

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの rasH2 マウスを用いた
強制経口投与による中期がん原性試験報告書

試験番号：0900, 0901

CAS No. 140 - 66 - 9

2019年3月5日

独立行政法人 労働者健康安全機構
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
GLP 対応	i
拡散防止措置及び動物福祉	i
厚生労働省担当課	ii
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	iii
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
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A 1～A 36、B 1～B 36	
FIGURES	A 1～A 6、B 1～B 6	
PHOTOGRAPHS	1～12	
APPENDICES	1-1～6	

標題

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの rasH2 マウスを用いた強制経口投与による中期がん原性試験

試験目的

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) に 26 週間強制経口投与し、そのがん原性を検索した。

試験法

本試験は「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」(平成 28 年度第 3 回発がん性評価ワーキンググループ: 2017 年 3 月 1 日厚生労働省) に準拠して実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づく試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP)」(昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正 平成 28 年 4 月 18 日厚生労働省告示第 208 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) を参考にして実施した。

拡散防止措置及び動物福祉

本試験は、「日本バイオアッセイ研究センターにおける遺伝子組換え生物使用実験安全管理規程」(平成 26 年 9 月 3 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日) 及び「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、最終改正平成 27 年 2 月 20 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」(平成 24 年 4 月 25 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日) を遵守した。

また、本試験は、日本バイオアッセイ研究センターの遺伝子組換え生物使用実験安全委員会 (承認番号 2017-04) 及び日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査された (承認番号 0183) 。

厚生労働省担当課

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験施設及び運営管理者

独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター
所長 菅野 純
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

本試験は、動物導入日より雄を試験番号 0900、雌を試験番号 0901 として実施した。

試験開始日	2017年 9月 8日
動物導入日	2017年 9月 15日
群分け日	2017年 9月 25日 (0900) 2017年 9月 27日 (0901)
被験物質投与開始日	2017年 9月 26日 (0900) 2017年 9月 28日 (0901)
被験物質投与終了日	2018年 3月 26日、27日 (0900) 2018年 3月 28日、29日 (0901)
定期解剖日	2018年 3月 27日、28日 (0900) 2018年 3月 29日、30日 (0901)
試験終了日	2019年 3月 5日

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの rasH2 マウスを用いた
強制経口投与による中期がん原性試験報告書

試験番号 : 0900, 0901

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	4
I-1 被験物質及び調製媒体	4
I-1-1 被験物質の名称等	4
I-1-2 被験物質の構造式及び分子量	4
I-1-3 被験物質の物理化学的性状等	4
I-1-4 被験物質の使用ロット等	4
I-1-5 被験物質の製造量等	5
I-1-6 被験物質の主な用途	5
I-1-7 許容濃度等	5
I-1-8 被験物質の調製媒体	5
I-1-9 被験物質の同一性・安定性	5
(1) 同一性	5
(2) 安定性	5
I-2 陽性対照物質及び調製媒体	6
I-2-1 陽性対照物質の名称等	6
I-2-2 陽性対照物質の構造式及び分子量	6
I-2-3 陽性対照物質の物理化学的性状等	6
I-2-4 陽性対照物質の使用ロット等	6
I-2-5 陽性対照物質の調製媒体	6
I-2-6 陽性対照物質の同一性・安定性	7
(1) 同一性	7
(2) 安定性	7
I-3 試験動物	7
II 試験方法	8
II-1 投与	8
II-1-1 投与経路	8
II-1-2 投与方法及び投与期間	8
II-1-3 投与用量	8
II-1-4 投与方法、投与期間及び投与用量の設定理由	8

II-1-5	被験物質及び陽性対照物質投与液の調製	10
II-1-6	被験物質及び陽性対照物質調製液の濃度及び均一性確認	10
II-1-7	被験物質及び陽性対照物質調製液の濃度安定性確認	10
II-2	動物管理	11
II-2-1	各群の使用動物数	11
II-2-2	群分け及び個体識別方法	11
II-2-3	飼育条件	11
(1)	飼育環境	11
(2)	飼料	12
(3)	飲水	12
II-3	観察・検査項目及び方法	12
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	12
II-3-2	体重測定	12
II-3-3	摂餌量測定	12
II-3-4	尿検査	13
II-3-5	血液学的検査	13
II-3-6	血液生化学的検査	13
II-3-7	病理学的検査	13
(1)	肉眼的観察	13
(2)	臓器重量	13
(3)	病理組織学的検査	14
II-4	数値処理と統計方法	14
II-4-1	数値の取り扱いと表示	14
II-4-2	統計処理	14
III	試験成績-1 (被験物質投与群)	16
III-1	生死状況	16
III-2	一般状態	16
III-3	体重	16
III-4	摂餌量	17
III-5	尿検査	17
III-6	血液学的検査	17
III-7	血液生化学的検査	17
III-8	病理学的検査	18
III-8-1	肉眼的観察	18

III-8-2	臓器重量	18
III-8-3	病理組織学的検査	19
III-8-4	死因	20
IV	試験成績-2 (陽性対照物質投与群)	21
IV-1	生死状況	21
IV-2	一般状態	21
IV-3	体重	21
IV-4	摂餌量	21
IV-5	尿検査	22
IV-6	血液学的検査	22
IV-7	血液生化学的検査	22
IV-8	病理学的検査	23
IV-8-1	肉眼的観察	23
IV-8-2	臓器重量	23
IV-8-3	病理組織学的検査	23
IV-8-4	死因	25
V	考察及びまとめ	26
V-1	生存率、一般状態、体重、摂餌量	26
V-2	腫瘍性及び腫瘍関連病変	26
V-3	その他の影響	27
V-4	陽性対照物質投与群 (<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methylurea: MNU) の評価	28
VI	結論	29
VII	文献	30
VIII	予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 及び試験計画書に従わなかつたこと	32

要約

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールのがん原性を検索する目的で、遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) を用いた強制経口投与による 26 週間の試験を実施した。

本試験は、媒体対照群、被験物質投与群 3 群及び陽性対照群 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea) の計 5 群の構成で、媒体対照群と被験物質投与群は雌雄とも各 25 匹/群、陽性対照群は 15 匹/群 (計 230 匹) とした。被験物質は毎日 1 回の強制経口投与 (26 週間)、陽性対照物質は単回腹腔内投与とした。投与用量は、雌雄とも、0 (オリブ油)、50、100 及び 200 mg/kg BW とし、陽性対照物質は、雌雄とも 75 mg/kg BW とした。観察、検査として、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、解剖時の肉眼的観察、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

被験物質投与の結果、生存率は、雌雄とも媒体対照群と比較して差を認めなかった。一般状態では、雌雄とも被験物質投与の影響と考えられる異常所見は認められず、体重及び摂餌量も投与期間を通して媒体対照群との間に顕著な差は認めなかった。

腫瘍の発生は、雄で胃 (前胃) の扁平上皮乳頭腫の発生が、媒体対照群、50 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群で 0 匹 (0%) に対し、200 mg/kg 群で 2 匹 (8%) にみられ、Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。扁平上皮癌は 200 mg/kg 群で 1 匹 (4%) に発生がみられ、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生 (200 mg/kg 群 3 匹、12%) は、Peto 検定と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。本試験における統計検定結果に加え、本試験に先立って実施した背景データ (無処置、50 匹) 及び文献データを参考に比較した結果、扁平上皮乳頭腫の試験単位での最大発生率 6.7% であり、200 mg/kg 群の扁平上皮乳頭腫の発生率 (8%) は、最大発生率を超えていた。また、扁平上皮癌の発生率 (4%) は、この範囲内であるものの試験単位での上限に近い発生率であった。以上の結果から、雄に認められた胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生増加は、rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠 (some evidence) と考えられた。一方、雌では腫瘍の発生増加は認められなかった。

非腫瘍性病変は、雌雄の腎臓と雄の肝臓に影響がみられた。腎臓では慢性腎炎の発生増加が雄の 200 mg/kg 群、雌の 100 mg/kg 以上の群で認められ、その程度は雌で強かった。また、肝臓では、小葉中心性の肝細胞肥大の発生増加が雄の 200 mg/kg 群で認められた。

陽性対照物質投与群では、雄に皮膚の扁平上皮乳頭腫、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生、胸腺の悪性リンパ腫、胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮癌の発生がそれぞれ有意な増加を示した。雌では、胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生、胸腺、脾臓及び全臓器の悪性リンパ腫の発生が有意な増加を示した。雌雄とも陽性対照物質投与による明らかな腫瘍の発生増加が認められ、本試験系の有効性が確認された。

以上のように、rasH2 マウスを用いて、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの 26 週間にわたる強制経口投与によるがん原性試験を行った結果、1) 雄 rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠が得られた (some evidence of carcinogenic activity)、2) 雌 rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論された。

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における主な腫瘍発生
(rasH2 マウス 雄)

投与用量 (mg/kg)		0	50	100	200	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺 胃 (前胃)	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	4	1	1		
	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	2	↑	↑
	扁平上皮癌 [#]	0	0	0	1		
	扁平上皮乳頭腫 +扁平上皮癌 [#]	0	0	0	3	↑↑	↑↑
鼻腔 脾臓	血管腫	0	1	0	0		
	血管腫	1	0	0	0		
	血管肉腫 [#]	0	1	0	2		
	血管腫+血管肉腫 [#]	1	1	0	2		
小腸 膀胱	血管肉腫 [#]	0	0	0	1		
	血管腫	0	1	0	0		
胸膜	血管腫	0	0	0	1		
	血管肉腫 [#]	0	1	0	0		
	血管腫+血管肉腫 [#]	0	1	0	1		
全臓器	血管腫	1	2	0	1		
	血管肉腫 [#]	0	2	0	3		

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における主な腫瘍発生
(rasH2 マウス 雌)

投与用量 (mg/kg)		0	50	100	200	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	3	2	0		
	細気管支-肺胞上皮癌 [#]	0	0	1	0		
	細気管支-肺胞上皮腺腫 +細気管支-肺胞上皮癌 [#]	3	3	3	0		
胃 (前胃)	扁平上皮癌 [#]	0	0	0	1		
鼻腔 脾臓	血管腫	0	0	1	0		
	血管肉腫 [#]	0	0	1	0		
唾液腺	血管腫	1	0	0	0		
子宮	血管腫	0	0	1	0		
筋肉	血管腫	0	0	0	1		
腹膜	血管肉腫 [#]	0	1	0	0		
全臓器	血管腫	1	0	2	1		
	血管肉腫 [#]	0	1	1	0		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

*： $p \leq 0.05$ で有意

**： $p \leq 0.01$ で有意

(Fisher 検定)

↑： $p \leq 0.05$ で有意増加

↑↑： $p \leq 0.01$ で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓： $p \leq 0.05$ で有意減少

↓↓： $p \leq 0.01$ で有意減少

(Cochran-Armitage 検定)

陽性対照 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea) の中期がん原性試験における主な腫瘍発生
(rasH2 マウス 雄)

投与用量 (mg/kg)		媒体対照 0	陽性対照 (MNU) 75
検査動物数		25	15
皮膚	扁平上皮乳頭腫	0	3 *
	肺		
	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	4
	細気管支-肺胞上皮癌 [#]	0	1
	細気管支-肺胞上皮腺腫 +細気管支-肺胞上皮癌 [#]	1	5 *
胃 (前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	15 **
	扁平上皮癌 [#]	0	4 *
	扁平上皮乳頭腫 +扁平上皮癌 [#]	0	15 **
胸腺	悪性リンパ腫 [#]	0	8 **

陽性対照 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea) の中期がん原性試験における主な腫瘍発生
(rasH2 マウス 雌)

投与用量 (mg/kg)		媒体対照 0	陽性対照 (MNU) 75
検査動物数		25	15
胃 (前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	13 **
	扁平上皮癌 [#]	0	2
	扁平上皮乳頭腫 +扁平上皮癌 [#]	0	13 **
リンパ節	悪性リンパ腫 [#]	0	2
胸腺	悪性リンパ腫 [#]	0	6 **
脾臓	悪性リンパ腫 [#]	0	3 *
全臓器	悪性リンパ腫 [#]	0	11 **

上段：上皮系腫瘍

下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

*：p≤0.05 で有意

**：p≤0.01 で有意

(Fisher 検定)

I 試験材料

I-1 被験物質及び調製媒体

I-1-1 被験物質の名称等 (文献 1)

名 称 : 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール
(4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenol)

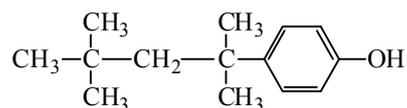
別 名 : 4-*tert*-Octylphenol

CAS No. : 140-66-9

被験物質番号 : 1238

I-1-2 被験物質の構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



化 学 式 : C₁₄H₂₂O

分 子 量 : 206.33

I-1-3 被験物質の物理化学的性状等 (文献 1、2)

性 状 : 白色～ほとんど白色、結晶～粉末

融 点 : 83°C

沸 点 : 279°C

溶 解 性 : 水にほとんど溶けない、エタノール及びアセトンに溶けやすい

保 管 条 件 : 室温かつ遮光

I-1-4 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 東京化成工業(株)

純 度 : 95.8% (東京化成工業(株) 試験成績書データ)

ロット番号 : Y8LQL

I-1-5 被験物質の製造量等 (文献 3)

製造、輸入量：22,524 t (平成 28 年度)

I-1-6 被験物質の主な用途 (文献 1)

樹脂、非イオン界面活性剤及びゴム添加剤の製造の中間体

I-1-7 許容濃度等

管理濃度：未設定

日本産業衛生学会：未設定

米国産業衛生専門家会議 (ACGIH)：未設定

国際がん研究機関 (IARC)：情報なし

ドイツ研究振興協会 (DFG)：MAK value 0.5 ml/m³(ppm) (4.3 mg/m³) (文献 4)

I-1-8 被験物質の調製媒体

名 称：オリーブ油 (日本薬局方)

製 造 元：丸石製薬(株)

ロット番号：76121

保管条件：室温かつ遮光

I-1-9 被験物質の同一性・安定性

(1) 同一性

被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 ((株)島津製作所 IRAffinity-1) を用いて測定し、文献値 (文献 5) と比較することにより確認した。

被験物質の赤外吸収スペクトルは文献値と同じ波数にピークを示したことから、被験物質は 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールであることを確認した。

その結果は APPENDIX 1-1 に示す。

(2) 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 ((株)島津製作所 IRAffinity-1) 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。

使用開始前と使用終了後の赤外吸収スペクトルに差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

その結果は APPENDIX 1-2 に示す。

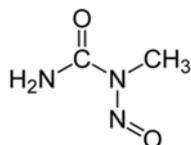
I-2 陽性対照物質及び調製媒体

I-2-1 陽性対照物質の名称等 (文献 6)

名 称 : *N*-Nitroso-*N*-methylurea
別 名 : *N*-Methyl-*N*-nitrosourea, MNU
CAS No. : 684-93-5

I-2-2 陽性対照物質の構造式及び分子量 (文献 6)

構 造 式 :



化 学 式 : $C_2H_5N_3O_2$
分 子 量 : 103.08

I-2-3 陽性対照物質の物理化学的性状等 (文献 6, 7)

性 状 : 薄黄色固体
融 点 : 119~124°C
溶 解 性 : 水に可溶 (14400 mg/L, 24°C)
保 管 条 件 : 冷蔵 (約 4°C) かつ遮光

I-2-4 陽性対照物質の使用ロット等

製 造 元 : Sigma-Aldrich Co. LLC.
ロット番号 : MKBQ7120V

I-2-5 陽性対照物質の調製媒体

名 称 : 0.1M ぐえん酸緩衝液 pH4.5
製 造 元 : 武藤化学(株)
ロット番号 : 170829
保 管 条 件 : 室温かつ遮光

I-2-6 陽性対照物質の同一性・安定性

(1) 同一性

陽性対照物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（(株)島津製作所 IRAffinity-1）を用いて測定し、文献値（文献 8, 9）と比較することにより確認した。

陽性対照物質の赤外吸収スペクトルパターンと主な結合官能基の吸収帯は文献値（文献 8）と一致した。また、確認のため、他の文献値（文献 9）との比較では、同じ各波数にピークを示したことから、陽性対照物質は *N*-Nitroso-*N*-methylurea であることを確認した。

その結果は APPENDIX 2-1 に示す。

(2) 安定性

陽性対照物質の安定性は、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（(株)島津製作所 IRAffinity-1）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。

使用開始前と使用終了後の赤外吸収スペクトルに差はみられず、使用期間中の陽性対照物質は安定であることを確認した。

その結果は APPENDIX 2-2 に示す。

I-3 試験動物

動物は、日本クレア(株)（富士生育場）の Jic:CB6F1-Tg rasH2@Jcl マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 120 匹を 6 週齢で導入し、7 日間を検疫と馴化を兼ねて飼育し、その後群分けまで待機飼育した。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 115 匹（群分け時体重範囲、雄：22.3～27.2 g、雌：17.6～22.6 g）を選別し、試験に用いた。

中期がん原性試験に rasH2 マウスを選択した理由は、中期発がん性試験としての有用性が検証されていることによる（文献 10）。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は経口投与とした。

II-1-2 投与方法及び投与期間

1日当たりの解剖可能な動物数を限定する理由から、媒体対照群及び被験物質投与群は、各群の先頭動物番号より14匹(A)と残り11匹(B)の2グループに分けた。

被験物質はオリブ油に溶解し、ディスポーザブル注射筒(ニプロ(株)製、1 mL)及びフレキシブル経口ゾンデ((有)フチガミ器械製、No.5202)を用いて、1日1回、26週間(雄:2017年9月26日~2018年3月26日(A)、27日(B)、雌:2017年9月28日~2018年3月28日(A)、29日(B))、毎日、12時から16時の時間帯に強制経口投与した。投与液量は5 mL/kg BWとし、直前に測定した体重に基づいて個体別に算出した。

陽性対照物質は0.1Mくえん酸緩衝液(pH 4.5)に溶解し、26Gまたは27G注射針を装着したディスポーザブル注射筒(ニプロ(株)製、1 mL)を用いて、群分け翌日(雄:2017年9月26日、雌:2017年9月28日)の12時から16時の時間帯に単回腹腔内投与した。投与液量は10 mL/kg BWとし、投与日の体重に基づいて個体別に算出した。

II-1-3 投与用量

被験物質は、雌雄ともに、50、100及び200 mg/kg BWの3段階(公比2)に設定した。また、媒体対照群としてオリブ油を投与する群を設けた。

陽性対照物質の投与用量は、雌雄ともに75 mg/kg BWとした。

II-1-4 投与方法、投与期間及び投与用量の設定理由

被験物質の投与方法を決定するために、C57BL/6Jマウスを用いて2週間混餌投与試験(試験番号4592)を実施した。その結果、混餌投与方法では対照群を含む全群に多量の餌こぼしがあり、高用量では摂餌忌避が認められた。一方、被験物質はオリブ油に溶解し、投与液中で8日間安定であることから、投与方法はオリブ油を媒体とする強制経口投与方法を選択した。

投与期間は、「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」(文献11)に従い、26週間とした。

本試験の投与用量は、4週間毒性試験(試験番号0890)の結果を基に設定した。4週間毒性試験では、雌雄のrasH2マウス(non-Tg)を用いて、1群当たり各10匹の動物に

0 (オリブ油)、30、100、200 及び 300 mg/kg BW の用量で、毎日、4 週間強制経口投与した。

その結果、雌雄とも全群で動物の死亡及び一般状態に毒性症状はみられなかったが、雌雄の 300 mg/kg 群では 2~3 週目にかけて餌こぼしが多い傾向が観察された。体重は媒体対照群と比較し、雌雄とも投与群でやや高値傾向で推移した。被験物質投与による影響は、主に腎臓と肝臓に認められ、造血系への影響も示唆された。

腎臓への影響として、剖検観察では 300 mg/kg 群の雌雄に腎臓の淡色化が各 4 例みられ、200 mg/kg 以上の群の雌で腎臓実重量と体重比が高値であった。病理組織学的検査では、近位尿細管の再生が 200 mg/kg 以上の群の雌雄（全例）、100 mg/kg 群の雄（3 例）に認められ、その程度は投与用量に対応して広範囲にみられた。また、尿細管腔内には顆粒状円柱の形成が 200 mg/kg 以上の群の雌雄、100 mg/kg 群の雄にみられた。血液生化学検査では、尿素窒素の高値が雄の 300 mg/kg 群で認められた。

肝臓への影響として、100 mg/kg 以上の群の雌雄で肝臓実重量と体重比の高値がみられ、病理組織学的検査では、雄の 200 mg/kg 以上の群に小葉中心性の肝細胞肥大及び単細胞壊死が認められた。また、血液生化学検査では、肝臓の障害性変化、脂質代謝等への影響を示唆する変化（雌雄に総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及び γ -GTP の高値、雄に ALT、LDH 及び ALP の高値等）認められた。これらの影響は雌雄とも概ね 100 mg/kg 以上の群でみられた。

造血系への影響を示唆する変化として、血液学的検査では 200 mg/kg 以上の群の雌雄に網赤血球比の高値、雄に血小板数の高値、雌に好中球比の低値とリンパ球比の高値が認められた。また、雌の 300 mg/kg 群では白血球数が高値であった。200 mg/kg 以上の群の雄と 300 mg/kg 群の雌に脾臓実重量と体重比の高値がみられ、病理組織学的検査では、200 mg/kg 以上の群の雌雄で髄外造血の亢進がみられた。

以上の結果から、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの毒性標的器官は主に腎臓、肝臓及び造血系であると考えられた。この中で腎臓の雌雄 300 mg/kg 群に認められた近位尿細管の再生像は広範囲に認められ、尿細管への傷害も広範囲に起きたと判断できることから、300 mg/kg は 26 週間の投与には耐えられないと考えられる。一方、近位尿細管の再生像は 200 mg/kg 群でも全例にみられるものの、その程度は減弱していることから、200 mg/kg は 26 週間の投与に耐えうる用量であると判断した。したがって、本試験では、高用量を 200 mg/kg BW に設定し、公比 2 で除して中用量を 100 mg/kg BW、低用量を 50 mg/kg BW とした。

陽性対照物質の投与用量は、ILSI/HESI 国際共同検証試験（文献 10）の方法を参考に、雌雄ともに 75 mg/kg BW とした。

II-1-5 被験物質及び陽性対照物質投与液の調製

被験物質投与液の調製は、秤量した被験物質にオリブ油を加え、マグネチックスターラーで攪拌・混合して溶解し、10、20 及び 40 mg/mL の濃度の投与液を調製した。調製した投与液は、調製液中の被験物質濃度の安定性が確認された 8 日間以内に使用した。調製後の投与液は、投与日まで冷蔵庫（約 4℃、遮光）内で保管した。

陽性対照物質投与液の調製は、秤量した陽性対照物質に 0.1M くえん酸緩衝液（pH 4.5）を加え、マグネチックスターラーで攪拌・混合して溶解し、7.5 mg/mL の濃度の投与液を調製した。なお、調製は投与日に用時調製とした。

II-1-6 被験物質及び陽性対照物質調製液の濃度及び均一性確認

被験物質調製液は、調製時の濃度及び均一性確認を全調製濃度について行った。初回調製時及び 13 週目に調製容器内から各 7 点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ（(株)島津製作所 LC-10）を用いて被験物質濃度を測定することで確認した。

陽性対照物質調製液は、調製時の濃度確認を行った。初回調製時に調製容器内から 3 点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ（(株)島津製作所 LC-10）を用いて陽性対照物質濃度を測定することで確認した。

被験物質調製液の濃度は APPENDIX 3-1、均一性は APPENDIX 3-2 に示す。また、陽性対照物質調製液の濃度は APPENDIX 4 示す。

被験物質調製液の平均濃度は、設定濃度に対して 95.8～100%の範囲にあった。また、均一性は各調製濃度ともばらつきが少なかった。従って、被験物質調製液は設定濃度に対して正確に調製されたことを確認した。

陽性対照物質調製液の平均濃度は、設定濃度に対して 106%及び 99.9%であり、陽性対照物質調製液は設定濃度に対して正確に調製されたことを確認した。

II-1-7 被験物質及び陽性対照物質調製液の濃度安定性確認

被験物質調製液の濃度安定性は、被験物質調製液（0.6 mg/mL 及び 60 mg/mL：投与用量として 3 mg/kg BW 及び 300 mg/kg BW に相当）を冷蔵保管（約 4℃）し、調製後 8 日間の濃度は安定であることを確認した（試験番号：8042）。本試験はその濃度範囲で実施するため濃度安定性確認は行わなかった。

陽性対照物質調製液の濃度安定性は、投与日に用時調製するため行わなかった。

濃度安定性確認の結果は APPENDIX 5 に示す。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

媒体対照群 1 群、被験物質投与群 3 群及び陽性対照群の計 5 群を設け、1 群当たりの動物数は、媒体対照群と被験物質投与群は雌雄各 25 匹、陽性対照群は雌雄各 15 匹の動物を用いた。

群名称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
媒体対照群	25 匹 (1001~1025)	25 匹 (2001~2025)
50 mg/kg 群	25 匹 (1101~1125)	25 匹 (2101~2125)
100 mg/kg 群	25 匹 (1201~1225)	25 匹 (2201~2225)
200 mg/kg 群	25 匹 (1301~1325)	25 匹 (2301~2325)
陽性対照群	15 匹 (1401~1415)	15 匹 (2401~2415)

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 12)。

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 (雄 202 室、雌 203 室) に収容し、室の扉に試験番号、試験動物、飼育期間及び遺伝子改変動物飼育中を表示し、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

飼育室の環境条件及び使用したケージ等を以下に示した。飼育室の温度と湿度は、実測値 (平均値±標準偏差) を < > 内に示した。

温度： 23±2℃ <202 室：22.8±0.2℃、203 室：22.6±0.3℃>

湿度： 55±15% <202 室：54±2%、203 室：56±1%>

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

ケージへの動物の収容方法： 個別飼育

ケージの材質・形状・寸法等：

ステンレス製 2 連網ケージ (112(W)×212(D)×120(H) mm/匹)

飼育器材の滅菌方法： 飼育器材（ラック、ケージ、餌箱、給水ノズル、作業台車、トレイ等）は、オートクレーブを用いて滅菌（約 120℃、15 分以上）した。

(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) 製造の CRF-1 固型（30kGy- γ 線照射滅菌飼料）を自由摂取させた。ただし、定期解剖前日（投与最終日）の夕方からは絶食させた。

試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株) から分析データを入手し、確認後保管した。

(3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。

飲水の水質は、動物試験施設として定期的（年 2 回）に実施している水道水の検査において、水道法に定められている水質基準に適合していることを確認した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

全動物について、毎日、投与前及び投与後に生死及び一般状態を観察した。また、定期解剖日は飼育室からの搬出時に一般状態を観察した。

II-3-2 体重測定

全動物について、週 1 回、投与前に体重測定を行った。また、定期解剖日には絶食後の体重（搬出時体重）を測定した。

死亡及び瀕死状態の動物は、飼育室からの搬出時に体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

全動物について、週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

II-3-4 尿検査

投与最終週に生存した動物のうち自然排尿した動物の新鮮尿について、尿試験紙（ウロラブスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

II-3-5 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にイソフルラン麻酔下で開腹し、腹大動脈から 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 6 に示す。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

II-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にイソフルラン麻酔下で開腹し、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 6 に示す。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

II-3-7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

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

(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) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡で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（レベル1）、切歯乳頭（レベル2）、第一臼歯の前端（レベル3）の3ヶ所（文献13）で切り出し（横断）、検査した。

検査器官・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、鼠径等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（胸骨、大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

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。

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、血液生化学的検査はAPPENDIX 6に示した単位と桁数により表示した。

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

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、媒体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Dunnnett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。

なお、媒体対照群と陽性対照群間の有意差検定は、まず F 検定を用い、等分散である場合は Student の t 検定を行い、等分散でない場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。

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、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1~4 に分け、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても媒体対照群と各投与群間で 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、各群ごとの総担腫瘍臓器数について、Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。なお、媒体対照群と陽性対照群間は、各群の総担腫瘍臓器数について Fisher 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-1 (被験物質投与群)

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE A 1, 2 及び FIGURE A 1, 2 に示す。

—雄—

被験物質投与による生存率への影響は認められなかった。

各群の 26 週における生存動物数 (生存率) は、媒体対照群 : 25 匹 (100%)、50 mg/kg 群 : 24 匹 (96%)、100 mg/kg 群 : 25 匹 (100%)、200 mg/kg 群 : 23 匹 (92%) であった。

—雌—

被験物質投与による生存率への影響は認められなかった。

各群の 26 週における生存動物数 (生存率) は、媒体対照群 : 23 匹 (92%)、50 mg/kg 群 : 24 匹 (96%)、100 mg/kg 群 : 25 匹 (100%)、200 mg/kg 群 : 24 匹 (96%) であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE A 3, 4 に示す。

—雌雄—

投与期間を通して、被験物質投与の影響と考えられる異常所見は認められなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE A 5~8 及び FIGURE A 3, 4 に示す。

—雄—

投与期間を通して媒体対照群との間に顕著な差は認められなかった。

投与群の最終体重は媒体対照群に対して、50 mg/kg 群 : 98 %、100 mg/kg 群 : 101 %、200 mg/kg 群 : 101 % であった。

—雌—

投与期間を通して媒体対照群との間に顕著な差は認められなかった。

投与群の最終体重は媒体対照群に対して、50 mg/kg 群 : 97 %、100 mg/kg 群 : 99 %、200 mg/kg 群 : 97 % であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量の推移を TABLE A 9~12 及び FIGURE A 5, 6 に示す。

—雄—

投与期間を通して媒体対照群との間に顕著な差は認められなかった。

投与期間を通しての1匹当たりの1日平均摂餌量は、媒体対照群：3.3 g、50 mg/kg 群：3.1 g、100 mg/kg 群：3.3 g、200 mg/kg 群：3.4 g であった。

—雌—

投与期間を通して媒体対照群との間に顕著な差は認められなかった。

投与期間を通しての1匹当たりの1日平均摂餌量は、媒体対照群：2.9 g、50 mg/kg 群：2.9 g、100 mg/kg 群：2.9 g、200 mg/kg 群：2.9 g であった。

Ⅲ-5 尿検査

尿検査の結果を TABLE A 13, 14 に示す。

—雌雄—

100 mg/kg 以上の群で尿蛋白の陽性度の減少、及びケトン体の陽性例の減少が認められた。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE A 15, 16 に示す。

—雄—

被験物質投与の影響と考えられる影響は認められなかった。

なお、200 mg/kg 群で MCV、網赤血球比及び好塩基球比が、統計学的に有意な高値を示したが、ごく軽度の変化であり、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

—雌—

100 mg/kg 以上の群でヘモグロビン濃度の低値、200 mg/kg 群で赤血球数、ヘマトクリット値、MCH 及び MCHC の低値が認められた。

なお、100 mg/kg 群で単球比が統計学的に有意な高値を示したが、投与用量に対応した変化ではないことから、偶発的変動と考えられた。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE A 17, 18 に示す。

—雄—

50 mg/kg 以上の群で総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及び ALP の高値、100 mg/kg 以上の群でグルコースの高値、並びに A/G 比の低値、200 mg/kg 群で尿素窒素

及びカルシウムの高値、並びにアルブミン及び総ビリルビンの低値が認められた。

—雌—

50 mg/kg 以上の群で ALP 及び CK の高値、100 mg/kg 以上の群で総コレステロール及びリン脂質の高値、並びに A/G 比の低値、200 mg/kg 群で総蛋白、アルブミン、トリグリセライド、 γ -GTP、尿素窒素、カルシウム及び無機リンの高値、並びに総ビリルビン、ナトリウム及びクロールの低値が認められた。

III-8 病理学的検査

III-8-1 肉眼的観察

解剖時の剖検観察所見を TABLE A 19, 20 に示す。

—雄—

前胃の結節が媒体対照群 0 匹に対して 200 mg/kg 群で 3 匹に認められた。また、腎臓の顆粒状変化が媒体対照群 0 匹に対して 200 mg/kg 群で 3 匹に認められた。

—雌—

前胃の結節が媒体対照群 0 匹に対して 200 mg/kg 群で 1 匹に認められた。また、腎臓の淡色化が媒体対照群 0 匹に対して 200 mg/kg 群で 16 匹に、腎臓の顆粒状変化が媒体対照群 0 匹に対して 200 mg/kg 群で 10 匹に認められた。

III-8-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量を TABLE A 21, 22 に、体重比を TABLE A 23, 24 に示す。

—雄—

50 mg/kg 以上の群で肝臓の体重比の高値、100 mg/kg 以上の群で肝臓の実重量の高値、200 mg/kg 群で脾臓の実重量と体重比の高値、並びに胸腺の実重量と体重比の低値が認められた。なお、腎臓の体重比が 100 mg/kg 群で低値を示したが、投与用量に対応した変化ではなかった。

—雌—

50 mg/kg 以上の群で胸腺の実重量の低値あるいは低値傾向、100 mg/kg 以上の群で腎臓の体重比の高値、200 mg/kg 群で脾臓の実重量と体重比、肝臓の体重比の高値が認められた。

その他、200 mg/kg 群で心臓の実重量の低値及び脳の体重比の高値がみられたが、200 mg/kg 群の搬出時体重は媒体対照群と比較して低値であり、それに起因するものと考えられた。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE A 25, 26 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE A 27, 28 に、担腫瘍動物数と発生腫瘍数を TABLE A 29, 30 に、転移性病変を TABLE A 31, 32 に示す。また、非腫瘍性病変は TABLE A 33, 34 に示す。さらに、病理組織所見の代表例を PHOTOGRAPH 1~6 に示す。

—雄—

1) 腫瘍性病変

<胃 (前胃) >

扁平上皮乳頭腫の発生は、媒体対照群、50 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群で 0 匹 (0%) に対し、200 mg/kg 群で 2 匹 (8%) に認められ、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。扁平上皮癌の発生は、200 mg/kg 群で 1 匹 (4%) にのみ発生がみられた。さらに、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生は、媒体対照群、50 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群で 0 匹 (0%) に対し、200 mg/kg 群で 3 匹 (12%) に認められ、Peto 検定 (有病率法、死亡率法+有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。

担腫瘍動物数は、媒体対照群 2 匹 (8%) に対し、50 mg/kg 群 7 匹 (28%)、100 mg/kg 群 1 匹 (4%)、200 mg/kg 群 7 匹 (28%) であった。

2) 非腫瘍性病変

<腎臓>

慢性腎炎の発生増加が 200 mg/kg 群で認められ、病変の程度は軽度から中等度であった。なお、100 mg/kg 群でも 1 匹に発生がみられた。慢性腎炎は、ネフロン単位で変性・壊死が認められ、尿細管の再生や線維化が認められた。

<肝臓>

小葉中心性の肝細胞肥大の発生増加が 200 mg/kg 群で認められ、病変の程度はいずれも軽度であった。なお、100 mg/kg 群でも 1 匹に発生がみられた。

—雌—

1) 腫瘍性病変

被験物質投与による腫瘍の発生増加は認められなかった。

担腫瘍動物数は、媒体対照群 5 匹 (20%) に対し、50 mg/kg 群 4 匹 (16%)、100 mg/kg 群 6 匹 (24%)、200 mg/kg 群 2 匹 (8%) であった。

2) 非腫瘍性病変

<腎臓>

慢性腎炎の発生増加と程度の増強が 100 mg/kg 群と 200 mg/kg 群で認められ、病変の程度は 100 mg/kg 群が軽度から中等度、200 mg/kg 群が中等度から重度であった。慢性腎炎は、ネフロン単位で変性・壊死が認められ、尿細管の再生や線維化が認められた。

Ⅲ-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE A 35, 36 に示す。

—雌雄—

投与群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加は認められなかった。

IV 試験成績-2 (陽性対照物質投与群)

IV-1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 及び FIGURE B 1, 2 に示す。

—雄—

陽性対照群の死亡は 7 匹みられ、媒体対照群と比較して生存率の低下が認められた。

26 週における生存動物数 (生存率) は、媒体対照群 : 25 匹 (100%)、陽性対照群 : 8 匹 (53.3%) であった。

—雌—

陽性対照群の死亡は 11 匹みられ、媒体対照群と比較して生存率の低下が認められた。

26 週における生存動物数 (生存率) は、媒体対照群 : 23 匹 (92%)、陽性対照群 : 4 匹 (26.7%) であった。

IV-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 3, 4 に示す。

—雌雄—

投与期間を通して、陽性対照物質投与の影響と考えられる異常所見の増加は認められなかった。

IV-3 体重

体重の推移を TABLE B 5~8 及び FIGURE B 3, 4 に示す。

—雄—

陽性対照群では、飼育 5 週目以降多くの週で体重の高値が認められた。

陽性対照群の最終体重は媒体対照群に対して 104 % であった。

—雌—

陽性対照群では、飼育 5 週目以降多くの週で体重の高値が認められた。

陽性対照群の最終体重は媒体対照群に対して 104 % であった。

IV-4 摂餌量

摂餌量の推移を TABLE B 9~12 及び FIGURE B 5, 6 に示す。

—雄—

陽性対照群では、投与期間を通して摂餌量の高値が認められた。

投与期間を通しての 1 匹当たりの 1 日平均摂餌量は、媒体対照群 : 3.3 g、陽性対照群 : 4.0 g であった。

—雌—

陽性対照群では、投与期間を通して摂餌量の高値が認められた。

投与期間を通しての1匹当たりの1日平均摂餌量は、媒体対照群：2.9 g、陽性対照群：3.6 gであった。

IV-5 尿検査

尿検査の結果を TABLE B 13, 14 に示す。

—雄—

陽性対照物質投与による影響は認められなかった。

—雌—

尿蛋白の陽性例の増加が認められた。

IV-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE B 15, 16 に示す。

—雄—

陽性対照群で好中球比の高値、並びにリンパ球比の低値が認められた。

—雌—

陽性対照群でリンパ球比の低値が認められた。

IV-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE B 17, 18 に示す。

—雄—

陽性対照群で AST、ALT、LDH、尿素窒素、カルシウム及び無機リンの高値が認められた。

なお、ALP が統計学的に有意な低値を示したが、低下性の変化であることから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

—雌—

陽性対照群で無機リンの高値、並びに A/G 比の低値が認められた。

なお、ALP が統計学的に有意な低値を示したが、低下性の変化であることから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

IV-8 病理学的検査

IV-8-1 肉眼的観察

解剖時の剖検観察所見を TABLE B 19, 20 に示す。

—雄—

媒体対照群と比較して、皮膚及び前胃の結節、リンパ節及び脾臓の腫大、胸腔の胸水貯留の発生が多く認められた。

—雌—

媒体対照群と比較して、前胃の結節、リンパ節、脾臓及び肝臓の腫大、縦隔の腫瘤、肺の赤色斑の発生が多く認められた。

IV-8-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量を TABLE B 21, 22 に、体重比を TABLE B 23, 24 に示す。

—雄—

陽性対照群で肝臓の実重量と体重比、心臓の実重量の高値が認められた。

—雌—

陽性対照群で心臓及び腎臓の体重比の高値が認められた。

IV-8-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE B 25, 26 に、統計解析 (Fisher 検定) の結果を TABLE B 27, 28 に、担腫瘍動物数と発生腫瘍数を TABLE B 29, 30 に、転移性病変を TABLE B 31, 32 に示す。また、非腫瘍性病変は TABLE B 33, 34 に示す。さらに、病理組織所見の代表例を PHOTOGRAPH 7~12 に示す。

—雄—

1) 腫瘍性病変

<皮膚>

扁平上皮乳頭腫の発生は、媒体対照群で 0 匹 (0%) に対し、陽性対照群で 3 匹 (20%) に認められ、Fisher 検定で有意な増加を示した。

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生は、媒体対照群で 1 匹 (4%) に対し、陽性対照群で 5 匹 (33.3%) に認められ、Fisher 検定で有意な増加を示した。

<胸腺>

悪性リンパ腫の発生は、媒体対照群で 0 匹 (0%) に対し、陽性対照群で 8 匹 (53.3%)

に認められ、Fisher 検定で有意な増加を示した。

<胃 (前胃) >

扁平上皮乳頭腫の発生は、媒体対照群で 0 匹 (0%) に対し、陽性対照群で 15 匹 (100%)、扁平上皮癌の発生は、媒体対照群で 0 匹 (0%) に対し、陽性対照群で 4 匹 (26.7%) に認められ、それぞれ Fisher 検定で有意な増加を示した。

その他、白血病細胞浸潤 (悪性リンパ腫転移) が多くの臓器に認められた。なお、担腫瘍動物数は、媒体対照群 2 匹 (8%) に対し、陽性対照群 15 匹 (100%) であった。

2) 非腫瘍性病変

<胃 (前胃) >

統計学的に有意でないものの、前胃の扁平上皮過形成の発生が陽性対照群で増加し、病変の程度はいずれも軽度であった。

—雌—

1) 腫瘍性病変

<胃 (前胃) >

扁平上皮乳頭腫の発生は、媒体対照群で 0 匹 (0%) に対し、陽性対照群で 13 匹 (86.7%)、扁平上皮癌の発生は、媒体対照群で 0 匹 (0%) に対し、陽性対照群で 2 匹 (13.3%) に認められた。扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生は Fisher 検定で有意な増加を示した。

<リンパ節、胸腺、脾臓>

悪性リンパ腫の発生は、いずれも媒体対照群で 0 匹 (0%) に対し、陽性対照群でリンパ節に 2 匹 (13.3%)、胸腺に 6 匹 (40.0%)、脾臓に 3 匹 (20.0%)、全臓器では 11 匹 (73.3%) に認められた。そのうち、胸腺、脾臓及び全臓器の発生が Fisher 検定で有意な増加を示した。

その他、白血病細胞浸潤 (悪性リンパ腫転移) が多くの臓器に認められた。なお、担腫瘍動物数は、媒体対照群 5 匹 (20%) に対し、陽性対照群 15 匹 (100%) であった。

2) 非腫瘍性病変

<胃 (前胃) >

前胃の扁平上皮過形成の発生増加が陽性対照群で認められ、病変の程度はいずれも軽度であった。

<副腎>

紡錘形細胞過形成の発生減少が陽性対照群で認められた。

IV-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE B 35, 36 に示す。

—雄—

陽性対照群では 7 匹の死亡がみられ、死因は全て悪性リンパ腫であった。

—雌—

陽性対照群では 11 匹の死亡がみられ、死因は 10 匹が悪性リンパ腫、1 匹が胃の腫瘍であった。

V 考察及びまとめ

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの rasH2 マウスを用いた強制経口投与による中期がん原性試験（投与用量：0（媒体対照）、50、100 及び 200 mg/kg）を行った結果、雄に前胃腫瘍（扁平上皮乳頭腫、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生）の発生増加がみられた。

V-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

動物の生存率は、雌雄とも媒体対照群と比較して差を認めなかった。一般状態では、雌雄とも被験物質投与の影響と考えられる異常所見は認められず、体重及び摂餌量も投与期間を通して媒体対照群との間に顕著な差は認めなかった。

V-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

本試験は rasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験の初回報告であり、当センターで行った対照群の蓄積データがないため、rasH2 マウスの背景データを取得する目的で、本試験に先立って実施した無処置動物 50 匹のデータをがん原性評価の参考とした。また、文献（文献 14, 15, 16）のヒストリカルコントロールデータ（雌雄 rasH2 マウス）もがん原性評価の参考とした。

雄では胃（前胃）の扁平上皮乳頭腫の発生が、媒体対照群、50 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群で 0 匹（0%）に対し、200 mg/kg 群で 2 匹（8%）みられ、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。扁平上皮癌の発生（200 mg/kg 群 1 匹、4%）は有意な増加は示さなかったが、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生（200 mg/kg 群 3 匹、12%）は、Peto 検定（有病率法、死亡率法+有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。

雄の胃の扁平上皮乳頭腫は、発生が極めて稀な腫瘍であり、当センターの雄 rasH2 マウス（無処置動物）50 匹の発生率は 2%（1/50 匹）であった。また、文献のヒストリカルコントロールデータでは、Paranjpe ら（文献 14）は平均 0.28%（26 試験、710 匹、最小 0%～最大 4%）、Nambiar ら（文献 15）は平均 0.6%（10 試験、333 匹、最小 0%～最大 4%）、Takaoka ら（文献 16）は平均 0.6%（12 試験、180 匹、最小 0%～最大 6.7%）と報告されている。これらの報告の試験単位での最大発生率は 6.7%であり、本試験の 200 mg/kg 群の扁平上皮乳頭腫の発生（2/25 匹、8%）は、試験単位での最大発生率を超えていることから、被験物質投与による影響と考えた。

扁平上皮癌も発生が極めて稀な腫瘍であり、当センターの背景データの発生率は 2%（1/50

匹)であった。文献データでは、Paranjpeらは平均0.56% (26試験、710匹、最小0%~最大4%)、Nambiarらは平均0.3% (10試験、333匹、最小0%~最大4%)、Takaokaらは平均0.6% (12試験、180匹、最小0%~最大6.7%)と報告されている。これらの報告の試験単位での最大発生率は6.7%であり、本試験の200 mg/kg群の扁平上皮癌の発生(1/25匹、4%)は、この範囲内であるものの試験単位での上限に近い発生率であった。これらのことを考慮し、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生(3/25匹、12%)も被験物質投与による影響と考えた。

従って、雄に認められた胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生増加は、rasH2マウスに対するがん原性を示す証拠と考えられた。

一方、雌では腫瘍の発生増加は認められず、雌 rasH2マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった。

V-3 その他の影響

病理組織学的検査では、雌雄の腎臓と雄の肝臓に影響がみられた。

腎臓では、慢性腎炎の発生増加が雄の200 mg/kg群で認められ、1例だが100 mg/kg群でも発生がみられた。雌では慢性腎炎の発生増加が100 mg/kg以上の群で認められ、その程度は雌で強かった。また、腎重量(体重比)は雌の100 mg/kg以上の群で高値であり、血漿中尿素窒素が雌雄の200 mg/kg群で高値を示した。

肝臓では、小葉中心性の肝細胞肥大の発生増加が雄の200 mg/kg群で認められ、100 mg/kg群でも1例に発生がみられた。また、肝の実重量が雄の100 mg/kg以上の群、体重比が雄の50 mg/kg以上の群と雌の200 mg/kg群で高値であり、血液生化学的検査で、雌雄の50 mg/kg以上の群でALPの高値、雌の200 mg/kg群で γ -GTPが高値を示した。

臓器重量では、胸腺重量(実重量・体重比)が雄の200 mg/kg群で低値を示し、雌では実重量が50 mg/kg以上の群で低値あるいは低値傾向を示したが、病理組織所見では変化はみられなかった。脾重量(実重量・体重比)は雌雄の200 mg/kg群で軽度の高値を示したが、病理組織所見に所見の増加はみられなかった。

血液学的検査では、雌の200 mg/kg群で軽度の貧血傾向(赤血球、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCH及びMCHCの低値)が認められた。

その他、血液生化学的検査で脂質代謝への影響を示唆する変化として、総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質の高値が、雄では50 mg/kg以上、雌では100 mg/kg以上ないし200 mg/kg群でみられた。

V-4 陽性対照物質投与群 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea: MNU) の評価

陽性対照物質として、MNU を単回腹腔内投与 (雌雄 15 匹、75 mg/kg BW) し、26 週間飼育した。

その結果、陽性対照群の生存動物数 (生存率) は、雄 8 匹 (53.3%)、雌 4 匹 (26.7%) であった。体重は媒体対照群に比較して、雌雄とも飼育 5 週目以降に高値が認められ、摂餌量も投与期間を通して高値が認められた。

腫瘍性病変の発生は、雄では皮膚の扁平上皮乳頭腫、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生、胸腺の悪性リンパ腫、胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮癌の発生が、それぞれ Fisher 検定で有意な増加を示した。7 匹の途中死亡動物の死因は全て悪性リンパ腫であり、担腫瘍動物数は、媒体対照群 2 匹 (8%) に対し、陽性対照群 15 匹 (100%) であった。

雌では、胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生、胸腺、脾臓及び全臓器の悪性リンパ腫の発生が Fisher 検定で有意な増加を示した。11 匹の途中死亡動物の死因は 10 匹が悪性リンパ腫、1 匹が胃の腫瘍であり、担腫瘍動物数は、媒体対照群 5 匹 (20%) に対し、陽性対照群 15 匹 (100%) であった。

以上の結果より、雌雄とも陽性対照物質 (MNU) 投与による明らかな腫瘍の発生増加が認められ、本試験系の有効性が確認された。

VI 結論

rasH2 マウスを用いて、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの26週間にわたる強制経口投与によるがん原性試験を行った結果、

1. 雄 rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠が得られた (some evidence of carcinogenic activity) と結論された。
2. 雌 rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論された。

VII 文献

- 1) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 1995. OECD SIDS. PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-. SIDS Initial Assessment Report for SIAM3. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/140669.pdf> [accessed 2017/04/26]
- 2) 東京化成工業(株). 2017. 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol 安全データシート.
- 3) 経済産業省. 2018. 優先評価化学物質の製造・輸入数量 (28年度実績) http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/volume/priority/Volume_priority_h28.xlsx [accessed 2018/11/16]
- 4) Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 2018. 4-tert-Octylphenol: MAK Value Documentation. The MAK Collection for Occupational Health and Safety 2018, Vol 3, No 3 pp1137-1150. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/3527600418.mb14066kske6318> [accessed 2018/11/16]
- 5) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 有機化合物スペクトルデータベース(SDBS). p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol. [accessed 2017/04/26].
- 6) シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社. 2017. N-Nitroso-N-methylurea 安全データシート.
- 7) U.S. National Library of Medicine. 2003. N-NITROSO-N-METHYLUREA. Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> [accessed 2017/09/06]
- 8) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 有機化合物スペクトルデータベース(SDBS). 1-methyl-1-nitrosourea. [accessed 2017/08/07].
- 9) National Institute of Standards and Technology (NIST). 2017. N-NITROSO-N-METHYLUREA. NIST Chemistry WebBook, SRD 69. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=684-93-5&Units=SI&cIR=on#IR-Spec> [accessed 2017/9/20]

- 10) Robinson DE, MacDonald JS. 2001. Background and framework for ILSI's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. *Toxicol Pathol* 29 (Suppl.): 13-19.
- 11) 「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」 2017. 平成 28 年度第 3 回発がん性評価ワーキンググループ（平成 29 年 3 月 1 日厚生労働省）資料.
- 12) 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.
- 13) Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Exp Toxic Pathol.* 49: 97-104.
- 14) Paranjpe MG, Elbekaei RH, Shah SA, Hickman M, Wenk ML, Zahalka EA. 2013. Historical control data of spontaneous tumors in transgenic CByB6F1-Tg (HRAS)^{2Jic} (Tg. rasH2) mice. *Int. J. Toxicol.* 32: 48-57.
- 15) Nambiar PR, Turnquist SE, Morton D. 2012. Spontaneous tumor incidence in rasH2 mice: review of internal data and published literature. *Toxicol. Pathol.* 40: 614-623.
- 16) Takaoka M, Sehata S, Maejima, T, Imai T, Torii M, Satoh H, et al. 2003. Interlaboratory comparison of short-term carcinogenicity studies using CB6F1-rasH2 transgenic mice. *Toxicol. Pathol.* 31: 191-199.

VIII 予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

1. 陽性対照物質 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea) の同一性確認

試験計画書では、「陽性対照物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 ((株) 島津製作所 IRAffinity-1) を用いて測定し、文献値 (文献 8) と比較することにより確認する。」と記載されていたが、文献 (文献 9) を追加し、陽性対照物質の同一性を確認した。

赤外吸収スペクトルパターンと主な結合官能基の吸収帯は文献値 (文献 8) と一致することを確認したが、更に、文献 (文献 9) との比較で、同じ各波数にピークを示すことを確認し、陽性対照物質は *N*-Nitroso-*N*-methylurea であることを確認した。

2. 媒体対照群と陽性対照群間の腫瘍性病変の統計検定

媒体対照群と陽性対照群間の腫瘍性病変の統計検定は、両群間の Fisher 検定の結果のみを用いて評価を行った。

上記変更は、いずれも試験結果の評価の信頼性に影響を及ぼすものではない。