

資料 2－6

1,3-ジブロモプロパンのラットを用いた強制経口投与による 肝中期発がん性試験報告書

試験番号：0827

CAS No. 109-64-8

2014年3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	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	i
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	1～7
FIGURES	1～3
PHOTOGRAPHS	1～3
APPENDICES	1-1～3-4

標題

1,3-ジブロモプロパンのラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験

試験目的

2 段階発がんモデルによるラット肝中期発がん性試験（伊東法）を用いて、1,3-ジブロモプロパンの肝発がんプロモーション作用の有無を検索し、その発がん性を予測した。

試験法

本試験は、「ラット肝中期発がん性試験による調査の基準」（平成 25 年 7 月 8 日厚生労働省発がん性評価ワーキンググループ合意事項）に準拠して実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づく試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正平成 12 年 12 月 25 日労働省告示第 120 号）に準拠して実施した。

動物福祉

本試験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号）、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」（平成 24 年 4 月 25 日規程第 17 号、最終改正平成 25 年 3 月 28 日規程第 12 号）を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査、承認された（承認番号 0054）。

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
東京都千代田区霞が関 1-2-2

1,3-ジブロモプロパンのラットを用いた強制経口投与による 肝中期発がん性試験報告書

試験番号：0827

本文

本文目次

項目	頁
1. 要約	1
2. 試験材料	
2-1. 被験物質	
2-1-1. 被験物質の名称等	3
2-1-2. 被験物質の構造式及び分子量	3
2-1-3. 被験物質の物理化学的性状等	3
2-1-4. 被験物質の使用ロット等	3
2-1-5. 被験物質の特性・同一性、安定性	
2-1-5-1. 被験物質の特性・同一性	3
2-1-5-2. 被験物質の安定性	3
2-2. 媒体	
2-2-2. 媒体の名称等	4
2-3. 陽性対照物質	
2-3-1. 陽性対照物質の名称等	4
2-3-2. 陽性対照物質の特性・同一性、安定性	
2-3-2-1. 陽性対照物質の特性・同一性	4
2-3-2-2. 陽性対照物質の安定性	4
2-4. 起始物質（イニシエーター）	
2-4-1. 起始物質の名称等	5
2-4-2. 起始物質の特性・同一性、安定性	
2-4-2-1. 起始物質の特性・同一性	5
2-4-2-2. 起始物質の安定性	5
2-5. 試験動物	6
3. 試験方法	
3-1. 試験の概略	7
3-2. 投与	
3-2-1. 被験物質	
3-2-1-1. 被験物質の投与経路	7
3-2-1-2. 被験物質の投与量及び投与方法	7
3-2-1-3. 被験物質の投与方法及び投与量の設定理由	7
3-2-1-4. 被験物質投与液の調製	8
3-2-1-5. 被験物質投与液中の被験物質濃度及び均一性	8
3-2-1-6. 被験物質投与液中の被験物質の安定性	8

本文目次(続き)

項目	頁
3-2-2. 陽性対照物質	
3-2-2-1. 陽性対照物質の投与量及び投与方法	9
3-2-2-2. 陽性対照物質投与液の調製	9
3-2-2-3. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質濃度及び均一性	9
3-2-2-4. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質の安定性	9
3-2-3. 起始物質	
3-2-3-1. 起始物質 (DEN) の投与量及び投与方法	10
3-2-3-2. 起始物質投与液の調製	10
3-2-3-3. 起始物質投与液中の起始物質濃度及び均一性	10
3-3. 動物管理	
3-3-1. 群の構成と動物数	10
3-3-2. 群分け方法	11
3-3-3. 動物の個体識別	11
3-3-4. 使用飼育室・手術室、ならびに他試験及び異種動物との区別	11
3-3-5. 飼育条件	11
3-4. 部分肝切除手術 (PH)	12
3-5. 観察・検査項目及び方法	
3-5-1. 動物の生死および一般状態の観察	12
3-5-2. 体重測定	12
3-5-3. 摂餌量測定	12
3-5-4. 病理学的検査	13
3-6. 数値処理と統計方法	
3-6-1. 数値の取扱と表示	13
3-6-2. 統計処理	14
4. 試験成績	
4-1. 生死状況及び一般状態	15
4-2. 体重	15
4-3. 摂餌量	15
4-4. 病理学的検査	
4-4-1. 剖検	15
4-4-2. 臓器重量	16
4-4-3. 病理組織学的検査	16
5. 考察及びまとめ	17
6. 結論	18
7. 文献	19
8. 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 及び試験計画に従わなかつたこと	21

1. 要約

2 段階発がんモデルによるラット肝中期発がん性試験（伊東法）を用いて、1,3-ジブromopropanの肝発がんプロモーション作用の有無を検索し、その発がん性を予測した。

本試験は、被験物質投与群 4 群、陰性（媒体）対照群及び陽性対照群の計 6 群の構成で、各群とも 20 匹の F344 雄ラットを用いた。起始物質としてジエチルニトロソアミン（DEN）200 mg/kg を単回腹腔内投与した（以降、DEN 処置と表記）。DEN 処置後、第 3 週目より 6 週間、オリブ油に溶解した被験物質を 0（媒体対照群）、5、15、50、150 mg/kg の用量で、また陽性対照群として生理食塩水に溶解したフェノバルビタールナトリウムを 25 mg/kg の用量で毎日 1 回、強制経口投与した。なお、DEN 処置後、第 3 週目の終わりに肝臓の 2/3 切除手術（以後、PH と表記）を行った。投与終了日の翌日に生存動物を安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である胎盤型 Glutathione *S*-transferase（GST-P）陽性細胞巢の発生を検査した。

被験物質による影響として、150 mg/kg 投与群で投与後に流涎が散見され、摂餌量の増加が認められたが、各群の体重に差は認められなかった。被験物質投与に起因する動物の死亡は認められなかった。肝臓重量は用量依存的に増加傾向を示し、実重量は 50 及び 150 mg/kg 投与群で、また相対重量は全被験物質投与群で有意な増加を示した。肝臓の GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、媒体対照群と比較して低値傾向を示し、150 mg/kg 投与群で有意な低値が認められた。なお、陽性対照群における GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、いずれも媒体対照群と比較して有意な高値を示した。

以上、1,3-ジブromopropanは、ラット肝臓における発がんプロモーション作用を示さず、その発がん性は陰性と結論した。

付表 1 1,3-ジブロモプロパンの肝中期発がん性試験結果（肝臓の GST-P 陽性細胞巣）

投 与 量	動物数 (匹)	GST-P 陽性細胞巣	
		陽性細胞巣数 (細胞巣数/cm ²)	陽性細胞巣面積 (mm ² /cm ²)
0 mg/kg (媒体対照群)	18	3.35±1.39	0.30±0.17
5 mg/kg	17	2.40±1.13	0.21±0.14
15 mg/kg	17	2.97±0.97	0.26±0.12
50 mg/kg	17	2.67±1.21	0.22±0.12
150 mg/kg	16	2.09±1.06**	0.14±0.09**
フェノバルビタールナトリウム 25 mg/kg (陽性対照群)	18	6.36±1.89##	0.50±0.19##

** : $p \leq 0.01$ で有意 (Dunnett 検定)

: $p \leq 0.01$ で有意 (Student t 検定)

2. 試験材料

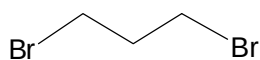
2-1. 被験物質

2-1-1. 被験物質の名称等

名 称 : 1,3-ジブロモプロパン (1,3-Dibromopropane、1,3-DBP)
 別 名 : トリメチレンブロミド
 CAS No. : 109-64-8

2-1-2. 被験物質の構造式及び分子量 (文献 1)

構 造 式 :



分 子 量 : 201.89

2-1-3. 被験物質の物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 無色透明の液体
 比 重 : 1.9844 (20℃) (東京化成工業(株)検査成績データ)
 融 点 : -36℃
 沸 点 : 167℃ (東京化成工業(株)検査成績データ)
 蒸 気 圧 : 0.18 kPa (25℃)
 溶 解 性 : 有機溶剤に可溶、水に 1.68 g/L (30℃) 溶解
 保 管 条 件 : 冷蔵 (約 4℃) かつ遮光

2-1-4. 被験物質の使用ロット等

名 称 : 1,3-ジブロモプロパン
 製 造 元 : 東京化成工業(株)
 規 格 : 東京化成 1 級
 純 度 : 99.9 % (東京化成工業(株)検査成績データ)
 ロ ッ ト 番 号 : FCG3J

2-1-5. 被験物質の特性・同一性、安定性

2-1-5-1. 特性・同一性

被験物質の同一性は、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、文献値 (文献 2) と比較することにより確認した。

その結果、物質の赤外吸収スペクトルは、文献値 (文献 2) と同じ波数にピークが認められ、被験物質は 1,3-ジブロモプロパ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。

2-1-5-2. 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。

2-2. 媒体

2-2-1. 媒体の名称等

名	称	:	オリーブ油
規	格	:	日本薬局方
製	造	元	: 丸石製薬（株）
ロ	ット	番	号 : 37041
保	管	条	件 : 室温かつ遮光

2-3. 陽性対照物質

2-3-1. 陽性対照物質の名称等

名	称	:	フェノバルビタールナトリウム（PB） Phenobarbital Sodium
CAS No.	:	57-30-7	
製	造	元	: 東京化成工業(株)
規	格	:	東京化成 1 級
純	度	:	93.4 %（東京化成工業(株)試験成績書データ）
ロ	ット	番	号 : GG01
保	管	条	件 : 室温かつ遮光

2-3-2. 陽性対照物質の特性・同一性、安定性

2-3-2-1. 特性・同一性

陽性対照物質の同一性は、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、文献値（文献 3）と比較することにより確認した。

その結果、物質の赤外吸収スペクトルは、文献値（文献 3）と同じ波数にピークが認められ、陽性対照物質はフェノバルビタールナトリウムであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 2-1 に示した。

2-3-2-2. 安定性

陽性対照物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に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、使用期間中の陽性対照物質は安定であったことを確認した。

それらの結果は APPENDIX 2-2 に示した。

2-4. 起始物質（イニシエーター）

2-4-1. 起始物質の名称等

名 称	:	N-ニトロソジエチルアミン（ジエチルニトロソアミン、DEN） <i>N</i> -Nitrosodiethylamine
CAS No.	:	55-18-5
製 造 元	:	東京化成工業(株)
規 格	:	東京化成 1 級
純 度	:	99.9 %（東京化成工業(株)試験成績書データ）
ロ ッ ト 番 号	:	FBMVM
保 管 条 件	:	冷蔵（約 4℃）かつ遮光

2-4-2. 起始物質の特性・同一性、安定性

2-4-2-1. 特性・同一性

起始物質の同一性は、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、文献値（文献 2）と比較することにより確認した。

その結果、物質の赤外吸収スペクトルは、文献値（文献 2）と同じ波数にピークが認められ、起始物質は *N*-ニトロソジエチルアミンであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 3-1 に示した。

2-4-2-2. 安定性

起始物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に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、使用期間中の起始物質は安定であったことを確認した。

それらの結果は APPENDIX 3-2 に示した。

2-5. 試験動物

5 週齢の F344/DuCrI CrIj ラット (SPF) の雄 132 匹を、日本チャールス・リバー(株) (厚木飼育センター) より入手し検疫と馴化を兼ねて 8 日間 (2013 年 9 月 24 日～2013 年 10 月 1 日) 飼育した後、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 120 匹 (群構成時体重範囲、110～133g) を選別し、試験に用いた。

なお、試験に F344/DuCrI CrIj ラット (SPF) を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くの肝中期発がん性試験に用いたデータがあること、また、当センターのバックグラウンドデータの蓄積があることによる。

3. 試験方法

3-1. 試験の概略

起始物質 (DEN) を腹腔内に単回投与後、第 3 週目より 6 週間、被験物質または陽性対照物質を毎日、強制経口投与した。なお、第 3 週目の終わりに肝臓の 2/3 切除 (PH: partial hepatectomy) を実施した。試験の概略を FIGURE 1 に示した。

投与終了日の翌日に生存動物を安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である胎盤型 Glutathione *S*-transferase (GST-P) 陽性細胞巢の発生を検査した。

3-2. 投与

3-2-1. 被験物質

3-2-1-1 被験物質の投与経路

投与経路は強制経口投与とした。

3-2-1-2. 被験物質の投与量及び投与方法

被験物質は、ディスポーザブル注射筒及びフレキシブル経口ゾンデを用いて、1 日 1 回、強制経口投与した。投与量は 0 (媒体対照、オリブ油)、5、15、50 及び 150 mg/kg とした。投与液量は 5 mL/kg とし、直近の体重に基づいて個体別に算出した。

投与は、起始物質の投与後 3 週目から 6 週間 (2013 年 10 月 16 日～2013 年 11 月 26 日)、毎日、13 時から 16 時の時間帯に実施した。但し、PH 実施日に投与は行わなかった。なお、2013 年 10 月 26 日は法定電気設備点検のため、午後停電となることから 10 時から 12 時の時間帯に投与を実施した。

3-2-1-3. 被験物質の投与方法及び投与量の設定理由

投与方法は、被験物質の物理化学的性質及びヒトが曝露される経路を考慮して経口投与とし、また、体重当りの被験物質の投与量を一定にするために強制経口投与方法を選択した。

投与量は、1,3-ジブロモプロパンの SD ラットを用いた強制経口投与による 28 日間反復投与毒性試験報告 (文献 5) 及び当センターにおいて F344 ラットの雄を用いて実施した用量設定試験の結果を参考に決定した。

28 日間試験 (文献 5) では、雌雄の SD ラットに 1,3-ジブロモプロパンを 10、50 及び 250 mg/kg の用量で 28 日間強制経口投与した結果、投与による死亡は認められず、250 mg/kg 群の雄に体重増加の抑制 (対照群の約 82%) が認められた。肝重量の増加が 50 mg/kg 群の雌と 250 mg/kg 群の雌雄にみられ、組織学的には、小葉中心性の肝細胞肥大が 50 及び 250 mg/kg 群の雌雄に認められた。また、250 mg/kg 群の雌で腎臓重量の増加及び胸腺重量の減少が認められた。

用量設定試験では、F344 ラットの雄を用いて起始物質投与及び PH を実施した群と実施しない群を設定し、上記試験報告（文献 5）を参考に、1,3-ジブロモプロパンを 50 及び 150 mg/kg の用量で 6 週間の強制経口投与を実施した。その結果、いずれの用量においても、一般状態や体重に異常は認められず、起始物質投与及び PH を実施した群と実施しない群にも顕著な差はみられなかった。

以上の試験報告及び用量設定試験により、本試験における設定用量は 150 mg/kg を最高投与量として、以下、50、15 及び 5 mg/kg とした。

3-2-1-4. 被験物質投与液の調製

被験物質を正確に秤量し、オリーブ油を加え、攪拌により溶解して 30 mg/mL の最高濃度の投与液を調製した。その他の 10、3 及び 1 mg/mL 濃度の投与液は、段階希釈法により調製した。被験物質（1,3-ジブロモプロパン）は、水に溶解しにくいことから、オリーブ油を媒体として選択した。

調製頻度は、7 日に 1 回調製し、投与液は投与日まで冷蔵庫（約 4℃、遮光）に保管した。

3-2-1-5. 被験物質投与液中の被験物質濃度及び均一性

被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 1、3、10 及び 30 mg/mL 調製液を調製容器内から 7 点サンプリングし、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）を用いて測定した。その結果、調製濃度は、設定濃度に対して 95.5%から 102%の範囲にあり、変動係数（CV 値）も 0.973 から 2.64%に範囲を示し、設定濃度に対して正確に調製されていることを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 1-3、均一性については、APPENDIX 1-4 に示した。

3-2-1-6. 被験物質投与液中の被験物質の安定性

被験物質調製液中における被験物質の安定性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 1 及び 30 mg/mL 調製液を冷蔵（約 4℃）かつ遮光の条件下で 8 日間保管したものについて、調製時と保管 8 日目の調製液をそれぞれ調製容器内から 7 点サンプリングし、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）を用いて測定した。その結果、1 及び 30 mg/mL 被験物質調製液の測定濃度は、調製時はそれぞれ 0.965 mg/mL 及び 29.5 mg/mL、保管後は 0.954 mg/mL 及び 30.2 mg/mL であり、8 日間安定であることを確認した。

その結果を、APPENDIX 1-5 に示した。

3-2-2. 陽性対照物質

3-2-2-1. 陽性対照物質の投与量及び投与方法

陽性対照物質は、ディスポーザブル注射筒及びフレキシブル経口ゾンデを用いて、1 日 1 回、強制経口投与した。投与量は 25 mg/kg、投与液量は 5 mL/kg とし、直近の体重に基づいて個体別に算出した。

投与期間は、被験物質と同じく起始物質投与後 3 週目から 6 週間（2013 年 10 月 16 日～2013 年 11 月 26 日）、毎日、13 時から 16 時の時間帯に実施した。但し、PH 実施日に投与は行わなかった。なお、2013 年 10 月 26 日は法定電気設備点検のため、午後停電となることから 10 時から 12 時に実施した。

3-2-2-2. 陽性対照物質投与液の調製

陽性対照物質を正確に秤量し、注射用水（日本薬局方、(株)大塚製薬工場、ロット番号 0E82N）を加え、攪拌により溶解して 5 mg/mL に調製した。

調製頻度は、7 日に 1 回調製し、投与液は投与日まで冷蔵庫（約 4℃、遮光）に保管した。

3-2-2-3. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質濃度及び均一性

陽性対照物質調製液中の陽性対照物質の濃度及び均一性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 5 mg/mL 調製液を調製容器内から 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）を用いて測定した。その結果、調製濃度は、設定濃度に対して 96.0%であり、また CV 値も 0.716%を示し、設定濃度に対して正確に調製されていることを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 2-3、均一性については、APPENDIX 2-4 に示した。

3-2-2-4. 陽性対照物質投与液中の陽性対照物質の安定性

陽性対照物質調製液中における陽性対照物質の安定性は、5 mg/mL 調製液を冷蔵（約 4℃）かつ遮光の条件下で 8 日間保管したものについて、調製時と保管 8 日目の調製液をそれぞれ調製容器内から 7 点サンプリングし、陽性対照物質濃度を高速液体クロマトグラフ（(株)島津製作所、LC-10）を用いて測定した。その結果、測定濃度は、調製時及び保管後それぞれ 4.80 mg/mL、4.89 mg/mL であり、8 日間安定であることを確認した。

その結果を、APPENDIX 2-5 に示した。

3-2-3. 起始物質

3-2-3-1. 起始物質（DEN）の投与量及び投与方法

起始物質は、25G 注射針を装着したディスポーザブル注射筒を用いて、単回腹腔内投与した。投与量は 200 mg/kg、投与液量は 5 mL/kg とし、直近の体重に基づいて個体別に算出した。

起始物質の投与は、群分け日の翌日（2013 年 10 月 2 日）の 13 時から 15 時にかけて行った。

3-2-3-2. 起始物質投与液の調製

起始物質を正確に秤量し、生理食塩液（日本薬局方、(株)大塚製薬工場、ロット番号 K3C97）を加え、攪拌により溶解して 40 mg/mL に調製した。投与液は用時調製とし、投与日の午前中に行った。

3-2-3-3. 起始物質投与液中の起始物質濃度及び均一性

起始物質投与液中の起始物質の濃度及び均一性は、投与開始前に、投与液とは別に調製した 40 mg/mL 調製液を調製容器内から 7 点サンプリングし、ガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジー、5890A）を用いて測定し、確認した。

その結果、調製濃度は、設定濃度に対して 108%であり、また CV 値も 1.85%を示し、設定濃度に対して正確に調製されていることを確認した。

その結果を、濃度については APPENDIX 3-3、均一性については、APPENDIX 3-4 に示した。

3-3. 動物管理

3-3-1. 群の構成と動物数

媒体対照群 1 群、被験物質投与群 4 群及び陽性対照群 1 群の計 6 群を設け、1 群当たり 20 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群 名 称	動物数（動物番号）
媒体対照群	20 匹 （1001～1020）
5 mg/kg 群	20 匹 （1101～1120）
15 mg/kg 群	20 匹 （1201～1220）
50 mg/kg 群	20 匹 （1301～1320）
150 mg/kg 群	20 匹 （1401～1420）
陽性対照群	20 匹 （1501～1520）

3-3-2. 群分け方法

検疫・馴化期間を通して一般状態及び体重の推移に異常を認めなかった動物から、起始物質（DEN）投与前日（2013年10月1日）に体重の中央値に近い120匹を選定した。群分けは、これらの選定し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で、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5）。

3-3-3. 動物の個体識別

動物は、検疫・馴化期間中は動物導入日に尾に油性マーカーによる色素塗布をすることで識別し、以降は、群分け時に耳パンチをすることで個体識別した。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

3-3-4. 使用飼育室・手術室、ならびに他試験及び異種動物との区別

動物はバリア区域内の独立した飼育室（209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。

なお、PHは、同じバリア区域内の手術室（211室）で実施した。

3-3-5. 飼育条件

(1) 飼育環境

動物は、飼育期間を通して以下の環境で飼育した。飼育室の温湿度は実測値（平均値±標準偏差）及び（最小値～最大値）で示した。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： $23.3 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ （最小値 23.0 ～最大値 23.9°C ）

湿 度： $54 \pm 2\%$ （最小値 48 ～最大値 73% ）

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： 個別飼育

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)

飼育器材（ラック、ケージ、餌箱、給水ノズル、作業台車、トレー等）は、オートクレーブを用いて滅菌（約 120°C 、15分以上）したものを用いた。

(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) 千葉工場製造の CRF-1 固型 (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。

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) から分析データを入手し、その記録は保管した。

(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、自動給水ノズルから自由摂取させた。

飲水の水質については、試験施設として 3 ヶ月ごとに実施している水質検査 ((財) 食品薬品安全センター秦野研究所に依頼) で、建築物衛生法施行規則第 4 条に基づく水質基準に適合していることを確認し、その記録は保管した。

3-4. 部分肝切除手術 (PH)

手術室においてイソフルランによる麻酔下で、肝臓の約 2/3 (中央葉と左葉) を切除する手術を全動物に行った。なお、手術に先立って、全動物の胸部から腹部にかけて、バリカンを用いて毛刈りを行った。

部分肝切除手術は、起始物質投与後、第 3 週目の終わり (2013 年 10 月 23 日) の 9 時から 13 時の間に実施した。手術の終了した動物は、麻酔からの覚醒を確認後、速やかに手術室から飼育室へ戻した。

3-5. 観察・検査項目及び方法

3-5-1. 動物の生死及び一般状態の観察

投与日 (起始物質投与日、被験物質投与日) は、全動物について、投与前及び投与後に生死及び一般状態を観察した。投与の無い日は、全動物について、午前中に 1 回、生死及び一般状態を観察した。

3-5-2. 体重測定

全動物について、週に 1 回、午前中に体重を測定した。さらに、PH 後 1 日及び 3 日にも体重を測定した。

3-5-3. 摂餌量測定

全動物について、週に 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、1 匹当たりの 1 日の摂餌量を算出した。

3-5-4. 病理学的検査

(1) 剖検

定期解剖時まで生存した全動物について、イソフルラン麻酔下で腹大動脈切断により放血して安楽死させた後、剖検し肉眼的に観察を行った。

(2) 肝臓重量

定期解剖動物について、肝臓の湿重量（実重量）を測定した。また、実重量の搬出時体重に対する百分率（相対重量）を算出した。

(3) 臓器の採取固定

剖検した動物は、肝臓を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。脾臓及び腎臓については、摘出後 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し保管した。

(4) 肝臓の免疫組織化学的検査

定期解剖動物について、固定・保存した肝臓（右上葉、右下葉及び尾状葉）を切り出し、パラフィン包埋、薄切後、GST-P の免疫組織学的染色を行った。肝臓組織の測定総面積並びに GST-P 陽性細胞巢の個数及び面積を病理標本画像解析装置（オリンパス株式会社、VS120；画像解析ソフトウェア、Visiopharm A/S, tissuemorphDP™）を用いて計測し、肝臓切片 1 cm² 当たりの GST-P 陽性細胞巢（直径 0.2 mm 以上）の個数及び総面積を算出した。なお、50 及び 150 mg/kg 投与群において GST-P の免疫組織化学的染色により弱い染色性の背景領域が認められたが、この領域は変異細胞巢である GST-P 陽性細胞巢とは区別する必要がある。自動計測による計測法では、GST-P 陽性細胞巢以外の陽性領域を測定してしまうため、目視で GST-P 陽性細胞巢を確認し、測定範囲を手動で指定して GST-P 陽性細胞巢のみを解析した。肝組織総面積については自動計測による解析結果を採用した。

肝臓の組織切片は、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的検査を実施した。

3-6. 数値処理と統計方法

3-6-1. 数値の取扱いと表示

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。

肝臓の実重量は、g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。相対重量は、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。

GST-P 陽性細胞巢の個数及び面積は、1 匹当たりの GST-P 陽性細胞巢の個数(個/cm²)及び面積(mm²/cm²)を算出し、小数点以下第 3 位を四捨五入して小数点以下第 2 位までを表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示す桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

3-6-2. 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より PH の不成立等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。

体重、摂餌量、臓器重量の測定値及び肝臓の GST-P 陽性細胞巢の個数と面積は、被験物質投与群については、媒体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。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(文献 6)。

陽性対照群と媒体対照群の平均値の有意差検定は、まず F 検定を用い、等分散である場合は Student の t 検定(片側)を行い、等分散でない場合は Aspin-Welch 検定(片側)を行った(文献 6)。

4. 試験成績

4-1. 生死状況及び一般状態

各群における一般状態の観察結果を TABLE 1 に示した。

生死状況については、投与又は横隔膜ヘルニア等伴う PH の不成立により、0、5、15、50、150 mg/kg 投与群及び陽性対照群で、それぞれ 1、3、3、2、4 及び 1 匹死亡した。また定期解剖の剖検において 0 及び 50 mg/kg 投与群及び陽性対照群で各 1 匹に PH 失敗による横隔膜穿孔又は内臓癒着を示す動物を認めた。そのため当該動物を有効動物から除外した。従って、最終的な有効動物は、0、5、15、50、150 mg/kg 投与群及び陽性対照群で、それぞれ 18、17、17、17、16 及び 18 匹であった。

一般状態については、PH 後に全ての群で黄色尿及び外陰汚染が散見されたが、PH 後 4 週目までに回復が認められた。また、被験物質 150mg/kg 投与群で投与後に流涎が散見された。

4-2. 体重

各群における体重推移の結果を TABLE 2 及び FIGURE 2 に示した。

各群の体重に差は認められなかった。各被験物質投与群の最終体重は、媒体対照群と比較して 5、15、50 及び 150 mg/kg 投与群でそれぞれ 102、98、101、95%であった。また陽性対照群は、105%であった。

4-3 摂餌量

各群における摂餌量の結果を TABLE 3 及び FIGURE 3 に示した。

150 mg/kg 投与群において、被験物質投与開始後 3 週目より、媒体対照群と比較して有意な摂餌量の高値が認められた。被験物質投与最終週の各投与群の摂餌量は、媒体対照群と比較して 5、15、50 及び 150 mg/kg 投与群それぞれ 105、99、106、117%であった。また陽性対照群は、投与 1 週目より、有意な摂餌量の高値が認められ、最終週では媒体対照群と比較して 135%であった。

4-4. 病理学的検査

4-4-1. 剖検

各群における剖検の結果を TABLE 4 に示した。

全内臓諸器官の剖検結果については、所見は見られなかった。

4-4-2. 臓器重量

各群における肝臓の実重量及び相対重量の結果を TABLE 5 に示した。

肝臓の実重量は、媒体対照群と比較して 50 及び 150 mg/kg 投与群で有意な高値を示した。また相対重量は、全投与群で有意な増加を示した。

また陽性対照群は、実重量及び相対重量ともに媒体対照群と比較して高値を示した。

4-4-3. 病理組織学的検査

(1) 肝臓の免疫組織化学的検査

各群における肝臓の GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数（個/cm²）及び面積（mm²/cm²）を TABLE 6 に示した。

被験物質投与群における肝臓の GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、媒体対照群と比較して低値傾向を示し、150 mg/kg 投与群で、ともに統計学的に有意な低値が認められた。陽性対照群における GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、媒体対照群と比較してともに有意な高値を示した。

(2) 病理組織学的検査

各群における肝臓の病理組織学的検査の結果を TABLE 7 に示した。

被験物質投与群では、投与の影響と思われる病理組織学的変化は認められなかった。陽性対照群では小葉中心性の肝細胞肥大が媒体対照群と比較して統計学的に有意に増加した。

5. 考察及びまとめ

2 段階発がんモデルによるラット肝中期発がん性試験（伊東法）を用いて、1,3-ジブromopropanの肝発がんプロモーション作用の有無を検索し、その発がん性を予測した。

本試験は、被験物質投与群 4 群、陰性（媒体）対照群及び陽性対照群の計 6 群の構成で、各群とも 20 匹の F344 雄ラットを用いた。起始物質として DEN 200 mg/kg を単回腹腔内投与した。DEN 処置後、第 3 週目より 6 週間、オリブ油に溶解した被験物質を 0（媒体対照群）、5、15、50、150 mg/kg の用量で、また陽性対照群として生理食塩水に溶解したフェノバルビタールナトリウムを 25 mg/kg の用量で毎日 1 回、強制経口投与した。なお、第 3 週目の終わりに PH を行った。投与終了日の翌日に生存動物を安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である GST-P 陽性細胞巢の発生を検査した。

試験の結果、PH の不成立等により最終的な有効動物は、0、5、15、50、150 mg/kg 投与群及び陽性対照群で、それぞれ 18、17、17、17、16 及び 18 匹であった。

被験物質による影響として、150 mg/kg 投与群で投与後に流涎が散見され、摂餌量の高値が認められた。被験物質投与による死亡動物は認められなかった。肝臓重量は増加傾向を示し、実重量は 50 及び 150 mg/kg 投与群で、また相対重量は全ての投与群で増加が認められた。肝臓の GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、媒体対照群と比較して被験物質投与群は低値傾向を示し、150 mg/kg 投与群で有意な低値が認められた。投与による肝臓の組織学的変化は認められなかった。陽性対照群における GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積は、ともに媒体対照群と比較して高値を示した。

本試験は、被験物質の最高投与量を肝重量の増加を示す用量まで実施した。また、媒体対照群を含む被験物質投与群の最終的な有効動物は各群 15 匹以上であり、媒体対照群及び陽性対照群の GST-P 陽性巢の単位面積あたりの個数及び面積はバックグラウンドデータの範囲内で試験は適切に実施されていた。

本被験物質に関しては、代謝活性化のネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験において陽性（文献 7、8）、また代謝活性化条件の有無にかかわらず CHL 細胞を用いた染色体異常試験において陽性（文献 9、10）の報告があり、in vitro 遺伝毒性を有することが示唆される。in vivo 遺伝毒性試験に関する報告はなかった。本被験物と構造の類似な 1,3-ジクロロプロパンに関しては、PCB 誘導のラット S9 を 10% 添加条件でネズミチフス菌を用いた遺伝子突然変異試験（文献 11）において陰性の報告があるが、NTP による PCB 誘導のラット及びチャイニーズハムスター S9 を 30% 添加したネズミチフス菌を用いた遺伝子突然変異試験（文献 12）では陽性の結果を報告している。また、ヒトリンパ球を用いた DNA 損傷試験（Comet assay）及び小核試験で陽性（文献 13）、マウスの腹腔内投与による骨髓小核試験で陰性（文献 14）の報告がある。

6. 結論

2 段階発がんモデルによる肝中期発がん性試験（伊東法）の結果、1,3-ジブロモプロパンは、ラット肝臓における発がんプロモーション作用を示さず、その発がん性は陰性と結論した。

7. 参考文献

- 1) Susan B. (Eds).1996. The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals 12th ed. Merck & CO., Inc.
- 2) 独立行政法人 産業技術総合研究所. 有機化合物スペクトルデータベース (SDBS) .
1,3-Dibromopropane、 N-Nitrosodiethylamine.
[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi. accessed 2013/6/25]
- 3) 株式会社 島津テクノリサーチ. Phenobarbital Sodium Salt 赤外吸収スペクトルデータ.
測定日 2013/9/12.
- 4) 厚生省. 2002. 1,3-ジブロモプロパンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験. 生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修. 化学物質点検推進連絡協議会編. 10. 162-173.
- 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) 吉村 功編. 毒性・薬効データの統計解析-事例研究によるアプローチ-. 東京：サイエンティスト社. 1987. pp22-64.
- 7) 労働省. 1996. 労働安全衛生法に基づく既存化学物質変異原性試験データ集. 労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, 日本化学物質安全・情報センター編集. pp315-316.
- 8) 厚生省. 2003. 1,3-ジブロモプロパンの細菌を用いる復帰突然変異試験. 生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, 化学物質点検推進連絡協議会編. 10. 174-178.
- 9) 労働省. 1996. 労働安全衛生法に基づく既存化学物質変異原性試験データ集. 労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, 日本化学物質安全・情報センター編集. pp553-554.
- 10) 厚生省. 2003. 1,3-ジブロモプロパンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験. 生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, 化学物質点検推進連絡協議会編. 10. 179-182.
- 11) Tornero-Velez R., Ross M.K., Graville C., Laskey J., Jones J.P., DeMarini D.M. and Evans M.V. (2004) Metabolism and mutagenicity of source water contaminations 1,3-dichloropropane and 2,2-dichloropropane. Drug Metabolism and Disposition. 32: 123-131.

- 12) U.S. National Institute of Environmental Health Sciences (2002) Department of Health and Human Services, Chemical Effects in Biological Systems.
(<http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpViews/?studyNumber=A13549> Accessed 2014/3/26)
- 13) Trfazoli M. and Kirsch-Volders M. (1996) In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropane, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. *Mutation Res.* 371: 185-202.
- 14) Crebelli R., Carere A., Leopardi P., Conti L., Fassion F., Raiteri F., Barone D., Ciliutti P., Cinelli S. and Vericat J.A. (1999) Evaluation of 10 aliphatic halogenated hydrocarbons in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutagenesis.* 14: 207-215.

8. 予見することのできなかっ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に従わなかったこと

法定電気設備点検のため、2013 年 10 月 26 日 13 時から 17 時まで停電となり、飼育施設の空調が停止した。その結果、飼育室の飼育室の換気回数はゼロとなり、湿度は約 1 時間 70% を超え試験計画書で規定する範囲を逸脱した。空調の復帰直後の動物の一般状態に異常は認められず、また、その後の一般状態及び体重に異常は認められなかったことから、本件による試験結果に対する影響はなかったと考えられる。

その他に、予見することのできなかっ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に従わなかったことはなかった。