

メタクリル酸ブチルのマウスを用いた
吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号：0819

CAS No. 97-88-1

2013年12月27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
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	i
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試資料の保管	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
本文	v
TABLES	A~K 4	
FIGURES	1~2	
APPENDICES	1-1~3	

標題

メタクリル酸ブチルのマウスを用いた吸入による 2 週間毒性試験

試験目的

メタクリル酸ブチルの吸入によるがん原性試験の投与濃度決定試験（13 週間試験）の予備試験として、メタクリル酸ブチルをマウスに 2 週間全身暴露（経気道投与）して、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 412（亜急性吸入毒性：28 日試験 2009 年 9 月 7 日採択）を参考にして実施した。

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審査された（承認番号 0028）。

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

メタクリル酸ブチルのマウスを用いた
吸入による 2 週間毒性試験報告書

試験番号：0819

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 構造式及び分子量	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	8
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	8
- 3 - 2 体重測定	8
- 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 病理学的検査	9
(1) 肉眼的観察	9
(2) 臓器重量	9
(3) 臓器の採取保存	9
(4) 病理組織学的検査	9
- 4 数値処理と統計方法	10
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	10
- 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	12
- 5 血液学的検査	12
- 6 血液生化学的検査	12
- 7 病理学的検査	13
- 7 - 1 肉眼的観察	13
- 7 - 2 臓器重量	13
- 7 - 3 病理組織学的検査	14
考察及びまとめ	16
- 1 用量 - 反応関係	16
- 2 13 週間試験の濃度決定	18
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

メタクリル酸ブチルのがん原性試験の投与濃度決定試験（13週間試験）の予備試験として、その生体影響を検索する目的で B6D2F1/Crlj マウスを用いた吸入による2週間の試験を実施した。

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5匹とし、合計60匹を用いた。被験物質の投与は、メタクリル酸ブチルを1日6時間、1週5日間で2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）、63、125、250、500及び1000 ppm（v/v）とした。観察、検査として、生死確認、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、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

メタクリル酸ブチル投与の結果、1000 ppm 群の雄3匹が死亡した。他の群では、雌雄とも死亡はみられなかった。一般状態の観察では、雄の1000 ppm 群で4日目の暴露後に、自発減少、円背位、失調歩行、体温低下、不整呼吸、立毛、振戦がみられた。内2匹が5日目に、1匹には所見は認められなかったが6日目に死亡した。体重は、雄の250 ppm 以上の群と雌の500 ppm 以上の群で、投与初期（2日目または4日目）に減少または増加抑制がみられた。また、雌の250 ppm 群でも、4日目の体重は減少したがその後回復した。また、摂餌量は、雌雄の1000 ppm 群で1週目に低値であったが、2週目は回復した。

血液学的検査では、雄の1000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値傾向、血小板数の高値傾向がみられた。また、500 ppm 以上の群で網赤血球比の高値または高値傾向がみられ、貧血傾向が示された。なお、雌では、被験物質投与による影響はみられなかった。

解剖時の肉眼的観察において、雄1000 ppm 群の死亡動物で胸腺と脾臓の萎縮がみられた。臓器重量では、雄1000 ppm 群で胸腺、精巣及び心臓重量の低値傾向、肝臓重量の高値傾向がみられた。なお、雄の生存動物と雌では、肉眼的観察及び臓器重量で被験物質投与による影響はみられなかった。

病理組織学的検査では、雄1000 ppm 群の死亡動物において、胸腺と脾臓の萎縮、腎臓に中等度から重度の尿細管壊死がみられ、死因は腎臓の傷害性変化によるものと考えられた。また、雄1000 ppm 群の生存動物でも、腎臓に尿細管壊死とその傷害に対する再生性変化がみられた。なお、雌の1000 ppm 群には、これらの病変はいずれも認められなかった。鼻腔では、雄の死亡動物で嗅上皮の壊死と萎縮、及び再生性変化が呼吸上皮と嗅上皮にみられ、雄の生存動物と雌では、嗅上皮の壊死と萎縮、及びそれらの再生性変化がみられた。500 ppm 群では、雄の腎臓で尿細管の再生性変化が、雌雄の鼻腔で嗅上皮の壊死と萎縮、及びそれらの再生性変化がみられた。250 ppm 以下の群では、雌雄の鼻腔にのみ同様の変化が認められ、嗅上皮の再生性変化は最低濃度の63 ppm まで認められたが、その程度は暴露濃度の低下に伴って減弱した。

以上の結果より、メタクリル酸ブチルの13週間試験の投与濃度は、500 ppm を最高濃度として、以下、250、125、63及び31 ppm（公比2）とした。

試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

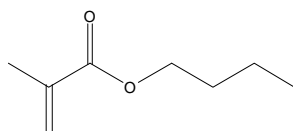
名 称 : メタクリル酸ブチル (Butyl methacrylate)

別 名 : n-ブチルメタクリレート

C A S N o . : 97-88-1

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1、2)

構 造 式 :



分 子 量 : 142.20

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1、2)

性 状 : 無色透明の液体

比 重 : 0.8936 (20)

沸 点 : 160

蒸 気 圧 : 2.12 mmHg (25)

溶 解 性 : エタノール、エチルエーテルに可溶。水に800mg/L (25) 溶解

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 : 和光一級

純 度 : 99.9 % (和光純薬工業(株)検査成績データ)

ロ ッ ト 番 号 : AWR4484

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、被験物質のマスペクトルを質量分析計((株)日立製作所 M-80B)にて測定した。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、被験物質のマスペクトルは文献値(文献 3)と同じフラグメントピークを示し、被験物質はメタクリル酸ブチルであることを確認した。

それらの結果は 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。それらの結果は APPENDIX 1-2 に示す。

- 4 試験動物

動物は、メタクリル酸ブ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)の B6D2F1/Crlj マウス(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各 36 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 30 匹(群構成時体重範囲、雄：22.4 ~ 24.4 g、雌：18.3 ~ 21.4 g)を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に B6D2F1/Crlj マウス(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、1週5日の暴露で2週間とし、計10回の暴露を行った。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、63、125、250、500及び1000 ppm（体積比 v/v）の5段階（公比2）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13週間試験の投与濃度を決定するため、週5日の暴露で2週間とした。

投与時間は OECD 化学品テストガイドライン 412（文献4）に従い1日6時間とした。

投与濃度は、マウスを用いた反復吸入暴露試験の報告はないため、ラットの文献を参考にし、また、技術的に安定して暴露可能な濃度として以下のように決定した。ラットを用いた28日間反復吸入暴露試験（6時間/日、5日/週）が0、310、952、1891 ppmの濃度で実施された（文献1）。その結果、全ての暴露群で体重増加や摂餌量に影響はみられなかった。952 ppm以上で自発減少、流涙、斜視、呼吸困難が散発的に観察され、1891 ppmで腎臓相対重量の増加（雌雄）、病理組織学的変化としては1891 ppmで鼻腔嗅上皮に軽度及び限局性の変性（雌雄）、952 ppmでは雌雄各1匹に同様の変化が認められ、LOELを952 ppm、

NOEL を 310 ppm としている。しかし、本試験で使用する吸入試験システムで、飼育環境条件を満たしながら濃度制御できる最高濃度は 1000 ppm であった。

従って、ラットを用いた吸入による 2 週間毒性試験(試験番号 0818)との比較を考慮し、本試験の投与濃度は雌雄とも 1000 ppm を最高濃度とした。以下 500、250、125、63 ppm (公比 2) と決定した。

- 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、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。この被験物質の蒸気を清浄空気(搬送空気)と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却、再加熱し、一定濃度にした後、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-14A)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 に示す。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 0.4 %以内、変動係数(標準偏差 / 平均値 $\times 100$)が 0.5 %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 5 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	5 匹 (1001 ~ 1005)	5 匹 (2001 ~ 2005)
1	63 ppm群	5 匹 (1101 ~ 1105)	5 匹 (2101 ~ 2105)
2	125 ppm群	5 匹 (1201 ~ 1205)	5 匹 (2201 ~ 2205)
3	250 ppm群	5 匹 (1301 ~ 1305)	5 匹 (2301 ~ 2305)
4	500 ppm群	5 匹 (1401 ~ 1405)	5 匹 (2401 ~ 2405)
5	1000 ppm群	5 匹 (1501 ~ 1505)	5 匹 (2501 ~ 2505)

- 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 5）。

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 604 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（604 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 に示す。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 ; 22.7 ± 0.1 >
 吸入試験室 ; 21 ± 2 < 604 室 ; 21.1 ± 0.1 >
 吸入チャンバー内 ; 20 ~ 24
 湿 度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$ < 605 室 ; $51 \pm 1\%$ >
 吸入試験室 ; $55 \pm 15\%$ < 604 室 ; $58 \pm 1\%$ >
 吸入チャンバー内 ; 30 ~ 70% (ただし、被験物質の湿度センサーへの
 付着により、正常な測定ができないため、投与群の湿度は暴露中及び暴
 露終了後 1 時間まで測定しなかった。)
 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 : 単飼
 ケージの材質・形状・寸法等 :
 検疫期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ (112(W) × 212(D) × 120(H) mm/匹)
 馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (95(W) × 116(D) × 120(H) mm/匹)
 投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (100(W) × 116(D) × 120(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) (千葉工場製造) の CRF-LPF 固型 (30kGy- 線照射滅菌飼料) を自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは絶食させた。

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。

(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、自動給水ノズルから自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として 3 ヶ月ごとに実施している水質検査 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所に依頼) で、建築物衛生法施行規則第 4 条に基づく水質基準に適合していることを確認し、その記録は保管した。

- 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

全動物について、投与期間の 2、4、7、10、14 日目の吸入暴露前に一般状態の詳細な観察を行い、その他の暴露日は吸入暴露前に生死及び瀕死を確認した。また、非暴露日は、朝に生死及び瀕死を確認した。なお、投与 4 日目には、暴露後も一般状態の詳細な観察を行った。

- 3 - 2 体重測定

全動物について、投与期間の 2、4、7、10、14 日目の暴露前に体重測定を行った。また、定期解剖日には絶食後の体重（搬出時体重）を測定した。死亡動物は、飼育室からの搬出時に体重を測定した。

- 3 - 3 摂餌量測定

全動物について、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、剖検直前にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示す。

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、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、剖検直前にイソフルラン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 に示す。

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、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

- 3 - 6 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について肉眼的に観察を行った。なお、定期解剖動物はイソフルラン麻酔下で腹大動脈より採血後、放血し安楽死させた。

(2) 臓器重量

定期解剖時の生存動物について、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) 臓器の採取保存

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した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺に固定液を注入する）、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、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（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) 病理組織学的検査

全動物について、下記の器官、組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。

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（文献6）で切り出し（横断）、検査した。

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、肝臓、腎臓、眼球、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 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 位までを表示した。

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。

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。

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, B 2 に示す。

- 雄 -

1000 ppm 群で 5 日目に 2 匹、6 日目に 1 匹、計 3 匹が死亡した。

500 ppm 以下の群では動物の死亡はみられなかった。

- 雌 -

全投与群で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, C 2 に示す。なお、1 週 4 日目の暴露前の所見は「週日の 1」、暴露後の所見は「週日の 2」として示す。

- 雄 -

1000 ppm 群では、4 日目の暴露後の観察で、2 匹の動物に自発減少、円背位、失調歩行、体温低下、不整呼吸及び立毛がみられ、内 1 匹には振戦もみられた。この 2 匹は翌朝死亡していた。また、1 匹には所見は認められなかったが、6 日目に死亡した。なお、生存した 2 匹に所見はみられなかった。

500 ppm 以下の群では、被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

全投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

- 3 体重

体重の推移を TABLE D 1~D 4 及び FIGURE 1, 2 に示す。なお、雄の 1000 ppm 群は、6 日目以降動物数が 2 匹のため、7 日目以降の統計検定を実施しなかった。

- 雄 -

250 ppm 以上の群で、投与初期（2 日目または 4 日目）に、体重の減少または増加抑制がみられた。また、125 ppm 群と 250 ppm 群で、14 日目の体重が有意な低値を示したが、投与濃度に対応した変化ではなく、偶発的な体重の低値と考えた。なお、1000 ppm 群の生存した 2 匹は、10 日目までは暴露開始前より低値であったが、投与終了時には他の群と大差はなかった。

投与群の最終体重は対照群に対し、63 ppm 群：93 %、125 ppm 群：92 %、250 ppm 群：95 %、500 ppm 群：93 %、1000 ppm 群：94 %であった。

- 雌 -

500 ppm 以上の群で、投与初期（2 日目または 4 日目）に、体重の減少または増加抑制がみられた。なお、250 ppm 群の 4 日目の体重は減少したが、その後回復した。

投与群の最終体重は対照群に対し、63 ppm 群：99 %、125 ppm 群：98 %、250 ppm 群：96 %、500 ppm 群：96 %、1000 ppm 群：99 %であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1～E 4 に示す。なお、雄の 1000 ppm 群は、6 日目以降動物数が 2 匹のため、統計検定を実施しなかった。

- 雄 -

1000 ppm 群では、1 週目の摂餌量は低値であったが、2 週目は回復した。

各群の 1 日当たりの平均摂餌量は、対照群：4.7 g、63 ppm 群：4.5 g、125 ppm 群：4.5 g、250 ppm 群：4.6 g、500 ppm 群：4.6 g、1000 ppm 群：3.6 g であった。

- 雌 -

1000 ppm 群では、1 週目の摂餌量は低値であったが、2 週目は回復した。

各群の 1 日当たりの平均摂餌量は、対照群：4.0 g、63 ppm 群：4.2 g、125 ppm 群：4.0 g、250 ppm 群：3.9 g、500 ppm 群：3.7 g、1000 ppm 群：3.6 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, F 2 に示す。なお、雄の 1000 ppm 群は、検査動物数が 2 匹のため統計検定を実施しなかった。

- 雄 -

赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値傾向、並びに、網赤血球比と血小板数の高値傾向が 1000 ppm 群でみられた。また、網赤血球比の高値が 500 ppm 群でみられた。

- 雌 -

全投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

- 6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, G 2 に示す。なお、雄の 1000 ppm 群は、検査動物数が 2 匹のため統計検定を実施しなかった。

- 雄 -

グルコース、トリグリセライド、ALT、ALP 及び無機リンが 1000 ppm 群で高値傾向で

あったが、1000 ppm 群の検査動物数は 2 匹のため明確な変化ではなかった。

- 雌 -

全投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

なお、ナトリウムの高値が 125 ppm 群と 250 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 7 病理学的検査

- 7 - 1 肉眼的観察

肉眼的所見を TABLE H 1, H 2 に示す。

- 雄 -

1000 ppm 群の死亡動物 (3 匹) では、胸腺の萎縮が 3 匹と脾臓の萎縮が 1 匹にみられた。

1000 ppm 群の生存動物 (2 匹) と 500 ppm 以下の群では、被験物質の影響と考えられる所見はみられなかった。

- 雌 -

全投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

- 7 - 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 I 1, I 2 と J 1, J 2 に示す。なお、雄の 1000 ppm 群は、検査動物数が 2 匹のため統計検定を実施しなかった。

- 雄 -

胸腺、精巣及び心臓の実重量と体重比の低値傾向、肝臓の実重量と体重比の高値傾向が 1000 ppm 群でみられた。

なお、精巣の実重量の高値が 250 ppm 群で、精巣の体重比の高値が 63 ppm ~ 500 ppm 群で、脳の体重比の高値が 63 ppm 群と 125 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではないことから、被験物質の影響とは判断しなかった。

- 雌 -

全投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

- 7 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査は、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、肝臓、腎臓、眼球及び肉眼的観察で変化のみられた胸腺と脾臓について行った。その結果を TABLE K 1 ~ K 4 に示す。

- 雄 -

[1000 ppm 群：死亡動物 3 匹、生存動物 2 匹]

死亡動物では、腎臓、鼻腔、肺、胸腺及び脾臓に変化がみられた。

腎臓では、尿細管壊死（中等度～重度）が 3 匹にみられた。

鼻腔では、呼吸上皮と嗅上皮に変化がみられた。呼吸上皮では、再生（軽度）が 2 匹に、嗅上皮では、壊死（中等度）が 3 匹、萎縮（軽度～中等度）が 3 匹、再生（軽度）が 3 匹にみられた。

肺では、水腫（軽度～中等度）が 2 匹にみられた。

胸腺では、萎縮（中等度）が 3 匹にみられた。

脾臓では、萎縮（中等度）が 1 匹にみられた。

生存動物では、臓腎と鼻腔に変化がみられた。

腎臓では、尿細管壊死（軽度）が 1 匹、尿細管の再生（中等度）が 2 匹にみられた。

鼻腔では、嗅上皮の壊死（軽度）と萎縮（軽度）が各 1 匹、再生（中等度）が 2 匹にみられた。

[500 ppm 群：生存動物 5 匹]

臓腎と鼻腔に変化がみられた。

腎臓では、尿細管の再生（軽度）が 2 匹にみられた。

鼻腔では、嗅上皮の壊死（軽度）が 4 匹、萎縮（軽度）が 1 匹、再生（中等度）が 5 匹にみられた。

[250 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では、嗅上皮の壊死（軽度～中等度）と再生（軽度～中等度）が各 5 匹にみられた。

[125 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では、嗅上皮の壊死（軽度）と萎縮（軽度）が各 1 匹、再生（軽度）が 5 匹にみられた。

[63 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では、嗅上皮の再生（軽度）が 1 匹にみられた。

- 雌 -

[1000 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では嗅上皮に変化がみられた。嗅上皮の壊死（軽度）が 1 匹、萎縮（軽度）が 4 匹、再生（中等度）が 5 匹にみられた。

[500 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では、嗅上皮の壊死（軽度）と萎縮（軽度）が各 3 匹、再生（中等度）が 5 匹にみ

られた。

[250 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では、嗅上皮の壊死（軽度）が 2 匹、再生（軽度～中等度）が 5 匹にみられた。

[125 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では、嗅上皮の壊死（軽度）が 3 匹、再生（軽度）が 5 匹にみられた。

[63 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔では、嗅上皮の再生（軽度）が 4 匹にみられた。

考察及びまとめ

メタクリル酸ブチルのがん原性を検索する目的で、B6D2F1/Crlj 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、その予備試験である 13 週間試験の投与濃度を決定するための予備試験として本試験 (2 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 5 匹) を設け、メタクリル酸ブチルの投与濃度は、0 (対照群)、63、125、250、500 及び 1000 ppm 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 2 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

メタクリル酸ブチル投与の結果、1000 ppm 群の雄 3 匹が 6 日目までに死亡した。他の群では、雌雄とも死亡はみられなかった。

一般状態の観察では、雄の 1000 ppm 群で 4 日目の暴露後に、2 匹の動物に自発減少、円背位、失調歩行、体温低下、不整呼吸及び立毛がみられ、内 1 匹には振戦もみられた。これらの動物は 5 日目に死亡した。また、1 匹には所見は認められなかったが、6 日目に死亡した。なお、1000 ppm 群の雄の生存動物 (2 匹) と 500 ppm 以下の群、雌の全投与群では一般状態に変化はみられなかった。

体重は、雄の 250 ppm 以上の群と雌の 500 ppm 以上の群で、投与初期 (2 日目または 4 日目) に減少または増加抑制がみられた。また、雌の 250 ppm 群は、4 日目の体重は減少したがその後回復した。最終体重は対照群に対し、雄では、63 ppm 群 : 93 %、125 ppm 群 : 92 %、250 ppm 群 : 95 %、500 ppm 群 : 93 %、1000 ppm 群 : 94 %、雌では、63 ppm 群 : 99 %、125 ppm 群 : 98 %、250 ppm 群 : 96 %、500 ppm 群 : 96 %、1000 ppm 群 : 99 %であった。また、摂餌量は、雌雄の 1000 ppm 群で 1 週目に低値であったが、2 週目は回復した。

血液学的検査では、雄の 1000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値傾向、血小板数の高値傾向がみられた。また、500 ppm 以上の群で網赤血球比の高値または高値傾向がみられ、貧血傾向が示された。なお、雌では、被験物質投与による影響はみられなかった。

解剖時の肉眼的観察では、被験物質投与による影響として、雄 1000 ppm 群の死亡動物で胸腺と脾臓の萎縮がみられた。しかし、定期解剖時の生存動物には、投与による影響と考えられる所見は認められなかった。臓器重量では、雄 1000 ppm 群で胸腺、精巣及び心臓の実重量と体重比の低値傾向、肝臓の実重量と体重比の高値傾向がみられた。なお、雌

では、肉眼的観察と臓器重量で被験物質投与による影響はみられなかった。

病理組織学的検査では、雄 1000 ppm 群の死亡動物で、胸腺と脾臓の萎縮、腎臓に中等度から重度の尿細管壊死がみられ、死亡動物の死因は腎臓の傷害性変化によるものと考えられる。また、雄 1000 ppm 群の生存動物でも、腎臓に尿細管壊死とその傷害に対する再生性変化がみられた。なお、死亡動物では肺水腫がみられたが、腎臓病変による二次的変化と考えられた。雌の 1000 ppm 群には、これらの病変はいずれも認められなかった。鼻腔では、雄の死亡動物で嗅上皮の壊死と萎縮、及び再生性変化が呼吸上皮と嗅上皮にみられた。また、雄の生存動物と雌では、嗅上皮の壊死と萎縮、及びそれらの再生性変化がみられた。なお、臓器重量で変化のみられた、雄 1000 ppm 群の精巣、心臓及び肝臓には、病理組織所見は認められなかった。

500 ppm 群では、雄の腎臓と雌雄の鼻腔に変化が認められた。雄の腎臓では、尿細管壊死等の傷害性変化はみられなかったが、尿細管の再生性変化が認められた。これは、1000 ppm 群と同様に、暴露により尿細管に壊死等の傷害性変化が一過性に出現したことを示唆する所見と考えた。鼻腔では、雌雄とも嗅上皮の壊死と萎縮、及びそれらの再生性変化がみられた。

250 ppm 群では、雌雄の鼻腔にのみ変化が認められ、嗅上皮の壊死とその再生性変化がみられた。

125 ppm 群では、雌雄の鼻腔にのみ変化が認められ、雄では嗅上皮の壊死と萎縮、雌では嗅上皮の壊死がみられ、雌雄ともそれらの再生性変化がみられた。

63 ppm 群では、雌雄の鼻腔で嗅上皮の再生性変化のみがみられた。

以上のように、マウスへのメタクリル酸ブチルの 2 週間吸入暴露により、主に腎臓と鼻腔に傷害性変化が認められ、鼻腔への影響は、最低投与濃度である 63 ppm まで起きることが示された。

- 2 13 週間試験の濃度決定

本試験の結果より、13 週間試験の投与濃度を以下のように決定した。

1000 ppm 群では、腎臓傷害が原因で暴露 6 日目までに雄の 3 匹が死亡した。雌の 1000 ppm 群と雌雄の 500 ppm 以下の群では死亡は認められず、一般状態観察でも異常所見はみられなかった。1000 ppm 群では雌雄とも暴露期間中に体重の減少がみられたが、暴露終了時にはほぼ対照群と同様の値に回復した。また、摂餌量の低値、血液学的検査では雄で貧血を示す変化が認められた。病理組織学的検査では、雄で腎臓の尿細管壊死とその再生性変化、雌雄で鼻腔の壊死と萎縮及びそれらの再生性変化がみられた。1000 ppm は動物の死亡がみられたことから、13 週間試験の最高濃度としては高すぎると考えられた。500 ppm 群では、雌雄で暴露初期に体重の減少、雄で網赤血球比の高値が認められた。病理組織学的検査では、雄の腎臓で尿細管傷害に対する再生性変化、雌雄の鼻腔で傷害性変化とその再生性変化がみられたが、これらの変化は動物の生死に関わらないと判断した。なお、250 ppm 以下の影響は、250 ppm 群で暴露初期に軽度の体重抑制がみられ、鼻腔への影響は最低濃度の 63 ppm まで認められたが、その程度は暴露濃度の低下に伴って減弱した。これらのことから、13 週間試験の最高濃度は 500 ppm が適切と考えた。

従って、13 週間試験の投与濃度は 500 ppm を最高濃度として、以下、250、125、63 及び 31 ppm (公比 2、少数点以下第 1 位四捨五入) と決定した。

文献

1. U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substance Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> [accessed 2012/12/13]
2. 化学工業日報社. 2013. 16313 の化学商品. 東京: 化学工業日報社, 375-376.
3. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
4. OECD. 2009. OECD Guideline for The Testing of Chemicals 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-day Study. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
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, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp Toxicol Pathol.* 49:97-104.

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。