

アクリル酸メチルのラットを用いた吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0803

CAS No. 96-33-3

2014年3月25日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試験資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A~L	2
FIGURES	1~4	
APPENDICES	1-1~3	

標題

アクリル酸メチルのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験

試験目的

アクリル酸メチルの吸入によるがん原性試験の投与濃度を決定する予備試験として、アクリル酸メチルをラットに 13 週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 413 (亜慢性吸入毒性：90 日試験 2009 年 9 月 7 日採択) を参考に実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP)」(一部改正。平成 12 年 12 月 25 日付け、労働省告示第 120 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) に準じて実施した。

動物福祉

本試験は、平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び平成 24 年 4 月 25 日付け、中央労働災害防止協会規程第 17 号「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞が関 1-2-2

アクリル酸メチルのラットを用いた吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0803

本文

本文目次

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

- 3 観察・検査項目及び方法	7
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	7
- 3 - 2 体重測定	7
- 3 - 3 摂餌量測定	8
- 3 - 4 血液学的検査	8
- 3 - 5 血液生化学的検査	8
- 3 - 6 尿検査	8
- 3 - 7 病理学的検査	9
(1) 肉眼的検査	9
(2) 臓器重量	9
(3) 病理組織学的検査	9
- 4 数値処理と統計方法	9
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	9
- 4 - 2 統計処理	10
 試験成績	 11
- 1 生死状況	11
- 2 一般状態	11
- 3 体重	11
- 4 摂餌量	11
- 5 血液学的検査	12
- 6 血液生化学的検査	12
- 7 尿検査	12
- 8 病理学的検査	13
- 8 - 1 肉眼的観察	13
- 8 - 2 臓器重量	13
- 8 - 3 病理組織学的検査	13
 考察及びまとめ	 16
- 1 用量 - 反応関係	16
- 2 無毒性量 (NOAEL)	17
- 3 がん原性試験の濃度決定	17

文献 19

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計
画書に従わなかつたこと 20

要約

アクリル酸メチルのがん原性を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による 2 年間 (104 週間) の試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験 (13 週間試験) を実施した。

本試験は、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 120 匹を用いた。被験物質の投与は、アクリル酸メチルを 1 日 6 時間、1 週 5 日間で 13 週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、12.5、25、50、100 及び 200 ppm (v/v) とした。観察、検査として、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、肉眼的観察 (解剖時)、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

アクリル酸メチルの暴露の結果、動物の死亡はみられず、一般状態観察でも雌雄に明確な変化はみられなかったが、体重増加の抑制が投与期間を通して、200 ppm 群の雌雄にみられた。摂餌量は 200 ppm 群の雄に投与期間を通して、雌に投与期間前半で低値がみられた。血液学的検査では、雌雄の赤血球に係わるパラメーターに変化がみられたが大きな変化ではなかった。血液生化学的検査では、雌雄の 200 ppm 群に ALP の高値がみられ、脂質代謝に関するパラメーターのいくつかには低値がみられた。臓器重量測定では、肺の体重比の高値が雄の 100 ppm 以上の群でみられた。病理組織学的検査では、気道 (鼻腔、喉頭、気管) にアクリル酸メチルの影響がみられた。鼻腔では、嗅上皮の壊死、萎縮、剥離、潰瘍及び甲介の癒着などの傷害性の変化が 200 ppm 群の雌雄にみられ、組織内には炎症もみられた。また、これらの変化にともなって、傷害部位の修復を示す上皮の再生や腺の呼吸上皮化生もみられた。呼吸上皮でも炎症と再生がみられ、加えて杯細胞の過形成もみられた。移行上皮では、上皮の過形成と扁平上皮化生がみられた。雌雄の 200 ppm 群で鼻腔にみられた傷害性の変化は、100 ppm 群でも嗅上皮にみられたが、発生数や程度は減弱し、50 ppm 以下の群には傷害性の変化は雌雄ともほとんどみられなかった。また、修復に係わる再生性の変化は、雄では 50 ppm 群、雌では 25 ppm 群まで認められた。喉頭では、炎症の発生が雄の 100 ppm と雌の 25 ppm 以上の群で多くみられ、また、上皮の再生が雌雄の 50 ppm 以上の群に多くみられた。気管では、200 ppm 群の雌雄に上皮の萎縮と再生がみられ、上皮の再生は雌雄とも 25 ppm 群でまでみられた。その他の器官、組織にはアクリル酸メチルの影響と思われる病理組織学的変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験におけるアクリル酸メチルのラットに対する 13 週間吸入暴露による無毒性量 (NOAEL) は、気道への影響をエンドポイントとして 12.5 ppm であると考えられた。また、がん原性試験は雌雄とも最高濃度を 160 ppm とし、以下、40 ppm、10 ppm (公比 4) と決定した。

試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

名 称 : アクリル酸メチル (Methyl acrylate)
別 名 : 2-プロペン酸メチル、アクリル酸メチルエステル
CAS No. : 96-33-3

- 1 - 2 示性式及び分子量 (文献 1)

示 性 式 : $\text{CH}_2=\text{CHCOOCH}_3$
分 子 量 : 86.09

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色の揮発性の液体
比 重 : 0.9535 (20)
沸 点 : 80.7
蒸 気 圧 : 86.6 mmHg (25)
溶 解 性 : エタノール、エチルエーテル、アセトン、クロロホルム、ベンゼンに可溶
保 管 条 件 : 室温、暗所に保管

- 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 和光純薬工業(株)
規 格 : 和光特級
純 度 : 99.9 % (和光純薬工業(株)検査成績データ)
使用ロット番号 : TLM1752

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、そのマススペクトルを質量分析計（(株)日立製作所 M-80B）を用いて測定し、その測定値を文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献 2）と同じ擬分子イオン及びフラグメントピークを示し、被験物質はアクリル酸メチルであることを確認した。

それらの結果を APPENDIX 1- 1 に示す。

- 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後にそのガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジーズ(株) 5890A）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果を APPENDIX 1-2 に示す。

- 4 試験動物

動物は、アクリル酸メチルのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCrIj ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 72 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 60 匹（群構成時体重範囲、雄：112～127g、雌：88～102g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCrIj ラット（SPF）を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

試験方法

- 1 投与

- 1 - 1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

- 1 - 2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

- 1 - 3 投与期間

投与期間は、1日6時間、原則として1週5日の暴露で13週間とし、計62回の暴露を行った。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、12.5、25、50、100及び200 ppm(体積比 v/v)の5段階に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間はがん原性試験の投与濃度を決定するため、週5日の暴露で13週間とした。

投与濃度は、アクリル酸メチルをラットに吸入暴露した2週間毒性試験(試験番号 0796)の結果(文献3)をもとに決定した。2週間試験は、0(対照群)、50、100、200、400及び800 ppmの濃度で行った。その結果、800 ppm群では主に肺水腫が原因で、雌雄とも全ての動物が死亡した。400 ppm以下の群では死亡はみられなかった。400 ppm群では雌雄とも顕著な体重増加の抑制(最終体重は対照群に対して雄:66%、雌:77%)、摂餌量の低値、一般状態の変化(異常呼吸音、角膜混濁等)がみられたのに加え、病理組織学的検査では、雌雄とも角膜、鼻腔、鼻咽頭管、喉頭、気管及び肺にアクリル酸メチルの刺激による傷害性または炎症性の変化が多くみられ、400 ppmは13週間試験の最高濃度としては高す

ぎると考えられた。200 ppm 群では雌雄とも体重増加の抑制（最終体重は対照群に対して雄：88 %、雌：91 %）と摂餌量の低値がみられたが、一般状態に変化はみられなかった。また、病理組織学的検査では、雌雄とも鼻腔から気管にかけて変化がみられたが、その程度は 400 ppm 群より減弱しており、動物の生死に関わるものではないと判断した。これらのことから、13 週間試験の最高濃度は 200 ppm が適切と考えた。

従って、13 週間試験の投与濃度は 200 ppm を最高濃度として、以下、100、50、25 及び 12.5 ppm（公比 2）とした。

- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質供給装置（柴田科学(株)特注）の発生容器内の被験物質を循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のパプリングにより蒸発させた。この被験物質の蒸気を循環式恒温槽で一定温度に冷却した後、清浄空気（希釈空気）と混合しながら再加熱し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を各吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はガスクロマトグラフで監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように被験物質の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

- 1 - 7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフ（(株)島津製作所 GC-14B）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分毎に測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差（ $(\text{平均値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$ ）が 0.1 %、変動係数（標準偏差 / 平均値 $\times 100$ ）が 1.2 %以内であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

- 2 動物管理

- 2 - 1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 10 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群 名 称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
対 照 群	10 匹 (1001 ~ 1010)	10 匹 (2001 ~ 2010)
12.5 ppm 群	10 匹 (1101 ~ 1110)	10 匹 (2101 ~ 2110)
25 ppm 群	10 匹 (1201 ~ 1210)	10 匹 (2201 ~ 2210)
50 ppm 群	10 匹 (1301 ~ 1310)	10 匹 (2301 ~ 2310)
100 ppm 群	10 匹 (1401 ~ 1410)	10 匹 (2401 ~ 2410)
200 ppm 群	10 匹 (1501 ~ 1510)	10 匹 (2501 ~ 2510)

- 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法 (適正層別方式) により実施した (文献 4)。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室 (検疫 605 室、馴化・投与 601 室) に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

- 2 - 3 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室 (605 室) で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室 (601 室) の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値 (平均値 ± 標準偏差) を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温 度 : 検疫室 ; 23 ± 2 < 605 室 ; 22.9 ± 0.1 >
 吸入試験室 ; 21 ± 2 < 601 室 ; 20.3 ± 0.2 >
 吸入チャンバー内 ; 20 ~ 24

湿度 : 検疫室 ; $55 \pm 15 \%$ < 605 室 ; $52 \pm 2 \%$ >
 吸入試験室 ; $55 \pm 15 \%$ < 601 室 ; $58 \pm 3 \%$ >
 吸入チャンバー内 ; 30 ~ 70 %
 明暗サイクル : 12 時間点灯(8:00 ~ 20:00) / 12 時間消灯(20:00 ~ 8:00)
 換気回数 : 検疫室・吸入試験室 ; 15 ~ 17 回 / 時
 吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回 / 時
 圧力 : 吸入チャンバー内 ; 0 ~ - 15 × 10Pa
 ケージへの動物の収容方法 : 検疫期間 ; 群飼(5 匹)、馴化・投与期間 ; 単飼
 ケージの材質・形状・寸法等 :
 検疫期間 ; ステンレス製群飼網ケージ (340(W) × 294(D) × 176(H) mm/匹)
 馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (125(W) × 216(D) × 176(H) mm/匹)
 投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (150(W) × 216(D) × 176(H) mm/匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場 : 千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30kGy- 線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株) から分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

(3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

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

- 3 観察・検査項目及び方法

- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

- 3 - 2 体重測定

体重測定は週 1 回行った。また、定期解剖動物の搬出時にも体重 (搬出時体重) を測定

した。

- 3 - 3 摂餌量測定

摂餌量は週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

- 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記*印検査項目）に採血した。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、クエン酸ナトリウム入り採血管の血液は、遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、プロトロンビン時間*、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)*、白血球数、白血球分類

- 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

- 3 - 6 尿検査

投与 13 週の検査時まで生存した動物から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティステックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

- 3 - 7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

定期解剖時に全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

全動物について、下記に示した臓器の湿重量(臓器実重量)を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率(臓器重量体重比)を算出した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で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(レベル1)、切歯乳頭(レベル2)、第一臼歯の前端(レベル3)の3ヶ所の横断面で切り出し(文献5)、検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄(大腿骨)、リンパ節(腋窩、鼠径等)、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸(十二指腸を含む)、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経(坐骨神経)、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨(大腿骨)、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

- 4 数値処理と統計方法

- 4 - 1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第3位まで測定し、小数点以下第3位を四捨五入して小数点以下第2位までを表示した。

体重は g を単位とし、整数値の1の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第1位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第3位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第4位を四捨五入し、小数点以下第3位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と桁数により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五

入を行い表示した。

- 4 - 2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較を行った。

病理組織学的検査の非腫瘍性病変は、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1~4 に分け、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との χ^2 検定を行った。

各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行った。

試験成績

- 1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 に示した。

- 雌雄 -

動物の死亡はみられなかった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示した。

- 雄 -

200 ppm 群で角膜混濁が投与初期に 2 匹みられたが、そのうちの 1 匹は、3 週目以降はみられなかった。

- 雌 -

200 ppm 群で角膜混濁が投与初期に 2 匹みられたが、2 匹とも 3 週目以降はみられなかった。

- 3 体重

体重の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 1, 2 に示した。

- 雄 -

200 ppm 群で投与期間を通して、体重増加の抑制がみられた。

投与群の最終体重は対照群に対し、12.5 ppm 群：98 %、25 ppm 群：102 %、50 ppm 群：101 %、100 ppm 群：97 %、200 ppm 群：85 %であった。

- 雌 -

200 ppm 群で投与期間を通して、体重増加の抑制がみられた。

投与群の最終体重は対照群に対し、12.5 ppm 群：97 %、25 ppm 群：101 %、50 ppm 群：97 %、100 ppm 群：99 %、200 ppm 群：92 %であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

- 雄 -

200 ppm 群では投与期間を通して、100 ppm 群では主に投与期間前半に摂餌量の低値が認められた。

13 週間の平均摂餌量は、対照群：16.5 g、12.5 ppm 群：16.4 g、25 ppm 群：16.5 g、50 ppm 群：16.6 g、100 ppm 群：15.6 g、200 ppm 群：14.2 g であった。

- 雌 -

200 ppm 群では主に投与期間前半に摂餌量の低値が認められ、また、50 ppm 群と 100 ppm 群でも投与期間前半に摂餌量の低値が散見された。

13 週間の平均摂餌量は、対照群：11.1 g、12.5 ppm 群：10.9 g、25 ppm 群：11.1 g、50 ppm 群：10.7 g、100 ppm 群：10.6 g、200 ppm 群：10.0 g であった。

- 5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

- 雄 -

ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び MCV の高値と網赤血球比の低値が 200 ppm 群でみられた。

- 雌 -

赤血球数及びヘマトクリット値の高値が 200 ppm 群でみられた。

- 6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

- 雄 -

ALP の高値と総蛋白、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及びカルシウムの低値が 200 ppm 群でみられた。

- 雌 -

ALP 及びカリウムの高値と総コレステロール及びリン脂質の低値が 200 ppm 群でみられた。

- 7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

蛋白の陽性度の増加が 25 ppm 群と 100 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなく、被験物質の影響とは考えなかった。

- 8 病理学的検査

- 8 - 1 肉眼的観察

定期解剖時に行った肉眼的観察結果を TABLE I 1, 2 に示した。

- 雄 -

眼球の混濁が 200 ppm 群で 1 匹にみられた。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる所見はみられなかった。

- 8 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

- 雄 -

肺の体重比の高値が 100 ppm 以上の群でみられた。

その他、200 ppm 群ではいくつかの臓器で実重量の低値や体重比の高値がみられたが、これらの変化は 200 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われた。

- 雌 -

200 ppm 群ではいくつかの臓器で実重量の低値や体重比の高値がみられたが、これらの変化は 200 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われた。

- 8 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE L 1, 2 に示した。

雄

被験物質の影響は、主に気道（鼻腔、喉頭、気管）にみられた。

[200 ppm 群]

鼻腔では、移行上皮に扁平上皮化生（軽度）及び過形成（軽度～中等度）が各 10 匹、呼吸上皮に再生（軽度）が 10 匹、杯細胞過形成（軽度）が 2 匹、炎症性細胞浸潤（軽度）が 10 匹に認められ、嗅上皮に壊死（中等度）、剥離（軽度～中等度）、萎縮（中等度）及び再生（中等度）が各 10 匹、潰瘍（軽度）が 5 匹、炎症性細胞浸潤（軽度）が 10 匹に認められた。また、甲介の癒着（軽度）が 6 匹に認められた。嗅上皮の萎縮は嗅細胞の数が減少し、上皮の丈が低くなった変化であり、甲介の癒着は鼻腔後方の篩骨甲介の癒着としてみられた。

喉頭では、上皮に再生（軽度～中等度）が 10 匹に認められた。

気管では、上皮に再生（軽度）が 7 匹、萎縮（軽度）が 6 匹に認められた。

なお、炎症性細胞浸潤（軽度）が喉頭と気管に各 1 匹認められたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。その他、眼球に角膜炎（軽度）が 1 匹に認められた。

[100 ppm 群]

鼻腔では、移行上皮に扁平上皮化生（軽度）が 1 匹、呼吸上皮に再生（軽度）が 9 匹、杯細胞過形成（軽度）が 10 匹に認められ、嗅上皮に萎縮（軽度）、壊死（中等度）及び再生（中等度）が各 10 匹、剥離（軽度）が 5 匹、呼吸上皮化生（軽度）が 1 匹、炎症性細胞浸潤（軽度）が 5 匹に認められた。

喉頭では、炎症性細胞浸潤（軽度）が 7 匹、上皮に再生（軽度）が 8 匹に認められた。

気管では、上皮に再生（軽度）が 6 匹に認められた。

なお、気管で炎症性細胞浸潤（軽度）2 匹に認められたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[50 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮に再生（軽度）が 8 匹、杯細胞過形成（軽度）が 6 匹に認められ、嗅上皮に再生（軽度～中等度）が 9 匹、萎縮（軽度）が 1 匹に認められた。

喉頭では、上皮に再生（軽度）が 3 匹に認められた。

気管では、潰瘍（軽度）が 1 匹、上皮に再生（軽度）が 5 匹に認められた。

なお、炎症性細胞浸潤（軽度）が喉頭で 1 匹、気管で 3 匹に認められたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[25 ppm 群]

気管では、上皮の再生が 1 匹にみられた。

なお、炎症性細胞浸潤（軽度）が喉頭で 3 匹、気管で 1 匹に認められたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[12.5 ppm 群]

炎症性細胞浸潤（軽度）が喉頭で 1 匹、気管で 2 匹に認められたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[対照群]

炎症性細胞浸潤（軽度）が喉頭で 1 匹に認められた。

雌

被験物質の影響は、主に気道（鼻腔、喉頭、気管）にみられた。

[200 ppm 群]

鼻腔では、移行上皮に扁平上皮化生（軽度）及び過形成（軽度）が各 10 匹、呼吸上皮に再生（軽度）及び炎症性細胞浸潤（軽度）が各 10 匹に認められ、嗅上皮に再生（中等度）、萎縮（中等度）、壊死（軽度）、剥離（軽度～中等度）及び炎症性細胞浸潤（軽度）が各 10 匹に認められた。また、甲介の癒着（軽度）が 7 匹、腺の呼吸上皮化生（軽度）が 3 匹に認められた。

喉頭では、炎症性細胞浸潤（軽度）が 6 匹、上皮に再生（軽度）が 6 匹に認められた。

気管では、上皮に萎縮（軽度）が 5 匹、再生（軽度）が 1 匹に認められた。

なお、泡沫細胞出現（軽度）が肺に 1 匹、炎症性細胞浸潤（軽度）が気管に 1 匹みられたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[100 ppm 群]

鼻腔では、移行上皮に扁平上皮化生（軽度）が 1 匹、呼吸上皮に再生（軽度）が 9 匹、杯細胞過形成（軽度）が 5 匹に認められ、嗅上皮に再生（中等度）、萎縮（軽度）及び壊死（軽度）が各 10 匹、剥離（軽度）1 匹、炎症性細胞浸潤（軽度）が 3 匹に認められた。

喉頭では、炎症性細胞浸潤（軽度）が 8 匹、上皮に再生（軽度）が 4 匹に認められた。

気管では、上皮に再生（軽度）が 1 匹、潰瘍（軽度）が 1 匹に認められた。

なお、炎症性細胞浸潤（軽度～中等度）が鼻腔の呼吸上皮に 2 匹、気管に 3 匹にみられたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[50 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮に再生（軽度）が 2 匹に認められ、嗅上皮に再生（軽度）が 5 匹、萎縮（軽度）が 1 匹に認められた。

喉頭では、炎症性細胞浸潤（軽度）が 8 匹、上皮に再生（軽度）が 6 匹に認められた。

気管では、上皮に再生（軽度）が 2 匹に認められた。

なお、炎症性細胞浸潤（軽度）が鼻腔の呼吸上皮に 2 匹、気管に 3 匹、肺に 1 匹にみられたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[25 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮に再生（軽度）が 1 匹、杯細胞過形成（軽度）が 1 匹に認められ、嗅上皮に萎縮（軽度）が 2 匹に認められた。

喉頭では、炎症性細胞浸潤（軽度）が 6 匹に認められた。

気管では、上皮に再生（軽度）が 2 匹に認められた。

なお、鼻腔では呼吸上皮に炎症性細胞浸潤（軽度～中等度）が 3 匹、気管では炎症性細胞浸潤（軽度）が 3 匹にみられたが、発生数が少なく、投与の影響は明確ではなかった。

[12.5 ppm 群]

炎症性細胞浸潤（軽度）が鼻腔の呼吸上皮で 1 匹、喉頭で 3 匹、気管で 2 匹、喉頭上皮の再生が 1 匹に認められたが、発生数が少なく投与の影響は明確ではなかった。

[対照群]

炎症性細胞浸潤（軽度）が鼻腔の呼吸上皮と喉頭で各 3 匹、気管で 1 匹に認められた。

考察及びまとめ

アクリル酸メチルのがん原性を検索する目的で、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による2年間(104週間)の試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験(13週間試験)を実施した。

本試験は、投与群5群、対照群1群の計6群(各群雌雄各10匹)を設け、アクリル酸メチルの投与濃度は、0(対照群)、12.5、25、50、100及び200 ppm(v/v)とした。投与期間は1日6時間、1週5日間の投与(全身暴露による経気道投与)で13週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、尿検査を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

- 1 用量 - 反応関係

アクリル酸メチルの投与は、ウサギの皮膚及び眼球に強い刺激性を示し、また、多くの哺乳動物の気道系組織に刺激性を示すことから、ECETOC(欧州化学物質生態毒性および毒性センター)はアクリル酸メチルの主な毒性は接触部位における刺激性または腐食性と結論している(文献6)。本試験においてもアクリル酸メチルの刺激によると思われる変化が気道を中心にみられた。

アクリル酸メチルの暴露の結果、動物の死亡はみられず、一般状態観察でも雌雄に明確な変化はみられなかった。体重は200 ppm群で、雌雄に体重増加の抑制がみられた。200 ppm群の最終体重は対照群に対し雄は85%、雌は92%となり、体重増加の抑制の程度は雌より雄の方が大きかった。摂餌量は、雄では200 ppm群で投与期間を通して、雌では主に投与期間前半で低値であった。

血液学的検査では、雄でヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及びMCVの高値、雌で赤血球数及びヘマトクリット値の高値が200 ppm群でみられたが、大きな変化ではなく、病理組織学的検査でも血液系への影響を示唆する変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、雄で総蛋白、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及びカルシウムの低値とALPの高値が200 ppm群でみられた。雌では総コレステロール及びリン脂質の低値とALP及びカリウムの高値が200 ppm群でみられた。200 ppm群でみられた蛋白や脂質の変化は主に摂餌量の低値に関連するものと思われる。血液生化学的検査でみられた変化に関連すると思われる病理組織学的所見は認められなかった。

臓器重量測定では、雄の肺の体重比が100 ppm以上で高値を示したが、病理組織学的検査では肺に変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、気道(鼻腔、喉頭、気管)にアクリル酸メチルの影響がみられた。

鼻腔では、200 ppm群の雌雄の嗅上皮に壊死、萎縮、剥離、潰瘍及び甲介の癒着などの

傷害性の変化がみられ、組織内には炎症（炎症性細胞浸潤）もみられた。また、同時に、傷害された部位の修復を示す再生と腺の呼吸上皮化生（雌のみ）もみられた。嗅上皮より前方に位置する呼吸上皮でも炎症と再生がみられ、加えて杯細胞の過形成もみられた。前庭に近い移行上皮では、炎症は認められず、再生性又は適応性の変化と考えられる上皮の過形成と扁平上皮化生がみられた。鼻腔でみられた所見に重篤なものはなく、その程度は軽度から中等度であった。200 ppm 群の雌雄の鼻腔にみられた嗅上皮と呼吸上皮の傷害性の変化は、100 ppm 群でも嗅上皮にみられたが、発生数や程度は減弱し、50 ppm 以下の群には雌雄とも傷害性の変化はみられなかった。また、修復に係わる再生性の変化は、雄では 50 ppm 群、雌では 25 ppm 群まで認められた。

喉頭では、200 ppm 群の雌雄に上皮の再生がみられ、この変化は雌雄とも 50 ppm 群までみられた。なお、雌の 12.5 ppm 群でも上皮の再生が 1 匹みられたが、その上の 25 ppm 群では上皮の再生はみられないことから、この発生は投与の影響とは考えなかった。また、炎症は雄の 100 ppm 群と雌の 25 ppm 以上の群で多くみられた。

気管では、200 ppm 群の雌雄に上皮の萎縮と再生がみられ、上皮の再生は雌雄とも 25 ppm 群までみられた。なお、100 ppm 群の雌と 50 ppm 群の雄に潰瘍が 1 匹みられたが、他の群に発生はみられず投与の影響は不明確であった。

以上のように、アクリル酸メチルのラットへの 13 週間の暴露により、気道（鼻腔、喉頭、気管）にアクリル酸メチルの影響がみられ、気道への毒性影響は、雌雄とも 25 ppm の濃度までみられた。

その他の器官、組織にはアクリル酸メチルの影響と思われる病理組織学的変化は認められなかった。

- 2 無毒性量（NOAEL）

アクリル酸メチルのラットへの 13 週間吸入暴露により、投与群において体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量及び病理組織学的検査に変化がみられた。その中で、病理組織学的検査において雌雄とも 25 ppm 群まで気道に変化がみられた。12.5 ppm 以下の群では、暴露に関連した明らかな毒性影響は雌雄とも認められなかった。従って、本試験におけるアクリル酸メチルのラットに対する 13 週間吸入暴露による無毒性量（NOAEL）は、気道への影響をエンドポイントとして 12.5 ppm であると考えられた。

- 3 がん原性試験の濃度決定

本試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では各群とも動物の死亡はみられず、一般状態観察でも雌雄に明確な変化はみられなかった。体重は 200 ppm 群で、雌雄に増加の抑制がみられた。病理組織学的検査では、

被験物質の刺激によると考えられる変化が鼻腔、喉頭及び気管に認められた。特に鼻腔の変化が最も顕著であり、鼻腔への影響は濃度依存的に減弱しながらも25 ppm 群まで認められた。病理組織学的検査でみられた所見は、鼻腔上皮の壊死、潰瘍、剥離、炎症、萎縮、再生、過形成、化生等であったが、その程度は200 ppm 群においても軽度から中等度であり、動物の生存に影響を及ぼすものではないと判断した。しかし、200 ppm 群の最終体重は対照群に対し、雄で85 %、雌で92%であることから、雄の200 ppm はがん原性試験における最大耐量を越えると思われた。一方、100 ppm 群では、最終体重は対照群に対し、雄が97 %、雌が99 %であり、この濃度を最高濃度とするにはやや低いと考えられた。これらの結果より、がん原性試験の最高濃度は100 ppm と200 ppm の中間の濃度が妥当であると考えられた。また、がん原性試験の最低濃度については、投与期間が長期にわたることを考慮し、13週間試験で投与の影響がみられなかった12.5 ppm と同等かやや低い濃度が望ましいと考えた。以上のことから、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも最高濃度を160 ppm とし、以下、40 ppm、10 ppm (公比4) と決定した。

文献

- 1) U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> [accessed 2012/1/4]
- 2) McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
- 3) 日本バイオアッセイ研究センター. 2012. アクリル酸メチルのラットを用いた吸入による2週間毒性試験報告書. 神奈川: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
- 4) 阿部正信 . 1986 . 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立 . 薬理と治療 14 : 7285-7302.
- 5) Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp. Toxic. Pathol.* 49: 97 - 104.
- 6) ECETOC. 1998. Joint Assessment of Commodity Chemicals No. 37

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。