

検討対象となる直接投与試験の『試験報告書（要約版）』一式

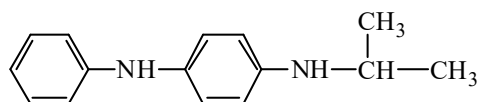
1. 「1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノ-ベンゼンのラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験」要約版

日本バイオアッセイ研究センター

1. 被験物質情報

1.1 被験物質の名称等

名 称 : 1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノ-ベンゼン
(1-Phenylamino-4-isopropylamino-benzene)
別 名 : N-Isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine
C A S N o . : 101-72-4
構 造 式 :



分 子 量 : 226.32
製 造 元 : 東京化成工業(株)
純 度 : 98.9%

1.2 被験物質の物理化学的性状等

性 状 : うすい灰色～赤みの灰色、結晶～粉末
融 点 : 80℃
沸 点 : 180℃
水 溶 解 性 : 不溶

1.3 用途、生産量

用 途 : オゾン劣化防止剤、有機ゴム薬品（老化防止剤）
製造・輸入量 : <20,000t（2013 年度）

1.4 許容濃度、管理濃度

設定されていない（OSHA, NIOSH, ACGIH, 日本産業衛生学会）

2. 選定理由

強い遺伝毒性あり（H26 年度遺伝毒性評価 WG）

微生物を用いる変異原性試験（エームズ試験）：陰性

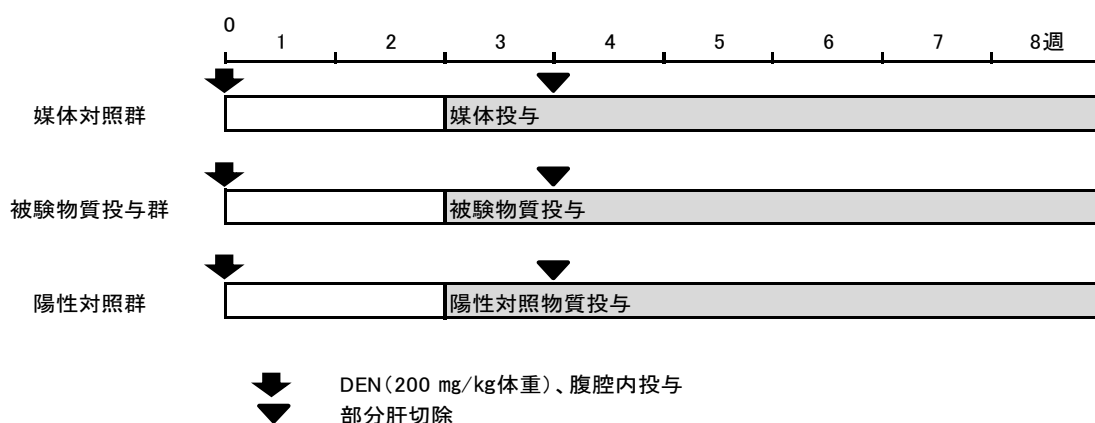
CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験：陽性

3. 肝中期発がん性試験結果要約

1) 目的

1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノ-ベンゼンの肝臓に対する発がんプロモーション作用の検索。

2) 方法



試験は、6週齢の雄ラット (F344/DuCrIjCrIj)、1群当たり22匹を用いて、5群構成 (計110匹) で行った。動物に*N*-ニトロソジエチルアミン (DEN) を200 mg/kg体重の用量で1回腹腔内投与し、2週間後から、1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノ-ベンゼンを0 (媒体対照、オリーブ油)、4、15及び60 mg/kg体重の用量で、6週間、毎日、強制経口投与した。また、陽性対照として、フェノバルビタールナトリウムを25 mg/kg体重の用量で、同期間、強制経口投与する群を設けた。1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノ-ベンゼンの投与開始1週間後には、肝臓の約2/3を切除する手術を行った。6週間の投与終了翌日に、動物はイソフルラン吸入麻酔により安楽死させ、剖検した。

肝臓 (右上葉、右下葉及び尾状葉) は、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した後、GST-P陽性細胞巢の解析を実施した。GST-P陽性細胞巢の解析は、胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P)の免疫組織学的染色 (ヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO(MULTI)抗 GST-P ポリクローナル抗体×1000希釈) を行って実施した。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、直径0.2 mm以上の面積に相当する GST-P陽性細胞巢について個数と面積を計測し、評価した。

3) 結果

要約表

群	有効 動物数	最終体重 g	肝臓重量		GST-P 陽性細胞巢	
			g	%	no./cm ²	mm ² /cm ²
媒体対照	22	263	6.529	2.683	5.385	0.427
4 mg/kg	22	264	6.802 △	2.775 ▲	5.773	0.443
15 mg/kg	21	264	7.963 ▲	3.239 ▲	4.282	0.302 ▽
60 mg/kg	19	252 ▼	11.229 ▲	4.815 ▲	7.660 ▲	0.491
陽性対照	21	275 ▲	8.452 ▲	3.364 ▲	10.752 ▲	0.937 ▲

△▽ p<0.05, ▼▲ p<0.01.

各値は平均値を示す。

動物の生死及び一般状態に投与の影響はみられなかった。60 mg/kg 群には体重増加の抑制が認められた。肝臓重量は 4 mg/kg 群から増加した。小葉中心性の肝細胞肥大と脂肪変性が 60 mg/kg 群に観察された。GST-P 陽性細胞巢は、15 mg/kg 群には数の減少傾向と面積の減少がみられ、60 mg/kg 群では数について明らかな増加が認められた。なお、腎臓には重量の増加が 60 mg/kg 群で、近位尿細管の好塩基性変化が 15 mg/kg 群と 60 mg/kg 群の少数例に観察された。

陽性対照群は、媒体対照群に比較して体重及び肝臓重量の増加が認められた。GST-P 陽性細胞巢は、媒体対照群に比較して単位面積当たりの数、面積ともに増加し、肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であると確認された。

4) 結論

1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノ-ベンゼンは、60 mg/kg/day の用量で肝臓に対する発がんプロモーション作用を示す。

参考 1 1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノ-ベンゼンの有害性情報

急性毒性：ラット LD₅₀=720 mg/kg

反復投与毒性：SD ラット 28 日間強制経口投与試験（10, 30, 100 mg/kg/day）

100 mg/kg: 体重増加抑制、赤血球数減少、網赤血球増加、総ビリルビン濃度増加、総蛋白濃度増加、ビリルビン尿

肝・腎・脾重量増加

肝小葉中間帯の脂肪化、肝細胞壊死、尿細管再生性変化

30 mg/kg: 総蛋白濃度増加、ビリルビン尿、肝重量増加

肝小葉中間帯の脂肪化

NOEL 10 mg/kg/day

発がん性：報告なし

参考 2 用量設定試験（予備試験）の主な結果

① 無処置動物 3 週間反復投与（強制経口投与）

F344 ♂8 週齢、0, 10, 30, 100, 200 mg/kg

200 mg/kg 投与 2 回で死亡がみられ投与中止

100 mg/kg 軟便、体重増加抑制（93%）
網赤血球数増加、総コレステロール・BUN ↑
肝臓・腎臓重量 ↑

30 mg/kg 総コレステロール ↑、肝臓・腎臓重量 ↑

10 mg/kg 総コレステロール ↑、肝臓重量 ↑

② 部分肝切除動物 2 週間反復投与（強制経口投与）

F344 ♂9 週齢、0, 30, 60, 100 mg/kg

100 mg/kg 軟便、体重増加抑制（95%）、肝臓・腎臓・脾臓重量 ↑

60 mg/kg 体重増加抑制（94%）、肝臓・腎臓重量 ↑

30 mg/kg 肝臓重量 ↑

投与用量の設定

4 mg/kg, 15 mg/kg, 60 mg/kg

2. *m*-クロロフェノール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

日本バイオアッセイ研究センター

1 被験物質

1.1 名称等

名称	: <i>m</i> -クロロフェノール(<i>m</i> -Chlorophenol)
製造元	: 東京化成工業 (株)
CAS No.	: 108-43-0
ロット番号	: V6ELG
含量	: 98.9%
分子量	: 128.6

1.2 物理化学的性状等

外観及び性状	: 白色～うすい黄色、結晶～塊
融点	: 33℃
沸点	: 214℃
溶解性	: 水に不溶

1.3 製造・輸入量及び用途

製造・輸入量	: —
用途	: 医薬・農薬の中間体、接着剤溶剤、耐熱性樹脂原料

1.4 有害性情報

急性毒性	: LD ₅₀ (ラット経口) 570 mg/kg
刺激性	: 強い (眼、皮膚、気道)
遺伝毒性	: 復帰突然変異試験 陽性
発がん性	: 情報なし
その他毒性	: 神経毒性の疑い

2 目的

F344/DuCrIj ラットを用いた肝中期発がん性試験 (伊東法) を用いて、*m*-クロロフェノールの肝臓に対するプロモーション作用の有無を検索した。

3 方法

試験は、被験物質投与群 3 群、媒体対照群及び陽性対照群の計 5 群の構成で、各群 22 匹の F344 雄ラット (6 週齢) を用いた。起始物質として *N*-ニトロソジエチルアミン (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、オリーブ油に溶解した被験物質を 0 (媒体対照群)、180、360 及び 720 mg/kg/day の用量で毎日 1 回、強制経口

投与し、また陽性対照群としてフェノバルビタールナトリウムを 25 mg/kg/day 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) 陽性細胞巣（直径 0.2 mm 以上）の数及び面積を計測し、肝臓単位面積当たりの陽性細胞巣の数及び面積を算出して評価した。

4 投与量設定の理由

被験物質の投与量は、用量設定試験の結果を基に決定した。用量設定試験は、急性（3 回投与）試験、3 週間反復投与試験及び部分肝切除した動物を用いる 9 日間反復投与試験を実施した。

急性（3 回投与）試験は、被験物質投与量を 600、1000、2,000 mg/kg/day に設定して雄の F344 ラット 3 匹に 8 週齢から毎日 1 回、3 日間、強制経口投与した。その結果、2,000 mg/kg/day では 1 回目の投与約 10 分後に激しい震戦、横臥がみられ、投与 1 時間後までに 3 匹とも死亡した。1,000 mg/kg/day 及び 600 mg/kg/day では体重増加の抑制はあったが一般状態の異常は認められなかった。

3 週間反復投与試験では、被験物質投与量を 0（媒体対照、オリーブ油）、125、250、500 及び 1,000 mg/kg/day に設定して、雄の F344 ラットに 8 週齢から毎日 1 回、3 週間、強制経口投与して投与終了翌日に剖検した。その結果、1,000 mg/kg/day では投与後に震戦及び流涎がみられ、1 匹は投与 6 回で死亡した。体重増加の抑制は 250 mg/kg/day 以上でみられ、投与 3 週間後の体重は媒体対照を 100% とすると、250 mg/kg/day は 96%、500 mg/kg/day は 94%、1,000 mg/kg/day は 80% であった。また、500 mg/kg/day 以上で血中の総コレステロールとリン脂質の増加、肝臓及び腎臓の相対重量の増加が認められた。

本試験の高用量を最終決定する目的で、部分肝切除した動物を用いる 9 日間反復投与試験を実施した。投与量は 0（媒体対照、オリーブ油）、300、500 及び 700 mg/kg/day とし、9 週齢で部分肝切除した雄の F344 ラットに、部分肝切除翌日から毎日 1 回、9 日間、強制経口投与した。その結果、被験物質投与による死亡や一般状態の異常はなく、体重増加の抑制もみられなかった。500 mg/kg 以上で肝臓及び腎臓の相対重量増加が認められた。

以上の結果から、本試験に用いる高用量は、動物に最小限の毒性兆候がみられるが、動物が 6 週間の投与に耐え得る用量として、500 mg/kg/day から 1,000 mg/kg/day の間が適切であると判断した。したがって、本試験では、高用量を 720 mg/kg に設定し、公比 2 で除して中用量を 360 mg/kg、低用量を 180 mg/kg とした。

5 結果

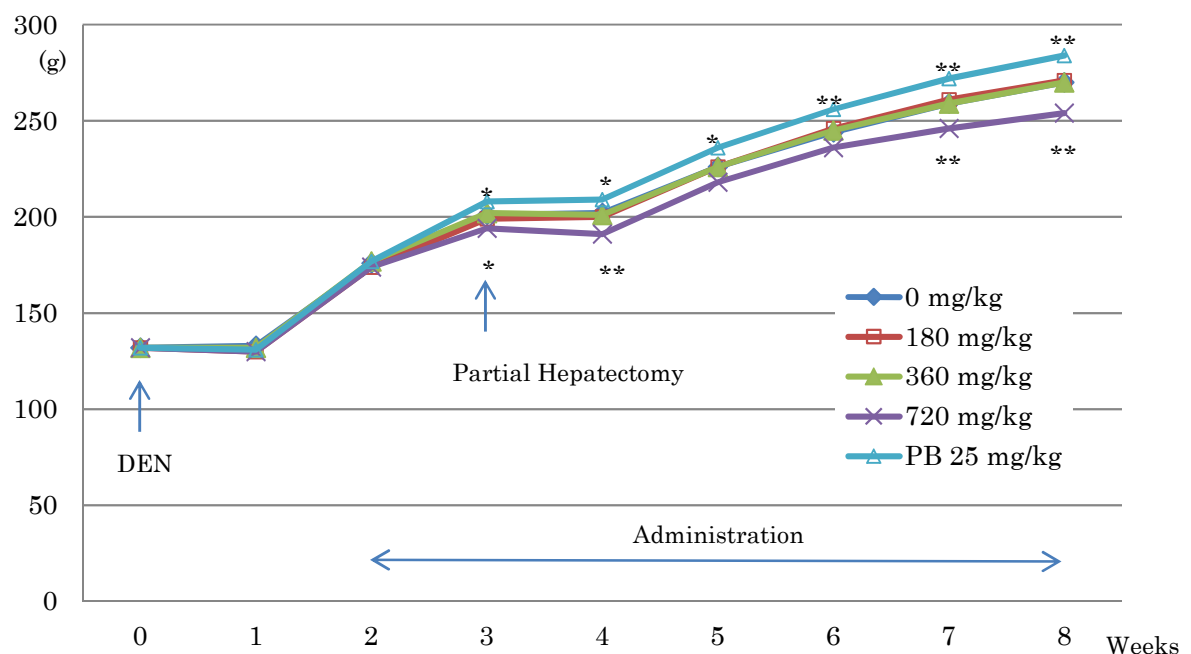
m-クロロフェノールの経口投与に起因する一般状態所見として、720 mg/kg 群で投与後の震戦と異常呼吸音が観察され、また、投与による死亡が 3 匹に認められた。720 mg/kg 群では体重増加の抑制もみられた。肝臓重量については、360 mg/kg 以上の群で相対重量の増加

がみられたが、絶対重量に对照群との差は認められなかった。また、腎臓重量については、360 mg/kg 以上の群で相対重量の増加がみられ、360 mg/kg 群では絶対重量の増加も認められた。病理組織学的検査で *m*-クロロフェノールの投与による毒性病変は観察されなかった。肝臓の GST-P 陽性細胞巣を解析した結果、単位面積当たりの数及び面積に投与の影響は認められなかった。

陽性对照群は、媒体对照群に比較して体重、摂餌量及び肝臓重量（絶対重量・相対重量）に増加が認められた。肝臓の GST-P 陽性細胞巣については単位面積当たりの数、面積ともに明らかな増加を示したことから、肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であると確認された。

6 結論

m-クロロフェノールは、本試験条件下では肝臓に対する発がんプロモーション作用を示さないと結論した。



*, **: Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

図1 *m*-クロロフェノールの肝中期発がん性試験における体重推移

表 1 *m*-クロロフェノールの肝中期発がん性試験における肝臓重量結果

投与量 (mg/kg/day)	検索 匹数	剖検時体重 ^a (g)	肝臓絶対重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
0	22	251 ± 16	6.571 ± 0.808	2.630 ± 0.393
180	21	253 ± 9	6.694 ± 0.620	2.640 ± 0.208
360	21	251 ± 13	7.191 ± 1.201	2.874 ± 0.505**
720	18	234 ± 9**	6.774 ± 0.521	2.896 ± 0.172**
PB 25	21	264 ± 11**	8.367 ± 0.473**	3.168 ± 0.115**

a : The value presented were obtained after the animals were fasted overnight.

** : Significantly different from control group at P<0.01.

表 2 *m*-クロロフェノールの肝中期発がん性試験における免疫組織化学的検査結果

投与量 (mg/kg/day)	検索 匹数	GST-P 陽性細胞巢	
		陽性細胞巢数 (No./cm ²)	陽性細胞巢面積 (mm ² /cm ²)
0	22	5.196 ± 2.005	0.441 ± 0.209
180	21	6.053 ± 2.083	0.523 ± 0.248
360	21	5.417 ± 2.326	0.450 ± 0.240
720	18	5.357 ± 2.050	0.441 ± 0.184
PB 25	21	10.373 ± 2.247**	0.980 ± 0.360**

** : Significantly different from control group at P<0.01.

3. 5-クロロ-2-ニトロアニリ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
日本バイオアッセイ研究センター

7 被験物質

7.1 名称等

名称	: 5-クロロ-2-ニトロアニリン (別名 2-アミノ-4-クロロ-1-ニトロベンゼン、5-クロロ-2-ニトロベンゼンアミン、2-ニトロ-5-クロロアニリン)
製造元	: 東京化成工業 (株)
CAS No.	: 1635-61-6
ロット番号	: PTW3K
含量	: 99.9 %
分子量	: 172.57

7.2 物理化学的性状等

外観及び性状	: 黄色～赤みの黄色、結晶～粉末
融点	: 128°C
溶解性	: 水に殆ど溶けない

7.3 製造・輸入量及び用途

製造・輸入量	: 1,000 t (平成 28 年度)
用途	: 動物医薬・駆虫剤・医薬・染料中間体

7.4 有害性情報

急性毒性	: LD50 : 5,000 mg/kg (ラット経口)
刺激性	: 情報なし
遺伝毒性	: エームス試験 : 陽性、染色体異常試験 : 陽性
発がん性	: 情報なし
特定標的臓器毒性	: なし

8 目的

F344/DuCrIjCrIj ラットを用いた肝中期発がん性試験 (伊東法) を用いて、5-クロロ-2-ニトロアニリンの肝臓に対するプロモーション作用の有無を検索した。

9 方法

試験は、被験物質投与群 3 群、媒体対照群及び陽性対照群の計 5 群の構成で、各群 22 匹の F344 ラット (雄 6 週齢) を用いて行った。起始物質として *N*-ニトロソジエチルアミン (DEN) 200 mg/kg を腹腔内へ投与した後、第 3 週目より 6 週間、オリーブ油に混和させた被験物質を 0 (媒体対照群)、50、100 及び 200 mg/kg/day の用量で、また、陽性対照群に

はフェノバルビタールナトリウムを 25 mg/kg/day の用量で、毎日 1 回、強制経口投与した。DEN 処置後、第 3 週目の終わりには肝臓の 2/3 を切除する手術を行った。動物は投与終了日の翌日に安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巣（直径 0.2 mm 以上）の数及び面積を計測し、肝臓単位面積当たりの陽性細胞巣の数及び面積を算出することでプロモーション作用の有無を評価した。

10 投与量設定の理由

被験物質の投与量は、以下に示す用量設定試験の結果を基に決定した。用量設定試験は、3 週間反復投与試験及び部分肝切除した動物を用いる 2 週間反復投与試験を実施した。

3 週間反復投与試験では、被験物質投与量を 0（媒体対照、オリブ油）、30、100、300 及び 1000 mg/kg に設定して、雄の F344 ラットに 8 週齢から毎日、3 週間、強制経口投与して投与終了翌日に剖検した。その結果、1000 mg/kg は投与後に顕著な麻酔様症状（流涙、自発運動減少、失調歩行、横臥）が観察され、体重の著しい減少もみられたことから、投与を 5 回で中止した。300 mg/kg では投与期間初期の投与後に軽微な麻酔作用（流涙、失調歩行）や体重の僅かな減少がみられたが、徐々に回復し、最終体重は対照動物に比較して 95%であった。剖検で肉眼病変は観察されなかったが、30 mg/kg 以上で肝臓の相対重量の増加がみられ、100 mg/kg と 300 mg/kg では腎臓の相対重量の増加も認められた。また、30 mg/kg 以上では血中の総コレステロール及びリン脂質の増加が認められた。

これらの結果を基に、本試験の高用量を最終決定する目的で、部分肝切除した動物を用いる 2 週間反復投与試験を実施した。被験物質投与量は 0（媒体対照、オリブ油）、100、200 及び 300 mg/kg とし、9 週齢で部分肝切除した雄の F344 ラットに、部分肝切除翌日から毎日、12 日間、被験物質を強制経口投与した。その結果、300 mg/kg は投与期間初期の投与後に 3 週間反復投与試験の 300 mg/kg でみられた症状と比較して強い麻酔様症状（失調歩行、転倒、横臥）を呈する動物がみられ、部分肝切除が被験物質の動物への感受性を上昇させると考えられた。100 mg/kg と 200 mg/kg では麻酔様症状は観察されなかった。最終体重は対照動物に比較して 300 mg/kg は 90%、200 mg/kg は 96%、100 mg/kg は 98%であった。また、肝臓の相対重量は、いずれの投与群も増加し、溶媒対照に対して 300mg/kg で 138%、200mg/kg で 140%、100mg/kg で 129%であった。

以上の結果から、本試験に用いる高用量は、動物にわずかな毒性兆候がみられるが、動物が 6 週間の投与に耐え得る用量として、200 mg/kg が適切であると判断した。したがって、本試験では、高用量を 200 mg/kg に設定し、公比 2 で除して中用量を 100 mg/kg、低用量を 50 mg/kg とした。

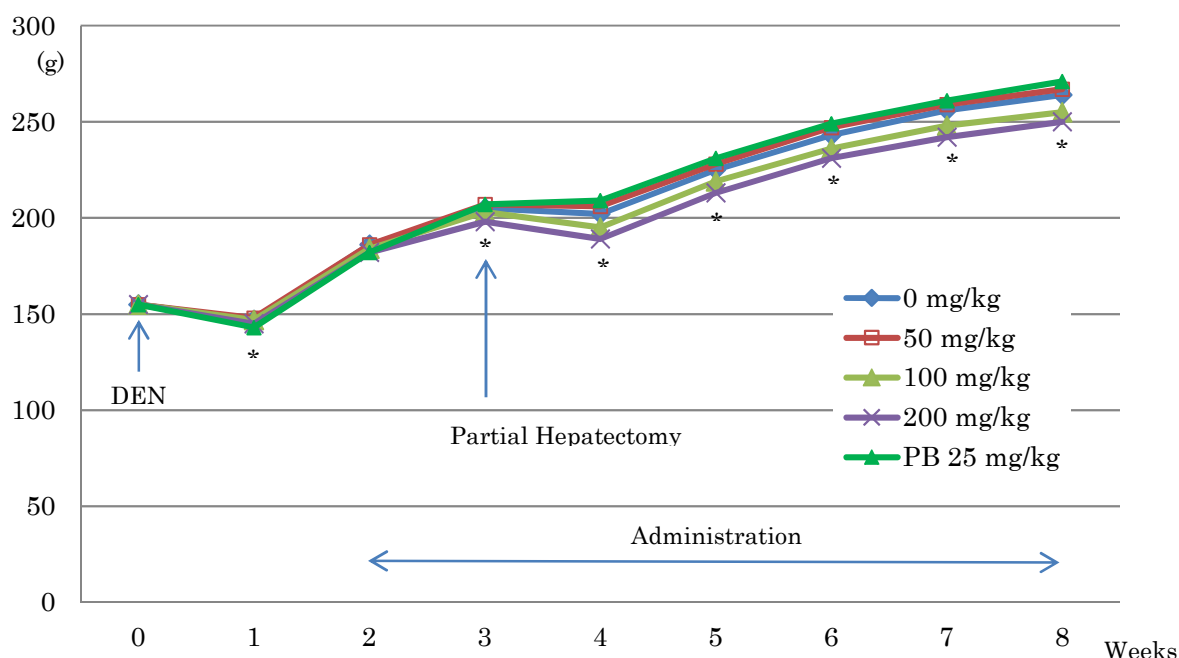
11 結果

投与に起因する一般状態所見は観察されなかった。100 mg/kg 以上の群では体重増加の抑制が認められ、200 mg/kg 群では一時的な摂餌量の減少も認められた。また、50 mg/kg 以上の全ての投与群には、肝臓と腎臓の実重量及び重量体重比の投与用量に対応した増加が認められた。ヘマトキシリン・エオジン染色標本による病理組織検査では、肝臓、腎臓ともに被験物質投与による毒性病変は認められなかった。肝臓の GST-P 陽性細胞巢を解析した結果、50 mg/kg 以上のすべての投与群で投与用量に対応して、単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巢（直径 0.2mm 以上）の数及び面積が有意な減少を示した。この減少は、肝臓重量の増加による相対的なものと考えられたが、減少が著しい理由は明らかでなかった。

陽性対照群は、肝臓の GST-P 陽性細胞巢について、単位面積当たりの数、面積ともに明らかな増加を示すことから、肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であると確認された。

12 結論

5-クロロ-2-ニトロアニリンは、本試験条件下では肝臓に対する発がんプロモーション作用を示さないと結論した。



* : Significantly different from control group at $p < 0.05$.

図1 5-クロロ-2-ニトロアニリンの肝中期発がん性試験における体重推移

表1 5-クロロ-2-ニトロアニリンの肝中期発がん性試験における肝臓重量結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	剖検時体重 ^a (g)	肝臓絶対重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
0	19	247 ± 15	6.045 ± 0.659	2.448 ± 0.250
50	21	248 ± 14	6.984 ± 0.551*	2.815 ± 0.141*
100	19	235 ± 13*	7.261 ± 0.720*	3.086 ± 0.253*
200	19	228 ± 14**	8.119 ± 0.820*	3.564 ± 0.255*
PB 25	21	249 ± 16	7.766 ± 0.530*	3.120 ± 0.134*

^a : The value presented were obtained after the animals were fasted overnight.

* : Significantly different from control group at p<0.05.

** : Significantly different from control group at p<0.01.

表2 5-クロロ-2-ニトロアニリンの肝中期発がん性試験における免疫組織化学的検査結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	GST-P 陽性細胞巢	
		陽性細胞巢数 (No./cm ²)	陽性細胞巢面積 (mm ² /cm ²)
0	19	4.044 ± 1.752	0.342 ± 0.168
50	21	2.600 ± 1.071*	0.199 ± 0.113**
100	19	1.791 ± 0.851**	0.135 ± 0.082**
200	19	0.854 ± 0.468**	0.039 ± 0.027**
PB 25	21	7.454 ± 2.125**	0.727 ± 0.289**

* : Significantly different from control group at p<0.05.

** : Significantly different from control group at p<0.01.

4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの rasH2 マウスを用いた 強制経口投与による中期がん原性試験結果概要

日本バイオアッセイ研究センター

1 被験物質

1-1 名称等

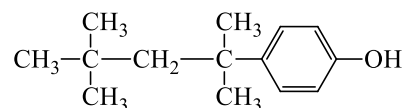
名 称：4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノール

別 名：4-*tert*-Octylphenol

CAS 番号：140-66-9

1-2 構造式及び分子量（文献1）

構 造 式：



分 子 量：206.33

1-3 物理化学的性状等（文献1, 2）

性 状：白色～ほとんど白色、結晶～粉末

融 点：83℃

沸 点：279℃

溶 解 性：水にほとんど溶けない、エタノール及びアセトンに溶けやすい

保管条件：室温、暗所に保管

1-4 製造量等（文献3）

製造、輸入量：23,364 t（平成29年度）

1-5 用途（文献1）

樹脂、非イオン界面活性剤及びゴム添加剤の製造の中間体

1-6 許容濃度等

管理濃度：未設定

日本産業衛生学会：未設定

米国産業衛生専門家会議（ACGIH）：未設定

国際がん研究機関（IARC）：情報なし

ドイツ研究振興協会（DFG）：MAK value 0.5ml/m³(ppm) (4.3mg/m³)（文献4）

1-7 遺伝毒性

微生物を用いる変異原性試験（Ames試験）：陰性（文献1, 5）

CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験：陽性（文献6）

2 目的

4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) に 26 週間強制経口投与し、そのがん原性を検索した。

3 方法

媒体対照群、被験物質投与群 3 群及び陽性対照群 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea, MNU) の計 5 群の構成で、媒体対照群と被験物質投与群は雌雄とも各 25 匹/群、陽性対照群は 15 匹/群とした。投与は毎日 1 回の強制経口投与 (26 週間)、陽性対照物質は単回腹腔内投与とした。投与用量は、雌雄とも、0 (オリブ油)、50、100 及び 200 mg/kg BW とし、陽性対照物質は、雌雄とも 75 mg/kg BW 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、解剖時の肉眼的観察、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

4 26 週間試験の用量設定理由

本試験の投与用量は、4 週間 (28 日間) 用量設定試験の結果を基に設定した。雌雄の rasH2 マウス (non-Tg) を用いて、1 群当たり各 10 匹の動物に 0 (オリブ油)、30、100、200 及び 300 mg/kg BW の用量で、毎日、4 週間強制経口投与した。

その結果、雌雄とも全群で動物の死亡及び一般状態に毒性症状はみられなかった。体重は雌雄とも投与群でやや高値傾向で推移した。

被験物質の毒性標的器官は主に腎臓 (重量増加、近位尿細管の再生、顆粒状円柱、尿素窒素の高値等)、肝臓 (重量増加、小葉中心性の肝細胞肥大及び単細胞壊死、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質及び γ -GTP の高値等) 及び造血系 (網赤血球比の高値、脾臓重量高値等) であると考えられた。この中で腎臓の雌雄 300 mg/kg に認められた近位尿細管の再生像は広範囲に認められ、尿細管への傷害も広範囲に起きたと判断できることから、300 mg/kg は 26 週間の投与には耐えられないと考えられる。一方、近位尿細管の再生像は 200 mg/kg でも全例にみられるものの、その程度は減弱していることから、200 mg/kg は 26 週間の投与に耐えうる用量であると判断した。したがって、本試験では、高用量を 200 mg/kg BW に設定し、公比 2 で除して中用量を 100 mg/kg BW、低用量を 50 mg/kg BW とした。

陽性対照物質の投与用量は、国際共同検証試験 (ILSI/HESI) (文献 7) の方法を参考に、雌雄ともに 75 mg/kg BW とした。

5 結果

動物の生存率は、雌雄とも媒体対照群と比較して差を認めなかった (生存率: 図 1)。一般状態では、雌雄とも被験物質投与の影響と考えられる異常所見は認められず、体重及び摂餌量も投与期間を通して媒体対照群との間に顕著な差は認めなかった (体重推移: 図 2)。

病理組織学的検査の結果

—雄—

① 腫瘍性病変（表 1）

本試験は rasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験の初回報告であり、当センターで行った対照群の蓄積データがないため、rasH2 マウスの背景データを取得する目的で、本試験に先立って実施した無処置動物 50 匹のデータをがん原性評価の参考とした。また、文献（文献 8, 9, 10）のヒストリカルコントロールデータ（雌雄 rasH2 マウス）もがん原性評価の参考とした。

<胃（前胃）>

雄では胃（前胃）の扁平上皮乳頭腫の発生が、媒体対照群、50 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群で 0 匹（0 %）に対し、200 mg/kg 群で 2 匹（8 %）みられ、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。扁平上皮癌の発生（200 mg/kg 群 1 匹、4 %）は有意な増加は示さなかったが、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生（200 mg/kg 群 3 匹、12 %）は、Peto 検定（有病率法、死亡率法+有病率法）と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。

雄の胃の扁平上皮乳頭腫は、発生が極めて稀な腫瘍であり、当センターの雄 rasH2 マウス（無処置動物）50 匹の発生率は 2 %（1/50 匹）であった。また、文献のヒストリカルコントロールデータでは、Paranjpe ら（文献 8）は平均 0.28 %、Nambiar ら（文献 9）は平均 0.6 %、Takaoka ら（文献 10）は平均 0.6 %と報告されている。これらの報告の試験単位での最大発生率は 6.7 %であり、本試験の 200 mg/kg 群の扁平上皮乳頭腫の発生（2/25 匹、8 %）は、試験単位での最大発生率を超えていることから、被験物質投与による影響と考えた。

扁平上皮癌も発生が極めて稀な腫瘍であり、当センターの背景データの発生率は 2 %（1/50 匹）であった。文献データでは、Paranjpe らは平均 0.56 %、Nambiar らは平均 0.3 %、Takaoka らは平均 0.6 %と報告されている。これらの報告の試験単位での最大発生率は 6.7 %であり、本試験の 200 mg/kg 群の扁平上皮癌の発生（1/25 匹、4 %）は、この範囲内であるものの試験単位での上限に近い発生率であった。これらのことを考慮し、扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生（3/25 匹、12 %）も被験物質投与による影響と考えた。

従って、雄に認められた胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生増加は、rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠と考えられた。

② 非腫瘍性病変

<腎臓>

慢性腎炎の発生増加が 200 mg/kg 群で認められ、病変の程度は軽度から中等度であった。なお、100 mg/kg 群でも 1 匹に発生がみられた。慢性腎炎は、ネフロン単位で変性・壊死が認められ、尿細管の再生や線維化が認められた。

<肝臓>

小葉中心性の肝細胞肥大の発生増加が 200 mg/kg 群で認められ、病変の程度はいずれも軽度であった。なお、100 mg/kg 群でも 1 匹に発生がみられた。

—雌—

① 腫瘍性病変（表 2）

被験物質投与による腫瘍の発生増加は認められなかった。

② 非腫瘍性病変

<腎臓>

慢性腎炎の発生増加と程度の増強が 100 mg/kg 群と 200 mg/kg 群で認められ、病変の程度は 100 mg/kg 群が軽度から中等度、200 mg/kg 群が中等度から重度であった。慢性腎炎は、ネフロン単位で変性・壊死が認められ、尿細管の再生や線維化が認められた。

6 まとめ

rasH2 マウスを用いて、4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの 26 週間にわたる強制経口投与によるがん原性試験を行った結果、

- 1) 雄 rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠が得られた (some evidence of carcinogenic activity) と結論された。
- 2) 雌 rasH2 マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論された。

7 陽性対照物質 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea: MNU) の評価（表 3, 4）

陽性対照物質として、MNU を単回腹腔内投与（雌雄 15 匹、75 mg/kg BW）し、26 週間飼育した。

腫瘍性病変の発生は、雄では皮膚の扁平上皮乳頭腫、肺の細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生、胸腺の悪性リンパ腫、胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮癌の発生が、それぞれ Fisher 検定で有意な増加を示した。7 匹の途中死亡動物の死因は全て悪性リンパ腫であり、担腫瘍動物数は、媒体対照群 2 匹（8 %）に対し、陽性対照群 15 匹（100 %）であった。

雌では、胃の扁平上皮乳頭腫、及び扁平上皮乳頭腫と扁平上皮癌を合わせた発生、胸腺、脾臓及び全臓器の悪性リンパ腫の発生が Fisher 検定で有意な増加を示した。11 匹の途中死亡動物の死因は 10 匹が悪性リンパ腫、1 匹が胃の腫瘍であり、担腫瘍動物数は、媒体対照群 5 匹（20 %）に対し、陽性対照群 15 匹（100 %）であった。

以上の結果より、雌雄とも陽性対照物質（MNU）投与による明らかな腫瘍の発生増加が認められ、本試験系の有効性が確認された。

表1 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雄)

投与用量 (mg/kg)		0	50	100	200	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺 胃 (前胃)	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	4	1	1		
	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	2	↑	↑
	扁平上皮癌 [#]	0	0	0	1		
	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	3	↑↑	↑↑
	+扁平上皮癌 [#]						
鼻腔 脾臓	血管腫	0	1	0	0		
	血管腫	1	0	0	0		
	血管肉腫 [#]	0	1	0	2		
	血管腫+血管肉腫 [#]	1	1	0	2		
小腸	血管肉腫 [#]	0	0	0	1		
	膀胱	0	1	0	0		
胸膜	血管腫	0	0	0	1		
	血管肉腫 [#]	0	1	0	0		
	血管腫+血管肉腫 [#]	0	1	0	1		
全臓器	血管腫	1	2	0	1		
	血管肉腫 [#]	0	2	0	3		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

*： $p \leq 0.05$ 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)

表2 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雌)

投 与 用 量 (mg/kg)		0	50	100	200	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	3	2	0		
	細気管支-肺胞上皮癌 [#]	0	0	1	0		
	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	3	3	0		
	+細気管支-肺胞上皮癌 [#]						
胃 (前胃)	扁平上皮癌 [#]	0	0	0	1		
鼻腔	血管腫	0	0	1	0		
脾臓	血管肉腫 [#]	0	0	1	0		
唾液腺	血管腫	1	0	0	0		
子宮	血管腫	0	0	1	0		
筋肉	血管腫	0	0	0	1		
腹膜	血管肉腫 [#]	0	1	0	0		
全臓器	血管腫	1	0	2	1		
	血管肉腫 [#]	0	1	1	0		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

[#]：悪性腫瘍

*： $p \leq 0.05$ 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)

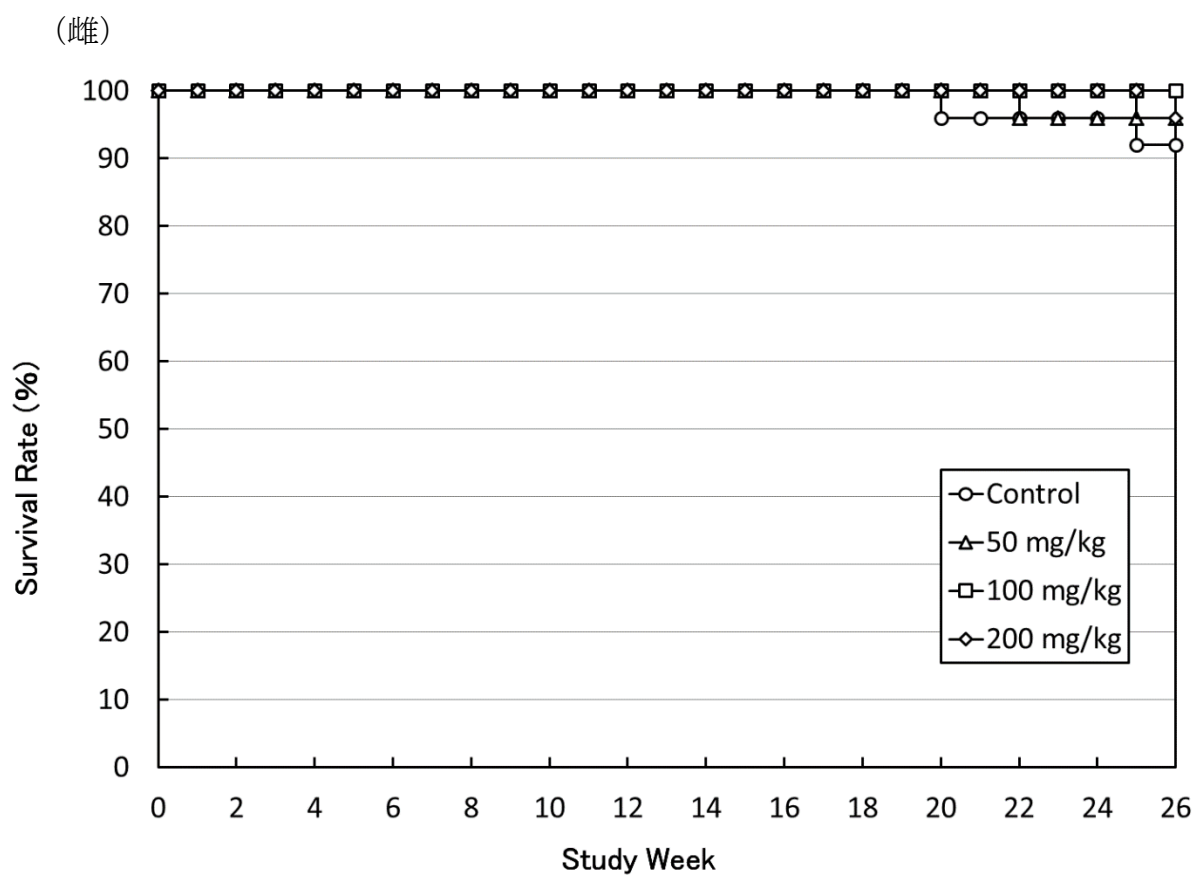
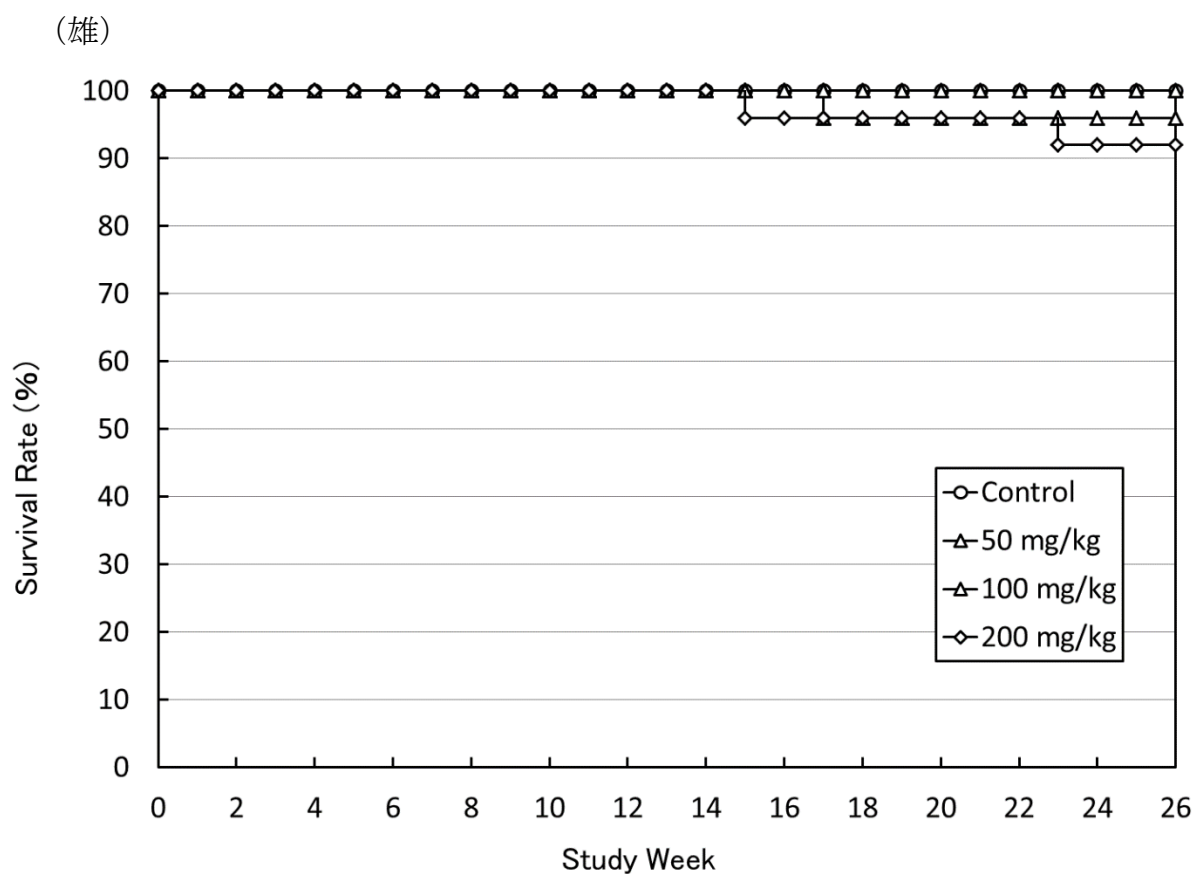


図1 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における生存率 (rasH2 マウス)

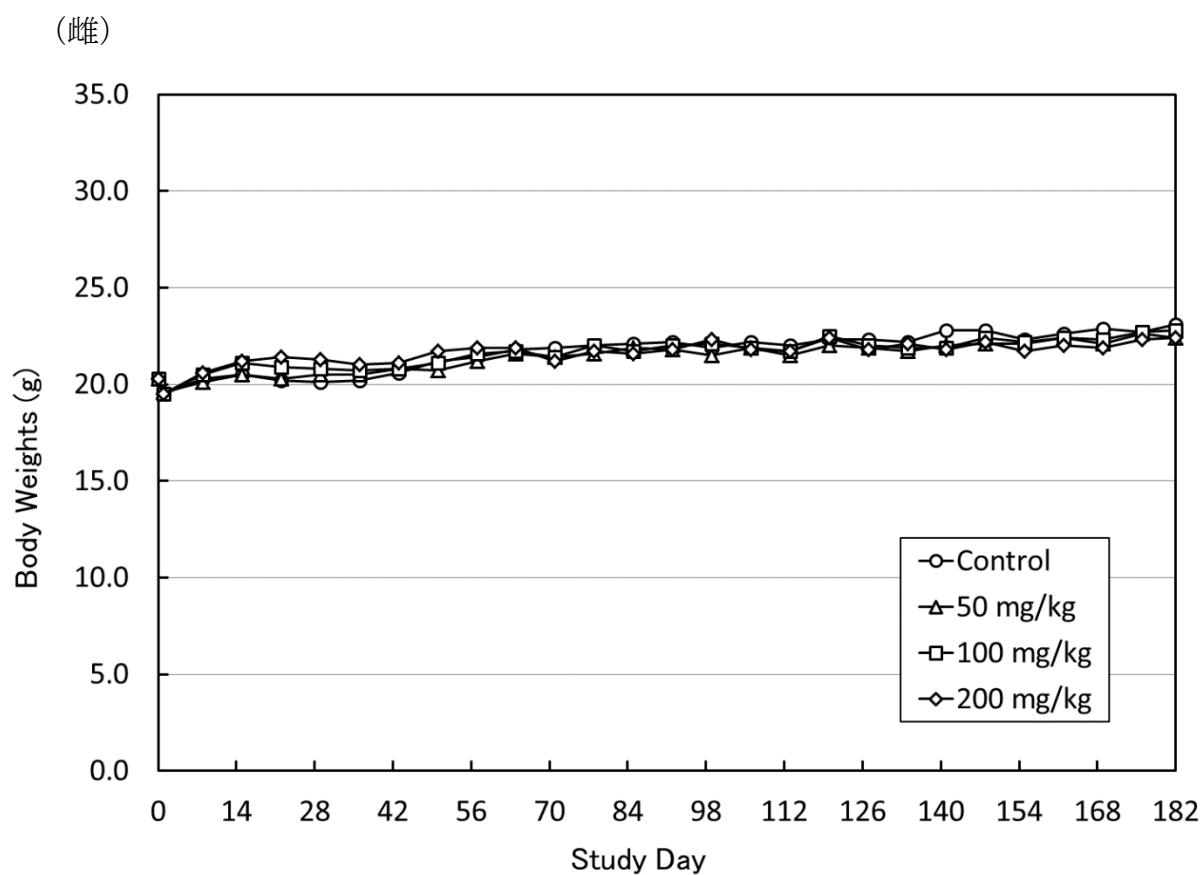
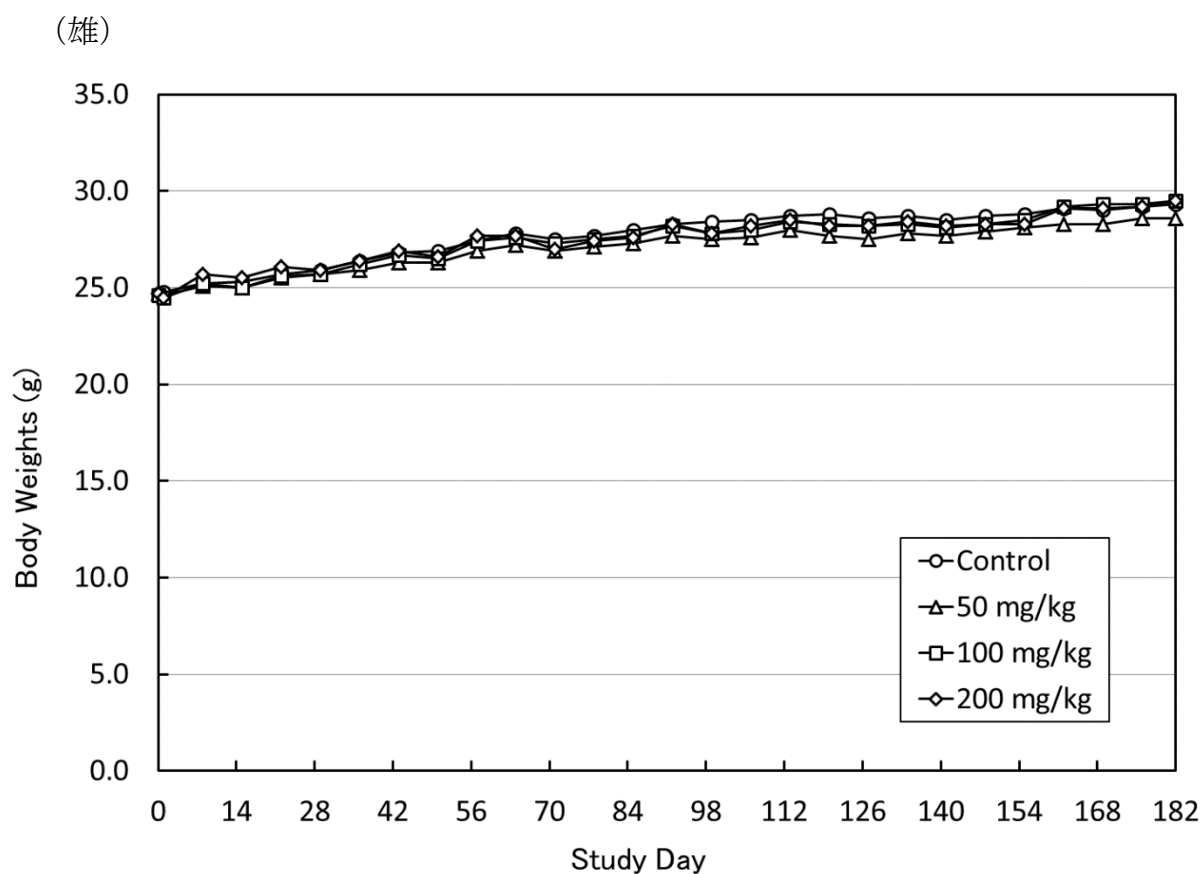


図2 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における体重推移 (rasH2 マウス)

表 3 陽性対照 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea) の中期がん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雄)

投 与 用 量 (mg/kg)		媒体対照 0	陽性対照 75
検査動物数		25	15
皮膚 肺	扁平上皮乳頭腫	0	3 *
	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	4
	細気管支-肺胞上皮癌 [#]	0	1
	細気管支-肺胞上皮腺腫 +細気管支-肺胞上皮癌 [#]	1	5 *
胃 (前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	15 **
	扁平上皮癌 [#]	0	4 *
	扁平上皮乳頭腫	0	15 **
	+扁平上皮癌 [#]		
胸腺	悪性リンパ腫 [#]	0	8 **

表 4 陽性対照 (*N*-Nitroso-*N*-methylurea) の中期がん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雌)

投 与 用 量 (mg/kg)		媒体対照 0	陽性対照 75
検査動物数		25	15
胃 (前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	13 **
	扁平上皮癌 [#]	0	2
	扁平上皮乳頭腫	0	13 **
	+扁平上皮癌 [#]		
リンパ節	悪性リンパ腫 [#]	0	2
胸腺	悪性リンパ腫 [#]	0	6 **
脾臓	悪性リンパ腫 [#]	0	3 *
全臓器	悪性リンパ腫 [#]	0	11 **

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

[#]：悪性腫瘍

*： $p \leq 0.05$ で有意 **： $p \leq 0.01$ で有意 (Fisher 検定)

文献

1. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 1995. OECD SIDS. PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-. SIDS Initial Assessment Report for SIAM3.
2. 東京化成工業(株). 2017. 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol 安全データシート.
3. 経済産業省. 2019. 優先評価化学物質の製造・輸入数量 (29 年度実績)
4. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 2018. 4-tert-Octylphenol: MAK Value Documentation. The MAK Collection for Occupational Health and Safety 2018, Vol 3, No 3 pp1137-1150.
5. 日本化学物質安全・情報センター編. 2000. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 東京: 日本化学物質安全・情報センター, 補遺 2 版. 95-98.
6. 日本化学物質安全・情報センター編. 2008. 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 東京: 日本化学物質安全・情報センター, 補遺 4 版. 190-191.
7. Robinson DE, MacDonald JS. 2001. Background and framework for ILSI' s collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. Toxicol Pathol 29 (Suppl.): 13-19.
8. Paranjpe MG, Elbekaei RH, Shah SA, Hickman M, Wenk ML, Zahalka EA. 2013. Historical control data of spontaneous tumors in transgenic CByB6F1-Tg (HRAS)2Jic (Tg. rasH2) mice. Int J Toxicol 32: 48-57.
9. Nambiar PR, Turnquist SE, Morton D. 2012. Spontaneous tumor incidence in rasH2 mice: review of internal data and published literature. Toxicol Pathol 40: 614-623.
10. Takaoka M, Sehata S, Maejima, T, Imai T, Torii M, Satoh H, et al. 2003. Interlaboratory comparison of short-term carcinogenicity studies using CB6F1-rasH2 transgenic mice. Toxicol Pathol 31: 191-199.