

クロトンアルデヒドのラットを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号 0318

CAS No. 123-73-9

2001年3月23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を用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号 0318

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	2
I-1-2 構造式、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、投与方法及び投与期間	4
II-1-2 投与濃度及び設定理由	4
II-1-3 被験物質の発生方法と濃度調整	4
II-1-4 被験物質の濃度測定	5
II-2 動物管理	
II-2-1 各群の使用動物数	5
II-2-2 群分け及び個体識別方法	5
II-2-3 飼育条件	5
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	6
II-3-2 体重測定	6
II-3-3 摂餌量測定	6

II-3-4	血液学的検査	6
II-3-5	血液生化学的検査	7
II-3-6	尿検査	7
II-3-7	病理学的検査	8
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	8
II-4-2	母数の取り扱い	9
II-4-3	統計方法	9
II-5	試資料の保管	10
III	試験成績	
III-1	動物の状態観察	
III-1-1	生死状況	11
III-1-2	一般状態	11
III-1-3	体重	11
III-1-4	摂餌量	12
III-2	血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	
III-2-1	血液学的検査	12
III-2-2	血液生化学的検査	12
III-2-3	尿検査	12
III-3	病理学的検査	
III-3-1	剖検	12
III-3-2	臓器重量	13
III-3-3	病理組織学的検査	13
III-3-4	死因	14
IV	考察及びまとめ	15
V	結論	17
VI	文献	18

要約

クロトンアルデヒドのがん原性を検索する目的でラットを用いた吸入による2年間(104週間)の試験を実施した。

試験には F344/DuCrj(Fischer)ラットを用い、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で雌雄各群 50 匹 (合計 400 匹) を使用した。投与はクロトンアルデヒドを 1 日 6 時間、1 週 5 日間、104 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に 3ppm、6ppm、12ppm とした。また、観察、検査項目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、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

投与の結果、生存率及び一般状態には、雌雄ともに影響はみられなかったが、12ppm 群では雌雄に体重増加の抑制と、摂餌量の低値がみられた。病理組織学的検査では、3ppm 群まで鼻腔への傷害(呼吸上皮の炎症、過形成、扁平上皮化生及び扁平上皮過形成、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生、異物性鼻炎等)がみられた。また、雌雄ともに自然発生が稀な鼻腔腫瘍の発生(腺腫:雌雄、横紋筋肉腫:雄)が統計学的には有意ではないが認められた。

以上のように、クロトンアルデヒドの投与により雌雄ともに少数例ではあるが自然発生が稀な鼻腔腫瘍の発生が認められた。この結果はクロトンアルデヒドの F344/DuCrj(Fischer)ラットの雌雄に対するがん原性を示す証拠と考えられた。

I 試験材料

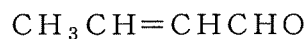
I-1 被験物質の性状等 (文献 1)

I-1-1 名称

名 称 : クロトンアルデヒド (Crotonaldehyde)

CAS No. : 123-73-9

I-1-2 構造式、分子量



分子量 : 70.09

I-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 無色透明の液体で特有の刺激臭あり

沸 点 : 102.2℃

融 点 : -69℃

比 重 : 0.853(20℃)

溶 解 性 : 水には溶解、各種有機溶剤に可溶

保存条件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保管

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : SKJ4743 (1996 年 10 月 24 日～1997 年 4 月 1 日)

LEL4703 (1997 年 4 月 2 日～1997 年 8 月 25 日)

LEH5371 (1997 年 8 月 26 日～1998 年 1 月 6 日)

WTK5303 (1998 年 1 月 7 日～1998 年 7 月 21 日)

WTE4391 (1998 年 7 月 22 日～1998 年 10 月 21 日)

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

グ レ ー ド : 和光特級

純 度 : 99.9%以上

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、ロットごとにマススペクトル、赤外吸収スペクトルの測定を実施した。測定した被験物質のマススペクトル及び赤外吸収スペクトルはそれぞれの文献値（文献 2, 3）と比較し、被験物質の特性・同一性を確認した。なお、それらの結果については、APPENDIX O 1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、ロットごとに使用開始前及び使用終了後にガスクロマトグラムを測定し、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は、APPENDIX O 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)（神奈川県厚木市下古沢 795 番地）の F344/DuCrj(Fischer)ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を生後 4 週齢で導入し（導入時体重範囲、雄:46～61g、雌:47～63g）、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見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 200 匹（群構成時体重範囲、雄:103～124g、雌:88～101g）を選別し、試験に供した。

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

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。すなわち設定濃度に調整したクロトンアルデヒドを吸入チャンバー内で試験動物に全身暴露することにより投与した。投与期間は 104 週間とし、1 日 6 時間、1 週 5 日間（祝祭日を除く）、暴露を行った。なお、対照群の動物には新鮮空気のみを暴露した。

投与期間中の総暴露回数は 104 週間で 488 回であった。

II-1-2 投与濃度及び設定理由

13 週間試験（試験番号：0292, 設定濃度：24ppm, 12ppm, 6ppm, 3ppm, 1.5ppm）の結果（文献 4）、全群雌雄ともに死亡はなかったが、1) 24ppm 群では体重増加抑制が強く、雌雄ともに鼻腔病変が顕著であり、2 年間の投与に耐え得る濃度ではない、2) 12ppm 群では軽度の体重増加抑制と軽度の鼻腔病変があった、3) 6ppm 以下の群では投与の影響がみられなかった。以上より、がん原性試験の設定濃度は、雌雄とも最高濃度を 12ppm とし、以下 6ppm、3ppm（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。まず、発生容器内のクロトンアルデヒドを循環式恒温槽で加熱（25℃）しながら、窒素ガスのバブリングにより蒸発させた。次に、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。最終的には、吸入チャンバー内のクロトンアルデヒドの濃度をガスクロマトグラフにより監視しながら、吸入チャンバーへの供給流量を調節することにより、チャンバー内濃度を設定濃度に調整した。

II-1-4 被験物質の濃度測定

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。測定結果を APPENDIX P 1 に示した。

各投与群における被験物質濃度の測定結果（平均値±標準偏差）は、3ppm 群：3.0±0.0ppm、6ppm 群：6.0±0.0ppm、12ppm 群：12.0±0.1ppm であり、各投与群ともに設定濃度に近似した値であった。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄 50 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	50 匹（1001-1050）	50 匹（2001-2050）
1	3ppm 群	50 匹（1101-1150）	50 匹（2101-2150）
2	6ppm 群	50 匹（1201-1250）	50 匹（2201-2250）
3	12ppm 群	50 匹（1301-1350）	50 匹（2301-2350）

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、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）。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては動物の尾に色素塗布を行い、またケージにも個体識別番号を付けた。投与期間において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、動物はバリア区域内の独立した室に収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他の試験及び異種動物と区別した。

II-2-3 飼育条件

動物は検疫室で 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、動物を吸入チャンバー内で飼育した。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、計測結果を APPENDIX P 2 にそれぞれ示した。吸入チャンバー室の環境条件は、温

度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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、吸入チャンバー内の環境条件は、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、換気回数 12 ± 1 回/時に設定した。その結果、吸入チャンバー内の環境はすべて設定条件の範囲内であった。

また、検疫期間中は 1 ケージ当たり 5 匹の群飼（ステンレス製群飼網ケージ、 $340\text{W} \times 294\text{D} \times 176\text{H mm}$ ）、馴化期間中（ステンレス製六連網ケージ、 $125\text{W} \times 216\text{D} \times 176\text{H mm}$ ）と投与期間中（ステンレス製五連網ケージ $150\text{W} \times 216\text{D} \times 176\text{H mm}$ ）は単飼とした。

飼料は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（ $3\text{Mrad}=30\text{KGy}$ - γ 線照射滅菌飼料、LOT No. 960705, 960808, 960910, 961009, 961112, 961207, 970110, 970210, 970306, 970410, 970513, 970604, 970708, 970808, 970906, 971008, 971112, 971208, 980110, 980207, 980307, 980409, 980508, 980608, 980709）を全飼育期間を通して、固型飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は全飼育期間を通して市水（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装置により自由摂取させた。

なお、飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)の自社分析データを、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 番 1 号）の分析データを使用ロットごとに入手し、また飲料水については(財)食品薬品安全センター（神奈川県秦野市落合 729-5）に 3 ヶ月毎に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と比較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

投与期間中は毎日 1 回、動物の生死及び瀕死動物を確認した。さらに、一般状態の観察を全動物について週 1 回行った。

II-3-2 体重測定

投与開始後 14 週間までは週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）、測定時に生存していた動物の体重を測定した。また、動物の死亡発見、切迫屠殺及び定期解剖の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

投与開始後 14 週間は週に 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）給餌量と残餌

量を測定し、その値から摂餌量を算出した。

Ⅱ-3-4 血液学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりEDTA-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（APPENDIX Q 1）。

検査項目は、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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、白血球数及び白血球分類とした。

なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食（18時間以上）させた。

Ⅱ-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、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血液生化学的検査を行った（APPENDIX Q 1）。

検査項目は、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、カルシウム及び無機リンとした。

なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食（18時間以上）させた。

Ⅱ-3-6 尿検査

投与103週まで生存した動物について新鮮尿を採取し、尿試験紙（バイエル・三共（株）製）を用いて検査した（APPENDIX Q 1）。

検査項目は、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血及びウロビリノーゲンとした。

Ⅱ-3-7 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼観察により剖検した。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について下記臓器の重量（実重量）を測定した。また、搬出時の体重値に対する百分率（体重比）も算出した。

測定臓器：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

全動物の下記に示した器官、組織及び肉眼的に変化がみられた器官、組織を摘出後、10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定し、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。

なお、鼻腔については切歯の後端（第 1 レベル）、切歯乳頭（第 2 レベル）、第一臼歯の前端（第 3 レベル）の 3 ヶ所で切り出し（横断）、検査した（文献 6）。また、左肺には、気管支より 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液を注入固定し検査した。

検査器官、組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄、リンパ節、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸、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、膈、乳腺、脳、脊髄、末梢神経、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨

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

吸入チャンバー内の被験物質濃度については ppm を単位とし、小数点以下 4 位までを測定し、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。

体重については g を単位とし、小数点以下第 1 位まで計測し、小数点以下第 1 位を四捨五入して整数値で表示した。

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 Q 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より除いた。

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、欠測となったデータについては母数より除いた。

尿検査は、投与 103 週まで生存した動物を対象に行い、検査ができた動物数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、各群の有効動物数（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）を母数とした。ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器をもつ動物数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計方法

病理組織学的検査及び尿検査以外の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。

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。

なお、病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、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。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto 検定（文献 7）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法（コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法＋有病率法（コンテックス 0～4 の総計で検定）を行った。

χ^2 検定と Fisher 検定は対照群と各投与群間の検定である。

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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖例にみつかった腫瘍

1：死亡/瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思うが、確かでない腫瘍

3：多分4だと思うが、確かでない腫瘍

4：死亡/瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

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、被験物質その他本試験に係る資料は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10年間とする。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 動物の状態観察

Ⅲ-1-1 生死状況

投与期間中における群別の生存状況を TABLE 2, 3 及び FIGURE 2, 3 に示した。

雄では、最終計測週（104 週）における生存数（生存率）は、対照群：39/50 例(78.0%)、3ppm 群：39/50 例(78.0%)、6ppm 群：45/50 例(90.0%)、12ppm 群：38/50 例(76.0%)であり、投与群と対照群との間に顕著な差はみられなかった。

雌では、最終計測週（104 週）における生存数（生存率）は、対照群：39/50 例(78.0%)、3ppm 群：38/50 例(76.0%)、6ppm 群：40/50 例(80.0%)、12ppm 群：40/50 例(80.0%)であり、投与群と対照群との間に顕著な差はみられなかった。

Ⅲ-1-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1, 2 に、外部腫瘍と内部腫瘍の発生動物数（一般状態の観察時に腫瘍を視診または触診できた数）を TABLE 4, 5 に示した。

投与期間を通しての外部腫瘍の発生動物数は、雄では対照群：12/50 例、3ppm 群：9/50 例、6ppm 群：8/50 例、12ppm 群：10/50 例、雌では対照群：7/50 例、3ppm 群：17/50 例、6ppm 群：9/50 例、12ppm 群：7/50 例であり、雌雄ともに投与群と対照群の間で顕著な差はみられなかった。

投与期間を通しての内部腫瘍の発生動物数は、雄では対照群：1/50 例、3ppm 群：3/50 例、6ppm 群：2/50 例、12ppm 群：4/50 例、雌では対照群：3/50 例、3ppm 群：5/50 例、6ppm 群：4/50 例、12ppm 群：7/50 例であり、雌雄ともに投与群と対照群の間で顕著な差はみられなかった。

その他の一般状態には、雌雄ともに投与群と対照群の間で特記すべき差を認めなかった。

Ⅲ-1-3 体重

投与期間中における群別の体重推移を TABLE 2, 3, FIGURE 4, 5 及び APPENDIX B 1, 2 に示した。

雄では 12ppm 群で体重増加の抑制がみられ、全期間を通して有意な低値を示した。

雌では 12ppm 群で体重増加の抑制がみられ、投与 2 週より継続して有意な低値を示した。また、6ppm 群で投与 12～18 週で継続して有意な低値を示したが、その後は差はみられなかった。

なお、最終計測時の体重は、対照群に対して雄は 3ppm 群 : 99%、6ppm 群 : 96%、12ppm 群 : 91%、雌は 3ppm 群 : 100%、6ppm 群 : 99%、12ppm 群 : 91%であった。

Ⅲ-1-4 摂餌量

投与期間中における群別の摂餌量（1日1匹当たりの摂餌量）を TABLE 6, 7、FIGURE 6, 7 及び APPENDIX C 1, 2 に示した。

雌雄ともに 12ppm 群で継続的または断続的な摂餌量の有意な低値を示した。また、6ppm 群と 3ppm 群ではまれに有意な高値または低値を示した。

Ⅲ-2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

Ⅲ-2-1 血液学的検査

定期解剖時に行った血液学的検査の結果を APPENDIX D 1, 2 に示した。

雌雄ともに、どの検査項目においても投与群と対照群との間に特記すべき差を認めなかった。

Ⅲ-2-2 血液生化学的検査

定期解剖時に行った血液生化学的検査の結果を APPENDIX E 1, 2 に示した。

雌雄ともに、12ppm 群でトリグリセライドの減少が認められた。他の検査項目は投与群と対照群との間に特記すべき差を認めなかった。

Ⅲ-2-3 尿検査

投与 103 週に行った尿検査の結果を APPENDIX F 1, 2 に示した。

雄では、どの検査項目においても投与群と対照群との間に特記すべき差を認めなかった。

雌では、pH の上昇が 6ppm 以上の群で、蛋白の陽性度の減少が 12ppm 群に認められた。

Ⅲ-3 病理学的検査

Ⅲ-3-1 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX G 1~6 に示した。

雌雄ともに、投与群と対照群との間に特記すべき変化はなかった。

Ⅲ-3-2 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 H 1, 2, I 1, 2 に示した。

雄の 12ppm 群で腎臓と肝臓の実重量の低値、肺と脳の体重比の高値が認められた。

雌の 12ppm 群で腎臓、肝臓及び脾臓の実重量の低値、肺、脳及び心臓の体重比の高値、6ppm 群で脳の実重量の高値が認められた。

Ⅲ-3-3 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果を APPENDIX J 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は APPENDIX K 1, 2 に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX L 1, 2 に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX M 1, 2 に統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定)、APPENDIX N 1~6 に転移性病変について示した。

1. 腫瘍性病変 (TABLE 8, 9, PHOTOGRAPH 1~4)

雄では統計学的に有意な増加または減少した腫瘍はなかった。しかし、鼻腔に腺腫が 3ppm 群の 1/50 例、6ppm 群の 1/50 例及び 12ppm 群の 2/50 例、また横紋筋肉腫が 12ppm 群の 1/50 例にみられた。

雌でも統計学的に有意に増加した腫瘍はなかった。しかし、鼻腔の腺腫が 12ppm 群の 1/50 例にみられた。なお、6ppm 群で甲状腺の C-細胞腺腫が有意 (Fisher 検定) な減少を示したが投与濃度に対応した変化ではなかった。

2. 非腫瘍性病変

<鼻腔> (TABLE 8, 9, PHOTOGRAPH 5~10)

雄では、3ppm 以上の群で呼吸上皮の炎症と扁平上皮化生ならびに嗅上皮の呼吸上皮化生が増加、6ppm 以上の群で異物性炎症と呼吸上皮の過形成の増加、さらに 12ppm 群で扁平上皮の過形成と嗅上皮の萎縮がみられた。また、統計学的に有意差は示されなかったが、嗅上皮の壊死が 6ppm 以上の群で少数例にみられた。

雌では、3ppm 以上の群で呼吸上皮の扁平上皮化生が増加、6ppm 以上の群で呼吸上皮の炎症と過形成が増加、さらに 12ppm 群で扁平上皮の過形成、異物性炎症、嗅上皮の萎縮と呼吸上皮化生が増加した。また、統計学的に有意差は示されなかったが、嗅上皮の壊死が 6ppm 以上の群で少数例にみられた。その他、嗅上皮のエオジン好性変化が 12ppm 群で減少した。

<副腎>

雄の 12ppm 群で髄質の過形成が減少した。

<脾臓>

雌の 3ppm 群でヘモジデリン沈着が減少したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

<甲状腺>

雌の 3ppm 以上の群で C-細胞の過形成が減少した。

Ⅲ-3-4. 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 10 に示した。

雌雄ともに投与により増加したと判断される死因はなかった。

IV 考察及びまとめ

(1) 生死状況、一般状態、体重、摂餌量

生存率と一般状態は、雌雄ともに投与群と対照群の間で差はみられなかった。

体重は、雌雄ともに 12ppm 群で増加抑制（雌雄ともに対照群に比べて 91%の抑制）を示した。

摂餌量は、雄では 12ppm 群で、雌では 6ppm 以上の群で継続的または断続的にやや低値で推移した。

(2) 剖検、臓器重量

剖検観察では、雌雄ともに投与群と対照群との間に変化はなかった。

臓器重量は雄では 12ppm 群で腎臓と肝臓の実重量の低値、肺と脳の体重比の高値が認められた。雌では 12ppm 群で腎臓、肝臓及び脾臓の実重量の低値、肺、脳及び心臓の体重比の高値が認められ、6ppm 群で脳の実重量の低値が認められた。これらの変化は、体重増加の抑制に伴う変化と考えられた。

(3) 血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査

血液学的検査では、雌雄ともに全検査項目において投与群と対照群との間に特記すべき差を認めなかった。

血液生化学的検査では、雌雄ともに、12ppm 群でトリグリセライドの減少が認められたが、その他の項目には投与群と対照群との間に特記すべき差を認めなかった。トリグリセライドの減少は体重増加の抑制と摂餌量の低下による影響と考えられた。

尿検査では、雌で pH の上昇が 6ppm 以上の群で、蛋白の陽性度の減少が 12ppm 群に認められたが、雄では、全検査項目において投与群と対照群との間に特記すべき差を認めなかった。雌でみられた変化は体重増加の抑制と摂餌量の低下による影響と考えられた。

(4) 腫瘍性病変

雄では鼻腔の腺腫が対照群を除く全投与群で少数例（0ppm 群：0/50 例、3ppm 群：1/50 例、6ppm 群：1/50 例、12ppm 群：2/50 例）、さらに横紋筋肉腫が 12ppm 群で 1/50 例（途中死亡動物）にみられた。また雌では腺腫が 12ppm 群で 1/50 例にみられた。これらの鼻腔腫瘍の発生は統計学的には有意なものではなかったが、過去に当センターで実施した F344 ラットを用いた発癌性試験（文献 8）の全対照群における発生数は腺腫が雄で 1/1199 例、雌では発生例なし（0/1097）、また横紋筋肉腫は雌雄ともに発生例がないことから、投与群でみられた鼻腔の腺腫及び横紋筋肉腫の発生は投与の影響であると判断した。

なお、雌では Fisher 検定において 6ppm 群で甲状腺の C-細胞腺腫が有意に減少したが、投与濃度に対応していなかったため、投与の影響ではないと判断した。

(5) 非腫瘍性病変

雌雄とも鼻腔に変化がみられ、その病変は呼吸上皮と嗅上皮の広範囲にわたり発生していた。

呼吸上皮では、炎症が雄の 3ppm 以上の群ならびに雌の 6ppm 以上の群で増加、上皮の過形成が雌雄の 6ppm 以上の群で増加、上皮の扁平上皮化生が雌雄の 3ppm 以上の群で増加した。また、扁平上皮の過形成が雌雄ともに 12ppm 群で増加し、特に雌の 1 例では異形成を伴いその程度も強いものであった。

嗅上皮では、上皮の萎縮が雌雄の 12ppm 群で増加、上皮の呼吸上皮化生が雄の 3ppm 以上の群ならびに雌の 12ppm 群で増加した。また、統計学的に有意差は示されなかったが、上皮の壊死が雌雄の 6ppm 以上の群で少数例にみられた。さらに、上皮のエオジン好性変化が雌の 12ppm 群で減少したが、その意義は不明であった。

被毛の鼻腔内侵入により発生すると考えられている異物性炎症が、雄の 6ppm 以上の群ならびに雌の 12ppm 群で増加した。異物性炎症の発生は、過去に当センターで実施した臭化メチルのラットを用いた吸入によるがん原性試験（文献 9）において雄の投与群で増加した。臭化メチルの投与でも鼻腔の嗅上皮を障害していたことから、吸入投与による鼻腔粘膜への障害が原因となって増加した変化であることが推察された。

その他の臓器でみられた変化と投与との関連性は不明であった。

(6) 公表論文（発癌性試験）との比較

クロトンアルデヒドの吸入投与による発癌性試験の報告はまだなく、ラットへの混水投与により実施した Chung らの実験が唯一報告されている（文献 10, 11）。Chung らの実験ではクロトンアルデヒドを 42mg/L 及び 421mg/L の濃度で飲水に混入し F344 ラットに 110 週間投与した結果、42mg/L の濃度で肝臓腫瘍が増加したが、421mg/L の濃度では増加しなかった。さらに、前腫瘍性病変であると考えられている enzyme-altered liver foci が 42mg/L 及び 421mg/L の濃度で発生しているが、この病変も 42mg/L の濃度で多く発生している。本試験では肝臓には腫瘍及び前腫瘍性病変の発生増加はなかった。これは投与経路による相違であることが推察された。

V 結論

F344/DuCrj(Fischer)ラットを用いて、クロトンアルデヒドの2年間(104週間)にわたる吸入によるがん原性試験を行なった。

その結果、雌雄とも少数例ではあるが鼻腔腫瘍(腺腫:雌雄、横紋筋肉腫:雄)の発生が認められ、この結果はクロトンアルデヒドのF344/DuCrj(Fischer)ラット雌雄に対するがん原性を示唆するものと考えられた。また、雌雄ともに3ppm群まで鼻腔に傷害の発生がみられた。

VI 文献

- 1.化学工業日報社(2000)
13700 の化学商品
化学工業日報社, 東京
- 2.Fred W. McLafferty (1994)
Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition.
John Wiley and Sons, Inc. (U.S.), Entry Number 1111
- 3.和光純薬工業からの提供資料(1996)
- 4.日本バイオアッセイ研究センター (1998)
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
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. Nagano, K., Enomoto, M., Yamanouchi, K., Aiso, S., Katagiri, T. and Matsumoto, M.
(1988)
Toxicologic Pathology of Upper Respiratory Tract.
Journal Toxicologic Pathology, 1, 115-127
7. Peto, R., Pike, M. C., Day, N. E., Gray, R. G., Lee, P. N., Parish, S., Peto, J.,
Richards, S. and Wahrendorf, J. (1980)
Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-
term animal experiments.
In : Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens:
A Critical Proposal.
IARC Monographs, Suppl. 2, pp.311-426, IARC, Lyon.
- 8.日本バイオアッセイ研究センター内部資料 (1984-1999)

9.日本バイオアッセイ研究センター (1989)

メチルブロミドのラット及びマウスを用いた吸入によるがん原性試験報告書
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川

10.U.S.EPA, IRIS (Integrated Risk Information System) (2000)

Crotonaldehyde

<http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/subst/0464.htm>

11.F-L., Chung, Tanaka, T. and Hecht, S. S. (1986)

Induction of liver tumors in F344 rats by crotonaldehyde.

Cancer Res. 46, 1285-1289