

1 - ブロモブタンのラットを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0560

CAS No. 109-65-9

2008年3月31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 - ブロモブタンのラットを用いた吸入によるがん原性試験

試験目的

1 - ブロモブタンをラットに 104 週間全身暴露し、がん原性を検索した。

試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準」及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験 1981 年 5 月 12 日採択）に準じて実施した。

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「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 長野 嘉介
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
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0560

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	3
I-1 被験物質の性状等	3
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式及び分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質の使用ロット等	3
I-3 被験物質の特性・同一性、安定性	4
I-3-1 特性・同一性	4
I-3-2 安定性	4
I-4 試験動物	4
II 試験方法	5
II-1 投与	5
II-1-1 投与経路	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質の発生方法と濃度調整	6
II-1-7 被験物質濃度の測定	6
II-2 動物管理	6
II-2-1 各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け及び個体識別方法	7
II-2-3 飼育条件	7
(1) 飼育環境	7
(2) 飼料	8
(3) 飲水	8

II-3	観察・検査項目及び方法	8
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	8
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	血液学的検査	9
II-3-5	血液生化学的検査	9
II-3-6	尿検査	9
II-3-7	病理学的検査	9
	(1) 剖検	9
	(2) 臓器重量	9
	(3) 病理組織学的検査	10
II-4	数値処理と統計方法	10
II-4-1	数値の取り扱いと表示	10
II-4-2	統計処理	10
III	試験成績	12
III-1	生死状況	12
III-2	一般状態	12
III-3	体重	12
III-4	摂餌量	13
III-5	血液学的検査	13
III-6	血液生化学的検査	13
III-7	尿検査	14
III-8	病理学的検査	14
	III-8-1 剖検	14
	III-8-2 臓器重量	14
	III-8-3 病理組織学的検査	15
	III-8-4 死因	16
IV	考察及びまとめ	17
IV-1	生存率、一般状態、体重、摂餌量	17
IV-2	腫瘍性及び腫瘍関連病変	17
IV-3	その他の影響	18
IV-4	無影響量 (NOEL)	19

IV-5	他文献との比較等	19
V	結論	20
VI	文献	21
VII	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	23

要約

1-ブロモブタンのがん原性を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による 2 年間 (104 週間) の試験を実施した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群雌雄とも 50 匹とし、合計 400 匹を用いた。被験物質の投与は、1-ブロモブタンを 1 日 6 時間、1 週 5 日間、104 週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 125、250 及び 500 ppm (公比 2) 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、剖検、臓器重量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、動物の生存率及び一般状態に 1-ブロモブタンの影響はみられなかった。体重は雌雄の 500 ppm 群で増加の抑制 (最終体重、雄：対照群の 83%、雌：対照群の 90%) がみられた。

病理組織学的検査の結果、雌雄とも 1-ブロモブタンに関連した腫瘍の発生増加は認められなかった。非腫瘍性病変としては、雄で鼻腔の呼吸上皮及び嗅上皮にエオジン好性変化の発生増加が認められた。

また、1-ブロモブタンのラットに対する無影響量 (NOEL) は、雄の血液系、脂質及び腎臓重量への影響をエンドポイントとして 125 ppm 未満であると考察した。

以上のように、F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、1-ブロモブタンの 2 年間 (104 週間) にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄とも腫瘍の発生増加は認められず、1-ブロモブタンのラットに対するがん原性はないと結論する。

1 - ブロモブタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雄)

	投与濃度 (ppm)		0	125	250	500	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	皮下組織	線維腫	3	1	5	5	↑ ↑	↑
	肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	2	1	3	6		
	肝臓	肝細胞腺腫	0	1	3	3		
	膵臓	島細胞腺腫	1	7 *	2	1		
	下垂体	腺腫	12	9	9	5		
	甲状腺	C-細胞腺腫	7	11	9	6		
	副腎	褐色細胞腫	4	4	1	2		
	精巣	間細胞腫	42	44	46	43		
	包皮腺	腺腫	1	2	2	3		
	悪性 腫瘍	肺	細気管支-肺胞上皮癌	1	0	2		
脾臓		単核球性白血病	7	4	2	1 *		
肝臓		肝細胞癌	0	0	1	0		
甲状腺		C-細胞癌	6	1	3	1		
副腎		褐色細胞腫：悪性	0	1	3	0		
脳		膠腫	0	3	1	1		

1 - ブロモブタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (ラット 雌)

	投与濃度 (ppm)		0	125	250	500	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数		50	50	50	50		
良性 腫瘍	下垂体	腺腫	13	14	13	7		↓
	甲状腺	C-細胞腺腫	6	6	2	3		
	子宮	子宮内膜間質性ポリープ	5	3	5	3		
	乳腺	線維腺腫	8	5	5	1 *		
	陰核腺	腺腫	2	4	6	3		
	悪性 腫瘍	脾臓	単核球性白血病	5	5	6		
子宮		子宮内膜間質性肉腫	3	1	1	3		

検定結果については生物学的意義を考慮して記載した。

* : $p \leq 0.05$ 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)

I 試験材料

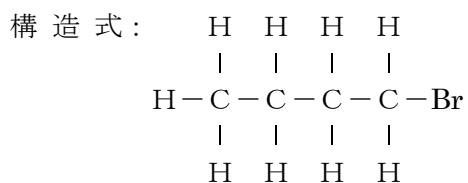
I-1 被験物質の性状等

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 構造式及び分子量 (文献1)



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： KLG0007 (2004/11/12~2005/9/2)

EWL0012 (2005/9/5~2006/5/22)

DPN0021 (2006/5/23~2006/11/9)

製 造 元： 和光純薬工業(株)

グ レ ード： 和光精製品

純 度： 99.7~100.0% (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、ロットごとにマススペクトルを質量分析計（(株)日立製作所 M-80B）を用いて測定し、また、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（(株)島津製作所 FTIR-8200PC）を用いて測定し、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。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

I-3-2 安定性

被験物質の安定性は、ロットごとに使用開始前及び使用終了後にガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジーズ 5890A）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。

その結果、各ロットとも使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

I-4 試験動物

動物は、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/DuCr1Cr1j ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 227 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、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 200 匹（群構成時体重範囲、雄：104～127g、雌：87～106g）を選別し、試験に用いた。

なお、F344/DuCr1Cr1j ラット（SPF）を選択した理由は、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による。

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被験物質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。

II-1-3 投与期間

投与期間は、1日6時間、原則として1週5日の暴露で104週間とし、計488回の暴露を行った。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は、125、250及び500 ppmの3段階（公比2）に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、がん原性試験による調査の基準（安衛法）（文献4）及びOECD化学品テストガイドライン451（発癌性試験）（文献5）に従い、2年間（104週間）とした。

投与濃度は13週間試験（試験番号0503）の結果（文献6）をもとに決定した。13週間試験は1000～63 ppm（公比2）の濃度で行った。その結果、動物の死亡はみられなかったが、1000 ppm群では雌雄で体重増加の抑制及び貧血傾向が認められ、病理組織学的検査では雌雄で鼻腔、胃及び脳に、雄で精巣に変化がみられた。また、臓器重量及び血液生化学的検査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超えると思われた。500 ppm群は、雄に体重増加の抑制がみられ、病理組織学的検査では雌雄で鼻腔に、雄で前胃に変化がみら

れた。また、臓器重量、血液学的検査及び血液生化学的検査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、病理組織学的検査でみられた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。

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）の発生容器内の被験物質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。この被験物質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被験物質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被験物質の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

II-1-7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフ（(株) 島津製作所 GC-14B）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分ごとに測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差（（平均値－設定濃度）／設定濃度×100）が 0.2%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が 0.4%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 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 50 匹の動物を用いた。

群名称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対照群	50 匹（1001～1050）	50 匹（2001～2050）
125 ppm 群	50 匹（1101～1150）	50 匹（2101～2150）
250 ppm 群	50 匹（1201～1250）	50 匹（2201～2250）
500 ppm 群	50 匹（1301～1350）	50 匹（2301～2350）

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 7）。

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（512 室）に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、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

検疫期間中は検疫室（517・518 室）で、馴化期間及び投与期間中は、吸入試験室（512 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

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ケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 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には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温 度 : 検疫室 ; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 517 室 ; $23.4 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、518 室 ; $23.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ >

吸入試験室 ; $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 512 室 ; $21.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ >

吸入チャンバー内 ; $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 検疫室 ; $55 \pm 15\%$ < 517 室 ; $54 \pm 1\%$ 、518 室 ; $51 \pm 2\%$ >

吸入チャンバー内 ; $55 \pm 15\%$

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 : 検疫室・吸入試験室 ; 15~17 回/時

吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回/時

圧 力 : 吸入チャンバー内 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

ケージへの動物の収容方法 : 検疫期間 ; 群飼 (5 匹)、馴化・投与期間 ; 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

検疫期間 ; ステンレス製群飼網ケージ (340(W)×294(D)×176(H) mm/5 匹)

馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (125(W)×216(D)×176(H) mm/匹)

投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (150(W)×216(D)×176(H) mm/匹)

(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) (千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30KG 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、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

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使用ロットごとに入手し、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) の分析データを使用ロットごとに入手し、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、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、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(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) に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を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、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

動物の生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

II-3-2 体重測定

体重測定は、投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回 (104 週にも測定) 行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び定期解剖動物の搬出時にも体重 (搬出時体重) を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

摂餌量は、投与開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回 (104 週にも測定) 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 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 3 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-3-5 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 3 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、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、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-3-6 尿検査

投与 104 週の検査時まで生存した動物から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティステイックス、シーメンスメディカルソリューションズ・ダイアグノスティクス）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-3-7 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

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：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・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

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、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）、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。

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 位まで測定し、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 3 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 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、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 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、尿検査についても対照群と各投与群間との 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（文献 8）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。また、Peto 検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて、死亡率法（コンテックス 3, 4 を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテックス 0, 1, 2 を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法+有病率法（コンテックス 0~4 の総計で検定）を行った。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、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。

注： Peto 検定に用いるコンテックス

0：定期解剖動物にみつかった腫瘍

1：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍

2：多分 1 だと思いが、確かでない腫瘍

3：多分 4 だと思いが、確かでない腫瘍

4：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

Ⅲ 試験成績

Ⅲ-1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 及び FIGURE 2, 3 に示した。

—雄—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：39 匹（78%）、125 ppm 群：35 匹（70%）、250 ppm 群：41 匹（82%）、500 ppm 群：37 匹（74%）であった。

—雌—

投与群の生存率に被験物質の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：38 匹（76%）、125 ppm 群：43 匹（86%）、250 ppm 群：41 匹（82%）、500 ppm 群：37 匹（74%）であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示した。

—雌雄—

特記すべき所見はみられなかった。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 4, 5 に示した。

—雄—

500 ppm 群では投与期間を通じて体重増加の抑制がみられた。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 125 ppm 群：99%、250 ppm 群：96%、500 ppm 群：83%であった。

—雌—

500 ppm 群では投与期間を通じて体重増加の抑制がみられた。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 125 ppm 群：99%、250 ppm 群：96%、500 ppm 群：90%であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 6, 7 に示した。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、投与群では摂餌量の高値が多くの週でみられたが、被験物質の暴露との関連は不明であった。

Ⅲ-5 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

—雄—

赤血球数の高値が全投与群に、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の高値が 125 ppm 群に、血小板数と白血球数の高値が 500 ppm 群にみられた。また、MCV と網赤血球比の低値が全投与群に、MCH の低値が 500 ppm 群にみられた。

なお、500 ppm 群の白血球数の平均値は対照群の値より低値であったが、対照群には極めて高値を示す動物がおり、統計学的には 500 ppm 群の白血球数は有意に高値であった。

—雌—

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血小板数及び白血球百分率の単球比の高値が 500 ppm 群でみられた。

その他、白血球百分率で分葉核好中球比の低値が 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-6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

—雄—

総コレステロールの高値が全投与群で、リン脂質、 γ -GTP の高値が 250 ppm 以上の群で、トリグリセライド、尿素窒素、カリウムの高値が 500 ppm 群でみられた。また、ナトリウムの低値が全投与群で、アルブミン、A/G 比の低値が 500 ppm 群でみられた。

その他、クロールの高値が全投与群でみられたが、これはクロールの測定で使用した電極（イオン選択電極法）が被験物質由来の臭素イオンの影響を受け、投与群の測定値が高値になった可能性が高いと考えられる（文献 9）。また、ALP の低値が 125 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。

—雌—

トリグリセライドの高値が 250 ppm 以上の群で、総コレステロール、リン脂質の高値が 500 ppm 群でみられた。また、アルブミン、A/G 比、ナトリウムの低値が 500 ppm 群でみられた。

その他、クロールの高値が全投与群でみられたが、雄同様、測定電極が臭素イオンの影響を受けた可能性が高いと考えられる。また、LDH と CK の変化が 500 ppm 群でみられたが、低下性の変化であった。さらに、 γ -GTP に 500 ppm 群において統計学的に有意な高値が示されたが、対照群との差は僅少であり、被験物質の暴露と関連しないものと考えられる。

Ⅲ-7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

—雄—

蛋白陽性度の増加が 500 ppm 群でみられた。

—雌—

蛋白陽性度の増加が 500 ppm 群でみられた。

その他、pH の低下が 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-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 剖検

剖検所見を TABLE I 1~6 に示した。

—雌雄—

被験物質の暴露の影響と思われる変化はみられなかった。

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 J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

—雄—

脾臓の実重量の低値が全投与群で、体重比の低値が 125 ppm 群でみられ、有意差はみられないものの、250 ppm 以上の群の体重比も対照群より低値であった。また、肝臓の実重量と体重比の高値が 250 ppm 以上の群で、精巣の実重量と体重比の高値が 500 ppm 群でみられた。さらに、腎臓の体重比の高値が全投与群でみられた。

その他、心臓と脳の実重量の低値、体重比の高値及び副腎の体重比の高値が 500 ppm 群

でみられたが、これらの変化は、500 ppm 群の搬出時体重の低値によるものと思われる。また、肺の体重比の高値が 250 ppm 以上の群でみられたが、それらの実重量は対照群よりやや低値であり、これらの変化と被験物質の暴露との関連は不明であった。

—雌—

肝臓の実重量の高値が 500 ppm 群で、体重比の高値が 250 ppm 以上の群でみられた。また、心臓と肺の体重比の高値が 250 ppm 以上の群で、腎臓の体重比の高値が 500 ppm 群でみられた。

その他、脳の実重量の低値が全投与群で、体重比の高値が 500 ppm 群でみられた。これらのうち、500 ppm 群の変化は同群の搬出時体重の低値によるものと思われる。125 ppm 群と 250 ppm 群では、脳の体重比の値が対照群と同等であったことから、実重量の変化と被験物質の暴露との関連は不明であった。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

検査結果のうち非腫瘍性病変を TABLE L 1~6 に示した。腫瘍性病変の結果は、担腫瘍動物数と腫瘍数を TABLE M 1, 2 に、腫瘍の種類別の発生数を TABLE N 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE O 1, 2 に、転移性病変を TABLE P 1, 2 に示した。また、腫瘍のうち統計学的に有意差が認められた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ (試験ごとの発生率 (最小%~最大%) と平均発生率(%)、発生匹数/総匹数) を TABLE Q に示した。

—雄—

1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

なお、肺では細気管支-肺胞上皮腺腫の発生が Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。しかし、各投与群における細気管支-肺胞上皮腺腫の発生 (125 ppm 群 : 1 匹、2%、250 ppm 群 : 3 匹、6%、500 ppm 群 : 6 匹、12%) は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内 (最小 0%~最大 12%、平均発生率 3.8%) であることから、細気管支-肺胞上皮腺腫の発生増加は被験物質の暴露によるものではないと判断した。肝臓では肝細胞腺腫の発生が Peto 検定 (有病率法) で増加傾向を示した。しかし、各投与群における肝細胞腺腫の発生 (125 ppm 群 : 1 匹、2%、250 ppm 群 : 3 匹、6%、500 ppm 群 : 3 匹、6%) は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内 (最小 0%~最大 8%、平均発生率 1.9%) であることから、肝細胞腺腫の発生増加は被験物質の暴露によるものではないと判断した。また、膵臓の島細胞腺腫の発生は Fisher 検定で 125 ppm 群に増加がみられた。しかし、有意な発生増加は低濃度群のみであり、その発生 (125 ppm 群 : 7 匹、14%) も、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内 (最小 0%~

最大 14%、平均発生率 2.1%) であることから、125 ppm 群の発生増加は被験物質の暴露によるものではないと判断した。

その他、脾臓の単核球性白血病の発生が Cochran-Armitage 検定で減少傾向、Fisher 検定で 500 ppm 群に減少が示された。

2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

呼吸上皮及び嗅上皮に病変の増加が観察された。

呼吸上皮ではエオジン好性変化の発生増加が 500 ppm 群で認められた。嗅上皮ではエオジン好性変化の程度の増加が 250 ppm 以上の群で認められた。

なお、下垂体の過形成が 500 ppm 群で有意な減少を示した。

その他、細気管支-肺胞上皮増生が 125 ppm 群で有意な発生増加を示したが、投与濃度に対応した増加ではないことから、発生増加は被験物質の暴露によるものではないと判断した。また、腎臓の慢性腎症の発生が 125 ppm 群と 250 ppm 群で対照群との間に有意差を示したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

—雌—

1) 腫瘍性病変

被験物質の暴露による腫瘍の発生増加はみられなかった。

なお、乳腺の線維腺腫の発生が Cochran-Armitage 検定で減少傾向、Fisher 検定で 500 ppm 群に発生減少が示された。

2) 非腫瘍性病変

被験物質の暴露による非腫瘍性病変の増加はみられなかった。

なお、肝臓の好塩基性小増殖巣が 500 ppm 群で減少した。

III-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE R に示した。

—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みられなかった。

IV 考察及びまとめ

1-ブロモブタンのラットを用いた2年間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：125、250及び500 ppm）を行ったが、腫瘍性病変の発生に1-ブロモブタンの影響は認められなかった。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

生存率及び一般状態に1-ブロモブタンの暴露による影響はみられなかった。

体重は雌雄の500 ppm群で増加の抑制（最終体重、雄：対照群の83%、雌：対照群の90%）がみられた。

摂餌量には1-ブロモブタンの影響はみられなかった。

IV-2 腫瘍性及び腫瘍関連病変

最高濃度の500 ppm群においても、雌雄とも1-ブロモブタンに関連した明らかな腫瘍の発生増加は認められなかった。なお、雄では肺の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生及び肝臓の肝細胞腺腫の発生がPeto検定やCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。また、膵臓の島細胞腺腫の発生がFisher検定で125 ppm群に増加がみられた。しかし、各投与群におけるこれら腫瘍の発生は、それぞれ当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲内であることから、これら腫瘍の発生増加は1-ブロモブタンの暴露によるものではないと判断した。

IARC（文献10）は、がん原性試験の最高投与濃度を亜慢性試験の結果からある程度の毒性影響が起きることが推定される濃度であり、腫瘍発生の結果以外で動物の寿命の長さを短縮させず、対照群と比較して10%以上の体重増加の抑制を引き起こす毒性兆候を惹起させないことが推定される濃度と定義した。米国国立がん研究所（NCI）小動物発がん性試験ガイドラインでは（文献11）、小動物を用いるがん原性試験の最高投与濃度は、対照群と比較して10%以下の体重抑制を引き起こす濃度で、かつ発がん性に関係する反応以外に、毒性的兆候、病理学的傷害による死亡率の上昇を引き起こさないと推定される最高濃度、即ち、最大耐量（Maximum Tolerated Dose (MTD)）を最高投与濃度として用いると定義した。また、体重増加の抑制に関する勧告は経験的なものであり、結果として超過した場合でも試験を無効にするものではないともいわれている（文献12）。

本がん原性試験の投与濃度は、II-1-5に示したように、13週間試験（試験番号0503）の結果（文献6）をもとに決定した。13週間試験は1000～63 ppm（公比2）の濃度で行った。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がみられ、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超えると思われる。500 ppm群は雄に体重増加の抑制がみられた。雄の体重増加の抑制は対照群の10%（最終体重：対照群の90%）であったことから、雄ラットのがん原性試験にお

ける MTD は 500 ppm であると推定した。さらに、当センターの吸入チャンバーは各群とも一つのチャンバーに雌雄各 50 匹を収容し、雌雄同一濃度で暴露するタイプであることから、本試験の最高濃度は雄ラットのがん原性試験における MTD であると推定した 500 ppm とした。

本がん原性試験においては、最高濃度群の 500 ppm 群の雄では最終体重が対照群の 83%であり、体重増加の抑制が 10%を超えていたが生存率に暴露の影響はみられなかった。また、500 ppm 群の雌では最終体重が対照群の 90%であり、生存率に暴露の影響はみられなかった。

従って、最高濃度 500 ppm とした本がん原性試験の投与濃度の設定は、適切であったと判断した。

IV-3 その他の影響

血液学的検査では、赤血球数の高値が雄の全投与群と雌の 500 ppm 群でみられた。さらに、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の高値が雄の 125 ppm 群と雌の 500 ppm 群に、血小板の高値が雌雄の 500 ppm 群にみられた。赤血球数の増加には、循環赤血球量が実際に増加している多血状態と脱水状態時のように循環血漿量が低下して起こる相対的な多血状態があるが、本試験における観察、検査結果からは、脱水状態時のような血漿量低下を示唆する結果は得られておらず、本試験の変化は循環赤血球量が実質的に増加していると考えられる。

当センターで実施したラットの 13 週間試験（文献 6）では、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。また、網赤血球比の増加は 500 ppm 群の雌雄と 250 ppm 群の雄にもみられた。しかし、500 ppm を最高濃度とした 104 週間の本試験では、投与終了時の検査で貧血ではなく赤血球数の増加（増血）が観察された。13 週間試験においては 1-ブロモブタンの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が、本試験においても骨髄等に赤血球数の増加に関連する病理組織所見は認められなかった。

血液生化学的検査では、雌雄でアルブミン、A/G 比、総コレステロール、リン脂質、トリグリセライド、ナトリウム、雄で γ -GTP、尿素窒素、カリウム、尿検査では雌雄で蛋白にそれぞれ変化がみられた。また、臓器重量では、雌雄の肝臓、腎臓、雄の脾臓、精巣、雌の心臓、肺に変化がみられた。しかし、病理組織学的検査では、鼻腔以外の臓器には 1-ブロモブタンの影響と思われる非腫瘍性病変の発生率の増加や程度の増強は認められなかった。

病理組織学的検査では雄の鼻腔の呼吸上皮と嗅上皮にエオジン好性変化の発生増加がみられた。この病変は呼吸上皮や嗅上皮の細胞質内にエオジンに好染する蛋白様物質が沈着したものであり、加齢に伴なって発生が増加することが報告されている（文献 13）。毒性的意義は不明であるが、タバコ、塩素、ジメチルアミン等の刺激性のある化学物質の吸入暴露により発生することが報告されている（文献 14、15、16、17）。なお、当センターで実施した 13 週間試験（文献 6）では、鼻腔の嗅上皮に萎縮が 1000 ppm 群で、嗅上皮の配列不整が 250 ppm 以上の群にみられたが、本試験の鼻腔への影響はエオジン好性変化以外に明らかな変化はみられなかった。

雌では暴露に関連した非腫瘍性病変の発生率の増加や程度の増強は認められなかった。

IV-4 無影響量 (NOEL)

以上のように本がん原性試験では投与群に体重増加の抑制がみられ、また、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量の測定、病理組織学的検査で 1-ブロモブタンの影響と思われる変化がみられた。

その中で、雄では赤血球数の高値、総コレステロールの高値、腎臓重量 (体重比) の高値が最低濃度群の 125 ppm 群までみられた。また、雌ではトリグリセライドの高値、肝臓、心臓、肺の重量 (それぞれ体重比) の高値が 250 ppm 群までみられた。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 2 年間吸入暴露による無影響量 (NOEL) は、雄の血液系、脂質及び腎臓重量への影響をエンドポイントとして 125 ppm 未満であると考えられる。

IV-5 他文献との比較等

① がん原性：1-ブロモブタンのラットを用いたがん原性試験、または長期試験の文献はみつからなかった。また、IARC では 1-ブロモブタンのがん原性について評価を行っていない。

② 変異原性：1-ブロモブタンについては、当センターでテドラーバッグを使用した気相暴露による微生物を用いた変異原性試験を、ネズミチフス菌 (TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) 及び大腸菌 (WP2*uvrA*/pKM101) を用いて実施している (文献 18)。その結果、代謝活性化の有る場合と無い場合ともに、3 菌株 (TA100、TA1535、WP2*uvrA*/pKM101) で陽性、2 菌株 (TA98、TA1537) で陰性を示している。

気相暴露法を用いた試験において陽性の結果を示した 3 種類の試験菌株は、全て塩基対置換型の遺伝子変異を検出する菌株であり、フレームシフト型の遺伝子変異を検出する菌株では陽性を示さなかった。

③ 代謝：1-ブロモブタンはウサギとラットにおける代謝に関する報告がある (文献 19)。1-ブロモブタンを投与したウサギとラットの尿中の代謝物として、ブチルメルカプツール酸、(2-ヒドロキシブチル)メルカプツール酸、(3-ヒドロキシブチル)メルカプツール酸、3-(ブチルチオ)乳酸が検出された。ただし、ウサギの主要代謝物は(3-ヒドロキシブチル)メルカプツール酸であり、2-ヒドロキシブチル異性体の産生は痕跡量であった。また、1-ブロモブタンを投与したラットの胆汁における代謝物として、*S*-ブチルグルタチオン、*S*-ブチルシステイニルグリシン、*S*-ブチルシステインが検出されている。

V 結論

F344/DuCr1Cr1j ラットを用いて、1-ブロモブタンの2年間（104週間）にわたる吸入によるがん原性試験を行った結果、雌雄とも腫瘍の発生増加は認められず、1-ブロモブタンのラットに対するがん原性はなかった。

VI 文献

1. U.S. National Library of Medicine. 2008. 1-Bromobutane, Chemical/Physical Properties. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. [accessed 6 February 2008].
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. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発 第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 "Carcinogenicity Studies". Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 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 13 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.
7. 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.
8. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2:311-426.
9. 野上清信. 1993. 1 電解質・無機成分. (1) Na、K、Cl. 臨床化学実践マニュアル II, 日常検査における異常値への対応. 大久保昭行、桑克彦、中甫、深田靖彦 編. 検査と技術 増刊号. 21(5 巻):46-47.
10. Bannasch P, Griesemer RA, Anders F, Becker R, Cabral JR, Della Porta G, et al. 1986. Long-term assays for carcinogenicity in animals. In: Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. (Montesano R, Bartsch H,

Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H. eds.). Lyon: IARC. IARC Scientific Publications No. 83:13-83.

11. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U. 1976. Guidelines for carcinogene bioassay in small rodents. NCI-CG-TR-1. DHEW Publication No.(NIH)76-801. Bethesda,MD: National Cancer Institute. 13-15.
12. Haseman JK. 1985. Issues in carcinogenicity testing: dose selection. *Fundam Appl Toxicol.* 5:66-78.
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. Monticello TM, Morgan KT, Uraih L. 1990. Nonneoplastic nasal lesions in rats and mice. *Environ Health Perspect.* 85: 249-255.
15. Renne RA, Dungworth DL, Keenan CM, Morgan KT, Hahn FF, Schwartz LW. 2003. Non-proliferative lesions of the respiratory tract in rats. In:Guides for toxicologic pathology. STP/ARP/AFIP. Washington, DC.
16. Buckley LA, Morgan KT, Swenberg JA, James RA, Hamm TE Jr, Barrow CS. 1985. The toxicity of dimethylamine in F-344 rats and B6C3F1 mice following a 1-year inhalation exposure. *Fundam Appl Toxicol.* 5: 341-352.
17. Wolf DC, Morgan KT, Gross EA, Barrow C, Moss OR, James RA, et al. 1995. Two-year inhalation exposure of female and male B6C3F1 mice and F344 rats to chlorine gas induces lesions confined to the nose. *Fundam Appl Toxicol.* 24: 111-131.
18. 中央労働災害防止協会. 2005. 「既存化学物質に係る変異原性の評価に関する調査研究 平成 16 年度 (補遺)」. 東京 : 中央労働災害防止協会. 25-30.
19. James SP, Jeffery DA, Waring RH, Wood PB. 1968. Some metabolites of 1-bromobutane in the rabbit and the rat. *Biochem J.* 109: 727-736.

Ⅶ 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

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はなかつた。

なお、被験物質の安定性の測定に使用したガスクロマトグラフ (5890A)、血液学的検査で使用した総合血液学検査装置 (ADVIA 120) 及び尿検査で使用した尿試験紙 (マルティステックス) の製造会社の社名が変更されたため、本報告書はそれぞれ、新社名を記載した。