

アクロレインのラットを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書

試験番号 : 0776

CAS No. 107-02-8

2011 年 12 月 13 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
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	i
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
本文	v
TABLES	A~K 6	
FIGURES	1~2	
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2週間毒性試験

試験目的

アクロレインの吸入によるがん原性試験の投与濃度決定試験（13週間試験）の予備試験として、アクロレインをラットに2週間全身暴露（経気道投与）して、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412（亜急性吸入毒性：28日試験 2009年9月7日採択）を参考にして実施した。

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方針」及び平成18年11月27日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」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承認された。

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 2 週間毒性試験報告書

試験番号 : 0776

本文

本文目次

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

- 3 観察・検査項目及び方法	7
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	7
- 3 - 2 体重測定	7
- 3 - 3 摂餌量測定	7
- 3 - 4 血液学的検査	8
- 3 - 5 血液生化学的検査	8
- 3 - 6 病理学的検査	8
(1) 剖検	8
(2) 臓器重量	8
(3) 臓器の採取保存	8
(4) 病理組織学的検査	9
- 4 数値処理と統計方法	9
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	9
- 4 - 2 統計処理	9
試験成績	11
- 1 生死状況	11
- 2 一般状態	11
- 3 体重	11
- 4 摂餌量	12
- 5 血液学的検査	12
- 6 血液生化学的検査	12
- 7 病理学的検査	13
- 7 - 1 剖検	13
- 7 - 2 臓器重量	13
- 7 - 3 病理組織学的検査	13
考察及びまとめ	17
- 1 用量 - 反応関係	17
- 2 13 週間試験の濃度決定	19
文献	20

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21

要約

アクロレインのがん原性試験の投与濃度決定試験（13 週間試験）の予備試験として、その生体影響を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による 2 週間の試験を実施した。

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 5 匹とし、合計 60 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 2 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、0.3、1、3 及び 10 ppm（v/v）とした。観察、検査として、生死確認、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、剖検観察、臓器重量の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、10 ppm 群で雌雄全動物が死亡した。他の群に死亡はみられなかった。一般状態の観察では、10 ppm 群の死亡動物に鼻周囲及び口周囲に褐色の汚染がみられ、さらに、呼吸困難、鼻漿液性分泌物、不整呼吸がみられた。また、3 ppm 群でも、異常呼気音がみられた。体重は、雌雄の 3 ppm 以上の群で投与濃度に対応した減少または増加抑制がみられた。摂餌量は雌雄の 3 ppm 群で低値であったが、2 週目は回復傾向であった。

血液学的検査では、雄に血小板数の低値、雌に白血球百分率で好中球比の高値とリンパ球比の低値が 3 ppm 群でみられた。血液生化学的検査では、雄で尿素窒素の高値及びカルシウムの低値が 3 ppm 群でみられた。

剖検では、10 ppm 群の死亡動物に肺の赤色斑、胃や小腸、大腸のガス貯留、胸腺の萎縮がみられた。3 ppm 群には肺の赤色斑が雄にみられた。臓器重量の測定では、アクロレインの影響と思われる変化はみられなかった。

病理組織学的検査ではアクロレインの影響は 1 ppm 群までみられた。10 ppm 群の死亡動物には雌雄とも呼吸器（鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺）に変化がみられた。鼻腔では呼吸上皮に糜爛、潰瘍、壊死、変性、再生、過形成、呼吸部の鼻腔内腔に滲出液の貯留、組織内に炎症性細胞浸潤、嗅上皮に壊死、糜爛、再生がみられた。また、鼻咽頭に鼻咽頭管の糜爛、変性、壊死、再生、鼻咽頭管内腔に滲出液の貯留、組織内に炎症性細胞浸潤、喉頭に炎症、糜爛、変性、壊死、再生、気管に炎症、糜爛、再生、壊死、肺に水腫、気管支肺炎、気管支上皮の壊死、鬱血、出血がみられた。3 ppm 群の雌雄でも、呼吸器（鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺）に 10 ppm 群と同様な変化がみられたが、10 ppm 群の変化より軽度であった。1 ppm 群では、鼻腔の呼吸上皮に変化がみられたが、雌雄とも軽度な変化であった。

以上の結果より、アクロレインの 13 週間試験の投与濃度は、3 ppm を最高濃度として、以下、2 ppm、1 ppm、0.3 ppm、0.1 ppm とした。

試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 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-プロペナル
C A S N o . : 107-02-8

- 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

- 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)
沸 点 : 52.6
蒸 気 圧 : 274 mmHg (25)
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 : 室温、暗所に保管

- 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 : 99.2 % (東京化成工業(株)検査成績データ)
ロ ッ ト 番 号 : KOLRO

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、そ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。

- 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。

- 4 試験動物

動物は、アクロレイン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：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCrI CrIj ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 36 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 30 匹（群構成時体重範囲、雄：109～122g、雌：87～103g）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。

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日の暴露で2週間とし、計10回の暴露を行った。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、0.1、0.3、1、3及び10 ppm（体積比 v/v）の5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決定試験（13週間試験）に使用する投与濃度を決定するため2週間とした。

投与濃度は文献を参考に以下のように決定した。すなわち、Leachら（文献3）は、アクロレインをSDラットに0、0.1、1.0、3.0 ppmの濃度で3週間（6時間/日、5日/週）吸入（全身）暴露した。その結果、3.0 ppm群に体重増加の抑制、脾臓重量の減少、鼻甲介の呼吸上皮の剥離、糜爛、壊死及び扁平上皮化生が起きたと報告している。

上記の文献を参考に、本試験の最高濃度はアクロレインの毒性が確実にみられると予想される10 ppmとし、最低濃度は本試験で使用する吸入試験システムで、現時点において技術的に濃度コントロールが可能な最低濃度0.1 ppmとした。従って、本試験の投与濃度は10 ppmを最高濃度として以下、3、1、0.3及び0.1 ppmとした。

- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質を高千穂化学工業(株)に依頼し、窒素ベースでガスボンベに充填（濃度：522～534 ppm、容量：47L）した。このボンベより得た被験物質を清浄空気と混合し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を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-14A）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 0.8%以内、変動係数（標準偏差 / 平均値 × 100）が 4.0%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 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 5 匹の動物を用いた。

群 名 称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対 照 群	5 匹 (1001 ~ 1005)	5 匹 (2001 ~ 2005)
0.1 ppm 群	5 匹 (1101 ~ 1105)	5 匹 (2101 ~ 2105)
0.3 ppm 群	5 匹 (1201 ~ 1205)	5 匹 (2201 ~ 2205)
1 ppm 群	5 匹 (1301 ~ 1305)	5 匹 (2301 ~ 2305)
3 ppm 群	5 匹 (1401 ~ 1405)	5 匹 (2401 ~ 2405)
10 ppm 群	5 匹 (1501 ~ 1505)	5 匹 (2501 ~ 2505)

- 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 4）。

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(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。

- 2 - 3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室(605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 < 605 室 ; 22.3 ± 0.1 >
吸入試験室 ; 21 ± 2 < 604 室 ; 20.5 ± 0.2 >
吸入チャンバー内 ; 20 ~ 24

湿度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$ < 605 室 ; $58 \pm 1\%$ >
吸入試験室 ; $55 \pm 15\%$ < 604 室 ; $59 \pm 1\%$ >
吸入チャンバー内 ; 30 ~ 70%

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 ; 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 : 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(W) × 294(D) × 176(H) mm/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:千葉県千葉市美浜区新港 8-2)の CRF-1 固型飼料(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、被験物質暴露中及び定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

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)が

ら分析データを使用ロットごとに入手し保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

(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、自動給水装置により自由摂取させた。ただし、被験物質暴露中は給水しなかった。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所(神奈川県秦野市落合 729-5)に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

- 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

動物の生死の確認は、検疫及び馴化期間中は毎日 1 回行い、投与期間中は暴露を行った日には暴露前と暴露後の 2 回、暴露をしなかった土曜日と日曜日には午前中に 1 回行った。

一般状態の詳細観察は、検疫及び馴化期間中は検疫開始日(導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に行い、投与期間中は 2、4、7、10、14 日目の暴露開始前(暴露を行わない日は午前中)に行った。

- 3 - 2 体重測定

体重測定は、検疫及び馴化期間中は検疫開始日(導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に行い、投与期間中は 2、4、7、10、14 日目の暴露開始前(暴露を行わない日は午前中)に行った。また、死亡動物及び定期解剖動物の搬出時にも体重(搬出時体重)を測定した。

- 3 - 3 摂餌量測定

摂餌量は週 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 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、剖検直前にエーテル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 - 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、剖検直前にエーテル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

- 3 - 6 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(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) 臓器の採取保存

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した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺に固定液を注入する）、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、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、腔、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）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。

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５）で切り出し（横断）、検査した。

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、肝臓、腎臓

- 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 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。

- 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。

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 生死状況

生死状況を TABLE B1, B2 に示した。

- 雄 -

10 ppm 群で全動物 (5 匹) が死亡した。投与 1 週の 2 日目に 2 匹、3 日目に 2 匹、7 日目に 1 匹が死亡した。

3 ppm 以下の群では動物の死亡はみられなかった。

- 雌 -

10 ppm 群で全動物 (5 匹) が死亡した。投与 1 週の 2 日目に 4 匹、4 日目に 1 匹が死亡した。

3 ppm 以下の群では動物の死亡はみられなかった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C1, C2 に示した。

- 雄 -

10 ppm 群では、鼻周囲及び口周囲に褐色の汚染がみられ、さらに、呼吸困難、鼻漿液性分泌物、不整呼吸がみられた。死亡動物は、ほぼこれらの症状のまま、投与 1 週の 7 日目までに死亡した。

3 ppm 群では投与 2 週目に異常呼気音がみられた。

1 ppm 以下の群では被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

10 ppm 群では、鼻周囲及び口周囲に褐色の汚染がみられ、さらに、呼吸困難、鼻漿液性分泌物がみられた。死亡動物は、ほぼこれらの症状のまま、投与 1 週の 4 日目までに死亡した。

3 ppm 群では投与 1 週の 7 日目から投与 2 週目に異常呼気音がみられた。

1 ppm 以下の群では被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 3 体重

体重の推移を TABLE D1 ~ D4 及び FIGURE 1, 2 に示した。

- 雄 -

3 ppm 以上の群で、投与濃度に対応した体重の減少または増加抑制がみられた。

投与群の最終体重は対照群に対し、0.1 ppm 群 : 101%、0.3 ppm 群 : 99%、1 ppm 群 :

101%、3 ppm 群：80%であった。

- 雌 -

3 ppm 以上の群で、投与濃度に対応した体重の減少または増加抑制がみられた。

投与群の最終体重は対照群に対し、0.1 ppm 群：100%、0.3 ppm 群：97%、1 ppm 群：100%、3 ppm 群：90%であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E1 ~ E4 に示した。(雌雄の 10 ppm 群は投与 1 週以内に全動物死亡のためデータなし)

- 雄 -

3 ppm 群で摂餌量が低値であったが、投与 2 週目は回復傾向であった。

- 雌 -

3 ppm 群で投与 1 週目に摂餌量が低値であった。

- 5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F1, F2 に示した。(雌雄の 10 ppm 群は全動物死亡のためデータなし)

- 雄 -

血小板数の低値が 3 ppm 群でみられた。

- 雌 -

白血球百分率で好中球比の高値及びリンパ球比の低値が 3 ppm 群でみられた。

- 6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G1, G2 に示した。(雌雄の 10 ppm 群は全動物死亡のためデータなし)

- 雄 -

尿素窒素の高値及びカルシウムの低値が 3 ppm 群でみられた。

その他、リン脂質の高値が 0.3 ppm 群でみられたが、投与濃度との対応がみられず、被験物質の影響とは判断しなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 7 病理学的検査

- 7 - 1 剖検

剖検所見を TABLE H1, H2 に示した。

- 雄 -

10 ppm 群 (死亡動物 5 匹) には、肺の赤色斑が全動物にみられ、また、胃のガス貯留が 4 匹、小腸または大腸のガス貯留が各 1 匹、胸腺の萎縮が 1 匹にみられた。

3 ppm 群には肺の赤色斑が 2 匹にみられた。

1 ppm 以下の群には被験物質の影響と考えられる所見は認められなかった。

- 雌 -

10 ppm 群 (死亡動物 5 匹) には、肺の赤色斑が 4 匹、胃のガス貯留が全動物、大腸のガス貯留が 2 匹、小腸のガス貯留が 1 匹にみられた。

3 ppm 以下の群には被験物質の影響と考えられる所見は認められなかった。

- 7 - 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 I1, I2 と J1, J2 に示した。(雌雄の 10 ppm 群は全動物死亡のためデータなし)

- 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、3 ppm 群では各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 3 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。また、1 ppm 群で腎臓の体重比の低値がみられたが、投与濃度との対応がみられず、被験物質の影響とは判断しなかった。

- 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、副腎、心臓、腎臓の体重比の高値が 3 ppm 群にみられたが、これらの変化は 3 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。

- 7 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査は鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、肝臓及び腎臓について行い、その結果を TABLE K1 ~ K6 に示した。

- 雄 -

[10 ppm 群：死亡動物 5 匹]

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺及び肝臓に変化がみられた。

鼻腔では、鼻前庭と呼吸部を中心に強い変化がみられ、暴露の影響は嗅部にまで及んでいた。鼻前提では扁平上皮に糜爛（軽度）が 1 匹、呼吸部では、呼吸上皮に潰瘍（軽度）と変性（軽度）が各 1 匹、糜爛（軽度～重度）が 5 匹、壊死（中等度～重度）が 3 匹、過形成（軽度）が 1 匹、再生（軽度～中等度）が 2 匹にみられた。呼吸部での変化は主として、鼻前庭に続く移行上皮にみられた。嗅部では、嗅上皮に壊死（重度）が 4 匹、糜爛（軽度～重度）が 5 匹、再生（軽度）が 1 匹にみられた。また、鼻腔の内腔に多数の好中球の浸潤を伴った滲出液（急性化膿性、中等度～重度）と組織内への炎症性細胞浸潤（軽度～中等度）が各 5 匹にみられ、これらの急性炎症は主として呼吸部にみられた。

鼻咽頭では、鼻咽頭管に糜爛（軽度～超重度）が 4 匹、壊死（重度から超重度）が 2 匹、上皮の変性（軽度）が 1 匹と再生（軽度）が 2 匹、組織内への炎症性細胞浸潤（軽度～中等度）が 3 匹にみられた。また、鼻咽頭管の内腔には好中球の浸潤を伴った滲出液（急性化膿性、軽度～重度）が 5 匹にみられた。

喉頭では、炎症（重度）が 5 匹、糜爛（重度～超重度）が 3 匹、潰瘍（重度）と上皮の壊死（重度）が各 1 匹、上皮の変性（軽度）と再生（軽度～中等度）が各 2 匹にみられた。

気管では、炎症（重度）と糜爛（中等度～超重度）が各 5 匹、上皮の再生（中等度）が 1 匹にみられた。

肺では、水腫（中等度）が 4 匹、気管支肺炎が（中等度）が 3 匹、気管支上皮の壊死（重度～超重度）が 5 匹にみられた。

肝臓では小葉中心性の脂肪変性（軽度）が 1 匹にみられた。

[3 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺に変化がみられた。

鼻腔には呼吸部と嗅部に変化がみられた。呼吸部では、呼吸上皮に壊死（軽度）、過形成（重度）、扁平上皮化生（軽度）及び粘膜下腺の過形成（軽度）が各 5 匹にみられた。呼吸上皮の過形成は、移行上皮にみられた再生性過形成であり、3 層～4 層程度の多層化がみられた。嗅部では、嗅上皮に萎縮（軽度～中等度）が 5 匹にみられた。また、呼吸部では、鼻腔の内腔に好中球の浸潤を伴う滲出液（軽度）が 4 匹と鼻腔周囲の組織内に炎症性細胞浸潤（中等度）が 5 匹にみられた。嗅部の鼻腔の内腔には好中球の浸潤を伴わない滲出液（軽度）が 1 匹にみられた。

鼻咽頭では、鼻咽頭管上皮の過形成（重度）が 5 匹、組織内への炎症性細胞浸潤（軽度）が 2 匹にみられた。また、鼻咽頭管の内腔に好中球を含む滲出液（急性化膿性、軽度～重度）が 2 匹にみられた。鼻咽頭管上皮の過形成は、鼻咽頭管の内腔を覆う立方上皮の再生性過形成であり、3 層～4 層程度の多層化が広範囲にみられた。

喉頭では扁平上皮化生（中等度～重度）が 5 匹にみられた。

気管では上皮の変性（中等度）が 5 匹にみられた。

肺では、水腫（中等度）が 1 匹、気管支上皮の変性が（軽度～中等度）が 4 匹、肺胞大食細胞の浸潤（軽度）と細気管支の肉芽形成（軽度）が各 1 匹にみられた。肉芽形成は細

気管支内腔において、剥離上皮細胞に組織が反応した小型のものであった。

[1 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔の呼吸部に変化がみられ、呼吸上皮の壊死（軽度）が 1 匹、再生（軽度）と過形成（軽度）が各 5 匹にみられた。

[0.3 ppm 群、0.1 ppm 群：各群生存動物 5 匹]

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

[10 ppm 群：死亡動物 5 匹]

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺及び肝臓に変化がみられた。

鼻腔では呼吸部を中心に強い変化がみられ、暴露の影響は嗅部にまで及んでいた。呼吸部では、呼吸上皮に壊死（軽度～重度）と糜爛（軽度～重度）が各 5 匹にみられた。呼吸部での変化は、主として鼻前庭に続く移行上皮にみられた。嗅部では、嗅上皮に壊死（重度）が 3 匹、糜爛（軽度～重度）が 5 匹にみられた。また、鼻腔の内腔に多数の好中球の浸潤を伴った滲出液（急性化膿性、重度）と組織内への炎症性細胞浸潤（軽度～中等度）が各 5 匹にみられ、これらの急性炎症は主として呼吸部にみられた。

鼻咽頭では、鼻咽頭管に糜爛（重度～超重度）が 5 匹、壊死（軽度）が 1 匹、組織内への炎症性細胞浸潤（軽度～中等度）が 3 匹にみられた。また、鼻咽頭管の内腔に好中球の浸潤を伴った滲出液（急性化膿性、中等度～重度）が 5 匹にみられた。

喉頭では、炎症（中等度～重度）が 5 匹、糜爛（重度～超重度）が 2 匹、上皮の壊死（重度～超重度）が 3 匹にみられた。

気管では、炎症（中等度～重度）が 5 匹、糜爛（重度～超重度）が 3 匹、上皮の壊死（超重度）が 2 匹にみられた。

肺では、水腫（中等度～重度）が 5 匹、気管支肺炎（中等度）が 2 匹、気管支上皮の壊死（重度～超重度）が 5 匹、鬱血（中等度）と出血（軽度）が各 1 匹にみられた。

肝臓では小葉中心性の脂肪変性（軽度）が 2 匹にみられた。

[3 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺に変化がみられた。

鼻腔には呼吸部と嗅部に変化がみられた。呼吸部では、呼吸上皮に壊死（軽度）、過形成（重度）が各 5 匹、扁平上皮化生（軽度）が 2 匹、粘膜下腺の過形成（軽度）が 5 匹にみられた。呼吸上皮の過形成は雄と同様の再生性の過形成変化であった。嗅部では、嗅上皮に萎縮（中等度～重度）が 5 匹にみられた。また、鼻腔の内腔には、好中球の浸潤を伴った滲出液（軽度）が 1 匹と好中球の浸潤を伴わない滲出液（軽度）が 4 匹にみられた。さらに、組織内への炎症性細胞浸潤（軽度～中等度）が 5 匹にみられた。

鼻咽頭では、鼻咽頭管上皮の過形成（中等度）が 5 匹、組織内への炎症性細胞浸潤（軽度）が 4 匹にみられた。鼻咽頭管上皮の過形成は雄と同様の再生性の過形成であった。

喉頭では、上皮の過形成（軽度～中等度）と扁平上皮化生（軽度～中等度）が各 4 匹に

みられた。

気管では上皮の変性（中等度）が 5 匹にみられた。

肺では気管支上皮の変性が（軽度）が 5 匹にみられた。

[1 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔の呼吸部に変化がみられ、呼吸上皮の再生（軽度）と過形成（軽度）が各 5 匹にみられた。呼吸上皮の再生は雄と同様の所見であった。

[0.3 ppm 群、0.1 ppm 群：各群生存動物 5 匹]

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

考察及びまとめ

アクロレインのがん原性を検索する目的で、F344/DuCr1Crlj 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、その予備試験である13週間試験の投与濃度を決定するための予備試験として本試験(2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5匹)を設け、アクロレインの投与濃度は、0(対照群) 0.1、0.3、1、3及び10 ppm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2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、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。また、投与期間中の死亡動物についても剖検観察及び病理組織学的検査を行った。

- 1 用量 - 反応関係

アクロレインの暴露の結果、10 ppm 群で雌雄全動物が死亡した。雄は投与1週の7日目までに、雌は投与1週の4日目までに死亡した。他の群に死亡はみられなかった。

一般状態の観察では、10 ppm 群の死亡動物に鼻周囲及び口周囲に褐色の汚染がみられ、さらに、呼吸困難、鼻漿液性分泌物、不整呼吸がみられた。また、3 ppm 群でも、主に投与2週目に異常呼吸音がみられた。1 ppm 以下の群では雌雄とも一般状態の変化はみられなかった。

体重は、雌雄の3 ppm 以上の群で、投与濃度に対応した減少または増加抑制がみられ、最終体重は対照群に対し、雄の0.1 ppm 群：101%、0.3 ppm 群：99%、1 ppm 群：101%、3 ppm 群：80%、雌の0.1 ppm 群：100%、0.3 ppm 群：97%、1 ppm 群：100%、3 ppm 群：90%であった。また、摂餌量は雌雄の3 ppm 群で低値であったが、2週目は回復傾向であった。

血液学的検査では、雄に血小板数の低値、雌に白血球百分率で好中球比の高値とリンパ球比の低値が、それぞれ3 ppm 群でみられたのみであった。

血液生化学的検査では、雄で尿素窒素の高値及びカルシウムの低値が3 ppm 群でみられたが、病理組織学的検査では腎臓等に変化はみられなかった。

剖検では、10 ppm 群の死亡動物には、ほとんど動物に肺の赤色斑及び胃や小腸、大腸のガス貯留がみられ、雄の1匹に胸腺の萎縮がみられた。3 ppm 群には肺の赤色斑が雄の2匹にみられた。1 ppm 以下の群には、雌雄ともアクロレインの影響と考えられる所見は認められなかった。胃、小腸及び大腸のガス貯留は、呼吸器の障害により呼吸が困難になった結果、口呼吸を行っていたことを示す所見と推察される(文献6)。

臓器重量の測定では、アクロレインの影響と思われる変化はみられなかった。

病理組織学的検査は鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、肝臓及び腎臓について行った。

10 ppm 群の雄は全動物が死亡し、呼吸器(鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺)に変化が認め

られた。鼻腔では呼吸上皮に糜爛、潰瘍、壊死、変性の強い傷害性変化がみられ、暴露開始から死亡までの経過が長い動物には呼吸上皮に再生や再生性の過形成が認められた。また、呼吸部の鼻腔内腔には化膿性滲出液が貯留し、鼻腔を囲む組織内にも炎症性細胞浸潤が認められ、呼吸部での急性組織傷害が示された。鼻前庭には扁平上皮の糜爛が1匹に認められただけで、アクロレインが鼻前庭の重層扁平上皮よりも呼吸部の呼吸上皮を強く傷害することが示された。呼吸部の後方に位置する嗅部の嗅上皮にも壊死、糜爛が認められ、また、一部の動物に再生が認められた。鼻腔から続く気道を構成する鼻咽頭管にも鼻腔の呼吸部でみられたものと同様の急性組織傷害として、糜爛、変性、壊死、鼻咽頭管内腔への化膿性滲出液の貯留、鼻咽頭管を囲む組織内に炎症性細胞浸潤がみられた。また、鼻咽頭管上皮の再生も一部の動物に認められた。喉頭にも炎症、糜爛が多くの動物にみられ、潰瘍、上皮の変性、壊死及び再生が一部の動物にみられた。気管では、炎症、糜爛が全ての動物にみられ、一部の動物に上皮の再生がみられた。肺では、肺内の気管支（肺内気管支から細気管支）上皮の壊死が全ての動物に、気管支肺炎が多くの動物にみられた。また、肺泡領域にはほとんどの動物に肺水腫が認められた。

10 ppm 群の雌も全動物が死亡し、雄と同様の変化が呼吸器（鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺）に認められた。鼻腔の呼吸上皮に壊死、糜爛、鼻腔の内腔に化膿性滲出液の貯留と鼻腔周囲の組織内に炎症性細胞浸潤がみられ、これらの急性炎症は主として呼吸部にみられた。また、嗅上皮の壊死、糜爛がみられた。鼻咽頭では、鼻咽頭管に糜爛、壊死、鼻咽頭管内腔に化膿性滲出液の貯留と鼻咽頭管周囲の組織内に炎症性細胞浸潤がみられた。喉頭と気管では、炎症、糜爛、上皮の壊死がみられた。肺では、水腫、気管支肺炎、気管支上皮の壊死がみられたほか、鬱血と出血が一部の動物にみられた。

3 ppm 以下の群では雌雄とも全動物が生存したが、アクロレインの影響は1 ppm 群までみられた。3 ppm 群の雄でも呼吸器（鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺）に変化が認められたが、10 ppm 群でみられた強い傷害性の変化はみられなかった。鼻腔では呼吸上皮に軽度の壊死がみられる程度となった。一方、傷害を受けた呼吸上皮（移行上皮）には再生性の過形成が認められた。また、呼吸上皮の扁平上皮化生と粘膜下の腺組織にも過形成が認められた。呼吸部の鼻腔内腔に好中球の浸潤を伴う滲出液と鼻腔周囲の組織内に炎症性細胞浸潤が認められたが、これらの急性組織反応も10 ppm 群よりも弱いものであった。嗅部では、嗅上皮が萎縮した状態に陥り、一部の動物の嗅部で鼻腔内腔に滲出液の貯留がみられた。鼻咽頭では、鼻咽頭管上皮の再生性過形成が全ての動物に、鼻咽頭管を囲む組織内への炎症性細胞浸潤も一部の動物にみられた。また、鼻咽頭管の内腔には化膿性滲出液の貯留がみられた。喉頭では、扁平上皮化生が全ての動物にみられた。気管では上皮の変性がみられたが、10 ppm 群でみられた上皮の糜爛はみられなかった。肺では、10 ppm 群でみられた肺内の気管支の壊死と気管支肺炎は認められず、気管支上皮の変性が多くの動物にみられた。また、細気管支内腔には剥離上皮細胞に組織が反応した小型の肉芽形成も一部の動物で認められた。肺泡領域では肺水腫と肺泡大食細胞の浸潤をそれぞれ1匹に認めただけであった。

3 ppm 群の雌も雄と同様の変化が認められた。鼻腔の呼吸上皮に壊死、再生性過形成、扁

平上皮化生、粘膜下腺の過形成、嗅上皮に萎縮がみられた。また、鼻腔の内腔に滲出液の貯留と組織内への炎症性細胞浸潤がみられた。鼻咽頭では、鼻咽頭管上皮の再生性過形成、鼻咽頭管周囲の組織内に炎症性細胞浸潤がみられた。喉頭では上皮の過形成と扁平上皮化生がみられた。気管では上皮の変性がみられ、肺では気管支上皮の変性がみられた。

以上のように、3 ppm 群では鼻腔から喉頭までの上部気道に急性の傷害性変化に加えて再生性変化と扁平上皮化生が多くの動物に認められ、気管から細気管支に至る下部気道には上皮の変性が多くの動物に認められた。

1 ppm 群では鼻腔の呼吸上皮だけに変化が認められた。雌雄とも呼吸上皮の再生と過形成が全動物にみられ、壊死が雄の 1 匹に認められた。

0.3 ppm 以下の群には、雌雄ともアクロレインの影響は認められなかった。

以上のように、ラットへのアクロレインの 2 週間の暴露により、鼻腔の障害が雌雄とも 1 ppm の濃度まで起きることが示された。

なお、10 ppm 群の雌雄で一部の動物の肝臓にみられた小葉中心性の脂肪化は、鼻腔を中心とした呼吸器障害による酸素欠乏で起きた変化であると考えられた。また、腎臓にはアクロレインの影響と思われる病理組織学的変化はみられなかった。

- 2 13 週間試験の濃度決定

本試験の結果より、13 週間試験の投与濃度を以下のように決定した。

本試験では、雌雄とも 10 ppm 群で全動物が死亡したが、3 ppm 以下の群では死亡はみられなかった。3 ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制、摂餌量の低下、一般状態の変化（異常呼気音等）がみられた。また、病理組織学的検査では、雌雄とも鼻腔（呼吸上皮、嗅上皮、粘膜下腺）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺にアクロレインによると思われる変化がみられた。しかし、3 ppm 群の摂餌量の低下は 2 週目には回復傾向にあり、一般状態の変化は少数例であった。また、3 ppm 群の病理組織学的検査で鼻腔から肺にみられた変化は、10 ppm 群より軽度であり、直ちに動物の生死に関わるものではなかった。これらのことから、13 週間試験の最高濃度は 3 ppm が適切と考えた。13 週間試験の最低濃度については、本試験で 0.3 ppm 以下でアクロレインの影響がみられなかったことから、投与期間が延長しても、本試験の最低濃度と同じ 0.1 ppm が適切と考えた。

従って、13 週間試験の投与濃度は 3 ppm を最高濃度として、以下、公比 3 で 1 ppm、0.3 ppm、0.1 ppm を設定し、さらに高濃度群におけるアクロレインの影響を検索するため、3 ppm と 1 ppm の間に 2 ppm を設定した。

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. Leach CL, Hatoum NS, Ratajczak HV and Gerhart JM. 1987. The pathologic and immunologic effects of inhaled acrolein in rats. *Toxicol Lett.* 39:189-198.
4. 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.
5. 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.
6. 伊東信行編著. 1994. 標的器官の毒性病理 (1), 呼吸器系 A . 鼻腔.最新毒性病理学. 東京:中山書店、85-95.

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はなかつた。

試験計画書に従わなかつたことについては、計画書では「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 位までを表示する。」とした。しかし、測定濃度が低濃度であったため、吸入チャンバー内の被験物質濃度は小数点以下第 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。