、ブチルアルデヒドの投与に由来する特徴的な病理組織学的変化と考えられ、長期間にわたる投与により上部気道の鼻腔領域のみならず、下部気道の肺にまで暴露の影響が及んだものと推察した。

結論

遺伝子改変マウス (**rasH2** マウス) を用いて、ブチルアルデヒドの 26 週間の吸入による中期がん原性試験を行った結果、ブチルアルデヒドの発がん性について、

1. 雄 **rasH2** マウスに対するがん原性を示す不確実な証拠が得られた (**equivocal evidence of carcinogenic activity**) と結論された。
2. 雌 **rasH2** マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (**no evidence of carcinogenic activity**) と結論された。

文献

- 1) **IPCS (International Program on Chemical Safety). 2006. ICSC: 0403. BUTYR ALDEHYDE. International Programme Chemical Safety. Available: <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0403.htm> [accessed 2017/08/21].**
- 2) 富士フイルム和光純薬 (株)検査成績データ
- 3) 化学工業日報社. 2014. 16514の化学商品. 東京：ブチルルデヒド, 591.
- 4) **McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.**
- 5) **Robinson DE, MacDonald JS. 2001. Background and framework for ILSI 's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. Toxicol Pathol 29 suppl, 13-19.**
- 6) 「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」 2017. 平成 28 年度第 3 回 発がん性評価グループ (平成 29 年 3 月 1 日) 資料.
- 7) **OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2009. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.**
- 8) 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適正層別方式の確立. 薬理と治療 14: 7285-7302.
- 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, 今井田克己, 相磯成敏 . 2017 . 各論 , 第 1 章 呼吸器系, 1 鼻腔・咽頭・喉頭・気管 . 新毒性病理組織学 (日本毒性病理学会編) . 東京：西村書店 , 99-116.

11) 日本バイオアッセイ研究センター. 2019. プチルアルデヒドの rasH2 マウス(non-Tg) を用いた吸入による 4 週間毒性試験 (中期がん原性試験予備試験) 報告書.

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

(1) 動物飼育環境条件の逸脱

暴露時間外の飼育中に、スクラバー点検時に換気量の逸脱（設定値 **780L/min** に対し **569.7 ~ 578.8 L/min**）が発生した。この他に、吸入チャンバーの換気回数変更操作時（暴露時間外の飼育中の換気量：**780 L/min**、暴露時間中換気量：**390 L/min**）に設定値を外れた。また、チャンバー洗浄（チャンバーホッパー部）に伴う温湿度の逸脱が不定期に発生した。吸入チャンバー飼育環境の逸脱（換気量、温度、湿度）が認められたが、試験結果の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。以下に設定値ならびに逸脱の最大値を示す。

	設定値	測定値
換気量 (暴露中)	390 ± 32 L/min (6 ± 0.5 回換気)	655.7L/min (10 回換気に相当)
換気量 (暴露時間外の飼育中)	780 ± 65 L/min (12 ± 1 回換気)	689.5. L/min (10 回換気に相当)
温度	23 ± 2	20.0
湿度	50 ± 20 %	78.8 %

(2) 尿検査データの欠落

投与最終週に生存している動物の自然排尿による新鮮尿を用いて尿検査を実施する計画であったが、以下の動物については新鮮尿の採取ができず、データ欠落となった。

検査日	データ欠落動物番号
2019年7月25日	1002, 1016, 1017, 1024 1101, 1102, 1105, 1109, 1110, 1111, 1112, 1113, 1116, 1121, 1123 1204, 1205, 1211, 1212, 1214, 1217, 1223, 1224 1301, 1302, 1306, 1309, 1310, 1317, 1321, 1325 2018, 2019, 2020, 2023, 2108 2117, 2122 2203, 2205, 2210 2307, 2317,

尿検査データの欠落については、評価に必要な検査動物数が確保されたことから、試験結果の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。

(3) 血液学的検査データの欠落

試験計画書では、定期解剖時に生存している全動物について血液学的検査を行うと規定されていたが、以下の動物について血液凝固により、検査を行うことができず計画書から逸脱した。

検査日	データ欠落動物番号
2019年7月30日~8月1日	2012, 2203

評価に必要な検査動物数が確保されており、血液学的検査データの欠落による試験結果の評価についての影響はなかったと判断した。