

遺伝子改変動物を用いた発がん性試験結果の評価等について
(令和2年度第1回発がん性評価ワーキンググループ報告)

平成25年度から化学物質の発がん性スクリーニングとして、ラット肝中期発がん性試験を実施している（これまでの試験結果については別添1参照）。

しかしながら、多臓器の標的性が疑われても、その調査結果のみでは発がん性の強度を評価できないこと、また経口ばく露による調査が不能なガスや蒸気、粉じんなどの物質については対応できない、という課題が指摘されていたところ。

このため、平成28年度第2回発がん性評価ワーキンググループ(平成29年1月16日)において、「遺伝子改変動物による発がん性試験」導入の承認を得、翌年度より次の2物質について日本バイオアッセイ研究センターにおいて実施してきたところ。

- ・ 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (CAS番号: 140-66-9)
- ・ 二酸化窒素 (CAS番号: 10102-44-0)

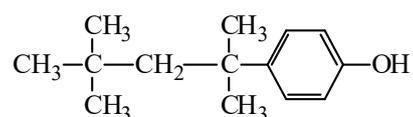
その試験結果(概要は別添2～6)を令和2年度第1回発がん性評価ワーキンググループ(令和2年6月11日)に報告し、評価を受けたので、その概要について下記のとおり報告する。

記

1 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (CAS番号: 140-66-9)

(1) 物質の基本情報等

ア 構造式及び分子量



分子量: 206.33

イ 物理化学的性状等

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

ウ 製造・輸入量

23,364 t (平成29年度)

エ 用途

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

(2) 試験結果

ア p53K0 マウス

- ・雌雄 p53K0 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。

イ rasH2 マウス

- ・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。
- ・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。

(3) 評価結果

陽性と判断される。しかしながら、直ちに長期試験等を実施する必要性を見いだす程の強度は認められない。

- ①がん原性指針への追加 → 必要なし。
- ②長期発がん性試験の実施 → 優先順位は低い。
- ③リスク評価 → 他の情報を含めて判断

2 二酸化窒素 (CAS 番号 : 10102-44-0)

(1) 物質の基本情報

ア 分子式及び分子量

化学式 : NO_2

分子量 : 46.0

イ 物理化学的性状等

性状 : 刺激臭のある帯赤褐色気体または茶色もしくは黄色の液体

相対蒸気密度 : 1.58 (空気=1)

蒸気圧 : 96 kPa (20°C)

沸点 : 21.2 °C

溶解性 : 水と反応して硝酸と一酸化窒素を生じる

保管条件 : 室温、暗所

ウ 製造・輸入量

酸化窒素として合計で 1,000~2,000 t 未満 (平成 29 年度実績)

エ 用途

合成ゴム原料

(2) 試験結果

ア p53K0 マウス

- ・ 雄 p53K0 マウスに対するがん原性を示す不確実な証拠が得られた (equivocal evidence of carcinogenic activity) と結論された。
- ・ 雌 p53K0 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

イ rasH2 マウス

- ・ 雄 rasH2 マウスに対するがん原性を示す不確実な証拠が得られた (equivocal evidence of carcinogenic activity) と結論された。
- ・ 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。

(3) 評価結果

陽性と判断される。しかしながら、直ちに長期試験等を実施する必要性を見いだす程の強度は認められない。

- ①がん原性指針への追加 → 必要なし。
- ②長期発がん性試験の実施 → 優先順位は低い。
- ③リスク評価 → 他の情報を含めて判断

中期発がん性試験(ラット肝中期発がん性試験)の実施状況

(2019年度第2回発がん性評価ワーキンググループまで)

実施年度		物質名	試験結果
平成25	2013	2-ビニルピリジン	陰性
		1, 3-ジブロモプロパン	陰性
平成26	2014	1, 4-ジブロモブタン	陰性
		1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン	陰性
		4-tert-ブチルフェノール	陰性
		2-クロロピリジン	陰性
		1, 4-ブタンジオールジグリシジルエーテル	陰性
		臭素酸ナトリウム	陰性
		平成27	2015
	イソフタル酸	陰性	
	オクタン酸	陰性	
	2-ジメチルアミノエタノール	陰性	
	4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノール	陰性	
	1-フェニルアミノ-4-イソプロピルアミノベンゼン	陽性	
平成28	2016	パラ-トルエンスルホン酸メチル	陰性
		m-クロロフェノール	陰性
		2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス(オキシメチレン)]ビス(オキシラン)	陰性
		3-メチルブタナール	陰性
		3-クロロ-1-プロパノール	陰性
		2-メトキシエチル=アクリラート	陰性
		平成29	2017
	カルシウム=ジホルマート	陰性	
	4, α -ジクロロトルエン(4-クロロベンジルクロリド)	陰性	
	3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸	陰性	
	3-メチルブタン酸	陰性	
	2-エチルブタン酸	陰性	
平成30	2018	4-アミノフェノール	陰性
		o-ニトロアニリン	陰性
		アセト酢酸アニリド	陰性
		ヘキサン酸	陰性
		3, 4-ジメチルフェノール	陰性
		メタクリル酸エチル	陰性
平成31 ／ 令和1	2019	5-クロロ-2-ニトロアニリン(2-アミノ-4-クロロ-1-ニトロベンゼン)	陰性
		酢酸亜鉛(Ⅱ)	陰性
		1, 3-ジフェニルグアニジン	陰性
		n-ヘプタン酸	陰性
		2-イソプロピルフェノール	陰性
		2-エチルヘキサナール	陰性

4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの p53 ヘテロ欠損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

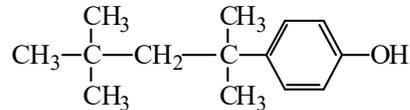
名 称：4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノール

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°C

沸 点：279°C

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 (p53 ヘテロ欠損マウス) 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 (2-Methoxy-5-methylaniline, *p*-Cresidine) 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) とし、投与用量は、雌雄とも、0 (オリブ油)、50、100 及び 200 mg/kg BW、陽性対照物質は、雌雄とも 300 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 週間試験の投与用量設定理由

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 C57BL/6J マウスを用いて、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、雌の 300 mg/kg で 1 匹の死亡が認められ、腎臓病変による死亡と推察された。試験終了時の最終体重に差はみられなかった。

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、尿素窒素の高値等)、肝臓 (重量増加、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) 及び血液/造血系 (ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値等) であると考えられた。雌の 300 mg/kg では、腎臓病変による死亡が 1 例認められ、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みられ、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 週間試験の最高用量としては高すぎると考えられる。一方、200 mg/kg では、近位尿細管の再生像は全例にみられるものの、その程度は減弱し、体重増加に抑制はみられていない。また、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量への影響も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。従って、本試験の高用量は 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、4 週間毒性試験を実施し、その結果を基に雌雄とも 300 mg/kg BW とした。

5 結果

動物の生存率は、媒体対照群と比較して雌雄とも 200 mg/kg 群で低下が認められた (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なかったが、体重は雌雄の 200 mg/kg 群で増加抑制が認められた (体重推移: 図 2)。なお、摂餌量は投与期間を通して媒体対照群との間に差は認められなかった。

病理組織学的検査の結果

—雄—

① 腫瘍性病変(表 1)

全ての臓器において、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が 50 mg/kg 以上の群で認められ、投与用量に依存して発生例数の増加と程度の増強がみられた。病変の程度は 50 mg/kg 群で軽度、100 mg/kg 群で軽度から中等度、200 mg/kg 群で中等度から重度であった。本病変の形態像は、硝子円柱の出現や尿細管の変性・壊死あるいは再生や線維化、間質領域の炎症性変化であり、尿細管障害による間質性腎炎の終末像とする腎病変で、ここでは慢性腎炎とする。

200 mg/kg で生存率の低下がみられた主な原因はこの腎臓病変によるものであった。

<骨>

骨異栄養症の発生増加が 200 mg/kg 群で認められ、病変の程度は軽度であった。骨異栄養症には、破骨細胞による骨吸収と骨細胞や骨芽細胞による類骨形成を認めた。

—雌—

① 腫瘍性病変(表 2)

全ての臓器において、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が 50 mg/kg 以上の群で認められ、投与用量に依存して発生例数の増加と程度の増強がみられた。病変の程度は 50 mg/kg 群で軽度、100 mg/kg 群で軽度から重度、200 mg/kg 群で中等度から重度であった。慢性腎炎の形態は雄と同様であった。

200 mg/kg で生存率の低下がみられた主な原因はこの腎臓病変によるものであった。

<骨>

骨異栄養症の発生増加が 50 mg/kg 以上の群で認められ、投与用量に依存して発生例数の増加と程度の増強がみられた。病変の程度は 50 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群でいずれも軽度、200 mg/kg 群で軽度から中等度であった。骨異栄養症の形態は雄と同様であった。

6 まとめ

p53 ヘテロ欠損マウスを用いて、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、雌雄 p53 ヘテロ欠損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 (2-Methoxy-5-methylaniline : *p*-Cresidine) の評価 (表 3, 4)

陽性対照物質として、2-Methoxy-5-methylaniline を 26 週間反復強制経口投与 (雌雄 15 匹、300 mg/kg BW) した。

腫瘍性病変の発生は、雌雄とも膀胱に認められ、雄では移行上皮癌の発生、移行上皮乳頭腫と移行上皮癌を合わせた発生がそれぞれ有意な増加を示した。雌では扁平上皮乳頭腫と移行上皮乳頭腫を合わせた発生が有意な増加を示した。また、前腫瘍性病変である乳頭状ないし結節状過形成 (PN 過形成) は、雌雄ともに有意な発生増加を示した。

以上より、雌雄とも陽性対照物質投与による膀胱腫瘍及び前腫瘍性病変の発生増加が認められ、本試験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 (p53ヘテロ欠損マウス 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		
副腎	皮質腺腫	0	0	0	1		
胸腺	悪性リンパ腫 [#]	0	1	0	0		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

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 (p53ヘテロ欠損マウス 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		
皮下組織	軟骨腫	0	0	0	1		
	肉腫 NOS [#]	0	1	0	0		
リンパ節	悪性リンパ腫 [#]	1	0	0	0		
骨	骨肉腫 [#]	0	0	0	1		

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)

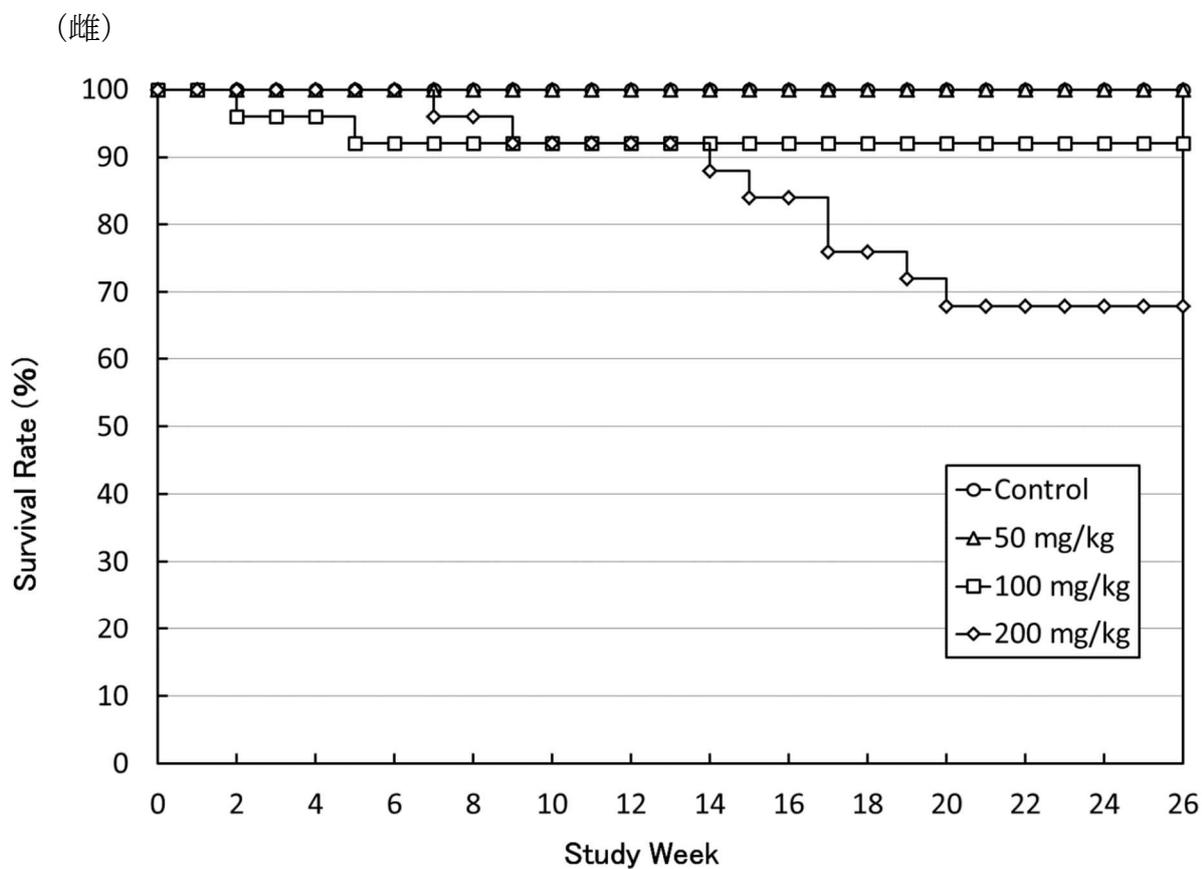
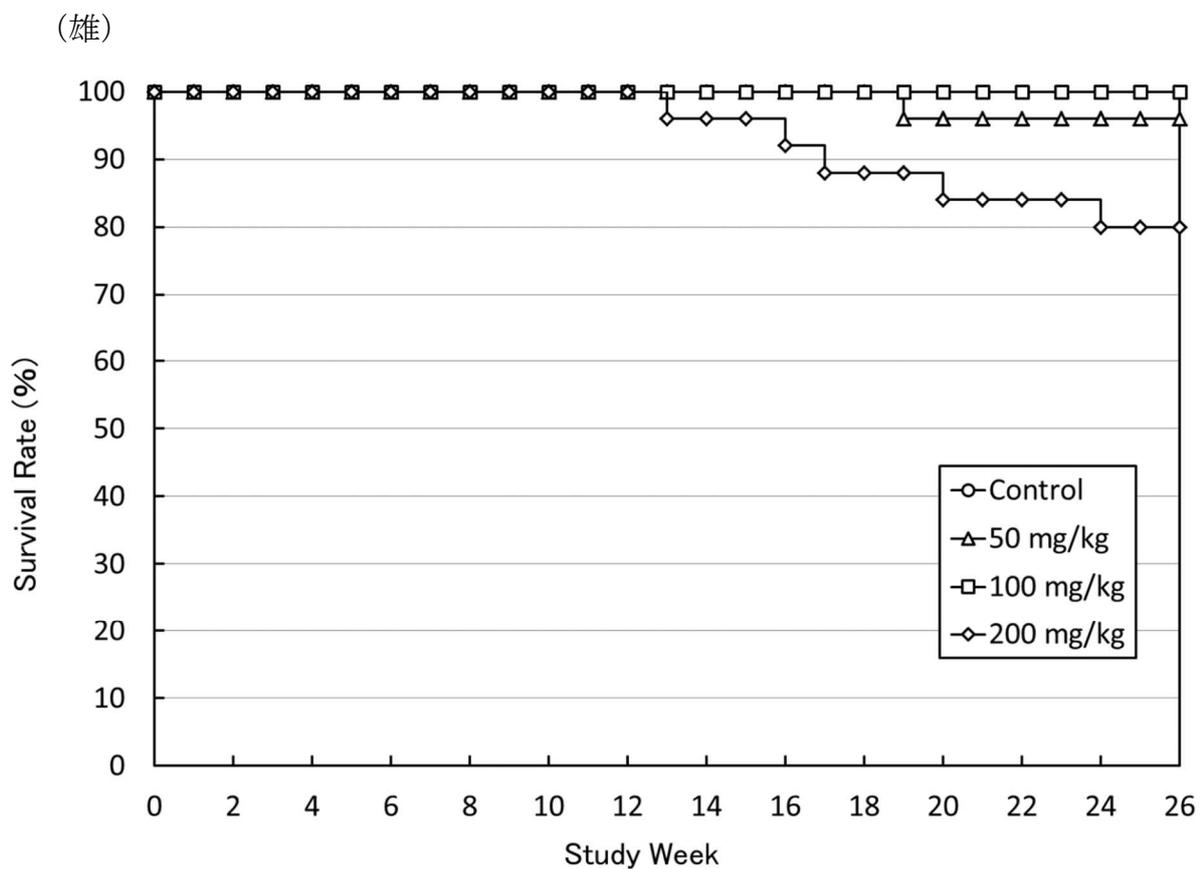


図1 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における生存率 (p53 ヘテロ欠損マウス)

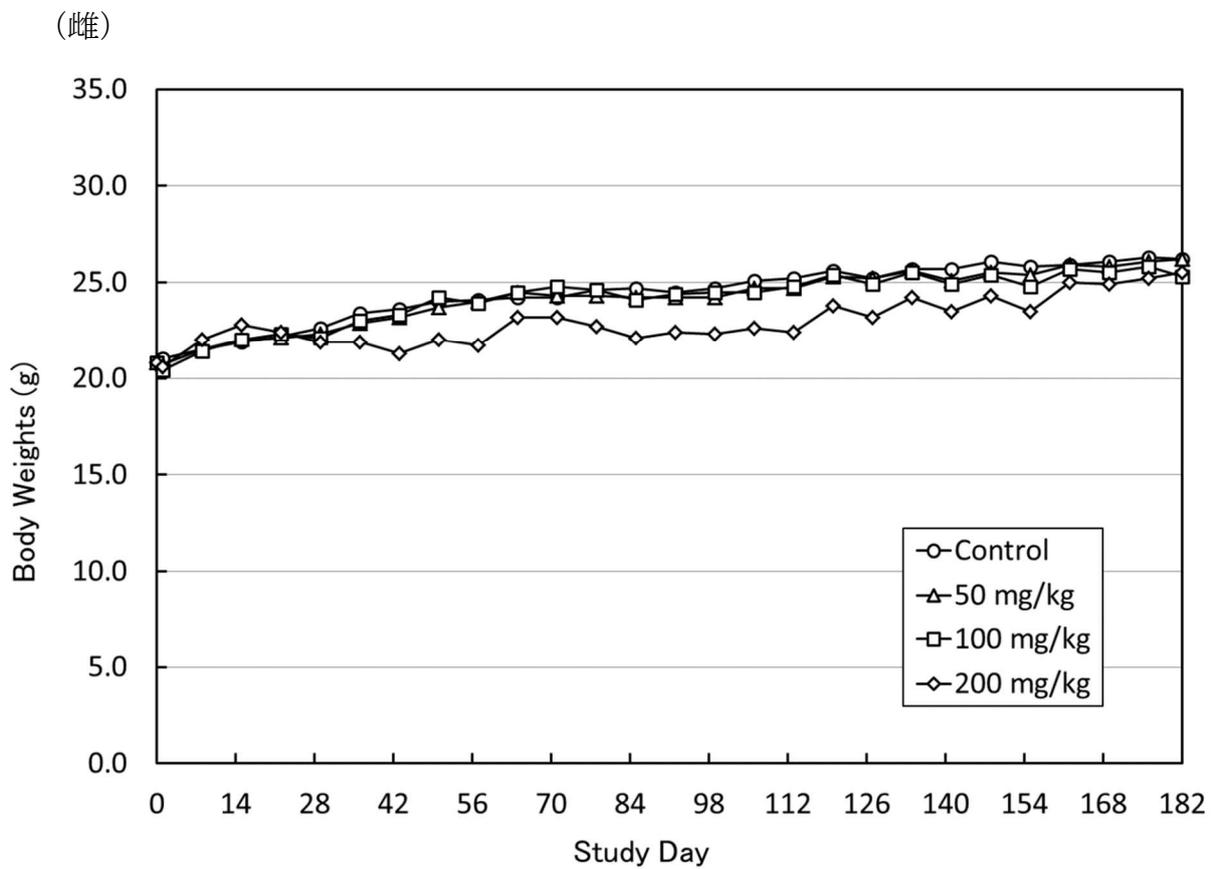
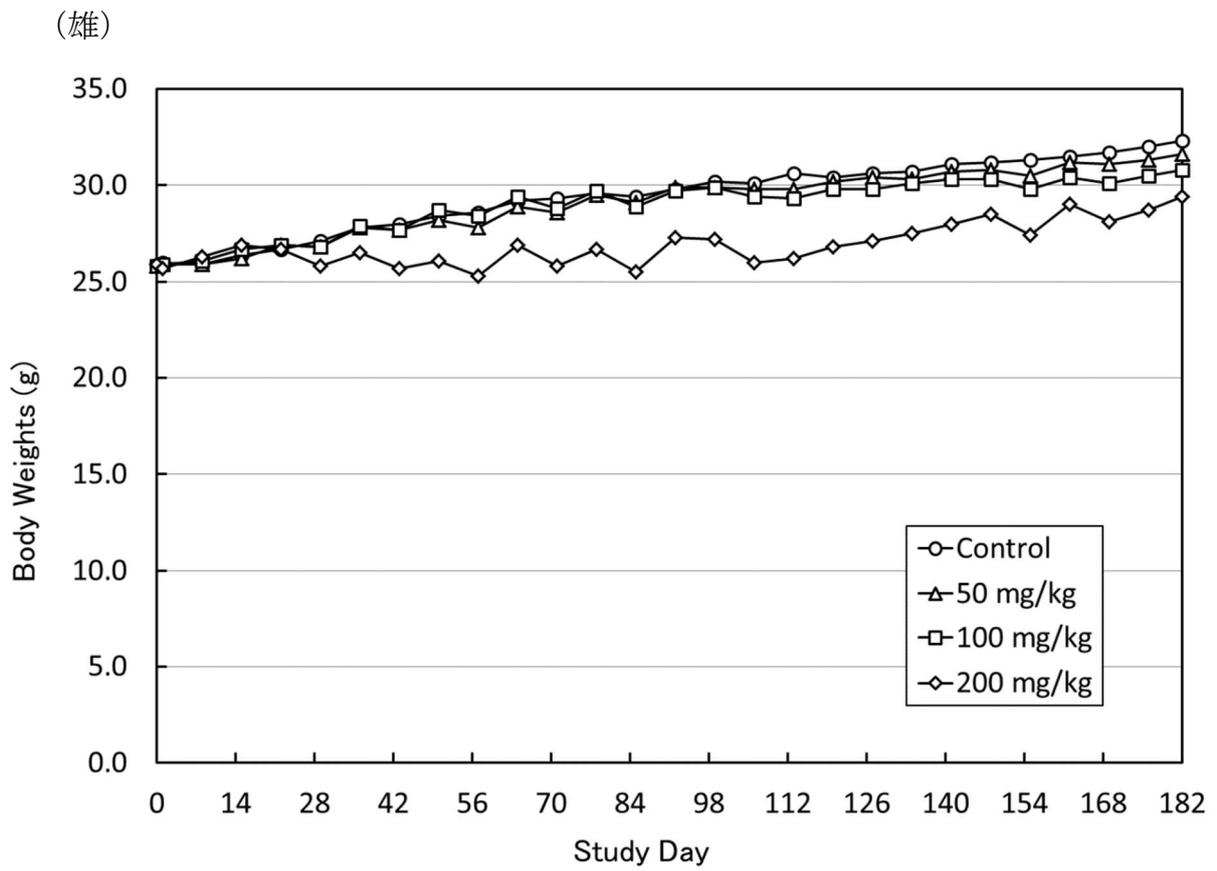


図2 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における体重推移 (p53 ヘテロ欠損マウス)

表 3 陽性対照 (2-Methoxy-5-methylaniline) の中期がん原性試験
 における主な腫瘍発生 (p53 ヘテロ欠損マウス 雄)

投 与 用 量 (mg/kg)		媒体対照	陽性対照
		0	300
検査動物数		25	15
膀胱	移行上皮乳頭腫	0	2
	移行上皮癌 [#]	0	3 *
	移行上皮乳頭腫 + 移行上皮癌 [#]	0	5 **

上皮系腫瘍

表 4 陽性対照 (2-Methoxy-5-methylaniline) の中期がん原性試験
 における主な腫瘍発生 (p53 ヘテロ欠損マウス雌)

投 与 用 量 (mg/kg)		媒体対照	陽性対照
		0	300
検査動物数		25	15
膀胱	扁平上皮乳頭腫	0	2
	移行上皮乳頭腫	0	1
	扁平上皮乳頭腫 + 移行上皮乳頭腫	0	3 *
リンパ節	悪性リンパ腫 [#]	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)

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.

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

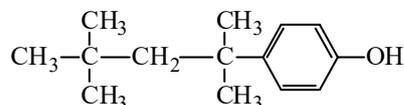
名 称：4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノール

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°C

沸 点：279°C

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 +扁平上皮癌 [#]	0	0	0	3	↑↑	↑↑
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 胸膜	血管腫	0	1	0	0		
	血管腫	0	0	0	1		
	血管肉腫 [#]	0	1	0	0		
全臓器	血管腫+血管肉腫 [#]	0	1	0	1		
	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 +細気管支-肺胞上皮癌 [#]	3	3	3	0		
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)

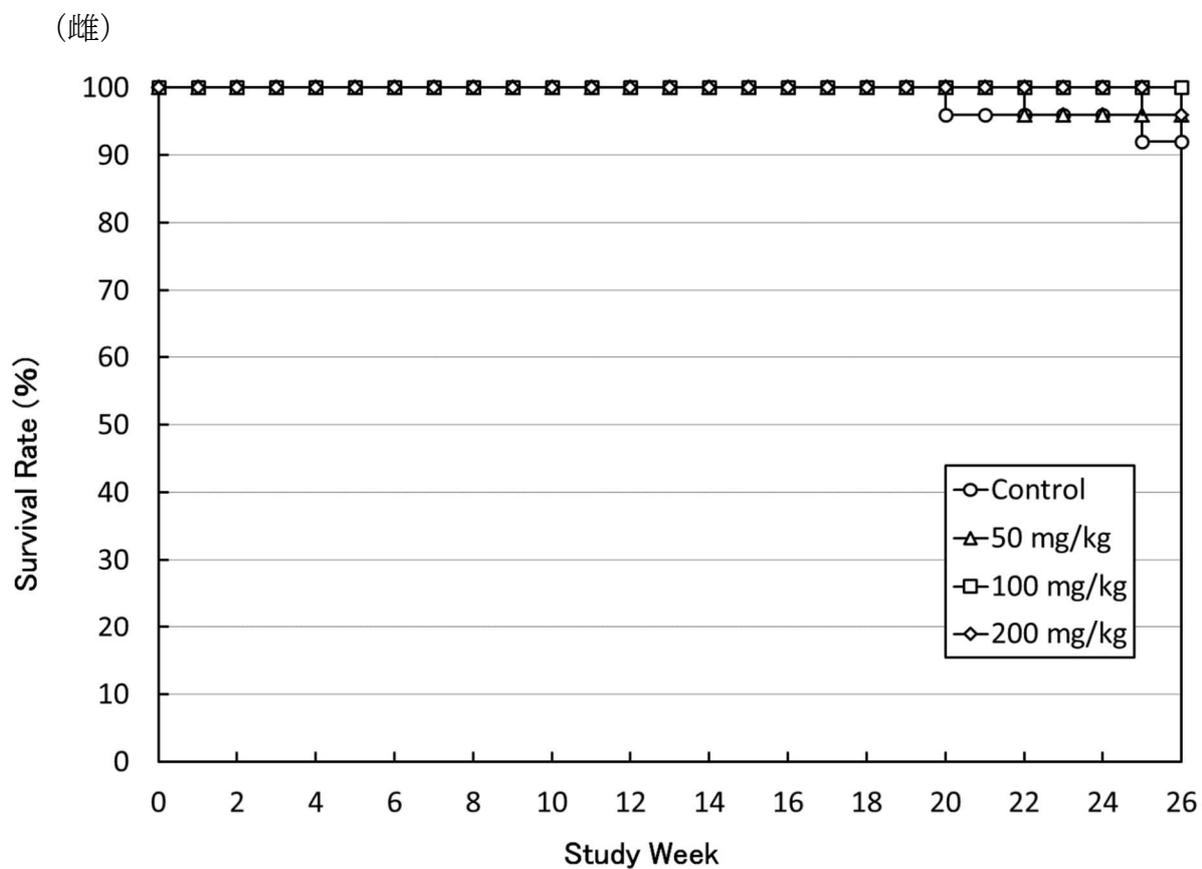
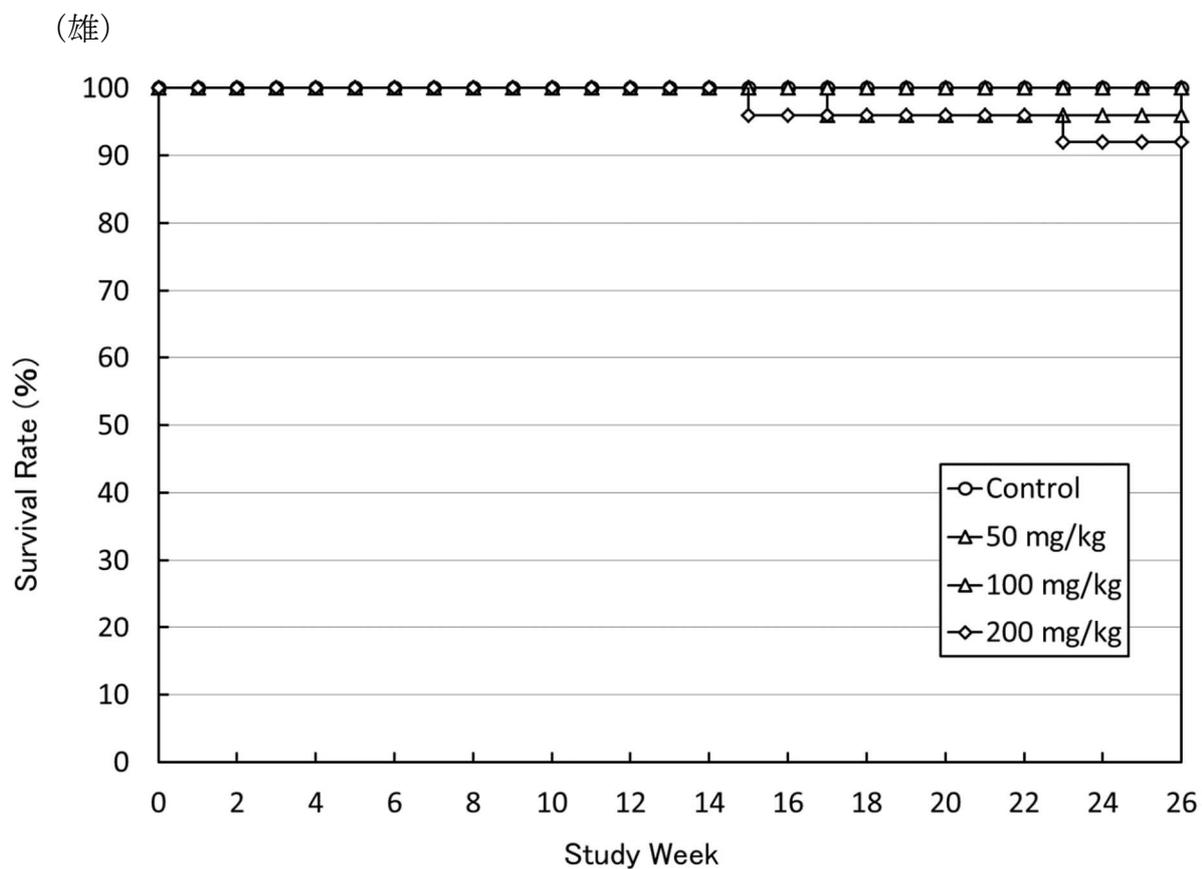


図1 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における生存率 (rasH2 マウス)

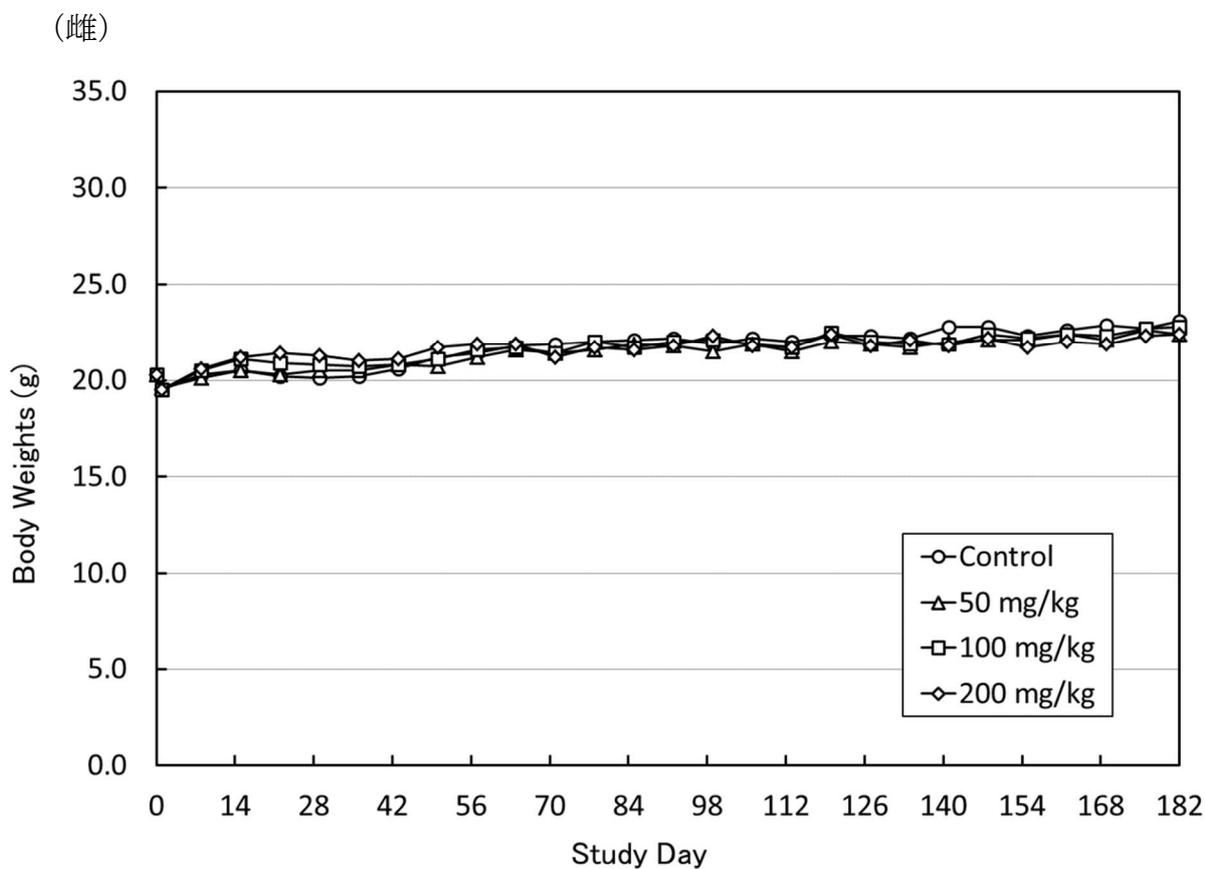
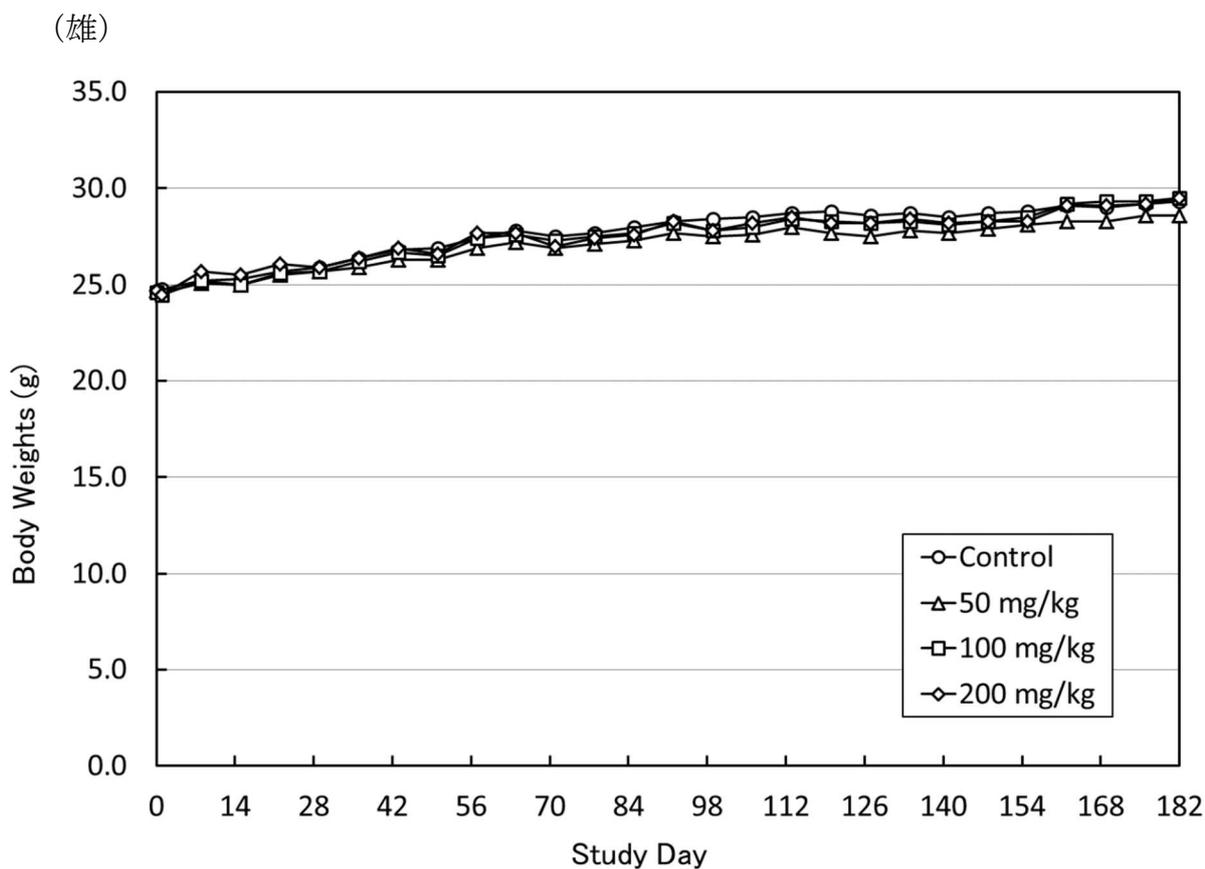


図2 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノールの中期がん原性試験における体重推移 (rasH2 マウス)

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	陽性対照
		0	75
検査動物数		25	15
皮膚	扁平上皮乳頭腫	0	3 *
	肺		
	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	1	5 *
	+細気管支-肺胞上皮癌 [#]		
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	陽性対照
		0	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.

二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入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：二酸化窒素 (Nitrogen dioxide)
別 名：過酸化窒素 (Nitrogen peroxide)
CAS 番号：10102-44-0

1-2 化学式及び分子量（文献1）

化 学 式：NO₂
分 子 量：46.0

1-3 物理化学的性状等（文献1）

性 状：刺激臭のある帯赤褐色気体または茶色もしくは黄色の液体
相対蒸気密度：1.58（空気=1）
蒸 気 圧：96 kPa（20℃）
沸 点：21.2 °C
溶 解 性：水と反応して硝酸と一酸化窒素を生じる
保 管 条 件：室温、暗所

1-4 製造量等（文献2）

製造・輸入数量：酸化窒素として合計で1,000～2,000トン未満
（平成29年度実績）

1-5 用途（文献3）

合成ゴム原料

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）：0.2ppm（TLV-TWA）、A4（ヒトに対して発がん性物質として分類できない物質）（文献4）
国際がん研究機関（IARC）：未設定

1-7 遺伝毒性

in vitro

エームス試験：陽性（文献5）
チャイニーズハムスター染色体異常試験：陽性（文献6）

チャイニーズハムスターDNA鎖切断試験：陽性（文献7）

in vivo

染色体異常試験（マウス白血球及び精母細胞）：陰性（文献8）

小核試験（マウス骨髄細胞）：陰性（文献9）

ショウジョウバエ変異原性試験：陰性（文献9、10）

2 目的

二酸化窒素を遺伝子改変マウス（p53KO マウス）に 26 週間全身吸入暴露（経気道投与）し、そのがん原性を検索した。

3 方法

投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群（各群：雌雄とも 25 匹）を設け、二酸化窒素の濃度は、0（対照群）、10、20 及び 40 ppm とし、1 日 6 時間、1 週 5 日間、26 週間暴露した。観察・検査項目として、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 週間試験の投与濃度設定理由

投与濃度は、雌雄の C57BL/6J マウス（8 週齢）を用いた 4 週間の予備試験結果をもとに決定した。0（対照群）、5、10、20 及び 40 ppm の濃度で暴露した結果、動物の死亡は認められなかった。一般状態、体重及び摂餌量は 40 ppm 群で影響がみられた。一般状態の観察では、暴露開始日と 2 日目の暴露後の観察で雌雄全匹に自発運動量の減少と不整呼吸がみられた。体重は 1 週目と 4 週目に雄で低値がみられ、摂餌量は雄では 1 週目と 4 週目に、雌では 1 週目に低値がみられた。臓器重量では、肺重量の高値が雌の 20 ppm 以上の群と雄の 40 ppm 群にみられた。病理組織学的検査では、鼻腔と肺に影響がみられた。鼻腔では、滲出液の貯留が 40 ppm の雌雄にみられ、また、呼吸上皮のエオジン好性変化と、鼻腺の呼吸上皮化生が全ての投与群の雌雄にみられた。肺では、炎症性細胞浸潤が 40 ppm 群の雌雄にみられた。なお、病理組織学的検査でみられた所見の程度はすべてが軽度であった。

以上のように、二酸化窒素の 4 週間吸入暴露の結果、雌雄のマウスの一般状態、体重（雄のみ）、摂餌量、肺重量及び病理組織学的検査結果に影響が認められた。しかし、毒性の程度はいずれも重篤なものではなく、40 ppm の濃度で 26 週間に亘って動物に暴露しても、毒性兆候は示されるものの死亡を増加させることはないと考えられた。したがって、本試験の投与濃度は 4 週間の予備試験と同じく、40 ppm を最高濃度とし、以下 20 ppm 及び 10 ppm を設定した。

5 結果

雌雄とも生存率、一般状態に、投与の影響はみられなかった。体重は、雄の 40 ppm 群で投与期間を通して体重増加の抑制がみられた。摂餌量は、雌雄の 40 ppm 群で投与 1 週目に低値、2 週目には高値がみられたが、各群とも投与期間を通しての平均摂餌量に差はみられなかった。臓器重量測定では、雌雄の 20 ppm 以上の群で肺重量が増加した。
(生存率：図 1、体重：図 2、摂餌量：図 3)

病理組織学的検査の結果

—雄—

① 腫瘍性病変 (表 1)

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は、対照群 0 匹 (0%)、10 ppm 群 0 匹 (0%)、20 ppm 群 0 匹 (0%)、40 ppm 群 2 匹 (8%) に認められ、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は、文献によるヒストリカルコントロールデータ (文献 11) では発生が認められず (0/433 匹、0%)、本試験の 40 ppm 群の発生率 (2/25 匹、8%) はこの値を超えていた。しかしながら、対照群との 2 群間検定 (Fisher 検定) では有意な増加は示されず、細気管支-肺胞上皮過形成等の腫瘍に関連する非腫瘍性病変の発生も認められていないことから、がん原性を示唆する証拠 (some evidence of carcinogenic activity) と判断するには不十分と考えられた。

② 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮では、エオジン好性変化及び萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

嗅部では、滲出液の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

<鼻咽頭>

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

<肺>

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度から中等度、40 ppm 群が軽度であった。

—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

<鼻腔>

嗅上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。また、萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

嗅部では滲出液の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

<鼻咽頭>

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

<肺>

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

6 まとめ

遺伝子改変マウス (p53KO マウス) を用いて、二酸化窒素の 26 週間の吸入による中期がん原性試験を行った結果、

- 1) 雄 p53KO マウスに対するがん原性を示す不確実な証拠が得られた (equivocal evidence of carcinogenic activity) と結論された。
- 2) 雌 p53KO 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。

表 1 二酸化窒素の中期がん原性試験における腫瘍発生 (p53KO マウス 雄)

投 与 濃 度 (ppm)		0	10	20	40	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	0	0	0	2	↑	↑
胃 (前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	1		

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加 (Peto, Cochran-Armitage 検定)

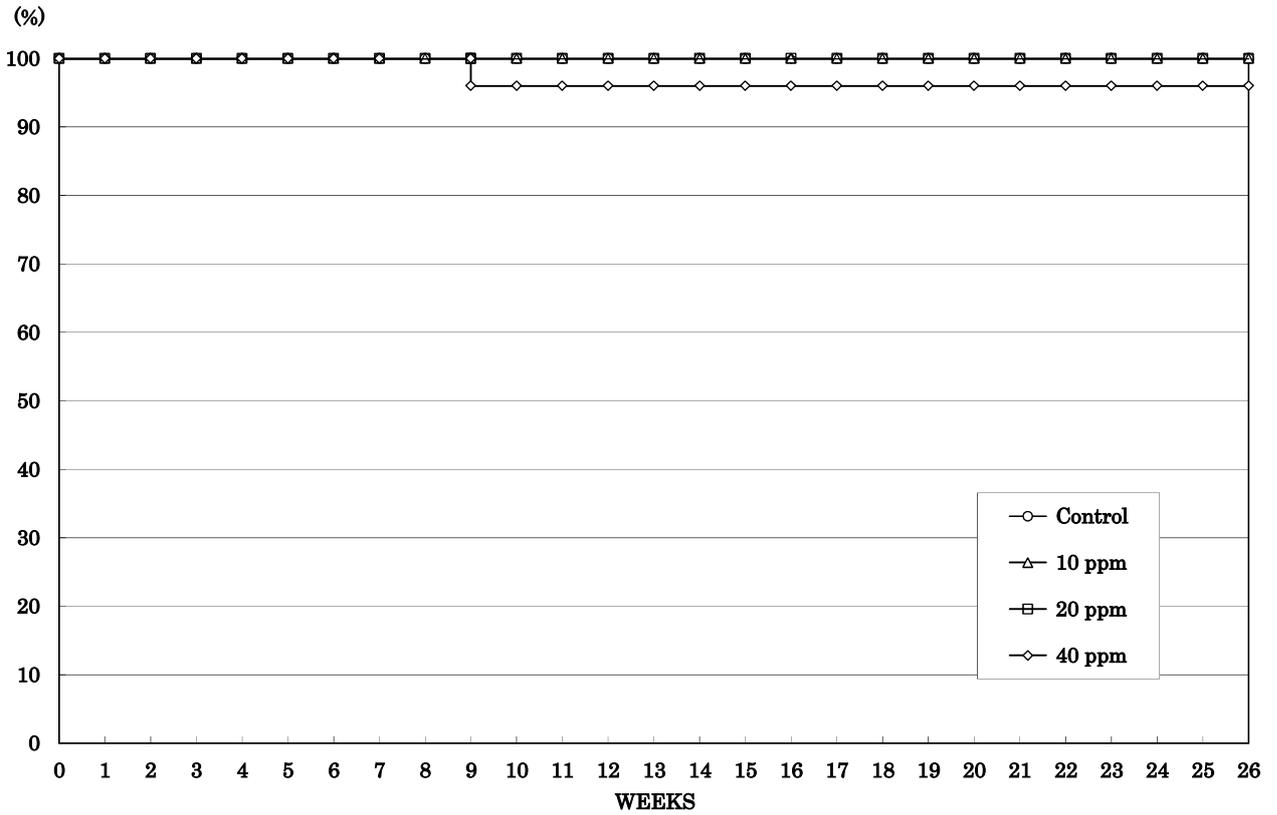
表 2 二酸化窒素の中期がん原性試験における腫瘍発生 (p53KO マウス 雌)

投 与 濃 度 (ppm)		0	10	20	40	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	1	0	0	1		
皮下組織	血管腫	0	0	1	0		
肝臓	組織球性肉腫#	0	1	0	0		
脾臓	血管腫	0	0	1	0		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

(雄)



(雌)

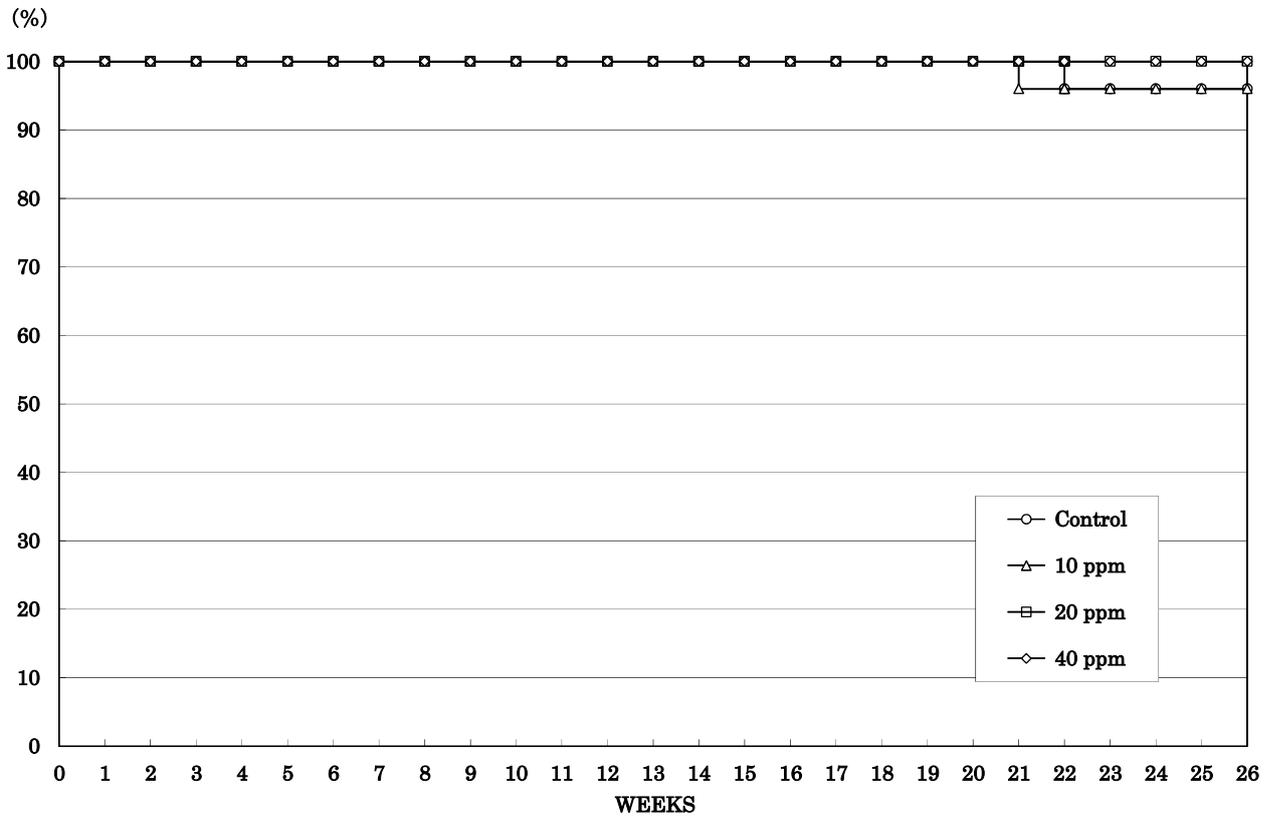
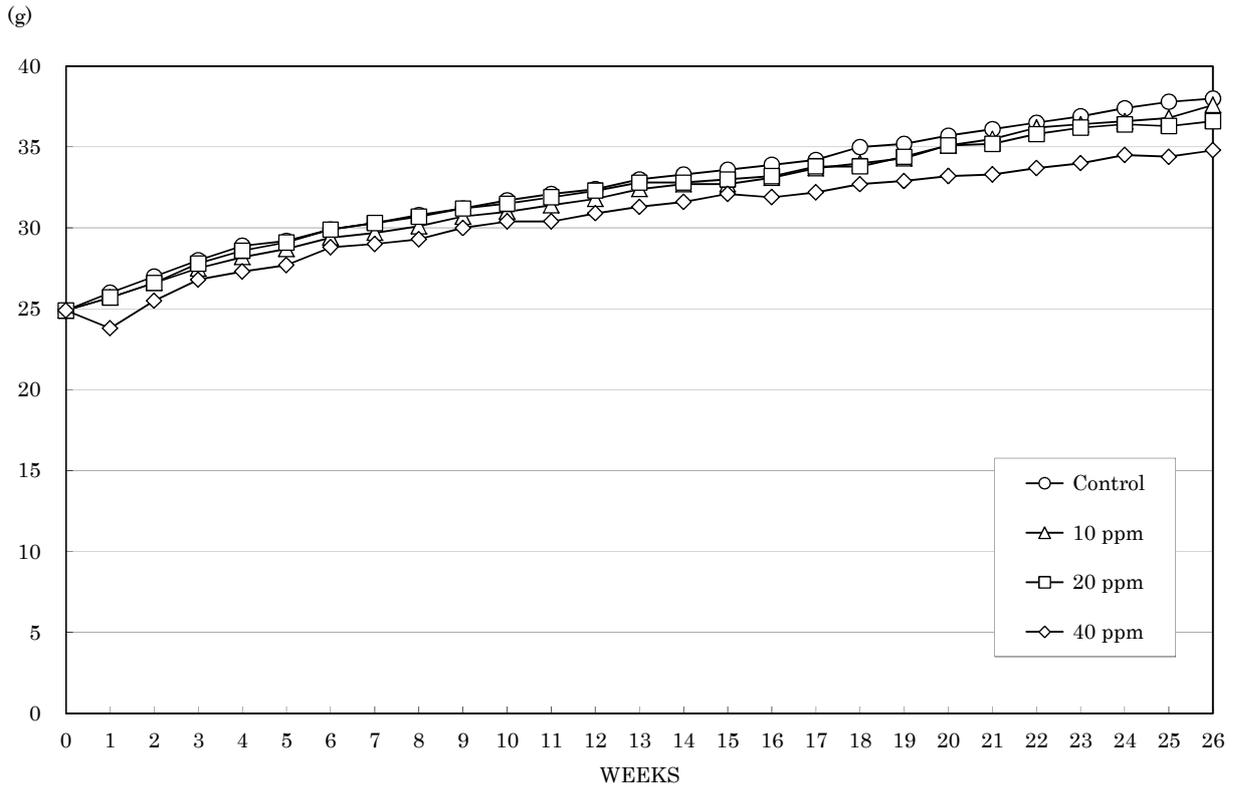


図1 二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における生存率

(雄)



(雌)

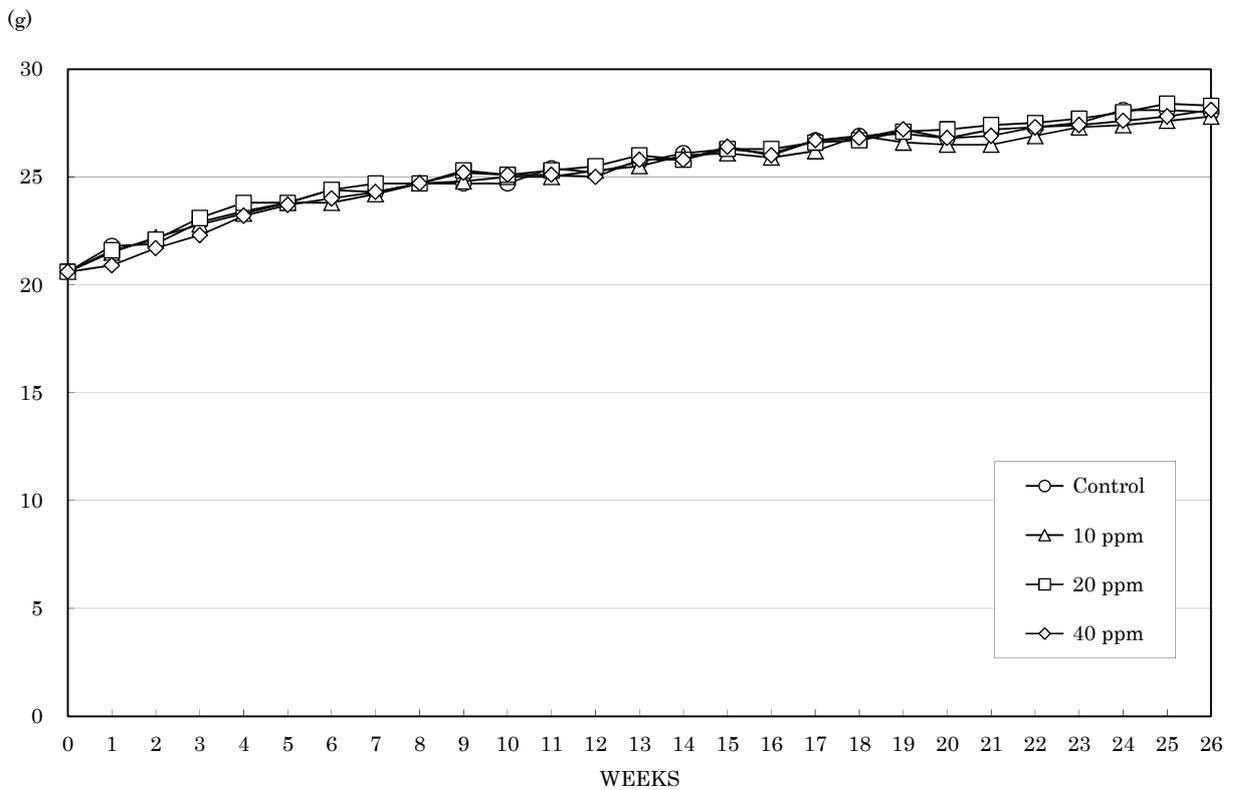
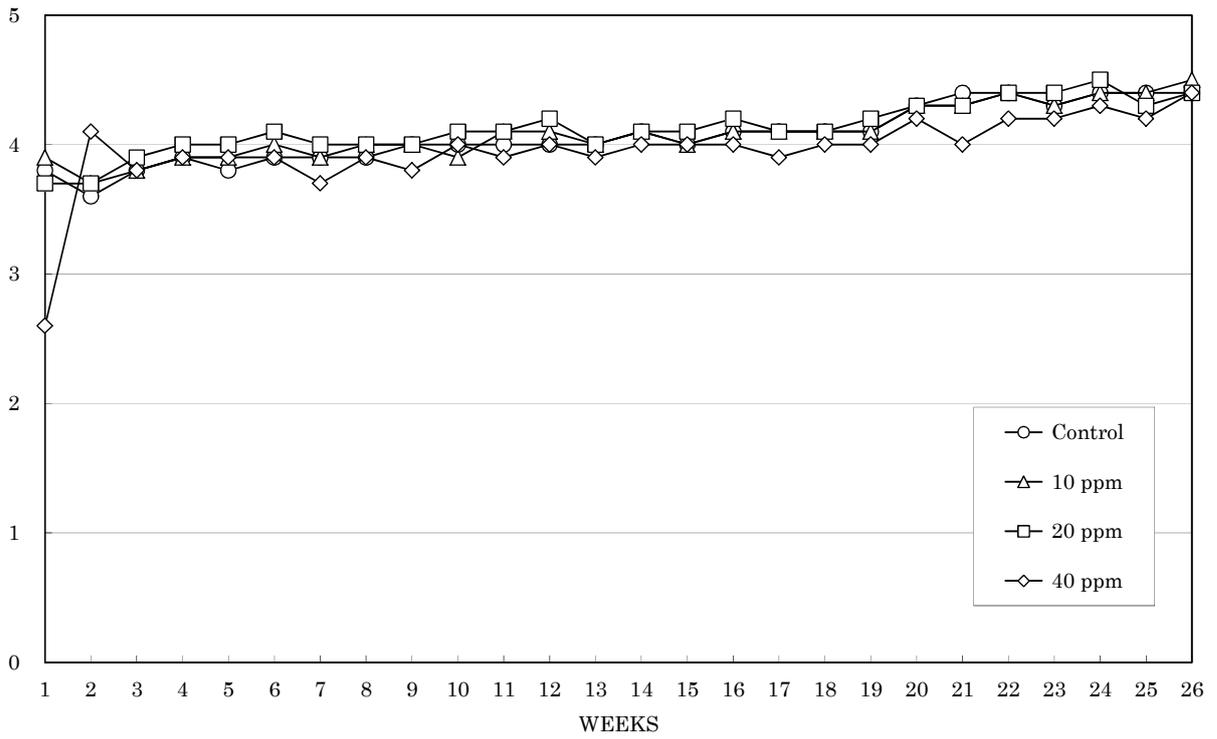


図2 二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における体重推移

(雄)

(g)



(雌)

(g)

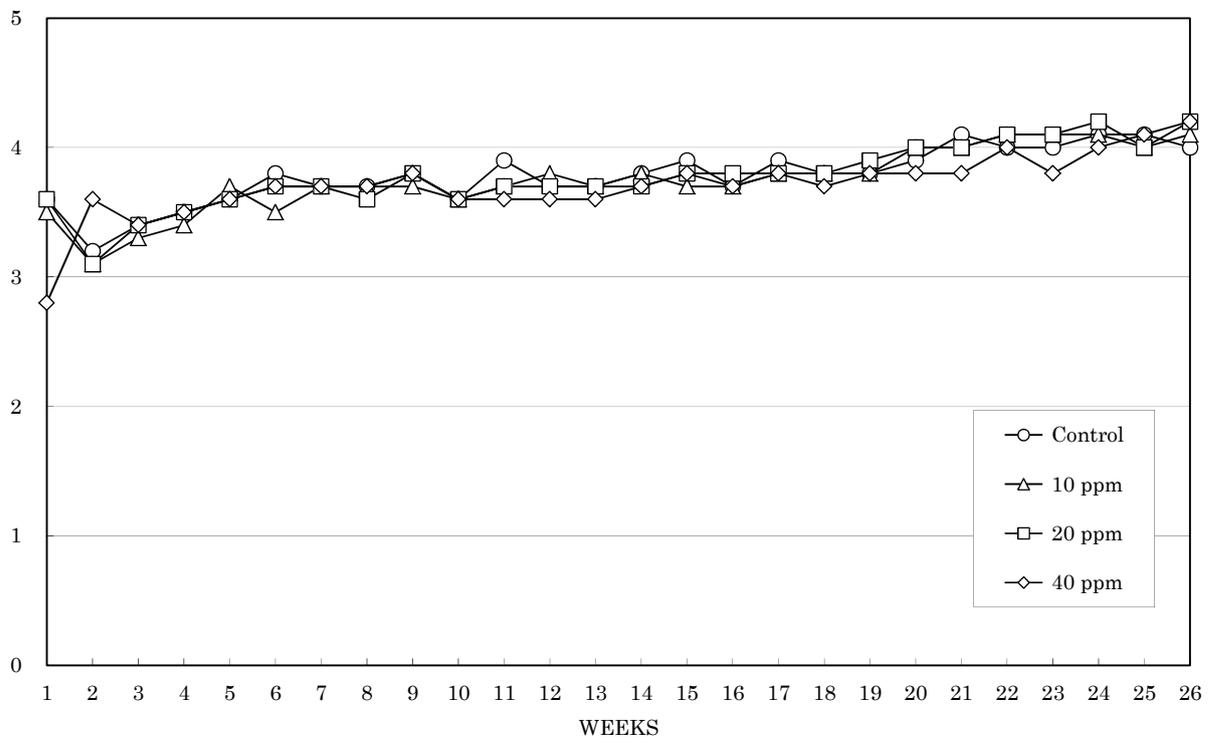


図3 二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における摂餌量

文献

- 1) International Programme on Chemical Safety. 2013. ICSC: 0930. NITROGEN DIOXIDE. International Chemical Safety Cards
- 2) 経済産業省、一般化学物質等の製造・輸入数量（平成 29 年度実績）
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構、NITE 化学物質総合情報提供システム（NITE-CHRIP）
- 4) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2012. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Nitrogen dioxide.
- 5) Biggart NW, Rinehart RR (1987). Comparison between aqueous-phase and gas-phase exposure protocols for determining the mutagenic potential of nitrogen dioxide and the gas fraction of welding fumes. *Mutat Res* 188:175-184.
- 6) Tsuda H, Kushi A, Yoshida D, Goto F (1981). Chromosomal aberrations and sisterchromatid exchanges induced by gaseous nitrogen dioxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 89:303-309.
- 7) Görsdorf S, Appel KE, Engholm C, Obe G (1990). Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 11:37-41.
- 8) Gooch PC, Luippold HE, Creasia DA, Brewen HG (1977). Observations on mouse chromosomes following nitrogen dioxide inhalation. *Mutat Res* 48:117-120.
- 9) Victorin K, Busk L, Cederbeg H, Magnusson J, (1990). Genotoxic Activity of 1,3-butadiene and Nitrogen Dioxide and Their Photochemical Reaction Products in *Drosophila* and in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay. *Mutat Res* 228:203-209.
- 10) Inoue H, Fukunaga A, Okubo S, (1981). Mutagenic effects of nitrogen dioxide combined with methylurea and ethylurea in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 88:281-290.

- 11) Storer RD, French JE, Haseman J, Hajian G, LeGrand EK, Long GG, Mixson LA, Ochoa R, Sagartz JE, Soper KA. 2001. P53^{+/-} hemizygous knockout mouse: overview of available data. *Toxicol Pathol.*;29 Suppl:30-50. Review.

二酸化窒素の rasH2 マウスを用いた吸入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：二酸化窒素 (Nitrogen dioxide)
別 名：過酸化窒素 (Nitrogen peroxide)
CAS 番号：10102-44-0

1-2 化学式及び分子量（文献1）

化 学 式：NO₂
分 子 量：46.0

1-3 物理化学的性状等（文献1）

性 状：刺激臭のある帯赤褐色気体または茶色もしくは黄色の液体
相対蒸気密度：1.58（空気=1）
蒸 気 圧：96 kPa（20℃）
沸 点：21.2 °C
溶 解 性：水と反応して硝酸と一酸化窒素を生じる
保 管 条 件：室温、暗所

1-4 製造量等（文献2）

製造・輸入数量：酸化窒素として合計で1,000～2,000トン未満
（平成29年度実績）

1-5 用途（文献3）

合成ゴム原料

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）：0.2ppm（TLV-TWA）、A4（ヒトに対して発がん性物質として分類できない物質）（文献4）
国際がん研究機関（IARC）：未設定

1-7 遺伝毒性

in vitro

エームス試験：陽性（文献5）
チャイニーズハムスター染色体異常試験：陽性（文献6）

チャイニーズハムスターDNA鎖切断試験：陽性（文献7）

in vivo

染色体異常試験（マウス白血球及び精母細胞）：陰性（文献8）

小核試験（マウス骨髄細胞）：陰性（文献9）

ショウジョウバエ変異原性試験：陰性（文献9、10）

2 目的

二酸化窒素を遺伝子改変マウス（rasH2 マウス）に 26 週間全身吸入暴露（経気道投与）し、そのがん原性を検索した。

3 方法

投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群（各群：雌雄とも 25 匹）を設け、二酸化窒素の濃度は、0（対照群）、10、20 及び 40 ppm とし、1 日 6 時間、1 週 5 日間、26 週間暴露した。観察・検査項目として、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 週間試験の投与濃度設定理由

投与濃度は、雌雄の rasH2 マウス（non-Tg）を用いた 4 週間の予備試験結果をもとに決定した。0（対照群）、5、10、20 及び 40 ppm の濃度で暴露した結果、投与による動物の死亡は認められなかった。一般状態及び体重は 40 ppm 群で影響がみられた。一般状態の観察では、投与期間初期の暴露後の観察で雌雄全匹に自発運動量の減少と不整呼吸がみられ、雌では異常鼻音もみられた。体重は雄では 1 週目のみに、雌では 2 週目から 4 週目に低値がみられた。臓器重量では、肺重量の高値が雄の 20 ppm 以上の群と雌の 10 ppm 以上の群にみられた。病理組織学的検査では、鼻腔と肺に影響がみられた。鼻腔では、滲出液の貯留が雌雄の 10 ppm 以上の群でみられ、移行上皮の糜爛又は潰瘍が雄の 20 ppm 群以上の群と雌の 10 ppm 以上の群でみられた。肺では、細気管支肺泡領域に上皮の増生が雌雄の 40 ppm 群、炎症が雄の 20 ppm 以上の群と雌の 10 ppm 以上の群にみられ、出現頻度や程度は濃度段階を反映していた。なお、病理組織学的検査でみられた所見の程度は、多くが軽度であった。

以上のように、二酸化窒素の 4 週間吸入暴露の結果、雌雄のマウスの一般状態、体重、肺重量及び病理組織学的検査結果に影響が認められた。しかし、毒性の程度はいずれも重篤なものではなく、40 ppm の濃度で 26 週間に亘って動物に暴露しても、毒性兆候は示されるものの動物の生存率には影響を与えないと考えられた。したがって、本試験の投与濃度は 4 週間の予備試験と同じく、40 ppm を最高濃度とし、以下 20 ppm 及び 10 ppm を設定した。

5 結果

雌雄とも生存率、一般状態に、投与の影響はみられなかった。体重は、雄の 40 ppm 群で投与後半、雌の 40 ppm 群で投与期間を通して増加抑制がみられた。摂餌量は、雄の 40 ppm で 17 週まで、雌の 20 ppm 以上の群では概ね投与期間を通して、雌の 10 ppm 群では投与期間前半に低値が散見されたが、各群とも対照群と比較して、投与期間を通しての平均摂餌量に差はみられなかった。(生存率：図 1、体重：図 2、摂餌量：図 3)

病理組織学的検査の結果

—雄—

① 腫瘍性病変 (表 1)

<脾臓>

血管腫の発生は、対照群：0 匹 (0%)、10 ppm 群：0 匹 (0%)、20 ppm 群：0 匹 (0%)、40 ppm 群：1 匹 (4%) に認められた。血管肉腫の発生は、対照群：0 匹 (0%)、10 ppm 群：0 匹 (0%)、20 ppm 群：0 匹 (0%)、40 ppm 群：1 匹 (4%) に認められた。血管腫と血管肉腫を合わせた発生は、対照群：0 匹 (0%)、10 ppm 群：0 匹 (0%)、20 ppm 群：0 匹 (0%)、40 ppm 群：2 匹 (8%) に認められ、Peto 検定 (有病率法+死亡率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。一方、対照群と 40 ppm 群との間では有意な増加は示されなかった。脾臓の血管腫と血管肉腫は、当センターで過去に実施した rasH2 マウス試験において、対照群及び投与群に非用量依存的に発生していた腫瘍であり、血管腫と血管肉腫を合わせた発生はそれぞれの試験の対照群で 0~2 匹の範囲で認められた (文献 11、12、13)。また、本試験においては、雄の脾臓腫瘍に関連する他の病変は認められなかった。これらのことから、がん原性を示唆する証拠 (some evidence of carcinogenic activity) と判断するには不十分と考えた。

② 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮では、萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。その他、エオジン好性変化の発生匹数の減少が 20 ppm 群でみられた。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

鼻腺では、増殖の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

嗅部では、滲出液の発生匹数の増加が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は軽度であった。

<鼻咽頭>

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

<肺>

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は軽度であった。

—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

<鼻腔>

嗅上皮では、萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。その他、エオジン好性変化の発生匹数の減少が全ての投与群でみられた。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

鼻腺では、増殖の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

嗅部では、滲出液の発生匹数の増加が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は軽度であった。

<鼻咽頭>

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

<肺>

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は軽度であった。

6 まとめ

遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) を用いて、二酸化窒素の 26 週間の吸入による中期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不確実な証拠が得られた (equivocal 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。

表 1 二酸化窒素の中期がん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雄)

投 与 濃 度 (ppm)		0	10	20	40	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	5	3	3		
肺	細気管支-肺胞上皮癌#	0	0	1	0		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫 +細気管支-肺胞上皮癌#	3	5	4	3		
皮膚	扁平上皮乳頭腫	1	0	0	0		
脾臓	血管腫	0	0	0	1		
脾臓	血管肉腫#	0	0	0	1		
脾臓	血管腫+血管肉腫#	0	0	0	2	↑	↑
皮下組織	血管肉腫#	1	0	0	0		
骨髄	血管腫	0	0	0	1		
胸腺	血管腫	0	1	0	0		
腎臓	血管腫	0	0	0	1		
精巣	血管肉腫#	0	0	1	0		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

:悪性腫瘍

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加 (Peto, Cochran-Armitage 検定)

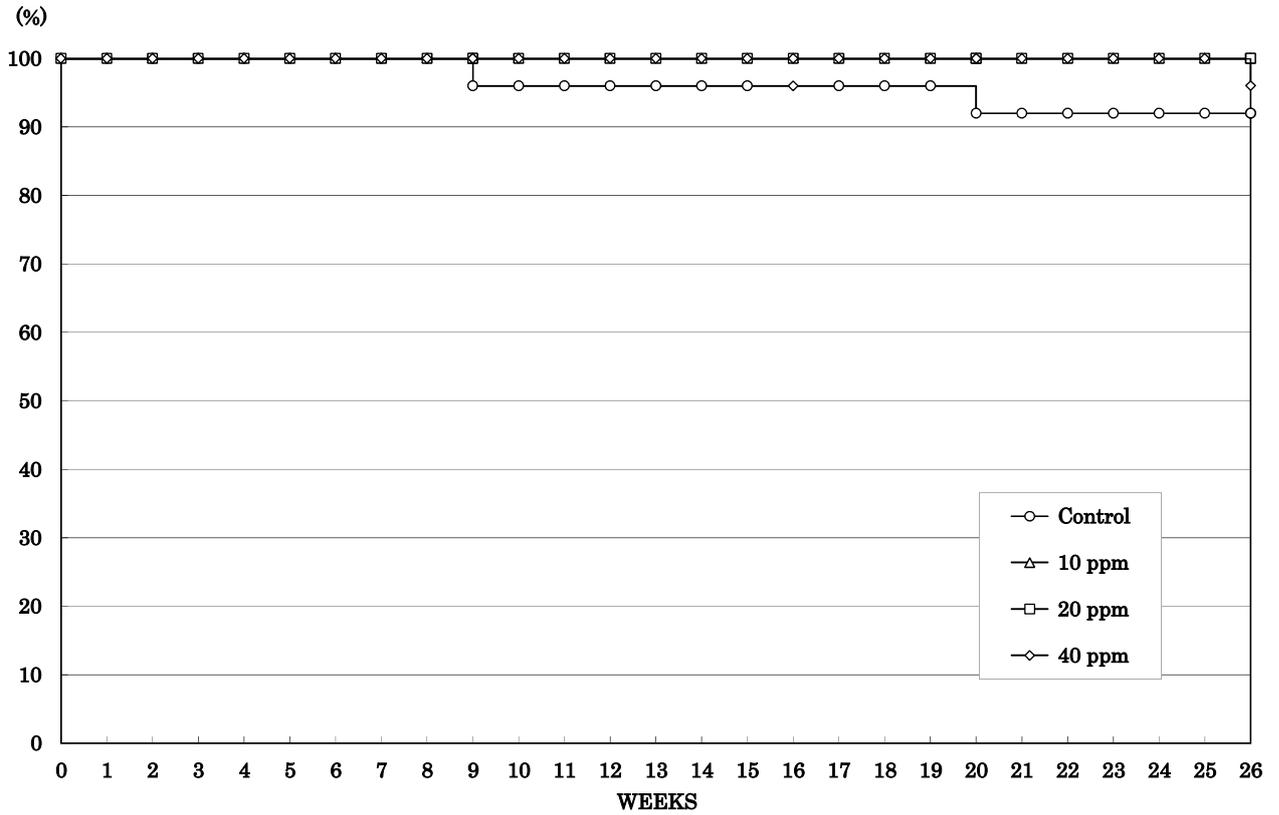
表 2 二酸化窒素の中期がん原性試験における腫瘍発生 (rasH2 マウス 雌)

投与濃度 (ppm)		0	10	20	40	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	1	2	2	1		
肺	細気管支-肺胞上皮癌#	0	0	1	0		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫 +細気管支-肺胞上皮癌#	1	2	3	1		
皮膚	扁平上皮乳頭腫	0	0	1	1		
胃 (前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	0	1	0		
尿道	移行上皮乳頭腫	0	0	1	0		
ハーダー腺	腺癌#	0	1	0	0		
肺	血管肉腫#	0	0	0	1		
胸腺	血管腫	0	0	0	1		
脾臓	血管腫	1	0	0	1		
脾臓	血管肉腫#	0	2	3	0		
脾臓	血管腫+血管肉腫#	1	2	3	1		
胃	血管肉腫#	1	0	0	0		
唾液腺	血管肉腫#	1	0	0	0		
縦隔組織	血管肉腫#	0	0	1	0		
後腹膜組織	血管肉腫#	0	0	0	1		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

:悪性腫瘍

(雄)



(雌)

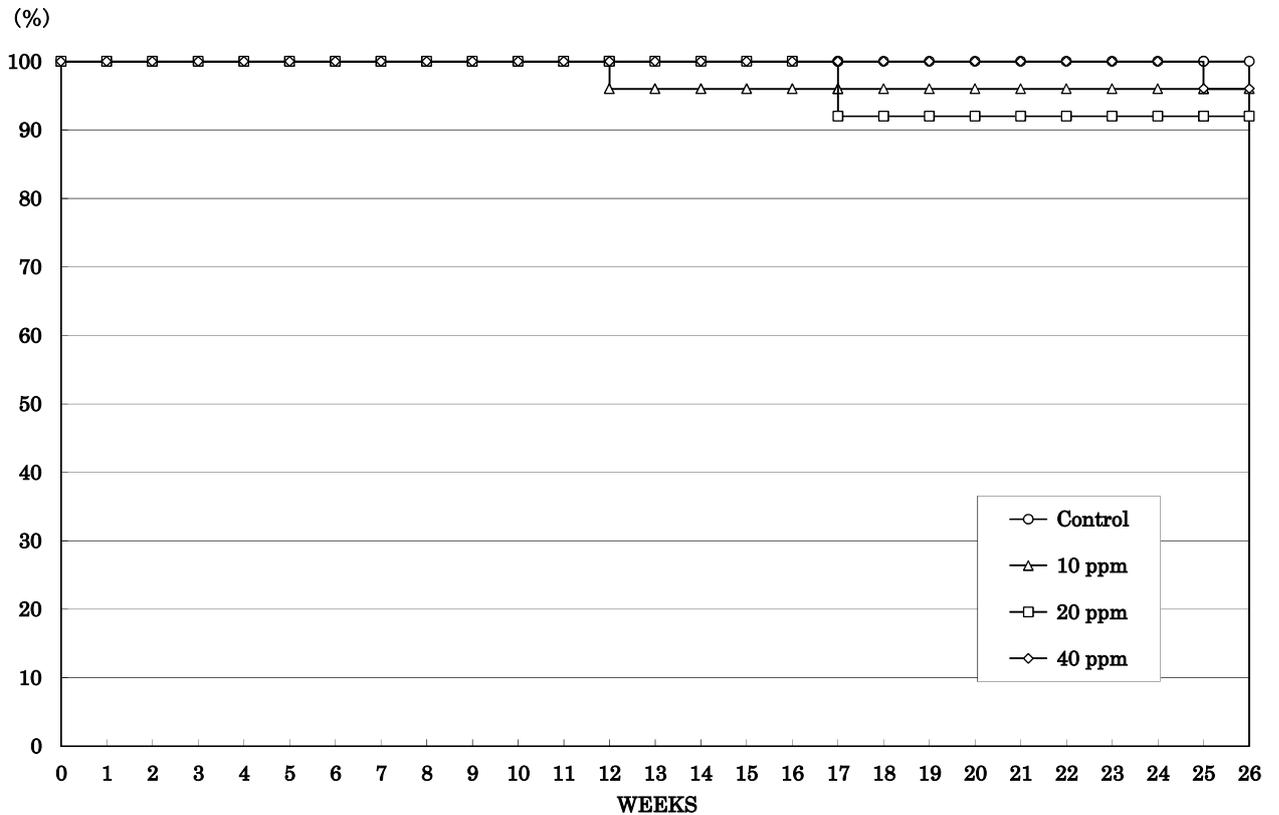
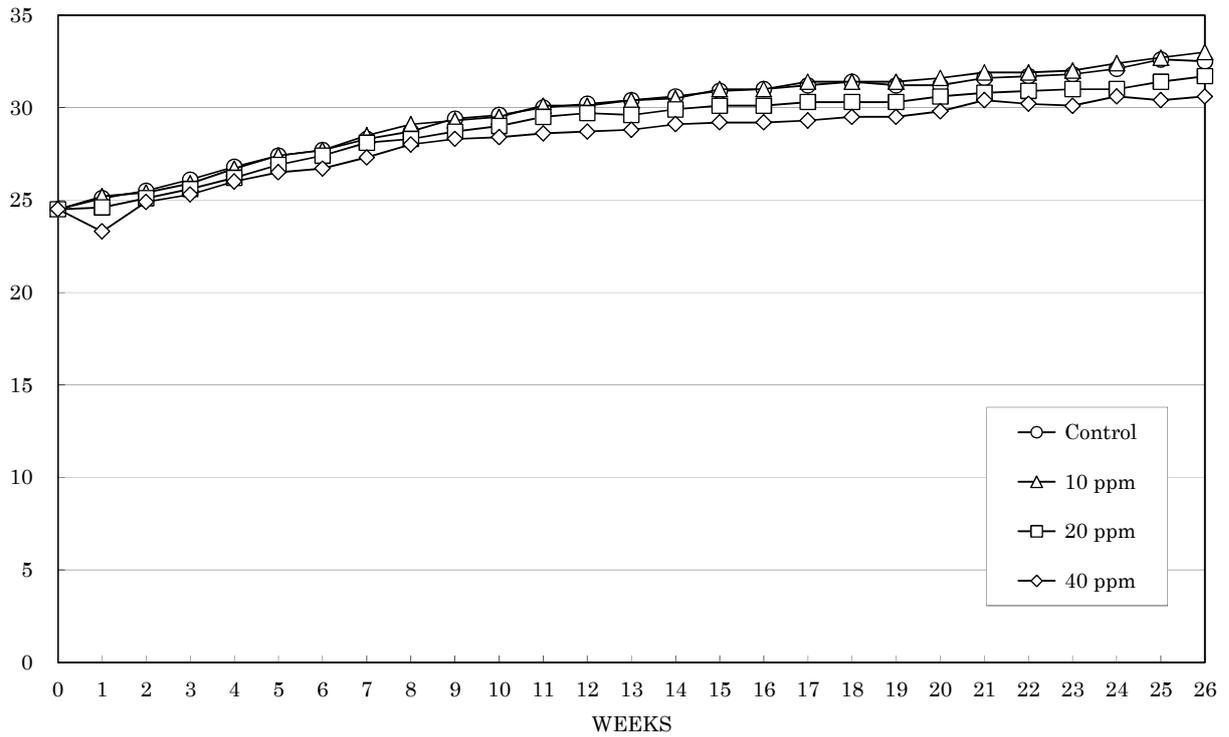


図1 二酸化窒素の rasH2 マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における生存率

(雄)

(g)



(雌)

(g)

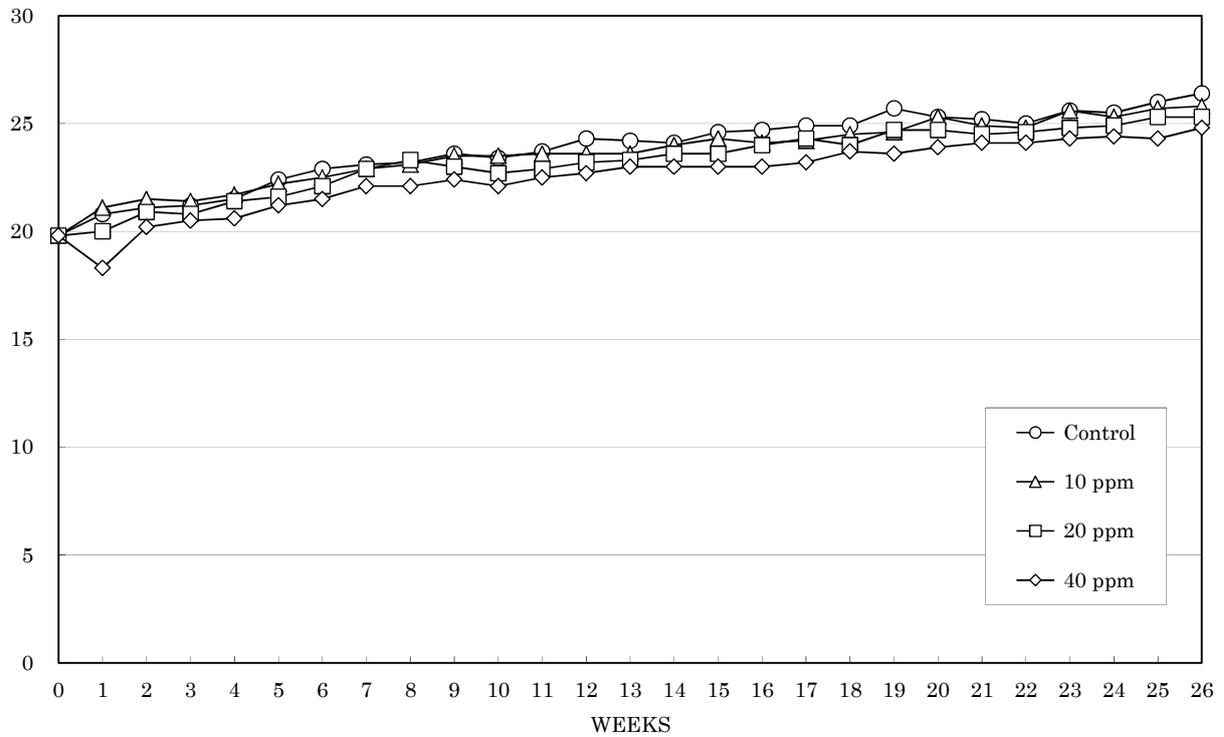
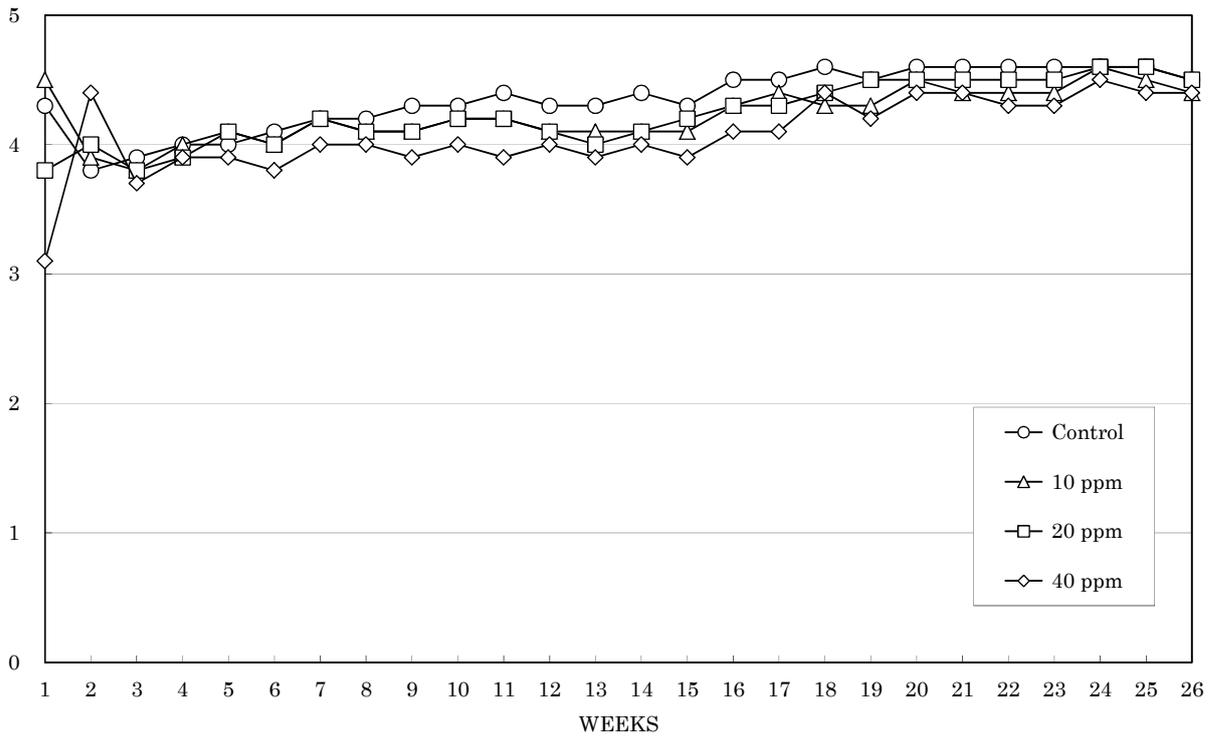


図2 二酸化窒素の rasH2 マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における体重推移

(雄)

(g)



(雌)

(g)

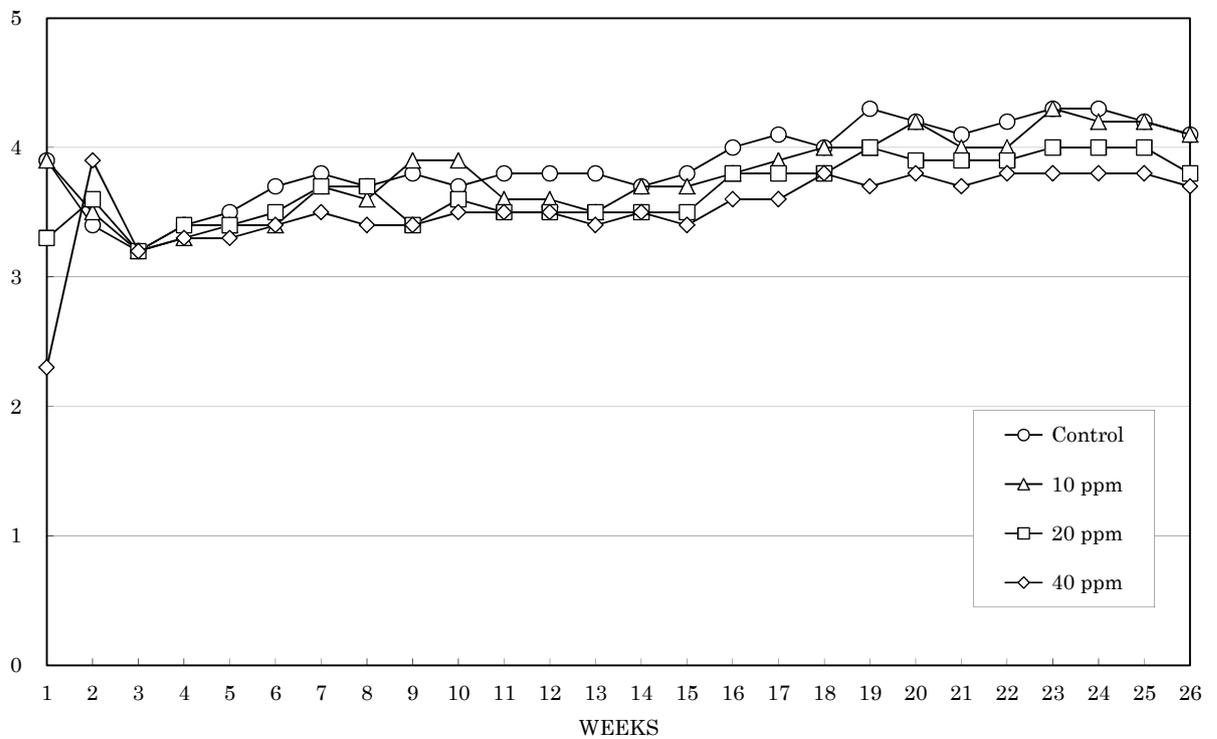


図3 二酸化窒素の rasH2 マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における摂餌量

文献

- 1) International Programme on Chemical Safety. 2013. ICSC: 0930. NITROGEN DIOXIDE. International Chemical Safety Cards
- 2) 経済産業省、一般化学物質等の製造・輸入数量（平成 29 年度実績）
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構、NITE 化学物質総合情報提供システム（NITE-CHRIP）
- 4) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2012. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Nitrogen dioxide.
- 5) Biggart NW, Rinehart RR (1987). Comparison between aqueous-phase and gas-phase exposure protocols for determining the mutagenic potential of nitrogen dioxide and the gas fraction of welding fumes. *Mutat Res* 188:175-184.
- 6) Tsuda H, Kushi A, Yoshida D, Goto F (1981). Chromosomal aberrations and sisterchromatid exchanges induced by gaseous nitrogen dioxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 89:303-309.
- 7) Görsdorf S, Appel KE, Engholm C, Obe G (1990). Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 11:37-41.
- 8) Gooch PC, Luippold HE, Creasia DA, Brewen HG (1977). Observations on mouse chromosomes following nitrogen dioxide inhalation. *Mutat Res* 48:117-120.
- 9) Victorin K, Busk L, Cederbeg H, Magnusson J, (1990). Genotoxic Activity of 1,3-butadiene and Nitrogen Dioxide and Their Photochemical Reaction Products in *Drosophila* and in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay. *Mutat Res* 228:203-209.
- 10) Inoue H, Fukunaga A, Okubo S, (1981). Mutagenic effects of nitrogen dioxide combined with methylurea and ethylurea in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 88:281-290.

- 11) 日本バイオアッセイ研究センター. 2019. 酸化チタン（ナノ粒子、アナターゼ型）の rasH2 マウスを用いた吸入による中期がん原性試験報告書.
- 12) 日本バイオアッセイ研究センター. 2019. 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報告書.
- 13) 日本バイオアッセイ研究センター. 2019. 2-ブロモプロパンの rasH2 マウスを用いた吸入による中期がん原性試験報告書.

参考 遺伝子改変動物を用いた中期がん原性試験の報告について
 (【経口】4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール、【吸入】二酸化窒素)
 令和2年3月

基本情報			遺伝子改変動物を用いたがん原性試験			
No.	物質名	CAS No.	rasH2マウス		P53koマウス	
			雄	雌	雄	雌
15	4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール	140-66-9	○	×	×	×
419	二酸化窒素	10102-44-0	△	×	△	×

試験結果凡例

- ◎ がん原性を示す明らかな証拠あり
- がん原性を示す(示唆する)証拠あり
- △ がん原性を示す不確実な証拠
- × がん原性を示す証拠なし