

クロロエタンの p53 KO マウスを用いた
吸入による中期発がん性試験報告書

試験番号：0922

CAS No. 75-00-3

2021年 6月 16日

独立行政法人 労働者健康安全機構
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
拡散防止措置及び動物福祉	i
厚生労働省担当課	ii
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	iii
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～P2	
FIGURES	1～7	
APPENDICES	1-1～14-2	

(APPENDIX 4-1～14-2 (個体表) は、報告書添付の CD に収録)

標題

クロロエタンの p53 KO マウスを用いた吸入による中期発がん性試験

試験目的

クロロエタンを遺伝子改変マウス (p53 KO マウス) に 26 週間全身暴露 (経気道投与) し、その発がん性を検索した。

試験法

本試験は「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」(平成 28 年度第 3 回発がん性評価ワーキンググループ: 2017 年 3 月 1 日厚生労働省) に準拠して実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づき試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP) 」(昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正平成 28 年 4 月 18 日厚生労働省告示第 208 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) を参考にして実施した。

拡散防止措置及び動物福祉

本試験は、「日本バイオアッセイ研究センターにおける遺伝子組換え生物使用実験安全管理規程」(平成 26 年 9 月 3 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日) 及び「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、最終改正平成 27 年 2 月 20 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」(平成 24 年 4 月 25 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日) を遵守して行った。

また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの遺伝子組換え生物使用実験安全委員会 (承認番号 2018-06) 及び日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査された (承認番号 0236) 。

厚生労働省担当課

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

試験施設及び運営管理者

独立行政法人労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター
所長代理 相磯 成敏
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日	2019年 3月 5日
動物導入日	2019年 3月 18日
群分け日	2019年 4月 1日
被験物質投与開始日	2019年 4月 2日
被験物質投与終了日	2019年 9月 30日
定期解剖日	2019年 10月 1、2、3、4日
試験終了日	2021年 6月 16日

クロロエタンの p53 KO マウスを用いた
吸入による中期発がん性試験報告書

試験番号：0922

本文

本文目次

	頁
要約	1
I 試験材料	3
I-1 被験物質の性状等	3
I-1-1 名称等	3
I-1-2 構造式及び分子量	3
I-1-3 物理化学的性状等	3
I-2 被験物質等	3
I-2-1 使用被験物質	3
I-2-2 被験物質の製造量	3
I-2-3 被験物質の主な用途	4
I-2-4 許容濃度、発がん分類	4
I-3 被験物質の特性	4
I-3-1 同一性	4
I-3-2 安定性	4
I-4 試験動物	4
II 試験方法	5
II-1 投与	5
II-1-1 投与経路	5
II-1-2 被験物質の投与方法	5
II-1-3 投与期間	5
II-1-4 投与濃度	5
II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
II-1-6 被験物質の発生方法及び濃度調整	6
II-1-7 被験物質濃度の測定	6
II-2 動物管理	6
II-2-1 群の構成及び各群の使用動物数	6
II-2-2 群分け方法	6
II-2-3 動物の個体識別	7
II-2-4 動物飼育室、並びに他試験及び異種動物との区別	7

II-2-5	飼育条件	7
(1)	飼育環境	7
(2)	飼料	8
(3)	飲水	8
II-3	観察・検査項目及び方法	8
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	8
II-3-2	体重測定	8
II-3-3	摂餌量測定	8
II-3-4	尿検査	8
II-3-5	血液学的検査	9
II-3-6	血液生化学的検査	9
II-3-7	病理学的検査	9
(1)	肉眼的観察	9
(2)	臓器重量	9
(3)	病理組織学的検査	9
II-3-8	病理ピアレビュー	10
II-4	数値処理と統計方法	10
II-4-1	数値の取扱いと表示	10
II-4-2	統計処理	10
III	試験成績	12
III-1	生死状況	12
III-2	一般状態	12
III-3	体重	12
III-4	摂餌量	13
III-5	尿検査	13
III-6	血液学的検査	13
III-7	血液生化学的検査	14
III-8	病理学的検査	14
III-8-1	肉眼的観察	14
III-8-2	臓器重量	14
III-8-3	病理組織学的検査	14
(1)	腫瘍性病変	15
(2)	非腫瘍性病変	15
III-8-4	死因	15

IV	考察及びまとめ	16
IV-1	生存率、一般状態、体重、摂餌量等	16
IV-2	腫瘍性病変	16
IV-3	腫瘍以外の影響	16
IV-4	他文献との比較	18
V	結論	18
VI	文献	19
VII	予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 及び試験計画書に従わなかつたこと	21

要約

クロロエタンの発がん性を検索する目的で、クロロエタンを遺伝子改変マウス (p53KO マウス) に 26 週間全身暴露 (経気道投与) した。

対照 1 群、投与 3 群の計 4 群 (各群雌雄とも 25 匹) を設け、クロロエタンの投与濃度は、0 (対照群)、2,400、6,000 及び 15,000 ppm (体積比 v/v) とした。投与期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の投与で 26 週間とし、投与中、生死及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与終了前に尿検査を行った。投与終了後に動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

26 週間の投与の結果、雌雄の生存率、一般状態に投与の影響はみられなかった。雌雄の 15,000 ppm 群で有意な体重増加の抑制がみられた一方で、摂餌量は、雌雄の 15,000 ppm 群とも投与期間を通して多く、体重増加抑制とは一致しなかった。雄の 15,000 ppm 群で、いずれも変化量は軽微であるが、赤血球数及びヘモグロビン濃度の低値並びに網赤血球比の高値がみられたことから軽度な貧血と判断した。また、雄の 15,000 ppm 群では、血液生化学的検査で軽度な総ビリルビン及び ALP の高値がみられた。病理組織学的検査では、肺及び精巣に毒性影響 (非腫瘍性病変) が観察された。肺では、気管支上皮の空胞変性が雌雄の全投与群にみられ、雄では、6,000 ppm 以上の群で有意に増加した。また、精巣では、精細管の萎縮が全投与群でみられ、15,000 ppm 群では有意に増加した。しかし、腫瘍性病変の発生増加は、雌雄の全投与群で認められなかった。

以上より、遺伝子改変マウス (p53KO マウス) を用いて、クロロエタンの 26 週間の吸入による中期発がん性試験を行った結果、雌雄マウスに対する発がん性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論した。

クロロエタンの中期発がん性試験における腫瘍発生 (p53KO マウス 雄)

投与濃度 (ppm)		0	2,400	6,000	15,000	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
リンパ節	悪性リンパ腫 [#]	1	0	0	0		
ハーダー腺	血管腫	0	0	1	0		

クロロエタンの中期発がん性試験における腫瘍発生 (p53KO マウス 雌)

投与濃度 (ppm)		0	2,400	6,000	15,000	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	1	0	0		
骨髄	血管腫	0	0	1	0		
胸腺	悪性リンパ腫 [#]	0	0	1	0		
骨	骨肉腫 [#]	1	0	0	0		

: 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)

I 試験材料

I-1 被験物質の性状等 (文献 1、2、3、4)

I-1-1 名称等

名 称 : クロロエタン (Chloroethane)
別 名 : 塩化エチル (Ethyl chloride)
CAS No. : 75-00-3

I-1-2 構造式及び分子量

構 造 式 :
$$\begin{array}{c} \text{Cl} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$$

化 学 式 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}$
分 子 量 : 64.52

I-1-3 物理化学的性状等

性 状 : 常温でエーテル臭を持つ無色気体
相対蒸気密度 : 2.22 (空気=1)
融 点 : $-136.4\text{ }^\circ\text{C}$
沸 点 : $12.3\text{ }^\circ\text{C}$
溶 解 性 : 水に微溶、アルコール、エーテルと自由に混和する
保 管 条 件 : 室温

I-2 被験物質等

I-2-1 使用被験物質

製 造 元 : 日本特殊化学工業株式会社
純 度 : 99.5%以上
ロット番号 : ET8016、ET9001、ET9007、ET9014

I-2-2 被験物質の製造量 (文献 5)

日本 : 1,000 t 化学物質排出把握管理促進法における製造・輸入区分 (2003 年)

I-2-3 被験物質の主な用途 (文献 2、3、4)

オレフィン重合触媒原料、発泡助剤、エチル化剤、農薬

I-2-4 許容濃度、発がん分類 (文献 3、4、6、7)

日本産業衛生学会 ; 100ppm (1993 年)

米国産業衛生専門家会議 (ACGIH) ; TLV-TWA 値 100ppm (264 mg/m³), Skin, A3.
(2001 年)

国際がん研究機関 (IARC) ; 3 (not classifiable) (1999 年)

I-3 被験物質の特性

I-3-1 同一性

被験物質の同一性は、被験物質のマスペクトルを質量分析計 (アジレントテクノロジーズ(株) 5973N) にて測定し、この測定値を文献値と比較することにより確認した (文献 8)。

その結果、被験物質のマスペクトルは文献値と同じ分子イオンピーク及びフラグメントピークを示し、被験物質はクロロエタンであることを確認した。

それらの結果を APPENDIX 1-1 に示す。

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、各ロットの赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 ((株)島津製作所 IRAffinity-1) 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。

それらの結果を APPENDIX 1-2 に示す。

I-4 試験動物

動物は、日本チャールス・リバー(株) (筑波 SAS センター) の B6.129S2-Trp53 tm1Tyj/J (p53 ヘテロ欠損マウス、p53 KO マウス) マウス (SPF) の雌雄を使用した。雄 116 匹、雌 103 匹を 6 週齢で導入し、検疫を 8 日間、馴化を 7 日間実施した後、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 100 匹 (群分け時体重範囲、雄 : 21.2~26.8g、雌 : 16.9~24.2 g) を試験に用いた。

中期発がん性試験に p53 ヘテロ欠損マウスを選択した理由は、中期発がん性検索のための有用性が検証されていることによる (文献 9)。

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。

II-1-3 投与期間

全動物において、投与期間は1日6時間、1週5日の暴露（原則として土、日曜日は暴露しない）で、2019年4月2日～2019年9月30日までの26週間とした。

II-1-4 投与濃度

投与濃度は2,400、6,000及び15,000 ppm（体積比 v/v）の3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、「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」（文献 10）に準拠して26週間とした。

投与時間は OECD 化学品テストガイドライン 451（文献 11）を参考に1日6時間とした。

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（試験番号 0916）結果をもとに決定した。0（対照群）、2,500、5,000、10,000 及び 15,000 ppm の濃度で吸入暴露した結果、雌雄各群に死亡は認められず、一般状態の変化は観察されなかった。体重も順調に増加し、各群間に差は認められなかった。病理組織学的検査では、雌雄に濃度依存的な肺の細気管支上皮細胞の空胞変性が認められた。肺以外の臓器では、特記すべき変化は認められなかった。

15,000 ppm の濃度で26週間の投与を行なったとしても、生死にかかわる重篤な変化は引き起こさないと判断し、15,000 ppm を最高濃度に設定し、以下、6,000 ppm、2,400 ppm（公比 2.5）とした。

II-1-6 被験物質の発生方法及び濃度調整

クロロエタンの発生方法を FIGURE1 に示した。被験物質の入った液化ボンベより得た必要な量の被験物質ガスを流量計及び流量調節バルブを用いて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-14A) により、暴露開始前から暴露終了後まで 15 分毎に測定した。

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 ($(\text{平均値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度} \times 100$) が 0.2 %以内、変動係数 (標準偏差 / 平均値 $\times 100$) が 0.6 %以内であり、チャンバー内濃度は良好に管理された。

II-2 動物管理

II-2-1 群の構成及び各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、1 群当たり雌雄各 25 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対照群	25 匹 (1001~1025)	25 匹 (2001~2025)
1	2,400 ppm群	25 匹 (1101~1125)	25 匹 (2101~2125)
2	6,000 ppm群	25 匹 (1201~1225)	25 匹 (2201~2225)
3	15,000 ppm群	25 匹 (1301~1325)	25 匹 (2301~2325)

II-2-2 群分け方法

群分けは、体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることで、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法 (適正層別方式) により実施した (文献 12)。

群分けにより除外された動物は、投与開始が確認されるまで飼育し、試験に使用する必要なくなったことを確認後、本試験系より外し、他の実験に使用した。

II-2-3 動物の個体識別

動物は、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をすることで、それ以降は、群分け時に耳パンチをすることで個体識別した。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

II-2-4 動物飼育室、並びに他試験及び異種動物との区別

動物はバリア区域内の独立した室（検疫 517、518 室、馴化・投与 516 室）に収容し、室の扉に試験番号、試験動物、飼育期間及び遺伝子改変動物飼育中を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

II-2-5 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫期間中は検疫室（517、518 室）、馴化期間及び投与中は、吸入試験室（516 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。検疫室、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。

温度： 検 疫 室； $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 517 室： $23.3 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ >
 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 518 室： $22.7 \pm 0.0^{\circ}\text{C}$ >

吸入試験室； $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ < 516 室： $22.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ >
 吸入チャンバー内； $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$

湿度： 検 疫 室； $55 \pm 15\%$ < 517 室： $53 \pm 1\%$ >
 $55 \pm 15\%$ < 518 室： $54 \pm 1\%$ >

吸入試験室； $55 \pm 15\%$ < 516 室： $55 \pm 5\%$ >
 吸入チャンバー内； $50 \pm 20\%$

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；15～17 回／時

吸入試験室；7～9 回／時

吸入チャンバー内； 6 ± 1 回／時

圧 力： 吸入チャンバー内； $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

ケージへの動物の収容方法： 個別飼育

ケージの材質・形状・寸法等：

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)

飼育器材 (ラック、ケージ、餌箱、給水ノズル、作業台車等) の滅菌：

オートクレーブ滅菌 (約 120°C、15 分以上)

(2) 飼料

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造の CRF-1 固型 (30kGy- γ 線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは絶食させた。

試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株)から分析データを入力し、確認した。

(3) 飲水

飲水は、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。

飲水の水質は、動物試験施設として定期的 (年 2 回) に実施している水道水の検査において、水道法に定められている水質基準に適合していることを確認した。

II-3 観察・検査項目及び方法

II-3-1 動物の生死及び一般状態の観察

全動物について、週 1 回、吸入暴露前の一般状態を詳細に観察した。その他の日は、暴露日は吸入暴露前に、非暴露日は 1 日 1 回、生死及び瀕死を観察した。瀕死状態の動物は、速やかに安楽死させた。

II-3-2 体重測定

全動物について、投与開始後は週 1 回投与前に体重測定を行った。また、定期解剖日には絶食後の体重 (搬出時体重) を測定した。

死亡及び瀕死状態の動物は、飼育室からの搬出時に体重を測定した。

II-3-3 摂餌量測定

全動物について、投与開始後週 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 尿検査

投与最終週に生存している動物のうち自然排尿した動物の新鮮尿について、尿試験紙 (ウロラプスティックス、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-3-5 血液学的検査

定期解剖時に生存している全動物について、イソフルラン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 に示す。

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-3-6 血液生化学的検査

定期解剖時に生存している全動物について、イソフルラン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 に示す。

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-3-7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について肉眼的に病変の観察を行った。なお、定期解剖動物はイソフルラン麻酔下で採血後、腹大動脈を切断、放血することで安楽死させた。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存していた動物について、下記に示す臓器の湿重量（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：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、下記の器官、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・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。

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13）で切り出し（横断）、検査した。

皮膚、鼻腔（3箇所を横断）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、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、膣、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、胸骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

II-3-8 病理ピアレビュー

病理組織診断の最終化後に外部専門家4名による病理ピアレビューを実施し、リンパ節、肺、ハーダー腺、骨髄、胸腺及び骨で認められた腫瘍について確認を行った。

その結果、病理組織診断の変更はなかった。

II-4 数値処理と統計方法

II-4-1 数値の取扱いと表示

各数値データは、測定機器の精度に合わせて表示した。

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2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 に示した単位と桁数により表示した。

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、Dunnnett 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うち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。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、各群の総担腫瘍臓器数について、Peto 検定（文献 14）、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定を行った。

各検定は 5%の有意水準で、Peto 検定、Fisher 検定で片側検定、その他の検定で両側検定を行い、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 及び FIGURE 2, 3 に示す。

—雄—

対照群で 1 匹死亡 (22 週) した。また、投与の影響とは考えなかったが 2,400 ppm 群で 1 匹死亡 (4 週) した。

各群の 26 週における生存動物数 (生存率) は、対照群 : 24 匹 (96%)、2,400 ppm 群 : 24 匹 (96%)、6,000 ppm 群 : 25 匹 (100%)、15,000 ppm 群 : 25 匹 (100%) であった。

—雌—

対照群で 2 匹死亡 (16 週、19 週) した。また、投与の影響とは考えなかったが 2,400 ppm 群で 1 匹 (14 週)、6,000 ppm 群で 2 匹 (19 週、22 週) 死亡した。

各群の 26 週における生存動物数 (生存率) は対照群 : 23 匹 (92%)、2,400 ppm 群 : 24 匹 (96%)、6,000 ppm 群 : 23 匹 (92%)、15,000 ppm 群 : 25 匹 (100%) であった。

Ⅲ-2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示す。なお、個体表は APPENDIX 4-1, 4-2 に示す。

—雌雄—

投与の影響はみられなかった。ただし、対照群を含め死亡動物の多くに異常呼吸が観察された。

Ⅲ-3 体重

体重の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 4, 5 に示す。なお、個体表は APPENDIX 5-1, 5-2 に示す。

—雄—

15,000 ppm 群で投与 5 週以降、有意な体重増加の抑制がみられた。

最終計測日の各投与群の体重は、対照群に対して、2,400 ppm 群 : 99%、6,000 ppm 群 : 97%、15,000 ppm 群 : 92% であった。

—雌—

15,000 ppm 群で投与 9、11 週及び 14 週以降、有意な体重増加の抑制がみられた。

最終計測日の各投与群の体重は、対照群に対して、2,400 ppm 群 : 99%、6,000 ppm 群 : 97%、15,000 ppm 群 : 95% であった。

Ⅲ-4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 6, 7 に示す。なお、個体表は APPENDIX 6-1, 6-2 に示す。

—雄—

15,000 ppm 群で投与初期（1 週から 3 週）並びに投与中期から後期に散発的に有意な高値がみられた。この他にも、有意差は示されないが摂餌量の増加傾向がみられた。しかし、前述した体重測定結果と対応していなかった。

投与期間を通しての 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群：4.3 g、2,400 ppm 群：4.3 g、6,000 ppm 群：4.3 g、15,000 ppm 群：4.5 g であった。

—雌—

15,000 ppm 群では投与 15 週以降、有意な高値がみられた。また、この他の週でも雄同様、対照群より摂餌量の増加傾向がみられたが体重測定結果と対応していなかった。

投与期間を通しての 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群：4.2 g、2,400 ppm 群：4.0g、6,000 ppm 群：4.0 g、15,000 ppm 群：4.5 g であった。

Ⅲ-5 尿検査

尿検査の結果を TABLE F 1, 2 に示す。なお、個体表は APPENDIX 7-1, 7-2 に示す。

—雌雄—

雌雄ともに 6,000 ppm 群で pH に有意差が示されたが、投与濃度との対応がみられず投与による影響とは考えなかった。

Ⅲ-6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示す。なお、個体表は APPENDIX 8-1, 8-2 に示す。

—雄—

赤血球数及びヘモグロビン濃度の有意な低値並びに MCV、MCH 及び網赤血球比の有意な高値が 15,000 ppm 群で認められた。また、MCH の有意な高値が 6,000 ppm 群でみられた。15,000 ppm 群での変化量は、軽微なものであるが貧血と考えた。

—雌—

MCV 及び MCH の有意な高値が 15,000 ppm 群でみられた。貧血の評価に用いられるパラメータの赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値は、対照群よりやや低値あるいは同程度であることから、傾向は示唆されるものの貧血とは考えなかった。

Ⅲ-7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE H 1, 2 に示す。なお、個体表は APPENDIX 9-1, 9-2 に示す。

—雄—

総ビリルビン及びALPの有意な高値とALT及びCKの有意な低値が最高投与群の15,000 ppm 群でみられた。なお、ALTは1例の異常値により平均値は高値となったが、統計学的には有意な低値であった。ALT及びCKは、低下性の変化であり毒性学的意義は不明であった。

—雌—

CKの有意な低値が6,000及び15,000 ppm 群でみられた。なお、6,000 ppm 群では、1例の異常値により平均値は高値となったが、統計学的には有意な低値であった。これらの変化は、低下性の変化であることから毒性学的意義は不明であった。

Ⅲ-8 病理学的検査

Ⅲ-8-1 肉眼的観察

解剖時の肉眼的観察結果を TABLE I 1, 2 に示す。なお、個体表は APPENDIX 10-1, 10-2 に示す。

—雌雄—

特記すべき所見はみられなかった。

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 に示す。なお、個体表は APPENDIX 11-1, 11-2 と APPENDIX 12-1, 12-2 に示す。

—雄—

15,000 ppm 群で肝臓の実重量の低値がみられ、肺と脾臓の体重比の高値がみられた。

—雌—

15,000 ppm 群で腎臓と脳の体重比の高値がみられた。

Ⅲ-8-3 病理組織学的検査

腫瘍性病変は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE L 1, 2 に、統計解析 (Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定) の結果を TABLE M 1, 2 に示す。また、転移性病変を TABLE N 1, 2 に、非腫瘍性病変を TABLE O 1, 2 に示す。なお、病理組織所見の個体表は APPENDIX 13-1, 13-2 に示す。

(1) 腫瘍性病変

—雄—

悪性リンパ腫が対照群で1例、ハーダー腺の血管腫が6,000 ppmで1例みられた。

—雌—

肺の細気管支-肺胞上皮腺腫が対照群及び2,400 ppm群で1例ずつみられた。また、骨髄の血管腫が6,000 ppmで1例、胸腺の悪性リンパ腫が6,000 ppmで1例みられた。骨の骨肉腫が対照群で1例みられた。

(2) 非腫瘍性病変

—雄—

<肺>

気管支上皮の空胞変性が2,400 ppm以上の群で見られ、6,000 ppm以上の群で有意に増加した。病変の程度は軽度から中等度であった。

<精巣>

精細管萎縮が2,400 ppm以上の群で見られ、15,000 ppm群で有意に増加した。病変の程度は軽度から中等度であった。

<肝臓>

肝臓の小葉中心性の脂肪変性の発生が6,000 ppm以上の群で有意に減少した。

—雌—

<肺>

気管支上皮の空胞変性が2,400 ppm以上の群で見られ、濃度に対応して多くみられたが、有意差は示さなかった。病変の程度は軽度から中等度であった。

III-8-4 死因

病理学的にみた死亡／瀕死の原因をTABLE P 1, 2に示す。なお、個体表はAPPENDIX 14-1, 14-2に示す。

—雌雄—

投与群に特異的な病変あるいは腫瘍による死亡の増加は認められなかった。

IV 考察及びまとめ

クロロエタンの発がん性を検索するために、クロロエタンを遺伝子改変マウス (p53KO マウス) に 26 週間全身暴露 (経気道投与) した。

本試験は、対照 1 群、投与 3 群の計 4 群 (各群雌雄とも 25 匹) を設け、クロロエタンの投与濃度は、0 (対照群)、2,400、6,000 及び 15,000 ppm (体積比 v/v) とした。投与期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日間の投与で 26 週間とし、投与中、生死及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与終了前に尿検査を行った。投与終了後に動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

IV-1 生存率、一般状態、体重、摂餌量等

26 週間の投与の結果、雌雄の生存率、一般状態に投与の影響はみられなかった。しかし、雌雄の 15,000 ppm 群で有意な体重増加の抑制がみられた。一方で、摂餌量は雌雄の 15,000 ppm 群とも投与期間を通して多く、体重増加抑制とは一致しなかった。

IV-2 腫瘍性病変

雌雄とも、1 群当たりの腫瘍発生数はいずれの臓器においても最大で 1 匹であり、腫瘍発生率の増加は認められなかった。したがって、雌雄とも発がん性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と判断した。

IV-3 腫瘍以外の影響

雄の 15,000 ppm 群では、いずれも変化量は軽微であるが、赤血球数及びヘモグロビン濃度の低値並びに網赤血球比の高値がみられたことから軽度な貧血と判断した。また、雄の 15,000 ppm 群では、血液生化学的検査で軽度な総ビリルビン及び ALP の高値がみられた。この生化学的変化について毒性学的な考察を試みた。

ビリルビンの高値は、1. 溶血、2. 肝障害、特に肝細胞障害や胆汁の排泄が不十分になる胆汁うっ滞でも生ずるとされている。

最初に溶血と投与との関連性について、溶血を惹起する代表的な化学物質、例えばアルコール、エーテル、クロロホルム等は赤血球膜に作用し溶血を促すとされる。溶血が盛んなときは、ヘモグロビン崩壊からいくつかの段階を経て遊離型ビリルビンが大量に生成され、結果として血液中ビリルビンが増加するとされる。本試験の被験物質のクロロエタンは、クロロホルムと同類のハロゲン化炭化水素に分類されることから、上記のようなメカニズムで

溶血を引き起こす可能性は考えられる。ただし、大量の赤血球の破壊により、間接ビリルビンの血中濃度が上昇した場合、それにもなって尿中へのウロビリノーゲンの排泄も亢進すると考えられる。しかし、本試験の尿中ウロビリノーゲンは対照群と差はなかったことから、溶血が起こっていたとしても、その程度は軽度であったと考えた。

次に、肝障害と投与との関連性について、前述したようにビリルビンの高値は、肝障害時、特に肝細胞障害や胆汁の排泄が不十分となる胆汁うっ滞で引き起こされる。本試験では、肝細胞の障害時に逸脱する酵素群、特に ALT、AST に高値はみられていないことから、肝細胞の障害の可能性は低いと考えた。また、本試験ではビリルビンとともに、ALP が高値を示した。ALP は、急性肝炎や慢性肝炎等ではあまり大きな上昇はみられないが、胆汁うっ滞では上昇するとされる。本試験では、病理組織学的検査で明らかにされなかったものの、胆汁うっ滞は示唆されたと考えた。胆汁うっ滞、特に毛細胆管性うっ滞の原因となる化学物質の多くは胆汁中に排泄され、毛細胆管のたんぱく質や脂質は高濃度の化学物質に暴露されると考えられている。例えば、1,1-ジクロロエチレンの低濃度投与により、毛細胆管性うっ滞が観察されることが報告されているが、反応性の高い代謝物(チオエーテルグルタチオン抱合体)の濃度が毛細胆管腔周辺領域で高くなるのが毒性の原因と考えられている(文献 15)。一方、クロロエタンも肝チトクローム p450 により酸化された後、グルタチオン抱合体(S-エチルグルタチオン)に代謝されると報告されている(文献 15)。クロロエタン代謝物の S-エチルグルタチオンの反応性は、1,1-ジクロロエチレンの代謝物のチオエーテルグルタチオンよりも低かったとしても、クロロエタンの投与濃度が 15,000 ppm の高濃度であったことから、毛細胆管腔周辺は高濃度のグルタチオン抱合体に長期間にわたり暴露された可能性は高いと推察した。

以上、ビリルビンの軽度の高値は、溶血あるいは胆汁うっ滞、またはその両者により出現した可能性が考えられた。

病理組織学的検査では、雌雄の肺及び雄の精巣に変化が認められた。肺では、気管支上皮の空胞変性が雌雄ともに 2,400 ppm 以上の群でみられ、雄では 6,000 ppm 以上の群で有意に増加した。気管支上皮の空胞変性は、本試験の予備試験である 4 週間吸入試験(試験番号 0916; 投与濃度: 0, 2,500, 5,000, 10,000, 15,000 ppm)でも、最低投与濃度の 2,500 ppm 群から雌雄全例に認められており、その程度は最高濃度の 15,000 ppm 群の雄で中等度、雌で重度であった。本 26 週間試験では、長期間の投与によって肺の気管支上の空胞変性は濃度依存的に認められたが、その発生率は 4 週間試験と比較して低下していた。そこで有所見動物について最終投与日から解剖までに要した日数を調査した所、空胞変性の認められた動物 31 匹のうち 30 匹が 4 日間の解剖期間の初日(最終投与の翌日)に剖検した個体で、残りの 1 匹は解剖 2 日目(最終投与の 2 日後)に解剖した動物であった。解剖 3 日及び 4 日目(最終投与の 3 日及び 4 日後)には、有所見動物は認められなかった。15,000 ppm 群の雌雄を合わせて検討した結果、空胞変性の発生頻度は、初日剖検群で 15/15 匹(100%)、2 日目剖検群で 1/15 匹(7%)、3 日目及び 4 日目剖検群ではそれぞれ 0/10(0%)であり、

投与終了からの時間経過に対応して顕著に有所見動物は減少した。この結果から、空胞変性は可逆性病変であると考えられた。また、4週間吸入試験の解剖は2日間で行っていることから、両試験で観察された空胞変性の発症率の違いは、投与終了日から解剖までにかかる日数の差と密接に関連するが、26週間試験では、その毒性の強さの程度が4週間試験に比べ減弱していることから、長期間の投与で耐性を得たことも示唆された。

また、雄で精巣の精細管の萎縮が2,400 ppm以上の群にみられ、15,000 ppm群で有意に増加した。精細管の萎縮は、4週間吸入試験では認められておらず長期間の投与によって初めて出現した病変であった。

IV-4 他文献との比較

クロロエタンのマウスを用いた発がん性試験結果として、米国 NTP で実施された B6C3F1 マウスによる2年間全身吸入暴露試験（暴露濃度：0, 15,000 ppm、暴露時間及び期間：6時間/日, 5日/週 暴露で100週間）が公開されている（文献1）。NTPでは、病理組織学的検査により子宮内膜由来の子宮癌（uterine carcinomas）の発生頻度が、対照群は0/49匹であったのに対し、15,000 ppm群では43/50匹であり、15,000 ppm群で顕著な増加がみられたと報告し、雌マウスに対して発がん性を示す明らかな証拠がある（clear evidence of carcinogenic activity for female B6C3F1 mice）と結論している。

しかし、本試験条件下では、クロロエタンの雌性マウスの子宮に対する発がん性は、認められなかった。

V 結論

遺伝子改変マウス（p53KO マウス）を用いて、クロロエタンの26週間の吸入による中期発がん性試験を行った結果、雌雄マウスに対する発がん性を示す証拠は得られなかった（no evidence of carcinogenic activity）と結論した。

VI 文献

- 1) National Toxicology Program (NTP). 1989. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Chloroethane (Ethyl chloride)(CAS NO. 75-00-3) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Technical Report Series No.346: <https://ntp.niehs.nih.gov/go/tr346.pdf> [accessed 2021/06/14]
- 2) 化学工業日報社. 2014. 16514 の化学商品東京 : クロロエタン, 909.
- 3) International Agency for Research on Cancer (IARC). 1991. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Chlorinated Drinking-water; Chlorination By-products; Some Other Halogenated Compounds; Cobalt and Cobalt Compounds. Vol. 52: 315-335. Lyon: IARC.
- 4) International Agency for Research on Cancer (IARC). 1999. Chloroethane. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide Vol. 71: 1345-1349.
- 5) 環境省 . 化学物質の環境リスク評価第4巻 . クロロエタン
<https://www.env.go.jp/chemi/report/h17-21/pdf/chpt1/1-2-2-04.pdf>
- 6) 日本産業衛生学会. 2020. 許容濃度等の勧告 (2020 年度) . 産業衛生学会雑誌 62: 198-230.
- 7) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2001. Ethyl Chloride. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: :ACGIH.
- 8) McLafferty F.W, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
- 9) 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.

- 10) 「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」2017.平成 28 年度第 3 回発がん性評価グループ（平成 29 年 3 月 1 日）資料.
- 11) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies". Adopted 25 June 2018. Paris: OECD.
- 12) 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適正層別方式の確立. 薬理と治療 14: 7285-7302.
- 13) 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.
- 14) Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 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*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs Suppl 2: 311-426.
- 15) Treinen-Moslen M. 2001. Chapter 13. Toxic Responses of the Liver. In : Casarett & Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 6th ed (Klaassen CD, ed). New York: McGraw-Hill. 485-486.

Ⅶ 予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

(1) 解剖予定動物の未記載

解剖期間（4日間）の日内では、同性間の解剖動物数に偏りがなく各群同数となるよう動物を振り分けた解剖計画（動物配列表作成）を立てていたが、試験計画書に記載していなかつた。以下にその解剖計画を示す。なお、上段は雄、下段は雌の動物番号である。

解剖日 (解剖予定数)	対照群	2,400 ppm 群	6,000 ppm 群	15,000ppm 群
2019年10月1日 (60匹)	1001~1010 2001~2005	1101~1110 2101~2105	1201~1210 2201~2205	1301~1310 2301~2305
2019年10月2日 (60匹)	1011~1015 2006~2015	1111~1115 2106~2115	1211~1215 2206~2215	1311~1315 2306~2315
2019年10月3日 (40匹)	1016~1020 2016~2020	1116~1120 2116~2120	1216~1220 2216~2220	1316~1320 2316~2320
2019年10月4日 (40匹)	1021~1025 2021~2025	1121~1125 2121~2125	1221~1225 2221~2225	1321~1325 2321~2325

(2) 動物飼育環境条件の逸脱

投与時間外の飼育中に圧力及び湿度の逸脱が不定期に発生した。以下に設定値並びに逸脱の最大値を示す。なお、チャンバー開閉時に圧力が陽圧になった期間があつた。しかし、これらの逸脱の程度は微小で試験結果の評価に影響を及ぼすものでないと判断した。

	設定値	測定値
圧力	0~-15×10Pa	-18.5×10Pa
湿度	50±20%	73.1%

(3) 尿検査データの欠落

投与最終週に生存している動物の自然排尿による新鮮尿を用いて尿検査を実施する計画であつたが、以下の動物については新鮮尿の採取ができず、データ欠落となつた。尿検査データの欠落については、評価に必要な検査動物数が確保されたことから、試験結果の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。

検査日	データ欠落動物番号
2019.9.27	1017, 1020, 1209, 1222
	2014, 2110, 2206, 2215, 2216, 2301

(4) 血液学的検査データの欠落

試験計画書では、定期解剖時に生存している全動物について血液学的検査を行うと規定されていたが、以下の動物について血管からの採血針外れ、血管への挿入不能による採取不可能、または凝固により検査を行うことができず、計画書から逸脱した。

検査日	データ欠落動物番号
2019.10.1	1208
	1306 (凝固)
	2201
2019.10.2	1212
	2306

評価に必要な検査動物数が確保されており、血液学的検査データの欠落による試験結果の評価についての影響はなかったと判断した。

(5) 血液生化学的検査データの欠落

試験計画書では、定期解剖時に生存していた全動物について血液生化学的検査を行うと規定されていたが、以下の動物について血管からの採血針外れや血管への挿入不能または採血途中での採血針の外れにより採血ができず、検査を行うことができなかつたため計画書から逸脱した。

検査日	データ欠落動物番号
2019.10.1	1208
	1305
	2105
	2201
2019.10.2	1212
	2306

評価に必要な検査動物数が確保されており、血液生化学的検査データの欠落による試験結果の評価についての影響はなかったと判断した。