

4-*tert*-ブチルカテコールのラットを用いた  
経口投与による13週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0719

CAS No. 98 29 3

2009年12月28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

目次

標題	.....
試験目的	.....
試験法	.....
GLP 対応	.....
試験委託者	.....
試験施設及び運営管理者	.....
試験日程	.....
試験関係者一覧	.....
試資料の保管	.....
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	.....
陳述書	.....
信頼性保証証明書	.....
本文	.....
TABLES	A ~ L
FIGURES	1 ~ 4
APPENDICES	1 ~ 3

## 標題

4-*tert*-ブチルカテコールのラットを用いた経口投与による 13 週間毒性試験 (混餌試験)

## 試験目的

4-*tert*-ブチルカテコールの経口投与によるがん原性試験の投与濃度を決定するために、4-*tert*-ブチルカテコールをラットに 13 週間経口 (混餌) 投与して、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 408 (げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験 1998 年 9 月 21 日採択) を参考にして実施した。

## 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

4-*tert*-ブチルカテコールのラットを用いた  
経口投与による13週間毒性試験（混餌試験）報告書

試験番号：0719

本文

## 本文目次

	頁
要約 .....	1
試験材料 .....	2
- 1 被験物質の性状等 .....	2
- 1 - 1 名称等 .....	2
- 1 - 2 構造式及び分子量 .....	2
- 1 - 3 物理化学的性状等 .....	2
- 2 被験物質の使用ロット等 .....	2
- 3 被験物質の特性・同一性、安定性 .....	3
- 3 - 1 特性・同一性 .....	3
- 3 - 2 安定性 .....	3
- 4 試験動物 .....	3
試験方法 .....	4
- 1 投与 .....	4
- 1 - 1 投与経路 .....	4
- 1 - 2 被験物質の投与方法 .....	4
- 1 - 3 投与期間 .....	4
- 1 - 4 投与濃度 .....	4
- 1 - 5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由 .....	4
- 1 - 6 被験物質混合飼料の調製方法 .....	5
- 1 - 7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性 ..	5
- 1 - 8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性 .....	5
- 1 - 9 被験物質の摂取量 .....	6

- 2	動物管理	6
- 2 - 1	各群の使用動物数	6
- 2 - 2	群分け及び個体識別方法	6
- 2 - 3	飼育条件	7
(1)	飼育環境	7
(2)	飼料	7
(3)	飲水	7
- 3	観察・検査項目及び方法	8
- 3 - 1	動物の生死及び一般状態の観察	8
- 3 - 2	体重測定	8
- 3 - 3	摂餌量測定	8
- 3 - 4	血液学的検査	8
- 3 - 5	血液生化学的検査	8
- 3 - 6	尿検査	9
- 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	9
- 4	数値処理と統計方法	9
- 4 - 1	数値の取り扱いと表示	9
- 4 - 2	統計処理	10
	試験成績	11
- 1	生死状況	11
- 2	一般状態	11
- 3	体重	11
- 4	摂餌量	12
- 5	被験物質摂取量	12
- 6	血液学的検査	13
- 7	血液生化学的検査	13
- 8	尿検査	13

- 9 病理学的検査	14
- 9 - 1 剖検	14
- 9 - 2 臓器重量	14
- 9 - 3 病理組織学的検査	15
考察及びまとめ	16
- 1 用量 反応関係	16
- 2 無毒性量 (NOAEL)	17
- 3 他の文献との比較	17
(1) 毒性	17
(2) 中期発がん試験	17
(3) 遺伝毒性	18
- 4 がん原性試験の濃度決定	18
文献	20
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	21

## 要約

4-*tert*-ブチルカテコールの経口投与によるがん原性試験の投与濃度を決定することを目的として、4-*tert*-ブチルカテコールを F344/DuCrI CrIj ラットに 13 週間経口（混餌）投与して、その生体影響を検索した。

本試験は、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、雌雄各群とも 10 匹とし、合計 120 匹を用いた。被験物質の投与は、4-*tert*-ブチルカテコールを混合した粉末飼料を動物に自由摂取させることにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0（対照群）、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm（重量比 w/w）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。

13 週間試験の結果、すべての投与群で死亡はみられなかった。10000 ppm 群では、雌雄とも投与期間を通して、体重増加の抑制（最終体重は対照群に対し、雄 81%、雌 85%）と摂餌量の低値が認められた。剖検では、雌雄とも多くの動物の前胃に肥厚がみられ、病理組織学的検査では、すべての動物の前胃上皮に過形成がみられた。前胃上皮の過形成は、雌雄ともに半数以上が中等度で残りが軽度であった。また、胸腺の萎縮が雄の全匹と雌の 3 匹にみられた。4000 ppm 群では、雌雄とも投与期間を通して、体重増加の抑制（最終体重は対照群に対し、雄 94%、雌 90%）と摂餌量の低値が認められた。病理組織学的検査では、雌雄とも多くの動物の前胃上皮に過形成がみられたが、その程度は 10000 ppm 群より減弱した。1600 ppm 群では、雌にのみ僅かな体重増加の抑制（最終体重は対照群に対し、93%）がみられた。前胃上皮の過形成は雌雄とも一部の動物に発生が認められたが、その程度は軽度であった。640 ppm 以下の群では雌雄ともに投与の影響は認められなかった。

4-*tert*-ブチルカテコールのラットに対する 13 週間混餌投与による無毒性量（NOAEL）は、雄では前胃上皮の過形成を、雌では前胃上皮の過形成と体重増加の抑制をエンドポイントとして、640 ppm（雄：38 mg/kg 体重/日、雌：43 mg/kg 体重/日）と判断した。

以上より、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 4000 ppm を最高投与濃度とし、以下 1333 及び 444 ppm（公比 3）に決定した。



## 試験材料

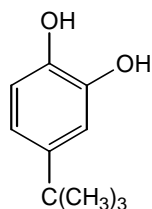
## - 1 被験物質の性状等

## - 1 - 1 名称等

名 称 : 4-*tert*-ブチルカテコール (4-*tert*-Butylcatechol)  
別 名 : 4-*tert*-ブチルピロカテコール  
CAS No. : 98-29-3

## - 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 166.22

## - 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1、2)

性 状 : 白色～うすい赤褐色の固体  
比 重 : 1.049(60/25 )  
融 点 : 53  
溶 解 性 : 水に難溶、エタノール、アセトンに易溶  
保 管 条 件 : 室温で暗所に保管

## - 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 和光純薬工業(株)  
グ レ ー ド : 和光特級  
純 度 : 99.2% (和光純薬工業(株)検査成績書データ)  
使用ロット番号 : PEK3567

### - 3 被験物質の特性・同一性、安定性

#### - 3 - 1 特性・同一性

被験物質の同一性は、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 3）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 4）と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 4-*tert*-ブチルカテコールであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

#### - 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ（株）島津製作所 LC-10）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、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ったことを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

### - 4 試験動物

動物は、4-*tert*-ブチルカテコール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/DuCrIj ラット（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 75 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 60 匹（群構成時体重範囲、雄：114～126g、雌：92～101g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCrIj ラット（SPF）を選択した理由は、遺伝的に安定していること、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。

## 試験方法

### - 1 投与

#### - 1 - 1 投与経路

投与経路は経口投与とした。

#### - 1 - 2 被験物質の投与方法

投与は、被験物質を粉末飼料に添加し、設定濃度に調製した被験物質混合飼料を粉末飼料用給餌器に充填し、動物に自由摂取させた。なお、被験物質混合飼料の交換は 7 日毎に実施した。

#### - 1 - 3 投与期間

投与期間は 13 週間とし、さらに、それぞれの動物の定期解剖前日まで連続投与した。

#### - 1 - 4 投与濃度

投与濃度は、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm (重量比 w/w) の 5 段階 (公比 2.5) に設定した。なお、対照群として粉末飼料のみの群を設けた。

#### - 1 - 5 投与方法、投与期間及び投与濃度の設定理由

被験物質は、常温で固体であり、かつ、水に難溶であるため、混餌による経口投与とした。

投与期間は、がん原性試験の投与濃度を決定するために 13 週間とした。

投与濃度は、経口投与による 2 週間毒性試験 (混餌試験、試験番号 0709) (文献 5) と NTP が実施した 14 週間の混餌経口投与試験 (文献 6) の結果をもとに設定した。2 週間試験は、F344/DuCr1Cr1j ラットの雌雄に、0 (対照群)、1250、2500、5000、10000 及び 20000 ppm の濃度の被験物質混合飼料を自由摂取させることによって行った。その結果、20000 ppm では、体重増加の著しい抑制 (投与終了時: 雄 68%、雌 77%) が認められた。10000 ppm では、投与終了時の体重は対照群と比較して雄 84%、雌 95% であり、雄の体重抑制が 10% を超えているが、一般状態に異常は認められなかった。また、NTP の試験では 12500 ppm の濃度での 14 週間試験投与により体重増加抑制が 23% あるものの動物の死亡がないことから、10000 ppm の濃度でも 13 週間の投与に耐えらると思われた。

従って、13週間試験の最高投与濃度は、10000 ppm が適当であると考えた。また、NTP が実施した14週間試験では雌雄とも最低投与濃度の781 ppm まで病理組織学的変化（前胃の角化亢進）が認められている。このため、無毒性量の情報を得るには、それ以下の濃度の設定が必要と考えられた。

以上より、13週間試験の投与濃度は、雌雄とも10000 ppm を最高投与濃度とし、以下4000、1600、640及び256 ppm（公比2.5）に設定した。

#### - 1 - 6 被験物質混合飼料の調製方法

粉末飼料（オリエンタル酵母工業(株)製 CRF-1）と被験物質をスパイラルミキサー（関東混合機工業(株) SS-251、CS-20 または HP-20M）で攪拌混合し、設定した濃度の被験物質混合飼料を調製した。初めに粉末飼料と被験物質を攪拌混合し、10000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。この10000 ppm 被験物質混合飼料を更に粉末飼料と攪拌混合し、256、640、1600 及び 4000 ppm の被験物質混合飼料を調製した。試験における濃度の表示は ppm(w/w)とした。また、被験物質混合飼料の調製は、投与開始日前日より2週に1回調製し、1週分をラット用餌箱に充填して翌日より動物に与えた。残余は、各濃度毎にビニール袋に小分け密封し、使用時まで冷蔵で保管した。

#### - 1 - 7 調製時における被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性

被験物質混合飼料中の被験物質の濃度及び均一性は、初回調製時に各投与濃度ごとに調製容器内の被験物質混合飼料を7点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ（株島津製作所 LC-10）を用いて測定し、確認した。

その結果、各群の平均調製濃度は、設定濃度に対して90.9～104%の範囲にあった。また、均一性は各群ともばらつきが少なかった。従って、被験物質混合飼料は、設定濃度に対して正確に調製されたことを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 2-1、均一性については APPENDIX 2-2 に示した。

#### - 1 - 8 被験物質混合飼料中の被験物質の安定性

被験物質混合飼料中の被験物質の安定性は、投与開始前に、最低投与濃度以下の150 ppm と最高投与濃度以上の15000 ppm の被験物質混合飼料で確認した。150 ppm と15000 ppm の被験物質混合飼料をラット用餌箱に充填し、動物飼育室内で室温保管（8日間）したものと、ビニール袋詰めにして密封し、冷蔵保管（8日間）したものについて、調製時と保管期間後の被験物質濃度を、高速液体クロマトグラフ（株島津製作所 LC-10）を用いて測定し、

それぞれの濃度を比較することにより確認した。

その結果、調製時の濃度を 100 %とした時に、室温保管(8日間)では、150 ppm:96.5 %、15000 ppm:98.6 %、冷蔵保管(8日間)では、150 ppm:96.5 %、15000 ppm:97.2 %であり、給餌期間中及び冷蔵保管中における被験物質混合飼料中の被験物質は安定であった。

その結果を APPENDIX 2-3 に示した。

#### - 1 - 9 被験物質の摂取量

体重、摂取量及び設定濃度より、動物の体重 (kg) 当たりの被験物質 1 日摂取量 (mg/kg 体重/日) を算出した。

#### - 2 動物管理

##### - 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。

群名称	動物数 (動物番号)	
	雄	雌
対照群	10 匹 (1001 ~ 1010)	10 匹 (2001 ~ 2010)
256 ppm 群	10 匹 (1101 ~ 1110)	10 匹 (2101 ~ 2110)
640 ppm 群	10 匹 (1201 ~ 1210)	10 匹 (2201 ~ 2210)
1600 ppm 群	10 匹 (1301 ~ 1310)	10 匹 (2301 ~ 2310)
4000 ppm 群	10 匹 (1401 ~ 1410)	10 匹 (2401 ~ 2410)
10000 ppm 群	10 匹 (1501 ~ 1510)	10 匹 (2501 ~ 2510)

##### - 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い動物から体重の中央値に近い雌雄各 60 匹を選別し、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(雌雄とも 208 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。

### - 2 - 3 飼育条件

#### (1) 飼育環境

動物は、全飼育期間を通して以下の環境で飼育した。飼育室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を< >内に記した。飼育室内の環境には、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 :  $23 \pm 2$  <  $22.8 \pm 0.2$  >

湿度 :  $55 \pm 15\%$  <  $55 \pm 1\%$  >

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

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 :

ステンレス製2連網ケージ(170(W)×294(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(30KGy-線照射滅菌飼料)固型または粉末飼料を使用した。検疫期間については固型飼料を固型飼料給餌器により自由摂取させた。馴化期間についてはCRF-1粉末飼料を粉末飼料給餌器により自由摂取させた。投与期間は、各投与群には所定の濃度にCRF-1粉末飼料を用いて調製した被験物質混合飼料を、対照群にはCRF-1粉末飼料のみを粉末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中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は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。

#### (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た。

- 3 観察・検査項目及び方法

- 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。

- 3 - 2 体重測定

測定時に生存していた全動物について、週 1 回行った。また、定期解剖動物の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

- 3 - 3 摂餌量測定

測定時に生存していた全動物について、週 1 回給餌量、残餌量及び餌こぼし量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

- 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及びヘパリンリチウム入り採血管（下記 印検査項目）に採血した全血を用いて、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、メトヘモグロビン濃度、白血球数、白血球分類

- 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、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

### - 3 - 6 尿検査

投与 13 週目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（マルティスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）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

### - 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：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

## - 4 数値処理と統計方法

### - 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。

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、残餌量及び餌こぼし量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値及び餌こぼし量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。

被験物質の体重 kg 当たりの 1 日摂取量は、摂取量に被験物質の設定濃度を乗じ、体重で除した値を mg/kg 体重 /日 を単位として小数点以下第 1 位を四捨五入し、整数値の 1 の位までを表示した。

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。

#### - 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、摂取量、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、<sup>2</sup>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<sup>2</sup>検定を行った。

各検定は 5%の有意水準で両側検定を行い、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。

## 試験成績

### - 1 生死状況

生死状況を TABLE A 1, 2 に示した。

#### - 雌雄 -

雌雄ともすべての群に死亡動物はみられなかった。

### - 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE B 1, 2 に示した。

#### - 雄 -

一般状態に変化はみられなかった。

#### - 雌 -

1600 ppm 以上の群で、尿による外陰部周囲の汚染が観察された。尿による外陰部周囲の汚染は、10000 ppm 群では、投与期間中すべての動物にみられたが、多くは回復し、最終観察時には 3 匹にみられた。4000 ppm 群では、投与期間中 6 匹の動物にみられ、最終観察時にみられたのは 3 匹であった。1600 ppm 群では、投与期間中に 2 匹にみられ、最終観察時にみられたのは 1 匹であった。640 ppm 以下の群では、一般状態に変化はみられなかった。

### - 3 体重

体重の推移を TABLE C 1~4、及び FIGURE 1, 2 に示した。

#### - 雄 -

4000 ppm 以上の群では、全投与期間を通して体重の低値が認められた。1600 ppm 以下の群では、対照群と同様の推移を示した。

なお、最終計測日における各投与群の体重は、対照群に対して、256 ppm 群：102%、640 ppm 群：101%、1600 ppm 群：97%、4000 ppm 群：94%、10000 ppm 群：81%であった。

#### - 雌 -

4000 ppm 以上の群では、ほぼ全投与期間を通して体重の低値が認められた。1600 ppm 群では投与期間の後半に体重の低値が認められた。640 ppm 以下の群では、対照群と同様の推移を示した。

なお、最終計測日における各投与群の体重は、対照群に対して、256 ppm 群：95%、640 ppm 群：96%、1600 ppm 群：93%、4000 ppm 群：90%、10000 ppm 群：85%であった。

#### - 4 摂餌量

摂餌量の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 3, 4 に示した。

- 雄 -

4000 ppm 以上の群では、ほぼ全投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。1600 ppm 以下の群では対照群と同様の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量(対照群に対する相対比)は、対照群:15.0 g、256 ppm 群:15.3 g(102%)、640 ppm 群:15.1 g(101%)、1600 ppm 群:14.4 g(96%)、4000 ppm 群:13.9 g(93%)、10000 ppm 群:11.9 g(79%)であった。

- 雌 -

4000 ppm 以上の群では、全投与期間を通して摂餌量の低値が認められた。1600 ppm 群では、主に投与期間の後半に摂餌量の低値が認められた。640 ppm 以下の群では対照群と同様の推移を示した。

全投与期間における各群の平均一日摂餌量(対照群に対する相対比)は、対照群:10.7 g、256 ppm 群:10.2 g(95%)、640 ppm 群:10.3 g(96%)、1600 ppm 群:9.9 g(93%)、4000 ppm 群:9.3 g(87%)、10000 ppm 群:8.2 g(77%)であった。

#### - 5 被験物質摂取量

体重、摂餌量及び設定濃度より算出した被験物質摂取量を TABLE E 1, 2 に示した。

- 雄 -

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、256 ppm 群:12~22、640 ppm 群:29~56、1600 ppm 群:71~136、4000 ppm 群:182~319、10000 ppm 群:452~749 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、256 ppm 群:15、640 ppm 群:38、1600 ppm 群:93、4000 ppm 群:232、10000 ppm 群:560 であった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、初回測定時(投与開始後 7 日目)の 10000 ppm 群で設定濃度比(2.5)をやや下回ったが、それ以外の週では設定濃度比に近い値を示した。

- 雌 -

各投与群の被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、256 ppm 群:14~23、640 ppm 群:36~59、1600 ppm 群:89~140、4000 ppm 群:220~332、10000 ppm 群:517~786 の範囲にあった。また、各投与群における全投与期間を通しての平均被験物質摂取量 (mg/kg 体重/日) は、256 ppm 群:17、640 ppm 群:43、1600 ppm 群:107、4000 ppm 群:259、10000 ppm 群:606 であった。各投与群の被験物質摂取量の比率は、初回測定時(投与開始後 7 日目)の 10000 ppm 群で設定濃度比(2.5)をやや下回ったが、それ以外の週では設定濃度比に近い値を示した。

- 6 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 -

MCV と MCH の高値が 10000 ppm 群に認められた。

- 雌 -

被験物質の投与による変化は認められなかった。

- 7 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 -

総コレステロールとリン脂質の高値が 1600 ppm 以上の群に、尿素窒素の高値が 4000 ppm 以上の群に、トリグリセライドの低値が 10000 ppm 群に認められた。また、アルブミンと A/G 比の高値、並びに ALT の低値が 10000 ppm 群で認められたが、僅かな変化であった。

- 雌 -

尿素窒素の高値が 4000 ppm 以上の群に、ALP、 $\gamma$ -GTP 及びカリウムの高値が 10000 ppm 群に認められた。また、総蛋白の低値が 10000 ppm 群で認められたが、僅かな変化であった。

- 8 尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雄 -

pH の低下が 10000 ppm 群に認められた。

その他、蛋白の陽性度の減少が 4000 ppm 群にみられたが、明確な変化ではなく、投与濃度に対応したものではなかった。

- 雌 -

ケトン体の陽性度の増加が 10000 ppm 群に認められたが、僅かな変化であった。

## - 9 病理学的検査

### - 9 - 1 剖検

剖検所見を TABLE I 1, 2 に示した。

- 雄 -

前胃の肥厚が 10000 ppm 群に 9 匹認められた。4000 ppm 以下の群では著変は認められなかった。

- 雌 -

前胃の肥厚が 10000 ppm 群に全匹認められた。4000 ppm 以下の群では著変は認められなかった。

### - 9 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量を TABLE J 1, 2 に、体重比を TABLE K 1, 2 に示した。

- 雄 -

腎臓の体重比の高値が 640 ppm 以上の群に認められたが、僅かな変化であり、10000 ppm 群の実重量は低値であった。

胸腺、副腎、精巣、心臓、肺、脾臓、肝臓及び脳に実重量の低値や体重比の高値がみられたが、4000 ppm 群以上の搬出時体重は対照群と比較して有意に低く、また、1600 ppm 群でも統計学的に有意ではないが対照群より低いことから、これらの臓器重量の変化は、搬出時体重の低値に伴う変化と考えた。

- 雌 -

胸腺、副腎、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓及び脳に実重量の低値や体重比の高値がみられたが、1600 ppm 以上の群の搬出時体重は対照群と比較して有意に低く、また、256 ppm 群と 640 ppm 群でも統計的に有意ではないが対照群より低いことから、これらの臓器重量の変化は、搬出時体重の低値に伴う変化と考えた。

### - 9 - 3 病理組織学的検査

非腫瘍性病変及びそれらの発生数を TABLE L 1, 2 に示した。

- 雄 -

前胃上皮の過形成が 10000 ppm 群の全匹、4000 ppm 群の 9 匹、1600 ppm 群の 8 匹にみられた。その程度は、10000 ppm 群では軽度から中等度、4000 ppm 群と 1600 ppm 群では軽度であった。前胃上皮の過形成は、扁平上皮細胞の増殖による上皮層（5 層以上）の肥厚であり、角化亢進を伴っていた。

また、胸腺の軽度な萎縮が 10000 ppm の全匹にみられた。

640 ppm 以下の群には被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

- 雌 -

前胃上皮の過形成が 10000 ppm 群の全匹、4000 ppm 群の 8 匹、1600 ppm 群の 4 匹にみられた。その程度は、10000 ppm 群と 4000 ppm 群では軽度から中等度、1600 ppm 群では軽度であった。

また、胸腺の軽度な萎縮が 10000 ppm の 3 匹にみられた。

640 ppm 以下の群には被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

その他、骨髄の肉芽形成とハーダー腺のリンパ球浸潤の発生に統計学的有意差がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

## 考察及びまとめ

4-*tert*-ブチルカテコールの F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた経口投与による 2 年間 (104 週間) のがん原性試験を実施するにあたり、その投与濃度を決定するために 13 週間試験を実施した。被験物質の投与は、4-*tert*-ブチルカテコールを混合した粉末飼料を動物に自由摂取させることにより行った。1 群当たりの動物数は雌雄各 10 匹とし、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群構成で行った。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、256、640、1600、4000 及び 10000 ppm (重量比 w/w) 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 用量 - 反応関係

4-*tert*-ブチルカテコールの投与の結果、雌雄ともすべての群に死亡動物は認められなかった。

一般状態の観察では、雄には変化はみられなかった。雌では、1600 ppm 以上の群で尿による外陰部周囲の汚染がみられたが、その多くは最終計測時までには回復した。

体重は、雌雄の 4000 ppm 以上の群で、ほぼ全投与期間を通して低値が認められた。1600 ppm 群では、雌にのみ投与期間の後半に低値がみられた。投与終了時の体重は対照群に対し、雄は 256 ppm 群 : 102%、640 ppm 群 : 101%、1600 ppm 群 : 97%、4000 ppm 群 : 94%、10000 ppm 群 : 81% であり、雌は 256 ppm 群 : 95%、640 ppm 群 : 96%、1600 ppm 群 : 93%、4000 ppm 群 : 90%、10000 ppm 群 : 85% であった。

摂餌量は、雌雄の 4000 ppm 以上の群で、ほぼ全投与期間を通して低値が認められた。1600 ppm 群では、雌に投与期間の後半に低値がみられた。なお、各投与群の平均被験物質摂取量の比率は、雌雄ともに、10000 ppm 群で初回測定時 (投与開始後 7 日目) に摂餌量の低値により設定濃度比 (2.5) をやや下回ったが、それ以外の週は、設定濃度比に近い値を示した。

血液学的検査では、雄 10000 ppm 群で MCV、MCH の高値がみられたが、僅かな変化であり、また、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値には対照群との間に差を認めなかった。雌では投与による影響は認められなかった。

血液生化学的検査では、雄は総コレステロール及びリン脂質の高値が 1600 ppm 以上の群に、尿素窒素の高値が 4000 ppm 以上の群に、トリグリセライドの低値が 10000 ppm 群に認められた。雌は尿素窒素の高値が 4000 ppm 以上の群に、ALP、 $\gamma$ -GTP とカリウムの高値が 10000 ppm 群に認められた。

尿検査では、雄で pH の低下が 10000 ppm 群に認められた。

臓器重量測定では、雌雄とも明らかな投与の影響は認められなかった。

病理学的検査では、剖検で雌雄の 10000 ppm 群に前胃の肥厚が認められ、病理組織学的検査で雌雄の 1600 ppm 以上の群の前胃上皮に過形成の発生が認められた。過形成の発生匹数、その程度は投与濃度に対応して増加した。その他、雌雄の 10000 ppm 群では胸腺の萎縮が認められたが、いずれも軽度であった。

## - 2 無毒性量 (NOAEL)

4-*tert*-ブチルカテコールの 13 週間混餌投与により、最も低濃度で現れた病理組織学的所見は前胃上皮過形成であり、雌雄とも 1600 ppm 以上の群に発生がみられた。また、雌では体重増加の抑制が 1600 ppm 以上の群で認められた。従って、4-*tert*-ブチルカテコールのラットに対する 13 週間混餌投与による無毒性量 (NOAEL) は、雄では前胃上皮の過形成を、雌では前胃上皮の過形成と体重増加の抑制をエンドポイントとして、雌雄とも 640 ppm (雄：38 mg/kg 体重/日、雌：43 mg/kg 体重/日) と判断した。

## - 3 他の文献との比較

### (1) 毒性

F344 ラットの雌雄に 0 (対照群)、781、1562、3125、6250 及び 12500 ppm (w/w) の濃度の 4-*tert*-ブチルカテコールを、14 週間反復経口投与 (混餌) した NTP の報告 (文献 6) がある。この報告では、雄の 1562 ppm 以上の群と雌の 3125 ppm 以上の群は体重増加の抑制が認められている。病理組織学的検査では、雌雄のすべての投与群で前胃上皮に角化亢進が認められ、3125 ppm 以上の群では過形成も認められている。また、雄の 6250 ppm 以上の群では肝臓の細胞質の変性が認められ、ラットの NOAEL を雄の肝細胞の変性をエンドポイントとして、3125 ppm (270 mg/kg 体重/日) としている。

この結果と本試験の結果を比較すると、本試験では 1600 ppm 以上の群で NTP の報告と同様に前胃上皮に過形成が認められた。これに対し、角化亢進は本試験では過形成を有する動物にのみに認められており、NTP の報告にあるような角化亢進のみの発生は認められなかった。前胃上皮の過形成は、前胃の様々な刺激により発生し、刺激性を有する化学物質の経口投与によく認められることが知られている (文献 8)。NTP の報告では、前胃に潰瘍や炎症がみられないことから、前胃上皮の過形成と角化亢進は刺激性により発生したものではないと推察している。また、NTP の報告は肝臓の細胞質の変性を認めたとしているが、本試験では NTP が NOAEL のエンドポイントとしている肝臓に病理組織学的な変化を認めなかった。

### (2) 中期発がん試験

F344 ラット雄を用いた中期発がん試験の報告がある (文献 9)。この試験では、*N*-メチ



ル-*N*<sup>2</sup>-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) によりイニシエーションした 16 匹のラットに 15000 ppm の 4-*tert*-ブチルカテコールを 51 週間反復経口投与 (混餌) した。その結果、前胃には、過形成がすべての動物にみられ、また、乳頭腫が 15 匹に、上皮内がんが 4 匹に、扁平上皮がんが 12 匹に発生した。また、腺胃においても、腺がんが 3 匹に、腺腫様過形成が 4 匹に発生した。一方、MNNG によるイニシエーション処理を行わず、4-*tert*-ブチルカテコールを 51 週間混餌口投与した 15 匹のラットには、前胃の過形成はすべての動物にみられたが、腫瘍性病変は前胃の乳頭腫が 1 匹にみられたのみであった。以上の結果より、4-*tert*-ブチルカテコールはラットの前胃と腺胃に発がんプロモーション作用を示すと報告している。

### (3) 遺伝毒性

4-*tert*-ブチルカテコールの微生物を用いる復帰突然変異試験では、ネズミチフス菌 TA97、TA98、TA100、TA102、TA104、TA1535、TA1537、TA1538 菌株、大腸菌 WP2、WP2*uvrA* 菌株及び酵母菌 JD1 株において、代謝活性化の有無にかかわらず陰性の結果を示した (文献 6、10)。また、ラット培養肝細胞を用いた染色体異常試験で陰性の結果を示した (文献 10) 一方、マウスリンパ腫細胞 L5178Y を用いた遺伝子突然変異試験では、陽性を示した (文献 11)。

げっ歯類を用いる小核試験においては、ラットに 1 回腹腔内投与した場合の骨髓細胞、マウスに混餌により 14 週間投与した場合の末梢血の両者とも陰性であった (文献 6)。

#### - 4 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通り決定した。

13 週間試験の結果、すべての投与群で死亡はみられなかった。10000 ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制 (最終体重は対照群に対し、雄 81%、雌 85%) と摂餌量の低値が認められた。病理組織学的検査で雌雄ともすべての動物に前胃上皮の過形成がみられ、その程度は半数以上が中等度で、残りが軽度であった。また、胸腺の軽度な萎縮がみられた。4000 ppm 群では、雌雄とも体重増加の抑制 (最終体重は対照群に対し、雄 94%、雌 90%) と摂餌量の低値が認められた。病理組織学的検査では、雌雄とも多くの動物に前胃上皮の過形成がみられたが、その程度は 10000 ppm 群より減弱した。1600 ppm 群では、雌にのみ僅かな体重増加の抑制 (最終体重は対照群に対し、93%) がみられた。病理組織学的検査では雌雄とも一部の動物に前胃上皮の過形成がみられ、その程度はいずれの動物も軽度であった。

以上の結果から、10000 ppm 群では、雌雄とも対照群に対して 10% 以上の体重増加の抑制が認められ、この濃度はがん原性の最高投与濃度としては高いと考えられた。4000 ppm 群では体重増加の抑制は 10% 以内であり、前胃上皮の過形成が雌雄ともに認められたが、その程度は多くが軽度であり、この濃度で 2 年間の長期投与を行っても、動物の生存率に

影響を与えないと判断した。最低濃度については、640 ppm 群でも投与の影響を認めなかったが、さらに長期の投与によって、毒性がより低濃度まで現れる可能性があるため、640 ppm より低い濃度とした。

以上より、がん原性試験の投与濃度は、雌雄とも 4000 ppm を最高投与濃度とし、以下 1333 及び 444 ppm (公比 3) に決定した。

## 文献

1. 化学工業日報社 . 2008 . 15308 の化学商品 . 東京 : 化学工業日報社 , 768-769 .
2. 和光純薬工業(株) . 2007 . MSDS No. JW021085, 製品安全データシート .
3. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY : John Wiley and Sons.
4. 和光純薬工業(株) . 2008 . 4-*t*-ブチルピロカテコール, 赤外吸収スペクトル .
5. 日本バイオアッセイ研究センター . 2009. 4-*tert*-ブチルカテコールのラットを用いた経口投与による 2 週間毒性試験 (混餌試験) 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 .
6. NTP. 2002. NTP Technical Report on Toxicity Studies of *p-tert*-Butylcatechol (CAS No. 98-29-3). Administered in Feed to F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice. Toxicity Report Series 70. Research Triangle Park, NC : National Toxicology Program.
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. 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 .
9. Hirose M, Yamaguchi S, Fukushima S, Hasegawa R, Takahashi S, Ito N. 1989. Promotion by dihydroxybenzene derivatives of *N*-methyl-*N*<sup>2</sup>-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced F344 rat forestmach and glandular. Cancer Research. 49:5143-5147.
10. Dean BJ, Brooks TM, Hodson-Walker G, Hutson DH. 1985. Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. Mutat Res. 153: 57-77.
11. McGregor DB, Riach CG, Brown A, Edwards I, Reynolds D, West K, Willington S. 1988. Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. Environ Mutagen. 11: 523-544.

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

本試験において、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。