

クロロエタンの rasH2 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：0929

CAS No. 75-00-3

2021年10月14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～Q2	
FIGURES	1～7	
PHOTOGRAPHS	1～6	
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 rasH2 マウスを用いた吸入による中期発がん性試験

試験目的

本試験は、クロロエタンを遺伝子改変マウス（rasH2 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、最終改正令和元年 7 月 11 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 2019-02）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 0257）。

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10月31日
動物導入日	2019年11月22日
群分け日	2019年12月2日
被験物質投与開始日	2019年12月3日
被験物質投与終了日	2020年6月1日
定期解剖日	2020年6月2、3、4、5日
試験終了日	2021年10月14日

クロロエタンの rasH2 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：0929

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	4
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	5
II 試験方法	6
II-1 投与	6
II-1-1 投与経路	6
II-1-2 被験物質の投与方法	6
II-1-3 投与期間	6
II-1-4 投与濃度	6
II-1-5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	6
II-1-6 被験物質の発生方法及び濃度調整	7
II-1-7 被験物質濃度の測定	7
II-2 動物管理	8
II-2-1 群の構成及び各群の使用動物数	8
II-2-2 群分け方法	8

II-2-3	動物の個体識別	8
II-2-4	動物飼育室、並びに他試験及び異種動物との区別	8
II-2-5	飼育条件	9
(1)	飼育環境	9
(2)	飼料	9
(3)	飲水	10
II-3	観察・検査項目及び方法	10
II-3-1	動物の生死及び一般状態の観察	10
II-3-2	体重測定	10
II-3-3	摂餌量測定	10
II-3-4	尿検査	10
II-3-5	血液学的検査	11
II-3-6	血液生化学的検査	11
II-3-7	病理学的検査	11
(1)	肉眼的観察	11
(2)	臓器重量	11
(3)	病理組織学的検査	11
II-3-8	病理ピアレビュー	12
II-4	数値処理と統計方法	12
II-4-1	数値の取扱いと表示	12
II-4-2	統計処理	12
III	試験成績	14
III-1	生死状況	14
III-2	一般状態	14
III-3	体重	14
III-4	摂餌量	15
III-5	尿検査	16
III-6	血液学的検査	16
III-7	血液生化学的検査	17
III-8	病理学的検査	18
III-8-1	肉眼的観察	18
III-8-2	臓器重量	18
III-8-3	病理組織学的検査	19
(1)	腫瘍性病変	19

(2) 非腫瘍性病変	20
III-8-4 死因	21
IV 考察及びまとめ	22
IV-1 生存率、一般状態、体重等	22
IV-2 腫瘍性病変	22
IV-3 腫瘍以外の影響	23
IV-4 発がん性について、他文献との比較	23
V 結論	24
VI 文献	25
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	27

要約

クロロエタンの発がん性を検索する目的で、遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) を用いた 26 週間全身暴露 (経気道投与) による中期発がん性試験を行った。

対照群 1 群、投与群 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、生存率、一般状態及び体重に、投与の影響はみられなかった。摂餌量では体重測定結果との対応はなかったが、投与期間を通して 15,000 ppm 群で対照群に比べ高値であった。血液学的検査では、雄の 6,000 ppm 以上の群で貧血傾向が示された。尿検査及び血液生化学的検査では、クロロエタンの毒性影響はみられなかった。臓器重量測定では、雄の 15,000 ppm 群で腎臓重量の高値 (実重量及び体重比) が示されたが、対応する病理組織学的変化は認められなかった。

解剖時の肉眼的観察で前胃に白色斑、並びに肺で白色斑及び結節が雌雄の全投与群にみられた。病理組織学的検査でも、非腫瘍性病変として前胃の過形成が雄では 2,400 ppm 以上の群、雌では 6,000 ppm 以上の群で認められ、発生率の増加及び所見の程度が増強した。肺では、気管支 (細気管支) 上皮の空胞変性が雌雄の全投与群でみられ、投与濃度に対応した程度の増強が示された。腫瘍性病変として、雄は、細気管支-肺胞上皮腺腫、細気管支-肺胞上皮癌及び細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた腫瘍 (いずれかを有する動物数) の発生が、Peto 検定及び Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、15,000 ppm 群では、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が Fisher 検定で有意な増加を示した。雌では、脾臓の血管肉腫の発生及び血管腫と血管肉腫を合わせた発生が Peto 検定で増加傾向を示し、これらの発生は、当センターのヒストリカルコントロールの範囲を超えた。また、皮下、大腸、筋肉の血管肉腫及び胃の血管腫を加えた全臓器における血管腫と血管肉腫を合わせた腫瘍発生も Peto 検定で増加傾向を示したが、これらの発生はヒストリカルコントロールの上限であった。

以上、遺伝子改変マウス (rasH2 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、雄では、15,000 ppm 群で細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生増加が示され、クロロエタンの雄 rasH2 マウスへの発がん性を示す明らかな証拠が得られた (clear evidence of carcinogenic activity) と結論した。また、雌では、全臓器における血管腫と血管肉腫を合わせた腫瘍発生の増加傾向がみられたが、ヒストリカルコントロールの上限であり、クロロエタンの雌 rasH2 マウスへの発がん性を示す不確実な証拠が得られた (equivocal 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 (rasH2 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		
皮膚	扁平上皮乳頭腫	0	0	1	0		
	肺						
	細気管支-肺胞上皮腺腫(A)	4	6	3	10	↑	↑
	細気管支-肺胞上皮癌 [#] (B)	1	1	0	5	↑↑	↑
	A または B	4	7	3	13 **	↑↑	↑↑
肝臓	肝細胞腺腫	2	1	0	0		
尿道	移行上皮癌 [#]	0	0	0	1		
ハーダー腺	腺腫	1	0	0	0		
	腺癌 [#]	1	0	0	0		
脾臓	悪性リンパ腫 [#]	0	0	0	1		
	血管腫	0	0	1	1		
	血管肉腫 [#]	1	0	0	0		
小腸	血管肉腫 [#]	0	0	1	1		
大腸	血管肉腫 [#]	0	1	0	0		
全臓器	血管腫または血管肉腫 [#]	1	1	2	2		

クロロエタンの中期発がん性試験における腫瘍発生 (rasH2 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(A)	3	6	6	6		
	細気管支-肺胞上皮癌 [#] (B)	3	2	2	3		
	A または B	6	7	8	7		
口腔	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	1		
胃	扁平上皮乳頭腫	2	1	0	0		
ハーダー腺	腺腫	0	0	0	1		
	腺癌 [#]	1	1	0	0		
尿道	移行上皮乳頭腫	1	0	0	0		
胸腺	悪性リンパ腫 [#]	0	1	0	0		
皮下	血管肉腫 [#]	0	0	0	1		
脾臓	血管腫	0	0	1	0		
	血管肉腫 [#]	0	1	1	3	↑	
	血管腫または血管肉腫 [#]	0	1	2	3	↑	
胃	血管腫	0	1	0	0		
大腸	血管肉腫 [#]	0	0	1	0		
筋肉	血管肉腫 [#]	1	1	0	0		
子宮	間質性ポリープ	0	1	0	1		
全臓器	血管腫または血管肉腫 [#]	1	3	3	4	↑	

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

*：p≤0.05 で有意

**：p≤0.01 で有意

(Fisher 検定)

↑：p≤0.05 で有意増加

↑↑：p≤0.01 で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

↓：p≤0.05 で有意減少

↓↓：p≤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 1~4)

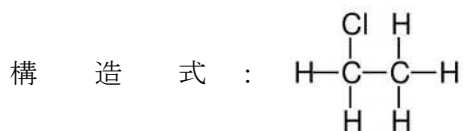
I-1-1 名称等

名 称 : クロロエタン (Chloroethane)

別 名 : 塩化エチル (Ethyl chloride)

C A S N o . : 75-00-3

I-1-2 構造式及び分子量



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 : ET9014、ET9020、ET0002

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 2~4)

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、6~9)

日本産業衛生学会 ; 100 ppm (1993 年)

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

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

ドイツ研究振興協会 (DFG) ; 3 (ヒトについて発がん性の疑いがあるが、データがなく
結論付けられない) (1990 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、被験物質のマススペクトルを質量分析計 (アジレントテクノロジー(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 10)。

その結果、被験物質のマス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イオンピークを示し、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、日本クレア（株）（富士生育場）の CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic(tg/wt) (rasH2) マウス (SPF) の雌雄を使用した。雄 103 匹、雌 103 匹を 6 週齢で導入し、検疫を 6 日間、馴化を 5 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：22.5～28.4 g、雌：18.0～22.8 g）を試験に用いた。

中期発がん性試験に rasH2 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 11）。

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

投与期間は1日6時間、1週5日の投与（土、日曜日の投与は行わない）で、2019年12月3日～2020年6月1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12）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13）を参考に1日6時間とした。

投与濃度は、雌雄のrasH2マウス（non-Tg）（投与開始時8週齢）を用いた4週間の予備試験（試験番号：0917）（文献14）の結果をもとに決定した。4週間試験の投与濃度は、0、2,500、5,000、10,000及び15,000 ppmで実施した。その結果、雌雄各群に死亡は認められず、一般状態の変化も観察されなかった。体重は投与期間を通して順調に増加し、各群

間に差は認められなかった。病理組織学的検査では、雌雄の肺で濃度依存的な気管支（細気管支）上皮の空胞変性の増加が認められたが、肺以外の臓器では、変化は認められなかった。

以上の結果、4週間試験では、最高投与濃度の 15,000 ppm で肺の気管支（細気管支）上皮の空胞変性が認められたのみであったため、この濃度で 26 週間の投与を実施しても、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、公比 2.5 で 6,000 ppm、2,400 ppm 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 FIGURE 1 に示した。

被験物質の入った液化ガス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 0.5 %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 15）。

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のなくなったことを確認後、本試験系より除外した。

II-2-3 動物の個体識別

動物は、導入時に尾に油性マーカーによる色素塗布をして検疫・馴化期間中の個体を識別し、群分け時に耳パンチをして以降の個体を識別した。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 ; $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ <517 室 : $23.9 \pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ > <518 室 : $22.4 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ >
	吸 入 試 験 室 ; $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ <516 室 : $22.0 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ >
	吸入チャンバー内 ; $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
湿 度	： 検 疫 室 ; $55 \pm 15 \%$ <517 室 : $52 \pm 1 \%$ > <518 室 : $57 \pm 1 \%$ >
	吸 入 試 験 室 ; $55 \pm 15 \%$ <516 室 : $48 \pm 2 \%$ >
	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 $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、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手し、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、投与前の一般状態を詳細に観察した。その他の日は、投与日は投与前に、非投与日は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、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た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-3-5 血液学的検査

定期解剖時に生存していた全動物について、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(全血)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た全動物について、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16)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、骨髄（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（胸骨、大腿骨）、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 3 名による病理ピアレビューを実施し、腫瘍性及び非腫瘍性病変について確認を行った。その結果、所見の変更はなかった。

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、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 17）、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 検定は片側検定、その他の検定では両側検定を行い、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—

6,000 ppm 群で 1 匹 (26 週)、15,000 ppm 群で 2 匹 (10 週、13 週) 死亡した。これらの動物は、自然発生腫瘍による死亡であり投与の影響ではないと判断した。なお、対照群及び 2,400 ppm 群での死亡は、みられなかった。

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

—雌—

対照群で 1 匹 (22 週) 死亡した。2,400 ppm 群で 2 匹 (17 週、25 週)、6,000 ppm 群で 1 匹 (18 週) 死亡した。これらの動物は、自然発生腫瘍による死亡であり投与の影響ではないと判断した。15,000 ppm 群での死亡は、みられなかった。

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 : 23 匹 (92%)、6,000 ppm 群 : 24 匹 (96%)、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。

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—

各投与群とも投与の影響はみられず、対照群とほぼ同様な推移を示した。

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：100 %、6,000 ppm 群：98 %、15,000 ppm 群：97 %であった。

—雌—

各投与群とも投与の影響はみられず、対照群とほぼ同様な推移を示した。

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：101 %、6,000 ppm 群：99 %、15,000 ppm 群：100 %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 群で投与期間を通して有意な高値がみられた。しかし、前述の体重測定結果との対応はなかった。

投与期間を通した 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群：4.2 g、2,400 ppm 群：4.2 g、6,000 ppm 群：4.2 g、15,000 ppm 群：4.6 g であった。

—雌—

15,000 ppm 群で投与期間を通して有意な高値がみられた。しかし、前述の体重測定結果との対応はなかった。また、2,400 及び 6,000 ppm で投与期間の中盤で有意な低値が散見された。

投与期間を通しての 1 匹当たりの平均摂餌量は、対照群：3.9 g、2,400 ppm 群：3.7 g、6,000 ppm 群：3.8 g、15,000 ppm 群：4.3 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。

雌雄とも自然排尿による採尿ができない動物がいたことから、検査数は、雄では対照群：25 匹、2,400 ppm 群：11 匹、6,000 ppm 群：19 匹、15,000 ppm 群：21 匹、雌では対照群：21 匹、2,400 ppm 群：21 匹、6,000 ppm 群：22 匹、15,000 ppm 群：23 匹であった。

—雄—

6,000 ppm 以上の群で pH の有意な低下がみられた。また、2,400 ppm 群で蛋白の陽性度の減少がみられた。pH の低下と投与との関連は不明であった。また、蛋白の陽性度の減少は投与濃度との対応がみられないことから毒性影響とは考えなかった。

—雌—

15,000 ppm 群で蛋白の陽性度の減少がみられた。この変化と投与との関連は不明であった。

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。雄の 2,400 ppm 群及び雌の 15,000 ppm 群で各 1 匹検査できない動物がいた。

—雄—

6,000 ppm 以上の群で赤血球数の低値並びに網赤血球比の高値がみられ、いずれも僅かな変化ではあるが有意差が示された。さらに、MCV、MCH にも 15,000 ppm 群で僅かな変化であるが有意な高値が示された。6,000 ppm 以上の群では貧血傾向と考えた。これらの群で認められた網赤血球比の僅かな高値は、赤血球数の減少に適応して網赤血球が増加した結果と考えた。また、赤血球数が減少した原因としては、後述の病理組織学的検査（Ⅲ-8-3 病理組織学的検査（2）非腫瘍性病変）で記述したように、前胃の潰瘍が 15,000 ppm 群で認められ、さらに、潰瘍に继发した再生性過形成で重度と診断した症例が 6,000 ppm 以上の群で認められていることにより、前胃の潰瘍からの持続性出血による二次的影響と考えた。

なお、2,400 ppm 群で MCH 及び MCHC に有意差が示されたが、僅かな変化であり投与濃度との対応がないことから投与による影響とは考えなかった。

—雌—

15,000 ppm 群で赤血球数の低値及び MCV の高値、6,000 ppm 以上の群で MCHC の低値がみられ、いずれも僅かな変化であるが有意差が示された。貧血傾向が 15,000 ppm 群で示唆されるものの、明らかではなかった。また、15,000 ppm 群で赤血球数が減少した原因としては、雄と同様、雌でも病理組織学的検査で前胃の潰瘍及び潰瘍に継発した再生性過形成が認められていることにより、前胃の潰瘍からの持続性出血による二次的影響と考えた。

なお、好酸球比に 2,400 及び 15,000 ppm 群で有意差が示されたが、好酸球比は、全群で個体間のばらつきが大きかったことから、偶発的な変化と考えた。

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。雄の 2,400 ppm 群及び雌の 15,000 ppm 群で各 1 匹、検査できない動物がいた。

—雄—

6,000 ppm 以上の群で CK の低値、並びに 15,000 ppm 群で総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、カリウム及びカルシウムの高値がみられ、いずれも、僅かな変化であるが有意差が示された。また、6,000 ppm 群で LDH の僅かな低値がみられ、有意差が示された。

CK 及び LDH は低下性の変化であり毒性学的意義は不明であった。総ビリルビンの高値については、総ビリルビンの平均値と変動の幅が対照群と 15,000 ppm 群とではほぼ等しいことから、生理的な変動範囲と判断した。また、グルコース、総コレステロール、カリウム及びカルシウムの高値は、最高濃度の 15,000 ppm 群での変化であり投与による影響は示唆されるものの、摂餌量の高値に伴う二次的な変化と考えた。

—雌—

6,000 ppm 以上の群でグルコース及び 15,000 ppm 群でカリウムの高値、並びに AST、ALP、CK 及び無機リンの低値がみられ、いずれも僅かな変化であるが有意差が示された。

6,000 ppm 群でのグルコースの高値は、偶発的な変化で投与による影響とは考えなかった。15,000 ppm 群の変化のうち、グルコース及びカリウムの高値は、摂餌量の高値に伴う二次的な変化と考えた。また、AST、ALP、CK 及び無機リンの変化は、有意差は示されたものの、いずれも僅かであった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。

その他、2,400 ppm 群で AST の有意な低値がみられたが、僅かな変化で投与濃度との対応がみられないことから毒性影響とは考えなかった。

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。

—雄—

肺の白色斑が対照群で 1 匹、2,400 及び 6,000 ppm 群で各 2 匹、15,000 ppm 群で 7 匹にみられた。また、肺の結節が対照群及び 2,400 ppm 群で各 2 匹、6,000 ppm 群で 1 匹、15,000 ppm 群で 7 匹にみられた。

胃（前胃）の白色斑が 2,400 ppm 群で 2 匹、6,000 ppm 群で 4 匹、15,000 ppm 群で 9 匹にみられた。

—雌—

肺の白色斑が 2,400 ppm 群で 4 匹、6,000 ppm 群で 2 匹、15,000 ppm 群で 5 匹にみられた。肺の結節が対照群で 3 匹、2,400 ppm 群で 5 匹、6,000 ppm 群で 6 匹、15,000 ppm 群で 5 匹にみられた。

胃（前胃）の白色斑が対照群で 3 匹、2,400 ppm 群で 1 匹、6,000 ppm 群で 4 匹、15,000 ppm 群で 19 匹にみられた。

脾臓の結節が 2,400 及び 6,000 ppm 群で各 1 匹、15,000 ppm 群で 3 匹にみられた。

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 群で腎臓の高値（実重量及び体重比）及び肝臓の体重比の高値がみられた。

—雌—

15,000 ppm 群で脾臓の実重量の高値、並びに脳の体重比の低値がみられた。なお、2,400 ppm 群で腎臓の体重比が低値を示したが、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

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。本試験でみられた腫瘍の日本バイオアッセイ研究センターにおけるヒストリカルコントロールデータ (発生匹数、総匹数、平均発生率 (%) 及び試験ごとの発生率 (最小 %~最大 %)) を TABLE P 1, 2 に示す。さらに、病理組織所見の代表例を PHOTOGRAPH 1~6 に示す。なお、個体表は APPENDIX 13-1, 13-2 に示す。

(1) 腫瘍性病変

—雄—

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫の発生が対照群で 4 匹 (16 %)、2,400 ppm 群で 6 匹 (24 %)、6,000 ppm 群で 3 匹 (12 %) 及び 15,000 ppm 群で 10 匹 (40 %) に認められ、Peto 検定 (有病率法) 及び Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。

細気管支-肺胞上皮癌の発生が対照群及び 2,400 ppm 群で各 1 匹 (4 %)、6,000 ppm で 0 匹 (0 %)、15,000 ppm 群で 5 匹 (20 %) に認められ、Peto 検定 (有病率法) 及び Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。

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腫瘍 (いずれかを有する動物数) の発生が、対照群で 4 匹 (16 %)、2,400 ppm 群で 7 匹 (28 %)、6,000 ppm で 3 匹 (12 %)、15,000 ppm 群で 13 匹 (52 %) に認められ、15,000 ppm 群では、Fisher 検定で有意な増加、Peto 検定 (有病率法) 及び Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示した。

—雌—

<血管腫・血管肉腫>

脾臓の血管肉腫の発生が対照群で 0 匹 (0 %)、2,400 及び 6,000 ppm 群で各 1 匹 (4 %)、15,000 ppm 群で 3 匹 (12 %) に認められ、Peto 検定 (有病率法、死亡率法+有病率法) で増加傾向を示した。また、脾臓の血管腫の発生が、6,000 ppm 群で 1 匹 (4 %) に認められ、血管腫と血管肉腫を合わせた腫瘍の発生は、対照群で 0 匹 (0 %)、2,400 ppm 群で 1 匹 (4 %)、6,000 ppm 群で 2 匹 (8 %)、15,000 ppm 群で 3 匹 (12 %) であり、Peto 検定 (有病率法) で増加傾向を示した。

胃の血管腫が 2,400 ppm 群で 1 匹 (4 %)、皮下の血管肉腫が 15,000 ppm 群で 1 匹 (4 %)、大腸の血管肉腫が 6,000 ppm 群で 1 匹 (4 %)、さらに筋肉の血管肉腫が対照群及び 2,400 ppm 群で各 1 匹 (4 %) に認められた。全臓器で血管腫と血管肉腫を合わせた腫瘍の発生は、対照群で 1 匹 (4 %)、2,400 及び 6,000 ppm で各 3 匹 (12 %)、15,000 ppm

群で4匹(16%)に認められ、Peto検定(有病率法)で増加傾向を示した。

(2) 非腫瘍性病変

—雄—

<胃(前胃)>

前胃の潰瘍が、15,000 ppm群で2匹(8%)に認められた。病変の程度はいずれも軽度であった。

前胃の過形成が、2,400 ppm群で2匹(8%)、6,000 ppm群で3匹(12%)、15,000 ppm群で10匹(40%)に認められ、15,000 ppm群で有意な増加を示した。病変の程度は、2,400 ppm群で軽度、6,000 ppm群で軽度または重度、15,000 ppm群で軽度から重度であった。前胃の過形成は、肉眼的観察では白色斑としてみられた。

<肺>

細気管支-肺胞上皮過形成が、対照群で1匹(4%)、6,000 ppm群で1匹(4%)、15,000 ppm群で2匹(8%)に認められた。病変の程度はいずれも軽度であった。

気管支(細気管支)上皮の空胞変性が、2,400及び6,000 ppm群で各5匹(20%)、15,000 ppm群で3匹(12%)に認められた。病変の程度は、2,400 ppm群で軽度、6,000 ppm群で軽度から中等度、15,000 ppm群で重度であった。

—雌—

<胃(前胃)>

前胃の潰瘍が、2,400 ppm群で1匹(4%)、15,000 ppm群で6匹(24%)に認められ、15,000 ppm群で有意な増加を示した。病変の程度は2,400 ppm群で軽度、15,000 ppm群では軽度から中等度であった。

前胃の過形成が、対照群で2匹(8%)、6,000 ppm群で6匹(24%)、15,000 ppm群で19匹(76%)に認められ、15,000 ppm群で有意な増加を示した。病変の程度は対照群で軽度、6,000 ppm群で軽度から中等度、15,000 ppm群では軽度から重度であった。肉眼的、病理組織学的特徴は、雄と同様であった。

<肺>

細気管支-肺胞上皮過形成が、2,400 ppm群で2匹(8%)に認められた。病変の程度は軽度であった。

気管支(細気管支)上皮の空胞変性が2,400 ppm以上の群で各々5匹(20%)に認められた。病変の程度は2,400 ppm群では軽度、6,000 ppm群は中等度、15,000 ppm群では重度であった。

<鼻腔>

嗅上皮のエオジン好性変化が、対照群及び 2,400 ppm 群で各 7 匹 (28 %)、6,000 ppm 群で 4 匹 (16 %) に認められ、15,000 ppm 群で 0 匹 (0 %) であった。15,000 ppm 群で有意な減少を示した。病変の程度はすべて軽度であった。

<鼻咽頭>

鼻咽頭のエオジン好性変化が、対照群で 12 匹 (48 %)、2,400 ppm 群で 11 匹 (44 %)、6,000 ppm 群で 5 匹 (20 %)、15,000 ppm 群で 2 匹 (8 %) に認められ、15,000 ppm 群で有意な減少を示した。病変の程度はすべて軽度であった。

III-8-4 死因

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

—雌雄—

死亡動物が少数みられたが、すべて自然発生腫瘍による死亡で投与の影響はなかった。

IV 考察及びまとめ

クロロエタンの発がん性を検索する目的で、遺伝子改変マウス (rasH2 マウス) を用いた 26 週間全身暴露 (経気道投与) による中期発がん性試験を行った。

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、体重等

クロロエタンの 26 週間の投与の結果、雌雄の生存率、一般状態及び体重に投与の影響はみられなかった。摂餌量では体重との対応はなかったが、投与期間を通して雌雄とも 15,000 ppm 群は対照群と比べ高値であった。血液学的検査では、雄の 6,000 ppm 以上の群で貧血傾向が示された。尿検査及び血液生化学的検査では、雌雄ともクロロエタンの毒性影響はみられなかった。臓器重量測定では、雄の 15,000 ppm 群で腎臓重量の高値 (実重量及び体重比) が示されたが、この増加に関連する病理組織学的変化は認められなかった。

IV-2 腫瘍性病変

雄は、クロロエタンの投与により肺に細気管支-肺胞上皮腺腫、細気管支-肺胞上皮癌及び細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生 (いずれかを有する動物数) が、Peto 検定及び Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、15,000 ppm 群では、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が、Fisher 検定で有意な増加を示した。以上のことから発がん性を示す明らかな証拠 (clear evidence of carcinogenic activity) と判断した。本所見は、雄の 15,000 ppm 解剖時の肉眼的観察では、肺の白色斑として多くの動物に認められた。

雌では、脾臓の血管肉腫の発生及び血管腫と血管肉腫を合わせた発生が Peto 検定で増加傾向を示し、これらの発生は当センターのヒストリカルコントロールの範囲を超えた。また、皮下、大腸、筋肉の血管肉腫及び胃の血管腫を加えた全臓器における血管腫と血管肉腫を合わせた腫瘍発生も Peto 検定で増加傾向を示した。当センターのヒストリカルコントロールでは、脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生は、最大 8% (平均 3.6%) であり、本試験における 15,000 ppm 群の脾臓の血管腫と血管肉腫を合わせた発生は 3 匹 (12%) で、ヒストリカルコントロールデータの上限を 1 匹越えた。また、全臓器の血管腫と血管肉腫を

合わせた発生は、最大 16% (平均 9.8%) であり、本試験における 15,000 ppm 群の全臓器での血管腫と血管肉腫を合わせた発生は 4 匹 (16%) で、ヒストリカルコントロールデータの上限であった。

以上のように、血管腫と血管肉腫の発生がヒストリカルコントロールの範囲を超えるものがあつたものの、血管腫や血管肉腫は自然発生が比較的多い腫瘍であることを考慮し、雌では発がん性を示す不確実な証拠 (equivocal evidence of carcinogenic activity) と判断した。

IV-3 腫瘍以外の影響

病理組織学的検査では、前胃の過形成が、雄では 2,400 ppm 以上の群、雌では 6,000 ppm 以上の群で認められ、発生率の増加及び所見の程度が増強した。肺では、気管支 (細気管支) 上皮の空胞変性が雌雄の全投与群でみられ、投与濃度に対応した程度の増強が示された。

前胃の過形成は、潰瘍に伴って認められるものも多いことから、再生性の過形成と考えた。また、腫瘍性増殖は認められず細胞異型もみられなかった。本所見は、肉眼的観察では白色斑としてみられた。この前胃の過形成は、発がん性試験の濃度決定のために行った 4 週間の予備試験 (試験番号 0917; 投与濃度: 0、2,500、5,000、10,000、15,000 ppm) では、認められておらず (文献 14)、発がん性試験にのみ認められた所見であつた。両試験での前胃の過形成の出現の違いは、投与期間 (予備試験は 4 週間、本試験は 26 週間) の違いによるものか、遺伝背景 (予備試験は rasH2 マウス (non-Tg)、本試験は rasH2 マウス) の違いによるものか明らかではないが、前胃の過形成は、本試験で認められた特徴的な所見であつた。

肺では、気管支 (細気管支) 上皮の空胞変性が最低濃度の 2,400 ppm 群から認められ、投与濃度に応じて程度が増強した。この病変は、4 週間の予備試験でも認められており、本試験同様、最低濃度から濃度に対応してその程度は増強した (文献 14)。本試験では、気管支 (細気管支) 上皮の空胞変性は投与終了後翌日 (終了 1 日後) に解剖した動物の全匹に認められたが、終了 2 日以降に解剖した動物には認められていなかった。このことから、気管支 (細気管支) 上皮の空胞変性は、最終投与から 2 日間で回復する可逆性の病変であることが明らかとなった。

IV-4 発がん性について、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 (National Toxicology Program) 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) が報告されている (文献 1)。NTP では、雄マウスの発がん性について、尿路感染症により投与群が早期に死亡したため、生存率の顕著な低下を理由に、発がん性を議論するのに不十分な試験

(Inadequate study) と結論づけているが、病理組織学的検査の結果では、肺腫瘍の合計（細気管支肺胞上皮腺腫または腺癌を有する動物数）が対照群で 5/50 匹であったのに対し、15,000 ppm 群では 10/48 匹であり、増加傾向を認めたと記載している。一方、雌マウスでは、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。

当センターで実施した遺伝子改変マウス（p53KO マウス）を用いたクロロエタンの 26 週間の吸入による中期発がん性試験（文献 18）では、対照群 1 群、投与群 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、本試験同様、0（対照群）、2,400、6,000 及び 15,000 ppm（体積比 v/v）で、1 日 6 時間、1 週 5 日間、26 週間投与した。その結果、腫瘍性病変の発生増加は、雌雄の全投与群で認められず、クロロエタンの遺伝子改変マウス（p53KO マウス）の雌雄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。

V 結論

遺伝子改変マウス（rasH2 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、雄では、15,000 ppm 群で細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生増加が示され、クロロエタンの雄 rasH2 マウスへの発がん性を示す明らかな証拠が得られた（clear evidence of carcinogenic activity）と結論した。雌では、全臓器における血管腫と血管肉腫を合わせた腫瘍発生の増加傾向がみられたが、ヒストリカルコントロールの上限であり、クロロエタンの雌 rasH2 マウスへの発がん性を示す不確実な証拠が得られた（equivocal 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.
- 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. Chloroethane. 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) 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. Accessed on 27 May 2021. <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. 2021. 許容濃度等の勧告 (2021 年度). 産業衛生学会雑誌 63: 179-211.
- 7) 日本産業衛生学会. 1993. 許容濃度暫定値 (1993) の提案理由. モノクロロエタン. 産業医学 35: 366-367.
- 8) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2001. Ethyl Chloride. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: ACGIH.
- 9) Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). 1992. Chloroethane. Occupational Toxicants Critical Data Evaluation for MAK Values and Classification of Carcinogens. Vol.3. 73-79. Weinheim, Wiley-VCH.
- 10) McLafferty F.W, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.

- 11) 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.
- 12) 「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.
- 13) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451: "Carcinogenicity Studies". Adopted 25 June 2018. Paris: OECD.
- 14) 日本バイオアッセイ研究センター. 2019. クロロエタンの rasH2 マウス (non-Tg) を用いた吸入による 4 週間毒性試験 (中期発がん性試験予備試験) 報告書 (試験番号 0917).
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 日本バイオアッセイ研究センター. 2021. 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) .

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) 吸入チャンバー内濃度の削除及び欠落

投与時間中に濃度測定が正確に行えず、計画書から逸脱（削除または欠落）した。削除データは、ガスクロマトグラフのカラム温度が設定値に達していなかつた。下記時間のチャンバー内濃度を正確に反映していないため削除した。欠落データについては、フロッピーディスクの不具合によりクロマトパックが停止したため下表時間で計測できなかつた。なお、CH-1は対照群、CH-3は2,400 ppm群、CH-5は6,000 ppm群、CH-7は15,000 ppm群の投与に使用した吸入チャンバーである。データの欠落については、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。

逸脱	日時	時間
CH-3、5、7の濃度データ削除	2020.1.20	11:37~12:00
CH-1の濃度データ欠落	2020.4.30	13:30~13:45

(2) 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ったが、以下の動物については新鮮尿の採取ができず、データ欠落となった。

雄の1群で25匹中14匹のデータが欠落したが、最低濃度群での欠落であったこと、また、血液生化学的変化及び病理学的検査で尿検査データとの関連の深い腎臓に毒性影響が認められていないことから、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
2020.5.29	1101, 1109, 1110, 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1118, 1120, 1121, 1122, 1125, 1204, 1205, 1211, 1214, 1219, 1220, 1301, 1315
	2005, 2016, 2025, 2112, 2119, 2217, 2224, 2304, 2316

(3) 血液学的検査データ及び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る全動物について血液学的検査及び血液生化学的検査を行うことが規定されていたが、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により上記検査を行うことができず、データ欠落となった。

データの欠落については、雄で1匹、雌で1匹の極少数の欠落であり、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
2020.6.2	1101
2020.6.4	2316