

1 - ブロモブタンのマウスを用いた
吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号 : 0481

CAS No. 109-65-9

2004年9月27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

1 - ブロモブタンのマウスを用いた
吸入による2週間毒性試験報告書

試験番号：0481

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	
I-1 被験物質の性状等	
I-1-1 名称等	2
I-1-2 構造式、示性式及び分子量	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	4
II-1-2 被験物質の投与方法	4
II-1-3 投与期間	4
II-1-4 投与濃度	4
II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由	4
II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整	5
II-1-7 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	6
II-2-3 飼育条件	6

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	7
Ⅱ-3-2	体重測定	7
Ⅱ-3-3	摂餌量測定	7
Ⅱ-3-4	血液学的検査	7
Ⅱ-3-5	血液生化学的検査	8
Ⅱ-3-6	病理学的検査	8
Ⅱ-4	数値処理と統計方法	
Ⅱ-4-1	数値の取り扱いと表示	9
Ⅱ-4-2	母数の取り扱い	9
Ⅱ-4-3	統計方法	9
Ⅲ	試験成績	
Ⅲ-1	生死状況	11
Ⅲ-2	一般状態	11
Ⅲ-3	体重	12
Ⅲ-4	摂餌量	12
Ⅲ-5	血液学的検査	12
Ⅲ-6	血液生化学的検査	13
Ⅲ-7	病理学的検査	
Ⅲ-7-1	剖検	13
Ⅲ-7-2	臓器重量	14
Ⅲ-7-3	病理組織学的検査	14
Ⅳ	考察及びまとめ	16
Ⅴ	文献	19

要約

1 - ブロモブタンのがん原性を検索する目的で、マウスを用いた吸入による 2 年間 (104 週間) の試験を実施するに当り、その予備試験である 13 週間試験の投与濃度を決定するための予備試験として本試験 (2 週間試験) を実施した。

本試験は、Crj:BDF₁ マウスを投与群 5 群、対照群 1 群の計 6 群 (各群雌雄各 5 匹) に分け、1 - ブロモブタンの投与濃度は、8000、4000、2000、1000 及び 500 ppm とした。投与期間は 1 日 6 時間、1 週 5 日間の投与 (全身暴露による経気道投与) で 2 週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。また、投与期間中の死亡動物についても剖検観察及び病理組織学的検査を行った。

1 - ブロモブタンの暴露の結果、1000 ppm 以上の群の雄及び 2000 ppm 以上の群の雌の全動物が死亡した。

死亡動物では、一般状態の観察で自発運動量の減少、立毛、不整呼吸、呼吸緩徐、体温低下等がみられた。病理組織学的検査では、8000 ppm 群は雌雄とも肝臓と肺に変化がみられた。4000 ppm 群では、雌雄とも肝臓、心臓及び肺に、2000 ppm 群では、雌雄とも肝臓、心臓、肺及び鼻腔に変化が認められた。1000 ppm 群の雄では、多くの動物に肝臓、肺、鼻腔及び心臓に変化がみられ、少数の動物に胸腺、脾臓、精巣、腎臓の変化がみられた。各群の死亡動物には肺と肝臓の病変が共通してみられた。

1000 ppm 以下の群の生存動物 (1000 ppm 群の雌及び 500 ppm 群の雌雄) では、一般状態の観察で円背位、立毛、不整呼吸が 1000 ppm 群の雌にみられた。また、体重増加の抑制が 1000 ppm 群の雌に認められた。

生存動物の血液学的検査では、貧血の傾向が 1000 ppm 群の雌及び 500 ppm 群の雌雄でみられた。血液生化学的検査では、雌雄で総コレステロール、雄で総蛋白及びクロールに変化がみられた。

生存動物の剖検観察では、前胃の肥厚が 1000 ppm 群の雌と 500 ppm 群の雌雄に、胸腺の萎縮が 1000 ppm 群の雌に、肝臓の白色斑が 500 ppm 群の雄にみられた。臓器重量では、肝臓の重量増加が 500 ppm 群の雄に、肺の重量増加が 1000 ppm 群の雌に、また、胸腺の重量低下が 1000 ppm 群の雌と 500 ppm 群の雌雄に、脾臓の重量低下が 1000 ppm 群と 500 ppm 群の雌に、卵巣の重量低下が 1000 ppm 群の雌に認められた。病理組織学的検査では、1000 ppm 群の雌は鼻腔、肺、胸腺、胃及び副腎に変化がみられた。500 ppm 群では、雌雄の鼻腔、肺、胸腺、胃及び雄の肝臓に変化がみられた。

以上のように、本試験では最低投与群の 500 ppm 群においても、血液系への影響、胸腺、肝臓、脾臓の重量への影響及び鼻腔、肺、胸腺、胃、肝臓への病理組織学的な影響が認められた。また、以上の結果から、吸入による 13 週間試験の投与濃度は、雌雄とも 500 ppm を最高濃度とし、以下、250、125、63、31 ppm (公比 2) と決定した。

I 試験材料

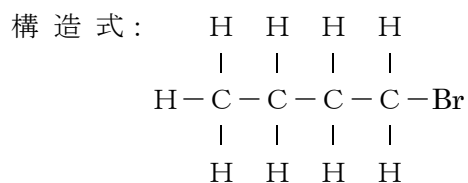
I-1 被験物質の性状等

I-1-1 名称等

名 称 : 1 - ブロモブタン (1 - Bromobutane)

CAS No. : 109 - 65 - 9

I-1-2 構造式、示性式及び分子量 (文献 1)



示性式 : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{Br}$

分子量 : 137.03

I-1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色透明の液体

沸 点 : 101.3°C

蒸気圧 : 41.97mmHg (25°C)

比 重 : 1.2686 (25°C/4°C)

溶解性 : 水に不溶、アルコール、エーテル、アセトン、クロロホルムに可溶

保管条件 : 室温で暗所に保管

I-2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : ASQ0017

製 造 元 : 和光純薬工業(株)

グ レ ー ド : 和光精製品

純 度 : 99.8% (和光純薬工業(株) 検査成績書データ)

I-3 被験物質の特性・同一性、安定性

I-3-1 特性・同一性

被験物質の同一性は、そのマススペクトルを質量分析計 (Hitachi M-80B) により測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) により測定し、それぞれの文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値 (文献 2) と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、また、赤外吸収スペクトルも文献値 (文献 3) と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 1-ブロモブタンであることを確認した。

なお、それらの結果は、APPENDIX A1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、投与開始前及び投与終了後にそのガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890A) により測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、測定結果に差はみられず、被験物質は投与期間中、安定であることを確認した。

なお、それらの結果は、APPENDIX A2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、1-ブロモブタンのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株)(厚木飼育センター:神奈川県厚木市下古沢 795)の Crj:BDF₁ マウス(SPF)の雌雄を使用した。なお、がん原性試験で使用する動物は、遺伝的に安定していること、腫瘍の自然発生率が低いこと、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることからの理由から、Crj:BDF₁ マウスと決定している。

マウス雌雄各 37 匹を生後 4 週齢で導入し (導入時体重範囲、雄:13.8~17.9g、雌:13.0~15.3g)、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で異常を認めない動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 30 匹 (群構成時体重範囲、雄:21.5~25.0g、雌:17.8~20.3g) を選別し、試験に用いた。

II 試験方法

II-1 投与

II-1-1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

II-1-2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した 1-ブロモブタンを含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。なお、対照群は新鮮空気による換気のみとした。

II-1-3 投与期間

投与期間は 1 日 6 時間、1 週 5 日の暴露で 2 週間とした。

II-1-4 投与濃度

8000、4000、2000、1000 及び 500 ppm の 5 段階（公比 2）の投与濃度を設定した。

II-1-5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与方法は労働環境における暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間はがん原性試験の投与濃度決定試験（13 週間試験）に使用する投与濃度を決定するため 2 週間とした。

投与濃度は以下のように決定した。1-ブロモブタンのマウスを用いた吸入による試験について文献検索を行ったが、信頼性の高い試験データは得られなかった。そこで、本試験で使用する吸入試験システムで、飼育環境条件（湿度 30～70%）を満たしながら濃度制御できる最高濃度 8000 ppm を雌雄とも最高濃度とし、以下、4000、2000、1000 及び 500 ppm（公比 2）と決定した。

II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の発生方法は FIGURE 1 に示した。被験物質供給装置（柴田科学(株) 特注）の発生容器内の 1-ブロモブタンを循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。この 1-ブロモブタンの蒸気を清浄空気（搬送空気）と混合し、さらに循環式恒温槽で一定温度に冷却、再加熱し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の 1-ブロモブタン濃度はガスクロマトグラフで監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように 1-ブロモブタンの吸入チャンバーへの供給量を調節した。

II-1-7 被験物質の濃度測定

吸入チャンバー内の 1-ブロモブタンの濃度は、自動サンプリング装置付のガスクロマトグラフ（Shimadzu GC-14A）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分毎に測定した。

濃度測定結果を APPENDIX B1 に示した。各投与群の 1-ブロモブタン濃度は、その平均値と設定濃度の差が 0.4%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100%）が 0.5%以内であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

II-2 動物管理

II-2-1 各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 5 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	動物数 (動物番号)	
		雄	雌
0	対 照 群	5 匹 (1001~1005)	5 匹 (2001~2005)
1	500 ppm 群	5 匹 (1101~1105)	5 匹 (2101~2105)
2	1000 ppm 群	5 匹 (1201~1205)	5 匹 (2201~2205)
3	2000 ppm 群	5 匹 (1301~1305)	5 匹 (2301~2305)
4	4000 ppm 群	5 匹 (1401~1405)	5 匹 (2401~2405)
5	8000 ppm 群	5 匹 (1501~1505)	5 匹 (2501~2505)

II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、発育順調で異常を認めない動物を体重の重い順より各群に1匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（層別体重平均法：適正層別方式）により実施した（文献4）。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間は色素塗布により、投与期間は耳パンチにより行い、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（AC-6 空調エリア）内の独立した室（604室）に収容し、飼育室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他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、吸入チャンバー内に移動し、馴化を開始した。馴化期間も1週間とし、投与開始日の前日に群構成を行った。投与期間中は吸入チャンバー内で飼育した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用した動物ケージを下表に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度については測定値（平均値±標準偏差）を（ ）内に記した。また、吸入チャンバー内環境の計測結果を APPENDIX B2 に示した。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境は、動物の健康状態に影響を与えるような変化は認められなかった。

	検疫室 (605 室)	吸入試験室 (604 室)	吸入チャンバー内	
			馴化期間	投与期間
温度	23±2℃ (23.2±0.1℃)	21±2℃ (21.8±0.2℃)	20~24℃	
湿度	55±15% (52±1%)	55±15% (58±1%)	30~70%	
明暗サイクル	12 時間点灯 (8 : 00~20 : 00) / 12 時間消灯 (20 : 00~8 : 00)			
換気回数	15~17 回/時		12±1 回/時	
圧力	—	—	0~-15 ×10Pa	
ケージへの動物 の収容方法	単飼	—	単飼	単飼
ケージの材質・ 形状	ステンレス製 2 連網ケージ	—	ステンレス製 6 連網ケージ	ステンレス製 5 連網ケージ
ケージ寸法 1 匹当り (mm)	W112 D212 H120	—	W 95 D116 H120	W100 D116 H120

飼料は全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)千葉工場（千葉県千葉市美浜区新港 8-2）の CRF-1 固型飼料（30KGy- γ 線照射滅菌飼料）を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、暴露中及び定期解剖日前日の夕方からは給餌しなかった。

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。ただし、暴露中は給水しなかった。

なお、試験に使用した飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)から自社分析データを入力し、保管した。飼料中の夾雑物については(財)日本食品分析センター（東京都渋谷区元代々木町 52-1）の分析データを入力し、また、飲水については(財)食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に分析を委託し、それぞれ試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した後、保管した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

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

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

II-3-2 体重測定

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

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、その値から摂餌量を算出した。

II-3-4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より、EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX L に示した。

[検査項目] 赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、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、白血球分類

II-3-5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より、ヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX L に示した。

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

II-3-6 病理学的検査

1 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

2 臓器重量

定期解剖動物について下記に示した各臓器の湿重量（実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の定期解剖時の体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

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 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、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、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（大腿骨）

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取り扱いと表示

各数値データは計測機器の精度に合わせて表示した。

チャンバー内の被験物質濃度は、ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで計測し、小数点以下第 2 位を四捨五入し、小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は、g を単位とし、小数点以下第 1 位まで計測し、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 位まで計測し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を計測期間の日数で除し 1 日当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 位まで計測し、表示した。臓器重量体重比は、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、血液生化学的検査は APPENDIX L に示した単位と精度により表示した。

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

II-4-2 母数の取り扱い

体重及び摂餌量は、各計測時に生存していた全動物を対象に計測し、測定した動物数を母数とした。

血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定は、定期解剖時まで生存した全動物を対象とし、検査動物数または測定動物数を母数とした。

剖検は全動物数を母数とした。

病理組織学的検査は臓器別に検査不能臓器数を除いたものを母数とした。

II-4-3 統計方法

雄の体重、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、検定の対象となる群が 2 群（対照群と 500 ppm 群）であったため、まず F 検定を行い、分布の違いが認められなかった場合は Student の t 検定を、分布の違いが認められた場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。

雌の体重、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、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。

なお、予備検定は 5%の有意水準で、最終検定は 5%及び 1%の有意水準で両側検定を行った。

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

動物の生死状況を TABLE 1, 2 に示した。

<雄>

1000 ppm 以上の群の全動物が、投与期間の 1 週の 5 日目までに死亡した。

4000 ppm 以上の群は 1 週の 1 日目の暴露後に全動物の死亡が確認された。2000 ppm 群は、1 週の 1 日目の暴露後に 1 匹、1 週の 2 日目の暴露開始前に 4 匹の死亡が確認された。

1000 ppm 群は、1 週の 2 日目の暴露開始前に 4 匹の死亡が確認され、1 週の 5 日目に 1 匹が死亡した。

他の群には死亡はみられなかった。

<雌>

2000 ppm 以上の群の全動物が、投与期間の 1 週の 2 日目までに死亡した。

4000 ppm 以上の群は 1 週の 1 日目の暴露後に、2000 ppm 群は 1 週の 2 日目の暴露開始前に、それぞれ全動物の死亡が確認された。

他の群には死亡はみられなかった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX C1, C2 に示した。

<雄>

4000 ppm 以上の群は、初日の暴露終了後に全動物の死亡が確認されたため、詳細観察による一般状態の変化は確認できなかった。2000 ppm 群は、初日の暴露終了後に生存していた 4 匹に、自発運動量の減少、立毛、不整呼吸、呼吸緩徐、体温低下がみられ、2 日目の暴露開始前に 4 匹の死亡が確認された。1000 ppm 群は初日の暴露終了後に、自発運動量の減少、立毛、不整呼吸が全動物にみられ、2 日目の暴露開始前に 4 匹の死亡が確認された。1 匹は 1 週の 5 日目に死亡したが、1 週の 2 日目から 4 日目に円背位、立毛、自発運動量の減少、尿による外陰部周囲の汚染、呼吸緩徐がみられた。

500 ppm 以下の群では、一般状態の変化はみられなかった。

<雌>

4000 ppm 以上の群は、初日の暴露終了後に全動物の死亡が確認されたため、詳細観察による一般状態の変化は確認できなかった。2000 ppm 群は、初日の暴露終了後に自発運動量の減少、立毛、不整呼吸、呼吸緩徐、体温低下が全動物にみられ、2 日目の暴露開始前に死亡が確認された。1000 ppm 群は初日の暴露終了後には一般状態の変化はみられなかったが、2 週の 3 日目に円背位 (2 匹)、立毛 (1 匹)、2 週の 7 日目に円背位、不整呼吸 (各 2 匹) が

みられた。

500 ppm 以下の群では、一般状態の変化はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE 1, 2、FIGURE 2, 3 及び APPENDIX D1, D2 に示した。

<雄>

生存動物では被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

<雌>

生存動物では 1000 ppm 群で体重増加の抑制が認められた。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量（1日1匹当り）を TABLE 3, 4 及び APPENDIX E1, E2 に示した。（雄の 1000 ppm 以上の群及び雌の 2000 ppm 以上の群は、投与期間の 1 週の 5 日目までに全動物が死亡したためにデータなし。）

<雄>

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

<雌>

1000 ppm 群の 2 週目の摂餌量が低値であった。

Ⅲ-5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 5, 6 及び APPENDIX F1, F2 に示した。（雄の 1000 ppm 以上の群及び雌の 2000 ppm 以上の群は、全動物が途中死亡したためにデータなし。）

<雄>

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少及び分葉核好中球比の減少とリンパ球比の増加が 500 ppm 群でみられた。

<雌>

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が 1000 ppm 群と 500 ppm 群でみられた。また、白血球数の減少が 1000 ppm 群でみられた。

その他、MCH の増加が 500 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ-6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 7, 8 及び APPENDIX G1, G2 に示した。(雄の 1000 ppm 以上の群及び雌の 2000 ppm 以上の群は、全動物が途中死亡したためにデータなし。)

<雄>

総蛋白の減少、総コレステロールの増加、クロールの増加が 500 ppm 群でみられた。

その他、ALP 及び尿素窒素に変化がみられたが、いずれも低下性の変化であり、毒性学的意義は不明であった。

<雌>

総コレステロールの増加が 1000 ppm 群でみられた。

その他、ALP 及び尿素窒素に変化がみられたが、いずれも低下性の変化であり、毒性学的意義は不明であった。

Ⅲ-7 病理学的検査

Ⅲ-7-1 剖検

剖検所見を APPENDIX H1～H4 に示した。

<雄>

8000 ppm 群 (死亡動物) では、肺の赤色斑 (3 匹) がみられた。

4000 ppm 群 (死亡動物) では、肺の赤色斑 (2 匹) がみられた。

2000 ppm 群 (死亡動物) では、肺の赤色斑 (3 匹) と赤色化 (1 匹) がみられた。

1000 ppm 群 (死亡動物) では、肺の赤色斑 (1 匹)、肝臓の小葉像明瞭化 (2 匹)、白色斑 (1 匹)、赤色斑 (1 匹) がみられた。

500 ppm 群には、肝臓の白色斑 (1 匹) と前胃の肥厚 (1 匹) がみられた。

<雌>

8000 ppm 群 (死亡動物) では、肺の赤色斑 (3 匹) がみられた。

4000 ppm 群 (死亡動物) では、変化が認められなかった。

2000 ppm 群 (死亡動物) では、肝臓の小葉像明瞭化 (5 匹)、肺の赤色斑 (3 匹)、赤色化 (1 匹) 及び胸水の貯留 (3 匹) がみられた。

1000 ppm 群には、胸腺の萎縮 (1 匹) と前胃の肥厚 (1 匹) がみられた。

500 ppm 群には、前胃の肥厚 (1 匹) がみられた。

Ⅲ-7-2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE 9, 10 及び APPENDIX I1, I2 (実重量)、APPENDIX J1, J2 (体重比) に示した。(雄の 1000 ppm 以上の群及び雌の 2000 ppm 以上の群は、全動物が途中死亡したためにデータなし。)

<雄>

肝臓の実重量と体重比の高値及び胸腺の実重量と体重比の低値が 500 ppm 群に認められた。

<雌>

肺の実重量と体重比の高値が 1000 ppm 群に認められた。また、肝臓と腎臓の体重比の高値が 1000 ppm 群と 500 ppm 群に、副腎の体重比の高値が 1000 ppm 群にみられた。これに対し、胸腺と脾臓の実重量と体重比の低値が 1000 ppm 群と 500 ppm 群に、卵巣の実重量と体重比の低値が 1000 ppm 群に認められた。

Ⅲ-7-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE 11~14 及び APPENDIX K1~K4 に示した。

<雄>

[8000 ppm 群]

肝臓の空胞変性が全動物で認められた。肝臓の空胞変性は肝細胞の細胞質内に微小な空胞が出現する所見であり、小葉全体の肝細胞に観察された。また、剖検時に肺の赤色斑がみられた動物 (3 匹) の肺には出血がみられた。

[4000 ppm 群]

肝臓の空胞変性と門脈域の出血が全動物で認められた。門脈域の出血の程度は中等度から重度であった。また、心臓の出血も全動物で認められ、この出血は左心室の心内膜下にみられた。肺には血管周囲の浮腫と出血が各々 4 匹と 2 匹にみられた。

[2000 ppm 群]

肝臓に空胞変性と小葉中心性の壊死が全動物で認められ、その程度は多くの動物が軽度であった。また、門脈域の出血が 1 匹にみられた。肺には血管周囲の浮腫と鬱血が全動物で認められ、出血と肺胞腔の浮腫が各 1 匹にみられた。その他、心臓の出血が 3 匹、鼻腔の嗅上皮の壊死が 2 匹、精巣の精原細胞壊死が 1 匹にみられた。

[1000 ppm 群]

肝臓に空胞変性と小葉中心性の出血が全動物で認められ、小葉中心性の壊死と水腫様の変性が各 1 匹にみられた。特に、肝臓の小葉中心性の出血は全動物とも重度な変化であった。肺には血管周囲の浮腫が全動物、鬱血が 1 匹にみられた。鼻腔には嗅上皮の壊死が全動物でみられた。また、心臓にはすり硝子状変化が 4 匹に認められた。すり硝子状変化は心筋の細

胞質内がすり硝子状を呈する所見であり、左心室の心筋に散在性にみられた。その他、胸腺と脾臓の萎縮、精巣の精原細胞壊死、腎臓の近位尿細管の壊死が各 1 匹にみられた。

[500 ppm 群]

鼻腔に嗅上皮の萎縮、肺に細気管支の好塩基性変化が全動物で認められたが、その程度は軽度であった。細気管支の好塩基性変化は、細気管支上皮が好塩基性に染色される所見であり、上皮細胞の脱落や核分裂像の出現を伴っていた。その他、胸腺の萎縮が 2 匹、前胃の過形成と糜爛が各々 2 匹と 1 匹、肝臓の巣状壊死が 1 匹にみられた。

<雌>

[8000 ppm 群]

肝臓の空胞変性が全動物で認められた。また、剖検時に肺の赤色斑がみられた動物 (3 匹) の肺には出血がみられた。

[4000 ppm 群]

肝臓の空胞変性が全動物で、門脈域の出血が 4 匹に認められ、また、心臓のすり硝子状変化が 4 匹に認められた。これらの所見の程度は多くの動物が中等度であった。さらに、心臓の出血、肺の血管周囲の浮腫や出血が各 1 匹にみられた。

[2000 ppm 群]

肝臓の小葉中心性の出血が全動物で、空胞変性が 4 匹に認められた。また、心臓のすり硝子状変化と肺の血管周囲の浮腫が全動物で、鼻腔の嗅上皮の壊死が 4 匹に認められた。特に、肝臓の小葉中心性の出血は全動物とも重度、また、心臓のすり硝子状変化は中等度から重度な変化であった。その他、心臓の出血や肺の鬱血が各 2 匹にみられた。

[1000 ppm 群]

鼻腔に嗅上皮の萎縮、肺に細気管支の好塩基性変化、胸腺に萎縮が全動物で認められたが、その程度は軽度であった。その他、前胃の過形成と糜爛が各々 2 匹と 1 匹、副腎の皮質の壊死が 2 匹にみられた。

[500 ppm 群]

鼻腔に嗅上皮の萎縮、肺に細気管支の好塩基性変化が全動物で、胸腺に萎縮が 4 匹に認められたが、その程度は軽度であった。その他、前胃の過形成が 3 匹、糜爛と潰瘍が各 1 匹にみられた。

IV 考察及びまとめ

1 - ブロモブタンのがん原性を検索する目的で、Crj:BDF₁マウスを用いた吸入による2年間(104週間)の試験を実施するに当たり、その予備試験である13週間試験の投与濃度を決定するための予備試験として本試験(2週間試験)を実施した。

本試験は、投与群5群、対照群1群の計6群(各群雌雄各5匹)を設け、1 - ブロモブタンの投与濃度は、8000、4000、2000、1000及び500 ppmとした。投与期間は1日6時間、1週5日間の投与(全身暴露による経気道投与)で2週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。また、投与期間中の死亡動物についても剖検観察及び病理組織学的検査を行った。

(1) 用量-反応関係

1 - ブロモブタンの暴露の結果、1000 ppm以上の群の雄及び2000 ppm以上の群の雌の全動物が死亡した。2000 ppm以上の群は雌雄とも1回の暴露で死亡し、1000 ppm群の雄は1週の5日目までに死亡した。1000 ppm群の雌及び500 ppm群の雌雄には死亡はみられなかった。

死亡動物では、4000 ppm以上の群は詳細観察による一般状態の変化は確認できなかったが、2000 ppm群は雌雄とも、初日の暴露終了後に自発運動量の減少、立毛、不整呼吸、呼吸緩徐、体温低下がみられた。1000 ppm群の雄では、初日の暴露終了後に自発運動量の減少、立毛、不整呼吸が全動物にみられ、1週の5日目に死亡した1匹には、2日目から4日目に円背位、立毛、自発運動量の減少、尿による外陰部周囲の汚染、呼吸緩徐がみられた。

死亡動物の病理学的検査では、8000 ppm群は剖検時に肺の赤色斑が雌雄とも一部の動物に観察された。病理組織学的検査では肝臓の空胞変性が雌雄とも全動物で認められた。また、剖検時に肺の赤色斑がみられた動物の肺には出血が認められた。動物の死亡は、この濃度では他の臓器には変化が認められないことから、肝臓や肺の変化が関与していると考えられる。

4000 ppm群の死亡動物には、剖検時に肺の赤色斑が雄の一部の動物に観察された。病理組織学的検査では肝臓と心臓の変化が雌雄とも多くの動物に認められた。また、肺の変化が雄の多くの動物と雌の少数の動物にみられた。肝臓の変化は空胞変性と門脈域の出血であった。心臓の変化は、雄は出血、雌は主にすり硝子状変化であり、ともに左心室の変化であった。肺の変化は血管周囲の浮腫や出血であった。動物の死亡は、8000 ppm群と同様に肝臓と肺に変化がみられることから、これらの変化が関与していると考えられるが、雌雄とも多くの動物に心臓の変化がみられ、この変化も動物の死亡に関与していたと推察される。

2000 ppm群の死亡動物には、剖検時に雄では肺の赤色斑や赤色化が多くの動物に観察され、雌には肝臓の小葉像明瞭化が全動物、肺の赤色斑や赤色化及び胸水の貯留が一部の動物でみられた。病理組織学的検査では雌雄とも肝臓、心臓、肺及び鼻腔に変化が認められた。

肝臓の変化は、空胞変性が雌雄とも多くの動物に認められ、雄には小葉中心性の壊死、雌には重度な小葉中心性の出血が全動物でみられた。心臓の変化は、雄には出血が一部の動物で認められ、雌では中等度から重度のすり硝子状変化が全動物にみられ、出血が一部の動物で認められた。肺の変化は血管周囲の浮腫や鬱血、鼻腔の変化は嗅上皮の壊死であった。その他、雄には精巣の精原細胞壊死が1匹にみられた。動物の死亡は、多くの動物に肺、肝臓及び心臓の変化が認められることから、4000 ppm 群と同様にこれらの臓器の変化が関与していたと考えられる。

1000 ppm 群の雄の死亡動物では、剖検時に肝臓に小葉像明瞭化や白色斑、赤色斑がみられた。病理組織学的検査では多くの動物に肝臓、肺、鼻腔及び心臓に変化が認められた。肝臓の変化は主に空胞変性と小葉中心性の重度な出血、肺の変化は血管周囲の浮腫、鼻腔の変化は嗅上皮の壊死、心臓の変化はすり硝子状変化であり、4000 ppm 群と同様に肺、肝臓及び心臓の変化が死亡に関与していたと考えられた。また、少数の動物に胸腺と脾臓の萎縮、精巣の精原細胞壊死、腎臓の近位尿細管の壊死がみられた。

1000 ppm 以下の群の生存動物（1000 ppm 群の雌及び500 ppm 群の雌雄）では、一般状態の観察で1000 ppm 群の雌に、2週の3日目から7日に円背位、立毛、不整呼吸がみられた。また、体重増加の抑制が1000 ppm 群の雌に認められた。

生存動物の血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の減少が1000 ppm 群の雌及び500 ppm 群の雌雄でみられ、投与群で生存した群には全て貧血の傾向がみられた。また、白血球数の減少が1000 ppm 群の雌で、分葉核好中球比の減少とリンパ球比の増加が500 ppm 群の雄でみられた。

生存動物の血液生化学的検査では、総コレステロールの増加が1000 ppm 群の雌と500 ppm 群の雄で、総蛋白の減少及びクロールの増加が500 ppm 群の雄でみられた。

生存動物の剖検観察では、1000 ppm 群の雌には胸腺の萎縮と前胃の肥厚、500 ppm 群の雄には肝臓の白色斑と前胃の肥厚、雌には前胃の肥厚が少数の動物にみられた。臓器重量では、肝臓の重量増加が500 ppm 群の雄に、肺の重量増加が1000 ppm 群の雌に認められた。また、胸腺の重量低下が1000 ppm 群の雌と500 ppm 群の雌雄に、脾臓の重量低下が1000 ppm 群と500 ppm 群の雌に、卵巣の重量低下が1000 ppm 群の雌に認められた。なお、雌では肝臓と腎臓の体重比の高値が1000 ppm 群と500 ppm 群に、副腎の体重比の高値が1000 ppm 群にみられた。これらのうち、1000 ppm 群の変化は解剖時体重の低値によるものと思われるが、肝臓は500 ppm 群の雄で重量の増加がみられ、また、雌の1000 ppm 群と500 ppm 群の肝臓の実重量は対照群に比べやや高値であることから、雌の1000 ppm 群と500 ppm 群の肝臓は重量が増加している可能性がある。

生存動物の病理組織学的検査では、1000 ppm 群の雌は、鼻腔に嗅上皮の萎縮、肺に細気管支の好塩基性変化、胸腺に萎縮が全動物で認められたが、その程度は軽度であった。細気管支の好塩基性変化は、細気管支上皮が好塩基性に染色される所見であり、上皮細胞の脱落や核分裂像の出現を伴っていることから、細気管支上皮に傷害が起きていたことを示す所見

であると考えられる。その他、一部の動物には前胃の過形成や糜爛、副腎の皮質の壊死もみられた。前胃の過形成は前胃上皮の傷害に伴ってみられる増殖性の所見であり（文献5）、経気道的に吸入された1-ブロモブタンが鼻腔などの気道に吸着し、気道における異物の排泄機能である粘液線毛運動等によって、口腔を経由して胃に運ばれたことにより引き起こされたものと考えられた（文献6）。なお、臓器重量に変化のみられた脾臓、卵巣及び重量体重比のみに変化のみられた肝臓、腎臓には病理組織学的変化が認められなかった。

500 ppm 群では、雌雄とも鼻腔（嗅上皮の萎縮）、肺（細気管支の好塩基性変化）、胸腺（萎縮）及び前胃（過形成や糜爛、潰瘍）に変化が認められたが、その程度は前胃の過形成が中等度であった以外は軽度であった。また、肝臓には雄の1匹に巣状壊死がみられた。なお、臓器重量に変化のみられた脾臓及び雌で重量体重比のみに変化のみられた腎臓には病理組織学的変化が認められなかった。

(2) 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)

以上のように、1-ブロモブタンのマウスへの2週間吸入暴露により、1000 ppm 以上の群の雄及び2000 ppm 以上の群の雌で動物が死亡した。500 ppm 群では死亡はみられなかったが、雌雄で貧血の傾向がみられ、雌雄の胸腺、雄の肝臓、雌の脾臓に重量の変化がみられた。また、病理組織学的検査では、雌雄の鼻腔、肺、胸腺、前胃、雄の肝臓に変化がみられた。従って、本試験では最低投与群の500 ppm 群においても、血液系への影響、胸腺、肝臓、脾臓の重量への影響及び鼻腔、肺、胸腺、胃、肝臓への病理組織学的な影響が認められた。

(3) 13週間試験の濃度決定

本試験の結果より、13週間試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では、1000 ppm 以上の群の雄及び2000 ppm 以上の群の雌で動物の死亡がみられたが、500 ppm 群では死亡がみられなかった。500 ppm 群では、雌雄で貧血の傾向がみられ、病理組織学的検査では、雌雄の鼻腔、肺、胸腺、前胃、雄の肝臓に変化がみられた。また、血液生化学的検査、剖検、臓器重量にも変化がみられた。しかし、貧血は軽度であり、病理組織学的検査でみられた変化も多くは軽度なものであった。その他にも重篤な変化はみられなかった。これらの結果より、13週間試験の投与濃度は、雌雄とも500 ppm を最高濃度とし、以下、250、125、63、31 ppm（公比2）と決定した。

V 文献

1. U.S. National Library of Medicine, Specialized Information Services 2004. N-Butyl Bromide, Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank(HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search> [accessed 9 June 2004].
2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
3. 和光純薬工業(株). 2003. 1 - ブロモブタン, 赤外吸収スペクトル.
4. 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.
5. Frantz JD, Betton G, Cartwright ME, Crissman JW, Macklin AW, Maronpot RR.1991. Proliferative lesions of the non-glandular and glandular stomach in rats, GI-3. In: Guides for Toxicologic Pathology. 1-20. STP/ARP/AFIP, Washington,DC.
6. Haschek WM, Witschi HR. 1991. Respiratory system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA:Academic Press, 761-827.