

1 - ブロモブタンのマウスを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0504

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 - ブロモブタンのマウスを用いた吸入による 13 週間毒性試験

試験目的

1 - ブ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 - ブロモブタンをマウスに 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 - ブロモブタンのマウスを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0504

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 | 9 |
| 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 | 12 |
| III-8-2 | 臓器重量 | 13 |
| III-8-3 | 病理組織学的検査 | 13 |
| 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、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10匹)に分け、1-ブロモブタンの投与濃度は、500、250、125、63及び31 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、1-ブロモブタンの影響と思われる変化はみられなかったが、体重増加の抑制は全投与群の雄にみられた。

血液への影響は、貧血が250 ppm以上の群の雄と500 ppm群の雌に認められた。

病理組織変化は、胃、肝臓、肺及び鼻腔に認められた。前胃の扁平上皮の過形成が雌雄とも250 ppm以上の群に認められた。肝臓には、雄の250 ppm群で小葉中心性の壊死と肝細胞の核の大型化が全動物でみられ、血漿GPTも増加した。500 ppm群では肝臓重量が増加したが、病理組織変化は数匹のみに認められた。肺には、雌雄とも31 ppm群まで細気管支の好塩基性変化が認められた。鼻腔には、雄では嗅上皮の配列不整と呼吸上皮化生、雌では嗅上皮の配列不整、呼吸上皮と嗅上皮のエオジン好性変化がみられ、嗅上皮のエオジン好性変化は31 ppm群まで認められた。

その他の臓器には、脾臓の重量低下が250 ppm以上の群の雌で、副腎の重量低下が500 ppm群の雌で認められた。

以上の結果から、1-ブロモブタンのマウスに対する13週間吸入暴露による最小毒性量(LOAEL)は、体重及び肺と鼻腔への影響をエンドポイントとして31 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125 ppmと推定し、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも125 ppmを最高濃度とし、以下、50、20 ppm(公比2.5)と決定した。

I 試験材料

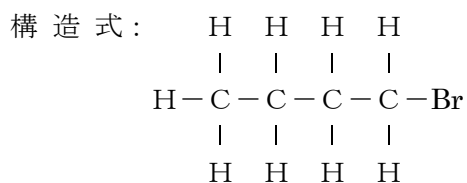
I-1 被験物質の性状等

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 75 匹を生後 4 週齢で導入し (導入時体重範囲、雄:14.3~19.7g、雌:12.8~17.2g)、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:22.7~26.1g、雌:18.0~20.9g) 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

500、250、125、63 及び 31 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 0481）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、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 週間吸入試験の投与濃度は、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。

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 0.3%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 | 動物番号 | |
|-----|-----------|------------------|------------------|
| | | 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 | 31 ppm 群 | 10 匹（1101～1110） | 10 匹（2101～2110） |
| 2 | 63 ppm 群 | 10 匹（1201～1210） | 10 匹（2201～2210） |
| 3 | 125 ppm 群 | 10 匹（1301～1310） | 10 匹（2301～2310） |
| 4 | 250 ppm 群 | 10 匹（1401～1410） | 10 匹（2401～2410） |
| 5 | 500 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 (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℃ (20.7±0.5℃) | 20~24℃ | |
| 湿度 | 55±15% (51±1%) | 55±15% (58±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) | W112 D212 H120 | — | W95 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、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、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（ウロラプ スティック 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、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 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、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、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、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。

吸入チャンバー内の被験物質濃度については ppm を単位として、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、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>

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、瘦削が投与 1 週目に 250 ppm 群と 125 ppm 群に 1 匹、円背位が 3 週目に 125 ppm 群に 1 匹みられたが、他には投与群に所見がみられなかった。

<雌>

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>

全投与群で体重増加の抑制が認められた。

最終体重は対照群に対して、500 ppm 群：91%、250 ppm 群：90%、125 ppm 群：92%、63 ppm 群：94%、31 ppm 群：95%となり、投与群間では大きな差はみられなかった。

<雌>

変化はみられなかった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量（1 日 1 匹当たり）を TABLE 3, 4 及び APPENDIX E1, E2 に示した。

<雄>

投与期間 1 週目に 125 ppm 以上の群の値がやや低値であった。

<雌>

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、投与期間 1 週目に 250 ppm 群で、6 週目に 250 ppm 以上の群でやや低値であった

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。

雌雄とも、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、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少が 250 ppm 以上の群で、MCV の増加が 500 ppm 群でみられた。

<雌>

赤血球数の減少が 500 ppm 群でみられた。また、MCV の増加が 250 ppm 以上の群で、MCH の増加及び MCHC の減少が 500 ppm 群でみられた。

その他、MCHC の減少が 125 ppm 群と 63 ppm 群で、リンパ球比の減少が 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。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

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

<雄>

総コレステロールの増加が 250 ppm 以上の群でみられた。また、総蛋白、アルブミン、GPT、ALP、カルシウムの増加が 250 ppm 群でみられた。

その他、CPK に変化がみられたが、低下性の変化であり、毒性学的意義は不明であった。

<雌>

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、CPK に変化がみられたが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。

雌雄とも、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 8, 9 及び APPENDIX J1, J2 (実重量)、APPENDIX K1, K2 (体重比) に示した。

<雄>

肝臓では、実重量と体重比の高値が 500 ppm 群でみられ、暴露によると考えられる重量増加がみられた。

その他、脾臓の実重量の低値が 500 ppm 群と 125 ppm 群に、脳の体重比の増加が全投与群に、腎臓の体重比の増加が 63 ppm 以上の群に、肝臓の体重比の増加が 250 ppm 群と 125 ppm 群に、肺の体重比の増加が 500 ppm 群と 125 ppm 群に、心臓の体重比の増加が 125 ppm 群と 63 ppm 群にみられたが、これらの変化は各投与群の解剖時体重の低値によるものと思われる。

<雌>

脾臓では、実重量と体重比の低値が 250 ppm 以上の群でみられ、暴露によると考えられる重量の低下がみられた。また、副腎は 500 ppm 群で実重量の低値がみられた。その体重比は有意差はみられないものの対照群より低値であり、500 ppm 群の副腎は暴露により重量が低下していると思われる。

その他、脳の実重量の低値が 500 ppm 群に、肺の体重比の増加が 125 ppm 以上の群に、腎臓の体重比の増加が 500 ppm 群にみられた。しかし、それぞれの体重比、あるいは実重量は対照群と同様な値であること、さらに、500 ppm 群の解剖時体重がやや低値であることから、これらの変化が被験物質の影響か不明であった。また、肝臓の体重比の高値が 125 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応したものではなかった。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE 10, 11 及び APPENDIX L1, L2 に示した。

<雄>

[500 ppm 群]

肝臓、鼻腔、肺及び胃に変化が認められた。

肝臓には、小葉中心性の壊死が 2 匹にみられ、1 匹は肝細胞に核の大型化が認められた。なお、巣状壊死が 1 匹にみられたが、雄の他の投与群ではこの変化は観察されず、被験物質との関連は明らかでなかった。

鼻腔の変化は嗅上皮にみられ、配列不整が 7 匹、呼吸上皮化生が 1 匹に認められた。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。

肺には細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。細気管支の好塩基性変化は、細気

管支の終末部に存在するクララ細胞の気管支内腔への突出の低下や線毛細胞の数の増加を伴っていた。

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 8 匹に認められた。また、1 匹には上皮が剥離する所見である糜爛もみられた。

これらの所見の程度は、前胃の過形成が 5 匹で中等度であった以外は、軽度な変化であった。

[250 ppm 群]

肝臓、肺及び胃に変化が認められた。

肝臓には、小葉中心性の壊死と核の大型化が全動物に認められた。肺には細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。胃には前胃の過形成が全動物に認められ、3 匹には糜爛もみられた。

これらの所見の程度は、肝臓の小葉中心性の壊死と前胃の過形成がそれぞれ 7 匹で中等度であった以外は、軽度な変化であった。

[125 ppm 群、63 ppm 群、31 ppm 群]

各群とも、肺に軽度な細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。

<雌>

[500 ppm 群]

鼻腔、肺及び胃に変化が認められた。

鼻腔の変化は嗅上皮と呼吸上皮にみられた。嗅上皮には配列不整が 3 匹、エオジン好性変化が 8 匹に認められた。また、呼吸上皮にもエオジン好性変化が 8 匹にみられた。エオジン好性変化は上皮細胞の細胞質内にエオジンで均一に明るく染色される液胞が出現する所見である。

肺には細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。胃には前胃の過形成が全動物に認められ、1 匹には糜爛もみられた。

これらの所見の程度は、前胃の過形成が 6 匹で中等度であった以外は、軽度な変化であった。

[250 ppm 群]

鼻腔、肺及び胃に変化が認められた。

鼻腔には、嗅上皮のエオジン好性変化が 6 匹、呼吸上皮のエオジン好性変化が 7 匹にみられた。嗅上皮の配列不整は 1 匹にのみ認められた。肺には細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。胃には前胃の過形成が 9 匹に認められ、1 匹には糜爛もみられた。

これらの所見の程度は、前胃の過形成が 3 匹で中等度であった以外は、軽度な変化であった。

[125 ppm 群]

肺に細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。鼻腔には、嗅上皮のエオジン好性変化が 2 匹、呼吸上皮のエオジン好性変化が 1 匹にみられた。これらの所見の程度は、いずれ

も軽度であった。

[63 ppm 群、31 ppm 群]

両群とも、肺に軽度な細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。鼻腔には、嗅上皮のエオジン好性変化が 63 ppm 群で 2 匹、31 ppm 群で 1 匹にみられた。これらの所見の程度は、嗅上皮のエオジン好性変化が 63 ppm 群の 1 匹で中等度であった以外は、軽度であった。

なお、63 ppm 群の 2 匹に肝臓の巣状壊死がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなく、被験物質による影響とは考えられなかった。

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、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、500、250、125、63 及び 31 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ず、一般状態の観察でも 1 - ブロモブタンの影響と思われる変化はみられなかった。体重では、増加の抑制が全投与群の雄にみられたが、最終体重は対照群に対して、500 ppm 群で 91%、最低濃度の 31 ppm 群で 95% となり、投与群間では大きな差はみられなかった。

血液への影響として、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少が 250 ppm 以上の群の雄で、赤血球数の減少が 500 ppm 群の雌でみられ、貧血が 250 ppm 以上の群の雄と 500 ppm 群の雌に認められた。赤血球数等の変化により、500 ppm 群では MCV、MCH、MCHC の値が変化した。また、MCV の増加が 250 ppm 群の雌にもみられたが、赤血球数等に変化はみられなかった。なお、血液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、肝臓、肺及び鼻腔に認められた。

胃の変化は雌雄とも 250 ppm 群まで認められた。変化が発生した部位は前胃であり、扁平上皮の過形成が多くの動物に認められた。また、少数の動物には糜爛の発生もみられた。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 6)、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 7)。

肝臓の変化は雄にのみ認められ、変化のみられた濃度は主に 250 ppm 群であった。すなわち、雄の 250 ppm 群は小葉中心性の壊死と肝細胞の核の大型化が全動物でみられた。雄の 250 ppm 群にみられた GPT の増加は肝臓の壊死を反映すると考えられる。これに対し、500 ppm 群では、臓器重量の増加が認められたが、小葉中心性の壊死が 2 匹、肝細胞に核の大型化が 1 匹にみられただけであった。本試験の予備試験として行った 2 週間試験でも、全例が死亡した雄の 1000 ppm 群と雌の 2000 ppm 群の肝臓にも小葉中心性出血あるいは壊死がみられている (文献 4)。

肺には雌雄とも最低濃度の 31 ppm 群まで細気管支の好塩基性変化が全動物で認められた。

細気管支の好塩基性変化は、細気管支の終末部に存在するクララ細胞の気管支内腔への突出の低下や線毛細胞の数の増加を伴っており、細気管支上皮のクララ細胞への影響を示す所見であると考えられる。また、2週間試験でも同様の変化が最低濃度の500 ppm 群までみられている（文献4）。

鼻腔の変化は、雄では500 ppm 群だけでみられ、雌では最低濃度の31 ppm 群まで投与濃度に対応して認められた。雄の500 ppm 群の変化は嗅上皮の配列不整と呼吸上皮化生であった。雌は嗅上皮の配列不整が250 ppm 以上の群、呼吸上皮のエオジン好性変化が125 ppm 以上の群、嗅上皮のエオジン好性変化が31 ppm 群までみられた。嗅上皮の配列不整と呼吸上皮化生は、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唆している（文献8）。嗅上皮への影響については、2週間試験でも萎縮が最低濃度の500 ppm 群までみられている（文献4）。また、雌に観察された嗅上皮と呼吸上皮のエオジン好性変化は老齢動物に自然発生することが報告されている所見であり（文献8）、嗅上皮に加えて呼吸上皮にも影響を与えていることを示す変化と考えられた。

なお、脾臓の重量低下が250 ppm 以上の群の雌で、副腎の重量低下が500 ppm 群の雌で認められたが、脾臓と副腎には、暴露による病理組織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13週間吸入暴露により、動物の死亡はみられなかったが、最低濃度である31 ppm 群においても、雄で軽度な体重増加の抑制がみられ、病理組織所見では、雌雄で肺の細気管支の好塩基性変化、雌に鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化が認められた。従って、本試験における1-ブロモブタンのマウスに対する13週間吸入暴露による最小毒性量 (LOAEL) は、体重及び肺と鼻腔への影響をエンドポイントとして31 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、全投与群の雄に体重増加の抑制がみられた。高濃度群の雄の最終体重は対照群に対して、500 ppm 群は91%、250 ppm 群は90%であった。さらに、250 ppm 群は、雄に貧血傾向が認められ、病理組織所見では雄の胃、肝臓、肺、雌の胃、肺、鼻腔に変化が認められた。特に、雄の肝臓では小葉中心性の壊死と肝細胞の核の大型化が全動物でみられ、小葉中心性の壊死は7匹が中等度であり、肝臓の傷害の程度は500 ppm 群より強かった。また、胃と肺の変化は500 ppm 群と同程度であったが、胃の変化（前胃の過形成）には中等度の変化もみられた。125 ppm 群は、雄の最終体重は対照群に対して92%であったが、病理組織所見は雌雄の肺と雌の鼻腔に軽度な変化がみられただけであった。肺と鼻腔の変化は、その内容、程度からがん原性試験においても、腫瘍の発生以外には動物の生存率に大きな影響を及ぼすものではないと考えられた。これらのことから、125

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られた。

また、本試験の最低濃度の 31 ppm 群でも、雄で軽度の体重増加の抑制がみられ、病理組織所見では雌雄の肺と雌の鼻腔に軽度な変化がみられたことから、がん原性試験の最低濃度は 31 ppm 未満が妥当と考えられた。

以上のことから、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 125 ppm を最高濃度とし、以下、50 、 20 ppm (公比 2.5) 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 - ブロモブタンのマウス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. 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.
7. Haschek WM, Witschi HR. 1991. Respiratory system. In: Handbook of Toxicologic Pathology (Haschek WM, Rousseaux CG, eds). San Diego, CA : Academic Press, 761-827.
8. 長野嘉介. 2000. 各論 1 章, 上部気道, 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, 99-116.