

部分翻訳

**European Union
Risk Assessment Report****ACROLEIN****CAS No: 107-02-8**

1st Priority List, Volume 7, 2001

欧州連合
リスク評価書 (Volume 7, 2001)
アクリルアルデヒド
(アクロレイン)

Institute for Health and Consumer Protection

European Chemicals Bureau

Existing Substances

European Union
Risk Assessment Report

CAS No.: 107-02-8 EINECS No.: 203-453-4

acrylaldehyde

C=CC=O

1st Priority List
Volume: 7

EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
EUR 19728 EN

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
2018年8月

本部分翻訳文書は、Acrolein (CAS No: 107-02-8)に関するEU Risk Assessment Report, (Vol. 7, 2001)の第4章「ヒト健康」のうち、第4.1.2項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文(評価書全文)は、
<https://echa.europa.eu/documents/10162/5cc7a672-4883-4bef-9d81-df93a25e07e5>を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量（濃度）-反応（影響）評価

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

4.1.2.1.1 動物における試験

アクロレイン (α,β -不飽和アルデヒド) はきわめて反応性が高く、グルタチオンやその他のチオール含有分子、タンパク質のスルフヒドリル基、第一級および第二級アミンと容易に結合する。主にアミノ基との反応の結果として、DNA およびタンパク質との相互作用が報告されている。アクロレイン分子はその高い反応性の結果として、主に適用部位で結合する (Beauchamp *et al.*, 1985; 国際化学物質安全性計画 [IPCS] , 1991)。

吸収および分布

Egle (1972) は、イヌをアクロレイン 0.4~0.6 mg/mL (172~258 ppm) 含有大気に吸入暴露させ、気道におけるアクロレイン蒸気の保持率について、吸気測定値から呼気測定値を減ずることにより検討した。気道全体の保持率は高く (81~84%)、濃度非依存的と考えられた。上下気道の保持率について個別に測定したところ、上気道の保持率は74~82%、下気道は66~70%を示した。ラットでは経口、吸入、皮下投与後全身に吸収されることが、尿中アクロレイン代謝物の排泄から証明された (Draminski, 1983; Kaye, 1973; Linhart *et al.*, 1996; Parent *et al.*, 1993; Sanduja, 1989)。実際の数値は以下の「代謝および排泄」の項に記載する。

Parent *et al.* (1991, 抄録のみ) は、雄雌ラットに2,3位標識 ^{14}C -アクロレイン 2 mg/kg 体重の単回静脈内投与、2 mg/kg 体重/日の反復 (強制) 経口投与 (非標識アクロレイン 14回投与後、 ^{14}C -アクロレイン単回投与)、2または15 mg/kg 体重の単回 (強制) 経口投与を行い、その分布について検討した。排泄物および各種組織 (詳細不明) の ^{14}C の分布を評価したところ、2 mg/kg 体重の単回経口投与群と反復経口投与群の分布に差は認められなかった。また、静脈内投与ではアクロレインと血液成分との結合に一貫したパターンが得られ、高用量経口投与群 (15 mg/kg) は低用量群に比べ異なる排泄パターンを生じた。経口投与群すべてが肝臓で ^{14}C の最大濃度を示した (Parent *et al.*, 1991)。

経皮吸収に関するデータは得られていない。入手可能な急性経皮毒性データについては、アクロレインに刺激性および腐食性があり、経皮吸収に関する試験報告が限られることから、経皮吸収の評価はできない。

代謝および排泄

可能性としてのアクロレイン代謝経路の模式図を Figure 1 に示す。この模式図は、IPCS と既存化学物質に関する GDCh (ドイツ化学会) 諮問委員会 (BUA) により公表された模式図から構成されている (IPCS, 1991; BUA, 1995)。

代謝および尿中、糞便中、呼気中への排泄に関する動物データ

Parent *et al.* (1993, 抄録) は、Parent *et al.* (1991) 記載と同じ投与計画を用い、ラットの ^{14}C -アクロレインの代謝および排泄について検討した。実験デザインおよび検討された実験濃度については、上記「吸収および分布」の項を参照されたい。

ラットに ^{14}C -アクロレインを経口投与したところ、放射能が尿中、呼気中、糞便中に排泄された。呼気中に含まれたのは主に $^{14}\text{CO}_2$ で、有機物質はごく微量であった。尿中代謝物には *S*-2-カルボキシエチルメルカプツール酸 (約 34%) と *S*-3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸 (約 7%) が含まれていた。糞中代謝物の同定はより複雑であった。糞便中の放射能の約 80% がメタノール、10% が水により抽出できた。少量の *S*-2-カルボキシエチルシステインおよび *S*-3-ヒドロキシプロピルシステインを除き、予測されたアクロレイン代謝物は同定できなかった。それ以外の糞中代謝物は同定できなかった (Parent *et al.*, 1993)。

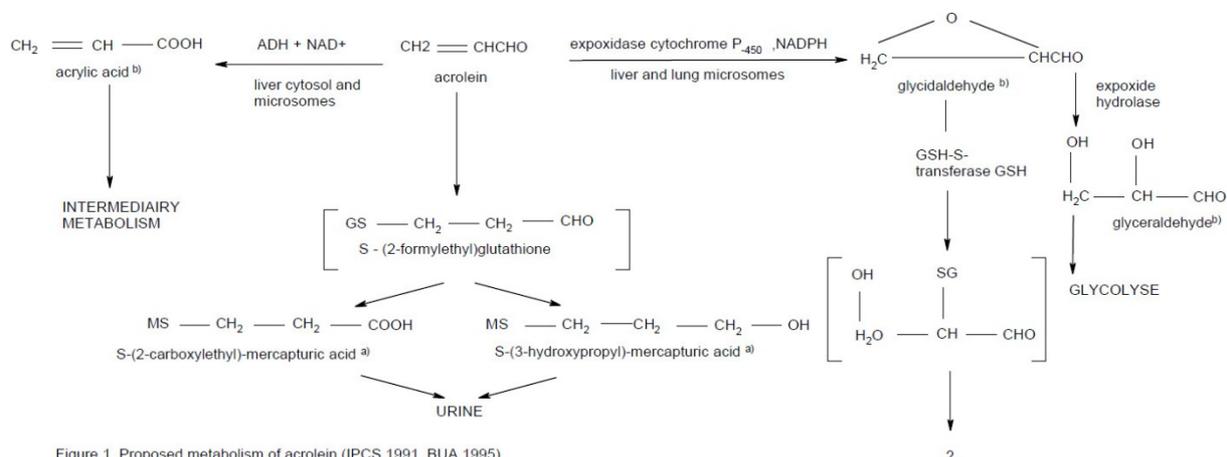


Figure 1. Proposed metabolism of acrolein (IPCS 1991, BUA 1995)
(GSH = glutathione = glutamylcysteinylglycine, ADH = aldehyde dehydrogenase, MS = mercapturic acid)

a) metabolite identified in rat in vivo
b) metabolite identified in in vitro systems
[] in brackets: metabolite not yet detected

Sanduja *et al.* (1989) によれば、アクロレイン単回経口投与 (ラット、13 mg/kg 体重、強制経口投与) により、その 78% が 3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸 [*S*-(3-ヒドロキシプロピル)-*N*-アセチル-*L*-システイン] として 24 時間尿に排泄された。Draminski *et al.* (1983) はラットにアクロレイン 10 mg/kg 体重を経口投与後、質量分析検出器付きガスクロマトグラフィを用い、尿中代謝物が *S*-カルボキシエチルメルカプツール酸とそのメチルエステルであることを同定した。このメチルエステルは、ガスクロマトグラフィ分析前の尿試料メチル化の結果によるものと考えられた。また、呼気中に未知代謝物が 1 つ認められた (Draminski *et al.*, 1983; IPCS 1992)。ラットでは、皮下投与量 (アクロレイン 50~300 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重または 2.8~16.8 mg/kg 体重) の 10~18% が 3-ヒドロキシプロピル-メルカプツール酸として 24 時間尿に認められた (Alarcon, 1976)。

Linhart *et al.* (1996) は、吸入投与か腹腔内投与のいずれかによりアクロレインに暴露させたラット尿中に、*N*-アセチル-*S*-(3-ヒドロキシプロピル) システイン (3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸) と *N*-アセチル-*S*-(2-カルボキシエチル) -システインの 2 種類のメルカプツール酸を同定した。

いずれの例も、3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸が主要代謝物であった。アクロレイン濃度 23、48、77、126 mg/m^3 に 1 時間暴露させたラットでは、24 時間以内に排泄されたメルカプツール酸、すなわち 3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸と *N*-アセチル-*S*-(2-カルボキシエチル)-システインの合計値は、それぞれ 0.87、1.34、2.81、7.13 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重、または推定吸収量の 10.9、13.3、16.7、21.5% に達した。推定吸収量は、毎分呼吸量報告値 (ラットでは 0.1 L/分) およびアクロレインの気道保持率 (83%) を基にし、さらに、アクロレインにより誘発された毎分呼吸量実測値の差について補正した。腹腔内投与ラットでは、24 時間以内に排泄されたメルカプツール酸部分は、妥当な用量範囲 (8.9~35.7 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重) 内でほぼ一定で、用量の 29.1 \pm 6.5% に達した (Linhart *et al.*, 1996)。

鼻の呼吸粘膜における非タンパク質性スルフヒドリル基の枯渇に関する動物データ

ラットにアクロレイン 0、0.1、0.5、1.0、または 2.5 ppm を 3 時間鼻部吸入チャンバーにおいて暴露させたところ、鼻の呼吸粘膜において濃度依存的に非タンパク質性スルフヒドリル基が枯渇した (Lam *et al.*, 1985)。

Cassee *et al.* (1996) は、ラットにアクロレイン 0.67 または 1.40 ppm を 3 日間鼻部吸入チャンバーにおいて吸入暴露後、鼻上皮の非タンパク質性スルフヒドリル基 (NPSH) 濃度が用量依存的に上昇する一方、6 時間暴露後のアクロレイン投与群の NPSH 濃度が対照群よりわずかに低いことを見出した。著者らは、これらの知見から、鼻上皮ではスルフヒドリル枯渇 (の可能性) に適応できると結論付けた (Cassee *et al.*, 1996, 4.1.2.6 反復投与毒性のその他の試験、短期吸入試験の項も参照)。

In vitro 代謝データ

In vitro データでは、アクロレインが肝アルデヒドデヒドロゲナーゼおよび肺または肝ミクロソームエポキシダーゼの基質になり得ることも示している。*In vitro* 試験において、2 種類のアクロレイン酸化物 (アクリル酸およびグリシドアルデヒド) が見出されている (Patel *et al.*, 1980; Ohno *et al.*, 1985; Rikans, 1987; Mitchell and Petersen, 1989)。アクロレインは、 NAD^+ または NADP^+ の存在下で、ラット肝画分により酸化されアクリル酸となったが、肺画分では酸化されなかった。一方、ラットの肝または肺ミクロソームのいずれかにアクロレインを添加し NADPH とインキュベーションすると、グリシドアルデヒドとその水和物であるグリセルアルデヒドが得られた (Patel *et al.*, 1980)。しかし、これらの代謝物はいずれも哺乳類では *in vivo* において立証されておらず、*in vitro* において認められた代謝経路が、*in vivo* におけるアクロレインの生体内変換でも機能するか否かは不明である。

4.1.2.1.2 ヒトにおけるデータ

トキシコキネティクスについては、ヒトにおけるデータが得られていない。

4.1.2.1.3 結論

アクロレインはきわめて反応性が高く、グルタチオンやその他のチオール含有分子、タンパク質のスルフヒドリル基、第一級および第二級アミンと容易に結合する。アクロレイン分子はその高い反応性の結果として、主に適用部位で結合する。イヌをアクロレイン蒸気に暴露させたところ、アクロレインの気道保持率は 81~84% に達した。ラットに経口、皮下、腹腔内投与後、尿中で回収されたアクロレインのメルカプツール酸誘導体は、それぞれ投与量の 70~80%、10~18%、 $29.1 \pm 6.5\%$ に達した。吸入暴露では推定吸収量の 11~22% が尿中に認められる。ラットに ^{14}C -アクロレインを経口投与後、放射能が尿中、呼気中、糞便中に認められる。これらの薬物動態試験の結果を用いて、経口および吸入投与によるアクロレイン吸収後の生体内変換の差の可能性について明確にすることは、試験デザインや用いた仮説などが原因でほとんど行えないことに留意されたい。

In vivo におけるアクロレインの主要代謝経路には、グルタチオン抱合が含まれると考えられる (Figure 1 も参照)。*In vitro* 代謝物であるアクリル酸、グリシドアルデヒド、グリセルアルデヒドは *in vivo* において立証されていない。

経皮暴露経路に関する吸収、分布、代謝、排泄の毒物動態データは得られていない。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 動物における試験

Table 4.10 summarises the available LD₅₀ and LC₅₀ tests.

Table 4.10 Summary of acute toxicity studies

Route	Species	LD ₅₀ /LC ₅₀	Unity	Reference
oral	rat	42 - 46	mg/kg bw	Smyth et al, 1951; Albin, 1975
oral	mouse	13.9 - 28	mg/kg bw	Albin, 1975; EPA/OTS 1991*
inhalation	rat	750 (10 min)	mg/m ³ (vapour)	Catalina et al, 1966
inhalation	rat	300 (30 min)	mg/m ³ (vapour)	Skog, 1950
inhalation	rat	65 (1 hr)	mg/m ³ (vapour)	Ballantyne et al 1989
inhalation	rat	18 - 21 (4 hr)	mg/m ³ (vapour)	Ballantyne et al 1989; Carpenter et al 1949
inhalation	rat	150 (4 hr)	mg/m ³ (vapour)	EPA/OTS, 1992*
inhalation	mouse	ca. 2000 (1 min)	mg/m ³ (nature unknown)	Shell, 1957
i.p.	rat	4	mg/kg bw	Murphy et al, 1983
i.p.	mouse	ca. 6 - 7	mg/kg bw	Shell, 1957; Warholm et al, 1984
s.c.	rat	50	mg/kg bw	Skog, 1950
s.c.	mouse	30	mg/kg bw	Skog, 1950
inhalation	mouse	400 (10 min)	mg/m ³ (nature unknown)	Shell, 1957
inhalation	mouse	151 (6 hr)	mg/m ³ (vapour)	Philippin et al, 1969; Philippin et al, 1970
inhalation	mouse	5225 (13.4 min)	mg/m ³ (vapour)	Salem et al, 1960
inhalation	mouse	4624 (13 min)	mg/m ³ (aerosol)	Salem et al, 1960
inhalation	rabbit	5225 (26.8 min)	mg/m ³ (aerosol)	Salem et al, 1960
inhalation	hamster	58 (4 hr)	mg/m ³ (nature unknown)	Kruyssen, 1971
inhalation	dog	344 (30 min)	mg/m ³ (nature unknown)	Albin, 1975
inhalation	guinea pig	5225 (24.9 min)	mg/m ³ (aerosol)	Salem et al, 1960
dermal	rabbit	164 (20% in mineral spirits)	mg/kg bw	Shell, 1957
dermal	rabbit	238 (10% in mineral spirits)	mg/kg bw	Shell, 1957
dermal	rabbit	200**	mg/kg bw	Albin, 1975
dermal	rabbit	562 (undiluted)	mg/kg bw	Shell, 1957
dermal	rabbit	335 (20% in water)	mg/kg bw	Shell, 1957
dermal	rabbit	1022 (10% in water)	mg/kg bw	Shell, 1957

* Report not submitted

**The available data do not indicate whether the test was performed with diluted or undiluted (100%) acrolein

経口半数致死量 (LD₅₀ 値) は、13.9~28 mg/kg (マウス) と 42~46 mg/kg 体重 (ラット) との間に差がみられる。ウサギに経皮投与した場合の LD₅₀ 値の範囲は 164~1022 mg/kg 体重で、溶媒およびアクロレイン塗布濃度に依存する。無希釈のアクロレインの経皮 LD₅₀ 値は、562 mg/kg 体重に達することが報告されている。4 時間半数致死濃度 (LC₅₀ 値) は、ラットでアクロレイン蒸気 18~150 mg/m³、ハムスターで 58 mg/m³ (アクロレインの状態は不明) である。マウスの 6 時間 LC₅₀ 値はアクロレイン蒸気 151 mg/m³ である。

単回経口投与後の毒性徴候には、自発運動量の減少、傾眠、反射および筋緊張の消失、振戦、呼吸困難、斜視、被毛粗剛、円背位姿勢、立毛、尾端の黒ずみおよび損傷、体重増加の抑制、肺うっ血および肺水腫、胃腸の出血が挙げられた。急性経皮投与試験後の (死亡以外の) 影響に関するデータは得られていない。吸入暴露後、眼および鼻刺激性の徴候、口呼吸、呼吸数減少、体重減少、肺および肝臓の変色が報告された。肺顕微鏡検査では、うっ血、出血、線維素沈着、壊死が認められた。

1:1 アクロレイン-グルタチオン付加体の腎毒性

雄 SD ラットに 1:1 アクロレイン-グルタチオン (GSH) 付加体 0.5 または 1 mmol/kg 体重を単回静脈内投与したところ、糖尿、タンパク尿、血清尿素窒素値の上昇、腎臓の肉眼的および組織病理学的変化を特徴とする腎毒性を発現した。腎毒性は γ -グルタミルトランスペプチダーゼ阻害剤であるアシピシンにより抑制されたことから、1:1 アクロレイン-GSH 付加体が毒性種に活性化されるには、腎臓におけるメルカプツール酸合成経路の最初のステップによる処理を要することが示された。本付加体 0.1 mmol/kg 体重を単回静脈内投与したラットは、腎毒性の徴候を示さなかった (Horvath *et al.*, 1992)。

備考

1:1 アクロレイン-GSH 付加体の用量 0.1、0.5、1 mmol は、それぞれアクロレイン 14、28、56 mg/kg 体重に当たることに留意されたい。これらの投与量は、アクロレインの LD₅₀ および LC₅₀ 報告値に比べきわめて高い。

4.1.2.2.2 ヒトにおけるデータ

4.1.2.3 刺激性の章の 4.1.2.3.2 ヒトにおけるデータ—偶発的暴露の記載を参照されたい。

4.1.2.2.3 結論

提示されたデータは、LD₅₀ および LC₅₀ 報告値の多くについて基礎データなし、あるいはきわめて限定的な報告ではあるが、指令 67/548/EC 付属書 VIIA 規定の基本要件に関しては許容可能である。欧州共同体 (EC) 基準によれば、アクロレインは経口および経皮経路では有毒、吸入後には非常に強い毒性がある。分類に関しては第 1 章を参照されたい。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物における試験

ウサギにアクロレイン蒸気濃度 1.9~2.6 ppm を 4 時間暴露させたところ、両眼に軽度の刺激性を生じた (Mettier, 1960)。一方、ウサギにアクロレイン蒸気 0.6 ppm (1.4 mg/m³) を 30 日間 (4 時間/日、5 日/週) 暴露させても、眼刺激性は生じなかった (Mettier *et al.*, 1960)。

ウサギ、ウシ、ヒツジ由来の気管標本による *in vitro* 試験 (Guillerm *et al.*, 1967; Kensler *et al.*, 1963; Sisson *et al.*, 1991)、およびニワトリによる *in vitro/in vivo* 試験 (Battista *et al.*, 1970) において、気管繊毛運動の低下が認められた。

ラットを空気中アクロレイン 0.25、0.67、または 1.40 ppm (アクロレインの状態は不明) を含有する大気に、1 日または 3 日間 (6 時間/日) 鼻部吸入チャンバーにおいて暴露させたところ、外観および行動は暴露中、暴露後とも本質的に正常であった。眼、鼻、呼吸刺激性に関する臨床徴候は報告されなかった。一方、顕微鏡検査により、アクロレイン 0.25 または 0.67 ppm 暴露群の鼻では、呼吸上皮/移行上皮に投与関連の軽度の組織病理学的変化が認められたが、嗅上皮には認められなかった。1.40 ppm 暴露群では、組織学的検査を行わなかった (Cassee *et al.*, 1996, 4.1.2.6 反復投与毒性のその他の試験、短期吸入試験の項も参照)。

複数の試験において、アクロレイン吸入後、気道の感覚刺激性を生じることが示されている。

アクロレインの 50%呼吸数抑制濃度 (RD₅₀ 値) は、マウスにおいて 2.4~6.6 mg/m³ (アクロレインの状態は不明) に達した (IPCS, 1992)。ラットの RD₅₀ 値は 9.2 および 13.7 mg/m³ (アクロレインの状態は不明) であった (IPCS, 1992, Cassee *et al.*, 1996)。

4.1.2.3.2 ヒトにおけるデータ

偶発的暴露

アクロレインとの偶発的暴露数例と、アクロレイン入りオレンジジュースの摂取による自殺未遂 1 例の記載が得られた。影響は主要暴露部位に認められ、最終的に腐食性をもたらす重度の刺激性の徴候が、皮膚および眼ならびに胃および気道の粘膜層において明らかにされた。

ボランティア試験

臭気の知覚および認識、ならびに眼、鼻、気道に及ぼす影響について閾値レベルを確立するため、複数のボランティア試験が実施された。これらの試験の多くは時期が古く、用いた分析法がしばしば明示されず、あるいは記載不十分であることに留意されたい。

臭気閾値

Leonardos (1969) は、臭気閾値 (全員 [n=4] が臭気を認識した最初の濃度と定義) が 0.21 ppm (0.48 mg/m³) であることを見出した。Plotnikova は、アクロレインの臭気閾値を 0.35 ppm (0.8 mg/m³) と報告した (Plotnikova 1957, 抄録, 詳細なし)。

吸入暴露による刺激性

眼、鼻、気道におけるアクロレイン蒸気の刺激性を検討するため、複数の実験が実施された。Weber-Tschopp *et al.*の試験 (1977) では、次の3つの実験が実施された (Table 4.11 も参照)。

- A. 35 分間の継続暴露により濃度 0 ppm から 0.6 ppm まで漸増させ、次に 0.6 ppm で一定にして 5 分間暴露 (n = 54)。
- B. 一定の濃度 0.3 ppm に 60 分間暴露 (n = 46)。
- C. 濃度を 0.15、0.3、0.45、0.6 ppm に上昇させ 4 回暴露 (1.5 分)、暴露間の回復時間は 8 分間 (n = 42)。

実験 A では、アクロレイン蒸気の濃度上昇により、眼および鼻に対する主観的な刺激性、不快感、まばたきの回数が増大し、呼吸数は減少した。統計的に有意な影響を示した濃度は、眼刺激性 0.09 ppm (0.21 mg/m³)、鼻刺激性 0.15 ppm (0.34 mg/m³)、まばたきの回数増加 0.26 ppm (0.59 mg/m³)、呼吸数の減少 0.6 ppm (1.3 mg/m³) であった。実験 B では、一定のアクロレイン蒸気濃度 0.3 ppm (0.69 mg/m³) 暴露から 10~20 分後、大幅な眼および鼻刺激性を記録し、40 分暴露後には呼吸数が有意に減少した。非継続的な暴露 (実験 C) と継続暴露 (実験 A) により生じた影響との比較から、眼および鼻刺激性は継続暴露の重症度の方が有意に高く、暴露時間依存的な影響を示すと結論付けられる。

Table 4.11 Summary of results from the study of Weber-Tschopp *et al.* (1977)

Exposure regime	Discomfort	Subjective eye irritation ¹	Subjective nose irritation ¹	Subjective throat irritation	Eye blinking rate	Sespiratory rate
A. continuous increase 0-0.6 ppm 40 min. Last 5 min. Constant n = 53	from 0.09 ppm	from 0.09 ppm	from 0.15 ppm	no change	from 0.26 ppm at 0.3 ppm sign doubling; not different from control up to 0.17 ppm	decrease at 0.6 ppm
B. continuous exposure 0.3 ppm, 1hr. n = 46	Effects increased in 20-30 min, thereafter constant	effects starting within 10-20 minutes, constant score ² after 40 minutes Max. score: 3	effects starting within 10-20 minutes, constant score ² after 40 minutes Max. score: 2	little increase in effects, constant score ² after 40 minutes Max. score: 1-2	from ca. 17 blinkings/min to ca. 38 blinkings/min, thereafter constant	slow decrease, significant after 40 min, not much change after longer exposure
C. discontinuous increase 0.15, 0.3, 0.45, 0.6 ppm n = 42	from 0.15 ppm	from 0.3 ppm	from 0.45 ppm	from 0.45 ppm		

¹Because the results were only presented in graphics from which statistically significance cannot be deviated, the conclusions from the authors were used, which seems to be in correspondence with the results in the graphics

²Scale 1-4; 1: no effect, 2: a little bit, 3: medium, 4: high

アクロレイン蒸気に 5 分間暴露させたボランティアの眼刺激性の程度を、0~2 の尺度で記録した (0: なし、1: 中程度、2: 重度)。この刺激性の指標では、0.06 ppm (0.14 mg/m³) で 0.471、1.3~1.6 ppm で 1.2、2.0~2.3 ppm で 1.5 に達した (Darley *et al.*, 1960)。

Sim and Pattle (1957) は、ボランティアをアクロレイン濃度 0.83 ppm 含有大気に 10 分間、1.2 ppm 含有大気に 5 分間暴露させ、アクロレインの刺激性について検討した。アクロレインは、暴露させたすべての粘膜表面にきわめて強い刺激性を示した。0.83 ppm では流涙が 20 秒以内に、1.2 ppm では既に 5 秒後に生じた。

経皮暴露による刺激性

ボランティア 8、10、48、20 名からなる群を対象に、それぞれアクロレイン濃度 0.01、0.1、1、10%のエタノール溶液によるパッチテストを実施した (Lacroix *et al.*, 1976)。1%塗布群では、48 名中 6 名 (12.5%) が陽性反応を記録し、4 例が水疱を伴う重度の浮腫、2 例が紅斑を伴う重度の浮腫であった。10%塗布群では、すべての被験者 (n = 20) が水疱、壊死、炎症細胞浸潤、乳頭浮腫による皮膚への影響を示した。0.01%塗布群 (n = 8) および 0.1%塗布群 (n = 10) の反応は認められなかった。暴露期間および症状発現開始に関する報告がなく、さらには低濃度群 1 群当たりのボランティア数がきわめて少なかったため、これらのデータを用いてヒトの皮膚刺激性に対する無影響量 (NEL) を確立することはできない。

ヒトにおける試験からの結論

アクロレイン蒸気 0.06 ppm (0.14 mg/m³) に 5 分間暴露後、軽度の眼刺激性 (主観的報告) が明らかにされた (Darley *et al.*, 1960)。臭気閾値は 0.21~0.35 ppm (0.48~0.80 mg/m³、アクロレインの状態は不明) であった (Leonardos, 1969, Plotnikova, 1957)。アクロレイン蒸気 0.3 ppm (0.69 mg/m³) への継続暴露により、10~20 分後に大幅な眼および鼻刺激性、暴露から 40 分後に有意な呼吸数減少を生じ (Weber-Tshopp *et al.*, 1977)、また、0.83 ppm (1.9 mg/m³、アクロレインの状態は不明) に 10 分間暴露後、すべての粘膜表面にきわめて強い刺激性がもたらされた (Sim and Pattle, 1957)。これらの試験デザインおよび記載から、アクロレイン短期吸入暴露後のヒトにおける刺激性の (無) 影響量について明確な結論は下せないが、Darley *et al.* (1960) の試験の自覚症状から得られたアクロレイン蒸気 0.14 mg/m³ を最小毒性量 (LOAEL)、Weber-Tschopp *et al.* (1977) の試験の測定可能な影響 (0.59 mg/m³ におけるまばたきの回数増加) から得られたアクロレイン蒸気 0.34 mg/m³ を無毒性量 (NOAEL) とし、これに基づいたリスク評価の実施が考えられる。

4.1.2.4 腐食性

アクロレインはウサギの皮膚および眼に腐食性があると述べられ、アクロレイン 1%溶液は眼および皮膚に重篤な損傷をもたらす (Albin, 1975, 報告書入手不能)。

4.1.2.4.1 刺激性および腐食性に関する結論

動物における報告データでは、EC 基準に従った適切な分類を行えない。一方、ヒトに認められる影響 (4.1.2.11 項参照) を考慮した場合、R34 の表示が示され、提示されたデータは、指令 67/548/EC 付属書 VIIA 規定の基本要件に関しては許容可能であると結論付けられる。分類に関しては第 1 章を参照されたい。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 動物におけるデータ

アクロレインは、モルモットマキシマイゼーション試験において陰性であることが報告されている (Susten *et al.*, 1990)。本試験では、雌モルモットをアクロレイン水溶液により処置した。皮内および局所感作誘導相、局所惹起相に用いた濃度は、それぞれ 0.01%、2.5%、0.5%であった。陽性対照として、ジニトロクロロベンゼン (DNCB) の 70%エタノール溶液を用いた。本試験の報告は不十分であったが、要請により業界側が本試験の生データを提出した。皮膚反応は 0.5、1、2、3 の尺度でスコアを付けた。惹起処置による皮膚反応の誘発は、試験群では最大 7 匹にみられた (スコア: 0.5) が、対照群で同一スコアを示したのは 1 匹のみであった。本試験のスコア 0.5 と 1 の識別は OECD ガイドラインと合致しない。著者らによれば、スコア 0.5 は密集していないまばらな発赤、スコア 1 は密集した軽度の発赤と定義されている。この記載と OECD ガイドラインの記載 (スコア 1: 不連続またはまばらな紅斑) を考慮すると、スコア 0.5 は OECD によるスコア 1 と解釈されるべきである。試験群の方が対照群よりも皮膚反応の発生率がかなり高かったことから、被験物質が皮膚感作物質でないという結論は疑わしいように思われる。ただし、本試験に基づいて、感作性について明確な結論を下すことはできない。

それ以外の感作性試験の結果は得られていない。

4.1.2.5.2 ヒトにおけるデータ

アクロレインの感作性については、ヒトにおけるデータが得られていない。

4.1.2.5.3 結論

入手可能な感作性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) の要件に従った実施および報告とはなっていない。ただし、認められた結果を考慮した場合、アクロレインは皮膚感作物質とみなされ R43 の表示が示されると考えられる。理事会指令 67/548/EEC に従った分類および表示では、感作性については分類なしという結論に達した。分類に関しては第 1 章を参照されたい。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

吸入試験

種々の反復投与吸入試験の試験デザインは、検討された暴露期間およびパラメータに関しては相互に大きく異なる。NOAEL の確立に適している反復投与毒性試験を **Table 4.12**、その他の試験を **Table 4.13** に要約する。

雄ラットをアクロレイン 0.17、1.07、2.98 ppm (0.4、2.5、6.9 mg/m³) (状態は不明) に 3 週間 (6 時間/日、5 日/週) 暴露させ、免疫および宿主防御機構に及ぼす影響を評価するデザインとした 1 試験では、気道の組織学的検討も行われた。低濃度群および中濃度群の影響は認められなかった一方、高濃度群では体重抑制および鼻病変が認められたが、肺病変は認められなかった (Leach *et al.*, 1987)。本ラット 3 週間試験から、気道病変に関する NOAEL は 1.07 ppm (2.5 mg/m³) と導ける。

Lyon *et al.* (1970) は、ラット、モルモット、サル、イヌをアクロレイン蒸気 0.7 および 3.7 ppm (1.6 および 8.5 mg/m³) に 6 週間 (8 時間/日、5 日/週) 暴露させ、その影響について検討した。鼻道および気管は検討されなかった。投与による死亡、臨床徴候、血液学および生化学的パラメータの変化は生じなかった。すべての種で肺に影響 (慢性炎症性変化、肺気腫) が認められた。この 6 週間試験から、ラット、モルモット、サル、イヌの NOAEL は 0.7 ppm (1.6 mg/m³) 未満であると結論付けられる。

同じ一連の実験で、ラット、モルモット、イヌ、サルを 0.22、1.0、1.8 ppm (0.5、2.3、4.1 mg/m³、アクロレインの状態は蒸気と考えられるが、報告に明確な記載はなかった) に 90 日間継続暴露させ、その影響について検討した。鼻の顕微鏡検査は行われず、臓器重量は記録されなかった。体重増加の抑制が、ラット 1.0 および 1.8 ppm 群にのみ生じた。肺、肝臓、腎臓、脳、心臓の非特異的炎症がすべての種で認められた (ラット：高濃度群、モルモットおよびサル：低濃度および高濃度群、イヌ：すべての群)。イヌでは、低濃度群の肺に投与関連の明確な病理学的変化が認められた。眼刺激性がイヌ、サルの 1.0 および 1.8 ppm 群で報告された (Lyon *et al.*, 1970)。本試験から、イヌ、モルモット、サルの亜慢性継続暴露に関する NOAEL は 0.22 ppm (0.5 mg/m³) 未満、ラットの NOAEL は 0.22 ppm (0.5 mg/m³) であると結論付けられる。

Table 4.12 Survey of repeated dose inhalation toxicity studies. Experiments suitable for derivation of NOAEL

Reference	Experimental	NOAEL	Remarks
Leach et al. 1987	3 wks, 6 h/d, 5 d/wk Conc: 0, 0.4, 2.5, 6.9 mg/m ³ (nature unknown) Examinations restricted to immune function and nasal/lung pathology	2.5 mg/m ³ (rat)	6.9 mg/m ³ , depressed body weights, nasal cavity: microscopic changes in mucous, respiratory and olfactory epithelium; <u>lungs</u> not affected.
Lyon et al. 1970	continuous 90 d Conc: 0, 0.5, 2.3, 4.1 mg/m ³ (vapour)	0.5 mg/m ³ (rat); <0.5 mg/m ³ (g.pig, monkey, dog)	0.5 mg/m ³ , non-specific inflammatory changes in liver, lungs, kidneys, heart
Lyon et al. 1970	6 wks, 8 h/d, 5 d/wk Conc: 0, 1.6, 8.5 mg/m ³ (vapour)	<1.6 mg/m ³ (rat, g.pig, monkey, dog)	1.6 mg/m ³ , chronic inflammatory changes and emphysema in lungs
Feron et al. 1978	13 wks, 6 h/d, 5 d/wk Conc: 0, 0.9, 3.2, 11.2 mg/m ³ (vapour)	< 0.9 mg/m ³ (rat) 0.9 mg/m ³ (hamster, rabbit)	0.9 mg/m ³ , rat, treatment-related effects: slightly decreased bw gain, histopathological lesions in epithelium of the nasal cavity in one rat
Kutzman et al. 1982, 1985	62 days, 6 h/d, 5 d/wk Conc: 0, 0.9, 3.2, 9.2 mg/m ³ (vapour), Fischer-344 rats	0.9 mg/m ³ (rat)	3.2 mg/m ³ , histopathological changes in the respiratory tract were found in 3/31 animals
Kutzman et al. 1982, 1984, 1986	62 days, 6 h/d, 5 d/wk Conc: 0, 0.9, 3.2, 9.2 mg/m ³ (vapour), Dahl rats, hypertension resistant and sensitive strains	< 0.9 mg/m ³ (rat)	0.9 mg/m ³ : histopathological changes in the respiratory tract of both strains
Costa & Kutzman 1982, 1985 Costa et al. 1986	62 days, 6 h/d, 5 d/wk Conc: 0, 0.9, 3.2, 9.2 mg/m ³ (vapour) Fischer-344 rats, probably same experiment as described by Kutzmann et al. 1985 (HEDSET 5.4.20).	< 0.9 mg/m ³ (rat)	0.9 mg/m ³ : enhancement of flow volume dynamics and increase in diffusing capacity of the lungs for CO. (Reported examinations were restricted to function and histopathology of the lungs)

Table 4.13 Survey of repeated-dose inhalation toxicity studies. Miscellaneous experiments

Reference	Experimental	Results
Buckley et al. 1984	* Mouse, 5 days, 6 h/d Conc: 0, 4 mg/m ³ (RD50; nature unknown) Examinations restricted to histopathology of respiratory tract	Histopathological changes of respiratory and olfactory epithelium in nasal cavity
Sherwood et al. 1986	* Rat, 3 wks, 6 h/d, 5 d/wk Conc: 0, 0.4, 2.5, 6.9 mg/m ³ (nature unknown) Determination of effects on macrophage functions	No change in pulmonary clearance of inhaled <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Increased enzyme activities in alveolar macrophages
Bouley et al. 1975, 1976	* Rat, continuous 77 d Conc: 0, 1.3 mg/m ³ (vapour) interim kills, restricted protocol	Lowered body weight and food consumption
Aranyi et al. 1986	* Mouse, 5 d, 3 h/d Conc: 0, 0.23 mg/m ³ (vapour)	Decreased pulmonary bactericidal activity to inhaled <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
Gusev et al. 1966	Rat, continuous 61 d Conc: 0, 0.15, 0.51, 1.52 mg/m ³ (nature unknown)	Poor reporting
Sinkuvene et al. 1970	Rat, continuous 61 d Conc: 0, 0.03, 0.14, 0.74 mg/m ³ (nature unknown)	Poor reporting
Watanabe & Aviado, 1974	Mouse, 5 wks, 30 min twice daily Conc: 0, 100 mg/m ³ (nature unknown)	Decrease in pulmonary compliance and increase in lung phospholipid content
Feron and Kruyssen 1977	Hamster, exposure 52 wks, 7 h/d, 5 d/wk, experimental 52 + 29 wks 0, 9.3 mg/m ³ (vapour) (co)carcinogenicity study	No mortality, decreased body weight gain, increased Hb and PCV in females, treatment-related changes in nasal cavity. See also Section 4.1.2.8
Campbell et al. 1981	* Mouse, 8h/d, 7d/wk Conc: 0, 4.7 mg/m ³ (vapour)	Increased mortality of acrolein treated mice after infection with <i>Streptococcus pyogenes</i>
Roussel et al. 1973	* Rat, continuous for 2-6 months Conc: 0, 1.2-1.5 mg/m ³ (nature unknown)	Lowered body weight, lung weight and food and water consumption. Minor respiratory tract lesions indicative of chronic irritation, hepatic tissue injury.

*Studies primarily aimed at evaluation of immune and/or host defence mechanism

Feron *et al.* (1978) によりラット、ハムスター、ウサギの雄雌に 0.4、1.4、4.9 ppm (アクロレイン蒸気 0.9、3.2、11.2 mg/m³) を 13 週間 (6 時間/日、5 日/週) 暴露させた試験では、感受性が最も高い種はラットであった。ラットの主な所見は、高濃度群の有意な高死亡率 (50%)、濃度依存的な体重増加の抑制 (低濃度群では有意差なし、他の 2 群では統計的有意差あり)、濃度依存的な気道病変からなり、気道病変は、低濃度群 1 匹の鼻腔における軽度の扁平上皮化生から高濃度群数匹の気道数カ所における重度の病変まで様々に及んだ。ウサギおよびハムスターは、0.4 ppm では投与関連の有害作用を示さなかったが、1.4 ppm でウサギは鼻腔に軽微な炎症性病変を示し、ハムスターには時に数回のくしゃみ、ならびに軽度の摂餌量減少および体重増加の抑制が認められ、4.9 ppm では双方に重度の気道病変が生じた (Feron *et al.*, 1978)。これらの試験から、ラットの亜慢性毒性に関する NOAEL は 0.4 ppm (0.9 mg/m³) 未満と結論付けられる。ウサギおよびハムスターの NOAEL は 0.4 ppm (アクロレイン蒸気 0.9 mg/m³) である。

別の一連の実験では、2 系統のラットを 0.4、1.4、4.0 ppm (アクロレイン蒸気 0.9、3.2、9.2 mg/m³) に 62 日間 (6 時間/日、5 日/週) 暴露させた。Fischer ラットでは低濃度群の肺の組織学的変化を認めなかったが、Dahl ラットでは、特に、終末細気管支上皮の過形成性/化生性変化が認められた。Fischer ラットで検討された肺機能パラメータは、低濃度群においてある程度の影響を受けた (Costa *et al.*, 1986; Kutzman *et al.*, 1984, 1985)。これらの試験から、両系統のラットの NOAEL は 0.4 ppm (アクロレイン蒸気 0.9 mg/m³) 未満であったと結論できる。

その他の試験、短期吸入試験

雄 SD ラットをアクロレイン 0、0.2、または 0.6 ppm に 1 日または連続 3 日間 (6 時間/日) 鼻部吸入チャンバーにおいて吸入暴露させ、鼻上皮細胞、気管上皮細胞、遊離肺細胞の増殖反応について検討した。増殖反応は、5-ブロモデオキシウリジン (BrdU) 標識法により測定された DNA 合成細胞の比率として示した。アクロレイン単回暴露により、検討された 3 細胞種で DNA 合成細胞の比率の濃度依存的な上昇が得られ、その上昇は、暴露濃度 0.2 ppm の肺細胞および気管細胞で既に統計的に有意であった。3 回暴露後、DNA 合成細胞の比率上昇が顕著に弱まったのは、順応のためと考えられた (Roemer *et al.*, 1993)。

Cassee *et al.* は、雄 albino Wistar ラットを空气中アクロレイン 0.25、0.67、または 1.40 ppm (状態は不明) を含有する大気に、1 日または 3 日間 (6 時間/日) 鼻部吸入チャンバーにおいて暴露させ、鼻の呼吸上皮および嗅上皮の組織病理学的変化および生化学的変化を検討し、さらに細胞増殖について測定した。各種濃度のアクロレインに暴露させたラットの外観および行動は、暴露中、暴露後とも本質的に正常であった。眼、鼻、呼吸刺激性に関する臨床徴候は報告されなかった。一方、顕微鏡検査により、アクロレイン 0.25 または 0.67 ppm (状態は不明) 暴露群の鼻では、呼吸上皮/移行上皮に投与関連の軽度の組織病理学的変化が認められたが、嗅上皮には認められなかった。1.40 ppm 暴露群では、組織学的検査を行わなかった。鼻上皮の細胞増殖については、3 日間の暴露後には増加していると考えられたが、1 日の暴露では認められなかった。後者の試験では、細胞増殖の測定を鼻上皮細胞に限定し、(増殖細胞核抗原 [PCNA] および BrdU 標識を用いて) 陽性に染色された基底膜 1 mm 当たりの細胞数として示した。

アクロレイン 0.67 または 1.40 ppm (状態は不明) に 3 日間暴露後、鼻上皮の NPSH 濃度が用量依存的に上昇する一方、6 時間暴露後のアクロレイン投与群の NPSH 濃度は対照群よりわずかに低かった (Cassee *et al.*, 1996, 4.1.2.1, 4.1.2.3, 4.1.2.11 項も参照)。

結論

これらの吸入試験の結果から NOAEL を確立することはできない。検討された最低濃度であるアクロレイン蒸気 0.9 mg/m³ (0.4 ppm、期間補正值 [DCV] : 0.16 mg/m³) に間欠暴露 (総暴露期間 62 日~13 週間 [6~7 時間/日、5 日/週]) させると、ラットには軽度ながら投与関連の変化が生じたが、ハムスターとウサギには生じなかった。

検討された最低濃度であるアクロレイン 0.5 mg/m³ (0.22 ppm) に継続暴露 (90 日間 [24 時間/日、7 日/週]) させると、モルモット、サル、イヌには投与関連の影響が生じたが、ラットには生じなかった。ラットを 1 日あるいは 3 日間アクロレインに暴露させると、検討された最低濃度レベル (すなわち、0.2~0.25 ppm [0.47~0.58 mg/m³]) 以上で細胞増殖をもたらし、アクロレイン 0.25 または 0.67 ppm (0.58~1.56 mg/m³) 暴露群の鼻では、呼吸上皮/移行上皮に投与関連の軽度の組織病理学的変化が生じたが、嗅上皮には生じなかった。鼻上皮細胞の NPSH 濃度は、3 日間暴露後 0.67 ppm (1.56 mg/m³) 以上に上昇した。

経口試験

入手可能な反復経口投与試験について **Table 4.13** に要約する。短期経口試験は得られなかった。亜慢性経口試験において、雄雌イヌにゼラチンカプセル入りアクロレイン投与量 0.1、0.5、1.5 mg/kg 体重 (4 週間後 2.0 mg/kg 体重に増量) を 1 日 1 回 53 週間投与した。認められた投与関連の主要な影響は、高用量群で主に最初の 4 週間に生じた頻回の嘔吐、および中用量群で時にみられた嘔吐のみであった。高用量群では、有意な血清総タンパク、カルシウム、アルブミン低値となった。

Table 4.14 Survey of repeated-dose studies. Oral experiments

Reference	Experimental	NOAEL	Results
Parent et al. 1992a	Rat, gavage 102 wks, 7 d/wk DI: 0, 0.05, 0.5, 2.5 mg/kg bw Interim kill at 12 months ⁶	0.05 mg/kg bw/d	dose-related decreased survival in males and females at 0.5 mg and higher
Parent et al. 1991	Mouse, gavage, 18 months, 7 d/wk. DI: 0, 0.5, 2, 4.5 mg/kg bw	2 mg/kg bw/d	decreased body weight gain and survival in males at 4.5 mg
Parent et al. 1992b	Dog, 53 wks, 7 d/wk DI: 0, 0.1, 0.5, 1.5/2 mg/kg bw 0.1% acrolein solution in gelatin capsules	0.5 mg/kg bw/d	increased vomiting incidence and decreased total serum protein, calcium and albumin in dogs of the high dose group. The incidences of vomiting decreased in time pointing to an adaptive effect

⁶ 投与期間は、毒性試験については 12 ヶ月、毒性/がん原性併合試験については 24 ヶ月とした。

それ以外の投与関連の影響は認められなかった (Parent *et al.*, 1992b)。本試験から、イヌの亜慢性毒性に関する NOAEL は 0.5 mg/kg 体重/日と結論付けられる。

長期強制経口投与試験は、ラット (102 週間) およびマウス (18 ヶ月間) の雄雌を対象に実施されている。認められた影響は、ラットの死亡、マウスの死亡および体重増加の抑制であった (Parent *et al.*, 1991, 1992a)。これらの試験から、ラット慢性毒性に関する NOAEL は 0.05 mg/kg 体重/日、マウスについては 2 mg/kg 体重/日と確立される。

結論

長期経口試験で認められた主な影響は、ラットの生存率低下 (NOAEL : 0.05 mg/kg 体重)、マウスの生存率低下および体重増加の抑制 (NOAEL : 2 mg/kg 体重)、イヌの血清総タンパク、カルシウム、アルブミン低値を伴う嘔吐発生率上昇 (NOAEL : 0.5 mg/kg 体重) からなっていた。これらの試験では選択された一部の知見のみ公表されているが、記載の試験デザインは関連する OECD および EC ガイドラインの基準に合致している。

4.1.2.6.2 ヒトにおけるデータ

反復暴露については、ヒトにおけるデータが得られていない。

4.1.2.6.3 反復投与毒性に関する結論

提示されたデータは、指令 67/548/EC 付属書 VIIA 規定の基本要件に関しては許容可能である。

4.1.2.7 変異原性および関連エンドポイント

4.1.2.7.1 細菌試験系における遺伝子突然変異

アクロレインの遺伝毒性は細菌により幅広く検討されており、多種多様な実験デザイン (スポット試験、プレート法、プレインキュベーション法など) や様々な指示菌およびエンドポイント (復帰突然変異系、前進突然変異、SOS クロモテスト、DNA 修復可能な細菌株と欠損株の細胞毒性差など) が用いられている。これらの試験結果には差がみられ、特に、1. アクロレインの物理化学的特性 (反応性、揮発性、不安定性など)、2. 特定の細菌に関するアクロレインの毒性 (変異原性の立証に適した用量範囲が狭まる)、3. 用いられる指示菌の特性およびその試験系の設定、の結果として生じるものである。

細菌による遺伝子突然変異試験について **Table 4.15** に要約する。**Table 4.15** には、一次 DNA 損傷試験 (umu 試験、SOS クロモテスト、細胞毒性比較試験)、さらに、きわめて限定的な設定、不十分な報告、または必須データ欠如のため評価できなかった変異原性試験は挙げられていない。

細菌による変異原性試験の結果から、アクロレインはネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 株 TA100、TA104、TA98 に直接作用する細菌変異原であると結論付けられる (Foiles *et al.*, 1989; Khudoley *et al.*, 1986, 1987; , 1980; Marnett *et al.*, 1985; Parent *et al.*, 1996; Waegemaekers *et al.*, 1984)。S9 mix 存在下および非存在下で実施された試験の一部では、代謝活性化ありの場合になしの場合より変異株の増加は少ないか、変異株を全く増加しないことが認められる (Khudoley *et al.*, 1986, 1987; Lutz *et al.*, 1980)。本試験系にグルタチオン (GSH) を添加したところ、指示菌に対するアクロレインの毒性は低減したが、変異原性の程度には影響を及ぼさなかった (Foiles *et al.*, 1989; Marnett *et al.*, 1985)。

4.1.2.7.2 酵母

酵母では、アクロレイン投与により出芽酵母 (*S. cerevisiae*) N123 にわずかな変異が得られたが、この軽度の増加に関する生物学的意義は疑わしく、また、用いられた別の酵母株 (出芽酵母 S211、S138 など) では、変異株数の増加は明らかにならなかった (Izard, 1973)。

4.1.2.7.3 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 試験

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 試験について、遺伝子突然変異試験の要約を **Table 4.16**、細胞遺伝学的試験の要約を **Table 4.17** に示す。

- **遺伝子突然変異** アクロレインにより、DNA 修復欠損ヒト線維芽細胞 (色素性乾皮症細胞) では遺伝子変異の増加が誘発されたが、正常な修復可能ヒト線維芽細胞では誘発されなかった (Curren *et al.*, 1988)。アクロレインは、ハムスターV79 細胞を用いた *HPRT* 試験でウシ胎児血清非存在下では陽性であったが、存在下では陽性でなく (Smith *et al.*, 1990)、また、血清濃縮培地を用いた CHO 細胞による標準的な *HPRT* 試験では陰性であった (Parent *et al.*, 1991)。
- **染色体異常** Au *et al.* の報告では、染色体異常試験において、アクロレインにより細胞毒性濃度 40 μM 以上で染色体分配障害 (chromosome tangling) が誘発されたが、それ未満の試験濃度での明確な染色体切断誘発の徴候はみられなかった。染色体分配障害は、潜在的な染色体異常誘発能の徴候とみなされた (Au *et al.*, 1980)。その後実験を行った Galloway *et al.* (1987) および Wilmer *et al.* (1985, 1986) は、アクロレインの染色体切断活性の徴候を見出さなかった。これらのデータに基づくと、哺乳類細胞を用いた *in vitro* 試験において、アクロレインは染色体異常を誘発しないと結論付けられる。
- **姉妹染色分体交換 (SCE)** アクロレインは、CHO 細胞およびヒトリンパ球における *in vitro* 試験で SCE を誘発することが示された (Au *et al.*, 1980; Galloway *et al.*, 1987; Wilmer *et al.*, 1986)。SCE の誘発および細胞毒性に対し、MESNA (2-メルカプトエタンスルホン酸、ナトリウム塩) が完全に保護した (Wilmer *et al.*, 1986)。CHO 細胞による 1 件の SCE 試験において、アクロレインは陰性であることが報告された (Loveday, Magna Corporation, 1982)。

4.1.2.7.4 ショウジョウバエ

Sierra *et al.* (1991) は、2 種類の体細胞変異組換え試験 (SMART) である眼色スポット試験および翅毛スポット試験、ならびに 2 種類の生殖細胞試験である伴性劣性致死試験 (SLRLT) および性染色体消失試験 (SCLT) を用いて、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) におけるアクロレインの遺伝毒性について検討した。後者の 2 種類の試験では、混餌投与と注射投与による暴露を用いた。その結果、SLRLT におけるアクロレインの変異原性は、注射投与時に認められるが混餌投与時には認められないこと、また、体細胞変異および組換え検出時に指向される試験法である 2 種類の SMART において、アクロレインは遺伝毒性を誘発することが示された。

キイロショウジョウバエの SCLT 結果から、混餌投与と注射投与のいずれも、アクロレイン暴露に起因する染色体異常誘発能を認めなかった (Sierra *et al.*, 1991)。

アクロレインを混餌投与および注射投与により暴露させたキイロシヨウジョウバエの成虫と、混餌投与により暴露させたキイロシヨウジョウバエの幼虫のいずれも、伴性劣性致死を誘発しなかった (Zimmering *et al.*, 1985, 1989)。Rapoport は、幼虫のアクロレイン混餌投与後の SLRLT 結果が陽性であることを報告した。ただし、本試験は報告が不十分であるため評価できなかった (Rapoport, 1948)。

4.1.2.7.5 哺乳類を用いた *in vivo* 試験

雄マウスに、アクロレインの 25%致死量 (LD₂₅: 1.5 mg/kg 体重、n = 5) および LD₅₀ (2.2 mg/kg 体重、n = 7) に近似する投与量を腹腔内投与したところ、アクロレイン投与雄マウスと交配させた雌マウスの妊娠率、総着床数および生存着床数、早期死亡数および後期死亡数から考えられるとおり、優性致死を誘発しなかった (Epstein *et al.*, 1972; Epstein and Shafner, 1968)。

雄ラットにアクロレイン 1、2.1、または 4.1 mg/kg 体重を単回腹腔内投与しても、骨髄の染色体異常を誘発しなかった (Gorodecki and Seixas, 1982)。

4.1.2.7.6 細菌および哺乳類細胞を用いた *in vitro*、ならびに哺乳類を用いた *in vivo* DNA 損傷試験

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 一次 DNA 損傷試験について、Table 4.18 に要約する。*In vitro* において哺乳類細胞をアクロレインで処理したところ、DNA 一本鎖切断の増加、また、一部の試験では DNA-タンパク質架橋の増加をもたらすことが示された。Grafström *et al.* は、明確な細胞毒性濃度のアクロレインに暴露させると、ヒト気管気管支上皮細胞で DNA 鎖間架橋が増加するという間接的証拠を見出した (Grafström *et al.*, 1988)。

アクロレイン処理により複数の DNA 付加体を生じることが示され、特に環状 1,N²-ヒドロキシプロパノデオキシグアノシンが多数の試験で同定された。同じ付加体が、シクロホスファミド (CP) で処理されたイヌリンパ球に認められた (Table 4.1.2.7-D 参照)。アクロレインに明確な変異原性反応を示すネズミチフス菌株 TA100 および TA104 では、DNA-アクロレイン付加体も同定されている (Foiles *et al.*, 1989, 世界保健機関 [WHO], 1992 に記載)。

ラット鼻粘膜ホモジネートとアクロレインとをインキュベーションしたところ、DNA-タンパク質架橋の濃度依存的な増加がもたらされた。一方、ラット鼻粘膜をアクロレイン蒸気 (2 ppm、6 時間) に暴露させても、アクロレインによる DNA-タンパク質架橋は誘発されなかった。ラットをアクロレイン (2 ppm) とホルムアルデヒド (6 ppm) の双方に 6 時間同時暴露させたところ、DNA-タンパク質架橋の収率は、ホルムアルデヒド (6 ppm、6 時間) 単独暴露時より有意に高かった (Lam *et al.*, 1985, Heck *et al.*, 1986)。

4.1.2.7.7 その他の試験

細胞形質転換

アクロレインは、C3H/10T1/2 細胞による 2 件の細胞形質転換試験において細胞形質転換能を示さなかった (Loveday *et al.*, Magna Corporation, 1982; Abernethy *et al.*, 1983)。Loveday *et al.* は 0.04~0.1 µg/mL、Abernethy *et al.* は濃度 6.3 µM (0.4 µg/mL) に細胞を暴露させた。後者の濃度 (すなわち 6.3 µM) は、用いた C3H/10T1/2 細胞の LC₅₀ 値を示したものである。アクロレインは腫瘍プロモーター存在下において、形質転換を開始させると考えられた (Abernethy *et al.*, 1983)。

病理生物学的影響 (Grafström *et al.*, 1988)

Grafström *et al.* (1988) は、培養ヒト気管支上皮細胞を用いて、アクロレインが細胞増殖、細胞膜の完全性、細胞分化、およびチオールの状態に影響を及ぼし、血清およびチオール非存在の条件下で DNA 損傷を生じ得るか検討した。

アクロレイン 3 μM でコロニー生存率は顕著に低下したが、膜透過性 (トリパンプルー染色液の取り込み率として測定) の増大には約 10 倍高い濃度が必要とされた。クローン増殖速度の低下、交差エンベロープ形成の用量依存的な増加、細胞表面積の増加により示されるとおり、アクロレインにより、マイクロモル単位の濃度でも上皮細胞は扁平上皮細胞に分化された。

アクロレインにより、全体および特定の低分子量遊離チオールとタンパク質のチオールが、細胞において顕著かつ用量依存的に枯渇した。アクロレイン暴露によりグルタチオンは酸化されず、チオールの枯渇は、還元型グルタチオンが直接アクロレインと結合し、活性酸素種を同時に産生せずに生じることが示された。さらに、アクロレインにより、ヒト気管支上皮細胞では DNA 一本鎖切断および DNA-タンパク質架橋が生じた (Table 4.18 参照)。これらの結果から、アクロレインにより、ヒト気管支上皮では多段階の発がんに関係する複数の細胞変性効果を生じることが示された (Grafström *et al.*, 1988)。

4.1.2.7.8 結論

提示されたデータは、指令 67/548/EC 付属書 VIIA 規定の基本要件に関しては許容可能である。アクロレインにより、複数の DNA 付加体を生じることが示され、特に環状 1,N²-ヒドロキシ-プロパノデオキシグアノシンが多数の試験で同定された。

アクロレインは細菌の変異原であり、遺伝子変異および姉妹染色分体交換を誘発し得るが、哺乳類細胞を用いた *in vitro* 試験では染色体異常はみられない。アクロレインはこれらの試験系で高毒性を示し、変異原性/遺伝毒性用量が細胞毒性用量に近似または重複するため、細菌および哺乳類細胞を用いた *in vitro* 試験におけるアクロレインの変異原性および遺伝毒性は、狭い用量範囲に限定される。

アクロレインは、真菌の DNA 損傷および変異を誘発しなかった。アクロレインは、ショウジョウバエの SMART では遺伝毒性と考えられたが、SCLT では遺伝毒性活性を示さなかった一方、ショウジョウバエの SLRLT では曖昧な結果が報告された。アクロレインはマウスの優性致死変異を誘発せず、ラット骨髄細胞の染色体異常を誘発しなかった。

Table 4.15 Gene mutation assays with bacteria

Indicator cells	Experimental	Result	Remarks	References
S. typhimurium TA104 TA102	-liquid preincubation -0 - 1.8 μ moles/plate -with and without glutathione -no S9mix	+ (TA104)	Addition of glutathione reduced toxicity, but not mutagenicity. T: > 0.9 (-GSH); > 1.8 μ mol/pl (+GSH)	Marnett et al., 1985
S. typhimurium TA100	-liquid suspension -0, 10, 15 μ g/2 ml incubation volume -no S9mix	+ (TA100)	T: no data	Waegemaekers and Bensink, 1984
S. typhimurium TA1535	-microtiter fluctuation test -0 - 62.5 nmoles/25 ml incubate -no S9mix	-	T: \geq 250 nmoles/25 ml	Pool et al., 1988
S. typhimurium TA1535, 98, 100	-plate incorporation assay -0.005 - 1 μ mol/plate -with and without S9mix	-	T: no data	Loquet et al., 1981
S. typhimurium TA98, 100	-plate incorporation assay -with and without S9mix	+ (TA98, TA100, without S9mix)	T: no data	Khudoley et al., 1987 Khudoley et al., 1986
S. typhimurium TA1535, 1537, 98, 100	-preincubation assay - 0.03- 100 μ g/plate -with and without S9mix	+ (TA100 with S9mix)	Increase in revertants at concentrations of 33, 40, 50 μ g/pl. T: 100 μ g/pl seen as decline in revertant colonies	Haworth et al., 1983
S. typhimurium TA100	-preincubation assay - 0 - 0.15 μ mol/2 ml -with and without S9mix	+ (TA100 without S9mix)	Mutagenic at low concentrations. At higher concentrations bacteriotoxicity interfered with mutagenicity testing	Lutz et al., 1982 Lutz et al., 1980
S. typhimurium hisD3052	-plate incorporation and preincubation assays - with and without S9mix	-	T: no data	Basu and Marnett, 1984
S. typhimurium TA1535, 1537, 1538, 98, 100	-plate incorporation - 0.001 - 0.1 μ l/plate -with and without S9mix	+ (TA98 without S9mix)	Dose-related increase in revertants in a very narrow dose range. Due to toxicity decrease in revertants at concentrations \geq 0.04 μ l/pl	Lijinski and Andrews, 1980
S. typhimurium TA100, 104	-preincubation assay with glutathione chase - 0 - 13 mM - without S9mix	+ (TA100 > TA104)	Increase in revertants in the range 1 - 10 mM. Drop in revertants at 13 mM and higher, due to toxicity.	Foiles et al., 1989

Table 4.15 continued overleaf

Table 4.15 continued

Indicator cells	Experimental	Result	Remarks	References
S. typhimurium TA102	- plate incorporation assay - 0 - 5000 µg/plate -with and without S9mix	-	T: no data	Jung et al., 1992
S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA102, TA104 E.Coli WP2 uvrA	-preincubation assay - dose levels: 0.3-75 µg/plate	+ (TA100 with and without S9 mix) + (TA98 with and without S9 mix) + (E.Coli with S9 mix)	Cytotoxicity was evident at doses \geq 33 µg/plate (-S9) and \geq 67 µg/plate (+S9). Evidence of mutagenicity was obtained at non-toxic dose levels in TA98 (weakly positive), TA100 (clearly positive), and E.Coli (marginally positive)	Parent et al, 1996
E. coli K12/343/113	-preincubation assay - 0 - 1 mM - without S9mix	-	T: at concentrations \geq 0.5 mM	Ellenberger and Mohn, 1977

+ = Positive

- = Negative

T = Bacteriotoxic

Table 4.16 Gene mutations assays with mammalian cells *in vitro*

Indicator cells	Experimental	Results	Remarks	References
Mc, V79 cells HGPRT test gene mutations	0, 0.02 - 2.0 µM without S9mix +/- FBS	+ (-S9, -FBS)	With FBS acrolein induced mutagenicity declined, but not toxicity. Survival amounted to 91%, 82%, 78% and 66% at 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 µM acrolein, respectively. At 1.0 µM, the lowest mutagenic concentration, the survival was 78% of the controls.	Smith 1990, 1989
Mc, CHO cells HGPRT test gene mutations	0.2 - 8 nI/ml with and without S9mix	-	Medium used was serum enriched Survival seriously affected at high acrolein concentrations.	Parent 1991
Mc, Human cells 1. XP fibroblasts (XPF) 2. Normal fibroblasts (NF) forward gene mutations	1. 0.2 - 0.6 µM 2. 0.8 - 2.0 µM Without S9mix	1. XPF: + (-S9) 2. NF: -	Medium used was serum free to prevent inactivation of acrolein. NF did not show an increase in mutants over a range of acrolein concentrations which caused a reduction in survival comparable to that seen with XPF. Above 0.6 µM cytotoxicity for XPF interfered with reliable mutagenicity screening.	Curren et al., 1988
Mc, CHO cells gene mutations	0.000002 - 0.0003 % with and without S9mix	*	report not available	EPA 1991
Mc, CHO cells HGPRT test gene mutations	-S9mix: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 µg/ml, 16 hrs. +S9mix: 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3 µg/ml, 4 hrs	*	+S9mix: highest dose 60% survival. Mutation frequencies in duplicate plates too variable for reliable assessment of potential genotoxicity of acrolein	Loveday and Gorodecki, Magna Corporation 1982

FBS = Fetal bovine serum

+ = Positive

- = Negative

* = Test/report not suitable for assessment of mutagenic/genotoxic activity

Table 4.17 Cytogenetic assays with mammalian cell *in vitro*

Indicator cells	Experimental	Results	Remarks	References
chromosome aberrations				
Mc, CHO cells,	0, 10, 40, 100 μ M with and without S9mix	*	MI (-S9): < 1 per 2000 cells MI (+ S9): amounts to 3.57, 0.64, 0.40, and 0% in control, 10, 40, and 100 μ M group, respectively	Au et al., 1980
Mc, CHO cells,	0.1 - 1.0 μ g/ml with and without S9mix	-		Galloway et al., 1987
Human lymphocytes,	0, 0.001 - 40 μ M with and without S9mix	-	T: \geq 20 μ M (decrease in mitotic activity)	Wilmer, 1985, 1986
Mc, CHO cells	0.1 - 2.0 μ g/ml (-S9, exposure 6 hrs) 0.4 - 2.0 μ g/ml (+S9, exposure 2 hrs)	*	T: \geq 2 (-S9), \geq 1.5 μ g/ml (+S9). Duration of exposure rather low. Number of cells analysed too low. Acrolein was reported to be negative.	Gorodecki and Seixas, Magna Corporation 1982
SCE				
Mc, CHOcells	0.000002 - 0.0003 % with and without S9mix	*	Report not available	EPA 1991
Mc, CHO cells	0.1 - 1.0 μ g/ml with and without S9mix	+ W (-S9)	Small increase in SCE at 1 μ g/ml	Galloway et al., 1987
Mc, CHO cells	0, 5, 10, 20, 40 μ M with and without S9mix	+ (-S9)	Acrolein induced a dose-dependent increase of SCE/metaphase at 5, 10, and 20 μ M. At 40 μ M cytotoxicity interfered with screening of SCEs.	Au et al., 1980
Human lymphocytes	0, 0.001 - 40 μ M without S9mix	+ (-S9)	Acrolein induced up to 1.6-fold increase in SCE above baseline but was not clastogenic. MESNA protected against SCE induction and cytotoxicity. T: \geq 20 μ M (decrease in mitotic activity)	Wilmer, 1985, 1986
Mc, CHO cells	without S9mix: 0.3, 0.5, 0.75 μ g/ml with S9mix: 0.1, 0.3, 0.5 μ g/ml	-	T: \geq 0.5 μ g/ml (with S9mix) T: \geq 0.75 μ g/ml (without S9mix)	Loveday, Magna Corporation, 1982

+ = positive

+ W = weak activity

- = negative

* = report/test not suitable for assessment of mutagenic/genotoxic activity

MI = mitotic index

FBS = fetal bovine serum

MESNA = 2-mercaptoethanesulfonic acid, sodium salt

T = toxic for indicator cells

Table 4.18 Primary DNA-damage in mammalian cells *in vitro*

Indicator cells	Experimental	Results	Remarks	References
Mouse L1210 leukemia cells	20 μ M without S9mix	DSS \uparrow DPCL = DICL =		Ericson et al., 1980
K 562 human leukemia cells	0 - 20 μ M without S9mix	DSS \uparrow	Cytotoxicity > 5 μ M	Crook et al., 1986
CHO cells 1. DNA adducts 2. Gene mutations (HGPRT/CHO)	0.1 - 1 mM 1. DNA adducts 2. Gene mutation	1. cyclic deoxyguanosine adducts \uparrow 2. Gene mutations *	Toxicity interfered with measurement of gene mutations	Foiles et al., 1990
Human skin and bronchial fibroblasts DNA alkylation 32 P-postlabelling		DNA adducts \uparrow	Several DNA adducts observed a.o. cyclic 1, N ² -hydroxypropanodeoxyguanosine. The same adduct was found in lymphocytes of a dog treated with CP	Wei et al., 1992 Wilson et al., 1991
Human tracheobronchial epithelial cells Alkaline elution assay according to Kohn	Cells were exposed to concentrations of 0, 30, 100 or 300 μ M acrolein for 1 h in thiol-free growth medium	DSS \uparrow DPCL \uparrow DICL \uparrow (indirect evidence)	Next to DNA damage, growth, membrane integrity, differentiation, and thiol status were studied at serum and thiol-free conditions	Grafström et al., 1988
Human Burkitt's lymphoma cells (EBV-transformed)	Cells were exposed to concentrations of 0, 30, 50 or 750 μ M acrolein for 4 h in thiol-free growth medium	DPCL \uparrow at exposure concentrations \geq 0.15 mM	Significant increases in DPLC were only observed at doses that resulted in complete cell death within 4 d following dosing.	Costa et al., 1997
Rat, homogenate of nasal mucosa	Homogenates were exposed to concentrations of 0, 0.3, 3 or 30 mM acrolein for 10 min at 0°C	concentration dependent increase in the percentage of interfacial DNA, pointing to DPCL \uparrow		Lam et al., 1985

DICL = DNA interstrand cross-links

DPCL = DNA protein cross-links

DSS = DNA single-strand breaks

\uparrow = Increase

= : No increase

* = Report/test not suitable for assessment of mutagenic/genotoxic activity

4.1.2.8 がん原性

4.1.2.8.1 動物における試験

吸入試験

吸入暴露を用いた長期の実験 2 件 (1 件はラット、もう 1 件はハムスター) が得られた。ただし、アクロレイン蒸気のがん原性評価のため具体的にデザインされた、適切な期間の吸入試験は実施されていない。

アクロレイン（状態の報告なし） 18.3 mg/m^3 （8 ppm）に10または18ヵ月間（1時間/日、5日/週）暴露させたラット（20匹/群）の肺には、投与関連の腫瘍および化生は認められなかった（Le Bouffant *et al.*, 1980）。

備考

限定的な実験デザインのため、アクロレインのがん原性評価に適した試験ではない。

シリアンゴールデンハムスターにアクロレイン蒸気 9.3 mg/m^3 （4 ppm）を52週間（7時間/日、5日/週）暴露させたところ、鼻の嗅上皮に炎症性変化および化生を示した（Feron and Kruyssen, 1977, 調和電子データセット [HEDSET] 5.4 項 24 および 5.7 項 3）。29週間の休薬期間後、ほとんどのハムスターで影響を受けた粘膜が部分的に回復した。アクロレイン蒸気に暴露後、アクロレイン投与とは無関係の偶発所見とみなされる、小さな気管乳頭腫を生じた雌1匹を除き、気道の腫瘍は認められなかった。鼻腫瘍およびそれ以外の部位における投与関連の腫瘍はみられなかった。同試験では、アクロレインがベンゾ[a]ピレンや *N*-ニトロソ-ジエチルアミンにがん原性亢進（共発がん）作用を有するという決定的証拠は認められなかった（Feron and Kruyssen, 1977）。暴露期間と実験期間はそれぞれ52週間、81週間と比較的短期で、ハムスターの寿命の3分の2に及ばなかったことに留意されたい⁷。

結論

いずれの吸入試験も化学物質のがん原性試験の通常の要件を満たさなかったことから、この試験結果からは、吸入暴露によるアクロレインのがん原性に関して明確な結論を下せない。Feron and Kruyssen の試験におけるアクロレインの共発がん性なしとの結論は、**4.1.2.11 「複合暴露に関する影響」**の項に記載されている。

経口試験

Fischer 344 ラットに、アクロレイン濃度 100 mg/L （5日/週、124週間）、 250 mg/L （5日/週、124週間）、または 625 mg/L （5日/週、104週間）を飲水投与した。ラットの数は、高用量群および非投与対照群では20匹/性/群、低用量および中用量群では雄20匹とした。生存ラットは123～132週間後に屠殺し、主要な臓器および組織について組織学的検査を行った。高用量群の雌では副腎皮質腺腫の発生率がわずかに高く、高用量群の雌の発生率は20匹中5匹、非投与対照群の雌は20匹中1匹に達することが認められた。それ以外に、投与関連の腫瘍性病変の発生率上昇に関する記載はなかった。同試験では、（副腎皮質腺腫を含む）いずれの腫瘍の発生率上昇も、アクロレインへの変換が考えられる化合物であるアクロレインオキシム、アクロレインジエチルアセタール、およびアリルアルコールにより誘発されなかった（Lijinsky and Reuber, 1987, Lijinsky, 1988）。この最終結果に対し病理学ワーキンググループが特別に組織され、本試験結果について再評価した。ワーキンググループは、投与後の雌に認められた副腎皮質腺腫（すなわち褐色細胞腫）のわずかな発生率上昇は、背景対照群の十分な限度内で生物学的意義なしと結論付けた。さらに、Lijinski/Reuber の試験では、アクロレインが雌ラットの副腎に及ぼすがん原性の証拠はないと結論付けられた（Parent *et al.*, 1992 参照）。

Sprague-Dawley ラットにアクロレイン（蒸留アクロレイン、0.25%ヒドロキノンにより安定化） 1 kg 体重当たり 0.05 、 0.5 、または 2.5 mg/kg を1日1回102週間強制経口投与した（Table 4.14 参照）。本試験を OECD 453 「慢性毒性／がん原性併合試験」に従って実施した。動物数は70匹/性/群とした。中間屠殺を13週間後（高用量群：5匹/性）、1年後（10匹/性/群）に行った。検査では1日1回観察し、3、6、12、18、24ヵ月後に各種臨床、血液学的、尿パラメータについて測定した。

⁷OECD 451 「がん原性試験」によれば、がん原性試験の期間は、用いられる動物の通常の寿命の大部分を包含する必要がある。一般にハムスターの場合、試験終了は18～24ヵ月の時点とすべきである。

備考：これに関連して、「試験期間」とは、投与を行った暴露期間とし、暴露期間+付加的な観察期間とはしない。

すべてのラットを剖検し、臓器重量の記録、組織の広範な顕微鏡検査を実施した。雄ラットは最初の1年間に用量依存的な生存率低下を示し、高用量群で統計的に有意、中用量群でわずかに有意であったが、この傾向は試験終了まで続かなかった。一方、雌ラットの最初の1年間に生じた用量依存的な生存率低下は試験終了まで続き、高用量群の生存率低下は統計的に有意、中用量群ではわずかに有意であった。クレアチニンホスホキナーゼ値が、ほぼすべての期間ですべての用量群において低下したが、統計的有意差は時に認められるのみであった（データ/数値の提示なし!）。腫瘍性病変、非腫瘍性病変など、それ以外の投与関連の影響は認められなかった（Parent, R.A. *et al.*, 1992a）。

CD-1 マウスにアクロレイン（蒸留アクロレイン、0.25%ヒドロキノンにより安定化）1 kg 体重当たり投与量 0.5、2.0、または 4.5 mg/kg を 1 日 1 回 18 ヶ月間強制経口投与した（Table 4.14 参照）。本試験を OECD 451 「がん原性試験」に従って実施した。動物数は 70 匹/性/群、高用量群は 75 匹/性とした。臨床観察を最初の 4 週間 1 日 1 回、以降週 1 回実施し、血液塗抹標本を 12 および 18 ヶ月後に採取した。マウスを剖検し、組織の広範な顕微鏡検査を実施した。所見として、雄では 4.5 mg/kg で統計的に有意な生存率低下および体重増加の抑制がみられ、雌では 2.0 および 4.5 mg/kg で体重増加の抑制（統計的有意差なし）が認められた。それ以外の投与関連の影響（腫瘍性病変、非腫瘍性病変など）は認められなかった。

要約すると、アクロレインの経口投与（強制経口投与、飲水投与）によりラットおよびマウスのがん原性は誘発されなかった（Lijinski, 1988; Lijinski and Reuber, 1987; Parent *et al.*, 1991, 1992a）。

結論

これらの結果から、アクロレインは経口発がん物質でないと結論付けることができる。

経皮試験

アクロレインの経皮がん原性を評価可能な経皮試験および皮下試験はない。Salaman and Roe はマウス背部にアクロレインを週 1 回、10 週間塗布する試験を行ったが、アクロレインのがん原性評価には暴露期間がきわめて短く、1 群当たりの動物数もきわめて少なかった（Salaman and Roe, 1956, 米国毒性物質疾病登録機関 [US ATSDR] , 1990 に引用）。

4.1.2.8.2 ヒトにおけるデータ

がん原性については、ヒトにおけるデータが得られていない。

4.1.2.8.3 がん原性に関する結論

アクロレインは、経口発がん物質でないことが証明されている。入手可能なデータでは、吸入暴露によるがん原性に関する結論は下せない。アクロレインのがん原性を評価可能な経皮試験は得られなかった。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 動物におけるデータ

In vitro 試験

ラット胚培養細胞 (Hales and Slott, 1987; Mirkes *et al.*, 1981, 1984; Schmid *et al.*, 1981; Slott and Hales, 1987a,b)、マウスの着床前胚 (Spielmann and Jacob-Müller, 1981) もしくは肢芽培養細胞 (Ghaida and Merker, 1992; Hales, 1989; Stahlmann *et al.*, 1985)、または鶏卵 (Chibber and Gilani, 1986; Kankaanpää *et al.*, 1979; Korhonen, 1983) を用いた多数の *in vitro* 試験により、アクロレインは発育遅延や胚・胎児死亡および奇形を生じ得ることが示された。

In vivo 試験

吸入試験

吸入試験 (Bouley *et al.*, 1975, 1976) は 1 件のみ得られている。本試験では、ラット雄 3 匹および雌 21 匹からなる群をアクロレイン (状態の報告なし) 0 または 1.26 mg/m^3 (0.55 ppm) に 26 日間継続暴露させ、暴露期間 4 日目に交配可能とした。妊娠率、胎児の数および体重に関しては、対照群と処理群に有意差を認めなかった。本試験の暴露期間は全精子形成期間を網羅せず、交配前暴露は 4 日間のみで、検討されたパラメータ数のごく限定的であったことに加え、試験デザインおよび試験結果に関する詳細が提示されなかったことから、本試験はアクロレインの生殖特性の評価に適切とはみなされない。

経口試験

入手可能な経口試験は 2 件公表されており、1 件は 2 世代生殖試験、もう 1 件は催奇形性試験で、いずれも Parent *et al.* (1992c, 1993) により行われている。これらの試験に加え、他に US ATSDR (1990) に引用されている未公表の経口投与生殖試験 3 件として、経口投与 2 世代生殖試験 1 件 (King, 1984) と、ウサギ試験 1 件 (Hoberman, 1987) およびラット試験 1 件 (King, 1982) による催奇形性試験 2 件が挙げられる。

雄雌ラット経口投与 2 世代生殖試験で認められた影響は、最高用量 7.2 mg/kg 体重/日における F0 世代の体重増加の抑制、および 5.4 mg/kg 体重/日以上における胃潰瘍のみであった (King, 1984, US ATSDR, 1990 に引用)。本試験から、発生毒性の NOAEL は 7.2 mg/kg 体重/日 (検討された最高用量)、親動物毒性の NOAEL は 4 mg/kg 体重/日と確立される。

適切に実施されたラット強制経口投与 2 世代試験では、雄雌にアクロレイン 0、1、3、または 6 mg/kg 体重を 1 日 1 回胃ゾンデにより投与した。高投与量 (6 mg/kg 体重/日) における F1 世代児の体重減少を除くと、雄雌の受胎能力などの生殖パラメータは、アクロレイン投与による影響を受けなかった。死亡率、臨床徴候、体重増加の抑制、胃の組織病理学的変化 (腺胃びらん、前胃の過形成/過角化) の増大として認められる親動物に対する毒性が、中用量群および高用量群に生じた (Parent *et al.*, 1992c)。本試験から、発生毒性の NOAEL は 3 mg/kg 体重/日、親動物毒性の NOAEL は 1 mg/kg 体重/日と確立される。

ラット (強制) 経口投与催奇形性試験では、投与量 10 mg/kg 体重/日において、骨格異常および骨化遅延の発生率上昇、平均胎児体重および同腹児総体重の減少が認められた。着床数および吸収数、同腹児当たりの生存/死亡胎児の割合は 10 mg 群では影響を受けなかった。ただし、本投与量は母動物毒性を示し、 10 mg 群の雌 40 匹中 14 匹が死亡した。 6 mg/kg 体重/日群に認められた影響は母動物の体重増加の抑制のみであり、発生に関する影響はなかった (King, 1982, US ATSDR, 1990 に引用)。本試験から、発生毒性の NOAEL は 6 mg/kg 体重/日、母動物毒性の NOAEL は 3.6 mg/kg 体重/日と確立される。

ウサギを妊娠中 2 mg/kg 体重/日以下に暴露させた催奇形性試験では、胚・胎児死亡に関する影響は受けなかった。一方、最終的な催奇形性試験に先立つ予備的な用量設定試験では、1 mg/kg 体重/日以上に暴露により、用量依存的な胎児吸収の発生率上昇をもたらした。この矛盾に関する説明は示されなかった。0.5 mg/kg 体重/日では、発生に関する影響は認められなかった。母動物では、0.5 mg/kg 体重/日において体重増加の抑制、4 mg/kg において死亡率上昇と胃潰瘍増加が認められた (Hoberman, 1987, US ATSDR, 1990 に引用)。用量設定試験と主試験の結果との間に未説明の矛盾があることを考慮すれば、本試験は、母動物および発生に関する NOAEL の評価には適していないと結論付けられる。

Parent *et al.* (1993) は、妊娠雌ウサギにアクロレイン 0.1、0.75、または 2.0 mg/kg 体重/日を妊娠 7 日目から 19 日目まで胃ゾンデにより経口投与した。2 mg 群では、母動物毒性を示す摂餌量減少を伴う母動物の体重増加の一過性抑制が、7 日目から 10 日目までの間認められた。この日以降、2 mg 群の摂餌量は増加し、体重がそれ以外の群を上回った。さらに、高用量群は平均胎児体重の増加を示したことから、このことは、本試験における有害作用とはみなされない ($P \leq 0.01$)。アクロレインにより、発生に関する不可逆的な影響は誘発されなかった。本試験から、発生に関する影響の NOAEL は 2 mg/kg 体重/日以上、母動物毒性の NOAEL は 0.75 mg/kg 体重/日と確立される。

経皮試験

データは得られていない。

その他の試験

妊娠ウサギに 3、4.5、6 mg/kg 体重/日を妊娠 9 日目に単回静脈内投与したところ、中用量群および高用量群に母動物毒性（死亡）が認められた。高用量群では、胚・胎児毒性（統計的に有意な吸収率上昇）も認められた (Claussen *et al.*, 1980)。

ラットおよびウサギにアクロレインを羊膜内注射したところ、胚・胎児毒性および催奇形性が誘発された (Claussen *et al.*, 1980; Hales, 1982; Slott and Hales, 1985)。

4.1.2.9.2 ヒトにおけるデータ

生殖毒性については、ヒトにおけるデータが得られていない。

4.1.2.9.3 生殖毒性に関する結論

提示されたデータは、指令 67/548/EC 付属書 VIIA 規定の基本要件に関しては許容可能である。

多数の *in vitro* 試験により、アクロレインは発育遅延や胚・胎児死亡および奇形を生じ得ることが示された。哺乳類を用いた *in vivo* 試験では、発生に関する影響は母動物毒性ももたらず投与量にのみ認められた。ウサギ経口投与催奇形性試験の全体的な NOAEL をみると、発生に関する影響は 2 mg/kg 体重以上、母動物に関する影響は 0.75 mg/kg 体重/日であった。ラット経口投与 2 世代試験では、6 mg/kg 体重における F1 児の軽度の体重減少を除き、生殖パラメータに関する影響は認められなかった。親動物および発生に関する影響の全体的な NOAEL は、それぞれ 1 および 3 mg/kg 体重/日であった。

4.1.2.10 免疫系に及ぼす影響

アクロレインが免疫系に及ぼす影響は、*in vivo* および *in vitro* 試験系において検討された。免疫あるいは宿主防御機構の評価を主要目的とした、多数の反復投与吸入毒性試験について **Table 4.13** に要約する。以下、複数の急性 *in vivo* 試験およびいくつかの *in vitro* データについて要約する。

マウス試験 (Astry and Jakab, 1983; Kawabata and White, 1977) およびラット試験 (Carl *et al.*, 1939) では、アクロレイン吸入暴露による肺の抗菌防御障害の誘発が認められた。マウスを 3 または 6 ppm に 8 時間吸入暴露させたところ、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染に対し、肺の用量依存的な抗菌防御障害が誘発された (Astry and Jakab, 1983)。より高濃度では感覚刺激性が増大したが、付加的な抗菌耐性障害は生じなかった。

複数の *in vitro* 試験において、肺マクロファージの殺菌活性の抑制が認められた。アクロレインはシクロホスファミドの代謝物であるため、*in vitro* 試験を実施し、シクロホスファミドの抗腫瘍活性がアクロレインの免疫反応亢進により左右されるのか否か検討した。その結果から、免疫反応はアクロレインにより亢進されることが示唆される。

4.1.2.11 複合暴露に関する影響

4.1.2.11.1 各種アルデヒドの複合暴露

アルデヒド混合物 (ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アクロレイン、あるいはクロトンアルデヒド) 暴露の影響は、細胞毒性、鼻毒性、感覚刺激性に重点を置いた *in vitro* 試験および短期吸入試験において検討されている。

In vitro 試験

ヒトおよびラット鼻上皮細胞を用いた *in vitro* 試験の結果が示すとおり、ホルムアルデヒド、アクロレイン、クロトンアルデヒド混合物に暴露させると、細胞毒性 (単一化合物の濃度-効果関係からの用量付加により予測可能) を生じる (Cassee, 1995C)。

短期吸入試験

ラット鼻粘膜をアクロレイン (2 ppm、6 時間) に暴露させても、DNA-タンパク質架橋は生じなかったが、ラットをアクロレイン (2 ppm) とホルムアルデヒド (6 ppm) の双方に 6 時間同時暴露させると、DNA-タンパク質架橋の収率は、ホルムアルデヒド (6 ppm、6 時間) 単独暴露時より有意に高かった (Lam *et al.*, 1985, Heck *et al.*, 1986)。さらに、ホルムアルデヒドとアクロレインを比較的高濃度で共暴露させると、アクロレインによる鼻粘膜のグルタチオン枯渇に起因する相乗作用を生じるという一部の証拠も認められた (Lam *et al.*, 1985)。

In vivo において鼻上皮に及ぼす相加作用または相互作用の可能性を検討するため、Cassee *et al.* は、雄 Wistar ラットを用いホルムアルデヒド (1, 3.2, 6.4 ppm)、アセトアルデヒド (750, 1500 ppm)、アクロレイン (0.25, 0.67, 1.40 ppm)、またはこれらのアルデヒド混合物に、明確な無毒から有毒まで様々な濃度に暴露させる 1 日および 3 日間の吸入試験 (6 時間/日) を実施した。検討されたパラメータは、鼻の呼吸上皮および嗅上皮の組織病理学的変化および生化学的变化などとした。さらに、鼻上皮の細胞増殖について、プロモデオキシウリジンの取り込みおよび増殖細胞核抗原の発現により測定した。その結果から、検討された各種アルデヒドの作用機序は類似していても、個々のアルデヒドは細胞毒性の明確な領域差を呈することが示された。また、アルデヒド混合物について得られた結果から、無毒性量の場合、同じ標的器官 (鼻) にこれらのアルデヒドを複合暴露させると、同じ種類の有害作用 (鼻刺激性/鼻に関する細胞毒性) を及ぼすが、一部で標的部位は異なる (鼻粘膜の様々な領域である) 結果を示し、複合暴露は、個々の化学物質暴露に伴う有害性より強い有害性を伴わないことが示唆された (Cassee *et al.*, 1996a)。

ホルムアルデヒドとアクロレインは、上気道の三叉神経受容体に対する競合的作用物質であることを示している (Kane and Alarie, 1978; Babiuk *et al.*, 1985)。雄ラットの鼻のみの暴露装置を用いて、呼吸数減少 (DBF) により測定されるホルムアルデヒド、アクロレイン、アセトアルデヒドの感覚刺激性について検討した。3種類のアルデヒドすべてが、Alarieにより定義された感覚刺激物質として作用した。

アクロレイン、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの RD_{50} 値は、それぞれ 9.2、10.0、3046 ppm であった。ホルムアルデヒドおよびアクロレインでは脱感作が生じたが、アセトアルデヒドでは、暴露時間の延長 (最大 30 分) により呼吸数が漸減した。アルデヒド混合物では脱感作が認められず、それどころか、暴露から最後の 15 分で呼吸数がさらに減少した。これらの結果から、刺激物質であるアルデヒド混合物に暴露させたラットでは、感覚刺激性が単独のアルデヒドごとに生じる場合より顕著で、これらのアルデヒドの複合作用は、基本的に共通の受容体 (三叉神経) の競合結果であると結論付けられた (Casseo *et al.*, 1996b)。

4.1.2.11.2 アクロレインおよびカーボンブラックの共暴露

マウスにカーボンブラック (10 mg/m^3) およびアクロレイン (5.8 mg/m^3 、状態の報告なし) を含有する大気に 4 日間 (4 時間/日) 吸入により共暴露させたところ、肺防御機構を障害することが、肺防御系機能を完全に果たす典型例である一連の感染病原体に対する耐性の低下により明らかにされた。カーボンブラック単独暴露とアクロレイン単独暴露のいずれの場合も、これらの病原体に対する肺防御に影響は認められなかった。生物学的影響を亢進するこうした機序について、カーボンブラック粒子はアクロレインを肺深部に導く輸送機構として作用し得るとの仮説が立てられた (Jakab, 1993)。

4.1.2.11.3 共発がん性

ハムスターにアクロレイン蒸気 9.3 mg/m^3 (4 ppm) を 52 週間 (7 時間/日、5 日/週) 暴露させても、ベンゾ[a]ピレンおよび *N*-ニトロソ-ジエチルアミンのがん原性には影響を及ぼさなかった (Feron and Krusysse, 1977)。