

塩化メチルのラット及びマウスを用いた
吸 入 に よ る がん原 性 試 験 報 告 書

試験番号：ラット/0210；マウス/0211

CAS N o. 74 - 87 - 3

平成9年6月27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

塩化メチルのラット及びマウスを用いた
吸入によるがん原性試験報告書

試験番号：ラット/0210；マウス/0211

本 文

本文目次

頁

要 約	1
I 試験材料	2
I - 1 被験物質の性状等	2
I - 1 - 1 名称と別名	2
I - 1 - 2 構造式、示性式、分子量	2
I - 1 - 3 物理化学的性状等	2
I - 2 被験物質の使用ロット等	3
I - 3 被験物質の特性・同一性・安定性	3
I - 3 - 1 特性	3
I - 3 - 1 同一性	3
I - 3 - 2 安定性	3
I - 4 試験動物	3
II 試験方法	4
II - 1 投与	4
II - 1 - 1 投与経路、投与方法及び投与期間	4
II - 1 - 2 投与濃度	4
II - 1 - 3 被験物質の発生方法と濃度調整	4
II - 1 - 4 被験物質濃度の測定	5
II - 2 動物管理	5
II - 2 - 1 各群の使用動物数	5
II - 2 - 2 群分け及び個体識別方法	5
II - 2 - 3 飼育条件	5
II - 3 観察・検査項目及び方法	6
II - 3 - 1 動物の一般状態の観察	6
II - 3 - 2 体重測定	6
II - 3 - 3 摂餌量測定	6
II - 3 - 4 血液学的検査	6
II - 3 - 5 血液生化学的検査	7
II - 3 - 6 尿検査	7
II - 3 - 7 病理学的検査	7
II - 4 数値処理と統計学的方法	8
II - 4 - 1 数値の取り扱いと表示	8
II - 4 - 2 母数の取り扱い	8
II - 4 - 3 統計方法	9
II - 5 試資料の保管	9

III 試験成績	10
III-1 ラットを用いた試験 (0210)	10
III-1-1 動物の状態観察	10
(1) 生死状況	10
(2) 一般状態	10
(3) 体重	10
(4) 摂餌量	11
III-1-2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	11
(1) 血液学的検査	11
(2) 血液生化学的検査	11
(3) 尿検査	11
III-1-3 病理学的検査	12
(1) 剖検	12
(2) 臓器重量	12
(3) 病理組織学的検査	12
(4) 死因	14
III-2 マウスを用いた試験 (0211)	15
III-2-1 動物の状態観察	15
(1) 生死状況	15
(2) 一般状態	16
(3) 体重	16
(4) 摂餌量	16
III-2-2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査	17
(1) 血液学的検査	17
(2) 血液生化学的検査	17
(3) 尿検査	17
III-2-3 病理学的検査	17
(1) 剖検	17
(2) 臓器重量	17
(3) 病理組織学的検査	18
(4) 死因	19
IV 考察及びまとめ	20
IV-1 ラット	20
IV-1-1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量	20
IV-1-2 腫瘍性病変	20
IV-1-3 非腫瘍性病変	21
IV-1-4 その他	21
IV-2 マウス	22
IV-2-1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量	22
IV-2-2 腫瘍性病変	22
IV-2-3 非腫瘍性病変	23

IV - 2 - 4 その他	23
V 結論	24
VI 文献	25

T A B L E S

TABLE 1 EXPERIMENTAL DESIGN AND MATERIALS AND METHODS
IN THE INHALATION STUDIES OF METHYL CHLORIDE

TABLE 2 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE RAT
(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 3 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE RAT
(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 4 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE IN CLINICAL OBSERVATION
:RAT:MALE

TABLE 5 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE IN CLINICAL OBSERVATION
:RAT:FEMALE

TABLE 6 FOOD CONSUMPTION IN MALE RAT(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 7 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE RAT(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 8 CAUSE OF DEATH:RAT

TABLE 9 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN MALE MOUSE
(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 10 SURVIVAL ANIMAL NUMBERS AND BODY WEIGHT CHANGES IN FEMALE MOUSE
(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 11 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE IN CLINICAL OBSERVATION
:MOUSE:MALE

TABLE 12 INCIDENCE AND TIME OF MASS OCCURRENCE IN CLINICAL OBSERVATION
:MOUSE:FEMALE

TABLE 13 FOOD CONSUMPTION IN MALE MOUSE(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 14 FOOD CONSUMPTION IN FEMALE MOUSE(TWO-YEAR STUDY)

TABLE 15 CAUSE OF DEATH:MOUSE

F I G U R E S

FIGURE 1 METHYL CHLORIDE GAS GENERATION SYSTEM AND INHALATION SYSTEM

FIGURE 2 SURVIVAL ANIMAL RATE:RAT:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 3 SURVIVAL ANIMAL RATE:RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 4 BODY WEIGHT CHANGES:RAT:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 5 BODY WEIGHT CHANGES:RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 6 FOOD CONSUMPTION:RAT:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 7 FOOD CONSUMPTION:RAT:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 8 SURVIVAL ANIMAL RATE:MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 9 SURVIVAL ANIMAL RATE:MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 10 BODY WEIGHT CHANGES:MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 11 BODY WEIGHT CHANGES:MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 12 FOOD CONSUMPTION:MOUSE:MALE(TWO-YEAR STUDY)

FIGURE 13 FOOD CONSUMPTION:MOUSE:FEMALE(TWO-YEAR STUDY)

P H O T O G R A P H S

PHOTOGRAPH 1 THYROID, FOLLICULAR ADENOMA
RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO.0210-1303

PHOTOGRAPH 2 THYROID, FOLLICULAR ADENOMA
RAT, MALE, 1000ppm, ANIMAL NO.0210-1303

PHOTOGRAPH 3 BRONCHIOLAR-ALVEOLAR ADENOMA
MOUSE, FEMALE, 200ppm, ANIMAL NO.0211-2221

PHOTOGRAPH 4 BRONCHIOLAR-ALVEOLAR ADENOMA
MOUSE, FEMALE, 200ppm, ANIMAL NO.0211-2221

APPENDICES

APPENDIX A 1 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX A 2 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX A 3 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX A 4 CLINICAL OBSERVATION (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX B 1 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX B 2 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX B 3 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX B 4 BODY WEIGHT CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX C 1 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX C 2 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX C 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX C 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX D 1 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX D 2 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX D 3 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX D 4 HEMATOLOGY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDICES (CONTINUED)

APPENDIX E 1 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX E 2 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX E 3 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX E 4 BIOCHEMISTRY (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX F 1 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX F 2 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX F 3 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX F 4 URINALYSIS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX G 1 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX G 2 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX G 3 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX G 4 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX G 5 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX G 6 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX G 7 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX G 8 GROSS FINDINGS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDICES (CONTINUED)

APPENDIX H 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:MALE

APPENDIX H 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
RAT:FEMALE

APPENDIX H 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:MALE

APPENDIX H 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), ABSOLUTE
MOUSE:FEMALE

APPENDIX I 1 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
RAT:MALE

APPENDIX I 2 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
RAT:FEMALE

APPENDIX I 3 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:MALE

APPENDIX I 4 ORGAN WEIGHT (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY), RELATIVE
MOUSE:FEMALE

APPENDIX J 1 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX J 2 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX J 3 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX J 4 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX J 5 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX J 6 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX J 7 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX J 8 HISTOLOGICAL FINDINGS:NON-NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDICES (CONTINUED)

APPENDIX K 1 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
RAT:MALE

APPENDIX K 2 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
RAT:FEMALE

APPENDIX K 3 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
MOUSE:MALE

APPENDIX K 4 NUMBER OF ANIMALS WITH TUMORS AND NUMBER OF TUMORS-TIME RELATED
MOUSE:FEMALE

APPENDIX L 1 HISTOLOGICAL FINDINGS:NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE

APPENDIX L 2 HISTOLOGICAL FINDINGS:NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE

APPENDIX L 3 HISTOLOGICAL FINDINGS:NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE

APPENDIX L 4 HISTOLOGICAL FINDINGS:NEOPLASTIC LESIONS (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE

APPENDIX M 1 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
RAT:MALE

APPENDIX M 2 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
RAT:FEMALE

APPENDIX M 3 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
(WITHOUT 800ppm GROUP)
MOUSE:MALE

APPENDIX M 4 NEOPLASTIC LESIONS-INCIDENCE AND STATISTICAL ANALYSIS
(WITHOUT 800ppm GROUP)
MOUSE:FEMALE

APPENDICES (CONTINUED)

APPENDIX N 1 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX N 2 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX N 3 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX N 4 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
RAT:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX N 5 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX N 6 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:DEAD AND MORIBUND ANIMALS

APPENDIX N 7 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:MALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX N 8 HISTOLOGICAL FINDINGS:METASTASIS OF TUMOR (TWO-YEAR STUDY:SUMMARY)
MOUSE:FEMALE:SACRIFICED ANIMALS

APPENDIX O 1 CHARACTERIZATION OF METHYL CHLORIDE (TWO-YEAR STUDIES)

APPENDIX O 2 IDENTITY OF METHYL CHLORIDE (TWO-YEAR STUDIES)

APPENDIX O 3 STABILITY OF METHYL CHLORIDE (TWO-YEAR STUDIES)

APPENDIX P 1 CONCENTRATION OF METHYL CHLORIDE IN INHALATION CHAMBER
(TWO-YEAR STUDIES)

APPENDIX P 2 ENVIRONMENT OF INHALATION CHAMBER
(TWO-YEAR STUDIES)

APPENDIX Q 1 METHODS FOR HEMATOLOGY,BIOCHEMISTRY AND URINALYSIS

APPENDIX Q 2 UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

要 約

塩化メチルのがん原性を検索する目的でラットとマウスを用いた吸入による2年間(104週間)の試験を実施した。

試験にはF344/DuCrj(Fischer)ラットとCrj:BDF₁マウスを用い、それぞれ被験物質投与群3群と対照群1群の計4群の構成で各群雌雄各50匹(合計ラット400匹、マウス400匹)を使用した。投与は塩化メチルを1日6時間、1週5日間で、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度はラットの雌雄ともに50ppm、224ppm、1000ppm、マウスは雌雄ともに50ppm、200ppm、800ppmとした。また、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、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

投与の結果、ラットでは雄の甲状腺の濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生の増加が認められ、被験物質の影響を否定できなかった。非腫瘍性病変としては、雄に肝臓の明細胞性小増殖巣と前立腺の炎症の発生減少(1000ppm群)、雌に慢性腎症の程度の減弱(1000ppm群)がみられた。

マウスでは、雌の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生増加が認められ、被験物質の影響を否定できなかった。なお、雌雄の800ppm群では投与期間前期より動物が死亡し生存数が著しく減少したため、投与期間の95週でこの群の全例を解剖した。また、この群には著しい体重増加の抑制、投与期間後期には立毛、強度の振戦がみられた。しかし、病理組織学的には死因となる特徴的な変化は認められなかった。

以上のように、塩化メチルの投与によりF344/DuCrj(Fischer)ラットでは雄の甲状腺の濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生、Crj:BDF₁マウスでは雌の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生の増加が認められた。しかし、ラットでは濾胞状腺腫と濾胞状腺癌のそれぞれの腫瘍単独での増加は認められず、マウスでは悪性の肺腫瘍の増加は認められなかった。また、ラット、マウスともその他の臓器、器官には腫瘍の発生増加はなく、本試験で観察されたラットの甲状腺とマウスの肺における腫瘍発生の増加は、塩化メチルのがん原性を証明するための証拠としては不十分であった。

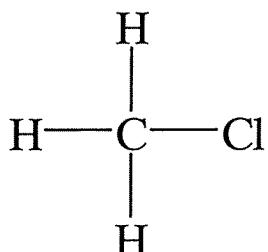
I 試験材料

I - 1 被験物質の性状等

I - 1 - 1 名称と別名

名 称 : 塩化メチル (Methyl chloride)
 別 名 : Chloromethyl
 Monochloromethane
 CAS No. : 74-87-3

I - 1 - 2 構造式、示性式、分子量



C H₃ C l (分子量 : 50.49)

I - 1 - 3 物理化学的性状等

性 状 : 無色透明のガス体、高濃度において甘みのあるクロロホルム様の臭気
 沸 点 : -23.73°C
 融 点 : -97.70°C
 比 重 : 0.920 (20/4°C)
 蒸 気 圧 : 10 mmHg (-92.4°C)
 溶 解 性 : 水には難溶、アルコール、クロロホルム、ベンゼンに易溶
 保 存 条 件 : 室温、遮光条件下で気密容器に保存

I - 2 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : P91031 (1992年10月22日～1992年11月2日)

83610 (1992年11月2日～1992年11月25日)

90388-01 (1992年11月25日～1993年12月8日)

93344 (1993年12月8日～1994年11月10日)

製造元 : 和光純薬工業株式会社

グレード : 特級

純度 : 99.0%以上

I - 3 被験物質の同一性・安定性

I - 3 - 1 特性

被験物質の特性は試験開始前に、ガスクロマトグラフ分析の実施、及び赤外吸収スペクトルの測定をすることにより確認した。なお、それらの結果について、APPENDIX 0 1に示した。

I - 3 - 2 同一性

被験物質の同一性は、ロットごとにマススペクトル及び赤外吸収スペクトルを測定し、マススペクトルによる分子量は計算値、赤外吸収スペクトルは文献値(文献1)と比較することにより確認した。なお、それらの結果について、APPENDIX 0 2に示した。

I - 3 - 3 安定性

被験物質の安定性は、ロットごとに使用開始前及び使用終了後にガスクロマトグラフ分析を実施し、それぞれのデータを比較することにより確認した。なお、それらの結果については、APPENDIX 0 3に示した。

I - 4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)のF344/DuCrj(Fischer)ラット(SPF)及びCrj:BDFlマウス(SPF)の雌雄を使用した。

ラット、マウスとも雌雄各248匹を生後4週齢で導入し、各1週間の検疫、馴化を経た後、発育順調で一般状態の観察所見に異常を認めなかった動物

から、体重値の中央値に近い雌雄各200匹(投与開始時体重範囲、ラット雄:110~126g、雌:90~102g/マウス雄:17.4~24.4g、雌:17.4~20.4g)を選別し、試験に供した。

II 試験方法

試験計画、材料及び方法等の概要を TABLE 1 に示した。

II - 1 投与

II - 1 - 1 投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。すなわち吸入チャンバー内に設定濃度に調整した塩化メチルを送り込み、試験動物に全身暴露することにより投与した。投与期間は104週間とし、1日6時間、1週5日間(祝祭日を除く)、暴露を行った。なお、対照群の動物には新鮮空気のみを暴露した。ただし、マウスの800ppm群についてはその理由は後述するが(III-2に記載)、95週の7日目に生存していた全動物を解剖(平成6年9月9日実施)したため、95週の6日目で暴露を中止した。

投与期間中の総暴露回数は以下の通りである。

ラット(試験番号:0210):104週間/488回

マウス(試験番号:0211):104週間/488回、800ppm群:95週間/447回

II - 1 - 2 投与濃度

投与濃度はラットの雌雄とも50ppm、224ppm、1000ppm、マウスでは雌雄とも50ppm、200ppm、800ppmと設定した。

II - 1 - 3 被験物質の発生方法と濃度調整

発生方法は FIGURE 1 に示す通り、フローメーターを用い塩化メチル純ガスを浄化圧縮空気で希釈し、一定濃度の塩化メチルガスを作製後、各投与群の吸入チャンバーの給気ラインにあるラインミキサーの上流側に供給した。この供給流量はフローメーターにより監視し、各吸入チャンバーの設定濃度になるように流量を調整した。各吸入チャンバーの被験物質濃度はガスクロマトグラフにより測定した。

II - 1 - 4 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の塩化メチルの濃度は自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフを用い、暴露開始前から暴露終了後まで15分毎に測定した。APPENDIX P 1に測定結果を示した。

各試験とも投与濃度の平均値は設定濃度を満足する結果を示した。なお、各投与群における被験物質濃度の測定結果(平均値±標準偏差)は、ラットでは50ppm群:50.1±0.6ppm、224ppm群:222.8±2.3ppm、1000ppm群:999.0±11.3ppmであり、マウスでは50ppm群:49.9±0.5ppm、200ppm群:200.3±2.6ppm、800ppm群:800.3±16.0ppmであった。

II - 2 動物管理

II - 2 - 1 各群の使用動物数

ラット及びマウスとも投与群3群及び対照群1群の計4群を設け、各群雌雄各50匹の動物を用いた。

II - 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、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2)。

試験期間中の動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間においては色素塗布し、またケージにも個体識別番号を付けた。投与期間においては耳バンチにより識別し、またケージにも個体識別番号を付した。

なお、ラットとマウスはバリア区域内の独立した室にそれぞれ収容し、各室に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他の試験及び異種動物と区別した。

II - 2 - 3 飼育条件

馴化期間及び投与期間中は、動物を吸入チャンバー内で飼育した。吸入チャンバー内の環境条件を TABLE 1 に、その計測結果を APPENDIX P 2 にそれぞれ示した。また、検疫室(検疫期間)及び吸入チャンバー室(馴化期間及び投与期間)の室内環境条件は、温度23±2°C、湿度55±10%、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/時であった。

また、検疫期間中のラットは1ケージ当たり5匹の群飼(ステンレス製網ケージ、340W×294D×176H mm)、マウスは1ケージ当たり1匹の単飼(ステンレス製網ケージ、112W×212D×120H mm)、馴化期間中はラット、マウスとも1ケージ当たり1匹の単飼(ステンレス製六連ケージ、ラット:125W×216D×176H mm、マウス:95W×116D×120H mm)、投与期間中はラット、マウスとも1ケージ当たり1匹の単飼(ステンレス製五連ケージ、ラット:150W×216D×176H mm、マウス:100W×116D×120H mm)で飼育した。なお、ケージは2週間毎に交換した。

飼料はオリエンタル酵母工業(株)のCRF-1固型飼料(3Mrad=30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を全飼育期間を通して固型飼料給餌器により自由摂取させた。

飲水は全飼育期間を通して市水(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、飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)の自社分析データを、夾雑物については(財)日本食品分析センターの分析データを使用ロットごとに入手し、また飲水については(財)食品薬品安全センターの分析データを3ヶ月に1回入手し、それぞれ異常のないことを確認した。

II - 3 観察・検査項目及び方法

II - 3 - 1 動物の一般状態の観察

毎日1回、動物の一般状態の観察を行った。

II - 3 - 2 体重測定

投与開始後14週までは週1回、それ以降は4週に1回、体重を測定した。なお、動物の死亡発見時及び切迫屠殺時にも体重を測定した。

II - 3 - 3 摂餌量測定

投与開始後14週までは週1回、それ以降は4週に1回、摂餌量を個体別に測定した。

II - 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりEDTA-2K入り採血管に採血した血液を用いて血液学的検査を行つ

た。なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食(18時間以上)させた。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX Q 1 に示した。

II - 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時まで生存した動物について、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血液生化学的検査を行った。なお、検査対象動物は解剖日前日より絶食(18時間以上)させた。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX Q 1 に示した。

II - 3 - 6 尿検査

投与最終週まで生存した動物について、新鮮尿を採取し尿検査を行った。

検査項目は TABLE 1、検査方法は APPENDIX Q 1 に示した。

II - 3 - 7 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について TABLE 1 に示した臓器の実重量を測定した。また、実重量の体重比、すなわち定期解剖時の体重に対する百分率を算出した。

(3) 病理組織学的検査

全動物の臓器を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて固定後、TABLE 1 に示した臓器及び肉眼的に変化がみられた組織を、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的に検査した。

II - 4 数値処理と統計学的方法

II - 4 - 1 数値の取り扱いと表示

チャンバー内被験物質濃度についてはppmを単位とし、小数点以下4位までを測定し、小数点以下2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

体重についてはgを単位とし、小数点以下第1位まで計測し、ラットでは小数点以下第1位を四捨五入して整数値で表示し、マウスではそのまま小数点以下第1位まで表示した。

摂餌量についてはgを単位とし、計測期間を通しての摂餌量を小数点以下第1位まで計測し、この値を計測期間の日数で除し、1日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

臓器実重量についてはgを単位とし、小数点以下第3位まで計測し、表示した。臓器重量体重比については臓器実重量値を解剖時体重で除し、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、血液生化学的検査についてはAPPENDIX Q 2に示した精度により表示した。A/G比はアルブミン/(総蛋白ーアルブミン)による計算で求め、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。

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

II - 4 - 2 母数の取り扱い

体重及び摂餌量については、各計測時に生存している全動物を対象に計測し、欠測となつたデータについては母数より除いた。

臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査は、定期解剖時まで生存した動物を対象とし、欠測となつたデータについては母数より除いた。

尿検査は、投与最終週まで生存した動物を対象を行い、検査数を母数とした。

剖検と病理組織学的検査データは、各群の有効動物数(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)を母数とした。ただし、腫瘍性病変については臓器別に、検査不能臓器をもつ動物数を除いたものを母数とした。

II - 4 - 3 統計方法

病理組織学的検査及び尿検査以外の本試験で得られた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。予備検定については5%の有意水準で両側検定を行い、最終検定では5%及び1%で両側検定を行った。

尿検査については χ^2 検定を行った。

また、病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかつた動物をグレード0として χ^2 検定を行つた。腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群ごとの総担癌臓器数について、Peto検定(文献3)、Cochran-Armitage検定、Fisher検定を行つた。またPeto検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテックス(注)を用いて死亡率法(コンテックス3,4を付与された腫瘍についての検定)、有病率法(コンテックス0, 1, 2を付与された腫瘍についての検定)、死亡率法+有病率法(コンテックス0~4の総計で検定)を行つた。

χ^2 検定とFisher検定は対照群と各投与群間の検定を行つた。

各群雌雄ごとに検査数が2以下の項目については検定より除外した。

(注) Peto検定に用いるコンテックス

- 0 : 定期解剖例にみつかった腫瘍
- 1 : 死亡/瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍
- 2 : 多分1だと思うが、確かでない腫瘍
- 3 : 多分4だと思うが、確かでない腫瘍
- 4 : 死亡/瀕死例にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

II - 5 試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、その他本試験に係る資料は試資料保管施設に保管する。保管期間は最終報告書提出後10年間とする。

III 試験成績

III-1 ラットを用いた試験

III-1-1 動物の状態観察

(1) 生死状況

投与期間中における群別の生存状況を TABLE 2,3 及び FIGURE 2,3 に示した。

最終計測週(104週)における生存数(生存率)は、対照群に比べ雄の224 ppm群がやや低値、雌の224 ppm群がやや高値であった。各群の生存数(生存率)は、雄の対照群:42/50例(84%)、50 ppm群:41/50例(82%)、224 ppm群:36/50例(72%)、1000 ppm群:41/50例(82%)、雌の対照群:37/49例(75.5%)、50 ppm群:37/50例(74%)、224 ppm群:45/50例(90%)、1000 ppm群:41/50例(82%)であった。

なお、雌の対照群で1例が事故により死亡した。

(2) 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 1,2 に、内部腫瘍、外部腫瘍の発生動物数を TABLE 4,5 に示した。

一般状態では、被験物質の投与によると思われる特徴的な所見は認められなかった。

全動物(死亡/瀕死及び生存動物)における各投与群の内部腫瘍の発生は、雄の224 ppm以上の群で対照群と比較して多かった。雌では差はみられなかった。また、外部腫瘍の発生では、雌の224 ppm群は対照群と比較してやや多く、雄の1000 ppm群では発生例が少なかった。

(3) 体重

投与期間中における群別の体重推移を TABLE 2,3、FIGURE 4,5 及び APPENDIX B 1,2 に示した。

雄の50 ppm群で9週と10週に高値を示したが、その後は対照群と同様に推移した。

雌雄の1000 ppm群は投与期間を通じて対照群に比較して低値を示し、体重増加の抑制が認められた。

その他の群では、対照群と比較して顕著な差は認められなかった。

(4) 摂餌量

投与期間中における群別の摂餌量(1日1匹当たりの摂餌量)を TABLE 6,7、FIGURE 6,7 及び APPENDIX C 1,2 に示した。

雄では 50 ppm 群及び 224 ppm 群で散発的に摂餌量の低値あるいは高値がみられたが、概ね対照群と同様な値であった。雄の 1000 ppm 群は投与開始より 13 週まで連続して、その後はしばしば摂餌量の低値がみられた。

雌では、50 ppm 群で 2 週から 5 週にかけて摂餌量の低値がみられたが、その後は対照群と同様な値であった。224 ppm 群では投与期間の前期(1~7 週)、中期(22~62 週)及び後期(98~104 週)にしばしば摂餌量の低値がみられた。1000 ppm 群では投与開始より 7 週まで、及び 50 週から 104 週まで連続して摂餌量の低値がみられた。

III - 1 - 2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

(1) 血液学的検査

定期解剖時に行った血液学的検査の結果を APPENDIX D 1,2 に示した。

雄では、1000 ppm 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、MCHC、リンパ球比の増加、血小板数、分葉核好中球比の減少が認められた。

雌では、1000 ppm 群でリンパ球比の増加及び分葉核好中球比の減少が認められた。

(2) 血液生化学的検査

定期解剖時に行った血液生化学的検査の結果を APPENDIX E 1,2 に示した。

雄では、1000 ppm 群でアルブミン、A/G 比の増加、GPT 活性の上昇、尿素窒素、クレアチニンの減少が認められた。

雌では、1000 ppm 群で CPK 活性の低下が認められた。

その他、雄で ALP 活性の低下がみられたが、投与濃度に対応したものではなかった。

(3) 尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果を APPENDIX F 1,2 に示した。

雄の224ppm以上の群で尿pHの低下が認められた。

雌の1000ppm群で蛋白の陽性度の減少が認められた。

III - 1 - 3 病理学的検査

(1) 剖検

解剖時に観察された剖検所見をAPPENDIX G 1~4に示した。

雌雄ともに投与群に特徴的な所見あるいは対照群と比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

(2) 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比をAPPENDIX H 1,2、I 1,2に示した。

雄では、1000ppm群に脾臓の実重量の高値が認められた。また副腎、心臓、腎臓、肝臓及び脳の実重量の低値、ならびに心臓、肺、腎臓、脳の体重比の高値が認められたが、これらの変化は体重増加の抑制に伴った変化と考えられた。

雌では、1000ppm群に腎臓、肝臓及び脳の実重量の低値、ならびに卵巣、心臓、肺、腎臓及び脳の体重比の高値が認められたが、これらの変化は体重増加の抑制に伴った変化と考えられる。

(3) 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果をAPPENDIX J 1~4に示した。腫瘍性病変の結果はAPPENDIX K 1,2に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX L 1,2に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX M 1,2に統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)、APPENDIX N 1~4に転移性病変について示した。

- 主な腫瘍性病変 -

<甲状腺>

雄の濾胞状腺腫(対照群:1/50例, 50ppm群:1/50例, 224ppm群:1/50例, 1000ppm群:3/50例)、及び濾胞状腺癌(対照群:2/50例, 50ppm群:0/50例, 224ppm群:2/50例, 1000ppm群:3/50例)の発生は統計学的に増加傾向を示さなかつたが、これらの腫瘍を合わせた発生(対照群:3/50例, 50ppm群:1/50例, 224ppm群:3/50例, 1000ppm群:6/50例)はPeto検定(有病率法)で増加傾

向を認めた。

－ その他の腫瘍性病変－

下記の腫瘍性病変の発生は統計学的に対照群と投与群の間に有意な差、あるいは投与群で増加、または減少傾向が示されたが、被験物質の投与による影響とは考えられなかつた。

< 肺 >

雄の細気管支－肺胞上皮腺腫の発生(対照群:0/50例, 50ppm群:1/50例, 224ppm群:3/50例, 1000ppm群:4/50例)がPeto検定(有病率法)で増加傾向を示した。しかし、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(対照群:1/50例, 50ppm群:1/50例, 224ppm群:3/50例, 1000ppm群:4/50例)では増加傾向が認められず、被験物質の投与による影響とは考えられなかつた。

雌の細気管支－肺胞上皮腺腫(対照群:5/49例, 50ppm群:0/50例, 224ppm群:0/50例, 1000ppm群:2/50例)はFisher検定で50ppm群と224ppm群で対照群と比較して発生の抑制が認められた。また、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(対照群:5/49例, 50ppm群:1/50例, 224ppm群:0/50例, 1000ppm群:2/50例)でもFisher検定で224ppm群に対照群と比較して発生の抑制が認められた。しかし、1000ppm群には対照群との間に有意な差は認められないことから被験物質の投与による影響とは考えられなかつた。

< 子宮 >

雌の子宮内膜間質性ポリープの発生(対照群:3/49例, 50ppm群:9/50例, 224ppm群:5/50例, 1000ppm群:11/50例)はPeto検定(有病率法, 死亡率法+有病率法)で増加傾向を示し、Fisher検定で1000ppm群に対照群と比較して発生の増加が認められた。しかし、この腫瘍の発生率は各投与群ともヒストリカルコントロールデータ(文献4)の試験単位での発生率の上限(子宮内膜間質性ポリープ、平均:14.7%、試験単位での発生率:2~28%)を越えていない。また、子宮内膜間質性ポリープと子宮内膜間質性肉腫を合わせた発生(対照群:3/49例, 50ppm群:9/50例, 224ppm群:6/50例, 1000ppm群:12/50例)はPeto検定(有病率法, 死亡率法+有病率法)、Cochran-Armitage検定で増加傾向を示し、Fisher検定で1000ppm群に対照群と比較して発生の増加が認められた。しかし、子宮内膜間質性肉腫の発生(対照群:0/49例, 50ppm群:0/50例, 224ppm群:1/50例, 1000ppm群:1/50例)は統計学的に増加傾向を示さず、1000ppm群の子宮内膜間質性ポリープと子宮内膜間質性肉腫を合わせた発生率(24.0%)は当センターで行われた試験における最高発生率

の上限(28.0%)を越えていないことから、この腫瘍の発生は被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

— 非腫瘍性病変 —

主な非腫瘍性病変を以下に示す。

雄の1000ppm群の定期解剖例に肝臓の明細胞性小増殖巣と前立腺の炎症、及び鼻腔の異物性鼻炎の発生減少が認められた。

雌の1000ppm群の定期解剖例に慢性腎症の程度の減弱が認められた。

— その他の非腫瘍性病変 —

下記の非腫瘍性病変の発生は統計学的に対照群と投与群の間に有意な差が示されたが、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

雄の1000ppm群の死亡、瀕死例に心臓の心筋線維症の発生減少がみられた。しかし、定期解剖例では有意差が認められないことから被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

雌の224ppm群の死亡、瀕死例に脾臓の髓外造血亢進の増加が認められたが、投与濃度に対応した変化ではなく、被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

(4) 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 8 に示した。

雌雄とも各投与群と対照群の間に顕著な差を認めなかった。

III - 2 マウスを用いた試験

雌雄の800ppm群は、投与期間前期から動物の死亡及び瀕死が断続的にみられ、生存動物数が著しく減少した。そこで、800ppm群は雄の生存数が12匹(生存率:25.0%)、雌の生存数が13匹(生存率:26.5%)となった95週の時点で、下記の理由により、生存していた全動物を解剖(平成6年9月9日実施)した。

- ・生存動物数が少なく、また生存動物は体重増加の抑制が著しく、立毛、強度の振戦が多くにみられ、投与を継続した場合、105週の定期解剖時まで動物が生存する可能性が少ない。
- ・上記のような所見がみられるものの、死亡時期の判断がはなはだ困難であり、特に雌では瀕死状態での解剖動物が2/37例しかなく、死亡動物における死後変化のおきた臓器での病理組織学的検査では死因の特定が難しい。

なお、病理組織学的検査(腫瘍性病変)では800ppm群の定期解剖日が他の群と異なるため、同群を統計解析の対象から除外した。

その他の群は雌雄とも予定どおり104週間投与し、105週目に解剖した。

III - 2 - 1 動物の状態観察

(1) 生死状況

投与期間中における群別の生存状況を TABLE 9,10 及び FIGURE 8,9 に示した。

最終計測週(104週)における雌雄の50ppm群と200ppm群での生存数(生存率)は、対照群と大きな差はみられなかった。各群の生存数(生存率)は、雄の対照群:38/50例(76%)、50ppm群:42/50例(84%)、200ppm群:41/50例(82%)、雌の対照群:35/50例(70%)、50ppm群:35/50例(70%)、200ppm群:34/49例(69.4%)であった。

95週で解剖した雌雄の800ppm群は、投与期間の前期(雄:13週、雌:21週)より断続的に動物の死亡及び瀕死がみられ、生存数が著しく減少した。95週の時点での生存数(生存率)は、雄の対照群:40/50(80%)に対して800ppm群:12/48(25%)、雌の対照群:41/50(82%)に対して800ppm群:13/49(26.5%)であった。

なお、雄の800ppm群で2例、雌の200ppm群と800ppm群でそれぞれ1例が事故により死亡した。

(2) 一般状態

一般状態の観察結果を APPENDIX A 3,4 に、内部腫瘍、外部腫瘍の発生動物数を TABLE 11,12 に示した。

一般状態では、雌雄の 50 ppm 群と 200 ppm 群は被験物質の投与によると思われる特徴的な所見は認められなかった。雌雄の 800 ppm 群では投与期間の前期から動物の死亡がみられたが、これらの動物には体重増加の抑制はみられるものの一般状態では特記すべき所見はみられず、雄では 13 週から 76 週までに 10 例、雌では 21 週から 89 週までに 20 例の動物が一般状態に変化がみられずに死亡した(雌 1 例は外部腫瘍が観察され 64 週に死亡)。しかし、投与期間後期には多くの動物に立毛と強度の振戦が観察され、雄では 70 週から 95 週までに 26 例、雌では 84 週から 95 週までに 15 例の動物がそれらの症状のまま死亡あるいは瀕死に至った。また、95 週の解剖時に生存していた動物のほぼ全例に立毛、振戦がみられた。

全動物(死亡及び生存動物)における各投与群の内部腫瘍及び外部腫瘍の発生状況は、雌雄ともに対照群と比較して大きな変化はみられなかった。

(3) 体重

投与期間中における群別の体重推移を TABLE 9,10、FIGURE 10,11 及び APPENDIX B 3,4 に示した。

雌雄の 50 ppm 群では、対照群と比較して差はみられなかった。200 ppm 群では 22 週以降、雌は 26 週以降、それぞれ対照群と比較して低値を示した。

雌雄の 800 ppm 群は、投与期間を通じて体重増加の抑制が著しく、95 週時点での体重は対照群に対して、雄:48.3%(24.7g)、雌:66.3%(24.2g) であった。

(4) 摂餌量

投与期間中における群別の摂餌量(1 日 1 匹当たりの摂餌量)を TABLE 13, 14、FIGURE 12,13 及び APPENDIX C 3,4 に示した。

雄の 50 ppm 群及び 200 ppm 群では散発的に摂餌量の低値あるいは高値がみられたが、概ね対照群と同様な値であった。雄の 800 ppm 群は投与開始週より 42 週まで断続的に摂餌量の高値がみられ、その後、70 週から 94 週までは(95 週で解剖)連続して摂餌量の低値がみられた。

雌では 50 ppm 群及び 200 ppm 群で散発的に摂餌量の低値あるいは高値がみられたが、ほぼ対照群と同様な値であった。雌の 800 ppm 群は 2 週から 35 週まで

断続的に摂餌量の高値がみられたが、その後は(95週で解剖)対照群とほぼ同様な値であった。

III - 2 - 2 血液学的検査・血液生化学的検査・尿検査

雌雄の800ppm群について各検査は実施したが、同時期に比較する対照群のデータが存在しないため評価から除外した。

(1) 血液学的検査

定期解剖時に行った血液学的検査の結果を APPENDIX D 3,4 に示した。

雌雄とも特記すべき変化は認められなかった。

(2) 血液生化学的検査

定期解剖時に行った血液生化学的検査の結果を APPENDIX E 3,4 に示した。

雄では、200ppm群でカリウムの増加が認められた。

雌では、50、200ppm群でA/G比の増加が認められた。

その他、雌でLDHに変化がみられたが、投与濃度に対応したものではなかった。

(3) 尿検査

投与期間最終週に行った尿検査の結果を APPENDIX F 3,4 に示した。

雄の200ppm群で尿pHの上昇が認められた。

III - 2 - 3 病理学的検査

(1) 剖検

解剖時に観察された剖検所見を APPENDIX G 5~8 に示した。

雌雄ともに投与群に特徴的な所見あるいは対照群と比較して顕著に高い発生を示した所見は認められなかった。

(2) 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を APPENDIX H 3, 4、

I 3, 4に示した。なお、雌雄の800ppm群について各臓器の重量は測定したが、同時期に比較する対照群のデータが存在しないため評価から除外した。

雄では各投与群と対照群の間に有意な差を認めなかつた。

雌では200ppm群に脾臓の実重量と体重比の低値が認められた。また、肺、腎臓及び脳の体重比の高値を認めたが、これらの変化は体重増加の抑制に伴つた変化と考えられる。

(3) 病理組織学的検査

非腫瘍性病変の結果をAPPENDIX J 5~8に示した。腫瘍性病変の結果はAPPENDIX K 3, 4に担腫瘍動物数と腫瘍数、APPENDIX L 3, 4に腫瘍の種類別の発生数、APPENDIX M 3, 4に統計解析(Peto検定、Cochran-Armitage検定、Fisher検定)、APPENDIX N 5~8に転移性病変について示した。なお800ppm群は他の群と解剖時期が異なるため、統計解析の対象から除外した。

－ 主な腫瘍性病変 －

<肺>

雌の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生(対照群:4/50例, 50ppm群:3/50例, 200ppm群:9/49例)が、Peto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。また、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(対照群:4/50例, 50ppm群:4/50例, 200ppm群:10/49例)も、Peto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。

－ その他の腫瘍性病変 －

下記の腫瘍性病変の発生は統計学的に対照群と投与群の間に有意な差、あるいは投与群で増加、または減少傾向が示されたが、被験物質の投与による影響とは考えられなかつた。

<肝臓>

雌の肝細胞腺腫の発生(対照群:2/50例, 50ppm群:5/50例, 200ppm群:7/49例)は、Peto検定(有病率法)で増加傾向が認められた。しかし、肝細胞腺腫と肝細胞癌を合わせた発生(対照群:6/50例, 50ppm群:8/50例, 200ppm群:7/49例)では増加傾向が認められず、被験物質の投与による影響とは考えられなかつた。

— 非腫瘍性病変 —

雌の50ppm群の死亡、瀕死例で脳の鉱質沈着の減少が認められたが、投与濃度に対応した変化ではなく、被験物質の投与による影響とは考えられなかつた。

(4) 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因を TABLE 15 に示した。

雌雄とも各投与群と対照群の間に顕著な差を認めなかつた。なお、800 ppm群については前述したとおり95週目に生存していた全動物を解剖したが、95週解剖動物及びそれ以前の死亡、瀕死動物とも、病理検査では死因となる顕著な変化は認められなかつた。

IV 考察及びまとめ

IV-1 ラット

IV-1-1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量

最終計測週(104週)における生死状況では、対照群に比べ雄の224ppm群の生存率がやや低値、雌の224ppm群の生存率がやや高値であったが、各投与群とも対照群と大きな差はなく、被験物質の影響と考えられる特徴的な死因も認められなかった。また一般状態の観察でも被験物質の投与によると思われる特徴的な所見はみられなかった。

体重では、雌雄の1000ppm群で投与期間を通じて体重増加の抑制がみられた。その他の群では、対照群と比較して大きな差はみられなかった。

摂餌量では、雌の224ppm群と雌雄の1000ppm群で摂餌量の低値が多くの期間でみられ、雌雄の1000ppm群の体重増加の抑制は、投与期間中の摂餌量の低値によるものと考えられたが、雌の224ppm群の体重値と摂餌量の関係は不明だった。

IV-1-2 腫瘍性病変

雄の甲状腺の濾胞状腺腫(対照群:1/50例, 50ppm群:1/50例, 224ppm群:1/50例, 1000ppm群:3/50例)及び濾胞状腺癌(対照群:2/50例, 50ppm群:0/50例, 224ppm群:2/50例, 1000ppm群:3/50例)の発生は統計学的に増加傾向を示さなかったが、これらの腫瘍を合わせた発生(対照群:3/50例, 50ppm群:1/50例, 224ppm群:3/50例, 1000ppm群:6/50例)はPeto検定(有病率法)で増加傾向を示した。1000ppm群の発生率(12%)は当センターで行われた試験における濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた最高発生率(8.0%)を越えていることから、この発生増加は被験物質の影響を否定できなかった。その他の臓器の腫瘍性病変の発生には被験物質の投与による影響を示す変化を認めなかった。

雌では各臓器とも腫瘍性病変の発生に被験物質の投与による影響を示唆する変化を認めなかった。

IV - 1 - 3 非腫瘍性病変

1000ppm群で雄の定期解剖例に、肝臓の明細胞性小増殖巣と前立腺の炎症、及び鼻腔の異物性鼻炎の発生減少、また雌に慢性腎症の程度の減弱が認められただけであった。なお、Pavkovら(文献6)の行ったF344ラットを用いた吸入による慢性毒性試験によると、雄の1000ppm群で6ヶ月から18ヶ月時点の解剖例に精巣の精細管に両側性の瀰漫性の変性と萎縮が認められたと報告されているが、本試験ではこれらの所見は認められなかった。

IV - 1 - 4 その他

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査ではいくつかのパラメーターに変化が認められた。しかし、これらの変化はいずれもわずかな変化であり、病理組織学的検査でも関連する臓器にその変化を示唆する所見がみられなかつたことから、被験物質との関係は不明であった。

また、雄の1000ppm群で脾臓の実重量の高値がみられたが、病理学的検査では関連する検査項目、及び臓器にその変化を示唆する所見がみられなかつたことから、被験物質との関係は不明であった。

IV - 2 マウス

IV - 2 - 1 生死状況、死因、一般状態、体重、摂餌量

最終計測週(104週)における雌雄の50ppm群と200ppm群の生存数(生存率)は対照群と比較して差はみられず、投与期間中の一般状態の観察でも被験物質の投与によると思われる所見は認められなかつた。800ppm群は投与期間前期より動物の死亡がみられ、95週の時点で雄の36/48例、雌の36/49例が死亡又は瀕死したため投与を中止し生存動物を解剖した。また、この群では多くの動物に立毛及び強度の振戦が発生した。なお、病理組織学的には死因となる特徴的な変化は認められなかつた。なお、Pavkovら(文献6)の行ったB6C3F₁マウスを用いた吸入による慢性毒性試験によると、1000ppm群の雌雄に振戦と麻痺が観察されたと報告しており、本試験では麻痺はみられなかつたものの振戦が観察された点では一致している。

体重では200ppm群の雄は22週以降、雌は26週以降、対照群と比較して低値を示した。雌雄の800ppm群は投与期間(95週で解剖)を通じて体重増加に著しい抑制がみられた。

摂餌量では雄の800ppm群は投与開始より42週まで断続的に高値、70週から94週までは(95週で解剖)連続して低値がみられ、雌の800ppm群は2週から34週まで断続的に高値がみられた。雌雄の800ppm群の摂餌量と体重増加の抑制との関係は不明であつた。

IV - 2 - 2 腫瘍性病変

雄では各臓器とも腫瘍性病変の発生に被験物質の投与による影響を示唆する変化は認められなかつた。

雌の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生(対照群:4/50例、50ppm群:3/50例、200ppm群:9/49例)がPeto検定(有病率法)とCochran-Armitage検定で増加傾向を示した。この腫瘍の発生率は200ppm群でヒストリカルコントロールデータの範囲(平均:3.7%、試験単位の発生率:0~10%)を越えていることから、この発生増加は被験物質の投与による影響を否定できなかつた。その他の臓器の腫瘍性病変には被験物質の投与による影響を示唆する変化を認めなかつた。なお、Pavkovら(文献6)の行ったB6C3F₁マウスを用いた吸入による慢性毒性試験によると、雄の1000ppm群で腎臓の腫瘍(腎皮質腺腫、腎皮質腺癌、乳頭状囊胞腺腫、乳頭状囊胞腺癌、及び管状囊胞腺腫)が有意な増加を示したことが報告されているが、本試験ではこれらの腫瘍の増加は認められなかつた。

IV - 2 - 3 非腫瘍性病変

被験物質の投与による直接的な変化を示す結果は得られなかった。なお、Pavkovら(文献6)の行ったB6C3F₁マウスを用いた吸入による慢性毒性試験によると、1000ppm群の雄で、肝臓の変化(中心域から中間帯までの肝細胞の空胞化、核の巨大化、細胞の巨大化、多核化、及び変性)、腎臓の変化(尿細管上皮の過形成と核の巨大化、腎皮質の囊胞)、さらに同群の雌雄には、小脳の変化(顆粒層の変性と萎縮)、脾臓の変化(リンパ組織の減少から脾臓の萎縮に至る変化)が認められたと報告されているが、本試験ではこれらの所見は認められなかった。

IV - 2 - 4 その他

血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査で変化のみられたパラメーターがあった。しかし、これらの変化はいずれもわずかな変化であり、病理組織学的検査でも関連する臓器に変化がみられなかつたことから、被験物質との関係は不明であった。

また、雌の200ppm群で脾臓の実重量と体重比の低値がみられたが、病理学的検査では関連する検査項目、及び臓器にその変化を示唆する所見がみられなかつたことから、被験物質との関係は不明であった。

V 結論

F344/DuCrj(Fischer)ラット及びCrj:BDF₁マウスを用いて塩化メチルの2年間(104週間)にわたる吸入によるがん原性試験を行った。

投与の結果、ラットでは雄の甲状腺の濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生の増加が認められ、被験物質の影響を否定できなかった。非腫瘍性病変としては、雄に肝臓の明細胞性小増殖巣と前立腺の炎症の発生減少(1000ppm群)、雌に慢性腎症の程度の減弱(1000ppm群)がみられた。

マウスでは雌の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生増加が認められ、被験物質の影響を否定できなかった。なお、雌雄の800ppm群では投与期間前期より動物が死亡し生存数が著しく減少したため、投与期間の95週でこの群の全例を解剖した。また、この群には著しい体重増加の抑制、投与期間後期には立毛、強度の振戦がみられた。しかし、病理組織学的には死因となる特徴的な変化は認められなかった。

以上のように、塩化メチルの投与によりF344/DuCrj(Fischer)ラットでは雄の甲状腺の濾胞状腺腫と濾胞状腺癌を合わせた発生、Crj:BDF₁マウスでは雌の細気管支-肺胞上皮腺腫の発生の増加が認められた。しかし、ラットでは濾胞状腺腫と濾胞状腺癌のそれぞれの腫瘍単独での増加は認められず、マウスでは悪性の肺腫瘍の増加は認められなかった。また、ラット、マウスともその他の臓器、器官には腫瘍の発生増加はなく、本試験で観察されたラットの甲状腺とマウスの肺における腫瘍発生の増加は、塩化メチルのがん原性を証明するための証拠としては不十分であった。

VI 文 献

1. William W.Simons (1978)
Sadtler Handbook of Infrared Spectra
pp106, Sadtler Research Laboratories, Inc
2. 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.
3. Peto, R., Pike, M.C., Day, N.E., Gray, R.G., Lee, P.N., Parish, S.,
Peto, J., Richrds, S. and Wahrendorf, J. (1980)
Guidelines for Simple, Sensitive Significance Tests for
Carcinogenic Effects in Long-term Animal Experiments.
In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for
Carcinogens: A Critical Appraisal,
IARC Monographs, Suppl. 2, pp. 311-426,
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
4. 日本バイオアッセイ研究センター内部資料 (1984-1994)
5. 日本バイオアッセイ研究センター (1996)
塩化メチルのラット及びマウスを用いた吸入によるがん原性予備試験
報告書
日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川
6. A Chronic Inhalation Toxicology Study in Rats and Mice to Methyl
Chloride.
Final Report to CIIT(1981) by the Battelle Columbus Laboratories,
Columbus, OH.