

1 - ブロモブタンのラットを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0503

CAS No. 109-65-9

2004年12月24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

標題

1 - プロモブタンのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験

試験目的

1 - プロモブタンの吸入によるがん原性試験の投与濃度を決定する予備試験として、
1 - プロモブタンをラットに 13 週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 413 (亜慢性吸入毒性：90 日試験 1981 年 5 月 12 日採択) を参考に実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「労働安全衛生法に基づく試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP)」(一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) に準じて実施した。

試験委託者

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

試験施設及び運営管理者

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
副所長 山本 静護
神奈川県秦野市平沢 2445

1 - ブロモブタンのラットを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0503

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	尿検査	7
II-3-5	血液学的検査	8
II-3-6	血液生化学的検査	8
II-3-7	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	10
III	試験成績	
III-1	生死状況	11
III-2	一般状態	11
III-3	体重	11
III-4	摂餌量	11
III-5	尿検査	12
III-6	血液学的検査	12
III-7	血液生化学的検査	12
III-8	病理学的検査	
III-8-1	剖検	13
III-8-2	臓器重量	13
III-8-3	病理組織学的検査	14
IV	考察及びまとめ	16
V	文献	18

要約

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

本試験は、F344/DuCrj(Fischer)ラットを投与群5群、対照群1群の計6群(各群雌雄各10匹)に分け、1-ブロモブタンの投与濃度は、1000、500、250、125及び63 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13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、尿検査を行い、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。

1-ブロモブタンの暴露の結果、動物の死亡はみられなかった。一般状態の観察では、瘦削、立毛及び尿による外陰部周囲の汚染が、投与13週目に1000 ppm群の雌1匹にみられただけであったが、体重増加の抑制が500 ppm以上の群の雄と1000 ppm群の雌で認められた。

血液への影響は、貧血が1000 ppm群の雌雄に認められた。また、プロトロンビン時間の延長が1000 ppm群の雌にみられた。

病理組織変化は、胃、小脳、精巣及び鼻腔に認められた。前胃扁平上皮の過形成が雌雄とも主に1000 ppm群にみられ、雌では250 ppm群の1匹にもこの変化が認められた。小脳には雌雄とも顆粒細胞の変性と顆粒層への鉍質沈着が1000 ppm群で、精巣には精原細胞壊死と鉍質沈着が1000 ppm群でみられた。鼻腔には嗅上皮への影響(萎縮、配列不整、呼吸上皮化生)がみられ、配列不整は雌雄とも250 ppm群まで認められた。

臓器重量は、肝臓の重量増加が250 ppm以上の群の雌雄、腎臓の重量増加が500 ppm以上の群の雌、副腎と肺の重量増加が1000 ppm群の雌でみられた。

以上の結果から、1-ブロモブタンのラットに対する13週間吸入暴露による無毒性量(NOEL)は、胃と鼻腔への影響及び肝臓の重量増加をエンドポイントとして125 ppmであると考えられた。また、吸入による2年間のがん原性試験の最大耐量を500 ppmと推定し、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも500 ppmを最高濃度とし、以下、250、125 ppm(公比2)と決定した。

I 試験材料

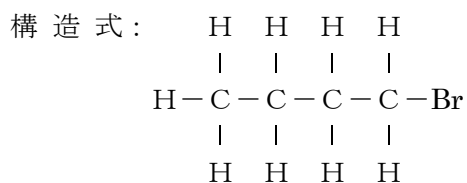
I-1 被験物質の性状等

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 F344/DuCrj (Fischer) ラット(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、F344/DuCrj(Fischer)ラットと決定している。

ラット雌雄各 75 匹を生後 4 週齢で導入し (導入時体重範囲、雄:57~67g、雌:48~59g)、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 60 匹 (群構成時体重範囲、雄:117~131g、雌:91~100g) 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（祝祭日は暴露なし）で 13 週間とし、計 61 回の暴露を行った。

II-1-4 投与濃度

1000、500、250、125 及び 63 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を決定するため 13 週間とした。

投与濃度は 2 週間の予備試験（試験番号 0480）の結果（文献 4）をもとに決定した。2 週間試験は 8000、4000、2000、1000 及び 500 ppm（公比 2）の濃度で行った。その結果、2000 ppm 以上の群で動物の死亡がみられたが、1000 ppm 以下の群では死亡がみられなかった。1000 ppm 群では、雄で体重増加の抑制、雌雄で血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、病理組織学的検査に変化がみられたが、雄の体重増加の抑制は対照群の 10%未満であり、病理組織学的検査では雌雄とも鼻腔に軽度な変化がみられただけであった。これらの結果より、13 週間吸入試験の投与濃度は、雌雄とも 1000 ppm を最高濃度とし、以下、500、250、125、63 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、清浄空気のパ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循環式恒温槽で一定温度に冷却した。次に、清浄空気（希釈空気）と混合して、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 0.5%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100%）が 0.6%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 10 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	雄 使用動物数（動物番号）	雌 使用動物数（動物番号）
0	対 照 群	10 匹（1001～1010）	10 匹（2001～2010）
1	63 ppm 群	10 匹（1101～1110）	10 匹（2101～2110）
2	125 ppm 群	10 匹（1201～1210）	10 匹（2201～2210）
3	250 ppm 群	10 匹（1301～1310）	10 匹（2301～2310）
4	500 ppm 群	10 匹（1401～1410）	10 匹（2401～2410）
5	1000 ppm 群	10 匹（1501～1510）	10 匹（2501～2510）

II-2-2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、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5）。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間は色素塗布により、投与期間は耳パンチにより行い、また、全期間を通してケージにも個体識別番号を付した。

なお、動物はバリア区域（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 (606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℃ (23.0±0.1℃)	21±2℃ (20.7±0.4℃)	20~24℃	
湿度	55±15% (54±1%)	55±15% (59±2%)	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）	W170 D294 H176	—	W125 D216 H176	W150 D216 H176

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、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。

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手し、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）の分析データを入手し、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、その記録を保管した。

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、毎日 1 回行った。また、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、投与期間中は週 1 回、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、投与期間中は週 1 回、暴露開始前に行った。また、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 尿検査

投与期間の最終週に採尿可能な動物から新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティ ステック ス、バイエル社製）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、ビリルビン、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、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より、EDTA-2 カリウム入り採血管及びクエン酸ナトリウム入り採血管（下記*印検査項目）に採血した。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、クエン酸ナトリウム入り採血管の血液は、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 M 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 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、血小板数、網赤血球比、プロトロンビン時間*、活性化部分トロンボプラスチン時間* (APTT)、白血球数、白血球分類

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 M 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、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

II-3-7 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

全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、骨髄（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、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。

吸入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 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は g を単位とし、整数値の 1 の位まで計測し、表示した。

摂餌量は 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 位を四捨五入して小数点以下第 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 M 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して表示した。

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、計測した動物数を母数とした。

尿検査は、投与最終週に行い、採尿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計測は、定期解剖時まで生存した全動物を対象とし、検査動物数または計測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

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。

病理組織学的検査の非腫瘍性病変は、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等を基準として 1~4 にグレード分けし、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても χ^2 検定を行った。

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。
雌雄とも、動物の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 C に示した。

<雄>

変化はみられなかった。

<雌>

1000 ppm 群で、投与 13 週目に瘦削、立毛及び尿による外陰部周囲の汚染が 1 匹にみられた。

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>

500 ppm 以上の群で体重増加の抑制が認められた。

<雌>

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>

投与期間 1 週目に 500 ppm 以上の群の値が低値、他の投与群の値がやや低値であった。

また、7 週以降、250 ppm 以上の群でやや高値な週が散見されたが、被験物質との関連は不明であった。

<雌>

投与期間 1 週目に、250 ppm 以上の群の値がやや低値であった。

また、4 週以降、250 ppm 以上の群が高値であったが、被験物質との関連は不明であった。

Ⅲ-5 尿検査

尿検査の結果を APPENDIX F1, F2 に示した。

<雄>

被験物質の影響と思われる変化は認められなかった。

なお、ケトン体陽性例の減少が 500 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

<雌>

変化はみられなかった。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE 5, 6 及び APPENDIX G1, G2 に示した。

<雄>

赤血球数、ヘモグロビン濃度の減少及び MCV、MCH の増加、MCHC の減少が 1000 ppm 群でみられた。また、血小板数と網赤血球比の増加が 250 ppm 以上の群でみられた。

その他、MCV の減少が 63 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。また、プロトロンビン時間の変化が 500 ppm 以上の群で、活性化部分トロンボプラスチン時間の変化が 1000 ppm 群でみられたが、それぞれ時間の短縮であり、毒性学的意義は不明であった。

<雌>

赤血球数、ヘモグロビン濃度の減少が 1000 ppm 群で、MCV の増加が 500 ppm 以上の群で、MCHC の減少が 1000 ppm 群でみられた。また、血小板数と網赤血球比の増加が 500 ppm 以上の群で、プロトロンビン時間の延長が 1000 ppm 群でみられた。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE 7, 8 及び APPENDIX H1, H2 に示した。

<雄>

総蛋白の増加が 125 ppm 以上の群で、アルブミンの増加が 500 ppm 以上の群でみられた。また、総ビリルビンの増加が 1000 ppm 群で、トリグリセライドの減少が 250 ppm 以上の群でみられた。電解質では、ナトリウムの減少とカルシウムの増加が 500 ppm 以上の群で、クロールの増加が 1000 ppm 群でみられた。

その他、A/G 比の減少が 250 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。また、GOT、GPT、LDH、ALP、CPK 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>

総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、 γ -GTP の増加が 1000 ppm 群でみられた。電解質では、ナトリウムの減少とカルシウムの増加が 500 ppm 以上の群で、クロールの増加が 1000 ppm 群でみられた。

その他、総ビリルビンの増加が 125 ppm 群で、トリグリセライドの増加が 500 ppm 群で、クロールの増加が 250 ppm 群でみられたが、それぞれ投与濃度に対応した変化ではなかった。また、GPT、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-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 剖検

剖検所見を APPENDIX I1, I2 に示した。

<雄>

被験物質の影響と思われる所見は認められなかった。

<雌>

1000 ppm 群は、1 匹に胸腺の萎縮がみられた。

500 ppm 以下の群には、被験物質の影響と思われる所見は認められなかった。

Ⅲ-8-2 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 J1, J2 (実重量)、APPENDIX K1, K2 (体重比) に示した。

<雄>

肝臓では、実重量の高値が 1000 ppm 群を除く投与群に、体重比の高値が 250 ppm 以上の群にみられた。腎臓では体重比の高値が 125 ppm 以上の群でみられた。また、肺の実重量の低値が 1000 ppm 群に、体重比の高値が 250 ppm 以上の群でみられ、さらに、精巣、心臓、脾臓、脳の実重量の低値が 1000 ppm 群に、体重比の高値が 500 ppm 以上の群に、胸腺の実重量の低値及び副腎の体重比の高値が 1000 ppm 群にみられた。

これらの変化のうち、肝臓は 500 ppm 群と 250 ppm 群に実重量と体重比の高値がみられ、1000 ppm 群では体重比の高値がみられた。1000 ppm 群は解剖時体重がかなり低値（対照群の 73%）であったが、肝臓の実重量は対照群よりやや高値であり、1000 ppm 群の肝臓も重量増加していると思われる。125 ppm 群と 63 ppm 群は実重量が高値であったが、体重比に有意な変化がみられず、重量が増加しているとは判断できなかった。従って、250 ppm 以上の群で暴露による肝重量の増加があったと判断した。

他の臓器の 1000 ppm 群の実重量の低値と 500 ppm 以上の群の体重比の高値は、1000 ppm 群と 500 ppm 群の解剖時体重の低値によるものと思われる。また、腎臓は 250 ppm 群と 125 ppm 群で、肺は 250 ppm 群でも体重比が高値であったが、それぞれ実重量は対照群と同様な値であり、被験物質の影響が不明であった。

<雌>

肝臓では、実重量と体重比の高値が 250 ppm 以上の群で、体重比の高値が 63 ppm 群でみられた。腎臓では実重量と体重比の高値が 500 ppm 以上の群にみられた。また、脾臓の実重量の低値が 1000 ppm 群で、体重比の高値が 500 ppm 群と 250 ppm 群で、脳の実重量の低値が 500 ppm 以上の群で、体重比の高値が 1000 ppm 群でみられた。副腎、心臓及び肺では体重比の高値が 500 ppm 以上の群にみられた。さらに、胸腺の実重量の低値が 1000 ppm 群にみられた。

これらの変化のうち、肝臓は 250 ppm 以上の群で、腎臓は 500 ppm 以上の群で実重量と体重比の高値がみられ、それぞれ暴露によると考えられる重量増加がみられた。肝臓は 63 ppm 群でも体重比の高値がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。副腎と肺は 1000 ppm 群で体重比の高値がみられた。1000 ppm 群は解剖時体重がかなり低値（対照群の 84%）であったが、副腎と肺の実重量はそれぞれ対照群よりやや高値であり、1000 ppm 群の副腎と肺は、暴露により重量が増加していると思われる。

胸腺は 1000 ppm 群で実重量の低値がみられ、体重比の平均値も有意差はみられないものの対照群より低値であった。しかし、同群では胸腺の萎縮が 1 匹にみられ、その動物の胸腺重量は著しく低かったが、他の動物の胸腺の体重比は対照群とは大きな差はなかった。従って、1000 ppm 群の胸腺の実重量の低値は解剖時体重の低値によるものか、あるいは、被験物質の影響かは不明であった。

他の臓器の 1000 ppm 群の実重量の低値と体重比の高値は、1000 ppm 群の解剖時体重の低値によるものと思われる。また、脳は 500 ppm 群で実重量が低値であったが、体重比は対照群と同様な値であり、また、脾臓は 500 ppm 群と 250 ppm 群で、副腎、心臓、肺は 500 ppm 群で体重比が高値であったが、それぞれの実重量は対照群と同様な値であり、これらの変化が被験物質の影響が不明であった。

III-8-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE 11, 12 及び APPENDIX L1, L2 に示した。

<雄>

[1000 ppm 群]

鼻腔、胃、精巣及び小脳に変化が認められた。

鼻腔の変化は嗅上皮にみられ、萎縮が 5 匹、配列不整が 6 匹、また、呼吸上皮化生が 3 匹に認められた。萎縮は嗅細胞の数の減少、配列不整は嗅上皮を構成する細胞の配列が乱れた

所見、呼吸上皮化生は嗅上皮が呼吸上皮に置き換わった所見である。

胃の変化は前胃にみられ、前胃の過形成、すなわち扁平上皮の細胞層が厚くなる所見が 4 匹に認められた。

精巣には精原細胞壊死が全動物でみられ、4 匹は鉍質沈着を伴っていた。

小脳には顆粒細胞の変性、すなわち小脳の顆粒層の顆粒細胞に核の濃縮や崩壊像が出現する所見が 1 匹にみられ、また、顆粒層への鉍質沈着が 3 匹に認められた。

これらの所見の程度は、前胃の過形成が 1 匹で中等度であった以外は、軽度な変化であった。

[500 ppm 群]

鼻腔と胃に変化が認められた。鼻腔には嗅上皮の配列不整が 6 匹、呼吸上皮化生が 2 匹に認められた。胃には前胃の過形成が 1 匹にみられた。所見の程度は、いずれも軽度であった。

[250 ppm 群]

鼻腔に軽度な嗅上皮の配列不整が 3 匹に認められた。

[125 ppm 群、63 ppm 群]

被験物質の影響と思われる所見は認められなかった。

<雌>

[1000 ppm 群]

鼻腔、胃及び小脳に変化が認められた。鼻腔の変化は雄と同様に嗅上皮にみられ、萎縮が 4 匹、配列不整が 8 匹、呼吸上皮化生が 2 匹に認められた。胃には、前胃の過形成が 2 匹、前胃の糜爛が 1 匹にみられた。小脳には顆粒細胞の変性が 5 匹、顆粒層への鉍質沈着が 1 匹に認められた。これらの所見の程度は、小脳の顆粒細胞の変性が 2 匹で中等度であった以外は、軽度な変化であった。

なお、剖検で胸腺に萎縮がみられた 1 匹には、病理組織学的にも胸腺に軽度な萎縮が認められた。

[500 ppm 群]

鼻腔に軽度な嗅上皮の配列不整が 3 匹に認められた。

[250 ppm 群]

鼻腔に軽度な嗅上皮の配列不整が 2 匹に認められた。また、胃には軽度な前胃の過形成が 1 匹にみられた。

[125 ppm 群、63 ppm 群]

被験物質の影響と思われる所見は認められなかった。

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、F344/DuCrj (Fischer)ラット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、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験(13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10匹)を設け、1-ブロモブタンの投与濃度は、1000、500、250、125及び63 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13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、尿検査を行い、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。

(1) 用量-反応関係

1-ブロモブタンの暴露の結果、動物の死亡はみられなかった。一般状態の観察では、瘦削、立毛及び尿による外陰部周囲の汚染が、投与13週目に1000 ppm群の雌1匹にみられただけであったが、体重増加の抑制が500 ppm以上の群の雄と1000 ppm群の雌で認められた。

血液への影響として、赤血球数とヘモグロビン濃度の減少及び網赤血球比の増加が1000 ppm群の雌雄にみられ、貧血が1000 ppm群の雌雄に認められた。赤血球数等の変化により、1000 ppm群ではMCV、MCH、MCHCの値が変化した。また、血小板数の増加が1000 ppm群の雌雄にみられ、この変化及び網赤血球比の増加は貧血に対する反応性変化と考えられた(文献6)。血小板数と網赤血球比の増加は、500 ppm群の雌雄と250 ppm群の雄にもみられ、また、MCVの増加は500 ppm群の雌にみられたが、赤血球数、ヘモグロビン濃度等の減少はみられなかった。さらに、プロトロンビン時間の延長が1000 ppm群の雌にみられ、1-ブロモブタンの血液凝固系への影響を示唆する変化と思われる。なお、血球系と血液凝固系への影響を示唆する病理組織所見は認められなかった

病理組織変化は、胃、小脳、精巣及び鼻腔に認められた。

胃の変化は、1000 ppm群で前胃の扁平上皮に過形成が雌雄とも認められ、雌の1匹には糜爛の発生もみられた。過形成は500 ppm群の雄の1匹、250 ppm群の雌の1匹にもみられた。本試験の予備試験として行った2週間試験では、2000 ppm群で前胃の糜爛と潰瘍がみられており(文献4)、13週間の暴露により前胃の傷害が扁平上皮の過形成に進んだことが示された。前胃の過形成は刺激に対する反応性の変化として現れる増殖性病変であり(文献7)、気道に吸着した1-ブロモブタンが粘液線毛運動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8)。

小脳には、顆粒細胞の変性と顆粒層における鉍質沈着が雌雄とも1000 ppm群のみに認められた。この所見は、臭化メチルの吸入によってラットとマウスの小脳に発生する変化と同様の組織像であった(文献9)。小脳顆粒細胞の変性は2週間試験でも、2000 ppm群の雌雄

にみられており（文献 4）、この変化は暴露の継続により低濃度で発現したことが示された。

精巣には精原細胞壊死や鉍質沈着が 1000 ppm 群でみられた。

精原細胞壊死は、2 週間試験でも、2000 ppm 群にみられており（文献 4）、この変化は暴露の継続により低濃度まで発現したことが示された。

鼻腔の変化は、雌雄とも 250 ppm 群まで認められた。1000 ppm 群では、雌雄とも嗅上皮に萎縮、配列不整及び呼吸上皮化生が認められた。500 ppm 群では、配列不整が雌雄に、呼吸上皮化生が雄にみられた。また、250 ppm 群では、配列不整が雌雄ともに認められた。これらの所見は 1-ブロモブタンの暴露により嗅上皮に傷害が発生することを示している。嗅上皮への影響は、2 週間試験でも最低濃度である 500 ppm 群までみられている（文献 4）。

なお、肝臓の重量増加が 250 ppm 以上の群の雌雄に、腎臓の重量増加が 500 ppm 以上の群の雌に、副腎と肺の重量増加が 1000 ppm 群の雌に認められたが、臓器重量に変化のみられたこれらの臓器には、病理組織変化は認められなかった。また、雌の 1 匹の胸腺に萎縮がみられたが、1-ブロモブタンとの関連は明らかではなかった。

(2) 無毒性量 (NOAEL) / 最小毒性量 (LOAEL)

以上のように、1-ブロモブタンのラットへの 13 週間吸入暴露により、動物の死亡はみられなかったが、250 ppm 群では病理組織所見で前胃の過形成（雌）、鼻腔の嗅上皮の配列不整（雌雄）、肝臓に重量増加（雌雄）がみられた。125 ppm 群では、投与に関連した明らかな影響は認められなかった。従って、本試験における 1-ブロモブタンのラットに対する 13 週間吸入暴露による無毒性量 (NOAEL) は、肝臓の重量及び鼻腔と胃への影響をエンドポイントとして 125 ppm であると考えられた。

(3) がん原性試験の濃度決定

本試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では動物の死亡はみられなかったが、1000 ppm 群では雌雄に体重増加の抑制及び貧血が認められ、病理組織所見では、雌雄で鼻腔、胃及び小脳に、雄で精巣に変化がみられた。また、臓器重量にも変化がみられた。特に、最終体重は対照群に対し、雄で 74%、雌で 85%であることから、1000 ppm はがん原性試験における最大耐量を越えると思われた。500 ppm 群は、雄に体重増加の抑制がみられ、病理組織所見では雌雄で鼻腔に、雄で前胃に変化がみられた。また、臓器重量にも変化がみられた。しかし、雄の体重増加の抑制は対照群の 10%（最終体重：対照群の 90%）であり、病理組織変化はいずれも軽度であった。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、500 ppm が 2 年間のがん原性試験における最大耐量であると考え、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 500 ppm を最高濃度とし、以下、250、125 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. 日本バイオアッセイ研究センター. 2004. 1 - ブロモブタンのラットを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書. 神奈川 : 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.
5. 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14:7285-7302.
6. 宮地勇人. 2002. 血液細胞アトラス-2, 写真と検査データでみる血液細胞の実践的読み方 (東海大学医学部附属病院臨床検査科血液検査室編). 東京 : 東海大学出版会, 13-14.
7. 真鍋淳, 松沼尚史, 高橋道人, 立松正衛, 西川秋佳. 2000. 各論 4 章, 消化管, 毒性病理組織学 (日本毒性病理学会編). 名古屋 : 日本毒性病理学会, 153-178.
8. Haschek WM, Witschi HR. 1991. Respiratory system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA : Academic Press, 761-827.
9. Hurtt ME, Morgan KT, Working PK. 1987. Histopathology of acute toxic responses in selected tissues from rats exposed by inhalation to methyl bromide. Fundam Appl Toxicol 9: 352-365.