メタリルクロライドのマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0270

CAS　No．563－47－3

平成10年6月30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

メタリルクロライドのマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0270

本　　文

本文目次　　頁

要約 1

Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の性状等
Ⅰ－1－1　名称と別名 3
Ⅰ－1－2　構造式、示性式、分子量 3
Ⅰ－1－3　物理化学的性状等 3

Ⅰ－2　被験物質の使用ロット等 4

Ⅰ－3　被験物質の特性・同一性・安定性
Ⅰ－3－1　特性・同一性 4
Ⅰ－3－2　安定性 4

Ⅰ－4　試験動物 4

Ⅱ　試験方法

Ⅱ－1　投与
Ⅱ－1－1　投与経路、投与方法及び投与期間 5
Ⅱ－1－2　投与濃度 5
Ⅱ－1－3　被験物質の発生方法と濃度調整 5
Ⅱ－1－4　被験物質濃度の測定 5

Ⅱ－2　動物管理
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

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法
Ⅱ－3－1　動物の一般状態の観察 7
Ⅱ－3－2　体重測定 7
Ⅱ－3－3　摂餌量測定 7

II－3－4　血液学的検査 7
II－3－5　血液生化学的検査 7
II－3－6　尿検査 8
II－3－7　病理学的検査 8

II－4　数値処理と統計学的方法
II－4－1　数値の取り扱いと表示 8
II－4－2　母数の取り扱い 9
II－4－3　統計方法 9

II－5　試資料の保管 10

III　試験成績

III－1　動物の状態観察
III－1－1　生死状況 11
III－1－2　一般状態 11
III－1－3　体重 11
III－1－4　摂餌量 12

III－2　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査
III－2－1　血液学的検査 12
III－2－2　血液生化学的検査 12
III－2－3　尿検査 13

III－3　病理学的検査
III－3－1　剖検 13
III－3－2　臓器重量 13
III－3－3　病理組織学的検査 14

III－4　死因 16

IV　考察及びまとめ

IV－1　生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量 17
IV－2　腫瘍性病変 17

Ⅳ－３　非腫瘍性病変 18
Ⅳ－４　その他 18

Ⅴ　結論 19

Ⅵ　文献 20

要約

メタリルクロライドのがん原性を検索する目的でマウスを用いた吸入による２年間(104週間)の試験を実施した。

試験にはCrj:BDF1マウスを用い、それぞれ被験物質投与群３群と対照群１群の計４群の構成で各群雌雄各50匹(合計400匹)を使用した。投与はメタリルクロライドを１日６時間、１週５日間、104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に50ppm、100ppm、200ppmとした。また、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、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

投与の結果、最終計測週(104 週)における生存率は、雌雄ともすべての投与群で対照群に比べ、やや高い値であった。体重は雌雄ともに暴露濃度に対応した群で摂餌量の減少に伴う増加の抑制がみられた。病理組織学的検査では雌雄とも前胃の過形成と扁平上皮乳頭腫の発生増加、また統計学的有意差は示さないものの雄の100ppm群の１例に扁平上皮癌の発生が認められ、被験物質の投与による影響と考えられた。また雌の投与群に認められたハーダー腺の腺腫の発生増加は、被験物質の投与による影響を否定できなかった。非腫瘍性病変としては、雌雄の投与群で鼻腔内にエオジンに淡染する滲出物の出現が雄の100ppm群まで、雌では最低濃度である50ppm群までみられ、この部位に嗅上皮の萎縮や嗅上皮及び腺の呼吸上皮化生も観察された。また加齢性病変として報告されている嗅上皮や呼吸上皮のエオジン好性変化の発生も投与群で増加しており、呼吸上皮のエオジン好性変化の増加は雌雄とも最低濃度である50ppm群まで、嗅上皮のエオジン好性変化の増加は雌雄とも100ppm群まで認められた。これらの所見は被験物質の投与による影響であると考えられた。

以上より、雄には前胃の扁平上皮乳頭腫と腫瘍の前段階の変化と考えられる過形成の発生増加が認められ、100ppm群の１例に扁平上皮癌の発生もみられ、これらの結果はメタリルクロライドのがん原性を示唆する証拠であると考えられた。雌にも前胃の扁平上皮乳頭腫と腫瘍の前段階の変化と考えられる過形成の発生増加が認められ、これらの結果はメタリルクロライドのがん原性を示唆する証拠であると考えられた。また、ハーダー腺の腺腫の発生増加も認められ、この腫瘍の増加は被験物質の投与による影響を否定できなかった。

メタリルクロライド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	50	100	200	ペトー	コクランアミテージ
	検査動物数		50	50	50	50	検定	検定
良性腫瘍	肺	細気管支ー肺胞上皮腺腫	1	8	5	7		
	前胃	扁平上皮乳頭腫	1	0[a)]	3	4	↑	
	肝臓	肝細胞腺腫	5	5	2	3		
	ハーダー腺	腺腫	3	7	9	5		
悪性腫瘍	肺	細気管支ー肺胞上皮癌	0	3	2	3		
	リンパ節	悪性リンパ腫	10	8	6	1**		↓↓
	脾臓	悪性リンパ腫	4	0	0	2		
		血管肉腫	2	3	1	1		
	前胃	扁平上皮癌	0	0[a)]	1	0		
	肝臓	血管肉腫	4	7	1	2		
		肝細胞癌	5	2	5	1		
	精巣上体	組織球性肉腫	3	0	0	0		
	全臓器	組織球性肉腫	5	2	4	1		
		悪性リンパ腫	14	8	6	3*		↓↓
	前胃	(扁平上皮乳頭腫/扁平上皮癌)	1	0[a)]	4	4	↑	

メタリルクロライド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	50	100	200	ペトー	コクランアミテージ
	検査動物数		50	48	50	49	検定	検定
良性腫瘍	肺	細気管支ー肺胞上皮腺腫	1	3	1	0		
	前胃	扁平上皮乳頭腫	1	0	5	4	↑	
	肝臓	肝細胞腺腫	3	4	1	3		
	下垂体	腺腫	11[a)]	4	4	2*[b)]		↓↓
	卵巣	嚢胞腺腫	2	1	4	1		
	ハーダー腺	腺腫	0	4	7*	8**	↑↑	↑↑
悪性腫瘍	リンパ節	悪性リンパ腫	11	10	12	7		
	脾臓	悪性リンパ腫	8	9	5	5		
	子宮	組織球性肉腫	5	11	16	10		
	全臓器	組織球性肉腫	6	14	18	12		
		悪性リンパ腫	19	19	17	12		

a)：検査動物数 49、b)：検査動物数 48、他は上段に表示の動物数と同じ

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

＊：有意水準5％以下で有意　　＊＊：有意水準1％以下で有意（フィッシャー検定）

↑：有意水準5％以下で有意増加　　↑↑：有意水準1％以下で有意増加（ペトー、コクランアミテージ検定）

↓：有意水準5％以下で有意減少　　↓↓：有意水準1％以下で有意減少（コクランアミテージ検定）

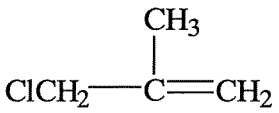
Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の性状等

Ⅰ－1－1　名称と別名

名　　称 ：メタリルクロライド(2-Methallyl chloride)
別　　名 ：3-Chloro-2-methylpropene　　Isobutenyl chloride
Methyl allyl chloride　　3-Chloro-2-methyl-1-propene
β- methallyl chloride　　2-Methyl-2-propenyl chloride
CAS No.　：563-47-3

Ⅰ－1－2　構造式、示性式、分子量



C_4H_7Cl(分子量：90.55)

Ⅰ－1－3　物理化学的性状等

性　　状 ：不快臭をもつ揮発性の無色透明の液体
沸　　点 ：71～72℃
融　　点 ：＜－80℃
比　　重 ：0.926～0.930(20/20℃)
蒸 気 圧 ：101.7mmHg(20℃)
溶 解 性 ：水には難溶、各種有機溶剤に可溶
保存条件 ：室温で暗所に保管

Ｉ－２　被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：LKG5978（1994年　7月　5日～1994年 11月 9日）
CAK4434（1994年 11月 10日～1995年　8月 9日）
SKK4584（1995年　8月 10日～1996年　7月 1日）
製　　造　　元：和光純薬工業株式会社
グ　レ　ー　ド：和光一級
純　　度：95%以上

Ｉ－３　被験物質の特性・同一性・安定性

Ｉ－３－１　特性・同一性

被験物質の特性・同一性は、ロットごとにマススペクトル、赤外吸収スペクトルの測定を実施した。測定した被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルはそれぞれの文献値（文献1，2）と比較し、被験物質の特性・同一性を確認した。なお、それらの結果について、 APPENDIX 0 1 に示した。

Ｉ－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赤外吸収スペクトルの測定及びガスクロマトグラフ分析を実施し、それぞれのデータを比較することにより確認した。なお、それらの結果については、APPENDIX 0 2に示した。

Ｉ－４　試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)（神奈川県厚木市下古沢795番地）のCrj:BDF1マウス(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各248匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見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(投与開始時体重範囲、雄:17.4～24.4g、雌:17.4～20.4g)を選別し、試験に供した。

II　試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

II－1　投与

II－1－1　投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。すなわち吸入チャンバー内で試験動物に設定濃度に調整したメタリルクロライドを全身暴露することにより投与した。投与期間は104 週間とし、1日6時間、1週5日間(祝祭日を除く)、暴露を行った。なお、対照群の動物には新鮮空気のみを暴露した。

投与期間中の総暴露回数は 104 週間で 489 回であった。

II－1－2　投与濃度

投与濃度は2週間試験（試験番号：0196）及び 13 週間試験（試験番号：0209）の結果をもとに雌雄とも 50ppm、100ppm、200ppm に設定した。（文献 3）

II－1－3　被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の発生方法は FIGURE 1 に示した。まず、発生容器内のメタリルクロライドを循環式恒温槽で加熱（30℃）しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。次に、このメタリルクロライド蒸気を循環式高温槽で冷却、再加熱し、新鮮空気と混合して一定濃度に調整した後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバーのラインミキサーに供給した。最終的には、吸入チャンバー内のメタリルクロライドの濃度をガスクロマトグラフにより監視しながら、吸入チャンバーへの供給流量を調節することによりチャンバー内濃度を設定濃度に調整した。

II－1－4　被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内のメタリルクロライドの濃度は自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフを用い、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分毎に測定した。測定結果を APPENDIX P 1 に示した。

各投与群における被験物質濃度の測定結果(平均値±標準偏差)は、50ppm 群:49.6±0.3ppm、100ppm 群:99.5±0.4ppm、200ppm 群:199.8±0.8ppm であり、各投与群ともに設定

濃度に近似した値であった。

II－2　動物管理

II－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。

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、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)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布し、またケージにも個体識別番号を付けた。投与期間においては耳パンチにより識別し、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室に収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他の試験及び異種動物と区別した。

II－2－3　飼育条件

馴化期間及び投与期間中は、動物を吸入チャンバー内で飼育した。吸入チャンバー内の環境条件を TABLE 1 に、その計測結果を APPENDIX P 2 にそれぞれ示した。また、検疫室(検疫期間)及び吸入チャンバー室(馴化期間及び投与期間)の室内環境条件は、温度23±2℃、湿度55±10%、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15～17回/時であった。

また、検疫期間中(ステンレス製網ケージ、112W×212D×120H mm)、馴化期間中(ステンレス製六連ケージ、95W×116D×120H mm)、投与期間中(ステンレス製五連ケージ、100W×116D×120H mm)とも単飼で飼育した。

飼料は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(3Mrad=30KGy-γ線照射滅菌飼料)を全飼育期間を通して固型飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は全飼育期間を通して市水(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。

なお、飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)の自社分析データを、夾雑

物については(財)日本食品分析センター(東京都渋谷区元代々木町52番1号)の分析データを使用ロットごとに入手し、また飲水については(財)食品薬品安全センター（神奈川県秦野市落合 729-5）の分析データを3ヶ月に1回入手し、それぞれ異常のないことを確認した。

II－3　観察・検査項目及び方法

II－3－1　動物の一般状態の観察

毎日1回、動物の生死及び瀕死動物を確認した。さらに、一般状態の観察を全動物について週1回行った。

II－3－2　体重測定

投与開始1週目は2回、その後14週までは週1回、それ以降は4週に1回、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時及び切迫屠殺時にも体重を測定した。

II－3－3　摂餌量測定

投与開始後14週までは週1回、それ以降は4週に1回、摂餌量を個体別に測定した。

II－3－4　血液学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりEDTA-2K 入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食(18時間以上)させた。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX Q 1 に示した。

II－3－5　血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、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血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食(18時間以上)させた。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX Q 1 に示した。

II－３－６　尿検査

投与最終週まで生存した動物について、新鮮尿を採取し尿検査を行った。検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX Q 1 に示した。

II－３－７　病理学的検査

（１）剖検

全動物について肉眼観察により剖検した。

（２）臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について TABLE 1 に示した臓器の実重量を測定した。また、定期解剖時の体重に対する百分率（体重比）を算出した。

（３）病理組織学的検査

全動物の臓器を 10％中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、TABLE 1 に示した臓器及び肉眼的に変化がみられた組織を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて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（第１レベル）、切歯乳頭（第２レベル）、第一臼歯の前端（第３レベル）の３ヶ所で切り出し（横断）、検査した。

II－４　数値処理と統計学的方法

II－４－１　数値の取り扱いと表示

チャンバー内被験物質濃度については ppm を単位とし、小数点以下４位までを測定し、小数点以下２位を四捨五入して小数点以下第１位までを表示した。

体重についてはｇを単位とし、小数点以下第１位まで計測し、そのまま小数点以下第１位まで表示した。

摂餌量についてはｇを単位とし、計測期間を通しての摂餌量を小数点以下第１位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、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。

臓器実重量についてはｇを単位とし、小数点以下第３位まで計測し、表示した。臓器重

量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、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、血液生化学的検査については APPENDIX Q 2 に示した精度により表示した。A/G比はアルブミン/(総蛋白－アルブミン)による計算で求め、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。

なお、各数値データにおいて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　母数の取り扱い

体重及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となったデータについては母数より除いた。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、欠測となったデータについては母数より除いた。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象に行い、検査数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、各群の有効動物数(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)を母数とした。ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器をもつ動物数を除いたものを母数とした。

II－４－３　統計方法

病理組織学的検査及び尿検査以外の本試験で得られた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。予備検定については５％の有意水準で両側検定を行い、最終検定では５％及び１％で両側検定を行った。

尿検査についてはχ^2検定を行った。

また、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として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、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定(文献 5)、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（下記（注）参照）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。

χ^2検定とFisher検定は対照群と各投与群間の検定を行った。
各群雌雄ごとに検査数が2以下の項目については検定より除外した。

(注) Peto検定に用いるコンテックス
0：定期解剖例にみつかった腫瘍
1：死亡/瀕死例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だと思うが、確かでない腫瘍
3：多分4だと思うが、確かでない腫瘍
4：死亡/瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

II－5　試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、その他本試験に係る資料は試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後5年間とする。

Ⅲ　試験成績

Ⅲ－１　動物の状態観察

Ⅲ－１－１　生死状況

投与期間中における群別の生存状況を TABLE 2, 3 及び FIGURE 2, 3 に示した。

最終計測週(104 週)における生存数(生存率)は、雌雄の各投与群とも対照群に比べ、やや高い値であった。各群の生存数(生存率)は、雄の対照群：40/50 例(80.0%)、50ppm 群：44/50 例(88.0%)、100ppm 群：43/50 例(86.0%)、200ppm 群：46/50 例(92.0%)、雌の対照群：29/50 例(58.0%)、50ppm 群：29/48 例(60.4%)、100ppm 群：31/50 例(62.0%)、200ppm 群：33/49 例(67.3%)であった。

なお、雌の 50ppm 群の２例と 200ppm 群の１例が事故により死亡したため、それらは有効動物数より除外した。

Ⅲ－１－２　一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に、内部腫瘤、外部腫瘤の発生動物数を TABLE 4, 5 に示した。

一般状態では、雌雄ともに被験物質の投与によると思われる特記所見は認められなかった。

外部腫瘤の発生動物数（投与期間を通しての発生動物数）は、雄では対照群：5/50 例、50ppm 群：1/50 例、100ppm 群：7/50 例、200ppm 群：3/50 例、雌では対照群：6/50 例、50ppm 群：5/48 例、100ppm 群：3/50 例、200ppm 群：5/49 例と雌雄ともに投与濃度に対応した変化を認めなかった。内部腫瘤の発生動物数（投与期間を通しての発生動物数）は、雄では対照群：8/50 例、50ppm 群：5/50 例、100ppm 群：3/50 例、200ppm 群：3/50 例、雌では対照群：11/50 例、50ppm 群：18/48 例、100ppm 群：19/50 例、200ppm 群：12/49 例であり、雄の各投与群において対照群と比較して少ない傾向がみられた。

Ⅲ－１－３　体重

投与期間中における群別の体重推移を TABLE 2, 3、FIGURE 4, 5 及び APPENDIX B 1, 2 に示した。

雌雄の各投与群とも投与濃度に対応した体重増加の抑制が認められ、雄では 50ppm 群は 46 週から 78 週まで、100ppm 群は 11 週から投与終了まで、200ppm 群は投与期間を通じて統計学的に有意な低値を示した。

雌では 50ppm 群は、6 週から 86 週の間、100ppm 群は 6 週から投与終了まで、200ppm 群は 2 週から投与終了までほとんどの週で統計学的に有意な低値を示した。

Ⅲ－１－４　摂餌量

投与期間中における群別の摂餌量(１日１匹当たりの摂餌量)を TABLE 6, 7、FIGURE 6, 7 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

雌雄の投与群ともに投与期間を通して投与濃度に対応した摂餌量の低下が認められ、多くの計測週で統計学的に有意な低値を示した。

Ⅲ－２　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

Ⅲ－２－１　血液学的検査

定期解剖時に行った血液学的検査の結果を APPENDIX D 1,2 に示した。

雄では、200ppm 群で赤血球数と白血球数の減少、ＭＣＶ、ＭＣＨ及び好酸球比の増加が認められた。

雌では、200ppm 群でヘモグロビン濃度の減少が認められた。

その他、雄で単球比に対照群と投与群の間に統計学的に有意な差が認められたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－２－２　血液生化学的検査

定期解剖時に行った血液生化学的検査の結果を APPENDIX E 1,2 に示した。

雄では 100ppm 以上の群に総蛋白、総コレステロール及びカルシウムの減少、ＧＯＴ、ＧＰＴ、ＬＤＨ及びＣＰＫの低下、A/G比、グルコースの増加が認められ、これに加えて 200ppm 群には総ビリルビンとクロールの増加、トリグリセライドの減少が認められた。

雌では 100ppm 以上の群でＡ/Ｇ比の増加、200ppm 群で総ビリルビンの増加、ＧＯＴ、ＡＬＰ及びＣＰＫの上昇、ＧＰＴの低下が認められた。

その他が、雌の 50ppm 群で対照群との間に有意な差がみられたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－２－３　尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果をAPPENDIX F 1、 2 に示した。

雄では、100ppm以上の群でケトン体の陽性度の増加、200ppm群で蛋白の陽性度の増加が認められた。

雌では、200ppm群でケトン体の陽性度の増加が認められた。

その他、雄でpH値の上昇、雌で蛋白の陽性度の増加がみられたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－３　病理学的検査

Ⅲ－３－１　剖検

解剖時に観察された剖検所見をAPPENDIX G 1～6 に示した。

雄では前胃の結節が100ppm群の3/50例と200ppm群の3/50例に認められた。なお、肝臓の結節は投与濃度に対応した減少傾向がみられた（対照群：16/50例、50ppm群：13/50例、100ppm群：9/50例、200ppm群：6/50例）。

雌では前胃の結節が100ppm群の4/50例と200ppm群の2/49例に認められた。

Ⅲ－３－２　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APPENDIX H 1, 2、I 1, 2 に示した。

雄では心臓に実重量の低値が100ppm以上の群、体重比の高値が200ppm群で、肺に体重比の高値が100ppm以上の群で、腎臓に実重量の低値が100ppm以上の群、体重比の低値が200ppm群で、肝臓に実重量の低値が50ppm以上の群で、また脳に実重量の低値が200ppm群、体重比の高値が100ppm以上の群で認められた。なお100ppm以上の群の解剖時体重は対照群に比較して低値であり、心臓と脳にみられた重量変化は、これに伴う変化と考えられた。

雌では、心臓に、実重量の低値が100ppm以上の群で、肺に体重比の高値が100ppm以上の群で、脾臓と肝臓に実重量の低値が200ppm群で、また脳に実重量の低値が100ppm以上の群、体重比の高値が200ppm群で認められた。なお、100ppm以上の群の解剖時体重は対照群と比較して低値であり、心臓、脾臓、肝臓及び脳にみられた重量変化は、これに伴う変化と考えられた。

その他、雄の脾臓の実重量と体重比及び雌の腎臓の実重量に対照群と比較して統計学的に、有意な差が認められたが、投与量に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－３－３　病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果をAPPENDIX J 1～6 に示した。腫瘍性病変の結果はAPPENDIX K 1, 2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX L 1, 2 に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX M 1, 2 に統計解析(Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定)、APPENDIX N 1～6 に転移性病変について示した。

－主な腫瘍性病変－
主な腫瘍性病変の結果をTABLE 8, 9 に示した。
＜胃＞
雄、雌ともに、前胃の扁平上皮乳頭腫の発生（雄は対照群：1/50 例、50ppm 群：0/50 例、100ppm 群：3/50 例、200ppm 群：4/50 例、雌は対照群：1/50 例、50ppm 群：0/48 例、100ppm 群：5/50 例、200ppm 群：4/49 例）がPeto 検定(有病率法)で増加傾向を示した。また、統計学的に有意差は示さなかったものの、前胃の扁平上皮癌の発生が100ppm 群の 1/50 例にみられた。
＜ハーダー腺＞
雌の腺腫の発生（対照群：0/50 例、50ppm 群：4/48 例、100ppm 群：7/50 例、200ppm 群：8/49 例）はPeto 検定(有病率法)とCochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定でも 100ppm 群と 200ppm 群に対照群と比較して有意な増加が認められた。
＜リンパ節＞
雄の悪性リンパ腫の発生（対照群：10/50 例、50ppm 群：8/50 例、100ppm 群：6/50 例、200ppm 群：1/50 例）はCochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 200ppm 群に対照群と比較して有意な減少が示された。なお、全臓器における雄の悪性リンパ腫の発生（対照群：14/50 例、50ppm 群：8/50 例、100ppm 群：6/50 例、200ppm 群：3/50 例）でもCochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 200ppm 群に対照群と比較して有意な減少が示された。
＜下垂体＞
雌の腺腫の発生（対照群：11/49 例、50ppm 群：4/48 例、100ppm 群：4/50 例、200ppm 群：2/48 例）はCochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定でも 200ppm 群に対照群と比較して有意な減少がみられた。

－その他の腫瘍性病変－
下記の腫瘍性病変の発生は統計学的に有意な差を示したが、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。
＜肺＞
雄の気管支－肺胞上皮腺腫の発生(対照群：1/50 例、50ppm 群：8/50 例、100ppm 群：5/50

例、200ppm 群：7/50 例)は Fisher 検定で 50ppm 群と 200ppm 群に対照群と比較して有意増加した。しかし、この腫瘍の発生率は各投与群とも当センターのヒストリカルコントロルデータ（文献 6）の試験単位での発生率の上限（気管支－肺胞上皮腺腫、平均：6.5%、試験単位での発生率：0～18%）を超えていなかった。また、気管支－肺胞上皮腺腫と気管支－肺胞上皮癌を合わせた発生（対照群：1/50 例、50ppm 群：9/50 例、100ppm 群：7/50 例、200ppm 群：9/50 例）も Peto 検定(有病率法)で増加傾向を示し、Fisher 検定でも全投与群とも対照群と比較して有意な増加を示した。しかし気管支－肺胞上皮癌の発生（対照群：0/50 例、50ppm 群：3/50 例、100ppm 群：2/50 例、200ppm 群：3/50 例）は統計学的に増加傾向を示さず、全投与群の発生率は当センターで行われた試験の対照群における気管支－肺胞上皮腺腫と気管支－肺胞上皮癌を合わせた発生率の上限（18%）を超えていないことから、この腫瘍の発生は被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

＜精巣上体＞

雄の組織球性肉腫の発生（対照群：3/50 例、50ppm 群：0/50 例、100ppm 群：0/50 例、200ppm 群：0/50 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。しかし、対照群の発生は当センターのヒストリカルコントロールデータ（文献 6）の範囲（平均：0.8%、試験単位での発生率：0～2%）を超えており、被験物質の投与により減少したとは考えられなかった。

＜子宮＞

雌の組織球性肉腫の発生（対照群：5/50 例、50ppm 群：11/48 例、100ppm 群：16/50 例、200ppm 群：10/49 例）は Fisher 検定で 100ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。しかし、投与濃度に対応した変化ではないため、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

＜全臓器＞

雌の組織球性肉腫の発生（対照群：6/50 例、50ppm 群：14/48 例、100ppm 群：18/50 例、200ppm 群：12/49 例）は Fisher 検定で 100ppm 群に対照群と比較して有意な増加が示された。しかし、投与濃度に対応した変化ではないため、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

－非腫瘍性病変－

主な非腫瘍性病変の結果を TABLE 10 に示した。

＜鼻腔＞

雌雄ともに滲出物の出現、嗅上皮の萎縮、嗅上皮や腺の呼吸上皮化生及び呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化が投与群で増加した。滲出物の出現は雄の 100ppm 以上の群、雌では最低濃度である 50ppm 群でもみられ、統計学的には雄の 200ppm 群と雌の 100ppm 以上の群に有意な差が認められた。その組織像は鼻腔内にエオジンで淡染する液体が貯留する所見であり、主に鼻腔の後方である第３レベル（第一臼歯の前端）に観察された。滲出物が

出現した部位の嗅上皮には萎縮と呼吸上皮化生、またその下部に存在する腺にも呼吸上皮化生がみられた。嗅上皮の萎縮、嗅上皮の呼吸上皮化生及び腺の呼吸上皮化生は雄では200ppm 群、雌では嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生が 100ppm 以上の群、腺の呼吸上皮化生が200ppm 群で有意な増加が認められた。呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化は加齢により対照群にもみられる病変と同質の所見であったが、投与群では雌雄とも発生例数の増加と程度の増強がみられ、呼吸上皮のエオジン好性変化は雌雄とも最低濃度である 50ppm 群まで、嗅上皮のエオジン好性変化は、雌雄とも 100ppm 群まで有意な発生増加が認められた。

＜胃＞

雄、雌ともに前胃の過形成が 200ppm 群で有意な増加を示した。また統計学的に有意差は示されなかったものの 100ppm 群でも過形成の発生は対照群に比べ高率であった。この過形成は前胃の被蓋上皮である扁平上皮にみられた。なお、腺胃の過形成は雄の 200ppm 群で有意な減少を示した。

＜脳＞

鉱質沈着は雌の 100ppm 以上の群に有意な減少がみられた。なお、雄の 100ppm 群には統計学的に鉱質沈着の有意な発生増加が示されたが投与濃度に対応した変化ではないため、被験物質による影響とは考えられなかった。

－その他の非腫瘍性病変－

下記の非腫瘍性病変の発生は統計学的に対照群と投与群の間に有意な差が示されたが、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

＜脾臓＞

髄外造血は雌の 50ppm 群で有意な増強を示した。しかし投与濃度に対応した変化ではないため、被験物質による影響とは考えられなかった。

III－4　死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 11 に示した。

雌雄とも各投与群と対照群の間に顕著な差を認めなかった。

Ⅳ　考察及びまとめ

Ⅳ－1　生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量

最終計測週(104 週)における生存率は雌雄の各投与群とも対照群に比べやや高い値であった。投与期間中の一般状態の観察では被験物質の投与によると思われる所見は認められなかった。

体重は雌雄ともに投与濃度に対応して全ての投与群に体重増加の抑制がみられた。

摂餌量も雌雄の全投与群で投与期間のほとんどの週で摂餌量の減少が認められた。

Ⅳ－2　腫瘍性病変

前胃の扁平上皮乳頭腫が雄では対照群の 1/50 例、100ppm 群の 3/50 例及び 200ppm 群の 4/50 例、雌では対照群の 1/50 例、100ppm 群の 5/50 例及び 200ppm 群の 4/49 例に発生し、Peto 検定により雌雄とも有意な増加傾向が示された。当センターにおける BDF1 マウスのヒストリカルコントロールデータ（文献 6）では前胃の扁平上皮乳頭腫の発生は雄は 0/848 例、雌では 1/850 例であり、雌雄とも 100ppm 以上の群の発生率はヒストリカルコントロールデータの発生率を超えており、被験物質の投与によりこの腫瘍が発生増加したと思われる。また統計学的な有意差は示さなかったが、雄の 100ppm 群の 1/50 例に扁平上皮癌の発生が認められた。非腫瘍性病変として雌雄とも 100ppm 以上の群（統計学的有意差は 200ppm 群）に前胃の被蓋上皮である重層扁平上皮に過形成の発生がみられた。

以上のようにメタリルクロライドの投与によって、雌雄ともに前胃の扁平上皮乳頭腫と過形成の発生増加が認められ、雄の 100ppm 群の 1 例に扁平上皮癌の発生がみられた。これらの結果は、メタリルクロライドの前胃に対するがん原性を示唆する証拠(some evidence)であると考えられた。

前胃に過形成をおこす物質は長期間投与により扁平上皮乳頭腫や扁平上皮癌を発生させることが報告されており（文献 7）、投与群でみられた前胃の過形成の増加は扁平上皮乳頭腫の前段階の変化と考えられた。また National Toxicology Program (NTP)の B6C3F1 マウスを用いた強制経口投与によるメタリルクロライドのがん原性試験報告（文献 8）によると、雄、雌ともに前胃の過形成（雄、対照群：0/49、100ppm 群：14/49、200ppm 群：15/49 雌、対照群：4/50、100ppm 群：6/48、200ppm 群：13/44）、扁平上皮乳頭腫（雄、対照群：3/49、100ppm 群：19/49、200ppm 群：30/49　雌、対照群：0/50、100ppm 群：15/48、200ppm 群：29/44）及び扁平上皮癌（雄、対照群：0/49、100ppm 群：5/49、200ppm 群：7/49　雌、対照群：0/50、100ppm 群：1/48、200ppm 群：2/44）の増加を観察し、NTP ではこれらの前腫瘍性及び腫瘍性変化をメタリルクロライドの投与による影響とした。本試験でも上記したように良性腫瘍である扁平上皮乳頭腫とその前段階と考えられる過形成の発生増加がみ

られ、吸入による投与でもマウスの前胃に経口投与と同様の変化が発現することが示された。また、1例ではあるが悪性腫瘍である扁平上皮癌の発生が雄の100ppm群にみられた。

雌のハーダー腺の腺腫の発生（対照群：0/50、50ppm群：4/48例、100ppm群：7/50例、200ppm群：8/49例）はPeto検定（有病率法）及びCochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定でも100ppm群と200ppm群に対照群と比較して有意な増加を認めた。100ppm群、200ppm群の発生率は当センターで行われた試験における雌のBDF1マウスの腺腫の最高発生率である12.0%をわずかに超えており、被験物質の投与による影響を否定できないものの、雌に対するがん原性を示す不確実な証拠(equivocal evidence)と考えられた。

雌の下垂体腺腫の発生（対照群：11/49例、50ppm群：4/48例、100ppm群：4/50例、200ppm群：2/48例）はCochran-Armitage検定で減少傾向を示し、Fisher検定でも200ppm群に対照群と比較して有意な減少が示され、投与群の発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内（平均発生率：14.6%、試験単位の発生率：2～35%）にあるものの群間の差が大きく投与による影響と考えられた。マウスの下垂体腫瘍は摂餌量を制限すると発生が低下することが報告されている（文献 9）。雌の投与群の摂餌量は投与濃度に対応して低下しており、この摂餌量の低下に伴って投与群の下垂体腺腫の発生が抑制したと推察される。

雄の悪性リンパ腫の発生（リンパ節、対照群：10/50例、50ppm群：8/50例、100ppm群：6/50例、200ppm群：1/50例　全臓器、対照群：14/50例、50ppm群：8/50例、100ppm群：6/50例、200ppm群：3/50例）はCochran-Armitage検定で減少傾向を示し、Fisher検定でも200ppm群に対照群と比較して有意な減少が示された。雄の投与群の悪性リンパ腫の発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内（平均発生率：9.7%、試験単位の発生率：2～20%）にあるものの、群間の差が大きく、メタリルクロライドの投与によって悪性リンパ腫の発生が抑制された可能性を否定できなかった。

Ⅳ－3　非腫瘍性病変

投与群の鼻腔には内腔にエオジンに淡染する滲出物の出現がみられた。発生部位は鼻腔の後方であり、この部位には嗅上皮の萎縮や嗅上皮および腺の呼吸上皮化生も観察された。この所見は雄では100ppm群、雌では最低濃度である50ppm群まで認められた。また加齢性病変として報告されている嗅上皮や呼吸上皮のエオジン好性変化の発生も投与群で増加していた（文献 10）。呼吸上皮のエオジン好性変化は、雌雄とも最低濃度である50ppm群まで増加が認められた。

その他、雄の200ppm群に腺胃の過形成の減少、雌の100ppm以上の群に脳の鉱質沈着の減少がみられた。

Ⅳ－4　その他

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査で変化のみられたパラメータがあった。しかし、これらの変化はいずれもわずかな変化であり、病理組織学的検査でも関連する臓器に変化がみられなかったことから、被験物質との関係は不明であった。

V　結論

Crj:BDF1 マウスを用いてメタリルクロライドの２年間(104 週間)にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果より以下の結論を得た。

雄には前胃の扁平上皮乳頭腫と腫瘍の前段階の変化と考えられる過形成の発生増加が認められ、100ppm 群の１例に扁平上皮癌の発生もみられ、これらの結果はメタリルクロライドのがん原性を示唆する証拠であると考えられた。雌にも前胃の扁平上皮乳頭腫と腫瘍の前段階の変化と考えられる過形成の発生増加が認められ、これらの結果はメタリルクロライドのがん原性を示唆する証拠であると考えられた。また、ハーダー腺の腺腫の発生増加も認められ、この腫瘍の増加は被験物質の投与による影響を否定できなかった。

非腫瘍性病変としては、鼻腔内にエオジンに淡染する滲出物の出現が雄の 100ppm 群まで、雌では最低濃度である 50ppm 群までみられ、この部位に嗅上皮の萎縮や嗅上皮及び腺の呼吸上皮化生も観察された。また加齢性病変として報告されている嗅上皮のエオジン好性変化や呼吸上皮のエオジン好性変化の発生も投与群で増加しており、呼吸上皮のエオジン好性変化の増加は雌雄とも 50ppm 群まで、嗅上皮のエオジン好性変化の増加は雌雄とも 100ppm 群まで認められた。これらの所見は被験物質の投与による影響であると考えられた。

Ⅵ 文献

1. Heller, S. R. and Milne, G. W. A. (1978)
EPA/NIH Mass Spectral Data Base Vol. 1, pp 53
U. S. Government Printing Office, Washington.

2. 和光純薬工業からの提供資料(1987)

3. 日本バイオアッセイ研究センター (1996)
メタリルクロライドのラット及びマウスを用いた吸入によるがん原性予備試験報告
日本バイオアッセイ研究センター，神奈川

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. Peto, R., Pike, M.C., Day, N. E., Gray, R. G., Lee, P. N., Parish, S., Peto,J., Richrds, S. and Wahrendorf, J. (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, IARC Monographs, Suppl. 2, pp. 311-426,
International Agency for Research on Cancer, Lyon.

6. 日本バイオアッセイ研究センター内部資料 (1984-1994)

7. 伊藤信行　編著 (1994)
最新毒性病理学
pp. 127，中山書店、東京

8. National Institutes of Health.(1986)
Toxicology and Carcinogenesis Studies of 3-chloro-2-methylpropene in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. (Gavage Studies)
NTP Tequnical Report 300.
U. S. Department of Health and Human Services, Research Triangle Park. N. C.

9. Witt W. M., Seldon W. G., and Thurman J. D. (1991)
Pathological endpoints in dietary restricted rodents-Fischer 344 rats and B6C3F1 Mice.
In:L. Fishbein ed. Biological Effects of Dietary Restriction., pp 73-86, Spinger-Verlag, New York.

10. Nagano K., Katagiri T., Aiso S., Senoh H., Sakura Y. and Takeuchi T. (1997)
Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice.
Exp. Toxic. Pathol., **49**, 97-104