メチルアミンのマウスを用いた
吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号：0682

CAS No. 74-89-5

2007年12月28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

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～K6

FIGURES 1～2

APPENDICES 1-1～3

標題

メチルアミンのマウスを用いた吸入による2週間毒性試験

試験目的

メチルアミンの吸入によるがん原性試験の投与濃度を決定する 13 週間試験の予備試験として、メチルアミンをマウスに2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412（反復投与吸入毒性：28日又は14日試験 1981年5月12日採択）を参考にして実施した。

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
東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

試験施設及び運営管理者

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
副所長　長野　嘉介
神奈川県秦野市平沢 2445

メチルアミンのマウスを用いた
吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号：0682

本文

本文目次

頁

要約 ・・・

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法 ･･･ 7
Ⅱ－3－1　動物の生死及び一般状態の観察 ･････････････････････････････ 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　病理学的検査 ･･･ 8
（1）剖検 ･･ 8
（2）臓器重量 ･･ 8
（3）臓器の採取保存 ･･ 8
（4）病理標本の作製及び病理組織学的検査 ････････････････････････････ 9
Ⅱ－4　数値処理と統計方法 ･･ 9
Ⅱ－4－1　数値の取り扱いと表示 ･････････････････････････････････････ 9
Ⅱ－4－2　統計処理 ･･･ 10

Ⅲ　試験成績 ･･ 11

Ⅲ－1　生死状況 ･･ 11
Ⅲ－2　一般状態 ･･ 11
Ⅲ－3　体重 ･･ 12
Ⅲ－4　摂餌量 ･･ 12
Ⅲ－5　血液学的検査 ･･ 12
Ⅲ－6　血液生化学的検査 ･･ 13
Ⅲ－7　病理学的検査 ･･ 13
Ⅲ－7－1　剖検 ･･･ 13
Ⅲ－7－2　臓器重量 ･･･ 14
Ⅲ－7－3　病理組織学的検査 ･･･ 14

Ⅳ　考察及びまとめ ･･･ 17

Ⅳ－1　用量－反応関係 ･･ 17
Ⅳ－2　13 週間試験の濃度決定 ･･ 19

Ⅴ　文献 ･･ 20

Ⅵ　予見することのできなかっ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ったこと・・・

要約

メチルアミン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、メチルアミンを 1 日 6 時間、1 週 5 日間、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 28、83、250、500 及び 750 ppm 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、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

メチルアミンの暴露の結果、750 ppm 群の雄 4 匹、雌全例（5 匹）、500 ppm 群の雄全例（5 匹）、雌 3 匹及び 250 ppm 群の雌 2 匹が死亡した。一般状態の観察では、死亡動物を含めて 250 ppm 以上の群の雌雄に異常呼気音、不整呼吸、腹部膨隆がみられた。また、250 ppm 以上の群では自発運動量減少、立毛、鼻周囲の出血、深呼吸、汚染、呼吸緩徐、洗顔、鼻漿液性分泌物、痩削、流涙、眼脂、角膜混濁等もみられた。体重は、雌雄とも 250 ppm 以上の群で減少がみられた。また、摂餌量も雌雄とも 250 ppm 以上の群で低値であった。

血液学的検査では、雌の 250 ppm 以上の群で軽度の貧血が示唆された。血液生化学的検査では、AST と ALT の高値が雌雄とも 250 ppm 以上の群、CK の高値が雄の 250 ppm 以上の群にみられた。

剖検では、死亡動物に雌雄とも、胸腺の萎縮、胃、小腸及び大腸のガス貯留がみられた。生存動物では 250 ppm 以上の群に胸腺の萎縮、小腸のガス貯留がみられた。臓器重量の測定では、胸腺と脾臓の重量低下が雄の 250 ppm 以上の群と雌の 83 ppm 以上の群にみられた。

病理組織学的検査では、250 ppm 以上の群の死亡動物は、雌雄とも鼻腔の呼吸上皮に炎症、壊死及び潰瘍、嗅上皮に萎縮、眼球に角膜の糜爛、胸腺に萎縮がみられた。また、500 ppm 以上の群では鼻咽頭、喉頭及び気管の炎症、上皮の変性や壊死等もみられた。動物は鼻腔傷害による呼吸困難のために死亡したと推察した。生存動物でも鼻腔の呼吸上皮、嗅上皮、喉頭、気管、胸腺に変化がみられ、鼻腔の呼吸上皮の変化（炎症、壊死、潰瘍、扁平上皮化生）は最低濃度の 28 ppm 群までみられた。また、肝臓に巣状壊死が雄の 250 ppm 以上の群と雌の 500 ppm 群に少数例みられた。

以上のことから、13週間試験の投与濃度は雌雄とも、160 ppm を最高濃度とし、以下、公比2で、80、40、20、10 ppm とした。

Ⅰ　試験材料

Ⅰ－1　被験物質の性状等

Ⅰ－1－1　名称等

名　　称：　メチルアミン（Methylamine）
CAS No.：　74-89-5

Ⅰ－1－2　構造式及び分子量（文献 1）

構 造 式：

$$H_3C-NH_2$$

分 子 量：　31.06

Ⅰ－1－3　物理化学的性状等（文献 1）

性　　状：　無色の気体
沸　　点：　－6.3℃
蒸 気 圧：　2.65×10^3 mmHg（25℃）
溶 解 性：　水、エタノール、アセトンに可溶
保管条件：　室温で暗所に保管

Ⅰ－2　被験物質の使用ロット等

製　造　元：　三菱ガス化学(株)
規　　格：　工業用製品
純　　度：　99.98%（三菱ガス化学(株) 試験成績表データ）
使用ロット番号：　M70124

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、そのマススペクトルを質量分析計（Hitachi M-80B）を用いて測定し、その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）と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、被験物質はメチルアミンであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

Ⅰ－3－2　安定性

被験物質の安定性は、投与開始前及び投与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（Hewlett Packard 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 に示した。

Ⅰ－4　試験動物

動物は、メチルアミン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 B6D2F1/Crlj マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 37 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：21.9～25.4g、雌：19.6～21.9g）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、腫瘍の自然発生率が低いこと、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。

Ⅱ　試験方法

Ⅱ－1　投与

Ⅱ－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。

Ⅱ－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。

Ⅱ－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 週間とした。

Ⅱ－1－4　投与濃度

投与濃度は、28、83、250、500 及び 750 ppm 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。

Ⅱ－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決定試験（13 週間試験）に使用する投与濃度を決定するため 2 週間とした。

投与濃度は文献を参考に以下のように決定した。マウスの LC50 値（2 時間）は 1889 ppm（文献 3）であった。マウスを用いた吸入による反復投与試験の文献はみつからなかったが、ラットでは Kinney ら（文献 4）によって試験が行われている。Kinney らは、雄の Crl:CD(SD)BR ラットに 75、225、750 ppm のメチルアミンを鼻部暴露装置を用いて、2 週間（6 時間/日、5 日/週）吸入暴露した。その結果、750 ppm 群で動物の死亡（投与期間内に 10 匹中 4 匹死亡）及び体重の減少、一般状態の変化（円背位、肺異常音、あえぎ呼吸、赤色鼻汁、目やに、流涎、立毛等）がみられ、病理組織検査では骨髄の低形成、肝臓の巣状壊死、鼻腔呼吸粘膜の壊死／潰瘍がみられた。225 ppm 群では、動物の死亡及び体重への影響はみられなかったが、赤色鼻

汁及び鼻腔の呼吸粘膜の壊死／潰瘍がみられた。75 ppm 群では、軽度な赤色鼻汁がみられただけであった。マウスの 2 時間の LC50 値が 1889 ppm であり、ラットでは 750 ppm で 2 週間の投与期間内に死亡がみられたことから、毒性の感受性にマウスとラットには大きな種差はないと考えた。これらのことから、本試験の最高濃度は 750 ppm とし、最低濃度は 75 ppm の 1/2 以下の濃度が妥当と考え、750 ppm より公比 3 で、以下 250、83、28 ppm（小数点以下第 1 位四捨五入）の 4 段階の濃度を設けた。さらに、750 ppm と 250 ppm の中間の濃度、500 ppm を設けた。従って、本試験の投与濃度は雌雄とも 750 ppm を最高濃度とし、以下 500、250、83、28 ppm と決定した。

Ⅱ－1－6　被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の液化ボンベより得た被験物質の蒸気を純窒素（99.99%以上）と混合し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を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。

Ⅱ－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（Shimadzu GC-14B）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分ごとに測定した。

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（（平均値－設定濃度）／設定濃度×100）が 0.7%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が 1.6%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。

Ⅱ－2　動物管理

Ⅱ－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 名 称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対　照　群	5 匹　(1001～1005)	5 匹　(2001～2005)
28 ppm 群	5 匹　(1101～1105)	5 匹　(2101～2105)
83 ppm 群	5 匹　(1201～1205)	5 匹　(2201～2205)
250 ppm 群	5 匹　(1301～1305)	5 匹　(2301～2305)
500 ppm 群	5 匹　(1401～1405)	5 匹　(2401～2405)
750 ppm 群	5 匹　(1501～1505)	5 匹　(2501～2505)

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、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（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。

Ⅱ－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；23.4±0.0℃＞
　　吸入試験室；21±2℃　＜604 室；20.9±0.1℃＞
　　吸入チャンバー内；20～24℃

湿　　度　：　検疫室；55±15%　＜605 室；52±1%＞
　　吸入試験室；55±15%　＜604 室；56±1%＞
　　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　：　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：千葉県千葉市美浜区新港 8-2）の CRF-1 固型飼料（30KGy-γ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、被験物質暴露中及び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の栄養成分については、オリエンタル酵母工業(株)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター（東京都渋谷区元代々木町 52-1）の分析データを使用ロットごとに入手し、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。ただし、被験物質暴露中は給水しなかった。

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。

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法

Ⅱ－3－1　動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死の確認は、検疫及び馴化期間中は毎日 1 回行い、投与期間中は暴露を行った日には暴露前と暴露後の 2 回、暴露を行わなかった土曜日と日曜日には午前中に 1 回行った。

一般状態の詳細観察は、検疫及び馴化期間中は検疫開始日（導入時）、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に行い、投与期間中は 2、4、7、10、14 日目の暴露開始前及び 1、5、6、7、8、9 日目の暴露後に行った。

Ⅱ－3－2　体重測定

体重測定は、検疫及び馴化期間中は検疫開始日（導入時）、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日（群構成時）に行い、投与期間中は 2、4、7、10、14 日目の暴露開始前に行った。また、動物の死亡発見時及び定期解剖動物の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

Ⅱ－3－3　摂餌量測定

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。

Ⅱ－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、白血球数

Ⅱ－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、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

Ⅱ－3－6　病理学的検査

（1）剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

（2）臓器重量

定期解剖動物について、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、下記の器官、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。

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、腹壁等）、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、腟、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）病理標本の作製及び病理組織学的検査

全動物について、下記の器官、組織を切り出し、パラフィン包埋を行った。

器官・組織：鼻腔（3 箇所を横断）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、肝臓、腎臓、眼球、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、肝臓、腎臓、眼球は全動物について、胸腺は肉眼的に変化のみられた動物について、それぞれ薄切、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。

Ⅱ－4　数値処理と統計方法

Ⅱ－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。

血液学的検査及び血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と精度により表示した。

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。

Ⅱ－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。

Ⅲ　試験成績

Ⅲ－1　生死状況

生死状況を TABLE B1, B2 に示した。

－雄－

750 ppm 群の 4 匹及び 500 ppm 群の全例（5 匹）が死亡した。

750 ppm 群では、投与期間 1 週の 6 日目と 7 日目に各 2 匹が死亡した。500 ppm 群では、1 週の 6 日目と 2 週の 1 日目に各 2 匹が死亡し、定期解剖日の朝に 1 匹の死亡が確認された。

－雌－

750 ppm 群の全例（5 匹）、500 ppm 群の 3 匹及び 250 ppm 群の 2 匹が死亡した。

750 ppm 群では、投与期間 1 週の 6 日目に 1 匹、2 週の 1 日目に 2 匹、2、7 日目に各 1 匹が死亡した。500 ppm 群では、1 週の 6 日目、2 週の 1、2 日目に各 1 匹が死亡した。250 ppm 群では 2 週の 1 日目に 2 匹が死亡した。

Ⅲ－2　一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C1, C2 に示した。なお、暴露前の所見及び暴露のない日の午前の所見は「週－日の 1」、暴露後の所見は「週－日の 2」として示した。なお、動物の生死確認を行い死亡が発見されたが、生存動物の症状観察を行わなかった場合は各所見の欄は「－」とした。

－雄－

750 ppm 群では、異常呼気音、不整呼吸、腹部膨隆（各 1 週の 1 日目より）がみられた。他に自発運動量減少、立毛、鼻周囲の出血、深呼吸、汚染、呼吸緩徐がみられた。

500 ppm 群では、異常呼気音、腹部膨隆（各 1 週の 1 日目より）、不整呼吸（1 週の 2 日目より）がみられ、他に立毛、鼻周囲の出血、深呼吸、自発運動量減少、呼吸緩徐がみられた。

250 ppm 群では、異常呼気音（1 週の 1 日目より）、不整呼吸、腹部膨隆（各 1 週の 4 日目より）がみられ、他に鼻周囲の出血、深呼吸、洗顔、鼻漿液性分泌物がみられた。

83 ppm 以下の群では一般状態の変化はみられなかった。

－雌－

750 ppm 群では、異常呼気音、腹部膨隆（各 1 週の 1 日目より）、不整呼吸（1 週の 2 日目より）がみられた。他に自発運動量減少、立毛、鼻周囲の出血、深呼吸、痩削、汚染、流涙、眼脂、角膜混濁、呼吸緩徐がみられた。

500 ppm 群では、異常呼気音、腹部膨隆（各 1 週の 1 日目より）、不整呼吸（1 週の 4

日目より）がみられ、他に立毛、鼻周囲の出血、深呼吸、自発運動量減少、痩削、眼脂がみられた。

250 ppm 群では、異常呼気音（1 週の 1 日目より）、不整呼吸（1 週の 5 日目より）、腹部膨隆（1 週の 4 日目より）がみられ、他に自発運動量減少、立毛、呼吸緩徐、深呼吸がみられた。

83 ppm 以下の群では一般状態の変化はみられなかった。

Ⅲ－3　体重

体重の推移を TABLE D1～D4 及び FIGURE 1, 2 に示した。

－雄－

250 ppm 以上の群では体重の減少がみられ、対照群に比べ低値であった。

投与群の最終体重は対照群に対し、28 ppm 群：100%、83 ppm 群：97%、250 ppm 群：71%、500 ppm 群：59%、750 ppm 群：62%であった。

－雌－

250 ppm 以上の群では体重の減少がみられ、対照群に比べ低値であった。

投与群の最終体重は対照群に対し、28 ppm 群：101%、83 ppm 群：94%、250 ppm 群：72%、500 ppm 群：65%であった（750 ppm 群は最終計測日の 2 週の 7 日目までに全例死亡）。

Ⅲ－4　摂餌量

摂餌量を TABLE E1～E4 に示した。

－雄雌－

250 ppm 以上の群で摂餌量が低値であった。

Ⅲ－5　血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F1, F2 に示した（雄の 500 ppm 群及び雌の 750 ppm 群は全例死亡のためデータなし）。

－雄－

網赤血球比の高値が 250 ppm 群でみられた。

その他、28 ppm 群と 83 ppm 群でヘマトクリット値、83 ppm 群でヘモグロビン濃度の高値がみられたが投与濃度に対応した変化ではなかった。

－雌－

ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCV の低値及び MCHC、血小板数、網赤血球

比の高値が 250 ppm 群でみられた。なお、500 ppm 群の 2 匹にも、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCV の低値及び血小板数、網赤血球比の高値がみられた。

Ⅲ－6　血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G1, G2 に示した（雄の 500 ppm 群及び雌の 750 ppm 群は全例死亡のためデータなし）。

－雄－

A/G 比、AST、ALT、CK の高値及びグルコース、リン脂質、クロールの低値が 250 ppm 群でみられた。なお、750 ppm 群の 1 匹にも、AST、ALT、CK の高値及びグルコース、リン脂質の低値がみられた。

－雌－

総蛋白、ALP の低値及び AST、ALT の高値が 250 ppm 群でみられた。なお、500 ppm 群の 2 匹にも、総蛋白、ALP の低値及び AST、ALT の高値がみられた。

Ⅲ－7　病理学的検査

Ⅲ－7－1　剖検

剖検所見を TABLE H1～H4 に示した。

－雄－

750 ppm 群の死亡動物（4 匹）には、胸腺の萎縮、胃及び小腸のガス貯留が全動物に、大腸のガス貯留が 3 匹にみられた。生存動物（1 匹）には胸腺の萎縮がみられた。

500 ppm 群の死亡動物（5 匹）には、胃、小腸及び大腸のガス貯留が全動物に、胸腺の萎縮が 4 匹にみられた。

250 ppm には胸腺の萎縮が全動物にみられた。

83 ppm 以下の群には、被験物質の影響と考えられる所見は認められなかった。

－雌－

750 ppm 群の死亡動物（5 匹）には、胃及び小腸のガス貯留が全動物に、胸腺の萎縮が 4 匹に、大腸のガス貯留が 3 匹にみられた。

500 ppm 群の死亡動物（3 匹）には、胸腺の萎縮、胃、小腸及び大腸のガス貯留が全動物にみられた。生存動物（2 匹）には、胸腺の萎縮が全動物にみられた。

250 ppm の死亡動物（2 匹）には、胸腺の萎縮、胃、小腸及び大腸のガス貯留が全動物にみられた。生存動物（3 匹）には、胸腺の萎縮が 2 匹に、小腸のガス貯留が 1 匹にみられた。

83 ppm 以下の群には、被験物質の影響と考えられる所見は認められなかった。

Ⅲ－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 I1, I2 と J1, J2 に示した。（雄の 500 ppm 群及び雌の 750 ppm 群は全例死亡のためデータなし）。

－雄－

胸腺と脾臓の実重量と体重比の低値が 250 ppm 群にみられた。なお、750 ppm 群の 1 匹も、胸腺と脾臓の実重量と体重比は低値であった。

その他、250 ppm 群は心臓、腎臓、肝臓の実重量の低値、副腎、肺、脳の体重比の高値がみられたが、これらの変化は 250 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと考えられた。また、28 ppm 群に副腎の実重量の高値がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

－雌－

胸腺と脾臓の実重量の低値が 83 ppm 群と 250 ppm 群に、体重比の低値が 250 ppm 群にみられ、有意差はみられないが、83 ppm 群の胸腺と脾臓の体重比も対照群より低値であった。なお、500 ppm 群の 2 匹も、胸腺と脾臓の実重量と体重比は低値であった。

その他、83 ppm 群に肝臓の実重量の低値、腎臓の体重比の高値、250 ppm 群に卵巣、心臓、腎臓、肝臓、脳の実重量の低値、副腎、心臓、肺、腎臓、脳の体重比の高値みられたが、これらの変化は 83 ppm 群と 250 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと考られた。

Ⅲ－7－3　病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE K1～K6 に示した。

－雄－

[750 ppm 群：死亡動物 4 匹、生存動物 1 匹]

死亡動物（4 匹）では、鼻腔（呼吸上皮、嗅上皮）、鼻咽頭、喉頭、気管、眼球、肝臓及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度～中等度）、壊死（中等度～重度）及び潰瘍（重度）が全動物、嗅上皮には萎縮（軽度）が 2 匹に認められた。また、鼻咽頭には上皮の変性（軽度～中等度）が 2 匹に認められた。喉頭には炎症（軽度）、上皮の壊死（軽度）及び扁平上皮化生（軽度と重度）が各 3 匹、上皮の変性（軽度）が 1 匹に認められた。気管には炎症（軽度）と上皮の変性（軽度）が各 2 匹、上皮の壊死（中等度）と扁平上皮化生（軽度）が各 1 匹に認められた。さらに、眼球には角膜の糜爛（中等度と超重度）が全動物に認められ、肝臓には巣状壊死（軽度）が 2 匹に認められた。なお、胸腺には萎縮（重度）が全動物に認められた。

生存動物（1 匹）では、鼻腔（呼吸上皮）、喉頭及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（中等度）、壊死（中等度）及び潰瘍（重度）、喉頭には扁平上皮化生（中等度）、胸腺には萎縮（重度）が認められた。

[500 ppm 群：死亡動物 5 匹]

鼻腔（呼吸上皮、嗅上皮）、鼻咽頭、喉頭、気管、眼球、肝臓及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度～中等度）が 4 匹、壊死（軽度～中等度）が全動物に、潰瘍（中等度～重度）が 4 匹、扁平上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。嗅上皮には萎縮（軽度）が 2 匹に認められた。また、鼻咽頭には上皮の変性（中等度）が 2 匹に認められた。喉頭には炎症（軽度）が 2 匹、上皮の変性（中等度）と壊死（軽度）が各 1 匹、扁平上皮化生（軽度～重度）が 4 匹に認められた。気管には上皮の変性（軽度～中等度）が 2 匹、炎症（軽度）、上皮の壊死（軽度）及び扁平上皮化生（軽度）が各 1 匹に認められた。さらに、眼球には角膜の糜爛（中等度～重度）が 3 匹に認められ、肝臓には巣状壊死（軽度）が 2 匹に認められた。なお、胸腺には萎縮（重度）が全動物に認められた。

[250 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔（呼吸上皮）、喉頭、肝臓及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度～中等度）、壊死（軽度～中等度）及び潰瘍（重度）が全動物に、扁平上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。また、喉頭には炎症（軽度）と扁平上皮化生（軽度）が各 1 匹に認められた。肝臓には巣状壊死（軽度）が 1 匹に認められ、胸腺には萎縮（重度）が全動物に認められた。

[83 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔（呼吸上皮）に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度）が全動物、壊死（軽度）と潰瘍（軽度）が各 4 匹、扁平上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。

[28 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔（呼吸上皮）に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度）が 2 匹、壊死（軽度）、潰瘍（軽度）及び扁平上皮化生（軽度）が各 1 匹に認められた。

－雌－

[750 ppm 群：死亡動物 5 匹]

鼻腔（呼吸上皮、嗅上皮）、喉頭、気管、眼球及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（中等度～重度）、壊死（中等度～重度）及び潰瘍（重度）がそれぞれ全動物に認められ、扁平上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。嗅上皮には萎縮（軽度）が 4 匹に認められた。また、喉頭には炎症（軽度～中等度）が全動物、上皮の壊死（軽度～中等度）と扁平上皮化生（中等度）が各 3 匹に認められた。気管には炎症（軽度）が 3 匹、上皮の壊死（軽度～中等度）と扁平上皮化生（軽度～中等度）が各 2 匹に認められた。さらに、眼球には角膜の糜爛（中等度～重度）が 4 匹に認められた。なお、胸腺には萎縮（重度）が全動物に認められた。

[500 ppm 群：死亡動物 3 匹、生存動物 2 匹]

死亡動物（3 匹）では、鼻腔（呼吸上皮）、喉頭、気管、眼球、肝臓及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度～中等度）、壊死（中等度～重度）及び潰瘍（重

度）が全動物に認められた。また、喉頭には炎症（軽度）と上皮の変性（軽度）が各 1 匹、扁平上皮化生（中等度）が 2 匹に認められた。気管には上皮の変性（軽度）が 1 匹に認められた。さらに、眼球には角膜の糜爛（重度）、肝臓には巣状壊死（軽度）が各 1 匹に認められた。なお、胸腺には萎縮（重度）が全動物に認められた。

生存動物（2 匹）では、鼻腔（呼吸上皮、嗅上皮）、喉頭、気管及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度～中等度）、壊死（中等度～重度）、潰瘍（重度）及び扁平上皮化生（軽度～中等度）が全動物に認められた。嗅上皮には萎縮（軽度）が全動物に認められた。また、喉頭には炎症（軽度）が 1 匹、扁平上皮化生（中等度）が全動物に認められた。気管には炎症（軽度）、上皮の壊死（軽度）が各 1 匹に認められた。なお、胸腺には萎縮（重度）が全動物に認められた。

[250 ppm 群：死亡動物 2 匹、生存動物 3 匹]

死亡動物（2 匹）では、鼻腔（呼吸上皮、嗅上皮）、眼球及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（中等度）、壊死（中等度）及び潰瘍（重度）が全動物、扁平上皮化生（中等度）が 1 匹に認められた。嗅上皮には萎縮（軽度）が全動物に認められた。さらに、眼球には角膜の糜爛（中等度～重度）が全動物に認められた。なお、胸腺には萎縮（重度）が全動物に認められた。

生存動物（3 匹）では、鼻腔（呼吸上皮、嗅上皮）及び胸腺に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（中等度）、壊死（中等度）、潰瘍（重度）及び扁平上皮化生（軽度～中等度）が全動物に認められた。嗅上皮には萎縮（軽度）が 2 匹に認められた。なお、胸腺には萎縮（重度）が標本作製をおこなった 2 匹中 2 匹に認められた

[83 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔（呼吸上皮）に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度）と壊死（軽度）が各 4 匹、潰瘍（軽度）が 2 匹、扁平上皮化生（軽度）が 3 匹に認められた。

[28 ppm 群：生存動物 5 匹]

鼻腔（呼吸上皮）に変化がみられた。鼻腔の呼吸上皮には炎症（軽度）が 2 匹及び扁平上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。

Ⅳ　考察及びまとめ

メチルアミン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、メチルアミンの投与濃度は、28、83、250、500 及び 750 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、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。また、投与期間中の死亡動物についても剖検観察及び病理組織学的検査を行った。

Ⅳ－1　用量－反応関係

メチルアミンの暴露の結果、750 ppm 群の雄 4 匹、雌全例（5 匹）、500 ppm 群の雄全例（5 匹）、雌 3 匹及び 250 ppm 群の雌 2 匹が死亡した。750 ppm 群と 500 ppm 群の死亡は投与期間 1 週の 6 日目以降、250 ppm 群の雌の死亡は 2 週の 1 日目であった。250 ppm 群の雄及び 83 ppm 以下の群に死亡はみられなかった。

一般状態の観察では、死亡動物を含めて 250 ppm 以上の群の雌雄に異常呼気音、不整呼吸、腹部膨隆がみられた。その他、250 ppm 以上の群では自発運動量減少、立毛、鼻周囲の出血、深呼吸、汚染、呼吸緩徐、洗顔、鼻漿液性分泌物、痩削、流涙、眼脂、角膜混濁等もみられた。83 ppm 以下の群では雌雄とも一般状態の変化はみられなかった。

体重は、雌雄とも 250 ppm 以上の群で減少がみられ、最終体重は対照群に対し、雄の 250 ppm 群：71%、500 ppm 群：59%、750 ppm 群：62%、雌の 250 ppm 群：72%、500 ppm 群：65%であった。また、摂餌量も雌雄とも 250 ppm 以上の群で低値であった。

血液学的検査では、雌の 250 ppm 群と 500 ppm 群でヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低値、網赤血球比の高値がみられ、貧血が示唆されたが、その程度は軽度であった。また、雄の 250 ppm 群でも網赤血球比の高値がみられた。本試験と同時に実施したメチルアミンのラットを用いた 2 週間試験でも、500 ppm 以上の群の雄及び 250 ppm 以上の群の雌で貧血または貧血を示唆する変化がみられおり（文献 6）、本試験の 250 ppm 群の雄の網赤血球比の高値も貧血を示唆する変化と思われる。

血液生化学的検査では、AST と ALT の高値が雌雄とも 250 ppm 以上の群にみられた。また、CK の高値が雄の 250 ppm 以上の群にみられた。病理組織学的検査では、雄の 250 ppm 以上の群と雌の 500 ppm 群に、少数例ながら肝細胞の巣状壊死がみられており、AST と ALT の高値はメチルアミンの肝臓への傷害性の影響を示すものと思われる。また、CK は筋疾患等により高値になるが、本試験では CK の高値の原因は不明であった。

剖検では、250 ppm 以上の群の死亡動物には雌雄とも、胸腺の萎縮、胃、小腸及び大腸のガス貯留がみられた。生存動物にも 250 ppm 以上の群に胸腺の萎縮がみられ、また、小腸のガス貯留が雌の 250 ppm 群に 1 例みられた。胸腺の萎縮は動物がストレス状態にあったことを示唆する所見と考えられる（文献 7）。また、胃、小腸及び大腸のガス貯留は、鼻腔の傷害により呼吸が困難になった結果、口呼吸を行っていたことを示す所見と推察され（文献 8）、一般状態の観察でみられた腹部膨隆は、この胃腸管のガス貯留が原因と思われる。83 ppm 以下の群では雌雄とも、メチルアミンの影響と考えられる所見は認められなかった。

臓器重量の測定では、胸腺と脾臓の重量低下が雄の 250 ppm 以上の群及び雌の 83 ppm 以上の群にみられた。化学物質の投与によるストレス反応によって、胸腺と脾臓の萎縮や重量低下が起きることが知られている（文献 7、9）。剖検及び病理組織学的検査では胸腺の萎縮が 250 ppm 以上の群の雌雄に観察されており、投与群で認められた胸腺及び脾臓の重量低下はメチルアミンの暴露により動物がストレス状態にあったことを示唆している。

病理組織学的検査は鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、肝臓、腎臓、眼球及び肉眼的に変化のみられた胸腺について実施した。250 ppm 以上の群の死亡動物は、雌雄とも鼻腔の呼吸上皮に炎症、壊死及び潰瘍、嗅上皮に萎縮（500 ppm 群の雌を除く）がみられ、その程度は軽度から重度であった。また、500 ppm 以上の群では、鼻咽頭に上皮の変性、喉頭及び気管に炎症、上皮の変性や壊死、扁平上皮化生がみられ、気道の傷害は広範囲に広がっていた。従って、動物は鼻腔傷害による呼吸困難のために死亡したと推察した。また、眼球に角膜の糜爛がみられた。生存動物では、雌雄とも鼻腔の呼吸上皮に炎症、壊死、潰瘍や扁平上皮化生が最低濃度の 28 ppm 群までみられた。これらの所見の発生例数及び程度は暴露濃度に対応していた。また、鼻腔の嗅上皮の萎縮が 250 ppm 群と 500 ppm 群の雌にみられた。さらに、その他の気道への影響もみられた。すなわち、喉頭の炎症や扁平上皮化生が 250 ppm 以上の群、気管の炎症が 500 ppm 群にみられた。メチルアミンは強い刺激を有することが報告されている（文献 10）。また、上部気道を中心とした上記の変化及び眼球の角膜炎は刺激性を有する化学物質の吸入暴露によって生じること（文献 11、12）が知られていることから、本試験で観察された呼吸器と眼球の所見はメチルアミンの刺激に起因した変化と考えられる。また、肝臓に巣状壊死が雄の 250 ppm 以上の群と雌の 500 ppm 群に少数例みられた。なお、剖検時にみられた胸腺の萎縮は病理組織学的にも確認された。また、肺と腎臓にはメチルアミンの影響と考えられる所見は認められなかった。

Ⅳ－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。

本試験では、500 ppm 以上の群の雌雄と250 ppm 群の雌に死亡がみられた。83 ppm 群では死亡がみられなかったが、雌の体重が対照群に比べやや低値（最終体重、雄：対照群の97%、雌：同94%）であった。また、雌雄とも鼻腔の呼吸上皮の炎症、壊死、潰瘍、扁平上皮化生

がみられた。しかし、体重及び鼻腔の変化は軽度であり、一般状態には変化がみられなかった。従って、83 ppm は13週間試験の最高濃度としてはやや低いと考えられた。これらのことから、13週間試験の最高濃度は、250 ppm と83 ppm の中間の濃度、160 ppm が妥当と考えた。また、28 ppm 群では、体重増加の抑制はみられなかったが、雌雄に鼻腔の呼吸上皮の炎症、扁平上皮化生、雄に呼吸上皮の壊死、潰瘍がみられたことから、13週間試験の最低濃度は、28 ppm 以下が望ましいと考えた。

以上のことから、13週間試験の投与濃度は雌雄とも、160 ppm を最高濃度とし、以下、公比2で、80、40、20、10 ppm とした。

V　文献

1. U.S. National Library of Medicine, Specialized Information Services 2007. Methylamine Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB [accessed 2007/01/19].

2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY：John Wiley and Sons.

3. ACGIH. 2001. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 7th ed. Cincinnati, OH: American Conference of Govermental Industrial Hygienists.

4. Kinney LA, Valentine R, Chen HC, Everett RM, Kennedy,Jr GL. 1990. Inhalation Toxicology of Methylamine. Inhal Toxicol 2: 29-39.

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. 日本バイオアッセイ研究センター. 2007.メチルアミン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: 中央労働災害防止教会，日本バイオアッセイ研究センター.

7. Boyd EM. 1972. Multiposal toxicity syndromes. In: Predictive Toxicometrics. Bristol: Scientechnica LTD, 367-378.

8. 伊東信行編著．1994．標的器官の毒性病理（1），呼吸器系　A．鼻腔.最新毒性病理学. 東京:中山書店，85-95.

9. Boyd EM. 1972. Uniposal toxicity syndromes. In: Predictive Toxicometrics. Bristol: Scientechnica LTD, 271-296.

10. Rodney RB, Joseph TN. 1982. Aliphatic and Alicyclic Amines. In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3th ed. (Clayton GD, Clayton FE. eds.). New York, NY：John Wiley and Sons. 3135-3173.

11. Jiang XZ, Morgan KT, Beauchamp RO Jr. 1984. Histopathology of acute and subacute nasal toxicity. In: Toxicology of the Nasal Passages (Barrow CS. ed). Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 51-66.

12. 伊東信行編著. 1994. 標的器官の毒性病理（4），感覚器系　A．眼（眼球、眼瞼、結膜、涙腺、ハーダー腺）.最新毒性病理学.東京:中山書店，317-324.

Ⅵ　予見することのできなかっ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ったこと

予見することのできなかっ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ったことはなかった。