

1 - ブロモブタンのマウスを用いた  
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号 : 0561

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 - ブロモブタンのマウスを用いた吸入によるがん原性試験

## 試験目的

1 - ブロモブタンをマウスに 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 - ブロモブタンのマウスを用いた  
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：0561

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	13
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	14
	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	腫瘍性病変	17
IV-3	その他の影響	17
IV-4	他文献との比較等	18

V	結論	19
VI	文献	20
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	22

## 要約

1-ブロモブタンのがん原性を検索する目的で B6D2F1/Crlj マウス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 20、50 及び 125 ppm (公比 2.5) 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、雌雄とも動物の生存率、一般状態、体重、摂餌量に 1-ブロモブタンの影響はみられなかった。

腫瘍性病変として、雄の肺に細気管支-肺胞上皮癌の発生増加が認められた。肺腫瘍の発生増加が認められた濃度は 50 ppm 以上であった。雌では暴露に関連した腫瘍性病変の増加は認められなかった。

非腫瘍性病変としては、雌で鼻腔の嗅上皮にエオジン好性変化の発生増加がみられた。

以上のように、B6D2F1/Crlj マウスを用いて 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、以下の結論を得た。

雄の肺に細気管支-肺胞上皮癌の発生増加が認められ、雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠である。雌では腫瘍の発生増加は認められなかった。

## 1 - ブロモブタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス 雄)

		投与濃度 (ppm)	0	20	50	125	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50		
良性 腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮腺腫	6	4	6	8		
	肝臓	肝細胞腺腫	12	13	11	20	↑	
悪性 腫瘍	肺	細気管支 - 肺胞上皮癌	2	7	13 **	16 **	↑↑	↑↑
	リンパ節	悪性リンパ腫	14	5 *	4 **	7		
	肝臓	肝細胞癌	7	10	3	9		
		組織球性肉腫	1	0	2	1		
	精巣上体	組織球性肉腫	0	0	0	2		
	皮下	組織球性肉腫	0	1	1	1		
	膀胱	組織球性肉腫	0	0	0	1		
	末梢神経	組織球性肉腫	0	0	1	0		
	縦隔	組織球性肉腫	0	0	1	0		
	骨髄	組織球性肉腫	0	1	0	0		
	肺	細気管支 - 肺胞上皮腺腫 + 細気管支 - 肺胞上皮癌	7	10	18 **	23 **	↑↑	↑↑
	肝臓	肝細胞腺腫 + 肝細胞癌	17	19	14	25	↑	
	全臓器	悪性リンパ腫	15	7 *	4 **	7 *		
		組織球性肉腫	1	2	5	5	↑	

## 1 - ブロモブタンのがん原性試験における主な腫瘍発生 (マウス 雌)

		投与濃度 (ppm)	0	20	50	125	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
		検査動物数	50	50	50	50		
良性 腫瘍	肝臓	血管腫	3	4	2	6		
	皮下	血管腫	0	0	1	0		
	骨髄	血管腫	0	0	1	1		
	脾臓	血管腫	0	2	0	1		
	膀胱	血管腫	0	1	0	0		
	卵巣	血管腫	0	1	0	1		
悪性 腫瘍	肝臓	血管肉腫	0	0	0	1		
	肝臓	血管腫 + 血管肉腫	3	4	2	7		
	全臓器	血管腫	3	8	4	9	↑	

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

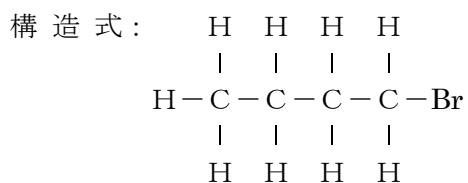
## I-1 被験物質の性状等

## 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 (2004/10/20~2005/9/2)

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

DPN0021 (2006/5/23~2006/10/17)

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 B6D2F1/Crlj マウス（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：22.0～25.5g、雌：17.8～20.8g）を選別し、試験に用いた。

なお、B6D2F1/Crlj マウス（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、20、50及び125 ppm（公比2.5）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0504）の結果（文献6）をもとに決定した。13週間試験は500～31 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、全投与群の雄に体重増加の抑制がみられた。500 ppm群と250 ppm群の雄の最終体重は、対照群の91%、90%であった。さらに、250 ppm群は病理組織学的検査で、雄の肝臓、肺、胃、雌の鼻腔、肺、胃に変化が認められた。特に、雄の肝臓傷害の程度は500 ppm群より強かった。125 ppm群では、雄の最終体重は対照群に対して92%であったが、病理組織学的検査で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、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た。また、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、病理組織学的検査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。以上の結果より、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。

#### 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（ $(\text{平均値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$ ）が0.5%以内、変動係数（ $\text{標準偏差} / \text{平均値} \times 100$ ）が1.0%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）
20 ppm 群	50匹（1101～1150）	50匹（2101～2150）
50 ppm 群	50匹（1201～1250）	50匹（2201～2250）
125 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（511 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（511 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 ;  $23.3 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、518 室 ;  $22.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  >

吸入試験室 ;  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  < 511 室 ;  $21.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  >

吸入チャンバー内 ;  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

湿 度 : 検疫室 ;  $55 \pm 15\%$  < 517 室 ;  $53 \pm 1\%$ 、518 室 ;  $50 \pm 1\%$  >

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 ;  $12 \pm 1$  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 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

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

馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ (95(W)×116(D)×120(H) mm/匹)

投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (100(W)×116(D)×120(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 $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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-3-6 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（ウロラブスティックス、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、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、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）、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、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 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、 $\chi^2$  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  $\chi^2$  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%）、20 ppm 群：32 匹（64%）、50 ppm 群：32 匹（64%）、125 ppm 群：39 匹（78%）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：18 匹（36%）、20 ppm 群：31 匹（62%）、50 ppm 群：24 匹（48%）、125 ppm 群：26 匹（52%）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—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 20 ppm 群：104%、50 ppm 群：100%、125 ppm 群：97%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。

最終計測日（104 週）の各投与群の体重は、対照群に対して 20 ppm 群：110%、50 ppm 群：107%、125 ppm 群：104%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。

### 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—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

—雌—

白血球百分率で、6 分類（リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、分葉核好中球、杆状核好中球）以外のその他（other）に分類された血球比の高値が 125 ppm 群でみられた。

### 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—

総蛋白、アルブミン、リン脂質、カルシウムの高値が 125 ppm 群でみられた。

—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、クロールの高値が 125 ppm 群でみられたが、クロールの測定で使用した電極（イオン選択電極法）は被験物質由来の臭素イオンの影響を受け、測定値が高値になる可能性があり（文献 9）、クロールの変化が被験物質の影響であるかは不明であった。また、アルブミンの高値が 50 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。

### Ⅲ-7 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

—雄—

pH の上昇が 125 ppm 群でみられた。

—雌—

ケトン体陽性例の増加が 125 ppm 群でみられた。

その他、潜血陽性例の減少が 20 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。

—雄—

50 ppm 群と 125 ppm 群で肺の結節が増加した。肺に結節を有する動物は、対照群が 9 匹であったのに対し、20 ppm 群は 7 匹、50 ppm 群は 14 匹、125 ppm 群は 20 匹であった。

—雌—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

#### 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。

—雌雄—

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

#### 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

投与群に肺腫瘍の発生増加がみられた。

<肺>

細気管支-肺胞上皮癌の発生は、Peto 検定 (有病率法、有病率法+死亡率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向、Fisher 検定で 50 ppm 群と 125 ppm 群に増加が認められた。50 ppm 群と 125 ppm 群における細気管支-肺胞上皮癌の発生は、それぞれ 13 匹 (26%)、16 匹 (32%) であり、これらの群の発生率はヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 0%~最大 24%、平均発生率 10.3%) を超えた。また、細気管支-肺胞上皮腺腫の増加は認められなかったが、細気管支-肺胞上皮癌と細気管支-肺胞上皮腺腫を合わせた

発生にも、Peto 検定（有病率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向、Fisher 検定で 50 ppm 群と 125 ppm 群に増加が示された。

なお、肝細胞腺腫の発生及び肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生は、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。しかし、肝細胞癌の発生については投与濃度に対応した発生増加は認められず、また、各投与群の肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生（20 ppm 群：19 匹、38%、50 ppm 群：14 匹、28%、125 ppm 群：25 匹、50%）はヒストリカルコントロールデータの範囲内（最小 8%～最大 68%、平均発生率 34.7%）であった。従って、肝臓腫瘍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、全臓器の組織球性肉腫の発生は、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示したが、各投与群の発生（20 ppm 群：2 匹、4%、50 ppm 群：5 匹、10%、125 ppm 群：5 匹、10%）は、ヒストリカルコントロールデータの範囲内（最小 0%～最大 22%、平均発生率 9.4%）であり、全臓器の組織球性肉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。

この他、リンパ節の悪性リンパ腫の発生が 20 ppm 群と 50 ppm 群で、全ての臓器を合わせた悪性リンパ腫の発生が全投与群で減少したが、発生率と投与濃度との間に対応はみられず、悪性リンパ腫の発生減少と被験物質の暴露との関係は明らかではなかった。

## 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、副腎の皮質細胞の増生が 20 ppm 群と 50 ppm 群で統計学的な有意差が示されたが、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、全臓器を合わせた血管腫の発生（対照群：3 匹、6%、20 ppm 群：8 匹、16%、50 ppm 群：4 匹、8%、125 ppm 群：9 匹、18%）は、Peto 検定（有病率法）で増加傾向が示された。しかし、これらの血管腫の多くは肝臓に発生したものであり、肝臓での血管腫の発生（対照群：3 匹、6%、20 ppm 群：4 匹、8%、50 ppm 群：2 匹、4%、125 ppm 群：6 匹、12%）には統計学的に有意な増加は認められなかった。従って、全臓器を合わせた血管腫の発生は、Peto 検定で増加傾向を示したものの、被験物質の暴露によるものではないと判断した。

### 2) 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化の発生は、対照群が 23 匹（軽度：22 匹、中等度：1 匹）、20

ppm 群が 26 匹（軽度）、50 ppm 群が 29 匹（軽度：27 匹、中等度：2 匹）、125 ppm 群が 35 匹（軽度：34 匹、中等度：1 匹）にみられ、125 ppm 群の発生に有意な増加が示された。

なお、鼻腔の腺の呼吸上皮化生が 20 ppm 群と 50 ppm 群で、嗅上皮の呼吸上皮化生が 50 ppm 群で、肝臓の血管拡張が 20 ppm 群と 50 ppm 群で、好酸性小増殖巣が 50 ppm 群で、また、角膜の鉍質沈着が 50 ppm 群で統計学的な有意差を示したが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

#### 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 - ブロモブタンのマウスを用いた 2 年間の全身暴露による吸入試験（投与濃度：20、50 及び 125 ppm）を行った。雄の投与群に肺腫瘍の発生増加がみられた。

##### IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量

生存率には雌雄とも 1 - ブロモブタンの暴露の影響はみられなかった。

また、一般状態、体重、摂餌量にも雌雄とも 1 - ブロモブタンの暴露の影響はみられなかった。

##### IV-2 腫瘍性病変

雄の肺に細気管支-肺胞上皮癌の発生増加が認められた。

雄の細気管支-肺胞上皮癌の発生は、Peto 検定（有病率法、有病率法+死亡率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向、Fisher 検定で 50 ppm 群と 125 ppm 群に増加が認められた。これらの群の発生率はヒストリカルコントロールデータの範囲を超えており、1 - ブロモブタンの暴露による発生増加であると判断した。細気管支-肺胞上皮癌の発生増加は 1 - ブロモブタンの雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠であると考えた。

雌では暴露に関連した腫瘍性病変の増加は認められなかった。

##### IV-3 その他の影響

血液や尿の検査では 125 ppm 群でいくつかの項目に変化がみられたのみであった。雄では、血液生化学的検査で総蛋白、アルブミン、リン脂質、カルシウムの高値がみられ、尿検査で pH の上昇がみられた。雌では、白血球百分率で 6 分類（リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、分葉核好中球、杆状核好中球）以外のその他（other）に分類された血球比の高値がみられ、尿検査でケトン体陽性例の増加がみられた。しかし、病理学的検査では臓器重量に 1 - ブロモブタンの影響と思われる変化はみられず、病理組織学的検査でも血液や尿の検査でみられた変化に関連すると思われる変化はみられなかった。

病理組織学的検査では非腫瘍性病変として、雌の鼻腔の嗅上皮にエオジン好性変化の発生増加がみられた。本試験の予備試験として実施した 13 週間試験でも、鼻腔の嗅上皮のエオジン好性変化が雌の 500 ppm 群から 31 ppm 群までの全投与群でみられたが（文献 6）、本試験では雌の 125 ppm 群にのみ発生増加が認められた。この病変は嗅上皮の支持細胞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、加齢に伴って発生が増加することが報告されている（文献 10、11）。また、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 11、12、

13、14)。雄では投与に関連した病変の増加は認められなかった。なお、13週間試験では肺に細気管支の好塩基性変化が雌雄とも 31 ppm 群までみられたが（文献 6）、本試験ではこの所見は認められなかった。

#### IV-4 他文献との比較等

① がん原性：1-ブロモブタンのマウス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 15）。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 16）。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

B6D2F1/Crlj マウスを用いて 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、以下の結論を得た。

雄に肺の細気管支-肺胞上皮癌の発生増加が認められ、雄マウスに対するがん原性を示す明らかな証拠である。雌では腫瘍の発生増加は認められなかった。

## 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 - ブロモブタンのマウスを用いた吸入による 13 週間毒性試験報告書. 神奈川県: 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. 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.

11. Monticello TM, Morgan KT, Uraih L. 1990. Nonneoplastic nasal lesions in rats and mice. *Environ Health Perspect.* 85: 249-255.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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 (ウロラブスティックス) 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。