

### 5.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

#### 1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは $\gamma$ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

#### 2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレは $\gamma$ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と

同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24時間及び48時間処理における被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

#### 5.6.4 染色体異常試験

##### 1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは $\gamma$ 線滅菌済プラスチックプレート（直径60mm）を用いた。プレートは各群4枚とした。
- (2) プレート当たり $2 \times 10^4$ 個の細胞（培養液5.0mL）を播種した。培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.933mLを除き、S9 mix 0.833mLに続きCP 0.100mL（最終濃度：14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.050mLを取り除き、溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050mLを取り除き、各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.150mLを除き、MMC 0.150mL（最終濃度：0.075  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6時間培養した。
- (3) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液5.0mLを加え、更に18時間培養を続けた。
- (4) 各群2枚のプレート（枝番号-1及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約2時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を0.1mL加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を0.075M塩化カリウム溶液で約15分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1液で固定した。固定した細胞をスライドガラス1枚につき2箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞滴下後、約1日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約15分間染色して染色体標本を作製した。
- (5) 残る各群2枚のプレート（枝番号-3及び-4）は、培養6時間後と同様の方法で18時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

## 6. 試験結果

### 6.1 細胞増殖抑制試験

#### 6.1.1 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Appendix 1-1 及び 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び 2-2 に示した。

##### 1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では 194 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 113.5 µg/mL と算出された。また、非代謝活性化では 48.4 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 38.5 µg/mL と算出された。

##### 2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化では 96.9 µg/mL 以上の用量で、非代謝活性化では 194 µg/mL 以上の用量で認められた。

##### 3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、388 µg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、24.2 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

#### 6.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Table 2-4 に示した。

##### 1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法では 96.9 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 69.8 µg/mL と算出された。また、48 時間処理法では 96.9 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 68.4 µg/mL と算出された。

##### 2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、194 µg/mL 以上の用量で認められた。

##### 3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、24 時間処理では 388 µg/mL 以上の用量で、48 時間処理では 194 µg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、12.1 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

## 6.2 染色体異常試験

### 6.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 1-1、Table 1-1 及び Appendix 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2、Table 1-2 及び Appendix 3-2 に示した。

#### 1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化では 133 µg/mL 以上の用量で認められた。非代謝活性化では認められなかった。

#### 2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、代謝活性化では 133 µg/mL で認められたが、非代謝活性化では全用量で認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、59.3 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

#### 3) 染色体構造異常

染構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化においては、133 µg/mL では 17.0%、88.9 µg/mL では 11.0%、59.3 µg/mL では 11.0%、39.5 µg/mL では 7.0%、26.3 µg/mL では 0.5% を示し、133~59.3 µg/mL では 10% 以上を示したことから陽性と、39.5 µg/mL では 5% 以上 10% 未満を示したことから疑陽性と、その他の用量では 5% 未満であったことから陰性と判定された。染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20% に何らかの以上が見られる用量である D20 値は 0.15 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は 160 であった。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、88.9 µg/mL では 4.0%、59.3 µg/mL では 0.5%、39.5 µg/mL では 0.5%、26.3 µg/mL では 1.0%、17.6 µg/mL では 1.5% を示し、全用量で 5% 未満であったことから陰性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は試験施設の背景値 (Attached Data 3) の陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

#### 4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、短時間処理法の代謝活性化においては、133 µg/mL では 0.5%、88.9 µg/mL では 1.5%、59.3 µg/mL では 1.0%、39.5 µg/mL では 1.0%、26.3 µg/mL では 0.5% を示し、全ての用量で 5% 未満であったことから陰性と判定された。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、88.9 µg/mL では 0.5%、59.3 µg/mL では 0%、39.5 µg/mL では 0%、26.3 µg/mL では 0%、17.6 µg/mL では 0%、を示し、全ての用量で 5% 未満であったことから陰性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、

M-1346

また試験施設の背景値（Attached Data 3）と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

## 7. 考察

アセナフチレンは、細胞増殖抑制試験の短時間処理法の代謝活性化では 194  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において、非代謝活性化では 48.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 96.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 113.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 38.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 69.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 68.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 133  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、非代謝活性化では 88.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定した。ただし、染色体異常試験の短時間処理法で、染色体構造異常誘発性が明らかに陽性であることが確定したため、連続処理法の用量については、設定を行ったが、実験は実施しなかった。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の総出現率の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では、最高用量の 133  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 39.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、陽性の判定基準である 10%以上から疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満からを示し、ほぼ用量依存的な増加が認められたため、総合的に陽性と判定した。一方、短時間処理法の非代謝活性化では、全用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、総合的に陰性と判定した。

なお、短時間処理法の代謝活性化における染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20%に何らかの以上が見られる用量である D20 値は、0.15  $\text{mg}/\text{mL}$ 、単位用量あたりの染色分体型交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は、160 であった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、アセナフチレンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。

陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。更に、いずれの群においても同一用量における 2 枚のプレート間に染色体異常細胞の出現頻度の著しい差は認められなかったことから、試験は適切に実施されたと判断した。

アセナフチレンは、細菌を用いる復帰突然変異試験において TA1537 及び TA1538 菌株に対して、代謝活性化及び非代謝活性化の条件下で陰性を示しているが、全ての

M-1346

1,2-環結合型の acenaphene は、TA1537 菌株において間接型の frameshift mutagen であることが報告されている<sup>6)</sup>。

以上の結果から、アセナフチレンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。



Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group  
[Short-term treatment: +S9 mix]

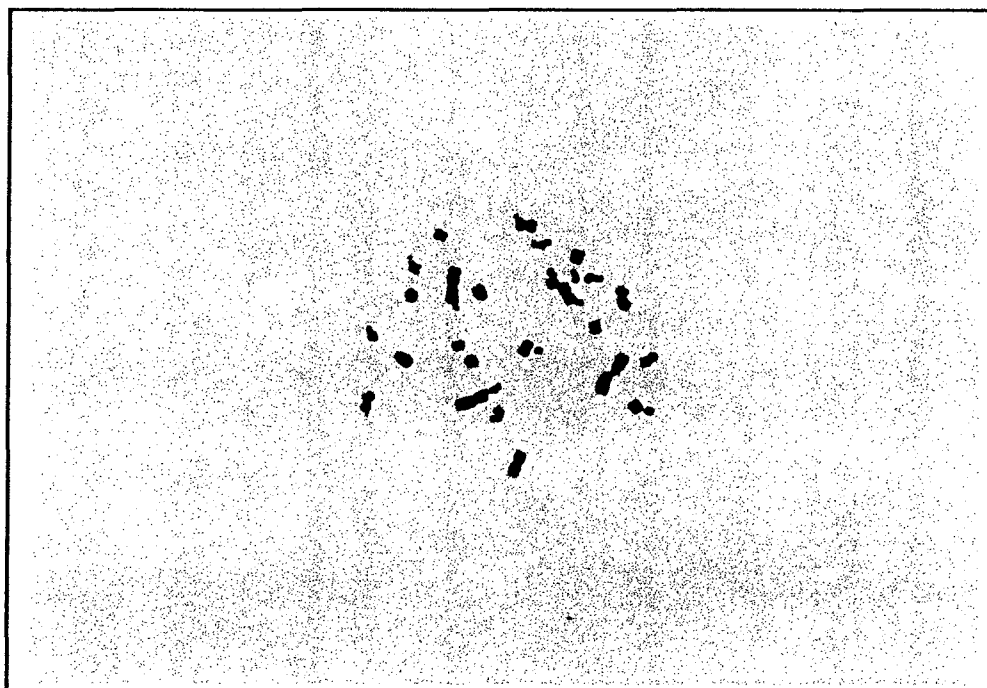


Photo. 2 A metaphase chromosome from the 133 µg/mL group with  
chromatid breaks  
[Short-term treatment: +S9 mix]



Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene  
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge-ment
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	1	0	1	-	68-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	115	100	0	0	0	-	58-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		26.3	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	61	100	1	0	1	-	47-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	61	100	0	0	0	-	46-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(57)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		39.5	100	2	4	0	0	0	5	0	5		61	100	1	0	1		18-1
			100	2	8	0	0	0	9	0	9	±	53	100	1	0	1	-	84-1
			200	4(2.0)	12(6.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	14(7.0)	0(0.0)	14(7.0)		(53)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		59.3	100	3	10	0	0	0	12	1	13		38	100	1	0	1		64-1
			100	5	9	0	0	0	10	0	10	+	46	100	1	0	1	-	32-1
			200	8(4.0)	19(9.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	22(11.0)	1(0.5)	23(11.5)		(39)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		88.9	100	4	8	0	0	1	12	0	12		38	100	2	0	2		66-1
			100	3	9	0	0	0	10	0	10	+	30	100	1	0	1	-	73-1
			200	7(3.5)	17(8.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	22(11.0)	0(0.0)	22(11.0)		(32)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		
		133	61	6	8	0	0	0	11	0	11		22	61	0	0	0		70-1
			39	3	7	0	0	0	8	0	8			39	0	0	0		70-2
			85	8	6	0	0	0	12	0	12	+	0	85	1	0	1	-	89-1
			15	3	0	0	0	0	3	0	3			15	0	0	0		89-2
			200	20(10.0)	21(10.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	34(17.0)	0(0.0)	34(17.0)		(10)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	3	54	0	0	0	54	0	54		107	100	0	0	0		91-1
			100	9	51	0	0	0	56	0	56	+	115	100	0	0	0	-	29-1
			200	12(6.0)	105(52.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	110(55.0)	0(0.0)	110(55.0)		(103)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

#### 4. 要約

アセナフチレンの28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0(0.5 w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20及び100 mg/kgとし、また、対照群と100 mg/kg投与群の一部の個体(1群雌雄各6匹)については投与期間終了後2週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

詳細な観察を含む一般状態では、100 mg/kg投与群の雌で流涎が散見されたほか、一部で粗毛及び削瘦も認められた。更に、オープンフィールド内観察に立ち上がり回数<sup>1</sup>の低値も認められた。

機能検査、握力及び自発運動量では、100 mg/kg投与群の雄で聴覚に、100 mg/kg投与群の雌で痛覚に弱い反応の動物が散見された。また、100 mg/kg投与群の雌で前肢握力の低値が、100 mg/kg投与群の雌雄で自発運動量の低値がみられた。

体重及び摂餌量では、低値が100 mg/kg投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示した。

尿検査(摂水量を含む)では、沈渣において小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向が100 mg/kg投与群の雄で、摂水量及び尿量の高値と浸透圧の低値が100 mg/kg投与群の雌雄でみられた。

血液学検査では、網赤血球率の低値及び血小板数の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、ヘモグロビン量及び平均赤血球色素濃度の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が100 mg/kg投与群の雌でみられた。

血液化学検査では、総コレステロール及びリン脂質の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、総たん白質及びアルブミンの高値が100 mg/kg投与群の雄でみられた。

病理学検査では、剖検で粗毛、低栄養状態及び子宮の小型化が100 mg/kg投与群の雌でみられ、重量及び組織学検査では20 mg/kg以上の投与群の雌雄で肝臓に、100 mg/kg投与群の雌雄で胸腺、心臓、大腿骨(骨髄を含む)、胸骨(骨髄を含む)、膀胱、腎臓、脾臓及び副腎に、雄で胃に、雌で腸間膜リンパ節、子宮及び卵巣に変化が認められた。

上述した変化のうち、回復期間中あるいは回復期間終了時にも雌雄の握力及び尿検査に、雄の病理学検査の副腎に変化がみられたが、その他の変化は休薬とともに軽減あるいは消失し、回復性を示した。

以上の結果、アセナフチレンの本試験条件下における無影響量は病理学検査における肝臓の変化などから4 mg/kg/dayと推定された。

B-6582

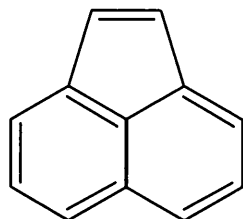
## 6. 試験材料及び方法

### 6.1 被験物質及び媒体

#### 6.1.1 被験物質

被験物質は新日鐵化学株式会社より提供された。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、検査成績書を添付資料1に示した。

名称	:	アセナフチレン
英名	:	Acenaphthylene
CAS 番号	:	208-96-8
官報公示整理番号	:	4-644
分子量	:	152.19
分子式	:	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>
構造式	:	



ロット番号	:	7-MOM
純度	:	96.3 %
不純物	:	
アセナフテン	:	3.3 %
入手量	:	775 g
安定性	:	投与終了後、被験物質について提供先で安定性を実施し、安定であることが確認された（添付資料2）。
保存方法	:	冷蔵（許容範囲 1~10°C；実測値 3~7°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用した。 換気のよい場所で行い粉塵が飛散しないように取り扱った。
返却	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は提供先に返却し、安定性を確認後廃棄した。

### 6.1.2 媒体

名称	:	メチルセルロース 400cP
ロット番号	:	EWM1974
メーカー	:	和光純薬工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

なお、媒体については、本試験に先立って実施した被験液中のアセナフチレンの安定性・均一性試験（試験番号：A-2171）において、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液中での被験物質の安定性及び均一性に良好な結果が得られていることから、0.5w/v%メチルセルロース水溶液を選択した。

## 6.2 投与液の調製

### 6.2.1 媒体の調製

調製方法	:	メチルセルロース 400cP を注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号；8K74）に溶解し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液とした。
保存方法	:	冷所（冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C；実測値 4~6°C）に保存し、調製後 8 日以内に被験液の調製に使用した。

### 6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して 0.8 mg/mL 液（低用量群液）、4 mg/mL 液（中用量群液）及び 20 mg/mL 液（高用量群液）を調製した。被験液は 8 日に 1 回以上の頻度で調製し、調製後 8 日以内に使用した。

### 6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用時まで冷所（冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C；実測値 3~6°C）に保存した。

### 6.2.4 媒体中での安定性

本被験物質の 0.1 及び 200 mg/mL 懸濁液（媒体：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）は、冷所（冷蔵庫内、1~10°C）、遮光で 8 日間、その後室温で 24 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-2171、添付資料 3）。

### 6.2.5 被験液の濃度・均一性確認

投与 1 週と 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表

B-6582

示値に対する濃度の割合は 100.1~106.5 % (許容範囲: 表示値に対する割合; 100±10 %)、均一性は 0.6~1.9 % (許容値: CV10 %以下) であり、いずれも許容範囲内であった (添付資料 4-1 及び 4-2)。分析法の概略を次に示す。

1 濃度当たりの採取本数及び採取量

- ： 3本 (上、中及び下層から採取)、1本につき 10 mL
- 測定対象物質 : アセナフチレン
- 測定対象標準物質
- 名称 : アセナフチレン
- ロット番号 : 7-MOM
- 保存方法 : 冷蔵 (許容範囲 1~10°C ; 実測値 2~7°C)
- 保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

HPLC 測定条件

- カラム : Cosmosil 5C18-MS-II  
(4.6 mm×150 mm、5 µm、ナカライテスク株式会社)
- カラム恒温槽設定温度 : 30°C
- 移動相 : 精製水/アセトニトリル (3/7、v/v)
- 流速 : 1.0 mL/min
- 検出 : UV (測定波長 254 nm)
- 注入量 : 10 µL
- オートサンプラー設定温度 : 10°C
- 分析時間 : 8 分
- 注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液 (システム適合性用)
2	3	標準溶液 (定量用)
3	1	測定実測試料 (0.8 mg/mL-上層)
4	1	測定実測試料 (4 mg/mL-上層)
5	1	測定実測試料 (20 mg/mL-上層)
6	1	測定実測試料 (0.8 mg/mL-中層)
7	1	測定実測試料 (4 mg/mL-中層)
8	1	測定実測試料 (20 mg/mL-中層)
9	1	測定実測試料 (0.8 mg/mL-下層)
10	1	測定実測試料 (4 mg/mL-下層)
11	1	測定実測試料 (20 mg/mL-下層)

標準溶液及び測定実測試料の測定は、注入後 24 時間以内に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内における 24 時間保存後の安定性が確認

されている。

### 6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用された系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

### 6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 47 匹<sup>注)</sup> を 5 週齢で入手し、当所で 8 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加量、一般状態及び詳細な一般状態の観察に異常がみられず健康と思われる雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 209~234 g、雌で 147~177 g であった。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外した。

注) : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 45 匹であったが、実際には雌雄各 47 匹が納入された。

### 6.5 飼育条件

動物は温度 21~25°C (許容範囲:23±3°C)、相対湿度 46~61 %、(許容範囲:50±20 %)、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (303 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D 350×H 200 mm : 日本ケージ株式会社) で個別飼育し、毎日 1 回の飼育室内の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 : 090309、090407) 及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

### 6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用ロットについて Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社に水道法に準拠する水質検査を定期的に (年 4 回) 依頼した。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

### 6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及

び用量ごと（対照群、低、中及び高用量群の順）に4桁の番号をつけた。この場合、1000の位は群、100の位は性（0番を雄、1番を雌）、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量（群）ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

### 6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回（7回/週）とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間（14日間）とし、この間投与を行わなかった。

### 6.9 投与方法

投与容量は5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08:00~11:21の間）。対照群には媒体（0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）を同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL）は最新の体重を基準に算出した。

### 6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

アセナフチレンの0（0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果<sup>1)</sup>、主な変化として、雌雄で1000 mg/kg投与群で全例が死亡し、100 mg/kg以上の投与群の器官重量に変化がみられことから、本試験における投与量は、100 mg/kg投与群を高用量とし、公比5で除し、20 mg/kgを中用量に、4 mg/kgを低用量に設定し、対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物を主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成表を表1に示す。

表 1.群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	4	0.8	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	20	4	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	100	20	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

## 7. 試験結果

### 7.1 一般状態の観察

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

#### 1) 投与期間

流涎が 100 mg/kg 投与群の雌で投与 16 日以降に散見された。また、粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/12 例で、削瘦が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例でいずれも投与 24 日以降に認められた。

#### 2) 回復期間

いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

### 7.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量

#### 7.2.1 詳細な一般状態の観察

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

#### 1) 投与期間

##### (1) 投与 1 週

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

##### (2) 投与 2 週

手に持っただけの観察において軽度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

##### (3) 投与 3 週

手に持っただけの観察において軽度あるいは中等度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 3/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

##### (4) 投与 4 週

手に持っただけの観察において軽度な粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/12 例、軽度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 4/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

#### 2) 回復期間

##### (1) 回復 1 週

オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

##### (2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、100 mg/kg 投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。



### 7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

#### 1) 投与 4 週

聴覚反応において弱い反応を示す動物が 100 mg/kg 投与群の雄 3/12 例で、また、痛覚反応において弱く反応する動物が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例で認められた。

#### 2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、100 mg/kg 投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

#### 1) 投与 4 週

前肢の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

#### 2) 回復 2 週

前肢及び後肢の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

### 7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

#### 1) 投与 4 週

測定開始後 20~30 分の測定値において有意な高値が 20 mg/kg 投与群の雌と 100 mg/kg 投与群の雄で有意な低値が、測定開始後 0~10 分及び 10~20 分の測定値において有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。更に、100 mg/kg 投与群の雄では測定開始後 0~60 分の測定値にも有意な低値が認められた。

#### 2) 回復 2 週

測定開始後 40~50 分の測定値において有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

### 7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

#### 1) 投与期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で投与 4 から 28 日、雌で投与 10 から 28 日に認められた。更に、100 mg/kg 投与群の雌雄では投与期間中の体重増加量でも有意な低値が認められた。

#### 2) 回復期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で回復 1 から 14 日に認められた。

#### 7.4 摂餌量

成績を Fig.6、7、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

##### 1) 投与期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で投与 7 から 28 日に認められた。

##### 2) 回復期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で回復 7 日に認められた。

#### 7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

##### 1) 投与 4 週

沈渣において小円形上皮細胞の陽性例が対照群の雌 1/12 例、20 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 4/12 例、雌 2/12 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雄で発現頻度の増加傾向が認められた。また、摂水量及び尿量の有意な高値と浸透圧の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

##### 2) 回復 2 週

沈渣において小円形上皮細胞の陽性例が、100 mg/kg 投与群の雌雄各 2/6 例でみられ発現頻度の増加傾向が認められた。また、尿量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で、浸透圧の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

#### 7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

##### 1) 投与期間終了時

赤血球数の有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雄と 20 mg/kg 投与群の雌で、ヘモグロビン量と平均赤血球血色素濃度の有意な高値が 100 mg/kg の投与群の雌で、網赤血球率の有意な低値と血小板数の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が 100 mg/kg 投与群の雌で、また、白血球百分率でリンパ球比率の有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雌で認められた。

##### 2) 回復期間終了時

網赤血球率の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、血小板数の有意な高値とフィブリノーゲン量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。また、白血球百分率で好塩基球比率と分画実数で好塩基球の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

#### 7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

##### 1) 投与期間終了時

AST 及びクレアチニンの有意な低値が 100 mg/kg の投与群の雌で、総コレステロールとリン脂質の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、トリグリセライドの有意な

高値が 4 mg/kg 投与群の雄で、尿素窒素の有意な低値が 20 mg/kg 投与群の雌で、無機リンの有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雌で、総たん白質とアルブミンの有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

## 2) 回復期間終了時

無機リンの有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、グルコースの有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロール及びリン脂質の有意な高値と総たん白質、アルブミン及び A/G 比の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

## 7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

### 1) 投与期間終了時

最終体重の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

脳	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
胸腺	:	絶対及び相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
心臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
肝臓	:	相対重量の有意な高値が 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。
脾臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
腎臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
副腎	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
卵巣	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。

### 2) 回復期間終了時

最終体重の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

脳	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
胸腺	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
心臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

		られた。
肝臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
脾臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
腎臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
副腎	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
精巣	:	絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群で認められた。
精巣上体	:	絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群で認められた。

### 7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

#### 1) 投与期間終了時

外部所見	:	粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/6 例で、低栄養状態が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
子宮	:	小型化が 100 mg/kg 投与群の 2/6 例で認められた。

#### 2) 回復期間終了時

腎臓	:	腎盂拡張が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
甲状腺	:	小型化が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。

### 7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-6 及び Appendix 173~244 に示した。

#### 1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が副腎、大腿骨（骨髄を含む）、胸骨（骨髄を含む）、腎臓、肝臓、腸間膜リンパ節、脾臓、胃、胸腺、膀胱及び子宮で認められた。

副腎	:	軽微な球状帯のび慢性肥大が、20 mg/kg 投与群の雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
大腿骨（骨髄を含む）	:	軽微あるいは軽度な骨髄細胞密度の低下が 100 mg/kg

- 投与群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。
- 胸骨（骨髄を含む）： 軽微な骨髄細胞密度の低下が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。
- 腎臓： 軽微~中等度の尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例で、軽微な単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例で認められた。
- 肝臓： 軽微なクッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例で、軽微な肝細胞の単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例で、軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 20 mg/kg 投与群の雄 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例で認められた。
- 腸間膜リンパ節： 軽微な萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌 3 例で認められた。
- 脾臓： 軽微なリンパ濾胞の萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌 2 例で認められた。
- 胃： 軽微な腺胃のびらんが 100 mg/kg 投与群の雄 2 例で認められた。
- 胸腺： 軽微~中等度な萎縮が 100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 4 例で認められた。
- 膀胱： 軽微な被蓋細胞の肥大が 100 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌全例で認められた。
- 子宮： 剖検において小型化が認められた 100 mg/kg 投与群の 2 例に軽度な萎縮が認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓： 軽微な尿細管拡張が 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な再生尿細管が対照群の雄 3 例と雌 1 例、4 mg/kg 投与群の雄 1 例、20 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で、軽微な皮髄境界部の鉍質沈着が 4 及び 20 mg/kg 投与群の雄各 1 例に、軽微な間質性の細胞浸潤が 4 mg/kg 投与群の雄 1 例、20 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に、腎芽腫が 4 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。
- 肝臓： 軽微あるいは軽度な辺縁帯の肝細胞の空胞化が対照群の雌雄各 2 例、4 mg/kg 投与群の雌雄各 3 例、20 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 5 例、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で、軽微な髓外造血が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な限局性の出血が 20 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽

- 微な微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、4 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例、20 mg/kg 投与群の雌雄各 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 2 例で認められた。
- 肺（気管支を含む）： 軽微な肺胞マクロファージの出現が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。
- 前立腺： 軽微あるいは軽度な間質性の細胞浸潤が対照群の 3 例、100 mg/kg 投与群の 2 例で認められた。
- 脾臓： 軽微な髄外造血が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例で認められた。
- 精巣： 軽微な精細管の萎縮が 100 mg/kg 投与群の 1 例で認められた。
- 甲状腺： 軽微な異所性胸腺が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な總後体遺残が対照群の雌雄各 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 3 例で認められた。

## 2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が副腎、腎臓及び肝臓で認められた。

- 副腎： 軽微な球状帯のび慢性肥大が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
- 腎臓： 軽微あるいは軽度な尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例に（剖検において腎盂拡張がみられた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例を含む）認められた。
- 肝臓： 軽微なクッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄 4 例で、軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例で認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓： 剖検において腎盂拡張が認められた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で中等度な腎盂拡張と軽度な再生尿細管が認められた。また、軽微な再生尿細管が対照群の雄 2 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な皮髄境界部の鉍質沈着が対照群の雌 1 例で、軽微な間質性な細胞浸潤が対照群の雄 2 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例で認められた。
- 肝臓： 軽微あるいは軽度な辺縁帯の肝細胞の空胞化が対照群の雌 3 例で、軽微な髄外造血が 100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 3 例と雌 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 4 例で認められた。

B-6582

- 脾臓 : 軽微な髄外造血が対照群及び 100 mg/kg 投与群の雌各 1 例で認められた。
- 甲状腺 : 剖検において小型化が認められた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で軽微な異所性胸腺と鰓後体遺残がみられたが、小型化に相当する所見は認められなかった。

## 8. 考察

アセナフチレンの 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v% メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20 及び 100 mg/kg とし、また、対照群と 100 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

詳細な観察を含む一般状態では、100 mg/kg 投与群の雌で流涎が散見されたほか、一部で粗毛及び削瘦も認められた。更に、オープンフィールド内観察に立ち上がり回数 of 低値も認められた。なお、これらの変化は休薬により消失した。その他、回復期間中に 100 mg/kg 投与群の雄でオープンフィールド内観察に立ち上がり回数の低値がみられたが、投与期間中には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

機能検査、握力及び自発運動量では、100 mg/kg 投与群の雄で聴覚に、100 mg/kg 投与群の雌で痛覚に弱い反応の動物が散見された。また、100 mg/kg 投与群の雌で前肢握力の低値が、100 mg/kg 投与群の雌雄で自発運動量の低値がみられた。これらの変化は病理学検査では中枢及び末梢神経系に異常はみられていないものの被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復 2 週においても 100 mg/kg 投与群の雌雄で前肢及び後肢握力の低値が認められた。その他、自発運動量について 20 mg/kg 投与群の雌で高値が投与 4 週に、100 mg/kg 投与群の雌で高値が回復 2 週に認められたが、いずれもごく軽度で一時的な変化であることから偶発性と判断した。

体重及び摂餌量では、低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示し、増加抑制が認められた。回復期間中においても 100 mg/kg 投与群の雌雄で低値がみられたが、体重増加量及び回復 14 日の摂餌量には対照群と差がなく休薬による回復性が認められた。

尿検査 (摂水量を含む) では、沈渣において小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雄で、摂水量及び尿量の高値並びに浸透圧の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、被験物質投与による腎臓への影響が疑われた。なお、回復 2 週においても沈渣で小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向及び尿量の高値あるいは浸透圧の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、休薬による回復性は認められなかった。

血液学検査では、網赤血球率の低値及び血小板数の高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、ヘモグロビン量及び平均赤血球血色素濃度の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が 100 mg/kg 投与群の雌でみられ、いずれの変化も発現機序は明らかではないものの被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復期間終了時においても血小板数の高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたものの程度は軽減し、網赤血球率も増加に転じていることから、休薬により回復性が認められた。その他、赤血球数の



低値が 4 mg/kg 投与群の雄と 20 mg/kg 投与群の雌で、白血球百分率でリンパ球比率の低値が 4 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で高用量群には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。また、回復期間終了時にフィブリノーゲン量及び白血球百分率と実数で好塩基球の低値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度で投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

血液化学検査では、総コレステロールとリン脂質の高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、総たん白質及びアルブミンの高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられ、被験物質投与による肝臓への影響が疑われた。回復期間終了時においても総コレステロール及びリン脂質の高値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたものの程度は軽減していることから、休薬による回復性が認められた。その他、投与期間終了時に AST 及びクレアチニンの低値が 100 mg/kg の投与群の雌でみられたが、ごく軽度であり、障害を示唆するとされる高値ではないことから、重要ではないと判断した。また、トリグリセライドの高値が 4 mg/kg 投与群の雄で、尿素窒素の低値が 20 mg/kg 投与群の雌で、無機リンの低値が 4 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で高用量群には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。更に、回復期間終了時に、無機リンの高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、グルコースの低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、総たん白質、アルブミン及び A/G 比の低値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

病理学検査では、剖検で粗毛、低栄養状態及び子宮の小型化が 100 mg/kg 投与群の雌でみられ、組織学的変化としては肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 20 mg/kg 以上の投与群の雄及び 100 mg/kg 投与群の雌で、クッパー細胞の色素沈着及び単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。更に、胸腺の萎縮、大腿骨（骨髄を含む）と胸骨（骨髄を含む）の骨髄細胞密度の低下、腎臓の尿細管の好塩基性化及び単細胞壊死、膀胱の被蓋細胞の肥大並びに副腎の球状帯のび慢性肥大の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、腺胃のびらんが 100 mg/kg 投与群の雄で、腸間膜リンパ節、脾臓のリンパ嚢胞及び子宮の萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、重量の変化としては肝臓の相対重量の高値が 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、心臓の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、胸腺の絶対及び相対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雌で、脾臓の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、卵巣の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。回復期間終了時には、組織学的変化として、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、クッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄で、腎臓の尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、副腎の球状帯のび慢性肥大の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雄で認められたが、副腎の変化を除いてはいずれも投与期間終了時より軽減するか消失し、回復性が示唆された。なお、100 mg/kg 投与群で認められた投与期間終了時の脳、腎臓及び副腎の相対重量の高値、回復期間終了時