クロトンアルデヒ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　0319

CAS　Ｎｏ．123‐73‐9

2001年3月23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

クロトンアルデヒ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　0319

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 …… 2
Ⅰ－1－2　構造式、分子量 …… 2
Ⅰ－1－3　物理化学的性状等 …… 2

Ⅰ－2　被験物質の使用ロット等 …… 2

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

Ⅰ－4　試験動物 …… 3

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 …… 4
Ⅱ－1－2　投与濃度及び設定理由 …… 4
Ⅱ－1－3　被験物質の発生方法と濃度調整 …… 4
Ⅱ－1－4　被験物質の濃度測定 …… 4

Ⅱ－2　動物管理
Ⅱ－2－1　各群の使用動物数 …… 5
Ⅱ－2－2　群分け及び個体識別方法 …… 5
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 …… 6
Ⅱ－3－2　体重測定 …… 6
Ⅱ－3－3　摂餌量測定 …… 6

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 …… 7
Ⅱ－3－7　病理学的検査 …… 7

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 …… 8
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 …… 12

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 …… 13
Ⅲ－3－4　死因 …… 15

Ⅳ　考察及びまとめ …… 16

Ⅴ　結論 …… 20

Ⅵ　文献 …… 21

要約

クロトンアルデヒ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:BDF_1 マウスを用い、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で雌雄各群 50 匹（合計 400 匹）を使用した。投与はクロトンアルデヒドを 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 3ppm、6ppm、12ppm 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、雌雄ともに生存率の低下はみられなかったが、雄では 6ppm 以上の群、雌では 12ppm 群で体重増加の抑制と摂餌量の低下がみられた。病理組織学的検査では雌雄とも 6ppm 以上の群で鼻腔への傷害（呼吸上皮の壊死、萎縮、立方化及び扁平上皮化生、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、腺の過形成と呼吸上皮化生、滲出液の出現、粘膜固有層の浮腫等）がみられた。しかし、雌雄ともに投与による腫瘍の発生増加は認められなかった。これに対し、腫瘍の発生減少が、雄では細気管支－肺胞上皮癌、悪性リンパ腫、肝細胞癌、及び肝臓の血管腫、雌では悪性リンパ腫と肝細胞腺腫でみられた。

以上のように、クロトンアルデヒドの投与により鼻腔への傷害がみられたが、腫瘍の発生増加は認められず、クロトンアルデヒドの Crj:BDF_1 マウス雌雄に対するがん原性を示す証拠は得られなかった。

Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の性状等　（文献 1）

Ⅰ－1－1　名称

名　　称：クロトンアルデヒド（Crotonaldehyde）
CAS No.：123-73-9

Ⅰ－1－2　構造式、分子量

$CH_3CH{=}CHCHO$

分子量：70.09

Ⅰ－1－3　物理化学的性状等

性　　状：無色透明の液体で特有の刺激臭あり
沸　　点：102.2℃
融　　点：－69℃
比　　重：0.853(20℃)
溶 解 性：水には溶解、各種有機溶剤に可溶
保存条件：室温、遮光条件下で気密容器に保管

Ⅰ－2　被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：SKJ4743（1996年11月22日～1997年4月1日）
LEL4703（1997年4月2日～1997年8月25日）
LEH5371（1997年8月26日～1998年1月6日）
WTK5303 (1998年1月7日～1998年7月21日)
WTE4391 (1998年7月22日～1998年11月19日)
製　造　元：和光純薬工業株式会社
グ レ ー ド：和光特級
純　　度：99.9%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2, 3）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 O 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ガスクロマトグラムを測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。なお、それらの結果については、APPENDIX O 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:BDF_1 マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を生後 4 週齢で導入し（導入時体重範囲、雄:15.0～19.5g、雌:13.4～17.6g）、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（群構成時体重範囲、雄:20.5～23.7g、雌:17.1～20.2g）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。すなわち設定濃度に調整したクロトンアルデヒドを吸入チャンバー内で試験動物に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 488 回であった。

Ⅱ－1－2　投与濃度及び設定理由

13 週間試験（試験番号：0293, 設定濃度：24ppm, 12ppm, 6ppm, 3ppm, 1.5ppm）の結果（文献 4）、全群雌雄ともに死亡はなかったが、1) 24ppm 群では体重増加抑制が強く、雌雄ともに鼻腔病変が顕著であり、2 年間の投与に耐え得る濃度ではない、2) 12ppm 群では軽度の体重抑制と軽度の鼻腔病変があった、3) 6ppm 以下の群では投与の影響がみられなかった。以上より、がん原性試験の設定濃度は、雌雄とも最高濃度を 12ppm とし、以下 6ppm、 3ppm（公比 2）とした。

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、発生容器内のクロトンアルデヒドを循環式恒温槽で加熱（25℃）しながら、窒素ガスのバブリングにより蒸発させた。次に、このクロトンアルデヒド蒸気を循環式恒温槽で冷却、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クロトンアルデヒ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　被験物質の濃度測定

吸入チャンバー内のクロトンアルデヒ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、3ppm 群：3.0±0.0ppm、6ppm 群：6.0±0.0ppm、12ppm 群：12.0±0.1ppm 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 50 匹の動物を用いた。

群番号	群名称	雄使用動物数（動物番号）	雌使用動物数（動物番号）
0	対照群	50 匹(1001-1050)	50 匹(2001-2050)
1	3ppm 群	50 匹(1101-1150)	50 匹(2101-2150)
2	6ppm 群	50 匹(1201-1250)	50 匹(2201-2250)
3	12ppm 群	50 匹(1301-1350)	50 匹(2301-2350)

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 5）。

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動物の尾に色素塗布を行い、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

動物は検疫室で 1 週間の検疫飼育を行った後、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。吸入チャンバー室及び吸入チャンバー内の環境条件を TABLE 1 に、計測結果を APPENDIX P 2 にそれぞれ示した。吸入チャンバー室の環境条件は、温度 22±2℃、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、吸入チャンバー内の環境条件は、温度 22±2℃、湿度 55±15%、換気回数 12±1 回/時に設定した。その結果、吸入チャンバーの環境はすべて設定条件の範囲内であった。

また、検疫期間中（ステンレス製二連網ケージ、112W×212D×120H mm）、馴化期間中（ステンレス製六連網ケージ、95W×116D×120H mm）及び投与期間中（ステンレス製五連網ケージ 100W×116D×120H mm）、いずれも単飼とした。

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、LOT No. 960705, 960808, 960910, 961009, 961112, 961207, 970110, 970210, 970306, 970410, 970513, 970604, 970708, 970808, 970906, 971008, 971112, 971208, 980110, 980207, 980307, 980409, 980508, 980608, 980709）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、また飲料水については(財)食品薬品安全センター（神奈川県秦野市落合 729-5）に 3 ヶ月毎に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容範囲と比較して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

投与期間中は毎日 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

投与開始後 14 週間までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）、測定時に生存していた動物の体重を測定した。なお、動物の死亡発見、切迫屠殺及び定期解剖の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

Ⅱ－3－3　摂餌量測定

投与開始後 14 週間は週に 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）給餌量と残餌量を測定し、その値から摂餌量を算出した。

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(APPENDIX Q 1)。

検査項目は、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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、白血球数及び白血球分類とした。

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。

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(APPENDIX Q 1)。

検査項目は、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、GOT、GPT、LDH、ALP、γ-GTP、CPK、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム及び無機リンとした。

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。

Ⅱ－3－6　尿検査

投与104週まで生存した動物について新鮮尿を採取し、尿試験紙（バイエル・三共（株）製）を用いて検査した(APPENDIX Q 1)。

検査項目は、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血及びウロビリノーゲンとした。

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下記臓器の重量（実重量）を測定した。また、搬出時の体重値に対する百分率（体重比）も算出した。

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

全動物の下記に示した器官、組織及び肉眼的に変化がみられた器官、組織を摘出後、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定し、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（文献 6）。また、左肺には、気管支より 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液を注入固定し検査した。

検査器官、組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸、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、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨

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

吸入チャンバー内の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。

体重についてはｇを単位とし、小数点以下第 2 位まで計測し、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。

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 104 週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

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。

なお、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。また、尿検査についても 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 7）、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。

χ^2 検定と Fisher 検定は対照群と各投与群間の検定である。

各群雌雄毎に検査数が 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、被験物質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 10 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。

雄では、対照群と 3ppm 群の途中死亡動物が投与 94 週頃から急に増加したため、最終計測週（104 週）における生存数（生存率）は、対照群：33/50 例(66.0%)、3ppm 群：30/50 例(60.0%)、6ppm 群：38/50 例(76.0%)、12ppm 群：43/49 例(87.8%)であり、12ppm 群で最も生存率が高い結果となった。

雌では、最終計測週（104 週）における生存数（生存率）は、対照群：30/50 例(60.0%)、3ppm 群：25/50 例(50.0%)、6ppm 群：30/50 例(60.0%)、12ppm 群：34/50 例(68.0%)であり、投与群と対照群の間に顕著な差はなかった。

なお、雄の 12ppm 群の 1 例（動物番号 0319-1336）は投与 31 週に事故死亡したため、有効動物数から除いた。

Ⅲ－1－2　一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に、外部腫瘤、内部腫瘤の発生動物数（一般状態の観察時に腫瘤を視診または触診できた数）を TABLE 4, 5 に示した。

投与期間を通しての外部腫瘤の発生動物数は、雄では対照群：3/50 例、3ppm 群：2/50 例、6ppm 群：3/50 例、12ppm 群：1/49 例、雌では対照群：7/50 例、3ppm 群：3/50 例、6ppm 群：5/50 例、12ppm 群：5/50 例であり、雌雄ともに投与群と対照群との間に顕著な差はなかった。

投与期間を通しての内部腫瘤の発生動物数は、雄では対照群：16/50 例、3ppm 群：17/50 例、6ppm 群：8/50 例、12ppm 群：11/49 例、雌では対照群：17/50 例、3ppm 群：18/50 例、6ppm 群：18/50 例、12ppm 群：13/50 例であり、雌雄ともに投与群と対照群との間に顕著な差がなかった。

その他の一般状態には、雌雄とも投与群と対照群との間に特記すべき差を認めなかった。

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。

雄では 6ppm 以上の群で投与濃度に対応した体重増加の抑制がみられた。12ppm 群は全

期間を通して、また、6ppm 群は 7 週以降、対照群と比較して低値で推移した。

雌では 12ppm 群で体重増加の抑制がみられ、全期間を通して対照群と比較して低値で推移した。

なお、最終計測時の体重は、対照群に対して雄は 3ppm 群：101％、6ppm 群：90％、12ppm 群：66％、雌は 3ppm 群：103％、6ppm 群：101％、12ppm 群：79％であった。

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。

雄では 6ppm 以上の群で投与濃度に対応した摂餌量の低値がみられた。12ppm 群は全期間を通して、また、6ppm 群は 6 週以降、対照群と比較して低値で推移した。

雌では 12ppm 群で全期間を通して摂餌量の低値がみられた。

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 12ppm 群で白血球数と杆状核好中球比の有意な減少がみられた。

雌では投与群と対照群との間に差を認めなかった。

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、12ppm 群にA/G比の増加、ALP 活性の上昇、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質の減少、GPT 活性と LDH 活性の低下、カルシウムの減少が認められた。

雌では、12ppm 群に総蛋白、グルコースの増加、ALP 活性の上昇がみられた。また、3ppm 群でカルシウムの減少がみられたが、投与濃度に対応していなかった。

Ⅲ－2－3　尿検査

投与 104 週に行った尿検査の結果を APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、12ppm 群にケトン体の陽性例の増加が認められた。

雌では、3ppm 群に pH の低下と潜血の陽性例の減少、6ppm 群に蛋白の陽性度の減少とケトン体の陽性例の増加が認められた。

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。

雄の12ppm群ではリンパ節と脾臓の腫大及び肺と肝臓の結節の発生が対照群と比較して減少していた。

雌の12ppm群ではリンパ節と脾臓の腫大及び肝臓の結節の発生が対照群と比較して減少していた。

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。

雄の12ppm群で、副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、肝臓及び脳に実重量の低値と体重比の高値、脾臓に実重量の低値が認められた。また、6ppm群で脳に体重比の高値が認められた。

雌の12ppm群で、脾臓に実重量と体重比の低値、心臓、腎臓及び肝臓に実重量の低値、また、卵巣、肺及び脳に体重比の高値が認められた。

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。

1. 腫瘍性病変

おもな腫瘍の発生を、TABLE 10, 11 に示した。

＜肺＞

雄の細気管支－肺胞上皮癌（対照群：10/50例、3ppm群：8/50例、6ppm群：9/50例、12ppm群：0/49例）及びこれに細気管支－肺胞上皮腺腫（対照群：2/50例、3ppm群：5/50例、6ppm群：5/50例、12ppm群：0/49例）を合わせた発生（対照群：12/50例、3ppm群：13/50例、6ppm群：11/50例、12ppm群：0/49例）がCochran-Armitage検定で減少傾向を示し、Fisher検定で12ppm群に有意な減少が認められた。

＜リンパ節＞

雄のリンパ節の悪性リンパ腫（対照群：11/50 例、3ppm 群：6/50 例、6ppm 群：9/50 例、12ppm 群：3/49 例）及び全臓器を合わせた悪性リンパ腫の発生（対照群：11/50 例、3ppm 群：7/50 例、6ppm 群：10/50 例、12ppm 群：3/49 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 12ppm 群に有意な減少が認められた。

雌のリンパ節の悪性リンパ腫（対照群：17/50 例、3ppm 群：17/50 例、6ppm 群：21/50 例、12ppm 群：6/50 例）及び全臓器を合わせた悪性リンパ腫の発生（対照群：21/50 例、3ppm 群：20/50 例、6ppm 群：26/50 例、12ppm 群：10/50 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 12ppm 群に有意な減少が認められた。

＜肝臓＞

雄の肝細胞癌（対照群：6/50 例、3ppm 群：6/50 例、6ppm 群：2/50 例、12ppm 群：1/49 例）及びこれに肝細胞腺腫（対照群：9/50 例、3ppm 群：11/50 例、6ppm 群：9/50 例、12ppm 群：5/49 例）とを合わせた発生（対照群：13/50 例、3ppm 群：15/50 例、6ppm 群：11/50 例、12ppm 群：6/49 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。また、血管腫（対照群：5/50 例、3ppm 群：9/50 例、6ppm 群：4/50 例、12ppm 群：0/49 例）及びこれに血管肉腫（3ppm 群：1/50 例）を合わせた発生（対照群：5/50 例、3ppm 群：10/50 例、6ppm 群：4/50 例、12ppm 群：0/49 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 12ppm 群に有意な減少が認められた。なお、全臓器を合わせた血管腫の発生（対照群：6/50 例、3ppm 群：11/50 例、6ppm 群：4/50 例、12ppm 群：2/49 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

雌でも肝細胞腺腫（対照群：3/50 例、3ppm 群：4/50 例、6ppm 群：2/50 例、12ppm 群：0/50 例）と肝細胞癌（対照群：1/50 例、3ppm 群：1/50 例、6ppm 群：0/50 例、12ppm 群：0/50 例）を合わせた発生（対照群：4/50 例、3ppm 群：5/50 例、6ppm 群：2/50 例、12ppm 群：0/50 例）が Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示した。

2. 非腫瘍性病変

＜鼻腔＞　（TABLE 8，9、PHOTOGRAPH　1～10）

雄では、呼吸上皮の立方化の増加が 6ppm 以上の群で認められ、12ppm 群では呼吸上皮の扁平上皮化生、壊死及び萎縮、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、滲出液の出現、腺の過形成と呼吸上皮化生、ならびに粘膜固有層の浮腫の発生が増加していた。また、統計学的に有意差は示されなかったが、呼吸上皮の炎症と過形成及び嗅上皮の壊死の発生が 12ppm 群にみられた。なお、嗅上皮のエオジン好性変化は 3ppm 群と 6ppm 群、呼吸上皮のエオジン好性変化は 6ppm 群で減少していた。その他、嗅上皮の呼吸上皮化生が 6ppm 群で統計学的に有意な減少を示したが、暴露濃度に対応した変化ではなかった。

雌では、呼吸上皮の立方化の増加が 6ppm 以上の群で認められ、呼吸上皮の扁平上皮化生、壊死、萎縮、炎症及び過形成、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、滲出液の出現、ならびに腺の呼吸上皮化生が 12ppm 群で増加した。また、統計学的に有意差は示されなかったが、嗅上皮の壊死、腺の過形成及び粘膜固有層の浮腫の発生が 12ppm 群にみられた。なお、嗅上皮のエオジン好性変化は 3ppm 群と 6ppm 群で減少が認められ、12ppm 群でも統計学的に有意差は示されなかったものの対照群より発生数が少なかった。また、呼吸上皮のエオジン好性変化の減少は 6ppm 群以上の群で認められた。呼吸上皮のエオジン好性変化の発生は 3ppm 群で統計学的に有意な増加が示されたが、暴露濃度に対応した変化ではなかった。

＜胃＞

腺胃の過形成が雌雄とも 12ppm 群で減少した。

＜腎臓＞

リンパ球浸潤が雄の 12ppm 群で減少した。

＜精巣＞

鉱質沈着が 12ppm 群で減少した。

＜脳＞

鉱質沈着が雄の 6ppm 以上の群で減少した。

その他、雄では唾液腺のリンパ球浸潤、雌では腎臓の硝子円柱と水腎症の発生に統計学的な有意差が示されたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－3－4　死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 12 に示した。

雄：12ppm 群は対照群に比較して白血病による死亡が少なかった。また、3ppm 群では白血病による死亡が少なかったのに対し、肝臓腫瘍による死亡が多くみられた。

雌：12ppm 群は対照群に比較して白血病による死亡が少なかった。

Ⅳ　考察及びまとめ

(1) 生死状況、一般状態、体重、摂餌量

最終計測週における生存率は、雄では 12ppm 群で最も高かったが、これは対照群と 3ppm 群の途中死亡動物が投与 94 週頃から急に増加したための結果であった。また、雌では対照群と投与群の間で差はみられなかった。

一般状態においては雌雄ともに対照群と投与群の間で差はみられなかった。

体重は、雄では 6ppm 以上の群で、雌では 12ppm 群で増加抑制がみられ、特に雄の 12ppm 群では著しい増加抑制（対照群に比較して 66%）を示した。

摂餌量は、体重推移と関連して、雄では 6ppm 以上の群で、雌では 12ppm 群で継続して低値を示した。

(2) 剖検、臓器重量

剖検では 12ppm 群に雌雄ともリンパ節と脾臓の腫大及び肝臓の結節の発生減少がみられ、雄では肺の結節も減少していた。

臓器重量については、雄の 12ppm 群で多くの臓器（副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、肝臓、脳）に実重量の低下と体重比の増加、脾臓に実重量の低下、6ppm 群で脳の体重比の低下が認められた。また、雌の 12ppm 群でも実重量の低値（脾臓、心臓、腎臓及び肝臓）と体重比の高値（卵巣、肺及び脳）が認められたが、脾臓は実重量、体重比とも低値であった。これらの結果の多くは雌雄ともに体重増加の抑制と関連したものと考えられたが、雌の脾臓では体重増加の抑制による要因以上に重量が低下していた。

(3) 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査

血液学的検査では、雄の 12ppm 群で白血球数と杆状核好中球比の減少がみられたが著しい変化ではなく、他の検査結果と関連するものでもなかった。

血液生化学的検査では、雌雄の 12ppm 群に対照群と比較して差のあったパラメーターがみられたが、著しい変化ではなかった。ただし、ALP 活性の上昇は雌雄に共通していた変化であった。

尿検査では、雄の 12ppm 群でケトン体の陽性例の増加がみられた。

(4) 腫瘍性病変

雌雄ともに、本試験でみられたいずれの腫瘍においても発生増加を認めなかった。これに対し、腫瘍の発生減少が、雄では肺の細気管支－肺胞上皮癌、リンパ節の悪性リンパ腫、肝臓の血管腫及び肝細胞癌、雌ではリンパ節の悪性リンパ腫と肝細胞腺腫にみられた。

雄の肺の細気管支－肺胞上皮癌（対照群：10/50 例、3ppm 群：8/50 例、6ppm 群：9/50 例、12ppm 群：0/49 例）及びこれに細気管支－肺胞上皮腺腫（対照群：2/50 例、3ppm

群：5/50 例、6ppm 群：5/50 例、12ppm 群：0/49 例）を合わせた発生（対照群：12/50 例、3ppm 群：13/50 例、6ppm 群：11/50 例、12ppm 群：0/49 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 12ppm 群に有意な減少が認められた。また、当センターのヒストリカルコントロールデータでは、雄 Crj:BDF_1 マウスを用いた 20 試験における対照群の細気管支－肺胞上皮癌の発生率は 0％～24％（110/996 例、11.0％）であり、本試験の 12ppm 群の発生率 0/49 例に相当する 0％の発生率を示したものは 20 試験のうち 1 試験だけであったことから、本試験の 12ppm 群の細気管支－肺胞上皮癌の発生率 0/49 例は通常の雄 Crj:BDF_1 マウスとしては稀な発生率であると考えられた。一方、本試験の雄の 12ppm 群の生存率は 86％であり対照群より高く、生存率の低下によってこの腫瘍の発生率が低下した可能性は考えられない。したがって、12ppm 群の細気管支－肺胞上皮癌の発生は被験物質の投与によって減少したと推察される。また、12ppm 群の細気管支－肺胞上皮腺腫の発生率（0/49 例）についても、統計学的な有意差は示されなかったものの、ヒストリカルコントロールデータは 2％～18％（72/996 例、7.2％）であり、20 試験のなかで 0％の発生率になった試験はみられず、被験物質の投与によって減少したと考えるのが妥当と考えた。

雄のリンパ節の悪性リンパ腫（対照群：11/50 例、3ppm 群：6/50 例、6ppm 群：9/50 例、12ppm 群：3/49 例）は Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 12ppm 群に有意な減少が認められた。当センターのヒストリカルコントロールデータでは雄 Crj:BDF_1 マウスのリンパ節の悪性リンパ腫の発生率は 2％～20％（100/997 例、10.0％）であり、本試験の 12ppm 群の発生率 3/49 例は平均よりは低い値であったが、ヒストリカルコントロールデータ 20 試験のうち発生率が 3/49 例以下の試験は 5 試験あり、本試験の発生率が異常に低いとは言えなかった。しかし、雌のリンパ節の悪性リンパ腫の発生（対照群：17/50 例、3ppm 群：17/50 例、6ppm 群：21/50 例、12ppm 群：6/50 例）も雄と同様に、Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 12ppm 群に有意な減少が認められた。当センターのヒストリカルコントロールデータでは雌 Crj:BDF_1 マウスにおけるリンパ節の悪性リンパ腫の発生率は 12％～44％（260/998 例、26.1％）であり、本試験の 12ppm 群の発生率 6/50 例に相当する発生率を示したものは 20 試験のうちもっとも発生率が低かった 1 試験だけであったことから、本試験の雌 12ppm 群の悪性リンパ腫の発生率は通常の雌 Crj:BDF_1 マウスとしては稀な発生率であり、被験物質の投与によって発生が減少したと推察された。したがって、雄の 12ppm 群におけるリンパ節の悪性リンパ腫の発生についても、異常に低い値ではないものの、被験物質の投与によって減少したとするのが妥当と考えた。

肝細胞腺腫と肝細胞癌は、個々の腫瘍の発生には統計学的な有意差が示されなかったが、両腫瘍を合わせた発生は雌雄とも Cochran-Armitage 検定で減少傾向が認められた。雄の肝細胞腺腫の発生は対照群：9/50 例、3ppm 群：11/50 例、6ppm 群：9/50 例、12ppm 群：5/49 例、肝細胞癌の発生は対照群：6/50 例、3ppm 群：6/50 例、6ppm 群：2/50 例、12ppm

群：1/49 例、雌の肝細胞腺腫の発生は対照群：3/50 例、3ppm 群：4/50 例、6ppm 群：2/50 例、12ppm 群：0/50 例、肝細胞癌の発生は対照群：1/50 例、3ppm 群：1/50 例、6ppm 群：0/50 例、12ppm 群：0/50 例であった。当センターのヒストリカルコントロールデータでは雄の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生率はそれぞれ 4%～34%（171/997 例、17.2%）と 2%～42%（217/997 例、21.8%）、雌の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生率はそれぞれ 2%～10%（51/998 例、5.1%）と 0%～8%（25/998 例、2.5%）であり、12ppm 群における発生率はヒストリカルコントロールデータの下限に近い値あるいはこれを下回る値であることから、雌雄とも 12ppm の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生は被験物質の投与によって減少したと考えられた。マウスの肝臓腫瘍は体重が低いと発生率が低下することが知られている（文献 9）。本試験でも体重増加の抑制が雌雄ともにみられることを考慮すると、雌雄とも 12ppm の肝細胞腺腫と肝細胞癌の発生は被験物質の投与による体重抑制に伴って発生が減少した可能性が高いと考えられた。

なお、肝臓の血管腫（対照群：5/50 例、3ppm 群：9/50 例、6ppm 群：4/50 例、12ppm 群：0/49 例）及びこれに血管肉腫（3ppm 群：1/50 例）を合わせた発生（対照群：5/50 例、3ppm 群：10/50 例、6ppm 群：4/50 例、12ppm 群：0/49 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示し、Fisher 検定で 12ppm 群に有意な減少が認められた。しかし、当センターのヒストリカルコントロールデータでは雄における肝臓の血管腫の発生率は 0%～10%（9/997 例、0.9%）、0%の発生率を示す試験が 20 試験のうち 16 試験あり、12ppm 群の発生率 0/49 例は異常に低い値とは言えなかった。また、全臓器を合わせた血管腫の発生（対照群：6/50 例、3ppm 群：11/50 例、6ppm 群：4/50 例、12ppm 群：2/49 例）も Cochran-Armitage 検定で減少傾向を示したが、肝臓以外の臓器の血管腫の発生には対照群と投与群の間に差がみられなかった。

（5）非腫瘍性病変

非腫瘍性病変については、雌雄とも鼻腔への傷害がみられた。すなわち、12ppm 群では呼吸上皮の壊死、萎縮、炎症、立方化、過形成及び扁平上皮化生、嗅上皮の壊死、萎縮及び呼吸上皮化生、滲出液の出現、腺の過形成と呼吸上皮化生、ならびに粘膜固有層の浮腫が発生し、6ppm 群でも呼吸上皮の立方化がみられた。しかし、3ppm 群ではこれらの鼻腔の障害は認められなかった。なお、鼻腔の加齢性病変であるエオジン好性変化に関しては、呼吸上皮のエオジン好性変化の減少が雄の 6ppm 群及び雌の 6ppm 群と 12ppm 群、嗅上皮のエオジン好性変化の減少が雌雄ともの 3ppm 群と 6ppm 群でみられた。また、雄は 12ppm 群に腺胃の過形成、腎臓のリンパ球浸潤、及び精巣と脳の鉱質沈着の発生減少、また 6ppm 群に脳の鉱質沈着の発生減少、雌でも 12ppm 群に腺胃の過形成の発生減少が認められた。

(6) 公表論文（発癌性試験）との比較

マウスを用いたクロトンアルデヒド投与の発癌性試験の報告は見当たらなかった。

V　結論

Crj:BDF_1マウスを用いて、クロトンアルデヒドの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。

その結果、雌雄とも腫瘍の増加は認められず、クロトンアルデヒドのがん原性を示す証拠は認められなかった。なお、クロトンアルデヒドによる鼻腔の障害が6ppm群までみられた。

Ⅵ 文献

1.化学工業日報社(2000)
13700 の化学商品
化学工業日報社，東京

2.Fred, W. McLafferty (1994)
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition.
John Wiley and Sons, Inc. (U.S.), Entry Number 1111

3.和光純薬工業からの提供資料(1996)

4.日本バイオアッセイ研究センター (1998)
クロトンアルデヒ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書
日本バイオアッセイ研究センター，神奈川

5.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.

6.Nagano, K., Enomoto, M., Yamanouchi, K., Aiso, S., Katagiri, T. and Matsumoto, M. (1988)
Toxicologic Pathology of Upper Respiratory Tract.
Journal of Toxicologic Pathology, 1, 115-127

7.Peto, R., Pike, M. C., Day, N. E., Gray, R. G., Lee, P. N., Parish, S., Peto, J., Richards, 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 Proposal.
IARC Monographs, Suppl. 2, pp. 311-426, IARC, Lyon.

8.日本バイオアッセイ研究センター内部資料 (1984-1999)

9.Seilkop, S, K. (1995)
The effect of body weight on tumor incidence and carcinogenicity testing in B6C3F$_1$ mice and F344 rats.
Fundamental and applied toxicology, 24, 247-259.