N,N-ジメチルアセトアミドのマウスを用いた吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0718

CAS No. 127-19-5

2010年3月26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

試験委託者 …… i

試験施設及び運営管理者 …… i

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　A～L 2

FIGURES　1～5

APPENDICES　1-1～3

標題

N,N-ジメチルアセトアミドのマウスを用いた吸入による13週間毒性試験

試験目的

N,N-ジメチルアセトアミドの吸入によるがん原性試験の投与濃度を決定する予備試験として、*N,N*-ジメチルアセトアミドをマウスに13週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

試験法

本試験はOECD化学品テストガイドライン413（亜慢性吸入毒性：90日試験　1981年5月12日採択）を参考にして実施した。

GLP対応

本試験は、昭和63年9月1日付け、労働省告示第76号「試験施設等が具備すべき基準(安衛法GLP)」（一部改正。平成12年3月29日付け、労働省告示第13号）に準拠し、OECD GLP（1997年11月26日採択）に準じて実施した。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞ヶ関1-2-2

試験施設及び運営管理者

中央労働災害防止協会　日本バイオアッセイ研究センター
副所長　長野　嘉介
神奈川県秦野市平沢2445

N,N-ジメチルアセトアミドのマウスを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0718

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　名称等 …… 2
　Ⅰ－1－2　構造式及び分子量 …… 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 …… 2
Ⅰ－3　被験物質の特性・同一性、安定性 …… 3
　Ⅰ－3－1　特性・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 …… 4
　Ⅱ－1－2　被験物質の投与方法 …… 4
　Ⅱ－1－3　投与期間 …… 4
　Ⅱ－1－4　投与濃度 …… 4
　Ⅱ－1－5　投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由 …… 4
　Ⅱ－1－6　被験物質の発生方法と濃度調整 …… 5
　Ⅱ－1－7　被験物質濃度の測定 …… 5
Ⅱ－2　動物管理 …… 6
　Ⅱ－2－1　各群の使用動物数 …… 6
　Ⅱ－2－2　群分け及び個体識別方法 …… 6
　Ⅱ－2－3　飼育条件 …… 6
　（1）飼育環境 …… 6
　（2）飼料 …… 7
　（3）飲水 …… 7

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法 …… 7
Ⅱ－3－1　動物の生死及び一般状態の観察 …… 7
Ⅱ－3－2　体重測定 …… 8
Ⅱ－3－3　摂餌量測定 …… 8
Ⅱ－3－4　血液学的検査 …… 8
Ⅱ－3－5　血液生化学的検査 …… 8
Ⅱ－3－6　尿検査 …… 8
Ⅱ－3－7　病理学的検査 …… 9
（1）剖検 …… 9
（2）臓器重量 …… 9
（3）病理組織学的検査 …… 9
Ⅱ－4　数値処理と統計方法 …… 9
Ⅱ－4－1　数値の取り扱いと表示 …… 9
Ⅱ－4－2　統計処理 …… 10

Ⅲ　試験成績 …… 11

Ⅲ－1　生死状況 …… 11
Ⅲ－2　一般状態 …… 11
Ⅲ－3　体重 …… 11
Ⅲ－4　摂餌量 …… 11
Ⅲ－5　血液学的検査 …… 11
Ⅲ－6　血液生化学的検査 …… 12
Ⅲ－7　尿検査 …… 12
Ⅲ－8　病理学的検査 …… 12
Ⅲ－8－1　剖検 …… 12
Ⅲ－8－2　臓器重量 …… 13
Ⅲ－8－3　病理組織学的検査 …… 13

Ⅳ　考察及びまとめ …… 15

Ⅳ－1　用量－反応関係 …… 15
Ⅳ－2　無毒性量（NOAEL）／最小毒性量（LOAEL） …… 16
Ⅳ－3　他の文献との比較 …… 16
Ⅳ－4　がん原性試験の濃度決定 …… 17

Ⅴ　文献 ･･･ 18

Ⅵ　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書に従わなかったこと ･･･ 20

要約

N,N-ジメチルアセトアミドのがん原性を検索する目的で B6D2F1/Crlj マウスを用いた吸入による 2 年間（104 週間）の試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験（13 週間試験）を実施した。

本試験は、被験物質投与群 5 群と対照群 1 群の計 6 群の構成で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 120 匹を用いた。被験物質の投与は、*N,N*-ジメチルアセトアミドを 1 日 6 時間、1 週 5 日間、13 週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0（対照群）、30、100、300、450 及び 600 ppm（体積比 v/v）とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

N,N-ジメチルアセトアミドの暴露の結果、雌雄ともに動物の死亡、一般状態の変化はみられなかった。投与群の体重は、雄は各群で投与期間の後半に軽度の増加抑制がみられた。雌では被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。摂餌量には被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。

血液学的検査では、血小板数の高値が雌雄とも 100 ppm 以上の群、白血球百分率の好中球比の高値が雄の 600 ppm 群、リンパ球比の低値が雌の 600 ppm 群でみられた。

血液生化学的検査では、総コレステロールと ALT の高値が雌雄とも 100 ppm 以上の群、リン脂質の高値とカリウムの低値が雄の 300 ppm 以上の群と雌の 100 ppm 以上の群、総蛋白の高値が雄の 600 ppm 群と雌の 450 ppm 以上の群、アルブミンの高値が雄の 600 ppm 群及び雌の 300 ppm 群と 450 ppm 群、カルシウムの高値が雄の 450 ppm 以上の群と雌の 600 ppm 群、クロールの低値が雄の 450 ppm 以上の群でみられた。

尿検査と剖検では、雌雄ともに *N,N*-ジメチルアセトアミドの暴露の影響と考えられる変化はみられなかった。

臓器重量の測定では、肝臓の実重量の高値が雄の 300 ppm 以上の群と雌の 600 ppm 群、体重比の高値が雄の全投与群と雌の 100 ppm 以上の群でみられた。また、雄では脾臓の体重比の高値が 100 ppm 以上の群、雌では脳の実重量の低値が 600 ppm 群でみられた。

病理組織学的検査では、肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大と壊死がみられた。小葉中心性の肝細胞肥大は、雄の 100 ppm 以上の群と雌の 300 ppm 以上の群でみられた。肝臓の壊死は、単細胞壊死（軽度～中等度）が雄の 300 ppm 以上の群と雌の全投与群でみられた。また、雄の 600 ppm 群には巣状壊死（軽度）と小葉中心性の肝細胞壊死（中等度）が少数例に、みられた。

本試験における *N,N*-ジメチルアセトアミドのマウスに対する 13 週間吸入暴露による最小毒性量（LOAEL）は、肝臓の重量をエンドポイントとして 30 ppm であると考えられた。

以上の結果より、*N,N*-ジメチルアセトアミドのがん原性試験は雌雄とも最高濃度を 300 ppm とし、以下、60 ppm、12 ppm（公比 5）と決定した。

Ⅰ　試験材料

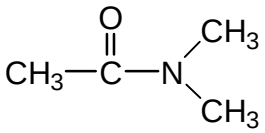
Ⅰ－1　被験物質の性状等

Ⅰ－1－1　名称等

名　　称：　*N,N*-ジメチルアセトアミド（*N,N*-Dimethylacetamide）
CAS No.：　127-19-5

Ⅰ－1－2　構造式及び分子量（文献 1）

構 造 式：



分 子 量：　87.12

Ⅰ－1－3　物理化学的性状等（文献 1）

性　　状：　無色の液体
比　　重：　0.94 (20℃)
融　　点：　-20℃
沸　　点：　166℃（760mmHg)
蒸 気 圧：　1.5 mmHg（20℃）
溶 解 性：　水に溶解
保管条件：　室温で暗所に保管

Ⅰ－2　被験物質の使用ロット等

製　造　元：　和光純薬工業(株)
規　　格：　和光特級
純　　度：　100.0%(和光純薬工業(株)検査成績データ)
ロット番号：　PEJ4938

Ⅰ－3　被験物質の特性・同一性、安定性

Ⅰ－3－1　特性・同一性

被験物質の同一性は、被験物質のマススペクトルを質量分析計（(株)日立製作所 M-80B）にて測定し、さらに被験物質の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）にて測定した。これらの数値をそれぞれの文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマススペクトルは文献値（文献 2）と同じ分子イオン及びフラグメントピークを、被験物質の赤外吸収スペクトルは文献値（文献 3）と同じスペクトルを示し、被験物質が *N,N*-ジメチルアセトアミドであることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示した。

Ⅰ－3－2　安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後にそのガスクロマトグラムをガスクロマトグラフ（アジレントテクノロジーズ 5890A）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ることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示した。

Ⅰ－4　試験動物

動物は、*N,N*-ジメチルアセトアミドのがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢 795）の B6D2F1/Crlj マウス（SPF）の雌雄を使用した。

雌雄各 72 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 60 匹（群構成時体重範囲、雄：22.1～24.4g、雌：18.2～20.7g）を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に B6D2F1/Crlj マウス（SPF）を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生の感受性が知られていることによる。

Ⅱ　試験方法

Ⅱ－1　投与

Ⅱ－1－1　投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

Ⅱ－1－2　被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った（FIGURE 1）。

Ⅱ－1－3　投与期間

投与期間は、1 日 6 時間、原則として 1 週 5 日の暴露で 13 週間とし、計 63 回の暴露を行った。

Ⅱ－1－4　投与濃度

投与濃度は、30、100、300、450 及び 600 ppm（v/v）の 5 段階に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

Ⅱ－1－5　投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間はがん原性試験の投与濃度を決定するため、週 5 日の暴露で 13 週間とした。

投与濃度は *N,N*-ジメチルアセトアミドをマウスに吸入暴露した 2 週間毒性試験の結果（文献 4）をもとに決定した。2 週間試験は 0（対照群）、30、100、300、450 及び 600 ppm（v/v）の濃度で行った。その結果、雌雄とも動物の死亡はなく、一般状態、体重及び摂餌量に暴露による影響を認めなかった。血液学的検査では、血小板数の高値が雄の 450 ppm 以上の群、雌の 300 ppm 以上の群でみられた。血液生化学的検査では総コレステロールの高値が雄の 300 ppm 以上の群と雌の 100 ppm 以上の群、ALT の高値が雄の 600 ppm 群と雌の 300 ppm 以上の群でみられた。その他、リン脂質の高値が雌の 100 ppm 以上の群でみられた。臓器重量では肝臓の実重量の高値が雄の 300 ppm 以上の群と雌の 100 ppm 以上の

群、体重比の高値が雌雄とも 100 ppm 以上の群でみられた。その他、胸腺に実重量と体重比の低値が雌の 600 ppm 群、精巣に体重比の低値が雄の 600 ppm 群でみられた。病理組織学的検査では雌雄とも肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大が 100 ppm 以上の群でみられ、さらに、雌では肝細胞の巣状壊死が 100 ppm 以上の群でみられた。

本試験に使用する吸入試験システムで動物の飼育環境条件を満たしながら、*N,N*-ジメチルアセトアミドの濃度制御が可能な上限は 600 ppm である。一方、2 週間吸入試験の結果、600 ppm の濃度の暴露では血液学的検査（血小板数の増加等）と血液生化学的検査（総コレステロールと ALT の高値等）での変化が認められ、肝臓には重量の増加、小葉中心性の肝細胞肥大、肝細胞の巣状壊死がみられるものの、雌雄とも動物の死亡はなく、一般状態、体重及び摂餌量に投与による影響はなかった。従って、13 週間試験の最高投与濃度は 600 ppm が適切であると判断した。また、30 ppm では投与の影響と考えられる変化がいずれの検査項目においても認められなかったことから、最低投与濃度は 30 ppm が適切と判断した。

以上のことから、13週間試験の投与濃度は雌雄とも、600 ppm を最高濃度とし、以下450、300、100、30 ppm（v/v）とした。

Ⅱ－1－6　被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質供給装置（柴田科学(株)特注）の発生容器内の *N,N*-ジメチルアセトアミドを循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。この被験物質の蒸気を清浄空気（搬送空気）と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却、再加温し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を各吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はガスクロマトグラフで監視し、その濃度データをもとに設定濃度になるように被験物質の吸入チャンバーへの供給量を調節した。

Ⅱ－1－7　被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付ガスクロマトグラフ（(株)島津製作所 GC-14B）により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分ごとに測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示した。各投与群の被験物質濃度は、その平均値と設定濃度の差（（平均値－設定濃度）／設定濃度×100）が 0.7%以内、変動係数（標準偏差／平均値×100）が 2.0%以内であり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

Ⅱ－2　動物管理

Ⅱ－2－1　各群の使用動物数

投与群 5 群及び対照群 1 群の計 6 群を設け、各群雌雄各 10 匹の動物を用いた。

群 名 称	動物数（動物番号）	
	雄	雌
対　照　群	10 匹（1001～1010）	10 匹（2001～2010）
30 ppm 群	10 匹（1101～1110）	10 匹（2101～2110）
100 ppm 群	10 匹（1201～1210）	10 匹（2201～2210）
300 ppm 群	10 匹（1301～1310）	10 匹（2301～2310）
450 ppm 群	10 匹（1401～1410）	10 匹（2401～2410）
600 ppm 群	10 匹（1501～1510）	10 匹（2501～2510）

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、一般状態及び体重の推移に異常を認めなかっ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 5）。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室（601 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。

Ⅱ－2－3　飼育条件

（1）飼育環境

検疫期間中は吸入試験室（601 室）で、馴化期間及び投与期間中は吸入試験室（601 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を＜　＞内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示した。吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、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。なお、検疫期間中の吸入試験室の温度の実測値が、試験計画書に記載した設定値の範囲外となったが、試験の信頼性に影響を及ぼすような事態ではなかった（Ⅵ項に詳細を記載した）。

温　　度　　：　吸入試験室；検疫期間　　23±2℃　＜601 室；20.5±0.3℃＞
　　馴化･投与期間　21±2℃　＜601 室；21.0±0.3℃＞

吸入チャンバー内；20～24℃

湿　　度　　：　吸入試験室；検疫期間　　55±15%　＜601 室；57±1%＞

馴化･投与期間　55±15%　＜601 室；56±1%＞

吸入チャンバー内；30～70%

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　　：　検疫室･吸入試験室；15～17 回／時

吸入チャンバー内　；飼育中 12±1 回／時、暴露中 6±0.5 回／時

圧　　力　　：　吸入チャンバー内　；0～－15×10Pa

ケージへの動物の収容方法　　：　単飼

ケージの材質・形状・寸法等　：

検疫期間；ステンレス製 2 連網ケージ（112(W)×212(D)×120(H) mm/匹）

馴化期間；ステンレス製 6 連網ケージ（95(W)×116(D)×120(H) mm/匹）

投与期間；ステンレス製 5 連網ケージ（100(W)×116(D)×120(H) mm/匹）

（2）飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)（千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港 8-2）の CRF-1 固型飼料（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。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株)から自社分析データを使用ロットごとに入手し、保管した。また、飼料中の夾雑物は本試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

（3）飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し､結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

Ⅱ－3　観察・検査項目及び方法

Ⅱ－3－1　動物の生死及び一般状態の観察

動物の生死及び瀕死の確認を毎日 1 回、また、一般状態の詳細な観察は週 1 回行った。

Ⅱ－3－2　体重測定

体重測定は週 1 回行った。また、動物の定期解剖動物の搬出時にも体重（搬出時体重）を測定した。

Ⅱ－3－3　摂餌量測定

摂餌量は週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

Ⅱ－3－4　血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

Ⅱ－3－5　血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、γ-GTP、CK、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

Ⅱ－3－6　尿検査

投与 13 週の検査時まで生存した動物から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（ウロラブスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

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

全動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

（3）病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

なお、鼻腔については切歯の後端（レベル 1）、切歯乳頭（レベル 2）、第一臼歯の前端（レベル 3）の 3 ヶ所（文献 6）で切り出し（横断）、検査した。

検査器官・組織：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、腟、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

Ⅱ－4　数値処理と統計方法

Ⅱ－4－1　数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第 3 位まで測定し、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。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 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。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査はAPPENDIX 3に示した単位と精度により表示した。

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

Ⅱ－4－2　統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。

病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較を行った。

病理組織学的検査の非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1～4 に分け、χ^2検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間とのχ^2検定を行った。

各検定は5%の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には5%及び1%の有意水準の表示を行った。

Ⅲ　試験成績

Ⅲ－1　生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 に示した。

－雌雄－

動物の死亡はみられなかった。

Ⅲ－2　一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示した。

－雌雄－

特記すべき所見はみられなかった。

Ⅲ－3　体重

体重の推移を TABLE D 1～4 及び FIGURE 2, 3 に示した。

－雄－

投与期間の後半に各投与群で体重増加の軽度の抑制がみられたが、最終体重は対照群と比較して統計学的に有意な差はみられなかった。

投与群の最終体重は対照群に対し、30 ppm 群：96%、100 ppm 群：95%、300 ppm 群：97%、450 ppm 群：93%、600 ppm 群：94%であった。

－雌－

被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。

投与群の最終体重は対照群に対し、30 ppm 群：100%、100 ppm 群：104%、300 ppm 群：103%、450 ppm 群：101%、600 ppm 群：103%であった。

Ⅲ－4　摂餌量

摂餌量を TABLE E 1～4 及び FIGURE 4, 5 に示した。

－雌雄－

被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。

Ⅲ－5　血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE F 1, 2 に示した。

－雄－

血小板数の高値が 100 ppm 以上の群、白血球百分率の好中球比の高値が 600 ppm 群でみられた。

－雌－

血小板数の高値が 100 ppm 以上の群、白血球百分率のリンパ球比の低値が 600 ppm 群でみられた。

なお、白血球数の低値が 450 ppm 群、白血球百分率の好酸球比の高値が 450 ppm 群、リンパ球比の低値が 100 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－6　血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示した。

－雄－

総コレステロールと ALT の高値が 100 ppm 以上の群、リン脂質の高値とカリウムの低値が 300 ppm 以上の群、カルシウムの高値とクロールの低値が 450 ppm 以上の群、総蛋白とアルブミンの高値が 600 ppm 群でみられた。

－雌－

総コレステロール、リン脂質と ALT の高値及びカリウムの低値が 100 ppm 以上の群、総蛋白の高値が 450 ppm 以上の群、アルブミンの高値が 300 ppm 群と 450 ppm 群、カルシウムの高値が 600 ppm 群でみられた。

Ⅲ－7　尿検査

尿検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

－雄－

被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。

なお、100 ppm 群で尿 pH の低下がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

－雌－

被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。

Ⅲ－8　病理学的検査

Ⅲ－8－1　剖検

剖検所見を TABLE I 1, 2 に示した。

－雌雄－

被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。

Ⅲ－8－2　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 TABLE J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示した。

－雄－

肝臓の実重量の高値が 300 ppm 以上の群、体重比の高値が全投与群、脾臓の体重比の高値が 100 ppm 以上の群でみられた。

なお、450 ppm 以上の群でみられた腎臓の実重量の低値と肺の体重比の高値、600 ppm 群でみられた精巣の実重量の低値は、450 ppm 以上の群で搬出時体重が対照群に対して低値を示したことによる。

－雌－

肝臓の実重量の高値が 600 ppm 群、体重比の高値が 100 ppm 以上の群、脳の実重量の低値が 600 ppm 群でみられた。

なお、600 ppm 群でみられた卵巣の体重比の低値は、600 ppm 群で搬出時体重が対照群に対して高値傾向を示したことによる。また、卵巣の実重量の低値が 450 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

Ⅲ－8－3　病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE L 1, 2 に示した。

－雄－

［600 ppm 群］

小葉中心性の肝細胞肥大が全動物（中等度）にみられた。また、単細胞壊死（軽度）が 2 匹、巣状壊死（軽度）が 1 匹、小葉中心性の肝細胞壊死（中等度）が 1 匹にみられた。

［450 ppm 群］

小葉中心性の肝細胞肥大が全動物（中等度）にみられた。また、単細胞壊死（軽度）が 2 匹にみられた。

［300 ppm 群］

小葉中心性の肝細胞肥大が全動物（中等度）にみられた。また、単細胞壊死（軽度）が 1 匹にみられた。

［100 ppm 群］

小葉中心性の肝細胞肥大が全動物（軽度～中等度）にみられた。

［30 ppm 群］

いずれの臓器にも被験物質の暴露の影響と考えられる変化はみられなかった。

－雌－

［600 ppm 群］

小葉中心性の肝細胞肥大が 9 匹（軽度）にみられた。また、肝臓に壊死と肝細胞肥大がみられた。すなわち、単細胞壊死（軽度～中等度）が 7 匹にみられた。

［450 ppm 群］

小葉中心性の肝細胞肥大が 8 匹（軽度）にみられた。また、肝臓に壊死と肝細胞肥大がみられた。すなわち、単細胞壊死（軽度～中等度）が 7 匹にみられた。

［300 ppm 群］

小葉中心性の肝細胞肥大が 6 匹（軽度）にみられた。また、肝臓に壊死と肝細胞肥大がみられた。すなわち、単細胞壊死（軽度～中等度）が 5 匹にみられた。

［100 ppm 群］

単細胞壊死（軽度）が 3 匹にみられた。

［30 ppm 群］

単細胞壊死（軽度）が 1 匹にみられた。

以上のように、*N,N*-ジメチルアセトアミドを暴露したマウスの肝臓には小葉中心性の肝細胞肥大と肝細胞の壊死がみられた。すなわち、小葉中心性の肝細胞肥大が、雄の 100 ppm 以上の群と雌の 300 ppm 以上の群でみられ、その発生数は対照群と比較して統計学的にも有意差を示した。肝臓の壊死は、単細胞壊死（軽度～中等度）が雄の 300 ppm 以上の群と雌の全投与群でみられ、雌の 300 ppm 以上の群での単細胞壊死の発生数は対照群と比較して統計学的な有意差を示した。また、雄の 600 ppm 群では、巣状壊死（軽度）と小葉中心性の肝細胞壊死（中等度）が各 1 匹にみられた。

Ⅳ　考察及びまとめ

N,N-ジメチルアセトアミドのがん原性を検索する目的で、B6D2F1/Crlj マウスを用いた吸入による 2 年間（104 週間）の試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として本試験（13 週間試験）を実施した。

本試験は、投与群 5 群、対照群 1 群の計 6 群（各群雌雄各 10 匹）を設け、*N,N*-ジメチルアセトアミドの投与濃度は、0（対照群）、30、100、300、450 及び 600 ppm とした。投与期間は 1 日 6 時間、1 週 5 日間の投与（全身暴露による経気道投与）で 13 週間とし、投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、尿検査を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

Ⅳ－1　用量－反応関係

N,N-ジメチルアセトアミドの暴露の結果、雌雄ともに動物の死亡、一般状態の変化はみられなかった。投与群の体重では、雄は各群で投与期間の後半に軽度の増加抑制がみられた。雌では被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。摂餌量には被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった。

血液学的検査では、血小板数の高値が雌雄とも 100 ppm 以上の群、白血球百分率の好中球比の高値が雄の 600 ppm 群、リンパ球比の低値が雌の 600 ppm 群でみられた。本試験と同時に実施した *N,N*-ジメチルアセトアミドのラットを用いた 13 週間試験（文献 7）においても、血小板数の高値が雄の 300 ppm 以上の群及び雌の 100 ppm 群と 450 ppm 群でみられている。*N,N*-ジメチルアセトアミドの暴露は血液系に何らかの影響を及ぼすと考えられる。なお、病理組織学的検査では、血液系への影響を示唆する病理組織所見は認められなかった。

血液生化学的検査では、総コレステロールと ALT の高値が雌雄とも 100 ppm 以上の群、リン脂質の高値とカリウムの低値が雄の 300 ppm 以上の群と雌の 100 ppm 以上の群、総蛋白の高値が雄の 600 ppm 群と雌の 450 ppm 以上の群、アルブミンの高値が雄の 600 ppm 群及び雌の 300 ppm 群と 450 ppm 群、カルシウムの高値が雄の 450 ppm 以上の群と雌の 600 ppm 群、クロールの低値が雄の 450 ppm 以上の群でみられた。これらの中で ALT、総コレステロールとリン脂質の変化については、それぞれ、後述する肝臓の病理組織学的な所見に関連した変化であると推測される（文献 8）。その他の血液生化学的検査の変化も、*N,N*-ジメチルアセトアミドの暴露による影響である可能性が高いが、その作用機序や毒性学的意義は不明であった。

尿検査と剖検では、雌雄ともに *N,N*-ジメチルアセトアミドの暴露の影響と考えられる変化はみられなかった。

臓器重量の測定では、肝臓の実重量の高値が雄の 300 ppm 以上の群と雌の 600 ppm 群、

体重比の高値が雄の全投与群と雌の 100 ppm 以上の群でみられた。また、雄では脾臓の体重比の高値が 100 ppm 以上の群、雌では脳の実重量の低値が 600 ppm 群でみられた。

病理組織学的検査では、肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大と壊死がみられた。小葉中心性の肝細胞肥大は、雄の 100 ppm 以上の群と雌の 300 ppm 以上の群でみられた。肝臓の壊死は、単細胞壊死（軽度～中等度）が雄の 300 ppm 以上の群と雌の全投与群でみられた。また、雄の 600 ppm 群には巣状壊死（軽度）と小葉中心性の肝細胞壊死（中等度）が少数例にみられた。

その他の臓器及び器官には、臓器重量に変化のみられた脾臓と脳を含め *N,N*-ジメチルアセトアミドの影響と考えられる病理組織学的変化は認められなかった。

以上のように、*N,N*-ジメチルアセトアミドの暴露は主に肝臓に影響を与え、肝重量の増加と小葉中心性の肝細胞肥大と肝細胞の壊死を引き起こした。血液生化学的検査における ALT の高値は肝細胞の壊死に対応した変化、また、総コレステロール、リン脂質の高値は小葉中心領域での肝細胞肥大に関連した変化と考えられる。

Ⅳ－2　無毒性量（NOAEL）／最小毒性量（LOAEL）

以上のように、*N,N*-ジメチルアセトアミドのマウスへの 13 週間吸入暴露により、雄の全投与群と雌の 100 ppm 以上の群で肝臓の重量（体重比）が暴露濃度に依存して増加した。従って、*N,N*-ジメチルアセトアミドのマウスに対する最小毒性量（LOAEL）は、WHO の LOAEL の定義に従って（文献 9)、肝臓の重量をエンドポイントとして 30 ppm であると判断した。

Ⅳ－3　他の文献との比較

N,N-ジメチルアセトアミドのマウスの毒性に関する文献はみられなかったが、*N,N*-ジメチルアセトアミドと類似した化合物である *N,N*-ジメチルホルムアミドのマウスに対する毒性に関しては、当センターで実施した 13 週間吸入試験で肝臓への影響が報告されている（文献 10)。すなわち、*N,N*-ジメチルホルムアミドを 0、50、100、200、400 及び 800 ppm（v/v）の濃度で B6D2F1/Crlj マウスに 13 週間吸入暴露（1 日 6 時間、週 5 日間）した結果、雌雄とも死亡動物、一般状態の異常は認められなかった。体重増加の抑制が雄の全投与群、摂餌量の減少が雄の 800 ppm 群で認められたが、雌では体重増加の抑制及び摂餌量の減少ともいずれの群においても認められなかった。血液学的検査で血小板数の増加、血液生化学的検査で ALT と総コレステロールの増加が雌雄ともに認められた。肝臓重量（実重量と体重比）の増加が雄で認められたが、雌では認められなかった。病理組織学的検査では、肝臓に変化がみられ、雌雄とも 800 ppm 群で単細胞壊死、雄のみ全投与群で小葉中心性の肝細胞の肥大が認められた。本試験の結果と比較すると、体重増加の抑制に関しては *N,N*-ジメチルホルム

アミドの毒性影響の方が強く、病理組織学的検査では、壊死性の変化に関しては *N,N*-ジメチルアセトアミドの毒性影響の方が強く、小葉中心性の肝細胞の肥大に関しては、雄では *N,N*-ジメチルホルムアミドと *N,N*-ジメチルアセトアミドの間に差はみられなかったが、雌では *N,N*-ジメチルアセトアミドの毒性影響の方が強いと思われた。以上のように、*N,N*-ジメチルアセトアミドには *N,N*-ジメチルホルムアミドに類似した毒性影響があると推測される。

Ⅳ－4　がん原性試験の濃度決定

本試験の結果より、がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では、動物の死亡はみられなかったが、雄では各投与群に軽度の体重増加の抑制がみられた（最終体重は対照群に対し、30 ppm 群 96%、100 ppm 群 95%、300 ppm 群 97%、450 ppm 群 93%、600 ppm 群 94%）。血液の検査では血小板数、総コレステロール、ALT の高値が雌雄とも100 ppm 以上の群、リン脂質の高値が雄の300 ppm 以上の群、雌の100 ppm 以上の群でみられ、また、肝臓の実重量の高値が雄の300 ppm 以上の群と雌の600 ppm 群、体重比の高値が雄の全投与群と雌の100 ppm 以上の群でみられた。病理組織学的検査では、肝細胞の肥大が雄の100 ppm 以上の群と雌の300 ppm 以上の群、肝細胞の壊死が雄の300 ppm 以上の群と雌の全投与群でみられた。以上のように13週間試験では *N,N*-ジメチルアセトアミドの影響は主に肝臓にみられた。

がん原性試験に使用するマウスの吸入試験システムで動物の飼育環境条件を満たしながら、*N,N*-ジメチルアセトアミドの濃度制御が可能な上限は450 ppm である。本試験では、雄の肝実重量の高値が300 ppm 以上の群でみられた。また、病理組織学的検査で肝細胞の肥大及び壊死が雌雄ともに観察されたのは300 ppm 以上の群であった。雄では各投与群に軽度の体重増加の抑制がみられたが、300 ppm 以下の群の体重の変化は450 ppm 以上の群より少なかった。以上のことから、がん原性試験の最高濃度としては300 ppm が適切と判断した。また、13週間試験の最低濃度である30 ppm でも雄の肝臓重量の体重比の高値、雌の1匹に肝細胞壊死がみられたことから、がん原性試験の最低濃度は30 ppm 未満の濃度が適切と考えた。

以上のことから、がん原性試験の最高濃度は雌雄とも 300 ppm とし、以下、公比 5 で 60 ppm、12 ppm（v/v）と決定した。

V　文献

1. ACGIH. 2001. N,N-Dimethyl acetamide. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. [CD-ROM 2007].

2. McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.

3. 和光純薬工業(株). 2003. *N,N*-ジメチルアセトアミド, 赤外吸収スペクトル.

4. 日本バイオアッセイ研究センター. 2008. *N,N*-ジメチルアセトアミドのラットを用いた吸入による 2 週間毒性試験報告書. 神奈川：中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター.

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. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. Exp Toxic Pathol 49: 97–104.

7. 日本バイオアッセイ研究センター. 2010. *N,N*-ジメチルアセトアミドのラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験報告書. 神奈川: 中央労働災害防止協会, 日本バイオアッセイ研究センター.

8. Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ. 1991. Endoplasmic reticulum. In: Hepatotoxicology (Robert GM, Steadman DH, Richard JB, eds). Boca Raton, FL: CRC Press, 23-73.

9. WHO. 1994. Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of Guidance Values for Health-based Exposure Limits. Environmental Health Criteria 170. International Programme on Chemical Safety, Geneva: World Health Organization.

10. Senoh H, Katagiri T, Arito H, Nishizawa T, Nagano K, Yamamoto S, et al. 2003. Toxicity due to 2- and 13-wk inhalation exposures of rats and mice to

N,N-dimethylformamide. J Occp Health, 45: 365-375.

11. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 413: ”Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study ”. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

Ⅵ　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書に従わなかったこと

試験計画書において、検疫期間中の吸入試験室（601 室）の温度設定は 23±2℃であったが、試験責任者が検疫期間中の温度設定を 21±2℃と指示したため、温度の実測値が 20.5±0.3℃となり、計画書の設定温度の範囲外の数値となった。しかし、OECD 化学品テストガイドライン 413（亜慢性吸入毒性：90 日試験　1981 年 5 月 12 日採択）（文献 11）における動物室の温度は 22±3℃とされており、本試験の検疫期間中の温度の実測値である 20.5±0.3℃は、その範囲内であった。また、検疫期間中の動物の一般状態や体重に温度の影響と考えられる変化がみられなかったことも考慮して、検疫期間中の吸入試験室（601 室）の温度が本試験の信頼性に影響を及ぼすような要因には成り得ないと判断した。