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

試験番号

2 週間試験：ラット/0286；マウス 0287

13 週間試験：ラット/0292；マウス 0293

CAS　No．123‐73‐9

2001 年 3 月 17 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

試験番号

2 週間試験：ラット/0286；マウス 0287

13 週間試験：ラット/0292；マウス 0293

本　　文

本　文　目　次　　頁

要旨 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、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 3

Ⅰ－3　被験物質の同一性・安定性

Ⅰ－3－1　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　被験物質の濃度測定 6

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 7

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

(Study No.0286,0287,0292,0293)

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 9
Ⅱ－４－２　母数の取り扱い 10
Ⅱ－４－３　統計方法 10

Ⅱ－５　試資料の保管 10

Ⅲ　試験成績

Ⅲ－１　ラットを用いた試験

Ⅲ－１－１　2週間試験（試験番号：０２８６）
1　動物の状態観察 11
2　血液学的検査・血液生化学的検査 12
3　病理学的検査 12

Ⅲ－１－２　13週間試験（試験番号：０２９２）
1　動物の状態観察 15
2　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 16
3　病理学的検査 16

Ⅲ－２　マウスを用いた試験

Ⅲ－２－１　2週間試験（試験番号：０２８７）
1　動物の状態観察 18
2　血液学的検査・血液生化学的検査 19
3　病理学的検査 19

Ⅲ－２－２　13週間試験（試験番号：０２９３）
1　動物の状態観察 22
2　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査 22
3　病理学的検査 23

Ⅳ　考察及びまとめ 25

Ⅴ　文献 31

TABLES

TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS IN THE INHALATION STUDIES OF CROTONALDEHYDE

TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT (TWO-WEEK STUDY)

TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT (TWO-WEEK STUDY)

TABLE 4 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 5 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 6 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 7 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 8 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 9 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 10 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE (TWO-WEEK STUDY)

TABLE 11 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (TWO-WEEK STUDY)

TABLE 12 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 13 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(TWO-WEEK STUDY)

TABLE 14 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 15 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE (THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 16 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

TABLE 17 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURES

FIGURE 1 CROTONALDEHYDE VAPOR GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES:RAT:MALE(TWO-WEEK STUDY)

FIGURE 3 BODY WEIGHT CHANGES:RAT:FEMALE(TWO-WEEK STUDY)

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES:RAT:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES:RAT:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION:RAT:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION:RAT:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 8 BODY WEIGHT CHANGES:MOUSE:MALE(TWO-WEEK STUDY)

FIGURE 9 BODY WEIGHT CHANGES:MOUSE:FEMALE(TWO-WEEK STUDY)

FIGURE 10 BODY WEIGHT CHANGES:MOUSE:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 11 BODY WEIGHT CHANGES:MOUSE:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 12 FOOD CONSUMPTION:MOUSE:MALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

FIGURE 13 FOOD CONSUMPTION:MOUSE:FEMALE(THIRTEEN-WEEK STUDY)

APPENDIXES

APPENDIX A 1-1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 1-2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 1-3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 1-4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 4-1 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 4-2 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 4-3 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 4-4 HEMATOLOGY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX A 5-1 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 5-2 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 5-3 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 5-4 BIOCHEMISTRY (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 6-1 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 6-2 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 6-3 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 6-4 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 6-5 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 6-6 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 6-7 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 6-8 GROSS FINDINGS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 7-1 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
RAT:MALE

APPENDIX A 7-2 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
RAT:FEMALE

APPENDIX A 7-3 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
MOUSE:MALE

APPENDIX A 7-4 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX A 8-1 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
RAT:MALE

APPENDIX A 8-2 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
RAT:FEMALE

APPENDIX A 8-3 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
MOUSE:MALE

APPENDIX A 8-4 ORGAN WEIGHT (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
MOUSE:FEMALE

APPENDIX A 9-1 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 9-2 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 9-3 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 9-4 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 9-5 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 9-6 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX A 9-7 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 9-8 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX A 10-1 IDENTITY OF CROTONALDEHYDE (TWO-WEEK STUDIES)

APPENDIX A 10-2 STABILITY OF CROTONALDEHYDE (TWO-WEEK STUDIES)

APPENDIX A 11-1 CONCENTRATION OF CROTONALDEHYDE IN INHALATION CHAMBER
(TWO-WEEK STUDIES)

APPENDIX A 11-2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER
(TWO-WEEK STUDIES)

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 1-1 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 1-2 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 1-3 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 1-4 CLINICAL OBSERVATION (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 2-1 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 2-2 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 2-3 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 2-4 BODY WEIGHT CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 3-1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 3-2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 3-3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 3-4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 4-1 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 4-2 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 4-3 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 4-4 HEMATOLOGY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 5-1 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 5-2 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 5-3 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 5-4 BIOCHEMISTRY (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 6-1 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 6-2 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 6-3 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 6-4 URINALYSIS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 7-1 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 7-2 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 7-3 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 7-4 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 7-5 GROSS FINDINGS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX B 8-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
RAT:MALE

APPENDIX B 8-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
RAT:FEMALE

APPENDIX B 8-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
MOUSE:MALE

APPENDIX B 8-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE

APPENDIXES (CONTINUED)

APPENDIX B 9-1 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
RAT:MALE

APPENDIX B 9-2 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
RAT:FEMALE

APPENDIX B 9-3 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
MOUSE:MALE

APPENDIX B 9-4 ORGAN WEIGHT (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY),RELATIVE
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 10-1 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 10-2 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 10-3 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 10-4 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX B 10-5 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (THIRTEEN-WEEK STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX B 11-1 IDENTITY OF CROTONALDEHYDE (THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX B 11-2 STABILITY OF CROTONALDEHYDE (THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX B 12-1 CONCENTRATION OF CROTONALDEHYDE IN INHALATION CHAMBER
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX B 12-2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER
(THIRTEEN-WEEK STUDIES)

APPENDIX C 1 METHODS FOR HEMATOLOGY,BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS

APPENDIX C 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

要旨

クロトンアルデヒドのがん原性を検索する目的でF344/DuCrj(Fischer)ラットとCrj:BDF$_1$マウス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、その投与濃度を設定するために本予備試験（2週間試験、13週間試験）を実施した。

2週間試験、13週間試験のラット、マウスともに各群雌雄10匹を用いて被験物質投与群5群、対照群1群の6群構成で行った。投与濃度はラット、マウスの雌雄とも2週間試験では100ppm、50ppm、25ppm、12.5ppm及び6.3ppm、13週間試験では24ppm、12ppm、6ppm、3ppm及び1.5ppmとした。投与はクロトンアルデヒドを含む空気を所定の濃度で1日6時間、1週5日間、全身暴露することにより行った。観察及び検査項目は、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（13週間試験）、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査とした。

2週間試験の結果、クロトンアルデヒドの投与により100ppmではラット、マウスともにすべて死亡し、50ppmではラットの雄6例、雌4例、またマウスの雌雄各8例が死亡した。暴露中には呼吸困難（あえぎ呼吸、開口呼吸）がラットで25ppm以上、マウスで50ppm以上にみられ、投与期間を通して同濃度群で異常呼吸音を聴取した。また体重増加の抑制がラットでは25ppm以上、マウスでは12.5ppm以上の投与群でみられ、これらの群では摂餌量も低下した。死亡動物では解剖時の肉眼的観察で、ラット、マウスともに胃から大腸へかけてのガスの貯留が多くの例でみられた。病理組織学的検査では主に、鼻腔から肺にかけての呼吸器系に投与の影響がみられた。死亡動物では粘膜上皮の壊死が特徴的であった。また定期解剖動物では、鼻腔の扁平上皮化生が特徴的で、ラットでは12.5ppmから、マウスでは25ppmからみられた。この変化はラットの鼻咽頭（25ppm以上）と気管（50ppm）、マウスの喉頭（50ppm）でもみられた。その他、炎症性細胞の浸潤など、主に粘膜の炎症性変化がラットでは6.3ppmから、マウスでは12.5ppmからみられ、濃度の増加とともに顕著となった。

以上よりラット、マウスともに25ppm以下の群では投与による死亡はなく、他の検査結果からも25ppmの濃度は13週間の暴露に耐え得る値と判断した。結果として13週間試験の設定濃度は数値を整数に整えることを加味し、ラット、マウスの雌雄ともに24ppm、12ppm、6ppm、3ppm、1.5ppm（公比2）とした。

13週間試験では、ラット、マウスともに投与による死亡はなかった。投与期間中、ラット、マウスともに24ppm群で異常呼吸音が聴取され、ま

た、体重増加の抑制と摂餌量の低下がラットの雌雄では12ppm以上で、マウスの雄では6ppm以上、雌では12ppm以上の群でみられた。病理組織学的検査では鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管で投与の影響がみられ、特に粘膜上皮の扁平上皮化生が特徴的であり、鼻腔ではラット、マウスともに12ppm以上の群で、その他では主に24ppm群のみにみられた。その他炎症性細胞の浸潤、鼻腔背側壁の浮腫などの主に呼吸器粘膜の炎症性変化が、ラット、マウスともに12ppm以上の群でみられ、濃度の増加とともに顕著となった。

以上より、クロトンアルデヒド投与の影響はラット、マウスともに24ppmでは体重増加の抑制及び鼻腔から上部気道へかけての病理組織学的変化が著しく、長期間の投与には高すぎる濃度と考えられた。12ppm群も投与による影響はみられたが、その変化は顕著ではなかった。これらのことよりがん原性試験の最高濃度は、ラット、マウスともに12ppmが最大耐量と判断し、以下6ppm、3ppm（公比2）とした。

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：クロトンアルデヒド(Crotonaldehyde)
別　　名：(E)-クロトンアルデヒド
　　trans-2-ブテナール
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
沸　　点：102℃
融　　点：-76.5℃
比　　重：0.80～0.860(d_{20}^{4})
蒸気圧：19mmHg(20℃)
保存条件：室温、遮光条件下で気密容器に保存

Ⅰ－２　被験物質の使用ロット等

使用ロット番号：2週間試験　SKR 5498
　　13週間試験　SKJ 4743
製　造　元：和光純薬工業株式会社
純　　度：99%以上

Ⅰ－３　被験物質の同一性・安定性

Ⅰ－３－１　同一性

2週間試験及び13週間試験とも被験物質の同一性は、そのマススペクトル及び赤外吸収スペクトルを測定し、それぞれの文献値（文献 1，2）と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、2週間試験は APPENDIX A 10-1、13週間試験は APPENDIX B 11-1に示した。

Ⅰ－３－２　安定性

2週間試験及び13週間試験とも被験物質の安定性は、投与開始前及び投与終了後に、その赤外吸収スペクトル及びガスクロマトグラフを測定し、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、2週間試験は APPENDIX A 10-2、13週間試験は APPENDIX B 11-2に示した。

Ⅰ－４　試験動物

動物は2週間試験及び13週間試験ともに日本チャールス・リバー（株）のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)及びCrj:BDF$_1$マウス(SPF)の雌雄を使用した。

2週間試験、13週間試験とも、ラット雌雄各75匹、マウス雌雄各75匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で異常を認めなかった動物から、それぞれ体重値の中央値に近い雌雄各60匹(群構成時体重範囲は、2週間試験ラット雄:107～122g、雌:91～101g/マウス雄:20.8～23.8g、雌:17.4～19.6g、13週間試験ラット雄:110～128g、雌:90～99g/マウス雄:21.0～23.6g、雌:17.5～19.5g)を選別して試験に供した。

なお、F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF$_1$マウスを選択した理由は、がん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせたことによる。

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

2週間試験及び13週間試験とも、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に設定濃度に調整したクロトンアルデヒドを含む空気を送り込み、試験動物に全身暴露する事により投与した。なお、対照群の動物には新鮮空気のみを暴露した。

各試験における投与期間及び暴露回数は以下の通りである。

2週間試験・・・・6時間/日，5日/週，10回/2週間
13週間試験・・・・6時間/日，5日/週（祝祭日を除く）
ラット：61回/13週間
マウス：61回/13週間

Ⅱ－1－2　投与濃度

2週間試験

ラット及びマウスの雌雄ともに最高濃度を100ppmに設定し、それ以下50ppm、25ppm、12.5ppm、6.3ppm（公比2）とした。

13週間試験

ラット及びマウスの雌雄ともに最高濃度を24ppmに設定し、それ以下12ppm、6ppm、3ppm、1.5ppm（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。発生容器内のクロトンアルデヒドを循環式恒温層で加熱しながら、窒素のバブリングにより蒸発させた。さら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。次に、吸入チャンバー内のクロ

トンアルデヒド濃度をガスクロマトグラフにより監視しながら、設定濃度になるように吸入チャンバーへの供給流量を調節した。

Ⅱ－１－４　被験物質の濃度測定

各試験における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。

2週間試験は APPENDIX A 11-1 、13週間試験は APPENDIX B 12-1 に測定結果を示した。

各試験とも投与濃度の平均値は設定濃度を満足する結果を示した。

Ⅱ－２　動物管理

Ⅱ－２－１　各群の使用動物数

2週間試験及び13週間試験とも投与群5群及び対照群1群の計6群を設け、各群雌雄10匹の動物を用いた。

Ⅱ－２－２　群分け及び個体識別方法

供試動物の各投与群への割り当ては、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 3）

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間は色素塗布により、投与期間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、他の試験との区別は、バリア区域内の独立した室にそれぞれ収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示することにより行った。

Ⅱ－２－３　飼育条件

動物は2週間試験及び13週間試験とも、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吸入チャンバー内で飼育した。各試験で使用した検疫室、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 に示した。また、各試験の吸入チャンバー内環境の計測結果を2週間試験は APPENDIX A 11-2 に、13週間試験は APPENDIX B 12-2 に示した。各試験とも吸入チャンバー内環境はすべて設定条件の範囲内であった。

各試験の検疫期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製2連型網ケージ、ラット：170W×294D×176H mm、マウス：112W×212D×120H mm)、馴化期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製6連型網ケージ、ラット：125W×216D×176H mm、マウス：95W×116D×120H mm)、投与期間中は1ケージ当り1匹の単飼(ステンレス製5連型網ケージ、ラット：150W×216D×176H mm、マウス：100W×116D×120H mm)の条件下で飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)のCRF-1固型飼料(3Mrad-γ線照射滅菌飼料)を飼育全期間を通して固型飼料給餌器により自由摂取させた。また、飲水は飼育全期間を通して、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、自動給水により自由摂取させた。なお、2週間試験では暴露中の給餌、給水はしなかった。

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

動物の生死確認は2週間試験では毎日1回または2回、13週間試験では毎日1回行った。また一般状態の詳細観察は、2週間試験ではラットで投与期間の1、2、4、7、10、14日、マウスで1、2、5、7、10、14日に、13週間試験ではラット、マウスともに毎週1回、暴露開始前に行った。さらに2週間試験の投与初日には、暴露中（吸入チャンバーの窓越に）と暴露後（生死確認時）にも行った。

Ⅱ－３－２　体重測定

2週間試験では、ラットで投与期間の1、2、4、7、10、14日に、マウスで1、2、5、7、10、14日に、また13週間試験では週1回、計測時に生存していた全動物の体重を測定した。

Ⅱ－３－３　摂餌量測定

2週間試験及び13週間試験とも週1回、摂餌量を測定した。

Ⅱ－３－４　血液学的検査

動物を解剖日前日より絶食(18時間以上)させ、定期解剖時まで生存した動物について、2週間試験では1群あたり雌雄各5匹まで、13週間試験では全動物を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、麻酔死、または採血手技のミスにより採血できなかった動物は母数より除いた。

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

Ⅱ－３－５　血液生化学的検査

動物を解剖日前日より絶食(18時間以上)させ、定期解剖時まで生存した動物について、2週間試験では1群あたり雌雄各5匹まで、13週間試験では全動物を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、麻酔死、または採血手技のミスにより採血できなかった動物は母数より除いた。

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

Ⅱ－３－６　尿検査

13週間試験の投与最終週に新鮮尿を採取し、尿検査を行った。

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

Ⅱ－３－７　病理学的検査

1　剖検

2週間試験及び13週間試験とも全動物を肉眼的に観察した。

2　臓器重量

定期解剖時まで生存した動物のうち、2週間試験では1群あたり雌雄各5匹まで、13週間試験では全動物について TABLE 1 に示した臓器の湿重量（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

2週間試験では各群雌雄それぞれ2例以上の動物、13週間試験では全動物のTABLE 1に示した臓器を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液にて固定し、さらに鼻腔と大腿骨は5%ギ酸で脱灰後パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色組織標本を作製し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。なお鼻腔は切歯の後端（ﾚﾍﾞﾙⅠ）、切歯乳頭（ﾚﾍﾞﾙⅡ）、第一臼歯の前端（ﾚﾍﾞﾙⅢ）の３ヶ所で切り出し（横断）、検査した（文献 4）。

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

体重についてはｇを単位とし、ラットでは小数点以下第1位を四捨五入して整数値で、マウスでは小数点以下第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 C 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から除いた。

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、2週間試験では1群あたり雌雄各5匹まで、13週間試験では全動物について検査し、欠測となったデータについては母数から除いた。

尿検査は、投与最終週に行い、検査数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査は、各群の有効動物数(供試動物数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。

Ⅱ－４－３　統計方法

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。なお、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。

病理組織学的検査のうち13週間試験は、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。なおχ^2検定は対照群と各投与群間との検定であり、最終検定では5%及び1%で両側検定を行った。また、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。

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日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書に従って、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。なお、標本については品質が評価に耐え得る期間保管する。

Ⅲ　試験成績

Ⅲ－１　ラットを用いた試験

Ⅲ－１－１　2週間試験　(試験番号:０２８６)

１　動物の状態観察

（１）生死状況

100ppm群の雄で投与期間の2日(1-2)に全例、雌で2日(1-2)に8例、3日(1-3)に2例死亡し、結果として雌雄ともに全例死亡した。さらに50ppm群の雄で投与期間の2日(1-2)に4例、4日(1-4)に1例、11日(2-4)に1例、雌で2日(1-2)に1例、3日(1-3)に2例、4日(1-4)に1例死亡し、結果として雄で6例、雌で4例死亡した。

（２）一般状態

投与初日（暴露中及び暴露終了後）

雌雄とも25ppm以上の投与群で呼吸困難（あえぎ呼吸、開口呼吸）を呈し、高濃度群ほど顕著であった。同所見は50ppm以上では暴露終了後にもみられ、100ppm群では異常呼吸音、自発運動量の減少、鼻汁、体温低下、チアノーゼ、腹部膨満もみられた。

投与期間中

観察日の暴露開始前に詳細観察した一般状態の結果をAPPENDIX A 1-1, A 1-2に示した。

50ppm群では雌雄ともに投与期間の2日(1-2)より異常呼吸音がみられ、さらに10日(2-3)より立毛もみられた。25ppm群では雌雄ともに10日(2-3)より異常呼吸音がみられた。死亡した動物では、鼻血性分泌物、不整呼吸、深呼吸、自発運動量の減少、及び体温低下がみられた例もあった。

（３）体重

体重の推移を TABLE 2, 3 、FIGURE 2, 3 及び APPENDIX A 2-1, A 2-2 に示した。

雌雄ともに、25ppm以上の投与群で投与期間の2日(1-2)より最終日(2-7)まで濃度依存的に低値であり、体重増加の抑制がみられた。

（４）摂餌量

摂餌量(1日1匹当たり)を TABLE 4, 5 及び APPENDIX A 3-1, A 3-2 に示した。

雌雄ともに25ppm以上の投与群で投与期間の1週、2週ともに濃度依存的に低値であった。

２　血液学的検査・血液生化学的検査

（１）血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX A 4-1, A 4-2 に示した。

雄では、50ppm群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、分葉核好中球比が増加、リンパ球比が減少、12.5ppm群でヘモグロビン濃度が減少した。

雌では、50ppm群でプロトロンビン時間が延長した。

（２）血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX A 5-1, A 5-2 に示した。

雄では、50ppm群でリン脂質が増加、ＧＰＴ活性とＬＤＨ活性が上昇、アルブミンとＡ／Ｇ比が減少、ＡＬＰ活性が低下した。

雌では、50ppm群でＧＰＴ活性が上昇、アルブミン、Ａ／Ｇ比、グルコースが減少、ＡＬＰ活性が低下、25ppm群でＡ／Ｇ比が減少した。

３　病理学的検査

（１）剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX A 6-1, A 6-2 （定期解剖）、A 6-3, A 6-4 （投与期間中死亡）に示した。

＜投与期間中死亡例＞

胃、小腸、大腸のガスの貯留、肺の赤色斑または赤色、肺の退縮不全がみられた。皮下組織の浮腫、胸水の貯留、眼の混濁、気管内の赤色液貯留もみられた。

＜定期解剖例＞

50ppm群で胸腺の萎縮と腺胃の潰瘍が雌雄に、肺の赤色斑が雌にみられた。その他の群でみられた肝臓のヘルニアと眼の混濁は、濃度依存的ではないため、投与と無関係な偶発性病変と判断した。

（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 A 7-1, A 7-2（実重量）、APPENDIX A 8-1, 8-2（体重比）に示した。

＜実重量＞

雄では、50ppm群で胸腺、精巣、心臓、腎臓、脾臓、肝臓が低値、25ppm群で胸腺、心臓、肝臓が低値であった。

雌では、50ppm群で胸腺、脾臓、肝臓が低値であった。

＜体重比＞

雄では、50ppm群で胸腺が低値、副腎、心臓、肺、腎臓、肝臓、脳が高値、25ppm群で腎臓と脳が高値であった。

雌の50ppm群で胸腺が低値、心臓、肺、腎臓、肝臓が高値、25ppm群で心臓と腎臓が高値であった。

（３）病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果をAPPENDIX A 9-1～A 9-4に示した。

＜途中死亡例＞

被験物質投与に起因すると示唆される変化が、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、胸腺、脾臓、肝臓、眼でみられた。

鼻腔

呼吸上皮の壊死、萎縮及び扁平上皮化生、嗅上皮の壊死と萎縮、ならびに炎症性細胞の浸潤がみられた。

鼻咽頭

上皮の壊死、萎縮及び扁平上皮化生、ならびに炎症性細胞の浸潤がみられた。

喉頭

上皮の壊死、扁平上皮の過形成、ならびに炎症性細胞の浸潤がみられた。

気管

上皮の壊死、萎縮及び扁平上皮化生、ならびに炎症性細胞の浸潤がみられた。

肺

鬱血、出血、浮腫、肺胞拡張、気管支上皮細胞の壊死と過形成がみられた。

胸腺

核崩壊がみられた。

脾臓

萎縮と核崩壊がみられた。

肝臓

肝細胞の巣状壊死がみられた。

眼

角膜の変性がみられた。

＜定期解剖例＞

被験物質投与に起因すると示唆される変化が鼻腔では6.3ppm以上、鼻咽頭と気管では、25ppm以上、喉頭、肺及び胸腺では50ppm群でみられた。

鼻腔

呼吸上皮には、扁平上皮化生と過形成が雌雄の12.5ppm以上で、壊死が雄の25ppm以上、雌の50ppm群で、萎縮が雌雄の50ppm群でみられた。

嗅上皮には、萎縮が雌雄の12.5ppm以上で、壊死が雄の25ppm以上、雌の50ppm群でみられた。

その他、炎症性細胞の浸潤が雌雄の6.3ppm以上でみられた。

鼻咽頭

上皮の扁平上皮化生が雄の50ppm群、雌の25ppm以上で、上皮の過形成が雌雄の25ppm群で、上皮の萎縮が雌雄の50ppm群でみられた。また、炎症性細胞の浸潤が雌雄の25ppm以上でみられた。

喉頭

上皮の壊死と扁平上皮の過形成が雌雄の50ppm群で、上皮の萎縮が雌の50ppm群で、炎症性細胞の浸潤も雌雄の50ppm群でみられた。

気管

上皮の扁平上皮化生が雌雄の50ppm群で、上皮の過形成が雌雄の25ppm以上で、上皮の萎縮が雌雄の50ppm群で、上皮の壊死が雄の50ppm群でみられた。炎症性細胞の浸潤も雌雄の50ppm群でみられた。

肺

浮腫、肺胞拡張、炎症性細胞の浸潤、及び気管支上皮細胞の過形成が雌雄の50ppm群で、肉芽が雌の50ppm群でみられた。

胸腺

萎縮と核崩壊が雌雄の50ppm群でみられた。

その他の組織でみられた変化は例数が少なく、また濃度依存的ではないため、投与と無関係な偶発性病変と判断した。

Ⅲ－１－２　13週間試験　(試験番号:０２９２)

１　動物の状態観察

（１）生死状況

投与群、対照群ともに死亡はなかった。

（２）一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX B 1-1, B 1-2 に示した。

雄の24ppm群で投与2週以降に異常呼吸音が散発された。また同所見は雌の24ppm群では投与3週の1例のみに認められた。

その他雌の6ppm群で角膜混濁が1例みられたが、濃度依存的ではないため、投与と無関係な偶発性病変と判断した。

（３）体重

体重の推移を TABLE 6, 7 、FIGURE 4, 5 及び APPENDIX B 2-1, B 2-2 に示した。

雄では12ppm群以上で全投与期間を通して濃度依存的に体重増加が抑制された。

雌では24ppm群で全投与期間を通して、12ppm群で投与7週以降13週まで濃度依存的に体重増加が抑制された。

（４）摂餌量

摂餌量(1日1匹当り)を TABLE 8, 9 、FIGURE 6, 7 及び APPENDIX B 3-1, B 3-2 に示した。

雄では12ppm群以上で全投与期間を通して濃度依存的に低値を示した。

雌では24ppm群では全投与期間で、12ppm群では7週以降で濃度依存的に低値を示した。

2　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

（1）血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX B 4-1, B 4-2 に示した。

雄では24ppm群で、ヘモグロビン濃度、ＭＣＶ、ＭＣＨ、分葉核好中球比が増加、単球比が減少した。また12ppm群でＭＣＶが増加した。

雌では24ppm群で、赤血球数とヘモグロビン濃度が増加、プロトロンビン時間が延長した。また12ppm群でプロトロンビン時間が延長し、ＭＣＶが減少した。

（2）血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX B 5-1, B 5-2 に示した。

雄では24ppm群で、総蛋白、アルブミン、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、カルシウムが減少、ＡＬＰ活性とＣＰＫ活性が上昇した。12ppm群で総コレステロールとリン脂質が減少した。

雌では24ppm群と12ppm群で、総蛋白、アルブミン、グルコース、総コレステロール、リン脂質が減少、ＡＬＰ活性が上昇、カリウムが増加した。6ppm群でグルコースが減少、ＡＬＰ活性が上昇した。3ppm群と1.5ppm群でグルコースが減少した。

（3）尿検査

尿検査の結果を APPENDIX B 6-1, B 6-2 に示した。

対照群との差はなかった。

3　病理学的検査

（1）剖検

定期解剖時の剖検所見を APPENDIX B 7-1, B 7-2 に示した。

肝臓のヘルニアが雄の1.5ppm群で1例、雌の3ppm群で1例、肝臓の結節が雌の6ppm群で1例、眼球の混濁が雌の6ppm群で1例みられたが、いずれも濃度依存的ではなく、偶発性病変と判断した。

（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 B 8-1, B 8-2（実重量）、APPENDIX B 9-1, B 9-2 （体重比）に示した。

＜実重量＞

雄では24ppm群で副腎が高値、胸腺、精巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳が低値、12ppm群で胸腺、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓が低値であった。

雌では24ppm群で副腎が高値、胸腺、卵巣、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳が低値、12ppm群で副腎が高値、胸腺と肝臓が低値であった。

＜体重比＞

雄では24ppm群で、胸腺と肝臓が低値、副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、脳が高値、12ppm群で胸腺が低値、副腎、精巣、心臓、肺、腎臓、脳が高値であった。

雌では24ppm群で胸腺が低値、副腎、心臓、肺、腎臓、肝臓、脳が高値、12ppm群で副腎、卵巣、心臓、肺、腎臓、肝臓、脳が高値であった。

（３）病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を APPENDIX B 10-1, B 10-2 に示した。

被験物質投与に起因すると示唆される変化が鼻腔では12ppm以上で、鼻咽頭、喉頭及び気管では24ppm群でみられた。

鼻腔

呼吸上皮には扁平上皮化生、過形成、萎縮が12ppm群と24ppm群の雌雄全例に、壊死が24ppm群の雄で4例、雌で2例にみられた。

嗅上皮には扁平上皮化生が12ppm群の雄で4例、雌で5例、24ppm群の雄で3例、雌で1例に、萎縮が12ppm群と24ppm群の雌雄全例に、また壊死が12ppm群の雄で4例、雌で2例、24ppm群の雌雄で全例に、呼吸上皮化生が12ppm群の雄で6例、雌で2例、24ppm群で雌雄全例に、エオジン好性変化が12ppm群の雌で1例にみられた。

その他レベルⅡとⅢの背側壁粘膜固有層の浮腫が12ppm群の雄で全例、雌で9例、24ppm群の雌雄全例に、炎症性細胞の浸潤が12ppm群と24ppm群の雌雄全例に、鼻甲介の癒着が24ppm群の雌雄各2例にみられた。

鼻咽頭

上皮の扁平上皮化生と過形成が24ppm群の雌雄全例に、また炎症性細胞の浸潤が24ppm群の雄全例にみられた。

喉頭

上皮の扁平上皮化生が24ppm群の雄で9例、雌で全例にみられた。

気管

上皮の扁平上皮化生が24ppm群の雄で9例、雌で3例にみられた。

その他の組織でみられた変化は、濃度依存的ではないため、投与と無関係な偶発性病変と判断した。

Ⅲ－２　マウスを用いた試験

Ⅲ－２－１　2週間試験　（試験番号：０２８７）

１　動物の状態観察

（１）生死状況

100ppm群の雄で投与期間の2日(1-2)に3例、3日(1-3)に4例、4日(1-4),5日(1-5),及び6日(1-6)に各1例、雌で2日(1-2),3日(1-3),及び4日(1-4)に各1例、5日(1-5)に4例、6日(1-6)に3例死亡し、結果として雌雄ともに全例死亡した。50ppm群では雄で投与期間の5日(1-5)に1例、7日(1-7)に2例、10日(2-3)に3例、雌で7日(1-7)に1例死亡し、さらに定期解剖時に50ppm群では雄が2例、雌が7例死亡しており、結果として雌雄各8例が死亡した。

（２）一般状態

投与初日（暴露中及び暴露終了後）

雌雄とも25ppm以上で不整呼吸を呈し、50ppm以上の投与群では呼吸困難（あえぎ呼吸、開口呼吸）もみられ、100ppm群では特に顕著であった。同所見は50ppm以上の投与群では暴露終了直後にもみられ、100ppm群では異常呼吸音の聴取、自発運動量の減少、体温低下がみられる例もあった。

投与期間中

観察日の暴露開始前に詳細観察した一般状態の結果をAPPENDIX A 1-3, A 1-4 に示した。

100ppm群では雌雄とも投与期間の2日(1-2)から、50ppm群では雄で7日(1-7)から、雌で14日(2-7)に異常呼吸音がみられた。死亡した動物では、立毛、不整呼吸、深呼吸、円背位、自発運動量の減少、及び体温低下がみられた例もあった。

（３）体重

体重の推移を TABLE 10, 11 、FIGURE 8, 9 及び APPENDIX A 2-3, A 2-4 に示した。

雄の25ppm以上の投与群では投与期間の2日(1-2)から、また12.5ppm群では5日(1-5)から投与最終日(2-7)まで濃度依存的に低値であり、雌の50ppm以上では投与期間の2日(1-2)から、25ppm群では5日(1-5)から、そして12.5ppm群では10日(2-3)から濃度依存的に低値であり、体重増加の抑制がみられた。

（４）摂餌量

摂餌量(1日1匹当り)を TABLE 12, 13 及び APPENDIX A 3-3, A 3-4 に示した。

雌雄ともに25ppm群と50ppm群では投与1週、2週ともに、また12.5ppm群では雄で投与2週、雌で投与1週に濃度依存的に低値であった。

２　血液学的検査・血液生化学的検査

（１）血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX A 4-3, 4-4 に示した。

雄では25ppm群で、ＭＣＶが減少、ＭＣＨＣと白血球数が増加、12.5ppm群で、ＭＣＶが減少した。

雌では25ppm群で、ＭＣＶが減少、12.5ppm群で赤血球数が増加した。

（２）血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX A 5-3, A 5-4 に示した。

雄では、25ppm群で総ビリルビンとカルシウムが増加、ＧＰＴ活性が上昇、グルコース、トリグリセライド、及びクロールが減少、ＡＬＰ活性が低下、12.5ppm群でクロールが減少、ＡＬＰ活性が低下した。その他6.3ppm群でＧＰＴ活性が上昇した。

雌では25ppm群で総コレステロールが増加、グルコースが減少した。

３　病理学的検査

（１）剖検

定期解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX A 6-5, A 6-6 （定期解剖時死亡も含む）、投与期間中に死亡した動物の剖検所見を A 6-7, A 6-8 に示した。

＜投与期間中死亡及び定期解剖時死亡例＞

投与期間中に死亡した動物では胃、小腸、大腸のガス貯留、肺の赤色または赤色斑、胸水がみられた。また定期解剖時に死亡していた動物では胃、小腸、大腸のガス貯留、胸腺の萎縮がみられた。

＜定期解剖（生存）例＞

50ppm群で胸腺の萎縮、胃、小腸、大腸のガス貯留がみられた。その他の群でみられた脾臓の黒色斑、精巣の欠損は、濃度依存的ではないため、投与と無関係な偶発性病変と判断した。

（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 A 7-3, A 7-4（実重量）、APPENDIX A 8-3, 8-4 （体重比）に示した。

＜実重量＞

雄では、25ppm群で胸腺、心臓、腎臓、肝臓が低値、12.5ppm群で胸腺と肝臓が低値であった。

雌では、25ppm群で胸腺、心臓、腎臓、脾臓、肝臓が低値、12.5ppm群で胸腺が低値であった。

＜体重比＞

雄では、25ppm群で胸腺が低値、肺と脳が高値、12.5ppm群で肺と脳が高値であった。

雌では、25ppm群で胸腺、脾臓、肝臓が低値、脳が高値、12.5ppm群で肝臓が低値、脳が高値であった。

（３）病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を APPENDIX A 9-5～A 9-8 に示した。

＜投与期間中死亡例＞

被験物質投与に起因すると示唆される変化が、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、胸腺、脾臓、肝臓、心臓、骨格筋でみられた。

鼻腔

呼吸上皮と嗅上皮の萎縮と壊死、また炎症性細胞の浸潤がみられた。

鼻咽頭

上皮の壊死と炎症性細胞の浸潤がみられた。

喉頭

上皮の萎縮、壊死、及び扁平上皮化生、また炎症性細胞の浸潤がみられた。

気管

上皮の萎縮と壊死、また炎症性細胞の浸潤がみられた。

肺

鬱血、出血、浮腫がみられ、気管支上皮の壊死もみられた。

胸腺

萎縮と核崩壊がみられた。

脾臓

萎縮と核崩壊がみられた。

肝臓

巣状壊死がみられた。

心臓

心筋の石灰化を伴う壊死がみられた。

骨格筋

石灰化を伴う壊死がみられた。

＜定期解剖（生存及び死亡）例＞

被験物質投与に起因すると示唆される変化が鼻腔では12.5ppm以上で、喉頭、気管、肺、胸腺、脾臓、肝臓、心臓、胃では50ppm群でみられた。

鼻腔

呼吸上皮には、萎縮が雄の12.5ppm群と25ppm群、雌の12.5ppm以上で、壊死が雄の12.5ppm群と25ppm群で、扁平上皮化生が雄の25ppm以上、雌の25ppm群でみられた。

嗅上皮には、萎縮が雄の12.5ppm以上、雌の25ppm以上でみられた。

その他、炎症性細胞の浸潤が雌雄の12.5ppm以上でみられた。

喉頭

上皮の壊死が雄の50ppm群、扁平上皮化生が雌雄の50ppm群でみられた。また炎症性細胞の浸潤が雌雄の50ppm群でみられた。

気管

上皮の萎縮と壊死が雌雄の50ppm群、過形成が雌の50ppm群でみられた。また炎症性細胞の浸潤が雌雄の50ppm群でみられた。

肺／気管支

鬱血、出血、気管支上皮の壊死と過形成が雄の50ppm群でみられた。

胸腺

萎縮が雌雄の50ppm群でみられた。

脾臓

萎縮が雌雄の50ppm群でみられた。

肝臓

肝細胞の巣状壊死が雌の50ppm群でみられた。

心臓

心筋の石灰化を伴う壊死が雄の50ppm群でみられた。

胃

腺胃のびらんが雌の50ppmでみられた。

その他の組織でみられた変化は例数が少なく、また濃度依存的ではないため、投与と無関係な偶発性病変と判断した。

Ⅲ－２－２　13週間試験　（試験番号：０２９３）

１　動物の状態観察

（１）生死状況

雄の対照群で投与3週に、3ppm群で投与6週に各1例死亡があったが、病理学的検査の結果、死因は水腎症であり、これは自然発生性のものと判断した。

また、雌の24ppm群で投与1週に1例が事故により死亡したため、これは有効動物数より除いた。

（２）一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX B 1-3 B 1-4に示した。

投与最終週に異常呼吸音が24ppm群の雄で2例、雌で1例みられた。

（３）体重

体重の推移を TABLE 14, 15、FIGURE 10, 11 及び APPENDIX B 2-3, B 2-4 に示した。

雌雄ともに12ppm以上の群では全投与期間を通して、また雄の6ppm群では投与4週から最終週まで濃度依存的に体重増加が抑制された。

（４）摂餌量

摂餌量(1日1匹当り)を TABLE 16, 17 、FIGURE 12, 13 及び APPENDIX B 3-3, B 3-4 に示した。

雄では12ppm群以上で全投与期間継続して、6ppm群で投与8週以降に濃度依存的に低値であった。

雌では12ppm群以上で全投与期間継続して濃度依存的に低値であった。

２　血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

（１）血液学的検査

血液学的検査の結果を APPENDIX B 4-3, B 4-4 に示した。

雄では3ppm群で血小板数が減少した。

雌では24ppm群でＭＣＶ、白血球数、リンパ球比が減少、分葉核好中球比が増加した。12ppm群で白血球数が減少した。

（２）血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を APPENDIX B 5-3, B 5-4 に示した。

雄では24ppm群でグルコース、トリグリセライド、リン脂質が減少、ＡＬＰ活性が上昇、総ビリルビンが増加した。12ppm群でグルコース、トリグリセライド、リン脂質が減少、ＡＬＰ活性が上昇した。3ppm群でアルブミンとグルコースが減少した。1.5ppm群でグルコースが減少した。

雌では24ppm群と12ppm群で総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質が減少、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、尿素窒素が増加、ＡＬＰ活性が上昇した。

（３）尿検査

尿検査の結果を APPENDIX B 6-3, B 6-4 に示した。

雄では12ppm群でｐＨが上昇し、雌では24ppm群と6ppm群でケトン体の陽性例が増加した。

３　病理学的検査

（１）剖検

剖検所見を APPENDIX B 7-3～B 7-5 に示した。

＜投与期間中死亡例＞

雄の対照群で死亡した1例では水腎症がみられ、また3ppm群で死亡した1例では水腎症と胸腺の萎縮がみられた。

＜定期解剖例＞

雄では脾臓の黒色斑が3ppm群で1例、肝臓の白色斑が12ppm群で1例、そして水腎症が1.5ppm群で1例、3ppm群で2例、6ppm群で1例、12ppm群で1例みられた。

雌では脾臓の黒色斑が1.5ppm群、3ppm群、及び24ppm群で各1例みられた。

これらは濃度依存的ではなく、少数例のため偶発性病変と判断した。

（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 B 8-3, B 8-4（実重量）、APPENDIX B 9-3, B 9-4（体重比）に示した。

＜実重量＞

雄では24ppm群で胸腺、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、脳が低値、12ppm群で心臓、脾臓、肝臓が低値、6ppm群で肝臓が低値であった。

雌では24ppm群で胸腺、副腎、卵巣、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、脳が低値、12ppm群で心臓、腎臓、脾臓、肝臓が低値であった。

＜体重比＞

雄では24ppm群で精巣、心臓、肺、腎臓、脳が高値、12ppm群で胸腺、精巣、心臓、肺、腎臓、脳が高値、6ppm群では胸腺、心臓、肺、脳が高値、3ppm群で心臓、腎臓、脾臓が高値であった。

雌では24ppm群で心臓、肺、腎臓、脳が高値、卵巣、脾臓、肝臓が低値、12ppm群で肺と脳が高値、脾臓と肝臓は低値、6ppm群と1.5ppm群で脳が高値であった。

（３）病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を APPENDIX B 10-3～B 10-5 に示した。

被験物質投与に起因すると示唆される変化が鼻腔と喉頭では12ppm以上で、鼻咽頭と気管では24ppm群でみられた。

鼻腔

呼吸上皮には扁平上皮化生と萎縮が12ppm以上の雌雄全例に、壊死が12ppm群の雄で2例、雌で3例、24ppm群の雌雄で全例に、エオジン好性変化が12ppm群の雄で3例、24ppm群の雄で2例、雌で8例にみられた。

嗅上皮には萎縮が12ppm群の雄で5例、雌で3例、24ppm群の雄雌全例に、壊死が12ppm群の雄で１例、24ppm群の雄で4例、雌で2例に、呼吸上皮化生が12ppm群の雄で2例、24ppm群の雌雄全例に、エオジン好性変化が12ppm群の雄で1例、24ppm群の雄で2例、雌で8例にみられた。

その他、レベルⅡとⅢの背側壁の粘膜固有層に浮腫が12ppm群の雄で3例、24ppm群の雄で8例、雌で全例に、炎症性細胞の浸潤が、12ppm群の雌雄各6例、24ppm群の雌雄全例に、レベルⅢでの浸出液の貯留が24ppm群の雄で全例、雌で8例にみられた。

鼻咽頭

上皮の扁平上皮化生が、24ppm群の雄で9例、雌で1例に、萎縮が24ppm群の雄で6例、雌で3例にみられた。

喉頭

上皮の扁平上皮化生が、12ppm群の雄で3例、雌で2例、24ppm群の雄で全例、雌で8例にみられた。

気管

上皮の扁平上皮化生が、24ppm群の雄で全例、雌で3例にみられた。

その他の組織でみられた変化は、いずれも濃度依存的ではないため、投与と無関係な偶発性病変と判断した。

Ⅳ　考察及びまとめ

Ⅳ－１　ラットを用いた試験

Ⅳ－１－１　２週間試験

クロトンアルデヒドの投与による生体への影響に、顕著な雌雄差は認められなかった。100ppm群では雌雄ともに全例死亡、50ppm群は雄6例、雌4例が死亡した。投与初日の暴露中の観察では25ppm以上の投与群で呼吸困難（あえぎ呼吸、開口呼吸）がみられ、投与濃度の増加とともに顕著となった。さらに投与期間中の暴露開始前の一般状態の詳細観察では、25ppm以上の投与群で異常呼吸音を聴取した。死亡した動物では解剖の結果、肉眼的に胃から大腸にかけてのガスの貯留が多くの例でみられたが、ゲッ歯類は呼吸の多くを鼻呼吸に依存していることが知られていることから、これは開口呼吸による消化管への空気の流入により生じた変化と推測された（文献　6）。その他、肺の赤色斑も多くの例でみられ、肺の赤色や退縮不全、胸水貯留、皮下の浮腫、眼の混濁、気管内の赤色液貯留もみられた。病理組織学的検査の結果、これらの死亡動物では鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、及び気管支の粘膜上皮の壊死が顕著であった。また萎縮が鼻腔の呼吸上皮と嗅上皮、鼻咽頭、及び気管で、扁平上皮化生が鼻腔の呼吸上皮、鼻咽頭、及び気管で、扁平上皮の過形成が喉頭に、さらに炎症性細胞の浸潤も鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管でみられた。また肺には鬱血、出血、浮腫、肺胞拡張がみられた。クロトンアルデヒドは呼吸器に対し強い刺激性を示す物質であることから（文献　5）、これら気道の粘膜上皮の壊死を主体とした変化は、クロトンアルデヒドの吸入刺激に起因した毒性変化であり、特に鼻腔病変が死亡につながったと推測した。その他、肝臓の巣状壊死と眼の角膜変性、胸腺の核崩壊、脾臓の萎縮と核崩壊もみられた。胸腺や脾臓の変化はストレスでみられることも多いため（文献　6）、呼吸器の傷害に伴う二次的な変化と考えられた。定期解剖時まで生存した動物では25ppm以上の投与群で異常呼吸音がみられ、さらに50ppm群では立毛もみられた。投与全期間を通じて、25ppm以上の投与群では体重の増加抑制が濃度依存的にみられ、加えて摂餌量も低下した。定期解剖では、クロトンアルデヒド投与に起因する変化は、肉眼的には胸腺の萎縮、肺の赤色斑、腺胃の潰瘍（病理組織検査では確認できなかった）が50ppm群でみられたのみであったが、病理組織学的検査では、気道である鼻腔、鼻咽頭及び気管の粘膜上皮の傷害が特徴的であった。鼻腔では呼吸上皮の扁平上皮化生が12.5ppm以上の群でみられ、また鼻咽頭上皮では25ppm以上で、気管の上皮では50ppm群でみられた。

その他の毒性変化として鼻腔では、炎症性細胞の浸潤（6.3ppm以上）、呼吸上皮の過形成（12.5ppm以上）、嗅上皮の萎縮（12.5ppm以上）、呼吸上皮と嗅上皮の壊死（25ppm以上）、呼吸上皮の萎縮（50ppm群）がみられた。鼻咽頭では炎症性細胞の浸潤（25ppm以上）、上皮の過形成（25ppm群）、上皮の萎縮（50ppm群）が、喉頭では上皮の萎縮、壊死、扁平上皮の過形成、炎症性細胞の浸潤（すべて50ppm群）、気管では上皮の過形成（25ppm以上）、上皮の萎縮、壊死、炎症性細胞の浸潤（各々50ppm群）がみられた。さらに肺では浮腫、肺胞拡張、炎症性細胞の浸潤、肉芽、及び気管支上皮細胞の過形成（すべて50ppm群）がみられた。なおこれらの組織でみられた上皮の過形成の多く（喉頭の扁平上皮の過形成を除く）は、扁平上皮化生した上皮に細胞数の増加が加わり、過形成に移行したものと考えられた。肉眼所見でみられた胸腺の萎縮は、組織学的にも核崩壊を伴う萎縮として認められた。その他の検査では、鼻腔を中心とした炎症性変化のためと思われる分葉核好中球の比率の増加が、また胸腺重量の低下は肉眼的にも組織学的にもみられた胸腺の萎縮と一致していたが、これらを含めてその他の検査の有意に変化した検査項目で、特に13週間試験の濃度決定を左右する様な意義をもつ毒性変化はなかった。全体的に、以上の結果に雌雄間で顕著な差は認められなかった。

以上の結果をまとめると、１）25ppm以下の群では投与による死亡はなかった。２）25ppm群では体重増加の抑制や摂餌量の低下、さらに病理組織学的にも毒性変化がみられたが、これらの変化は13週間試験におそらく耐え得る程度の毒性変化であると判断した。３）6.3ppm群と12.5ppm群でも病理組織学的に毒性変化がみられたため、変化のみられない濃度も必要と判断した。４）雌雄の間の顕著な差は認められなかった。これらの事実に基づいて13週間試験では25ppmを最高濃度とすることが適当と考えたが、濃度の数値を整数に整えることを加味して、雌雄ともに24ppm、12ppm、6ppm、3ppm、1.5ppm（公比 2）とした。

Ⅳ－１－２　１３週間試験

クロトンアルデヒドの投与による死亡は雌雄ともになかった。一般状態の観察では24ppm群の雌雄で異常呼吸音が聴取された。また12ppm以上の投与群では雌雄ともに体重の増加抑制が濃度依存的にみられ、摂餌量も低下した。定期解剖時の肉眼的観察ではクロトンアルデヒドの投与に起因する変化は認められなかったが、病理組織学的検査で、雌雄とも鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管の粘膜上皮に扁平上皮化生等の毒性変化がみられた。鼻腔では呼吸上皮及び嗅上皮の扁平上皮化生が12ppm以上の投与群でみられ、呼吸上

皮領域の扁平上皮化生は過形成に移行している部分も存在した。鼻腔の扁平上皮化生は、2週間試験における変化に比べ角化が多く、病変が進行していると推察された。またその発生部位は鼻腔の前部、すなわちレベルⅠ（切歯の後端）で顕著だった。鼻咽頭、喉頭、気管の上皮では24ppm群でみられ、鼻咽頭では鼻腔の呼吸上皮の変化と同様に上皮の過形成を伴っていた。その他の変化として鼻腔では呼吸上皮と嗅上皮の萎縮、嗅上皮の壊死と呼吸上皮化生が12ppm以上で、炎症性細胞の浸潤とレベルⅡ及びⅢ（切歯乳頭及び第一臼歯前端の横断部位）における背側壁の浮腫が12ppm以上で、呼吸上皮の壊死が24ppm群で、また鼻甲介の癒着も24ppm群でみられた。鼻咽頭では炎症性細胞浸潤が24ppm群でみられた。これらの変化に関連して、血液学的検査では雄の24ppm群で分葉核好中球の比率が増加していた。また血液生化学的検査の主に12ppm以上の群で有意に変化していた項目の中で、雌雄に共通し、かつ濃度依存性のあるものが総コレステロールとリン脂質の減少であった。臓器重量測定の結果、実重量、体重比重量ともに変化のあったものとして雄では12ppm以上の群で胸腺が低下、副腎が増加、雌では12ppm以上の群で副腎が増加した。しかし血液・血液生化学的検査、臓器重量等の結果は、これらの変化を含めてすべて軽度な変化であり、がん原性試験の濃度決定を左右するものではなかった。以上の結果に雌雄の間で顕著な差は認められなかった。

このように2週間試験を含めて、ラットのクロトンアルデヒド吸入投与による変化は、主に鼻腔から気管にかけての気道、特に鼻腔に認められ、鼻腔前部粘膜の扁平上皮化生が特徴的であった。このような変化は、刺激性のある化学物質、例えばホルムアルデヒドなどにより生じることが報告されている（文献　6,7）。ホルムアルデヒドの慢性の投与では、鼻腔前部から扁平上皮癌が発生するとされており（文献　8）、クロトンアルデヒド吸入投与による鼻腔病変の種類及び発生部位から推測して、クロトンアルデヒドの長期投与でも腫瘍の発生が疑われる。

以上の13週間試験の結果から、１）クロトンアルデヒド投与の影響は雌雄ともに12ppm以上の群でみられた。２）24ppmでは病理組織学的変化と体重増加抑制が顕著であり、2年間の投与には耐えられず、12ppmが最大耐量と判断した。従って、がん原性試験の濃度は雌雄ともに12ppm、6ppm、3ppm（公比 2）とした。

(Study No.0286,0287,0292,0293)

Ⅳ－２　マウスを用いた試験

Ⅳ－２－１　２週間試験

ラットを用いた試験とほぼ同様な結果が得られた。マウスではクロトンアルデヒドの投与により最終投与日までに100ppm群は雌雄ともに全例死亡、50ppm群は雄6例、雌1例が死亡した。さらに50ppm群では解剖日に雄2例、雌7例が死亡し、結果として雌雄各8例が死亡した。投与初日の暴露中の観察では50ppm以上の投与群で呼吸困難（あえぎ呼吸、開口呼吸）がみられ、100ppm群で特に顕著であった。さらに投与期間中の暴露開始前の一般状態の詳細観察では、50ppm群で異常呼吸音を聴取した。死亡した動物では解剖の結果、肉眼的に胃から大腸にかけてのガスの貯留がみられたが、これはラットと同様に開口呼吸による消化管への空気の流入により生じた変化と推測された。その他、肺の赤色や赤色斑、胸水貯留もみられた。病理組織学的検査の結果、これらの死亡動物では鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、気管支の粘膜上皮の壊死が顕著であった。また粘膜上皮の萎縮や炎症性細胞の浸潤、喉頭の一部では扁平上皮化生もみられた。肺には鬱血や出血、浮腫もみられた。これらの変化はラットと同様にクロトンアルデヒドの吸入による刺激に起因した毒性変化であり、特に鼻腔病変が死亡につながったと推測した。その他、胸腺と脾臓の萎縮と核崩壊、肝臓の巣状壊死、心筋や骨格筋の壊死もみられた。定期解剖時まで生存した動物では、50ppm群で異常呼吸音が聴取された。投与期間の体重の推移は、12.5ppm以上の群で増加抑制が濃度依存的にみられ、加えて摂餌量も低下した。定期解剖時まで生存していた動物ではクロトンアルデヒド投与に起因する変化は、肉眼的には50ppm群で胸腺の萎縮がみられたのみであったが、病理組織学的検査では、気道の粘膜上皮の傷害が特徴的であった。鼻腔の呼吸上皮の扁平上皮化生は、25ppm以上の群でみられ、同様な変化が50ppm群の喉頭の粘膜上皮でもみられた。その他の変化として鼻腔では呼吸上皮の壊死と萎縮、嗅上皮の萎縮、炎症性細胞の浸潤が12.5ppm以上の群で、喉頭では上皮の壊死と炎症性細胞の浸潤が50ppm群で、気管では上皮の萎縮と壊死、上皮の過形成、炎症性細胞の浸潤が50ppm群でみられた。さらに肺では鬱血、出血、気管支上皮の壊死と過形成が50ppm群でみられた。なお、ラットでみられたような扁平上皮化生から過形成への移行はみられなかった。その他、胸腺と脾臓の萎縮、肝臓の巣状壊死、心筋の壊死が50ppm群でみられた。その他の検査で、肉眼的にも組織学的にもみられた胸腺の萎縮は、胸腺重量の低下と一致していたが、これを含めてその他の検査項目では、特に13週間試験の濃度決定を左右する様な意義をもつ毒性変化はなかった。全体的に以上の結果に

雌雄間で顕著な差は認められなかった。

以上の結果をまとめると、１）25ppm以下の群では投与による死亡はなかった。２）12.5ppm群と25ppm群では雌雄ともに体重増加の抑制や摂餌量の低下、さらに病理組織学的にも毒性変化がみられたが、これらの変化は13週間試験におそらく耐え得る程度の毒性変化であると判断した。３）雌雄間に顕著な差は認められなかった。従って、13週間試験では25ppmを最高濃度とすることが適当と考えたが、濃度の数値を整数に整えることを加味して、ラットと同様に、雌雄ともに24ppm、12ppm、6ppm、3ppm、1.5ppm（公比 2）とした。

Ⅳ－２－２　１３週間試験

クロトンアルデヒドの投与による死亡は雌雄ともになかったが、雄の対照群と3ppm群の各1例に、先天性と思われる水腎症による死亡があった。一般状態の観察では、24ppm群の雌雄の少数例で異常呼吸音を聴取した。また体重の増加抑制が雄では6ppm以上で、雌では12ppm以上の投与群で濃度依存的にみられ、摂餌量も同濃度群では低下した。定期解剖時の肉眼的観察ではクロトンアルデヒドの投与に起因する変化はなかったが、病理組織学的検査で、雌雄の鼻腔、鼻咽頭、喉頭、及び気管の粘膜上皮に傷害が認められた。鼻腔では呼吸上皮の扁平上皮化生が12ppm以上の投与群でみられ、それは2週間試験における変化に比べ角化が強く、病変が進行していると推測された。またその発生部位は鼻腔の前部、すなわちレベルⅠで顕著だった。喉頭の上皮でも扁平上皮化生は12ppm以上の群で、また鼻咽頭と気管の上皮では24ppm群でみられた。なお、ラットでみられたような扁平上皮化生から過形成への移行はみられなかった。その他の変化として鼻腔では呼吸上皮と嗅上皮の萎縮、壊死及びエオジン好性変化、そして嗅上皮の呼吸上皮化生が12ppm以上の群で、炎症性細胞の浸潤とレベルⅡ及びⅢにおける背側壁の浮腫が12ppm以上で、レベルⅢでの浸出液の貯留が24ppm群でみられた。鼻咽頭では上皮の萎縮が24ppm群でみられた。これらの変化に関連して、血液学的検査では雌の24ppm群で分葉核好中球の比率が増加していた。また血液生化学的検査の主に12ppm以上の群で有意に変化していた項目の中で、雌雄に共通し、かつ濃度依存性のあるものはトリグリセライドとリン脂質の減少、ＡＬＰ活性の上昇であった。臓器重量測定の結果、脾臓は実重量、体重比重量ともに、雌の12ppm以上の群で低下した。しかし血液・血液生化学的検査や臓器重量等の変化はすべて軽度であり、がん原性試験の濃度決定を左右するものではなかった。クロトンアルデヒドの毒性における性差

は、雄でやや体重増加の抑制が著しいこと以外は、雌雄間に顕著な差は認められなかった。

このように2週間試験を含めて、マウスでのクロトンアルデヒドの吸入投与による変化はラットと同様に主に鼻腔から気管にかけての気道、特に鼻腔に認められ、鼻腔前部粘膜の扁平上皮化生が特徴的であった。

以上の13週間試験の結果から、1）クロトンアルデヒド投与の影響は雄の体重増加の抑制が6ppmでもみられたものの、毒性による変化は雌雄ともに主に12ppm以上の群でみられた。2）24ppmでは病理組織学的変化と体重増加抑制が顕著であり、2年間の投与には耐えられず、12ppmが最大耐量と判断した。従って、がん原性試験の濃度はラットと同様に雌雄ともに12ppm、6ppm、3ppm（公比 2）とした。

V 文献

1. EPA/NIH Mass Spectral Data Base (1978)
Vol.1, pp.16

2. 和光純薬工業からの提供資料 (1995)

3. 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

4. K.Nagano , et al. (1988)
Toxicologic Pathology of Upper Respiratory Tract
Journal of Toxicologic Pathology, 1, 115-127

5. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (1992)
Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 6 th ed. vol.1, 342-343

6. 伊東信行 (1994)
最新毒性病理学, 中山書店, pp.85-94

7. T. M. Monticello, et al. (1990)
Nonneoplastic Nasal Lesions in Rats and Mice
Environmental Health Perspectives, 85, 249-274

8. W. D. Kerns, et al. (1983)
Carcinogenicity of Formaldehyde in Rats and Mice after Long-Term Inhalation Exposure
Cancer Research, 43, 4382-4392