

アクリル酸=2-ヒドロキシエチルのラットを用いた
経口投与による 13 週間毒性試験(混水試験)報告書

試験番号：0323

CAS No. 818-61-1

2003 年 2 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

アクリル酸=2-ヒドロキシエチルのラットを用いた
経口投与による 13 週間毒性試験(混水試験)報告書

試験番号：0323

本 文

本文目次

頁

要約	1
I 試験材料	
I-1 被験物質の性状等	
I-1-1 名称等	2
I-1-2 構造式、示性式、分子量	2
I-1-3 物理化学的性状等	2
I-2 被験物質の使用ロット等	2
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	
I-3-1 特性・同一性	3
I-3-2 安定性	3
I-4 試験動物	3
II 試験方法	
II-1 投与	
II-1-1 投与経路	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与の方法、投与期間、投与濃度及びその設定理由	5
II-1-6 被験物質混合飲水の調製方法	6
II-1-7 調製時における被験物質混合飲水中の被験物質の濃度	6
II-1-8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性	6
II-1-9 被験物質の摂取量	7
II-2 動物管理	
II-2-1 各群の使用動物数	7
II-2-2 群分け及び個体識別方法	7

Ⅱ-2-3	飼育条件	8
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	8
Ⅱ-3-2	体重測定	8
Ⅱ-3-3	摂水量測定	9
Ⅱ-3-4	摂餌量測定	9
Ⅱ-3-5	血液学的検査	9
Ⅱ-3-6	血液生化学的検査	9
Ⅱ-3-7	尿検査	10
Ⅱ-3-8	病理学的検査	10
Ⅱ-4	数値処理と統計方法	
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	10
Ⅱ-4-2	母数の取り扱い	11
Ⅱ-4-3	統計方法	11
Ⅲ	試験成績	
Ⅲ-1	生死状況	12
Ⅲ-2	一般状態	12
Ⅲ-3	体重	12
Ⅲ-4	摂水量	12
Ⅲ-5	摂餌量	13
Ⅲ-6	被験物質摂取量	13
Ⅲ-7	血液学的検査	13
Ⅲ-8	血液生化学的検査	14
Ⅲ-9	尿検査	14
Ⅲ-10	病理学的検査	
Ⅲ-10-1	剖検	14
Ⅲ-10-2	臓器重量	14
Ⅲ-10-3	病理組織学的検査	15

Ⅳ まとめ及び考察

Ⅳ-1 まとめ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16

Ⅳ-2 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

Ⅳ-3 がん原性試験の投与濃度・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

Ⅴ 文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

要約

アクリル酸＝2-ヒドロキシエチルのがん原性を検索する目的で、F344/DuCrj (Fischer) ラットを用いた経口投与による2年間(104週間)のがん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するために13週間試験を実施した。投与はアクリル酸＝2-ヒドロキシエチルを各投与濃度に調製した被験物質混合飲水を動物に自由摂取させる方法で行った。1群当りの動物数は雌雄各10匹とし、被験物質投与群5群と対照群1群の6群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも250 ppm、500 ppm、1000 ppm、2000 ppm 及び 4000 ppm とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂水量・摂餌量の測定、血液・血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

試験の結果、投与濃度に対応して、雌雄の全投与群の摂水量及び摂餌量が低下し、雄の1000 ppm 以上の群、雌の全投与群で体重増加が抑制された。特に、最高用量群である4000 ppm 群での雌雄の体重増加の抑制は顕著であった(対照群の最終計測日体重に比べて、雄75%、雌80%)が、雌雄ともに死亡はなかった。アクリル酸＝2-ヒドロキシエチル投与の影響は主に肝臓と腎臓にみられた。肝臓への影響を示唆する変化として、体重比重量の増加(雄：1000 ppm 以上の群、雌：500 ppm 以上の群)や血中の総コレステロールとリン脂質の増加(雄：1000 ppm 以上の群、雌：2000 ppm 以上の群)などがみられたが、組織学的変化は伴わなかった。腎臓への影響を示唆する変化として、体重比重量の増加(雄：500 ppm 以上の群、雌：全投与群)や血漿中の尿素窒素の増加(雄：2000 ppm 以上の群、雌：4000 ppm 群)、さらに血漿中の総蛋白の減少(雌雄：4000 ppm 群)と尿蛋白の増加(雄：4000 ppm 群、雌：2000 ppm 以上の群)などがみられた。病理組織学的には雄の腎臓では尿細管腔の硝子円柱の出現が1000 ppm 群と4000 ppm 群に1匹みられただけであったが、雌の腎臓では500 ppm 以上の群で近位尿細管上皮細胞内に好酸滴が出現した。肝臓と腎臓への影響の他に、2000 ppm 以上の群に赤血球数とヘモグロビン濃度の減少(雄)、MCVの増加(雌雄)、4000 ppm 群に網赤血球比の増加(雌雄)がみられ、血液への影響(貧血)が示唆された。また、雌雄の4000 ppm 群に唾液腺の萎縮、雄の4000 ppm 群の1匹に前胃の扁平上皮過形成がみられ、被験物質投与の影響が疑われた。

これらの結果より、雄では500 ppm 以上の群、雌では最低用量群である250 ppm 以上の群で腎臓への影響がみられたため、これをエンドポイントとすると最小毒性量(LOAEL)は250 ppm(雌：0.019～0.030g/kg body weight/day)であると考えられた。

以上のように、病理学的検査や血液・血液生化学的検査等ではアクリル酸＝2-ヒドロキシエチル投与による著しい影響はみられなかったが、最高用量群である4000 ppm 群の体重増加抑制は大きく、動物は2年間の連続投与には耐えられないと判断した。また、腎臓の組織学的変化が雌の500 ppm 以上の群でみられたことから、最小用量は500 ppm 以下が適当と考えた。従って、アクリル酸＝2-ヒドロキシエチルのがん原性試験の投与濃度は、雌雄ともに2000 ppm を最大耐量と判断し、2000 ppm、800 ppm、320 ppm(公比2.5)に設定した。

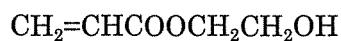
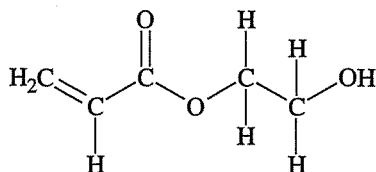
I 試験材料

I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : アクリル酸=2-ヒドロキシエチル (2-Hydroxyethyl acrylate)
 別 名 : 2-ヒドロキシエチルアクリレート (2-Hydroxyethyl acrylate)
 IUPAC 名 : 2-Hydroxyethyl acrylate
 CAS. No. : 818-61-1

I-1-2 構造式、示性式、分子量 (文献 1)



分子量 : 116.1

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

外 観 : 無色透明な液体
 沸 点 : 82℃ (0.6 KPa)
 凝 固 点 : -70℃以下
 溶 解 性 : 水、有機溶媒に可溶
 保存条件 : 室温で暗所に保存

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : LEM 4569
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 グ レ ー ド : 和光試薬 1 級
 純 度 : 96.4% (和光純薬工業 (株) 検査成績書データ)

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性の確認は、使用したアクリル酸＝2－ヒドロキシエチルのマススペクトルを質量分析計（Hewlett Packard 5989B）により測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（Shimadzu FTIR-8200PC）により測定し、アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルの文献値と比較することにより行った。なお、使用した被験物質のガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）により測定し、不純物を同定した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献 2）と同じフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値（文献 3）と同じ波長にピークが認められ、本被験物質はアクリル酸＝2－ヒドロキシエチルであることを確認した。なお、ガスクロマトグラムを測定したところ、アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルとは異なる 3 つの不純物のピークを認めた。それぞれの不純物はアクリル酸（面積比：1.125%）、p-メトキシフェノール（面積比：0.053%）、未同定物質（面積比：2.632%）であった。

なお、それらの結果は、APPENDIX M 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性の確認は、使用したアクリル酸＝2－ヒドロキシエチルについて、使用開始前及び使用終了後に、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（Shimadzu FTIR-8200PC）により、また、ガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）により測定し、使用開始前及び使用終了後のそれぞれのデータを比較することにより行った。

その結果、使用開始前後の測定結果に差はみられず、投与期間中のアクリル酸＝2－ヒドロキシエチルは安定であることを確認した。

なお、その結果は、APPENDIX M 2 に示した。

I-4 試験動物

動物は日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の F344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄を使用した。

雌雄各 75 匹を 5 週齢で導入し、1 週間の検疫・馴化を経た後、発育順調で、異常を認めない動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 60 匹（投与開始時体重範囲、雄：116～131g、雌：92～103g）を選別し、6 週齢より試験に供した。

なお、がん原性試験で使用する動物は、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、理由から F344/DuCrj(Fischer)ラットを使用することが決定している。当試験はがん原性試験の予備試験であるため F344/DuCrj(Fischer)ラットを使用した。

Ⅱ 試験方法

Ⅱ-1 投与

Ⅱ-1-1 投与経路

経口投与

Ⅱ-1-2 被験物質の投与方法

脱イオン水（フィルターろ過し、紫外線照射した市水を脱イオンした水）をさらにフィルターろ過した飲水に被験物質を添加し、設定濃度に調製した被験物質混合飲水を褐色ガラス製給水瓶に充填し、動物に自由摂取させた。

Ⅱ-1-3 投与期間

1996年11月19日から1997年2月20日までの13週間、解剖直前まで連続投与した。なお、被験物質混合飲水の交換頻度は、週2回とした。

Ⅱ-1-4 投与濃度

最高投与濃度を4000 ppmに設定し、以下、2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、250 ppm（公比2）とした。なお、対照群として脱イオン水のみを設けた。

Ⅱ-1-5 投与の方法、投与期間、投与濃度及びその設定理由

当該被験物質は常温で液体であり、水に可溶であるため混水による経口投与とした。

投与期間は、がん原性試験の投与濃度を決定するために13週間とした。

各群の投与濃度は2週間予備試験（文献4）の結果をもとに設定した。2週間試験では6週齢のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)の雌雄にアクリル酸=2-ヒドロキシエチルを各設定濃度に調製した混合飲水を2週間自由摂取させた。1群当たりの動物数は雌雄各10匹とし、被験物質投与群を5群、対照群を1群の6群構成で行った。被験物質投与濃度は、雌雄とも512、1280、3200、8000、20000 ppm（公比2.5）とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重・摂餌量・摂水量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を実施した。

試験の結果、20000 ppm群と8000 ppm群では被験物質混合飲水に対する忌避が著しく、

雌雄ともに死亡が認められたため、この濃度で 13 週間の試験を実施するのは適切でないと考えた。一方、3200 ppm 群では被験物質混合飲水の飲水忌避による摂水量の低下がみられ、それに起因して摂餌量の低下や体重増加の抑制が認められたが、動物に死亡はなく、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査では重篤な影響を示す所見は認められなかった。よって、13 週間試験の最高用量は、3200 ppm 以上で 8000 ppm 以下、かつ 3200 ppm 群の動物の飲水忌避状態から推察して 3200 ppm に近い濃度に設定すべきであると考えた。従って、13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも最高用量を 4000 ppm とし、以下 2000 ppm、1000 ppm、500 ppm、250 ppm（公比 2）に設定した。

Ⅱ－1－6 被験物質混合飲水の調製方法

脱イオン水をさらにフィルターろ過した飲水に被験物質を溶解して設定濃度になるように希釈混合による調製をした。なお、濃度の表示は ppm（重量対重量比）とした。また、被験物質混合飲水の調製頻度は、給水瓶の交換頻度に合わせて週 2 回とした。

Ⅱ－1－7 調製時における被験物質混合飲水中の被験物質の濃度

被験物質混合飲水中における被験物質の濃度は、初回調製時（初回投与開始直前）に各投与濃度に調製された被験物質混合飲水を各 3 ポイントでサンプリングし、ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて分析し、確認した。

分析の結果、各群の平均調製濃度は設定濃度に対し、102～106%の範囲にあった。また、3 ポイントの均一性に関しては、各濃度群内の濃度のばらつきも少なく良好であった。

その結果を APPENDIX M 3 に示した。

Ⅱ－1－8 被験物質混合飲水中の被験物質の安定性

調製された被験物質混合飲水中における被験物質の投与状態（室温放置）での安定性は、ラット用給水瓶に充填した 250 ppm 及び 4000 ppm の被験物質混合飲水を調製時及び調製後 7 日目にガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5890A）を用いて分析し、その被験物質濃度を比較することにより確認した。その結果、調製時を 100%とすると、調製後 7 日目には調製濃度に対し 250 ppm：95.8%、4000 ppm：97.3%であり、投与状態（室温放置）での被験物質混合飲水中の被験物質は安定であることを確認した。

その結果を APPENDIX M 4 に示した。

Ⅱ-1-9 被験物質の摂取量

各計測週における動物の体重、摂水量及び設定濃度より、体重 kg 当たりの 1 日被験物質摂取量 (g/kg body weight /day) を算出した。

その結果を APPENDIX E 1, 2 に示した。

Ⅱ-2 動物管理

Ⅱ-2-1 各群の使用動物数

被験物質投与群 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。

雄		雌	
群 名 称	使用動物数 (動物番号)	群 名 称	使用動物数 (動物番号)
対 照 群	10 匹 (1001~1010)	対 照 群	10 匹 (2001~2010)
250 ppm 群	10 匹 (1101~1110)	250 ppm 群	10 匹 (2101~2110)
500 ppm 群	10 匹 (1201~1210)	500 ppm 群	10 匹 (2201~2210)
1000 ppm 群	10 匹 (1301~1310)	1000 ppm 群	10 匹 (2301~2310)
2000 ppm 群	10 匹 (1401~1410)	2000 ppm 群	10 匹 (2401~2410)
4000 ppm 群	10 匹 (1501~1510)	4000 ppm 群	10 匹 (2501~2510)

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 (層別体重平均法: 適正層別方式) により実施した (文献 5)。なお、群分けは被験物質投与開始直前の体重を基に実施した。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫・馴化期間では色素塗布により、投与期間では耳パンチにより識別した。また、全飼育期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物は全飼育期間、バリア区域 (AC-1 空調エリア) 内の独立した室 (101 室) に収容し、飼育室に試験番号、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

<飼育環境>

飼育室内の環境は、温度： $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度： $55\pm 10\%$ 、明暗サイクル：12 時間点灯(8:00～20:00)/12 時間消灯(20:00～8:00)、換気回数：15～17 回/時に設定した。温度及び湿度の計測結果（平均値±標準偏差）は、温度： $22.6\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、湿度： $59\pm 1\%$ であった。なお、動物の状態に影響を与えるような大きな環境変化は認められなかった。

<飼育ケージ>

動物は、全飼育期間を通して、単飼ケージ（ステンレス製ラット 2 連網ケージ、1 匹当り W170×D294×H176mm）に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。

<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)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、解剖前日の夕方以降は摂取させなかった。

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)の分析データを使用ロット毎に入手し、保管した。また、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毎に入手し、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た。

<飲水>

検疫・馴化期間は、フィルターろ過及び紫外線照射した市水を脱イオン化した飲水（脱イオン水）をさらにフィルターろ過した後に給水瓶により自由摂取させた。投与期間は、脱イオン水をフィルターろ過した飲水に被験物質を希釈混合した被験物質混合飲水を給水瓶により自由摂取させた。

飲水は、(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）に委託して分析した結果を、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

生死及び瀕死の確認を毎日 1 回行い、さらに詳細な一般状態の観察を週 1 回行った。

Ⅱ-3-2 体重測定

週に 1 回体重を測定した。なお、解剖日の搬出時にも体重を測定した。

Ⅱ-3-3 摂水量測定

週 1 回、給水量と残水量を測定し、その差を給水日数で除した値を 1 日当りの摂水量とした。

Ⅱ-3-4 摂餌量測定

週 1 回、給餌量と残餌量を測定し、その差を給餌日数で除した値を 1 日当りの摂餌量とした。

Ⅱ-3-5 血液学的検査

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、以下の検査項目について血液学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食（18 時間以上）させた。

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

検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

Ⅱ-3-6 血液生化学的検査

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、遠心分離して得られた血漿を用いて以下の検査項目について血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日夕方より絶食（18 時間以上）させた。

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、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK、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

検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

Ⅱ-3-7 尿検査

投与最終週に新鮮尿を採取し、尿検査試験紙を用いて以下の検査項目について検査した。

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

検査方法は APPENDIX N 1 に示した。

Ⅱ-3-8 病理学的検査

(1) 剖検

肉眼的に剖検観察を行った。

(2) 臓器重量

解剖時に、以下に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、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

下記の器官、組織を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。

検査器官、組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（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、脾臓、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、脊髓、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）

Ⅱ-4 数値処理と統計方法

Ⅱ-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

体重については g を単位とし、整数値の 1 の位まで計測し表示した。

摂餌量と摂水量については g を単位とし、計測期間を通しての摂取量を小数点以下第 1 位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、1 日当りの平均摂取量を算出し、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。

アクリル酸=2-ヒドロキシエチルの体重 kg 当たりの 1 日摂取量は、摂水量にアクリル酸=2-ヒドロキシエチルの設定濃度を乗じ、各群の平均体重で除した値を g/kg body

weight/day を単位として小数点以下第 4 位を四捨五入して小数点以下第 3 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、血液生化学的検査については APPENDIX N 2 に示した単位と精度により表示した。

なお、各数値データにおいての平均値及び標準偏差は上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

II-4-2 母数の取り扱い

体重、摂水量及び摂餌量は、全動物を対象に計測し、欠測となったデータについては母数より除いた。

血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査は、全動物を対象とし、欠測となったデータについては母数より除いた。

臓器重量は、全動物を対象に計測したデータを母数とした。

病理組織学的検査データは、全動物を対象に検査したデータを母数とした。

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として、最初に 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。

病理組織学的検査については、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。検定は、所見のみられなかった動物をグレード 0 として分類し、各グレード毎の動物の度数分布により行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間で 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。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE 1, 2 に示した。

雌雄とも全ての群に、死亡は認められなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に示した。

雄では、投与 2～3 週に鼻及び外陰部周囲の汚染と立毛が 4000 ppm 群の 1 匹に観察された。

雌では、投与 2 週に口及び鼻周囲の汚染が 4000 ppm 群の 2 匹に、投与 2 週から 6 週にかけて立毛が 4000 ppm 群の 4～5 匹に観察された。また、投与 5 週に糞の少量排泄が 500 ppm 群の 1 匹に観察された。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 1, 2、APPENDIX B 1, 2 に示した。

<雄>

1000 ppm 以上の群で投与濃度に対応した体重増加の抑制がみられた。投与 13 週の最終計測日の各投与群の体重は、対照群を 100%とすると、250 ppm 群：97%、500 ppm 群：97%、1000 ppm 群：96%、2000 ppm 群：88%、4000 ppm 群：75%であった。

<雌>

全投与群で投与濃度にはほぼ対応した体重増加の抑制がみられたが、2000 ppm 以下の群では、体重増加の抑制は僅少であった。投与 13 週の最終計測日の各投与群の体重は、対照群を 100%とすると、250 ppm 群：94%、500 ppm 群：95%、1000 ppm 群：92%、2000 ppm 群：91%、4000 ppm 群：80%であった。

なお、4000 ppm 群の投与 1 週の体重は、雌雄ともに投与開始時よりも低下していた。

Ⅲ-4 摂水量

摂水量を TABLE 3, 4、FIGURE 3, 4、APPENDIX C 1, 2 に示した。

雌雄ともに、全投与群で投与濃度にはほぼ対応した摂水量の低下が認められた。また、4000 ppm 群の投与 1 週の摂水量は、雌雄ともに非常に低い値（対照群に比べて、雄 35%、雌 40%）を示した。

全投与期間における各投与群の摂水量は、対照群を 100%とすると、雄では、250 ppm 群：85～91%、500 ppm 群：81～87%、1000 ppm 群：73～80%、2000 ppm 群：61～69%、4000 ppm 群：35～54%、雌では、250 ppm 群：67～104%、500 ppm 群：67～97%、1000 ppm 群：53～74%、2000 ppm 群：50～65%、4000 ppm 群：36～49%の範囲にあった。

Ⅲ－5 摂餌量

摂餌量を TABLE 5, 6、FIGURE 5, 6、APPENDIX D 1, 2 に示した。

雌雄ともに全投与群で投与濃度にほぼ対応した摂餌量の低下が認められた。

また、4000 ppm 群の投与 1 週の摂餌量は、雌雄ともに非常に低い値（対照群に比べて、雄 54%、雌 55%）を示した。

Ⅲ－6 被験物質摂取量

体重、摂水量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を APPENDIX E 1, 2 に示した。

全投与期間における 1 日当りの被験物質摂取量 (g/kg body weight/day) の平均値（最小～最大値）は、雄では、250 ppm 群：0.017(0.013～0.024)、500 ppm 群：0.031(0.024～0.047)、1000 ppm 群：0.058(0.045～0.089)、2000 ppm 群：0.107(0.084～0.162)、4000 ppm 群：0.190(0.158～0.256)、雌では、250 ppm 群：0.024(0.019～0.030)、500 ppm 群：0.049(0.041～0.055)、1000 ppm 群：0.073(0.059～0.095)、2000 ppm 群：0.136(0.112～0.174)、4000 ppm 群：0.228(0.193～0.302)の範囲にあった。全投与期間における各群の平均被験物質摂取量の比率は、雄では 1.8 から 1.9 の範囲、雌では 1.5 から 2.0 の範囲にあり、設定用量比（公比 2）よりも低値を示した。

Ⅲ－7 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 7, 8、APPENDIX F 1, 2 に示した。

<雄>

2000 ppm 以上の群で赤血球数の減少、及び MCV と MCH の増加、2000 ppm 群でヘモグロビン濃度の減少、4000 ppm 群でプロトロンビン時間の短縮及び網赤血球比の増加がみられた。

<雌>

2000 ppm 以上の群で MCV の増加、2000 ppm 群で MCH の増加、4000 ppm 群で網赤血球比の増加がみられた。

Ⅲ－8 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 9, 10、APPENDIX G 1, 2 に示した。

<雄>

1000 ppm 以上の群で総コレステロールとリン脂質の増加、2000 ppm 以上の群で A/G 比、尿素窒素及びカリウムの増加、並びにグルコースの減少、2000 ppm 群でナトリウムの減少、4000 ppm 群で総ビリルビンの増加及び総蛋白の減少がみられた。

<雌>

1000 ppm 以上の群で A/G 比とトリグリセライドの増加、並びにナトリウムの減少、2000 ppm 以上の群で総コレステロールとリン脂質の増加、4000 ppm 群で γ -GTP と尿素窒素の増加、並びに総蛋白、アルブミン及びクレアチニンの減少がみられた。

Ⅲ－9 尿検査

尿検査の結果を TABLE 11, 12、APPENDIX H 1, 2 に示した。

雄では、4000 ppm 群で尿蛋白の陽性度の増加が認められた。

雌では、2000 ppm 以上の群で尿蛋白の陽性度の増加が認められた。

Ⅲ－10 病理学的検査

Ⅲ－10－1 剖検

解剖時に観察した剖検結果を APPENDIX I 1, 2 に示した。

雌雄とも、投与群に特徴的な所見あるいは対照群に比較して顕著に高い発生率を示した所見は認められなかった。

Ⅲ－10－2 臓器重量

臓器重量の結果を TABLE 13, 14、APPENDIX J 1, 2 (実重量)、APPENDIX K 1, 2 (体重比) に示した。

<雄>

腎臓の体重比重量が 500 ppm 以上の群で投与濃度に対応して増加した。また、肝臓の体重比重量が 1000 ppm 以上の群で投与濃度に対応して増加、肝実重量も 4000 ppm 群で増加した。

<雌>

腎臓の体重比重量が、全投与群で投与濃度に対応して増加、さらに、実重量も 1000 ppm

以上の群で増加した。また、肝臓の体重比重量が、500 ppm 以上の群で投与濃度に対応して増加した。

Ⅲ－10－3 病理組織学的検査

病理組織学的所見を TABLE 15、APPENDIX L 1, 2 に示した。

<雄>

唾液腺の萎縮が 4000 ppm 群で増加した。

腎臓の近位尿細管腔における硝子円柱の出現が 1000 ppm 群と 4000 ppm 群の各 1 匹に認められた。また、前胃の扁平上皮過形成が 4000 ppm 群の 1 匹に認められた。

<雌>

唾液腺の萎縮が 4000 ppm 群で増加した。

腎臓の近位尿細管細胞内における好酸滴の出現が 500 ppm 以上の群に認められた。

その他にみられた病変は、投与濃度と対応しておらず、また、通常にみられる病変のため、被験物質投与とは無関係な病変であると判断した。

IV まとめ及び考察

アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルは、熱硬化性塗料、接着剤、繊維処理剤、潤滑油添加剤、コポリマーの改質剤などに用いられるが、この化学物質への職業性暴露は、それが生産されている場所及び使用されている場所においてみられ、主に、皮膚への接触や吸入により労働者の体内に侵入する。本試験では、アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルが水に溶解することから、投与経路を飲水投与とし、雌雄ラットの混水経口投与によるがん原性試験の予備試験として 13 週間試験を実施した。

IV-1 まとめ

アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルの F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) のがん原性試験における投与濃度を検索するための予備試験として 13 週間試験を実施した。投与はアクリル酸＝2－ヒドロキシエチルを各投与濃度に溶解した飲水の自由摂取で行った。1 群当たりの動物数は雌雄各 10 匹とし、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、雌雄とも 250、500、1000、2000、4000 ppm (公比 2) とした。

試験の結果、雌雄とも全ての群に死亡はなかったが、全投与群の摂水量及び摂餌量が投与濃度に対応して低下し、雄では 1000 ppm 以上の群、雌では全投与群で体重増加が抑制された。特に、4000 ppm 群では、雌雄ともに投与 1 週の摂水量と摂餌量は非常に少なく、投与 1 週の体重は投与開始時より減少した。4000 ppm 群の体重はその後増加傾向を示したが、最終計測日の体重は、対照群を 100%とすると、雄で 75%、雌で 80%に抑制された。4000 ppm 群の動物の状態は、主に投与初期に一時的に口、鼻及び外陰部周囲の汚染や立毛が雌雄の数匹にみられたが、これらの所見は徐々にみられなくなった。投与最終週に行った尿検査では、雄の 4000 ppm 群、雌の 2000 ppm 以上の群で尿蛋白の陽性度が増加した。血液学的検査では、雄の 2000 ppm 以上の群で赤血球数とヘモグロビン濃度の減少、雌雄の 2000 ppm 以上の群で MCV の増加、雌雄の 4000 ppm 群で網赤血球比の増加が認められた。血液生化学的所見は、アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルの肝機能及び腎機能への影響を示唆した。肝機能への影響を示唆するパラメータとして、総コレステロールとリン脂質が雄の 1000 ppm 以上の群及び雌の 2000 ppm 以上の群で増加、トリグリセライドが雌の 1000 ppm 以上の群で増加、総ビリルビンが雄の 4000 ppm 群で増加、 γ -GTP が雌の 4000 ppm 群で増加した。腎機能への影響を示唆するパラメータとして、尿素窒素が雄の 2000 ppm 以上の群及び雌の 4000 ppm 群で増加、総蛋白が雌雄の 4000 ppm 群で減少、A/G 比が雄の 2000 ppm 以上の群及び雌の 1000 ppm 以上の群で増加、アルブミン及びクレアチニンが雌の 4000 ppm 群で減少した。アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルによる肝臓及び腎臓への影響は臓器重量にも現われ、肝臓の体重比重量が雄の 1000 ppm 以上の群及

び雌の 500 ppm 以上の群で増加、腎臓の体重比重量は雄の 500 ppm 以上の群及び雌の全投与群で増加した。雌の 1000 ppm 以上の群の腎臓重量は、体重増加の抑制があるにも関わらず実重量でも増加していた。腎臓への影響は、病理組織学的に、雄では近位尿細管腔の硝子円柱の出現が 1000 ppm 群と 4000 ppm 群の各 1 匹にみられたに過ぎなかったが、雌では近位尿細管上皮細胞内の好酸滴の出現が 500 ppm 以上の群にみられた。その他、病理組織学的検査で雌雄の 4000 ppm 群に唾液腺の萎縮を認め、さらに、雄 4000 ppm 群の 1 匹に前胃の扁平上皮過形成を認めた。

IV-2 考察

(1) 用量－反応関係

アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルはヒトの皮膚に付着した場合はやけどの症状をおこすほど刺激性が強い（文献 1）。被験物質混合飲水の自由摂取による投与方法を用いた 2 週間試験（投与濃度：512 ppm、1280 ppm、3200 ppm、8000 ppm、20000 ppm）では、摂水量は投与濃度に対応して低下し、高濃度では動物が死亡した（文献 4）。即ち、雌雄ともに 3200 ppm 以上では被験物質混合飲水の忌避があり、忌避によると思われる動物の死亡が 8000 ppm 以上でみられた。よって、本試験の 13 週間投与では、被験物質混合飲水の忌避による死亡がみられない投与濃度を最高投与用量とすることを念頭に、4000 ppm を選択している。アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルの 4000 ppm の被験物質混合飲水を 13 週間にわたり自由摂取させた結果、投与初期には飲水忌避と考えられる顕著な摂水量の減少に起因して摂餌量及び体重が減少したが、その後体重は増加に転じ、また、死亡も認められなかった。2000 ppm 以下の投与群でも雌雄ともに体重増加の抑制と摂水量の減少がみられたが、各種検査において大きな変化は雌雄ともにみられなかった。

アクリル酸＝2－ヒドロキシエチルの飲水投与は肝臓と腎臓に主に機能的影響を与えた。肝臓では雌雄ともに体重比重量の増加（雄：1000 ppm 以上、雌：500 ppm 以上）、さらに雄では総コレステロールとリン脂質（1000 ppm 以上）及び総ビリルビン（4000 ppm）の増加、雌ではトリグリセライド（1000 ppm 以上）、総コレステロールとリン脂質（2000 ppm 以上）及びγ-GTP（4000 ppm）の増加があった。ただし、これらの変化は組織学的な異常所見を伴わなかった。本試験の投与濃度を決定する試験として実施した 2 週間試験では、3200 ppm で雄の肝臓に肝細胞の壊死を伴わない細胞分裂像の増加がみられた（文献 4）が、本試験の 4000 ppm の 13 週間投与では肝細胞の壊死や細胞分裂像の増加は確認できなかった。

腎臓への影響として、体重比重量が雄の 500 ppm 以上、雌の 250 ppm より増加し、さらに雌の 1000 ppm 以上では体重増加の抑制があるにも関わらず実重量も増加していた。組織学的にも主に雌に明らかな病変がみられ、500 ppm 以上で近位尿細管上皮に好酸滴が出現した。雄にはこの病変はみられなかったが、1000 ppm と 4000 ppm で近位尿細管腔に硝

子円柱がみられた。近位尿細管上皮の好酸滴は、主に糸球体からの蛋白の漏出が増加した場合の蛋白様物質として考えられ、また、硝子円柱も糸球体の透過亢進や尿細管での再吸収障害の結果みられる蛋白様物質である（文献 6）。4000 ppm では雌雄ともに血漿中の総蛋白が減少し、かつ尿中の蛋白は増加した。

血液への影響として、雌雄の高用量群で、貧血が示唆されたが、対応する病理組織学的変化は骨髓や脾臓に認められなかった。

その他に、雌雄の 4000 ppm で唾液腺の萎縮が観察された。唾液腺の萎縮は、利尿薬であるフロセミド、レセルビン、放射線照射によって惹起される変化であることが報告されている（文献 7, 8）。ただし、本試験でみられた唾液腺の萎縮の病理発生原因については、被験物質の直接的作用によるものかどうかは不明である。また、アクリル酸=2-ヒドロキシエチルの胃への影響を示唆する変化として、雄 4000 ppm 群の 1 匹に前胃に扁平上皮過形成が認められた。

(2) 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)

以上の結果から、雄では 500 ppm 以上の群、雌では最小用量群である 250 ppm 群より腎臓への影響がみられたため、アクリル酸=2-ヒドロキシエチルの本試験条件下における最小毒性量は腎臓への影響をエンドポイントとすると 250 ppm（雌：0.019～0.030 g/kg body weight/day）であると考えられた。

IV-3 がん原性試験の投与濃度

がん原性試験の投与濃度は、今回の 13 週間投与試験の結果を考慮し、以下のように設定した。

アクリル酸=2-ヒドロキシエチルの飲水投与により、主に肝臓及び腎臓に影響がみられた。それらの影響は、本試験における最高用量である 4000 ppm の 2 年間にわたる投与によっても動物を死亡させるほどのものではないと考えられた。ただし、4000 ppm では飲水忌避が原因と思われる体重増加の抑制がやや大きかったことから 2 年間にわたる投与には耐えられないと判断し、最高用量を 2000 ppm に設定した。また、腎臓の組織変化が雌の 500 ppm 以上でみられたことから、最小用量は 500 ppm 以下が適当であると考えた。

従って、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも最高用量を 2000 ppm とし、以下 800 ppm、320 ppm（公比 2.5）に設定した。

V 文献

1. 化学工業日報社 (2003)
14303 の化学商品
pp.357-358, 化学工業日報社, 東京
2. McLafferty, F. W. (1994)
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition.
John Wiley and Sons, Inc. New York
3. 和光純薬工業 (株) からの提供資料
4. 日本バイオアッセイ研究センター (2003)
アクリル酸=2-ヒドロキシエチルのラットを用いた経口投与による 2 週間試験
(混水試験) 報告書
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
5. 阿部正信 (1986)
長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の
確立
薬理と治療, 14, 7285-7302
6. 渡辺満利、西川秋佳 (2000)
腎臓
In: 毒性病理組織学 (Ed. 伊東信行)
pp.247-266, 日本毒性病理学会, 名古屋
7. Neuenschwander, S. B. and Elwell, M. R. (1990)
Salivary glands.
In: Pathology of the Fischer Rat, Reference and Atlas (Eds: Boorman, G. A., Eustis,
S. L., Elwell, M. R., Montgomery, C. A. Jr. and MacKenzie, W. F.)
pp. 31-42, Academic Press, Inc., San Diego
8. 伊東信行 (1994)
標的器官の毒性病理 (1) 消化器系、D. 口腔、舌、咽頭、唾液腺、食道
In: 最新毒性病理学 (Ed. 伊東信行)
pp.110-119, 中山書店, 東京