

アクリル酸メチル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：0832

CAS No. 96-33-3

2017年3月29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	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	ii
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~P2	
FIGURES	1~6	
PHOTOGRAPHS	1~6	
APPENDICES	1-1~3	

標題

アクリル酸メチルのマウスを用いた吸入によるがん原性試験

試験目的

アクリル酸メチルを雄マウスに 94 週間、雌マウスに 97 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、「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 12 年 12 月 25 日労働省告示第 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、「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）及び「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 日規程第 17 号、最終改正平成 25 年 3 月 28 日規程第 12 号）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（承認番号 0060）。

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

アクリル酸メチル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：0832

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 構造式及び分子量	3
- 1 - 3 物理化学的性状等	3
- 2 被験物質の使用ロット等	3
- 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 被験物質の投与方法	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	7
- 2 - 1 各群の使用動物数	7
- 2 - 2 群分け及び個体識別方法	7
- 2 - 3 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	10
(3) 病理組織学的検査	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 生死状況	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	13
- 8 病理学的検査	14
- 8 - 1 肉眼的観察	14
- 8 - 2 臓器重量	14
- 8 - 3 病理組織学的検査	14
- 8 - 4 死因	16
考察及びまとめ	17
- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量	17
- 2 腫瘍性病変	17
- 3 その他の影響	18

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

アクリル酸メチル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 94 週間、雌マウス 97 週間の試験を実施した。なお、投与期間は雌雄とも 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、投与期間を短縮した。

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、アクリル酸メチルを 1 日 6 時間、1 週 5 日間で雄マウス 94 週間、雌マウス 97 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)、2.5、10 及び 40 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。

アクリル酸メチルの暴露の結果、投与による動物の生存率に低下は認められず、動物の一般状態に雌雄ともアクリル酸メチルの影響はみられなかった。体重は、40 ppm 群で増加の抑制がみられ、雄は投与 50 週、雌は投与 30 週まで対照群より低値で推移した。摂餌量は、雌雄の 40 ppm 群で、雄が投与 78 週まで、雌が 74 週まで低値であった。

病理組織学的検査では、雌雄に腫瘍の発生増加はみられなかった。非腫瘍性病変としては、雌雄とも鼻腔と鼻咽頭に影響がみられた。鼻腔の嗅上皮の炎症、壊死、萎縮、再生、呼吸上皮化生、エオジン好性変化、呼吸上皮の炎症とエオジン好性変化(雄のみ)、固有層の腺の呼吸上皮化生、鼻咽頭のエオジン好性変化の発生匹数が増加または病変の程度が増強した。これらの影響がみられた濃度は雌雄とも 10 ppm 以上の群であった。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いて、アクリル酸メチルの雄 94 週間、雌 97 週間の吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄とも、腫瘍の発生増加は認められず、アクリル酸メチルの雌雄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。ただし、本試験ではすべての群でアミロイドーシスによる低体重と死亡例の増加が認められたことから、本試験の発がん性に対する検出力は低下していた可能性があり、条件がより適切であれば発がん性が示される可能性がある。

表 アクリル酸メチル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	2.5	10	40	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	肺 肝臓	細気管支 - 肺胞上皮腺腫	2	2	1	3		
		肝細胞腺腫	3	4	1	2		
悪性腫瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	4	3	3	6		
	肝臓	肝細胞癌	1	2	4	0		
	肝臓	組織球性肉腫	2	1	0	3		

表 アクリル酸メチル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	2.5	10	40	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性腫瘍	胃 (前胃) 卵巣 子宮	扁平上皮乳頭腫	1	2	1	3		
		嚢胞腺腫	2	3	0	3		
		子宮内膜間質性ポリープ	1	0	3	1		
悪性腫瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	8	7	8	7		
	肝臓	組織球性肉腫	2	3	5	2		
	子宮	組織球性肉腫	8	8	2 *	12		

* : 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

名 称 : アクリル酸メチル (Methyl acrylate)
別 名 : 2-プロペン酸メチル、アクリル酸メチルエステル
CAS No. : 96-33-3
被験物質番号 : 1249

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

示 性 式 : $\text{CH}_2=\text{CHCOOCH}_3$
分 子 量 : 86.09

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色の揮発性の液体
比 重 : 0.9535 (20)
沸 点 : 80.7
蒸 気 圧 : 86.6 mmHg (25)
溶 解 性 : エタノール、エチルエーテル、アセトン、クロロホルム、ベンゼンに可
溶
保 管 条 件 : 室温、暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 和光純薬工業(株)
規 格 : 和光特級
純 度 : 99.9%(和光純薬工業(株)検査成績書データ)
ロット番号 : AWF1535 (2014/2/15 ~ 2014/10/31)
(使用期間) KPJ3619 (2014/11/4 ~ 2015/8/18)
ECL0060 (2015/8/19 ~ 2015/12/25)

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、ロットごとに被験物質のマ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、被験物質のマスペクトルは文献値（文献 2）と同じ擬分子イオン及びフラグメントピークを示し、被験物質はアクリル酸メチル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、ロットごとに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、各ロットとも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、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 220 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（群分け時体重範囲、雄：22.9～26.7g、雌：18.6～22.0g）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。

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、雄は94週間、雌は97週間とし、雄は計446回、雌は計460回の暴露を行った。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、2.5、10及び40 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。

- 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化学剤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94週に対照群、雌では投与97週に対照群と低投与群の生存動物数が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94週、雌の投与を97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0804）の結果（文献5）をもとに決定した。13週間試験は0（対照群）、6.3、12.5、25、50及び100 ppmの濃度で行った。その結果、動物の死亡はみられず、一般状態観察でも雌雄に変化はみられなかった。体重は25 ppm群まで、雌雄に体重増加の抑制がみられた。病理組織学的検査では、鼻腔と鼻咽頭に被験物質の刺激に

よると考えられる変化が認められた。特に、鼻腔上皮における変化が最も顕著であり、鼻腔への影響は濃度依存的に減弱しながらも6.3 ppm 群まで認められた。病理組織学的検査でみられた所見は、鼻腔上皮の剥離、炎症、萎縮、再生、化生や腺の過形成等であったが、その程度は100 ppm 群においてもほとんどが軽度から中等度であり、動物の生存に影響を及ぼすものではないと判断した。しかし、100 ppm 群の最終体重は対照群に対し、雄で83 %、雌で85 %であることから、100 ppm はがん原性試験における最大耐量を越えると思われた。50 ppm 群では最終体重は対照群に対して、雄が91 %、雌が93 %であり、この濃度が最大耐量に近いと思われた。但し、50 ppm 群の摂餌量は雌雄ともにやや低く、雌の摂餌量は経時的に減少する傾向もみられた。これらの結果より、がん原性試験の最高濃度は50 ppm より少し低い濃度が妥当と考えられた。また、がん原性試験の最低濃度については、13週間試験で投与の影響がみられた6.3 ppm より低い濃度が望ましいと考えられた。

以上のことから、がん原性試験は雌雄とも最高濃度を40 ppm とし、以下、10 ppm、2.5 ppm（公比4）と決定した。

- 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循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバプリングにより蒸発させた。この被験物質の蒸気を循環式恒温槽で一定温度に冷却した後、清浄空気（希釈空気）と混合しながら再加熱し、一定濃度にした後、流量計を用いて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。

- 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（ $(\text{平均値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$ ）及び変動係数（ $\text{標準偏差} / \text{平均値} \times 100$ ）とも、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 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)
2.5 ppm 群	50 匹 (1101 ~ 1150)	50 匹 (2101 ~ 2150)
10 ppm 群	50 匹 (1201 ~ 1250)	50 匹 (2201 ~ 2250)
40 ppm 群	50 匹 (1301 ~ 1350)	50 匹 (2301 ~ 2350)

- 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 517・518 室、馴化・投与 511 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 (雄: 517 室、雌: 518 室) で、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 < 517 室 ; 23.0 ± 0.2 、 518 室 ; 22.8 ± 0.0 >
 吸入試験室 ; 22 ± 2 < 511 室 ; 21.9 ± 0.3 >
 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 ; $56 \pm 1\%$ >
 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 ~ - 15 × 10Pa
 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(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- 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。

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

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、投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回 (雌は 97 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。

- 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。

- 3 - 4 尿検査

投与 88 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 - 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

- 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

- 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7)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 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、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。

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

- 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

試験成績

- 1 生死状況

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

- 雄 -

腎臓病変とアミロイドーシスによる死亡の増加により、各群で生存率が低下したが、40 ppm 群の低下は対照群と比較すると抑制されていた。

各群の 94 週における生存動物数（生存率）は、対照群：12 匹（24%）、2.5 ppm 群：16 匹（32%）、10 ppm 群：12 匹（24%）、40 ppm 群：27 匹（54%）であった。

- 雌 -

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。なお、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 97 週における生存動物数（生存率）は、対照群：12 匹（24%）、2.5 ppm 群：12 匹（24%）、10 ppm 群：12 匹（24%）、40 ppm 群：20 匹（40%）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。

- 雌雄 -

被験物質の影響と思われる所見はみられなかった。

- 3 体重

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

- 雄 -

40 ppm 群は投与開始週より体重増加に抑制がみられ、投与 50 週まで対照群よりやや低値で推移した。

最終計測日（94 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 2.5 ppm 群：109%、10 ppm 群：117%、40 ppm 群：105%であった。

- 雌 -

40 ppm 群は投与開始週より体重増加に抑制がみられ、投与 30 週まで対照群よりやや低値で推移した。

最終計測日（97 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 2.5 ppm 群：98%、10 ppm 群：95%、40 ppm 群：102%であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

- 雄 -

40 ppm 群は投与開始から投与 78 週まで対照群より低値であった。

- 雌 -

40 ppm 群は投与開始から投与 74 週まで対照群より低値であった。

- 5 尿検査

尿検査の結果を 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。

- 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。

- 雌雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 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。

- 雌雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、雌の ~~40~~ 40 ppm 群で A/G 比の高値がみられたが、僅かな変化であり、投与の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。

- 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 -

40 ppm 群で脾臓の実重量の低値がみられたが、これに対応した病理組織学的変化はみられなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 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 に示した。また、非腫瘍性病変は TABLE N 1, 2 に、転移性病変は TABLE O 1, 2 に示した。さらに、病理組織所見の代表例を PHOTOGRAPHS 1~6 に示した。

- 雄 -

1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

2) 非腫瘍性病変

< 鼻腔 >

呼吸上皮、嗅上皮、固有層の腺に病変の増加または程度の増強が観察された。

呼吸上皮には、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 10 ppm 以上の群で認められ、これらの病変の程度は軽度から中等度であった。また、有意ではないが、軽度な炎症が 40 ppm 群で認められた。

嗅上皮には、炎症と呼吸上皮化生の発生匹数の増加と程度の増強が 10 ppm 以上の群で認められ、エオジン好性変化は 40 ppm 群で、萎縮、壊死、再生は 10 ppm 群で発生匹数の増加が認められた。炎症、壊死、呼吸上皮化生の程度は軽度から中等度、萎縮、再生、エオジ

ン好性変化の程度はいずれも軽度であった。

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増加と程度の増強が 10 ppm 以上の群で認められ、この病変の程度は軽度から重度であった。嗅上皮の炎症は粘膜及び固有層内の炎症性細胞浸潤と浮腫性変化であり、呼吸上皮化生は嗅上皮や固有層の腺上皮が線毛を持った単層または多列円柱上皮に置き換わった変化であり、呼吸上皮化生は嗅上皮が分布する鼻腔中央から後方（レベル 2～3）の背側に認められた。

< 鼻咽頭 >

エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

なお、10 ppm 群では肝臓にアミロイド沈着の発生匹数の増加を示したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。その他、膀胱の拡張、大腸のアミロイド沈着の発生匹数が 40 ppm 群で減少した。

- 雌 -

1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

その他、子宮の組織球性肉腫の発生が Fisher 検定で 10 ppm 群に有意な減少を示した。

2) 非腫瘍性病変

< 鼻腔 >

呼吸上皮、嗅上皮、固有層の腺に病変の増加または程度の増強が観察された。

呼吸上皮には、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、この病変の程度は軽度であった。

嗅上皮には、炎症と呼吸上皮化生の発生匹数の増加と程度の増強が 10 ppm 以上の群で認められ、エオジン好性変化は 40 ppm 群で、萎縮、壊死、再生は 10 ppm 群で発生匹数の増加が認められた。エオジン好性変化、炎症、呼吸上皮化生の程度は軽度から中等度、壊死、萎縮、再生の程度はいずれも軽度であった。

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増加と程度の増強が 10 ppm 以上の群で認められ、この病変の程度は軽度から重度であった。嗅上皮や固有層の腺にみられた非腫瘍性病変の形態変化は雄と同様であった。

< 鼻咽頭 >

エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 10 ppm 以上の群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

なお、2.5 ppm 群では脳に鉍質沈着の発生匹数の増加を示したが、投与濃度に対応した変

化ではなかった。大腸のアミロイド沈着の発生匹数は 40 ppm 群で増加を示したがわずかな変化であった。その他、鼻腔の呼吸上皮エオジン好性変化、卵巣のアミロイド沈着の発生匹数または病変の程度が 40 ppm 群で減少した。

- 8 - 4 死因

病理学的にみた死亡 / 瀕死の原因を TABLE P 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、2.5 ppm 及び 10 ppm 群において、アミロイドーシスによる死亡が多かった。アミロイドーシスによる死亡は腎臓（糸球体）、肺、心臓、肝臓、胃、小腸、大腸、副腎、精巣、卵巣等への多臓器へのアミロイド沈着による死亡であった。これらに加え、雄では腎病変、尿閉による死亡が対照群で多く、40ppm 群では少ない傾向にあった。

考察及びまとめ

アクリル酸メチルのマウスを用いた、雄 94 週間、雌 97 週間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：0、2.5、10 及び 40 ppm）を行った結果、雌雄とも腫瘍の発生増加は認められなかった。

本試験においては、雌雄とも腎臓病変とアミロイドーシスによる死亡の増加により、全群での生存率が低下した。また、アミロイドーシスを発症しなかった過去の試験の同系動物に比較して低体重にて推移した。当初、投与期間は雌雄とも 2 年間（104 週間）を予定していたが、雄では投与 94 週に、雌では投与 97 週にそれぞれ対照群の生存率が 25%を下回ったことから、OECD 化学品テストガイドライン 451（文献 4）に従い、対照群の定期解剖時の動物数を確保するために投与を終了し、雄を 95 週、雌を 98 週で動物を解剖した。また、がん原性試験の投与期間については、本試験が準拠したがん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献 3）において、マウスを用いるがん原性試験の投与期間を 18 ヶ月（78 週間）以上と規定しているが、本試験はこの投与期間を満している。

- 1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

動物の生存率は、腎臓病変とアミロイドーシスによる死亡の増加により、各群で生存率が低下した。また、雄では 40 ppm 群の生存率の低下が対照群と比較して抑制された。雄の 40 ppm 群では、腎病変、尿閉による死亡が対照群より少ない傾向がみられ、病理組織学的検査で膀胱の拡張や大腸のアミロイド沈着の発生匹数の減少がみられた。従って、これらの病変の減少が生存率に影響したと考えられるが、アクリル酸メチルの投与との関連については不明であった。

一般状態では、雌雄ともアクリル酸メチルの影響と思われる所見はみられなかった。

体重は、40 ppm 群で増加に抑制がみられ、雄は投与 50 週、雌は投与 30 週まで対照群よりやや低値で推移した。摂餌量は、雌雄の 40 ppm 群で、雄が投与 78 週まで、雌が 74 週まで低値であった。また、アミロイドーシスを発症しなかった過去の試験の同系動物に比較して低体重にて推移した。

- 2 腫瘍性病変

雌雄とも、腫瘍の発生増加は認められず、アクリル酸メチルの雌雄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）。なお、本がん原性試験結果の評価については、National Toxicology Program の Definition of Carcinogenicity Results（文献 9）を参考にした。

本試験が準拠したがん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献 3）では、最高用量は、腫瘍以外の原因で正常な寿命を変えることなく、かつ、最小限の毒性兆候を表すのに十分な用

量とすることとあり、OECD 化学品テストガイドライン 451 (文献 4) では、主要な標的器官と毒性影響を明らかにするが、苦痛、高度な毒性、病的状態または死亡を引き起こさないような用量とし、体重増加抑制 (約 10%) などで示される明らかな毒性が得られるように設定することとある。本試験の病理組織学的検査によりアクリル酸メチルの投与による標的臓器 (鼻腔) に対する毒性影響が明らかとなったが、その毒性影響は重篤ではなく、鼻腔への毒性影響が原因で死亡した動物もいなかった。また、雌雄とも投与開始週より体重増加に抑制がみられ、雄では最大 8 % (投与 26 週) の体重増加抑制が認められた。従って、最高濃度を 40 ppm とした本がん原性試験の濃度設定は上記の最高用量に関する基準を満たし、適切であったと判断する。

マウスの発がん性試験の陰性結果が受け入れられるための生存率に係わる条件は、慢性毒性および癌原性試験の計画と実施に関する OECD ガイダンス文書 No. 116 に示されている (文献 10)。これによると、すべての群における生存率は 18 ヶ月で 50% 以上でなければならず、投与期間中の飼育管理等の問題のために、どの群も 10 % 以上失われてはならないとある。本試験の 18 ヶ月における各群の生存率は、雄で対照群：78.76 %、2.5 ppm 群：78.76 %、10 ppm 群：72 %、40 ppm 群：88 %、雌で対照群：86 %、2.5 ppm 群：84 %、10 ppm 群：80 %、40 ppm 群：82 % であり、飼育管理等の問題で死亡した動物もいなかったため、本試験結果は、上記条件を満たしている。

なお、本試験の対照群を含むすべての群では、過去に当センターで実施したアミロイドーシスを発症しなかった同系動物によるがん原性試験の対照群の動物と比較して、試験期間を通して体重増加の抑制傾向がみられた。また、試験後半においてアミロイドーシスによる死亡例が増加していた。これらのことから、本試験の発がん性に対する検出力は低下していた可能性がある。鼻腔の非腫瘍性病変は、発がん性が確認されたラット吸入試験 (文献 11) において認められたものと本質的に同一のものであることから、条件がより適切であればマウスにおいても発がん性が示される可能性は残る。

- 3 その他の影響

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び病理学的検査の肉眼的観察と臓器重量では、雌雄ともアクリル酸メチルの影響と思われる明確な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と鼻咽頭に影響がみられた。鼻腔では、嗅上皮の炎症、壊死、萎縮、再生、呼吸上皮化生、エオジン好性変化、呼吸上皮の炎症とエオジン好性変化 (雄のみ) 固有層の腺の呼吸上皮化生、鼻咽頭のエオジン好性変化の発生匹数が増加または病変の程度が増強した。これらの影響がみられた濃度は雌雄とも 10 ppm 以上の群であった。

嗅上皮には傷害を示す変化として雌雄とも 10 ppm 以上の群で炎症、壊死、萎縮が認められたが、壊死と萎縮を示した動物は 10 ppm 群より 40 ppm 群で少なかった。また、傷害の修復による変化 (文献 12,13) である再生、呼吸上皮化生 (嗅上皮や腺) も 10 ppm 以上でみられた

が、再生を示した動物は壊死や萎縮と同様に10 ppm 群より40 ppm 群で少なかった。これらの変化は、40 ppm 群では嗅上皮のほとんどが呼吸上皮に化生し、嗅上皮の存在する領域が相対的に減少したためと考えられる。マウスにみられる固有層の腺の呼吸上皮化生は通常、鼻腔前方（レベル1）背側の呼吸上皮の分布する領域の固有層において加齢性病変として認められる（文献 12）が、本試験の投与群にみられた腺の呼吸上皮化生は鼻腔中央から後方（レベル2～3）の背側、すなわち嗅上皮分布領域の固有層に認められたため、この部位にみられた腺の呼吸上皮化生については投与の影響と考えられる。従って、アクリル酸メチルの10 ppm 以上の暴露は、マウス雌雄の嗅上皮分布領域を中心に炎症、壊死、萎縮、再生、呼吸上皮化生への形態学的に連続した変化を示した。その他、嗅上皮、呼吸上皮及び鼻咽頭にエオジン好性変化の発生匹数の増加が認められた。エオジン好性変化は加齢性変化としてみられるが（文献 7）、弱い慢性刺激による反応として考えられている（文献 14）。今回、投与群で嗅上皮、呼吸上皮及び鼻咽頭のエオジン好性変化の発生匹数の増加が認められたことは、加齢性変化をアクリル酸メチル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）でも、鼻腔の嗅上皮（剥離、萎縮、炎症性細胞浸潤、鼻甲介の癒着、再生、呼吸上皮化生）や嗅上皮領域固有層の腺（呼吸上皮化生、過形成）に投与の影響がみられていた。しかしながら、これらの鼻腔の傷害性及び再生性変化は本試験系において腫瘍性病変の発生には至らなかった。

結論

B6D2F1/Crlj マウスを用いて、アクリル酸メチルの雄 94 週間、雌 97 週間の吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄とも、腫瘍の発生増加は認められず、アクリル酸メチルの雌雄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。ただし、本試験ではすべての群でアミロイドーシスによる低体重と死亡例の増加が認められたことから、本試験の発がん性に対する検出力は低下していた可能性があり、条件がより適切であれば発がん性が示される可能性がある。

文献

1. U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> [accessed 2012/1/4]
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. 2014. アクリル酸メチル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. 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. 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.
9. National Toxicology Program (NTP). Definition of Carcinogenicity Results, Available: <https://ntp.niehs.nih.gov/go/baresults>, [accessed 2017/3/28].
10. OECD. 2012. Guidance Document 116 on the conduct and design of chronic toxicity and carcinogenicity studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 2ND edition. ENV/JM/MONO(2011)47

11. 日本バイオアッセイ研究センター. 2017. アクリル酸メチルのラットを用いた吸入によるがん原性試験報告書. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Elizabeth FM, Rodney AM. 2007. A review of upper respiratory tract inhalation pathology. *Comp Clin Pathol*. 4: 215-222.

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。